

## 三重 PCR 检测鱼类致病性嗜水气单胞菌

王远微, 汤承, 于学辉, 王英, 岳华\*

(西南民族大学生命科学与技术学院, 成都 610041)

**摘要:**【目的】建立一种能够快速准确地检测致病性嗜水气单胞菌的 PCR 方法。【方法】根据嗜水气单胞菌的 16S rRNA、气溶素基因 (*aer*) 和丝氨酸蛋白酶基因 (*ahp*) 的保守序列设计了 3 对引物, 然后进行了 PCR 反应条件的优化、特异性和敏感性的检测并与普通的细菌分离鉴定进行了临床样本和人工攻毒样本检出率的比较。【结果】该方法特异性好, 只对致病性嗜水气单胞菌呈阳性扩增; 敏感性高, 最低可检测 100fg 的细菌 DNA 模版。对临床疑似黄鳝 (*Monopterus albus*) 样本的检出率为 81.8%, 高于细菌分离的 40.9%; 对人工攻毒鲫鱼 (*Carassius auratus*) 样本的检出率为 87.5%, 高于细菌分离的 67.5%。【结论】本方法的成功建立, 实现在同一反应管中同时对 16SrRNA、*aer* 和 *ahp* 的检测, 避免了只针对 *aer* 或 *ahp* 单个毒力基因的 PCR 检测方法可能存在的漏检和误检, 为致病性嗜水气单胞菌的诊断、大规模检疫、流行病学调查等提供了一种快速、准确而有效的检测方法。

**关键词:** 嗜水气单胞菌; *aer*; *ahp*; 16S rRNA; 三重 PCR

中图分类号: R37 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0947-05

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 是一种广泛存在于水环境的常在病原菌, 它不仅能引发多种水生动物的传染病, 而且还能导致爬行类、两栖类、鸟类以及哺乳类等多种动物全身性败血症或局部感染, 并常致死动物。20 世纪 90 年代以来, 该病原菌常引起我国淡水养殖鱼类的暴发性败血症, 造成了重大的经济损失, 已成为水产养殖动物的主要细菌病之一<sup>[1]</sup>。近年来大量材料证明, 嗜水气单胞菌亦可单独或与其它致病菌共同感染, 引发人类的食物中毒、腹泻、败血症以及局部的伤口感染等病症, 影响食品安全, 并且是免疫抑制病人和肝功能疾病患者的机会致病菌<sup>[2-4]</sup>。其公共卫生学意义日益受到广泛重视。

嗜水气单胞菌的毒力差异较大, 广泛存在无毒菌株, 传统的细菌分离鉴定要结合毒素的生物学或血清学方法才能确定其致病性, 费时、费力而且敏感性不

高; 现已建立了针对 *aer* 或 *ahp* 进行检测的普通 PCR 方法, 用于致病性嗜水气单胞菌快速诊断<sup>[5-8]</sup>。但是由于存在 *aer*<sup>+</sup>*ahp*<sup>-</sup>基因型和 *aer*<sup>-</sup>*ahp*<sup>+</sup>基因型的致病菌株<sup>[9, 10]</sup>, 针对 *aer* 或 *ahp* 单个基因建立的 PCR 方法可能存在漏检。因此建立多重毒力基因的 PCR 检测方法是该致病菌检测比较可取的方法<sup>[9]</sup>。此外 *aer* 和 *ahp* 不具有种属特异性, 气单胞菌属的其它细菌也可能有这两个基因, 而且基因的序列同源性比较高, 所以只针对毒力基因进行检测而不进行种的鉴定会导致误检<sup>[8]</sup>, 因此在进行毒力基因的检测同时进行种的鉴定是该致病菌准确检测的有效保证<sup>[11]</sup>。

本实验旨在建立同时针对嗜水气单胞菌 16S rRNA、*aer* 和 *ahp* 进行检测的 PCR 方法, 以期提高对致病性嗜水气单胞菌检测的准确性、检出率以及检测效率, 为致病性嗜水气单胞菌的快速检测、大规模检疫、流行病学调查等提供新的检测手段。

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重大项目 (2006BAD06A11)

\*通讯作者: Tel: +86-28-85528276; Fax: +86-28-85522855; E-mail: yhua900@yahoo.com.cn

作者简介: 王远微 (1982-), 男 (满族), 辽宁鞍山人, 硕士研究生, 病原分子生物学专业方向。E-mail: wangyuanwei0729@hotmail.com

收稿日期: 2008-01-10; 修回日期: 2008-04-01

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和临床样本：**嗜水气单胞菌 ATCC7966 标准株和 AH39 参考株购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心；嗜水气单胞菌 J-1 株由南京农业大学姚火春副教授惠赠；嗜水气单胞菌 xs91-4-1、温和气单胞菌 CR79-1-1、豚鼠气单胞菌 DMA1-A、简达气单胞菌 F30-3、维氏气单胞菌 J1CC-M 购于中国科学院水生生物研究所；豚鼠气单胞菌 AT 株由通威集团有限公司研究所惠赠；嗜水气单胞菌分离株 SW001-SW009 由本实验分离鉴定保存，致病性大肠杆菌 2385 购自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心；沙门氏菌 C79-6 购自中国兽药监查所；葡萄球菌购自四川省药品食品检验所；产气荚膜梭菌 CLM001、链球菌 SPM001 由本实验分离鉴定保存。临床样本 22 份（编号为 SWL001-SWL022），来源于成都某鳝鱼养殖场，具有肝脏出血肿胀，肛门外翻，腮部的出血等典型的嗜水气单胞菌病临床症状和病理变化的鳝鱼。人工攻毒鲫鱼样本 40 份（编号为 SWR001-SWR040）：用嗜水气单胞菌分离株 SW001，接种 LB 肉汤培养 18 h（细菌浓度为  $10^9$ ），0.2mL/尾脊鳍基部肌肉注射人工感染健康鲫鱼，感染鲫鱼表现出嗜水气单胞菌病典型临床症状和病理变化。

**1.1.2 主要试剂和仪器：**Taq DNA 聚合酶、dNTPs、pMD 18-T Vector 购于 TaKaRa 公司；细菌基因组 DNA 提取试剂盒购于北京 TIANGEN 公司；Mini Tissue/Cells DNA Extraction Kit 试剂盒购于上海华舜生物工程有限公司；AXY prep<sup>TM</sup> DNA Gel extraction kit 由美国 AXYGEN 公司生产；E.Z.N.A.Plasmid Mini Kit I 质粒提取试剂盒由 OMEGA 公司生产。高速离心机 centrifuge 5804（Eppendorf 公司，德国）；核酸蛋白检测仪 DU800（Beckman 公司，美国）；普通梯度 PCR 仪 Px2（Thermo Hybaid 公司，美国）；普通 PCR 仪 my cycler<sup>TM</sup>、核酸电泳仪 powerpac universal<sup>TM</sup>、凝胶成像系统 VerSa Doc2000（Bio-Rad 公司）。

### 1.2 PCR 方法的建立

**1.2.1 引物设计：**根据 GenBank 中已公布的嗜水气单胞菌 *ahp* 和 *aer* 的保守序列，分别设计扩增特异性片段的引物，16S rRNA 引物参照褚卫华等<sup>[8]</sup>的引物，采用 NCBI 网站 BLAST 工具，在 GenBank 中进行检索，初步验证特异性后交于大连宝生物公司合成（表 1）。

表 1 引物信息  
Table 1 Information for primers

Primers	Sites	Size of fragment/bp	Sequence (5' 3')
P <sub>aer</sub>	1359-1483	561	ATGACGGCGGTTGCGAGGGTT TGTGGTTCCAGTTCGGGCGATTGT
P <sub>ahp</sub>	876-1003	128	CTCCTACTCCAGCGTCGGC GATCGTCGGTGCGGTTGT
P <sub>16S rRNA</sub>	445-1130	686	GAAAGGTTGATGCCTAATACGTA CGTGCTGGCAACAAAGGACAG

**1.2.2 DNA 的提取：**将嗜水气单胞菌 ATCC7966 接种于普通营养肉汤置于 28℃ 振荡培养 24 h，取培养液按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒的操作说明提取细菌基因组 DNA，作为本实验的阳性模板。

**1.2.3 引物的特异性检验：**采用上述 16S rRNA、*aer* 和 *ahp* 的引物对阳性模板进行 PCR 扩增，反应体系和反应条件按照 Taq 酶试剂推荐。2% 琼脂糖凝胶电泳，Goldview 染色，目的片段用胶回收试剂盒回收，按照载体说明书与 pMD18-T Vector 连接，转化 DH5 $\alpha$ 感受态细胞，挑选阳性菌落，提取阳性菌落的质粒，进行质粒 PCR 鉴定后送大连宝生物工程公司测序。

**1.2.4 反应条件的优化：**按 25  $\mu$ L 的总反应体系，用 Taq 酶试剂推荐的体系，在不同 DNA 模板浓度下对退火温度从 50 ~65 进行优化，再以优化的退火温度，对引物浓度进行优化，以电泳条带最亮，不产生非特异性扩增，引物二聚体最少，同时敏感性最高为优化指标。

**1.2.5 敏感性检测：**阳性模板用紫外分光光度计测定其浓度，然后对模板进行 10 倍连续稀释，用优化的反应体系和条件进行扩增，确定该方法检测的敏感性。

**1.2.6 特异性评价：**用建立的方法分别检测 ATCC7966、AH39、J-1、xs91-4-1、SW001、CR79-1-1、DMA1-A、F30-3、J1CC-M、*Ecoli*2385、C79-6、葡萄球菌、SPM001、CLM001、健康鲫鱼的组织 DNA 以及无模板对照，以评价该方法的特异性，扩增出 16S rRNA 和两个毒力基因的任意一个即判为阳性，否则为阴性。

### 1.3 PCR 及细菌分离鉴定对临床疑似样本和人工攻毒样本的检出率的比较

对 22 份临床疑似样本和 40 份人工攻毒样本进行常规的细菌分离，接种于 LB 培养基置 28 温箱培养，分离到的细菌按照致病性嗜水气单胞菌检测的国家

标准<sup>[12]</sup>进行了氧化酶试验、AHM 鉴别培养基、吡啶试验、葡萄糖、蔗糖、阿拉伯糖、七叶苷及水杨苷等 5 种糖发酵试验鉴定,并通过脱脂奶平板试验鉴定其致病性。同时采用 Mini Tissue/Cells DNA Extraction Kit 试剂盒提取所有样本的 DNA,分别采用本实验所建立 PCR 方法进行检测,以比较对临床样本的检出率。随机抽取 16S rRNA 基因、*aer* 基因、*ahp* 基因各 5 个阳性扩增产物进行克隆测序,以验证 PCR 检测的准确性。

## 2 结果

### 2.1 PCR 方法的建立

**2.1.1 引物的特异性:** 3 对引物分别扩增出 128 bp、561 bp、686 bp 大小的片段,与预期结果一致(图略)。对 3 个基因目的片段测序结果见 GenBank Accession No. EF666486, EU254217, EU254233,经序列的比对分析表明与嗜水气单胞菌 ATCC7966 的 16S rRNA、*aer* 和 *ahp* 序列的同源性均为 100%。

**2.1.2 优化的反应条件:** 经过优化得到的最佳反应体系为: *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.125 μL, MgCl<sub>2</sub> 1.5 μL (250 mmol/L), 10 × PCR buffer 2.5 μL、dNTP 2 μL (2.5 mmol/L), P<sub>*aer*</sub> 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL、P<sub>*ahp*</sub> 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL、P<sub>16SrRNA</sub> 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL、DNA template 2 μL,加 dH<sub>2</sub>O 补足 25 μL。最佳反应条件为:95 °C 预污染 5 min;(94 °C 30 s, 60 °C 30s, 72 °C 30s, 35 个循环 72 °C 10 min 结束反应。

**敏感性检测:** 敏感性检测的结果显示(图 1)本实验建立的 PCR 方法阳性模板的扩增在 10<sup>-6</sup> 时(模板量为 100fg) 16S rRNA、*ahp* 和 *aer* 均有目的条带,但在 10<sup>-7</sup> 时(模板量为 10fg) 16S rRNA 和 *aer* 仍有扩增条带,但 *ahp* 无扩增条带,所以最终本方法的灵敏度为 100fg 的 DNA 模板。

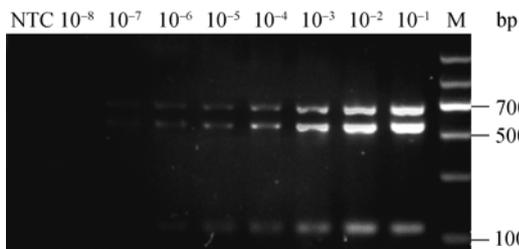


图 1 三重 PCR 方法的敏感性检测结果  
Fig. 1 The sensitivity of triplex PCR. M: DNA marker; 10<sup>-1</sup>–10<sup>-8</sup>: Concentration gradient of DNA; NTC: template control.

**2.1.4 特异性检测结果:** 特异性检测实验表明(图 2),只在检测嗜水气单胞菌的菌株 ATCC7966、AH39、J-1、xs91-4-1 以及 SW001 时本方法才出现特异性的扩增条带,而在检测实验采用的温和气单胞菌、豚鼠气单胞菌、简达气单胞菌、维氏气单胞菌、葡萄球菌、产气荚膜梭菌、链球菌、大肠杆菌、沙门氏菌、正常的黄鳝组织的 DNA 以及无模板对照时均为阴性。

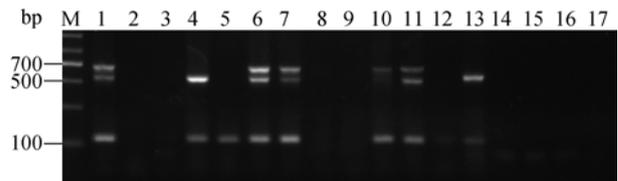


图 2 PCR 的特异性检测结果  
Fig. 2 Specificity of PCR. 1–17: DNA of ATCC7966, DMA1-A, CLM001, AT, J1CC-M, AH39, xs91-4-1, C79-6, E.coli2385, E.coliCMCC44752, SW001, J-1, CR79-1-1, F30-3, Staphylococcus, SPM001, genomic DNA of fish cells, template control.

### 2.2 PCR 和细菌分离鉴定对临床疑似样本和人工攻毒样本的检出率的比较

22 份临床疑似样本 PCR 的检测阳性结果为 18/22,细菌分离的结果为 9/22,PCR 的阳性结果包括了细菌分离的所有阳性样本,具体见表 2;40 份人工攻毒

表 2 PCR 和细菌分离鉴定对临床疑似样本的检出结果  
Table 2 the detection result of suspicious clinical samples by PCR and bacterial isolation

Sample No.	16S rRNA	<i>aer</i>	<i>ahp</i>	Bacterial isolation
SWL001	+	+	+	+
SWL002	+	+	+	+
SWL003	+	+	+	+
SWL004	+	+	+	+
SWL005	+	+	+	+
SWL006	+	+	+	+
SWL007	+	+	+	+
SWL008	+	+	+	+
SWL009	+	+	+	+
SWL010	+	+	+	-
SWL011	+	-	+	-
SWL012	+	+	+	-
SWL013	+	+	+	-
SWL014	-	-	-	-
SWL015	-	-	-	-
SWL016	+	-	-	-
SWL017	+	+	-	-
SWL018	+	+	-	-
SWL019	-	-	-	-
SWL020	+	+	-	-
SWL021	+	+	-	-
SWL022	-	-	-	-

+ Positive results; -Negative results.

样本, PCR 的检测阳性结果为 35/40, 细菌分离的结果为 27/40, PCR 的阳性结果包括了细菌分离的所有阳性样本, 具体见表 3。随机抽取的 16S rRNA、*aer*、*ahp* 基因的测序结果证实扩增的片段确为目的基因片段, 结果见 GenBank accession No: EU254218--EU254232。

表 3 PCR 和细菌分离鉴定对人工攻毒样本的检出结果  
Table 3 Detection result of artificial challenge samples by PCR and bacterial isolation

Sample No.	16S rRNA	<i>aer</i>	<i>ahp</i>	Bacterial isolation
SWR001	+	+	+	-
SWR002	+	+	+	+
SWR003	+	+	+	+
SWR004	+	+	+	+
SWR005	+	+	+	-
SWR006	+	+	+	+
SWR007	+	+	+	+
SWR008	+	+	+	+
SWR009	+	+	+	+
SWR010	+	+	+	-
SWR011	-	-	-	-
SWR012	+	+	+	+
SWR013	+	+	+	+
SWR014	+	+	+	-
SWR015	+	+	+	+
SWR016	+	+	+	+
SWR017	-	-	-	-
SWR018	+	+	+	+
SWR019	+	+	+	+
SWR020	+	+	+	+
SWR021	+	+	+	+
SWR022	+	+	+	+
SWR023	-	-	-	-
SWR024	+	+	+	+

+ Positive results; -Negative results.

### 3 讨论

嗜水气单胞菌不但给水产养殖业造成了重大的经济损失, 而且威胁着人类的健康, 因此快速、准确的诊断对该病的防治有重要的意义。传统的细菌分离鉴定存在操作步骤繁多, 检测周期长的缺点, 而且自然界存在大量的无毒菌株, 分离菌株还必须进行毒力检测。常用的检测嗜水气单胞菌毒力的方法主要有生物学方法<sup>[13]</sup>和血清学方法<sup>[14-17]</sup>。生物学方法直观可靠, 但操作复杂; 血清学方法虽然比较简便, 但嗜水气单胞菌不同菌株所产生的毒素有抗原性的差异, 产毒素菌株的毒力基因在体外培养条件下可能丢失产毒素的能力<sup>[18]</sup>, 因此可能存在漏检, 加之特异性不强、敏感性不高、标准血清的制备困难等问题, 所以这些方法都不适于该病快速诊断、大规模检疫及流行病学调查。

16S rRNA 结构既有高度的保守性又具有高变

性, 保守性反映生物物种的亲缘关系, 高变性则揭示生物物种的特征核酸序列, 使其具有了进行种属鉴定的分子基础, 而且它广泛分布于除真菌和病毒之外的所有微生物, 这些特点使其在微生物的分类鉴定和发现新物种中发挥了非常重要的作用<sup>[11]</sup>。储卫华<sup>[8]</sup>等就建立了针对 16S rRNA 和 *aer* 鉴定致病性嗜水气单胞菌的 PCR 方法。*aer* 和 *ahp* 是嗜水气单胞菌重要的毒力基因, 与嗜水气单胞菌有无毒力或者毒力的强弱有很高的相关性<sup>[9]</sup>, 而且这两对基因在致病性嗜水气单胞菌中的分布很广泛, 是检测嗜水气单胞菌毒力比较理想的毒力基因。Kong<sup>[5]</sup>、卢强<sup>[6]</sup>、Shannon<sup>[7]</sup> 针对气溶素基因、储卫华<sup>[10]</sup> 针对丝氨酸蛋白酶基因都建立了检测致病性嗜水气单胞菌相应的 PCR 方法。但是由于存在 *aer*<sup>+</sup>*ahp*<sup>-</sup> 基因型和 *aer*<sup>-</sup>*ahp*<sup>+</sup> 基因型的致病菌株<sup>[9,10]</sup>, 因此以上只针对 *aer* 或 *ahp* 单个基因建立的 PCR 方法可能存在漏检。

本研究建立了能在同一反应管对嗜水气单胞菌的 16S rRNA、*aer* 和 *ahp* 同时进行扩增的 PCR 方法。同时对 *aer* 和 *ahp* 进行检测, 避免了针对单个毒力基因进行检测所存在的漏检情况, 在检测过程中也发现两例 *ahp*<sup>+</sup>*aer*<sup>-</sup> 基因型的具有典型临床症状的病料, 见表 2, 也印证了针对两个毒力基因进行的检测的必要性和重要性; 由于 *aer* 和 *ahp* 基因在嗜水气单胞菌所在属(气单胞菌属)的其它种细菌中也有分布, 因此本实验除了对毒力基因进行检测外, 还对 16S rRNA 进行了检测, 以鉴定种的特异性, 避免了不进行 16S rRNA 鉴定所存在的误检情况, 在进行特异性检测时, 温和气单胞菌和维氏气单胞菌的 *ahp* 呈阳性, 简单气单胞菌和豚鼠气单胞菌 AT 株同时有 *aer* 和 *ahp* 的扩增, 对嗜水气单胞菌的 16S rRNA 却无扩增, 表明进行 16S rRNA 的检测是非常重要的; 实现了在同一反应中对 3 个基因进行检测, 只要 16S rRNA 和任意一个毒力基因有扩增即判为阳性结果, 不但简化了实验的操作程序、提高了检测效率, 而且节约了检测的成本; 该方法具有较高的敏感性, 最低可检测到 100fg 的 DNA 模板, 对临床疑似样本的检出率为 18/22, 高于细菌分离的 9/22 (见表 2), 对人工攻毒样本的检出率为 35/40, 也高于细菌分离的 27/40 (见表 3), 证明了在实际应用时也具有很高的敏感性。该方法的建立为致病性嗜水气单胞菌的诊断、大规模检疫、流行病学调查等提供了一种快速、准确而有效的检测方法。

## 参 考 文 献

- [1] 郭闯, 王永坤. 嗜水气单胞菌研究进展. 水产科学(Fisheries Science), 2003, 22(6): 48-51.
- [2] 花蕾. 一起嗜水气单胞菌致腹泻病暴发的病原分析. 中国卫生检验杂志(Chinses Journal of Health Laboratory Technology), 2006, 16(10): 1264-1275.
- [3] 杨守明, 王民生. 嗜水气单胞菌及其对人的致病性. 疾病控制杂志(Chinese Journal of Disease Control & Prevention), 2006, 10(5): 511-514.
- [4] Rathinasamy S, Thangavelu T, Govinadasamy V, et al. Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in acute gastroenteritis among children. *Indian J Med Res*, 2006, 123: 61-66.
- [5] Kong RYC, Lee SKY, Law TP, et al. Rapid detection of six types of bacterial pathogens in mains waters by multiplex PCR. *Water Raserch*, 2002, 36: 2802-2812.
- [6] 卢强, 任瑞义, 王文东, 等. 致病性嗜水气单胞菌气溶素基因 PCR 检测方法的建立. 中国兽医学报(Chinese Journal of Veterinary Science), 2001, 21(4): 347-349.
- [7] Shannon KE, Lee DY, T Trevors J, et al. Application of real-time quantitative PCR for the detection of selected bacterial pathogens during municipal wastewater treatment. *The Science of the total environment*, 2007, 382(1): 121-129.
- [8] 储卫华, 陆承平. PCR 扩增特异性 16SrRNA 和溶血素基因检测致病性嗜水气单胞菌. 水产学报(Journal of Fisheries of China), 2005, 29(1): 79-82.
- [9] 朱大玲, 李爱华, 汪建国, 等. 嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性. 中山大学学报(自然科学版)(Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni), 2006, 45(1): 82-85.
- [10] 储卫华. 嗜水气单胞菌临床分离菌株外毒力因子的检测. 中国兽医杂志(Chinese Journal of Veterinary Medicine), 2006, 42(1): 49-50.
- [11] Jill E. Clarridge. Impact of 16SrRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17(4): 840-862.
- [12] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 中华人民共和国国家标准致病性嗜水气单胞菌检验方法 GB/T 18652-2002, 2002-02-19 发布, 2002-05-01 实施.
- [13] 王利. 鱼类嗜水气单胞菌的几种检测方法. 中国兽药杂志(Chinese Journal of Veterinary Drug), 2002, 36(8): 39-40.
- [14] Delamare APL, Echeverrigaray S, Duarte KR, et al. Production of a monoclonal antibody against *Aeromonas hydrophila* and its application to bacterial identifications. *Appl Microbe*, 2002, 92: 936-940.
- [15] Sunee K, Suwat D, Rungrawan C, et al. Distribution of *Aeromonas hydrophila* Serogroups in different clinical samples and the development of polyclonal antibodies for rapid identification of the genus *Aeromonas* by direct agglutination. *Microbiol Immunol*, 2002, 46(12): 875-879.
- [16] 沈素芳, 储卫华, 陆承平. 鱼类致病性气单胞菌诊断试剂盒的研制. 中国兽医学报(Chinese Journal of Veterinary Science), 2000, 20(5): 462-464.
- [17] 陈昌福. 用直接荧光抗体和细菌培养法对中华鳖体内的嗜水气单胞菌的检测. 华中农业大学学报(Journal of Huazhong Agricultural University), 1998, 17(3): 264-266.
- [18] 胡靖, 李爱华, 胡成钰, 等. 温度和 pH 值对嗜水气单胞菌毒力基因表达的影响. 南京理工大学学报(Journal of Nanjing University of Science and Technology), 2006, 6, 30(3): 375-380.

## Detecting pathogenic *Aeromonas hydrophila* in fish by triplex PCR

Yuanwei Wang, Cheng Tang, Xuehui Yu, Ying Wang, Hua Yue\*

(College of Life Science and Technology, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** [Objective] To develop a rapid PCR method to detect pathogenic *Aeromonas hydrophila* in fish. [Methods] For multiple PCR, three pairs of primers were designed based on the conservative sequences of 16SrRNA genes, aerolysin (*aer*) genes and serine-protease (*ahp*) genes of *Aeromonas hydrophila*. By optimization of PCR conditions and estimation of specificity, sensitivity, detection rate, a triplex PCR assay was established. [Results] The assay had a high specificity detecting only pathogenic strains of *Aeromonas hydrophila* but not other irrelative bacteria. The assay had a high sensitivity with the detection limit as low as 100fg, the detection rate of suspicious clinical samples by this assay was 81.8%, which was noticeably higher than that by bacterial isolation method (40.9%). The detection rate of mimic challenge samples by this assay was 87.5%, which was also noticeably higher than that by bacterial isolation method (67.5%). [Conclusion] The simultaneous detection of 16SrRNA gene and two virulent genes in one PCR assay could avoid missed detection possibly caused by PCR with single virulent gene, and provided a useful tool for rapid diagnosis, large-scale quarantine, and epidemiological investigation of the pathogenic *Aeromonas hydrophila*.

**Keywords:** *Aeromonas hydrophila*; *aer*; *ahp*; 16S rRNA; triplex PCR

Supported by the 11<sup>th</sup> Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2006BAD06A11)

\*Corresponding author. Tel: +86-28-85528276; Fax: +86-28-85522855; E-mail: yhua900@yahoo.com.cn

Received: 10 January 2008/ Revised: 1 April 2008