

文章编号:1005-8737(2001)02-0076-04

鳃弧菌口服微胶囊疫苗的制备 及其对鲈鱼的免疫效果

余俊红¹, 沈继红², 王祥红¹, 王宝坤¹, 纪伟尚¹, 胡应劭³, 徐怀恕¹

(1. 青岛海洋大学 生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266003; 3. 香港中文大学 生物系, 香港)

摘要:以分离自患病鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)的致病菌 W-1 为材料, 利用喷雾微胶囊技术制备口服微胶囊疫苗。结果表明, 喷雾干燥条件对疫苗微胶囊颗粒影响较大; 其适宜条件为: 进料温度 40℃, 进料速度 40 ml/min, 热风温度 200℃; 其制备的微胶囊疫苗平均粒径为 45.5 μm, 平均含菌量为 2.79×10^9 mg⁻¹ 干粉。将此微胶囊疫苗及全细胞疫苗直接拌入饵料口服免疫接种鲈鱼幼鱼, 1 周后以 W-1 活菌攻毒 (2.5×10^6 CFU/尾)。结果表明, 微胶囊疫苗组的 1 周累积死亡率 (41.7%) 低于全细胞疫苗组 (45.0%), 均低于对照组 (95.0%)。2 个免疫组都有一定的免疫保护力, 微胶囊疫苗组和全细胞疫苗组的免疫保护力分别为 56.1% 和 52.6%。

关键词:鳃弧菌; 口服微胶囊疫苗; 疫苗制备; 鲈鱼; 免疫**中图分类号:** S942.5**文献标识码:** A

暴发性弧菌病是危害海水养殖鱼类最严重的疾病之一, 它可以感染多种鱼类并造成大量死亡^[1]。应用抗生素等化学法治疗是较常用的手段, 但是由此可引发细菌抗药性、破坏环境微生物生态及造成抗生素污染等一系列问题^[2]。利用疫苗防治各种鱼类疾病已有成功范例, 但大多集中在注射和浸浴等免疫接种方法^[3-7], 口服免疫接种很少^[8-9], 口服微胶囊疫苗尚未见报道。本文以鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 为实验菌株, 利用喷雾微胶囊技术制备弧菌疫苗, 探讨了制备口服微胶囊疫苗的喷雾干燥条件并检测了微胶囊疫苗的颗粒特性。并将此微胶囊疫苗及未微胶囊化的全细胞疫苗直接拌入饵料口服免疫接种鲈鱼 (*Lateolabrax japonicus*) 幼鱼, 以

检测比较它们的免疫效果。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试验用鱼 鲈鱼幼鱼, 取自莱州大华水产公司。幼鱼体重 20~30 g, 体长 10~15 cm。

1.1.2 菌株 从饲养患病鲈鱼体内^[10]分离到 1 株致病菌 W-1, 经鉴定为鳃弧菌。

1.2 方 法

1.2.1 鲈鱼暂养 试验用幼鲈首先在 3 m × 3 m × 1.5 m 的水泥池中暂养 1 周, 然后分组饲养在 50 L 的试验桶中 (盛 40 L 砂滤海水)。每桶 20 尾, 每组设 3 个平行。每天正常投喂鱼糜, 换水量为水体的 1/2。水温为 24~26℃。

1.2.2 全细胞疫苗的制备 将菌株 W-1 接种于 2216E 斜面, 28℃ 培养 48 h, 加入无菌生理盐水制成菌悬液。再接种于液体 2216E 培养基, 摇床培养 48 h, 转速 100~110 r/min, 再加入 0.5% 福尔马林溶

收稿日期: 2000-08-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870581); 国家“九七三”资助项目 (G1999-012-004)

作者简介: 余俊红 (1971-), 女, 青岛海洋大学博士生, 从事海洋微生物方面研究 E-mail: H SXu@mail.ouqd.edu.cn

液灭活 48 h, 离心(7 000 r/min, 30 min), 收集灭活疫苗。

1.2.3 微胶囊疫苗的制备

(1) 乳化液的制备 包埋剂、乳化剂加热溶解于蒸馏水中, 冷却至室温后加入上述浓缩疫苗中, 然后以 10 000 r/min 高速搅拌, 充分乳化。

(2) 喷雾干燥微囊化 采用直接喷雾干燥法制备微胶囊疫苗。其工艺流程如下: 液体发酵培养菌体→福尔马林灭活→离心浓缩→包埋剂+乳化剂→乳化液→喷雾干燥成微胶囊疫苗。同时研究不同喷雾干燥条件对微胶囊造粒的影响。

1.2.4 微胶囊疫苗的微囊化检测

(1) 微胶囊粒径测定 显微镜法测量其大小, 在可视视野中, 随机取 20~30 个微胶囊颗粒, 测其直径, 取平均值。

(2) 微胶囊疫苗含菌量测定 精确称取微胶囊疫苗粉末 0.010 g, 溶于 100 ml 经 0.22 μm 滤膜过滤除去死菌体的无颗粒水中, 充分溶解后, 取 1 ml 溶液作 10 倍梯度稀释。然后, 取合适稀释度的试管以吡啶橙荧光直接镜检计数(AODC)^[11]总菌数。

1.2.5 微胶囊疫苗效果的评定

(1) 安全性评定试验 将 0.1 g 微胶囊疫苗溶于 10 ml 无菌生理盐水中, 取 0.1 ml 溶液注射给健康鲈鱼, 逐日观察记录其 1 周死亡率。

(2) 累积死亡率和免疫保护力的测定 每天按鲈体重的 10% 投喂冰冻小杂鱼鱼糜, 分别将微胶囊疫苗和全细胞疫苗拌在鱼糜中, 微胶囊疫苗按 0.1 g/kg 鱼体重投喂, 全细胞疫苗按 1 ml/kg 鱼体重投喂, 连续投喂 5 d, 对照组投喂不含疫苗的鱼糜。免疫结束 1 周后, 用 W-1 活菌注射攻毒, 剂量为 2.5×10^6 /尾。观察 1 周内的死亡率并按下列公式计算免疫保护力(RPS):

$$RPS = [(对照组死亡率 - 实验组死亡率) / 对照组死亡率] \times 100\%$$

2 结果

2.1 喷雾干燥条件

喷雾干燥的主要目的是为了将湿菌体乳化液干燥以得到流动性良好的粉末。不同进料温度、进料速度以及热风温度对干燥效果的影响见表 1。

表 1 喷雾干燥条件对微胶囊化的影响

Table 1 Influence of different spray-drying conditions on microencapsulation

项目 Item	进料温度/℃ Feed temperature			进料速度/(ml·min ⁻¹) Feed speed			热风温度/℃ Hot wind temperature		
	20	40	60	40	60	80	180	200	220
湿粉粘壁现象 Adherence to wall	轻微 Little	无 No	轻微 Little	无 No	轻微 Little	严重 Much	轻微 Little	无 No	轻微 Little
粉末流动性 Power fluidity	差 Bad	好 Good	好 Good	好 Good	好 Good	差 Bad	较好 Fair	好 Good	好 Good
干燥效果 Drying effect	差 Bad	好 Good	一般 Mediocre	好 Good	较好 Fair	差 Bad	一般 Mediocre	好 Good	好 Good

由表 1 可见, 喷雾干燥适宜条件为: 进料温度 40℃, 进料速度 60 ml/min, 热风温度 200℃。

2.2 微胶囊疫苗的微囊化

2.2.1 微胶囊疫苗颗粒大小 经测定, 微胶囊疫苗颗粒直径 18.4~68.4 μm, 平均 45.5 μm, 见图 1。

2.2.2 微胶囊疫苗含菌量 经 AODC 法测得总菌量为 2.79×10^8 ml⁻¹, 即疫苗粉末含菌量为 2.79×10^9 /mg 干粉, 见图 2。

2.3 微胶囊疫苗的疫苗效果

2.3.1 疫苗安全性 注射后的幼鲈鱼抢食积极, 游动活泼, 1 周内未有任何异常。表明微胶囊疫苗安全性良好。

2.3.2 累积死亡率 经过 5 d 的疫苗投喂(图 3),

免疫实验组均有一定的抵抗活菌攻毒的能力。活菌攻毒后, 对照组死亡率始终高于 2 个免疫组, 其 1 周的累积死亡率为 95.0%。微胶囊疫苗组的 1 周累计死亡率(41.7%)略低于全细胞疫苗组(45.0%)。

2.3.3 免疫保护力 经过口服免疫接种后, 2 个免疫组都获得一定的免疫保护力。微胶囊疫苗组和全细胞疫苗组的免疫保护力分别为 56.1% 和 52.6%, 前者略高于后者。

3 讨论

针对日益严重的细菌性疾病, 越来越多的水产养殖研究者倾向采用疫苗接种法进行防治^[12,13], 与其它免疫接种方法相比, 口服免疫法更适合于大



图1 微胶囊疫苗颗粒(光镜, $\times 400$)

Fig.1 Microencapsulated vaccine particle

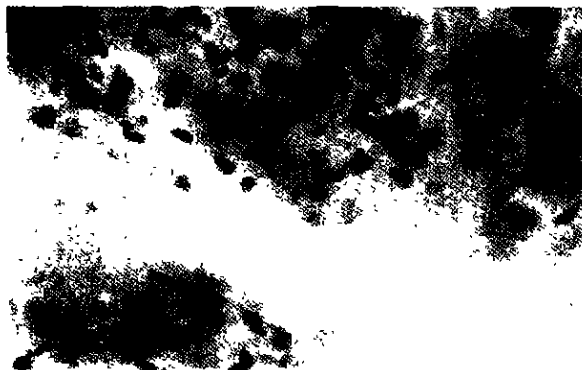


图2 微胶囊疫苗,示微胶囊内菌体(光镜, $\times 1000$)

Fig.2 The bacteria in the microencapsulated vaccine

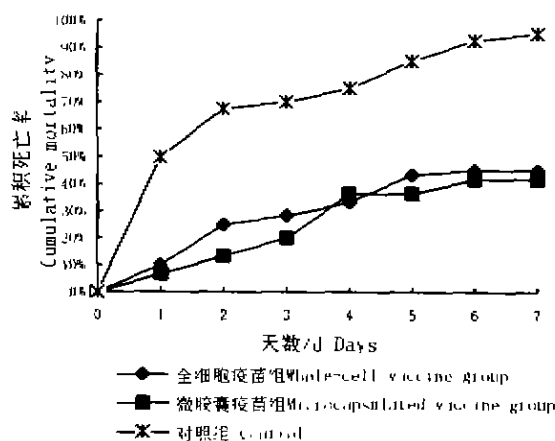


图3 攻毒后不同口服疫苗组鲈鱼累积死亡率

Fig.3 Cumulative mortality of sea perch after injection with vaccine

规模的养殖鱼群,不受鱼的大小及时间的限制,对鱼也不产生应激反应,尤其易于多次重复免疫,因而解决了鱼类再次免疫的技术难题^[12]。本文尝试利用喷雾微胶囊技术包埋弧菌疫苗,并通过对包埋材料及喷雾干燥条件优化,得到了流动性良好的口服微胶囊疫苗。其平均粒径为 $45.5 \mu\text{m}$,平均含菌量为 $2.79 \times 10^9/\text{mg}$ 干粉。将其应用于鲈鱼幼鱼的免疫实验,获得了较好的免疫效果。

Joosten^[14]曾制备微胶囊弧菌疫苗,通过对草鱼和鳞鱼的口服免疫接种,发现疫苗的微囊化后,降低了抗原在消化道的降解,提高了口服疫苗的效果。本实验证实了这个结论,即微胶囊化的疫苗提高了鱼体对抗原的吸收。

喷雾微胶囊技术是一项比较新颖、用途广泛、发展迅速的新技术。喷雾微胶囊可使菌体抗原得到保护,并且微胶囊疫苗无发酵细菌的异味,易被鱼接受,使用也非常方便。通过对胶囊壁材的选取及工艺的优化,可以对心材(抗原)的释放时间和释放速率进行控制。这样,可以使保护性抗原有效避免在养殖环境和鱼消化道中的损失,直接到达鱼肠道吸收,从而减少疫苗用量,提高疫苗的免疫效果。

致谢:李军博士给本文提出许多宝贵意见,特此感谢。

参考文献:

- [1] Austin B, Austin D A. Bacterial Fish Pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish [M]. Third Edition. Chichester: Praxis Publishing Ltd, 1999. 237-241.
- [2] Li Jun, Norman Y S Woo, Xu Huaishu, et al. Antibiotic resistance and plasmid profiles of *Vibrio* isolates from cultured silver sea bream, *Sparus aurata* [J]. Marine Pollution Bulletin, 1999, 39, (1-12):245-249.
- [3] Ellis A E. Recent Development in oral vaccine delivery systems [J]. Fish Pathol, 1995, 30:293-300.
- [4] Newman S G. Bacterial vaccine for fish [J]. Annual Review of Fish Diseases, 1993, 3:145-185.
- [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, 13(3):271-278.
- [6] 陈昌福,周文豪. 多种接种途径对翘鳞细菌性烂鳃和败血症的免疫预防效果[J]. 淡水渔业, 1996, 26(1):3-6.
- [7] 陈月英,钱冬,沈智华,等. 淡水鱼类细菌性败血症菌苗浸浴免疫的研究[J]. 海洋与湖沼, 1998, 29(6):597-602.
- [8] 陈昌福,纪国良. 草鱼口服鱼害粘球菌疫苗的免疫效果[J]. 淡水渔业, 1989, (6):3-8.
- [9] 安利国,傅荣恕,邢维贤,等. 鲤竖鳞病原及其疫苗的研究[J]. 水产学报, 1998, 22(2):136-142.
- [10] 肖慧,李军,徐怀恕,等. 鲈鱼苗烂鳃、烂尾病原菌的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(1):87-93.

- [11] 徐怀恕, 杨学宋, 李 筠, 等. 对虾苗期细菌病害的诊断与控制 [M]. 北京: 海洋出版社, 1999. 170-171.
- [12] 陈怀青. 鱼类免疫接种的理论与实践 [J]. 国外水产, 1995, (3): 7-10.
- [13] Char M, Gapasin R S J, Dehasque M, et al. Vaccination of European seabass fry through bioencapsulation of *Artemia nauplii* [J]. Aqua Int, 1994, 2(4): 254-261.
- [14] Joosten P H M, Tiemersma E, Threels A, et al. Oral vaccination of fish against *Vibrio anguillarum* using alginate microparticles [J]. Fish & Shellfish Immunology, 1997, 7(7): 471-485.

Oral vaccination of sea perch, *Lateolabrax japonicus*, against *Vibrio anguillarum* using microencapsulated vaccine

YU Jun-hong¹, SHEN Ji-hong², WANG Xiang-hong¹, WANG Bao-kun¹,
JI Wei-shang¹, HU Ying-shao(Norman. Y. S. Woo)³, XU Huai-shu¹

(1. College of Marine Life Sciences, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China;

2. First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao 266003, China;

3. Department of Biology, The Chinese University of Hongkong, Shatin NT, Hongkong, China)

Abstract: The oral microencapsulated vaccine was prepared using *Vibrio anguillarum*, isolated from diseased sea perch, *Lateolabrax japonicus* while a technique of spray-drying microencapsulation was employed. The optimum conditions for spray-drying were: feed temperature 40°C, feed speed 40 ml/min, hot wind temperature 200°C. The microencapsulated-vaccine particles produced had an average diameter of 45.5 μm and the average bacterial mass of 2.79 × 10⁹ mg⁻¹ particle-powder. Then, the sea perch were fed directly the diets mixed with the microencapsulated vaccine and the whole-cell vaccine, respectively, for 5 d, while the control only the normal diet. One week after that all the experimental fish were injected with *V. anguillarum* and the 1-week observation results showed that the 2 vaccine-fed groups were much lower than control in 1-week cumulative mortality, which were 41.7% (microencapsulated group), 45.0% (whole-cell group) and 95% (control), respectively. The relative percentage survival of the 2 vaccine-fed groups were 56.1% and 52.6%, respectively.

Key words: *Vibrio anguillarum*; oral microcapsule vaccine; vaccine preparation; *Lateolabrax japonicus*; immunization