

创伤弧菌病原学快速检测技术的研究

陈 肖 卢中秋

创伤弧菌脓毒症 (*Vibrio vulnificus* sepsis) 是世界各国沿海地区常见的致死性疾病,多见于慢性肝病等免疫低下人群。研究发现该病起病急骤,多数患者在入院后 48h 内迅速进展为脓毒症性休克和多脏器功能不全 (MODS),病死率在 50% ~ 70% 以上^[1,2]。然而,创伤弧菌脓毒症致病机制复杂,至今尚未阐明。

由于我国酒精性肝病和乙肝后慢性肝病人数不断增长,随着易感人群的增多,预测创伤弧菌脓毒症的发生率将进一步增高,因此对其进行早期诊断尤为重要,传统的生化检查耗材费时,不利于创伤弧菌的早期诊断^[3]。随着免疫检测技术及分子生物学技术的发展,国内外的学者已经建立了许多快速、特异、简单、敏感的创伤弧菌检测方法,明显提高了诊断水平。本文重点介绍国内外检测创伤弧菌快速简便的技术,并就其原理、方法、应用前景等进行综述。

一、脂肪酸气相色谱分析技术

气相色谱分析技术是重要的近代分析手段,具有分离效能高、分析速度快、定量结果准、易于自动化等特点,广泛地用于医药、生化、环境科学等各个领域,是不可缺少的重要的分离、分析工具。王志刚等^[4]采用气相色谱法测定 VV 菌脂肪酸的种类和含量,并与软件标准图谱进行比对建立了细菌脂肪酸气相色谱分析技术对创伤弧菌鉴定的新方法。该法 20min 内色谱给出 VV 脂肪酸特征图,峰位与标准图谱的差异仅为 0.21%,99.17% 的峰能明确识别,与经典的细菌生化反应及 DNA 鉴定相比,具有灵敏、精确、快速、成本低廉的特点,为临床实验室创伤弧菌的提供了新的方法。但该技术的实验条件缺标准化,包括培养基的成分、培养条件、色谱条件等,影响细菌鉴定的可重复性和准确性。

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y12H150014);浙江省医学创新学科建设计划基金资助项目(11-CX26);浙江省“十二五”重点学科建设计划基金资助项目

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院急诊医学中心

通讯作者:卢中秋,教授,主任医师,博士生导师,电子信箱:lzq640815@163.com

二、免疫学检测技术

免疫学检测技术是利用抗原抗体反应的特异性原理,制成特异的抗原抗体复合物来检测抗原或者抗体的分析技术。现代免疫检测技术的发展迅速,用于创伤弧菌检测方法也不断更新。

1. 酶免疫测定(EIA):酶免疫测定是指标记抗原或抗体形成酶标志物,酶标志物与待测样品中相应的抗原或者抗体反应后,形成相应的酶标记抗原抗体复合物,复合物上的酶标记可以催化底物显色。酶免疫测定可分为酶联免疫吸附实验(ELISA)和酶免疫组化技术。由于 ELISA 特异性强、敏感度高、检测时间短等特点,目前国内外已广泛应用于病原微生物的快速检测,且易于制成试剂盒。但该技术需要实验之前完成对创伤弧菌的增菌,如能与其他技术联合,不需增菌即可完成检测,将会大大缩短检测的时间,为临床早期确诊提供依据。

2. 胶体金免疫层析法:免疫胶体金技术是一种 20 世纪 80 年代新发展起来的固相免疫测定技术,以胶体金为标志物,通过金颗粒来放大免疫反应,使结果在固相膜(如硝酸纤维素膜)上显现出来。由于胶体金本身可以显色不用加显色剂,可以标记抗原或者抗体,可采用标记抗原与待检抗原的竞争法进行检测,又可采用标记抗体或者双抗体夹心法进行检测,既简便又快速,已经广泛用于各种微生物的快速检测。严智敏等^[5]利用双抗体夹心法制备创伤弧菌胶体金免疫层析快速检测试纸条,加入待检样品之后 20 ~ 30min 即可出现结果,灵敏度达 2×10^6 CFU/ml,切具有较好的特异性和稳定性。该法能在较短时间内显示结果,而常规方法、生化检查、免疫学检查及分子生物技术很难在短时间内出现检查结果,因此该法有望在临床及食品检验中应用以达到快速检测的效果。

三、分子诊断技术

分子生物学技术的应用以特异核酸序列的酶学扩增代替传统的生物学扩增,通过体外扩增,可以将靶基因片段成百万倍的放大,从而极大的提高了核酸分子检测的灵敏度,提高了速度和敏感度,而且能提

高病原诊断的特异性。分子技术引入实验室给创伤弧菌的快速检测打开了一个新的窗口,随着分子技术的不断更新,创伤弧菌的诊断技术也是日新月异。

1. PCR法:以单克隆抗体为基础的酶联免疫吸附试验可以快速检测创伤弧菌,但需要一定的细菌浓度,而PCR可以将微量的DNA大幅的扩增,有效的缩短检测时间,且具有极高的敏感度。Rolg等^[6]建立的PCR法能够进行菌种鉴别还能够进行对人类健康有危害的菌株的鉴别,该法是利用与人类潜在的致病性有关的pilF基因。Baker-Austin等^[7]基于pilF基因的多态性建立了检测致病性创伤弧菌的实时PCR法,准确性为97.9%,该法具有快速、特异性强、敏感度高等特点,且能够准确的用于生物型2和菌株3的鉴别。常规PCR仅用于单一的菌株,用此检测创伤弧菌的效率低。

多重PCR技术可以在一个体系中加入多对引物,同时扩增出多个核酸片段,可以提高创伤弧菌的检出效率。在其中加入多种病原微生物的特异性引物,可同时检出多种病原微生物,从而提高了临床诊断的准确性。Hidemasa等^[8]基于atpA基因序列建立的检测霍乱弧菌、副溶血弧菌、创伤弧菌的多重PCR方法,能特异性的从133种弧菌种属及其他种属的细菌菌株中检测出3种弧菌,并且在海水的检测中也证实该法是有用的。Han等^[9]利用创伤弧菌毒力相关基因(vcg)、16S rRNA、荚膜多糖操纵子(CPS)及创伤弧菌的种特异性基因vvhA建立了两组多重PCR法,对PCR的反应条件进行优化,通过对10种创伤弧菌参照菌株及80种牡蛎中的分离菌株进行鉴别,每组PCR的准确率为100%。多重PCR能够特异且快速地对创伤弧菌进行同源性及特异性检测,该法在微生物生态学及流行病学研究中极具价值。Neogi等^[10]建立了检测霍乱弧菌、创伤弧菌、副溶血弧菌的多重PCR法,该法设计的引物建立在霍乱弧菌、副溶血弧菌的toxR基因及创伤弧菌的vvhA基因基础之上,该法在检验包括322种霍乱弧菌、12种创伤弧菌、82种副溶血弧菌、20种其他弧菌属菌株在内的488种弧菌菌株及其他17种与人类疾病相关的细菌时,特异性及敏感度均为100%,即使是在比较接近的种属之间,该法也可准确的检测,该法可以适用于关于这些弧菌暴发流行的防御系统。

实时定量PCR技术可以准确定量,而且可以避免假阳性的产生,从而解决了常规PCR应用于临床基因诊断的局限。Wang等^[11]发现从牡蛎组织中提

取的新型DNA酶,能够干扰创伤弧菌的实时定量PCR,因此用涂有膨润土的活性炭去除牡蛎中的DNase和其他PCR抑制剂,能够检测出每克牡蛎组织中10CFU的创伤弧菌,与DNA纯化系统相比灵敏度提高了近10倍。Tebbs等^[12]采用一种新的多重实时PCR技术,在一个反应管中可以同时检测霍乱弧菌、创伤弧菌、副溶血弧菌,减少和简化每次测量的成本,快速、准确的检测致病性弧菌的水生贝壳类或海水样品。潘军航等^[13]采用根据vvhA基因序列设计的引物和探针进行实时荧光定量PCR检测,该法对预增菌5h后提取的DNA进行实时荧光定量PCR检测,其检测效果最佳,灵敏度达1.4CFU/ml,具有快速、特异性强、敏感度高等特点,能在8h内完成在牡蛎等海产品中创伤弧菌的快速检测。吴增辉等^[14]建立的基于溶细胞毒素基因vvhA检测创伤弧菌的Taq-Man实时荧光定量PCR,其仅对创伤弧菌DNA呈现阳性检测结果,其检测灵敏度可达0.01ng 创伤弧菌DNA,具有快速、稳定、敏感、特异等优点,虽不能检测粪便中的创伤弧菌,但可以快速检测出血液和感染伤口中的创伤弧菌,因此对临床创伤弧菌检测具有重要意义,以此指导临床治疗,可减少患者截肢和病死率。

2. 基因探针技术:基因探针技术具有高度的特异性,与分子杂交技术相结合可以进行有效的准确的定性和定量分析,从而使分子杂交技术得以推广应用。该技术检测快速、敏感度高,目前国内外研究者已经建立了多种针对微生物独立基因的探针技术。美国FDA推荐采用VVAP探针进行创伤弧菌特异性计数。此方法受到实验条件的限制,未能进行大规模的临床试验,如能与其他检测方法联合,将给创伤弧菌的检测带来新的思路。

3. 环介导恒温扩增技术(loop mediated isothermal amplification, LAMP):环介导恒温扩增技术是一种新的核酸扩增技术,该技术在等温条件下即可高效、快速、特异地扩增靶序列。与PCR相比,其检测极限更低,在30min~1h之内可将靶序列扩增至 $10^9 \sim 10^{10}$ 倍,操作简便,不需要PCR仪和特殊试剂,产物也易于检测,具有高度的特异性。Han等^[15]通过定量的环介导恒温技术来检测生蚝中的毒力型创伤弧菌,经过6h的富集,可检测出1CFU/g的毒力型创伤弧菌ATCC 33815菌株。Liyongjun等以vcg基因为靶基因建立了快速检测创伤弧菌的环介导恒温扩增法,该方法能够检测有毒力菌株和无毒菌株,也能在冬季有效的检测出非培养基上的病原体,具有很高的敏感

度、准确性和简便性。Surasilp 等建立的基于 rpos 基因的环介导恒温扩增法 (LAMP) 联合横向流动试纸条法 (LFD) 快速检测创伤弧菌, LAMP - LFD 法能准确地辨别 14 种创伤弧菌菌株, 不能辨别 25 种非创伤弧菌的弧菌菌株和 37 种非弧菌菌株, 具有较高的特异性。LAMP - LFD 法检测的敏感度在纯培养基中是 1.5×10^3 CFU/ml, 在没有增菌的牡蛎样品中, 该法的最低限度是 1.2×10^4 CFU/g。该法的准确性及敏感度使其能够被用于创伤弧菌污染的食品的有效检测。

4. 变性高效液相色谱技术: 变性高效液相色谱技术 (DHPLC) 是近年来发展起来的一项新的分析技术。DHPLC 具有较高的敏感度和特异性, 目前在基因突变检测、细菌鉴定、DNA 片段大小测定等许多研究领域应用广泛。刘彤等^[16]应用 PCR 结合变性高效液相色谱技术建立创伤弧菌快速准确的检测方法, 经过 DHPLC 分析条件优化, 在 DHPLC 非变性温度下分析创伤弧菌特异性 PCR 扩增产物, 该法检测低限可达到 124CFU/ml, 且特异性强、灵敏度高、耗时短、操作简单, 对于创伤弧菌感染能快速准确地进行诊断, 有利于以便及早对感染创伤弧菌的患者采取适当的措施进行治疗。

四、前景与展望

创伤弧菌脓毒症病情进展快, 病死率高。研究发现, 创伤弧菌脓毒症进展过程中炎症因子明显升高, 因此早诊断、早期抗炎治疗并结合早期的外科手术治疗是提高生存率的关键^[17,18]。由于创伤弧菌的表型特征在生物体内是可变的, 其快速、准确识别一直是个问题, 此外生化鉴定和确认需要两天或以上完成, 灵敏的分子生物学检测技术对创伤弧菌的暴发将是有益的检测和管理。

近年来创伤弧菌的检测技术已由传统的培养检测发展到免疫学和分子生物学检测技术, 分子生物学技术可以从基因水平去检测创伤弧菌, 并能鉴别毒力菌株与非毒力菌株, 对创伤弧菌的流行病学研究有重要意义。但在实际操作中相对要求较高, 且多数为海产品的检测, 需要大规模的研究来验证其可行性, 应用于临床还需要一定的距离。笔者深信, 随着检测技术的更新和完善, 创伤弧菌的快速检测必定能为患者的治疗和预后提高新的靶点。

参考文献

- 1 卢中秋, 洪广亮. 创伤弧菌脓毒症诊治进展 [J]. 临床外科杂志, 2011, 19(3): 159 - 163
- 2 Lu ZQ, Li MF, Liang H, *et al.* Dynamic expression of liver tissue apoptosis related genes in vibrio vulnificus sepsis rats and effects of anti-

- bacterial agents [J]. J Huazhong Univ Sci Technol: Med Sci, 2009, 29 (2): 193 - 197
- 3 洪广亮, 卢中秋. 慢性肝病患者并发创伤弧菌脓毒症研究现状 [J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(2): 236 - 238
- 4 王志刚, 邵平扬, 徐幼平. 脂肪酸气相色谱技术鉴定创伤弧菌 [J]. 浙江检验医学, 2010, 8(4): 24 - 27
- 5 严智敏, 郑晶, 陈清, 等. 创伤弧菌快速检测试纸条的研制 [J]. 南方医科大学报, 2011, 31(5): 894 - 896
- 6 Rolg FJ, Sanjuan E, Llorens L, *et al.* pilF polymorphism - based PCR to distinguish vibrio vulnificus strains potentially dangerous to public health [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(5): 1328 - 1333
- 7 Baker - Austin C, Lemm E, Hartnell R, *et al.* pilF polymorphism - based real - time PCR to distinguish Vibrio vulnificus strain of human health relevance [J]. Food Microbiology, 2012, 30(1): 17 - 23
- 8 Hidemasa I, Kazutoshi M, Shunsuke Y, *et al.* Multiplex PCR assay for identification of three major pathogenic Vibrio spp, vibrio cholerae, vibrio parahaemolyticus, and vibrio vulnificus [J]. Molecular and Cellular Probes, 2011, 25(4): 174 - 176
- 9 Han F, Ge B. Multiplex PCR assays for simultaneous detection and characterization of Vibrio vulnificus strains [J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(2): 234 - 240
- 10 Neogi SB, Chowdhury N, Asakura M, *et al.* A highly sensitive and specific multiplex PCR assay for simultaneous detection of vibrio cholerae, vibrio parahaemolyticus and vibrio vulnificus [J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 51(3): 293 - 300
- 11 Wang S, Robert EL. Interference of real - time PCR quantification of vibrio vulnificus by a Novel DNase from the Eastern Oyster (Crassostrea virginica) [J]. Food Biotechnology, 2010, 24(2): 121 - 134
- 12 Tebbis RS, Brzoska PM, Furtado MR, *et al.* Design and validation of a novel multiplex real - time PCR assay for vibrio pathogen detection [J]. Journal of Food Protection, 2011, 74(6): 939 - 948
- 13 潘军航, 金大智, 梅玲玲, 等. 实时荧光定量 PCR 快速检测创伤弧菌的研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(6): 1314 - 1318
- 14 吴增辉, 楼永良, 卢中秋, 等. 基于 vvhA 基因 TaqMan 实时荧光定量 PCR 快速检测创伤弧菌的研究 [J]. 中华急诊医学杂志, 2007, 16(5): 477 - 481
- 15 Han F, Wang F, Ge B. Detecting virulent - type vibrio vulnificus strains in raw oysters by quantitative loop - mediated isothermal amplification [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2011, 77(8): 2589 - 2595
- 16 刘彤, 郑秋月, 赵昕, 等. 变性高效液相色谱技术对创伤弧菌检测的研究 [J]. 中国微生态学杂志, 2011, 23(5): 470 - 472
- 17 梁欢, 卢中秋, 邱俏檬, 等. 创伤弧菌脓毒症大鼠肝组织 CD14 和促/抗炎细胞因子基因表达及抗生素干预研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2009, 29(3): 253 - 257
- 18 卢中秋, 卢才教, 洪广亮, 等. 34 例创伤弧菌脓毒症患者的流行病学特点及临床诊治 [J]. 中华急诊医学杂志, 2009, 18(7): 732 - 736

(收稿日期: 2012 - 11 - 12)

(修回日期: 2012 - 11 - 23)