

# 弯曲菌快速检测技术研究及应用进展

申进玲<sup>1,2</sup>, 赵丽娜<sup>1</sup>, 韩伟<sup>1</sup>, 杨捷琳<sup>1</sup>, 崔思宇<sup>2</sup>, 蒋原<sup>1,3,\*</sup>

(1.上海出入境检验检疫局动植物和食品检验检疫技术中心, 上海 200135; 2.张家港出入境检验检疫局检验检疫综合技术中心, 江苏 张家港 215600; 3.江苏省肉类生产与加工质量安全控制协同创新中心, 江苏 南京 210095)

**摘要:** 弯曲菌是引起人类食源性腹泻的主要病原菌之一, 快速及特异地检测该致病菌对控制弯曲菌病传播至关重要。本文综述了近年来基于蛋白、核酸和其他水平的技术在弯曲菌快速检测中的应用研究, 并对未来弯曲菌检测技术的发展趋势和研究方向进行展望, 以期快速、准确、高效、低成本、高通量的弯曲菌检测方法的建立提供参考。

**关键词:** 弯曲菌; 快速检测; 免疫学技术; 分子生物学技术; 生物传感器技术

## Recent Progress in the Development and Application of Technologies for Rapid Detection of *Campylobacter*

SHEN Jinling<sup>1,2</sup>, ZHAO Lina<sup>1</sup>, HAN Wei<sup>1</sup>, YANG Jielin<sup>1</sup>, CUI Siyu<sup>2</sup>, JIANG Yuan<sup>1,3,\*</sup>

(1. Technology Center for Animal Plant and Food Inspection and Quarantine, Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China; 2. Technology Center of Zhangjiagang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Zhangjiagang 215600, China; 3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Meat Production and Processing, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** *Campylobacter* is one of the major pathogens causing human diarrhea. Therefore, rapid and specific detection of *Campylobacter* is of vital importance to control the transmission of this pathogen. In this article, the analytical methods at the protein and nucleic acid levels that have been applied in the rapid detection of *Campylobacter* are described. Furthermore, future research directions for the development of new detection technologies are discussed. This review is expected to provide useful information for the development of rapid, accurate, efficient, low-cost and high throughput detection methods for *Campylobacter*.

**Keywords:** *Campylobacter*; rapid detection; immunological technology; molecular biological technology; biosensor technology

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201823045

中图分类号: TS207.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2018)23-0313-08

引文格式:

申进玲, 赵丽娜, 韩伟, 等. 弯曲菌快速检测技术研究及应用进展[J]. 食品科学, 2018, 39(23): 313-320. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201823045. <http://www.spkx.net.cn>

SHEN Jinling, ZHAO Lina, HAN Wei, et al. Recent progress in the development and application of technologies for rapid detection of *Campylobacter*[J]. Food Science, 2018, 39(23): 313-320. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201823045. <http://www.spkx.net.cn>

弯曲菌 (*Campylobacter* spp.) 是导致人类食源性腹泻的主要病原菌之一, 其感染已成为全球范围内引起细菌性肠胃炎的主要病因。在欧美等发达国家该菌引起的食源性疾病病例数已超过沙门氏菌、单增李斯特菌和志贺菌<sup>[1-2]</sup>。弯曲菌常定居在野生动物、家禽、家畜及宠物的肠道内, 主要经粪-口途径传播, 人通过食用被污染的禽制品、水源和牛奶而感染。目前, 弯曲菌属已

被鉴定的有26个种 (<http://www.bacterio.net/-allnamesac.html>), 对人致病的种包括空肠弯曲菌 (*C. jejuni*)、结肠弯曲菌 (*C. coli*)、海鸥弯曲菌 (*C. lari*)、乌普萨拉弯曲菌 (*C. upsaliensis*)、胎儿弯曲菌 (*C. fetus*) 等。其中空肠弯曲菌和结肠弯曲菌引起大多数的人类疾病, 空肠弯曲菌引起超过90%人类疾病感染<sup>[3-4]</sup>, 除急性肠胃炎, 其感染还可并发严重的格林-巴利综合征, 可引起人

收稿日期: 2017-07-28

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目 (2016IK308); 江苏出入境检验检疫局青年基金项目 (2016KJ53)

第一作者简介: 申进玲 (1983—), 女, 工程师, 博士, 研究方向为食源性病原微生物检验。E-mail: jinling\_zhan19@163.com

\*通信作者简介: 蒋原 (1964—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为病原微生物检验。E-mail: jiangyuan@shciq.gov.cn

呼吸肌麻痹而导致死亡<sup>[5]</sup>。剩余大多数人类疾病由结肠弯曲菌引起。其余15种弯曲菌种也可从人类检测或分离出来<sup>[6]</sup>。

目前弯曲菌检测主要依赖传统的生化方法,根据选择性培养基生长特征、镜检和诸多生化指标来判别。但该方法繁琐费时(一般需要5 d),实验室培养条件比较苛刻,且不能区分生化反应特征很相似的弯曲菌各菌种。根据ISO 10272—2015方法和GB 4789.9—2014《食品安全国家标准 食品微生物学检验 空肠弯曲菌检验》方法,空肠弯曲菌是唯一能水解马尿酸盐的弯曲菌,并且是区分空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的唯一生化指标。但最近发现一些空肠弯曲菌在实验室培养条件下不能水解马尿酸盐,或水解马尿酸盐的能力很弱,从而导致结果的误判<sup>[7]</sup>。传统培养方法的另一个问题是不能检测“活的不可培养状态”的细菌,而弯曲菌在受到饥饿、压力或物理损伤状态下很容易进入此状态,而在条件适宜时又重新复活从而引起疾病<sup>[8]</sup>。

鉴于传统分离鉴定方法的弊端,近年来,多种弯曲菌快速检测技术发展迅速。本文就国内外弯曲菌快速检测技术的研究及应用现状与问题进行综述,以期为进一步提高食品中弯曲菌的检测效率和检出率提供参考。

## 1 弯曲菌快速检测技术

### 1.1 基于蛋白的检测方法

#### 1.1.1 基于免疫学的方法

免疫学技术的基本原理是抗原抗体反应,即抗原与抗体之间发生特异性结合。免疫学检测技术具有特异性较强、灵敏度较高、效率高、成本低、对操作人员要求低且不需要大型仪器等优点,因此目前应用最为广泛。

##### 1.1.1.1 乳胶凝集反应

乳胶凝集反应是根据抗原与抗体特异性结合的原理,采用吸附性好的大分子乳胶颗粒作为载体吸附可溶性抗原,当特异性抗体与之结合后,即产生凝集反应。目前美国农业部弯曲菌分离和鉴定方法USDA FSIS MLG 41.04中推荐的弯曲菌乳胶确认试剂盒PanBio-Campy (jcl)或F46 Microgen *Campylobacter*即采用此原理,被广泛应用于禽类淋洗液、环境海绵取样和生肉产品中弯曲菌的鉴定。

##### 1.1.1.2 酶联免疫法

酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法是一种固相免疫测定技术,是酶免疫测定技术中应用最为广泛的技术。其基本原理是将已知的抗原或抗体吸附在固相载体表面,并保持其免疫活性,检测时将待检样本和酶标抗原或抗体先后与固相载体表面吸附的抗体或抗原反应,再加入酶标抗体与免疫复合物结合,最后加入酶反应底物,根据底物被酶催化

产生的颜色、吸光度变化从而进行定性或定量分析。ELISA法具有特异性强、灵敏度高、快速简便、易于标准化等优点,已经被广泛应用于多种细菌的快速检测,包括对弯曲菌属<sup>[9]</sup>、空肠弯曲菌及其血清型O:23<sup>[10]</sup>、胎儿弯曲菌<sup>[11]</sup>、空肠弯曲菌和结肠弯曲菌<sup>[12]</sup>检测等。

#### 1.1.1.3 免疫传感器方法

生物传感器是对生物物质敏感并能将其浓度转换为电信号等进行检测的仪器。它是由固定化的生物敏感材料作识别元件(包括酶、抗原、抗体、微生物、细胞、组织、核酸等生物活性物质)、信号转换器(如氧电极、光敏管、场效应管、压电晶体等)及信号放大装置构成的分析工具或系统组成。待测物与识别元件发生作用后,所得产物(光、热等)通过信号转换器转变为可以输出的电信号、光信号等,从而达到分析检测的目的。免疫传感器是基于抗原抗体特异性识别功能而研制成的一类生物传感器。与传统免疫学检测方法相比,免疫传感器技术具有明显的优势,如时间更节约、成本更低、可现场实时检测、特异性强、灵敏度高,已经被广泛应用于食品安全检测中。不同的免疫传感器被应用于弯曲菌的检测,有些已经进行了多种基质测试。

Sista等利用亲和素-生物素化学原理,将空肠弯曲菌的多克隆兔抗体免疫球蛋白G固定于传感器表面,对空肠弯曲菌的检测范围可达 $10^2 \sim 10^9$  CFU/mL,且在磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)和牛奶中的反应无差异<sup>[13]</sup>。采用相同的设备,Wei Dong等在空肠弯曲菌纯培养物和鸡肉淋洗液中测试,虽然检出限均可达 $10^3$  CFU/mL,但由于鸡肉中背景菌群的干扰,其灵敏度受到一定的影响<sup>[14]</sup>。也有将空肠弯曲菌噬菌体NCTC 12673受体结合蛋白作为识别元件,对空肠弯曲菌的检出范围达 $10^2 \sim 10^9$  CFU/mL<sup>[15]</sup>。Sapsford等采用全内反射荧光法与夹心免疫分析相结合,可对缓冲液和多种复杂食品基质中的多种致病菌包括空肠弯曲菌和结肠弯曲菌进行检测。对空肠弯曲菌在缓冲液和酸奶、牛奶、火鸡香肠、火鸡火腿等多种食品基质中的检出限为 $10^2 \sim 10^3$  CFU/mL<sup>[16]</sup>。

运用电化学原理,Viswanathan等借助纳米晶来检测弯曲菌。将固定好弯曲菌抗体的电极暴露于接种过弯曲菌的牛奶之后,浸入抗体标记的PBS纳米晶溶液中,从而形成抗体-细菌-抗体的三明治结构。对弯曲菌的检测范围为 $(1 \times 10^3) \sim (5 \times 10^5)$  CFU/mL,最低检出限约 $4 \times 10^2$  CFU/mL<sup>[17]</sup>。Huang Jinlin等采用玻璃碳电极作为工作电极,开发出粪便中空肠弯曲菌检测的免疫传感器<sup>[18]</sup>,该传感器对空肠弯曲菌的线性检测范围为 $10^3 \sim 10^7$  CFU/mL,2个月之内性能保持稳定,4个月后电信号强度约降至87.8%,在病人粪便中的信号变化幅度为6%~7%。

Masdor等利用兔多克隆抗体和鼠单克隆抗体建立纳米金颗粒放大的夹心法,建立基于石英晶体微天平的空肠弯曲菌检测免疫传感器,该传感器对缓冲液中空肠弯曲菌的检出限为150 CFU/mL,与其他致病菌具有很低的交叉反应<sup>[19]</sup>。Wang Hong等建立基于量子点-荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)的荧光免疫测定方法,所建立的方法对禽肉中空肠弯曲菌的检出限为30~50 CFU/mL,检出时间在2 h以内<sup>[20]</sup>。

#### 1.1.1.4 其他基于免疫学的方法

Huang Hongsheng等开发了基于抗原抗体反应的点克隆杂交免疫分析方法,用于平板分离中对耐热弯曲菌的快速筛选和确认,对每一个点克隆可检出 $10^5$ 个细胞。与传统培养方法相比,该方法对鸡肉或蔬菜中耐热弯曲菌的检测准确度达100%<sup>[21]</sup>。液相芯片技术是在不同荧光编码的微球上进行抗体结合,与检测物反应后,再加入标记抗体,通过红、绿两束激光分别检测微球编码和报告荧光来达到定性和定量的目的,已经被广泛应用于食品中致病菌的检测。Charlarmroj等开发出同步检测鸡肉中3种致病菌(包括空肠弯曲菌、单增李斯特菌和沙门氏菌)的液相芯片方法,经48 h增菌后,对空肠弯曲菌的检出限为1 CFU<sup>[22]</sup>。

免疫方法虽然灵敏度比传统培养方法高,也存在一定的局限性,如特异性不强、易出现假阳性、对反应体系环境要求较高等<sup>[23]</sup>。如市售的弯曲菌免疫分析试剂盒,包括ProSpecT *Campylobacter* Microplate Assay、Premier CAMPY、ImmunoCard STAT! CAMPY等,它们虽是针对空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的共同抗原而检测,但与乌普萨拉弯曲菌有交叉反应<sup>[24]</sup>。

#### 1.1.2 基于质谱的方法

基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)是近年来发展起来的一种新型的用于微生物鉴定和分型的技术。其原理是用激光照射样品与基质形成的共结晶薄膜,基质从激光中吸收能量,样品解吸附,基质-样品之间发生电荷转移使得样品分子电离,电离的样品在电场作用下飞过真空飞行管,通过离子的质量与电荷之比( $m/z$ )与离子的飞行时间成正比来分析离子,并测得样品分子的分子质量。不同的细菌经过MALDI-TOF-MS检测可以形成特异性的指纹图谱,将待测菌的指纹图谱与已有的质谱图谱库比较,即可确定细菌种属。该方法具有灵敏度高、准确度高及分辨率高等特点,已在多种微生物包括弯曲菌的快速鉴定、分型中应用<sup>[25-27]</sup>。

在空肠弯曲菌中,编码基因上的非同义突变可导致空肠弯曲菌不同亚种之间的生物标记质谱发生改变,Fagerquist等证明生物标记质谱的改变可以用于区分空肠

弯曲菌空肠亚种和德莱亚种<sup>[28-29]</sup>。Zautner等找出位于不同等位基因亚型上的生物标记离子,可导致空肠弯曲菌空肠亚种MLST ST22和ST45质谱的变化<sup>[30]</sup>。近年来利用质谱技术检测弯曲菌耐药性的研究也较为热门。邹玉涵对9株不同来源的空肠弯曲菌进行MALDI-TOF-MS分型鉴定,发现耐药菌图谱与非耐药菌图谱相差不大,并没有明显的特征峰出现,MS图谱与耐药谱的相关性不高<sup>[25]</sup>。Penny等对172株不同来源的空肠弯曲菌菌株进行MALDI-TOF-MS检测,通过改善质谱处理参数从而提高了该方法对空肠弯曲菌菌株的分型能力,提高了对耐药株的检出率<sup>[26]</sup>。基于质谱的蛋白组系统树状图分析方法逐渐成为微生物新型分型方法,可对弯曲菌不同的生物特征标记如耐药性等进行鉴定<sup>[31]</sup>。

目前,法国生物梅里埃和英国布鲁克公司都已经开发了基于此方法的微生物鉴定仪,并累积了大量病原菌的相关谱库,而且此类方法标准GB/T 33682—2017《基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴别微生物方法通则》也将于2017年12月开始实施。

#### 1.2 基于核酸的检测方法

基于核酸的方法是对致病菌特异的一段DNA或RNA进行检测。主要包括聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)法、实时荧光定量PCR、环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification method, LAMP)、DNA微阵列等。

##### 1.2.1 PCR-凝胶电泳法

与传统培养方法相比,PCR方法快速简便。常用于PCR的靶基因有16S rRNA、23S rRNA、*mapA*、*ceuE*、*cdt*、*flaA*、*flaB*等。16S rRNA由于在所有弯曲菌中均存在,且片段较长,已经被广泛应用于弯曲菌的快速检测和鉴定中<sup>[32]</sup>。但是由于16S rRNA在各类弯曲菌中的同源性较高,因此难以将各种弯曲菌如空肠弯曲菌和结肠弯曲菌区分开。近年来,通过对16S rRNA、23S rRNA以及16S与23S rRNA之间的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)的序列比较分析得知,用于区分物种和菌株的最有用的序列为ITS区域<sup>[33]</sup>。Fontanot等采用一组引物针对ITS可变区域进行扩增,可用于快速筛选食品样品中空肠弯曲菌和结肠弯曲菌,由于该引物对此两种菌的扩增长度不同,因此可对其进行区分<sup>[34]</sup>。

何蕊等以16S rRNA、*mapA*和*ceuE*作为靶基因,建立空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的多重PCR检测方法,此两种菌都能扩增出各自特异性的条带,而其他弯曲菌不能扩增出任何条带<sup>[35]</sup>。Kamei等以*cdt*为目的基因建立了能同步检测6种致病性弯曲菌(*C. jejuni*、*C. fetus*、*C. coli*、*C. upsaliensis*、*C. hyointestinalis*和*C. lari*)的多重PCR,根据PCR产物大小对每种致病性弯曲菌进行区分<sup>[36]</sup>。Saiyudthong等设计特异性引物分别



对*C. jejuni*、*C. coli*和*C. lari*中的特异性基因随机序列、*asp*和*glyA*进行扩增,从而对这3种弯曲菌进行检测,对*C. jejuni*和*C. coli*的检测灵敏度达到0.017 ng/PCR, *C. lari*的检测灵敏度达到0.016 ng/PCR<sup>[37]</sup>。Cui Mingquan等以*hipO*、16S rRNA以及氟喹诺酮抗性基因*gryA*为目标基因,可对由*gryA*突变介导的氟喹诺酮抗性的空肠弯曲菌进行检测<sup>[38]</sup>。Huq等分别以16S rRNA、*hipO*、*asp*、*gyrB*为目标基因建立粪便中同步检测弯曲菌以及3种致病性弯曲菌(*C. concisus*、*C. jejuni*、*C. coli*)的三重PCR,灵敏度比传统方法有所提高<sup>[39]</sup>。Kamei等采用通用引物对以下弯曲菌*C. jejuni*、*C. coli*、*C. fetus*、*C. hyointestinalis*、*C. lari*、*C. helveticus*和*C. upsaliensis*共有基因*cdt*进行PCR扩增后进行限制片段长度多态性分析,从而实现对上述弯曲菌的检测分型<sup>[40]</sup>。

以上PCR-凝胶电泳方法无需昂贵的设备,适于在基层实验室推广应用。尤其是多重PCR不仅可以对弯曲菌进行检测,并且可以同时几种致病性弯曲菌加以区分,大幅节省了时间和成本。其缺点是需要后续的电泳过程,操作较为繁琐,耗时较长。

#### 1.2.2 PCR-非凝胶电泳法

近年来随着分子生物学的发展,一些替代电泳的方法也逐渐被应用于弯曲菌的快速检测中,在PCR结束后无需电泳,闭管操作,防止了交叉污染。

##### 1.2.2.1 实时荧光PCR法

实时荧光PCR技术是将传统的PCR扩增和检测相结合,在PCR体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定性定量分析的方法。根据荧光标记方法一般分为染料法和探针法。与传统的PCR相比,实时荧光PCR方法具有特异性更强、灵敏度更高、自动化程度高、有效解决PCR污染问题等优点,在21世纪初已广泛应用于各种领域,包括弯曲菌等食源性致病菌的快速检测中。Mayr等建立了*C. jejuni*、*C. coli*和*C. lari*多重实时荧光PCR检测方法,对*C. jejuni*和*C. lari*的灵敏度为50 fg,对*C. coli*的灵敏度为500 fg。增菌前对3种弯曲菌在食品中的检出限均可达到1~10 CFU/25 g。经过48 h增菌后,实时荧光PCR对400份食品中弯曲菌的检出率为55.4%,高于传统方法检出率(40.3%),且可在2 d内给出可靠结果<sup>[41]</sup>。Bui等建立了禽类粪便中空肠弯曲菌的反转录实时荧光PCR检测和计数方法,仅对有活力的空肠弯曲菌进行检测,与传统培养方法结果一致,而基于DNA的检测方法却不能区分死的和活的菌株<sup>[42]</sup>。Hao Haihong等针对*VSI*、23S rDNA和核糖体蛋白L4编码基因,建立了基于TaqMan MGB探针的同步检测空肠弯曲菌和大环内酯抗性位点突变的多重实时荧光PCR方法,与传统的生化鉴定方法和最小抑菌浓度(minimal inhibit concentration,

MIC)测定方法结果一致,方法的检出限为0.03 ng或3 CFU/PCR<sup>[43]</sup>。McGoldrick等建立了区分*C. fetus fetus*与*C. fetus venerealis*的SYBR实时荧光PCR方法,灵敏度分别达到100%和98.7%,特异性分别达到99.8%和99.6%<sup>[44]</sup>。Persson等以*gyrB*为目标基因,建立基于TaqMan的实时荧光PCR方法,并结合后续的焦磷酸测序技术,实现对粪便中*C. jejuni*、*C. coli*、*C. lari*、*C. upsaliensis*和*C. fetus*的快速检测<sup>[45]</sup>。

目前,已经有一些市售的实时荧光PCR的弯曲菌检测商品化试剂盒通过美国分析化学家协会(Association of Official Analytical Chemists, AOAC)认证,包括杜邦公司用于即食火鸡肉产品和鸡胴体洗液中弯曲菌的检测试剂盒(Dupont BAX real time PCR assay for *C. jejuni*, *C. coli* and *C. lari*),可同时对此3种弯曲菌进行鉴定,以及伯乐公司用于食品和环境中的弯曲菌检测试剂盒(iQ-check *Campylobacter* real time PCR)。我国目前尚未有申请AOAC认证的弯曲菌检测试剂盒。

##### 1.2.2.2 LAMP技术

LAMP是在等温条件下(60~65 ℃)短时间内(通常1 h内)对目标基因进行扩增,与常规PCR相比,无需模板的热变性、温度循环等过程,是一种全新的核酸扩增方法,其原理是针对靶基因上的6个区域设计4条引物,利用链置换型DNA聚合酶在恒温条件下进行扩增反应,15~60 min内可实现 $10^9 \sim 10^{10}$ 倍的扩增,可以通过肉眼观察白色沉淀的有无来判断靶基因是否存在。LAMP灵敏度高、特异性强、不需PCR仪、简单快速,已经被广泛应用于各种病原菌和转基因产品检测等领域。Yamazaki等建立了*C. jejuni*和*C. coli*的LAMP检测方法,两种菌在人粪便样品中的检测灵敏度分别为 $5.6 \times 10^3$  CFU/g和 $4.8 \times 10^3$  CFU/g。对90份粪便样品的检测结果显示,LAMP检测方法比涂布方法相比,灵敏度和特异性分别达到81.3%和96.6%<sup>[46]</sup>。Sabike等利用*C. jejuni*中的氧化还原酶基因和*C. coli*中的*gufA*基因,建立此两种菌的LAMP检测方法。与传统方法相比,在165个肉鸡样品中,LAMP方法的灵敏度为82.8%(48/58),特异性为100%(107/107);在55个羊群中,灵敏度为90.5%(19/21),特异性为100%(34/34);在28个农场的比较中,灵敏度和特异性均达到100%。所建立的方法从收到样品到获得结果仅需90 min,可应用于农场及屠宰前的空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的快速筛查,防止弯曲菌污染的传播<sup>[47]</sup>。Zang Xiaoqi等以空肠弯曲菌的*cjaA*基因为靶基因,建立空肠弯曲菌的LAMP检测方法,可应用于零售食品样品中空肠弯曲菌的快速筛查。在475个不同样品中,PCR和传统方法的检出率分别为14.9%和12.7%,均低于LAMP检出率(16.6%)。在对不同洁净度样品的检测中,零售食品中的检测特异性(95.5%)和

准确度(96.1%)均比粪便和环境样品中高。该LAMP方法应用于食品样品的检测,可在40 min内得到结果,可作为大量样品和现场样品中空肠弯曲菌快速筛选或补充方法<sup>[48]</sup>。Romero等针对弯曲菌16S rRNA设计引物,将LAMP技术和免疫磁珠分离技术结合起来,可从农场靴子棉签样品中直接进行LAMP反应,无需前增菌和DNA纯化过程,90 min内可获得结果,灵敏度可达到22 拷贝数,与传统方法相比,特异性达到100%,可应用于农场弯曲菌现场检测<sup>[49]</sup>。

#### 1.2.2.3 DNA微阵列技术

在一个测试中同时对多种致病菌进行检测非常重要,它不仅可以大幅降低成本,并且可以综合评价一个产品的微生物安全性。针对特异性DNA的微阵列满足以上要求,它不但可以对致病菌进行检测,而且可以对菌株的毒力特征或耐药特征进行测定。Suo Biao等以多种看家基因和毒力基因为目标基因,成功建立了同时检测生鲜肉样品中4种致病菌(包括单增李斯特菌、沙门氏菌、大肠杆菌O157:H7和空肠弯曲菌)的多重PCR-DNA微阵列方法<sup>[50]</sup>。

#### 1.2.2.4 其他PCR-非凝胶电泳法

Banowary等采用PCR与高分辨率熔解分析(high-resolution melting, HRM)相结合的方法,选用*hipO*和*asp*建立空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的双重PCR方法,仅通过PCR之后的熔解曲线分析,就能检测PCR片段的微小序列差异<sup>[51]</sup>。

PCR-ELISA方法采用ELISA方法代替电泳检测,由于ELISA的多级放大作用,其灵敏度大大提高。史艳宇等针对空肠弯曲菌16S rRNA设计特异性引物和探针,以探针5'端标记生物素,成功建立食品中空肠弯曲菌的PCR-ELISA检测方法,灵敏度比常规PCR提高10倍<sup>[52]</sup>。唐梦君等针对*gyrA*设计空肠弯曲菌特异性引物和探针,将生物素和地高辛分别标记于上游引物5'端和核酸探针3'端,建立的PCR-ELISA方法对空肠弯曲菌基因组DNA检出限为2 fg,对模拟泄殖腔样本的检出限为50 CFU/mL,对100份临床样品进行检测,PCR方法和PCR-ELISA方法检出率分别为60%和69%<sup>[53]</sup>。

#### 1.2.3 DNA生物传感器方法

DNA生物传感器是一种能将目标DNA的存在转变为可检测电信号的传感装置。Darbha等开发出一个基于纳米金FRET探针的DNA生物传感器,用于弯曲菌的筛选。纳米金表面被修饰后,浸入用于标记ssDNA的染料中,染料被吸附到纳米金后,荧光被100%淬灭,当DNA杂交发生后,由于dsDNA和ssDNA静电特性不同,构型改变因此导致荧光淬灭的降低。该方法对弯曲菌的线性检测范围为 $(8 \times 10^{-1}) \sim (7 \times 10^4)$  nmol/L DNA,但并未对弯曲菌的细胞数目进行测定比较<sup>[54]</sup>。

#### 1.3 其他方法

##### 1.3.1 细菌快速检测激光散射技术

细菌快速检测激光散射技术(bacterial rapid detection using optical scattering technology, BARDOT)是基于激光传感器的平板上菌落快速鉴定方法。它采用635 nm红色二极管激光(低能量)直接作用于菌落中心,产生圆形周围对称的散射图案,而不损伤细胞。前向光散射图像被一个电荷耦合的传感器自动捕捉。基于菌落的物理特性(大小、形状、折光率等)、细胞表面化学组成以及不同琼脂培养基之间的作用,不同细菌具有特定的菌落散射图案。光散射图案由特定的软件自动处理分析。细菌样品的分类取决于它们对数据库中散射图案的相似性。利用该方法进行细菌鉴定的优势是快速、自动化、高通量、对完整的菌落形态不造成损害。He Yiping等采用此原理,对6 909株细菌进行主成分分析,建立了空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的激光散射快速鉴定方法,结果显示弯曲菌与其他细菌相比,具有截然不同的光散射图案,对不同细菌混合物的检测结果显示对弯曲菌与其他细菌的区分准确率达85%。与实时荧光PCR验证结合,该传感器能够对零售鸡肉中的弯曲菌进行鉴定<sup>[55]</sup>。

##### 1.3.2 基于凝集素分型的生物传感器方法

凝集素是在植物或动物中存在的蛋白质或糖蛋白,非免疫起源。它们与一些不同类别的碳水化合物特异性地结合,且结合特性比基于抗体的更为稳定。基于凝集素分型的生物传感器已经被应用于空肠弯曲菌的检测中。将凝集素固定于石英晶体的金表面上,当细菌与传感器表面结合,由于细菌增加而引起的共振频率和耗散反应被记录下来。根据不同空肠弯曲菌菌株之间的耗散反应的巨大变化,可以不经前处理从而成功对每株菌分型。Yakovleva等采用凝集素分型方法,成功实现对7类不同的空肠弯曲菌进行生物特性研究<sup>[56]</sup>。

## 2 结 语

以上各种弯曲菌快速检测方法与传统方法相比,具有很大的优势,但各有利弊。基于免疫方法的特异性和灵敏度取决于特异抗体对抗原的结合强度,在无干扰因子如其他非目标菌、蛋白质等的基质中效果较好。基于MS的方法虽然快速可靠,但主要应用于对纯菌株的鉴定分型,要达到直接从样品中分析弯曲菌菌种的目的,则需要调整实验策略,建立一系列适合弯曲菌的重现性好的分析方法。PCR方法虽然具有灵敏度高、准确度高、快速简便等优势,但对操作人员的要求较高,也需特定的较为昂贵的仪器,使其在实际应用中受限。新兴的LAMP方法无需特殊的仪器,适宜于基层实验室的推广应用。DNA或蛋白质微阵列可以同步检测多个样品中的多种致病菌及其生物特征,从成本上具有一定的优势,



但这些方法仍需有效的样品前处理步骤。基于生物传感器的方法自动化程度高,对操作人员的要求不高,可实现对样品的现场实时无损检测,但在食品基质中的检测效果仍需提高。

样品制备无论对于弯曲菌传统检测还是快速检测方法都是至关重要的,尤其是对于快速检测方法来说是一个瓶颈。今后需要加强样品中弯曲菌富集方法,如核酸适配体富集弯曲菌技术的研究,从而使后续快速检测方法更有效;也可采用预富集技术,如采用较低的成本成倍提高单位体积的致病菌数量,如过滤、大小分级、离心、免疫磁珠分离技术等。快检技术的另一个瓶颈是不同样品基质对核酸制备、免疫识别等快检步骤的影响不同,应研发针对不同食品基质的核酸和蛋白提取方法,针对不同基质类型优化后续检测参数,建立适用于不同基质的检测方法。

应加强不同检测方法之间的组合研究,开发出检测范围更宽泛、准确度更高的技术。抗体经过修饰后与特殊的弯曲菌菌株结合后可采用核酸的方法进行检测,核酸扩增后的产物也可用免疫的方法进行检测。核酸技术和免疫技术的结合可对多种致病菌同时进行定量检测。免疫方法结合后续的生物传感器可对多种致病菌同步检测。将多种方法结合起来,有望实现弯曲菌的快速、准确、高效、低成本、高通量检测。

另外,可采用宏基因组学技术,作为基于基因组的弯曲菌定量风险评估或流行病学研究的工具。宏基因组学方法应集检测和鉴定为一体,对样品中总DNA进行操作。由于高通量测序的成本越来越低,该技术在未来弯曲菌中的应用前景极好,对于每天有大量样品的实验室非常实用。

综上所述,随着分子生物学技术和免疫学技术的不断发展,越来越多的新方法被应用于弯曲菌的快速检测中,从而为临床诊断和食品安全控制提供更多便利。现有弯曲菌快速检测方法各有利弊,建立一个更快速简便、更稳定可靠、更高效准确、更低成本的弯曲菌检测技术是保证公共卫生和食品安全的迫切需求。可以预见,多种检测技术的有机结合和优势互补有望解决上述需求。

#### 参考文献:

- [1] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Preliminary food net data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food:10 states, 2006[J]. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2007, 56(14): 336-339.
- [2] EFSA and ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014[J]. EFSA Journal, 2015, 13(12): 313-320. DOI:10.2903/j.efsa.2015.4329.
- [3] GILLESPIE I A, O'BRIEN S J, FROST J A, et al. A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses[J]. Emerging Infectious Diseases, 2002, 8(9): 937-942. DOI:10.3201/eid0809.010187.
- [4] FITZGERALD C. *Campylobacter*[J]. Clinics in Laboratory Medicine, 2015, 35(2): 289-298. DOI:10.1016/j.cll.2015.03.001.
- [5] NACHAMKIN I, ALLOS B M, HO T. *Campylobacter species* and Guillain-Barre syndrome[J]. Clinical Microbiology Reviews, 1998, 11(3): 555-567.
- [6] MAN S M. The clinical importance of emerging *Campylobacter species*[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2011, 8(12): 669-685. DOI:10.1038/nrgastro.2011.191.
- [7] CANER V, COKAL Y, CETIN C, et al. The detection of *hipO* gene by real-time PCR in thermophilic *Campylobacter* spp. with very weak and negative reaction of hippurate hydrolysis[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2008, 94(4): 527-532. DOI:10.1007/s10482-008-9269-4.
- [8] SILVA J, LEITE D, FERNANDES M, et al. *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review[J]. Frontiers in Microbiology, 2011, 2: 1-12. DOI:10.3389/fmicb.2011.00200.
- [9] ANG C W, KROGFELT K, HERBRINK P, et al. Validation of an ELISA for the diagnosis of recent *Campylobacter* infections in Guillain-Barre and reactive arthritis patients[J]. Clinical Microbiology & Infection, 2007, 13(9): 915-922. DOI:10.1111/j.1469-0691.2007.01765.x.
- [10] HOCHER I, VIOCHNA D, SKVOR J, et al. Development of an indirect competitive ELISA for detection of *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* O:23 in foods[J]. Folia Microbiol (Praha), 2004, 49(5): 579-586. DOI:10.1007/BF02931537.
- [11] HUM S, STEPHENS L R, QUINN C. Diagnosis by ELISA of bovine abortion due to *Campylobacter fetus*[J]. Australian Veterinary Journal, 1991, 68(8): 272-275. DOI:10.1111/j.1751-0813.1991.tb03240.x.
- [12] MONFORT J D, BECH-NIELSEN S, STILLIS H F. Detection of flagellar antigen of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in canine faeces with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): new prospects for diagnosis[J]. Veterinary Research Communications, 1994, 18(2): 85-92. DOI:10.1007/BF01839224.
- [13] SISTA S, WEI D, OYARZABAL O, et al. Sensitive surface plasmon resonance biosensor for the near-real time detection of *Campylobacter jejuni*[C]//207<sup>th</sup> ECS Meeting Symposium. Quebec: The Electrochemical Society, 2005: 1468-1468.
- [14] WEI Dong, OYARZABAL O A, HUANG T S, et al. Development of a surface plasmon resonance biosensor for the identification of *Campylobacter jejuni*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2007, 69(1): 78-85. DOI:10.1016/j.mimet.2006.12.002.
- [15] SINGH A, ARUTYUNOV D, MCDERMOTT M T, et al. Specific detection of *Campylobacter jejuni* using the bacteriophage NCTC 12673 receptor binding protein as a probe[J]. Analyst, 2011, 136(22): 4780-4786. DOI:10.1039/c1an15547d.
- [16] SAPSFORD K E, NGUNDI M M, MOORE M H, et al. Rapid detection of foodborne contaminants using an array biosensor[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2006, 113(2): 599-607. DOI:10.1016/j.snb.2005.07.008.
- [17] VISWANATHAN S, RANI C, HO J A. Electrochemical immunosensor for multiplexed detection of food-borne pathogens using nanocrystal bioconjugates and MWCNT screen-printed electrode[J]. Talanta, 2012, 94: 315-319. DOI:10.1016/j.talanta.2012.03.049.
- [18] HUANG Jinlin, YANG Gongjun, MENG Wenjing, et al. An electrochemical impedimetric immunosensor for label-free detection of *Campylobacter jejuni* in diarrhea patients' stool based on O-carboxymethylchitosan surface modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles[J].

- Biosensors and Bioelectronics, 2010, 25(5): 1204-1211. DOI:10.1016/j.bios.2009.10.036.
- [19] MASDOR N A, ALTINTAS Z, TOTHILL I E. Sensitive detection of *Campylobacter jejuni* using nanoparticles enhanced QCM sensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2016, 78: 328-336. DOI:10.1016/j.bios.2015.11.033.
- [20] WANG Hong, LI Yanbin, SLAVIK M. Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in poultry products using quantum dots and nanobeads based fluorescent immunoassay[J]. International Journal of Poultry Science, 2014, 13: 253-259.
- [21] HUANG Hongsheng, PHIPPS-TODD B, MCMAHON T, et al. Development of a monoclonal antibody-based colony blot immunoassay for detection of thermotolerant *Campylobacter* species[J]. Journal of Microbiological Methods, 2016, 130: 76-82. DOI:10.1016/j.mimet.2016.08.015.
- [22] CHARLERMROJ R, MAKORNWATTANA M, GRANT I R, et al. Validation of a high-throughput immunobead array technique for multiplex detection of three foodborne pathogens in chicken products[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 224: 47-54. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.02.017.
- [23] GILTNER C L, SAEKI S, BOBENCHIK A M, et al. Rapid detection of *Campylobacter* antigen by enzyme immunoassay leads to increased positivity rates[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2012, 51(2): 618-620. DOI:10.1128/JCM.02565-12.
- [24] COUTURIER B A, COUTURIER M R, KALP K J, et al. Detection of non-*jejuni* and-*coli* *Campylobacter* species from stool specimens with an immunochromatographic antigen detection assay[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(6): 1935-1937. DOI:10.1128/JCM.03208-12.
- [25] 邹玉涵. 弯曲菌耐药性与耐药基因检测分析及其基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱的分型研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2010: 53-60.
- [26] PENNY C, GROTHENDICK B, ZHANG L, et al. A designed experiments approach to optimizing MALDI-TOF MS spectrum processing parameters enhances detection of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni*[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1-9. DOI:10.3389/fmicb.2016.00818.
- [27] RANDALL L P, LEMMA F, KOYLASS M, et al. Evaluation of MALDI-TOF as a method for the identification of bacteria in the veterinary diagnostic laboratory[J]. Research in Veterinary Science, 2015, 101: 42-49. DOI:10.1016/j.rvsc.2015.05.018.
- [28] FAGERQUIST C K, BATES A H, HEATH S, et al. Sub-speciating *Campylobacter jejuni* by proteomic analysis of its protein biomarkers and their post-translational modifications[J]. Journal of Proteome Research, 2006, 5(10): 2527-2538. DOI:10.1021/pr050485w.
- [29] FAGERQUIST C K, MILLER W G, HARDEN L A, et al. Genomic and proteomic identification of a DNA-binding protein used in the "fingerprinting" of *Campylobacter* species and strains by MALDI-TOF-MS protein biomarker analysis[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77(15): 4897-4907. DOI:10.1021/ac040193z.
- [30] ZAUTNER A E, MASANTA W O, TAREEN A M, et al. Discrimination of multilocus sequence typing-based *Campylobacter jejuni* subgroups by MALDI-TOF mass spectrometry[J]. BMC Microbiol, 2013, 13: 1-8. DOI:10.1186/1471-2180-13-247.
- [31] ZAUTNER A E, MASANTA W O, WEIG M, et al. Mass spectrometry-based phyloproteomics (MSPP): a novel microbial typing method[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 13431. DOI:10.1038/srep13431.
- [32] KULKARNI S P, LEVER S, LOGAN J M, et al. Detection of *campylobacter* species: a comparison of culture and polymerase chain reaction based methods[J]. Journal of Clinical Pathology, 2002, 55(10): 749-753.
- [33] MAN S M, KAAKOUSH N O, OCTAVIA S, et al. The internal transcribed spacer region, a new tool for use in species differentiation and delineation of systematic relationships within the *Campylobacter* genus[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2010, 76(10): 3071-3081. DOI:10.1128/AEM.02551-09.
- [34] FONTANOT M, IACUMIN L, CECCHINI F, et al. Rapid detection and differentiation of important *Campylobacter* spp. in poultry samples by dot blot and PCR[J]. Food Microbiology, 2014, 43: 28-34. DOI:10.1016/j.fm.2014.05.001.
- [35] 何蕊, 黄金林, 许海燕, 等. 弯曲菌多重PCR检测方法的建立及其初步应用[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2007, 28(1): 5-8.
- [36] KAMEI K, KAWABATA H, ASAKURA M, et al. A cytolethal distending toxin gene-based multiplex PCR assay for *Campylobacter jejuni*, *C. fetus*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, and *C. lari*[J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2016, 69(3): 256-258. DOI:10.7883/yoken.JJID.2015.182.
- [37] SAIYUDTHONG S, PHUSRI K, BUATES S. Rapid detection of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* in fresh chicken meat and by-products in Bangkok, Thailand, using modified multiplex PCR[J]. Journal of Food Protection, 2015, 78(7): 1363-1369. DOI:10.4315/0362-028X.JFP-14-415.
- [38] CUI Mingquan, WU Chenbin, ZHANG Peng, et al. Development of multiplex-mismatch amplification mutation-PCR assay for simultaneous detection of *Campylobacter jejuni* and mutation in *gyrA* gene related to fluoroquinolone resistance[J]. Foodborne Pathogens & Disease, 2016, 13(11): 642-645. DOI:10.1089/fpd.2016.2169.
- [39] HUQ M, GONIS G, ISTIVAN T. Development and evaluation of a multiplex PCR for the detection of *Campylobacter concisus* and other *Campylobacter* spp. from gastroenteritis cases[J]. Open Journal of Medical Microbiology, 2014, 4(1): 29-37.
- [40] KAMEI K, ASAKURA M, SOMROOP S, et al. A PCR-RFLP assay for the detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. helveticus* and *C. upsaliensis*[J]. Journal of Medical Microbiology, 2014, 63(5): 659-666. DOI:10.1099/jmm.0.071498-0.
- [41] MAYR A M, LICK S, BAUER J, et al. Rapid detection and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Campylobacter lari* in food, using multiplex real-time PCR[J]. Journal of Food Protection, 2010, 73(2): 241-250. DOI:10.4315/0362-028X-73.2.241.
- [42] BUI X T, WOLFF A, MADSEN M, et al. Reverse transcriptase real-time PCR for detection and quantification of viable *Campylobacter jejuni* directly from poultry faecal samples[J]. Research in Microbiology, 2012, 163(1): 64-72. DOI:10.1016/j.resmic.2011.10.007.
- [43] HAO Haihong, LIU Jie, KUANG Xiuhua, et al. Identification of *Campylobacter jejuni* and determination of point mutations associated with macrolide resistance using a multiplex *TaqMan* MGB real-time PCR[J]. Journal of Applied Microbiology, 2015, 118(6): 1418-1425. DOI:10.1111/jam.12793.
- [44] MCGOLDRICK A, CHANTER J, GALE S, et al. Real Time PCR to detect and differentiate *Campylobacter fetus* subspecies *fetus* and *Campylobacter fetus* subspecies *venerealis*[J]. Journal of Microbiol Methods, 2013, 94(3): 199-204. DOI:10.1016/j.mimet.2013.06.014.
- [45] PERSSON S, PETERSEN H M, JESPERSGAARD C, et al. Real-time *TaqMan* polymerase chain reaction-based genus-identification and pyrosequencing-based species identification of *Campylobacter*

- jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* directly on stool samples[J]. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2012, 74(1): 6-10. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.029.
- [46] YAMAZAKI W, TAGUCHI M, ISHIBASHI M, et al. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and simple detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*[J]. Journal of Medical Microbiology, 2008, 57(4): 444-451. DOI:10.1099/jmm.0.47688-0.
- [47] SABIKE I I, UEMURA R, KIRINO Y, et al. Use of direct LAMP screening of broiler fecal samples for *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in the positive flock identification strategy[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1-5. DOI:10.3389/fmicb.2016.01582.
- [48] ZANG Xiaoqi, TANG Haiyan, JIAO Xin'an, et al. Can a visual loop-mediated isothermal amplification assay stand out in different detection methods when monitoring *Campylobacter jejuni* from diverse sources of samples?[J]. Food Control, 2017, 75: 220-227. DOI:10.1016/j.foodcont.2016.12.010.
- [49] ROMERO M R, D'AGOSTINO M, ARIAS A P, et al. An immunomagnetic separation/loop-mediated isothermal amplification method for rapid direct detection of thermotolerant *Campylobacter* spp. during poultry production[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(2): 469-477. DOI:10.1111/jam.13008.
- [50] SUO Biao, HE Yiping, PAOLI G, et al. Development of an oligonucleotide-based microarray to detect multiple foodborne pathogens[J]. Molecular and Cellular Probes, 2010, 24(2): 77-86. DOI:10.1016/j.mcp.2009.10.005.
- [51] BANOWARY B, DANG V T, SARKER S, et al. Differentiation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* using multiplex-PCR and high resolution melt curve analysis[J]. PLoS ONE, 2015, 10(9): e0138808. DOI:10.1371/journal.pone.0138808.
- [52] 史艳宇, 刘金华, 薛力刚, 等. PCR-ELISA法检测食品中空肠弯曲菌[J]. 食品科学, 2013, 34(10): 246-249. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201310054.
- [53] 唐梦君, 周生, 张小燕, 等. 空肠弯曲菌PCR-ELISA方法的建立[J]. 吉林农业大学学报, 2013, 35(3): 340-345.
- [54] DARBHA G K, LEE E, ANDERSON Y R, et al. Miniaturized sensor for microbial pathogens DNA and chemical toxins[J]. IEEE Sensors Journal, 2008, 8(6): 693-700. DOI:10.1109/JSEN.2008.922727.
- [55] HE Yiping, REED S, BHUNIA A K, et al. Rapid identification and classification of *Campylobacter* spp. using laser optical scattering technology[J]. Food Microbiology, 2015, 47: 28-35. DOI:10.1016/j.fm.2014.11.004.
- [56] YAKOVLEVA M E, MORAN A P, SAFINA G R, et al. Lectin typing of *Campylobacter jejuni* using a novel quartz crystal microbalance technique[J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 694(1): 1-5. DOI:10.1016/j.aca.2011.03.014.