

综述

副溶血性弧菌快速定量检测方法研究进展

王殿夫¹, 齐欣², 徐娜³, 卢雁⁴, 吕敬章⁵, 麻丽丹⁶

(1. 辽东学院, 辽宁 丹东 118002; 2. 大连海关技术中心, 辽宁 大连 116002; 3. 大连海关综合技术服务中心, 辽宁 大连 116699; 4. 黑龙江省绿色食品科学研究院, 黑龙江 哈尔滨 150086; 5. 深圳市检验检疫科学研究院, 广东 深圳 518045; 6. 丹东海关综合技术服务中心, 辽宁 丹东 118000)

摘要:副溶血性弧菌(VP)是我国沿海地区食物中毒最常见的病原菌之一,引发的食品安全事件逐年上升。目前定量检测食品中副溶血性弧菌的国家标准方法为最大可能数法,该方法检测时限长且操作步骤繁琐,不能满足快速定量检测的需求。随着现代生物技术的发展,新的定量检测方法不断涌现,研发了多种快速灵敏的副溶血性弧菌定量检测方法。本文综述了近年来生物技术领域常见的定量方法在副溶血性弧菌快速定量检测中的研究现状及应用进展,充分了解各检测方法的特点,以期食品中副溶血性弧菌的快速精准定量检测研究提供理论参考及发展方向。

关键词:副溶血性弧菌; 快速定量检测; 研究进展; 生物技术

中图分类号:R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2024)03-0360-09

DOI:10.13590/j.cjfh.2024.03.019

Research progress in the rapid quantitative determination of *Vibrio parahaemolyticus*WANG Dianfu¹, QI Xin², XU Na³, LU Yan⁴, LYU Jingzhang⁵, MA Lidan⁶

(1. Liaodong University, Liaoning Dandong 118002, China; 2. Technology Centre of Dalian Customs District, Liaoning Dalian 116002, China; 3. Comprehensive Technical Service Center of Dalian Customs, Liaoning Dalian 116699, China; 4. Green Food Research Institute of Heilongjiang, Heilongjiang Harbin 150086, China; 5. Shenzhen Academy of Inspection and Quarantine, Guangdong Shenzhen 518045, China; 6. Comprehensive Technical Service Center of Dandong Customs, Liaoning Dandong 118000, China)

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus* (VP) is one of the most common pathogens that cause food poisoning in coastal areas of China. In fact, the food safety incidents of VP have been increasing on a yearly basis. The current national standard method for quantitatively detecting VP in food is the most probable number method. This method is time-consuming and tedious, and cannot be used to achieve rapid quantitative detection. Owing to modern biotechnology, new quantitative methods have been generated. In fact, a series of rapid and sensitive methods have been developed to quantify VP. This review seeks to discuss recent research and application progress of rapid methods for quantifying VP using biotechnology methods, and highlight the characteristics of each rapid method to provide a theoretical reference and development direction for the rapid and accurate quantitation of VP in food.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; rapid quantitative detection; research progress; biotechnology

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是一种革兰阴性嗜盐性病原菌,生长在含盐0.5%~8%的环境中,兼性厌氧,形态多为杆状或弯曲状,广泛

分布于海水、河口、淤泥以及鱼虾、贝类、藻类等海产品中^[1]。VP是造成人类食源性疾病感染最主要的病原菌之一,人们常因食用被污染、未充分煮熟或交叉污染的水产制品而引起副溶血性弧菌食物中毒,导致胃肠炎等疾病^[2]。常在美国、日本、东南亚地区及我国沿海地区发生中毒事件。

食品安全问题关系着民生大计。近年来,由副溶血性弧菌引发的食物中毒事件占细菌性食物中毒的比例呈逐年上升趋势,对人类的健康造成了很大的威胁。根据2018年和2019年中国大陆因微

收稿日期:2023-02-06

基金项目:食品安全国家标准适用性研究(FRBZ-2023);大连海关科研项目(2022DK06)

作者简介:王殿夫 男 高级实验师 研究方向为食品安全

E-mail:2361756@163.com

通信作者:吕敬章 男 研究员 研究方向为食品安全

E-mail:ficswsw@163.com

生物致病因子引起食源性疾病暴发事件的统计分析可知,副溶血性弧菌导致的事件数占微生物因素事件数的比例分别为 32.84% 和 32.59%,是引发我国食源性疾病的首要病原菌,主要通过甲壳类、贝类等海产品进行食源性疾病的传播^[3-4]。同时也有相关研究报道,当食物中副溶血性弧菌数量达到 $\geq 10^6$ CFU/mL 时能够引起疾病,但对其进行快速精准定量检测还很困难^[5]。

伴随着全球对食品安全风险意识的不断提升,副溶血性弧菌作为引起食源性疾病的重要病原菌之一,其简便准确的检测方法对食源性疾病的早期识别及预警能力具有重大的意义。近年来,随着生物技术的广泛应用,食源性副溶血性弧菌在定量检测研究中也获得了较大的进展。本文对目前生物技术领域中常见的副溶血性弧菌定量检测方法应用进行概述,充分了解副溶血性弧菌定量检测方法的现状,以期为生物学领域食源性副溶血性弧菌准确快速定量检测技术的发展提供借鉴,建立更适合于日常检测和疫情防控的精准、快速、便捷的定量检测方法,防范因食源性致病菌污染给人民生命、财产带来的伤害及损失,增强应对食品安全事件的应急能力。

1 副溶血性弧菌流行现状

欧盟通过欧共体条例第 178/2002 号正式建立食品和饲料快速预警系统(Rapid alert system for food and feed, RASFF),该信息交流平台在维护进出口食品安全的同时,其警情通告数据对食品质量安全的监管及预警更是具有重大的意义。经查询 2020—2022 年近 3 年的数据,由副溶血性弧菌检出造成严重影响的通报事件为 6 条,主要集中在冷冻虾、对虾、贻贝等样品中。根据美国疾病与预防控制中心(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)的统计数据可知^[6],2011—2020 年因食品及水源污染副溶血性弧菌造成美国各个州食源性疾病暴发共计 937 次,患病人数为 16 568 人,205 人死亡,同时 2016—2020 年副溶血性弧菌暴发平均次数相比 2011—2015 年上升了 30.79%。我国沿海地区是副溶血性弧菌感染引起胃肠炎的高发区,其感染引起的疾病具有明显的季节性,并且主要集中在温度较高的夏秋季,2017—2020 年我国报告副溶血性弧菌感染引起胃肠炎的病例共计 3 033 例^[7]。近年来,随着人们生活水平的日益提高,水产品需求也呈逐年上升趋势。在我国大连市、海口市、宁波市和青岛市等地区,贝类海产品中副溶血性弧菌的检出率可达 32.6%~57.3%,污染越严重越会增加食源性

疾病暴发的潜在风险^[8]。同时由副溶血性弧菌引起的食源性疾病事件也是屡见不鲜^[9-11]。因此,由副溶血性弧菌引发的食源性疾病对国民经济、进出口贸易及人类健康均构成了严重的威胁。

2 副溶血性弧菌传统定量检测方法

鉴于水产制品中副溶血性弧菌造成污染的严重性和广泛性,我国国家标准中明确规定水产制品中副溶血性弧菌为强检项目之一^[12]。GB 29921—2021《食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量》^[13]规定水产制品中副溶血性弧菌采样方案及限量为 $n=5, c=1, m=100$ MPN/g, $M=1\ 000$ MPN/g; GB 31607—2021《食品安全国家标准 散装即食食品中致病菌限量》^[14]规定即食水产制品中副溶血性弧菌限量为 $\leq 1\ 000$ MPN/g。检测方法均采用 GB 4789.7—2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》^[15]标准中定量检测方法,即最大可能数(Most probable number, MPN)计数法,方法主要通过增菌、分离、鉴定、查表等流程完成检测,根据食品中副溶血性弧菌检出量的多少来反映食品受污染的程度。

选择性分离可疑菌落的筛选及鉴定直接影响 MPN 的定量检测结果。在检测方法中主要依靠硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖(Thiosulfate citrate bile salts sucrose, TCBS)琼脂培养基或弧菌显色培养基进行目标菌的筛选。TCBS 是一种经典的弧菌选择性培养基,大部分弧菌在 TCBS 平板上可生长,菌落呈现绿色、黄绿色或者黄色等颜色,这是因为有些弧菌可以利用培养基中的蔗糖产酸,使培养基的 pH 降低后指示剂变黄色,而不能利用蔗糖的则仍呈现绿色,但是随着培养时间的延长,黄色菌落可以发生变化变成黄绿色,这主要是由于培养基 pH 的变化而造成,同时创伤弧菌、拟态弧菌、哈氏弧菌等其他海洋弧菌在 TCBS 平板上也可生长为绿色菌落,严重影响副溶血性弧菌的判读,在实际检测工作中容易导致误检、漏检情况的发生,检测灵敏度低^[16]。弧菌显色培养基是以不同微生物胞内酶反应条件之间的差异为依据,培养基中加入特定性底物,通过颜色对菌种进行鉴别,非目标菌则会呈现其他颜色或菌落不生长,相对于 TCBS 培养基具有更好的判读效果,大大降低因人员因素引起结果判读误差,提高检测的灵敏度和特异性。最后将 TCBS 或弧菌显色培养基分离得到的可疑菌落进行生化鉴定,根据阳性管数鉴定结果查 MPN 检索表报告副溶血性弧菌定量检测结果。该方法属于传统检测的经典方法,但是检测步骤较为繁琐,检测

周期较长(48~120 h),不适用于大批量样品定量检测及快速筛查^[17-18]。同时不同检测人员对可疑菌落的挑选和生化鉴定结果的判读存在较大差异,方法也不能满足疾病暴发溯源的快速检测需求。

近年来,也有采用双层平板法对海产品中副溶血性弧菌进行平板计数定量检测,通过上层培养基营养丰富达到壮大菌种作用,下层培养基的选择性可以抑制非目标菌生长,缩短培养时间的同时更便于检测人员对目标菌的鉴定和计数工作^[19]。方法操作简单方便,可增加副溶血性弧菌定量检测结果的准确度,更易于检测人员结果的判读,不过该方法因为存在竞争作用使目标菌受到抑制而无法生长,造成假阴性结果。

3 副溶血性弧菌快速定量检测方法

3.1 基于分子生物学的快速定量检测方法

3.1.1 实时荧光定量PCR检测方法

实时荧光定量聚合酶链式反应技术(Qualitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)是在PCR反应体系中加入荧光基团,通过反应过程中荧光信号的积累来实时监测PCR反应进程,模板的Ct值与其起始拷贝数存在线性关系,最后依赖标准曲线来定量分析样品中的待测成分。副溶血性弧菌具有多种致病因子,其中溶血毒素作为副溶血性弧菌的一种主要致病因子,由不耐热溶血毒素(Thermolabile hemolysin, *tlh*)、耐热直接溶血素(Thermostable direct hemolysin, *tdh*)和溶血相关溶血素(Thermostable direct hemolysin-related hemolysin, *trh*)组成,三者与副溶血性弧菌的致病性有着密切的关系。*tlh*基因是副溶血性弧菌自身特有基因而不是毒力基因,可证实副溶血性弧菌的存在。*tdh*和/或*trh*基因则为毒力基因,证实副溶血性弧菌具备致病性。副溶血性弧菌引起的食源性疾病暴发事件则与毒力基因密切相关,因此常将三者作为分子生物学方法中检测副溶血性弧菌的靶基因,通过对其致病因子的检测以建立副溶血性弧菌的各种快速鉴定和检测方法^[20]。

3.1.1.1 基于MPN与实时荧光定量PCR相结合检测方法

随着检测技术的不断发展,采用传统MPN定量检测方法鉴定副溶血性弧菌已慢慢趋向于被其他快速鉴定技术方法所取代。实时荧光定量PCR技术作为分子生物学技术较为成熟的模式之一,以其高效、快速等特点被广泛应用于致病菌的检测中,可达到缩短检测时限、增加灵敏度的目的。再结合MPN检索表查找并报告检测数值,最终达到

快速定量检测的目的。Aranda等^[21]采用MPN和实时荧光定量PCR相结合方法对智利南部内陆海贝类样品中的副溶血性弧菌进行评估,未检测到致病标志物*tdh*基因和*trh*基因,但连续采集两年的贝类样品中副溶血性弧菌*tlh*基因总量分别高达0.38和3.66 lg MPN/g,研究结果更好的证实,在检测中选取*tlh*作为副溶血性弧菌靶基因具有更强的特异性。陈泽辉^[22]采用MPN和实时荧光定量PCR两者相结合的方法,对厦门地区收集的79份贝类样品副溶血性弧菌*tlh*基因进行鉴定,检出率达95.0%(75/79),并同时副溶血性弧菌的*tdh*、*trh*和开放读码框(Open reading frame, *orf8*)基因进行鉴定,根据鉴定结果查MPN表从而获得餐饮环节中贝类产品副溶血性弧菌毒力因子的快速定量检测结果,从样品处理到扩增反应结束总用时不超过24 h。实时荧光定量PCR技术因特异性高、检测速度快而被广泛应用,但该技术对核酸片段检测时,死亡菌体的基因片段也可以进行扩增反应,无法准确地检测到目标菌的存活状态和非可培养状态细胞(Viable but non-culturable, VBNC)的存在,导致PCR鉴定结果出现假阳性,从而影响MPN值的计数结果。

3.1.1.2 基于PMA与实时荧光定量PCR相结合检测方法

叠氮溴化丙锭(Propidium monoazide, PMA)为一种核酸结合生物染料。破损的细胞膜在一定波长的可见光作用下会将PMA染料上的叠氮基团生成Nitrene基,再与核酸中的碳氢化合物生成牢固的共价氮碳键以完成对DNA的不可逆修饰,从而导致破损的细胞无法完成扩增反应。但完整的细胞膜结构可将PMA染料排除在外,通过此处理过程达到区分活菌和死菌的目的^[23]。曹潇^[24]建立了基于免疫磁纳米珠与PMAxx-qPCR相结合的新型检测技术体系(IMS-PMAxx-qPCR),并应用于海产品中副溶血性弧菌活菌快速精敏定量检测中,在非前增菌的条件下,检出限可达1.05 CFU/g,检测周期约为5 h。为了更有效的帮助PMA穿透受损或死亡细胞,Ling等^[25]在PMA之前加入脱氧胆酸钠(Sodium deoxycholate, SD)进行处理,通过SD-PMA处理条件的优化建立了食品中副溶血性弧菌SD-PMA-qPCR的活菌定量检测方法。PMA与实时荧光定量PCR相结合检测方法是目前食源性致病菌领域最具备应用前景的活菌鉴定检测技术,但在研究中应关注引物设计及菌液浓度等因素对试验结果的影响。

3.1.2 数字PCR检测方法

数字PCR(Digital PCR, dPCR)是实现单分子

目标基因扩增的绝对定量检测方法^[26]。与实时荧光 PCR 检测方法相比,dPCR 不依靠标准曲线,抑制剂对反应影响小并且检测灵敏度高,可实现样品的绝对定量检测^[27]。翁文川等^[28]将微滴式数字 PCR (Droplet digital polymerase chain reaction, ddPCR) 与 PMA 活细胞荧光染料技术相结合成新的联用检测方法 PMA-ddPCR,应用于副溶血性弧菌活菌的检测中,联用后的 PMA-ddPCR 检测方法同时具备区分活菌与死菌和灵敏度高的技术优势,解决了因死菌 DNA 出现假阳性的现象,结果基本等同于传统的平板计数方法,采用副溶血性弧菌标准菌株不同菌液浓度进行测定时,副溶血性弧菌检出限为 20 CFU/mL。LEI 等^[29]基于 *tlh*、*tdh*、*ureR* 和 *orf8* 基因建立了食品样品中副溶血性弧菌 4-plex 微滴式数字 PCR 检测方法,方法的测定灵敏度为 39 CFU/mL,此方法不仅能对副溶血性弧菌进行绝对定量检测,还能对不同血清类型的副溶血性弧菌进行分类。王一萍等^[30]首次采用非特异性核酸染料 Eva Green 建立检测副溶血弧菌 *tlh* 基因和鼠伤寒沙门菌 *InvA* 基因的双重数字 PCR 方法,其中检测 DNA 最低浓度为 10 fg/ μ L, *tlh* 最低检测限为 16.8 copies/20 μ L,该方法提高了双重数字 PCR 检测方法的灵敏度。目前,SN/T 5364.1—2021《出口食品中致病菌检测方法 微滴式数字 PCR 法 第 1 部分:副溶血性弧菌》^[31]是我国首个设定副溶血性弧菌检出限[1~5 CFU/25 g(mL)]的检测标准。随着基因领域的发展,数字 PCR 技术已在食品、临床、环境等多个领域得到应用,提高了各个领域的检测水平,但由于技术成本昂贵,数字 PCR 在常规检测中的应用受到一定的限制。

3.1.3 CRISPR 基因编辑检测体系

成簇规律间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)系统是原核生物(古细菌和细菌)抵御噬菌体、质粒等外源核酸入侵而获得的一种免疫机制,是近年来新兴的一种具有强大功能的基因编辑检测方法^[32-34]。其相关蛋白(CRISPR associated protein, Cas)依赖前间区序列邻近基序(Protospacer-adjacent motif, PAM)序列进行快速识别,含有的 RuvC 和 HNH 催化结构域对双链 DNA(Double-strand DNA, dsDNA)具有精准的切割活性^[35]。依据检测原理不同研发出的技术主要包括两方面:一种是利用 Cas 蛋白家族特异性识别 dsDNA,主要以 CRISPR/Cas9 检测系统为主;另外一种是利用 Cas 蛋白家族特异识别核酸后激活旁路切割活性,主要以 CRISPR/Cas12 和 CRISPR/Cas13 检测系统为主。董换哲等^[36]将 CRISPR/Cas12a 系统与跨越式滚环等温扩增技术(Saltatory rolling circle

amplification, SRCA)结合,利用设计的 crRNA 特异性识别 SRCA 反应产生的串联重复扩增靶标,以激活 Cas12a 对单链 DNA(Single strand, ssDNA)报告探针的切割活性,最终通过荧光信号变化结果对副溶血性弧菌菌液进行定量检测,检出限达 3.6 CFU/mL,与 GB 4789.7—2013 方法同时对 36 份海产品进行副溶血性弧菌检测,建立的 SRCA-Cas12a 方法敏感性达 100.0%,特异性为 95.2%、符合率为 97.2%,方法的建立为副溶血性弧菌的快速定量检测提供新的思路。ZHANG 等^[37]基于 CRISPR/Cas12a 系统,建立了一种副溶血性弧菌荧光定量 PCR 可视化终点检测方法,方法以副溶血性弧菌 *tlh* 为靶基因,试管盖上预先加入 CRISPR 试剂后在微型热循环仪上进行扩增反应,37 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 即可在紫外灯下肉眼观察荧光读数,方法实用性强,避免了因携带造成的污染,降低假阳性结果。HU 等^[38]选择副溶血性弧菌自选靶点 *VP008* 使扩增产物含有大量 PAM 序列后,结合 CRISPR/Cas12a 系统建立了 LAMP-CRISPR 检测方法,方法在副溶血性弧菌检测中具备高特异性和高敏感性,同时当初始接种量为 5 CFU/mL 副溶血性弧菌人工污染虾样品时,只需富集 2 h 便可对样品进行检测,整个反应小于 30 min,检测结果可通过扩增曲线进行相对定量分析,也可采用紫外灯观察结果,不受仪器限制,方法的建立表明 LAMP-CRISPR 在核酸检测方面具有很高的潜力。目前,CRISPR/Cas 系统凭借其快速简便、靶向精准等特点,已在生物学、医学等多个领域被广泛应用^[39]。同时基因编辑系统中具备一些编辑或序列识别的新酶也在不断地被研发^[40-41]。CRISPR 基因编辑系统必将成为微生物领域精准定量检测领域的利器,为食品安全保障提供新的思路^[42]。但不同的基因编辑工具均存在脱靶率高的问题,寻求新的 Cas 蛋白类型、拓展 PAM 序列等研究将是未来工作的重点。

3.1.4 环介导等温扩增检测方法

环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)作为一种适用于基因诊断的恒温核酸扩增新方法,最大的优势在于不需要复杂的设备,通过肉眼观察白色浑浊或绿色荧光的生成来判断反应结果的一种定性和定量检测方法,特别适用于实验室的快速检测。近年来,LAMP 方法因对仪器设备要求不高、操作简便、检测效率高等优点已被广泛地应用于致病菌检测领域中,并与其他检测方法相结合建立的菌体低含量检测方法也取得了新的研究进展^[43-45]。但该方法同 PCR 方法一样无法区分细胞存活状态及 VBNC 的存在,同时

LAMP方法引物设计复杂,需针对靶基因的6个区域设计4条引物,而实际检测中为显著缩短检测时间会设计6条引物,可多引物的存在可能造成二聚体的存在,影响检测结果的准确性。

3.1.5 重组酶聚合酶扩增检测方法

重组酶聚合酶扩增(Recombinase polymerase amplification, RPA)技术为现代新兴的一种体外核酸恒温扩增检测方法,主要依赖于重组酶 *UvsY*、单链结合蛋白 Gp32 和链置换 DNA 聚合酶 Bsu 等一套复杂的酶体系实现对模板的扩增,引物和探针的设计对扩增反应的成败十分重要,在 25~43 °C 恒温条件下完成扩增反应,5~20 min 即可得到检测结果^[46]。ZHU 等^[47]根据副溶血性弧菌 *tlh* 基因标记物建立贝类样品中实时 RPA 方法,从样品的制备到数据采集用时不到 30 min,检出限达 0.4 pg/μL,并与 MPN 方法相结合,缩短现场检测时限的同时提高了检测准确性,对副溶血性弧菌现场检测具有巨大的潜力和实际应用价值。随着 RPA 技术的逐渐普及,RPA-测流层析试纸条(RPA-lateral flow dipstick, RPA-LFD)作为一种半定量方法已被应用于副溶血性弧菌检测中,数字 RPA 方法则可实现食源性细菌的绝对定量检测^[48-50]。目前应用该技术建立的快速定量检测方法已在病原学检测、食品安全检测、疾病诊断等多个领域得到了广泛的应用^[51]。RPA 技术操作简单且灵敏度高、特异性强,适用于食品安全监管及突发公共事件对副溶血性弧菌的快速检测,但作为一种新兴技术,也存在一定问题,现还没有专门的软件能设计其引物和探针,RPA 反应时必须要有三种复杂酶同时参与,酶活力如何保持也有待进一步研究。该方法今后需在临床上进行进一步验证、推广及应用,更好的服务于生命科学的各个领域。

3.2 生物传感器检测方法

生物传感器是待测目标物与各种敏感酶、生物碱、抗原和基因序列等生物感受器发生相互作用后,将生物信号转化为电信号的一种检测设备。生物传感器中作为修饰层的纳米材料其构建和筛选十分重要,具有三维结构的纳米材料在传感器上的固定率明显高于二维结构材料,更有利于提高传感器的亲和性及性能^[52]。目前,适用于食源性致病物的生物传感器种类较多,其中电化学生物传感器、光学适配体传感器和荧光生物传感器应用最广泛^[53-55]。WANG 等^[56]将可视化荧光信号和定量电化学信号联用,研究出 DNA 酶-二茂铁-点击化学触发荧光/电化学双信号生物传感器。生物传感器具有快捷、准确、低成本等特点。但在实际应用中也存在一定的局限性,食品基质中含有的蛋白质和糖

类等干扰物、不同基质 pH 值存在差异、生物传感器探头日常维护等因素均会影响适配体与靶标之间的特异性结合,降低传感器的灵敏度,妨碍生物传感器在实际检测中的应用^[57-58]。而基因传感器因涉及 DNA 杂交,如何避免长链单碱基的突变,提高固化稳定性也是未来研究的重点。

3.3 免疫检测方法

免疫学检测方法是利用抗原和抗体之间可以特异性结合的特点,达到对样品中目标物质的定性或定量检测,主要包括酶联免疫吸附(Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)法、荧光免疫法、免疫磁珠法和免疫层析法。副溶血性弧菌的定量检测主要以前两种方法为主。ELISA 方法较为成熟,具备良好的灵敏度和特异性,市场上多以商业化试剂盒流通,和传统培养法比较此方法大大减少了检测时间,但实际操作仍比较繁琐,成本较高,易因污染导致假阳性,如与电化学、色谱等方法联用时则可更加精准地进行定量检测^[59]。荧光免疫分析法是目标菌抗原(或抗体)上标记含有量子点的探针发生特异性免疫反应后形成荧光免疫复合物,依据荧光强度的变化进行定性及定量检测。LIU 等^[60]将卵黄抗体(IgY)固定在金纳米颗粒表面以构建 CdSe/ZnS-QDs 荧光免疫检测体系,无须增菌便可检测低浓度的副溶血性弧菌(10 CFU/mL)。该方法相对于 ELISA 方法而言,具有检测时间更短,反应灵敏度更高的特点。

目前,食源性副溶血性弧菌在生物技术领域的快速定量检测方法主要包括以上内容。随着生物检测技术的不断发展,除 *tlh*、*tdh* 和 *trh* 基因外,还有许多研究人员采用其他靶位基因对副溶血性弧菌进行检测,包括弧菌中广泛存在的 *toxR* 基因、可甄别副溶血性弧菌 O3:K6 流行株的 *orf8* 基因等。再通过绝对定量或不同技术相结合方法达到副溶血性弧菌定量检测的目的,其应用技术如表 1 所示。

4 讨论

因食源性副溶血性弧菌引发的食品安全事件逐年攀升,传统的病原菌分离培养作为副溶血性弧菌检测的金标准,对食品中副溶血性弧菌的预防和监管起到积极的促进作用。但随着全球市场经济的发展,水产品在国际贸易和国内市场的占比均呈增长趋势,副溶血性弧菌绝对定量检测的需求将会更加迫切,传统的副溶血性弧菌定量检测方法因耗时耗力已不能满足食源性疾病暴发后及时溯源的要求。因此病原菌快速、精准的定量检测已成为未来发展的大方向。

表1 食品中副溶血性弧菌快速定量检测方法
Table 1 Rapid quantitative detection method for *Vibrio parahaemolyticus* in food

检测方法	食品基质	预增菌培养基	靶位基因	检出限	检测时间	参考文献
SD-PMA-qPCR	虾	3% NaCl NAPW	<i>toxR</i>	50 CFU/mL	5 h	[25]
IMS-PMAXx-qPCR	虾	3% NaCl APW	<i>tlh</i>	1.05 CFU/g	5 h	[24]
ddPCR	牡蛎	LB	<i>tlh</i>	16.8 copies/20 μ L	12 h	[30]
	鳕鱼	LB	<i>tlh</i>	50 CFU/mL	14 h	[61]
PMA-ddPCR	基围虾	3% NaCl APW	<i>tlh</i>	11.2 CFU/g	3~4 h	[28]
	小帆立贝	3% NaCl APW	<i>tlh</i>	8.96 CFU/g	3~4 h	[28]
4-plex-ddPCR	蛤蜊	0.1% PW	<i>tlh</i> , <i>tdh</i> , <i>ureR</i> , <i>orf8</i>	39 CFU/mL	2~3 h	[29]
SRCA-Cas12a	菌液	3% NaCl APW	<i>toxR</i>	3.6 CFU/mL	50 min	[36]
CRISPR/Cas12a-PCR	虾	—	<i>tlh</i>	1.02 \times 10 ² 拷贝/ μ L	—	[37]
LAMP-CRISPR	虾	3% NaCl TSB	<i>VP008</i>	5 CFU/mL	30 min	[38]
RPA-CRISPR	鲜虾	—	<i>tdh</i> , <i>trh</i>	10 ² CFU/g	30 min	[62]
Real-time RPA	贝类	3% NaCl APW	<i>tlh</i>	0.4 pg/uL	30 min	[47]
RAA-LFD	虾	3% NaCl APW	<i>toxR</i>	7.4 CFU/g	30 min	[48]
MAADF-荧光/电化学双信号传感器	虾、蟹及鱼	—	—	6 CFU/mL	3 h	[56]
CdSe/ZnS-QDs 荧光免疫检测	虾、碎牛肉及咸菜	无须预增菌	IgY 抗体	10 CFU/mL	—	[60]

注:—表示文献中未做说明

生物技术在食源性副溶血性弧菌检测中占据重要的地位,以其为基础的定量检测技术也在被众多学者不断研发及革新,以探索目标物更低检出限、精准定量结果及完整反应机制。目前,针对我国副溶血性弧菌定量检测标准只涉及传统方法和数字 PCR 方法,其他方法的缺失不满足其定量检测标准化的需求。同时细菌的增菌培养过程严重影响目标菌的检测时限,现已有通过免疫磁珠分离技术、纳米技术代替前期增菌过程的研究并取得较好的效果,前期增菌步骤被替代将是未来的发展趋势,此项技术的发展进步将会大幅度降低致病菌的检测时间,迎接快速定量检测时代的到来。分子生物学检测技术在副溶血性弧菌检测中占据重要的地位,细菌真实存活状态及 VBNC 状态是影响其检测结果准确性的主要因素,现基于 PMA、噬菌体等与其他检测方法的联合得以有效区分活菌/死菌的研究已成为热点,使产生毒素的活菌检测研究站在了一个新高度。数字化时代的到来以各种工具及软件构建模型开展微生物定量风险评估将为监管提供重要的数据支撑,降低因食源性副溶血性弧菌污染造成的风险^[63]。随着各种检测技术的发展,多学科之间交叉联合方法的使用将被广泛应用,通过技术方法优势的整合,以期提高副溶血性弧菌定量检测的灵敏度和准确性,更能满足实际检测工作的需求。同属于生物技术范畴内的常见检测方法还包括基因芯片技术、噬菌体鉴定技术、双功能抗体、代谢组学检测技术等,目前这些技术方法更侧重于副溶血性弧菌的快速检测和鉴定分析^[64]。相信随着生物领域新兴技术的兴起,这些定性检测技术也终将与其他前沿学科技术方法相结合,为食源性致病菌的定量检测提供更准确、快速、广泛的方法,确保食品安全监管和疫情防控的有效性,减少致病菌

污染造成的经济损失,为水产品乃至整个食品领域生产销售环节的食品安全提供完善的技术支持。

参考文献

- [1] 吴美娇, 吴有雪, 刘程, 等. 基于组合胶体金纳米颗粒的免疫层析试纸条快速可视化检测海产品中副溶血性弧菌[J]. 工业微生物, 2021, 51(2): 1-9.
WU M J, WU Y X, LIU C, et al. Rapid visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood by immunochromatographic strip based on composited colloidal gold nanoparticles[J]. Industrial Microbiology, 2021, 51(2): 1-9.
- [2] CHEN X, ZHU Q Y, LIU Y C, et al. Pathogenic characteristics of and variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from acute diarrhoeal patients in southeastern China from 2013 to 2017[J]. Infection and Drug Resistance, 2020, 13: 1307-1318.
- [3] 李红秋, 贾华云, 赵帅, 等. 2021年中国大陆食源性疾病暴发监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(4): 816-821.
LI H Q, JIA H Y, ZHAO S, et al. Analysis of foodborne disease outbreaks in Chinese mainland in 2021[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(4): 816-821.
- [4] 李红秋, 郭云昌, 宋壮志, 等. 2019年中国大陆食源性疾病暴发监测资料分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2021, 33(6): 650-656.
LI H Q, GUO Y C, SONG Z Z, et al. Analysis of foodborne disease outbreaks in China in 2019[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2021, 33(6): 650-656.
- [5] PRUENTE V L, JONES J L, MCGOUGH M D, et al. Effects of tumbling, refrigeration, and resubmersion on *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus* levels in North Carolina cultured oysters (*C. virginica*)[J]. Aquaculture, 2022, 546: 737343.
- [6] CDC. Foodborne outbreak online database [DB/OL]. (2022-02-03) [2022-12-08]. <https://www.cdc.gov/norsdashboard/>.
- [7] WHO. Advances in science and risk assessment tools for *Vibrio parahaemolyticus* and *V. vulnificus* associated with seafood[M]. Rome: FAO, 2021.
- [8] 李平, 黄涵, 钟汶兵. 海口市市售贝类海产品副溶血性弧菌

- 污染调查及耐药和毒力基因研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2019, 31(4): 366-370.
- LI P, HUANG H, ZHONG W B. Investigation of *Vibrio parahaemolyticus* contamination, drug resistance and virulence genes in shellfish products sold in Haikou [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2019, 31(4): 366-370.
- [9] 强鑫华, 王若南, 郑书发, 等. 浙江湖州地区2017—2020年食源性腹泻患者来源副溶血弧菌特征分析[J]. 临床检验杂志, 2022, 40(11): 844-848.
- QIANG X H, WANG R N, ZHENG S F, et al. Characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* from patients with food-borne diarrhea in Huzhou, Zhejiang province from 2017 to 2020 [J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2022, 40(11): 844-848.
- [10] 翁琴云. 厦门市水产品中副溶血性弧菌和溶藻弧菌的污染状况研究[J]. 现代食品, 2022, 28(8): 180-182.
- WENG Q Y. Contamination of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in aquatic products in Xiamen city [J]. Modern Food, 2022, 28(8): 180-182.
- [11] 蒋凯, 宗雯琦, 戴月, 等. 2016—2020年江苏省副溶血性弧菌食源性疾病事件流行病学分析[J]. 现代预防医学, 2022, 49(19): 3615-3620.
- JIANG K, ZONG W Q, DAI Y, et al. *Vibrio parahemolyticus* foodborne disease events in Jiangsu, 2016-2020 [J]. Modern Preventive Medicine, 2022, 49(19): 3615-3620.
- [12] 凌南, 范謩钰, 任建鸾, 等. 食源性人兽共患病病原活菌检测技术研究进展[J]. 中国动物检疫, 2018, 35(10): 68-73.
- LING N, FAN L Y, REN J L, et al. Research progress on detection technologies of food-borne zoonotic diseases [J]. China Animal Health Inspection, 2018, 35(10): 68-73.
- [13] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量: GB 29921—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.
- National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. National food safety standard-Limit of pathogenic bacteria in prepackaged food: GB 29921—2021[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021.
- [14] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 散装即食食品中致病菌限量: GB 31607—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.
- National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation. National food safety standard- Limit of pathogenic bacteria in bulk ready to eat food: GB 31607—2021[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021.
- [15] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验: GB 4789.7—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- National Health and Family Planning Commission. National food safety standard- Microbiological examination of food hygiene - Examination of *Vibrio parahaemolyticus*: GB 4789.7—2013[S]. Beijing: Standards Press of China, 2014.
- [16] 王红. 副溶血性弧菌传播流行及分子检测技术概述[J]. 大众科技, 2018, 20(4): 46-48.
- WANG H. Prevalence and molecular detection techniques of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Popular Science & Technology, 2018, 20(4): 46-48.
- [17] ZHOU B, YE Q, CHEN M, et al. Novel species-specific targets for real-time PCR detection of four common pathogenic *Staphylococcus* spp [J]. Food Control, 2022, 131: 108478.
- [18] 陈媛媛, 王亚男, 刘士朋. 副溶血性弧菌致病性和检测方法研究进展[J]. 河北医药, 2022, 44(22): 3491-3495.
- CHEN Y Y, WANG Y N, LIU S P. Study on pathogenicity and detection method of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Hebei Medical Journal, 2022, 44(22): 3491-3495.
- [19] 周霞霞, 邢家深, 傅晓, 等. 双层平板直接定性定量法检测海产品中副溶血性弧菌[J]. 食品工业科技, 2020, 41(6): 228-232.
- ZHOU X X, XING J L, FU X, et al. Direct qualitative and quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood by double plate method [J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(6): 228-232.
- [20] 徐苗苗, 李健, 李桂玲, 等. CPA-核酸试纸条快速检测副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)方法的建立及其在海产品检测中的应用[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(3): 681-688.
- XU M M, LI J, LI G L, et al. Development of cross priming amplification combined with nucleic acid strip for detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2016, 47(3): 681-688.
- [21] ARANDA C P, YÉVENES M, RODRIGUEZ-BENITO C, et al. Distribution and growth of *Vibrio parahaemolyticus* in southern Chilean clams (*Venus antiqua*) and blue mussels (*Mytilus chilensis*) [J]. Foodborne Pathogens and Disease, 2015, 12(1): 1-7.
- [22] 陈泽辉. 副溶血性弧菌的定量检测技术研究与应用[D]. 厦门: 集美大学, 2020.
- CHEN Z H. Research and application of quantitative detection technology for *Vibrio parahaemolyticus* [D]. Xiamen: Jimei University, 2020.
- [23] 李聪聪. PMA-qPCR活菌检测方法的建立与应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- LI C C. Establishment and application of PMA-QCPR method for detecting viable bacteria [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.
- [24] 曹潇. 免疫磁分离结合PMAxx-qPCR技术快速定量检测VBNC状态副溶血弧菌的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2019.
- CAO X. Study on rapid and quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* in VBNC state by immunomagnetic separation combined with PMAxx-qPCR technology [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2019.
- [25] LING N, SHEN J, GUO J, et al. Rapid and accurate detection of viable *Vibrio parahaemolyticus* by sodium deoxycholate-propidium monoazide-qPCR in shrimp [J]. Food Control, 2020, 109: 106883.
- [26] XU L, QU H, ALONSO D G, et al. Portable integrated digital PCR system for the point-of-care quantification of BK virus from urine samples [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 175: 112908.
- [27] IBEKWE M A, MURINDA S E, PARK S, et al. Comparative use of quantitative PCR (qPCR), droplet digital PCR (ddPCR),

- and recombinase polymerase amplification (RPA) in the detection of shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in environmental samples [J]. *Water*, 2020, 12(12): 3507.
- [28] 翁文川, 管锦绣, 谢会, 等. 水产品中副溶血性弧菌 PMA-ddPCR 活菌定量检测方法的研究[J]. *现代食品科技*, 2019, 35(6): 273-279.
- WENG W C, GUAN J X, XIE H, et al. Study on quantitative detection method of *Vibrio parahaemolyticus* by PMA-ddPCR in aquatic products [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2019, 35(6): 273-279.
- [29] LEI S W, GU X K, XUE W, et al. A 4-plex droplet digital PCR method for simultaneous quantification and differentiation of pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* based on single intact cells [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1727.
- [30] 王一萍, 段林洁, 曾杰生, 等. 基于双重数字 PCR 检测副溶血弧菌和鼠伤寒沙门氏菌[J]. *现代食品*, 2021(15): 176-181.
- WANG Y P, DUAN L J, ZENG J S, et al. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Salmonella typhimurium* by duplex droplet digital PCR[J]. *Modern Food*, 2021(15): 176-181.
- [31] 中华人民共和国海关总署. 出口食品中致病菌检测方法 微滴式数字 PCR 法 第 1 部分: 副溶血性弧菌: SN/T 5364.1—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.
- General Administration of Customs of the People's Republic of China. Droplet digital PCR method for detection of pathogens in export food-Part 1: *Vibrio parahaemolyticus*: SN/T 5364.1—2021[S]. Beijing: Standards Press of China, 2021.
- [32] TENG F, GUO L, CUI T T, et al. CDetection: CRISPR-Cas12b-based DNA detection with sub-attomolar sensitivity and single-base specificity[J]. *Genome Biology*, 2019, 20(1): 1-7.
- [33] ZETSCHKE B, GOOTENBERG J S, ABUDAYYEH O O, et al. *Cpf1* is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system[J]. *Cell*, 2015, 163(3): 759-771.
- [34] 王雪亮, 肖艳群, 王华梁. CRISPR/Cas 系统在分子检测中的应用[J]. *检验医学*, 2020, 35(2): 181-185.
- WANG X L, XIAO Y Q, WANG H L. Application of CRISPR/Cas system in molecular detection [J]. *Laboratory Medicine*, 2020, 35(2): 181-185.
- [35] WRIGHT A V, LIU J J, KNOTT G J, et al. Structures of the CRISPR genome integration complex [J]. *Science*, 2017, 357(6356): 1113-1118.
- [36] 董换哲, 苑宁, 张蕴哲, 等. 跨越式滚环等温扩增技术结合 CRISPR/Cas12a 定量检测海产品中的副溶血性弧菌[J]. *食品科学*, 2022, 43(14): 289-295.
- DONG H Z, YUAN N, ZHANG Y Z, et al. Saltatory rolling circle amplification combined with CRISPR/Cas12a for quantitative detection *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods[J]. *Food Science*, 2022, 43(14): 289-295.
- [37] ZHANG M, LIU C, SHI Y, et al. Selective endpoint visualized detection of *Vibrio parahaemolyticus* with CRISPR/Cas12a assisted PCR using thermal cycler for on-site application [J]. *Talanta*, 2020, 214: 120818.
- [38] HU A, KONG L, LU Z, et al. Construction of a LAMP-CRISPR assay for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Food Control*, 2023, 149: 109728.
- [39] 孙雯君, 黄行许, 王鑫杰. 基于 CRISPR 的快速灵敏便捷分子检测[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(1): 60-73.
- SUN W J, HUANG X X, WANG X J. CRISPR-based molecular diagnostics: A review [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(1): 60-73.
- [40] CHEN W, REN Z H, TANG N, et al. Targeted genetic screening in bacteria with a Cas12k-guided transposase [J]. *Cell Reports*, 2021, 36(9): 109635.
- [41] PAUSCH P, AL-SHAYEB B, BISOM-RAPP E, et al. CRISPR-CasΦ from huge phages is a hypercompact genome editor [J]. *Science*, 2020, 369(6501): 333-337.
- [42] 胡玉灿, 曹朝辉, 郑灵刚, 等. CRISPR-Cas 基因编辑技术在微生物组工程中的应用[J]. *高等学校化学学报*, 2023, 44(3): 57-69.
- HU Y C, CAO C H, ZHENG L G, et al. Applications of CRISPR-cas technologies in microbiome engineering [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2023, 44(3): 57-69.
- [43] SHEN Z K, LIU Y, CHEN L M. Qualitative and quantitative detection of potentially virulent *Vibrio parahaemolyticus* in drinking water and commonly consumed aquatic products by loop-mediated isothermal amplification [J]. *Pathogens*, 2021, 11(1): 10.
- [44] ANUPAMA K P, NAYAK A, KARUNASAGAR I, et al. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay along with conventional and real-time PCR assay for sensitive detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from seafood sample without enrichment [J]. *Molecular Biology Reports*, 2021, 48(1): 1009-1016.
- [45] 刘涛, 俞骅, 张蔚, 等. 免疫磁珠-环介导等温扩增联用技术快速检测副溶血性弧菌方法的建立[J]. *中国预防医学杂志*, 2017, 18(4): 266-271.
- LIU T, YU H, ZHANG W, et al. Establishment of a rapid detection method for *Vibrio parahaemolyticus* by immunomagnetic beads-loop-mediated isothermal amplification [J]. *Chinese Preventive Medicine*, 2017, 18(4): 266-271.
- [46] MAFFERT P, REVERCHON S, NASSER W, et al. New nucleic acid testing devices to diagnose infectious diseases in resource-limited settings [J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2017, 36(10): 1717-1731.
- [47] ZHU P, GAO W F, HUANG H L, et al. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish by real-time recombinase polymerase amplification [J]. *Food Analytical Methods*, 2018, 11(8): 2076-2084.
- [48] 李达容. 水产品中副溶血性弧菌和霍乱弧菌 RAA-LFD 快速检测方法的建立与应用研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2022.
- LI D R. Establishment and application of RAA-LFD rapid detection method for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in aquatic products [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2022.
- [49] 秦雪, 付世寒, 杨鑫焱, 等. 重组酶聚合酶等温扩增技术在食源性致病菌检测中的应用[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(20): 449-455.
- QIN X, FU S Q, YANG X Y, et al. Application of recombinase

- polymerase amplification in detection of foodborne pathogen[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(20): 449-455.
- [50] XIANG X, DIAO E, SHANG Y, et al. Rapid quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* via high-fidelity target-based microfluidic identification[J]. Food Research International, 2022, 162: 112032.
- [51] 王亚楠, 陈昌国. 重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(5): 504-511.
WANG Y N, CHEN C G. Advances in the research of recombinase polymerase amplification technology[J]. Medical Journal of Chinese PLA, 2021, 46(5): 504-511.
- [52] ZHANG W, CUI C, CHEN H, et al. Advances in electrochemical aptamer biosensors for the detection of food-borne pathogenic bacteria[J]. Chemistry Select, 2022, 7(29): e202202190.
- [53] 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 D D, LIU M C, YANG Y G, et al. Recent progress in technologies for rapid detection of foodborne pathogens[J]. Food Science, 2022, 43(3): 276-285.
- [54] 李雪彤, 林英, 张园, 等. 食源性致病菌适配体生物传感器研究进展[J]. 生物技术通报, 2019, 35(4): 125-138.
LI X T, LIN Y, ZHANG Y, et al. Application progress on aptasensors in detection of food-born pathogenic bacteria [J]. Biotechnology Bulletin, 2019, 35(4): 125-138.
- [55] 闫夏萌, 张蕴哲, 卢鑫, 等. DNA酶生物传感器在食源性致病菌检测中的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(5): 202-208.
YAN X M, ZHANG Y Z, LU X, et al. Research progress on DNAzyme biosensor in the detection of foodborne pathogens[J]. Food Research and Development, 2023, 44(5): 202-208.
- [56] WANG S, HU J, XIAO S. Fluorescent/electrochemical dual-signal response biosensing strategy mediated by DNAzyme-ferrocene-triggered click chemistry for simultaneous rapid screening and quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2023, 380: 133393.
- [57] 王琦, 颜春蕾, 高洪伟, 等. 基于核酸适配体传感器检测食品致病菌的研究进展[J]. 生物技术通报, 2020, 36(11): 245-258.
WANG Q, YAN C L, GAO H W, et al. Research progress of DNA aptasensors for foodborne pathogen detection[J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(11): 245-258.
- [58] 秦铭灿, 田雪晴, 周俊栏, 等. 基于核酸适配体的生物传感技术检测食源性致病菌研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(13): 5237-5243.
QIN M C, TIAN X Q, ZHOU J L, et al. Research progress on the detection of foodborne pathogens by biosensor based on aptamers[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(13): 5237-5243.
- [59] 纪懿芳, 胡文忠, 姜爱丽, 等. 海产品中副溶血弧菌检测方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(5): 365-369.
JI Y F, HU W Z, JIANG A L, et al. Advancement of detection techniques for *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products[J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(5): 365-369.
- [60] LIU Y, ZHAO C, FU K, et al. Selective turn-on fluorescence detection of *Vibrio parahaemolyticus* in food based on charge-transfer between CdSe/ZnS quantum dots and gold nanoparticles [J]. Food Control, 2017, 80: 380-387.
- [61] 方佩佩, 赵丽青, 马云, 等. 副溶血性弧菌微滴数字PCR定量方法的建立[J]. 食品工业科技, 2018, 39(19): 252-257.
FANG P P, ZHAO L Q, MA Y, et al. Establishment of digital PCR assay for detection of *Vibrio parahemolyticus* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2018, 39(19): 252-257.
- [62] 姜瀚集. 基于CRISPR技术的食源性致病微生物检测新技术研究[D]. 北京: 军事科学院, 2022.
JIANG H J. Study on new detection technology of food-borne pathogenic microorganisms based on CRISPR technology [D]. Beijing: Academy of Military Sciences, 2022.
- [63] 宋晓昀, 王晔茹, 国琳, 等. 快速微生物定量风险评估工具及其改进在海产品中副溶血性弧菌风险分级中应用[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(1): 83-87.
SONG X Y, WANG Y R, GUO L, et al. Application and improvement of swift quantitative microbiological risk assessment 2 tool in risk ranking of *Vibrio parahaemolyticus* in different categories of seafood [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2020, 32(1): 83-87.
- [64] 尚玉婷, 叶青华, 刘振杰, 等. 微生物高通量快速检测技术研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(8): 2801-2814.
SHANG Y T, YE Q H, LIU Z J, et al. Research progress on high-throughput rapid detection technology of microorganism[J]. Microbiology China, 2021, 48(8): 2801-2814.