

- [J]. *Nutr Res*, 2000, 20: 1309-1318.
- [8] 余焕玲, 毕研霞, 肖荣, 等. β 谷固醇对高脂饲料喂养小鼠空间学习记忆能力的影响 [J]. *首都医科大学学报*, 2008, 29(6): 724-727.
- [9] BURKE K T, COLVIN P L, MYATT L, et al. Transport of maternal cholesterol to the fetus is affected by maternal plasma cholesterol concentrations in the golden Syrian hamster [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(6): 1146-1155.
- [10] GOHARKHAY N, TAMAYO E H, YIN H, et al. Maternal hypercholesterolemia leads to activation of endogenous cholesterol synthesis in the offspring [J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2008, 199(3): 273. e1-273. e6.
- [11] PLOSCH T, KRUIT J K, BLOKS V W, et al. Reduction of cholesterol absorption by dietary plant sterols and stanols in mice is independent of the Abcg5/8 transporter [J]. *J Nutr*, 2006, 136: 2135-2140.
- [12] ELAHI M M, CAGAMPANG F R, ANTHONY F W, et al. Statin Treatment in hypercholesterolemic pregnant mice reduces Cardiovascular risk factors in their offspring [J]. *Hypertension*, 2008, 51: 939-944.
- [13] PALINSKI W, D' ARMIENTO F P, WITZTUM J L, et al. Maternal hypercholesterolemia and treatment during pregnancy influence the long-term progression of atherosclerosis in offspring of rabbits [J]. *Circ Res*, 2001, 89(11): 991-996.
- [14] SCHONFELD G. Plant sterols in atherosclerosis prevention [J]. *Am J Clin Nutr*, 2010, 92(1): 3-4.
- [15] 李翠珍, 赵刚. 耐力训练对雄性高脂膳食大鼠血清瘦素水平及性发育的影响 [J]. *沈阳师范大学学报: 自然科学版*, 2009, 27(1): 105-109.
- [16] 朱照平, 黄宇烽, 潘连军, 等. 营养性高脂血症对雄性新西兰兔睾丸和阴茎发育的影响 [J]. *中华男科学杂志*, 2005, 11(12): 904-907.

论著

副溶血性弧菌诊断血清的比较

陈敏 陈洪友 王刚毅 王文静 张曦
(上海市疾病预防控制中心, 上海 200336)

摘要:目的 比较我国自主生产和进口的副溶血性弧菌诊断血清在检出率、反应强度和特异性等方面的差异。方法 使用进口和我国自主生产的诊断血清同时对 35 株副溶血性弧菌标准菌株和 60 株临床菌株进行玻片凝集, 以检测其血清型。结果 对于参考菌株, 两者的检出率均为 100%, 对于临床株, 两者的一致率为 95%; 且两者的特异性均良好。结论 我国自主生产的副溶血性弧菌诊断血清性能良好, 可以用于副溶血性弧菌分型鉴定。

关键词:副溶血性弧菌; 诊断血清; 比较

中图分类号: R155.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2010)06-0493-05

Comparison of Diagnostic Serum Kits for *Vibrio parahaemolyticus*

CHEN Min, CHEN Hong-you, WANG Gang-yi, WANG Wen-jing, ZHANG Xi

(Shanghai Municipal Center for Disease Control & Prevention, Shanghai 200336, China)

Abstract: Objective To compare the antiserum kits for the diagnosis of *Vibrio parahaemolyticus* produced by DenKa SeiKen Corporation in Japan and Tianjin Biochip Corporation in China. **Method** The serotype of standard strains and clinical strains of *Vibrio parahaemolyticus* were detected by slide agglutination tests with antiserum kits from these two corporations. **Results** The detection rate of both kits for standard strains is 100%; the consistency of these two kits for clinical strains is 95%; and the specificity of both kits were good. **Conclusion** The diagnostic antiserum kit produced by Tianjin Biochip Corporation performed very well in this study, and can be used for the detection and identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; Diagnostic Antiserum; Comparison

收稿日期: 2010-06-25

基金项目: “艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项之能力建设项(2008ZX10004-002)

作者简介: 陈敏 男 副主任技师

通信作者: 张曦 女 主任医师 研究方向为病原微生物检验 E-mail: xzhang@scdc.sh.cn

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 广泛存在于海水和海产品中,是我国沿海地区常见的食物中毒病原菌。据报道我国沿海地区近 10 年来由该菌引起的食物中毒占细菌性食物中毒事件的首位^[1-3]。上海市 2004 年至 2008 年间的食物中毒资料显示,食物中毒患者肛拭标本中副溶血性弧菌的检出率分别为 36.34%、45.52%、31.34%、60.6%、52.8%,占检出阳性菌的首位,是引起食物中毒的主要致病菌^[4]。目前,根据 O 抗原和 K 抗原的不同对副溶血性弧菌进行血清分型,掌握副溶血性弧菌的血清型分布对于流行病学研究具有深远意义^[5-7]。以前,副溶血性弧菌诊断血清均为进口产品,价格昂贵,相关监测工作的成本很高。现在,天津生物芯片技术有限责任公司已自主研发出我国第一套副溶血性弧菌 O 抗原和 K 抗原诊断血清。为比较该诊断

血清分型的可靠性,选取 35 株副溶血性弧菌参考株、60 株副溶血性弧菌临床株、10 株弧菌属非副溶血性弧菌、5 株亲水气单胞菌、5 株大肠杆菌、5 株志贺菌、5 株沙门菌,平行用该诊断血清和相应的进口诊断血清进行检测比较,结果表明,国产的分型诊断血清与进口的分型效果一致,可以用于副溶血性弧菌监测中血清分型的研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

35 株副溶血性弧菌参考株。60 株副溶血性弧菌临床分离株。用于特异性验证的菌株:10 株弧菌属非副溶血性弧菌、5 株亲水气单胞菌、5 株大肠杆菌、5 株志贺菌、5 株沙门菌,其编号和来源见表 1。

表 1 用于特异性验证的菌株

名称	编号	来源
创伤弧菌	G2353	美国典型菌种保藏中心(ATCC)
河流弧菌	G2354	美国典型菌种保藏中心(ATCC)
弗氏弧菌	G2355	美国典型菌种保藏中心(ATCC)
拟态弧菌	G2358	天津出入境检验检疫局
河流弧菌	G2359	天津出入境检验检疫局
溶藻弧菌	G2360	天津出入境检验检疫局
霍利沙弧菌	G3391	上海市疾病预防控制中心
麦氏弧菌	G3393	上海市疾病预防控制中心
梅氏弧菌	G3395	上海市疾病预防控制中心
珊瑚鱼弧菌	G3403	上海市疾病预防控制中心
嗜水气单胞菌	G2775	德国微生物菌种保藏中心(DSMZ)
嗜水气单胞菌	G2738	中国医学微生物菌种保藏中心(CMCC)
亲水气单胞菌	G3379	上海市疾病预防控制中心
亲水气单胞菌	G3395	上海市疾病预防控制中心
嗜水气单胞菌	G3574	上海市疾病预防控制中心
大肠杆菌 O55	G1116	中国医学微生物菌种保藏中心(CMCC)
大肠杆菌 O157	G2735	中国疾病预防控制中心
大肠杆菌 O26	G2697	中国医学微生物菌种保藏中心(CMCC)
大肠杆菌 O111	G3429	美国典型菌种保藏中心(ATCC)
大肠杆菌 O115	G2921	中国医学微生物菌种保藏中心(CMCC)
痢疾志贺菌 1 型	G1018	中国疾病预防控制中心
福氏志贺菌 1a 型	G1030	中国疾病预防控制中心
福氏志贺菌 2a 型	G1032	中国疾病预防控制中心
福氏志贺菌 4b 型	G1035	中国疾病预防控制中心
宋内氏志贺菌 1 相	G1041	中国疾病预防控制中心
伤寒沙门菌	G2308	中国医学微生物菌种保藏中心(CMCC)
肠炎沙门菌	G2350	天津出入境检验检疫局
副伤寒沙门菌	G3426	中国医学微生物菌种保藏中心(CMCC)
猪霍乱沙门菌	G3427	中国医学微生物菌种保藏中心(CMCC)
猪霍乱沙门菌	G3428	中国医学微生物菌种保藏中心(CMCC)

1.2 分型血清

进口血清为日本生研株式会社 DenKa SeiKen 公司生产,共有 11 种 O 分型血清、9 种 K 多价及 65 种 K 单价因子血清,均在有效期内。

国产血清为天津生物芯片技术有限责任公司生

产,共有 1 种 O 多价及 13 种 O 分型血清、9 种 K 多价及 65 种 K 单价因子血清,均在有效期内。

1.3 副溶血性弧菌分离、鉴定

肛拭样品按 WS 271—2007《感染性腹泻诊断标准》进行检验;食品样品按 GB /T 478917—2008《食

品卫生微生物学检验 副溶血性弧菌检验》进行检验^[8]。可疑菌落进行氧化酶试验并接种 0、3%、7%、10% 氯化钠蛋白胨水和含 3% 氯化钠的乳糖、葡萄糖、甘露醇、蔗糖、肌醇、淀粉、精氨酸、赖氨酸等生化管,结果凡符合 0 和 10% 氯化钠蛋白胨水不生长而 3%、7% 氯化钠蛋白胨水生长,氧化酶、精氨酸、赖氨酸、葡萄糖、甘露醇、淀粉、动力阳性者可鉴定为副溶血性弧菌。

1.4 复苏菌种

用 3% NaCl 结晶紫增菌液复苏 VP, 37 °C 培养 18 ~ 24 h, 接种 TCBS 培养基, 37 °C 培养 18 ~ 24 h, 挑取绿色单菌落接种 3% NaCl TSA 斜面, 37 °C 培养 18 ~ 24 h, 并按 1.3 方法挑取单个菌落进行鉴定。

1.5 血清分型

按卫生防疫细菌手册^[9]和 GB /T 478917—2008《食品卫生微生物学检验 副溶血性弧菌检验》^[8]中的相关方法以及两种诊断血清中的说明书提供的方法进行血清分型。

表 2 35 株副溶血性弧菌参考菌株玻片凝集反应结果对比

菌株编号	血清型	检测结果		菌株编号	血清型	检测结果	
		进口血清	国产血清			进口血清	国产血清
G2854	O5	3+	3+	G2875	O5	3+	3+
	K17	4+	4+		K15	4+	4+
G2855	O9	4+	3+	G2876	O1	3+	3+
	K19	4+	4+		K56	4+	3+
G2856	O10	3+	4+	G2877	O4	3+	3+
	K24	4+	4+		K12	4+	4+
G2857	O7	3+	3+	G2878	O3	4+	4+
	K19	4+	4+		K33	4+	4+
G2858	O1	2+	3+	G2879	O4	4+	4+
	K32	4+	4+		K49	4+	4+
G2859	O1	3+	3+	G2880	O4	3+	3+
	K26	4+	4+		K63	4+	4+
G2860	O5	3+	3+	G2881	O1	3+	3+
	K47	4+	4+		K56	4+	3+
G2861	O11	3+	3+	G2882	O1	3+	3+
	K30	3+	3+		K56	4+	3+
G2863	O10	3+	4+	G2883	O3	4+	4+
	K52	4+	4+		K36	3+	3+
G2864	O2	3+	3+	G2884	O3	4+	4+
	K28	3+	3+		K48	4+	4+
G2865	O3	4+	4+	G2885	O5	3+	3+
	K33	4+	4+		K15	4+	4+
G2868	O1	3+	3+	G2887	O6	3+	3+
	K32	4+	4+		K18	4+	4+
G2869	O3	4+	4+	G2888	O6	3+	3+
	K6	4+	4+		K18	4+	4+
G2870	O3	4+	4+	G2890	O11	3+	3+
	K6	4+	4+		K40	3+	3+
G2871	O3	4+	4+	G2891	O11	3+	3+
	K6	4+	4+		K30	3+	3+
G2872	O5	3+	3+	G3383	O12	UN	3+
	K15	4+	4+		K17	4+	4+
G2873	O1	3+	3+	G3386	O13	UN	3+
	K38	4+	4+		K6	4+	4+
G2874	O4	3+	3+				
	K8	4+	4+				

注:1. 所有菌株均来自日本大阪微生物研究所;

2. UN 表示未检出;

3. 4+ 或 3+ 表示玻片凝集反应强度,反应强度判标准如下:

反应强度	判别依据
4+	反应澄清透明,凝集颗粒较多、较大
3+	反应澄清透明,凝集颗粒较多、较小
2+	反应有些混浊,但仍可见较多颗粒状凝集
1+	反应非常混浊,只有少许颗粒状凝集
-	反应完全混浊,未出现任何凝集

1.5.1 K 抗原检测 取 TSA 斜面培养物做玻片凝集实验(玻片凝集时间为 40 s)。用蜡笔在一张玻片上划出适当数量的间隔,先滴加多价 K 抗血清,与菌苔磨匀,出现凝集后再用对应的单价抗血清进行检测。阳性凝集反应可立即观察到。如与多价 K 血清均不凝集,取菌苔溶于 0.5 ml 3% NaCl 制成菌悬液,与 0.5 ml 0.2% 盐酸等体积混合,室温静置 30 min。4 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,用 3% NaCl 溶液重悬菌体,重复操作 1 次,用处理后的菌悬液重新进行 K 抗原检测,如仍为阴性,则培养物 K 抗原属于未知。用 3% NaCl 做自凝对照。

1.5.2 O 抗原检测 取菌苔与含 3% NaCl 的 5% 甘油溶液混匀制成菌悬液,121 °C 灭菌 1 h,以破坏 K 抗原,灭菌后 4 000 r/min 离心 15 min,弃上清液,用 3% NaCl 溶液重悬菌体。用蜡笔在一张玻片上划出适当数量的间隔,先滴加多价 O 群抗血清,与菌苔磨匀,出现凝集后再用对应的单价抗血清进行检测。如与 O 群血清均不凝集,将菌悬液再次 121 °C 灭菌 1 h 后重新检测。如仍为阴性,则培养物的 O 抗原属于未知。用 3% NaCl 做自凝对照。

1.5.3 特异性检验 取进口和国产诊断血清的 O1、O2、O3、O4、O5、O6、O7、O11、O12、O13 等 10 种 O 抗诊断血清和 K1、K3、K4、K5、K6、K7、K8、K9、K10、K21、K22、K23、K24、K25、K26、K28、K39、K40、K41、K42、K43、K44、K45、K55、K56、K57、K58、K59、K60、K61 等 30 种 K 抗诊断血清与标准菌株中任意 5 株非对应菌株(其他血清型)以及 10 株弧菌属非副溶血性弧菌、5 株亲水气单胞菌、5 株大肠杆菌、5 株志贺菌、5 株沙门菌进行玻片凝集反应(玻片凝集时间为 2 min),以检测这 40 种血清的种内和种间特异性。

2 结果

2.1 副溶血性弧菌标准菌株的玻片凝集结果

对于 35 株副溶血性弧菌参考菌株,进口诊断血清检出率为 94.3% (33/35),国产诊断血清的检出率均为 100%。进口血清因为缺乏 O12、O13 的抗血清,所以不能检出 O12、O13 两种血清型,但是对于其他血清型的检出率为 100%。见表 2。

2.2 副溶血性弧菌临床分离株的玻片凝集结果

对于 60 株副溶血性弧菌临床分离株,国产诊断血清和进口诊断血清的检测符合率为 95% (57/60)。对于检测结果有差异的 3 株临床分离株,进口诊断血清的检测结果为 O3:K6,而国产诊断血清的检测结果为 O13:K6。使用国产诊断血清检测时,O3 血清也存在 1+ 的反应强度,但是 O13 血

表 3 60 株副溶血性弧菌临床和环境分离菌株

菌株编号	来源	玻片凝集反应结果对比			一致性
		进口血清	国产血清		
vp07085	病人	O3 ,K6	O3 ,K6		是
vp07092	病人	O3 ,K6	O13 ,K6		否
vp07250	病人	O11 ,K36	O11 ,K36		是
vp07278	病人	O4 ,K68	O4 ,K68		是
vp07316	病人	O4 ,K9	O4 ,K9		是
vp07319	病人	O4 ,K8	O4 ,K8		是
vp07322	病人	O1 ,K32	O1 ,K32		是
vp07334	病人	O1 ,K32	O1 ,K32		是
vp07364	食物中毒病人	O11 ,K36	O11 ,K36		是
vp07365	食物中毒病人	O4 ,K9	O4 ,K9		是
vp07384	病人	O4 ,K8	O4 ,K8		是
vp07419	食物中毒病人	O4 ,K68	O4 ,K68		是
vp07422	病人	O3 ,K6	O3 ,K6		是
vp08001	病人	O1 ,K32	O1 ,K32		是
vp08002	环境水样	O12 ,K66	O12 ,K66		是
vp08003	环境水样	O10 ,K24	O10 ,K24		是
vp08005	环境水样	O10 ,K24	O10 ,K24		是
vp08006	病人	O3 ,K54	O13 ,K54		否
vp08008	病人	O3 ,K6	O3 ,K6		是
vp08011	病人	O4 ,K68	O4 ,K68		是
vp08019	病人	O4 ,K68	O4 ,K68		是
vp08028	病人	O3 ,K6	O3 ,K6		是
vp08030	病人	O3 ,K6	O3 ,K6		是
vp08041	病人	O11 ,K36	O11 ,K36		是
vp08049	病人	O11 ,K36	O11 ,K36		是
vp08053	病人	O4 ,K42	O4 ,K42		是
vp08066	病人	O1 ,K25	O1 ,K25		是
vp08073	病人	O1 ,K56	O1 ,K56		是
vp08075	病人	O1 ,K56	O1 ,K56		是
vp08084	病人	O11 ,K36	O11 ,K36		是
vp08087	病人	O1 ,K56	O1 ,K56		是
vp08088	病人	O4 ,K9	O4 ,K9		是
vp08467	病人	O8 ,K20	O8 ,K20		是
vp08470	食品	O3 ,K31	O3 ,K31		是
vp08476	病人	O4 ,K8	O4 ,K8		是
vp08500	病人	O4 :K9	O4 ,K9		是
vp08633	病人	O8 ,K41	O8 ,K41		是
vp08672	病人	O1 ,K41	O1 ,K41		是
vp08675	食物中毒病人	O4 ,K8	O4 ,K8		是
vp08832	病人	O4 ,K8	O4 ,K8		是
vp09038	病人	O2 ,K28	O2 ,K28		是
vp09040	病人	O1 ,K25	O1 ,K25		是
vp09079	食品	O5 ,K30	O5 ,K30		是
vp09081	食品	O4 ,K42	O4 ,K42		是
vp09084	食物中毒病人	O9 ,K44	O9 ,K44		是
vp09093	食品	O12 ,K66	O12 ,K66		是
vp09135	病人	O1 ,K56	O1 ,K56		是
vp09144	病人	O11 ,K36	O11 ,K36		是
vp09278	食品	O3 ,K33	O3 ,K33		是
vp09287	病人	O4 ,K13	O4 ,K13		是
vp09301	病人	O4 ,K13	O4 ,K13		是
vp09421	病人	O3 ,K6	O3 ,K6		是
vp09442	病人	O3 ,K6	O13 ,K6		否
vp09628	病人	O3 ,K6	O3 ,K6		是
vp09631	病人	O3 ,K6	O3 ,K6		是
vp09639	病人	O4 ,K68	O4 ,K68		是
vp09671	病人	O8 ,K41	O8 ,K41		是
vp09796	病人	O4 ,K68	O4 ,K68		是
vp09799	病人	O11 ,K36	O11 ,K36		是
vp09985	病人	O4 ,K11	O4 ,K11		是

清反应强度为 4+。关于 O3 和 O13 的抗原结构是否存在关联,需要在以后的实验中继续研究,见表 3。

2.3 两者的对比

对于参考菌株,两种诊断血清的检测结果一致率为 100%,对于分离菌株两者的一致率为 95% (57/60),两种诊断血清的反应强度比较见表 4。

表 4 两种诊断血清对参考菌株的反应强度

血清型	试剂名称	检测参考菌株数量	反应强度(数量)			
			4+	3+	2+	≤1+
O 抗血清	进口试剂	35	9	23	1	2
	国产试剂		10	25	0	0
K 抗血清	进口试剂	35	31	4	0	0
	国产试剂		28	7	0	0

两种诊断血清的反应强度几乎没有差异。O 抗血清反应强度在 3+ 以上的,国产诊断血清占 100%,进口诊断血清占 97%。K 抗血清反应强度在 3+ 以上的,国产的和进口的均占 100%。

所选国产诊断血清与进口诊断血清中的不同血清与 5 株非对应菌株(其他血清型)、10 株弧菌属非副溶血性弧菌、5 株亲水气单胞菌、5 株大肠杆菌、5 株志贺菌、5 株沙门菌的玻片凝集结果均在 2+ 以下,即为阴性反应,表明国产诊断血清与进口诊断血清的种内和种间特异性均良好。

3 讨论

副溶血性弧菌包括 O、K 及 H 3 种抗原。O 抗原为细胞壁脂多糖最外层的特异多糖,K 抗原为荚膜多糖,H 抗原为鞭毛抗原。所有副溶血性弧菌的 H 抗原均相同,但是 O 抗原和 K 抗原存在差异,至今已发现有 13 个 O 群及 65 个 K 抗原,可分成 845 个血清型。

两种诊断血清都在规定的 40 s 反应时间内出

了结果,总体来看,进口血清的反应时间要稍快于国产血清。

无论是针对参考菌株还是临床分离株的检测,国产诊断血清与进口诊断血清的检测结果显示了高度的一致性,同时检测特异性良好。特别是,国产诊断血清比进口诊断血清增加了 1 种多价 O 抗血清和 O12、O13 两种 O 单价抗血清,提高了检出率。总之,国产副溶血性弧菌 O 和 K 抗原诊断血清可以满足对副溶血性弧菌检测的需要。

参考文献

- [1] 张宏伟,付建荣,苏东,等. 弧菌科细菌致急性腹泻的流行病学调查[J]. 中华医学检验,1996,19:451.
- [2] 刘弘,王科家,杨召萍. 上海市集体性食物中毒分析[J]. 上海预防医学杂志,2003,15(11):454-456.
- [3] 黎薇,方伟,柯昌文,等. 广东省 2003~2008 年副溶血性弧菌血清学分型研究[J]. 中国病原生物学杂志,2009,4:7.
- [4] 杨丽华,陈洪友,王小光,等. 副溶血性弧菌食物中毒分离株的血清型、耐药性及毒力基因检测[J]. 中华医学检验,2009,19:12.
- [5] OKUDA J, ISHIBASHI M, HAYAKAWA E, et al. Emergence of unique O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* in Calcutta, India, and isolation of strains from the same clonal group from Southeast Asian travelers arriving in Japan [J]. J Clin Microbiol, 1997, 35(12): 3150-3155.
- [6] CHIOU C S, HSU S Y, CHIU S I, et al. *Vibrio parahaemolyticus* serovar O3:K6 as cause of unusually high incidence of foodborne disease outbreaks in Taiwan from 1996 to 1999 [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(12): 4621-4625.
- [7] WONG Hinchung, LIU Shuhui, KU Leewen, et al. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolates obtained from foodborne illness outbreaks during 1992 through 1995 in Taiwan [J]. J Food Prot, 2000, 63(7): 900-906.
- [8] 中华人民共和国卫生部. GB/T 47897—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.
- [9] 何晓青. 卫生防疫细菌检验[M]. 北京:新华出版社, 1989.