

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240117002

食源性甲型肝炎病毒快速检测技术研究进展

魏莹^{1,2}, 杨艳歌², 赵健淞^{1,2}, 李涛², 李红娜², 孙冬梅^{1*}, 袁飞^{2*}

[1. 黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院, 大庆 163000; 2. 中国检验检疫科学研究院, 国家市场监督管理总局重点实验室(食品质量与安全), 北京 100176]

摘要: 病毒在食源性疾病的爆发中起着至关重要的作用, 其中, 甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV)感染后能够致人衰弱, 并引发急性肝衰竭。由于其传染迅速, 影响范围广, HAV 污染已经给消费者带来了严重的健康风险, 且在全球范围内造成了大规模的食源性疫情和经济损失。因此, 早期快速准确的检测 HAV 对于食品安全和疫情暴发的溯源至关重要, 以便及时确定并召回受污染的食品, 防止感染的进一步发生。传统的 HAV 检测方法由于检出率不高以及病毒在细胞内的培养周期长等问题, 往往耗时费力, 无法快速有效地对其进行检测。本文对目前报道较多的 HAV 快速检测技术进行了阐述和梳理, 对各项技术的检出限、检测时间以及优缺点进行了比较, 并对 HAV 快速检测技术研究进行了展望, 为后续 HAV 的快速检测研究提供依据, 也有助于进一步探讨与开发 HAV 快速检测的新技术, 以有效防止 HAV 的传播与危害。

关键词: 甲型肝炎病毒; 快速检测; 分子生物学; 免疫学

Research progress of rapid detection technology for foodborne hepatitis A virus

WEI Ying^{1,2}, YANG Yan-Ge², ZHAO Jian-Song^{1,2}, LI Tao², LI Hong-Na²,
SUN Dong-Mei^{1*}, YUAN Fei^{2*}

[1. College of Life Science and Technology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163000, China;
2. Key Laboratory of Food Quality and Safety for State Market Regulation (Chinese Academy of Inspection and Quarantine), Beijing 100176, China]

ABSTRACT: Viruses play a crucial role in the outbreaks of foodborne disease, among of which, hepatitis A virus (HAV) infection can cause debilitation and acute liver failure. Due to its rapid transmission and wide range of impacts, HAV contamination has posed serious health risks to consumers and caused large-scale foodborne outbreaks and economic losses around the world. Therefore, early, rapid and accurate detection of HAV is essential for food safety and traceability of outbreaks, so that contaminated food can be identified and recalled in time to prevent further infections. Because of the low detection rates and the long incubation period of the virus in cells, HAV detection methods are often time-consuming and laborious, which make it difficult to quickly and effectively detect for it. This article described and

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFF1100900、2022YFF0607900)

Fund: Supported by the National Key Research and Development Program of China (2022YFF1100900, 2022YFF0607900)

*通信作者: 孙冬梅, 博士, 教授, 主要研究方向为微生物学。E-mail: sdmlzw@126.com

袁飞, 博士, 研究员, 主要研究方向为食源性微生物。E-mail: feiyuan@163.com

*Corresponding author: SUN Dong-Mei, Ph.D, Professor, Heilongjiang Bayi Agricultural University, No.5, Xinfeng Road, High-tech Zone, Daqing City 163000, China. E-mail: sdmlzw@126.com

YUAN Fei, Ph.D, Professor, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, No.11, Ronghua South Street, Yizhuang Economic Zone, Beijing 100176, China. E-mail: feiyuan@163.com

summarized the currently reported HAV rapid detection techniques, comparing the limits of detection, detection times, as well as their advantages and disadvantages, and prospected the research on HAV rapid detection technologies, which is expected to provide a basis for further research on rapid detection of HAV, and also contribute to the exploration and development of new technologies for rapid detection of HAV, so as to prevent the spread and harm of HAV.

KEY WORDS: hepatitis A virus; rapid detection; molecular biology; immunology

0 引言

甲型肝炎病毒(hepatitis A virus, HAV)属于小RNA病毒科嗜肝病毒属,仅有一个血清型和一个抗原抗体系统。1973年, HAV首次由 Feinslone 通过免疫电镜技术在甲型肝炎急性期患者的粪便中发现^[1]。人类 HAV 毒株共分为3种基因型(I、II和III)和7种亚型(IA、IB、IC、IIA、IIB、IIIA和IIIB),世界范围内最普遍的是IA亚型。HAV会导致以肝脏损伤为主的急性肠道传染性疾病,人类是该病毒目前已知的唯一储存宿主,其在人体中的潜伏期通常为14~28 d,任何年龄均可患本病,感染后的恶化和相关并发症在老年人、免疫功能低下患者、慢性肝病患者和孕妇中较为常见,极少数患者感染 HAV 后会引发致命的急性肝功能衰竭^[2]。据2022年世界卫生组织估计,每年约有150万人感染 HAV^[3]。

HAV 主要传播途径为粪-口传播,例如人与人之间的接触,或食用受污染的食物或水^[4]。冷链运输食品如海产品、新鲜浆果中 HAV 的污染尤为严重,许多国家的研究和数据证实了双壳类软体动物贝类在过滤海水来获取食物时,能将海水中的病毒积累于消化系统,从而导致病毒的传播,目前 HAV 的重要传播载体为牡蛎和贻贝^[5]。由于 HAV 性质稳定,可在环境中长期存在,且在低温环境中仍能保持其传染性,普通的消毒或控制细菌病原体的食品制作程序并不能完全杀灭 HAV,因此 HAV 具有极大的污染食品的能力^[6]。HAV 疾病一旦暴发,传染速度极快且容易复发,难以消除,并且会通过人与人之间的传播,导致疫情持续时间延长,在社区流行数月^[7]。1988年上海市由于受粪便污染的毛蚶未经煮熟而被食用,引起了建国以来最大规模的一次甲型肝炎爆发,短期内导致31余万人感染,47人死亡^[8]。因此,快速灵敏的 HAV 检测技术对于监管机构进行常规监测和疫情调查至关重要,以便确定疫情的来源,并及时召回受污染的食品以防止进一步感染^[9]。

传统的 HAV 检测方法如电镜观察法和细胞培养法,由于检出率不高以及 HAV 难以适应细胞,培养周期太长等因素,无法快速有效的对其进行检测。近些年,随着技术进步,目前主要采用分子生物学和免疫学两大类技术进行 HAV 检测,相较于传统方法,不仅缩短了检测时间,减少了操作烦琐度,增加了灵敏度,还大大提高了检测结果的准确度,从而被广泛应用^[10]。因此本文就这两类技术进行综述,比较各项检测技术的检出限与检测时间,并分析其优缺点,为后续 HAV 快速检测技术的发展和完善以及

新技术的研发及应用提供参考。

1 免疫学技术

抗原与抗体的特异性结合反应是一切免疫测定技术的基本原理,免疫学技术具有检测快速、灵敏度高、特异性强等特点^[11]。但截至目前,大部分研究都是针对血清基质,针对复杂的食品基质一般需要增加病毒洗脱步骤,然后再采用免疫学方法检测。采用该种技术进行 HAV 快速检测主要有以下6类。

1.1 酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是目前应用最广泛的免疫学检测技术,也是 HAV-IgM 检测的经典方法。该技术的原理是通过在酶上标记二抗,由于抗原抗体反应具有特异性,通过观察酶催化底物后的颜色变化来判断试验结果。黄旭华^[12]分别采用 ELISA 与胶体金法对患者的 HAV 与戊型肝炎病毒(hepatitis E virus, HEV)进行检验,结果表明 ELISA 的 HAV 诊断率为84.60%,要明显优于胶体金法(61.50%)。李冬琦等^[13]使用 HAV 多克隆抗体和 HAV 单克隆抗体酶结合物建立双抗体夹心 ELISA,该方法的灵敏度为0.546875 IU/mL,且与其他人用疫苗和辅料成分无交叉反应。ELISA 虽是衡量其他免疫学检测技术准确率的标准,但因为该测定需要多个步骤,包括使用几种试剂的添加和洗涤,直到最后一步抗体-抗原结合产生可测量的信号后才可观测结果,与其他技术相比相对耗时,价格昂贵;而且,ELISA 最大的问题是当样本浓度较高时,竞争法的假阴性率相对较高^[14]。

1.2 电化学发光免疫分析法

电化学发光免疫分析法(electro-chemi-luminescence immunoassay assay, ECLIA)是主要利用电极表面特异性电化学发光反应进行免疫分析的技术^[15]。其原理主要是利用发光标记物与靶物质之间结合的特异性,在碱性环境下发光,通过测定光能间接得到待测物的浓度,整个反应过程在全自动化封闭体系中进行,避免了交叉污染,无人操作等误差的影响^[16]。与 ELISA 相比,其假阳性率降低、检验时间较短、标本测定效率高,更接近于临床流行病学。蔡贤惠^[17]将 ELISA 与 ECLIA 对 HAV-IgM 抗体的检测进行了对比评价,结果表明 ELISA 虽具有较高的敏感度(100.00%),但特异性不如 ECLIA,且 ECLIA 测定时能够实现全自动化,更适用于临床诊断。但 ECLIA 同样存在仪器试剂成本较高

的问题,且由于其原理是根据对光能进行测定从而间接得到待测物浓度,所以也存在检测精度不高的问题。

1.3 斑点金免疫渗滤测定法

斑点金免疫渗滤测定法(dot immune-gold filtration assay, DIGFA)是在具有渗滤作用的微孔滤膜上包被已知的抗原或抗体,将其作为固相载体,在加入待测样本后抗原抗体快速结合并反应生成红色的可见斑点,该反应过程省去了底物显色的步骤^[18]。该技术针对不同待检物主要有两种检测方法,如双抗夹心法针对抗原的检测、间接法用于检测抗体等。刘瑛等^[19]建立了检测抗-HAV 抗体的快速 DIGFA,灵敏度和特异度分别为 92.80%和 92.98%,结果与 ELISA 和 ECLIA 一致。但该技术作为一种定性检测技术,不仅无法同时检测多种样品,且对于低浓度样本检测时灵敏度低,其灵敏度和特异性依赖于抗体的质量和选择,常导致临床出现漏检等问题,因此其实际应用受到了一些限制。

1.4 近红外免疫层析技术

近红外免疫层析技术(near-infrared immunochromatographic assay, NICA)是将近红外荧光与免疫层析技术相结合的一种侧向流技术,通过近红外荧光染料对病毒单抗进行标记,从而制备近红外免疫层析试纸条,实现对目的病毒抗体进行快速检测^[20]。万晓楠等^[21]建立了一种应用 Dyligh 800 荧光染料的 NICA 试纸条快速检测食源性 HAV 的技术,由于生物基体极少在荧光探针 Dyligh 800 区域自发荧光,因此具有背景荧光量小、检测灵敏度高的优点。该技术最低检出限为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,与反转录-聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)法的符合率达 100%。但由于该检测技术需要依赖抗体,试纸条虽便于携带但成本相对较高,且存在信号强度低,定量辨别力差等通病,因此其推广应用受限。

1.5 胶体金免疫层析技术

胶体金免疫层析技术(gold immunochromatography assay, GICA)是以胶体金为示踪标志物,将二抗标记上胶体金颗粒,通过待测物与含有反应试剂的层析条上的特定受体发生高特异亲和性免疫反应生成标记物,该反应可直接观察到检测结果^[22]。陈凤仙^[23]采用 GICA 和 ELISA 对 20 例样本的 HAV-IgM 检测效果进行了比较,发现 ELISA 验准确率为 95.00%,显著优于 GICA (60.00%)。陆寒等^[24]通过对 1152 份甲型肝炎 IgG 阳性样品进行检测,同样对 GICA 和 ELISA 的检测效果进行了比较,结果显示 HAV 只有对浓度不低于 20 IU/mL 的甲型肝炎抗 HAV-IgG 检测特异性较高,而对于低于 20 IU/mL 的 IgG 抗体的检测不如 ELISA 敏感。但 GICA 技术的试剂与样品用量极少,无需仪器设备,操作步骤简单快捷,极大程度上避免了因复杂操作而引起的实验误差,因此检测时间与传统的 ELISA 相比有较大的优势,且胶体金试剂与实验结果均能够长期保存。

1.6 3D 探针

3D 探针是使用肽配体-人铁蛋白重链(human ferritin heavy chain, hFTH)纳米粒子的常见载体,通过将目的抗原的多拷贝基因呈递到 hFTH 纳米颗粒表面合成的,该探针能够通过表面上的纳米颗粒的时程聚类实现检测信号的增强,从而进行精确的一步免疫分析^[25]。KWON 等^[26]应用该技术检测 HAV 感染患者血清中的抗 HAV 抗体,只需将甲型肝炎患者血清和还原剂添加到含有金离子和 3D 探针(即 vAgNPs)的预测定溶液中,即可进行一步免疫测定,5~20 min 内即可产生明显的光学信号,能够准确区分抗 HAV-IgM 和 IgG 抗体。目前基于 vAgNP 的免疫测定没有产生任何假阴性/阳性信号,灵敏度与特异性较高。但此技术的相关报道较少,对于针对不同基质的检测等内容还需进一步丰富。

2 分子生物学技术

由于食物中病毒浓度较低,加上食物基质的复杂性,使检测食物样本中的病毒变得困难。分子生物学技术具有灵敏度高、漏检率低等优势,即使食物样本中病毒含量较低,也可通过 PCR 将目的片段进行扩增,从而进行检测^[27]。目前报道较多的 HAV 分子生物学检测技术主要有以下 7 类。

2.1 反转录-聚合酶链式反应

传统的 PCR 方法由于操作较为烦琐,存在对操作人员技术、仪器要求高且耗时长等问题,无法便携快速地进行检测,因此在一些疾病暴发区或偏远地区的应用受阻^[28]。RT-PCR 是将 RNA 的反转录(reverse transcription, RT)与 PCR 相结合的技术,其原理是通过反转录获得病毒的总 RNA 或 mRNA 后,在反转录酶的作用下将 RNA (mRNA) 反转录成 cDNA,进行 PCR 扩增,是目前病毒检测应用最广泛的技术。目前该技术已经被发展成能够通过一次反应同时检测多种病毒或同一种病毒的不同基因型的多重 RT-PCR。PROBERT 等^[29]开发了一种能够检测 HAV 3 种亚型 IA、IB 和 IIIA 的三重 RT-PCR,各亚型检出限分别为 0.1、10 与 10 copies/反应,与单重 RT-PCR 分别检测各基因型相比,未观察到各基因型靶标的检出限差异且在任何检测浓度下均未检测到异源分析物的交叉反应性。由于引物间的碱基会互补产生二聚体,从而容易导致实验结果产生假阳性,CHOU 等^[30]采用优化探针的解链温度并缩短两个原始引物的方法减少该情况的发生,改进后方法的检出限为 $3.7 \times 10^{-2} \sim 6.6 \times 10^{-2}$ 半数组织培养感染量(50% tissue culture infectivedose, TCID₅₀),检测灵敏度比先前的检测方法高 10~1000 倍。RT-PCR 技术具有特异性好、灵敏度高的优势,但需要不同温度的热循环扩增,且必须依赖精密的核酸扩增仪,所以更多的适用于实验室检测^[31]。

2.2 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)是目前应用最广泛的技术,该技术通过向原始的 PCR 反应

体系中加入荧光标记探针或相应的荧光染料, 连续监测指数扩增期间的荧光信号变化, 从而通过荧光信号的积累实时监测整个 PCR 进程, 由于在 PCR 扩增的指数时期, 模板的 Ct 值和该模板的起始拷贝数存在线性关系, 进而通过计算标准曲线对待测模板进行定量分析^[32]。针对病毒 RNA 需要先进行反转录, 即 RT-qPCR。国际标准化组织 (International Organization for Standardization, ISO) 采用该技术制定标准 ISO 15216-2 用于食品中 HAV 的检测。WANG 等^[33]通过 RT-qPCR 对比了 ISO 15216-2: 2019 标准方法与增加了聚乙二醇沉淀程序两种从马尼拉蛤中富集 HAV 的技术, 灵敏度分别为 102.5 细胞培养半数感染量/mL (cell culture infective dose 50%, CCID₅₀) 和 101.5 CCID₅₀/mL。ELMAHDY 等^[34]建立了绿色蔬菜中 HAV、诺如病毒 (norovirus, NoV) GI 和 NoV GII 的 RT-qPCR 检测方法, 对 HAV 的检出率可达 31.2%, 平均浓度为 9.2×10^4 genome copies/g, NoV GI 和 NoV GII 的检出率分别为 20% 和 30%, 平均浓度分别为 1.1×10^4 genome copies/g 和 2.03×10^3 genome copies/g。采用 RT-qPCR 技术还能通过一次反应进行多重检测, 从而提高检测效率, 如 YU 等^[35]建立了一种由 5 对引物组成的同时检测 Nov GI/GII、HAV、轮状病毒 (rotavirus, RV) 和腺病毒 (adenovirus, AdV) 5 种致病性病毒的多重 RT-qPCR 方法, 对 NoV GI、NoV GII 和 HAV 的检出限均为 10^1 copies/ μ L, 对 RoV 和 AdV 的检出限为 10^2 copies/ μ L, 且病毒间不存在交叉作用。除了能进行多重检测以外, 为了能对检测过程进行控制, FUENTES 等^[36]开发了一种以门戈病毒为过程控制病毒, 可同时检测 HAV、NoV GI、NoV GII 的四重 RT-qPCR 方法, 结果显示, 对于 NoV GII, 四重检测与单重检测具有相似的检出限, 对于 HAV 和 NoV GI, 四重检测的检出限比单重检测高 10 倍。但在多重检测过程中, 由于多个模板在同一个反应中结合, 试剂之间的竞争增加常导致荧光信号低于标准单重的 PCR, 因此其灵敏度略低, 但可满足欧洲标准化委员会开发的用于选定食品中病毒检测方法的要求。RT-qPCR 技术能够进行快速定性检测, 且具有成本低、重复性好、可靠性高等优点, 已经被广泛用于食品行业检测、环境监测、临床疾病诊断等^[37], 但该技术目前只能进行半定量, 尚无法进行精准定量。

2.3 微滴式数字 PCR

微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 是在普通 PCR 前先对样品进行微滴化处理, 即利用微滴发生器将含有核酸分子的荧光 PCR 反应体系“分割”为数万个纳升级的微滴, 核酸分子在各微滴中随机分布, 每个微滴均作为一个独立的反应, 扩增后利用微滴分析仪对各微滴分别进行检测, 通过阳性微滴的比例以及泊松分布原理计算出待测分子的初始拷贝数或浓度, 进而对初始反应体系中的核酸靶分子数做到绝对定量^[38]。经 PCR 扩增后, 逐个对每个微滴进行检测, 其定量不需要标准曲线, 且精密度明显高于 RT-qPCR^[39]。针对 RNA 病毒, 同样需要在 ddPCR 的

基础上与 RT 结合, 即 RT-ddPCR。COUDRAY-MEUNIER 等^[40]证实了 RT-ddPCR 技术定量是根据信号的有无而不是荧光强度的变化来进行, 因此很少会由于某些与基质类似的物质引起荧光强度的变化, 避免了 qPCR 因基质相关抑制而导致的扩增效率偏差, 并有望发展到对食品样品中其他人类病原体的定量检测。PERSSON 等^[41]的评估证实了 RT-ddPCR 的检出限 (95%) 比 RT-qPCR 高出 10%, 且 RT-ddPCR 能够在不需要外部校准曲线的情况下同时定量不同的靶标, 并检测出病毒浓度随时间的微小变化, 更适用于食品控制和临床研究。HAN 等^[42]将探针等比例混合进一步开发出了能够同时检测 HAV 与 NoV GI、NoV GII 的三重 ddPCR 方法, NoV GI、NoV GII 和 HAV 的检出限分别为 7.5、5.0 和 5.0 copies/反应。但典型的 ddPCR 的液滴形成与扩增和检测都分别在不同仪器中完成, 只能检测已知的有针对性的突变, 并且每个测定能检测到的突变数量有限, 与 RT-qPCR 相比成本高的同时更加复杂耗时。

2.4 环介导等温扩增技术

环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是 2000 年首次由 Notomi 等人提出的一种新型核酸扩增技术, 相较于其他核酸等温扩增技术发展较为成熟^[43]。其原理是设计 4 种能够特异性识别目的基因 6 个区域的引物 (外引物 F3、B3 和内引物 FIP、BIP)。在初始扩增阶段, 外引物 F3 与 B3 延伸, 同时剥离相应的内引物, FIP 与 BIP 延长生成的子链在形成单链后折叠形成茎环结构, 得到两端都有茎环结构的哑铃状循环模板; 随后, 茎环结构上的部分单链与内引物在链置换 DNA 聚合酶的作用下杂交并延伸, 再次生成单链并从原来的模板上剥离下来。重复以上步骤, 最终获得大小不一、具有类似单体结构的产物^[44]。常用的 LAMP 扩增产物检测方法有荧光法、浊度法、琼脂糖凝胶电泳法、试纸条法以及添加染料指示剂等。李雪梅等^[45]建立了 HAV 的 LAMP 检测技术, 通过筛选和优化, 最终确定检测温度为 63°C, 检测灵敏度为 10 copies/ μ L, 特异性强。邱丰等^[46]通过添加快速引物, 提高了 HAV 的检测灵敏度, 达到 5 TCID₅₀/mL。崔健等^[47]将该技术与 PCR 就扩增效率进行了比较; 与 RT-PCR 就检出限以及实际样品检测进行了比较, 结果表明, LAMP 与 PCR 扩增效率一致, 检测灵敏度为 10.76 copies/ μ L, 实际样品检测结果与实时荧光 RT-PCR 一致。WU 等^[48]建立了一种用于检测 HAV 的 LAMP 与实时生物发光分析 (bioluminescent assay in real-time, BART) 相结合的 RT-LAMP-BART 技术, 该技术对绿色洋葱、草莓、贻贝和牛奶中 HAV 的检出限分别为 8.3×10^0 PFU/15 g、 8.3×10^1 PFU/50 g、 8.3×10^0 PFU/5 g 和 8.3×10^0 PFU/40 mL, 结果与 RT-PCR 结果一致。RT-LAMP 技术的检测结果能够直接观察, 并且检测具有较高的灵敏度与特异性, 适用于现场监测, 有着良好的应用前景, 但值得注意的是, 该技术由于在扩增过程中需要加入多条引

物,同样存在碱基会互补产生二聚体的问题,进而产生假阳性,所以在设计引物的过程中要求更高且更困难^[49]。

2.5 多酶恒温快速扩增技术

多酶恒温快速扩增(multi-enzyme isothermal rapid amplification, MIRA)技术是 2019 年开发出的一种全新的常温恒温扩增技术^[50]。该技术依靠 4 种功能蛋白,即单链结合蛋白(single strand DNA-binding protein, SSB)、DNA 解旋酶 egp 41、重组酶-Rec A 和 DNA 聚合酶-DNA pol I^[51]。在常温恒温条件下,引物与重组酶-Rec A 形成 Rec/ssDNA 复合体,在解旋酶 gp41 和 SSB 的作用下,侵入双链 DNA 模板形成 D-loop 区域,快速延伸从而实现扩增^[52]。当模板为 RNA 时,特异性引物可以在逆转录酶的作用下直接合成 cDNA 作为 MIRA 反应的模板^[53]。SUN 等^[54]将 RT-MIRA 和侧流层析试纸条(lateral flow dipstick, LFD)相结合,对 HAV 的 5'UTR 保守区域进行测定,该技术在 37°C 下,12 min 内即可完成 MIRA 扩增,LFD 试纸条的肉眼观察可在 10 min 内完成,检测灵敏度为 1 copies/ μ L,与传统的 RT-PCR 进行比较,其准确率可达到 100%。该技术不依赖特殊仪器,在资源有限地区,特别是 HAV 高流行地区具有很大的应用潜力。但由于该技术近几年刚刚兴起,市场认知度还比较低,还需进一步的数据积累研究。

2.6 多功能分子印迹传感器

分子印迹技术是在聚合物单体溶液中以目标分子作为模板与交联剂进行聚合,形成复合物单体后再通过物理或化学方法将模板分子去除,从而得到分子印迹聚合物(molecularly imprinted polymer, MIP),制得的 MIP 中具有多重作用的位点,且能够在空间和结合位点上匹配模板分子的空穴,具有高度选择性^[55]。在实际印迹过程中,当目标模板分子因价格昂贵等问题而不能作为实际模板,可选用虚拟模板代替目标模板^[56]。ZHANG 等^[57]研制出了一种基于 MIP 技术的磁共振光散射传感器用于测定 HAV,线性范围为 0.02~1.40 nmol/L,检出限为 6.2 pmol/L,检测快速且灵敏度高,但孵育时间还有待进一步缩短。LUO 等^[58]分别制备了 HAV 和乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV) MIP 的荧光传感器,对 HAV 和 HBV 的检出限分别为 3.4 pmol/L 和 5.3 pmol/L,检测均能在 20 min 内完成,不仅对 HAV 和 HBV 的同时检测具有良好的灵敏度和选择性,而且检测结果还可以通过紫外灯(365 nm)进行肉眼观察。但该技术在对病毒进行印记的过程中,还需要分析考虑并系统评估目标大小、溶解度、脆性和成分复杂性等关键因素,操作烦琐,推广应用受限。

2.7 基因芯片技术

基因芯片技术主要通过核酸分子杂交将高密度的 DNA 片段按特定顺序附着在固相表面,并采用同位素或荧光材料对 DNA 探针进行标记,从而实现基于碱基互补杂交

的详细基因表达和监测研究,因其通量高、自动化程度高等被广泛应用在各个领域^[59]。万志香^[60]建立了一种可视化纳米金探针 HAV 检测基因芯片技术,该技术在银染 12 min 的情况下可以检测 100 fM HAV 扩增子,且结果与 ELISA 检测抗-HAV-IgM 结果无显著性差别。YU 等^[61]首次展示了利用肠道病毒平铺微阵列对人工接种并提取自新鲜农产品中的 HAV 和 NoV 进行快速分子鉴定,结果显示,绿色洋葱中 HAV 的检出限为 1.2×10^5 基因组当量。基因芯片检测技术除了快速灵敏,还具有能够实现高通量、自动化等优势,在生命科学及相关领域中已呈现出广阔的应用前景,但由于其检测需要昂贵的尖端仪器,还未广泛应用于市场监测。

2.8 二代测序技术

二代测序技术(next-generation sequencing, NGS)是基于 PCR 和基因芯片发展而来的一种 DNA 测序技术,NGS 引入了可逆终止末端,从而实现边合成边测序,通过在 DNA 复制过程中捕捉新添加的碱基所携带的特殊标记(一般为荧光分子标记)来确定 DNA 的序列,为了达到增强荧光信号强度以读出 DNA 序列的目的,单个 DNA 分子必须扩增成由相同 DNA 组成的基因簇后同步进行复制^[62]。NGS 一次上机可同时检测大量 DNA 分子,具有快速检测、高通量等优势。LEE 等^[63]开发了基于多重 PCR 的 NGS,直接从甲型肝炎患者的血清和粪便样本获得几乎全基因组序列来定义 HAV 基因型,以确保在含有相对低病毒载量的临床样品中 HAV 的高基因组覆盖率。结果发现,与全基因组序列相比,VP3 基因具有较好的同源性,可作为 HAV 暴发流行的基因型溯源的候选基因。但 NGS 目前也存在局限性,由于读长增长会导致基因簇复制的协同性降低,使碱基测序质量下降,严格限制了 NGS 的读长(不超过 500 bp),且价格相对昂贵,对数据分析人员的要求较高,尚未在实验室实现全面普及。

本文将不同检测技术所涉及的检出限、检测时间、优缺点等信息汇总于表 1。

3 结束语

越来越多的流行病学研究表明,由 HAV 引起的甲型病毒性肝炎作为一种传染性疾病,其传播迅速,呈全世界范围分布。我国作为甲型病毒性肝炎的高发区,发病率位居各型肝炎的首位。因此,能够做到在现场准确快速地对 HAV 进行检测,有利于减少因摄入病毒引起的感染,对食品安全和公共卫生具有重要意义,同样也是目前需要攻克的一个难点^[64]。

随着科学的不断发展,国内外相关的 HAV 快速检测技术正在不断地更新与完善,各种新型检测技术层出不穷,虽然目前已报道的各种技术在快速性、便利性、准确性、特异性等方面都有了很大的提升,但仍存在一些问题:

表1 甲型肝炎病毒快速检测技术
Table 1 Rapid detection of hepatitis A virus

类别	检测方法	检出限	检测时间/min	优点	缺点	文献
免疫学技术	DIGFA	/	10	可直接观察结果,检测时间缩短,结果直观可靠。	对于低浓度样本,检测时灵敏度低,常导致临床出现漏检且成本较高。	[19]
	NICA	1 μg/mL	15	特异性良好,灵敏度较高,与肠道病毒71型、AdV、Rv、NoV无交叉反应。	检测过程需要依赖抗体,进而导致成本增加。	[21]
	GICA	20 IU/mL	20	操作简单快捷,胶体金试剂保存时间长。	但易产生弱阳性,准确度不高。	[24]
	3D 探针	0.01 μM	5~20	反应迅速,准确度高,灵敏度和特异性可达100%,能够定量测定。	作为一种新方法,目前发展尚浅。	[26]
	RT-PCR	$3.7 \times 10^{-2} \sim 6.6 \times 10^{-2}$ TCID ₅₀	/	试剂成本低,耗时少,可以做到多重检测等优点。	依赖精密的核酸扩增仪,程序复杂,更适用于实验室检测。	[30]
	RT-qPCR	10 ¹ copies/μL	/	灵敏度高,准确度高,能够做到快速定性检测。	无法做到精确定量,且需要专业仪器辅助,因此推广应用受限。	[35] [36]
	RT-ddPCR	9.2 copies/反应 5.0 copies/反应	/ /	能够检测出病毒浓度随时间的微小变化。	只能对已知且有针对性的突变进行检测,并且每个测定能检测到的突变数量有限。	[41] [42]
分子生物学技术	RT-LAMP	10 copies/μL 5 TCID ₅₀ /ml	60~120 /	不依赖大型仪器设备,检测结果能够直接观察,并且检测灵敏度高,特异性强,适用于现场监测。	容易造成气溶胶污染,影响检测结果。	[45] [46] [47]
		10.76 copies/μL	40			[47]
		8.3×10 ⁰ PFU/5 g	/			[48]
	RT-MIRA	1 copies/μL	47	不需要特殊仪器,可资源稀缺地区普及。	目前的研究只针对HAV的质粒DNA进行检测,还需要进一步对HAV病原体进行检测来确定其真实情况下的可行性。	[54]
	多功能分子印迹传感器	6.2 pmol/L	/	检测快速,具有良好的灵敏度和选择性,而且检测结果还可以直接通过肉眼观察。	该技术操作烦琐,不易推广。	[57]
		3.4 pmol/L	20			[58]
	基因芯片技术	1.2×10 ⁵ 基因组当量	/	具有快速、灵敏、高通量、自动化等优点。	由于该技术检测需要昂贵的尖端仪器,还未广泛应用于市场监测。	[61]
NGS	10 ² copies/μL	/	快速检测,高通量,覆盖度高。	价格相对昂贵,对数据分析人员的要求较高,尚未在实验室实现全面普及。	[63]	

注: /表示文献中未提及。

(1)灵敏度与特异性平衡的问题。免疫学技术虽然灵敏度高,但特异性不足,容易产生交叉反应。分子生物学技术即使标本量很少,也可以通过核酸扩增得到可分析的片段,这在标本紧缺的情况下优于免疫学技术^[65],是目前HAV检测应用最广泛的技术。但灵敏度较高,实验过程中容易受气溶胶或反复开盖等影响,引起污染,导致出现假阳性结果,因此

对实验条件要求严格。(2)检测下限的问题。目前的快检方法对于低浓度HAV的检测效果有限,这可能导致一些早期感染或低载量病毒的漏检。尤其食品基质多样,组成复杂,干扰物质多,更容易造成漏检。(3)现场应用的问题。目前报道的技术大多仍需依赖于复杂的、高成本的仪器和专业的操作人员等,这极大地限制了它在日常检测和低资源环境中的使用,

无法完全适用于现场快速检测,所以还需要进一步创新研究^[66]。目前的快速检测技术尚无法直接分析病毒的活性,只能通过检测病毒载量来间接推断病毒的复制能力和感染程度,无法准确区分是活病毒还是病毒核酸残留。

因此未来在 HAV 快速检测方面提出以下建议:

(1)在平衡灵敏度和特异性方面,可以针对不同食品基质、不同应用场景等选择适当的检测方法,在确保能够检测到目标病毒的同时减少非特异性反应。例如,ELISA 作为抗体应用最广泛的一种方法,已经逐渐成为了一种检测金标准,而用适配体代替抗体,从而产生了酶联适配体试验,在保证灵敏度的基础上提高了检测的特异性。(2)在提高检测下限方面,可开发更高效的 HAV 病毒富集和分离技术,提高 HAV 富集纯化效果,降低检测下限,避免基质效应等问题。如王娉等^[67]采用聚乙二醇沉淀富集小浆果中低剂量感染的 HAV,回收率可以达到 15.51%,对 HAV 减毒疫苗的检测灵敏度可低至滴度 4.49 CCID₅₀/mL,对 HAV 质粒的检测灵敏度可低至 35 copies/ μ L。另外,还可以筛选和建立高效的 RNA 提取方法,快速获取 HAV 检测模板,从而提高后续检测的准确性和灵敏度。(3)在提高现场实际应用方面,可研制能在现场稳定运行的便携式快检设备,实现即时检测和数据分析。或开发不依赖设备的现场快速检测技术,如重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)、重组酶介导等温扩增(recombinase-aided amplification, RAA)和酶促重组等温扩增(enzymatic recombinase amplification, ERA)等低温扩增技术,这些技术在 37~42°C 下即可反应,与人体温接近,因此可以夹在腋下或握在手中进行检测,并且可以结合显色剂、试纸条等直接进行结果判定,检测时间仅需 5~30 min,大大缩短了检测时间,具有很大的现场应用潜力^[68]。

综上所述,HAV 的快检技术仍有很大的发展空间。未来希望积极探索新的技术领域,开发更多高效的、准确的、灵敏的、便捷的、现场适用的食品中 HAV 快速检测技术,可以将多种检测方法联合,如将纳米技术、生物传感器和生物信息学等技术结合,利用纳米材料提高检测的灵敏度,利用人工智能辅助分析提高检测结果的准确性,综合快速检测、富集纯化、定性定量、活性分析等方面技术的优势,形成合力,从而解决当前存在的问题,为有效保障食品安全,防止病毒感染,避免爆发感染事件提供更为有效的技术支撑和有力保障。

参考文献

- [1] HAVELAAR AH, KIRK MD, TORGERSON PR, *et al.* World health organization foodborne disease burden epidemiology reference group. World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010 [J]. *PLoS Med*, 2015, 12(12): e1001923.
- [2] 王艺博, 孙小雨, 徐艳玲, 等. 甲肝病毒及其疫苗研究现状[J]. *中国生物制品学杂志*, 2018, 31(3): 315-318.
WANG YB, SUN XY, XU YL, *et al.* Research status of hepatitis A virus and vaccine [J]. *Chin J Biol*, 2018, 31(3): 315-318.
- [3] World Health Organization. WHO Position Paper on hepatitis A vaccines—October 2022 [J]. *Weekly Epidemiol Rec*, 2022, 97: 493-512.
- [4] MEDIC S, ANASTASSOPOULOU C, PUSTAHJIA T, *et al.* Epidemiological transition and strategies for the control of hepatitis A in Serbia [J]. *Viruses*, 2023, 15(3): 753.
- [5] WU R, MENG B, CORREDIG M, *et al.* Efficient capturing and sensitive detection of hepatitis A virus from solid foods (green onion, strawberry, and mussel) using protamine-coated iron oxide (Fe₃O₄) magnetic nanoparticles and real-time RT-PCR [J]. *Food Microbiol*, 2022, 102: 103921.
- [6] SÁNCHEZ G. Processing strategies to inactivate hepatitis A virus in food products: A critical review [J]. *Compr Rev Food Sci F*, 2015, 14(6): 771-784.
- [7] LIN KY, SUN HY, HUANG YS, *et al.* Durability of serologic responses to inactivated hepatitis A virus vaccination among people living with HIV following acute hepatitis A outbreak: A 5-year follow-up study [J]. *Emerg Microb Infect*, 2023, 12(2): 2239946.
- [8] 俞顺章. 甲型肝炎流行促进了“大卫生”的诞生[J]. *上海预防医学*, 2017, 29(1): 1-3.
YU SZ. Hepatitis A contributed to the birth of the “public health at large” [J]. *Shanghai J Prev Med*, 2017, 29(1): 1-3.
- [9] COLA G, FANTILLI AC, PISANO MB, *et al.* Foodborne transmission of hepatitis A and hepatitis E viruses: A literature review [J]. *Int J Food Microbiol*, 2021, 338: 108986.
- [10] 朱金艳, 高彬, 孙森森, 等. 贝类中甲肝病毒检测技术研究进展[J]. *食品安全导刊*, 2022(13): 132-134.
ZHU JY, GAO B, SUN MM, *et al.* Research progress on detection technology of hepatitis A virus in shellfish [J]. *China Food Saf Magaz*, 2022, (13): 132-134.
- [11] 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]. *轻工学报*, 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 Light Ind*, 2014, 29(3): 7-11.
- [12] 黄旭华. 感染性疾病甲肝、戊肝的免疫学检验[J]. *临床检验杂志(电子版)*, 2018, 7(4): 731.
HUANG XH. Immunological tests for infectious hepatitis A and hepatitis E [J]. *Clin Lab J (Electron Ed)*, 2018, 7(4): 731.
- [13] 李冬琦, 高旭哲, 潘皓, 等. 甲型肝炎病毒抗原含量双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立及验证[J]. *生物化工*, 2023, 9(1): 12-17, 22.
LI DQ, GAO XZ, PAN H, *et al.* Development and validation of double antibody sandwich ELISA for determination of hepatitis A virus antigen content [J]. *Biol Chem Eng*, 2023, 9(1): 12-17, 22.
- [14] 令海英. 化学发光与酶联免疫吸附试验在乙肝病毒血清学检验中的应用对比[J]. *智慧健康*, 2023, 9(23): 13-16, 21.
LING HY. Application comparison of chemiluminescence and ELISA in serological test of hepatitis B virus [J]. *Smart Health*, 2023, 9(23): 13-16, 21.
- [15] 李轶春. 病毒性肝炎血清标志物检测方法新进展[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2020, 12(12): 1753-1756.
LI YC. New progress in detection methods of viral hepatitis serum markers [J]. *J Mol Diagn Ther*, 2020, 12(12): 1753-1756.
- [16] 张娟, 陈晓光. 电化学发光免疫分析技术及其临床应用[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2010, 33(4): 264-266.
ZHANG J, CHEN XG. The explanation and clinical application of electrochemiluminescence immunoassay [J]. *China J Front Health Quar*, 2010, 33(4): 264-266.
- [17] 蔡贤惠. 电化学发光免疫分析与酶联免疫吸附试验检测甲型肝炎病毒 IgM 抗体的对比评价[J]. *中国医药指南*, 2021, 19(23): 74-75.
CAI XH. Comparative evaluation of electrochemiluminescence immunoassay

- and enzyme linked immunosorbent assay for detection of IgM antibody to hepatitis A virus [J]. *Guide China Med*, 2021, 19(23): 74–75.
- [18] 张宏刚, 宋玲玲, 陈苏红. 斑点金免疫渗滤技术及其在检测中的应用[J]. *军事医学*, 2011, 35(4): 307–309, 314.
- ZHANG HG, SONG LL, CHEN SH. Dot immunogold filtration assay and its application [J]. *Mil Med Sci*, 2011, 35(4): 307–309, 314.
- [19] 刘瑛, 高红丽, 徐德忠, 等. 斑点金免疫渗滤试验检测血清中抗-HAV抗体[J]. *第四军医大学学报*, 2000, (11): 1438–1439.
- LIU Y, GAO HL, XU DZ, *et al.* Detection of anti-HAV antibodies in serum by dot gold immunofiltration assay[J]. *J Air Force Med Univ*, 2000, (11): 1438–1439.
- [20] AMIOT CL, XU S, LIANG S, *et al.* Near-infrared fluorescent materials for sensing of biological targets [J]. *Sensors-Basel*, 2008, 8(5): 3082–3105.
- [21] 万晓楠, 畅晓晖, 齐玮, 等. 基于近红外免疫层析技术快速检测食源性甲型肝炎病毒[J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46(7): 213–217.
- WAN XN, CHANG XH, QI W, *et al.* Rapid detection method of foodborne hepatitis A virus based on near-infrared immunochromatography [J]. *Food Ferment Ind*, 2020, 46(7): 213–217.
- [22] 曲萌, 毕胜利, 董志恒. 胶体金免疫层析技术同步检测甲、戊型肝炎病毒 IgM 抗体的研究[J]. *中国实验诊断学*, 2003, (2): 90–92.
- QU M, BI SL, DONG ZH. The study of colloidal gold immunochromatography assay for the synchronous detection of hepatitis A and E virus-specific IgM antibody [J]. *Chin J Lab Diagn*, 2003, (2): 90–92.
- [23] 陈凤仙. 感染性疾病甲肝、戊肝的免疫学检验[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2015, 0(69): 40–41.
- CHEN FX. Immunological tests for infectious hepatitis A and hepatitis E [J]. *World Latest Med Inf*, 2015, 0(69): 40–41.
- [24] 陆寒, 董聪聪. 两种抗 HAV-IgG 试剂盒检测效果比较[J]. *现代疾病预防控制*, 2016, 27(8): 589–591.
- LU H, DONG CC. Comparison of the detection effects of two anti HAV-IgG assay kits [J]. *Mod Dis Control Prev*, 2016, 27(8): 589–591.
- [25] JO E, HEO JS, LIM JY, *et al.* Peptide ligand-mediated endocytosis of nanoparticles to cancer cells: Cell receptor-binding-versus cell membrane-penetrating peptides [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(6): 1437–1449.
- [26] KWON JH, KIM HH, CHO HB, *et al.* Viral antigen nanoparticles for discriminated and quantitative detection of different subtypes of anti-virus immunoglobulins [J]. *Nanoscale*, 2019, 11(39): 18282–18289.
- [27] NEMES K, PERSSON S, SIMONSSON M. Hepatitis A virus and hepatitis E virus as food- and waterborne pathogens-transmission routes and methods for detection in food [J]. *Viruses*, 2023, 15(8): 172.
- [28] 秦智伟, 薛亮, 高珺珊, 等. 食源性病毒核酸恒温检测技术研究进展[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(1): 266–277.
- QIN ZW, XUE L, GAO JS, *et al.* Advances in nucleic acid isothermal detection technologies for foodborne viruses [J]. *Microbiol China*, 2021, 48(1): 266–277.
- [29] PROBERT WS, HACKER JK. New subgenotyping and consensus real-time reverse transcription-PCR assays for hepatitis A outbreak surveillance [J]. *J Clin Microbiol*, 2019, 57(9): e00500–19.
- [30] CHOU KX, WILLIAMS-HILL DM. Improved TaqMan real-time assays for detecting hepatitis A virus [J]. *J Virol Method*, 2018, 254: 46–50.
- [31] 禹兰平, 王楷成, 潘俊慧, 等. 等温扩增技术概述及其在动物病原检测中的应用[J]. *中国动物检疫*, 2022, 39(12): 96–103.
- YU LP, WANG KC, PAN JH, *et al.* Overview of isothermal amplification technology and its application in animal pathogen detection [J]. *China Anim Health Inspect*, 2022, 39(12): 96–103.
- [32] 梁子英, 刘芳. 实时荧光定量 PCR 技术及其应用研究进展[J]. *现代农业科技*, 2020, (6): 1–3, 8.
- LIANG ZY, LIU F. Research progress on real-time quantitative PCR technology and its application [J]. *Mod Agric Sci Technol*, 2020, (6): 1–3, 8.
- [33] WANG DF, CAO JJ, TIAN Z, *et al.* Development of a new concentration method for hepatitis A virus detection (ISO 15216–2: 2019) in Manila clams (*Ruditapes philippinarum*) [J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2022, 172(30): 114172.
- [34] ELMAHDY EM, SHAHEEN MNF, MAHMOUD LHI, *et al.* Detection of norovirus and hepatitis A virus in strawberry and green leafy vegetables by using rt-qPCR in Egypt [J]. *Food Environ Virol*, 2022, 14(2): 178–189.
- [35] YU Z, XU Z, CHEN J, *et al.* Quantitative risk assessment of five foodborne viruses in shellfish based on multiplex Qpcr [J]. *Foods*, 2023, 12(18): 3462.
- [36] FUENTES C, GUIX S, PÉREZ-RODRIGUEZ JF, *et al.* Standardized multiplex one-step qRT-PCR for hepatitis A virus, norovirus GI and GII quantification in bivalve mollusks and water [J]. *Food Microbiol*, 2014, 40: 55–63.
- [37] 安钢力. 实时荧光定量 PCR 技术的原理及其应用[J]. *中国现代教育装备*, 2018, (21): 19–21.
- AN GL. The principle and application of real-time fluorescent quantitative PCR [J]. *China Mod Educ Equip*, 2018, (21): 19–21.
- [38] HOU Y, CHEN S, ZHENG Y, *et al.* Droplet-based digital PCR (ddPCR) and its applications [J]. *TrAC-Trend Anal Chem*, 2023, 158: 116897.
- [39] 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): 8604–10.
- [40] COUDRAY-MEUNIER C, FRAISSE A, MARTIN-LATIL S, *et al.* A comparative study of digital RT-PCR and RT-qPCR for quantification of hepatitis A virus and norovirus in lettuce and water samples [J]. *Int J Food Microbiol*, 2015, 201: 17–26.
- [41] PERSSON S, ALM E, KARLSSON M, *et al.* A new assay for quantitative detection of hepatitis A virus [J]. *J Virol Method*, 2021, 288: 114010.
- [42] HAN YZ, WANG JC, ZHANG SH, *et al.* Simultaneous quantification of hepatitis A virus and norovirus genogroup I and II by triplex droplet digital PCR [J]. *Food Microbiol*, 2022, 103: 103933.
- [43] 周振杰, 王冬梅, 欧阳松应. 环介导等温扩增技术在新型冠状病毒检测中的应用研究进展[J]. *福建师范大学学报(自然科学版)*, 2022, 38(5): 69–78.
- ZHOU ZJ, WANG DM, OUYANG SY. Research progress on the application of loop-mediated isotherma amplification technology in the detection of SARS-CoV-2 [J]. *J Fujian Norm Univ (Nat Sci Ed)*, 2022, 38(5): 69–78.
- [44] 白榕, 白琳琳, 汪少芸, 等. LAMP 扩增产物检测方法研究进展及基因编辑技术在其中的应用[J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(10): 2016–2030.
- BAI R, BAI LL, WANG SY, *et al.* Research progress of LAMP amplicons detection method and the application of gene editing technology [J]. *J Agric Biotechnol*, 2021, 29(10): 2016–2030.
- [45] 李雪梅, 李献刚, 刘思宁, 等. 实时逆转录环介导等温扩增法快速检测甲型肝炎病毒[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(20): 8273–8278.
- LI XM, LI XG, LIU SN, *et al.* Rapid determination of hepatitis A virus by real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(20): 8273–8278.
- [46] 邱丰, 郭敬卓, 丁军颖, 等. 一种改良的环介导恒温扩增技术在甲型肝炎病毒核酸检测上的应用[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2012, 26(6): 483–485.
- QIU F, GUO MZ, DING JY, *et al.* Detection of hepatitis A virus RNA with an improved loop-mediated isothermal amplification assay [J]. *Chin J Exp Clin Virol*, 2012, 26(6): 483–485.
- [47] 崔健, 高子惠, 张晓波, 等. 基于荧光及可视化逆转录环介导等温扩增检测食源性甲型肝炎病毒的方法开发[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(18): 103–111.

- CUI J, GAO ZH, ZHANG XB, *et al.* Development of a method for the detection of foodborne hepatitis A virus based on fluorescence and visualization loop-mediated isothermal amplification [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(18): 103–111.
- [48] WU R, MENG B, CORREDIG M, *et al.* Rapid detection of hepatitis A virus in foods using a bioluminescent assay in real-time (BART) and reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) technology [J]. *Food Environ Virol*, 2023, 15(2): 144–157.
- [49] WU Y, BAI L, YE C, *et al.* Novel miniaturized fluorescence loop-mediated isothermal amplification detection system for rapid on-site virus detection [J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 964244.
- [50] ZENG F, WU M, MA L, *et al.* Rapid and sensitive real-time recombinase polymerase amplification for detection of Marek's disease virus [J]. *Mol Cell Probe*, 2019, 48: 101468.
- [51] SUN ML, LAI HY, CHONG NY, *et al.* Simple and feasible detection of hepatitis B virus via combination of multienzyme isothermal rapid amplification and lateral flow dipstick strip [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 763079.
- [52] 尚柯, 张彪, 张敏, 等. 基于多酶恒温快速扩增-侧向流层析联用技术的肉制品真实性研究[J/OL]. *食品科学*: 1-17. [2024-03-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20231123.1154.004.html>
- SHANG K, ZHANG B, ZAHNG M, *et al.* Authenticity identification of meat products using multienzyme isothermal rapid amplification-lateral flow dipstick inspection technology [J/OL]. *Food Sci*: 1-17. [2024-03-04]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20231123.1154.004.html>
- [53] 陈慧. 基于等温扩增技术和微流控技术的呼吸道病毒检测方法的建立与性能评估[D]. 镇江: 江苏大学, 2023.
- CHEN H. Development and evaluation of nucleic acid tests for respiratory viruses based on isothermal amplification and microfluidic technology [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2023.
- [54] SUN ML, ZHONG Y, LI XN, *et al.* Simple and feasible detection of hepatitis A virus using reverse transcription multienzyme isothermal rapid amplification and lateral flow dipsticks without standard PCR laboratory [J]. *Artif Cell Nanomed B*, 2023, 51(1): 233–240.
- [55] XIAO JS, YU WS, GAO JS, *et al.* Research progress of molecular imprinting technology [J]. *Adv Mater Res*, 2013, 2527(750–752): 1678–1681.
- [56] 张红杰, 郭知明. 分子印迹技术原理及在标准物质定值中的应用[J]. *仪器仪表用户*, 2018, 25(9): 55–57.
- ZHANG HJ, GUO ZM. The principle of molecularly imprinted technology and its application in standard material determination [J]. *Instrumentation*, 2018, 25(9): 55–57.
- [57] ZHANG F, LUO L, GONG H, *et al.* A magnetic molecularly imprinted optical chemical sensor for specific recognition of trace quantities of virus [J]. *Royal Soc Chem Adv*, 2018, 8: 32262–32268.
- [58] LUO L, ZHANG F, CHEN C, *et al.* Visual simultaneous detection of hepatitis A and B viruses based on a multifunctional molecularly imprinted fluorescence sensor [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(24): 15748–15756.
- [59] 王丹丹, 刘鸣畅, 杨艳歌, 等. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(3): 276–285.
- WANG DD, LIU MC, YANG YG, *et al.* Recent progress in technologies for rapid detection of foodborne pathogens [J]. *Food Sci*, 2022, 43(3): 276–285.
- [60] 万志香. 应用 DNA-纳米金探针的可视化甲型肝炎病毒检测基因芯片的研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2006.
- WAN ZX. Research on the visual gene microarray for detection of hepatitis A virus using gold-DNA probes [D]. Wuhan: Wuhan University, 2006.
- [61] YU C, HIDA K, PAPAFRAGKOU E, *et al.* Evaluation of U.S. Food and drug administration enteric viruses microarray for detection of hepatitis A virus and norovirus in inoculated tomatoes, green onions, and celery [J]. *J Food Prot*, 2020, 83(9): 1576–1583.
- [62] GU W, MILLER S, CHIU CY. Clinical metagenomic next-generation sequencing for pathogen detection [J]. *Annu Rev Pathol*, 2019, 14: 319–338.
- [63] LEE GY, KIM WK, CHO S, *et al.* Genotyping and molecular diagnosis of hepatitis A virus in human clinical samples using multiplex PCR-based next-generation sequencing [J]. *Microorganisms*, 2022, 10(1): 100.
- [64] 王帅, 杨艳歌, 吴占文, 等. 重组酶聚合酶扩增、重组酶介导等温扩增及酶促重组等温扩增技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展[J]. *食品科学*, 2023, 44(9): 297–305.
- WANG S, YANG YG, WU ZW, *et al.* A review of the application of recombinase polymerase amplification, recombinase-aided amplification and enzymatic recombinase amplification in rapid detection of foodborne pathogens [J]. *Food Sci*, 2023, 44(9): 297–305.
- [65] FODDAI ACG, GRANT IR. Methods for detection of viable foodborne pathogens: Current state-of-art and future prospects [J]. *Appl Microbiol Biot*, 2020, 104(10): 4281–4288.
- [66] 张群. 食源性病毒分子生物学检测技术研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2020, 39(8): 112.
- ZHANG Q. Research on molecular biological detection techniques for foodborne viruses [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2020, 39(8): 112.
- [67] 王娉, 田卓, 齐欣, 等. 聚乙二醇沉淀富集和预扩增反转录实时定量聚合酶链式反应高灵敏检测小浆果中低浓度甲型肝炎病毒[J]. *分析化学*, 2022, 50(8): 1168–1178.
- WANG P, TIAN Z, QI X, *et al.* Highly sensitive detection of low concentration hepatitis A virus in small berries using polyethylene glycol precipitation enrichment and pre-amplification reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction [J]. *Chin J Anal Chem*, 2022, 50(8): 1168–1178.
- [68] 杨艳歌, 吴占文, 李涛, 等. 诺如病毒快速检测技术研究进展[J]. *中国食品卫生杂志*, 2023, 35(1): 131.
- YANG YG, WU ZW, LI T, *et al.* Research progress in rapid detection of norovirus [J]. *Chin J Food Hyg*, 2023, 35(1): 131.

(责任编辑: 郑丽韩晓红)

作者简介



魏莹, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物学。

E-mail: 2686532199@qq.com



孙冬梅, 博士, 教授, 主要研究方向为微生物学。

E-mail: sdmlzw@126.com



袁飞, 博士, 研究员, 主要研究方向为食源性微生物。

E-mail: feyyuan@163.com