

养殖牙鲆鳃弧菌疫苗的研究*

莫照兰 徐永立 张培军

(中国科学院海洋所实验海洋生物学开放实验室 青岛 266071)

提要 以牙鲆病原性鳃弧菌 MB 为抗原,制备了细胞 (CV)、细胞-胞外产物 (CEV)、脂多糖 (LPS) 三种疫苗,通过浸泡和注射两种途径对牙鲆进行两次免疫,检测疫苗的免疫保护效果。免疫后 4 周可检测到免疫组牙鲆具有明显的凝集抗体效价,其中注射组效价显著高于浸泡组,而对照组变化不明显。与对照组相比,免疫组牙鲆获得良好的免疫保护力,其中注射免疫组高于浸泡组。在注射免疫途径中,以 CEV 的免疫保护效果最好;在浸泡免疫途径中,以 CEV 和 LPS 的免疫保护效果最好。结果表明鳃弧菌 MB 的细胞-胞外产物苗有显著的免疫保护作用。

关键词 牙鲆,鳃弧菌,疫苗

牙鲆 *Pamlichthys olivaceus* 是珍贵的经济鱼类之一,目前在中国北方沿海地区大规模养殖。随着高密度工厂化养殖的迅速发展和海水污染的日益严重,危害养殖牙鲆健康的各种病原相继出现,引起了严重的经济损失^[1-2]。1999 年夏季作者从发病牙鲆分离到一株病原 MB,经鉴定该病原为鳃弧菌^①,可导致未成年牙鲆 30%~40% 的死亡,病鱼的主要症状为鳍条出血,体表溃烂形成一深洞,消化道弥漫性出血。由于养鱼厂常年大量使用抗生素和化学药品,使该鳃弧菌产生较广泛的耐药性,不仅给药物防治带来很大的困难,而且还造成了周围养殖环境的污染,因此必需寻找另一有效而安全的疾病防治途径。

免疫是防治鱼类疾病的一条重要途径。本文以鳃弧菌 MB 为病原制备了细胞苗、细胞-胞外产物苗和 LPS,在浸泡和注射两种免疫途径下,比较了 3 种疫苗的免疫效果。

1 材料与方方法

1.1 菌株

从牙鲆病鱼分离的鳃弧菌毒株,保存于 -80℃。实验前细菌于 TSA(胰大豆蛋白胨 1%,酵母粉 0.5%,FePO₄ 0.01%,NaCl 2%,琼脂 1.5%)活化,并在健康牙鲆体内传代 3 次。

1.2 实验鱼

体重 9~12 g 的牙鲆鱼以流动水暂养于 200 L 圆

缸中,每天按鱼体重的 5% 投喂人工饵料。实验观察期间水温为 17~24℃,盐度 32~34。

1.3 疫苗的制备

1.3.1 细胞苗 (CV) 的制备 细菌在 TSA 平板上 28℃ 培养 24 h,以 PBS(pH 7.4) 洗下,加入 0.5% 福尔马林(V/V)于 28℃ 灭活,定期取样接种培养,检查细菌灭活情况。灭活后以 4 000 r/min 离心 30 min 沉淀细胞, PBS 洗 3 次,用含 0.3% 福尔马林的 PBS 悬浮,使浓度为 2.0×10⁹~3.0×10⁹ 个/ml,贮存于 4℃。

1.3.2 细胞-胞外产物苗 (CEV) 的制备 按照 Liu1957 年报道的方法提取细菌胞外产物 (ECP),将其浓缩至蛋白浓度为 10 g/L,加入 0.5% 福尔马林于 100℃ 灭活 10 min,4℃ 保存。用 PBS 稀释至一定浓度,与 2.2.1 的灭活菌细胞混合,使细胞浓度为 2×10⁹~3×10⁹ 个/ml,即为 CEV。

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 4211 号。国家重点基础研究专项资助项目 G1999012003 号。

第一作者:莫照兰,出生于 1967 年,博士,副研究员,在研课题为“鱼类病原菌致病因子的作用过程”。E-mail: devbiol@ms.qdio.ac.cn

① Mo et al.. A *Vibrio anguillarum* strain associated with ulcerative skin in cultured flounder, *Pamlichthys olivaceus*. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 2001.

收稿日期:2000-12-11;修回日期:2001-05-16

1.3.3 脂多糖(LPS)的制备 细菌以 TSB(不加琼脂的 TSA) 培养 48 h, 6 000 r/ min 离心 30 min, 取菌体, 按照 Johnsen 1977 年报道的方法提取脂多糖, 以 PBS 稀释到 30 g/L, 贮存于 4 ℃。

1.4 疫苗的安全性

将疫苗 CV, CEV 和 LPS 各以 0.3 ml/ 尾腹部肌肉注射健康牙鲆。对照设 3 组, 分别注射 PBS, 活细菌以及未灭活的 ECP。实验鱼暂养 15 d, 观察并记录鱼的症状及存活情况。

1.5 免疫

1.5.1 浸泡免疫 用海水将疫苗 CV, CEV 和 LPS 配制至浓度依次为 10^9 个/ml, 10^8 个/ml(0.1 g/L), 0.1 g/L, 放入牙鲆, 通气浸泡 30 min; 不加疫苗的牙鲆通气处理 30 min, 作为对照组。2 周后以相同条件进行二次浸泡免疫。

1.5.2 注射免疫 浓度依次为 10^9 个/ml, 10^8 个/ml(0.2 g/L), 0.2 g/L 的 CV, CEV 和 LPS, 各以 0.1 ml/ 尾腹部肌肉注射健康牙鲆, 对照组注射等量的 PBS。2 周后以同等剂量进行第二次免疫。

1.6 血清凝集抗体效价测定

第 2 次免疫后的第 2 周开始尾柄静脉采血, 每次取 3 尾鱼。血液于 37 ℃ 放置 1 h, 冰箱过夜, 离心取血清。用 96 孔血凝板, 以疫苗细胞为抗原对血清进行效价测定。

1.7 疫苗免疫保护力的测定

在第 2 次免疫后的第 8 周, 每组取鱼 25 尾, 以 M8 活菌进行攻毒, 腹部肌肉注射 0.2 ml/ 尾, 统计每组鱼攻毒后 14 d 内的疫苗免疫保护力 (RPS), 计算公式

$$\text{为: RPS} = \left[1 - \frac{\text{免疫组死亡率}}{\text{对照组死亡率}} \right] \times 100\%$$

2 结果

2.1 疫苗的灭活及其安全性

疫苗的安全性结果见表 1。经 0.5% 福尔马林处理的细菌细胞, 在 28 ℃ 36 h 被灭活, 灭活后的细菌细胞以腹部注射健康牙鲆, 存活率达 100%; 未经灭活的 ECP 注射牙鲆, 15 d 内死亡率为 100%, 病鱼的主要症状为注射部位周围肌肉红肿、内脏贫血, 表明细菌的胞外毒素可导致牙鲆中毒; CEV 腹部注射健康牙鲆, 存活率达 100%, 说明细菌的 ECP 在 100 ℃ 条件下 10 min 可被灭活; 剂量为 9 mg/ 尾的细菌 LPS 未引起牙鲆死亡, 表明较高浓度的 LPS 对牙鲆是安全的。

表 1 疫苗的安全性

Tab.1 Safety of vaccine preparations to fish

组别	注射剂量 (ml)	实验鱼数 (尾)	存活率 (%)
CV (10^9 个/ml)	0.3	10	100
CEV (10^9 个/ml + 10 g/L)	0.3	10	100
LPS (30 g/L)	0.3	10	100
对照 1 (10^9 个/ml)	0.3	10	0
对照 2 (10 g/L)	0.3	10	0
对照 3 (PBS)	0.3	10	100

对照 1: 未经灭活的抗原; 对照 2: 未灭活的 ECP; 对照 3: PBS。

2.2 牙鲆的体液免疫反应

以疫苗细胞为抗原检测免疫牙鲆的血清抗体效价。从浸泡组的结果来看, 免疫后第 4 周开始检测到抗体效价, 但滴度很低, 平均为 1: 2.0~1: 5.3; 免疫后 6~7 周, 效价达到最高, 各组依次平均为 45.3 (CV)、32.6 (CEV)、24.0 (LPS), 此后效价呈缓慢下降趋势。对照组虽能检测到抗体效价, 但变化不明显, 变化范围为 0~1: 8.0 (图 1)。

从注射免疫组的结果来看, 免疫后第 4 周检测到

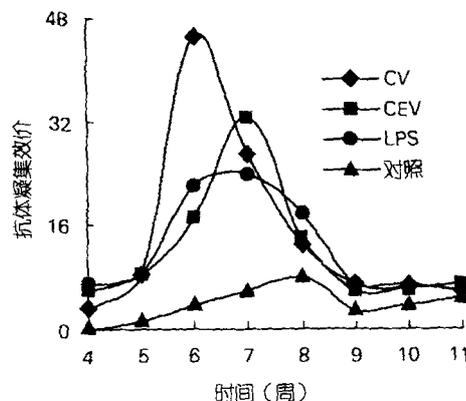


图 1 浸泡免疫牙鲆鱼抗鳃弧菌灭活细胞的血清凝集效价变化

Fig.1 Changes in agglutination titres against killed cells of *V.anguillarum* in *Pamlichthys olivaceus* after immersion immunization

较高抗体效价, 第 7~8 周达到最高效价, 各组依次平均为 1: 768.0 (CV)、853.3 (CEV) 和 512.0 (LPS), 第 8 周后效价呈逐渐下降趋势, 至 11 周时, 效价维持在 213.3~341.3。对照组抗体效价没有很大变化, 变化范围在 1: 1.3~1: 11.3 (图 2)。

比较两种免疫方式的血清抗体效价,浸泡组明显低于注射组。在浸泡组中,以 CV组出现的抗体效价

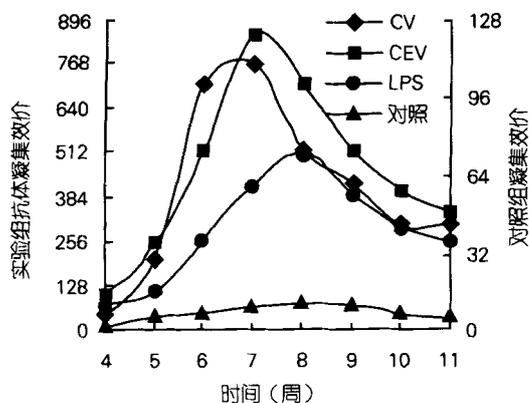


图2 注射免疫牙鲆鱼抗鳃弧菌灭活细胞的血清凝集效价变化

Fig.2 Changes in agglutination titres against killed cells of *V.anguillarum* in *Pamlichthys olivaceus* after injection immunization

最高;在注射组中,以 CEV组出现的抗体效价最高。

2.3 疫苗免疫保护力

牙鲆免疫后 80 d,以 2.16×10^9 FU/ml 活菌肌肉注射,各组获得了不同程度的免疫保护(表 2)。从浸泡免疫的结果来看, CV, CEV 和 LPS 组的免疫保护力依次为 32.0%, 44.0%, 44.0%, 以 CEV 和 LPS 的保护力最高, CV 的保护力最低;从注射免疫结果来看, CV, CEV 和 LPS 组的免疫保护力依次为 64.0%, 76.0%, 72.0%, 以 CEV 的保护率最高, 其次为 LPS, 最低为 CV。对照组的免疫保护力为 0。结果表明注射免疫效果比浸泡好。

表 2 疫苗免疫保护力

Tab.2 Relative percent survival of vaccine against *V. anguillarum* strain MB

组别	死亡鱼数(实验鱼数)		免疫保护率(%)	
	浸泡免疫	注射免疫	浸泡免疫	注射免疫
CV	17(25)	9(25)	32.0	64.0
CEV	14(25)	6(25)	44.0	76.0
LPS	14(25)	7(25)	44.0	72.0
对照	25(25)	25(25)	0.0	0.0

3 讨论

在制备疫苗时,为了保护抗原,作者采用了较温和的灭活条件,即在 0.5%福尔马林和 28℃下灭活,

并通过离心方法沉淀细胞,以排除福尔马林对鱼体的影响。初步实验表明,鳃弧菌 MB 可产生多种胞外酶和热不稳定性溶血素,在体外可溶解牙鲆血细胞。试验中采用 0.5%福尔马林、100℃(10 min)的方法对 ECP 进行脱毒,消除了胞外毒素对鱼体的毒性作用。

传统的鱼类疫苗是灭活的细菌细胞苗,对某些鱼类疾病起到了保护作用,但对某些疾病并未获得理想的结果。许多研究表明许多病原侵入机体后都是通过产生外毒素、蛋白酶、溶血素等毒力因子而使宿主发病,机体则通过产生相应的抗体而得到保护。实验证明,鳃弧菌 MB 产生的胞外毒素可导致牙鲆死亡。此外, LPS 是革兰氏阴性细菌细胞外膜的主要成分,是重要的表面抗原(O 抗原),具有极高的免疫原性,因此在上述基础上,本文通过浸泡和肌肉注射两种免疫途径,比较了细胞苗、细胞-胞外产物苗和 LPS 的免疫效果。

在注射和浸泡两种免疫途径下,含有胞外产物的细胞苗比单纯的细胞苗具有更高的保护力,在一定程度上表明 MB 的胞外产物具有保护性抗原成分;同时结果也表明了 LPS 也起到了明显的保护作用。LPS 是对哺乳动物有害而对鱼类无害的一类细菌毒素,一定量的 LPS 能使鱼类产生极其显著的免疫反应,从而获得对该种病原的较强的免疫能力。陈昌福等人 1989 报道用粘球菌类脂多糖注射草鱼, 4 mg/尾(50~100 g)的剂量可导致 50%的死亡率。在作者的实验中,用较大剂量的 MB LPS(9 mg/尾, 9~12 g)注射牙鲆,不仅未导致死亡,而且还使牙鲆获得较高的血清中和抗体。目前报道的细菌胞外产物含有多种成分,如蛋白酶、溶血素、脂蛋白等,因此对于鳃弧菌 MB 的胞外产物组成需要进一步研究,以确定保护性抗原的作用。

从血清学反应和免疫保护力来看,注射免疫比浸泡免疫效果好。从注射免疫结果来看,牙鲆的血清抗体滴度和免疫保护力呈正相关。从浸泡免疫结果来看,牙鲆血清抗体滴度与保护力的相关性不明显,虽然血清效价很低,但具有较高的免疫保护力,与未经免疫的牙鲆有明显的差异。

尽管注射方式具有较好的免疫效果,但操作繁琐、工作量大、且易造成鱼体的过分应激反应,在作者的实验中,常出现注射鱼急性死亡的情况。浸泡免疫的理论基础是鱼的鳃和皮肤等体表组织可摄取抗原,适用各种规格鱼,虽然效果不如注射法,但可以满足生产需要,因而已成为当前免疫接种最常用的方法。影响浸泡免疫效果的因素很多,如浸泡时间、温度以及疫苗的浓度等,因此如何提高浸泡免疫的效果,是下一步研究工作的内容。

参考文献

- 1 曲凌云,孙修勤,张进兴.养殖牙鲆淋巴囊肿病毒的电镜观察,青岛海洋大学学报,2000,30(2):105~110
- 2 于大国,张宗伟,孙永昌.牙鲆仔鱼肠道白浊病及其防治,中国水产,1998,1:41~42

辅助参考文献

陈昌福,纪国良.草鱼对鱼害粘球菌类脂多糖的免疫反

应,淡水渔业,1989,4:4~8

Liu P V.. Survey of haemolysin production among species of *Pseudomonas*, *J. Bacteriol.*, 1957, 74:718~727

Johnsen G S.. Immunological studies on *Vibrio anguillarum*, *Aquaculture*, 1977, 10:221~230

VACCINATION AGAINST *Vibrio Anguillarum* ON CULTURED FLOUNDER, *Paralichthys olivaceus*

MO Zhao lan XU Yong li ZHANG Pei jun

(*Experimental Marine Biological Laboratory, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences., Qingdao, 266071*)

Received: Dec., 11, 2000

Key Words: *Paralichthys olivaceus*, *Vibrio anguillarum*, Vaccine

Abstract

The efficacy of three vaccine formulations, a whole-cell bacterin (CV), a whole-cell with extracellular products vaccine (CEV) and a lipopolysaccharide vaccine (LPS), which are against *Vibrio anguillarum* MB was evaluated by the route of immersion and injection in flounder, *Paralichthys olivaceus*. The evident antibody titres were detected obviously in the twice-vaccinated fish 4 weeks after immunization, in which the injection group revealed higher antibody titres than the immersion group did, whereas the unvaccinated group did not showed evident change in the antibody titres. The vaccinated fish also showed higher relative percent survival (RPS) against bacteria than the unvaccinated fish did, in which the RPS of the injected group was higher than that of the immersion group. ECV, as well as CEV and LPS showed efficient protections in the injection and the immersion route, respectively. Results revealed that the protection of CEV against *Vibrio anguillarum* MB was conspicuous.

(本文编辑:刘珊珊)