

# 水产品中人鱼共患细菌性病原分子生物学 检测方法研究进展

高子惠<sup>1</sup>, 朴永哲<sup>1</sup>, 宫月<sup>2</sup>, 张璜<sup>3</sup>, 郑秋月<sup>1\*</sup>, 曹际娟<sup>1\*</sup>

(1. 大连民族大学生命科学学院, 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 大连 116600;  
2. 大连海关技术中心, 大连 116001; 3. 广州双螺旋基因技术有限公司, 广州 510630)

**摘要:** 水产行业是国民经济重要产业之一, 水产养殖过程中病原微生物造成鱼类病害频发, 人鱼共患病原菌会对人类健康构成威胁, 水产品安全问题日益突出。人鱼共患病原菌检测方法对于病害的发现、预防及水产行业的健康可持续发展具有重要意义。人鱼共患病原菌包括人鱼共患细菌性病原和人鱼共患寄生虫病原等。本文对水产品中常见的人鱼共患细菌性病原的种类及其危害性、细菌性病原分子生物学检测方法的原理和应用及成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)基因编辑技术在病原菌检测方面的最新研究进展进行了综述, 为研发易携带且简便快速的新型核酸检测方法及产品及水产品中人鱼共患病原菌的检测和防治提供参考和借鉴。

**关键词:** 水产品; 人鱼共患细菌性病原; 分子生物学; 成簇的规律间隔的短回文重复序列

## Research progress on molecular biological detection methods for bacterial pathogen common to humans and fish in aquatic products

GAO Zi-Hui<sup>1</sup>, PIAO Yong-Zhe<sup>1</sup>, GONG Yue<sup>2</sup>, ZHANG Huang<sup>3</sup>, ZHENG Qiu-Yue<sup>1\*</sup>, CAO Ji-Juan<sup>1\*</sup>

(1. Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization of Ministry of Education, College of Life Science, Dalian Minzu University, Dalian 116600, China; 2. Dalian Customs Technology Center, Dalian 116001, China;  
3. Guangzhou Double Helix Gene Technology Co., Ltd., Guangzhou 510630, China)

**ABSTRACT:** The aquatic industry is one of the important industries in the national economy. In the process of aquaculture, pathogenic microorganisms cause frequent fish diseases, and the bacterial pathogen common to humans and fish also pose a threat to human health. The safety of aquatic products is becoming increasingly prominent. The detection methods of bacterial pathogen common to humans and fish is of great significance for the discovery and prevention of diseases and the healthy and sustainable development of the aquatic industry. The pathogenic bacteria common to humans and fish include symbiotic bacterial pathogens and symbiotic parasitic pathogens. This paper reviewed the species and harmfulness of common fish and human bacterial diseases in aquatic products, the principle and application of molecular biology detection methods for bacterial pathogen, and the latest research progress of clustered regularly

**基金项目:** 大连市揭榜挂帅项目(2021JB12SN039)、辽宁省“兴辽英才计划”项目(XLYC2002106)

**Fund:** Supported by the Dalian City Unveiled Project (2021JB12SN039), and the Liaoning “Xingliao Talent Plan” Program (XLYC2002106)

**\*通信作者:** 郑秋月, 博士, 研究员, 主要研究方向为生物与食品安全。E-mail: zhengqy@dlnu.edu.cn

曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向为生物与食品安全。E-mail: caojijuan@dlnu.edu.cn

**\*Corresponding author:** ZHENG Qiu-Yue, Ph.D, Professor, Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization of Ministry of Education, Dalian Minzu University, No.18, Liaohe West Road, Xipu New District, Dalian 116600, China. E-mail: zhengqy@dlnu.edu.cn

CAO Ji-Juan, Ph.D, Professor, Key Laboratory of Biotechnology and Bioresources Utilization of Ministry of Education, Dalian Minzu University, No.18, Liaohe West Road, Xipu New District, Dalian 116600, China. E-mail: caojijuan@dlnu.edu.cn

interspaced short palindromic repeats (CRISPR) gene editing technology in pathogenic bacteria detection, so as to provide references for the research and development of portable, simple and rapid new nucleic acid detection methods, products and the detection and prevention of bacterial pathogen common to humans and fish in aquatic products.

**KEY WORDS:** aquatic products; bacterial pathogen common to humans and fish; molecular biology; clustered regularly interspaced short palindromic repeats

## 0 引言

我国水域资源辽阔, 水产养殖生产加工业发展迅速, 颇具规模的集中化高产量养殖方式具有节约资源与空间的优势, 在一定程度上提高了水产品的产量。但高密度、高数量的养殖模式破坏了水体的微生态平衡, 各种病原微生物的迅速繁衍导致水产品患病概率增加, 养殖病害频繁暴发。从我国全国水产养殖行业病害情况来看, 每年约有 200 多种水产品病害是由病原菌引起的, 造成 50% 以上的发病率, 导致 20% 的经济损失<sup>[1]</sup>。据联合国粮食与农业组织 2020 年《世界渔业和水产养殖现状》报告, 预计 2030 年鱼类总产量将增至 2.04 亿 t, 较 2018 年增长 15%, 人均鱼类消费量预计为 21.5 kg<sup>[2]</sup>, 鱼类产品需求逐年增加。鱼类的大部分病害是由人鱼共患病原菌引起, 人鱼共患病原菌对人类健康也存在严重威胁<sup>[3]</sup>。因此, 加强水产养殖过程中鱼病监测, 及早发现病害并采取预防措施, 防止疫病扩散流行, 确保水产养殖卫生和水产品质量安全尤为重要。

常见感染水产品的病原微生物主要有 3 种类型, 第一种是弧菌、爱德华氏菌、假单胞菌等细菌性病原, 第二种是绦虫、车轮虫等寄生虫类病原, 第三种是鲤春病毒等病毒性病原<sup>[4]</sup>。其中细菌性鱼病的发病率和致死率都接近或超过 50%, 并且随着高密度、集约化程度的提高而呈上升趋势, 水产病害已成为我国水产业持续、健康发展的制约因素<sup>[5]</sup>。病原菌的早期检测对于保障水产品质量安全具有重要意义, 常见细菌性病原检测方法包括微生物培养鉴定的生化方法、以抗原抗体特异性反应为基础的免疫学方法和发展迅速的分子生物学方法等。本文重点介绍水产品中主要的人鱼共患病原菌种类及其危害性, 分子生物学检测方法及应用, 以及最新的基因编辑技术簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)在病原菌检测中的应用等, 为水产品中人鱼共患病原菌的检测和防治提供参考和借鉴。

## 1 人鱼共患病原菌种类及危害性

### 1.1 假单胞菌

假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)作为一种专性需氧的革兰氏阴性杆菌, 在空气、水、土壤环境、食物中分布广泛, 包括铜绿假单胞菌、荧光假单胞菌、丁香假单胞菌、恶臭假单胞菌、施氏假单胞菌等。荧光假单胞菌是典型的条件致病菌, 可引发草鱼、鲤鱼等淡水鱼类和热带鱼、真鲷和石斑鱼、鲑科鱼类的赤皮病<sup>[6]</sup>。水型点状假单胞菌是能引

起金鱼、鲤、鲫等多种鱼类患有竖鳞病的条件致病菌, 常在静水养鱼池和高密度养殖条件下引发疾病。其他假单胞菌也会引起鲫鱼、银鱼、虹鳟等鱼类出现严重的败血症症状<sup>[4]</sup>。假单胞菌同样能够感染人类, 其中以铜绿假单胞菌感染居多, 当人体出现免疫力严重下降、长期使用广谱抗生素或者大面积外伤等状况时, 该菌可导致皮肤、呼吸道、消化道、泌尿道和骨髓等部位的感染<sup>[7]</sup>。

### 1.2 气单胞菌

气单胞菌(*Aeromonas* spp.)属气单胞菌科, 是广泛分布于水环境中的革兰氏阴性菌群, 可以从淡水、海水、污水、患病鱼类、食品及动物粪便中分离, 是典型的人鱼共患病原菌, 易引起人类偶发性感染, 引发肠道疾病或食物中毒等。危害较大的气单胞菌有豚鼠气单胞菌、达克气单胞菌、维氏气单胞菌、嗜水气单胞菌、简氏气单胞菌、舒氏气单胞菌和水生气单胞菌等<sup>[8]</sup>。嗜水气单胞菌和温和气单胞菌会引起罗非鱼、加州鲈、乌鳢、草鱼及青鱼等多种海淡水鱼类患上体表溃疡病和气单胞菌败血症; 点状气单胞菌会引起团头鲂、斑点叉尾鲷和大口鲇等鱼患腐皮病; 其他气单胞菌也会导致鱼类出现肠炎病及烂鳃病等细菌性疾病<sup>[9]</sup>。

### 1.3 爱德华氏菌

爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)属于肠杆菌科, 易引起鱼类感染爱德华氏菌病, 迟缓爱德华氏菌、鲑鱼爱德华氏菌和保科爱德华氏菌是主要致病菌<sup>[10]</sup>。迟缓爱德华氏菌在水环境中分布广泛, 是一种具有高发病率和致死率的人鱼兽共患条件致病菌, 可引起人体肠炎、腹泻、脑膜炎、蜂窝组织炎、肝脓肿及败血症等症<sup>[11]</sup>。可感染斑马鱼、日本鳊、牙鲈、鳊鱼等多种鱼类, 导致鱼类出现腹部积水肿胀、体表出血、肠内出现黏液等病症, 造成鱼类大量死亡<sup>[12]</sup>。鲑爱德华氏菌能引起叉尾鲷、黄颡鱼、六须鲶等鱼类患上败血症, 水质差、养殖密度过高、水中有机质多等都是该病的诱因<sup>[9]</sup>。刘春等<sup>[13]</sup>采用迟缓爱德华氏菌的分离菌株 Z1 感染透明四带无须鲷和斑马鱼的研究表明, 当菌液浓度达到  $1 \times 10^6$  CFU/mL 时, 其致死率可达到 80% 和 90%。

### 1.4 弧菌

弧菌属(*Vibrio*)细菌广泛存在于水环境中, 是引起鱼类和贝类病害最常见的条件致病菌之一, 其数量与鱼类弧菌病的发生密切相关。在有关石斑鱼病害的报告中, 有三分之二都是由弧菌引起的, 致死率高达 50%<sup>[14-15]</sup>。目前已报道的感染水产品的病原性弧菌超过 120 种, 包括霍乱弧菌、溶藻弧菌、费氏弧菌、创伤弧菌、哈维弧菌、鳃弧菌和副溶血性弧菌等<sup>[16]</sup>。

弧菌病的症状和病变因病原体与患病鱼种类不同而有所差异, 鳃弧菌的感染主要特征是体表皮肤溃疡; 溶藻弧菌感染可使病鱼胃囊特别膨大, 出现“腹胀满症”; 创伤弧菌、副溶血弧菌等的感染可引起鱼类的体表溃疡、出血等<sup>[7]</sup>。哈维弧菌也是一种较为严重的感染海水鱼类和无脊椎动物的病原体, 可导致鱼类出现失明、胃肠炎、皮肤溃疡和尾腐病等疾病<sup>[17]</sup>。人类感染弧菌的临床表现主要有三种, 胃肠炎、伤口感染和败血症, 其中最常见的是自限性胃肠炎<sup>[18]</sup>。

### 1.5 美人鱼发光杆菌

美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)包括美人鱼亚种和杀鱼亚种。其中美人鱼亚种能够在人类中引起致命性感染, 能导致鱼类发生细菌性败血症, 引起鱼类表皮形成溃疡, 也是导致埃及、西班牙和突尼斯及土耳其黑海地区的鲈鱼和鲷鱼死亡的主要细菌病原体<sup>[19]</sup>。美人鱼发光杆菌杀鱼亚种主要引发鱼类假性结核疾病, 是一种非常严重的细菌性败血症, 主要危害真鲷、黄带鲈和海鲈等, 因为它的宿主范围广, 受感染鱼类死亡率高, 抗生素耐药性广泛, 成为最具威胁的感染病原菌之一<sup>[20]</sup>。

### 1.6 链球菌

链球菌(*Streptococcus*)是一种人畜共患的条件致病菌, 能长期生存在富营养化或养殖污染严重的水体中, 包括海豚链球菌, 无乳链球菌和副乳房链球菌等, 海豚链球菌和无乳链球菌是引起鱼类链球菌病的主要致病菌<sup>[21]</sup>。该病流行范围广, 发病率高, 主要分布在温带和热带养殖区域, 全年均可发病, 能够感染石斑鱼、花鲈、油鲱等多种鱼类, 病鱼会出现眼球突出、出血、肛门红肿和腹水等症状, 造成鱼类死亡<sup>[22]</sup>。人类感染链球菌能够引发化脓性扁桃体炎<sup>[23]</sup>、猩红热<sup>[24]</sup>等疾病, 并可能诱发肾病综合征等并发症<sup>[25]</sup>。

### 1.7 诺卡氏菌

诺卡氏菌(*Nocardia*)是一种丝状革兰氏阳性细菌, 也是一种人畜共患的条件致病菌。包括鳊鱼诺卡氏菌、星状诺卡氏菌、杀鲑诺卡氏菌和粗形诺卡氏菌, 其中以鳊鱼诺卡氏菌和星状诺卡氏菌引起的鱼类诺卡氏菌病居多<sup>[26-27]</sup>。主要危害鳊、鲴、大黄鱼、罗非鱼和石斑鱼等, 自然发病率可达 15%~30%, 严重的达到 60%, 人工感染的病死率可高达 90%~100%, 发病时呈现肛门红肿、体表损伤溃烂及腹部膨胀等症状<sup>[28-29]</sup>。诺卡氏菌通常是机会感染, 在患有慢性肺病、糖尿病、恶性肿瘤、艾滋病患者以及移植患者中较为常见, 可通过呼吸道或者直接污染伤口等方式侵入人的肺、皮肤、软组织、中枢神经系统及心脏等, 导致病变部位的化脓性炎症及脓肿形成<sup>[30]</sup>。

### 1.8 分枝杆菌

分枝杆菌(*Mycobacterium*)是一类革兰氏阳性需氧杆菌, 能引发鱼类患有分枝杆菌疾病, 常见的病原体有海洋分枝杆菌、偶发分枝杆菌和龟分枝杆菌, 其他的如脓肿分枝杆菌、切萨皮克分枝杆菌、中间分枝杆菌、肖特西分枝

杆菌和苏尔盖分枝杆菌等多种非结核分枝杆菌也从海鱼中被分离出来<sup>[31]</sup>。分枝杆菌病流行广泛, 是一种人鱼共患病原菌。目前已经在 150 多种海水和淡水鱼类中发现该病, 主要危害鲑科鱼类<sup>[32]</sup>。感染分枝杆菌的鱼有眼球突出、嗜睡、游泳行为异常、生长不良、腹水、皮肤病变以及肉芽肿性炎症等症状<sup>[31]</sup>。结核分枝杆菌主要通过呼吸道传播感染人类, 非结核分枝杆菌可通过呼吸道吸入、皮肤和软组织创伤后直接感染, 最典型的疾病就是肺结核、结核性胸膜炎、结核性脑膜炎、肠结核、淋巴结核、骨关节结核等<sup>[33]</sup>。

## 2 人鱼共患病原菌分子生物学检测方法

近年来, 分子生物学方法在人鱼共患细菌性病害检测领域发展迅速, 通过捕捉鉴定目标病原菌的核酸分子快速准确地证实病原。其中聚合酶链反应、等温扩增方法、基因芯片、基因测序以及生物传感器等分子生物学技术应用较为广泛。

### 2.1 聚合酶链反应方法

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)通过体外扩增特异性靶基因序列检测致病菌, 包括常规 PCR、套式 PCR、反转录 PCR、多重 PCR、巢式 PCR、实时荧光 PCR、数字 PCR 等多种反应形式。

#### 2.1.1 普通 PCR

普通 PCR 是依靠 DNA 半保留复制的技术原理, 在高温 DNA 聚合酶的作用下, 双链 DNA 变性成单链 DNA; 重复循环变性-退火-延伸 3 个步骤, 得到更多的“半保留复制链”, 扩增得到大量的模板 DNA。CHRISTY 等<sup>[34]</sup>采用 PCR 方法证实了嗜水气单胞菌中存在导致鱼类患病的气溶蛋白毒力基因。YEN 等<sup>[35]</sup>用 PCR 方法鉴定出患有出血性疾病红鼓鱼上有蓝色弧菌、溶藻弧菌、东方弧菌和河流弧菌 4 种致病菌, 并测定出这 4 种弧菌的毒素基因是主要致病基因。陈国权等<sup>[36]</sup>针对鳊鱼诺卡氏菌种内保守、种间变异的特异性基因组片段设计特异性引物, 成功建立了鳊鱼诺卡氏菌特异性 PCR 检测方法, 检测灵敏度核酸浓度达 80 pg/μL, 菌液浓度达 8.6 CFU/μL。常规 PCR 技术操作简单, 可特异性地快速检测细菌, 但标本或核酸纯化过程中易出现扩增反应抑制物, 且核酸提取中的随机误差会导致假阳性或假阴性结果的出现; 而且常规 PCR 需要电泳分离扩增产物, 操作烦琐, 易引起实验室污染; 为满足多层次、快速、精准的检测需求, 又衍生出多种新型 PCR 技术<sup>[37]</sup>。

#### 2.1.2 多重 PCR

多重 PCR 又称复合 PCR, 其反应原理、反应试剂和操作过程与普通 PCR 相同, 在同一反应体系中加入两对或以上引物, 分别扩增不同目的基因, 得到不同扩增产物; 在保留普通 PCR 特异性、敏感性基础上减少了操作步骤及试剂用量, 提高检测效率, 节省反应成本<sup>[38]</sup>。ZAHER 等<sup>[39]</sup>采用多重 PCR 筛查了副溶血弧菌和嗜水气单胞菌分离株的耐药性及部分毒力基因。XU 等<sup>[40]</sup>采用双引物寡核苷酸(dual priming oligonucleotide, DPO)体系设计特异性 DPO 引物, 采用多重 PCR 同时检测溶藻弧菌、副溶血弧菌、霍

乱弧菌和创伤弧菌。XU 等<sup>[41]</sup>还将多重 PCR 与实时荧光 PCR 相结合, 利用 *tdh* 和 *trh* 两个毒力基因设计 3 组引物和探针, 建立了副溶血弧菌多重实时荧光 PCR 快检方法。多重 PCR 技术具有较常规 PCR 省时、简便、高效且试剂消耗少等优点, 可实现一次 PCR 扩增同时检测多个靶基因。但多对引物同时扩增需要优化多重反应条件, 保证多个靶基因的扩增效率, 容易出现引物之间互相干扰, 出现非特异性扩增和假阴性结果等, 应注意控制试验条件, 避免外源性 DNA 污染<sup>[37]</sup>。

2.1.3 实时荧光 PCR

实时荧光 PCR 技术应用广泛, 是通过设计特异性的荧光标记核酸探针, 进行 PCR 扩增来检测荧光探针发光基团的荧光强度, 达到对 PCR 产物准确鉴定目的的技术<sup>[35]</sup>。实时荧光 PCR 反应特异性主要在于荧光探针的设计, 目前已经开发出 TaqMan、Molecular Beacon、LightCycler、Single-labeled probe、ResonSense 及双链探针等探针标记技术<sup>[42]</sup>。ANUPAMA 等<sup>[43]</sup>针对副溶血弧菌的 *tdh* 和 *trh* 基因进行普通 PCR、实时荧光 PCR 与环介导等温扩增(loop mediated isothermal amplification, LAMP)检测, 结果显示, LAMP 与实时荧光 PCR 灵敏度相当, 灵敏度高于普通 PCR ( $P<0.05$ )。MOUGIN 等<sup>[44]</sup>建立哈维弧菌 SYBR Green I 荧光测试方法, 检测水平低至 5 个基因组拷贝, 检测灵敏度高, 有助于评估水产养殖中哈维弧菌的动态生长状态, 调整用药方案, 避免大量使用抗生素出现耐药性。实时荧光 PCR 方法具有特异性良好、灵敏度较高、速度快等特点, 已经成为分子生物检测的“金标准”, 但存在成本较高, 需要特殊的热循环仪和试剂, 操作过程较为复杂等问题, 不能满足现场及时检测的需求<sup>[37]</sup>。

2.1.4 数字 PCR

数字 PCR (digital PCR, dPCR)是在普通 PCR 和实时荧光 PCR 基础上发展起来的第三代 PCR 技术, 是一种将 PCR 反应物进行有限稀释后在大量不同的反应单元中进行独立的 PCR 扩增, 根据泊松分布原理及阳性微滴的个数与比例, 经过统计学分析对核酸分子进行绝对定量, 有微流体式数字 PCR (microfluidic digital PCR, mdPCR)、微滴

式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)和芯片式数字 PCR (chip digital PCR, cdPCR)等多种形式<sup>[45]</sup>。LEWIN 等<sup>[46]</sup>针对循环水产养殖系统中的嗜冷黄杆菌和鲁氏耶尔森菌建立了多重 ddPCR 检测方法, 对嗜冷黄杆菌和鲁氏耶尔森菌的灵敏度分别为 0.0011 和 1.24 ng, 该方法具有良好的特异性并能够降低鱼类死亡率, 减少生产损失。LI 等<sup>[47]</sup>建立了 cdPCR 用于分析罗非鱼不同组织样本中的无乳链球菌 DNA, 并与平板计数和 qPCR 结果进行比较, cdPCR 方法相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 5%, 平板计数和 qPCR 的 RSD 分别为 15%和 10%, 可见 cdPCR 方法更精确, 为细菌性病害的定量检测提供了有效方法。数字 PCR 能实现灵敏、准确的绝对定量, 能有效避免常规 PCR 抑制剂的影响, 但其耗材成本高、试验通量少, 不能实现操作智能化, 仪器定价高也成为该技术推广使用的一大难题<sup>[37]</sup>。

2.2 等温扩增方法

基于核酸等温扩增的环介导等温扩增(loop mediated isothermal amplification, LAMP)、重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)和重组酶介导等温扩增(recombinase aided amplification, RAA)等新兴技术不需要设置普通 PCR 扩增的变性、退火、延伸等不同温度的热循环步骤, 可实现核酸的等温扩增<sup>[48]</sup>。

2.2.1 LAMP 扩增

LAMP 是一种新型核酸扩增方法, 在等温条件下通过使用具有高置换活性的 *bstDNA* 聚合酶, 设计一组 4~6 条引物, 在 63~65℃等温扩增目的基因, 结果判读有荧光信号和显色可视两种方式<sup>[49]</sup>。LAMP 可视法检测流程如图 1 所示, 基于实验室条件, 可以选择水浴锅、金属浴或实时荧光 PCR 仪进行等温扩增反应; 显色法可以用肉眼直接判读结果, 阳性样品显绿色, 阴性样品显橙色; 荧光反应可以用目视仪直接判读荧光结果。LEE 等<sup>[50]</sup>利用辣根过氧化物酶(horse radish peroxidase, HRP)分子信标开发了一种副溶血性弧菌比色可视 LAMP 方法, 58.8℃扩增检出限达到  $1\times 100$  CFU/mL, 引进 HRP 分子信标可以改进 LAMP 易出

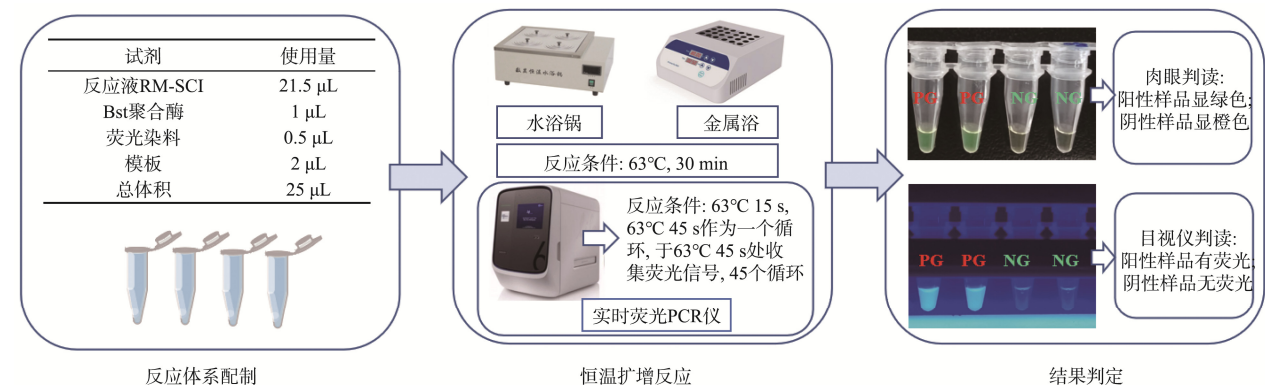


图 1 LAMP 等温扩增方法检测流程图  
Fig.1 Detection flow chart of LAMP isothermal amplification method

现假阳性结果的问题。ZHANG 等<sup>[51]</sup>建立了沙门氏菌免疫捕获环介导等温扩增(immunocapture loop-mediated isothermal amplification, IC-LAMP)方法, 50 min 内出现绿色荧光和梯形条带的阳性结果, 提高了检测灵敏度和特异性。姚学良等<sup>[52]</sup>针对美人鱼发光杆菌杀鱼亚种 *IGS2* 基因建立 LAMP 检测方法, 灵敏度为  $2.6 \times 10^2$  CFU/mL, 具有较好特异性和稳定性, 可用于该菌的野外现场快速检测。LAMP 方法具有灵敏度高、特异性好、反应恒温及结果可视化等优点, 可以在短时间内扩增少量基因; LAMP 扩增中使用的是 Bst 聚合酶, 对核酸抑制剂具有高耐受性, 当样品被污染或无法获得高纯度核酸样品时也能够进行检测, 可用于临床环境中的基因检测及食品和环境样品的快速检测等, 不足之处在于 LAMP 需要设计 4~6 对引物, 高扩增效率及其高敏感度易导致假阳性结果, 影响特异性和准确性, 在操作过程中需注意避免外源性 DNA 的引入<sup>[53]</sup>。

### 2.2.2 RPA 扩增

RPA 是 TwistDx 公司发明的一种模仿 T4 噬菌体内核酸复制机制, 依赖重组酶和单链结合蛋白在体外恒温条件下实现 DNA 特异性识别与结合, 通过链置换 DNA 聚合酶实现模板 DNA 扩增的恒温核酸扩增新技术<sup>[54]</sup>。GENG 等<sup>[55]</sup>通过设计溶血性基因的特异性引物和探针, 建立了基于 RPA 的副溶血性弧菌检测方法, 38°C、20 min 获得结果, 检出限达到  $1.02 \times 10^2$  copies。RPA 可与横向流动试纸条(lateral flow dipstick, LFD)结合, 开发出一种集重组酶聚合酶扩增、胶体金标记、分子杂交和侧向流层析等方法为一体的 RPA-LFD 技术, 实现扩增产物的可视化监测<sup>[56]</sup>。MABROK 等<sup>[57]</sup>报告了一种基于 RPA 和 LFD 组合检测柱状黄杆菌的方法, 37°C 重组酶聚合酶等温扩增 30 min, 在环境温度下测流试纸反应 2 min, 检出限达到 0.4 CFU, 具有很好的特异性和准确性。LI 等<sup>[58]</sup>针对斑点叉尾鲷爱德华氏菌 *serC* 基因的保守序列开发了 RPA、实时 RPA 和 RPA-LFD 3 种检测方法, RPA-LFD 和实时 RPA 可在 38°C 下 30 min 内完成检测, 这 3 种方法都具有较高灵敏度(102 copies/ $\mu$ L)和特异性, 灵敏度是普通 PCR 的 10 倍。

### 2.2.3 RAA 扩增

RAA 也是一种新型的恒温核酸快速扩增技术, 在较低温度下(一般为 37°C)就可以实现 DNA 或 RNA 的快速扩增<sup>[59]</sup>。该技术原理与 RPA 类似, RAA 利用细菌或真菌中获得的重组酶来替代 RPA 中较难获得的噬菌体重组酶<sup>[60]</sup>。ZHANG 等<sup>[61]</sup>建立了基于 RAA 快速检测沙门氏菌的方法, 利用便携设备在 39°C、20 min 完成反应。王金凤等<sup>[62]</sup>基于铜绿假单胞菌 *ecfX* 基因设计特异性 *exo* 探针, 建立了快速检测铜绿假单胞菌的实时荧光 RAA 方法, 39°C、20 min 得到阳性结果, 检出限分别为  $3.0 \times 10^3$  fg/反应和  $1.0 \times 10^3$  CFU/反应, 可用于不同来源的铜绿假单胞菌的快速检测和鉴定。葛以跃等<sup>[63]</sup>将 RAA 与 CRISPR-Cas13a 检测系统相结合, 建立了副溶血性弧菌快速检测方法, 灵敏度为 10 copies/反应, 且与其他病原体之间无交叉反应, 所建立的 RAA-Cas13a 方法为副溶血性弧菌的快速检测提供了新的工具。

RAA 和 RPA 两种等温扩增方法, 只需要恒温设备, 反

应不需要在较高温度下进行, 5~30 min 内完成整个反应; 对设备要求低, 且不受场地限制, 在野外缺少设备时可以利用人体腋窝保温进行检测; 与此同时, 反应试剂以冻干形式提供, 增加了稳定性, 运输和储藏过程不需要冷藏, 为野外检测与现场诊断提供了极大的便利<sup>[64]</sup>。但存在结果假阳性, 非特异性扩增以及形成引物二聚体等问题<sup>[59]</sup>, 也因缺乏专门设计引物的软件存在成本和时间消耗大等问题, 在引物探针的主动设计上, 还有待进一步深入研究<sup>[64]</sup>。

## 2.3 生物芯片方法

生物芯片为“人类基因组计划”基础上发展起来的新型技术, 包括蛋白质芯片、基因芯片、组织芯片、芯片实验室等, 具有高度多样化、并行性、微型化、自动化特点, 在病原微生物检测中, 具有显著优势, 能够实现一张芯片上, 同时对多种病原微生物展开快速检测, 样品用量少, 减少了试剂消耗, 具有较高的特异性与灵敏度; 但在实际应用中也会出现假阳性、假阴性等问题, 同时芯片或微阵列的重复使用, 会导致检测灵敏度降低, 高昂的价格及烦琐的步骤限制了芯片的普及应用<sup>[65]</sup>。尽管生物芯片技术存在一些问题, 但并不能阻碍其发展步伐, 随着生命科学、信息技术以及分子生物学技术的发展, 生物芯片技术也会日趋完善, 并逐渐应用到日常生活中<sup>[66]</sup>。

### 2.3.1 基因芯片

基因芯片技术始于上个世纪 90 年代, 因其具有高通量的特点, 在病原菌高通量筛查中发挥了重要作用。利用点样技术将寡核苷酸或者 cDNA 按照预先设定好的核酸分子杂交衍生列进行高密度集成, 然后固定在支持载体表面, 载体表面与探针进行杂交后, 杂交反应信号被传感器捕捉到, 分析载体样本的基因功能与基因表性特征, 对致病菌进行鉴定<sup>[67]</sup>。CHEN 等<sup>[68]</sup>建立了多重 PCR 与基于载玻片上单碱基延伸标签阵列(single base extension-tag array on glass slides, SBE-TAGS)的 DNA 微阵列杂交相结合的芯片方法, 可以同时检测副溶血性弧菌、霍乱弧菌、创伤弧菌和哈维弧菌等 7 种致病菌, 该微阵列芯片检测特异性 100%, 灵敏度达到 200 fg~2 pg, 可确保快速准确地检测海鲜中的致病性弧菌物种, 同时为水产养殖业带来低经济负担。SHI 等<sup>[69]</sup>采用基因芯片对病鱼体内的哈维弧菌、溶藻弧菌、副溶血性弧菌、嗜水气单胞菌进行检测, 芯片检测灵敏度  $\geq 100$  CFU/mL, 与 16s rRNA 基因测序的结果一致。

### 2.3.2 微流体芯片

微流体芯片也因具有高灵敏度、高通量和大规模并行化测试性能优势, 而被应用于病原体通量筛查。SALMAN 等<sup>[70]</sup>设计了一种包括聚碳酸酯微流体 PCR 芯片、分流热循环器和荧光检测器在内的分流 PCR 微流控装置, 实现低成本和便携式核酸扩增检测传染性病原菌。OU 等<sup>[71]</sup>将 LAMP 和微流体芯片相结合建立了大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、志贺氏菌等 6 种病原菌的快速微流体检测系统, 尤其适用于感染点、基层医院及灾区救援等设备和人员有限的环境进行快速检测。ZHAO 等<sup>[72]</sup>成功开发了新型水凝胶微流体芯片并应用于病原体分析, 该芯片包含齿形结构的富



集层和带显色培养基的检测层, 大肠杆菌捕获试验证实了富集层能够提高捕获效率, 显色培养基能够特异性鉴定病原体, 达到结果可视化目的, 为芯片与其他功能模块结合实现多种病原体检测提供参考。SUN 等<sup>[73]</sup>将微流体与荧光检测平台相结合设计了一种新型的浓度梯度微流体芯片, 测试沙门氏菌对青霉素类和喹诺酮类抗生素的耐药性, 提供了一种灵敏快速的抗生素敏感性测试方法, 有助于抗生素耐药菌株及细菌耐药性突变的检测。

## 2.4 基因测序方法

传统的人鱼共患细菌性病原监控和鉴定方法, 检测中长期且操作烦琐, 不能满足快速检测需求, 对于近源种也不能精准分辨。应用基因测序技术, 能够有效了解细菌性病原的致病机制等, 实现高度覆盖和高灵敏度目标, 降低技术成本, 提高致病菌分型能力, 实现对相同序列菌株的分型, 检测结果准确性高, 达到了高通量和高分辨目的<sup>[74]</sup>。

### 2.4.1 基因组测序

基因测序为测定 DNA 或 RNA 碱基排列顺序的技术, 最早在 20 世纪 70 年代由 Frederick Sanger 提出, 也称 Sanger 技术, 又称一代测序技术。目前以二代和三代测序技术为主的全基因组测序发展迅速。其中“边合成边测序”的 Solexa 测序技术、Roche 454 测序技术、“边连接边测序”的 SOLiD 测序技术是比较具有代表性的二代测序技术。与一代测序技术相比, 二代测序技术在保持高准确性和降低成本的同时还提升了测试效率<sup>[75]</sup>。第三代测序技术则是以单分子荧光、纳米孔实时记录为技术核心, 在原有的化学间接性测试基础上融入显微镜观察的直接性实时物理测试, 测序效率提升了 2 万倍, 精确率高达 99.9999%, 并且测序过程无需进行 PCR 来增强检测的荧光信号, 有效避免了 PCR 扩增引起的误差<sup>[76]</sup>。DENG 等<sup>[77]</sup>从我国深圳水产养殖的患病鱼体中分离到一株多重耐药、感染石斑鱼的哈维氏菌株, 分析整个基因组序列的 5678 个基因, 发现 487 个有助于细菌发病机制的毒力基因和 25 个抗生素耐药性基因(antibiotic resistance genes, ARGs)。对 31 个哈维氏菌株的比较基因组进行分析, 发现了 217 个基因和 7 个基因家族, 包括一个 C 类  $\beta$ -内酰胺酶基因、一个毒力相关蛋白 D 基因和一个 OmpA 家族蛋白基因, 研究结果有助于进一步分析哈维氏菌的致病机制和耐药性。OKADA 等<sup>[78]</sup>对 341 株霍乱弧菌及其近缘种的 MS6\_A0927 基因测序结果显示, 携带基因可分为 M 和 LH 两大类, 并且发现了 79 株 M 基因和 46 株 LH 基因的序列变异及基因位点多态性, 证实霍乱弧菌具有高度的遗传多样性, 为其基因序列分析及菌种鉴定提供了研究基础。

### 2.4.2 16S rDNA 测序

目前基于 16S rDNA 或 16S rRNA 扩增及序列分析构建系统发育树的方法进行菌种鉴定和耐药性检测应用广泛。AZWAI 等<sup>[79]</sup>利用 PCR 和 16S rDNA 测序对利比亚不同区域 93 份海鲜、肉类样品进行弧菌属计数和分离, 其中 48 份(51.6%)分离出可疑菌落; 通过基因测序, 48 份可疑样品中有 11 份(22.9%)鉴定为弧菌属。SI 等<sup>[80]</sup>对患病大菱鲆的肠、

肝脏和脾脏等组织进行 16S rRNA 测序, 结果显示, 致病菌在肠道中的多样性高于其他感染组织, 证实了爱德华氏菌是感染大菱鲆的主要致病菌。陈彦希等<sup>[81]</sup>采用 16S rRNA 基因序列分析方法证实了黄颡鱼中的分离菌株为拟态弧菌, 与弧菌科弧菌属同源性高达 92.8%~99.9%, 进化树分析结果表明, 分离株与霍乱弧菌、易北河弧菌、溶藻弧菌、拟态弧菌等自成一个分支, 并且在这分支下又与中国分离的拟态弧菌 SCCF04 (KC503059.1)、拟态弧菌 XQ (KJ604709.1) 另成一个小分支, 为黄颡鱼拟态弧菌病的防控提供了参考。PUK 等<sup>[82]</sup>利用 16S rRNA、Hsp65 基因测序及基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法成功鉴定出观赏鱼中海洋分枝杆菌、偶发分枝杆菌、嗜血分枝杆菌和脓肿分枝杆菌。

## 2.5 生物传感器方法

生物传感器因具有高灵敏度、低成本、使用便捷和实时分析等优点而被应用于致病菌检测。生物传感器包含与检测目标感应识别的生物受体, 将目标生物物质的浓度转化为可测量信号的传感器<sup>[83]</sup>, 包括光学生物传感器、电化学生物传感器、荧光生物传感器以及比色生物传感器等。NORDIN 等<sup>[84]</sup>开发了一种以 DNA 杂交为原理, 使用聚乳酸金纳米颗粒(polylactic acid-stabilized goldnanoparticles, PLA-AuNPs) 修饰的丝网印刷碳电极(screen-printed carbonelectrode, SPCE), 使用亚甲基蓝作为氧化还原指示剂的电学生物传感器方法, 快速检测副溶血性弧菌。LOW 等<sup>[85]</sup>设计了基于双比色/电化学方法的新型酶/纳米颗粒 DNA 生物传感器, 用于霍乱弧菌的特异性检测, 该测定平台耐贮存和即用型试剂的使用, 大大简化了生物分析程序, 使其更易于现场应用。MALHOTRA 等<sup>[86]</sup>介绍了一种经济高效的便携式 3D 打印设备电学生物传感器, 可在 15 min 内使用 500  $\mu$ L 样品快速检测某些大肠杆菌(*E. coli*)菌株(DH5 $\alpha$ 、BL21、TOP10 和 JM109), 检出限高达 53 CFU, 定量限为 270 CFU, 非常适合进行现场快速筛查检测。生物传感器与微流体技术联用, 可达到减少预处理步骤、快速灵敏、设备便携和操作简单的目的, 实现食源性致病菌的快速检测<sup>[87]</sup>。BAI 等<sup>[88]</sup>将醛标记的探针阵列共价连接到联氨衍生的芯片表面, 将 PCR 扩增产物与探针杂交, 成功开发了检测 11 种食源性病原体的硅基光学薄膜生物传感器芯片。相比其他技术, 生物传感器技术的灵敏度更高, 专一性更强; 样品检出限更低, 一般可达到 ng 数量级; 分析样品速度更快, 一般几秒钟即可完成检测; 操作更简单、便捷, 解决了效率低、速度慢等技术性问题。但生物传感器检测的可重复性需要研究, 现阶段多限于实验室研究, 还无法实现商业化, 实现该技术的广泛应用还需要一段时间<sup>[89]</sup>。

## 3 人鱼共患病原菌检测方法最新研究进展

2020 年诺贝尔化学奖授予了对新一代基因编辑技术 CRISPR 有特殊贡献的两位女科学家。目前能在体外“定点”切割 DNA 的 CRISPR 技术已成为全球生物技术发展热点, 在肿瘤、新冠病毒等诊断和检测领域发展迅速。基因编辑

技术所研发构建的一种基于簇状规则间隔短回文重复序列 CRISPR 和相关蛋白 CAS 的新检测平台,是自然界中细菌和考古细菌抵御噬菌体感染和质粒转移的一种防御机制<sup>[90]</sup>,依赖于 CRISPR RNA (CrRNA)引导的 Cas12a (DNA)或 Cas13 (RNA)在识别靶核酸后与 ssDNA 或 ssRNA 报告分子的切割能力,可与荧光探针、胶体金试纸条等方法联合应用。基于不同特性的 Cas 蛋白,目前报道的 CRISPR 效应器可分为 Cas9、Cas12、Cas13 等 3 类<sup>[91]</sup>。由于 CRISPR/CAS 系统特异性好、灵敏度高、检测便捷等优点和 CAS12a 的 DNA 靶向性,CRISPR/CAS12a 系统在细菌的早期诊断和现场快速检测领域应用广泛,其检测原理如图 2 所示<sup>[92]</sup>。XIAO 等<sup>[93]</sup>以编码致病性溶血素的 *vhha* 基因为目的基因,设计了 RAA 引物和 crRNA 序列,开发了一种不需要特殊仪器,只需要 40 min 就可快速检测副溶血弧菌的 RAA-CRISPR/Cas12a 检测方法。WU 等<sup>[94]</sup>采用一种结构简单,成本低的可逆阀辅助芯片耦合 CRISPR/Cas12a 技术,通过优化裂解缓冲液、环介导等温扩增试剂和 CRISPR 试剂,在 50 min 内得到可视化的阳性绿色荧光信号,对副溶血性弧菌检出限可达到 30 copies。ZHANG 等<sup>[95]</sup>基于 CRISPR/Cas12a 系统,在低成本的热循环仪上建立了一种特异性强、可视化的 PCR 方法,肉眼观察产生绿色荧光的阳性结果,对副溶血性弧菌检出限为  $1.02 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L,为 CRISPR 技术在鱼类病原体检测中的应用提供了新策略。

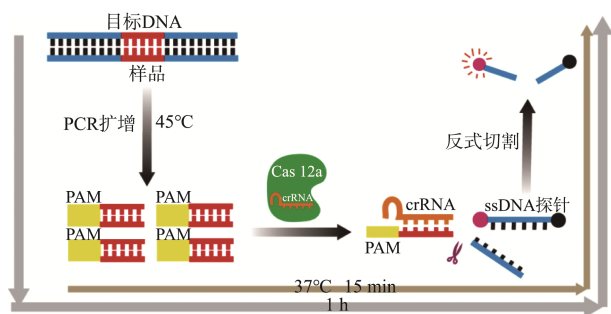


图 2 CRISPR/CAS 12 技术检测原理图

Fig.2 Schematic diagram of CRISPR/CAS 12 technology detection

## 4 总结与展望

我国是水产养殖大国,水产品养殖生产加工行业为国民经济和人民生活带来了丰富的利益和资源。为了更好地促进水产养殖业发展,提高水产品质量安全,预防人鱼共患病的发生,保护人类消费和健康安全,发展和推广人鱼共患病害菌灵敏快速的早期检测方法尤为重要。而且由于养殖过程中抗生素的使用造成水产养殖病原菌耐药性增强,耐药菌株增多、耐药性发生突变也是影响水产品质量安全的突出问题;有关寄生虫鉴定和病原菌耐药性检测的方法也有待进一步研发。水产品养殖及生产加工现场需要操作简便、对专业性要求低、样品经简单前处理后即可测试、分析方法简单快速准确、在短时间内可出结果的快检方法。

分子生物学技术在诊断人鱼共患细菌性病害方面有

着形态学等传统诊断技术无法比拟的优势,能在水产动物感染病原菌但又未出现明显症状或大规模暴发前给予准确的预测和预报,以便及时采取防控措施。PCR 操作简单,实现病原菌的分子生物学快速检测;多重 PCR 满足了同时检测多种病原菌的需求;实时荧光 PCR 能够准确检测目标菌;数字 PCR 能够实现病原菌的精准定量,但存在成本高等问题。为了简化操作步骤和降低成本,以 LAMP、RPA、RAA 为代表的等温扩增技术发展起来,这些方法具备反应恒温、速度快、结果可视化等优点,满足现场即时检测的需求,却也存在结果假阳性及非特异性扩增等问题。随着分子生物学技术的不断发展和成熟,基因测序、生物芯片以及生物传感器等新兴技术也应用到细菌性病原检测中并发挥了重要作用,多种技术联合应用,实现病原菌的快速精准检测。

近年来快速发展的核酸可视化技术和基因编辑技术为开发新型快检方法提供了新思路,未来可以研发易携带且操作简便的新型核酸检测方法及产品,对测试设备设施和检测人员的专业性要求低,方便基层实验室或养殖人员对病原菌进行现场快速监测,使检测从专业实验室发展到水产品养殖生产加工第一线。保证在水产品养殖感染病害发生早期快速确诊病原体,及时采取防护措施,科学合理使用渔药,保护水产品安全,降低水产养殖中因病害所造成的损失,推动水产品养殖和生产加工行业健康可持续发展。

## 参考文献

- [1] 黄智森. 浅析水产养殖病害及其药物控制[J]. 江西水产科技, 2019, (3): 40-41.
- [2] HUANG ZS. Analysis of aquaculture diseases and their drug control [J]. Jiangxi Fish Sci Technol, 2019, (3): 40-41.
- [3] 莽琦, 徐钢春, 朱健, 等. 中国水产养殖发展现状与前景展望[J]. 渔业现代化, 2022, 49(2): 1-9.
- [4] MANG Q, XU GC, ZHU J, et al. Developmental status and prospective vision for China's aquaculture [J]. Fish Mod, 2022, 49(2): 1-9.
- [5] 杨治国, 林伟, 田海军. 人鱼共患疾病[J]. 河南水产, 2009, (3): 37-38.
- [6] YANG ZG, LIN W, TIAN HJ. Mermaid disease [J]. J Henan Aquat Prod, 2009, (3): 37-38.
- [7] PEKALA-SAFIŃSKA A. Contemporary threats of bacterial infections in freshwater fish [J]. J Vet Res, 2018, 62(3): 261-267.
- [8] 秦玉广, 陈秀丽, 朱永安, 等. 细菌性鱼病研究现状与展望[J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2010, 31(3): 49-57.
- [9] QIN YG, CHEN XL, ZHU YAN, et al. Advances on bacterial fish disease research [J]. J Jinggangshan Univ (Nat Sci Ed), 2010, 31(3): 49-57.
- [10] 高琳, 陈万义, 任婧. 食品中荧光假单胞菌的危害及其快速检测方法研究进展[J]. 食品工业科技, 2015, 36(16): 373-377.
- [11] GAO L, CHEN WY, REN Q. Research progress on the harm of *Pseudomonas fluorescens* in food and its rapid detection method [J]. Sci Technol Food Ind, 2015, 36(16): 373-377.
- [12] 唐小丽, 封毅, 卓少元, 等. 铜绿假单胞菌感染的非抗生素治疗研究进展[J]. 微生物与感染, 2021, 16(2): 129-136.
- [13] TANG XL, FENG Y, ZHUO SY, et al. No-antibiotictherapiesof *Pseudomona saeruginosa* infection [J]. J Microb Infect, 2021, 16(2): 129-136.
- [14] FERNÁNDEZ-BRAVO A, FIGUERAS MJ. An update on the genus *Aeromonas*: Taxonomy, epidemiology, and pathogenicity [J]. Microorganisms, 2020, 8(1): 129.
- [15] 常见鱼类细菌性疾病防控技术[Z]. 海洋与渔业, 2020, (2): 67-70.

- Prevention and control technology of common fish bacterial diseases [Z]. Mar Fish, 2020, (2): 67–70.
- [10] 邓显文, 谢芝勋, 刘加波, 等. 罗非鱼迟缓爱德华氏菌的分离与鉴定[J]. 水生生态学杂志, 2009, 2(1): 114–117.
- DENG XW, XIE ZX, LIU JB, *et al.* Isolation and identification of *Edwardsiella lentus* from tilapia [J]. J Hydroecol, 2009, 2(1): 114–117.
- [11] 李飞翔. 迟缓爱德华氏菌及鱼类迟缓爱德华氏菌病研究进展[J]. 江西水产科技, 2019, (2): 28–29.
- LI FX. Research progress of *Edwardsiella tarda* and *Edwardsiella tarda* disease in fish [J]. Jiangxi Fish Sci Technol, 2019, (2): 28–29.
- [12] 牟为, 管玲玉, 王启要, 等. 迟钝爱德华氏菌菌系统构建[J]. 微生物学杂志, 2011, 31(3): 1–5.
- MOU W, GUAN LY, WANG QY, *et al.* Construction of the ecdysis system of *Edwardsiella tarda* [J]. J Microbiol, 2011, 31(3): 1–5.
- [13] 刘春, 李凯彬, 王庆, 等. 斑马鱼迟缓爱德华氏菌的鉴定, 致病性及药物敏感性[J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(3): 105–111.
- LIU C, LI KB, WANG Q, *et al.* Identification, pathogenicity and drug sensitivity of *Edwardsiella tarda* from Danio rerio [J]. J Huazhong Agric Univ, 2013, 32(3): 105–111.
- [14] LEE LH, MUTALIB NS, LAW JWF, *et al.* Discovery on antibiotic resistance patterns of *Vibrio parahaemolyticus* in Selangor reveals carbapenemase producing *Vibrio parahaemolyticus* in marine and freshwater fish [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 2513.
- [15] DENG Y, XU L, CHEN H, *et al.* Prevalence, virulence genes, and antimicrobial resistance of *Vibrio* species isolated from diseased marine fish in South China [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 1–8.
- [16] 张依琳, 吴凡, 简纪常, 等. 海水养殖病原弧菌对鱼类宿主定植机制研究进展[J]. 广东海洋大学学报, 2021, 41(6): 138–146.
- ZHANG YL, WU F, JIAN JC, *et al.* Research progress on the mechanism of fish host colonization by marine aquaculture pathogenic *Vibrio* [J]. J Guangdong Ocean Univ, 2021, 41(6): 138–146.
- [17] ZHANG XH, HE X, AUSTIN B. *Vibrio harveyi*: A serious pathogen of fish and invertebrates in mariculture [J]. Mar Life Sci Technol, 2020, 2(3): 231–245.
- [18] 陈静, 祁露, 郑雅露, 等. 致病性弧菌及其噬菌体防治研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(24): 9288–9294.
- CHEN J, QI L, ZHENG YL, *et al.* Review on pathogenic *Vibrio* and its phage control [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(24): 9288–9294.
- [19] EISSA AE, ABOU-OKADA M, ALKURDI ARM, *et al.* Catastrophic mass mortalities caused by *Photobacterium damsela* affecting farmed marine fish from Deeba Triangle, Egypt [J]. Aquac Res, 2021, 52(9): 4455–4466.
- [20] ANTONELLO J, MASSAULT C, FRANCH R, *et al.* Estimates of heritability and genetic correlation for body length and resistance to fish pasteurellosis in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) [J]. Aquaculture, 2009, 298(1–2): 29–35.
- [21] 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 链球菌病[J]. 中国水产, 2011, (10): 49–50.
- CHEN AIP, JIANG YL, QIAN D, *et al.* Streptococcosis [J]. Chin Aquat Prod, 2011, (10): 49–50.
- [22] 辛年香, 蔡延渠. 鱼类链球菌病的研究进展[J]. 科学养鱼, 2017, (9): 61–63.
- XIN NX, CAI YQ. Research progress of fish *Streptococcosis* [J]. Sci Fish Farm, 2017, (9): 61–63.
- [23] 曾白华, 王春. 无乳链球菌致儿童化脓性扁桃体炎 1 例[J]. 四川医学, 2016, 37(6): 704.
- ZENG BH, WANG C. A case of pyogenic tonsillitis in children caused by *Streptococcus agalactis* [J]. Sichuan Med J, 2016, 37(6): 704.
- [24] 李龙建, 徐艳广, 刘英, 等. 北京市门头沟区 2013–2017 年猩红热流行病学特征分析[J]. 医学动物防制, 2019, 35(4): 349–351.
- LIL J, XU YG, LIU Y, *et al.* Epidemiologic characteristics of scarlet fever in Mentougou District of Beijing from 2013 to 2017 [J]. J Med Pest Control, 2019, 35(4): 349–351.
- [25] 洪建东, 施丽景, 郑天文, 等. 儿童急性链球菌感染后肾炎致肾病综合征激素的治疗作用[J]. 中国小儿急救医学, 2009, (6): 550–552.
- HONG JD, SHI LJ, ZHENG TW, *et al.* Therapeutic effect of hormones on nephrotic syndrome caused by acute streptococcal nephritis in children [J]. Chin J Ped Emerg Med, 2009(6): 550–552.
- [26] 多甜, 张超, 赵晓进, 等. 鱼诺卡氏菌研究进展[J]. 水产科学, 2017, 36(3): 391–394.
- DUO T, ZHANG C, ZHAO XJ, *et al.* Research progress of *Nocardia* fish [J]. Fish Sci, 2017, 36(3): 391–394.
- [27] MAEKAWA S, YOSHIDA T, WANG PC, *et al.* Current knowledge of nocardiosis in teleost fish [J]. J Fish Dis, 2018, 41(3): 413–419.
- [28] 朱志东, 吕莉, 邓剑壕, 等. 鱼类诺卡氏菌病的研究进展[J]. 水产养殖, 2018, 39(1): 48–52.
- ZHU ZD, LV L, DENG JH, *et al.* Research progress of nocardiosis in fish [J]. J Aquac, 2018, 39(1): 48–52.
- [29] 陈海新, 朱宇嘉, 董碧莲, 等. 鱼类诺卡氏菌病的研究进展[J]. 科学养鱼, 2021, (3): 48–51.
- CHEN HX, ZHU YJ, DONG BL, *et al.* Research progress of nocardiosis in fish [J]. Sci Fish Farm, 2021, (3): 48–51.
- [30] 黄景明, 祝文娟. 诺卡氏菌分类及临床意义[J]. 卫生职业教育, 2005, (15): 137–139.
- HUANG JM, ZHU WX. Classification and clinical significance of *Nocardia* [J]. Health Vocat Educ, 2005, (15): 137–139.
- [31] PHILLIPS ACN, SUEPAUL R, SOTO E. Ocular localization of mycobacterial lesions in tank-reared juvenile cobia, *Rachycentron canadum* [J]. J Fish Dis, 2017, 40(12): 1799–1804.
- [32] JACOBS JM, STINE CB, BAYA AM, *et al.* A review of mycobacteriosis in marine fish [J]. J Fish Dis, 2009, 32(2): 119–130.
- [33] 郭倩, 申晨. 儿童非结核分枝杆菌病研究进展[J]. 结核与肺部疾病杂志, 2021, 2(2): 184–188.
- GUO Q, SHEN C. The progress of non-tuberculous mycobacterium disease in children [J]. J Tuberc Lung D, 2021, 2(2): 184–188.
- [34] CHRISTY G, KUSDAWARTI R, HANDIJATNO D. Determination of the aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* using the polymerase chain reaction (pcr) technique [C]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2019.
- [35] YEN PTH, LINH NQ, TRAM NDQ. The identification and determination of toxin genes of *Vibrio* strains causing hemorrhagic disease on red drum (*Sciaenops ocellatus*) using PCR [J]. AMB Express, 2021, 11(1): 1–8.
- [36] 陈国权, 黄碧艳, 张子雯, 等. 鲷鱼诺卡氏菌特异性 PCR 检测方法的建立[J]. 基因组学与应用生物学, 2021, 40(Z2): 2656–2665.
- CHEN GQ, HUANG BY, ZHANG ZW, *et al.* Establishment of a specific PCR method for detection of *Nocardia seriolae* [J]. Genom Appl Biol, 2021, 40(Z2): 2656–2665.
- [37] 李伟哲, 刘露, 张辉, 等. PCR 技术在水产动物疾病检测中的应用[J]. 水产科学, 2019, 38(5): 726–733.
- LI WZ, LIU L, ZHANG H, *et al.* Applications of PCR technology in diseases diagnosis in aquaculture animals [J]. Fish Sci, 2019, 38(5): 726–733.
- [38] 王进, 姚莉, 王菲菲. 多重 PCR 技术原理及在食品检测中的应用[J]. 中国医院用药评价与分析, 2016, 16(S1): 264–265.
- WANG J, YAO L, WANG FF. The principle of multiplex PCR technology and its application in food detection [J]. Eval Anal Drug-Use Hosp China, 2016, 16(S1): 264–265.
- [39] ZAHER HA, NOFAL MI, HENDAM BM, *et al.* Prevalence and antibiogram of *Vibrio parahaemolyticus* and *Aeromonas hydrophila* in the flesh of Nile Tilapia, with special reference to their virulence genes detected using multiplex PCR technique [J]. Antibiotics, 2021, 10(6): 654.
- [40] XU YG, SUN LM, WANG YS, *et al.* Simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seafood using dual priming oligonucleotide (DPO) system-based multiplex PCR assay [J]. Food Control, 2017, 71: 64–70.
- [41] XU D, JI L, WU X, *et al.* Detection and differentiation of *Vibrio*



- parahaemolyticus* by multiplexed real-time PCR [J]. Can J Microbiol, 2018, 64(11): 809–815.
- [42] 施林祥, 李东辉. 实时荧光 PCR 研究新进展[J]. 世界华人消化杂志, 2005, (5): 596–599.
- SHI LX, LI DH. New progress in real-time fluorescent PCR research [J]. World Chin J Digestol, 2005, (5): 596–599.
- [43] ANUPAMA KP, NAYAK A, KARUNASAGAR I, *et al.* Evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay along with conventional and real-time PCR assay for sensitive detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from seafood sample without enrichment [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(1): 1009–1016.
- [44] MOUGIN J, ROQUIGNY R, TRAVERS MA, *et al.* Development of a mreB-targeted real-time PCR method for the quantitative detection of *Vibrio harveyi* in seawater and biofilm from aquaculture systems [J]. Aquaculture, 2020, 525: 735337.
- [45] 马新冉, 肖雨晴, 雷春, 等. 数字 PCR 技术在水产病原菌检测中的应用[J]. 鲁东大学学报(自然科学版), 2020, 36(1): 48–54.
- MA XR, XIAO YQ, LEI C, *et al.* Application of digital PCR technology in the detection of aquatic pathogens [J]. Ludong Univ J (Nat Sci Ed), 2020, 36(1): 48–54.
- [46] LEWIN AS, HAUGEN T, NETZER R, *et al.* Multiplex droplet digital PCR assay for detection of *Flavobacterium psychrophilum* and *Yersinia ruckeri* in Norwegian aquaculture [J]. J Microbiol Methods, 2020, 177: 106044.
- [47] LI Y, FAN B, LI D, *et al.* Chip-based digital PCR for direct quantification dynamic bacterial load in target organs of tilapia infected with *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing meningoencephalitis in teleosts [J]. Aquacult Rep, 2020, 18: 100548.
- [48] TING L, KUN Y. Application of isothermal amplification technology for pathogen detection in parasitic and other diseases [J]. Chin J Schistosomiasis Control, 2018, 30(2): 232–236.
- [49] WONG YP, OTHMAN S, LAU YL, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A versatile technique for detection of microorganisms [J]. J Appl Microbiol, 2018, 124(3): 626–643.
- [50] LEE JE, MUN H, KIM SR, *et al.* A colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay based on HRP-mimicking molecular beacon for the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Biosens Bioelectron, 2020, 151: 111968.
- [51] ZHANG L, DU X, CHEN C, *et al.* Development of a rapid, one-step-visual method to detect Salmonella based on IC-LAMP method [J]. Iran J Vet Res, 2020, 21(1): 20.
- [52] 姚学良, 蔡琰, 徐晓丽, 等. 美人鱼发光杆菌杀鱼亚种 LAMP 快速检测方法建立与应用[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2021, 52(1): 7–12.
- YAO XL, CAI Y, XU XL, *et al.* Establishment of the rapid detection method by loop-mediated isothermal amplification for *Photobacterium damsela* subsp. Piscicida and its application [J]. J Shandong Agric Univ (Nat Sci Ed), 2021, 52(1): 7–12.
- [53] NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): Principle, features, and future prospects [J]. J Microbiol, 2015, 53(1): 1–5.
- [54] 杜亚楠, 赵笑, 范小瑞, 等. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展及其应用[J]. 上海农业学报, 2018, 34(6): 117–122.
- DU YN, ZHAO X, FAN XR, *et al.* Research progress and application of recombinase polymerase amplification technology [J]. Shanghai J Agric, 2018, 34(6): 117–122.
- [55] GENG Y, TAN K, LIU L, *et al.* Development and evaluation of a rapid and sensitive RPA assay for specific detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood [J]. BMC Microbiol, 2019, 19(1): 1–9.
- [56] 于灵芝, 陶凌云, 魏晓峰. 可视化核酸检测技术 RPA-LFD 的研究和应用进展[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(6): 547–553.
- YU LZ, TAO LY, WEI XF. Research and application progress of visual nucleic acid detection technology RPA-LFD [J]. Lab Anim Comp Med, 2021, 41(6): 547–553.
- [57] MABROK M, ELAYARAJA S, CHOKMANGMEEPISARN P, *et al.* Rapid visualization in the specific detection of *Flavobacterium columnare*, a causative agent of freshwater columnaris using a novel recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow dipstick (LFD) assay [J]. Aquaculture, 2021, 531: 735780.
- [58] LI H, ZHANG L, YU Y, *et al.* Rapid detection of *Edwardsiella ictaluri* in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) by real-time RPA and RPA-LFD [J]. Aquaculture, 2022, 552: 737976.
- [59] 马巧妮, 王萌, 朱兴全. 重组酶介导扩增技术及其在病原微生物快速检测中的应用进展[J]. 中国生物工程杂志, 2021, 41(6): 45–49.
- MA QN, WANG M, ZHU XQ. Recombinase-mediated amplification technology and its application progress in rapid detection of pathogenic microorganisms [J]. Chin Biotechnol, 2021, 41(6): 45–49.
- [60] 孙晓红, 后来旺, 李达容, 等. 重组酶等温扩增技术在分析检测中的应用研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(24): 265–270.
- SUN XH, HOU LW, LI DR, *et al.* Research progress of application of recombinase isothermal amplification technology in analysis and detection [J]. Food Ferment Ind, 2020, 46(24): 265–270.
- [61] ZHANG X, GUO L, MA R, *et al.* Rapid detection of *Salmonella* with recombinase aided amplification [J]. J Microbiol Methods, 2017, 139: 202–204.
- [62] 王金凤, 项佳林, 孙晓霞, 等. 铜绿假单胞菌实时荧光重组酶介导链置换核酸扩增方法建立及应用[J]. 中国食品卫生杂志, 2020, 32(5): 524–529.
- WANG JF, XIANG JL, SUN XX, *et al.* Establishment and application of a real-time fluorescent recombinase-mediated strand replacement nucleic acid amplification method for *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chin J Food Hyg, 2020, 32(5): 524–529.
- [63] 葛以跃, 苏璇, 张倩, 等. CRISPR-Cas13a 结合重组酶介导的扩增快速检测副溶血性弧菌方法的建立[J]. 现代预防医学, 2019, 46(20): 3777–3781.
- GE YY, SU X, ZHANG Q, *et al.* Establishment of a rapid detection method for *Vibrio parahaemolyticus* by CRISPR-Cas13a combined with recombinase-mediated amplification [J]. Mod Prev Med, 2019, 46(20): 3777–3781.
- [64] 施奕, 徐昌平, 余蓓蓓, 等. 重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J]. 病毒学报, 2020, 36(3): 522–532.
- SHI Y, XU CP, YU BB, *et al.* Research progress in recombinase polymerase amplification (RPA) [J]. Chin J Virol, 2020, 36(3): 522–532.
- [65] 熊勋爵. 分子生物学技术应用于病原微生物检测中的价值研究[J]. 数理医药学杂志, 2017, 30(6): 931–932.
- XIONG XJ. Study on the value of molecular biology technology in the detection of pathogenic microorganisms [J]. J Math Med, 2017, 30(6): 931–932.
- [66] 杜艳艳. 生物芯片技术在食品安全检测中的应用前景[J]. 现代仪器, 2009, 15(4): 10–12.
- DU YY. Application prospects of biochip technology in food safety testing [J]. Mod Instrum, 2009, 15(4): 10–12.
- [67] 洪诗然, 陈松. 基因芯片技术在食品检测中的应用[J]. 食品安全导刊, 2021, (30): 175–176.
- HONG SR, CHEN S. Application of gene chip technology in food testing [J]. Chin Food Saf Magaz, 2021, (30): 175–176.
- [68] CHEN W, YU S, ZHANG C, *et al.* Development of a single base extension-tag microarray for the detection of pathogenic *Vibrio* species in seafood [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 89(6): 1979–1990.
- [69] SHI YH, CHEN J, LI CH, *et al.* Detection of bacterial pathogens in aquaculture samples by DNA microarray analysis [J]. Aquaculture, 2012, 338: 29–35.
- [70] SALMAN A, CARNEY H, BATESON S, *et al.* Shunting microfluidic PCR device for rapid bacterial detection [J]. Talanta, 2020, 207: 120303.

- [71] OU H, WANG Y, WANG Q, *et al.* Rapid detection of multiple pathogens by the combined loop-mediated isothermal amplification technology and microfluidic chip technology [J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(10): 11053–11066.
- [72] ZHAO P, ZHANG J, ZHANG W, *et al.* Fabrication of a novel hydrogel-based microfluidic chip and its application in pathogen analysis [J]. *Anal Methods*, 2021, 13(43): 5240–5246.
- [73] SUN J, REN Y, JI J, *et al.* A novel concentration gradient microfluidic chip for high-throughput antibiotic susceptibility testing of bacteria [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(4): 1127–1136.
- [74] 崔玉娟. 基因测序技术在食品安全检测中的应用[J]. *食品安全导刊*, 2021, (23): 173–174.
- CUI YJ. Application of gene sequencing technology in food safety detection [J]. *Chin Food Saf Magaz*, 2021, (23): 173–174.
- [75] 张淳, 张媛媛. 基因测序技术在细菌性传染病监测中的应用[J]. *中国医学装备*, 2017, 14(7): 134–138.
- ZHANG C, ZHANG YY. Application of gene sequencing technology in surveillance of bacterial infectious diseases [J]. *Chin Med Equip*, 2017, 14(7): 134–138.
- [76] 周子超, 何岚, 丁月平. 全基因组测序(WGS)在肠杆菌科细菌中的应用研究[J]. *智慧健康*, 2019, 5(2): 70–72.
- ZHOU ZC, HE L, DING YP. Application of whole gene sequencing (WGS) in Enterobacteriaceae [J]. *Smart Healthc*, 2019, 5(2): 70–72.
- [77] DENG Y, XU H, SU Y, *et al.* Horizontal gene transfer contributes to virulence and antibiotic resistance of *Vibrio harveyi* 345 based on complete genome sequence analysis [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 1–19.
- [78] OKADA K, WONGBOOT W, CHANTAROJ S, *et al.* *Vibrio cholerae* embraces two major evolutionary traits as revealed by targeted gene sequencing [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 1–10.
- [79] AZWAI SM, ALFALLANI EA, ABOLGHAIT SK, *et al.* Isolation and molecular identification of *Vibrio* spp. by sequencing of 16S rDNA from seafood, meat and meat products in Libya [J]. *Open Vet J*, 2016, 6(1): 36–43.
- [80] SI Y, WEN J, XU Y, *et al.* Rapid pathogen discovery in diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) using 16S rRNA high throughput sequencing [J]. *Aquacult Rep*, 2021, 21: 100835.
- [81] 陈彦希, 杨伯启, 温贵兰, 等. 黄颡鱼源拟态弧菌的分离鉴定[J]. *动物医学进展*, 2020, 41(4): 53–57.
- CHEN YX, YANG BQ, WEN GL, *et al.* Isolation and identification of *Vibrio mimicus* from yellow catfish [J]. *Prog Vet Med*, 2020, 41(4): 53–57.
- [82] PUK K, BANACH T, WAWRZYNIAK A, *et al.* Detection of *Mycobacterium marinum*, *M. peregrinum*, *M. fortuitum* and *M. abscessus* in aquarium fish [J]. *J Fish Dis*, 2018, 41: 153–156.
- [83] DA-SILVA E, BAUDART J, BARTHELEMEBS L. Biosensing platforms for *Vibrio* bacteria detection based on whole cell and nucleic acid analysis: A review [J]. *Talanta*, 2018, 190: 410–422.
- [84] NORDIN N, YUSOF NA, RADU S, *et al.* Development of an electrochemical DNA biosensor to detect a foodborne pathogen [J]. *Jove-J Vis Exp*, 2018, (136): e56585.
- [85] LOW KF, ZAIN ZM, YEAN CY. A signal-amplified electrochemical DNA biosensor incorporated with a colorimetric internal control for *Vibrio cholerae* detection using shelf-ready reagents [J]. *Biosens Bioelectron*, 2017, 87: 256–263.
- [86] MALHOTRA S, PHAM DS, LAU MPH, *et al.* A low-cost, 3D-printed biosensor for rapid detection of *Escherichia coli* [J]. *Sensors*, 2022, 22(6): 2382.
- [87] MI F, HU C, WANG Y, *et al.* Recent advancements in microfluidic chip biosensor detection of foodborne pathogenic bacteria: A review [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2022: 414(9): 2883–2903.
- [88] BAI S, ZHAO J, ZHANG Y, *et al.* Rapid and reliable detection of 11 food-borne pathogens using thin-film biosensor chips [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(3): 983–990.
- [89] 窦博鑫, 张云亮, 王艳, 等. 生物传感器在食品检测领域的应用研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(3): 845–851.
- DOU BX, ZHANG YL, WANG Y, *et al.* Advances in the application of biosensors in the field of food detection [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(3): 845–851.
- [90] 刘世利. CRISPR 基因编辑技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2020.
- LIU SL. CRISPR gene editing technology [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2020.
- [91] 钱佳婕, 黄迪, 徐颖华, 等. 食源性致病微生物检测技术研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(12): 4775–4785.
- QIAN JJ, HUANG D, XU YH, *et al.* Research progress on detection technology of foodborne pathogenic microorganisms [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12(12): 4775–4785.
- [92] BONINI A, POMA N, VIVALDI F, *et al.* Advances in biosensing: The CRISPR/Cas system as a new powerful tool for the detection of nucleic acids [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 192: 113645.
- [93] XIAO X, LIN Z, HUANG X, *et al.* Rapid and sensitive detection of *Vibrio vulnificus* using CRISPR/Cas12a combined with a recombinase-aided amplification assay [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 767315.
- [94] WU H, CHEN Y, YANG Q, *et al.* A reversible valve-assisted chip coupling with integrated sample treatment and CRISPR/Cas12a for visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Biosens Bioelectron*, 2021, 188: 113352.
- [95] ZHANG M, LIU C, SHI Y, *et al.* Selective endpoint visualized detection of *Vibrio parahaemolyticus* with CRISPR/Cas12a assisted PCR using thermal cycler for on-site application [J]. *Talanta*, 2020, 214: 1.

(责任编辑: 郑丽于梦娇)

## 作者简介



高子惠, 硕士研究生, 主要研究方向为水产品质量安全检测。  
E-mail: 1165173736@qq.com



郑秋月, 博士, 研究员, 主要研究方向为生物与食品安全。  
E-mail: zhengqy@dlnu.edu.cn



曹际娟, 博士, 研究员, 主要研究方向为生物与食品安全。  
E-mail: caojijuan@dlnu.edu.cn