

食品检测用副溶血性弧菌标准物质的制备和评价

刘娜, 赵琳娜, 王学硕, 崔生辉*

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: 该研究制备并检测了不含基质的副溶血性弧菌标准物质。用质谱、生化、16S RNA 基因序列测定 3 种方法对菌株 CMCC20030 分别确认种属。先采用冷冻干燥技术制备 800 个样品[10^3 CFU/样品(20 μ L)]。然后随机抽取 20 个样品进行均匀性检验; 再将样品存放 25、37 $^{\circ}$ C 分别在 1、3、5、7 d 取出进行运输稳定性检验, 将样品存放 4 $^{\circ}$ C 分别于 7、14、28 d 进行短期保藏性检验, 将样品存放 -20 $^{\circ}$ C 分别于 14、28、60 d 的保藏稳定性检验。组织 5 家实验室对样品进行协同标定。最后用食品基质检测使用效果。菌株 CMCC20030 经 3 种方法均鉴定为副溶血性弧菌。均匀性检验中, $F_{\text{样品}}=1.930$, 小于 $F_{\text{INV}}(0.05, 19, 20)$ 。稳定性检验中, 于 -20 $^{\circ}$ C 保藏 60 d、4 $^{\circ}$ C 保存 28 d、25 $^{\circ}$ C 保藏 7 d 和 37 $^{\circ}$ C 保藏 3 d 后, 活菌含量 10^3 CFU/样品。协同标定实验中, 5 家实验室结果均为 10^3 CFU/样品。使用效果实验中, 20 种食品基质加入样品后均可以检出, 本底对照均未检出。制备的不含基质的副溶血性弧菌样品满足标准物质要求, 可依据不同目的灵活使用。

关键词: 微生物标准物质; 副溶血性弧菌; 制备; 检测

文章篇号: 1673-9078(2021)11-348-353

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.11.0257

Preparation and Testing of *Vibrio parahaemolyticus* Reference Materials for Food Analysis

LIU Na, ZHAO Linna, WANG Xueshuo, CUI Shenghui*

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract: In this study, *Vibrio parahaemolyticus* reference materials without matrix were prepared and detected. The standard strain CMCC20030 was identified by MALDI-TOF MS, biochemical reaction and 16S RNA gene sequencing. The *Vibrio parahaemolyticus* samples (800) with 10^3 CFU/sample (20 μ L) were prepared by freeze-drying technology. 20 samples were selected randomly for uniformity test. The samples were stored at 25 $^{\circ}$ C and 37 $^{\circ}$ C for 1, 3, 5 and 7 days respectively for transportation stability test, stored at 4 $^{\circ}$ C for 7, 14 and 28 days respectively for short-term preservation stability test, and stored at -20 $^{\circ}$ C for 14, 28 and 60 days respectively for preservation stability test. Five laboratories were organized for collaborative calibration. 20 food products were chosen as the substrate, the applicability was tested according to GB4789.7-2013. The strain CMCC20030 was identified as *Vibrio parahaemolyticus* by MALDI-TOF MS, biochemical reaction and 16s RNA gene sequencing. The uniformity result was $F_{\text{sample}}=1.930 < F_{\text{INV}}(0.05, 19, 20)$ by one-way anova. The samples were still 10^3 CFU/sample when storing 60 d at -20 $^{\circ}$ C, 28 d at 4 $^{\circ}$ C, 3 d at 37 $^{\circ}$ C and 7 d at 25 $^{\circ}$ C. All the results of 5 laboratories were 10^3 CFU/sample. All 20 samples presented *Vibrio parahaemolyticus* positively when adding any substrate, only 20 substrates presented negatively. The *Vibrio parahaemolyticus* sample without matrix meets relevant standards of uniformity, stability, collaborative calibration and applicability, can be applied to different study as reference material according to different purposes.

Key words: microbial reference material; *Vibrio parahaemolyticus*; preparation; testing

引文格式:

刘娜,赵琳娜,王学硕,等.食品检测用副溶血性弧菌标准物质的制备和评价[J].现代食品科技,2021,37(11):348-353

LIU Na, ZHAO Linna, WANG Xueshuo, et al. Preparation and testing of *Vibrio parahaemolyticus* reference materials for food analysis [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(11): 348-353

收稿日期: 2021-03-11

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFC1604303)

作者简介: 刘娜 (1988-), 女, 助理研究员, 研究方向: 食品安全检测, E-mail: xinyiliuna@163.com

通讯作者: 崔生辉 (1972-), 男, 研究员, 研究方向: 食品安全检测, E-mail: cuishenghui@aliyun.com

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是一种嗜盐细菌^[1], 主要污染海产品, 如贝类、海鱼、海虾等均是常见的被污染物, 甚至高盐腌制的食品如咸菜、腌肉等也能分离出副溶血性弧菌。海鲜盛产的夏秋季节, 是由于食用被副溶血性弧菌污染食物而引起的食物中毒事件^[2-4]的高发时段。随着人民生活水平的提高以及渔业的发展, 现在人们四季均可以食用到各色海鲜, 而由副溶血性弧菌导致的食物中毒事件也在国内外多地逐年发生^[5-9], 水产食品的安全问题引起各国高度重视。

副溶血性弧菌检验是保证水产食品安全中的关键环节^[10]。我国目前副溶血性弧菌检验依照 GB 4789.9-2016 进行检验, 整个检验流程一般需要 5~7 个工作日; 且在检验过程中有很多因素会干扰检验结果, 如人员操作、培养基质量、检验环境等, 排除外在干扰条件确保准确是立足之本, 进一步提高时效性则是保证纷繁多样水产食品安全的重要措施。近年来, 耐药菌株的出现^[11,12]更对副溶血性弧菌检验的准确性和时效性更是提出了更高的要求^[13-19]。而即用型副溶血性弧菌标准物质既能排除干扰保证结果, 又能省去培养阳性对照菌株时间从而保证时效性。

我国在即用型微生物标准物质研究方面起步较晚^[20], 关于副溶血性弧菌的标准物质, 目前只有福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心研究含有鱼肉基质副溶血性弧菌标准物质^[21]的报道, 而不含基质的标准物质目前还没有相关报道, 且国外目前尚无副溶血性弧菌的标准物质的相关报道。本研究制备的副溶血性弧菌标准物质不含基质, 可以依据不同目的添加不同基质或直接使用, 灵活性更高。弥补了我国在副溶血性弧菌标准物质方面的不足。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, *V. parahaemolyticus*) CMCC20030 来源于中国医学细菌保藏管理中心 (China Medical Bacterial Species Conservation and Management Center, CMCC)。

1.1.2 试剂与仪器

3%氯化钠碱性蛋白胨水、TCBS 培养基为北京陆桥公司产品; 胰蛋白胨大豆琼脂 (tryptose soya agar, TSA) 为美国 BD 公司产品; 生理盐水、氯化钠、L 型细胞涂布棒 (L 棒) 为国药集团产品; 西林瓶 (2 mL) 为肖特药品包装 (浙江) 有限公司。Thermo1389 生物

安全柜为美国 Thermo 公司产品; Thermo 205050GC 恒温培养箱为美国 Thermo 公司产品; VITEK COMPACT 2 全自动微生物分析系统为产品法国梅里埃公司; 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) 为德国 Bruker 公司产品; LABCONCO FreeZone12L 冷冻干燥机为德国 LABCONCO 公司产品; FORMA 恒温摇床、HYC-940 螺旋涂布仪为西班牙 IUL 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株确认

用 10 μm 接种环, 取冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存液 (50% 甘油配制的 BHI 液体培养基) 的 CMCC20030 菌株一环, 分区划线于 3%氯化钠 TSA 平板, 置 36 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h。挑取单菌落分区划线于 3%氯化钠 TSA 平板, 置 36 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h。分别采用质谱 (MALDI-TOF MS)、生化方法 (VITEK COMPACT 2 全自动微生物分析系统)、基因序列 (16S RNA) 测定 3 种方法对 CMCC20030 菌株进行种属确认。

1.2.2 副溶血性弧菌样品的制备

用高压灭菌后的棉签收集 CMCC20030 新鲜培养物于冻干保护剂中, 涡旋震荡确保菌液均匀, 以 20 μL /样品进行速冻, 于冷冻干燥机中进行冷冻干燥, 制备样品。

用 1 mL 生理盐水稀释冻干前菌液 20 μL , 通过螺旋涂布仪的 E50 模式涂布于 3%氯化钠 TSA 平板, 置 36 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h 后, 计数活菌数目作为冻干前样品 CFU 数目。用 1 mL 生理盐水溶解样品, 并依照上述方法涂布、培养, 统计菌落数作为冻干后样品 CFU 数目。冻干前样品 CFU 数目/冻干后样品 CFU 数目为冻干存活率。依照冻干存活率调制菌液, 最终制备成 10^3 CFU/样品的副溶血性弧菌菌球 800 个, 将每个样品分别放入 2 mL 的西林瓶中, 并用冷冻干燥机真空压盖, 待用。

1.2.3 副溶血性弧菌样品的均匀性检验

随机抽取副溶血性弧菌样品 20 个, 依照检测冻干后样品 CFU 数目的方法, 设置 2 个平行, 统计样品 CFU 数目。通过单因素方差分析方法分析本次研制的副溶血性弧菌样品的均匀性。

1.2.4 副溶血性弧菌样品的稳定性检验

将副溶血性弧菌样品放置于 25、37 $^{\circ}\text{C}$ 环境中, 分别于 1、3、5、7 d 抽取 3 个样品, 依照均匀性检验方法统计样品 CFU 数目, 并以均匀性检验样品的均数为基数计算存活率, 对运输稳定性进行评价。

将副溶血性弧菌样品放置于 4 °C、-20 °C 冰箱中，其中 4 °C 保存的样品分别于 0、7、14、28 d 各抽取 3 个，-20 °C 保存的样品分别于 14、28、60 d 各抽取 3 个，分别依照均匀性检验方法统计 CFU 数目，并以均匀性检验样品的均数为基数计算存活率，对保藏稳定性进行评价。

1.2.5 协作标定

向 5 家实验室分别发放随机抽取的 10 个样品，并提供作业指导书。作业指导书提供方法如下：将每个样品溶解于 1 mL 生理盐水中，使用涡旋振荡器充分混匀作为原液，取 100 μL 原液与 900 μL 生理盐水混匀，制成 1:10 稀释液，分别取上述两种浓度的稀释液 100 μL，并用 L 棒或全自动螺旋涂布仪涂布于 3%氯化钠 TSA 平板，设置 2 个平行，将平板置 36 °C 培养 18~24 h 后，统计样品 CFU 数目，并对菌落进行生化鉴定。

1.2.6 副溶血性弧菌菌球食品基质验证

表 1 食品基质信息表

Table 1 Food matrices information

编号	名称及验证结果
1	甘竹鲮鱼罐头 (+)
2	甘竹凤尾鱼罐头 (+)
3	古龙豆豉沙丁鱼罐头 (+)
4	北戴河油浸金枪鱼罐头 (+)
5	鹰金钱美味豆豉鱼罐头 (+)
6	福泽海蜇头 (+)
7	甘竹黄花鱼罐头 (+)
8	嘉瑞裙带菜 (+)
9	劲仔小鱼 (+)
10	波力海苔 (+)
11	波力海苔 (+)
12	深水湾胡萝卜味深海三文鱼棒 (+)
13	深水湾玉米味深海鳕鱼棒 (+)
14	深水湾金枪鱼棒 (+)
15	上好佳鲜虾片 (+)
16	上好佳鲜虾条 (+)
17	嘉瑞淡干海带丝 (+)
18	嘉瑞淡干海木耳 (+)
19	一品爽烤紫菜 (+)
20	金锣鱼肉香肠 (+)

注：“+”代表食品基质通过添加副溶血性弧菌菌球溶液检出副溶血弧菌，“-”代表食品基质通过添加副溶血性弧菌菌球溶液未检出副溶血弧菌。

根据 GB 29921-2013《食品安全国家标准食品中致病菌限量》选择水产制品作为食品基质（详见表 1），称取每种基质 2 份（25 g/份），1 份作为验证基质，1

份作为本底对照。随机取 3 个样品用 3 mL 生理盐水溶解作为待验证菌液，取 100 μL 至各个验证基质作为试验组，另取 100 μL 生理盐水至本底作为对照组，随后依照 GB 4789.7-2013《食品安全国家标准食品微生物学检验副溶血性弧菌检验》进行检验。

1.2.7 数据处理

各个检测项目的数据均经 SPSS (Statistical Product and Service Solutions) 处理。

2 结果与讨论

2.1 菌株种属确认

菌株 CMCC20030 种属结果确认如下：MALDI-TOF MS 鉴定为 *V. parahaemolyticus* (分值为 2.302)，VITEK COMPACT 2 全自动微生物分析系统鉴定为 *V. parahaemolyticus* (99% Probability)，16S RNA 基因序列经 NCBI 分析为 *V. parahaemolyticus* (100% Percent Identity)。

2.2 副溶血性弧菌冻干样品的制备

本研究制备副溶血性弧菌冻干样品 800 个。在研制过程中发现，副溶血性弧菌冻干后存活率较低 (0.8‰)，这可能也是限制我国副溶血性弧菌标准物质发展的限制因素之一。本研究通过提高副溶血性弧菌母液的浓度以及优化冻干条件，如选择液氮快速塑形（样品为白色球状）、真空冻干以及真空压盖，已经形成了稳定的研制方法：制备高浓度 (10⁶ CFU/mL) 副溶血弧菌母液浓度，在液氮中快速塑形成球 (20 μL/球)、真空冻干 16 h、真空压盖、-20 °C 保存样品。

2.3 副溶血性弧菌冻干样品的均匀性检验

表 2 副溶血性弧菌样品均匀性计数结果

Table 2 Results of uniform count of *V. parahaemolyticus* samples (10³ CFU/sample)

序号	平行 1	平行 2	序号	平行 1	平行 2
1	2.13	2.36	11	2.46	2.22
2	2.20	2.07	12	2.48	2.20
3	2.46	2.46	13	2.36	2.16
4	2.39	2.12	14	2.50	2.26
5	2.26	2.50	15	2.20	2.02
6	2.42	2.26	16	2.40	2.10
7	2.40	2.36	17	2.14	1.94
8	2.35	2.40	18	2.46	2.43
9	2.08	1.82	19	2.35	2.63
10	2.25	2.35	20	2.34	2.16

表3 副溶血性弧菌样品运输稳定性计数结果

Table 3 Counting results of transport stability of *V. parahaemolyticus* samples (10^3 CFU/sample)

时间/d	37 °C		25 °C	
	10^3 CFU/样品	存活率/%	10^3 CFU/样品	存活率/%
0	2.29	/	2.29	/
1	2.21	96.81	2.30	100.60
3	1.49	65.31	1.87	81.65
5	0	0	1.96	85.73
7	/	/	1.32	57.74

表4 副溶血性弧菌样品储藏稳定性试验结果

Table 4 Counting results of preservation stability of *V. parahaemolyticus* samples (10^3 CFU/sample)

时间/d	-20 °C		4 °C	
	10^3 CFU/样品	存活率/%	10^3 CFU/样品	存活率/%
0	2.29	/	2.29	/
7	2.22	96.94	2.33	102.06
14	2.33	102.06	2.16	94.48
28	2.30	100.4	1.83	80.19
60	2.31	101.1	/	/

随机抽取的 20 个副溶血性弧菌冻干样品计数结果见表 2。经分析,数值分布符合正态分布,最大值为 2490 CFU/样品,最小值为 1950 CFU/样品,中位数为 2320 CFU/样品,均值为 2286 CFU/样品,样品间标准差约为 330 CFU。经单因素方差分析,样品满足均匀性检验要求 ($F=1.92, p>0.05$)。从均匀性检验结果结果看出,拿到样品后,用 1 mL 生理盐水溶解本样品即可得到 10^3 CFU/mL 的菌溶液(微生物检验适于定性、定量的工作液),省去稀释等过程。

2.4 副溶血性弧菌样品的稳定性检验

副溶血性弧菌样品运输稳定性检验结果见表 3。从结果可以看出,在 37 °C 存放 3 d 或 25 °C 存放 7 d 后样品活菌数目仍满足研制前设定的 10^3 CFU/菌球要求。

副溶血性弧菌样品保藏稳定性检验结果见表 4。从结果可以看出, -20 °C 保藏 60 d 或 4 °C 保藏 28 d 后样品活菌数目仍满足研制前设定的 10^3 CFU/菌球要求,即 -20 °C 可以作为长期存放条件,且经过后期继续监测,发现 -20 °C 保藏 3 年后仍为 10^3 CFU/菌球。而 4 °C 可以作为短期储存条件。

在稳定性检验中,发现副溶血性弧菌标准物质在 37 °C 存放 3 d 内,样品满足 10^3 CFU/菌球要求,而我国运输系统较为发达,样品寄送时间大约 2~3 d,因此满足运输稳定性要求。若在邮寄时添加冰袋或干冰,则稳定性会进一步加强。如何提高副溶血性弧菌标准物质在 37 °C 等高温条件下的稳定性是未来研究的方向。

2.5 副溶血性弧菌样品的协同标定

为保证研制的副溶血性弧菌样品数据准确可靠,本实验室组织了 5 家实验室开展协作标定实验。标定结果显示,生化鉴定均为副溶血性弧菌,具体活菌含量结果见表 5。从结果可以看出,5 家实验室检测样品活菌含量均在 10^3 CFU/样品的水平,满足研制前设计含量为 10^3 CFU/样品的要求。

表5 5家实验室协作标定结果(10^3 CFU/样品)

Table 5 Collaborative calibration results of 5 laboratories

样品编号	实验室代码				
	A	B	C	D	E
CODE: 1	1.30	2.00	1.70	1.90	2.40
CODE: 2	1.60	2.10	2.10	1.90	2.20
CODE: 3	1.80	1.90	1.80	1.70	2.30
CODE: 4	1.00	1.90	1.60	1.80	2.40
CODE: 5	1.10	2.40	2.20	1.70	2.50
CODE: 6	1.30	2.20	2.00	1.70	2.40
CODE: 7	1.90	2.00	1.90	1.50	2.40
CODE: 8	1.50	2.10	1.80	1.60	2.40
CODE: 9	1.40	2.20	2.20	1.50	1.80
CODE: 10	1.60	2.10	2.00	1.70	2.30

本实验室关于副溶血性弧菌标准物质计数的方法均是螺旋涂布方法。如在均匀性检验中,各个样品活菌含量数值高度一致,样品间误差小。而在组织协同标定的实验中,有些实验室选择手工 L 棒涂布的方法,虽然结果都满足 10^3 CFU/样品要求,但是样品间差异

大于螺旋涂布的方法。可能原因是在螺旋涂布时,仅有涂布针孔接触样品溶液以及培养基,且针孔涂布路径一致。而L棒涂布时,接触培养基的面积远大于涂布针孔;且涂布路径不能保证高度一致,另外在涂布完成后沾留在L棒上的菌液也存在差异,以上因素均可能导致偏差。现在国内外不少定量研究均是采取螺旋涂布接种方法^[22,23]。

2.6 副溶血性弧菌样品的食品基质验证

在食品基质验证实验中,试验组均检测出副溶血性弧菌,结果见表1;对照组均未检测出副溶血性弧菌。

为保证副溶血性弧菌样品具有广泛的应用范围,本研究根据GB 29921-2013《食品安全国家标准食品中致病菌限量》选择20种水产制品作为食品基质做验证试验。通过结果可以看出,本研究副溶血性弧菌标准物质可以直接作为对照适用于多种水产制品副溶血性弧菌检验中的阳性对照,省去接种、培养阳性对照菌株的时间,简化检验程序,提高检验效率。

3 结论

本研究研制的副溶血性弧菌标准物质均一性、稳定性以及基质验证均符合预期设定,满足相关要求,已被纳入国家药品标准物质(编号800006)。副溶血性弧菌标准物质不仅可以用于加强对食品副溶血性弧菌检验的质量控制,还可以用于实验室内部培养基质量、阳性对照、方法确认、人员考核、检验环境等各个环节的质量控制,而且本研究制备的副溶血性弧菌标准物质不含基质,可以依据不同目的添加不同基质或直接使用,灵活性更高,为今后准确无误的副溶血性弧菌检验提供基础支持,更是弥补了我国在副溶血性弧菌标准物质方面的不足。

参考文献

- [1] D Pal, N D. Isolation, identification and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from fish samples in Kolkata [J]. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2010, 14: 545-549
- [2] 刘秋爽.副溶血弧菌引起食物中毒调查[J].医疗装备,2018,31(1):71-72
LIU Qiushuang. Investigation of food poisoning caused by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Chinese Journal of Medical Device, 2018, 31(1): 71-72
- [3] 姜大栋,李琦.一起副溶血弧菌感染食物中毒病原学检测[J].中国现代药物应用,2018,12(7):220-222
JIANG Dadong, LI Qi. Etiological detection of food poisoning caused by *Vibrio parahaemolyticus* infection [J]. Chinese Journal of Modern Drug Application, 2018, 12(7): 220-222
- [4] 张婷,杨梦华.副溶血弧菌的毒力基因表达调控的分子机制[J].微生物学报,2020,60(7):1345-1357
ZHANG Ting, YANG Menghua. Molecular mechanisms of virulence genes expression in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(7): 1345-1357
- [5] 吕素玲,李秀桂,姚雪婷,等.2014年广西北海市养殖环境与牡蛎中诺如病毒污染相关性调查[J].实用预防医学,2017,7:769-772
LYU Suling, LI Xiugui, YAO Xueting, et al. Correlation between oyster production environment and norovirus contamination in Beihai city, Guangxi, 2014 [J]. Practical Preventive Medicine, 2017, 7: 769-772
- [6] 张致一,刘军,董杰,等.天津市市售贝类产品中副溶血性弧菌污染和耐药状况的调查[J].中国卫生检验杂志,2015,14:2413-2415
ZHANG Zhiyi, LIU Jun, DONG Jie, et al. Investigation on the contamination and drug resistance of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfishes sold in Tianjin [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2015, 14: 2413-2415
- [7] 吴青,韩海红,于东敏,等.北京市水产品污染与感染病例中副溶血性弧菌血清型和毒力基因型的比较研究[J].中国食品卫生杂志,2015,4:363-367
WU Qing, HAN Haihong, YU Dongmin, et al. Comparative study of serotypes and virulence genes of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from contaminated aquatic products and infection cases in Beijing [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2015, 4: 363-367
- [8] Guin Sailen, S M, Chowdhury Goutam, et al. Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in diarrhoeal patients, fish and aquatic environments and their potential for inter-source transmission [J]. Heliyon, 2019, 5(5): e01743
- [9] 宗华,曾德唯,殷静,等.重庆市南岸区水产品 and 腹泻患者副溶血弧菌相关性分析[J].现代医药卫生,2020,36(15):2339-2342
ZONG Hua, ZENG Dewei, YIN Jing, et al. Analysis on correlation between vibrio parahaemolyticus and *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products and diarrhea patients in Nanan district of Chongqing city [J]. Journal of Modern Medicine & Health, 2020, 36(15): 2339-2342
- [10] 毕水莲,罗永文,关小莺.PCR衍生技术快速检测副溶血弧菌的研究进展[J].江西农业学报,2017,29(8):105-109

- BI Shuilian, LUO Yongwen, GUAN Xiaoying. Research advances in rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* by derivative techniques of PCR [J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2017, 29(8): 105-109
- [11] Li Lingzhi, G M, Lu Tianyu, et al. Dissection of ToxR-dependent and ToxR-independent stress-regulated pathways in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Microbiol Res, 2019, 223(225): 79-87
- [12] WU Chunqin, Z T, ZHANG Wenwen, et al. Two DsbA proteins are important for *Vibrio parahaemolyticus* pathogenesis [J]. Front Microbiol, 2019, 10
- [13] 季宵雷,许海燕,苏婧,等.82株副溶血性弧菌毒力基因及耐药性分析[J].中华微生物学和免疫学杂志,2018,38(1):37-40
JI Xiaolei, XU Haiyan, SU Jing, et al. Analysis of virulence genes and drug resistance in 82 *Vibrio parahaemolyticus* strains [J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2018, 38(1): 37-40
- [14] 牛丽,巴永兵,白凤佳,等.耐药性副溶血性弧菌生长异质性比较研究[J].食品安全质量检测学报,2018,9(8):1802-1809
NIU Li, BA Yongbing, BAI Fengjia, et al. Comparative study on growth heterogeneity of antimicrobial resistant *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2018, 9(8): 1802-1809
- [15] 白瑶,叶淑瑶,闫韶飞,等.2015年我国食源性副溶血性弧菌毒力基因及耐药特征研究[J].食品安全质量检测学报,2017, 6:2318-2324
BAI Yao, YE Shuyao, YAN Shaofei, et al. Virulence and antimicrobial characteristics of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* strains in China in 2015 [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2017, 6: 2318-2324
- [16] 严寒秋,张新,黄琪,等.2011-2014年北京市副溶血性弧菌血清型及毒力基因特征分析[J].现代预防医学,2015,24:4468-4470
YAN Hanqiu, ZHANG Xin, HUANG Ying, et al. Analysis on the characteristics of serotype and virulence gene of *Vibrio parahaemolyticus* in Beijing during from 2011 to 2014 [J]. Modern Preventive Medicine, 2015, 24: 4468-4470
- [17] Nicolás Plaza, D P-R, Sebastián Ramírez-Araya, et al. Conservation of small regulatory RNAs in *Vibrio parahaemolyticus*: possible role of RNA-out encoded by the pathogenicity island (VPaI-7) of pandemic strains[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(11): 2827
- [18] Edlind T, R G P, Development and evaluation of polymorphic locus sequence typing for epidemiological tracking of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Foodborne Pathog Dis, 2019, 16(11): 752-760
- [19] WU Shijia, D N, SHEN Mofei, et al. Surface-enhanced Raman spectroscopic single step detection of *Vibrio parahaemolyticus* using gold coated polydimethylsiloxane as the active substrate and aptamer modified gold nanoparticles [J]. Mikrochim Acta, 2019, 186(7): 401
- [20] 曹丽梅,王一平,陈国庆,等.我国生物检测用国家标准物质现状与思考[J].中国生物制品学杂志,2015,28(8):886-888
CAO Limei, WANG Yiping, CHEN Guoqing, et al. Current status and thinking of national standard materials used in biological testing in my country [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2015, 28(8): 886-888
- [21] 林杰,柯璐,郑晶,等.一种含鱼肉基质的副溶血性弧菌标准物质[P]. CN107557427A,2018-09-01
LIN Jie, KE Lu, ZHENG Jing, et al. A standard substance of *Vibrio parahaemolyticus* containing fish meat matrix [P]. CN107557427A, 2018-09-01
- [22] 卢勉飞,蔡芷荷,叶青华,等.固体培养基螺旋接种和涂布接种方法比较研究[J].中国卫生检验杂志,2016,26(4):512-515
LU Mianfei, CAI Zhihe, YE Qinghua, et al. Studies on the comparison of the solid culture media spiral plating method and the surface spread plate method [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2016, 26(4): 512-515
- [23] Shridhar P B, Lance W Noll, Charley A Cull, et al. Spiral plating method to quantify the six major Non-O157 *Escherichia coli* serogroups in cattle feces [J]. Journal of Food Protection, 2017, 80(5): 848-856