

## 副溶血性弧菌分离鉴定方法的改进(Ⅱ) ——方法验证

卫生部食品卫生监督检验所 唐细良

导师:周桂莲 刘宏道

为了检验改进方法的实用性、重复性及检验结果的可靠性,先后采取不同海鱼样品严格按照改良方法步骤进行检验,现将结果报告如下:

### 1 材料与方法

1.1 样品:采用体表涂抹法,先后从市场采取带鱼样品 33 份、偏口鱼 12 份、鲃鱼 8 份、香支鱼 5 份、快鱼 5 份。

1.2 方法重复性检验:从分离鉴定出的副溶血性弧菌中随机抽取 30 株,用改进方法进行重检。

1.3 结果可靠性检验:从完全符合副溶血性弧菌诊断标准的弧菌中,随机抽取 30 株,用河南开封医学生物制品厂生产的 V-18A 生化板进行检验。

1.4 实验动物分组:先根据体重分三大组,再将每组动物随机分组,每组为 3 只雌性昆明小白鼠。

### 2 结果

表1 海鱼样品中副溶血性弧菌初步诊断结果

	样品数	存 在	很可能	可 能	合 计
带 鱼	33	31	2	0	33
偏口鱼	12	7	5	0	12
鲃 鱼	8	8	0	0	8
快 鱼	5	5	0	0	5
香支鱼	5	5	0	0	5
合 计	63	56	7	0	63

2.1 样品中副溶血性弧菌的初步诊断结果:根据初步诊断标准(详见“方法建立”部

分),由表 1 可知,63 份海鱼样品中,初步判断 56 份海鱼样品中存在有副溶血性弧菌,7 份海鱼样品中很可能存在有副溶血性弧菌。

2.2 不同鉴别性平板对副溶血性弧菌检出效果比较:63 份海鱼样品中,七叶贰平板上共分离出 71 株副溶血性弧菌,其中 58 株完全符合诊断标准;13 株仅个别指标不符,根据综合判断原则,仍诊为副溶血性弧菌。蔗糖平板上共分离出 50 株该菌,其中 43 株完全符合诊断标准,7 株仅个别指标不符。葡萄糖平板上共分离出 59 株该菌,其中 44 株完全符合诊断标准,15 株仅个别指标不符。

表2 不同鉴别性平板检出效果比较

	样品数	菌株数	K. P阳性		蔗糖阳性	
			菌株数%	菌株数%	菌株数%	菌株数%
七叶贰平板	63	71	21	29. 5	28	39. 5
葡萄糖平板	63	59	10	17. 0	18	30. 6
蔗糖平板	63	50	2	1. 0	0	0
三者综合	63	111	32	28. 9	40	36. 3

由表 2 可知,就单一鉴别性平板对样品中副溶血性弧菌检出效果而言,七叶贰平板最佳,其次为葡萄糖平板,最次为蔗糖平板,但检出效果均不如三者综合。就 K·P 阳性株检出效果而言,七叶贰平板最好,其次为葡萄糖平板,最次为蔗糖平板。

2.3 海鱼样品中副溶血性弧菌的阳性率:由于没有标准血清,无法进行血清学分型。规定同一样品中分离出的副溶血性弧菌,若 2 个或 2 个以上菌株所有诊断指标完全一致,则

考虑为相同细菌。

从表 3 可知,不同海鱼样品中副溶血性弧菌阳性率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。三种鉴别性平板对海鱼样品中副溶血性弧菌阳性率差异亦无统计学意义。三种鉴别性平板综合起来,可从每一份海鱼样品中分离出副溶血性弧菌,阳性率为 100%,明显高于常规检验方法的阳性率 79.4% ( $\chi^2 = 16.91$ ,  $P < 0.005$ )。

2.4 初步诊断结果的可靠性评价:根据初步判断标准,18—22 小时内初步判断 63 份海

鱼样品中,有 56 份中肯定存在有副溶血性弧菌,7 份中很可能存在有副溶血性弧菌。而最终检验结果为 63 份海鱼样品中副溶血性弧菌阳性率为 100%,故可认为初步诊断结果基本准确可靠。

2.5 小鼠毒性试验:将分离鉴定后的 111 株副溶血性弧菌分别接种至 3.5%氯化钠碱性蛋白胨水,37℃,增菌 16—18 小时,给每只试验鼠腹腔注射 0.5ml 菌液,观察 2—3 天。设标准副溶血性弧菌为阳性对照组,3.5%氯化钠碱性蛋白胨水为空白对照组。

表3 海鱼样品中副溶血性弧菌阳性率(%)

鉴别性平板	带鱼		偏口鱼		香支鱼		快鱼		鲃鱼						
	样品数	阳性数	阳性率	样品数	阳性数	阳性率	样品数	阳性数	阳性率	样品数	阳性数	阳性率			
蔗糖平板	33	31	93.9	12	7	58.3	5	4	80	5	3	60	8	5	62.5
七叶贰平板	33	31	93.9	12	8	66.7	5	4	80	5	4	80	8	8	100
V·P平板	33	28	84.8	12	8	66.7	5	3	60	5	5	100	8	8	100
三者综合	33	33	100	12	12	100	5	5	100	5	5	100	8	8	100

$\chi_1^2 = 1.4382, n^1 = 2, P > 0.05$        $\chi_2^2 = 16.91, n^1 = 1, P < 0.005$

表4 毒性与生物学特性的关系

毒力	菌株数	耐盐性 试验 (%)				七叶贰	V P	蔗糖	阿拉伯胶糖	葡萄糖	氧化酶	赖氨酸	精氨酸	K P
		3.5	7	9	11									
		+/-	+/-	+/-	+/-									
强毒力株	58	58/0	58/0	56/2	4/54	58/0	5/53	26/32	53/5	58/0	58/0	57/1	2/56	25/33
中等毒力株	15	15/0	15/0	13/2	2/13	15/0	1/14	3/12	14/1	15/0	15/0	15/0	1/14	5/10
弱毒力株	10	10/0	10/0	10/0	2/8	10/0	0/10	2/8	9/1	10/0	10/0	10,0/0	0/10	2/8
阳性对照	3	3/0	3/0	3/0	0/3	3/0	0/3	0/3	3/0	3/0	3/0	3/0	0/3	3/0
无毒力株	28	28/0	28/0	26/2	1/27	28/0	0/28	9/19	0/28	28/0	28/0	28/0	1/27	0/28

毒力判断标准:试验鼠在 2—3 天内全部死亡者为强毒力株;2/3 只死亡者为中等毒力株;1/3 只死亡者为弱毒力株;所有试验鼠全部存活者为无毒力株。

试验结果表明,111 株副溶血性弧菌中,有 58 株为强毒力株,占总数的 52.3%;15 株

为中等毒力株,占总数的 13.5%;10 株为弱毒力株占总数的 9.0%;28 株为无毒力株,占总数的 25.2%。

由表 4 可知,58 株强毒力株中,有 25 株为 K·P 阳性,53 株为阿拉伯胶糖阳性。32 株 K·P 阳性菌均表现为毒力株,阿拉伯胶

糖阳性株亦均为毒力株,提示该菌毒力与某些生化特性有关。但是83株毒力株中,尚有51株为K·P阴性株,7株为阿拉伯胶糖阴性株,故不能说神奈川现象阴性株、阿拉伯胶糖阴性株均为无毒力株。

2.6 改进方法检验结果的重复性检验:结果表明每项试验指标前后二次试验结果完全一致。

2.7 改进方法检验结果的可靠性评价:30株副溶血性弧菌经V-18A细菌生化鉴定,结果均为副溶血性弧菌,且可靠性均在97.42%以上。

### 3 讨论

3.1 改进的副溶血性弧菌分离鉴定方法使漏检率大大下降。从63份海鱼样品中,三种鉴别性平板联合起来,共分离出111株副溶血性弧菌,其中40株表现为蔗糖阳性。无疑,若采用常规方法对样品进行检验,至少将漏掉40株蔗糖阳性株。三种鉴别性平板联合起来,63份海鱼样品中副溶血性弧菌阳性率为100%,而蔗糖平板阳性率仅为79.4%。二者阳性率差异有明显的统计学意义( $P < 0.005$ )。

3.2 初步诊断结果基本准确可靠:初步判断结果与最终检验结果基本符合。

3.3 改进方法检验结果重复性好,且准确可靠。这是因为此方法设备要求低,实验操作技能易掌握,不会出现由于操作技术难掌握而导致人为误差。由于改良的V-P、葡萄糖产酸等试验方法均很易明确判断结果,所以结果准确可靠。

3.4 副溶血性弧菌的毒力判断指标:一般文献报告<sup>[2,3]</sup>,K·P阳性菌均为毒力株,而K·P阴性菌为无毒力株。本文结果表明,K·P阳性菌确为毒力株,但是K·P阴性的副溶血性弧菌并非全为非致病菌<sup>[4]</sup>尤其是当阿拉伯胶糖阳性时,致病的可能性极大,提示阿

拉伯胶糖阳性可作为判断该菌毒力的一个客观指标。

3.4 海鱼中存在有较高比例的K·P阳性副溶血性弧菌。本次分离鉴定出的111株该菌中,K·P阳性株占28.9%,而蔗糖平板上分离出的该菌仅1%表现为K·P阳性,与一般文献报告<sup>[1]</sup>结果一致。这可能是由于单纯凭蔗糖阴性挑选可疑菌落,漏检率很高,尤其是蔗糖阳性菌完全被漏检。本文表明,32株K·P阳性菌中,就有26株表现为蔗糖阳性。故可认为,海鱼中K·P阳性的副溶血性弧菌并非仅占1%左右。这也能用来部分解释为什么通常从中毒患者粪便中分离出K·P阳性菌,而从中毒食品中却常只能分离出K·P阴性菌株<sup>[5]</sup>。

本实验得到了卫生部食检所微生物室王淑真、王淑颖、李志刚,柳根水等同志的热情帮助,在此表示衷心的感谢。

### 参 考 文 献

- [1]Toshio Miwatani, et al. *Vibrio Parahaemolyticus: A Causative Bacterium of Food Poisoning*. Saikon Publishing Co. : LTD · Tokyo, 1976; 101-104.
- [2]周桂莲,等·副溶血性弧菌致病性的研究:一些具有特殊性状副溶血性弧菌的初步研究·中华微生物学和免疫学杂志 1982; 2(5): 299-302.
- [3]Honda T, et al. Identification of Lethal Toxin With the Thermostable Direct Hemolysin Produced by *Vibrio Parahaemolyticus* and Some Physicochemical Properties of the Purified Toxin. *Infection and Immunity*/1978; 13: 133-139.
- [4]Honda T, et al. Purification and Characterization of a Hemolysin *Vibrio Parahaemolyticus* and Related to the Thermostable Direct Hemolysin. *Infection and Immunity*/1988; 961-965.
- [5]Karunasagar SW, et al. Enhancement of *Vibrio Parahaemolyticus* Virulence by Lysed Erythrocyte Factor and Iron. *Infection and Immunity*/1984; 141-144.