

# 嗜水气单胞菌佐剂灭活苗免疫中华鳖抵抗嗜水气单胞菌的致死性感染

张林<sup>1</sup> 丁运敏<sup>2</sup> 艾晓辉<sup>1\*</sup>

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所 湖北 荆州 434000)  
(2. 华中农业大学 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 通过建立中华鳖浸泡感染模型评价中华鳖嗜水气单胞菌油乳剂灭活疫苗对中华鳖的免疫保护效力。在主动免疫保护试验中, 疫苗免疫组中华鳖能产生较高的抗体水平, 在使用  $10 \times LD_{50}$  的嗜水气单胞菌 T3 株进行浸泡攻毒后, 保护率为 100% (10/10), 生理盐水对照组中华鳖的存活率仅为 30% (3/10)。在被动免疫保护试验中, 疫苗腹腔免疫异育银鲫抗血清能 80% (8/10) 保护中华鳖抵抗  $10 \times LD_{50}$  的 T3 株的腹腔接种的攻击, 生理盐水对照组中华鳖的存活率为 20% (2/10)。研究结果表明嗜水气单胞菌佐剂油乳剂灭活苗具有良好的免疫学原性, 可有效预防由嗜水气单胞菌引起的中华鳖红底板和肠道败血症等疾病。

**关键词:** 嗜水气单胞菌, 油乳剂灭活苗, 免疫原性

## Protecting Soft-shelled Turtle from Fatal *Aeromonas Hydrophila* Infection by Immunization with *Aeromonas Hydrophila* Emulsion-oil Vaccine

ZHANG Lin<sup>1</sup> DING Yun-Min<sup>2</sup> AI Xiao-Hui<sup>1\*</sup>

(1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Jingzhou, Hubei 434000, China)  
(2. Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

**Abstract:** We evaluated immune protection effectiveness of the *aeromonas hydrophila* emulsion-oil vaccine in an immersion challenge model against haemorrhagic intestinal necrosis (HIN) and red abdominal shell by using soft-shelled turtles. In the active immune protection test, a high level of antibody was produced by the vaccine group. All the soft-shelled turtles in the vaccine group (10/10) were survived after challenged with 10 times 50% lethal dose ( $LD_{50}$ ) of virulent T3 strain, compared with 30% (3/10) survivors in the control group injected with 0.8% NaCl solution. In the passive immune protection test, 80% survivors (8/10) were observed in the group injected with serum, but only 20% (2/10) survivors were observed in the control group injected with 0.8% NaCl solution. These results showed that *hydrophila Aeromonas* emulsion-oil vaccine had good immunogenicity, which could be used in the

prevention of haemorrhagic intestinal necrosis (HIN) and red abdominal shell in soft-shelled turtles.

**Keywords:** *Aeromonas hydrophila*, Emulsion-oil killed vaccine, Immunogenicity

嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)在自然界分布广泛,普遍存在于淡水、污水、淤泥、土壤和人类粪便中,对水产动物、畜禽和人类均有致病性,是一种典型的人-兽-鱼共患病原菌<sup>[1]</sup>。它是淡水鱼类败血症的主要病原菌,可引起中华鳖的出血性肠道坏死症、红脖子病、红底板病、疔疮病、白斑病和腐皮病等,且发病率高,危害性大。更重要的是,嗜水气单胞菌的先期感染易导致其他多种细菌性和病毒性病原的继发感染,从而导致中华鳖的发病率和死亡程度增加<sup>[2]</sup>。在我国,随着集约化养鳖业的发展及鳖的频繁引种和调动,由嗜水气单胞菌引起的肠道败血症、红底板、白斑病、腐皮病等疾病也随之扩散蔓延,造成较大的经济损失。临床调查表明,针对嗜水单胞菌引起的中华鳖各种病的疫苗还未广泛应用,商品疫苗还未见报道。因此,开发新型、经济、免疫效力更好的嗜水气单胞菌商品疫苗是世界养鳖业的迫切需要。

嗜水气单胞菌具有耐热的 O 抗原、不耐热的 K 抗原、鞭毛 H 抗原和菌毛抗原,其致病性与致病因子密切相关,目前已证实嗜水气单胞菌致病因子有外毒素、蛋白酶、S 蛋白、菌毛和外膜蛋白等<sup>[1,3-4]</sup>。致病因子上存在许多编码保护性抗原蛋白成分的基因<sup>[5]</sup>。在中华鳖的感染试验中,无毒力因子的嗜水气单胞菌不能导致中华鳖发生出血性肠道坏死症、红底板等疾病。已报道中华鳖受嗜水气单胞菌攻击的保护率与血清抗体水平呈线性关系。单一的保护性抗原不能完全激发机体的免疫应答,免疫效果不太理想。因此本研究用嗜水气单胞菌全菌佐剂油乳剂灭活疫苗或者疫苗免疫的异育银鲫抗嗜水气单胞菌血清免疫中华鳖,实验结果证实疫苗或抗血清均能抵抗中华鳖对嗜水气单胞菌的致死性感染,表明研制的嗜水气单胞菌佐剂灭活疫苗具有良好的保护力,显示了良好的应用前景。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、试验动物和疫苗:**中华鳖嗜水气单胞菌 T3 株,长江水产研究所鱼病室分离鉴定并保存。体重为  $100 \pm 20$  g 的健康中华鳖采用随机抽查法,

间接血凝试验证实嗜水气单胞菌抗体呈阴性,以及体重为  $250 \pm 20$  g 的健康异育银鲫,均购自本所实验基地。中华鳖嗜水气单胞菌 T3 株佐剂灭活疫苗菌体浓度为  $1 \times 10^{10}$  CFU/mL,由本所研制,珠江水产研究所 GMP 疫苗生产车间试制。

**1.1.2 疫苗制备:**油相制备:取杭州产注射药用白油 94 份(以毫升为单位),加入硬脂酸铝 1 份(以克为单位),边加边搅拌,直到透明为止,再加入 5 份司本-80(以毫升为单位),充分混匀,灭菌后冷却至室温备用。

水相制备:取 4 份灭菌的吐温-80 加入到 96 份菌液中,边加边搅拌,使吐温-80 充分溶解为止。

乳化:水相与油相的比例为 1.2 : 1,先取油相 1 份加入,慢速搅拌,同时缓缓加入水相 1.2 份,加完后再以 8000-10000 r/min 乳化 5-10 min,在终止搅拌前加入 1% 硫柳汞溶液,使其终浓度为万分之一。

**1.1.3 热稳定性抗原的制备:**将嗜水气单胞菌 T3 株接种于 TSA 固体培养基,28°C 培养 24 h,挑取单菌落重新接种 TSA 固体培养基纯化扩大培养,28°C 培养 12-16 h 后再于 TSA 固体培养基上均匀划线进行大量增殖,28°C 培养 24 h,用 PBS 洗下菌苔,7000 r/min 离心 2 min,弃上清,估测细菌沉淀的体积,加入菌体体积 9 倍的 pH 7.4 PBS,涡旋混合均匀后室温过夜,7000 r/min 离心 10 min,将上述 1 : 9 的细菌悬液于  $1.0 \times 10^5$  Pa 高压蒸汽处理 2 h,7000 r/min 离心 10 min,取上清用 PBS 将菌体浓度调为  $1 \times 10^8$  CFU/mL。上清即为热稳定性抗原,又称嗜水气单胞菌分型抗原。

### 1.2 中华鳖感染模型的建立

将 T3 菌株接种于 AHM 固体培养基 28°C 恒温培养,24 h 后挑取单个菌落接入 TSB 液体培养基振荡培养。12-16 h 后按 1% 的比例接入新配制的 TSB 液体培养基中进行大量增殖,28°C 培养 20 h 后收集菌液,2000 r/min 离心 5 min,收集菌体,用含酪蛋白 10.0 g/L、葡萄糖 10.0 g/L、 $K_2HPO_4$  2.0 g/L 无菌生理盐水稀释菌体,菌液浓度调整至约  $1 \times 10^{10}$  CFU/mL。将上述制备的菌液盛于(体积 = 长 × 宽 × 高 = 0.8 m × 0.8 m × 0.5 m)塑料池,并用加热棒将水温控制在 25°C-28°C,放置 40 只中华鳖(背部划一道痕)

于其中浸泡,分别在浸浴 15、30、60、120 min 后每次取出 10 只,每个浸泡时间段所取得 10 只鳖于取出 12 h 后,将其中 2 只解剖取肝脏和脾脏,匀浆器匀浆并分别溶于 2 mL 无菌生理盐水,以平板表面涂布法进行活菌计数,计算中华鳖肝脏和脾脏中嗜水气单胞菌的含量,确定中华鳖肝脏和脾脏中嗜水气单胞菌含量随浸泡攻毒时间的变化关系。每组另外 8 只隔离饲养,观察 15 d,按 Bliss 法计算嗜水气单胞菌对中华鳖在浸泡感染模型下的半数致死剂量(LD<sub>50</sub>)。

### 1.3 中华鳖主动免疫保护试验

取健康中华鳖共 60 只,随机分成 2 组(30 只/组)。第 1 组每只后腿肌注射免疫疫苗 0.5 mL,第 2 组注射相同体积的无菌生理盐水。于免疫后(不攻毒)第 7、14、28、35、60、90、120 天对每组中 2 只鳖切断颈动脉采血。将 2 只鳖的血清等量混合,采用琼脂糖扩散法,检测该组平均抗体水平。免疫后 28 d,按 1.2 中所建立的模型使用 T3 强毒株选出每组 12 只鳖进行浸泡攻毒 60 min,攻毒剂量为 10 × LD<sub>50</sub>。攻毒 12 h 后每组取 2 只,解剖取肝脏和脾脏,匀浆器匀浆并溶于 2 mL 无菌生理盐水,以平板表面涂布法进行活菌计数,计算中华鳖肝脏和脾脏中嗜水气单胞菌含量,即实际攻毒剂量。攻毒后第 7、14、21、28、35 天,每组鳖选取 2 只鳖采血并检测血清抗体水平。攻毒后观察 15 d,死亡鳖立即剖检并进行病原菌的分离鉴定。

### 1.4 中华鳖被动免疫保护试验

将疫苗 0.3 mL/条腹腔注射异育银鲫,每隔半月后加强免疫 1 次,在三免后 10 d 测定抗体效价并进行断尾采血,提取血清,0.22 μm 滤膜过滤除菌,-20°C 保存备用。20 只中华鳖随机分成 2 组。第 1 组 10 只肌肉注射 0.5 mL 嗜水气单胞菌油乳剂疫苗免疫异育银鲫抗血清,第 2 组 10 只肌肉注射 0.5 mL 无菌生理盐水。注射后 7 d,所有中华鳖使用 10 × LD<sub>50</sub> T3 菌株进行腹腔注射攻毒。攻毒后观察发病及死亡情况,连续观察 15 d,死亡中华鳖立即剖检并进行病原菌的分离鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 中华鳖浸泡感染模型的建立

从浸泡感染中华鳖的肝脏和脾脏活菌计数的曲线可以看出(图 1),浸泡攻毒 15 min 后,中华鳖肝脏

和脾脏活菌含量随浸泡于嗜水气单胞菌溶液中时间的增加而缓慢上升。在浸泡 15、30、60 和 120 min 感染后,肝脏和脾脏的平均活菌含量分别达到  $1.51 \times 10^4$  CFU、 $4.52 \times 10^4$  CFU、 $1.78 \times 10^5$  CFU、 $3.02 \times 10^5$  CFU,按 Bliss 法公式计算嗜水气单胞菌通过浸泡感染中华鳖的 LD<sub>50</sub> 为  $1.33 \times 10^6$  CFU。

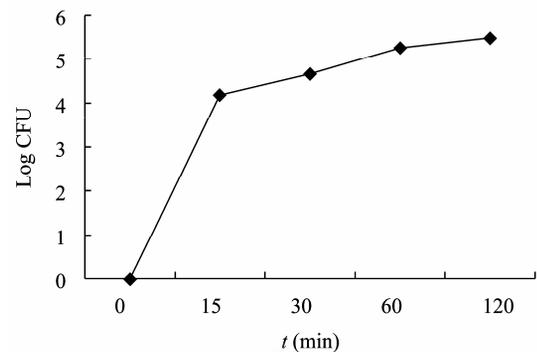


图 1 中华鳖肝脏和脾脏中的 Ah 活菌含量随浸泡攻毒时间变化曲线

Fig. 1 Time course of increases in numbers of CFU in liver and spleen of Soft-shelled Turtle after infection with *Aeromonas hydrophila*

### 2.2 疫苗免疫中华鳖的抗体消长规律

用琼脂扩散试验检测血清样品抗体消长规律,抗原为上述制备的热稳定性抗原,结果见图 2。奇怪的发现生理盐水空白对照组鳖在整个试验期间能够检测到有微弱的抗体水平升高现象,分析认为,一方面可能是嗜水气单胞菌广泛的存在与自然界,某些物种在自然进化的过程中就具有微弱抵抗嗜水气单胞菌的能力。疫苗免疫组血清抗体水平于免疫后迅速升高,在免疫后 1 周抗体转阳,由 1: (8 ± 2.8)

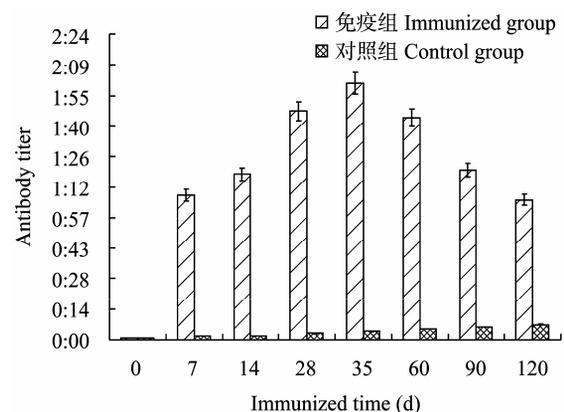


图 2 血清抗体效价比较

Fig. 2 Comparison of the antibody in the serum

逐渐上升, 35 d 处于抗体水平高峰, 效价为 1: (61 ± 3.2), 以后出现逐渐下降趋势持续至免疫后 90 d 的 1: (20 ± 1.5), 免疫后 120 d 还存在微弱的抗体, 效价为 1: (6 ± 1.1), 说明抗体可维持 3 个月。当疫苗免疫组中华鳖在免疫后 28 d 进行嗜水气单胞菌强毒株 T3 浸泡攻毒后, 血清抗体水平则再次迅速升高, 在攻毒后 7 d 达到最高值 1: (71 ± 3.2)。

### 2.3 中华鳖主动免疫的保护性试验结果

中华鳖肝脏和脾脏嗜水气单胞菌含量随浸泡攻毒时间的变化关系, 在免疫后 28 d, 试验组和对照组进行浸泡攻毒 60 min。攻毒后经过测定可知, 攻毒实际剂量为  $4.13 \times 10^4$  CFU/(肝脏和脾脏)。生理盐水对照组鳖攻毒后表现: 精神萎靡, 不食, 离群独居, 浮于水面, 96 h 后开始出现死亡, 死亡高峰出现在 7-9 d。死亡鳖剖检可见: 肝脏变脆, 肿大, 出血, 坏死, 表面附有一层伪膜, 易剥离; 脾脏明显的肿大, 变黑; 肠道糜烂, 红肿; 从死亡鳖的肠道、肝脏、脾脏和肾脏, 血液均能分离到嗜水气单胞菌。疫苗免疫组 10 只鳖存活 10 只, 保护率为 100% (10/10); 对照组(10 只)只存活 3 只。

### 2.4 中华鳖被动免疫的保护性试验结果

空白对照组中华鳖攻毒后表现精神萎靡, 不食, 浮于水面, 焦躁不安, 48 h 后开始出现死亡, 死亡高峰出现在 3-5 d, 在第 7 天内全部死亡。死亡鳖剖检病变情况与浸泡攻毒病变情况相似, 但是脾脏、肾脏、心脏病变较重, 并出现严重的肠道病变, 糜烂, 呈深红色、解剖后有暗紫色血液从肠内流出, 体腔内(主要靠近肠壁)有血凝块。从死亡鳖肠道、肝脏、脾脏和肾脏均能分离到感染菌。疫苗免疫的异育银鲫抗血清免疫组中华鳖攻毒后表现精神沉郁, 不食, 活动明显减少, 喜欢离群独处, 但攻毒 24 h 后基本恢复正常, 若给予刺激, 表现出很强的活动能力。10 只幼鳖存活 8 只, 保护率为 80%(8/10)。

## 3 讨论

在中华鳖感染模型中, 已经报道的方法有腹腔接种、肌肉注射和浸泡感染法。嗜水气单胞菌发生黏附和感染的位置是上皮组织。采用浸泡感染途径与天然感染途径相一致, 该攻毒途径较腹腔和肌肉接种途径的感染方式更加可靠。另外, 本试验采用  $100 \pm 20$  g 的中华幼鳖, 这是因为自然状态下幼鳖

更易感染嗜水气单胞菌而发生肠道败血症。中华鳖浸泡感染模型的建立为进一步开展嗜水气单胞菌的致病机理研究, 疫苗的效力检测等奠定基础。

嗜水气单胞菌具有 4 种抗原成份, 动物机体自身免疫本是一个很复杂的过程, 单一的保护性抗原成分往往很难有效激发机体免疫系统, 不能提供完全的免疫保护<sup>[6]</sup>。据有关报道, 中华鳖的感染试验中, 其保护率与血清抗体水平有一定的相关性<sup>[7-8]</sup>。本研究中, 我们使用硬脂酸铝佐剂乳化全菌疫苗, 免疫中华鳖后攻毒结果表明, 该疫苗能够完全保护中华鳖抵抗致死剂量的嗜水气单胞菌强毒株 T3 的攻击。这表明该疫苗具有良好的免疫原性, 可以提供全面的免疫保护, 疫苗免疫组幼鳖在攻毒后没有出现任何发病症状; 攻毒 7 d 后, 血清抗体水平又有显著提高。这表明免疫鳖依赖攻毒前针对全菌抗原的抗体优势就能抵抗嗜水气单胞菌强毒株的攻击, 并能产生强烈的再次免疫应答反应, 但嗜水气单胞菌全菌抗原的免疫机制还有待进一步的研究。

嗜水气单胞菌的毒力因子不仅多, 而且复杂, 主要有: 外毒素(Exotoxin), 胞外蛋白酶, 结构蛋白, 它们对机体发挥毒性作用时也不是单个因子的作用, 而是相互协同作用<sup>[5]</sup>。这些毒力因子的表达与病原所处的环境具有紧密的相关性, 它能够根据宿主和外环境生长条件的不同, 迅速调整并适应宿主的内环境, 众多的环境信号都可调节毒力基因的表达<sup>[3]</sup>。Chu 等<sup>[9]</sup>研究发现, 鳃和破坏的皮肤很可能是该病原菌进入宿主的主要途径。之后未见关于嗜水气单胞菌进入宿主后的分布和动态变化的其他报道。

其致病机理是, 嗜水气单胞菌依靠菌毛或 S 层蛋白破坏中华鳖的皮肤黏膜上皮细胞, 在部分 OMPs 和孔蛋白作用下侵入机体内, 依靠丝氨酸蛋白酶、LPS 及其他胞外蛋白酶牢牢定植于鳖破坏的皮肤和肠道, 定殖成功后依靠 II 型和 III 型分泌系统相关蛋白不断合成和分泌外毒素(如气溶素/溶血素和细胞毒性肠毒素)以降低其的免疫反应, 并进一步增殖, 利用群体感应、分泌系统和/或基因调节系统摄取宿主养分、养料等, 同时也给其他病原的寄居和增殖创造条件<sup>[10-11]</sup>, 最终导致中华鳖肠道败血症的发生, 引起死亡。

在被动免疫试验中,疫苗免疫的异育银鲫抗血清肌肉注射中华鳖,尽管异育银鲫三免后血清凝集效价不高,只有 1:16,这可能是受免鱼种类不同对菌苗免疫原产生的免疫应答机理不同,所产生的针对性的特异性抗体不强的缘故。但实验结果表明异育银鲫抗血清免疫的中华鳖能够部分保护中华鳖抵抗致死剂量( $10 \times LD_{50}$ )的嗜水气单胞菌强毒株 T3 的攻击。说明仅依靠检测免疫血清凝集抗体效价是难以准确判断受免鱼免疫保护力的强弱。传统方法是用兔抗血清免疫中华鳖,考虑到兔抗血清的制备一般是亚单位疫苗加弗氏佐剂,而本研究是全菌灭活疫苗,抗原成份较多且复杂,其相应免疫原产生的免疫应答机制还有待研究。另外,异育银鲫与中华鳖生物遗传性相近,同属水类栖生动物,本研究首次应用异育银鲫抗血清代替传统的兔抗血清,为中华鳖免疫防制提供了新的思路。

本研究结果表明中华鳖嗜水气单胞菌油乳剂灭活疫苗具有很好的免疫原性及其免疫效力,能给予中华鳖足够的免疫保护,可有效预防由嗜水气单胞菌引起的中华鳖肠道败血症及红底板病,具有良好的应用前景。

## 参 考 文 献

- [1] 于学辉,王远微,汤承,等.嗜水气单胞菌的研究进展.西南民族大学学报,2007,33(3):507-514.
- [2] Chanphong J, Sirirat T. The relationship between virulence and whole cell protein composition in various

strains of *Aeromonas hydrophila*//Flegel T, Macrae IH. Disease in Asian Aquaculture III: Fish Health Section Manila: Asian Fisheries Society, 1997.

- [3] 朱大玲,李爱华,汪建国,等.嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性.中山大学学报,2006,45(1):82-85.
- [4] 黄晓,叶巧真,何建国,等.嗜水气单胞菌外膜蛋白基因 ompTS 的克隆与序列分析.水产学报,2001,25(6):552-558.
- [5] Yu HB, Zhang YL, Liu YL, et al. Identification and characterization of putative virulence of genes and gene clusters in *Aeromonas hydrophila* PPD134/91. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(8): 4469-4477.
- [6] Xu CX, Wang SY, Zhang ZX, et al. Immunogenic cross-reaction among outer membrane proteins of gram-negative bacteria. *Interna Immunopharmacol*, 2005(5): 1151-1163.
- [7] 杨先乐,周剑光,蔡完其,等.中华鳖对 T3 菌苗的回忆应答.水产学报,2002,24(2):156-160.
- [8] Yang Z, Pan H, Sun H. The immune response and protective efficacy of oral alginate microparticle *Aeromonas sobria* vaccine in soft-shelled turtles (*Trionyx sinensis*). *Vet Immunol Immunopathol*, 2007, 119(3/4): 299-302.
- [9] Chu WH, Lu CP. *In vivo* fish models for visualizing *Aeromonas hydrophila* invasion pathway using GFP as a biomarker. *Aquaculture*, 2008(277): 152-155.
- [10] Garfufio RA, Thornton JT, Kay WW. *Aeromonas salmonicida* grown *in vivo*. *Infection and Immunity*, 1993(61): 3854-3862.
- [11] Khushiramani R, Girisha SK, Karunasagar I, et al. Cloning and expression of an outer membrane protein omp TS of *Aeromonas hydrophila* and study of immunogenicity in fish. *Protein Expression Purification*, 2007(51): 303-307.

## 栏目介绍

## 生物实验室

将原来“技术与方法”栏目改为“生物实验室”。刊发的文章主要侧重于从实验室科研人员的角度,深度报道使用某种仪器设备进行实验后所获得的最新结果,交流由此衍生出的新技术新方法。希望此栏目能够成为架起实验室与实验室,以及实验室与仪器生产商之间联系的桥梁。