

# 引起鱼类暴发性流行病的嗜水气单胞菌的 血清型、毒力及溶血性\*

钱冬 陈月英 沈锦玉 沈智华

(浙江省淡水水产研究所 湖州 313001)

**摘要** 对分离自暴发病鱼的 33 株嗜水气单胞菌株的血清型、毒力和溶血性进行了研究。结果表明: 按 O 抗原不同, 大部分菌株可分为 TPS-30 和 PBJS-76 两个血清型, 这两个血清型菌株分布于浙江各地及南方其它省市, 可能是构成暴发病流行嗜水气单胞的主要血清型; 这些菌株对健康白鲫有很强致病力,  $LD_{50}$  小于  $10^6$ , 有很强的产溶血素能力, 但某些菌株的毒力与其溶血效价无直接联系。

**关键词** 暴发性鱼病, 嗜水气单胞菌, 血清型、毒力及溶血性

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 是一种在水体中广泛存在的细菌, 可引起鱼类及其它水生动物多种疾病。研究表明, 它是近年来在我国各地大规模流行的主要淡水养殖鱼类暴发性疾病的主要病原, 各地均分离到了致病力极强的嗜水气单胞菌菌株<sup>[1~3]</sup>。

浙江省自 1989 年起暴发性鱼病流行。在这期间, 作者对全省各地鲫、鲢、鳊、团头鲂等多种发病鱼进行了广泛的病原体分离, 共得 100 多株菌, 大部分为致病力极强的嗜水气单胞菌。为了进一步揭示暴发病本质, 为该病的免疫预防和早期诊断提供依据, 作者对浙江以及其它省市病鱼分离的嗜水气单胞菌进行了血清型、毒力和溶血性研究。现将研究结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

嗜水气单胞菌 AS1.927 购自中国科学院微生物研究所菌种室; 浙江省嗜水气单胞菌菌株由本所暴发病组分离, 其余嗜水气单胞菌菌株分别由珠江水产研究所、长江水产研究所、上海水产大学、南京农业大学、天津水产研究所及浙江水产学院馈赠。嗜水气单胞菌株及来源详见表 1。

### 1.2 实验动物

制备抗血清用新西兰白兔购自浙江省医学科学院动物中心; 攻毒用健康白鲫由本所养殖场提供, 规格 10 g 左右。

### 1.3 菌体抗原制备

嗜水气单胞菌菌株涂布营养琼脂, 25~30 °C 培养 20 h, 刮取菌苔, 生理盐水冲洗菌

\* “八五”国家攻关课题。

本文于 1995 年 1 月 14 日收到。

体三次, 将菌体分别用 0.5% 福尔马林灭活 2 h 及 100℃ 水浴灭活 1 h, 制得全菌抗原 (WC 抗原) 和菌体抗原 (O 抗原), 4℃ 保存备用。

表 1 从暴发病鱼分离的嗜水气单胞菌来源

Table 1 *A. hydrophila* strains isolated from infected fishes

分离地点 Region	分离时间 Year	菌株数 Number of strains	病鱼 Host
浙江省 Zhejiang	1990~1991	18	鲢鱼、鲫鱼、鳊鱼等 silver carp, crucian carp, chinese bream etc.
浙江省 Zhejiang	1992~1993	7	鲫鱼、鳊鱼 crucian carp, chinese bream
广东省 Guangdong		2	鲮鱼 mud carp
湖北省 Hubei	1991	1	鲢鱼 silver carp
上海市 Shanghai	1989	3*	银鲫 crucian carp
江苏省 Jiangsu	1989	1	鲫鱼 crucian carp
天津市 Tianjing	1991	2	鲢鱼、鳊鱼 silver carp, bighead

\* 其中一株为温和气单胞菌 (*A. sobria*)。  
One strain is *A. sobria*.

#### 1.4 抗血清制备

0.5% 福尔马林灭活菌体 0.5ml (浓度为  $1 \times 10^9$  CFU/ml) 加等量弗氏完全佐剂混合均匀, 皮下多点免疫新西兰白兔, 以后每隔一周耳静脉加强免疫(不加佐剂), 逐次加大抗原剂量, 获满意效价后颈动脉放血取血清。

#### 1.5 试管凝集法

兔抗血清(1:80 稀释) 0.25 ml, 加入 0.25 ml 浓度为 10 亿/ml 抗原, 充分摇匀, 室温 2 h, 4℃ 过夜观察凝集反应。

#### 1.6 嗜水气单胞菌毒力 (LD<sub>50</sub>) 测定

嗜水气单胞菌菌株接种营养肉汤, 25℃ 培养 18~20 h, 测菌浓度, 用无菌生理盐水 10 倍系列稀释菌体, 腹腔注射健康白鲫, 实验水温 25℃, 记录死鱼数, 按 Reed-Muench 法计算 LD<sub>50</sub>。

#### 1.7 溶血性测定

嗜水气单胞菌菌株接种营养肉汤, 25℃ 200 r/min 摇床培养 20 h, 上清液用生理盐水倍比稀释, 用 1% 兔血球测溶血效价, 以 50% 血球溶解稀释度为其终点<sup>[4]</sup>。

## 2 实验结果

### 2.1 嗜水气单胞菌的血清型

用嗜水气单胞菌 TPS-30、PBJs-76、AS1.927 制备兔抗血清, 与各地病鱼分离的嗜水气单胞菌菌株进行试管凝集试验, 结果表明 (表 2): TPS-30、PBJs-76 以及 AS1.927 三个菌株相互没有交叉反应, 是三种不同血清型的嗜水气单胞菌菌株。从暴发病鱼中分离的致病性嗜水气单胞菌菌株, 大多数可与 TPS-30 或 PBJs-76 两种血清型中的其中一种发生凝集反应, 反应专一性较强, 没有发现与两种抗血清均能反应的菌株, 从而可将这些菌株分为 TPS-30 型和 PBJs-76 型两个血清型。全菌抗原和 O 抗原血清反应类型

完全相同,表明这些菌株血清型的差异主要由耐热性 O 抗原所决定。两个血清型菌株不但分布于浙江各地区,而且在广东、湖北、江苏、上海等地都可分离到,并且具有极强毒力;北方的两个致病性嗜水气单胞菌菌株,其中一株与 PBJs-76 同型,但凝集程度略低,没有发现与 AS1.927 同型的菌株。

表 2 从暴发病鱼中分离的嗜水气单胞菌血清型

Table 2 Serotypes of *A. hydrophila* isolated from infected fishes

菌株来源 Source	血清型 Serotypes				总数 Total
	TPS-30	PBJs-76	AS1.927	其它 Others	
浙江 Zhejiang	6	16	0	3	25
上海 Shanghai	2	0	0	1*	3
广东 Guangdong	2	0	0	2	2
湖北 Hubei	0	1	0	0	1
天津 Tainjing	0	1	0	0	2
江苏 Jiangsu	0	1	0	0	1

\* 该菌已鉴定为温和气单胞菌。  
It's known as *A. sobria*.

以上结果表明, O 抗原为 TPS-30 和 PBJs-76 两个血清型的嗜水气单胞菌菌株,构成了暴发病流行嗜水气单胞菌的主要类群。

## 2.2 嗜水气单胞菌的毒力和溶血性

营养肉汤培养 18~20 h 的嗜水气单胞菌 10 倍系列稀释腹腔注射攻击健康白鲫,根据死鱼和攻击菌量计算  $LD_{50}$ , 并测定上清液溶血效价,共结果见表 3。由表 3 可见:从暴发病鱼中分离的嗜水气单胞菌菌株对健康白鲫有极强毒力,  $LD_{50}$  低于  $10^{6.0}$ , 最强的在  $10^4$  以下,同时这些菌株还有较强的产溶血素能力,上清液溶血效价在 1:8~1:16 不等;从病鱼中分离的温和气单胞菌株 N-1-2,虽然也分泌溶血素,并有较强毒力,但比起嗜水气单胞菌菌株毒力要低一些,  $LD_{50}$  大于  $10^{6.0}$ ;嗜水气单胞菌菌株 AS1.927 培养上清也

表 3 嗜水气单胞菌菌株的毒力和溶血性

Table 3 The virulence and hemolytic activity of *A. hydrophila* strains

菌株 Strains	$LD_{50}$ (CFU/Fish)	溶血效价 Hemolytic titer	来源 Source
TPS-30	$10^{5.24}$	1:16	浙江 Zhejiang
PBJs-76	$10^{5.30}$	1:8	浙江 Zhejiang
AS1.927	$>10^{6.3}$	1:16	北京 Beijing
DII-1	$10^{5.24}$	1:16	上海 Shanghai
N-1-2	$10^{6.32}$	1:16	上海 Shanghai
CHAH	$10^{6.13}$	1:16	湖北 Hubei
J-1	$10^{5.77}$	1:8	江苏 Jiangsu
SPD-103	$10^{6.25}$	1:16	浙江 Zhejiang
SBS-106	$10^{6.45}$	1:16	浙江 Zhejiang
PBS-105	$10^{6.20}$	1:16	浙江 Zhejiang

有较高的溶血效价,但以  $1 \times 10^6$  CFU/尾剂量攻毒均不能使健康鲫鱼发病致死。

### 3 讨 论

作者研究了三十余株分离自暴发病鱼的嗜水气单胞菌的血清型,结果表明:按 O 抗原的不同,这些菌株大部分可分为 TPS-30 和 PBJs-76 两个血清型,这两个血清型菌株分布于浙江各地及南方其它省市,有较强的产溶血素能力,对健康白鲫有极强毒力,可能是引发近年来暴发性鱼病嗜水气单胞菌的主要血清型。这一研究结果将有助于制备菌苗的菌种选择,为早期诊断和开展病原体检疫提供了理论依据。

近年来,随着不断从暴发病鱼中分离到有很强致病力的嗜水气单胞菌株,嗜水气单胞菌作为暴发性鱼病的主要病原体已逐渐为研究者所接受<sup>[1~3]</sup>。包括嗜水气单胞菌在内的运动性气单胞菌 (Motile *Aeromonas*, 另外还包括温和气单胞菌 (*A. sobria*), 豚鼠气单胞菌 *A. caviae*) 是水体中分布极为广泛的细菌,可引起鱼类及多种水生动物疾病以及人类腹泻等多种感染。较早对这类细菌进行系统血清学研究的 Leblanc 等发现, O 抗原为 LL<sub>1</sub> 型的嗜水气单胞菌菌株对鱼体毒力较强,而 O 抗原为 TF<sub>2</sub> 的菌株则毒力较弱<sup>[7]</sup>。近年来,先后有日本、荷兰、英国等学者对运动性气单胞菌进行抗原比较研究,已发现了 100 种以上的 O 抗原血清群<sup>[8,9]</sup>,但这些菌株大多来自人类临床标本。作者的研究表明,引起暴发性鱼病的嗜水气单胞菌存在着两个优势的 O 抗原血清型,用血清学方法对各地的菌株进行比较研究,将有助于进一步揭示暴发病的本质和发病规律,在流行病学上有很大的意义。

嗜水气单胞菌的致病机理,一直为众多研究者所关注。对于暴发性鱼病的致病机理,近年来已作了一些研究。孙其焕等人的研究表明,内毒素可能是使鱼体死亡的原因之一<sup>[3]</sup>;涂小林等的研究表明,嗜水气单胞菌分泌的 hec 毒素是使鱼体死亡的主要原因<sup>[6]</sup>。作者测定了部分菌株的溶血性和 LD<sub>50</sub>,发现两者并不完全成对应关系,如 AS1.927 株,其上清有较高的溶血效价,但对鲫鱼无毒力。国外学者在研究嗜水气单胞菌致病性时也有类似报道,如 Paniagua 等人对众多嗜水气单胞菌菌株致病因子进行研究,发现溶血性和对鱼体的毒力无直接联系,在研究的 63 株产溶血素嗜水气单胞菌菌株中,有 11 株对鱼体无毒力。嗜水气单胞菌对于鱼体的致病机理是一个较为复杂的问题,除了菌株本身毒力因子外,菌株对鱼体的侵入能力及影响因素是值得进一步探讨的内容。

**致谢** 本工作得到中国科学院微生物研究所蔡妙英研究员的指导和帮助,特此致谢。

### 参 考 文 献

- [1] 徐伯亥,殷 战,陈燕桑,等. 水产科技情报, 1991, 18(5): 134~136.
- [2] 陈怀青,陆承平. 南京农业大学学报, 1991, 14(4): 87~91.
- [3] 孙其焕,孙佩芳,金丽华,等. 水产学报, 1991, 15(2): 130~139.
- [4] 贺 路,左文功,蔡传奇,等. 淡水渔业, 1992, (3): 13~15.
- [5] 沈锦玉,陈月英,沈智华,等. 科技通报, 1993, 9(6): 397~401.
- [6] 涂小林,陆承平. 微生物学报, 1992, 32(6): 432~438.
- [7] Leblanc D, Mittal K R, Olivier G et al. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 42(1): 56~60.
- [8] Thomas L V, Gross R J, Cheasty T et al. *J Clin Microbiol*. 1990, 28(5): 980~984.

[9] Shimada T, Kosako Y. *J Clin Microbiol*, 1991, 29(1): 197~199.

[10] Panisagua C, Rivero O, Anguita J *et al*. *J Clin Microbiol* 1990, 28(2): 350~355.

## SEROGROUPS, VIRULENCE AND HEMOLYTIC ACTIVITY OF *AEROMONAS HYDROPHILA* WHICH CAUSED FISH BACTERIAL SEPTICAEMIA

Qian Dong    Chen Yueying    Shen Jinyu    Shen Zhihua  
(*Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001*)

**Abstract** A new infected disease called bacterial septicaemia occurred in cyprinid fish throughout China during 1989~1992. *A. hydrophila* was known as the most important pathogen of this harmful disease. Thirty-three strains of *A. hydrophila*, most isolated from moribund fishes, were serogrouped by tube-agglutination with rabbit antisera. Most of the isolates could be grouped into two serotypes, TPS-30 and PBJS-76. These two groups could be found not only in Zhejiang province but in other province in south China. It can be concluded that the two serogroups were the main *Aeromonas* groups caused this fishdisease. These isolates were virulent to *Carassius auratus*, with LD<sub>50</sub> values of 10<sup>4</sup> to 10<sup>6</sup>. The hemolytic activity ranged from titers of 1/8 to 1/16. No relationship were observed with the hemolytic activity and virulence.

**Key words** Fish bacterial septicaemia, *Aeromonas hydrophila*, Serogroups, Virulence and hemolytic activity