

应用荧光抗体技术检测牙鲆体内的河流弧菌

鄢庆枇^{1,2}, 邹文政¹, 纪荣兴¹, 庄峙厦², 王小如²

(1. 集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 厦门大学 化学化工学院, 福建 厦门 361005)

摘要:用灭活的河流弧菌(*Vibrio fluvialis*) 抗原, 注射免疫实验兔, 制得凝集价为 1: 5 120 的抗血清。用试管凝集法检测了抗血清的特异性, 再用免疫吸附法去除交叉反应, 从而得到高效价、高特异性的抗河流弧菌血清。用所制备的抗血清在实验室中建立起河流弧菌荧光抗体检测技术(FAT), 在荧光显微镜下可清楚地看到被标记的病原菌, 整个检测过程只需 3 h。用河流弧菌感染牙鲆(*Paralichthys olivaceus*), 24 h 后, 用 FAT 测定牙鲆的血液、肾脏和肝脏中的河流弧菌, 在血液中河流弧菌的检出率最高, 其次是肾脏, 肝脏的检出率最低。以上结果表明: 荧光抗体技术可以快速、灵敏、准确地检测出牙鲆体内的河流弧菌。

关键词: 荧光抗体检测技术; 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*); 河流弧菌(*Vibrio fluvialis*)

中图分类号: S941 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)04-0016-04

河流弧菌(*Vibrio fluvialis*) 是生活在海洋里的一种条件致病菌^[1]。由于该病原菌的适应能力比较强, 海水的温度、盐度、pH 等都较适于河流弧菌的生长, 所以广泛分布在海洋环境中。近几年, 该菌已引起包括牙鲆在内的多种水产动物的败血症、脓疱病等疾病^[2-5], 造成了非常严重的经济损失。河流弧菌不仅是多种水产动物的致病菌, 而且也是人类的致病菌, 是因食用不洁海产品而导致流行性腹泻的主要致病菌^[6,7]。因此, 进行养殖牙鲆(*Paralichthys olivaceus*) 河流弧菌检测不仅是牙鲆养殖过程中防病治病需要, 也是提高海产品卫生质量、保障食用者健康的需要。

传统的致病菌检测方法需要鉴定形态特征、培养特性、生理生化特征等, 整个过程耗时较长, 操作烦琐, 不能满足病害防治的需要。荧光抗体检测技术与传统的检测方法相比具有快速、灵敏、准确等优点。鄢庆枇等^[8]用荧光抗体技术进行了大黄鱼病原弧菌(溶藻弧菌)检测, 张晓华等^[9]用间接荧光抗体诊断技术检测了对虾体内的副溶血弧菌, 吴淑勤等^[10]应用间接荧光抗体技术研究了水中嗜水气单胞菌数量与鱼类出血性败血症的关系。但是, 目前还没有牙鲆体内河流弧菌荧光抗体检测的研究报道。

作者应用前期从患病牙鲆体内分离到的河流弧菌制备抗血清, 建立河流弧菌荧光抗体检测方法, 并用于牙鲆体内河流弧菌的检测, 以期对牙鲆河流弧菌病的防治和水产品检验有所帮助。

1 材料与方 法

1.1 试验菌株

河流弧菌: 分离自患病牙鲆。

交叉反应菌: 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、坎普氏弧菌(*V. campbellii*)、海弧菌(*V. pelagius*)、弗氏弧菌(*V. furnissii*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、耐久肠球菌。以上菌株都购自中国普通微生物菌种保藏管理中心, 均保存于 - 80℃ 低温冰箱。

1.2 实验兔

雄性新西兰大白兔 4 只, 购于上海实验兔养殖场, 体质量为 2.5~3.0 kg/只。实验兔饲料购自厦门建发制药厂。

1.3 河流弧菌抗血清的制备

1.3.1 抗原的制备与注射

河流弧菌接种于营养琼脂斜面, 30℃ 温育 24 h, 用 0.5% 石炭酸生理盐水将菌苔洗下 60℃ 水浴 1 h 灭活, 再稀释到与 McFarland 比浊管 3 号管浊度相等。耳缘静脉注射免疫实验兔。每隔 5 d 注射 1 次, 总共注射 4 次, 第一次注射 0.5 mL, 每次递增 0.5 mL。

1.3.2 试血

第 4 次注射后第 7 天从实验兔耳中央静脉抽血

收稿日期: 2005 04 13; 修回日期: 2005 10 08

基金项目: 国家 863 计划项目(2001AA635070); 国家 863 计划项目(2002AA639600)

作者简介: 鄢庆枇(1971), 男, 福建永泰人, 副教授, 博士, 主要从事水产疾病学研究, 电话: 0592-6180204, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn

1 mL, 分离血清, 用试管凝集法测定其效价。如测得血清的凝集价 > 1: 1 280, 可以进行大量采血。

1.3.3 血清的效价和特异性检测

用试管凝集法测定所制备的抗血清的效价和对其他菌株的交叉反应凝集价^[8]。

1.3.4 交叉反应的去除

以吸附法去除河流弧菌抗血清与其他菌的交叉反应: 将有交叉反应的菌株, 每株培养一支斜面, 用生理盐水洗脱, 5 000 r/min 离心 10 min, 再反复荡洗离心 3 次, 离心管底部即为菌体。然后在离心管中加入河流弧菌抗血清 5 mL 进行吸附, 振荡混匀, 放在 4℃ 冰箱中过夜。次日将血清 5 000 r/min 离心 10 min。取上层清液, 再用 0.45 μm 滤膜过滤。再次测定其效价以及交叉反应效价。

1.4 荧光抗体检测

1.4.1 菌液的荧光抗体检测步骤

1.4.1.1 涂片、固定

把河流弧菌涂片于载玻片上, 风干, 在火焰上灼烧 2~3 次让其固定。以 PBST 洗涤 3 次, 每次 3 min。

1.4.1.2 加抗血清

把抗血清(稀释 1 000 倍), 滴加于载玻片上。将玻片放入预热的湿盒中, 37℃ 温育 1 h。以 PBST 溶液洗涤 3 次, 每次 3 min。

1.4.1.3 加标记二抗

加 FITC 标记的羊抗兔 IgG, 37℃ 温育 1 h。以 PBST 溶液洗涤 3 次, 每次 3 min。

1.4.1.4 镜检

在玻片上加 PBS 甘油, 加盖玻片封固, 在盖玻片上加一滴无自发荧光的香柏油, 用荧光显微镜观察。

1.4.2 牙鲈的体内河流弧菌的荧光抗体检测

从东山某牙鲈养殖场购买健康牙鲈, 体质量约 80~110 g, 暂养 3 d 后取 15 尾牙鲈分为 3 组, 每组 5 尾, 第一组每尾注射 1×10^7 cfu/mL 河流弧菌菌液 0.1 mL, 第二组每尾注射 1×10^8 cfu/mL 河流弧菌菌液 0.1 mL, 第三组为对照组, 每尾注射灭菌生理盐水 0.1 mL。

注射后 24 h, 取牙鲈血液、肝脏、肾脏进行河流弧菌荧光抗体检测。其中: 血液样品用草酸钾抗凝, 静置后直接取上层溶液进行检测; 肝脏、肾脏, 加入 5 倍体积生理盐水, 匀浆静置后取上层溶液进行检测。

1.4.3 荧光抗体检测

具体步骤同 1.4.1。

2 结果与分析

2.1 抗血清凝集价及特异性

实验兔注射 4 次抗原后, 其抗血清凝集价达到

1: 5 120, 符合实验要求。交叉反应的结果表明所制备的抗血清与其它弧菌有微弱的交叉反应, 最高为 1: 80, 其它各菌株中只有大肠杆菌和铜绿假单胞菌有微弱的交叉反应。通过免疫吸附过滤后, 抗体的效价虽有所下降, 但仍达到 1: 2 560, 而且经过吸附后所制备的抗血清特异性大大增强, 与 12 株其他细菌不会产生凝集反应(表 1), 可以用于河流弧菌的荧光抗体检测。

表 1 河流弧菌抗血清的凝集价

Tab 1 Agglutination titer and cross action titer of antiserum against *V. fluvialis*

测试菌株	吸附前凝集价	吸附后凝集价
河流弧菌	1: 5 120	1: 2 560
副溶血弧菌	1: 80	< 1: 10
溶藻弧菌	1: 20	< 1: 10
哈维氏弧菌	1: 10	< 1: 10
坎普氏弧菌	1: 10	< 1: 10
海弧菌	1: 40	< 1: 10
弗氏弧菌	< 1: 10	< 1: 10
嗜水气单胞菌	< 1: 10	< 1: 10
金黄色葡萄球菌	< 1: 10	< 1: 10
枯草杆菌	< 1: 10	< 1: 10
大肠杆菌	1: 20	< 1: 10
铜绿假单胞菌	1: 10	< 1: 10
耐久肠球菌	< 1: 10	< 1: 10

2.2 荧光抗体检测结果

河流弧菌与荧光抗体结合后在荧光显微镜下观察, 可以看到在黑色背景下, 菌体发出绿色荧光, 其形态清晰易辨。图 1 可见荧光显微镜下河流弧菌呈短杆状, 与经染色后在普通光学显微镜下观察到的河流弧菌菌体形态一致。

2.3 人工感染的牙鲈的检测结果

用所制备的河流弧菌抗血清进行了牙鲈血液、肝脏、肾脏的间接荧光抗体检测, 结果在注射了河流弧菌的牙鲈血液和肾脏能够清晰地观察到河流弧菌(图 2), 而在注射生理盐水的牙鲈体内没有发现河流弧菌。注射高浓度(1×10^8 cfu/mL) 河流弧菌的牙鲈体内河流弧菌的检出率高于注射低浓度(1×10^7 cfu/mL) 的检出率。实验组牙鲈中, 血液河流弧菌的检出率最高, 其次是肾脏, 肝脏的检出率最低(表 2)。实验组牙鲈注射了一定量的河流弧菌, 虽然在取样检测时的外观并未有异常, 但在体内却能检测出河流弧菌, 这说明间接荧光抗体技术可以用于未发病带菌状态的牙鲈的检测。

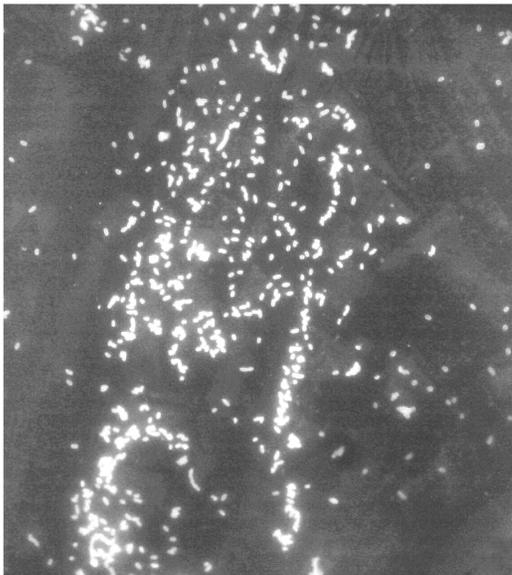


图 1 荧光显微镜下的河流弧菌(× 1 000)

Fig. 1 *V. fluvialis* under fluorescent microscope

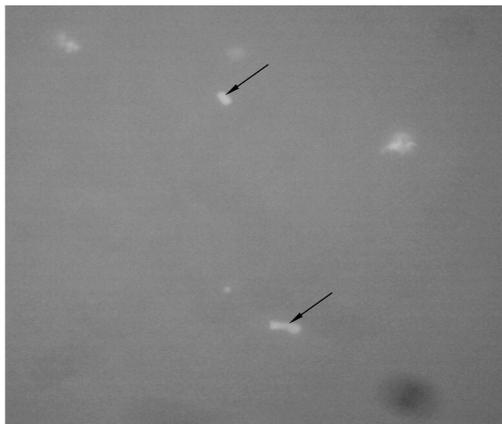


图 2 牙鲈血液中河流弧菌荧光抗体检测(× 1 000)

Fig. 2 *V. fluvialis* in blood of *P. olivaceus* detected by fluorescent microscope(× 1 000)



图 3 牙鲈肝脏中河流弧菌荧光抗体检测(× 1 000)

Fig. 3 *V. fluvialis* in liver of *P. olivaceus* detected by fluorescent microscope(× 1 000)



图 4 牙鲈肾脏中河流弧菌荧光抗体检测(× 1 000)

Fig. 4 *V. fluvialis* in kidney of *P. olivaceus* detected by fluorescent microscope(× 1000)

表 2 牙鲈体内河流弧菌的检出率

Tab 2 The ratio of *V. fluvialis* detected in *P. olivaceus*

样品	检出率(%)		
	试验组 I	试验组 II	对照组
血液	80	100	0
肝脏	40	80	0
肾脏	60	100	0

3 讨论

快速、准确地诊断水产养殖动物病原菌是对病害进行有效防治的基础和先决条件。由于传统的细菌鉴定工作量大,费时长,因而各国的科学家都在寻求对水产动物重要病原菌的快速、简单、准确的检测方法,从最初的简单抗原抗体血清反应,到现在的酶联免疫吸附反应(ELISA 技术)及荧光抗体技术(FAT)。FAT 的基本原理是将抗原抗体反应的特异性和敏感性与显微镜的精确性相结合。以荧光素为标记物,与已知的抗体(或抗原)结合,而不影响其免疫学特性。然后将荧光素标记的抗体作为标准试剂,用于检测和鉴定未知的抗原。在荧光显微镜下,可以直接观察呈现特异荧光的抗原抗体复合物及其存在的部位。应用间接荧光抗体技术对病原菌进行快速诊断,一般从制样到完成检测只需 3~ 4 h,既可以克服培养法时间过长的缺点,准确性又大大高于一般镜检结果^[6,7]。因此,该方法受到许多学者的重视,已经用于多种水产动物疾病的检测, Kawahara 和 Kusuda^[11]利用荧光抗体技术能很好地区分 α 、 β 溶血素的链球菌; Largo 等^[12]利用免疫荧光技术检测养殖大型海藻的病原弧菌 *Vibrio* sp. P11; Hung Hung 和 Yerr Ling^[13]利用荧光抗体技术研究了弧菌抗原在对虾体内传递过程及其在组织中的定位情况。

用荧光抗体检测法检测人工感染过河流弧菌的牙鲈,血液中检测到的细菌较多,说明了河流弧菌在牙鲈体内能通过血液传播,进而引起养殖动物败血症。肾脏、肝脏中也检出河流弧菌,这说明肾脏、肝脏

是河流弧菌的靶器官。肾脏、肝脏的检出率较低可能与样品处理方法有关。作者采用组织均浆后取上层溶液检测的方法,由于部分弧菌滞留在组织块中等原因难免会出现漏检,同时,肝脏组织均浆液在荧光显微镜下的背景荧光较强,在一定程度上影响到河流弧菌的检测。检测结果还表明:牙鲆体内河流弧菌的检测率与注射菌浓度密切相关,注射菌浓度越高,河流弧菌检出率也越高。在检测时,有部分牙鲆没有表现出相应的症状,但在其体内能够检测到河流弧菌,说明该方法不仅能用于患病牙鲆的病原检测,也能用于外观正常的带菌状态牙鲆的病原检测。

研究结果表明:荧光抗体检测法能够快速、灵敏、准确地检测出牙鲆体内的河流弧菌。在此基础上,用荧光抗体检测法进一步研究河流弧菌的感染途径与传播路径,将有助于揭示河流弧菌对牙鲆的致病机制。

参考文献:

- [1] Baffone W, Citterio B, Vittoria E, *et al.* Determination of several potential virulence factors in *Vibrio* spp. isolated from seawater [J]. **Food Microbiology**, 2001, 18: 479-488.
- [2] 常建波, 宫向红, 孙逢贤, 等. 养殖牙鲆弧菌病原菌初步研究[J]. 海洋水产研究, 2001, 22(1): 37-41.
- [3] 李太武, 丁明进, 相建海, 等. 皱纹盘鲍对河流弧菌 II 疫苗免疫的研究[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(1): 27-32.
- [4] 鄢庆枇, 苏永全, 王军, 等. 网箱养殖青石斑鱼河流弧菌病研究[J]. 海洋科学, 2001, 25(10): 17-19.

- [5] 张朝霞, 苏永全, 王军, 等. 斑节对虾病原菌河流弧菌(I型)的研究[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2000, 39(增刊): 208-213.
- [6] 范长权, 广德印, 李士超. 一起食物中毒事件的调查报告[J]. 中国公共卫生管理, 2001, 17(3): 249-250.
- [7] 张慧兰, 李富玲. 从腹泻患者的粪便中首次在黑龙江省检出河流弧菌 I 的分离鉴定[J]. 哈尔滨医药, 1991, 11(4): 23-25.
- [8] 鄢庆枇, 苏永全, 王军, 等. 大黄鱼弧菌病的荧光抗体快速诊断研究[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2001, 6(4): 291-295.
- [9] 张晓华, 徐怀恕, 徐兵, 等. 中国对虾弧菌病的间接荧光抗体诊断技术研究[J]. 海洋与湖沼, 1997, 28(6): 604-610.
- [10] 吴淑勤, 石存斌, 潘厚军, 等. 应用间接荧光抗体技术研究水中嗜水气单胞菌的数量与鱼类出血性败血症的关系[J]. 中国水产科学, 1994, 1(2): 1-9.
- [11] Kawahara E, Kusuda R. Direct fluorescent antibody technique for diagnosis of bacterial disease in eel[J]. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 1987, 53: 395-399.
- [12] Largo D, Fukami K, Asachi M, *et al.* Immunofluorescent detection of ice ice disease promoting bacterial strain *Vibrio* sp. P11 of the farmed macroalga, *Kappaphycus alvarezii* [J]. **Journal of Marine Biotechnology**, 1998, 6: 178-182.
- [13] Hung Hung S, Yerr Ling S. Tissue location of *Vibrio* antigen delivered by immersion to tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. **Aquaculture**, 1996, 145(1): 41-54.

Detection of *Vibrio fluvialis* in *Paralichthys olivaceus* using indirect fluorescent antibody technique

YAN Qing pi^{1,2}, ZOU Weir zheng¹, JI Rong-xing¹, ZHUANG Zhixia², WANG Xiaoru²

(1. Fisheries College of Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. College of Chemistry & Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Apr., 13, 2005

Key words: fluorescent antibody technique; *Paralichthys olivaceus*; *Vibrio fluvialis*

Abstract: *Vibrio fluvialis*, the pathogenic bacteria of *Paralichthys olivaceus* were inactivated for vaccine. using an anti *V. fluvialis* sera, agglutination titer up to 1: 5 120, was got from rabbits by injected vaccine. The serum has no cross reaction to *Vibrio parahaemolyticus* and other 11 strains after being absorbed. Using the anti sera, indirect fluorescent antibody technique for detection of *V. fluvialis* was established. The pathogenic bacteria could be observed clearly under fluorescent microscope. The whole process lasts merely 3 h. The *P. olivaceus* was artificially infected by injecting of *V. fluvialis*, and after 24 h post injection, the blood, kidney and liver of *P. olivaceus* were detected for *V. fluvialis* by indirect fluorescent antibody technique. The results showed that the ratio of *V. fluvialis* detected in blood was higher than those in kidney and liver. The results indicated that FAT would be used to detect *V. fluvialis* in *P. olivaceus* rapidly, sensitively and truly.

(本文编辑: 刘珊珊)