第12卷第3期　　中 国 水 产 科 学　　Vol.12 No.3
2005年5月　　Journal of Fishery Sciences of China　　May 2005

中华绒螯蟹腹水病病原分析

李槿年[1],李玉英[2],胡守奎[3],李　琳[1],方　兵[1],余为一[1],张晓华[1]
(1.安徽农业大学 动物科技学院,安徽 合肥 230036; 2.南阳师范学院 生命科学系,河南 南阳 473061; 3.安徽省疾病预防控制中心,安徽 合肥 230001)

摘要： 从六安地区患腹水病的中华绒螯蟹(*Eriocher sinensis*)体内分离到一株病原菌(HX4菌株),经API/ATB半自动化鉴定和分子遗传学鉴定,确定为拟态弧菌(*V. mimicus*)。应用PCR技术、电镜技术、组织细胞模型和动物实验对该菌的毒素共调菌毛(Toxin Coregulated Pilus,TCP)、外毒素和内毒素等毒力因子研究的结果表明,HX4菌株为TCP^+株,在pH 6.7定居因子培养基中,30 ℃需氧培养条件下可较好表达TCP;TCP^+菌对肠管的黏附率为(32.19±0.14)%、对HEp-2细胞的黏附菌数为16.03±4.66、对中华绒螯蟹的毒力(LD_{50})为2.08×10^6 $CFU\cdot mL^{-1}$,均显著高于TCP^-菌,其相应值分别为(0.52±0.06)%、6.8±2.06和2.09×10^7 $CFU\cdot mL^{-1}$;外毒素具有很强的细胞毒性($TCID_{50}$ 0.25 μg)、肠毒性(皮肤蓝斑直径15 mm)和中华绒螯蟹致死性(LD_{50} 1.40 μg),而内毒素对中华绒螯蟹基本无致病性。由此可见,TCP和外毒素是拟态弧菌HX4菌株的2种重要毒力因子,在细菌致病过程中起重要作用。

关键词: 中华绒螯蟹;腹水病;拟态弧菌
中图分类号: S945.6　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1005-8737-(2005)03-0267-08

有关中华绒螯蟹(*Eriocher sinensis*)腹水病的报道认为,该病是由拟态弧菌(*V. mimicus*)和嗜水气单胞菌(*A. hydrophila*)感染所引起[1-2]。作者曾于2000年从安徽六安地区患腹水病的中华绒螯蟹体内分离得到一株细菌(HX4菌株),经人工感染实验证实,其为该病的病原并初步认为是拟态弧菌[3]。为了进一步鉴定病原菌,揭示其致病机理,为防治该病提供理论依据,本研究在先前工作基础上采用API/ATB半自动化鉴定法和分子遗传学的热变性温度法对HX4菌株进行表型鉴定和细菌染色体DNA中mol%(G+C)测定,确定该菌的种属并对其毒力因子进行系统研究。

1　材料与方法

1.1 材料

1.1.1　实验菌株　HX4菌株由本研究室分离保存;大肠杆菌K12株购自中国科学院微生物研究所。

1.1.2　实验动物与细胞　昆明系小鼠体重18~22 g,购自安徽医科大学实验动物中心;中华绒螯蟹体重30~40 g,取自养蟹场;HEp-2细胞由安徽医科大学微生物组惠赠。

1.1.3　主要试剂和培养基　溶菌酶、DNA Marker DL2000和PCR试剂均为上海生物工程公司产品;营养琼脂培养基、TCBS培养基、LB培养基和细胞培养液均为杭州微生物试剂厂产品;pH 6.5定居因子培养基(CFA)按文献[4]配制。

1.2　细菌的鉴定

1.2.1　API/ATB半自动化鉴定　HX4菌株接种营养琼脂平板,28 ℃培养24 h后挑取菌落混于生理盐水中,用API/ATB光电比浊仪测量配成0.5 mol/L cFarland的菌悬液。吸取菌悬液接种ID32E测试卡(55 μL/孔),置35 ℃培养箱孵育24 h。取出测试卡置阅读器上检测反应结果并转换为能被计算机接受的反应编码,最后由计算机判定并打印鉴定结果(鉴定质量用鉴定概率%id与模式频率*T*表示)。

1.2.2　细菌染色体DNA中mol%(G+C)测定　采用热变性温度(T_m)法[5]。HX4菌株接种LB培养液扩大培养后离心收集菌体。2 g湿菌体悬浮于20 mL SE液中,加10 mg溶菌酶,37 ℃水浴60 min。

收稿日期:2004-07-21; 修订日期:2004-10-21.
基金项目:安徽省自然科学基金资助项目(01041206);省高校"十五"优秀人才科研资助项目.
作者简介:李槿年(1962-),女,教授,从事动物微生物学教学与研究.E-mail:Lijinnian2000@163.com

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

加2 mL 25%SDS溶液,60 ℃水浴振荡10 min,超声波作用3 min。细菌破壁后采用酚氯仿法[8]提取染色体DNA,DNA溶液适当稀释后置于带加热装置的紫外分光光度计中完成热变性过程,测定各变性温度下的吸光值(OD_{260}),绘制热变性曲线,由T_m值计算mol%(G+C)。以大肠杆菌K12株作对照。

1.3 毒素共调菌毛(TCP)的检测及其特性测定

1.3.1 TCP的检测 根据基因文库中霍乱弧菌tcpA全序列,应用DNAstar软件,在tcpA基因保守区内设计合成引物(上游引物:5′—CACGATAAGAAAACCGGTCAAGA—3′;下游引物:5′—CAAATGCAACGCCGAATGGAGC—3′;预期扩增片段长度为617 bp)。采用50 μL反应体系PCR扩增HX4菌株tcpA基因,琼脂糖凝胶电泳法检测PCR产物。同时,HX4菌株分别接种CFA琼脂平板和LB琼脂平板,30 ℃需氧培养24 h,各取少许菌液滴于铜网膜上,2% PTA负染后置透射电镜下观察细菌表面有无TCP。

1.3.2 TCP的组织细胞黏附性测定

(1)HEp-2细胞黏附试验 HX4菌株分别接种CFA和LB琼脂培养基,30 ℃需氧培养24 h,获得TCP^+菌和TCP^-菌。各取1 mL TCP^+菌液和TCP^-菌液(浓度均为2×10^7 CFU·mL^{-1})分别加入含有盖玻片的HEp-2单层细胞培养皿中,37 ℃ 5%二氧化碳培养箱孵育1 h,吸去菌液,用Hanks液洗涤4次。取出盖玻片姬姆萨染色后油镜下随机选取30个细胞,计数黏附菌数,以平均每个细胞黏附菌数超过10个判为黏附阳性[7]。并用t检验对TCP^+菌组和TCP^-菌组的数据进行统计学分析,比较二者间的差异性。

(2)中华绒螯蟹肠管黏附试验 分为TCP^+菌处理组和TCP^-菌处理组,每组有5个中华绒螯蟹肠管样品,每个肠管剔尽结缔组织,用PBS反复冲洗后,纵切成小节段,再用KPT缓冲液清洗3次。将1 mL浓度为10^8 CFU·mL^{-1}的TCP^+菌液和TCP^-菌液分别加入含有肠管节段和19 mL KPT缓冲液的三角烧瓶内,37 ℃振荡孵育1 h。用PBS洗涤肠管节段4次,以洗去非特异性黏附细菌。加2 mL PBS研磨肠管节段,使用TCBS培养基对倍比稀释的研磨液进行活菌计数,计算TCP^+菌和TCP^-菌对肠管的黏附率并用t检验进行统计学分析,比较二者间的差异性。以上实验重复2次。

1.3.3 TCP的致病性测定 按1.3.2(1)方法培养TCP^+菌,将反复洗涤后的TCP^+菌体稀释为5个等比梯度进行人工感染,每一稀释度菌液注射5只中华绒螯蟹,0.2 mL/只。连续7 d观察中华绒螯蟹发病死亡情况,对死亡蟹剖检观察其病理变化,无菌采取肝脏接种营养琼脂平板分离细菌,并根据Reed-Muend法[8]计算半数致死量(LD_{50})。实验中同时测定TCP^-菌对中华绒螯蟹的LD_{50},比较二者间的差异性。

1.4 外毒素的提取及其毒性测定

1.4.1 外毒素的提取 在最佳产毒条件下扩大培养HX4菌株[9],离心收集上清液。上清液依次经50%饱和硫酸铵盐析和DEAE-Sephadex A50离子交换层析(含0~0.6 mol·L^{-1} NaCl的pH 7.8, 0.05 mol·L^{-1} Tris-HCl梯度洗脱)纯化蛋白并采用Lowry法[10]测定其浓度。

1.4.2 细胞毒性测定 上述方法提取的外毒素经Lowry法测定其浓度为0.768 mg·mL^{-1},用Hanks液稀释成4个等比梯度(0.15~1.2 μg/孔)后,加入长满HEp-2单层细胞的微量培养板内,每一稀释度重复8孔,20 μL/孔。培养板置37 ℃ 5% CO_2培养箱作用1 h,每孔加100 μL培养液,37 ℃ 5% CO_2培养箱培养7 d,每天观察细胞病变情况,根据Reed-Muend法计算半数组织细胞感染量($TCID_{50}$)。实验中同时设外毒素阳性对照和细胞对照。

1.4.3 肠毒性测定 采用兔皮肤蓝斑试验[7]进行分析。

1.4.4 致死性测定 取不同稀释度的外毒素(1:30~1:240)注射4组中华绒螯蟹,每组5只,剂量0.3 mL/只,连续7 d观察中华绒螯蟹发病死亡情况,根据Reed-Muend法计算LD_{50}。同时设生理盐水对照。

1.5 内毒素的致病性实验

反复离心洗涤HX4菌体,经超声波破壁,用三氯乙酸法[11]粗提内毒素,注射用蟹5只,0.3 mL/只,观察中华绒螯蟹发病死亡情况。同时设生理盐水对照。

2 结果与分析

2.1 细菌的鉴定

如表1、图1所示,半自动化鉴定中HX4菌株的反应编码是10445100000,检索菌种名称为拟态

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

弧菌，其鉴定概率和期望值分别是 99.7 和 0.95，为极好的鉴定。T_m 法鉴定中该菌株 DNA 的 T_m 值为 75℃，代入公式 51.2 + 2.08X（T_m 未知菌 − T_m 大肠杆菌 K12）得出 mol%(G + C) 为 51%，处在弧菌属范围内(38%～51%)。综合表型鉴定与分子遗传学鉴定结果确定 HX4 菌株为拟态弧菌。

表 1 HX4 菌株的 API/ATB 半自动化鉴定结果

Tab.1 Results of API/ATB semiautomated identification of HX4 strain

ODC+	ADH−	LDC−	URE−	LARL−	GAT−	5KG−	LIP−
RP+	βGLU−	MAN−	MAL+	IND+	βNAG−	βGAL+	GLU+
SAC−	LARA−	DARL−	αGLU−	αGAL−	TRE−	RHA−	INO−
ADO−	PLE−	βGUR−	CEL−	SOR−	αMAL−	MNT−	ASPA−
反应编码：10445100000；鉴定结果：拟态弧菌（%id 99.7，T 0.95）							

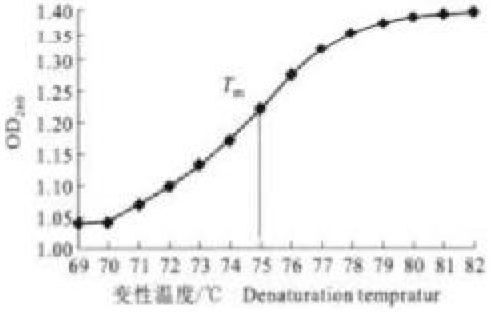


图 1 HX4 菌株 DNA 的变性曲线

Fig.1 Denaturation curve of HX4 strain DNA

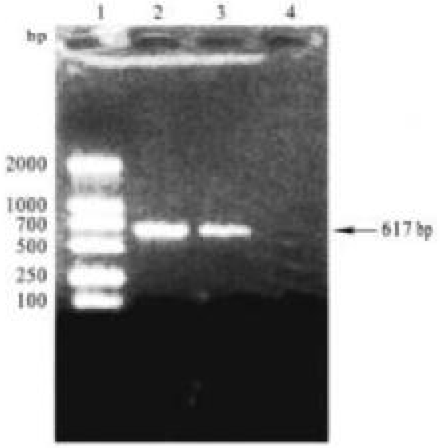


图 2 PCR 扩增 HX4 菌株 tcpA 基因的电泳图谱

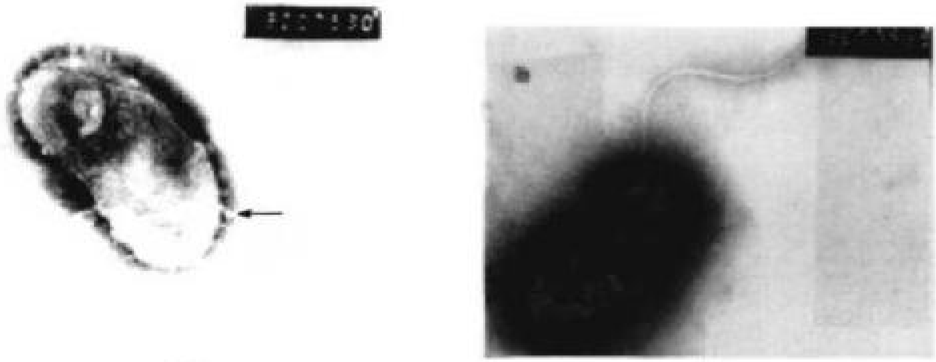
1：DL2000 Marker；2：酚氯仿法提取的 DNA；3：煮沸法提取的 DNA；4：阴性对照

Fig.2 Electrophoresis profile of tcpA gene of HX4 strain amplified by PCR

1：DL2000 Marker；2：DNA extracted by phenol and chloroform；3：DNA extracted by boiling；4：Negative control

2.2 TCP 的检测

如图 2 和图 3 所示，采用煮沸法和酚氯仿法提取的 HX4 菌株模板 DNA 均能扩增到 617 bp tcpA 基因片段。使用定居因子培养基(CFA)培养的细菌表面存在短粗而中空的菌毛；而使用 LB 培养基培养的细菌表面无菌毛。综合 PCR 技术和电镜技术的检测结果证实 HX4 菌株为 TCP^+ 菌株，在 pH 6.7 CFA 培养基中 30 ℃需氧培养条件下可较好表达 TCP。



CFA LB

图 3 HX4 菌株在 CFA 与 LB 培养基中表达 TCP(箭头所示)的情况

Fig.3 TCP (showed by arrow) expressing condition of HX4 strain cultured in CFA and LB medium

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

2.3 TCP的组织细胞黏附性

如表2和图4显示，细菌可黏附HEp-2细胞，TCP$^+$菌和TCP$^-$菌对HEp-2细胞的黏附菌数分别为16.03±4.66和6.8±2.06，根据判定标准确定前者为黏附阳性菌，后者为黏附阴性菌。表3为TCP$^+$菌和TCP$^-$菌对中华绒螯蟹肠管黏附率的比较，经t检验得知TCP$^+$菌对肠管的黏附率远大于TCP$^-$菌，二者差异极显著($P<0.01$)。表明该菌对组织细胞的黏附作用主要由TCP所介导。

表2 HX4株菌对HEp-2细胞的黏附

Tab.2 Adhesion of HX4 strain to HEp-2 cells

试验组 Group	30个细胞黏附菌数 Adhesive bacterial number of 30 cells respectively					$\bar{X}\pm SD$
TCP$^+$菌 TCP$^+$ strain	29	12	13	18	20	16.03±4.66
	11	16	13	16	26	
	18	15	17	10	15	
	9	19	15	8	17	
	23	15	19	17	20	
	13	17	15	11	14	
TCP$^-$菌 TCP$^-$ strain	7	6	6	9	8	6.80±2.06
	5	9	8	7	6	
	7	7	8	3	8	
	5	9	9	7	6	
	6	7	4	3	8	
	8	8	7	6	3	

注：$t=9.92>t\ 0.01(2.66;df=58)$，$P<0.01$，差异极显著.

Note: Values(expressed as mean±SD, $n=30$) are significantly different($P<0.01$).

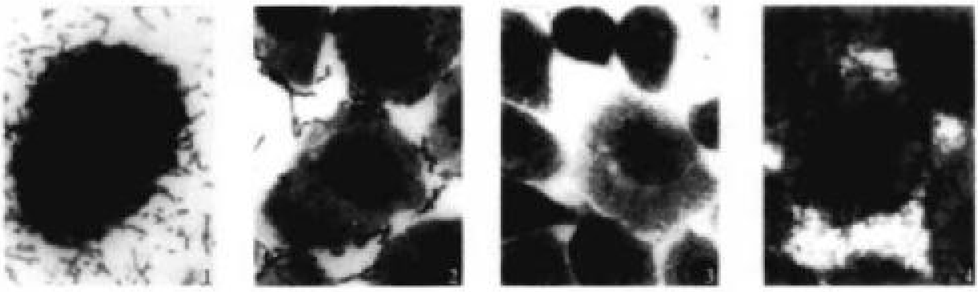


图4 HX4菌株对HEp-2细胞的黏附

1:TCP$^+$菌；2:TCP$^-$菌；3:细胞对照；4:大肠杆菌阳性对照

Fig.4 Adhesion of the HX4 strain to HEp-2 cells

1:TCP$^+$ strain; 2:TCP$^-$ strain; 3:Cell control; 4:Positive control

表3 HX4菌株对中华绒螯蟹肠管的黏附率

Tab.3 Adhensive rat of HX4 strain to the *Eriocheir sinensis* intestine

组别 Group	细菌浓度/($\times10^3$CFU·mL^{-1}) concentration	黏附菌数/($\times10^3$CFU·dic^{-1}) Adhensive bacteria number					黏附率/% Adhansive rate					$\bar{X}\pm SD$
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
TCP$^+$菌组 TCP$^+$ strain	2 500	800	804	804	807	809	32.00	32.16	32.16	32.28	32.19	32.19±0.14
TCP$^-$菌组 TCP$^-$ strain	2 500	11	13	13	13	15	0.44	0.52	0.52	0.52	0.60	0.52±0.06

注：$t=465>t\ 0.01(3.335;df=8)$，$P<0.01$，差异极显著.

Note: Values(expressed as mean±SD, $n=5$) are significantly different($P<0.01$).

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

2.4 TCP 的致病性

注射 TCP^+ 菌 20 h 后，多数中华绒螯蟹开始发病，病蟹表现为不吃食，运动力下降。解剖死亡蟹可见腹腔内有大量黄色腹水，心脏肿大，肝呈淡黄色并从肝脏中分离到相应细菌，而对照组中华绒螯蟹全部健活。注射 TCP^- 菌的中华绒螯蟹也于 30 h 后部分发病死亡，但临床症状与病理剖检变化均不如 TCP^+ 菌试验组蟹明显。根据表 4 和表 5 的数据，采用 Reed-Maend 法计算出 TCP^+ 菌和 TCP^- 菌对中华绒螯蟹的 LD_{50} 分别为 2.08×10^6 CFU·mL^{-1} 和 2.09×10^7 CFU·mL^{-1}，TCP^+ 菌对河蟹的 LD_{50} 约为 TCP^- 菌的 10 倍。由于实验中使用的攻击细菌为反复离心洗涤后的菌体，这样可以排除细菌培养条件下产生的外毒素的干扰。TCP^+ 菌体进入体内后，毒素共调菌毛具有协同毒素表达作用，从而增加了 TCP^+ 菌的产毒量，因此，TCP^+ 菌的毒力较强。

表 4　TCP^+ 菌对中华绒螯蟹的 LD_{50} 测定

Tab.4　LD_{50} determination of TCP^+ strain to *E. sinensisr*

组别 Group	剂量/(CFU·mL^{-1}) Dose	只　数 Number	死亡数 Dead number	存活数 Survival number	累计结果 Accumulated results 存活数 Survival number	死亡数 Dead	死亡率/% Mortality
1	8.48×10^6	5	5	0	0	13	100
2	4.24×10^6	5	4	1	1	8	89
3	2.12×10^6	5	3	2	3	4	57
4	1.06×10^6	5	1	4	7	1	12.5
5	5.3×10^5	5	0	5	12	0	0
$LD_{50} = 2.08 \times 10^6$ CFU·mL^{-1}							

表 5　TCP^- 菌对中华绒螯蟹的 LD_{50} 测定

Tab.5　LD_{50} determination of TCP^- strain to *Eriocheir sinensis*

组别 Group	剂量/(CFU·mL^{-1}) Dose	只　数 Number	死亡数 Dead number	存活数 Survival number	累计结果 Accumulated results 存活数 Survival number	死亡数 Dead	死亡比例 Dead/total	死亡率/% Mortality
1	8.8×10^7	5	5	0	0	13	13/13	100
2	4.4×10^7	5	4	1	1	8	8/9	89
3	2.2×10^7	5	3	2	3	4	4/7	57
4	1.1×10^7	5	2	3	6	1	1/7	14.3
5	5.5×10^6	5	0	5	11	0	0/11	0
$LD_{50} = 2.09 \times 10^7$ CFU·mL^{-1}								

2.5 外毒素的细胞毒性

经外毒素作用的 HEp-2 细胞和阳性对照细胞均发生细胞病变(图 5)，表现为细胞变圆、脱落或聚集成葡萄串状，而对照组细胞正常。根据表 6 数据计算其半数组织细胞感染量($TCID_{50}$)为 0.25 μg，表明外毒素对 HEp-2 细胞具有很强的细胞毒性。

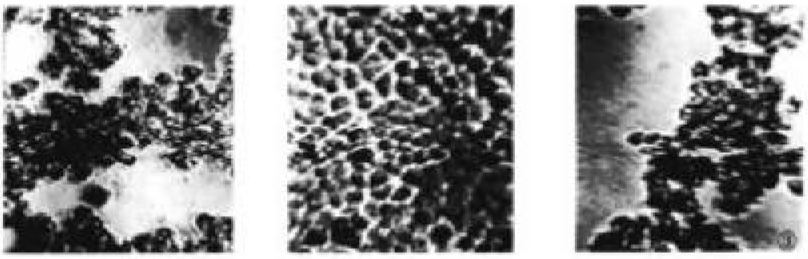


图 5　外毒素的细胞毒性

①:HX4 菌株外毒素；②:细胞对照；③:外毒素阳性对照

Fig.5　Cytotoxicity of the exotoxin produced by HX4 strain to HEp-2 cell

①:Exotoxin of HX4 strain；②:Cell control；③:Positive control

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

表6 外毒素对中华绒螯蟹 HEp-2 细胞的 $TCID_{50}$ 测定结果

Tab.6 $TCID_{50}$ determination of exotoxin produced by HX4 strain to HEp-2 cell of *Eriocheir sinensis*

组别 Group	感染量/μg Infective dose	孔数 Number	阳性 Positive	阴性 Nagtive	累计结果 Accumulated results			
					阳性 Positive	阴性 Nagtive	病变比例 CPE/total	病变率 CPE rate
1	0.15	8	3	5	3	7	3/10	30.00
2	0.3	8	6	2	9	2	9/11	81.82
3	0.6	8	8	0	17	0	17/11	100
4	1.2	8	8	0	25	0	25/25	100
$TCID_{50}$ = 0.25 μg								

2.6 外毒素的肠毒性

家兔背部接种外毒素的部位皮肤变蓝，蓝斑直径平均为 15 mm，而注射生理盐水的对照部位皮肤正常，表明外毒素具有较强的肠毒性。

2.7 外毒素的致病性

不同稀释度的外毒素注射中华绒螯蟹后 12 h 陆续发病死亡，而对照组中华绒螯蟹 1 月内仍健活。根据表 7 数据计算其 LD_{50} 为 1.40 μg，表明外毒素对中华绒螯蟹具有很强的毒力。

2.8 内毒素的致病性

中华绒螯蟹注射内毒素后，其活动性及摄食量略减少，但 2 d 后又恢复正常。表明内毒素对中华绒螯蟹的致病性很弱。

表7 外毒素对中华绒螯蟹 LD_{50} 的测定结果

Tab.7 LD_{50} determination of exotoxin produced by HX4 strain to *Eriocheir sinensis*

组别 Group	感染量/μg Infective dose	只数 Number	死 Dead	生 Survival	累计结果 Accumulated results		
					生 Survival	死 Dead	死亡率/% Mortality
1	0.96	5	2	3	5	2	28.6
2	1.92	5	3	2	2	5	71.4
3	3.84	5	5	0	0	10	100
4	7.68	5	5	0	0	15	100
LD_{50} = 1.40 μg							

3 讨论

细菌分类鉴定方法包括常规鉴定法、半(全)自动化鉴定法和分子遗传学鉴定法。常规鉴定法费时费力，准确率较低；半(全)自动化鉴定法快速敏感，但数据库中模式菌种数量有限，不能对所有细菌进行鉴定；分子遗传学鉴定法特异性强，但技术要求和成本较高。因此，只有将几种鉴定方法有机结合起来才能客观准确地对细菌定位。本研究同时采用 API/ATB 半自动化法和分子遗传学的 T_m 法鉴定 HX4 菌株，结果显示其反应编码是 10445100000，检索菌种名称为拟态弧菌；mol%(G+C)为 51%，处在弧菌属水平。综合 2 种鉴定方法的结果确定 HX4 菌株为拟态弧菌。

TCP 广泛存在于霍乱弧菌表面，具有黏附定居黏膜表面和协同毒素基因表达的作用[7]。鉴于拟态弧菌的生物学特性等与霍乱弧菌极为相似，作者根据霍乱弧菌 tcpA 基因全序列设计合成引物，以 HX4 菌株 DNA 为模板，通过 PCR 技术扩增到 617 bp tcpA 基因片段。同时电镜下观察到细菌表面存在短粗而中空的菌毛，与李峰[7]描述的霍乱弧菌 TCP 形态相吻合。从而证实拟态弧菌 HX4 菌株

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

为 TCP^+ 株，在 pH 6.7 定居因子培养基中 30 ℃ 需氧培养条件下可表达 TCP。研究中采用黏附模式细胞 HEp-2 细胞为细胞模型，本种动物中华绒螯蟹肠管为组织模型以及动物实验测定 HX4 菌株对组织细胞的黏附性和对中华绒螯蟹的毒力。结果显示，①TCP^+ 菌和 TCP^- 菌对肠管的黏附率分别为 (32.19 ± 0.14)% 和 (0.52 ± 0.06)%；对 HEp-2 细胞平均黏附菌数分别为 16.03 ± 4.66 和 6.8 ± 2.06，其间均存在极显著差异（$P<0.01$），表明该菌对组织细胞的黏附作用主要是由 TCP 所介导。②TCP^+ 菌的毒力约为 TCP^- 菌的 10 倍。由于实验中使用的攻击细菌为反复离心洗涤后的菌体，这样可以排除细菌培养条件下产生的外毒素的干扰。TCP^+ 菌体进入体内后，毒素共调菌毛具有协同毒素表达作用，从而增加了 TCP^+ 菌的产毒量，即 TCP 通过协同细菌毒素的表达来增强其毒力。

HX4 菌株外毒素的毒性实验结果表明，外毒素也是一种重要的毒力因子，具有很强的细胞毒性、肠毒性和中华绒螯蟹致死性。与吴后波等[12]报道的真鲷源拟态弧菌外毒素具有较强细胞毒性和微弱肠毒性有所不同，这可能与菌株的来源和外毒素的提纯方法不同有关。内毒素致病性实验结果表明，其对中华绒螯蟹致病性很弱，原因可能是中华绒螯蟹为变温动物，由内毒素引起的热量迅速散发至水环境中，不能积留在体内引起机体生理功能紊乱而导致疾病发生。

综上所述，TCP 和外毒素是拟态弧菌 HX4 菌株的 2 种重要毒力因子，该菌的致病机理主要是细菌首先依靠毒素共调菌毛 TCP 黏附定居于感染部位的组织细胞表面，然后大量生长繁殖，产生具有多种毒性作用的外毒素损伤感染部位组织细胞，从而促进病原弧菌及其外毒素随血液循环由感染部位扩散至全身组织器官而导致严重疾病。研究中同时发现 TCP 及外毒素均具有良好的免疫保护性（另文报道），提示下一步可研制 TCP 或外毒素基因工程亚单位苗预防水产动物的弧菌病。

参考文献：

[1] 陆宏达，金丽华，范丽萍，等．中华绒螯蟹细菌性病原的分离和鉴定[J]．水产学报，1999，23(4)：381－386.

[2] 沈锦玉，尹文林，钱　冬，等．中华绒螯蟹"腹水病"及"抖抖病"并发病病原的研究[J]．中国水产科学，2000，7(3)：89－92.

[3] 李槿年，余为一，江定丰，等．蟹源拟态弧菌的编码鉴定及其特性分析[J]．中国兽医学报，2002，22(3)：231－233.

[4] Masaaki Iwanaga，Koichiro Yamamoto. New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 biotype EL-Tor[J]. Journal of Clinical Microbiology，1985，22(3)：405－408.

[5] 李影林．临床微生物学及检验[M]．北京：人民卫生出版社，2002．74－75；148－150.

[6] 赵　斌，何绍江．微生物学实验[M]．北京：科学出版社，2002．172－173.

[7] 李　峰，刘　娟，孟凡亮，等．霍乱弧菌 TCP 菌毛黏附作用的研究[J]．中国预防医学杂志 2001，3(2)：194－197.

[8] 杨正时．杨正时论文集（第二卷）[C]．北京：中国微生态学杂志编辑部，1998．626－627.

[9] 李玉英，李槿年，余为一．蟹源拟态弧菌最佳产毒条件的筛选[J]．水产学报，2003，27(5)：468－473.

[10] 汪家政，范　明．蛋白质技术手册[M]．北京：科学技术出版社，2001．47－50.

[11] 严　杰，罗海波，陆德源．现代微生物学实验技术及其应用[M]．北京：人民卫生出版社，1997．137－138.

[12] 吴后波，潘金培．海水养殖真鲷弧菌病病原菌外毒素的分离、纯化及微生物学活性[J]．海洋与湖沼，2002，33(1)：83－88.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn

Analysis on pathogen producing ascitic fluid disease of *Eriocher sinensis*

LI Jin-nian[1], LI Yu-ying[2], HU Shou-kui[3], LI Lin[1], FANG Bing[1], YU Wei-yi[3], ZHANG Xiao-hua[1]
(1. College of Aanimal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China 2. Department of Life Sciences, Nanyang Normal College, Nanyang 473061, China 3. Provincial Center for Prevention and Control of Diseases, Hefei 230001, China)

Abstract: A strain of pathogenic bacteria (HX4) was isolated from *Eriocher sinensis* with ascitic fluid disease in the area of Liuan, Anhui Province and was classified as *V. mimicus* by API/ATB semiautomated idetification and molecular genetic idetification. The Toxin Coregulated Pilus (TCP), exotoxin and endotoxin of HX4 strain were studied by PCR technigue, electropherogram technology, tissue or cells model and animal experiments. The results showed that HX4 strain was a TCP^+ strain, which could express TCP very well in pH 6.5 CFA medium at 28 ℃ in aerobic cultivation. The intestinal adhesive rate (32.16%), adhesive bacterial numbers to HEp-2 cells (16.04 ± 4.66) and virulence to *E. sinensis* (LD_{50} 2.08×10^4 CFU·mL^{-1}) of TCP^+ strain were all markedly higher than those (0.44%, 6.8 ± 2.06 and 2.09×10^7 CFU·mL^{-1} respectively) of TCP^- strain. The exotoxin produced by HX4 strain had strong cytotoxicity ($TCID_{50}$ 0.25 μg), enterotoxicity (diameter of skin blue spot 15 mm) and lethality to *E. sinensis* (LD_{50} 1.40 μg), but the endotoxin had little pathogenicity to *E. sinensis*. From above results, it was concluded that TCP and exotoxin were both important virulent factors of HX4 strain, which played a key role in pathogenic process.
Key words: *Eriocheir sinensis*; ascitic fluid disease; *V. mimicus*

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.com.cn