

口服嗜水气单胞菌生物被膜疫苗的动物免疫试验

张吉红, 储卫华, 陆承平

(南京农业大学 动物医学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 将热灭活的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)生物被膜(biofilm, BF)菌苗和浮游(free cell, FC)菌苗口服免疫小鼠和剑尾鱼,通过测定抗体效价、相对保护率、小鼠的淋巴细胞转化和肠道sIgA浓度,评价免疫效果。免疫20 d后,BF菌苗组50尾剑尾鱼的相对保护率为68%;FC菌苗组为42%。BF菌苗组12只小鼠的相对保护率为70%;FC菌苗组为50%;对照组为17%。BF菌苗组小鼠外周血淋巴细胞转化率是7.28,FC菌苗组为3.87,对照组为2.36。BF菌苗组小鼠肠道sIgA浓度是1.22 $\mu\text{g}/\text{mL}$;FC菌苗组为0.73 $\mu\text{g}/\text{mL}$;对照组为0.465 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。免疫30 d后,小鼠的血清凝集抗体达到最高,BF组抗体达128:1,FC组为32:1,对照组为2:1。各组间差异显著($P < 0.01$)。结果表明,BF菌苗较FC菌苗能更有效地刺激机体的免疫系统,尤其是肠道淋巴组织的免疫应答,对剑尾鱼和小鼠具有较好的保护力。

关键词: 嗜水气单胞菌;生物被膜疫苗;免疫

中图分类号: S942 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2004)05-0404-04

致病性嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是引起淡水鱼细菌性败血症的重要病原菌。自1989年以来,淡水鱼爆发性传染病在我国广为流行,造成严重的经济损失,其病原大多数为Ah^[1]。为防治该病,国内外学者研制了多种嗜水气单胞菌疫苗,包括热灭活苗、超声处理灭活苗、亚单位苗及弱毒苗等^[2-4]。在多种免疫途径中,口服免疫最为经济、方便。但针对气单胞菌败血症口服疫苗,产生期短、免疫应答较弱,其中一个重要的原因是疫苗在到达后部肠管淋巴组织或器官前,已被消化降解。BF菌被外层的多糖蛋白复合物所包绕,可抵抗抗体、血清及吞噬细胞的杀伤作用^[5]。BF菌苗被认为可防止胃肠道的破坏作用。本实验用掺入BF菌苗的饲料喂养小鼠和剑尾鱼,研究并分析了其免疫效果。

1 材料与方法

1.1 菌株及全菌灭活苗的制备^[6]

AhJ-1菌株为本实验室分离保存。FC菌疫苗的制备,AhJ-1菌种划线接种于LB琼脂平板,28℃培养过夜,再挑取适量菌体接种于LB培养基中(pH 7.2),28℃震荡培养,培养24 h后,进行细菌计数。

BF菌疫苗的制备:将滤膜放入含LB的三角烧瓶中,再加入隔夜培养的AhJ-1菌液,塞紧盖子,以

防污染。28℃静置连续培养9 d,隔天添加培养基,至其形成BF。将带有滤膜的菌液超声作用10 min,取出滤膜,再涡旋3 min,使菌液充分混匀,进行细菌计数。将FC和BF菌液90℃30 min热灭活。按常规作无菌检验及安全试验。FC和BF菌苗拌入鱼饲料和小鼠饲料中,制成颗粒料,剑尾鱼按 10^{13} CFU/(g·d⁻¹)投喂,小鼠按 10^{14} CFU/(g·d⁻¹)喂,4℃保存备用。

1.2 实验动物

剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)150尾,由中国水产科学研究院珠江水产研究所提供。在水箱内驯养观察1周后进行试验,每天用充氧泵充氧,定时投放颗粒饲料和换水排除代谢废物。

8周龄左右健康昆明雄性小鼠,22 g/只,购自南京医科大学动物中心。

1.3 免疫试验

剑尾鱼分3组,每组50尾。试验前一天不投料,第2天投喂FC疫苗或BF疫苗,每天按鱼体重的8%投喂。对照组投喂普通饲料(南京农业大学动物科技学院),连续投喂15 d,然后所有鱼投喂普通饲料喂养20 d。3组试验条件相同,水温为26~28℃。

小鼠分3组,每组22只,BF和FC菌苗每天按

收稿日期:2003-07-14; 修订日期:2004-03-30。

作者简介:张吉红(1978-),女,硕士,从事动物微生物学与免疫学研究。现工作单位:宁波出入境检验检疫局,邮编:315012。

通讯作者:陆承平。E-mail: lucp@njau.edu.cn

小鼠体重的20%喂养,对照组喂养普通饲料,连续投喂15 d。

1.4 相对保护率测定

免疫后20 d,以 10^7 CFU/0.1 mL(约50 LD₅₀)肌肉注射所有试验鱼及每组12只小鼠。逐日记录死亡情况,测定相对保护率(RSP)^[7]。

1.5 全菌凝集试验

用平板凝集试验,常规方法^[8]。

1.6 淋巴细胞转化功能的测定^[9]

采用³H-TdR掺入微量全血法测定淋巴细胞转化。免疫后20 d,每组取6只小鼠无菌断颈取全血进行淋巴细胞转化实验。无菌操作于10 mL灭菌塑料离心管中,每管分别加入900 μ L PHA⁺ RPMI-1640 营养液和PHA⁻ RPMI-1640 营养液,每管做2个平行管,再加入抗凝血100 μ L/管,摇匀,在37 $^{\circ}$ C,5%的CO₂培养箱培养72 h(期间振荡3~4次),培养结束前18 h加0.1 mL ³H-TdR(每管1 μ Ci)。培养结束后,每管加3%的冰醋酸6 mL,以2000 r/min离心10 min,弃上清,如此反复3次。沉淀加30% H₂O₂ 4滴,85 $^{\circ}$ C水浴15 min褪色,再加200 μ L的氢氧化钠(2 mol/L),继续加热30 min消化细胞,使沉淀完全溶解。将消化液转移入液闪杯中,80 $^{\circ}$ C烘干,加入5 mL闪烁液,过夜后机测每分钟衰变数(DPM)。按以下公式计算:

刺激指数(SI) = $\frac{\text{PHA}^+ \text{DPM}(2 \text{管平均})}{\text{PHA}^- \text{DPM}(2 \text{管平均})}$

1.7 小鼠肠道 sIgA 的测定

将断颈取血后的小鼠打开腹腔,分离出小肠,收集小肠内容物,称重,与生理盐水1:1(W/V)稀释,混匀后2000 r/min离心30 min^[10],取上清。放射免疫分析法(RIA)检测肠道内容物 sIgA 水平, sIgA 检测试剂盒(批号:94卫药准字F-09号)购自上海放射免疫分析技术研究所,按说明书进行操作。

2 结果

2.1 全菌凝集抗体效价的测定

BF组小鼠在免疫10、20、30、40、50 d后,其血清凝集抗体效价分别为: 2^4 、 2^6 、 2^7 、 $2^{5.5}$ 、 2^5 , FC组分别为 2^3 、 2^4 、 $2^{5.5}$ 、 2^4 、 2^2 ,对照组分别为 2^0 、 2^0 、 2^1 、 2^0 、 2^1 ,以抗体效价的对数为纵坐标,以免疫时间为横坐标,作抗体效价动态曲线(见图1)。

2.2 相对保护率

以50 LD₅₀攻毒试验鱼和小鼠。50尾BF疫苗

免疫鱼中,累积死亡16尾。50尾FC疫苗免疫鱼中累积死亡29尾。50尾未免疫对照鱼全部死亡。据相对保护率(RSP) = $[1 - (\text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率})] \times 100\%$ 公式计算,BF疫苗组相对保护率为68%;FC疫苗组相对保护率为42%。经Excel软件统计处理,表明各组间差异显著。12只BF疫苗组小鼠中,累计死亡3只,相对保护率为70%;12只FC疫苗组小鼠中,累计死亡5只,相对保护率为50%;12只对照组小鼠中,累计死亡10只,相对保护率为17%。

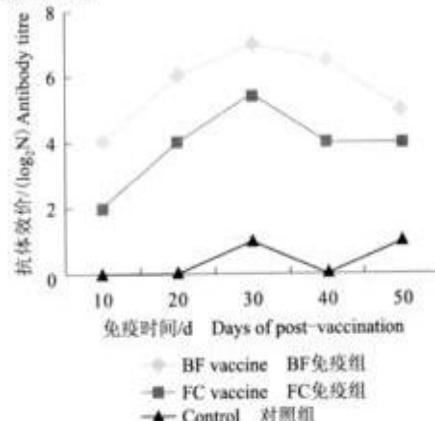


图1 小鼠的免疫抗体效价

Fig.1 Antibody titres in mice

2.3 小鼠外周血淋巴细胞转化

按刺激指数(SI) = $\frac{\text{PHA}^+ \text{DPM}(2 \text{管平均})}{\text{PHA}^- \text{DPM}(2 \text{管平均})}$ 计算,BF疫苗组、FC菌疫苗组及对照组小鼠的刺激指数分别是7.29、3.87、2.37。BF疫苗组小鼠的刺激指数较FC菌疫苗组升高了88.0%,经Excel软件统计处理,2组间差异显著;较对照组提高了208.0%,2组间差异极显著;对照组小鼠的刺激指数较FC菌疫苗组小鼠有所下降,下降了38.9%(图2)。说明口服免疫可有效地刺激淋巴细胞转化。

2.4 小鼠肠道 sIgA 水平

BF疫苗组、FC菌疫苗组及对照组小鼠的肠道 sIgA 浓度分别是1.22 μ g/mL、0.74 μ g/mL和0.47 μ g/mL。BF疫苗组小鼠的肠道 sIgA 水平较FC菌疫苗组升高了65.8%,经Excel软件统计处理,2组间差异显著;较对照组提高了162.7%,2组间差异极显著;对照组小鼠的肠道 sIgA 水平较FC菌疫苗组有所下降,下降了36.9%(图3)。

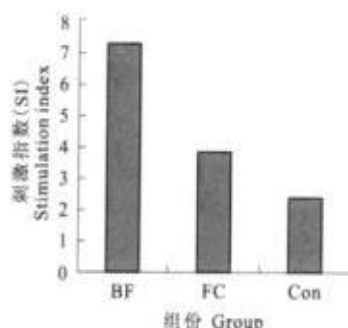


图2 口服免疫对小鼠外周血淋巴细胞转化的影响

Fig. 2 Effect of oral vaccination on transformation of blood lymphocyte in mice

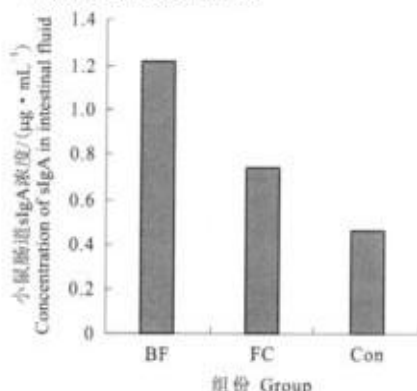


图3 口服免疫对小鼠小肠分泌sIgA的影响

Fig. 3 Effect of oral vaccination on sIgA secretion of intestinal in mice

3 讨论

BF是细菌在生长过程中附着于固体表面而形成的膜状物,其组成为细菌分泌的多糖蛋白(glycocalyx, GLX)及众多菌体细胞,前者将后者包绕其中,处于类凝胶状态,可保护细菌免受抗菌药物及消毒剂的作用。国内对BF引起的难治性疾病的报道较多,尚未见有将细菌BF作为自身佐剂用于免疫的报道。提高口服免疫效果的关键是避免抗原成分在接触肠道淋巴组织前被消化降解。有报道杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)的荚膜多糖可使菌体免于血清及腹腔液各种成分的破坏,并可产生免疫保护作用^[11-12],荚膜多糖的成分与BF的蛋白多糖相似,推测BF中蛋白多糖复合物也应具有相似的作用。

本试验以剑尾鱼和小鼠为实验模型,评价BF疫苗的免疫效果。结果显示BF疫苗组的小鼠淋巴细胞转化率和sIgA含量均比FC疫苗组高,且淋巴

细胞转化率和sIgA含量具有相关性,即sIgA含量高的机体其淋巴细胞转化率亦较高。口服免疫的小鼠可产生较高的血清抗体,表明口服免疫不仅可刺激粘膜局部产生分泌型的免疫球蛋白,又可引起全身性的免疫应答,形成体内广泛而有效的免疫保护作用。

秦磊^[13]等报道,在亚单位疫苗研究中,鱼体试验与以小鼠为动物模型的试验取得的结果相一致,说明以小鼠为模型在一定程度上可替代鱼做试验,当然鱼体试验仍不可少。剑尾鱼是经长期培育的试验鱼,遗传学背景较均一,易饲养,体型小,可用较多的数量,做试验优于银鲫等一般鱼类。但缺点是不便采血分析免疫指标,本试验同时采用小鼠做试验,正好可补其不足。

Azad等^[6]报道口服免疫应答还与免疫的剂量及时间有关,每克鱼每天以 10^{13} CFU免疫15 d,效果最佳。不同品种的鱼免疫反应也不尽相同,肠管长的品种免疫期长,抗体滴度高。BF菌苗能够有效地刺激机体产生免疫应答可能与其可提高菌苗在肠道中的滞留时间和吸收以及使抗原表位不受破坏有关,其具体机理还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 石理瑞,高峰. 抗生素添加剂的负面效应及其代替品的研究[J]. 饲料博览, 2000, 3: 24-26.
- [2] Post G. Response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to antigens of *Aeromonas hydrophila*[J]. J Fish Res Board Can, 1966, 23: 311-323.
- [3] Song Y L, Kou G H. Immune response of eel (*Anguilla japonica*) against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella anguilli-morteferum* (*E. tarda*) infection[J]. Natural Science Communication Series, 1981, 3: 107-115.
- [4] Loghothetis P N, Austin B. Immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Aeromonas hydrophila*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1994, 4: 239-254.
- [5] Anwer H, Strap J L, Costerton J W. Susceptibility of biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa* to bactericidal activities of whole blood and serum[J]. FEMS Microbial Letters, 1992, 92: 235-242.
- [6] Azad I S, Shankar K M, Mohan C V, et al. Biofilm vaccine of *Aeromonas hydrophila* standardization of dose and duration for oral vaccination of carps[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1999, 9: 519-528.
- [7] Newman S G, Majnarich J J. Direct immersion vaccination of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson and juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum), with a *Yersinia ruckeri* bacterin[J]. J Fish Dis, 1982, 5: 339-341.
- [8] 余 霞, 谢少文, 杨桂贞, 等. 临床免疫[M]. 上海: 上海科学

- 技术出版社, 1982.
- [9] 杨贵贞. 医用免疫学[M]. 长春: 吉林人民出版社, 1981.
- [10] McGhee J J, Mestecky M, Dertzbaugh J, et al. The mucosal immune system: From fundamental concepts to vaccine development [J]. Vaccine, 1992, 10: 75-88.
- [11] Garfalo R A, Thornton J T, Kay W W. *Aeromonas salmonicida* grown in vivo[J]. Infection and Immunity, 1993, 61: 3 854-3 862.
- [12] Bricknell L R, Bowden T J, Lomax J, et al. Antibody response and protection of Atlantic salmon (*Salmo salar*) immunized with an extracellular polysaccharide of *Aeromonas salmonicida* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1997, 7: 1-16.
- [13] 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.

Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination

ZHANG Ji-hong, CHU Wei-hua, LU Cheng-ping

(College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Among the various methods of vaccination, the oral route is simple, cheap and ideal for mass administration to fish of all size. However, attempts to orally vaccinate against motile aeromonad septicemia have either yielded mild and short lived or inadequate responses. One of the important factors for the inconsistency and poor response to oral vaccination is the digestive degradation of antigens in the foregut before the vaccine reaches immune-responsive areas in the hind-gut and other lymphoid organs. Certain bacteria form biofilm on substrates and these have been found to be resistant to antibiotics, phagocytosis and the killing effect of whole blood and serum due to a protective glycocalyx layer. The glycocalyx matrix of the biofilm vaccine is believed to protect the antigens against gastric destruction. Here we present further studies on the effect of dose and duration of oral vaccination with a biofilm vaccine of *Aeromonas hydrophila* in mice and swordtail fish. 150 mice and 66 swordtail fish (*Xiphophorus helleri*) were fed with the *A. hydrophila* J-1 biofilm (BF) and free cell (FC) vaccines inactivated by heat, which were mixed with ingredients of feed. Relative percentage survival (RPS), antibody titres, transformation of blood lymphocyte and sIgA secretion intestines in mouse were tested 20 days after vaccination, for 50 swordtail fish, RPS in BF and FC vaccine group were 68% and 42% respectively. For 12 mice, they were 70% and 50%. RPS in control group was 17%. In mice, the lymphocyte transformation rates in BF, FC vaccine group and the control group were 7.28, 3.87 and 2.36 respectively. The sIgA concentrations in intestinal fluid were 1.22 $\mu\text{g/mL}$, 0.73 $\mu\text{g/mL}$ and 0.465 $\mu\text{g/mL}$ individually. There were significant differences between the groups ($P < 0.01$). It was obtained that the BF vaccine could enhance the immunological response of fish and mice, especially the gut-associated lymphoid tissue.

Key words: *Aeromonas hydrophila*; biofilm vaccine; immunization

Corresponding author: LU Cheng-ping. E-mail: lucp@njau.edu.cn