

吴鹏, 孙雅和, 朱旭丽, 等. 食源性致病菌快速检测技术及其标准化应用研究进展 [J]. 食品工业科技, 2024, 45(5): 426-437. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060053

WU Peng, SUN Yahe, ZHU Xuli, et al. Research Progress on Rapid Detection Technology and Standardized Application of Foodborne Pathogens[J]. Science and Technology of Food Industry, 2024, 45(5): 426-437. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060053

· 专题综述 ·

食源性致病菌快速检测技术及其标准化应用研究进展

吴 鹏¹, 孙雅和¹, 朱旭丽¹, 周树华^{1,*}, 张成云^{2,*}

(1. 浙江省标准化研究院, 金砖国家标准化 (浙江) 研究中心, 之江标准化智库, 国家市场监管数字化
研究与应用技术创新中心, 浙江杭州 310007;

2. 文成县食品药品综合检测中心, 浙江温州 325399)

摘 要: 随着新型食品安全检测技术的快速发展, 食源性致病菌快速检测技术改善了传统检测方法周期长、灵敏度低等缺陷, 对于保障民众生命健康和经济社会发展起到重要作用, 而标准化则是推动快速检测技术应用推广的关键和前提。本文系统介绍了生理生化检测技术、免疫学检测技术、分子检测技术等目前使用较多的食源性致病菌快速检测方法, 总结了各类不同方法的技术原理、研究进展及优缺点, 并从标准化角度进一步介绍了国内外快速检测技术的标准现状以及应用实践情况。新型快速检测技术具备灵敏、快速、特异性强的优势, 但也存在一定的缺陷, 如免疫检测技术抗体前处理较为麻烦, 生理生化检测技术有污染菌混淆问题, 分子检测技术有一定假阳性等。此外, 大部分检测方法仍属于非法定方法, 缺乏统一的判定标准, 国内外相关标准体系仍不完善, 制约了快速检测技术的标准化推广应用。基于此, 本文从标准化角度提出了食源性致病菌快速检测技术未来发展的建议, 以期后续食品安全相关技术的研究与标准化建设提供参考。

关键词: 食源性致病菌, 快速检测技术, 标准化应用

中图分类号: TS207.4

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2024)05-0426-12

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2023060053

本文网刊:



Research Progress on Rapid Detection Technology and Standardized Application of Foodborne Pathogens

WU Peng¹, SUN Yahe¹, ZHU Xuli¹, ZHOU Shuhua^{1,*}, ZHANG Chengyun^{2,*}

(1. Zhejiang Institute of Standardization, BRICS Standardization (Zhejiang) Research Center, Zhejiang Standardization Think Tank, National Market Regulation Digital Research and Application Technology Innovation Center, Hangzhou 310007, China;

2. Wencheng County Food and Drug Comprehensive Inspection and Testing Center, Wenzhou 325399, China)

Abstract: In recent years, with the rapid development of new food safety testing technologies, rapid detection of foodborne pathogens has improved traditional detection methods that suffer from long cycles and low sensitivity, thus playing an important role in safeguarding public health and promoting economic and social development. Standardization is the key to the promotion and application of rapid detection technologies. This article systematically introduces commonly used rapid detection methods for foodborne pathogens, including physiological and biochemical detection, immunological detection, and molecular detection. The principles, research progress, advantages, and disadvantages of various methods are summarized. What's more, domestic and abroad standardization status and application of rapid detection technologies are

收稿日期: 2023-06-08

基金项目: 浙江省市场监督管理局科技计划项目 (ZC2023020)。

作者简介: 吴鹏 (1993-), 男, 硕士, 工程师, 研究方向: 农业食品质量和标准化, E-mail: 976064153@qq.com。

* 通信作者: 周树华 (1976-), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 标准化, E-mail: shuazhou@163.com。

张成云 (1993-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品质量技术, E-mail: 616939223@qq.com。

further introduced from a standardization perspective. The new rapid detection technology has the advantages of sensitivity, speed, and strong specificity, but there are also certain shortcomings, such as the cumbersome pre-treatment of antibodies in immune detection technology, the confusion of contaminated bacteria in physiological and biochemical detection technology, and certain false positives in molecular detection technology. In addition, most detection methods are still illegal and lack unified judgment standards. The relevant standard systems at home and abroad are still incomplete, which restricts the standardized promotion and application of rapid detection technology. Therefore, this article proposes suggestions for the future development of rapid detection technology for foodborne pathogens from the perspective of standardization, in order to provide reference for the research and standardization construction of food safety-related technologies in the future.

Key words: foodborne pathogen; rapid detection technology; standardized application

近年来,随着“健康中国 2030”国家战略的有效推进以及全民健康意识的提升,食品安全得到了前所未有的重视。然而,调查数据显示,2011~2020 年,全国共上报食源性疾病暴发事件 35806 起,累计患病人数 266968 人,其中由微生物引起的食源性相关患病人数占比最多,高达 35.69%,我国食品微生物安全形势依然严峻^[1]。食源性致病菌(foodborne pathogen)是指以食物为载体引起人类发生疾病的一类细菌微生物,主要有大肠杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、志贺氏菌等。因不同地域和饮食特征的差异,我国最常见且对公众健康产生的影响也较大的食源性致病菌主要包含金黄色葡萄球菌、单核细胞增生李斯特氏菌、副溶血性弧菌、沙门氏菌和克罗诺杆菌(阪崎肠杆菌)等 5 种。因此,开发出快速、灵敏、简便、特异的食源性致病菌检测技术并进行标准化应用推广已成为控制食品安全问题的关键。

食源性致病菌的传统检测方法虽然较为成熟稳定,但一般主要依据致病菌形态学、生理学和生态学等特征经过菌种分离培养、生化鉴定等检测步骤来实现定性定量,存在检测周期长、灵敏度不高、操作繁琐、耗费成本较高和一定概率的假阴性等缺点^[2],很难满足企业生产加工、基层市场监管执法、公共卫生安全和海关进出口检验检疫等方面应对突发食品安全事件的需求。近年来,随着生物技术 in 食品安全领域的快速应用,食源性致病菌快速检测技术也获得了很大的发展。本文主要对目前常用的生理生化检测技术、免疫学检测技术、分子检测技术等 3 种食源性致病菌快速检测技术及其标准化应用进行了研究分析,以期对我国食品微生物安全检测领域的技术发展提供借鉴,同时为该领域的标准制定和实施应用提供理论参考。

1 食源性致病菌快速检测技术的分类

1.1 生理生化检测技术

生理生化检测技术是指通过研究微生物代谢过程中产生的分子和特异物质等生物化学变化特征,从而间接得到微生物量化结果。目前应用较多的主要有以下几种。

1.1.1 ATP 生物发光法 ATP 生物发光法是指通

过 ATP 与荧光素-荧光素酶结合发生化学反应所形成的荧光信号来测定三磷酸腺苷(ATP)含量的一种快速便捷的生物化学方法。ATP 是细胞内特殊的自由能载体,普遍存在于所有生物活细胞内并在一定条件下保持含量稳定,因此通过 ATP 在样品中的浓度可推算活菌数。ATP 生物发光法本质上是将化学能通过生理生化反应转化为光能,利用 ATP 浓度与荧光强度呈正相关从而定量其浓度,通过即时反馈和定量有机污染,ATP 生物发光可以成为食品企业使用的有效监测工具^[3-4]。该法在食品中微生物尤其是大肠菌群、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等致病菌的测定中应用非常广泛。Tang 等^[5]对比大肠菌群纸法(标准方法)和 ATP 生物发光法在食堂卫生监督中评价厨具卫生状况的有效性,该研究对河北省 6 家食堂的厨具采用整群随机抽样,通过大肠菌纸试验和 ATP 生物发光试验对样品进行评估,结果显示大肠菌纸法和 ATP 生物发光法检测厨具的阴性检出率分别为 64.39% 和 49.07%,两种方法的 Kappa 系数为 0.549,表明两种方法得出的结果比较一致,说明 ATP 检测法有利于餐饮单位卫生监督现场快速检测。Cao 等^[6]研究开发了一种便携式 ATP 生物发光传感器,该传感器对大肠杆菌 O157:H7 菌株具有高特异性,利用噬菌体的高特异性和简单的信号双扩增策略,在菌株水平上实现了对活菌的识别,具有较高的灵敏度,其便携式信号读出器使其适合现场检测,在最佳条件下,该方法的检测范围为 $10^2 \sim 10^7$ CFU/mL,30 min 内的最低检出限为 30 CFU/mL,结果表明该方法与平板计数法无差异,但检测时间大大缩短,且该方法为活体大肠杆菌的即时检测(POCT)提供了新的途径,有望推广到其他具有相应噬菌体的毒力菌株的检测中。Jaeho 等^[7]利用 ATP 生物发光通过空气中颗粒物(PM)来确定细菌种群,设计并构建了圆盘式撞击器,以切断大于 1、2.5 和 10 μm 的气溶胶,以收集采样拭子上的 PM1、PM2.5 和 PM10,确定了相对光单位(RLU)与菌落形成单位(CFU)之间的相关性。ATP 生物发光法也存在一定不足,比如检测限较高,易受酶的种类、游离性 ATP 和不同盐类等影响,结果稳定性不足,影响其推广应用,目前主要在水体检测和环境监测等领域应用^[8]。

1.1.2 电阻抗技术 电阻抗技术是指利用培养基中

不同微生物代谢活动的差异,通过电阻抗测量来检测微生物的技术。致病微生物通过生理代谢活动使培养基营养底物由电惰性变为电活性,从而增大其电导性、降低电阻抗。因此,利用致病微生物代谢活性的差异所引起的阻抗值改变与培养基中微生物含量在一定时间内呈正比的原理,可以定量表征微生物。近年来,随着生理生化代谢技术的发展,电阻抗技术在食源性微生物的鉴定检测方面获得了较大的进展。Kargupta等^[9]提出了一种通过使用微通道电阻抗谱(m-EIS)来实时检测细胞暴露于杀伤剂后的死亡情况从而快速实现检测致病菌,m-EIS的原理为当具有非零膜电位的活细胞暴露于高频交流电场时,诱导电荷会在膜界面积聚,细胞死亡伴随着膜电位的丧失,因此电荷存储(电容)也随之丧失。张志伟^[10]利用电阻抗技术对枯草芽孢杆菌和大肠杆菌、活酵母和灭活酵母等细菌进行检测分析,结果表明该方法获得较好的细菌区分效果,相比于传统方法时间更短、操作更简单。利用该技术测定大肠杆菌、沙门氏菌和霉菌等食品安全领域微生物含量已经被美国分析化学家协会(AOAC)正式接收,具备快速、敏感、特异性高和重复性好等优点。

1.1.3 微量生化法 微量生化法主要应用于肠杆菌科等指标性的食源性致病菌种的检测,包括放射测量法、微热量技法等类型。放射测量法是指通过对微生物代谢所需的碳水化合物进行微量放射性标记,从而以生长代谢过程中菌种的二氧化碳浓度来定量分析致病菌含量。而微热量技法则是通过微生物代谢过程中产生的热效应进行微生物定量检测分析的技术^[11]。其主要原理为:通过微量热计实时监测微生物生长过程中的热量变化值与时间延迟的关系来制作热曲线图,再与标准曲线进行比对分析来定性致病菌,其核心关键在于建立完善的标准数据库^[12]。微量生化法具有效率高、准确性强和可重复性等特点,是一项快速准确且较复杂的微生物检测技术,目前已经有效应用于酵母菌、乳酸菌和大肠菌群等致病菌检测。Molendijk等^[13]研究评估了12株金黄色葡萄球菌对噬菌体的敏感性,采用斑点试验、电镀效率(EOP)、光密度试验(均在培养基中)和人血清微热量技法4项试验对10株临床分离的金黄色葡萄球菌(其中5株耐甲氧西林)进行比较,结果表明使用微热量技法测定的浓度更低、更灵敏,有助于快速提高检测灵敏性。Zhao等^[14]研究评估了商用微量生化检测试剂盒、MALDI-TOF MS平台和自动rep-PCR DNA识别技术在酵母菌检测中的性能,该研究收集了71株临床重要的酵母菌,结果确定了28S nrDNA和ITS测序的一致性,得到更高的检测精度。目前,利用微量生化法制备的重复性好、精密度高的标准化试剂盒已相继在市面上商业化应用,有效满足了快速检测技术市场需求,实现检测效率和结果可靠性的有效提升。与此同时,微量生化试剂盒检测技术虽然

有效推进了传统检测方法的快速标准化应用,但在具体测试中仍需依赖人工进行加样和结果解读,自动化水平有待进一步提高。未来,该技术的试剂盒开发与应用将朝数字化、智能化方向不断发展。

总体来说,生理生化技术的优点在于灵敏快速,且特异性高、重复性好,多为无损检测,但也存在判定标准不统一、污染菌混淆以及与传统培养方法检测结果不完全一致等缺陷。随着微生物代谢组学的发展,生理生化技术的应用潜力很大,尤其是在全球性的公共食品安全问题上可发挥有效作用。

1.2 免疫学检测技术

免疫学检测技术主要是基于抗原与抗体结合反应的免疫学原理,通过敏感的标记、示踪技术对各种食源性致病菌的免疫学指标进行特异、超微量的分析检测来确定其含量,在食品微生物的快速检测中也应用非常广泛。其优点是灵敏度高、快速、成本较低且特异性高,目前主要瓶颈在于制备抗体前处理较为麻烦。主要有以下几类。

1.2.1 传统免疫学检测方法 传统的免疫学检测方法技术较为成熟,但操作步骤较为繁琐,用时较长。其中具有代表性的主要有乳胶凝集法、酶联免疫法、免疫荧光法以及免疫层析法等。

乳胶凝集法(latex agglutination, LAT)是指利用人工制造的乳胶颗粒对抗体进行标记,使其与待测抗原发生的凝集反应可被肉眼识别,从而实现目标病原微生物检测的方法^[15]。Waldemar等^[16]采用乳胶凝集试验方法去筛选检测大肠杆菌血清群O157、O26、O104、O111和O145,结果表明该方法具有灵敏、快速、易于操作和成本较低的优势,在只配备基本设备的小型流动实验室中即可进行,可用于筛选血清诊断引起溶血性尿毒综合征的肠出血性大肠埃希氏菌(VTEC)感染。Nordin等^[17]研究评价了Prolex Staph extra Latex 乳胶凝集试验方法在检测金黄色葡萄球菌中的效果,该方法采用Prolex葡萄球菌超胶乳凝集试验、常规试管凝固酶和DNA酶试验对初阳性外周血培养物进行检测,结果显示Prolex Staph extra Latex 乳胶凝集试验灵敏度为100%,特异度为91.7%。LAT是一种适合在基层市场推广应用的快速、准确、简便且无需特殊仪器的方法。

酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是通过加入酶标记抗体对表面吸附抗原的固相化载体进行免疫酶染色,发生显色反应后进行定量分析确定待测致病菌含量的方法。ELISA在超低浓度分析物的定量分析中表现出了优异的性能和广泛的实用性,常用的有双抗体夹心法、竞争法和间接法。其中双抗体夹心法应用于食源性致病菌检测领域一般较多,其灵敏度较高^[18]。Wu等^[19]针对鼠伤寒沙门氏菌研究开发了一种新型双抗体夹心检测法,其夹心结构为酶联抗体-适配体,应用于牛奶中该致病菌的检测,检测限值达到 10^3 CFU/mL。ELISA

在金黄色葡萄球菌、产气荚膜梭菌以及大肠杆菌等致病菌检测中也应用较广泛。Zhao 等^[20]通过制备单克隆抗体,采用双抗体夹心法检测金黄色葡萄球菌肠毒素 B,其检测限值达到 0.01 ng/mL,并且未产生交叉反应。目前市场上利用单克隆抗体和多克隆抗体检测食源性致病菌毒素的 ELISA 检测试剂盒的商品化程度已经非常高,开发的试剂盒种类也非常多^[21]。然而,传统的 ELISA 需要较长的检测时间、检测步骤繁琐、效率较低且劳动强度大。Wang 等^[22]提出了采用磁性纳米机器人(MNRs)作为可操作的免疫分析探针,促进自动化和高效的 ELISA 分析的策略,称为纳米机器人启用 ELISA(nR-ELISA)。测试结果表明,MNR-Ab1s 可以在微尺度上增强与目标分析物的结合效果,集成的 nR-ELISA 系统可以显著缩短检测时间、减少人力投入,且通过对亥姆霍兹线圈磁场分布的模拟,验证了该方法的可扩展性,证明了利用现有策略构建高通量 nR-ELISA 检测仪器的可行性。将磁性微/纳米机器人作为主动免疫分析探针,用于自动高效的酶联免疫吸附试验(ELISA),不仅在未来的即时检测(POCT)中具有巨大的潜力,而且将自推进微/纳米机器人的实际应用扩展到分析检测领域。ELISA 法具有标准化水平高、稳定性好、成本较低、特异性强和可批量检测等优点。但也存在试剂要求高、无法同时鉴定多种成分、可能发生一定交叉反应和假阴性等缺点。随着商品化和自动化仪器的普及和标准化应用,ELISA 将有很广阔的应用潜力和市场空间。

荧光免疫法(immunofluorescence technique, IFT)是指基于生物化学和免疫学原理,利用示踪荧光物质标记致病菌抗原抗体,通过显微镜观测其呈现的特异性荧光反应,从而实现目标致病菌检测的目的。IFT 可分为直接法和间接法,能够对沙门氏菌、金黄色葡萄球菌以及单增李斯特菌等致病菌实现快速检测。Ozeh 等^[23]利用该技术充分结合光电动力学定量分析大肠杆菌,结果表明检测限在 4 h 内即达到 10^4 CFU/mL。该法需要的仪器设备简单,具有剪异性强、时间短、限值低等优点,但也存在操作步骤较为复杂、非特异性染色和结果判定有一定主观性等问题^[24]。

免疫层析法(immunochromatography assay, ICA)是基于横向流动免疫分析的一种免疫技术,在食源性的病原体、霉菌毒素和疾病检测领域得到了广泛的应用。该方法将待测液通过毛细管层析分离后,与预先标记过的抗原(抗体)着色试剂进行有效结合,产生的不同组分的剪异性可视化显色反应(一般层析后 2~10 min 内),从而实现目标微生物的定性检测^[25-26]。Li 等^[27]研究了一种基于靶向在大肠杆菌 K12 载体表面生长的信号策略,并成功地将其自组装在具有双测试线图案的增强 ICA 上,用于黄曲霉毒素 A (OTA)和黄曲霉毒素 B1 (AFB1)的检测,结

果表明,两种真菌毒素的定量检出限均为 0.01 ng/mL (提高了 10 倍),OTA 和 AFB1 的检出限分别为 0.01~0.5 和 0.01~0.2 ng/mL,与液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)具有良好的剪异性,证实了 ICA 的高可靠性和适用性,该方法具有灵敏度提高、剪效率高、成本低等优点。该项研究可为多组分污染物的灵敏、同步、快速、现场监测提供重要的参考方法。免疫层析法对致病微生物实现快速简便检测,应用前景较佳。

1.2.2 现代免疫学检测方法 现代免疫学检测方法一般是指利用免疫反应的剪异性充分结合现代传感技术的高灵敏度,从而实现对抗原、抗体反应有效监测的一类生物免疫传感器检测技术。其免疫传感器主要是通过将抗原与抗体反应所产生的参数变化转换为电子信号,从而实现目标菌的检测^[28]。该技术与传统方法和 ELISA 相比最大的优点是能够实时快速检测,具有高灵敏度、低成本和强剪异性等优点,目前已被开发并应用于包括大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌等在内的食源性微生物分析,其应用已涉及到食品工业、临床医学、环境监测与处理等各领域。主要包含电化学式免疫传感器和压电晶体免疫传感器等。

电化学式免疫传感器技术(electrochemical immunosensor)是指基于电化学的检测方法,将待测物在电极介质面上反应产生的化学信号转导为电信号从而实现检测目的的一种免疫传感器检测方法,已被用于识别和定量微生物^[29]。电化学式免疫传感器是利用电化学转导技术实现高通量、实时在线检测致病菌的一种设备,分为电流型、电势型和电阻型等类型,其中电阻型主要用于细菌检测,另外两类则应用于病毒领域。电阻抗免疫传感器主要是基于测量样品与电极相关联时电特性的变化来检测食源性致病菌。Pérez-Fernández 等^[30]针对黄曲霉致病菌研发了一种在丝网印刷碳电极上的电化学式免疫传感器,以检测黄曲霉致病菌毒素在开心果中的含量,该传感器经过优化后在 0.01~2 $\mu\text{g/L}$ 的线性范围内,重现性好(RSD: 2%),在 PBS 缓冲液和开心果基质中的检出限分别为 0.017 $\mu\text{g/L}$ 和 0.066 $\mu\text{g/kg}$,具备简单、便宜、快速且具有与 ELISA 和 LC-MS/MS 相当的灵敏度,使该方法成为进行黄曲霉致病菌感染筛选的有效途径。Izadi 等^[31]研发了一种 DNA 纳米改性的电化学免疫传感器检测方法,其原理主要是通过增加电荷转移阻力利用传感器实时监测靶向 DNA 序列,可在乳制品中特异地检测蜡状芽孢杆菌。

压电晶体免疫传感器(piezoelectric immunosensor)是根据压电效应产生的沉积质量与其频率响应之间的线性关系将化学信号或生物信号转化为电信号的一种传感器,可以无需标记物、灵敏高效地检测微量致病菌。压电晶体免疫传感器对微生物所产生的特定挥发性化合物气味感应较为灵敏,已成为确定食品污染较为成功的方法之一。压电晶体免疫传

感器与其他传感器相比,具有快速便携、反应灵敏、无需标记样品且自动化程度高等优点。Ruchika等^[32]利用自组装单层己二硫醇(HDT)、半胱胺和3D纳米金(AuNPs)制备了无标记电化学石英晶体微天平(EQCM)免疫传感器,并将其用于花生中黄曲霉毒素B1(AFB1,食品霉菌毒素)的检测,检测AFB1的灵敏度为 $126\mu\text{A}\cdot\text{ng}^{-1}\sim 1\text{mL}\cdot\text{cm}^{-2}$,检出限为 $8\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。该项目新兴技术已在其他领域得到了广泛应用,在食源性致病菌检测领域也具备较好应用前景^[33]。

1.3 分子检测技术

近年来,分子生物学的快速发展给食源性致病菌快速检测技术带来了重大变革,推动了过去局限于对致病菌形态学、生理学和生态学等常规的特征检验转变为从分子生物学水平开展研究,从而开发建立了众多的新型检测技术,取得了快速的应用进展。主要方法类型如下。

1.3.1 聚合酶链式反应 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术主要是基于DNA变性和复性原理,充分发挥DNA聚合酶活性,结合相关引物和脱氧核糖核酸等共同作用,使模板DNA短时间内实现大量扩增从而达到检测目的的技术手段。在食源性致病菌快速检测中的应用比较广泛的主要为常规PCR技术、多重PCR技术、实时荧光PCR技术和数字PCR技术等。

常规PCR技术是指通过一对特异性引物的应用并结合热稳定性较高的DNA聚合酶对少量核酸样品进行循环温度作用实现扩增目的的一种体外扩增技术,其原理是针对特定致病菌的特定基因片段设计引物并扩增,从而检测扩增基因片段实现目的。该技术的循环反应过程包括高温变性、低温退火和适温延伸等步骤。Perdoncini等^[34]通过常规PCR、数字PCR和实时PCR技术定量检测家禽屠宰过程中不同阶段的耐热弯曲杆菌,结果表明3种检测方法的群检阳性率基本一致。该技术主要特点表现为特异性强,灵敏度高,快速便携,标本纯度要求不高。

多重PCR技术是指通过两对以上特异性引物同时进行核酸扩增的PCR反应,其反应过程和基本原理均与常规PCR相同,主要区别在于引物数量的不同。该技术可同时实现多种致病微生物的鉴定及某些致病微生物的分型鉴定,具备高效性、低成本和系统性等特点^[35]。Lee等^[36]使用多重PCR技术同时分析评估人工接种的沙门氏菌、单核细胞增生李斯特菌以及金黄色葡萄球菌等致病菌的检测效果时,检测限值在12h内能达到1CFU/mL。Park等^[37]将基于薄膜的PCR模块、电极模块和基于聚二甲基硅氧烷(PDMS)的手指驱动微流控模块集成在一起,建立了一个简单的集成无泵微流控芯片的单片机病原体分析系统,用于同时分析多个样品中的病原体,在膜室中采用热循环聚合酶链反应(PCR)法扩增食

源性致病菌靶基因,并采用方波伏安法对扩增基因进行电化学定量,该研究中选择大肠杆菌O157:H7作为靶菌,结果表明对该致病菌的检出限(LOD)达到了 10^2CFU/mL 。鉴于集成微流控芯片的显著特点,该传感平台可用于病原体筛选,在即时检测领域具有广阔的应用前景。

实时荧光PCR技术是指在反应中添加荧光基团从而实现通过荧光信号实时监测PCR反应进程,以达到定量分析的目的。该技术因其在DNA初始模板评价和荧光信号检测等方面的定量分析能力优异而成为一个活跃的领域,与常规PCR技术相比可对样品实现实时定性、定量分析,有效缩短检测时间^[38-39]。周敏琪^[40]针对奶粉中的克罗诺杆菌属利用实时荧光定量PCR进行检测分析,检测限达到 $4.7\times 10^3\text{CFU/mL}$ 。

此外,以数字PCR技术(digital PCR, dPCR)等为代表的第三代PCR技术随着科学技术的发展应用越来越广泛。dPCR作为一种新兴的目标核酸绝对定量技术,在食源性致病菌快速检测中应用越来越广泛^[41]。dPCR与荧光PCR相比可直接定量DNA分子数量,实现对起始样品的精准分析。dPCR无需依赖标准曲线和扩增阈值,具有高精度、高灵敏度和绝对定量等特点^[42-43]。

总之,PCR技术在食源性致病菌检测方面已成为非常实用的技术。目前主要存在的瓶颈问题:一是检测靶点的特异性不高导致的假阳性;二是抑制剂或干扰因素的存在导致的假阴性;三是现有的增菌方法难以快速有效地富集目标菌体所导致的样品前处理与菌体富集的有效性差。随着PCR研究的不断深入和拓宽,荧光定量PCR、数字PCR等先进技术的持续迭代升级,必将推动该技术标准化应用向更高层次发展,为食品安全事业作出更大贡献。

1.3.2 等温扩增检测技术 等温扩增检测技术(isothermal amplification technology, IAT)是近年来发展起来的基于特定温度下实现核酸扩增的新型技术,主要包括环介导等温扩增和依赖核酸序列的扩增等类型。其优势主要为对仪器的要求相对简单,检测周期短,适合现代分子生物学快速检测技术的发展需求,发展前景广阔。

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)主要是指通过特异性引物与DNA聚合酶在等温条件($60\sim 65\text{ }^{\circ}\text{C}$)下共同作用实现目标序列扩增的一种新型扩增技术,其避免了传统PCR需要变温扩增而对仪器性能的依赖,同时兼具快速简便、特异性强的特点^[44]。LAMP由于其等温特性和高灵敏度,越来越多地应用于病原微生物监测的核酸检测中。Hu等^[45]研究构建了LAMP反应与CRISPR/Cas12a相结合的检测副溶血性弧菌的方法,该方法具有良好的特异性和敏感性,40株被试菌株的定性准确度达到100%,纯培养物和DNA的检

出限分别达到 2.5 CFU/mL 和 5 fg/ μ L。富集培养 2 h 后,对初始接种 5 CFU/mL 副溶血性弧菌的人工污染样品进行检测,整个反应时间小于 30 min,提高了检测限,并提供了多种端点检测方法,不受仪器的限制,在卫生医疗条件有限的地方具有很高的应用价值。王瑾^[46]利用 LAMP 方法检测沙门氏菌,检测限达到 6 CFU/mL,时间仅 45 min。LAMP 广泛应用于沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血性弧菌、单核细胞增生李斯特氏菌等致病菌的检测^[47]。Young 等^[48]采用了 LAMP 方法从 69 份美国国家抗菌素耐药性监测系统(NARMS)零售肉类和家禽样品中快速筛选沙门氏菌。结果表明 LAMP 对培养物的灵敏度为 100%,证明了快速、稳健、高灵敏度的分子筛选方法在简化实验室工作流程中的好处。截至 2022 年 7 月,绝大多数 NARMS 肉类零售站点已采用沙门氏菌 LAMP 测定法对所有样品进行快速筛选。LAMP 的主要优势:一是效率高,其效率是常规 PCR 的 10~100 倍;二是特异性强、周期短,且设备要求不高^[49]。缺陷:一是产物仅用于结果判断分析,不可克隆;二是引物特异性要求较高;三是易因形成气溶性胶而造成假阳性^[50]。

依赖核酸序列的扩增技术(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)是指一种在 RNA 聚合酶作用下通过一对引物连续作用实现体外核酸序列等温扩增的技术。该反应主要通过 T7 RNA 聚合酶、AMV(avian myeloblastosis virus)逆转录酶、RNA 酶 H 以及一对引物在 42 ℃ 左右来完成,主要步骤为:第一步, RNA 链与含 T7 启动子序列的正向引物结合后在 AMV 酶催化下形成 DNA-RNA 双链,再通过 RNA 酶 H 消除其中的 RNA 链后剩下 DNA 单链;第二步, DNA 单链在 AMV 酶和反向引物共同作用下形成含 T7 启动子序列的 DNA 双链;第三步,通过 T7 RNA 聚合酶的作用进一步完成转录过程,短时间内实现模板 RNA 大量高倍扩增。NASBA 针对目标 RNA 或 DNA 序列具有较强的特异性,具有高灵敏度、操作简便、不易污染等优势,已广泛应用于食品安全快速检测。在动物疫病预防方面, NASBA 已被国家标准列为检测禽流感病毒的推荐方法之一^[51];在植物病毒检测等方面应用也较为广泛^[52]。Nai 等^[53]提出了一种改进的 T4 基因 32 蛋白介导的 NASBA 方法,用于三种单链结合蛋白 RecA、Extreme Thermostable 单链结合蛋白(ET SSB)和 T4 基因 gp32 蛋白(gp32)的检测,在 41 ℃ 下进行一步 NASBA。与两步法相比,所有 SSBs 的扩增率都有显著提高,研究发现 gp32 可将 HIV-1 RNA 检测的阳性时间(ttp)平均提高到 13.6% 的一步 NASBA 和 6.7% 的常规 NASBA,显示其简化工作流程的潜力,适合于 NASBA 的应用。NASBA 技术因需要通过 RNA 酶抑制剂来防止 RNA 降解,导致检测成本较高,目前仍处于研究阶段,但国外发达国家已将该

项技术列入重点发展的检测手段,并通过研究项目资助开始制备检测试剂盒进行推广应用。

1.3.3 基因芯片技术 基因芯片技术(DNA chip)是一项融合分子生物学、化学和电子激光等各领域先进技术,通过一次微排列实验可对上千种基因的突变形态和表达水平等进行准确快速检测的新型技术。该技术主要是通过原位合成寡核苷酸或者以显微打印的方式直接固化 DNA 探针于固相支持物表面,再通过计算机对标记样品杂交信号进行鉴定分析,从而实现样品的遗传信息测定,其高通量特点弥补了 PCR 技术的检测缺陷。根据不同芯片制备原理可分为原位合成芯片(synthetic gene chip)和 DNA 微阵列(DNA microarray)两类。其中原位合成芯片主要利用光引导聚合技术(light-directed synthesis)原理,一般用于寡聚核苷酸和寡肽分子的合成; DNA 微阵列则是采用 PCR、DNA 核酸合成和克隆等分子生物学技术以显微打印等方式固化 DNA 探针于支持物表面而制作而成。左秀华^[54]利用基因芯片技术结合多重 PCR 技术检测大肠杆菌,结果表明灵敏度可达 10^4 CFU/mL,可有效鉴别产肠毒素大肠杆菌和大肠杆菌 O157 等。Guo 等^[55]开发了一种可用于多目标检测的便携式分区 DNA 水凝胶芯片,将目标识别荧光适体夹纳入多个滚圈扩增产物中,通过交联扩增形成分割表面固定化的 DNA 水凝胶芯片,可实现对多个目标的便携、同时检测,该方法拓展了半干化学策略的应用,可实现不同靶点的高通量和护理点检测(POCT),为食源性致病菌检测提供了新的潜在解决方案。

基因芯片技术优势在于效率高、高通量、可定量检测,但在样品前处理、检测限与灵敏度、标准统一性、基因芯片特异性等方面还有待改进。随着科技的进步,未来的趋势将朝着微型化、信息化、可视化的方向发展。

1.3.4 基因组测序技术 基因组测序技术是指对未知基因组序列的样品进行氨基酸或核酸等生物小分子序列测定的技术。从 1977 年至今,基因测序技术经历了 Sanger 测序、高通量测序(NGS)和单分子/纳米孔测序总共三代技术的发展,已取得了相当大的进步。近年来,第三代单分子/纳米孔测序技术在食源性致病菌检测领域应用越来越多。

单分子/纳米孔测序技术是指通过纳米材料、高分子、光学等先进技术手段相结合来分析碱基信号差异,从而实现读取基因序列信息的目的。该技术在食源性致病菌检测中的应用主要体现在解析长片段的可移动基因组,具有超长解读的特点。用于公共卫生监测和食源性病原体流行病学调查的全基因组测序(WGS)主要依赖于产生短读取的测序平台,长读取纳米孔测序的持续改进,如牛津纳米孔技术(ONT),在公共卫生和食品工业环境中展示了利用该技术的多重优势的潜力,包括快速周转和现场适用

性,以及优越的读取长度。Xian 等^[56]利用已建立的肠炎沙门氏菌分离物队列进行分型评估用于主要食源性病原体单核苷酸多态性(SNP)分析的纳米孔长读测序和核心基因组多位点序列分型(cgMLST)的技术成熟度。该项研究为不断发展的纳米孔技术建立了一个基线,作为高质量沙门氏菌亚型的可行解决方案,无论单独使用还是与短读平台一起使用,都能提供相当的亚型表现,为评估和优化在特定环境中实施食源性病原体监测的 ONT 方法的辅助工作提供了基础支撑。Sarahl 等^[57]将 MiIO 纳米孔测序技术应用于国际空间站的微生物现场快速鉴定和检测,结果表明大规模的微生物鉴定效果良好。Ji 等^[58]利用 PacBio 测序技术研究污水处理厂细菌菌群,结果显示可鉴定细菌菌属水平总序列的 68%。

单分子/纳米孔测序技术具有高通量、精准可靠、安全、便于组装且具有发现 unique reads 的潜在优势,但其用于食源性致病菌检测的瓶颈在于生物信息学软件与数据库的大量需求,且成本较高,限制了其在商业市场的应用推广,未来随着科技的发展将更为稳定和成熟^[59]。

2 食源性致病菌快速检测技术的标准化应用

标准化是保障食品安全和人民生命健康的重要手段和基础性支撑,也是推动先进技术应用实施并发挥成效的关键前提。随着经济全球化的发展,食品安全已跨越国界,世界各国对于贸易往来中的食品安全问题都非常重视,全球食品安全检测技术越来越统一化、标准化^[60]。近年来,我国在食源性致病菌快速检测技术研究方面取得了一定的进展,但标准化水平仍相对偏低,在此形势下,加快先进快速检测技术标准化建设和应用,推动与国际技术标准接轨,对于提高我国食品安全水平意义重大,同时也有利于我国打破食品农产品出口的技术性贸易壁垒,推动食品贸易高质量发展^[61-62]。

当前,传统常见的食源性致病菌检测方法主要依据为食品安全国家标准中关于散装即食食品^[63]和预包装食品^[64]的致病菌限量及相应的食品微生物学检验方法,主要以传统培养检测方法为主,具体信息见表 1。传统的培养计数法目前仍是食源性致病菌检测的金标准方法,对于指标性验证具有较强的准确

性,其标准化应用也相对较为成熟,但是检测流程繁琐、耗时长,一般需要 2~4 d 才能得到检测结果,限制了其大范围推广应用,且难以满足目前行业内快速检测的市场需求。随着科技的发展,新型快速检测技术发展迅速,而标准化则是这些快速检测技术能否成功推广的核心和关键,因此有必要讨论目前食源性致病菌快速检测技术的国内外标准化现状,从而更好地推动该领域技术应用推广。

2.1 国内快速检测技术标准化现状

目前国内针对食源性致病菌快速检测技术的相关标准制定已经取得了一定的进展。国内相关标准初步梳理已有 48 项以上。其中针对 PCR 和 ELISA 相关快速检测方法制定了推荐性国家标准,具有时间短、灵敏度高的优点,一般仅需 2~4 h,检测限可达 10² CFU/mL,但一般企业生产或监管部门市场抽检的食品样本中致病菌浓度都较低,所以需要进行 0.5~1 d 的前增菌处理,该过程大大延长了检测周期,导致难以有效开展食品安全风险的前期预警。除了国家标准外,其他相关标准基本属于海关进出口检验检疫领域行业标准,主要包含 PCR 试纸条、荧光 PCR、数字 PCR、基因芯片、分型 MLST、环介导等温扩增以及基因测序等先进快速检测技术,有力支撑了进出口检验检疫事业的发展。但在其他行业领域,尤其是卫生、农业、商务、市场监管等行业领域的标准供给仍明显不足,亟需制定符合行业发展需求的先进快速检测方法标准。对于一些较为先进的目前尚不具备制定国家/行业标准条件的快速检测方法,可以根据市场实际优先选择制定团体标准或企业标准,满足市场发展需求,待条件具备后可按程序制定为国家/行业标准进行推广使用。具体标准信息见表 2。

2.2 国外快速检测技术标准化现状

国外先进标准(含国际标准)初步梳理了 17 项,主要有 ISO、俄罗斯、印度、英国和德国等相关标准,大部分是关于 PCR 技术的检测应用,涉及检测方法的一般要求和定义、检测和定量分析等方面,其中俄罗斯在食源性致病菌领域标准制定进展较快,欧盟和国际标准化组织(ISO)也制定了一系列先进检测方法标准。欧盟法规(EC)No 2073/2005《食品微生物

表 1 常见食源性致病菌对应标准化检测方法
Table 1 Standardized detection methods for common foodborne pathogens

中文名/拉丁名	常见来源	国家标准检测方法
沙门氏菌/ <i>Salmonella</i> spp.	乳制品、肉制品、饮料、水产制品、粮食制品、巧克力、即食豆类制品、即食果蔬制品、即食蛋制品、即食调味品、坚果等	GB 4789.4-2016
金黄色葡萄球菌/ <i>Staphylococcus aureus</i>	乳制品、肉制品、冷冻饮料、粮食制品、即食果蔬制品、即食豆类制品、即食调味品等	GB 4789.10-2016
单核细胞增生李斯特氏菌/ <i>Listeria monocytogenes</i>	肉制品、乳制品、水产制品、冷冻饮料、即食果蔬制品等	GB 4789.30-2016
致泻大肠埃希氏菌/ <i>Diarrheagenic Escherichia coli</i>	肉制品、即食果蔬制品等	GB 4789.6-2016
副溶血性弧菌/ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	水产制品、即食调味品等	GB 4789.7-2013
克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)/ <i>Cronobacter</i> spp.	特殊膳食食品(婴儿配方奶粉1段)	GB 4789.40-2016
空肠弯曲菌/ <i>Campylobacter jejuni</i>	肉制品等	GB 4789.9-2014

标准》^[65]中包含安全标准、过程卫生标准、采样标准等,针对致病菌安全限量也提供了 PCR、ELISA 及等温扩增技术等快速检测技术标准。这些国外标准都具备较好的参考学习价值,可以根据国内实际借鉴

表2 国内食源性致病菌快速检测技术相关标准

Table 2 Domestic standards for rapid detection technology of foodborne pathogens

中文名/拉丁名	检测方法标准	主要应用技术领域
沙门氏菌/ <i>Salmonella</i> spp.	SN/T 5439.1-2022; SN/T 1870-2016; SN/T 1870-2016; SN/T 4525.1-2016; SN/T 3872-2014; SN/T 2641-2010; SN/T 2651-2010; SN/T 2563-2010; SN/T 2349-2009; SN/T 1869-2007	涉及PCR-试纸条法、实时荧光PCR法、基因芯片法、分型 MLST方法、MALDI-TOF-MS法、PCR-DHPLC法、MPCR- DHPLC法、PCR法等应用
金黄色葡萄球菌/ <i>Staphylococcus aureus</i>	SN/T 5439.2-2022; SN/T 1870-2016; SN/T 4283.6-2015; SN/T 4525.2-2016; SN/T 2754.1-2011; SN/T 2641-2010; SN/T 2651-2010; SN/T 2563-2010; SN/T 2349-2009; SN/T 1869-2007; SN/T 5364.5-2021	涉及PCR-试纸条法、实时荧光PCR法、基因芯片法、分型 MLST方法、环介导恒温扩增(LAMP)检测方法、PCR- DHPLC法、MPCR-DHPLC法、PCR法、微滴式数字 PCR法等应用
单核细胞增生李斯特氏菌/ <i>Listeria monocytogenes</i>	SN/T 1870-2016; SN/T 1870-2016; SN/T 4283.6-2015; SN/T 4525.9-2016; SN/T 3872-2014; SN/T 2754.4-2011; SN/T 2641-2010; SN/T 2651-2010; SN/T 2563-2010; SN/T 2349-2009; SN/T 1869-2007; SN/T 5364.6-2021	涉及PCR-试纸条法、实时荧光PCR法、基因芯片法、分型 MLST方法、MALDI-TOF-MS法、环介导恒温扩增(LAMP)检测 方法、PCR-DHPLC法、MPCR-DHPLC法、PCR法、微滴式数字 PCR法等应用
致泻大肠埃希氏菌/ <i>Diarrheagenic Escherichia coli</i>	SN/T 5439.5-2022; SN/T 1870-2016; SN/T 4283.6-2015; SN/T 4525.8-2016; SN/T 2754.2-2011; SN/T 2641-2010; SN/T 2651-2010; SN/T 2349-2009; SN/T 1869-2007; SN/T 5364.7-2021	涉及PCR-试纸条法、实时荧光PCR法、基因芯片法、分型 MLST方法、环介导恒温扩增(LAMP)检测方法、PCR- DHPLC法、PCR法、微滴式数字PCR法等应用
副溶血性弧菌/ <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	SN/T 5439.3-2022; SN/T 1870-2016; SN/T 4283.6-2015; SN/T 4525.3-2016; SN/T 3872-2014; SN/T 2754.5-2011; SN/T 2641-2010; SN/T 2349-2009; SN/T 1869-2007; SN/T 5364.1-2021	涉及PCR-试纸条法、实时荧光PCR法、微孔板基因芯片法、分型 MLST方法、MALDI-TOF-MS法、环介导恒温扩增(LAMP)检测 方法、PCR-DHPLC法、PCR法、微滴式数字PCR法等应用
克罗诺杆菌属(阪崎肠杆菌)/ <i>Cronobacter</i> spp.	SN/T 5439.4-2022; SN/T 1870-2016; SN/T 4525.5-2016; SN/T 2754.15-2011; SN/T 2641-2010; SN/T 2349-2009; SN/T 1869-2007; SN/T 5364.8-2021	涉及PCR-试纸条法、实时荧光PCR法、分型MLST方法、环介 导恒温扩增(LAMP)检测方法、PCR-DHPLC法、PCR法、微滴式 数字PCR法等应用
空肠弯曲菌/ <i>Campylobacter jejuni</i>	SN/T 5439.6-2022; SN/T 1870-2016; SN/T 4283.6-2015; SN/T 4525.7-2016; SN/T 2754.7-2011; SN/T 2641-2010; SN/T 2651-2010; SN/T 2563-2010; SN/T 2349-2009; SN/T 1869-2007	涉及PCR-试纸条法、实时荧光PCR法、基因芯片法、分型 MLST方法、环介导恒温扩增(LAMP)检测方法、PCR- DHPLC法、PCR法等应用
小肠结肠炎耶尔森氏菌/ <i>Yersinia enterocolitica</i>	SN/T 1870-2016; SN/T 4283.6-2015; SN/T 4525.10-2016; SN/T 2754.6-2011; SN/T 2641-2010; SN/T 2563-2010; SN/T 2349-2009; SN/T 1869-2007	涉及实时荧光PCR法、微孔板基因芯片法、分型MLST方法、环 介导恒温扩增(LAMP)检测方法、PCR-DHPLC法、PCR法、微 滴式数字PCR法等应用
霍乱弧菌/ <i>Vibrio cholerae</i>	SN/T 1870-2016; SN/T 4283.6-2015; SN/T 4525.4-2016; SN/T 3872-2014; SN/T 2754.11-2011; SN/T 2641-2010; SN/T 2349-2009; SN/T 1869-2007	涉及实时荧光PCR法、微孔板基因芯片法、分型MLST方法、 MALDI-TOF-MS法、环介导恒温扩增(LAMP)检测方法、 PCR法、微滴式数字PCR法等应用

表3 国外食源性致病菌快速检测技术相关标准

Table 3 Foreign standards for rapid detection technology of foodborne pathogens

序号	标准号	标准名称(中文译)	国家/地区	实施日期
1	GOST R 57989-2017	特殊食品 聚合酶链反应食源性致病菌检测方法	俄罗斯	2019/1/1
2	GOST ISO/TS 13136-2016	食品和动物饲料的微生物学 用于检测食源性致病菌的基于实时聚合酶链式反应的方法 检测产志贺毒素大肠杆菌(STEC)和测定O157、O111水平方法	俄罗斯/ISO	2017/7/1
3	GOST ISO 20837-2013	食品和动物饲料的微生物学 聚合酶链反应(PCR)检测食源性致病菌 定性检测样品制备的要求	俄罗斯/ISO	2015/7/1
4	GOST ISO 22118-2013	食品和动物饲料的微生物学 聚合酶链反应(PCR)检测食源性致病菌的检测和定量分析 性能特点	俄罗斯/ISO	2015/7/1
5	GOST ISO 22119-2013	食品和动物饲料的微生物学 实时聚合酶链反应(PCR)检测食源性致病菌 一般要求和定义	俄罗斯/ISO	2015/7/1
6	PD CEN ISO/TS 17919-2013	食物链的微生物学 用于检测食源性致病菌的聚合酶链反应(PCR)A,B,E和F型肉毒神经毒素产生梭状芽胞杆菌的检测	英国/欧盟/ISO	2013/11/30
7	DIN CEN ISO/TS 13136-2013	食品和动物饲料的微生物学 食源性致病菌检测用于聚合酶链反应的实时方法 检测产志贺毒素的大肠杆菌以及测定O157、O111、O26、O103和O145血清组的并行法	德国/欧盟/ISO	2013/4/1
8	PD CEN ISO/TS 13136-2012	食品和动物饲料的微生物学 用于检测食源性致病菌的基于实时聚合酶链式反应的方法 检测产志贺毒素大肠杆菌(STEC)和测定O157、O111水平方法	英国/欧盟/ISO	2012/11/30
9	GOST R 52833-2007	食品和动物饲料的微生物学 聚合酶链反应(PCR)用于检测的食源性致病菌方法 一般要求和定义	俄罗斯	2009/1/1
10	IS 16427-2016	食品动物饲料微生物学 聚合酶链反应法食源性致病菌检测 定性检测试样制备要求	印度	2016
11	IS 16428-2016	食品动物饲料微生物学 聚合酶链反应法食源性致病菌检测 定性法放大和检测要求	印度	2016
12	IS 16431-2018	食品动物饲料微生物学 聚合酶链反应法食源性致病菌检测和计数 特性	印度	2018
13	IS 16432-2016	食品动物饲料微生物学 聚合酶链反应法食源性致病菌检测 一般要求和定义	印度	2016
14	IS 16433-2016	食品动物饲料微生物学 实时聚合酶链反应法食源性致病菌检测 一般要求和定义	印度	2016
15	IS 16987-2018	食品和动物饲料微生物学 基于实时聚合酶链反应(PCR)的食源性致病菌检测方法 水平法检测产志贺毒素大肠杆菌(Stec)和O157、O111、O26、O103和O145血清型的测定	印度	2018
16	ISO 22964-2017	食物链微生物学 横式法阪崎肠杆菌检测	ISO	2017/04/04
17	(EC)No 2073/2005	食品微生物标准	欧盟	2006/01/01

或进行采标转化,以推动我国食品安全快速检测技术的标准化发展。具体标准信息见表3。

2.3 国内外标准化应用实践

2.3.1 国内标准化应用实践 食源性致病菌快速检测技术在国内的标准化应用主要涉及企业生产加工、基层市场监管执法、公共卫生安全和海关进出口检验检疫等领域。具体如下。

在企业生产加工领域,针对企业生产加工过程中的食品微生物致病菌的安全检测,主要包括生产环境的微生物监控和过程产品的微生物监控^[66]。具体的生产加工过程中微生物的监控检测要点包括:监控指标、采样点位、频率、采样和检测方法、评判原则和整改措施等,通过对各环节的标准化监控检测可有效反映企业工业化生产过程的食品安全管理水平。这其中最为关键的即是致病菌的快速检测方法标准化应用,因为检测涉及生产—加工—消费等全产业链,目前国内相关企业已经在结合自身生产工艺、产品特点以及环境条件制定了一系列的企业检测标准,主要有PCR技术、ELISA技术等,同时相关团体协会也在逐步开展分子检测技术、生物传感器技术等先进检测方法的团体标准制定。

在基层市场监管执法领域,食源性致病菌快速检测方法具有操作便捷、灵敏度高、时间短、成本低、特异性强以及对环境和仪器要求低等优点,适合基层市场监管部门对大量样品的快速筛查抽检,其标准化应用推广是将食品安全问题遏制在进入消费者餐桌前端的关键和前提,是保障食品安全和防控食源性致病菌感染的重要基础支撑。市场监管部门^[67-68]在婴幼儿配方乳粉及企业乳制品生产许可规定中也明确推荐企业使用快速检测方法和设备,但应保障结果可靠性,同时要求企业应定期将自身的快速检测方法、设备与国家标准方法进行对标验证,阳性结果应通过国标方法确认。

在公共卫生安全领域,快速、准确地鉴别食源性致病菌是及时应对突发性食品安全事件、有效预防和控制公共卫生安全的前提和关键。中共中央国务院2019年5月印发的《关于深化改革强食品安全工作的意见》中强调要加快食品安全标准制定,确保人民群众“舌尖上的安全”。国家卫生健康委在关于航空食品卫生规范中^[69]也明确建议可采用微生物快速检测方法进行筛查检测,再以国际方法进行验证确认。

在海关进出口检验检疫领域,全国各地海关技术检测机构相继主导制定了《GB/T 4789.9-2008 食品卫生微生物学检验 空肠弯曲杆菌检验》等多项致病菌快速检验领域的国家/行业标准。上海海关技术团队针对空肠弯曲菌开发的实时荧光PCR快速检测方法已获美国分析化学家协会(AOAC)PTM认证,该技术是我国第一个自主研发的通过AOAC国际认证的食品微生物快速检测方法^[70]。通过自主研发标

准化试剂盒和国际认证,一方面可有效提升国产试剂盒的质量水平和国际认可度,降低食品安全快速检测领域的技术性贸易壁垒,推动进出口贸易发展;另一方面也填补国内食品安全先进检测技术国际认证领域的空白,为下一步AOAC等其他先进国际标准的研制积累技术经验,有助于增强我国技术和标准话语权。

2.3.2 国外标准化应用实践 由美国科学院、美国工程院、美国医学科学院共同制定的“2030美国食品和农业科技发展战略”的具体目标中提到“开发食源性致病菌早期快速检测方法并进行标准化应用”,其中重点突破领域为“交叉学科研究和系统研究方法、传感技术”^[71]。国际食品法典委员会(CAC)对于即食食品中的大肠杆菌、肠杆菌科、菌落总数等微生物致病菌主要强调过程控制,仅在标准法规中明确了单核细胞增生李斯特氏菌在即食食品中的限量,并对检测方法作了相应说明^[72-73]。CAC于2013年修订了《制定和应用食品微生物标准的原则和指南》(CAC/GL 21-1997),其中规定了微生物标准制定的目的、考虑因素、采样方案和检验方法等内容,用于指导各国微生物标准管理工作^[74]。CAC在2009年修订的《婴幼儿粉状配方食品卫生操作规范》(CAC/RCP 66-2008)中提出了婴幼儿粉状配方食品相关产品中的沙门氏菌和克罗诺杆菌等的限量标准及对应检测方法。国际食品微生物标准委员会(ICMSF)早在2002年出版的《食品微生物检验与食品安全控制-食品中的微生物(第七卷)》中就对微生物标准的选择、制定和应用,以及分级采样方案原理、类型和应用等内容进行了详细介绍。提出的分级采样方案是食品微生物标准化领域的重要组成部分,已被CAC及世界各国广泛采纳和引用。ICMSF在《食品加工过程的微生物控制原理与实践-食品中的微生物(第八卷)》(2011年版)中系统分析了18大类不同食品中的微生物危害和潜在风险,并提出应控制的主要致病菌种类、限量要求、关键控制点及相应的检测方法等。近年来,诸多国家或地区,如欧盟、日本、澳大利亚、美国等,均逐步制定或修订了与CAC法典等国际先进标准相协调一致的食源性致病菌检测技术标准。

3 结论

近年来,食源性致病菌快速检测技术及其标准化应用取得了快速发展,对于食品安全事业的支撑作用也愈加凸显。随着全球对食品安全的愈加重视以及科技的发展,新型检测技术在时间、灵敏度以及特异性上都有了较大提升,但标准化仍是目前快速技术推广和应用的关键和短板。一方面,新型快速检测技术在灵敏、快速、特异性强的同时,大部分仍然属于非法定方法,且几乎都存在一定的缺陷,例如免疫检测技术存在抗体前处理较为麻烦,生理生化检测技术存在污染菌混淆问题,缺乏统一的判定标准。另一方

面,先进的纳米技术、基因技术、传感器技术等前沿科学不断与食源性致病菌的快速检测融合发展,利用多学科交叉结合,实现优势互补,从而推进快速检测技术的标准化应用,将成为未来发展的必然趋势。此外,国内外针对食源性致病菌快速检测技术的相关标准体系仍不完善,制约了快速检测技术的标准化推广应用。国内现行标准主要为海关进出口检验检疫领域的行业标准,难以满足行业发展的需求,因此亟需制定一系列快速检测技术的国家/行业标准、地方标准和团体标准等,补齐标准短板,推动食品安全检测事业发展。

未来,食源性致病菌检测技术应符合检测速度足够快、检测限值足够低、检测特异性足够好等特点,朝着简便化、标准化和数字化的方向发展。对其未来发展提出建议如下:一是加快新型检测技术的标准化研究开发。找准当前的技术缺陷和不足,以标准化视角持续研究和迭代升级。二是完善食品安全快速检测技术标准体系。加快建立健全覆盖企业生产、市场监管、公共卫生和海关进出口等不同行业领域的技术标准体系来支撑我国食品安全事业发展。三是提高检测技术应用推广的质量和水平。适应新时代发展要求,着力推动食品安全快速检测技术标准化应用全产业链覆盖,加快先进技术在基层的推广和普及,从而提高食品安全质量。

参考文献

- [1] 夏琳琳,邱爽,王若彤,等. 2011—2020 年中国食源性疾病爆发的时空趋势[J]. 卫生研究, 2023, 52(2): 226–231. [XIA L L, QIU S, WANG R T, et al. Spatiotemporal trends of food-borne disease outbreaks in China from 2011 to 2020[J]. Journal of Health Research, 2019, 52(2): 226–231.]
- [2] 鄢雷娜. 乳制品中三种食源性致病菌活菌快速检测方法的研究及检测试剂盒的应用[D]. 南昌: 南昌大学, 2018. [YAN Leina. Research on rapid detection methods for three foodborne pathogenic bacteria in dairy products and application of detection kits[D]. Nanchang: Nanchang University, 2018.]
- [3] 常超,王凌,伍金娥. 基于 ATP 再生体系快速检测乳品中微生物[J]. 食品科学, 2018, 39(4): 320–324. [CHANG Chao, WANG Ling, WU Jine. Rapid detection of microorganisms in dairy products based on ATP regeneration system[J]. Food Science, 2018, 39(4): 320–324.]
- [4] SUPUN H, ANURADHI M, KRISTEN G, et al. Relationship between ATP bioluminescence measurements and microbial assessments in studies conducted in food establishments: A systematic literature review and meta-analysis[J]. Journal of Food Protection, 2022, 85(12): 1855–1864.
- [5] TANG Y, SUN J, DONG D R, et al. Comparison of coliform paper test and ATP bioluminescence assay for monitoring the disinfection of kitchen utensils in canteens of Hebei, China[J]. Heliyon, 2023, 9(4): e14839–e14839.
- [6] CAO C, WANG M, ZHANG D Y, et al. Portable ATP bioluminescence sensor with high specificity for live *Escherichia coli* O157: H7 strain synergistically enhanced by orientated phage-modified stir bar extraction and bio-proliferation[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2022, 220: 114852–114852.
- [7] JAEHO O, JISOO C, MILAD M, et al. Size-classified monitoring of ATP bioluminescence for rapid assessment of biological distribution in airborne particulates[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2023, 234: 115356–115356.
- [8] 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 Dandan, LIU Mingchang, YANG Yange, et al. Research progress in rapid detection technology of foodborne pathogens[J]. Food Science, 2022, 43(3): 276–285.]
- [9] KARGUPTA R, YANG Y, PUTTASWAMY S, et al. Detection by death: A rapid way to detect viable slow-growing microorganisms achieved using microchannel electrical impedance spectroscopy (m-EIS)[J]. Technology, 2018, 6(1): 24–35.
- [10] 张志伟. 基于介电泳与电阻抗技术的细菌检测技术研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2020. [ZHANG Zhiwei. Based on the technology of dielectrophoresis and electrical impedance bacteria detection technology research[D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2020.]
- [11] 鹿磊,胡颖. 免疫检测技术在食品检测中的应用[J]. 粮食科技与经济, 2019(7): 67–69. [LU Lei, HU Ying. Application of immune detection technology in food testing[J]. Grain Technology and Economy, 2019(7): 67–69.]
- [12] 封莉,黄继超,刘欣,等. 食源性致病菌快速检测技术研究进展[J]. 食品科学, 2012, 33(21): 332–339. [FENG Li, HUANG Jichao, LIU Xin, et al. Research progress in rapid detection technology of foodborne pathogens[J]. Food Science, 2012, 33(21): 332–339.]
- [13] MOLENDIJK MICHÈLE M, PHAN MY V T, BODE LONNEKE G M, et al. Microcalorimetry: A novel application to measure *in vitro* phage susceptibility of *Staphylococcus aureus* in human serum[J]. Viruses, 2022, 15(1): 14.
- [14] ZHAO Y, TSANG C C, XIAO M, et al. Yeast identification by sequencing, biochemical kits, MALDI-TOF MS and rep-PCR DNA fingerprinting[J]. Medical Mycology, 2017, 56(7): 816–827.
- [15] 杨宇,张汉斌,卢勉飞,等. 乳胶凝集检测技术用于沙门菌快速筛选的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(11): 1552–1553, 1556. [YANG Ning, ZHANG Hanbin, LU Mianfei, et al. Research on latex agglutination detection technology for rapid screening of *Salmonella*[J]. Chinese Journal of Health Inspection, 2017, 27(11): 1552–1553, 1556.]
- [16] WALDEMAR R, ANNA C, KORNELIA G. Development and evaluation of latex agglutination tests for the detection of human antibodies to the lipopolysaccharides of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) serogroups O157 and non-O157[J]. Journal of Microbiological Methods, 2017, 140: 74–76.
- [17] NORDIN N, HUSSIN N S, HANAFIAH A, et al. *Staphylococcal aureus* bacteraemia: Clinical characteristic & evaluation of Prolex Staph Xtra latex agglutination test in the rapid identification of *Staphylococcus aureus*[J]. The Malaysian Journal of Pathology, 2021, 43(3): 435–447.
- [18] 江江湖,董明盛. 食品微生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010. [JIANG Hanhu, DONG Mingsheng. Food microbiology [M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2010.]
- [19] 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: 16974–16981.
- [20] ZHAO X, LIN C, WANG J, et al. Advances in rapid detection methods for foodborne pathogens[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(3): 297–312.
- [21] BRANDAO D, LIEBANA S, PIVIDORI M I. Multiplexed

- detection of foodborne pathogens based on magnetic particles[J]. *New Biotechnology*, 2015, 32(5): 511–520.
- [22] WANG Y, LIU X X, CHEN C, et al. Magnetic nanorobots as maneuverable immunoassay probes for automated and efficient enzyme linked immunosorbent assay[J]. *ACS Nano*, 2022, 16(1): 180–191.
- [23] OZEH U O, NNANNA A G A, NDUKAIFE J C. Coupling immunofluorescence and optoelectrokinetic technique for *Escherichia coli* detection and quantification in water[C]//ASME 2018 International Mechanical Engineering Congress and Exposition. Pittsburgh, 2018: 1–7.
- [24] FINCHAM R E A, BASHIRI H, LAU M C, et al. Editorial: Multiplex immunohistochemistry/Immunofluorescence technique: The potential and promise for clinical application[J]. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 2022, 9: 831383–831383.
- [25] 韩金龙, 闵武琼, 叶富饶, 等. 微生物快速检测技术研究进展[J]. *现代食品*, 2022, 28(8): 105–107. [HAN Jinlong, MIN Wuqiong, YE Furao, et al. Research progress in rapid microbial detection technology[J]. *Modern Food*, 2022, 28(8): 105–107.]
- [26] JAYAN H, PU H B, SUN D W. Recent development in rapid detection techniques for microorganism activities in food matrices using bio-recognition: A review[J]. *Trends in Food Science and Technology*, 2020, 95(3): 233–246.
- [27] LI M, LU W Y, MAO Y H, et al. An enhanced immunochromatography assay based on gold growth on the surface of *E. coli* carrier for the simultaneous detection of mycotoxins[J]. *Talanta*, 2023, 251: 123798–123798.
- [28] PARK M, TSAI S L, CHEN W. Microbial biosensors: Engineered microorganisms as the sensing machinery[J]. *Sensors*, 2013, 13(5): 5777–5795.
- [29] 曹卓松, 孙飞龙, 李辰宇, 等. 电化学生物传感器及其检测大肠杆菌的研究[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(10): 193–197. [CAO Zhuosong, SUN Feilong, LI Chenyu, et al. Research on electrochemical biosensor and its detection of *Escherichia coli*[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(10): 193–197.]
- [30] PEREZ-FERNÁNDEZ B, MAESTRONI B M, NAKAYA S, et al. Development, optimization and validation of an electrochemical immunosensor for determination of total aflatoxins in pistachio[J]. *Food Control*, 2023, 152. doi: 10.1016/j.foodcont.2023.109859
- [31] IZADI Z, SHEIKH-ZEINODDIN M, ENSAFI A A, et al. Fabrication of an electrochemical DNA-based biosensor for *Bacillus cereus* detection in milk and infant formula[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 80(1): 582–589.
- [32] RUCHIKA C, PRATIMA R S, JAY S, et al. A novel electrochemical piezoelectric label free immunosensor for aflatoxin B1 detection in groundnut[J]. *Food Control*, 2015, 52: 60–70.
- [33] AYDIN M, AYDIN E B, SEZGINTÜRK M K. Advances in immunosensor technology[J]. *Advances in Clinical Chemistry*, 2021, 102: 61–62.
- [34] PERDONCINI G, SIERRA A Y M, MOREIRA L L, et al. Detection and quantification of *Campylobacter* in poultry slaughterhouses using conventional microbiological technique, most probable number, and real-time PCR[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2022, 19(2): 143–150.
- [35] LI B G, CHEN J Q. Development of a sensitive and specific qPCR assay in conjunction with propidium monoazide for enhanced detection of live *Salmonella* spp. in food[J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13(1): 273.
- [36] LEE N, KWON K Y, OH S K, et al. A multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Escherichia coli* 0157: H7, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus* in Korean ready-to-eat food[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2014, 11(4): 574–580.
- [37] PARK Y M, PARK J, LIM S Y, et al. Integrated pumpless microfluidic chip for the detection of foodborne pathogens by polymerase chain reaction and electrochemical analysis[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020: 129130.
- [38] MA Y T, ZENG L, ZHANG J H. A fluorescence detection optical system for real-time quantitative PCR[C]. 2020.
- [39] 陈启明. 克罗诺杆菌免疫学和分子生物学检测方法研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016: 1–19. [CHEN Qiming. Research on immunological and molecular biological detection methods for *Cronobacterium*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016: 1–19.]
- [40] 周敏琪. 应用实时荧光定量PCR技术检测婴幼儿奶粉中阪崎肠杆菌(克罗诺杆菌属)的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017: 24–46. [ZHOU Minqi. Detection of *Enterobacteriaceae sakazakii* (*Cronobacter*) in infant milk powder by real-time fluorescent quantitative PCR[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017: 24–46.]
- [41] NAZIR S. Medical diagnostic value of digital PCR (dPCR): A systematic review[J]. *Biomedical Engineering Advances*, 2023, 6: 100092.
- [42] 张艳, 井汇源, 孙彦婷, 等. 数字PCR精准定量方法研究进展[J]. *中国草食动物科学*, 2020, 40(6): 55–59, 80. [ZHANG Yan, JING Huiyuan, SUN Yanting, et al. Research progress on precise quantitative methods of digital PCR[J]. *Chinese Herbivorous Animal Science*, 2020, 40(6): 55–59, 80.]
- [43] 张瑾, 张娟, 徐翻飞, 等. 数字PCR技术及在病原微生物检测中的应用[J]. *口岸卫生控制*, 2019, 24(5): 16–20. [ZHANG Jin, ZHANG Juan, XU Fanfei, et al. Digital PCR technology and its application in pathogen detection[J]. *Port Health Control*, 2019, 24(5): 16–20.]
- [44] 范安妮, 余之蕴, 张娟, 等. 环介导等温扩增技术在食品安全检测领域的应用研究进展[J]. *食品工业科技*, 2018, 39(10): 330–334. [FAN Annie, SHE Zhiyun, ZHANG Juan, et al. Research progress in the application of ring mediated isothermal amplification technology in food safety detection[J]. *Food Industry Technology*, 2018, 39(10): 330–334.]
- [45] HU A T, KONG L Y, LU Z X, et al. Construction of a LAMP-CRISPR assay for the detection of *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *Food Control*, 2023, 149.
- [46] 王瑾. 非预增菌实时荧光环介导等温扩增快速检测鸡肉中沙门氏菌的研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2017: 16–32. [WANG Jin. A study on the rapid detection of *Salmonella* in chicken by non pre enriched real time fluorescence loop mediated isothermal amplification[D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2017: 16–32.]
- [47] 杨丽霞, 曾思思, 钟菲菲. 实时荧光等温扩增法检测4种常见食源性致病菌[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(14): 4692–4697. [YANG Lixia, ZENG Sisi, ZHONG Feifei. Real time fluorescence isothermal amplification method for detecting four common foodborne pathogens[J]. *Journal of Food Safety and Quality Testing*, 2019, 10(14): 4692–4697.]
- [48] YOUNG S R, DOMESLE K J, MCDONALD R C, et al. Toward the adoption of loop-mediated isothermal amplification for *Salmonella* screening at the national antimicrobial resistance monitoring system's retail meat sites[J]. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2022, 19(11): 758–766.
- [49] NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, et al. Loop-mediated isothermal amplification(LAMP): Principle, features, and future

- prospects[J]. *Journal of Microbiology*, 2015, 53(1): 1-5.
- [50] MORI Y, KANDA H, NOTOMI T. Loop-mediated isothermal amplification(LAMP): Recent progress in research and development[J]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2013, 19(3): 404-411.
- [51] GB/T 19440-2004, 禽流感病毒 NASBA 检测方法[S]. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国标准出版社, 2004-02-14. [GB/T 19440-2004, NASBA detection method for avian influenza virus[S]. General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standards Press of China, 2004-02-14.]
- [52] LAW J W, AB MUTALIB N S, CHAN K G, et al. An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 1-16.
- [53] NAI Y H, DOEVEN E H, GUIJT R M. An improved nucleic acid sequence-based amplification method mediated by T4 gene 32 protein[J]. *PLoS One*, 2022, 17(3): e0265391-e0265391.
- [54] 左秀华. 多重 PCR 技术结合基因芯片检测致泻性大肠杆菌的研究[J]. *名医*, 2020(12): 129-130. [ZUO Xiuhua. Detection of diarrhoeal *Escherichia coli* by multiplex PCR combined with gene chip[J]. *Famous Doctor*, 2020(12): 129-130.]
- [55] GUO Y, LI W X, ZHANG R C, et al. A portable and partitioned DNA hydrogel chip for multitarget detection[J]. *Lab on a Chip*, 2023, 23(11).
- [56] XIAN Z H, LI S T, MANN D A, et al. Subtyping evaluation of *Salmonella enteritidis* using single nucleotide polymorphism and core genome multilocus sequence typing with nanopore reads[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(15): e0078522-e0078522.
- [57] SARAHL C, CHARLES Y C, KRISTEN K J, et al. Nanopore DNA sequencing and genome assembly on the international space station[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1-32.
- [58] JI B, WANG S L, GUO D B, et al. Comparative and comprehensive analysis on bacterial communities of two full-scale wastewater treatment plants by second and third-generation sequencing[J]. *Bioresource Technology Reports*, 2020, 11: 100450.
- [59] CHEN T, SUN Q W, MA Y, et al. A transcriptome atlas of silkworm silk glands revealed by PacBio single-molecule long-read sequencing[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2020, 295(5): 1227-1237.
- [60] 王国蓉. 加强检测技术标准化研究促进食品安全水平不断提升[J]. *食品安全导刊*, 2016(15): 24. [WANG G R. Strengthening research on standardization of detection technology to promote continuous improvement of food safety level[J]. *Food Safety Tribune*, 2016(15): 24.]
- [61] 顾冰冰. 加强检测技术标准化研究促进食品安全水平不断提升[J]. *现代食品*, 2019(18): 32-34,41. [GU Bingbing. Strengthening research on standardization of detection technology to promote continuous improvement of food safety level[J]. *Modern Food*, 2019(18): 32-34,41.]
- [62] 穆冬雪. 检测技术标准化对提升食品安全的意义[J]. *食品安全导刊*, 2022(8): 51-53. [MU Dongxue. The significance of technology standardization to improve food safety detection[J]. *Journal of Food Safety Tribune*, 2022(8): 51-53.]
- [63] GB 31607-2021, 食品安全国家标准 散装即食食品中致病菌限量[S]. 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, 中国标准出版社, 2021-08. [GB 31607-2021, National food safety standard for the limit of pathogenic bacteria in bulk instant food[S]. National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation, Standards Press of China, 2021-08.]
- [64] GB 29921-2021, 食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量[S]. 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, 中国标准出版社, 2021-08. [GB 29921-2021, National food safety standard for the limit of pathogenic bacteria in prepackaged food[S]. National Health Commission of the People's Republic of China, State Administration for Market Regulation, Standards Press of China, 2021-08.]
- [65] European Union. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance)[EB/OL]. [2020-03-08]. ELI: <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj>.
- [66] GB 14881-2013, 食品安全国家标准 食品生产通用卫生规范[S]. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 中国标准出版社, 2013-05. [GB 14881-2013, National food safety standard general hygienic code for food production[S]. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, Standards Press of China, 2013-05.]
- [67] 国家市场监督管理总局. 婴幼儿配方乳粉生产许可审查细则(2022 版)[Z]. 2022-11-14. [State Administration for Market Regulation. Detailed rules for the examination of the production license of infant formula milk powder (2022 Edition)[Z]. 2022-11-14.]
- [68] 国家质量监督检验检疫总局. 企业生产乳制品许可条件审查细则(2010 版)[Z]. 2010-11-01. [General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Detailed rules for examination of license conditions for enterprise production of dairy products (2010 Edition)[Z]. 2010-11-01.]
- [69] GB 31641-2016, 食品安全国家标准 航空食品卫生规范[S]. 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局, 中国标准出版社, 2016-12. [GB 31641-2016, National food safety standard aviation food hygiene regulations[S]. National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China, State Food and Drug Administration, Standards Press of China, 2016-12.]
- [70] 申进玲, 蒋原, 赵丽娜, 等. 空肠弯曲菌快速检测试剂盒研制及 AOAC 验证[J]. *中国食品学报*, 2020, 20(9): 312-322. [SHEN Jinling, JIANG Yuan, ZHAO Lina, et al. Development and AOAC validation of a rapid detection kit for *Campylobacter jejuni*[J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2020, 20(9): 312-322.]
- [71] 许竹青. 美国面向 2030 的农业研发重点及对我国的启示[J]. *科技中国*, 2020(7): 49-51. [XU Zhuqing. Priorities of agricultural research and development for 2030 in the United States and its implications for China[J]. *Science and Technology China*, 2020(7): 49-51.]
- [72] CAC/GL 61-2007, 应用食品卫生通则控制食品中单增李斯特菌的指南[S]. 国际食品法典委员会. [CAC/GL 61-2007, Guidelines for the control of *Listeria monocytogenes* in foods using general principles of food hygiene[S]. Codex Alimentarius Commission.]
- [73] 田静, 刘秀梅. 即食食品中单核细胞增生李斯特菌风险管理措施的研究[J]. *中国食品学报*, 2011, 11(2): 163-168. [TIAN Jing, LIU Xiumei. Research on risk management measures for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods[J]. *Chinese Journal of Food Science*, 2011, 11(2): 163-168.]
- [74] CAC/GL 21-2013, 制定和应用食品微生物标准的原则和指南[S]. 国际食品法典委员会. [CAC/GL 21-2013, Principles and guidelines for developing and applying food microbiological standards[S]. Codex Alimentarius Commission.]