

## 罗非鱼源无乳链球菌的间接ELISA快速检测方法

祝璟琳, 李天宇, 肖炜, 邹芝英, 杨弘\*

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏无锡 214081)

**摘要:** 以罗非鱼源无乳链球菌为抗原, 免疫新西兰兔获得高效价的多克隆抗体; 以此多克隆抗体作为一抗, 羊抗兔IgG-HRP作为酶标二抗, 建立无乳链球菌的间接ELISA快速检测方法。采用棋盘滴定法确定抗原与一抗的最佳工作浓度分别为 $10^6$  CFU/mL和1:10 000; 酶标二抗的最适工作浓度为1:1000。病原菌检测灵敏度为每孔 $10^3$  CFU。该方法标准化后具有快速、灵敏等特性, 与海豚链球菌等其他常见水产病原菌无交叉反应; 阻断实验中的阻断率达72.02%; 交叉反应和阻断实验的结果显示该方法具有较高的特异性。将该方法标准化后检测了44株2007—2013年分离的罗非鱼无乳链球菌, 阳性检测率为100%; 对人工感染后死亡的30尾罗非鱼的脑组织进行检测, 阳性检测率为100%; 对人工感染后未死亡的20尾罗非鱼的脑, 肝和脾组织进行检测, 脑的阳性检测率为0%, 肝的阳性检测率为25%, 脾的阳性检测率为50%; 表明该技术不仅能够检测已发病的罗非鱼, 而且能够检测无症状的带菌罗非鱼, 该方法的建立有助于快速准确地诊断由无乳链球菌引起的罗非鱼链球菌病。

**关键词:** 罗非鱼; 无乳链球菌; 酶联免疫反应; 早期检测

**中图分类号:** S 917.1; S 942.5

**文献标志码:** A

无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)又名B族链球菌(Group B *Streptococcus*, GBS), 革兰氏阳性球菌, 是自然界中广泛存在的一种条件致病菌, 根据其荚膜多糖抗原性的不同, 可分为10种血清型(I a、I b、II~IX型), 能引发败血症和脑膜炎<sup>[1]</sup>。罗非鱼(*Oreochromis sp.*)是我国出口量最大的养殖鱼类, 曾经以易养、抗病力强著称, 自2009年在我国海南首次大规模暴发链球菌病后<sup>[1]</sup>, 无乳链球菌已成为危害我国罗非鱼产业最重要的病原菌。近年来, 该病的临床症状有复杂化趋势, 给该疾病防治技术的研究和应用带来了困难。Li等<sup>[2]</sup>发现尼罗罗非鱼(*O. niloticus*)体内无乳链球菌慢性感染的现象, 除了在脊椎附近的肌肉中有黄色或红黑的结节及突眼外, 没有其他的临床症状。因此, 建立简便、稳定的无乳链球菌快速检测技术, 尤其是早期快速

检测技术的建立对无乳链球菌的防治显得尤为重要和迫切。PCR检测方法(双重PCR<sup>[3-4]</sup>、三重PCR<sup>[5]</sup>、巢式PCR<sup>[6]</sup>)已在国内外广泛开展, 并且灵敏度高、特异性强, 但受实验条件以及费用高、假阳性率高等因素的限制, 不适宜在基层推广。相比之下酶联免疫吸附实验(ELISA)方法操作简单易行、灵敏度高、可重复性强, 易制成检测特定种类病原菌的商品性试剂盒, 更适用于野外操作及大量样品的检测。郭玉娟等<sup>[7]</sup>研究表明2007—2010年从广东以及海南等地养殖的患病罗非鱼体内分离到的无乳链球菌分子血清型均为I a型; 李莉萍等<sup>[8]</sup>对2007—2012年从广西、广东、海南、福建和云南等地养殖的罗非鱼体内分离获得的168株无乳链球菌流行菌株的血清型进行分析, 发现I a血清型为主要血清型, 占总数的94.64%。说明我国罗非鱼源无乳链

收稿日期: 2016-01-21 修回日期: 2016-06-14

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2015JBFM27); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-49); 罗非鱼原良种保种选育

通信作者: 杨弘, E-mail: yangh@ffrc.cn

球菌荚膜多糖抗原性未发生明显的变异, 因此针对无乳链球菌 I a血清型建立间接ELISA快速检测方法在临床上可行并适用的。本实验以罗非鱼源 I a血清型无乳链球菌为抗原, 免疫新西兰兔获得高效价的多克隆抗体; 以此多克隆抗体作为一抗, 羊抗兔IgG-HRP作为酶标二抗, 建立无乳链球菌的间接ELISA快速检测法, 将有助于快速准确地诊断由无乳链球菌引起的罗非鱼链球菌病。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用无乳链球菌(编号LB110808-2)2011年分离自广西柳州并经16 S rRNA分子鉴定确定(GenBank登录号: JQ990153), 按文献<sup>[7]</sup>的多重PCR方法已鉴定为 I a血清型, 保存于本实验室-70 °C超低温冰箱。用于交叉实验的海豚链球菌(*S. iniae*)采自广西宜州, 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)和溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)由宁波大学鱼病室惠赠, 人工感染用鱼为1999年从埃及农业部水产中心实验室引进尼罗罗非鱼群体的选育后代; 新西兰兔购于无锡惠山实验动物中心; 羊抗兔IgG-HRP酶标抗体(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG)购自Santa Cruz Biotechnology, Inc; 可溶性单组分TMB底物溶液购自天根生化科技(北京)有限公司; 超滤管为康宁公司产品; 蛋白质含量检测试剂盒为Thermo公司的BCA试剂盒。

### 1.2 无乳链球菌的制备和灭活

将保存于-70 °C冰箱的无乳链球菌接种于脑心浸液液体培养基中, 于摇床28 °C培养18~24 h后, 菌液以4000 r/min离心5 min, 用8.5 g/L无菌生理盐水洗涤2次, 加入1%的甲醛于37 °C灭活24 h, 通过菌落平板涂布法检测灭活效果; 4000 r/min离心5 min, 弃上清液, 用麦氏比浊法配制出浓度约为 $1 \times 10^8$  CFU/mL的菌悬液作为免疫抗原。

### 1.3 免疫血清的制备和纯化

选择3只健康新西兰兔, 其中2只背部皮下多点注射免疫, 分4次免疫, 免疫间隔期为7 d, 另1只不注射作为阴性对照; 首次免疫为弗氏完全佐剂与无乳链球菌菌体(1:1)混合乳化, 加强免疫为弗氏不完全佐剂与无乳链球菌菌体(1:1)

混合乳化, 最后一次免疫7 d后, 耳缘静脉采血, 凝集效价达1:2560以上即可耳静脉采血。血液室温静置数小时后, 4000 r/min离心吸取血清。同样的方法收集未进行免疫的兔血清, 作为阴性对照血清。

血清纯化采用饱和硫酸铵盐析法。取2 mL免疫血清加等量的pH 7.4的0.01 mol/L磷酸盐缓冲液, 将血清稀释1倍; 再逐滴加入4 mL饱和硫酸铵溶液, 边加边搅拌; 置4 °C冰箱静置1 h, 然后4 °C低温4000 r/min离心15 min, 弃上清液, 沉淀用2 mL 0.01 mol/L磷酸盐缓冲液溶解; 冰浴中逐滴加入1 mL饱和硫酸铵边加边搅拌, 使饱和度为33%, 置4 °C冰箱静置1 h, 冷冻离心收集沉淀, 重复操作2遍。将沉淀溶于1 mL 0.01 mol/L磷酸盐缓冲液中, 用100 ku的超滤管于4 °C离心除盐, 用0.01 mol/L的磷酸盐缓冲液充分洗涤除盐, 经1% BaCl<sub>2</sub>和奈氏试剂检验滤液中已无NH<sub>4</sub><sup>+</sup>和SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>后, 停止超滤。同样的方法用于阴性对照血清的纯化。

### 1.4 ELISA方法的建立

ELISA检测流程 用pH 9.6的0.05 mol/L碳酸盐缓冲液稀释无乳链球菌, 同时设阴性对照孔和空白对照孔, 每个被检样品孔和阴性对照孔内分别加入100 μL的病原菌, 空白对照孔加入100 μL的包被缓冲液, 60 °C烘箱内烘4 h; 每孔加入300 μL PBST缓冲液洗涤3次; 每孔分别加入200 μL 1%的BSA封闭液, 封闭1 h, PBST缓冲液洗涤3次; 每孔加入100 μL适当稀释的阳性血清和阴性血清, 37 °C孵育1 h, PBST缓冲液洗涤3次; 每孔加入工作浓度稀释1000倍的100 μL的羊抗兔IgG-HRP酶标抗体, 37 °C孵育1 h, PBST缓冲液洗涤3次; 每孔加入可溶性单组分TMB底物溶液100 μL, 37 °C避光反应20 min; 每孔加入50 μL 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应; 用酶标检测仪读取OD<sub>450</sub>值, 以判定结果。

棋盘式滴定法确定抗原最适包被浓度 将 $10^8$  CFU/mL浓度的无乳链球菌从1:10至1:10 000做系列梯度稀释, 每个稀释度包被2孔, 每孔100 μL, 60 °C烘干, 固定阳性血清浓度(1:2000), 酶标二抗作1:1000稀释, 根据说明书方法测定。以能产生OD<sub>450</sub>值为1.0左右, 且P/N值[(阳性对照OD<sub>450</sub>值-空白对照OD<sub>450</sub>值)/(阴性对照OD<sub>450</sub>值-空白对照OD<sub>450</sub>值)]最大的抗原稀释度为最佳稀释度。

**免疫血清最适稀释度的确定** 无乳链球菌抗原按最适工作浓度包被,将阳性血清和阴性血清分别按1:5000、1:10 000、1:15 000、1:20 000、1:25 000、1:30 000进行系列稀释,每孔100  $\mu\text{L}$ ,每个稀释度2孔;酶标抗体作1:1000稀释,根据说明书方法测定。选择阳性血清的 $\text{OD}_{450}$ 值接近1.0, $P/N$ 值最大的稀释度为最适稀释度。

**免疫血清敏感性实验** 将无乳链球菌菌悬液稀释成 $10^7$  CFU/mL,而后进行十倍比稀释至 $10^2$  CFU/mL,将血清稀释到最适工作浓度,以确定最小的抗原检测浓度。以产生 $\text{OD}_{450}$ 值接近1.0, $P/N$ 值 $\geq 2.1$ 判为阳性,检测阳性标为“+”,检测阴性标为“-”(下同)。

**特异性实验** 交叉实验:用浓度均为 $10^6$  CFU/mL的海豚链球菌、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华菌和溶藻弧菌包被酶标板,无乳链球菌作为对照,血清采用最适稀释度, $P/N$ 值 $\geq 2.1$ 判为阳性,检测是否有交叉反应情况。阻断实验:将 $10^6$  CFU/mL的无乳链球菌菌液包被酶标反应板,将阳性血清从1:1000开始倍比稀释,各稀释度分别加入等量的无乳链球菌菌液,混匀后于 $37^\circ\text{C}$ 放置1 h,同时设不做任何处理的抗无乳链球菌阳性血清和阴性血清作为对照,进行ELISA测定,测定其阻断率:  $\text{RP}=(N-T)/N$ ,式中, $\text{RP}$ 为阻断率(%); $N$ 为未经处理阳性血清的 $\text{OD}_{450}$ 值, $T$ 为经无乳链球菌菌液处理的阳性血清的 $\text{OD}_{450}$ 值。

**重复性实验** 3种无乳链球菌抗原按最适工作浓度包被,免疫血清采用最适稀释度,作ELISA检测,每个检测8孔,由每孔的 $\text{OD}_{450}$ 值计算出平均 $\text{OD}_{450}$ 值与标准差(SD),进而计算出板内变异系数(CV)。同种无乳链球菌抗原按最适工作浓度包被,免疫血清采用最适稀释度,作ELISA检测,在随机5块板上重复上述测定,每板检测8孔,根据 $\text{OD}_{450}$ 值可以计算出板间变异系数。 $\text{CV}(\%)=\text{SD}/X\times 100$ ,式中, $\text{CV}$ 为变异系数, $\text{SD}$ 为标准差, $X$ 为 $\text{OD}_{450}$ 。

## 1.5 临床菌株检测

将2007—2013年我国罗非鱼主产区收集的44株无乳链球菌从 $-70^\circ\text{C}$ 冰箱取出,复壮后分别接种于脑心浸液液体培养基中,于摇床 $28^\circ\text{C}$ 培养18~24 h后,菌液以4000 r/min离心5 min,弃上

清液,用8.5 g/L无菌生理盐水洗涤2次,加入1%的甲醛于 $37^\circ\text{C}$ 灭活24 h,4000 r/min离心5 min,弃上清液,用pH 9.6的0.05 mol/L碳酸盐缓冲液稀释至 $10^6$  CFU/mL作为待检测包被抗原。用建立的间接ELISA的方法对病原菌进行检测。每个抗原稀释度做2个平行,结果取平均值。

## 1.6 人工感染实验检测

**临界值的选择** 鱼类组织用拍打式匀浆机匀浆后进行反复冻融处理,即取10尾健康尼罗罗非鱼脑、肝和脾,称取50~150 mg组织与0.01 mol/L pH 7.4的无菌PBS(4 mL)混合,用拍打式匀浆机匀浆后,组织匀浆液在液氮和 $37^\circ\text{C}$ 水浴中反复冻融3次, $4^\circ\text{C}$ 下4000 r/min离心5 min,取上清液用BCA试剂盒进行蛋白质含量检测。以碳酸盐包被液稀释抗原脑、肝和脾为100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,每孔取100  $\mu\text{L}$ 进行包被,按照筛选的最适条件进行ELISA检测。每个样品设3个平行孔。临界值的判断:临界值=阴性标本平均 $\text{OD}$ 值 $\pm(3\times\text{SD})$ 。

**人工感染样品的检测** 将90尾体质量为(58.5 $\pm$ 5.2) g的尼罗罗非鱼饲养在3个养殖桶内,每个桶30尾,每天正常投饵、换水,水温为(32 $\pm$ 1) $^\circ\text{C}$ 。将培养完成的无乳链球菌以 $2.14\times 10^7$  CFU/mL腹腔注射尼罗罗非鱼,注射量均为0.3 mL/尾,对照组10尾注射等体积的8.5 g/L无菌生理盐水。人工感染2 d后累计死亡率为70%,分别采集30尾死亡罗非鱼的脑,以及20尾未死亡罗非鱼的脑、肝和脾组织,用拍打式匀浆机匀浆后进行反复冻融处理,然后进行包被抗原的制备,按照筛选的最适条件进行ELISA检测, $\text{OD}_{450}$ 值大于临界值的样品检测结果为阳性。

## 2 结果

### 2.1 无乳链球菌的免疫血清制备

用新西兰兔制备无乳链球菌的免疫血清,以微孔板凝集法测定抗血清的效价,发现无乳链球菌有很好的免疫原性,免疫4次后2只兔子的抗体效价均可达1:2560以上,将此抗血清纯化后作为ELISA检测用的一抗。

### 2.2 ELISA检测方法的标准化

**抗原最适包被浓度的确定** 对抗原作不同稀释度处理所测得的阳性血清和阴性血清的 $\text{OD}_{450}$ 值如表1所示,由于抗原在作1:100稀释时,

表 1 抗原最适包被浓度的确定

抗原稀释度/(CFU/mL) antigen concentration	阳性血清OD <sub>450</sub> positive sera OD <sub>450</sub>	阴性血清OD <sub>450</sub> negative sera OD <sub>450</sub>	P/N
10 <sup>8</sup>	1.754	0.150	17.126
10 <sup>7</sup>	1.560	0.113	24.152
10 <sup>6</sup>	0.900	0.079	29.293
10 <sup>5</sup>	0.234	0.074	7.667
10 <sup>4</sup>	0.094	0.087	1.176

OD<sub>450</sub>值最接近1.0时, P/N值最大为29.293。所以抗原最佳包被浓度为10<sup>6</sup> CFU/mL。

免疫血清最适稀释度的确定 当免疫血清稀释度为10 000倍, OD<sub>450</sub>值最接近1.0时, P/N值较大, 为68.214。所以免疫血清最适稀释度确定为1 : 10 000(表2)。

表 2 免疫血清最适稀释度的确定

血清稀释度 sera concentration	阳性血清OD <sub>450</sub> positive sera OD <sub>450</sub>	阴性血清OD <sub>450</sub> negative sera OD <sub>450</sub>	P/N
5000×	1.025	0.061	78.080
10 000×	1.005	0.064	68.214
15 000×	0.930	0.065	55.031
20 000×	0.878	0.068	42.538
25 000×	0.890	0.064	54.290
30 000×	0.758	0.060	67.476

免疫血清敏感性的确定 用最适稀释度的血清(1 : 10 000 V/V)检测抗原的灵敏度(表3)。菌悬液为10<sup>4</sup> CFU/mL时即可检出, 即每孔10<sup>3</sup> CFU。

特异性实验 交叉实验: 检测海豚链球菌、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华菌、溶藻弧菌与抗无乳链球菌血清交叉反应情况, 罗非鱼源无乳链球菌作为对照, 结果显示只有无乳链球菌交叉反应呈阳性, 其余细菌呈阴性(表4)。

阻断实验: 无乳链球菌处理后的阳性血清随着稀释度的增加, OD<sub>450</sub>值明显下降, 并逐渐接近阴性水平; 而未经无乳链球菌处理的阳性血清随着稀释度的增加下降缓慢。阻断率最高可达72.02%(表5)。

重复性实验 板内变异系数(CV)值为1.687%,

表 3 免疫血清敏感性实验结果

抗原浓度/(CFU/mL) antigen concentration	阳性血清OD <sub>450</sub> positive sera OD <sub>450</sub>	阴性血清OD <sub>450</sub> negative sera OD <sub>450</sub>	P/N	+/-
10 <sup>7</sup>	1.300	0.069	69.389	+
10 <sup>6</sup>	0.676	0.058	96.154	+
10 <sup>5</sup>	0.167	0.053	77.333	+
10 <sup>4</sup>	0.076	0.056	5.444	+
10 <sup>3</sup>	0.061	0.064	0.760	-
10 <sup>2</sup>	0.056	0.062	0.409	-

注: +. 检测结果为阳性, -. 检测结果为阴性, 下同  
Notes: +. positive result, -. negative result, the same below

表 4 免疫血清交叉实验结果

抗原 antigen	阳性血清OD <sub>450</sub> positive sera OD <sub>450</sub>	阴性血清OD <sub>450</sub> negative sera OD <sub>450</sub>	P/N	+/-
无乳链球菌 <i>S. agalactiae</i>	1.078	0.084	30.235	+
海豚链球菌 <i>S. iniae</i>	0.072	0.067	1.319	-
嗜水气单胞菌 <i>A. hydrophila</i>	0.068	0.061	1.591	-
迟缓爱德华菌 <i>E. tarda</i>	0.063	0.064	0.929	-
溶藻弧菌 <i>V. alginolyticus</i>	0.062	0.062	0.958	-

表 5 免疫血清阻断实验结果

稀释度 dilution	阻断后 post-inhibition	阻断前 pre-inhibition	阻断率/% inhibition rate
1000×	1.179	1.389	15.12
2000×	1.122	1.351	16.96
4000×	0.978	1.231	20.56
8000×	0.768	1.109	30.76
16 000×	0.604	1.109	45.58
32 000×	0.396	0.918	56.92
64 000×	0.239	0.694	65.61
128 000×	0.145	0.517	72.02
256 000×	0.104	0.328	68.24

SD=0.019, OD<sub>450</sub>平均值为1.164。板间变异系数(CV)值为3.7%, SD=0.038, OD<sub>450</sub>平均值为1.037。板内变异系数和板间变异系数均小于10%。

## 2.3 临床菌株检测

对2007—2013年从我国罗非鱼主产区收集

的44株无乳链球菌(经API 20 Strep鉴定)进行ELISA快速检测,所有44株罗非鱼源无乳链球菌ELISA检测结果显示呈阳性(表6),相对符合率为100%。

### 2.4 人工感染实验样品检测

临界值的确定 10尾不同组织的阴性样

本,即健康罗非鱼脑、肝和脾,1:10 000稀释一抗血清后进行ELISA实验。脑的临界值为0.291,肝的临界值为0.226,脾的临界值为0.503(表7)。

人工感染样品的检测 对人工感染死亡后30尾罗非鱼的脑组织进行检测,阳性检测率为100%;对人工感染后未死亡的20尾罗非鱼的脑、

表6 罗非鱼源无乳链球菌ELISA快速检测结果

Tab. 6 Detection of *S. agalactiae* isolated from the infected tilapia by ELISA

序号 no.	菌种编号 bacteria no.	采集地点 collection sites	P/N	结果 result	序号 no.	菌种编号 bacteria no.	采集地点 collection sites	P/N	结果 result
1	HN090816-1	海南	6.52	+	23	BHC110810-2	广西	13.55	+
2	HN090816-2	海南	6.21	+	24	BHC110810-3	广西	7.88	+
3	LG100621-1	海南	37.71	+	25	BHX110810-1	广西	10.69	+
4	LG100621-3	海南	5.07	+	26	BHX110810-2	广西	5.24	+
5	LG100621-4	海南	4.18	+	27	BHX110810-3	广西	20.41	+
6	LG100621-5	海南	4.98	+	28	GX1201	广西	15.01	+
7	HN20	海南	8.21	+	29	GX1202	广西	5.88	+
8	HN1201	海南	9.30	+	30	GX1203	广西	11.56	+
9	HN1202	海南	5.97	+	31	GX1204	广西	10.44	+
10	HN1203	海南	6.52	+	32	GD35	广东	12.66	+
11	HN1204	海南	3.22	+	33	GD36	广东	17.97	+
12	HN1205	海南	4.38	+	34	GD37	广东	10.50	+
13	HN1206	海南	7.82	+	35	GD45	广东	4.33	+
14	HN1207	海南	11.90	+	36	GD51	广东	8.83	+
15	HN1208	海南	18.69	+	37	GD1301	广东	23.54	+
16	HN1209	海南	6.74	+	38	GD1302	广东	15.87	+
17	LB110808-2	广西	5.51	+	39	GD1303	广东	69.63	+
18	YF110808-1	广西	21.88	+	40	GD1304	广东	8.46	+
19	YF110808-2	广西	18.31	+	41	GD1305	广东	53.89	+
20	YF110808-3	广西	4.03	+	42	FJ0701	福建	10.01	+
21	YF110808-4	广西	28.31	+	43	FJ1001	福建	53.47	+
22	BHC110810-1	广西	18.64	+	44	FJ1101	福建	75.08	+

表7 临界值的确定

Tab. 7 Determination of the cutoff

样品 samples	脑 brain	肝 liver	脾 spleen
平均值 average	0.132	0.143	0.369
标准差 SD	0.053	0.028	0.045
平均值±标准差 mean±SD	0.132±0.053	0.143±0.028	0.369±0.045
临界值 cutoff	0.291	0.226	0.503

肝和脾组织进行检测,脑组织的阳性检测率为0%,肝的阳性检测率为25%,脾的阳性检测率为50%(表8)。

### 3 讨论

罗非鱼链球菌病是由无乳链球菌和海豚链球菌引起的细菌性疾病,Chen等<sup>[9]</sup>研究表明在

表 8 人工感染样品的检测

Tab. 8 The detection of artificial infection sample

检测结果 detection result	死亡罗非鱼 dead tilapia		未死亡罗非鱼 living tilapia	
	脑 brain	脑 brain	肝 liver	脾 spleen
检测样品数/尾 samples number	30	20	20	20
阳性样本数/尾 number of positive samples	30	0	5	10
阳性检测率/% rate of positive samples	100	0	25	50

2008年以前以海豚链球菌为主要病原菌, 2009年以后以无乳链球菌为主。典型的无乳链球菌病症状为体色发黑, 眼球突出, 角膜混浊发白, 游姿平衡失调, 在水中“打转”或侧游, 体表具点状或斑块出血, 内脏器官广泛出血并引起败血症等<sup>[1]</sup>。但仍然有一些相近的革兰氏阳性球菌感染会使鱼体表现出相似的临床症状, 如海豚链球菌, 格氏乳球菌(*Lactococcus garviae*)、沙氏漫游球菌(*Vagococcus salmoninarum*)和肠球菌(*Enterococcus sp.*)等<sup>[10]</sup>。因此, 建立快速、准确的病原菌检测方法, 准确判断及鉴别致病菌, 做到对“菌”下药, 是控制罗非鱼链球菌病的关键。

无乳链球菌的检测方法主要有以细菌培养为基础的传统检测方法、分子生物学检测方法和免疫学检测方法。传统检测方法是将病原菌分离, 培养纯化后对其生理生化特征进行分析, 该方法费时长、工作量大。利用一些商品化试剂盒如API 20 Strep、Strep B OIA系统等, 可以对无乳链球菌进行快速鉴定, 但仍然无法摆脱分离、培养和生化鉴定的方法学局限, 因为其本质仍是一个微缩化的生化反应集合<sup>[11]</sup>。分子生物学技术的发展为病原菌的快速检测提供了良好的技术平台。针对根据无乳链球菌特异性序列设计的双重PCR<sup>[13-4]</sup>和三重PCR<sup>[5]</sup>、巢式PCR<sup>[6]</sup>、实时定量PCR<sup>[12]</sup>方法以及环介导等温扩增技术(LAMP)<sup>[13-15]</sup>的研究在国内外已经广泛开展, 且具有灵敏度高、特异性强、检测快速等优点, 但是费用高以及对人员的实验技能要求高。ELISA法包括间接ELISA法、双抗体夹心ELISA法和斑点ELISA法等, 被广泛应用于水产病原菌的快速检测, 如皱纹盘鲍(*Haliotis discus hannai*)的荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)<sup>[16]</sup>, 大黄鱼(*Larimichthys crocea*)的溶藻弧菌<sup>[17]</sup>, 凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)的副溶血弧菌(*V.*

*parahaemolyticus*)<sup>[18]</sup>, 大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)的迟缓爱德华菌<sup>[19]</sup>和施氏鲟(*Acipenser schrenckii*)的嗜水气单胞菌<sup>[20]</sup>等。任燕等<sup>[21]</sup>用斑点ELISA法检测致病性嗜水气单胞菌, 阳性检测率为90.3%, 和基因PCR法、16S rRNA PCR法符合率分别为91.6%和81.9%。Nishiki等<sup>[22]</sup>针对停乳链球菌(*S. dysgalactiae*)表面免疫蛋白(Sd-Sip)建立了双抗体夹心ELISA检测方法, 实验表明这是一个有效的诊断手段。张新艳<sup>[23]</sup>建立了无乳链球菌的双抗体夹心ELISA检测方法, 检测灵敏度为 $0.85 \times 10^6$  CFU/mL, 应用结果与双重PCR检测结果比较, 相对符合率为98.33%, 并认为抗体夹心ELISA法灵敏度相对高于间接ELISA; 但本研究建立的罗非鱼无乳链球菌间接ELISA法检测限仅为每孔 $10^3$  CFU, 相当于 $10^4$  CFU/mL的菌液浓度, 高于双抗体夹心ELISA法检测该菌的灵敏度。王斌等<sup>[24]</sup>用2种ELISA方法快速检测大菱鲂细菌性出血性败血症的病原菌, 也发现间接ELISA方法具有较高的灵敏度, 但双抗体夹心法由于采用了预先包被抗体的方法来检测抗原, 受检样品不需稀释, 可直接用于测定, 而间接ELISA方法虽然操作快速简单, 结果直观易于判断, 但受检样品需要稀释至一定浓度, 且酶标板对颗粒性抗原如细菌等的吸附较差。本研究参照鄢庆枇等<sup>[17]</sup>, 樊景凤等<sup>[18]</sup>报道的抗原包被后烘箱烘干法, 大大提高了细菌的吸附量。交叉实验和阻断实验结果显示与海豚链球菌、嗜水气单胞菌、迟缓爱德华菌等鱼类常见致病菌无交叉反应, 阳性血清对无乳链球菌具有特异性, 表明该方法具有较高的特异性。而重复性实验显示板内变异系数和板间变异系数均小于10%, 表明该方法稳定性和重复性良好。此外, 若将患病鱼组织匀浆上清液直接包被, 用间接ELISA方法检测也显示效果良好, 表明该方法可用于分离纯化细菌抗原和病灶组织所带细菌抗原的检测, 突破了传统检测方法和双抗体夹心法需要将病原菌分离、培养的限制。在实际工作中应根据实际条件选择适当的ELISA检测法。

用建立的间接ELISA检测方法对2007—2013年我国养殖罗非鱼体内分离的44株无乳链球菌进行检测, 阳性检测率为100%, 检测结果与之前鉴定结果一致, 相对符合率为100%。将该方法标准化后分别检测健康罗非鱼10条, 人工感染后死亡的罗非鱼30尾和未死亡的罗非鱼20

尾, 获得健康罗非鱼脑、肝和脾的临界值; 因为罗非鱼死亡时间过长可能会造成内脏糜烂或者腹水, 相比之下脑组织不易糜烂且阳性检测率为100%; 而对人工感染后未死亡的罗非鱼内脏检测显示脾的阳性检测率最高, 表明该技术不仅能够检测已发病的罗非鱼, 而且能够检测无病症带菌的罗非鱼, 故可将死亡罗非鱼脑组织列为首选检测靶组织, 未死亡罗非鱼的脾列为首选检测靶组织。实验结果表明建立的间接ELISA方法具有快速、特异、易操作等优点, 稳定、重复性好, 并可以同时检测大量样品。该方法的建立有助于快速准确地诊断由无乳链球菌引起的罗非鱼链球菌病。如果将此方法进行标准化后制备成商品试剂盒, 可有效应用于罗非鱼链球菌病的早期诊断, 有效预防疾病发生。

#### 参考文献:

- [1] 祝璟琳, 杨弘, 邹芝英, 等. 海南养殖罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 致病链球菌的分离、鉴定及其药敏试验[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(4): 590-596.  
Zhu J L, Yang H, Zou Z Y, et al. Isolation, identification and drug sensitivity test of pathogenic streptococcus from tilapias *Oreochromis niloticus* cultured in Hainan[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(4): 590-596 (in Chinese).
- [2] Li Y W, Liu L, Huang P R, et al. Chronic streptococcosis in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), caused by *Streptococcus agalactiae*[J]. Journal of Fish Diseases, 2014, 37(8): 757-763.
- [3] 樊海平, 吴斌, 张新艳, 等. 双重PCR检测罗非鱼源无乳链球菌方法的建立[J]. 福建农业学报, 2014, 29(1): 8-11.  
Fan H P, Wu B, Zhang X Y, et al. Rapid detection of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia with double PCR[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2014, 29(1): 8-11 (in Chinese).
- [4] 王均, 汪开毓, 肖丹, 等. 罗非鱼源无乳链球菌双重PCR快速检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(5): 496-502.  
Wang J, Wang K Y, Xiao D, et al. Development of double PCR for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia[J]. Chinese Veterinary Science, 2011, 41(5): 496-502 (in Chinese).
- [5] 黄锦炉, 汪开毓, 肖丹, 等. 无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)三重PCR快速检测方法的建立与应用[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(2): 254-261.  
Huang J L, Wang K Y, Xiao D, et al. The development and application of a triple PCR method for rapid detection of *Streptococcus agalactiae*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2012, 43(2): 254-261 (in Chinese).
- [6] Jiménez A, Tibatá V, Junca H, et al. Evaluating a nested-PCR assay for detecting *Streptococcus agalactiae* in red tilapia (*Oreochromis* sp.) tissue[J]. Aquaculture, 2011, 321(3-4): 203-206.
- [7] 郭玉娟, 张德锋, 樊海平, 等. 中国南方地区罗非鱼无乳链球菌的分子流行病学研究[J]. 水产学报, 2012, 36(3): 399-406.  
Guo Y J, Zhang D F, Fan H P, et al. Molecular epidemiology of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in Southern China[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(3): 399-406 (in Chinese).
- [8] 李莉萍, 王瑞, 黄婷, 等. 2007-2012年中国罗非鱼无乳链球菌流行菌株血清型分析[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(5): 469-475.  
Li L P, Wang R, Huang T, et al. Serotype of *Streptococcus agalactiae* isolated from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* in China from 2007 to 2012[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2014, 29(5): 469-475 (in Chinese).
- [9] Chen M, Li L P, Wang R, et al. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 159(3-4): 526-530.
- [10] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish[M]. Striling: Springer, 2012.
- [11] Evans J J, Pasnik D J, Klesius P H. A commercial rapid optical immunoassay detects *Streptococcus agalactiae* from aquatic cultures and clinical specimens[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 144(3-4): 422-428.
- [12] Ke D B, Ménard C, Picard F J, et al. Development of conventional and real-time PCR assays for the rapid detection of group B streptococci[J]. Clinical Chemistry, 2000, 46(3): 324-331.
- [13] Suebsing R, Kampeera J, Tookdee B, et al. Evaluation of colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay for visual detection of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* in tilapia[J]. Letters in Applied Microbiology, 2013, 57(4): 317-324.
- [14] Kimura K, Yanagisawa H, Wachino J I, et al. Rapid and reliable loop-mediated isothermal amplification method for detecting *Streptococcus agalactiae*[J]. Japanese Journal of Infectious Diseases, 2013, 66(6): 546-548.
- [15] Ke X L, Huo H H, Lu M X, et al. Development of loop-

- mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid detection of *Streptococcus agalactiae* in tilapia, *Oreochromis niloticus*[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 2014, 45(5): 586-594.
- [16] 叶林, 俞开康, 王如才, 等. 皱纹盘鲍幼鲍溃烂病病原菌的ELISA检测法[J]. 中国水产科学, 1998, 5(2): 119-123.  
Ye L, Yu K K, Wang R C, *et al.* A elisa method for detecting the pathogenic bacteria of fester disease in cultured juvenile abalone[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 1998, 5(2): 119-123 (in Chinese).
- [17] 鄢庆彬, 方恩华, 苏永全, 等. 大黄鱼溶藻弧菌LPS的间接ELISA检测[J]. 台湾海峡, 2004, 23(1): 56-61.  
Yan Q P, Fang E H, Su Y Q, *et al.* Detection of the *Vibrio alginolyticus* LPS of *Pseudosciaena crocea* by indirect ELISA[J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 2004, 23(1): 56-61 (in Chinese).
- [18] 樊景凤, 梁玉波, 宋立超, 等. 凡纳滨对虾红体病原菌间接ELISA快速检测方法的研究[J]. 水产学报, 2006, 30(1): 113-117.  
Fan J F, Liang Y B, Song L C, *et al.* Indirect ELISA method for detecting the pathogenic bacteria of *Litopenaeus vannamei* red body disease[J]. Journal of Fisheries of China, 2006, 30(1): 113-117 (in Chinese).
- [19] 白方方, 兰建新, 王燕, 等. 迟缓爱德华氏菌间接ELISA快速检测法[J]. 中国水产科学, 2009, 16(4): 619-625.  
Bai F F, Lan J X, Wang Y, *et al.* Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rapid detection of *Edwardsiella tarda*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16(4): 619-625 (in Chinese).
- [20] 刘双凤, 邹作宇, 韩志忠, 等. 施氏鲟病原嗜水气单胞菌ELISA快速检测方法的研究[J]. 淡水渔业, 2009, 39(6): 69-73.  
Liu S F, Zou Z Y, Han Z Z, *et al.* Indirect ELISA method for detecting the hemorrhagic septicemia pathogen of sturgeon, *Acipenser schrenckii*[J]. Freshwater Fisheries, 2009, 39(6): 69-73 (in Chinese).
- [21] 任燕, 潘子豪, 陆承平, 等. Dot-ELISA法检测致病性嗜水气单胞菌[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(10): 1409-1415.  
Ren Y, Pan Z H, Lu C P, *et al.* Detection of Pathogenic *Aeromonas hydrophila* by Dot-ELISA[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2011, 42(10): 1409-1415 (in Chinese).
- [22] Nishiki I, Minami T, Itami T, *et al.* Cloning and expression of a surface immunogenic protein in *Streptococcus dysgalactiae* isolated from fish and its application in enzyme-linked immunosorbent assays to diagnose *S. dysgalactiae* infections in fish[J]. Journal of Fish Diseases, 2014, 37(12): 1031-1039.
- [23] 张新艳. 罗非鱼无乳链球菌双抗体夹心ELISA检测方法的建立[J]. 福建农业学报, 2014, 29(6): 570-574.  
Zhang X H. Establishment of DAS-ELISA Detection for *Streptococcus agalactiae* in tilapia[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2014, 29(6): 570-574 (in Chinese).
- [24] 王斌, 范薇, 李艳, 等. 用两种ELISA方法快速检测大菱鲆细菌性出血性败血症的病原菌[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23(4): 252-257.  
Wang B, Fan W, Li Y, *et al.* Tow rapid ELISA methods for detection of pathogenic bacteria of hemorrhagic septicemia in cultured turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Journal of Dalian Fisheries University, 2008, 23(4): 252-257 (in Chinese).



## Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rapid detection of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia

ZHU Jinglin, LI Dayu, XIAO Wei, ZOU Zhiying, YANG Hong\*

(Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization,  
Ministry of Agriculture Freshwater Fisheries Research Center,  
Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** A bacterium LB110808-2 was isolated from the spleen of a moribund tilapia in August 2011 in Guangxi Province, and identified as *Streptococcus agalactiae* by 16 S rRNA gene. The antisera against strain LB110808-2 were obtained from the New Zealand white rabbit. The titer of the polyclonal antibody was 1 : 2560. This polyclonal antibody was used as primary antibody in indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The goat anti-rabbit IgG-HRP was used as secondary antibody. The indirect ELISA method of rapid detection of *S. agalactiae* was developed. The basic procedure of the indirect ELISA was as follows: *S. agalactiae* antigen was diluted with 0.05 mol/L Carbonate buffer (pH 9.6) and 100  $\mu$ L diluted antigen was added to each well of the 96 well plate, followed by drying out at 60 °C. The plate was washed three times with 300  $\mu$ L of PBST (PBS+0.2% Tween 20) buffer, and 300  $\mu$ L of 1% BSA blocking buffer (1% Albumin from bovine serum in PBST) was added to each well and the plate was incubated at 37 °C for 1 h. Subsequently, the plate was washed three times with PBST buffer, and each well was added with diluted positive serum or negative serum before incubating the plate at 37 °C for 1 h. Each well of the plate was added with goat anti-rabbit IgG-HRP after the plate was washed with PBST buffer three times. The plate was then incubated at 37 °C for 1 h, and was washed three times with PBST buffer. Each well was added 100  $\mu$ L single-component TMB soluble substrate solution. The plate was then incubated at 37 °C for 20 min in dark place. The reaction was terminated with 50  $\mu$ L 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The value of OD<sub>450</sub> was determined by the ELISA reader.

The optimum coated concentration of the antigen was determined to be 10<sup>6</sup> CFU/mL using chessboard titration method. The optimum antiserum concentrations of the primary antibody and the enzyme linked secondary antibody were determined to be 1 : 10 000 and 1 : 1000, respectively. The sensitivity of the serum was tested, and the sensitivity of *S. agalactiae* that can be detected was 10<sup>3</sup> CFU. Cross reactions of the antiserum with the strains of other common aquatic pathogenic bacteria were detected, and all the results were negative. Inhibition rate was 72.02% in inhibition test. The cross assay and the inhibition assay indicated that this method had high specificity. The method was optimized and standardized to detect the infected *S. agalactiae* isolated from the diseased tilapia from 2007 to 2013. All the 44 bacterial strains tested were positive, with a 100% positive detection rate. Next, we conducted the test of artificial infection using the *S. agalactiae*. Seventy percent of the fish were dead. Among the dead fish, 30 samples were detected from the brain tissue, and the positive detection rate was 100%. Among the live fish, 20 samples were detected from the brain, liver and spleen. None was positive from the brain tissue, but the liver and spleen were detected as positive, accounting for 25% and 50%, respectively. These results indicated that this assay can be used to detect not only the dead fish, but also the carrier. Thus, the established indirect ELISA method is very important for rapid and accurate diagnosis of tilapia infected by *S. agalactiae* at the early stage.

**Key words:** *Oreochromis* sp.; *Streptococcus agalactiae*; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); detection at the early stage

**Corresponding author:** YANG Hong. E-mail: yangh@ffrc.cn

**Funding projects:** Special Scientific Research Funds for Central Non-profit Institutes (2015JBFM27); Earmarked Fund for China Agriculture Research System (CARS-49); Tilapia Original Breeding