

两种副溶血性弧菌检测方法的比对

罗心怡, 丁清龙, 周 露*

(广东省食品检验所, 广州 510435)

摘要: 目的 比较国家标准中的定性检测法与快速检测法中的普通 PCR 法在检测食源性副溶血性弧菌上的区别与优劣, 为今后针对副溶血性弧菌的检测方法的改进依据及应对突发食品安全事件时快速检测提供参考。**方法** 采用 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》与 SN/T 1869-2007《食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法》对经阳性菌株污染的市售墨鱼干样品进行副溶血性弧菌的检测, 并对 2 种方法进行对比。**结果** 2 种方法在针对食源性副溶血性弧菌的检验上的比对结果均为检出。在实验耗时方面, 国家标准法确认检出阳性需耗时 4 d, 快速检测法仅需耗时 26 h。**结论** 国家标准中的定性检测法与快速检测方法均能检出副溶血性弧菌, 国标法在应对日常检验上标准且能够广泛应用, 快速检测方法在快速、准确地应对食品安全突发事件方面具有优势。

关键词: 副溶血性弧菌; 方法比对; 国家标准; 快速检测

Comparison of 2 detection methods for *Vibrio parahaemolyticus*

LUO Xin-Yi, DING Qing-Long, ZHOU Lu*

(Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China)

ABSTRACT: Objective To compare the differences, advantages and disadvantages of ordinary PCR methods between the qualitative and rapid detection method in the national standard for the detection of foodborne *Vibrio parahaemolyticus*, in order to provide a reference for the future improvement of the detection method for *Vibrio parahaemolyticus* and rapid detection in response to food safety emergencies. **Methods** GB 4789.7-2013 *National foods safety standard-Food microbiological examination-Vibrio parahaemolyticus test* and SN/T 1869-2007 *Rapid detection methods for pathogens in foods-PCR method* were used for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* and the 2 methods were compared. **Results** The comparative results of 2 methods on the test for *Vibrio parahaemolyticus* of food origin were both detectable. In terms of the experimental time, it took 4 d for the national standard method to confirm the positive detection, and only 26 h for the rapid detection method. **Conclusion** *Vibrio parahaemolyticus* can be detected by both qualitative and rapid tests in the national standards. National standard method is standard and can be widely used for routine testing. Rapid detection method has advantages in responding quickly and accurately to food safety emergencies.

KEY WORDS: *Vibrio parahaemolyticus*; comparison of methods; national standards; rapid detection

*通讯作者: 周露, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物安全。E-mail: zhoululu1982@sohu.com

*Corresponding author: ZHOU Lu, Senior Engineer, Guangdong Institute of Food Inspection, Guangzhou 510435, China. E-mail: zhoululu1982@sohu.com

1 前言

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, VP)是一种革兰氏阴性弧菌, 属弧菌科弧菌属, 是一种能引起海产性细菌性胃肠炎的食源性致病菌。其嗜盐, 因此广泛分布于近岸海水、海底沉积物和鱼贝类中, 海产品(如海鱼、海虾等)以及含盐分较高的腌制食品(如腌菜、酱肉等)是传播副溶血性弧菌的最常见载体^[1], 系沿海地区引起突发食品安全事件的首要致病菌。副溶血性弧菌最早发现于上世纪 50 年代日本发生的一次食物中毒事件中^[2], 20 世纪 90 年代末, 越南中部因其感染爆发了一场大规模的肠道疾病, 共报告了 523 例^[3]。我国每年因副溶血性弧菌导致食源性疾病发病 495.1 万人次^[4], 食源性疾病监测网及国家食品安全信息监测系统统计数据显示: 2002~2007 年暴发的细菌性食物中毒事件中, 副溶血性弧菌位居病原菌之首^[5], 可见副溶血性弧菌对人类的生产生活造成的影响, 因此在食品检测中副溶血性弧菌的检测是实验室的重点关注对象之一。

根据 ISO17025《检测和校准实验室能力认可准则》^[6]与 CNAS-CL01-A001:2018《检测和校准实验室能力认可准则在微生物检测领域的应用说明》^[7]的规定, 实验室应有监控结果有效性的程序, 其中包括实验室内部比对。实验室内部比对是寻求比对因素对检测结果的影响, 根据所选比对因素的不同, 比对形式主要有人员比对、方法比对、仪器比对和留样再测等^[8]。为证明本实验室人员具备检测副溶血性弧菌的能力, 本研究以内部质量监控的形式进行比对, 分别采用 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》^[9]和 SN/T 1869-2007《食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法》^[10]中的方法, 对经阳性菌株污染的市售墨鱼干样品进行副溶血性弧菌的检测, 以期为今后针对副溶血性弧菌的检测方法的改进提供依据及应对突发食品安全事件时的快速检测提供参考。

2 材料与方法

2.1 样品

市售墨鱼干, 下样号为内部质控 19Q2200213。

对照阳性菌株: ATCC 17802-4-20190218 副溶血性弧菌(美国菌种保藏中心)。

2.2 仪器与试剂

PL6001E 电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); Masticator 均质器(西班牙 IUL 公司); SW-CJ-2F 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); LRH-250F 生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司); DensiCHEK-plus 比浊仪(法国梅里埃公司); T100PCR 仪(美国伯乐公司); Sorvall™ LYNX 高速离心机(美国 Thermo 公司)。

3%氯化钠碱性蛋白胨水、3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂(北京陆桥公司); 硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖(thiosulfate citrate bile salts sucrose, TCBS)琼脂培养基、副溶血性弧菌生化鉴定盒、革兰氏染色液(广东环凯公司); 弧菌显色培养基(法国科马嘉公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)(天根生化科技(北京)公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 GB 4789.7-2013 定性检测法

样品制备、阳性污染与增菌: 样品属于头足类水产品, 以无菌操作均匀取样品共 25 g, 加入 3%氯化钠碱性蛋白胨水 225 mL, 用拍击式均质器拍击 2 min, 制备成 10^{-1} 的样品匀液。以阳性菌株(ATCC 17802-4-20190218)对样品均液进行阳性污染。用接种环沾取少量对照阳性菌株添加入 3 mL 3%氯化钠碱性蛋白胨水, 以比浊仪比浊制备成 0.5 麦氏浊度的阳性菌悬液, 再用 10 μ L 接种环取一环(菌数约为 1.5×10^6)入样品均液, 混匀后于 36 $^{\circ}$ C 培养 18 h。

分离: 分别用接种环在距离液面以下 1 cm 内沾取一环增菌液, 于 TCBS 琼脂培养基平板与弧菌显色培养基平板上划线分离, 36 $^{\circ}$ C 培养 24 h。

纯化: 挑取 3 个可疑菌落, 划线接种 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂平板, 36 $^{\circ}$ C 培养 24 h。

初步鉴定: 挑取纯培养的单个菌落进行氧化酶试验、三糖铁琼脂穿刺及嗜盐性试验。嗜盐性试验是挑取纯培养的单个可疑菌落, 分别接种不同氯化钠浓度的胰胨水, 36 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 观察液体浑浊情况。

确定鉴定: 从分离平板挑取纯培的单个菌落制成菌悬液, 按生化试剂盒操作说明书操作。

2.3.2 SN/T 1869-2007 普通 PCR 法

样品制备、阳性污染与增菌按照 GB 4789.7-2013 进行。挑取可疑菌落, 加入 50 μ L DNA 提取液, 8000 r/min 离心 5 min, 尽量吸弃上清; 再加入 50 μ L DNA 提取液, 混匀后沸水浴 5 min, 12000 r/min 离心 5 min, 取上清保存制备模板 DNA 以待检测。

PCR 反应: 预变性: 95 $^{\circ}$ C 1 min; 扩增: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 5 min; 循环数: 35, 后延伸: 72 $^{\circ}$ C 2 min, 电泳步骤按标准 SN/T 1869-2007 进行。

3 结果与分析

3.1 实验结果

样品 19Q2200213 在 TCBS 上呈 2~3 mm, 圆形、半透明、表面光滑的绿色菌落, 在弧菌显色培养基上呈淡紫色圆形菌落; 挑取分纯后的可疑菌落进行革兰氏染色, 染色结果为革兰氏阴性菌, 呈棒状、弧状等形态, 无芽孢。初步鉴定结果: 嗜盐性试验结果为在无盐胨水及 10% NaCl 胨水中不生长, 在 3%、6%和 8% NaCl 胨水中生长(表 1)。

氧化酶试验结果为阳性, 在 3%氯化钠三糖铁琼脂上斜面产碱, 底层产酸, 不产气及硫化氢, 有动力。副溶血性弧菌

生化鉴定盒鉴定结果为检出副溶血性弧菌(表 2)。PCR 鉴定结果为检出副溶血性弧菌(图 1)。

表 1 嗜盐性试验结果
Table 1 Results of salinity growth test

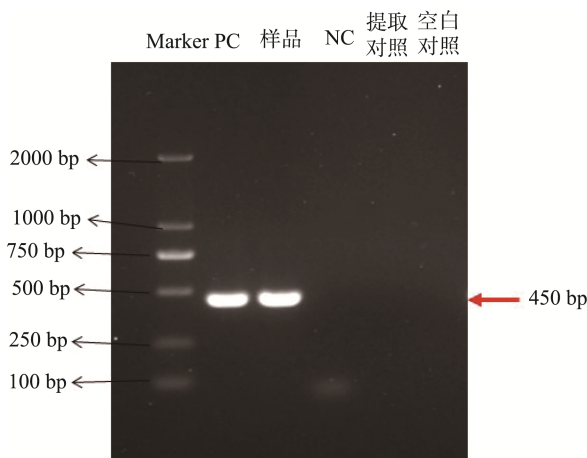
	无盐胨水	3%NaCl 胨水	6%NaCl 胨水	8%NaCl 胨水	10%NaCl 胨水
ATCC17802-4-20190218	-	+	+	+	-
19Q2200213	-	+	+	+	-

注: + 为阳性结果, - 为阴性结果。

表 2 生化试剂盒鉴定结果
Table 2 Results of the bacterial biochemical identification kit

	氧化酶	H ₂ S	半固体	甘露醇	蔗糖	乳糖	葡萄糖	赖氨酸脱羧酶	VP	ONPG
ATCC 17802-4-20190218	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-
19Q2200213	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-

注: + 为阳性结果, - 为阴性结果。



注: PC 为阳性对照(ATCC17802-4-20190218), NC 为阴性对照。

图 1 19Q2200213 样品 PCR 扩增产物电泳图

Fig.1 19Q2200213 electrophoresis of PCR-amplified samples

3.2 结果分析

采用 2 种方法对经阳性菌株污染的市售墨鱼干样品进行副溶血性弧菌的检测, 结果均为检出副溶血性弧菌。在检测结果准确性方面, 2 种方法都可以达到要求; 在实验耗时方面, 国家标准法确认检出阳性需耗时 4 d, 快速检测法仅需耗时 26 h; 在检测步骤方面, 国标方法需要分离纯化及初步鉴定, 步骤较多, 且使用试剂耗材耗费大; 快速检测法操作简单, 灵敏度高, 但样品内有可能残留死亡菌的 DNA 片段, 造成假阳性的结果。

4 结论与讨论

当某个检测项目可由多种方法进行的操作时, 实验室可采用方法比对试验的方式进行内部质量控制^[11]。本研究比对以内部质量监控的形式进行, 分别采用 GB 4789.7-2013 和 SN/T 1869-2007 中的方法对阳性污染的样品进行副溶血性弧菌的检测。两种方法的检测结果均为副溶血性弧菌检出, 检测结果与实际情况一致, 说明本实验室人员具备 GB 4789.7-2013 和 SN/T 1869-2007 检测副溶血性弧菌的能力。

经过此次方法比对发现, 2 种方法检测结果一致。快速检测法缩短了检测周期, 适合针对食品安全突发事件迅速高效地进行检测。国家标准法步骤繁多, 较快速检测法而言人为因素影响较大^[12], 考验实验人员的整体能力; 但在国际上被广泛承认, 是鉴定副溶血性弧菌的基准方法, 如出现争议应以此法为基准^[13]。因此可将快速检测法作为初筛, 再使用国标法对可疑样品进行确证实验, 可大大减少人力物力的损耗。

综上所述, 在对样品进行检验的过程中, 应灵活掌握普通 PCR 法等快速检测方法的运用, 并与国标方法结合进行综合判断。如果在检测工作中能及时发现问题, 对及时发现食品安全监测中的风险点, 提高政府监管效率, 以及流行病学溯源性研究均具有深远意义^[14]。

参考文献

- [1] 徐方旭, 刘诗扬, 兰桃芳, 等. 食源性致病菌污染状况及其应对策略

- [J]. 食品研究与开发, 2014, 35(1): 98–101.
- Xu FX, Liu SY, Lan TF, *et al.* Pollution situation and coping strategies of foodborne pathogens [J]. Food Res Dev, 2014, 35(1): 98–101.
- [2] Nguyen TPY, Nguyen TN, Nguyen TBV, *et al.* Antimicrobial residues, non-typhoidal *Salmonella*, *Vibrio* spp. and associated microbiological hazards in retail shrimps purchased in Ho Chi Minh city (Vietnam) [J]. Food Control, 2020, 107.
- [3] 韩小龙, 张海燕, 曹明秀, 等. 我国海产品中副溶血性弧菌的污染现状与控制策略分析[J]. 食品与发酵工业, 2015, 41(7): 263–267.
- Han XL, Zhang HY, Cao MX, *et al.* Analysis of the contamination status and control strategies of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood in China [J]. Food Ferment Ind, 2015, 41(7): 263–267.
- [4] 高飞, 孙群露, 刘晓峰, 等. 一起副溶血性弧菌食物中毒调查分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(5): 470–473.
- Gao F, Shun QL, Liu XF, *et al.* Investigation on a food poisoning caused by *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Chin J Food Hyg, 2013, 25(5): 470–473.
- [5] 吴琪, 伦嘉欣, 许少洪, 等. 2011~2013 年广州市海珠区不同来源副溶血性弧菌分离株血清分型及耐药性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(4): 317–320.
- Wu Q, Lun JX, Xu SH, *et al.* Analysis of serotype and antibiotics resistance in *Vibrio parahaemolyticus* from different sources in Haizhu district of Guangzhou during 2011–2013 [J]. Chin J Food Hyg, 2014, 26(4): 317–320.
- [6] ISO/IEC 17025-2005 检测和校准实验室能力的通用要求[S]. ISO/IEC 17025-2005 Accreditation criteria for testing and calibration laboratories [S].
- [7] CNAS-CL01-A001:2018 检测和校准实验室能力认可准则在微生物检测领域的应用说明[S]. CNAS-CL01-A001:2018 Guidance on the application of testing and calibration laboratory competence accreditation criteria in the field of microbiological testing [S].
- [8] 孟欣, 温福田, 赵海鑫. 食品检测实验室内部质量控制技术[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(22): 7819–7821.
- Meng X, Wen FT, Zhao HX. Internal quality control technology of food testing laboratory [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(22): 7819–7821.
- [9] 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 testing-*Vibrio parahaemolyticus* testing [S].
- [10] SN/T 1869-2007 食品中多种致病细菌快速检测方法 PCR 法[S]. SN/T 1869-2007 Rapid detection methods for pathogens in foods-PCR method [S].
- [11] RB/T 208-2016 化学实验室内部质量控制比对试验[S]. RB/T 208-2016 Contrast test of internal quality control in chemical laboratory [S].
- [12] 肖波, 周阳, 孙松松. 食品中副溶血性弧菌检测能力验证分析[J]. 预防医学情报杂志, 2017, 33(5): 447–449.
- Xiao B, Zhou Y, Shun SS. Analysis of proficiency testing for food-borne *Vibrio parahaemolyticus* [J]. J Prev Med Inform, 2017, 33(5): 447–449.
- [13] 凌秀梅, 王艳琴, 陈冬梅, 等. 两种检测水产品中副溶血性弧菌方法的比较分析[J]. 生物技术进展, 2012, 2(1): 44–47.
- Ling XM, Wang YQ, Chen DM, *et al.* Comparison of two methods to detect *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. Curr Biochnol, 2012, 2(1): 44–47.
- [14] 王桂兰, 钟雷响, 曹爱巧, 等. 副溶血性弧菌与弧菌科易混淆菌的鉴别方法[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(18): 6097–6102.
- Wang GL, Zhong LX, Chao AQ, *et al.* Identification methods of *Vibrio parahaemolyticus* and confounding strains [J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(18): 6097–6102.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



罗心怡, 检验员, 主要研究方向为食品微生物检验。

E-mail: catlxy@foxmail.com



周露, 高级工程师, 主要研究方向为食品生物安全。

E-mail: zhoulu1982@sohu.com