

# 流水式养殖动物中弧菌和嗜水气单胞菌的 PCR 法监测

傅松哲<sup>1</sup> 夏文<sup>1</sup> 涂俊凌<sup>1</sup> 樊国印<sup>1</sup> 刘鹰<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 南昌市疾病预防控制中心, 330038)

(<sup>2</sup> 中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

**摘 要** 为了解流水式养殖场养殖动物中弧菌和气单胞菌的感染状况, 分别针对霍乱弧菌肠毒素 A 亚单位(*ctxA*)基因、O139 和 O1 群群特异基因、毒力协同调节菌毛 A 亚单位基因(*tcpA*)、中心调节蛋白基因(*toxR*)、副溶血弧菌不耐热溶血素基因(*tlh*)、创伤弧菌 *Vibrio vulnificus* 溶细胞素基因(*vvhA*)和嗜水气单胞菌的气溶素基因(*aerA*)设计引物, 建立了聚合酶链式反应(PCR)检测技术, PCR 产物经电泳, 根据扩增条带的大小和数目, 检测和区分霍乱弧菌、嗜水气单胞菌和副溶血弧菌。对南昌沿岸霍乱流行水域及附近养殖场的养殖动物进行了 18 个月的连续监测, 对 1 440 份水产品的增菌液进行 PCR 检测, 17 份检出副溶血弧菌, 25 份检出霍乱弧菌, 创伤弧菌和嗜水气单胞菌均未检出。扩增结果与传统培养检测法的结果一致。监测结果表明, 南昌附近地区霍乱弧菌和副溶血弧菌检出率分别为 1.74% 和 1.18%, 总体感染状况处于较低水平, 但个别养殖品种弧菌检出率较高。

**关键词** 副溶血弧菌 霍乱弧菌 聚合酶链反应 基因型

**中图分类号** S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)03-0098-06

## PCR detection of pathogenic *Vibrio* and *Aeromonas hydrophila* in aquaculture animals in flowing-through systems

FU Song-zhe<sup>1</sup> XIA Wen<sup>1</sup> TU Jun-ling<sup>1</sup> FAN Guo-yin<sup>1</sup> LIU Ying<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> Nanchang Center for Disease Control and Prevention, 330038)

(<sup>2</sup> Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071)

**ABSTRACT** To investigate the prevalence of pathogenic *Vibrio* and *Aeromonas hydrophila* in aquaculture animals in flowing through systems in Nanchang, animals were sampled over an 18-month period between March 2009 and September 2010. Seven pairs of primers were designed for toxin sub-unit A(*ctxA*) gene, O139 special gene, O1 special gene, *tcpA* gene, *toxR* gene, haemolytic gene, *vvhA* gene and aerolysin(*aerA*) gene. Specific PCR was established to simultaneously detect these 7 genes. Strains of *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *Aeromonas hydrophila* can be detected and differentiated by the size and numbers of specific PCR products through electrophoresis bands examination. In 1 440 tested samples, 17 samples were *Vibrio parahaemolyticus* positive (1.74%), 25 samples were *Vibrio*

大西洋鲑鱼封闭循环清洁生产项目部分资助

\* 通讯作者。E-mail: yinliuocas@gmail.com, Tel: (0532)82898646

收稿日期: 2010-09-03; 接受日期: 2010-12-08

作者简介: 傅松哲 (1985-), 男, 硕士, 主要从事环境微生物学研究。E-mail: fusongzhe@hotmail.com, Tel: (0791)6363255

cholerae positive (1.18%), and no *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio vulnificus* were found in the samples. The results of PCR detection were consistent with those of the traditional culture methods. The results indicated that the levels of pathogenic *Vibrio* in Nanchang area were very low, while the levels of pathogenic *Vibrio* in *Amyda Sinensis* and *Rana catesbeiana* were relatively high.

**KEY WORDS** *Vibrio parahaemolyticus* *Vibrio cholerae* Polymerase chain reaction  
Genotype

随着我国海、淡水集约化养殖的快速发展,水产养殖中疾病危害呈现日益严重的趋势。副溶血弧菌 *Vibrio parahaemolyticus* 和致病性嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila* 是近年我国各地大规模流行的养殖鱼类暴发性疾病的主要病原,可以引起养殖虾类的红腿病、烂鳃病和鱼类体表溃疡等细菌性疾病,给水产养殖业造成了巨大的经济损失(周丽等 1998)。霍乱弧菌 *Vibrio cholerae* 作为另一人畜共患的重要病原,也给水产品的食品安全构成了严重的威胁,并在 1991 年造成了中南美地区的霍乱大流行(Fields *et al.* 1992)。尽管依靠传统培养法,弧菌已被广泛分离和培养计数,然而, Xu 等(1982)发现在一定的环境条件,弧菌可能进入一种存活但非可培养状态,可能导致其数量被显著低估。传统的鱼虾类细菌病的诊断需要经过细菌分离与鉴定,鉴定操作的过程繁杂、检验周期长,需 7 d 以上才能报告结果,也给鱼虾的及时治疗、流行病的控制和流行病学的调查带来极大的困难。特异性 PCR 技术由于具有灵敏、准确、快速的特点成为近年来水产品病原检测的重要手段。目前国内外已建立了不少用 PCR 检测副溶血弧菌和霍乱弧菌的方法(Lipp *et al.* 2003; Singh *et al.* 2001; 李志峰等 2003),并对工厂化养殖系统进行了监测(马妍等 2008),相应的商品化 PCR 试剂盒也已面世。然而目前,对于传统流水式养殖动物的细菌性病害的报道十分分散,对各类别养殖动物的病害风险还缺乏了解。在本文中,通过采用种间特异性 PCR 方法对南昌地区周边养殖场中水产品的弧菌和气单胞菌进行了为期 18 个月的系统性监测,以期了解流水式养殖场养殖动物中弧菌和气单胞菌的感染情况和存在的风险,为进一步采取预防措施提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品采集

选取养殖场及淡水内陆江河水系监测点,对以往有霍乱疫情发生地段内的江河水域附近的养殖场中的养殖动物进行监测。监测点包括:军山湖东侧、艾溪湖西侧、象湖西侧、扬子洲西侧地区、塘山镇、武阳镇 6 个地区的养殖场。每月分别采集 20 份全标本(整体标本或整体的一部分)和 60 份涂抹标本(体表涂抹或鳃内涂抹等)。共采集水产品 1 440 份。采样时间为 2009 年 4 月~2010 年 9 月。水产品包括鳖 *Amyda sinensis* 100 份、牛蛙 *Rana catesbeiana* 250 份、虾、蟹等甲壳类 104 份、贝壳类 106 份、青鱼和草鱼各 440 份。对于全标本,样本体表用 75% 酒精棉球消毒,无菌条件下用剪刀打开腹腔,取出完整的动物肠道,分别剪断动物的中肠和后肠,采集肠道。对于涂抹标本,用无菌棉签对体表或鳃内进行涂抹,放入 Cary-Blair 运送培养基保存。

### 1.2 病原菌的分离与鉴定

将经均质的动物肠道 10 g 或涂抹后的棉签接种至碱性蛋白胨水,37 °C 培养 8 h 后,分别在 TCBS、氨苄青霉素麦康凯琼脂划线,28 °C 培养 24 h。取单菌落并转种于斜面培养。上述培养基均由杭州微生物试剂有限公司提供。斜面培养物按说明接种 API 20E 生化试剂条(由法国梅里埃公司提供),37 °C 培养 24 h 后,采用 ATB Expression 自动细菌鉴定仪进行鉴定。取霍乱弧菌阳性菌作玻片凝集:取培养物 1 滴,置于载玻片上,再加诊断血清,1 min 内呈颗粒状凝集的即为阳性。霍乱弧菌诊断血清(O1 群多价,单价分型血清,O139 群)购自中国药品生物制品检定所。

### 1.3 DNA 提取和 PCR 检测

模板 DNA 提取采用浓缩裂解法:取 2 ml 碱性蛋白陈水增菌液 8 000 r/min, 2 min 离心得菌体,弃净上清液。用 100  $\mu$ l TE 重悬。100  $^{\circ}$ C 水浴裂解 5 min。8 000 r/min, 2 min 离心取上清液备用。*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、Loading Buffer 和 DNA Marker 由 TaKaRa 公司生产;0.5 $\times$ TBE 缓冲液和 EB 为自配;引物由上海捷倍思基因技术有限公司合成(表 1)。采用普通 PCR 仪(MJPC-100 型)对提取的 DNA 进行扩增。引物及 PCR 扩增反应条件参考文献(Lipp *et al.* 2003;Singh *et al.* 2001;李寿崧等 2008;邵碧英等 2008)。对 *tlh* 基因扩增条件稍加改进:94  $^{\circ}$ C 变性 5 min 后,94  $^{\circ}$ C, 30 s;55  $^{\circ}$ C, 60 s;72  $^{\circ}$ C, 30 s;30 个循环;72  $^{\circ}$ C, 10 min 延伸补足。对上述基因的扩增均采用单一 PCR 体系。将 PCR 扩增产物与 Loading Buffer 混合,各上样 3  $\mu$ l, 5 V/cm 电泳 30 min。KO2DAK 数码成像系统拍摄。电泳条带采用自动凝胶成像系统(Bio-Rad Gel Doc XR)进行观察,并分析电泳结果。

表 1 引物序列和扩增产物

Table 1 Primers and PCR products for specific amplification of *A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, and *V. vulnificus*

目标 Target	引物序列 Primer sequence	扩增长度 Amplification length (bp)	参考文献 Reference
不耐热直接溶血素基因 Thermolabile hemolysin gene( <i>tlh</i> )	F:5'-GCGATATCATGATGAAAAAACAATC-3' R:5'-GCCAAGCTTTTAGAAAACGGTACTC-3'	1 300	李志峰等 2003
肠毒素 A 亚单位基因 Toxin sub-unit A( <i>ctxA</i> ) gene	F:5'-ACA GAG TGA GTA CTT TGA CC -3' R: 5'-ATA CCA TCC ATA TAT TTG GGA G -3'	308	Lipp <i>et al.</i> 2003
O1 群群特异基因 O1 special gene	F:5'-GTT TCA CTG AAC AGA TGG G-3' R: 5'-GGT CAT CTG TAA GTA CAA C-3'	192	Lipp <i>et al.</i> 2003
O139 群群特异基因 O139 special gene	F:5'-TTA CCA GTC TAC ATT GCC-3' R:5'-CGT TTC GGT AGT TTT TCT GG -3'	417	Lipp <i>et al.</i> 2003
中心调节蛋白基因 Toxin operon gene( <i>toxR</i> )	F:5'-CCT TCG ATC CCC TAA GCA ATA C-3' R:5'-AGG GTT AGC AAC GAT GCG TAA G-3'	779	Singh <i>et al.</i> 2001
毒力协同调节菌毛基因 Toxin-coregulated pilus gene ( <i>tcpA</i> )	F:5'-CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG-3' R:5'-CGAAAGCACCTTCTTTTCACACGTTG-3'	470	Singh <i>et al.</i> 2001
溶细胞素 <i>vvhA</i> 基因 Cytolysin <i>vvhA</i> gene	F:5'-TTGGTCCATTGCCAGCAGTTAC -3' R:5'-TGTTGGTTGACGAGCCCGCAGAG -3'	582	邵碧英等 2008
气溶素基因 Aerolysin gene ( <i>aerA</i> )	F:5'-GCAGAGCCCGTCTATCCAGACCAG-3' R:5'-TCACGCTGAGGCTGACGTTGTTGAAG-3'	1 393	李寿崧等 2008

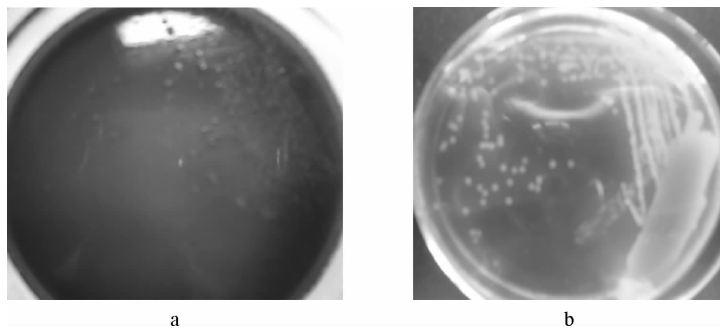


图 1 疑似副溶血弧菌(a)和疑似霍乱弧菌(b)菌落形态

Fig. 1 The colony of suspect *V. parahaemolyticus* (a) and *V. cholerae*(b)

## 2 结果

### 2.1 分离培养结果

在 TCBS 琼脂分离平板上有 17 份样品中存在直径较大、呈半透明、绿色、圆整而扁平的菌落(图 1-a),革兰氏染色均为 G-杆菌,无芽胞,氧化酶阳性,存在典型的“神奈川现象”。另外,25 份样品中还存在黄色菌落(图 1-b)。氨苄青霉素麦康凯琼脂未见可疑乳白色菌落,即未检出嗜水气单胞菌。

### 2.2 生化反应及血清凝集

将可疑菌落按说明接种 API 20E 生化试剂条,依据法国梅里埃的 API 20E 细菌生化自动鉴定系统提示,17 份样品与副溶血弧菌相符,25 份样品与霍乱弧菌相符,生化符合率均为 99.9%。血清凝集实验表明,25 株霍乱弧菌中,8 株为 O139 血清型,19 株为 O1 血清型(其中 5 株为小川型,14 株为稻叶型)。其中稻叶型占 56%(图 2)。

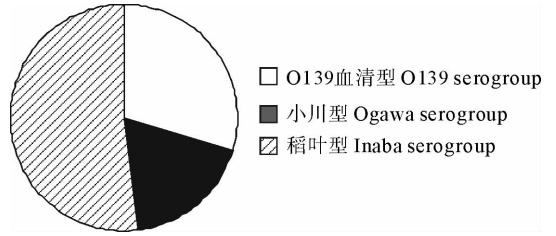


图 2 霍乱弧菌血清型的分布

Fig. 2 Distribution of serogroups of *V. cholerae*

### 2.3 分子生物学的检测

19 份样品在 192 bp 处有条带,为 O1 群特异基因阳性,其毒力基因经检测均为阴性。另有 8 份样品为 O139 群特异基因阳性。以霍乱弧菌主要毒力基因 *ctxA*、*tcpA* 和 *toxR* 为目的基因,对增菌液进行 PCR 扩增,DL2 000 DNA Marker 作参照,1 份来自 O139 群的样品同时出现 *ctxA* 基因、*tcpA* 基因和 *toxR* 基因条带。电泳结果见图 2。另有 7 份来自 O139 群样品只出现 *ctxA* 基因或 *tcpA* 基因条带。而来自小川型和稻叶型霍



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9

M: 2 000 bp DNA Ladder(从上到下依次为 2 000, 1 000, 750, 500, 200, 100 bp);

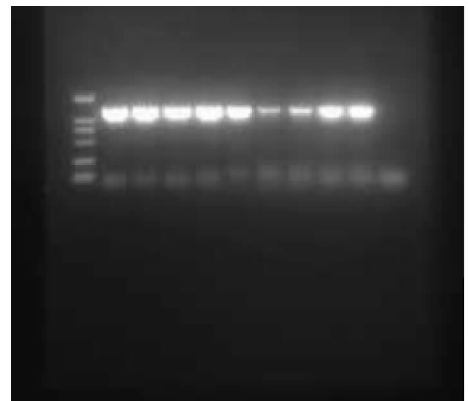
1: 样品中的 *ctxA* 基因 2: *ctxA* 基因阳性对照; 3: *ctxA* 基因阴性对照; 4: 样品中的 *tcpA* 基因; 5: *tcpA* 基因阳性对照; 6: 样品中的 *toxR* 基因; 7: *toxR* 基因阳性对照; 8: *tcpA* 基因阴性对照; 9: *toxR* 基因阴性对照

M: DL 2000 DNA marker; Lane 1: *ctxA* in sample; Lane 2: Positive control of *ctxA*; Lane 3: Negative control of *ctxA*; Lane 4: *tcpA* in sample; Lane 5: Positive control of *tcpA*; Lane 6: *toxR* in sample; Lane 7: Positive control of *toxR*; Lane 8: Negative control of *tcpA*; Lane 9: Negative control of *toxR*

图 3 样品中霍乱弧菌菌株的扩增结果

Fig. 3 PCR products of the strains of

*V. cholerae* in samples



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

M: 2 000 bp DNA Ladder(从上到下依次为 2 000, 1 000, 750, 500, 200, 100 bp);

1~8: 水产品中不耐热直接溶血素基因的扩增结果; 9: 阳性对照; 10: 阴性对照

M: DL 2000 DNA marker; 1~8 lanes: Amplified fragments of *tlh* gene;

Lane 9: Positive control; Lane 10: Negative control

图 4 样品中副溶血性弧菌菌株的扩增结果

Fig. 4 PCR products of the strains of

*V. parahaemolyticus* in samples

乱弧菌对应的增菌液,均未检出 *ctxA*、*tcpA* 和 *toxR* 基因。以副溶血性弧菌主要毒力基因不耐热直接溶血素基因为目的基因,对碱性蛋白陈水增菌液进行 PCR 扩增。在 1280 份样品中,17 份样品在 1 300 bp 出现条带,毒力基因 *aerA*。而所有霍乱弧菌 O139 群致病性分离株则至少含有 *ctxA* 基因。

## 2.4 霍乱弧菌、副溶血性弧菌的季节性分布和在各类别养殖动物的检出率比较

副溶血弧菌特异性独立基因为阳性,即检出副溶血性弧菌,检出率为 1.18%。所有样品均未扩增出创伤弧菌溶细胞素 *vohA* 基因和嗜水气单胞菌。对霍乱弧菌、副溶血性弧菌在 4 个季节的分布进行了统计,结果见表 2。绝大部分弧菌阳性样品分布在夏、秋季节,而冬季均未检出。副溶血性弧菌在夏、秋季节检出率分别达到了 1.67% 和 1.25%,高于全年平均检出率 1.18%。而霍乱弧菌在夏、秋季节检出率分别达到了 3.10% 和 0.83%,在春季也达到 1.50%,两种弧菌在不同类别养殖动物中的检出率有很大差异。其中霍乱弧菌的检出率在鳖和牛蛙中分别达到 6.00% 和 5.60%,远高于其他类别的养殖品种。副溶血性弧菌也表现出类似的分布特征,这与俞新莲等(2009)的报道较为一致。需要引起养殖户和相关部门的高度关注。

## 3 讨论

通过 PCR 扩增,判断相应基因的存在与否,已成为病原菌快速检验的重要方法。用 PCR 方法检测水产品中的弧菌优越性很多,最主要是简便快捷。每一批样品从样品制备到检出,将增菌的时间算在内,也只需要 24 h,而常规培养法需要 7 d 以上。因此,该方法的建立对水产动物弧菌病和嗜水气单胞菌病的快速诊断和分子流行病学的调查有重要意义。

选择合适的用于扩增检测的基因是保证 PCR 方法特异性的关键。本研究针对 GenBank 中登录的致病性嗜水气单胞菌的气溶素基因(*aerA*),副溶血弧菌的不耐热直接溶血素基因(*tlh*)、霍乱弧菌的 *ctxA* 基因、*toxR* 基因、*tcpA* 基因、O139 群特异性基因和 O1 群特异性基因作为检测目的基因,设计相应的特异性引物,通过 PCR 方法扩增出特异性片断。该 PCR 方法的应用成为快速评估环境样品中致病性弧菌和嗜水气单胞菌流行特征的重要工具。副溶血性弧菌和霍乱弧菌被成功检出,这些信息将有助于对弧菌病的流行特征建立预测模型,并在未来对养殖系统弧菌病的暴发建立早期预警。随着 PCR 在各个领域中的应用,研究者在传统 PCR 技术的基础上不断加以改进,如多重 PCR 为在同一 PCR 反应体系中,加入多对引物,对多个目的基因同时进行扩增(许拉等 2008;李晨等 2010)。目前这种 PCR 方法在病原性海洋弧菌的检测中得到广泛应用。同时 PCR 还存在一些缺点,如系统容易受外源 DNA 的污染。同时,目前设计的引物也有限,还无法对所有弧菌进行检测,这些都有待于进一步改进。

对致病性弧菌和嗜水气单胞菌进行长期监测十分必要。Colwell 等(1977)对 Chesapeake Bay 海湾水域霍乱弧菌、副溶血性弧菌和其他弧菌的地理分布和发生率进行了详细调查,提出沿岸水域是弧菌的重要来源。Lipp 等(2003)从 1998~2000 年对秘鲁沿海进行了为期 17 个月的监测,发现了霍乱弧菌的季节性分布规律。杨健等(2010)对渤海湾天津沿岸海水中的创伤弧菌进行了定性和定量检测,用 SYBR Green 实时定量 PCR 方法测定了 8 个海水样品,样品中创伤弧菌的浓度高达  $7.12 \times 10^3 \sim 8.40 \times 10^5$  个/L,表明天津沿岸海水存在严重的创伤弧菌污染。这些研究都表明,对沿岸水域的弧菌等致病菌进行系统性监测十分重要。通过作者为期 18 个月的监测,对南昌地区养殖场进行系统采样,监测结果显示霍乱弧菌和副溶血性弧菌总体检出率较低,感染状况总体处于较低水平。然而鳖和牛蛙作为南方淡水地区常见的养殖品种,其霍乱弧菌的检出率在鳖和

表 2 霍乱弧菌和副溶血性弧菌的分布

Table 2 Distribution of *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus* among each of the fractions sampled

		阳性样品数/总采集样品数(检出率) Positive samples/total (percentage)	
		霍乱弧菌 <i>V. cholerae</i>	副溶血性弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>
季节 Season	夏季 Summer	15/480(3.10%)	8/480(1.67%)
	秋季 Fall	4/480(0.83%)	6/480(1.25%)
	冬季 Winter	0/80 (0.00%)	0/80 (0.00%)
	春季 Spring	6/400(1.50%)	3/400(0.75%)
养殖动物类别 Type of animals	鳖 <i>A. sinensis</i>	6/100(6.00%)	6/100(6.00%)
	牛蛙 <i>R. catesbeiana</i>	14/250(5.60%)	8/250(3.20%)
	甲壳类 Crustaceans	2/104(1.92%)	3/104(2.88%)
	贝壳类 Shellfish	1/106(0.94%)	1/106(0.94%)
	鱼类 Fish	2/880(0.23%)	3/880(0.34%)

牛蛙中分别达到6.00%和5.60%,远高于其他类别的养殖品种,需要引起高度关注。由于流水式养殖饲育水体交换量差,同时该地区夏秋季节温度较高,养殖系统仍然存在着较大的风险,需要防范弧菌病在局部流行。

养殖环境与病害的发生存在着必然的联系。当养殖水体处于正常状态时,在水生生物内外环境中存在一个相对稳定的微生物优势种群。但是养殖环境恶化时(如氨氮升高),养殖生物体正常生理功能和免疫机制受到损伤,为病原菌侵入创造有利条件(Karunasagar *et al.*, 1994)。同时由于病原菌大部分生长速度都较快,此时数量急剧增加,打破原有的生态平衡,便引发疾病。在流水式养殖池内,由于水温回升较快及夏季水温的增高,饲育水体的交换频次低,交换量小或水的过滤不佳以及粗放式的管理方式,为弧菌的生存与繁衍提供了最佳条件,从而导致弧菌在养殖动物体表的附生,引起体表溃疡和感染。郑小宏等(2010)对发生病害的欧鳗网箱养殖区进行了全面调查,也发现海水中细菌均以溶藻弧菌和嗜水气单胞菌为主要优势菌,菌量超出正常海区。同时,由于流水式养殖池较为封闭,高密度的养殖极易使弧菌在整个养殖池内流行,造成大批养殖动物的感染,最终造成消费者的食源性感染。夏文等(2009)曾报道了江西省南昌市由食用海产品引起数百人食物中毒的事件,发现副溶血性弧菌为其主要病因。虽然南昌市未报告本地霍乱弧菌引起的食源性疾病暴发,但对水产品消费量较大,且市民尤其喜食蟹和牛蛙,易引起食源性的感染,需要引起高度关注。未来需要继续监测淡水水产品中弧菌的污染状况及其流行趋势,加强疾病预警和对养殖户的相关健康教育。

#### 4 结论

通过为期18个月的监测,南昌地区霍乱弧菌和副溶血性弧菌检出率分别为1.74%和1.18%,总体感染状况处于较低水平。然而霍乱弧菌的检出率在蟹和牛蛙中分别达到6.00%和5.60%,远高于其他类别的养殖品种。副溶血性弧菌也表现出类似的分布特征,需要引起养殖户和相关部门的高度关注。

#### 参 考 文 献

- 李志峰,聂军. 2003. 副溶血弧菌 *tlh* 基因的克隆及序列分析. 中国人兽共患病杂志, 19(2):10~12
- 李寿崧,郭立新,江树勋. 2008. 嗜水气单胞菌气溶素基因的克隆和序列分析. 微生物学通报, 35(5):700~704
- 李晨,王秀华,黄捷. 2010. 3种主要水产病原菌多重PCR检测方法的建立. 渔业科学进展, 31(3):100~106
- 马妍,李健,王斌,王群,刘淇. 2008. 工厂化育苗养殖体系内细菌数量动态变化研究. 安徽农业科学, 36(18):7703~7705
- 许拉,黄捷,戈蕾,杨冰. 2008. 同时检测两种对虾病毒和4种弧菌的同步PCR方法的建立. 海洋水产研究, 29(4):39~45
- 许拉,黄捷,杨冰. 2008. 病原检测基因芯片应用及在水产病害检测的前景. 海洋水产研究, 29(1):109~114
- 邵碧英,王传得,郑晶,黄晓蓉,曹际娟,陈彬,吴谦. 2008. 食品中5种致病性弧菌MPCR-DHPLC检测方法的建立. 食品科学, 29(10):500~504
- 夏文,倪贤生,胡主花,涂俊凌,唐盈,肖菊珍,龙慧,李鹏. 2009. 一起副溶血性弧菌食物中毒的实验室研究. 现代预防医学, 36(23):4506~4511
- 杨健,赵化兵,张明露,朱滨,朱琳,蔡宝立. 2010. 天津沿海水体中创伤弧菌的PCR检测和定量. 安全与环境学报, 10(1):98~101
- 俞新莲,刘红莲,黄仕杰. 2009. 养殖场牛蛙及池水霍乱弧菌监测分析. 海峡预防医学杂志, 15(4):30~31
- 周丽,宫庆礼. 1998. 海水鱼虾蟹贝病害防治技术. 青岛:青岛海洋大学出版社
- 郑小宏,温彩霞. 2000. 罗源湾欧鳗海水网箱养殖病害调查研究. 福建畜牧兽医, 22(5):3
- Colwell, R. R., Kaper, J., and Joseph, S. W. 1977. *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. Science, 198(4315):394~396
- Fields, P. I., Popovic, T., Wachsmuth, K., and Olsvik, Ø. 1992. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. J. Clin. Microbiol. 30:2118~2121
- Lipp, E. K., Rivera, I. N. G., Gil, A. I., Espel, E. M., Choo-pun, N., Louis, V. R., Russek-Cohen, E., Huq, A., and Colwell, R. R. 2003. Direct detection of *Vibrio cholerae* and *ctxA* in Peruvian coastal water and plankton by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 69(6):3676~3680
- Singh, D. V., and Maria, H. M. 2001. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. Appl. Environ. Microbiol. 67(2):910~921
- Xu, H. S., Roberts, N. C., Singleton, F. L., Attwell, R. W., Grimes, D. J., and Colwell, R. R. 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. Microbiol. Ecol. 8:313~323
- Karunasagar, I., Pai, R., Malathi, G. R., and Karunasagar, I. 1994. Mass mortality of *Penaeus monodon* larvae due to antibiotic-resistant *Vibrio harveyi* infection. Aquaculture, 128:203~209