

综述

食物中典型致病菌的快速检测研究进展

王紫璇^{1,2}, 孙洁芳², 邵兵^{1,2}(1. 中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110001; 2. 北京市疾病预防控制中心
食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013)

摘要:近年来,由致病微生物和细菌毒素造成的食品安全事件频发,对人类健康构成了严重威胁。准确、快速发现食品中的致病菌是控制食源性疾病暴发的必要手段。虽然经典的细菌培养技术是致病菌检测的金标准,但其检测用时长,技术要求高,不能满足食品安全防控快速筛查需求。近年发展的基于电化学和光谱学的微生物快速检测技术,具有使用简便、响应快速、便于现场检测的优势,可以与实验室精准检测技术优势互补,为保障公共卫生安全提供有力工具,具有重要的研究和应用意义。本文综述了几种典型的食源性致病菌的快速检测方法。重点强调了食品基质对这些微生物和毒素检测的干扰,并列举了一些克服食物基质干扰的样品处理方法,以实现食品中毒素的富集和准确灵敏检测。最后以典型的食源性致病菌为代表,简述了快速检测技术的研究现状、技术难点和未来的发展方向。

关键词:食源性致病菌;快速检测;样品前处理;传感技术

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2022)02-0382-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.02.031

Research progress in rapid detection of typical pathogenic bacteria in food stuffWANG Zixuan^{1,2}, SUN Jiefang², SHAO Bing^{1,2}

(1. School of Public Health, China Medical University, Liaoning Shenyang 110001, China; 2. Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing 100013, China)

Abstract: Food contamination of pathogenic bacteria poses a serious threat to human health. Accurate and rapid detections of pathogenic bacteria in food stuff are of great concerns, which are necessary to reduce outbreaks of foodborne diseases. Although traditional culture-based detection of pathogen are reliable and classical, they suffer from cumbersome and time-consuming. Recently, various detection strategies based on electrochemistry and optical spectroscopy using advanced nanomaterials and micro-analytical systems have emerged as portable and ultrasensitive sensing platform. This review focuses on several typical rapid detection method for foodborne pathogens, and emphasizes the negative effect of interference to these detection systems. Some sample processing method for achieving accurate detection are listed. Finally, taking typical food-borne pathogens as examples, the development status and future research directions of rapid detection technology are briefly described.

Key words: Food borne pathogenic bacteria; rapid detection; sample preparation; sensing technology

食品从原料生产到最终消费,可通过水、空气、土壤、肥料和食品加工环境等环节被致病菌污染。食源性疾病已成为影响公共健康的主要威胁因素,每年大约有 20% 的人群因不安全饮水和进食患

病^[1]。食源性疾病通常由食用被致病菌(包括细菌、病毒、真菌、毒素和寄生虫)污染的食物或水引起。目前,已确认 30 余种病原微生物可导致食源性疾病,其中细菌引发住院和死亡的人数最多。在食源性致病菌中,单核细胞增生李斯特菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌、大肠杆菌 O157:H7 等志贺毒素产生菌引发细菌性痢疾、霍乱、伤寒等传染性疾 病^[2]。更重要的是,近年来生物恐怖主义的挑衅对重大活动的顺利进行构成了严重威胁^[3]。为确保食品安全并最大限度地减少食源性疾病的发生,从源头上阻断食源性疾病的暴发,对食品中

收稿日期:2021-12-01

基金项目:首都卫生发展科研专项(2018-4-1014);国家重点研发计划食品安全关键技术研发重点专项(2018YFC1602600)

作者简介:王紫璇 女 硕士研究生 研究方向为食品安全

E-mail:345518377@qq.com

通信作者:孙洁芳 女 副研究员 研究方向为食品安全

E-mail:sunjf2001@163.com

致病菌及其产生的生物毒素进行高效、准确、灵敏地检测成为实现该目标的关键环节。开发针对食源性致病菌的快速检测技术和小型便携器件,不仅可与实验室传统精准检测形成优势互补,还可用于现场筛查,为重大活动中的生物性突发中毒事件提供应急措施及安全保障。因此本文综述了用于检测食物基质中典型致病菌和细菌毒素的方法,为本领域的研究人员提供一些最新的研究进展。

1 微生物检测方法现状分析

目前,常见的微生物检测方法,如平板计数、聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)技术等,存在着需要前处理和检测脱节(容易引起靶标分子丢失,造成假阴性)、需要专业人员参与和检测周期长等缺点,不能满足食品安全现场筛查需求^[4]。虽然传统微生物培养技术和基于大型仪器的实验室检测仍然是准确可靠的确证方式^[5],但近年来发展起来的一些基于免培养方法的食源性致病菌的检测技术,更加简便、快速^[6],可以更好地服务于应用需求。

考虑到食品基质的多样性和复杂性,发展快速、灵敏、简便、准确的检测方法具有较大的技术挑战,快速现场检测技术能够即时筛查到从原料、加工过程、存储、销售等环节中存在的致病菌,从而对被污染的产品进行及时有效的控制,具有较好发展前景^[7-8]。此外,快速现场检测技术对食源性疾病控制也至关重要,依赖这些技术能够迅速查明受污染的食品、疾病暴发源头和感染人群,从而有效防止疾病的进一步传播。近年来,随着生物传感技术的发展,针对食品中典型致病微生物和细菌毒素的分离富集和检测技术的研究取得了巨大的进展,检测灵敏度不断升高、检测时间进一步缩短,甚至可以实现不需要富集直接检测食品样品中的痕量食源性致病菌^[9-10]。

2 食物基质对病原微生物和细菌毒素检测的影响

从复杂的食物基质中检测致病菌及生物毒素是快速检测的关键技术也是技术难点之一。食物基质是各种复杂成分的异质混合物,脂肪和各种无机微粒会干扰抗体识别结合;水果中碳水化合物、多酚物质影响核酸扩增;氯化钠、蔗糖和赖氨酸会通过干扰核酸模板结合或干扰DNA聚合酶活性抑制PCR检测^[11]。牛奶、牛肉和鸡肉等高蛋白基质也对DNA提取和后续的PCR产生显著抑制^[12]。水果、蔬菜和肉类在经历均质处理后,可能会释放一些干扰下游分析和检测的酶或抗菌成分^[13]。除了PCR

和酶反应,食物基质成分和固有特性也会干扰其他类型的食源性致病菌检测。LI等^[14]发现当使用电化学免疫传感器用于牛奶、菠菜和肉糜基质中的大肠杆菌O157:H7检测时,致病菌会黏附样品基质上,降低检测准确性。SHARMA等^[6]利用压电悬臂传感器检测病原菌时发现牛奶基质中高含量糖、蛋白质和脂肪基质会导致传感器共振频率下降,基质干扰严重。TAYLOR等^[15]发现当使用表面等离子体共振(Surface plasmon resonance, SPR)传感器检测苹果汁中致病菌时发现,体系pH对检测结果影响很大,pH值为3.7时显著干扰抗体-抗原结合,而将pH值调至7.4可以消除这种干扰效应。WANG等^[16]使用SPR传感技术检测食品中空肠弯曲杆菌,大肠杆菌O157:H7食源性致病菌时,碳水化合物、膳食纤维、脂质和蛋白质成分引起的非特异性吸附会干扰检测。此外,生食样品通常有高水平的原生菌群,它们的大量存在干扰特定食源性致病菌的检测。例如,NERO等^[17]发现生牛奶基质中,高含量的原生菌群(肠球菌和乳酸杆菌)干扰单核细胞增生李斯特菌和肠炎链球菌的检测。因此开发快速现场检测技术必须考虑基质干扰问题,并匹配相应的样品前处理技术,保证方法准确、灵敏、可靠性。

3 食品样品中病原微生物和细菌毒素的富集方法

基于经典微生物培养技术可增加目标病原菌的数量,以提高检测方法灵敏度,但该方法通常繁琐耗时,技术要求高。许多非培养方法通过从食品样品中捕获目标病原菌,净化样品基质,也可以较好地解决检测灵敏度和可靠性问题,不影响细菌细胞的特性。这种基于非培养技术的致病菌富集方法,由于操作简单、不依赖复杂的实验条件和设备、成本低的优势受到广泛关注。

对于一些饮料和液体样品,离心和过滤仍然是较常用的分离手段^[18]。目前开发出一些基于过滤和离心的改进型样品处理方法能用于大量样品的浓缩系统和高通量的自动化样品处理系统。例如,BREWSTER等^[19]构建的一个逐级样品处理系统,分三个阶段使用不同的过滤材料富集提取牛肉样品中的大肠杆菌O157:H7,实现了污染食品中超低含量的致病菌的回收检测。LI等^[20]开发了一种自动微滤仪,通过对鸡肉匀浆进行生化预处理和预过滤,实现了500~1000倍的微生物浓缩提取。在使用离心和过滤方法处理样品,由于通常使用一系列的浓缩步骤,且涉及到多次分离和重复洗涤,不可避免地造成回收率的降低。相比于过滤和离心技

术,基于生物亲和作用的提取方法,如免疫磁分离(Immunomagnetic separation, IMS)已经成为分离食源性致病细菌的主要方法^[21-23]。由于其超顺磁性和巨大的比表面积,磁性纳米粒子(Magnetic nanoparticles, MNPs)已被开发成为多种配体附着平台,用于识别回收各种致病菌。此外,MNPs的大小比致病菌小1~2个数量级,这使得多个MNPs可以附着在一个细菌细胞上,提高了分离效果^[24]。不同的化合物和程序被用于稳定磁芯,改善表面功能化,并减少非特异性相互作用^[25]。除了免疫吸附作用外,基于其他生物亲和分子如:适配体^[26]、噬菌体蛋白^[27]和其他多糖等识别分子^[28]的亲磁珠被设计构建。这种基于磁性分离快速和简便的应用优势,可从广泛的食物基质中选择性的提取目标毒素或致病菌,一般在1h内即可完成样品处理,且无稀释或样品损失,还便于实现自动化和大批量样品处理^[29]。在这种方法中,样品处理效果很大程度上取决于配体的亲和能力,同时磁性吸附材料的物理性质,和表面涂层性质都会对分离的效果产生影响。当使用磁分离技术时,需要考虑附着在磁性颗粒上的生物材料的寿命、食物基质中的干扰、磁场的强度,最大限度地发挥功能化颗粒与目标之间的相互识别和集合。需要指出的是,在大多数情况下,活的致病菌是造成食品污染的最关键因素,而IMS回收技术无法区分致病菌是否存活,这一点在实际应用中应给与考虑。总之,对于复杂的食物基质来说,致病菌富集和样品净化对保证后续快速检测的灵敏度和可靠性具有重要意义,是本领域的研究重点。有效的分离富集方法可以减少检测成本、缩短检测时间、提高检测的工作效率,对于后续检测技术的运用提供有力的支持,是食品检测不可或缺的一部分。

4 典型食源性致病菌快速检测技术

与传统培养方法相比,基于生物传感的快速检测技术,具有检测时间短、操作简单、技术要求低等优点。生物传感器可以达到与仪器检测方法相似甚至更好的检测效果。近年来,实时、便携式、以及基于功能纳米材料的生物传感技术发展迅速^[30],在食品安全监控方面显示出巨大的应用潜力,已被用于各类食物基质中免培养型食源性致病菌快速检测。

4.1 酶联免疫吸附检测技术

酶联免疫吸附测定(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是目前应用最广泛的食源性病原菌的检测方法。近年来ELISA的发展方向为构建更为灵敏的信号输出原件,与IMS或其他捕获

浓缩方法结合提高基质适用性,以及性能更为优越的新抗体开发等几方面。纳米材料由于其巨大的比表面积,用于构建高抗体密度的识别或信号报告元件,可显著提升检测灵敏度。CHUNGLOK等^[31]报道了使用单壁碳纳米管(Single-wall carbon nanotubes, SWCNTs)固定化抗体和酶用于检测大肠杆菌O157:H7,与使用非偶联的抗体检测相比,使用SWCNTs检测方法检测限降低两个数量级。CHO等^[32]利用3种抗体功能化的金纳米颗粒(AuNPs)开发了一种ELISA检测方法,AuNPs通过三维组装允许更多标记抗体连接到传感界面,因此极大地增强了检测信号。该方法进一步结合IMS,实现能2h内检测出食物基质中低至3CFU/mL的大肠杆菌O157:H7和15CFU/mL的沙门氏菌。CHO等^[33]报道了一种多重夹心免疫分析法,用于高灵敏度荧光同时检测大肠杆菌O157:H7和沙门氏菌。首先基于抗体特异性标记的磁性颗粒异性捕获两种致病菌,分离纯化基质后,使用两种二抗标记的特异性荧光纳米颗粒分别识别两种细菌,最后通过酶解释放附着在捕获目标上的纳米荧光探针来实现检测信号输出。WU等^[34]开发了一种利用核酸适配体功能化磁分离方法捕获牛奶中的沙门氏菌,分离清洗基质与二抗形成夹层结构,最后使同时标记检测二抗识别单元和报告酶的AuNPs输出检测信号,实现了低至5CFU/mL的沙门氏菌的检出。

值得一提的是,唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia gladioli*)是我国发现的死亡率最高的食源性致病菌,其致病原因是菌体产生的两种小分子毒性代谢产物:米酵菌酸和毒黄素^[35]。目前国内外对米酵菌酸的免疫分析研究涉及较少。刘秀梅等^[36]制备了米酵菌酸-牛血清白蛋白结合物、卵清蛋白结合物,获得抗米酵菌酸半抗原的单克隆细胞株,建立间接竞争ELISA法,方法灵敏度为10 μ g/L,线性范围在10³~10⁵ μ g/L之间,无法满足检测需求。近年张小波等^[37]开发米酵菌酸荧光定量检测卡,检测线性范围为1~100 μ g/L,是现有免疫分析文献中唯一对食品样本中米酵菌酸检测进行了验证的研究,但仍达不到实际应用中的检测要求。至于毒黄素的检测,CHOI等^[38]采用生物传感器对毒黄素进行测定,根据 β -半乳糖苷酶活性判断外源性毒黄素浓度,该方法对毒黄素的检测范围为24.3~243.0 μ g/L。

金黄色葡萄球菌分泌的肠毒素是一类具有呕吐活性的胞外单链小分子蛋白质,分子量约为26~29kDa。依据抗原性和等电点的不同可将常见肠毒素分为SEA、SEB、SEC、SED、SEE等5种类型,其中SEC又可分为SEC1、SEC2和SEC3等3种亚型。

随着对肠毒素的深入研究和生物技术的发展,基于抗原抗体反应的免疫检测技术已经逐步建立并应用到检验中,部分成熟可靠的技术已经商业化。德国拜发公司的 RIDASCREEN SET[®] A、B、C、D、E 和 RIDASCREEN[®] SET Total 试剂盒可以对 SEA、SEB、SEC、SED、SEE 分型检测和总量检测,检测限为 0.25 ng/mL,交叉反应率 10%~20%。LIANG 等^[39]制备了可以同时识别 SEA 和 SEB 的单克隆抗体,检测限均在 1 ng/mL 左右。王文彬等^[40]制备了 SEA、SEB、SEC、SED、SEE 的单克隆抗体,并且建立了基于单克隆抗体的胶体金多重试纸条检测方法,牛奶样品中的肉眼检测限分别为 10、10、10、10、25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。CHING 等^[41]采用复合试纸条对牛奶、苹果汁和橙汁中加标的 BoNT/A 和 B 进行检测,灵敏度可达到 ng/mL 水平。SCOTCHER 等^[42]首先构建肉毒毒素 B 血清型单克隆抗体(BoNT/B),并构建了一种三明治酶联免疫分析法,比传统的基于小鼠生物测定法灵敏度高 10 倍以上。

4.2 基于光学快速检测技术

SPR 检测是食源性致病菌检测中报道较多的一类技术。纳米材料诸如纳米纤维、纳米粒子和量子点等由于其独特的光学特性而引起了人们的广泛关注,通常将抗体、适配体、DNA 等传感元件固定在 SPR 传感器表面,以保证高信噪比和快速检测。

RODRIGUEZ-EMMENEGGER 等^[43]提出了将抗体共价偶连在抗污高分子修饰的 SPR 芯片表面,以抑制牛奶样品中高脂质和高蛋白的污染。近年来,微小型化 SPR 生物传感器、多路检测和纳米技术引起了人们的广泛关注。SON 等^[44]使用小型化 SPR 检测系统(Spreeta)实现了鸡肉中肠炎沙门氏菌低至 0.2 CFU/mL 的检测。除了使用抗体,其他生物识别元件也可用于 SPR 生物传感器。WANG 等^[16]用凝集素(小麦胚芽凝集素)作为生物受体检测大肠杆菌 O157:H7,在污染黄瓜和牛肉中对大肠杆菌检测限分别为 10 和 10^3 CFU/mL。 TSAI 和 LI^[45]开发了几种 SPR 免疫传感器来检测如牛奶中的葡萄球菌肠毒素 A (Staphylococcal enterotoxin A, SEA); FERRACCI 等^[46]检测牛奶、苹果汁和胡萝卜汁中的肉毒毒素 BoNT/B,基于检测毒素的内蛋白水解裂解活性实现 SPR 检测。TEMUR 等^[47]开发了一种使用适配体修饰的金磁纳米棒,通过基于 SPR 的夹心方法对葡萄球菌肠毒素 B (Staphylococcal enterotoxin B, SEB)检测,同时该方法也可基于 SERS 技术实现牛奶中的毒素低至埃摩尔级检测。

基于荧光和比色检测致病菌也是快速检测的主流方向。PIRES 等^[48]合成了对细菌代谢物有响

应的功能化聚合物囊泡,并将其用于苹果中金黄色葡萄球菌和大肠杆菌 O157:H7 的检测,通过光度计检测颜色变化实现对目标物的检测。YOU 等^[49]开发了适用于乳胶免疫凝集试验的手持设备,用于检测光散射信号,无需样品前处理即可实现菠菜中大肠杆菌 O157:H7 的现场快速检测。SONG 等^[50]报道了一种基于荧光共振能量转移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)的生物传感器,使用修饰荧光淬灭剂的磁性纳米颗粒,碳纳米管修饰互补核酸序列,对牛奶样品中添加的肠炎链球菌细胞进行裂解后的目标核酸片段进行检测,方法检测限为 10^2 CFU/mL。SRISA-ART 等^[51]构建了纸基比色分析食源性致病菌的快检方法,首先基于 IMS 富集捕获致病菌,使用标记有半乳糖苷酶标记的二抗识别并催化氯苯酚红- β -D-吡喃半乳糖苷底物变色,通过将液相反应体系滴加在滤纸上后出现的色带变化,实现对于未经稀释的牛奶中 10^2 CFU/mL 的沙门氏菌的可视化快速检测。MARTYNENKO 等^[52]合成了具有长荧光寿命的 Ag/In/S 量子点并将其组装在包被多孔磁性纳米颗粒表面,通过表面偶联的抗体识别致病菌并将其从基质中回收,实现稳态或时间分辨荧光检测。YU 等^[53]设计了一种基于荧光共振能量转移(FRET)检测技术用于检测金黄色葡萄球菌,分别构建万古霉素修饰的金纳米簇(Van-AuNCs)和适配体修饰的金纳米颗粒(Apt-AuNPs),基于二者能够同时识别致病菌并发生 FRET 效应实现荧光检测。ZHENG 等^[54]设计了基于微流控系统的致病菌超快检测体系,利用芯片内独特设计的 3 维微反应池,快速收集样品中的菌体,并基于抗体贵金属纳米酶对目标物进行识别和信号输出,在 10 min 内可对未处理的复杂样品实现低至 17 CFU/mL 的可视化检测。

SERS 具有指纹识别,不受水干扰、灵敏度高、简单快速等应用优势,在应用于食源性病原菌的检测领域,其关键技术在于构建性能优越的 SERS 检测基底和识别传感界面^[55]。MENG 等^[56]构建了性能优越的二维纳米杂合基底,通过在石墨烯表面生成纳米结构后,继续沉积硅基纳米保护层,形成三明治型的纳米复合结构,这种先进的纳米结构可实现检测致病菌稳定、灵敏的 SERS 信号,该基底能够实现集病原菌捕获、识别、失活功能于一体,具有很强的应用价值。GAO 等^[57]使用适配体修饰银纳米颗粒(AgNPs)用于 SERS 直接检测致病菌,针对菌体自身的拉曼指纹图谱进行检测,相比较不用适配体标记的 AgNPs 灵敏度提高 50 倍,检测限低至 1.5 CFU/mL。

4.3 基于电化学快速检测技术

根据所测参数的不同,电化学生物传感器可分为安/伏安型、电位型和电导/阻抗型。电化学测量可以应用于液体、固体或气体分析物,但后两种方法在食品样品分析中不常见。电化学生物传感器具有良好的灵敏度、快速响应和简单的优势^[58]。

VISWANATHAN等^[59]报道了一种用于多重检测大肠杆菌 157:H7、弯曲杆菌和沙门氏菌的一次性使用免疫传感器。使用多壁碳纳米管-聚烯丙基胺修饰的打印电极作为抗体固定基质,同时使用抗体功能化纳米晶体(CdS、CuS和PbS)标记捕获抗体。将添加了病原菌的牛奶作为食物基质用于评价检测方法的优越性。结果表明该方法对3种不同的食源性病原菌均检测限均可达到 10^4 CFU/mL的检测限。AFONSO等^[60]报道了一种基于伏安法检测免疫传感器用于检测沙门氏菌,磁性分离富集后,使用抗体标记的AuNPs作为电化学检测探针。TANG等^[61]利用辣根过氧化物酶标记的二氧化硅纳米颗粒掺杂多壁碳纳米管作为信号放大元件,开发了一种伏安三明治免疫传感器,实现了液体和固体食品样品中肠毒素的灵敏检测,并与ELISA检测结果具有良好的相关性。DONG等^[62]报道了牛奶基质中对沙门氏菌的无标记电化学检测法。将抗体固定在金纳米颗粒和聚(氨基胺)-多壁碳纳米管-壳聚糖纳米复合膜修饰的玻碳电极上,通过阻抗变化测量添加在牛奶中沙门氏菌的检测。JOUNG等^[63]于2013年在透明质酸修饰的氧化铝纳孔膜上修饰抗体,实现了全脂牛奶中大肠杆菌 O157:H7 的检测。由于其独特的纳米结构和电学特性,石墨烯已成为一种有吸引力的生物传感材料,用于开发电导生物传感器。WANG等^[64]测试了金纳米颗粒改性的石墨烯纸电极用于无标记阻抗免疫检测大肠杆菌 O157:H7,在牛肉和黄瓜样品中分别检测到低至 1.5×10^{-4} 和 1.5×10^{-3} CFU/mL的目标细菌。WU等^[65]在电极表面通过电化学聚合方法,构建针对菌体的聚吡咯分子印迹层,用于基于阻抗信号变化的电化学检测方法,实现了1 h内对 10^3 CFU/mL大肠杆菌 O157:H7的直接检测,该方法方便快捷,检测效果优越。NEMR等^[66]发展了基于微流体电化学检测平台的耐药性金黄色葡萄球菌快速检测。生物或食品样本无需经过样品前处理,直接经过特定的微流控芯片捕获,识别膜表面耐药性特定蛋白的免疫探针经过微流体通道被致病菌结合,识别探针表面的碱性磷酸酶输出电化学检测信号。该方法能够实现低至845 CFU/mL的高灵敏度保证耐药菌株的快速检测,生物和食品基质不对检测造成干扰。

KUSS等^[67]提出了一种基于致病菌表达的细胞色素c氧化酶的电化学生物传感器,通过在廉价的丝网印刷电极上偶联不同致病菌的抗体捕获目标物,构建的电极便于应用在便携式检测设备上。由于细胞色素c氧化酶这一生化反应在菌体中的普遍性,使这一概念可适用于不同的病原菌的快速检测(<5 min)。PUGIA等^[68]构建了一套用于致病菌精准分析的电化学免疫分析与质谱技术联用技术,基于具有独特质量标签的信号离子发射释放放大纳米颗粒结合致病菌用于质谱信号输出。该方法使用标准微流控自动样品制备平台提取致病菌。基于碱性磷酸酶偶联的致病菌特异性抗体输出电化学信号,在15 min~1 h内检测金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿假单胞菌裂解物的质谱信号,实现每个样本低至 10^4 个细菌的检测限,还能针对阳性样本,继续实现多重或抗性基因的质谱检测。

5 结论

由于食源性致病菌通常以低浓度存在食品样品中,因此需要新型预处理和快速检测方法来处理实现准确可靠的检测。近年来发展了许多先进的检测方法,为解决食品安全和公共卫生问题提供了新思路,特别是随着对新鲜和无加工食品的需求不断增加,这类检测技术将受到越来越多的关注。基于先进的纳米材料构建灵敏的检测探针,深入探讨纳米传感界面结构性能提升方法可靠性,开发简便高效的样品前处理技术,研发富集净化检测集成化的便携式设备均是该领域的重要研究方向,相关研究的发展将推动食品微生物检测产业发展,提高检测的便捷性、灵敏度、可靠性、响应速度、检测通量和自动化程度是微生物检测技术发展方向。

参考文献

- [1] Department of Food Safety, Zoonoses and Foodborne Diseases of WHO. The global burden of foodborne diseases: taking stock and charting the way forward [EB/OL]. [2006-09-25]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241595292>.
- [2] SHENG LINA, ZHU MEIJUN. Practical in-storage interventions to control foodborne pathogens on fresh produce [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2021, 20(5): 4584-4611.
- [3] WALPER S A, LASARTE ARAGONÉS G, SAPSFORD K E, et al. Detecting biothreat agents: From current diagnostics to developing sensor technologies [J]. *ACS Sensors*, 2018, 3(10): 1894-2024.
- [4] KWON D, JOO J, LEE J, et al. Magnetophoretic chromatography for the detection of pathogenic bacteria with the naked eye [J]. *Analytical Chemistry*, 2013, 85(15): 7594-7598.

- [5] COSTELLO M, RHEE M S, KANG D H. Miniaturized two-fold dilution method for enumerating total microbial load and coliforms in raw milk [J]. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 2002, 10 (1): 19-25.
- [6] SHARMA H, MUTHARASAN R. Review of biosensors for foodborne pathogens and toxins [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, 183: 535-549.
- [7] GRACIAS K S, MCKILLIP J L. A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2004, 50 (11): 883-890.
- [8] DWIVEDI H P, JAYKUS L A. Detection of pathogens in foods: The current state-of-the-art and future directions [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2011, 37 (1): 40-63.
- [9] CASTLE L M, SCHUH D A, REYNOLDS E E, et al. Electrochemical sensors to detect bacterial foodborne pathogens [J]. *ACS Sensors*, 2021, 6 (5): 1717-1730.
- [10] WANG B, PARK B. Immunoassay biosensing of foodborne pathogens with surface plasmon resonance imaging: A review [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68 (46): 12927-12939.
- [11] WILSON I G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (10): 3741-3751.
- [12] FLUIT A C, WIDJOATMODJO M N, BOX A T, et al. Rapid detection of salmonellae in poultry with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59 (5): 1342-1346.
- [13] BHUNIA A K. One day to one hour: How quickly can foodborne pathogens be detected? [J]. *Future Microbiology*, 2014, 9 (8): 935-946.
- [14] LI D J, FENG Y Y, ZHOU L, et al. Label-free capacitive immunosensor based on quartz crystal Au electrode for rapid and sensitive detection of *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 687 (1): 89-96.
- [15] TAYLOR A D, LADD J, YU Q M, et al. Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 22 (5): 752-758.
- [16] WANG Y X, YE Z Z, SI C Y, et al. Monitoring of *Escherichia coli* O157: H7 in food samples using lectin based surface plasmon resonance biosensor [J]. *Food Chemistry*, 2013, 136 (3-4): 1303-1308.
- [17] NERO L A, DE MATTOS M R, BARROS M D A F, et al. Interference of raw milk autochthonous microbiota on the performance of conventional methodologies for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp detection [J]. *Microbiological Research*, 2009, 164 (5): 529-535.
- [18] LEE H W, YOON S R, KIM S J, et al. Identification of microbial communities, with a focus on foodborne pathogens, during kimchi manufacturing process using culture-independent and -dependent analyses [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 81: 153-159.
- [19] BREWSTER J D. Large-volume filtration for recovery and concentration of *Escherichia coli* o157: H7 from ground beef [J]. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 2009, 17 (2): 242-256.
- [20] LI X, XIMENES E, AMALARADJOU M A R, et al. Rapid sample processing for detection of food-borne pathogens via cross-flow microfiltration [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79 (22): 7048-7054.
- [21] UYTENDAELE M, VAN HOORDE I, DEBEVERE J. The use of immuno-magnetic separation (IMS) as a tool in a sample preparation method for direct detection of *L. monocytogenes* in cheese [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 54 (3): 205-212.
- [22] WANG Y, FEWINS P A, ALOCILJA E C. Electrochemical immunosensor using nanoparticle-based signal enhancement for *Escherichia coli* O157: H7 detection [J]. *IEEE Sensors Journal*, 2015, 15 (8): 4692-4699.
- [23] YANG Y J, XU F, XU H Y, et al. Magnetic nano-beads based separation combined with propidium monoazide treatment and multiplex PCR assay for simultaneous detection of viable *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* O157: H7 and *Listeria monocytogenes* in food products [J]. *Food Microbiology*, 2013, 34 (2): 418-424.
- [24] WANG Y L, RAVINDRANATH S, IRUDAYARAJ J. Separation and detection of multiple pathogens in a food matrix by magnetic SERS nanoprobe [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011, 399 (3): 1271-1278.
- [25] LI K, LAI Y J, ZHANG W, et al. Fe₂O₃@Au core/shell nanoparticle-based electrochemical DNA biosensor for *Escherichia coli* detection [J]. *Talanta*, 2011, 84 (3): 607-613.
- [26] WU S J, DUAN N, SHI Z, et al. Simultaneous aptasensor for multiplex pathogenic bacteria detection based on multicolor upconversion nanoparticles labels [J]. *Analytical Chemistry*, 2014, 86 (6): 3100-3107.
- [27] POSHTIBAN S, JAVED M A, ARUTYUNOV D, et al. Phage receptor binding protein-based magnetic enrichment method as an aid for real time PCR detection of foodborne bacteria [J]. *The Analyst*, 2013, 138 (19): 5619-5626.
- [28] EL-BOUBBOU K, GRUDEN C, HUANG X F. Magnetic glyco-nanoparticles: A unique tool for rapid pathogen detection, decontamination, and strain differentiation [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2007, 129 (44): 13392-13393.
- [29] CHEN J, SHI X M, GEHRING A G, et al. Automated immunomagnetic separation for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 from spinach [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2014, 179: 33-37.
- [30] YOON J Y, KIM B. Lab-on-a-chip pathogen sensors for food safety [J]. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 2012, 12 (8): 10713-10741.
- [31] CHUNGLOK W, WURAGIL D K, OAES W, et al. Immunoassay based on carbon nanotubes-enhanced ELISA for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 26 (8): 3584-3589.
- [32] CHO I H, IRUDAYARAJ J. *In-situ* immuno-gold nanoparticle network ELISA biosensors for pathogen detection [J]. *International*

- Journal of Food Microbiology, 2013, 164 (1): 70-75.
- [33] CHO I H, MAUER L, IRUDAYARAJ J. *In-situ* fluorescent immunomagnetic multiplex detection of foodborne pathogens in very low numbers[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 57: 143-148.
- [34] WU W H, LI J, PAN D, et al. Gold nanoparticle-based enzyme-linked antibody-aptamer sandwich assay for detection of *Salmonella typhimurium* [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2014, 6 (19): 16974-16981.
- [35] ANWAR M, KASPER A, STECK A R, et al. Bongkreki acid-a review of a lesser-known mitochondrial toxin [J]. Journal of Medical Toxicology, 2017, 13 (2): 173-179.
- [36] LIU X M, WEN W H. Development of a monoclonal antibody cell line against bongkreki acid [J]. Journal of Hygiene Research, 1996, 25(4): 48-50.
- [37] ZHANG X B, WEN G Y, XIN M M, et al. Development and application of fluorescence quantitative detection card for bongkreki acid[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2019, 10(11): 3584-3589.
- [38] CHOI O, LEE Y, HAN I, et al. A simple and sensitive biosensor strain for detecting toxoflavin using β -galactosidase activity[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 50: 256-261.
- [39] LIANG B, ZHANG Y X, LIU A P, et al. Production of a monoclonal antibody by simultaneous immunization of staphylococcal enterotoxin A and B [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 164 (6): 831-840.
- [40] WANG W B, LIU L Q, XU L G, et al. Gold-nanoparticle-based multiplexed immunochromatographic strip for simultaneous detection of staphylococcal enterotoxin A, B, C, D, and E[J]. Particle & Particle Systems Characterization, 2016, 33 (7): 388-395.
- [41] CHING K H, LIN A, MCGARVEY J A, et al. Rapid and selective detection of botulinum neurotoxin serotype-A and -B with a single immunochromatographic test strip [J]. Journal of Immunological Methods, 2012, 380(1-2): 23-29.
- [42] SCOTCHER M C, CHENG L W, STANKER L H. Detection of botulinum neurotoxin serotype B at sub mouse LD₅₀ levels by a sandwich immunoassay and its application to toxin detection in milk[J]. PLoS One, 2010, 5 (6): e11047.
- [43] RODRIGUEZ-EMMENEGGER C, AVRAMENKO O A, BRYNDA E, et al. Poly (HEMA) brushes emerging as a new platform for direct detection of food pathogen in milk samples [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26 (11): 4545-4551.
- [44] SON J R, KIM G, KOTHAPALLI A, et al. Detection of *Salmonella enteritidis* using a miniature optical surface plasmon resonance biosensor[J]. Journal of Physics: Conference Series, 2007, 61: 1086-1090.
- [45] TSAI W C, LI I C. SPR-based immunosensor for determining staphylococcal enterotoxin A [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2009, 136 (1): 8-12.
- [46] FERRACCI G, MARCONI S, MAZUET C, et al. A label-free biosensor assay for botulinum neurotoxin B in food and human serum[J]. Analytical Biochemistry, 2011, 410 (2): 281-288.
- [47] TEMUR E, ZENGİN A, BOYACI H, et al. Attomole sensitivity of staphylococcal enterotoxin B detection using an aptamer-modified surface-enhanced Raman scattering probe [J]. Analytical Chemistry, 2012, 84 (24): 10600-10606.
- [48] PIRES A C D S, SOARES N D F F, da SILVA L H M, et al. A colorimetric biosensor for the detection of foodborne bacteria [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2011, 153 (1): 17-23.
- [49] YOU D J, GESHELL K J, YOON J Y. Direct and sensitive detection of foodborne pathogens within fresh produce samples using a field-deployable handheld device [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 28 (1): 399-406.
- [50] SONG Y, LI W K, DUAN Y F, et al. Nicking enzyme-assisted biosensor for *Salmonella enteritidis* detection based on fluorescence resonance energy transfer [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 55: 400-404.
- [51] SRISA-ART M, BOEHLE K E, GEISS B J, et al. Highly sensitive detection of *Salmonella typhimurium* using a colorimetric paper-based analytical device coupled with immunomagnetic separation[J]. Analytical Chemistry, 2018, 90 (1): 1035-1043.
- [52] MARTYNENKO I V, KUSIĆ D, WEIGERT F, et al. Magneto-fluorescent microbeads for bacteria detection constructed from superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles and AIS/ZnS quantum dots[J]. Analytical Chemistry, 2019, 91 (20): 12661-12669.
- [53] YU M Q, WANG H, FU F, et al. Dual-recognition Förster resonance energy transfer based platform for one-step sensitive detection of pathogenic bacteria using fluorescent vancomycin-gold nanoclusters and aptamer-gold nanoparticles [J]. Analytical Chemistry, 2017, 89 (7): 4085-4090.
- [54] ZHENG L Y, CAI G Z, QI W Z, et al. Optical biosensor for rapid detection of *Salmonella typhimurium* based on porous Gold@Platinum nanocatalysts and a 3D fluidic chip [J]. ACS Sensors, 2020, 5 (1): 65-72.
- [55] LISTER A P, SELLORS W J, HOWLE C R, et al. Raman scattering techniques for defense and security applications [J]. Analytical Chemistry, 2021, 93 (1): 417-429.
- [56] MENG X Y, WANG H Y, CHEN N, et al. A graphene-silver nanoparticle-silicon sandwich SERS chip for quantitative detection of molecules and capture, discrimination, and inactivation of bacteria[J]. Analytical Chemistry, 2018, 90 (9): 5646-5653.
- [57] GAO W C, LI B, YAO R Z, et al. Intuitive label-free SERS detection of bacteria using aptamer-based *in situ* silver nanoparticles synthesis [J]. Analytical Chemistry, 2017, 89 (18): 9836-9842.
- [58] SHARMA H, MUTHARASAN R. Rapid and sensitive immunodetection of *Listeria monocytogenes* in milk using a novel piezoelectric cantilever sensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2013, 45: 158-162.
- [59] VISWANATHAN S, RANI C, HO J A A. Electrochemical immunosensor for multiplexed detection of food-borne pathogens using nanocrystal bioconjugates and MWCNT screen-printed electrode[J]. Talanta, 2012, 94: 315-319.
- [60] AFONSO A S, PÉREZ-LÓPEZ B, FARIA R C, et al. Electrochemical detection of *Salmonella* using gold nanoparticles [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 40 (1): 121-126.
- [61] TANG W L, ZHAO G Y, ZHAN X J. Developing Shigella

- flexneri enzymatic immunosensor based on MWCNT/DMF composite and 4-SPCE [J]. *Food Science and Technology*, 2010, 35(11): 51-56.
- [62] DONG J, ZHAO H, XU M R, et al. A label-free electrochemical impedance immunosensor based on AuNPs/PAMAM-MWCNT-Chi nanocomposite modified glassy carbon electrode for detection of *Salmonella typhimurium* in milk [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141 (3): 1980-1986.
- [63] JOUNG C K, KIM H N, LIM M C, et al. A nanoporous membrane-based impedimetric immunosensor for label-free detection of pathogenic bacteria in whole milk [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 44: 210-215.
- [64] WANG Y X, PING J F, YE Z Z, et al. Impedimetric immunosensor based on gold nanoparticles modified graphene paper for label-free detection of *Escherichia coli* O157: H7 [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 49: 492-498.
- [65] WU J K, WANG R N, LU Y F, et al. Facile preparation of a bacteria imprinted artificial receptor for highly selective bacterial recognition and label-free impedimetric detection [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91 (1): 1027-1033.
- [66] NEMR C, SMITH S J, LIU W H, et al. Nanoparticle-mediated capture and electrochemical detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91 (4): 2847-2853.
- [67] KUSS S, COUTO R A S, EVANS R M, et al. Versatile electrochemical sensing platform for bacteria [J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91 (7): 4317-4322.
- [68] PUGIA M, BOSE T, TJIOE M, et al. Multiplexed signal ion emission reactive release amplification (SIERRA) assay for the culture-free detection of gram-negative and gram-positive bacteria and antimicrobial resistance genes [J]. *Analytical Chemistry*, 2021, 93 (17): 6604-6612.