

食源性病原微生物快速检测技术应用现状与发展趋势

陈爱亮*

(中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 北京 100081)

摘要: 本文综述了目前国内外食源性病原微生物快速检测技术的种类, 包括传统培养方法的改进、免疫分析法、PCR 方法、DNA 探针法、ATP 荧光法以及生物芯片法等, 介绍了相应产品在我国的应用现状。在此基础上分析了目前食源性病原微生物快速检测技术发展面临的挑战, 讨论了未来的技术与产品发展趋势, 希望对国内食品安全检测技术研发和产业发展有一定的参考意义。

关键词: 食源性病原微生物; 快速检测; 食品安全

Technology application status and development trend of rapid detection of foodborne pathogenic microorganisms

CHEN Ai-Liang*

(Institute of Quality Standards and Testing Technology for Agro-products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

ABSTRACT: The recent development progress of rapid detection technology for foodborne pathogenic microorganisms were reviewed in this paper, including improved culture-based methods, immunoassays, PCR technology, DNA probe, ATP bioluminescence and biochip etc. Current application status in China of these technical products was introduced. To provide a reference to domestic food safety testing technology research and industrial development, the challenges of rapid detection methods of foodborne pathogenic microorganisms were analyzed and the development trends were discussed.

KEY WORDS: foodborne pathogenic microorganism; rapid detection; food safety

食品安全关系国计民生。近年来我国从政府科研院所高校到企业相关研发部门, 都投入了很大的人力物力进行食品安全检测试剂与设备的开发。鉴于我国目前食品安全突出问题主要表现为农兽药残留、非法添加物以及霉菌毒素等化学污染物方面, 我国大部分食品安全企业研发的产品也多集中在这些化学

污染物检测方面, 开发了多种化学污染物的酶联免疫试剂盒、胶体金检测卡、以及基于酶法、光谱法等各种速测仪等产品。而对于食源性病原微生物检测方面, 目前尚未引起足够重视, 从事微生物检测产品开发的企业以及目前市场上可见的微生物检测产品种类都比较少。观察欧美等发达国家食品安全经历的过

基金项目: 国家国际科技合作专项(2012DFA31140)

Fund: Supported by International Science & Technology Cooperation Program of China (2012DFA31140)

*通讯作者: 陈爱亮, 副研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: ailiang.chen@gmail.com

*Corresponding author: CHEN Ai-Liang, Associate Professor, Institute of Quality Standard & Testing Technology for Agro-Products, Chinese Academy of Agricultural Sciences, No.12, Zhongguancun South Street, Beijing 100081, China. E-mail: ailiang.chen@gmail.com

程,从食品安全长远发展来看,农兽药残留以及非法添加物等食品安全问题是国民经济发展到特定阶段必然出现的问题,也会随着国民经济的发展和农业生产方式的转变而弱化。但是致病微生物却将长期存在,并将是国民经济进一步发展后的食品安全的主要问题^[1],目前之所以在我国还没引起足够的重视与我国目前并不完善的监测体系和并不严格的食物中毒上报制度有关^[2]。

一般的食品微生物检验基本流程包括:菌落总数计数、大肠杆菌菌群计数、常见致病菌(单增李斯特氏菌、肠炎弧菌、沙门氏菌、弯曲菌属和致病性大肠菌)检验。传统的检测方法包括增菌培养筛选及后续计数检测、生化反应鉴定或血清学鉴定等环节,这些传统方法技术成熟、准确性高、所需设备简单,仍然是目前食品卫生监管机构的主流检测方法^[3]。然而随着检验要求的提升和检验规模的扩大,传统方法的缺点也日益凸显,如实验操作繁琐,检测周期长,准备和收尾工作繁重、特异性不足、灵敏度低,而且需要专业操作人员等。再加上实际检测中,大部分食品微生物检测的结果为阴性,因此需要一种简单、灵敏、准确、能够现场应用的快速检测方法对大量样本进行筛查,通过去除大部分阴性结果,剩余少许疑似阳性样品再用传统的培养鉴定方法进行确认,从而大大提高食品微生物检验的执行效率。

近年来,食源性病原微生物快速检测技术获得了很大的进展^[4],主要包括两方面,一是在传统微生物培养法基础上的改进,包括使用特定荧光或显色酶底物等进行快速生化鉴定等;二是随着生物技术的进步开发了一系列基于抗体和核酸的快速检测技术。围绕这两大类技术配套开发了自动化检测仪器,进一步提高了食源性病原微生物的检测效率^[4,5]。本文综述了食源性病原微生物快速检测技术应用现状,通过对国内外微生物快速检测技术与产品比较和分析,指出未来微生物快速检测技术的发展趋势,希望对国内食品安全检测技术研发和产业发展有一定的参考意义。

1 食源性病原微生物快速检测技术应用现状

1.1 传统培养鉴定法的改进

为了减少传统微生物培养法的培养时间,提高鉴定效率,近年来不断对传统平板培养与生化鉴定

方法进行改进,目前已经研发了一系列的技术与产品,主要包括以下几类。

1.1.1 显色培养基法

不同致病菌在代谢过程中能够产生的特异性的酶,通过在培养基中加入相应的底物和指示剂,在细菌生长过程中产生荧光或显示一定颜色,利用紫外灯观察细菌产生的荧光或直接观察菌落颜色,可以把检测、计数和鉴定一次完成。这种技术将传统的致病菌分离与生化反应鉴定有机的结合起来,且检测结果直观,因此显色培养基技术正成为目前微生物快速检测的主流技术^[6,7]。检测的酶主要有:糖苷酶、酯酶、脂酶、DNA酶、蛋白酶和磷酸酶^[8]。

法国科玛嘉(CHROMagar)公司是较早开发显色培养基产品并进入中国大陆市场的国外企业,产品主要包括沙门氏菌、单增李斯特菌、大肠杆菌、副溶血性弧菌等常见致病菌^[7,9-11]。美国BD公司也开发了一次性显色培养基平板,用于菌落总数和常见致病菌的检测鉴定,并通过代理公司在国内市场销售。

国内近几年也进行了相关产品的研发。中国检科院下属北京陆桥公司即开发了大肠杆菌及大肠菌群、沙门氏菌、李斯特氏菌、阪崎肠杆菌、蜡样芽孢杆菌等致病菌显色培养基产品。广东省微生物研究所研发了包括大肠杆菌、蜡样芽孢杆菌、单增李斯特菌、副溶血性弧菌、大肠菌群、沙门氏菌等常见食源性致病菌特异性的生化显色培养基,极大地简化了传统食源性致病菌的检测和鉴定方法,使检测所需时间从传统的7~15 d缩短为1~2 d,大幅度缩短样品的检测时间^[12,13]。

1.1.2 载体培养法(干片法)

载体培养法是在显色培养基法基础上进一步发展起来的,又称干片法,其原理是利用无毒的高分子材料作为培养基载体,将特定的培养基和显色物质附着在上面,通过微生物在培养基上面的生长特征和显色反应对微生物进行鉴定。该方法取样与接种同时进行,同时保留了显色培养基法的直观优点,操作简单,分析时间短,而且结果更为准确,已经达到常规定量检测方法的水平。对于有些项目的测定,几乎可以与标准方法相媲美。目前载体培养法在食源性微生物检测中已得到广泛应用,其中滤膜法被广泛应用于生乳、巴氏杀菌乳与奶油的质量管理中。

载体培养法的代表产品当属美国3M公司开发的Petrifilm系列微生物测试片,以检测大肠菌群为

例, Petrifilm 大肠菌群测试片采用可再生的水合物干膜, 由上下两层薄膜组成。上层聚丙烯薄膜含有粘合剂、指示剂及冷水可溶性凝胶; 下层聚乙烯薄膜含有大肠菌群生长所需的 VRB 培养基。大肠菌群在发育时产生琥珀酸脱氢酶, 将上层薄膜中的指示剂还原成红色非溶解性三苯甲, 从而使细菌着色。另外, 测试片表面覆盖的薄膜可留住发酵乳糖的大肠菌群产生的气体。故测试片上红色菌落周围有气泡者, 为大肠菌群。3M 的 Petrifilm 系列测试片目前还包括菌落总数、大肠杆菌与大肠菌群、环境李斯特菌、金黄色葡萄球菌、霉菌酵母等^[14-16]。该方法准确度和精确度高, 可测定微量检品, 无需其他试剂, 操作简便, 易于运输保存, 成本低廉, 非常适用于实验室及现场监测。3M 公司还配套开发了便携式的微生物判读仪, 用于测试片的判读, 降低了工作量, 也减少了可能的操作误差。类似原理产品还包括日本日水 (Nissui) 公司开发的 Compact Dry 系列微生物快速检测片和 BIOCONTROL 的 SimPlate 致病菌快速检测皿等^[17], 都是利用预制培养基和专利的检测片, 提供准确并易于判读的检测结果, 检测时间比传统方法缩短数天。

国内中国检科院下属北京陆桥公司也开发了类似的 Easy Test 微生物测试片系列产品, 包括菌落总数、大肠菌群、金葡菌、大肠杆菌/大肠菌群、酵母/霉菌以及沙门氏菌测试片。该产品适用于 GB/T4789-2008 标准, 检测灵敏度高、特异性强、结果准确, 可在 24~48 h 内完成相关检测。

1.1.3 自动化微生物快速培养与鉴定系统

近年来, 基于传统的微生物培养和生化鉴定的原理, 微生物的检测鉴定技术已逐步由手工检测走向集成化和自动化, 结合配套检测仪和软件分析, 力求简便、快速、准确、灵敏。这些全自动微生物检测系统主要包括增菌培养和生化鉴定两个方面。通过增菌培养, 低至一个细菌或真菌的活细胞即有可能被检测出来, 而对微生物鉴定的方法大都是基于细菌成分或代谢特征来进行的。目前我国尚未有全自动的微生物检测鉴定系统, 市场上产品均为代理销售的国外产品, 主要包括以下几种。

法国生物梅里埃的 Vitek AMS 自动微生物检测系统在国内获得了广泛应用, 其对细菌的鉴定是以每种细菌的微量生化反应为基础, 不同种类的 Vitek 检测卡含有多个生化反应孔, 内含 30 种生化试剂,

可接种细胞纯培养基悬液。通过检测悬液孵育过程中的生化反应变化, 将反应结果与电脑中的数据库进行对比, 从而得出鉴定结果^[18]。该系统是目前世界上最先进、自动化程度最高的细菌鉴定仪器。可鉴别 405 种细菌。它有高度的特异性、敏感性和重复性, 操作简便、检测速度快, 绝大多数细菌的鉴定检测时间在 2~18 h, 如鉴定沙门菌属只需 4 h, 鉴定志贺氏菌属只需 6 h, 鉴定霍乱弧菌等致病性弧菌亦只需 4~13 h。

Soleris 实时光电微生物快速检测系统由检测仪、软件以及配套的检测试剂组成^[19]。Soleris 试剂基于传统的微生物培养理论和染色技术, 在 Soleris 专用试剂瓶中预先放置有特异性的培养基以及区分不同病原微生物的专用指示剂, 加入微生物培养时, 不同微生物代谢产物会改变培养基的 pH 值或产生 CO₂ 等, 从而引起相应指示剂的颜色变化。通过光电检测器检测试剂瓶底部颜色变化, 并利用计算机进行分析统计, 从而得到准确的检测结果^[20-22]。Soleris 实时光电微生物快速检测系统可以大大简化传统的微生物检测方法, 缩短传统微生物检测的时间, 在 6~24 h 内即可得到定量的检测结果^[23]。

德国 RVLM 微生物快速检测系统^[24], 由检测仪、软件以及配套的微生物检测瓶组成, 针对不同的食源性致病菌及细菌总数、霉菌总数等, 根据不同的检测原理包括传统培养皿法、酶法(beta-葡萄糖苷酸酶分析)、免疫法及基因法, 设计了不同的检测瓶, 所有试剂均置于瓶中, 检测时只需将样本加入瓶中即可。根据颜色的变化定性定量对食源性微生物进行检测。而且在瓶盖集成了无菌处理试剂, 检测完后可以通过挤压瓶盖直接对试剂瓶进行无菌处理。以大肠菌群为例: 若菌落数 > 10⁸ CFU/mL, 2 h 内颜色即变成黄色; 若菌落数 < 10² CFU/mL, 14 h 内颜色不会变成黄色; 若菌落不存在, 18 h 后颜色仍保持开始颜色或其他中间色(不变成黄色)。

Milliflex Quantum 微生物快速检测系统, 主要应用了两项技术: 薄膜过滤法和荧光染色技术^[25]。通过利用广泛接受的 Millex 薄膜过滤装置进行样品处理, 保证了结果的一致性和可靠性; 而且通过使用 Milliflex 漏斗进行大体积样品的检测, 也提高了检测灵敏度; 同时, 这一独特的设计保证了所有可能抑制微生物生长的物质能够被冲洗掉。过滤和培养过后, 试剂中的荧光底物在微生物细胞内发生酶解反应并

积累,产生荧光信号,通过专用读数器显示并计数。该系统的特点在于快速检测并计数微生物,但不能对微生物进行鉴定,由于该方法具有非破坏性,因此检测到的微生物可以进一步分离培养,利用常规方法进行鉴定。

Biolumix 实时微生物荧光光电快速检测系统^[26, 27],由检测器、一次性检测管和软件组成,其中检测管上部是包含有各种特异性的培养液和指示剂,底部嵌入透明的 CO₂ 固定传感器。该系统以传统微生物培养理论为基础,将染色技术、荧光探测技术、膜技术以及二氧化碳传感技术相结合,通过监控微生物生长代谢所引发的荧光、光密度、颜色变化以及微生物代谢产生的 CO₂ 变化,可以快速确定样本中细菌总数、大肠菌群/大肠杆菌以及沙门氏菌、金葡菌等致病菌和霉菌酵母菌的存在^[28-30]。

1.2 免疫分析法

免疫分析法的原理是基于抗原抗体的特异性反应对微生物进行鉴定的,发展该方法的前提一般需要制备待检微生物的特异抗体,根据检测模式和检测信号的不同,主要分为酶联免疫试剂盒和胶体金检测卡两类。两种技术都已经非常成熟,由于国内目前关注的重点是农兽药残留、违禁添加物检测等,国内企业已经利用这两种技术开发了多种兽药残留检测试剂盒和胶体金检测卡。相对而言,基于这两种技术开发的微生物检测试剂盒和检测卡产品相对较少。

1.2.1 酶联免疫分析法

ELISA 试剂盒技术比较成熟,只要获得致病微生物特异性抗原抗体便可以开发快速检测 ELISA 试剂盒,微生物检测一般采用夹心模式,因此具有非常好的灵敏度和特异性。

目前进入中国市场的主要国外产品有:美国 BIOCONTROL 公司开发的 Transia 系列,主要包括沙门、李斯特、单增李斯特等;荷兰 Biocheck 酶联免疫 ELISA 试剂盒,能够检测多种致病菌;除此之外还有美国 3M 公司、BIOLINE 公司开发的沙门、单增李斯特等多种致病菌检测试剂盒。

国内则有良润生物公司等开发了大肠 O157:E7、金黄色葡萄球菌、单增李斯特、沙门氏菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲杆菌、乙型溶血链球菌、志贺氏菌、阪崎肠杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌等 ELISA 检测试剂盒。

1.2.2 胶体金检测卡

该技术利用胶体金作为显色信号,以层析膜作为反应载体,将所需试剂都集成到检测纸条或检测卡上,检测时只需加入样品,5~20 min 即可肉眼观察检测结果,因此非常适合现场快速检测。

目前国内市场上的进口产品主要有美国 SDIX Rapid Check 系列产品,检测品种包括沙门、李斯特和大肠杆菌 O157:H7 等,检测时间为 10 min,这种方法需要增菌步骤,增菌后的检测灵敏度可以与 PCR 相当。Merck Millipore 公司的 Singlepath Duopath 系列致病菌胶体金免疫测试片,可以检测沙门、李斯特、大肠 O157:H7、弯曲杆菌、单增李斯特、D 军团菌、蜡样芽孢杆菌等。NH 免疫胶体金层析系列,检测品种包括大肠 O157:H7、O26、O111、沙门、李斯特、结肠弯曲杆菌,同样该方法需要增菌培养 18 h 以上。

国内良润生物公司开发了一系列致病菌胶体金免疫测试卡,主要品种包括大肠 O157、金黄色葡萄球菌、单增李斯特、沙门氏菌、副溶血性弧菌、空肠弯曲杆菌、乙型溶血链球菌、志贺氏菌、阪崎肠杆菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌等。为了提高层析法检测的灵敏度和定量的准确性,军事医学科学院利用上转换荧光染料替代胶体金标记,并和北京热景生物联合开发了基于上转换荧光免疫层析技术的系列致病菌检测卡,主要包括副溶血性弧菌、O157:H7、单增李斯特、沙门等。

1.2.3 全自动免疫荧光酶标仪

法国生物梅里埃公司在 ELISA 试剂盒的基础上研制了一种全自动免疫荧光酶标仪 VIDAS,是集固相吸附、酶联免疫、荧光检测和乳胶凝集诸方法优点于一体的综合性检测系统,可用于检测食品及环境样本中的致病菌,包括沙门氏菌、李斯特菌、单核细胞增生李斯特菌、葡萄球菌肠毒素、大肠埃希菌 O157:H7、弯曲菌等。其原理即是利用夹心 ELISA 方法,将抗体提前包被在固相接受器上,其它试剂固定在试剂条上,形成即用型试剂,插入仪器中,然后由机器分担所有工作,直至打印报告。一般经 48 h 增菌过程后,多数检测可于 50 min 内结束。

1.3 PCR 技术

核酸扩增技术是生物医学领域病原体确认的常用检测技术。与免疫分析方法检测特定的致病微生物的蛋白抗原不同,PCR 法检测的是致病微生物的特定

核酸片段。理论上, PCR 可在两个小时之内把一个单拷贝 DNA 扩增一百万倍, 所以它极高的灵敏度可以消除或大大降低对增菌培养的依赖性。但由于食品中存在的高蛋白、高脂肪、铁类、腐殖质等成分可能抑制 PCR 扩增的效率, 因此目前大部分 PCR 技术检测致病菌的方法仍然需要一个增菌培养的步骤, 但增菌的时间已经比传统方法大为缩短^[31]。PCR 技术已大量运用到食品微生物检测领域^[32, 33], 并建立了相关检测标准, 如 SN/T 1632.2-2005《奶粉中阪崎肠杆菌检验方法第 3 部分: 荧光 PCR 方法》、DIN 10135:1999《沙门氏菌聚合酶连锁反应(PCR)检验方法》、ISO 20837:2006《食品和动物饲料微生物学-聚合酶链反应(PCR)检测食源病原体-定性检测用样品的制备》。根据 PCR 扩增产物的检测方法, 可将目前市场上的利用 PCR 技术进行食源性微生物检测的产品大概分为 5 类。

1.3.1 荧光定量 PCR 技术

荧光定量 PCR 是 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出的一种新型核酸定量试验技术, 它利用荧光染料或荧光标记的特异性探针, 对 PCR 产物进行荧光标记, 通过监测扩增反应的荧光信号, 从而实现在线监控 PCR 扩增反应过程, 通过统计分析和设置标准曲线, 可以初始模板核酸进行定量。与常规 PCR 相比, 荧光定量 PCR 简化了定量的检测过程, 产物无需电泳即可实时观察定量, 反应快速, 灵敏度高^[1, 34]。目前已经在医疗诊断领域获得广泛应用。荧光定量 PCR 技术也相对成熟, 国内外无明显差距, 国内达安基因已经开发了几十种用于临床诊断的荧光定量 PCR 试剂盒, 但是针对食品中致病微生物的荧光定量 PCR 试剂盒, 国内关注较少。

目前国内市场上的国外产品主要有: Biostest 微生物 PCR 检测试剂盒, 主要检测品种包括沙门、单增李斯特、空肠弯曲杆菌、肠出血性大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、结肠炎耶尔森、阪崎杆菌; 美国 BioXL 公司的各种常见致病菌荧光定量 PCR 检测试剂盒; 德国 IFP 公司的沙门、李斯特、大肠 O157、金黄色葡萄球菌、阪崎肠杆菌检测试剂盒。

国内广东微生物所开发了一系列特异性好, 灵敏度高的可应用于畜禽肉、水产品和饮用水中致病菌检测的单重或多重 PCR 检测试剂盒, 检测时间为 7~10 h, 检测限达到 10~100 cfu/mL。

1.3.2 微流控 PCR 芯片/全自动 PCR 分析系统

传统的 PCR 或荧光定量 PCR 技术需要配制试剂、扩增和检测等多个步骤, 样品用量大, 升降温速度慢, 使得检测时间较长。近年来迅速发展的微流控技术或缩微芯片实验室技术极大的促进了微型 PCR 技术的发展^[35]。该技术以微流控芯片为核心, 样品加热冷却速度快, 温度均衡速度快, 样本用量小, 操作简单。而且微流控芯片一般一次性使用, 可避免 PCR 实验之间的污染。目前该技术还在不断的研发完善中, 国内尚无此类产品, 但已有国外产品进入中国市场。

美国 GeneSTAT 便携式快速检测系统即是一款基于微流控芯片 PCR 技术的自动化核酸分析检测系统^[36], 其所有用到的试剂均已固定在微流控芯片中, 样品及试剂仓完全与外界隔离, 通过实时荧光定量 PCR 技术进行检测。它不受任何场地及环境影响, 不需要任何外围支持设备和 PCR 检测前的样本预处理。只需将可疑样本直接放入仪器样品瓶并置入检测模块中, 在 60 min 内即可完成样本处理, PCR 过程及结果输出。该方法还有一个显著的改进就是采用了干式 PCR 试剂, 一方面使得相关芯片耗材可以室温运输, 延长保存期, 同时提高了检测方法的灵敏度, 可检测低至 25~50 拷贝的核酸样品, 免去了前增菌的步骤。类似产品还有加拿大 Lumex 公司生产的实时微芯片 PCR 分析仪 AriaDNA, 由微芯片 PCR 分析仪 AriaDNA 和微芯片(包含固定 PCR 试剂芯片)组成。在完成 DNA/RNA 提取和提纯后, 可在 20 min 完成 PCR 分析。

1.3.3 等温 PCR 技术

近年新发展起来的核酸等温扩增技术^[37], 无需常规 PCR 中的热变性、温度循环、扩增产物电泳以及紫外成像等过程, 无需精确升降温的仪器设备, 只需恒定温度(室温或 37 °C)就能完成扩增, 因此无论是在实际操作还是仪器要求方面, 都比 PCR 技术更为简单方便, 同时该技术与传统的 PCR 相比, 具有更高的灵敏度, 反应采用全封闭式反应体系, 无需进行任何扩增后处理, 避免了产物交叉感染的可能, 因此该技术更适合于开发现场使用的快速检测产品^[38, 39]。目前实现等温扩增的技术原理有多种, 主要包括环介导等温扩增、链替代等温扩增、滚环等温扩增、依赖解旋酶等温扩增、依赖核酸序列等温扩增、单引物等温扩增和核酸快速等温检测放大等检测技术, 其中环介导等温扩增目前已在一定范围内得到

了应用^[40, 41], 其它技术也在不断发展与完善之中。开发此类产品除了技术原理之外, 主要是开发配套的等温扩增装置和检测仪。目前市场上同类产品也主要是进口产品, 国内还没有基于该技术的试剂盒或产品。

国外产品主要包括: 美国 3M MDS100 致病菌快速检测仪, 该系统采用环介导核酸等温扩增技术和生物荧光捕获技术, 通过捕获 DNA 扩增反应过程中产生的 ATP 而发出的生物荧光, 实现自动化检测 DNA 扩增产物, 并以图表和直观检测点两种形式来表示检测结果。利用该检测仪目前开发的微生物检测项目有沙门氏菌, 李斯特菌属, 单增李斯特菌和大肠杆菌 O157 等, 检测灵敏度可以达到 1 cfu/25 g。当然如同其他 PCR 技术一样, 该方法也需要一步前增菌。各个检测项目增菌时间为沙门氏菌 8~18 h, 李斯特菌属 22~48 h, 大肠杆菌 O157 需要 8~18 h。上机检测运行时间: 阳性结果: 10~20 min, 阴性结果: 75 min。英国 OptiGene Limited 公司 Genie II 等温扩增荧光检测系统是一款基于 LAMP 技术的核酸开放检测平台, 结合荧光检测技术, 可用于各类等温扩增反应在分子水平基础上检测细菌、病毒等微生物。该平台配有 LAMP 引物设计软件, 可在 15 min 内通过等温扩增法检测出目标 DNA、RNA 分子。类似产品还有美国 NEOGEN 公司的 ANSR 等温扩增致病菌检测系统, 该方法也需要预增菌步骤, 检测项目主要有沙门氏菌, 李斯特、大肠 O157、非 O157 志贺毒素大肠埃希氏菌等, 其中检测沙门氏菌 10 min 即可完成, 李斯特 18 min。

1.3.4 数字 PCR 技术

数字 PCR 技术堪称 PCR 技术革命性的创新技术^[42, 43]。传统的 PCR 技术包括荧光定量 PCR 技术只能相对定量, 或者依据参照基因所做的标准曲线进行定量。而数字 PCR 技术的出现, 则让你能够直接数出 DNA 分子的个数, 是对起始样品的绝对定量, 使得基于 PCR 技术的食源性微生物的半定量检测真正成为定量检测^[44, 45]。数字 PCR 技术, 是通过一定技术将微量 PCR 扩增样品稀释或分液成大量小的扩增反应体系, 每个体系不超过一个模板分子, 然后将所有样品在相同条件下进行 PCR 扩增。由于只有含有 1 个模板分子的扩增体系才会发生扩增并产生荧光信号, 不含有模板分子的扩增体系不能扩增, 因此通过计数即可以进行初始模板的绝对定量^[46, 47]。

美国 BIO-RAD 公司在收购的 QuantaLife 公司开

发的微滴数字 PCR(ddPCR)技术基础上, 开发了用于微生物核酸检测的 QX100 微滴数字 PCR 仪^[48]。其中的微滴发生器将含有核酸分子的反应体系形成成千上万个纳升级的微滴, 其中每个微滴或不含待检核酸靶分子, 或者含有一个至数个待检核酸靶分子, 且每个微滴都作为一个独立的 PCR 反应器。经 PCR 扩增后, 采用微滴分析仪逐个对每个微滴进行检测, 有荧光信号微滴判读为 1, 没有荧光信号微滴判读为 0, 最终根据泊松分布原理以及阳性微滴的比例, 分析软件可计算给出待检靶分子的浓度或拷贝数。

除 BIO-RAD 公司采用微滴方式数字 PCR 外, 目前还有两类数字 PCR 技术平台。一是 2006 年美国 Fluidigm 公司结合微流体技术、生物技术和微电子等技术推出的 Bio-Mark 高通量基因分析系统。其创新就在于集成液体通路(IFC)技术: 利用集成电路制作工艺(光刻)在硅片或石英玻璃上刻上许多微管和微腔体, 通过不同的控制阀门控制溶液在其中的流动来实现生物样品的分液、混合、PCR 扩增。Bio-Mark 基因分析系统由 Bio-Mark 实时 PCR 系统(整合了高性能计算机)、IFC 微液流芯片(耗材)、IFC Controller(将生物样品、反应试剂导入到 IFC 微液流芯片中)和数据分析软件四部分构成。2010 年 Life Technologies 公司也推出了基于微流体芯片和通道的数字 PCR 平台 -OpenArray 系统。它提供的 TaqMan OpenArray 数字 PCR 试剂盒可在 OpenArray 平板上运行。

1.3.5 全自动 PCR 技术

为了减少 PCR 操作的复杂性, 提高检测的效率, 目前已经开发了基于 PCR 技术的多种全自动 PCR 分析仪。比较知名即是美国杜邦公司开发的 BAX 全自动病原菌检测系统, 该仪器已经被 AOAC、USDA-FSIS、Heakh Canada、AFNOR 等权威机构认可, 可检测沙门氏菌、大肠杆菌 O157、单增李斯特菌等 16 种致病菌^[49-53]。该仪器从增菌到检测完成需要 8~30 h。细菌无需抽提直接加入裂解液加热即可, 而 PCR 试剂则以药片形式预装入 PCR 管中, 根据要检测的细菌选择相应的扩增程序, 最后通过荧光定量 PCR 方法进行检测。值得一提的是杜邦公司是第一个开发出药片化 PCR 试剂的公司。

德国耶拿开发的 Mobilab 微生物现场快速检测系统^[54], 也是一种全自动的现场使用的 PCR 分析系统, 从样本采集、核酸抽提、高速 PCR 扩增到检测

结果显示,全部操作在同一系统平台上完成,样本无需送到实验室进行检验,现场就能快速得到检验结果。原本需要 24~48 h 完成的病原微生物检测,现在缩短到 1 h 即可完成。而且该方法利用高特异性和高灵敏度的薄层层析试纸条检测技术,阴性条带结果一目了然。配套提供沙门氏菌、李斯特菌、大肠杆菌、流感病毒等多种常用的检测试剂盒,也可提供用户的要求定制检测试剂盒。

1.4 DNA 探针技术

核酸探针是指带有标记的特异 DNA 片段。根据碱基互补原则,核酸探针能特异性地与目的 DNA 杂交,最后用特定的方法测定标记物。探针标记方式包括放射性标记、非放射性标记,具有直观、准确等特点^[55]。DNA 探针技术主要针对的是不同的微生物保守的 rRNA 序列,这是因为细菌 rRNA 的高复制量为探针检测提供了一个天然的扩增对象,探针检测 rRNA 也因此具有了比较高的灵敏度^[56-60]。但是 DNA 探针技术并没有像想象的得到普及。只有少数几家公司在积极推广这种用于食品检测的技术。

美国 GENE-TRAK 公司开发的 GENE-TRAK 检测试剂^[61],将 DNA 杂交技术和酶免疫检测技术相结合,设计的 DNA 探针包括两个部分,一部分为荧光素标记的与细菌 rRNA 杂交结合的测定探针,另一部分为多聚 A 组成的捕捉探针,通过与测定仪上的多聚 T 杂交将测定探针与细菌 rRNA 形成的杂交体固定到测定仪上。然后加入过氧化物酶标记的抗荧光素抗体和显色底物进行检测。美国 GEN-PROBE 公司开发的 AccuProbe 检测试剂主要用于细菌纯培养基分离物的鉴定^[62],通过利用化学发光吖啶碱标记的单链探针与 16S rRNA 的特定序列进行杂交,然后水解使未结合的探针失活。随后加入的碱性 H₂O₂ 可以激活标记物使其在 430 nm 处发光,并由发光计定量测定。

美国杜邦 RiboPrinter 微生物鉴定系统^[63, 64],是目前全球唯一自动化的 DNA 指纹仪器,用于鉴定鉴别微生物并给出 DNA 指纹分子信息。其基本原理是基于核糖体分型技术,使用常用限制性内切酶(如 *EcoR* I, *Pvu* II, *Pst* I)消化目标菌 DNA 产生基因片段,该基因片段经电泳分离后转移到硝酸纤维素膜上,与杜邦专门设计的 DNA 探针杂交,该探针包含编码高度保守 16S rRNA 和 23S rRNA 的 DNA 片段及间

隔序列,杂交后化学发光产生信号有相机捕获传至工作站处理,产生“条形码”状条带图像,即 rRNA 基因指纹图,并与数据库比较,从而达到细菌鉴定和分型的目的。该系统可鉴定沙门氏菌、大肠杆菌 O157、单增李斯特菌和阪崎肠杆菌等致病菌在内的 1400 多种细菌。为环境分离物、致病菌、有害生物体、质控菌株等任何细菌建立了一个全自动的基因指纹图库,这一精确到菌株水平的鉴定为政府检测机构、食药企业、医院等进行微生物环境控制和流行病学调查提供了强大的支持。

1.5 ATP 生物荧光法

ATP 是各种生命活动能量的直接来源,存在于所有生物体中,所以通过检测 ATP,可以间接地证明生物体的存在。ATP 生物荧光法是通过荧光素-荧光素酶系统和样品中的 ATP 发生一系列生化反应,最终产生氧化反应导致光的发射,利用高灵敏度的仪器测量光量子的大小(光强度),以定量样品中的 ATP 浓度,即以 ATP 表示生物量或生化活性的大小^[65]。该方法可以在不增菌的情况下,在 5~10 min 内检测出 10⁴ cfu/mL 的细菌。因此 ATP 法比较适用于食品加工过程中的卫生质量监控^[66-68];然而由于所有有生命的生物体都可产生 ATP,所以 ATP 生物荧光法只能用来估算总的细菌数,而不能判定是否有特定细菌或病原菌存在。需要说明的是此法检测的是 ATP 的总量,也就是包括来源于微生物的 ATP 和来源于诸如食品等有机物的游离 ATP。现在已有企业研制开发出了去除游离 ATP 的产品,可以大大提高对来源于微生物的 ATP 的检测灵敏度和特异性。

相对于传统平皿培养法测定细菌总数需要 48 h,测定霉菌、酵母菌等则需要 7 d 而言,采用 ATP 荧光法检测,无需培养过程,最短可在几十秒内完成一个样本的测定,快速提供污染程度的信息。灵敏度可高达 10⁻¹² mol/L 到 10⁻¹⁸ mol/L。该方法检测对象不仅限于微生物,还适合于对食品生产设备或与食品密切接触设备等清洁度的检测、医院手术器械清洁程度的检测等诸多方面^[66-68]。采用此方法操作简单,可使工作量大减,实现简捷化、效率化。

ATP 生物荧光检测仪作为专门用于快速检测微生物数量的测定仪器,简单实用,能快速和方便得到微生物的增长水平,及时采取有效措施控制微生物的繁殖,从而可以有效防治微生物大量繁殖引发的

一系列问题。目前国内外均开发了相关的检测仪器。

国外进入中国市场的主要产品有美国 3M 公司的 MLS II 微生物荧光检测仪, 美国 NEOGEN 公司的 ATP 荧光检测仪, 英国 HY-LiTE 2 System 多功能 ATP 荧光检测仪, 以及美国 Hygiena 便携式荧光仪, 这些检测仪灵敏度一般在 10~15 到 10~16 mol ATP, 其中包括 Hygiena 便携式荧光仪在内的多种 ATP 荧光检测仪提供检测用的 ATP 检测试剂。

国内广东省微生物研究所研制了基于 ATP 发光原理的检测试剂盒与便携式生物发光微生物数量快速检测仪 HKM—NRD(I), 结合滤膜法富集微生物, 可以用于水样中细菌总数的检测

1.6 生物芯片技术

目前用于微生物检测的生物芯片技术主要是基于核酸探针杂交的基因芯片技术^[69, 70], 通过将多种待检微生物的特异性 16S rRNA 基因序列固定到芯片上^[71], 通过增菌和 PCR 扩增制备待检微生物的特异 DNA 序列, 然后与芯片上的探针序列杂交, 最后通过荧光或其他信号方式进行检测确认。因此生物芯片是 PCR 技术与 DNA 探针技术的集成, 虽然其灵敏度与 PCR 技术相当, 但其具有高通量、多参数、高精度和快速分析等特征, 所以备受青睐。我国已将此技术引入到行业标准中来, 如 SN/T1543-2005《食源性致病菌基因芯片鉴定方法》, SN-T2651-2010《肉及肉制品中常见致病微生物检测方法-生物芯片法》等。除了测定核酸的基因芯片外, 生物芯片也包括基于抗原抗体反应的免疫分析蛋白芯片, 可以理解成为 ELISA 法的集成, 可同时检测多种微生物抗原。目前检测核酸的生物芯片技术主要分为 2 类, 一类是基于固相基片的传统基因芯片, 另一类是基于荧光编码微球的液相悬浮芯片。

1.6.1 基因芯片

基因芯片是近年来迅速发展的一门生物高新技术, 它以其能够快速、高效、大规模地同步检测生物遗传信息的卓越功能而得到发展。基因芯片又称微阵列技术, 通过原位合成技术或点样技术在玻片等固相支持物表面固定不同的寡核苷酸探针, 然后将要检测的病原微生物核酸通过 PCR 扩增进行荧光标记后与玻片表面的探针进行杂交, 通过激光共聚焦显微镜扫描, 分析杂交信号即可得到检测样品中的病原微生物种类信息。由于基因芯片可以同时固定成千

上万个探针, 因此利用基因芯片可以一次鉴定多种微生物。

虽然基因芯片在病原微生物检测中具有快速、灵敏、高通量、自动化等特点^[71, 72]。但目前仍面临一些问题有待解决, 表现为所需硬件如微阵列点样仪或寡核苷酸原位合成仪, 激光共聚焦扫描仪等仪器设备较贵; 样品和芯片杂交在固相上进行, 空间因素会对杂交造成不利影响。最重要的一点是, 虽然基因芯片具有高通量的优点, 但是对于食源性微生物检测来讲, 需要同时检测的微生物的种类并不多, 一般几种到几十种而已。因此相对于可同时测定数万个核酸目标的基因芯片来讲, 一方面是芯片的浪费, 一方面是检测微生物成本过高, 从而限制了该技术在食源性致病微生物检测领域的应用。目前国内市场上尚无国外食源性微生物基因芯片检测产品。我国生物芯片北京国家工程研究中心暨博奥生物有限公司开发了系列食源性致病微生物检测试剂盒。其检测原理是利用已有的待检测微生物的基因组序列信息, 特别是更为完整的 16 rRNA 基因序列数据库, 首先分析各种微生物的特异的代表序列, 设计特异性探针, 同时根据侧翼的共同序列部分设计通用引物, 并首先在引物的 5' 端标记荧光, 这样在 PCR 过程中即可使扩增产物标记荧光分子。标记完成后的 PCR 产物变性后与芯片上相匹配的探针序列发生杂交, 经芯片扫描得出荧光信号, 从而鉴定样品中存在的微生物。该方法需要事先增菌培养 12 h, DNA 提取需要 2 h, PCR 扩增 4 h, 然后是杂交和结果判读 3 h。该基因芯片可同时并行检测金黄色葡萄球菌、霍乱弧菌、大肠杆菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特氏菌、沙门氏菌、乙型溶血性链球菌、副溶血弧菌、空肠弯曲杆菌、阪崎肠杆菌等等, 适合大样品量筛查, 灵敏度较高, 可有效检出低至 0.5 ng 致病菌 DNA, 检测速度快: 整个检测过程可在 18 h 内完成, 大大优于传统检测方法。

1.6.2 悬浮芯片

悬浮芯片又称液相芯片, 是 1997 年美国 Luminex 公司开发研制的多功能生物芯片分析平台, 也是唯一被美国食品与药物管理局(FDA)批准用于临床诊断的新型生物芯片产品, 因液相芯片中所有的反应都是在悬浮于液相中的微球表面上进行而得名^[73]。与固相芯片技术不同, 悬浮芯片的核心技术是其利用两种荧光进行编码的微球, 直径在 5~7 μm,

表面可以结合核酸、蛋白等各种生物分子, 再进行核酸杂交或抗原抗体反应后, 微球快速排成单列通过检测通道。通过分析微球的荧光编码确定微球固定探针的种类, 而通过第三种荧光信号确定微球上结合生物靶分子的多少, 从而可以快速的进行高通量分析。

与传统的固相基因芯片相比, 悬浮芯片技术首先克服了传统的固相杂交的缺点, 试剂在液相中反应, 大大提高了杂交效率。同时, 可以根据检测指标需求, 自由组合检测微球种类, 建立灵活多样的悬浮芯片检测系统, 大大降低了检测成本。正是由于液相芯片这些优点, 该技术已被广泛用于临床诊断领域^[74-77]。在食源性微生物检测方面, 国外也已经开发了例如沙门氏菌检测方面的试剂盒, 用于饲料中的沙门氏菌检测。国内关于该技术的研究主要集中于临床诊断领域和农兽药残留、转基因检测等食品安全领域, 关于利用该技术进行食源性微生物的检测也已经受到关注并开始研究^[78]。

2 食源性微生物快速检测技术面临的挑战及发展方向

2.1 食源性微生物快速检测技术面临的挑战

食源性微生物的快速检测, 甚至是传统检测都比临床上微生物检测诊断面临更多的挑战。这很大程度上是由食品检测本身的性质和要求所决定的。这些挑战主要表现在以下几个方面。

2.1.1 食品的基质复杂性

食品可由多种成分构成, 包括蛋白质、脂肪、碳水化合物、防腐剂以及其他化学成分等, 其物理状态也表现为多种多样, 包括粉末、液态、固体、凝胶等, 食品基质的这种异质性使得食物中的细菌可能呈不规则分布, 从而使得食品检测更为复杂。另外, 某些食物本身就含有较高含量的正常微生物, 这些微生物对健康没有明显的危害, 但是这些正常微生物的存在会干扰相对数量较少的致病菌的分离和确认, 而有些致病菌仅需少量的数量就可以致病, 如志贺氏菌和大肠杆菌 O157 等。同时食品生产中的加工处理方法如加热、冷却、干燥、冷冻、添加化学品以及其他因素可能会对致病菌造成损伤, 损伤后的细菌对增菌培养中的许多成分和抗生素比较敏感, 所以除非受损伤后的细菌可以复活, 否则更容易被标本

中的正常菌群的生长所掩盖^[79]。为了解决这些问题, 传统的微生物检测需要经常更换检测方法或采取分步富集培养的方法, 即先用非选择性富集培养基使所有病原体得到生长而正常微生物受到抑制, 然后再接种至选择性或鉴别培养基中进行鉴定。同时, 食品基质对检测方法的效果具有很大的影响, 很多情况下, 对一种食品基质实用的快速检测方法未必对另一种适用。如利用 PCR 技术检测, 食物中的高蛋白、高脂肪对 *Taq* 酶具有抑制作用, 可能导致检测结果假阴性。同时 PCR 操作过程要求严格, 微量的外源性 DNA 进入 PCR 后可以引起无限放大产生假阳性结果。

因此, 在开发食源性微生物快速检测技术时, 为了保证检测的准确性, 要根据不同食品基质选择可行的快速检测技术, 同时又要根据不同的检测技术, 设计简单可行的样品处理方法, 保证要检测的致病菌能够顺利检测到, 同时没有干扰检测的其他成分引入。

2.1.2 增菌培养步骤

虽然有如此多样的微生物快速检测方法, 而且检测时间从几分钟到几小时就可以完成, 但除了检测细菌总数的 ATP 荧光法外, 几乎所有的方法都还要用到前增菌步骤, 这种对增菌培养的依赖延长了检测的时间, 从而使得快速检测并不“快”。因此开发无需增菌步骤即能够检测食品中少量致病菌的方法就显得异常突出和重要。这一方面依赖于高灵敏抗干扰方法的创新研究, 一方面也依赖于对食品基质中少量致病菌分离和富集。从这一点来讲, 目前的各种快速检测对增菌培养的依赖也表现在这两方面, 一是通过增菌培养对致病菌起到了一个富集的作用, 同时去掉了其他微生物、死亡细胞和亚致死细胞等影响; 二是通过增菌培养的步骤也去掉食品中大量的可能对检测方法有干扰作用的基质。

2.1.3 DNA 检测的局限性

由于传统的培养法需要几天的时间才能确认, 因此基于 DNA 分析的快速检测方法正逐渐成为微生物的主流检测方法。但是利用 DNA 检测微生物有一定的局限性。第一, 经过食物加工已经死亡的细菌或亚致死细菌, 其 DNA 仍可能存在并被检测到, 但这并不表明一定有活的致病微生物在; 第二, 有些致病菌引起的食物中毒是由于摄取了细菌产生的毒素所造成的, 因此针对毒素基因的 DNA 探针或 PCR 方法

得到的阳性结果也只表示带有这些基因序列的致病微生物存在,存在潜在产毒可能性,但并不代表一定有活的细胞存在、或基因已被表达、或已经产生了毒素^[80]。另外基因突变或其他因素也可能致使携带了基因序列的细菌无法表达。当然由于快速检测方法一般是作为筛选方法来实际使用的,相对而言,假阳性的问题影响并不大,因为筛选出的少许疑似样品还需要利用传统的增菌培养生化鉴定等方法进一步确认。

2.2 食源性微生物快速检测技术发展方向

虽然已经发展了诸多的食源性微生物快速检测方法,这些方法都有各自的优点和缺点,每种方法都有自己适用的对象和环境。但是如同上面所说,这些方法仍然面临食品本身性质与检测要求的挑战,因此,为了保障食源性微生物安全,未来还应该加大对食源性微生物快速检测技术研究,开发更准确、更快速、更简单的食源性微生物快速检测技术与产品。

2.2.1 致病菌分离富集方法研究

为了克服食品基质不同成分对检测方法可能的干扰作用,以及对于少量的致病菌进行富集,达到可供检测的灵敏度,从而可以避免前增菌步骤,真正实现食源性微生物的快速检测。免疫磁珠技术(immunomagnetic separation, IMS)整合了免疫反应的高度特异性和磁性分离快速、简单的优点,可以在复杂的食品基质中达到快速富集致病微生物细胞,同时消除干扰物质的目的,已被广泛用于细胞的分离提纯、体外扩增、微生物检测等方面,因此与其他快速灵敏的微生物检测技术相结合,有望可以省去前增菌步骤^[81-83]。除了免疫磁珠技术以外,膜过滤法也可以达到去除干扰物质,富集待检微生物的目的,而且操作起来更为简单。如果向在膜上富集的微生物加入裂解液使DNA直接吸附在膜上,然后直接进行扩增,则会进一步简化检测方法。

2.2.2 多重检测技术研究

食物中常见的致病微生物有多种,最常见的包括大肠杆菌O157、李斯特氏菌和沙门氏菌等。因此对于食源性微生物检测来说,多重检测就显得尤为重要。目前的大多数快速检测方法中,除去细菌总数检测和生物芯片技术,大部分都是单指标检测,也即一次只检测一种致病菌,多种致病菌需要不同的试剂和方法去检测。生物芯片虽然能够进行多重检测,

但是对于生物芯片所依据的原理,也即PCR扩增和探针杂交反应而言,随着检测细菌种类的增多,设计多重PCR技术也越来越难,因为不同的致病菌的引物序列不同,满足最佳扩增效率的扩增条件也不同,在一个体系中很难兼顾所有致病菌的扩增效率。同时检测的致病菌种类越多,设计的引物和探针也就越多,那么在扩增以及后面的杂交时,发生非特异性反应的可能性也就越高,容易引起检测误差。而如果不能进行多重PCR,那么也就是失去多重检测的意义,因为还需要为每种致病菌设计一个PCR扩增体系。因此生物芯片技术尤其是其中的悬浮芯片技术,可能会在食源性微生物多重检测中发挥重要的作用,因为悬浮芯片技术的通量不是特别高,一般几种到几十种,相对容易设计不同致病菌的引物和探针,并在一个体系内完成扩增和杂交,相对于传统的固相芯片,悬浮芯片具有不可比拟的成本优势和指标灵活检测优势。

2.2.3 定量检测

目前的微生物快速检测方法中,能够绝对定量的方法不快速,快速的方法多是相对定量或半定量,而微生物定量快速检测对于执行食品微生物限量标准、对食品中的致病微生物进行风险评估更具有实际的意义。因此仍需加大致病微生物快速定量检测方法开发。目前用来对微生物定量的方法主要是显色培养基和载片法,虽然该方法可以容易定量致病微生物,但是操作时间太长。因此可以考虑把该技术与免疫磁珠分离技术、膜过滤技术以及最近发展起来的数字PCR技术相结合,开发一种真正快速的致病微生物快速定量检测方法。

2.2.4 快速检测方法的评估和认证

目前针对食源性致病微生物的快速检测方法越来越多,例如针对沙门氏菌、大肠杆菌O157等的各种商品试剂盒多达几十种,这么多的方法对于使用者未必是好事,因为他们可能不知道该选择哪种。而且不同方法具有不同的灵敏度,针对同一检测样品可能就会有截然不同的检测结果,例如目前方便食品对沙门氏菌的检测标准是“零检出或不存在”,随着检测方法的改进和灵敏度的提高,原来的“零检出或不存在”可能会成为“检出”,这对食品行业和食品卫生检测机构提出了新的问题。因此开展微生物快速检测方法的有效性评估,对实际检测中所用的快速检测方法进行认证就显得非常重要。对于临床微生物

诊断方法一般都会各个国家的 FDA 进行批准和认证, 而食源性致病微生物检测方法的认证, 目前最广泛也是公认程度最高的是国际组织 AOAC, 通过 AOAC 认证的方法一般都被视为是“权威或标准”的方法, 当然目前很多商品化的食源性微生物检测方法也都参考了 AOAC 已经认证的方法, 很多商品化的检测试剂盒通过了 AOAC 的认证。但是作为负责食品卫生质检的政府相关单位, 仍需要进一步强化食源性微生物快速检测方法及试剂盒的评估认证和管理工作, 并根据检测技术发展以及食品安全需要, 不断调整相关的检测方法, 从而保证食品安全和食品行业的可持续发展。

参考文献

- [1] Tzschoppe M, Martin A, Beutin L. A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables [J]. *Int J Food Microbiol*, 2012, 152(1-2): 19-30.
- [2] Lam HM, Remais J, Fung, MC, *et al.* Food supply and food safety issues in China [J]. *Lancet*, 2013, 381(9882): 2044-2053.
- [3] Swaminathan B, Feng P. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1994, 48: 401-426.
- [4] 王伟华, 张新武, 周靖波, 等. 食源性微生物快速检测研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2010, 27(4): 182-188.
Wang WH, Zhang XW, Zhou JB, *et al.* Research progress on fast detection methods of foodborne pathogenic microbe [J]. *J Food Safe Qual*, 2010, 27(4): 182-188.
- [5] 吴泉铸, 陈丽叶, 赵超, 等. 食源性病原微生物生物传感器的快速检测方法及其进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2013(3): 835-840.
Wu XQ, Chen LY, Zhao C, *et al.* Research progress on rapid detection methods of biosensors for foodborne pathogenic microorganism [J]. *J Food Safe Qual*, 2013(3): 835-840.
- [6] Teramura H, Sekiguchi J, Inoue K. A novel chromogenic screening medium for isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* [J]. *Biocontrol Sci*, 2013, 18(2): 111-115.
- [7] Webb K, Ritter V. CHROMagar *Salmonella* Detection Test Kit. Performance Tested Method 020502 [J]. *J AOAC Int*, 2009, 92(6): 1906-1909.
- [8] 张淑红, 吴清平, 张菊梅, 等. 显色培养基在几种食源性致病菌快速检测中的应用[J]. *微生物学通报*, 2006, 33(6): 108-111.
Zhang SH, Wu QP, Zhang JM, *et al.* Application of chromogenic media in some food-borne pathogenic bacterial rapid detection [J]. *Microbiol*, 2006, 33(6): 108-111.
- [9] Ritter V, Kircher S, Sturm K, *et al.* Evaluation of BD BBL CHROMagar *Staph aureus* medium using AOAC and ISO culture methods. Performance tested method 100503 [J]. *J AOAC Int*, 2009, 92(5): 1432-1453.
- [10] Ritter V, Kircher S, Dick N. USDA FSIS, FDA BAM, and ISO culture methods BD BBL CHROMagar O157 media [J]. *J AOAC Int*, 2009, 92(4): 1118-1127.
- [11] Ritter V, Kircher S, Sturm K, *et al.* USDA FSIS, FDA BAM, AOAC, and ISO culture methods BD BBL CHROMagar *Listeria Media* [J]. *J AOAC Int*, 2009, 92(4): 1105-1117.
- [12] 吴清平, 韦献虎, 张菊梅, 等. 吡啶酚显色底物的合成及其在微生物检测中的应用研究进展[J]. *化学通报*, 2013, 76(7): 580-589.
Wu QP, Wei XH, Zhang JM, *et al.* Research progress of syntheses and applications in detecting microorganisms of indoxyl chromogenic substrates [J]. *Chemistry*, 2013, 76(7): 580-589.
- [13] 吴清平, 周艳红, 蔡芷荷. 卫生微生物特异性显色培养基的研究与应用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(1): 124-126.
Wu QP, Zhou YH, Cai ZH. Application and research of chromogenic culture media in detection and identification of sanitary microorganisms [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2005, 15(1): 124-126.
- [14] Benesh DL, Crowley ES, Bird PM. 3M Petrifilm Environmental *Listeria* Plate [J]. *J AOAC Int*, 2013, 96(2): 225-228.
- [15] de Sousa GB, Tamagnini LM, Gonzalez RD, *et al.* Evaluation of Petrifilm method for enumerating aerobic bacteria in Crottin goat cheese [J]. *Rev Argent Microbiol*, 2005, 37(4): 214-216.
- [16] Silva BO, Caraviello DZ, Rodrigues AC, *et al.* Evaluation of Petrifilm for the isolation of *Staphylococcus aureus* from milk samples [J]. *J Dairy Sci*, 2005, 88(8): 3000-3008.
- [17] Kodaka H, Goto K, Umeki K, *et al.* Comparative evaluation of the Desoxycholate Agar Nissui Food Stamp and swab methods for estimating coliform organisms in poultry processing plants after cleaning in Japan [J]. *J Basic Microbiol*, 2004, 44(6): 445-450.
- [18] Hou HM, Ding J, Zhang GL, *et al.* Bacterial flora in turbot *Scophthalmus maximus* cultured in deepwell seawater of Liaodong Peninsula [J]. *J Aquatic Food Prod Technol*, 2013(accepted).
- [19] http://www.neogen.com/FoodSafety/S_Index.html.
- [20] Mozola M, Gray RL, Feldpausch J, *et al.* Validation of the Soleris NF-TVC method for determination of total viable count in a variety of foods [J]. *J AOAC Int*, 2013, 96(2): 399-403.
- [21] Foti D, Romano L, Alles S, *et al.* Validation of the Soleris *E. coli* method for detection and semi-quantitative determination of

- Escherichia coli in foods [J]. J AOAC Int, 2012, 95(3): 786–794.
- [22] Alles S, Shrestha N, Ellsworth A, *et al.* Validation of the Soteris yeast and mold test for semiquantitative determination of yeast and mold in selected foods [J]. Performance tested methods 040901 [J]. J AOAC Int, 2009, 92(5): 1396–1415.
- [23] 于宝军. Soteris 实时光电微生物快速检测系统[J]. 食品安全导刊, 2010(9): 41–42.
- Yu BJ. Soteris–Real–time System in Rapid Detection of Microbiology [J]. China Food Safe, 2010(9): 41–42.
- [24] <http://www.royalbiotech.com/royal-vial-lab-mutireader.html>.
- [25] Meder H, Baumstummeler A, Chollet R, *et al.* Fluorescence–based rapid detection of microbiological contaminants in water samples [J]. Sci World J, 2012.
- [26] 上海美凯纯生物科技有限公司. 利用 BioLumix 微生物荧光光电检测系统快速检测蜡样芽胞杆菌[J]. 食品安全导刊, 2011(9): 30–31.
- Shanghai microtrend biotech co., ltd. Application of BioLumix fluorescent photoelectric detection system for rapid detection of bacillus cereus [J]. China Food Safe, 2011(9): 30–31.
- [27] <http://www.mybiolumix.com/>.
- [28] Brideau R. Rapid Detection of Pseudomonads in Dairy Products and Process Water [C]. 2013 Annual Meeting of International Association for Food Protection, July 28–31, 2013.
- [29] 原铨. 酸奶制品中的霉菌酵母菌快速自动化检测应用[C]. 第五届中国北京国际食品安全高峰论坛论文集, 2012: 189–191.
- Yuan Q. Fast automatic detection of mould and yeast in the yogurt products [C]. The Fifth China Beijing Int Food Safe Peak Forum, 2012: 189–191.
- [30] 袁莉红, 原铨. 牛奶中细菌总数快速检测方法的建立及初步应用[C]. 第四届中国北京国际食品安全高峰论坛论文集, 2011: 238–240.
- Yuan LH, Yuan Q. Development of total bacterial count detection method in milk [C]. The Fourth China Beijing Int Food Safe Peak Forum, 2011: 238–240.
- [31] Canizalez–Roman A, Flores–Villasenor H, Zazueta–Beltra JN, *et al.* Comparative evaluation of a chromogenic agar medium–PCR protocol with a conventional method for isolation of Vibrio parahaemolyticus strains from environmental and clinical samples [J]. Can J Microbiol, 2011, 57(2): 136–142.
- [32] Hill WE, Suhaim R, Richter HC, *et al.* Polymerase chain reaction screening for Salmonella and enterohemorrhagic Escherichia coli on beef products in processing establishments [J]. Foodborne Pathog Dis, 2011, 8(9): 1045–1053.
- [33] Surendraraj A, Thampuran N, Joseph TC. Molecular screening, isolation, and characterization of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 from retail shrimp [J]. J Food Prot, 2010, 73(1): 97–103.
- [34] Kumar R, Surendran PK, Thampuran N. Rapid quantification of Salmonella in seafood by real–time PCR assay [J]. J Microbiol Biotechnol, 2010, 20(3): 569–573.
- [35] Yoon JY, Kim B. Lab–on–a–chip pathogen sensors for food safety [J]. Sensors (Basel), 2012, 12(8): 10713–41.
- [36] <http://www.dxna.com/>.
- [37] Craw P, Balachandran W. Isothermal nucleic acid amplification technologies for point–of–care diagnostics: a critical review [J]. Lab Chip, 2012, 12(14): 2469–2486.
- [38] Asiello PJ, AJ Baeumner. Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review [J]. Lab Chip, 2011, 11(8): 1420–1430.
- [39] 马丽敏, 卢亦愚. 核酸等温扩增技术研究进展[J]. 浙江预防医学, 2013, 25(1): 24–27.
- Ma LM, Lu YU. Research progress of nucleic acid Isothermal amplification [J]. Zhejiang J Prev Med, 2013, 25(1): 24–27.
- [40] Yamazaki W, Kumeda Y, Uemura R, *et al.* Evaluation of a loop–mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of Vibrio parahaemolyticus in naturally contaminated seafood samples [J]. Food Microbiol, 2011, 28(6): 1238–1241.
- [41] Niessen L, Luo J, Denschlag C, *et al.* The application of loop–mediated isothermal amplification (LAMP) in food testing for bacterial pathogens and fungal contaminants [J]. Food Microbiol, 2013, 36(2): 191–206.
- [42] Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, *et al.* High–throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number [J]. Anal Chem, 2011, 83(22): 8604–8610.
- [43] Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, *et al.* Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification [J]. Anal Chem, 2012, 84(2): 1003–1011.
- [44] Hayden RT, Gu Z, Ingersoll J, *et al.* Comparison of droplet digital PCR to real–time PCR for quantitative detection of cytomegalovirus [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(2): 540–546.
- [45] 朱强远, 杨文秀, 高一博, 等. 一种可绝对定量核酸的数字 PCR 微流控芯片[J]. 高等学校化学学报, 2013, 34(3): 545–550.
- Zhu QY, Yang WX, Gao YB, *et al.* Microfluidic digital chip for absolute quantification of nucleic acid amplification [J]. Chem J Chin Univ, 2013, 34(3): 545–550.
- [46] Morisset D, Stebih D, Milavec M, *et al.* Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR [J]. PLoS One, 2013, 8(5): e62583.
- [47] Roberts CH, Last A, Molina–Gonzalez S, *et al.* Development and evaluation of a next–generation digital PCR diagnostic assay for ocular Chlamydia trachomatis infections [J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(7): 2195–2203.

- [48] Kelley K, Cosman A, Belgrader P, *et al.* Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a duplex droplet digital PCR assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2013, 51(7): 2033–2039.
- [49] Ganz K, Gill A. Inhibition of polymerase chain reaction for the detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on walnut kernels [J]. *Food Microbiol*, 2013, 35(1): 15–20.
- [50] Wallace FM, Burns F, Fleck L, *et al.* Evaluation of DuPont Qualicon Bax System PCR assay for yeast and mold [J]. *J AOAC Int*, 2010, 93(3): 928–935.
- [51] Silbernagel K, Jechorek R, Barbour WM, *et al.* Evaluation of the BAX system for detection of *Listeria monocytogenes* in foods: collaborative study [J]. *J AOAC Int*, 2004, 87(2): 395–410.
- [52] Silbernagel K, Jechorek R, Carver C, *et al.* Evaluation of the BAX system for detection of *Salmonella* in selected foods: collaborative study [J]. *J AOAC Int*, 2003, 86(6): 1149–1159.
- [53] Strapp CM, Shearer AE, Joerger RD. Survey of retail alfalfa sprouts and mushrooms for the presence of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria* with BAX, and evaluation of this polymerase chain reaction-based system with experimentally contaminated samples [J]. *J Food Prot*, 2003, 66(2): 182–187.
- [54] <http://www.analytik-jena.de/en/life-science/products/cat/cat/detection-systems-for-food-pathogens.html>.
- [55] 何宏艳. 核酸杂交技术在食品微生物检验中的应用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(6): 767–768.
- He HY. Application of nucleic acid hybridization technology in food-borne microbe detection [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2005, 15(6): 767–768.
- [56] Liu CC, Yeung CY, Chen PH, *et al.* *Salmonella* detection using 16S ribosomal DNA/RNA probe-gold nanoparticles and lateral flow immunoassay [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 2526–2532.
- [57] Oyarzabal OA, Behnke NM, Mozola MA. Validation of a microwell DNA probe assay for detection of *Listeria* spp. in foods Performance-tested method 010403 [J]. *J AOAC Int*, 2006, 89(3): 651–668.
- [58] Duvall RE, Eklund M, Tran TT, *et al.* Improved DNA probe detection of *Listeria monocytogenes* in enrichment culture after physical-chemical fractionation [J]. *J AOAC Int*, 2006, 89(1): 172–179.
- [59] Ingianni A, Floris M, Palomba P, *et al.* Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in foods, by a combination of PCR and DNA probe [J]. *Mol Cell Probes*, 2001, 15(5): 275–280.
- [60] O'Connor L, Joy J, Kane M, *et al.* Rapid polymerase chain reaction/DNA probe membrane-based assay for the detection of *Listeria* and *Listeria monocytogenes* in food [J]. *J Food Prot*, 2000, 63(3): 337–342.
- [61] Stewart DS, Reineke KF, Tortorello ML. Comparison of assurance gold salmonella EIA, BAX for screening/*Salmonella*, and GENE-TRAK *Salmonella* DLP rapid assays for detection of *Salmonella* in alfalfa sprouts and sprout irrigation water [J]. *J AOAC Int*, 2002, 85(2): 395–403.
- [62] Beumer RR, te Giffel MC, Kok MT, *et al.* Confirmation and identification of *Listeria* spp [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1996, 22(6): 448–452.
- [63] Kennett CA, Stark B. Automated ribotyping for the identification and characterization of foodborne clostridia [J]. *J Food Prot*, 2006, 69(12): 2970–2975.
- [64] Pettipher GL, Osmundson ME, Murphy JM. Methods for the detection and enumeration of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and investigation of growth and production of taint in fruit juice and fruit juice-containing drinks [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1997, 24(3): 185–189.
- [65] 李利霞, 常超, 伍金娥. ATP 生物荧光法及其应用的研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2010(9): 394–397.
- Li LX, Chang C, Wu JE. Research progress in the ATP bioluminescence assay and its applications [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2010(9): 394–397.
- [66] Whitehead KA, Smith LA, Verran J. The detection of food soils and cells on stainless steel using industrial methods: UV illumination and ATP bioluminescence [J]. *Int J Food Microbiol*, 2008, 127(1–2): 121–128.
- [67] Oulahal-Lagsir N, Martial-Gros A, Bonneau M, *et al.* Ultrasonic methodology coupled to ATP bioluminescence for the non-invasive detection of fouling in food processing equipment—validation and application to a dairy factory [J]. *J Appl Microbiol*, 2000, 89(3): 433–441.
- [68] Corbitt AJ, Bennion N, Forsythe SJ. Adenylate kinase amplification of ATP bioluminescence for hygiene monitoring in the food and beverage industry [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2000, 30(6): 443–447.
- [69] Rasooly A, Herold KE. Food microbial pathogen detection and analysis using DNA microarray technologies [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2008, 5(4): 531–550.
- [70] Kostic T, Stessl B, Wagner M, *et al.* Microbial diagnostic microarray for food- and water-borne pathogens [J]. *Microb Biotechnol*, 2010, 3(4): 444–454.
- [71] Wang XW, Zhang L, Jin LQ, *et al.* Development and application of an oligonucleotide microarray for the detection of food-borne bacterial pathogens [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 76(1): 225–233.
- [72] Kostrzynska M, Bachand A. Application of DNA microarray technology for detection, identification, and characterization of food-borne pathogens [J]. *Can J Microbiol*, 2006, 52(1): 1–8.

- [73] Dunbar SA. Applications of Luminex xMAP technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection [J]. *Clin Chim Acta*, 2006, 363(1-2): 71-82.
- [74] Landlinger C, Preuner S, Willinger B, *et al.* Species-specific identification of a wide range of clinically relevant fungal pathogens by use of Luminex xMAP technology [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(4): 1063-1073.
- [75] Schweighardt AJ, Battaglia A, Wallace MM. Detection of Anthrax and Other Pathogens Using a Unique Liquid Array Technology [J]. *J Forensic Sci*, 2013.
- [76] Jobs M, Eriksson R, Blomberg J. Quantitative and multiplex detection of pathogenic fungi using padlock probes, generic qPCR, and suspension array readout [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 968: 105-118.
- [77] Liu J, Gratz J, Maro A, *et al.* Simultaneous detection of six diarrhea-causing bacterial pathogens with an in-house PCR-luminex assay [J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(1): 98-103.
- [78] 孙智勇. 食源性致病菌高通量悬浮芯片检测技术研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2012.
Sun ZY. High-throughput suspension array for detecting foodborne pathogens [D]. Beijing: Academy of Military Medical Science, 2012.
- [79] Lee HY, Chai LC, Pui CF, *et al.* Profiling of recovery efficiencies for three standard protocols (FDA-BAM, ISO-11290, and modified USDA) on temperature-injured *Listeria monocytogenes* [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2011, 21(9): 954-959.
- [80] Rall VL, Sforzin JM, MF de Deus, *et al.* Polymerase chain reaction detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from Brazilian Minas cheese [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2010, 7(9): 1121-1123.
- [81] Kannan P, Yong HY, Reiman L, *et al.* Bacteriophage-based rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157:H7 isolates from ground beef [J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2010, 7(12): 1551-1558.
- [82] Yoshitomi KJ, Jinneman KC, Zapata R, *et al.* Detection and isolation of low levels of *E. coli* O157:H7 in cilantro by real-time PCR, immunomagnetic separation, and cultural methods with and without an acid treatment [J]. *J Food Sci*, 2012, 77(8): M481-489.
- [83] 余楠, 车小燕. 免疫磁珠技术在病原微生物检测中的应用前景[J]. *中华检验医学杂志*, 2011, 34(3): 280-283.
Yu N, Che XY. Application prospect of immunomagnetic separation in the detection of pathogenic microorganism [J]. *Chinese J Lab Med*, 2011, 34(3): 280-283.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介

陈爱亮, 博士, 副研究员, 主要研究方向为食品质量安全快速检测技术。
E-mail: ailiang.chen@gmail.com