

仪器法在菌落总数推测及食源性致病菌检测 鉴定中的研究进展

郭琦, 赖卫华*, 山珊

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 南昌 330047)

摘要: 食源性致病菌引发疾患的发病率居各类疾病总发病率的前列, 在我国和其他国家, 食源性致病菌带来的疾病都是引起公众危害的主要因素, 是当前世界上最突出的卫生问题。快速有效的食源性致病菌检测鉴定技术是食源性疾病预防与控制的关键。另外, 菌落总数作为评定食品被污染程度的标志, 具有重要的卫生学意义。与传统的方法相比, 仪器法检测鉴定速度快、结果准确, 可以避免人为判读带来的误差, 因而得到了广泛的应用。本文对菌落总数推测及食源性致病菌检测鉴定的各类仪器的原理、特点以及应用进展进行了综述, 并展望了仪器法在菌落总数推测和食源性致病菌检测鉴定中的研究方向。

关键词: 食源性致病菌; 菌落总数; 仪器法

Development of instrumental method for inference of total number of colonies and identification foodborne pathogens

GUO Qi, LAI Wei-Hua*, SHAN Shan

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

ABSTRACT: The incidence of food-borne diseases caused by foodborne pathogen is in the forefront of the total incidence of various diseases. In our country and other countries, the diseases caused by foodborne pathogens are the main factor leading to the risk to the general public, which are the most prominent hygienic problems in the world. Rapid and effective detection and identification of food-borne pathogen is the key to prevent and control foodborne diseases. In addition, the total number of colonies, as a target for extent of contamination in food, is very important in sanitation. Instrument methods have been widely used owing to their speed and accurate test results and avoiding errors caused by human judgment compared with traditional methods. This paper reviewed the principles, characteristics and application about the inference of total number of colonies and identification food-borne pathogens by instrument methods, and the research direction of instrument methods have been summarized in the inference of total number of colonies and identification foodborne pathogens.

基金项目: 南昌大学食品科学与技术国家重点实验室自由探索课题(SKLF-ZZB-201307)、南昌市科学技术局党外专家博士产学研合作专项(2012-CYH-DW-SP-001)

Fund: Supported by the Free Explore Issue of State Key Laboratory of Food Science and Technology of Nanchang University (SKLF-ZZB-201307), Dr. Science and Technology Bureau of Nanchang Non-Party Experts and Research Cooperation Projects (2012-CYH-DW-SP-001)

*通讯作者: 赖卫华, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品质量安全。E-mail: talktolaiwh@163.com

*Corresponding author: LAI Wei-Hua, Professor, State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China. E-mail: talktolaiwh@163.com

KEY WORDS: foodborne pathogens; total number of colonies; instrumental methods

1 引言

微生物污染引起的食源性疾病是最突出的食品安全问题^[1]。食源性致病菌感染源大多为肉制品、水产制品、蛋制品、乳制品,果蔬等。其中常见的食源性致病菌有沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157:H7、单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌和志贺氏菌等^[2]。另外,菌落总数作为评定食品被污染程度的标志,具有重要的卫生学意义。2014年美国疾病预防控制中心统计,每年大约有六分之一的美国人受食源性致病菌感染而影响身体健康^[3]。世界卫生组织统计,在英国每年约有一百万人受食源性致病菌影响^[4]。我国也面临着同样的问题,这严重影响了食品工业的发展和消费者对食品行业的信心^[5]。因此,控制食品污染,减少食源性疾病,保障消费者健康,是食品安全工作者的首要任务^[6]。

传统的微生物检验方法根据微生物不同的生理生化特性对其进行鉴定,包括增菌培养、分离培养、生化试验、血清学试验等。传统的微生物检测方法是微生物鉴定和仲裁结果判定的金标准,但是其检测时间较长(3~5 d),操作繁琐^[7]。

近年来,涌现出多种菌落总数及食源性致病菌的检测方法,如微生物选择性培养基法^[8-10]、酶联免疫吸附法^[11](ELISA)、聚合酶链式反应^[12-15](PCR)、免疫层析法^[16-18]、自动仪器化分析技术^[19,20]等。其中仪器法可以及时有效地对样本中的菌落总数和食源性致病菌进行检测和鉴定,避免了人为操作带来的误差,因而得到了广泛的关注^[21]。本文对推测菌落总数及检测鉴定食源性致病菌应用的各类仪器的原理、特点以及应用进行综述,并展望了仪器法在菌落总数推测和食源性致病菌检测鉴定中的研究方向。

2 菌落总数测定

2.1 ATP 生物发光法

2.1.1 原理

三磷酸腺苷(Adenosine Triphosphate, ATP)是广泛存在于生物体内的一种能量物质,生物体死亡后,ATP在细胞内酶的作用下很快地被分解,测定样品中的ATP浓度,即可推算出样品中的活菌数。检测ATP含量的仪器方法是荧光光度计法。萤火虫荧光素酶简称虫光素酶,相对分子质量为62000,是一种能将化学能转变为光能的活性蛋白质,即生物催化剂。在有氧气和二价镁离子存在的条件下,虫光素酶作为催化剂,ATP与荧光素反应释放出荧光。当荧光素及虫光素酶过量时,释放的荧光强度与ATP在一定范围内成线性关系,因此可以通过测量荧光光强度确定检测样

品中的ATP含量,进而推测细菌总数。

2.1.2 特点

食品细菌快速测定仪是基于ATP生物发光法测定各类食品微生物菌落总数的仪器^[22]。使用食品细菌快速测定仪测定样品中微生物的总数可达到标准培养法的90%以上,与传统的微生物检测方法相比,该仪器操作简单,携带方便,可就地即时检测样品,5 min内得到测定结果。可以节省时间、人力和物力,被广泛应用于食品样品的现场检测和紧急突发事件的处理。但国外研发出的商品化ATP检测仪价格昂贵,导致该方法推广难度增大。

2.1.3 应用

Trudil等^[23]使用食品细菌快速测定仪筛查并识别食品和水样品中的细菌,测定50 μL纯培养的金黄色葡萄球菌数为 10^5 cfu/mL,可以在两分钟之内得出结果,准确率大于90%。黄彬等^[24]研究利用CTAB提取细菌ATP,以期降低检测费用,同时结合食品细菌快速测定仪实现对样品细菌总数的快速检测并分析在不同系统中的准确性。结果表明:大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、乳酸菌和枯草芽孢杆菌细胞采用CTAB提取出的细菌ATP的发光强度与细菌总数的线性相关性良好,相关系数均在0.92以上。对代表性的果汁、面、肉和奶制品经CTAB处理提取出细菌ATP后,对于细菌总数在 $10^3\sim 10^7$ cfu/mL的产品,根据ATP的荧光强度,能准确的判断出细菌总数,且生物荧光法与平板计数法两者检测结果的相关系数达到0.9895。

2.2 阻抗法

2.2.1 原理

阻抗法是通过测量微生物代谢时引起培养基电特性的变化来测定样品中微生物含量的一种快速检测方法^[25]。微生物在生长过程中利用低电导率的大分子物质(如蛋白质,多肽及碳水化合物等)进行新陈代谢,生成带电荷的低分子分解物,使电导率发生变化^[26]。检测系统根据电导率的变化,由计算机实时收集、分析和处理,做出标准曲线,得出细菌总数。对于一些难以通过培养基中电导变化检测的微生物,可以通过测量KOH吸收微生物代谢产生CO₂后电导率的变化,间接推测微生物的含量。

2.2.2 特点

微生物自动分析仪是运用阻抗法推测菌落总数的仪器。与传统的微生物检验方法相比,使用微生物自动分析仪检测菌落总数的方法省时省力^[27-28]。该方法检测灵敏度高,最低可检测出0.2~1 cfu/mL(g)样品;检测样品种类广,包括食品、化妆品和药品;检测的微生物项目多;样品含菌量越高,检测速度越快;检测步骤简单,将样品加入培养基后放入仪器中,启动程序后可自动检出结果;液体样品无需前处理过程,固体样品需进行均质和稀释步骤。虽

然该检测方法比传统方法要省力得多,但在制作标准曲线过程中工作量较大。

2.2.3 应用

陈巧燕^[29]运用 Bactrac4300 微生物自动分析仪计算巴氏杀菌乳中细菌总数,通过仪器建立曲线方程 $Y=-1.0307X+9.0268$, 相关系数 $r^2=0.9761$, 采用阻抗法对巴氏杀菌乳中细菌总数和大肠菌群检测,结果可靠,细菌总数的检测时间由 48 h 缩短至 8 h, 大肠菌群检测时间由 24 h 缩短至 10 h, 大大缩短了检测时间。谷福^[30]运用 Bactrac4300 微生物自动分析仪推测了巴氏奶中菌落总数,并和 GB/T 4789.2-2008 平板计数菌落计数方法进行了比较, t 检验结果得出 $P > 0.05$, 无显著性差异,应用 Bactrac4300 微生物自动分析仪测定巴氏奶中菌落总数作为出厂检验标准是可行的。

3 致病菌快速检测

3.1 全自动荧光酶标免疫法(VIDAS 法)

3.1.1 原理

VIDAS 法是一种全自动免疫荧光酶标法,是将抗原或抗体结合到固相载体表面,然后加入受检标本(测定其中的抗体或抗原)和酶标抗原或抗体^[31]。经充分洗涤,通过激发光源检测颜色反应的深浅来进行定性或定量分析。由于酶的催化效率很高,故可极大地放大反应效果,从而使测定方法达到很高的灵敏度。进行免疫学检测所需试剂封闭在试剂条内,借助充当加样头的固相容器的配合,完成整个捕获、洗涤、标记、底物反应、终止与读数的过程。

3.1.2 特点

运用 VIDAS 法检测致病菌灵活性高,可同时进行不同试验(80 个标本/每工作日),也可单个测试运作。检测速度快,经 48 h 增菌后,多数试验可于 50 min 内结束。检测范围广,VIDAS 可以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、大肠杆菌 O157、弯曲杆菌等。

VIDAS 法得到的结果准确可靠,整个过程标准化、自动化;内设自检系统,无交叉污染。并且具有简单、快速、特异性好和灵敏度高等特点,可满足对大批样品中沙门氏菌的筛选检测要求,适用于食品卫生监管、商品检验检疫以及临床诊断等领域。但由于部分抗原复杂,该方法也容易产生假阳性的结果。

3.1.3 应用

Hadziyannis 等^[32]应用 VIDAS 法和直接免疫荧光法检测呼吸道核胞体病毒(RSV),与直接免疫荧光法相比,VIDAS 法的灵敏度和特异性分别为 82%和 94%。

黄嫦娇等^[33]使用 VIDAS 法和 GB/T 4789.4-2003 法对沙门氏菌进行检测,比较两种检测方法的灵敏度和特异性,当样品中细菌含量为 3 cfu/25 g 时,VIDAS 方法的检出率达

到 90%,其中活菌的检测限为 4 cfu/25 g,且用该方法检测沙门氏菌属和非沙门氏菌属标准株的特异性为 100%。结果表明,VIDAS 方法具有简单、快速、特异性好和灵敏度高等特点,并可满足大批样品沙门氏菌筛选检测的要求,适用于食品卫生监管、商品检验检疫以及临床诊断等领域。

刘新亮等^[34]利用 mini-VIDAS 方法和 GB 方法检测食品中沙门氏菌,将两种检测方法进行比较,采用 GB 和 mini-VIDAS 方法检测相同样品中沙门氏菌总数结果完全相同,mini-VIDAS(约 49 h)检测时间远远少于 GB 法(约 100 h)。

全志琴等^[35]探索了 VIDAS 和 VITEK32 在食品卫生检验中的应用,检测样品 257 份,VIDAS 法检测沙门氏菌阳性样品 11 份,国标法检测沙门氏菌阳性样品 8 份。VIDAS 法检测单增李斯特菌阳性样品 17 份,国标法检测单增李斯特菌阳性样品 10 份。VIDAS+VITEK32 法检测沙门氏菌阳性样品 9 份,检测单增李斯特菌阳性样品 12 份。得出结论,VIDAS 法有很高的灵敏性,VITEK32 法有很高的准确性,VIDAS+VITEK32 方法检出率高于国标法。

3.2 Matrix 法

3.2.1 原理

Matrix 致病菌快速检测系统是目前商业化致病菌快速检测产品中最快的方法之一,由英国 Matrix 公司建立。Matrix 致病菌快速检测系统包括 Pathatrix 和 Colortrix 两个系统。Pathatrix 是一种基于免疫磁分离的仪器方法,对磁珠表面进行基因修饰,将多克隆抗体或单克隆抗体连接在磁珠表面,制成免疫磁珠。免疫磁珠在 Pathatrix 仪器中可以选择性捕获流动样品中的目标抗原,借助外磁场的作用将目标物吸附在捕获区,实现对大容量样品中微生物的快速富集。Colortrix-将分离出来的抗原抗体结合物加入试剂 A(酶联二抗),经洗涤后加入试剂 B(底物),初筛阳性样品显蓝色,阴性样品无色,整个显色过程约 15 min。

3.2.2 特点

Matrix 法检测速度快,Pathatrix 系统与 Colortrix 系统或 PCR 方法结合,大部分致病菌检测时间只需 5~8 h,李斯特菌需 16 h 左右。Matrix 法所采用的免疫磁分离富集技术具有分离速度快、操作简单、捕获效率高、重复性好等特点,可在食品样品预处理中广泛应用^[36]。该方法已获得美国 AOAC(Association of Official Analytical Chemists)认证。但该方法在样品菌数较低的情况下,还需要对样品经非选择性培养基增菌过夜,导致检测时间过长。

3.2.3 应用

赖卫华等^[37]对于贮藏于 4℃ 的家制酸奶中低浓度大肠杆菌 O157:H7 的存活进行了研究,利用 Pathatrix 大体积循环系统特异性地捕获酸奶中的大肠杆菌 O157:H7。实验结果表明,酸奶中大肠杆菌 O157:H7 的数量逐渐减少,12 天后检测不到。因此乳制品加工及保存过程中,需要加强对

大肠杆菌 O157: H7 污染的监测,以保证乳制品的安全性。

基于 Pathatrix 系统的荧光定量 PCR 方法被广泛应用于肉类食品中致病菌的快速检测^[38-39]。

马凯等^[40]使用 Pathatrix 系统结合三重荧光定量 PCR 检测食品中沙门氏菌、志贺氏菌和金黄色葡萄球菌,利用特异性免疫磁球,在 37 °C 条件下从 250 mL 猪肉增菌液体中富集循环捕获目标菌。快速提取目标菌 DNA 后,利用特异性的引物与探针,对 3 种食源性致病菌进行三重荧光定量 PCR 检测。开发的基于 Pathatrix 系统的三重荧光定量 PCR 方法,能够在 8 h 内完成对食品中 3 种致病菌的检测,并且灵敏度高、特异性好,此方法可以作为快速应对食品安全突发事件的检测手段。

4 致病菌鉴定

4.1 BIOLOG 鉴定法

4.1.1 原理

BIOLOG 鉴定仪是利用微生物对不同碳源代谢率的差异鉴定微生物。针对每一类微生物筛选 95 种不同碳源,配合四唑类显色物质(如 TTC、TV),固定于鉴定孔板上,接种细菌,微生物细胞利用不同碳源进行新陈代谢,通过检测氧化还原酶与显色物质发生反应产生的颜色变化(吸光度)以及微生物生长造成的浊度差异(浊度),与标准菌株数据库进行比对,可得出最终鉴定结果。BIOLOG 鉴定仪是以微平板上 95 种碳源的利用情况为基础从而进行鉴定的仪器^[41]。

4.1.2 特点

运用 BIOLOG 鉴定仪鉴定微生物,大大降低了人为因素在细菌鉴定过程中的影响^[42]。该方法可以快速读取结果,可鉴定包括细菌、酵母和丝状真菌在内总计 1973 种微生物,几乎涵盖了所有的人类、动物、植物病原菌以及食品和环境中的微生物^[43-45];以碳源利用率为基础,用于鉴定的反应数量多达 95 种,鉴定结果特异性强、分离度大、扩充空间巨大,软件能够对颜色及浊度进行自动补偿,可排除由视觉判断引起的主观差异;边界值可调,可排除干扰反应;操作简单,鉴定板分类简单,仅 5 种鉴定板,对操作人员的专业水平要求不高。BIOLOG 系统可以在菌种代谢特征研究方面提供相关数据信息,但是在用于土壤真菌混合碳源的利用情况分析方面还有不足之处^[46]。

4.1.3 应用

徐引弟等^[47]应用 BIOLOG 鉴定仪快速分离猪粪中猪霍乱沙门氏菌。从临床初诊为仔猪副伤寒的病猪采集粪便,接种于亚硝酸盐亮绿增菌液增菌,划线于 SS 琼脂培养基,挑无色透明菌落纯化。纯化菌落用碳源方法中肠杆菌鉴定板鉴定,同时用常规生化鉴定管鉴定,结果符合猪霍乱沙门氏菌的生化特征。

许学斌等^[48]应用 BIOLOG 鉴定仪对新出现的硫化氢

(H₂S)阴性山夫登堡沙门菌流行菌株进行鉴定,确认 12 株属于 H₂S 和 *hilA*、*invA* 基因均阴性的表型不典型菌株;所有菌株除对四环素有较高耐药性(75.6%)外,对其他测试抗菌药物均敏感。

4.2 VITEK 法

4.2.1 原理

VITEK 法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 试卡(检测卡)含有多种的生化反应孔。将手工分离的待检菌的纯菌落制成符合一定浊度要求的菌悬液,经充填机将菌悬液注入试卡内,封口后放入读数器/恒温培养箱,根据试卡各生化反应孔中的生长变化情况,由读数器进行光学扫描,定时测定各生化介质中指示剂的显色(或浊度反应),然后把读出信息输入电脑储存并进行分析,再通过数值编码技术与数据库中反应文件进行比较,最后鉴定报告将在显示器上自动显示并在打印机上自动打印。VITEK 是目前世界上最先进、自动化程度最高的细菌鉴定仪器之一。

4.2.2 特点

VITEK 鉴定法具有高度的特异性、灵敏度和重复性,操作简便,人为误差小,检测快速的特点^[49-50],数小时内可获得试验结果(肠杆菌只需 4~6 h),快速生长菌可在 2 h 内报告结果;该方法使用灵活,可随时放入试卡进行测试;实验结果准确可靠,一般常见的细菌均可准确地鉴定出来。VITEK 鉴定方法已获得 AOAC 认证。VITEK 已被许多国家定为细菌最终鉴定设备,并获美国食品药品监督管理局(FDA)认可^[51]。VITEK 方法也适合于临床鉴定和药敏试验,可为临床合理使用抗生素提供依据^[52-54]。但该方法对检验人员要求相对较高,检验人员应加强微生物基础知识、手工鉴定基础和操作技能的培训,加强学习仪器原理,同时作好室内质控工作的经验也很重要的,才能迅速、准确地为临床提供可靠的诊断和治疗依据^[55]。

4.2.3 应用

黄训端等^[56]使用 VITEK 快速检测草莓中的蜡样芽孢杆菌,采用形态、生理生化以及生物分子等多种手段开展了草莓中芽孢杆菌的鉴定研究,结果确认草莓携带的芽孢杆菌为蜡样芽孢杆菌。实验表明了 VITEK 微生物自动鉴定系统可快速检测草莓中的芽孢菌,结果可靠,为建立草莓杀菌抑菌方法提供了参考。

孙燕萍等^[57]评价了 VITEK 方法对无锡市常见 12 种食源性致病微生物金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌、变形杆菌、副溶血性弧菌、O139 群霍乱弧菌、沙门菌、大肠杆菌 O157: H7、志贺菌、溶血性链球菌、单核细胞增生李斯特菌、空肠弯曲菌、小肠结肠炎耶尔森菌鉴定的准确性,结果表明使用 VITEK 鉴定 12 种食源性致病微生物的鉴定结果与 API 鉴定系统(具有美国 FDA 的细菌鉴定标准)鉴定结果的总体符合率为 99.6%,PCR 快速检测方法结果与 API

鉴定系统鉴定结果符合率为 97.3%。

王原等^[58]对 VITEK 方法鉴定葡萄球菌的能力进行了评价, 得出结果 VITEK 方法和 API Staph 系统的总体鉴定符合率为 95.1%, 其中金黄色葡萄球菌的鉴定符合率为 100%, 凝固酶阴性葡萄球菌的鉴定符合率为 90.5%。VITEK 2 compact 鉴定系统能够满足临床工作的需求, 其中对金黄色葡萄球菌的鉴定率较高。

4.3 MALDI-TOF-MS 法(基质辅助激光解析电离飞行时间质谱)

4.3.1 原理

基质辅助激光解吸(MALDI)是一种用于质谱软离子化的技术。其原理是用激光照射样品与基质形成的共结晶薄膜, 基质从激光中吸收能量传递给生物分子, 而电离过程中将质子转移到生物分子或从生物分子得到质子, 而使生物分子电离的过程。飞行时间质量分析器(TOF)的原理是离子在电场作用下加速飞过飞行管道, 根据到达检测器的飞行时间不同而被检测, 即测定离子的质荷比与离子的飞行时间成正比, 检测离子。MALDI-TOF-MS 是运用上述原理的质谱仪。

4.3.2 特点

MALDI-TOF-MS 法是简便快速、高通量、低成本, 并且准确性较高的鉴定方法, 有可能取代现有的对于真菌和细菌鉴定方法。在细菌鉴定方面, 除了部分少见菌株因数据库尚未建立相关参考谱图而暂时无法鉴定外, MALDI-TOF-MS 已经能够鉴定出大部分的细菌; 在酵母样真菌鉴定方面 MALDI-TOF-MS 鉴定效果也很好, 与常规鉴定方法比较, 检测速度快, 通过特殊的标本处理流程, 可用于丝状真菌鉴定^[59]。但由于 MALDI-TOF-MS 在对细菌进行检测鉴定时, 对细菌的纯度要求较高, 且细菌数据库尚未完善, 有待进一步研究^[60]。

4.3.3 应用

Romero-Gomez 等^[61]使 MALDI-TOF 和 VITEK 两种快速有效的仪器结合, 从阳性血培养瓶中直接接种, 对微生物进行鉴定和药敏试验。得出结论, 通过 MALDI-TOF 直接鉴定, 使用 VITEK 对从阳性血培养瓶中接种的微生物进行药敏试验, 得到了非常好的结果, 并且降低了最初接种和药敏试验的时间。

吕佳等^[62]论述了 MALDI-TOF-MS 技术鉴定食源性致病菌的影响因素, 包括基质的选择、食源性致病菌的培养条件、样品的处理方式、数据库资源的更新与补充, 以达到减小这些因素的干扰, 最大程度地发挥该技术优势的目的。作为一种便捷的食源性致病菌鉴定技术, MALDI-TOF-MS 必将在该领域发挥巨大作用。

王耀等^[63]建立单增李斯特氏菌的 MALDI-TOF-MS 快速鉴定与分型方法, 实验收集 37 株单增李斯特氏菌分离株, 应用 MALDI-TOF-MS 采集图谱, 获取独特的蛋白质指纹

图谱, 汇总成标准图谱, 建立单增李斯特氏菌鉴定数据库。采用单增李斯特氏菌标准菌株进行验证, 表明鉴定结果的可信度很高。在数据库信息的基础上, 对 37 株单增李斯特氏菌分离株进行聚类分型。分型结果表明, 在蛋白质水平上, MALDI-TOF-MS 可把 37 株单增李斯特氏菌分成 9 个型别。

Pavlovic 等^[64]基于 MALDI-TOF-MS 方法分离鉴定食源性酵母菌, 得出数据表明, MALDI-TOF-MS 法是一个准确可靠的方法, 可以去进行食源性酵母菌群的分类和鉴定。

5 展望

为保证食品安全, 快速灵敏地检测食品中的菌落总数和致病菌, 仪器法受到了广泛的关注。仪器法相较于传统的检测方法来说, 虽然具有很多的优点, 但其部分方法过程繁琐, 需要专业人员操作, 成本过高, 无法满足大量样品的现场检测。另外, 我国食品安全检测仪器的的发展还处于比较落后的状态, 尤其是在质谱等高端仪器领域, 仍然没有摆脱大量依靠进口的现状, 自主研发的仪器在质量和指标参数等方面存在各种问题, 产品缺乏创新和后续升级能力^[65]。所以, 如何在保证准确性的前提下降低检测时间; 如何降低仪器法的繁琐操作步骤; 如何自主设计更便携化、一体化、廉价化的仪器则是我们需要进一步研究的重要方面。不过随着我国技术水平不断进步, 相信会在食品安全检测仪器方面取得进一步的发展, 仪器法也将会被越来越多地应用于食品安全检测中。

参考文献

- [1] 王云国, 李怀燕. 食品微生物检验内容及检测技术[J]. 粮油食品科技, 2010, 18(3): 40-43.
Wang YG, Li HY. The inspection items and technique of microorganism in food [J]. Sci Technol Cereals Oils Foods, 2010, 18(3): 40-43.
- [2] Xu Y, Cui L, Tian C, *et al.* A multiplex polymerase chain reaction coupled with high-performance liquid chromatography assay for simultaneous detection of six foodborne pathogens [J]. Food Control, 2012, 25(2): 778-783.
- [3] The Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2011 Estimates of Foodborne Illness in the United States. URL [EB/OL] (<http://www.cdc.gov/Features/dsFoodborneEstimates>) (updated: April 15, 2011)
- [4] World Health Organization Foodborne Disease Strategy: 2010 update. United Kingdom: WHO; 2010. URL [EB/OL] (<http://multimedia.who.int/publications/mfs2010.pdf>) (Published May 3 2011)
- [5] 魏子淇, 李沛生. 食源性致病微生物的快速检测方法及其研究现状[J]. 现代食品科技, 2013, 29(2): 438-442.
Wei ZH, Li BS. Reviews of rapid detection methods for foodborne pathogenic microorganisms [J]. Mod Food Sci Technol, 2013, 29(2): 438-442.
- [6] 陈福生, 高志贤, 王建华. 食品安全检测与现代生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 1-2.

- Chen FS, Gao ZX, Wang JH. Food safety testing and modern biotechnology [M]. Bei Jing: Chemical Industry Press, 2004: 1-2.
- [7] 李成忠. 食品微生物快速检测技术研究[J]. 生物技术世界, 2014, (9): 66-67.
- Li CZ. Food microbiology rapid detection technology [J]. Biotech World, 2014, (9): 66-67.
- [8] 方改霞, 单林娜, 李慧, 等. 多菌种酸奶中活性乳酸菌的计数方法研究[J]. 微生物学杂志, 2009, (3): 101-104.
- Fang GX, Shan LN, Li H, *et al.* Active lactobacteria counting method in yogurt fermented with multi-stain [J]. J Microbiol, 2009, (3): 101-104.
- [9] 张继英, 张娅婷. 不同选择性培养基对乳酸菌生长的影响[J]. 信阳农业高等专科学校学报, 2006, 16(3): 119-120.
- Zhang JY, Zhang YL. The effect of the different selected media on the growth of lactics [J]. J Xinyang Agric Coll, 2006, 16(3): 119-120.
- [10] 曹建平, 韩丹, 王健. 食品中金黄色葡萄球菌定量检测方法比较研究[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(8): 242-243.
- Cao JP, Han D, Wang J. A comparative study on quantitative detection of *Staphylococcus aureus* in food [J]. J Anhui Agric, 2015, 43(8): 242-243.
- [11] 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.
- Wu YH, Niu RJ, Lai WH, *et al.* Detection of *Salmonella* by double antibody sandwich ELISA [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(10): 62-65.
- [12] Ismagliov RF, Tice JD, Gerdtz CJ, *et al.* Method of performing PCR reaction in continuously flowing microfluidic plugs: U.S. Patent 8, 822, 148[P]. 2014-9-2.
- [13] 郑秋月, 赵彤彤, 袁慕云, 等. 实时荧光 PCR 检测食品中丙型副伤寒沙门氏菌和猪霍乱沙门氏菌[J]. 食品科技, 2014, 39(2): 297-301.
- Zheng QY, Zhao TT, Yuan MY, *et al.* Detection of *Salmonella paratyphi C* and *Salmonella Choleraesuis* in food by real-time PCR [J]. Food Sci Technol, 2014, 39(2): 297-301.
- [14] 杨小鹏, 李海刚, 吴清平, 等. 免疫磁捕获-荧光定量 PCR 快速检测食品中沙门氏菌[J]. 食品工业科技, 2014, 35(24): 79-83.
- Yang XJ, Li HG, Wu QP, *et al.* Rapid detection of *Salmonella* in food by immunomagnetic separation-real-time PCR assay [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(24): 79-83.
- [15] 陈清华. PCR 及其改进技术在食品安全检测中的应用研究[J]. 福建分析测试, 2014, 23(2): 23-27.
- Chen QH. Research on application of PCR and Improved PCR technology in food safety detection [J]. Fujian Anal Test, 2014, 23(2): 23-27.
- [16] 李建武, 宋春美, 刘芳, 等. 免疫层析试纸技术及其在食品安全检测中的应用[J]. 食品科学, 2014, 35(8): 36-41.
- Li JW, Song CM, Liu F, *et al.* Immunochromatographic strip technology and its application in food safety detection [J]. Food Sci, 2014, 35(8): 36-41.
- [17] Shamsi MH, Choi K, Ng AHC, *et al.* A digital microfluidic electrochemical Immunoassay [J]. Lab Chip, 2014, 14(3): 547-554.
- [18] 夏诗琪, 徐超莲, 刘道峰, 等. 胶体金免疫层析法联检食品中 5 种典型沙门氏菌模型的建立和优化[J]. 食品科学, 2014, 35(22): 154-158.
- Xia SQ, Xu CL, Liu DF, *et al.* Preparation and optimization of colloidal gold strip for simultaneously detecting five typical *Salmonella* in Foods [J]. Food Sci, 2014, 35(22): 154-158.
- [19] 李永生, 朱险峰, 宋华林, 等. 全自动生化分析仪的基本原理与常见故障排除方法[J]. 医疗卫生装备, 2014, 35(5): 154-155.
- Li YS, Zhu XF, Song HL, *et al.* The basic principle of automatic biochemical analyzer and common troubleshooting methods [J]. Chin Med Equip J, 2014, 35(5): 154-155.
- [20] 孙素娟, 张金柱. 全自动生化分析仪测量方法探讨[J]. 品牌与标准化, 2014, (2): 43-44.
- Sun SJ, Zhang JZ. Discussion on automatic biochemical analyzer measurement method [J]. Enterprise Standardization, 2014, (2): 43-44.
- [21] 蒋士强. 食品质量安全检测中对科学仪器设备的需求[J]. 现代科学仪器, 2007, (4): 26-31.
- Jiang SQ. Food quality and safety testing in demand for scientific instruments and equipment [J]. Mod Sci Instrum, 2007, (4): 26-31.
- [22] 王琴, 蒋波, 耿静. 食品细菌快速测定仪在生乳检测中的运用[J]. 新疆畜牧业, 2014, (8): 23-25.
- Wang Q, Jiang B, Geng J. Tester food bacteria used in the detection of raw milk [J]. Xinjiang Anim Husb, 2014, (8): 23-25.
- [23] Trudil D, Loomis L, Pabon R, *et al.* Rapid ATP method for the screening and identification of bacteria in food and water samples [J]. Biocatalysis-2000: Fundamentals and Applications, 2000, 41(6): 27-29.
- [24] 黄彬, 余元善, 唐道邦, 等. CTAB 提取 ATP 的生物荧光法快速检测细菌总数准确性研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(2): 269-273.
- Huang, Yu YS, Tang DB, *et al.* The accuracy of rapid detection of bacterial count by bioluminescence assay with CTAB-Extracted ATP [J]. Mod Food Sci Technol, 2014, 30(2): 269-273.
- [25] 唐佳妮, 吕元, 张爱萍, 等. 阻抗法的研究进展及其在食品微生物检测中的应用[J]. 中国食品学报, 2010, 10(3): 186-192.
- Tang JN, Lv Y, Zhang AP, *et al.* Progress impedance method and its application in food microbiology detection [J]. J Chin Instit Food Sci Technol, 2010, 10(3): 186-192.
- [26] Wimalaratne SK, Farid MM. Pressure assisted thermal sterilization [J]. Food Bioprod Process, 2008, 86(4): 312-316.
- [27] 赵国俊, 范放, 傅晓琴. 电阻抗法检测食品中的细菌总数与平板计数法的比较[J]. 广州食品工业科技, 1998, 14(2): 63-65.
- Zhao GJ, Fan F, Fu XQ. Comparison of food bacteria plate count the total number of electrical impedance detection method [J]. Guangzhou Food Sci Technol, 1998, 14(2): 63-65.
- [28] Yang L, Bashir R. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria [J]. Biotechnol Adv, 2008, 26(2): 135-150.
- [29] 陈巧燕. 阻抗法快速检测巴氏杀菌乳中菌落总数的研究[J]. 中国酿造, 2012, 31(8): 89-91.
- Chen QY. Rapid detection of bacterial count in pasteurized milk with impedance method [J]. China Brewing, 2012, 31(8): 89-91.
- [30] 谷福. 用阻抗法快速测定巴氏奶中菌落总数[J]. 大众标准化, 2010, 123-124.
- Gu F. Rapid determination of impedance pasteurized milk in the total number of colonies [J]. Popular Standardization, 2010, 123-124.
- [31] 赵杰文, 孙永海. 现代食品检测技术[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2008.
- Zhao JW, Sun YM. Modern food testing technology [M]. Beijing: China Light Industry Press, 2008.
- [32] Hadziyannis E, Sholtis W, Schindler S, *et al.* Comparison of VIDAS with direct immunofluorescence for the detection of respiratory syncytial virus in clinical specimens [J]. J Clin Virol, 1999, 14(2): 133-136.

- [33] 黄嫦娇, 黄晓蓉, 郑晶, 等. 全自动荧光酶联免疫方法检测食品中沙门氏菌[J]. 安徽农业科学, 2010(10): 5320-5321.
Huang CJ, Huang XR, Zheng J, et al. Detection of *Salmonella* in food samples by VIDAS method [J]. J Anhui Agric Sci, 2010(10): 5320-5321.
- [34] 刘新亮, 潘仲乐, 庞钧予, 等. 联用检测仪器与显色培养基对食品和水产品中沙门氏菌的检验[J]. 饲料博览, 2014, (7): 42-45.
Liu XL, Pan ZL, Pang JY, et al. Associated instruments and chromogenic medium for *Salmonella* food and aquatic products inspection [J]. Feed Rev, 2014, (7): 42-45.
- [35] 全志琴. VIDAS 和 VITEK32 在食品卫生检验中的应用[J]. 河南科技大学学报: 医学版, 2011, 29(2): 142-143.
Tong ZQ. Application of VIDAS and VITEK 32 to food examination [J]. J Henan Univ Sci Technol, 2011, 29(2): 142-143.
- [36] 山珊, 牛瑞江, 赖卫华, 等. 免疫磁珠法富集沙门氏菌的优化及应用[J]. 食品工业科技, 2013, 34(13): 153-156.
Shan S, Niu RJ, Lai WH, et al. Optimization and application of immunomagnetic beads for enriching *Salmonella* spp. [J]. Sci Technol Food Ind, 2013, 34(13): 153-156.
- [37] 赖卫华, 冯贻泽. 贮藏于 4 °C 的家制酸奶中低浓度大肠杆菌 O157:H7 的存活研究[J]. 食品科学, 2010, (5): 252-255.
Lai WH, Feng YZ. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in Home-made Yogurt during Storage at 4 °C [J]. Food Sci, 2010, (5): 252-255.
- [38] Fedio WM, Jinneman KC, Yoshitomi KJ, et al. Detection of *E. Coli* O157:H7 in raw ground beef by Pathatrix™ immunomagnetic-separation, real-time PCR and cultural methods [J]. Int J Food Microbiol, 2011, 148(2): 87-92.
- [39] 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.
- [40] 马凯, 李宝明, 白羽, 等. 基于免疫磁分离的三重荧光定量 PCR 检测食品中沙门氏菌, 志贺氏菌和金黄色葡萄球菌[J]. 微生物学通报, 2014, 41(11): 2369-2377.
Ma K, Li BM, Bai Y, et al. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella*, *Shigella*, and *Staphylococcus aureus* in food using a multiplex RT-PCR assay based on immunomagnetic separation [J]. Microbiol Chin, 2014, 41(11): 2369-2377.
- [41] 程池, 杨梅, 李金鑫, 等. BIOLOG 微生物自动分析系统—细菌鉴定操作规程的研究[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(5): 50-54.
Cheng C, Yang M, Li JX, et al. Biolog microbial identification system-study on bacterial identification procedures [J]. Food Ferment Ind, 2006, 32(5): 50-54.
- [42] 杜昕波, 赵耘, 李伟杰, 等. 利用 BIOLOG 系统对不同种类细菌鉴定的研究[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(9): 31-33.
Du XB, Zhao Y, Li WJ, et al. Biolog Microbial Identification System Study on bacterial identification procedures [J]. Chin J Vet Drug, 2008, 42(9): 31-33.
- [43] 吴慧明, 张晶, 朱国念. 新型杀螨剂 F1050 优势降解菌(芽孢杆菌)的筛选及其鉴定[J]. 农药学报, 2004, 6(2): 43-47.
Wu HM, Zhang J, Zhu GN. Screening and Identification of Dominant Degradation Microorganisms to Miticide F1050 [J]. Chin J Pesticide Sci, 2004, 6(2): 43-47.
- [44] Belviso S, Giordano M, Ambrosoli R, et al. Assessment of lactic acid bacteria sensitivity to terpenoids with the Biolog methodology [J]. Dairy Sci Technol, 2014, 94(2): 195-203.
- [45] Zhang TY, Wu YH, Zhuang LL, et al. Screening heterotrophic microalgal strains by using the Biolog method for biofuel production from organic waste water [J]. Algal Res, 2014, 6: 175-179.
- [46] Hobbie EA, Watrud LS, Maggard S, et al. Carbohydrate use and assimilation by litter and soil fungi assessed by carbon isotopes and BIOLOG assays [J]. Soil Biology Biochem, 2003, 35: 303-311.
- [47] 徐引弟, 郭爱珍, 贾爱卿, 等. 猪霍乱沙门氏菌的快速分离鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2007, 39(2): 8-11.
Xu YD, Guo AZ, Jia AQ, et al. Rapid isolation and identification of *Salmonella choleraesuis* [J]. Anim Husb Vet Med, 2007, 39(2): 8-11.
- [48] 许学斌, 陈敏, 屠丽红, 等. 不典型山夫登堡沙门菌流行菌株的鉴定[J]. 检验医学, 2010, 25(10): 797-800.
Xu XB, Chen M, Tu LH, et al. Identification on the epidemic strains of atypical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Senftenberg [J]. Lab Med, 2010, 25(10): 797-800.
- [49] Kleiss T, Deberghes P, Durrer M, et al. Identification of environmental *Staphylococci* and *Coliforms* by the Vitek Auto Microbic System [J]. Food Microbiol, 1995, 12: 199-202.
- [50] 杨毓环, 陈伟伟. VITEK 全自动微生物检测系统原理及其应用[J]. 海峡预防医学杂志, 2000, 6(3): 38-39.
Yang YH, Chen WW. VITEK automated microbial detection system principles and applications [J]. Strait J Prevent Med, 2000, 6(3): 38-39.
- [51] 李洁莉, 周小微. 应用 VITEK 全自动微生物鉴定系统检测婴儿配方奶粉中阪崎肠杆菌[J]. 江苏食品与发酵, 2006(3): 34-36.
Li JL, Zhou XW. Applications VITEK automated microbial identification system detects infant formula *Enterobacter sakazakii* [J]. Jiangsu Food Ferment, 2006(3): 34-36.
- [52] 乔宁, 喻华, 殷琳, 等. VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析仪性能分析[J]. 淮海医药, 2012, 30(3): 211-213.
Qiao N, Yu H, Yin L, et al. Performance analysis of VITEK 2 COMPACT automatic microbiology analyzer [J]. J Huaihai Med, 2012, 30(3): 211-213.
- [53] Nakasone I, Kinjo T, Yamane N, et al. Laboratory-based evaluation of the colorimetric VITEK-2 Compact system for species identification and of the advanced expert system for detection of antimicrobial resistances: VITEK-2 Compact system identification and antimicrobial susceptibility testing [J]. Diagnostic Microbiol Infect Dis, 2007, 58(2): 191-198.
- [54] Jin WY, Jang SJ, Lee MJ, et al. Evaluation of VITEK 2, MicroScan, and Phoenix for identification of clinical isolates and reference strains [J]. Diagnostic Microbiol Infect Dis, 2011, 70(4): 442-447.
- [55] 刘杰, 赵满仓, 周海峰. VITEK-II 全自动微生物鉴定系统在室间质评中的应用研究及对策[J]. 医学综述, 2014, 20(17): 3215-3217.
Liu J, Zhao MC, Zhou HF. VITEK-II automated microbial identification system applications research and countermeasure in the EQA [J]. Med Recapitulate, 2014, 20(17): 3215-3217.
- [56] 黄训端, 潘见, 余晓峰, 等. 草莓中蜡样芽孢杆菌的 VITEK 快速检测[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(4): 99-102.
Huang XD, Pan J, Yu XF, et al. Rapid test of *Bacillus cereus* in strawberry with Vitek Auto Microbic System [J]. J Microbiol, 2006, 26(4): 99-102.
- [57] 孙燕萍, 彭浩, 凌霞, 等. VITEK2 Compact 全自动微生物分析系统的应用及鉴定结果分析[J]. 现代预防医学, 2010, 37(20): 3891-3893.

- Sun YP, Peng H, Ling X, *et al.* Application of VITEK 2 compact automatic microbial analysis system and its identification results analysis [J]. *Mod Pre Med*, 2010, 37(20):3891–3893.
- [58] 王原, 许江燕. VITEK-2 compact 全自动微生物鉴定仪对葡萄球菌鉴定能力的评价[J]. *生物医学工程学进展*, 2011, 31(4):206–208.
- Wang Y, Xu JY. Evaluation of the VITEK-2 compact automated microbiology system for identification of *Staphylococcus* [J]. *Progress Biomed Eng*, 2011, 31(4): 206–208.
- [59] 张丽, 徐英春. MALDI-TOF MS 在临床微生物实验室的应用研究进展[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2013, 13(3): 226–231.
- Zhang L, Xu CY. Application of MALDI-TOF MS mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology [J]. *Chin J Infect Chemother*, 2013, 13(3): 226–231.
- [60] 战晓微, 傅俊范, 郑秋月, 等. 沙门氏菌 MALDI-TOF-MS 检测方法的建立[J]. *现代食品科技*, 2011, 27(5): 595–597.
- Zhan XW, Fu JF, Zheng QY, *et al.* Establishment of a MALDI-TOF-MS method for *Salmonella* detection [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2011, 27(5): 595–597.
- [61] Romero-Gómez MP, Gómez-Gil R, Paño-Pardo JR, *et al.* Identification and susceptibility testing of microorganism by direct inoculation from positive blood culture bottles by combining MALDI-TOF and Vitek-2 Compact is rapid and effective [J]. *J Infect*, 2012, 65(6): 513–520.
- [62] 吕佳, 卢行安, 刘淑艳, 等. MALDI-TOF-MS 技术鉴定食源性致病菌的影响因素[J]. *分析仪器*, 2011, (2): 12–17.
- Song J, Lu XA, Liu SY, *et al.* Effect of MALDI-TOF-MS technique to identify foodborne pathogens Factor [J]. *Anal Instrum*, 2011, (2): 12–17.
- [63] 王耀, 曹际娟, 赵昕, 等. 单增李斯特氏菌 MALDI-TOF-MS 鉴定与分型研究[J]. *食品科学*, 2012, 33(3): 194–198.
- Wang Y, Cao JJ, Zhao X, *et al.* Identification and Subtyping of *Listeria monocytogenes* by MALDI-TOF-MS[J]. *Food Sci*, 2012, 33(3): 194–198.
- [64] Pavlovic M, Mewes A, Maggipinto M, *et al.* MALDI-TOF MS base identification of food-borne yeast isolates [J]. *J Microbiol Meth*, 2014, 106: 123–128.
- [65] 张强. 我国食品安全检测仪器的发发展现状[J]. *农业工程*, 2011, 1(2): 46–50.
- Zhang Q. Development situation of food safety testing instruments in China [J]. *Agric Engineer*, 2011, 1(2):46–50.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



郭琦, 硕士研究生, 主要研究方向为食品质量与安全。
E-mail: ncuskguoqi@163.com



赖卫华, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为食品质量安全。
E-mail: talktolaiwh@163.com