

致病性迟缓爱德华菌的检测*

熊清明 陆承平**

(南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室 南京 210095)

摘 要:系统检测了 25 株迟缓爱德华菌(*Edwardasiella tarda*, Et)的胞外产物(ECP),包括溶血素、胞外蛋白酶(ECPase),并用 Et 强致病株 JEL4 的 ECP 抗血清作 Dot-ELISA 检测各株 Et 的 ECP,同时对小鼠和剑尾鱼作致病性试验。试验表明,具动物致病性的菌株溶血素检测均为阳性,ECPase 与致病性无关。JEL4 ECP 的 Dot-ELISA 结果与动物致病性的符合率达 100%。在此基础上,建立了致病性 Et 的检测方法,该方法只需作简便的平板溶血试验和 Dot-ELISA,即可检测 Et 的 ECP,无须作动物试验,从而简化了致病性 Et 的检测程序,为研制检测试剂盒奠定了基础。

关键词:迟缓爱德华菌,溶血素,胞外蛋白酶, Dot-ELISA

中图分类号:R37 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 06-0736-05

迟缓爱德华菌(*Edwardasiella tarda*, Et)对养殖的水产动物具有广泛的致病性,同时也可引起人的肠胃炎等。已证实 Et 存在致病株与非致病株的差异,区分这一差异,检出致病株,至关重要。本实验以强致病菌株 JEL4 株的胞外产物(ECP)为抗原,制备抗血清,建立 Dot-ELISA 方法,用于检测致病性 Et。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养

国内从鳖、鳊分离鉴定的 17 株,来自江苏、广东、湖北、福建等地,另从国外引进 8 株 Et 参考株,包括 ATCC15947 = DSM30052(以下简称 15947),由德国吉森大学 Baljer 教授惠赠,其余分别由德国中黑森州兽医站 Nilz 博士、美国加州卫生部微生物实验室 Janda 教授、日本宫崎大学 Aoki 教授惠赠。均由本实验室保存,参见表 1。

取 -80℃甘油肉汤保存的 Et 菌种接种于胰酪大豆蛋白胨肉汤(TSB),37℃培养 24h,再接种胰酪大豆蛋白胨(TSA)平板,37℃培养 24h。

1.2 胞外产物(ECP)的提取及其抗血清的制备

参照 Inamura 等^[1]的方法,将 Et 于 TSB 培养 20h 后,接种于覆有灭菌玻璃纸的 TSA 平板上,37℃ 24h,用 PBS 洗下玻璃纸上的细菌培养物,10 000g 离心 30min,上清过滤除菌(0.45μm 滤膜),贮藏于 -30℃备用。

用 15947、JEL4 两菌株的 ECP 分别免疫健康家兔(体重约 2.0kg,成年新西兰白兔,购

* 江苏省“九五”重点攻关项目(BE96427)

** 通讯作者

作者简介:熊清明(1975-),男,湖北孝感人,硕士,从事水生动物病原微生物和免疫学研究。

收稿日期:2000-12-11,修回日期:2001-04-13

于江苏省农科院)。免疫程序:首次免疫将 ECP 与等体积福氏完全佐剂(GIBCO)混合,背部皮内多点注射 14 天后与福氏不完全佐剂等体积混合,皮下多点注射,28 天后肌肉注射再次强化免疫。蛋白总量约 3mg/只,当抗体的琼扩效价达 1:16 时,心脏采血,分离血清,-20℃分装保存。

1.3 毒力因子检测

1.3.1 溶血素检测:参照葛艳等^[2]和高大庆等^[3]的方法,分别用平板法(PA)、接触溶血(CH)和上清溶血(SA)法检测。

1.3.2 胞外蛋白酶(ECPase)检测:分别用脱脂奶平板法(Skim Milk Plate)、底物(Azocasein)法及 Dot-ELISA。前者接种 Et 于 1%脱脂奶营养琼脂平板,37℃孵育 48h,观察结果,菌落周围出现透明溶蛋白圈者,判为阳性。底物(Azocasein)法参照 Allan 和 Stenvenson 方法^[4],稍加改动。Dot-ELISA 用嗜水气单胞菌 J-1 株 ECPase 54 抗血清^[5](本室保存)为工作血清。Dot-ELISA 程序为 Et ECP 4 μ L 滴于 NC 膜光面烘干,5%脱脂奶封闭 1h,取出 NC 膜,PBS-T 洗涤 5 次,每次 3min,加 1:80 稀释的 ECPase 54 抗血清 37℃孵育 1h,洗涤同上,再加 PPA (1:40)37℃孵育 1h,同上洗涤,于 DAB-4HCl(二氨基联苯胺四盐酸盐,Sigma)30% H₂O₂ 中显色,以出现明显斑点者为阳性。设 Ah-J-1 株为阳性对照,PBS 为阴性对照。

1.4 致病性 ECP 的 Dot-ELISA 检测

分别用致病菌株 15947 和 JEL4 的 ECP 抗血清为工作血清,作 Dot-ELISA,程序同上。

1.5 Et 的动物致死性

1.5.1 对小鼠的致病性:将 25 株 Et 分别接种 TSB37℃震荡过夜,美蓝染色活菌计数约为 10⁹cfu/mL。取健康小鼠 130 只,约 20g/只,购自南京医科大学实验动物中心,分别取各株菌悬液腹腔注射,0.2ml/只,5 只/组。对照组注射无菌 TSB,观察 72h。

1.5.2 对实验鱼致病性:实验鱼采用纯系剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)260 尾,由中国水产科学院珠江水产研究所鱼病室提供,平均体重约 2g,体长约 4~6cm,置于 50L 水箱中适应 3d,水温(27±2)℃。取 25 株 EtTSB 培养物,分别腹腔注射,10 尾/组,0.05mL/尾,72h 记录死亡结果。

2 结果

2.1 毒力因子检测

溶血性 PA、CH 和 SA 三种方法的阳性检出率分别为 65.2%、52%和 32%。蛋白酶脱脂奶平板和底物法检测阳性率分别为 64%和 80%,二者基本平行。Et ECPase 和 AhJ-1 株 ECPase 无任何交叉反应性。溶血性和蛋白酶产生之间无相关性(表 1)。

2.2 ECP 的 Dot-ELISA 检测结果

用 Et 15947 和 JEL4 的 ECP 抗体分别检测 25 株 Et 菌株,ECP 阳性率分别为 40.0%和 44.0%,其中菌株 38 用 JEL4 ECP 抗体检测为阳性而 15947 为阴性,仅此一例不符,符合率为 90.9%。

2.3 动物致病性

15947、AC8321、JEL4、JF、205、44、45、51、105 菌株能致死小鼠和剑尾鱼,二者平行性良好。该 9 株 Et Dot-ELISA 结果均为阳性,符合率达 100%(表 1)。

表 1 溶血素、ECP 及动物致病性试验 (死亡数/总数)

Table 1 Result of hemolysis, Dot-ELISA of ECP and lethality of Et strains to mouse and *Xiphophorus helleri* (died/total)

Strain	Host	Source	Hemolysis		ELISA with ECP-Ab of		Animal lethality	
			PA	CH	15947	JEL4	Mouse	<i>Xiphophorus helleri</i>
15947	human	ATCC	+	0.237	+	+	7/8	10/10
38	trout	Dr. Nilz	+	0.047	-	+	0/8	3/10
Et-1	human	Dr. Janda	-	-	-	-	0/8	0/10
Et-11	human	Dr. Janda	+	-	-	-	0/8	0/10
Et-12	human	Dr. Janda	+	-	-	-	0/8	0/10
Et-13	human	Dr. Janda	+	-	-	-	0/8	0/10
SA8318	flounder	Dr. Aoki	-	-	-	-	0/8	0/10
AC8321	eel	Dr. Aoki	+	0.272	+	+	0/8	1/10
JEL4	eel	Guangdong	+	0.938	+	+	6/8	10/10
JF	unkown	Hubei	+	1.504	+	+	3/3	10/10
121	turtle	Fujian	ND	0.105	-	-	0/3	0/10
123	turtle	Fujian	-	-	-	-	0/3	0/10
M8	eel	Guangdong	-	-	-	-	0/3	0/10
D6	eel	Guangdong	-	-	-	-	0/3	0/10
203	eel	Hubei	-	-	-	-	0/3	0/10
205	eel	Hubei	+	1.466	+	+	2/3	10/10
751	eel	Jiangsu	+	1.054	-	-	0/3	0/10
753	eel	Fujian	ND	-	-	-	0/3	0/10
22	eel	Guangdong	-	-	-	-	0/3	0/10
43	eel	Jiangsu	+	0.994	+	+	1/3	6/10
44	eel	Jiangsu	+	0.320	+	+	0/3	10/10
45	eel	Jiangsu	+	1.448	+	+	3/3	9/10
51	eel	Jiangsu	+	1.454	+	+	2/3	7/10
66	eel	Jiangsu	-	-	-	-	0/3	0/10
105	eel	Jiangsu	+	0.263	+	+	1/3	6/10

ND: No determination

3 讨论

Et 的常规检测仅限于细菌的分离鉴定和生化试验,但不能判定其致病性。葛艳等^[6]通过检测 Et 的溶血素、细胞毒素等毒力因子和有无侵袭力为指标,结合常规细菌学检测建立了 Et 检测程序。在此基础上,本试验进一步选择了 Et 的 ECP 及其包含的溶血素、胞外蛋白酶为检测指标,并比较它们与动物致病性的相关性。

欧阳志明等^[7,8]证实,良好的粘附力和侵袭力、细胞结合性溶血素(CAH)及载铁体等因子与小鼠致病力有正相关性。葛艳等^[9]发现,Et的ECP是与动物致病性相平行的毒力因子。进一步研究证明,ECP具溶血性、细胞毒性和侵袭力,三项皆为阳性的菌株对小鼠致死率为90%,皆为阴性者对小鼠则无致病性。但致病性由ECP的何种成分决定仍不清楚^[6]。

尽管胞外蛋白酶(ECPase)是许多细菌的致病因子^[10,11],但是本试验的检测结果表明,Et ECPase检测阳性与动物致病性并无相关性,相反,对动物致病的菌株多不产ECPase,与嗜水气单胞菌的情况不同^[5,12,13]。溶血活性和Et动物致病性则存在良好相关性,致病菌株(15947、AC8321、JEL4、JF、205、44、45、51、105)无一例外都有溶血活性,且溶血活性强烈,动物致死率也高。另外,ECP的Dot-ELISA和溶血素CH和SA法检测阳性符合率高达90%以上,且溶血检测的A₅₄₀值越高,Dot-ELISA斑点显色愈明显。Dot-ELISA敏感且可定量,优于检测Et溶血素的其它方法。已报道Et具有多种溶血素,并对其进行了克隆表达及特性分析^[14-17]。本试验表明Et的ECP中含有的溶血活性成分是Et重要的毒力因子。

本试验以小鼠和剑尾鱼为动物模型检测Et的致病性,二种动物试验结果基本平行,但剑尾鱼更为灵敏,检出率(44%)比小鼠(32%)稍高。剑尾鱼易于饲养,目前已有培育的纯系品种^[18],可作为动物模型之用。

ECP抗体Dot-ELISA结果阳性者,与动物致死率的符合率达100%。JEL4与15947的ECP抗体的检测结果基本吻合,二者仅一例(Et38)不符,但前者更灵敏,斑点显色更清晰,说明JEL4的抗体更适于作Dot-ELISA之用,可望以此构建致病性Et检测的诊断试剂盒。

参 考 文 献

- [1] Inamura H, Muroga K, Nakai T. *Fish Pathol*, 1984, **25**:237 ~ 241.
- [2] 葛艳, 陈怀青, 陆承平. 中国预防兽医学报, 1999, **21**(1): 4 ~ 6.
- [3] 高大庆, 黄锡全, 陆承平, 等. 中国人畜共患病杂志, 2000, **16**(4): 53 ~ 55.
- [4] Allan R J, Stevenson R M W. *Canadian J of Microbiology*, 1981, **27**: 1114 ~ 1122.
- [5] 李焕荣, 陈怀青, 陆承平. 水生生物学报, 1997, **21**(1): 97 ~ 100.
- [6] 葛艳, 陈怀青, 陆承平. 动物检疫, 1999, **16**(3): 24.
- [7] 欧阳志明, 陈怀青, 陆承平. 水生生物学报, 1998, **22**(增刊): 11 ~ 15.
- [8] 欧阳志明, 陈怀青, 陆承平. 南京农业大学学报, 1997, **20**(3): 87 ~ 91.
- [9] 葛艳, 陈怀青, 陆承平. 中国兽医学报, 2000, **20**(1): 34 ~ 37.
- [10] 李瑞武, 陈怀青, 陆承平. 国外医学-微生物分册, 1998, **21**(3): 22 ~ 23.
- [11] Chabot D J, Thune R L. *Journal of Fish Disease*. 1991, **14**: 171 ~ 183.
- [12] 李焕荣, 陈怀青, 陆承平. 南京农业大学学报, 1996, **19**(3): 88 ~ 94.
- [13] 储卫华, 陆承平. 南京农业大学学报, 2000, **23**(2): 80 ~ 84.
- [14] Janda J M, Abbott S. *FEMS Microbiol Lett*, 1993, **111**: 275 ~ 280.
- [15] Hirono I, Tange N, Aoki T. *Mol Microbiol*, 1997, **24**: 851 ~ 856.
- [16] Chen J D, Lai S Y, Huang S L. *Arch Microbiol*, 1996, **165**: 9 ~ 17.
- [17] Chen J D, Huang S L. *Fish Sci*, 1996, **62**: 538 ~ 542.
- [18] 黄志斌, 吴淑勤, 石存斌, 等. 中国水产科学, 2000, **3**(7): 107 ~ 109.

DETECTION OF PATHOGENIC *EDWARDSIELLA TARDA*

Xiong Qingming Lu Chengping*

(key lab of animal disease diagnostic and immunology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: 25 *Edwardsiella tarda* (Et) strains had been detected both on their viruslent factor Extracellular Product (ECP), including the hemolysin and extracellular protease (ECPase), and on their pathogenicity to mice and *Xiphophorus helleri*. ECP was detected by Dot-ELISA with rabbit antiserum against ECP of reference strain JEL4. The results showed that the animal pathogenicity of Et had good correlation with its hemolysin other than with ECPase. The agreement between Dot-ELISA of JEL4 ECP and pathogenicity to animal was up to 100%. It was desirable to establish a detecting method, which only need detect the ECP with plate assay (PA) and Dot-ELISA, but needn't have animal experiment. Furthermore it is possible to develop a diagnosis kit of application to simplify the detecting procedure of pathogenic Et.

Key words: *Edwardsiella tarda*, Hemolysin, ECPase, Dot-ELISA

* Corresponding author