

## 研究报告

## 副溶血性弧菌鉴定能力验证样品的制备

马聪<sup>1,2</sup>, 谭海玲<sup>1</sup>, 刘礼平<sup>4</sup>, 邓小玲<sup>2,3</sup>, 张万里<sup>1</sup>, 蔡芷荷<sup>5</sup>, 杨宁<sup>5</sup>, 黎薇<sup>1</sup>,  
严纪文<sup>5</sup>, 陈文胜<sup>4</sup>, 罗建波<sup>2</sup>, 柯昌文<sup>1</sup>

- (1. 广东省疾病预防控制中心病原微生物检验所, 广东 广州 510300; 2. 中山大学公共卫生学院, 广东 广州 510080; 3. 广东省疾病预防控制中心营养与食品安全所, 广东 广州 510300;  
4. 广东省疾病预防控制中心质量管理技术部, 广东 广州 510300;  
5. 广东省微生物研究所, 广东 广州 510300)

**摘要:**目的 研制适用于副溶血性弧菌(*Vibrio Parahaemolyticus*, VP) 能力验证(PT) 项目的 VP 菌及干扰菌的冷冻干燥样品, 建立有效的样品制备与评估流程。方法 通过不同比例混匀的 VP 和干扰菌拟态弧菌(*Vibrio minicus*, VM) 经冻干后在鉴定培养基上菌落生长优势比, 确定制备 PT 样品的混合菌 VP 和 VM 的浓度比例; 通过系统抽样和鉴定以评估样品的均一性; 通过观察样品在 180 d 保存期内菌量的变化情况以评估样品的稳定性; 根据 188 间检测实验室反馈的鉴定结果以评估和计算样品的实际合格率。结果 选择 5 000:1 比例制备的 VP 和 VM 混合 PT 样品能在鉴定培养基有效分离两种菌落; 抽检的 40 份样品均能有效鉴定, 显示 PT 样品具有较好的一致性; 通过保存温度和时间的稳定性实验显示, PT 样品在 36 ℃ 下能稳定保存 5 d, 冻干后 PT 样品于 4 ℃ 保存 180 d 后 VP 菌仍能检出; 188 家参与实验室检测结果显示, PT 样品合格率为 97.3%。结论 本研究制备的冻干 PT 样品及实验流程控制适用于副溶血性弧菌及类似的微生物鉴定能力验证项目。

**关键词:** 副溶血性弧菌; 拟态弧菌; 冷冻干燥; 冻干; 能力验证; 食源性致病菌

中图分类号: R378.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2011)06-0515-05

**Preparation of *Vibrio parahaemolyticus* lyophilization materials for proficient test on bacteria identification**

Ma Cong<sup>1,2</sup>, Tan Hailing<sup>1</sup>, Liu Liping<sup>4</sup>, Deng Xiaoling<sup>2,3</sup>, Zhang Wanli<sup>1</sup>, Cai Ziheng<sup>5</sup>,  
Yang Ning<sup>5</sup>, Li Wei<sup>1</sup>, Yan Jiwen<sup>5</sup>, Chen Wensheng<sup>4</sup>, Luo Jianbo<sup>2</sup>, Ke Changwen<sup>1</sup>  
(Institute of Microbiology, Center for Disease Control and Prevention of Guangdong  
Province; Guangdong Guangzhou 510300, China)

**Abstract: Objective** To establish and evaluate the procedure for preparation of lyophilized (freeze-dried) *Vibrio parahaemolyticus* (VP) composed with *Vibrio minicus* (VM) culture materials for Proficient Test (PT) on bacteria identification.

**Methods** Selecting a suitable proportion and concentration of VP and VM for identifying the dominant ratio of VP to VM cultured in the identification medium after lyophilization. Assessing and identifying the homogeneity of random PT specimen and evaluating the stability of specimen kept for 180 days. The exact acceptability of PT specimen was calculated according to the results of participating laboratories. **Results** 5 000:1 (VP: VM) was selected as a proper ratio for freeze-dried PT specimen. The batch of specimen was in a preferable accordance ratio and could keep stable for at least 180 days while storing at 4 ℃. Specimen can be stored at 36 ℃ for 5 days during transportation. The acceptability rate of samples was 97.3% calculated by the results of 188 participating laboratories. **Conclusion** Freeze-dried PT samples as well as preparation procedures were suitable for PT test of *Vibrio Parahaemolyticus* and can be used universally for analogical PT tests.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; *Vibrio Minicus*; lyophilization; freeze-dried; proficient test; foodborne pathogens

实施微生物鉴定能力验证项目 (proficiency testing, PT) 可有效评估参与实验室进行相关微生物

收稿日期: 2011-05-12

基金项目: 广东省自然科学基金团队项目(06201654); 国家认监委能力验证计划(CNCA-2009-B06); 广东省“十一五”医学重点专科研究项目(粤卫[2008]50号)

作者简介: 马聪 男 技师 硕士生 研究方向为食品微生物检验 E-mail: congma@126.com

通信作者: 邓小玲 女 主任技师 博士 研究方向为病原微生物检验 E-mail: xiaolingcdc@hotmail.com

检验的技术能力<sup>[1]</sup>。开展项目的主要流程包括:组织方实验室根据能力验证需求选择目标菌、制备合格的PT样品、通过物流形式发放到参与实验室、评估验证结果等步骤。由于微生物PT样品的质量因冻干条件的影响存在较大不确定性<sup>[2-3]</sup>,因此,需对其进行全流程的评估以保证项目的有效实施。副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)作为近年我国食物中毒和食源性疾病常见的病原菌<sup>[4]</sup>,是能力验证项目较常选用的目标菌。组织方在制备VP菌PT样品时,一般选择适用于菌种长期保藏的真空冷冻干燥法(以下简称冻干)及真空封装保存。研究显示,经冻干后VP菌易出现存活率低和存活期短的现象<sup>[5]</sup>;而且,PT样品在发放过程中,外界的高温条件也可能会影响VP菌的复苏能力,导致参与实验室在鉴定时出现结果偏差。为增加质控考核的难度,组织方除制备单一目标菌样品外,通常还将制备含有一定量干扰菌与目标菌的混合菌PT样品;由于不同菌种的生长与复苏效率存在差异,若混合浓度配比不当,将会增加考核样品出现质量不稳定的风险<sup>[2]</sup>。目前,国内尚未见有适用于组织方的副溶血性弧菌考核样品制备及其质量控制等技术的研究报道。

本研究拟通过VP混合菌浓度比例摸索、PT样品均一性与稳定性的检测,结合参与实验室的样品鉴定结果,探讨合格VP菌PT样品的相关特性,并建立其冻干制备与冻干后效果评估的系统流程,为相关的微生物鉴定能力验证项目研究提供技术参考。

## 1 材料与设备

### 1.1 菌种

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, ATCC: 33847);拟态弧菌(*Vibrio minicus*, VM, AS1.1881),作为研究样品制备中加入的干扰菌,由广东省微生物研究所惠赠。

### 1.2 试剂

冻干保护剂选用脱脂牛乳(英国OXOID);冻干前的营养培养基采用含5%绵羊血胰酪胨大豆(TSA)培养基(广州迪景);冻干后计数使用3%氯化钠肉汤和TSA培养基(北京陆桥);分离鉴定采用硫代硫酸盐-柠檬酸-盐胆盐-蔗糖琼脂(TCBS)培养基(北京陆桥)和弧菌显色培养基(法国CHROMagar、广东环凯HKC);PCR检测使用的Premix Ex Taq<sup>TM</sup>购自Takara(大连宝生物),引物委托上海生工合成。

### 1.3 设备

混合菌PT样品比例研究采用麦氏浓度计(法

国梅里埃)计算悬液浓度;冻干预实验采用FreeZone 6型真空冷冻干燥系统(美国LABCONCO)及真空封装设备;PT样品批量制备由广东环凯微生物科技有限公司冻干实验室协助进行;菌种鉴定系统:API 20E细菌鉴定系统、全自动细菌生化鉴定系统VITEK32(法国梅里埃);温度梯度PCR仪(德国TGradient)。菌量的统计分析采用SPSS 13.0软件。

## 2 实验方法

### 2.1 样品制备

#### 2.1.1 单一目标菌PT样品的制备

单一目标菌PT样品(下文称PT样品A)制备操作为:VP菌经TSA血平板培养18h后,菌苔定量洗脱至10%灭菌脱脂牛乳的保护剂中并充分混匀后,将悬液按每安瓿0.3ml分装后冻干。

冻干实验步骤包括预冻干、降温、干燥等操作步骤<sup>[6]</sup>。待冻干PT样品经分装后放入低温冰箱(-20℃)预冻干8h,此后置于冻干设备中于-45℃下进行降温操作(按微生物制品和氯化钠溶液的共结晶温度降低15℃)干燥9h,干燥过程真空度保持在 $(75 \pm 3) \times 10^{-3}$  mBAR,其后进行真空封装保存。PT样品经一致性和稳定性实验确认后,进行批量制备。PT样品A的预期目标,是增菌后VP菌在TCBS和弧菌显色培养基均能复苏。

#### 2.1.2 混合菌PT样品的制备

VM在鉴定培养基上的菌落形态和生化特征与同一菌属的VP具有一定的相似性,需在TCBS培养基上挑取可疑菌落进行生化鉴定,或选用显色培养基分辨以避免误检和漏检<sup>[7]</sup>;因此,为增加VP鉴定的难度,本研究的混合菌样品(下文称PT样品B)将适量添加VM菌。PT样品B的预期目标,是增菌后两种菌在TCBS和弧菌显色培养基均能复苏,培养基上两种菌落形成单位(CFU)基本均量。预实验显示,VP与VM的生长效率存在差异,冻干后VP菌量损失值较VM大且复苏能力也较其弱。经初步摸索,确定VP与VM在100:1至10 000:1的比例区间内混合的样品能符合预期目标。

混合菌制备过程:采用3% NaCl灭菌溶液配制1.5 Mac的VP悬液,根据麦氏当量与菌浓度的对应关系,菌液浓度约为 $4.5 \times 10^8$  CFU/ml;通过预设混合比例(见表1)换算VM悬液的浓度和体积,混合VP和VM悬液并加入保护剂后进行冻干,冻干步骤与PT样品A一致。

PT样品B混合比例的确定:通过对不同比例冻干的PT样品进行复苏,分别观察两种菌在TCBS和弧菌显色培养基上的CFU优势比和挑选鉴定可疑

菌落的方法,选定最适合的混合比例。

## 2.2 目标菌和干扰菌的鉴定

PT 样品 A 和 B 中 VP 菌和 VM 菌的鉴定:参考国标 GB 4789.7—2008 和采用微生物鉴定系统 (API 20E 细菌鉴定系统或全自动细菌生化鉴定系统 VITEK) 的方法<sup>[8]</sup>;利用此前已验证的 VP 菌种特异性基因 PCR 鉴定的方法<sup>[9]</sup>进行辅助鉴定。

## 2.3 PT 样品菌量计数

菌量计数采用涂布法:PT 样品 A、B 经 3% 氯化钠肉汤复苏后进行 10 倍梯度稀释,取不同稀释度菌液 0.1 μl 在 TSA 培养基均匀涂布,经 37 °C 培养 24 h 后进行菌落计数并计算菌浓度。需要说明的是,研究在对 PT 样品 B 进行菌量计数的预实验时,发现弧菌显色培养基对 VP 和 VM 的复苏均有一定的抑制作用,并未能准确地反映样品实际菌量值。因此,本研究采用了非选择性鉴别 VP 和 VM 菌的 TSA 培养基,统计值为两菌 CFU 值的合计数;在通过 TSA 计数的同时也结合弧菌显色培养基的筛选和其他鉴定实验的结果,以判断 PT 样品是否符合制备的预期目标和实验要求。

## 2.4 PT 样品的一致性评价

PT 样品的一致性是指冻干后的 PT 样品能达到复苏和鉴定的预期目标。通过设计合理的抽样方案并进行检测以评估其一致性;本研究采用单纯随机抽样法并参考生物指标监测采样量的有关计算方法用于抽样量的确定<sup>[10]</sup>。公式如下(1):

$$n = \left( \frac{u_a \sigma}{\delta} \right)^2, n_c = \frac{n}{1 + n/N}$$

式中: $n$  为无限总体样品的抽样数, $n_c$  为本研究抽样数, $u_a$  取值 1.96 ( $a$  为 0.05 时), $\sigma$  表示样品菌量(以 CFU 计,下同)标准偏差, $\delta$  表示样品菌量的容许偏差, $N$  为本次制样品量(PT 样品 A、B 各制备 500 份)。

抽样量的计算首先需根据 VP 在鉴定培养基的检出限值,获知菌量标准偏差( $\sigma$ )和容许偏差( $\delta$ ),不同抽检 PT 样品中的菌量可存在偏差,某些 PT 样品若低于一定菌量限值时将无法复苏<sup>[2-3]</sup>。因此,容许偏差值(仅考虑下限值)设为观察 PT 样品的均值减去标准偏差与预设的菌量下限值之和。本研究参考文献报道 VP 菌在弧菌鉴定培养基中的检出限量为 3 Log<sub>10</sub> CFU/ml<sup>[7]</sup>;为更好地确保 PT 样品的性能和合格率,将有效 PT 样品的菌量值设为高于 3.5 Log<sub>10</sub> CFU/ml。此外,在一致性评价过程中将随机抽取 4 °C 保存 2 天和 7 天的 PT 样品 A、B 各 2 份进行菌量计数后获取  $\sigma$  值;根据  $\sigma$  值和预期菌量确定  $\delta$  值并得到抽样量  $n_c$ ;抽取等量样本与协

作实验室进行平行检测,通过合格率(%)指标评估其一致性。

## 2.5 PT 样品的稳定性评价

### 2.5.1 保存温度对样品稳定性的影响

冻干后的微生物样品需置于冷藏条件下以保证其稳定性<sup>[2]</sup>。鉴于本次全国性的能力验证项目参与实验室的地理跨度大,发放样品的过程预计需要 3 至 5 d 的时间;期间 36 °C 或以上高温天气和封装环境可能会造成 PT 样品的失效。因此,需评估 PT 样品在不同温度条件下的耐热稳定性。

耐热稳定性通过抽样检测 VP 和 VM 菌合格率确定。抽检合格率是合格 PT 样品数占抽样数的百分比(见表 2)。冻干后 PT 样品在 180 d 内分 4 个阶段选取 14 个时段抽取,分别为第 1~7 d 每天抽检、第 10~20 d 每 5 d 抽检、第 30~50 d 每 10 d 抽检、第 180 d 抽检终止;从置于 4、25、36 及 42 °C 的环境条件中的 PT 样品 A 和 B 中随机抽取 2~4 份进行鉴定。

### 2.5.2 保存时间对样品稳定性的影响

本研究拟观察在 4 °C 的保存条件下,PT 样品菌量随保存时间延长的变化情况。观察时间为 180 d 内选取 7 个时段,每次随机抽取 2~4 份样本进行复苏、计数及鉴定;采用 SPSS 软件生成菌量与保存时间变化趋势的散点图和模拟曲线(见图 2)。

## 2.6 实测 PT 样品的结果统计

组织方根据参与实验室回送的原始实验记录比对鉴定结果和预期结果,以分析和统计各实验室的鉴定能力及制样的质量。本项目以分离鉴定法作为阳性结果的判断依据,预期结果与鉴定结果一致,表明 PT 样品质量合格;当出现不一致的情况时,将评估是否由于检测技术的原因所造成。本项目采用实际合格率的指标,即参与实验室所检 PT 样品的合格间数占发放总间数的百分比,以真实地评价制备样品的质量。

## 3 结果

### 3.1 PT 样品 B 的混合比例

结果显示,当 VP:VM 比例低于 1 000:1 时,VP 在培养基上复苏生长较弱,不易检出;在混合比例为 10 000:1 时 VP 菌落生长较强势,但 VM 菌落稀少,干扰效果不明显;而在 5 000:1 比例时,VP 和 VM 菌落生长均势符合预期要求(见表 1)。因此,本研究选择该浓度作为 PT 样品 B 的混合比例以进行批量制备。

### 3.2 PT 样品的一致性评价结果

通过菌量计数得到抽检 PT 样品 A 的均值和  $\sigma$

表 1 不同混合比例的 VP 与 VM 菌在两种培养基上的菌落生长情况( PT 样品 B)

Table 1 Effect of different proportion of VP and VM on the growth of bacterial colonies in different media ( sources from specimen B)	100:1	200:1	500:1	1 000:1	5 000:1	10 000:1
弧菌鉴定培养基 TCBS Media	- / +	+ / + + +	+ / + + +	+ + / + +	+ + / + +	+ + + / +
弧菌显色培养基 Vibrio Color Media	- / +	+ / + + +	+ / + + +	+ + / + +	+ + / + +	+ + + / +
效果评价 Evaluation	-	+	+	++	+++	++

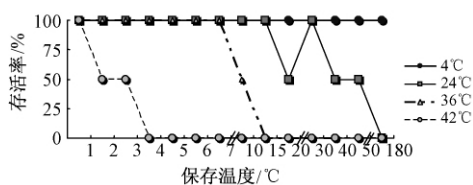
注 “-”表示未见副溶血性弧菌( VP) 生长, “+ / + + +”表示 VP 和拟态弧菌( VM) 在培养基上 CFU 生长优势比。

值为 6.64 和 0.05 ,PT 样品 B 是 4.58 和 0.7。根据抽样公式计算 ,PT 样品 A 和 B 的  $\delta$  值为分别为 3.09 和 0.38 ,并得到满足该批 PT 样品 A 和 B 预期要求的抽样量应至少超过 14 份。据此 ,组织方随机抽取 A 和 B 各 20 份作为一致性检测的样本。通过平行检测结果显示 ,抽检样品经复苏后 VP 和 VM 的生化性状稳定 ,在显色培养基上可有效分辨 ,并且微生物鉴定系统也能正确鉴定 VP 和 VM 菌( 置信值均超过 85%); 本次抽样检测的合格率为 100% ( 40/40) 。

### 3.3 PT 样品的稳定性评价结果

#### 3.3.1 温度对样品菌量的影响

结果显示 ,PT 样品 A 在 4℃ 条件下保存 180 d 期间的 14 个时点中 ,抽检存活率保持在 100%; 保存于 25℃ 15 d、36℃ 10 d 及 42℃ 3 d 的存活率是 100%; 若超过上述保存时间后 ,部分 PT 样品 A 的检样中 VP 未能有效复苏 ,抽检存活率出现不稳定状态。PT 样品 B 在 4℃ 条件下保存 180 d 期间的 14 个时点中 ,抽检样品 VP 和 VM 菌合格率保持在 100% ,保存于 25℃ 15 d、36℃ 5 d 及 42℃ 1 d 的合格率是 100% ,若超过上述保存时间后 ,部分 PT 样品 B 的检样中 VP 未能有效复苏 ,抽检存活率也会出现不稳定状态( 见图 1); PT 样品 B 菌量的稳定性受温度影响较 PT 样品 A 略大。



注: 图中各抽样阶段在横轴上以“//”线断开。

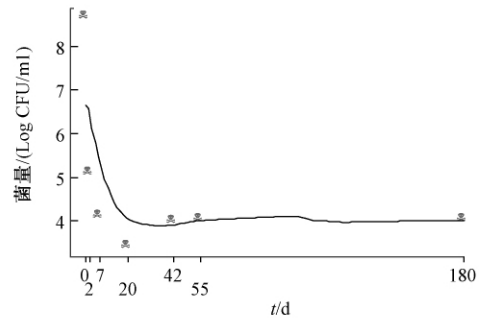
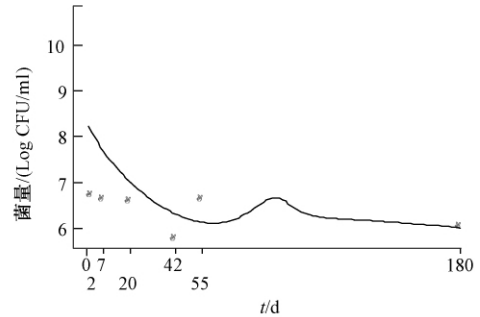
图 1 PT 样品 B 中 VP 在不同温度条件下的抽样存活率

Figure 1 Survival rate of VP kept under different temperatures

#### 3.3.2 保存时间对样品菌量的影响

结果显示 ,PT 样品 A 和 B 经冻干过程后 ,菌量损失超过 50% ,分别降至 6.67 和 5.07。PT 样品 A 菌量在 180 d 时点的菌量( 4.00) 比冻干后初始菌量( 5.07) 下降了 21.10% ,PT 样品 B 菌量在 180 d 时点的菌量( 6.00) 比冻干后初始菌量( 6.67) 也下降了 11.17%。PT 样品 A 和 B 置于 4℃ 及避光条件下保存 180 d ,期间抽检的菌量值仍可达到检出的预期

下限值( 见图 2) 。



注 “第 0 天”数值为冻干实验前的菌量 , “第 2 天”数值为冻干后样品的初始菌量。

图 2 PT 样品 A( 上图) 和 B( 下图) 的保存时间与菌量变化  
Figure 2 Variation of VP colonies of specimen A( up) and B( down) conserved for different interval ( Unit: LogCFU/ml)

### 3.4 模拟测试及参与实验室结果

PT 样品储存 4 d 后( 气温 33℃) 开封鉴定结果符合预期目标 ,经邮递( 气温 37℃) 折返后鉴定结果也符合预期结果 ,因此 ,组织方确认研制 PT 样品具备满足发放要求的稳定性。

在参与实验室完成项目后 ,组织方根据 188 家参与实验室反馈结果进行分析 ,显示鉴定正确的有 167 家 ,鉴定有误 21 家 ,反映 PT 样品实际的合格率达到 88.8% ( 167/188) 。经筛选剔除鉴定技术原因的 16 份 ,修正后合格率为 97.3% ( 183/188) 。结果显示 ,本项目研制的 PT 样品的达到稳定性和均一性的预期。

### 4 讨论

据统计 ,美国每年开展的临床和微生物实验室

的各类相关检验 PT 项目平均达到千余项次,组织方获取了百万条以上的参与实验室检测能力的数据库<sup>[1]</sup>。实验室通过参加各种 PT 项目,可以有效地检验和了解自身和同行的技术能力,因此成为实验室能力的重要体现。近年来,我国临床和微生物实验室组织也开展了大量细菌鉴定的 PT 项目。然而,众多参与实验室反馈认为,部分项目可能在制样过程中没有进行严谨的科学研究和采用严格质量控制流程,造成样品质量的不均一性和不稳定性,影响参与实验室对鉴定结果的判断。

本次副溶血性弧菌能力验证项目(PT)冻干样品的制备,是以 VP 菌的冷冻干燥技术为基础,建立一套对 PT 样品研制和发放过程中可能存在的影响因素进行充分预测和评估的技术流程;其中,混合菌 PT 样品是制备研究的重点和难点。通过观察不同比例混合菌悬液冻干 PT 样品复苏后两菌 CFU 的优势比和鉴定结果,本研究选择 5 000:1 的比例进行 PT 样品的制备和评估,并通过多家参与实验室的反馈结果的验证,显示了较高的合格率,相关结果目前在国内未见报道。

本研制 PT 样品具有较好的一致性。弧菌属菌种由于细胞壁中脂多糖成分影响了冻干时胞内水分的外渗<sup>[2]</sup>,造成冻干后 VP 菌存活率较低和不能复苏<sup>[3]</sup>,导致了 PT 样品合格率偏低。本研究对总体 PT 样品的菌量和合格率进行了可靠的评估,并利用合理的抽样方案和鉴定方法加以验证,确保了参与实验室所收到的样品是均一的且符合考核的预期要求。

稳定性实验结果表明,温度对冻干后 PT 样品的菌量影响较大。PT 样品在 42 ℃ 的条件下,VP 和 VM 菌量在数天内迅速降低至不能复苏,而储存于 4 ℃ 的条件下在 180 d 内仍比较稳定,符合检测限量预期;这显示了冷藏条件对 PT 样品以及菌种保藏的重要性<sup>[3]</sup>。本研究根据 PT 样品在不同温度条件下耐热保存时间的实验结果,在发放过程中添加了冷藏材料,也通过模拟实验验证了其耐热特性,这有效地预防了合格样品因发放条件的影响造成质量的改变,实验效果也在实际合格率数据上得到体现。

本研究中对于 PT 样品冻干后菌量的计数,采用 TSA 和显色培养基相结合的常规结果评定方法,结果表明该法可以满足本研究要求。目前,已有研究报道改进了混合菌的分类计数方法:根据细菌的存活和凋亡细胞设计不同标记的荧光探针,借助流

式细胞技术进行计数,能精确地获知冻干前后 PT 样品的菌量<sup>[11]</sup>,并且可通过数学模型拟合和比较不同细菌的生长趋势<sup>[12-13]</sup>,以动态监测样品中混合菌量的变化情况,这将对改进我国微生物实验室制备能力验证样品的质量控制提出新的思路<sup>[14]</sup>。

本次副溶血性弧菌 PT 项目的质控流程研究,将为微生物能力验证样品的研制提供借鉴作用。同时,该项目的实施也对我国食品安全和疾病预防和检测工作具有重要的现实意义。

致谢:本研究得到广东省微生物研究所吴清平教授,严纪文主任以及项目的协作实验室——广州市疾病预防控制中心微生物检验科的技术支持,在此表示感谢。

## 参考文献

- [1] HOWERTON D, KROLAK J M, MANASTERSKI A, et al. Proficiency testing performance in US laboratories: results reported to the Centers for Medicare & Medicaid Services, 1994 through 2006[J]. Arch Pathol Lab Med 2010, 134(5): 751-758.
- [2] TSONKA U D, TODOR D. Antibiosis and conservation of microorganisms[J]. J Culture Collect 2004-2005, (4): 17-28.
- [3] 常金梅,蔡芷荷,吴清平,等.菌种冷冻干燥保藏的影响因素[J].微生物学通报 2008, 35(6): 959-962.
- [4] 中华人民共和国卫生部.关于 2009 年全国食物中毒事件情况的通报[EB/OL]. [2010-03-05]. <http://www.moh.gov.cn>.
- [5] YUKIE M S, JUNJI S, TAKASHI I, et al. Survival of freeze-dried bacteria[J]. J Gen Appl Microbiol 2008(54): 9-24.
- [6] 李华,骆艳娥,刘延琳.真空冷冻干燥微生物的研究进展[J].微生物学通报 2002, 29(3): 78-82.
- [7] 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[J].微生物学通报 2008, 35(1): 145-148.
- [8] 中华人民共和国卫生部,中国国家标准化管理委员会. GB/T 4789.7—2008 食品卫生微生物学检验副溶血性弧菌检验[S].北京:中国标准出版社,2008.
- [9] 马聪,朱海明,严纪文,等.不同来源的副溶血性弧菌定性定量分析及毒素基因检测[J].中国食品卫生杂志,2009, 21(5): 402-405.
- [10] 杨树勤.卫生统计学[M].3版.北京:人民卫生出版社,1993: 139.
- [11] MORGAN C A, BIGENI P, HERMAN N, et al. Production of precise microbiology standards using flow cytometry and freeze drying[J]. Cytometry 2004, (part A 62A): 162-168.
- [12] 王璐华,宁喜斌.副溶血性弧菌生长预测模型的建立与应用探讨[J].华北农学报 2008, 23(增刊): 263-267.
- [13] PARTHUISOT N, CATALA P, LEBARON P, et al. A sensitive and rapid method to determine the viability of freeze-dried bacterial cells[J]. Appl Microbiol 2003(36): 412-417.
- [14] 胡小玲,金国农.混合肠道菌盲样在室间质控检测中的应用[J].浙江预防医学 2003, 15(4): 79-80.