

嗜水气单胞菌和河弧菌二联疫苗对鲫的免疫效果

李爱华 吴玉深 蔡桃珍 卢全章

(中国科学院水生生物研究所; 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要:在采用正交试验设计优化了 *Aeromonas hydrophila* 和 *Vibrio fluvialis* 二联全菌疫苗制备工艺的基础上, 研究了采用该工艺所制备的疫苗对鲫的免疫保护效果。结果表明注射免疫鲫4周后, 抗 *A. hydrophila* 和 *V. fluvialis* 血清凝集效价分别为: 1 4—1 32 和 1 2—1 16, 平均都为 1 10, 但对攻毒均具有有效的保护作用。浸泡免疫、高渗浸泡免疫或加多糖浸泡免疫在免疫4周后, 对 *A. hydrophila* 攻毒均无保护作用; 然而, 加多糖浸泡免疫对 *V. fluvialis* 攻毒可产生有效的保护。免疫扩散试验表明, 在煮沸并经超声波处理后的 *A. hydrophila* 或 *V. fluvialis* 菌液中均存在两种优势抗原。

关键词: 二联疫苗; 嗜水气单胞菌; 河弧菌; 鲫

中图分类号: S941.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2002)01-0052-005

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila* (Chester) Stanier) 和河弧菌(*Vibrio fluvialis* (Lee et al.) Jensen et al.) 是淡水养殖鱼类细菌性出血性败血症(Bacterial haemorrhagic septicemia) 的两种主要病原。它们引起的感染症状、流行病学特征很相近, 且死亡率高, 目前该病在我国仍相当严重。多年来, 此病的防治主要依赖抗菌药物, 但随着社会的发展, 这将受到越来越严厉的限制, 因此疫苗的开发与使用已成为必然趋势。实际上, 在过去的10—20年间, 接种疫苗预防养殖鱼类传染性疾病已经取得巨大成功。如 *A. salmonicida*、*Vibrio sp.*、*Yersinia sp.* 等多种疫苗已商业化。而且不久的将来巴斯德菌病(Pasteurellosis) 和链球菌病(Streptococcosis) 也有望通过免疫预防得到控制。*A. hydrophila* 感染的免疫预防虽也取得不同程度的成功, 并且力图在基因工程改良的弱毒疫苗、亚单位疫苗等方面有所突破^[1-3], 但尚未见商品化。而且试验中的疫苗, 以单价苗居多, 多联疫苗少见。鉴于 *A. hydrophila* 和 *V. fluvialis* 可引起同一种疾病, 因此研制二联疫苗就成为必然。为此, 研究了该二联疫苗对鲫的免疫保护效果。

1 材料与方法

1.1 试验菌株 *Aeromonas hydrophila* XS91-4-1 和 *Vibrio fluvialis* WY91-24-3, 均由本实验室分离、保存, 具有很强的毒力^[4]。普通肉汤和营养琼脂用于细菌的活化与培养。

收稿日期: 2000-11-20; 修订日期: 2000-12-20

基金项目: 中国科学院知识创新工程项目 KSCX 2-1-04; 生物学及生物技术特别支持费资助

作者简介: 李爱华(1963-), 男, 江西南昌人; 博士, 副研究员; 主要从事鱼类细菌学和免疫学研究

1.2 试验鱼 鲫 (*Carassius auratus* Linnaeus), 体重为 $23.05 \pm 10.2\text{g}$, 水温为 $21\text{—}25$, 免疫接种前已驯养 2 周, 驯养及免疫接种期间均投喂商品饵料, 微流水养殖。

1.3 疫苗的制备 两种细菌经扩大培养后, 收集菌体, 用生理盐水配成 2% 的菌悬液。两菌按 2 : 1 的比例混合后, 加入福尔马林至所需终浓度, 在一定温度下灭活, 并作活菌检查。免疫接种前, 用 PBS 洗 2 次, 以除去福尔马林, 最后用 PBS 定容至原体积。疫苗中菌体总浓度为 2.4×10^9 cfu/ mL (比浊法测定)。

1.4 鲫的浸泡免疫和注射免疫 根据上述方法制备的二联疫苗, 对鲫进行免疫试验。试验分 5 组, 第 1 组为常规方法浸泡, 疫苗终浓度为 2.4×10^7 cfu/ mL, 浸泡时间为 2 min; 第 2 组为高渗浸泡, 试验鱼先在 6% 的盐水溶液中浸泡 2 min, 然后在与上述相同疫苗溶液中浸泡 2 min; 第 3 组为高渗浸泡加多糖免疫组, 试验鱼先按上述方法高渗浸泡, 然后转入到加有 0.1g/L 多糖的疫苗溶液中浸泡 2 min; 第 4 组为腹腔注射组, 注射剂量为 0.4mL/尾; 第 5 组为对照组, 只用 6% 盐溶液浸泡 2 min, 然后在自来水中再浸泡 2 min。免疫期限为 4 周。

1.5 攻毒试验 经预试验确定的 *A. hydrophila* 与 *V. fluvialis* 攻毒菌量分别为: 6×10^5 cfu/尾和 6×10^4 cfu/尾, 每尾鱼注射 0.2mL。每组试验鱼数为 15 尾, 用两种病原菌分别攻毒。记录攻毒后 10 d 内各组的死亡数。相对百分成活率 (Relative Percent Survival) 按下列公式计算^[5]:

$$\text{RPS} = \{1 - (\text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率})\} \times 100\%$$

1.6 血样采集 免疫 4 周后, 从注射免疫组、单纯浸泡免疫组及未免疫组各取 6 尾鱼, 采血, 常规方法分离血清。

1.7 凝集效价的测定 采用微量稀释法, 测定其 *A. hydrophila* 和 *V. fluvialis* 的凝集效价。

1.8 免疫扩散试验 在用 PBS 配制的 1.2% 琼脂糖中进行。O-抗原 (O-antigen) 及兔抗 O-抗原血清 (Rabbit anti-O sera) 的制备参照有关文献^[6]。

2 结果

2.1 不同免疫方式的免疫保护作用 对优化工艺制备的疫苗进行了浸泡免疫、高渗浸泡免疫、添加多糖后的浸泡免疫以及注射免疫 (单次注射, 未加佐剂) 等不同方式免疫效果的比较试验。浸泡免疫时间均为 2 min, 免疫 4 周后测得的保护率见图 1。注射免疫组, 对 *A. hydrophila* 的攻毒保护率为 61.5%, 对 *V. fluvialis* 的攻毒保护率为 90%; 浸泡免疫组, 除加多糖的高渗浸泡可产生对 *V. fluvialis* 的有效免疫保护外, 其它形式的浸泡免疫都不能产生有效的保护作用。

2.2 血清抗体效价 免疫 4 周后, 鲫血清中抗 *A. hydrophila* 和抗 *V. fluvialis* 的凝集效价分别为 1 : 10.8 (1 : 4—1 : 32) 和 1 : 9.8 (1 : 2—1 : 16) (图 2)。但是免疫接种时若以氟氏不完全佐剂, 则效价明显升高, 免疫接种两周后即达到 1 : 40—1 : 80 (结果另报道)。

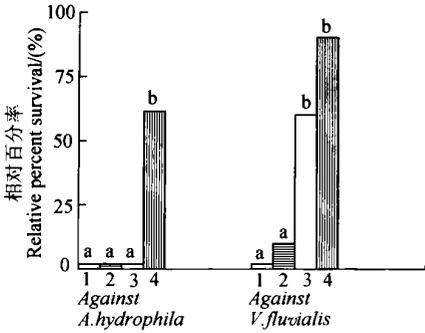


图 1 不同方式免疫后鲫对两种细菌感染的相对免疫保护率

Fig. 1 RPS of crucian carp immunised with the bivalent vaccine against 2 bacteria by different means

注: 带有不同字母的平均值之间差异显著
Means with different letters are significantly different $p < 0.05$ or $p < 0.01$
1. 常规浸泡; 2. 高渗浸泡;
3. 高渗+ 多糖; 4. 腹腔注射

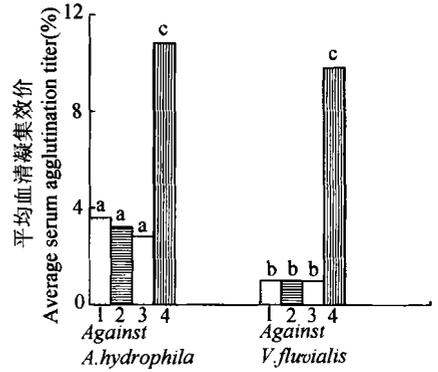


图 2 不同方式免疫后, 鲫对两种细菌的血清凝集效价

Fig. 2 Serum agglutination titers of *c. auratus* against 2 bacteria after different types of vaccinations (n = 6)

1. 常规浸泡; 2. 高渗浸泡; 3. 高渗+ 多糖; 4. 腹腔注射

2. 3 免疫扩散试验结果 从图 3 可以看出, 在 *V. fluvialis* 疫苗中存在两种主要免疫原, 而在 *A. hydrophila* 疫苗中存在一个主要和一个次要免疫原。而且, 在两种细菌的胞外产物中存在多种具有免疫原性的蛋白成分, 其分子量明显比菌体抗原的分子量大。而且 *A. hydrophila* 与 *V. fluvialis* 的主要抗原之间无交叉反应。免疫扩散实验结果还显示, 采用福而马林灭活和反复冻融加超声波处理使菌体细胞破碎等两种方法制备的疫苗, 在主要抗原的种类上不存在差别。另外, 免疫鱼血清对两种抗原的免疫扩散均未出现可见的沉淀线, 这很可能是由于血清中的抗体效价太低的缘故。

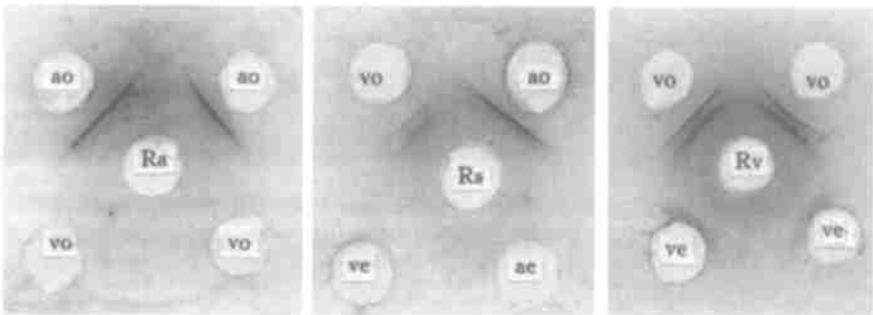


图 3 嗜水气单胞菌(Ah)和河弧菌(Vf)的 O 抗原(ao 和 vo)及胞外产物(ae 和 ve)对兔抗 Ah 血清(Ra)、兔抗 Vf 血清(Rv)以及两种血清的混合物(Rs)的免疫扩散

Fig. 3 Immunodiffusion of O antigens (ao and vo) and ECP(ae and ve) of *A. hydrophila* (Ah) and *V. fluvialis* (Vf) against rabbit anti-Ah serum (Ra), rabbit anti-Vf serum (Rv) and the mixture of the 2 anti-sera (Rs)

3 讨论

气单胞菌属的细菌是淡水水体中微生物区系的恒定组成部分, 在水体中它们与其它

的微生物一道共同起着天然生物滤器和促进水体自我净化的作用。但因在水产养殖,特别是鱼类养殖条件下常引起流行病,故而越来越受到研究人员的重视。虽然 *A. hydrophila* 对许多药物敏感,但在实际应用中药物并不有效,疫苗的开发与应用将是必然的趋势。然而 *A. hydrophila* 的疫苗一直处于实验阶段,且进展缓慢,尚无商业制品。主要障碍是其血清型的多样性,以及缺乏标准化的重复性好的实验攻毒方法,以评估疫苗的有效性。此外,*A. hydrophila* 感染已不是欧美等发达国家的水产养殖的主要问题,加之在温水养殖中使用疫苗经济上是否合算?也是阻碍 *A. hydrophila* 疫苗发展的重要原因。所以,有关 *A. hydrophila* 疫苗研究的文献相对于其它重要细菌,如 *A. salmonicida*、*V. anguillarum*、*V. ordalii*、*Edwardsiella ictaluri* 等来说是非常少的。

本研究中,采用强毒株按照优化工艺制备二联疫苗(根据有关资料分析,其中菌株的 *A. hydrophila* XS 91-4-1 属于杂交组 HG2 血清型为 O 97),比较了该二联疫苗几种不同免疫方法所产生的免疫效果。其中,腹腔注射免疫产生最好的免疫效果,浸泡免疫的效果不甚理想。特别是 *A. hydrophila* 疫苗,采用浸泡或高渗免疫,或高渗免疫佐以多糖免疫均不能产生有效的保护作用。但是可以检测出与对照相比明显升高的血清凝集效价(这也证明凝集效价与保护率并不直接相关)。如果在疫苗制备过程中保留胞外产物,免疫保护率也没有显著的改善(结果未显示)。Post^[7] 给虹鳟鱼注射不加佐剂的热灭活 *A. hydrophila* 全菌疫苗,保护率也只有 62.5%;Schacte^[8] 采用皮下注射免疫 Channel catfish,保护率只有 37.5%,而口服和浸泡方式免疫完全无效。Lamers 等^[9] 采用免疫荧光技术研究 *A. hydrophila* 在鲤鱼淋巴器官中的定位,发现若采用浸泡免疫,在淋巴器官中根本检测不到抗原。当然,可能正是由于上述原因,使得有关 *A. hydrophila* 疫苗的免疫效果存在许多相矛盾的报道^[10-12]。新加坡国立大学的研究人员已经克隆了 *A. hydrophila* 粘附因子的基因,并以可溶性蛋白的形式进行大量表达。以此蛋白制备的疫苗对不同血清型的 *A. hydrophila* 以及几种不同的细菌均可产生有效的保护,从而克服了 *A. hydrophila* 血清型多样性对疫苗开发的制约问题。该成果已在美国申请专利。

如果高渗免疫佐以多糖,则对河弧菌疫苗可产生 60% 的相对免疫保护率,但是其血清凝集效价却不见升高,这说明多糖的作用在于促进机体的非特异性免疫,而不是特异性免疫。免疫鱼血清对两种抗原的凝集效价均只有 1:10 左右,所以在免疫扩散中不能显现出沉淀线。其他学者检测到的凝集效价也很低^[13]。

此外,免疫扩散试验中,尽管所用的抗原是 O 抗原,抗体是用细菌 O 抗原制备的兔抗血清,但沉淀线是否就是 O 抗原所为,尚不能肯定。

参考文献:

- [1] Hernanz MC, Flano del CE, Lopez, et al. Molecular characterization of the *Aeromonas hydrophila* aroA and potential use of an auxotrophic aroA mutant as a live attenuated vaccine[J]. *Infect Immun*, 1998, **66**(5): 1813 - 1821
- [2] Lutwyce P, Exner MM, Habcock RE, et al. A conserved *Aeromonas salmonicida* porin provides protective immunity to rainbow trout[J]. *Infect Immun*, 1995, **63**: 3137- 3142
- [3] Dooiev JGS, Lallier R, Trust TJ. Surface antigens of virulent strains of *Aeromonas hydrophila* [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1986, **12**: 339- 344

- [4] 徐伯亥, 殷战, 吴玉深, 等. 淡水养殖鱼类爆发性传染病致病菌的研究[J]. 水生生物学报, 1993, 17: 259—265
- [5] Lorenzen N, Lorenzen E, et al. Protective immunity to VHS in rainbow trout following DNA vaccination [J]. *Fish & shellfish immunol*, 1988, 8: 261— 270
- [6] Leblanc D, Mittal KR, Olivier G, et al. Serogrouping of motile *Aeromonas hydrophila* isolated from healthy and moribund fish [J]. *Appl and Environ Micro*, 1981, 42(1): 56— 60
- [7] Post G. Response of rainbow trout to antigens of *Aeromonas hydrophila* [J]. *J Fish Res Bd Can*, 1966, 23: 1487— 1494
- [8] Schacte JH. Studies on the immunization of the channel catfish against two bacterial pathogens [D]. Ph. D. Thesis, Auburn University, Auburn AL, 1— 89
- [9] Lamers CH & De Haas M J. Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Cell Tissue Res*, 1985, 242A(3): 491— 498
- [10] Ruangapan L, Kitao T, Yoshida T. Protective efficacy of *Aeromonas hydrophila* vaccines in Nile tilapia [J]. *Vet. Immunol Immunopathol*, 1986, 12: 345— 350
- [11] Baba T, Imamura J, Izawa K, Ikeda K. Cell-mediated protection in carp against *Aeromonas hydrophila* [J]. *J Fish Dis*, 1988, 11: 171— 178
- [12] Kurunasagar I, Rosalind G. Immunological response of the Indian major carps to *Aeromonas hydrophila* vaccine [J]. *J Fish Dis*, 1991, 14: 413— 417
- [13] 陈月英, 钱冬, 沈智华, 等. 淡水鱼类细菌性败血症菌苗浸泡免疫研究[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(6): 597—603

DEVELOPMENT AND IMMUNE EFFICACY OF A BIVALENT ANTI-*AEROMONAS HYDROPHILA* AND ANTI-*VIBRIO FLUVIALIS* VACCINE IN *CARASSIUS AURATUS* LINNAEUS

LI Ai-hua, WU Yu-shen, CAI Tao-zhen and LU Quan-zhang

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences;

State key laboratory of freshwater ecology and biotechnology, Wuhan 430072)

Abstract: *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio fluvialis* are the causative agents pathogenic bacterial of haemorrhagic septicemia of a variety of farmed fish in China. A bivalent vaccine against these two pathogens was being developed by an orthogonal array design. The optimized bivalent vaccine could elicit effective protection from experimental challenge of *A. hydrophila* for *C. auratus* 4 weeks after immunized by i. p injection, but not by neither immersion vaccination nor hyperosmotic infiltration with or without supplement of polysaccharide. The vaccine was also protective against the challenge of *V. fluvialis* when fish was immunized by i. p injection and immersion vaccination plus polysaccharide. At challenge time, serum agglutination titers from fish injected with the bivalent vaccine were $1 \ 4-1 \ 32$, $1 \ 2-1 \ 16$, results of immunodiffusion indicated that there were two dominant antigens in boiled and sonicated *V. fluvialis* and *A. hydrophila* vaccine.

Key words: Bivalent vaccine; *Aeromonas hydrophila*; *Vibrio fluvialis*; *Carassius auratus*