

陈秀琴, 黄梅清, 郑 敏, 等. 食源性致病菌快速检测技术及其应用研究进展 [J]. 福建农业学报, 2018, 33 (4): 438—446.
CHEN X Q, HUANG M Q, ZHENG M, et al. Advances on Rapid Detection of Foodborne Pathogens and the Application [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 33 (4): 438—446.

食源性致病菌快速检测技术及其应用研究进展

陈秀琴, 黄梅清, 郑 敏, 陈少莺 *

(福建省农业科学院畜牧兽医研究所/福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心, 福建 福州 350013)

摘要: 随着食品工业的发展, 食品安全成为人们日益关注的公共健康问题。在影响食品安全的因素中, 病原微生物是最主要的因素之一。因此, 建立食源性致病菌的快速检测技术对确保食品安全和保障人类健康意义重大。传统的食源性致病菌检测方法, 如微生物培养法和菌落技术法耗时费力, 远不能满足食品安全快速检测的要求。目前已报道多种食源性致病菌的快速检测方法, 如免疫学技术、分子生物学技术、生物传感器技术等。本文综述了国内外食源性致病菌的快速检测技术及其应用研究进展, 比较分析各项检测技术的特点, 为新的食源性致病菌检测技术的开发提供参考。

关键词: 食源性致病菌; 快速检测; 免疫学技术; 分子生物学技术; 生物传感器技术; 代谢学技术

中图分类号: TS 207.4

文献标识码: A

文章编号: 1008—0384 (2018) 04—

Advances on Rapid Detection of Foodborne Pathogens and the Application

CHEN Xiu-qin, HUANG Mei-qing, ZHENG Min, CHEN Shao-ying *

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Science /
Fujian Animal Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: With the development of food industry, product safety is becoming an increasingly important public health issue. Among the factors that affect food safety, illnesses caused by pathogenic microorganisms is of paramount concern. To prevent or curtail the undesirable incidence from happening, establishment of rapid detection methodologies on foodborne pathogens is one of the indispensable measures. Conventional bacterial detection methods, such as culture and colony counting, are time consuming, laborious and inadequate to meet the demand of a modern society. In recent years, various rapid detection methods have been developed, which apply the technologies involving immunological, molecular biotechnical and/or bio-sensing approaches. This article reviews the methodologies currently available in China and abroad, and compares the pros and cons of the associated technologies and applications.

Key words: foodborne pathogens; rapid detection; immunological technique; molecular biotechnology; biosensor; metabolomics analysis

民以食为天, 食以安为先。近年来, 食品安全事件的频繁发生给人们带来了巨大的痛苦和损失。据美国疾病控制中心报道, 美国平均每年有 3 000 人死于食源性致病菌引发的疾病^[1]。美国农业部估计每年因食源性致病菌疾病引起的损失达 156 亿美元^[2]。我国国家卫生计生委通报了 2015 年食物中毒事件情况: 全年共收到全国食物中毒类突发公共卫生事件报告 169 起, 中毒 5 926 人, 死亡 121

人。其中微生物性食物中毒人数最多, 占全年食物中毒总人数的 53.7%^[3]。食源性致病菌引发的疾病与食品污染问题已成为全世界共同关注的公共卫生问题。

现在已经确认有 31 种病原菌会引发食源性疾病, 常见的有沙门氏菌 *Salmonella* spp.、肠出血性大肠杆菌 O157: H7 *Escherichia coli* O157: H7、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*、单

收稿日期: 2018-01-01 初稿; 2018-03-30 修改稿

作者简介: 陈秀琴 (1988—), 女, 硕士, 研究方向: 预防兽医学 (E-mail: lyunxqchen@163.com)

* 通讯作者: 陈少莺 (1962—), 女, 硕士, 研究员, 研究方向: 动物传染病免疫学研究 (E-mail: chensy58@163.com)

基金项目: 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2018R1102); 福建省财政专项——福建省农业科学院青年创新团队 (STIT2017-3-10)

增李斯特菌 *Listeria monocytogenes*、蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus*、空肠弯曲杆菌 *Campylobacter jejuni*、副溶血性弧菌 *Vibrio parahaemolyticus*、志贺氏菌 *Shigella* spp. 等^[4]。食源性病原菌分布广泛,不仅存在于生鲜食物中,也存在于熟食食物中。不同类型的食物受污染的致病菌也不一样。例如,畜禽肉易受到沙门氏菌、大肠杆菌 O157: H7、金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的污染,而水产品中常见的致病菌是副溶血性弧菌^[5]。

随着食品安全问题日益严峻,以及对低剂量($<100 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$)食源性致病菌的检测需求,建立灵敏度高、特异性强、检测迅速的方法对于保障食品安全和防止疾病传播至关重要^[6]。目前,食源性致病菌快速检测技术主要包括免疫学技术、分子生物学技术和生物传感器技术等,本文主要综述上述检测技术及其应用,并比较不同检测技术的优缺点。

1 免疫学检测技术

1.1 酶联免疫吸附法(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

ELISA 是将抗原、抗体免疫反应和酶的高效催化反应有机结合起来的一种技术,可用于定性和定量检测^[7]。食源性致病菌的检测一般采用双抗体夹心 ELISA 法,检测灵敏度较高^[8]。1977 年,国外研究者首次应用该法检测食品中的沙门氏菌^[9]。经过多年的发展,ELISA 已广泛应用于食源性致病菌的检测。此外,ELISA 还可以用于检测细菌毒素,如产气荚膜梭菌 α 、 β 和 ϵ 毒素,金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B、C 和 D,大肠杆菌肉毒素和肠毒素^[10]。Liu 等制备金黄色葡萄球菌肠毒素 B 的单克隆抗体,采用化学发光双抗体夹心 ELISA 法检测金黄色葡萄球菌肠毒素 B,检测限度为 $0.01 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,并且与其他肠毒素 A、C 和 D 不存在交叉反应^[6]。现在也已开发出多种致病菌的 ELISA 检测试剂盒,应用特异性的多克隆抗体和单克隆抗体来检测细菌毒素的 ELISA 检测试剂盒也已经商品化^[11]。

ELISA 具有特异性强、稳定、检测费用低、易于操作,标准化程度高,且可对大批量样品进行同时检测等优点。但是 ELISA 难以同时分析多种成分,对试剂的选择性高,分析结构类似的化合物存在交叉反应,会出现假阴性^[12]。

1.2 免疫磁性分离技术(Immunomagnetic

separation, IMS)

IMS 是通过富集目的菌以达到检测方法所需的最低浓度,使目的菌不经预增菌即可被快速检出,以缩短检测时间。IMS 可以单独使用,也可以与其他检测技术灵活联合使用,如显色培养基、ELISA 和分子生物学技术^[13]。联用的主要目的是富集样品中的目标微生物,使检测更加高效、灵敏。用于检测大肠埃希氏菌 O157: H7 的国标 GB/T 4789. 36-2016 中第二法也采用此法进行富集标本中的大肠埃希氏菌 O157: H7^[14]。目前市场上已经出现多种细菌的免疫磁珠分离检测试剂盒,也有 IMS 与 PCR 结合的检测试剂盒^[11]。

IMS 能有效消除食品基质对后续检测的干扰,是一种分离速度快、特异、操作简单的方法,并且不影响被分离细胞或其他生物材料的生物学性状和功能^[15-16]。但是该方法也存在不足之处。如果没有选择特异的抗原靶标,则会富集到许多杂菌,同时由于目标致病菌在食品基质中的污染量很低,目标菌的生长易受到杂菌的抑制,导致无法检测到目标菌^[17]。

1.3 免疫荧光技术(Immunofluorescence technique, IFT)

IFT 是采用荧光色素标记抗体(或抗原),抗原和抗体反应结合后,在荧光显微镜下可发出荧光,最终达到检测致病菌的目的^[18]。IFT 可分为直接法和间接法。由于该法不需复杂的仪器设备,具有特异性强、检测迅速、敏感性高等优点,现已用于多种致病菌的检测。但是 IFT 的结果判定存在主观性,存在非特异性染色问题,操作步骤比较复杂^[19]。

1.4 免疫胶体金技术(Immungoldlabelling technique, IGTLT)

IGLT 可用于定性或半定量快速检测食源性致病菌,如检测大肠杆菌 O157: H7、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌和单增李斯特菌等^[19-21]。应用该技术已经开发出多种病原菌的胶体金试纸条。该技术具有以下优点:操作简单,易于携带;无需专业人员和其他仪器;反应迅速(10~15 min);肉眼即可直接判定检测结果;检测成本低廉;可检测的样品多样化(包括液体)^[20]。因此,免疫胶体金试纸条适合基层和现场的快速检测。但免疫胶体金试纸条也存在一些缺陷。如灵敏度偏低($10^5 \sim 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$),只能定性和单元检测食源性致病菌,检测结果易受到试验环境的影响等^[19,22]。

1.5 乳胶凝集法 (Latex agglutination, LA)

该法主要有反向间接血凝试验和反向被动胶乳凝集试验两种, 是一种比较成熟的检测方法。后者用于检测可溶性抗原, 更常被用于检测食物或纯培养物中的毒素^[23]。应用该法已经开发多种商业化试剂盒, 如梅里埃公司开发的 Slidex Staph 试剂盒

可用来快速鉴定金黄色葡萄球菌, 检测时间不到 1 min; 英国 Oxoid 公司也相继开发出用于检测弯曲杆菌、李斯特菌、沙门氏菌以及金黄色葡萄球菌等致病菌的乳胶凝集试剂盒^[24]。

免疫学技术在检测食源性致病菌中的具体应用见表 1。

表 1 免疫学技术在检测食源性致病菌中的应用

Table 1 Immunology-based methods for foodborne pathogen detection

检测方法	检测的致病菌	检测限度	检测食品	检测时间	参考文献
ELISA	副溶血性弧菌	10^3 cell	海鲜	—	[25]
	沙门氏菌	1×10^4 CFU · mL ⁻¹	人工污染的牛奶	—	[26]
IMS-mPCR	沙门氏菌、志贺氏杆菌、金黄色葡萄球菌	2.0~9.6 CFU · g ⁻¹	人工污染的鲜猪肉	< 7 h	[13]
IFT	沙门氏菌	—	鸡蛋、沙拉酱	< 24 h	[27]
IGLT	大肠杆菌	3×10^5 CFU · mL ⁻¹	牛奶	—	[19]
	沙门氏菌	$1.3 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^6$ CFU · mL ⁻¹	牛奶	—	[19]

注:“—”代表文献中未提及。表 2、3 同。

2 分子生物学检测技术

2.1 聚合酶链式反应技术 (Polymerase chain reaction, PCR)

1985 年, Mullis 等创建了 PCR 技术, 用于快速扩增特定目标基因。由于常规 PCR 一次只能检测一种致病菌, 而食品中经常存在多种致病菌, 因此, 在常规 PCR 基础上衍生出几十种不同类型的 PCR 法, 其中以多重 PCR (Multiplex PCR, mPCR) 和实时荧光定量 PCR (Real time fluorescent quantitative PCR, RT-qPCR) 在食源性致病菌检测中的应用最为广泛。

2.1.1 多重 PCR (mPCR) mPCR 的原理是在反应体系中同时加入多对引物, 对特异性的目的片段进行扩增, 从而实现同时检测多种致病菌的目的^[28]。mPCR 既可同时检测血清型复杂的单一病原菌^[29], 如沙门氏菌、大肠杆菌等, 也可同时检测多种致病菌^[30], 大大节省了试剂和时间, 并且还保留常规 PCR 的特异性和敏感性。商品化的检测试剂盒如 Biocontrol 公司生产的 Assurance GDS MPX 是将 IMS 和 mPCR 结合起来检测 *E. coli* O157: H7、O26、O45、O103、O111、O121、O145, 预增菌 10~18 h, 在 1 h 内即可完成检测^[10]。

但是由于普通多重 PCR 引物间存在相互干扰, 高浓度模板对低浓度模板产生竞争性抑制, 导致扩增效率降低。针对这一缺点, 研究者建立一种通用引物-多重 PCR (universal primer-multiplex PCR,

PU-M-PCR)。该方法是分别在几种特异性引物的 5 端接上一段新序列, 在 PU-M-PCR 中除了目的基因特异性引物外, 还有一对通用引物。在 PCR 反应的前 10 个循环, 复合引物进行扩增, 而通用引物由于缺少模板, 无法进行扩增。当特异性引物用尽, 通用引物开始以得到的产物为模板进行序列扩增。该技术可提高检测灵敏度, 降低成本, 已被应用于大肠杆菌、单增李斯特菌和沙门氏菌的检测^[31~32]。

近年来形成的多通道振荡流多重 PCR 也已经应用于多种致病菌的检测, 该方法可同时检测多个样品, 并且能快速扩增 DNA。应用该方法在 35 min 内即可完成对肠炎沙门氏菌、大肠杆菌 O157: H7 和单增李斯特菌核酸序列的同时扩增^[33]。

2.1.2 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) RT-qPCR 是在 1992 年由日本研究者首次提出, 4 年后美国一家公司推出的 qPCR 仪使得 RT-qPCR 真正市场化, 从而实现从定性到定量的飞跃。常用的 RT-qPCR 有 Taq Man 探针法和荧光染料法。RT-qPCR 既可以定性也可以定量分析结果, 与普通 PCR 相比, 灵敏度更高 (≤ 100 CFU · mL⁻¹), 并且减少了因实验室污染造成结果假阳性^[34]。RT-qPCR 不仅可以检测单种致病菌也可以同时检测多种致病菌, 如大肠杆菌、单增李斯特菌和沙门氏菌等^[35~36]。

与常规 PCR 相比, RT-qPCR 扩增和检测一步完成, 无需开盖, 避免了 PCR 产物对实验室的污染; 自动化程度高、定量结果准确、重现性好; 检测速度快, 能同时检测大量样品^[37]。但是该方法检测成本

较高；酶活性易受到不同食品基质成分的干扰和抑制；对引物和探针的特异性靶基因序列选择及设计要求较高，选择及设计不当可能会降低检测灵敏度和特异性^[38]。此外，不论是 RT-qPCR 还是常规 PCR 都无法区分死菌和活菌。为了解决这一问题，科研人员采用 DNA 染料 EMA(Edthidiummonoazide bromide, 叠氮溴化乙啶) 和 PMA(Propidiummonoazide bromide, 叠氮溴化丙啶) 预处理细菌，再与 PCR 技术结合。这两种染料是通过抑制死菌的 DNA 扩增，选择性扩增活菌的 DNA。Martin 等^[39]用 PMA 与 RT-qPCR 结合检测熟火腿中的沙门氏菌数量，结果表明检测限度为 $10^3 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$ ，该法可以减少假阳性率。

2.2 恒温基因扩增技术 (Isothermal amplification)

恒温扩增技术包括解链酶扩增 (Helicase-dependent amplification, HDA)、实时荧光核酸恒温扩增 (Simultaneous amplification and testing, SAT)、链置换扩增 (Strand displacement amplification, SDA)、切口酶核酸恒温扩增 (Nicking enzyme mediated amplification, NEMA)、滚环扩增 (Rolling circle amplification, RCA)、依赖核酸序列的扩增 (Nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)、转录介导扩增 (Transcription mediated amplification, TMA)、环介导恒温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 等。其中，已用于食源性致病菌检测主要是 LAMP 和 NASBA。

2.2.1 环介导恒温扩增 (LAMP) LAMP 是 Notomi 等于 2000 年开发的一种核酸扩增方法。该方法在恒温下仅用一种酶即可进行核酸的快速扩增反应。反应产物的检测方法有 3 种，分别为琼脂糖凝胶电泳、在扩增产物中加入 SYBR Green I 荧光染料和直接肉眼观察^[15, 40]。在反应管中加入 SYBR Green I 后，若含有扩增产物，肉眼可见反应体系颜色变绿，反之，则保持橙色不变^[7]。现在开发出的 LAMP 浊度仪能实现对反应进行实时监测，并且能够进行定量检测^[41]。近年来，在常规 LAMP 的基础上又衍生出新型的 LAMP 技术，如 RT-LAMP (reversetranscription LAMP)、mLAMP (multiplex LAMP) 和 in situ LAMP 等。在食源性致病菌检测领域，LAMP 首次被用于检测大肠杆菌 O157: H7 的 *srxA₂* 基因^[42]。随着 LAMP 技术的发展，目前研发出用于检测李斯特

菌、沙门氏菌、弯曲杆菌和产志贺样毒素大肠杆菌的商业化试剂盒^[43]。

LAMP 方法的优点：操作简单，只需要在恒温下即能完成扩增反应，与 PCR 相比，不需要经过升温降温的循环^[44]；特异性高；灵敏度高，比常规 PCR 高 1~2 个数量级；结果只需用肉眼观察即可；检测速度快，整个扩增在 30~60 min 即可完成；检测成本低：只需一个恒温水浴锅，适合基层和现场检测用。但其也存在缺点：对引物设计要求高，且难度大；扩增序列长度要求不能超过 300 bp；环引物间的非特异性配对会导致假阳性；检测过程中容易被污染，造成假阳性^[45]。

2.2.2 依赖核酸序列的扩增 (NASBA)

NASBA 又称自主序列复制系统或再生长序列复制技术，是 Compton 于 1991 年首次建立，一般用于 RNA 的扩增。与普通 PCR 不同的是 NASBA 是由一对引物介导的、连续均一地、体外特异地对单链 RNA 进行恒温扩增的反应。反应在 42℃ 条件下进行，需要两条特异性引物和 3 种酶 (AMV 逆转录酶、T7 RNA 多聚酶和 RNase H)。扩增的产物可通过琼脂糖凝胶电泳、基于电化学发光技术、酶联寡核苷酸捕获法、酶联凝胶试验、荧光检测法和核酸杂交检测法检测^[45~46]。应用分子信标与 NASBA 结合是一种实时检测特异单链 RNA 的有效方法，已经用于沙门氏菌、副溶血性弧菌、单增李斯特菌等细菌的检测^[47~49]，也可用于禽流感病毒、口蹄疫病毒、狂犬病病毒等的检测^[46]。

NASBA 具有以下的优点：反应迅速；恒温扩增，不需要特殊控温仪器；操作简单；适合检测的样品多。缺点如下：样品制备复杂；不能进行大通量检测，一次最多检测 12 个样品^[7]。

2.3 基因芯片技术

基因芯片 (Genechip) 是生物芯片的一种，又称 DNA 芯片、DNA 微列阵 (DNA microarray)、寡核苷酸阵列 (Oligonucleotide array)。基因芯片是一种新兴的技术，可以做到在同一时间里进行高通量检测样品，对微生物的分析可做到一次性鉴定种属、毒力因子和基因多态性分析^[50]。有研究报道用异羟基洋地黄毒苷和生物素标记 DNA 同时检测沙门氏菌、志贺氏菌、单增李斯特菌和大肠杆菌，最低检测限度为 $10^5 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，并且不需要细菌预扩增的过程^[51]。基因芯片也可以和 PCR^[52]、IMS 联用^[53]。

该技术能实现对致病菌的高通量和并行检测，操作简便，重复性好，特异性强，灵敏度高，几个

小时内即可完成检测。然而,由于基因芯片技术刚刚起步,还存在一些不足之处。例如,样品制备过程复杂,芯片存在假阳性,无法建立标准化程序,

检测仪器昂贵,难以在一般实验室应用^[54]。

分子生物学技术在检测食源性致病菌中的应用见表 2。

表 2 分子生物学技术在检测食源性致病菌中的应用
Table 2 Nucleic acid-based methods for foodborne pathogen detection

检测方法	检测的致病菌	检测限度	检测食品	检测时间	参考文献
mPCR	大肠杆菌 O157:H7, 单增李斯特菌, 金黄色葡萄球菌, 沙门氏菌	$10^3 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$	人工污染的猪肉	—	[30]
	沙门氏菌, 大肠杆菌 O157:H7, 单增李斯特菌	沙门氏菌, 大肠杆菌 O157:H7 为 $10 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$, 单增李斯特菌为 $10^2 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$			
RT-qPCR	沙门氏菌,	$10^3 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$	熟火腿 鲜猪肉	< 8 h	[39]
	金黄色葡萄球菌, 沙门氏菌, 志贺氏菌	金黄色葡萄球菌为 $9.6 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$, 沙门氏菌为 $2.0 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$, 志贺氏菌为 $6.8 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$			
	大肠杆菌 O157:H7	$78 \text{ pg} \cdot \text{管}^{-1}$			
LAMP	沙门氏菌	$0.05 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ DNA	生鸡蛋, 禽肉, 水产品等	< 40 min	[57]
NASBA	副溶血性弧菌	$5.1 \times 10^2 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$			
基因芯片技术	大肠杆菌, 沙门氏菌, 金黄色葡萄球菌等	$10 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$	人工污染的牛奶和肉	3 h	[58]

3 生物传感器检测技术

生物传感器是将特定的生物识别转换为可识别的信号进行检测的分析仪器。目前应用于食源性致病菌较多的是光学生物传感器和电化学生物传感器。

光学生物传感器在食源性致病菌检测中应用最多的是表面等离子共振 (Surface plasmon resonance, SPR)。使用基于 SPR 的生物传感器可用来检测沙门氏菌^[59~60]、霍乱弧菌^[61]。阻碍 SPR 生物传感器实际应用的原因是所检样品成分复杂,使感受器表面捕获非特异性靶标分子,从而导致假阳性^[45]。SPREETA 生物传感器和 BIACORE

3000 生物传感器是两种已经商业化的应用 SPR 的光学生物传感器。

电化学传感器根据观测参数的不同,可分为安培法、电位法、阻抗法和电导法等类型。已有相关研究报道使用电化学传感器来检测沙门氏菌^[62~63]、致病性大肠杆菌^[64]、弯曲杆菌^[63]。生物传感器检测技术在检测食源性致病菌的更多应用见表 3。

该技术具有较好的灵活性,可以和其他检测技术相结合。但是该技术在应用中需使用大型仪器来读取荧光,使用不便捷;对实验环境要求较高,在农贸市场、基层乡镇和不发达地区应用较为困难^[65]。

表 3 生物传感器检测技术在检测食源性致病菌中的应用
Table 3 Biosensor-based methods for foodborne pathogen detection

检测方法	检测的致病菌	检测限度	检测食品	检测时间	参考文献
SPR	大肠杆菌 O157:H7、沙门氏菌	大肠杆菌 O157:H7: $57 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (汉堡包), $17 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (黄瓜); 沙门氏菌: $7.4 \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (汉堡包), $11.7 \times 10^3 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (黄瓜)	汉堡包、黄瓜	< 80min	[59]
	鼠伤寒沙门氏菌	$100 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$			
电化学传感器	大肠杆菌、空肠弯曲杆菌、沙门氏菌	$400 \sim 800 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$	奶粉 牛奶	< 60min 1h	[60] [63]
	致病性大肠杆菌	$10 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$			

4 代谢学检测技术

代谢学检测技术在食源性致病菌检测应用较多的是 ATP 生物发光检测法。该法是利用活菌内含有 ATP, 当细菌死亡后, 细菌内的 ATP 被细胞内酶分解, 应用荧光素和荧光素酶可使之释放能量并产生荧光, 荧光的量与 ATP 的浓度成正比。因此, 通过测定 ATP 的浓度即可推算出活菌总数^[66]。该方法的检测时间不到 5 min, 是目前检测时间最短的检测方法之一。该法无需对样本中的微生物进行培养, 操作简便、快捷且测定范围广, 其

检测的是食品中的活菌总数, 更能准确反映食品卫生的真实情况。

但是也存在不足之处: 易受到温度、酸碱等因素影响, 食品和 ATP 提取剂含有的某些离子会干扰测定; 不能作为细菌鉴定; 灵敏度还有待提高; 仅适用于细菌含量高的物体 ($> 10^4 \text{ CFU} \cdot \text{g}^{-1}$)^[67-68]。该法无特异性, 但是通过用 IMS 来捕获靶细菌, 再进行荧光测定即能克服此缺点^[69]。常见食源性致病菌检测技术优、缺点比如表 4 所示。

表 4 常见食源性致病菌检测技术的比较

Table 4 Comparison on common technologies applied for foodborne pathogen detection

种类	名称	特点	不足
免疫学检测技术	ELISA	特异、稳定、费用低、易于操作; 可进行大量样品的同时检测; 能够检测毒素。	影响因素多; 不能同时对多种成分进行分析; 对试剂的选择性高; 存在假阴性。
	IMS	特异性强、灵敏度高、分离速度快。	样品需求量大; 必须筛选到致病菌的特异性抗原靶标; 可能存在假阳性。
	IFT	特异性强; 检测时间短。	灵敏度偏低, 具有主观因素; 技术程序比较复杂。
	IGLT	操作简单; 易于携带; 无需专业人员和其他仪器; 反应迅速; 成本低廉; 适合在基层及大批量样品的现场筛查。	灵敏度低。
	LA	特异性强、操作简便、快速、经济、判断直观, 适合基层使用。	灵敏度较低。
分子生物学检测技术	mPCR	特异性、灵敏度较高; 一次可同时检测多种致病菌。	会受 PCR 抑制物影响; 扩增效率低; 引物设计较难; 无法区分死菌和活菌。
	RT-qPCR	特异性强, 敏感性高; 不需扩增后处理; 实时监测扩增产物。	成本高; 会受 PCR 抑制物影响; 做多重 qPCR 较难; 无法区分死菌和活菌; 需要专业人员操作。
	LAMP	特异性强, 敏感性高; 容易操作; 成本低。	引物设计难; 扩增序列不能超过 300 bp; 容易交叉污染; 假阳性高。
	NASBA	特异性强、灵敏度较高; 反应迅速, 操作简单; 成本低。	不能进行大通量检测; 样品制备复杂; 样品必须是活的微生物。
基因芯片技术		特异性强, 敏感性高; 能实现对食品中的致病菌高通量和并行检测; 操作简便快速。	成本高; 需要专业人员操作; 芯片制备和杂交过程耗时。
生物传感器检测技术		只需极微量的检测样本; 灵敏度高, 重复性好。	成本高。
代谢学检测技术	ATP 生物发光技术	检测时间特别短; 采用该方法制作的检测仪体积小, 携带方便。	检测试剂贵; 反应易受到各类因素影响。

5 结语与展望

传统的食源性致病菌检测法需要经过细菌培养、分离与鉴别、生化分析和血清学鉴定等过程, 检测结果较为准确, 但操作繁琐且耗时长 (4~7 d), 难以有效预防和控制食源性致病菌疾病的暴发。因此, 必须建立快速、特异、灵敏的食源性致病菌检测方法。目前, 已经建立许多快速检测方法, 但是在实际应用中, 大部分方法仍然需要在灵敏度和特异性两方面进行改进。免疫学检测技术检

测迅速、操作简便, 但灵敏度有待提高。分子生物学技术灵敏度和特异性相对较高, 但是其中的 mPCR、qPCR 技术需要专业人员操作和特定的检测仪器。生物传感器检测技术可用于检测致病菌及其产生的毒素, 样品不需要预增菌, 但传感器制备复杂, 不易推广。ATP 生物发光技术检测迅速, 但灵敏度还有待提高。

食源性致病菌的快速检测包括缩短检测单种致病菌的时间和多个样品同时检测, 未来开发的快速检测方法可从这两方面进行拓展。除生物传感器检

测技术外，其他都需要样品的前处理，即从食品基质中富集微生物，这也是能否实现快速检测致病菌的关键点。富集细菌的方法包括过滤、离心和IMS等，也可以将这些方法联合使用。此外，为了缩短检测时间及提高准确性，可以将不同的检测技术联合应用，如IMS结合分子生物学技术、免疫学技术。本文所综述的检测方法中除免疫荧光技术外其他均已开发出商业化检测试剂盒。但是这些检测试剂盒能检测的致病菌种类少，需要开发更多种类的检测试剂盒。

不论是哪一种检测技术，结果均具有一定滞后性，起不到预知的作用。因此，建立食源性致病菌的生长预测模型，建立食源性微生物的预测数学模型，为食源性致病菌的安全性评估和危险性评估提供理论依据，将是未来研究的方向。此外，我国目前缺乏食源性致病菌代谢产物数据库，因此，有必要利用代谢组学研究技术建立食源性致病菌代谢产物数据库和代谢网络。

参考文献：

- [1] YASMIN J, AHMED M R, CHO B. Biosensors and their applications in food safety: a review [J]. *Journal of Biosystems Engineering*, 2016, 41 (3): 240—254.
- [2] Centers for Disease Control and Prevention(CDC). 2015 Food Safety Report[EB/OL]www.cdc.gov/foodnet/index.html.
- [3] 国家卫生计生委办公厅. 国家卫生计生委办公厅关于2015年全国食物中毒事件情况的通报[EB/OL]. http://www.nhfpc.gov.cn/yjb/s7859/201604/8d34e4c442c54d33909319954c43311c.shtml. 2016-04-01/2016-11-28.
- [4] VELUSAMY V, ARSHAK K, KOROSTYNSKA O, et al. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors [J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28 (2): 232—254.
- [5] BOSILEVAC J M, GUERINI M N, KALCHAYANAND N, et al. Prevalence and characterization of salmonellae in commercial ground beef in the United States [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2009, 75 (7): 1892—1900.
- [6] ZHAO X, LIN C, WANG J, et al. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014, 24 (3): 297—312.
- [7] 何琳. 环介导等温扩增技术快速检测水产动物病原的研究[D]. 杭州：浙江大学，2012.
- [8] 江汉湖, 董明盛. 食品微生物学[M]. 北京：中国农业出版社，2010.
- [9] KRYSINSKI E P, HEIMSCHE R C. Use of enzyme-labeled antibodies to detect *Salmonella* in foods [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1977, 33 (4): 947—954.
- [10] LIU F, LI Y, SONG C, et al. Highly sensitive microplate chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of staphylococcal enterotoxin B based on a pair of specific monoclonal antibodies and its application to various matrices [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82 (18): 7758—7765.
- [11] BRANDAO D, LIÉBANA S, PIVIDORI M I. Multiplexed detection of foodborne pathogens based on magnetic particles [J]. *New Biotechnology*, 2015, 32 (5): 511—520.
- [12] PARK S H, AYDIN M, KHATIWARA A, et al. Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products [J]. *Food Microbiology*, 2014, 38 (4): 250—262.
- [13] MA K, DENG Y, BAI Y, et al. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in fresh pork using a multiplex real-time PCR assay based on immunomagnetic separation [J]. *Food Control*, 2014, 42: 87—93.
- [14] GB/T 4789.36-2016 食品安全国家标准食品微生物学检验大肠埃希氏菌 O157: H7/NM 检验[S].
- [15] 覃昱. 应用免疫磁珠分离及LAMP技术快速检测配方奶粉中克罗诺杆菌[D]. 广州：南方医科大学，2014.
- [16] 毛燕, 黄小林, 许恒毅, 等. 免疫磁分离技术在食源性单增李斯特菌检测中应用的研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36 (8): 351—355.
- [17] 刘细霞, 涂俊铭. 免疫磁珠分离技术及其在食源性致病菌检测中应用的进展[J]. 中国抗生素杂志, 2014, 39 (12): 956—960.
- [18] 封莉, 黄继超, 刘欣, 等. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33 (21): 332—339.
- [19] 王文彬. 乳及乳制品中主要食源性致病菌的免疫快速检测方法研究[D]. 无锡：江南大学，2017.
- [20] 牛凯莉. 基于胶体金免疫层析法的食源性致病菌检测技术的研究[D]. 上海：上海师范大学，2013.
- [21] 潘秀华. 单核细胞增生李斯特菌胶体金免疫层析检测试纸条的制备[D]. 武汉：华中农业大学，2013.
- [22] 章小雨, 戴晓爱. 免疫胶体金技术在医学检验领域的应用与进展[J]. 实验与检验医学, 2014, 32 (3): 279—281.
- [23] FENG P. *Food microbiology, fundamentals and frontiers*, 3rd edn [M]. ASM Press: Washington D C, 2007, 911—934.
- [24] 谢雪钦. 食品微生物快速检测方法优劣比较[J]. 质量技术监督研究, 2013 (3): 2—7.
- [25] KUMAR B K, RAGHUNATH P, DEVEGOWDA D, et al. Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 145 (1): 244—249.
- [26] 伍燕华, 牛瑞江, 赖卫华, 等. 双抗夹心酶联免疫吸附法检测沙门氏菌[J]. 食品工业科技, 2014, 35 (10): 62—65.
- [27] INSALATA N K, SCHULTE S J, HERMAN J H. Immunofluorescence technique for detection of salmonellae in various foods [J]. *Applied Microbiology*, 1967, 15 (5): 1145—1149.
- [28] RAJKHOWA S, HUSSAIN I, RAJKHOWA C. Detection of heat-stable and heat-labile enterotoxin genes of *Escherichia coli* in diarrhoeic faecal samples of mithun (*Bos frontalis*) calves by polymerase chain reaction [J]. *Journal of Applied*

- Microbiology*, 2009, 106 (2): 455—458.
- [29] VERSTRAETE K, ROBYN J, DEL-FAVERO J, et al. Evaluation of a multiplex-PCR detection in combination with an isolation method for STEC O26, O103, O111, O145 and sorbitol fermenting O157 in food [J]. *Food Microbiology*, 2012, 29 (1): 49—55.
- [30] GUAN Z P, JIANG Y, GAO F, et al. Rapid and simultaneous analysis of five foodborne pathogenic bacteria using multiplex PCR [J]. *European Food Research and Technology*, 2013, 237 (4): 627—637.
- [31] 商颖, 许文涛, 元延芳, 等. 通用引物多重PCR技术检测3种病原微生物 [J]. 食品科学, 2011, 32 (10): 103—106.
- [32] YUAN Y, XU W, ZHAI Z, et al. Universal primer-multiplex PCR approach for simultaneous detection of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* spp. in food samples [J]. *Journal of Food Science*, 2009, 74 (8): 446—452.
- [33] WANG H, ZHANG C, XING D. Simultaneous detection of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157: H7, and *Listeria monocytogenes* using oscillatory-flow multiplex PCR [J]. *Microchimica Acta*, 2011, 173: 503—512.
- [34] RODA A, MIRASOLI M, RODA B, et al. Recent developments in rapid multiplexed bioanalytical methods for foodborne pathogenic bacteria detection [J]. *Microchimica Acta*, 2012, 178: 7—28.
- [35] DELBEKE S, CEUPPENS S, HOLVOET K, et al. Multiplex real-time PCR and culture methods for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella Thompson* in strawberries, a lettuce mix and basil [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, 193: 1—7.
- [36] TORKY H A, AHMED H A, OMRAN E S. Duplex real time PCR for simultaneous detection of *Salmonella* species and *Listeria monocytogenes* in frozen meat [J]. *Alexandria Journal for Veterinary Sciences*, 2015, 46: 100—109.
- [37] FREEMAN W M, WALKER S J, VRANA K E. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential [J]. *Biotechniques*, 1999, 26 (1): 112—125.
- [38] 蒋原. 食源性病原微生物检测指南 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [39] MARTIN B, RAURICH S, GARRIGA M, et al. Effect of amplicon length in propidiummonoazidequantitative PCR for the enumeration of viable cells of *Salmonella* in cooked ham [J]. *Food Analytical Methods*, 2013, 6 (2): 683—690.
- [40] WANG L, SHI L, ALAM M J, et al. Specific and rapid detection of foodborne *Salmonella* by loop-mediated isothermal amplification method [J]. *Food Research International*, 2008, 41 (1): 69—74.
- [41] MORI Y, NAGAMINE K, TOMITA N, et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation [J]. *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 2001, 289 (1): 150—154.
- [42] MARUYAMA F, KENZAKA T, YAMAGUCHI N, et al. Detection of bacteria carrying the *stx2*gene by in situ loop-mediated isothermal amplification [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2003, 69 (8): 5023—5028.
- [43] MORI Y, NOTOMI T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases [J]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2009, 15 (2): 62—69.
- [44] NAGAMINE K, WATANABE K, OHTSUKA K, et al. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template [J]. *Clinical Chemistry*, 2001, 47 (9): 1742—1743.
- [45] LEONE G, VAN SCHIJNDEL H, VAN GEMEN B, et al. Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1998, 26 (9): 2150—2155.
- [46] 高闪电, 常惠芸, 丛国正, 等. NASBA(依赖核酸序列的扩增)技术及其在病毒检测中的应用 [J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29 (1): 80—85.
- [47] 雷质文, 姜英辉, 王妍婷, 等. 沙门氏菌的依赖于核酸序列恒温扩增检测方法的建立 [J]. 食品安全质量检测学报, 2011, 2 (5): 22—26.
- [48] 倪鑫, 王志聪, 雷质文, 等. 依赖于核酸序列恒温扩增技术快速检测副溶血性弧菌方法的建立 [J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33 (11): 882—886.
- [49] LAW J W, AB MUTALIB N S, CHAN K G, et al. An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1—16.
- [50] SHOMAKER T S, WARD K. Microarray technology in biomedical research [J]. *Hawaii Medical Journal*, 2006, 65 (9): 253—256.
- [51] KUPRADIT C, RODTONG S, KETUDATCAIRNS M. Development of a DNA macroarray for simultaneous detection of multiple foodborne pathogenic bacteria in fresh chicken meat [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2013, 29 (12): 2281—2291.
- [52] SUO B, HE Y, PAOLI G, et al. Development of an oligonucleotide-based microarray to detect multiple foodborne pathogens [J]. *Molecular & Cellular Probes*, 2010, 24 (2): 77—86.
- [53] SUN H, MO Q H, LIN J C, et al. Rapid simultaneous screening of seven clinically important enteric pathogens using a magnetic bead based DNA microarray [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2011, 27 (1): 163—169.
- [54] 杨春光, 王宏伟, 彭心婷, 等. 食品病原微生物快速检测技术研究进展 [J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 29 (1): 41—47.
- [55] 宋东晓. 多重PCR检测牛肉中沙门氏菌、单增李斯特菌和大肠杆菌O157:H7的研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
- [56] Ranjbar R, Erfanmanesh M, Afshar D, et al. Visual detection of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 using loop-mediated isothermal amplification [J]. *Electronic Physician*, 2016, 8 (6): 2576—2585.

- [57] 孔超, 董娜, 高伟. 应用环介导等温扩增法快速检测食品中沙门氏菌的研究 [J]. 中国病原生物学杂志, 2015, 10 (9): 816—818.
- [58] HUANG A, QIU Z, JIN M, et al. High-throughput detection of food-borne pathogenic bacteria using oligonucleotide microarray with quantum dots as fluorescent labels [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 185: 27—32.
- [59] VAIŠOCHEROVÁ-LÍSALOVÁ H, VÍŠOVÁ I, ERMINI M L, et al. Low-fouling surface plasmon resonance biosensor for multi-step detection of foodborne bacterial pathogens in complex food samples [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 80 (3): 84—90.
- [60] FARKA Z, JUŘÍK T, PASTUCHA M, et al. Enzymatic precipitation enhanced surface plasmonresonance immunosensor for the detection of *Salmonella* in powdered milk [J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88 (23): 11830—11836.
- [61] TAHERI R A, REZAYAN A H, RAHIMI F, et al. Development of an immunosensor using oriented immobilized anti-OmpW for sensitive detection of *Vibrio cholerae* by surface plasmon resonance [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 86: 484—488.
- [62] HU C, DOU W, ZHAO G. Enzyme immunosensor based on gold nanoparticles electroposition and Streptavidin-biotin system for detection of *S. pullorum* & *S. gallinarum* [J]. *Electrochimica Acta*, 2014, 117: 239—245.
- [63] VISWANATHAN S, RANI C, HO J A. Electrochemical immunosensor for multiplexed detection of food-borne pathogens using nanocrystal bioconjugates and MWCNT screen-printed electrode [J]. *Talanta*, 2012, 94 (94): 315—319.
- [64] ZHANG W, LUO C, ZHONG L, et al. Sensitive detection of entero-pathogenic *E. coli* using a bfpA gene-based electrochemical sensor [J]. *Microchimica Acta*, 2013, 180 (13—14): 1233—1240.
- [65] 黄欣迪, 涂晓波, 亓双, 等. 食源性致病菌的检测方法及其发展趋势 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7 (12): 4794—4800.
- [66] LÓPEZ-CAMPOS G, MARTÍNEZ-SUÁREZ J V, AGUADO-URDA M, et al. Microarray detection and characterization of bacterial foodborne pathogens [M]. Boston: Springer, 2012, 13—32.
- [67] 唐倩倩, 叶尊忠, 王剑平, 等. ATP生物发光法在微生物检验中的应用 [J]. 食品科学, 2008, 29 (6): 460—465.
- [68] JASSON V, JACXSENS L, LUNING P, et al. Alternative microbial methods: An overview and selection criteria [J]. *Food Microbiology*, 2010, 27 (6): 710—730.
- [69] HUNTER D M, LESKINEN S D, MAGAÑA S, et al. Dead-end ultrafiltration concentration and IMS/ATP-bioluminescence detection of *Escherichia coli*O157: H7 in recreational water and produce wash [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 87 (3): 338—342.

(责任编辑: 张梅)