

恒温荧光核酸检测与国标法在副溶血性弧菌检验能力验证中的应用与分析

符天晓*, 吴育忠, 高土玲

(海南省食品药品检验所三亚分所, 三亚 572000)

摘要: 目的 通过参加中国食品药品检定研究院组织的副溶血性弧菌检验能力验证活动, 提高实验室检测副溶血性弧菌的准确率。**方法** 对能力验证标号为 CODE1~CODE3 的 3 组鱼蛋白粉样品, 使用恒温荧光核酸检测技术与国标 GB 4789.7-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验进行副溶血性弧菌的检测。**结果** 使用恒温荧光核酸检出 CODE2 为阳性结果, 与 GB 4789.7-2013 国家标准方法检出的阳性结果一致, 证明 CODE2 为副溶血性弧菌。**结论** 通过此次能力验证, 使得实验室副溶血性弧菌的检测能力得到了有效提高, 为快速检测副溶血性弧菌提供参考。

关键词: 快检检测; 国标方法; 能力验证; 副溶血性弧菌

Application and analysis of thermostatic fluorescence nucleic acid detection and national standard method in the proficiency testing of *Vibrio parahaemolyticus*

FU Tian-Xiao*, WU Yu-Zhong, GAO Tu-Ling

(Hainan Institute For Food and Drug Control Sanya Branch, Sanya 572000, China)

ABSTRACT: Objective To improve the accuracy of laboratory detection of *Vibrio parahaemolyticus* by participating in the proficiency testing organized by National Institutes for Food and Drug Control. **Methods** *Vibrio parahaemolyticus* was detected by thermostatic fluorescence nucleic acid technology and national standard GB 4789.7-2013 National food safety standard-Food microbiological analysis-*Vibrio parahaemolyticus* test in 3 groups of fish protein powder samples with CODE1-CODE3 for proficiency testing. **Results** CODE2 was detected as a positive result by thermostatic fluorescence nucleic acid, which was consistent with the positive result detected by GB 4789.7-2013 national standard method, proving that CODE2 was *Vibrio parahaemolyticus*. **Conclusion** Through this proficiency testing, the detection ability of *Vibrio parahaemolyticus* in the laboratory has been effectively improved, providing a reference for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*.

KEY WORDS: rapid detection; national standard method; proficiency testing; *Vibrio parahaemolyticus*

1 引言

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种嗜盐性

细菌, 食用含有该菌的食物会引起食物中毒^[1]。含有此类细菌的食物主要为海产品, 如贝壳类、墨鱼、海鱼、海虾、海蟹、海蜇等, 以及含盐分较高的腌制食品, 如咸菜、腌

*通讯作者: 符天晓, 工程师, 主要研究方向为食品药品微生物检测。E-mail: 124962380@qq.com

*Corresponding author: FU Tian-Xiao, Engineer, Hainan Institute For Food and Drug Control Sanya Branch, Sanya 572000, China. E-mail: 124962380@qq.com

菜等^[2]。此菌的存活能力强,在抹布和砧板上能存活一个月以上,海水中可存活 47 d,临床上以急性起病、腹痛、呕吐、腹泻及水样便为主要症状^[3]。副溶血性弧菌引起食物中毒及急性肠胃炎已成为全球重要公共卫生问题之一^[4]。所以对副溶血性弧菌的检验应加强重视。

恒温荧光核酸检测是利用环介导等温核酸扩增^[5](loop-mediated isothermal amplification, LAMP)和实时荧光技术相结合,通过收集荧光信号来判断样品是否发生扩增并判断扩增量,与普通 LAMP 技术相比较,所建立的检测方法具有可实时监控反应过程,反应时间更短,灵敏度和特异性更高,操作更为简单等优点^[6]。

为了提高对食品中副溶血性弧菌的检测能力和水平,本实验室报名参加 2017 年由中国食品药品检定研究院计划的副溶血性弧菌检验能力验证,通过使用恒温荧光核酸检测技术^[7]与国标 GB 4789.7-2013^[8]的结果进行对比分析,使得实验室的管理水平和检验技术得到有效的提高,为相关实验室的检测工作提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 样品来源

中国食品药品检定研究院发放的编号为 CODE1 ~ CODE3 的鱼蛋白粉和冻干菌珠。

2.1.2 检测试剂、仪器

3%氯化钠碱性蛋白胨水、硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂弧菌显色培养基、3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂、3%氯化钠三糖铁琼脂、副溶血性弧菌生化鉴定试剂盒(广州环凯微生物有限公司); DNA 提取液、A-VP-I 试剂、B-I 试剂、C-I 石蜡、NG-I 阴性对照液、PG-VP-I 阳性对照液、扩增引物序列(广州双螺旋基因技术有限公司)。所有试剂经过验证并在有效期内。

MLS-3781L-PC 高压蒸汽灭菌锅(日本松下公司); KB240 生化培养箱(德国 BINDER 公司); BHC-1300IIA2 生物安全柜(苏州安泰空气计数有限公司); Deaou-308C 恒温荧光检测仪(广州迪奥公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 国标检验方法

参照 GB 4789.7-2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌》^[8]进行检测。

2.2.2 恒温荧光 PCR 筛选技术检验方法及原理

参照广州双螺旋基因技术有限公司试剂盒的方法进行模板制备、试剂配制、添加模板、扩增反应。具体如下:

(1)模板制备

将增菌液摇匀静止,取增菌液 100 μ L 至 900 μ L DNA 提取液,涡旋振荡混匀,100 $^{\circ}$ C 条件下加热 5 ~ 10 min,

1000 r/min 离心 2 min,所得上清液为提取核酸基因组(2 μ L)作为 PCR 扩增模板。

(2)试剂配制

将试剂解冻、混匀,离心 30 s,将 A-VP-I 试剂和 B-I 试剂置于 1.5 mL 离心管中,涡旋混匀,离心 30 s,分装到 N 个 0.2 mL PCR 管中,每管加入 23 μ L 混合反应液,向每管加入 1 滴 C-I 试剂(N 个待测样+1 个阴性对照+1 个阳性对照)。

(3)添加模板

在步骤 2 中已含反应液的 PCR 管中加入 2 μ L 模板,顺序为 NG-I,待测样品模板、PG-VP-I,涡旋混匀 30 s,离心 1 min,立即进行扩增反应。

(4)扩增反应

63 $^{\circ}$ C 条件下反应 45 min,使用 Deaou-308C 恒温荧光检测仪进行检测,仪器自动判定结果,如若有“S”型扩增曲线,则判断为阳性;如无“S”型扩增曲线,则判为阴性。

3 结果与分析

3.1 国标检验结果

3.1.1 菌落形态

分别将 CODE1 ~ CODE3 的鱼蛋白粉样品加入 225 mL 3%氯化钠碱性蛋白胨水中混匀,放置于 36 $^{\circ}$ C 培养 14 h,对增菌液分别用接种环沾取一环,于 TCBS 平板或弧菌显色培养基平板上划线分离。于 36 $^{\circ}$ C 培养 18、24 h。3 份样品分别在平板上的菌落特征形态如表 1。分别在 18、24 h 观察菌落形态,发现培养时间过长,会导致杂菌生长速度过快,使可疑菌落被覆盖。

3.1.2 生化实验

分别将 3 份样品挑起 5 个可疑菌落划线接种 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂,36 $^{\circ}$ C 培养 24 h。结果如表 2, CODE2 为副溶血性弧菌, CODE1、CODE3 未检出副溶血性弧菌。

3.2 恒温荧光检测结果

如图 1 所示, CODE2 样品与阳性对照副溶血性弧菌的荧光对数值相近,而 CODE1、CODE3 的荧光对数值低。

3.3 恒温荧光法与国标法对 3 组样品验证结果的比较

能力验证样品的恒温荧光法与国标方法检测结果比较见下表 3。由表 3 可知,恒温荧光法与国标方法相比,灵敏度 $(P+) = A/(A+B) \times 100\% = 1/(1+0) \times 100\% = 100\%$; 特异性 $(P-) = D/(B+D) \times 100\% = 2/(0+2) \times 100\% = 100\%$; 准确度 $= (A+C)/N \times 100\% = (1+2)/3 \times 100\% = 100\%$ 。

式中, A-待确认方法和参考方法均确认为阳性的数量, B-参考方法为阳性,待确认方法为阴性的数量, C-待确认方法和参考方法均确认为阴性的数量, D-待确定方法和参考方法均确定为阴性的数量, $N=A+B+C$ 。

表 1 不同时间在选择性培养基上的菌落特征
Table 1 Characteristic of colonies on selective media at different time

编号	选择性平板	菌落特征	
		18 h	24 h
CODE1	弧菌显色培养基	有可疑紫红色菌落	紫红色菌落被杂菌覆盖
	TCBS 琼脂	有可疑绿色菌落	绿色菌落被杂菌覆盖
CODE2	弧菌显色培养基	有可疑紫红色菌落	紫红色菌落被杂菌覆盖
	TCBS 琼脂	有可疑绿色菌落	绿色菌落被杂菌覆盖
CODE3	弧菌显色培养基	有可疑紫红色菌落	紫红色菌落被杂菌覆盖
	TCBS 琼脂	有可疑绿色菌落	绿色菌落被杂菌覆盖
阳性对照	弧菌显色培养基	典型紫红色菌落	典型紫红色菌落
	TCBS 琼脂	典型绿色菌落	典型绿色菌落

表 2 可疑菌落在生化试剂盒中的鉴定
Table 2 Identification of suspected colony in biochemical kit

编号/生化	CODE1	CODE2	CODE3	阳性对照
氧化酶	+	+	+	+
革兰氏染色	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁻
斜面	K	K	K	K
3%氯化钠 底层	A	A	A	A
三糖铁 产气	-	-	-	-
硫化氢	-	-	-	-
0%	-	-	-	-
6%	+	+	+	+
嗜盐性实验 8%	+	+	+	+
10%	+	-	+	-
3%氯化钠甘露醇	+	+	+	+
3%氯化钠半固体	+	+	+	+
3%氯化钠蔗糖	+	-	+	-
3%氯化钠葡萄糖	+	+	+	+
3%氯化钠葡萄糖产气	-	-	-	-
3%氯化钠赖氨酸脱羧酶	+	+	+	+
V-P 实验	+	-	+	-
ONPG	-	-	-	-

注: K 代表产碱; A 代表产酸; +代表阳性或有动力; -代表阴性或无动力。

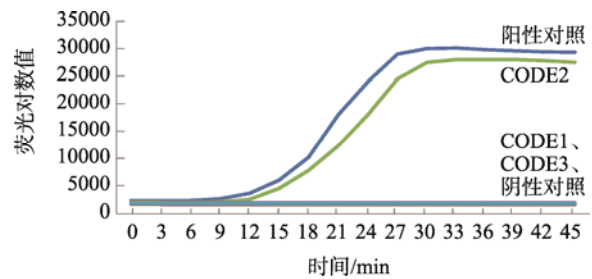


图 1 3 组样品检测结果
Fig.1 Test results of 3 groups of samples

表 3 恒温荧光法与国标方法检测结果比较
Table 3 Comparison of detection results between constant temperature fluorescence method and national standard method

样品	恒温荧光法	国标方法最终结果
CODE1	-	-
CODE2	+	+
CODE3	-	-

注: +代表阳性; -代表阴性。

4 结论与讨论

此次能力验证的结果为: CODE2 为副溶血性弧菌, CODE1、CODE3 未检出副溶血性弧菌。此次参加副溶血性弧菌能力验证难度较以往较大, 中检院在制备样品时, 阳性样本中副溶血性弧菌和各种背景菌的浓度都为 10^4 CFU/mL, 阴性样本的背景菌浓度为 10^4 CFU/mL。其中 1 种背景菌溶藻弧菌, 该菌的生长速度明显快于副溶血性弧菌, 且所需的培养基与副溶血性弧菌生长培养基相同。挑取的初期增菌液较多或者培养时间较长时, 溶藻弧菌极有可能连成片覆盖副溶血性弧菌造成假阴性^[9,10]。如果只用国标法检测可能会漏检导致能力验证不满意。与国标方法

相比, 恒温荧光核酸检测法检测副溶血性弧菌未检出阴性, 阳性灵敏度为 100%, 准确度为 100%, 检测一致良好。因此, 通过恒温荧光核酸检测出的阳性样品更可为后续的国标方法检验作为重要提示, 防止漏检现象的发生。

通过此次实验可以得出, 利用恒温荧光检测仪检测结果与国标方法检测结果一致^[11], 说明了此次实验用恒温荧光核酸检测副溶血性弧菌的准确度很高, 同时与国标方法对比可以快速的检出阳性样品, 提高漏检率和检验时效^[12]。所以在今后的工作中, 可以利用恒温荧光核酸检测筛选技术对海产品及食品进行检测, 并与国标方法进行比对, 确立利用恒温荧光核酸筛选技术进行检测准确性的验证^[13]。同时, 在重大餐饮保障任务、重点节假日餐饮食品^[14,15]安全任务中, 也可以利用恒温荧光核酸快检技术进行检测, 当检出阳性样品时, 可以做出准确的判断, 提高食药监管部门应急处突的快速反应能力, 确保广大人民群众的饮食安全^[16]。

参考文献

- [1] 王立伟, 张昭寰, 赵勇, 等. 市售水产品中副溶血性弧菌污染的定量风险评估[J]. 上海预防医学, 2016, (6): 365-371.
Wang LW, Zhang ZH, Zhao Y, et al. Quantitative risk assessment of contamination of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products [J]. Shanghai J Prev Med, 2016, (6): 365-371.
- [2] 刘秀梅, 程苏云, 陈艳, 等. 2003 年中国部分沿海地区零售海产品中副溶血性弧菌污染状况的主动监测[J]. 中国食品卫生杂志, 2005, (2): 97-99.
Liu XM, Cheng SY, Chen Y, et al. Active surveillance on *Vibrio parahaemolyticus* in retail seafoods from coastal areas of China in 2003 [J]. Chin J Food Hyg, 2005, (2): 97-99.
- [3] 萧松建, 周奕, 龚红英, 等. 一起副溶血性弧菌食物中毒调查[J]. 中国热带医学, 2017, 18(10): 1046-1049.
Xiao SJ, Zhou Y, Gong HY, et al. Investigation on a poisoning of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. China Trop Med, 2017, 18(10): 1046-1049.
- [4] 何永贵. 冰鲜海产品食源性致病菌污染的调查分析[J]. 中国医药科学, 2017, (19): 180-182, 193.
He YG. Investigation and analysis of foodborne pathogenic bacteria pollution of chilled seafood [J]. China Med Pharm, 2017, (19): 180-182, 193.
- [5] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucl Acids Res, 2000, 28(12): 63-68.
- [6] 李丽丽, 叶蕾, 张璜, 等. 恒温实时荧光法快速检测奶粉中阪崎肠杆菌方法的建立[J]. 现代食品科技, 2016, (9): 308-313.
Li LL, Ye L, Zhang H, et al. A real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification method to detect enterobacter sakazakii in milk powder [J]. Mod Food Sci Technol, 2016, (9): 308-313.
- [7] 李洁云, 王文珺, 阎颖, 等. 恒温荧光核酸检测仪检测 2 种食源性致病菌的方法验证[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(4): 761-768.
Li JY, Wang WJ, Yan Y, et al. Method verification for the detection of 2 kinds of food pathogens by constant temperature fluorescent nucleic acid detector [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(4): 761-768.
- [8] GB 4789.7-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验[S].
GB 4789.7-2013 National food safety standard-Food microbiology examination of *Vibrio parahaemolyticus* [S].
- [9] 张作杰. 食源性疾病监测中副溶血性弧菌现场快速检测方法的建立与应用[J]. 现代食品, 2018, (7): 144-146.
Zhang ZJ. Establishment and application of rapid detection method for *Vibrio parahaemolyticus* in foodborne disease surveillance [J]. Mod Food, 2018, (7): 144-146.
- [10] 陈秀琴, 黄梅清, 郑敏, 等. 食源性致病菌快速检测技术及其应用研究进展[J]. 福建农业学报, 2018, (4): 438-446.
Chen XQ, Huang MQ, Zheng M, et al. Advances on rapid of foodborne pathogens and the application [J]. Fujian J Agric Sci, 2018, (4): 438-446.
- [11] 广州迪奥生物科技有限公司. 恒温荧光检测仪: CN 2014301456. X [P]. 2014-11-05.
Guangzhou Dior Biotechnology Co., Ltd. Constant temperature fluorescence detector: CN 2014301456. X [P]. 2014-11-05.
- [12] 萨日那, 康俊巍, 李玉英, 等. 快速微生物检测法与国标法对比实验研究[J]. 中国食品工业, 2013, (9): 58-59.
Sa RN, Kang JW, Li YY, et al. Comparative experimental study on rapid microbiological assay and national standard [J]. Food Bever Ind, 2013, (9): 58-59.
- [13] 陈秀云, 何泳媚, 许雪荷, 等. 3 种食品致病菌实时荧光核酸恒温扩增试剂盒方法验证对比研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(3): 1047-1052.
Chen XY, He YM, Xu XH, et al. Validation comparison analysis of 3 kinds of food pathogens simultaneous amplification and testing kit methods [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8 (3): 1047-1052.
- [14] 易敏英, 凌莉, 刘助红, 等. 恒温实时荧光法检测副溶血性弧菌[J]. 现代食品科技, 2013, (5): 1131-1135.
Yi MY, Ling L, Liu ZH, et al. Thermostatic real-time fluorescence detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Mod Food Sci Technol, 2013, (5): 1131-1135.
- [15] 王晔茹, 林兰, 徐潇, 等. 餐饮服务食品微生物风险评估研究进展[J]. 中国药事, 2013, (5): 530-533.
Wang YR, Lin L, Xu X, et al. Research progress of microbiological risk assessment on restaurant foods [J]. Chin Pharm Aff, 2013, (5): 530-533.
- [16] 王兰兰, 张莉, 范志勇, 等. 2017 年湖北省餐饮食品安全状况分析及对策探讨[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(9): 2267-2270.
Wang LL, Zhang L, Fan ZY, et al. Analysis and countermeasure discussion of catering food safety situation of Hubei province in 2017 [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(9): 2267-2270.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



符天晓, 工程师, 主要研究方向为食品药品微生物检测。
E-mail: 124962380@qq.com