

实验技术与方法

微滴式数字聚合酶链式反应定量检测水产品中溶藻弧菌

李丹¹, 马丹¹, 李碧鹰², 徐蕾蕊¹, 魏咏新¹, 魏海燕¹, 汪琦¹, 赵晓娟¹, 刘莉¹, 张西萌¹, 付溥博¹, 曾静¹
(1. 北京海关, 北京 100026; 2. 中国食品发酵工业研究院有限公司, 北京 100015)

摘要:目的 建立水产品中溶藻弧菌微滴式数字聚合酶链式反应(ddPCR)快速定量检测方法。方法 采用SN/T 1870—2016《出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光PCR法》中溶藻弧菌的引物探针,建立优化ddPCR反应体系,梯度稀释溶藻弧菌纯培养液,确定ddPCR方法的检出限(LOD)和定量限(LOQ);通过人工添加试验,比较ddPCR与实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)方法定量的准确性,以验证ddPCR方法用于检测水产品中溶藻弧菌的可行性。结果 所建立的水产品中溶藻弧菌ddPCR检测方法经过溶藻弧菌标准菌株、分离菌株以及其他近源菌株验证,具有良好的特异性;纯培养的LOD和LOQ一致,均为2.2拷贝/反应,相当于110 CFU/ml纯菌液,定值结果与传统平板计数方法相差0.04个对数值。在人工污染模拟试验中ddPCR的定量结果较qPCR更接近理论添加值,检测重复性以及低浓度样品的检出情况也均优于qPCR。ddPCR对人工污染样品的LOQ可达120拷贝/g。结论 溶藻弧菌ddPCR定量检测方法特异性好、灵敏度高、结果准确,可为快速定量检测溶藻弧菌提供参考。

关键词:微滴式数字聚合酶链式反应;溶藻弧菌;定量检测

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2019)04-0345-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2019.04.009

Detection of *Vibrio alginolyticus* in aquatic products
by droplet digital polymerase chain reaction

LI Dan¹, MA Dan¹, LI Biying², XU Leirui¹, WEI Yongxin¹, WEI Haiyan¹, WANG Qi¹,
ZHAO Xiaojuan¹, LIU Li¹, ZHANG Ximeng¹, FU Pubo¹, ZENG Jing¹
(1. Beijing Customs, Beijing 100026, China; 2. China National Research Institute of
Food and Fermentation Industries Co. LTD., Beijing 100015, China)

Abstract: Objective To establish a new accurate quantitative method for detection of *Vibrio alginolyticus* by droplet digital polymerase chain reaction PCR (ddPCR) in aquatic products. **Methods** The primer and probe of *Vibrio alginolyticus* in Method for the Detection of Pathogens in Food for Export—Real-time PCR Method (SN/T 1870-2016) were selected, and the ddPCR reaction system was established and optimized. The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were tested based on ddPCR using pure bacterial genomic DNA and quantitative accuracy analysis was performed on the result. In order to verify the feasibility of the method, positive strain was added to pre-screening squid rings without background and the result obtained by ddPCR and quantitative real time polymerase chain reaction (qPCR) were compared. **Results** *Vibrio alginolyticus* performed good specificity in ddPCR detection in this experiment. In pure culture of *Vibrio alginolyticus*, the LOD and LOQ values overlapped each other, which was 2.2 copies/reaction, corresponding to 110 copies/ml. In the artificial contaminated experiment, the result of ddPCR for quantification of *Vibrio alginolyticus* were closer to theoretical value, and the repeatability and the detection rate of low concentration sample were also better than qPCR. The LOQ of artificially contaminated sample could reach 120 copies/g. **Conclusion** The result showed that quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* by ddPCR had good specificity, high sensitivity and accuracy, which had practical application value.

Key words: Droplet digital polymerase chain reaction; *Vibrio alginolyticus*; quantitative detection

收稿日期:2019-06-19
基金项目:“食品安全关键技术研发”重点专项(2017YFC1601602);
原国家质检总局科技计划(2017IK176)
作者简介:李丹 女 工程师 研究方向为食品安全与微生物检测
E-mail: lidan@bjciq.gov.cn
通信作者:曾静 女 研究员 研究方向为食品安全与微生物检测
E-mail: zengj@bjciq.gov.cn

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)是一种革兰阴性嗜盐菌,广泛存在于海洋和江河入海口的水域中,是海水类弧菌中的优势菌种。摄入或接触被溶藻弧菌感染的食品可能会引起胃肠炎或伤口感染^[1-2]、中耳炎^[3]等,我国近年来多个城市陆续报道了溶藻弧菌引起的食源性疾病事件^[4-7]。同时,它也是鱼、虾、贝等海水养殖水产品的一种条件致病

菌。当环境恶化时,水生动物机体免疫力下降,容易引起弧菌病的暴发^[8],给水产养殖业造成巨大经济损失。

目前,溶藻弧菌的检测仍以传统培养法为主,如美国食品药品监督管理局(FDA)和北欧食品分析委员会方法^[9-10],需要经过夜培养、选择性平板分离、生化鉴定等复杂的过程,不仅耗时费力,而且样品中潜在的其他杂菌有可能会因过度增殖而给目标菌分离造成干扰。我国国家标准中对溶藻弧菌的检测方法还没有具体规定,出入境检验检疫行业标准 SN/T 1870—2016《出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法》^[11]提供了溶藻弧菌可疑菌落的实时荧光聚合酶链式反应(PCR)检测方法。然而,当前针对溶藻弧菌的检测仍多以定性为主,缺少简便而有效的定量检测方法。

微滴式数字 PCR(ddPCR)被认为是第三代核酸扩增技术,其原理是通过把稀释到一定浓度的 DNA 分子分布到 10 000~20 000 个微滴中,使大部分微滴中 DNA 分子的数量为 1 或 0,然后通过 PCR 扩增和阳性信号的累积读取阳性反应单元数,再根据泊松分布计算出样品中的 DNA 分子数,从而实现对 DNA 分子的绝对定量^[12-13]。目前该技术已被用于部分微生物的定量检测,例如针对临床标本中耐甲氧西林的金黄色葡萄球菌^[14]、牛粪便标本中产志贺毒素的大肠埃希菌^[15],以及食品中的单核细胞增生李斯特菌、副溶血性弧菌、金黄色葡萄球菌、沙门菌、大肠埃希菌 O157:H7、阴沟肠杆菌等^[16-21],尚未见到可用于水产品中溶藻弧菌定量检测的相关报道。

本研究建立了适用于水产样品中溶藻弧菌的 ddPCR 精准定量检测方法,为开展水产品风险监控和水产品脱毒净化处理有效性评估提供了技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

标准菌株共 10 株,购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)、中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)、中国一般微生物典藏中心(CGMCC);5 株溶藻弧菌和 1 株非 O1、非 O139 群霍乱弧菌来源于北京海关技术中心(BJCTC),分离自水产品,见表 1。

1.1.2 主要仪器与试剂

Nanodrop 2000 超微量紫外分光光度计(美国赛默飞世尔),Veriti PCR 仪(美国 Applied Bio

表 1 试验用菌株列表		
Table 1 List of experimental strains		
菌株名称	菌株来源及编号	菌株数
溶藻弧菌	CICC 10889	1
	BJCTC 001~005	5
副溶血性弧菌	ATCC 17802	1
	ATCC 27562	1
创伤弧菌	CGMCC 1758	1
	ATCC 33653	1
拟态弧菌	CGMCC 1.1969	1
	CICC 10474	1
河流弧菌	CGMCC 1.1611	1
弗氏弧菌	CGMCC 1.1612	1
非 O1、非 O139 群霍乱弧菌	BJCTC 006	1
嗜水气单胞菌	CICC 10868	1

Systems), QX100 微滴生成仪、微滴读取仪均购自美国 Bio-Rad。

ddPCR 定量试剂盒(美国 Bio-Rad),细菌基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司],Petrifilm™ 6404 菌落总数测试片(德国 3 M),引物、探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及平板计数

利用 3% 氯化钠碱性蛋白胨水对溶藻弧菌(CICC 10889)的过夜培养物进行 10 倍梯度稀释。采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取各稀释度菌液 DNA,提取步骤按照试剂盒说明书进行,最终将核酸溶解在 100 μl TE 缓冲液中。同时用 3 M 细菌总数测试纸片计数不同梯度纯菌液浓度,每个稀释度做 2 个平行检测。

1.2.2 超微量紫外分光光度计测定

取溶藻弧菌(CICC 10889)在 3%氯化钠碱性蛋白胨水中的过夜培养物 1 ml,提取其核酸并用超微量紫外分光光度计进行浓度和纯度的测定,确保提取核酸在 260 和 280 nm 处吸光度的比值(A260/A280)在 1.8~2.0 之间,并按公式(1)^[10]计算提取溶藻弧菌基因组 DNA 的拷贝浓度:

$$c = \frac{m \times 10^{-9}}{n \times 1.096 \times 10^{-21}} \quad (1)$$

其中 c 代表提取的细菌基因组浓度(拷贝/μl); m 代表超微量紫外分光光度计测得的核酸浓度(ng/μl); n 代表细菌基因组的长度(bp)。根据美国生物技术信息中心(NCBI)已经发布的溶藻弧菌基因组的测序数据,其平均长度为 5.3×10^6 bp。

1.2.3 引物探针及实时荧光 PCR 试验

为了便于 ddPCR 与实时荧光定量 PCR(qPCR)的方法比较,本研究选取 SN/T 1870—2016^[11]中依据溶藻弧菌单拷贝 *groel* 基因(GenBank:

CP006718.1)所设计的引物探针(见表2),同时用于 ddPCR 和 qPCR 的扩增反应。

表2 溶藻弧菌 qPCR/ddPCR 扩增引物探针序列
Table 2 Primer and probe sequence for *Vibrio alginolyticus*
qPCR/ddPCR

引物/探针	序列(5'-3')	产物长度/bp
正向引物	GAGCTTCTGTGAATGTAACGACAC	122
反向引物	ACCCACACGCTCCATTGC	
探针	TCTCTGCAAACTCAGACGCAAGCGTAGG	

qPCR 的反应体系和条件参照 SN/T 1870—2016^[11]。在对水产品进行 qPCR 检测时,以 10 倍梯度稀释的溶藻弧菌基因组核酸拷贝浓度为横坐标,以对应循环阈值(Ct 值)为纵坐标,绘制 qPCR 标准曲线,根据回归公式和 qPCR 检测水产品 Ct 值计算其中包含的靶基因拷贝数。

1.2.4 ddPCR 试验

反应体系(20 μl):10 μl ddPCR Master Mix for Probes(no dUTP),上、下游引物各 1.5 μl(终浓度 750 nmol /L),探针 0.5 μl(终浓度 250 nmol/L),DNA 模板 2 μl,用双蒸水补足总体积。将 20 μl 的 ddPCR 反应预混液和 70 μl 微滴生成油分别加入到 8 孔微滴生成卡中,置于微滴生成仪中生成微滴。将生成的油包水的微滴(40 μl)缓慢转移至 96 孔板中,封膜后置于 PCR 仪上进行扩增反应。扩增反应条件:95 ℃ 预变性 10 min;94 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 1 min,40 个循环;98 ℃ 固化微滴 10 min。将扩增后的 96 孔板置于微滴读取仪中,利用 Quanta Soft 软件进行结果读取和分析,得到 ddPCR 测定结果与对应纯菌液浓度的换算公式:

$$C = N \times \frac{V_1}{V_2 \times V_3} \tag{2}$$

其中 C 为对应纯菌液浓度(CFU/ml);N 为 20 μl ddPCR 反应体系中测得的核酸拷贝数(拷贝/20 μl);V₁ 为提取核酸的最终定容体积(μl);V₂ 为 ddPCR 反应体系中加入的核酸模板体积(μl);V₃ 为提取的菌悬液体积(ml)。

1.2.5 ddPCR 退火温度的优化

以溶藻弧菌基因组 DNA 作为模板,分别在 56、58、60、62 ℃ 四个退火温度下进行 ddPCR 扩增反应,根据扩增结果筛选出最佳退火温度。

1.2.6 ddPCR 特异性验证

分别提取表 1 中所列菌株的过夜培养物基因组 DNA,并稀释到 10⁻³ 稀释度后照优化的条件进行 ddPCR 检测,以验证其特异性。

1.2.7 实际样品添加

选择经传统方法^[6]及 qPCR 方法验证无溶藻弧

菌的市售鱿鱼圈样品作为添加基质。对溶藻弧菌过夜培养纯菌液进行 10 倍梯度稀释并平板计数,同时取 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸ 稀释度纯菌液各 25 ml 分别添加到盛有 25 g 鱿鱼圈样品的均质袋中,各添加浓度分别设 3 个样品重复,另取 1 份 25 g 鱿鱼圈样品加入 3% 氯化钠碱性蛋白胨水代替添加纯菌液作为阴性对照,上述样品用拍击式均质器拍击 2 min,制成系列 1:1 含有不同浓度溶藻弧菌的鱿鱼圈污染样品。取各样品匀液 2 ml 分别利用试剂盒法提取细菌基因组 DNA,最终将核酸溶解在 100 μl TE 缓冲液中,进行 ddPCR 和 qPCR 检测,比较两者的定值效果。

2 结果

2.1 ddPCR 扩增体系的建立与优化

ddPCR 对溶藻弧菌 DNA 扩增的一维散点图和直方图见图 1。溶藻 DNA 扩增效果良好,一维散点图中阳性微滴和阴性微滴明显分成两簇,并且中间弥散微滴数目少(图 1a);直方图中阳性峰和阴性峰明显分开,中间无任何干扰(图 1b),表明溶藻弧菌的 qPCR 扩增引物和探针可以直接应用到 ddPCR 的扩增体系中。

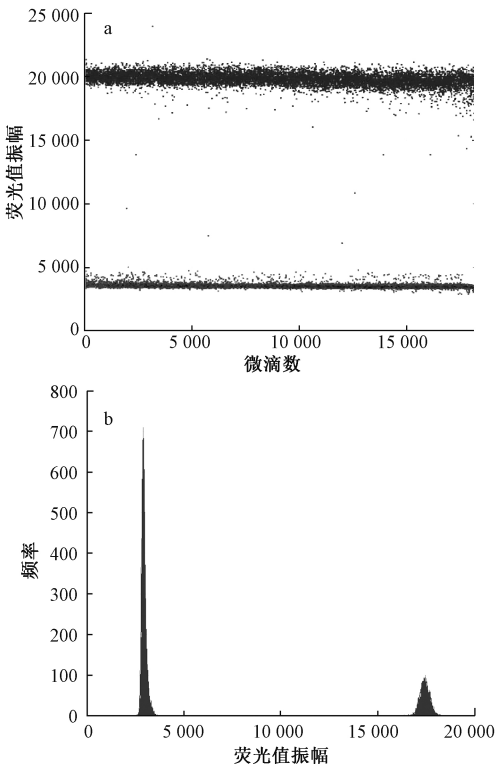


图1 ddPCR 方法扩增溶藻弧菌的散点图(a)和直方图(b)
Figure 1 One-dimensional scatter plot of selected wells/samples (a) and histograms of selected wells/samples fluorescent droplet amplitudes (b) for quantifying *Vibrio alginolyticus* genomic DNA by ddPCR

在 56、58、60、62 ℃ 四个温度条件下, ddPCR 的定量结果并没有明显差异, 但 60 和 62 ℃ 条件下 ddPCR 扩增的荧光信号强度却呈现一定的下降趋势(见图 2), 因此将 58 ℃ 作为最终退火温度。

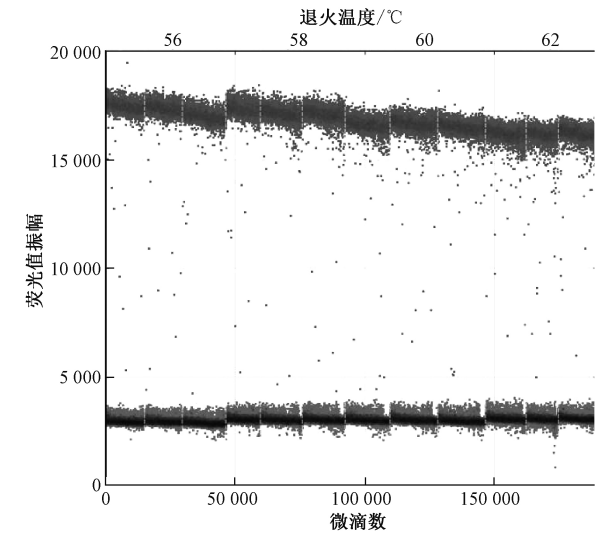
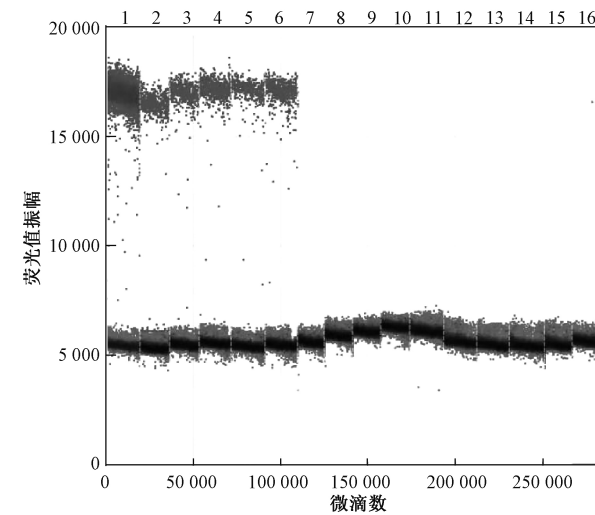


图 2 不同退火温度下 ddPCR 的扩增结果
Figure 2 Amplification results of ddPCR at different annealing temperature

2.2 ddPCR 特异性分析

ddPCR 对 6 株溶藻弧菌均呈现阳性扩增信号(图 3), 而 9 株其他弧菌和 1 株嗜水气单胞菌的检测均呈阴性(图 3), 表明建立的溶藻弧菌 ddPCR 检测方法特异性强。



注: 1 为溶藻弧菌(CICC 10889); 2~6 为溶藻弧菌自分离株(BJCTC 001~005); 7 为创伤弧菌(ATCC 27562); 8 为创伤弧菌(CGMCC 1758); 9 为拟态弧菌(ATCC 33653); 10 为拟态弧菌(CGMCC 1.1969); 11 为拟态弧菌(CICC 10474); 12 为河流弧菌(CGMCC 1.1611); 13 为弗氏弧菌(CGMCC 1.1612); 14 为副溶血性弧菌(ATCC 17802); 15 为霍乱弧菌自分离株(BJCTC 006); 16 为嗜水气单胞菌(CICC 10868)
图 3 ddPCR 对溶藻弧菌及其他近缘菌株 DNA 的检测结果
Figure 3 Specificity detection of *Vibrio alginolyticus* by ddPCR

2.3 ddPCR 方法测定溶藻弧菌基因组 DNA 的最低检出限(LOD)和定量限(LOQ)

对纯菌液 qPCR 与 ddPCR 最低均可检测到 10^{-7} 稀释度(图 4)。 $10^{-7} \sim 10^{-3}$ 稀释度纯菌液($9.8 \times 10^1 \sim 9.8 \times 10^5$ CFU/ml)经 ddPCR 测得的基因组浓度呈现良好的线性关系, 相关系数 R^2 为 0.999, 10^{-7} 稀释度三次重复试验均能检出, 且检测变异系数(CV 值)为 15.75% (小于 20%), 所以 LOD 和 LOQ 均为 2.2 拷贝/反应, 其对应纯菌液浓度为 1.1×10^2 CFU/ml, 见表 3。

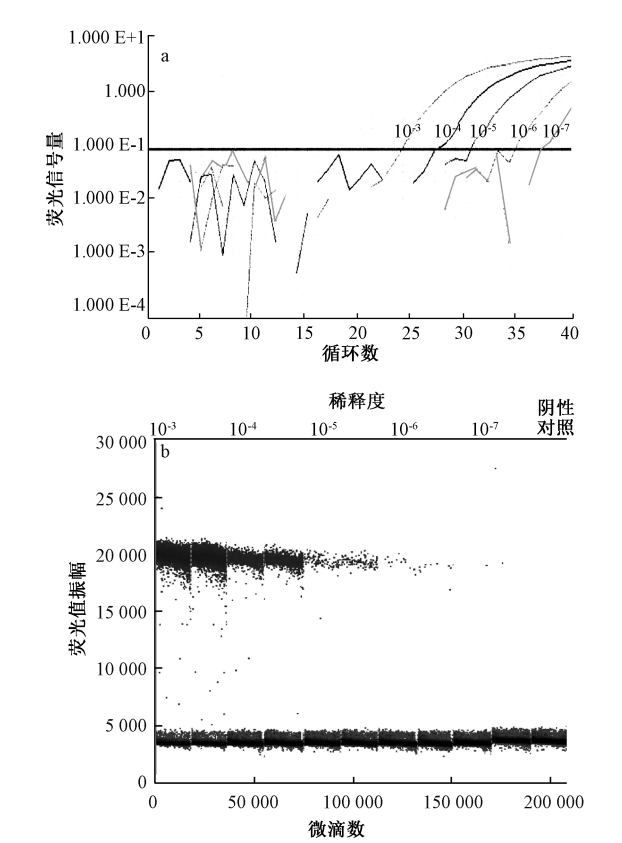


图 4 溶藻弧菌纯菌液的 qPCR 扩增曲线(a)和 ddPCR 扩增微滴分布图(b)
Figure 4 qPCR amplification curve (a) and ddPCR amplification droplet map of *Vibrio alginolyticus* (b)

2.4 ddPCR 与平板计数、超微量紫外分光光度计测定结果的比较

溶藻弧菌(CICC 10889)在 3% 氯化钠碱性蛋白胨水中的过夜培养物经过平板计数测得其浓度为 9.8×10^8 CFU/ml, 其对数值为 8.99; 超微量分光光度计测定基因组 DNA 浓度, 经计算所对应菌液浓度为 1.97×10^9 CFU/ml, 其对数值为 9.29; 在 $10^{-7} \sim 10^{-3}$ 定值范围内 ddPCR 测得纯菌液浓度分别乘以对应稀释因子计算出原纯菌液浓度为 $1.1 \times 10^9 \sim 9.6 \times 10^8$ CFU/ml, 对数值在 8.86~9.04 范围内, 其平均值为 8.95, 比平板计数法和超微量紫外分光光度计法测得值分别低 0.04 和 0.34 个对数值(图 5)。

表 3 梯度稀释的溶藻弧菌纯菌液 ddPCR 定量检测结果

Table 3 Gradient dilution of ddPCR quantitative detection results of *Vibrio alginolyticus*

稀释因子	ddPCR 检测结果/(拷贝/20 μl)				对应纯菌液浓度 /(CFU/ml)	CV/%	平板计数结果 /(CFU/ml)	分光光度计结果 /(CFU/ml) ^a
	平行 1	平行 2	平行 3	平均值				
10 ⁻³	20 000	18 660	19 120	19 260	9.6×10 ⁵	3.53	9.8×10 ⁵	1.97×10 ⁶
10 ⁻⁴	1 704	1 666	1 690	1 686	8.4×10 ⁴	1.14	9.8×10 ⁴	1.97×10 ⁵
10 ⁻⁵	148	144	146	146	7.3×10 ³	1.37	9.8×10 ³	1.97×10 ⁴
10 ⁻⁶	19	13	17	16	8.2×10 ²	17.50	9.8×10 ²	1.97×10 ³
10 ⁻⁷	2	2	2	2	1.1×10 ²	15.75	9.8×10 ¹	1.97×10 ²

注:^a:根据公式(1)计算出分光光度计测定的提取细菌基因组浓度(拷贝/μl),乘以提取基因组核酸定容体积(100 μl),再除以提取的纯菌液体积(1 ml),即得到对应稀释度纯菌液浓度(CFU/ml)

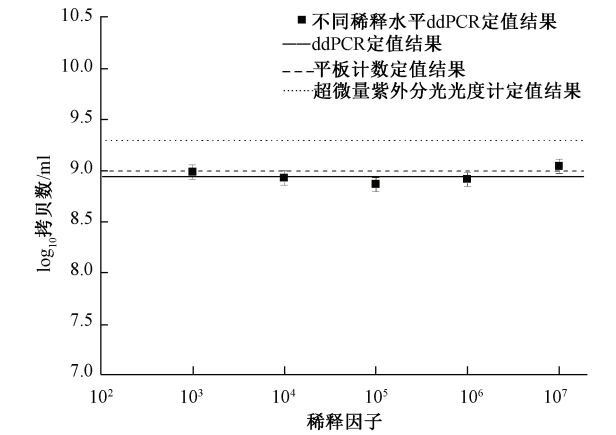


图 5 溶藻弧菌纯菌液中基因组浓度定值结果比较

Figure 5 Comparison of genomic concentration determination results of *Vibrio alginolyticus*

ddPCR 的定量结果同平板计数的预计值间存在良好的相关性,相关系数 R^2 为 0.997。

2.5 实际样品检测

根据添加纯菌液的平板计数结果,预计人工污染的鱿鱼圈样品中溶藻弧菌的理论添加值为 $1.21\times 10^1\sim 1.21\times 10^5$ CFU/ml。提取人工添加样品中 DNA,同时进行 ddPCR 和 qPCR 检测,结果发现 ddPCR 对 10^{-8} 稀释度仍能检出,qPCR 仅检测到 10^{-7} 稀释度;而且,对于 $10^{-7}\sim 10^{-4}$ 稀释度,ddPCR 的定值结果与理论添加值非常接近,检测的 CV 值均小于 23.5%,明显小于 qPCR,ddPCR 对该人工污染样品的 LOQ 可达 120 拷贝/g(见表 4)。

3 讨论

当前针对食源性致病菌的定量检测方法仍主要分为传统培养法和分子生物学方法两大类,前者主要包括平板计数和最大可能数(MPN)法,而后的主要为 qPCR 法。新兴的 ddPCR 技术可以直接对核酸进行绝对定量,因此有望为食源性致病菌的定量检测提供更加精准的手段。本研究选取 SN/T 1870—2016 中溶藻弧菌的引物探针,通过反应体系和条件优化建立溶藻弧菌 ddPCR 定量检测技术,证明了 qPCR 扩增反应转化为 ddPCR 的可行性。

表 4 ddPCR 与 qPCR 对人工污染鱿鱼圈样品中溶藻弧菌的定量检测结果

Table 4 Quantitative detection results of *Vibrio alginolyticus* in artificially contaminated squid samples by ddPCR and qPCR

检测方法	添加纯菌液稀释度	定量检测结果/(拷贝/g)				CV/%
		1	2	3	平均值	
ddPCR	10 ⁻⁴	141 000	149 000	138 000	143 000	3.99
	10 ⁻⁵	12 900	13 500	14 300	13 600	5.18
	10 ⁻⁶	1 560	1 540	1 480	1 500	2.72
	10 ⁻⁷	140	90	140	120	23.41
	10 ⁻⁸	60	0	80	47	89.21
qPCR	10 ⁻⁴	231 000	301 000	311 000	281 000	15.51
	10 ⁻⁵	22 800	33 600	21 500	26 000	25.58
	10 ⁻⁶	2 500	2 140	2 480	2 400	8.52
	10 ⁻⁷	322	181	415	310	38.50
	10 ⁻⁸	—	—	—	—	—

注:—表示未检出

利用梯度稀释的溶藻弧菌纯菌液评价 ddPCR 方法的检测性能。能被可靠检测到的最低靶基因水平即为 LOD^[14],而测定结果的 CV 值≤25%时的最低靶基因浓度即为 LOQ^[22];因此,ddPCR 方法对溶藻弧菌的 LOD 和 LOQ 均为 2.2 拷贝/反应,相当于 110 CFU/ml,且 ddPCR 定值结果与平板计数结果非常接近。

在人工污染鱿鱼圈样品试验中,将 ddPCR 与 qPCR 定值结果进行比较,进一步评价所建立 ddPCR 方法的有效性。结果表明,ddPCR 对溶藻弧菌的定量结果更为接近理论添加值,而 qPCR 的定值结果均明显偏高;而且 ddPCR 的检测重复性以及 对低浓度样品的检出情况也均优于 qPCR。qPCR 方法属于相对定量,结果的准确性和重复性在很大程度上依赖于所绘制的标准曲线质量及扩增效率,并且需要具备已知浓度的核酸标准品^[11]。本研究采用梯度稀释的溶藻弧菌纯菌液中提取的基因组 DNA 作为 qPCR 检测标准品,并通过紫外分光光度法测定标准品 DNA 的浓度,实际得到的是 260 nm 处所有核酸分子的吸光度值,无法区分其他非目标 DNA 或 RNA 分子以及蛋白等杂质成分,标准品浓度偏高,必然导致最终 qPCR 定值结果偏高。此外,样品中存在不同程度的核酸扩增抑制成分干扰导致扩增效率的差异,因此,不同实验室、不同人员间

qPCR 的定量检测结果缺少可比性。而 ddPCR 作为一种根据传统 PCR 原理和泊松统计分布设计的新型 PCR 技术,既不依赖于扩增曲线的 Ct 值,也不依赖于标准曲线,其微滴反应能极大程度分散反应体系,有效消除抑制因子的作用^[11],保证检测过程中的扩增效率,因此 ddPCR 对低浓度 DNA 的检测灵敏度优于 qPCR。

综上所述,本试验建立的 ddPCR 方法灵敏、稳定、特异性好,能够满足水产品中溶藻弧菌的定量检测需求,且不需要增菌及后续复杂的生化鉴定步骤,大幅缩短检测时间,为溶藻弧菌的快速定量检测提供了新的手段。

参考文献

[1] SADOK K, MEJDI S, NOURHEN S, et al. Phenotypic characterization and RAPD fingerprinting of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* isolated during Tunisian fish farm outbreaks [J]. Folia Microbiol,2013,58(1):17-26.

[2] 谢扬,李鹏,李肖莉,等.溶藻弧菌急性胃肠炎 3 例报告[J].中国人兽共患病学报,2007,23(9):956.

[3] ARDIC N, OZYURT M. Case report;otitis due to *Vibrio alginolyticus*[J]. Mikrobiyol Bul, 2004, 38(1/2):145-148.

[4] 熊海平,许海燕,苏婧.一起由解藻酞酸弧菌引起食物中毒的病原菌检验分析[J].交通医学,2013,27(1):32-33.

[5] 程亚琪,隋凌云.一起溶藻弧菌引起的食物中毒[J].临床医药文献电子杂志,2014,1(11):2043.

[5] 裴先前,蔡彩霞.一起溶藻弧菌引起食物中毒的病原学检验与分析[J].海峡预防医学杂志,2008,14(4):44-45.

[7] 林燕,郑双来.一起由溶藻弧菌引起食源性疾病疫情的调查分析[J].中国农村卫生事业管理,2017,37(1):59-60.

[8] 胡超群,陶保华.对虾弧菌病及其免疫预防的研究进展[J].热带海洋,2000,19(3):84-94.

[9] U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual, chapter 9, *Vibrio*[S].2004.

[10] Nordic Committee on Food Analysis. NMKL 15602. ED., 197

pathogenic *Vibrio* species. Detection and enumeration in foods [S].1997.

[11] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.出口食品中食源性致病菌检测方法 实时荧光 PCR 法;SN/T 1870—2016 [S].北京:中国标准出版社,2016.

[12] 李亮,隋志伟.基于数字 PCR 的单分子 DNA 定量技术研究进展[J].生物化学与生物物理进展,2012,39(10):1017-1023.

[13] MORISSET D,TEBIH D,MILAVEC M,et al. Quantitative analysis of food and feed samples with droplet digital PCR[J].PLoS One,2013,8(5):e62583.

[14] KELLEY K,COSMAN A,BELGRADER P,et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by a duplex droplet digital PCR assay[J].Journal of Clinical Microbiology,2013,51(7):2033-2039.

[15] VERHAEGEN B, DE REU K,DE ZUTTER L,et al. Comparison of droplet digital PCR and qPCR for the quantification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in bovine feces[J].Toxins,2016,8(5):157.

[16] WITTE A K, FISTER S, MESTER P,et al. Evaluation of the performance of quantitative detection of the *Listeria monocytogenes prfA* locus with droplet digital PCR [J]. Anal Bioanal Chem,2016,408(27):7583-7593.

[17] 方佩佩,赵丽青,马云,等.副溶血性弧菌微滴数字 PCR 定量方法的建立[J].食品工业科技,2018,39(19):252-257.

[18] 周巍,李月华,孙勇,等.微滴式数字 PCR 技术定量检测发酵乳中金黄色葡萄球菌[J].食品科学,2017,38(16):287-291.

[19] 赵新,蓝青阔,陈锐,等.应用微滴数字 PCR 技术快速检测食用菌中沙门氏菌[J].食品与生物技术学报,2017,36(3):315-321.

[20] 董莲华,张玲,姜君,等.大肠杆菌 O157:H7微滴数字 PCR 定量方法的建立[J].分析化学研究报告,2015,43(3):319-324.

[21] 禹思宇,唐连飞,陈雪琴,等.检测阴沟肠杆菌的数字 PCR 定量方法建立[J].畜牧与兽医,2016,4(3):1-4.

[22] RICCHI M, BERTASIO C, BONIOTTI M B, et al. Comparison among the quantification of bacterial pathogens by qPCR, dPCR, and cultural methods[J]. Front Microbiol,2017,8:1174-1188.

· 公告 ·

市场监管总局关于发布《食品中匹可硫酸钠的测定》
食品补充检验方法的公告

(2019 年第 30 号)

按照《食品补充检验方法工作规定》有关要求,《食品中匹可硫酸钠的测定》食品补充检验方法已经国家市场监督管理总局批准,现予发布。

特此公告。
附件:食品中匹可硫酸钠的测定

市场监管总局
二〇一九年六月十九日