

Primary Investigation of Pathogenic Bacteria from Sold Terrapin Eggs in Xiamen

Yujuan Wu^{1,2}, Fande Kong^{2*}, Shufei Xu¹, Rengrui Wang²

¹Biological Engineering Institute, Jimei University, Xiamen

²Xiamen Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Xiamen

Email: *kfd67@sina.com

Received: Apr. 24th, 2014; revised: May 29th, 2014; accepted: Jun. 4th, 2014

Copyright © 2014 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

Objective: To explore the situation of pathogens of Xiamen local terrapin eggs. **Methods:** The pathogens were isolated with standard methods. The pure cultures isolated from terrapin eggs were further specified by MALDI-TOF-MS, serological test and PCR methods. **Results:** 100% of 7 batches of Xiamen local terrapin eggs were contaminated with pathogenic bacteria according to MALDI-TOF-MS. 76 strains of isolated pathogenic bacteria fell into 16 genera and 26 species. All of the terrapin eggs carried five or more pathogenic bacteria. **Conclusion:** The results suggest that high-contamination rate, broad genera, coexistence of multiple species and isolation of pathogenic bacterium are very common phenomena. It's very necessary to enforce surveillance of pathogenic bacteria in terrapin eggs.

Keywords

Terrapin Egg, MALDI-TOF-MS, Pathogen

厦门市售甲鱼蛋携带病原菌情况初步调查

吴玉娟^{1,2}, 孔繁德^{2*}, 徐淑菲², 王仍瑞²

¹集美大学生物工程学院, 厦门

²厦门出入境检验检疫局, 厦门

Email: *kfd67@sina.com

*通讯作者。

收稿日期：2014年4月24日；修回日期：2014年5月29日；录用日期：2014年6月4日

摘要

目的：了解厦门市售甲鱼蛋携带病原菌情况。方法：按照病原菌的检测标准进行分离培养，获得纯培养物后，用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)结合相应的诊断血清及PCR方法进行鉴定。结果：自7批厦门市售甲鱼蛋中分离到了16个属26种共76株细菌，甲鱼蛋带菌率为100%，多重带菌情况严重。结论：该次甲鱼蛋的检验结果表明，甲鱼蛋所携带病原菌种类广，大部分为多重带菌，部分携带致病菌或条件致病菌。因此必须做好甲鱼蛋的检疫工作，以确保人们身体健康和养殖业的健康持续发展。

关键词

甲鱼蛋，MALDI-TOF-MS，病原菌

1. 引言

甲鱼蛋(Turtle eggs)具有很高的营养价值和药用价值，既可食用又可用作种苗孵化。甲鱼蛋携带的病原菌可能来自甲鱼(*Trionyx sinensis*)亲体或外界环境，在适宜的温度和湿度下，病原菌大量繁殖，蛋壳上的细菌可进入蛋内导致内容物带菌，使蛋腐败变质[1]。研究发现甲鱼蛋带菌时间可长达 39 天[2]，被污染的甲鱼蛋用于幼鳖的孵化，还可能导致幼鳖患病、水体污染等一系列后果。关于甲鱼蛋携带病原菌的调查报道较少，且国内报道的主要针对进口甲鱼蛋[3] [4]，厦门市售甲鱼蛋主要来自外地养殖企业，分散而得不到有效监管，其携带的病原菌数量及种类尚不清楚。

随着科学技术的不断进步和对细菌研究的不断深入，细菌的分类鉴定方法已从最传统的形态、生理生化鉴定发展到多位点序列测序等一系列新技术新方法，不仅提高了细菌鉴定的水平，还增强了人们对于病原微生物认识的广度和深度，然而每种方法都有本身的局限性。传统的检测方法费时费力，检测周期大约为 3~5 天时间，若是某些苛养菌则需要更久，受某些抗生素的影响还易发生假阴性[5]。免疫学方法的实验结果受操作人员主观影响较大，分子生物学方法一般只能同时检测一种或几种病原菌，可以实现高通量的生物芯片成本较高，应用于实际检测还需解决许多问题。

基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization, Time-of-Flight, mass spectrometer)是近年发展起来的一种新型的生物质谱方法，用于细菌的鉴定非常有优势，尤其是针对甲鱼蛋此类样品量大且携带菌种未知的检验项目，飞行质谱可以快速地进行高通量的鉴定工作。每种细菌都有其特异性的蛋白质，在质谱仪中就会形成区别于他种细菌的特异性质谱图，再与软件本身带有的细菌质谱图数据库进行比较，就可鉴定该株细菌的种类。MALDI-TOF-MS 具有操作简便、微量化、高通量、灵敏度强和特异性高等诸多优点，现已被广泛应用于病原微生物的鉴定。

本研究应用 MALDI-TOF-MS 并结合血清学试验和 PCR 方法对厦门市售甲鱼蛋携带的病原菌进行分离鉴定，为相关部门的检疫和监管工作提供参考，促进我国甲鱼养殖业的健康可持续发展。

2. 材料与方法

2.1. 甲鱼蛋来源及所用菌株

甲鱼蛋采购自厦门市水产批发市场，共 7 批，编号为 1(20130810)、2(20130821)、3(20130901)、

4(20130930)、5(20131011)、6(20131108)和 7(20131204), 每批次 15 个蛋, 蛋均为食用冷冻品, 蛋壳完整无裂痕。

霍乱弧菌 05015(ctx⁺)和 05018(ctx⁺)标准菌株由厦门市疾控中心提供, 产肠毒素大肠杆菌(ETEC) C83902(LT⁺ STb⁺)和 C83916(STa⁺ STb⁺)标准菌株, 购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心。

2.2. 培养基、诊断血清及试剂

营养琼脂、PALCAM 琼脂、麦康凯琼脂、HE 琼脂、亚硫酸铋琼脂(BS)、TCBS 琼脂、庆大霉素培养基、血平板、营养肉汤、李氏增菌肉汤、氯化镁孔雀绿肉汤(MM)、碱性蛋白胨水(APW)和 7.5%氯化钠肉汤等细菌培养基均购自北京陆桥技术有限责任公司; 大肠杆菌 O157 诊断血清、霍乱弧菌 O1 和 O139 诊断血清购自宁波天润生物药业有限公司; PCR 检测试剂购自宝生物工程(大连)有限公司; 无水乙醇、甲酸、乙腈、三氟乙酸(TFA)、 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CHCA)和标准肽等购自 Bruker Daltonics 公司。

2.3. 方法

2.3.1. 细菌分离培养

1) 取样

无菌操作条件下, 用无菌棉签蘸取灭菌生理盐水后擦拭蛋壳取样部位, 完成后, 再用碘酊消毒蛋壳取样部位, 然后用酒精棉脱碘消毒, 然后用无菌镊子将消毒部位的蛋壳破洞后, 将蛋黄捣碎, 再用无菌棉签蘸取内容物取样。取样完成后, 蛋壳表面的棉拭子和蛋内容物所取样品分开培养。

2) 细菌分离

不同菌群分别选用相应的增菌液和选择性培养基进行分离培养。主要有单增李斯特菌用李氏增菌肉汤和 PALCAM 琼脂, 肠道致病菌用营养肉汤、MM、麦康凯琼脂、HE 琼脂和 BS 琼脂等, 金黄色葡萄球菌用 7.5%氯化钠肉汤和血平板, 致病性弧菌用 APW 和 TCBS 琼脂, 庆大霉素培养基专门用于霍乱弧菌的选择性分离培养。

2.3.2. MALDI-TOF-MS 鉴定

1) 基质和 BTS 标准品的配制

用 100 μ l 标准溶液溶解 CHCA, 剧烈震荡后 12,000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 2 min, 保存于 4℃ 备用。

用 50 μ l 标准溶液溶解 BTS 标准品, 反复吹打使之混匀, 但应避免出现气泡, 静置 5 mins 后再吹打不少于 20 次, 12,000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 2 min, 取上清分装, 每管 5 μ l, 保存于 -20℃ 备用。

标准溶液, 包含 50%乙腈, 2.5%TFA 和 47.5%超纯水。

2) 纯培养物前处理及点靶

将分离到的纯菌落接种于营养肉汤, 置 37℃ 过夜培养, 取 1.5 ml 液体培养物于 Eppendorf 管中, 12,000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 2 mins, 弃上清; 用无菌生理盐水洗涤 2 次, 离心弃上清; 然后加入 300 μ l 去离子水, 振荡混匀, 再加入 900 μ l 无水乙醇, 混匀后静置 3~4 mins; 12,000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 2 mins 除去乙醇, 必要时再离心一次, 以确保乙醇全部除尽; 最后加入 50 μ l 70%甲酸, 振荡混匀后再加入 50 μ l 乙腈, 混匀, 静置 3~4 mins; 12,000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 2 mins, 取上清点靶。

先吸取 1 μ l 上清或 BTS 标准品点靶, 自然放干后再在上面点 1 μ l 基质, 基质干燥后上机。

3) 数据采集

将点好标准品和样品的靶板放置于仪器内, 抽真空。打开 FlexControl 软件, 校准仪器, 选择数据采集方法, 调好仪器参数, 采用 337 nm 氮激光源、线性正离子检测模式, 延迟时间为 130 ns, 误差范围为 ± 300 ppm, 离子源 1 加速电压 20.06 kv, 离子源 2 加速电压 18.55 kv, 离子源镜头电压 9.03 kv, 激光强

度为 14%~16%，每个样本选 6 个点进行射击，每个点射击 100 次。m/z 的采集范围为 2000~ 20,000 Da。用鼠标点击 Start 按钮，手动采集标准品数据进行仪器校准，再采集样品的质量图谱并保存。质量图谱也可以用 AutoExecute 软件自动获取。

4) 数据分析

打开 BioTyper 软件，将采集的图谱导入，全部选中后，选择数据库进行鉴定。

2.3.3. 血清试验和 PCR

通过血清学试验和 PCR 对大肠埃希氏菌、霍乱弧菌进行进一步分型。

1) 血清学鉴定

分别用霍乱弧菌 O1 群多价血清、O139 血清、O1 群稻叶型血清和小川型血清对可疑霍乱弧菌菌株进行鉴定分型，用大肠杆菌 O157 诊断血清对分离到的大肠杆菌进行鉴定。具体操作方法为用无菌接种针挑取适量菌落在血清中涂抹均匀，同时以无菌生理盐水作为对照，排除细菌的自凝现象。

2) PCR 鉴定

根据本实验室建立的方法检测霍乱弧菌霍乱毒素 ctx 基因，产肠毒素大肠杆菌 LT、STa、STb 肠毒素基因。引物大小及序列如表 1。

反应体系及反应条件如下：

ctx: 10 × buffer(含 Mg²⁺)2.5 μl, 2.5 mM dNTP 2.0 μl, 5 U/μl Taq 酶 0.2 μl, 10 μmol/L 上下游引物 2 μl, 模板 1 μl, 补水至 25 μl。

94℃ 4 min; 94℃ 35 s, 54℃ 40 s, 72℃ 40 s 共 30 个循环, 72℃ 7 min。

LT: 10 × buffer(含 Mg²⁺)2.5 μl, 2.5 mM dNTP 2.0 μl, 5U/μl Taq 酶 0.2 μl, 10 μmol/L 上下游引物 1 μl, 模板 1 μl, 补水至 25 μl。

94℃ 4 min; 94℃ 35 s, 55℃ 40 s, 72℃ 40 s 共 30 个循环, 72℃ 7 min。

STa: 10 × buffer(含 Mg²⁺)2.5 μl, 2.5 mM dNTP 2.0 μl, 5 U/μl Taq 酶 0.2 μl, 10 μmol/L 上下游引物 0.5 μl, 模板 1 μl, 补水至 25 μl。

94℃ 4 min; 94℃ 35 s, 55℃ 40 s, 72℃ 40 s 共 30 个循环, 72℃ 7 min。

STb : 10 × buffer(含 Mg²⁺)2.5 μl, 2.5 mM dNTP 2.0 μl, 5 U/μl Taq 酶 0.2 μl, 10 μmol/L 上下游引物 1.5 μl, 模板 1 μl, 补水至 25 μl。

94℃ 4 min; 94℃ 35 s, 49℃ 40 s, 72℃ 40 s 共 30 个循环, 72℃ 7 min。

3. 结果

3.1. 甲鱼蛋多重带菌情况

7 批样品中，蛋壳和内容物带菌率均为 100%，且所有样品都是多重带菌。带菌最多的是 4 号样品，

Table 1. Sequences of PCR primers, product size

表 1. PCR 引物序列、产物长度

毒素基因	引物	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
ctx	F	CGTCAAGGAATTTTACACCT	70
	R	GCTCCAAGATCATCGATG	
LT	F	GAGCACAATATATCTCAGG	414
	R	ATCAATTTTGGTCTCGGTC	
STa	F	AAAAGCGAGTGTACCTCGACA	326
	R	TCCAGCACAGGCAGGATTA	
STb	F	TGCTACAAATGCCTATG	194
	R	ATGGTGCTGAATGCTAT	

多达 20 种，菌种类别覆盖较广。样品带菌情况如表 2。

3.2. 甲鱼蛋携带细菌普查结果

经 MALDI-TOF-MS 结合血清学试验及 PCR 方法鉴定分析，该次普查的甲鱼蛋共分离到 16 个属 26 种共 76 株细菌，其中蛋壳分离到 41 株，内容物分离到 35 株。优势菌种为肠杆菌科细菌，有 40 株，占 52.6%，其中肠杆菌属最多，有 17 株。同时还分离到了嗜水气单胞菌、肺炎克雷伯氏菌、奇异变形杆菌、沙门氏菌及霍乱弧菌等致病菌，血清学试验结果表明，所分离到的霍乱弧菌均为非 O1 非 O139 型。详细结果如表 3 所示。

3.3. 血清学试验及 PCR 检测结果

通过对大肠埃希氏菌、霍乱弧菌进行进一步分型得知，本次研究中分离到的大肠埃希菌均为普通大肠杆菌，无肠出血性大肠杆菌 O157 和产肠毒素大肠杆菌，霍乱弧菌为非 O1/非 O139 的无毒株。血清学试验结果如表 4，PCR 检测结果如图 1。图 1 中 A-D 分别为 ctx、LT、STa、STb 基因的电泳结果图。

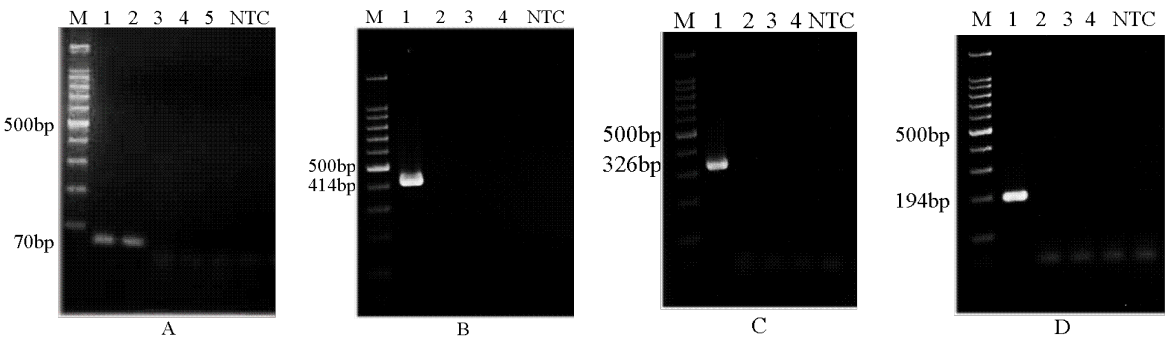
4. 讨论

1975 年，Anhalt J P, Fenselau C 将 MALDI-TOF-MS 应用于细菌的分析和鉴定[6]，MALDI-TOF-MS 应用于病原菌的鉴定操作简便、鉴定准确度高、灵敏度高、快速、高通量等优点，由于是基于蛋白质的分析，蛋白质由基因决定，使鉴定结果更具稳定性和可信度，国内外已有许多成功的应用。鲍春梅等[7]应用 MALDI-TOF-MS 建立了宋内志贺菌的数据库可并对野生菌株进行了鉴定，结果完全符合。其布勒哈斯等[8]的研究证明，MALDI-TOF-MS 不仅可以鉴定到属、种、亚种，还可进行菌株水平上的区分和鉴定。在鉴定准确度方面，与传统的鉴定方法相比，符合率在 85%~95%之间[9] [10]，与 16SrRNA 序列分析相

Table 2. Coexistence of multiple species in seven terrapin eggs sold in Xiamen
表2. 7批厦门市售甲鱼蛋样品多重带菌情况

样品	1		2		3		4		5		6		7	
	W	N	W	N	W	N	W	N	W	N	W	N	W	N
数量(株)	5	3	4	1	4	4	7	13	8	4	6	6	7	4
	8		5		8		20		12		12		11	

Note: W-shell, N-Contents (注: W 表示外壳, N 表示内容物)。



M: 100 bp DNA Marker; (A): 1-5 分别为霍乱弧菌 05015、霍乱弧菌 05018、蛋 4 外菌株、蛋 4 内菌株、蛋 5 外菌株; (B)、(C)、(D)1 分别为 ETEC C83902、ETEC C83916、ETEC C83902; 2~4 分别为蛋 6 外菌株、蛋 6 内菌株、蛋 7 外菌株; NTC 为阴性对照。

Figure 1. Results of PCR
图 1. PCR 结果

Table 3. Classification Results of MALDI-TOF-MS bacteria isolated from terrapin eggs sold in Xiamen**表3.** 厦门市售甲鱼蛋所携带细菌的MALDI-TOF-MS鉴定结果

细菌	中文名	拉丁文名	株数		批次编号
			蛋壳 W	内容物 N	
<i>Aeromonas</i> spp. (5/76, 6.6%)	维氏气单胞菌	<i>Aeromonas culicicola</i>	0	1	5W
	嗜水气单胞菌	<i>Aeromonas hydrophila</i>	2	2	4WN/5N/7W
<i>Walcaligenes</i> spp. (1/76, 1.3%)	粪产碱杆菌	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0	1	4N
<i>Arthrobacter</i> spp. (1/76, 1.3%)	根特节杆菌	<i>Arthrobacter gandavensis</i>	0	1	3N
	蜡样芽胞杆菌	<i>Bacillus cereus</i>	4	2	1W/2WN/3W/4WN
<i>Bacillus</i> spp. (8/76, 10.5%)	环状芽胞杆菌	<i>Bacillus circulans</i>	0	1	3N
	纺锤形赖氨酸芽孢杆菌	<i>Bacillus fusiformis</i>	1	0	7W
	弗氏柠檬酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	4	5	1N, 4/5/6/7(WN)
<i>Enterobacter</i> spp. (17/76, 22.4%)	产气肠杆菌	<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	0	2W/3W
	阿氏肠杆菌	<i>Enterobacter asburiae</i>	1	1	1W/4N
	阴沟肠杆菌	<i>Enterobacter cloacae</i>	6	3	2/5/7/(W) 3/4/6(WN)
	神户肠杆菌	<i>Enterobacter kobei</i>	2	0	1W/3W
	阪崎肠杆菌	<i>Enterobacter sakazakii</i>	1	1	3N/4W
<i>Escherichia</i> spp. (3/76, 3.9%)	大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	2	1	6WN/7W
<i>Klebsiella</i> spp. (1/76, 1.3%)	肺炎克雷伯氏菌	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	1	4N
<i>Morganella</i> spp. (3/76, 3.9%)	摩氏摩根氏菌	<i>Morganella morganii</i>	1	2	4N/5WN
<i>Ochrobactrum</i> spp. (1/76, 1.3%)	小麦苍白杆菌	<i>Ochrobactrum tritici</i>	0	1	1N
<i>Proteus</i> spp. (2/76, 2.6%)	奇异变形菌	<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	7W
	普通变形杆菌	<i>Proteus vulgaris</i>	1	0	5W
<i>Pseudomonas</i> spp. (5/76, 6.6%)	门多萨假单胞菌	<i>Pseudomonas mendocina</i>	0	2	4N/7N
	食油假单胞菌	<i>Pseudomonas oleovorans</i>	1	2	4N/6WN
<i>Salmonella</i> spp. (4/76, 5.3%)	沙门氏菌	<i>Salmonella</i> sp.	3	1	1W/4WN/5W
<i>Serratia</i> spp. (1/76, 1.3%)	粘质沙雷氏菌	<i>Serratia marcescens</i>	1	0	5W
<i>Staphylococcus</i> spp. (9/76, 11.8%)	松鼠葡萄球菌	<i>Staphylococcus sciuri</i>	5	4	1//6/7(WN) 2W/4N/5W
	溶藻弧菌	<i>Vibrio alginolyticus</i>	2	1	6WN/7W
	霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i>	2	1	4WN/5W
总计			41	35	
			76		

Note: The same kind of bacteria separated in the same sample using different kinds of media was calculated only once.

注：用不同种培养基在同一个样品中分离到的同种细菌仅计算一次。

Table 4. Detection results of *Vibrio cholera* and *Escherichia coli* by serological test
表 4. 甲鱼蛋样品霍乱弧菌和大肠杆菌血清凝集结果

样品编号	O1 多价血清		O139 血清		O157 血清	
	可疑菌株	生理盐水	可疑菌株	生理盐水	可疑菌株	生理盐水
蛋 4 外(霍乱弧菌)	-	-	-	-		
蛋 4 内(霍乱弧菌)	-	-	-	-		
蛋 5 外(霍乱弧菌)	-	-	-	-		
蛋 6 外(大肠杆菌)					-	-
蛋 6 内(大肠杆菌)					-	-
蛋 7 外(大肠杆菌)					-	-

比具有更高的菌株鉴定能力[11]。但 MALDI-TOF-MS 在鉴定方面也存在一些局限性，虽然对于血液、尿液等[12] [13]临床标本可直接进行检测，但对于像甲鱼蛋这类背景较复杂的样本还需分离纯化单菌落。由于鉴定是依赖于数据库的信息量和准确性，因此还需要不断的完善数据库，同时还要对样本处理和操作流程进行优化，以使鉴定结果准确可靠。

对厦门市水产批发市场销售的甲鱼蛋进行检验，结果检出了 16 个属 26 种共 76 株细菌，无论是蛋壳还是内容物都带菌，且多重带菌现象严重。本次从甲鱼蛋中分离到了 4 株沙门氏菌，蛋壳和内容物都有，陈建辉等[4]也从甲鱼蛋中分离到了一株沙门氏菌，说明沙门氏菌污染甲鱼蛋的情况普遍存在。霍乱弧菌也是对人和水产品危害较大的细菌，虽然分离到的为非 O1 非 O139 群霍乱弧菌，但 Sarkar A 等[14]发现某些非 O1 非 O139 群霍乱弧菌拥有 2 个 7 个碱基(TTTTGAT)的重复序列，该重复序列位于 *ctxAB* 基因上游间隔区，也有可能产生毒素。研究认为编码霍乱毒素(CT)的溶源性噬菌体 CTXΦ 可以整合或复制到霍乱弧菌染色体上，使无毒株变为产毒株[15]。另外，还检出了大肠杆菌和其他条件致病，在免疫力低下时会导致疾病暴发。甲鱼蛋在存放过程中极易被环境中的细菌污染，使蛋壳携带大量细菌，这些细菌可经过气孔进入蛋内[16]，导致内容物被污染。被污染的甲鱼蛋不仅容易腐败变质，若加工成了蛋制品还会引起食物中毒的危险，且在流通过程中会造成细菌的传播。

本研究分离的肠杆菌科细菌基本与陈建辉等[4]2007 年对台湾甲鱼蛋携带肠杆菌科情况进行的普查结果总体相一致；陈拱立等[17]在走私的台湾甲鱼蛋中也分离到了 10 株非 O1 非 O139 霍乱弧菌，弗氏柠檬酸杆菌和嗜麦芽寡养单胞菌也占有很大比例，结果显示甲鱼蛋细菌类别分布广泛、构成复杂、多重带菌率高；罗朝晨等[18]对台湾甲鱼蛋携带弧菌科细菌的普查结果显示，气单胞菌属占有较高的比例，其次为非 O1 非 O139 霍乱弧菌，也有个别蛋携带拟态弧菌和河流弧菌。本研究从厦门市售甲鱼蛋中分离到的主要病原菌基本与其他研究资料相符合，这可能与甲鱼蛋本身携带的菌种有关。另外，有个别种属的细菌存在差异，这可能与甲鱼蛋本来的生长环境、甲鱼亲体状况及运输、存放过程中的条件有关。其他菌属尚无资料进行对比。

5. 结论

目前市场上的甲鱼大部分都是由人工养殖的，由于人工养殖甲鱼的密度大，极易发生群体性细菌感染，用于孵化的甲鱼蛋的质量直接影响到甲鱼的健康。甲鱼蛋本身携带病原菌，就极可能在存放、运输及孵化的过程中使病原菌大量繁殖，使幼鳖患病，甲鱼蛋作为可食用的食品也会引起人类食物中毒。因此对于甲鱼蛋要进行严格的质量检验，以保证养鳖业健康发展和人们的身体健康。

基金项目

厦门市科技计划项目(3502z20124003)。

参考文献 (References)

- [1] 陈亮, 陈拱立, 陈润生, 等 (2005) 鳖卵带菌情况与实验感染霍乱弧菌的研究 III: O139 群霍乱弧菌污染鳖卵的实验观察. *海峡预防医学杂志*, **3**, 18-20.
- [2] 陈拱立, 陈亮, 罗朝晨, 等 (2005) 鳖卵带菌情况与实验感染霍乱弧菌的研究 IV: 种卵污染 O139/O1 霍乱弧菌后在孵化期和稚鳖初期该菌的检出情况. *海峡预防医学杂志*, **3**, 21-23.
- [3] 徐淑菲, 孔繁德 (2010) MALDI Biotyper 高通量微生物鉴定系统在进口甲鱼蛋检疫中的初步应用. *厦门检验检疫科技*, **2**, 30-35.
- [4] 陈建辉, 谢一俊, 郭维植, 等 (2007) 鳖蛋携带肠杆菌科细菌的调查. *中国食品卫生杂志*, **3**, 267-269.
- [5] 邵晖, 吴玲玲, 王伟, 等 (2008) 食品中病原微生物检测方法进展及优缺点评价. *中国食品工业*, **4**, 40-43.
- [6] Anhalt, J.P. and Fenselau, C. (1975) Identification of bacteria using mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **47**, 219-225.
- [7] 鲍春梅, 崔恩博, 陈鹏, 等 (2012) MALDI-TOF-MS 鉴定宋内志贺菌的初步应用研究. *传染病信息*, **1**, 10-13.
- [8] 其布勒哈斯, 田世民, 邹明强, 等 (2009) MALDI-TOF 质谱技术分析与鉴定病原细菌研究. *微生物学通报*, **3**, 416-426.
- [9] Benagli, C., Rossi, V., Dolina, M., et al. (2011) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One*, **6**, Article ID: e16424.
- [10] Risch, M., Radjenovic, D., Han, J.N., et al. (2010) Comparison of MALDI TOF with conventional identification of clinically relevant bacteria. *Swiss Medical Weekly*, **24**, Article ID: w13095.
- [11] 范铁男, 邹积宏, 卢行安, 等 (2010) 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术作为常见益生菌菌种鉴定辅助工具的研究. *中国微生态学杂志*, **11**, 970-973.
- [12] Seng, P., Rolain, J.M., Fournier, P.E., et al. (2010) MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology. *Future Microbiology*, **5**, 1733-1754.
- [13] Stevenson, L.G., Drake, S.K. and Murray, P.R. (2010) Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**, 444-447.
- [14] Sarkar, A., Nandy, R.K., Nair, G.B., et al. (2002) Vibrio pathogenicity island and cholera toxin genetic element- associated virulence genes and their expression in non-O1 non-O139 strains of *Vibrio cholera*. *Infection and Immunity*, **70**, 4735-4742.
- [15] Waldor, M.K. and Mekalanos, J.J. (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*, **272**, 1910-1914.
- [16] 张彦明, 贾靖国 (1995) 市售鲜鸡蛋细菌污染情况的调查研究. *肉类卫生*, **9**, 9-11.
- [17] 陈拱立, 谢一俊, 陈伟伟, 等 (2005) 鳖卵带菌情况与实验感染霍乱弧菌的研究 I: 一批鳖卵抽检样品中所见细菌的记述. *海峡预防医学杂志*, **2**, 15-17.
- [18] 罗朝晨, 王晓萍, 陈拱立, 等 (2005) 鳖卵带菌情况与实验感染霍乱弧菌的研究 II: 鳖卵中弧菌科致病菌携带情况的调查. *海峡预防医学杂志*, **2**, 18-20.