

# 两种弧菌显色培养基在疑似副溶血性弧菌鉴定中的效果比较

徐晓可, 吴清平, 张菊梅, 吴葵, 张淑红, 郭伟鹏

(广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东省华南应用微生物重点实验室—省部共建国家重点实验室培育基地, 广东省微生物研究所, 广东广州 510070)

**摘要:** 为了比较环凯和科玛嘉弧菌显色培养基对食品中可疑菌株的初步鉴定作用, 本文按国标(GB/T 4789.7-2008)程序, 以环凯和科玛嘉弧菌显色培养基初步鉴定硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖琼脂(TCBS)的副溶血性弧菌可疑菌株, 最后用API和MID鉴定证实。在97份食品样品的定性与定量检测中, TCBS疑似菌株有109株, 对应样品有31份。环凯和科玛嘉弧菌显色培养基对109株TCBS可疑菌株初步鉴定的结果相同, 均检出64株显紫色的可疑菌株, 对应样品22份。经API和MID确认, 阳性菌株60株, 阳性样品为22份, 阳性率为22.68%。两种培养基初步鉴定TCBS可疑菌株的敏感性、特异性和符合性均分别为100.00%、91.84%和96.33%。环凯和科玛嘉弧菌显色培养基对TCBS的可疑菌株具有较好的初步鉴定效果。

**关键词:** 弧菌显色培养基; 食品; TCBS 可疑菌株; 副溶血性弧菌

**文章编号:** 1673-9078(2012)12-1806-1809

## Comparison of Two Kinds of *Vibrio* Chromogenic Medium for Identification of Presumptive *Vibrio parahaemolyticus*

XU Xiao-ke, WU Qing-ping, ZHANG Ju-mei, WU Kui, ZHANG Shu-hong, GUO Wei-peng

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology(Ministry-Guangdong Province Jointly Breeding Base), South China, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou, 510070, China)

**Abstract:** The presumptive *Vibrio Parahaemolyticus* strains isolated by thiosulfate - citrate - bile salts - sucrose agar (TCBS) from food samples were preliminary identified by HKM and CHROMagar vibrio chromogenic media according to the National Standards (GB/T4789.7-2008) and finally were confirmed by the API and MID identification. In qualitative and quantitative detection of 97 food samples, suspect strains appeared in 109/970 TCBS plates, corresponding to 31 samples. 109 suspect strains from different TCBS plates were inoculated with two kinds of chromogenic media. The results showed that there were 64 purple strains, corresponding to 22 samples. 60 strains were identified as *V. parahaemolyticus* by API20E among 64 purple strains, corresponding to 22 samples, the positive rate was 22.68%. The sensitivity, specificity, and accordance of two media were 100.00%, 91.84% and 96.33% respectively. HKM and CHROMagar vibrio chromogenic media can be recommended as good choice for preliminary identification of TCBS suspicious strains from foods.

**Key words:** vibrio chromogenic medium; food; TCBS suspicious strain; *Vibrio parahaemolyticus*

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是世界上公认的重要食源性致病菌, 近年来已成为我国微生物性食物中毒的头号致病菌<sup>[1-3]</sup>。目前副溶血性弧菌检测仍以传统方法为主, 在检验中选择性平板是分离菌

收稿日期: 2012-09-06

基金项目: 广州市科技计划项目(2010U1-E00611)

作者简介: 徐晓可(1980-), 女, 助理研究员, 研究方向为食品安全微生物检测

通讯作者: 吴清平(1962-), 男, 研究员, 研究方向为食品安全微生物检测与控制

落最重要的培养基。硫代硫酸盐-柠檬酸盐-氯化钠-蔗糖琼脂(TCBS)是目前国内外最常用的分离平板, 它利用副溶血性弧菌不发酵蔗糖的特点并结合酸碱指示剂对其进行鉴定, 副溶血性弧菌在这种平板上呈现绿色菌落。但是TCBS平板存在一定缺陷, 当有发酵蔗糖产酸、在TCBS上产生黄色菌落的一类弧菌存在时, 由于颜色扩散, 副溶血性弧菌往往不容易辨认; 而且, TCBS不能有效的区分副溶血性弧菌和与其生化特点相似的创伤弧菌(*V. vulnificus*)、拟态弧菌(*V. mimicus*)等<sup>[4]</sup>。如果直接从TCBS挑取可疑菌株进行

鉴定, 后续鉴定的工作量和鉴定成本都会大大增加。

利用显色培养基鉴定微生物是近年来开发的新型快速检测技术, 通过在分离培养基中加入细菌特异性酶的显色底物, 直接根据菌落颜色就可以对菌种做出初步鉴定, 可以减少颜色扩散等其他方面的干扰因素, 大大提高了检测效率<sup>[5-7]</sup>。如果直接将样品的增菌液接种在显色培养基平板上, 尤其在食品样品的定量检测中因显色培养基使用量大造成成本比较高而限制了其使用。如果先用 TCBS 对样品进行初筛, 然后利用显色培养基对 TCBS 菌株进行初步鉴定, 则可以大大提高检测效率和节约成本。目前, 环凯和科玛嘉弧菌显色培养基为市场上较为常见的产品。为了解环凯和科玛嘉显色培养基对 TCBS 可疑菌株的鉴定效果, 本研究进行了 97 份食品样品的定性与定量检测, 从 TCBS 培养基共挑取了 109 株可疑菌株接种两种显色培养基进行比较分析, 为弧菌显色培养基的广泛应用提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

从广东省深圳市、韶关市、湛江市、汕头市和河源市的超市、集贸市场和农贸市场采集食品样品 97 份 (水产品 48 份, 熟食 49 份), 置于 2℃~8℃ 采样箱中于 24 h 内送实验室检验。

### 1.2 培养基及试剂

3% 氯化钠蛋白胨水 (APW)、TCBS、环凯弧菌显色培养基、科玛嘉显色培养基、3% 氯化钠胰蛋白酶大豆琼脂 (TSA) 和 MID 鉴定试剂盒等购自广东环凯微生物科技有限公司; API 20E 生化鉴定试剂盒及其配套试剂购自法国梅里埃公司。

### 1.3 检验方法

按 GB/T 4789.7-2008<sup>[8]</sup> 进行定性和定量检测, 分别从定量检测的 9 管和定性检测的增菌液中取一环接种于 TCBS 培养基, 置 36℃±1℃ 培养 18 h~24 h。

### 1.4 菌株的显色培养基初步鉴定以及鉴定系统确证

从 TCBS 培养基挑取可疑菌株接种于环凯和科玛嘉弧菌显色培养基, 36℃±1℃ 培养 18 h~24 h, 根据显示培养基的颜色初步鉴定。同时对 TCBS 可疑菌株进行 API20E 和 MID 鉴定。

### 1.5 数据分析

敏感性 (%) =  $a/(a+c) \times 100$ ; 特异性 (%) =  $d/(d+b) \times 100$ ; 符合率 =  $(a+d)/e \times 100$ <sup>[9-10]</sup>

真阳性数 (a) = 实际检出的阳性数 - 假阳性数 (b);

真阴性数 (d) = 实际检出的阴性数 - 假阴性数 (c);

被检总数: e

## 2 结果

### 2.1 食品样品在 TCBS 培养基的分离情况

在 97 份样品的定性定量检测中, 共划线了 970 个 TCBS 平板, 其中有 109 个 TCBS 平板上生长了呈圆形, 半透明、表面光滑, 直径 2 mm~3 mm 的可疑绿色菌落, 对应的样品数为 31 份; TCBS 培养基定性定量检测 97 份食品样品中可疑副溶血性弧菌的检出情况见表 1。从表 1 可以看出, 在 97 份样品中, TCBS 疑似菌株对应样品有 31 份, 确认阳性样品为 22 份, 阳性样品数占可疑菌样品数 70.97%。

表 1 TCBS 和显色培养基检测 97 份食品样品中副溶血性弧菌的结果

Table 1 The detection of *Vibrio parahaemolyticus* in 97 food samples by TCBS

样品名称	份数	TCBS 疑似菌株份数	确认阳性数
水产品	48	27	21
熟食	49	4	1
合计	97	31	22

### 2.2 两种培养基副溶血性弧菌生长状况比较

在科玛嘉弧菌显色培养基上, 可疑副溶血性弧菌呈圆形、半透明、表面光滑的紫红色, 直径 2 mm~3 mm; 在环凯弧菌显色培养基上, 疑似副溶血性弧菌与在科玛嘉弧菌平板上的菌落形态相似, 只是疑似菌落的颜色在环凯平板上比科玛嘉略为偏深 (图 1)。



图 1 环凯和科玛嘉显色培养基的显色效果

Fig.1 The coloreffect of HKM and CHROMagar chromogenic media

注: A: 环凯显色培养基; B: 科玛嘉显色培养基。

### 2.3 两种培养基副溶血性弧菌检出率比较

本次实验检测样品 97 份, 将 97 份样品中的 109 株 TCBS 可疑菌株接种于环凯和科玛嘉弧菌显色培养基, 在科玛嘉显色培养基上检出副溶血性弧菌可疑菌株 64 株, 对应样品 22 份, 阳性率为 22.68%; 环凯弧菌显色培养基上副溶血性弧菌可疑菌株 64 株, 对应样品 22 份, 阳性率为 22.68%。两种培养基对 TCBS 可

疑菌株的鉴定结果表明, 22 份阳性样品完全一致, 阳性样品数占可疑菌样品数 100%, 两者无差异 (表 2)。

表 2 副溶血性弧菌在两种培养基上的检出率

Table 2 Detection of *Vibrio parahaemolyticus* in 97 food samples by two chromogenic media

培养基	可疑菌 株/株	可疑样 品/份	确认阳性 样品/份	检出 率/%
科玛嘉弧菌 显色培养基	64	22	22	22.68
环凯弧菌显 色培养基	64	22	22	22.68

#### 2.4 两种培养基比较分析

将上述 TCBS 可疑菌株进行鉴定, 在显色培养基显紫色的 64 株菌中, 有 60 株用 API20E 鉴定为副溶

表 3 两种弧菌显色平板对 TCBS 可疑菌株鉴定的符合性和特异性比较

Table 3 Accuracy and specificity of HKM and CHROMagar chromogenic media for detecting *Vibrio parahaemolyticus*

培养基	样品数	TCBS 可疑菌株	真阳性数	假阳性数	真阴性数	假阴性数	敏感性	特异性	符合性
环凯	97	109	60	4	45	0	100.00%	91.84%	96.33%
科玛嘉	97	109	60	4	45	0	100.00%	91.84%	96.33%

### 3 讨论

目前, 国内外对副溶血性弧菌的检测方法主要包括传统方法如国标法; 分子生物学法如 PCR 法和 LAMP 法; 免疫分析检测技术及基因芯片技术等<sup>[11-15]</sup>。传统方法仍然是检测方法的金标准。在 GB/T 4789.7-2008 标准中, TCBS 和弧菌显色培养基都是推荐使用的培养基。因 TCBS 不能有效的区分副溶血性弧菌和与其生化特点相似的创伤弧菌、拟态弧菌等, 如果直接对 TCBS 可疑菌株进行鉴定, 不但检测周期长 (3~5 天)、而且生化试验程序复杂、所需试剂繁多。据报道, TCBS 和显色培养基都有假阳性, 但 TCBS (21%) 的假阳性率高于显色培养基 (5%)<sup>[5]</sup>。利用这个特点, 可以使用显色培养基对 TCBS 的可疑菌株进行初步鉴定。在本研究中, 使用两种显色培养基初步鉴定 109 株 TCBS 可疑菌株, 首先就可以排除 45 株可疑菌株, 大大减少了后续的鉴定工作量, 提高了检测效率。

目前环凯和科玛嘉弧菌显色培养基为市场上较为常见的产品。已有学者对这两种培养基在实际样品检测效果进行了比较<sup>[15,16]</sup>, 但对 TCBS 可疑菌株的初步鉴定效果尚未见报道。本研究的结果表明两种培养基初步鉴定 TCBS 可疑菌株的敏感性、特异性和符合性均分别为 100.00%、91.84%和 96.33%。张温玲等<sup>[16]</sup>的研究表明, 科玛嘉弧菌显色培养基上阳性样品数占可疑菌株样品数 82.6%; 环凯弧菌显色培养基上阳性

血性弧菌, 另外 4 株鉴定结果不理想。因此, 采用了另一个鉴定系统 MID, 结果各有 2 株被鉴定为嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophilia*) 和类鼻疽假单胞菌 (*Burkholderia pseudomallei*)。在显色培养基显示绿色和白色的菌株中, 大多数被鉴定为创伤弧菌和拟态弧菌, 未鉴定到副溶血性弧菌 (数据未显示)。鉴定结果对应的样品阳性数与显色培养基阳性数一致 (表 2)。

根据 API 和 MID 的鉴定结果, 两种弧菌显色培养基对 97 份食品样品分离的 TCBS 可疑菌株初步鉴定的敏感性、特异性和符合性见表 3。从表 3 可以看出, 两种培养基初步鉴定 TCBS 可疑菌株的敏感性、特异性和符合性均分别为 100.00%、91.84%和 96.33%。环凯和科玛嘉弧菌显色培养基对 TCBS 的可疑菌株具有较好的初步鉴定效果。

样品数占可疑菌株样品数 73.1%。虽然显色培养基有一定的假阳性, 但本研究的结果发现, 经过 TCBS 初筛后, 两种显色培养基对应的样品阳性数与系统鉴定结果对应的样品阳性数一致, 阳性样品数占可疑菌株样品数 100%; 而 TCBS 阳性样品数占可疑菌株样品数 70.97%。因此, 环凯和科玛嘉弧菌显色培养基对 TCBS 的可疑菌株具有较好的初步鉴定效果。另外研究还发现, 在弧菌培养基显紫色的菌株中, 可以细分为紫红色和紫蓝色。在 64 株显紫色的菌株中, 其中显紫红色的 60 株都被 API 鉴定为副溶血性弧菌, 而显紫蓝色的 4 株用 API 不能鉴定出结果, 最后采用 MID 系统鉴定。

### 4 结论

在传统方法检测中, TCBS 由于其成本较低可以用于食品样品的初筛; 然后利用特异好较强而成本较高的弧菌显色平板对 TCBS 可疑菌株进行初步鉴定; 选择 TCBS 和弧菌显色平板联用的方法, 可以提高检测效率和节约成本。环凯和科玛嘉弧菌显色培养基对 TCBS 的可疑菌株都具有较好的初步鉴定效果。如果将现有的弧菌显色培养基进行改造, 对显紫蓝色的菌株进行抑制, 弧菌显色培养基的特异性会更高, 从而具有更广泛的应用价值。

### 参考文献

[1] Zhao F, Zhou DQ, Cao HH, et al. Distribution, serological

- and molecular characterization of *Vibrio parahaemolyticus* from shellfish in the eastern coast of China [J]. Food Control, 2010, 22(7): 1095-1100
- [2] Rahimi E, Ameri M, Doosti A, et al. Occurrence of Toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* Strains in Shrimp in Iran [J]. Foodborne Pathog Dis, 2010, 7(9): 1107-1111
- [3] 刘秀梅,陈艳,王晓英,等.1992-2001年食源性疾病暴发资料分析-国家食源性疾病预防网[J].卫生研究,2004,33(6): 725-727
- [4] Su YC, Liu C. *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety [J]. Food Microbiol, 2001, 24(6): 549-558
- [5] Duan J, Su YC. Comparison of a chromogenic medium with thiosulfate-citrate-bile- salt-sucrose agar for detecting *Vibrio parahaemolyticus*[J]. J Food Sci, 2005, 70(2): 125-128
- [6] Pinto D, Terio A, Novello V, et al. Comparison between thiosulphate-citrate-bile-salt- sucrose (TCBS) agar and CHROMagar Vibrio for isolating *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Food Control, 2011, 22(1): 124 -127
- [7] 卢勉飞,蔡芷荷,吴清平,等.一种副溶血性弧菌显色培养基的应用[J].微生物学通报,2010,37(5):701-707
- [8] GB/T4789.7-2008.食品卫生微生物学检验-副溶血性弧菌检验[S].北京:中国标准出版社,2008:1-2
- [9] 陈茂义,胡竭,刘建昭,等.科玛嘉显色培养基和 XLD、SS、HE 分离食品中沙门菌效果比较[J].公共卫生与预防医学,2008,19(4):12-14
- [10] Perez JM, Cavalli P, Roure C, et al. Comparison of four chromogenic media and hektoen agar for detection and presumptive identification of *Salmonella* strains in human stools[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(3): 1130-1134
- [11] Jones JL, Noe KE, Byars R, et al. Evaluation of DNA colony hybridization and real-time PCR for detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in postharvest-processed oysters [J]. J Food Prot, 2009, 72(10): 2106-2109
- [12] Nemoto J, Ikedo M, Kojima T, et al. Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid and Sensitive Detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. J Food Prot, 2011, 74(9): 1462-1467
- [13] Wang RZ, Huang JD, Zhang W, et al. Detection and identification of *Vibrio parahaemolyticus* by multiplex PCR and DNA-DNA hybridization on a microarray [J]. J Genet Genomics, 2011, 38(3): 129-135
- [14] 何浩,苏永泉,徐贵升,等.食品中金黄色葡萄球菌、单增李斯特氏菌和副溶血性弧菌的 MPCR 法检测[J].现代食品科技,2006,22(2):215-218
- [15] 窦勇,胡佩红.ELISA 法快速检测水产品中副溶血性弧菌[J].现代食品科技,2008,24(6):598-602
- [16] 张温玲,肖平建,林杰,等.用两种显色培养基检测弧菌的效果比较[J].福建畜牧兽医,2012,34(1):3-4
- [17] 邓冬云,陈萍.两种副溶血性弧菌显色培养基实际应用效果比较[J].中国医药指南,2011,9(35):45-46