《腹泻粪便标本中溶藻弧菌检验》

团体标准编制说明

《腹泻病人粪便标本中溶藻弧菌检验》

标准编制组

2023 年 8 月

一、 工作简况

（包括任务来源、起草单位、主要工作过程、标准编制组成员及其所做的主要工作等）

（一）任务来源

依据《北京预防医学会团体标准管理办法(2023 年版)》，按照《关于开展 2023 年团体标准编制工作的通知》要求，本项目于 2023 年 2 月由北京市通州区疾病预防控制中心向北京预防医学会标准化管理办公室提出申请，2023 年 3 月北京预防医学会经过专家论证批准该项目立项，开展腹泻粪便标本中溶藻弧菌检验标准的制定工作。

（二）起草单位

北京市通州区疾病预防控制中心 、北京市疾病预防控制中心、北京市顺义区疾病预防控制中心 、北京市延庆区疾病预防控制中心。

（三）主要工作过程

本标准制定严格按照 GB/T 1.1《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的要求执行。

2023 年 2 月，北京市通州区疾病预防控制中心接到北京预防医学会“2023 年北京预防医学会团体标准申报要求”任务后，成立了标准编制组，制定编制计划，对样本中溶藻弧菌检验相关资料进行文献查阅、资料调研。

2023 年 3 月，标准编制组成员进行立项答辩，并通过立项论证，同意立项。

2023 年 4 月～8 月，标准编制组制定标准验证方案并完成培养基性能验证、包容性、排他性等实验室内验证。

2023 年 8 月～9 月，编制组完成标准的实验室间验证并完成征求意见稿和编制说明。

（四）标准编制组成员及其所做的主要工作

赵凤玲：检验方法的技术路线、技术指标的提出及标准制订各阶段质控、内容核定工作，负责起草标准版本、征求意见稿、送审稿、报批稿的制订和标准解读、编制说明。

张晓媛：检验方法的技术路线、技术指标的提出、内容核定工作，负责标准

版本、征求意见稿、送审稿、报批稿的核定，编制说明核定，协同试验。

李颖：检验方法的技术路线、技术指标的提出、内容核定工作，负责标准版本、征求意见稿、送审稿、报批稿的核定，编制说明核定，协同试验。

王迪：标准版本、征求意见稿、送审稿、报批稿的核定，编制说明核定，协同试验。

王建国：方法技术指标的确定及送审稿、报批稿的核定，编制说明核定。

高翔：方法技术指标的确定及送审稿、报批稿的核定，编制说明核定。

邹林：方法技术指标的确定及送审稿、报批稿的核定，编制说明核定。

常馨：方法技术指标的确定及验证试验。

刘扬：方法技术指标的确定及验证试验。

崔玉娟：协同试验。

李晓辉：政策经费支持、方向引领。

王艳春：方法技术指标的确定。

李秋虹：政策解读、送审稿、报批稿、编制说明核定。

赵春艳：方法技术指标的确定。

邵春昕：政策解读、项目探究。

罗宇馨：方法技术指标的确定及验证试验。

黄震：方法技术指标的确定及验证试验。

王润萍：方法技术指标的确定及验证试验。

甄博珺：方法技术指标的确定及验证试验。

张萍：方法技术指标的确定及验证试验。

张冲：方法技术指标的确定及验证试验。

高洁：方法技术指标的确定及验证试验。

周景林：方法技术指标的确定及验证试验。

王苗：协同试验。

张莹：协同试验。

二、标准编制的必要性和预期效果

（一）标准编制的必要性

1. 溶藻弧菌的危害

溶藻弧菌（Vibrio alginolyticus）是一类广泛存在于海水、河口环境以及鱼类、虾蟹、贝类等海产品中的革兰阴性杆状或弯曲状细菌，专性嗜盐。人们通过接触水或食用受污染的海鲜而感染，引起人体食物中毒、严重的软组织感染、败血症、中耳炎等疾病。超过 20 种弧菌可引起人类弧菌病，在美国，引起弧菌病的最常见病原体是副溶血性弧菌、创伤弧菌和溶藻弧菌。据估计，美国每年发生 80000 例弧菌病、500 例住院治疗和 100 例死亡，其中大多数未经培养证实。法国比斯开湾一份关于 2001-2019 年弧菌感染的临床流行病学调查报告显示溶藻弧菌感染占总弧菌感染的 34.3%，是最常见的致病性弧菌，其引起的疾病与各种病理有关，病死率为 7.14%。我国海产品中溶藻弧菌的检出率可达到 82%。近些年我国溶藻弧菌引起疾病的事件也时有报道。因此，溶藻弧菌的分离鉴定显得愈发重要，快速、准确地鉴定溶藻弧菌具有重要的意义。

近些年在腹泻疫情的处置中会发现一些临床表现与副溶血性弧菌引起的疾病极其相似，但在实验室分离培养中发现分离到的致病菌生化特征与副溶血性弧菌不同，鉴别后发现为溶藻弧菌。但是在溶藻弧菌引起疾病的疫情处置中没有可遵循的检测标准，无法出具检测报告，制定溶藻弧菌的检验标准可以解决这一尴尬问题。

2. 国内外溶藻弧菌检验标准的不足

（1）**国外的标准**都是针对弧菌属，尤其对副溶血性弧菌、霍乱弧菌、创伤弧菌等有较详细的介绍，**没有对溶藻弧菌检测的具体介绍**，多是从其它致病性弧菌鉴别实验中介绍溶藻弧菌的分离及生化特点。

（2）国内溶藻弧菌检验标准的不足

① 检验范围中没有适用粪便标本的；

② 弧菌检验的国家标准有副溶血性弧菌和创伤弧菌，但没有溶藻弧菌；

③ 弧菌属的检验方法多是十几年前发布的，没有引入分子生物学、MALDI-TOF MS 等灵敏快捷的方法；

④ 仅有的溶藻弧菌检验标准是出入境机构关于出口食品中溶藻弧菌的检验标准，不能满足疾病预防控制机构对食源性疾病处置的要求。

（二）预期效果

建立《腹泻粪便标本中溶藻弧菌检验》标准为溶藻弧菌引起的腹泻及食物中毒的检验提供依据，通过生化、质谱、荧光 PCR 相结合的鉴定手段，更快更迅速地作出定性判断，有利于疫情处置，有利于守护首都人民健康。

三、标准编制的原则和依据

（一） 原则

采用传统的分离培养和快速的荧光 PCR 方法结合、生化鉴定与质谱鉴定结合原则，编制腹泻粪便标本中溶藻弧菌检验流程，满足疾控机构疫情处置和医疗机构肠道门诊疾病诊断的需要。

（二） 参考、引用的标准和文献

[1] 王海波,张京云,王多春等.溶藻弧菌TaqMan实时PCR快速检测体系的建立[J].中国卫生检验杂志,2011,21(05):1150-1152.

[2] GB4789.7-2013 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]

[3] WS 271-2007, 感染性腹泻诊断标准[S].

[4] GB4789.44-2020 食品安全国家标准 食品微生物学检验 创伤弧菌检验[S]

[5] GB4789.28-2013 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]

四、主要技术内容的论据

主要技术内容在增菌培养基、选择性分离培养基、鉴定方法、荧光 PCR 初筛的条件摸索方面，综合考虑溶藻弧菌及各种肠道致病菌在培养基中的生长表现，最后选定 3%氯化钠碱性蛋白胨水为溶藻弧菌的增菌培养基、TCBS 和弧菌显色培养基为选择性分离培养基；将荧光 PCR 和 MALDI-TOF MS 作为溶藻弧菌的可选鉴定方法；并将荧光 PCR 初筛引入检测流程，在可疑溶藻弧菌引起的食物中毒处置时可以快速作出初步判断。

五、主要试验（或验证）的分析、综述报告（详细验证过程见验证方案）

（一）选择性分离培养基的验证

将标准储备菌株溶藻弧菌 CICC10889 、验证实验室从腹泻粪便和食源性疾病暴发疫情中分离的溶藻弧菌、副溶血性弧菌、创伤弧菌、霍乱弧菌、嗜水气单胞菌、类志贺邻单胞菌、大肠埃希氏菌、金黄色葡萄球菌、产气肠杆菌、粪肠球菌接种 TCBS 平板和弧菌显色培养基平板，观察溶藻弧菌和其他菌在两种选择性培养基上的生长状态。

溶藻弧菌在 TCBS 和弧菌显色培养基上生长良好，且颜色、形态特征明显，作为选择性分离培养基的效果好。

（二） 标准的包容性验证

腹泻粪便和食源性疾病暴发疫情中分离的溶藻弧菌 30 株，于脑心浸液肉汤中培养过夜，转种于 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂，过夜培养。分别用 VITEK 系统生化、溶藻弧菌荧光 PCR 方法、MALDI-TOF MS 三种方法对 30 株溶藻弧菌进行鉴定。

生化结果：30 个菌株 VITEK 细菌生化鉴定系统给出的拉丁文鉴定结果均为 *Vibrio alginolyticus*，结果可信度在 90%以上（好的鉴定及以上）的为 26 个，86%-88%（可接受的鉴定）的有 4 个，生化符合率为 100%。MALDI-TOF MS 鉴定结果：30 个菌株质谱鉴定结果均为 *Vibrio alginolyticus*，质谱评分均为种水平可信的结果，符合率为 100%。荧光 PCR 法鉴定结果：30 个菌株均有特异的 S 型曲线，荧光 Ct 值在 14.13-20.88 之间，都为阳性结果，符合率为 100%。三种鉴定方法都能很好地鉴定出 30 株溶藻弧菌，三种鉴定方法的敏感性均为 100%。

（三） 标准的排他性验证

将 26 株非溶藻弧菌菌株（大肠埃希氏菌 CICC23657、弗氏柠檬酸杆菌 CICC10404、产气肠杆菌 CICC10293、小肠结肠炎耶尔森氏菌 CICC10869、肠炎沙门氏菌 CICC21513、鼠伤寒沙门氏菌 CICC21484、福氏志贺菌 CICC10865、痢疾志贺菌 CICC23829、鲍氏志贺菌 CICC21680、宋内志贺菌 CICC23875、金黄色葡萄球菌 CICC23656、金葡 2017189、金葡 2017190、蜡样芽胞杆菌 CICC23828、蜡样 2021081、蜡样 2021105、单增李斯特 CICC21635、单增 2021078、单增 2021079、单增 2021080、副溶血性弧菌 CICC21617、霍乱弧菌 CICC23789、河流弧菌 2019342、创伤弧菌 CICC21615、嗜水气单胞菌 2019186、类志贺邻单胞菌 2012320）于脑心浸液肉汤中培养过夜，转种于哥伦比亚血琼脂平板，过夜培养。

分别用 VITEK 系统生化、溶藻弧菌荧光 PCR 方法、MALDI-TOF MS 三种方法对 26 株菌株进行鉴定。生化方法验证结果：生化方法虽然对蜡样芽胞杆菌的鉴定有局限性，但是对其他菌的鉴定结果及可信度都很高，未见溶藻弧菌的交叉反应。MALDI-TOF MS 验证结果：志贺氏菌和大肠埃希氏菌区分不开，对其他菌的鉴定结果及可信度都很高，未见溶藻弧菌的交叉鉴定。溶藻弧菌荧光 PCR 法验证结果：26 个菌株均未见特异的 S 型曲线，都为阴性结果，此鉴定方法对溶藻弧菌排他性良好。溶藻弧菌的三种鉴定方法特异性均为 100%。

（四）标准的检测限验证（杂菌干扰实验）

1. 验证过程

粪便标本 50 份（1g/份）加入干扰菌大肠埃希氏菌（每份 1 000 CFU～2 000 CFU）。用溶藻弧菌质控球调制高浓度菌液 1 CFU/mL～10 CFU/mL,低浓度菌液 0.1CFU/mL～1CFU/mL。将高浓度菌液 1mL 加入一份加了干扰菌的粪便标本，制作 5 份；将低浓度菌液 1mL 加入一份加了干扰菌的粪便标本，制作 40 份；其他 5 份加了干扰菌而未加溶藻弧菌菌液的粪便标本为空白对照标本。按本标准溶藻弧菌检验程序进行检测。出具荧光 PCR 初筛、生化鉴定、荧光 PCR 鉴定、质谱鉴定检测结果。

2. 验证结果

(1) 实验室 1 检测限验证结果见表 1。

表 1 实验室 1 检测限验证结果浓度类别	标本号	增菌液荧光 PCR 初筛结果		鉴定结果					
		阴性/阳性	Ct 值	生化结果（VITEK 报告拉丁文名称）	生化结果可信度（%）	质谱结果(拉丁文名称)	质谱评分（安图）	荧光 PCR 结果（阴性/阳性）	荧光 PCR（Ct 值）
高浓度	1	阳性	21.129	Vibrio alginolyticus	95	Vibrio alginolyticus	9.518	阳性	13.675
	2	阳性	22.300	Vibrio alginolyticus	99	Vibrio alginolyticus	9.627	阳性	15.627
	3	阳性	22.621	Vibrio alginolyticus	96	Vibrio alginolyticus	9.657	阳性	15.384

	4	阳性	21.720	Vibrio alginolyticus	99	Vibrio alginolyticus	9.648	阳性	15.658
	5	阳性	21.331	Vibrio alginolyticus	98	Vibrio alginolyticus	9.430	阳性	15.846
3 低浓度	6	阳性	25.254	Vibrio alginolyticus	89	Vibrio alginolyticus	9.657	阳性	16.124
	7	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	8	阳性	24.635	Vibrio alginolyticus	98	Vibrio alginolyticus	9.760	阳性	17.232
	9	阳性	25.736	Vibrio alginolyticus	99	Vibrio alginolyticus	9.723	阳性	16.354
	10	阳性	25.437	Vibrio alginolyticus	99	Vibrio alginolyticus	9.669	阳性	16.747
	11	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	12	阳性	24.720	Vibrio alginolyticus	99	Vibrio alginolyticus	9.492	阳性	15.621
	13	阳性	25.850	Vibrio alginolyticus	96	Vibrio alginolyticus	9.632	阳性	16.165
	14	阳性	24.982	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.742	阳性	16.234
	15	阳性	36.958	Vibrio alginolyticus	99	Vibrio alginolyticus	9.670	阳性	16.074
	16	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	17	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	18	阳性	21.309	Vibrio alginolyticus	98	Vibrio alginolyticus	9.659	阳性	15.936
	19	阳性	24.389	Vibrio alginolyticus	99	Vibrio alginolyticus	9.535	阳性	15.721
	20	阳性	25.267	Vibrio alginolyticus	99	Vibrio alginolyticus	9.617	阳性	15.492
	21	阳性	25.146	Vibrio alginolyticus	97	Vibrio alginolyticus	9.736	阳性	15.321
	22	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	23	阳性	21.092	Vibrio alginolyticus	99	Vibrio alginolyticus	9.730	阳性	15.746
	24	阳性	30.256	Vibrio alginolyticus	89	Vibrio alginolyticus	9.678	阳性	15.924
	25	阳性	19.829	Vibrio alginolyticus	99	Vibrio alginolyticus	9.564	阳性	15.635
	26	阳性	25.724	Vibrio alginolyticus	95	Vibrio alginolyticus	9.599	阳性	15.283
	27	阳性	32.178	/	/	/	/	/	/
	28	阳性	25.329	Vibrio alginolyticus	94	Vibrio alginolyticus	9.710	阳性	15.236
	29	阳性	24.678	Vibrio alginolyti	99	Vibrio alginol	9.694	阳性	15.658

				cus		yticus			
	30	阳性	24.324	Vibrio alginolyticus	96	Vibrio alginolyticus	9.628	阳性	16.271
	31	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	32	阳性	24.236	Vibrio alginolyticus	95	Vibrio alginolyticus	9.480	阳性	16.426
	33	阳性	24.141	Vibrio alginolyticus	97	Vibrio alginolyticus	9.740	阳性	16.832
	34	阳性	22.875	Vibrio alginolyticus	92	Vibrio alginolyticus	9.643	阳性	15.635
	35	阳性	23.927	Vibrio alginolyticus	98	Vibrio alginolyticus	9.614	阳性	15.269
	36	阳性	26.098	Vibrio alginolyticus	99	Vibrio alginolyticus	9.705	阳性	15.147
	37	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	38	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	39	阳性	22.044	Vibrio alginolyticus	96	Vibrio alginolyticus	9.575	阳性	14.981
	40	阳性	19.657	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.592	阳性	15.636
	41	阳性	22.192	Vibrio alginolyticus	97	Vibrio alginolyticus	9.681	阳性	16.748
	42	阳性	26.257	Vibrio alginolyticus	98	Vibrio alginolyticus	9.640	阳性	15.237
	43	阳性	19.457	Vibrio alginolyticus	99	Vibrio alginolyticus	9.635	阳性	16.625
	44	阳性	24.632	Vibrio alginolyticus	96	Vibrio alginolyticus	9.534	阳性	16.324
	45	阳性	30.646	Vibrio alginolyticus	92	Vibrio alginolyticus	9.614	阳性	15.825
对照组	46	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	47	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	48	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	49	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	50	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/

结果：高浓度组荧光 PCR 初筛、生化鉴定、荧光 PCR 鉴定、质谱鉴定检测结果均为阳性；低浓度组初筛阳性率为 80%，生化鉴定、荧光 PCR 鉴定、质谱鉴定检测结果阳性率均为 77.5%，三个鉴定方法的阳性符合率均为 100%；对照组四组结果均为未检出。

（2）实验室 2 检测限验证结果见表 2。

表 2 实验室 2 检测限验证结果

浓度类别	标本号	增菌液荧光PCR初筛结果		鉴定结果					
		阴性/阳性	Ct 值	生化结果（VITEK 报告拉丁文名称）	生化结果可信度(%)	质谱结果(拉丁文名称)	质谱评分（布鲁克）	荧光PCR结果(阴性/阳性)	荧光PCR(Ct值)
高浓度	1	阳性	14.43	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.808	阳性	11.21
	2	阳性	14.14	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.932	阳性	11.35
	3	阳性	14.08	Vibrio alginolyt	98%	Vibrio alginolytic	1.803	阳性	11.20
	4	阳性	14.31	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.923	阳性	11.47
	5	阳性	14.24	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	2.070	阳性	12.41
低浓度	6	阳性	14.13	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.774	阳性	12.41
	7	阳性	14.16	Vibrio alginolyt	97%	Vibrio alginolytic	1.814	阳性	11.10
	8	阳性	14.60	Vibrio alginolyt	98%	Vibrio alginolytic	1.800	阳性	13.10
	9	阳性	14.68	Vibrio alginolyt	96%	Vibrio alginolytic	1.845	阳性	11.76
	10	阳性	14.08	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.713	阳性	12.29
	11	阳性	14.38	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.849	阳性	11.88
	12	阳性	14.51	Vibrio alginolyt	90%	Vibrio alginolytic	1.745	阳性	11.02
	13	阳性	15.05	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.828	阳性	11.81
	14	阳性	14.17	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.775	阳性	11.33
	15	阳性	14.78	Vibrio alginolyt	98%	Vibrio alginolytic	1.788	阳性	12.23
	16	阳性	15.13	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.770	阳性	11.64
	17	阳性	15.27	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.714	阳性	11.45
	18	阳性	14.79	Vibrio alginolyt	97%	Vibrio alginolytic	1.788	阳性	12.20

	19	阳性	14.99	Vibrio alginolyt	93%	Vibrio alginolytic	1.771	阳性	12.39
	20	阳性	14.97	Vibrio alginolyt	98%	Vibrio alginolytic	1.890	阳性	13.44
	21	阳性	15.13	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.968	阳性	12.71
	22	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	23	阳性	15.20	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.704	阳性	11.99
	24	阳性	15.02	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.826	阳性	10.70
	25	阳性	15.22	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	2.008	阳性	13.34
	26	阳性	15.26	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.894	阳性	11.25
	27	阳性	14.33	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.963	阳性	11.32
	28	阳性	14.59	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.830	阳性	12.31
	29	阳性	14.79	Vibrio alginolyt	98%	Vibrio alginolytic	2.176	阳性	11.82
	30	阳性	13.44	Vibrio alginolyt	98%	Vibrio alginolytic	1.772	阳性	10.62
	31	阳性	14.21	Vibrio alginolyt	98%	Vibrio alginolytic	1.933	阳性	12.07
	32	阳性	14.48	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.887	阳性	11.97
	33	阳性	14.65	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.808	阳性	11.30
	34	阳性	14.06	Vibrio alginolyt	96%	Vibrio alginolytic	1.766	阳性	11.85
	35	阳性	14.36	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.945	阳性	11.78
	36	阳性	14.23	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.878	阳性	13.07
	37	阳性	14.48	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.765	阳性	12.25
	38	阳性	13.58	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	2.034	阳性	12.08
	39	阳性	14.43	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.780	阳性	11.68
	40	阳性	14.73	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	2.015	阳性	11.56
	41	阴性	N/A	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.841	阳性	12.12
	42	阳性	14.79	Vibrio alginolyt	98%	Vibrio alginolytic	1.967	阳性	12.53

	43	阳性	14.43	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.776	阳性	11.93
	44	阳性	14.31	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.774	阳性	11.53
	45	阳性	14.74	Vibrio alginolyt	99%	Vibrio alginolytic	1.948	阳性	12.96
对照组	46	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	47	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	48	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	49	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	50	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/

结果：高浓度组荧光 PCR 初筛、生化鉴定、荧光 PCR 鉴定、质谱鉴定检测结果均为阳性；低浓度组初筛阳性率为 95%，生化鉴定、荧光 PCR 鉴定、质谱鉴定检测结果阳性率均为 97.5%，三个鉴定方法的阳性符合率均为 100%；对照组四组结果均为未检出。

（3）实验室 3 检测限验证结果见表 3。

表 3 实验室 3 检测限验证结果

浓度类别	标本号	增菌液荧光 PCR 初筛结果		鉴定结果					
		阴性/阳性	Ct 值	生化结果（VITEK 报告拉丁文名称）	生化结果可信度（%）	质谱结果（拉丁文名称）	质谱评分（布鲁克）	荧光 PCR 结果（阴性/阳性）	荧光 PCR（Ct 值）
高浓度	1	阳性	14.33	Vibrio alginolyti	99%	Vibrio alginolyt	2.299	阳性	12.51
	2	阳性	14.12	Vibrio alginolyti	99%	Vibrio alginolyt	2.246	阳性	11.65
	3	阳性	14.07	Vibrio alginolyti	96%	Vibrio alginolyt	2.308	阳性	11.45
	4	阳性	14.56	Vibrio alginolyti	95%	Vibrio alginolyt	2.267	阳性	12.41
	5	阳性	14.14	Vibrio alginolyti	90%	Vibrio alginolyt	2.466	阳性	11.23
	6	阳性	14.65	Vibrio alginolyti	96%	Vibrio alginolyt	2.215	阳性	11.46

	7	阳性	14.84	Vibrio alginolyti	90%	Vibrio alginolyt	2.211	阳性	12.40
	8	阳性	14.68	Vibrio alginolyti	99%	Vibrio alginolyt	2.370	阳性	11.20
	9	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	10	阳性	14.65	Vibrio alginolyti	99%	Vibrio alginolyt	2.445	阳性	11.39
	11	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	12	阳性	15.53	Vibrio alginolyti	99%	Vibrio alginolyt	2.373	阳性	12.12
	13	阳性	15.99	Vibrio alginolyti	99%	Vibrio alginolyt	2.360	阳性	12.11
	14	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	15	阳性	15.18	Vibrio alginolyti	99%	Vibrio alginolyt	2.329	阳性	11.65
	16	阳性	15.45	Vibrio alginolyti	98%	Vibrio alginolyt	2.307	阳性	11.44
	17	阳性	15.17	Vibrio alginolyti	96%	Vibrio alginolyt	2.286	阳性	11.21
	18	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	19	阳性	15.33	Vibrio alginolyti	99%	Vibrio alginolyt	2.312	阳性	11.93
	20	阳性	15.26	Vibrio alginolyti	99%	Vibrio alginolyt	2.407	阳性	12.15
	21	阳性	15.43	Vibrio alginolyti	96%	Vibrio alginolyt	2.197	阳性	11.73
	22	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	23	阳性	15.23	Vibrio alginolyti	96%	Vibrio alginolyt	2.372	阳性	12.14
	24	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	25	阳性	15.29	Vibrio alginolyti	96%	Vibrio alginolyt	2.377	阳性	11.75
	26	阳性	15.66	Vibrio alginolyti	96%	Vibrio alginolyt	2.325	阳性	11.47
	27	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	28	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	29	阳性	14.77	Vibrio alginolyti	96%	Vibrio alginolyt	2.333	阳性	11.33
	30	阳性	15.42	Vibrio alginolyti	99%	Vibrio alginolyt	2.311	阳性	11.26

	31	阳性	15.61	Vibrio alginolyti	95%	Vibrio alginolyt	2.255	阳性	10.99
	32	阳性	15.12	Vibrio alginolyti	99%	Vibrio alginolyt	2.415	阳性	10.98
	33	阳性	15.98	Vibrio alginolyti	96%	Vibrio alginolyt	2.367	阳性	12.00
	34	阳性	15.14	Vibrio alginolyti	96%	Vibrio alginolyt	2.230	阳性	11.74
	35	阳性	14.99	Vibrio alginolyti	97%	Vibrio alginolyt	2.355	阳性	12.01
	36	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	37	阳性	15.18	Vibrio alginolyti	96%	Vibrio alginolyt	2.280	阳性	11.85
	38	阳性	15.28	Vibrio alginolyti	99%	Vibrio alginolyt	2.267	阳性	11.97
	39	阳性	15.23	Vibrio alginolyti	99%	Vibrio alginolyt	2.270	阳性	12.18
	40	阳性	15.13	Vibrio alginolyti	97%	Vibrio alginolyt	2.212	阳性	10.96
	41	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	42	阳性	15.19	Vibrio alginolyti	99%	Vibrio alginolyt	2.299	阳性	11.77
	43	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	44	阳性	14.31	Vibrio alginolyti	97%	Vibrio alginolyt	2.256	阳性	12.03
	45	阳性	15.24	Vibrio alginolyti	97%	Vibrio alginolyt	2.355	阳性	11.47
对照组	46	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	47	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	48	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	49	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/
	50	阴性	N/A	/	/	/	/	/	/

结果：高浓度组荧光 PCR 初筛、生化鉴定、荧光 PCR 鉴定、质谱鉴定检测结果均为阳性；低浓度组初筛阳性率为 72.5%，生化鉴定、荧光 PCR 鉴定、质谱鉴定检测结果阳性率均为 72.5%，三个鉴定方法的阳性符合率均为 100%；对照组四组结果均为未检出。

（4）实验室 4 检测限验证结果见表 4。

表 4 实验室 4 检测限验证结果

浓度类别	样本号	增菌液荧光PCR初筛结果		鉴定结果					
		阴性/阳性	（Ct值）	生化结果（VITEK 报告拉丁文名称）	生化结果可信度（%）	质谱结果(拉丁文名称)	质谱评分（安图）	荧光PCR结果（阴性/阳性)	荧光PCR（Ct值）
高浓度	1	阳性	15.5	Vibrio	93	Vibrio	9.0	阳性	13.0
	2	阳性	15.3	Vibrio alginolyticus	94	Vibrio alginolyticus	9.279	阳性	12.0
	3	阳性	15.8	Vibrio alginolyticus	92	Vibrio alginolyticus	9.303	阳性	13.0
	4	阳性	15.8	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.342	阳性	12.5
	5	阳性	15.2	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.476	阳性	13.5
低浓度	6	阳性	26.3	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.335	阳性	14.3
	7	阴性	/	/	/	/	/	/	/
	8	阴性	/	/	/	/	/	/	/
	9	阳性	15.7	Vibrio	93	Vibrio	9.2	阳性	14.0
	10	阳性	25.4	Vibrio alginolyticus	95	Vibrio alginolyticus	9.008	阳性	12.0
	11	阳性	29.1	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.268	阳性	13.0
	12	阳性	15.6	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.426	阳性	13.0
	13	阳性	15.4	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.349	阳性	13.0
	14	阳性	28.1	Vibrio alginolyticus	94	Vibrio alginolyticus	9.162	阳性	14.5

	15	阳性	28.9	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.178	阳性	13.5
	16	阴性	/	/	/	/	/	/	/
	17	阳性	25.4	Vibrio alginolyticus	95	Vibrio alginolyticus	9.188	阳性	15.6
	18	阳性	15.6	Vibrio	93	Vibrio	9.2	阳性	12.5
	19	阳性	26.4	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.053	阳性	12.5
	20	阳性	28.3	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.175	阳性	14.0
	21	阳性	29.7	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.130	阳性	13.5
	22	阳性	16.1	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.199	阳性	13.2
	23	阳性	15.8	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.002	阳性	13.0
	24	阴性	/	/	/	/	/	/	/
	25	阳性	26.4	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.122	阳性	16.3
	26	阴性	/	/	/	/	/	/	/
	27	阳性	23.8	Vibrio alginolyticus	94	Vibrio alginolyticus	9.476	阳性	13.6
	28	阳性	24.8	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.425	阳性	12.0
	29	阳性	16.3	Vibrio	93	Vibrio	9.5	阳性	12.0
	30	阳性	26.6	Vibrio alginolyticus	95	Vibrio alginolyticus	9.531	阳性	13.5
	31	阳性	25.5	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.442	阳性	14.5
	32	阳性	30.3	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.002	阳性	13.5
	33	阳性	25.3	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.034	阳性	13.5
	34	阳性	28.4	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.518	阳性	14.0
	35	阳性	31.3	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.257	阳性	13.5
	36	阳性	26.5	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.189	阳性	14.0
	37	阳性	21.6	Vibrio	93	Vibrio	9.0	阳性	12.5

				alginolyticus		alginolyticus	96		
	38	阳性	24.6	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.157	阳性	15.0
	39	阳性	23.5	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.057	阳性	14.6
	40	阴性	/	/	/	/	/	/	/
	41	阳性	32.0	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.415	阳性	12.0
	42	阳性	28.6	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.167	阳性	12.0
	43	阳性	22.6	Vibrio alginolyticus	94	Vibrio alginolyticus	9.537	阳性	13.8
	44	阳性	24.7	Vibrio alginolyticus	92	Vibrio alginolyticus	9.518	阳性	16.2
	45	阳性	22.6	Vibrio alginolyticus	93	Vibrio alginolyticus	9.335	阳性	15.4
对照组	46	阴性	/	/	/	/	/	/	/
	47	阴性	/	/	/	/	/	/	/
	48	阴性	/	/	/	/	/	/	/
	49	阴性	/	/	/	/	/	/	/
	50	阴性	/	/	/	/	/	/	/

结果：高浓度组荧光 PCR 初筛、生化鉴定、荧光 PCR 鉴定、质谱鉴定检测结果均为阳性；低浓度组初筛阳性率为 85%，生化鉴定、荧光 PCR 鉴定、质谱鉴定检测结果阳性率均为 85%，三个鉴定方法的阳性符合率均为 100%；对照组四组结果均为未检出。

3. 验证结果评价

（1）4 个实验室在高浓度组（1 CFU/g～10 CFU/g）荧光 PCR 初筛、生化鉴定、荧光 PCR 鉴定、质谱鉴定检测结果阳性率均为 100%，且三个鉴定方法的阳性符合率均为 100%。

（2）低浓度组（0.1 CFU/g～1 CFU/g）荧光 PCR 初筛的阳性率实验室 1 为 80% 略高于三个鉴定结果阳性率的 77.5%，实验室 2 为 95% 略低于三个鉴定组的 97.5%，其它两个实验室荧光 PCR 初筛的阳性率与三个鉴定方法检测结果一致。以生化鉴定方法为基准方法，荧光 PCR 初筛总的灵敏度为 100%，特异性为 100%。低浓度组总的阳性率为：荧光 PCR 初筛 83.1%、生化鉴定方法 83.1%、荧光 PCR

鉴定方法 83.1%、质谱鉴定方法 83.1%。

（3）三个鉴定方法：生化鉴定、荧光 PCR 鉴定、质谱鉴定对分离菌株鉴定结果的一致率为 100%。

（五）验证试验的综合评价

此标准检测方法灵敏度 100%，特异性 100%，检测限可到≥1 CFU/g。

六、采用国际标准的程度与水平的简要说明

国内外无腹泻粪便标本中溶藻弧菌检验的标准，本标准借鉴副溶血性弧菌检验（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）的生化鉴定部分，又将近些年发展的灵敏快捷的荧光 PCR、MALDI-TOF MS 方法引入本文件作为鉴定方法，并考虑到疾控机构腹泻疫情处置的时间要求设置了增菌液荧光 PCR 的快速筛查方法。

七、标准涉及的专利及相关知识产权说明

无

八、重大意见分歧的处理经过和依据

无

九、其他应予说明的事项

本标准批准文件申请书名称为《人体粪便标本中溶藻弧菌检验》，考虑到本标准文件适用范围为各级疾控机构及医疗机构肠道门诊，其标本主要为腹泻粪便标本，修改标准名称为《腹泻粪便标本中溶藻弧菌检验》。