

研究简报

# 乳胶凝集试验检测罗氏沼虾越冬亲虾 暴发性病原莫格球拟酵母

## LATEX AGGLUTINATION TEST FOR THE DETECTION OF PATHOGENIC *TORULOPSIS MOGII* FROM *MACROBRACHIUM ROSENBERGII*

涂小林 杨勇 孙其焕

Tu Xiao-lin, Yang Yong and Sun Qi-huan

(上海水产大学养殖系, 200090)

(Department of Aquaculture, SFU, 200090)

**关键词** 罗氏沼虾, 亲虾, 莫格球拟酵母, 抗血清, 乳胶凝集试验

**KEYWORDS** *Torulopsis mogii*, *Macrobrachium rosenbergii*, parent shrimp, antiserum, latex agglutination test

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)生长快、个体大、食性广、肉味美、营养好、易养殖,在上海市郊广为养殖。1991年12月底至1992年1月,上海某农场越冬棚内罗氏沼虾发生了一种疾病,越冬亲虾大批死亡。研究表明莫格球拟酵母(*Torulopsis mogii*)是其病原(孙其焕等,1995)。

莫格球拟酵母是一种真菌,对这一疾病的研究,在国内外还未见报导,尚无有效药物治疗该病。主要采取预防措施避免疾病发生,但病原的诊断尚无有效方法。建立快速、敏感、特异的检测方法,可以早期诊断该病,及时采取有效措施来减少损失。本文旨在制备莫格球拟酵母的抗血清,建立快速、敏感的免疫学检测方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌株

莫格球拟酵母,由本教研组孙其焕等分离鉴定。

### 1.2 抗原乳剂制备

按[王世中,1980]法进行。

### 1.2.1 福氏不完全佐剂

液体石蜡:羊毛脂=5:3。经8磅20分钟灭菌后于4℃贮存备用。

### 1.2.2 福氏完全佐剂

在不完全佐剂中加入适量的卡介苗(BCG)(购自上海生物制品所)。

### 1.2.3 菌体培养与灭活

莫格球拟酵母接种于马铃薯琼脂培养基上,于28℃生长24小时后,洗下菌苔,加福尔马林至浓度为0.4%,于30℃恒温箱中过夜,经检验无活菌后即为备用抗原。

### 1.2.4 抗原乳剂制备

佐剂于微火中融化后加入制备的抗原,充分混匀,制成油包水乳剂。

## 1.3 抗血清的制备

### 1.3.1 免疫动物

选购2公斤左右新西兰兔,于兔背部皮内多点注射抗原乳剂2ml,两周后取1ml抗原与等量福氏不完全佐剂混成抗原乳剂于兔颈部皮下、后肢肌肉注射,放血前再加强免疫[杜念兴,1985]。

### 1.3.2 抗体效价检测

初次免疫两周后,开始定期从兔耳静脉采血约0.5ml,分离血清后,进行试管凝集反应,当达到一定效价时,心脏采血,分离血清。

## 1.4 乳胶凝集试验

### 1.4.1 乳胶致敏

按取乳胶(购自上海医学检验所)1ml用生理盐水25倍稀释后,分成五管,分别滴加用生理盐水1:1、1:20、1:40、1:80、1:160等稀释的抗血清,边加边摇,至出现细微颗粒之后,仍继续滴加至颗粒消失为止。

### 1.4.2 乳胶凝集试验

将抗原2-3滴滴在玻片上,在其上滴加致敏乳胶1滴,用牙签混匀,出现明显凝集颗粒者为阳性反应。同时观察出现凝集反应的时间。待检样品同法在玻片上进行检测反应。

### 1.4.3 致敏乳胶稳定性试验

致敏后的乳胶加入0.04%NaN<sub>3</sub>,于4℃保存一至六个月后,与抗原进行反应。设生理盐水为阴性对照。

## 2 结果

### 2.1 关于抗血清的制备

用制备的莫格球拟酵母与福氏完全佐剂油包水乳剂免疫新西兰兔,其免疫程序与产生的抗血清效价见表1,经多次加强免疫后,制备出高效价的抗血清,试管凝集效价为1:6400。

### 2.2 关于乳胶凝集试验

利用制备的兔抗莫格球拟酵母血清致敏聚苯乙烯乳胶,不同稀释度的血清致敏乳胶的用量见图1。当血清稀释度为1:80时,能较好地反映产生颗粒及颗粒消失情况,而且与抗原反应时,可在3-5分钟之内出现较明显的凝集颗粒。

### 2.3 致敏乳胶稳定性试验

致敏乳胶于4℃保存6个月后,取出与莫格球拟酵母反应,仍出现明显凝集。阴性对照不出现凝集。

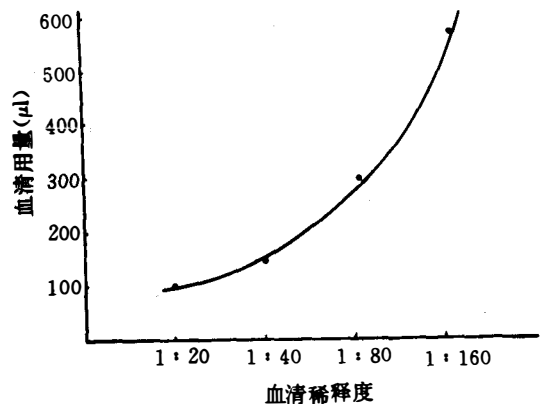


图1 乳胶致敏情况

Fig. 1 Adjunction of *Tolulopsis mogii* on latex

表1 莫格球拟酵母免疫程序

Tab. 1 Immunological steps of *Torulopsis mogii*

免疫次数	时间(天)	剂量(ml)	佐剂	注射部位	血清效价
初次		2	福氏完全佐剂	皮内多点	—
加强	第14天	2	福氏不完全佐剂	皮下	1:160
第三次	第24天	2	福氏不完全佐剂	肌肉	1:320
第四次	第36天	1.5	福氏不完全佐剂	肌肉	1:800
第五次	第43天	0.3	无	耳静脉	1:3200
第六次	第49天	0.3	无	耳静脉	1:6400

### 3 讨论

1991年底,上海市郊某养殖单位的罗氏沼虾,在越冬期间发生了暴发性疾病,在12月底至1992年1月死亡率达90%以上,严重影响了该年的罗氏沼虾育苗,造成很大的经济损失。对于此病的病原,经研究,为莫格球拟酵母,并证实了它对罗氏沼虾的致病性。

罗氏沼虾又名马来西亚长臂大虾,是世界上最大的淡水虾。我国自1976年从国外引进养殖成功后,全国不少省市纷纷推广,已列为主要养殖品种之一。上海市已有七个县养殖,面积达130万平方米[顾德平,1992]。对罗氏沼虾疾病,至今研究较少,其病原主要为细菌,如丝状细菌(*Filamentobacteria*)、弧菌(*Vibrio*)、腐皮镰刀菌(*Fusarium solangi*)、褐斑病贝内克氏菌(*Benec rea*)等。此外,真菌病已发现的病原为一种链壶菌(*Lagenidium*) [王洪起,1985] [何筱洁等,1989]。首次报道了莫格球拟酵母引致罗氏沼虾发生暴发性病。

该病原严重感染越冬棚内罗氏沼虾亲虾,而且这种真菌易繁殖,使病情迅速传播,在很短的时间内引起大量死亡。因此控制疾病,对该病进行早期诊断,尽早采取措施,建立快速检测方法显得较有意义。

本实验用莫格球拟酵母作为抗原,加入佐剂免疫动物制备出高效价的抗血清,致敏聚苯乙烯乳胶后,建立了乳胶凝集试验快速检测该病原莫格球拟酵母技术。而且1:80倍稀释的血清300 $\mu$ l可致敏25ml 乳胶液,每个样品的检测仅需1滴约100 $\mu$ l致敏的乳胶。与直接凝集试验相比,该技术大大提高了反应的灵敏度和血清的应用价值。致敏乳胶比较稳定,在4 $^{\circ}$ C冰箱中可保存至少6个月,为该法在生产上的应用打下了良好的基础。

聚苯乙烯乳胶是利用化工原料苯乙烯经过乳液聚合后得到的高分子乳胶液,乳胶微球分子直径0.8 $\mu$ m。它对蛋白质、核酸等高分子物质具有良好的吸附性能。利用聚苯乙烯乳胶的微小颗粒作为载体,以吸附某些抗原(或抗体),即能检测相应的抗体(或抗原)。本法有快速、简便、保存方便、比较准确等优点[杜念兴,1985]。1956年该技术自 Singer 用来检测类风湿因子[杜念兴,1985]以来,在血清学诊断中,已得到广泛应用,医学上,用来检测隐球酵母,进行嗜血杆菌的流行病学调查,用作妊娠诊断试剂,卫生防疫上,用于沙门氏菌抗原检测及肉品和培养液中肉毒梭菌毒素检测[吕纯凯等,1982;余 滨等,1983;徐肇华等,1980;Horiguchi 等,1984;Mitui 等,1981]等等。

本实验建立的乳胶凝集试验可以同时检测大批样品,并在数分钟内得出结果。这在水产生产上尤其具有重要意义。水产养殖上,一般对暴发性传染病的诊断主要依赖于流行情况、临床症状及病理变化等。另外患病虾有时没有任何特殊症状就发生大批死亡,因而乳胶凝集试验对莫格球拟酵母的检测技术为防治罗氏沼虾疾病,提供了一个较方便的诊断方法。

## 参 考 文 献

- [1] 王世中,1980.免疫化学技术,102-120.科学出版社(京)。
- [2] 王洪起,1985.罗氏沼虾一些常见病及其防治.国外水产,(1):36-37。
- [3] 吕纯凯等,1982.一种检测风湿性因子的稳定的 IgG-乳胶玻板试剂.上海免疫学杂志,2(1):24-26。
- [4] 余 滨等,1983.医学微生物学,444-445.人民卫生出版社(京)。
- [5] 杜念兴,1985.兽医免疫学,182-189.上海科学技术出版社。
- [6] 顾德平等,1992.罗氏沼虾养殖技术问答,1-2.上海科学普及出版社。
- [7] 徐肇华等,1980.单克隆抗体胶乳妊娠诊断试剂的研制.上海免疫学杂志,5(5):296-298。
- [8] Horiguchi, Y. et al, 1984. Detection of *Clostridium botulinum toxin* by reversed passive latex agglutination. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 46(4):487-491.
- [9] Mitui, T. et al., 1981. Studies of *Haemophilus* infection in swine. *Vet. Microbiol.*, 6:339-349.

## 纪念活动

## 敬 业 奉 公 ， 为 人 师 表

——上海水产大学隆重纪念鱼类学家、教育家  
朱元鼎教授诞辰100周年

1996年10月2日是我国著名鱼类学家、教育家、原上海水产学院已故院长、一级教授朱元鼎先生诞辰100周年纪念日。9月27日上午,上海水产大学隆重举行纪念活动。国家副主席荣毅仁为朱元鼎教授诞辰100周年作了“敬业奉公,为人师表”的题词。市教委领导、上海水产大学的党政领导、专家、教授、朱元鼎先生生前好友及家属等参加了纪念活动。

朱元鼎先生是我国鱼类学的奠基人,1930年始专攻鱼类形态、分类研究并取得了突破性的成就。1931年发表我国第一部系统的鱼类学专著《中国鱼类索引》,奠定了中国鱼类分类学的研究基础,至今仍是研究鱼类学的重要参考文献。1935年发表的专著《中国鲤科鱼类之鳞片、咽骨与牙齿之比较研究》,几十年来一直被中外鱼类学的教学和科研工作者列为必读的参考文献之一。国外学者为称颂他对咽骨、咽齿的深入研究,特将鲤科鱼类的咽骨命名为“元鼎”骨。70年代后期,他和他的助手们完成了《中国软骨鱼类的侧线管系统以及罗伦瓮和罗伦管系统的研究》专著,通过对鱼类这一感觉器官的研究,在鱼类进化方面取得超越前人的突破,提出了一个新的分类系统,将分类研究提高到更高的水平。五十余年中,朱元鼎先生勤奋著述,严谨治学,一丝不苟,精益求精,发表的科学研究专著和论文达五十余部(篇),并创建了东海水产研究所和我国品种最为齐全最具规模的鱼类标本室,室藏标本2000种、数万号,成为国内研究中国鱼类的四大基地之一,能为国内外鱼类学家研究中国鱼类提供标本和资料的少数标本室之一。他的学术研究一直坚持到生命的最后一刻,为祖国的科学事业作出了巨大贡献。

与会的专家、教授们,从不同的角度缅怀朱元鼎先生的勤奋著述,严谨治学,一丝不苟,精益求精和对后辈们的谆谆教诲、热情提携,培养出一大批专家、教授。

朱元鼎教授的敬业奉献、为人师表的精神为我们留下的专著、论文达数百万字,是我国的科学事业、水产事业的一份宝贵财富,他的敬业奉献,为人师表的精神将成为我校的宝贵精神财富,在水大师生中代代相传,发扬光大。