

淡水鱼类细菌性败血症菌苗 浸浴免疫研究*

陈月英 钱冬 沈智华 沈锦玉 曹铮 尹文林 张念慈

(浙江省淡水水产研究所 湖州 313001)

提要 于1992年12月—1995年12月,采用嗜水气单胞菌TPS-30株制成全菌苗,对本所、绍兴、杭州等地渔场鲫、鲢、鳙等进行浸浴免疫试验和生产性防病试验。(1)网箱试验:将含菌 5×10^9 全菌苗按1:10, 1:100, 1:500稀释,对体重超过10g的健康鲫进行菌苗浓度与浸浴时间、增效剂、高渗剂、加强免疫、连续多批分别浸浴和增氧剂等6项免疫试验。经不同时间的RSP%及部分抗体测定结果表明,在1:10—1:500的浓度中分别浸浴1—60min后,45—188天的RSP达66.7%—100%;菌苗液中加入 5×10^{-6} 增效剂和2%高渗剂可使RSP提高10%;首次免疫后间隔1—6个月再加强免疫,可使RSP提高及免疫有效期延长;将1:10菌苗连续浸浴鲫15批,其中前10批免疫鱼的RSP可达60%以上;增氧剂直接加入菌苗液中会降低RSP。部分免疫鱼的血清中有微弱的特异抗体。(2)生产性试验表明:7.7ha成鱼池和533ha湖泊的鱼种浸浴免疫后,池塘免疫鱼平均成活率提高15%,用药成本降低;湖泊死鱼数比上年同期减少55.8%。

关键词 鱼细菌性败血症 全菌苗 浸浴免疫 预防

学科分类号 S941.42

淡水养殖鱼类细菌性败血症既危害鲫、团头鲂和鲢、鲤等摄食性鱼类,又危害鲢、鳙等滤食性鱼类;流行期比以往的常见性鱼病提早1—2个月,并且池塘、湖泊等水域均可发生。对大水体病害,难以用药物防治。菌苗浸浴免疫技术简便易行,颇受研究者瞩目(徐德海等,1992; Croy *et al.*, 1977)。目前对细菌性败血症鱼病免疫技术研究的报道还较鲜见。作者在该病嗜水气单胞菌病原、血清型及其菌苗制备技术研究(沈锦玉等,1993; 钱冬等,1995; 陈月英等,1996)的基础上,开展菌苗浸浴免疫技术及生产性防病研究,以期为开发更有效的浸浴菌苗及提高生产性防病效果提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 网箱试验

菌苗制备菌株为嗜水气单胞菌TPS-30,于1991年5月分离自浙江湖州发病的团头鲂(沈锦玉等,1993)。按文献制备全菌苗(陈月英等,1996),菌苗含菌量为 5×10^9 CFU/ml,

* “八五”国家科技攻关项目,85-15-03-01号。陈月英,女,出生于1938年2月,研究员, Fax: 0086-0572-2041254

收稿日期: 1996-04-22, 收修改稿日期: 1998-05-27

使用时用清洁池水按 1:10(称高浓度), 1:100 或 1:500(称低浓度)稀释成 5×10^8 , 5×10^7 和 1×10^7 CFU/ml。试验于 1993 年 3 月—1995 年 12 月进行, 供试鱼为本所夹山渔场专塘培育的 1—2 龄健康鲫 (*Carassium auratus*), 平均体重超过 10g。试验网箱规格为 $1 \times 1 \times 2 \text{m}^3$, 池塘水深 2m。受试鱼在鱼种运输用的聚乙烯薄膜袋中进行全菌苗浸浴免疫后, 分别放入网箱中饲养, 定期取样, 5—15 尾 / (箱·次), 以 TPS-30 菌株作攻击菌, 测定免疫保护率 [(Relatively Survival Percent, RSP(%))] 及部分抗体, 各项试验均设不经菌苗浸浴等处理的对照组。

1.1.1 菌苗浓度和浸浴时间试验 设 3 个试验组, 以 1:10, 1:100, 1:500 浓度菌苗分别浸浴免疫鲫 1min, 5min 及 60min, 每组试验鱼 100 尾, 水温 14°C 。235 天中共取样 5 次, 测 RSP。

1.1.2 增效剂试验 用市售的萘苄碱作增效剂。在浓度为 1:100 菌苗中加入萘苄碱 5×10^{-6} , 将 30 尾供试鲫浸浴 5min。免疫 17 天和 45 天后, 测 RSP。

1.1.3 高渗剂试验 用市售食盐作高渗剂, 菌苗浓度为 1:100。试验分为 2 组。A 组: 将 30 尾鱼放入含有 2% 食盐的菌苗液中浸浴 5min; B 组: 先将 30 尾鱼放入 2% 食盐溶液中浸浴 2min, 再转入菌苗液中浸浴免疫 5min。35 天后取样, 测 RSP。

1.1.4 加强免疫试验 以 1:10, 1:100, 1:500 浓度菌苗分别浸浴免疫鲫 1min, 5min 和 60min。每组受试鱼 100 尾。首次免疫后将鱼分别放入网箱中饲养, 间隔 1 个月或 3 个月或 6 个月后, 以相同的浓度和时间再加强免疫一次。加强免疫后 45—392 天期间取样测 RSP。

1.1.5 连续多批浸浴免疫试验 在 1:10 浓度的菌苗中, 将第一批鲫放入, 浸浴 1min 后取出, 再放入第 2 批浸浴。连续浸浴 15 批鱼, 每批受试鱼 20 尾。将其中第 1, 4, 8, 10, 12 和 14 批鱼分别放入网箱饲养。45 天后取样测 RSP。

1.1.6 增氧剂试验 为防止鱼群免疫时缺氧进行增氧试验, 增氧剂由本所水化室提供, 主要成分为 CaO_2 。菌苗浓度为 1:500, 在 5L 浸浴液中加入增氧剂 3g, 将 20 尾鲫浸浴 3h。45 天后测 RSP。

1.1.7 血清抗体测定 分别取 1.1.4 项试验网箱中以 1:10 和 1:500 菌苗浓度作首次免疫及加强免疫鲫 5—10 尾。尾动脉采血, 混合同组鱼血清。用间接凝法(北京医学院微生物教研组, 1980)进行特异抗体测定。

1.2 生产性防病试验

1.2.1 池塘 绍兴县马安十六方等渔场的 62ha 成鱼塘, 1990 年起鲫、鲢、团头鲂等鱼流行严重的细菌性败血症。于 1992 年 12 月对 16 300kg 鲫进行全菌苗浸浴免疫。试验在水泥船中进行, 菌苗和增效剂浓度分别为 1:500 和 5×10^{-6} , 水温 10°C 左右, 把鱼浸浴 3h 后放入池中饲养。年终对其中 7.7ha 的试验塘进行捕捞, 统计产量、成活率, 计算防治鱼病成本等。

1.2.2 湖泊 选择杭州西湖水域进行, 该湖水面 533ha, 于 1990 年 8 月开始流行鲢、鳙、鲫等细菌性败血症, 1991—1993 年死鱼 128 493 尾, 1993 年 1—11 月死鱼 29 338 尾。1993 年 12 月至 1994 年 1 月, 对 60 余万尾鲢、鳙、鲫等 1 龄鱼种进行全菌苗浸浴免疫试验。试验在运输鱼的鱼篓中进行, 菌苗、增效剂浓度为 1:500 和 5×10^{-6} , 运输浸浴时间为 2—3h, 水

温 10℃ 左右。到达目的地后,将鱼取出直接放入湖中。统计全年死鱼数。

2 结果

2.1 浸浴免疫技术及其免疫效果

2.1.1 菌苗浸浴浓度、时间及增效剂、高渗剂与免疫效果 由表 1 所示,用不同菌苗浓度、不同时间浸浴的鲫均可获得对同型菌株不同程度的保护,以 17—35 天和 235 天的 RSP 较低,仅为 6.7%—50%;45—188 天可达到 66.7%—100% 的有效保护,尤其以 1:10 浓度浸浴的 RSP 最高,且持续时间也最久;增效剂组的 RSP 在 17 天和 45 天时分别为 50% 和 100%,而无增效剂组则分别为 25% 和 75%;2% 高渗剂与菌苗混合使用比两者分开使用的 RSP 提高 10% (分别为 70% 和 60%),而且也便于生产上操作。

表 1 菌苗浸浴浓度与时间对 RSP (%) 的影响 (ND 示未做)

Tab. 1 Effect of bacterin concentration and bathing time on *C. auratus* RSP (%)

免疫时间 (d)	浸浴浓度与时间 (min)						对照组死亡率 (%)
	1:10, 1min	1:100, 5min				1:500, 60min	
		无增效剂	加增效剂	高渗剂			
				A	B		
17	ND	25.0	50.0	No	No	50.0	80.0
35	28.7	13.3	ND	70	60	6.7	100.0
45	100.0	75.0	100.0	No	No	66.7	85.7
80	100.0	75.0	ND	No	No	75.0	80.0
188	100.0	100.0	ND	No	No	80.0	100.0
235	ND	50.0	ND	No	No	50.0	80.0

2.1.2 加强免疫的间隔时间的免疫效果 两次免疫的间隔时间对鲫 RSP 有很大影响,间隔 3 个月的两种浸浴法的免疫保护率都高于间隔 1 个月 (见表 2)。间隔 6 个月的高浓度组在 392d 的 RSP 为 80%。表明,首次免疫 1—6 个月内鱼体都有免疫记忆,同时提高浸浴菌苗浓度及适当延长两次免疫的间隔时间有利于 RSP 的提高和免疫期的延长。

表 2 加强免疫的间隔时间对 RSP (%) 的影响

Tab. 2 Effect of immunization interval time on *C. auratus* RSP (%)

间隔时间 (月)	1:100		1:500		对照组死亡率 (%)
	首次免疫	加强免疫	首次免疫	加强免疫	
1	63.6	72.7	72.7	72.7	73.3
3	71.4	100	62.5	75.0	80.0

2.1.3 连续多批浸浴的免疫效果 用 1:10 浓度的菌苗先后对 15 批鲫浸浴,45d 后测得前 10 批的 RSP 达 60% 以上,此后各组的 RSP 逐渐下降 (见表 3)。这种方法既可节省菌苗用量和操作时间,又不影响效果,在生产上就地大批放养鱼种时进行快速浸浴免疫更具有

表 3 高浓度菌苗连续多批浸浴对 RSP (%) 的影响

Tab. 3 Effect of bacterin used for batches at concentration of 1:10 on *C. auratus* RSP (%)

第 1 批	第 4 批	第 8 批	第 10 批	第 12 批	第 14 批	对照组死亡率 (%)
90.0	80.0	80.0	60.0	30.0	10.0	100.0

实用性。

2.1.4 增氧剂对浸浴免疫效果的影响

表4 浸浴免疫鲫血清抗体效价的测定结果

Tab. 4 Serum antibody titer of *C. auratus* after bathed immunization by bacterin

组号	组别	效价
1 [#]	首次免疫组(1:10)	1:8
2 [#]	首次免疫组(1:500)	<1:4
3 [#]	加强免疫组(1:10)	1:16
4 [#]	加强免疫组(1:500)	1:4
5 [#]	对照组	<1:4

结果表明,在 5L 1:500浓度菌苗中添加 3g 增氧剂,45 天的 RSP 比不添加增氧剂组降低 40.6%。

2.1.5 抗体效价

一组首次免疫和两组加强免疫的受试鲫血清中均能测到 $\geq 1:4$ 的特异性抗体,特别是两次都用高浓度菌苗浸浴的 3[#]组抗体效价达 1:16,首次免疫低浓度组的抗体水平较低。

2.2 生产性防病效果

2.2.1 对鱼塘的免疫结果

据绍兴县马安十六方等渔场的 7.7ha 成鱼塘的统计,1992 年冬季免疫鲫 7 800 尾、总体重为 1 300kg。1993 年共计捕获鲫 9 600kg,比 1992 年的 8 558.7kg,增产 1 041.3kg,平均成活率提高 15%。同时,鱼病防治费用比上年减少 64.8%(2 476.55 元),还提高了同池其它养殖鱼类的成活率和产量。根据该场以往的发病规律和相邻渔场发病情况,一般以鲫先发病死亡,然后为鲢、团头鲂和鳊等。鲫免疫接种后减少了传染源,因而也减少了其它鱼的发病死亡。

2.2.2 对湖泊的免疫结果

1993 年底对西湖当年放养的鲢、鳊、鲫等鱼种进行浸浴免疫,1994 年 1—11 月份共计死鱼 12 973 尾,占当年放养鱼数的 2.16%,比上年同期减少 55.8%,比前 3 年的年平均数减少 69.4%,见表 5。可见,1994 年的 2 个死亡高峰比上年有大幅度下降。

表5 杭州西湖免疫(1:500菌苗浓度)前后死鱼尾数

Tab. 5 Mortality of fish in the West Lake in Hangzhou before and after bathed by 1:500 bacterin concentration

月份	5	6	7	8	9	10	11	12
1992年	2 623	1 027	2 236	1 907	14 145	9 478	3 491	346
1993年	1 130	1 510	1 711	2 277	9 224	8 484	2 052	
1994年	1 087	801	573	512	2 186	3 814	1 946	

3 讨论与结语

3.1 菌苗浸浴免疫效果

作者用淡水鱼类细菌性败血症病原嗜水气单胞菌 TPS-30 菌株制成全菌苗,对体重超过 10g 的鲫进行多项浸浴免疫对比试验,以免疫保护率(RSP)评价其效果。结果表明,采用全菌苗 1:10 浓度 1min 和 1:500 浓度分别浸浴 1min 和 60min,可使免疫接种 45 天以上的鲫对同型菌株获得有效保护。免疫期最长可持续 6 个月至一年。用 1:500 苗长时间浸浴池塘和湖泊冬季放养鱼种 1—3h,也可使受试鱼或同水域其它鱼类安全渡过来年的细菌性败血症流行季节。表明,用这种全菌苗作抗原浸浴免疫的鲫、鲢、团头鲂等易感鱼的鱼种,可以有效地预防这些鱼的细菌性败血症。本试验结果展示了嗜水气单胞菌全菌苗预防细菌性败血症的应用前景。

3.2 菌苗浸浴免疫的条件

菌苗浸浴免疫效力及其免疫期一直是人们所关注的问题。本试验用嗜水气单胞菌全菌苗浸浴免疫鲫等体重超过 10g 的鱼种,并以全菌苗含有嗜水气单胞菌菌体抗原以及分泌的胞外产物如 HEC 毒素、胞外蛋白酶等可溶性抗原,加上增效剂莨菪和高渗剂食盐的作用,促进了鱼体微循环,提高了机体对抗原吸收作用,经一定时间的浸浴,使抗原容易经鳃、侧线和肠道等器官组织进入体内,因而提高了 RSP(%)并延长了其免疫期。据酒井正博等报道(1988)用 β -溶血性链球菌液体培养菌苗浸浴免疫平均体重 15g 的虹鳟可获得 72% 的有效率,但其免疫有效期不到 60d。Johnson 等(1982)用鳗弧菌和耶尔森氏菌所进行的研究认为,个体重 4g 的鱼能保持 1 年以上的防御能力,而 1g 和 2g 体重的仅为 3 个月和 6 个月。由于不同作者所采用的抗原、鱼的种类、具体操作技术或增效剂等不同,因而所获得的效果可能也不同,但用菌苗进行浸浴免疫接种,可以使鱼获得一定的免疫保护。

并于莨菪碱的作用,作者从草鱼出血病疫苗浸浴免疫经验证明其有增效作用;莨菪添加于一龄草鱼饲料中能提高草鱼成活率和产量(张念慈等,1990;陈月英等,1994)。本研究也表明,一定浓度的莨菪可能是抗原进入鱼体的一种有效免疫增效剂。

3.3 加强免疫的间隔期

用全菌苗对鱼体进行加强免疫试验,两次浸浴免疫的间隔时间在 1—6 个月均可使鲫获得有效保护。这种保护率以间隔 3 个月和 6 个月比 1 个月稍佳。由此提示,首次免疫以后究竟在鱼的 RSP 或抗体水平达到何种水平时再加强免疫为好?这是一个问题。从实用性看,细菌性败血症所危害的主要是 2 龄以上的养殖鱼类,尤其是湖泊、水库等大水体,养殖周期长,为使其免受危害,采用加强免疫尤为必要。如若在 4—5 月份夏花鱼种培育阶段进行首次浸浴免疫,到年底鱼种放养时再重复接种一次可能更为有效。从加强免疫的 RSP 和抗体效价分析,用高浓度短时间浸浴两次为最好。

3.4 菌苗的重复使用

本研究表明,用高浓度菌苗液重复连续浸浴 10 批鱼种均可获得有效保护。这一结果也与日本的水产疫苗用法用量基本一致(李庆春,1991;陈胜香,1991)。疫苗的反复浸浴鱼种技术,对生产上简化操作、降低浸浴免疫成本有实用意义,但 1:10 的浓度浸浴 10 批的免疫成本还相对较高。在实际使用中,随着浸浴批数的增加,菌苗液抗原浓度逐渐下降。菌苗稀释的下限是多少,如何防止浸浴菌苗液水质的恶化,这些问题,还有待作进一步研究。

3.5 化学增氧剂在浸浴免疫中的使用

本试验表明采用以 CaO_2 为主要成分的增氧剂直接加于菌苗液中浸浴免疫鱼 3h, RSP 比不加增氧剂组明显降低。这可能由于 CaO_2 在水中释放的原子态氧使全菌苗抗原结构被破坏所致。作者设想为解决鱼群缺氧浮头又不影响浸浴初期菌苗的抗原构,可以把增氧剂在浸浴免疫后期鱼群呈现缺氧浮头时加入菌苗液中,这可能既增氧又不影响免疫效果。

综上所述,采用全菌苗进行浸浴免疫的菌苗浓度与时间,增效剂,高渗剂,加强免疫、连续多批浸浴和增氧剂等浸浴免疫试验,以及生产性防病试验结果表明,一定的菌苗浓度与浸浴时间均可使鲫获得免疫保护;在菌苗中加入 5×10^{-6} 莨菪碱和 2% 食盐有增效作用;加强免疫比一次免疫的效果好;免疫的间隔时间 1—6 均有免疫效果,并以 3—6 个月优于 1 个月;在高浓度菌苗中浸浴的 10 批鱼,均可获得有效免疫保护; CaO_2 等不能在鱼种浸浴前

加入菌苗液中,避免影响效果。用全菌苗浸浴供饲养的鲫、鲢、团头鲂等鱼种,均可提高其成活率和产量。

致谢 本工作得到绍兴县水技站沈芸高级工程师和杭州西湖水域管理处李梅姿高级工程师的帮助,谨志谢忱。

参 考 文 献

- 北京医学院微生物教研组,1980. 实验免疫学. 北京:人民卫生出版社. 396—414
- 李庆春,1991. 水产养殖上之疫苗——寻求有效之投送途径. 养鱼世界(台湾),8:59—63
- 陈月英 钱冬 沈智华等,1996. 养殖鱼类细菌性败血症的菌苗制备技术. 水产学报,20(2):125—131
- 陈月英 叶金云 沈智华,1994. 添加莼蓉和疫苗对一龄草鱼促长防病饲养效果的研究. 浙江水产学院学报,13(2):104—109
- 陈胜香,1991. 水产用疫苗的使用情况与效果. 养鱼世界(台湾),9:56—58
- 张念慈 杨广智 尹文林等,1990. 莼蓉对夏花草鱼浸浴免疫的增效作用. 浙江水产学院学报,9(2):79—83
- 沈锦玉 陈月英 沈智华等,1993. 浙江养殖鱼类暴发性流行病病原的研究 I. 嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)的分离、致病性及生理生化特性. 科技通报,9(6):397—401
- 徐德海 吴淑勤,1992. 国外鱼类疫苗研究进展. 国外水产,4:1—3
- 钱冬 陈月英 沈锦玉等,1995. 引起鱼类暴发性流行病的嗜水气单胞菌的血清型、毒力及溶血性. 微生物学报,35(6):460—464
- 酒井正博 厚田静男 小林正典,1988. ニジマスの β -溶血性連鎖球菌症に対する浸漬ワクチンの有効性. 鱼病研究,23(4):269—270
- Croy T R, Amend D F. 1977. Immunization of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) against vibriosis using the hyperosmotic infiltration technique. Aquaculture, 12:317—325
- Johnson K A, Flynn J K, Amend D F, 1982. Duration of immunity in Salmonids fry vaccinated by direct immersion in *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterin. J Fish Diseases, 5, 207—213

STUDIES ON BATH IMMUNIZATION OF BACTERIN FOR FISH BACTERIAL SEPTICEMIA

CHEN Yue-ying, QIAN Dong, SHEN Zhi-hua, SHEN Jin-yu,
CAO Zheng, YIN Wen-lin, ZHANG Nian-ci

(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou, 313001)

Abstract Bath vaccination tests and field prevention trials of fish bacterial septicemia were carried out with crucian carp (*Carassius auratus*), silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and bighead (*Aristichthys nobilis*) in fish farms located in Huzhou, Shaoxing, Hangzhou from Dec. 1992 to Dec. 1995, using the formalin-inactivated whole cell bacterin of *Aeromonas hydrophila* strain TPS-30, which was isolated from disease blunt-snout bream (*Mygalobrama amblycephala*). In the bath vaccination tests, crucian carp was bathed for 1, 5, 60 mins with bacterin diluted 10, 100 and 500 times, respectively, and relatively survival percent (RSP, %) were 66.7%—100% after the fish was cultured in cages from 45 to 188 days. The RSP was 10% higher in bacterin solution added with 5×10^{-6} enhancing agent and 2% high osmotic agent. The RSP increased and the period of immunity prolonged after about 45 days, when crucian carp was immunized at 1, 3, six months interval after the first immunization. Bacterin diluted 10 times was used for 15 batches of fish-bathing, the RSP of the first, forth, eighth, tenth batch of fishes was above 60%. The RSP decreased, when oxygen-enriching agent was used in the bacterin solution. The serum of fish bathed once or twice has a little specific antibody after 45 days. In field trials, the fingerlings, including crucian carp, silver carp, bighead etc were bathed with bacterin in fish ponds with an area of 6.6ha., Shaoxing and in the West Lake with an area of 533ha, Hangzhou. The survival rate of adult fishes was increased by about 15%. The cost of drugs was decreased by 80%. The mortality of fish immunized in lake was 55.8% lower than that of the control group.

Key words Fish bacterial septicemia Whole cell bacterin Bath immunization Prevention

Subject classification number S941.42