

文章编号:1000-0615(2009)04-0679-06

## 豚鼠气单胞菌胶体金免疫层析试纸条的研制

辛志明, 樊海平, 吴斌, 张新艳

(福建省淡水水产研究所, 福建 福州 350002)

**摘要:**采用淋巴细胞杂交瘤技术制备抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体分泌细胞株,获取抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体,柠檬酸三钠还原氯金酸制备胶体金颗粒,选择直径20 nm的胶体金颗粒,标记抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体并制备胶体金垫。将胶体金垫与喷涂有抗豚鼠气单胞菌兔多克隆抗体和羊抗鼠抗体的硝酸纤维素膜及样品吸收垫等组装成免疫层析试纸条,建立豚鼠气单胞菌的快速检测方法。用灭活细菌与血清混合的模拟样本测定试纸条的特异性、灵敏度,结果显示,试纸条对嗜水气单胞菌、温和气单胞菌、鳃弧菌、溶藻弧菌、荧光假单胞菌、副溶血弧菌等13种常见病原菌没有交叉反应,与豚鼠气单胞菌显示特异性反应,检测灵敏度为 $1 \times 10^6$  CFU/mL,结果显示时间小于5 min。研制的豚鼠气单胞菌胶体金免疫层析检测试纸条具有快速、简便、特异性高、适用于基层临床生产推广应用等优点。

**关键词:**豚鼠气单胞菌;杂交瘤技术;单克隆抗体;胶体金;免疫层析

**中图分类号:**S 917

**文献标识码:**A

豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)是水产养殖中常见的条件致病菌,传染途径为通过伤口侵袭宿主,具有发病快、流行广、导致死亡率高等特点,严重影响水产养殖业的发展<sup>[1-2]</sup>。按常规的细菌分离鉴定豚鼠气单胞菌程序复杂费时,易延误防治时机,因此,建立快速准确、及时的检测技术是控制豚鼠气单胞菌危害的基本前提。国内对豚鼠气单胞菌的检测也进行了一系列的研究,李学勤、杨振国等报道利用兔抗豚鼠气单胞菌多克隆抗体检测豚鼠气单胞菌<sup>[3-4]</sup>;黄威权等<sup>[5]</sup>报道了将抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体应用于豚鼠气单胞菌免疫学检测<sup>[5]</sup>;林业杰等<sup>[6]</sup>建立了豚鼠气单胞菌的噬菌体检测技术,但存在一定的交叉反应。已建立的这些方法存在着不便于基层生产应用、特异性差、检测过程长等缺点。

胶体金免疫层析技术由于其快速、便捷、不需特殊设备、结果判断直观等优势,越来越受到人们的重视。本文报道了利用单克隆抗体和胶体金标记技术建立豚鼠气单胞菌胶体金免疫层析快速检测方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*) (参考株、Jx01-1、M316、ZJ03-A1、ZN1、拓荣 01618、TPS30、草鱼眼、浙大、M0010408g3、Bah3、Ah342-2、FH01-b1、M0010402F1、江田、M0052804、CHS33、Ah961004、PM203、Ah10501、M0010325F、YT-1、BL1、HL-605、Bah2、M0023162、M00041005、WC、H326、CQ3、13-3、水大)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) (参考株)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*) (参考株)由福建省农业科学院鱼病研究中心提供。荧光假单胞菌(*Pseudomonas pseudomallei*) (03151)、副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) (03128)、哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*) (03152)、易损气单胞菌(*Aeromonas trota*) (10067)、耶尔森氏肠炎菌(*Yersinia enterocolitica*) (耶尔森)由中国农业部渔业动植物病原库提供。温和气单胞菌(*A. sobria*) (96-5)、非O1群霍乱弧菌(Non-O1 *Vibrio*

收稿日期:2008-05-28

修回日期:2008-08-14

资助项目:海洋与渔业科技项目(闽海渔科05201号)

通讯作者:樊海平, Tel:0591-83796968, E-mail: fanhaiping@tom.com

cholerae)(96-2)、嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)(96-17)、鳃弧菌(*V. anguillarum*)(NA1)、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)(参考株)、豚鼠气单胞(*A. caviae*)(AB40511NA、AB40511NA1)、无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)(TL60829NA)、鲁氏不动杆菌(*Acinetobacter lwoffii*)(96-6)、迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)(Al60306NA1、Js60516NA2)由福建省淡水水产研究所水产动物病害控制实验室分离保存。

## 1.2 试验方法

**细菌抗原制备** 将1.1菌株经LB培养基增菌、计数,3 000 r/min离心20 min后收集菌体。0.4%甲醛灭活,3 000 r/min离心20 min,收集灭活菌体。

将收集的灭活豚鼠气单胞菌(AB40511NA1)用无菌生理盐水调整菌体浓度为 $1 \times 10^9$  CFU/mL,作为灭活抗原免疫动物;用小牛血清10倍稀释,调整浓度为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^9$  CFU/mL作为模拟阳性样本用于测试试纸条的灵敏度。其它灭活菌株用小牛血清稀释,调整菌体浓度为 $1 \times 10^8$  CFU/mL,作为模拟阴性样本用于测试试纸条的特异性。

**抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立和抗体制备** 按常规方法进行<sup>[7]</sup>。

**抗豚鼠气单胞菌多克隆抗体的制备** 按细菌抗原制备中描述的方法制备抗原,取经灭活的豚鼠气单胞菌抗原0.5 mL,多点注射免疫新西兰兔,两周后追加免疫,间隔一周再加强免疫一次,第4次免疫后检测兔血清效价,动脉取血,离心,上清于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

**抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体小鼠腹水制备、效价测定、特异性分析与亚类鉴定** 腹水制备抗体,按常规方法进行;单克隆抗体效价测定、特异性分析与亚类鉴定采用ELISA法<sup>[7]</sup>。

**抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体的纯化与纯度鉴定** 葡萄球菌蛋白A亲和层析纯化法和SDS-PAGE电泳法<sup>[7]</sup>。

**抗体预处理** 取纯化后抗体,经生理盐水稀释,0.3 mol/L KCNS中 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 透析12 h,0.2 mol/L pH 9.6硼酸盐缓冲液中 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 透析12 h,期间换液4次,经PEG浓缩后收集。在260 nm和280 nm波长处测定OD值,计算抗体浓度,调整浓度至2 mg/mL, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

**抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体抗原结合位点的分析** 采用Western-blotting法<sup>[7]</sup>。

**胶体金的制备** 采用Frens法<sup>[8]</sup>。

**免疫胶体金最适标记pH的确定** 用0.05 mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 和0.1 mol/L HCl分别将胶体金溶液的调至不同pH梯度。取不同pH的胶体金1.5 mL,分别加入按抗体预处理中处理的单克隆抗体10  $\mu\text{L}$ ,迅速混匀,室温下放置30 min后,加入5% KCl 50  $\mu\text{L}$ ,混匀后静置4 h。观察颜色变化较小的组为稳定组,该pH为最适标记酸碱度。

**免疫胶体金最适标记蛋白浓度的确定** 用0.05 mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$ 和0.1 mol/L HCl将胶体金溶液调至最适pH。取按抗体预处理中处理后的单克隆抗体设置不同蛋白梯度量,再加入最适pH的胶体金溶液1.0 mL,混匀。 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 放置40 min,加入5% KCl 50  $\mu\text{L}$ ,混匀后静置4 h。观察颜色变化较小的组,记录加入的单克隆抗体蛋白量,该蛋白浓度为最适标记浓度。

**硝酸纤维素膜的处理** 硝酸纤维素膜经1%  $\text{CH}_3\text{OH}$ (含0.5 mol/L NaCl)漂洗后, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 温箱干燥。将羊抗鼠二抗、兔抗豚鼠单胞菌多克隆抗体用pH 7.6的0.05 mol/L PBS(0.5 mol/L NaCl,0.05% Tween-20)稀释,12 000 r/min离心10 min,以2  $\mu\text{L}/\text{cm}$ 量喷涂于硝酸纤维素膜的质控线与检测线位置, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 温箱干燥2 h,pH 7.6的0.05 mol/L PB(2% BSA,0.1 mol/L NaCl,0.3% Tween-20)封闭, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 温箱干燥4 h。

**抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体的胶体金标记**

按抗体预处理中的方法,将处理后的抗体,12 000 r/min离心10 min去除沉淀蛋白。取10 mL胶体金溶液,加入0.2 mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$ (1% PEG、15% Tween-20)200  $\mu\text{L}$ ,冰浴条件下,加入抗体反应20 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$  12 000 r/min离心60 min,弃上清;用pH 9.6的0.2 mol/L硼酸盐缓冲液(1% BSA,0.02% PEG,0.3% Tween-20,0.1 mol/L NaCl)10 mL重悬沉淀, $4\text{ }^\circ\text{C}$  12 000 r/min离心60 min,弃上清,重复1次,pH 7.6的0.05 mol/L PB(1% BSA,0.02% PEG,12% 蔗糖,0.3% Tween-20,1%  $\text{NaN}_3$ ,0.1 mol/L NaCl)重悬沉淀, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 贮存备用。

**胶体金垫的处理** 玻璃纤维膜用1%  $\text{CH}_3\text{OH}$ 漂洗后,在pH 7.4的0.05 mol/L PBS(1% Tween-20)中浸泡20 min后, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 干燥2 h。

将金标抗体均匀喷涂于玻璃纤维膜上,37 °C 过夜干燥。

**样品垫的处理** 玻璃纤维素膜用 pH 7.4 的 0.2 mol/L PB (1% Tween-20, 0.5 mol/L NaCl) 浸泡 20 min 后,37 °C 温箱中干燥过夜。

**试纸条的组装** 将吸水纸、包被硝酸纤维素膜、喷涂玻璃纤维、玻璃纤维从上到下依次固定于不干胶底板上,即成试纸条,与干燥剂一起装入铝箔袋内,密封贮存。

**试纸条的检测特异性分析** 拆开试纸条密封袋,恢复至常温,取按细菌抗原制备中的方法制备的模拟阳性、阴性样本 100  $\mu$ L 滴加在试纸条的加样孔内,5 min 内观察检测结果。

**灵敏度检测** 拆开试纸条密封袋,恢复至常温,取按细菌抗原制备中的方法制备的豚鼠气单胞菌模拟阳性标本 100  $\mu$ L 滴加在试纸条的加样孔内,5 min 内观察检测结果。

**稳定性检测** 将胶体金试纸条放置于 37 °C 恒温箱和 4 °C 冰箱环境中,进行保质期和热稳定性试验。试验期间,每隔 7 d 随机抽取试纸条,参照细菌抗原制备中的方法设阳性样本、阴性样本(牛血清)、PBS 3 组,每组重复测试 5 次,检验产品稳定性。

## 2 结果

### 2.1 抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体杂交瘤细胞株建立

经细胞融合、筛选、建株,共获得 3 株能稳定分泌抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 1F10、1C4、0E10。

### 2.2 抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体免疫球蛋白亚类鉴定

利用羊抗鼠 IgG 各亚类抗体经夹心 ELISA 法测定,1C4、1F10 属 IgG<sub>2a</sub>, 0E10 属 IgG<sub>3</sub>。

### 2.3 抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体腹水制备与效价测定

5 周龄的 Balb/c 小鼠制备腹水,测定抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体效价,1F10 为 1:5.12  $\times$  10<sup>-4</sup>, 0E10, 1C4 为 1:2.56  $\times$  10<sup>-4</sup>。

### 2.4 抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体特异性分析

抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体与嗜水气单胞菌(MC316、9617、JX01-1、参考株)、温和气单胞菌(参考株、96-5)、鳃弧菌(标准株、NA1)、溶藻弧

菌(参考株)、副溶血弧菌(参考株)、非 O1 群霍乱弧菌(96-2)无交叉反应,与豚鼠气单胞菌(AB40511NA1)、豚鼠气单胞菌(AB40511NA)有阳性反应。

### 2.5 抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体的纯化与纯度鉴定

纯化的抗体与纯化后的杂蛋白经 SDS-PAGE 电泳后显示,纯化后的抗体纯度较高(图 1)。

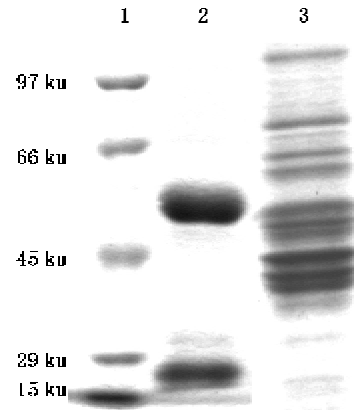


图 1 抗体纯化 SDS-PAGE 电泳分析

泳道 1: 蛋白质标准样品;泳道 2: 亲和纯化后的 IgG;泳道 3: 纯化后的杂蛋白

Fig.1 SDS-PAGE analysis of McAb purified with Protein A

Lane 1: Protein marker; lane 2: purified IgG with protein A; lane 3: Flowthrough

### 2.6 抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体抗原结合位点的分析

Western-blotting 结果表明 3 株抗豚鼠气单胞菌单克隆抗体主要针对豚鼠气单胞菌的 3 个不同的抗原表位(图 2)。

### 2.7 胶体金的制备

经过紫外分光光度计波长扫描观察测定,光谱扫描最大吸收峰在 524 nm 处,所制备的胶体金颗粒均匀度较高,应用电子显微镜观察测定颗粒直径为 20 nm(见图 3、4)。

### 2.8 试纸条的特异性分析

将组装后的试纸条与嗜水气单胞菌(33 株)、鳃弧菌(2 株)、非 O1 群霍乱弧菌(1 株)、荧光假单胞菌(1 株)、副溶血弧菌(1 株)、温和气单胞菌(2 株)、溶藻弧菌(1 株)、哈维氏弧菌(1 株)、易损气单胞菌(1 株)、耶尔森氏肠炎菌(1 株)、无乳糖链球菌(1 株)、鲁氏不动杆菌(1 株)、迟钝爱德华氏菌(2 株)13 种 48 株水产细菌呈阴性反应,

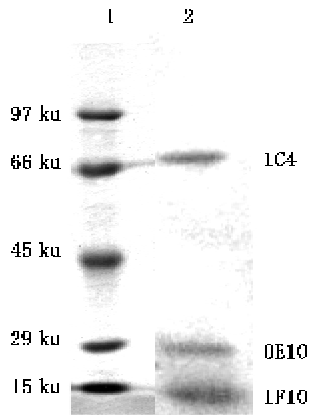


图2 三株单抗的抗原表位分析

泳道1: 蛋白质标准样品; 泳道2: 1C4, 0E10, 1F10 Western-blotting 杂交印迹

Fig.2 Western-blotting assay of 1C4, 0E10, 1F10

Lane 1: Pre-stained protein marker; lane 2: Western-blotting assay of 1C4, 0E10, 1F10

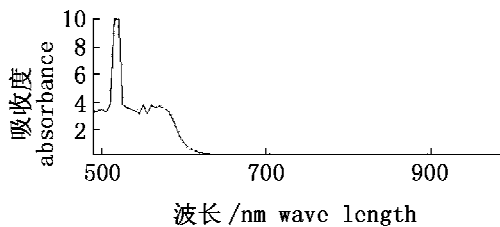


图3 胶体金颗粒紫外分光光度计扫描图

Fig.3 The spectrum of the colloidal gold

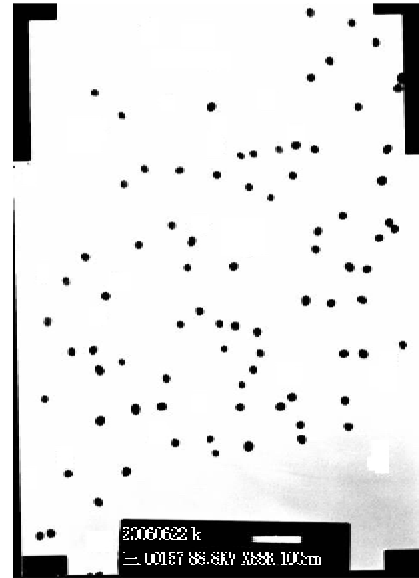


图4 胶体金颗粒透射电子显微镜扫描图

Fig.4 Colloidal gold scanned by transmission electron microscopy

实验室分离的2株豚鼠气单胞菌菌株均为阳性反应。特异性检测所用的菌株均已经过种类鉴定,说明本试纸条与测试菌株无交叉反应。

### 2.9 试纸条的灵敏度检测

胶体金试纸条对模拟阳性样本检测的灵敏度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL(表1)。

表1 试纸条检测豚鼠气单胞菌(AB40511NA1)灵敏度试验结果

Tab.1 The sensitivity of strip to *Aeromonas caviae* (AB40511NA1)

菌株 strain	细菌浓度 bacteria concentration(CFU/mL)					
	$1 \times 10^8$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^3$
豚鼠气单胞菌 AB40511NA1 <i>Aeromonas caviae</i> AB40511NA1	+++	++	+	-	-	-

## 3 讨论

### 3.1 豚鼠气单胞菌胶体金快速检测试纸条在应用中的思考

本文建立的胶体金免疫层析检测试纸条进行了实验室模拟样本的测试,灵敏度与特异性测定所采用的菌株均经过生理生化鉴定,检测结果显示检测特异性强、灵敏度高、使用便捷。在水产疾病的诊断过程中,胶体金试纸条的测试结果将为病原菌的感染种类确定提供重要的参考信息。

### 3.2 豚鼠气单胞菌胶体金快速检测试纸条的优势与不足

国内报道利用兔抗豚鼠气单胞菌多克隆抗体检测豚鼠气单胞菌<sup>[3-4]</sup>,但该检测方法存在检测时间长、检测特异性差、不便临床应用、需要昂贵的检测设备及专业技术人员等问题。林业杰等<sup>[6]</sup>将鉴定后选出的9株噬菌体液按比例混合,配制成一种诊断液用于豚鼠气单胞菌的诊断,结果发现有85%左右的菌株可在收到标本后36~48 h内作出初步报告,减少了大量菌株生化鉴定

的工作量和试验材料。该诊断液对属的特异性较强,对属外的常见弧菌均未见交叉裂解,但种的特异性较低,对属内的嗜水气单胞菌和温和气单胞菌的交叉裂解较普遍。黄威权等<sup>[5]</sup>报道的豚鼠气单胞菌单克隆抗体可以应用于 ELISA 试剂盒的组装,该方法检测灵敏度高、特异性好,但存在检测时间长、不便临床应用、需要昂贵的检测设备及专业的技术人员等问题。

本文建立的胶体金免疫层析快速检测试纸条具有快速、简便、特异性好、不需要辅助设备、检测人员专业技术要求低等优点,适合用于大批量的现场疾病诊断,适合流行病学调查,对豚鼠气单胞菌的感染、污染检测起辅助作用。胶体金免疫层析方法是基于免疫学反应与胶体金标记技术的一种诊断方法,在菌体大颗粒抗原的检测应用上存在检测灵敏度比较低的缺点,检测灵敏度较 ELISA 法低<sup>[9]</sup>。

### 3.3 检出率的提高

对细菌性病原的快速、高灵敏度的检测是诊断和有效防治细菌性疾病的重要前提。但是在感染早期或刚发病的鱼体内含菌量较低的情况下,存在由于胶体金试纸条灵敏度的不足导致检出率比较低的问题。临床应用上,可以通过增菌后检测来弥补检出率上的不足。

### 3.4 抗体的标记 pH

抗体与胶体金之间的电荷引力是实现标记的重要作用力之一,当标记的 pH 低于抗体蛋白的等电点时蛋白带有正电荷,与带负电荷的胶体金颗粒发生强烈的吸引作用而达到标记效果。在标记条件摸索过程发现,选用的 1F10 单克隆抗体的最适标记 pH 为 9.6,与其他文献报道的 7.0~8.3 的 pH 条件存在较大的差异<sup>[10-11]</sup>。这可能与 1F10 单克隆抗体的氨基酸组成和序列有关。

### 3.5 多种细菌的快速检测试纸条研制

本文报道的试纸条是针对豚鼠气单胞菌单一细菌进行检测,但是导致水产养殖动物病害发生

的细菌复杂多样,所以要建立起完善的检测体系还需要针对不同的细菌建立起胶体金免疫层析检测方法,才能满足临床生产应用的要求,实现在同一个试纸条上同时对多细菌进行检测,不仅可以降低成本还能极大提高检测效率。

### 参考文献:

- [1] 樊海平,曾占壮. 由豚鼠气单胞菌引起的欧洲鳗鲡败血症[J]. 水产学报,1999,23(3):313-318.
- [2] 安利国,傅荣恕,邢维贤,等. 鲤竖鳞病病原及其疫苗的研究[J]. 水产学报,1998,22(2):136-142.
- [3] 李学勤,王振英,马家好,等. 淡水鱼类主要细菌性传染病快速诊断的研究 I. SPA-CoA 检测 6 株运动型气单胞菌[J]. 中国兽医学报,1997,17(1):33-35.
- [4] 杨振国,李学勤,王振英,等. 淡水养殖鱼类主要细菌性传染病快速诊断的研究—直接荧光抗体法检测 6 株鱼类致病菌[J]. 黑龙江畜牧兽医,1997,8:5-8.
- [5] 黄威权,师建国,唐旭. 豚鼠气单胞菌抗独特型单克隆抗体的制备和初步鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2006,22(5):644-645.
- [6] 林业杰,张琳,胡海林. 用噬菌体诊断豚鼠气单胞菌[J]. 中国公共卫生,1997,13(7):394-395.
- [7] 金伯泉. 细胞和分子免疫学实验技术[M]. 西安:第四军医大学出版社,2002:9-54.
- [8] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions[J]. Nature,1973,241:21.
- [9] 樊景凤,梁玉波. 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.
- [10] 李伟,王静胡,孔新. 应用胶体金免疫层析技术建立炭疽杆菌芽孢的快速检测方法[J]. 中国国境卫生检疫杂志,2004,27(6):329-331.
- [11] 杜玉萍,陈清,王雅贤. 胶体金免疫层析法检测金黄色葡萄球菌的初步研究[J]. 热带医学杂志,2006,6(6):650-652.

## A rapid immunochromatography test format for *Aeromonas caviae* detection

XIN Zhi-ming, FAN Hai-ping, WU Bin, ZHANG Xin-yan

(The Freshwater Fisheries Research Institute of Fujian Province, Fuzhou 350002, China)

**Abstract:** *Aeromonas caviae* is a pathogenic bacterium that can infect various farmed fishes, and cause high mortality. Thus, a rapid and sensitive technique is necessary for the detection of the bacteria to prevent further economic losses. For rapid and simple examination, an immunochromatographic lateral flow assay system (GICA) was developed. In GICA, the rabbit anti-*A. caviae* antibody applied to nitrocellulose membrane acts as a capture reagent for the target analyte in a sample, and the monoclonal antibody against *A. caviae* conjugated with colloidal gold acts as signal generator. Sodium citrate was used as reducer to donate electrons to the positively charged gold ions in solution and colloidal gold particles was produced. The size of colloidal gold particles was checked by a transmission electron microscope (TEM), and the TEM images showed the average diameter of colloidal gold particles was almost the same size; approximately 20.0 nm in diameter. We produced monoclonal antibody against *A. caviae* by hybridoma technology. After cloning, three strains of hybridoma named 0E10, 1C4 and 1F10 were obtained. An absorbing pad, often paper, is attached to nitrocellulose membrane. On the nitrocellulose membrane, rabbit anti-*A. caviae* antibody was used as a capture antibody at the test line (T) and goat anti-mouse IgG antibody was used as the capture antibody at the control line (C). A conjugate pad which was attached to the nitrocellulose membrane contains gold particles conjugated with 1F10 monoclonal antibody specific to the analyte being detected. A sample pad, usually glass fiber, is attached to the conjugate pad. During detection, the liquid sample migrates by capillary diffusion through the conjugate pad, rehydrating the gold conjugate and allowing the interaction of the sample analyte with the conjugate. The complex of gold conjugate and analyte then moves onto the nitrocellulose membrane and migrates towards the test line (T), where it becomes immobilized and produces a distinct signal in the form of a sharp red line. A second line, a control line (C), was also formed on the membrane by excess gold conjugate, indicating the test is complete. The preliminary feasibility study of this method was described as follows: the sensitivity of the GICA test strip towards *A. caviae* was high with a detection limit of  $1 \times 10^6$  CFU/mL, The specificity of the assay is 100% with no cross-reaction being observed with thirteen bacteria of aquaculture pathogens such as *A. hydrophila*, *A. sobria*, *Vibrio alginolyticus* etc., Accurate reading time needed for confirmation of the assay can be completed in 5 min with a liquid sample of 100  $\mu$ L, The GICA test strip is stable at room temperature for 6 months or more (data not shown). This study indicated that the GICA test strip assay system provided high sensitivity and specificity for the detection of *A. caviae* at low concentration. The assay is rapid, simple, cheap, and does not require any sophisticated equipment. Thus, the GICA test strip will be a useful technique for rapid diagnosis of *A. caviae* infection.

**Key words:** *Aeromonas caviae*; hybridoma technology; monoclonal antibody; colloidal gold; immunochromatography