

# 鲤竖鳞病病原及其疫苗的研究

安利国 傅荣恕 邢维贤 杨桂文  
(山东师范大学生物系, 济南 250014)

**摘要** 对发生在山东境内的鲤竖鳞病进行了病原学研究, 经过病原分离、人工感染实验和细菌学鉴定, 确定豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)是鲤竖鳞病的病原菌。在此基础上, 得到了免疫原性较高和生产工艺简单的鲤竖鳞病疫苗。同时, 对该疫苗的安全性、免疫保护力和效价等进行了系统研究, 并进行了一定范围的口服免疫应用试验。

**关键词** 鲤, 竖鳞病, 豚鼠气单胞菌, 疫苗

鲤竖鳞病是一种常见病, 随着高密度集约化养殖的普及, 该病出现暴发性流行趋势。在我国的吉林、天津和山东等地多次出现该病的暴发性流行, 死亡率为 50%~100%。虽然国内外对该病已有不少研究, 但对其病原始终未能搞清[田欣田等 1992, Fijan 1971, Schaperclaus 1965, Volf 和 Havelka 1965]。我们近年来对山东境内的数个养鱼场进行调查, 采集病鱼标本, 分离病原, 进行了人工感染试验和细菌学鉴定, 确定豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)是鲤竖鳞病的病原菌。在此基础上, 制备灭活疫苗, 并进行了免疫应用试验。

## 1 材料和方法

### 1.1 流行病学调查

选择莱芜雪野水库网箱养殖场和莱芜市渔业开发公司养鱼场作为网箱养鱼的代表点, 临邑县城关养鱼场和成武县养鱼场作为池塘养鱼的代表点, 对鲤竖鳞病的发病时间、气温、水温、发病率和死亡率进行调查。

### 1.2 病毒学试验

取鱼的肝、肾、脾等组织, 按病毒学实验要求进行除菌过滤后, 以 1 mL/尾将组织过滤除菌滤液腹腔注射入健康鲤的体内, 空白组代之以 0.6% 的生理盐水。

### 1.3 病原菌的分离与纯化

无菌取病鱼的肝、肾、脾、心、肠、脑、鳃及皮肤等多种组织以及发病区的水样, 接种于细菌培养基上, 按常规进行病原菌的分离纯化培养。

### 1.4 人工感染试验

采用注射、创伤涂抹和体外浸泡等途径对分离到的菌株分别作感染试验, 观察发病情况, 统计其死亡率, 确定致病菌。

## 1.5 菌种鉴定

按 Popoff [1984] 介绍的方法, 从细菌形态和生理生化特征方面对致病菌进行鉴定。

## 1.6 疫苗制备

### 1.6.1 灭活方法

加热灭活: 将致病菌稀释为不同的浓度后, 于  $60 \sim 63^{\circ}\text{C}$  水浴震荡培养, 15、30、60、90 和 120 分钟取样检查灭活效果。化学灭活: 将致病菌稀释后, 分别加入等体积的 2%、4%、6% 的甲醛和 1/1000、2/1000、4/1000、6/1000 菌毒清(招远市蚕庄化工厂出品),  $30^{\circ}\text{C}$  灭活。12、24、48 小时后取样, 检查灭活效果。

### 1.6.2 灭活疫苗的免疫原性

以 1mL/尾鱼的剂量将浓度为  $1 \times 10^6$  个菌/mL 的不同灭活方法制备的疫苗对健康鲤进行皮下免疫注射, 1 周后取其血清, 进行抗体凝集效价测定。

## 1.7 疫苗的安全性试验

### 1.7.1 注射途径的安全性试验

实验组鲤分为 7 组, 分别由皮下注入不同剂量的灭活疫苗, 对照组代之以等量的生理盐水。正常饲喂, 观察两周死亡率。

### 1.7.2 口服途径的安全性试验

实验分为四组, 三个实验组和一个对照组。实验组分别以 1g/kg 体重、5g/kg 体重、10g/kg 体重和 20g/kg 体重经口饲喂, 对照组饲喂正常饵料。连续饲喂五天, 观察其变化。

## 1.8 疫苗的免疫保护率

### 1.8.1 注射途径的免疫保护率

将健康鲤以  $2 \times 10^5$  个细菌/kg 体重的剂量皮下注射疫苗后, 分别于 15 天、30 天和 60 天腹腔注射豚鼠气单胞菌活菌液进行攻毒, 统计其两周病死率, 计算疫苗的免疫保护率。

### 1.8.2 口服途径的免疫保护率

以 2mg/kg 体重的剂量, 按 1:100 制成药饵, 每天投喂一次, 连续投喂一个月, 于免疫结束后 30 天和 60 天腹腔注射  $1 \times 10^6$  个细菌/kg 豚鼠气单胞菌活菌液, 进行攻毒, 统计其两周病死率, 计算口服的免疫保护率。

## 1.9 疫苗的免疫效价测定

共计三个组: 口服免疫组、注射免疫组和对照组, 每组鲤 100 尾, 体重 0.5~1 公斤, 口服剂量为 2mg/kg·d, 连续免疫 30 天, 注射剂量为  $2 \times 10^5$  个细菌/kg, 一次性注射; 对照组不加免疫处理。水温  $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ 。于口服和注射后 15 天和 30 天, 取样采血, 测定其免疫血清的抗体凝集效价和血清蛋白的含量。

## 1.10 鲤竖鳞病口服疫苗的免疫防治实验

该实验在莱芜渔业开发公司养鱼场进行, 口服疫苗投喂剂量为 2mg/kg·d, 连续投喂一个

月,于沉箱前和来年起箱后统计竖鳞病的发病率。

## 2 实验结果

### 2.1 流行病学调查结果

通过连续三年的调查,发现鲤竖鳞病在山东境内的发病时间为初冬至春天,由12月初至来年4月中旬,发病高峰为12月底至1月底。初次发病季节的最低气温在 $0^{\circ}\text{C}$ 以下,最高水温在 $5^{\circ}\text{C}$ 以下,尤其是气温骤降时该病出现暴发性特征。网箱养殖鲤的发病率和死亡率较高,严重的网箱死亡率可高达100%,造成毁灭性损失。池塘养殖鲤的死亡率较低,在10%~35%之间。

### 2.2 病毒学试验

实验结果表明,组织匀浆液可导致鲤发病死亡,而组织除菌滤液无致病性,证明鲤竖鳞病的病因不是病毒。

### 2.3 病原菌的分离与纯化

从20尾患病鱼的各种组织和水样中分离到多株细菌,从中筛选出三株在病鱼各种组织和水样中均出现的细菌,分别以代号XY-1、XY-2和XY-3表示。

### 2.4 人工感染试验

人工感染试验表明:XY-3通过各种感染途径均不能使鱼发病;XY-2通过注射和创伤涂抹均能使鱼发病,但发病鱼肠道和皮肤均出现出血症状,与竖鳞病的自然症状不相符;XY-1通过注射、创伤涂抹和浸泡三种途径均能致病,注射组发病和死亡时间较短,多在3~4天,创伤涂抹组发病和死亡时间多在7~10天;体外浸泡发病和死亡时间在20~30天。发病率和死亡率以注射组为最高(100%),创伤涂抹组次之(60%),浸泡组最低(40%),并且中间需要降温处理才能发病。XY-1菌株所致病鱼病症,随感染途径不同有所差异,但均接近鲤竖鳞病的自然病症。组织病理学观察发现死亡鱼的肝脏和肾脏出现了不同程度的损伤。取XY-1人工感染死亡鱼的肝、肾等组织,进行细菌重分离,得到与原菌致病性相同的菌株。

### 2.5 菌种鉴定

#### 2.5.1 菌落形态

菌落圆形,微突,透明,无色,表面光滑,边缘整齐,直径2~3mm,有异味。

#### 2.5.2 菌体形态

菌体呈杆状,菌体直,两端钝圆,长度(1~3) $\mu\text{m}$  $\times$ (0.4~1) $\mu\text{m}$ ,极生单鞭毛,运动活泼,无芽孢,革兰氏染色阴性(图1)。

#### 2.5.3 生理生化特征

XY-1菌株显示活泼的运动性,主要的生



图1 豚鼠气单胞菌的透射电镜照片( $\times 16\ 000$ )

Fig. 1 The ultrastructure(TEM) of *Aeromonas caviae*

理生化特征符合气单胞菌属, V.P 试验和葡萄糖产气呈阴性以及半胱氨酸产  $H_2S$  等特征与豚鼠气单胞菌基本一致(表 1)。因而, 鲤竖鳞病的病原菌 XY-1 被确定为豚鼠气单胞菌(*Aeromonas cav iae*)

表 1 XY-1 菌株与其它气单胞菌形态和生理生化特征的比较

Tab. 1 The comparisons of morphological physiological and biochemical features between XY-1 and *Aeromonas*

性 状	菌 株			性 状	菌 株		
	RXY-1豚鼠气单胞菌	嗜水气单胞菌			RXY-1豚鼠气单胞菌	嗜水气单胞菌	
革兰氏染色	-	-	-	极生单鞭毛	+	+	+
运动性	+	+	+	成簇、成链状排列	-	-	-
成单个、成对排列	+	+	+	在胰蛋白酶、大豆 洋菜上有褐色色素	-	-	-
在 37℃营养液中生长	+	+	+	7%NaCl 营养液中生长	-	-	-
氧化酶	+	+	+	硝酸盐还原为亚硝酸盐	+	+	+
赖氨酸脱羧酶(moller's)	-	-	-	鸟氨酸脱羧酶(moller's)	-	-	-
精氨酸脱羧酶(moller's)	+	+	+	苯丙氨酸脱氨酶	-	-	-
淀粉水解	+	+	+	明胶液化	+	+	+
七叶苷水解	-	+	+	分解半乳糖	+	+	+
在 KCN 肉汤中生长	+	+	+	L-组氨酸 L-精氨酸利用	+	+	+
L-丙氨酸	+	d	d	阿拉伯糖利用	+	+	+
1%胨水中产吡啶	+	+	+	发酵甘油	-	d	d
甘露醇发酵	+	+	+	蔗糖发酵	+	+	+
肌醇发酵	-	-	-	V.P 反应	-	-	+
葡萄糖产气	-	-	+	半胱氨酸产 $H_2S$	-	-	+

注: + 为阳性反应; - 为阴性反应; d 为某些菌株阳性, 某些菌株阴性

## 2.6 疫苗制备

### 2.6.1 豚鼠气单胞菌灭活实验

加热灭活: 加热灭活效果与灭活菌液浓度和灭活时间有关, 当菌液浓度为  $1 \times 10^9$  时, 60 ~ 63℃加热 30 分钟才能灭活, 当菌液浓度为  $1.6 \times 10^9$  时, 需 60 分钟, 当菌液浓度为  $5 \times 10^9$  时, 需 90 分钟才能完全灭活。化学灭活: 化学灭活效果与灭活剂的浓度和灭活时间有关, 1%的甲醛和 1/1000 菌毒清需 48 小时才能灭活, 当甲醛浓度增至 2/1000 和 3/1000 时, 12 小时即可灭活。

### 2.6.2 灭活疫苗的免疫原性

免疫后一周的鱼血清抗体凝集效价为 1500 ~ 1550, 甲醛灭活 12 小时制备的灭活疫苗的免疫原性较差, 为 1280。

## 2.7 疫苗的安全性实验

### 2.7.1 注射和口服疫苗的安全性

注射免疫的  $LD_{50}$  为  $1 \times 10^8$  菌/kg, 口服免疫组未出现异常和死亡。

### 2.7.1 疫苗免疫的毒性实验

小白鼠经饲喂疫苗免疫鱼的组织后均未发现任何异常现象, 解剖也未发现与对照组有任何差别。

## 2.8 疫苗的免疫保护率

注射疫苗的免疫保护率于注射后 15 天和 30 天较高,为 88.9%。注射后 60 天降为 55.6%,口服疫苗的免疫保护率虽略低于注射免疫,但免疫 60 天后的免疫保护率(80%)与 30 天(70%)相比降低幅度并不大。

## 2.9 疫苗的免疫效价测定

在养鱼场自然条件下,疫苗经口服和注射均能获得较高的效价,口服 30 天后的免疫效价(2000)略低于注射免疫(2500),而在实验室内,免疫血清的抗体效价却较低。结果见表 2。

表 2 自然条件下疫苗的免疫效价

Tab. 2 The valence of vaccine under natural conditions

取样时间	注 射 免 疫		口 服 免 疫		对 照
	注射后 15 天	注射后 30 天	口服 15 天	口服 30 天	
自然条件凝集效价	2500	2500	1000	2000	15
室内条件凝集效价		1500		1000	
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	

注: 每组取样鱼数为 5

血清蛋白的高效液相色谱图表明,鲤竖鳞病疫苗以注射和口服两种途径均能使免疫鱼的血清蛋白明显增加(图 2)。

## 2.10 鲤竖鳞病口服疫苗防治试验

经一定范围的养鱼防治实验表明,对照组竖鳞病的发病率为 55%,而实验组为 5%( $n$  为 10 000,  $p < 0.001$ ),口服疫苗可使鲤竖鳞病的自然发病率降低 50%左右。

## 3 讨论

鲤竖鳞病在欧洲称为鲤传染性水肿病(Infectious Drops of Carp),在波兰、德国、前苏联、荷兰、南斯拉夫等地都曾流行,被认为是一种毁灭性的传染病[Fijan 1971, Schaperclaus 1965, Volf 和 Havelka 1965]。鲤竖鳞病虽然在我国淡水养殖中也是一种常见病,曾在多地流行,但对其流行病学的调查资料却很少[中国科学院水生生物研究所鱼病学研究室 1981]。我们通过对山东省境内部分鱼场的多年调查,发现该病的发生和流行出现在低温季节,尤其是气温骤降时。在山东境内,鲤竖鳞病发生于初冬的 12 月初至来年的 4 月中旬,气温在 15℃以下。初次发病多受突然降温的寒流的影响,气温在 0℃以下。在发病之前的鱼体内已可检出大量的病原菌,为潜伏感染,温度骤降诱发其发病。

国外有不少学者对鲤竖鳞病进行了研究,但对其病因是病毒还是细菌一直存在争议[田欣田 1992, Fijan 1972, Schaperclaus 1965, Volf 和 Havelka 1965],本实验排除了病毒致病的可能性,同时从大量的具有典型竖鳞病症状的病鱼体内分离出了病原菌,通过注射、创伤涂抹和浸泡等不同途径感染成功,对细菌进行了形态观察和多种生理生化反应,确定鲤竖鳞病的病原菌为豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*)。

王振英等[1993]从长春的患出血性败血症的鲤体内分离到豚鼠气单胞菌。我们从患竖鳞病的鲤体内也分离到了豚鼠气单胞菌,但其所致病症、发病时间与出血性败血症有很大差别。鲤出血性败血症以皮肤和内脏出血为主要特征,发病时间为全年温度最高的8月份,发病水温为 $20^{\circ}\text{C}$ 以上;而鲤竖鳞病以鳞囊水肿和竖鳞为特征,皮肤和内脏均无出血症状,发病时间为全年温度最低的12月份至4月份,水温低于 $15^{\circ}\text{C}$ 。水温降低可使鲤出血病缓解或消失,但水温的骤降却使鲤竖鳞病出现暴发。产气单胞菌属于条件致病菌,它的致病性不仅与水温有关,而且其产生病症也因水温不同而不同,同是豚鼠气单胞菌既能在高温时导致出血性败血症,又能在低温时导致竖鳞病。王振英等曾建议将鲤出血性败血症称为鲤豚鼠气单胞菌感染症,考虑到鲤感染豚鼠气单胞菌后既可表现出出血性败血症又可表现竖鳞病,故还是称鲤出血性败血症为妥。豚鼠气单胞菌在生理生化特征上最接近嗜水气单胞菌,它们的主要区别在于:V.P反应、葡萄糖产气和半胱氨酸产 $\text{H}_2\text{S}$ ,嗜水气单胞菌均表现阳性,而豚鼠气单胞菌均表现阴性。鲤竖鳞病病原菌与豚鼠气单胞菌相同。王振英[1993]等将从鲤出血性败血症病鱼体内分离到的菌株鉴定为豚鼠气单胞菌,但是在V.P反应和精氨酸双水解酶等方面与豚鼠气单胞菌不完全吻合,杨正时[1990]从北京地区分离到的气单胞菌被认为可能是一个新种,但它的生理生化特征与豚鼠气单胞菌却很相近。我们认为,很可能在不同地区的患病鲤体内分离到的几种气单胞菌都属于豚鼠气单胞菌,由于地区不同,气候条件和水质条件不同而使其出现了某些特征的变异。因此,有必要对不同地方发现的几个菌种进行深入的比较研究。

该疫苗经口服所获得血清免疫效价和免疫能力持续时间较长,这使其应用成为可能。鲤竖鳞病的发病期在12月份,到来年4月份,这个时间正好是鱼的越冬期,已停止饲养。在秋季的9、10月份,鲤能正常的进食,此时进行口服疫苗免疫,所获得的免疫力能够保持到鲤竖鳞病发病的冬季,初步应用试验表明,该口服疫苗可以比较有效地预防鲤竖鳞病的发生。

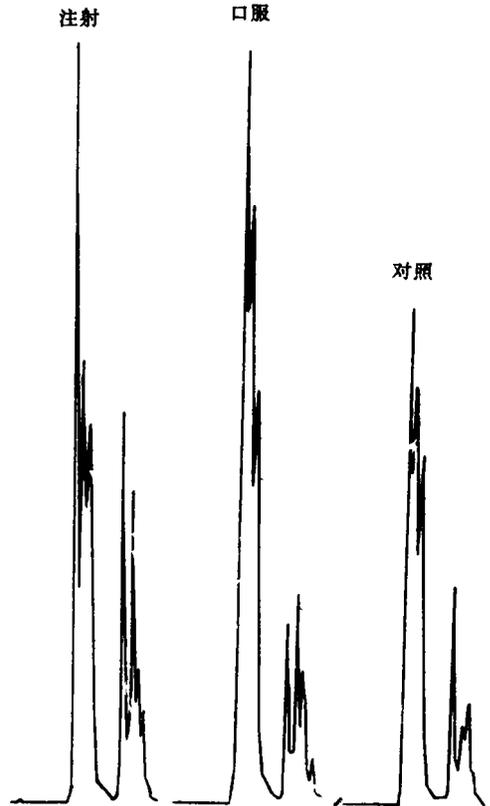


图2 疫苗免疫鲤的血清蛋白高效液相色谱图

Fig.2 The liquid chromatograph of carp's serum protein immunized by vaccine

## 参 考 文 献

- 中国科学院水生生物所鱼病学研究室. 1981. 鱼病调查手册. 上海: 上海科学技术出版社. 125.
- 王振英, 李学勤, 马家好等. 1993. 鲤鱼豚鼠气单胞菌感染症研究, 1 病原菌分离鉴定. 兽医大学学报, 13(1): 55~57.
- 田欣田, 邱震东, 马家好等. 1992. 实验性鲤鱼竖鳞病的病理形态学观察. 兽医大学学报, 12(3): 289.
- 杨正时. 1990. 由气单胞菌的一个新种引起的一次暴发性鱼病的病原学研究. 中国微生态学杂志, 2(1): 45~62.
- Fijan N N. 1971. Isolation of the Viral Causative agent from the acute form of infectious dropsy of carp. *Vet Arch*, 41: 125~138.
- Fijan N N. 1972. Infectious dropsy in carp—a disease complex. *Symp Zool Soc Lond*, 30: 39~51.
- Popoff M. 1984. Genus III *Aeromonas*. Kring, N. H. & J. G. Holt ed, *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Voll Wiooiams wiooiams Co. Baltimore 545~548.
- Schaperclaus W. 1965. Etiology of infectious carp dropsy. *Ann N Y Acad Sci*, 126: 587~600.
- Volf F, Havelka J. 1965. Investigation of the cause of the infectious dropsy of carp. *Ann N Y Acad Sci*, 126: 601~605.

## STUDIES ON PATHOGEN AND VACCINE OF CARP DROPSY

AN Li-Guo, FU Rong-Shu, XING Wei-Xian, YANG Gui-Wen

(*Department of Biology, Shandong Normal University, Jinan 250014*)

**ABSTRACT** The pathogen of carp dropsy in Shandong Province was separated and confirmed to *Aeromonas caviae* by methods of virology and artificial infection. An inactive vaccine with high immunogenicity against carp dropsy was made by a simple technological process. The safety, immunological protection and valence of this vaccine were studied, and an oral vaccination was carried out in fishery.

**KEYWORDS** Carp, Dropsy, *Aeromonas caviae*, Vaccine