

环介导等温扩增检测一起副溶血性弧菌食物中毒

罗可天, 梁 暄, 丁 珊, 宋妙芳, 林 智(广州市越秀区疾病预防控制中心, 广东 广州 510055)

摘要:目的 利用环介导等温扩增(LAMP)技术对一起食物中毒事件进行病原菌检测, 评价其作为快速筛查办法的可行性。方法 以 LAMP 技术对采集到的肛拭子标本、涂抹样品、食品样品进行病原菌检测, 同时以国标 GB/T4789-2003 中使用的检测方法进行平行对照实验。结果 18 份样本中有 6 份检出副溶血性弧菌, LAMP 检测结果与 GB/T4789-2003 方法检测结果一致。结论 LAMP 方法可作为一种快捷、操作简便的方法应用于食物中毒事件中致病菌的检测。

关键词:副溶血性弧菌; 食物中毒; 环介导等温扩增

中图分类号: R155.31 文献标识码: B 文章编号: 1673-4254(2009)08-1718-02

副溶血性弧菌是一种重要的食源性致病菌, 广泛存在于海水、海底沉积物及鱼贝虾蟹等海产品中, 由该菌引起的食物中毒案例在世界各地均有报道。目前, 副溶血性弧菌食物中毒已在数量上超过沙门氏菌中毒案例, 成为我国的首要食源性致病菌^[1]。环介导等温扩增(LAMP)技术是 Notomi 于 2000 年报道的一种新型核酸扩增方法, 有不需要 PCR 仪、肉眼可判断结果及反应时间短等优点, 可用于病原体核酸的检测^[2]。本研究应用 LAMP 和 GB/T4789-2003 法检测副溶血性弧菌特异靶基因序列, 探讨 LAMP 在副溶血性弧菌感染诊断上的价值, 旨在为食源性疾病的监测及诊断提供更为准确、简便、经济的辅助手段。

1 事件回顾

2007 年 5 月 23 日, 广州市越秀区某广场工地发生了一起疑似食物中毒事件, 8 人中毒, 出现腹痛、腹泻等消化道症状, 在某医院急诊室就诊。患者均为该广场工地工人, 居住在工地内的宿舍, 分住不同房间, 无明显宿舍聚集性。有共同进餐史, 发病前 72 h 内均在东风广场工地食堂进食。根据临床症状和病人食谱调查, 初步诊断为细菌性食物中毒。

2 临床调查

患者症状均为腹泻水样便(腹泻 3~20 次)、腹痛(以上腹部绞痛和脐部隐痛为主); 个别患者有头晕、头痛、乏力; 均无发热、呕吐。血常规检测发现 2 人白细胞总数升高, 以中性粒细胞升高为主, 1 人白细胞总数为临界值。经抗菌素治疗和对症治疗后, 病人病情稳定, 无危重和死亡病例。

3 实验室检验

3.1 样品来源

共采集标本 18 份, 其中食物中毒病人肛拭标本

8 份, 厨房公用品、物体表面涂抹样 6 份, 剩余食品 4 份。

3.2 试剂和材料

培养基:营养肉汤、GN 增菌液、SC 增菌液、7.5% NaCl 增菌液、嗜盐性弧菌增菌、碱性蛋白胨水液、S-S 琼脂平板、血平板、EMB 平板、TCBS 平板、普通营养琼脂平板、四号琼脂平板等培养基, 均为广东环凯微生物科技公司 / 广东省微生物研究所生产, 均在有效期内使用; 沙门氏菌诊断血清、志贺氏菌、致病性大肠杆菌诊断血清、霍乱弧菌诊断血清均购自成都生物制品研究所; 沙门氏菌、志贺氏菌、大肠杆菌 O157:H7、霍乱弧菌、金黄色葡萄球菌和副溶血弧菌等 LAMP 检测试剂盒均购自广州华峰生物科技有限公司。

3.3 检验方法

同时采用 LAMP、GB/T4789-2003 方法。

3.3.1 LAMP 检测法 按试剂盒说明书操作, 具体如下: 将采集标本按 GB/T4789-2003 相应部分进行增菌处理后; 用 1 ml 增菌液收集菌体; 加入 80 μ l DNA 提取液, 混匀后沸水浴 10 min; 10 000 r/min 离心 2 min, 上清即为核酸模板。LAMP 反应体系包括反应液 22 μ l、Bst 聚合酶 0.5 μ l、稳定液 30 ml 和上述样品核酸模板 2.5 μ l, 置 65 $^{\circ}$ C 恒温反应 1 h 后取出置室温停止反应, 向反应管中加入 2 μ l 显色液观察管中颜色判读结果。反应管呈现绿色为阳性, 显橙色则判为阴性。

3.3.2 GB/T4789-2003 方法 依据中华人民共和国国家标准 GB/T4789-2003《食品卫生检验方法微生物部分》相关部分进行^[3]。

4 结果

4.1 GB/T4789-2003 方法

4.1.1 分离培养 样品各增菌液均浑浊生长且有菌膜, 接种选择性平板培养基培养可见在 TCBS 平板上有优势菌落生长, 菌落湿润, 草绿色, 24 h 培养物约 2~3 mm 大小, 圆形、光滑、不易挑起; 在血平板上直

收稿日期: 2009-03-05

作者简介: 罗可天(1973-), 女, 主管技师

径 3~4 mm, 灰白色, 稍隆起, 有透明溶血环, 疑似副溶血性弧菌菌落; 其他培养基上无可疑菌落生长。

4.1.2 革兰染色镜检 取疑似副溶血性弧菌落经涂片镜检均为革兰阴性、杆状稍弯曲的无芽胞弧菌。

4.1.4 结果 18 份样品中共有 6 份样品检出副溶血性弧菌, 病人肛拭子样品 4 份, 剩余食品 1 份, 物体表面涂抹样品 1 份, 阳性率为 33.3%, 未检出其他致病菌。

4.2 LAMP 检测法

LAMP 检测结果和 GB/T4789-2003 方法检测结果一致, 见表 1。

表 1 应用 GB/T4789-2003 和 LAMP 方法检测样品的试验结果

检测项目	样本结果(份数)	
	国标方法	LAMP方法
致病性大肠杆菌	-	-
沙门氏菌	-	-
志贺氏菌	-	-
金黄色葡萄球菌	-	-
副溶血弧菌	+(6)	+(6)
霍乱弧菌	-	-
溶血链球菌	-	-
变形杆菌	-	-

-, 表示检测结果阴性, +, 表示检测结果阳性

5 讨论

食源性致病菌的检验技术目前主要根据国标 GB/T4789-2003 进行^[3], 需要增菌、转种、分离培养、生化鉴定等试验, 耗时长, 实验结果也常受到多种因素的影响。建立食源性病原微生物的快速诊断方法, 对实现食源性传染病的预警与预测, 提高预防和控制食源性疾病的应急能力至关重要。迄今, 国内外学者对食源性致病菌的检测方法进行了大量研究, 建立了多种检测方法, 如病原分离鉴定、特异蛋白的免疫学检测技术、聚合酶链式反应技术等。最近 LAMP 技术被应用到食品微生物检测领域, 为食源性疾病的监测及诊断提供了更为准确、简便、经济的辅助手段。

LAMP 技术主要根据不同靶序列设计的两对特殊的内、外引物, 特异性识别靶序列上的 6 个独立区域, 利用 *Bst* DNA 聚合酶可在恒温下启动循环链置换反应, 并由引物自身的特点形成哑铃状结构引导序

列延伸^[2], 具有较高的扩增效率, 最终形成有很多环的花椰菜结构的茎-环 DNA 混合物。加入显色液后可通过颜色变化直接肉眼判读结果, 操作简单, 耗时短, 无特殊设备要求及经验依赖, 可为紧急公共安全事件的快速处理提供新的手段及依据。目前 LAMP 技术方法已被国外学者广泛使用, 在动植物检疫、临床检测中均有报道, 包括水产中白斑综合征病毒快速检测^[4]、SARS 冠状病毒检测^[5]、临床中耐药基因检测^[6]。国内也有报道建立了 LAMP 检测方法对模拟食品样品中副溶血弧菌进行检测, 显示出较好的适用性^[7]。

本实验同时采用国标 GB/T4789-2003 方法和 LAMP 方法对常见食物中毒病原菌: 沙门氏菌、志贺氏菌、金黄色葡萄球菌、副溶血弧菌、霍乱弧菌等进行检测。结果表明在 18 份样品中国标方法检出副溶血弧菌 6 份, 未检出其他致病菌。根据病人临床表现、流行病学资料及实验检测结果, 参照《食品卫生国家标准汇编(5)》WS/T81-1996^[8]可判定本次食物中毒为副溶血性弧菌所致。LAMP 检测方法 with 国标方法的检测结果完全一致, 表明 LAMP 技术在病原菌检测方面有很好的应用潜力。

参考文献:

- [1] 陈瑞英, 鲁建章, 苏意诚, 等. 食品中副溶血性弧菌的危害分析、检测与预防控制[J]. 食品科学, 2007, 28(1): 341-7.
- [2] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12): E63.
- [3] GB/T4789-2003 食品卫生检验方法(微生物部分)[S].
- [4] Kono T, Savan R, Sakai M, et al. Detection of white spot syndrome virus in shrimp by loop-mediated isothermal amplification [J]. J Virol Methods, 2004, 115(1): 59-65.
- [5] Ushio M, Yui I, Yoshida N, et al. Detection of respiratory syncytial virus genome by subgroups-A, B specific reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. J Med Virol, 2005, 77(1): 121-7.
- [6] 申建维, 王旭, 范春明, 等. 等温扩增检测耐药基因 MECA 方法的建立及其临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(2): 23-5.
- [7] 徐芊, 孙晓红, 赵勇, 等. 副溶血弧菌 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(12): 66-72.
- [8] WS/T81-1996 副溶血性弧菌食物中毒诊断标准及处理原则[S].