



殷建忠, 二级教授, 昆明医科大学副校长, 博士生导师, 享受国务院政府特殊津贴专家, 云岭教学名师, 教育部首届高校健康教育教指委委员, 云南省高校营养与食品安全重点实验室主任, 健康云南发展智库首席专家, 云南省哲学社会科学云南重点人群研究创新团队首席专家, 国家级一流本科课程负责人。主要从事营养流行病学研究, 主持国家重点研发计划课题1项和国家自然科学基金4项; 获云南省哲学社会科学优秀成果一等奖1项, 云南省科技进步三等奖4项。代表性成果发表于 The Lancet Regional Health -Western Pacific、JHEP Reports、eLife、Addiction、JCEM 等期刊, 入选 ESI 高水平论文2篇, 入选 “In the top 5% of all research outputs scored by Altmetric” 2篇, 在 The BMJ 发表文章简评(Rapid Response)2篇。主持完成教育部公共卫生与预防医学学术学位研究生课程建设项目, 获云南省高等教育教学成果二等奖1项。

常见食源性病原菌检测技术的研究进展

黄雪娟^{1,2)}, 郭艳东³⁾, 刘冉²⁾, 汪艳蛟^{1,2)}, 吴少雄^{1,2)}, 常巍²⁾, 米飞^{1,2)}, 殷建忠^{1,2)}
(1)云南省公共卫生与生物安全重点实验室, 云南昆明 650500; 2)昆明医科大学公共卫生学院, 云南昆明 650500; 3)保山中医药高等专科学校基础医学院, 云南保山 678000)

[摘要] 食品安全是全球重大的公共卫生问题, 食源性病原菌是威胁人类健康及食品安全的主要因素, 快速准确地检测食源性病原菌对保障食品安全、预防食源性疾病具有重要意义。传统病原微生物检测方法操作繁琐且耗时, 不能及时检测出食品中的病原菌。随着生物技术的快速发展, 其在食源性病原菌检测中的应用越来越广泛, 为预防食源性疾病的发生及传播提供了强有力的技术支撑。综述常见食源性病原菌的危害以及快速检测方法的原理、应用及优缺点, 以期开展食品安全风险评估、食源性疾病监测等工作提供参考依据。

[关键词] 食源性病原菌; 危害; 检测技术; 食品安全

[中图分类号] TS207.4 [文献标志码] A [文章编号] 2095-610X(2024)11-0001-08

Research Progress on Detection Techniques of Common Foodborne Pathogens

HUANG Xuejuan^{1,2)}, GUO Yandong³⁾, LIU Ran²⁾, WANG Yanjiao^{1,2)},
WU Shaoxiong^{1,2)}, CHANG Wei²⁾, MI Fei^{1,2)}, YIN Jianzhong^{1,2)}

(1) Yunnan Provincial Key Laboratory of Public Health and Biosafety, Kunming Yunnan 650500;
2) School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500;
3) School of Basic Medical Sciences, Baoshan College of Traditional Chinese Medicine, Baoshan Yunnan 678000, China)

[Abstract] Food safety is a major public health problem in the world. Foodborne pathogens are the main

[收稿日期] 2024-07-28

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(32160551); 云南省兴滇英才支持计划基金资助项目(XDYC-QNRC-2022-0229); 保山市科技计划基金资助项目(2023bskj029); 保山市中医药高等专科学校科技计划基金资助项目(2024k001); 保山市中医药高等专科学校百名中青年学术技术带头人培养基金资助项目(2024zd002)

[作者简介] 黄雪娟(1998~), 女, 云南宣威人, 在读硕士研究生, 主要从事食源性病原菌分子流行病学研究工作。郭艳东与黄雪娟对本文有同等贡献。

[通信作者] 殷建忠, E-mail: yinjianzhong2005@sina.com; 米飞, E-mail: mifei99@126.com

factors threatening human health and food safety. Rapid and accurate detection of foodborne pathogens is of great significance to ensure food safety and prevent foodborne diseases. Traditional detection methods of pathogenic microorganisms are cumbersome and time-consuming, and can not detect pathogens in food in time. With the rapid development of biotechnology, its application in the detection of foodborne pathogens is more and more extensive, which provides a strong technical support for the prevention of the occurrence and spread of foodborne diseases. In this paper, the harm of common foodborne pathogens and the principle, application, advantages and disadvantages of rapid detection methods were reviewed, in order to provide reference for food safety risk assessment and foodborne disease monitoring.

[**Key words**] Foodborne pathogens; Hazards; Detection technologies; Food safety

食品是人类赖以生存和发展的物质基础, 食品安全关系国计民生。食源性病原菌是引起食源性疾病的主要因素, 是指在食品加工、流通过程中引起食品污染, 造成人类疾病的一类病原菌, 主要有大肠杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、沙门氏菌、志贺氏菌、变形杆菌等。食源性疾病的暴发和散发在世界范围内经常发生, 其因较高的发病率和死亡率造成了严重的经济负担, 已成为全球主要的公共卫生问题。据报道, 全世界每年约有 300 万例与食源性病原体有关的腹泻病例^[1]。在欧盟, 2020 年有 3 000 多例食源性疾病的暴发, 沙门氏菌是食源性暴发最常见的细菌病原体^[2]。据统计, 在全球范围内 2016 年 5 岁以下儿童约有 7 500 万人感染志贺氏菌, 全年龄组有 212 438 人死于志贺氏菌感染^[3]。食源性疾病的经常发生表明, 食源性病原菌构成重大的公共卫生风险, 严重危害着人们的身体健康。对食源性病原菌的定性及定量检测能确保食品安全、减少食源性疾病的发生,

故一项快速、灵敏、高效的检测技术对保障食品安全至关重要。由此, 本文重点探讨分子生物学、免疫学、代谢组学、生物传感器等多种检测技术的检测原理、应用及优缺点, 以为食源性病原菌的快速检测提供参考依据。

1 常见食源性病原菌的传播途径及其危害

食源性病原菌广泛存在于自然界内, 在食品从原材料生产阶段直至最终消费的整个链条中, 均有可能通过与水、空气、土壤及食品加工环境的接触遭受病原体的侵袭与污染, 从而引起人类感染。不同的食源性病原菌导致人群感染和传播的方式多样, 各病原菌引起疾病的主要临床症状也有较大的区别。如沿海地区食源性疾病频发的主要致病菌之一是副溶血性弧菌, 金黄色葡萄球菌是引起化脓性炎症的主要病原菌, 大肠杆菌、奇异变形杆菌常会引发泌尿系统的感染, 见表 1。

表 1 常见食源性病原菌的主要食品传播介质及临床症状

Tab. 1 The main food transmission medium and clinical symptoms of common foodborne pathogens

菌种	主要食品传播介质	主要临床症状
大肠杆菌	水、肉类、奶及奶制品等	腹泻、尿路和腹腔感染、菌血症、新生儿脑膜炎 ^[4]
沙门氏菌	猪肉、鸡肉、鸡蛋、牛肉、牛奶等	急性胃肠炎(如呕吐、腹泻)、败血症及副伤寒 ^[5]
单增李斯特菌	肉及肉制品、腌制品、冷冻食品等	胃肠炎、败血症、流产、脑膜炎
志贺氏菌	蔬菜、肉类、蛋制品、奶制品等	发热、腹痛、呕吐、腹泻
副溶血性弧菌	鱼、虾、贝类等海产品	急性肠胃炎(腹痛、腹泻、肠痉挛、呕吐) ^[6]
金黄色葡萄球菌	水、奶制品、肉和肉制品、糕点等	呕吐、腹泻、局部化脓感染(毛囊炎、疖、痈)、全身性感染(菌血症、脓毒血症等) ^[7]

2 食源性病原菌检测技术

2.1 基于培养的传统检测技术

传统检测技术是基于病原体能在营养琼脂培

养基上生长的特性进行检测, 包括增菌、富集性培养、选择性分离、生化鉴定和血清学鉴定等多个过程, 该法操作步骤多、检验周期长, 不能实现快速检测; 此外, 该法灵敏度较低, 如不可培养的路原体进行培养鉴定则可能出现假阴性。

2.2 分子生物学检测技术

2.2.1 聚合酶链式反应 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是一种可将特定目标 DNA 片段进行体外循环扩增的技术, 其被认为是基于核酸的分子诊断应用的金标准, 但其需要昂贵复杂的热循环设备、训练有素的技术人员和反应时间, 不适合用于快速检测。近年来以 PCR 技术为基础衍生的检测技术众多, 其中应用较多的为多重 PCR、实时荧光定量 PCR 和逆转录酶 PCR 技术。与大多数基于培养和免疫测定的方法相比, 基于 PCR 技术的方法更敏感、可重复性高、用途更广泛。

(1) 多重 PCR (multiplex PCR, mPCR): 在同一体系中加入 2 对及以上引物同时检测多个目标基因。例如 Boukharouba 等^[8]建立的 mPCR 技术可同时检测出大肠杆菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌。Feng 等^[9]基于靶基因设计 *LMxysn1095*、*lmo1083* 和 *smcL* 共 3 对引物进行 mPCR 鉴定不同分子分型的菌株, 结果显示可从多种菌株中确定血清型 4 h 的单增李斯特菌菌株。尽管一次扩增可检测多个目标基因, 但 mPCR 反应体系中多个引物之间可能产生引物二聚体, 应注意调整各引物的浓度或不能进行多重 PCR 检测。

(2) 实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR): 基于荧光染料或探针 (常用 SYBR Green、TaqMan 探针等) 定量病原菌, 该法能在反应过程中实时监测 PCR 产物。与 TaqMan 探针相比, SYBR Green 简单且成本更低、且可计算扩增产物的 T_m 值用于区分目标产物与引物二聚体, 但 SYBR Green 缺乏特异性, 会与其它非特异性反应产物结合, 而 TaqMan 探针只与目标序列结合。有研究^[10]显示 SYBR Green qPCR 检测灵敏度更高, 检测金黄色葡萄球菌检出限为 1×10^3 CFU/mL, 而 TaqMan qPCR 法检测检出限为 1×10^4 CFU/mL。总体而言, qPCR 比传统 PCR 更敏感, 且具有高通量分析和自动化等优点。该法还可与其它方法一起结合使用, Hu 等^[11]分别针对 *ssaR*、*hlyA*、*rfbE*、*toxR*、*ipaH* 基因, 采用 qPCR 结合 mPCR 对大肠杆菌、单增李斯特菌、O157 大肠杆菌、副溶血性弧菌、志贺氏菌进行鉴定, 检测限为 $1.3 \times 10^3 \sim 1.6 \times 10^4$ CFU/g。

(3) 逆转录酶 PCR (reverse transcription PCR, RTPCR): 通过从 RNA 转录物中创建互补 DNA 来检测 RNA, 利用 qPCR 对互补 DNA 进行定量检

测。细菌转录过程中 mRNA 水平在细胞死亡后会迅速下降, 可检测到的 mRNA 仅限于样品中的活细胞。但因 mRNA 在食物基质中会迅速降解易产生假阴性结果, 研究者^[12]更多使用 Viable PCR 来区分死菌与活菌, 原理是使用细胞活力染料如叠氮溴化乙啶和叠氮溴化丙啶与 DNA 扩增方法结合使用, 只有完整的细胞才能进行 PCR 扩增从而可区分死菌与活菌。此外, RTPCR 在使用的过程中很可能存在 DNA 污染, 消除 DNA 也会在一定程度上减少初始 RNA 的浓度, 有研究^[13]表明其可通过使用特殊修饰引物来解决, 能更准确地反映样品的初始 RNA 浓度。

2.2.2 环介导等温扩增技术 等温核酸扩增技术因其不依赖复杂的热循环设备、对温度要求不高, 更适用于现场快速检测。目前已开发出多种等温扩增技术, 如单链位移扩增、核酸序列扩增、多重位移扩增、解旋酶依赖扩增、杂交链反应、滚环扩增、跨越式滚环等温扩增、重组酶聚合酶扩增、环介导等温扩增, 其中环介导等温扩增及重组酶聚合酶扩增等技术应用较为广泛。

(1) 环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP): 利用 Bst DNA 聚合酶在 $60 \sim 65$ °C 温育 $30 \sim 60$ min 即可完成扩增, 无需热循环仪, 其反应原理见图 1。大多 PCR 技术 (除 qPCR) 的 DNA 扩增产物需要电泳分离, 而 LAMP 可通过多种方法检测扩增子, 除琼脂糖凝胶电泳外, 如使用孔雀石绿进行肉眼比色、使用荧光染料 (SYBR green I) 观察颜色的变化、肉眼观察浊度或使用浊度计来监测焦磷酸镁的沉淀反应。浊度计可用于实时监测可见沉淀物的浊度, 且不需要特殊的探针、指示器或辅助试剂, 具有高度自动化的优点。通过凝胶电泳检测 LAMP 扩增子表现出阶梯状的条带模式, 其耗时且产生的大量 DNA 扩增子可能增加样品间交叉污染的风险^[14], 而浊度监测在封闭条件下进行, 降低了交叉污染的风险, 故常用肉眼比色或浊度测定来确定 LAMP 扩增子。

LAMP 相比于 PCR 具有更高的特异性和敏感性, 扩增产物产量更高, 其在 1h 内产生的 DNA (约 10^9 拷贝) 多于普通 PCR (约 10^6 拷贝)^[16]。LAMP 具有高度特异性可区分模板上多达 8 个特定位置, 而 PCR 只能区分 2 个特定位置^[17]。目前, 已开发出多种不同类型的 LAMP 检测方法, 如多重 LAMP、逆转录 LAMP、实时 LAMP 和原位 LAMP。Stratakos 等^[18]开发的多重 LAMP 用于检测非致病

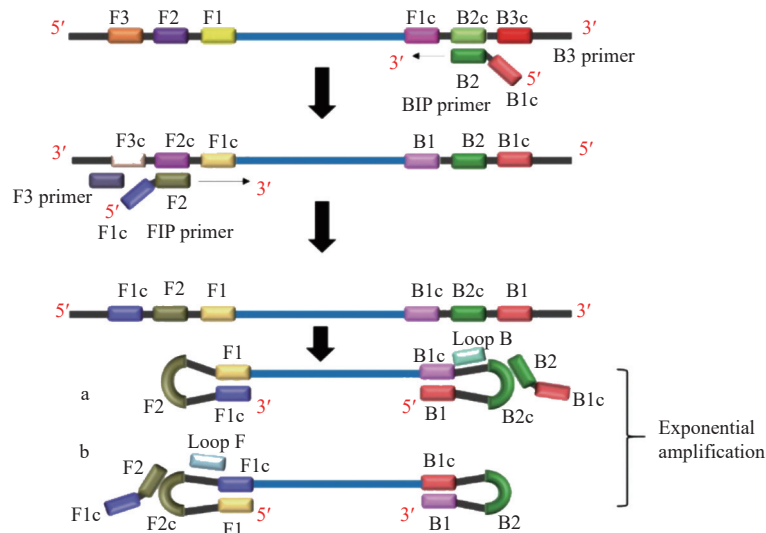
图 1 LAMP 反应原理示意图^[15]

Fig. 1 Schematic diagram of loop-mediated isothermal amplification

性大肠杆菌(以 *phoA* 基因为靶点)和产毒大肠杆菌(以 *stx1* 或 *stx2* 基因为靶点), 65 °C 条件下 30 min 完成检测, 检出限为 $10^2 \sim 10^3$ CFU/g。Abdullah 等^[19] 以伤寒沙门氏菌 *S. Typhi* 基因设计引物, 通过观察反应的颜色变化(绿色荧光为阳性, 橙色荧光为阴性)观察产物, 结果显示其灵敏度(20 CFU)较传统 PCR(200 CFU)高 10 倍。Wu 等^[20] 用比色指示剂羧基萘酚蓝结合 LAMP 视觉检测金黄色葡萄球菌, 其特异性好, 与非金黄色葡萄球菌无交叉反应。但 LAMP 环路引物之间的非特异性配对易导致假阳性, 有研究^[21] 显示在 LAMP 反应混合物中加入二甲基亚砜和甜菜碱, 赋予寡核苷酸更多的稳定性可减少非特异性相互作用。

(2) 滚环扩增(rolling circle amplification, RCA): 反应原理为寡核苷酸挂锁探针(padlock probe, PLP)与靶序列杂交, 在 DNA 连接酶作用下合成环状模板, 在 ϕ 29 DNA 聚合酶的作用下沿环延伸最终产生数条长单链 DNA 产物。包括单引物扩增 RCA、多引物扩增 RCA 和指数扩增 RCA。跨越式滚环等温扩增技术(saltatory rolling circle amplification, SRCA)与滚环扩增相比实现了非闭环 DNA 模板扩增, 其灵敏度高。有研究表明其检测单增生李斯特菌检出限低, 是传统 PCR 方法的 1/1 000^[22]; 董晶等^[23] 依据副溶血性弧菌基因 *toxR* 建立的实时荧光跨越式滚环等温扩增(qSRCA)与染料叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA)相结合的检测方法检测副溶血性弧菌, 灵敏度 3.2×10^2 CFU/mL, 较 PMA-qLAMP 方法高 10 倍, 较 PMA-qPCR 方法高 100 倍。

(3) 重组酶聚合酶扩增技术(recombinase poly-

merase amplification, RPA): 由加载因子、重组酶、Bsu DNA 聚合酶和单链结合蛋白参与的 1 种等温扩增反应。RPA 与 LAMP 相比, 反应温度更低、需要的底物更少、灵敏度更高, 且 20 min 即可完成反应, 更适用于条件简陋的现场检测。李达容等^[24] 建立 RPA 与侧流层析试纸条相结合检测副溶血性弧菌的方法, 检测灵敏度(6.4 fg/ μ L)较普通 PCR 高出 100 倍, 见表 2。

2.2.3 CRISPR-Cas 检测技术 成簇有序间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)由高度保守的重复序列和间隔序列串联而成, CRISPR 相关蛋白(CRISPR associated proteins, Cas)具有内切酶能识别核酸, 基于 CRISPR-Cas 的分子检测技术检测病原菌在灵敏度、特异性、成本和时间方面均优于等温核酸扩增检测技术。CRISPR-Cas 系统分为 2 大类 6 型 48 亚型, 其中 CRISPR-Cas9 及 Cas12 系统已被广泛应用于病原体核酸的检测。但该系统尚处于起步阶段, 仍有许多挑战需要克服, 如载体功能受病原菌基因大小的限制, 识别和切割核酸依赖于导向识别邻近基序(proto-spacer adjacent motif, PAM)或间隔区侧翼序列(proto-spacer flanking sequence, PFS)。

Cas9 是应用较多的 Cas 效应内切酶, Wang 等^[25] 结合 CRISPR-Cas9 系统开发的侧流检测方法能在 1h 内检出单增李斯特菌, 克服了侧流检测繁琐且低效的杂交步骤的缺点。等温指数扩增反应因需外源寡核苷酸引物常引起非特异性扩增, Huang 等^[26] 建立了 1 种基于 CRISPR/Cas9 介导的新型触发等温指数扩增反应, 无须外源引物, 避

表 2 LAMP、RCA 及 RPA 3 种检测技术的比较

Tab. 2 A Comparison of three detection technologies: LAMP, RCA, and RPA

	LAMP	RCA	RPA
聚合酶	Bst DNA 聚合酶	phi29 DNA 聚合酶	Bsu DNA 聚合酶
扩增温度(°C)	60 ~ 65	37 ~ 65	37 ~ 40
引物数量(条)	4 ~ 6	1 ~ 2 引物和 PLP	2
目标基因长度(bp)	<300	<1 700	<500
反应时间(min)	<60	<150	20 ~ 40

免了外源引物导致的靶标非依赖性扩增, 还能很好地区分单碱基错配。Cas9 与单向导 RNA (single guide, sgRNA) 结合时对靶 DNA 具有很强的亲和力, 有研究^[27]表明使用 Cas9 / sgRNA 复合物作为靶向材料可用于检测金黄色葡萄球菌, 无需使用细胞裂解物进行基因分离步骤, 即可在 30 min 内高灵敏度地检测靶基因, 检出限 10 CFU/mL。Jiang 等^[28]应用 CRISPR/Cas12a 结合 RPA 和视觉检测技术检测副溶血性弧菌的 *tdh* 和 *trh* 基因, 优于 qPCR 等传统检测方法, 检出限 10² CFU/g。Li 等^[29]基于 CRISPR/Cas12a 的荧光平台, 将重组酶介导等温核酸扩增技术与 Cas12a 介导的裂解相结合用于检测单核细胞增生李斯特菌, 可克服 DNA 扩增子转移过程中的气溶胶污染风险, 15 min 可完成检测, 检出限 1.35 × 10² CFU/mL。

2.2.4 基因芯片技术 基因芯片技术基于核酸杂交(二维 DNA 探针微阵列与标志物品以碱基配对的形式杂交), 通过扫描系统检测杂交信号和强度对样品进行检测, 该技术具有特异性强、灵敏度高、自动化、高通量等特点。目前开发了多种用于现场病原菌检测的小型化检测系统, 如 Shin 等^[30]开发了 16S rRNA 衍生的基因生物芯片系统, 已成功地用于 16 种食源致病菌(大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等)的检测。Sarengaowa 等^[31]开发的原位合成基因芯片, 通过筛选特异性探针来检测单核细胞增生李斯特菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、大肠杆菌等, 检测限为 3 log CFU/g, 检测时间为 24 h。

2.3 免疫学检测技术

免疫学检测技术原理基于微生物抗原和抗体之间存在亲和力而特异性结合, 该法除检测食源性病原菌, 还可用于检测芽孢、毒素、蛋白质, 包括鞭毛及细胞表面抗原等。该方法比基于培养的方法更快且具有高度特异性, 其中酶联免疫吸附试验、胶体金免疫层析技术是应用较广泛的免疫测定方法。

2.3.1 酶联免疫吸附试验 酶联免疫吸附试验

(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 基于带有酶标记的抗原与抗体特异性结合形成带有酶标记的复合物。直接 ELISA 操作简单, 但抗体成本高; 间接 ELISA 和双抗体夹心 ELISA 灵敏度和特异度比直接 ELISA 要更好, 但二抗可能与抗原发生反应造成信号错乱, 双抗体夹心法常用于检测大分子抗原, 而间接法常用于测定抗体。目前已开发出多种新型酶联免疫吸附试验(试剂盒)用于检测食源性病原菌。Pang 等^[32]开发了操作时间短、成本低、灵敏度较高的新型酶联免疫吸附试验用于检测大肠杆菌, 仅需 5 μL 的样品, 不到 3 h 的时间即可完成检测, 检出限为 1 × 10⁴ CFU/mL, 特异性高。Lv 等^[33]建立了 1 种基于荧光杂交链反应的多色超灵敏酶联免疫吸附测定平台, 用 3 种不同的荧光同时检测到大肠杆菌、沙门氏菌和单核细胞增生李斯特菌, 检出限分别为 3.4 × 10、6.4 和 7.0 × 10 CFU/mL。尽管 ELISA 检测效率高, 但 ELISA 的操作较为复杂, 需要专门的设备和训练有素的人员, 实验过程需要严格控制实验操作, 如加样不可太快, 不能外溅和产生气泡, 洗板不彻底还易引起假阳性等问题。

2.3.2 胶体金免疫层析技术 胶体金免疫层析技术 (gold immunochromatography assay, GICA) 通过胶体金标记物的显色作用可肉眼观察显色条带进行分析, 检测便捷、成本低、灵敏度高。Niu 等^[34]采用胶体金免疫层析试纸条检测金黄色葡萄球菌, 检出限为 10³ CFU/mL。另外, 胶体金免疫层析技术还可与免疫磁分离技术结合使用来提高其灵敏度, Zhou 等^[35]使用该法检测副溶血性弧菌, 结果显示免疫磁珠分离富集后, 胶体金免疫层析技术的灵敏度提高了 100 倍。

2.4 代谢组学技术

2.4.1 三磷酸腺苷生物发光法 三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 随着病原微生物有机体的代谢循环, ATP 会随着机体死亡而被分解。三磷酸腺苷生物发光法是通过加入荧光素酶测定 ATP 的浓度来推算活菌总数。该方法的优点主要是快

速简便,但灵敏度较差,检测通常要求细菌浓度不少于 1 000 CFU/mL;其次该法不能区分微生物与非微生物 ATP,若食品本身含有 ATP 即造成假阳性;此外,不同的 pH 值和温度也会对荧光酶的发光产生影响从而影响测定结果。

2.4.2 电阻抗技术 电阻抗技术是通过检测基于微生物的代谢引起的导电性变化来判断细菌的数量变化。目前可用于食品中细菌总数的检测,具有灵敏度高,方便快捷等特点。有研究表明该法检测沙门氏菌的检出率和灵敏度均高于传统法^[36]。

2.4.3 微热量计技术 微热量计技术依据的原理是在代谢过程中,不同种类的微生物所释放的热量会随时间产生变化形成独特的温谱图。借助微热量计对产热数据进行整理,绘制热谱图。通过比较病原菌的标准图谱可判断食源性致病菌的种类和数量。

2.4.4 放射测量技术 微生物生长将碳水化合物代谢为 CO₂,将微量的放射性¹⁴C 注入到碳水化合物中,利用仪器检测¹⁴CO₂ 的含量来明确细菌数量。该方法检测速度快、精准度高和自动化程度高,目前,在多种食源性致病菌的检测中得到良好的应用。

2.5 生物传感器技术

生物传感器将生物识别元件(如酶、蛋白质、

DNA、细胞、组织等)与物理化学传感器紧密接触,当生物受体识别到微生物时,可将其转换为可测量的信号,从而间接反应微生物的种类与数量。生物传感技术灵敏度高、检测快速、抗干扰能力强,还能实现在线运行、自动检测,且不需要样品预富集,检测过程中只需微量的待测样本。基于噬菌体的生物传感器可用于检测活的病原体,能够检测浓度为 10⁵~10⁸ CFU/mL 的蜡样芽孢杆菌^[37]。生物传感技术还可与芯片技术结合使用,Xu 等^[38]结合微流控芯片技术开发的传感器可同时分析副溶血性弧菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌,其检出限低、检出范围宽。

3 小结

随着消费者对食品安全要求的提高和现代化技术的进步,食源性病原菌检测技术取得显著进展,检测技术种类繁多。本文重点探讨了基于培养的传统检测技术、免疫测定、分子生物学检测技术和生物传感器等方法的检测原理及优缺点,见表 3。在实际应用中,应根据其优缺点结合实际应用需求选择合适的检测技术或使用多重技术相融合的检测方法来克服单一检测技术的缺陷,从而提高检测灵敏度、特异度,缩短检测周期。

表 3 食源性病原菌检测方法比较

Tab. 3 Comparison of detection methods for foodborne pathogens

检测方法	检测原理	优点	缺点
传统培养	根据病原菌的生长特性进行增菌、培养、分离、纯化	可培养分离得微生物	①耗时、操作繁琐 ②灵敏度低
mPCR	加入2对以上引物,同时扩增多个目标基因	①灵敏度和特异度好 ②可同时检测多个微生物群	①引物设计较为复杂 ②可能产生引物二聚体
qPCR	使用荧光染料或探针可定量监测反应中 PCR 产物	①高通量、自动化 ②较普通 PCR 污染风险更低 ③可实时进行定量分析	①需要复杂的仪器设备 ②不适合快速检测
RT PCR	通过 RNA 创建互补 DNA,对互补 DNA 进行定量	①可进行定量分析 ②可检测活的微生物	①若 mRNA 降解则引起假阴性 ②操作复杂,费用较高
LAMP	根据目标基因的6个区域设计4种特异引物,用 Bst DNA 聚合酶完成扩增	①产物产量高 ②不需复杂的热循环仪器 ③可视化观察检测结果	①LAMP 产物不易降解 ②可视化观察存在主观性 ③凝胶电泳不能识别条带大小 ④限制靶 DNA 长度 < 300 bps
RPA	重组酶、聚合酶参与	反应温度低、反应快速	引物设计难度高
CRISPR-Cas 基因编辑		高效的基因编辑技术	①载体功能受病原菌基因大小限制 ②引物设计范围小
ELISA	抗原、抗体特异性结合	①自动化,灵敏度和特异度好 ②可一次处理大量样品	仪器设备、操作复杂
代谢组学	基于代谢特征鉴定代谢产物	可对微生物进行定量	①生物体代谢变化快,稳定性差 ②数据分析专业性高
传感器/基因芯片	物理、化学信号转换生物信息/核酸杂交	①高通量、自动化 ②灵敏度特异度高	设备复杂

此外, 下一代测序技术(Next-Generation Sequencing, NGS)也被广泛应用于病原菌的检测, 如全基因组测序技术可对食源性病原体的基因型、多样性进行鉴定, 依据遗传特征进行流行病学分析, 具有病原体监测、追踪等潜力。但全基因组测序技术费用昂贵, 在病原菌检测的应用中受到限制。

综上所述, 食源性病原菌的检测技术研究进展迅速, 但仍需不断努力和创造。未来还需加强新技术的研发与应用, 致力于开发便捷、准确、低廉高效、自动化的食源性病原菌检测技术, 为保障食品安全、降低食源性疾病的发生提供更加有力的支持。

[参考文献]

- [1] Ribot E M, Hise K B. Future challenges for tracking foodborne diseases: PulseNet, a 20-year-old US surveillance system for foodborne diseases, is expanding both globally and technologically[J]. *Embo Rep*, 2016, 17(11): 1499–1505.
- [2] European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European union one health 2021 zoonoses report[J]. *Efsa J*, 2022, 20(12): e07666.
- [3] Khalil I A, Troeger C, Blacker B F, et al. Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic Escherichia coli diarrhoea: The global burden of disease study 1990–2016[J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(11): 1229–1240.
- [4] Denamur E, Clermont O, Bonacorsi S, et al. The population genetics of pathogenic Escherichia coli[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(1): 37–54.
- [5] 田牧雨, 张一敏, 董鹏程, 等. 沙门氏菌和单增李斯特菌诱导性耐酸响应机制的研究进展 [J]. *食品科学*, 2019, 40(5): 316–322.
- [6] Qi X L, Wang H X, Bu S R, et al. Incidence rates and clinical symptoms of Salmonella, Vibrio parahaemolyticus, and Shigella infections in China, 1998–2013[J]. *J Infect Dev Ctries*, 2016, 10(2): 127–133.
- [7] Tong S Y, Davis J S, Eichenberger E, et al. Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28(3): 603–661.
- [8] Boukharouba A, Gonzalez A, Garcia-ferrus M, et al. Simultaneous detection of four main foodborne pathogens in ready-to-eat food by using a simple and rapid multiplex PCR (mPCR) assay[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2022, 19(3): 1031.
- [9] Feng Y, Yau H, Chen S, et al. Rapid detection of Hyper-virulent serovar 4h Listeria monocytogenes by multiplex PCR[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11(6): 1309.
- [10] Fusco V, Quero G M, Morea M, et al. Rapid and reliable identification of Staphylococcus aureus harbouring the enterotoxin gene cluster (egc) and quantitative detection in raw milk by real time PCR[J]. *Int J Food Microbiol*, 2011, 144(3): 528–537.
- [11] Hu Q, Lyu D, Shi X, et al. A modified molecular beacons-based multiplex real-time PCR assay for simultaneous detection of eight foodborne pathogens in a single reaction and its application[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2014, 11(3): 207–214.
- [12] Chen M, Lan X, Zhu L, et al. PCR mediated nucleic acid molecular recognition technology for detection of viable and dead foodborne pathogens[J]. *Foods*, 2022, 11(17): 2675.
- [13] Đermić D, Ljubić S, Matulić M, et al. Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) without the need for prior removal of DNA[J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 11470.
- [14] Silva S, Pardee K, Pena L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of Zika virus: A review[J]. *Viruses*, 2019, 12(1): 19.
- [15] Wong Y P, Othman S, Lau Y L, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A versatile technique for detection of micro-organisms[J]. *J Appl Microbiol*, 2018, 124(3): 626–643.
- [16] Soroka M, Wasowicz B, Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): The better sibling of PCR[J]. *Cells*, 2021, 10(8): 1931.
- [17] Parida M, Sannarangaiah S, Dash P K, et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): A new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases[J]. *Rev Med Virol*, 2008, 18(6): 407–421.
- [18] Stratakos A C, Linton M, Millington S, et al. A loop-mediated isothermal amplification method for rapid direct detection and differentiation of nonpathogenic and verocytotoxigenic Escherichia coli in beef and bovine faeces[J]. *J*

- Appl Microbiol*, 2017, 122(3): 817–828.
- [19] Abdullah J, Saffie N, Sjasri F A, et al. Rapid detection of salmonella typhi by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method[J]. *Braz J Microbiol*, 2014, 45(4): 1385–1391.
- [20] Wu C, Zeng Y, He Y. Rapid visualization and detection of *Staphylococcus aureus* based on loop-mediated isothermal amplification[J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2021, 37(12): 209.
- [21] Asadi R, Mollasalehi H. The mechanism and improvements to the isothermal amplification of nucleic acids, at a glance[J]. *Anal Biochem*, 2021, 62(631): 114260.
- [22] 苑宁, 张蕴哲, 张海娟, 等. 可视化跨越式滚环扩增技术检测食品中单核细胞增生李斯特氏菌 [J]. *食品科学*, 2021, 42(16): 239–245.
- [23] 董晶, 徐慧, 郭威, 等. 实时荧光跨越式滚环等温扩增结合 PMA 检测虾产品中的活副溶血性弧菌 [J]. *食品科学*, 2021, 42(24): 289–295.
- [24] 李达容. 水产品中副溶血性弧菌和霍乱弧菌 RAA-LFD 快速检测方法的建立与应用研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2022.
- [25] Wang X, Xiong E, Tian T, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9-mediated lateral flow nucleic acid assay[J]. *ACS Nano*, 2020, 14(2): 2497–2508.
- [26] Huang M, Zhou X, Wang H, et al. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9 triggered isothermal amplification for site-specific nucleic acid detection[J]. *Anal Chem*, 2018, 90(3): 2193–2200.
- [27] Guk K, Keem J O, Hwang S G, et al. A facile, rapid and sensitive detection of MRSA using a CRISPR-mediated DNA FISH method, antibody-like dCas9/sgRNA complex[J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 95(9): 67–71.
- [28] Jiang H J, Tan R, Jin M, et al. Visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* using combined CRISPR/Cas12a and recombinase polymerase amplification[J]. *Biomed Environ Sci*, 2022, 35(6): 518–527.
- [29] Li F, Ye Q, Chen M, et al. Cas12aFDet: A CRISPR/Cas12a-based fluorescence platform for sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* serotype 4c[J]. *Anal Chim Acta*, 2021, 75(1151): 338248.
- [30] Shin H H, Hwang B H, Cha H J. Multiplex 16S rRNA-derived geno-biochip for detection of 16 bacterial pathogens from contaminated foods[J]. *Biotechnol J*, 2016, 11(11): 1405–1414.
- [31] Sarengaowa, Hu W, Feng K, et al. An in situ-synthesized gene chip for the detection of food-borne pathogens on fresh-cut cantaloupe and lettuce[J]. *Front Microbiol*, 2019, 10(2): 3089.
- [32] Pang B, Zhao C, Li L, et al. Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid *Escherichia coli* O157: H7 detection[J]. *Anal Biochem*, 2018, 59(542): 58–62.
- [33] Lv X, Huang Y, Liu D, et al. Multicolor and ultrasensitive enzyme-linked immunosorbent assay based on the fluorescence hybrid chain reaction for simultaneous detection of pathogens[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(33): 9390–9398.
- [34] Niu K, Zheng X, Huang C, et al. A colloidal gold nanoparticle-based immunochromatographic test strip for rapid and convenient detection of *Staphylococcus aureus*[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2014, 14(7): 5151–5156.
- [35] Zhou J, Zhang C, Zhang X, et al. Immunomagnetic separation-based nanogold enhanced surface plasmon resonance and colloidal gold test strips for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Arch Microbiol*, 2020, 202(5): 1025–1033.
- [36] 王鑫, 闫磊, 曾庆祝. 沙门氏菌的检测技术与方法 [J]. *现代食品科技*, 2007, 23(5): 82–85, 75.
- [37] Ramarao N, Tran S L, Marin M, et al. Advanced methods for detection of *Bacillus cereus* and its pathogenic factors[J]. *Sensors (Basel)*, 2020, 20(9): 2667.
- [38] Xu Z, Wang J, Jia Z, et al. A microfluidic chip-based multivalent DNA walker amplification biosensor for the simultaneous detection of multiple food-borne pathogens[J]. *Analyst*, 2023, 148(5): 1093–1101.