

斑点叉尾鲷源嗜麦芽寡养单胞菌的脂质体疫苗研究

汪开毓¹, 邓龙君², 肖丹³, 耿毅¹, 黄小丽², 陈德芳¹

(1. 四川农业大学 动物医学院 鱼病研究中心, 四川 雅安 625014; 2. 四川农业大学 动物科技学院 水产系, 四川 雅安 625014; 3. 通威股份有限公司, 四川 成都 610041)

摘要: 采用反相蒸发法制备嗜麦芽寡养单胞菌的脂质体疫苗, 通过灌胃分别给予各组斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)脂质体疫苗(I-III组)、嗜麦芽寡养单胞菌灭活苗(IV组)和生理盐水(V组), 每2周给药1次, 共3次。于接种疫苗后第1天、14天、28天和第49天采集静脉血, 测定白细胞的杀菌活性和血清抗体IgM含量的变化, 并用细菌攻毒实验检测免疫保护效应。结果显示, 本实验制备的脂质体疫苗粒径约为 $(0.9 \pm 0.3) \mu\text{m}$, 包封率为53.23%, 与嗜麦芽寡养单胞菌灭活苗相比能显著增强斑点叉尾鲷吞噬细胞的杀菌活性和血清抗体IgM水平。腹腔注射活菌攻毒后, 脂质体疫苗免疫的I-III组的相对免疫保护率分别为34.8%、48.2%和55.4%; 而嗜麦芽寡养单胞菌灭活苗免疫的IV组的相对免疫保护率仅有6.7%, 生理盐水对照V组保护率则为零。研究表明, 口服脂质体疫苗对斑点叉尾鲷具有显著的免疫保护效应, 可作为预防嗜麦芽寡养单胞菌感染的疫苗。[中国水产科学, 2009, 16(5): 751-757]

关键词: 斑点叉尾鲷; 嗜麦芽寡养单胞菌; 脂质体疫苗

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2009)05-0751-07

近年来, 在中国许多地区养殖的斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)中发生了一种以肠炎、肠套叠和脱肛等为特征的“急性流行性传染病”。该病发病突然、死亡率高, 严重威胁着斑点叉尾鲷养殖业的健康发展。早在1988年美国就有类似疾病的报道, Durborow等^[1]从病鱼器官中分离到嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)和柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnaris*)等多种细菌, 并且分析认为, 由于某些方面的原因导致肠道血流减少, 进一步引起黏膜损伤, 继而发生由肠道蛋白酶类参与的肠黏膜自溶, 出现肠道断裂、不规则收缩和套叠等现象, 不过有关这些分离细菌与疾病之间因果关系的推断却并无证据支持^[1]。汪开毓等^[2-3]、耿毅等^[4]从不同地区患“肠套叠”症的斑点叉尾鲷体内分离到同一种具有高度致病性的嗜

麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*), 人工回归感染实验表现出与自然感染相似的临床症状和病理学特征, 从而证实其为斑点叉尾鲷“肠套叠”症的病原。

嗜麦芽寡养单胞菌由于能分泌 β -内酰胺酶和氨基糖苷类修饰酶, 因此容易产生多重耐药性^[5-6]。而且使用抗生素造成的药物残留已经导致美国阿拉巴马等州禁销中国的斑点叉尾鲷产品^[7]。这为由该菌引起的斑点叉尾鲷“肠套叠”症的药物防治带来了诸多难题。因此, 通过免疫接种技术预防感染就显得十分紧迫和必要。

脂质体是类脂质组成的细胞样小球体, 具有良好的生物安全性、组织相容性和生物降解性, 能将抗原导向抗原呈递细胞(APC), 增强抗原诱导体液免疫和细胞免疫的能力^[8]。在医学上已成功研制出结核病^[9]、

收稿日期: 2008-08-26; 修订日期: 2009-04-08.

基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队项目(IRT0848); 农业部动物检疫检测与防治项目(2130108); 通威股份有限公司重点资助项目(2006-2009).

作者简介: 汪开毓(1955-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事水生动物疾病的研究. Tel: 0835-2885753; E-mail: kywang@sicau.edu.cn

鼠疫耶尔森菌^[10]、脑膜炎球菌^[11]、破伤风及白喉^[12]等的脂质体疫苗,临床试验都取得了很好的效果。Irie等用含BSA(牛血清白蛋白)的脂质体免疫鲤有效诱导了免疫应答^[13],并用包裹杀鲑气单胞菌抗原的脂质体口服免疫鲤,诱导了黏膜免疫和显著的体液免疫,并使攻毒后鲤的存活率达到了83.5%^[14]。故脂质体作为水产动物疫苗佐剂具有良好的应用前景。本实验制备了嗜麦芽寡养单胞菌的脂质体疫苗,通过口服对斑点叉尾鲷进行免疫接种,并进行保护性研究,为生产上有效预防斑点叉尾鲷嗜麦芽寡养单胞菌病探索新的途径。

1 材料与方法

1.1 材料

实验菌株及动物:嗜麦芽寡养单胞菌为本实验室鉴定、保存。健康斑点叉尾鲷,体质量(100±5)g,购自眉山市斑点叉尾鲷养殖场。

主要试剂:MEM培养基、卵磷脂和胆固醇购自SIGMA公司,IgM试剂盒为北京莱博生物材料研究所产品,淋巴细胞分离液为天津灏洋生物制品公司产品。

1.2 抗原的制备

无菌条件下将嗜麦芽寡养单胞菌接种到胰酪胨大豆培养基(TSB),28℃,120 r/min振荡培养24 h。培养后的细菌悬液按体积比加入0.3%的甲醛灭活,并进行超声波破碎,300 W共约10 min,4℃冷藏保存备用。

1.3 脂质体疫苗的制备和技术指标测定

1.3.1 脂质体疫苗的制备 实验采用反相蒸发法制备脂质体^[15],卵磷脂和胆固醇按物质的量比为1:1溶于10 mL氯仿中,旋转蒸发形成脂质薄膜,再将脂质薄

膜溶于10 mL乙醚中,加入抗原液,超声乳化3 min,形成稳定的W/O乳液,继续减压旋转蒸发至脂质体悬液形成。

1.3.2 脂质体疫苗的技术指标测定

(1)电镜观察及粒径测定 将制备的脂质体微粒用1%磷钨酸负染后,滴于有支持膜的铜网上,干燥后用透射电镜观察并拍摄照片,测定其粒径(直径)大小^[14]。

(2)包封率测定 用10 mg/mL的鱼精蛋白溶液将0.1 mL脂质体样品沉淀,混匀放置3 min,再加入3 mL缓冲液,2 000 g离心20 min沉淀脂质体。用BCA蛋白定量试剂盒测定加入的抗原量($W_{总}$)和上清液中游离的抗原量($W_{游}$)。按下列公式计算包封率(Q_w)^[14]:

$$Q_w(\%) = (W_{总} - W_{游}) / W_{总} \times 100\%$$

1.4 免疫实验

分组:共分5个处理组,I组、II组和III组为嗜麦芽寡养单胞菌的脂质体疫苗口服免疫组;IV组为嗜麦芽寡养单胞菌灭活苗口服免疫组;V组为口服生理盐水对照组。每组设3个重复,每个重复40尾(表1),共120尾。

免疫和采血:在接种前,斑点叉尾鲷停食12 h,接种疫苗时先用1%(V/V)的乙醚使鱼轻度麻醉。按上述分组在第1天用软管对斑点叉尾鲷进行灌胃,给药剂量如表1所示。于第14天、第28天按相同剂量加强免疫2次。在第1天、14天、28天和第49天分别在5个组的每个重复中随机取5尾鱼进行尾静脉采血备用。所采的血液分2份,一份为肝素钠抗凝血,供白细胞杀菌活性的检测;另一份为非抗凝血,用于血清抗体的测定。

表1 斑点叉尾鲷的分组及免疫
Tab. 1 Groups and vaccination of channel catfish

组别 Group	疫苗 Bacterin	剂量 Dosage	尾数 <i>n</i>	每组重复数 Repeat No
I	脂质体疫苗 Liposome-encapsulated vaccine	50 μg/尾	120	3
II	脂质体疫苗 Liposome-encapsulated vaccine	100 μg/尾	120	3
III	脂质体疫苗 Liposome-encapsulated vaccine	200 μg/尾	120	3
IV	嗜麦芽寡养单胞菌灭活苗 <i>S. maltophilia</i> antigen	200 μg/尾	120	3
V	生理盐水 Saline	1 mL/尾	120	3

1.5 白细胞杀菌活性的测定

1.5.1 白细胞悬液的制备 取1.0 mL抗凝血缓慢加注到1.5 mL相对质量密度为1.070的淋巴细胞分离液中,以2 500 r/min离心15 min,吸取白细胞层,以Hank's液重悬,并计数,调整细胞浓度至 1.0×10^7 mL^[16]。台盼蓝染色检测白细胞存活率,活细胞数不少于90%^[17]。

1.5.2 杀菌活性测定 取白细胞悬液0.5 mL,加入0.1 mL浓度为 1.0×10^8 mL的金黄色葡萄球菌悬液,混匀后置于28℃水浴中孵育1 h,离心10 min弃上清液,并加入0.5 mL Hank's液重悬,在原温度下继续孵育。于80 min、100 min、120 min和150 min后从中吸取0.2 mL细胞悬液到另1试管中,加入1.0 mL浓度为0.2%的Tween-20破碎白细胞,并加入0.5 mL MEM培养基培养16 h,此时再加入0.06 mL浓度为5.0 mg/mL的MTT(四甲基偶氮唑盐),摇动15 min后测定600 nm处的吸光度(OD值)^[18]。按下列公式计算杀菌指数(BI):

$$BI = T_x \text{时间还原MTT的OD值} / T_0 \text{时间还原MTT的OD值}$$

BI < 1.0为具有杀菌能力;BI > 1.0则无杀菌能力;BI值升高,杀菌能力降低,反之亦然。

1.6 血清抗体IgM的测定

血清抗体的测定采用北京莱博生物材料研究所的IgM测定试剂盒测定。

1.7 攻毒

在免疫后的第63天,对I-V组均进行细菌攻毒实验。先用1%(V/V)的乙醚对斑点叉尾鲷进行轻度麻醉,按 1×10^8 CFU/mL剂量腹腔注射嗜麦芽寡养单胞菌活菌悬液,每尾0.2 mL,统计14 d内各组的死亡率。按下列公式计算相对免疫保护率:

$$\text{相对免疫保护率} = (1 - \text{实验组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$$

1.8 统计学分析

实验数据采用SPSS 11.5统计软件进行处理。实验结果用平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示,采用ANOVA进行单因素方差分析和Duncan氏方法进行多重比较, $P < 0.01$ 为差异极显著, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 脂质体疫苗的技术指标

反相蒸发法制备的脂质体悬液肉眼观察为乳白色混悬液,静置1 h无分层和沉淀现象。经过磷钨酸负染后脂质体透射电镜照片如图1所示,该法制备的脂质体粒径分布较均匀,大小约为 $(0.9 \pm 0.3) \mu\text{m}$ 。采用BCA蛋白定量试剂盒测得加入脂质悬液的总蛋白量($W_{\text{总}}$)为5.194 mg,上清液中游离的蛋白量($W_{\text{游}}$)为2.429 mg,脂质体包封率为53.23%。

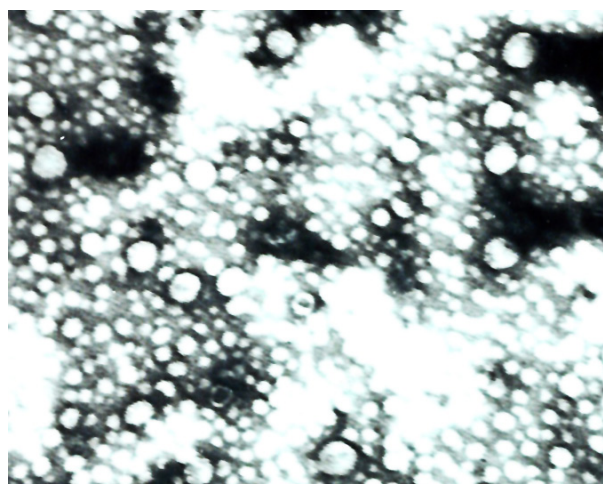


图1 脂质体疫苗的负染透射电镜照片($\times 6\ 000$)

Fig. 1 Photograph of negative stain electron microscopy of liposome-encapsulated vaccine ($\times 6\ 000$)

2.2 白细胞杀菌活性

白细胞杀菌活性的测定结果如表2所示。将白细胞与细菌混合孵育80 min后各组杀菌指数值最小(均<1.0)。组间方差分析结果表明,脂质体疫苗免疫组(I-III组)的杀菌能力均极显著高于嗜麦芽寡养单胞菌灭活苗免疫组(IV组)($P < 0.01$),且嗜麦芽寡养单胞菌灭活苗免疫组(IV组)的杀菌能力极显著高于生理盐水对照组(V组)($P < 0.01$)。不同免疫剂量的脂质体疫苗组间方差分析结果显示,在第14天时,III组杀菌指数为0.544,极显著小于I组(0.728)和II组(0.651)的杀菌指数($P < 0.01$),表明III组的杀菌能力极显著高于I组和II组;在28 d和49 d时,III组(0.531、0.573)和II组(0.542、0.62)的白细胞杀菌指数

均极显著低于 I 组 (0.681、0.758)($P<0.01$); 在 49 d 时, 质体疫苗剂量在 200 μg /尾时杀菌活性最强, 持续效果最好。

III 组的杀菌能力显著高于 II 组 ($P<0.05$), 说明口服脂

表 2 各组斑点叉尾鲷白细胞杀菌活性的变化
Tab. 2 Changes of bactericidal activity of leukocytes in *Ictalurus punctatus* of each group $n=40; \bar{x} \pm \text{SD}$

组别 Group	接种疫苗后时间/d Time after vaccination			
	1	14	28	49
I	0.955±0.012	0.728±0.013 ^{Bb}	0.681±0.014 ^{Cc}	0.758±0.019 ^{Cc}
II	0.959±0.013	0.651±0.011 ^{Bc}	0.542±0.015 ^{Dd}	0.620±0.009 ^{Dd}
III	0.955±0.015	0.544±0.008 ^{Cd}	0.524±0.019 ^{Dd}	0.573±0.022 ^{De}
IV	0.945±0.020	0.934±0.012 ^{Aa}	0.801±0.011 ^{Bb}	0.868±0.026 ^{Bb}
V	0.962±0.019	0.974±0.015 ^{Aa}	0.949±0.009 ^{Aa}	0.954±0.008 ^{Aa}

注: 同列标注不同大写字母表示各项间差异极显著 ($P<0.01$), 不同小写字母表示各项间差异显著 ($P<0.05$)。
Note: Different capital letter superscripts in the same column donate extremely significant difference ($P<0.01$); different small letter superscripts donate significant difference ($P<0.05$).

2.3 血清抗体水平

各组斑点叉尾鲷血清中 IgM 含量的测定结果如表 3 所示。脂质体疫苗组血清 IgM 含量在免疫后 14 d、28 d、49 d 时均比未免疫时极显著增强 ($P<0.01$), 并随免疫次数的增加而增强; 而嗜麦芽寡养单胞菌灭活苗免疫组 (IV 组) 和生理盐水对照组 (V 组) 的血清 IgM 水平在第 1 天和第 14 天时并无显著差异 ($P>0.05$), 只是在第 28 天和第 49 天时 IV 组才显著高于 V 组 ($P<0.05$), 并随时间的延长 IgM 水平也随之降低。

不同免疫剂量的脂质体疫苗免疫组间比较显示, III 组和 II 组的血清 IgM 水平均极显著高于 I 组 ($P<0.01$); II、III 2 组间无显著差异 ($P>0.05$)。嗜麦芽寡养单胞菌灭活苗免疫组 (IV 组) 的血清 IgM 水平仅在免疫后第 28 天与生理盐水对照组有极显著 ($P<0.01$) 差异; 但 IV 组在免疫后的总体抗体水平均较脂质体疫苗免疫组低 ($P<0.05$), 且嗜麦芽寡养单胞菌灭活苗免疫组 IgM 含量在 49 d 后出现下降趋势。

表 3 各组斑点叉尾鲷血清中 IgM 含量的变化
Tab. 3 Changes of IgM content in serum of *Ictalurus punctatus* of each group $n=40; \bar{x} \pm \text{SD}; \text{g/L}$

组别 Group	接种疫苗后时间/d Time after vaccination			
	1	14	28	49
I	0.876±0.014	1.121±0.031 ^{Bb}	1.336±0.028 ^{Bb}	1.388±0.078 ^{Bc}
II	0.887±0.021	1.519±0.028 ^{Cc}	1.743±0.020 ^{Cc}	1.942±0.050 ^{Cd}
III	0.856±0.024	1.505±0.007 ^{Cc}	1.864±0.096 ^{Cc}	2.123±0.045 ^{Cd}
IV	0.864±0.035	0.870±0.023 ^{Aa}	1.131±0.115 ^{Bb}	0.965±0.090 ^{Ab}
V	0.880±0.012	0.878±0.026 ^{Aa}	0.868±0.019 ^{Aa}	0.875±0.018 ^{Aa}

注: 同列标注不同大写字母表示各项间差异极显著 ($P<0.01$), 不同小写字母表示各项间差异显著 ($P<0.05$)。
Notes: Different capital letter superscripts in the same column donate extremely significant difference ($P<0.01$); different small letter superscripts donate significant difference ($P<0.05$).

2.4 口服接种脂质体疫苗的保护效应

各免疫组斑点叉尾鲷经 3 次口服免疫后, 在第 63 天腹腔注射嗜麦芽寡养单胞菌活菌悬液。攻毒后 14 d, 统计各组的死亡率并计算相对免疫保护率, I—IV 组的相对免疫保护率分别为 34.8%、48.2%、

55.4% 及 6.7%, 而生理盐水对照组 (V 组) 则为 0。根据各组的相对免疫保护率进行分析, 结果表明, 不同免疫剂量的脂质体疫苗免疫组均能极显著 ($P<0.01$) 提高对斑点叉尾鲷的保护作用, 而 IV 组与 V 组相比则无显著差异 ($P>0.05$), 说明脂质体疫苗能有效地保

护斑点叉尾鲷免受嗜麦芽寡养单胞菌的侵袭。脂质体疫苗免疫组随着免疫剂量的增加保护效应也随之增强,与 I 组相比,II、III 2 个高剂量组的保护率极显著增强($P<0.01$); II、III 2 组间差异不显著($P>0.05$)。未免疫组(V 组)在攻毒后,死亡鱼表现出典型的体表充血、体色变淡、腹部膨大、腹水和肠套叠等症状,而 I-IV 组也均有不同程度感染发病的斑点叉尾鲷,但其发病的程度均比 V 组要轻。

3 讨论

在渔用疫苗的几种免疫方法中以口服免疫法操作最方便^[19]。为了避免口服抗原易被消化道降解,免疫效果不佳这一问题,研究人员设计出许多抗原载体系统,如明胶胶囊、生物可降解聚酯类微球和脂质体等^[20]。

脂质体主要是由磷脂和胆固醇等组成的单层或多层双分子夹水结构,对多种抗原具有明显的载体和佐剂效应^[6]。大量研究表明,脂质体作为疫苗佐剂具有以下优点:(1)抗原与脂质体单纯混合就可增强抗原的免疫原性,若包裹或锚定在脂质体上则更强;(2)可将抗原导向网状内皮系统,使其优先被巨噬细胞等抗原呈递细胞(APC)所摄取,并有抗原缓释作用;(3)可生物降解,本身无毒性和免疫原性;(4)可改变免疫应答类型和方式,增强抗原诱导体液免疫和细胞免疫的能力,促进产生免疫记忆^[21]。正因为有上述的优越性,脂质体已作为一种新型的疫苗佐剂而被广泛研究。

通常采用反相蒸发法制备的脂质体粒径大小集中在 $0.2 \sim 1 \mu\text{m}$ 之间,包封率为 $35\% \sim 65\%$ ^[15]。相比之下本实验采用该法所获得的脂质体疫苗粒径约为 $0.9 \mu\text{m}$,包封率为 53.24% ,符合上述指标分布范围,并与 Baca-Estrada 等^[10]制备的鼠疫耶尔森菌阳离子脂质体疫苗包封率(56%)相近。由于脂质体粒径大小会影响其在体内的分布,据文献报道粒径介于 $0.2 \sim 6 \mu\text{m}$ 之间则主要分布于肝脾和肠道淋巴系统^[22],因此本实验制备的脂质体疫苗符合佐剂和靶向要求。经过对免疫指标的检测结果发现,脂质体疫苗免疫组

比嗜麦芽寡养单胞菌灭活苗免疫组和生理盐水对照组均能显著增强斑点叉尾鲷吞噬细胞的杀菌活性和抗体水平,表明脂质体包裹的嗜麦芽寡养单胞菌抗原在肠道能被有效地吸收。

细菌攻毒实验结果显示,生理盐水对照组(V 组)均出现了腹水和肠套叠等典型症状,且发病率和死亡率均很高,全部死亡。经过脂质体疫苗免疫后的 I-III 组斑点叉尾鲷也均有不同程度的发病和死亡,具体表现为发病率随着免疫剂量的增加而降低。总体说来脂质体疫苗免疫组的发病率相比嗜麦芽寡养单胞菌灭活苗免疫组和生理盐水对照组都低,而且发病症状也不太典型。攻毒后,脂质体疫苗免疫组的相对免疫保护率分别为 34.8% 、 48.2% 和 55.4% ,均极显著($P<0.01$)高于嗜麦芽寡养单胞菌灭活苗免疫组(6.7%),说明超声波破碎后的嗜麦芽寡养单胞菌灭活苗的免疫效果受到胃肠道低 pH 值环境和蛋白水解酶破坏的影响;相比之下脂质体在经过胃肠道时能较好地保护包裹或锚定在其上的嗜麦芽寡养单胞菌抗原,增强免疫效果。此外,研究表明适当比例的脂质体与抗原复合物能与机体细胞膜直接融合或通过内吞作用进入细胞,在脂质扩散入细胞膜的过程中,破坏了膜与抗原间的相互作用,而使抗原成分进入细胞浆诱导机体产生免疫应答^[23]。

众所周知,对于渔用疫苗口服免疫的效果,研究者们的结论并不相同,有的研究结论认为有效,而另一些研究结论则刚好相反^[24]。Muroga 等用 *V. anguillarum* PB-15 菌株的活菌和经 0.01% 硫柳汞灭活的菌苗对日本鳗鲡(*Anguilla japonicus*)每日拌料投喂 1 次,连喂 4 个月后用活菌注射攻毒,结果表明只有投喂活菌的日本鳗鲡显示了较弱的免疫保护力^[25]。因此如何提高口服渔用疫苗的免疫保护率是口服免疫法的关键和难点。本实验制备的嗜麦芽寡养单胞菌脂质体疫苗通过 3 次口服免疫后最高相对免疫保护率达到 55.4% ,避免了长期免疫、节约了抗原用量,可作为预防嗜麦芽寡养单胞菌感染的疫苗。但这个保护率仍较低,其原因可能是本实验采用反相蒸发法制备的脂质体为单室脂质体,包封率仅为 53.24% ,相比郝淑

美等^[26]采用薄膜和冷冻干燥相结合的方法制备的多层脂质体的包封率(91.1%)要低,较低的包封率将会导致大多抗原处于游离状态,散在的抗原因为得不到载体的保护而易被消化失去抗原性。

参考文献:

- [1] Durborow R M, Hanson L. Severed intestine in channel catfish [J]. J Wildlife Dis, 1988, 24 (1): 146-149.
- [2] 汪开毓, 耿毅, 黄小丽, 等. 斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) 传染性套肠症 (Infectious intussusception) [J]. 现代渔业信息, 2006, 21 (9): 3-8.
- [3] 汪开毓, 耿毅, 黄小丽, 等. 斑点叉尾鲷传染性套肠症及其防治 [J]. 淡水渔业, 2006, 36 (6): 61-64.
- [4] 耿毅, 汪开毓, 陈德芳, 等. 斑点叉尾鲷一株致病菌的分离、鉴定与系统发育分析 [J]. 微生物学报, 2006, 46 (4): 28-31.
- [5] 孙二琳. 嗜麦芽寡养单胞菌耐药机制的研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2003, 28 (7): 445-448.
- [6] Lambert T, Ploy M C, Denis F, et al. Characterization of the chromosomally (6')-Iz gene of *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. J Antimicrob Chemother, 2000, 46 (6): 2 366-2 374.
- [7] 曾南华, 唐湘北. 湖南省加强斑点叉尾鲷生产质量管理工作 [J]. 内陆水产, 2007, 32 (7): 6.
- [8] 周红蕾, 李春玲, 王贵平, 等. 脂质体作为疫苗免疫佐剂的应用进展 [J]. 动物医学进展, 2006, 27 (2): 34-38.
- [9] Lima K M, Bonato V L, Faccioli L H, et al. Comparison of different delivery systems of vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice [J]. Vaccine, 2001, 19 (25-26): 3 518-3 525.
- [10] Baca-Estrada M E, Snider M M, Babiuk L A, et al. Intranasal immunization with liposome-formulated *Yersinia pestis* vaccine enhances mucosal immune responses [J]. Vaccine, 2000, 18 (21): 2 203-2 211.
- [11] Wright J C, Williams J N, Heckels J E. Immunization with the recombinant PorB outer membrane protein induces a bactericidal immune response against *Neisseria meningitidis* [J]. Infect Immun, 2002, 70 (8): 4 028-4 034.
- [12] Popescu C, Durbaca S, Ivanov D. Negatively charged liposomes as immunological adjuvant for tetanus and diphtheria toxoids [J]. Rouman Arch Microbiol Immunol, 1998, 57 (3-4): 255-261.
- [13] Irie T, Watarai S, Kodama H. Humoral immune response of carp (*Cyprinus carpio*) induced by oral immunization with liposome-entrapped antigen [J]. Dev Comp Immunol, 2003, 27 (5): 413-421.
- [14] Irie T, Watarai S, Iwasaki T, et al. Protection against experimental *Aeromonas salmonicida* infection in carp by oral immunization with bacterial antigen entrapped liposomes [J]. Fish Shellfish Immunol, 2005, 18 (3): 235-242.
- [15] 张灵芝. 脂质体制备及其在生物医学中的应用 [M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998.
- [16] 余贺. 医学微生物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983.
- [17] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996: 1-363.
- [18] 李静, 陈昌福. 草鱼白细胞对福建爱德华氏菌杀菌活性的研究 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 1998, 35 (4): 619-623.
- [19] 李荔, 刘志刚, 喻海琼, 等. 一种新型鱼病口服疫苗的研制和示踪研究 [J]. 热带医学杂志, 2006, 6 (4): 382-384.
- [20] Mestecky J, Moldoveanu Z, Novak M, et al. Biodegradable microspheres for the delivery of oral vaccines [J]. J Control Release, 1994, 28 (1-3): 131-141.
- [21] Krishnan L, Dicaire C J, Patel G B, et al. Archaeosome vaccine adjuvants induce strong humoral, cell-mediated, and memory responses: comparison to conventional liposomes and alum [J]. Infect Immun, 2000, 68 (1): 54-63.
- [22] 黄文, 李兆申, 白杨, 等. 幽门螺杆菌重组蛋白脂质体疫苗免疫保护作用动物实验研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33 (10): 978-985.
- [23] Ninomiya A, Ogasawara K, Kajino K, et al. Intranasal administration of a synthetic peptide vaccine encapsulated in liposome together with an anti-CD40 antibody induces protective immunity against influenza A virus in mice [J]. Vaccine, 2002, 20 (25-26): 3 123-3 129.
- [24] 郑芳艳. 创伤弧菌外膜蛋白疫苗对斜带石斑鱼浸泡免疫的初步研究 [D]. 上海: 上海水产大学, 2005: 1-51.
- [25] Muroga K, Egusa S. Immune response of the Japanese eel to vibrio anguillarum-II: Possibility of oral vaccination [J]. Bull Jpn Soc Sci Fish, 1969, 35 (1): 6-11.
- [26] 郝淑美, 王亚军, 戚凤春, 等. 脂质体流感疫苗制备及体液免疫应答的研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2007, 23 (3): 263-266.

Liposome-encapsulated bacterial antigen against *Stenotrophomonas maltophilia* infection in channel catfish (*Ictalurus punctatus*)

WANG Kai-yu¹, DENG Long-jun², XIAO Dan³, GENG Yi¹, HUANG Xiao-li², CHEN De-fang¹

(1. Fish Disease Research Center, College of veterinary medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. Department of Aquaculture, College of Animal Science and Technology, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 3. Tongwei Co. Ltd., Chengdu 610041, China)

Abstract: Liposome-encapsulated *Stenotrophomonas maltophilia* antigen was prepared by using reverse-phase evaporation method to investigate its potential protective efficacy for *S. maltophilia* infection. Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) were divided into five treatment groups: I - III group were immunized orally with liposome-encapsulated *S. maltophilia* antigen at the dosage of 50 µg/ind, 100 µg/ind and 200 µg/ind. IV group was immunized orally with inactivated *S. maltophilia* antigen alone. And V group was set as control by giving equivalent water. Vaccination was carried out 3 times at 2-week intervals. On day 1, 14, 28 and 49, bactericidal activity of leukocytes and content of IgM in serum were detected periodically to investigate cellular and humoral immune effects. On day 63, all fish were challenged with alive *S. maltophilia* (1×10^8 CFU/mL) by injection to estimate the protective efficacy. The liposome-encapsulated *S. maltophilia* antigen was successfully obtained, with mean size of (0.9 ± 0.3) µm. After immunization, liposome-encapsulated *S. maltophilia* antigen triggered significantly higher bactericidal activity and serum antibody level compared with *S. maltophilia* alone ($P < 0.05$). After challenge with *S. maltophilia*, the relative survival rates of I, II, III group, which had received different dosage of liposome-encapsulated *S. maltophilia* antigen, were 34.8%, 48.2%, 55.4%, respectively. In contrast, the relative survival rate of IV group which had received antigen of inactivated *S. maltophilia* was merely 6.7%, and the survival rate of the control group (V group) was even 0. These results suggest that liposome-encapsulated *S. maltophilia* antigen has the potential for inducing protective immune response against atypical *S. maltophilia* infection and also suggest the possibility of developing a vaccine that may ultimately be used for fish disease prevention. [Journal of Fishery Sciences of China, 2009, 16 (5): 751–757]

Key words: Channel catfish (*Ictalurus punctatus*); *Stenotrophomonas maltophilia*; liposome-encapsulated vaccine