七、水產病害及免疫技術之研究

午仔魚主要病原菌快速檢測套組之研發

朱惠真、廖哲宏
水產養殖組

鏈球菌屬和發光桿菌屬的細菌是很多淡水魚及海水魚的病原，包含海水鱸魚、鰤魚、金鯛魚和大菱鮃，不論野生環境及養殖環境都非常容易感染，因此也造成了全球非常大的經濟損失。目前診斷這些病原的方法有多重擴增反應法 (multiplex PCR assay) 及恆溫環狀擴增法 (LAMP)，這些方法雖然檢出率很高，因涉及到操作的複雜性及耗時性，無法在田間直接使用。快速檢測在養殖現場是控制疾病爆發良好的手段，也是十分適合的養殖田間管理操作，在這個研究中我們結合了聚合酶重組擴增技術 (RPA) 及側流試紙 (LF-strip) 技術，能夠快速地檢測 4 株常見的鏈球菌及發光桿菌病原 (*Streptococcus iniae* (SI), *S. agalactiae* (SA), *Photobacterium damselae* subsp. *damselae* PDSD)、*P. damselae* subsp. *piscicida* (PDSP))。本項快篩試紙無論是針對於鏈球菌或是發光桿菌，RPA 的擴增只需在 36－37 度下耗費 15 分鐘即可完成，再加上 5 分鐘的顯色反應便可以判讀診斷結果；在靈敏度的檢測試驗，發光桿菌的快篩試紙其靈敏度是待測 DNA 濃度達 0.1－1 ng，鏈球菌的快篩試紙其靈敏度是待測 DNA 濃度達 0.01－15 ng (圖 1)，其結果和 PCR 的檢測結果一致；另於專一性的檢測則無偽陽性產生 (圖 2、3)。

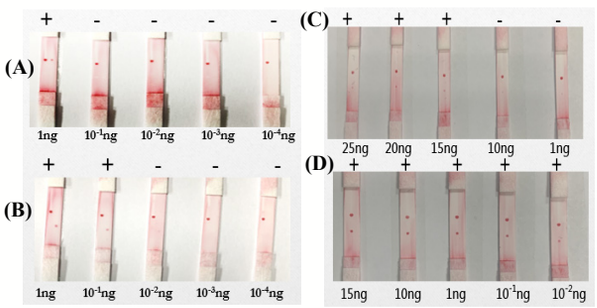

圖 1　試紙靈敏度測試
(A)及(B)為 RPA-LF-PDSP 及 RPA-LF-PDSD，(C)及(D)為 RPA-LF-SI 及 RPA-LF-SA，靈敏度分別為 1ng、0.1ng、15ng 及 0.01ng

聚合酶重組擴增測流試紙 (RPA-LF) 是可以運用在午仔魚的疾病診斷，其具備有靈敏度高及快速的特性，未來此快篩試紙會應用於午仔魚幼苗的篩選汰換，除避免造成疾病的大爆發，也可以提高午仔魚的育成率。

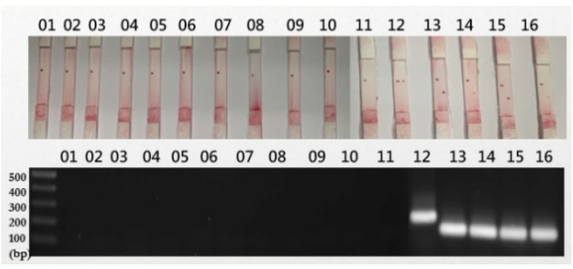

圖 2　發光桿菌 RPA-LF 之專一性測試
偵測菌種為 01-16 分別為 *S. iniae*、*S. iniae*、*S. iniae*、*A. hydrophila*、*E. tarda*、*V. alginolyticus*、*V. harveyi*、*V. parahaemolyticus*、*V. aestuarianus*、*S. epidermidis*、*S. agalactiae*、*P. damselae* subsp. *piscicida*、*P. damselae* subsp. *damselae*、*P. damselae* subsp. *damselae*、*P. damselae* subsp. *damselae*、*P. damselae* subsp. *damselae*

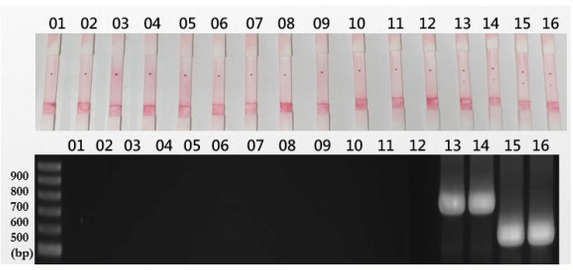

圖 3　鏈球菌 RPA-LF 之專一性測試
偵測菌種為 01-16 分別為 *A. hydrophila*、*E. tarda*、*V. alginolyticus*、*V. parahaemolyticus*、*V. harveyi*、*S. epidermidis*、*V. aestuarianus*、*P. damselae* subsp. *damselae*、*P. damselae* subsp. *damselae*、*P. damselae* subsp. *damselae*、*P. damselae* subsp. *damselae*、*P. damselae* subsp. *damselae*、*P. damselae* subsp. *piscicida*、*S. iniae*、*S. iniae*、*S. agalactiae*、*S. agalactiae*