



## 霍乱弧菌检测技术研究进展

方微微<sup>1,2,3</sup>, 王恒樑<sup>4\*</sup>, 李晓晖<sup>1,2,3</sup>, 卢瑛<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>上海海洋大学食品学院, 上海 201306

<sup>2</sup>上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306

<sup>3</sup>农业部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室, 上海 201306

<sup>4</sup>军事科学院军事医学研究院生物工程研究所, 北京 100091

**摘要:** 随着社会的发展, 公共卫生及水体质量已得到明显提升, 但到目前为止在发展中国家由霍乱疫情导致的死亡率依旧非常高, 而霍乱弧菌即为霍乱疫情爆发的病原菌, 且霍乱在我国被列为甲类传染病。目前国内外针对霍乱弧菌已经建立了多种有效的检测技术, 对控制霍乱暴发作用显著。本文综述了近年来霍乱弧菌检测技术研究新进展, 包括微生物学、免疫学、分子生物学等较成熟的检测方法, 生物传感器、快速检测技术等新兴检测方法, 并总结各种技术优缺点, 展望未来霍乱弧菌检测的市场需求。

**关键词:** 霍乱弧菌, 检测, RDT, 生物传感器

霍乱弧菌属于弧菌科, 革兰氏阴性菌。生态环境位于沿海水域和河口, 通常与浮游动物和贝类有关。目前, 根据“O”抗原的变异, 已鉴定出超过 200 种霍乱弧菌<sup>[1-2]</sup>, 大多数霍乱弧菌菌株不致病。到目前为止, 只有属于血清群 O1 和 O139 的菌株与流行性霍乱有关。

人们通过摄入受霍乱弧菌污染的水或食物而被感染, 摄入的大部分霍乱弧菌被胃酸杀死, 存活的菌体在小肠中定殖并产生霍乱毒素<sup>[3]</sup>, 导致人患急性水样腹泻病。尽管现在水质、卫生以及霍

乱临床治疗已经有所改善, 但该疾病每年仍然会导致全球约 10 万人死亡。一项分析表明, 在霍乱流行国家, 每年约有 2900 万例病例和 95000 例死亡病例发生, 其中非洲分别占 60% 和 68%, 几乎所有死亡事件都发生在发展中国家<sup>[4]</sup>。可见霍乱疫情的控制发展中国家依旧面临非常严峻的形势。

以 *cholerae*、*detection* 为关键词在 Web of Science 进行近 5 年(截止到 2018 年 9 月)的文献检索, 其结果见图 1 和图 2, 由相关引文数可见, 近 5 年来

基金项目: 国家科技重大专项(2018ZX10101003); 病原微生物生物安全国家重点实验室开放研究基金(SKLPBS1832)

\*通信作者。卢瑛, Tel: +86-21-61900503, E-mail: y-lu@shou.edu.cn; 王恒樑, Tel: +86-10-66948802, E-mail: wanghl@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2018-10-15; 修回日期: 2019-01-21; 网络出版日期: 2019-03-13

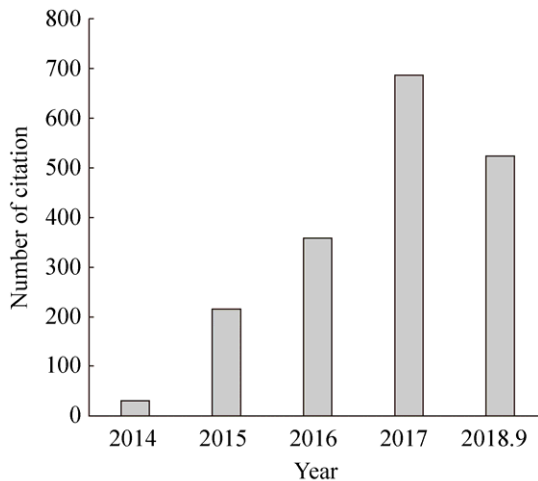


图 1. 每年引文数

Figure 1. Number of citations per year.

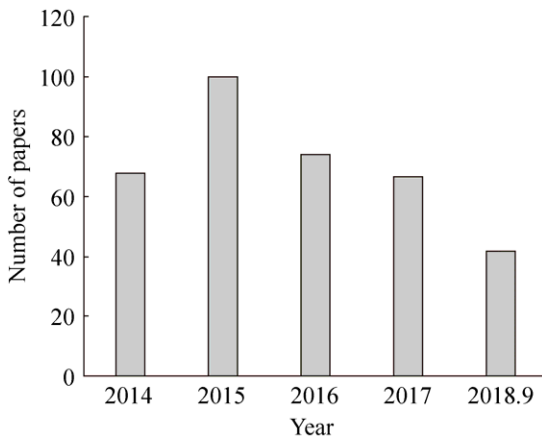


图 2. 每年发表论文数

Figure 2. Number of papers published each year.

有关霍乱弧菌检测研究逐年增多, 而每年发表论文数也相对较高, 其中 2015 年发表论文数达到 100 篇以上, 而截止到今年 9 月份也已超过 50 篇, 证明其是近几年研究热点。因此本文对霍乱弧菌检测技术进行综述, 并展望其未来的市场需求。

## 1 霍乱弧菌检测技术

目前用于霍乱弧菌检测的方法主要有微生物学方法、分子生物学方法和免疫学方法。与微

生物学方法相比, 分子生物学方法应用越来越广泛<sup>[5-7]</sup>, 而这两种方法的结合为分离、检测和鉴定提供了强有力的工具。免疫学方法更适用于感染早期的检测。例如, 孟加拉国的霍乱流行期间, 当样本中的霍乱弧菌无法培养时, 使用免疫学方法可以在环境样本中鉴定霍乱弧菌<sup>[8]</sup>。目前, 尽管微生物学与分子生物学方法足够灵敏和准确, 但是昂贵的设备和专业人员的需求是其在现场和初级实验室中推广的障碍。使用胶体金纳米粒子作为生物标签的免疫层析试验是一种常见的快速检测方法<sup>[9-10]</sup>; 然而, 对它们性能进行评估发现其在特异性方面存在缺陷<sup>[11]</sup>。因此, 仍然需要快速、简单、灵敏和准确的快速检测方法。在这篇综述中, 我们回顾了国际公认的常规检测方法和霍乱弧菌检测的新技术。为了解决其他技术的局限性, 生物传感器与快速检测技术(RDT)可能成为一种有效的替代方案, 但它们仍然需要进行一些改进, 以便在现场使用。

### 1.1 微生物学检测方法

目前, 霍乱诊断在疾病暴发管理中的黄金标准仍然是通过选择性培养基从粪便样品中分离出细菌, 然后进行生化鉴定和血清分型。霍乱弧菌营养要求不高, 在普通培养基上即可生长良好, 在碱性蛋白胨水中生长迅速, 因此常以其作为选择性增菌培养基。用选择性培养基, 如 TCBS 琼脂进行分离, 在 TCBS 上直径 2-4 mm 的有光泽的菌落可被认为是霍乱弧菌, 大约需要 8 d 才能确认是否为霍乱病例<sup>[12]</sup>。并且这些可疑的菌落还需生化试验证实, 然后进行血清群确认, 并确定抗生素耐药性<sup>[13]</sup>, 或通过使用开发用于靶向基因组 DNA 的 O1 和 O139 的引物进行 PCR, 从而对结果进行综合评定, 由此可判断是否为霍乱弧菌。

微生物学检测方法灵敏度和特异性较好,但其检测耗时长、工作量大,且易受环境、培养条件及操作人员主观因素等条件影响,不能满足疾病防控快速反应体系的需求,不利于临床快速诊断。

## 1.2 分子生物学检测方法

**1.2.1 聚合酶链式反应(PCR):** 1987年,PCR的发明实现了细菌高灵敏度的检测。因为它通过放大目标而不是信号来检测生物体,因此不太容易产生假阳性。目标DNA可在不到1h内扩增100万倍,理论上灵敏度可达到检测单一目标病原体<sup>[14]</sup>。而多重PCR可以通过不同的引物扩增编码每种细菌菌株特定基因的DNA区域来同时检测几种病原菌<sup>[15]</sup>。如霍乱弧菌的毒力基因*ctxA*、*tcp*与其他基因如*rfb*、*ompW*、*hly*,这样既可以达到高效检测霍乱弧菌的目的,也可以改变由于毒力基因特异性不够高而造成的假阳性现象。

Xu等<sup>[16]</sup>使用双启动寡聚核苷酸引物系统(DPO)开发了一种快速可靠的多重PCR检测方法,设计了针对*mdh*、*vvhA*、*colH*和*toxR*基因的特异性DPO引物,用于区分霍乱弧菌、创伤弧菌、溶藻弧菌和副溶血性弧菌。纯培养物或人工污染的食物基质中的每种弧菌检测限 $<1.5 \times 10^2$  CFU/mL。虽然PCR不是检测特定的霍乱弧菌基因的金标准,但它具有检测限低的优点。与传统培养法比,PCR具有明显的优势,可用于检测微生物病原体,并具有特异性强、灵敏度高、快速准确的优点。

除了常规的PCR技术,目前实时荧光定量PCR因其工作量小、结果可在2h内获得<sup>[17]</sup>等优点也使其得到了广泛应用。Park等<sup>[18]</sup>开发了一种多重荧光定量PCR方法用于鉴定三种弧菌:副溶血性弧菌、霍乱弧菌、创伤弧菌。该方法特异性

高,在检测的细菌间未发生交叉反应,检测线为 $10^4$  CFU/mL。Greig等<sup>[19]</sup>开发了双重实时荧光定量PCR以快速鉴定和分型霍乱弧菌,其中171/178(96.1%)分离株的PCR结果与血清分型、生物分型和预期的荧光定量PCR结果一致。

**1.2.2 基因芯片:** 基因芯片也称为“生物芯片”,可根据固定在基质上的分子探针的类别分为蛋白质芯片、碳水化合物芯片和基因芯片等。特别是基因芯片,已成为当前生物检测的重要分析工具,它们均基于核酸探针与其互补靶标之间的特异性杂交形成稳定的双链体或三链体<sup>[20]</sup>。Shin等<sup>[21]</sup>构建了一个由双生物分子DNA和碳水化合物组成的混合DBM微阵列系统,用于检测霍乱弧菌产生的CT毒素、DBM微阵列LOD水平,包括基因组DNA为1.7–8.7  $\mu\text{g/mL}$ ,纯CT毒素为1–2 ng/mL,霍乱弧菌细胞为 $1.71 \times 10^6$ – $1.71 \times 10^7$ ,最小的预富集培养时间约为90 min。

由此可见,由固定在固体基质上的数千种功能化探针组成的基因芯片是一种综合分析设备,已被引入生物化学和医学诊断等多领域,并且与PCR相比,可提供准确、高通量的平行分析<sup>[22]</sup>。

**1.2.3 环介导等温扩增技术(LAMP):** LAMP是Notomi等开发的基于核酸的检测方法的另一种变体。该方法的独特之处是在60–65 °C的等温条件下进行扩增,因此省略了对热循环仪的需要。大多数基于LAMP的测定法已被用于检测副溶血性弧菌、创伤弧菌、沙门氏菌属和在海鲜及环境样品中的单增李斯特菌<sup>[23–25]</sup>。与其他PCR检测方法相比,LAMP被证明更具特异性和灵敏性<sup>[26]</sup>。使用LAMP检测霍乱弧菌的*ctxA*基因,最低检测限达到每个反应1.4 CFU,比普通PCR高近10倍,说明该方法具有很高的灵敏度。同样地,这种技

术被开发用于检测各种海鲜中副溶血性弧菌 TLH 和 *groEL* 基因<sup>[27-28]</sup>。相兴伟等<sup>[29]</sup>建立环介导等温扩增技术(LAMP),可同时快速检测水产品中副溶血性弧菌和霍乱弧菌。针对副溶血性弧菌 *toxR* 和霍乱弧菌 *ompW* 基因设计特异性引物,灵敏度可达 3.12 fg,且与其他常见的细菌菌株无交叉反应,特异性为 100%,对模拟食品样品进行直接检测时检测限为 50 CFU/mL。

但是,由于 LAMP 技术涉及到的引物设计相对复杂,容易出现假阳性结果,同时阳性结果依靠人为肉眼判断,存在个人差异,不够客观,因此虽然 LAMP 技术简便、快速、特异性强且不需要特殊的试剂和仪器,但它的缺点使其很难应用于基层。

### 1.3 免疫学检测方法

**1.3.1 酶联免疫吸附实验:**酶联免疫吸附试验(ELISA)是应用抗原抗体特异性结合反应检测目标样品,一般不需要分离即可直接检测,操作简便<sup>[30]</sup>。程晋霞<sup>[31]</sup>等通过 VcNo.6 抗体建立了双抗体夹心法检测霍乱弧菌,该方法灵敏度达到  $10^3$  CFU/mL,抗体特异性试验结果表明 VcNo.6 特异性也较好。在基质添加试验中,最低检出限为 1 CFU/g 样品。遗憾的是 ELISA 检测无法实现较准确的定量。

**1.3.2 快速检测技术(rapid diagnostic tests):**目前针对霍乱弧菌的 RDT 是一种基于金标抗体或荧光标记抗体的免疫层析试纸条检测技术,主要对容易引发流行性霍乱的血清群 O1 和 O139 的脂多糖进行检测。因其快速、经济、操作简便不需要专业技术人员等优点,可作为卫生医疗条件差的环境中霍乱诊断的替代方案<sup>[32]</sup>。

Hao 等<sup>[33]</sup>开发了一种称为 VchUPT-LF 的方法,这是一种基于上转换发光的侧向流动(UPT-LF)试纸

条,可同时检测霍乱弧菌 O1 和 O139 血清群。虽然应用独立的 2 个检测通道使检测结果更为稳定,但与单靶标检测相比,灵敏度下降了 10 倍。Sayeed 等<sup>[34]</sup>针对霍乱弧菌 O1 LPS 制备了 Inaba 和 Ogawa 血清型的单克隆抗体,通过胶体金标记开发了免疫层析侧向流动装置 Cholkit,实现了霍乱弧菌 O1 血清型的检测,其灵敏度高达 97.5%,特异性为 98.4%;但是 Cholkit 只能用于 O1 的检测,其应用范围较窄。

目前市场上已有霍乱的 RDT 产品 Crystal VC,是一种利用免疫层析原理和金标抗体相结合,能够在临床和环境样品中检测霍乱弧菌脂多糖(LPS)的商业化检测试剂盒,可直接从粪便样品中快速检测霍乱弧菌血清型 O1 和 O139,仅需 15–20 min,其对 O1 血清群检测灵敏度为  $10^6$  CFU/mL, O139 为  $10^7$  CFU/mL<sup>[35]</sup>。但特异性较低,只有 60%–70% 左右<sup>[36]</sup>。Denue 等<sup>[37]</sup>对尼日利亚东北部 Maiduguri 暴发霍乱期间入住医院的患者使用 Crystal VC 进行检测,结果显示 Crystal VC 测试的灵敏度为 95.1%,特异性仅为 59.3%。

以上霍乱弧菌 RDT 采用的标记物为胶体金或荧光物质,而以胶体金作为标记物只能检测硝酸纤维素膜表面 10–20  $\mu\text{m}$  的光学信号,损失近 80%–90% 的信号<sup>[38]</sup>。近年来,采用磁性纳米材料作为标记物检测病原微生物的报道日益增多。以磁性纳米材料作为标记物的试纸条检测的是磁信号,磁性分析仪可以检测硝酸纤维素膜表面到内部的三维结构大部分磁信号(80%–90%)。另外由于生物样本通常具有极低的磁背景噪声,因此对检测信号产生的干扰最小,且磁信号非常稳定,不受样品颜色干扰<sup>[39]</sup>。

综上所述,以不同标记物开发的霍乱 RDT,

其检测性能存在着显著差异。在实验室基础设施和暴发地区医疗条件有限的情况下,可以把各种 RDT 作为快速诊断因霍乱弧菌引起的腹泻病的辅助手段,同时建议和其他多种检测技术相结合使用。

#### 1.4 生物传感器

生物传感器是一种可将生物反应转换为电信号的分析设备。它由 2 个主要部分组成:生物感受器或生物识别元件用于识别目标物,换能器用于将目标物转换为可测量的电信号。生物受体可以是组织、细胞器、微生物等,并且可通过光学、电化学、微机械等一种或多种技术组合转导<sup>[40]</sup>。关于霍乱弧菌检测,迄今为止开发的生物传感器主要是电化学和光学。

Low 等<sup>[41]</sup>开发出一种新的基于酶/纳米粒子的 DNA 生物传感器具有双比色/电化学方法,用于霍乱弧菌的病原体的序列特异性检测,当对 145 个临床分离的粪便样品进行检测时,该方法显示出优异的灵敏度和特异性(100%)。基因组 DNA 检测限为 0.5 ng/mL,细菌为 10 CFU/mL,动态范围分别为 0–100 ng/mL 和  $\log_{10}(1 \times 10^4 \text{ CFU/mL})$ 。Lim 等<sup>[42]</sup>通过 M13 噬菌体展示与霍乱毒素 B 亚基(CTX-B)结合形成一种独特短肽,对其进行修饰和化学合成以产生一系列亲和肽,使用基于等离子体的光学技术进行霍乱毒素的生物传感器检测研究,其中局部表面等离子共振以  $3\sigma$ -rule 规则获得的检测限(LOD)为 1.89 ng/mL,而表面增强拉曼散射的 LOD 为 3.51 pg/mL。在这两种情况下,灵敏度远远高于先前报道的值。

Narmani 等<sup>[43]</sup>基于金纳米颗粒(AuNPs)和磁性纳米颗粒(MNP)制备了基于 DNA 的超灵敏纳米材料荧光检测系统,用于检测霍乱弧菌 O1OmpW 基

因。LOD 和 LOQ 分别为 2.34 ng/mL 和 7.75 ng/mL,并且该值小于 PCR 方法(20 ng/mL)。获得了霍乱弧菌 O1 血清群的靶 DNA 浓度的良好线性关系( $R^2=0.9989$ ),值为 5–250 ng/mL。

通过以上研究可看出生物传感器是灵敏度较高的检测设备,为其所针对的人群提供准确、简单的解决方案,还提供定性、定量或几乎实时半定量的结果。未来,生物传感器可能被调制成自动化系统的一部分,具有微制造或小型化潜力,允许构建简单便携式设备以进行快速分析,因此未来的研究应在以上方面多作努力。

## 2 总结和展望

霍乱患病死亡数量在全球每年依旧可以达到十万人,而预防及早期检测对于疫情的控制可起到显著成效。但是目前作为金标准的传统检测方法费时费力且受实验人员主观因素的影响,不能满足疾病防控快速反应体系的需求。因此,具有良好市场潜力和发展前景的快速检测技术的要求是方便现场操作、快速、低成本且不需要特定的设备或者专业人员,特异性强、灵敏度高,具有一年以上的保存期限且不需冷藏。分子生物学方法虽在灵敏度上占据绝对优势,但它对实验人员要求较高,且需要复杂的仪器设备,费用相对昂贵,这对一些经济及医疗条件有限的疫情暴发地区有很大限制。相较于以上方法,生物传感器较有优势,可提供准确、简单的解决方案,还提供定性、定量或几乎实时半定量的结果,并且设备具有微制造或小型化潜力,因此需在构建简单便携式设备上多作努力,以进行方便快速的分析。

对于霍乱这种通常暴发在医疗卫生条件较差的发展中国家且需要快速确诊进行治疗的疾病,

检测时间短、成本低、使用方便且准确性高的技术具有更好的市场前景和应用市场。基于免疫学的 RDT 技术可以满足霍乱弧菌现场检测要求,但以胶体金为标记物的 RDT 在定量检测时因只能采集二维信号,导致灵敏度较低。而以磁性纳米材料作为标记物的 RDT 试纸条,可采集从膜表面到

底部的三维信号,因而在快速定性的同时可实现准确定量,且检测信号很稳定。该技术今后在霍乱弧菌的快速检测方面具有更好的市场潜力和应用前景。

表 1 对当前霍乱弧菌的各种检测技术进行了对比总结。

表 1. 霍乱弧菌各种检测技术对比表

Table 1. Comparison table of various detection techniques of *Vibrio cholerae*

Detection technology	Advantage	Disadvantage	LOD
Microbiology	Standard diagnostics	Laborious, time-consuming and lacks sensitivity	+
Molecular biology	Higher sensitivity	Sophisticated equipment and skilled personnel	+++
Immunology	Rapid, low cost, easy to use	Sensitivity and specificity are limited	++
Biological sensor	User-friendly, no trained personnel is required, the result is obtained in a short time	Efficient diagnostic point-of-care devices not developed	++++

“+” increase means the detection limit is lowered.

## 参考文献

- [1] Banerjee R, Das B, Balakrish Nair G, Basak S. Dynamics in genome evolution of *Vibrio cholerae*. *Infection, Genetics and Evolution*, 2014, 23: 32–41.
- [2] Das B, Pazhani GP, Sarkar A, Mukhopadhyay AK, Nair GB, Ramamurthy T. Molecular evolution and functional divergence of *Vibrio cholerae*. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2016, 29(5): 520–527.
- [3] Peterson KM, Gellings PS. Multiple intrainestinal signals coordinate the regulation of *Vibrio cholerae* virulence determinants. *Pathogens and Disease*, 2018, 76(1), doi: 10.1093/femspd/ftx126.
- [4] Clemens JD, Nair GB, Ahmed T, Qadri F, Holmgren J. Cholera. *Lancet*, 2017, 390(10101): 1539–1549.
- [5] Wei S, Ma XH, Wang TJ, Long Y, Ji Q, Ren J, Wu XY. Multiplex DPO-PCR for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae*. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(22): 80–83. (in Chinese)  
魏霜, 马新华, 汪天杰, 龙阳, 纪强, 任娇, 吴希阳. 双重 DPO-PCR 检测副溶血弧菌和霍乱弧菌. *食品工业科技*, 2016, 37(22): 80–83.
- [6] Eschbach E, Martin A, Huhn J, Seidel C, Heuer R, Schumacher JH, Ulrich S, Axe JO, Konietzny A, Strauch E, Oberheitmann B. Detection of enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*: performance of real-time PCR kits in an interlaboratory study. *European Food Research and Technology*, 2017, 243(8): 1335–1342.
- [7] Arimitsu H, Sasaki K, Tsuji T. Immunochromatographic detection of the heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* with cross-detection of cholera toxin. *Journal of Microbiological Methods*, 2017, 132: 148–152.
- [8] Hossain ZZ, Leekitcharoenphon P, Dalsgaard A, Sultana R, Begum A, Jensen PKM, Hendriksen RS. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* O1 isolated from cholera patients in Bangladesh. *Letters in Applied Microbiology*, 2018, 67(4): 329–336.
- [9] Wang YJ, Yang SH, Liu L, Pang XY, Sun CY, Li SS. Development of gold-immunochromatography test for rapid detection of *Vibrio Cholerae* group O1. *Labeled Immunoassays and Clinical Medicine*, 2013, 20(1): 36–39. (in Chinese)  
王玉金, 杨书豪, 刘丽, 庞向宇, 孙晨阳, 李珊珊. 霍乱弧菌 O1 胶体金免疫层析快速检测法的建立. *标记免疫分析与临床*, 2013, 20(1): 36–39.
- [10] Pengsuk C, Chaivisuthangkura P, Longyant S, Sithigorngul P. Development and evaluation of a highly sensitive immunochromatographic strip test using gold nanoparticle for direct detection of *Vibrio cholerae* O139 in seafoods samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 2013, 42: 229–235.

- [11] Yu CY, Ang GY, Chua AL, Tan EH, Lee SY, Falero-Diaz G, Otero O, Rodríguez I, Reyes F, Acosta A, Sarmiento ME, Ghosh S, Ramamurthy T, Yean CY, Lalitha P, Ravichandran M. Dry-reagent gold nanoparticle-based lateral flow biosensor for the simultaneous detection of *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 86(3): 277–282.
- [12] Engku NSEAR, Nurul NAB, Chan YY. Cholera diagnosis: Current and future technologies for point-of-care diagnosis in less developed countries. // Sustainable Diagnostics for Low Resource Areas. Penang: Penerbit Universiti Sains Malaysia 2016.
- [13] Learoyd TP, Gaut RM. Cholera: under diagnosis and differentiation from other diarrhoeal diseases. *Journal of Travel Medicine*, 2018, 25(S1): S46–S51.
- [14] Batt CA. Food pathogen detection. *Science*, 2007, 316(5831): 1579–1580.
- [15] Mehrabadi JF, Morsali P, Nejad HR, Imani Fooladi AA. Detection of toxigenic *Vibrio cholerae* with new multiplex PCR. *Journal of Infection and Public Health*, 2012, 5(3): 263–267.
- [16] Xu YG, Sun LM, Wang YS, Chen PP, Liu ZM, Li YJ, Tang LJ. Simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seafood using dual priming oligonucleotide (DPO) system-based multiplex PCR assay. *Food Control*, 2017, 71: 64–70.
- [17] Page AL, Alberti KP, Mondonge V, Rauzier J, Quilici ML, Guerin PJ. Evaluation of a rapid test for the diagnosis of cholera in the absence of a gold standard. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37360.
- [18] Park JY, Jeon S, Kim JY, Park M, Kim S. Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction Assays for Simultaneous Detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 2013, 4(3): 133–139.
- [19] Greig DR, Hickey TJ, Boxall MD, Begum H, Gentle A, Jenkins C, Chattaway MA. A real-time multiplex PCR for the identification and typing of *Vibrio cholerae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2018, 90(3): 171–176.
- [20] Shi HH, Yang FP, Li WJ, Zhao WW, Nie KX, Dong B, Liu ZC. A review: fabrications, detections and applications of peptide nucleic acids (PNAs) microarray. *Biosensors and Bioelectronics*, 2015, 66: 481–489.
- [21] Shin HH, Seo JH, Kim CS, Hwang BH, Cha HJ. Hybrid microarray based on double biomolecular markers of DNA and carbohydrate for simultaneous genotypic and phenotypic detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae*. *Biosensors and Bioelectronics*, 2016, 79: 398–405.
- [22] Shen XT, Zhao XT. Advances in detection methods for *Vibrio cholerae* infection. *Journal of Microbes and Infections*, 2011, 6(2): 113–116. (in Chinese)  
沈小婷, 赵雪涛. 霍乱弧菌检测方法的研究进展. *微生物与感染*, 2011, 6(2): 113–116.
- [23] Han FF, Wang F, Ge BL. Detecting potentially virulent *Vibrio vulnificus* strains in raw oysters by quantitative loop-mediated isothermal amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(8): 2589–2595.
- [24] Zhang L, Pan ZM, Geng SZ, Chen X, Liu ZY, Zhao F, Jiao XA. A loop-mediated isothermal amplification method targets the *HisJ* gene for the detection of foodborne *Salmonella*. *European Food Research and Technology*, 2012, 234(6): 1055–1062.
- [25] Vongkamjan K, Fuangpaiboon J, Jirachotrapee S, Turner MP. Occurrence and diversity of *Listeria* spp. in seafood processing plant environments. *Food Control*, 2015, 50: 265–272.
- [26] Wang L, Shi L, Alam MJ, Geng YH, Li L. Specific and rapid detection of foodborne *Salmonella* by loop-mediated isothermal amplification method. *Food Research International*, 2008, 41(1): 69–74.
- [27] Siddique MP, Jang WJ, Lee JM, Ahn SH, Suraiya S, Kim CH, Kong IS. *groEL* is a suitable genetic marker for detecting *Vibrio parahaemolyticus* by loop-mediated isothermal amplification assay. *Letters in Applied Microbiology*, 2017, 65(2): 106–113.
- [28] Prompamorn P, Sithigorngul P, Rukpratanporn S, Longyant S, Sridulyakul P, Chaivisuthangkura P. The development of loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick for detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 52(4): 344–351.
- [29] Xiang XW, Zheng B, Gu LX, Zhou XY, Zhou XJ, Shao HH, Hu XJ, Zhou YF. Study on simultaneous detection of *Vibrio Parahaemolyticus* and *Vibrio Cholerae* in aquatic products by loop-mediated isothermal amplification method. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(1): 253–260. (in Chinese)  
相兴伟, 郑斌, 顾丽霞, 周向阳, 周秀锦, 邵宏宏, 胡兴娟, 周宇芳. 双重 LAMP 技术快速检测水产品中副溶血性弧菌和霍乱弧菌的方法学研究. *现代食品科技*, 2017, 33(1): 253–260.

- [30] 王鑫蕊. 基于上转发光免疫层析霍乱弧菌多重检测技术研究. 中国人民解放军军事医学科学院硕士学位论文, 2017.
- [31] Cheng JX, Zeng J, Zhang L, Zhang L, Zhang HY, Liu XS, Cao D. Preparation of monoclonal antibodies against flagellin core protein of *Vibrio cholerae* and its application in establishing double-antibody sandwich ELISA for testing *Vibrio cholerae* from food products. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2013, 29(11): 1169–1173. (in Chinese)  
程晋霞, 曾静, 张蕾, 张琳, 张海予, 刘雪松, 曹栋. 霍乱弧菌鞭毛蛋白单克隆抗体的制备及双抗体夹心 ELISA 的建立. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 29(11): 1169–1173.
- [32] Martinez-Pino I, Luquero FJ, Sakoba K, Sylla S, Haile M, Grais RF, Ciglenecki I, Quilici ML, Page AL. Use of a cholera rapid diagnostic test during a mass vaccination campaign in response to an epidemic in Guinea, 2012. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2013, 7(8): e2366.
- [33] Hao M, Zhang PP, Li BS, Liu X, Zhao Y, Tan HL, Sun CY, Wang XC, Wang XR, Qiu HY, Wang DC, Diao BW, Jing HQ, Yang RF, Kan B, Zhou L. Development and evaluation of an up-converting phosphor technology-based lateral flow assay for the rapid, simultaneous detection of *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139. *PLoS One*, 2017, 12(6): e0179937.
- [34] Sayeed MA, Islam K, Hossain M, Akter NJ, Alam MN, Sultana N, Khanam F, Kelly M, Charles RC, Kováč P, Xu P, Andrews JR, Calderwood SB, Amin J, Ryan ET, Qadri F. Development of a new dipstick (Cholkit) for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 in acute watery diarrheal stools. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2018, 12(3): e0006286.
- [35] Mukherjee P, Ghosh S, Ramamurthy T, Bhattacharya MK, Nandy RK, Takeda Y, Nair GB, Mukhopadhyay AK. Evaluation of a rapid immunochromatographic dipstick kit for diagnosis of cholera emphasizes its outbreak utility. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2010, 63(4): 234–238.
- [36] Cecchini F, Fajs L, Cosnier S, Marks RS. *Vibrio cholerae* detection: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 79: 199–209.
- [37] Denué BA. Evaluation of a rapid dipstick test (Crystal Vc<sup>®</sup>) for the diagnosis of cholera in Maiduguri, northeastern Nigeria. *Archives of Medicine and Health Sciences*, 2018, 6(1): 24–27.
- [38] Xu XW, Cui ZQ, Lu Y, Jia XM, Wang YL. Establishment of HBV rapid magnetic immunochromatographic method based on magnetic nanoprobe for Pre-S1 antigen. *Journal of Biology*, 2016, 33(1): 98–103. (in Chinese)  
徐晓巍, 崔正权, 卢瑛, 贾鑫明, 王祎龙. 基于磁性纳米探针的乙肝前 S1 抗原的快速磁性免疫层析方法的建立. *生物学杂志*, 2016, 33(1): 98–103.
- [39] Chen YR, Wang K, Liu ZR, Sun RJ, Cui DX, He JH. Rapid detection and quantification of tumor marker carbohydrate antigen 72-4 (CA72-4) using a superparamagnetic immunochromatographic strip. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, 408(9): 2319–2327.
- [40] Velusamy V, Arshak K, Korostynska O, Oliwa K, Adley C. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(2): 232–254.
- [41] Low KF, Zain ZM, Yean CY. A signal-amplified electrochemical DNA biosensor incorporated with a colorimetric internal control for *Vibrio cholerae* detection using shelf-ready reagents. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, 87: 256–263.
- [42] Lim JM, Heo NS, Oh SY, Ryu MY, Seo JH, Park TJ, Huh YS, Park JP. Selection of affinity peptides for interference-free detection of cholera toxin. *Biosensors and Bioelectronics*, 2018, 99: 289–295.
- [43] Narmani A, Kamali M, Amini B, Kooshki H, Amini A, Hasani L. Highly sensitive and accurate detection of *Vibrio cholerae* O1 *OmpW* gene by fluorescence DNA biosensor based on gold and magnetic nanoparticles. *Process Biochemistry*, 2018, 65: 46–54.



## Advances in detection of *Vibrio cholerae* infection

Weiwei Fang<sup>1,2,3</sup>, Hengliang Wang<sup>4\*</sup>, Xiaohui Li<sup>1,2,3</sup>, Ying Lu<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> College of Food, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

<sup>2</sup> Shanghai Engineering Research Center of Aquatic Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China

<sup>3</sup> Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Products on Storage and Preservation (Shanghai), Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China

<sup>4</sup> Institute of Bioengineering, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100091, China

**Abstract:** Nowadays, global water quality has been improved significantly with the development of public health. However, the death rate caused by cholera epidemic is still high in developing countries. *Vibrio cholerae*, the exact pathogen for the cholera epidemic, has been categorized as a Class A infectious disease in China. At present, a series of effective detection techniques for *Vibrio cholerae* have been established worldwide. In this study, recent advances on detection technology of *Vibrio cholerae*, including microbiology immunology, molecular biology, biosensors and rapid detection technology methods, were summarized. In addition, the advantages and disadvantages of various technology were compared, and the market demand of *vibrio cholerae* detection in the future was addressed.

**Keywords:** *Vibrio cholerae*, detection, RDT, biosensor

(本文责编: 李磊)

---

Supported by the National Science and Technology Major Project (2018ZX10101003) and by the State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity (Academy of Military Medical Science) (SKLPBS1832)

\*Corresponding authors. Ying Lu, Tel: +86-21-61900503, E-mail: y-lu@shou.edu.cn; Hengliang Wang, Tel: +86-10-66948802, E-mail: wanghl@nic.bmi.ac.cn

Received: 15 October 2018; Revised: 21 January 2019; Published online: 13 March 2019