

文章编号: 1674 - 5566(2016)01 - 0086 - 11

## 两种 LD<sub>50</sub> 计算方法对副溶血性弧菌毒力的比较研究

董雪红, 田 敏, 季 策, 马文元, 张庆华

(上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

**摘 要:** 副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)是目前备受关注的人畜共患病的病原。为了比较 7 株不同来源的 Vp 对斑马鱼的毒力大小及致病能力,采用急性毒性试验测定 96 h 内 Vp 对斑马鱼的半数致死剂量(median lethal dosage, LD<sub>50</sub>),用累积法和 Bliss 法对比分析 LD<sub>50</sub> 指标。结果显示:VpKNH1 无致病性。其他菌株感染后,均表现出腹部出血,腹腔有腹水,内脏出血等症状。用累积法和 Bliss 法分析人类致病菌株 ATCC17802、ATCC33847 及水生动物致病菌株 Vp13、Vp31、Vp41、Vp57 共 6 株不同来源的副溶血性弧菌的 LD<sub>50</sub>,累积法计算得到的 LD<sub>50</sub> 分别为  $6.0 \times 10^7$ 、 $7.4 \times 10^7$ 、 $3.9 \times 10^7$ 、 $1.6 \times 10^8$ 、 $1.6 \times 10^8$ 、 $9.3 \times 10^7$  CFU/mL; Bliss 法得到的 LD<sub>50</sub> 分别为  $5.0 \times 10^7$ 、 $7.6 \times 10^7$ 、 $3.6 \times 10^7$ 、 $1.5 \times 10^8$ 、 $1.6 \times 10^8$ 、 $9.4 \times 10^7$  CFU/mL。研究结果发现两种计算方法得出的 LD<sub>50</sub> 数值差距较小,结果相似,不同菌株毒力强弱的顺序均为:Vp13 > ATCC17802 > ATCC33847 > Vp57 > Vp31 ≥ Vp41 > VpKNH1。综上所述,累积法及 Bliss 法均可用于检测细菌毒力大小,但由于计算机的发展使得 Bliss 计算方法更加简便,为更优的选择。

**关键词:** 副溶血性弧菌; 斑马鱼; LD<sub>50</sub>; 累积法; Bliss 法

**中图分类号:** S 941.4      **文献标志码:** A

副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*, Vp)是目前备受关注的人畜共患病的病原,不仅是重要的海水动物弧菌病的病原<sup>[1-2]</sup>,给水产养殖业造成极大的经济损失,而且极易引起食物中毒、肠胃炎等疾病,严重的可导致败血症甚至死亡,对人类健康危害巨大<sup>[1-3]</sup>。该菌毒力因子众多,致病机理复杂。利用毒力基因,如直接耐热溶血素(thermostable direct hemolysin, TDH)、TDH 相关不耐热肠毒素(TDH-related heat-labile toxin, TRH)、不耐热溶血毒素(thermolabile hemolysin, TLH)等评价细菌的致病特性已得到普遍认可<sup>[4-6]</sup>,但运用这些毒力因子进行检测仍不能较好地判断不同菌株之间的毒力差异。最好最直接的方法是运用动物模型来进行半数致死剂量(median lethal dosage, LD<sub>50</sub>)的测定。LD<sub>50</sub>的概念最早于 1927 年由英国生物学家 TREVE 提出,用导致一半动物死亡的剂量来表示药物的毒性

大小。根据医学主题词表的定义,LD<sub>50</sub>是指能杀死一半试验总体的有害物质、有毒物质或游离辐射的剂量。一般是用有毒物质质量和实验生物质量之比进行表示(mg/kg 或 CFU/mL)。

LD<sub>50</sub>现今已经广泛应用于医学、药学、动物医学(兽医学)、植物医学(植物保护学)、微生物学、生态学、毒理学等生命科学研究领域,成为衡量毒性大小的重要参数,在病原菌(包括人类、动植物的病原菌)的毒力评价中成为经典的方法,很难被替代<sup>[7]</sup>。目前较为常用的方法有 3 种:一种是改良寇氏法,但要求是正态分布<sup>[8-10]</sup>,即最低剂量呈现反应率 0% (P<sub>n</sub> = 0),最高剂量出现反应率 100% (P<sub>m</sub> = 1),才能得到精确结果;一种是 Bliss 法<sup>[11]</sup>,计算比较精确可靠,卫生部要求新药必须用 Bliss 法进行 LD<sub>50</sub>测定评估;第 3 种方法是累积法,累积法也称 Reed-Muench 法<sup>[12]</sup>,在微生物学中比较常用<sup>[13]</sup>,但结果比较粗略。

收稿日期: 2015-05-04      修回日期: 2015-07-31

基金项目: 上海市教育委员会科研创新项目(13ZZ127);教育部留学回国人员科研启动基金资助项目(D-8002-15-0042);上海海洋大学博士启动基金项目(A-0209-13-0105344);水产动物遗传育种中心上海市协同创新中心项目(ZF1206)

作者简介: 董雪红(1987—),女,硕士研究生,研究方向为水产动物疾病。E-mail: dongxuehong9007@163.com

通信作者: 张庆华, E-mail: qhzhang@shou.edu.cn

斑马鱼作为有效的人类传染病模型<sup>[14-15]</sup>和水生病原菌疾病模型<sup>[16]</sup>具有明显的优势:成鱼体型较小,一般体长 4~6 cm;生长发育快,受精后 24 h 主要器官原基基本形成;生长周期短,3~4 个月即性成熟,且易于饲养。本文运用累积法、Bliss 法,利用斑马鱼模型比较来源于人类、环境和水生动物的 7 株 Vp 的毒力大小,以期为 Vp 的致病机理研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用鱼

实验所用斑马鱼为同一种系,均为 AB 系斑马鱼,购于中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所斑马鱼平台。所用斑马鱼约为 4 cm,10 月龄,大小、健康状况基本相同。实验前至少驯养 7 d,使适应实验环境,但不适宜长期饲养(<2 个月),实验前停食 1 d,以防剩余的饵料及粪便影响水质。驯养期间,死亡率不得超过 5%,否则需重新更换斑马鱼进行驯养。养殖方法参照 WESTERFIELD<sup>[17]</sup>(或 [http://zfin.org/zf\\_info/zfbook/zfbk.html](http://zfin.org/zf_info/zfbook/zfbk.html))进行。

### 1.2 实验菌株

副溶血性弧菌 ATCC17802、VpKNH1 由加州大学洛杉矶分校(University of California, Los Angeles, UCLA)王艳玲博士惠赠,ATCC33847、Vp13、Vp31、Vp41、Vp57 由上海海洋大学赵勇教授惠赠,其中后 4 种菌株均分离自南美白对虾。

### 1.3 主要试剂

主要试剂:硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖琼脂培养基(Thiosulfate citrate bile salts sucrose agar culture medium, TCBS)(北京路桥技术有限公司,CM402);胰蛋白胨(上海生工生物工程有限公司,73049-73-7);酵母膏(上海生工生物工程有限公司,8013-01-2);Tris(amresco,77-86-1);氯化钠(Sigma,7647-14-5)。

LBS 液体培养基(1 L):950 mL 蒸馏水,50 mL 1 mol/L Tris pH 7.5,10 g 胰蛋白胨(tryptone),5 g 酵母膏(yeast extract),20 g NaCl。

### 1.4 主要仪器

Milli-Q Direct 8 超纯水系统(品牌:Millipore,型号:Milli-Q Direct 8),离心机(品牌:ependorf,型号:5810R),恒温摇床(品牌:Innova,型号:40R)。

### 1.5 菌液准备

将-80℃冰箱终浓度为 15%甘油保存的 7 株副溶血性弧菌在 TCBS 平板上分离纯化,37℃培养箱内培养过夜。挑取单克隆接种到 3 mL LBS 液体培养基,置于 37℃摇床,200 r/min 培养过夜。将过夜菌液重新接种到新的 LBS 液体培养基摇菌,16 h 左右测 OD<sub>600</sub>,平板计数后备用。将 OD<sub>600</sub>为 1.26 的菌液(约 1.6×10<sup>8</sup> CFU/mL)4 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 0.85%生理盐水清洗沉淀 3 遍,加入 1/100 LBS 体积的 0.85%生理盐水悬浮沉淀,菌液浓度为 1.60×10<sup>10</sup> CFU/mL,并将此菌液进行 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>倍稀释得到浓度分别为 1.6×10<sup>9</sup>、1.6×10<sup>8</sup>、1.6×10<sup>7</sup>和 1.6×10<sup>6</sup> CFU/mL 的菌液备用。

### 1.6 Vp 人工感染斑马鱼的预实验

为确定正式试验所需浓度范围,我们选取较大范围的浓度梯度,各浓度分别为 1.6×10<sup>10</sup>、1.6×10<sup>9</sup>、1.6×10<sup>8</sup>、1.6×10<sup>7</sup>和 1.6×10<sup>6</sup> CFU/mL。每个浓度随机 3 尾鱼,不设平行组,实验持续 48~96 h。每日至少两次记录各容器内的死亡率,并及时取出死鱼。求出 24 h 100%死亡的浓度和 96 h 无死亡的浓度。如果依此预实验结果无法确定正式实验所需的浓度范围,应另选其他浓度范围再次进行预实验。

### 1.7 Vp 人工感染斑马鱼的正式实验

根据预实验结果 3 倍梯度稀释浓度为 1.6×10<sup>9</sup> CFU/mL 的菌液,使浓度梯度分别为 5.3×10<sup>8</sup>、1.8×10<sup>8</sup>、6.0×10<sup>7</sup>、2.0×10<sup>7</sup>和 6.7×10<sup>6</sup> CFU/mL,进行斑马鱼感染实验。采用腹腔注射的人工感染方式,每组 10 尾斑马鱼,每尾鱼 10 μL 菌悬液。同时设阴性对照组,注射等量 0.85%生理盐水。每组设 3 个平行实验。接种后,各组分开饲养于不同的水族箱中,定时观察。统计 12、24、36、48、72 及 96 h 的累积死亡数,死亡数取 3 个平行数据的平均值。

### 1.8 LD<sub>50</sub>的计算方法

ReeD-Muench 方法:参照顾兵等<sup>[18]</sup>的实验方法进行。要求每组实验动物数量相等,并且剂量呈等比数列的剂量假定一动物感染较低稀释度的菌液,如仍能生存,则在感染较高稀释度时,也应当生存,所以积累总计栏内,各组应生存动物总数是由感染较低稀释度而生存的动物数向感染较高稀释度而生存的动物数累加而得。相反

若一动物死于较高稀释度的菌液,则应死于较低的稀释度,所以总计死亡动物数时,是由较高稀释度致死的数目向较低稀释度致死的数目累加而得。故先将实验中的死亡动物数和存活动物数进行累加求和,再用此两者的数值计算每个浓度下的累积死亡率。由于累积的死亡率的线性较不累积时的要好,故此方法只运用一个累积死亡率大于50%和一个小于50%的2组数据即可得到一条直线,并将此条直线近似认为是死亡率和剂量对数相关的直线,50%死亡率的点在该直线上。根据数学方法算出一个比例系数 $r$ ,取反对数即可得到 $LD_{50}$ 。

$$r = (m - n) / (a - b) \quad (1)$$

$$\lg LD_{50} = r(50 - b) + n \quad (2)$$

式中: $a$ 为大于50%的死亡率; $m$ 为其对应的剂量对数; $b$ 为小于50%的死亡率; $n$ 为其对应的剂量对数。累积法计算较方便,故较多地应用于微生物学,特别是在稀释分析中;可粗略进行 $LD_{50}$ 的判断,但误差较大。

Bliss法:Bliss法又称加权法,参照顾兵等<sup>[18]</sup>和黎七雄等<sup>[19]</sup>的实验方法进行。

将实验所得存活率由百分率与概率单位转换表查出其概率单位,又称经验概率单位( $yem$ )。

在坐标纸上,用对数剂量与经验概率单位( $yem$ )构成点绘制直线,并由直线找出各对数剂量相当的概率单位即期望概率单位( $Y$ )。计算作业概率单位( $y$ ),对 $Y$ 值进行校正:

$$y = (Y - P/Z) + P/Z \quad (3)$$

式中:( $Y - P/Z$ )是所有动物都生存时的概率单位,全距( $1/Z$ )为极大值与极小值间的距离; $P$ 为实验所得动物死亡率,各参数由作业概率单位的极大值、极小值、全距与权重系数表查出;将各点

进行加权( $nw$ ),用 $X^2$ 作直线性检验。如果各个点不显著偏离直线,即可进行回归直线方程计算,如果由直线方程得到的期望概率单位( $Y_1$ )与前次的不够接近,则需对 $Y_1$ 再次校正;将各 $X$ 值代入方程 $Y_2 = \bar{y} + b(X - \bar{x})$ 。反应率等于0.5时,将 $Y_2 = 5$ 代入方程: $Y_2 = \bar{y} + b(X - \bar{x})$ 得到的值即为 $LD_{50}$ 的对数值。

Bliss法是目前最为可靠、精确的 $LD_{50}$ 测定方法。早期,因为其计算过程太过烦琐,故难以得到推广。但随着计算机的普及,研究者更多运用基于Bliss法的计算程序计算 $LD_{50}$ 。本文亦运用Bliss软件计算 $LD_{50}$ 。

## 2 结果

### 2.1 预实验结果

预试验结果显示VpKNH1没有致病性,注射该菌的斑马鱼未见死亡,所以正式实验时只用其余6株Vp进行感染。被Vp感染死亡的斑马鱼腹部充血,腹腔内有腹水,内脏器官出血。并且得出24 h 100%死亡率为 $1.6 \times 10^9$  CFU/mL,96 h内无死亡的浓度为 $1.6 \times 10^6$  CFU/mL。正式实验菌液浓度在此两浓度之间进行设定。

### 2.2 ATCC17802 感染斑马鱼 $LD_{50}$ 的计算结果

人类致病菌株ATCC17802感染斑马鱼后,试验结果显示,当注射浓度为 $5.3 \times 10^8$  CFU/mL的菌液12 h时,斑马鱼累积死亡数即过半,36 h后全部死亡,为急性感染。注射生理盐水的对照组感染期间未发现死亡现象。运用累积法从表中直接得出96 h时ATCC17802菌株的 $LD_{50}$ 为 $6.0 \times 10^7$  CFU/mL(表1)。运用Bliss法计算得到的 $LD_{50}$ 为 $5.0 \times 10^7$  CFU/mL(表2)。

表1 累积法计算ATCC17802感染斑马鱼96 h  $LD_{50}$   
Tab.1 Reed-Muench method to calculate  $LD_{50}$  of zebrafish infected by ATCC17802 at 96 h

| 剂量/(CFU/mL)<br>dose   | 剂量对数<br>logarithmic dose | 受试动物数/尾<br>test animals | 死亡动物数/尾<br>dead | 存活动物数/尾<br>alive | 累积死亡数/尾<br>total dead | 累积存活数/尾<br>total alive | 累积死亡率/%<br>percent mortality |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------|------------------|-----------------------|------------------------|------------------------------|
| $5.3 \times 10^8$     | 8.7                      | 10                      | 10              | 0                | 26                    | 0                      | 100                          |
| $1.8 \times 10^8$     | 8.3                      | 10                      | 6               | 4                | 16                    | 4                      | 80                           |
| $6.0 \times 10^7$     | 7.8                      | 10                      | 4               | 6                | 10                    | 10                     | 50                           |
| $2.0 \times 10^7$     | 7.3                      | 10                      | 3               | 7                | 6                     | 17                     | 26.1                         |
| $6.7 \times 10^6$     | 6.8                      | 10                      | 3               | 7                | 3                     | 24                     | 11.1                         |
| 生理盐水<br>normal saline | -                        | 10                      | 0               | 10               | -                     | -                      | -                            |

注:- 说明没有对应的数值,以下同。

Note: - indicates there was no data for it, the same in following.

表 2 Bliss 法计算 ATCC17802 感染斑马鱼 96 h LD<sub>50</sub>  
Tab. 2 Bliss method to calculate LD<sub>50</sub> of zebrafish infected by ATCC17802 at 96h

| 剂量/(CFU/mL)<br>dose   | 剂量对数(X)<br>logarithmic dose | 受试动物数/尾<br>test animals | 死亡动物数/尾<br>dead | 死亡率/%<br>mortality | 经验概率单位(yem)<br>Probit for<br>observed kill | 期望概率单位(Y)<br>Probit for<br>expected kill |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------|--------------------|--|--|
| 5.3 × 10 <sup>8</sup> | 8.7                         | 10                      | 10              | 100                | -  | 6.1                                      |
| 1.8 × 10 <sup>8</sup> | 8.3                         | 10                      | 6               | 60                 | 5.3  | 5.6                                      |
| 6.0 × 10 <sup>7</sup> | 7.8                         | 10                      | 4               | 40                 | 4.8  | 5.1                                      |
| 2.0 × 10 <sup>7</sup> | 7.3                         | 10                      | 3               | 30                 | 4.5  | 4.6                                      |
| 6.7 × 10 <sup>6</sup> | 6.8                         | 10                      | 3               | 30                 | 4.5  | 4.1                                      |
| 生理盐水<br>normal saline | -                           | 10                      | 0               | 0                  | -  | -  |

回归方程  $Y = -2.91 + 1.03X$ ;  $Y$  为期望概率单位;  $X$  为剂量对数。以下回归方程中出现的变量意义与此相同。半数致死量  $LD_{50} = 5.0 \times 10^7$  CFU/mL,  $LD_{50}$  (Feiller 校正) 95% 的可信限 =  $(1.6 \times 10^7 - 1.3 \times 10^8)$  CFU/mL。

### 2.3 Vp13 感染斑马鱼 LD<sub>50</sub> 的计算结果

水生动物致病菌株 Vp13 感染斑马鱼后, 试

验结果显示, 当注射浓度为  $5.3 \times 10^8$  CFU/mL 的菌液 12 h 时, 斑马鱼即全部死亡, 为急性感染。注射生理盐水的对照组感染期间未发现死亡现象。运用累积法直接得出 96 h 时 Vp13 菌株的  $LD_{50}$  为  $3.9 \times 10^7$  CFU/mL (表 3)。运用 Bliss 法计算得到的  $LD_{50}$  为  $3.6 \times 10^7$  CFU/mL (表 4)。

表 3 累积法计算 Vp13 感染斑马鱼 96 h LD<sub>50</sub>  
Tab. 3 Reed-Muench method to calculate LD<sub>50</sub> of zebrafish infected by Vp13 at 96 h

| 剂量/(CFU/mL)<br>dose   | 剂量对数<br>logarithmic dose | 受试动物数/尾<br>test animals | 死亡动物数/尾<br>dead | 存活动物数/尾<br>alive | 累积死亡数/尾<br>total dead | 累积存活数/尾<br>total alive | 累积死亡率/%<br>percent mortality |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------|------------------|-----------------------|------------------------|------------------------------|
| 5.3 × 10 <sup>8</sup> | 8.7                      | 10                      | 10              | 0                | 29                    | 0                      | 100                          |
| 1.8 × 10 <sup>8</sup> | 8.3                      | 10                      | 8               | 2                | 19                    | 2                      | 90.5                         |
| 6.0 × 10 <sup>7</sup> | 7.8                      | 10                      | 6               | 4                | 11                    | 6                      | 64.7                         |
| 2.0 × 10 <sup>7</sup> | 7.3                      | 10                      | 3               | 7                | 5                     | 13                     | 27.8                         |
| 6.7 × 10 <sup>6</sup> | 6.8                      | 10                      | 2               | 8                | 2                     | 21                     | 8.7                          |
| 生理盐水<br>normal saline | -                        | 10                      | 0               | 10               | -                     | -                      | -                            |

表 4 Bliss 法计算 Vp13 感染斑马鱼 96 h LD<sub>50</sub>  
Tab. 4 Bliss method to calculate LD<sub>50</sub> of zebrafish infected by Vp13 at 96 h

| 剂量/(CFU/mL)<br>dose   | 剂量对数(X)<br>logarithmic dose | 受试动物数/尾<br>test animals | 死亡动物数/尾<br>dead | 死亡率/%<br>mortality | 经验概率单位(yem)<br>probit for<br>observed kill | 回归机率(Y)<br>regression<br>probability |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------|--------------------|--|--------------------------------------|
| 5.3 × 10 <sup>8</sup> | 8.7                         | 10                      | 10              | 100                | -  | 6.7                                  |
| 1.8 × 10 <sup>8</sup> | 8.3                         | 10                      | 8               | 80                 | 5.8  | 6.0                                  |
| 6.0 × 10 <sup>7</sup> | 7.8                         | 10                      | 6               | 60                 | 5.3  | 5.3                                  |
| 2.0 × 10 <sup>7</sup> | 7.3                         | 10                      | 3               | 30                 | 4.5  | 4.6                                  |
| 6.7 × 10 <sup>6</sup> | 6.8                         | 10                      | 2               | 20                 | 4.2  | 3.9                                  |
| 生理盐水<br>normal saline | -                           | 10                      | 0               | 0                  | -  | -                                    |

50% 的死亡率对应的剂量浓度位于  $6.0 \times 10^7$  CFU/mL 与  $2.0 \times 10^7$  CFU/mL 之间。死亡率每增加一个百分点, 剂量对数增加:  $(7.8 - 7.3) / (64.7 - 27.8) = 0.01$ 。死亡率从 27.8% 增加到 50%, 剂量对数增加为:  $0.01 \times (50 - 27.8) = 0.3$ 。  $\lg LD_{50} = 0.3 + 7.3 = 7.6$ , 取反对数得  $LD_{50} = 3.9 \times 10^7$  CFU/mL。

回归方程  $Y = -5.97 + 1.45X$ , 半数致死量

$LD_{50} = 3.6 \times 10^7$  CFU/mL,  $LD_{50}$  (Feiller 校正) 95% 的可信限 =  $(1.6 \times 10^7 \sim 7.2 \times 10^7)$  CFU/mL。

### 2.4 ATCC33847 感染斑马鱼 LD<sub>50</sub> 的计算结果

人类致病菌株 ATCC33847 感染斑马鱼后, 试验结果显示, 当注射浓度为  $5.3 \times 10^8$  CFU/mL 的菌液 12 h 时, 斑马鱼死亡率即达到 90%, 为急性感染。注射生理盐水的对照组感染期间未发现死亡现象。运用累积法计算得出 96 h 时

ATCC33847 菌株的  $LD_{50}$  为  $7.4 \times 10^7$  CFU/mL(表 5)。运用 Bliss 法计算得到的  $LD_{50}$  为  $7.6 \times 10^7$  CFU/mL(表 6)。

50% 的死亡率对应的剂量浓度位于  $1.8 \times 10^8$  CFU/mL 与  $6.0 \times 10^7$  CFU/mL 之间。死亡率

每增加一个百分点,剂量对数增加: $(8.3 - 7.8)/(73.7 - 44.4) = 0.02$ 。死亡率从 27.8% 增加到 50%,剂量对数增加为: $0.02 \times (50 - 44.4) = 0.09$ 。 $\lg LD_{50} = 0.1 + 7.8 = 7.9$ ,取反对数得  $LD_{50} = 7.4 \times 10^7$  CFU/mL。

表 5 累积法计算 ATCC33847 感染斑马鱼 96 h  $LD_{50}$

Tab. 5 Reed-Muench method to calculate  $LD_{50}$  of zebrafish infected by ATCC33847 at 96 h

| 剂量/(CFU/mL)<br>dose   | 剂量对数<br>logarithmic dose | 受试动物数/尾<br>test animals | 死亡动物数/尾<br>dead | 存活动物数/尾<br>alive | 累积死亡数/尾<br>total dead | 累积存活数/尾<br>total alive | 累积死亡率/%<br>percent mortality |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------|------------------|-----------------------|------------------------|------------------------------|
| $5.3 \times 10^8$     | 8.7                      | 10                      | 9               | 1                | 23                    | 1                      | 95.8                         |
| $1.8 \times 10^8$     | 8.3                      | 10                      | 6               | 4                | 14                    | 5                      | 73.7                         |
| $6.0 \times 10^7$     | 7.8                      | 10                      | 5               | 5                | 8                     | 10                     | 44.4                         |
| $2.0 \times 10^7$     | 7.3                      | 10                      | 2               | 8                | 3                     | 18                     | 14.3                         |
| $6.7 \times 10^6$     | 6.8                      | 10                      | 1               | 9                | 1                     | 27                     | 3.6                          |
| 生理盐水<br>normal saline | -                        | 10                      | 0               | 10               | -                     | -                      | -                            |

表 6 Bliss 法计算 ATCC33847 感染斑马鱼 96 h  $LD_{50}$

Tab. 6 Bliss method to calculate  $LD_{50}$  of zebrafish infected by ATCC33847 at 96 h

| 剂量/(CFU/mL)<br>dose   | 剂量对数(X)<br>logarithmic dose | 受试动物数/尾<br>test animals | 死亡动物数/尾<br>dead | 死亡率%<br>mortality | 经验概率单位(yem)<br>Probit for<br>observed kill | 期望概率单位(Y)<br>Probit for<br>expected kill |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------|--|--|
| $5.3 \times 10^8$     | 8.7                         | 10                      | 9               | 90                | 6.3  | 6.1                                      |
| $1.8 \times 10^8$     | 8.3                         | 10                      | 6               | 60                | 5.3  | 5.5                                      |
| $6.0 \times 10^7$     | 7.8                         | 10                      | 5               | 50                | 5.0  | 4.9                                      |
| $2.0 \times 10^7$     | 7.3                         | 10                      | 2               | 20                | 4.2  | 4.3                                      |
| $6.7 \times 10^6$     | 6.8                         | 10                      | 1               | 10                | 3.7  | 3.6                                      |
| 生理盐水<br>normal saline | -                           | 10                      | 0               | 0                 | -  | -  |

回归方程  $Y = -5.15 + 1.29X$ , 半数致死量  $LD_{50} = 7.6 \times 10^7$  CFU/mL,  $LD_{50}$  (Feiller 校正) 95% 的可信限 =  $(3.5 \times 10^7 \sim 1.8 \times 10^8)$  CFU/mL。

## 2.5 Vp57 感染斑马鱼 $LD_{50}$ 的计算结果

水生致病菌 Vp57 感染斑马鱼后,结果显示,当注射菌液浓度为  $5.3 \times 10^8$  CFU/mL 时,12 h 的

死亡率即达到 80%,为急性感染。注射生理盐水的对照组感染期间未发现死亡现象。运用累积法计算得出 96 h 时 Vp57 菌株的  $LD_{50}$  为  $9.3 \times 10^7$  CFU/mL(表 7)。运用 Bliss 法计算得到的  $LD_{50}$  为  $9.4 \times 10^7$  CFU/mL(表 8)。

表 7 累积法计算 Vp57 感染斑马鱼 96 h  $LD_{50}$

Tab. 7 Reed-Muench method to calculate  $LD_{50}$  of zebrafish infected by Vp57 at 96 h

| 剂量/(CFU/mL)<br>dose   | 剂量对数<br>logarithmic dose | 受试动物数/尾<br>test animals | 死亡动物数/尾<br>dead | 存活动物数/尾<br>alive | 累积死亡数/尾<br>total dead | 累积存活数/尾<br>total alive | 累积死亡率/%<br>percent mortality |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------|------------------|-----------------------|------------------------|------------------------------|
| $5.3 \times 10^8$     | 8.7                      | 10                      | 9               | 1                | 21                    | 1                      | 95.5                         |
| $1.8 \times 10^8$     | 8.3                      | 10                      | 7               | 3                | 12                    | 4                      | 75.0                         |
| $6.0 \times 10^7$     | 7.8                      | 10                      | 3               | 6                | 5                     | 10                     | 33.3                         |
| $2.0 \times 10^7$     | 7.3                      | 10                      | 2               | 8                | 2                     | 18                     | 10.0                         |
| $6.7 \times 10^6$     | 6.8                      | 10                      | 0               | 10               | 0                     | 28                     | 0.0                          |
| 生理盐水<br>normal saline | -                        | 10                      | 0               | 10               | -                     | -                      | -                            |

50% 的死亡率对应的剂量浓度位于  $1.8 \times 10^8$  CFU/mL 与  $6.0 \times 10^7$  CFU/mL 之间。死亡率每增加一个百分点,剂量对数增加: $(8.3 - 7.8)/(75 - 33.3) = 0.01$ 。死亡率从 27.8% 增加到

50%,剂量对数增加为: $0.01 \times (50 - 33.3) = 0.2$ 。 $\lg LD_{50} = 0.2 + 7.8 = 8.0$ ,取反对数得  $LD_{50} = 9.3 \times 10^7$  CFU/mL。

表 8 Bliss 法计算 Vp57 感染斑马鱼 96 h LD<sub>50</sub>  
Tab. 8 Bliss method to calculate LD<sub>50</sub> of zebrafish infected by Vp57 at 96 h

| 剂量/(CFU/mL)<br>dose   | 剂量对数(X)<br>logarithmic dose | 受试动物数/尾<br>test animals | 死亡动物数/尾<br>dead | 死亡率%<br>mortality | 经验概率单位(yem)<br>probit for<br>observed kill | 期望概率单位(Y)<br>probit for<br>expected kill |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------|--|--|
| 5.3 × 10 <sup>8</sup> | 8.7                         | 10                      | 9               | 90                | 6.3  | 6.3                                      |
| 1.8 × 10 <sup>8</sup> | 8.3                         | 10                      | 7               | 70                | 5.5  | 5.5                                      |
| 6.0 × 10 <sup>7</sup> | 7.8                         | 10                      | 3               | 30                | 4.5  | 4.7                                      |
| 2.0 × 10 <sup>7</sup> | 7.3                         | 10                      | 2               | 20                | 4.2  | 3.8                                      |
| 6.7 × 10 <sup>6</sup> | 6.8                         | 10                      | 0               | 0                 | -  | 3.0                                      |
| 生理盐水<br>normal saline | -                           | 10                      | 0               | 0                 | -  | -  |

回归方程  $Y = -8.66 + 1.71X$ , 半数致死量 LD<sub>50</sub> = 9.5 × 10<sup>7</sup> CFU/mL, LD<sub>50</sub> (Feiller 校正) 95% 的可信限 = 5.1 × 10<sup>7</sup> - 1.9 × 10<sup>8</sup> CFU/mL。

## 2.6 Vp31 感染斑马鱼 LD<sub>50</sub> 的计算结果

水生致病菌 Vp31 感染斑马鱼后, 结果显示, 当注射菌液浓度为 5.3 × 10<sup>8</sup> CFU/mL 时, 12 h 的

死亡率达到 70%, 为急性感染。注射生理盐水的对照组感染期间未发现死亡现象。运用累积法计算得出 96 h 时 Vp31 菌株的 LD<sub>50</sub> 为 1.6 × 10<sup>8</sup> CFU/mL (表 9)。运用 Bliss 法计算得到的 LD<sub>50</sub> 为 1.5 × 10<sup>8</sup> CFU/mL (表 10)。

表 9 累积法计算 Vp31 感染斑马鱼 96 h LD<sub>50</sub>  
Tab. 9 Reed-Muench method to calculate LD<sub>50</sub> of zebrafish infected by Vp31 at 96 h

| 剂量/(CFU/mL)<br>dose   | 剂量对数<br>logarithmic dose | 受试动物数/尾<br>test animals | 死亡动物数/尾<br>dead | 存活动物数/尾<br>alive | 累积死亡数/尾<br>total dead | 累积存活数/尾<br>total alive | 累积死亡率/%<br>percent mortality |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------|------------------|-----------------------|------------------------|------------------------------|
| 5.3 × 10 <sup>8</sup> | 8.7                      | 10                      | 9               | 1                | 17                    | 1                      | 94.4                         |
| 1.8 × 10 <sup>8</sup> | 8.3                      | 10                      | 4               | 6                | 8                     | 7                      | 53.3                         |
| 6.0 × 10 <sup>7</sup> | 7.8                      | 10                      | 3               | 7                | 4                     | 14                     | 22.2                         |
| 2.0 × 10 <sup>7</sup> | 7.3                      | 10                      | 1               | 9                | 1                     | 23                     | 4.2                          |
| 6.7 × 10 <sup>6</sup> | 6.8                      | 10                      | 0               | 10               | 0                     | 33                     | 0                            |
| 生理盐水<br>normal saline | -                        | 10                      | 0               | 10               | -                     | -                      | -                            |

50% 的死亡率对应的剂量浓度位于 1.8 × 10<sup>8</sup> CFU/mL 与 6.0 × 10<sup>7</sup> CFU/mL 之间。死亡率每增加一个百分点, 剂量对数增加: (8.3 - 7.8) / (53.3 - 22.2) = 0.02。死亡率从 27.8% 增加到

50%, 剂量对数增加为: 0.02 × (50 - 22.2) = 0.4。lgLD<sub>50</sub> = 0.4 + 7.8 = 8.2, 取反对数得 LD<sub>50</sub> = 1.6 × 10<sup>8</sup> CFU/mL。

表 10 Bliss 法计算 Vp31 感染斑马鱼 96 h LD<sub>50</sub>  
Tab. 10 Bliss method to calculate LD<sub>50</sub> of zebrafish infected by Vp31 at 96 h

| 剂量/(CFU/mL)<br>dose   | 剂量对数(X)<br>logarithmic dose | 受试动物数/尾<br>test animals | 死亡动物数/尾<br>dead | 死亡率%<br>mortality | 经验概率单位(yem)<br>probit for<br>observed kill | 期望概率单位(Y)<br>probit for<br>expected kill |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------|--|--|
| 5.3 × 10 <sup>8</sup> | 8.7                         | 10                      | 9               | 90                | 6.3  | 5.9                                      |
| 1.8 × 10 <sup>8</sup> | 8.6                         | 10                      | 4               | 40                | 4.7  | 5.1                                      |
| 6.0 × 10 <sup>7</sup> | 7.8                         | 10                      | 3               | 30                | 4.5  | 4.3                                      |
| 2.0 × 10 <sup>7</sup> | 7.3                         | 10                      | 1               | 10                | 3.7  | 3.5                                      |
| 6.7 × 10 <sup>6</sup> | 6.8                         | 10                      | 0               | 0                 | -  | 2.7                                      |
| 生理盐水<br>normal saline | -                           | 10                      | 0               | 0                 | -  | -  |

回归方程  $Y = -8.95 + 1.71X$ , 半数致死量 LD<sub>50</sub> = 1.5 × 10<sup>8</sup> CFU/mL, LD<sub>50</sub> (Feiller 校正) 95% 的可信限 = (8.0 × 10<sup>7</sup> - 3.3 × 10<sup>8</sup>) CFU/mL。

## 2.7 Vp41 感染斑马鱼 LD<sub>50</sub> 的计算结果

水生致病菌 Vp41 感染斑马鱼后, 结果显示, 当注射菌液浓度为 5.3 × 10<sup>8</sup> CFU/mL 时, 12 h 的累积死亡率达到 40%, 毒力较弱。注射生理盐水

的对照组感染期间未发现死亡现象。运用累积法计算得出 96 h 时 Vp41 菌株的  $LD_{50}$  为  $1.6 \times 10^8$  CFU/mL (表 11)。运用 Bliss 法计算得到的  $LD_{50}$  为  $1.6 \times 10^8$  CFU/mL (表 12)。

50% 的死亡率对应的剂量浓度位于  $1.8 \times 10^8$  CFU/mL 与  $6.0 \times 10^7$  CFU/mL 之间。死亡率

每增加一个百分点, 剂量对数增加:  $(8.3 - 7.8) / (52.9 - 25) = 0.02$ 。死亡率从 27.8% 增加到 50%, 剂量对数增加为:  $0.02 \times (50 - 25) = 0.43$ 。  
 $\lg LD_{50} = 0.4 + 7.8 = 8.2$ , 取反对数得  $LD_{50} = 1.6 \times 10^8$  CFU/mL。

表 11 累积法计算 Vp41 感染斑马鱼 96 h  $LD_{50}$

Tab. 11 Reed-Muench method to calculate  $LD_{50}$  of zebrafish infected by Vp41 at 96 h

| 剂量/(CFU/mL)<br>dose   | 剂量对数<br>logarithmic dose | 受试动物数/尾<br>Test animals | 死亡动物数/尾<br>dead | 存活动物数/尾<br>alive | 累积死亡数/尾<br>total dead | 累积存活数/尾<br>total alive | 累积死亡率%<br>percent mortality |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------|------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------------|
| $5.3 \times 10^8$     | 8.7                      | 10                      | 8               | 2                | 17                    | 2                      | 89.5                        |
| $1.8 \times 10^8$     | 8.3                      | 10                      | 4               | 6                | 9                     | 8                      | 52.9                        |
| $6.0 \times 10^7$     | 7.8                      | 10                      | 3               | 7                | 5                     | 15                     | 25                          |
| $2.0 \times 10^7$     | 7.3                      | 10                      | 2               | 8                | 2                     | 23                     | 8                           |
| $6.7 \times 10^6$     | 6.8                      | 10                      | 0               | 10               | 0                     | 33                     | 0                           |
| 生理盐水<br>normal saline | -                        | 10                      | 0               | 10               | -                     | -                      | -                           |

表 12 Bliss 法计算 Vp41 感染斑马鱼 96 h  $LD_{50}$

Tab. 12 Bliss method to calculate  $LD_{50}$  of zebrafish infected by Vp41 at 96 h

| 剂量<br>dose            | 剂量对数(X)<br>logarithmic dose | 受试动物数/尾<br>test animals | 死亡动物数/尾<br>dead | 死亡率%<br>mortality | 经验概率单位(yem)<br>probit for<br>observed kill | 期望概率单位(Y)<br>probit for<br>expected kill |
|-----------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------|-------------------|--|--|
| $5.3 \times 10^8$     | 8.7                         | 10                      | 8               | 80                | 5.8  | 5.7                                      |
| $1.8 \times 10^8$     | 8.26                        | 10                      | 4               | 40                | 4.7  | 5.1                                      |
| $6.0 \times 10^7$     | 7.8                         | 10                      | 3               | 30                | 4.5  | 4.4                                      |
| $2.0 \times 10^7$     | 7.3                         | 10                      | 2               | 20                | 4.2  | 3.8                                      |
| $6.7 \times 10^6$     | 6.8                         | 10                      | 0               | 0                 | -  | 3.2                                      |
| 生理盐水<br>normal saline | -                           | 10                      | 0               | 0                 | -  | -  |

回归方程  $Y = -5.64 + 1.30 \log(X)$ , 半数致死量  $LD_{50} = 1.6 \times 10^8$  CFU/mL,  $LD_{50}$  (Feiller 校正) 95% 的可信限 =  $(7.9 \times 10^7 \sim 5.3 \times 10^8)$  CFU/mL。

## 2.8 不同计算方法比较各菌株毒力结果

综上所述, 用累积法计算得到 Vp13、ATCC33847、ATCC17802、Vp57、Vp31 和 Vp41 共 6 株菌株的  $LD_{50}$  分别为:  $3.9 \times 10^7$ 、 $7.4 \times 10^7$ 、

$6.0 \times 10^7$ 、 $9.3 \times 10^7$ 、 $1.6 \times 10^8$  和  $1.6 \times 10^8$  CFU/mL。用 Bliss 法计算得到此 6 株菌株的  $LD_{50}$  分别为:  $3.6 \times 10^7$ 、 $7.6 \times 10^7$ 、 $5.0 \times 10^7$ 、 $9.4 \times 10^7$ 、 $1.5 \times 10^8$  和  $1.6 \times 10^8$  CFU/mL。综合两种方法计算得到的 7 株 Vp 的毒力强弱均为: Vp13 > ATCC17802 > ATCC33847 > Vp57 > Vp31 ≥ Vp41 > VpKNH1 (表 13)。

表 13 不同计算方法比较不同 Vp 菌株的毒力大小

Tab. 13 Different calculation method to compare the virulence of Vp strains

| 菌株编号<br>stain | $LD_{50}$ / (CFU/mL)      |                         | 毒力强弱<br>virulence |
|---------------|---------------------------|-------------------------|-------------------|
|               | 累积法<br>Reed-Muench method | Bliss 法<br>Bliss method |                   |
| Vp13          | $3.9 \times 10^7$         | $3.6 \times 10^7$       | 1                 |
| ATCC17802     | $6.0 \times 10^7$         | $5.0 \times 10^7$       | 2                 |
| ATCC33847     | $7.4 \times 10^7$         | $7.6 \times 10^7$       | 3                 |
| Vp57          | $9.3 \times 10^7$         | $9.4 \times 10^7$       | 4                 |
| Vp31          | $1.6 \times 10^8$         | $1.5 \times 10^8$       | 5                 |
| Vp41          | $1.6 \times 10^8$         | $1.6 \times 10^8$       | 6                 |
| VpKNH1        | -                         | -                       | 7                 |

### 3 讨论

本文首次运用斑马鱼模型比较了来源于环境、人类宿主及水生动物宿主的 7 株副溶血性弧菌的毒力大小,这对于比较不同来源、含有不同致病基因的 V<sub>p</sub> 毒力大小提供了良好的方法,为今后深入研究其致病机理奠定了理论依据。细菌毒力的检测方法主要包括:菌落形态分析、毒力因子基因水平、蛋白水平、细胞模型、动物模型等方法<sup>[19-20]</sup>,这些方法从不同层次和角度为细菌的致病性及细菌和宿主之间的相互作用提供了很多信息。目前用副溶血性弧菌的许多毒力基因,如 *tlh*、*trh*、*tdh* 等用于评价其毒力特征,但都不能给出定量的评价标准。LD<sub>50</sub> 及类似概念,如半数致死浓度 (median lethal concentration, LC<sub>50</sub>)、半数抑制浓度 (half-inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)、半数效应浓度 (median effective concentration, EC<sub>50</sub>) 因能衡量毒性大小而成为重要的参考依据<sup>[7]</sup>,现已广泛应用于生命科学研究领域。虽然早在 1959 年动物学家 RUSSELL 和微生物学家 BURCH 对动物实验提出代替 (replacement)、改进 (refinement) 和减少 (reduction) 的“3R 概念”,即在生命科学研究中应采取其他手段来代替动物实验,改进实验方法,减少动物数量和痛苦,提倡动物保护和动物福利,但动物实验目前仍无法完全被其他技术所替代<sup>[7]</sup>。因此,尽量减少动物用量,改进实验方法是毒理学评价发展的主要趋势。斑马鱼作为低等的脊椎动物,近年来成为感染性疾病的理想模型,正是符合以上发展趋势的结果<sup>[15]</sup>。

目前 LD<sub>50</sub> 的计算方法有很多,如:寇氏法<sup>[8]</sup>、回归直线法<sup>[21]</sup>、序贯法<sup>[22]</sup>、霍恩氏法<sup>[23]</sup> 又称目测图解法、改良寇氏法<sup>[9]</sup>、logistic 模型法<sup>[24]</sup>、固定剂量法<sup>[25]</sup> 等。其中以 Bliss 创建、后为 FISHER、FINNEY 所发展的加权概率单位法 (又称 Bliss 法) 在数理上最为严谨精密,成为标准的 LD<sub>50</sub> 计算方法<sup>[26-28]</sup>。尽管 LD<sub>50</sub> 测算方法经过几十年研究已有许多重要进展,但似乎目前还无法提出一种任何条件下都能令人满意的方法。本研究因结果不是正态分布,无法运用寇氏法进行计算,所以我们选用有代表性的累积法及 Bliss 法 2 种方法分别对 6 株致病性 V<sub>p</sub> 进行毒力分析,发现这 2 种方法得到的 LD<sub>50</sub> 结果相似,有较好的吻合

性。累积法计算方便,更多地运用在微生物学中,尤其在稀释分析中<sup>[13]</sup>;但此法最大的缺点是不考虑操作误差,是近似值,使得计算结果不够精确,只可以作为实验过程中 LD<sub>50</sub> 的粗略判断。Bliss 法是目前最为精确、可靠的 LD<sub>50</sub> 测定方法。由于其在数理上严谨精密,甚至称其为机率单位正规法。在早期,因为其计算过程太烦琐,很难推广。随着计算机的普及,研究者更多运用基于 Bliss 法的计算程序计算 LD<sub>50</sub><sup>[29-30]</sup>,使得 Bliss 方法计算过程更加简单准确,是计算 LD<sub>50</sub> 更好的选择。我们认为,Bliss 法是评价 6 株 V<sub>p</sub> 毒力强弱的很好方法。

虽然动物模型是最好最直接的测定 LD<sub>50</sub> 的方法,但若比较很多菌株的毒力,就需要大量的试验动物,如小鼠、大鼠、豚鼠或猪等,这样不但实验费用会明显提高,而且也会使工作量加大,浪费人力、物力和财力。而斑马鱼成鱼体型小,生长发育快,生长周期短且易于饲养,实验成本低廉,而且,斑马鱼具备天然免疫系统和获得性免疫系统,因此,近年来,用斑马鱼来替代以上实验动物进行感染性疾病模型成为普遍采用的理想方法。本研究结果表明斑马鱼对副溶血性弧菌致病菌株易感,可以用来测定 LD<sub>50</sub>, 评价其毒力大小。对比不同来源的致病菌结果发现人类致病菌和水生动物致病菌的 LD<sub>50</sub> 结果没有显著性差异。人类致病菌对斑马鱼也有致病性,表明两种宿主对副溶血性弧菌的易感性有平行关系,在一定程度上斑马鱼可以代替小鼠等实验动物作为研究副溶血性弧菌的动物模型。对比国内外的不同 V<sub>p</sub> 毒力发现, V<sub>p</sub>13 菌株的致病力最强,而 V<sub>p</sub>41 菌株的致病力最弱。这 2 株菌均为国内菌株。而 3 株国外菌株,除 V<sub>p</sub>KNH1 分离自夏威夷海域的环境样品,为无毒菌株外, ATCC33847、ATCC17802 的毒力与其余 3 株国内菌株相似。对比发现,国外的 2 株 V<sub>p</sub>, ATCC17802 含 *trh* 毒力基因,而 V<sub>p</sub>KNH1 不含毒力基因,没有溶血性。国内的 4 株 V<sub>p</sub>: V<sub>p</sub>13、V<sub>p</sub>31、V<sub>p</sub>41 及 V<sub>p</sub>57,均分离自南美白对虾,含有 *tdh*。ATCC17802 和 ATCC33847 均含 *tlh*, 不同之处在于 *trh* 和 *tdh*, 但 LD<sub>50</sub> 指标反映的毒力接近,而对于含有 *tdh* 的 V<sub>p</sub>13 和 V<sub>p</sub>41 而言, LD<sub>50</sub> 指标反映的毒力差异明显,所以,很难只依据毒力基因的有无判断细菌的致病性。虽然,细菌种属是



菌株毒力的内在关键影响因素,但也因分离时间不同,所传代次不同,对其致病力有所影响,这些应在菌种使用和保藏过程中予以重视。

目前,对于应用斑马鱼进行 LD<sub>50</sub>判断 V<sub>p</sub> 的毒力大小还缺乏相应的标准。PARANJPYE 等<sup>[31]</sup>采用腹腔注射的方式测定 *V. parahaemolyticus* RIMD2210633 菌株对斑马鱼的 LD<sub>50</sub>为 5.46 × 10<sup>5</sup> CFU/mL, NEELY 等<sup>[32]</sup>采用腹腔和肌肉注射的方式,测定化脓链球菌 *S. pyogenes* HSC5 菌株对斑马鱼的 LD<sub>50</sub>相似,均为 10<sup>3</sup> CFU/mL。PRESSLY 等<sup>[33]</sup>研究发现,斑马鱼腹腔注射 10<sup>4</sup> 和 10<sup>5</sup> CFU/mL 的迟缓爱德华菌 (*Edwardsiella tarda*) 死亡率分别为 30% 和 60%。陆承平和陈怀青<sup>[34]</sup>对 Ah 的毒力判断依据是,将 LD<sub>50</sub> < 10<sup>5</sup> CFU/mL 者视为强毒株,LD<sub>50</sub> 在 10<sup>6</sup> ~ 10<sup>7</sup> CFU/mL 者为中毒株,LD<sub>50</sub> > 10<sup>7</sup> CFU/mL 者为弱毒株或无毒株。若根据该依据判断,这 7 株 V<sub>p</sub> 都属于弱毒株或无毒株,主要原因可能是:(1)实验室多次传代造成毒力减弱,实验前未进行复壮;(2)实验菌株不是斑马鱼的原始病原菌,不同宿主传播致毒力减弱,有待深入研究。因此笔者认为,考虑到不同的试验动物以及不同种属的细菌,不同时间内的 LD<sub>50</sub> 反映的毒力强弱判断依据应有差异。对于 V<sub>p</sub> 而言,今后需要在大样本调查的基础上,根据 LD<sub>50</sub> 指标建立合理的毒力判断标准。

总之,本文利用斑马鱼模式脊椎动物,采用 LD<sub>50</sub>测定方法对 7 株不同来源的 V<sub>p</sub> 进行了毒力比较,加深了毒力基因与其致病性的关系认识,为今后深入研究其致病机理奠定了理论依据。

#### 参考文献:

- [1] GARCÍA K, TORRES R, URIBE P, et al. Dynamics of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains during seafood-related summer diarrhea outbreaks in southern Chile[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(23): 7482–7487.
- [2] FUENZALIDA L, HERNÁNDEZ C, TORO J, et al. *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish and clinical samples during two large epidemics of diarrhoea in southern Chile [J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(4): 675–683.
- [3] TANAKA H, SHINJI T, SAWADA K, et al. Development and application of a bioluminescence ATP assay method for rapid detection of coliform bacteria [J]. Water Research, 1997, 31(8): 1913–1918.
- [4] XIAO N, LI B, LIU X, et al. Etiologic characteristics of

- Vibrio parahaemolyticus* strains causing outbreaks and sporadic cases in Guangdong [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2014, 35(12): 1379–1383.
- [5] WEST C K G, KLEIN S L, LOVELL C R. High frequency of virulence factor genes *tdh*, *trh*, and *tlh* in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from a pristine estuary [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(7): 2247–2252.
- [6] 丁莹,潘迎捷,赵勇,等. 副溶血性弧菌耐热直接溶血毒素基因的克隆及原核表达[J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(3): 257–262.
- DING Y, PAN Y J, ZHAO Y, et al. Clone and expression of thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2009, 18(3): 257–262.
- [7] 杨海智,马海霞,杨信东. 国内关于半数致死量及类似生物效应指标测算方法研究进展[J]. 国外医药(抗生素分册), 2012, 33(2): 62–66.
- YANG H Z, MA H X, YANG X D. Current research progress on the calculation methods of LD<sub>50</sub> and similar biological effect indicators [J]. World Notes on Antibiotics, 2012, 33(2): 62–66.
- [8] KARBBER G. Determination of LD<sub>50</sub> [J]. Arch Exp Pathol Pharma, 1931, 162: 480.
- [9] 孙瑞元. 简捷实用的半数致死量综合计算法 [J]. 药学报, 1963, 10(2): 65–74.
- SUN R Y. A practical combined method for computing the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1963, 10(2): 65–74.
- [10] 杨世洪. 半数致死量 LD<sub>50</sub>速算法 [J]. 卫生研究, 1974(5): 73–78.
- YANG SH. A fast calculation method for the median lethal dose LD<sub>50</sub> [J]. Journal of Hygiene Research, 1974(5): 73–78.
- [11] FINNEY D J. The median lethal dose and its estimation [J]. Archives of Toxicology, 1985, 56(4): 215–218.
- [12] REED L J, MUENCH H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints [J]. American Journal of Epidemiology, 1938, 27(3): 493–497.
- [13] 张学松. 计算半数致死量的新方法 [J]. 中国家禽, 1994(6): 19.
- ZHANG X S. The new method to calculate the median lethal dose [J]. China Poultry, 1994, (6): 19.
- [14] DAVIS J M, CLAY H, LEWIS J L, et al. Real-time visualization of *mycobacterium-macrophage* interactions leading to initiation of granuloma formation in zebrafish embryos [J]. Immunity, 2002, 17(6): 693–702.
- [15] ALLEN J P, NEELY M N. Trolling for the ideal model host: zebrafish take the bait [J]. Future Microbiology, 2010, 5(4): 563–569.
- [16] RUNFT D L, MITCHELL K C, ABUAITA B H, et al. Zebrafish as a natural host model for *Vibrio cholerae*

- colonization and transmission [ J ]. Applied and Environmental microbiology, 2014, 80(5): 1710 - 1717.
- [17] WESTERFIELD M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*) [ M ]. University of Oregon Press, 2000.
- [18] 顾兵,张政,李玉萍,等.半数致死量及其计算方法概述 [ J ]. 中国职业医学, 2009, 36(6): 507 - 508, 511.  
GU B, ZHANG Z, LI YP, et al. Summary of median lethal dose and its calculation methods [ J ]. China Occupational Medicine, 2009, 36(6): 507 - 508, 511.
- [19] 谢超华,朱力,王恒樑.志贺菌毒力检测的常用方法 [ J ]. 生物技术通讯, 2009, 20(5): 738 - 741.  
XIE C H, ZHU L, WANG H L. Methods for detecting the virulence of *shigellaspp.* [ J ]. Letters in Biotechnology, 2009, 20(5): 738 - 741.
- [20] 邹礼根,刘超.对虾保鲜剂急性毒性和致突变作用研究 [ J ]. 上海海洋大学学报,2010,19(3): 410 - 414.  
ZOU L G, LIU C. Study on acute toxicity and mutagenicity of prawn preserving reagent [ J ]. Journal of Shanghai Ocean University, 2010, 19(3): 410 - 414.
- [21] BERKSON J. Application of the logistic function to bio-assay [ J ]. Journal of the American Statistical Association, 1944, 39(227): 357 - 365.
- [22] DIXON W J, MOOD A M. A method for obtaining and analyzing sensitivity data [ J ]. Journal of the American Statistical Association, 1948, 43(241): 109 - 126.
- [23] 肖经纬,崔涛,孟会林,等.3种急性经口毒性试验方法的比较 [ J ]. 毒理学杂志,2007(2): 135 - 136.  
XIAO J W, CUI T, MENG H L, et al. The comparison of three kinds of method for acute oral toxicity test [ J ]. The Journal of Toxicology, 2007(2): 135 - 136.
- [24] 章元明.半数致死量 LD<sub>50</sub>的刀切估计及其抽样方差 [ J ]. 畜牧兽医学报,1997, 28(6): 499 - 503.  
ZHANG Y M. The jackknife estimate and sampling variance of LD<sub>50</sub> [ J ]. Acta Veterinariae Zootechnica Sinica, 1997, 28(6): 499 - 503.
- [25] 杨杏芬.急性毒性体内及体外替代方法研究进展 [ J ]. 中国公共卫生, 2011, 27(10): 1331 - 1333.  
YANG X F. Current research progress on the alternative method about acute toxicity in vivo and in vitro [ J ]. Chinese Journal of Public Health, 2011, 27(10): 1331 - 1333.
- [26] 刘文江.半数致死量的测定及三种计算方法的比较 [ J ]. 西北国防医学杂志, 1984(2): 162 - 164.  
LIU W J. Comparison of three kinds of calculation methods for the median lethal dose [ J ]. Medical Journal of National Defending Forces in Northwest China, 1984, (2): 162 - 164.
- [27] 黎七雄,汪晖,肖清秋,等.半数致死量(LD<sub>50</sub>) Bliss 法的评价及计算 [ J ]. 数理医药学杂志, 1995(4): 318 - 320.  
LI Q X, WANG H, XIAO Q Q, et al. Evaluation and calculation of median lethal dose (LD<sub>50</sub>) with Bliss method [ J ]. Journal of Mathematical Medicine, 1995(4): 318 - 320.
- [28] 王捷,梁震,刘瑛.急性毒性 LD<sub>50</sub>实验研究的进展 [ J ]. 农药,2000(5): 45 - 46.  
WANG J, LIANG Z, LIU Y. Progress of the experimental study of acute toxicity LD<sub>50</sub> [ J ]. Pesticides, 2000, 39(5): 45 - 46.
- [29] SASS N. Humane endpoints and acute toxicity testing [ J ]. ILAR Journal, 2000, 41(2): 114 - 123.
- [30] 章元明,曾子建,张跃.半数致死量 LD<sub>50</sub>的百分偏差和渐近方差 [ J ]. 生物数学学报,1999(1): 122 - 126.  
ZHANG Y M, ZENG Z J, ZHANG Y. Percentage bias and variance of LD<sub>50</sub> [ J ]. Journal of Biomathematics, 1999, 14(1): 122 - 126.
- [31] PARANJPYE R N, MYERS M S, YOUNT E C, et al. Zebrafish as a model for *Vibrio parahaemolyticus* virulence [ J ]. Microbiology, 2013, 159(12): 2605 - 2615.
- [32] NEELY M N, PFEIFER J D, CAPARON M. Streptococcus-zebrafish model of bacterial pathogenesis [ J ]. Infection and Immunity, 2002, 70(7): 3904 - 3914.
- [33] PRESSLEY M E, PHELAN P E, WITTEN P E, et al. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella ictaluri* infection in the zebrafish [ J ]. Developmental & Comparative Immunology, 2005, 29(6): 501 - 513.
- [34] 陆承平,陈怀青.研究鱼类病原菌的思路和方法 [ J ]. 鱼类病害研究,1995, 17(3): 42 - 43.  
LU C P, CHEN H Q. The thinking and methods for fish pathogen [ J ]. Fish disease research, 1995, 17(3): 42 - 43.

## The comparative study on the LD<sub>50</sub> to evaluate the virulence of *Vibrio parahaemolyticus* using two calculation methods

DONG Xuehong, TIAN Min, JI Ce, MA Wenyuan, ZHANG Qinghua

(Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** The *Vibrio parahaemolyticus* (Vp) is paid much attention to as a zoonosis pathogen at present. In order to compare the virulence and pathogenicity of seven Vp strains from different sources, we used zebrafish as the model to test median lethal dosage (LD<sub>50</sub>) by acute toxicity experiment within 96h, and analyzed the data with Reed-Muench method and Bliss method. The results suggested that the LD<sub>50</sub> tested by Reed-Muench method of human pathogenic bacteria (ATCC17802, ATCC33847) and aquatic animal pathogens (Vp13, Vp31, Vp41, Vp57) were  $6.0 \times 10^7$ ,  $7.4 \times 10^7$ ,  $3.9 \times 10^7$ ,  $1.6 \times 10^8$ ,  $1.6 \times 10^8$ ,  $9.3 \times 10^7$  CFU/mL, respectively and  $5.0 \times 10^7$ ,  $7.6 \times 10^7$ ,  $3.6 \times 10^7$ ,  $1.5 \times 10^8$ ,  $1.6 \times 10^8$ ,  $9.4 \times 10^7$  CFU/mL, respectively, with Bliss method. The results showed that these two kinds of calculation methods had little difference for the LD<sub>50</sub>, and the virulence of these seven different Vp strains were as follows: Vp13 > ATCC17802 > ATCC33847 > Vp57 > Vp31 > Vp41 > VpKNH1. To conclude, Reed-Muench method and Bliss method can both be used to test Vp strains virulence. However, Bliss calculation method is more simple and accurate than the Reed-Muench method with the development of computer technology. As a result, it is the better choice for LD<sub>50</sub>.

**Key words:** *Vibrio parahaemolyticus*; zebrafish; LD<sub>50</sub>; Reed-Muench method; Bliss method