

牙鲆迟缓爱德华氏菌急性感染实验:4种不同方法的比较^{*}刘云¹ 刘允坤² 杨栋¹ 姜国良¹(¹ 青岛海洋大学海洋生命学院 266003)(² 国家海洋局第一海洋研究所 青岛 266061)

摘要 为了检验疫苗对牙鲆免疫效果,探讨有效的注射途径尤为重要。本文通过采用迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)对牙鲆(*Pseudoscophthalmus olivaceus*)进行感染实验,对口腔、肌肉、腹腔和腹腔加肌肉4种注射方法进行了评价比较。其半致死浓度(LD₅₀)分别为口腔灌注法 $10^{8.38}$ CFU/ml、肌肉注射法 $10^{7.54}$ CFU/ml、腹腔注射法 $10^{6.70}$ CFU/ml和腹腔加肌肉注射法 $10^{6.09}$ CFU/ml。结果表明牙鲆对迟缓爱德华氏菌敏感,在这4种注射方法中,以腹腔注射法这种人工感染方式最佳。

关键词 牙鲆,迟缓爱德华氏菌,感染实验,半致死浓度(LD₅₀)

随着牙鲆养殖业在我国的蓬勃发展,牙鲆疾病日趋严重,成为养殖业的重大障碍^[1]。据池上裕治1996年报道,在牙鲆最常发生的3种细菌性疾病,即爱德华氏菌病、链球菌病和弧菌病中,迟缓爱德华氏菌病,又名腹水病,是牙鲆养殖中造成经济损失最大的疾病,每年7~8月,20℃以上的高水温期为发病高峰期。夏季水温越高发病期越长,秋、冬季的危害也越大。若25℃以上水温长期持续,则发病危险性更大^[4]。一旦发病,高密度饲养的小型鱼死亡率高。改善养殖环境可在一定程度上减轻这种病害,但更积极的方法是预防免疫。马久地隆幸等1995年以及Rashid等1997年对牙鲆迟缓爱德华氏菌病原性实验已有报道,但都为慢性毒性实验,并且由于环境温度、剂量、注射方法和鱼体大小等不同,结果也不尽相同。本研究为牙鲆对迟缓爱德华氏菌的急性感染实验,目的就是建立迟缓爱德华氏菌对牙鲆的致死模型,为筛选对迟缓爱德华氏菌具有保护性的疫苗做好前期准备。

1 材料和方法

1.1 菌种及试验用鱼

迟缓爱德华氏菌来自天津动植物检疫所。将迟缓爱德华氏菌纯化,口腔灌注,从发病鱼中分离出致病力较高的病原菌,在SS培养基上检验,同时在-20℃冷冻干燥保存。实验用牙鲆幼鱼购自山东威海海珍品养殖公司,平均体长5.0 cm,平均体重1.5 g。每次

购得鱼苗都置于9 L水族箱里暂养1周,换水,充氧并用颗粒饵料饲喂,水温 20.0 ± 1.0 ℃。实验期间鱼停止进食。

1.2 试验方法

将菌株活化、复壮、分离,转接淡水的2216E斜面25~27℃,48 h培养,用无颗粒生理盐水洗下菌苔,进行10倍稀释,制成 10^{-1} ~ 10^{-5} 5个浓度梯度。用平板涂布法和荧光染色显微计数法(AODC法)计数菌液浓度。

将牙鲆分组后,分别用4种方法对其进行人工感染,即口腔灌注法、肌肉注射法、腹腔注射法和腹腔加肌肉注射法。每种注射方法都根据需要设3~4个梯度,并对每一注射方法设定一组对照组(注射同等量的无菌生理盐水),并保留不做注射的空白对照组。每尾鱼的注射量为0.1 ml。同时记录当天水温。实验重复2~3次。口腔灌注法采用微量取液器取0.1 ml通过口腔和食道缓缓送入胃里;肌肉注射法是用灭过菌的针在背鳍下方、侧线上方注射;腹腔注射法是从腹鳍之间插入腹腔;腹腔加肌肉注射法是将针头从泄殖腔后进入,顺腹壁向后插入肌肉,注射0.05 ml后针头推到腹腔再注射0.05 ml。

^{*} 国家海洋 863 计划资助项目 8190206 号。

收稿日期:2000-11-16;修回日期:2000-12-08

1.3 半数致死量 (LD₅₀) 的测定

观察记录 3 d 内鱼的发病及死亡情况(对口腔灌注法记录 4 d 内的发病情况)。同时取样、分离病原菌,鉴定。计算鱼的半数致死量(LD₅₀),计算方法参考

Read - Muench 法^[1]。

2 结果

2.1 主要症状

表 1 4 种注射方法死亡率的比较

Tab.1 Comparison of mortality of four different methods

实验 次数	注射 方法	病菌稀 释度	实验组			累计数			
			死亡比数	死亡数	存活数	总死亡数	总存活数	死亡率	
								比数	百分数(%)
第一次实验	口腔	10 ⁰	4/5	4	1	10	1	10/11	90.9
		10 ⁻¹	2/5	2	3	6	4	6/10	60.0
		10 ⁻²	4/5	4	1	4	5	4/9	44.4
	肌肉	10 ⁰	5/5	5	0	15	0	15/15	100
		10 ⁻¹	4/5	4	1	10	1	10/11	90.9
		10 ⁻²	4/5	4	1	6	2	6/8	75.0
		10 ⁻³	2/5	2	3	2	5	2/7	28.6
	腹腔	10 ⁻¹	5/5	5	0	13	0	13/13	100
		10 ⁻²	4/5	4	1	8	1	8/9	88.9
		10 ⁻³	4/5	4	1	4	2	4/6	66.7
		10 ⁻⁴	5/5	0	5	0	7	0/7	0
	腹腔加肌肉	10 ⁻²	5/5	5	0	12	0	12/12	100
		10 ⁻³	3/5	3	2	7	2	7/9	77.8
		10 ⁻⁴	1/5	1	4	4	6	4/10	40.0
		10 ⁻⁵	3/5	3	2	3	8	3/11	27.3
第二次实验	口腔	10 ⁻¹	3/5	3	2	6	2	6/8	75
		10 ⁻²	1/5	1	4	3	6	3/9	33.3
		10 ⁻³	2/5	2	3	2	9	2/11	18.2
	肌肉	10 ⁻¹	5/5	5	0	6	0	6/6	100
		10 ⁻³	1/5	1	4	1	4	1/5	20.0
		10 ⁻⁵	0/5	0	5	0	9	0/9	0
	腹腔	10 ⁻²	5/5	5	0	6	0	6/6	100
		10 ⁻⁴	1/5	1	4	1	4	1/5	20.0
		10 ⁻⁶	0/5	0	5	0	9	0/9	0
	腹腔加肌肉	10 ⁻²	5/5	5	0	9	0	9/9	100
		10 ⁻⁴	2/5	2	3	4	3	4/7	57.1
		10 ⁻⁶	2/5	2	3	2	6	2/8	25
第三次实验	肌肉	100	6/6	6	0	14	0	14/14	100
		10 ⁻¹	3/3	3	2	8	2	8/10	80.0
		10 ⁻²	5/5	5	0	5	2	5/7	71.4
		10 ⁻³	0/5	0	5	0	7	0/7	0
	腹腔	10 ⁻³	10/10	10	0	13	0	13/13	100
		10 ⁻⁴	1/10	1	9	3	9	9/12	75.0
		10 ⁻⁵	2/10	2	8	2	17	2/19	10.5
		10 ⁻⁶	0/10	0	10	0	27	0/27	0

据韩先朴等 1989 年研究表明,鱼病的症状表现为两大类型:一种是肾脏型,另一种是肝脏型,实验中人工感染后造成牙鲆发生病变,经解剖有肝肾脓肿、充血,腹水现象,特别是腹水现象明显。

2.2 病原菌的特征

革兰氏阴性杆菌,菌体直、单个。25~28℃培养 24 h,菌体 (0.6~0.8) μm×(0.8~2.4) μm,多数为 (0.7~0.8) μm×(1.1~1.4) μm,随培养时间延长菌体缩短。长时间培养菌体很多呈球形。周鞭毛,运动,无荚膜,无芽孢。在普通培养基上 25~28℃培养 48 h 菌落直径为 0.5 mm 左右。正圆形灰白色透明隆起,周缘光滑。能在 SS 培养基上生长。

2.3 感染实验

本实验通过 4 种方法,用迟缓爱德华氏菌对牙鲆进行感染。这 4 种方法分别为:口腔灌注法、肌肉注射法、腹腔注射法和腹腔加肌肉注射法。实验期间水温为 21.0±1.0℃。通过感染得出 3 d 内(口腔灌注为 4 d)牙鲆的死亡情况,得到每种注射方法的半数致死浓度。通过半数致死浓度对各种注射方法加以分析比较如下,见表 1。

2.3.1 口腔灌注法 因口腔灌注反应较慢,故观察 4 d 内的死亡情况,得到的平均半数致死浓度为 $10^{8.38}$ CFU/ml,通过两次实验的观察,发现当浓度达到 4×10^{10} CFU/ml 时有 90% 的死亡率,但在此浓度下 4 d 之内达不到 100% 的死亡率。

2.3.2 肌肉注射法 平均半数致死浓度为 $10^{7.54}$ CFU/ml,通过 3 次实验,得出当浓度达到 6.4×10^8 CFU/ml 时,能达到 100% 的死亡率,当浓度达到 4.0×10^8 CFU/ml 时,达到 75% 的死亡率。

2.3.3 腹腔注射法 平均半数致死浓度为 $10^{6.70}$ CFU/ml,当浓度为 6.4×10^8 CFU/ml 时,能达到 100% 死亡率,浓度为 4.0×10^8 CFU/ml 时,死亡率为 88.9%。

2.3.4 腹腔加肌肉注射法 平均半数致死浓度为 $10^{6.09}$ CFU/ml,当浓度为 4×10^7 CFU/ml 时,3 d 内 100% 死亡。

4 种注射方法的半数致死浓度测定值见表 2。

3 讨论

迟缓爱德华氏菌是感染牙鲆的一种重要菌种。

表 2 4 种注射方法的半数致死浓度(LD₅₀) CFU/ml 测定值

Tab.2 Observed values of Medial lethal dose (LD₅₀) of four different methods

实验次数	口腔灌注法 96LD ₅₀	肌肉注射法 72LD ₅₀	腹腔注射法 72 LD ₅₀	腹腔加肌肉注射法 72 LD ₅₀
第一次实验	$10^{8.36}$	$10^{7.46}$	$10^{6.75}$	$10^{6.62}$
第二次实验	$10^{8.40}$	$10^{7.47}$	$10^{6.74}$	$10^{5.56}$
第三次实验	/	$10^{7.70}$	$10^{6.62}$	/
均值	$10^{8.38}$	$10^{7.54}$	$10^{6.70}$	$10^{6.09}$

据马久地隆幸等 1995 年报道,它的胞外产物及菌体均含有毒素,该菌分布于血液、肠、肝、肾中。通过 4 种方法用迟缓爱德华氏菌对牙鲆进行感染实验,每种方法都重复实验二到三次,每次结果都有很高的相近性,除口腔灌注法外,且每种方法都能在一定的浓度内 3 d 中达到 50% 的死亡率。所以无论哪种方法,都具有死亡率高,存活率低,重现性高的特点,都可以作为人工感染的注射方法。比较这 4 种注射方法,半数致死浓度分别为腹腔加肌肉注射法 $10^{6.09}$ CFU/ml,腹腔注射法 $10^{6.70}$ CFU/ml,肌肉注射法 $10^{7.54}$ CFU/ml 和口腔灌注法 $10^{8.38}$ CFU/ml。腹腔加肌肉注射法对牙鲆的致死效果最好,其次为腹腔注射、肌肉注射和口腔灌注法。这种顺序与 Rashid 等^[3]的慢性毒性结果,即腹腔法(4~5 d)、浸泡法(7~10 d)和口服法(9~10 d)大体相同,由于他未做半数致死浓度,因而无法进行直接的比较。综合来看,腹腔加肌肉注射法虽然致死效果最好,但容易对牙鲆造成较大的物理伤害;肌肉注射法的注射剂量不易过大;口腔灌注对鱼体造成的物理伤害虽然最小而且是最接近自然感染的人工感染方式,但致死效果最差。因此,对牙鲆的迟缓爱德华氏菌人工感染方式还是以腹腔注射法最佳。

参考文献

- 安德森, D.P., (张寿山、华鼎可译). 鱼类免疫学. 北京: 农业出版社, 1984. 110~113
- 周 丽. 青岛海洋大学学报, 1997, 27(2): 173~180
- Rashid M. M., Nakai Y., Muroga K.. *Fish Science*, 1997, 63(3): 384~387
- Ronald L. Thune, Lisa A. Collins and Michael P. Pena.. *Journal of the World Aquaculture Society*, 1997, 28(2): 193~201

(本文编辑: 刘珊珊)

INFECTION EXPERIMENTS WITH *Edwardsiella tarda* IN THE BASTARD HALIBUT (*Paralichthys olivaceus*) : AN EVALUATION OF FOUR DIFFERENT CHALLENGE METHODS

LIU Yun¹ LIU Yun-kun² YANG Dong¹ JIANG Guoliang¹

(¹College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, 266003)

(²First Institute of Oceanography, S O A, Qingdao, 266061)

Received: Nov.16, 2000

Key Words: Bastard halibut, *Paralichthys olivaceus*, *Edwardsiella tarda*, Infection experiment, Median lethal dose (LD₅₀)

Abstract

In testing the efficacy of vaccines in the Bastard halibut(*Paralichthys olivaceus*), a reliable challenge method is essential. Four different challenge methods with *Edwardsiella tarda*, including oral administration, intramuscular injection, intraperitoneal injection, and both intramuscular and intraperitoneal injection methods were evaluated in the Bastard halibut. LD₅₀ were determined as 10^{7.54} CUF/ ml by intramuscular injection, 10^{6.70} CUF/ ml by intraperitoneal injection, 10^{8.38} CUF/ ml by oral administration, 10^{6.09} CUF/ ml by intramuscular and intraperitoneal injection. These results show that the Bastard halibut has high susceptibility to *Edwardsiella tarda*. Compared to the other three methods, intraperitoneal injection method is the most suitable method with high mortalities. (本文编辑:刘珊珊)