食源性致病菌鉴定技术研究进展

潘兰芳, 黄建飞, 陈 晶, 赖小红, 张樱子, 兰全学*
(深圳市计量质量检测研究院食品检测所, 深圳 518131)

摘 要: 食源性致病菌是影响食品安全的重要因素之一, 近年来食源性致病菌污染带来的食品安全事故不断被报道, 因此建立食源性致病菌的快速检测方法对食源性疾病控制至关重要。食源性致病菌的传统检测方法周期较长、检测步骤繁琐, 不适用于快速检测, 因而快速、简便、特异的检测方法成为研究的热点。本文主要从生化鉴定技术、分子生物学技术、免疫技术、代谢技术以及噬菌体鉴定技术等方面介绍目前国内外用于食品致病菌检测的技术, 并对这些技术进行分析和总结, 以期为今后进一步研究和开发新的检测技术提供参考。

关键词: 分子生物学技术; 免疫技术; 代谢技术; 食源性致病菌

Research progress on identification of food-borne pathogen

PAN Lan-Fang, HUANG Jian-Fei, CHEN Jing, LAI Xiao-Hong, ZHANG Ying-Zi, LAN Quan-Xue*
(*Food Testing Institute*, *Shenzhen Academy of Metrology & Quality Inspection*, *Shenzhen* 518131, *China*)

ABSTRACT: Food-borne pathogen is one of the most primary factors which affect the food safety. Food safety accidents polluted by food-borne pathogen have been reported constantly, so establishment of methods for detection of food-borne pathogen is very important. The characteristics of traditional methods for detection have longer periods and tedious steps, which can't be adapted to rapid detection. More researches have focused on the quick, convenient and specific methods. This article summarized several advanced technologies including biochemical technology, molecular biology technology, immunity technology, metabolism technology and bacteriophage technology, so as to provide a reference for the further study.

KEY WORDS: molecular biology technology; immunity technology; metabolism technology; food-borne pathogens

1 引 言

食品安全是全球性的重大公共卫生问题, 致病微生物污染带来的食品安全事故也不断的被报道, 如英国的疯牛病、法国的李斯特氏菌病、日本的肠出血性大肠杆菌 O157: H7 和雪印牛奶的葡萄球菌肠毒素中毒事件、我国安徽阜阳劣质婴幼儿配方粉事件等[1], 这对食源性致病菌鉴定技术也提出了更高的要求, 需要建立快速、灵敏以及精确的方法来检测食源性致病菌。传统的食品微生物检测通常采用琼脂平板培养法, 这种方法主要依靠培养基进行培养、分离及生化鉴定, 操作过程繁杂且费时费力, 一般需几天才能完成[2], 无法满足食品安全快速检测的要求, 食源性致病菌的检测技术面临着快速检测技术转变的挑战。目前一些食品微生物快速检测方法主要是通过综合应用微生物学、化学、生物化学、生物物理学、免疫学以及血清学试验技术对微生物进行检测。本文就国内外食源性致病菌鉴定技术的研究进展进行了概括和总结。

2 生化鉴定技术

2.1 传统分离培养法

自卫计委颁布 GB 4789 系列标准以后, 我国的食品微

*通讯作者: 兰全学, 硕士, 高级工程师, 研究方向为食品安全检测与研究。E-mail: 61723585@qq. com
***Corresponding author:** LAN Quan-Xue, Master, Senior Engineer, Food Testing Institute, Shenzhen Academy of Metrology & Quality Inspection, Shenzhen 518131, China. E-mail: 61723585@qq.com

生物检验逐步标准化, 该系列对食源性致病菌检测的一般步骤为: 增菌培养、分离纯化、革兰氏染色、生化试验及血清学试验等[3]。显色培养基的不断发明和广泛应用使传统分离培养方法在分离纯化这一步得到了很好的改善。显色培养基是一种新型分离培养基, 通过在培养基中加入某种特定的无色合成底物, 经微生物特异性酶的作用而释放出色原, 呈各种颜色或荧光。其反应的灵敏性和特异性大大优于传统培养基。例如沙门氏菌显色培养基用于食品中沙门氏菌的分离培养, 沙门氏菌显紫色, 大肠杆菌显蓝色, 其他细菌显无色, 大大降低了操作者在选择性平板上辨识可疑菌落的难度[4]。

近十年, 随着食源性疾病突发事件的出现, 逐渐暴露出食源性致病菌传统分离培养鉴定技术检验耗时长、步骤较繁琐等诸多不足之处, 食源性致病菌鉴定技术快速、简便的现实需求促使了食源性致病菌鉴定技术从传统的普通生化鉴定向商品化的成套生化鉴定试剂盒和自动化的生化鉴定仪器发展。

2.2　商品化成套试剂

商品化成套试剂主要包括国内外厂商的各类生化鉴定条,它们以生产生化鉴定条为主, 通过与已知的菌株数据库进行比较, 大部分可完成食源性致病菌的最终鉴定。戴小波等[5]用 Analytic Products INC (API)微生物鉴定系统对 32 种室间质控菌株进行鉴定, 鉴定符合率为 96.9%。李玉等[6]采用国家标准 GB 4789 中的方法及 API 生化鉴定方法对经过 Vitek 2 Compact 检测分离的 20 株沙门氏菌、40 株单增李斯特氏菌、30 株金黄色葡萄球菌和 30 株蜡样芽孢杆菌检测结果一致。成套试剂操作简单、快捷, 可大大减少实验过程, 节省时间。但它们主要通过颜色变化作为最终判定标准, 对实验人员的经验要求较高; 另外, 对沙门氏菌、大肠埃希氏菌 O157 等细菌的鉴定需结合血清学试验才能做出最终鉴定。

2.3　全自动微生物鉴定分析系统

全自动微生物鉴定是以每种细菌的微量生化反应为基础, 然后采用显色反应, 通过相关仪器给出鉴定结果。目前市面上常用的全自动微生物鉴定主要有法国生物梅里埃公司生产的 Vitek 2 Compact、美国 BD 公司生产的 PHOENIX100、美国德灵公司生产的 MicroScan。其特点是一次可进行几十个生化反应, 数据库更大。

Vitek 2 Compact 目前已被多个国家定为细菌最终鉴定的设备, 并获美国药品和食品管理局(Food and Drug Administration, FDA)认可, 其生化反应孔可达 60 多种, 该系统大大缩短了食源性致病菌的生化鉴定时间, 且操作简单, 实验结果具有高度的特异性、灵敏性和重复性。目前 Vitek 系统的微生物鉴定卡常用的共 7 种, 可鉴定 405 种细菌属。但对某些菌做最后鉴定还需做附加实验, 如对沙门氏菌属只能做到属的水平鉴定, 最后鉴定需要做特异血清凝集试验。有时最后鉴定报告上会出现“good confidence marginal separation”(好的可信性但难于区分), 即生化反应结果同时符合数据库的两个菌, 并且相似值均在可接受范围, 使得难于区分这两种菌, 需要加做一些试验方可下最后结论, 如鉴定为副溶血弧菌和嗜水气单胞菌时, 鉴定结果会提示需加做 VP 试验、0%NaCl 生化试验、七叶苷试验来加以区别[7]。

3　分子生物学技术

3.1　多聚酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)

多聚酶链式反应技术又称基因体外扩增法, 其基本原理是通过在体外对一些微生物相应特定的双链 DNA 片段进行高效扩增, 然后对这些 DNA 片段的扩增产物含量进行检测, 从而快速地对食品中微生物含量完成测定。Whyte 等[8]分别采用传统方法和 PCR 方法对生禽肉中的沙门氏菌进行检测, 传统方法检出 16%的样品被沙门氏菌污染, 而 PCR 方法检出 19%的样品被沙门氏菌污染。相对于传统检验方法来说, PCR 技术检测周期较短, 特异性强, 灵敏度高, 可直接用增菌液进行食源性致病菌的检测。

实时荧光定量 PCR 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。所采用的荧光物质分为荧光染料和荧光探针, SYBRGreen I 荧光染料和 TaqMan 探针法较为常见[9]。SYBRGreen I 荧光染料法是在 PCR 反应体系中, 加入过量 SYBR 荧光染料, SYBR 荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后发射荧光信号, 而不掺入链中的 SYBR 染料分子不会发射任何荧光信号, 从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步。Dario 等[10]采用 SYBRGreen I 荧光染料法从禽肉中检测出沙门氏菌。TaqMan 探针法是利用 TaqDNA 聚合酶的 5’-3’核酸酶活性来酶切和降解标记报告荧光基因和淬灭荧光基因的探针。探针完整时, 报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收; PCR 扩增时, Taq 酶的 5’-3’外切酶活性将探针酶切降解, 使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离, 从而荧光监测系统可接收到荧光信号, 即每扩增一条 DNA 链, 就有一个荧光分子形成, 实现了荧光信号的累积与 PCR 产物的形成完全同步。该方法广泛应用于食品中单核增生李斯特[11]、大肠杆菌 O157:H7[12]和沙门氏菌[13,14]等病原致病菌的检测。

多重 PCR 原理跟常规 PCR 相同, 只是在同一反应体系中加入多对引物同时扩增多条目的 DNA 片段, 采用该方法可同时检测多种病原微生物。Kawasaki 等[15]应用多重 PCR 同时检测出肉内的沙门氏菌、单增李斯特菌和大肠杆菌 O157:H7。许一平等[16]根据沙门氏菌 *invA* 基因、大肠杆菌 *phoA* 基因和金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因序列设计 3 条特

异性引物进行多重 PCR，同时检测出上述目标序列。该方法简便快捷，但实际应用中也有一些不足，容易形成假阳性结果、非特异性扩增产物或者扩增失败。

3.2 环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)

LAMP 是一种新型的核酸扩增方法，其特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4 种特异引物，在链置换 DNA 聚合酶的作用下于 60~65 ℃恒温实现核酸扩增[17,18]。实验结果可以通过肉眼观察白色浑浊沉淀来判断，无需繁琐的电泳和紫外观察。

徐义刚等[19]基于金黄色葡萄球菌高度保守的 *Sa442* 基因序列，设计特异性 LAMP 扩增引物对 26 个种类共 45 株细菌进行扩增，所试的 20 株金黄色葡萄球菌均为 LAMP 阳性，并用该 LAMP 方法对 958 份样品进行检测，检出 115 份阳性样品，与国标法检测结果一致。

LAMP 的优点是反应时间短(30~60 min)、灵敏度高，操作简单，不需要特殊仪器，适合基层快速鉴定[20,21]。但其最大的缺点是引物设计复杂。

3.3 滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)

滚环扩增是人为模拟微生物环状 DNA 分子滚环复制而发展起来的一种恒温核酸扩增方法，传统的滚环扩增方法体系中主要包括环状 DNA 模板、单链 DNA 引物和适量的 DNA 聚合酶，反应中单链 DNA 引物在 DNA 聚合酶的催化下，沿着环状 DNA 模板由 5’端向 3 端方向不断复制，形成大量的拷贝。根据 RCA 引物数量不同，将其分为“单引物 RCA”、“双引物 RCA”和“多引物 RCA”，根据扩增效率不同分为“线性 RCA”和“指数 RCA”，根据其扩增模板特点可分为“环形模板 RCA”和“线性模板 RCA”，根据其扩增目标的不同可分为“目标扩增 RCA”和“信号扩增 RCA”[22,23]。该方法因具有反应条件简单、扩增效率高等特点引起极大关注，在核酸检测中具有很大的应用价值和潜力。目前已被用于环状 DNA 的扩增、基因测序、基因表达图谱制作、芯片技术、免疫组化、单核苷酸多态性检测及病毒和细胞基因检测分型等方面[24]。张健[25]对 271 份日常检测样品进行副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特氏菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、志贺氏菌 4 种致病菌检测，使用 RCA 检测方法对 4 种目标菌设计引物并成功扩增出特异性的 DNA 片段。使用 RCA 检测方法的阳性检出率分别为 2.21%、3.69%、1.78%和 2.21%，使用普通 PCR 检测方法的阳性检出率分别为 2.21%、3.69%、1.48%和 1.48%，使用传统方法的阳性检出率分别为 1.11%、2.58%、0.74%和 0.74%，RCA 检测方法阳性检出机率略高于普通 PCR 检测方法，而明显高于传统检测方法，可利用该技术开发致病菌小肠结肠炎耶尔森氏菌 RCA 检测试剂盒。

3.4 基因芯片

基因芯片技术是 20 世纪 90 年代发展起来的一种高新生物技术，采用光导原位合成或显微印刷等方法将点有各种基因寡核酸特定序列的探针分子有序地、密集地固定在经过相应处理的支持物上，加入标记的待测样品进行杂交，通过扫描仪定量分析杂交信号的强弱及分布来分析目的片段的有无，从而确定检测样品是否存在特定微生物[26-28]。

基因芯片具有操作简单快速、高通量、特异性强等优点而被越来越广泛的应用在食品检测中。Chizhikov 等[29]建立一种基因芯片检测系统，通过多重 PCR 扩增与食源性致病菌志贺氏菌、沙门氏菌和肠出血性大肠杆菌 O157:H7 相关的 6 种毒力因子，然后与芯片杂交鉴定 6 种基因。金大智等[30]建立了三重 PCR 结合基因芯片检测伤寒沙门氏菌、痢疾杆菌和单增李斯特菌的方法，灵敏度可以达到 10^2 拷贝数/mL。该方法灵敏度高、特异性和重复性较好，弥补了多重 PCR 不能鉴定多种目的片段的弊端。Carl 等[31]利用基因芯片技术研究出大肠埃希氏菌、伤寒杆菌、痢疾杆菌和空肠弯曲菌的基因芯片检测方法，其检测结果敏感度大大高于传统方法，而且操作简单快捷，重复性好。然而由于基因芯片技术刚刚起步，还处于研发阶段，许多地方还有待改进。

4 免疫技术

4.1 乳胶凝集反应

乳胶凝集反应是利用抗原与抗体特异性结合的特性，加上具有良好吸附性的大分子的乳胶颗粒作为载体吸附可溶性抗原于其表面，当特异性抗体与之结合后，产生凝集反应[32]。Aureus Test 试剂盒就是利用乳胶凝集反应原理研制，用于检测食品中金黄色葡萄球菌。该试剂盒中含有的聚苯乙烯乳胶粒子对免疫抗蛋白 AIgG 和鞭毛蛋白都非常敏感，当含有金黄色葡萄球菌的样品加入到试剂盒中 1 min 内将发生凝集反应[33]。Medina 等[34]利用 LTA 检测 6 种血清型大肠杆菌，其制备的 IgG-乳胶复合物特异性较好。

4.2 酶联免疫吸附(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

1971 年，Engvall 建立了 ELISA 方法，是一种固相免疫分析方法，它将受检标本(测定其中的抗原或抗体)吸附于固相载体表面的抗原或抗体，在载体上进行免疫酶染色，底物显色后，通过定性或定量分析有色产物量来确定样品中待测物质含量[35]。ELISA 方法具有灵敏度高、特异性强、快速简便等优点[36]，目前该方法已被广泛应用于多种细菌检测，如食品中大肠杆菌 O157[37]、单增李斯特菌、沙门氏菌[38]、副溶血性弧菌、志贺氏菌[39]等。

4.3　免疫胶体金技术

该技术以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的一种新型的免疫标记技术。胶体金是由氯金酸在还原剂(如白磷、抗坏血酸、枸橼酸钠、鞣酸)等作用下, 聚合成一定大小的金颗粒, 并由于静电作用成为一种稳定的胶体状态, 形成带负电的疏水胶溶液。当抗原抗体反应发生时, 待检测的抗原抗体(带正电)就会吸附到胶体金颗粒表面(弱碱环境下带负电荷)形成包被而被胶体金标记[40], 目前市面上可用免疫胶体金技术检测的食源性致病菌有大肠埃希氏菌 O157: H7、霍乱弧菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌等, 多用于现场快速检测。

4.4　免疫磁珠分离技术

该技术将特异性抗体偶联在磁性颗粒的表面, 与样品中的致病菌发生特异性的结合, 使致病菌不断得到分离、浓缩[41-43]。免疫磁珠分离技术代替了常规的选择性增菌培养过程, 可特异有效地将目的微生物从样品中快速分离出来。Xiong 等[44]建立一种利用免疫磁珠分离技术高效富集大肠杆菌 O157:H7 的方法, 目标菌的捕获效率可达到 98%(磁珠量为 0.05 mg), 即使在食品基质中也有较高的捕获效率(牛奶中捕获效率达到 99.8%)。山珊等[45]利用该方法富集培养沙门氏菌, 当磁珠含量为 0.4 mg, 抗体标记量为 50 μg/mg, 菌液浓度为 10^2~10^6 cfu/mL 时, 其捕获效率为 65%~82%。

5　代谢技术

代谢学技术是指利用微生物代谢的理论, 通过比对微生物生理生长的一些指标如底物、点阻抗和代谢产物变化的特性, 从而达到微生物检测目的, 主要包括电阻抗技术、ATP 生物发光法、放射测量技术、微热量计技术等。电阻抗法是通过测量微生物代谢引起的培养基电特性变化来测定样品中微生物含量的一种快速检测方法。其原理是细菌在培养基内生长繁殖的过程中, 将会使培养基中的大分子代谢为具有电活性的小分子物质如乳酸, 这些离子态物质能增加培养基的导电性, 使培养基的阻抗发生变化, 通过检测培养基的电阻抗变化情况, 判定细菌在培养基中生长繁殖特性, 检测出相应的细菌[46]。Pless 等[47]采用阻抗法和传统检测方法对 122 种含有沙门氏菌的阳性菌样品进行比对检测, 结果发现用阻抗方法共检出 119 种, 传统的亚硒酸盐-胱氨酸培养基检出 106 种, 二用 RV 培养基仅检出 92 种。

6　噬菌体鉴定技术

噬菌体是一种寄生于细菌的病毒, 能在具有感受性的活菌体内繁殖并将细菌裂解, 噬菌体的专一性较强, 噬菌体检测方法根据不同原理可以分为 4 种, 即基于烈性噬菌体快速裂解宿主菌并形成直观清晰的噬菌斑、与生物传感器联用技术、采用荧光标记以及应用分子生物学技术构建报告噬菌体用于检测。噬菌体检测食源性致病菌的主要方法是利用噬菌体与宿主细菌质检的专一性进行, 可以用来鉴定特定的致病菌[48,49]。李萌等[50]利用肠杆菌科噬菌体进行食品病原菌检测, 检测出沙门氏菌和志贺氏菌仅需要 24~30 h。Oda 等[51]研究用绿色荧光蛋白标记的 PP01 噬菌体成功检测出大肠杆菌 O157:H7, 这种标记后的噬菌体特异性强, 不能够与大肠杆菌 K-12 菌株结合。Wolber 等[52]将 *inaW* 基因插入噬菌体 P22 中并在目标致病菌沙门氏菌中得到表达, 在-10 ℃下通过荧光染料判断, 检出限达到 10 cfu/mL。Ripp 等[53]构建含有荧光素酶基因的报告噬菌体用于检测大肠杆菌 O157:H7, 结果发现检出限可达 1 cfu/mL。

7　展　望

通过综述以上食源性致病菌的鉴定技术, 可以看出各种技术各有优点和不足。传统的微生物生化鉴定作为各检测方法的基础, 虽然耗时长, 但它仍是微生物检测的“金标准”; 全自动微生物鉴定技术快速、简便, 但其主要由数据库中的资料来鉴定细菌, 因此受数据库资料的不完整性影响较大; 免疫学技术快速、灵敏、重现性好、费用低, 但容易出现假阳性、假阴性; 生物芯片及生物传感器技术鉴定快速, 但费用太高, 不利于普及。随着社会的发展和科技的进步, 建立更灵敏、更简便、更快捷的食源性致病菌鉴定技术是保证食品安全的迫切需要, 多学科和多种技术的交叉发展成为未来食源性致病菌鉴定技术的发展方向。

参考文献

[1] 周明东. 食源性致病菌快速检测方法的建立及其试剂盒的研制和应用[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
Zhou MD. Establishment of rapid detection method of food-borne pathogens and development and application of the detection kit [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2012.

[2] 王敏. 检验食品微生物新方法[J]. 四川食品与发酵, 1997, (3): 38–39.
Wang M. A new method of food microbiology inspection [J]. Sichuan Food Ferment, 1997, (3): 38–39.

[3] 罗荣, 任秀, 崔生辉. 食品中沙门氏菌快速检测方法的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(4): 1468–1472.
Luo R, Ren X, Cui SH. Research progress of rapid detection technique of Salmonella in food [J]. J Food Saf Qual, 2016, 7(4): 1468–1472.

[4] 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 China, 2006, 33(6): 108–111.

[5] 戴小波, 曾朱君, 许坚锋, 等. API 与 DL-96 微生物鉴定系统在鉴定室间质控菌株中的对比研究[J]. 国际检验医学志, 2013, 34(11): 1437–1439.

Dai XB, Zeng ZJ, Xu JF, *et al*. Study on comparasion of quality control strains identification between t API and DL-96 microbial identification system [J]. Int J Lab Med, 2013, 34(11): 1437–1439.

[6] 李玉, 王艳, 孙红, 等. Vitek-2 Compact 在食源性致病菌检测中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(13): 2118–2119.
Li Y, Wang Y, Sun H, *et al*. Application of VITEK-2 Compact in the detection of food-borne pathogenic bacteria [J]. Chin J Health Lab Technol, 2015, 25(13): 2118–2119.

[7] Crowley Erin, Bird Patrick, Fisher Kiel, *et al*. Evaluation of the VITEK 2 Gram-negative (GN) microbial identification test card: collaborative study [J]. J AOAC Int, 2012, 95(3): 778–785.

[8] Whyte P , Gill KM, Collins JD. The prevalence and pcr detection of *Salmonella* contamination in raw poultry [J]. Vet Microbiol, 2002, 89(1): 53–60.

[9] 刘克斌. 荧光定量 PCR 在病原微生物检测中的应用[J]. 职业与健康, 2010, 26(21): 2531–2533.
Liu KB. Application of real-time quantitaive pcr in detection of pathogenic microorganisms [J]. Occup Health, 2010, 26(21): 2531–2533.

[10] Dario DM, Luciana C, Elisabetta D, *et al*. Evaluation of DNA Extraction methods for use in combination with SYBR green I Real-Time PCR to detect *Salmonella* enterica serotype enteritidis in poultry [J]. Appl Environ Microbiol, 2003 , 69(6): 3456–3461.

[11] VR Lunge, BJ Miller, KJ Livak, *et al*. Factors affecting the performance of 5′ nuclease PCR assays for Listeria monocytogenes detection [J]. J Microbiol Methods, 2002, 51(3): 361–368.

[12] Sharma Vijay K. Detection and quantitation of enterohemorrhagic Escherichia coli O157, O111, and O26 in beef and bovine feces by real-time polymerase chain reaction [J]. J Food Protect, 2002, 9: 1363–1511.

[13] Susumu Kawasaki, Bon Kimura, Tateo Fujii. Comparison of TaqMan *Salmonella* amplification/detection kit with standard culture procedure for detection of *Salmonella* in meat samples [J]. Food Hyg Saf Sci, 2001, 42(1): 33–39.

[14] Chen CM. Interlaboratory validation of a real-time PCR 24-hour rapid method for detection of *Salmonella* in food [J]. J Food Prot, 2009, 72(5): 945–951.

[15] Kawasaki Susumu, HorikoshiNaoko, Okada Yukio, *et al*. Multiplex PCR for simultaneous detection of *Salmonella spp*., *Listeria* monocytogenes, and *Escherichia coli* O157: H7 in meat samples [J]. J Food Protect, 2005, 3: 448–648.

[16] 许一平, 成炜, 邵彦春, 等. 沙门菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的多重 PCR[J]. 微生物学通报, 2006, 33(6): 89–94.
Xu YP, Cheng W, Shao YC, *et al*. Detection of *Salmonella spp*., *E scherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR [J]. Microbiol China, 2006, 33(6): 89–94.

[17] 李永刚, 王德国, 武建刚, 等. 环介导恒温扩增法(LAMP)检测金黄色葡萄球菌[J]. 食品工业科技, 2010, 1: 388–391.
Li YG, Wang DG, Wu JG, *et al*. Detecting of *Staphylococcus aureus* by loop-mediated isotherm alamp lification(LAMP) method[J]. Sci Technol Food Ind, 2010, 1: 388–391.

[18] 张如胜, 魏泉德. LAMP 技术在病原微生物检测中的应用[J]. 华南预防医学, 2007, 33(5): 45–49.
Zhang RS, Wei QD. Application of LAMP in detection for foodborne microorganism [J] .South China J Prev Med, 2007, 33(5): 45–49.

[19] 徐义刚, 崔丽春, 杨君宏, 等. 食品中沙门氏菌 DNA 环介导等温扩增快速检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(5): 452–458.
Xu YG, Cui LC, Yang JH, *et al*. Development of a loop-mediated isothermal amplification method with fimY gene for rapid detection of Salmonella in food [J]. Chin Vet Sci, 2010, 40(05): 452–458.

[20] Fan FX. The development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of salmonella enterica serovar typhi [J]. PLoS One, 2015, 10(4): 1–13.

[21] Abdullah J. Rapid detection of *Salmonella* Typhi by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method [J]. Braz J Microbiol, 2014, 45(4): 1385–1391.

[22] 张斌, 基于滚环扩增技术的核酸分析[D]. 上海: 上海大学, 2015.
Zhang B. Assay of nucleic acids based on rolling circle amplification [D]. Shanghai: Shanghai University, 2015.

[23] 林彩琴. 基于滚环扩增的目视法核酸检测技术[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
Lin CQ. Naked-eye detection of Nucleic Acids based on rolling circke amplification [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.

[24] Takeo Y, Kunitada N, Keiichi U, *et al*. Microwave assisted rolling circle amplification [J]. Nucl Acids Symposium Series, 2006, 50: 305–306.

[25] 张健. 利用滚环扩增技术检测食源性致病菌微生物的研究与应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
Zhang J. Detection of food-borne pathogens with rolling circle amplification technique [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.

[26] Rick WY, Wang T, Laura B, *et al*. Application of DNA microarrays in microbial systems [J]. J Microbiol Methods, 2001, 47(3): 257–272.

[27] 王运照, 胡文忠, 李婷婷, 等. 基因芯片在微生物检测中的应用及发展概况[J]. 食品工业科技, 2015, 36(15): 396–400.
Wang YZ, Hu WZ, Li TT, *et al*. Research of application and development of gene chip in microbiology detection [J]. Sci Technol Food Ind, 2015, 36(15): 396–400.

[28] 郑大明, 张静. 基因芯片技术在食品微生物检测和研究中的应用[J]. 食品科学, 2004, 25(8): 188–190.
Zheng DM, Zhang J. Review on gene chip technology applications on food microbiology assay [J]. Food Sci, 2004, 25(8): 188–190.

[29] Vladimir Chizhikov1, Avraham Rasooly, KonstantinChumakov, *et al*. Microarray analysis of microbial virulence factors [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(7): 3258–3263.

[30] 金大智, 文思远, 王升启, 等. 基因芯片技术在检测肠道致病菌方面的应用[J]. 微生物学报, 2006, 46(3): 500–503.
Jin DZ, Wen SY, Wang SQ, *et al*. DNA microarrays and their application in detecting and identifying intestinal pathogens [J]. Acta Microbiol Sin, 2006, 46(3): 500–503.

[31] Edman CF, Mehta P, Press R, *et al*. Pathogen analysis and genetic predisposition testing using microelectronic arrays and isothermal amplification [J]. J Invest Med, 2000, 48(2): 93–101.

[32] 郑东宏. 食品微生物检验新方法简介[J]. 广州食品工业科技, 2004, 20(02): 133–135.
Zheng DH. Brief introduction for new method in food microbe testing [J]. Guangzhou Food Sci Technol, 2004, 20(02): 133–135.

[33] 蒋志国, 杜琪珍. 食品病原微生物快速检测技术研究进展[J]. 食品研究与开发, 2008, 29(3) : 165–169.

Jiang ZG, Du QZ. Areview on qicke detection of pathogenic microbe in food [J]. Food Res Dev, 2008, 29(3): 165–169.

[34] Medina MB, Shelver WL, Fratamico PM, *et al*. Latex agglutination assays for detection of non-O157 Shiga toxin–producing Escherichia coli serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145 [J]. J Food Protect, 2012, 5: 812–997.

[35] 水小溪, 蔡乐, 赵宝华. ELISA 技术在食品安全检测中的应用[J]. 生命科学仪器, 2008, 6(10): 51–54.
Shui XX, Cai L, Zhao BH. Applications on the food safety detection by ELISA [J]. Life Sci Instrum, 2008, 6(10): 51–54.

[36] 陈爱华, 杨坚. 酶联免疫吸附(ELISA)法在食品微生物检测中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2004, (04): 105–111.
Chen AH, Yang J. The Technology of enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) [J]. China Food Addit, 2004, (04): 105–111.

[37] 刘红亮, 李克生, 陈学忠, 等. 大肠杆菌 O157 LPS 单克隆抗体的制备及 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(12): 1260–1265.
Liu HL, Li KS, Chen XZ, *et al*. Preparation of monoclonal antibodies for *E.coli* O157 LPS and development of a sandwich ELISA [J]. Chin Vet Sci, 2011, 41(12): 1260–1265.

[38] 文其乙, 焦新安, 刘秀梵, 等. 直接 ELISA 检测沙门氏菌方法的建立及其应用研究[J]. 中国兽医学报, 1995, 15(02): 105–111.
Wen QY, Jiao XA, Liu XF, *et al*. A direct ELISA for the detection of *Salmonella spp.* in different specimens [J]. Chin J Vet Sci, 1995, 15(02): 105–111.

[39] 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, 6(1): 41–47.
Yang CG, Wang HW, Peng XT, *et al*. Research advances for fast detection of food borne pathogenic bacteria [J]. J Food Saf Qual, 2015, 6(1): 41–47.

[40] 陈俊彦, 肖琼. 免疫胶体金技术的应用与展望[J]. 化学分析计量, 2014, 23(1): 101–104.
Chen JY, Xiao Q. Application and prospect of immune colloidal gold technique [J]. Chem Anal Meter, 2014, 23(1): 101–104.

[41] 盛跃颖, 陈敏. 免疫磁珠分离技术在病原微生物检测中的应用[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(05): 478–481.
Sheng YY, Chen M. Application of immunomagnetic beads separation techniques in microbiology [J]. Chin J Food Hyg, 2011, 23(05): 478–481.

[42] 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.
Liu XX, Tu JM. Immunomagnetic beads separation techniques and its application progress in detection of food borne pathogens [J]. Chin J Antibiot, 2014, 39(12): 956–960.

[43] 胡金强, 雷俊婷, 詹丽娟, 等. 免疫学技术在食源性微生物检测中的应用综述[J]. 郑州轻工业学院学报, 2014, 29(3): 7–11.
Hu JQ, Lei JT, Zhan LJ, *et al*. Application review of immunology technology in detection for foodborne microorganism [J]. J Zhengzhou Univ Light Ind, 2014, 29(3): 7–11.

[44] Xiong QR, Xi C, Jasdeep K, *et al*. Development of an immunomagnetic separation method for effecient enrichment of *Escherichia* coli O157: H7 [J]. Food Control, 2014, 37: 41–45.

[45] 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.

[46] 马丽娜. 基于代谢产物的食源性致病菌快速技术研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2014.
Ma LN. The study of rapid detection techniques of food-borne pathogens based on the metabolites [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2014

[47] Pless P, Futschik K, Schopf E. Rapid detection of *Salmonellae* by means of a new impedance-splitting method [J]. J Food Protect, 1994, 5: 365–444.

[48] 江艳华, 姚林, 王鹏, 等. 噬菌体及其裂解酶在食源性致病菌检测和控制中的应用[J]. 微生物学通报, 2011, 38(10): 1561–1571.
Jiang YH, Yao L, Wang P, *et al*. Application of bacteriophages and their lysins for detection and control of foodborne pathogens [J]. Microbiol China, 2011, 38(10): 1561–1571.

[49] 曹振辉, 金礼吉, 徐永平, 等. 噬菌体控制主要食源性致病菌的研究进展[J]. 食品科学, 2013, 34(5): 274–278.
Cao ZH, Jin LJ, Xu YP, *et al*. Application of bacteriophages in control of foodborne pathogens [J]. Food Sci, 2013, 34(5): 274–278.

[50] 李萌, 王静雪, 林洪. 噬菌体检测食源性致病菌的研究进展[J]. 食品科学, 2010, 31(23): 439–446.
Li M, Wang JX, Lin H. Research progress of the use of bacteriophage to detect foodborne pathogenic bacteria [J]. Food Sci, 2010, 31(23): 439–446.

[51] Masahito Oda, Masatomo Morita, Hajime Unno, *et al*. Rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 by using green fluorescent protein-labeled PP01 bacteriophage [J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70(1): 527–534.

[52] Wolber PK, Green RL. Detection of bacteria by transduction of ice nucleation genes [J].Trends Biotechnol, 1990, 8(10): 276–279.

[53] Ripp S, Jegier P, Johnson CM, *et al*. Bacteriophage-amplified bioluminescent sensing of Escherichia coli O157:H7 [J]. Anal Bioanal Chem, 2008, 391(2): 507–514.

(责任编辑：姚菲)

作者简介

潘兰芳，助理研究员，主要研究方向为食品安全检测与研究。
E-mail: 89426731@qq.com

兰全学，硕士，高级工程师，主要研究方向为食品安全检测与研究。
E-mail: 61723585@qq.com