

食源性致病菌快速检测技术研究进展

陈洪周^{1,2}, 牛婧媛¹, 李琦¹, 任玉伟¹, 蔡克周¹, 叶应旺^{1*}

(1. 合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽合肥 230601) (2. 安徽国泰众信检测技术有限公司, 安徽合肥 230051)

摘要: 食源性致病菌是引起食品安全事件最重要的因素, 严重制约食品工业的高质量发展, 开发高灵敏度、低成本、强特异性的快速检测方法对保障食品安全, 促进食品工业发展具有重要意义。传统检测方法存在灵敏度低、耗时长、操作繁琐、特异性差等局限性。该文综述了近年来食源性致病菌检测领域取得的最新研究进展, 重点阐述了免疫检测技术、分子生物学检测技术以及生物传感器检测的最新研究成果。以及与多种技术相结合构建新型快速检测方法, 并在食源性致病菌检测中的应用情况。随着科学技术的进步, 未来食源性致病菌快速检测方法将基于多学科交叉融合技术, 实现致病菌的便捷化、智能化快速检测, 以期为食品安全管理和公众健康提供更有效的检测手段和保障措施。

关键词: 食源性致病菌; 食品安全; 免疫学; 分子生物学; 生物传感器; 噬菌体

文章编号: 1673-9078(2026)6-432-444

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.6.0624

Research Progress on Rapid Detection Technology for Foodborne Pathogens

CHEN Hongzhou^{1,2}, NIU Jingyuan¹, LI Qi¹, REN Yuwei¹, CAI Kezhou¹, YE Yingwang^{1*}

(1.School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

(2.Anhui Guotai Zhongxin Testing Technology Co. Ltd., Hefei 230051, China)

Abstract: Foodborne pathogens are among the most significant contributors to food safety incidents, severely hindering the sustainable development of the food industry. Developing rapid detection methods with high sensitivity, low cost, and strong specificity is crucial for ensuring food safety and advancing the food industry. Conventional detection methods are limited by low sensitivity, prolonged analysis time, complex procedures, and inadequate specificity. This review summarizes the latest research advances in foodborne pathogen detection in recent years, focusing on immunoassay techniques, molecular biological detection technologies, and biosensor-based detection. It also discusses the integration of various technologies to develop novel rapid detection methods and their applications in foodborne pathogen detection. Advances in science and technology will enable future rapid detection methods to leverage multidisciplinary integration, facilitating convenient and intelligent pathogen monitoring. These advancements should yield effective detection tools and preventive strategies for food safety management and public health protection.

Key words: foodborne pathogens; food safety; immunology; molecular biology; biosensor; bacteriophage

引文格式:

陈洪周,牛婧媛,李琦,等.食源性致病菌快速检测技术研究进展[J].现代食品科技,2026,42(6):432-444.

CHEN Hongzhou, NIU Jingyuan, LI Qi, et al. Research progress on rapid detection technology for foodborne pathogens [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(6): 432-444.

收稿日期: 2025-05-06; 修回日期: 2025-06-16; 接受日期: 2025-06-21
基金项目: 安徽省科技特派员赋能“秸秆变肉”暨肉牛振兴项目 (202513b10050001)

作者简介: 陈洪周 (1978-), 男, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品质量与安全, E-mail: hz.chen@163.com
通讯作者: 叶应旺 (1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全检测与控制, E-mail: yeyingwang04@126.com

食品安全问题是现代社会的关注焦点, 它不仅影响消费者的健康和生活质量, 还导致严重的经济损失, 甚至影响国家形象和国际关系。食源性致病菌是引发食源性疾病的最重要因素, 对全球公共卫生安全构成重大威胁。据世界卫生组织统计, 每年全球约有 10% 的人因食用受致病菌污染的食物感染食源性疾病^[1]。常见的食源性致病菌主要有致病性大肠杆菌

(Pathogenic *Escherichia coli*)、沙门菌 (*Salmonella*)、单核细胞增生李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*) 和金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 等^[2-4]，它们大多数会通过污染食品原料或相关制品等引发人群食物中毒，从而对食品安全和公众健康造成严重危害^[5-7]。

传统的食源性致病菌检测方法主要依赖基于生化鉴定的国标法和核酸检测的分子生物学方法。国标法基于细菌的可培养性，操作繁琐，但难以检测出亚致死和活的不可培养 (Viable But Non-culturable, VBNC) 状态的致病菌，而 VBNC 状态的细菌在一定条件下仍能恢复活性^[8]，导致食物中毒的发生。传统的分子生物学方法一般是利用常规多聚酶链式反应 (PCR) 检测技术来进行检测，然而 PCR 检测技术虽然具有高灵敏度以及高特异性，但同样无法区分食源性致病菌的存在状态。这些方法虽然在食源性致病菌检测中效果显著，但通常需要投入大量时间和精力，以及丰富的资源 (如液体和固体培养基、化学试剂等)，并且数据收集过程也十分繁琐和耗时^[9,10]。

随着生物学技术、生物化学技术以及材料学等领域的蓬勃发展，新的食源性致病菌检测技术不断呈现，如等温核酸扩增 - 微流控检测技术^[11]、基于 CRISPR/Cas 12a 的荧光生物传感器^[12]和纸基生物传感器^[13]等。噬菌体由于其特异性强、成本低、灵敏度高等特点，已经作为食源性致病菌的特异性识别靶点成为检测领域研究的新热点^[14]。此外，便携式和便于现场使用的生物传感器等快速检测系统在食品安全基层检验方面也显示出巨大的潜力^[15,16]。

1 免疫检测技术

免疫检测方法具有高灵敏度和特异性的优点，已成为重要的技术手段。免疫检测技术最初主要是酶联免疫检测^[17,18]。随着检测技术的发展，多种检测技术的结合如免疫 - 分子检测^[19,20]、新型免疫荧光检测、免疫层析检测^[21,22]、纳米抗体检测等在食源性致病菌安全防控中发挥着重要作用，具体原理的示意图 (图 1)。

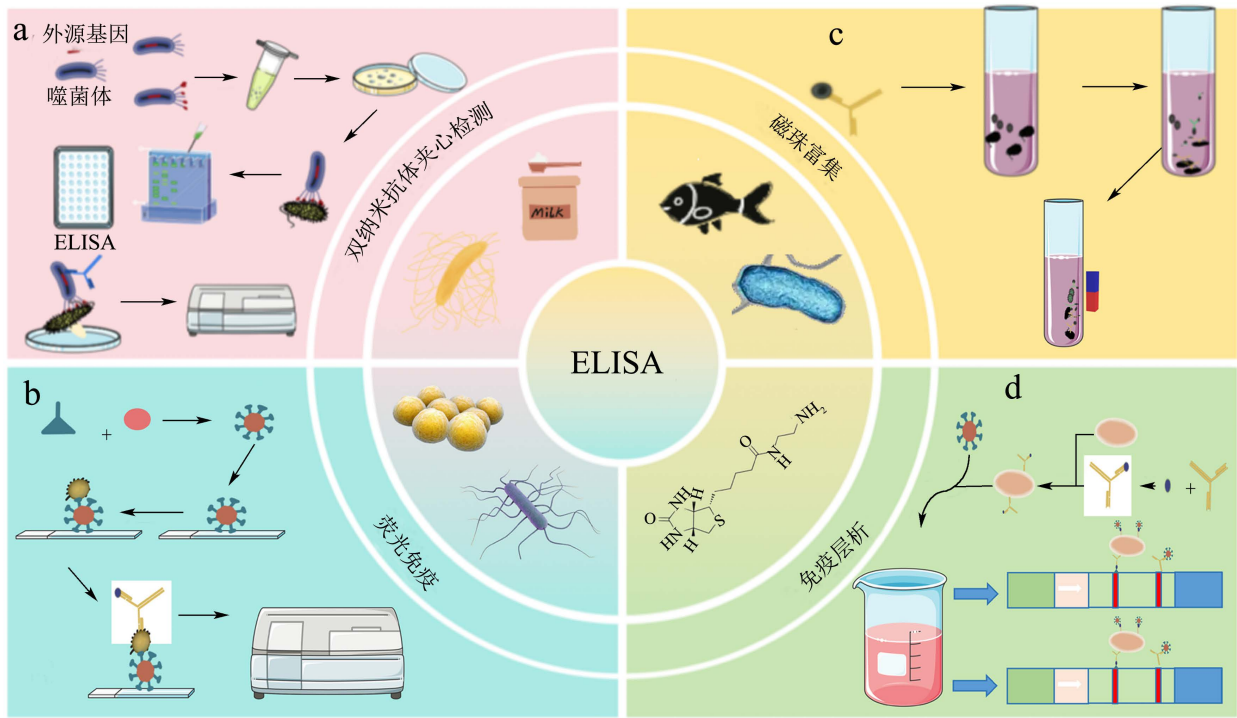


图 1 免疫检测技术原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the principle of the immunodetection technology

1.1 免疫磁珠分离技术

免疫磁珠分离技术将抗体与磁珠相结合，在磁场的作用下，可以迅速的将与目标致病菌结合的免疫磁珠分离出来，以此实现样品的分离和富集，适用于食品中痕量病原体的检测^[23-25]，同时可以利用特异

性抗体与微生物抗原间的亲和作用来实现特定微生物的快速检测^[26]。Zhang 等^[27]开发了一种免疫磁珠分离 - 对流 PCR (IMBS-CPCR) 技术，解决了水产品中四种常见弧菌现场快速检测的问题，实现了高捕获率和低非目标菌捕获率的双重结果，该技术检测

限低至 10 CFU/mL, 但需要复杂的专业设备和知识。Li 等^[28]研发出了一种基于磁珠靶向富集和滚环扩增 (Rolling Circle Amplification, RCA) 的可用于检测金黄色葡萄球菌视觉检测方法。该方法利用 SELEX 技术筛选新的适体, 采用双重适体识别来提高特异性, 并结合磁珠靶富集和 RCA 策略来提高灵敏度, 实现了对于金黄色葡萄球菌的可视化检测, 检测限低至 10 CFU/mL, 该技术较为复杂, 需要特定的设备和试剂, 可能不适合资源有限的检测环境。Fan 等^[29]设计出一种结合免疫磁珠分离 (IMS) 和多重实时 PCR 的技术, 实现了肉类中沙门氏菌、单核细胞增生李斯特菌和大肠杆菌 O157:H7 的快速准确检测, 检测限分别降至 12、33 和 11 CFU/25 g, 该类技术在设计引物时要尽量避免不同引物间的干扰。

1.2 新型纳米抗体检测

纳米抗体是一种新兴的抗体形式, ELISA 技术与纳米抗体之间的结合能够显著提高检测的灵敏度和准确性^[30]。Zhang 等^[31]提出了基于噬菌体展示纳米抗体的双纳米体夹心化学发光酶免疫分析法 (Ph-ELCISA), 用于奶粉中阪崎克罗诺杆菌的快速高灵敏检测。该方法通过噬菌体展示技术筛选出高亲和力、高稳定性的纳米抗体, 解决了传统免疫分析中抗体成本高、亲和力低的问题, 但是纳米抗体的制备和化学发光检测设备可能较为复杂和昂贵。Dhehibi 等^[32]研究了一种基于纳米抗体的磁荧光免疫分析方法, 可以高特异性地识别致病性大肠杆菌 F17 阳性菌株。该方法利用筛选后的特异性纳米抗体 *Nb1* 和 *Nb4* 结合磁珠和辣根过氧化物酶, 实现了对目标细菌的高效捕获和检测, 该方法的检测限可达 1.8 CFU/mL。Bai 等^[33]建立了基于纳米抗体的免疫磁分离平台, 采用表位为基础的筛选策略, 通过将纳米抗体与磁性纳米颗粒偶联, 实现对目标细菌的高效捕获与富集, 结合双纳米抗体夹心酶联免疫吸附测定 (ELISA) 进行检测, 该方法检测限为 3.2×10^3 CFU/mL, 可在 4 h 内从食品样品中检测到 1 CFU 的沙门菌肠炎亚种, 显著缩短了富集培养时间, 有效避免了基质干扰。Wang 等^[34]构建了基于噬菌体展示纳米抗体的比色生物传感器, 该方法通过构建噬菌体展示纳米抗体库筛选出高亲和力和特异性的纳米抗体, 并将纳米抗体展示在噬菌体表面, 通过纳米抗体与目标细菌特异性结合, 阻止金纳米颗粒的聚集, 从而实现颜色变化。该方法可在 100 min 内完成检测, 肉眼检测限为 10^4 CFU/mL, 且对其他细菌无交叉反应。Shi 等^[35]开发了一种基于 *foxA* 基因的 IMBs-qPCR 检测方法。该方法通过将抗体与免疫磁性珠结合,

捕获食品样品中的小肠结肠炎耶尔森氏菌, 然后利用 qPCR 进行定量分析, 该方法在人工污染的牛奶和猪肉样品中的检测限为 64 CFU/mL。

1.3 荧光免疫新型检测法

Cheng 等^[36]提出一种新的荧光免疫法, 采用一种双识别策略, 通过结合万古霉素和抗体来识别细菌, 然后监测量子点的荧光信号变化进行检测。该方法可以同时检测多种食源性致病菌, 对金黄色葡萄球菌、蜡样芽孢杆菌和单核细胞增生李斯特菌的低检测限分别为每孔 18、3 和 36 CFU, 该类技术中成本相对较高, 双识别元件的比例和荧光信号条件需要不断优化。Hormsombut 等^[37]开发了基于介孔二氧化硅纳米粒子增强的微阵列技术, 采用荧光免疫分析法解决了多重食源性病原体高灵敏度同步检测的问题。该方法将荧光素掺杂的介孔二氧化硅纳米粒子与链霉亲和素和检测抗体结合, 形成荧光素掺杂的介孔二氧化硅纳米粒子-链霉亲和素-抗体复合物, 利用抗体-适配体阵列实现病原体检测。该方法在缓冲溶液和食品样品中检测限低至 10^2 CFU/mL, 该技术需要配套微阵列扫描仪, 可能不适合基层现场应用。Dou 等^[38]开发了一种新的纳米荧光夹心免疫吸附测定法 (nano-FSIA)。该方法通过将抗体固定在 96 孔微板上, 结合大粒径荧光微球和单克隆抗体作为荧光探针, 实现对沙门菌的定量分析。在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 和牛奶中, 该方法的检测限分别为 234 CFU/mL 和 346 CFU/mL, 该技术仅仅针对单一病原体, 且检测限较高。

1.4 新型侧向层析测定技术

免疫层析技术与 ELISA 结合后, 在食源性致病菌的现场快速检测中显示出高效、便捷的特点, 在检测食源性致病菌比如大肠杆菌 O157:H7^[39]、副溶血性弧菌^[40]、金黄色葡萄球菌^[41]、单核细胞增生李斯特菌^[42]和沙门菌^[43]等多种食源性致病菌中得到了广泛应用。Pan 等^[44]开发了一种新型侧向层析检测方法。该方法利用噬菌体尾纤维蛋白 (TFP) 和三功能纳米酶探针, 通过模拟噬菌体与细菌之间的相互作用, 解决了李斯特菌快速高灵敏度检测的问题, 噬菌体尾纤维蛋白具有严格的特异性, 目标细菌的覆盖面较窄。在免疫测定中的标志物金纳米粒子可以与抗体结合来实现对小分子的检测和信号放大, 实现了致病菌的高灵敏检测^[45]。金纳米粒子的应用在侧流测定法 (LFA) 检测中不仅提高了检测的灵敏度, 还降低了使用成本, 使得 LFA 成为一种方便携带、成本低廉且检测快速的检测工具^[46]。由于金纳米粒子在提高检测灵敏度和特

异性上起到了重要作用，这些方法常常被用于医疗保健领域中病原性病毒和细菌的检测^[47]。Cao 等^[48]提出了一种基于生物素化的侧流测定法（LFA）。该方法通过磺基 -NHS- 生物素非特异性标记细菌表面的脂蛋白，利用生物素与链霉亲和素的强结合力，将细菌固定在试纸条的测试线上，随后利用免疫层析法进行检测，解决了传统 LFA 无法检测总细菌的问题，实现了总细菌和病原性细菌的同时检测，还可以通过金纳米粒子的显色反应来实现半定量检测。Shang 等^[49]基于链置换环介导的等温扩增技术开发了一种新的量子点纳米珠标记的侧向流免疫层析试纸条（QBs-labelled LFIAS），可以用于快速灵敏地检测鼠伤寒沙门菌。该方法利用 QBs 的高灵敏度和 SD-LAMP 的高特异性，实现了沙门菌的定量检测，检测限低至 10^{-1} CFU/mL，线性检测范围为 $10^2\sim10^7$ CFU/mL，但是该技术流程复

杂，需整合核酸提取、等温扩增、侧向层析多步骤，耗时较长，且需要荧光读取仪，不适用于现场检测。

表 1 对于文中提到的免疫检测相关新技术的不同指标进行了总结对比。由此可以看出，新型纳米抗体检测和荧光免疫新型检测法灵敏度更高，可低至单个 CFU/mL 级。虽然所有技术普遍强调高特异性，但纳米抗体检测的特异性相对更强。而荧光免疫新型检测方法可以实现同时检测多种致病菌，这在实际应用中可以大大提高工作效率。文中提到的新型侧向层析测定技术因其方便、快速则更适用于现场检测。免疫磁珠分离技术和新型纳米抗体检测成本较高，而荧光免疫新型检测法和新型侧向层析测定技术在成本和便捷性上有更好的平衡。总之，每种技术都有其独特优势，但也有一定的缺点，我们可以将之融合起来取其精华去其糟粕从而创造出更为先进的技术。

表 1 免疫层析技术总结
Table 1 Summary of Immunochromatographic Technology

技术类型	方法 / 原理	输出信号	检出限	目标菌	参考文献
免疫磁珠分离	抗体 - 磁珠结合 + 对流 PCR	PCR 荧光信号	10 CFU/mL	四种常见弧菌	[27]
磁珠富集 -RCA	磁珠靶向富集 + 滚环扩增 可视化	颜色变化（可视化）	10 CFU/mL	金黄色葡萄球菌	[28]
免疫磁珠 -PCR	免疫磁珠分离 + 多重实时 PCR	荧光信号	12~33 CFU/25g	沙门菌、李斯特菌、 大肠杆菌 O157:H7	[29]
纳米抗体化学发光	双纳米体夹心 + 化学发光酶 免疫分析	化学发光信号		阪崎克罗诺杆菌	[31]
纳米抗体磁荧光	纳米抗体 + 磁珠 + 辣根过氧 化物酶	荧光信号	1.8 CFU/mL	致病性大肠杆菌 F17	[32]
纳米抗体免疫磁分离	纳米抗体 - 磁珠富集 + 双抗体 夹心 ELISA	酶联显色信号	3.2×10^3 CFU/mL	沙门菌肠炎亚种	[33]
噬菌体纳米抗体比色	纳米抗体 - 噬菌体结合 + 金纳 米颗粒聚集抑制	颜色变化（可视化）	10^4 CFU/mL		[34]
荧光免疫双识别	万古霉素 + 抗体双识别 + 量子 点荧光	荧光信号	3~36 CFU/孔	金葡菌、蜡样芽孢杆菌、 李斯特菌	[36]
介孔二氧化硅微阵列	介孔二氧化硅纳米粒子 + 荧光 免疫分析	荧光信号	10^2 CFU/mL	多重食源性病原体	[37]
纳米荧光夹心免疫	荧光微球 + 单克隆抗体夹心	荧光信号	234~346 CFU/mL	沙门菌	[38]
噬菌体尾纤维层析	噬菌体尾纤维蛋白 + 纳米 酶探针	金纳米粒子显色		李斯特菌	[44]
生物素化侧流测定	生物素 - 链霉亲和素结合 + 金 纳米显色	颜色变化（半定量）		总细菌及病原性细菌	[48]
量子点层析试纸条	链置换 LAMP+ 量子点纳米 珠标记	荧光信号	10^{-1} CFU/mL	鼠伤寒沙门菌	[49]

2 分子生物学检测技术

本文重点介绍了一些基于传统 PCR 技术改进的新型 PCR 技术、等温扩增技术以及 CRISPR-Cas 系统在食源性致病菌检测中的应用。

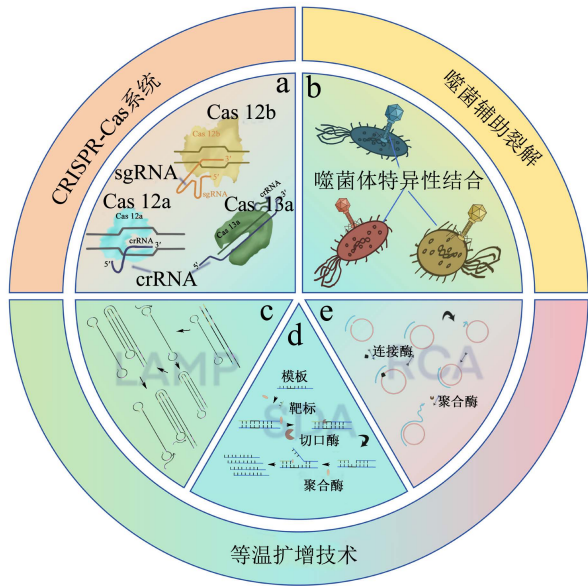


图 2 分子生物学检测技术

Fig.2 Molecular biology detection techniques

注:(a) CRISPR ;(b) 噬菌体辅助裂解;(c) 环介导等温扩增;
(d) 链置换扩增;(e) 滚环扩增。

2.1 聚合酶链式反应PCR

2.1.1 新型PCR技术的应用

多重 PCR 和数字 PCR 结合了 PCR 和荧光技术,被认为是检测食源性致病菌的有效方法。RT-PCR 技术通过引入荧光物质,能够实时监测 PCR 反应过程中的扩增产物量,从而提高检测的灵敏度和特异性。姚艳玲等^[50]将实时荧光 PCR 技术与同步增菌方法相结合,建立了针对五种常见食源性致病菌的快速检测体系。该体系在优化 DNA 模板提取和熔解曲线分析的基础上,可以在 6 h 内获得快速检测结果,适用于突发公共卫生事件中的应急响应,为流行病学调查和污染源追溯提供及时数据支持,但需要荧光定量 PCR 仪及丰富的专业知识。张静等^[51]建立了一种高分辨熔解曲线的技术,能够同时快速检测鸡肉中沙门菌、单核细胞增生李斯特菌、金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌。该技术分别以这 4 种菌的 *fimY*、*hly*、*nuc* 和 *orfC* 特异性基因为靶基因,建立了多重 HRM-real time PCR 检测体系。该体系分别对沙门菌、单增李斯特菌、金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌产生出特异性熔解曲线;该体系检测

单一和多种致病菌菌液的灵敏度均为 10² CFU/mL,人工染菌样本的检测限均可以达到 5 CFU/25 g。相比传统单菌检测,显著缩短检测时间,适用于肉类加工企业的批量筛查和监管部门的快速抽检,但需确保多重引物在同一退火温度下高效扩增,优化周期长。

2.1.2 多重PCR与噬菌体辅助裂解

Kim 等^[52]提出了一种基于噬菌体辅助裂解和多重 PCR 的食品中病原体检测方法。该方法通过噬菌体辅助裂解技术,成功从被大肠杆菌 O157: H7、沙门菌和蜡样芽孢杆菌污染的食物样本中回收和浓缩目标细菌,浓缩因子超过 3。在 1 h 内有效提取细菌基因组 DNA,并使用多重 PCR 技术,能够同时检测 10² CFU/mL 浓度的三种目标病原体,解决了复杂基质中致病菌核酸提取效率低的问题,尤其适用于乳制品、即食食品等易受污染的高风险品类,但特定噬菌体的识别谱较窄,无法覆盖广谱病原体,且对低浓度样本仍需预增菌。Wisuthiphaet 等^[53]提出了一种利用噬菌体扩增来检测细菌的新方法。该方法利用噬菌体感染目标细菌后迅速扩增其遗传物质,来产生大量子代噬菌体。研究人员通过荧光显微镜观察扩增后的噬菌体,可以在 8 h 内从椰汁和模拟菠菜洗涤水中检测到每毫升 10 个大肠杆菌单位,灵敏度与实时 PCR 相当,但需要的试剂和设备简单。该方法适合资源有限的基层监管机构或现场应急检测,但检测周期较长,荧光显微镜操作需要专业人员,结果误判易受影响。

2.2 等温扩增技术

等温扩增技术无需复杂的热循环仪器,操作更加简便,反应速度也更快,能够在短时间内实现核酸的快速扩增,而且具有高灵敏度和高特异性,能够在较低模板浓度下准确检测到目标序列。目前在食源性致病菌检测中常用的等温聚合扩增方法主要包括环介导等温扩增^[15]、链置换扩增^[16]和滚环扩增^[17]等技术^[54,55],其基本原理如图 2 所示。

2.2.1 环介导等温扩增

Notomi 等于 2000 年首次提出了一种新型的核酸扩增体系即环介导等温扩增技术 (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)。该技术利用 *Bst* DNA 聚合酶的链置换活性,可在 60~75 °C 恒温条件下于 1 h 内完成高特异性和高灵敏度的靶标 DNA 的指数级扩增^[18,22,56-58]。相较于传统 PCR, LAMP 技术无需依赖精密温控设备,反应全程保持单一温度;运行成本低;检测流程周期短等^[19,59]。Wang 等^[60]基于 LAMP 开发了一种快速检测副溶血性弧菌的新方法,该方法能

在纯培养和混合细菌中检测低至 3.7×10^1 CFU/mL。该技术操作复杂,对人员技术要求高,基层普及难度大。Du 等^[61]提出了纳米金增强 LAMP 方法,利用纳米金来增强 LAMP 反应和硫酸铜负染色技术,有效解决了 LAMP 反应中的假阳性和非特异性扩增问题,该方法利用纳米金提高了 LAMP 扩增效率,实现了 30 min 内对沙门菌可视化检测。该技术可能存在肉眼判断主观差异,缺乏定量数据支撑。Kim 等^[62]等通过结合实时荧光 LAMP 和比色 LAMP 技术,开发出了一种专门用于检测沙门菌汤普森血清型的新型 LAMP 检测方法。该方法仅需 45 min 就能完成检测,检测限达到 10 CFU/mL,但需要配套荧光读取设备,基层使用受限,且未纯化的模板中抑制物可能降低 LAMP 效率,需优化裂解液配方。Fiore 等^[63]应用 LAMP 检测即食熟肉中的单核细胞增生李斯特菌,他们通过设计特异性引物,在恒定温度下利用 Bst 聚合酶进行 DNA 扩增,通过颜色变化直接观察扩增结果。该方法可以在 30 min 内完成对 37 个实验污染即食肉样品的检测,可以开发出一系列细菌的 LAMP 技术,满足食品中致病菌的快速筛查。

2.2.2 链置换扩增技术

链置换扩增 (Strand Displacement Amplification, SDA) 是一种基于核酸内切酶切割和 DNA 聚合酶链置换活性的等温核酸扩增技术^[64]。链置换扩增 (SDA) 技术因其高效率和低成本,广泛应用于食源性致病菌检测。Cai 等^[65]利用 SDA 技术开发了一种荧光检测方法,通过结合精细设计的功能嵌合体和分子信标,成功实现了对金黄色葡萄球菌的高灵敏检测。该方法的检出限可达 39 CFU/mL,但需优化适配体与分子信标序列匹配度,容易受食品复杂基质的干扰。Lu 等^[66]通过精心设计的探针提出了适配体介导的双链置换扩增 (SDA) 结合微流控芯片电泳 (MCE) 的方法,用于超高灵敏度检测鼠伤寒沙门菌 (*S. Typhimurium*),检测限低至 6 CFU/mL,但微流控芯片制备工艺复杂,配套电泳系统价格昂贵,需要专业人员进行芯片操作和电泳数据分析及人员技术要求较高。Zhang 等^[67]开发了一种基于核酸链置换的毛细管电泳技术,该技术通过设计特异性 DNA 探针与适配体结合,形成探针-适配体复合物,通过毛细管电泳分离并检测这些探针的荧光强度,从而间接确定细菌的种类和浓度。该技术能够在 2.5 min 内快速分离并检测这 3 种细菌的探针,但该技术对探针和适配体的特异性要求高。

2.2.3 滚环扩增技术 (RCA)

滚环等温扩增 (Rolling Circle Amplification, RCA) 技术的原理基于锁式探针 (Padlock Probe) 与

目标 DNA 的特异性结合及环状模板的扩增^[68,69]。在恒温条件下,具有链置换功能的 DNA 聚合酶以环状探针为模板,结合引物启动扩增:引物沿环状模板延伸时,聚合酶不断置换新合成的单链 DNA,生成一条由重复序列组成的长单链 DNA 或者单链 RNA^[70],此产物可以与数百条荧光链互补杂交来实现荧光放大^[71,72],也可以形成 G-四联体结构进行可视或荧光检测^[73]。Deng 等^[74]开发了数字滚环扩增 (dRCA) 技术,该方法通过一个特殊的 DNA 探针识别活细菌的 RNA 用它来精确检测食品中的活病原菌。dRCA 技术非常灵敏,即使活菌比例只有 0.1% 也能检测到,灵敏度是传统方法的 50 倍,该技术需 RNA 提取、探针设计及数字分区等复杂步骤,检测周期长,且数字 PCR 芯片和 RNA 特异性探针成本高,难以普及。Carole 等^[75]开发了一种多重分支跳跃式滚环扩增技术,用于快速检测食品中的病原体。该技术通过使用多重探针和荧光标记的锁式探针,能够在 30 min 内检测合成靶标,并在 2 h 内检测实际细菌,适用于检测牛奶中的鼠伤寒沙门氏菌和金黄色葡萄球菌,但该技术仅仅检测两种细菌,如增加检测对象可能导致探针间竞争结合,且多色荧光标记需精准校准光谱通道,易导致误判。Jang 等^[76]通过滚环扩增和切口酶反应循环生成引物,提出了引物生成-滚环扩增 (PG-RCA) 方法,实现核酸的指数级扩增,但切口酶特异性不足可能导致非特异性引物生成,需严格优化酶浓度和反应时间,且指数扩增后期可能出现平台期,影响低拷贝数样本的定量精度。

2.3 CRISPR/Cas 系统

CRISPR 系统是一种存在于细菌和古细菌中的天然免疫系统,用于对抗噬菌体等外来遗传物质的入侵^[77]。该系统允许细菌把病毒 DNA 片段整合到自己的基因组中形成 CRISPR 序列中的间隔子。当同一病毒再次入侵细菌时,细菌使用从间隔子转录出的 RNA 将 CAS 蛋白引导到目标外源源的 DNA 序列中,然后将其切割,以便快速准确地攻击外源病原体^[78]。常用的 Cas 蛋白包括 Cas12a、Cas12b 和 Cas13a,它们分别用于检测不同的目标核酸^[79]。

2.3.1 CRISPR-Cas12a 在致病菌检测中的应用

Zhou 等^[80]通过 CRISPR/Cas12a 的活化和切割、酶反应和葡萄糖信号读取的过程,开发了一种基于 CRISPR/Cas12a-RAA 系统的检测方法检测沙门菌,实现从靶基因到葡萄糖信号的间接转化,检测限可低至 5 CFU/mL,但是信号转化受食品基质干扰较大。Lv 等^[81]设计了一种基于 CRISPR/Cas12a-RAA 的检测虾样品中副溶血性弧菌的单管新型检测系统,该

方法在纯培养物中的 LOD 为 67 CFU/mL, 在虾样品中的检测限可达 73 CFU/mL, 可满足精准检测副溶血性弧菌的需求, 但该技术通量小, 且实际样品检测限略高于纯培养物表明检测结果受食品基质影响较大。Rathore 等^[82]建立起基于 CRISPR-Cas12a 系统的快速检测方法, 通过设计特异性 crRNA 与 Cas12a 酶结合, 识别并切割目标基因, 从而在紫外线激发下发出荧光, 实现对致病性大肠杆菌的快速、准确检测, 但该方法依赖荧光检测设备 (紫外灯或荧光分光光度计), 便携性受限, 且未提及复杂食品基质 (如肉类、乳制品) 中的检测效果。Sun 等^[83]采用了一锅法 RPA-Cas12a 系统和链霉亲和素-金纳米粒子 (SA-AuNP) 为基础的 CRISPR 特异性侧流试纸条 (LFS), 建立了基于 RPA-Cas12a-LFS 方法的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA) 直接可视化检测方法, 实现了在 60 min 内直接从各种牛奶样品中特异性识别 MRSA, 但金纳米粒子标记需优化偶联效率, 可能存在非特异性吸附导致背景显色, 影响结果判读。该方法仅针对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA), 对其他耐药菌或非耐药菌的检测需重新设计探针。

2.3.2 CRISPR-Cas12b在致病菌检测中的应用

张懿翔等^[84]提出了将 CRISPR/Cas12b 技术与 LAMP 技术相结合的方法, 通过设计特异性 LAMP 引物和向导 RNA 靶向序列, 保证了快速检测过程的高灵敏度和特异性, 该方法能够检测到低至 0.1 pg/ μ L 的核酸水平, 检出限低于 10 CFU/100 g, 该技术需依次进行 LAMP 扩增和 Cas12b 切割, 现场检测效率易受影响, 基层实验室普及成本相对较高。Gong 等^[85]提出了一步法 LAMP-CRISPR/Cas12b 检测系统。该方法通过 LAMP 扩增目标 DNA 序列, 利用 CRISPR-Cas12b 系统进行特异性检测, 其检测限低至每次反应 30 拷贝, 且反应仅需 45 min, 与传统培养方法的检测结果完全一致, 但该方法无法覆盖沙门氏菌属其他血清型或多菌种同时检测, 且 LAMP 与 Cas12b 的酶体系需优化缓冲液成分 (如 Mg^{2+} 浓度), 提高酶活性。Gong 等^[86]研发出一种创新的 RPA-CRISPR/Cas12b 检测系统, 整个反应 1h 即可完成, 检测限为 14.4 拷贝, 解决了肠沙门菌印第安纳州血清型 (*Salmonella enterica* serovar Indiana) 的快速检测, 该方法使用定制化设计 crRNA, RPA 试剂成本高于 LAMP, 且 Cas12b 酶价格较高。

2.3.3 CRISPR-Cas13a在致病菌检测中的应用

Cas13a 是一种以 RNA 为靶标的 VI 型效应蛋白^[87]。由于其独特的非特异性切割活性, 使得它在食源性致病菌的 RNA 检测中表现出显著优势。Cas13a 可以通

过识别并结合目标 ssRNA 后, 在切割靶标 RNA 的同时, 还能非特异性地切割体系中的任意 ssRNA, 从而实现对活菌的高效检测^[88]。Guo 等^[89]研发出一种结合 PCR 和 CRISPR/Cas13a 的技术, 用于提高沙门菌检测的灵敏度和特异性。他们利用 PCR 扩增目标基因 *HilA*, 然后通过 CRISPR/Cas13a 的 RNA 切割活性实现沙门菌的可视化检测, 但该方法需热循环仪完成 PCR 扩增, 无法满足真正的“现场无设备检测”。Xiang 等^[90]开发了一种基于 RAA 和 CRISPR/Cas13a 的高通量微流控策略 (hMC-CRISPR), 通过一步法准确识别病原性李斯特菌。该技术在微流控芯片上整合了 RAA-CRISPR/Cas13a 系统, 通过转录过程协调核酸扩增和 CRISPR/Cas13a 的切割效率, 阻止基因组 DNA 和扩增子的完全切割。激活的 Cas13a 核酶切割荧光 RNA 报告分子, 生成荧光信号。该技术在 60 min 内成功检测了 8 个样本中的李斯特菌属、单核细胞增生李斯特菌、无害李斯特菌和伊万诺夫李斯特菌, 但是微流控芯片制备工艺复杂, 需专业设备, 大规模应用成本较高, 且芯片为一次性消耗, 进一步增加检测成本。Wang 等^[91]提出了一个基于壳聚糖核酸提取和 RAA-T7-CRISPR/Cas13a 核酸检测的离心微流控平台, 用于快速检测病原体。该平台采用壳聚糖静电吸附法纯化核酸, 结合 RAA-T7-CRISPR/Cas13a 系统进行核酸定量, 并通过离心微流控技术实现全自动操作。该平台在最优条件下能够在 1 h 内自动检测鸡肉上清液中的沙门菌, 检测限为 10 CFU/mL。但是需针对特定菌种设计专用微流控模块, 通用性差, 拓展至其他致病菌需重新开发芯片和试剂体系。需要依赖离心微流控装置, 虽然便携性优于传统 PCR 仪, 但仍需小型化电源支持, 现场环境中应用受限。CRISPR 技术在食源性致病菌检测中的应用展现出高效、灵敏和特异性的优势, 未来结合不同的扩增和检测技术, CRISPR 将为食源性致病菌的检测提供了强有力的保障。

表 2 对于文中提到的分子生物学检测相关新技术的不同指标进行了总结对比。PCR 技术和 CRISPR-Cas 系统在食源性致病菌检测中的应用都具有高灵敏度和特异性, 但 CRISPR-Cas 系统能够区分活菌和死菌, 提供更为精确的检测结果。相比之下, 等温扩增技术的优势主要是操作简便、反应速度快, 无需复杂的热循环仪器, 因此也更适合进行现场快速检测。目前 CRISPR-Cas 系统以及新型多重 PCR 技术都能实现多靶标检测, 因此实际应用过程中可以优先考虑。而在成本问题上, 等温扩增技术和 CRISPR-Cas 系统的成本相对较低, 而 PCR 技术由于需要精密的设备和试剂成本较高。

表 2 分子生物学检测技术总结

Table 2 Summary of molecular biology detection techniques					
技术类型	方法 / 原理	输出信号	检出限	目标菌	参考文献
实时荧光 PCR	同步增菌 + 实时 荧光 PCR	荧光信号	5 CFU/25 g	五种常见食源性致病菌	[50]
多重 HRM-PCR	高分辨溶解曲线 + 实时 PCR	溶解曲线信号	10 ² 拷贝数 /mL	沙门菌、李斯特菌、 金葡菌、弯曲菌	[51]
噬菌体辅助裂解 -PCR	噬菌体裂解 + 多重 PCR	荧光信号	10 ² CFU/mL	大肠杆菌 O157:H7、沙门 菌、蜡样芽孢杆菌	[52]
LAMP	恒温核酸扩增 + 颜色变化	颜色变化 (可视化)	3.7 × 10 ¹ CFU/mL	副溶血性弧菌	[60]
纳米金增强 LAMP	纳米金催化 + 硫酸铜负染色	颜色变化 (可视化)		沙门菌	[61]
荧光 - 比色 LAMP	实时荧光 + 比色双模式	荧光 / 颜色信号	10 CFU/mL	沙门菌汤普森血清型	[62]
SDA	荧光标记 + 分子信标	荧光信号	39 CFU/mL	金黄色葡萄球菌	[65]
适配体 -SDA- 微流控	适配体识别 + 双链置换扩增 + 电泳	电泳信号	6 CFU/mL	鼠伤寒沙门菌	[66]
dRCA	RNA 特异性探针 + 滚环扩增	荧光信号	活菌比例 0.1%	活病原菌	[74]
CRISPR-Cas12a-RAA	Cas12a 切割 + 葡萄糖信号读取	葡萄糖浓度信号	5 CFU/mL	沙门菌	[80]
CRISPR-Cas12b-LAMP	LAMP 扩增 + Cas12b 切割	荧光信号	0.1 pg/μL	克罗诺杆菌属	[84]
CRISPR-Cas13a 微流控	RAA 扩增 + Cas13a 切割 + 荧光报告分子	荧光信号	10 CFU/mL	致病性李斯特菌	[91]

3 生物传感器检测技术

近年来，生物传感器技术凭借其高灵敏度、快速响应、便于现场检测等优势，在食源性致病菌检测领域展现出巨大潜力。目前食源性致病菌检测领域所用传感器的生物识别元件、信号放大元件、部分检测对象以及基本原理如图 3 所示。

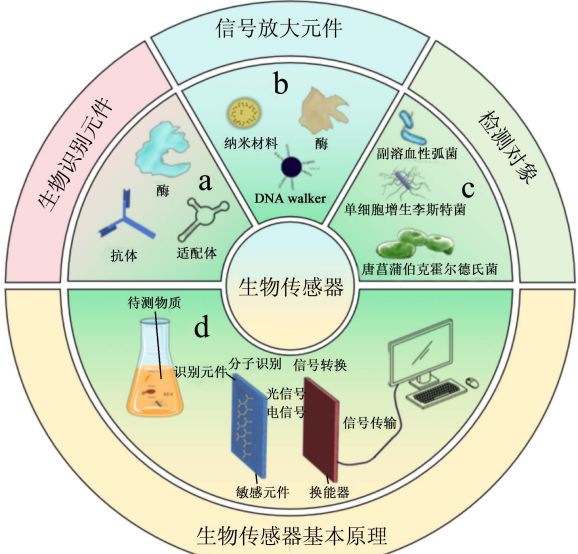


图 3 分子传感器检测技术

Fig.3 Molecular sensor detection techniques

3.1 电化学生物传感器

电化学传感器在食源性病原体检测中表现出显著的优势。Jiang 等^[92]基于适体调节的 Pt 纳米颗粒 / 空心碳球纳米酶活性开发出电化学传感器，能够在 10~10⁹ CFU/mL 的线性范围内检测病原体，检出限为 2 CFU/mL。利用适体 (Aptamer) 特异性识别细菌，调控 Pt 纳米颗粒 / 空心碳球的酶活性，通过电信号放大实现超灵敏检测，线性范围宽 (10~10⁹ CFU/mL)，检出限低至 2 CFU/mL。但是适体筛选需通过 SELEX 技术，周期长且成本高，且食品中蛋白质、金属离子可能吸附于碳球表面，影响适体与细菌结合效率。此外，Jiang 等^[93]还设计了一种基于微流体线基的电化学适体传感器，用于快速检测副溶血性弧菌，该传感器能够在 15 min 内完成样品富集和检测，线性范围为 1~10⁶ CFU/mL，检出限为 1 CFU/mL。但是该方法仅针对副溶血性弧菌，多重检测需开发多通道微流控芯片，技术复杂度高，且微通道内径小，易受样品杂质堵塞，需严格过滤样品或集成预处理模块。Pang 等^[94]构建的 G- 三链体 / 血晶素 DNA 酶介导的比色适体传感器在检测大肠杆菌 O157:H7 时表现出高灵敏度和特异性。该传感器利用核酸外切酶 III 辅助扩增和适体功能化磁性珠，能够在 1.3×10³~1.3×10⁷ CFU/mL 的线性范围内检测病原体，检出限为 1.3×10³ CFU/mL。该方

法检出限高于前序案例,可能漏检低浓度污染,且肉眼判断显色易受光线、操作人员经验影响,缺乏定量数据。

3.2 光学生物传感器

Yang 等^[95]提出了基于 DNA walker 的表面增强拉曼光谱方法,采用表面增强拉曼光谱法解决了样品中低浓度沙门菌的检测难题。该技术的原理为通过表面增强拉曼散射效应,结合 DNA walker 信号放大效应实现对沙门氏菌高灵敏度检测, DNA walker 设计需多步核酸合成与修饰,且 SERS 信号受纳米金颗粒均一性影响大,重现性待提升,并且需拉曼光谱仪,设备体积大、成本高,难以应用于现场快速检测。Jayan 等^[96]开发了一种微流控-SERS 平台,用于快速检测食品中的大肠杆菌。该平台通过在 Y 型蛇形微流控通道中原位合成银纳米粒子 (AgNPs),利用适配体引导 AgNPs 合成,增强了 SERS 信号,检测限低至 1.1 CFU/mL,线性检测范围覆盖 $10^2 \sim 10^8$ CFU/mL,但是食品颗粒杂质可能阻塞微流控通道,需进行样品的前处理。Qiu 等^[97]研发出了一种超灵敏的无标记光纤环形激光生物传感器,用于检测食品中的鼠伤寒沙门氏菌。他们采用单模锥形七芯单模 (STSS) 光纤环形激光 (FRL) 传感器技术,通过集成 STSS 光纤到 EDFA 环形激光系统中,获得了极窄的半峰全宽 (FWHM) 和高消光比 (ER)。该传感器能在 20 min 内检测到 10 CFU/mL 的鼠伤寒沙门菌溶液。该方法光纤激光系统需专业团队搭建,成本极高,且维护复杂,难以普及至基层实验室,且光纤表面需固定抗体/适体以识别细菌。Cao 等^[98]设计了一个便携式 ATP 生物发光传感器,采用定向噬菌体修饰搅拌棒提取和生物增殖的方法,解决了现场快速检测活大肠杆菌 O157:H7 菌株的问题。他们将选定的噬菌体定向固定在聚二烯丙基二甲基氯化铵修饰的金搅拌棒上作为生物受体,经过简单的搅拌棒吸附提取和 LB 培养基中的生物增殖后,被捕获的大肠杆菌 O157:H7 数量激增,最终通过便携式 ATP 生物发光传感器进行量化,该生物测定法在 30 min 内提供了 $10^2 \sim 10^7$ CFU/mL 的可检测范围,检测限低至 30 CFU/mL,该方法仅针对特定血清型细菌,需开发多噬菌体鸡尾酒试剂以覆盖多种致病菌,且食品中 ATP 酶可能受裂解液配方的影响。

3.3 荧光生物传感器

量子点 (QDs) 因其优越的光学性能而广泛用于构建荧光生物传感器。Jiao 等^[99]基于铂基荧光纳米

酶 (Pt-OCDs) 和链置换扩增 (SEA) 技术开发了一种名为 “loong frolic pearls” 的新平台。该平台能够解决伯克霍尔德氏菌的检测和灭菌问题。它使用 SEA 技术扩增目标 DNA,结合 Pt-OCDs 的荧光和催化特性,实现三种超灵敏检测模式 (比色-荧光-光热)。该方法涉及核酸扩增、纳米酶合成、光热效应调控等多步骤,操作难度大,需专业人员执行,且光热灭菌所需能量可能对食品成分 (如蛋白质、维生素) 造成破坏,需优化条件以平衡杀菌效率与食品品质。Kang 等^[100]提出了一种基于核酸多重扩增平台的双模式比色和荧光生物传感器,用于单核细胞增生李斯特菌的检测。该方法通过适配体识别细菌触发指数扩增反应 (EASDR),实现了铂纳米颗粒 (Pt NPs) 和荧光染料的固定化,从而产生荧光和比色信号的变化。解决了传统单模式检测易受食品基质干扰、可能导致假阳性结果的问题,通过双重信号输出提高了检测的准确性。在荧光检测模式下,该生物传感器对单核细胞增生李斯特菌的检测限能达到 10 CFU/mL。Wang 等^[101]提出了一种先进的显微镜成像平台,该平台利用二维编码的聚苯乙烯 (PS) 微球和基于 *Argonaute* 的解码系统,实现了食品和临床样本中病原细菌的无扩增多重检测,无需进行 DNA 提取。他们通过特定的适配体识别病原细菌,将其信息转化为引导 DNA (gDNA) 信号,激活丁酸梭菌 *Argonaute* (CbAgo) 进行精确的 DNA 切割,在荧光 PS 探针的颜色、大小和计数中编码病原细菌的类型和浓度。之后通过计算机视觉算法处理这些信号,能够在 1.5 h 内检测到 10^2 CFU/mL 的病原细菌,但是目前仅支持少数几种细菌 (如大肠杆菌、沙门菌),且设备依赖性强,需荧光显微镜与图像分析软件,基层实验室缺乏相关设备,普及难度大。荧光生物传感器具有检测食源性致病菌的巨大潜力,其高灵敏度、快速响应和多通道检测使其成为检测食品安全的重要工具。未来的研究将继续优化传感器性能,将各种纳米材料与荧光染料相结合,以获得更好的研究结果。

表 3 对于文中提到的生物传感器检测相关新技术的不同指标进行了总结对比。由这些文章不难看出,电化学生物传感器在样品富集和检测速度上具有优势,更适合现场快速检测。相比之下,光学生物传感器通过表面增强拉曼散射效应,具有极高的检测灵敏度,也因而更适合实验室高精度检测。而荧光生物传感器则是通过多重信号的输出来提高检测的准确性,更适合复杂基质中的高准确性检测。

表 3 生物传感器检测技术总结
Table 3 Summary of biosensor detection technology

技术类型	方法 / 原理	输出信号	检出限	目标菌	参考文献
电化学适配传感器	适配 -Pt 纳米颗粒 / 碳球纳米酶	电化学信号	2 CFU/mL		[92]
微流控电化学传感器	微流体线基 + 适配识别	电化学信号	1 CFU/mL	副溶血性弧菌	[93]
比色适配传感器	G- 三链体 / 血晶素 DNA 酶 + 磁珠富集	颜色变化	1.3×10 ³ CFU/mL	大肠杆菌 O157:H7	[94]
SERS-DNAwalker	表面增强拉曼 +DNA 步行器信号放大	拉曼散射信号		沙门菌	[95]
微流控 -SERS 平台	微流控合成银纳米粒子 + 适配体引导	拉曼散射信号	1.1 CFU/mL	大肠杆菌	[96]
光纤激光生物传感器	单模光纤激光 + 细菌识别	激光光谱信号	10 CFU/mL	鼠伤寒沙门菌	[97]
ATP 生物发光传感器	噬菌体修饰搅拌棒 +ATP 发光	生物发光信号	30 CFU/mL	活大肠杆菌 O157:H7	[98]
荧光纳米酶平台	铂基纳米酶 + 链置换扩增 (SEA)	荧光 / 比色 / 光热信号		伯克霍尔德氏菌	[99]
二维编码微球成像	荧光微球 +Argonaute 解码系统	荧光成像信号	10 ² CFU/mL	病原细菌	[101]

4 总结与展望

食源性致病菌的检测是保障食品安全重要手段。本文重点阐述了免疫检测技术、分子生物学检测技术以及部分生物传感器检测技术的应用，并对未来可能发展的研究方向和改进措施进行了展望。传统方法与新兴技术的结合将在提高食源性病原体检测的灵敏度、特异性和有效性方面展现出了显著效果，有效防止受食源性致病菌污染的食品进入市场，确保消费者的饮食安全。然而，目前很多技术尚处于研发阶段，便携式生物传感器和其他快速检测系统的落地生产将具有广阔的市场前景，不仅有助于企业对食源性致病菌的快速筛查，也有利于基层的监管工作。另外，食品基质复杂可能对检测结果产生干扰，这要求开发高效的样品前处理技术，提高检测的准确性和可靠性。

因此，未来的致病菌检测领域发展方向将集成多种技术的交叉融合，实现智能化、便捷化的致病菌快速检测，从而推动食品工业的高质量发展。例如，通过结合生物技术与信息技术，利用大数据和人工智能处理检测数据，来实现智能化管理；通过结合纳米技术与生物传感器，来推动便携式高灵敏度检测设备的开发；设计先进的自动化检测平台和远程监控预警系统，来提高检测效率；发明便携式检测设备和一次性耗材方便基层监管和现场使用；优化 CRISPR-Cas 技术和等温扩增技术，来提升检测的灵敏度和特异性；优化样品前处理技术和多靶标检测技术，来应对复杂食品基质，提高检测的准确性和覆盖面。这些方面的进步将共同推动食源性致病菌检测的智能化、便捷化，为食品安全管理和公众健康提供更强大的保障。

参考文献

[1] CHARLES M A P F, HEIDY M W D B, CHRISTINA B, et al.

Microbial food safety in the 21st century: Emerging challenges and foodborne pathogenic bacteria [J]. Trends in Food Science & Technology, 2018, 81: 155-158.

[2] RAHIM A, MOHAMMAD H Y, AZIZ A F, et al. Controlling of foodborne pathogen biofilms on stainless steel by bacteriophages: A systematic review and meta-analysis [J]. Biofilm, 2024, 7: 100170.

[3] WANG J J, HE T T, CHEN L, et al. Antibacterial efficiency of the curcumin-mediated photodynamic inactivation coupled with L-arginine against *Vibrio parahaemolyticus* and its application on shrimp [J]. International Journal of Food Microbiology, 2024, 411: 110539.

[4] CHENG B, ZHANG D W, WANG T, et al. Characterization of the broad-spectrum phage vB_CsaM_CBT2 and its inhibition of multidrug-resistant *Cronobacter sakazakii* in powered infant formula [J]. Food Control, 2024, 158: 110262.

[5] ZHANG Y, HU X Z, WANG Q J, et al. Recent advances in microchip-based methods for the detection of pathogenic bacteria [J]. Chinese Chemical Letters, 2021, 33: 2817-2831.

[6] DUAN S G, YU Y, GUO Y C, et al. Epidemiological evaluation of bacillus cereus-induced foodborne outbreaks-China, 2010-2020 [J]. China CDC Weekly, 2023, 5(33): 737-741.

[7] SUN T M, LIU Y T, QIN X J, et al. The prevalence and epidemiology of *Salmonella* in retail raw poultry meat in China: A systematic review and meta-analysis [J]. Foods, 2021, 10(11): 27-57.

[8] 刘玉杰.两种食源性细菌活的非可培养状态(VBNC)的检测方法研究[D].烟台:烟台大学,2023.

[9] PVICKY J, LIESBETH J, PIETERNEL L, et al. Alternative microbial methods: an overview and selection criteria [J]. Food Microbiology, 2010, 27(6): 710-730.

[10] DJANET F, SHAMIM R, DARREN H, et al. As clean as they look? Food hygiene inspection scores, microbiological contamination, and foodborne illness [J]. Food Control, 2019, 96: 76- 86.

[11] LU Y X, ZHANG J B, LU X N, et al. Isothermal nucleic acid amplification based microfluidic “lab-on-a-chip” for the detection of pathogenic bacteria and viruses in agri-foods [J]. Trends in Food Science Technology, 2024, 148: 104482.

[12] DUAN Q Q, BU S J, LI H J, et al. A novel specific fluorescent biosensor for detection of foodborne pathogens based on split crRNA of CRISPR/Cas12a [J]. Microchemical Journal, 2024, 200: 110253.

- [13] FENG Q M, WANG C C, MIAO X M, et al. A novel paper-based electrochemiluminescence biosensor for non-destructive detection of pathogenic bacteria in real samples [J]. *Talanta*, 2023, 267: 125224.
- [14] 王璇,戚敏钰,马芸琳,等.基于噬菌体的食源性致病菌检测技术研究进展[J].*药物分析杂志*,2023,43(10):1645-1652.
- [15] ANGELA M V, CARLOS A L, SHU-I T, et al. Evanescent wave fiber optic biosensor for *Salmonella* detection in food [J]. *Sensors*, 2009, 9: 5810-5824.
- [16] ZOI K, JASMINA V, APOSTOLOS V. Applications of biosensors for bacteria and virus detection in food and water-a systematic review [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2022, 111: 367-379.
- [17] EVA E, PETER P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G [J]. *Immunochemistry*, 1971, 8(9): 871-874.
- [18] TIZIANA D F, MARIA S, PIERINA V, et al. Development of a capture ELISA for rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples [J]. *Food Analytical Methods*, 2019, 12(2): 322-330.
- [19] ANDREW G G, SHU-I T. High-throughput biosensors for multiplexed food-borne pathogen detection [J]. *Analytical Chemistry*, 2011, 4: 151-172.
- [20] KELLY A S, LEE-ANN J. Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: A review [J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2004, 30(1): 7-24.
- [21] CARMEN G, EVA B, BARTEK R, et al. Detection of *E. coli* labeled with metal-conjugated antibodies using lateral-flow assay and laser-induced breakdown spectroscopy [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, 412(6): 1291-1301.
- [22] GEERTRUIDA A P-T, JAKOB K, AART V A. Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 393(2): 569-582.
- [23] HUANG Z, HU S, XIONG Y H, et al. Application and development of superparamagnetic nanoparticles in sample pretreatment and immunochromatographic assay [J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 114: 151-170.
- [24] HUANG Z, PENG J, HAN J J, et al. A novel method based on fluorescent magnetic nanobeads for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 [J]. *Food Chemistry*, 2019, 276: 333-341.
- [25] CHENG R N, LI L, ZHENG S H, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* in milk and pork via immunomagnetic separation and recombinase polymerase amplification [J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(2): e02249-22.
- [26] ZHAI Y, MENG X J, LI L, et al. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* using magnetic nanobead-based immunoseparation and quantum dot-based immunofluorescence [J]. *RSC Advances*, 2021, 11: 38638-38647.
- [27] ZHANG W W, YANG Y, KONG F, et al. Development and optimization of immunomagnetic bead separation-convective PCR (IMBS-CPCR) for on-site detection of four common *Vibrio* species in aquaculture [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2024, 211: 116928.
- [28] LI B Y, YU M, MA S Y, et al. Visual detection of *Staphylococcus aureus* based on magnetic bead target enrichment and rolling circle amplification [J]. *Journal of Analytical Science and Technology*, 2025, 16(1): 1-8.
- [29] FAN W, GAO XY, LI HN, et al. Rapid and simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, and *Listeria monocytogenes* in meat using multiplex immunomagnetic separation and multiplex real-time PCR [J]. *European Food Research and Technology*, 2022, 248: 869-879.
- [30] 姚文艳,姜晖.食源性创伤弧菌检测技术研究进展[J].*分析测试学报*,2022,41(4):562-569.
- [31] ZHANG Y, LIAO X R, YU G G, et al. Phage-displayed nanobody as a sensitive nanoprobe to enhance chemiluminescent immunoassay for *Cronobacter sakazaki* detection in dairy products [J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(36): 13698-13707.
- [32] ASMA D, ABDELMOUNAAIM A, AMAL R, et al. Nanobody-based sandwich immunoassay for pathogenic *Escherichia coli* F17 strain detection [J]. *Biosensors*, 2023, 13: 299.
- [33] BAI M F, WANG Y Q, ZHANG C, et al. Nanobody-based immunomagnetic separation platform for rapid isolation and detection of *Salmonella enteritidis* in food samples [J]. *Food Chemistry*, 2023, 424: 136416.
- [34] WANG P, YU G G, WEI J, et al. A single thiolated-phage displayed nanobody-based biosensor for label-free detection of foodborne pathogen [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 443: 130157.
- [35] SHI J X, CHI H, CAO A P, et al. Development of IMBs-qPCR detection method for *Yersinia enterocolitica* based on the *foxA* gene [J]. *Archives of Microbiology*, 2021, 203: 4653-4662.
- [36] CHENG X, WANG C C, LIU A R, et al. Simultaneous detection of foodborne pathogenic bacteria in milk by fluorescence immunoassay [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2023, 285: 121830.
- [37] TIMPIKA H, NUTSARA M, SURACHATE K, et al. Mesoporous silica nanoparticles-enhanced microarray technology for highly sensitive simultaneous detection of multiplex foodborne pathogens [J]. *ACS Applied Bio Materials*, 2024, 7(2): 2367-2377.
- [38] DOU X C, ZHANG Z W, LI C, et al. A novel nanoparticle-based fluorescent sandwich immunoassay for specific detection of *Salmonella typhimurium* [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2024, 413: 110593.
- [39] DOU L N, BAI Y C, LIU M G, et al. "Three-to-One" multi-functional nanocomposite-based lateral flow immunoassay for label-free and dual-readout detection of pathogenic bacteria. [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2022, 204: 114093.
- [40] PRADIT W, PARIN C, SUPARAT T, et al. Development of a rapid immunochromatographic strip test for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* toxin B that cause acute hepatopancreatic necrosis disease. [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2019, 43(2): 207-214.
- [41] WANG S, SHEN W Z, ZHENG S, et al. Dual-signal lateral flow assay using vancomycin-modified nanotags for rapid and sensitive detection of *Staphylococcus aureus* [J]. *RSC Advances*, 2021, 11(22): 13297-13303.
- [42] ZHOU S Y, XU L G, KUANG H, et al. Fluorescent microsphere immunochromatographic sensor for ultrasensitive monitoring deoxynivalenol in agricultural products [J]. *Microchemical Journal*,

- 2020, 164: 106024.
- [43] ZHANG Y Y, REN F Z, WANG G X, et al. Rapid and sensitive pathogen detection platform based on a lanthanide-labeled immunochromatographic strip test combined with immunomagnetic separation [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 329: 129273.
- [44] PAN X, SHI D L, FU Z F, et al. Rapid separation and detection of *Listeria monocytogenes* with the combination of phage tail fiber protein and vancomycin-magnetic nanozyme [J]. *Food Chemistry*, 2023, 428: 136774.
- [45] MONIKA C, GÜNTHER P, ESTEBAN B-M, et al. Tools to compare antibody gold nanoparticle conjugates for a small molecule immunoassay [J]. *Microchimica Acta*, 2023, 190(2): 62.
- [46] HE S. No-cost ballpoint pen dispenser for lateral flow assays [J]. *Talanta*, 2023, 263: 124742.
- [47] NAN X X, YAO X S, YANG L, et al. Lateral flow assay of pathogenic viruses and bacteria in healthcare [J]. *Analyst*, 2023, 148(19): 4573-4590.
- [48] CAO Y Q, CHEN Y L, ZHANG X Y, et al. Biotinylation-based lateral flow assays for pathogenic and total bacteria detection [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2025, 1338: 343607.
- [49] SHANG Y T, CAI S Z, YE Q H, et al. Quantum dot nanobeads-labelled lateral flow immunoassay strip for rapid and sensitive detection of salmonella typhimurium based on strand displacement loop-mediated isothermal amplification [J]. *Engineering*, 2021, 19: 62-70.
- [50] 姚艳玲,周宇东,刘骆强,等.同步增菌结合实时荧光聚合酶链式反应快速检测食品中5种致病菌[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022,13(13):4258-4264.
- [51] 张静,周倩,唐梦君,等.高分辨溶解曲线技术结合荧光实时PCR法同时检测鸡肉中4种食源性致病菌[J]. *现代食品科技*, 2021, 37(6):296-303.
- [52] KIM S M, KIM E J, JANG E J, et al. Bacteriophage-assisted lysis and eluted genomic DNA-based detection of pathogenic bacterial contamination in food [J]. *Food Control*, 2024, 162: 110433.
- [53] NICHAREE W, YANG X, GLENN M Y, et al. Quantitative imaging of bacteriophage amplification for rapid detection of bacteria in model foods [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 853048.
- [54] LUO D, HUANG X L, MAO Y, et al. Two-step large-volume magnetic separation combined with PCR assay for sensitive detection of *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk [J]. *Journal of Dairy Science*, 2017, 100(10): 7883-7890.
- [55] ALIREZA K, ROGHAYEH J, MAHSA D, et al. Ratiometric visual detection of tetracycline residues in milk by framework-enhanced fluorescence of gold and copper nanoclusters [J]. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 242(5): 118715.
- [56] YIN J J, LIU Y Q, WANG S, et al. Engineering a universal and label-free evaluation method for mycotoxins detection based on strand displacement amplification and G-quadruplex signal amplification [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 256: 573-579.
- [57] WANG Z L, ZONG S F, LIU Y, et al. Simultaneous detection of multiple exosomal microRNAs for exosome screening based on rolling circle amplification [J]. *Nanotechnology*, 2021, 32(8): 085504.
- [58] CHEN X, MA K, YI X, et al. The rapid and visual detection of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex loop-mediated isothermal amplification linked to a nanoparticle-based lateral flow biosensor [J]. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2020, 9(1): 1-12.
- [59] CHO M H, JANG W C, CHOI J G. Detection for methicillin resistant staphylococcus aureus in using Bio-Chip based loop mediated isothermal amplification assay [J]. *Journal of the Korean Chemical Society*, 2013, 57(1): 81-87.
- [60] WANG S Q, GAO Y H, MIAO Y Q, et al. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* by one-pot LAMP-CRISPR/Cas12b combined with immunomagnetic beads [J]. *Food Control*, 2025, 172: 111181.
- [61] DU Z H, LIN S H, LI J L, et al. Nano-gold-enhanced LAMP method for qualitative visual detection of Salmonella in milk [J]. *Microchimica Acta*, 2022, 189(9): 365.
- [62] EISEUL K, SEUNG-MIN Y, HAE-YEONG K. Rapid detection of Salmonella enterica subsp. enterica serovar Thompson by real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and colorimetric LAMP combined without DNA extraction in the field [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2023, 182: 114850.
- [63] ALFONSINA F, IDA T, GIANNI C, et al. Application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the detection of listeria monocytogenes in cooked ham [J]. *Foods*, 2023, 12(1): 193.
- [64] XU P, ZHENG X, TAO Y, et al. Cross-Interface emulsification for generating size-Tunable droplets [J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(6): 3171-3177.
- [65] CAI R F, ZHANG Z W, CHEN H H, et al. A versatile signal-on electrochemical biosensor for *Staphylococcus aureus* based on triple-helix molecular switch [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2021, 326: 128842.
- [66] LU Y Q, XIE Q H, CHEN J Y, et al. Aptamer-mediated double strand displacement amplification with microchip electrophoresis for ultrasensitive detection of *Salmonella typhimurium* [J]. *Talanta*, 2024, 273: 125875.
- [67] ZHANG S Y, WANG Q Q, NING J F, et al. Nucleic acid strand displacement for indirect determination of foodborne bacteria by capillary electrophoresis and its application in antagonism and bacteriostasis studies [J]. *Electrophoresis*, 2024, 45: 318-326.
- [68] WU Y R, SEFAH K, LIU H P, et al. DNA aptamer-micelle as an efficient detection/delivery vehicle toward cancer cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(1): 5-10.
- [69] ZENG R J, SU L S, LUO Z B, et al. Ultrasensitive and label-free electrochemical aptasensor of kanamycin coupling with hybridization chain reaction and strand-displacement amplification [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1038: 21-28.
- [70] JIANG Y Q, QIU Z Y, LE T, et al. Developing a dual-RCA microfluidic platform for sensitive E. coli O157:H7 whole-cell detections [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2020, 1127: 79-88.
- [71] LIU J, ZHAN Z X, LIANG T B, et al. Dual-signal amplification strategy: Universal asymmetric tailing-PCR triggered rolling circle amplification assay for fluorescent detection of *Cronobacter* spp. in

- milk [J]. Journal of Dairy Science, 2020, 103(4): 3055-3065.
- [72] GODWIN A O, KIRNPAL K B S. Current and future perspectives on isothermal nucleic acid amplification technologies for diagnosing infections [J]. Infection and Drug Resistance, 2020, 13: 455-483.
- [73] HAO L L, GU H J, DUAN N, et al. An enhanced chemiluminescence resonance energy transfer aptasensor based on rolling circle amplification and WS2 nanosheet for *Staphylococcus aureus* detection [J]. Analytica Chimica Acta, 2017, 959: 83-90.
- [74] DENG R J, SHI Y C, ZHANG Y, et al. Precise, Sensitive detection of viable foodborne pathogenic bacteria with a 6-Order dynamic range via digital rolling circle amplification [J]. ACS Sensors, 2024, 9: 4127-4133.
- [75] NANFACK V D C, LINA S, JIAN J, et al. Multispectral pathogens detection in food using multiplex hyperbranched saltatory rolling circle amplification [J]. Talanta, 2024, 279: 126618.
- [76] EUN-JIN J, TAI-YONG K, LIM J-A, et al. Primer generation-rolling circle amplification method optimized for the detection of pathogenic bacteria [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2024, 29: 890-901.
- [77] LUCIANO A M, ERIK J S. CRISPR interference: RNA directed adaptive immunity in bacteria and archaea [J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11(3): 181-190.
- [78] SANNE E K, SAMUEL H S. Harnessing “a billion years of experimentation”: the ongoing exploration and exploitation of CRISPR-Cas immune systems [J]. Crispr Journal, 2018, 1(2): 141-158.
- [79] 蒋静,赵文亮,李文越,等.基于CRISPR/CAS系统的现场核酸检测技术[J]中国动物检疫,2022,39(3):55-60.
- [80] ZHOU C, HUANG D, WANG Z Y, et al. CRISPR Cas12a-based “sweet” biosensor coupled with personal glucose meter readout for the point-of-care testing of *Salmonella* [J]. Journal of Food Science, 2022, 87(9): 4137-4147.
- [81] LV X R, CAO W W, ZHANG H, et al. CE-RAA-CRISPR assay: a rapid and sensitive method for detecting *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. Foods, 2022, 11(12): 13.
- [82] PALLAVI R, ASHESH B, AGNES K-N, et al. Rapid detection of pathogenic *E. coli* based on CRISPR Cas system [J]. Frontiers in Microbiology, 2024, 15: 1423478.
- [83] SUN Y X, ZHANG L R, WU H M, et al. Direct visual detection for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in milk based on the RPA-Cas12a-LFS method [J]. Food Control, 2025, 173: 111209.
- [84] 张懿翔,张清平,刘洋.结合CRISPR/Cas12b与LAMP技术的乳粉中克罗诺杆菌属的检测[J].中国乳品工业,2023,51(12):54-58.
- [85] GONG J, ZHANG D, XU J, et al. Rapid and accurate detection of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis using a one-step LAMP-CRISPR/Cas12b method [J]. Food Control, 2024, 164: 110534.
- [86] GONG J, ZHANG D, FU L, et al. A One-Pot Convenient RPA-CRISPR-Based Assay for *Salmonella enterica* Serovar Indiana Detection [J]. Microorganisms, 2024, 12(3): 519.
- [87] OMAR O A, JONATHAN S G, SILVANA K, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector [J]. Science, 2016, 353(6299): aaf5573.
- [88] HILLARY V E, CEASAR S A. A Review on the mechanism and applications of CRISPR/Cas9/Cas12/Cas13/Cas14 proteins utilized for genome engineering [J]. Molecular Biotechnology, 2023, 65(3): 311-325.
- [89] GUO B Y, ZHOU C Y, ZHAO Y, et al. Sensitive visual detection of *Salmonella* using a combination of PCR and CRISPR/Cas13a [J]. International Dairy Journal, 2025, 164: 106185.
- [90] XIANG X R, LI F, YE Q H, et al. High-throughput microfluidic strategy based on RAA-CRISPR/Cas13a dual signal amplification for accurate identification of pathogenic *Listeria* [J]. Sensors and Actuators: B. Chemical, 2022, 358: 131517.
- [91] WANG S Y, DUAN H, LIN J H, et al. A centrifugal microfluidic platform for rapid detection of pathogens based on chitosan nucleic acid extraction and RAA-T7-CRISPR/Cas13a nucleic acid detection [J]. Sensors and Actuators: B. Chemical, 2023, 393: 134223.
- [92] JIANG X H, LV Z W, RAO C Q, et al. Simple and highly sensitive electrochemical detection of *Listeria monocytogenes* based on aptamer-regulated Pt nanoparticles/hollow carbon spheres nanozyme activity. [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2023, 392: 133991.
- [93] JIANG H, SUN Z K, GUO Q, et al. Microfluidic thread-based electrochemical aptasensor for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 182: 113191.
- [94] PANG L D, WANG L E, LIANG Y Q, et al. G-triplex/hemin DNzyme mediated colorimetric aptasensor for *Escherichia coli* O157:H7 detection based on exonuclease III-assisted amplification and aptamers-functionalized magnetic beads [J]. Talanta, 2024, 269: 125457.
- [95] YANG E L, LI D, YIN P K, et al. A novel surface-enhanced Raman scattering (SERS) strategy for ultrasensitive detection of bacteria based on three-dimensional (3D) DNA walker [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2021, 172: 112758.
- [96] JAYAN H, ZHOU R Y, ZHENG Y X, et al. Microfluidic-SERS platform with in-situ nanoparticle synthesis for rapid *E. coli* detection in food [J]. Food Chemistry, 2025, 471: 142800.
- [97] QIU S, LIU B, LENG Y K, et al. A label-free fiber ring laser biosensor for ultrahigh sensitivity detection of *Salmonella Typhimurium* [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2023, 234: 115337.
- [98] 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 and Bioelectronics, 2023, 220: 114852.
- [99] JIAO R, REN Y W, ZHANG X Y, et al. Platinum-based fluorescent nanozyme-driven “loong frolic pearls” multifunctional nanoplatform for tri-mode ultrasensitive detection and synergistic sterilization of *Burkholderia gladioli* [J]. Food Chemistry, 2025, 463: 141107.
- [100] KANG Q, ZHANG S Q, MA C J, et al. A dual-Mode colorimetric and fluorescence biosensor based on a nucleic acid multiplexing platform for the detection of *Listeria monocytogenes* [J]. Analytical Chemistry, 2025, 97: 1853-1860.
- [101] WANG M J, LI L T, WEI L Y, et al. Multiplexed pathogenic bacteria detection via a two-dimensional encoded fluorescent microsphere system [J]. Nano Letters, 2025, 25: 2256-2265.