ICS 11.100
CCS C 05

T/BPMA

北 京 预 防 医 学 会 团 体 标 准

T/BPMA XXXX—2023

腹泻粪便标本中溶藻弧菌检验

Detection of Vibrio alginolyticus in fecal samples of diarrhe

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2023.8.18）

2023－XX－XX 发布　　2023－XX－XX 实施

北京预防医学会　　发 布

前　　言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则　第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由北京预防医学会提出。

本文件由北京预防医学会归口。

本文件起草单位：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。

本文件主要起草人：赵凤玲、张晓媛、李颖、王迪、王建国、高翔、邹林、常馨、刘扬、崔玉娟、李晓辉、王艳春、李秋虹、赵春艳、邵春昕、罗宇馨、黄震、王润萍、甄博珺、张萍、张冲、高洁、周景林、王苗、张莹。

腹泻粪便标本中溶藻弧菌检验

1 范围

本文件给出了人体腹泻粪便标本中溶藻弧菌的检验方法。
本文件适用人体腹泻粪便标本中溶藻弧菌的检验。

2 规范性引用文件

GB 19489 实验室生物安全通用要求。

3 术语和定义

本文件未给出术语和定义。

4 主要设备

4.1 恒温培养箱：36 ℃±1 ℃，42 ℃±1 ℃。

4.2 恒温水浴箱：56 ℃±1 ℃。

4.3 全自动微生物生化鉴定系统。

4.4 实时荧光 PCR 仪。

4.5 MALDI-TOF MS 微生物质谱分析系统。

5 主要培养基和试剂

5.1 3%氯化钠碱性蛋白胨水：见附录 A.1。

5.2 硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖（TCBS）琼脂：见附录 A.2。

5.3 弧菌显色培养基。

5.4 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂：见附录 A.3。

5.5 3%氯化钠三糖铁琼脂：见附录 A.4。

5.6 生化鉴定试剂盒。

6 检验程序

溶藻弧菌的检验程序见图 1。

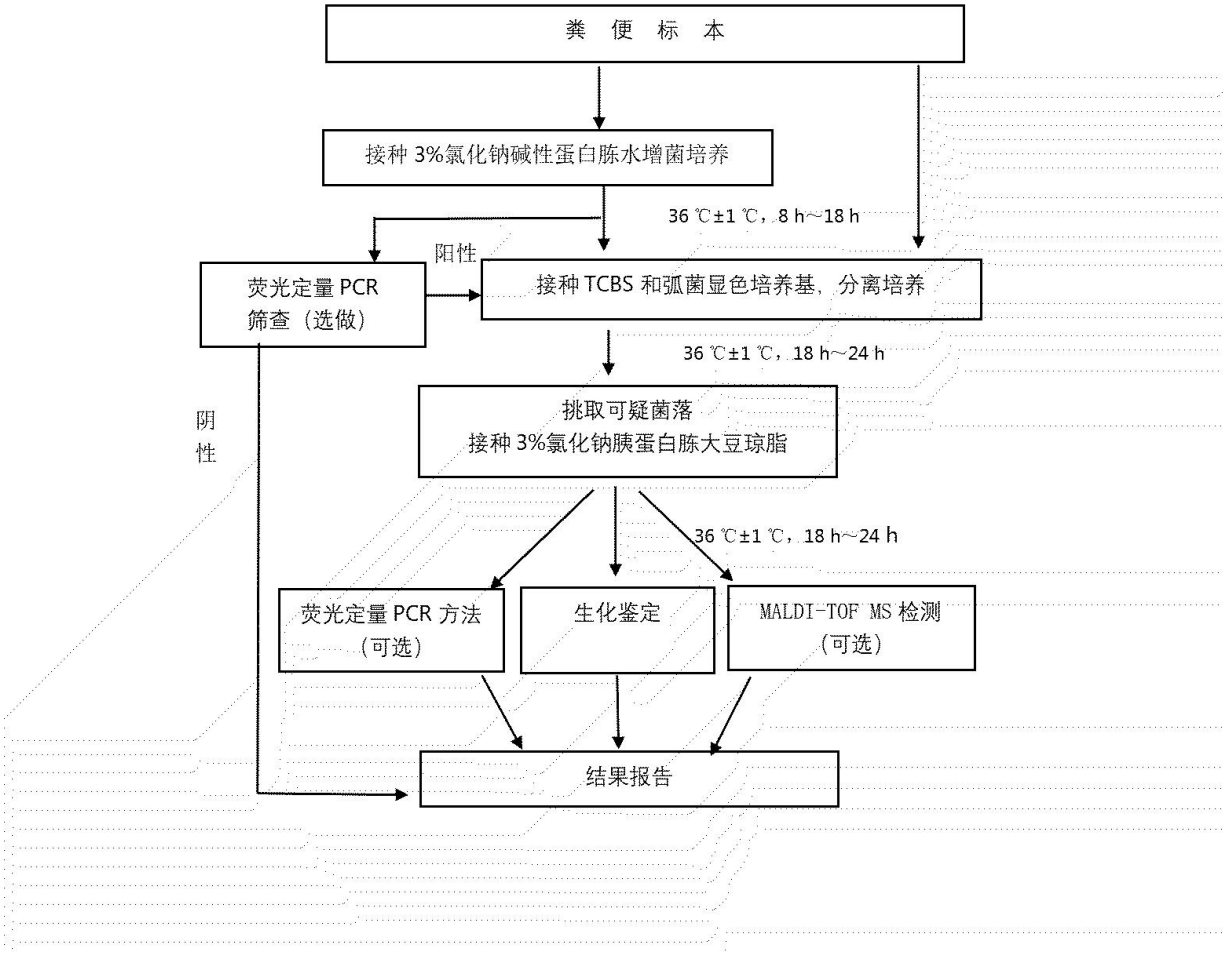

图1 溶藻弧菌检验程序

7 操作步骤

7.1 样本的收集

尽量在患者使用抗生素前无菌采集新鲜粪便标本 3 g～5 g(或者黄豆至蚕豆大小)，2 h内运送到检测实验室，若运送时间超过 2 h者，标本应放入 Cary-Blair 运送培养基中；便拭子或者肛拭子，可放入 Cary-Blair 运送培养基中室温条件下当天运送至实验室。

7.2 分离培养

7.2.1 直接分离培养

粪便标本直接划线接种于 TCBS 和弧菌显色培养基，36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h。

7.2.2 增菌分离培养

7.2.2.1 增菌

从便盒中挑取黄豆粒大小粪便标本(水样便 300 uL～500 uL),加入到 10 mL 的 3%氯化钠碱性蛋白胨水中，充分混匀后进行增菌培养；将便拭子或者肛拭子直接放入 10 mL 的 3%氯化钠碱性蛋白胨水中，充分挤压混匀，取出棉签后进行增菌培养，36 ℃±1 ℃培养 8 h～18 h。

7.2.2.2 实时荧光 PCR 方法快速筛查（选做）

7.2.2.2.1 DNA 提取

直接取 7.2.2.1 获得的增菌液 1 mL 加到无菌离心管中,8000 r/min 离心 2 min,吸弃上清，加入 500 uL无菌超纯水，充分混匀后制成肉眼可见的混浊菌悬液,煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液用于 PCR 检测。若不能及时检测则于 -20 ℃保存备用。

也可利用细菌基因组提取试剂盒提取 DNA,操作方法按试剂盒说明书进行。

7.2.2.2.2 PCR 检测

实时荧光 PCR 反应体系体积为 20 uL：2×通用 PCR 反应混合物(Premix Ex TaqTM)10 uL、上下游引物(10 umol/L)各 0.4 uL、探针(10 umol/L)0.4 uL、模板 DNA 2 uL,水补足至 20 uL。引物和探针序列见表 1。

反应参数：95 ℃预变性 30 s，95 ℃变性 5 s，60 ℃退火延伸 20 s,循环 40 次，在退火阶段检测荧光。

表 1 溶藻弧菌实时荧光 PCR 引物和探针的序列及产物长度

引物	核苷酸序列(5’～3’)	产物长度
COL F	GTGGCTTACACGTTGGAATGATC	
COL R	TTTGGCAAGGTCTGTTTGGTTAC	142 bp
COL P	HEX－CACAAATTGCTCGTTCCACTGCCCACC－BHQ1	

7.2.2.2.3 结果判定

Ct 值≥40.0,判定样品检测结果为阴性，报告未检出溶藻弧菌；

Ct 值 ≤35.0,可判定该样品检测结果为溶藻弧菌核酸阳性；

Ct 值在 35.0 与 40.0 之间,需重新检测，如重测 Ct 值仍在此区间且曲线呈标准的 S 型且有明显的指数增长期，则判断为阳性，否则判断为阴性。

判定溶藻弧菌核酸阳性者，需进行分离培养及后续的鉴定试验。

7.2.2.3 分离

取增菌液划线接种于 TCBS 平板和弧菌显色培养基平板，于 36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h。典型的溶藻弧菌菌落在 TCBS 上呈圆形、表面光滑、大而扁平的黄色菌落，直径 2 mm～3 mm。在弧菌显色培养基上的菌落特征参照产品说明书进行判定。

7.3 纯培养

在 TCBS 平板和弧菌显色培养基平板上各挑取 5 个可疑菌落,划线接种 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂，36 ℃±1 ℃培养 18 h～24 h。

7.4 鉴定

溶藻弧菌的鉴定可采用生化鉴定或 MALDI-TOF MS 鉴定或实时荧光 PCR 方法鉴定。

7.4.1 生化鉴定

7.4.1.1 挑取纯培养的单个可疑菌落，接种 3%氯化钠三糖铁琼脂斜面并穿刺底层，36 ℃±1 ℃培养 24 h 观察结果。溶藻弧菌在 3%氯化钠三糖铁琼脂中的反应为底层变黄不变黑，无气泡，斜面颜色变黄，有动力。

7.4.1.2 嗜盐性试验：挑取纯培养的单个可疑菌落，分别接种 0%、6%、8%和 10%不同氯化钠浓度的胰胨水，36 ℃±1 ℃培养 24 h，观察液体混浊情况。溶藻弧菌在无氯化钠的胰胨水中不生长，在 3%氯化钠、6%氯化钠、8%氯化钠和 10%氯化钠的胰胨水中生长旺盛。

7.4.1.3 取纯培养物分别接种含3%氯化钠的甘露醇试验培养基、赖氨酸脱羧酶试验培养基、MR-VP培养基，36 ℃±1 ℃培养24 h～48 h后观察结果；3%氯化钠三糖铁琼脂隔夜培养物进行ONPG试验。可选择生化鉴定试剂盒或全自动微生物生化鉴定系统。溶藻弧菌的生化反应及与其它弧菌鉴别见表2。

表2 溶藻弧菌生化反应及与其它弧菌的鉴别

名称	氧化酶	赖氨酸	精氨酸	鸟氨酸	明胶	脲酶	V－P	42℃生长	蔗糖	D－纤维二糖	乳糖	阿拉伯糖	D－甘露糖	D－甘露醇	ONPG	嗜盐性试验 氯化钠含量 %				
																0	3	6	8	10
溶藻弧菌 V.alginolyticus	＋	＋	－	＋	＋	－	＋	＋	＋	－	－	－	＋	＋	－	－	＋	＋	＋	＋
副溶血性弧菌 V.parahaemolyticus	＋	＋	－	＋	＋	V	－	＋	－	V	－	＋	＋	＋	－	－	＋	＋	＋	－
创伤弧菌 V.vulnificus	＋	＋	－	＋	＋	－	－	＋	－	＋	＋	－	＋	V	＋	－	＋	＋	－	－
霍乱弧菌 V.cholerae	＋	＋	－	＋	＋	－	V	＋	＋	－	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－
拟态弧菌 V.mimicus	＋	＋	－	＋	＋	－	－	＋	－	－	－	－	＋	＋	＋	＋	＋	－	－	－
河弧菌 V.fluvialis	＋	－	＋	－	＋	－	－	V	＋	＋	－	＋	＋	＋	＋	－	＋	＋	V	－
弗氏弧菌 V.furnissii	＋	－	＋	－	＋	－	－	－	＋	－	－	＋	＋	＋	＋	－	＋	＋	＋	－
梅氏弧菌 V.metschnikovii	－	＋	＋	－	＋	－	＋	V	＋	－	－	－	＋	＋	＋	－	＋	＋	V	－
霍利斯弧菌 V.hollisae	＋	－	－	－	－	－	－	nd	－	－	－	＋	＋	－	－	－	＋	＋	－	－

注：＋表示阳性；－表示阴性；nd 表示未试验；V 表示可变。

7.4.2 MALDI-TOF MS检测

7.4.2.1 检测步骤

MALDI-TOF MS 检测步骤如下：

a) 在 1.5 mL离心管中加入 300 μL 去离子水。

b) 挑取 1 个～2 个单菌落于离心管中，充分振荡混匀。

c）加入 900 μL 无水乙醇，充分混匀。

d）室温离心 2 min～4 min，转速 8000 r/min～14800 r/min，倾去上清，再次离心，使用移液枪完全除去上清，操作过程中不应接触沉淀。

e）37 ℃～40 ℃干燥沉淀 2 min～5 min，至沉淀表面无明显水迹。

f）加入裂解液 1（10 μL），振荡混匀。

g）加入裂解液 2（10 μL），充分混匀。

h）室温离心 2 min～4 min，转速 8000 r/min～14800 r/min。

i）吸取 1 μL 上清液，滴加到样品靶上，并在室温下晾干。

j）晾干后取1 μL 基质溶液覆盖在上述样品点上，并在室温下晾干。

k）将样品靶放入质谱仪进行测定。

7.4.2.2 仪器参数设置

选择线性操作模式，正离子模式，检测范围：2000 Da-20 000 Da；激光点击数：每图谱 40次(6次激光累积)；激光频率：60.0 Hz；离子源加速电压：20 kV。对可疑菌落进行质谱数据采集并保存，通过 autof ms 操作软件进行分析鉴定。

7.4.2.3 结果判读

MALDI-TOF MS 鉴定结果给出数据库中与鉴定菌种最为匹配的 10 个菌株种属，并给出相对应的匹配分值，分值 6 分以下不可信，6-9 分需要查看十个明细，9 分以上种水平可信。

7.4.2.4 MALDI-TOF MS 结果判定及报告

可疑菌落经 MALDL-TOF MS 鉴定为溶藻弧菌，且匹配分值大于等于 9 分，判定检测结果为阳性。

（此处为Autof MS1000 MALDI-TOF MS 质谱仪操作方法及技术参数，其它品牌和型号请参见仪器说明书。）

7.4.3 荧光 PCR 鉴定

7.4.3.1 将 TCBS 或弧菌显色培养基上的溶藻弧菌可疑菌落纯培养物转至 500 uL 无菌超纯水中，充分混匀后制成肉眼可见的混浊菌悬液,煮沸 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液用于 PCR 检测。若不能及时检测则于 -20 ℃保存备用。

也可用商业化的 DNA 提取试剂盒，按其说明提取制备 DNA 模板。

7.4.3.2 PCR 检测和结果判定同 7.2.2.2

7.5 结果与报告

根据可疑菌落系统生化和（或）MALDI-TOF MS 鉴定结果和（或）实时荧光 PCR 结果，报告标本中检出或未检出溶藻弧菌。

7.6 生物安全

样本检测和废弃物处理 按照 GB 19489 规定执行。

附 录 A
（规范性）
培养基与试剂

A.1 3%氯化钠碱性蛋白胨水

A.1.1 成分

蛋白胨	10.0 g
氯化钠	30.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.1.2 制法 校正 pH 至 8.5±0.2，121 ℃高压灭菌 10 min。

A.2 硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖（TCBS）琼脂

A.2.1 成分

蛋白胨	10.0 g
酵母浸膏	5.0 g
柠檬酸钠（Na3C6H507·2H20	10.0 g
硫代硫酸钠（$Na_2S_2O_3$）	10.0 g
氯化钠	10.0 g
牛胆汁粉	5.0 g
柠檬酸铁	1.0 g
胆酸钠	3.0 g
蔗糖	20.0 g
溴麝香草酚蓝	0.04 g
麝香草酚蓝	0.04 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.2.2 制法 将各成分溶于蒸馏水中，校正 pH 至 8.6±0.2，加热煮沸至完全溶解。冷至 50 ℃左右倾注平板备用。

A.3 3%氯化钠胰蛋白胨大豆琼脂

A.3.1 成分

胰蛋白胨	15.0 g
大豆蛋白胨	5.0 g
氯化钠	30.0 g
琼脂	15.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.3.2 制法

将A.3.1 中成分溶于蒸馏水中，校正 pH 至7.3±0.2，121 ℃高压灭菌15 min。

A.4 3%氯化钠三糖铁琼脂

A4.1 成分

蛋白胨	15.0 g
胨蛋白胨	5.0 g
牛肉膏	3.0 g
酵母浸膏	3.0 g
氯化钠	30.0 g
乳糖	10.0 g
蔗糖	10.0 g
葡萄糖	1.0 g
硫酸亚铁（$FeSO_4$）	0.2 g
苯酚红	0.024 g
硫代硫酸钠（$Na_2S_2O_3$）	0.3 g
琼脂	12.0 g
蒸馏水	1 000.0 mL

A.4.2 制法

将 A.4.1 中成分溶于蒸馏水中，校正 pH 至 7.4±0.2。分装到适当容量的试管中。121 ℃ 高压灭菌 15 min。 制成高层斜面，斜面长 4 cm～5 cm，高层深度为 2 cm～3 cm。

参 考 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].