

基于环介导等温扩增法 (LAMP) 检测上海市售贝类产品中副溶血性弧菌的毒力菌株

韩小龙^{1,2}, 张海燕², 曹明秀², 沈晓盛²

(1. 上海海洋大学食品学院, 上海 201306) (2. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090)

摘要: 基于环介导等温扩增法 (LAMP) 对上海市 8-10 月市售贝类产品中副溶血性弧菌毒力菌株 (*tdh* 和 *trh* 毒力基因) 进行检测分析, 共检测贝类样品 180 份, 6 个常规品种, 实验同时采用 PCR 测定方法进行对比。结果表明, 含 *tdh* 和 *trh* 毒力基因的副溶血性弧菌在市售贝类中的检出率分别是 12.77% 和 11.66%, PCR 的分析结果为 11.11% 和 7.78%。对分离的毒力菌株进行血清型分型后发现了 2 株 O3:K6 型副溶血性弧菌, 其中 1 株为毒力基因双阳性菌 (*tdh*+/*trh*+), 2 株 O3:K6 型副溶血性弧菌的 PFGE 条带型相似度较高 (相似度 > 90%)。这些结果表明上海市售贝类产品中副溶血性弧菌毒力菌株存在一定的污染, 应引起足够重视。双阳性 O3:K6 型副溶血性弧菌的出现值得关注, 应对各血清型菌株尤其是 O3:K6 型副溶血性弧菌的流行情况加强监测。PCR 检测结果对比分析表明, LAMP 方法适用于贝类产品中副溶血性弧菌毒力菌株的检测分析。

关键词: 副溶血性弧菌; 市售贝类; 环介导等温扩增法; *tdh* 基因; *trh* 基因

文章编号: 1673-9078(2015)9-278-283

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.9.045

Detection of Virulent *Vibrio parahaemolyticus* Strains from Commercial Shellfish in Shanghai by Loop-mediated Isothermal Amplification

HAN Xiao-long^{1,2}, ZHANG Hai-yan², CAO Ming-xiu², SHEN Xiao-sheng²

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China.)

(2. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Fisheries Academy of Fishery Science, Shanghai 200090, China)

Abstract: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) was used to detect and analyze virulence-associated genes, thermostable direct hemolysin (*tdh*) and thermostable-related hemolysin (*trh*), in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from commercial shellfish in Shanghai from August to October, 2014. A total of 180 samples of six common species of shellfish were studied and results were compared between LAMP and polymerase chain reaction (PCR) assays. The detection rates of *tdh* and *trh* genes in *Vibrio parahaemolyticus* strains from commercial shellfish were 12.77% and 11.66% using LAMP as compared to 10.55% and 7.77% by PCR, respectively. Serotyping the isolated virulent strains revealed two O3:K6 serotype *Vibrio parahaemolyticus* strains, including one carrying double-positive virulence genes (*tdh*+/*trh*+). Additionally, high similarity was observed between pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) bands of two O3:K6 serotype *Vibrio parahaemolyticus* strains (similarity > 90%). The results indicate contamination of commercial shellfish in Shanghai by virulent strains of *Vibrio parahaemolyticus*, where the emergence of *tdh*+/*trh*+ O3:K6 serotype *Vibrio parahaemolyticus* is a cause for concern. Surveillance needs to be strengthened, for *Vibrio parahaemolyticus* strains of different serotypes, especially the O3:K6 serotype. Results from the comparison with PCR assay indicated that LAMP method was suitable for the detection of virulent strains of *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish.

Key words: *Vibrio parahaemolyticus*; commercial shellfish; loop-mediated isothermal amplification; thermostable direct hemolysin gene; thermostable-related hemolysin gene

副溶血性弧菌 (*Vibrio Parahaemolyticus*) 是近年来我国特别是沿海城市的首要食源性致病菌。从 1992-2001 年的统计数据结果来看, 副溶血性弧菌是

收稿日期: 2014-12-04

基金项目: 中央公益型科研院所基本科研业务费项目 (2014T05)

作者简介: 韩小龙 (1989-), 男, 研究生

通讯作者: 沈晓盛 (1977-), 男, 副研究员, 从事水产品质量与安全研究

这十年间引起食物中毒的主要致病菌, 特别是 1998 年以来, 副溶血性弧菌中毒事件的发生数量呈明显上升趋势, 并逐渐超过沙门氏菌成为首要的食源性致病菌^[1]。资料显示, 该菌在我国引起食源性疾病每年约 495.1 万人次, 发病比例已远高于各发达国家^[2]。由于副溶血性弧菌广泛存在于海洋环境中, 可通过海水或食物链传递到鱼、虾、贝等海产品中, 因此常能在海

产品中分离到该菌,其检出率一般都在 20%以上^[3],尤其是贝类产品,检出率相对更高,甚至可以高达 80%以上^[4]。然而,并非所有的副溶血性弧菌都是致病的,只有感染携带耐热直接溶血素 *tdh*(thermostable direct hemolysin)和耐热直接溶血素相关溶血素 *trh* (*tdh*-related hemolysin)基因的副溶血性弧菌才可能使人发病,感染该菌后可引发以腹泻、腹痛为主的急性肠胃炎症状,严重的还会引发原发性败血症。然而,尽管副溶血性弧菌在贝类中的检出率很高,但我国现有的国标检测方法未针对其毒力基因进行检测和分析,所以从中检出的副溶血性弧菌多为不含毒力基因的非致病菌,其结果并不能真正反映该菌的危害程度。因此,检测和分析贝类中携带毒力基因的副溶血性弧菌真实污染情况对预防贝类产品中副溶血性弧菌感染具有十分重要的意义。

环介导等温扩增法(Loop-Mediated Isothermal Amplification),简称 LAMP,是一种在恒温条件下实现目的基因快速扩增的基因扩增技术。该技术较传统的 PCR 法有更高的特异性和扩增效率,且操作更为简便^[5]。因此, LAMP 和 LAMP-MPN 可以作为一种有效的定性和定量检测工具对目的基因进行检测^[6]。目前, LAMP 技术已越来越多的被用于副溶血性弧菌的定性定量检测中^[7]。脉冲场凝胶电泳(PFGE)可以对分离的副溶血弧菌毒力菌株进行分子分型^[8],从而为毒力菌株引起的食源性疾病溯源及其分子流行病学研究提供参考。本文基于 LAMP 法对上海市市售贝类中携带 *tdh* 和 *trh* 毒力基因的副溶血性弧菌进行检测。并用 PCR 方法进行对比分析。一方面,是为了进一步了解上海市市售贝类中的副溶血性弧菌毒力菌株污染的真实情况,以便为该菌引起的食源性疾病控制提供事实依据;另一方面,可进一步确认 LAMP 方法对贝类中副溶血性弧菌毒力菌株的检测效果,以便为贝类产品质量安全监管提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

实验所需贝类样品于 2014 年 8 月至 10 月在上海市铜川路水产市场随机购买,品种包括蛤蜊、牡蛎、缢蛏、贻贝、文蛤和扇贝共 180 份,每月采集每种贝类各 10 份,连续采集三个月。样品运回实验室后立即开始检测。

1.1.2 标准菌株来源

副溶血性弧菌标准菌株 ATCC33847(*tdh*+/*trh*-,

O4:K11)和 ATCC17802(*tdh*-/*trh*+,O1:K1)来自中国科学院微生物研究所。PFGE 相对分子量标准(沙门菌 Braenderup 血清型菌株 H9812)由上海市疾病预防控制中心微生物实验室提供。

1.1.3 试剂

LAMP 固体 DNA 扩增试剂盒(日本荣研株式会社),PCR 试剂(上海生工生物工程技术有限公司),副溶血性弧菌分型用免疫血清(O 群别和 K 型别,日本生研公司),科玛嘉培养基(上海科玛嘉微生物技术有限公司),TSA、TSB、3% APW(北京陆桥技术有限责任公司)。其余试剂均购于国药集团,分析纯。

1.1.4 仪器

台式高速冷冻离心机(Techcomp, CT14RD),干式恒温金属浴(Bio-Medical Science, BSR-M002),PCR 扩增仪(Eppendorf, 6325),凝胶成像分析仪(BIO-RAD, Gel Doc™ XR+),脉冲凝胶电泳仪(BIO-RAD Chef M apper™)。

1.2 方法

1.2.1 引物选择

表 1 *tdh* 和 *trh* 基因的 LAMP 引物

Table 1 Primers for *tdh* and *trh* genes used for LAMP assay

引物	序列(位置编号)
<i>tdh</i> -FIP	gtacctgacgttgtaactgattgtctctgacttttgacaac(F1c-F2)
<i>tdh</i> -BIP	tgacatcctacatgactgtgaacacttatagccagacaccgc(B1c-B2)
<i>tdh</i> -F3	agatattgtttgttctcagat(F3)
<i>tdh</i> -B3	aacacagcagaatgaccg(B3)
<i>tdh</i> -LF	gtacggttttcttttacattacg(LFc)
<i>tdh</i> -LB	aagactatacaatggca(LB)
<i>trh</i> -FIP	ctttctggttataaacatggtacttctataaaagtctgttttaggcttg(F1c-F2)
<i>trh</i> -BIP	tataggcgcttaacactttgaacaaagatgtatagcgtcaat(B1c-B2)
<i>trh</i> -FIP2	tctggctataaagatggccttcaagaatgttctgatttaggcttg(F1c-F2)
<i>trh</i> -BIP2	tataggcgcttaaccatttgataaaagcgttcacggtcaat(B1c-B2)
<i>trh</i> -F3	tgccgctctcatatgc(F3)
<i>trh</i> -B3	ggaggactattggacaac(B3)
<i>trh</i> -LF	cggtcttcacaaaatcagag(LFc)
<i>trh</i> -LB	acccgcagttgtgaaaaccg(LB)
<i>trh</i> -LB2	gcctgaagctgtgaaaaccg(LB)

本实验使用的 LAMP 引物来源于副溶血性弧菌 *tdh*^[9]和 *trh*^[10]基因序列,该套引物包括 2 个内引物、2 个外引物和 2 个环引物(表 1)。LAMP 引物由 Greiner Bio One 提供合成。参照 FDA 2004 Bacteriological Analytical Manual Online Chapter 9 中的 PCR 检测方法来分析副溶血性弧菌毒力菌株在贝类中的分布情况。PCR 实验中使用的 *tdh*、*trh*^[11]引物(表 2)由上海生

工生物工程技术有限公司提供合成。

表 2 *tdh* 和 *trh* 基因的 PCR 引物

Table 2 Primers for *tdh* and *trh* genes used for PCR assay

引物	序列
<i>tdh</i> -D3	ccactaccactctcatatgc
<i>tdh</i> -D5	ggtaactaaatggctgacatc
<i>trh</i> -R2	ggctcaaaatggtaagcg
<i>trh</i> -R6	cattccgctctcatatgc

1.2.2 DNA 模板制备

取 1 mL 增菌液至 1.5 mL 离心管中, 14000 r/min 离心 1 min。弃上清液, 后加入 1 mL 灭菌生理盐水混匀。沸水中加热 5 min 后立即放入冰中保持 2 min。14000 r/min 再离心 5 min。取上清液作为实验用 DNA 模板。

1.2.3 LAMP 反应程序

将 DNA 模版 (*tdh* 检测: 1.3 μL、*trh* 检测: 2.3 μL) 和去离子水 (*tdh* 检测: 23.7 μL、*trh* 检测: 22.7 μL) 加入含有 LAMP 固体试剂的 8 连管中, 轻轻翻转 10 次使固体试剂充分溶解。之后置于 65 °C 恒温金属浴加热 1 h。1 h 后升至 80 °C 保持 15 min 终止反应。肉眼观察反应管内出现白色沉淀即为阳性反应。

1.2.4 PCR 反应程序

DNA 模版 (十倍稀释液, 1.2 μL)、10X 缓冲液 (无氯化镁, 2 μL)、25 mM 氯化镁溶液 (1.6 μL)、2.5 mM

dNTP 溶液 (1.6 μL)、10 μM 引物溶液 (0.8×2 μL)、DNA 聚合酶 (0.1 μL)、去离子水 (11.9 μL), 体系共 20 μL。预变性 96 °C 5 min; 94 °C 1 min、55 °C 1 min、72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min。

1.2.5 血清型分型

副溶血性弧菌血清分型采用玻片凝集法, 依据 GB 4789.7-2013 食品安全国家标准, 食品微生物学检验, 副溶血性弧菌血清型检验方法进行。

1.2.6 PFGE 分析

菌悬液浓度控制在 3.6~4.0 之间, 56 °C 下将其与等体积的 1% SeaKem Gold 凝胶混合制成含菌胶块, 蛋白酶 K 进行消化处理, 使用 Not I 于 37 °C 下酶切 3 小时。电泳条件设置为: 脉冲转换时间 10s-35s, 线性递增, 电压 6 v/cm, 脉冲角度 120 °C 电泳时间 19 h, 全程温度控制在 14 °C。初始电流控制在 135mA-145 mA 之间。

2 结果与分析

2.1 毒力菌株的污染状况分析

从表 3 可以看出, 在上海市水产品销售市场随机抽取的 180 份贝类样品中, LAMP 检测结果共存在 23 份 *tdh* 阳性样品和 21 份 *trh* 阳性样品, 检出率分别为 12.77% 和 11.66%。

表 3 *tdh* 和 *trh* 毒力基因的 LAMP 和 PCR 定性检测

Table 3 Qualitative detection results for *tdh* and *trh* virulence genes by LAMP and PCR

种类	8 月份(阳性份数/总份数)				9 月份(阳性份数/总份数)				10 月份(阳性份数/总份数)				总计(阳性份数/总份数)			
	LAMP		PCR		LAMP		PCR		LAMP		PCR		LAMP		PCR	
	<i>tdh</i> +	<i>trh</i> +	<i>tdh</i> +	<i>trh</i> +	<i>tdh</i> +	<i>trh</i> +	<i>tdh</i> +	<i>trh</i> +	<i>tdh</i> +	<i>trh</i> +	<i>tdh</i> +	<i>trh</i> +	<i>tdh</i> +	<i>trh</i> +	<i>tdh</i> +	<i>trh</i> +
蛤蜊	3/10	2/10	1/10	2/10	3/10	2/10	2/10	1/10	2/10	3/10	3/10	2/10	8/30	7/30	6/30	5/30
牡蛎	0/10	0/10	1/10	0/10	1/10	2/10	0/10	1/10	2/10	2/10	1/10	2/10	3/30	4/30	2/30	3/30
缢蛏	2/10	2/10	2/10	2/10	2/10	3/10	1/10	2/10	2/10	2/10	1/10	1/10	6/30	7/30	4/30	5/30
贻贝	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/30	0/30	0/30	0/30
文蛤	1/10	0/10	2/10	0/10	1/10	0/10	2/10	0/10	2/10	0/10	2/10	0/10	4/30	0/30	6/30	0/30
扇贝	1/10	1/10	0/10	0/10	1/10	1/10	2/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	2/30	3/30	2/30	1/30
共计	7/60	5/60	6/60	4/60	8/60	9/60	7/60	5/60	8/60	7/60	7/60	5/60	23/180	21/180	20/180	14/180
检出率%	11.66	8.33	10	6.66	13.33	15	11.66	8.33	13.33	11.66	11.66	8.33	12.77	11.66	11.11	7.78

表 4 *tdh* 和 *trh* 毒力基因的 LAMP-MPN 和 PCR-MPN 定量检测

Table 4 Quantitative detection results for *tdh* and *trh* virulence genes by LAMP-MPN and PCR-MPN

种类	LAMP 定性		LAMP 定量(MPN/g)		PCR 定性		PCR 定量(MPN/g)	
	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>	<i>tdh</i>	<i>trh</i>
蛤蜊	+	+	7.5	>110	+	+	4.3	110
文蛤	+	-	9.3	/	+	-	4.3	/
缢蛏	+	+	72	29	+	+	36	28
贻贝	-	-	/	/	-	-	/	/

PCR 检测结果共存在 20 份 *tdh* 阳性样品和 14 份 *trh* 阳性样品, 检出率分别是 11.11% 和 7.78%。这表明上海市市售贝类中存在一定的副溶血性弧菌毒力菌株, 食用贝类产品尤其是生食或半生食贝类存在潜在的副溶血性弧菌毒力菌株的感染风险。两种方法的检测结果均高于 2011 年上海市市售水产品中副溶血性弧菌毒力基因的检测结果^[3]。一方面, 较高的检出率可能是因为采样时间集中于副溶血性弧菌污染最为严重的 8~10 月份, 在此时间段内平均气温和海水温度均要比其他月份高, 这更加利于副溶血性弧菌的生长的繁殖。另一方面, 贝类因其生长的固定性和滤食性特点, 对副溶血性弧菌具有一定富集作用, 因而其携带副溶血性弧菌的几率要大于其他类水产品, 这也可能会造成其相对较高的副溶血性弧菌毒力菌株检出率。从两种检测方法的检测结果对比可以看出, LAMP 法对副溶血性弧菌 *tdh* 毒力菌株的检出率要稍高于 PCR 法, LAMP 法对副溶血性弧菌 *trh* 毒力菌株的检出率要明显高于 PCR 法。后者差异较大的原因可能是 LAMP 法使用了两种 *trh* 基因引物, 对毒力菌株的选择范围更大。为了进一步了解副溶血性弧菌毒力菌株在样品中的含量, 对从 10 月份随机选择的 3 种阳性样品和 1 种阴性样品分别进行了一次 LAMP-MPN 和 PCR-MPN (15 管法) 定量检测。检测结果如表 4 所示。

两种定量结果表明, 双阳性样品 (*tdh+*/*trh+*) 中的 *tdh* 和 *trh* 毒力基因的含量会有显著差异 ($P < 0.01$), 如蛤蜊中的副溶血性弧菌 *trh* 毒力基因的含量是副溶血性弧菌 *tdh* 毒力基因含量的 14 倍以上。在定性实验中一直表现为阴性结果的贻贝在定量试验中仍未检出副溶血性弧菌毒力菌株。同时可以看出, 在 3 种阳性贝类样品中 LAMP-MPN 的 *tdh* 和 *trh* 基因的定量结果均高于 PCR-MPN。原因可能是 LAMP 技术在 15 管法 MPN 测试中较 PCR 技术有更高的灵敏性。此外, 本次定量结果与各个样品的增菌液在科玛嘉平板上生长后显示的紫色菌落数量相一致, 如蛤蜊和缢蛭生长的紫色菌落很多, 文蛤有少量紫色菌落, 贻贝未出现紫色菌落。这在一定程度上说明了副溶血型弧菌毒力菌株的存在量与副溶血性弧菌总体存在量有一定的正相关性。

2.2 毒力菌株的分离及血清型鉴定

近年来, O3:K6 型副溶血性弧菌已经成为亚洲地区的主要流行菌株, 我国每年也会发生多起 O3:K6 型副溶血性弧菌的感染流行事件。为了进一步了解本次检测结果中副溶血性弧菌毒力菌株的血清型类型, 对

贝类样品进行毒力菌株分离实验。实验最终在 180 份样品中分离出 96 株副溶血性弧菌菌株。并在其中的 4 份阳性样品中分离得到 5 株副溶血性弧菌毒力菌株 (表 5), 毒力菌株的分离率约在 5.2%。本次分离实验采用了一种新型的分离方法“两步增菌法”。第一阶段: 使用接种环对显色平板上所有的紫色菌落和区域进行蘸取, 转移至 TSB 培养基中增殖培养, 再对增菌液进行 LAMP 毒力基因检测, 该阶段重复 1 至 2 次并逐渐减小蘸取菌落数和区域面积。第二阶段: 对前一步毒力菌株含量大幅提升后的增菌液进行平板划线培养, 之后挑取单菌落并转移至 4×6 画好线的 24 格平板上, 并对每个格内的单菌落分别进行 LAMP 检测, 通过阳性结果即可在平板上找到对应编号的副溶血性弧菌毒力菌株。

从表 5 中可以看出, 在蛤蜊样品中分离出了两种携带不同毒力基因的副溶血性弧菌 (*tdh+*/*trh+*, *tdh-*/*trh+*)。这说明在同一份蛤蜊样品中可能同时存在两种或以上携带不同毒力基因的毒力菌株。因此这在一定程度上解释了定量实验时蛤蜊样品中 *trh* 毒力基因的数量远大于 *tdh* 毒力基因的原因。此次分离得到的副溶血性弧菌毒力菌株均含有 *trh* 毒力基因, 这可能是因为本实验室使用了两种 *trh* 毒力基因引物, 对 *trh* 毒力基因的选择范围更大。另具美国的一项研究表明, 从食物中或环境中分离得到的毒力菌株几乎都会同时产生 *tdh* 和 *trh* 溶血素^[12], 而 *tdh* 毒力基因会在生长增值过程中自发的消失。本次实验分离的 5 株菌全部携带有 *trh* 毒力基因, 有三株毒力菌株不携带 *tdh* 毒力基因, 实验结果在一定程度上与上述研究相符合。还有研究认为根据从患者排泄物中分离的毒力菌株的基因型来看, 携带 *tdh* 基因但不携带 *trh* 基因的菌株才是能够引起流行的副溶血性弧菌菌株^[13]。因此携带毒力基因的副溶血性弧菌在感染人体后是否会发生特定的基因变化仍有待研究。

表 5 *tdh* 和、或 *trh* 毒力基因菌株的分离和血清型分型

Table 5 Isolation of *V. parahaemolyticus* strains carrying *tdh* and/or

<i>trh</i> genes and serotype classification				
种类	菌株名称	血清型	<i>tdh</i>	<i>trh</i>
蛤蜊	HC20141001-1	O4:K34	+	+
	HC20141001-2	O2:K28	-	+
	HC20141101-1	O3:K6	-	+
缢蛭	RC20141001-1	O3:K6	+	+
扇贝	SC20141101-1	O3:K45	-	+

血清型鉴定结果表明, 5 株毒力菌株分属 4 个不同的血清型 (表 5)。从蛤蜊和缢蛭中各分离出一株 O3:K6 型副溶血性弧菌, 占总分离菌数的 40%。之前

的研究表明环境中分离得到的 O3:K6 型副溶血性弧菌只携带 *tdh* 或者是 *trh* 毒力基因^[14]。本次实验首次分离得到一株双阳性 (*tdh*+/*trh*+) 的 O3:K6 型副溶血性弧菌。这表明该型菌在毒力基因上产生了新的变化。是否会因此而引发更严重的感染事件值得警惕。在蛤蜊样品中出现了三种不同血清型的副溶血性弧菌毒力菌株, 可见副溶血性弧菌毒力菌株在样品中产生污染的复杂性。

2.3 PFGE 分析

表型鉴定往往无法区分相同血清型的不同的菌株。为了进一步从基因水平区分两株 O3:K6 型副溶血性弧菌, 对分离菌进行了 PFGE 分析。PFGE 结果显示不同血清型的副溶血性弧菌 PFGE 带型相似性较低, 同菌群之间有一定相似性 (图 1)。从蛤蜊和缢蛏中分离出的两株 O3:K6 型副溶血性弧菌的 PFGE 条带型相似度较高 (>90%), 菌株间亲缘关系较近。这两株 O3:K6 型菌的 PFGE 条带不仅彼此之间差异较小, 与之前的 O3:K6 型菌的带型相比也发生了一定的变化, 这种变化是否与其毒力基因的变化相适应还有待研究。蛤蜊中分离出的三株毒力菌株的 PFGE 条带表明, 该种贝类样品中存在的副溶血性弧菌毒力菌株亲缘关系较远。这表明某一型的毒力菌株并没有在该贝类产区产生大规模的流行。

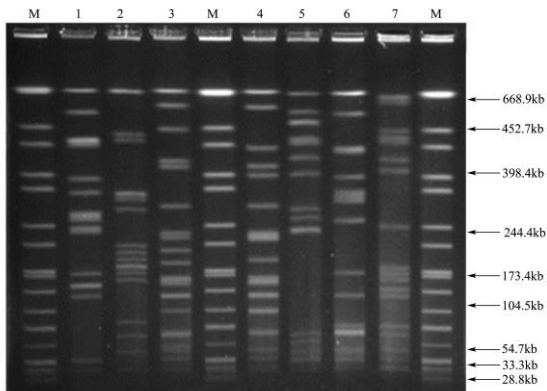


图 1 5 株分离菌和 2 株标准菌的 PFGE 凝胶电泳图

Fig.1 PFGE pattern obtained for five isolated strains and two standard strains

注: M, H9812; 1, HC20141001-1; 2, HC20141001-2; 3, RC20141001-1; 4, HC20141101-1; 5, SC20141101-1; 6, ATCC17802; 7, ATCC33847.

3 结论

3.1 8~10 月上海市市售贝类中副溶血性弧菌毒力菌株含 *tdh* 和 *trh* 毒力基因的副溶血性弧菌的检出率分别是 12.77% 和 11.66%。较其他文献报道略高, 说明该

菌对贝类产品食用的安全性具有潜在的威胁, 尤其是用于生食或半生食的贝类产品, 应引起足够的重视。

3.2 LAMP 法检测的副溶血性弧菌 *tdh* 毒力菌株分析结果略高于 PCR 法, 对副溶血性弧菌 *trh* 毒力菌株检测时选择了 2 种引物, 因此比 PCR 法检测时使用的 1 种引物所产生的检测结果更高。对比实验说明 LAMP 法用于贝类中副溶血性弧菌毒力菌株的检测分析是可行的。

3.3 分离出的 2 株 O3:K6 型副溶血性弧菌毒力菌株的基因型有所不同, 特别是双阳性 O3:K6 血清型菌株 (*tdh*+/*trh*+) 的出现应该引起足够重视, 建议进一步加强对该菌的监测, 防止该菌引起的食源性疾病的发生。

参考文献

- [1] 陈瑞英, 鲁健章, 苏意城, 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): 341-247
CHEN Rui-ying, LU Jian-zhang, SU Yi-Cheng, et al. Review on risk analysis, detection and control of *Vibrio parahaemolyticus* in food [J]. Food Science, 2007, 28(1): 341-347
- [2] 毛雪丹, 胡俊峰, 刘秀梅, 等. 用文献综述法估计我国食源性副溶血性弧菌病发病率[J]. 中华疾病控制杂志, 2013, 17(3): 265-267
MAO Xue-dan, HU Jun-feng, LIU Xiu-mei, et al. Study on incidence of foodborne disease caused by *Vibrio parahaemolyticus* by literature review method [J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2013, 17(3): 265-267
- [3] 高玮, 潘迎捷, 赵勇, 等. 上海市水产品中副溶血性弧菌的分离、鉴定及毒力基因和血清型分布[J]. 食品与生物技术学报, 2011, 30(2): 278-282
GAO Wei, PAN Ying-jie, ZHAO Yong, et al. Isolation, identification, serotype and virulence of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the aquatic products in Shanghai markets [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2011, 30(2): 278-282
- [4] 陈永红, 李晶, 唐雨德. 南京夏秋季海产品中副溶血性弧菌的污染监测及其毒力与耐药性[J]. 实用预防医学, 2012, 19(4): 500-502
CHEN Yong-hong, LI Jing, TANG Yu-de, et al. Surveillance on contamination, virulence and drug resistance of *Vibrio parahaemolyticus* in summer and autumn seafood in Nanjing [J]. Practical Preventive Medicine, 2012, 19(4): 500-502
- [5] Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal

- amplification (LAMP): recent progress in research and development [J]. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2013, 19(3):404-411
- [6] Zhao Xi-hong, Wang Li, Chu Jin, et al. Rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* strains and virulent factors by loop-mediated isothermal amplification assays [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2010, 19(5):1191-1197
- [7] Wang Li, Zhao Xi-hong, Chu Jin, et al. Application of an improved loop-mediated isothermal amplification detection of *Vibrio parahaemolyticus* from various seafood samples [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2011, 5(31): 5765-5771
- [8] 姜晓冰,关文英,申志新,等.食源性副溶血弧菌脉冲场凝胶电泳分型[J].*现代食品科技*,2009,25(2):146-148
JIANG Xiao-bing, GUAN Wen-ying, SHEN Zhi-xin, et al. Molecular typing of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* by pulsed-field gel electrophoresis [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2009, 25(2): 146-148
- [9] Yamazaki W, Kumeda Y, Misawa N, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of the *Tdh* and *Trh* genes of *Vibrio parahaemolyticus* and related vibrio species [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(3): 820-828
- [10] Yamada. Oral presentation at US-Jap. CMSP 47th Ann. Joint Meet. Cholera. 2012
- [11] Tada J, Ohashi T, Nishimura N, et al. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*Tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*Trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 1992, 6(6): 477-487
- [12] DePaola A, Kaysner C A, Bowers J, et al. Environmental investigations of *Vibrio parahaemolyticus* in oysters after outbreaks in Washington, Texas, and New York (1997 and 1998) [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(11): 4649-4654
- [13] 沙丹,刁保卫,肖勇,等.2009-2011年无锡市副溶血性弧菌分离菌株的毒力检测及 PFGE 分析[J].*中国病原生物学杂志*, 2012,7(7):507-509
SHA Dan, DIAO Bao-wei, XIAO Yong, et al. Detection of virulence factors and pulsed field gel electrophoresis analysis of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from wuxi from 2009-2011 [J]. *Journal of Pathogen Biology*, 2012, 7(7): 507-509
- [14] Matsumoto C, Okuda J, Ishibashi M. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2000, 38(2):578-585