

[引用格式] 金健,程志强,王志勇,等.一种大黄鱼盾纤毛虫病的PCR检测方法的建立与应用[J].集美大学学报(自然科学版),2026,31(3):264-273. DOI:10.19715/j.jmuzr.2026.03.02.

一种大黄鱼盾纤毛虫病 PCR 检测方法 的建立与应用

金健^{1,2}, 程志强^{1,2}, 王志勇^{1,2}, 张东玲^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 农业农村部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 为防控大黄鱼苗种期盾纤毛虫病的发生, 保证无虫鱼苗投放网箱, 基于贪食迈阿密虫和海洋尾丝虫的 18S rRNA 基因序列设计特异性引物, 建立一种盾纤毛虫病的复合 PCR 检测方法。通过引物特异性验证、灵敏度测试和实际样品检测, 综合评估该检测方法的灵敏度和准确性。结果表明, 该方法可特异性扩增贪食迈阿密虫与海洋尾丝虫的 DNA, 而对锥体虫、变形假单胞菌、虹彩病毒等非目标病原及健康大黄鱼组织 DNA 均无非特异性扩增, 具有良好的特异性。灵敏度检测显示, 该方法检测贪食迈阿密虫和海洋尾丝虫的最低浓度分别为 4.82×10^3 copies/ μ L (2.4 ng/L) 和 1.67×10^3 copies/ μ L (1.3 ng/L), 检测灵敏度较高。利用该方法对 10 份自然感染大黄鱼样本进行检测, PCR 方法共检出 6 份阳性样品, 优于传统镜检方法的检出率 (5 份), 进一步验证了该方法在实际样品检测中的准确性与敏感性。

[关键词] 大黄鱼; 盾纤毛虫; PCR 检测; 小亚基核糖体 RNA

[中图分类号] S 943 **[文章编号]** 1007-7405(2026)03-0264-10 DOI:10.19715/j.jmuzr.2026.03.02

Development and Application of PCR Detection Technology for Large Yellow Croaker Scuticociliatosis

JIN Jian^{1,2}, CHENG Zhiqiang^{1,2}, WANG Zhiyong^{1,2}, ZHANG Dongling^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for East China Sea of Ministry Agriculture and Rural Affairs, Xiamen 361021, China)

Abstract: In order to prevent outbreaks of scuticociliatosis of juvenile large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) and ensure that parasite-free juveniles are stocked in sea cages, species-specific primers targeting the 18S rRNA gene sequences of *Miamiensis avidus* and *Uronema marinum* were designed to establish a multiplex PCR detection method for scuticociliatosis. The method was comprehensively evaluated through primer specificity verification, sensitivity testing, and application to naturally infected samples. The results demonstrated that the method could specifically amplify DNA from *M. avidus* and *U. marinum*, without cross-reactivity with non-target pathogens such as *Trypanosoma*, *Pseudomonas plecoglossicida*, and *Iridovirus*, nor with DNA from healthy *L. crocea* tissues, indicating good specificity. Sensitivity tests revealed that the minimum detectable concentrations

[收稿日期] 2025-04-28

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (32172964); 福建省自然科学基金项目 (2022J02042); 厦门市科技补助项目 (2024CXY0320)

[通信作者] 张东玲, 博士, 副教授, 博导, 从事水产生物遗传育种方向研究, E-mail:342312933@qq.com

for *M. avidus* and *U. marinum* were 4.82×10^3 copies/ μL (2.4 ng/L) and 1.67×10^3 copies/ μL (1.3 ng/L), respectively, demonstrating high sensitivity. Ten naturally infected croaker samples were tested using the PCR method, and six positive samples were detected in total, outperforming traditional microscopy which detected only five, thus further confirming its diagnostic accuracy and sensitivity in field samples.

Keywords: *Larimichthys crocea*; scuticociliatosis; PCR test; 18S rRNA

0 引言

大黄鱼 (*Larimichthys crocea*) 是我国东南地区重要的经济鱼类, 为我国传统四大海产渔业种类之一, 有“海水国鱼”之称^[1]。2023 年, 我国大黄鱼年产量为 28.10 万 t, 仅次于卵形鲳鲹 (*Pomfret ovata*) 的 29.22 万 t, 在海水养殖鱼类中位居第二^[2]。近年来, 大黄鱼种质资源退化和养殖环境恶化问题日益严重, 病害暴发的风险提高。盾纤毛虫病对大黄鱼鱼苗期的危害最为严重, 可导致鱼体消瘦、体表溃烂、继发感染, 继而引发大黄鱼鱼苗的大规模死亡, 近几年每年因该病死亡的大黄鱼苗种超 10 亿尾^[3]。盾纤毛虫是一类兼性寄生的纤毛虫, 在鱼体免疫力低下或环境恶化时可快速转入致病状态, 引发体表溃烂、细菌继发感染, 甚至造成大规模死亡^[4-5]。目前已报道的感染大黄鱼的盾纤毛虫主要为贪食迈阿密虫 (*Miamiensis avidus*) 和海洋尾丝虫 (*Uronema marinum*) 等^[6]。此外, 其他海水养殖动物均会感染盾纤毛虫, 包括大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)^[7]、牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)^[8]、真鲷 (*Pagrus major*)^[9]、红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*)^[10]、海参 (*Sea cucumber*)^[11] 和海胆 (*Echinoidea*)^[3] 等。

早期、快速且准确的病原学检测对于盾纤毛虫病的有效防控具有重要意义。目前, 传统的检测手段主要包括刮取鱼体表黏液、病灶部位涂片, 以及剪取鳍条和鳃组织制作水浸片等, 通过光学显微镜观察盾纤毛虫形态以进行诊断^[12]。然而, 当感染虫体数量较少时, 该方法的检出率明显下降, 难以满足早期诊断的需求。此外, 这些传统检测方法在种属鉴定方面亦存在明显局限。随着分子生物学技术的发展, PCR 等检测方法因其灵敏度高、特异性强已在多种寄生虫快速检测中得到广泛应用。核糖体小亚基 RNA (18S rRNA) 基因由于在寄生虫基因组中丰度高、序列中兼具保守区和可变区, 已成为寄生虫分子鉴定和系统发育分析的重要标记^[13]。以 18S rRNA 基因为靶标的分子检测策略已被成功应用于多种原生动物寄生虫的检测, 包括小林三叶虫 (*Gyrodactylus kobayashi*)^[14]、碘泡虫 (*Myxobolus honghuensis*)^[15]、澳洲异尾涡虫 (*Heterochaerus australis*)^[16]、胎毛滴虫 (*Tritrichomonas foetus*)^[17] 等。因此, 本研究针对盾纤毛虫 18S rRNA 序列设计特异性引物, 建立适用于大黄鱼盾纤毛虫病的 PCR 检测方法, 实现盾纤毛虫病原的快速准确识别, 也为其流行病学调查与早期防控提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1) 实验用鱼。大黄鱼样品 1~3 采自福建宁德白称潭鱼排, 样品 4~10 采自福建福州连江一个暴发盾纤毛虫病的大黄鱼育苗公司。样品 1~5 经显微镜检查确定有盾纤毛

虫后保存于 75% 乙醇中；样品 6 ~ 10 则来自盾纤毛虫发病群体，但个体外观及行为表现正常，镜检无寄生虫。样品 1 ~ 10 的具体信息见表 1。

表 1 大黄鱼样品信息
Tab. 1 Information of large yellow croaker samples

样品编号	样品长度/cm	采样时间	采样地点	临床症状与镜检情况
1	5 ~ 6	2024 - 05	宁德蕉城	摄食减少，游动异常，体表溃烂，取体表溃烂部位和鳃镜检有盾纤毛虫
2	5 ~ 6	2024 - 05	宁德蕉城	摄食减少，游动异常，体表溃烂，取体表溃烂部位和鳃镜检有盾纤毛虫
3	5 ~ 6	2024 - 05	宁德蕉城	摄食减少，游动异常，体表溃烂，取体表溃烂部位和鳃镜检有盾纤毛虫
4	3 ~ 4	2025 - 03	福州连江	体表正常，头部发红，鳃和脑镜检后有盾纤毛虫
5	3 ~ 4	2025 - 03	福州连江	体表正常，头部发红，鳃和脑镜检后有盾纤毛虫
6	3 ~ 4	2025 - 03	福州连江	体表正常，黏液和鳃均未观察到盾纤毛虫
7	3 ~ 4	2025 - 03	福州连江	体表正常，黏液和鳃均未观察到盾纤毛虫
8	3 ~ 4	2025 - 03	福州连江	体表正常，黏液和鳃均未观察到盾纤毛虫
9	3 ~ 4	2025 - 03	福州连江	体表正常，黏液和鳃均未观察到盾纤毛虫
10	3 ~ 4	2025 - 03	福州连江	体表正常，黏液和鳃均未观察到盾纤毛虫

2) 主要试剂。组织基因组 DNA 提取试剂盒（FastPure Cell/Tissue DNA Isolation Mini Kit）购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；DNA Marker、10 × Loading buffer、2 × ApexHF HS DNA Polymerase FS 购自湖南艾科瑞生物工程有限公司；琼脂糖购自厦门兰博利德生物技术有限公司；胶回收试剂盒购自北京天漠科技开发有限公司；重组质粒购自上海百赛生物科技股份有限公司；DH5α 细胞购自北京擎科生物科技股份有限公司；胰蛋白胨、酵母粉购自赛默飞世尔科技公司；氯化钠、无水乙醇购自西陇化工有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 盾纤毛虫的形态观察

取 20 μL 培养的虫液滴置于洁净载玻片中央，轻轻覆盖盖玻片，避免产生气泡。采用光学显微镜从低倍逐级转换至高倍进行观察，并对盾纤毛虫的形态特征进行拍照记录。

1.2.2 大黄鱼基因组 DNA 提取

虹彩病毒 DNA 由集美大学水产学院邹鹏飞老师赠送。健康的鱼整尾研磨成匀浆液，病鱼取发病溃烂部分进行 DNA 提取。DNA 提取按照组织基因组 DNA 提取试剂盒（FastPure Cell/Tissue DNA Isolation Mini Kit）的说明书步骤进行操作。

1.2.3 特异性引物的设计及合成

对 GenBank 已登录的贪食迈阿密虫和海洋尾丝虫的 18S rRNA 序列（KX357144.1、KX259260.1、MF418591.1、GQ465466.1）进行多序列比对，比对结果显示，R1 为贪食迈阿密虫特异引物，结合区段在海洋尾丝虫中存在多个错配碱基；F2 与 R2 为海洋尾丝

虫特异性引物, 在贪食迈阿密虫中未发现完全匹配区段, 结合区域位于 18S rRNA 的可变区 (见图 1)。引物序列如表 2 所示, 所用引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。



图 1 2 种盾纤毛虫及引物结合区段的 18S rRNA 多序列比对图

Fig.1 Multiple sequence alignment of 18S rRNA for scuticociliate and primer binding regions

表 2 贪食迈阿密虫和海洋尾丝虫的 PCR 扩增引物

Tab. 2 PCR amplification primers for *M. avidus* and *U. marinum*

引物名称	引物序列	产物大小/bp
18S rRNA-F1	TCATTCAAGTTTCTGCCCTATC	454
18S rRNA-R1	CAAGGTAAAGAGCCTACTCCACTA	454
18S rRNA-F2	CAGTCTCAGTTCTGGCTTAGGT	712
18S rRNA-R2	TGCCGATTAAAGATCAACATAC	712

1. 2. 4 PCR 扩增及检测

以实验室体外培养的贪食迈阿密虫和海洋尾丝虫 DNA 为模板, 使用上述引物进行 PCR 扩增, 以检测引物对两类盾纤毛虫的种属特异性识别能力。PCR 反应体系如下: DNA 聚合酶为 10 μ L, 正向引物为 0.8 μ L, 反向引物为 0.8 μ L, ddH₂O 为 7.4 μ L, DNA 模板为 1 μ L, 总体积为 20 μ L。

反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 扩增 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 总延伸 10 min。随后使用 1% 凝胶电泳分析 PCR 产物。

1. 2. 5 特异性验证

为提高检测方法的适用性, 将 F1 和 F2 引物等比例混合构建复合扩增体系, 以验证其对大黄鱼盾纤毛虫不同种属的同步检测。在复合引物扩增体系中, F1/R1 与 F2/R2 两

对引物按物质的量比为 1:1 混合, 每条引物的最终浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 混合后引物总浓度为 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 。其中, F1、R1、F2、R2 各取 0.8 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 加入 20 μL 总反应体系中, 确保各引物浓度均衡, 便于两种盾纤毛虫的同时扩增检测。同时, 为评估引物的特异性, 本文选择在大黄鱼盾纤毛虫病流行季节可能并发且临床症状易混淆的代表性病原, 包括锥体虫 (*Trypanosoma*)、虹彩病毒 (*Iridovirus*)、变形假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicida*) 等。

为保证 PCR 体系的一致性, 上述病原及健康大黄鱼组织样本的核酸均采用相同的提取方法进行处理。其中, 锥体虫、变形假单胞菌及健康组织样本的 DNA 均使用统一的组织 DNA 提取试剂盒提取。考虑到虹彩病毒为典型 DNA 病毒, 结构特殊, 故使用病毒 DNA 提取试剂盒, 以确保提取效率与下游检测的灵敏度。以各病原提取的 DNA 为模板, 大黄鱼基因组 DNA 作为空白对照, 参照节 1.2.4 所述反应体系与扩增程序进行 PCR 反应, 并通过 1% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测。

1.2.6 重组质粒标准品的构建

以贪食迈阿密虫和海洋尾丝虫的 DNA 为模板, 使用筛选得到的特异性引物进行扩增, PCR 反应体系包括 Taq 酶 15 μL 、正向引物 1.2 μL 、反向引物 1.2 μL 、ddH₂O 9.2 μL 、DNA 模板 1 μL , 总反应体积为 30 μL , PCR 反应程序同节 1.2.4。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收目的条带并纯化。随后, 将纯化获得的 DNA 片段与 19-T 载体进行连接反应, 构建重组质粒。将 10 μL 重组产物转入 DH5 α , 并涂布于含有氨苄青霉素的 LB 固体平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 ~ 15 h。挑选平板上生长良好的单菌落, 并对其进行阳性克隆鉴定。筛选获得的阳性菌株送至上海生工生物工程股份有限公司进行 Sanger 测序。测序后的阳性质粒使用 Multiskan GO™ 分光光度计测定其浓度, 并借助在线工具 DNA/RNA Copy Number Calculator(<https://www.endmemo.com/bio/dnacopynum.php>) 计算其拷贝数。

1.2.7 引物灵敏性检测

将目标片段克隆至 19-T 载体后, 筛选阳性克隆并通过测序验证正确性。提取验证菌株的质粒并测定其浓度, 采用 10 倍梯度稀释法制备系列浓度质粒模板, 分别取各梯度稀释液作为模板进行 PCR 扩增, 反应体系及扩增程序参照节 1.2.4 所述条件执行。

1.2.8 样品灵敏度检测

对大黄鱼样品进行 PCR 检测, 并与显微镜检查结果进行对比, 以评估 PCR 体系的灵敏性和检测结果的可靠性。将 PCR 检测呈阳性的样品扩增产物送至上海生工生物工程股份有限公司进行测序, 并在 NCBI BLAST 数据库中进行在线比对, 以分析序列同源性。

2 结果与分析

2.1 盾纤毛虫的形态学观察

光学显微镜观察显示, 贪食迈阿密虫和海洋尾丝虫整体形态相似, 均呈水滴形或椭圆形, 表面布满纤毛。贪食迈阿密虫体型较短圆, 中央可见大核 (macronucleus, MA) (见图 2a); 海洋尾丝虫体型稍修长, 后端渐尖, 体内可见聚集的食物泡 (food vacuole,

FV) (见图 2b)。两者在不同饱食度条件下的形态存在一定变异, 形态特征重叠, 仅依靠形态难以准确区分, 因此本研究设计了特异性引物以辅助鉴定。

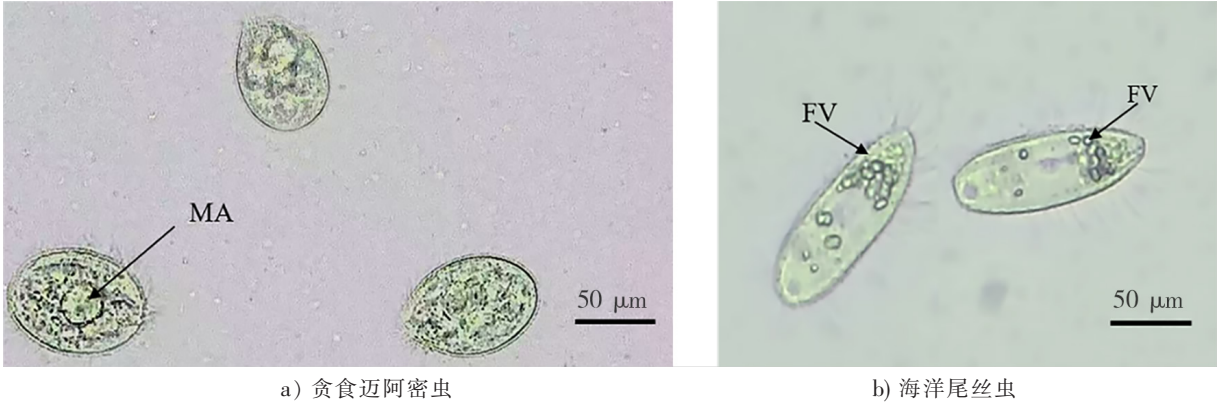
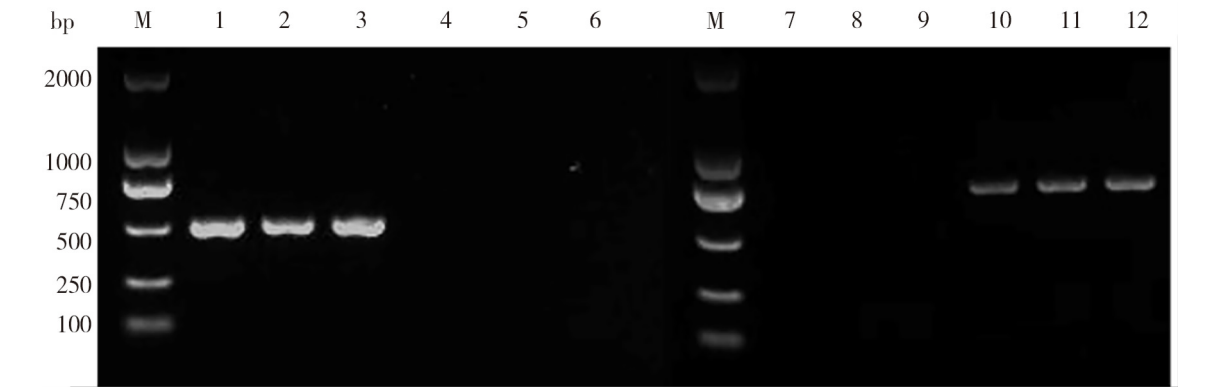


图 2 贪食迈阿密虫和海洋尾丝虫的形态学观察

Fig.2 Morphological observation of the *M. avidus* and *U. marinum*

2.2 大黄鱼盾纤毛虫 PCR 检测体系的构建

PCR 扩增结果如图 3 所示, 可见, F1/R1 和 F2/R2 2 对引物均能扩增出目标片段, 扩增产物大小与预期结果一致。F1/R1 特异性扩增出贪食迈阿密虫, F2/R2 特异性扩增出海洋尾丝虫。为提高检测虫体的覆盖范围, 将 2 对引物等比例混合使用, 以确保能同时检测出 2 种盾纤毛虫。



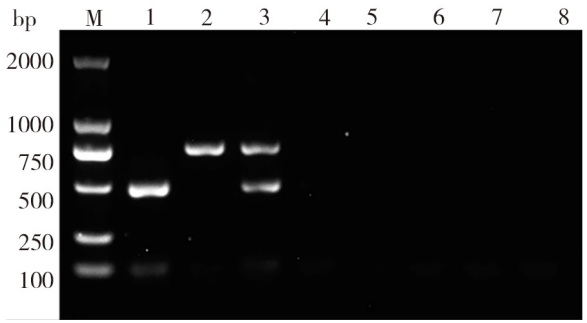
注: 1~6 为引物 F1/R1 扩增结果; 7~12 为引物 F2/R2 扩增结果; 1~3 和 7~9 是以贪食迈阿密虫基因组 DNA 为模板; 4~6 和 10~12 是以海洋尾丝虫基因组 DNA 为模板。

图 3 PCR 扩增产物电泳图

Fig.3 PCR amplification product electrophoresis image

2.3 特异性检测

以盾纤毛虫 DNA 和各类病原基因组为模板, 采用引物 F1/R1 和 F2/R2 等比例混合进行 PCR 扩增, 结果如图 4 所示。可见, 除贪食迈阿密虫、海洋尾丝虫和 2 种盾纤毛虫混合 DNA 具有特性行扩增条带外, 其余锥体虫、变形假单胞菌、虹彩病毒、大黄鱼 DNA 和空白 ddH₂O 均未检测到扩增条带, 表明设计的 PCR 引物体系对盾纤毛虫具有较好的特异性。



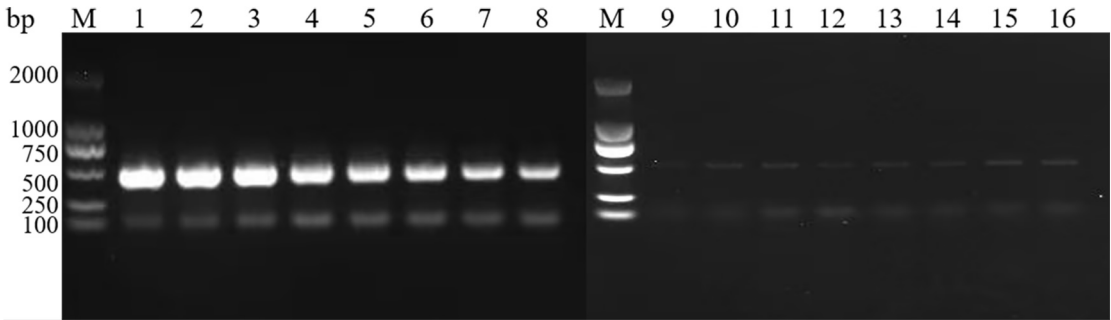
注:M—2000 Marker;1—贪食迈阿密虫;2—海洋尾丝虫;3—贪食迈阿密虫和海洋尾丝虫;4—锥体虫;5—变形假单胞菌;6—大黄鱼虹彩病毒;7—大黄鱼;8—ddH₂O。

图 4 PCR 特异性检测结果

Fig.4 PCR specific detection results

2.4 引物灵敏度检测

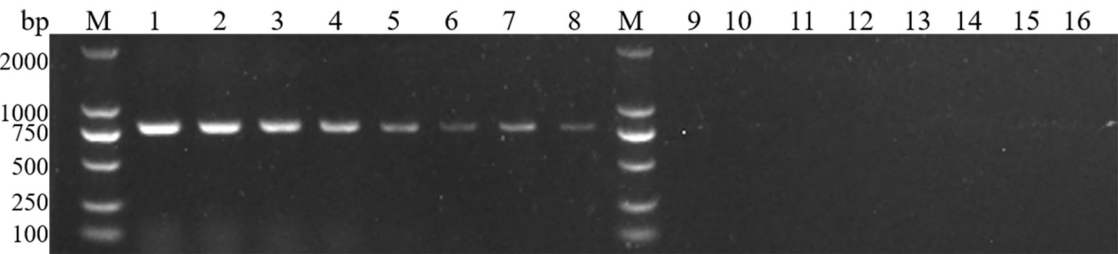
以贪食迈阿密虫为模板构建的质粒质量浓度为 24 mg/L，以海洋尾丝虫为模板构建的质粒质量浓度为 13 mg/L。利用建立的 PCR 方法分别对 16 个不同梯度的灵敏度样本进行检测，结果显示，对于贪食迈阿密虫，当其质粒模板的浓度在 4.82×10^3 copies/ μ L (2.4 ng/L) 时，扩增条带清晰；当模板浓度低于 4.82×10^2 copies/ μ L (0.24 ng/L) 时，扩增条带模糊（见图 5）。表明该方法能检测到的贪食迈阿密虫的最低浓度为 4.82×10^3 copies/ μ L (2.4 ng/L)。对于海洋尾丝虫，当其质粒模板浓度在 1.67×10^3 copies/ μ L (1.3 ng/L) 时，扩增条带清晰；当模板浓度低于 1.67×10^2 copies/ μ L (0.13 ng/L) 时，扩增条带模糊（见图 6）。表明该方法能检测到的海洋尾丝虫的最低浓度为 1.67×10^3 copies/ μ L (1.3 ng/L)。



注：M 为 2000 Marker；1~16 为模板拷贝数 $4.82 \times 10^{10} \sim 4.82 \times 10^{-5}$ copies/ μ L

图 5 贪食迈阿密虫 PCR 灵敏度检测结果

Fig.5 PCR sensitivity detection results of *M. avidus*



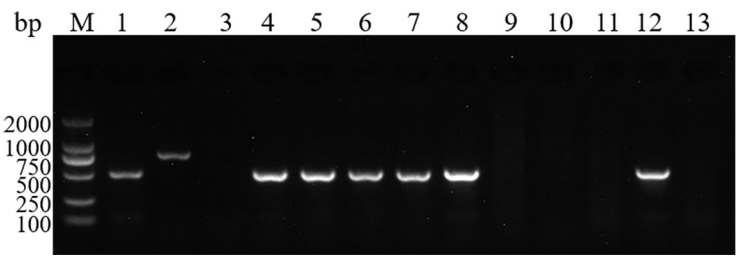
注：M 为 2000 Marker；1~16 为模板拷贝数 $1.67 \times 10^{10} \sim 1.67 \times 10^{-5}$ copies/ μ L

图 6 海洋尾丝虫 PCR 灵敏度检测结果

Fig.6 PCR sensitivity detection results of *U. marinum*

2.5 样品灵敏度检测

对 10 尾大黄鱼样品进行 PCR 检测, 扩增结果如图 7 所示。可见, 显微镜检出盾纤毛虫的样品 1—5 均成功扩增出阳性片段。此外, 镜检未检出盾纤毛虫的样品 9 也成功扩增出阳性片段。测序比对结果表明, 样品 1—5 及样品 9 的序列与贪食迈阿密虫 (GenBank 登录号 KX259260.1) 一致性均超过 99%。本方法扩增的产物均为盾纤毛虫 18S rRNA 基因片段, 相较于传统显微镜检查, 该方法更可靠, 可用于大黄鱼寄生性盾纤毛虫的分子鉴定。



注: M 为 2000 Marker; 1 为 *M.avidus* 阳性对照; 2 为 *U.marinum* 阳性对照; 3 为 ddH₂O 阴性对照; 4~13 为 10 个大黄鱼样品。

图 7 大黄鱼样本的 PCR 检测结果
Fig.7 PCR detection results of large yellow croaker sample

3 讨论

近年来, 盾纤毛虫病已成为大黄鱼幼苗培育阶段的高发疾病, 给水产养殖业造成严重的经济损失。该病原涉及多个盾纤毛虫种属, 目前已报道的主要包括贪食迈阿密虫、海洋尾丝虫等^[18]。由于缺乏针对盾纤毛虫感染的特效药物, 早期精准诊断成为疾病防控的关键环节。因此, 建立灵敏、特异的早期检测技术成为防控该病的关键。

18S rRNA 基因作为一种保守且具有一定变异性的分子标记, 已被广泛应用于多种寄生虫的种属鉴定与系统发育研究^[3,19]。本研究基于贪食迈阿密虫和海洋尾丝虫的 18S rRNA 基因序列设计了特异性引物, 能够有效检测大黄鱼组织中的贪食迈阿密虫和海洋尾丝虫。引物的高度特异性表明, 2 种盾纤毛虫 18S rRNA 基因区域的种间差异显著, 成功避免了交叉反应。混合引物的策略扩大了检测范围, 适用于 2 种盾纤毛虫的同步筛查, 尤其对混合感染样本的快速诊断具有实用价值。此外, 本文构建的 PCR 检测体系对贪食迈阿密虫的最低检测限为 4.82×10^3 copies/ μ L (2.4 ng/L), 对海洋尾丝虫的最低检测限为 1.67×10^3 copies/ μ L (1.3 ng/L)。两者存在一定程度的灵敏度差异, 该差异可能源于引物与各自模板的结合效率不同, 例如 GC 含量、二级结构及退火匹配性等因素均可能影响扩增效率。此外, 还需考虑 2 种盾纤毛虫在基因组中 18S rRNA 基因拷贝数的差异, 原生动物 rRNA 基因常以多拷贝重复存在, 若海洋尾丝虫的 18S rRNA 拷贝数更高, 则在等量模板中目标序列更丰富, 从而更容易被检测到。尽管存在差异, 但 2 种引物体系的检测灵敏度均显著优于传统显微镜检查, 足以识别早期或低载量感染, 为盾纤毛虫病的及时防控提供了技术保障。需要指出的是, 本研究所建立的 PCR 方法虽然具有良好的特异性与灵敏度, 能够有效识别盾纤毛虫病原 DNA, 但由于扩增靶标为 18S

rRNA 基因,该方法仅能判断病原是否存在,尚无法区分其是否具备活性,因而不能直接用于判定是否为活动性感染。在实际应用中,尤其是在药物处理后,若病原虫已失活但其 DNA 仍残留于组织中,可能导致 PCR 仍呈阳性,存在出现“假阳性”的风险。因此,该方法更适用于发病早期的病原快速筛查与确诊,而在疗效评估或康复监测阶段,建议结合临床症状、组织镜检等综合指标进行判定。

大黄鱼盾纤毛虫病的流行高峰期为每年 3—6 月,其暴发与水温条件密切相关,最适流行水温范围通常为 $17 \sim 22\text{ }^{\circ}\text{C}$ [3,19]。值得注意的是,该流行期内养殖海区常同时存在其他病原如锥体虫、虹彩病毒及变形假单胞菌等,可能与盾纤毛虫形成混合感染,导致临床症状复杂化,增加诊断难度。本研究通过交叉反应验证表明,建立的 PCR 方法对上述病原基因组均未产生非特异性扩增,表明其具有良好的特异性。在实际应用方面,对 10 个自然感染的大黄鱼样本进行 PCR 检测,结果显示,镜检阳性样本 1~5 的 PCR 均扩增出特异性条带,测序比对证实,其与贪食迈阿密虫序列 (GenBank 登录号: KX259260.1) 相似性达 99% 以上。样本 9 的镜检漏检可能因虫体数量低或分布不均,而 PCR 方法通过对核酸的高效扩增,突破了传统形态学检测在灵敏度方面的限制。

4 结论

基于贪食迈阿密虫和海洋尾丝虫的 18S rRNA 基因序列设计特异性引物,本文建立一种盾纤毛虫病的复合 PCR 检测方法,并通过引物特异性验证、灵敏度测试和实际样品检测,综合评估该检测方法的灵敏度和准确性。结果表明,该方法可特异性扩增贪食迈阿密虫与海洋尾丝虫的 DNA,而对锥体虫、变形假单胞菌、虹彩病毒等非目标病原及健康大黄鱼组织 DNA 均无非特异性扩增,具有良好的特异性。本研究建立的 PCR 检测方法兼具快速性、特异性与高灵敏度,适用于大黄鱼盾纤毛虫病的早期诊断和流行病学调查,为该病的科学防控提供了重要的技术支撑。未来研究可进一步结合荧光探针 PCR 或数字 PCR 技术,实现病原负荷的定量分析,有助于更精确地监测盾纤毛虫的感染动态与传播风险。

[参 考 文 献]

- [1] 陈慧,林国文,刘招坤,等. 网箱养殖大黄鱼生长特性的研究[J]. 海洋科学,2010,34(11):1-5.
- [2] 农业农村部渔业渔政管理局,全国水产技术推广站,中国水产学会. 2024 中国渔业统计年鉴[M]. 北京:中国农业出版社,2024.
- [3] 张善霖. 大黄鱼体内寄生纤毛虫病的诊断与治疗[J]. 福建水产,2011,33(2):58-61.
- [4] STEVERDING D. Scuticociliatosis caused by *Philasterides dicentrarchi* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2022, 150: 87-101.
- [5] 林能锋,陈立志,曾红. 贪食迈阿密虫 (*M. avidus*) 对 4 种海水养殖鱼类组织匀浆液的趋化性[J]. 福建畜牧兽医,2021, 43(2):11-13.
- [6] GAO Y Q, JIN S B, DANG H F, et al. Mitochondrial genome sequencing of notorious scuticociliates (*Pseudocohnilembus persalinus*) isolated from Turbot (*Scophthalmus maximus* L.) [J]. Mitochondrial DNA Part B: Resources, 2018, 3(2): 1077-1078.

- [7] SHIN S M, KOLE S, LEE J, et al. Formulation of chitosan microsphere-based oral vaccine against the scuticociliate parasite *Miamiensis avidus*; evaluation of its protective immune potency in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2023, 142: 109159.
- [8] 崔青曼, 袁春营, 李春岭, 等. 主要海水养殖鱼类白点病和盾纤毛虫病防治技术[J]. 水利渔业, 2007(6): 85-87.
- [9] HUANG Y X, WANG S, GAO Y Q, et al. Comparison of mitochondrial genome and development of specific PCR primers for identifying two scuticociliates, *Pseudocohnilembus persalinus* and *Uronema marinum* [J]. Parasites and Vectors, 2021, 14(1): 318.
- [10] 何建平, 殷蕊. 工厂化养殖仿刺参苗种盾纤毛虫病防控技术要点[J]. 科学养鱼, 2023(4): 59-60.
- [11] VEGA T R, HAY M. Mystery solved? disease detectives identify the cause of a mass die-off in the sea[J]. Science Advances, 2023, 9(16): 5478.
- [12] 孙滔, 米荣升, 张烨华, 等. 基于不同靶基因的 3 种住肉孢子虫 PCR 检测方法比较[J]. 动物医学进展, 2020, 41(12): 1-6.
- [13] DAS B K, DHAR S, KUMAR V, et al. Morphological and molecular evidence of fish parasite *Gyrodactylus kobayashi* and *Argulus japonicus* isolated from ornamental fish (*Carassius auratus*) [J]. Agricultural Research, 2024, 14: 579-590.
- [14] 王钊, 王好, 钱爱东, 等. 一例查干湖异育银鲫洪湖碘泡虫病原的鉴定与生物信息学分析[J]. 大连海洋大学学报, 2015, 30(5): 509-513.
- [15] 孔森, 廖梅杰, 王印庚, 等. 刺参养殖池塘中新敌害生物澳洲异尾涡虫的鉴定及其危害[J]. 水产学报, 2020, 44(9): 1513-1524.
- [16] 刘继兵, 赵洪喜. 基于 18S RNA 的胎毛滴虫感染 PCR 诊断方法的建立[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2022, 40(5): 682-685.
- [17] ZHOU R L, XIE X, YIN F. Isolation, characterization and virulence of *Metanophrys* sp. (Ciliophora; Scuticociliatida) from large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in China [J]. Aquaculture, 2024, 578: 740132.
- [18] SAHOO P K, PATTANAYAK S, PAUL A, et al. First record of *Metanophrys sinensis* (Protozoa: Ciliophora; Scuticociliatida) from India causing large scale mortality in a new host *Macrobrachium rosenbergii* Larvae [J]. Journal of Fish Diseases, 2018, 41(8): 1303-1307.
- [19] TAO Z, LIU L, CHEN X R, et al. First isolation of *Miamiensis avidus* (Ciliophora; Scuticociliatida) associated with skin ulcers from reared pharaoh cuttlefish *Sepia pharaonis* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2016, 122(1): 67-71.

(责任编辑 马建华 英文审校 黄力行)