

研究简报

鳖嗜水气单胞菌疫苗的试制

THE PREPARATION OF *AEROMONAS HYDROPHILA* VACCINE TO SOFT SHELLED TURTLE

孙玉华

SUN Yu-Hua

(上海水产大学渔业学院, 200090)

(College of Fisheries, SFU, 200090)

关键词 鳖, 嗜水气单胞菌, 疫苗

KEYWORDS soft shelled turtle, *Aeromonas hydrophila*, vaccine

中图分类号 S947.1

嗜水气单胞菌能引起人和动物的疾病。我国的许多淡水鱼类的暴发病病原是嗜水气单胞菌[孙其焕等 1991, 陈怀青和陆承平 1991]。暴发病的流行造成巨大的经济损失, 严重影响了我国渔业的发展。近年来各种名特水产品的养殖也正在受这种细菌的危害[孙佩芳等 1996, 陆宏达和金丽华 1996]。一味地应用抗生素及化学药物将会带来很多不良后果, 且效果不很明显。因此开发一种有效的疫苗势在必行。国外商品性鱼用疫苗在七十年代中已开始生产, 国内也在研究试制[杨先乐等 1989, 许淑英等 1994, 孙建和和陆承平 1995]。本实验室人员从患穿孔病的鳖上分离到一嗜水气单胞菌强毒菌株 Ah-9551。鳖一旦得了穿孔病, 轻者身上出现很多孔洞, 重者大量死亡, 损失严重。用此菌株制备疫苗, 如在生产实践中能通过有效的免疫途径, 将会对鳖病的预防带来一定好处。

1 材料与方 法

1.1 试验用菌种及动物

试验用菌种经鉴定为嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)9551菌株, 简称 Ah-9551。小鼠每只重约 25g, 购自上海贵宝实验动物中心。鳖每个重约 30g, 购自上海郊区某养鳖厂。玻璃缸中驯养一周后进行试验, 循环水, 30℃ 水温, 定时投放饵料及清除排泄物。

1.2 疫苗的制备

选择健康活鳖做 Ah-9551 菌株的复壮, 将发病刚死的鳖立即解剖, 用其肝脏做平板划线, 28℃ 培养 18h, 挑取单菌落再通过纯化, 斜面接种培养备用。将复壮过的 Ah-9551 菌株接种肉汤蛋白胨液体培养基, 摇床培养 110rpm, 28℃, 26h, 计数后全部培养物用 0.2% 的甲醛 37℃ 灭活 72h [陈月英等 1996], 再加 1% 的亚硒酸钠维生素 E 注射液为免疫增强剂, 制得全菌疫苗。用常规方法进行无菌检测, 同时用两倍于使用浓度的全菌苗腹腔注射, 检测疫苗的安全性。疫苗 4℃ 保存。

1.3 小鼠的免疫保护试验

将 20 只小鼠分四组, 按内插法计算 LD₅₀ [邱郁春 1992]。另将 12 只小鼠随机分成两组: 全菌疫苗免疫组和生理盐水对照组。初次免疫两周后加强免疫, 加强后四周用 50LD₅₀ 的 Ah-9551 菌株攻击, 观察三天, 记录发病死亡情况。小鼠抗体动态检测按照 [兰州生物制品研究所 1980] 微量凝集法。免疫剂量为 10⁹ 个菌/只, 生理盐水 0.2mL。

1.4 鳖的免疫保护试验

将 28 只鳖随意挑 14 只作对照, 每只注射 0.2mL 无菌生理盐水, 其余作肌肉注射全菌疫苗, 剂量为 10⁹ 个菌/只。初次免疫后两周强化免疫, 免疫剂量与途径与初次免疫相同, 强化后四周腹腔注射 Ah-9551 菌株攻击。每次随机抽取 3 只鳖断颈取血, 用微量血凝法测抗体效价。

2 结果

2.1 疫苗的制备

疫苗含菌量为 5×10⁹ 个菌/mL, 接种普通琼脂平板未见菌落生成。安全性试验显示, 腹腔注射疫苗的 6 只小鼠和 6 只鳖全部健活。

2.2 小鼠的免疫保护及 LD₅₀ 的测定

攻击后三天内免疫组全部健活, 对照组全部死亡, 保护率 100%。Ah-9551 对小鼠的毒力作用见表 1 (接种剂量为 0.2ml 菌液)。据表 1, Ah-9551 菌株对小鼠的半数致量为 3×10⁴ 个菌。

表 1 Ah-9551 菌株对小鼠的毒性

Tab. 1 The toxic effects of strain Ah-9551 on rats

细菌稀释	观察结果			累计结果		
	死亡数	存活数	死亡率(%)	死亡数	存活数	死亡率(%)
10 ⁻³	5	0	100	10	0	10/10 100
10 ⁻⁴	3	2	60	5	2	5/7 71
10 ⁻⁵	2	3	40	2	5	2/7 29
10 ⁻⁶	0	5	0	0	10	0/10 0

2.3 免疫小鼠的抗体动态

图1显示免疫小鼠的抗体动态。从图上可以看出，疫苗注射的第七天抗体效价为 2^4 ，强化免疫后一周达 2^8 。

2.4 鳖的免疫保护

强化免疫后四周对鳖进行 Ah-9551 菌株攻击，免疫组保护率80%，对照组全部发病且有两只死亡(表2)。

表2 鳖的免疫保护试验

Tab. 2 Protection test of soft shelled turtle after vaccination

分组	试验数	发病数	无病数	保护率(%)
免疫组	14	3(轻)	11	80
对照组	14	14(其中2只死)	0	0

2.5 免疫鳖的抗体动态

初免后5天开始检测到抗体，7天时抗体效价 2^1 ，强化免疫后一周抗体效价为 2^7 ，高峰维持较长时间，三个月后检测到抗体效价为 2^5 ，见图2。

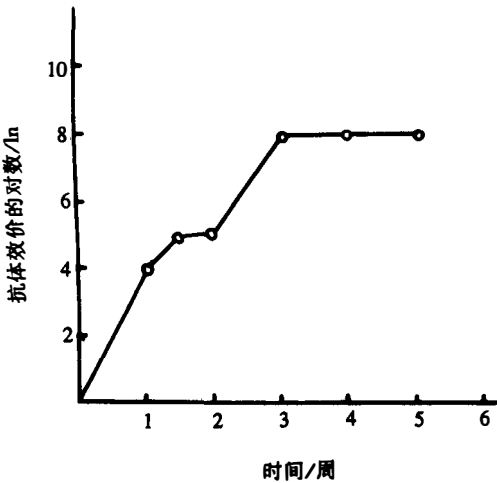


图1 免疫小鼠的抗体动态

Fig. 1 The antibody kinetics of vaccinated mice

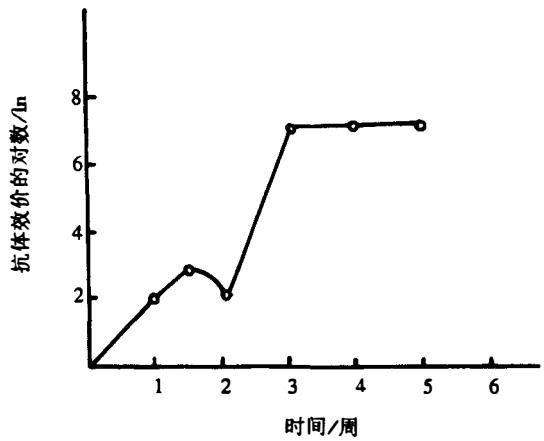


图2 免疫鳖的抗体动态

Fig. 2 The antibody kinetics of vaccinated soft-shelled turtle

3 讨论

鱼类存在着免疫器官，并能对外来抗原产生应答[Yocum 等 1975, Secombers 和 Man-

ning 1980, Chilmonczyk 1985]。鳖作为爬行动物,从进化角度讲它介于鱼类与哺乳类之间,也具有基本的免疫器官和细胞[林正卿等 1993]。从本试验看,鳖在接受抗原刺激后,很快就在血液中产生抗体,且血液中的抗体持续时间较长,并能在再次接触同源菌株时有一定的保护力,说明鳖可以通过免疫保护达到预防疾病的目的。

由于嗜水气单胞菌抗原成分复杂,取什么菌株作疫苗关系到免疫保护的覆盖率。本实验中用的 Ah-9551 菌株系从病鳖身上分离到的强毒菌株。在实验室里用同源菌株攻毒,获得较好的保护效果。在生产实践中鳖受其它菌株(不同血清型)的感染,是否能达到一定的免疫效果,是一个值得继续探讨的问题。

本文为蔡完其教授“鳖病防治”课题的部分内容。在工作中得到了蔡完其教授、孙其焕副教授及孙佩芳老师的大力帮助与支持,在此一并致谢。

参 考 文 献

- 兰州生物制品研究所编. 1980. 实用免疫学方法. 北京:人民卫生出版社. 71~72.
- 孙其焕,孙佩芳,金丽华等. 1991. 异育银鲫溶血性腹水病病原的研究. 水产学报,15(2):130~139.
- 孙佩芳,蔡完其,吴建农等. 1996. 鳖穿孔病的病原研究. 水产学报,20(2):120~124.
- 孙建和,陆承平. 1995. 嗜水气单胞菌疫苗的研制. 畜牧与兽医,27(5):202~205.
- 杨先乐,夏春,左文功. 1989. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究. 水产学报,13(2):138~144.
- 许淑英,李焕林,邓国成等. 1994. 草鱼出血病细胞培养弱毒疫苗的制备及其免疫效果. 水产学报,18(2):110~117.
- 陈怀青,陆承平. 1991. 嗜水气单胞菌;黄鳝出血性败血症的病原. 中国人兽共患病杂志,(7):21~23.
- 邱郁春. 1992. 水污染鱼类毒性实验方法. 北京:中国环境科学出版社. 54~61.
- 陆宏达,金丽华. 1996. 鳖嗜水气单胞菌败血症的研究. 水产学报,20(3):223~230.
- 林飞卿,余传霖,何球藻. 1993. 医学基础免疫学. 北京:人民卫生出版社. 11~12.
- 陈月英,钱冬,沈智华等. 1996. 养殖鱼类细菌性败血症的菌苗制备技术. 水产学报,20(2):125~130.
- Chilmonczyk S. 1995. Evolution of the thymus in rainbow trout. Immunology: 285~292. Academic Press (London).
- Secombes C J, Manning M J. 1980. Comparative studies on the immune system of fisheries and amphibians: antigen localization in the carp (*Cyprinus carpio* L.). J Fish Dis, 3(5):399~412.
- Yocum D et al. 1975. Hapten-carrier effect in teleost fish. J Immunol, 114(3):925~927.