

血清凝集、基因测序联合检测霍乱弧菌的应用*

刘万静¹, 王多春², 唐倩³ (1. 安康市疾病预防控制中心生物检验科, 陕西安康 725000;
2. 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 北京 102206;
3. 安康市人民医院检验科, 陕西安康 725000)

摘要:目的 避免霍乱弧菌检测假阳性, 提高检测正确率。方法 随机选取 2013 年 1~7 月, 全国各省市 CDC 送往中国 CDC 霍乱初筛阳性菌株 14 株; 用 LB 营养琼脂培养 12 h, 挑取单菌落进行霍乱弧菌血清凝集, 同时水煮模板法提取菌株的 DNA。针对弧菌属 16SrDNA 序列设计引物, 进行弧菌 16SrDNA PCR 检测, 电泳观察 16SrDNA 产物, 将 16SrDNA 阳性产物送测序公司测序, 测序结果在 NCBI 网站上进行 Blast 比对, 分析比较血清凝集和 Blast 比对结果。结果 共选取 14 株菌进行实验, 血清凝集阳性 12 株, 2 株未凝。经弧菌 16SrDNA 扩增, 电泳观察 14 株菌均扩增出相应的片段, 说明所选菌株均为弧菌属。将 14 株菌的 16SrDNA 阳性产物测序, 并将测序结果进行 Blast 比对: 2 株血清未凝集菌均是哈维氏弧菌; 12 株血清凝集阳性的菌中, 1 株是需钠弧菌, 其余 11 株是霍乱弧菌。结论 血清凝集和基因测序联合检测霍乱弧菌, 可避免霍乱弧菌检测假阳性, 提高检测正确率。

关键词: 霍乱弧菌; 血清凝集; 16SrDNA; 基因测序

中图分类号: R378.3; Q786 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414(2015)02-084-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2015.02.026

Application of Detecting *Vibrio Cholerae* Combined with Serum Agglutination and Gene Sequencing

LIU Wan-jing¹, WANG Duo-chun², TANG Qian³ (1. Department of Biological Laboratory,
Center for Disease Prevention and Control of Ankang Municipality, Shaanxi Ankang 725000,
China; 2. Institute of Infectious Diseases Prevention and Control,
Center for Chinese Disease Prevention and Control, Beijing 102206, China;
3. Department of Clinical Laboratory, Ankang People's Hospital, Shaanxi Ankang 725000, China)

Abstract: **Objective** To avoid false positive detection of *Vibrio cholerae* and improve the detection correct rate. **Methods** 1~7 months of 2013 were randomly selected, the national various provinces and cities CDC to China cholera CDC positive screening 14 strains. LB nutrient agar 12 hours, take single colony to *Vibrio cholera* serum agglutination, extraction of strain DNA at the same time boiled template method. For *Vibrio* 16SrDNA sequence and design primers for PCR detection of *Vibrio*, 16SrDNA, electrophoresis were used to observe the 16SrDNA products, 16SrDNA positive products sent to sequencing company sequencing, sequencing results were Blast comparison on the NCBI website for the analysis and comparison of serum agglutination and Blast alignment. **Results** 12 strains was positive for agglutination and 2 strains of non agglutination in 14 strains. The *Vibrio* 16SrDNA amplification, electrophoresis were used to observe the 14 isolates that were amplified fragment corresponding, that the selected strains were vibrio. The 16SrDNA positive products were 14 strains, and the sequencing the Blast results; 2 strains of bacteria were *Vibrio harveyi* for non agglutination, in 12 positive strains of serum agglutination; 1 strains was *Vibrio natriegen* and 11 strains were *Vibrio cholerae*. **Conclusion** Detection of *Vibrio cholerae* combined with serum agglutination and gene sequencing can avoid false positive result of *Vibrio cholerae*, and improve correct rate of the detection.

Keywords: *Vibrio cholerae*; serum agglutination; 16SrDNA; gene sequence

霍乱是由霍乱弧菌引起的烈性肠道传染病, 在中国属法定管理的“甲类”传染病, 以发病急、传播快、波及范围广、能引起大流行特征。根据 O 抗原的不同已划分出 206 个血清群, 发现 O1 群和 O139 群产毒株是引起霍乱暴发流行的主要血清群毒株^[1]。常规检测霍乱的方法有培养生化鉴定、血清凝集、PCR 等, 但各方法都有一定的局限性。培

养分离生化反应不典型, 血清凝集由于交叉抗原的存在, 产生假阳性; 如 O139 群霍乱弧菌可以和 O22 群、O155 群、O1 群粗糙型发生凝集^[2]。特别是基层单位主要通过生化反应和血清凝集来鉴定, 由此造成假阳性无法解决, 这已明显跟不上试验要求。原核生物的 rRNA 含有 3 种类型: 23S, 16S, 5SrRNA, 只有 16S 长度适中信息量较大且易分

* 作者简介: 刘万静(1986-), 男, 技师, 主要从事肠道传染病检测, E-mail: 137787975@163.com。

通讯作者: 唐倩, 女, 技师, E-mail: 791859600@qq.com。

析。细菌 16SrDNA 中有多个区段保守性,根据这些保守区可以设计出细菌通用引物,可以扩增出所有细菌 16SrDNA 片段,并且这些引物仅对细菌是特异性的,也就是说这些引物不会与非细菌的 DNA 互补,而细菌 16SrDNA 可变区的差异可以用来区分不同的菌。近年来,随着基因测序的快速发展,细菌基因库的完善,为细菌的快速鉴定提供一个精准的方法。我们可将细菌进行基因测序,再将基因序列放在基因库中比对,即可得到确切的结果。本文针对弧菌属设计其 16SrDNA 引物,并将培养分离、血清凝集、PCR、测序结合起来,探讨一个可避免霍乱弧菌检测假阳性,提高其检出正确率的方法,现介绍如下:

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:本人进修期间在国家疾病预防控制中心(CDC)腹泻实验室随机挑选 2013 年 1~7 月来自山西、湖南、安徽、北京等省市的 14 份霍乱弧菌初筛阳性菌株,其来源于海水、甲鱼、病人、海产品涂抹液等分离物。

1.1.2 试剂和仪器:LB 琼脂所用蛋白胨、酵母膏均为 OXOID 所产;琼脂粉(日本进口);NaCl(北京试剂厂);121℃,15 min 高压灭菌自行倾倒。电泳琼脂浓度为 1 g/dl;国产血清(中国 CDC 流研所自制)、进口血清(泰国 S&A 公司);Mix(天一辉远 cat303104);PCR 仪(Sensequest);凝胶成像仪(GEL-DOEXR BIO-RAD);DYY-6C 型电泳仪(北京市六一仪器厂)。

1.1.3 引物:针对弧菌属的 16SrDNA 序列,由北京天一辉远生物科技有限公司合成上、下游引物,引物:16SrDNA-F: AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG; 16SrDNA-R: ACGGCTACCTTGTTACG ACTT。

1.2 方法

1.2.1 取经 LB 营养琼脂培养 12 h 单个可疑菌落,进行自制、进口血清的凝集。

1.2.2 制备菌种的 DNA:挑取单个菌落于已加入 100 μ l 去 DNA 的超纯水中,标记完毕放于 100℃ 沸水中煮 10 min,拿出包埋于冰块中待冷却,13 000 r/min 离心 10 min,上清液即为目的 DNA。

1.2.3 本实验 PCR 采用 20 μ l 体系:分别取 16sF,16sR 各 1 μ l, Mix 6 μ l, 去 DNA 超纯水 10 μ l, DNA 模版 2 μ l。反应条件 95℃ 3 min, 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 2 min, 72℃ 5 min, 16℃ 保存。第 2 步至第 4 步每步 30 个循环。质控为 MO45 (O139 群)和 N16961(O1 群),阴性对照模板用水代替。

1.2.4 电泳、成像:倒胶块待冷却取 1.2.3 中 PCR 产物、MarKer(DL15000)各 5 μ l,加于相应孔中,220V 电泳 10~15 min,成像仪拍照。

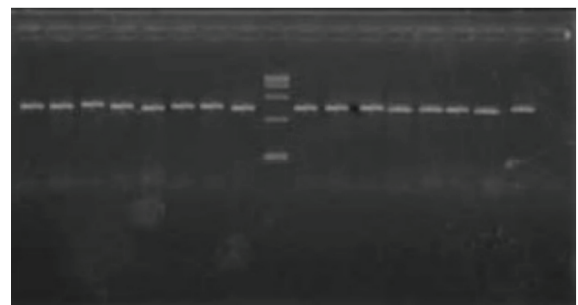
1.2.5 测序:取 1.2.3 中制备的 PCR 产物,送天一辉远生物科技有限公司测序,将测序结果进行 Blast 比对。

2 结果

2.1 血清凝集结果 见表 1。

菌名	国产 O1	国产 O139	进口 O1	进口 O139	对照
Shx-2	—	—	—	—	—
Shx-5	—	—	—	—	—
1680	—	+	—	+	—
FJ1301	—	+	—	+	—
Vc4328	+(稻叶)		+		—
Vc4329	+(小川)		+		—
Vc4592	+(稻叶)		+		—
Vc4595	+(稻叶)		+		—
Vc4596	+(稻叶)		+		—
Vc4628		+		+	—
Vc4629		+		+	—
Vc4630		+		+	—
Vc4649		+		+	—
Vc4650		+		+	—

2.2 扩增产物电泳结果 见图 1。



备注:本实验取 16S 产物进行电泳,凡是弧菌均应扩增出相应片段,且片段大小 1.6Kb 左右。加样从左往右,按血清凝集排列顺序。9 号为 Marker;16,17 号分别为 N16961,MO45;18 号为阴性质控;N16961,MO45 分别为 O1 群和 O139 群,霍乱弧菌的质控菌株。

图 1 扩增产物电泳结果

2.3 基因序列 Blast 比对结果 见表 2。

本实验选取 14 株待检菌,12 株自制、进口 O1/O139 血清凝集均阳性,2 株为阴性。将 14 株菌 DNA 经过 16SrDNA 引物扩增,取扩增产物进行电泳,从电泳结果图,我们看出所有菌株都扩增出了相应的 16s 片段,这说明它们都是弧菌属。为了和血清学凝集结果对比,本文将 PCR 产物进行测序、Blast 比对。我们可得出如下结论:12 株血清凝集阳性的菌中,有 11 株经测序为霍乱弧菌

O1/O139 群,这和血清凝集的结果是一致的,1株为需钠弧菌,和血清凝集的结果不一致,符合率92%。2株血清未凝集的菌,测序结果均为哈维氏弧菌,符合率为100%。通过本方法发现需钠弧菌也会和O139群血清交叉凝集,同时说明血清凝集阳性的菌株不一定是霍乱弧菌,需要进一步确认。

表2 基因序列 Blast 比对结果

菌株	Blast 结果	菌株	Blast 结果
Shx-2	Vibrio harveyi	4596	vibrio cholerae O1 biovar
SHx-5	Vibrio harveyi	4595	vibrio cholerae O1 biovar
1680	Vibrio cholerae O139 biovar	4628	vibrio cholerae O139 biovar
FJ1301	Vibrio natriegen	4629	vibrio cholerae O139 biovar
4328	vibrio cholerae O1 biovar	4630	vibrio cholerae O139 biovar
4329	vibrio cholerae O1 biovar	4649	vibrio cholerae O139 biovar
4392	vibrio cholerae O1 biovar	4650	vibrio cholerae O139 biovar

3 讨论 培养、生化反应可为霍乱疫情初步判定提供方向。血清凝集由于种属之间存在交叉抗原、抗原变异等问题存在假凝集。如麦氏弧菌会和O139血清凝集^[3],温和气单胞菌与霍乱弧菌O22血清群发生交叉凝集^[4]。PCR方法依赖特异性的引物,能够准确灵敏高效的检测目标菌^[5];但PCR检测为阳性的标本,培养分离为阴性的占一定比例^[6,7]。经典的检测霍乱弧菌的方法,我们还是依赖于生化鉴定和血清凝集。但受制于试验方法学、交叉抗原、抗原变异、实验血清等问题,此时我们会误将符合生化特征、血清凝集结果阳性的待检菌判定为霍乱弧菌。如本实验中,实验菌自制、进口的O139血清凝集阳性,但经过测序证实却不是霍乱弧菌。本文将培养、血清凝集、测序结合在一起;将血清凝集作为初筛,用PCR扩增进一步筛选,将扩增产物测序、Blast比对,得到最终结果。

综上所述,并结合相关血清交叉凝集的报道,我们不难看出O1/O139血清凝集阳性的不一定是霍乱弧菌,还需做补充实验。我们知道基因测

序,可认为是鉴定细菌的“金标准”,随着基因库的完善,基因测序成本的降低,基因测序必将大规模应用于细菌学检测。通过本文的方法,我们可准确对霍乱判定,避免交叉凝集、抗原变异等引起的假性凝集,同时兼顾传统方法的优势,因此是一个比传统方法更为全面、准确的鉴定霍乱弧菌的操作方法。在疫情的初步确定方面由于综合了现行的实验方法,因此无差异,但在后续准确性方面有现行方法不可替代之处。本方法避免了霍乱弧菌检测假阳性的问题,提高了其检出的正确率。

参考文献:

- [1] 徐建国, 阚 飙, 张建中, 等. 现场细菌学[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 31.
Xu JG, Kan B, Zhang JZ, et al. The bacterial[M]. Beijing: Science Press, 2011: 31.
- [2] 高守一, 魏承毓, 丁静秋, 等. 霍乱防治手册[M]. 5版. 中华人民共和国卫生部疾病控制司, 1999: 35-36.
Gao SY, Wei CY, Ding JQ, et al. Cholera prevention and control of manual[M]. 5th Ed. The People's Republic of China Ministry of Health Disease Control Division, 1999: 35-36.
- [3] 章乐怡, 李小春, 洪程基. 与O139霍乱弧菌血清交叉凝集的麦氏弧菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 17(4): 665-666.
Zhang LY, Li XC, Hong CJ. Vibrio metschnikovilli can crossagglutinate with vibrio cholerae O139[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2003, 17(4): 665-666.
- [4] 金春光, 徐霞芬. 与霍乱弧菌O22血清群发生交叉凝集的温和气单胞菌[J]. 宁波医学, 2000, 12(8): 33.
Jin CG, Xu XF. With moderate gas Vibrio cholerae serogroup O22 cross agglutination of Aeromonas[J]. Medical Journal of Ningbo, 2000, 12(8): 33.
- [5] He JW, Jiang S. Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real time PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(5): 2250-2255.
- [6] 王晓梅, 王多春, 谭海玲, 等. 实时聚合酶链反应检测O1群和O139群霍乱弧菌方法的建立及应用[J]. 中华流行病学杂志, 2007, 28(8): 768-771.
Wang XM, Wang DC, Tan HL, et al. Development and application of real-time polymerase chain reaction to detect vibrio cholerae O1 and O139 in river water[J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2007, 28(8): 768-771.
- [7] 梁 暄, 李柏生, 牟成惠, 等. 实时荧光PCR技术检测珠江水霍乱弧菌[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(8): 2000-2001.
Liang X, Li BS, Mou CH, et al. Real time fluorescence PCR technique to detect the Pearl River water choleraic vibrio[J]. Journal of Southern Medical University, 2010, 30(8): 2000-2001.

收稿日期: 2014-06-30
修回日期: 2015-01-11