

鱼肠道弧菌疫苗制备及免疫保护效果

程顺峰

(青岛农业大学, 山东青岛 266109)

摘要:通过比较不同灭活剂及灭活条件对鱼肠道弧菌(*Vibrio ichthyoenteri*)的灭活效果,确定以0.4%(v/v)福尔马林溶液在25℃下处理30h作为疫苗的最佳灭活条件,用灭活的鱼肠道弧菌疫苗免疫大菱鲆并测定了该疫苗针对鱼肠道弧菌、溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌(*Vibri parahaemolyticus*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)等的免疫保护力,结果表明,采用注射免疫方式接种后,针对鱼肠道弧菌的免疫保护率达75%;溶藻弧菌免疫保护率为67.6%;鳃弧菌免疫保护率为50%;副溶血弧菌免疫保护率为57.2%;采用浸浴免疫方式接种后,疫苗针对鱼肠道弧菌、溶藻弧菌、鳃弧菌、副溶血弧菌的免疫保护力分别为25%、22.3%、11.1%、12.5%。

关键词:鱼肠道弧菌;疫苗;免疫保护力

中图分类号:S 94

文献标识码:A

论文编号:2009-1501

Preparation of Vaccine against *Vibrio ichthyoenteri* and Evaluation of the Immune Efficiency

Cheng Shunfeng

(Qingdao Agriculture University, Qingdao Shandong 266109)

Abstract: In this article compared the results of different inactivation and inactivated conditions on the *Vibrio ichthyoenteri* vaccine. The appropriate method for inactivation the bacterium was treatment the bacteria suspension with 0.4% formalin at 25℃ for 30h. The efficacy of vaccine against *Vibrio ichthyoenteri*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibri parahaemolyticus* and *Vibrio anguillarum* on the turbot *Scophthalmus maximus* L was study by vaccinated with vaccine by immersion and injection routines. The results showed that the relative percent survival (RPS) was 75% for *Vibrio ichthyoenteri* by injection routines, 67.6% for *Vibrio alginolyticus*, 50% for *Vibrio anguillarum* and 57.2% for *Vibri parahaemolyticus*, but the RPS was 25% for *Vibrio ichthyoenteri* by immersion routines to the turbot, 22.3% for *Vibrio alginolyticus*, 11.1% for *Vibrio anguillarum* and 12.5 for *Vibri parahaemolyticus*.

Key words: *Vibrio ichthyoenteri*, vaccine, relative percent survival

0 引言

大菱鲆(*Scophthalmus maximus* L)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、石鲈(*kareius bicoloratus*)等鲆鲽鱼类为中国北方海水养殖业的主养鱼类,但伴随高密度、规模化养殖模式的推广,以及苗种、亲体、引种等国家地区间的交流,由弧菌属病原性细菌所引发的疾病呈爆发性流行趋势,其中尤以溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌(*Vibri parahaemolyticus*)、鳃

弧菌(*Vibrio anguillarum*)鱼肠道弧菌(*Vibrio ichthyoenteri*)等所引起的疾病常表现出较大的流行面积、较高的发病率及死亡率,由此造成的直接和间接经济损失达上百亿元,严重影响了水产养殖业的发展^[1]。目前,针对该类细菌性疾病生产中主要采用抗生素等化学药物进行防治,虽在一定程度上发挥了积极作用,但长期、大量的使用化学药物,会使病原菌产生抗药性,并使养殖鱼类致畸、致癌、致突变,对食用者构成潜

基金项目:山东省自然科学基金项目(Y2007D31, Y2007D74);青岛农业大学人才基金项目(630701)。

第一作者简介:程顺峰,男,1978年出生,博士,讲师,主要从事水生生物病害学研究。通信地址:266109 山东省青岛市城阳区春阳路青岛农业大学动物科技学院, Tel: 0532-86080734, E-mail: chengshunfeng@gmail.com。

收稿日期:2009-07-02, **修回日期:**2009-07-27。

在的威胁,另外也对渔业生态环境造成二次污染^[2]。通过制备疫苗控制细菌性疾病已成为近年来水产病害研究领域的一个亮点,已有学者制备了溶藻弧菌、鳃弧菌等的疫苗并用于疾病的防治^[3-6],但关于鱼肠道弧菌疫苗的研究尚无报道,笔者参考肖慧等的研究^[4],利用不同条件制备了鱼肠道弧菌灭活疫苗,并研究了该灭活疫苗对溶藻弧菌、副溶血弧菌、鳃弧菌等三种致病性弧菌的免疫保护效果,以期对相关鱼类疫苗的研究积累资料。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)、副溶血弧菌(*Vibriopara haemolyticus*)、鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)取自中国海洋大学水产学院病害实验室、鱼肠道弧菌(*Vibrio ichthyoenteri*)由淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室张晓君老师提供。试验用健康大菱鲆鱼购于青岛市黄岛养殖厂,体长17~20 cm,试验于青岛农业大学循环水养殖实验室进行,每个试验桶盛有40 L砂滤海水,购回的大菱鲆暂养7天后发现无异常情况即开始试验,免疫接种前后按照常规养殖程序管理。

1.2 方法

1.2.1 鱼肠道弧菌疫苗灭活剂的确定 将鱼肠道弧菌接种于2216E平板上,25℃培养48 h,灭菌PBS洗脱菌苔。调整细菌浓度为 $(2.0\sim 2.5)\times 10^9$ cfu/ml,使用福尔马林和氯仿法灭活,福尔马林灭活法调整灭活溶液中福尔马林终浓度为0.1%(v/v),0.3%(v/v),0.6%(v/v),1.0%(v/v),氯仿灭活法调整灭活溶液中氯仿终浓度为:0.2%(v/v),0.4%(v/v),0.6%(v/v),0.8%(v/v)。

1.2.2 疫苗灭活温度及时间的确定 福尔马林和氯仿各处理组灭活温度均采用15℃、28℃和65℃三种。每间隔4 h,由各试管中取少量菌悬液涂于2216E平板上,每组2个平行,28℃培养72 h,观察平板上是否有菌落生长,以确定最佳灭活时间。

1.2.3 灭活疫苗安全性检测 取在最佳灭活条件下灭活的细菌,注射免疫5尾鱼,每尾0.1 ml,观察10天,以确定疫苗的安全性。同时取0.1 ml灭活的菌悬液,涂布于2216E平板,每组2个平行,28℃培养72 h,观察有无菌落形成。

1.2.4 半数致死量(LD₅₀)测定 鱼肠道弧菌、溶藻弧菌、鳃弧菌、副溶血弧菌接种于2216E液体培养基28℃振荡培养24 h后。分别计数,4种致病菌均取4个浓度,即浓缩10倍、原液、稀释10倍、稀释100倍计数,测定其细菌含量,每种菌每个浓度接种5尾大菱鲆,0.2 ml/尾,腹腔注射,观察并记录15天的死亡情况,测定4株

菌对大菱鲆的半数致死量。

1.2.5 疫苗接种

(1)注射免疫:免疫组大菱鲆采用肌肉注射方式进行免疫,每尾大菱鲆注射0.2 ml制备的疫苗,7天后同法加强免疫1次。对照组大菱鲆注射无菌生理盐水,每尾大菱鲆注射0.2 ml。

(2)浸浴免疫:免疫组大菱鲆采用浸浴方式进行免疫,首先用海水将疫苗浓度调整至 1×10^7 cfu/ml,混匀,在小容积水族箱中,将大菱鲆置于稀释好的疫苗溶液中浸泡30 min,然后将鱼和菌液倒回试验桶中,7天后同法再次免疫1次。对照组采用同样处理浸泡于生理盐水中。

1.2.6 免疫保护力的测定 不同方法接种疫苗的试验组和对照组大菱鲆饲养2周后,4种致病菌分别进行攻毒试验,每组取10尾大菱鲆,均采用肌肉注射方式,其中鱼肠道弧菌攻毒浓度为 2×10^9 cfu/ml、溶藻弧菌攻毒浓度为 1.8×10^9 cfu/ml,鳃弧菌攻毒浓度为 4.7×10^8 cfu/ml、副溶血弧菌攻毒浓度为 1.5×10^9 ,注射剂量为0.1 ml/尾。将免疫组和对照组试验大菱鲆进行注射攻毒后,统计免疫组和对照组2周的死亡率。参考肖慧等的方法计算免疫保护力(Relative Percent Survival, RPS)^[4]:

免疫保护力(%)=(对照组死亡率-试验组死亡率)/对照组死亡率 $\times 100\%$

2 结果

2.1 灭活剂及灭活条件

该试验最佳灭活条件为:采用浓度为0.3%(v/v)福尔马林溶液,在温度为25℃时处理24 h即可完全灭活(见表1);采用浓度为0.8%(w/v)氯仿溶液在温度为65℃时处理12 h即可完全灭活(见表2)。综合考虑疫苗的安全性、有效性及实践应用等各因素,确定以0.4%(v/v)的福尔马林溶液在25℃下处理30 h作为疫苗的最佳灭活条件。

2.2 疫苗安全性检测

将灭活的鱼肠道弧菌涂布于2216E平板上进行疫苗的安全性检测,发现在28℃培养72 h后2216E平板上无菌落生长,该结果证明细菌已全部灭活。连续7天观察接种疫苗的大菱鲆,发现全部存活,且进食及活动正常,确认所制备疫苗是安全的,对大菱鲆无不良影响。

2.3 半数致死量的确定

鱼肠道弧菌按4个浓度梯度接种4组鱼,0.2 ml/尾,结果于感染后5天发现部分试验鱼表现有肝脏不同程度肿胀,肾脏肿胀,有不同量的腹水,解剖死鱼发现肠道内具有淡黄白色黏液及腹水。统计各组死亡率,发现鱼肠道弧菌高剂量(6.3×10^9 cfu/ml)接种组死

表1 不同浓度、不同时间福尔马林溶液的灭活效果

温度/℃	时间/h	浓度/(V/V)			
		0.1	0.3	0.6	1.0
4	24	+	+	+	-
	48	+(-)	+	+	+(-)
	72	+	-	-	-
25	24	+	-	-	-
	48	-	-	-	-
	72	-	-	-	-
65	24	-	-	-	-
	48	+(-)	-	-	-
	72	-	-	-	-

注：+：表示平板培养基上有菌落形成；-：表示平板培养基上无菌落形成；+(-)：表示有两种试验结果。

表2 不同浓度、不同时间氯仿溶液的灭活效果

温度/℃	时间/h	浓度/(V/V)			
		0.2	0.4	0.6	0.8
4	12	+	+	+(-)	+(-)
	24	+(-)	+	+	+
	48	+	+(-)	-	-
25	12	+	+	+	+
	24	+	+	+	+(-)
	48	+	+	+	-
65	12	+	+	+	-
	24	-	+(-)	-	-
	48	+(-)	-	-	-

亡率达100%；而低剂量(6.3×10^6 cfu/ml)接种组死亡率为20%。应用RM6240软件计算鱼肠道弧菌LD₅₀，得出其为 7.81×10^7 cfu/ml；同理计算可知鳃弧菌LD₅₀为

1.36×10^7 cfu/ml；副溶血弧菌LD₅₀为 3.16×10^7 cfu/ml；溶藻弧菌LD₅₀为 1.45×10^7 cfu/ml。具体见表3。对照组大菱鲆于15天观察期内均无异常。

表3 四种菌株对大菱鲆的半数致死量

组别	剂量/(cfu/ml)	总鱼数	死亡鱼数	死亡率	LD ₅₀ /(cfu/ml)
鱼肠道弧菌	6.3×10^9	5	5	100%	7.81×10^7
	6.3×10^8	5	4	80%	
	6.3×10^7	5	2	40%	
	6.3×10^6	5	1	20%	
鳃弧菌	4.2×10^9	5	5	100%	1.36×10^7
	4.2×10^8	5	4	80%	
	4.2×10^7	5	3	80%	
	4.2×10^6	5	2	60%	
副溶血弧菌	6.8×10^9	5	5	100%	3.16×10^7
	6.8×10^8	5	3	60%	
	6.8×10^7	5	3	60%	
	6.8×10^6	5	2	40%	
溶藻弧菌	5.6×10^9	5	4	80%	1.45×10^7
	5.6×10^8	5	4	80%	
	5.6×10^7	5	3	60%	
	5.6×10^6	5	2	40%	

2.4 疫苗的免疫效果

2.4.1 注射免疫结果 结果表明对照组大菱鲆的鱼体消瘦,发黑,鳍条有缺损,鱼体出现条纹状充血,腹部膨大,有不同程度的腹水,肝脏及肾脏肿胀,肠道内淡黄白色黏液。注射免疫组大菱鲆显示出一定的免疫保护力,仅部分大菱鲆的鳍条稍微有些破损,没有腹部膨大现象,体表正常。进行攻毒试验20天后,统计发现鱼肠道弧菌对照组死亡率达到80%,试验组死亡率为

20%,免疫保护率达到75%;溶藻弧菌对照组的死亡率为60%,疫苗免疫组的死亡率为20%,免疫保护率为67.6%;鳗弧菌对照组的死亡率为80%,疫苗免疫组死亡率为40%,免疫保护率为50%;副溶血弧菌对照组的死亡率为70%,疫苗免疫组的死亡率为30%,免疫保护率为57.2%(表4)。可见鱼肠道弧菌疫苗对副溶血弧菌、鳗弧菌、溶藻弧菌等致病菌也具有一定的免疫保护性。

表4 注射免疫大菱鲆的免疫保护力

组别	注射剂量/(cfu/ml)	死亡数/攻毒数/尾	死亡率	免疫保护率
鱼肠道弧菌试验组	2.5×10^9	2/10	20%	75%
鱼肠道弧菌对照组	2.5×10^9	8/10	80%	
溶藻弧菌试验组	1.4×10^9	2/10	20%	67.6%
溶藻弧菌对照组	1.4×10^9	6/10	60%	
鳗弧菌试验组	6.5×10^8	4/10	40%	50%
鳗弧菌对照组	6.5×10^8	8/10	80%	
副溶血弧菌试验组	2×10^9	3/10	30%	57.2%
副溶血弧菌对照组	2×10^9	7/10	70%	

2.4.2 浸泡免疫结果 结果显示采用该方法免疫试验大菱鲆,进行攻毒试验20天后,鱼肠道弧菌试验组大菱鲆部分死亡,死亡率为60%,对照组死亡率为80%,疫苗的免疫保护力为25%,免疫保护力明显低于同时期内采用注射方式免疫的免疫保护力(75%);溶藻弧

菌对照组死亡率达到90%,疫苗试验组死亡率为70%,免疫保护率达到22.3%;鳗弧菌对照组的死亡率为90%,疫苗试验组死亡率为80%,免疫保护率为11.1%;副溶血弧菌对照组的死亡率为80%,疫苗试验组的死亡率为70%,免疫保护率为12.5%。具体见表5。

表5 浸泡免疫大菱鲆的免疫保护力

组别	剂量/(cfu/ml)	死亡数/攻毒数/尾	死亡率	免疫保护率
鱼肠道弧菌试验组	—	6/10	60%	25%
鱼肠道弧菌对照组	—	8/10	80%	
溶藻弧菌试验组	—	7/10	70%	22.3%
溶藻弧菌对照组	—	9/10	90%	
鳗弧菌试验组	—	8/10	80%	11.1%
鳗弧菌对照组	—	9/10	90%	
副溶血弧菌试验组	—	7/10	70%	12.5%
副溶血弧菌对照组	—	8/10	80%	

注:“—”表示浸泡免疫试验大菱鲆放入试验桶后未统计水体中灭活疫苗的剂量。

3 讨论

目前鱼类免疫接种方法有注射、口服、浸浴及喷雾等^[7]。注射免疫的优势在于疫苗可足量地转入免疫体系中并激起明显的免疫反应,这对于其他方法是绝对不能做到的。因为通过注射,辅助剂和各种免疫刺激剂都可以包括在抗原中,提高抗原的效果并延长免疫反应的耐久性。但注射免疫费时费力,鱼的应激反应也大。浸浴免疫省时方便,是仅次于注射法的有效给

药途径,并且可适用于难以实施注射的鱼苗。但其吸收效果受到多种因素的影响,且疫苗进入体内的机理并不十分清楚^[8]。试验采用了注射与浸泡两种方式进行疫苗的接种,结果显示,注射免疫方式与浸泡免疫方式相比,在一定程度上增强了疫苗的免疫效果,提高了免疫组大菱鲆的免疫保护力。

该试验中选择大菱鲆幼鱼作为试验对象,原因如下:节省疫苗用量,同样体积的疫苗可接种数量更多的

大菱鲆幼鱼;从免疫的效果来看,在大菱鲆幼苗期进行免疫接种后,其免疫系统会产生免疫记忆效应,在随后相当长的生长过程中对相应的病原菌均可产生免疫保护作用,从根本上做到降低成本,减少经济损失^[9]。

试验中使用鳗弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌攻毒已接种鱼肠道弧菌疫苗的受试鱼,结果发现该疫苗对鳗弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌的均有一定的免疫保护作用。高冬梅等^[3]在研究鳗弧菌灭活疫苗的免疫保护效果时也发现被该疫苗对副溶血弧菌也有一定的免疫保护性。张伟妮等通过研究8株致病性弧菌外膜蛋白的抗原性,证实分子量为36kDa的外膜蛋白是弧菌所共有的特异性抗原^[10]。战文斌等认为不同弧菌株间存在共同抗原,此抗原决定簇可达到一种弧菌疫苗对几种病原弧菌引起的弧菌病具有免疫保护力的目的^[11]。唐小千等采用双向电泳研究不同弧菌分子量为36kDa的外膜蛋白后认为,虽然不同弧菌存在相同的分子量蛋白,但通过外膜蛋白的研究来筛选不同种弧菌共同的亚单位疫苗存在着较大的困难^[12]。试验中,虽然发现了鱼肠道弧菌疫苗对鳗弧菌、副溶血弧菌、溶藻弧菌具有一定的免疫保护力,但确定这四种弧菌共同的保护性抗原还有待于进一步研究。

参考文献

[1] 张晓君.三种海水养殖鱼主要细菌性疾病的研究[D].青岛:中国海

洋大学,2006:23-25.

- [2] 王海芳,孙际佳,赵典惠,等.溶藻弧菌疫苗对黑鲷的免疫效果研究[J].华南农业大学学报,2008,29(1):97-100.
- [3] 高冬梅,李健,王群.鳗弧菌灭活疫苗对牙鲆免疫效果的研究[J].海洋水产研究,2004,25(1):34-40.
- [4] 肖慧,李军,王祥红,等.鲈鱼鳗弧菌病疫苗的制备及免疫防治效果[J].青岛海洋大学学报,2003,33(2):226-232.
- [5] 曹宏梅,李健,战文斌.鳗弧菌和溶藻弧菌二联疫苗对大菱鲆的免疫效果[J].中国水产科学,2006,13(3):397-402.
- [6] 朱开玲.鳗弧菌灭活疫苗对海水养殖大菱鲆的免疫预防作用研究[D].青岛:中国海洋大学,2003:37-42.
- [7] 杨先乐,陈远新.鱼用疫苗的现状及其发展趋势[J].水产学报,1996,20(2):159-167.
- [8] 刘洪明.大菱鲆对豚链球菌免疫应答特性的研究[D].青岛:中国海洋大学,2006:18-19.
- [9] 曹宏梅.二联疫苗及药物对大菱鲆的免疫影响研究[D].青岛:中国海洋大学,2006:25-28.
- [10] 张伟妮,周丽,邢婧,等.水产动物主要弧菌外膜蛋白结构的比较分析[J].海洋水产研究,2008,29(2):23-27.
- [11] 战文斌,齐继光,刘洪明,等.水产动物6种主要病原菌与抗血清的免疫交叉反应[J].中国水产科学,2004,11(1):14-19.
- [12] 唐小千,战文斌,周丽,等.6种海洋致病性弧菌36kDa外膜蛋白特性分析[J].中国海洋大学学报,2009,39(2):197-202.