

病原微生物检测技术研究进展

张春雷

上海伯杰医疗科技股份有限公司, 上海 201401

摘要: 随着新兴技术的不断发展,传感器和人工智能技术的应用让病原体检测更加便捷、快速和准确。然而,目前对于传感器和人工智能技术在病原体检测中的综合应用研究尚比较缺乏。对病原体检测技术进行了综述,包括传统的培养技术、分子检测技术和免疫检测技术,重点总结了基于传感器和人工智能图像识别技术的病原体检测方法,并介绍了它们各自的优势和特点,以期更清晰地了解各种病原体检测技术的优势,把握未来病原体检测技术的发展方向。

关键词: 病原体;分子检测;免疫检测;传感器;图像识别;人工智能

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2023.0120

中图分类号:Q93-332 文献标志码:A

Pathogens Detection Technology: A Review

ZHANG Chunlei

Shanghai BioGerm Medical Technology Co., Ltd., Shanghai 201401, China

Abstract: With the continuous development of emerging technologies, the application of sensor technology and artificial intelligence technology has brought convenient, fast and accurate advantages to pathogen detection. However, there is a lack of overall research on pathogen detection technology, as well as a summary study on sensor technology and artificial intelligence technology. A review of pathogen detection technologies was presented, including traditional cultivation techniques, molecular detection techniques, and immune detection techniques. The focus was on summarizing pathogen detection methods based on sensors and artificial intelligence image recognition techniques, and introducing their respective advantages and characteristics, in order to gain a clearer understanding of the advantages of various pathogen detection technologies and to gain an understanding of the future development direction of pathogen detection technologies.

Key words: pathogens; molecular detection; immunodetection; sensor; image recognition; artificial intelligence

感染性疾病是由病原微生物引起的一类具有传染性的疾病,其发病率较高且致病微生物和寄生虫种类繁多。这些疾病可以感染患者的多个系统、器官和组织,引发免疫反应,对健康造成严重负担。根据国家卫生健康委员会公布的数据,2022年我国甲乙类传染病报告发病243.1万例,报告死亡2.2万人,发病数前五位的是病毒性肝炎、肺结核、梅毒、淋病和布鲁氏菌病,分别有1 105 865、560 847、441 159、96 313和66 138例,占甲乙类传染病报告发病总数的93.4%。报告死亡数居前5位的是艾滋病、肺结核、病毒性肝炎、狂犬

病、流行性出血热,分别有18 885、2 205、543、118、34例,占甲乙类传染病报告死亡总数的99.8%^[1]。此外,感染性疾病也给社会经济带来沉重负担。以我国流感为例,每年平均约有88 100例呼吸道疾病死亡病例与流感相关,占有呼吸道疾病死亡病例的8.2%^[2]。我国流感每年所导致的经济负担高达263.81亿元^[3]。以上数据表明,感染性疾病对个人健康和社会经济都带来了巨大的负担。因此,加强感染性疾病的监测和预防至关重要,可以减少其对公共卫生和社会经济的不利影响。

病原微生物检测技术是一种通过识别和定量样本中可能存在的微生物来进行病原体检测的方法。在病原微生物检测领域,常见的技术包括核酸检测方法、免疫学检测方法等^[4],这些技术的应用可以协助识别致病因素或潜在的健康风险。通过对人体样本中微生物的检测和定量,我们能够及时追踪病原体的传播,并采取相应的防控措施来确保人群健康。此外,病原微生物检测技术还对流行病学监测起到了积极的促进作用。本文对病原体检测技术进行了综述,总结了各种检测方法的优点和特点,以期在病原体检测中的综合应用提供参考。

1 核酸检测技术

1.1 聚合酶链式反应

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是一种用于扩增特定脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)序列以供检测和分析的分子技术。在病原体检测中,PCR技术已被广泛应用,其中一些常见的基于PCR的方法包括传统PCR、实时PCR、多重PCR、巢式PCR、反转录PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)、实时定量PCR(quantitative PCR, qPCR)和数字PCR。

实时定量PCR^[4]和数字PCR^[5-6]是目前最常用和最准确的PCR方法。qPCR技术通过在PCR反应体系中引入荧光基团,实时监测PCR过程中的荧光信号积累,并通过标准曲线对未知模板进行定量分析。在猴痘病毒的检测技术中,qPCR方法检测猴痘病毒应用最广,约占所有猴痘病毒检测技术应用的一半以上,该方法具有快速、灵敏、可扩展等特点^[7]。胡文阳等^[8]报道了一种利用qPCR方法进行非洲猪瘟病毒检测的研究,该方法对非洲猪瘟病毒的检出限可低至 $10 \text{ copies} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,具有快速、安全、低成本的特点。

数字PCR的原理与qPCR类似,但在检测过程中采用微流控技术将PCR反应分离成单个液滴,并确保每个液滴中只存在一个目标模板。数字PCR能够有效提高目标检测的灵敏度,并能够进行绝对定量拷贝数的分析。已有研究证明,数字PCR可广泛用于人类疱疹病毒、巨细胞病毒、人流感病毒、乙肝病毒和艾滋病病毒(human immunodeficiency virus, HIV)等的检测,其可解决

传统PCR方法无法量化或检测低水平病毒载量的限制,从而达到灵敏度高、准确定量的特点^[9]。Nyarubaba等^[10]和胡思宏等^[6]研究了数字PCR在新型冠状病毒检测中的应用,及其在参考标准的建立、环境监测以及突变检测上的广谱应用,结果发现,与qPCR对比,数字PCR除了具备qPCR的特异性、敏感性等特点,在低载量病原体的检测中也具有重要作用。

综上所述,PCR技术在病原体检测中发挥着重要的作用,为病原体的快速、准确和灵敏检测提供了有效的手段。因此,可以根据具体的检测需求和研究目的,选择合适的PCR方法从而提高病原体检测的可靠性和精确性。

1.2 DNA微阵列分析

DNA芯片^[11]是一种用于检测目标DNA的方法,其原理是在芯片上固定大量寡核苷酸序列,使其能够与目标DNA发生杂交。DNA微阵列技术是一种强大的基因组技术,通过荧光标记的寡核苷酸序列与目标DNA杂交,并利用检测荧光信号来识别目标DNA。Douglas在2005年就总结了DNA微阵列芯片在病原体检测中的应用及挑战,并介绍了基于PCR的微阵列芯片方法和无PCR的直接检测微阵列方法,该技术可用于多种病原体的同时检测,具有高通量、高灵敏度和高特异性等优点。但是,因其成本高、样本处理复杂,尚无法广泛用于病原体的检测中,磁珠法微阵列芯片有望解决样本处理的问题^[12]。

1.3 下一代测序技术

下一代测序技术(next generation sequencing, NGS)是一组高通量测序方法,其在基因组学和分子生物学领域产生了革命性的影响。这些技术的出现使得快速、经济、高效地测序大量核糖核酸序列成为可能,为研究人员提供了深入探索基因组学、转录组学和表观组学等领域的机会。NGS技术对于生命科学研究、消费基因组学以及分子诊断等领域都产生了重大影响。

特别是在病原体鉴定方面,利用NGS技术可以一次性鉴定样本中的所有微生物种类,实现了快速、经济的病原体鉴定应用。通过对样本中的核糖核酸序列进行高通量测序,可以获得详细的微生物组成信息,包括病原体的种类和数量。自2014年Wilson等^[13]将宏基因组测序技术首次用于临床,为一名14岁的联合免疫缺陷患者提供

了直接的感染证据并挽回其生命开始,宏基因组测序在病原体的鉴定应用上取得了长足发展。2019年,Goggin等^[14]将NGS技术用于病人的血液感染复发预测,并证明了该技术的可行性和临床价值。到目前为止,宏基因组测序已被用于呼吸系统、消化系统、神经系统等人体各系统的感染诊断中,为疾病的诊断和流行病学调查提供了重要的支持^[15-19]。综上所述,分子检测技术为病原体鉴定提供了快速、敏感、特异的方法。

2 免疫学检测方法

2.1 酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是一种常用的生物化学分析方法,用于检测样本中的抗原或抗体。ELISA利用酶标记的抗原或抗体作为示踪剂,通过催化底物的显色或高活性发光反应来实现定量分析的目的。

在ELISA中,酶与抗体相结合形成复合物,而该复合物与待检测物质结合发生特异性反应。随后,加入底物,酶催化底物的转化产生可检测的信号,如颜色变化或发光。信号的强度与溶液中待检测物质或病原体的数量成正比。Pang等^[20]采用了一种新型纸基酶联免疫吸附试验(paper-based ELISA, p-ELISA),可在3 h内完成大肠杆菌O157:H7的检测。该方法的检出限为 1×10^4 CFU $\cdot$ mL⁻¹,并具有较高的特异性。酶联免疫吸附试验因其敏感性、特异性以及能够同时检测多个样本而得到广泛应用。

2.2 免疫层析法

免疫层析法是一种常用的特异性免疫诊断方法,其原理是将特异性抗体固定在硝酸纤维素膜的特定区域上。当干燥的硝酸纤维素膜浸入样品(如尿液或血清)时,样品会通过毛细作用沿着膜向前移动。样品中的特定抗原与固定的特异性抗体结合,如果使用免疫胶体金或免疫酶染色,可以使特定区域显示一定的颜色,从而实现特异性免疫诊断。Park等^[21]开发了一种快速敏感的免疫层析方法,用于检测鼠伤寒沙门氏菌。该方法采用2种不同的光信号产生方法,包括比色法和化学发光法,成功地产生了比色和化学发光信号。该方法的检测时间分别为20和16 min,检出限范围为 $9.2 \times 10^3 \sim 9.2 \times 10^6$ CFU $\cdot$ mL⁻¹。

较短的检测时间和较低的检出限使免疫层析具有潜在的临床应用和流行病学调查价值。然而,仍然需要进一步的研究和验证,以确保该方法的准确性和可靠性。

2.3 免疫荧光显微镜检查

荧光染料被用作标记抗体或抗原,是通过荧光显微镜技术检测荧光素标记的显微镜检查技术。荧光标记抗体可直接检测临床标本中的微生物抗原,如甲型流感病毒、副流感1-3病毒和呼吸道合胞病毒等,其灵敏度可达96%,特异性可达98%^[22-23]。荧光素标记的单克隆抗体可用于沙眼衣原体、嗜肺军团菌和百日咳的诊断,灵敏度可达90%,特异性可达80%^[24]。间接荧光法可用于卡氏肺孢子虫病、锥虫病和血吸虫病等寄生虫病的诊断^[25-26]。

这种荧光显微镜检查技术的应用为微生物抗原的直接检测提供了一种高灵敏度和高特异性的方法^[27]。通过荧光染料的标记,可以在显微镜下观察到荧光信号的存在,从而确定目标微生物的存在与否。这种技术在临床诊断中具有重要的应用价值,可以帮助医生快速准确地诊断和监测各种感染性疾病。

2.4 免疫磁分离法

通过将特定病原体的单个或多个抗原混合在一起,并利用抗原-抗体反应和外部磁场将致病菌与病原体分离,磁珠方法已成功应用于食源性少量细胞的检测。尽管在检测过程中可能发生交叉反应^[28-30],但免疫检测方法,如酶联免疫吸附测定法(ELISA)、侧流免疫层析法(lateral flow immunochromatography assays, LFIA)和免疫磁分离法(immunomagnetic separation, IMS),因其特异性、敏感性和易用性,已广泛用于检测病原体。然而,这些检测方法仍面临一些挑战,需要进一步改进以提高性能。黄震等^[31]开发了一种基于免疫磁珠分离方法富集检测大肠杆菌O157:H7,可以在35 min内完成牛奶中大肠杆菌O157:H7的富集,在 10^5 CFU $\cdot$ mL⁻¹时,捕获效率仍可达到93.4%。此外,林吉恒等^[32]也将该技术应用于食源性致病菌的检测,并可与其他检测手段结合,具有灵敏度高、检测时间短、操作简单等优势。

免疫学方法具有以下几种优势。①快速、简便。LFIA等免疫学方法能够在几分钟到几小时内快速、简便地检测病原体,使我们能够及时采取干预措施,预防疾病爆发。②特异性。免疫学方

法利用抗体与目标抗原的特异性结合,能够准确识别和区分样品中的病原体。③灵敏度。抗体工程和检测方法的发展提高了免疫学检测方法的灵敏度,使得检测低水平病原体成为可能。④多通道免疫分析。多通道 ELISA 和微阵列等多通道免疫方法可以在单一反应中同时检测多种病原体,提高病原体检测效率。⑤具有便携式和可现场部署的设备。便携式和可现场部署的免疫检测设备的开发,如手持式 LFIA 和基于微流控的免疫分析,实现了现场检测和病原体的实时监测。

然而,免疫学方法仍面临一些挑战。①交叉反应和特异性。抗体与非靶抗原之间的交叉反应可能导致假阳性结果,影响免疫检测方法的特异性。针对不同表位开发的高特异性抗体和采用多重抗体可帮助解决这一问题。②基质效应和干扰。不同样品的复杂性可能引起免疫学检测中的基质效应和干扰,导致灵敏度降低或假阴性结果,而有效的样品制备和纯化方法是克服这一挑战的关键。通过应对这些挑战并改进免疫学检测方法,可以进一步改善对病原体的检测,保障公众健康。

3 基于生物传感器的检测技术

生物传感器是结合生物识别元件和传感器的分析设备,用于检测和定量样品中的目标分析物。在微生物检测中,生物传感器被用于监测和检测各种微生物,如细菌、病毒和原生动物,以及它们的代谢产物和其他污染物。生物传感器在微生物检测中的应用具有响应快、灵敏度高、能够进行实时监测等优点。

基于生物传感器的技术在开发针对各种病原体的快速、高灵敏度和床旁诊断工具方面发挥着关键作用。这些技术通常涉及使用经过特殊工程改造的抗体或其他生物分子来检测具有高敏感性和特异性的靶抗原。其中,一些新兴的生物传感器技术包括光学生物传感器和电化学生物传感器。

3.1 光学生物传感器

光学生物传感器是将生物识别元件与传感器系统相结合的紧凑分析装置,其发射的光学信号与特定分析物的浓度成正比。光学生物传感器在生物医学研究、诊断、环境监测、药物开发和食品安全等多个领域显示出巨大的应用潜力。光学生物传感器可以通过不同的光学现象,如光强度、波

长或偏振的变化来检测目标分析物的存在或浓度。例如,Ho 等^[33]报道了一种荧光标记法的光学生物传感器,用于检测大肠杆菌 O157:H7,其检测限为 360 copies·mL⁻¹。另外,王顺等^[34]采用表面等离子体共振法对不同倍数稀释后的大肠杆菌 O157:H7 阳性样品进行检测,结果可获得良好的线性关系且理论检出限可达 1.87×10³ CFU·mL⁻¹,比 ELISA 试剂盒提高了 4 个数量级。

3.2 电化学生物传感器

电化学生物传感器是一类利用电信号和化学信号的转换来实现其功能的生物传感器。近几十年来,多种电化学生物传感器已被用于病原体检测。根据修饰电极表面的生物特征元件的类型,电化学生物传感器可以分为电化学基因传感器、电化学免疫传感器和电化学适配体传感器。与光学技术相比,电化学方法通常具有更简单的使用步骤和更低的成本^[35]。

其中,电化学基因传感器通过将 DNA 探针固定在底物表面以识别其互补的靶序列,并通过信号转换装置(换能器)将序列杂交信号转换为电信号。电化学基因传感器已被用于各种细菌的检测,而待测样本通常不需要特殊处理(如过滤、离心、富集)就能够快速鉴定细菌^[36-38]。

电化学免疫传感器利用抗原或抗体作为敏感材料,并通过电化学检测系统(换能器)来实现对病原微生物的检测。近年来,该类传感器已成为鉴定和定量细菌病原体的有效方法,并得到广泛应用。例如,Cimafonte 等^[39]开发了一种基于丝网印刷金电极的电化学免疫传感器,可快速检测饮用水中的大肠杆菌,仅需 1 h 即可提供结果,检出限可达 30 CFU·mL⁻¹。

电化学适配体传感器以核酸适配体作为生物识别元件或检测对象,并通过换能器将适配体分子特异性识别中产生的信号转化为电信号。电化学适配体传感器在病原体检测领域具有广泛的实际应用价值。Abdelrasoul 等^[40]通过一种电化学适配体传感器,利用大肠杆菌外膜蛋白 Ag1 适配体功能化的指间电极检测饮用水中的大肠杆菌,其缓冲液的检出限为 9 CFU·mL⁻¹,检测时间为 60 min。

综上所述,生物传感器技术在微生物检测中具有重要的应用价值,并为开发快速、高灵敏度和床旁诊断工具提供了关键支持。光学生物传感器和电化学生物传感器是现阶段发展较为成熟的两

种生物传感器技术,它们在微生物检测中表现出不同的优势和适用性。

4 图像识别技术

随着人工智能技术的快速发展,基于人工智能的图像识别技术已经开始应用于病原体检测领域。该技术主要通过图像采集器采集样本微观图像,然后基于人工智能分类算法对图像数据进

行预处理、病原体特征的提取、模型的训练、模型的评估和优化及测试样本图像的检测等过程识别病原体。目前,常用的人工智能算法有传统的机器学习方法(如支持向量机、决策树等)、基于特征分类方法(如主成分分析等)以及基于深度学习的分类方法(如卷积神经网络等)。例如,Goswami等^[41]介绍了一个基于机器学习检测新型冠状病毒的图像识别鉴定过程,该技术能够简便、迅速且低成本地检测病原体(图1)。

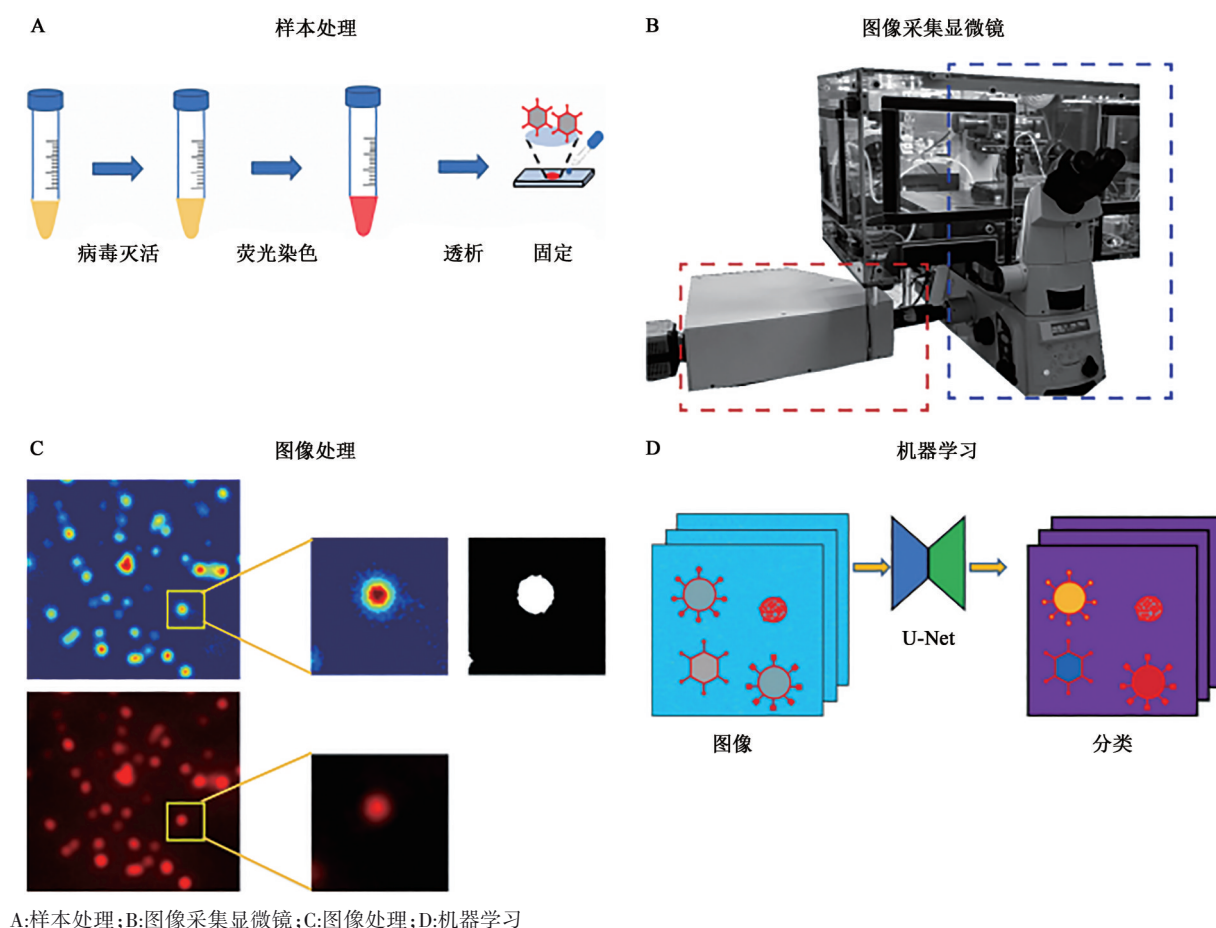


图1 病毒分类及机器学习示意图^[41]

Fig. 1 Schematic diagram of virus classification and machine learning^[41]

Rahman等^[42]进行了一项基于深度卷积神经网络(convolutional neural network, CNN)的研究,用于真菌属在显微图像中的分类。该研究中收集了89个真菌属的数据进行分类,预测结果中最高准确率为65.35%,排名第3的准确率为75.19%。在另一项研究中,陶成龙等^[43]提出了一种基于深度学习和高光谱显微图像的快速病原体鉴定方法,该方法的鉴定准确率达到94.9%。这些研究结果

表明,基于人工智能的图像识别技术在病原体检测中具有巨大的潜力。

5 展望

本文旨在总结病原体的不同检测技术,并讨论在何种情况下应选择何种技术,以及未来的技术发展趋势。现有各种先进的微生物检测技术

有望显著提高病原体和其他微生物的鉴定速度和准确率,从而有助于控制病原体的传播。结合分子、光学和电化学等多种检测技术可以提供更全面的样品病原体分析,从而增强检测能力并提供更可靠的结果。此外,将自动化和高通量分析相结合,如基于芯片的微流控设备和自动化成像系统,能够实现对样品的高通量分析,减少对人工操作的需求,提高病原体检测的效率。同时,利用基于人工智能和机器学习的方法,有助于实现病原微生物的自动化检测和分类,预测微生物的生长和活性,以及监测病原体的流行趋势。这些技术的应用能够提高病原体检测的准确性和速度。

参 考 文 献

- [1] 国家卫生健康委员会规划发展与信息化司. 2021年我国卫生健康事业发展统计公报[J]. 中国病毒病杂志, 2022, 12(5): 321-330.
Department of Planning, Development and Informatization Technology, National Health Commission of the People's Republic of China. Statistical bulletin of China's health development in 2021[J]. Chin. J. Viral Dis., 2022, 12(5): 321-330.
- [2] LI L, LIU Y, WU P, *et al.* Influenza-associated excess respiratory mortality in China, 2010-15: a population-based study[J]. Lancet Public Health, 2019, 4(9): 473-481.
- [3] 龚慧, 申鑫, 严涵, 等. 2006-2019年中国季节性流感疾病负担估计[J]. 中华医学杂志, 2021, 101(8): 560-567.
GONG H, SHEN X, YAN H. Estimating the disease burden of seasonal influenza in China, 2006-2019[J]. Natl. Med. J. China, 2021, 101(8): 560-567.
- [4] WHILEY H, TAYLOR M. *Legionella* detection by culture and qPCR: comparing apples and oranges[J]. Crit. Rev. Microbiol., 2016, 42(1): 65-74.
- [5] ZHAO Y, LIN K, ZHANG H, *et al.* Evaluation of droplet digital PCR rapid detection method and precise diagnosis and treatment for suspected sepsis (PROGRESS): a study protocol for a multi-center pragmatic randomized controlled trial[J/OL]. BMC Infect. Dis., 2022, 22(1): 630[2024-01-29]. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07557-2>.
- [6] 胡思宏, 游国叶. 数字PCR在新型冠状病毒检测中的应用前景[J]. 生物技术进展, 2020, 10(6): 674-679.
HU S H, YOU G Y. Application prospects of digital PCR in detection of SARS-CoV-2[J]. Curr. Biotechnol., 2020, 10(6): 674-679.
- [7] CHAUHAN R P, FOGEL R, LIMSON J. Overview of diagnostic methods, disease prevalence and transmission of mpox (formerly monkeypox) in humans and animal reservoirs[J/OL]. Microorganisms, 2023, 11(5): 1186[2024-01-29]. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051186>.
- [8] 胡文阳, 李朝阳, 闫晓光, 等. 非洲猪瘟病毒实时荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2022, 52(6): 761-766.
HU W Y, LI Z Y, YAN X G, *et al.* Establishment of qPCR detection method for African swine fever virus[J]. Chin. Vet. Sci., 2022, 52(6): 761-766.
- [9] 杜丕波, 柳楠, 林维石, 等. 数字PCR在新型冠状病毒检测中的应用[J]. 中国消毒学杂志, 2022, 39(11): 853-858.
DU P B, LIU N, LIN W S, *et al.* Application of digital PCR in novel coronavirus detection[J]. Chin. J. Disinfect., 2022, 39(11): 853-858.
- [10] NYARUABA R, MWALIKO C, DOBNIK D, *et al.* Digital PCR applications in the SARS-CoV-2/COVID-19 era: a roadmap for future outbreaks[J/OL]. Clin. Microbiol. Rev., 2022, 35(3): e0016821[2024-01-29]. <https://doi.org/10.1128/cmr.00168-21>.
- [11] AL-KHALDI S F, MOSSOBA M M, ALLARD M M, *et al.* Bacterial identification and subtyping using DNA microarray and DNA sequencing[J]. Meth. Mol. Biol. Clifton N. J., 2012, 881: 73-95.
- [12] CALL D R. Challenges and opportunities for pathogen detection using DNA microarrays[J]. Crit. Rev. Microbiol., 2005, 31(2): 91-99.
- [13] WILSON M R, NACCACHE S N, SAMAYOA E, *et al.* Actionable diagnosis of neuroleptospirosis by next-generation sequencing[J]. N. Engl. J. Med., 2014, 370(25): 2408-2417.
- [14] GOGGIN K P, GONZALEZ-PENA V, INABA Y, *et al.* Evaluation of plasma microbial cell-free DNA sequencing to predict bloodstream infection in pediatric patients with relapsed or refractory cancer[J]. JAMA Oncol., 2020, 6(4): 552-556.
- [15] ZHAO M, LI Y, GAO Z, *et al.* Plasma metagenomics reveals regional variations of emerging and re-emerging pathogens in Chinese blood donors with an emphasis on human parvovirus B19[J/OL]. One Health, 2023, 17: 100602[2024-01-29]. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100602>.
- [16] LIU Y, WANG X, XU J, *et al.* Diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing of lower respiratory tract specimen for the diagnosis of suspected *Pneumocystis jirovecii* pneumonia[J/OL]. Ann. Med., 2023, 55(1): 2232358[2024-01-29]. <https://doi.org/10.1080/07853890.2023.2232358>.
- [17] LI Y, BIAN W, WU S, *et al.* Metagenomic next-generation sequencing for *Mycobacterium tuberculosis* complex detection: a meta-analysis[J/OL]. Front. Public Health, 2023, 11: 1224993[2024-01-29]. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2023.1224993>.
- [18] HAN D, LI Z, LI R, *et al.* mNGS in clinical microbiology laboratories: on the road to maturity[J]. Crit. Rev. Microbiol., 2019, 45(5-6): 668-685.
- [19] 李伟, 王冲, 刘嗣嘉, 等. 宏基因组学技术在痤疮研究中的应用进展[J]. 生物技术进展, 2021, 11(6): 694-699.
LI W, WANG C, LIU S J, *et al.* Application progress of metagenomic technology in acne research[J]. Curr. Biotechnol., 2021, 11(6): 694-699.
- [20] PANG B, ZHAO C, LI L, *et al.* Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid *Escherichia coli* O157: H7 detection[J]. Anal. Biochem., 2018, 542: 58-62.
- [21] PARK S, KIM Y T, KIM Y K. Optical enzyme-linked immunosorbent assay on a strip for detection of *Salmonella typhimurium*[J]. BioChip J., 2010, 4(2): 110-116.
- [22] 李晓光, 陈静, 王伟, 等. 新型快速流行性感胃病毒抗原检测方法免疫荧光法在流行性感胃筛查中的应用价值研究[J].

- 中国全科医学, 2020, 23(36): 4651-4655.
- LI X G, CHEN J, WANG W, *et al.* Application of a novel rapid immunofluorescence assay in influenza screening[J]. Chin. Gen. Pract., 2020, 23(36): 4651-4655.
- [23] 顾伟忠, 舒艳, 赵云, 等. 采用直接免疫荧光法对呼吸道分泌物中多种呼吸道病毒抗原检测的价值及临床应用[C]//浙江省病理技术学术大会暨第六届长三角病理技术学术会议论文汇编, 2019.
- [24] 叶夏云, 刘丽, 席春生. 单克隆抗体免疫荧光法检测孕妇生殖道沙眼衣原体[J]. 西北国防医学杂志, 2001, 22(3): 78-79.
- YE X Y, LIU L, XI C S. Detection of *Chlamydia trachomatis* in reproductive tract of pregnant women by monoclonal antibody immunofluorescence[J]. Med. J. Natl. Defending Forces Northwest China, 2001, 22(3): 78-79.
- [25] 王攀, 陈贤君, 钟倩怡, 等. 三种方法在检测嗜肺军团菌中的应用和评价[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(14): 2017-2018.
- WANG P, CHEN X J, ZHONG Q Y, *et al.* Application and evaluation of three methods for legionella pneumophila detection[J]. Chin. J. Health Lab. Technol., 2014, 24(14): 2017-2018.
- [26] 王小环, 杨莲如, 赵林立, 等. 免疫荧光检测技术及其在寄生虫检测中的应用进展[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(3): 81-84.
- WANG X H, YANG L R, ZHAO L L, *et al.* Brief introduction of immunofluorescent test technology and application progress on parasites detection[J]. China Anim. Husbandry Vet. Med., 2012, 39(3): 81-84.
- [27] 张荣, 李雪波, 王玲, 等. 免疫荧光法检测生殖道病原体感染的临床研究[J]. 中国社区医师, 2023, 39(19): 90-92.
- ZHANG R, LI X B, WANG L, *et al.* Clinical study on immunofluorescence assay for detecting reproductive tract pathogen infections[J]. Chin. Commun. Doctors, 2012, 39(3): 81-84.
- [28] MANSFIELD L P, FORSYTHE S J. The detection of *Salmonella* using a combined immunomagnetic separation and ELISA end-detection procedure[J]. Lett. Appl. Microbiol., 2000, 31(4): 279-283.
- [29] PENG H, SHELEF L A. Automated rapid screening of foods for the presence of salmonellae[J]. J. Food Prot., 1999, 62(11): 1341-1345.
- [30] WATTAM A R, INZANA T J, WILLIAMS K P, *et al.* Comparative genomics of early-diverging *Brucella* strains reveals a novel lipopolysaccharide biosynthesis pathway[J/OL]. mBio, 2012, 3(5): 00246-12[2023-12-24]. <https://doi.org/10.1128/mBio.00246-12>.
- [31] 黄震, 罗梅霞, 汪泽祥, 等. 免疫磁分离法高效富集牛奶中大肠杆菌 O157: H7[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(14): 4492-4497.
- HUANG Z, LUO M X, WANG Z X, *et al.* Efficient enrichment of *Escherichia coli* O157: H7 in milk based on immunomagnetic separation[J]. J. Food Saf. Qual., 2019, 10(14): 4492-4497.
- [32] 林吉恒, 黄朱梁, 彭志兰, 等. 免疫磁珠分离技术在食源性致病菌检测中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(18): 5998-6005.
- LIN J H, HUANG Z L, PENG Z L, *et al.* Application of immunomagnetic beads separation techniques in detection of food-borne pathogenic bacteria[J]. J. Food Saf. Qual., 2019, 10(18): 5998-6005.
- [33] HO J A A, HSU H W, HUANG M R. Liposome-based microcapillary immunosensor for detection of *Escherichia coli* O157: H7[J]. Anal. Biochem., 2004, 330(2): 342-349.
- [34] WANG S, XIE J, JIANG M, *et al.* The development of a portable SPR bioanalyzer for sensitive detection of *Escherichia coli* O157: H7[J/OL]. Sensors, 2016, 16(11): 1856[2024-01-29]. <https://doi.org/10.3390/s16111856>.
- [35] BANAKAR M, HAMIDI M, KHURSHID Z, *et al.* Electrochemical biosensors for pathogen detection: an updated review[J/OL]. Biosensors, 2022, 12(11): 927[2024-01-29]. <https://doi.org/10.3390/bios12110927>.
- [36] FERNANDES A M, ABDALHAI M H, JI J, *et al.* Development of highly sensitive electrochemical genosensor based on multiwalled carbon nanotubes-chitosan-bismuth and lead sulfide nanoparticles for the detection of pathogenic *Aeromonas*[J]. Biosens. Bioelectron., 2015, 63: 399-406.
- [37] FLOW K, ZAIN Z M, YEAN C Y. A signal-amplified electrochemical DNA biosensor incorporated with a colorimetric internal control for *Vibrio cholerae* detection using shelf-ready reagents[J]. Biosens. Bioelectron., 2017, 87: 256-263.
- [38] SUN Y, HE X, JI J, *et al.* A highly selective and sensitive electrochemical CS-MWCNTs/Au-NPs composite DNA biosensor for *Staphylococcus aureus* gene sequence detection[J]. Talanta, 2015, 141: 300-306.
- [39] CIMAFONTE M, FULGIONE A, GAGLIONE R, *et al.* Screen printed based impedimetric immunosensor for rapid detection of *Escherichia coli* in drinking water[J/OL]. Sensors, 2020, 20(1): 274[2024-01-29]. <https://doi.org/10.3390/s20010274>.
- [40] ABDELRASOUL G N, ANWAR A, MACKAY S, *et al.* DNA aptamer-based non-faradaic impedance biosensor for detecting *E. coli*[J]. Anal. Chim. Acta, 2020, 1107: 135-144.
- [41] GOSWAMI N, HE Y R, DENG Y H, *et al.* Label-free SARS-CoV-2 detection and classification using phase imaging with computational specificity[J/OL]. Light Sci. Appl., 2021, 10(1): 176[2024-01-29]. <https://doi.org/10.1038/s41377-021-00620-8>.
- [42] RAHMAN M A, CLINCH M, REYNOLDS J, *et al.* Classification of fungal Genera from microscopic images using artificial intelligence[J/OL]. J. Pathol. Inform., 2023, 14: 100314[2024-01-29]. <https://doi.org/10.1016/j.jpi.2023.100314>.
- [43] TAO C, DU J, TANG Y, *et al.* A deep-learning based system for rapid genus identification of pathogens under hyperspectral microscopic images[J/OL]. Cells, 2022, 11(14): 2237[2024-01-29]. <https://doi.org/10.3390/cells11142237>.