

不同试剂盒检测急性肝胰腺坏死病 比对与分析

莫钻兰 李敏* 黄炳炽 彭家杰 洪伟彬 胡健声 黄洁莹

广东省东莞市动物疫病预防控制中心,广东东莞 523000

摘要 为加强水生动物防疫系统实验室能力建设,东莞市动物疫病预防控制中心参加了2020年由全国水产技术推广总站组织的对虾急性肝胰腺坏死病病原检测能力测试。按照中国水产科学研究院黄海水产研究所(以下简称黄海所)下发的《作业指导书》,对样品进行鉴定。检测结果为满意。另外,东莞市动物疫病预防控制中心以本次参测的样品为检测样品,选用3种商品化的对虾肝胰腺坏死荧光PCR检测试剂盒(A、B、C)进行试验分析,结果表明:A与C的检测结果与标准结果相同,B未检出阳性盲样。

关键词 急性肝胰腺坏死病;能力测试;不同试剂盒

急性肝胰腺坏死病(acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND),因其主要发生于虾苗放养后7~30 d,又名早期死亡综合征(early mortality syndrome, EMS)^[1-2],死亡率可达100%^[3],是近年来出现的一种新型致命性的细菌性疾病,主要危害凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)和中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)。该病最早于2010年被发现,近年来,马来西亚、越南、泰国、菲律宾、墨西哥等国家相继有所报道^[4-9],使全球对虾养殖业每年损失近10亿美元^[10],严重影响了对虾产业的发展。

血清学分型、生化鉴定是检测鉴定细菌的经典方法,郭书林等^[11]研究发现,MALDI-TOF-MS检测效率高于生化鉴定方法,与PCR结合使用更有利于急性肝胰腺坏死病的诊断和监测。随着检测技术的不断发展,越来越多商品化的实时荧光定量PCR检测试剂盒被研发出来。本研究就本实验室参加的急性肝胰腺坏死能力测试的样品来对比和分析不同商品化荧光定量PCR试剂盒检测结果的一致性。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 样品。此次待检样品和阳性标准物质均由中国水产研究院黄海水产研究所(以下简称黄海所)提供。8份样品均保存于95%乙醇中,编号为107873、107231、107122、107512、107243、107235、107431、107233。

2) 试剂。海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒(批号:S8107)购自天根;引物探针(批号:111516527)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;预混液(批号:AK11116A)购自Takara;3种商品化的对虾肝胰腺坏死荧光PCR检测试剂盒分别来自不同生产厂家:A(批号:200417)、B(批号:67054)、C(批号:JC0003202006)。

3) 仪器设备。生物安全柜,高速离心机,荧光PCR仪。

1.2 方法

1) 本次能力测试要求的检测方法。按照黄海所下发的《病原测试项目作业指导书》,依据SC/T 7233-202X《急性肝胰腺坏死病诊断规程》(报批稿)

收稿日期:2021-03-09

*通讯作者

莫钻兰,女,1988年生,助理兽医师、经济师。

进行试验分析。

①核酸提取。使用天根 DNA 提取试剂盒,依其说明书提取急性肝胰腺坏死病毒的核酸。

②qPCR 检测。按表 1 中引物和探针配置 qPCR 反应体系,分装到 PCR 管中,分别加入样品模板 DNA,阴性对照和阳性对照。混匀离心后,置于荧光定量 PCR 仪中。按表 1 中的反应程序进行扩增,25 μL PCR 反应体系,包括:2 \times PCR Premix (Probe qPCR) 12.5 μL 、引物 VpPirA-F (10 mol/L) 0.75 μL 、引物 VpPirA-R (10 mol/L) 0.75 μL 、Taqman Probe (10 mol/L) 0.25 μL 、模板 DNA (浓度:50~100 ng/ μL) 1 μL 、灭菌双蒸水 9.75 μL 。结果判定标准详见表 2。

2) 商品化的急性肝胰腺坏死实时荧光定量

PCR 检测。以本次参测盲样为样品,从市场上选取 3 家不同厂家生产的实时荧光定量 PCR 检测试剂盒检测(由 A、B、C 代替)进行试验与分析,3 种试剂盒的试验成立标准、结果判定标准各不相同(表 3)。按照各自试剂盒说明书配制荧光 PCR 反应体系,依次加入阴性对照、样品核酸和阳性对照,加样后及时盖紧管盖,做好标记,混匀后离心,按照各自的反应程序扩增。

2 结果与分析

2.1 核酸检测结果

依据《SC/T 7233-202X》(报批稿)方法对样品进行试验分析。如图 1 所示,阳性质控 Ct 值为 22.65 且有典型的 S 型曲线,阴性对照无 Ct 值,试验成立。

表 1 qPCR 检测的引物、探针、反应程序和时间

扩增基因	引物和探针	引物和探针序列(5'→3')	反应程序	反应时间/min
	VpPirA-F	TTGGACTGTCGAACCAAACG		
pirAvp	VpPirA-R	GCACCCATTGGTATTGAATG	95 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45 个循环,在每个循环结束后收集荧光信号	60
	Taqman Probe	6'FAM-AGACAGCAAACATACACCTATCATCCCG-GA-3'TAMRA		

表 2 试验结果判定标准

试剂成立标准	结果判定
阳性对照:Ct 值 \leq 35 且出现 S 型典型扩增曲线; 阴性对照:无 Ct 值	Ct 值 \leq 35 且出现典型扩增曲线, Vahpnd 核酸阳性; Ct 值 \geq 40 或无扩增曲线, Vahpnd 核酸阴性; 35<Ct 值 $<$ 40, 可疑。复检后, Ct 值 \leq 35 且出现典型扩增曲线, Vahpnd 核酸阳性。

表 3 不同试剂盒的反应体系、反应时间、试验成立和结果判定标准

试剂	反应体系/ μL	反应时间/min	质量控制	结果判定
A	20+5	66	阳性对照:Ct 值 \leq 30 且有典型扩增曲线; 阴性对照无扩增曲线或 Ct 值为 0	Ct 值 \leq 35 且在有典型扩增曲线, 阳性; Ct 值 $>$ 40 或无 Ct 值, 无典型的扩增曲线, 阴性; 35<Ct 值 \leq 40 且有典型扩增曲线为可疑, 重新检测后仍可疑, 为阳性
B	23+2	68	阳性对照:Ct 值 \leq 30 且有扩增曲线; 阴性对照:无扩增曲线或无 Ct 值	Ct 值 \leq 35 且有扩增曲线, 阳性; 无 Ct 值且无扩增曲线, 阴性; 35<Ct 值 $<$ 37, 可疑, 重新检测后, 仍可疑, 为阳性;
C	23+2	56	阳性对照:有扩增曲线; 阴性对照为平滑直线;	Ct 值 \leq 32 且有扩增曲线, 阳性; 无 Ct 值且无扩增曲线, 阴性; 32<Ct 值 $<$ 40, 可疑, 重新检测后, 仍可疑, 为阳性;

样品 107243、107431、107235、107231、107873 在 FAM 通道有典型的扩增曲线且 Ct 值分别为 15.09, 28.14, 32.64, 33.15 和 33.5, 样品 107122、107233、107512 均无 Ct 值。因此, 可判样品 107243、107431、107235、107231、107873 为 Vahpnd 核酸阳性, 样品 107122、107233、107512 为 Vahpnd 核酸阴性, 检测结果为满意。

2.2 商品化的急性肝胰腺坏死实时荧光定量 PCR 结果
各试验阴、阳对照符合说明书的试剂成立标准, 试验均成立。但是, 只有 A、C 与对比试验结果一致, B 均未检出阳性盲样(图 2)。如表 3 所示, C 试剂的反应时间较 A 略快, 分别是 56 min 和 66 min。设定相同阈值时, A 试剂检测的 5 个阳性样品的 Ct 值要略小于 C 试剂(表 4)。

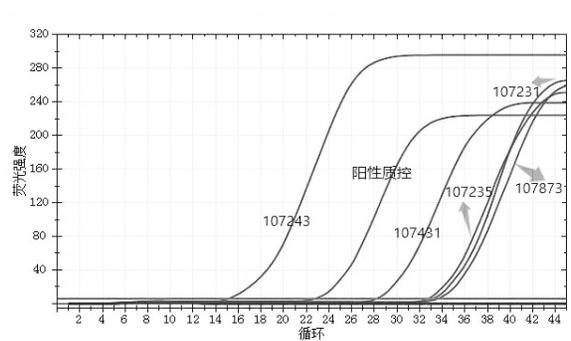


图 1 Vahpnd 的扩增曲线图

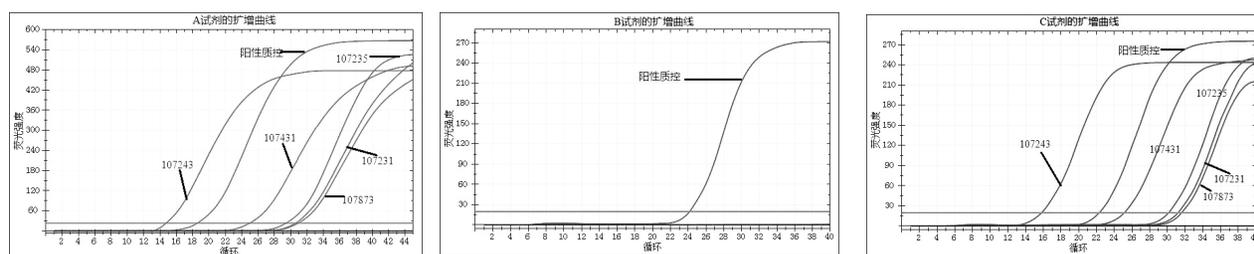


图 2 不同试剂的扩增曲线图

表 4 设定相同阈值时, A、C 试剂检测出的阳性样品的 Ct 值

阳性样品编号	Ct 值(A 试剂)	Ct 值(C 试剂)
107873	30.82	31.58
107231	30.48	31.18
107243	14.66	15.77
107235	29.32	30.12
107431	24.89	25.13

3 讨论

本次能力验证的检测依据《SC/T 7233-202X《急性肝胰腺坏死病诊断规程》(报批稿)》中可以采用商品化探针法 qPCR, 但也同时强调的是需要有同等效果。本次试验发现, 市场上 3 种商品化荧光定量 qPCR 试剂盒, A 和 C 的检测结果符合能力验证的结果, 因此, 实验室在选用商品化试剂盒时需要做试剂比对, 更有利于确保检测数据的准确性。

本次试验设置相同的阈值为 20, A 试剂的 Ct 值偏小。研究发现: Ct 值与该 DNA 模板的起始拷贝数的对数呈反比^[12], 但是, A 试剂加入的模板量大于 C 试剂, 因此, 不能判断 A 试剂的灵敏度高于 C 试剂。对比 A、C 试剂扩增曲线图, 发现 A 试剂在 40 个循环后还出现了缓慢增长的趋势, C 试剂更接近 S 形, 可推测为 A 试剂的反应液还有较充足的离子、酶、能量等。这是因为随着 PCR 循环的增多, 产物增长的速度逐渐减缓, 待所有的 dNTP、酶等被基本

用尽后,扩增曲线就进入了平台期^[13]。结合表 1 和表 3,标准方法的反应时间是 60 min,A 试剂的反应时间为 66 min,C 试剂的反应时间为 56 min。在实际工作中,如果想尽快得到检测结果,可选 C 试剂。

参 考 文 献

- [1] NACA.Asia pacific emergency regional consultation on the emerging shrimp disease:early mortality syndrome (EMS)/acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPNS) [R]. Bangkok, Thailand: Network of Aquaculture, Centres in Asia-Pacific, 2012.
- [2] LIGHTNER D V, REDMAN R M, PANTOJA C R, et al. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia[J]. Global aquaculture advocate, 2012, 15(1):40.
- [3] FAO.Report of the FAO/MARD technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepato-pancreatic necrosis syndrome (AHPNS) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304) [R]. Hanoi, Viet Nam: FAO Fisheries and aquaculture report, 2013.
- [4] 农财宝典对虾产业研究室.2013 年中国白对虾产业报告[R].广州:南方农村报农财宝典,2014:106-107.
- [5] TRAN L, NUNAN L, REDMAN R M, 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.
- [6] FLEGEL T W.Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia[J].Journal of invertebrate pathology, 2012, 110(2):166-173.
- [7] JOSHI J, SRISALA J, TRUONG V H, et al.Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepato-pancreatic necrosis disease (AHPND) [J]. Aquaculture, 2014 (428-429):297-302.
- [8] DE L P, LEOBERT D, CABILLON N A R, et al.Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines[J]. Diseases of aquatic organisms, 2015, 116(3):251-254.
- [9] GOMEZ-GIL B, SOTO-RODRÍGUEZ S, LOZANO R, et al.Draft genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus* strain M0605, which causes severe mortalities of shrimps in Mexico[J].Genome announcements, 2014, 2(2):5-14.
- [10] GLOBAL A A. Cause of EMS shrimp disease identified: GAA news release[EB/OL]. (2013-05) [2018-09-09]. <https://www.aquaculturealliance.org/blog/cause-of-ems-shrimp-disease-identified/>.
- [11] 郭书林, 尤颖哲, 陈何东, 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.
- [12] 张贺, 李波, 周虚, 等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及应用[J]. 动物医学进展, 2006, 27(157):5-12.
- [13] 周志刚, 马士文, 黄兴军, 等. 不同荧光 PCR 试剂盒检测非洲猪瘟病毒的比对与分析[J]. 畜牧兽医杂志, 2020, 39(6):1-3, 6.

【责任编辑:胡 敏】