

鳗鲡源创伤弧菌的间接 ELISA 快速检测

肖益群^{1,2}, 翟少伟^{1,2}, 郭松林^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 鳗鲡现代产业技术教育部工程研究中心, 福建 厦门 361021)

[摘要] 创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)血清2型对鳗鲡有专一的感染性,是鳗鲡出血性败血症、烂鳃病和烂尾病的重要病原菌。采用间接ELISA法对制备的兔抗创伤弧菌多克隆抗血清进行效价测定,结果表明其效价高达1:512 000。从发病鳗鲡中分离出创伤弧菌和37株其他致病菌,将38株病原菌以较低浓度(1×10^6 cfu/mL)包被后通过兔抗创伤弧菌血清进行交叉反应水平检测,结果表明,兔抗创伤弧菌血清稀释到1:256 000或1:128 000时,其与37株其他病原菌均未产生明显的ELISA交叉反应。该血清分别经1:64 000和1:32 000稀释后,采用ELISA方法检测了经创伤弧菌、鳗鲡爱德华氏菌(*Edwardsiella anguillarum*)和嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)攻毒感染死亡的美洲鳗鲡(*Auguilla rostrata*)脏器组织悬液(肝脏、肾脏和鳃),结果表明,兔抗创伤弧菌血清经1:32 000稀释后可特异性检出鳗鲡鳃和肾脏组织中的创伤弧菌。

[关键词] 美洲鳗鲡;兔抗血清;创伤弧菌;间接ELISA

[中图分类号] S 942.5

The Indirect ELISA for Rapid Detection of *Vibrio vulnificus* from Eels

XIAO Yiqun^{1,2}, ZHAI Shaowei^{1,2}, GUO Songlin^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Engineering Research Center of the Modern Industry Technology for Eel, Ministry of Education, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Serum type 2 of *Vibrio vulnificus* is highly pathogenic to eel and cause hemorrhagic sepsis, gill rot and tail rot. In this study, *V. vulnificus* and 37 strains of pathogenic bacteria isolated from infected eel were used as bacterial strains. The polyclonal antiserum titers of rabbit anti-*V. vulnificus* were determined by indirect ELISA, and the results showed that the titer of the antiserum was 1:512 000. Thirty-eight strains of pathogenic bacteria were coated with the concentration of 1×10^6 cfu/mL and then cross-reacted with the antiserum. The results showed that when the antiserum was diluted to 1:256 000 or 1:128 000, there was no obvious ELISA cross-reaction between the *V. vulnificus* and other 37 bacterial pathogens in eels. After the antiserum was diluted at 1:64 000 and 1:32 000 respectively, the suspensions of liver, kidney and gill of *Auguilla rostrata* infected by *V. vulnificus*, *E. anguillarum* and *A. hydrophila* were detected by ELISA. The results showed that the 1:32 000 diluted antiserum specifically detect the bacterial pathogen of *V. vulnificus* in the gill and kidney of eels.

Keywords: *Auguilla rostrata*; rabbit antiserum; *Vibrio vulnificus*; indirect ELISA

0 引言

鳗鲡是我国重要的养殖经济品种。随着养殖生产集约化程度提高和水域环境影响,鳗鲡病害

[收稿日期] 2019-07-11

[基金项目] 现代农业产业体系专项资金项目(CARS-46),福建省自然科学基金项目(2019J01689)

[作者简介] 肖益群(1993—),女,硕士生。通信作者:郭松林(1976—),男,教授,硕导,从事鱼类病害与免疫防治研究。E-mail:gsl@jmu.edu.cn

日益严重，对鳗鲡养殖业的健康持续发展造成了威胁，尤以细菌性疾病最为严重。创伤弧菌（*V. vulnificus*）是弧菌属第 5 群细菌，革兰氏染色阴性，为嗜盐型海洋菌^[1]。同时，创伤弧菌还是兼性厌氧型细菌，在有氧和无氧条件下均能生长，最适生长温度为 28℃。根据生化反应、遗传特性、血清学试验的差异和宿主范围的不同，将其分为 3 种生物型^[2]，其中生物 2 型菌株是鳗鲡的重要病原菌，是导致鳗鲡出血性败血症、烂鳃病、烂尾病等的原发性致病菌^[3-5]。创伤弧菌表面的外膜蛋白（OMPs）和胞外产物中的外毒素在细菌的致病过程中起着十分重要的作用^[6-7]。创伤弧菌对鳗鲡有较强的感染性，若能建立起快速而又准确的检测方法，将能有效防治和控制鳗鲡细菌病害的发生，减少养殖业的经济损失。酶联免疫吸附法（ELISA）是一种利用抗原抗体之间的特异性反应与酶分子的高效催化作用，使降解底物产生颜色反应，可定性定量检测抗原或抗体的方法^[8]。该方法有着操作简便、所需时间短、特异性强、灵敏度高、结果直观和实用性强等优点^[9-10]。纵观已经报道的细菌鉴定试剂盒研究，基本局限于细菌培养后的实验室检测，能够用于养殖发病现场的细菌检测试剂盒很少，且一般均存在严重的非特异性反应。本研究以实验室近 20 年分离的创伤弧菌和其他 37 株鳗鲡致病菌为材料，拟初步建立特异性的创伤弧菌的 ELISA 现场快速检测方法，以期能够特异性检出病鳗脏器内的创伤弧菌。

1 材料与方法

1.1 菌株、血清和酶标抗体

试验采用的 38 株菌取自集美大学水产学院鳗鱼病原菌库，其编号与鉴定结果详见表 1。创伤弧菌兔抗血清由本实验室制备，羊抗兔酶标抗体购自 Thermo 公司。

表 1 试验所用菌株名称及编号
Tab. 1 Name and number of bacterial strains used in this experiment

编号 Number	菌株 Bacterial strain	编号 Number	菌株 Bacterial strain
B04	鲁氏耶尔森氏菌 <i>Yersinia ruckeri</i>	B894	杀鲑气单胞菌杀鲑亚种 <i>Aeromonas salmonicida</i> sub-sp. <i>salmonicida</i>
B09	肠棕气单胞菌 <i>Aeromonas enterocolitica</i>	B896	杀鲑气单胞菌杀日本鲑亚种 <i>A. salmonicida</i> subsp. <i>masoucida</i>
B12	产酸克雷伯氏菌 <i>Klebsiella oxytoca</i>	B4199	威隆气单胞菌 <i>A. Veronii</i>
B25	弗氏柠檬酸杆菌 <i>Citrobacter freundii</i>	B4221	嗜水气单胞菌无气亚种 <i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i>
B36	耐盐短杆菌 <i>Brevibacterium halotolerans</i>	B4224	软体气单胞菌 <i>Aeromonas molluscorum</i>
B37	威隆气单胞菌 DNA8 群 <i>Aeromonas veronii</i> DNA Group 8	B4227	兽生气单胞菌 <i>A. bestiarum</i>
B43	溶解阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>	B4232	中间气单胞菌 <i>Aeromonas media</i>
B47	溶解阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i>	B4240	舒伯特气单胞菌 <i>Aeromonas schubertii</i>
B53	兽生气单胞菌 <i>Aeromonas bestiarum</i>	B4486	小鱼气单胞菌 <i>Aeromonas tiddler</i>
B56	嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	B4995	波波夫气单胞菌 <i>Aeromonas popoffii</i>
B61	河流弧菌 <i>Vibrio fluvialis</i>	B5179	杀鲑气单胞菌 smithia 亚种 <i>A. salmonicida</i> sub-sp. <i>smithia</i>
B65	嗜水气单胞菌 DNA1 群 <i>A. hydrophila</i> DNA group 1	B5761	威隆气单胞菌 <i>A. Veronii</i>
B68	鳗鲡爱德华氏菌 <i>Edwardsiella anguillarum</i>	B5864	软体气单胞菌 <i>A. molluscorum</i>
B69	威隆气单胞菌 DNA10 群 <i>A. Veronii</i> DNA Group 10	B7289	水簇气单胞菌 <i>Aeromonas aquirorum</i>
B72	绿脓假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B7401	河流气单胞菌 <i>Aeromonas fluvialis</i>
B76	弗氏柠檬酸杆菌 <i>C. freundii</i>	B7443	杀鱼气单胞菌 <i>Aeromonas piscicola</i>
B77	产碱假单胞菌 <i>Pseudomonas alkaligenes</i>	B11	嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>
B1002	溶藻弧菌 <i>Vibrio alginolyticus</i>	B79	鳗鲡爱德华氏菌 <i>E. anguillarum</i>
B1003	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	B88	创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>

1.2 试验鳎鲷和菌液制备

30 尾健康美洲鳎鲷 (*Auguilla rostrata*) 取自集美大学水产学院海水养殖场,饲养于水簇箱中,保持充气。用 1×10^8 cfu/mL 创伤弧菌、迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella anguillarum*) 和嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 分别腹腔注射健康鳎鲷 10 尾,收集不同时间濒死或刚刚死亡的鳎鲷脏器,样品经匀浆后保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。将创伤弧菌采用划平板法接种于含有 0.5% NaCl 的胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 培养基上,在生化培养箱中 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,无菌操作下挑取平板分离培养出的单菌落接种于胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB),于摇床培养箱中 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 振荡培养约 16 h。将肉汤倒入灭菌后的离心管,配平质量,于高速冷冻离心机上 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、7 000 r/min 离心 4 min,然后弃上清液,用 PBS 重悬沉淀,经同条件下离心和 PBS 洗涤 3 次后,再用少量包被液重悬沉淀,边加包被液边测 A_{595} ,待 $A_{595} = 0.1$ 时,即得到浓度为 1×10^8 cfu/mL 的创伤弧菌菌液。按此方法分离培养其他 37 株菌株并制备菌液。

1.3 创伤弧菌兔抗血清效价的测定

用包被液稀释 1.2 制得的浓度为 1×10^8 cfu/mL 的创伤弧菌菌液,并调整至最佳工作浓度 (1×10^6 cfu/mL),用排枪以 100 μL /孔包被于酶标板上,置恒温培养箱中 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 包被过夜直至干燥。用 PBST 洗涤酶标板 3 次,200 μL /孔,5 min/次。加入封闭液 (1 % BSA/PBST) 200 μL /孔,恒温培养箱中 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。PBST 洗涤液又洗板 3 次,5 min/次。加入 PBST 稀释的创伤弧菌兔抗血清 (用 PBST 按 1:8 000, 1:16 000, 1:32 000, 1:64 000, 1:128 000, 1:256 000, 1:512 000, 1:1024 000 进行倍比稀释,每个稀释度做 2 孔平行) 100 μL /孔,阴性对照孔加入相同稀释度的等量阴性兔血清, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。PBST 再洗板 3 次,5 min/次。用 PBST 按 1:20 000 稀释的羊抗兔酶标抗体 100 μL /孔加入酶标板中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。继续用 PBST 洗板 4 次,5 min/次。加入 OPD 底物溶液 (按照每 10 mL OPD 底物溶液临用前加入 30 μL 的 30% H_2O_2) 50 μL /孔,显色 10 min。最后加入 2 mol/L 的 H_2SO_4 终止显色,50 μL /孔,酶标仪上测 A_{492} 。间接 ELISA 检测法测定。以 S/N 值 ≥ 2 的最高稀释倍数为该样品的血清效价 (S 为样品的 A_{492} , N 为阴性对照的 A_{492})。

1.4 创伤弧菌兔抗血清与鳎鲷病原菌的交叉 ELISA 试验

以创伤弧菌为例,将制得的 $A_{595} = 0.1$ 的创伤弧菌菌液用包被液稀释 100 倍后得到约 1×10^6 cfu/mL 的菌悬液,按 100 μL /孔加入 96 孔酶标板中,于干燥箱中 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 包被过夜直至干燥。同法包被其他 37 株菌株的菌液,每株菌包被 2 孔。创伤弧菌兔抗血清用 PBST 分别按 1:256 000、1:128 000 进行稀释,根据 1.3 的间接 ELISA 检测法进行试验。当样品 $A_{492} < \text{阳性对照 } A_{492} \times 50\%$ 时且其 S/N 值小于 2 判定为不交叉,当阳性对照 $A_{492} \times 50\% \leq \text{样品 } A_{492} < \text{阳性对照 } A_{492} \times 80\%$ 时且其 S/N 值小于 2 判定为交叉菌,当样品 $A_{492} \geq \text{阳性对照 } A_{492} \times 80\%$ 且其 S/N 值大于 2 时判定为创伤弧菌。

1.5 攻毒死亡后鳎鲷不同组织悬液的检测

用 ELISA 方法检测创伤弧菌、迟缓爱德华氏菌和嗜水气单胞菌分别攻毒死亡后的鳎鲷的肝脏、肾脏、鳃。样品采集方法如下:解剖鳎鲷并取出各脏器,分别先用剪刀剪碎,再用研钵进行粗研磨,用离心管称取 0.1 g,加入 1 mL PBS 混匀,离心 5 s 取上清液,用 PBS 进行倍比稀释,即质量浓度分别为 0.1,0.05,0.025,0.012 5,0.006 25,0.003 125 g/mL,每个质量浓度做 2 孔平行,100 μL /孔包被于酶标板上,恒温培养箱中 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 包被过夜至干燥,同时做阳性、阴性和空白对照,阴、阳性对照的创伤弧菌液包被浓度均为 1×10^6 cfu/mL,阴性对照以免阴性血清代替抗血清。以样品 $A_{492} \geq \text{阳性对照 } A_{492} \times 80\%$ 且 P/N 值 ≥ 2 (P 为阳性对照 A_{492}) 判定为检出。创伤弧菌兔抗血清用 PBST 分别按 1:128 000、1:64 000、1:32 000 进行稀释,据 1.3 的间接 ELISA 检测法进行试验。

2 结果

2.1 兔抗创伤弧菌血清效价

本研究在检测创伤弧菌抗血清效价时采用了 3 个细菌的包被浓度,分别为 1×10^5 , 1×10^6 , $1 \times$

10^7 cfu/mL，结果发现 1×10^6 cfu/mL 的包被效果最好。以 1×10^6 cfu/mL 的抗原菌液包被 ELISA 板，不同稀释倍数的兔抗创伤弧菌血清 ELISA 检测结果如表 2 所示。由表 2 可知，当血清稀释倍数为 1:512 000 时， S/N 值 >2 ，故该兔抗血清的效价为 1:512 000。

表 2 兔抗创伤弧菌血清 ELISA 效价的测定结果

Tab. 2 Determination of ELISA titer of rabbit anti - *V. vulnificus* in serum

血清稀释度 Serum dilution	菌液浓度 Bacterial concentration /(cfu · mL ⁻¹)	A_{492}	S/N	+ / -	血清稀释度 Serum dilution	菌液浓度 Bacterial concentration /(cfu · mL ⁻¹)	A_{492}	S/N	+ / -
1: 8 000	1×10^6	0. 534	9. 798	+	1: 256 000	1×10^6	0. 178	3. 431	+
1: 16 000	1×10^6	0. 485	8. 890	+	1: 512 000	1×10^6	0. 113	2. 073	+
1: 32 000	1×10^6	0. 406	7. 450	+	1: 1 024 000	1×10^6	0. 091	1. 661	-
1: 64 000	1×10^6	0. 329	6. 037	+	阴性 Negative	1×10^6	0. 055		
1: 128 000	1×10^6	0. 236	4. 330	+	空白 Blank	0	0. 050		

2. 2 兔抗创伤弧菌血清与其他病原菌的交叉试验结果

用兔抗创伤弧菌血清与 38 株细菌进行 ELISA 交叉实验，当兔抗创伤弧菌血清稀释度为 1:256 000 或 1:128 000，菌液包被浓度为 1.0×10^6 cfu/mL 时，除创伤弧菌外，其他 37 株菌的 A_{492} 均小于阳性对照的一半，且其 S/N 值均小于 2（见表 3、表 4）。表明这 37 菌株鳃鲷病原菌均不与兔抗创伤弧菌血清产生明显的 ELISA 交叉反应。

表 3 兔抗创伤弧菌血清 (1:256 000) 的交叉试验结果

Tab. 3 Cross-reaction of rabbit anti - *V. vulnificus* serum (1:256 000) diluted

菌株 Bacterial strain	A_{492}	S/N	+ / -	菌株 Bacterial strain	A_{492}	S/N	+ / -
B09	0. 058	0. 950	-	B77	0. 106	1. 752	-
B12	0. 051	0. 835	-	B04	0. 103	1. 694	-
B25	0. 055	0. 901	-	B7443	0. 060	0. 992	-
B36	0. 053	0. 876	-	B4995	0. 054	0. 884	-
B37	0. 063	1. 041	-	B4486	0. 055	0. 909	-
B43	0. 063	1. 041	-	B5864	0. 058	0. 950	-
B47	0. 055	0. 909	-	B5761	0. 056	0. 926	-
B53	0. 055	0. 909	-	B7401	0. 064	1. 058	-
B56	0. 059	0. 984	-	B68	0. 055	0. 909	-
B61	0. 063	1. 0413	-	B896	0. 057	0. 934	-
B65	0. 056	0. 917	-	B5179	0. 051	0. 843	-
B69	0. 052	0. 860	-	B4221	0. 059	0. 975	-
B72	0. 057	0. 934	-	B4240	0. 071	1. 165	-
B76	0. 049	0. 810	-	B4232	0. 058	0. 959	-
B1002	0. 058	0. 950	-	B7289	0. 056	0. 917	-
B1003	0. 096	1. 587	-	B11	0. 055	0. 909	-
B4224	0. 062	1. 017	-	B79	0. 064	1. 058	-
B4199	0. 059	0. 975	-	B88	0. 217	3. 587	
B4227	0. 052	0. 851	-	阴性 Negative	0. 061		
B894	0. 049	0. 818	-	空白 Blank	0. 048		

表 4 兔抗创伤弧菌血清(1: 128 000) 稀释时的交叉试验结果
Tab. 4 Cross-reaction of rabbit anti-*V. vulnificus* serum diluted at 1: 128 000

菌株 Bacterial strain	A_{492}	S/N	+ / -	菌株 Bacterial strain	A_{492}	S/N	+ / -
B09	0. 079	1. 129	-	B77	0. 076	1. 086	-
B12	0. 059	0. 836	-	B04	0. 071	1. 007	-
B25	0. 059	0. 843	-	B7443	0. 066	0. 936	-
B36	0. 065	0. 921	-	B4995	0. 062	0. 879	-
B37	0. 066	0. 943	-	B4486	0. 060	0. 857	-
B43	0. 087	1. 243	-	B5864	0. 081	1. 150	-
B47	0. 066	0. 943	-	B5761	0. 084	1. 200	-
B53	0. 066	0. 936	-	B7401	0. 066	0. 943	-
B56	0. 058	0. 821	-	B68	0. 069	0. 979	-
B61	0. 074	1. 050	-	B896	0. 062	0. 886	-
B65	0. 066	0. 943	-	B5179	0. 068	0. 971	-
B69	0. 070	0. 993	-	B4221	0. 082	1. 164	-
B72	0. 081	1. 150	-	B4240	0. 082	1. 171	-
B76	0. 066	0. 943	-	B4232	0. 081	1. 150	-
B1002	0. 073	1. 036	-	B7289	0. 059	0. 843	-
B1003	0. 059	0. 843	-	B11	0. 062	0. 879	-
B4224	0. 071	1. 007	-	B79	0. 079	1. 129	-
B4199	0. 070	0. 993	-	B88	0. 330	4. 714	-
B4227	0. 080	1. 136	-	阴性 Negative	0. 052		
B894	0. 062	0. 879	-	空白 Blank	0. 050		

2. 3 攻毒死亡鳎鲷不同组织悬液检测结果

分别采集创伤弧菌、迟缓爱德华氏菌和嗜水气单胞菌攻毒死亡后的鳎鲷肝脏、肾脏、鳃等组织悬液, 经 ELISA 板包被后采用兔抗创伤弧菌血清进行检测。由表 5、表 6 可知, 将兔抗创伤弧菌血清 1: 64 000 稀释时, 鳃包被质量浓度为 0. 025 ~ 0. 1 g/mL 条件下可检出创伤弧菌; 而当血清 1: 32 000 稀释时, 鳃包被质量浓度为 0. 025 ~ 0. 05 g/mL 和肾脏包被浓度为 0. 0125 g/mL 条件下均可检出创伤弧菌。

表 5 细菌攻毒死亡鳎鲷检测结果平均值(血清 1: 64 000 稀释)
Tab. 5 Average results of dead eels challenged by bacteria (serum 1: 64 000 dilution)

攻毒菌 Challenge bacteria	组织 Tissue	质量浓度 Concentration/(g · mL ⁻¹)					
		0. 1	0. 05	0. 025	0. 012 5	0. 006 25	0. 003 125
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	肝脏 Liver	0. 067	0. 072	0. 076	0. 089	0. 155	0. 124
	肾脏 Kidney	0. 110	0. 076	0. 144	0. 175	0. 162	0. 131
	鳃 Gill	0. 214	0. 213	0. 184	0. 130	0. 114	0. 094
鳎鲷爱德华氏菌 <i>E. anguillarum</i>	肝脏 Liver	0. 074	0. 088	0. 112	0. 113	0. 070	0. 070
	肾脏 Kidney	0. 063	0. 060	0. 066	0. 063	0. 070	0. 071
	鳃 Gill	0. 073	0. 081	0. 064	0. 078	0. 066	0. 063
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	肝脏 Liver	0. 097	0. 113	0. 130	0. 118	0. 091	0. 083
	肾脏 Kidney	0. 097	0. 104	0. 068	0. 058	0. 073	0. 066
	鳃 Gill	0. 123	0. 108	0. 089	0. 076	0. 081	0. 057
阳性 Positive		0. 222					
阴性 Negative		0. 063					
空白 Blank		0. 070					

表 6 攻毒死亡鳗鲡检测结果平均值(血清 1: 32 000 稀释)
Tab. 6 Average results of dead eels challenged by bacteria (serum 1: 32 000 dilution)

攻毒菌 Challenge bacteria	组织 Tissue	质量浓度 Concentration/(g · mL ⁻¹)					
		0. 1	0. 05	0. 025	0. 012 5	0. 006 25	0. 003 125
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	肝脏 Liver	0. 073	0. 055	0. 067	0. 070	0. 106	0. 148
	肾脏 Kidney	0. 168	0. 110	0. 152	0. 220	0. 193	0. 145
	鳃 Gill	0. 165	0. 219	0. 205	0. 156	0. 116	0. 090
鳗鲡爱德华氏菌 <i>E. anguillarum</i>	肝脏 Liver	0. 089	0. 102	0. 108	0. 106	0. 069	0. 067
	肾脏 Kidney	0. 080	0. 073	0. 070	0. 061	0. 059	0. 063
	鳃 Gill	0. 077	0. 096	0. 102	0. 066	0. 067	0. 059
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	肝脏 Liver	0. 116	0. 131	0. 157	0. 173	0. 118	0. 130
	肾脏 Kidney	0. 095	0. 117	0. 121	0. 091	0. 069	0. 071
	鳃 Gill	0. 114	0. 157	0. 121	0. 087	0. 067	0. 067
阳性 Positive		0. 264					
阴性 Negative		0. 065					
空白 Blank		0. 060					

3 讨论

提高 ELISA 检测法准确性的最重要因素是采用高效价的特异性兔抗血清，高倍稀释的兔抗血清可以降低抗原抗体反应中的非特异吸附水平，增强抗原抗体的特异性反应，进而提高检测方法的灵敏度和准确性^[11]。本试验检测的兔抗创伤弧菌血清效价高达 1: 512 000（见表 2），表明该血清为高效价的特异性血清，可用于特异性检测创伤弧菌。为确保该法能特异性检出鳗鲡体内的致病性创伤弧菌，本研究采用实验室分离的另 37 株病原菌（见表 1）进行交叉试验。结果表明，高倍稀释后的兔抗创伤弧菌血清与其他 37 株菌均未发生明显的交叉反应（见表 3、表 4）。因此，用该血清检测发病或死亡鳗鲡体内的创伤弧菌将具有良好的特异性和准确的检测效果^[12]。

本研究用稀释度为 1: 64 000 和 1: 32 000 的兔抗创伤弧菌血清时均能特异性检测出创伤弧菌。当血清 1: 64 000 稀释时鳃组织包被质量浓度的范围较广(0. 025 ~ 0. 1 g/mL)；而 1: 32 000 稀释时，鳃包被质量浓度稍窄(0. 025 ~ 0. 05 g/mL)，但同时可从 0. 0125 g/mL 的肾脏组织中检出创伤弧菌（见表 5、表 6）。文献 [13 – 14] 研究表明，组织包被质量浓度过高或过低均可影响检测效果，过低可能因菌量少而达不到最低检测限，过高可能受组织中非特异性物质的干扰。本研究未在肝脏中检测到创伤弧菌，这可能与该菌感染后的定植位置相关。本试验在血清稀释度为 1: 128 000 时也进行了感染死亡鳗鲡的检测，但未检测到创伤弧菌，可能与血清检测菌体（见表 3、表 4）和检测组织所要求的抗体浓度不同有关（见表 5、表 6）。另外，本研究仅检测了鳗鲡常见的 3 种病原菌（创伤弧菌、嗜水气单胞菌和鳗鲡爱德华氏菌）感染死亡后的脏器，有必要用其他鳗鲡病原菌进行攻毒和检测，以进一步验证该抗血清的检测效果。

由于攻毒或自然感染后病原菌在脏器中的含菌量往往可以达到 1 × 10⁶ cfu/g 组织以上，故本次检测采用 1 × 10⁶ cfu/mL 的病原菌作为阳性对照，但若组织中达不到此含菌量，则可能无法被本次建立的方法检出^[15]。由于直接用组织悬液包被在 ELISA 板上进行抗原吸附的效果易受组织蛋白的干扰，余俊红等^[13]在检测鳗弧菌时对组织悬液进行了 100 ℃ 煮沸 5 ~ 10 min 的前处理，可降低组织蛋白的干扰，增加抗原样品的吸附能力；王艳等^[16]采用 dot – ELISA 代替间接 ELISA 方法进行试验并较好地改善了蛋白干扰的问题。

综上所述，本研究获得的兔抗创伤弧菌高效价血清对该菌的菌体检测特异性好，其对该菌攻毒感染死亡的鳗鲡也有较高的检出率，拟在鳗鲡养殖实践中取发病鳗鲡的鳃(0. 025 ~ 0. 1 g/mL)和肾脏组织(0. 0125 g/mL)采用 1: 32 000 稀释的抗体进行快速检测。同时，本研究结果为创伤弧菌病快速检测

试剂盒的研制建立了条件。

[参 考 文 献]

- [1] LEE C T, AMARO C, ANJUAN E, et al. Identification of DNA sequences specific for *Vibrio vulnificus* biotype 2 strains by suppression subtractive hybridization [J]. Appl Environ Microbiol, 2005, 71(9): 5593-5597.
- [2] 邢丽萍, 周斌. 创伤弧菌生物学研究进展 [J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(7): 1833-1836.
- [3] AMARO C, BOSCA E G. *Vibrio vulnificus* biotype 2, pathogenic for eels, is also an opportunistic pathogen for humans [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(4): 1454-1457.
- [4] BIOSCA E G, AMARO C, ESTEVE C, et al. First record of *Vibrio vulnificus* biotype 2 from diseased European eel, *Anguilla anguilla* [J]. J Fish Dis, 2010, 14: 103-109.
- [5] 宋立超, 樊景凤, 刘述锡, 等. 病原性海洋弧菌快速检测方法的研究进展 [J]. 海洋环境科学, 2005, 24(1): 65-69.
- [6] SUZUKI S, KUROE K, YASUE K, et al. Antigenicity and N-terminal amino acid sequence of a 35 kD porin-like protein of *Vibrio anguillarum*: comparison among different serotypes and other bacterial species [J]. Lett Appl Microbiol, 1996, 23: 257-260.
- [7] FISHER W S, OLIVER L M, MANNING C S, et al. Decreased resistance of eastern oysters (*Crassostrea virginica*) to a protozoan pathogen (*Perkinsus marinus*) after sublethal exposure to tributyltin oxide [J]. Marine Environmental Research, 1999, 47: 185-201.
- [8] 曾伟伟, 王庆, 石存斌, 等. 免疫学和分子生物学技术在水产动物疾病诊断中的应用 [J]. 动物医学进展, 2010, 31(6): 111-117.
- [9] 王崇明, 杨冰, 宋晓玲, 等. 应用双抗夹心 ELISA 法检测皱纹盘鲍致病病原—创伤弧菌的研究 [J]. 海洋水产研究, 1999, 20(1): 30-34.
- [10] 减红梅, 樊景凤, 王斌, 等. 应用斑点 ELISA 技术检测副溶血弧菌 [J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(1): 79-82.
- [11] 张晓华, ROBERTSON P, AUSTIN B, 等. 检测海洋弧菌的酶联免疫吸附试验研究 [J]. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(3): 326-332.
- [12] 李重实, 李强, 刘海燕, 等. 鲶爱德华氏菌间接酶联免疫快速检测法的建立 [J]. 广东海洋大学学报, 2010, 30(4): 17-21.
- [13] 余俊红, 姚斐, 王宝坤, 等. 应用间接 ELISA 技术快速检测花鲈病原菌——鳎弧菌 [J]. 高技术通讯, 2001, 7(1): 23-27.
- [14] 白方方, 兰建新, 土燕, 等. 迟缓爱德华氏菌间接 ELISA 快速检测法 [J]. 中国水产科学, 2009, 16(4): 619-625.
- [15] 职通瑞, 宋晓玲, 张晓静, 等. 多抗间接 ELISA 方法的建立及其在海洋细菌快速检测中的应用 [J]. 渔业科学进展, 2015, 36(2): 71-76.
- [16] 王艳, 何再平, 黄忠荣, 等. 快速检测致病性副溶血弧菌的 dot-ELISA 方法的建立 [J]. 中国动物传染病学报, 2018, 26(5): 52-56.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 黄力行)