

海水养殖细菌性病害检测方法研究进展

肖婧凡¹,王 玥¹,张元兴¹,雷霖霖²

(1. 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237; 2. 中国水产科学院黄海水产研究所,山东青岛 266071)

[摘要] 随着我国水产养殖业的不断发展,各种病害问题日益突出。细菌性病害在所有病害中占到相当大的比例,因此其检测方法的开发在水产养殖病害发现、防治、无公害水产品生产及卫生质量检验中均具有重要意义。本文对近年来国内外主要海水养殖细菌性病害检测方法的研究情况进行综述,介绍了主要细菌性病害的各种检测方法的原理、应用及其研究进展,为我国今后建立水产养殖细菌性病害检测方法标准及推动相应检测产品的商品化提供参考。

[关键词] 水产养殖;细菌性病害;检测方法

[中图分类号] S942.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-1742(2014)09-0010-06

1 前言

21世纪人类社会面临着“人口剧增、资源匮乏、环境恶化”三大问题的严峻挑战,随着陆地资源的日益减少及天然渔业的日渐枯竭,水产养殖业显得日益重要。由于水土资源有限,从提高养殖面积来增加产量难以持续发展。因此,规模化、集约化、高密度养殖模式逐渐成为我国海水鱼类养殖业的发展主流。工厂化养殖模式和高密度网箱养殖模式也成为今后海水养殖的一个必然趋势。

随着海水养殖业的不断发展,各种病害问题日益突出,对养殖的产量及成长造成严重影响。目前,我国的海水养殖水产动物的病害种类达200余种,常年养殖病害发病率达50%以上,损失率30%左右,估计每年因水产养殖病害问题而造成的直接经济损失就达百亿元,并且还有上升的趋势,病害问题已成为制约海水养殖业健康发展的重要因素^[1]。根据2006年统计的我国水产养殖疾病种类的检测结果可知:在128种病害中病毒性疾病17种,

细菌性疾病61种,真菌性疾病4种,寄生虫疾病28种,藻类性疾病6种,其他病害3种,不明病因9种^[2],细菌性疾病的比例约占一半。由此可见,由细菌性感染引起的养殖鱼类病害已成为造成我国水产养殖鱼种经济损失的一个主要原因。

2 国内外海水养殖主要细菌性病害

水产养殖病害研究一直是世界各国学者关注的热点,国外对养殖鱼类病害的研究历史较早,也较深入,其中针对水产养殖细菌性病害的研究占到很大比例,主要集中在造成较大经济损失的致病性弧菌、嗜水气单胞菌、假单胞菌、爱德华氏菌等细菌性病原^[3]。

2.1 弧菌病

弧菌病是国内外海水养殖业中常见的疾病,常见的致病菌有鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*)、哈维氏弧菌(*V. harveyi*)、溶藻弧菌(*V. alginolyticus*)、杀鲑弧菌(*V. salmonicida*)等,其中鳃弧菌

[收稿日期] 2014-06-23

[基金项目] 农业公益性行业科研专项(nyhyzx201303047)

[作者简介] 肖婧凡,1981年出生,女,博士,助理研究员,主要从事海洋病原微生物检测及病害防控工作;E-mail: yxzhang@ecust.edu.cn

是弧菌病的典型病原菌,在国内外均对重要的经济养殖品种造成严重的病害。杀鲑弧菌为冷水弧菌病的病原,主要出现在加拿大和北欧国家(主要是挪威和英国),对大马哈鱼和鳕鱼养殖造成了很大危害^[4-6]。此外,哈维氏弧菌、创伤弧菌及溶藻弧菌也是海水养殖中常见的致病菌,对花鲈鱼、石斑鱼、鳗鲡、对虾和大黄鱼养殖造成巨大经济损失^[7-9]。

2.2 爱德华氏菌病

由迟钝爱德华氏菌(*E. tarda*)引起的爱德华氏菌病是一种危害巨大的鱼类病害,在世界许多国家都有相关病例的报道,可感染多种鱼类。目前迟钝爱德华氏菌已成为鳗鲡养殖中危害最大的一种病,2002年在中国北方大菱鲆养殖区出现*E. tarda*感染病例。到2004年,该病已呈频繁暴发态势,给大菱鲆养殖带来巨大经济损失。据报道,大连地区养殖的大菱鲆由于*E. tarda*感染而引发的出血性腹水病的发病率高达70%~80%,体长10~15 cm的病鱼死亡率高达90%~95%^[10]。

2.3 假单胞菌病

鳗败血假单胞菌(*Pseudomonas anguilliseptica*)被认为是养殖鱼种的重要病原。该菌在1972年被描述为红点病的发病病原,造成养殖日本鳗大量死亡^[11]。此后,该菌在台湾、苏格兰和丹麦的欧洲鳗的养殖场被报道^[12]。除感染鳗鱼,该菌还是大菱鲆和黑斑小鲷鱼种的新发病原^[13],主要在冬季时低温条件下发病(16℃以下),感染此败血症的鱼腹部膨大、表皮和内脏出现出血溃疡点。

2.4 细菌性肾病(bacterial kidney disease, BKD)

BKD是由鲑鱼肾杆菌(*Renibacterium salmoninarum*)造成的,对于淡水和海水养殖鱼种有很高的致死率^[14-16]。BKD在北美、日本、西欧和智利已有所报道,对太平洋鲑鱼的经济效益影响尤其大。在出现感染的临床症状前该病原菌能通过有性垂直传播给下一代,目前主要的治疗手段对此疾病都基本无效。

3 国内外海水养殖品种主要病害检测方法

针对以上养殖鱼种主要细菌性病害,各国研究人员为开发快速、准确、有效的诊断方法广泛开展工作。笔者等将目前已报道的国内、国外主要海水养殖细菌性病害检测方法总结为以下几种类型进行叙述。

3.1 基于微生物生理生化检测的方法

针对养殖鱼种细菌性病原的检测,最经典的鉴定方法是对病原进行分离纯化,基于形态学检测、生理学和通过一系列的生理生化实验实现对微生物的初步鉴定^[17]。然而,这种方法耗时长、操作繁琐,不利于细菌性病害的快速诊断。法国生物梅里埃公司于1970年开发出一系列微生物鉴定用生理生化检测试剂盒,使细菌鉴定更简单快捷。该系列试剂盒已成为国际公认的鉴定细菌的参考标准,目前在海水养殖鱼类细菌性病害的诊断中,已将API系列试纸条检测结果作为鉴定的辅助手段之一。Abdel-Aziz等^[18]采用API 20NE生理生化检测试剂盒与分子鉴定相结合,对导致埃及沿海养殖金头鲷和欧洲海鲈大量死亡的病原进行了鉴定,确定了溶藻弧菌、副溶血弧菌和美人鱼发光杆菌杀鱼亚种造成病害的主要病原。潘晓艺等^[19]根据API 20E结果结合16S rDNA和gyrB基因序列比对,确定从发病养殖中华鳖肝脏分离得到的一株致病菌为迟钝爱德华氏菌。

除了API系列检测试剂盒,针对一些特殊的细菌性病原还可以采取更为简便的显色培养技术^[20]。该技术在培养基中加入细菌特异性酶的显色底物,使菌落出现不同颜色而达到分离鉴定的目的,如硫柠檬蔗糖琼脂(thiosulfate citrate bile salts sucrose agar, TCBS agar)已经被广泛用于霍乱弧菌和副溶血弧菌的分离鉴定。近年来还有很多新型显色培养基被开发出来,如选择性显色弧菌培养基(vibriobiochrome medium, BCVM),副溶血弧菌在其上生长形成的菌落呈紫色,而其他弧菌则呈蓝绿色,可以更有效的将副溶血弧菌与其他致病性弧菌区分开来。目前这种方法不仅被广泛用于人类病原菌的初步分离鉴定,也越来越多地被应用到水产养殖业病害检测中。

3.2 基于分子生物学技术的检测方法

基于分子生物学技术的养殖鱼类细菌性病害的检测方法在已有报道文献中占到50%以上,该方法与传统的生理生化检测方法相比简洁、快速、灵敏度高、特异性强,可用于细菌性病害疾病的预警和诊断。

3.2.1 聚合酶链反应技术

聚合酶链反应或称多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR),是根据生物信息学等方法寻找特定病原菌特异性基因序列设计特异性引物,扩

增后产生特异性片段从而达到检测病原菌的目的^[21]。目前多数文献针对不同细菌性病害的特异性基因序列设计引物,建立了灵敏有效的检测方法。Pinto等^[22]以 *toxR*, *tlh*, *tdh* 和 *trh* 作为目的基因实现了副溶血弧菌的检测;Lee等^[23]以创伤弧菌溶血素为靶标,设计特异性引物建立其PCR检测方法。随着PCR技术的成熟,基于多种病菌的同时检测的多重PCR技术逐渐发展起来。Kong等^[24]建立了一种以嗜水气单胞菌的气单胞菌溶素基因、弗氏志贺菌 *ipaH* 基因、鼠伤寒沙门氏菌 *ipaB* 基因、霍乱弧菌 *epsM* 基因和副溶血弧菌 16 S-23 S rDNA 为目标基因,设计六对扩增后可产生6种不同长度的片段的特异性引物来快速同时检测水产品中这6种致病菌。此检测方法可在12 h内完成,检测限可以达到 $10^0 \sim 10^2$ CFU/mL。

3.2.2 环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)

由于传统的PCR技术需要精确控制扩增反应各阶段温度,一定程度上限制了其在水产养殖业中的应用。Notomi等^[25]于2000年提出的一种只需在恒温条件下就可以进行核酸扩增的LAMP技术。LAMP通过设计两对特别的引物(内引物和外引物)在一种有链置换活性的DNA聚合酶作用下进行的一种自动链置换DNA合成反应。因为DNA在65℃左右处于动态平衡状态,任何一个引物向双链DNA的互补部位进行碱基配对延伸时,另一条链就会解离成为单链,所以该技术在恒温下就可以进行核酸扩增^[26],已被用于多种水产养殖细菌性病害的检测。Yeh等^[27]根据鲶鱼爱德华氏菌 *eip18* 基因设计引物进行LAMP扩增,在65℃反应60 min后可得到鲶鱼爱德华氏菌基因特异性条带,检测限可达到20 CFU/mL,可以从养殖水体样本中实现鲶鱼爱德华氏菌的检出。Surasilp等^[28]将LAMP与横向流动试纸条分析相结合,以 *rpoS* 基因为靶基因建立了一种LAMP-LFD方法来检测创伤弧菌,对于纯培养检测限可达到 1.5×10^3 CFU/mL。

3.2.3 实时定量PCR技术(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)

qRT-PCR目前也被广泛用于水产养殖病害的定量检测。该技术特异性强、灵敏度高、重复性好,可同时检测同一样本中不同靶序列。Blackstone等^[29]以TaqMan探针为基础,采用qRT-PCR技术以副溶血弧菌特异性 *tdh* 基因为靶基因来检测副溶血弧菌,检测限可

达到每PCR体系1 CFU。Panicker等^[30]针对 *vvh* 基因设计寡核苷酸引物,建立了以SYBR Green I染料为基础的qRT-PCR快速、特异性地检测牡蛎组织匀浆和墨西哥湾水体中的创伤弧菌。该方法对于纯基因组DNA的最低检测量为1 pg,水体中检测限可达10 CFU/mL。许龙岩等^[31]根据副溶血弧菌 *toxR* 基因和 *tdh* 基因设计引物对副溶血弧菌建立了一种基于TaqMan探针的双重荧光PCR检测法。该方法具有良好的特异性,水体中常见非副溶血弧菌细菌均呈阴性,副溶血弧菌的菌浓度与 *Ct* 值的反向线性关系良好,检测限为 3.6×10^2 CFU/mL。

3.2.4 基因探针技术

自1975年DNA探针杂交技术被首次提出,基因探针技术已得到了很大的进步和发展。该技术的基本依据是核酸杂交,针对决定病原菌生物体特性的DNA序列设计特异性标记的DNA或RNA探针,就可以通过样品与探针杂交是否形成杂交分子来检测是否存在目标病原菌。基因探针的标记方法主要有放射性标记法和非放射性标记法两种。目前常用的标记物为碱性磷酸酶(AP)和地高辛(DIG)。该技术除用于人类病原诊断,也被用于水产养殖病原检测中。周凤丽等^[32]针对溶藻弧菌胶原蛋白酶基因和外膜蛋白基因设计了两对引物对溶藻弧菌进行PCR扩增,对扩增产物以DIG标记制备基因探针用于检测溶藻弧菌,发现胶原蛋白酶基因探针有较高特异性,可用于对溶藻弧菌的检测鉴定分析。Raghunath等^[33]用AP来标记基因探针检测海洋食品中的 *trh*⁺ 副溶血弧菌,对40株副溶血弧菌、45株其他弧菌和55株非弧菌进行探针杂交,特异性达100%,检测限达到 $5.0 \times 10^2 \sim 3.4 \times 10^3$ CFU/g。

3.3 基于免疫学相关技术的检测方法

除分子生物学技术外,免疫学相关技术也被广泛用于水产养殖品种病害诊断。基于免疫学相关的检测方法利用抗原抗体特异性结合的原理,目前应用较多的有酶联免疫吸附法和免疫层析技术。

3.3.1 酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

ELISA技术最早出现于1971年,该技术的基础是抗原抗体特异性反应,常用的ELISA方法有竞争法测抗原、间接法测抗体和双抗体夹心法,其特异性取决于抗体的特异性^[34]。Smith等^[35]最早将ELISA应用于鱼疝病的诊断,灵敏度达 10^2 CFU/mL。Kumar等^[36]建立了快速检测水产品中副溶血弧菌的

ELISA方法。吴晓春等^[37]以鱼肠道弧菌为抗原制备多克隆抗体,用ELISA法来检测对海水鱼造成危害的弧菌属致病菌,灵敏度可达到每孔 10^5 CFU/mL。

3.3.2 免疫层析技术

传统ELISA技术操作繁琐、耗时长,限制了其在养殖场现场检测中的应用。目前,研究工作者将免疫层析技术应用于快速检测,如侧向层析技术(lateral-flow technology, LFT)被用于快速检测试纸条的研发。与传统检测方法相比,该检测技术具有快速、简便、价格低廉等优点。LFT的原理与ELISA相似,以固定了捕获蛋白(通常为抗体或抗原)的硝酸纤维素膜作为基板,采用乳胶、胶体金、碳以及新型材料(上转磷光或量子点)作为标记物对抗体或抗原进行标记,其检测结果可以用肉眼直接观测。目前已商业化用于诊断的免疫层析试纸产品大多为以纳米级胶体金颗粒为标记材料。此技术操作简便,一般5~15 min就可得到结果,已广泛用于药残检测、食品安全、临床诊断中,也有用于水产养殖品种病害检测的报道。Sithigorngul等^[38]制备了抗哈维氏弧菌的鼠单克隆抗体和羊多克隆抗体,将这两种抗体用于胶体金免疫层析试纸条的制备,结果表明样品检测量只需100 μ L,针对哈维氏弧菌的检测限可达 10^6 CFU/mL以上,而检测时间小于15 min。秦璞等^[39]利用胶体金免疫层析技术研制了一种快速检测迟钝爱德华氏菌的试纸条,该试纸条对迟钝爱德华氏菌有良好特异性,5~10 min就可以得到检测结果,敏感度达到 10^5 CFU/mL。

近年来,出现了基于新型材料和免疫层析技术,如目前报道较多的有量子点(quantum dots, QDs)、上转磷光(up-converting phosphor, UCP)、纳米磁珠、荧光微球等标记抗体的免疫层析。其中量子点与抗体偶联后用于免疫层析显示出良好的稳定性和荧光强度,在人类病原菌检测上已经有所应用。Tully等^[40]初步建立了一种以量子点标记抗体检测李斯特单增杆菌(*Listeria monocytogenes*)表面蛋白InlB,检测限可以达到12 ng/mL。上转磷光材料则因其背景干扰小、灵敏度高等特点,被应用于耶尔森氏菌和布鲁氏菌^[41, 42]的检测中,其灵敏度是胶体金免疫层析技术的10倍。目前,以上新型材料还未见用于鱼类病原菌检测的报道,但这些材料在未来检测试纸条研制中显示出良好的应用前景。

3.4 芯片技术

随着近年来生物芯片技术的发展,以及病害检

测对大规模、高通量的要求,芯片技术越来越多被用到病原菌的检测中。其中,应用最多的是基因芯片和蛋白芯片技术。基因芯片技术可以高通量、平行化对多种靶基因进行准确鉴定,为菌种鉴定提供了技术平台。Panicker等^[43]也通过多重PCR与DNA芯片相结合建立了一种主要针对创伤弧菌、霍乱弧菌和副溶血弧菌检测沿海水域和甲壳类动物中的致病弧菌的方法,检测灵敏度为 $10^2\sim 10^3$ CFU/mL。

蛋白芯片又称蛋白微阵列,蛋白芯片是将各蛋白有序排列固定在载体上,之后用特异性标记的抗体或抗原蛋白与微阵列作用,经过扫描后确定蛋白间是否有相互作用。与基因芯片相比,蛋白芯片的研究仍处于摸索阶段。究其原因是由于蛋白质分子本身结构功能的复杂性与特殊性造成的。目前蛋白芯片用于水产养殖细菌性病害检测的报道较少。

4 现有海水养殖细菌性病害检测方法的利弊及发展方向

综上所述,目前已报道多种海水养殖细菌性病害的检测方法,这些方法各有优缺点,相比较而言,基于细菌富集培养及生理生化指标检测的方法耗时、费力、精度和可靠性有限;基于分子生物学技术的检测方法虽然灵敏度高、特异性强、快速准确,能够检测出样品中的微量核酸,但是需要特定仪器设备并由专业技术人员操作,无法应用于基层养殖单位;基于免疫学技术ELISA检测方法操作流程耗时繁琐,无法实现对样品的实时检测。目前广泛采用的胶体金免疫层析技术虽然操作简便、耗时短、不需要专业技术人员操作,可以用于基层养殖场现场检测,但灵敏度不够高,导致一些发病症状不明显或特异的病害无法在感染初期检出并采取有效措施;基因芯片可高通量并行检测,人为操作的误差小,然而也存在价格昂贵等缺点。蛋白芯片技术虽然有着高特异性、高通量的特点,然而蛋白质结构复杂,合成困难,且蛋白较DNA更脆弱,易变性失活从而影响其性质和功能。

如何选择有效的水产病害检测方法,应根据施用单位的情况而异。对于具有一定实验室条件的水产品检验检疫单位或大型养殖企业,可以采用分子生物学技术,辅助以生理生化检测手段,实现常规样品的检测。对于大量样品,则可采用芯片技术进行高通量检测,用于病害预警或附加值较高的水

产品食品安全检测。由于芯片制备复杂且检测设备成本较高,影响了该技术的推广。开发低成本芯片制备技术同时降低检测设备成本是今后的发展方向。针对基层养殖单位或个体养殖户,免疫层析试纸条因其操作简单快速,携带方便而显示出极大的优势,但该技术灵敏度有限,无法实现病害感染早期诊断,限制了其在海水养殖细菌性病害检测方面的进一步应用。制备具有更好亲和力的单克隆抗体,采用新型抗体标记材料配合相应的便携式荧光读取器,不仅有助于免疫层析试纸条灵敏度的提高,还可以用于病害的半定量分析及多元化检验。目前已有研究人员研制出灵敏度是胶体金免疫层析试纸条10~100倍的免疫层析试纸条,虽然还处于实验室阶段,且生产成本还有待进一步降低,但相信未来此类产品将成为广大养殖基层单位病害检测的主流产品。

参考文献

- [1] 董波. 我国海水养殖动物病害发生现状及其基础研究进展[J]. 生物技术世界, 2005 (4): 29-30.
- [2] 邹瑗徽. 我国水产养殖病害问题研究[J]. 科技经济市场, 2006 (8): 44.
- [3] Toranzo A E, Magarinos B, Romalde J L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems [J]. Aquaculture, 2005, 246(1): 37-61.
- [4] Bruno D W. Histopathology of bacterial kidney disease in laboratory infected rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with reference to naturally infected fish [J]. Journal of Fish Diseases, 1986, 9(6): 523-537.
- [5] Bruno D W, Munro A L S. Uniformity in the biochemical properties of *Renibacterium salmoninarum* isolates obtained from several sources [J]. FEMS Microbiology Letters, 1986, 33(3): 247-250.
- [6] Egidius E, Wiik R, Andersen K, et al. *Vibrio salmonicida* sp. nov., a new fish pathogen [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1986, 36(4): 518-520.
- [7] 张晓君, 房海, 陈翠珍, 等. 致病性哈氏弧菌生物学及分子特征[J]. 中国兽医学报, 2009 (9): 1120-1124.
- [8] Horseman M A, Surani S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection [J]. International Journal of Infectious Diseases, 2011, 15(3): 157-166.
- [9] 陈强, 鄢庆彬, 马牲. 溶藻弧菌致病性研究进展[J]. 海洋科学, 2006, 30(8): 83-89.
- [10] 王斌, 孙岑, 范薇, 等. 养殖大菱鲆出血性败血症病原菌致病性的研究及鉴定[J]. 大连水产学院学报, 2006, 21(2): 100-104.
- [11] Wakabayashi H, Egusa S. Characteristics of a *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond-cultured eels (*Anguilla japonica*) [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1972, 38(6): 577-587.
- [12] Stewart D J, Woldemariam K, Dear G, et al. An outbreak of 'Sekiten-byo' among cultured European eels, *Anguilla anguilla* L., in Scotland [J]. Journal of Fish Diseases, 1983, 6(1): 75-76.
- [13] Magariños B, Romalde J L, López-Romalde S, et al. Pathobiological characterisation of *Photobacterium damsela* subsp. piscicida isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*) [J]. Bulletin-European Association of Fish Pathologists, 2003, 23(4): 183-190.
- [14] Matejusova I, Bain N, Colquhoun D J, et al. Multilocus variable-number tandem-repeat genotyping of *Renibacterium salmoninarum*, a bacterium causing bacterial kidney disease in salmonid fish [J]. BMC Microbiology, 2013, 13: 285-293.
- [15] Murraya A G, Munro L A, Wallace I S, et al. Epidemiology of *Renibacterium salmoninarum* in Scotland and the potential for compartmentalised management of salmon and trout farming areas [J]. Aquaculture, 2012, 324: 1-13.
- [16] Hall L M, Duguid S, Wallace I S, et al. Estimating the prevalence of *Renibacterium salmoninarum*-infected salmonid production sites [J]. Journal of Fish Diseases, 2014. Doi:10.1111/jfd.12234.
- [17] 夏凡, 杨丽君, 王静, 等. 病原性海洋弧菌致病机理及其快速检测方法研究进展 [J]. 食品工业科技, 2011, 32(1): 366-376.
- [18] Abdel-Aziz M, Eissa A E, Hanna M, et al. Identifying some pathogenic *Vibrio*/*Photobacterium* species during mass mortalities of cultured Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) from some Egyptian coastal provinces [J]. International Journal of Veterinary Science and Medicine, 2013, 1(2): 87-95.
- [19] 潘晓艺, 郝贵杰, 姚嘉赞, 等. 中华鳖爱德华菌病原菌的分离鉴定及致病因子研究[J]. 淡水渔业, 2011, 40(6): 40-45.
- [20] Duan J, Liu C, Su Y C. Evaluation of a double layer agar plate for direct enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Food Science, 2006, 71(2): 77-82.
- [21] 张世秀, 张新中, 谢珍玉, 等. 分子生物学技术在水产养殖动物细菌性病原检测中的应用[J]. 海南大学学报: 自然科学版, 2007, 25(1): 96-100.
- [22] Di Pinto A, Ciccarese G, De Corato R, et al. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in southern Italian shellfish [J]. Food Control, 2008, 19(11): 1037-041.
- [23] Lee S E, Kim S Y, Kim S J, et al. Direct identification of *Vibrio vulnificus* in clinical specimens by nested PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36(10): 2887-2892.
- [24] Kong R Y C, Lee S K Y, Law T W F, et al. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in marine waters by multiplex PCR [J]. Water Research, 2002, 36(11): 2802-2812.
- [25] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.
- [26] 黄火清, 郁昂. 环介导等温扩增技术的研究进展 [J]. 生物技术, 2012, 22(3): 90-94.
- [27] Yeh H Y, Shoemaker C A, Klesius P H. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of channel catfish *E. ictalurus punctatus* important bacterial pathogen *Edwardsiella ictaluri* [J]. Journal of Microbiological Methods, 2005, 63(1): 36-44.
- [28] Surasilp T, Longyant S, Rukpratanporn S, et al. Rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* by loop-mediated isothermal amplification combined with lateral flow dipstick targeted to *rpoS* gene [J]. Molecular and Cellular Probes, 2011, 25(15): 8e163.
- [29] Blackstone G M, Nordstrom J L, Vickery M C, et al. Detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in oyster enrichment.

- ments by real time PCR [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2003, 53(2): 149–155.
- [30] Panicker G, Myers M L, Bej A K. Rapid detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by real-time PCR [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(1): 498–507.
- [31] 许龙岩, 袁慕云, 曹际娟, 等. TaqMan 探针双重荧光 PCR 法检测副溶血性弧菌[J]. *食品科学*, 2013, 34(18): 263–266.
- [32] 周凤丽, 简纪常, 吴灶和. 地高辛标记的 DNA 探针制备及其应用于溶藻弧菌的检测[J]. *华中农业大学学报*, 2009 (4): 459–462.
- [33] Raghunath P, Pradeep B, Karunasagar I, et al. Rapid detection and enumeration of trh-carrying *Vibrio parahaemolyticus* with the alkaline phosphatase-labelled oligonucleotide probe [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(1): 266–270.
- [34] 张晓辉, 邓志平, 何 丰, 等. ELISA 技术在水产养殖病害诊断和海洋生物毒素检测中的应用进展[J]. *海洋学研究*, 2009, 26(4): 79–85.
- [35] Smith P, Davey S. Evidence for the competitive exclusion of *Aeromonas salmonicida* from fish with stress-inducible furunculosis by a fluorescent pseudomonad [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1993, 16(5): 521–524.
- [36] Kumar B K, Raghunath P, Devegowda D, et al. Development of monoclonal antibody based sandwich ELISA for the rapid detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 145(1): 244–249.
- [37] 吴晓春, 邓 灯, 程顺峰, 等. 鱼肠道弧菌间接 ELISA 快速检测法的建立[J]. *水产科学*, 2013, 32(5): 284–288.
- [38] Sithigorngul P, Rukpratanporn S, Pecharaburanin N, et al. A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of pathogenic isolates of *Vibrio harveyi* [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 71(3): 256–264.
- [39] 秦 璞, 胡 晓, 张在阳, 等. 鱼类致病性迟钝爱德华氏菌胶体金快速检测试纸的研制[J]. *华东理工大学学报: 自然科学版*, 2011, 37(3): 330–334.
- [40] Tully E, Hearty S, Leonard P, et al. The development of rapid fluorescence-based immunoassays, using quantum dot-labelled antibodies for the detection of *Listeria monocytogenes* cell surface proteins [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2006, 39: 127–134.
- [41] Qu Qing, Zhu Ziwen, Wang Yufei, et al. Rapid and quantitative detection of *Brucella* by up-converting phosphor technology-based lateral-flow assay [J]. *Journal of Microbiology Methods*, 2009, 79 (1): 121–123.
- [42] Pyo D, Yoo J. New trends in fluorescence immunochromatography [J]. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 2012, 33(2): 203–222.
- [43] Panicker G, Call D R, Krug M J, et al. Detection of pathogenic *Vibrio* spp. in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(12): 7436–7444.

Progress on the detection technology of bacterial pathogens in marine aquaculture

Xiao Jingfan¹, Wang Yue¹, Zhang Yuanxing¹, Lei Jilin²

(1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao, Shandong 266071, China)

[Abstract] With the rapid developments in marine aquaculture, the bacterial pathogen has been recognized as a serious cause of disease. The urgency of implementing diagnosis to control the spread of bacterial disease and safety of aquaculture products is presently the dominant issue to be concerned. The aim of this review is to compile the dispersed literature published about different aspects of the detection technology of bacterial diseases occurring in aquaculture worldwide. The current status in the development of rapid diagnosis of aquaculture bacterial diseases will provide useful information on the establishment of detection standards and development of diagnosis products.

[Key words] marine aquaculture; bacterial pathogen; detection technology