

祭仲石, 厉成新, 王中清, 等. 嗜水气单胞菌灭活疫苗对鲫鱼的免疫效果[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(4): 168-171.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.04.031

嗜水气单胞菌灭活疫苗对鲫鱼的免疫效果

祭仲石, 厉成新, 王中清, 韦艳, 张木泓

(上海市海丰水产养殖有限公司, 江苏盐城 224151)

摘要:随着食品安全等问题日趋严重, 寻找良好而安全的防治细菌性疾病的方法迫在眉睫。本研究利用从患病鲫鱼体内分离的嗜水气单胞菌制备灭活疫苗, 用(50 ± 5) g 的健康鲫鱼作为试验对象, 免疫组腹腔注射制备的疫苗, 对照组腹腔注射等量的磷酸缓冲液。二次免疫后 1、7、14、21、28 d 检测血清凝集效价、血清中溶菌酶活性和酸性磷酸酶活性; 二次免疫 28 d 后, 对免疫组和对照组同时腹腔注射嗜水气单胞菌进行攻毒, 观察鲫鱼生长状况, 记录死亡率。结果表明, 免疫组血清凝集效价在免疫后逐渐升高, 在 21 d 达到峰值, 明显高于对照组; 血清中溶菌酶活性和酸性磷酸酶活性都于免疫后 14 d 达到峰值, 明显高于对照组; 攻毒结果显示, 免疫组死亡率 10.0%, 对照组死亡率 83.7%, 相对保护率达到 88.5%。说明制备的嗜水气单胞菌灭活疫苗可以诱导鲫鱼产生免疫应答反应, 对嗜水气单胞菌的感染具有较好的免疫保护作用。

关键词:嗜水气单胞菌; 疫苗; 免疫保护; 鲫鱼; 血清凝集效价; 溶菌酶; 酸性磷酸酶

中图分类号: S942.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)04-0168-04

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 属于 γ -变形菌纲气单胞菌目气单胞菌科气单胞菌属^[1-2]。嗜水气单胞菌是水产养殖中多种疾病的病原菌, 广泛存在自然水体与养殖水体中, 在池塘水质恶化、养殖对象体质下降时往往诱发疾病, 给水产养殖带来重大损失^[3-5]。嗜水气单胞菌是一种重

要的淡水养殖病原菌, 可以感染多种水产动物, 其中以细菌性败血症最为严重, 一般表现为体表和鳍条充血、肛门红肿、腹部肿胀、有腹水等^[6-7]。该病在每年的 6—9 月高发, 暴发迅速, 一旦暴发往往造成巨大的损失。目前, 治疗嗜水气单胞菌引起的疾病主要还是依靠内服抗生素和外用消毒剂来控制, 但是, 抗生素和消毒剂的长期不合理使用容易产生耐药菌株^[8-9], 同时抗生素和消毒剂在鱼体内残留也导致了食品安全问题。因此, 寻找安全有效的方法控制细菌性疾病对水产养殖及食品安全方面具有重要意义。

运用免疫学方法, 制备细菌疫苗, 是控制细菌

收稿日期: 2019-01-09

基金项目: 国家大宗淡水鱼产业体系上海综合试验站海丰农场示范片(编号: CARS-46-30-6)。

作者简介: 祭仲石(1989—), 男, 江苏盐城人, 硕士, 水产工程师, 主要从事水产养殖疾病检测与防治工作。E-mail: 973691132@qq.com。

[6] 严大明, 刘小帅, 杨淞, 等. 重口裂腹鱼鳞片发育和覆盖过程[J]. 动物学杂志, 2014, 49(3): 391-398.

[7] 李忠利, 陈永祥, 胡思玉, 等. 四川裂腹鱼和重口裂腹鱼形态差异的多元分析[J]. 动物学杂志, 2015, 50(4): 547-554.

[8] 陈永祥, 罗泉笙. 四川裂腹鱼繁殖生态生物学研究(续) II 胚胎发育的研究[J]. 毕节师专学报, 1994(4): 1-7.

[9] 陈永祥, 罗泉笙. 乌江上游四川裂腹鱼的胚胎发育[J]. 四川动物, 1997(4): 163-167.

[10] 吴青, 王强, 蔡礼明, 等. 松潘裸鲤的胚胎发育和胚后仔鱼发育[J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(3): 276-279.

[11] 向成权, 曾如奎, 邓龙君, 等. 细鳞裂腹鱼人工催产及胚胎发育观察[J]. 现代农业, 2018(8): 78.

[12] 吴青, 王强, 蔡礼明, 等. 齐口裂腹鱼的胚胎发育和仔鱼的早期发育[J]. 大连水产学院学报, 2004, 19(3): 218-221.

[13] 左鹏翔, 李光华, 冷云, 等. 短须裂腹鱼胚胎与仔鱼早期发育特性研究[J]. 水生生态学杂志, 2015, 36(3): 77-82.

[14] 刘阳, 朱挺兵, 吴兴兵, 等. 短须裂腹鱼胚胎及早期仔鱼发育观察[J]. 水产科学, 2015, 34(11): 683-689.

[15] 刘小帅, 王红梅, 甘维熊, 等. 雅砻江长丝裂腹鱼胚胎形态发育及仔鱼生长研究[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(31): 118-121.

[16] 冷云, 徐伟毅, 刘跃天, 等. 小裂腹鱼胚胎发育的观察[J]. 水利渔业, 2006, 26(1): 32-33.

[17] 蔡林钢, 牛建功, 张北平, 等. 伊犁裂腹鱼胚胎及早期仔鱼发育的观察[J]. 淡水渔业, 2011, 41(5): 74-79.

[18] 龚小玲, 崔忠凯, 吴敏芝, 等. 塔里木裂腹鱼胚胎和仔鱼的发育与生长[J]. 上海海洋大学学报, 2013, 22(6): 827-834.

[19] 申安华, 李光华, 赵树海, 等. 光唇裂腹鱼胚胎发育与仔鱼早期发育的研究[J]. 水生生态学杂志, 2013, 34(6): 76-80.

性疾病最有效的途径。疫苗是由病原微生物制成,常用的有灭活疫苗和弱毒疫苗,灭活疫苗安全性好、制备容易,但其表面部分抗原成分被破坏,所以免疫效果不佳;而弱毒疫苗是由弱毒株制备,免疫效果好,但弱毒疫苗是活菌,存在毒力恢复的风险,所以弱毒疫苗须谨慎使用^[10]。水产中常用灭活疫苗免疫养殖鱼类,近年来多项研究表明,嗜水气单胞菌灭活疫苗可以使鱼类取得较好的免疫效果^[11-14]。本试验以鲫鱼为研究对象,使用甲醛灭活的嗜水气单胞菌作为抗原,对鲫鱼进行免疫,定期测定鲫鱼血清凝集效价和免疫保护率,旨在为鲫鱼细菌性出血病的防控提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验鱼

从江苏省盐城市大丰区某鲫鱼养殖场采购健康鲫鱼,规格 50 g 左右,体表正常,无损伤。于实验室暂养 1 周,水温(20±0.5)℃,溶氧含量≥5 mg/L,每天投喂配合饲料 2 次,及时清除粪便、残饵。

1.2 疫苗制备

试验用嗜水气单胞菌于 2018 年分离自大丰某发病塘口,编号 HFHL-3-24。将菌种接种于脑心浸液(BHI)液体培养基中,30℃培养 24 h,离心法收集菌体,使用灭菌的磷酸缓冲液(PBS)调节菌液浓度至 1 亿 CFU/mL。在菌液中添加甲醛,使甲醛终浓度为 0.2%,30℃培养 24 h,经过涂板验证彻底灭活后,离心法收集菌体,使用 PBS 清洗 2~3 次,最终调节浓度至 1 亿 CFU/mL,即制出嗜水气单胞菌疫苗,置于 4℃保存备用。

1.3 疫苗安全性检测

在超净工作台中吸取 100 μL 制备好的嗜水气单胞菌灭活疫苗,涂布于 BHI 固体培养基上,设置 3 个重复,30℃培养 48 h,观察是否有菌落形成。取 30 尾鲫鱼腹腔注射疫苗 0.2 mL,另取 30 尾注射 0.2 mL PBS 作为对照,观察 2 周。

1.4 免疫与血清收集

将暂养后的鲫鱼随机分为 2 组,每组 50 尾,分别于 200 L 水族缸中进行试验。免疫组鲫鱼每尾注射制备的灭活疫苗 0.2 mL,对照组每尾注射等量的 PBS,第 1 次免疫 7 d 后进行二次免疫,然后分别在 1、7、14、21、28 d 随机从免疫组和对照组中取 5 尾鲫鱼,尾柄静脉取血,将血液放置于室温下 2 h,然后放置于 4℃冰箱 6~8 h,4℃下 4 000 r/min 离心

10 min,收集上层血清,-20℃保存备用。

1.5 血清溶菌酶(LZM)和酸性磷酸酶(ACP)活力测定

按照南京建成生物工程研究所试剂盒说明书操作测定免疫组和对照组血清 LZM 和 ACP。

计算公式为:

$$\text{LZM 活力} = \text{测定管}(D_2 - D_1) \div \text{标准管}(D_2 - D_1) \times \text{标准管浓度}(200 \text{ U/mL}) \times \text{样本稀释倍数}, \text{U/mL}。$$

$$\text{ACP 活力} = \text{测定管} D \div \text{标准管} D \times \text{标准管酚含量}(0.005 \text{ mg}) \times (100 \text{ mL} \div 0.05 \text{ mL}), \text{U}/100 \text{ mL}。$$

1.6 血清凝集效价

参考吴学婧等的方法^[10],使用 96 孔 U 型板进行血清凝集效价测定。在 U 型板 1~12 孔中加入 100 μL PBS,在第 1 孔中加入 100 μL 血清,混匀后依次向后进行 2 倍稀释,最后每孔加入 100 μL 的灭活疫苗,混匀后放置于 37℃恒温培养箱 2 h,4℃过夜,观察凝集效果。凝集效果判定:“++”表示 100%凝集,凝集颗粒明显,液体透明;“+”表示 50%凝集,液体较混浊;“-”表示未凝集,液体混浊。出现“+”以上的血清最大稀释度为凝集效价。

1.7 免疫保护率测定

在二次免疫后 28 d,从免疫组和对照组中随机取 30 尾鲫鱼,每尾鱼腹腔注射 0.2 mL 嗜水气单胞菌(1 亿 CFU/mL),每天记录死亡量,观察 2 周并统计各组的死亡率,计算出相对免疫保护率。免疫保护率(RPS)=(1-免疫组死亡率/对照组死亡率)×100%。

2 结果与分析

2.1 疫苗安全性

将制备的疫苗涂布于 BHI 固体培养基上,作 3 个平行,28℃放置 48 h 后,3 个平板上均未出现明显菌落,说明嗜水气单胞菌已完全灭活。鲫鱼注射疫苗 2 周内生活良好,未见明显发病症状和死亡,说明制备的疫苗安全性较好,可以用于后续的试验。

2.2 LZM 活力随时间变化

鲫鱼二次免疫后,血清中 LZM 活力变化如图 1 所示。可以看出,免疫组血清中 LZM 活力逐渐上升,在免疫后 14 d 达到最高值(188.6 U/mL),然后逐渐下降;对照组血清中溶菌酶活力无明显变化,一直处于较低的水平,免疫组 LZM 活力 14 d 后开始明显高于对照组。

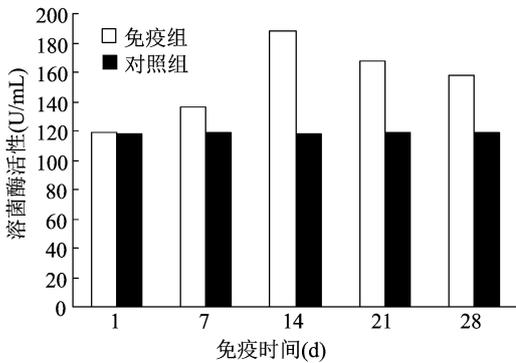


图1 LYM 活力随免疫时间的变化

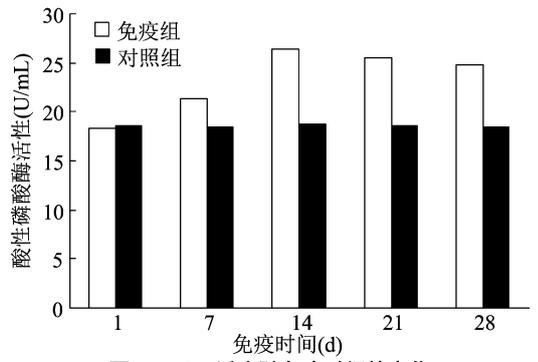


图2 ACP 活力随免疫时间的变化

2.3 ACP 活力随时间变化

鲫鱼二次免疫后,免疫组血清中 ACP 活力在免疫后逐渐上升,在免疫后 14 d 达到最高值 (26.4 U/mL),然后趋于稳定,有缓慢下降;对照组血清中 ACP 活力无明显变化,且一直处于较低的水平,免疫组 ACP 活力免疫后 7 d 开始明显高于对照组(图 2)。

2.4 血清凝集效价

鲫鱼注射嗜水气单胞菌疫苗后,其血清抗体凝集效价见表 1。结果表明,免疫组鲫鱼血清对嗜水气单胞菌具有明显的凝集作用,免疫组鲫鱼在二次免疫后,其血清凝集效价逐渐上升,在 21 d 达到最大值(1:512);对照组鲫鱼的血清凝集效价一直处于较低的水平(1:4),免疫组明显高于对照组。

表 1 嗜水气单胞菌灭活疫苗对鲫鱼血清抗体效价的影响

时间(d)	分组	稀释倍数											
		2	4	8	16	32	64	128	256	512	1 024	2 048	4 096
1	免疫组	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	对照组	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	免疫组	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	对照组	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	免疫组	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
	对照组	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	免疫组	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-
	对照组	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	免疫组	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-
	对照组	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.5 免疫保护率

二次免疫后 28 d,使用嗜水气单胞菌对免疫组和对照组鲫鱼进行攻毒感染试验,攻毒后饲养 2 周。由表 2 可知,攻毒 2 周后,免疫组鲫鱼死亡 3 尾,死亡率 10.0%;对照组鲫鱼死亡 26 尾,死亡率 86.7%。由免疫保护率公式计算得,嗜水气单胞菌 HFHL-3-24 对鲫鱼的免疫保护率为 88.5%。

表 2 嗜水气单胞菌对鲫鱼攻毒结果

分组	试验鱼数量(尾)	死亡量(尾)	死亡率(%)
免疫组	30	3	10.0
对照组	30	26	86.7

3 讨论

鱼类具有相对完善的免疫系统,主要免疫器官

是胸腺、肾脏和脾脏,鱼类的免疫系统可以对接种的疫苗产生一定的非特异性免疫和特异性免疫反应,从而保护鱼体,阻止病原菌的入侵^[15-17]。

鱼类血清中具有多种体现免疫力的酶,溶菌酶和酸性磷酸酶活性是体现鱼体免疫力的重要指标,通过检测酶活性可以了解鱼体的免疫能力。周勇等对施氏鲟免疫注射灭活嗜水气单胞菌疫苗后发现,施氏鲟血清中的溶菌酶和酸性磷酸酶活性分别在免疫后 7 d 和 14 d 达到峰值,极显著高于对照组^[18];孙金辉等研究嗜水气单胞菌灭活疫苗对虹鳟免疫力和抗病力的影响时发现,嗜水气单胞菌灭活疫苗可以提高虹鳟血清溶菌酶活力,虹鳟免疫后 14 d 显著高于对照组,在 21 d 时达到最大值^[11];毛会丽等研究发现,嗜水气单胞菌灭活疫苗可以极大地提高溶菌酶和酸性磷酸酶活性^[19]。本研究表明,

鲫鱼在注射嗜水气单胞菌灭活疫苗 7 d 后,溶菌酶和酸性磷酸酶活性明显增强,随着时间推移不断增加,在 14 d 达到最高峰,随后逐渐下降,到 28 d 时仍然明显高于对照组,说明嗜水气单胞菌灭活疫苗有效促进了血清中溶菌酶和酸性磷酸酶活性,增强了鲫鱼的非特异性免疫效果。

血清凝集效价是判断血清中抗体水平的一项指标,周勇等对施氏鲟免疫注射灭活嗜水气单胞菌疫苗后发现,血清抗体效价于免疫后 21 d 达到 1:203 的峰值,显著高于对照组^[18]。刘迅猛使用 0.3% 甲醛灭活疫苗免疫鲫鱼后,血清抗体效价持续增高,在 49 d 达到最高值,然后开始下降^[20]。本研究结果表明,免疫 7 d 后,即可见血清凝集效价明显高于对照组,在 21 d 达到最高值,到试验结束未见明显下降,与其他研究结果略有差异,可能是不同嗜水气单胞菌菌株的抗原决定簇不同和灭活条件不同等因素造成的。孙金辉等将嗜水气单胞菌疫苗免疫虹鳟后发现,嗜水气单胞菌灭活疫苗对虹鳟有较高的免疫保护作用,免疫保护率达到 71.43%^[11];蒋启欢等研究表明,采用腹腔注射的方式,嗜水气单胞菌疫苗对草鱼的免疫保护率达到 90%^[12]。本研究的攻毒结果显示,嗜水气单胞菌灭活疫苗对鲫鱼有较强的免疫保护作用,相对免疫保护率为 88.5%,与相关研究结果相一致。

嗜水气单胞菌是常见的水产致病菌,而抗生素和消毒剂的大量使用容易产生耐药菌株,同时抗生素在鱼体内残留也导致了食品安全问题。因此,应用免疫学原理,研究水产养殖用防控细菌性疾病的疫苗,对水产养殖的健康发展具有重要意义。本研究说明本方法制备的嗜水气单胞菌可以诱导鲫鱼产生非特异性和特异性免疫应答反应,对嗜水气单胞菌的感染具有较好的免疫保护作用,后期还需对免疫途径、免疫期和佐剂等进行研究,以期寻找适合当地大面积生产使用的灭活疫苗。

参考文献:

[1] 李莉,陈颖,张超,等. 水产动物气单胞菌鉴定方法研究进展[J]. 水产科学,2015,34(2):128-134.
[2] Chopra A K, Houston C W, Peterson J W, et al. Cloning, expression, and sequence analysis of a cytolytic enterotoxin gene from *Aeromonas*

hydrophila [J]. Canadian Journal of Microbiology, 1993, 39(5): 513-523.
[3] 秦杨蕾,毛芝娟,钱国英. 嗜水气单胞菌及其免疫防控措施的研究进展[J]. 浙江万里学院学报,2015,28(6):77-81.
[4] Aguilera - Arreola M G, Hernandez - Rodriguez C, Gerardo Z, et al. *Aeromonas hydrophila*, clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes [J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 242(2): 231-240.
[5] 王玉堂,陈昌福,吕永辉. 水产养殖动物致病菌耐药性检测数据实际作用[J]. 中国水产,2013(10):57-61.
[6] 张运强,李庆乐. 嗜水气单胞菌的致病性及其防治方法[J]. 广西农业科学,2007,38(5):565-568.
[7] 沈锦玉. 嗜水气单胞菌的研究进展[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版),2008,27(1):78-86.
[8] 任玉水,曹建亭,李茂启,等. 药敏试验在水产养殖病害防治中的应用技术研究[J]. 渔业致富指南,2006(5):54-55.
[9] Cabello F C, 张红林,何力. 水产养殖业预防性抗生素的大量使用:一个日益严重的人与动物健康以及环境问题[J]. 淡水渔业,2016,46(6):109-112.
[10] 单晓枫,高云航,李影,等. 鱼用疫苗研究进展[J]. 中国兽药杂志,2005,39(11):23-26.
[11] 孙金辉,王庆奎,陈成勋,等. 嗜水气单胞菌灭活疫苗对虹鳟免疫力和抗病力的影响[J]. 淡水渔业,2013,43(1):44-49.
[12] 蒋启欢,叶应旺,胡王,等. 草鱼嗜水气单胞菌 L1 灭活疫苗培养条件的优化[J]. 生物技术进展,2012,2(3):206-211.
[13] 任燕,张德峰,孙承文,等. 鱼源嗜水气单胞菌疫苗生产菌株与分离株的抗原性分析[J]. 中国预防兽医学报,2015,37(3):207-210.
[14] Delamare A L, Echeverrigaray S, Duarte K R, et al. Production of a monoclonal antibody against *Aeromonas hydrophila* and its application to bacterial identification [J]. Journal of Applied Microbiology, 2002, 92(5): 5.
[15] 张媛媛,宋理平. 鱼类免疫系统研究进展[J]. 河北渔业,2018(2):49-56.
[16] 李凤铃,李兆新,翟毓秀,等. 鱼类适应性免疫系统研究概述[J]. 水产科学,2012,31(4):240-244.
[17] 张永安,聂品. 鱼类体液免疫因子研究进展[J]. 水产学报,2000,24(4):376-381.
[18] 周勇,史玉恒,赵建青,等. 嗜水气单胞菌灭活疫苗免疫施氏鲟后的免疫应答反应与保护效果[J]. 中国水产科学,2018(1):195-203.
[19] 毛会丽,关建义,贺文旭,等. 嗜水气单胞菌灭活疫苗对银鲫的免疫效果研究[J]. 中国免疫学杂志,2014(11):1499-1503,1507.
[20] 刘训猛. 江苏地区嗜水气单胞菌血清型多样性分析及灭活疫苗研发[D]. 南京:南京农业大学,2016.