

研究报告

双重聚合酶链式反应快速筛查副溶血性弧菌流行株方法应用与评价

宋元君^{1,2}, 陈洪友¹, 陈涌¹, 罗嘉远¹, 张曦¹, 陈敏¹

(1.上海市疾病预防控制中心, 上海 200336; 2.复旦大学公共卫生学院, 上海 200032)

摘要:目的 基于种属特异性 *tlh* 基因和典型毒力基因 (*tdh1_368* 特异性位点) 建立双重聚合酶链式反应 (duplex PCR, DPCR) 检测副溶血性弧菌 (VP) 体系并评价。方法 对建立的 DPCR 检测体系, 用单盲法评估特异性和灵敏度, 用人工模拟样品、腹泻标本和水产品进行现场方法学评估。结果 该法具有高特异性 (100%) 和灵敏度 ($\geq 1.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$), 用所建立的方法和培养法平行检测腹泻标本、市售水产品中的 VP, 阳性率差异无统计学意义, 对 VP 流行株的正确判断率为 93.5% (29/31); 对腹泻标本 24 h 内、模拟样品增菌后 4~8 h 内检测并报告 VP 大流行株。结论 DPCR 结合常规样品增菌能加快样品中 VP 的检测和报告, 为及时处理疫情提供技术支持。

关键词: 副溶血性弧菌; 双重聚合酶链式反应; 大流行菌群; 快速

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2019)04-0330-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2019.04.006

Application and evaluation of duplex polymerase chain reaction for rapid screening of epidemic *Vibrio parahaemolyticus* strains

SONG Yuanjun^{1,2}, CHEN Hongyou¹, CHEN Yong¹, LUO Jiayuan¹, ZHANG Xi¹, CHEN Min¹

(1. Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China;

2. School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: Objective To establish and evaluate a duplex polymerase chain reaction (DPCR) system of species-specific *tlh* gene and typical virulence gene (*tdh1_368*) of *Vibrio parahaemolyticus* (VP). **Methods** The DPCR system was evaluated by single blind method for specificity and sensitivity, and the field methodological evaluation was carried out by artificially contaminated samples, diarrhea fecal samples and aquatic products. **Results** The developed method had high specificity (100%) and high sensitivity ($\geq 1.5 \text{ ng}/\mu\text{l}$). No significant difference in the VP positive rate of diarrhea samples and aquatic products detected by this method and culture method. This method confirmed that the VP epidemic strain within diarrhea samples was 93.5% (29/31); DPCR could report VP epidemic clones within 24 hours with diarrhea specimens and 4-8 hours after enrichment of artificially contaminated samples. **Conclusion** DPCR combined with routine bacterial enrichment method could shorten the reporting time of monitoring and processing time of emergency samples, DPCR could help improve the prediction, early warning and traceability of VP epidemic clones, and improve the efficiency of public health disposal and control.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; duplex polymerase chain reaction; epidemic clones; rapidly

副溶血性弧菌 (VP) 在过去 20 多年里一直是国内沿海各省首位细菌性食物中毒病原菌, 多见于鱼、虾、蟹和贝类等海水鱼介^[1-2]。近年, 随着经济发展、人民消费水平能力提高, 对养殖水产品的规

模和消费量不断增加, 由 VP 所致散发和暴发病例在肠道腹泻病流行季节常形成典型的流行曲线。因而, 针对高毒力 VP 流行克隆的快速甄别具有重要公共卫生意义。本研究基于 VP 典型毒力基因 VP-*tdh* 结合种属特异性基因, 建立可同步检测并鉴别 VP 流行株的双重聚合酶链式反应 (VP-DPCR) 快速检测方法, 可直接用于原始样品或标本 (食品、粪便) 中副溶血性弧菌大流行株的筛查。

收稿日期: 2019-07-09

基金项目: 上海市卫生和计划生育委员会青年课题 (20164Y0084); 艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治专项-致病菌血清型分子鉴定技术体系的应用性研究 (2017ZX10303405-004)

作者简介: 宋元君 男 主管技师 研究方向为肠道细菌检测

E-mail: songyuanjun@scdc.sh.cn

通信作者: 陈敏 男 主任技师 研究方向为细菌病原学检测

E-mail: chenmin@scdc.sh.cn

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂

核酸浓度检测仪 (美国赛默飞)、PCR 扩增仪

(美国伯乐)。碱性蛋白胨水(APW)、哥伦比亚血琼脂平板、硫代硫酸钠枸橼酸盐胆盐蔗糖琼脂平板(TCBS)、弧菌显色琼脂平板、3% NaCl 营养琼脂平板均购自上海市疾病预防控制中心,琼脂糖(日本 Takara),VP 分型血清(日本生研),含高保真酶 PCR 预混液和相关引物(上海生工生物工程股份有限公司),所有试剂均在有效期内使用。

1.1.2 试验菌株

本次研究 VP-DPCR 利用的 30 株 VP 菌株均购自上海市疾病预防控制中心菌毒种保藏中心,VP 菌株背景见表 1。按照文献定义副溶血性弧菌高毒

力流行克隆条件:满足 *tdh* 与群特异性 PCR (group specific PCR,GS-PCR)同时阳性^[3]。实验室方法评估的阴性菌株(15 株):溶藻弧菌(总 12-90)、嗜水气单胞菌(CGMCC 11801)、拟态弧菌(ATCC 33653)、O1 群埃尔托霍乱弧菌(SCDC 2016-8)、阴沟肠杆菌(总 214-88)、大肠埃希菌(CICC 10907)、克罗诺杆菌(ATCC 51329)、蜡样芽胞杆菌(CMCC 63303)、类志贺邻单胞菌(ATCC 14029)、鼠伤寒沙门菌(ATCC 14028,JSSM 16154)、单核细胞增生李斯特菌(ATCC 19115)、空肠弯曲菌(ATCC 33291)、金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、痢疾志贺菌(CMCC 51105)。

表 1 DPCR 检测方法实验室评估所用 VP 菌株背景信息

Table 1 Background information of VP strains used for laboratory evaluation of DPCR assay

序号	菌株	年代	地区	血清型	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	GS-PCR	流行株
1	127-96	1996	上海卢湾	O3:K6	+	-	+	是
2	肛 88	2012	上海浦东	O3:K6	+	-	+	是
3	03959/3	2012	上海闵行	O3:K7	+	-	+	是
4	F542	2011	上海嘉定	O10:K60	+	-	+	是
5	F346	2012	上海嘉定	O1:K36	+	-	+	是
6	1717	2012	上海黄浦	O1:K25	+	-	+	是
7	1200154	2012	上海普陀	O1:KUT	+	-	+	是
8	qpvp120023	2012	上海青浦	O3:KUT	+	-	+	是
9	1201412	2012	上海普陀	O4:K68	+	-	+	是
10	VP140897	2014	上海普陀	O4:KUT	+	-	+	是
11	VP140988	2014	上海杨浦	O8:K41	+	-	+	是
12	VP140987	2014	上海杨浦	O3:K6	+	-	+	是
13	VP141285	2014	上海闸北	O10:K60	+	-	+	是
14	VP160114	2016	上海青浦	O1:K36	+	-	+	是
15	VP160115	2016	上海青浦	O3:K6	+	-	+	是
16	AQ4037	1985	日本	O3:K6	-	+	-	否
17	42-88	1987	辽宁营口	O3:K6	-	+	-	否
18	163-86	1986	上海虹口	O1:K25	+	-	-	否
19	虹 353	1983	上海虹口	O4:K8	+	-	-	否
20	229-91	1991	上海卢湾	O3:K6	-	-	+	否
21	828-1	2012	上海崇明	O4:K9	+	-	-	否
22	肠 1120	2011	上海嘉定	O4:K12	+	+	-	否
23	PD417	2012	上海浦东	O3:K29	+	-	-	否
24	F270	2011	上海嘉定	O1:K33	-	-	-	否
25	VP141114	2014	上海青浦	O4:K12	+	+	-	否
26	VP141167	2014	上海松江	O2:K3	+	-	-	否
27	VP140160	2014	上海奉贤	O2:K28	-	-	-	否
28	VP160255	2016	上海松江	O4:K8	+	-	-	否
29	VP160250	2016	上海宝山	O1:K64	-	-	+	否
30	ATCC 17802	1950	日本	O1:K1	+	-	-	否

1.2 方法

1.2.1 VP-DPCR 体系优化和方法建立

选择 VP 特异性编码基因 *tlh* 序列^[4]和 VP 大流行株编码基因 *tdh1_368*^[5]。引物序列通过 BLAST 在线与 GenBank 数据库比对,未发现与其他物种核酸序列存在非特异结合,且验证 DPCR 体系可识别大流行菌群 *tdh1_368* 和非大流行的 VP 序列。*tlh* 和 *tdh1_368* 扩增产物分别为 450 和 208 bp,所有引物以灭菌去离子水配成 10 μmol/L 的使用浓度。通

过 Prime STAR Max DNA Polymerase 高保真酶和普通 *Taq* 酶进行体系比较与优化,反应体系中退火温度(55、58、62、64 ℃)、引物浓度组合等因素进行试验优化。本次研究涉及引物和相关参数,见表 2。VP-DPCR 操作流程:菌株培养和 DNA 提取(菌株接种于哥伦比亚血琼脂平板,36 ℃ 培养 18~24 h,挑取 2~3 个单个菌落于 100 μl 灭菌去离子水混匀,密封置 95 ℃ 10 min 后于 12 000 r/min 离心 5 min,上清液为 DNA 模板);电泳:取 5 μl

DPCR 产物和 2 μl 加样缓冲液充分混匀,加入 1% 琼脂糖凝胶(0.1 μg/ml 溴化乙锭),电泳缓冲液为

0.5×TBE,电压为 6 V/cm,电泳时间 30 min,取胶块置紫外灯观察。

表 2 PCR 引物及其使用参数

Table 2 Primer pairs and their parameters

引物	序列(5'-3')	产物/bp	文献
<i>tdh</i>	F: GTAAAGGTCTCTGACTTTTGGAC	270	[4]
	R: TGGAATAGAACCTTCATCTTCACC		
<i>trh</i>	F: TTGCTTCGATATTTTCAGTATCT	486	[4]
	R: CATAACAAACATATGCCCATTTCC		
<i>toxR-S</i>	F: TAATGAGGTAGAAACA	651	[6]
	R: ACGTAACGGGCTTACA		
<i>tdh1_368</i> 本研究	F: GTCATTCTGCTGTGTTTCGTAAAATCGTG	208	[5]
	R: AAAAACGATTCTTTGTTGGATATACACATTACCAA		
<i>tlh</i> 本研究	F: AAAGCGGATTATGCAGAAGCACTG	450	[4]
	R: GCTACTTTCTAGCATTCTCTGCG		

1.2.2 DPCR 的实验室评价

使用参考菌株评价 DPCR 的特异性和灵敏度。特异性验证:使用 30 株 VP 和 15 株非 VP 菌株,采用单盲法将所有参考菌株重新编号,以灭菌蒸馏水为阴性对照,按照 DPCR 优化后流程进行;灵敏度验证:挑取 VP 大流行株(VP160115),复苏后用灭菌双蒸水制成悬液,95 °C 处理 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液作为核酸模板进行连续梯度稀释,用核酸浓度检测仪测试并确认核酸浓度呈 10 倍梯度稀释,以灭菌蒸馏水为阴性对照,按照 DPCR 优化后流程进行。

1.2.3 DPCR 的模拟加标样品回收与评价

挑选 VP 大流行株(VP160115)经 3%NaCl 营养琼脂平板 18 h 培养,以灭菌磷酸缓冲盐溶液作 10 倍梯度稀释,选取 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 倍稀释液进行双平板计数,计算平均细菌菌落总数。吸取菌液浓度分别为 10¹、10²、10³ CFU/ml 的 VP 菌液各 1 ml,分别加

入 25 g 生鱼肉、青口贝的预处理模拟样品(样品经 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》^[7] 确认为 VP 阴性),倒入 225 ml 的 APW,以生理盐水作为空白对照。人工染菌样品置(36±1)°C、150 r/min 摇床振荡培养。增菌 4、6、8、10、18 h,各取培养液 1 ml,进行菌液 DNA 提取,取 1.5 μl 进行 DPCR 检测,试验重复 3 次。

1.2.4 DPCR 的临床腹泻标本检测

2016 年 6~9 月,选择上海地区 6 家腹泻监测点医院,腹泻监测病例标本 266 例,单盲法比较 DPCR 和常规分离方法:粪便拭子于 3%NaCl 的 APW 中置(36±1)°C 培养 6 h 后取 100 μl 增菌液提取核酸进行 DPCR,同时划线分离 TCBS 和弧菌显色平板,于(36±1)°C 培养 18~24 h,挑取可疑菌落进行生化初筛和鉴定,对符合 VP 表型特征者进行 *tdh*、*GS-PCR*、*trh* 毒力基因等大流行株的确认,见图 1。

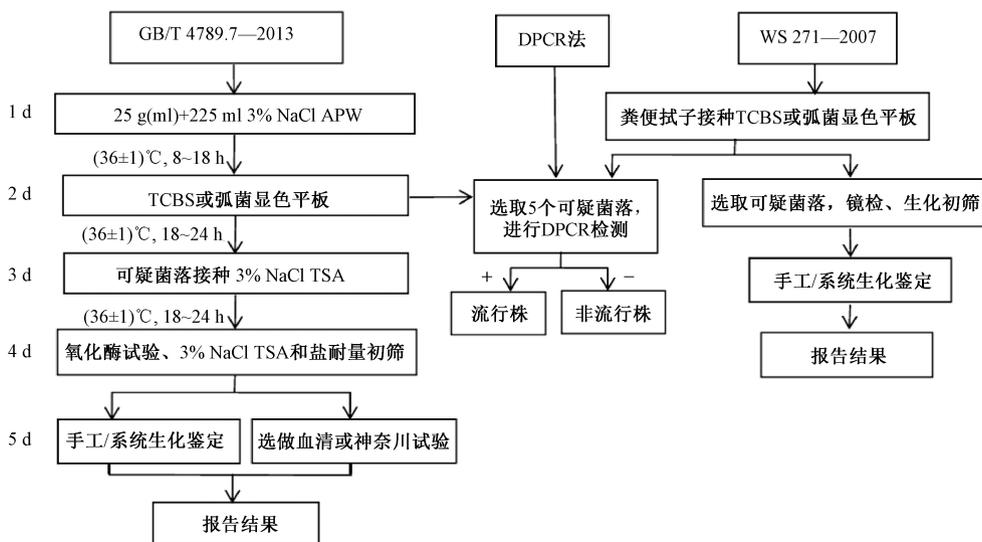
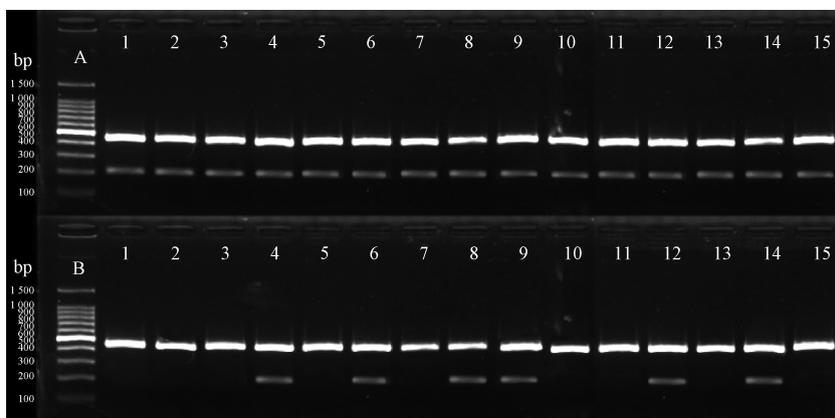


图 1 DPCR 和常规培养法检测腹泻标本和市售水产品技术完成路线图

Figure 1 Technical completion roadmap of DPCR and conventional culture for detecting diarrhea specimens and marketing aquatic products

1.2.5 DPCR 的市售水产品样品检测

2016 年腹泻病流行季节,选择 2 家超市和农贸市场主动采集 30 份海水鱼介产品,单独包装当天送实验室,取贝类内容物,包括贝肉和体液;鱼类取表面组织、肠或鳃;甲壳类取动物的中心部分,包括肠和鳃。处理样品 25 g(ml),加 3% NaCl 的 APW 225 ml 制成 1:10 混匀液,(36±1)℃ 培养 18 h 后挑取增菌液接种选择性平板划线、分离、培养。另取增菌液 1 ml,10 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,沉淀加入 100 μl 灭菌去离子水振荡混匀,95℃ 热裂解 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,上清液为 DNA 模板进行 DPCR 检测,见图 1。



注:A:高保真酶;B:普通 Taq 酶;1~15 分别对应表 1 中的 15 株 VP 大流行株

图 2 DPCR 体系中使用高保真酶和普通 Taq 酶的电泳图谱

Figure 2 Electrophoretic mapping of high fidelity enzyme and common Taq enzyme in DPCR system

2.2 DPCR 的特异性和灵敏度

单盲法验证 30 株 VP 和 15 株非 VP 菌株的特异性,30 株 VP、15 株非 VP 菌株结果无异议。30 株 VP 中的 15 株 VP 流行株的 *tlh* 和 *tdh1_368* 均呈阳性,15 株 VP 非流行株均为 *tlh* 阳性,其余 15 株非 VP 菌株的模板验证也均为阴性,即 DPCR 方法的特异性为 100%;未发现假阳性和假阴性结果。DPCR 的灵敏度选择 VP 大流行株(VP160115),模板浓度在 150、15、1.5 ng/μl 均有较好扩增条带,模板浓度为 0.15 ng/μl 时未出现完整扩增条带,判定 DPCR 对 VP 大流行株最低检出为 1.5 ng/μl。

2.3 DPCR 的模拟加标样品的回收检测

1 份青口贝和 1 份生鱼肉经 APW 增菌培养,当 VP 大流行株初浓度为 10³ CFU/ml 时,增菌 4 h 后 DPCR 即可证实流行株(*tdh1_368*)、增菌 6 h 后培养法证实 VP 菌落;当初始菌为 10² 和 10¹ CFU/ml 时,增菌 8 h 后 DPCR 可证实流行株(*tdh1_368*)并通过培养法证实 VP 菌落。

2.4 DPCR 在临床粪便标本的应用评价

2016 年 6~9 月 6 家哨点医院的腹泻病例标本

2 结果

2.1 DPCR 终体系

选取 15 株 VP 大流行株进行 DPCR 体系优化试验。在比较两种 DNA 聚合酶体系后选择含高保真酶的 PCR 预混液,其反应条件:95℃ 3 min (95℃ 变性 30 s;62℃ 退火 1 min;72℃ 延伸 1 min)、热循环 30 次,72℃ 延伸 5 min,4℃ 维持。25 μl 反应体系:含高保真酶 PCR 预混液 12.5 μl、*tlh* 和 *tdh1_368* 上下游引物各 1 μl,DNA 模板 1.5 μl,以灭菌去离子水补足体系至 25 μl。15 株 VP 大流行株在最终的 DPCR 反应体系(包括引物浓度、DNA 聚合酶、退火温度)优化效果见图 2。

共 266 份,粪便拭子经增菌在 24 h 内 DPCR 证实 31 份标本为 *tlh* 阳性,其中 29 份为大流行株(*tdh1_368* 阳性);常规培养法 3 d 后确认 31 份标本 VP 阳性并检出菌株,阳性率均为 11.7%。VP 菌株经 *trh*、*tdh*、GS-PCR 验证:其中的 29 株为 VP 大流行株,占 93.5%,病原学结果与 DPCR 诊断一致;31 株 VP 涵盖 4 种血清型:O3:K6(22 株)和 O4:K68(7 株)符合国内已知 VP 流行株表型,O4:KUT(1 株)和 O3:K5(1 株)为 VP 不常见非流行株,见表 3。

表 3 DPCR 和常规分离方法在临床腹泻标本的单盲比较和评价

Table 3 Application of DPCR in clinical specimens and serology identification

DPCR	GS-PCR		血清型
	GS-PCR+ <i>tdh</i> +/ <i>trh</i> -	GS-PCR- <i>tdh</i> -/ <i>trh</i> -	
<i>tdh1_368</i> +/ <i>tlh</i> +	29	0	O3:K6(22),O4:K68(7)
<i>tdh1_368</i> -/ <i>tlh</i> +	0	1	O4:KUT(1),O3:K5(1)

2.5 DPCR 在市售水产品的应用评价

30 份市售水产品经增菌后 DPCR 和培养法检测。DPCR 在 24 h 内检出 20 份样品为 VP 阳性,1 份扇贝样品检出为大流行株(*tdh1_368*);培养法

5 d后证实 20 株均为 VP 非流行株,未从扇贝中分离到 VP 大流行株。虽然两者的病原学结果一致,但 DPCR 提示扇贝样品存在 VP 大流行株污染的潜在可能。

3 讨论

传统 GS-PCR 法甄别 VP 大流行株的前提是首先分离到 VP 菌株,是建立在病原学之上的毒力鉴别,缺少实际案例的诊断意义^[8]。虽能满足 VP 在血清型与毒力型间的标准化分型共识,始终在 VP 食源性暴发调查中缺少有效作用。有学者在 GS-PCR基础上调整耐热直接溶血素(TDH)基因建立的双重 PCR 定义 VP 流行株,即 GS-PCR 和 TDH 同时阳性即可定义为流行株^[5,9]。本次研究的技术路线是基于 *tdh1_368* 的 VP 大流行株靶点^[5],增加识别诊断 VP 的种特异性靶点而形成满足样品中 VP 诊断需要,同步识别 VP 流行株(包括大流行株)的 DPCR。经实验室保存菌株(特异性和灵敏度)、模拟加标样品回收、腹泻标本和水产品样品的方法比对等,较全面完成 DPCR 的应用评价。目的是通过更简便的快速方法解决 VP 大流行菌群在精准监测和应急事件中的实验室应用。

经过参考菌株(VP 种内外)验证 DPCR 提示本次所用引物和酶的 DPCR 反应体系具有很好的预期一致性,初步达到诊断 VP 和识别大流行株效果。检测周期为 3 h,适用于基层单位开展对临床和食品样品的 VP 检测工作。不足之处在于本研究所用参考菌株和数量存在一定局限性,同时只是针对核酸的定性检测。

本次的 DPCR 体系应用在腹泻病例的增菌样品可排除杂菌干扰,替代多个 VP 毒力基因检测,达到同步诊断和识别 VP(流行群)的效果,相对常规分离方法的检测周期,更加简便有效。该体系如应对暴发病例^[10-14],结合常规病原学培养和血清学分型技术及分子分型等手段便于发现 VP 新流行克隆,更可以快速处置由 VP 引起的公共卫生事件。本次 DPCR 从 1 份扇贝样品中检出 VP 大流行株而培养法未能证实 VP 病原的现象显示:DPCR 作为快速有效的诊断方法,提示潜在的 VP 流行克隆的污染,加强针对流行克隆的培养、分离、筛选需要进一步研究。此外,研发 DPCR 定量检测,结合数字 PCR 能够应用于风险评估和风险预警等领域,拓展非培养技术的可推广和应用范围。

本次研究证实,上海市流行季节 VP 导致的腹泻病例 90%以上仍和其大流行株有关,上海市流通的贝壳水产品中有潜在大流行株污染的食品安全

风险。和常规方法检测 VP 比较,DPCR 具有快速、准确识别 VP 流行和非流行株的重要公共卫生作用。对于沿海地区识别和溯源食源性暴发案例中可疑污染源具有更为精准的防控技术和储备应用,可弥补常规经典培养方法的不足。

(志谢 上海市卫生健康委员会吴凡副主任对本研究在设计及文章撰写方面给与的指导与帮助)

参考文献

- [1] 陈洪友,屠丽红,陈敏,等.贝类水产中副溶血性弧菌菌型分布研究[J].疾病监测,2014,29(7):522-527.
- [2] BROBERG C A, CALDER T J, ORTH K. *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants[J]. Microbes Infect, 2011,13 (12/13):992-1001.
- [3] GINOVAR T M, PRATS C, PORTELL X, et al. Analysis of the effect of inoculum characteristics on the first stages of a growing yeast population in beer fermentations by means of an individual-based model[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2011,38 (1):153-165.
- [4] 胡玉山,王鸣,杜琳,等.副溶血性弧菌流行群特异多重 PCR 鉴定[J].中国公共卫生,2007,23(5):581-582.
- [5] 陈洪友,屠丽红,宋元君,等.基于 *tdh1* 基因变异的大流行副溶血性弧菌鉴别方法的建立[J].中国食品卫生杂志,2015,27(4):353-358.
- [6] 韩艳青,侯凤伶,张淑红,等.基于多重 PCR 的副溶血弧菌大流行菌群及其毒力基因检测方法的建立与评价[J].疾病监测,2016,31(9):750-754.
- [7] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验:GB 4789.7—2013[S].北京:中国标准出版社,2013.
- [8] 刘秀梅,陈艳,王晓英,等.1992—2001 年食源性疾病暴发资料分析——国家食源性疾病监测网[J].卫生研究,2004,33(6):725-727.
- [9] MATSUMOTO C, OKUDA J, ISHIBASHI M, et al. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses[J]. J Clin Microbiol, 2000,38(2):578-585.
- [10] 陆欣,徐斌,陈欢,等.一起副溶血性弧菌引起的食源性疾病事件调查[J].预防医学,2019,31(3):302-304,308. DOI:10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2019.03.020.
- [11] 李静华,张锦芳,周辉映,等.一起旅行团副溶血性弧菌食物中毒调查分析[J].预防医学情报杂志,2019,35(3):276-279,283.
- [12] 萧松建,周奕,龚红英,等.一起副溶血性弧菌食物中毒调查[J].中国热带医学,2018,18(10):1046-1049. DOI:10.13604/j.cnki.46-1064/r.2018.10.19.
- [13] 曹志玲.一起副溶血性弧菌食源性疾病暴发事件的调查[J].中国药物与临床,2019,19(4):564-566. DOI:10.11655/zgywylc2019.04.012.
- [14] 施怡茹,陈洪友,卢晓芸,等.一起多血清型副溶血性弧菌聚集性腹泻事件的病原分析[J].检验医学与临床,2018,15(24):3662-3666. DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.24.006.