

荧光 PCR 和 PFGE 在副溶血弧菌食物中毒诊断中的应用研究

兰全学¹, 李庆阁², 扈庆华¹, 石晓路¹, 王冰¹, 林一曼¹

摘要: [目的] 探讨荧光 PCR 和脉冲场电泳 (PFGE) 在副溶血弧菌食物中毒调查中的应用。[方法] 对中毒样品进行荧光 PCR 检测, 副溶血弧菌临床分离株基因组 DNA 经 NotI 酶切, 通过 PFGE 获得电泳图谱, 利用 BioNumerics 软件对图谱进行聚类分析。[结果] 部分样品荧光 PCR 检测结果呈阳性, 同起食物中毒菌株 PFGE 图谱一致。[结论] 荧光 PCR 可以快速准确的鉴定病原体。PFGE 具有很强的菌株同源性分析能力, 适用于食物中毒病原学鉴定和传染源溯源。荧光 PCR 和 PFGE 在食物中毒的快速诊断中可发挥重要作用。

关键词: 荧光 PCR; 脉冲场电泳; 副溶血弧菌食物中毒

APPLICATION OF REAL-TIME PCR AND PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS IN THE DIAGNOSIS OF VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS FOOD POISONING LAN Quan-xue, LI Qing-ge, HU Qing-hua, et al. (Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China)

Abstract: [Objective] To explore the application of real-time PCR and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in the investigation of *Vibrio parahaemolyticus* food poisoning. [Methods] The poisoning samples were assayed by real-time PCR. *Vibrio parahaemolyticus* strains were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis with restriction enzyme NotI. PFGE patterns of isolates were clustered using BioNumerics software. [Results] Some samples were positive using real-time PCR assay. PFGE patterns of strains from the same outbreak of food poisoning were identical. [Conclusions] Real-time PCR can be applied in the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. PFGE has high resolution, which enables itself to identify pathogen and trace infection sources. Real-time PCR and PFGE should play important roles in food poisoning diagnosis.

Key words: Real-time PCR; Pulsed-field gel electrophoresis; Food poisoning of *Vibrio parahaemolyticus*

副溶血弧菌是一种嗜盐的革兰阴性短杆菌, 常存在于近海水、海产品及盐渍食品中, 是我国沿海地区夏、秋季食物中毒的主要病原菌^[1]。目前, 副溶血弧菌的检测主要依靠传统的分离培养及生化鉴定, 需要耗费大量的时间和人力, 不能满足公共卫生快速反应体系的需求。荧光 PCR 检测技术是近年来发展起来的新兴 PCR 技术, 具有比传统 PCR 具有更快速、更特异和更敏感的优势。此外, 对分离菌株进行分子分型, 有利于进一步确认食物中毒病原体和传染源溯源。目前分子分型包括脉冲场凝胶电泳、多位点序列分析、随机扩增多态性分析和核糖体分型等技术, 其中 PFGE 被认为是分子分型的“金标准”。为了探讨荧光 PCR 和 PFGE 在食物中毒调查中的作用, 本文分析了荧光 PCR 和 PFGE 用于两起副溶血弧菌食物中毒调查的情况。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与标本 深圳市 2006 年 6 月一起副溶血弧菌食物

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30300281), 广东省卫生厅资助项目 (A2003709)

作者简介: 兰全学 (1977-), 男, 技师, 硕士, 研究方向: 微生物检验

通讯作者: 扈庆华, E-mail: huqinghua03@163.com

作者单位: 1 深圳市疾病预防控制中心, 深圳, 518020; 2 厦门大学

中毒病人肛拭子分离菌株 5 株, 菌株编号分别为 vp06003、vp06004、vp06005、vp06006、vp06007。2006 年 8 月深圳市某酒店食物中毒采集标本 20 份, 其中病人肛拭子 4 份, 厨师肛拭子、手拭子共 8 份, 案板拭子、刀拭子等共 8 份。

1.1.2 副溶血弧菌的常规分离鉴定 所需培养基和生化试剂由北京陆桥技术有限公司提供, 诊断血清为日本生研产品。

1.1.3 荧光 PCR 检测 荧光 PCR 仪为美国伯乐 (Bio-rad) i-cycler, 引物、分子信标探针设计好后由上海生工合成, 其他试剂为大连宝生物产品。

1.1.4 脉冲场电泳 脉冲场电泳仪为 Gene PathTM System (Bio-rad), 凝胶成像系统为 Quantity One (4.4.0, Bio-rad) 系统, 分析软件为 BioNumerics (Version 3.0, Applied Maths)。Seakem Gold 胶 (Cambraex Bio Science Rockland)、蛋白酶 K (MERCK)、限制性内切酶 NotI (NEB) 和 XbaI (NEB) 等试剂用于脉冲场凝胶电泳。分子量参考标准菌株为 PulseNet 中使用的沙门菌 H9812^[2]。

1.2 实验方法

1.2.1 副溶血弧菌的常规分离鉴定 按照《食品卫生微生物学检验》进行常规分离和鉴定^[3]。

1.2.2 荧光 PCR 检测 20 份中毒样品经氯化钠结晶紫增菌过夜后, 取 1 ml 离心去上清液, 沉淀加 100 μ l 灭菌蒸馏水悬浮, 同时挑取可疑菌落于 100 μ l 灭菌蒸馏水中悬浮, 于 100 煮沸 5 min, 离心后取上清液 5 μ l 作模板, 引物、探针浓度为 0.4

μM, MgCl₂ 为 2 mM, dNTP 为 100 mM, Taq 酶为 1 U, 扩增热循环为 94 3 min, 94 15 s, 52 20 s, 94 15 s, 40 个循环, 52 检测标记荧光。

1.2.3 脉冲场电泳 参照美国 CDC 推荐的霍乱弧菌脉冲场电泳标准方法对副溶血弧菌进行 PFGE 分型^[4]。步骤包括胶块的制备、裂解、洗涤、酶切 (副溶血弧菌用内切酶 NotI, 沙门菌 H 9812 用内切酶 XbaI)、电泳。电泳程序分为两部分: 电压 6.0 v/cm, 脉冲时间 2~10 s, 线性条件, 转换角度 120°, 电泳时间 13 h; 电压 6.0 v/cm, 脉冲时间 20~25 s, 线性条件, 转换角度 120°, 电泳时间 6 h。电泳结束后, 将胶块用 EB 溶液染色, 纯水洗涤, 凝胶成像系统拍照。最后用软件 BioNumerics 分析电泳图谱, 得到菌株的聚类分析树状图。

2 结果

2.1 菌株分离鉴定

菌株 vp06003、vp06004、vp06005、vp06006、vp06007, 血清型均为 O1: K25。某酒店食物中毒 4 份病人肛拭子分离到副溶血弧菌, 编号分别为 vp06055、vp06056、vp06057、vp06058, 血清型均为 O3: K6; 厨师肛拭子、手拭子、案板拭子和刀拭子未分离到致病菌。

2.2 荧光 PCR 检测

4 份病人肛拭子的氯化钠结晶紫增菌液, 经荧光 PCR 检测结果为阳性; 厨师肛拭子、手拭子、案板拭子和刀拭子荧光 PCR 检测结果均为阴性。同时采用传统方法也从此 4 份病人肛拭子分离到副溶血弧菌, 其他标本未分离到副溶血弧菌。

2.3 脉冲场电泳

副溶血弧菌基因组 DNA 在 NotI 酶切后经脉冲场电泳, DNA 片段得到良好的分离, 各株细菌 DNA 条带数目为 15~16。分子量最大的片段出现在约 1 135 kb 位置, 分子量最小的片段出现在约 20 kb 位置。由图 1 可见, 同起食物中毒菌株 PFGE 图谱一致, 某区上送食物中毒菌株 vp06003、vp06004、vp06005、vp06006、vp06007 电泳图谱一致, 相似性系数为 100%, 为相同 PFGE 型; 某酒店食物中毒分离株 vp06055、vp06056、vp06057、vp06058 电泳图谱也一致, 为另一相同 PFGE 型。

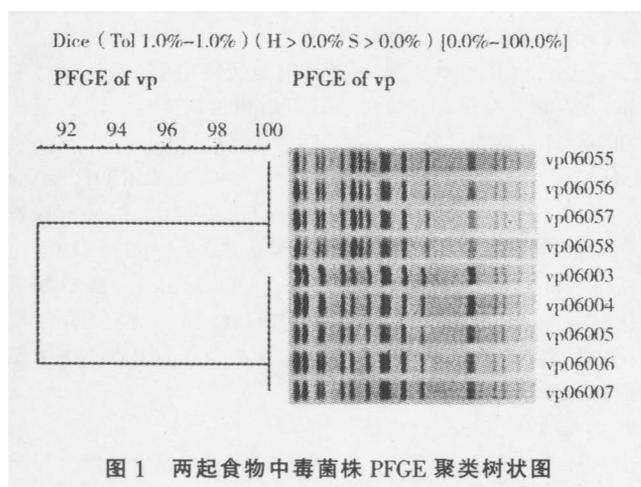


图 1 两起食物中毒菌株 PFGE 聚类树状图

3 讨论

实验中我们对副溶血弧菌特异毒力基因进行荧光 PCR 检测, 4 份病人肛拭子增菌液荧光 PCR 检测结果为阳性, 已经可以初步判断此起食物中毒由副溶血弧菌引起。荧光 PCR 检测

结果与常规分离培养结果一致, 说明了荧光 PCR 结果的可靠性。细菌的传统分离培养不仅耗时、灵敏度低, 而且步骤烦琐。荧光 PCR 将扩增和产物分析结合在一起, 实现了对 PCR 扩增产物的实时动态检测和结果自动分析, 由于不需要后电泳, 避免了污染, 方便快捷, 可在 1~2 h 内得出结果, 可一次检测 96 份甚至更多样品, 为实验室检验带来极大的方便。由于荧光 PCR 简便、快捷、敏感和特异的特点, 便于基层实验室使用, 具有很好的推广应用前景, 适用于疫情的快速诊断和疫源地监测。

PFGE 结果显示, 在不同样品分离到了相同 PFGE 型的副溶血弧菌, 根据来自同一亲代的个体具有共同的遗传物质, 在 PFGE 实验中表现出相同的指纹图谱的原理, 这些菌株来源于同一克隆株, 从分子分型水平进一步证实了是副溶血弧菌污染所致的食物中毒。根据 Tenover 标准, 如菌株间的 DNA 条纹有 1~3 条不同, 则存在很近的亲缘关系^[5]。可见, 两起食物中毒分离菌株同源性很高, 为遗传紧密相关菌株, 从分子水平显示两起食物中毒有一定的相关性, 有研究指出血清型 O1: K25 是血清型 O3: K6 的变异型^[6]。在这两起食物中毒中, 遗憾的是没有采集到患者所食剩余食品, 若能在食品中发现相同 PFGE 型的菌株, 则有利于进一步追踪传染源, 为控制传染源提供有效的证据。

PFGE 基于菌株的 DNA 指纹原理来确诊菌株之间的亲缘关系, 具有分型能力强、结果容易判断和重复性好等优点, 用来查明暴发流行的传染源及传播途径, 为控制传染源提供实验室诊断依据, PFGE 技术将在分子流行病学调查中得到广泛应用。单独的血清学分型方法难以准确分析菌株之间的亲缘关系, 若能联合 PFGE 等分子分型技术则能大大提高分型能力。

本研究应用了传统的分离培养鉴定、毒力基因荧光 PCR 检测和 PFGE 分型, 从不同的角度和层次鉴定了两起由副溶血弧菌引起的食物中毒, 从分子生物学的角度探讨了两起食物中毒。

参考文献:

- [1] 严纪文, 马聪, 朱海明, 等. 2003~2005 年广东省水产品中副溶血性弧菌的主动监测及其基因指纹图谱库的建立 [J]. 中国卫生检验杂志, 2006, 16 (4): 387-391.
- [2] Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, et al. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43 (3): 1045-1050.
- [3] 中华人民共和国国家标准. 食品卫生微生物学检验 [M]. 北京: 中国标准出版社, 2004. 47-51.
- [4] Cooper KL, Luey CK, Bird M, et al. Development and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping of *Vibrio cholerae* [J]. Foodborne Pathog Dis, 2006, 3 (1): 51-58.
- [5] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strains typing [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33 (9): 2233-2239.
- [6] Hara-Kudo Y, Sugiyama K, Nishibuchi M, et al. Prevalence of pandemic thermostable direct hemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 in seafood and the coastal environment in Japan [J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (7): 3883-3891.

(收稿日期: 2006-10-08)