网络出版时间:2019-01-24　16:29　　DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.08.003
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190124.1627.006.html

舒伯特气单胞菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用

刘礼辉[1],胡　蕾[1,2],杨圆圆[3],方　伟[3],林　强[1],付小哲[1],
梁红茹[1],赵永亮[1,4],李宁求[1]

(1 中国水产科学研究院 珠江水产研究所,农业部渔用药物创制重点实验室,广东省水产动物免疫技术重点实验室,广东 广州 510380;
2 上海海洋大学 水产与生命学院,上海 201306;3 广东省水生动物疫病预防控制中心,广东 广州 510222;
4 华中农业大学 水产学院,湖北 武汉 430070)

[摘　要] 【目的】建立一种快速、灵敏的舒伯特气单胞菌(*Aeromanas schubertii*)检测方法。【方法】以舒伯特气单胞菌 *rpoD* (RNA polymerase sigma-70 factor)为靶标基因,设计特异性引物及 TaqMan 探针,建立舒伯特气单胞菌的 TagMan 实时荧光定量 PCR 检测方法,同时验证该方法的特异性、灵敏度、重复性,并用该方法对 50 份临床样品进行检测,验证其应用效果。【结果】含舒伯特气单胞菌 *rpoD* 基因的质粒拷贝数与循环阈值(*Ct*)的标准曲线相关系数为 1.000,扩增效率为 94.705%。实时荧光定量 PCR 检测方法只对舒伯特气单胞菌的靶基因检测结果呈阳性,对嗜水气单胞菌(*Aeromanas hydrophila*)、维氏气单胞菌(*Aeromonas veronii*)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)、诺卡氏菌(*Nocardia seriolae*)等其他 14 种致病菌的检测结果均为阴性,具有高度特异性;对舒伯特气单胞菌重组质粒和纯培养细菌的检出灵敏度分别为 4.76 拷贝/μL 和 15 CFU/mL;批内和批间重复性试验变异系数分别为 0.95%和 1.05%。50 份临床样品检测结果显示,该方法阳性样品检出率为 22%,高于传统细菌分离方法(10%)的检出率。【结论】建立的舒伯特气单胞菌实时荧光定量 PCR 检测方法特异性强、灵敏度高、重复性好,适用于舒伯特气单胞菌的快速诊断检测和流行病学调查。

[关键词] 舒伯特气单胞菌;*rpoD* 基因;实时荧光定量 PCR
[中图分类号] S941.3　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1671-9387(2019)08-0017-08

Development and application of a real-time PCR assay for detection of *Aeromanas schubertii*

LIU Lihui[1], HU Lei[1,2], YANG Yuanyuan[3], FANG Wei[3], LIN Qiang[1], FU Xiaozhe[1], LIANG Hongru[1], ZHAO Yongliang[1,4], LI Ningqiu[1]

(1 *Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, Guangdong* 510380, *China*;
2 *College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai* 201306, *China*; 3 *Guangdong Provincial Aquatic Animal Epidemic Disease Prevention and Control Center, Guangzhou, Guangdong* 510222, *China*; 4 *College of Fisheries, Huazhong Agriculture University, Wuhan, Hubei* 430070, *China*)

Abstract: 【Objective】This study established a sensitive protocol for the detection of *Aeromanas shuberti*. 【Method】The TaqMan real-time PCR was developed with a pair of primers and TaqMan probe targeting the conserved region of *A. schubertii rpoD* gene. The specificity, sensitivity and repeatability of the

[收稿日期] 2018-07-19
[基金项目] 2017 年度广东省渔港建设和渔业发展专项资金(鱼病防治)项目;中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2017HY-ZC0405)
[作者简介] 刘礼辉(1982－),女,湖南娄底人,助理研究员,硕士,主要从事水产养殖病害研究。E-mail:lhliu0614@163.com
[通信作者] 李宁求(1978－),男,湖南宁乡人,副研究员,博士,主要从事淡水鱼类病害防治研究。E-mail:liningq@126.com

method were verified, and 50 clinical samples were tested to verify its application. 【Result】 The correlation efficiency for standard curves of *Ct* value and plasmid copy number was 1.000 and the amplification efficiency was 94.705%. The assay was highly specific for amplification from *A. schubertii*, and had no detection of other 14 pathogenic bacteria including *Aeromanas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas sobria* and *Nocardia seriolae*. The detection limits of recombinant plasmid and pure culture bacteria were 4.76 copies/μL and 15 CFU/mL, respectively. The variation efficiencies in inter-batch repeatability test and intra-batch repeatability test were 0.95% and 1.05%. The positive rate of 50 clinical samples detected by the established method was 22%, which was higher than that of the traditional method (10%). 【Conclusion】 The developed real-time PCR assay was specific, sensitive, repeatable and suitable for epidemiological investigation, prevention and control of *A. schubertii*.

Key words: *Aeromanas schubertii*; *rpoD* gene; real-time PCR

舒伯特气单胞菌(*Aeromanas schubertii*)属气单胞菌科(Aeromonadaceae)、气单胞菌属(*Aeromanas*),为革兰氏阴性杆菌。该菌广泛存在于淡水、海水、土壤、鱼类和脊椎动物肠道中,可导致伤口感染、神经性肌膜炎,是急性腹泻的重要致病菌,严重的还会引起败血症,危及生命。1988年,Hickman-Brenner等[1]在美国德克萨斯州首次发现人感染舒伯特气单胞菌。随后在欧洲[2-3]、中国[4-5]也发现了由舒伯特气单胞菌引起的食源性疾病的病例。而舒伯特气单胞菌作为条件致病菌,在水产养殖中较常见。2012年,国内学者先后报道了舒伯特气单胞菌引起的鳢科鱼类内脏类结节病,其发病时间较短,对鳢科鱼类具有较高的致病力和致死率[6-8],但目前对其病原分布、影响因素、流行规律等各方面的研究仍不深入和系统,因此建立灵敏高效的病原定量检测技术,对该病的早期诊断和防控具有重要意义。

目前,针对舒伯特气单胞菌的快速检测方法较少见,仅刘春等[9]根据该菌的促旋酶B亚单位基因(*gyrB*)、溶血素基因(*hlyA*)的保守序列设计引物,建立了双重PCR检测方法,但该方法仅适用于鳢源舒伯特气单胞菌,且只能进行定性检测,而无法定量。Nagar等[10]研究表明,应用*rpoD*基因(RNA polymerase sigma-70 factor)分析能有效区分和鉴别气单胞菌属的种类。因此,本研究以舒伯特气单胞菌*rpoD*基因为靶基因,建立基于TaqMan探针的舒伯特气单胞菌荧光定量PCR检测方法,并采用该方法对50份临床样品进行对比检测,旨在为舒伯特气单胞菌的早期预警、诊断及防控提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 菌株及临床样品

鳢源致病性舒伯特气单胞菌(*Aeromonas schubertii*)分离株WL1483、舒伯特气单胞菌标准株(*A. schubertii* ATCC43700)、嗜水气单胞菌标准株(*A. hydrophila* ATCC49140和ATCC7970)、温和气单胞菌标准株(*A. sobria* ATCC43979)、维氏气单胞菌标准株(*A. veronii* ATCC35624)、简氏气单胞菌(*A. jandaei* ATCC49568)、鲖爱德华菌标准株(*Edwardsiella ictaluri* ATCC33202)、杀鲑气单胞菌杀鲑亚种标准株(*A. salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC33658)、诺卡氏菌(*Nocardia seriolae* JZ-1)、迟缓爱德华菌标准株(*E. tarda* ATCC15947)、副溶血弧菌标准株(*Vibrio parahaemolyticus* ATCC33846)、海豚链球菌标准株(*Streptococcus iniae* ATCC29177)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* ATCC25571)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* BD-1)、柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare* GHS061212)和类志贺邻单胞菌(*Plesiomonas shigelloides* HP-1)共16株菌,均由珠江水产研究所鱼病室保存。

临床样品来源于广东各地鳢、加州鲈养殖场,包括体表有出血点、内脏类结节等临床症状的发病鱼和正常鱼样品共30份,养殖水样品20份。

1.2 引物与TaqMan探针的设计

从GenBank数据库中获取气单胞菌属主要种代表性菌株的*rpoD*基因序列,采用Vector NTI Suite 9.0软件对其进行同源性分析。针对舒伯特气单胞菌*rpoD*基因特异性序列,采用Premier 5.0生物学软件设计特异引物和探针,上、下游引物序列分别为:*rpoD*-F. 5′-AACATGCGCGAGATGATGGA-3′;*rpoD*-R. 5′-CGCACTCGTTGTTGGTGAAG-3′;探针序列为:*rpoD*-P:5′-(FAM,荧光基团)-GCTCGACACACATCTTCAGG-(Eclipse,淬灭基团)-3′。将此引物和探针进行BLAST同源性比较,

确保其对舒伯特气单胞菌具有高度特异性。探针和引物委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.3　各菌株基因组 DNA 的实时荧光定量 PCR 及特异性检测

以 1.1 节中各菌株基因组 DNA 为模板，进行实时荧光定量 PCR 扩增，通过观察扩增曲线判断其特异性，以双蒸水为空白对照。参照 Premix Ex Taq™说明书，将上、下游引物及探针、Premix Ex Taq™、ROX Reference Dye Ⅱ、模板加入到反应体系中，于 ABI QuantStudio 6 Flex 荧光定量 PCR 仪上进行荧光定量 PCR 扩增。荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL：2×Mix 10 μL，上游引物（10 μmol/L）0.4 μL，下游引物（10 μmol/L）0.4 μL，荧光探针（5 μmol/L）0.4 μL，Dye Ⅱ 0.4 μL，DNA 模板 2 μL，去离子水 6.4 μL。反应程序为：95 ℃预变性 10 s；95 ℃ 5 s，60 ℃ 34 s（收集 FAM 荧光信号），扩增 40 个循环，反应耗时 54 min。

1.4　阳性重组质粒的制备与检测标准曲线的建立

以舒伯特气单胞菌标准菌株 ATCC43700 的 DNA 为模板，用 *rpoD* 基因特异性引物扩增 *rpoD* 基因保守序列，获得片段长度为 392 bp 的 PCR 产物。将含有目的扩增片段的 PCR 产物切胶回收、纯化，连接到 PMD18-T（Takara）质粒载体中制备重组质粒标准品，经测序分析验证。用核酸测定仪（D-Drop-1000）测定标准品的浓度，根据阿伏伽德罗常数换算出 1 μL 标准品中的拷贝数。用双蒸水对标准品进行 10×倍比稀释，采用优化好的体系进行荧光定量 PCR 反应（每个稀释度 3 个重复），建立质粒拷贝数与循环阈值（*Ct*）对应关系的标准曲线。

1.5　舒伯特气单胞菌荧光定量 PCR 的灵敏度检测

1.5.1　含 *rpoD* 基因质粒的最低检出限　提取含有目的片段的质粒 DNA（4.76×10^8 拷贝/μL），10 倍等比稀释为 4.76×10^6，4.76×10^5，4.76×10^4，4.76×10^3，4.76×10^2，4.76×10^1，4.76×10^0，4.76×10^{-1}拷贝/μL，以无菌水为空白对照，并用相应引物与探针进行荧光定量 PCR 扩增，确定该方法对靶基因的最低检出限。

1.5.2　纯培养物的最低检出限　利用平板计数法，对舒伯特气单胞菌 ATCC43700 进行计数，调节菌液密度达到 1.5×10^8 CFU/mL，再按 10 倍梯度稀释。取 1 mL 各密度菌液，用细菌基因组提取试剂盒提取 DNA 作为检测模板（终体积 50 μL），以无菌水为模板作空白对照，用 1.3 节中荧光定量 PCR 检测方法，确定对舒伯特气单胞菌纯培养物的最低检出限。

1.6　舒伯特气单胞菌荧光定量 PCR 的重复性检测

取舒伯特气单胞菌 *rpoD* 基因质粒 DNA 进行荧光定量 PCR，在同一次试验中重复 30 次，观察其 *Ct* 值变异系数。同时观察在 30 个不同试验中此样品的 *Ct* 值变异系数，确定该方法的重复性。

1.7　临床样品的检测

对 50 份临床样品（鱼样品各取 0.1 g 肝脏组织，养殖水样品各取 1 mL 混匀的养殖水）提取总 DNA，进行荧光定量 PCR 检测；同时无菌操作取 0.1 g 鱼肝脏组织匀浆液或 100 μL 水样（10 倍浓缩），在脑心浸液琼脂培养基（brian heart infusion，BHI）中进行传统细菌分离培养，分别挑选单菌落纯化培养后提取 DNA，进行常规 PCR 检测。对荧光定量 PCR 检测结果呈阳性、而传统细菌分离培养检测结果呈阴性的临床样品进行复检，方法如下：取 0.1 g 组织匀浆或 1 mL 水样（10 倍浓缩）置于碱性蛋白胨水中增菌 6 h 后，再进行分离纯化培养，对经常规 PCR 检测、生化鉴定（biologⅢ细菌鉴定仪）以及荧光定量 PCR 检测同时认定为舒伯特气单胞菌者，判定为阳性。

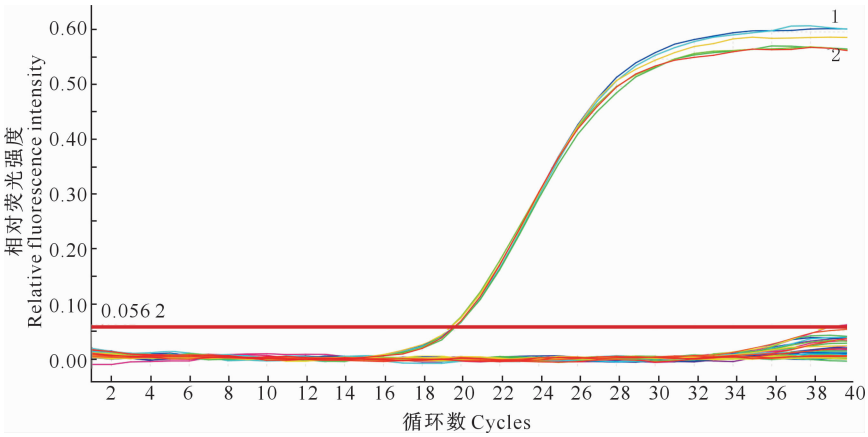
2　结果与分析

2.1　舒伯特气单胞菌荧光定量 PCR 的特异性

荧光定量 PCR 特异性检测结果显示，舒伯特气单胞菌菌株 ATCC43700、WL1483 均可检测到“S”型荧光扩增曲线，结果为阳性；而嗜水气单胞菌、维氏气单胞菌、温和气单胞菌、诺卡氏菌等其他 14 株非舒伯特气单胞菌样品和空白对照品均无荧光扩增曲线，*Ct* 值无法读取，结果均为阴性。表明以 *rpoD* 为靶基因设计的荧光定量 PCR 检测方法可特异性检测舒伯特气单胞菌（图 1）。

2.2　舒伯特气单胞菌荧光定量 PCR 标准曲线的建立

用舒伯特气单胞菌 *rpoD* 基因的阳性重组质粒进行荧光定量 PCR 扩增，以不同浓度的质粒拷贝数为横坐标，相对应的循环阈值 *Ct* 为纵坐标，获得标准曲线，该曲线的斜率为 −3.456，截距为 38.089（图 2）。得出质粒拷贝数（*X*）与 *Ct* 值之间的线性方程为：$Ct=-3.456\ \lg X+38.089$。标准曲线在 $4.76\times10^2\sim4.76\times10^8$ 拷贝/μL 时有良好的线性关系，相关系数为 1.000，扩增效率为 94.705%。



1. 舒伯特气单胞菌 ATCC43700;2. 舒伯特气单胞菌病原分离株 WL1483

1. *Aeromonas schubertii* ATCC43700;2. *Aeromonas schubertii* WL1483

图 1 舒伯特气单胞菌荧光定量 PCR 检测方法的特异性

Fig. 1 Specificity of the real-time PCR for *Aeromonas schubertii* detection

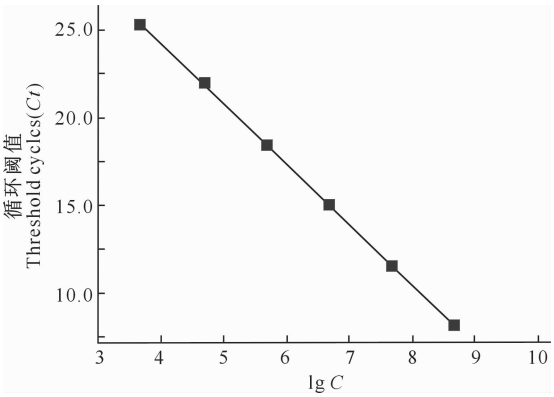


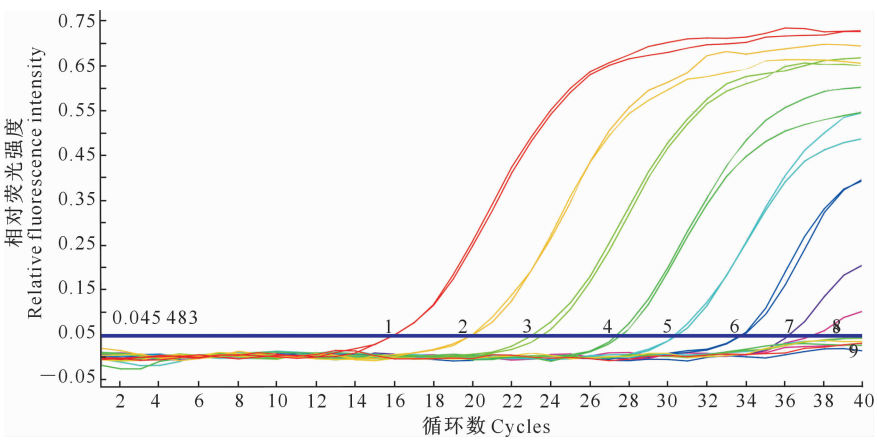
图 2 舒伯特气单胞菌 *rpoD* 质粒拷贝数(*C*)与循环阈值(*Ct*)的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of *Aeromonas schubertii* plasmid copies (*C*) and threshold cycle (*Ct*)

2.3 舒伯特气单胞菌荧光定量 PCR 的灵敏度试验

2.3.1 含 *rpoD* 基因质粒的最低检出限 用建立的荧光定量 PCR 方法对 4.76×10^{6},4.76×10^{5},4.76×10^{4},4.76×10^{3},4.76×10^{2},4.76×10^{1},4.76×10^{0},4.76×10^{-1}拷贝/μL 的舒伯特气单胞菌重组质粒标准品进行检测,结果(图 3)显示,当样品中重组质粒为 4.76×10^{0} 拷贝/μL 以上时,荧光定量 PCR 扩增可生成“S”型荧光曲线(曲线 1~7);当样品中的重组质粒低于 4.76×10^{-1}拷贝/μL 时,无“S”型荧光曲线生成(曲线 8)。

2.3.2 纯培养物的最低检出限 用建立的荧光定量 PCR 方法对 1.5×10^{7},1.5×10^{6},1.5×10^{5},1.5×10^{4},1.5×10^{3},1.5×10^{2},1.5×10^{1},1.5×10^{0} CFU/mL的细菌基因组 DNA 进行检测,结果见图 4。

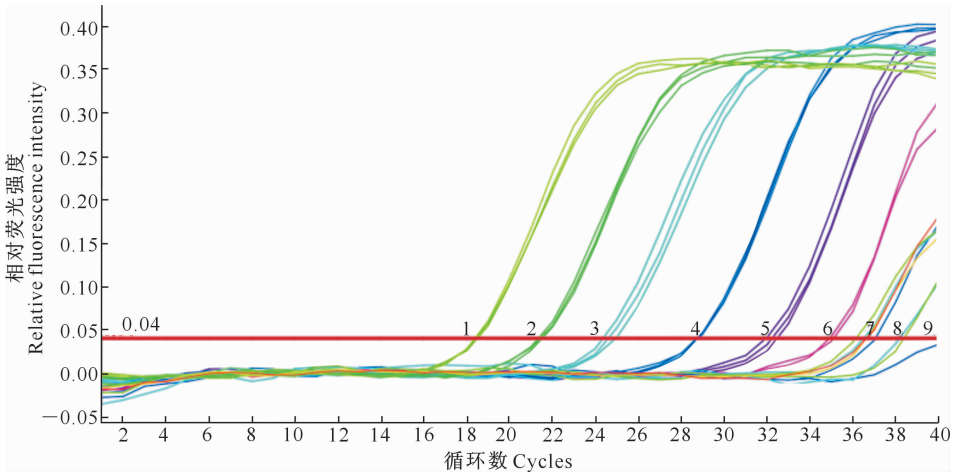


1~8. 分别为 4.76×10^{6},4.76×10^{5},4.76×10^{4},4.76×10^{3},4.76×10^{2},4.76×10^{1},4.76×10^{0},4.76×10^{-1}拷贝/μL 的重组质粒标准品;9. 空白对照

1−8. Recombinant plasmid concentrations were 4.76×10^{6},4.76×10^{5},4.76×10^{4},4.76×10^{3},4.76×10^{2},4.76×10^{1},4.76×10^{0}, and 4.76×10^{-1} copies/μL;9. Blank control

图 3 舒伯特气单胞菌重组质粒荧光定量 PCR 的灵敏度

Fig. 3 Sensitivity of the real-time PCR for *Aeromonas schubertii* plasmid detection



1～8. 分别为 1.5×10^7，1.5×10^6，1.5×10^5，1.5×10^4，1.5×10^3，1.5×10^2，1.5×10^1，1.5×10^0 CFU/mL 的舒伯特气单胞菌纯培养物基因组；9. 空白对照

1－8. Genome DNA of pure cultured *A. schubertii* 1.5×10^7，1.5×10^6，1.5×10^5，1.5×10^4，1.5×10^3，1.5×10^2，1.5×10^1，and 1.5×10^0 CFU/mL；9. Blank control

图 4　舒伯特气单胞菌基因组荧光定量 PCR 的灵敏度

Fig. 4　Sensitivity of the real-time PCR for genome of *Aeromonas schubertii* detection

图 4 显示，当样品中至少有 1.5×10^1 CFU/mL 细菌基因组 DNA 时，荧光定量 PCR 扩增可生成“S”型荧光曲线（曲线 1～7 ）；当样品中的细菌菌落数低于 1.5×10^0 CFU /mL 时，无“S”型荧光曲线生成（曲线 8）。

2.4　舒伯特气单胞菌荧光定量 PCR 的重复性

对同一样品在同一次试验获得的 *Ct* 值进行统计发现，同一次试验内 30 个平行样的扩增曲线在阈值线附近基本重合（图 5），*Ct* 值平均读数为 18.5，标准差为 0.094，变异系数为 0.95%。同一样品在 30 次不同试验中所获得的 *Ct* 值也基本相同，*Ct* 平均值为 19.3，标准差为 0.143，变异系数为 1.05%。以上统计结果表明，本试验所建立的舒伯特气单胞菌荧光定量 PCR 快速检测方法重复性较好。

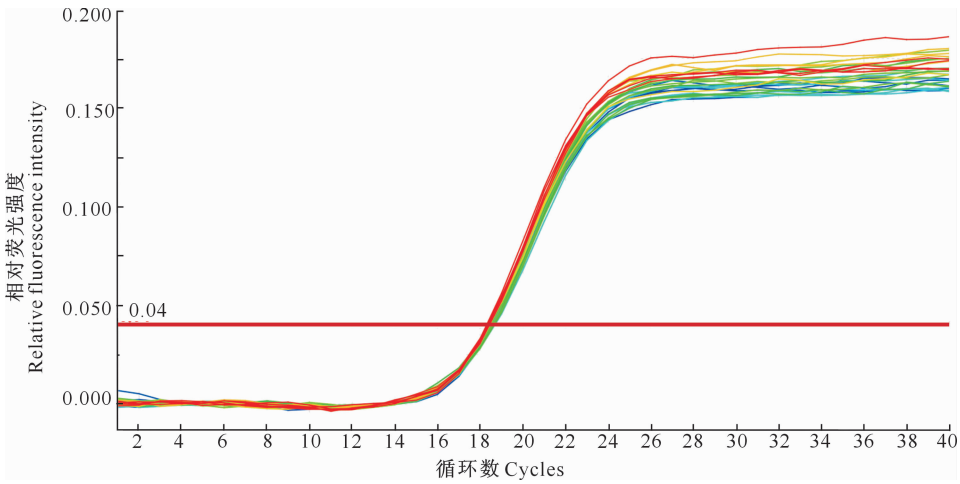


图 5　舒伯特气单胞菌荧光定量 PCR 重复 30 次的试验结果

Fig. 5　Results of 30 *Aeromonas schubertii* detections by real-time PCR

2.5　荧光定量 PCR 检测方法的临床应用

应用荧光定量 PCR 方法对临床送检的 50 份样品进行检测，结果（表 1）显示，从中检出阳性样品 11 份，检出率 22%，与传统细菌分离和常规 PCR 鉴定结果（阳性 5 份，检出率 10%）相比，检出率明显提高。对定量 PCR 检测阳性、传统检测结果阴性的样品进行增菌再分离，通过常规 PCR 检测和生理生化鉴定，确定检测结果呈阳性。

表 1 舒伯特气单胞菌临床样品的荧光定量 PCR 检测结果

Table 1 Detection of samples of *Aeromonas schubertii*

样品 Sample	荧光 PCR 检测结果 Fluorescence PCR		传统检测结果 Traditional method		复检结果 Recheck	
	阳性 Positive	阴性 Negative	阳性 Positive	阴性 Negative	阳性 Positive	阴性 Negative
鱼样 1 Fish sample 1		−		−		−
鱼样 2 Fish sample 2		−		−		−
鱼样 3 Fish sample 3	+			−	+	
鱼样 4 Fish sample 4		−		−		−
鱼样 5 Fish sample 5		−		−		−
鱼样 6 Fish sample 6		−		−		−
鱼样 7 Fish sample 7	+		+		+	
鱼样 8 Fish sample 8		−		−		−
鱼样 9 Fish sample 9		−		−		−
鱼样 10 Fish sample 10	+			−	+	
鱼样 11 Fish sample 11		−		−		−
鱼样 12 Fish sample 12		−		−		−
鱼样 13 Fish sample 13		−		−		−
鱼样 14 Fish sample 14		−		−		−
鱼样 15 Fish sample 15	+		+		+	
鱼样 16 Fish sample 16		−		−		−
鱼样 17 Fish sample 17		−		−		−
鱼样 18 Fish sample 18		−		−		−
鱼样 19 Fish sample 19	+			−	+	
鱼样 20 Fish sample 20		−		−		−
鱼样 21 Fish sample 21		−		−		−
鱼样 22 Fish sample 22		−		−		−
鱼样 23 Fish sample 23		−		−		−
鱼样 24 Fish sample 24	+		+		+	
鱼样 25 Fish sample 25		−		−		−
鱼样 26 Fish sample 26		−		−		−
鱼样 27 Fish sample 27		−		−		−
鱼样 28 Fish sample 28	+			−	+	
鱼样 29 Fish sample 29		−		−		−
鱼样 30 Fish sample 30	+			−	+	
水样 1 Water sample 1		−		−		−
水样 2 Water sample 2		−		−		−
水样 3 Water sample 3		−		−		−
水样 4 Water sample 4	+		+		+	
水样 5 Water sample 5		−		−		−
水样 6 Water sample 6		−		−		−
水样 7 Water sample 7		−		−		−
水样 8 Water sample 8		−		−		−
水样 9 Water sample 9		−		−		−
水样 10 Water sample 10		−		−		−
水样 11 Water sample 11	+			−	+	
水样 12 Water sample 12		−		−		−
水样 13 Water sample 13		−		−		−
水样 14 Water sample 14		−		−		−
水样 15 Water sample 15		−		−		−
水样 16 Water sample 16	+		+		+	
水样 17 Water sample 17		−		−		−
水样 18 Water sample 18		−		−		−
水样 19 Water sample 19		−		−		−
水样 20 Water sample 20		−		−		−
合计 Total	11	39	5	45	11	39

3 讨　论

由舒伯特气单胞菌引起的鳢科鱼类内脏白点病，在临床上与其他病原菌引起的鳢科鱼类内脏类结节病，如诺卡氏菌[11]、分枝杆菌[12]和类立克次体[13]等引起的鳢科鱼类内脏类结节病等相似，因此难以区分。由于内脏类结节病的病理组织损伤潜伏期较长，当出现严重的结节症状时体表才会出现相关症状，加之不同病原所致的类似症状诊断困难，因此建立特异、快速、灵敏的检测方法对鳢舒伯特气单胞菌早期预警和病原监测具有重要意义。

用于细菌病诊断的方法通常有 2 类：一是细菌分离培养，为细菌病诊断金标准，但病原菌的分离纯化耗时长，检出率低，对操作技术要求较高；二是分子生物学诊断，如 PCR 方法等，其以快速、敏感和特异等优点而被广泛应用于细菌鉴定。管家基因在细菌分类鉴定中被广泛使用，其中 16S rRNA 的应用尤为广泛[14]。但气单胞菌属细菌种类繁多，种间 16S rRNA 基因差异较小，仅通过 16S rRNA 基因难以对其进行分类鉴定；而一些保守性相对较低的管家基因 *gyrB*、*rpoB*[15-16]和 *gyrA*、*rpoD*[17-19]等已被广泛用于气单胞菌属/假单胞菌属的分类鉴定。本研究利用 *rpoD* 基因保守序列建立的舒伯特气单胞菌荧光定量检测体系，在 16 株常见病原菌检测中具有良好的特异性，证实 *rpoD* 基因能将嗜水气单胞菌、杀鲑气单胞菌、维氏气单胞菌、温和气单胞菌、简氏气单胞菌等气单胞菌在种的水平上进行准确区分，表明该方法适用于舒伯特气单胞菌的特异性检测。

荧光定量 PCR 快速检测方法灵敏性高，在样本中菌体含量很低的情况下，仍能检测出菌体核酸，并且可对大量样本进行定性和定量分析，因此被广泛应用于动物医学和分子生物学研究领域[20-21]。本研究建立的荧光定量 PCR 方法检测舒伯特气单胞菌的最低检测限为 15 CFU/mL，其灵敏度明显高于刘春等[9]建立的舒伯特气单胞菌多重 PCR 方法（3×10^2 CFU/mL）。在临床样品检测试验中，荧光定量 PCR 阳性检出率明显高于传统检测方法，其中传统检测结果阳性的样品，荧光定量 PCR 检测结果均为阳性，荧光定量 PCR 检测结果为阴性的样品，传统检测结果无一阳性。荧光定量检测阳性的 11 份样品中，传统检测只有 5 份阳性，增菌复检结果表明 11 份样品均为阳性。荧光定量 PCR 检测结果与传统检测结果不完全一致，可能是由于其检测灵敏度不同所致，但复检结果表明，荧光定量 PCR 检测结果与临床结果相符。早期潜伏感染的组织样品或水体中舒伯特气单胞菌载菌量较低时，采用传统细菌分离检测方法可能存在假阴性问题，虽然增菌后检测能提高阳性检出率，但样品中的杂菌同样可能干扰检测结果，因此本研究建立的舒伯特气单胞菌荧光定量 PCR 检测方法在特异性和灵敏度方面有明显优势，能较好地应用于舒伯特气单胞菌的检测和诊断，可为舒伯特气单胞菌病的早期预警和流行病学调查提供技术支撑。

[参考文献]

[1] Hickman-Brenner F W, Fanning G R, Mathew A, et al. *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1988, 26(8): 1561-1564.

[2] Amy M C, Marii M A, Fanning G R, et al. Characterization of *Aeromonas schubertii* strains recently isolated from traumatic wound infections [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1989, 27(8): 1826-1830.

[3] Kao T L, Kao M L. A fatal case of necrotizing *Aeromonas schubertii* fasciitis after penetrating injury [J]. American Journal of Emergency Medicine, 2012, 30: 258. e3-258. e5.

[4] 王立华，梁玉兰，刘汉超，等. 从腹泻病人大便检出 1 株与肠出血性大肠菌 O157 交叉凝集的舒伯特气单胞菌 [J]. 预防医学文献信息，2002，8(2)：140.
Wang L H, Liang Y L, Liu H C, et al. *Aeromonas schubertii*, cross agglutination with EHEC O157, found in excrement of diarrhea patients [J]. Liferatue and Information On Preventine Medicine, 2002, 8(2): 140.

[5] 王晓萍，陈拱立，郭维植. 从腹泻患者中检出简达和舒伯特气单胞菌 [J]. 海峡预防医学杂志，1997，3(1)：26-27.
Wang X P, Chen G L, Guo W Z. *Aeromonas schubertii* and *Aeromonas jandaei* found in diarrhea patients [J]. Strait Journal of Preventive Medicine, 1997, 3(1): 26-27.

[6] 罗　霞，邓国成，廖国礼，等. 斑鳢内脏白点病病原的分离鉴定 [J]. 大连海洋大学学报，2012，27(2)：95-100.
Luo X, Deng G C, Liao G L, et al. Isolation and identification of causative pathogen for visceral white spot in Taiwan snakehead *Channa maculata* [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2012, 27(2): 95-100.

[7] Liu J Y, Li A H. First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor), in China [J]. Journal of Fish Diseases, 2012, 35: 335-342.

[8] 刘　春，李凯彬，王　庆，等. 杂交鳢（斑鳢♀×乌鳢♂）内脏类结节病病原菌的分离、鉴定与特性分析 [J]. 水产学报，2012，36(7)：1119-1125.
Liu C, Li K B, Wang Q, et al. Isolation, identification and characterization of *Aeromonas schubertii* from hybrid snakehead

(*Channa maculata* ♀×*C. argus* ♂)[J]. Journal of Fisheries of China,2012,36(7):1119-1125.

[9] 刘 春,李凯彬,王 庆,等.鱼致病性舒伯特气单胞菌双重PCR检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2014,36(1):54-57.
Liu C,Li K B,Wang Q,et al. Establishment of duplex PCR for detection of pathogenic *Aeromonas schubertii* [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine,2014,36(1):54-57.

[10] Nagar V,Shashidhar R,Bandekar J R. Characterization of *Aeromonas strains* isolated from Indian foods using *rpoD* gene sequencing and whole cell protein analysis[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology,2013,29(4):745-752.

[11] 曹 铮,沈锦玉,谢荣林,等.乌鳢结节病病原诺卡氏菌的分离与鉴定[J].水生生物学报,2009,33(2):338-340.
Cao Z,Shen J Y,Xie R L,et al. Isolation and identification of a strain of *Nocardia* a pathogen of snakehead fish (*Ophicephalus argus-argus*) with tuberculosis[J]. Acta Hudrobiologica Sinica,2009,33(2):338-340.

[12] Enrico T,Alessandro B,Elena B,et al. Identification of the newly described *Mycobacterium poriferae* form tuberculous lesions of snakehead fish (*Channa striatus*)[J]. Comparative Immunology,Microbiology & Infectious Diseases,1996,19(1):25-29.

[13] 郭琼林,贾伟章,韩先朴,等.我国淡水养殖乌鳢的类立克次体感染[J].自然科学进展,2004,14(1):59-64.
Guo Q L,Jia W Z,Han X P,et al. Rickettsia-like infection in a cultured fish,*Ophiocephalus argus* [J]. Progress in Natural Science,2004,14(1):59-64.

[14] 金 鑫,李 妍,陈代杰.PCR扩增16S rRNA基因在细菌菌种鉴定中的应用[J].国外医药抗生素分册,2003,249(5):223-225.
Jin X,Li Y,Chen D J. Application of 16S rRNA gene in identification of bacteria[J]. World Notes on Antibiotics,2003,249(5):223-225.

[15] Küpfer M,Kuhnert P,Korczak B M,et al. Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA,*gyrB* and *rpoB* gene sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2006,56:2743-2751.

[16] Soler L,Yáñez M A,Chacon M R,et al. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2004,54:1511-1519.

[17] Ghyselinck J,Coorevit A,Van L A,et al. An *rpoD* gene sequence based evaluation of cultured *Pseudomonas* diversity on different growth media[J]. Microbiology,2013,159(Pt 10):2097-2108.

[18] 李欣悦,李凤娟,杜鹏程,等.*rpoD* 和 *gyrA* 基因对气单胞菌鉴定的比较分析[J].疾病监测,2016,31(3):200-204.
Li X Y,Li F J,Du P C,et al. Comparative analysis of *rpoD* and *gyrA* gene in identification of *Aeromonas* [J]. Disease Surveillance,2016,31(3):200-204.

[19] Senderovich Y,Ken-Dror S,Vainblat I,et al. A molecular study on the prevalence and virulence potential of *Aeromonas* spp. recovered from patients suffering from diarrhea in Israel[J]. PLoS One,2012,7(2):1-6.

[20] 凌 娇,王 权,万 莹,等.副溶血弧菌和霍乱弧菌双重荧光定量PCR快速检测方法的建立与应用[J].畜牧与兽医,2018,50(4):93-99.
Ling J,Wang Q,Wan Y,et al. Establishment and application of the duplex real-time PCR of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholera* [J]. Animal Husbandry &Veterinary Medicine,2018,50(4):93-99.

[21] 杨 俊,聂福平,李应国,等.迟缓爱德华氏菌TaqMan荧光定量PCR检测方法的建立[J].中国兽医科学,2018(8):953-957.
Yang J,Nie F P,Li Y G,et al. Development of TaqMan real-time PCR assay for the detection of *Edwardsiella tarda* [J]. Chinese Veterinary Science,2018(8):953-957.