

变形假单胞菌灭活疫苗研究

霍建强^{1,2}, 赵玲敏^{1,2}, 覃映雪^{1,2}, 鄢庆枇^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 农业部东海海水健康养殖重点实验室, 福建 厦门 361021)

[摘要] 选取甲醛、苯酚、和氯仿三种化学灭活剂在不同的条件下对变形假单胞菌进行灭活处理, 确定了0.2%甲醛溶液28℃处理12h; 0.5%苯酚溶液28℃处理24h; 3.5%氯仿溶液28℃处理12h的灭活条件。分别用三种灭活剂制备的疫苗免疫斜带石斑, 测定斜带石斑的血清抗体效价和感染后的免疫保护率。结果显示: 接种甲醛灭活疫苗组的血清抗体效价最高, 接种苯酚灭活疫苗组的抗体效价次之, 接种氯仿灭活疫苗组的抗体效价最低; 三种灭活疫苗的免疫保护率分别为甲醛灭活疫苗46.67%, 苯酚灭活疫苗30%, 氯仿灭活疫苗20%。选择甲醛灭活疫苗与弗氏佐剂、白油佐剂、氢氧化铝、206佐剂、蜂胶等5种佐剂分别配伍后注射免疫斜带石斑, 结果显示: 添加佐剂组斜带石斑血清抗体效价全都大幅高于未添加佐剂组, 其中白油的效果最好; 添加佐剂组免疫保护率也全都大幅高于未添加佐剂组, 也是白油佐剂的效果最好, 免疫保护率高达91.67%, 其余各组分别为氢氧化铝83.33%、206佐剂80.56%、弗氏佐剂72.22%、蜂胶66.67%。研究表明研制出了具有良好免疫保护效果的变形假单胞菌灭活疫苗, 为进一步的中试试验奠定了基础。

[关键词] 变形假单胞菌; 灭活疫苗; 斜带石斑; 免疫佐剂

[中图分类号] S 917.1

Studies on Inactivated Vaccine of *Pseudomonas plecoglossicida*

HUO Jianqiang^{1,2}, ZHAO Lingmin^{1,2}, QIN Yingxue^{1,2}, YAN Qingpi^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Key Laboratory of Healthy Mariculture for the East China Sea, Ministry of Agriculture, Xiamen 361021, China)

Abstract: In the present study, three chemical inactivation agents (methanol, phenol and chloroform) were used to investigate the inactivation condition of *Pseudomonas plecoglossicida*, and the selected conditions were as follows: 0.2% methanol for 12 h at 28℃, 0.5% phenol for 24 h at 28℃, and 3.5% chloroform for 12 h at 28℃. In order to estimate the application of the inactivated vaccine in aquaculture, a trial was designed to investigate the effect of inactivated vaccine of *P. plecoglossicida* on serum antibody titer and immune protection after infection in grouper *Epinephelus coioides*. The highest antibody titer was observed in fish injected with formalin-killed vaccine, while the lowest was obtained in fish injected by chloroform-killed vaccine. The immune protection rate of the three inactivated vaccine were 46.7% of formalin-killed vaccine, 30% of phenol-killed vaccine and 20% of chloroform-killed vaccine, respectively. In order to investigate the effects of different immune adjuvants, fish were injected by formalin-killed vaccine and five different ad-

[收稿日期] 2017-03-10

[修回日期] 2017-05-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31672694); 福建省科技重大专项(2016NZ0001-3); 福建省科技项目(2014R0110)

[作者简介] 霍建强(1990—), 男, 硕士, 从事水产微生物学研究。通信作者: 鄢庆枇(1971—), 男, 教授, E-mail: yanqp@jmu.edu.cn。

juvants respectively, including Freund's adjuvant, white oil adjuvant, alhydrogel, 206 adjuvant and propolis adjuvant. The results showed that both of the serum antibody titer and immune protection rate of *E. coioides* injected by adjuvant added groups were higher than the control group without adjuvant, and the white oil adjuvant treated group exhibited the highest antibody titer and immune protection rate among the treatment groups. The results indicated that the inactivated vaccine of *P. plecoglossicida* could effectively improve the immune response of *E. coioides*. The study provides a theoretical basis for further pilot test.

Keywords: *Pseudomonas plecoglossicida*; inactivated vaccine; *Epinephelus coioides*; immunologic adjuvant

0 引言

变形假单胞菌 (*Pseudomonas plecoglossicicla*) 作为自然界的常见菌, 对多种污染物有较强的分解能力, 常被用于污水处理^[1]。由变形假单胞菌引起的水产养殖动物疾病, 特别是由变形假单胞菌引起的内脏白点病是危害大黄鱼 (*Pseudomonas plecoglossicida*) 的常见疾病, 引起大黄鱼大规模死亡, 给养殖业造成严重的损失^[2-3]。2014 年, 福建闽东地区爆发大规模的大黄鱼白点病, 该病的死亡率和发生率再创新高, 给闽东地区的水产养殖业带来了庞大的经济损失^[4]。变形假单胞菌不仅能引起大黄鱼的内脏白点病, 在人工感染情况下也能引起斜带石斑 (*Epinephelus coioides*) 等海水鱼的内脏白点病, 感染死亡率可达 100%。以前对于鱼类疾病的防治大多是用抗菌类药物, 由于此类药物的大量不合理使用, 容易使病原菌产生耐药性, 同时药物的大量残留也危害着人类的健康。随着对绿色环保食品 and 环境保护的要求, 寻求安全、绿色、经济、有效的疫苗研究越来越受到重视。Duff 首次将灭活的鲑鱼产气单胞菌 (*Aeromonas salranicida*) 口服免疫应用于鳙鱼 (*Squaliobarbus ourriculus*) 获得成功^[5]。余晓丽等^[6]用海豚链球菌 (*Streptococcus iniae*) 疫苗免疫奥尼罗非鱼 (*Oreochromis spp*), 注射免疫组的免疫保护率达到 100%。虽然目前已有少量渔用疫苗获得批准上市, 但远不能满足水产病害防治的需要。目前关于变形假单胞菌灭活疫苗的研究尚未见报道。

疫苗的灭活方式有物理灭活和化学灭活, 其中化学灭活应用更为广泛, 且成本较低制备简单, 化学灭活剂中有甲醛、戊二醛、苯酚、烷化剂、B—丙内酯、结晶紫、氯仿^[7]。其中甲醛、氯仿和苯酚对细菌性病原的灭活应用较多且效果好价格低更适合实际生产中的应用。疫苗免疫佐剂常用的有油类佐剂、矿物质佐剂、微生物佐剂和动植物佐剂^[8], 其中白油佐剂、氢氧化铝、206 佐剂、弗氏佐剂和蜂胶等几种佐剂是上述类型佐剂中较为常用, 并且有研究表明这些佐剂对疫苗有较好的辅助免疫效果, 具有成本较低、制备简单、安全性好等特点。

鉴于大黄鱼在水族箱中不易饲养, 本文以斜带石斑鱼为实验动物。选用甲醛、苯酚和氯仿三种不同的化学灭活剂对变形假单胞菌进行灭活, 得出较温和的灭活条件, 并比较其灭活后对斜带石斑鱼的免疫效果, 还通过添加不同的免疫佐剂对斜带石斑鱼进行免疫, 以期得出对变形假单胞菌灭活效果最佳的灭活剂和灭活条件, 制备出具有良好免疫保护效果的变形假单胞菌灭活疫苗。同时比较各佐剂灭活疫苗组对斜带石斑鱼免疫效果的影响, 为疫苗在大黄鱼病害防治中的应用提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验鱼与暂养

斜带石斑鱼购自福建省龙海市某养殖场, 体长 (13 ± 2) cm, 暂养于 1 t 水体的循环水养殖系统。暂养 1 周后用于免疫实验。整个实验期间水温控制在 (20 ± 2) °C, 投喂商品饲料。

1.2 供试菌株及培养条件

用于本研究的变形假单胞由本实验室分离自患病大黄鱼^[2]。变形假单胞菌接种于 TSB 培养液,

28 ℃、180 r/min 振荡培养 24 h 后, 离心收集菌体, PBS 清洗 3 次后用 PBS 稀释至一定浓度, 备用。

1.3 灭活条件的优化

在制备好的 PBS 菌悬液中, 分别加入不同体积分数的甲醛溶液(0.05%、0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%)、苯酚(0.1%、0.3%、0.5%)和氯仿溶液(2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%), 并分别在 4、28、37 ℃ 下进行灭活处理, 在 12、24、36、48 h 各吸取 0.1 mL 的菌液涂布在 TSA 平板, 28 ℃ 培养 24 h, 观察其是否灭活完全。每个处理涂 3 个平板。

1.4 灭活菌苗的制备

甲醛、氯仿、苯酚 3 种灭活剂按 1.3 确定的最佳灭活条件, 制备变形假单胞菌灭活疫苗。将灭活后的菌液 6000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 用无菌 PBS 洗涤菌体 3~4 次, 最后用 PBS 悬浮菌液并调节至特定浓度, 4 ℃ 保存备用。

1.5 不同佐剂疫苗的制备

选取了弗氏佐剂、白油佐剂、氢氧化铝、206 佐剂、蜂胶等 5 种佐剂, 分别和筛选出的最优灭活剂灭活的变形假单胞菌疫苗按照体积比 1:1、7:3、4:1、1:1、1:1 进行乳化混合, 4 ℃ 冷藏保存备用。

1.6 安全性实验

将疫苗以 0.2 mL/尾的剂量, 每组 15 尾斜带石斑鱼进行胸鳍基部注射; 对照组 15 尾斜带石斑鱼胸鳍基部注射活化的变形假单胞菌菌悬液 0.2 mL。观察并记录试验鱼的症状及死亡情况, 试验时间 30 d。

1.7 斜带石斑鱼的免疫与感染

1.7.1 不同化学灭活剂变形假单胞菌疫苗注射免疫试验

设甲醛灭活疫苗组、苯酚灭活疫苗组、氯仿灭活疫苗组及 1 个对照组, 实验组每尾鱼胸鳍基部注射相应的疫苗 0.2 mL, 对照组每尾鱼胸鳍基部注射 PBS 溶液 0.2 mL。初次免疫 4 周后进行第 2 次免疫, 第 2 次免疫 2 周后进行攻毒保护试验。

1.7.2 不同佐剂变形假单胞菌灭活疫苗注射免疫实验

设置弗氏佐剂疫苗组、白油佐剂疫苗、氢氧化铝疫苗、206 疫苗、蜂胶疫苗等 5 组佐剂疫苗组以及 1 个无佐剂对照组和空白对照组。各个佐剂疫苗组每尾鱼胸鳍基部注射相应的佐剂疫苗 0.2 mL, 无佐剂对照组每尾鱼胸鳍基部注射变形假单胞菌灭活疫苗 0.2 mL, 空白对照组每尾鱼胸鳍基部注射 PBS 溶液 0.2 mL。初次免疫 4 周后进行第 2 次免疫, 第 2 次免疫 2 周后进行人工感染试验。

1.7.3 人工感染及免疫保护率测定

在第 2 次免疫 2 周后, 各组斜带石斑鱼分别胸鳍基部注射 0.2 mL/尾变形假单胞菌进行人工感染, 观察 15 天, 解剖死亡鱼分离致病菌, 看是否是攻毒感染致死, 统计各组的死亡情况, 计算疫苗免疫保护率 (protection ratio, PR), $PR = (1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$ 。

1.8 血清抗体效价的测定

在免疫后的第 1、2、3、4、5、6 周, 每组各取 3 尾进行采血, 从尾静脉采血, 置于 1.5 mL 离心管中, 静置 1 h, 等血液凝固后, 置于 4 ℃ 冰箱过夜, 让血清充分析出, 6000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 96 孔血凝板法测定血清抗体效价。

2 结果

2.1 灭活剂对变形假单胞菌的灭活效果

用不同终浓度的甲醛对变形假单胞菌灭活的结果见表 1。从表 1 可以看出, 当温度为 4 ℃ 时, 灭活需要的时间较长且浓度较高, 如用 0.3% (体积分数) 的甲醛需要处理 24 h 可以灭活, 当温度为 28 ℃ 和 37 ℃ 时, 用 0.2% (体积分数) 的处理 12 h 即可完全灭活。

用不同终浓度的苯酚灭活变形假单胞菌时发现: 当温度为 4 ℃ 时, 0.5% (体积分数) 的苯酚需要处理 48 h, 所需的时间较长且灭活效果较差; 当温度为 28 ℃ 时, 0.5% (体积分数) 的处理 24 h

可完全灭活; 当温度为 37 ℃ 时, 0.5% (体积分数) 的也需要处理 24 h 才可完全灭活。

用不同终浓度的氯仿灭活变形假单胞菌时发现: 当温度为 4 ℃ 时, 4.5% (体积分数) 的氯仿需要处理 24 h 可以完全灭活; 当温度为 28 ℃ 时, 3.5% (体积分数) 的处理 12 h 即可完全灭活; 当温度为 37 ℃ 时, 3.5% (体积分数) 的处理 12 h 可完全灭活。

根据本试验结果, 并综合考虑疫苗的安全性、有效性及实践应用等各因素, 最终选择 3 种灭活剂各自的灭活变形假单胞菌的条件如下: 0.2% (体积分数) 甲醛溶液 28 ℃ 处理 12 h; 0.5% (体积分数) 苯酚溶液 28 ℃ 处理 24 h; 3.5% (体积分数) 氯仿溶液 28 ℃ 处理 12 h。

表 1 甲醛溶液的灭活效果
Tab. 1 The inactivated effect of formaldehyde solution

温度 Temperature /℃	时间 Time/h	体积分数 Concentration/%					
		0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
4	12	+	+	+	+(—)	—	—
	24	+	+(—)	+(—)	—	—	—
	36	+	—	—	—	—	—
	48	+(—)	+(—)	+(—)	—	—	—
28	12	+	+	—	—	—	—
	24	+	+(—)	—	—	—	—
	36	+(—)	+(—)	—	—	—	—
	48	—	—	—	—	—	—
37	12	+	+	—	—	—	—
	24	+	+(—)	—	—	—	—
	36	—	—	—	—	—	—
	48	+(—)	+(—)	—	—	—	—

说明: “+” 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; “+ (—)” 表示有两种实验结果。
Notes: “+” indicates colonies on plates; “—” indicates no colonies on the plates; “+ (—)” indicates both experimental results present.

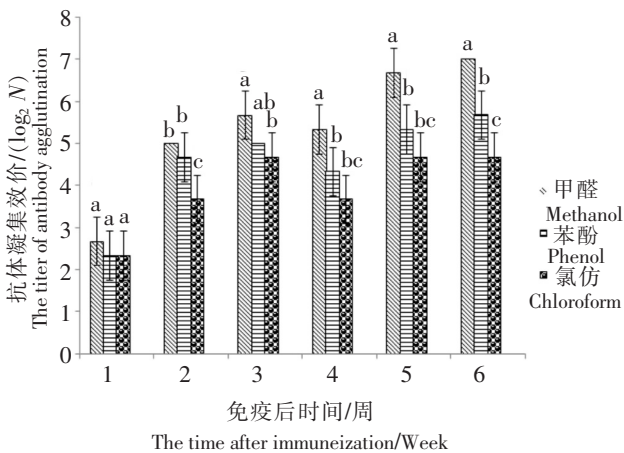
2.2 灭活疫苗对变形假单胞菌的安全性

根据 2.1 选择的灭活条件, 分别制备甲醛、苯酚、氯仿变形假单胞菌灭活疫苗。将制备的全菌灭活疫苗, 吸取 0.1 mL 涂布于 TSA 固体培养基上。在 28 ℃ 恒温培养箱中培养 24 h 后, 培养皿上未见菌落出现, 表明疫苗已完全灭活。分别用各灭活剂制备的灭活疫苗和无菌 PBS 溶液胸鳍基部注射健康的斜带石斑鱼。观察 15 d, 疫苗组全部存活且未出现不良反应。表明变形假单胞菌灭活疫苗对斜带石斑鱼是安全的。

2.3 接种灭活疫苗后斜带石斑鱼血清的抗体凝集效价

2.3.1 接种不同灭活剂的变形假单胞菌疫苗

在整个实验过程, 注射 PBS 的对照组始终没有检测到针对变形假单胞菌的血清抗体, 而各免疫组都检测到针对变形假单胞菌的血清抗体。各免疫组中, 接种甲醛灭活疫苗组的血清抗体效价最高, 接种苯酚灭活疫苗组的抗体效价次之, 接种氯仿灭活疫苗组的抗体效价最低。实验期间, 各免疫组虽然血清抗体效价各不相同, 但其变化趋势是一致的, 都表现为前



说明: 不同小写字母表示在同一个时间点组间差异有统计学意义($P<0.05$)。
Note: Different letters indicate significant difference($P<0.05$).
图 1 不同药物灭活的变形假单胞菌疫苗血清抗体凝集效价
Fig.1 The antibody titers of *P. plecoglossicida* inactivated vaccines using different inactivation agents

3 周效价逐渐升高，第 4 周略有下降，第 5 周再升高（见图 1）。

2.3.2 接种不同佐剂配伍的变形假单胞菌疫苗

用甲醛灭活菌苗与不同佐剂配伍后注射免疫斜带石斑，其血清抗体效价结果如图 2 所示。实验过程中，添加佐剂组和不添加佐剂组斜带石斑都检测到针对变形假单胞菌的血清抗体效价，添加佐剂各组的血清抗体效价都显著高于不添加佐剂组 ($P < 0.05$)，添加佐剂各组的血清抗体效价没有显著性差异，添加白油组的抗体效价略高 ($P > 0.05$)。实验期间，各免疫组血清抗体效价的变化趋势是一致的，都表现为前 3 周效价逐渐升高，第 4 周略有下降，第 5 周再升高。

2.4 疫苗的免疫保护率

2.4.1 不同灭活剂制备的疫苗

人工感染后，各组斜带石斑都陆续出现死亡，其中对照组在 3 d 就开始出现死亡，7 d 内全部死亡，各免疫组都是在 4 d 开始出现少量死亡，15d 实验期内平均累计死亡率甲醛组最低（53.33%），苯酚组次之（70%），氯仿组最高（80%）（见表 2）。解剖发现病死鱼脾脏和肾脏上有明显的白色结节，从病灶部位分离纯化得到变形假单胞菌。

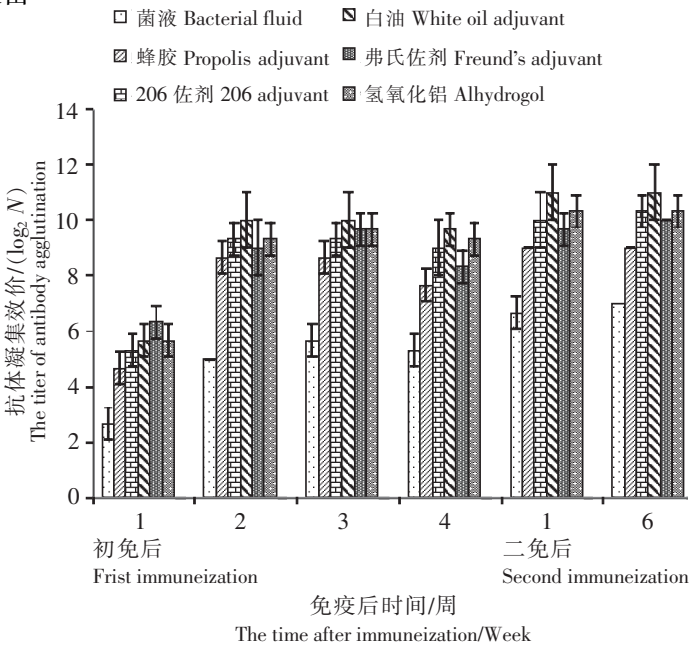


图 2 不同佐剂变形假单胞菌疫苗组血清抗体凝集效价
Fig.2 The antibody titers of *P. plecoglossicida* inactivated vaccine with different adjuvants

表 2 变形假单胞菌攻毒后各组的免疫保护情况
Tab.2 Relative protection rate of *E. coioides* challenged by *P. plecoglossicida*

组别 Groups	鱼数/尾 Total fish	死亡鱼数/尾 Number of death	平均死亡率 Mortality/%	免疫保护率 PR/%
甲醛组 Methanol	30	16	53.33 ± 4.71 ^a	46.67
苯酚组 Phenol	30	21	70.00 ± 7.20 ^b	30
氯仿组 Chioroform	30	24	80.00 ± 5.67 ^c	20
对照组 Control	30	30	100.00 ± 0.00 ^d	0

说明：不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。
Note: Different letters indicate significant differences at the 0.05 level.

2.4.2 添加不同佐剂的灭活疫苗

人工感染后，各组斜带石斑都陆续出现死亡，其中对照组在第 3 天就开始出现死亡，不添加佐剂组在第 4 天开始出现死亡，各添加佐剂组都是在第 5 天开始出现死亡。各添加佐剂组不仅开始出现死亡的时间要晚于不添加佐剂组，实验期内死亡的斜带石斑的数量也少于不添加佐剂组。15 d 实验期内添加白油佐剂组的免疫保护率最高（91.67%），这与血清抗体效价的结果相一致。免疫保护率由高到低依次是：白油佐剂组 > 氢氧化铝组 > 206 佐剂组 > 弗氏佐剂组 > 蜂胶组 > 无佐剂全菌组（见表 3）。解剖发现病死鱼脾脏和肾脏上有明显的白色结节，从病灶部位分离纯化得到变形假单胞菌。

表 3 变形假单胞菌攻毒后免疫保护情况
Tab. 3 Relative protection rate of *E. coioides* challenged by *P. plecoglossicida*

组别 Groups	鱼数/尾 Total fish	死亡鱼数/尾 Number of death	平均死亡率 Mortality/%	免疫保护率 PR/%
白油佐剂 White oil adjuvant	36	3	8.33 ± 4.54 ^a	91.67
氢氧化铝佐剂 Alhydrogel adjuvant	36	6	16.67 ± 6.00 ^{ab}	83.33
206 佐剂 206 adjuvant	36	7	19.44 ± 4.54 ^{bc}	80.56
弗氏佐剂 Freund's adjuvant	36	10	27.78 ± 6.80 ^{cd}	72.22
蜂胶 Propolis adjuvant	36	12	33.33 ± 3.93 ^d	66.67
无佐剂组 Without adjuvant	36	19	52.78 ± 4.72 ^e	47.22
PBS 对照组 Control group	36	36	100.00 ± 0.00 ^f	

说明: 相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$); 不同字母代表差异显著 ($P < 0.05$)。
Notes: Different letters indicate significant differences, while the same letters indicate no significant differences at the 0.05 level.

3 讨论

3.1 变形假单胞菌灭活条件的筛选

选择合适的灭活方法和灭活剂对灭活疫苗的研制十分重要^[9-11]。灭活疫苗的安全性和抗原的完整性是疫苗的重要指标, 在灭活的过程中温度升高、灭活剂浓度增大或其作用时间延长等情况, 其抗原性均相应减弱^[12]。陈月英等^[13]研究表明过高的灭活剂也不利于疫苗的安全使用。采取温和的灭活条件能有力地保护细菌疫苗的抗原性^[14]。肖慧等^[15]用不同的药物灭活鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 苗进行安全性实验, 得出甲醛的灭活效果最好, 苯酚的灭活次之, 氯仿灭活效果较差。张玉芬^[16]等对嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 用甲醛在不同条件下灭活进行琼脂双向扩散实验, 认为28 ℃ 时 0.2% (体积分数) 的浓度处理 12 h 是最佳灭活条件。这些与本实验结果相一致, 本文检测了甲醛、苯酚和氯仿对菌液的灭活效果, 在保证完全灭活的前提下, 选取 28 ℃ 下各灭活剂较为温和的灭活条件。

血清抗体效价测定和免疫保护率的测定是判断疫苗免疫效果的重要方法^[17-19]。本文用 3 种不同灭活剂在较温和灭活条件下制备的灭活疫苗对石斑鱼免疫后, 血清抗体效价和相对免疫保护率都有不同程度的提高, 与对照组有显著性差异 ($P < 0.05$)。接种甲醛灭活疫苗组的血清抗体效价最高, 接种苯酚灭活疫苗组的抗体效价次之, 接种氯仿灭活疫苗组的抗体效价最低。甲醛组的免疫保护率最高 (46.67%), 苯酚组的免疫保护率次之 (30%), 氯仿组的免疫保护率最低 (20%)。血清抗体效价大部分时候与免疫保护情况成正相关, 这与张波等^[20]、Guo 等^[21]、王燕等^[22]的研究相一致。

3 种灭活剂制备变形假单胞菌灭活疫苗免疫保护率不同, 分析原因是因为不同的化学灭活剂对致病菌灭活机制不同, 对抗原结构的保护情况不一样, 抗原结构性完整保护率就相对较高。其中甲醛灭活疫苗组免疫保护效果最好, 所以选取 0.2% (体积分数) 的甲醛溶液 28 ℃ 处理 12 h 作为接下来试验制备变形假单胞菌灭活疫苗的最佳灭活剂灭活条件。这与文献 [13, 15] 基本一致。

3.2 佐剂对灭活疫苗免疫保护效果的影响

疫苗的免疫效果受多方面的影响, 灭活疫苗可以通过添加佐剂、增加疫苗的用量或者加强免疫来提高机体的特异性免疫应答水平, 增加对疾病的防御能力。张吉红等^[24]和肖琳琳等^[25]研究表明添加佐剂后可以明显增强嗜水气单胞菌疫苗的免疫效果; 隋虎辰等^[26]用两种多糖来配伍迟钝爱德华氏菌 (*Edwardsiella trada*) 灭活疫苗免疫大菱鲆 (*Psetta maxima*), 免疫保护效果有显著提高; 杨星等^[27]制备了嗜水气单胞菌灭活疫苗分别与蜂胶、弗氏佐剂和氢氧化铝乳化混合, 可有效防治嗜水气单胞菌引起的病害。Evans 等^[28]用无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) 弗氏佐剂灭活疫苗对罗非鱼 (*Oreochromis spp*) 进行免疫, 测得免疫保护率达到 80%。本实验结果与上述报道相似, 表明佐剂可

显著提高变形假单胞菌灭活疫苗的免疫效果。

在本实验中用甲醛灭活的变形假单胞菌分别与弗氏佐剂、白油佐剂、氢氧化铝、206 佐剂、蜂胶乳化混合后,都能不同程度的提高变形假单胞菌疫苗的免疫效果。第 2 次免疫后各组的抗体较之前有明显的提高,白油佐剂组、氢氧化铝组和 206 佐剂组血清抗体效价最高都是 1:2048,弗氏佐剂和蜂胶组的血清抗体效价峰值分别为 1:1024、1:512。第 2 次免疫后 2 周进行攻毒感染。

白油佐剂组的血清抗体效价和相对保护率都高于其他组,这可能是由于白油佐剂与抗原混合后,起到了一个贮存抗原的作用,使抗原可以缓慢释放长时间刺激机体而导致。并有研究表明,油类佐剂中油含量和油滴的大小跟免疫效果成正比^[29]。氢氧化铝和 206 佐剂的免疫效果较好,其中氢氧化铝对抗原的吸附情况与对机体的免疫情况有密切关系;206 佐剂是一种水包油包水的双相乳液,该佐剂黏度小注射性好,疫苗可分布于内外水相,抗原成分可聚在油包水和外相水中,使抗原缓慢释放,游走释放的同时通过加强巨噬细胞等增强抗原的免疫反应。弗氏佐剂的保护率虽然较高但是也存在着以下问题,制备的乳液的粘度较高,注射比较困难,注射后对鱼的应激较大,对鱼的生长也有不同程度的影响,这与杨星等^[27]的研究相似。蜂胶在本实验中获得了较好的相对免疫保护率与对照组有显著性差异 ($P < 0.05$),并且对鱼生长有促进作用,可能是蜂胶含有多种活性物质,既可保持抗原结构特性,又可作为免疫增强剂,易被机体吸收,提高了斜带石斑鱼的特异性免疫。

4 结论

本文用 3 种不同的灭活剂制备变形假单胞菌灭活疫苗,发现 0.2% (体积分数) 的甲醛在 28 ℃ 下灭活 12 h 效果最好,对抗原免疫原性影响最小并且免疫保护率最高。变形假单胞菌灭活疫苗和不同的佐剂乳化混合后增强抗原的免疫原变性并提高机体的免疫能力,其中白油佐剂组、氢氧化铝佐剂和 206 佐剂的效果最好。

[参 考 文 献]

- [1] PALIWAL R, UNİYAL S, RAI J P N. Evaluating the potential of immobilized bacterial consortium for black liquor biodegradation [J]. Environ Sci Pollut Res 2015, 22(9): 6842-6852. DOI:10.1007/S11356-014-3872-X.
- [2] 胡娇, 张飞, 徐晓津, 等. 大黄鱼 (*Pseudosciaena crocea*) 内脏白点病病原分离鉴定及致病性研究 [J]. 海洋与湖沼, 2014, 45(2): 409-417. DOI:10.11693/hyhz20140300078.
- [3] MAO Z, LI M, CHEN J. Draft genome sequence of *Pseudomonas plecoglossicida* strain NB2011, the causative agent of white nodules in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) [J]. Genome Announcements, 2013, 1(4): e00586-13. DOI:10.1128/genomeA.00586-13.
- [4] 许斌福, 程海华, 池洪树, 等. 大黄鱼内脏白点病的病原分析与鉴定 [J]. 福建农业学报, 2015, 30(7): 631-635.
- [5] DUFF D C B. The oral immunization of trout against bacterium salmonicida [J]. Journal of Immunology, 1942, 44(1): 87-94.
- [6] 余晓丽, 陈明, 李莉萍, 等. 罗非鱼海豚链球菌疫苗及其免疫效果的研究 [J]. 淡水渔业, 2008, 38(6): 31-37.
- [7] 卫龙兴, 王福泉. 动物疫苗中灭活剂与佐剂的种类及其作用 [J]. 现代农业科技, 2009(19): 321.
- [8] 刘振兴, 张殿昌, 龚世园. 鱼用免疫佐剂的研究概况 [J]. 水生态学杂志, 2007, 27(2): 3-6.
- [9] 杨先乐, 夏春, 左文功. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究: 疫苗株的免疫原性及其有效免疫剂量的比较 [J]. 水产学报, 1989, 13(2): 138-144.
- [10] CIPRIANO R C, STARLIPER C E. Immersion and injection vaccination of salmonids against furunculosis with an avirulent strain of *Aeromonas salmonicida* [J]. The Progressive Fish-Culturist, 1982, 44(1982): 167-169.
- [11] DIXON P F, HILL B J. Inactivation of infectious pancreatic necrosis virus for vaccine use [J]. Journal of Fish Diseases, 1983, 6(5): 399-409.
- [12] 孙红祥. 中华鳖温和气单胞菌口服缓释微球疫苗的研究: 疫苗生产菌株灭活方法的优化 [J]. 中国兽医学报, http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb

2003, 23(2): 157-159.

- [13] 陈月英, 钱冬, 沈智华, 等. 养殖鱼类细菌性败血症的菌苗制备技术 [J]. 水产学报, 1996, 20(2): 125-131.
- [14] 陈月英, 钱冬. 淡水鱼类细菌性败血症菌苗浸浴免疫研究 [J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(6): 597-603.
- [15] 肖慧, 李军. 鲈鱼鳃弧菌病疫苗的制备及免疫防治效果 [J]. 青岛海洋大学学报 (自然科学版), 2003, 33(2): 226-232.
- [16] 张玉芬, 张秀军, 何生美. 嗜水气单胞菌疫苗用菌液培养条件及灭活方法的研究 [J]. 江西农业大学学报, 2009, 30(1): 31-34.
- [17] PRESS C M, EVENSEN Ø, REITAN L J, et al. Retention of furunculosis vaccine components in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following different routes of vaccine administration [J]. Journal of Fish Diseases, 1996, 19(19): 215-224.
- [18] MAGNADOTTIR B, GUDMUNDSDOTTIR B K. A comparison of total and specific immunoglobulin levels in healthy Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and in salmon naturally infected with *Aeromonas salmonicida* subsp. *achromogenes* [J]. Veterinary Immunology & Immunopathology, 1992, 32(1/2): 179-189.
- [19] JR P R, LANDOLT M L, BUSCH R A. Route of vaccine administration: effects on the specific humoral response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 1998, 33(3): 157-166.
- [20] 张波, 曾令兵, 罗晓松, 等. 嗜水气单胞菌3种疫苗免疫的青鱼外周血免疫指标的变化 [J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(1): 100-105. DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2012.01.021.
- [21] GUO S L, WANG Y, GUAN R Z, et al. Immune effects of a bivalent expressed outer membrane protein to American eels (*Anguilla rostrata*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 35(2): 213-220.
- [22] 王燕, 张晓华, 吕俊超, 等. 养殖大菱鲈病原菌迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及其疫苗研制 [J]. 中国水产科学, 2009, 16(3): 394-403.
- [23] 耿晓修, 丁诗华, 孙翰昌, 等. 荧光假单胞菌灭活疫苗对草鱼的免疫保护效应 [J]. 西南大学学报 (自然科学版), 2006, 28(1): 120-123.
- [24] 张吉红, 陆承平. 佐剂对嗜水气单胞菌灭活疫苗免疫效果的作用 [J]. 中国兽药杂志, 2003, 37(4): 26-27.
- [25] 肖琳琳, 张庆华. 蜂胶佐剂对异育银鲫嗜水气单胞菌灭活疫苗的免疫增强试验 [J]. 海洋渔业, 2004, 26(4): 295-299.
- [26] 隋虎辰, 谢国驷, 边慧慧, 等. 两种多糖作为迟缓爱德华氏菌 (*Edwardsiella tarda*) 灭活疫苗佐剂对大菱鲈 (*Scophthalmus maximus*) 的免疫保护效果 [J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(5): 1001-1007.
- [27] 杨星, 张美彦, 周勇, 等. 不同佐剂对大鲈嗜水气单胞菌灭活疫苗的免疫效果 [J]. 水生态学杂志, 2015, 36(5): 69-73. DOI:10.15928/j.1674-3075.2015.05.011.
- [28] EVANS J J, KLESIOUS P H, SHOEMAKER C A. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration [J]. Vaccine, 2004, 22(27/28): 3769-3773.
- [29] JANSEN T, HOFMANS M P M, THEELEN M J G, et al. Structure-activity relations of water-in-oil vaccine formulations and induced antigen-specific antibody responses [J]. Vaccine, 2005, 23(8): 1053-1060.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 马 英)