

养殖大菱鲂病原菌迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及其疫苗研制

王燕, 张晓华, 吕俊超, 徐子男, 陈吉祥, 韩茵

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 2006年9月山东胶南某养殖场大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)发生病害,从患病大菱鲂脾脏分离出优势菌株WY28,人工感染试验证实WY28菌株对大菱鲂和斑马鱼(*Danio rerio*)有较强的致病性,其对大菱鲂和斑马鱼的半数致死剂量(LD_{50})分别为39 cfu/g (BW) (3.3×10^2 cfu/ind)和 2.1×10^4 cfu/g (BW) (6.4×10^3 cfu/ind)。综合该菌在形态与生理生化特征及16S rDNA同源性等方面的实验结果,确定WY28菌株为迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)。该菌对先锋霉素V、庆大霉素、氟哌酸、痢特灵等抗生素敏感。WY28菌株经福尔马林灭活制成灭活疫苗,对大菱鲂进行腹腔注射免疫,免疫后第4周测得免疫鱼血清中抗迟缓爱德华氏菌的抗体效价平均为1:1 280。免疫后第6周,免疫鱼血清中抗迟缓爱德华氏菌的抗体效价达到更高水平(平均值为1:3 289.6)。攻毒试验表明,受免鱼的相对存活率明显高于对照组。由此可见,利用从病鱼体内分离的迟缓爱德华氏菌菌株制备的灭活疫苗能使大菱鲂较有效抵御迟缓爱德华氏菌强毒株的攻击。[中国水产科学, 2009, 16(3): 394-403]

关键词: 迟缓爱德华氏菌; 大菱鲂; 灭活疫苗; 抗体效价; 免疫保护力

中图分类号: S9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)03-0394-10

大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)原产于大西洋东北部区域,是近年来中国引进的优良海水养殖品种之一,在中国北方沿海地区养殖非常普遍。然而,随着养殖规模的扩大,大菱鲂的病害问题日渐突出^[1-2],给养殖业造成巨大的经济损失^[3-5]。

迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)是多种淡、海水养殖鱼类的重要病原菌之一^[6],有关迟缓爱德华氏菌引起日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)、欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)等疾病的报告在国内外已屡见不鲜^[7-10],不少国家和地区均不同程度地发生和流行过由该菌引起的鱼类病害,且损失严重;同时,该菌也能在一定条件下引发人类胃肠炎^[11]。2002年秋季,山东沿海部分养殖场的苗期和养成期大菱鲂发生批量死亡现象,研究证实其病原为迟缓爱德华氏菌^[12]。对迟缓爱德华氏菌引发的疾病,主要是使用抗生素治疗。然而,化学药剂和抗生素的使用会引起抗药菌

株的产生,并导致药物残留以及水环境污染。2006年冬季,在上海各大超市出售的大多数大菱鲂中检出甲醛或(和)抗生素残留,对水产品养殖业和市场造成了巨大的冲击。鉴此,传统疫苗被认为将在鱼类细菌性传染病的防治中起到重要作用^[13]。

本研究以山东胶南某渔场发病大菱鲂中分离得到的优势菌株WY28为研究对象,经形态、生理生化特征及16S rDNA同源性等方面的鉴定,确定WY28菌株为迟缓爱德华氏菌。目前对大菱鲂病害的防治主要采用抗生素方法,然而抗生素的使用会导致抗性菌株的产生,而且也会危害到人类健康,不符合无公害水产品的生产要求。为建立一种环境友好型防治迟缓爱德华氏菌引起的大菱鲂病害的方法,作者将WY28菌株制成灭活疫苗,对该渔场的大菱鲂进行免疫并对疫苗的免疫保护作用进行研究,旨在为由迟缓爱德华氏菌引起的鱼类病害提供防治依据。

收稿日期: 2008-03-18; 修订日期: 2008-06-18.

基金项目: 国家863计划项目(2007AA09Z434; 2008AA092501); 农业部公益性行业科研专项资助课题(nyhyzx07-046).

作者简介: 王燕(1982-),女,博士研究生; 研究方向: 海洋微生物学. E-mail: wangyan19820527@yahoo.cn.

通讯作者: 张晓华(1965-),女,教授,从事海洋微生物学和海水养殖动物病害研究. Tel: 0532-82032767. E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn

1 材料与方法

1.1 病原菌的分离与鉴定

1.1.1 病原菌的分离 发病大菱鲆取自山东胶南某海水养殖场,病鱼主要表现为尾部出血,腹部部分区域发红,并有少量破损斑点,解剖发现肝脏局部发红。对患病大菱鲆用无菌生理盐水冲洗2遍,用1 mL无菌注射器从病鱼尾静脉取血0.2 mL,并迅速将所取的血液涂布于LBN(含2%NaCl的LB)平板。然后无菌操作进行解剖,取出病鱼的肝、胆、肾、脑、脾等组织小块于无菌离心管中,无菌盐水冲洗组织块,用无菌棉签将组织捣碎并蘸取少量接种于LBN平板,28℃恒温培养24 h后,挑取形态特征一致的优势菌落进行分离纯化,将纯化后的菌株置于15%的甘油溶液中,-80℃保存备用。同时,将纯化的优势菌接种于LBN平板和TCBS平板,28℃恒温培养24 h,观察菌落颜色及特征。

1.1.2 人工感染试验 将16 h的细菌培养物用0.85%的无菌盐水制成菌悬液,经平板计数浓度为 7.9×10^9 cfu/mL,10倍系列稀释后备用。取健康^[14]的大菱鲆(平均体质量8.5 g)30尾,分为5个实验组,1个对照组,每组5尾。用海水饲养,日换水量约50%。3 d后实验组分别腹腔注射50 μ L 10倍梯度稀释的菌悬液;对照组腹腔注射同等剂量的无菌生理盐水。每天正常饲喂并换水,连续饲养观察14 d,随时记录死亡情况。取濒死大菱鲆内脏组织进行细菌再分离。

以同样的方法人工感染模式动物斑马鱼(平均体质量0.3 g),并取濒死斑马鱼的内脏组织进行细菌的再分离。利用Probit法^[15]计算出实验菌株对大菱鲆以及斑马鱼的半数致死量(LD₅₀)。

1.1.3 药敏试验 采用纸片扩散法,取100 μ L菌悬液(经显微镜计数约为 10^9 cfu/mL)涂布于LBN平板,用无菌镊子将抗生素纸片(购于杭州微生物试剂有限公司)轻轻贴在平板表面,28℃恒温培养24 h后测定抑菌圈直径,根据说明书的标准确定WY28菌株对不同抗生素的敏感性。

1.1.4 16S rDNA序列测定与分析 将分离菌株过夜培养,用1 mL无菌去离子水洗脱,100℃煮沸10 min,12 000 r/min离心10 min,取上清作为PCR反应

所用模板。PCR反应的引物是细菌16S rDNA的通用引物,扩增保守区段的第8~1 510段核苷酸序列。正向引物B8F序列为:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物B1510序列为:5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3'。引物由上海生物工程公司合成。PCR反应体系(50 μ L):5 μ L 10×PCR缓冲液,3 μ L 25 mmol/L MgCl₂,1 μ L 2.5 mmol/L 4×dNTP,0.25 μ L *Taq*聚合酶(5 U/ μ L),各0.5 μ L 50 μ mol/L正向和反向引物,1 μ L模板,其余用无菌去离子水补足。PCR反应条件:94℃预变性5 min;94℃1 min;55℃1 min;72℃1.5 min,30个循环;72℃延伸10 min。

PCR产物用TaKaRa凝胶回收试剂盒回收纯化后,克隆到PUCm-T载体,并转化大肠杆菌JM109,然后,由上海生物工程公司测序。将所得的16S rDNA序列与GenBank中的核酸序列进行BLAST分析,选取与该序列相似性最高的细菌16S rDNA序列,用MEGA 4.0软件进行进化树分析、作图。

1.1.5 生理生化特征的测定 利用API 20E自动鉴定系统(BioMérieux, France),按说明所述的方法进行鉴定,并进行氧化酶试验。

1.2 分离菌灭活疫苗对大菱鲆的免疫研究

1.2.1 实验鱼及饲养条件 实验鱼来自上述渔场,免疫用鱼体质量120 g,于饲养池中正常饲喂配合饲料,正常供循环水并充气。

1.2.2 灭活疫苗的制备 将上述分离鉴定的菌株接种在LBN培养基中,28℃振荡培养24 h,加入0.2%(V/V)的甲醛28℃灭活,定期取样接种培养,检查细菌灭活情况。灭活后以6 000 r/min离心(4℃)10 min收集菌体,生理盐水洗涤2次,并重悬菌体,使浓度约为 10^9 cfu/mL,4℃贮存备用。

1.2.3 疫苗的安全性检测 将灭活疫苗以0.2 mL/ind腹腔注射大菱鲆,对照组注射同等剂量的无菌生理盐水。然后正常饲养观察14 d,观察并记录鱼的活动及存活情况。

1.2.4 大菱鲆的免疫 以0.2 mL/ind的剂量腹腔注射灭活疫苗免疫2 000尾大菱鲆,并以注射同等剂量生理盐水的200尾大菱鲆为对照。2周后,以同样的方法加强免疫1次,然后正常饲养。

1.2.5 血清凝集抗体效价测定 实验组和对照组分别于首次免疫接种后第4周、第6周随机抽取10尾,进行尾静脉采血。血液于4℃放置过夜,离心分离血清。用96孔血凝板,以疫苗细胞为抗原对血清进行效价测定。

1.2.6 疫苗免疫保护力的测定 在首次免疫后的第4、第6周,每组分别取鱼6尾,以活菌进行攻毒试验,腹腔注射0.2 mL/ind,统计每组鱼攻毒后14 d内的疫苗免疫保护力(RPS),计算公式为: $RPS = (1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$

2 结果与分析

2.1 病原菌的分离与鉴定

2.1.1 病原菌的分离及其形态特征 从5尾患病大菱鲆的血、肝、胆、脑、肾、脾中分离到优势度在95%以上的病原菌15株。在LBN培养基上,15株菌的菌落形态、大小、颜色均一致,都不能在TCBS培养基上生长,且对15株菌所测生理生化特征相同,故判定为同一种细菌,以从其中一尾鱼的脾脏中分离的菌株(编号为WY28)作为代表,进行后续试验。

WY28菌株在LBN平板上28℃培养24 h后,菌落圆形,边缘整齐,表面隆起光滑,呈淡黄色;革兰氏染色阴性,短杆状,有鞭毛,具运动性。

2.1.2 人工感染试验 腹腔注射4 d后实验组大菱鲆开始出现死亡。当注射50 μL浓度 $\geq 7.9 \times 10^5$ cfu/mL的菌液时,死亡率为100%;至第14天,注射浓度10倍系列稀释后的死亡率分别为80%、60%、0%,而对照组大菱鲆无一例死亡(表1)。由此计算出WY28菌株对大菱鲆的LD₅₀为39 cfu/g(鱼)(3.3×10^2 cfu/ind)。人工感染后发病的大菱鲆主要表现为腹水,活力大大减弱。

表 1 菌株 WY28 人工感染健康大菱鲆结果
Tab. 1 Pathogenicity of WY28 to turbot

注射浓度/(cfu·mL ⁻¹) Concentration of bacteria	死亡数/尾 Number of deaths	死亡时间/d Time to death
7.9×10^6	5	2-9
7.9×10^5	5	3-9
7.9×10^4	4	4-12
7.9×10^3	3	5-14
7.9×10^2	0	14
对照组 Control	0	14

注: 剂量为50 μL/ind,实验鱼数量为5尾。
Note: Dosage was 50 μL/ind; n=5.

实验组斑马鱼在注射24 h后开始出现死亡。注射浓度为 2.0×10^7 cfu/mL时,斑马鱼在2 d内全部死亡。至第14天,注射浓度10倍系列稀释后的死亡率分别为60%、60%、20%、0%、0%、0%,而对照组斑马鱼无一例死亡(表2)。由此计算出WY28菌株对模式动物斑马鱼的LD₅₀为 2.1×10^4 cfu/g(鱼)(6.4×10^3 cfu/ind)。人工感染后发病的斑马鱼主要表现为腹部发红,活力大大减弱。

表 2 菌株 WY28 人工感染健康斑马鱼结果
Tab. 2 Pathogenicity of WY28 to zebrafish

注射浓度/(cfu·mL ⁻¹) Concentration of bacteria	死亡数/尾 Number of death	死亡时间/d Time to death
2.0×10^7	5	1-2
2.0×10^6	3	2-9
2.0×10^5	3	3-9
2.0×10^4	1	14
2.0×10^3	0	14
2.0×10^2	0	14
2.0×10^1	0	14
对照组 Control	0	14

注: 剂量为20 μL/ind,实验鱼5尾。
Note: Dosage was 20 μL/ind; n=5.

按1.1.1所述方法取人工感染后发病濒死大菱鲆和斑马鱼的内脏组织涂布于LBN平板,均可分离到大量菌落形态高度一致的细菌,其菌落形态、大小以及生理生化特征均与WY28菌株相同。

2.1.3 药敏试验 在所试的30种抗生素中,WY28菌株对先锋霉素V、庆大霉素、氟哌酸、痢特灵等抗生素敏感,而对其他抗生素则具有一定的抗性(表3)。

2.1.4 16S rDNA序列分析及比较 WY28菌株的16S rDNA序列(在GenBank数据库中的登录号为EU259317)与GenBank数据库中其他细菌的16S rDNA序列进行比较,发现与迟缓爱德华氏菌的相似性>99.7%,进化树分析表明WY28菌株与迟缓爱德华氏菌属于同一类群(图1)。

2.1.5 生理生化特征 API 20E自动鉴定系统结果显示,WY28菌株呈赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶、柠檬酸利用、H₂S、吲哚产生、葡萄糖氧化发酵反应阳性,而系统中的其他反应呈阴性,氧化酶反应也为阴性。这与迟缓爱德华氏菌的性质基本一致,只有柠檬酸利用不符(表4),可初步确认WY28菌株为迟缓爱德华氏菌。

表 3 WY28 菌株对抗菌药物的敏感性
Tab. 3 Sensitivity of strain WY28 to antimicrobial agents

抗菌药物 Antibiotic	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$) Dosage	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition	敏感性 Sensitivity	抗菌药物 Antibiotic	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{disc}^{-1}$) Dosage	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition	敏感性 Sensitivity
青霉素 Penicillin	10	0	R	新霉素 Neomycin	30	22	R
苯唑青霉素 Oxacillin	1	0	R	四环素 Acheomycin	30	0	R
氨苄青霉素 Ampicillin	10	0	R	强力霉素 Doxycycline	30	0	R
羧苄青霉素 Carbenicillin	100	0	R	美满霉素 Minocin	30	0	R
氧哌嗪青霉素 Piperacillin	100	0	R	红霉素 Erythromycin	15	0	R
先锋霉素Ⅳ Cephalothin Ⅳ	30	0	R	麦迪霉素 Midecamycin	30	0	R
先锋霉素Ⅴ Cefazolin	30	24	S	氟哌酸 Norfloxacin	10	20	S
先锋霉素Ⅵ Cephradin	30	20	S	奥复星 Ofloxacin	5	17	S
头孢呋肟 Cifuroxime	30	0	R	丙氟哌酸 Ciprofloxacin	5	20	R
复达欣 fortum	30	0	R	万古霉素 Vancomycin	30	0	R
菌必治 Rocephin	30	0	R	多粘菌素 B Polymyxin B	300	0	R
丁胺卡那霉素 Amikacin	30	15	R	复方新诺明 Cotrimexazole	75	0	R
庆大霉素 Gentamycin	10	15	S	痢特灵 Furaxone	300	25	S
卡那霉素 Kanamycin	30	17	R	氯霉素 Chloramphenicol	30	14	R
先锋必素 Cefoperazone	75	0	R	氯洁霉素 Chlorodeoxylincomycin	2	0	R

注: S 表示敏感; R 表示抗性。
Note: S-Sensitive; R-Resistant.

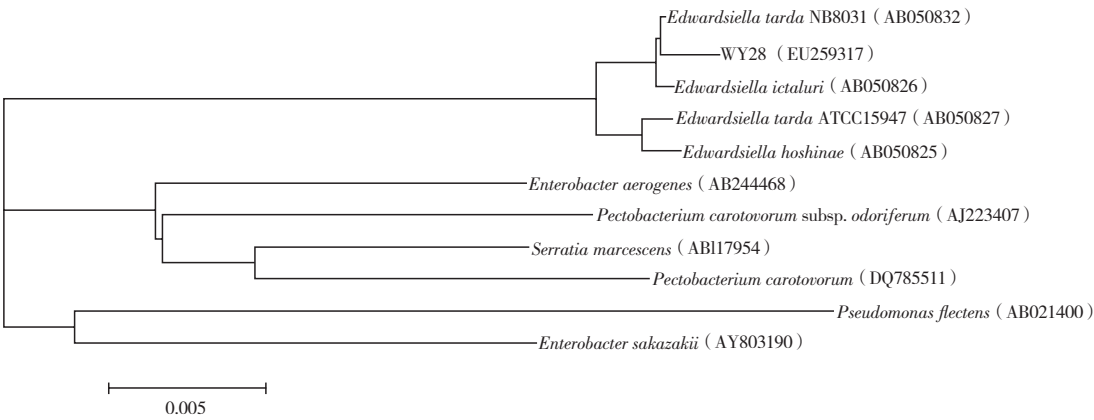


图1 根据菌株 WY28 的 16S rDNA 序列构建的进化树
Fig. 1 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences

表 4 WY28 菌株与 3 种爱德华氏菌生理生化特征的比较
Tab. 4 Characteristics exhibited by WY28 in comparison with three *Edwardsiella* species

反应名称 Phenotypic trait	WY28	迟缓爱德华氏菌 ^[16] <i>Edwardsiella tarda</i>	鲑鱼爱德华氏菌 ^[16] <i>Edwardsiella ictaluri</i>	保科爱德华氏菌 ^[16] <i>Edwardsiella hoshinae</i>
β-半乳糖苷酶 β-Galactosidase	—	—	—	—
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	—	—	—	—
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	+	+	+	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	+	+	26%–75% +	+
柠檬酸利用 Citrate utilization	+	—	—	—
H ₂ S 产生 H ₂ S production	+	+	—	—
脲酶 Urease	—	—	—	—
吲哚产生 Indole production	+	+	—	11%–25% +
VP 反应 Voges-Proskauer reaction	—	—	—	—
明胶酶 Gelatinase	—	—	—	—
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+
甘露醇 Mannitol	—	—	—	+
山梨醇 (SOR) Sorbitol	—	—	—	—
鼠李糖 Rhamnose	—	—	—	—
蔗糖 Sucrose	—	—	—	+
密二糖 Melibiose	—	—	—	—
阿拉伯糖 Arabinose	—	—	—	11%–25% +
氧化酶 Oxidase	—	—	—	—
运动性 Mobility	—	+	—	+

注: +: 阳性反应; —: 阴性反应。
Note: +: Positive; —: Negative.

2.2 WY28菌株灭活疫苗对大菱鲆的免疫研究

2.2.1 疫苗质量及安全性 WY28菌株用0.2%甲醛28℃处理24 h时,取样所涂平板经48 h培养后,平板上无菌落生长,表明灭活彻底。所有注射疫苗的大菱鲆全部存活,且进食及活动正常,疫苗安全可靠。

2.2.2 大菱鲆的体液免疫反应 以疫苗细胞为抗原检测免疫大菱鲆的血清抗体效价。结果显示大菱鲆

经腹腔注射免疫后,产生了明显的特异性免疫反应。在免疫后第4周和第6周时,免疫组血清随着免疫时间的增长,抗体凝集效价也随之增高;而对照组的抗体效价均低于2。在第4周时被注射的鱼体已产生了较高的抗体水平,其几何平均数为1 280;于第6周抗体效价几何平均数为3 289.6,最高效价可达4 096(图2)。

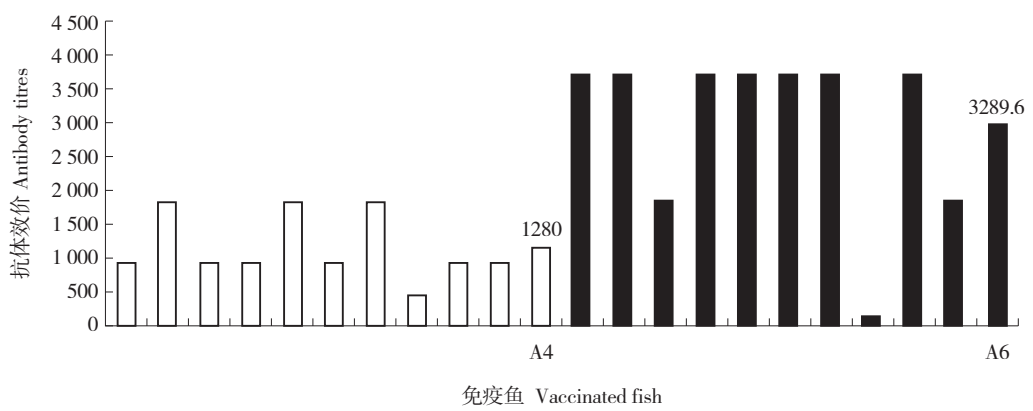


图2 大菱鲆免疫后第4周、第6周抗体效价及比较
A4: 免疫后第4周抗体效价平均值 A6: 免疫后第6周抗体效价平均值
□ 免疫后第4周抗体效价 ■ 免疫后第6周抗体效价
Fig. 2 Antibody titres in vaccinated turbot 4 weeks and 6 weeks after immunization
A4: Average of the antibody titres in vaccinated fish 4 weeks after immunization
A6: Average of the antibody titres in vaccinated fish 6 weeks after immunization
□ The antibody titres in vaccinated fish 4 weeks after immunization
■ The antibody titres in vaccinated fish 6 weeks after immunization

2.2.3 疫苗的免疫保护力 免疫后第4周用 2.5×10^5 cfu/mL的WY28腹腔注射攻毒感染大菱鲆,对照组在感染后第10天出现死亡,第13天时全部死亡,而

免疫组在感染后第12天才开始出现死亡,存活率为33.3%,免疫保护力为33.3%(表5)。

表5 大菱鲆免疫后第4周用 2.5×10^5 cfu/mL的WY28攻毒后的免疫保护力
Tab. 5 Relative percent survival (RPS) against bacteria (2.5×10^5 cfu/mL) 4 weeks after immunization of turbot

组别 Group	试验鱼数/尾 Number of fish in experiment	存活鱼数/尾 Number of survived fish	存活率/% Survival rate	免疫保护力/% RPS
免疫组 Immunized group	6	2	33.3	33.3
对照组 Control	6	0	0	

免疫后第6周分别用 3.4×10^7 cfu/mL、 1.6×10^6 cfu/mL、 1.6×10^5 cfu/mL的WY28腹腔注射感染大菱鲆。当菌液浓度为 3.4×10^7 cfu/mL时,对照组在感染

后第7天全部死亡,而免疫组在感染后第10天才开始出现死亡,第11天时全部死亡(表6);当菌液浓度为 1.6×10^6 cfu/mL时,对照组在感染后第7、8两天内

全部死亡,免疫组虽然也在感染后第7天开始出现死亡,但死亡速度远远低于对照组,且存活率为16.7%,免疫保护力为16.7%(表6);当菌液浓度为 1.6×10^5 cfu/mL时,对照组在感染后第2天出现死亡,第14天时全部死亡,而免疫组在感染后第7天才开始出现死亡,存活率为66.7%,免疫保护力为66.7%(表6)。

表6 大菱鲆免疫后第6周用不同浓度的WY28菌液攻毒后的免疫保护力
Tab. 6 Relative percent survival (RPS) against different concentration of WY28 6 weeks after immunization

菌液浓度/(cfu·mL ⁻¹) Concentration of bacteria	组别 Group	试验鱼数/尾 Number of fish in experiment	存活鱼数/尾 Number of survived fish	存活率/% Survival rate	免疫保护力/% RPS
3.4×10^7	免疫组 Immunized group	6	0	0	0
	对照组 Control	6	0	0	
1.6×10^6	免疫组 Immunized group	6	1	16.7	16.7
	对照组 Control	6	0	0	
1.6×10^5	免疫组 Immunized group	6	4	66.7	66.7
	对照组 Control	6	0	0	

3 讨论

3.1 大菱鲆病原菌WY28的分离鉴定

迟缓爱德华氏菌是一种细胞内寄生的鱼类致病菌,它能感染多种淡水和海水鱼类,也能在一定条件下引发人的胃肠炎^[17];本研究从中国工厂化养殖的患病大菱鲆中分离到病原菌WY28,基于16S rDNA序列的进化树分析,WY28菌株与迟缓爱德华氏菌菌株NB8031聚为一支,但与迟缓爱德华氏菌菌株ATCC15947的关系比起鲑鱼爱德华氏菌相对较远,这可能是由于菌株的来源不同造成的。WY28 16S rDNA序列与GenBank数据库中迟缓爱德华氏菌菌株NB8031 16S rDNA序列的相似性大于99.7%,而且该菌除柠檬酸利用外,其他形态及生理生化特征与伯杰氏细菌鉴定手册中的迟缓爱德华氏菌特征基本一致,因此可以认为WY28与迟缓爱德华氏菌属于同一类群。

3.2 病原菌WY28菌株对斑马鱼及大菱鲆LD₅₀的比较

王燕等^[18]用斑马鱼作为模式动物测定了海水养殖半滑舌鳎病原菌美人鱼发光杆菌杀鱼亚种的LD₅₀,结果表明美人鱼发光杆菌杀鱼亚种对斑马鱼的LD₅₀与对半滑舌鳎的LD₅₀基本一致。本研究

用斑马鱼作为模式动物测定了大菱鲆致病菌株WY28的LD₅₀,结果表明,虽然WY28对斑马鱼的LD₅₀和对大菱鲆的LD₅₀存在一定差异,但也在一定程度上说明斑马鱼具有作为海水养殖病原菌病原性测定的模式动物的潜力。

3.3 病原菌WY28菌株灭活疫苗的研究

本研究在用WY28菌株制备灭活疫苗时,为了保护抗原,采用了较为温和的灭活条件,即用0.2%(V/V)的甲醛28℃灭活24 h,通过离心沉淀细胞并用灭菌生理盐水洗涤,以排除甲醛对鱼体的影响。目前鱼类疫苗的给予途径有注射、口服、浸浴和喷雾,它们在保护力的获得、副作用、实用性及成本的高低等方面各有优缺点。其中注射免疫的效果最好并已得到公认^[19-21],因此在本实验中为了得到较好的免疫效果,采用了腹腔注射的方法。免疫后的大菱鲆体内抗体效价比对照组明显上升。

测定疫苗的免疫保护力一般用50~100倍LD₅₀菌液浓度进行攻毒实验,在本实验中,免疫后第6周当攻毒感染的菌液浓度为 1.6×10^6 cfu/mL(即 2.7×10^3 /g,约为70倍LD₅₀)时,其免疫保护力为16.7%,然而,当攻毒感染的菌液浓度为 1.6×10^5 cfu/mL(即 2.7×10^3 /g,约7倍LD₅₀)时,其免疫保护力为66.7%。这说明WY28菌株

灭活疫苗的免疫保护作用与攻毒试验注射的菌液浓度密切相关,攻毒感染试验中注射的菌液浓度越低,WY28菌株灭活疫苗对大菱鲆的免疫保护作用越强。当用约 10^5 cfu/mL的菌液浓度进行攻毒时,可以得到较好的免疫效果,因此认为该菌液浓度是较合适的测定迟缓爱德华氏菌菌株WY28灭活疫苗免疫保护力的攻毒菌液浓度,而且低浓度的菌液比较接近鱼类生存的自然环境,所以本实验中分离的爱德华氏菌的菌体灭活疫苗可在较大程度上预防由感染该菌引起的大菱鲆病害。在攻毒感染试验中,免疫后第4周用 2.5×10^5 cfu/mL的WY28腹腔注射攻毒感染大菱鲆,对照组在感染后第10天出现死亡,而免疫后第6周用菌液浓度为 1.6×10^5 cfu/mL感染大菱鲆时,对照组在感染后第2天出现死亡,出现死亡的时间差异较大。这可能是由大菱鲆的个体差异造成的,因为免疫后第6周的对照组在感染后第2天只有1尾鱼死亡,其余5尾鱼均集中在感染后第10天至第13天死亡,所以从整体死亡时间考虑其差异并不大。

关于爱德华氏菌病的疫苗,国外已经进行了一些研究。Rashid等^[22]用福尔马林灭活的迟缓爱德华氏菌(FKC)和其胞外及胞内产物作为疫苗,采用口服、注射和浸泡3种方法对牙鲆进行免疫。结果表明,细胞内及细胞外产物对牙鲆有致死性,而在除浸泡法外的其他免疫组中,牙鲆对FKC的抗血清凝集价都增加。但FKC的保护性不明显,只是浸泡组和注射组在感染后的死亡时间延长了。Gutierrez和Miyzaki^[23]给鳎注射迟缓爱德华氏菌的FKC和脂多糖(LPS)21 d后,再进行感染,发现只起到轻微的保护作用。Salati等^[24]对从迟缓爱德华氏菌粗提的脂多糖进行成分分析,发现其主要含有蛋白质、糖类和脂肪酸。通过试验发现糖类具有更好的抗原性,但目前对于该菌尚无较好的疫苗可以应用。秦磊等^[24]用嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*, Ah)的细胞外毒素和胞外蛋白酶分别与爱德华氏菌的脂多糖及脱毒多糖偶联,制成3种二联疫苗,对小鼠进行免疫,发现3种疫苗都具有较好的二联疫苗性能,但未对鱼体进行实验。本研究中使用甲醛灭活的迟缓爱德华氏菌,采

用腹腔注射的方法对大菱鲆进行免疫,结果表明,对于迟缓爱德华氏菌来说对大菱鲆进行注射灭活疫苗免疫是一条有效的免疫防治途径。爱德华氏菌是细胞内寄生菌,它能在一定程度上可以避开鱼类抗体免疫体系的作用,但是本研究证明菌体灭活疫苗对之仍然是有效的,这说明即使是细胞内寄生菌也可以通过使用疫苗来增强鱼体对该菌的抵抗力。

尽管注射免疫具有较好的免疫效果,但因其操作过程中对鱼有胁迫作用,对操作者有危险又费时费力,因而对较小的幼苗不适用^[21,26]。相信随着对鱼类免疫体系及抗原如何进入鱼体及对鱼体作用机理的深入研究,会找到更为便捷有效的疫苗给予途径。

参考文献:

- [1] 周进. 大菱鲆主要疾病及其防治[J]. 水产养殖,2003,24(1): 31-32.
- [2] 程开敏,俞开康,战文斌. 大菱鲆疾病的研究进展[J]. 鱼类病害研究,2001,23(2): 33-38.
- [3] 雷霖霖. 海水养殖新品种介绍: 大菱鲆[J]. 中国水产,2000,4: 38-39.
- [4] Bricknell I R, Bowden T J, Verner-Jeffreys D W, et al. Susceptibility of juvenile and sub-adult Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) to infection by *Vibrio anguillarum* and efficacy of protection induced by vaccination [J]. Fish Shellfish Immunol,2000,10: 319-327.
- [5] 杨先乐,陈远新. 鱼用疫苗的现状及其发展趋势[J]. 水产学报,1996,20(2): 159-167.
- [6] 王国良,徐兴林,路正. 鳎爱德华氏菌病原菌及一新种[J]. 水产学报,1993,17(3): 224-229.
- [7] 卢全章,朱心玲. 鳎肝肾病原菌的研究[J]. 水生生物学报,1994,18(4): 360-368.
- [8] Wakabayashi H, Egusa S. Edwardsiella tarda (*Paracolobactrum anguillimortiferum*) associated with pond-culture eel disease [J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries,1973,39(9): 931-936.
- [9] 周凯,郑国兴,孙其焕. 欧洲鳎红头病原的研究[J]. 水生生物学报,1999,23(4): 304-310.
- [10] 陈翠珍. 爱德华氏菌及鱼类爱德华氏菌病[J]. 河北科技师范学院学报,2004,18(3): 70-76.
- [11] 陈翠珍,房海,张晓君,等. 牙鲆与大菱鲆病原迟缓爱德华氏菌生物学特性及系统发育学分析[J]. 高技术通讯,2005,15(10): 83-88.
- [12] 李筠,颜显辉,陈吉祥,等. 养殖大菱鲆腹水病病原的研究[J]. 中国

- 海洋大学学报, 2006, 36 (4): 649–654.
- [13] Schnick R A, Alderman D J, Armstrong R, et al. World wide aquaculture drug and vaccine registration progress [J]. Bull Eur Ass Fish Pathol, 1997, 17: 251–256.
- [14] Austin B, Austin DA. Methods for the microbiological examination of fish and shellfish [M]. Chichester: Ellis Horwood, 1989.
- [15] Wardlaw A C. Practical statistics for experimental biologists [M]. Chichester: John Wiley and Sons, 1985.
- [16] Garrity G M. Bergey's manual of systematic bacteriology, 2nd ed. Vol. 2: The Proteobacteria [M]. 2005, New York: Springer-Verlag.
- [17] 陈超然, 毛芝娟, 陈昌福. 鱼用疫苗研制过程中面临的问题与课题 [J]. 河南水产, 2002, 1: 9–11.
- [18] 王燕, 韩茵, 张晓华, 等. 半滑舌鳎病原菌(发光杆菌杀鱼亚种)的分离与鉴定 [J]. 微生物学报, 2007, 47 (5): 763–768.
- [19] Gudding R, Lillehaug A, Evensen O. Recent developments in fish vaccinology [J]. Veterin Immunol Immunopathol, 1999, 72: 203–212.
- [20] Quentel C, de Baulny M O. Vaccination of juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L against vibriosis [J]. Aquaculture, 1995, 132: 125–131.
- [21] Zhou Y, Huang H, Su Y, et al. Vaccination of the grouper, *Epinephalus awoara*, against vibriosis using the ultrasonic technique [J]. Aquaculture, 2002, 203 (3–4): 229–238.
- [22] Rashid M M, Mekuchi T, Nakai T, et al. Serological study on *Edwardsiella tarda* strains isolated from diseased Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Fish Pathology, 1994, 29: 277.
- [23] Gutierrez M A, Miyazaki T. Responses of Japanese eels to oral challenge with *Edwardsiella tarda* after vaccination with formalin-killed cells or lipopolysaccharide of the bacterium [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1994, 6: 110–117.
- [24] Salati F, Kusudu R. Chemical composition of lipopolysaccharide from *Edwardsiella tarda* [J]. Fish Pathology, 1985, 20 (2/3): 187–191.
- [25] 秦磊, 姚火春, 陆承平. 嗜水气单胞菌与迟缓爱德华氏菌亚单位二联疫苗对小鼠的免疫效果 [J]. 中国兽医学报, 2000, 20 (2): 163–166.
- [26] Nakanishi T, Kiryu I, Ototake M. Development of a new vaccine delivery method for fish: percutaneous administration by immersion with application of a multiple puncture instrument [J]. Vaccine, 2002, 20: 3 764–3 769.

Isolation of *Edwardsiella tarda* from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) and vaccination against *Edwardsiella tarda*

WANG Yan, ZHANG Xiao-hua, LU Jun-chao, XU Zi-nan, CHEN Ji-xiang, HAN Yin

(College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The diseased turbot, exhibiting haemorrhaging of the basal fin and ulceration of the body surface, were taken aseptically from the hepatopancreas, blood, gall bladder, kidney, spleen and brain, and inoculated immediately onto LBN (LB medium supplement with 2% NaCl) plates, which were incubated at 28 °C for 48 h. A Gram-negative, rod shaped bacterium (designated as strain WY28) was isolated from the spleen of diseased fish. WY28 gave positive reactions for ornithine decarboxylase, lysine decarboxylase, H₂S, citrate utilisation, indole and fermentation of glucose, but was negative for arginine dihydrolase, Voges-Proskauer reaction, oxidase, β-galactosidase, tryptophan deaminase, urease, gelatinase, motility and acid production from amygdalin, arabinose, inositol, sorbitol, rhamnose, melibiose, sucrose and mannitol. WY28 was similar to *Edwardsiella tarda* in morphological, most of the physiological, biochemical characteristics and 16S rDNA sequence except motility and Citrate utilization. WY28 was identified to be *E. tarda*. Antibiotic sensitivity was determined by using antibiotic discs impregnated with 30 kinds of antibiotics. WY28 was sensitive to cefazolin (30 µg), gentamycin (10 µg), norfloxacin (10 µg), furazolidone (300 µg).

Pathogenicity assays revealed that WY28 was virulent to turbot and zebrafish (*Danio rerio*) by intraperitoneal injection challenge. The LD₅₀ of WY28 to turbot and zebrafish was calculated as 39 cfu/g of fish (3.3×10^2 cfu/fish) and 2.1×10^4 cfu/g of fish (6.4×10^3 cfu/fish), respectively. In addition, WY28 was re-isolated as pure cultures from internal organs of turbot and zebrafish. The results of pathogenicity assays demonstrated that although the LD₅₀ of WY28 for turbot and zebrafish were

different, zebrafish as model animals had potential use for determining pathogenicity of marine bacterial pathogens.

Turbots were vaccinated with formalin-killed vaccine of WY28 via intraperitoneal injection. Controls were injected with same volumes of saline. The evident antibody titres (average was 1:1 280) were detected in vaccinated fish 4 weeks after immunization. The antibody titres reached a higher level (average was 1:3 289.6) 6 weeks after immunization. Vaccinated turbot were intraperitoneal injected with different concentrations of WY28 to detect relative percent survival (RPS) of formalin-killed vaccine of WY28. The vaccinated fish showed higher RPS against bacteria than the unvaccinated fish. When the vaccinated fish were challenged with 10^7 cfu/mL of bacteria, the RPS was calculated as 0%; When the vaccinated fish were challenged with 10^6 cfu/mL of bacteria, the RPS was calculated as 16.7%. However, when the vaccinated fish were challenged with 10^5 cfu/mL of bacteria, the RPS was calculated as 66.7%. This demonstrated that the protective effects of inactivated vaccine of WY28 were affected by the concentration of challenging bacteria. The formalin-killed vaccine of WY28 showed higher RPS when the turbot were challenged with lower concentration of pathogen, which was considered to be similar to natural culture environment. Therefore, the inactivated vaccine of WY28, to a large extent, could prevent turbot diseases caused by *E. tarda*. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (3):394–403]

Key words: *Edwardsiella tarda*; turbot; inactivated vaccine; antibody titres; relative percent survival (RPS)

Corresponding author: ZHANG Xiao-hua. E-mail: xhzhang@ouc.edu.cn

..... 2009水产科技论坛

主题: 健康养殖与水产品质量安全

2009年9月25–27日 中国·广州

2009水产科技论坛将于2009年9月25日至27日在中国广州召开。论坛将以“健康养殖与水产品质量安全”为主题,围绕水产健康增养殖技术与渔业工程、渔业环境与养殖容量、渔业资源可持续利用、水产养殖病害预防与控制、水产生物技术与遗传育种、水产品加工与质量安全控制等专题进行交流与研讨。欢迎国内外相关领域的专家、学者和科研人员到广州出席论坛。

主办单位: 中国水产科学研究院

支持单位: 农业部科技教育司 农业部渔业局

承办单位: 中国水产科学研究院南海水产研究所

农业部海水养殖生态与质量控制重点开放实验室

广东省渔业生态环境重点开放实验室

协办单位: 世界渔业研究中心 日本水产综合研究中心 韩国国立水产科学院

中国海洋大学 上海海洋大学 广东海洋大学 大连水产学院

会议语言: 开幕式及主题报告: 英汉同传 专题报告: 英语

详情请查询 www.cafs.ac.cn 或致电: 010-68671170 **联系人:** 静 莹