

应用间接荧光抗体技术研究水中嗜水气单胞菌的数量与鱼类出血性败血病的关系

吴淑勤 石存斌 潘厚军 黄志斌

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

摘 要 应用间接荧光抗体技术(IFAT),并结合嗜水气单胞菌(Ah)地区优势血清型,对鱼类出血性败血病的致病菌 Ah 进行水中数量的测定。人工感染试验和对生产鱼塘调查的结果表明,水中 Ah 菌量与疾病呈正相关,致病浓度又随鱼体健康低下、水中氮氮偏高、溶氧偏低等多种因子的影响而下降。本试验方法快速简便,检测对象为水体,非常适用于预测疾病的发展趋势。

关键词 荧光抗体技术,鱼类出血性败血病,嗜水气单胞菌,地区优势血清型,水质因子

细菌性鱼病快速诊断方法应养殖生产的急需而不断发展^[1],其中荧光抗体技术(FAT)具有快速、简便、准确等优点,国外已进行了许多研究,如 Rogers^[10]用于检测斑点叉尾鲇的两种爱德华氏菌;楠田理一^[7]诊断鲈、鳊、鳙几种主要细菌病;Lee^[9]检测大鳞大麻哈鱼亲鱼卵中肾脏病病原菌;Ainsworth^[8]结合单克隆抗体更准确地判断斑点叉尾鲇肠型败血症。这些研究的对象均为鱼体,未见检测水中菌的研究报道,楠田理一希望 FAT 应用于防疫学方面,调查养殖场水中病菌的分布与消长。实现水中菌的测定,将为细菌性鱼病诊断与预测预报,拓开一条新的路子,因为水样随时可取,而病鱼的采集则往往困难得多,尤其是早期感染的病鱼。本文应用间接荧光抗体技术(Indirect fluorescence antibody technique,简称 IFAT)对近年来爆发流行于中国的鱼类出血性败血病的致病菌之一嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*,简称 Ah)进行水中数量的测定,了解菌量与疾病的关系,评估其在预测、诊断 Ah 病方面的可行性。

材 料 与 方 法

(一)间接荧光抗体技术(IFAT)

IFAT 方法和 Ah 检测血清的制备同首届全国水产青年工作者学术交流会论文集中

收稿日期:1994-04-11。

《鱼类嗜水气单胞菌病的快速检测——地区性优势血清型的应用》(吴淑勤等,1993)。

(二)显微镜视野内菌量与水中菌量的关系曲线的建立

1. 试验 Ah 菌株 SX2 分离自患出血性败血病的斑点叉尾鲷,经鱼体毒力验证和生理生化分类鉴定。

2. 水样制备 取代表性养鱼池塘水 500ml,加入已知浓度的菌,再加 1%福尔马林,置室温 2~3 小时后移至 4℃ 过夜。用 200 目(孔径约为 100μm)标准筛除掉大型浮游生物及水中大颗粒杂质,滤液经单层滤纸和双层滤纸各抽滤一次,再 3000 转/分离心 30 分钟,沉淀部分悬浮于 3ml 无菌水,500 转/分离心 10 分钟,弃除底部小型绿藻及杂质,上液加入 0.01%NaN₃ 防腐。以不加菌的鱼塘水为对照。

3. IFAT 计数 取上述处理水样 10μl,在玻片上涂成直径 2cm 的圆面,风干或 37℃ 干燥,用对应菌株 SX2 抗血清作 IFAT,在 400× 荧光显微镜下计数,以染有圈状绿色荧光的短杆状菌为阳性。

4. 标准曲线的形成 设 12 个不同水平菌浓度,每一浓度制成 3 个 IFAT 片,每片计算 30 个视野的菌数,共计数 90 个视野,取平均值,得每 10 个视野的菌个数(Cells per 10 fields of the microscope, C/10FM),在添加菌水样所得的 10FM 菌数扣除对照鱼塘水的 10FM 菌数后为实得的 10FM 菌数。由已知的 C/ml 和对应的 C/10FM 在坐标内画出一平滑的曲线。

(三)人工感染试验

1. 试验菌株 SX2

2. 试验鱼 健康鲢、鳙、鳊鱼种,取自本所养殖场,在室内适应三天以上,食欲良好;体弱鲢,体表寄生锚头蚤,食欲较差。

3. 浸泡感染 将体侧去掉数片鳞的试验鱼分别放入含有几种浓度菌或添加 NH₄Cl 的水中进行浸泡感染,累计一周内受试鱼的死亡数。观察鱼体健康和铵(氨)氮对鱼体易感性影响的试验,在浸泡感染 24 小时后,取部分鱼作肝、肾组织的 IFAT。检查感染强度;同时以细菌培养法作对照。

(四)鱼塘调查

于发病季节,分别在广东省珠江三角洲两个地区的鱼塘取水样,同时了解与疾病相关的水质情况和养殖方式。

1. 水中菌量的测定 在每个池塘 5 个不同位置水表面以下 10~30 厘米处各取水样 100ml,合并为 500ml 的水再加 1%福尔马林,水样取回试验室 4℃ 隔夜,然后按标准曲线的水样处理和菌计数方法进行。IFAT 的检测剂为代表这两个地区的优势血清型抗血清 XH54 和 NN38*,分别用这两种抗血清对同一水样作平行测定,选取二者中高菌量值 C/10FM 作为结果由标准曲线读取 C/ml。

2. 水质测定 溶氧、铵(氨)氮、pH 均按常规法^[2]进行。

* 吴淑勤等,1993. 鱼类嗜水气单胞菌病的快速检测——地区性优势血清型的应用。首届全国水产青年工作者学术交流会议论文集。

结 果

(一) 荧光显微镜视野菌个数与水中菌浓度的关系

表 1 为已知菌浓度及测得的对应平均 10 个视野菌数, 系列数据表明, 二者成正相关。取常用的 $10^2 \sim 10^6$ C/ml 及对应的 C/10FM, 在坐标上得图 1 标准曲线。

表 1 显微镜视野内菌数与水中菌数的关系

Table 1 Relation between the amounts of *A. hydrophila* in the field of the microscope and it in the water

每 10 个视野菌个数 Cells per 10 fields of the microscope (C/10FM)	每毫升菌个数 Cells per ml (C/ml)	每 10 个视野菌个数 Cells per 10 fields of the microscope (C/10FM)	每毫升菌个数 Cells per ml (C/ml)
5	5.6×10^2	57	1.1×10^4
9	1.1×10^3	82	3.7×10^4
15	5.6×10^3	123	7.4×10^4
18	1.1×10^4	520	1.1×10^5
22	3.7×10^4	1540	5.6×10^5
31	7.4×10^4	5280	1.1×10^6

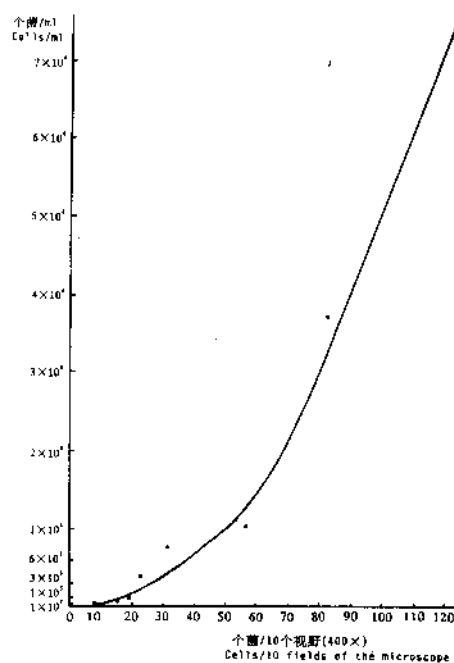


图 1 荧光显微镜视野菌数与水中菌浓度的关系曲线

Fig. 1 Curve showing the relation between the amounts of *A. hydrophila* in the field of the microscope and it in the water

(二)人工感染试验

1. 菌量与疾病的关系 表 2 显示,病菌 SX2 对鲮、鲢、鳙三种鱼的毒力相近,在菌浓度 $\leq 6 \times 10^4$ C/ml 时,未见鱼发生死亡; 6×10^5 C/ml 时,诱发少部分鱼生病,三种鱼共 7 次感染,平均死亡率为 5.7%;菌浓度达 6×10^6 C/ml 时,三种鱼平均死亡率提高到 47.0%。

表 2 导致鱼体发病的水中 Ah 浓度

Table 2 Relation between the concentration of *A. hydrophila*

and occurring of the disease of fishes

水温 23~25℃

Water temperature

鱼 Fishes	日期 Date	菌 浓 度(c/ml) Concentration of <i>A. hydrophila</i> in water						阴性对照 Negative control
		6×10^2	6×10^3	6×10^4	6×10^5	6×10^6		
		死亡率(死亡数/受试鱼尾数) Rate of death (No. of dead fish / No. of tested fish)						
鲮 <i>Cirrhinus molitorella</i>	93. 11. 3	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	20%(2/10)	0(0/10)	
	93. 12. 4	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	20%(2/10)	60%(6/10)	0(0/10)	
	93. 12. 15	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	90%(9/10)	0(0/10)	
	94. 1. 26	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	10%(1/10)	50%(5/10)	0(0/10)	
鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	93. 10. 13	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	10%(1/10)	40%(4/10)	0(0/10)	
	94. 1. 21	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	30%(3/10)	0(0/10)	
鳙 <i>Aristichthys mobilis</i>	94. 1. 21	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	40%(4/10)	0(0/10)	
三种鱼总平均 Average of 3 kinds of fishes		0(0/10)	0(0/10)	0(0/10)	5.7%	47.0%	0(0/10)	

2. 鱼体健康状况和铵(氨)氮对鱼体疾病易感性的影响 表 3 显示,组织菌分离与组织菌 IFAT 的结果基本吻合,后者比前者更为敏感。由 IFAT 看出,无铵(氨)氮(Ammonia—N, A—N)组,健康鲮和体弱鲮在水中菌浓度仅为 6×10^3 C/ml 时,有少部分鱼体内已染菌, $\geq 6 \times 10^4$ C/ml 时,绝大部分鱼染菌,然而健康鲮抗性强,在 $\leq 6 \times 10^5$ C/ml 时,尽管体内有菌亦不发病,而体弱鲮则抗性差,染上菌后,发病就难以避免, 6×10^3 C/ml 浓度下死亡率就有 14%。随着浓度升高,同样是 6×10^6 C/ml 浓度,健康鲮死亡率为 43%,而体弱鲮则达 100%。添加 A—N 情况下,健康鲮由不添加 A—N 的可致死浓度 6×10^6 C/ml 下降到 6×10^5 C/ml,体弱鲮在同等菌浓度的水平上,死亡率大大提高,而且高 A—N(3mg/L 和 6mg/L)比低 A—N(1mg/L)的有害作用更为显著。

(三)生产塘水中菌量及有关因子调查

1. 发病塘与未发病塘的水中菌量及水质值比较 广东省珠江三角洲地区的普通家鱼养殖方式多采用施肥的方法来肥水,有的在塘边建猪舍,猪粪直接进入池塘,经常使塘水偏肥。统计 18 口发病塘和 19 口未发病塘的结果显示(表 4),水中 Ah 菌量与发病有关,塘中菌量分别为 66 ± 4 C/10FM(相当于 $1.6 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^4$ C/ml)和 32 ± 3 C/10FM(相

当于 $3.5 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^3 \text{C/ml}$), 差异非常显著。铵(氮)氮含量已发病塘高于未发病塘, 分别为 $2.19 \pm 0.52 \text{mg/L}$ 和 $1.30 \pm 0.02 \text{mg/L}$, 差异显著。溶氧和 pH 无显著差异, 且都在适宜养殖的范围内。

表 3 鱼体健康状况和铵(氮)氮对鱼体易感性的影响

Table 3 Influence of the healthy state of fish and Ammonia-N on the sensitivity of fish to the disease
水温 25°C
Water temperature

Tested fishes 受试鱼	检测项目 Detecting items	不添加铵(氮)氮 Non-added Ammonia-N 水中菌浓度(C/ml) Concentration of <i>A. hydrophila</i> in water					添加铵(氮)氮(mg/L) Added Ammonia-N					
							1			3		
							6			1		
							水中菌浓度 $6 \times 10^3 \text{C/ml}$ Concentration of <i>A. hydrophila</i> in water			水中菌浓度 $6 \times 10^5 \text{C/ml}$ Concentration of <i>A. hydrophila</i> in water		
		6×10^2	6×10^3	6×10^4	6×10^5	6×10^6	1	3	6	1	3	6
* 健康鲢 <i>Cirrhinus molitor</i> (healthy)	IFAT	---	---	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	3 尾/组 3 fish/group	---	---	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	细菌培养 Bacterial culture	---	---	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	一周内死亡率 (死亡数/受试 鱼尾数) Rate of death in one week (No. of dead fish / No. of tested fish)	0(0/7)	0(0/7)	0(0/7)	0(0/7)	43% (3/7)	0(0/7)	0(0/7)	0(0/7)	43% (3/7)	57% (4/7)	43% (3/7)
* 体弱鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> (Weak)	IFAT	---	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	3 尾/组 3 fish/group	---	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	细菌培养 Bacterial culture	---	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	一周内死亡率 (死亡数/受试 鱼尾数) Rate of death in one week (No. of dead fish / No. of tested fish)	0 (0/7)	14% (1/7)	57% (4/7)	57% (4/7)	100% (7/7)	14% (1/7)	43% (3/7)	29% (2/7)	71% (5/7)	100% (7/7)	100% (7/7)

+, ++, +++: 分别表示 Ah 在鱼体组织中的感染强度为弱、中强、强;

—: 表示阴性感染;

*: 菌株 SX2 对健康鲢和体弱鲢的毒力相近, 因此两种鱼可用于对比试验。

+, ++, +++: The infectious intensity of *A. hydrophila* in the fish tissue is slight, middle heavy and heavy.

—: Negative infection

*: *Hypophthalmichthys molitrix* and *Cirrhinus molitor* could be compared at this test, because the virulence of strain SX2 was similar to both of them.

2. 致病菌量与发病季节的关系 由图 2 可见, 各发病季节病塘菌量的平均值差异不显著, 即发病菌量与季节关系不密切, 可能与广东省气温偏暖有关。

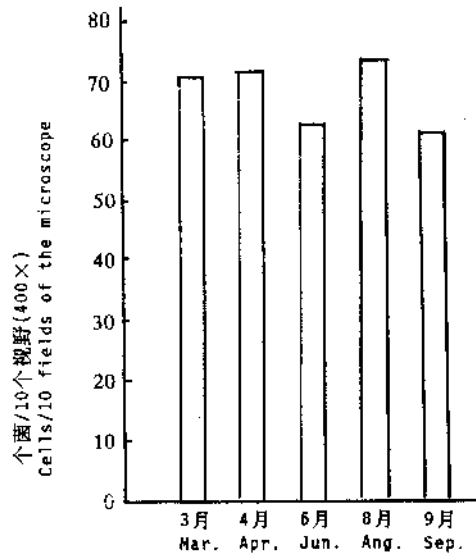
图2 池塘水中 *Ah* 菌量与发病季节的关系

Fig. 2 Relation between the amounts of

A. hydrophila in fish ponds and the diseased seasons

3. 池塘水肥度对菌量的影响 对三口肥水塘和一口瘦水塘, 分别在 1992 年 3 个不同月份测水中菌量。由图 3 显示, 瘦水塘每次菌量均比肥水塘低。

表4 发病塘与未发病塘的水中菌量及水质值比较

Table 4 Comparison on amounts of *A. hydrophila* in water and the data of water factors between the diseased ponds and non-diseased ponds

	每 10 个视野菌数 C/10FM Cells/10 fields of the microscope (相当于每 ml 菌数 C/ml) (be equal to Cells C/ml)	铵(氮)氮 mg/L Ammonia-N	溶氧 mg/L Dissolved oxygen	pH	水 温 Water temperature
发病塘 (n=18) Diseased ponds	$66 \pm 4 (1.6 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^4)$	2.19 ± 0.52	3.40 ± 0.54	7.10 ± 0.02	18~30℃
未发病塘 (n=19) Non-diseased ponds	$32 \pm 3 (3.5 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^3)$	1.30 ± 0.02	3.50 ± 0.44	7.07 ± 0.02	
t 检验 Statistical detection	$P < 0.01$	$P < 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$	

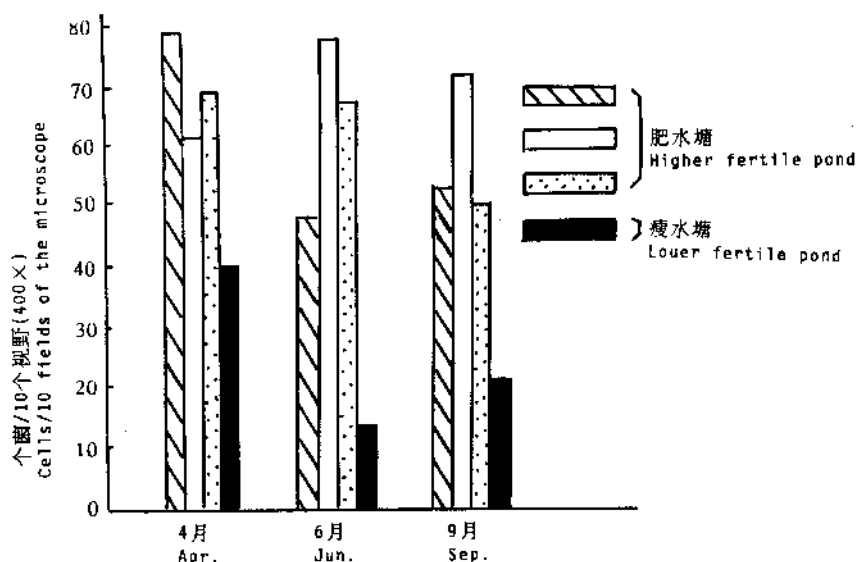


图3 池塘水肥度对 Ah 菌量的影响

Fig. 3 Influence of fertility of fish ponds on the amounts of *A. hydrophila*

4. 池塘环境因子对鱼体易感性的影响 由表5,与18口病塘的平均值比较,病塘A、B的铵(氮)氮偏高,溶氧偏低,菌量远低于18口病塘的平均值,分别为 1.1×10^3 和 2.8×10^3 ,病塘C温差变化大,菌量为 8.3×10^3 C/ml,低于18口塘的平均值。由此暗示,水质某些因子削弱了鱼体对入侵病菌的防御力,在菌浓度偏低的情况下,也可使鱼体感染发病。

表5 提高鱼体易感性的池塘环境因子

Table 5 Environment factors of ponds for rising the sensitivity of fish to the disease

	Ah 数量 C/10FM Amounts of <i>A. hydrophila</i> (相当于 C/ml) (be equal to Cells C/ml)	铵(氮)氮 mg/L Ammonia-N	溶氧 mg/L Dissolved oxygen	影响因子 Effect factors
18口发病塘 18 diseased ponds	$64 \pm 4 (1.6 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^4)$	2.19 ± 0.52	3.40 ± 0.54	
病塘 A Diseased pond A	$18 (1.1 \times 10^3)$	3.57	2.38	铵(氮)氮偏高 溶氧偏低 Higher Ammonia-N Lower dissolved oxygen
病塘 B Diseased pond B	$26 (2.8 \times 10^3)$	6.08	0.88	
病塘 C Diseased pond C	$45 (8.3 \times 10^3)$	1.63	4.17	温差变化大* Change of water temperature

* 1993年3月16日~3月22日,受寒潮影响,7天内白天平均水温由21℃降至10℃,又由10℃回升到21℃。

The water temperature at daytime in average was from 21℃ to 10℃ then from 10℃ to 21℃ in one week from Mar. 16 to 22, 1993 when effected by the cold wave.

讨 论

本文的人工感染试验结果和现场调查结果都充分说明了,水中 Ah 菌量与出血性败

血病呈正相关。采用 IFAT 测定水中病菌,可在荧光显微镜下观察菌体,符合特异性染色,又符合菌体大小形态的判为阳性,这一方法的灵敏度与准确度均较高,非常适用于防疫学调查。在该法的应用中应注意以下两个方面的问题。

(一)定量

C/ml——C/10FM 标准曲线(简称曲线)的准确度直接影响着待检水样的结果。因此,在建立曲线的过程中,从含菌水样的过滤、离心、浓缩、涂成规定的检测面积、作 IFAT 至镜下计数,均要求严格的质量控制。待检池塘水样的测定,只有沿用作标准曲线水样的系列条件,才能使结果的可比性强。

曲线的 C/10FM 由抗原菌与其特异性抗血清的反应结果而得,如将曲线的 10FM 菌检出率设为 100%,则池塘水样的菌检出率有某些偏差。原因之一,池塘水中 Ah 血清型不均一^[3],用地区优势血清型 Ah 检测抗血清,检出率在 50%以上,与曲线 100%相比偏低,如以 2~3 种地区优势血清型抗血清进行平行测定,选取结果最高的菌数,可降低漏检率。原因之二,池塘水中菌的种类很复杂,可能有少部分非 Ah 菌发生交叉染色*,而使所测得的菌量偏高,对此,关键是选择特异性好的抗血清。还可能有少量类似菌的形态、大小的藻类或其它杂质出现非特异性染色,也使所测值偏高。原因之三,细菌在鱼塘不同水层的分布不均等,表层的浓度高于深层^[4],本试验采样水位为鱼塘表层。此外,还可能因为天气的原因,下风处细菌多于上风处^[4],如采样点分配不均匀,会造成实测菌数偏高或偏低。这些干扰因子造成了菌量波动,但可看到干扰因子之间在某种程度上起到互补的作用。尽管如此,在使用曲线时,仍需考虑所得值偏差的存在,使评估病情时能更客观些。

(二)综合分析

试验结果表明,出血性败血病与病菌 Ah 的数量相关,致病菌浓度又随多方面的因子影响而波动。当人工浸泡感染健康鱼时,菌株 SX2 的致病浓度为 $10^5 \sim 10^6$ C/ml,同法对体弱鱼时,致病浓度下降至 $10^3 \sim 10^4$ C/ml,在水中添加铵(氨)氮情况下,促使同等菌浓度感染的鱼死亡率有较大提高。生产塘环境复杂,影响因子多,调查的发病塘菌浓度为 $1.6 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^4$ C/ml,显著低于人工感染的水平。调查结果还显示,在铵(氨)氮偏高、溶氧偏低及气温变化大时,致病菌浓度可下降至 10^3 C/ml。许多学者的研究工作也证明了某些水环境因子对鱼体有不良影响,削弱了机体的抗病能力。如黄旭田等^[5]人工接种 *E. taylori* 与 *A. hydrophila* 混合感染鳊鱼,在水中添加含氮化合物,结果显示,菌亚致死浓度条件对鳊鱼可呈致病性。又如胡益民等^[6]对鲫、鲢、鳙等养殖鱼类爆发病的调查结果表明,疾病的消长与水质环境中无机三氮量的变化有关,发病塘铵(氨)氮和亚硝酸氮的含量显著高于未发病塘。综上所述,纯粹以菌量来判断病情是片面的,还需结合其它因子加以综合分析。就我们的调查结果看,当测得池塘水样 Ah 达 10^3 C/ml 时,警示发病危机,应采取各种预防措施,如改良水质,供给合理营养,避免鱼体受伤。

除了致病菌量随着鱼体易感性的提高而下降,还应看到菌量本身是波动的,受到水温、溶氧、浮游生物等多种因子的影响^[4]。本试验调查结果也显示,肥度高的池塘更利于细菌的大量繁殖,因此肥水塘应列为监测的主要对象之一。

* 吴淑勤等,1993。鳊鲩混合感染迟缓爱德华氏菌和嗜水气单胞菌的快速诊断。鱼病学研究论文集,第二辑。

参 考 文 献

- [1] 徐德海等,1992. 国外鱼类细菌病快速诊断方法. 国外水产, (3):34~37.
- [2] 湛江水产专科学校主编,1979. 淡水养殖水化学,219—221,238—239,212—216. 农业出版社.
- [3] 陆承平,1992. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述. 水产学报,16(3):282—288.
- [4] 刘国才等,1992. 鱼塘内细菌数量消长与季节变动. 水产学报,16(1):24—31.
- [5] 黄旭田等,1992. 鳗鱼在 *Edwardsiella tarda* 与 *Aeromonas hydrophila* 混合感染下之致病性研究. 现代渔业, 4(11):66—71,4(12):58—63,5(1):44—49.
- [6] 胡益民等,1991. 鲫、鲢、鳙等养殖鱼类爆发性疾病与水质环境关系调查初报. 鱼类病害研究,13(3):41—44.
- [7] 楠田理一等,1986. 荧光抗体法による细菌性疾患の迅速診断. 养殖,23(5):106—109.
- [8] Ainsworth, A. J., 1986. Use of monoclonal antibodies in the indirect fluorescent antibody technique (IFA) for the diagnosis of *Edwardsiella ictaluri*. Journal of Fish Diseases, (9):439—444.
- [9] Lee, E. G. —H. et al., 1987. Immunofluorescence screening of *Renibacterium salmoninarum* in the tissues and eggs of farmed chinook salmon spawners. Aquaculture, (65):7—14.
- [10] Rogers, W. A., 1981. Serological detection of two species of *Edwardsiella* infecting catfish. International Symposium on Fish Biologics; Serodiagnostics and vaccines, Leetown, W. Va., U. S. A., Develop. biol. Standard, (49):169—172.

RESEARCH ON RELATION BETWEEN AMOUNT OF *A. HYDROPHILA* IN WATER AND HAEMORRHAGIC SEPTICEMIA OF FISHES WITH IFAT

Wu Shuqin Shi Cunbin Pan Houjun Huang Zhibin

(Pearl River Fishery Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380)

ABSTRACT *Aeromonas hydrophila* (Ah) is a pathogen of haemorrhagic septicemia of fishes. The amount of Ah in water was detected by indirect fluorescence antibody technique (IFAT) with local preponderance serotypes of Ah. The test results of immersion infection of fish body and fish ponds show that there is a positive correlation between the amount of Ah in water and the disease of the fishes. The concentration of causing the disease will be down with such factors as weak fish body, higher ammonia — N, and lower dissolved oxygen. The method is quick and easy with water as its detecting object so it is suitable for prediction of the development tendency of the disease.

KEYWORDS Fluorescence antibody technique, Haemorrhagic septicemia, *A. hydrophila*, Preponderance serotype, Factors in water