

文章编号:1000-0615(2000)06-0564-06

弧菌疫苗对斑节对虾和日本对虾 免疫预防的作用

陶保华, 胡超群, 任春华

(中国科学院南海海洋研究所, 广东 广州 510301)

摘要: 尝试使用免疫学的方法来防治对虾弧菌病。将病原副溶血弧菌制成福尔马林灭活疫苗, 在实验条件下分别以浸泡、口服和注射等方式接种于斑节对虾和日本对虾, 结果发现, 在一定的范围内, 对虾的免疫保护率随疫苗浓度的增加而升高。在注射接种的方式中, 斑节对虾在 10^9 、 10^8 、 10^7 cells·mL⁻¹ 的疫苗剂量下的保护力分别为 40%、50% 和 40%, 浸泡组(疫苗浓度分别为 10^8 cells·mL⁻¹、 10^7 cells·mL⁻¹ 和 10^6 cells·mL⁻¹) 的免疫保护率分别为 30%、30% 和 20%, 投喂组的免疫保护率为 11.1%。日本对虾注射免疫组(疫苗剂量为 10^8 cells·mL⁻¹、 10^7 cells·mL⁻¹ 和 10^6 cells·mL⁻¹) 的免疫保护率分别为 60%、40% 和 30%, 浸泡组(疫苗浓度分别为 10^8 cells·mL⁻¹、 10^7 cells·mL⁻¹ 和 10^6 cells·mL⁻¹) 的分别为 22.2%、22.2% 和 11.1%, 投喂组的免疫保护率为 0。表明疫苗能提高对虾的成活率和抗感染能力, 初步证实了对虾弧菌灭活疫苗的有效性, 为日后大规模的生产实践打下了基础。

关键词: 弧菌疫苗; 免疫预防; 斑节对虾; 日本对虾

中图分类号: S945.4 **文献标识码:** A

The immunological protection of *vibrio* vaccine to *Penaeus monodon* and *Penaeus japonicus*

TAO Bao-hua, HU Chao-qun, REN Chun-hua

(South China Sea Institute of Oceanology, CAS, Guangzhou 510301, China)

Abstract: For preventing penaeid shrimps vibriosis, the immunological methods are studied. Vaccines are made of killed bacteria by formalin. Shrimps inoculated by immersion, intramuscular injection and oral administration are more resistant to vibriosis than those not inoculated. Within a certain extent, the resistance to vibriosis of penaeid shrimps inoculated improves with the increasing of vaccine concentration. For *Penaeus monodon* by intramuscular injection, the RPS (Relative Percent of Survival) is 40%、50% and 40% respectively in vaccine concentration of 10^9 、 10^8 、 10^7 cells·mL⁻¹, the RPS is 30%、30% and 20% respectively in vaccine concentration of 10^8 cells·mL⁻¹、 10^7 cells·mL⁻¹ and 10^6 cells·mL⁻¹ by immersion, the RPS is 11.1% by oral administration. For *Penaeus japonicus* by intramuscular injection, the RPS is 60%、40% and 30% respectively in vaccine concentration of 10^8 cells·mL⁻¹、 10^7 cells·mL⁻¹ and 10^6 cells·mL⁻¹, the RPS is 22.2%、22.2% and 11.1% respectively in vaccine concentration of 10^8 cells·mL⁻¹、 10^7 cells·mL⁻¹ and 10^6 cells·mL⁻¹ by immersion, the RPS is 0 by oral administration. The result suggested that the vaccine can improve penaeid shrimps survival rate and anti-infected

收稿日期:1999-12-22

资助项目:中国科学院“九五”重大科研资助项目(K2951-B-111);中国科学院生物科学与技术特别支持费项目(Y982201)

作者简介:陶保华(1970-),男,湖北黄冈人,实习研究员,主要从事海洋生物病害研究。E-mail:bhtao@yahoo.com

ability.

Key words: *vibrio* vaccine; immune protection; *Penaeus mondon*; *Penaeus japonicus*

随着养殖业的发展,病害问题日渐突出。病原已涉及到包括海水鱼、虾和贝类在内的几乎所有养殖种类,其中尤以细菌病最为常见。目前人们已普遍认识到常用的抗生素等药物存在着诱导病原菌抗药性的产生和污染环境等潜在威胁,希望有一种更为有效的防治措施,免疫防治是其中较为有效的手段之一。在鱼类中,目前全世界已有20多种细菌病的疫苗作为商品化生产,但在对虾中,迄今仍无一种有效的商用疫苗出现,因此,本实验尝试使用免疫学方法对对虾弧菌病进行防病研究。

1 材料与方法

1.1 实验对虾

体长7~9cm的健康斑节对虾和日本对虾,直接购于养殖场。

1.2 实验菌株

湛江地区发病虾场分离到的致病弧菌——副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)。

1.3 疫苗的研制

将副溶血弧菌接种于普通液体海水培养基(pH=7.2),30℃振荡培养24h后,加入40%甲醛溶液使其终浓度为0.5%,灭活24h。用平板涂布法检验无菌落产生后,将灭活菌悬液用美国杜邦公司 Sorvall RC 28S 冷冻高速离心机离心洗涤,最后配成含菌量为 10^9 cells/mL的疫苗于4℃冰箱中保存。疫苗在施用前均作无菌检查,上述所有操作均在严格无菌条件下进行。

1.4 疫苗的有效性检测

1.4.1 疫苗接种

实验均在室内进行。实验用水族箱在实验前均经漂白粉消毒,水族箱大小为80cm×40cm×60cm,每只水族箱放气石一个,实验水深为50cm,实验用水为砂滤新鲜海水,实验水温分别为30℃(斑节对虾)和26℃(日本对虾),海水盐度为25~30,pH为8.2~8.4,连续充气,每日投饵两次(早晚各一次),每天吸污、换水,换水量为30%/d,实验周期为15d。

肌肉注射法接种 将上述灭活菌苗以三个浓度梯度用肌肉注射法接种于体长9~11cm的斑节对虾(分别为 10^7 、 10^8 和 10^9 cells·mL⁻¹)和日本对虾(分别为 10^6 、 10^7 和 10^8 cells·mL⁻¹),注射剂量为每尾0.1mL,对照组注射等量生理盐水。每个实验组用虾10尾,观察对虾的死亡情况。

浸泡接种 将上述灭活菌苗以 10^6 、 10^7 、 10^8 cells·mL⁻¹的浓度浸泡接种于斑节对虾和日本对虾,方法是先将对虾在高渗海水溶液盐度为50中浸泡2min,然后放入各浓度的灭活菌悬液中浸泡3min,最后放入水族箱中,每箱放虾10尾,对照组不浸泡疫苗,其余操作同浸泡组,观察对虾的死亡情况。

口服接种 将上述灭活菌苗以 10^9 cells·mL⁻¹饲料的浓度浸泡饵料10min,晾干后投喂接种于斑节对虾和日本对虾,连喂7d。每箱放虾10尾,对照组直接投喂未经浸泡菌苗的干饵,观察对虾的死亡情况。

1.4.2 攻毒感染

于对虾接种15d后,用副溶血弧菌对上述接种对虾和对照虾进行肌注攻毒,注射剂量为每尾0.1mL,感染菌悬液浓度为 2.8×10^7 CFU·mL⁻¹(斑节对虾,CFU为Clone Forming Unit,即菌落形成单位)和 4.3×10^7 CFU/mL(日本对虾),实验周期为10d,记录死亡情况。

1.5 免疫指标测定

1.5.1 免疫保护率的测定,按下式计算

$$\text{免疫保护率的测定}(\%) = (1 - \frac{\text{免疫组死亡率}}{\text{对照组死亡率}}) \times 100$$

1.5.2 血清中酚氧化酶活力(PO)的测定

分别取正常的和注射免疫后 3、6、12、24、36、48、72、96、120、144、168、192h 的斑节对虾,抽取血淋巴,测定对虾血清的 PO 活力,采用 Ashida^[1]的测定方法,参照王雷等^[2]的进行,具体方法为:自对虾头胸甲后插入心脏取血,置于 Eppendorf 离心管中 4℃ 过夜,然后低速离心使血清析出。将 3mL 0.1mol·mL⁻¹ pH 为 6.0 的磷酸盐缓冲液分别与 100μL 的 0.01mol·mL⁻¹ 的 L-dopa 及 100μL 待测血清于室温下混匀,每隔 2min 读取 490nm 波长下的光密度值,以 OD₄₉₀ 对反应时间作图。酶活力以实验条件下每分钟 OD₄₉₀ 增加 0.001 为一个酶活力单位,为简便起见,本实验用控制相同测定条件的办法,直接用活力单位表示酶活性。

2 结果

2.1 疫苗安全性检验

注射剂量 10⁹cells·mL⁻¹ 的免疫组在注射后 24h 有少量死亡,无明显症状,其余组均正常,其死亡情况见表 1 和表 2。

表 1 免疫后实验斑节对虾的实验结果

Tab. 1 The results of test with vaccinated *P. monodon*

试验组别	实验虾数 (尾)	接种浓度 Cells·mL ⁻¹	1d	2d	3d	4d	5d	7d	9d	11d	13d	15d
注射组 1	10	4.2 × 10 ⁹	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
注射组 2	10	4.2 × 10 ⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
注射组 3	10	4.2 × 10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
注射对照组	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡组 1	10	4.2 × 10 ⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡组 2	10	4.2 × 10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡组 3	10	4.2 × 10 ⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡对照组	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
投喂组	10	10 ⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
投喂对照组	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 2 免疫后日本对虾的实验结果

Tab. 2 The results of test with vaccinated *P. japonicus*

试验组别	实验虾数 (尾)	接种浓度 Cells·mL ⁻¹	1d	2d	3d	4d	5d	7d	9d	11d	13d	15d
注射组 1	10	3.6 × 10 ⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
注射组 2	10	3.6 × 10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
注射组 3	10	3.6 × 10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
注射对照组	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡组 1	10	3.6 × 10 ⁸	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡组 2	10	3.6 × 10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡组 3	10	3.6 × 10 ⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
浸泡对照组	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
投喂组	10	10 ⁹	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
投喂对照组	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.2 疫苗效力试验

肌注感染后,在整个实验周期内,实验组均有不同程度的存活,而对照组则在5d内全部死亡,其死亡情况见表3和表4。

表3 攻毒感染后斑节对虾的实验结果

Tab.3 Mortality of *P. monodon* challenged with *Vibrosis*

试验组别	实验虾数 (尾)	接种浓度 Cells·mL ⁻¹	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d
注射组1	10	4.2×10 ⁹	1	2	2	0	1	0	0	0	0	0
注射组2	10	4.2×10 ⁸	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
注射组3	10	4.2×10 ⁷	1	2	1	1	1	0	0	0	0	0
注射对照组	10	0	2	2	4	1	1	0	0	0	0	0
浸泡组1	10	4.2×10 ⁸	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0
浸泡组2	10	4.2×10 ⁷	1	2	2	0	1	0	0	0	0	0
浸泡组3	10	4.2×10 ⁶	1	2	2	2	1	0	0	0	0	0
浸泡对照组	10	0	2	3	2	2	0	1	0	0	0	0
投喂组	10	10 ⁹	2	2	1	2	1	0	0	0	0	0
投喂对照组	10	0	1	3	2	2	1	0	0	0	0	0

表4 攻毒感染后日本对虾的实验结果

Tab.4 Mortality of *P. japonicus* challenged with *Vibrosis*

免疫组别	实验虾数 (尾)	接种浓度 Cells·mL ⁻¹	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d
注射组1	10	3.6×10 ⁸	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0
注射组2	10	3.6×10 ⁷	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0
注射组3	10	3.6×10 ⁶	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0
注射对照组	10	0	2	4	3	1	0	0	0	0	0	0
浸泡组1	10	3.6×10 ⁸	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0
浸泡组2	10	3.6×10 ⁷	3	2	1	0	1	0	0	0	0	0
浸泡组3	10	3.6×10 ⁶	2	3	1	1	1	0	0	0	0	0
浸泡对照组	10	0	3	4	1	1	0	0	0	0	0	0
投喂组	10	10 ⁹	2	3	2	1	1	1	0	0	0	0
投喂对照组	10	0	4	3	3	0	0	0	0	0	0	0

2.3 免疫保护率的计算

斑节对虾注射免疫组(接种浓度分别为10⁹cells·mL⁻¹、10⁸cells·mL⁻¹和10⁷cells·mL⁻¹)的免疫保护率分别为40%、50%和40%,浸泡组(接种浓度分别为10⁸cells·mL⁻¹、10⁷cells·mL⁻¹和10⁶cells·mL⁻¹)的分别为30%、30%和20%,投喂组的免疫保护率为11.1%。

日本对虾注射免疫组(接种浓度为10⁸cells·mL⁻¹、10⁷cells·mL⁻¹和10⁶cells·mL⁻¹)的免疫保护率分别为60%、40%和30%,浸泡组(接种浓度分别为10⁸cells·mL⁻¹、10⁷cells·mL⁻¹和10⁶cells·mL⁻¹)的分别为22.2%、22.2%和11.1%,投喂组的免疫保护率为0。

2.4 血清中酚氧化酶活力的变化

接种弧菌苗后,对虾血清中酚氧化酶的活力明显高于对照组,并且随着时间的推移开始缓慢下降,其活力变化值见表5。

表5 免疫后斑节对虾血清中酚氧化酶的活力变化值

Tab.5 The changes of PO activities in serum of *P. monodon* after vaccination

实验组别	3h	6h	12h	24h	36h	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d
免疫组	15.0	18.2	22.0	25.6	20.5	24.7	21.0	14.6	18.4	20.0	16.2	15.3
对照组	12.5	10.7	13.6	11.8	9.6	12.5	11.3	9.5	9.8	12.3	10.2	11.2

3 讨论

3.1 弧菌疫苗的安全性和有效性

在疫苗应用中,安全性和有效性是最为重要的。为了不损失细胞内的一些热敏性物质,本文采用福尔马林灭活的方法制得疫苗,通过对副溶血弧菌疫苗的实验发现,在含菌 $10^8 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以下施用时对虾无任何不良反应,而以含菌量为 $10^9 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 施用时则会引起对虾的少量死亡,故此,作者认为在疫苗浓度为 $10^8 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时施用是安全的。同时,在各接种浓度下,该疫苗对斑节对虾和日本对虾均有不同程度的保护作用,并且在 $10^6 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1} \sim 10^8 \text{ cells} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度范围内,免疫保护率随着疫苗浓度的升高而增强,初步证实了疫苗的有效性。关于免疫保护率的提高原因,推测可能是由于疫苗剂量的增加提高了菌体表面抗原进入虾体的量,从而加强了酚氧化酶原系统的激活,使对虾免疫系统自我保护能力加强。

3.2 免疫保护率的持续时间

有关对虾细菌疫苗的持久性问题,不同研究者得出了不同的结果。Lewis 和 Lawrence^[3] 研制的一种弧菌疫苗,应用浸泡的方法对南美白对虾接种后,其免疫保护率可持续到成虾收获时。Itami 等^[4] 对日本对虾接种弧菌疫苗后,其免疫保护率可持续 50d。叶孝经^[5] 通过小规模的生产应用发现,中国对虾接种弧菌苗后,其免疫保护率也可持续到收虾时。在斑节对虾中,Song 和 Sung^[6] 认为保护力只有 14d 左右。本实验的研究发现,以注射和浸泡的方式对斑节对虾和日本对虾进行接种,15d 后仍有一定程度的免疫保护率。

3.3 接种方式的选择

在鱼类中,抗原可通过鳃进入鱼体内^[7],也可以通过消化道进入体内^[8]。而在对虾中,目前对于疫苗进入虾体的机制仍不清楚,Sung 和 Song^[9] 用间接荧光抗体技术对热灭活的创伤弧菌抗原在对虾体内组织定位进行了观察,发现弧菌苗主要分布在肝胰腺、肠道和淋巴组织中,但进入部位仍不清楚,使得在对疫苗接种方式的选择上缺乏指导作用。

本实验中,由三种接种途径的免疫效果来看,注射方式保护效果最好,但使用起来费时费力,限制了它在大规模的养殖生产中应用,然而在亲虾的抗病防治中则不失为是一种好的方法;浸泡方式效果不很理想,且疫苗需要量大,在养成期的应用也有限制,但对于苗期幼体的接种仍然是一种好的方法,对虾幼体经浸泡接种后,可获得较长时间的免疫保护率^[3,4];投喂方式由于受到虾体消化酶的破坏而效果较差,但使用方便、疫苗的需要量小,在实际生产中较为可行,如能以某种方式加以改造使用,如添加于微囊以抵消消化系统的作用,则不失为一种经济可行的接种途径。为获得较为持久的免疫保护率,有人尝试结合浸泡和投喂两种方式,对斑节对虾进行接种,并取得了好的效果^[10]。故探索一条既经济又实用的免疫方式对于当前虾类的免疫预防是至关重要的。

3.4 酚氧化酶活力

在甲壳动物中,酚氧化酶原系统在机体对外物入侵过程中起着重要作用,伴随着颗粒细胞的脱颗粒

和酚氧化酶原系统的激活,酚氧化酶被释放出来,起识别和调理作用。本实验以酚氧化酶的活力作为免疫指标,结果显示,免疫后斑节对虾酚氧化酶的活力升高,说明疫苗的使用能够激活虾体内酚氧化酶的活性。由于在取血等操作过程和冰箱中保存的过程中均可激活酚氧化酶原^[11],造成酚氧化酶的释放而影响实验结果的准确性;同时,受实验条件的限制,每次只能取 2~3 尾对虾的血样测定后取平均值,无法象大型实验动物那样连续取样,使得实验测得的数值随着实验对虾的体质差异而变化较大,酚氧化酶的活力没有显示出明显的规律性,这都有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Ashida M. Purification and characterization of prophenoloxidase from hemolymph of the silkworm *Bombyx mori* [J]. *Archi Biochem Biophys*, 1971, 144: 749 - 762.
- [2] 王 雷, 李光友, 毛远兴. 口服免疫型药物后中国对虾某些血淋巴因子的测定及方法研究 [J]. *海洋与湖沼*, 1995, 26(1): 34 - 41.
- [3] Lewis D H, Lawrence A L. Immunoprophylaxis to *Vibrio* sp. in pond reared penaeid shrimp [A]. *Proceedings symposium on warm water crustacean aquaculture* [C]. Brigham Young University, Laie, Hi, 1985.
- [4] Itami T, Takahashi Y, Yoneoka K, et al. Survival of larval giant tigerprawns *Penaeus monodon* after addition of killed vibrio cells to a microencapsulated diet [J]. *J Aquatic Animal Health*, 1991, 3(2): 151 - 152.
- [5] 叶孝经. 对虾弧菌苗免疫的研究 [J]. *海洋水产研究丛刊*, 1990, 32: 13 - 18.
- [6] Song Y L, Sung H H. Enhancement of growth in tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by bacteria prepared from *Vibrio vulnificus* [J]. *Bull Eur Ass Fish Pathol*, 1990, 10(4): 98 - 99.
- [7] Tatner M F, Home M I T. Factors influencing the uptake of 14c-labeled *Vibrio anguillarum* vaccine in direct immersion experiments with Rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson [J]. *J Fish Biol*, 1983, 22: 585 - 591.
- [8] Robohm R A. Evidence that oral ingestion is the principal route of antigen uptake in bath-immunized fish [J]. *Dev Comp Immunol*, 1986, 10: 145.
- [9] Sung H H, Song Y L. Tissue location of *Vibrio* antigen delivered by immersion to tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. *Aquac*, 1996, 145: 41 - 54.
- [10] Home M T, Poy M, Pranthanpipat P. Control of vibriosis in black tige shrimp, *Penaeus monodon*, by vaccination [A]. In: *Diseases in Asian Aquaculture II*, Shariff M, Arthur J R, & Subasinghe R P, eds. *Fish Health Section* [C]. Manila: Asian Fisheries Society. 1995. 459 - 467.
- [11] Ashida M, Sderhill K. The prophenoloxidase activating system in crayfish [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1984, 77B(1): 21 - 26