

养殖刺参腐皮综合征 2 种致病菌间接荧光抗体快速检测方法

王印庚¹, 谢建军², 荣小军¹, 廖梅杰¹, 张正¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316100)

摘要: 以养殖刺参(*Apostichopus japonicus*)腐皮综合征的 2 种致病菌: 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。以载玻片为介质, 建立了 2 种病原菌的间接荧光抗体检测技术(IFAT)。交叉反应、阻断试验和吸收试验结果均表明本方法特异性强。对人工感染实验中的养殖水体及发病刺参溃烂组织检测, 可以检出水体和患病刺参溃烂组织中的相应病原菌, 病原菌被染成明亮的黄绿色, 检测灵敏度 2.4×10^4 cell/mL。冰冻切片检测结果显示, 在刺参肿胀嘴部与溃烂肌肉处有大量染成黄绿色的细菌颗粒。结果表明: 采用 IFAT 可以对刺参腐皮综合征 2 种致病菌进行准确快速的检测。该方法的建立对刺参腐皮综合征的流行病学调查及快速诊断具有重要意义。[中国水产科学, 2010, 17(2): 329–336]

关键词: 刺参; 腐皮综合征; 灿烂弧菌; 假交替单胞菌; 间接荧光抗体检测(IFAT)

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2010)02-0329-08

21 世纪初, 刺参(*Apostichopus japonicus*)养殖在中国北方沿海蓬勃兴起, 并迅速发展成为中国最重要的海水养殖种类之一。2008 年中国养殖刺参总面积达 64 386 hm², 年总产量 77 517 t^[1], 产生了巨大的经济效益和社会效益。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, 加之生产过程中的不规范操作, 导致病害问题日趋严重, 2003 年至 2006 年, 整个北方沿海刺参养殖业由于病害暴发造成巨大经济损失。疾病种类多种多样, 其中以刺参“腐皮综合征”的危害最为严重。该病波及面广, 传染性强, 死亡率常高达 90%, 造成经济损失惨重, 是导致中国刺参大面积死亡的最重要疾病^[2]。刺参腐皮综合征的发病症状表现为: 摇头、口部肿大、排脏、身体萎缩、口部溃烂、体表大面积溃疡直至溶解死亡^[2](图版 I-A)。王印庚等^[2-3]和张春云等^[4]报道灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)和假交替单胞菌

(*Pseudoalteromonas nigrifaciens*) 2 种菌均为该病的致病原(图版 I-B、C)。

目前应用于水产动物疾病快速检测的方法主要有: 细菌自动鉴定系统、酶联免疫检测, 免疫荧光抗体技术, PCR 检测等^[4]。近 2 年已有 Dot-ELISA^[5]和核酸探针检测^[6]检测技术应用于海参疾病检测, 其中核酸探针检测灵敏度较高但是技术难度较大, Dot-ELISA 则操作简便结果直观, 但是较难进行定量检测, 由于免疫荧光抗体检测可以直接显示抗原形态, 进行抗原定位, 而且灵敏度较高, 在快速检测技术中有其独特优势, 已经广泛应用于水产动物疾病的临床诊断^[7-9]。由于一般进行细菌病原的检测需要先完成细菌培养, 然后进行检测, 检测时间相对较长, 本研究利用间接荧光抗体检测技术(Indirect Fluorescent Antibody Technique, IFAT)对刺参腐皮综合征 2 种主要病原菌进行检测和分析, 尝试对人

收稿日期: 2009-04-16; 修订日期: 2009-12-08.

基金项目: 国家 863 计划项目(2006AA100313); 山东省科技发展计划项目(2004GG2205116); 青岛科技发展计划项目(02-1-kchhh-44); 山东省农业良种工程重大课题(抗病刺参良种选育); 青岛市公共领域科技支撑计划项目(08-1-1-5-hy)。

作者简介: 王印庚(1963-), 男, 博士, 研究员, 从事水产动物健康养殖和疾病防控研究. Tel: 0532-85841732; E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn

工感染实验组的水体、感染刺参组织通过简单前期处理后直接进行检测,评价不经过细菌培养直接进行海参疾病检测的可行性,另外尝试通过荧光标记对刺参感染组织中的抗原进行定位,初步探索病原菌的感染途径。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

异硫氰酸(FITC)标记羊抗兔-IgG,羊抗兔 IgG 购于北京中杉金桥生物有限公司;福氏完全佐剂购自 Sigma 公司;荧光抗体染色封片液(0.5 mol/L 碳酸盐缓冲液(CBS)与甘油体积比 1:1, pH 9.5); PBS (0.15 mol/L, pH 7.6); PBST (含 0.05% Tween-20 的 PBS, pH 7.6); Nikon E800 显微镜。

1.2 实验菌株

H1、H2 菌株分别为本实验室 2004 年、2005 年分离于患腐皮综合征的刺参,并鉴定为灿烂弧菌^[3]和假交替单胞菌^[2]。标准菌株:灿烂弧菌、假交替单胞菌、鳗弧菌(*V. 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(*V. parahaemolyticus*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)均购于中国科学院微生物研究所标准菌株库。金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)由农业部海洋渔业资源可持续利用重点开放实验室刘庆慧老师惠赠。

1.3 抗原制备

灿烂弧菌 H1、假交替单胞菌 H2 接种于胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSA),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。经 TSA 平板培养确认灭活效果后,离心菌液(8 000 r/min,10 min),洗涤 3 次,用 1.5% 生理盐水稀释至菌体浓度 2.4×10^9 cell/mL 备用(由平板活菌计数最终确认浓度)。

1.4 抗血清制备

采用本实验制备灿烂弧菌 H1 兔抗血清(以下简称 KH1)、假交替单胞菌 H2 兔抗血清(以下简称 KH2)。免疫方案参见文献[4]。

1.5 免疫血清的效价与特异性

1.5.1 交叉反应及效价 用海水常见致病菌(1.2)以及大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作为对照,凝集反应测定制备的 KH1、KH2 的效价与特异性,并对有交叉反应的菌进行荧光检测。

1.5.2 特异性检测 阻断试验,先用羊抗兔 IgG 进行孵育,然后再用荧光标记抗体染色;吸收试验,将抗体用相应过量抗原吸收反应后,离心取上清液进行 IFAT。

1.6 IFAT 方法的建立

1.6.1 载玻片的处理 新载玻片经酸泡,洗净,无水乙醇浸泡 24 h,烘干后,放入经加热新配甲醛明胶溶液(35%甲醛 2.5 mL,明胶 0.5 g,蒸馏水 100 mL)处理 10 min,取出烘干备用。

1.6.2 样品处理 取待测水样 40 mL,加入福尔马林使体积分数至 0.5%,室温灭活 24 h。200 目筛绢滤去大型杂质,单层灭菌滤纸抽滤,5 000 r/min 离心 15 min,沉淀部分悬浮于 5 mL 1.5% 生理盐水,500 r/min 低速离心,弃去底部杂质。5 000 r/min 离心 15 min,沉淀部分用 100 μ L 无菌水重悬,4℃放置待检。待检测患病刺参溃烂组织匀浆,同时取健康刺参组织作对照,匀浆后同上述水样处理。

1.6.3 检测程序 取浓缩后的待检水样 10 μ L,载玻片上均匀涂布成直径的 2 cm 的圆面,晾干后 55℃固定 10 min。滴加一抗,免疫湿盒内 37℃孵育 40 min, PBST 漂洗 2 次,每次 2 min。晾干后,滴加二抗,37℃孵育 30 min,同上方法漂洗,最后用荧光抗体染色封片液封片。荧光显微镜 490 nm 激发光下观察,以观察到黄绿色细菌形态的颗粒为阳性结果。检测设阴性对照、阳性对照与试剂空白对照。

1.7 抗体最佳工作浓度筛选

一抗稀释度 1:40、1:80、1:160、1:320、1:640,二抗稀释度 1:20、1:40、1:80、1:100、1:200,采用 1.6 和 1.9.4 中方法,根据一抗、二抗在 IFAT 和冰冻切片的免疫荧光检测效果选择最佳工作浓度。

1.8 IFAT 灵敏度检测

以 H1 为代表,用 1.3 中制备 H1 抗原连续稀释至 10^2 数量级,进行检测,以确定本方法的最低检测限。

1.9 人工感染试验刺参病原菌的检测

1.9.1 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 11~14 ℃,pH 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。注射用活菌用过滤灭菌海水稀释到 3×10^8 cell/mL,腹腔注射剂量每头刺参 0.5 mL,空白组注射灭菌海水。

1.9.2 人工感染试验水体的检测 各感染组用相应抗体进行检测,C 组用 2 种抗血清分别进行检测。感染刺参呈现明显发病症状,换水前对试验水体进行检测。每组取 2 个水样,按照 1.6 中水样处理,然后进行检测。同时用 TSB 培养基涂布培养感染试验水体中细菌,将培养出的细菌进行检测,并与水样的直接检测结果对比。

1.9.3 刺参患病组织的检测 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,取溃烂处肌肉组织按照 1.6.2 中样品处理方法处理后检测。每组检测 4 个样品,共检测 20 个样品。用 TSB 划线培养溃烂处肌肉中的细菌,培养的优势种细菌也作检测。

1.9.4 冰冻切片的免疫荧光检测 取患病刺参溃烂处肌肉、肿胀嘴部和健康刺参肌肉做冰冻切片,切片厚度 12 μ m,60 ℃烤片过夜,丙酮固定。冰冻切片用 PBST 洗涤 5 min,然后按照 1.6.3 中操作程序检测,一抗温育时间 1 h,二抗温育时间 40 min,用封片液封片后镜检观察。

2 结果与分析

2.1 免疫血清的特异性

用海水养殖中常见病原菌及金黄色葡萄球菌与大肠杆菌对 KH1、KH2 进行凝集反应。实验结果见表 1,测得 KH1 效价为 2 560, KH2 效价 2 560。其中 KH1 稀释度在 40 倍时仍与鳗弧菌发生凝集反应,而 KH2 则特异性较高,仅在稀释度为 10 时与鳗弧菌和创伤弧菌有轻微交叉反应。对能够产生交叉反应的细菌进行检测,当一抗稀释度为 20 时,可以

观察到细菌被染成黄绿色颗粒,但是染色较暗且形态模糊,见图版 II -C (鳗弧菌)。阻断试验与吸收试验的 IFAT 结果均显示为黑色背景,说明抗血清特异性较高,符合间接荧光抗体检测要求。

2.2 抗体最佳工作浓度及 IFAT 检测灵敏度

一抗在 1:40 到 1:640 的稀释度下,二抗在 1:20 到 1:200 稀释度下均能得到不同强度的荧光,结合 2.1 交叉反应结果,确定在玻片上进行样品直接 IFAT 的最佳工作浓度为:KH1 稀释度 400, KH2 稀释度 200,二抗稀释度 80;冰冻切片的 IFAT 实验, KH1 稀释度 200, KH2 稀释度 100,二抗稀释度 80。

2.3 IFAT 检测灵敏度

用 2.2 中最适一抗、二抗稀释度来检测 IFAT 的灵敏度。400 倍观察染色结果:菌体浓度 2.4×10^3 cells/mL 时,无法观察到染成黄绿色荧光的菌体。菌体浓度 2.4×10^4 cell/mL 时,显微镜视野可见少量菌体。因此可以确定本试验 IFAT 检测灵敏度在 2.4×10^4 cell/mL。

2.4 感染刺参组织及实验水体的检测结果

用 KH1、KH2 对人工感染刺参溃烂组织样品及养殖水体处理样品进行检测,结果显示:16 份溃烂组织样品均检测呈阳性,4 份未呈现明显病变组织样品有 2 份样品呈阳性,6 份感染试验水体检测结果均呈阳性,空白对照组则未见任何特异染色颗粒。阳性样品检测到带黄绿色荧光菌体(图版 II -A、B)。用 TSB 培养出的感染水体与刺参溃烂处的细菌,检测结果也可见和直接检测相同的黄绿色菌体。阳性对照标准灿烂弧菌与假交替单胞菌与 H1, H2 均可见清晰的黄绿色菌体。

2.5 感染刺参冰冻切片免疫荧光检测结果

取具有典型发病症状刺参的溃烂处体壁组织(图版 II A-a),肿胀嘴部(图版 II A-b)和健康的刺参体壁进行冰冻切片免疫荧光检测,检测结果发现肿胀口部组织(图版 II -D)及溃烂体壁(图版 II -E)冰冻切片均出现黄绿色细菌样小颗粒阳性信号,而对照组体壁组织切片染成均一的黄绿色(图版 II -F)。标本自发荧光对照呈阴性黑色背景或淡黄绿色背景,观察不到染色成黄绿色菌体颗粒。

表 1 主要海洋致病性细菌与 2 种刺参病原菌兔抗血清的交叉反应效价
Tab. 1 Cross-reaction titers between antiserum from 2 pathogeneses in *A. japonicus* and pathogeneses in marine culture by agglutination

标准菌株 Standard strain	抗血清 Antiserum	
	KH1	KH2
鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	1: 20	1: 10
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	1: 20	—
河流弧菌 <i>V. Fluvialis</i>	1: 40	—
创伤弧菌 <i>V. Vulnificus</i>	1: 20	1: 10
副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	1: 20	—
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	1: 20	—
哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	1: 40	—
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	—	—
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	—	—
灿烂弧菌 <i>V. splendidus</i>	1: 2560	—
假交替单胞菌 <i>P. nigrifaciens</i>	—	1: 2560
灿烂弧菌 H1	1: 2560	—
假交替单胞菌 H2	—	1: 2560

注: “—” 表示没有交叉反应; KH1-灿烂弧菌 H1 的兔抗血清; KH2-假交替单胞菌 H2 的兔抗血清。
Note: “—” No cross-reaction ; KH1- Antiserum of *Vibrio splendidus* H1; KH2-Antiserum of *Pseudoalteromonas nigrifaciens* H2.

3 讨论

3.1 免疫血清的特异性

本研究中制备的 KH1、KH2 与大多数标准菌株有轻微的交叉反应,其原因可能是由于各菌株亲缘关系交近,存在一些相同的表面抗原。已有诸多研究表明弧菌之间或者相同种属之间的抗体都存在交叉:王军等^[10]制备的溶藻弧菌 O 抗原抗体也与副溶血弧菌等产生了交叉反应,交叉反应效价达到 1: 80,通过特异性吸附,消除了交叉反应。Noales 等^[11]在对创伤弧菌生物 2 型进行间接荧光检测时,也发现其与气单胞菌属的 *A. ichthiosmia* 发生了交叉反应。Albert 等^[12]也报道 *A. trota* 与孟加拉霍乱弧菌发生交叉反应。由于本实验中交叉反应的效价并不高,最高为 1: 40,可以通过提高稀释倍数,排除轻微的交叉反应对检测结果的干扰。而且通过对各标准菌株进行检测,发现在抗体稀释度较低的情况下,能够发生交叉反应的菌株仅能染成不规则的暗黄绿色小点(图版 II-C),并不能和灿烂弧菌 H1 和假交替单胞菌 H2 那样染成规则黄绿色菌体形状,提高稀释比例到 1: 100,则基本检测不出各标准菌株。因此本实验方法可以基本消除 KH1、KH2 在进行 IFAT 检测过程中的非特异性反应,排除其他非病原菌的干扰。

3.2 IFAT 检测灵敏度

由于未经处理的载玻片黏附力较弱,而且因表面张力待测样品不易涂布均匀,本实验采用甲醛明胶溶液处理载玻片,使得载玻片固定菌体能力提高,而且容易涂布均匀,这有利于提高检测灵敏度。对已知浓度的菌液进行梯度稀释后进行检测表明,本实验采用方法能够检测到水体中 2.4×10^4 cell/mL 的菌量,与谢建军等^[5]建立的 Dot-ELISA 检测灵敏度(9.4×10^3 cell/mL)以及采用双抗夹心及间接 ELISA 检测水产动物病原菌的灵敏度较为接近($10^4 \sim 10^5$ cell/mL)^[13-14],而与同样采用间接荧光抗体方法进行细菌检测的灵敏度则存在一定差异:Noales 等^[11]用滤膜检测副溶血弧菌生物 2 型时检测限是 10^4 cell/滤器,吴淑勤等^[15]用载玻片通过 IFAT 检测嗜水气单胞菌,最低检测限达 56 cell/mL,可能与实验载体与方法有较大关系。在本研究的实际检测过程中,通过水样浓缩处理,虽然在处理过程中不可避免有一部分菌量损失,但是依然提高了检测样中的细菌实际浓度,因此在进行样品检测时,实际检测限可能会比 2.4×10^4 cell/mL 高,关于这点尚需进一步实验证实。由于本实验在检测过程中未进行前增菌处理,但是检测结果阳性符合率达到 100%,因此检测灵敏度在可接受范围以内。

3.3 检测结果与刺参腐皮综合征的感染特点分析

目前研究表明,刺参腐皮综合征病原具有多样性和复杂性特点,另外一种假单胞菌属的细菌亦可导致刺参患病^[16]。本研究从刺参人工感染试验不同感染组的水体和患病刺参溃烂组织处中均能检测到病原菌,尤其是混合感染的 C 组中 2 种病原菌可以分别用 2 种抗体检出,因此对于患病刺参可以用 2 种抗体同时进行检测判断是否因灿烂弧菌或假交替单胞菌感染引起,这对于患病刺参疾病诊断具有重要意义。由于感染刺参均采用腹腔注射,而刺参的体腔和外界有水交换,在其受到刺激时,甚至会有排脏反应,所以不可避免的有一部分致病菌被排出,因此在水体中检测到了致病菌。

患腐皮综合征刺参的主要组织病理变化是炎症细胞发生浓缩或者破碎形成增生性结节,然后产生大量上皮间空洞和纤维样病变^[17]。本实验对患病刺参溃烂处组织肌肉和肿胀口部冰冻切片的检测结果发现阳性组织出现特异性黄绿色细菌荧光信号。溃烂组织经过 TSB 培养基培养,分离到优势度高的细菌,经检测也证实为感染的致病菌 H1 和 H2。这也从病原学角度证实了组织病理变化的原因:病原菌侵入皮肤,大量繁殖引发炎症最终皮肤溃烂。在感染试验过程中观察到感染刺参先是围口部肿胀(这提示内部首先感染),然后腹腔注射部位会首先出现溃疡,最后全身出现溃疡点。这提示在养殖过程中需控制刺参生活环境中病原菌数量,尽量避免刺参表皮损伤,一旦病原菌从伤口侵入,很有可能造成疾病的发生。

刺参营底栖生活,不易观察到其摄食及活动情况,而且由于疾病发生是比较缓慢的一个过程,一旦发生疾病,而不能及时采取防治措施,就会造成刺参大面积的死亡,因此对刺参养殖池池水的主要致病菌进行监控,对有效控制刺参疾病发生有重大意义。本实验通过 2 种抗体进行间接荧光检测可以确定患病刺参水体或组织中是否携带或这 2 种主要致病菌,而且本检测技术检测水体中细菌数量仅需 4~5 h,可以为疾病诊断赢得宝贵的时间,从而尽快采取防治措施,减少经济损失。

参考文献:

- [1] 农业部渔业局. 中国渔业统计年鉴 [J]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [2] 王印庚, 荣小军, 张春云, 等. 养殖刺参主要疾病及防治技术 [J]. 海洋科学, 2005, 29(3): 1-7.
- [3] 王印庚, 方波, 荣小军, 等. 养殖刺参保苗期重大疾病“腐皮综合征”病原及其感染源分析 [J]. 中国水产科学, 2006, 13(4): 610-616.
- [4] 张春云, 王印庚, 荣小军. 养殖刺参腐皮综合征病原菌的分离与鉴定 [J]. 水产学报, 2006, 30(1): 118-123.
- [5] 谢建军, 王印庚, 张正, 等. 养殖刺参腐皮综合征两种病原菌 Dot-ELISA 快速检测 [J]. 海洋科学, 2007, 31(8): 59-64.
- [6] 王印庚, 张凤萍, 李胜忠, 等. 刺参腐皮综合征病原灿烂弧菌检测探针的制备及应用 [J]. 水产学报, 2008, 33(1): 119-125.
- [7] 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.
- [8] 陈师勇, 莫照兰, 徐永立, 等. 水产养殖病原微生物检测技术研究进展 [J]. 海洋科学, 2002, 26(9): 31-35.
- [9] 付崇罗, 宋微波, 李赞, 等. 栉孔扇贝感染急性病毒性坏死性病毒的组织病理学与免疫荧光检测 [J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 741-744.
- [10] 王军, 鄢庆枇, 苏永全, 等. 溶藻弧菌的间接荧光抗体快速检测 [J]. 海洋科学, 2002, 26(7): 1-4.
- [11] 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]. J Appl Microbiol, 2000, 89: 599-606.
- [12] Albert M J, Ansaruzzaaman M, Shimada T. et al, Characterization of *Aeromonas trota* strains that cross-react with *Vibrio cholerae* O139 Bengal [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33: 3119-3123.
- [13] 李国, 闫茂仓, 常维山, 等. 文蛤副溶血弧菌间接 ELISA 检测技术的研究 [J]. 海洋通报, 2008, 27(5): 85-90.
- [14] 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.
- [15] 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): 1-10.
- [16] 马悦欣, 徐高蓉, 张恩鹏, 等. 仿刺参幼参急性口围肿胀症的细菌性病原 [J]. 水产学报, 2006, 30(1): 118-124.
- [17] 荣小军. 养殖刺参主要疾病的流行病学和组织病理学研究以及寄生虫病原学初探 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2005: 51-60.

王印庚等：养殖刺参腐皮综合征 2 种致病菌间接荧光抗体快速检测方法

WANG Yingeng et al: Rapid detection of 2 pathogenses of skin ulcer syndrome in cultured *Apostichopus japonicus* by indirect fluorescence antibody technique



图版 I 人工感染实验刺参典型症状及病原菌电镜负染照片

A: 人工感染实验中患腐皮综合征的刺参典型症状^[2], “a” 示皮肤溃烂, “b” 示肿嘴症状.

B: 灿烂弧菌透射电镜照片^[2] (标尺=500 nm).

C: 假交替单胞菌透射电镜照片 (标尺=200 nm)^[4].

Plate I Typical symptoms of diseased *A. japonicus* and the electron microscope photograph of *V. splendidus* and *P. nigrifaciens*

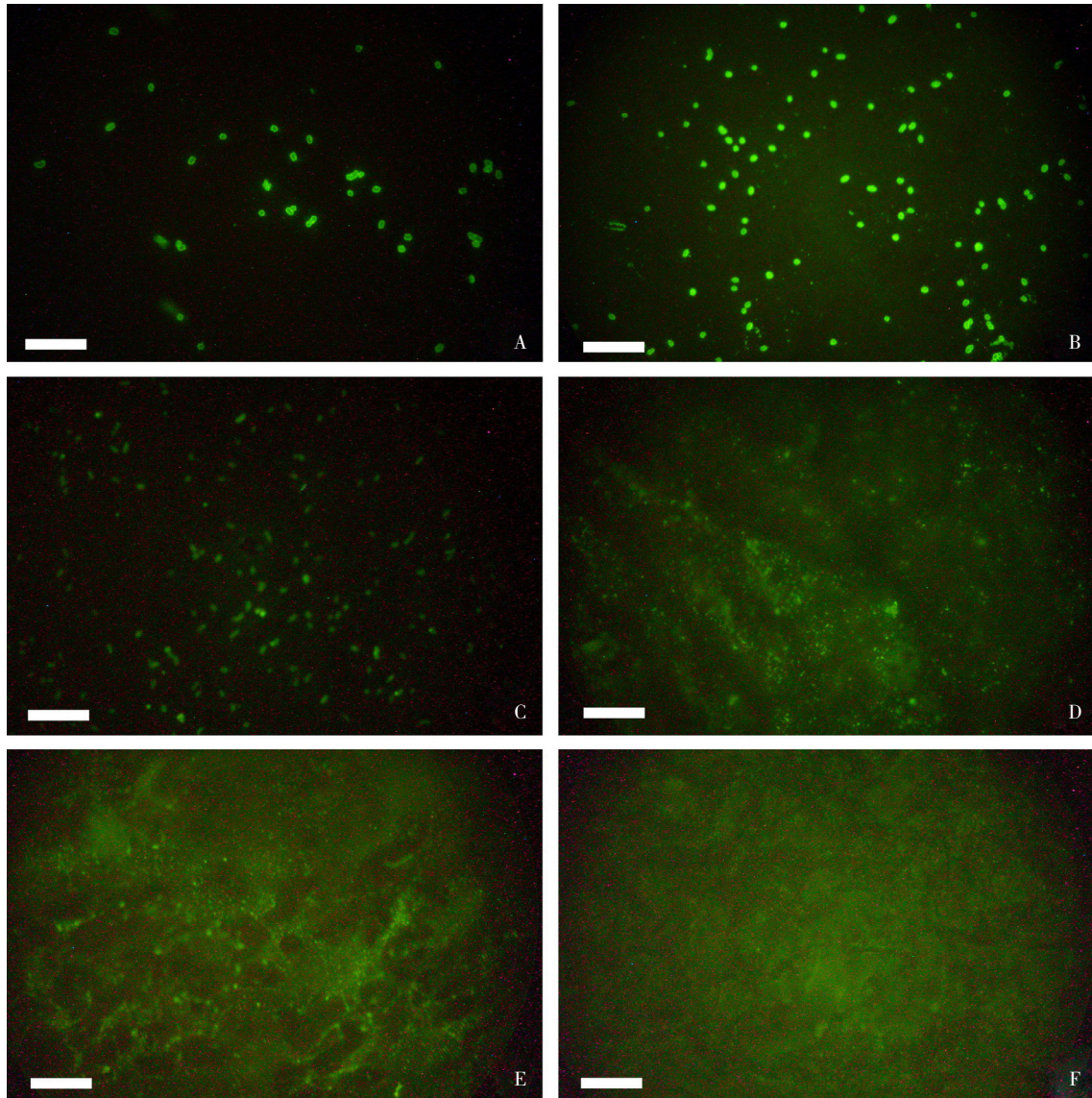
A: Skin ulceration (arrow “a”) and mouth tumidity (arrow “b”) are typical symptoms of diseased *A. japonicus*.

B: Electron microscope photograph of *V. splendidus* (bar=500 nm)^[2].

C: Electron microscope photograph of *P. nigrifaciens* (bar=200 nm)^[4].

王印庚等：养殖刺参腐皮综合征 2 种致病菌间接荧光抗体快速检测方法

WANG Yingeng et al: Rapid detection of 2 pathogenesis of skin ulcer syndrome in cultured *Apostichopus japonicus* by indirect fluorescence antibody technique



图版 II 人工感染刺参养殖水体、交叉反应菌及溃烂组织冰切片的间接荧光抗体检测结果

A: 人工感染实验组水体中灿烂弧菌检测结果. B: 人工感染实验组水体中假交替单胞菌检测结果. C: 低浓度一抗检测鳃弧菌结果; D、E: 患病刺参溃烂肌肉和肿胀嘴部的冰冻切片的检测结果, 在组织中可见散落的黄绿色细菌颗粒; 发病刺参肿胀嘴部冰冻切片检测结果, 可见明显黄绿色细菌颗粒; F: 健康刺参肌肉冰冻切片检测结果, 背景为均一黄绿色. 标尺=20 μm .

Plate II Detection of IFAT (including water , ulcer tissues of diseased *A. japonicus* , cross-reaction with *V. anguillarum* , frozen sections)

A: *V. splendidus* detected by IFAT from the water in infection group, B: *P. nigrofaciens* detected by IFAT from the water in infection group, C: *V. anguillarum* detected by IFAT with low dilution of antiserum, note the faint yellow-green shape comparing to *V. splendidus* (A) and *P. nigrofaciens* (B), D & E: Positive result of frozen section of ulcerated muscle (D) and tumidly mouth (E) from diseased *A. japonicus* infected with *V. splendidus*, note the scattered yellow-green dots were pathogen stained specifically with antiserum primary antibody and with FITC-labelled secondary antibody, F: Negative result of frozen section of muscle from healthy *A. japonicus*. bar=20 μm .

Rapid detection of 2 pathogens of skin ulcer syndrome in cultured *Apostichopus japonicus* by indirect fluorescence antibody technique

WANG Yingeng¹, XIE Jianjun², Rong Xiaojun¹, Liao Meijie¹, ZHANG Zheng¹

(1. Key Laboratory for Sustainable Utilization of Marine Fisheries Resources, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology, Qingdao 266071, China; 2. Marine Fishery Research Institute of Zhejiang Province, Zhoushan 316100, China)

Abstract: An indirect fluorescence antibody technique for the rapid detection of *Vibrio splendidus* and *Pseudoalteromonas nigrifaciens*—the two pathogens of the skin ulcer syndrome of sea cucumber *Apostichopus japonicus*, has been developed on glass slides. The antiserum of *V. splendidus* (KH1) and *P. nigrifaciens* (KH2) were prepared with rabbits. Cross-reactions of antisera with other 11 main marine pathogens were detected by agglutination, and the results showed low cross-reaction which was eliminated by heightening the dilution of antisera. The cross reaction assay and absorb assay indicated the method was successful in distinguishing those pathogens. Working concentration of two antisera and FITC-goat-anti-rabbit IgG (FITC-IgG) were assayed by grads dilutions: dilution titers of KH1, KH2 and FITC-IgG were 400, 200 and 80 respectively for detecting bacteria, while dilution titers of KH1, KH2 and FITC-IgG were 200, 100 and 80 respectively for detecting frozen section of tissues. The sensitivity of the method was 2.4×10^4 cells/mL. An artificial infection experiment on sea cucumber by 2 pathogens were carried out, and bacteria cultured from tissues (muscle ulceration, mouth tumidity, muscle) of diseased *A. japonicus*, water, and frozen sections of tissues were detected by IFAT. Results showed the established method could detect the pathogens from diseased sea cucumber, water and even healthy sea cucumber in infection test. *V. splendidus* and *P. nigrifaciens* were stained with bright yellow-green. Positive cells in frozen sections indicated that the mouth tumidity and skin ulceration symptoms of diseased sea cucumber were caused by the invading of bacteria. The overall detecting results suggest that applying this technique properly in clinical diagnosis of skin ulcer syndrome of *A. japonicus* would be more efficient and accurate. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17 (2): 329–336]

Key words: *Apostichopus japonicus*; skin ulcer syndrome; *Vibrio splendidus*; *Pseudoalteromonas nigrifaciens*; rapid detection; indirect fluorescence antibody technique

Corresponding author: WANG Yingeng. E-mail: wangyg@ysfri.ac.cn