

文章编号: 1004 - 7271(2005)03 - 0248 - 05

梭子蟹乳化病的间接 ELISA 诊断

赵青松^{1,2}, 徐 镇¹, 陈寅儿¹, 金 珊¹, 徐国辉³

(1. 宁波大学生物科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211;

2. 上海水产大学生命科学与技术学院, 上海 200090;

3. 浙江省舟山市普陀区海洋与渔业局, 浙江 舟山 316010)

摘 要:以梭子蟹乳化病的病原菌—溶藻弧菌为抗原,制成免疫血清;利用辣根过氧化酶标记的羊抗兔血清(HRP-IgG)为酶标二抗,建立了检测溶藻弧菌的间接 ELISA 快速诊断法。结果表明,应用间接 ELISA 技术检测溶藻弧菌有较高的灵敏度,最低的检测量为 10^4 cfu/mL。同时交叉反应表明其具有较高的特异性。人工感染试验 48 h 后,就能在血淋巴和鳃中检测到溶藻弧菌。应用建立的间接 ELISA 法进行现场检测,表现有病蟹的阳性检出率为 90%,表现健康蟹的阳性检出率为 20%,养殖海水中没有阳性检出。

关键词:梭子蟹;乳化病;间接 ELISA;溶藻弧菌

中图分类号:S 945 文献标识码:A

Study on indirect ELISA method for detecting the pathogenic bacteria of Emulsification disease in portunidae

ZHAO Qing-song^{1,2}, XU Zhen¹, CHEN Yin-er¹, JIN Shan¹, XU Guo-hui³

(1. Life Science and Technology Faculty, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. College of Aqua-life Science and Technology, Shanghai Fishery University, Shanghai 200090, China;

3. Ocean and Fishery Bureau, Putuo, Zhoushan 316010, China)

Abstract: Presented in this paper is a method of indirect of enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for rapid diagnosis of pathogenic bacteria of Emulsification disease in portunidae. The antiserum for *Vibrio alginolyticus* was obtained by immunizing rabbit against *Vibrio alginolyticus*, the anti-rabbit IgG goat was marked horseradish peroxidase(HRP) and used in an indirect ELISA detection. The result showed that the lowest *Vibrio alginolyticus* suspension detected limit in laboratory was 10^4 CFU/mL. *Vibrio alginolyticus* was detecting in 48h, artificial infection. On worksite, *Vibrio alginolyticus* was detected by indirect ELISA from the clinically diseased and healthy portunidae at the rate of 90% and 20% respectively, and none from the seawater.

Key words: portunidae; Emulsification disease; indirect ELISA; *Vibrio alginolyticus*

梭子蟹乳化病(Emulsification disease)是近年来梭子蟹养殖中较为严重的传染病之一,该病造成梭子蟹大量死亡,给养殖生产带来了较大的经济损失。因此建立快速、灵敏、准确的诊断技术在防治梭子蟹疾病中是非常必要且有十分重要的意义。酶联免疫吸附实验法(简称 ELISA 方法)具有快速、灵敏和特异性等优点,因此在医学及动物疾病诊断中得到广泛应用^[1]。本试验应用间接 ELISA 法对梭子蟹乳化

收稿日期:2004-11-24

基金项目:浙江省自然科学基金项目(302440)和宁波市青年基金项目(2003A62013)

作者简介:赵青松(1963-),男,浙江温岭人,主要从事水产养殖及水产病害控制研究。E-mail:zhaqing-song@nbu.edu.cn

病的早期诊断方法进行了研究,以期为此病的早期诊断和防治提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂

包被液:碳酸缓冲液,0.05 mol/L,pH 9.6;Na₂CO₃ 1.59 g,NaHCO₃ 2.93 g,蒸馏水加至 1 000 mL,4 ℃保存不超过 2 周;洗涤液(PBST):NaCl 8 g,KH₂PO₄ 0.2 g,Na₂HPO₄·12H₂O 2.9 g,KCl 0.2 g,Tween-20 0.5 mL,用蒸馏水加至 1 000 mL;酶标抗体:HRP-羊抗兔 IgG,购自华美生物工程公司;封闭液:小牛血清;磷酸盐-柠檬酸缓冲液(ELISA 底物溶液):Na₂HPO₄ 2.84 g,柠檬酸 2.10 g,蒸馏水加至 100 mL,溶解后加邻苯二胺 40 mg,溶解后避光存放,临用前加 30% H₂O₂ 0.15 mL;终止液:2 mol/L H₂SO₄ 溶液。

1.1.2 仪器

固相载体:聚苯乙烯 96 孔微量板,国产;酶标仪(Labsystems Multiskan MKS 型,Labsystems)。

1.2 实验菌株

菌株 1205-11 分离于患乳化病的梭子蟹上,人工感染试验证实菌株 1205-11 为梭子蟹乳化病的病原菌,经鉴定 1205-11 菌株为溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)。其它菌株购自中科院微生物所。

1.3 抗原的制备

采用甲醛和加热法灭活。甲醛浓度系列为:0.4%,0.2%,0.1%,0。加热温度设置为:4,30,60 ℃。灭活时间设置为:1,8,24,48,72 h。灭活处理后接种于 IP^[2]平板上培养,计菌落数,筛选出最佳灭活条件。灭活病原以 5 000 r/min 离心 10 min,洗涤,离心,重复 3 次,制备成抗原,并用紫外分光光度计鉴定抗原纯度。最后调节浓度相当于麦氏比浊管 3 号,置 4 ℃冰箱保存备用。

1.4 免疫血清的制备

选择的实验兔为日本大耳兔,购于宁波动物检疫所,雄性,健康,体重为 3.5~4.0 kg/ind。注射方法采用耳缘静脉注射,在最后一次注射后的第 3 天,测定其血清效价,当达到一定效价后采用颈动脉放血,制备好的抗体血清分装小试管后-80 ℃保存。

1.5 间接 ELISA 实验方法

主要参照林清华^[3]的间接 ELISA 检测法进行。

1.6 间接 ELISA 工作浓度的确定

免疫血清抗体的效价通过固定抗原的浓度(10⁷ cfu/mL),系列稀释抗血清的倍数(10~1000),用间接 ELISA 技术测定抗体效价及最佳工作浓度。酶标抗体最佳的工作浓度为稀释 1000 倍。

1.7 免疫血清特异性的测定

1.7.1 敏感性实验

根据 1.6 实验确定的免疫血清抗体和酶标抗体工作浓度,系列稀释抗原浓度,以确定最小检测的抗原浓度。

1.7.2 特异性的测定

选择弧菌属不同的细菌共 8 株,测定其与所制备的溶藻弧菌多价混合血清的交叉反应来判断抗血清的特异性。实验细菌的浓度均为 10⁶ cfu/mL。

1.8 病原菌检测

1.8.1 实验蟹

人工感染所用的健康蟹均采自浙江省宁波市北仑某养殖场,活体运回实验室暂养。

1.8.2 人工感染实验

采用创伤浸泡感染试验和浸浴感染试验。创伤浸泡试验用无菌剪刀对试验蟹进行背壳、步足创伤,置于试验菌浓度为 $(8.0 \pm 0.5) \times 10^6$ cfu/mL的海水中连续浸泡3 h,然后转入自然海水中养殖。浸浴感染试验使用健康蟹于试验菌浓度为 $(8.0 \pm 0.5) \times 10^6$ cfu/mL的海水中连续浸泡3 h,然后转入自然海水中养殖。

1.8.3 病原菌的检测

人工感染24 h后,取梭子蟹的鳃、血淋巴、肌肉、肝等组织,用无菌的0.85%生理盐水匀浆,离心取上清液进行检测,此后每隔24 h进行取样。

1.9 现场应用

应用建立好的间接ELISA技术对宁波、舟山等地的养殖梭子蟹和养殖水体进行检测。

2 结果

2.1 抗原制备结果

采用甲醛和加热法灭活筛选出溶藻弧菌的最佳灭活条件为30℃下灭活24 h。紫外分光光度计鉴定抗原纯度为90%以上。

2.2 免疫血清抗体的效价及最佳工作浓度

采用试管凝集法进行抗血清的效价测定,免疫血清的最后效价为1:1280。采用交叉连续稀释法确定免疫血清的最佳工作浓度,抗原浓度恒定为 10^5 cfu/mL,调节免疫血清抗体的稀释倍数为10~1000,经间接ELISA反应后,在 $\lambda = 492$ nm的吸收值见表1。由表1可知免疫血清的最佳工作浓度为稀释50倍。

表1 免疫血清最佳工作浓度的确定

Tab.1 Determination of the optimal antisera dilution

免疫血清稀释倍数	10	20	50	100	200	500	1000
OD值	1.564	1.632	1.843	1.42	1.2	0.98	0.876

2.3 免疫血清的特异性

2.3.1 敏感性的测定

在试验中,免疫血清抗体的稀释倍数为50,酶标二抗的稀释倍数为1000,而抗原的浓度改变从 10 cfu/mL到 10^9 cfu/mL,测定免疫血清对抗原的灵敏度,在 $\lambda = 492$ nm的吸收值见表2。由表2可见,用间接ELISA测得的溶藻弧菌对抗原的灵敏度为 10^4 cfu/mL(OD > 1.5为阳性)。

表2 免疫血清敏感性的测定

Tab.2 Detection of the sensitivity of the antisera

抗原浓度(cfu/mL)	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
OD值	0.851	1.205	1.423	1.785	2.364	2.589	2.987	3.124	3.426

2.3.2 特异性的测定

用溶藻弧菌(1205-11)及其他弧菌对照菌株,对免疫血清做间接ELISA测定,结果表明溶藻弧菌抗血清与其他大部分弧菌对照菌株无交叉反应,因此具有高度的专一性,符合免疫学检测的要求,可用于梭子蟹病原菌的检测,见表3。

2.4 梭子蟹组织中溶藻弧菌的检测

以同样处理的正常梭子蟹样品为阴性对照,利用建立的间接ELISA技术检测了人工感染溶藻弧菌

的梭子蟹样品,在创伤浸泡试验中,每次取样 5 只,结果见图 1~图 4,在浸浴试验中,没有检测到溶藻弧菌。结果表明,人工感染 24 h 后,用 ELISA 技术检测最快呈阳性的组织是鳃和血淋巴,肝脏和肌肉是在感染 96 h 后才呈阳性,病蟹的检出率为 100%。

表 3 不同弧菌在间接 ELISA 试验中的交叉反应

Tab.3 Cross-reaction of antisera of other vibrios in indirect ELISA

弧菌名称	菌号	来源	交叉反应
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	1205-11		+
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	02-1		-
鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	02-2		-
创伤弧菌 <i>V. vulnificus</i>	02-3		-
河流弧菌 <i>V. fluvialis</i>	02-4	中国科学院微生物研究所	-
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	02-5		-
拟态弧菌 <i>V. minicus</i>	02-6		-
霍利斯弧菌 <i>V. hollisae</i>	02-7		-
产气弧菌 <i>V. gazogenes</i>	02-8		-

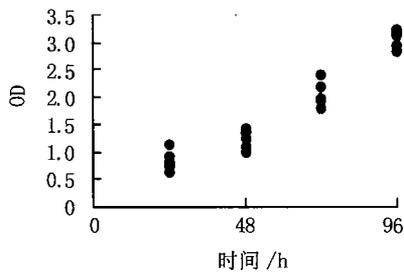


图 1 人工感染 24 h 后鳃内溶藻弧菌的变化

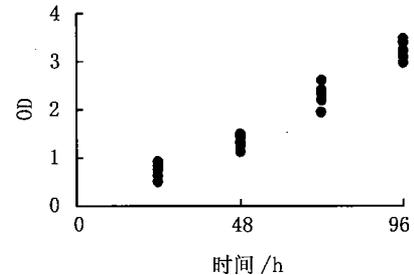
Fig.1 Variety of *Vibrio alginolyticus* in gill after 24 h

图 2 人工感染 24 h 后血淋巴内溶藻弧菌的变化

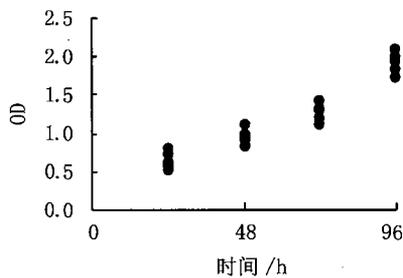
Fig.2 Variety of *Vibrio alginolyticus* in blood after 24 h

图 3 人工感染 24 h 后肝脏内溶藻弧菌的变化

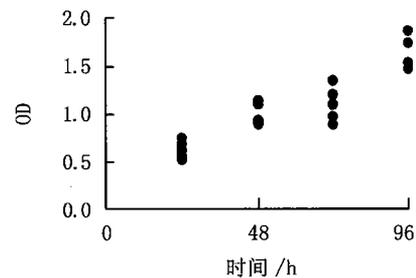
Fig.3 Variety of *Vibrio alginolyticus* in liver after 24 h

图 4 人工感染 24 h 后肌肉内溶藻弧菌的变化

Fig.4 Variety of *Vibrio alginolyticus* in muscle after 24 h

2.5 现场检测

应用建立的间接 ELISA 法对宁波、舟山等地的养殖梭子蟹和养殖水体进行现场检测(表 4)。结果表明,表观有病蟹的阳性检出率为 90%,表观健康蟹的阳性检出率为 20%,养殖海水中没有阳性检出。

表4 应用间接 ELISA 法现场检测结果
Tab.4 Detection of portunidae by ELISA

取样时间	取样地点	样本性质	检测样本总数	阳性样本数	阳性率/%
2003-11	朱家尖	表观有病	10	9	90
2003-11	朱家尖	表观健康	10	0	0
2003-11	朱家尖	养殖水体	10	0	0
2004-05	北仑	表观有病	10	9	90
2004-05	北仑	表观健康	10	2	20
2004-05	北仑	养殖水体	10	0	0

3 讨论

梭子蟹乳化病的主要症状是血淋巴液变为乳白色,折断步足可流出大量白色粘液,患病严重时肌肉可全部化为粘液,如牛奶一般,因此被命名,此病在浙江沿海梭子蟹养殖中危害严重。通过病原分离及人工感染试验认为梭子蟹乳化病是由溶藻弧菌和葡萄牙假丝酵母共同作用引起的。由于酵母菌的个体较大,可在显微镜下观察,因此对此病的诊断方法主要是检测溶藻弧菌。溶藻弧菌广泛分布于自然海区中,是水产动物的条件致病菌。可引起大黄鱼、中国对虾、真鲷、鲑点石斑鱼、锯缘青蟹、石斑鱼、鲈鱼等^[4-10]水产动物发生疾病,对水产养殖业危害极大。传统诊断方法比较繁琐,工作量大,耗时较长,相比较而言,在对病原菌检测时,ELISA 技术具有准确、快捷、灵敏、操作简便等特点。

本试验中,应用间接 ELISA 法对人工感染的梭子蟹各组织进行检测,结果表明,感染 24 h 后,能检测出溶藻弧菌的部位是鳃和血淋巴,感染 96 h 后检测到的部位是肌肉,而此时感染蟹一般是处于带菌状态而没有症状出现。由于血淋巴的采集比较方便,而且不会导致蟹体的死亡。因此,我们对宁波、舟山等地的养殖梭子蟹和养殖水体中进行现场检测,抽取适量的血淋巴,发现此方法能快速地检测出蟹体中是否存在溶藻弧菌,准确率较高,相比较常规培养来讲耗时较短,因此我们认为间接 ELISA 法可以用作梭子蟹乳化病的早期诊断的辅助方法。

由于水产动物生活在水中,初发疾病时不易被发现,一旦发病,传播速度快,危害面大,死亡率高,因而早期快速、准确、灵敏的诊断尤为重要。本试验的研究结果表明,最易被病原菌侵染的组织,应用 ELISA 技术进行快速检测,可检出对发病早期的带菌蟹。因此如能优化各项反应条件,进一步提高其特异性和灵敏性,制备成快速检测试剂盒,在水产养殖业上将有着积极而重要的意义。

参考文献:

- [1] 李义. 细菌性鱼病快速诊断技术的进展[J]. 水产科技情报, 1997, 24(2): 51-55.
- [2] 金珊, 王国良, 赵青松, 等. 海水网箱养殖鲈鱼皮肤溃疡病的防治药物[J]. 台湾海峡, 2000, 19(2): 233-236.
- [3] 林清华. 免疫学实验[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1999. 254-260.
- [4] 金珊, 蔡完其, 王国良, 等. 养殖大黄鱼细菌性疾病的病原研究[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2002, 21(3): 225-230.
- [5] 于占国, 林凤翔, 卞正和, 等. 溶藻弧菌引起中国对虾红腿病的回接实验观察[J]. 海洋学报(中文版), 1996, 18(6): 135-139.
- [6] Iwata K, Tanohara Y, Ishibashi O. Studies on factors related to mortality of young red seabream (*Pagrus major*) in the artificial seed production [J]. Fish Pathology, 1978, 13: 97-102.
- [7] 黄志坚, 何建国. 鲑点石斑鱼细菌病原的分离鉴定和致病性[J]. 中山大学学报(自然科学版), 2002, 41(5): 64-67.
- [8] 毛芝娟, 卓华龙. 锯缘青蟹细菌性传染病的病原菌研究[J]. 水产科学, 2001, 20(1): 8-11.
- [9] Lee K K. Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabaricus* Bloch et Schneider [J]. Microbial Pathogenesis, 1995, 19: 39-48.
- [10] Rodgers C J, Furones M D. Disease problems in cultured marine fish in Mediterranean [J]. Fish Pathology, 1998, 33(4): 157-164.