

海产品中副溶血性弧菌检测能力验证分析报告

张 芳^{1,2*}, 韩 涛^{1,2}, 林碧莲^{1,2}, 傅德江^{1,2}

(1. 福建省产品质量检验研究院, 福州 350002; 2. 国家加工食品监督检验中心(福州), 福州 350002)

摘要: 目的 通过参加英国 FAPAS 分析实验室组织的海产品中副溶血性弧菌检测能力验证, 对其实验结果出现的异常现象进行分析, 找出导致本次能力验证组织失效的原因。**方法** 按照 GB 4789.7-2013、SN/T 1870-2016 及相关作业指导书等进行实验, 通过采用本实验室经常采用的检测方法进行检验, 对实验出现的异常结果进行分析。**结果** 发现 M224d21A 和 M224d21B 这 2 个冷藏运输箱包装的冻干样品由于储藏和运输等问题, 导致未检出副溶血性弧菌。**结论** 此次能力验证分析对于我院在海产品中副溶血性弧菌检测方面技术水平的提高和品牌形象的确立起到了积极作用, 同时也为检验工作者对于能力验证出现异常现象提供一种解决问题的新思路、新方法。

关键词: 海产品; 副溶血性弧菌; 检测水平; 能力验证

Analysis report on detection ability of *Vibrio parahaemolyticus* in marine products

ZHANG Fang^{1,2*}, HAN Tao^{1,2}, LIN Bi-Lian^{1,2}, FU De-Jiang^{1,2}

(1. Fujian Province Product Quality Inspection Institute, Fuzhou 350002, China; 2. National Processing Food Supervision and Inspection Center (Fuzhou), Fuzhou 350002, China)

ABSTRACT: Objective To analyze the abnormal phenomena of the experimental results and find out why the proficiency testing failed by attending the proficiency testing of detecting the *Vibrio parahaemolyticus* in marine products organized by British FAPAS analysis laboratory. **Methods** According to GB 4789.7 2013, SN/T 1870-2016 and the related operation instructions, the methods for regular lab tests were used to detect and analyze the abnormal results of the experiment. **Results** It was concluded that no *Vibrio parahaemolyticus* was detected in the two freeze dried samples packed in refrigerated transport case M224d21A and M224d21B because of storage and transportation problems. **Conclusions** The proficiency testing has played a positive role in improving testing technology in the field of detecting the *Vibrio parahaemolyticus* in marine products, which is helpful to establish the brand image. At the same time, it also provides a new idea and a new method to solve the problem for the inspection workers for the abnormal phenomenon of ability verification.

KEY WORDS: marine products; *vibrio parahaemolyticus*; detection level; proficiency testing

基金项目: 福建省产品质量检验研究科技项目(KY201937A)

Fund: Supported by Fujian Province Product Quality Inspection Research Science and Technology Project (KY201937A)

*通讯作者: 张芳, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: 804285642@qq.com

*Corresponding author: ZHANG Fang, Engineer, Fujian Provincial Institute for Product Quality Inspection, 121 Shan Tau Kok, Gulou District, Fuzhou 350002, China. E-mail: 804285642@qq.com

1 引言

副溶血性弧菌是一种广泛分布于近岸海水、海底沉淀物和海产品中的嗜盐性细菌。对于世界许多沿海国家和地区如日本、东南亚国家、美国、台湾地区等,副溶血性弧菌所引起的食物中毒事件占有细菌性食物中毒事件的一半以上^[1,2]。副溶血性弧菌同时也是引起我国,特别是沿海地区细菌性食物中毒危害的首要食源性致病菌^[3,4]。在我国,近年来随着人民生活水平不断提高,水产品不断进入内陆,其销量逐年增加,由副溶血性弧菌引发的食源性疾病呈明显上升趋势^[5]。人们食用被副溶血性弧菌污染而又未煮熟的水产品,可能会出现腹泻、呕吐、腹痛等急性肠胃炎症状,因此要求检测单位具有能够快速准确的检测出副溶血性弧菌,应对各种突发性食物中毒事件的能力^[6]。

为了确保检验单位的检测水平,每年都应在相关领域参加一定计划数量的能力验证。实验室通过参加能力验证是为了提高实验室检测水平,同时也是保证实验室质量控制的重要手段。参加实验室能力验证活动能及时发现问题并加以纠正,确保检测结果的准确性和实验室质量管理体系更好地运转^[7-10]。而对于不满意或可疑结果如何进行确证性分析,目前还是缺少相关文献的报道和研究。通过该课题对微生物实验室检验过程中出现异常结果进行确证性的分析,以期检验工作者在日常检验工作中寻求一种解决实验异常结果的新思路、新方法。

2017年福建省产品质量检验研究院参加了英国FAPAS分析实验室组织“FAPAS-Food Microbiology Distribution 225 Verification of vibrio parahaemolyticus detection in Marine products”能力验证。通过官网查询能力验证结果,官网公布能力验证结果为组织失效。本研究对实验过程中出现异常结果进行分析讨论,以期寻求出本次能力验证组织失效的原因。此次能力验证结果分析,对实验室接收到能力验证异常结果提供了一种验证结果准确性的新思路和新方法,从而确保实验室在海产品中副溶血性弧菌检测领域检测结果的准确性。

2 材料与方

2.1 样品来源

英国FAPAS分析实验室下发的2个冷藏冰袋运输干海鱼加标样,样品编号分别为:M224d21A、M224d21B。

2.2 培养基和试剂

3%(M/V)NaCl碱性蛋白胨水、3%(M/V)NaCl胰蛋白胨琼脂、TCBS(thiosulfate citrate bile salts)琼脂(北京陆桥生物技术有限公司);弧菌显色培养基(法国科马嘉公司);副溶血性弧菌标准菌株 ATCC17802(北京陆桥生物技术有限公司);细菌基因组DNA提取试剂盒(天根生物科技(北京)有

限公司);10×PCR Buffer、MgCl₂、dNTPs溶液、Taq酶(上海生工生物工程有限公司);引物探针参照文献^[10]委托上海生工生物技术公司进行合成,引物探针序列见表1。以上使用试剂均在有效期内。

表1 引物和探针
Table 1 Primers and probes

引物探针	
副溶血性弧菌	5'-GCGACCTTTCTCTGAAATATTAATTGT-3' 5'-CATTCGCGTGGCAAACATC-3' 5'-CGCACAAAGGCTCGACGGCTGA-3'

2.3 仪器设备

LRH系列生化培养箱(上海一恒科技有限公司);HH-6数字恒温水浴锅(国华电器有限公司);ABI 7500实时荧光PCR检测仪器(美国Life Tech公司);SterilGARD III Advance生物安全柜(美国贝克公司);IKA MS3 basic涡旋振荡器(上海琪特分析仪器有限公司);JJ 1000电子天平(美国双杰兄弟集体有限公司);HVE50高压灭菌锅(日本Hirayama公司);MDF-U3386S超低温冰箱(日本Sanyo公司)。以上仪器均使用正常。

2.4 实验方法

现分别按照GB 4789.7-2013《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验》^[11]和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》^[12]及相关作业指导书进行检验,比对分析实验结果。

2.4.1 传统国标方法

(1)按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》进行实验。

(2)将干鱼加标样用3% NaCl碱性蛋白胨水1 mL溶解,转移于225 mL 3% NaCl碱性蛋白胨水,于36℃培养18 h。

(3)取增菌液用接种环分别划线于TCBS琼脂、科马嘉弧菌显色培养基上,于36℃培养24 h,观察实验结果。

2.4.2 实时荧光PCR法

(1)按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》进行实验。

(2)取上述传统菌检方法中的增菌液1 mL加到1.5 mL无菌离心管中,于室温下13000 r/min离心5 min,吸弃上清液。

(3)取100 μL溶解酶加入到离心管中,37℃处理1 h。

(4)将处理液使用细菌基因组DNA提取试剂盒提取副溶血性弧菌DNA(注:如果不能及时用于实验,可将DNA提取液存储于-20℃保存备用)。

(5)反应体系:10×PCR Buffer 5 μL、25 mmol/L MgCl₂ 4 μL、10 mmol/L dNTPs溶液 1 μL、10 mmol/L引物上下游各2 μL、探针1 μL、5 U/μL Taq DNA酶 1 μL、模板DNA

3 μL 、 ddH_2O 补足 50 μL 。反应程序: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 10 min; 94 $^\circ\text{C}$ 15 s, 60 $^\circ\text{C}$ 60 s, 45 个循环。

(6) 将上述增菌液分别取 100 μL 加入到 3% NaCl 碱性蛋白胨水中进行第 2 次增菌, 将该增菌液按上述方法重新进行 PCR 基因扩增实验。

3 结果与分析

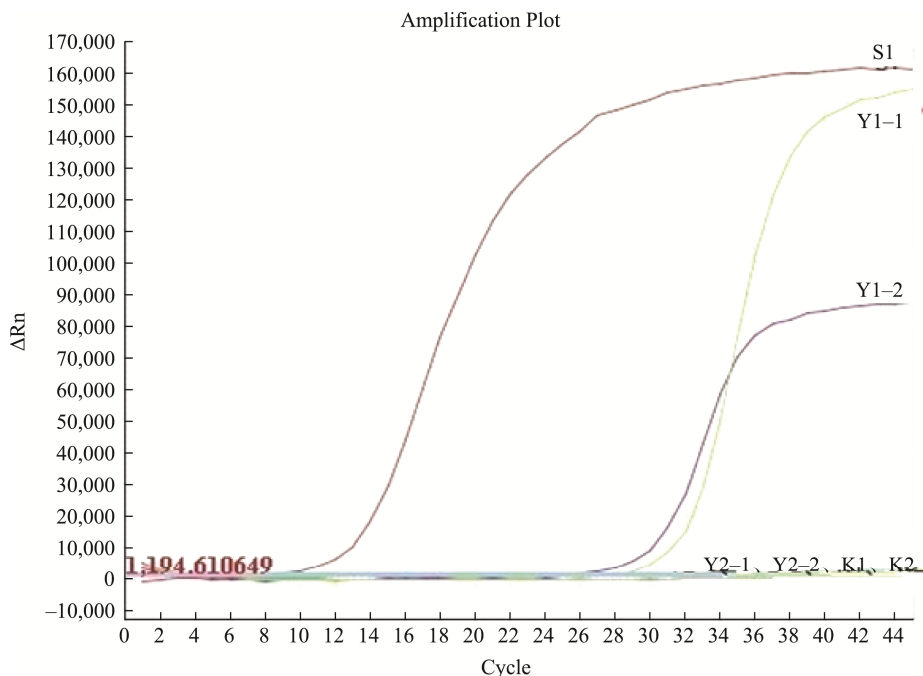
按照传统菌检测, 将培养后的增菌液划线, 接种于选择性鉴定培养基 TCBS 琼脂和科马嘉弧菌显色培养基, 经过划线培养后观察实验结果。结果选择平板上均无任何菌落生长, 样品 M224d21A 报出结果为: 未检出/25 g; M224d21B 报出结果为: 未检出/25 g。而按照实时荧光 PCR 法检测, 第 1 次扩增实验结果见图 1, 第 2 次扩增实验结果见图 2。由图 1 可知, M224d21A 的平行样 Y1-1、Y1-2 均有扩增, Y1-1 的 C_t 值为 28.31, Y1-2 的 C_t 值为 26.66; M224d21B 的平行样 Y2-1、Y2-2 均无扩增, 样品 M224d21A 报出结果为: 检出/25 g; M224d21B 报出结果为: 未检出/25 g。由图 2 可知, M224d21A、M224d21B 平行样均无扩增, 样品 M224d21A 报出结果为: 未检出/25 g; M224d21B 报出结果为: 未检出/25 g。

根据上述实验结果进行分析, 发现 M224d21A 在用传统菌检测中与第 1 次实时荧光 PCR 的检测中, 出现相互矛盾的检测结果。为了确保实验的准确性, 对实验各环节进行筛查, 希望从中能找到检测结果可疑的原因。首先用

副溶血性弧菌标准菌株对培养基(参考 GB 4789.28-2013 《食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求》^[13])、细菌提取试剂、扩增试剂等重新进行验收, 排除试剂等对实验结果干扰的可能性。通过标准菌株对培养基进行验收, 培养基均满足培养基验收技术要求, 可正常使用, 排除了试剂干扰因素后, 进一步对实验结果进行分析, 推测可能是样品本身出现制备或运输问题。按照上述思路, 对 2 次增菌液重新进行基因扩增, 经过进一步增菌, 发现此次 M224d21A 样品中未能检测出副溶血性弧菌。通过实验证实上述的推断, 由于样品本身制备或运输问题导致能力验证组织失败。样品 M224d21A 本身含有副溶血性弧菌, 由于菌株失活或死亡导致在第 2 次增菌过程无法增殖繁殖, 因此在第 2 次扩增实验中出现无法增菌扩增的实验结果。

4 结论与讨论

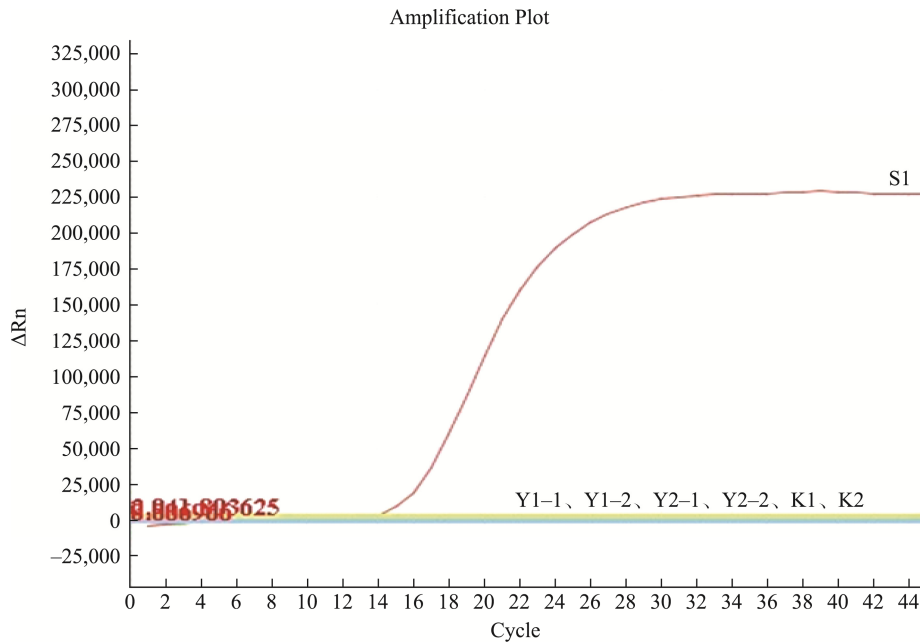
通过上述分析, 得出了这次能力验证出现实验异常的真正原因。由于副溶血性弧菌细胞壁中脂多糖成分影响了冻干时胞内水分外渗, 造成冻干后菌存活率低和不能复苏^[14], 且含副溶血性弧菌的样品质量因冻干条件的影响存在较大不确定性^[14,15], 导致样品检出率偏低。因此需对其全流程该进行有效评估以保证项目的有效实施^[15]。而此次能力验证缺少严格的样品制备、模拟运输等对副溶血性弧菌活性评估的具体措施, 从而导致样品在制备或运输菌株



注: S1 阳性菌株; Y1-1、Y1-2 为 M224d21A 的平行样品; Y2-1、Y2-2 为 M224d21B 的平行样品; K1 试剂空白; K2 提取空白。

图 1 第 1 次扩增实验结果实时荧光 PCR 实验结果

Fig.1 Results of the first amplification real-time fluorescent PCR



注: S1 阳性菌株 Y1-1、Y1-2 为 M224d21A 的平行样品 Y2-1、Y2-2 为 M224d21B 的平行样品 K1 试剂空白 K2 提取空白。

图 2 第 2 次扩增实验结果实时荧光 PCR 实验结果

Fig.2 Results of the second amplification real-time fluorescent PCR

失活或死亡, 最终导致本次能力验证失效。通过本次研究探讨希望能给检验人员对能力验证出现异常现象, 给出一种分析和解决问题的新思路和新方法。通过本次能力验证, 我院在该检测领域的检测水平得到提升和锻炼, 同时也对我院在海产品中副溶血性弧菌检测方面技术水平进行了认可, 为检验工作者对于能力验证出现异常现象提供一种解决问题的新思路、新方法。

参考文献

- [1] Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, *et al.* Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3: K6 and its serovariants [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2007, 20(1): 39–48.
- [2] Pan TM, Wang TK, Lee CL, *et al.* Food-borne disease outbreaks due to bacteria in Taiwan, 1986 to 1995 [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(5): 1260–126.
- [3] Tsonka UD, Todor D. Antibiosis and conservation of microorganisms [J]. *J Cult Collect*, 2005, (1): 17–28.
- [4] 张晶, 龚玉娇, 陈佳璇, 等. 广州地区 70 株副溶血性弧菌病原学特征分析[J]. *现代预防医学*, 2018, 45(4): 704–707, 719.
Zhang J, Gong YJ, Chen JX, *et al.* Pathogenic biological characteristics of *Vibrio parahaemolyticus* in Guangzhou [J]. *Mod Prev Med*, 2018, 45(4): 704–707, 719.
- [5] 马聪, 谭海玲, 刘礼评, 等. 副溶血性弧菌鉴定能力验证样品的制备[J]. *中国食品卫生杂志*, 2001, 23(6): 515–519.
Ma C, Tan HL, Liu LP, *et al.* Preparation of *Vibrio parahaemolyticus* identification sample [J]. *Chin J Food Hyg*, 2001, 23(6): 515–519.
- [6] 王桂兰, 钟雷响, 阙式媛, 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): 6097–6012.
Wang GL, Zhong LX, Kan SF, *et al.* Identification methods of *Vibrio parahaemolyticus* and confounding strains [J]. *J Food Saf Qual*, 2019, 10(18): 6097–6012.
- [7] 刘红瑛, 孙明霞, 潘明霞. 2010 年克拉玛依市不同级别餐饮业食用植物油检测结果分析[J]. *现代预防医学*, 2014, 41(5): 950–951.
Liu HY, Sun MX, Pan MX. Analysis of edible vegetable oil test results of different grade catering industry in Karamay city in 2010 [J]. *Mod Prev Med*, 2014, 41(5): 950–951.
- [8] 付玉生, 李永利, 王爱月. 河南省 181 份油条卫生指标检测结果分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2012, 22(8): 1958–1960.
Fu YS, Li YL, Wang AY. Analysis of 181 test results of youtiao sanitary indexes in Henan province [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2012, 22(8): 1958–1960.
- [9] 周娜, 朱宝平, 贾玉珠. 厦门市个体自榨花生油和小吃店食用植物油卫生质量分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 24(6): 868–870.
Zhou N, Zhu BP, Jia YZ. Analysis on hygienic quality of peanut oil and edible vegetable oil in Xiamen city [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2014, 24(6): 868–870.
- [10] 刘丽娟, 马雪征, 甄维, 等. 流感病毒分型及亚型实时荧光定量 PCR 检测能力验证结果分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2014, 25(23): 4131–4132.
Liu LJ, Ma XZ, Zhen W, *et al.* Analysis of real-time fluorescence quantitative PCR detection capability of influenza virus typing and subtype [J]. *Chin J Health Lab Technol*, 2014, 25(23): 4131–4132.
- [11] 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 microbiological examination: *Vibrio parahaemolyticus* [S].
- [12] 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

[S].
SN/T 1870-2016 Detection of foodborne pathogens in exported food-Real time PCR method [S].

[13] GB 4789.28-2013 食品安全国家标准 食品微生物学检验 培养基和试剂的质量要求[S].

GB 4789.28-2013 National food safety standard-Quality requirements for food microbiological test media and reagents [S].

[14] 陈瑞英, 鲁建章, 苏意诚, 等. 食品中副溶血性弧菌的危害分析、检测与预防控制[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 341-346.

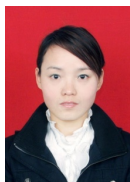
Chen RY, Lu JZ, Su YC, *et al.* Analysis, detection, prevention and control of *Vibrio parahaemolyticus* in food [J]. Food Sci, 2007, 28(1): 341-346.

[15] 赵现锋, 王舒, 周晓屏, 等. 水产品中副溶血性弧菌快速检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(4): 886-889.

Zhao XF, Wang S, Zhou XP, *et al.* Advances in rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products [J]. J Food Saf Qual, 2008, 9(4): 886-889.

(责任编辑: 李磅礴)

作者简介



张 芳, 工程师, 主要研究方向为微生物检测。

E-mail: 804285642@qq.com

“食品保鲜与贮藏”专题征稿函

食品保鲜与贮藏对保障食品的品质具有重要意义, 越来越得到国内外学者的广泛关注。

鉴于此, 近期刊特别策划了“食品保鲜与贮藏”专题, 主要围绕(1)果蔬、粮食、水产品、禽肉制品等食品保鲜方法、技术; (2)食品在储藏中的生理、生化变化; (3)食品腐败以及控制方法等或您认为有意义的领域展开讨论, 计划在 2020 年 7-8 月出版。

我们去年也组织过此专题, 由上海海洋大学的谢晶教授担任专题主编, 于 5 月见刊, 专题共收录文章 17 篇, 各方面反响都很不错。

鉴于您在该领域的成就, 学报主编国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员及编辑部全体成员特别邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 以期进一步提升该专题的学术质量和影响力。综述及研究论文均可, 请在 2020 年 5 月 10 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题**食品保鲜与贮藏**):

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者登录-注册投稿-投稿选择“专题: **食品保鲜与贮藏**”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsqa@126.com(备注: **食品保鲜与贮藏**专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部