

中国对虾弧菌病的间接荧光抗体 诊断技术研究*

张晓华 徐怀恕 许兵 纪伟尚

韩茵[†] 杨学宋^{††} 马建康^{††}

(青岛海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

[†](宁波市水产研究所, 浙江 315010)

^{††}(莱州市大华水产实业公司, 山东 261413)

提要 于1994年8月—1995年5月建立中国对虾病原菌——副溶血弧菌的间接荧光抗体检测技术,其中副溶血弧菌的特异抗血清由家兔制备,羊抗兔免疫球蛋白用异硫氰酸荧光素标记,并以罗丹明标记的牛血清白蛋白为背景染色。应用该技术在山东省莱州市大华水产实业公司养殖场检测中国对虾样品中的副溶血弧菌。结果表明,养成期人工感染对虾中,副溶血弧菌主要集中于中国对虾的注射点附近的肌肉及血淋巴中,说明由肌肉注射而进入体内的病原菌主要转移部位是血淋巴;菌浴感染苗期中国对虾中,尽管虾苗外观未见异常,但可检测到大量副溶血弧菌;苗期对虾中的副溶血弧菌现场检测,3组发病虾苗样品中均检测到副溶血弧菌,3组外观健康的虾苗样品中,其中1组样品中检测到副溶血弧菌,另外2组样品未检测到副溶血弧菌,表明间接荧光抗体技术不仅可用于诊断发病的感染对虾,也可用于检测带菌状态或未发病的感染对虾。

关键词 间接荧光抗体诊断技术 中国对虾 副溶血弧菌

弧菌性病害是困扰对虾养殖业的重要因素 (Delves-Broughton et al., 1976)。面对不断增多的病原种类,单纯依靠传统技术方法已很难适应研究和生产的需要,为此建立灵敏、准确、快速的对虾病原菌鉴定技术已成为研究的主要方向和生产发展的急需。在病原菌的快速诊断方面有荧光抗体技术 (FAT)、酶联免疫吸附试验 (ELISA) 以及聚合酶链反应 (PCR) 等。近年来,这些技术已越来越多地应用于对虾细菌性病害的诊断 (Adams, 1991; Song et al., 1992)。对虾病原菌的间接荧光抗体诊断技术研究尚不多见 (Chen et al., 1994)。本文报告中国对虾病原菌——副溶血弧菌诊断血清的制备,间接荧光抗体技术的建立以及应用该技术检测养成期和苗期中国对虾中的副溶血弧菌,以期对对虾病原菌的快速诊断提供依据。

* 欧洲共同体“发展中国家生命科学和技术计划”资助项目,STD₃(TS3-CT94-0269)号。张晓华,女,出生于1965年9月,博士生。

收稿日期:1996年2月13日,接受日期:1997年7月9日

1 材料和方法

1.1 实验菌株

副溶血弧菌 (*Vibrio Parahaemolyticus*) 菌株 4-7, 25-C 于 1989 年 9 月分离自患败血症中国对虾 (*Penaeus chinensis*, 下简称对虾); 菌株 1.1614, 1.1615 于 1994 年 6 月购自中国科学院微生物研究所; 菌株 J, 于 1994 年 8 月购自济南市卫生防疫站; 菌株 QM1 于 1994 年 6 月购自卫生部药品生物制品检定所。用于测定交叉反应的菌株列于表 2。

1.2 抗原制备

将副溶血弧菌菌株 4-7, 1.1614, 1.1615, J 和 QM1 在 2216E 平板上培养 24h, 用双蒸水配制的生理盐水洗脱, 以 3 000r / min 离心 20min, 洗涤三次, 于 100℃ 水浴 2h, 以除去鞭毛抗原。免疫用菌液浓度为 1×10^9 cell / ml。

1.3 免疫血清制备

选择健康的体重 2kg 的家兔, 除 25-C 菌株外, 其它菌株均分别按 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0ml 菌量分 5 次静脉注射免疫家兔, 注射时间间隔为两周, 每株细菌免疫 3 只兔子。最后一次注射后, 第 7 天取血测定抗体效价, 效价达 1:1 280 以上, 即可取血并制备免疫血清。

1.4 交叉反应的去除

选择弧菌属不同的细菌及其它属的细菌共 52 株, 按 Xu 等 (1984) 的方法测定副溶血弧菌混合免疫血清的交叉反应及交叉反应的效价。凡有交叉反应的菌株, 每株培养斜面 5 支, 用双蒸水生理盐水洗脱, 并以 3 000r / min 离心 20min, 洗涤三次, 然后加入到混合免疫血清中进行吸附, 室温振荡 30min, 置冰箱过夜。离心法除去吸附用菌体, 上清液再经孔径 0.2 μ m 微孔滤膜过滤。吸附后的免疫血清再测定交叉反应, 如没有凝集现象, 即为副溶血弧菌多价免疫血清。

1.5 间接荧光抗体检测技术 (iFAT)

对 Xu 等 (1984) 的方法进行必要的改进。应用该技术诊断对虾细菌性疾病的操作要点如下。

1.5.1 取发病对虾, 抽取养成期对虾的血淋巴和匀浆苗期对虾, 制成涂片让其自然干燥。将涂片在 55℃ 固定 10min。

1.5.2 将涂片放入不透光培养皿内, 培养皿底部放两层湿润的滤纸, 使空间保持湿润。在涂片上加两滴 1:5 的罗丹明标记的牛血清 (RITC, BBL 公司出品), 为使牛血清分布均匀, 加盖 24cm \times 32cm 的盖玻片。将培养皿放入 37℃ 温箱中反应 30min。用 0.1mol / L PBS (磷酸盐缓冲液, pH = 7.6) 冲洗玻片 3 次。在 0.1mol / L PBS 中浸泡 10min, 去除未反应的牛血清。按上述步骤, 用两滴 1:100 副溶血弧菌多价免疫血清 (本文研制) 进行反应。同样按上述步骤, 用两滴 1:10 异硫氰酸荧光素标记的羊抗兔 IgG 血清 (FITC, 上海生物制品所生产) 进行反应。在反应后的涂片上加一滴荧光抗体覆盖液 (PBS : 甘油 = 1:9), 加盖玻片。在盖玻片上加一滴无自发荧光的香柏油。

用落射光荧光显微镜观察。100W 汞灯, 激发光滤光片为 450—490nm, 荧光滤光片为 510nm。通过荧光显微镜观察, 背景为黑色或红色, 菌体为黄绿色。

1.6 中国对虾的人工感染实验

取 300 尾健康的对虾蚤状幼体 (Z_3) 置于实验桶中 (盛有消毒海水 20L), 暂养 48h。副

溶血弧菌株 25-C, 在 2216E 斜面上培养 24h, 以无菌生理盐水制成菌悬液并将菌液加入实验水体中, 使水中实验菌浓度为 10^7 cell / ml。对照组不加菌液, 其它条件同人工感染实验组。每天正常投饵和换水。3d 后, 从实验组和对照组各取 20 尾虾苗, 均用 $100\mu\text{m}$ 孔径的无菌筛绢过滤; 然后, 用 100ml 的无菌生理盐水冲洗 3 次, 用灭菌的匀浆器匀浆并制成涂片。用间接荧光抗体技术检测虾苗中的副溶血弧菌。

选 12 尾健康的体长为 12cm 的养殖对虾, 在实验槽内 (加有消毒海水) 暂养 24—36h。用副溶血弧菌 4-7 及 1.1614 菌株的混合菌悬液 (1.2×10^9 cell / ml) 在对虾第三或第四腹节注射感染, 每尾对虾注射 0.04ml。对虾濒死时, 分别取近注射点肌肉、远注射点肌肉、肝胰脏、心肌、附肢、血淋巴及眼球液等组织供检测用。血淋巴及眼球液采用涂片法。其它组织按 Austin 等 (1989) 的方法进行固定、包埋和切片。用间接荧光抗体技术检测副溶血弧菌在各组织中的分布。

1.7 苗期对虾中副溶血弧菌的现场检测

在对虾育苗池中, 取自然发病的虾苗作为发病样品, 在蚤状期和仔虾期共取 3 组 (每组样品 20 尾虾苗)。取 3 组健康虾苗样品作为对照。将样品过滤、冲洗、匀浆及涂片。用间接荧光抗体技术检测虾苗中的副溶血弧菌。

2 结果

2.1 血清制备及血清的专一性

结果表明, 用家兔制备对虾病原菌免疫诊断血清, 每只家兔可获得约 30ml 的血清。血清的效价因菌株不同和家兔的差异也有所不同, 但一般可达 1:1 280 以上。对虾的病原菌——副溶血弧菌具有特异性的抗原结构, 但也与其他细菌有共同抗原, 这些共同抗原造成了诊断血清交叉反应的出现, 为此必须采用吸附法去除交叉反应部分的抗体。吸附处理后, 血清的效价一般略有降低。免疫诊断血清吸附前后的效价见表 1。

表 1 副溶血弧菌免疫诊断血清吸附处理前后的效价

Tab.1 Titers of *V.parahaemolyticus* antisera before and after being absorbed

菌号	吸附前效价	吸附后效价
4-7	1:640	1:320
1.1614	1:5 120	1:2 560
1.1615	1:2 560	1:1 280
J	1:2 560	1:1 280
QM1	1:5 120	1:2 560

经过测定, 吸附处理前, 在 52 株弧菌属及其它属的细菌中, 有 38 株具有交叉反应 (交叉反应效价 $> 1:2$), 6 株不具有交叉反应 (交叉反应效价 $\leq 1:2$), 8 株没有测定 (ND)。免疫诊断血清仅与一株鳗弧菌的交叉反应效价达到 1:256, 与其它细菌交叉反应效价最高为 1:96。经过吸附处理后, 免疫诊断血清与 52 株细菌都

没有交叉反应, 血清的专一性符合免疫学检测的要求, 可以应用于对虾病原菌的检测。免疫诊断血清吸附处理前后的交叉反应见表 2。

2.2 人工感染实验结果

苗期对虾人工菌浴感染实验表明, 实验组和对照组的虾苗外观都未见异常。然而, 在实验组虾苗中可检测到大量副溶血弧菌, 在对照组的虾苗中未检测到。养成期人工感染实验表明, 副溶血弧菌主要集中于注射点附近的肌肉 (图版 I:1) 及血淋巴中 (图版 I:2), 其它部位如远注射点肌肉、附肢肌肉、肝胰脏及心肌中细菌数量很少, 眼球液内没有细菌。

表2 副溶血弧菌免疫诊断血清吸附处理前后的交叉反应结果

Tab.2 Cross reactivity of *V.parahaemolyticus* antisera before and after being absorbed

细菌名称	菌号	交叉反应效价	吸附后交叉反应
溶藻弧菌	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1:1607	—
坎贝氏弧菌	<i>V. campbellii</i>	1:1597	—
河弧菌	<i>V. fluvialis</i>	1:1609	—
哈维氏弧菌	<i>V. harveyi</i>	1:1593	—
飘浮弧菌	<i>V. natriegens</i>	1:1594	—
远洋弧菌	<i>V. pelagius</i>	1:1588	—
鳗弧菌	<i>V. anguillarum</i>	19105	—
鳗弧菌	<i>V. anguillarum</i>	19106	—
鳗弧菌	<i>V. anguillarum</i>	19109	—
鳗弧菌	<i>V. anguillarum</i>	19264	—
鳗弧菌	<i>V. anguillarum</i>	HOG	—
溶藻弧菌	<i>V. alginolyticus</i>	17749	—
坎贝氏弧菌	<i>V. campbellii</i>	25920	—
费氏弧菌	<i>V. fischeri</i>	7744	—
梅氏弧菌	<i>V. metschnikovii</i>	7708	—
	<i>V. ponticus</i>	14391	—
	<i>V. marinagillus</i>	14398	—
适应弧菌	<i>V. adaptatus</i>	19263	—
	<i>V. algosus</i>	14990	—
肋生弧菌	<i>V. costicola</i>	33508	—
创伤弧菌	<i>V. vulnificus</i>	C-7184	—
纽瓦克弧菌	<i>V. neocistes</i>	14636	—
易北河弧菌	<i>V. albensis</i>	14547	—
霍乱弧菌01	<i>V. cholerae</i> -01	1d	ND
霍乱弧菌非01	<i>V. cholerae non</i> -01	Ia-N-37	ND
霍乱弧菌非01	<i>V. cholerae non</i> -01	1d-N-27	ND
霍乱弧菌非01	<i>V. cholerae non</i> -01	N-2007H	ND
霍乱弧菌非01	<i>V. cholerae non</i> -01	II-N-186	ND
霍乱弧菌非01	<i>V. cholerae non</i> -01	1e-N-10	ND
发光杆菌	<i>Photobacterium logei</i>	15382	—
大肠杆菌	<i>Escherichia coli</i>	25922	—
大肠杆菌	<i>E. coli</i>	10798	—
大肠杆菌	<i>E. coli</i>	WP-2	—
大肠杆菌	<i>E. coli</i>	K-12	—
大肠杆菌	<i>E. coli</i>	QM2	—
产气肠杆菌	<i>Enterobacter aerogenes</i>	10006	—
鸡沙门氏菌	<i>Salmonella gallinarum</i>	SAK10002	ND
索氏志贺氏菌	<i>Shigella sonnei</i>	1290-SS	ND

续表2

	细菌名称	菌号	交叉反应效价	吸附后交叉反应
弗氏柠檬酸杆菌	<i>Citrobacter freundii</i>	SAK100	1:3	—
嗜水气单胞菌	<i>Aeromonas hydrophila</i>	15467	1:6	—
铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145	1:12	—
节杆菌	<i>Arthrobacter simple</i>	1.754	1:6	—
普通变形菌	<i>Proteus vulgaris</i>	1.1527	1:6	—
棒状杆菌	<i>Corynebacterium pekinense</i>	1.1735	1:96	—
不动杆菌	<i>Acinetobacter sp.</i>	k-1	1:12	—
肠杆菌	<i>Enterobacter sp.</i>	k-2	1:48	—
微球菌	<i>Micrococcus sp.</i>	k-3	1:24	—
棒状杆菌	<i>Corynebacterium sp.</i>	k-4	1:2	—
微球菌	<i>Micrococcus sp.</i>	k-5	1:2	—
假单胞菌	<i>Pseudomonas sp.</i>	k-6	1:2	—
黄杆菌	<i>Flavobacterium sp.</i>	k-7	1:12	—
不动杆菌	<i>Acinetobacter sp.</i>	k-8	1:12	—

2.3 苗期对虾中副溶血弧菌的现场检测结果

在3组发病虾苗样品中,其中1组样品有大量副溶血弧菌,另外2组样品中有少量的。在3组健康虾苗样品中,其中1组样品中有少量副溶血弧菌,另外2组样品未检测到。

3 讨论与结论

快速、准确地诊断中国对虾发病原因是对病害进行有效防治的基础和先决条件。应用间接荧光抗体技术对病原菌进行快速诊断既可以克服培养法时间过长的缺点,准确性又大大高于一般镜检观察。由于此方法使用了副溶血弧菌的混合多价血清且去除了交叉因素,血清专一性很强,为此可以准确的检测出由副溶血弧菌引起的养成期对虾的红腿病及苗期对虾疾病,并且时间很短,一般3h内即可完成。因此,荧光抗体技术是一种快速、准确、灵敏的诊断技术。

间接荧光抗体技术还是研究病原菌在寄主体内各组织中分布情况的有效方法。这有助于了解对虾败血症病原菌的侵入途径及主要作用部位。普通组织切片染色(如H·E染色)中染料只对染色的组织具特异性,而对病原菌无区别能力。荧光抗体染色法既可以检测病原菌在寄主体内的分布,又可以确定病原菌的种类。对由副溶血弧菌引起的败血症虾的检测结果表明,由肌肉注射而进入体内的病原菌主要转移部位是血淋巴。许兵等(1993)发现自然发病死亡对虾中副溶血弧菌主要存在部位也是血淋巴。这进一步证实,副溶血弧菌是由于侵入对虾循环系统引起败血症而导致对虾死亡的。间接荧光抗体技术也可用于检测苗期对虾的病原菌。当用副溶血弧菌对苗期对虾进行人工感染实验时,尽管虾苗无任何发病症状,但用间接荧光抗体技术却可检测到副溶血弧菌,如对6个发病和健康的样品检测结果,其中4个样品有副溶血弧菌。因此,间接荧光抗体技术不仅可用于诊断发病的感染对虾,也可用于检测带菌状态或未发病的感染对虾。

应用免疫血清诊断对虾细菌性疾病,还应当注意到对虾细菌性疾病往往是由多种条件致病菌引起的。因此,应当利用各种病原菌制备多种抗体血清配套使用,以便诊断出不

同种类的病原菌,采取相应的防治措施。另外,据 Kasthuri 等(1989)报道,副溶血弧菌菌体抗原(O 抗原)有 12 型,胞外多糖抗原(K 抗原)有 59 型,并且所有菌株都具有相同的鞭毛抗原(H 抗原)。因此,制备副溶血弧菌抗体血清,应当利用 12 型菌体抗原的菌株,制备出各型的血清,然后再混合成副溶血弧菌的多价血清,用于对虾病原菌的诊断,才可避免因血清型的不同而出现的漏检现象。

参 考 文 献

- 许 兵、纪伟尚、徐怀恕等,1993,海洋学报,15 (1): 98—106。
Adams, A., 1991, *Aquaculture*, 93:101—108。
Austin, B. and Austin, D. A., 1989, *Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish*, Halsted Press (New York, Chichester, Brisbane, Toronto), pp. 69—98。
Chen, D. and Hanna, P. J., 1994, *Dis. Aquat. Org.*, 20 (2):159—162。
Delves-Broughton, J. and Poupard, C. W., 1976, *Aquaculture*, 7:201—217。
Kasthuri, V., Kim, S. W., Nakano, H. et al., 1989, *System. Appl. Microbiol.*, 11:194—201。
Song, Y. L. and Chang, W. J. et al., 1992, *Dis. Aquat. Org.*, 14:43—50。
Xu, H. S., Roberts, N. C., Adams, L. B. et al., 1984, *J. Micro. Meth.*, 2:221—231。

STUDY ON DIAGNOSIS OF *VIBRIOSIS* IN *PENAEUS CHINENSIS* BY INDIRECT FLUORESCENT ANTIBODY STAINING PROCEDURE

Zhang Xiaohua, Xu Huaishu, Xu Bing, Ji Weishang, Han Yin[†],
Yang Xuesong^{††}, Ma Jiankang^{††}

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003)

[†](Ningbo Fisheries Research Institute, Zhejiang 315010)

^{††}(Dahua Fishery Production Group Company of Laizhou, Shandong 261413)

Abstract An indirect fluorescent antibody technique (iFAT) incorporating fluorescein isothiocyanate conjugated anti-rabbit globulin goat serum, and rhodamine isothiocyanate conjugated bovine serum albumin (RITC-BSA, BBL, Cockeysville, MD) as background stain has been developed for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* during August 1994—May 1995. The iFAT was based on Xu et al. (1984). *V. parahaemolyticus*, strains 4—7, 1.1614, 1.1615, J and QM1 were used as antigens. Rabbits were immunised five times in 2 weeks intervals by injecting 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 and 2.0 ml bacterial suspension intravenously, with three rabbits for each strain (Tab.1). On the 7th day after the last injection, antibody titers were determined by slide agglutination. If the titers were higher than 1 280, the blood was withdrawn by

venepuncture and antiserum was prepared. 52 strains of *Vibrio* (non-*V. parahaemolyticus* spp.) and related organisms were used for cross reactivity studies (Tab. 2). Each strain proven to have cross reactivity was grown on five Marine Agar slopes at 28°C for 24 hours, washed three times (3 000 r/min, 20 min) in sterile 0.85% saline, and added to the pooled antiserum. The mixture was stirred at room temperature for 30 min, then overnight at 4°C. Cells were removed by centrifugation, followed by filtration through 0.2µm Nuclepore membrane filters. After being absorbed, the cross reactivity of the antiserum was tested again. For the case of no agglutination, the polyvalent antiserum for *V. parahaemolyticus* was used. Before absorption, with 52 *Vibrio* strains and other bacteria, 38 strains had cross-reactions, 6 strains did not have cross-reactions, and 8 strains were not tested. Cross-reactivity titers of most strains were not more than 1:96, but one strain of *V. anguillarum* was 1:256 (Tab. 2). After absorption, there were no cross reactivities between antiserum and 52 strains of bacteria. The specificity of antiserum was suitable for the demands of immunological examinations of shrimp pathogens.

Levels of bacteria in adult *Penaeus chinensis* challenged with *V. parahaemolyticus* and in larval shrimps were detected using this method in Dahua Hatchery, Laizhou, Shandong, P. R. China. The results of *V. parahaemolyticus* in adult challenged shrimp show that *V. parahaemolyticus* mainly exist in the muscle tissues near the injection site (Plate I:1) and in haemolymph (Plate I:2). There were only a few bacteria in other tissues, such as muscle far from injection site, limbs, hepatopancreas and heart. There were no bacteria in the eyeball fluid. This indicates that the major infection site of pathogens entering shrimps by intramuscular injection is haemolymph. The results of *V. parahaemolyticus* in challenged larval shrimps show that a lot of *V. parahaemolyticus* can be detected in the samples collected from the challenged shrimp larvae, though none of the shrimps died during challenge. None of the bacteria could be detected in control samples. A field-scale test of *V. parahaemolyticus* in shrimp hatchery show that *V. parahaemolyticus* can be detected in all the three groups of diseased shrimp larvae samples and one group of health shrimp larvae sample. Therefore, iFAT can be used not only to diagnose the clinically diseased shrimp, but also to recognize subclinically diseased or carrier shrimps.

Key words Indirect fluorescent antibody staining *Penaeus chinensis* *Vibrio parahaemolyticus*