

进口对虾急性肝胰腺坏死病病原分离鉴定及环介导等温扩增(LAMP)检测方法的建立

黄燕琼, 邓艳, 门星怡, 陈婉霞, 柏建山*

(广州白云机场海关国家水产品检测重点实验室, 广东广州 510470)

摘要: 该研究抽取了 453 批在 2017~2018 年自越南、泰国、马来西亚进境的对虾样品进行对虾急性肝胰腺坏死病 (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND) 病原的分离鉴定, 并对结果进行分析。结果显示: 直接取对虾肝胰腺组织进行病原分离检出率只有 2.87%, 而肝胰腺组织经过富集培养后, 检出率则达到 16.11%; 来自越南进境的对虾样品阳性检出率最高, 312 批次的样品阳性检出率为 21.79%, 分离出 11 株阳性菌株, 分离成功率为 15.07%。为了快速、灵敏和可靠的鉴定 AHPND 病原, 该研究建立了一种快速检测 AHPND 病原的环介导等温扩增 (LAMP) 方法。结果表明: 仅 AHPND 病原具有明显的扩增曲线和颜色变化, 质粒的检测低限为 1 fg/ μ L, 比普通 PCR 方法高 100 倍, 且稳定性强; 对 37 个实际样本检测显示, 阳性率为 35.13%, 阳性检出率高于普通 PCR 检测结果。该研究建立的 LAMP 快速检测方法适用于 AHPND 病原特异性检测, 病原的分离鉴定分析也可为进口对虾的实验室检测提供参考数据。

关键词: 急性肝胰腺坏死病; 分离鉴定; 环介导等温扩增 (LAMP)

文章编号: 1673-9078(2022)04-275-281

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.4.0593

Isolation and Identification of the Pathogen Associated with Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease in Imported Prawns and the Establishment of A Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay

HUANG Yanqiong, DENG Yan, MEN Xingyi, CHEN Wanxia, BAI Jianshan*

(State Key Testing Laboratory of Aquatic Products, Guangzhou Baiyun Airport Customs, Guangzhou 510470, China)

Abstract: In this study, 453 batches of samples were collected from prawns imported from Vietnam, Thailand and Malaysia during 2017~2018, to isolate and identify the pathogens of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). The analysis of the obtained results showed that the detection rate of the pathogen isolated from the hepatopancreas tissues of prawns was only 2.87%, whilst the detection rate reached 16.11% after enrichment culture. The prawn samples imported from Vietnam had the highest positive detection rate, with the positive detection rate of 312 batches of samples being 21.79%, and 11 positive strains were isolated with the rate of separation success being 15.07%. In order to identify quickly, sensitively and reliably the AHPND pathogens, a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay was established for rapid detection of AHPND pathogens in this research. The results showed that only the AHPND pathogen had obvious

引文格式:

黄燕琼, 邓艳, 门星怡, 等. 进口对虾急性肝胰腺坏死病病原分离鉴定及环介导等温扩增 (LAMP) 检测方法的建立[J]. 现代食品科技, 2022, 38(4): 275-281

HUANG Yanqiong, DENG Yan, MEN Xingyi, et al. Isolation and identification of the pathogen associated with acute hepatopancreatic necrosis disease in imported prawns and the establishment of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(4): 275-281

收稿日期: 2021-06-07

作者简介: 黄燕琼 (1979-), 女, 高级兽医师, 研究方向: 水生动物及产品的疫病和寄生虫检测, E-mail: 1012502668@qq.com

通讯作者: 柏建山 (1976-), 男, 博士, 高级兽医师, 研究方向: 水生动物及产品的疫病和寄生虫, E-mail: 57205984@qq.com

amplification curve and color change, and the limit of plasmid detection was 1 fg/ μ L, which was 100 times higher than that of the conventional PCR method, and had high stability. The detection of 37 actual samples showed that the positive rate was 35.13%, which was higher than that of conventional PCR test. The LAMP rapid detection method established in this study is suitable for the specific detection of AHPND pathogens, and the isolation, identification and analysis of pathogens can also provide reference data for laboratory detection of imported prawns.

Key words: acute hepatopancreatic necrosis; isolation and identification; loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

对虾急性肝胰腺坏死病 (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND) 是由一种携带着编码毒力蛋白 *pVA1* 质粒的特殊副溶血性弧菌引起的对虾病害。2009 年以来, 急性肝胰腺坏死病 (AHPND) 先后在中国、越南、马来西亚、泰国爆发, 2013 年蔓延到西半球的墨西哥。该病发病快、死亡率高、流行面广, 给对虾养殖业造成极大的损失。2013 年全球养殖对虾产量较 2012 年减少近四分之一, 其中泰国下降约 50%, 马来西亚对虾产量从 2010 年的 7.0×10^4 t 下降至 2011 年的 4.0×10^4 t, 我国自 1.5×10^6 t 下降到 1.3×10^6 t, 下降约 17%^[1], 且该病在接下来的时间仍将严重影响着我国对虾产量, 给我国对虾养殖业健康发展带来威胁。因此, 对 AHPND 病原的研究引起了国内外学者的广泛关注, 仍将是今后的研究焦点和热点, 针对该病的快速检测方法也在不断的研究和完善中。鉴于该病的危害严重, 目前世界动物卫生组织 (OIE) 已将其列入水生动物疫病法定报告目录。

2014 年, 我国对虾养殖成功率仍然很低, 发病率超过 60%。为了满足国内市场需求, 我国开始大量进口对虾, 从对虾出口大国变为进口国, 严重影响了我国对虾产业发展^[2]。目前, 从广州口岸进境的对虾主要是来自越南、泰国、马来西亚三个国家, 数量从 2016 年的 1072.08 t 增长到 2018 年的 1990.83 t, 金额从 2016 年的 1404.85 万美元增长到 2018 年的 2596.99 万美元。其中越南的对虾进口量占总进口量的 70% 多, 而这几个国家的养殖对虾也是急性肝胰腺坏死病爆发严重的国家。

环介导等温扩增 (LAMP) 技术, 利用 4 条特异性引物识别靶基因的 6 个区域, 并加入两条环引物加速反应, 利用一种具有链置换功能的 DNA 聚合酶 (Bst DNA polymerase) 在恒温条件 (60~65 °C) 反应 40~60 min, 即可完成反应。LAMP 的结果判断方法很多, 可以选择荧光法, 在反应体系中加入荧光染料, 用荧光检测系统实时监控, 不用开盖, 可以防止气溶胶的污染, 适合实验室检测; 也可以选择染色法, 扩增后在反应液中加入荧光染料, 混匀后看是否有颜色变化, 适合实地检测。本研究对 2017~2018 两年间白云机场口岸进境的 453 批次对虾样品进行 AHPND 病原的分离和鉴定并进行结果分析, 建立快速检测 AHPND 病

原的环介导等温扩增 (LAMP) 方法, 并对其特异性、灵敏性、稳定性进行验证, 该病原的分离鉴定结果分析为进口对虾的检测提供了参考数据, 快速检测方法的建立为各实验室和基层养殖企业提供一种更加快速和容易操作的方法选择。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源

白云机场口岸进境的对虾样品分别来自越南、泰国、马来西亚三个国家, 本研究在 2017~2018 年两年间从这三个国家进境的对虾样品中共抽取 453 批次进行 AHPND 病原分离鉴定。每批次重 2 kg, 采 2 g 肝胰腺组织。

1.1.2 主要仪器和试剂

3K15 冷冻离心机, 德国 Sima 公司; C1000 梯度 PCR 仪、电泳仪, 美国 Bio-rad 公司; ABI QuantStudio7Flex 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; Multiskan GO 全波长读数仪, 美国 Thermo 公司。

引物由北京六合华大基因科技有限公司广州分公司合成; 甜菜碱 (Betaine) 和 $MgSO_4$, 购自美国 Sigma 公司; Bst DNA polymerase large fragment、 $10 \times$ ThermoPol 反应缓冲液、SYBR Green I 荧光染料, 购自 New England Biolabs 公司; DNA 提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、18-T 载体克隆试剂盒、DH5 α 菌株、质粒提取试剂盒、Taq 酶、 Mg^{2+} 、dNTPs 和 PCR10 \times Buffer 反应液, 购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 AHPND 病原分离鉴定和感染分析

1.2.1 AHPND 病原富集增菌培养

肝胰腺组织匀浆后按照核酸抽提试剂盒的操作要求提取基因组 DNA, 后进行 PCR 扩增。剩下的组织匀浆液按 1:10 的比例放入 3% APW (氯化钠碱性蛋白胨水) 培养基中, 30 °C, 250 r/min 振荡培养 4 h, 离心弃上清, 再进行核酸抽提和 PCR 扩增。

1.2.2 AHPND 病原特定基因的 PCR 扩增

PCR 扩增使用 OIE 《水生动物疾病诊断手册第 2.2.1 章》中推荐的引物 AP3, 检测 AHPND 致病相关的

基因 *pVA1*。引物序列为：AP3-F：5'-ATGAGTAACAATATAAAACATGAAAC-3'；AR3-R：5'-GTGGTAATAGATTGTACAGAA-3'^[3]。反应体系 (25 μ L) 为：2.5 μ L 10 \times PCR buffer (Mg^{2+} free)，0.7 μ L 50 mmol/L $MgCl_2$ ，0.4 μ L 10 mmol/L dNTP Mix，0.5 μ L 10 μ mol/L AP3上游引物，0.5 μ L 10 μ mol/L AP3下游引物，1.25 U Taq酶，DNA模板2 μ L，DEPC水补至25 μ L。反应条件为：94 $^{\circ}C$ 预变性5 min；94 $^{\circ}C$ 变性30 s、53 $^{\circ}C$ 退火30 s、72 $^{\circ}C$ 延伸40 s，30个循环；最后72 $^{\circ}C$ 延伸5 min；4 $^{\circ}C$ 保温。取反应产物5 μ L在1%琼脂糖凝胶中进行电泳20 min，在凝胶成像系统中观察并拍照记录结果。AHPND致病相关的基因*pVA1*的目的片段为333 bp，在333 bp处有明显条带的判定为AHPND病原可疑。

1.2.3 AHPND 病原菌株分离

将可疑的肝胰腺组织培养液用无菌接种环蘸取后于TCBS (硫代硫酸盐-柠檬酸盐-胆盐-蔗糖) 琼脂平板上划线分离，划5~10个平板，37 $^{\circ}C$ 培养箱中培养8~18 h。挑取符合典型副溶血弧菌的可疑菌落，分别接种到5 mL 3% APW培养基的试管中，37 $^{\circ}C$ 培养箱中培养8~18 h，后用细菌DNA提取试剂盒提取菌液基因组DNA，再进行PCR扩增 (反应体系和条件如1.2.2)。

1.2.4 AHPND 病原菌株鉴定

扩增产物为可疑 AHPND 阳性的则进行生化鉴定 (按照 GB 4789.7-2013 进行)，确定是否符合副溶血性弧菌生化反应结果。同时将菌液 PCR 产物送测序，经 BLAST 比对后，确定该分离的菌株是否为携带致病基因 *pVA1* 的特殊副溶血性弧菌。

1.2.5 AHPND 病原分离鉴定结果分析

对 453 批次的进境对虾感染 AHPND 病原的分离鉴定结果进行分析，确定越南、泰国、马来西亚三个国家进境对虾感染 AHPND 病原的阳性检出率情况。

1.3 AHPND-LAMP 引物的设计合成，构建反应体系和优化反应条件

1.3.1 引物设计

根据文献报道，以急性肝胰腺坏死病病原质粒 *pVA1* 的 AP2 基因作为靶基因，采用引物设计软件 Primer Explorer 4.0 设计包括环引物在内的 6 条 LAMP 引物，利用 BLAST 工具对引物序列进行特异性比对，并利用 DNAMAN 和 Oligo 7.0 软件对引物的发夹结构、错配等情况进行分析。引物由北京六合华大基因科技有限公司广州分公司合成，利用 BLAST 工具对引物序列进行特异性比对，使用阳性样品，分别对引物进行筛选，选取表现最好的引物。引物序列见表 1。

1.3.2 AHPND 病原检测靶标基因 *pVA1* 的 AP2 质粒构建

用 LAMP 引物的外引物 F3、B3 对 AHPND 病原基因组 DNA 进行 PCR 扩增，使用 Takara 公司的 Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 试剂盒，按照说明书步骤进行 DNA 片段的回收，使用 Takara 公司的 pMDTM 18-T Vector Cloning Kit 试剂盒，按照说明书步骤进行质粒构建，使用 Takara 公司的 Plasmid Purification Kit Ver.4.0 试剂盒，按照说明书步骤进行质粒的提取。用 Multiskan GO 全波长读数仪检测质粒 DNA 的浓度，将质粒置于 -20 $^{\circ}C$ 冰箱保存。

1.3.3 AHPND-LAMP 反应体系优化

本研究采用优化后的 LAMP 反应体系及条件，25 μ L 反应体系含有：8 mmol/L dNTP mix、10 \times ThermoPol 反应缓冲液、100 mmol/L $MgSO_4$ 水溶液、5 mol/L 甜菜碱、F3 0.2 μ mol/L、B3 0.2 μ mol/L、FIP 1.6 μ mol/L、BIP 1.6 μ mol/L、LF 0.8 μ mol/L、LB 0.8 μ mol/L、DNA 聚合酶 8 U、10 \times SYBR Green I 0.5 μ L，待检样品 2 μ L，用超纯水补齐至 25 μ L，最后在体系表面加密封油防止污染。设置阳性对照和 15 次阴性对照平行，在荧光检测系统中，63 $^{\circ}C$ 反应 45~60 min。如果用染色法则将反应液置于金属浴或水浴锅中 63 $^{\circ}C$ 反应 30~45 min，再把 1 μ L 1000 \times SYBR Green I 显色液小心滴在反应管盖中间，然后颠倒混匀反应管，观察反应液颜色，若呈现黄绿色则为阳性，呈现橙色则为阴性。

1.3.4 灵敏性分析

表 1 LAMP 引物序列

Table 1 Sequence of primers for the LAMP

| 引物名称 | 序列 (5'-3') |
|--------------|---|
| F3 | CTCTGGCTGTACCTACTACA |
| B3 | TTACAGTCATTCAGCGATCC |
| FIP (F1c+F2) | TCGATTAAGCAACCATCCACCTGTAAGTCTCGAGCTTGCTG |
| BIP (B1c+B2) | TTGGGCGAAACGGCAAGATTCAACGTAGGAAGCAACAA |
| LoopF | GGATTTGACGCCACCACT |
| LoopB | CTTAGTGTACCCAGAGCCAAA |

表 2 2017~2018 年进境对虾 AHPND 分离鉴定情况

Table 2 Identification results of imported shrimp in 2017~2018

| 样品来源 | 采样批次 | 肝胰腺直接分离 AHPND 病原阳性 | 检出率 % | 分离出 AHPND 阳性菌株 | 肝胰腺富集培养后分离 AHPND 病原阳性 | 检出率 % | 分离出 AHPND 阳性菌株 |
|------|------|--------------------|-------|----------------|-----------------------|-------|----------------|
| 越南 | 312 | 13 | 4.17 | 0 株 | 68 | 21.79 | 11 株 |
| 泰国 | 92 | 0 | 0 | 0 株 | 5 | 0.05 | 0 株 |
| 马来西亚 | 49 | 0 | 0 | 0 株 | 0 | 0 | 0 株 |
| 总计 | 453 | 13 | 2.87 | 0 株 | 73 | 16.11 | 11 株 |

将阳性对照质粒进行 10 倍梯度稀释, 分别以 1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、1 pg/μL、100 fg/μL、10 fg/μL、1 fg/μL、100 ag/μL 八个梯度浓度作为模板和阴性对照 (灭菌超纯水), 用优化的荧光法、染色法进行检测, 以确定 AHPND-LAMP 反应体系的灵敏性。同时使用相同稀释度的模板进行普通 PCR 反应, 对比两种方法的检测灵敏性。

1.3.5 特异性分析

用建立的 AHPND-LAMP 的反应体系和条件对含传染性皮下和造血器官坏死病毒 (IHHNV)、对虾白斑综合症病 (WSSV)、斑节对虾杆状病毒 (MBV)、虾细菌性肝胰腺坏死病 (NHPB)、对虾杆状病毒 (BP)、对虾黄头病毒 (YHV)、对虾桃拉病毒 (TSV) 和副溶血弧菌 DNA (不含 *pVA1* 基因) 及 AHPND 病原的阳性模板进行扩增和结果判定。IHHNV、WSSV、MBV、YHV、副溶血弧菌均由本实验室分离、鉴定并保存, NHPB、BP、TSV 由广州双螺旋基因技术有限公司赠予。

1.3.6 稳定性分析

以浓度为 100 pg/μL 和 1 pg/μL 的阳性质粒为模板 DNA, 各自设置 15 次平行, 同时设置阴性对照 (灭菌超纯水), 用优化的 AHPND-LAMP 反应体系和条件进行荧光法检测, 计算 Ct 值的标准差 (SD) 和变异系数 (CV), 以确定 AHPND-LAMP 方法的稳定性。

1.3.7 AHPND-LAMP 方法与普通 PCR 方法的对比

用 AHPND-LAMP 荧光法对 37 批次进境对虾样品 (越南 21 批次、泰国 9 批次、马来西亚 7 批次) 进行 AHPND 病原的检测, 并与普通 PCR 检测方法进行对比。

2 结果与讨论

2.1 AHPND 病原分离鉴定和结果分析

分离的菌株符合副溶血性弧菌生化反应结果, 同时菌液 PCR 产物的测序结果与 GenBank 数据库的 AHPND 参考序列 (BAVF0000000.1)^[4] 的同源性达到 98%~99%, 则确定该分离的菌株为携带致病基因 *pVA1* 的特殊副溶血性弧菌^[4-6]。

由于广州白云机场口岸进境的对虾是食用养殖鲜活对虾, 进境时外观上观察都是健康的。采用无菌接种环蘸取肝胰腺组织划线接种到培养基上, 培养后很难分离出形态一致的优势菌群。本研究采用两种病原的分离方法, 一种是直接用对虾的肝胰腺组织抽提基因组 DNA 后进行 PCR 扩增, 分离病原; 另一种是采用 OIE《水生动物疾病诊断手册第 2.2.1 章》中的要求, 把肝胰腺组织富集培养后抽提基因组 DNA, 进行 PCR 扩增再分离病原。实验结果发现: 取对虾的肝胰腺组织不富集培养直接进行 PCR 检测, 检出核酸阳性 13 批次, 感染率仅 2.87%, 且无法分离出阳性菌株; 取肝胰腺组织经过富集增菌培养后, 检出核酸阳性 73 批次, 感染率则高达 16.11%。自越南、泰国、马来西亚进境的 453 批次对虾样品中, 越南的对虾样品阳性感染率最高, 达到 21.79%, 分离出 11 株阳性菌株, 分离成功率为 15.07%。泰国进境对虾感染率只有 0.05%, 未分离出阳性菌株。而马来西亚的进境对虾未检出 AHPND 病原 (见表 2)。

由此可见, 针对病原含量不高的亚临床感染样品或环境样品, 富集增菌培养后再进行检测, 对于检测实验室来讲, 是非常必要的, 可以防止大量的漏检情况出现。采肝胰腺→富集增菌培养→PCR 初筛→分离菌株→菌株鉴定, 是比较好的 AHPND 病原分离方法^[7-11]。

2.2 AHPND-LAMP 反应条件优化

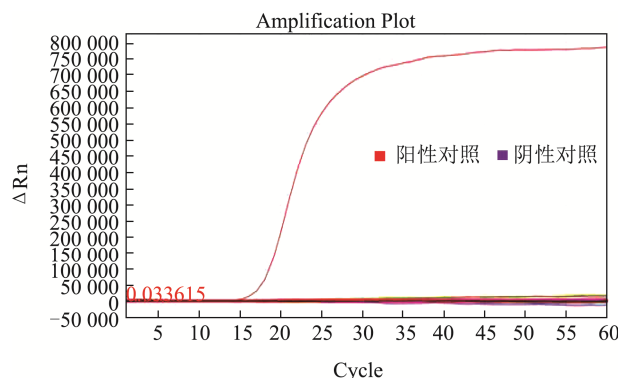


图 1 LAMP 法检测 AHPND 病原的反应条件优化试验

Fig.1 Assessment of optimization of reaction system for the AHPND-LAMP assay

观察 AHPND-LAMP 反应结果, 荧光法最佳的反应条件是 63 °C 30 s; 63 °C 15 s, 63 °C 45 s, 60 个循环, 最佳的反应时间是 60 min 30 s (见图 1); 而染色法最佳的反应时间是 45 min。

2.3 AHPND-LAMP 灵敏性检测

将阳性质粒进行 10 倍梯度稀释后进行 LAMP 检测, 当模板浓度为 1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、1 pg/μL、100 fg/μL、10 fg/μL 和 1 fg/μL 时有明显的扩增曲线和颜色变化, 可见质粒的检测限为 1 fg/μL (图 2a, b)。采用普通 PCR 方法对同样浓度的质粒模板进行扩增, 当模板浓度为 1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、1 pg/μL、100 fg/μL 时有目标条带, 可见其检测限为 100 fg/μL (见图 3)。综合上述检测方法的结果发现, 本文建立的 AHPND-LAMP 检测方法具有很高的灵敏度, 且 LAMP 方法的灵敏度比 PCR 方法高出两个数量级。

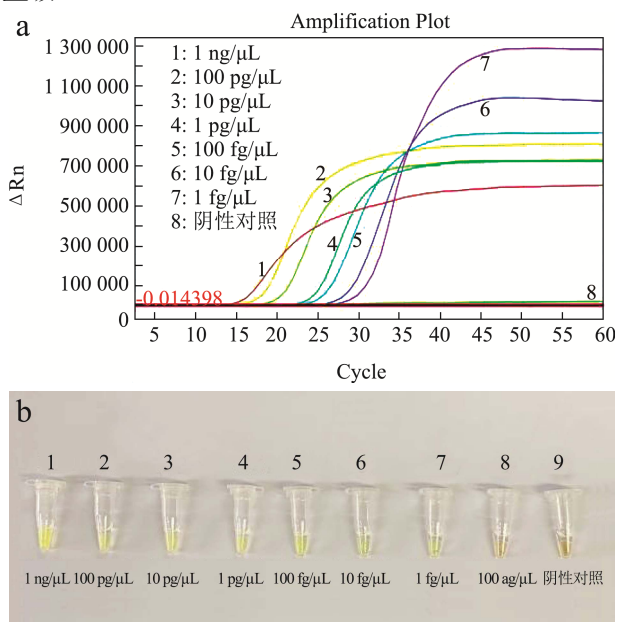


图 2 LAMP 法检测 AHPND 病原的灵敏性试验

Fig.2 Assessment of sensitivity for the AHPND-LAMP assay

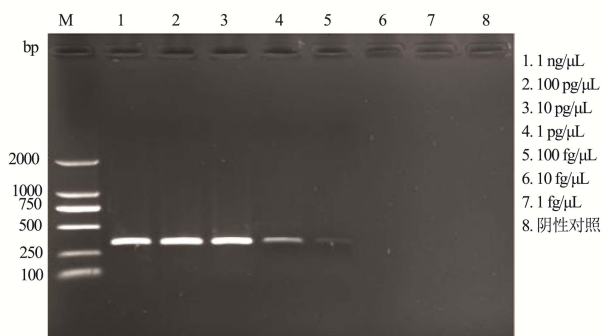


图 3 PCR 法检测 AHPND 病原的灵敏性试验

Fig.3 Assessment of sensitivity for the conventional PCR assay

2.4 AHPND-LAMP 特异性检测

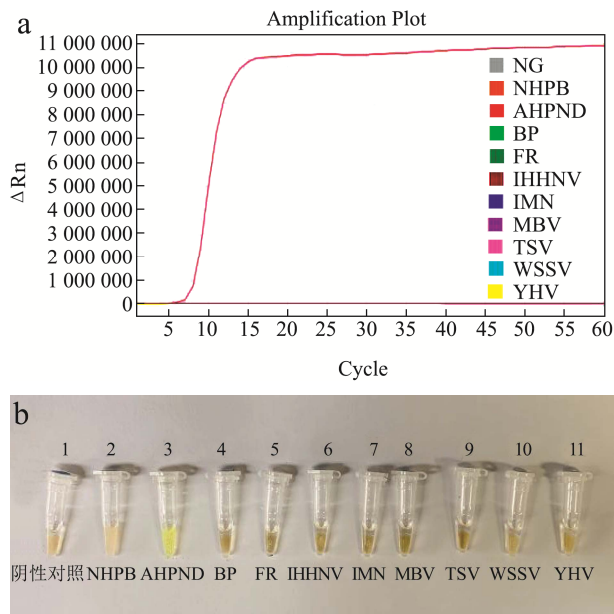


图 4 LAMP 法检测 AHPND 病原的特异性试验

Fig.4 Assessment of specificity for the AHPND-LAMP assay

使用优化后的 AHPND-LAMP 反应方法, 对 10 种虾类疫病进行检测, 荧光法只有 AHPND 出现明显的扩增曲线, 其他疫病没有扩增曲线; 染色法只有 AHPND 出现黄绿色, 其他疫病都是橙色。说明设计的 AHPND-LAMP 反应引物特异性良好 (见图 4)。

2.5 AHPND-LAMP 稳定性检测

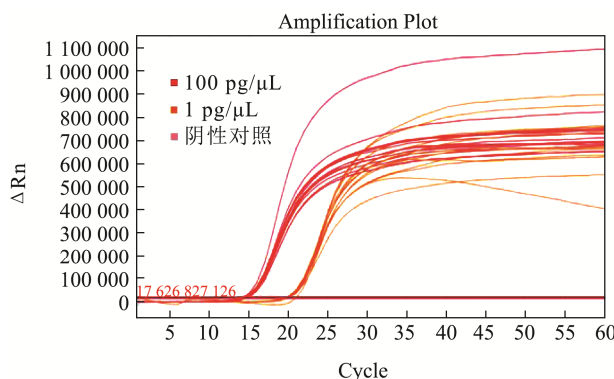


图 5 LAMP 法检测 AHPND 病原的稳定性试验

Fig.5 Assessment of stability for the AHPND-LAMP assay

表 3 LAMP 法检测 AHPND 病原的稳定性试验

Table 3 Assessment of stability for the AHPND-LAMP assay

| 样品名称 | Ct 值平均值 | SD | CV/% |
|-----------|---------|------|------|
| 100 pg/μL | 15.65 | 0.18 | 1.15 |
| 1 pg/μL | 20.93 | 0.20 | 0.95 |

用 100 pg/μL 和 1 pg/μL 的质粒模板进行 15 次重复试验, 验证 AHPND-LAMP 荧光反应方法的稳定性。如图 5 所示, 模板浓度为 100 pg/μL 和 1 pg/μL 的 15

次平行试验中,均产生“S”型扩增曲线,阴性对照无扩增;同一个模板浓度出峰时间相差不大,Ct值的变异系数小于3%(见表3)。由此可见,本文建立的AHPND-LAMP方法具有良好的稳定性。

2.6 LAMP方法与普通PCR方法的比对

表4 实际样品中LAMP和PCR方法检测AHPND病原的结果

Table 4 Detection results of samples by LAMP method and PCR method

| 样品来源 | 样品数量 | LAMP | | | PCR | | |
|------|------|------|----|---------|-----|----|---------|
| | | 阳性 | 阴性 | 阳性检出率/% | 阳性 | 阴性 | 阳性检出率/% |
| 越南 | 21 | 11 | 10 | 35.13 | 7 | 14 | 24.32 |
| 泰国 | 9 | 2 | 7 | | 2 | 7 | |
| 马来西亚 | 7 | 0 | 7 | | 0 | 7 | |
| 总计 | 37 | 13 | 24 | | 9 | 28 | |

3 结论

3.1 目前,关于对虾急性肝胰腺坏死病(Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease, AHPND)的研究更多的是聚焦在病原的确定、致病机理分析和检测方法的建立方面,针对不同样品的病原分离鉴定的研究较少涉及。在病原的分离鉴定上,都是直接采用无菌接种环蘸取肝胰腺组织划线接种到培养基上进行菌株分离,这种分离方法适用于病原含量高的样品,不适用于病原含量不高的亚临床感染样品或环境样品。本研究在分离AHPND的病原时发现针对病原含量不高的亚临床感染样品或环境样品,富集增菌培养后再进行检测,对于检测实验室来讲,是非常必要的,不仅可以防止大量的漏检情况出现,而且可以提高病原的检出率。采样→富集增菌培养→PCR初筛→分离菌株→菌株鉴定,是比较好的病原分离方法。但是在病原菌株分离过程中发现,进行肝胰腺组织富集增菌培养的时候,AHPND的病原菌株在大量增殖的同时,存在于肝胰腺中的普通副溶血性弧菌也在大量的增殖,而且普通副溶血性弧菌常常会形成优势菌群,压制AHPND的病原菌株生长,划线挑菌时,常常挑到的是普通副溶血性弧菌,这给AHPND病原菌株的准确分离带来很大的干扰。使用OIE《水生动物疾病诊断手册第2.2.1章》的富集增菌方法来分离AHPND的病原菌株,对于样品量多的检测,仍不是一个十分高效的方法。所以如何优化AHPND病原菌株的分离鉴定方法,仍是检测上需要进一步研究解决的问题。

3.2 本研究建立的AHPND病原LAMP检测方法,其特异性好,仅AHPND病原具有明显的扩增曲线和颜色变化,没有交叉反应,灵敏度可达到 $1\text{ fg}/\mu\text{L}$,比普通PCR方法高100倍。对实际样品进行检测时,阳

性检出率高于PCR检测结果。传统的PCR方法至少需要2~3h,而LAMP方法可在60min 30s内完成反应。本检测方法非常适用于基层实验室,为AHPND病原的快速鉴定、流行病学调查和风险监控等提供了更好的方法选择。

参考文献

- [1] Loc Tran, Linda Nunan, Rita M Redman, et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2013, 105(1): 45-55
- [2] 陈信忠,郭书林,龚艳清,等.对虾急性肝胰腺坏死综合征病原研究进展[J].*检验检疫学刊*,2016,26(1):72-76
CHEN Xinzhong, GUO Shulin, GONG Yanqing, et al. Progress of pathogen for acute hepatopancreatic necrosis syndrome [J]. *Journal Inspection and Quarantine*, 2016, 26(1): 72-76
- [3] World Organization for Animal Health (OIE). Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease [DB/OL]// *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2021*. (2021 ed: 97-108).https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/2021/2.2.01_AHPND.pdf
- [4] Jee Eun Han, Kathy F J Tang, Loc H Tran, et al. Photorhabdus insect-related (PIR) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp [J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2015, 113(1): 33-40
- [5] Chung-Te Lee, I-Tung Chen, Yi-Ting Yang, et al. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin [J]. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America, 2015, 112(34): 10798-10803
- [6] Hung-Chiao Lai, Tze Hann Ng, Masahiro Ando, et al. Pathogenesis of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(2): 1006-1014
- [7] Arunrut N, Kampeera J, Sirithammajak S, et al. Sensitive visual detection of AHPND bacteria using loop-mediated isothermal amplification combined with DNA-functionalized gold nanoparticles as probes [J]. *Plos One*, 2016, 11(3): 1-18
- [8] Ratchanok, Sirikharin, Suparat, et al. Characterization and PCR detection of binary, pir-like toxins from *Vibrio parahaemolyticus* isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp [J]. *Plos One*, 2015, 10(5): 1-16
- [9] Kongrueng J, Tansila N, Mitraparp-Arthorn P, et al. LAMP assay to detect *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in shrimp [J]. *Aquaculture International*, 2015, 23(5): 1179-1188
- [10] 贾丹, 史成银, 黄捷, 等. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病 (AHPND) 病原分离鉴定及其致病性分析. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 103-111
- JIA Dan, SHI Chengyin, HUANG Jie, et al. Identification and pathogenicity analysis of bacterial pathogen associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in the Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 103-111
- [11] 郭书林, 尤颖哲, 陈河东, 等. 对虾急性肝胰腺坏死综合征不同检测方法结果分析 [J]. *中国动物检疫*, 2020, 37(1): 87-90
- GUO Shulin, YOU Yingzhe, CHEN Hedong, et al. Analysis on the different detection methods for AHPND in shrimps [J]. *China Animal Health Inspection*, 2020, 37(1): 87-90

(上接第 240 页)

- [12] 黎娟, 乔庆东, 庄景新, 等. 改进的高效液相色谱-串联质谱方法同时测定动物性食品中 4 种 β_2 -受体激动剂残留 [J]. *色谱*, 2016, 34(2): 170-175
- LI Juan, QIAO Qingdong, ZHUANG Jingxin, et al. Simultaneous determination of the residues of four β_2 -agonists in animal foods by modified high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2016, 34(2): 170-175

(上接第 297 页)

- [35] LI Chunying, WANG Liangxue, DONG Sisi, et al. Phlorizin exerts direct protective effects on palmitic acid (PA)-induced endothelial dysfunction by activating the PI3K/AKT/eNOS signaling pathway and increasing the levels of nitric oxide (NO) [J]. *Medical Science Monitor Basic Research*, 2018, 24: 1-9
- [36] SUN Yinshi, LI Wei, LIU Zhengbo. Preparative isolation, quantification and antioxidant activity of dihydrochalcones from sweet tea (*Lithocarpus polystachyus* Rehd.) [J]. *Journal of Chromatography B*, 2015, 1002: 372-378
- [37] GAO Jianmei, LIU Shuang, XU Fan, et al. Trilobatin protects against oxidative injury in neuronal PC12 cells through regulating mitochondrial ROS homeostasis mediated by AMPK/Nrf2/Sirt3 signaling pathway [J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2018, 11: 267
- [38] Fasil A, Biadgo B, Abebe M. Glycemic control and diabetes complications among diabetes mellitus patients attending at University of Gondar Hospital, northwest Ethiopia [J]. *Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy*, 2019, 12: 75-83
- [39] 贺筱蓉, 葛根煎剂对四氧嘧啶致糖尿病小鼠血糖及其并发症的影响 [J]. *现代食品科技*, 2007, 10: 32-33
- HE Xiaorong. Effects of *Pueraria lobata* on blood sugar and complications of alloxan-induced diabetes mice [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2007, 10: 32-33
- [40] Sampath Chethan, Sang Shengmin, Ahmedna Mohamed. *In vitro* and *in vivo* inhibition of aldose reductase and advanced glycation end products by phloretin, epigallocatechin 3-gallate and 6-gingerol [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2016, 84: 502-513
- [41] Kahn B B, Shulman G I, Defronzo R A, et al. Normalization of blood-glucose in diabetic rats with phlorizin treatment reverses insulin-resistant glucose-transport in adipose-cells without restoring glucose transporter gene-expression [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1991, 87(2): 561-570