

# 养殖刺参腐皮综合征两种致病菌 Dot-ELISA 快速检测

谢建军<sup>1,2</sup>, 王印庚<sup>1</sup>, 张 正<sup>1</sup>, 荣小军<sup>1</sup>

(1. 农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室, 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071; 2. 上海水产大学 生命科学与技术学院, 上海 200090)

**摘要:**以养殖刺参 (*Apostichopus japonicus*) 腐皮综合征两种主要致病原灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*) 和假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas nigrifaciens*) 为抗原, 分别制备兔抗血清, 建立了两种病原菌的点酶 ELISA (Dot-ELISA) 检测方法。根据方正试验, 确定检测用一抗、二抗最佳工作稀释度: 灿烂弧菌抗血清稀释度 320, 酶标二抗稀释度 3 000; 假交替单胞菌抗血清稀释度 160, 酶标二抗稀释度 2 000。阻断试验结果表明两种抗血清特异性均较高。灿烂弧菌抗血清在稀释度为 40 时与溶藻胶弧菌、河流弧菌、创伤弧菌等弧菌发生微弱交叉反应, 提高稀释度到 160 时, 不发生交叉反应。假交替单胞菌抗血清基本不与常见海水致病弧菌发生交叉反应。人工感染试验检测结果表明该方法能从患病海参溃烂组织、未发病海参组织和感染水体检测到相应致病菌, 检测灵敏度为  $9.4 \times 10^3$  个/mL。人工感染试验检测结果经直接凝集反应验证。该方法操作简便、灵敏度高, 不需复杂仪器设备, 适合在基层推广。

**关键词:**刺参 (*Apostichopus japonicus*); 腐皮综合征; 灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*); 假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas nigrifaciens*); Dot-ELISA; 快速检测

**中图分类号:** S941.42      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-3096(2007)08-0059-06

21 世纪初, 刺参养殖在中国北方沿海蓬勃兴起, 迅速发展成为中国最重要的海水养殖品种之一, 2004 年山东辽宁两省养殖刺参年产值超过 100 亿元, 取得了显著的经济和社会效益<sup>[1]</sup>。由于刺参养殖规模的迅速扩张, 病害防治等配套技术相对滞后, 加上生产过程中的不规范操作, 导致病害问题日趋严重, 整个北方沿海刺参养殖业由于病害暴发造成的年经济损失超过 30 亿元。养殖刺参腐皮综合征是近年来导致中国刺参大面积死亡的最重要疾病。该病波及面广, 传染性强, 死亡率常高达 90%, 造成了惨重经济损失。王印庚<sup>[1]</sup> 和张春云<sup>[2]</sup> 报道灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*) 和假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas nigrifaciens*) 是该病的致病原。

灿烂弧菌和假交替单胞菌是海水动物重要致病菌。灿烂弧菌可引发大菱鲆、牙鲆、大西洋鲑、鲑鱼、鲈鱼等患多种疾病; 而假交替单胞菌可引发皱纹盘鲍溃烂病、大黄鱼体表溃烂病、中华绒螯蟹颤抖病等。目前已有用 PCR 检测灿烂弧菌的报道, 还未见假交替单胞菌检测方法的报道。由于常用的水产动物疾病诊断方法如 API、PCR、ELISA、间接荧光抗体等, 需要较特殊的设备和复杂操作, 难以在基层推广<sup>[3]</sup>, 因此建立一种方便快捷适用于基层的检测方法尤为重要。由于点酶 ELISA (Dot-ELISA) 具备灵敏度高、

操作简便、结果容易判读等优点, 在动物疾病诊断上有广泛应用<sup>[4]</sup>。

本试验首次通过 Dot-ELISA 方法对养殖刺参两种病原菌进行检测, 探讨该方法在刺参疾病临床诊断应用的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

灿烂弧菌 (H1)、假交替单胞菌 (H2) 菌株由本实验室 2004 年、2005 年分离于患腐皮综合征的刺参, 并鉴定为灿烂弧菌<sup>[3]</sup> 和假交替单胞菌<sup>[2]</sup>。标准菌株: 灿烂弧菌、假交替单胞菌、鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、溶藻胶弧菌 (*V. alginolyticus*)、河流弧菌 (*V. fluvialis*)、创伤弧菌 (*V. vulnificus*)、副溶血弧菌

收稿日期: 2006-12-18; 修回日期: 2007-04-10

基金项目: 山东省科技发展计划项目 (2004GG2205116); 青岛市科技发展计划项目 (02-1-kchhr-44)

作者简介: 谢建军 (1979-) 男, 湖北京山人, 硕士, 主要从事水产动物疾病学研究, E-mail: xiejianjun611@163.com; 王印庚, 通讯作者, 电话: 0532-85841732, E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

(*V. parahaemolyticus*),嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*), 哈维氏弧菌(*V. harveyi*), 大肠杆菌(*Escherichia coli*)均购于中国科学院微生物研究所标准菌株库。

新西兰大白兔(雄性, 2 kg左右)购自山东青岛市立医院动物房。HRP-羊抗兔 IgG, 羊抗兔 IgG, 购自北京中衫金桥生物有限公司。福氏完全佐剂、4-氯-1-萘酚购于 Sigma 公司。

## 1.2 抗原制备

灿烂弧菌、假交替单胞菌接种于胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB), 27℃培养 24 h, 1.5% 无菌生理盐水洗脱, 加入 0.5% 福尔马林溶液灭活 48 h。然后, 经培养确认灭活效果后, 离心菌液(8 000r/min, 10 min), 洗涤 3 次, 再用 1.5% 生理盐水稀释至菌体密度  $2.4 \times 10^9$  个/mL 备用。

## 1.3 抗血清制备

大白兔 2 只, 取兔血清, 确认与两病原菌无天然凝集后, 分别制备 H1、H2 的血清抗体。免疫方案: 分 3 次免疫, 初次免疫用福氏完全佐剂与抗原充分乳化后皮下多点注射, 注射剂量 1.0 mL, 二次免疫不使用佐剂, 皮下多点注射与耳静脉注射相结合, 免疫间隔时间 10 d, 最后一次免疫结束 10 d 后, 耳静脉采血, 用 96 孔 U 型板凝集法测定抗体效价。如果效价较低, 经耳静脉加强免疫一次, 间隔 7 d 后采血。抗血清分装后 -80℃ 冰箱保存备用。

## 1.4 Dot-ELISA 检测方法的建立

(1) 取适当大小的硝酸纤维素膜(NCM), 划成 6 mm × 6 mm 小格, 临用前放置于 0.01 mol/L 的 TBS 中平衡 10 min, 甩干后晾干备用。

(2) 待测抗原隔水煮沸 10 min, 摇匀后点样, 每个方格点样 5 μL, 37℃ 干燥 15 min, 55℃ 固定 10 min。

(3) 将点好样的硝酸纤维素膜置于盛有 0.01 mol/L MTBS (含 5% 脱脂奶粉的 Tris-盐酸缓冲液) 的杂交袋中, 封口。37℃ 水浴 1 h。每隔 15 min 振荡 1 min。用 TBST (含 0.05% Tween-20 的 Tris-盐酸缓冲液) 洗涤硝酸纤维素膜 3 次, 每次 2 min, 晾干备用。

(4) 将膜置于用 MTBS 稀释的抗血清中, 37℃ 水浴温育 30 min, 同上洗涤方法。膜晾干后置于用 MTBS 适当稀释的 HRP-羊抗兔 IgG 中, 37℃ 水浴温育 30 min。同上洗涤, 备用。

(5) 将膜放入新配 4-氯-1-萘酚显色液(无水甲醇溶解 3 g/L, 黑色瓶储存 14 d, 临用前用 10 mL TBS, 4 μL 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 2 mL 储存液混合<sup>[5]</sup>), 室温避光显色 0~30 min, 显色时间以阳性对照出现明显蓝紫色斑点为标准。自来水冲洗中止反应, 自然晾干。以出

现蓝紫色斑点, 与背景反差强烈为强阳性, 与背景反差较强为阳性, 与背景反差较弱为弱阳性, 不出现斑点或斑点微弱为阴性。同时以酶空白, 抗血清空白, 抗原空白对照显色结果作参照。

## 1.5 Dot-ELISA 检测方法的标准化

### 1.5.1 抗血清和二抗的最佳工作浓度筛选

以纯培养灿烂弧菌 H1、假交替单胞菌 H2 抗原为模型, 固定抗原浓度在  $2.4 \times 10^8$  个/mL, 抗血清稀释度从 1:80 到 1:2 560, 二抗稀释度从 1:500 到 1:4 000 倍比稀释。进行 Dot-ELISA 方阵试验, 确定两种抗血清进行相应抗原检测时的最佳抗体稀释度。

### 1.5.2 交叉反应试验

抗血清进行梯度稀释, 酶标二抗按照 1.5.1 中最佳稀释度, 对 8 种标准菌株进行 Dot-ELISA 试验, 以观察该方法的特异性。

### 1.5.3 阻断试验

将 2 种抗血清从 1:80 稀释至 1:1 280, 分别加入相应的过量抗原, 37℃ 温育 30 min, 离心后, 取上清, 用此抗血清进行 Dot-ELISA 试验, 同时用未处理过的抗血清作对照。

### 1.5.4 Dot-ELISA 灵敏度试验

以灿烂弧菌抗原及相应血清抗体 KH1 为模板, 将抗原从  $2.4 \times 10^8$  个/mL 按照如下浓度稀释:  $2.4 \times 10^7$ ,  $2.4 \times 10^6$ ,  $1.2 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $1.5 \times 10^5$ ,  $7.5 \times 10^4$ ,  $3.75 \times 10^4$ ,  $1.87 \times 10^4$ ,  $9.4 \times 10^3$ ,  $4.7 \times 10^3$ ,  $2.4 \times 10^3$ ,  $1.2 \times 10^3$ , 600, 300, 150 个/mL, 用上述浓度抗原进行一抗、二抗最佳稀释度、Dot-ELISA 检测。

## 1.6 人工感染试验刺参病原菌检测

### 1.6.1 人工感染试验

试验用刺参由山东省即墨某养殖场提供, 刺参体质量 30~50 g, 体长 10 cm 左右。饲养于 10 L 实验桶, 充气, 试验水温 10~14℃, pH 为 8.15~8.30, 试验分 4 组, 每组刺参 7 只, A 组用 H1 感染, B 组用 H2 感染, C 组用 H1, H2 等量混合感染, D 组为空白对照组。感染组每组各设 2 个平行组。注射用活菌以过滤灭菌海水稀释到  $3 \times 10^8$  个/mL, 腹腔注射剂质量 0.5 mL/只, 空白组注射灭菌海水。

### 1.6.2 人工感染试验病原菌检测

感染刺参后呈现明显发病症状之后, 对试验水体进行检测。取各组感染水体样品, 灭菌滤纸过滤, 滤液用 TSB 培养基 28℃ 涂布培养感染试验水体中细菌, 培养出的细菌取优势度超过 10% 的菌株做 Dot-ELISA, 每组取 2 个水样。对先后出现口部肿大, 皮肤溃烂等典型“腐皮综合征”症状的刺参, 取溃烂处肌

肉研磨后 TSB 培养基涂布培养,培养出的细菌进行 Dot-ELISA 检测。另取感染组未发病海参的肌肉组织进行检测。每个样品检测设 2 个平行组。为了增加检测结果的可信度,将平板培养的细菌分别纯化 2 次后用抗血清进行直接玻璃片凝集试验 (direct agglutination, DA),并用相应菌株作阳性对照。

## 2 结果

### 2.1 病原菌抗血清制备

用新西兰大白兔制得灿烂弧菌抗血清 KH1 效价 2 560,假单胞菌抗血清 KH2 效价 2 560。

### 2.2 抗血清和二抗的最佳工作浓度筛选

依据 Dot-ELISA 结果,综合考虑斑点显色深浅、背景显色、空白显色以及试剂节省等因素,各抗体最佳稀释工作浓度如下:抗血清 KH1 稀释度 320,相应酶标抗体稀释度 3 000;抗血清 KH2 稀释度 160,相应酶标抗体稀释度 2 000。

### 2.3 交叉反应

灿烂弧菌抗血清 KH1 在稀释度为 40 时与溶藻胶弧菌、河流弧菌、创伤弧菌、副溶血弧菌、鳗弧菌、嗜水单胞菌、哈维氏弧菌等发生较弱的显色反应,而稀释度到 160 后,则基本无显色反应,而阳性对照则显色依然十分清晰(图 1)。假交替单胞菌兔抗血清 KH2 则在稀释度为 20 时与鳗弧菌、创伤弧菌发生轻微交叉反应。

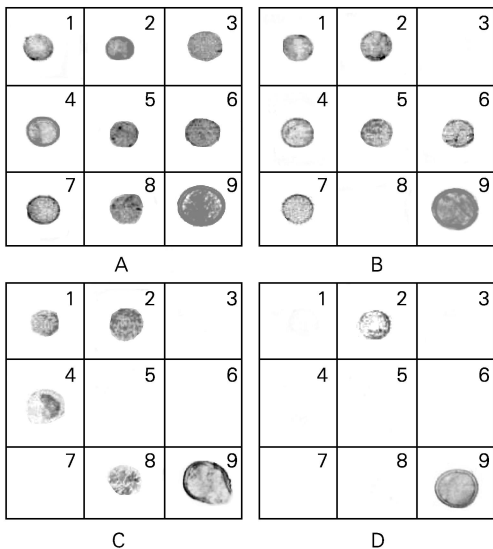


图 1 灿烂弧菌抗血清不同稀释度下与 8 株标准菌的 Dot-ELISA 交叉反应结果

Fig.1 The result of detecting eight standard bacteria by Dot-ELISA at different dilution ratios of KH1

A,B,C,D 抗血清 KH1 稀释度分别为 20,40,80,160;1. 溶藻胶弧菌;2. 河流弧菌;3. 大肠杆菌;4. 创伤弧菌;5. 副溶血弧菌;6. 鳗弧菌;7. 嗜水气单胞菌;8. 哈维氏弧菌;9. 灿烂弧菌(H1)

A,B,C,D dilution proportion of KH1 20,40,80,160;

1. *Vibrio alginolyticus*; 2. *V. fluvialis*; 3. *Escherichiacoli*; 4. *V. vulnificus*; 5. *V. parahaemolyticus*; 6. *V. anguillarum*; 7. *A. hydrophila*; 8. *V. harveyi*; 9. *V. splendidus*(H1)

### 2.4 阻断试验及灵敏度试验

没有经过相应抗原过量吸收的抗血清 KH1, KH2, 稀释度 640 时均可显出清晰斑点,而经过过量吸收的抗血清 KH1、KH2 仅能在稀释度 40 时才能显出比较清晰的斑点。说明抗血清的特异性较高。

灵敏度试验结果表明当待检抗原的浓度低于  $9.4 \times 10^3$  个/mL 后,就不会出现清晰的斑点(图 2),图中第 10 个显色点抗原浓度为  $9.4 \times 10^3$  个/mL。

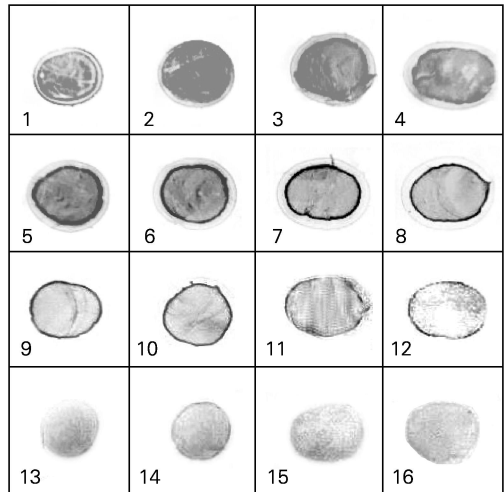


图 2 Dot-ELISA 灵敏度试验

Fig.2 Sensitivity of Dot-ELISA

1, 2, 3~16 表示灿烂弧菌 H1 按照 1.6.4 中梯度稀释的浓度:

$2.4 \times 10^7$ ,  $2.4 \times 10^6$ ,  $1.2 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $1.5 \times 10^5$ ,  $7.5 \times 10^4$ ,  $3.75 \times 10^4$ ,  $1.87 \times 10^4$ ,  $9.4 \times 10^3$ ,  $4.7 \times 10^3$ ,  $2.4 \times 10^3$ ,  $1.2 \times 10^3$ , 600, 300, 150 个/mL

1, 2, 3~16 shows the density of *V. splendidus*(H1) as 1.6.4:

$2.4 \times 10^7$ ,  $2.4 \times 10^6$ ,  $1.2 \times 10^6$ ,  $6 \times 10^5$ ,  $3 \times 10^5$ ,  $1.5 \times 10^5$ ,  $7.5 \times 10^4$ ,  $3.75 \times 10^4$ ,  $1.87 \times 10^4$ ,  $9.4 \times 10^3$ ,  $4.7 \times 10^3$ ,  $2.4 \times 10^3$ ,  $1.2 \times 10^3$ , 600, 300, 150 cells/mL

### 2.5 人工感染试验检测结果

感染致病菌后 48 h, 刺参感染试验组相继出现摇头、肿嘴、皮肤溃烂等典型的腐皮综合征症状。对感染试验组内的患病刺参、未出现患病症状的刺参、感染水体以及对照组水体与刺参分离的菌落进行检测,检测结果见表 1。结果表明,利用特定抗血清均能从感染水体、患病刺参溃烂组织、感染组中未发病

海参组织检测到特定致病菌。直接玻片凝集与 Dot-ELISA 检测结果一致。

表 1 人工感染试验检测结果

Tab.1 The detection results of infection test by Dot-ELISA and DA

组别	检测项目	分离细菌代号	优势度 (%)	Dot-ELISA 阳性菌株		直接凝集结果		菌株确认
				KH1	KH2	KH1	KH2	
A 组	水样 患病海参 溃烂肌肉 未发病海参组织	AW1	80	+	-	+	-	H1
		AW2	15	-	-	-	-	
		AZ1	70	+	-	+	-	H1
		AZ2	20	-	-	-	-	
		AY1	50	+	-	+	-	H1
		AY2	30	-	-	-	-	
B 组	水样 患病海参 溃烂肌肉 未发病海参组织	BW1	70	+	+	+	+	H2
		BW2	15	-	-	-	-	
		BW3	10	-	-	-	-	
		BZ1	90	+	+	-	-	H2
		BY1	40	+	+	+	+	H2
		BY2	30	-	-	-	-	
C 组	水样 患病海参 溃烂肌肉 未发病海参 组织	CW1	40	+	-	+	-	H1
		CW2	30	-	+	-	+	H2
		CW3	15	-	-	-	-	
		CZ1	50	+	-	+	-	H1
		CZ2	30	-	+	-	+	H2
		CZ3	15	-	-	-	-	
		CY1	40	+	-	+	-	H1
		CY2	25	-	-	-	-	未知细菌
D 组	水样 正常肌肉组织	DW1	25	-	-	-	-	无特定病原菌
		DW2	15	-	-	-	-	
		DW3	10	-	-	-	-	
		DZ1	30	-	-	-	-	
		DZ2	20	-	-	-	-	无特定病原菌
		DZ3	20	-	-	-	-	

注: TSB 平板培养水体及溃烂组织优势度小于 10% 的细菌菌落未作检测; “+”表示检测结果阳性, “-”表示检测结果阴性, 检测结果已经经过平行检测组验证; H<sub>1</sub> 为灿烂弧菌, H<sub>2</sub> 为假交替单胞菌

### 3 讨论

#### 3.1 Dot-ELISA 方法的特异性与灵敏度

本试验通过交叉反应和阻断试验来验证抗血清及 Dot-ELISA 方法的特异性。灿烂弧菌抗血清在低稀释度下能与大多数弧菌发生交叉反应, 与嗜水气单胞菌也发生了交叉反应, 均显现较淡的斑点。但是当抗血清稀释度增大后, 则检测结果仅见微弱斑点, 而阳性对照则依然显现较强斑点。可能是灿烂弧菌与大多数弧菌亲缘关系较近, 具有未知的共同抗原, 从而发生了交叉反应。由于共同抗原的相应抗体滴度较低, 提高抗血清稀释度后, 这种交叉反应则无法用 Dot-ELISA 方法检测到。而检测灿烂弧菌时, 即使在高稀释度下, 检测结果依然显现强阳性。

假交替单胞菌在低稀释度情况下, 仅与鳃弧菌、创伤弧菌发生较弱交叉反应, 而阳性对照则显现强阳性, 可能是因为与弧菌亲缘关系较远, 共同抗原较少。用相应过量抗原吸附之后, 抗血清的大部分特异

性抗体已经被吸附掉, 这样, 处理过的抗血清进行 Dot-ELISA 检测, 在适宜稀释度下检测不出相应抗原。交叉反应、吸收试验结果说明抗血清特异性较高。

Dot-ELISA 灵敏度试验结果表明: 当抗原浓度低于  $9.4 \times 10^3$  个/mL 后, 斑点显色与抗原浓度为 150 个/mL 时的显色结果相差较小(图 2), 即使能够显出斑点, 但是容易误判假阳性, 因此本试验的最低检测限在  $9.4 \times 10^3$  个/mL。这个检测灵敏度与张红见等<sup>[6]</sup>用 Dot-ELISA 检测牛胴体沙门氏菌灵敏度 400 个/mL 相比较低。常用的 ELISA、间接荧光抗体等免疫学方法检测灵敏度大多也在  $10^4$  个/mL 左右<sup>[7,8]</sup>。尽管在一般养殖水体和患病海参组织病原菌还达不到这个浓度, 但是感染试验的检测结果表明, 用此方法可以对分离培养后的细菌进行快速鉴定。相比传统鉴定方法<sup>[9]</sup>, 也比较方便快捷。

#### 3.2 人工感染试验的 Dot-ELISA 检测

人工感染试验的 Dot-ELISA 结果表明, 患病海

参的溃烂组织,病原菌优势度最大。从灿烂弧菌感染组 A 组患病海参溃烂肌肉组织培养的 AZI 优势度达到 70%,经过检测证实是灿烂弧菌 H1。同样,B 组感染组,溃烂肌肉组织分离 BZI,优势度达到 90%,经检测,证实为假交替单胞菌 H2。混合感染组,从溃烂组织分离的两株优势度最大的菌株,也证实分别是灿烂弧菌 H1 和假交替单胞菌 H2。而空白对照组,肌肉组织分离的细菌相对无优势。说明患病刺参肌肉组织因病原菌侵袭而发生病变,进而溃烂。由于刺参与养殖水体不断进行着水交换,采取腹腔注射方式,一部分病原菌会因刺参呼吸作用而进入养殖水体,因此从感染试验各组水体均检测到相应病原菌。Dot-ELISA 与直接凝集反应检测结果高度一致,说明 Dot-ELISA 检测结果特异性较强。

### 3.3 Dot-ELISA 方法用于刺参疾病检测的可行性

目前海水养殖动物疾病病原菌的检测技术大多是常规培养鉴定、免疫学检测技术(免疫荧光、免疫酶技术)、核酸检测技术(核酸探针、PCR 技术、16SrRNA 检测等)、核酸技术与免疫学结合的检测技术(免疫-PCR、PCR-ELISA)等技术<sup>[3]</sup>。分子生物学检测技术特点是灵敏度高,特异性好,而且不受病原可培养与否的限制,但是因为要求实验仪器精密,而且操作技术难度大,所以使用起来较有难度。Dot-ELISA 技术操作比较简单,而且无需特殊仪器,可以一次性检测大量样品,经济快捷。因此,该方法在畜牧业上检测寄生虫<sup>[10]</sup>、细菌、病毒<sup>[11]</sup>均有广泛应用。Rakhi 等<sup>[12]</sup>用该法检测猪囊状幼虫,Carlina 等<sup>[5]</sup>用该方法检测利什曼虫均取得很好效果。臧红梅等<sup>[13]</sup>用 Dot-ELISA 检测副溶血弧菌,灵敏度也可达  $10^4$  个/mL。该方法还用来检测鱼粉及牛胴体中沙门氏菌的含量,阳性检出率较高<sup>[6,14]</sup>。本试验对已培养出的病原菌的检测可控制在 4h 内完成,而且由于结果容易判读。硝酸纤维素膜避光密封可长期保存,利于复检及备档。因此该方法比较适用于缺少相应设备的养殖场以及野外操作和现场检测。

#### 参考文献:

[1] 王印庚,方波,荣小军,等. 养殖刺参保苗期重大疾病“腐皮综合症”病原及其感染源分析[J]. 中国水产科学,2006,13(4):610-616.

- [2] 张春云,王印庚,荣小军,等. 养殖刺参腐皮综合症病原菌的分离与鉴定[J]. 水产学报,2006,30(1):118-123.
- [3] 宋立超,樊景凤. 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.
- [4] 张莹,徐文弟. 酶联免疫吸附测定法在医学研究中的新进展[J]. 哈尔滨医科大学学报,2000,34(4):306-308.
- [5] Carolina M, Guimaraes S, Beatriz J, et al. Evaluation of Dot Enzyme-Linked immunosorbent assay for mucocutaneous leishmaniasis and comparison with microplate enzyme immunoassay [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1986, 9: 364-367.
- [6] 张红见,韩志辉,魏建华,等. 应用 Dot-ELISA 检测牛胴体沙门氏菌[J]. 中国兽医科技,2004,34(2):54-56.
- [7] Noales E M, Biosca E G. An indirect immunofluorescent antibody technique for detection and enumeration of *Vibrio vulnificus* serovar E (biotype 2) development and applications [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2000,89:599-606.
- [8] Albert M J, Ansaruzzaaman M, Shimada T, et al. Characterization of *Aeromonas trota* strains that cross-react with *Vibrio cholerae* O139 Bengal [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995,33: 3 119-3 123.
- [9] 张伟妮,周丽,那婧,等. 养殖大菱鲆腹水症病原菌 SR1 的分离及鉴定[J]. 中国水产科学,2006,13(4):603-609.
- [10] Sloan L, Schneider S, Risenblatt J. Evaluation of enzyme-linked immunoassay for serological diagnosis of cysticercosis [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33: 3 124-3 128.
- [11] 朱红,周宗青. 应用斑点酶联免疫吸附试验快速检测传染性法氏囊病病毒[J]. 上海畜牧兽医通讯,2001,1:18-19.
- [12] Rakhi B, Parija S C, Narayan S K. Dot-ELISA for the diagnosis of neurocysticercosis[J]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 2004, 46(5):249-252.
- [13] 臧红梅,樊景凤,王斌. 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.
- [14] 康明,韩志辉,李刚. Dot-ELISA 法检测鱼粉中沙门氏菌的研究[J]. 草原与饲料,2004,7:58-60.

## Rapid detection of two pathogens of skin ulcer syndrome in cultured *Apostichopus japonicus* by Dot-ELISA

XIE Jian-jun<sup>1,2</sup>, WANG Yin-geng<sup>1</sup>, ZHANG Zheng<sup>1</sup>, RONG Xiao-jun<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Biology Science & Technology College, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Received: Dec. 18, 2006

**Key words:** *Apostichopus japonicus*; skin ulcer syndrome; *Vibrio splendidus*; *Pseudoalteromonas nigrifaciens*; Dot-ELISA; rapid detection

**Abstract:** A Dot-ELISA test has been developed for the rapid detection of *Vibrio splendidus* and *Pseudoalteromonas nigrifaciens* that were the two pathogens of the skin ulcer syndrome in sea cucumber *Apostichopus japonicus*. The antisera of *V. splendidus* and *P. nigrifaciens* were prepared with rabbits. The best working concentrations of two kinds of antisera and HRP-goat-anti-rabbit IgG (HRP-IgG) were assayed by chessboard test. As *V. splendidus* was detected, the dilution ratios of antiserum and HRP-IgG were 1:320 and 1:3000. As to *P. nigrifaciens*, the dilution ratios were 1:160 and 1:2000. Cross-reactions of antiserum with other main pathogens were examined, and the results showed that low cross reaction could be mostly eliminated by heightening the dilution of antiserum. The cross-reaction assay and absorb assay indicated the method was successful in distinguishing those pathogens. The established method was able to detect the pathogens from diseased sea cucumber, water and even normal sea cucumber in infection test. The sensitivity of the method was  $9.4 \times 10^3$  cells/mL. The same results were also verified by the direct agglutination test. This study showed that Dot-ELISA was a rapid detection method, and because of its ease of performance and high specificity and no instrumentation required, it could be applied under field conditions where sophisticated facilities are lacking.

(本文编辑:张培新)