

一种副溶血性弧菌显色培养基的应用

卢勉飞¹ 蔡芷荷¹ 吴清平^{2*} 叶青华¹

(1. 广东环凯微生物科技有限公司 广东 广州 510070)

(2. 广东省微生物研究所 广东 广州 510070)

摘要: 副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种在海产品中广泛存在的嗜盐性细菌,也是重要的食源性致病菌。传统检验方法检测周期长、特异性低,为提高检测效率、缩短检测周期,开发出一种副溶血性弧菌显色培养基(HKMVPM),与国外同类产品 KHVPM 和 TCBS 在灵敏度、特异性及检测效果方面进行了比较和初步评价。结果显示, HKMVPM 显色培养基和 KHVPM 显色培养基均具有较好的选择性和特异性,这 3 种培养基对天然污染样品的分离率高低顺序为 HKMVPM > KHVPM > TCBS。显色培养基具有高检出率及高特异性的特点,有良好的应用前景。

关键词: 显色培养基, 副溶血性弧菌, 天然污染样品, 应用研究

Application of HKM *Vibrio parahaemolyticus* Chromogenic Medium

LU Mian-Fei¹ CAI Zhi-He¹ WU Qing-Ping^{2*} YE Qing-Hua¹

(1. Guangdong Huankai Microbial Sci. & Tech. Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510070, China)

(2. Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, Guangdong 510070, China)

Abstract: *Vibrio parahaemolyticus* is a saltophilic and important food-borne pathogen which widely exists in all kinds of seafood. The general method costs more time and has low specificity in isolating and identifying of *V. parahaemolyticus*. In order to enhance the efficiency and shorten the detection periods, a new chromogenic medium (HKMVPM) was designed in this study. The sensitivity, specificity and detection efficiency of HKMVPM were studied and compared with that of KHVPM and TCBS by detecting the reference strains and natural samples. The results showed that the selectivity and specificity of HKMVPM were same as that of KHVPM. The detection efficiency of HKMVPM was better than that of KHVPM. The detection efficiency of KHVPM was better than that of TCBS. *V. parahaemolyticus* chromogenic medium shows a high degree of higher sensitivity and specificity and has a good prospect in applying.

Keywords: Chromogenic media, *Vibrio parahaemolyticus*, Natural samples, Application study

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP), 广泛分布于海水、海底泥沙、浮游生物和鱼贝类中, 为海产食品引起急性胃肠炎的重要病原菌之一,

发病呈世界性分布, 尤其在沿海地区发病较高, 许多人因食用被本菌污染而又未煮熟的海产品而引起中毒, 发病率高。在近年来沿海地区的微生物性

食物中毒中,该菌已成为首要病原。仅美国 1997、1998 年就有 4 个州发生副溶血性弧菌食物中毒 650 例^[1-2]。自 2001 年以来,副溶血性弧菌性食物中毒已经成为我国最常见的食源性疾患。目前,我国常规检测方法大多要经过前增菌、选择性增菌、选择性培养、生化鉴定、神奈川现象和血清学反应等过程。这些实验操作繁琐,需耗时 5-6 d,检出率低,给海产品生产、出入境检验检疫、食品卫生监督等带来困难,不但影响经济发展,而且不利于及时诊断和控制流行病的传染,不能满足食品中病原菌快速检测的现实需要^[1-6]。另外,传统硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂培养基(TCBS)的选择效果不明显,可疑菌落不易识别,当有其他的弧菌或肠道菌群存在时会影响副溶血性弧菌的检出,给检测技术人员带来极大的工作量与不确定性^[5,7]。

近年来,分子生物学的检测技术已被广泛应用,使副溶血性弧菌的快速检测有了很大发展^[1,3-4,8-9]。但是这些技术需要的设备费用较大、技术要求高、操作复杂,在基层检测机构不易推广。而显色培养基因为将微生物的分离与鉴定合二为一,具有省时省力、操作简便、敏感性和特异性都较高的优点,特别是能与常规检测方法较好地接轨而越来越受到国内外的关注。显色培养基是根据酶的特征设计的对微生物进行快速检测的一种分离培养基,基本原理是:在分离培养基中加入检测某些菌种的特异性酶底物,该底物为人工合成,由产色基因和微生物可代谢物质组成,通常为无色,但在特异性酶作用下游离出发色基因并显示一定颜色,直接观察菌落颜色即可对菌种做出初步鉴定,具有快速、简便和经济的特点^[5,10-16]。本实验室应用自主研发的 HKM 副溶血性弧菌显色培养基与国外同类商品化产品对质控菌株和天然污染的海产品样品进行了测试,系统地比较了培养基的性能。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC17802、副溶血性弧菌 ATCC33864、副溶血性弧菌 15C、副溶血性弧菌 17a、副溶血性弧菌 23d、副溶血性弧菌 24e、非 O₁ 霍乱弧菌 (*V. cholerae non O₁*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*) HK8031、创伤弧菌

(*V. vulnificus*) ATCC2756、拟态弧菌(*V. mimicus*) As1.1969、嗜水气单胞 (*Aeromollas hydrophila*) AS1.927、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) ATCC27853、阪崎肠杆菌(*Enterobacter sakazakii*) ATCC51329、大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*) ATCC25922、柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*) ATCC8090、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*) -57、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*) CMCC (B) 45301、亚利桑那氏菌(*Salmonella Arizona*) CMCC (B) 47001、粪肠球菌 (*Streptococcus faecalis*) ATCC29212、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) ATCC6538。

1.1.2 培养基及试剂:HKM 副溶血性弧菌显色培养基(HKMVPM)由本实验室研制, KHVPM 为进口同类产品,碱性琼脂、3%胰蛋白胍大豆琼脂(3% TSA)、碱性蛋白胍水和硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂培养基(TCBS)由广东东环凯微生物科技有限公司提供。

MIDA + B 鉴定条由英国 Microgen 公司提供。

1.1.3 样品:试验所用实际样品均采集于市内超市,共 28 份。

1.2 方法

1.2.1 培养基制备:HKM 副溶血性弧菌显色培养基和 KHVPM 均按配制说明书制备成平板备用。

1.2.2 显色培养基特异性的验证:将副溶血性弧菌、霍乱弧菌、溶藻弧菌、创伤弧菌、拟态弧菌、嗜水气单胞、阪崎肠杆菌、大肠埃希氏菌、柠檬酸杆菌、肺炎克雷伯氏菌、阴沟肠杆菌、铜绿假单胞菌、亚利桑那氏菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌接种在营养琼脂复苏 24 h 后,分别划线接种 HKMVPM 平板和 KHVPM 平板,37°C 培养 18-24 h。观察不同细菌在显色培养基上的菌落特征,比较两种培养基对副溶血性弧菌的特异性反应。

1.2.3 副溶血性弧菌在显色培养基上生长率和灵敏度检验:分别用接种环挑取上述副溶血性弧菌的新鲜菌苔一环,加入到 10 mL 0.85%生理盐水中配成原液,然后进行 10 倍梯度稀释,取副溶血性弧菌浓度为 10³-10⁴ CFU/mL 的菌液与霍乱弧菌、拟态弧菌和溶藻弧菌组成混合菌液,各取 50 μL 分别螺旋接种于 HKMVPM 平板和 KHVPM 平板,37°C 培养 18-24 h。观察副溶血性弧菌在两种显色培养基生

长的情况, 并对其进行菌落计数, 比较副溶血性弧菌在两种显色培养基上的生长率。

1.2.4 不同杂菌浓度下副溶血性弧菌在显色培养基上生长率和灵敏度检验: 将上述不同的实验菌株分成 4 组, 从 I 到 IV 组合中, 副溶血性弧菌和霍乱弧菌的接种量不变, 而拟态弧菌和溶藻弧菌的接种量 10 倍递增混合螺旋接种于两种显色平板上; 同时用碱性琼脂和 3% TSA 分别对霍乱弧菌、副溶血性弧菌、拟态弧菌和溶藻弧菌的接种量进行计数; 组合 V 中为副溶血性弧菌与拟态弧菌按一定比例制成的冻干混合物; 增菌用 225 mL 碱性蛋白胨水, 添加 1 mL 相应不增菌的组合中的菌液, 37°C 培养 18 h, 将增菌液用螺旋接种法接种于两种显色平板上, 37°C 培养 24 ± 2 h, 比较两种培养基的分离率与检出限。

1.2.5 天然污染样品中副溶血性弧菌检测: 取 25 g 经处理过后的样品置于 225 mL 碱性蛋白胨水增菌液的三角瓶中, 37°C 培养 18 h; 增菌液分别划线在两种显色平板和 TCBS 平板上, 37°C 培养 24 h, 挑取可疑菌落。

1.2.6 分离鉴定: 将疑似菌落分离纯化, 用英国 Microgen 公司的 GNA + B 鉴定条进行生化鉴定和确认。

2 结果

2.1 显色培养基的特异性

显色培养基的特异性结果见表 1, HKMVPM 显色平板和 KHVPM 显色平板均有较好的显色效果。两种显色培养基上副溶血性弧菌菌落均呈现特异性的品红色; 霍乱弧菌、创伤弧菌和拟态弧菌均呈现

表 1 试验菌株在各种培养基上的特异性试验
Table 1 The specificity of test strains on the different medium

菌株 Strains	菌落色泽 Colony color		
	HKMVPM	KHMVPM	TCBS
副溶血性弧菌 ATCC17802 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ATCC17802	品红色	品红色	蓝绿色
非 O ₁ 霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i> non O ₁	蓝绿色	蓝绿色	黄色
创伤弧菌 ATCC27562 <i>V. vulnificus</i> ATCC27562	蓝绿色	蓝绿色	蓝绿色
溶藻弧菌 HK8031 <i>V. alginolyticus</i> HK8031	无色	无色	黄色
拟态弧菌 As1.1969 <i>V. mimicus</i> As1.1969	蓝绿色	蓝绿色	蓝绿色
嗜水气单胞 AS1.927 <i>Aeromonas hydrophila</i> AS1.927	部分受抑, 微绿	部分受抑, 无色	蓝绿色
阪崎肠杆菌 ATCC51329 <i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC51329	部分受抑, 蓝绿色	部分受抑, 蓝绿色	部分受抑, 蓝绿色
大肠埃希氏菌 ATCC25922 <i>Escherichia coli</i> ATCC25922	部分受抑, 蓝绿色	受抑严重, 蓝绿色	部分受抑, 蓝绿色
柠檬酸杆菌 ATCC8090 <i>Citrobacter freundii</i> ATCC8090	部分受抑, 蓝绿色	部分受抑, 蓝绿色	部分受抑, 蓝绿色
阴沟肠杆菌 CMCC (B) 45301 <i>Enterobacter cloacae</i> CMCC (B) 45301	灰黑色	灰黑色	部分受抑, 蓝绿色
亚利桑那氏菌 CMCC (B) 47001 <i>Salmonella arizona</i> CMCC (B) 47001	部分受抑, 无色	部分受抑, 无色	部分受抑, 蓝绿色
铜绿假单胞菌 ATCC27853 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	无色	黄绿	部分受抑, 蓝绿色
肺炎克雷伯氏菌-57 <i>Klebsiella pneumoniae</i> -57	部分受抑, 蓝绿色	受抑制, 蓝绿色	部分受抑, 蓝绿色
粪肠球菌 ATCC29212 <i>Streptococcus faecalis</i> ATCC29212	受抑制, 品红色	受抑制, 品红色	部分受抑, 黄色
金黄色葡萄球菌 ATCC6538 <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538	受抑制, 金黄色	受抑制, 金黄色	部分受抑, 蓝绿色

蓝绿色; 溶藻弧菌、亚利桑那氏菌和铜绿假单胞菌在该显色培养基上均为无色菌落; 阴沟肠杆菌呈灰黑色菌落; 其他肠道杆菌显蓝绿色菌落, 生长均受抑制; 粪肠球菌虽显品红色, 但生长受抑制; 金黄色葡萄球菌在显色培养基上显它本来的金黄色, 且生长受抑制。实验结果表明, 大部分肠道菌和金黄色葡萄球菌对副溶血性弧菌的辨认无干扰作用, 副溶血性弧菌显色培养基具有较高的选择性和特异性; 而在 TCBS 平板上, 创伤弧菌、拟态弧菌和嗜水气单胞菌与副溶血性弧菌均显蓝绿色, 不能区分。

2.2 副溶血性弧菌在显色培养基上的生长率和灵敏度

各实验菌株在不同显色培养基中的灵敏度和生长率试验结果见表 2, 结果显示对副溶血性弧菌 ATCC17802、ATCC33864、17a 和 23d 的检出率, HKMVPM 和 KHVPM 显色培养基没有显著差异, 两种显色培养基可以达到相同的灵敏度和检测限, 但

对副溶血性弧菌 15C 和 24e, HKMVPM 显色培养基则优于 KHVPM; 在 HKMVPM 和 KHVPM 显色培养基上副溶血性弧菌仍呈特殊的品红色菌落, 而其他弧菌呈现蓝绿色或无色菌落, 表明其他弧菌基本不影响副溶血性弧菌的检测。

2.3 在不同干扰强度下副溶血性弧菌在显色培养基上的生长率和灵敏度

将副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) ATCC17802 与各非目标弧菌菌液混合, 分别将不增菌和增菌的菌液接种于两种显色培养基, 其灵敏度和生长率试验结果如表 3 和表 4 所示, 结果显示对副溶血性弧菌 ATCC17802 增菌或不增菌, HKMVPM 显色培养基的检出率稍优于 KHVPM, 但随着非目标弧菌的浓度升高, 会影响副溶血性弧菌的分离; 对混合冻干粉, 在未增菌情况下, HKMVPM 显色培养基可分离到副溶血性弧菌, 而 KHVPM 则未检出; 在增菌后, 两者均可检出副溶血性弧菌, 但检出率 HKMVPM 远远高于 KHVPM。

表 2 6 种组合中的副溶血性弧菌在显色培养基上的灵敏度试验
Table 2 The sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* from six combination of different bacteria on the chromogenic medium

菌株 Strains	HKMVPM		KHMVPM	
	Diameter (mm)	Number of colonies (CFU/mL)	Diameter (mm)	Number of colonies (CFU/mL)
非 O ₁ 霍乱弧菌 <i>V. cholerae non O₁</i>		6.14 × 10 ³		6.64 × 10 ³
拟态弧菌 As1.1969 <i>V. mimicus</i> As1.1969		6.61 × 10 ³		7.6 × 10 ²
溶藻弧菌 HK8031 <i>V. alginolyticus</i> HK8031		7.62 × 10 ³		6.35 × 10 ³
副溶血性弧菌 ATCC17802 <i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802	纯	2.53	2.63	4.66 × 10 ³
	混			5.27 × 10 ³
副溶血性弧菌 23d <i>V. parahaemolyticus</i> 23d	纯	2.98	2.84	4.67 × 10 ³
	混			3.56 × 10 ³
副溶血性弧菌 15c <i>V. parahaemolyticus</i> 15c	纯	2.37		0
	混			0
副溶血性弧菌 17a <i>V. parahaemolyticus</i> 17a	纯	2.89	2.60	1.61 × 10 ⁴
	混			1.75 × 10 ⁴
副溶血性弧菌 882364 <i>V. parahaemolyticus</i> 882364	纯	2.45	3.10	6.46 × 10 ³
	混			6.17 × 10 ³
副溶血性弧菌 24e <i>V. parahaemolyticus</i> 24e	纯	3.10		0
	混			0

表3 在不增菌情况下5种组合中的副溶血性弧菌在显色培养基上的灵敏度
Table 3 The sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* from five combination of different bacteria on the chromogenic medium without enrichment

组合 Compounding	菌株 Strains	Number of colonies		
		HKMVPM	KHVPM	3% TSA/Alkaline agar
	副溶血性弧菌 ATCC17802	73	45	109
	非 O ₁ 霍乱弧菌	4	4	660
	拟态弧菌 As1.1969	65	10	160
	溶藻弧菌 HK8031	25	56	95
I	副溶血性弧菌 ATCC17802	80	21	
	非 O ₁ 霍乱弧菌	30	4	
	拟态弧菌 As1.1969			
	溶藻弧菌 HK8031	19	40	
II	副溶血性弧菌 ATCC17802	37	24	
	非 O ₁ 霍乱弧菌	60	24	
	拟态弧菌 As1.1969			
	溶藻弧菌 HK8031	131	238	
III	副溶血性弧菌 ATCC17802	38	26	
	非 O ₁ 霍乱弧菌	200	100	
	拟态弧菌 As1.1969			
	溶藻弧菌 HK8031		无以计	
IV	副溶血性弧菌 ATCC17802	19	16	
	非 O ₁ 霍乱弧菌			
	拟态弧菌 As1.1969		无以计	
	溶藻弧菌 HK8031			
V (混合冻干菌株, 10 倍稀释)	副溶血性弧菌 ATCC17802	15	0	
V (Admixture of freeze-dry strains, 10 dilute multiples)	拟态弧菌 As1.1969	0	5	

2.4 自然污染样品中副溶血性弧菌的检测

如表 5 所示, 在检测的 28 份海鲜样品中, HKMVPM 和 KHVPM 以及 TCBS 平板上的可疑菌落检出率分别为 64.28%、60.71%和 82.14%, 但经生化鉴定确证后的符合率分别为 94.44%、94.11%和 60.86%。结果表明, 两种显色培养基对可疑菌落的检出率及符合率均没有显著差异, 可以达到相同的检测限, 且均优于 TCBS。三种培养基相比, 两种显色培养基比 TCBS 具有更高的检测效率, 可减少对较多可疑菌落的生化鉴定。

3 讨论

对副溶血性弧菌建立起鉴别性显色快速检测技术, 实现对致病菌的快速检测, 可以大大地降低工作量、节省人力和物力, 因而在食品安全中对提高

食品质检质控水平和效率具有十分重要的意义。近年来, 国外已商品化的显色培养基, 已被许多国家的政府和检测机构采用(包括国内食品监督检定所、商检和疾病预防控制中心等), 应用于食品、医药卫生和环境监测等领域, 给检测工作提供了很大方便, 但由于成本因素国内一般厂家较少使用进口产品。我国已于 2008 年 10 月修订了食品中副溶血性弧菌的标准检验方法^[17], 显色培养基首次进入我国的食品卫生标准, 必将会进一步促进该检测技术在全国范围内得到更广泛的应用。目前, 国内外已有不少应用显色培养基进行副溶血性弧菌分离的文献报导^[5,7,10-16]。

该显色培养基由同事首先研究开发, 但由于在实验中所用的菌株有限以及其他方面原因, 导致其配方还存在一些问题, 主要表现在部分目标菌显色

表4 在增菌情况下5种组合中的副溶血性弧菌在显色培养基上的灵敏度
Table 4 The sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* from five combination of different bacteria on the chromogenic medium with enrichment

组合 Compounding	稀释度 Dilute multiple	菌株 Strains	Number of colonies	
			HKMVPM	KHVPM
I	10 ⁻⁴	副溶血性弧菌 ATCC17802	52	15
		非 O ₁ 霍乱弧菌	200	50
		拟态弧菌 As1.1969		
		溶藻弧菌 HK8031	0	
	10 ⁻⁶	副溶血性弧菌 ATCC17802	3	1
		非 O ₁ 霍乱弧菌	100	6
		拟态弧菌 As1.1969		
		溶藻弧菌 HK8031	0	
II	10 ⁻⁴	副溶血性弧菌 ATCC17802	32	8
		非 O ₁ 霍乱弧菌	1000	80
		拟态弧菌 As1.1969		
		溶藻弧菌 HK8031	0	
	10 ⁻⁶	副溶血性弧菌 ATCC17802	3	0
		非 O ₁ 霍乱弧菌	180	30
		拟态弧菌 As1.1969		
		溶藻弧菌 HK8031	0	
III	10 ⁻⁴	副溶血性弧菌 ATCC17802	2	0
		非 O ₁ 霍乱弧菌	1000	100
		拟态弧菌 As1.1969		
		溶藻弧菌 HK8031	7	2
	10 ⁻⁶	副溶血性弧菌 ATCC17802	0	
		非 O ₁ 霍乱弧菌	50	20
		拟态弧菌 As1.1969		
		溶藻弧菌 HK8031	1	0
IV	10 ⁻²	副溶血性弧菌 ATCC17802	0	
	10 ⁻⁴	非 O ₁ 霍乱弧菌	无以计	
	10 ⁻⁶	拟态弧菌 As1.196		
		溶藻弧菌 HK8031		
V (混合冻干菌株, 10 倍稀释) V (Admixture of freeze-dry strains, 10 dilute multiples)	10 ⁻⁶	副溶血性弧菌 ATCC1780	无以计	108
		拟态弧菌 As1.1969	0	5 × 10 ⁴
	10 ⁻⁸	副溶血性弧菌 ATCC17802	6 × 10 ⁴	20
		拟态弧菌 As1.1969	1 × 10 ⁴	2 × 10 ⁴

表5 实际样品中的副溶血性弧菌检测
Table 5 The detection of *Vibrio parahaemolyticus* in natural samples

样品(数量) Sample (Number)	HKMVPM		KHVPM		TCBS	
	Suspicious colonies	Confirmation colonies	Suspicious colonies	Confirmation colonies	Suspicious colonies	Confirmation colonies
元贝(6) Shellfish (6)	4	4	4	4	5	3
虾(10) Shrimp (10)	10	10	9	9	10	8
蟹(5) Crab (5)	1	1	1	1	3	1
带子(7) Fillet (7)	3	2	3	2	5	2
总计 Total	18	17	17	16	23	14
检出率 Detection rate (%)	64.28		60.71		82.14	
符合率 Accord rate (%)	94.44		94.11		60.86	

不明显和检出率低,并且实际样品中非目标菌的过分散而影响目标菌的检出。作者就其所存在的缺点对此配方重新进行了优化与改良,并应用了比文献[5]更多种类的目标菌和非目标菌以及模拟样品对该显色培养基新配方进行了更全面的效果验证,取得了较满意的实验结果。

在对混合弧菌的冻干样品检测中,副溶血性弧菌经过超低温真空干燥后,细胞受损,活力下降,若显色培养基对受损的细胞复苏能力不够,将导致不能检出的结果。

本实验室研究团队首次研究开发出具有自主知识产权的双酶底物复合显色培养基。本研究发现显色培养基对酶的特异性是相对的,某些肠道细菌(如粪肠球菌、肠杆菌等)也含有与副溶血性弧菌相同的 β -D-葡萄糖苷酶,在显色培养基上也会显示出同样的色泽,造成对目标菌的干扰;但由于肠杆菌同时含有 β -D-半乳糖苷酶,故本显色培养基的显色底物是双酶混合底物,不但含有副溶血性弧菌 β -D-葡萄糖苷酶所对应的底物,同时还含有肠道细菌 β -D-半乳糖苷酶所对应的底物,通过优化配方竞争性显色,使肠道细菌显示出蓝绿色,从而可以与副溶血性弧菌区分;另外,当样品中杂菌的浓度过高时,增菌会使杂菌竞争性生长,导致分离不出目标菌。故在检测过程中如无有效的增菌方法,则可能降低显色培养基的敏感性。如检测高污染的样品时,可在增菌前先用显色平板划线或计数,避免非目标菌的干扰,而且可大大节省检测时间。

参 考 文 献

[1] 谭翰清,万成松.副溶血性弧菌快速检测研究进展.华南预防医学,2004,31(1):21-23.
[2] 程苏云,罗芸,叶菊莲,等.副溶血性弧菌快速检测方法研究.疾病监测,2007,22(9):642-645.
[3] 葛菲菲,徐锋,沈莉萍,等.副溶血性弧菌PCR检测方法的建立.中国预防兽医学报,2008,30(3):229-232.
[4] 潘幸福.海产品副溶血性弧菌检出方法探讨.中华预防

医学杂志,1992,26(2):103-104.

- [5] 张淑红,吴清平,张菊梅,等.副溶血性弧菌显色培养基检测效果初步评价.微生物学通报,2008,35(1):145-146.
[6] 钟凯.副溶血弧菌快速检测的进展及其应用.中国预防医学杂志,2005,6(1):75-78.
[7] Su YC, Duan JY, Wu WH. Selectivity and specificity of a chromogenic medium for detecting *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of food protection*, 2005, 68(7): 1454-1456.
[8] 王文,陈贵连.生物素-亲和素斑点酶联免疫吸附试验快速检测鱼源副溶血性弧菌的研究.中国兽医学报,1991,1(1):18-22.
[9] 于庆潭,郑红霞,李伟.协同凝集实验诊断副溶血性弧菌感染的初步探讨.中国疗养医学,2009,18(8):679-680.
[10] 卢勉飞,吴清平,刘云林,等.特异性酶反应在食源性致病菌检测中的应用.中国卫生检验杂志,2005,15(3):354-356.
[11] 朱敏华,项明洁,倪语星.科玛嘉弧菌显色培养基对弧菌的分离培养.诊断学理论与实际,2004,3(1):28-30.
[12] 巫结冰,陈德云,胡伟宁,等.弧菌显色培养基进行多种弧菌分离鉴定的研究.中国卫生检验杂志,2007,17(8):1451-1452.
[13] Hara-Kudo Y, Nishina T, Nakagawa H, et al. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(12): 5819-5823.
[14] Remy H, Pund RP, Buhler C, et al. Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in fishery products first experiences with a novel selective culture medium. *Archiv fur Lebensmittelhygiene*, 2007, 58(4): 121-123.
[15] 许如苏,林彩华,黄桂荣,等.副溶血性弧菌快速测试片检测性能研究.中国卫生检验杂志,2008,18(12):2621-2622,2738.
[16] 吴清平,周艳红,蔡芷荷.卫生微生物特异性显色培养基的研究与应用.中国卫生检验杂志,2005,15(1):124-126.
[17] GBT 4789.7-2008.食品卫生微生物学检验 副溶血性弧菌检验.