

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2012.00433

嗜麦芽寡养单胞菌脂多糖对斑点叉尾鲷免疫保护作用

汪开毓^{1,2} 黄锦炉¹ 肖丹³ 彭浪^{1,2} 黄艺丹^{1,2}

(1. 四川农业大学鱼病研究中心, 雅安 625014; 2. 四川农业大学, 动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 雅安 625014;
3. 通威股份有限公司, 成都 610041)

摘要:嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)是近年来引起斑点叉尾鲷高致死性、传染性疾病的主要病原之一。为了研究嗜麦芽寡养单胞菌脂多糖对斑点叉尾鲷的免疫保护作用, 实验选用了 400 尾健康斑点叉尾鲷, 随机分成 I、II、III、IV 四个组, 每组用鱼 100 尾, 每组下设两个重复, 每个重复用鱼 50 尾, 以腹腔注射的方式分别向 I、II、III、IV 四个组的斑点叉尾鲷注射嗜麦芽寡养单胞菌脂多糖、无花果多糖加脂多糖、全菌灭活苗和生理盐水, 在试验第 0、第 28 天时分别进行首次免疫和加强免疫, 试验期间每隔 7d, 对试验鱼的血液白细胞杀菌活性、补体 C3 含量、IgM 含量和血清凝集效价滴度进行测定; 试验第 49 天时进行活菌攻毒。结果表明, 首免后, 接种脂多糖、无花果多糖加脂多糖的试验鱼血清凝集效价滴度明显升高, 白细胞杀菌活性、补体 C3 含量、IgM 含量也明显增加; 加强免疫后, 脂多糖、无花果多糖加脂多糖的试验鱼血清凝集效价滴度峰值分别为 1 256 和 1 512, 白细胞杀菌活性峰值分别为 0.565 和 0.511, 补体 C3 含量峰值分别 0.194 和 0.180mg/mL, IgM 含量峰值分别 1.415 和 1.464mg/mL, 免疫保护率分别为 70.0%和 65%。嗜麦芽寡养单胞菌脂多糖和脂多糖+无花果多糖受免鱼的上述指标均显著($P<0.05$)或极显著($P<0.01$)地高于生理盐水注射组, 这两者的免疫保护效果优越于全细胞灭活苗。

关键词:嗜麦芽寡养单胞菌; 斑点叉尾鲷; 脂多糖; 无花果多糖; 免疫

中图分类号: S942.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)03-0433-08

嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)是一种非发酵型革兰氏阴性杆菌, 广泛分布于水、土壤、植物根系、人和动物的体表中^[1]。该菌是一种无特定感染宿主的条件性致病菌, 可引起人的伤口感染和败血症^[2-5]、山羊的羊毛腐烂^[6]和圈养蛇传染性口腔炎^[7], 也可引起鳄鱼败血症^[8]和卵型鲳鲈的大规模发病死亡^[9]。近年来, 四川、贵州、广西、重庆等地区网箱养殖斑点叉尾鲷相继暴发了一种急性流行性传染病, 发病鱼主要出现体表褪色斑、脱肛、严重肠炎和腹水, 并以肠套叠为主要病理特征, 其发病率和死亡率均在 90%以上, 造成的经济损失极其严重^[10]。汪开毓等通过病原学和动物回归试验研究, 首次证实了该病病原是嗜麦芽寡养单胞菌^[11, 12]。嗜麦芽寡养单胞菌具有多重耐药性,

其耐药率也呈逐年增加趋势, 这给以抗生素类药物防治为主要措施的基层养殖户带来严峻的问题。因此, 为了减少菌株耐药性产生及缓解因抗生素类药物过量使用后其残留污染环境的压力, 建立对该菌感染有效的免疫防治方法显得十分重要。

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌细胞壁外膜的大分子物质, 主要由多糖、类脂和蛋白质组成^[13], 对多种鱼类具有良好的免疫原性^[14, 15], 可有效促进机体 B 淋巴细胞再生、激活吞噬细胞活性和溶菌能力, 提高受免鱼的免疫保护力^[16-18]。本实验以嗜麦芽寡养单胞菌脂多糖作为主要免疫剂, 设计了脂多糖(LPS)免疫组、脂多糖加无花果多糖(LPS-FCPS)免疫组、全菌灭活苗(Formlin-killed cell, FKC)免疫组和生理盐水对照组, 通过比较试验斑点

收稿日期: 2011-04-01; 修订日期: 2012-01-07

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); 农业部动物检验检疫检测与防治项目(2130108); 通威股份有限公司重点项目(2006-2009)资助

通讯作者: 汪开毓(1955—), 男, 教授, 博导; 主要从事水生动物疾病研究。Tel: 0835-2885753; E-mail: kywang@sicau.edu.cn

叉尾鲷的白细胞杀菌活性、补体 C3 含量、IgM 含量、血清凝集效价和免疫保护率差异性,为综合评价嗜麦芽寡养单胞菌脂多糖的免疫效果提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验菌株:嗜麦芽寡养单胞菌,由四川农业大学鱼病研究中心保存提供。试验动物:健康斑点叉尾鲷400尾,体重为(50±5)g,购自眉山市某商用养殖场。主要试剂:DNAase、RNAase(Sigma);葱酮(国药集团化学试剂有限公司);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)(Amresco);低限基本培养基(Minima essential medium, MEM)(Gibco);淋巴细胞分离液(天津灏洋生物制品科技有限责任公司);补体 C3 测定试剂盒(浙江伊利康生物技术有限公司);免疫球蛋白 M 试剂盒(北京莱博生物材料研究所);其他试剂均为国产分析纯。主要仪器:UV-2000 型分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司)、DU-800 核酸蛋白分析仪(Beckman)、DNA110-230 真空浓缩干燥仪(Thermo)。无花果:市售优质。

1.2 嗜麦芽寡养单胞菌脂多糖的提取

LPS 的提取采用热酚水法^[19]进行。将嗜麦芽寡养单胞菌接种于胰酶大豆肉汤(Tryptone Soya Broth, TSB), 28℃恒温振荡培养 24h, 3000 r/min 离心收集菌体,反复冻融数次,取冻融菌液在 68℃水浴中加入等体积 90%的苯酚,匀速摇荡 20—30 min 后冷却至 10℃, 10000 r/min 低温离心 45min,取上清液,下层液体依上法重复提取 2 次。将收集的上清液装透析袋,流水冲洗和双蒸水透析各 48h,每天换水数次。透析液经 PEG6000 浓缩为原来体积的 1/4 时,加入 DNAase(50 μg/mL)和 RNAase(50 μg/mL), 37℃作用 4h, 100℃水浴 10min 后冷却至常温, 1500 r/min 再离心 30min,取上清液真空浓缩干燥即得 LPS 粉末,置 4℃冰箱保存。

1.3 无花果多糖的提取和鉴定

无花果多糖的提取参照水提醇沉淀法^[20]进行。将

无花果剪成若干碎片,放入盛有适量蒸馏水的烧瓶中,于 95℃水浴锅中回流浸提 6h,每 2h 取出过滤一次,合并滤液,再用旋转蒸发仪按 1:1 比例浓缩滤液。向滤液中加入 1/4 倍的 Sevage 液(氯仿:正丁醇=4:1),然后以 4000 r/min 的速度反复离心 6 次,每次 15min,以除去蛋白质;取上清,向上清中加入无水乙醇至乙醇终末浓度为 75%,静置 24h,离心,收集沉淀,冷冻干燥后放置 4℃冰箱中保存。取干燥后的沉淀提取物 5 mg 溶于 50 mL 蒸馏水中,经多糖特殊显色鉴定,硫酸葱酮试剂显色阳性,硫酸苯酚试剂显色阳性。

1.4 免疫剂的制备和试验鱼分组

将嗜麦芽寡养单胞菌接种于胰酶大豆肉汤, 28℃恒温振荡培养 24h, 4000 r/min 离心收集菌体,用 0.65%无菌生理盐水稀释细菌至 10⁸ CFU/mL,并按菌液容积的 0.6%加入甲醛, 28℃恒温振荡灭活 48h, 4℃保存备用。取适量嗜麦芽寡养单胞菌脂多糖粉末溶于蒸馏水中,使其终浓度为 1 mg/mL, 4℃保存备用。再取适量嗜麦芽寡养单胞菌脂多糖粉末和无花果多糖提取物一起溶于蒸馏水中,使脂多糖和无花果多糖在溶液中的终浓度分别达到 1 mg/mL 和 5 mg/mL, 4℃保存备用。

选择 400 尾健康斑点叉尾鲷,随机分成 I、II、III和IV组,每组设置 2 个的重复处理,每个处理用鱼 50 尾。I 组为脂多糖溶液注射组,II 组为脂多糖和无花果多糖溶液注射组,III组为嗜麦芽寡养单胞菌全菌灭活苗注射组,IV组则为生理盐水注射组(空白对照组),注射方式为腹腔注射。I、II、III组的首免剂量均为 0.2 mL/尾,试验第 28 天时相同剂量加强免疫,IV组则两次均注射同容积生理盐水,具体免疫方案(表 1)。

1.5 白细胞的分离与血清制备

在免疫的第 0、第 7、第 21、第 35、第 49 天时,用无菌注射器采试验鱼尾静脉血,所采血液分为两份,一份为肝素钠抗凝血,用于白细胞杀菌活性的测定;另一份为非抗凝血,用于血清补体 C3、IgM

表 1 不同试验组免疫方案
Tab. 1 Immunizing dose of the fishes vaccinated with different immunizator

组别 Group	免疫剂 Immunizator	首免剂量(mL/尾) Initial immunization	加强免疫剂量(mL/尾) Booster immunization	浓度 Concentration (mg/mL)	有效含量 Effective content (mg)
I	LPS	0.2	0.2	1	0.2
II	LPS and FCPS	0.2	0.2	1 and 5	0.2 and 0.5
III	FKC	0.2	0.2	10 ⁸ CFU/mL	2×10 ⁷
IV	生理盐水	0.2	0.2	0.65%	—

含量和血清凝集效价测定。

1.6 白细胞杀菌活性的测定

取白细胞悬液 0.5 mL，加入 0.1 mL 的浓度为 1.0×10^8 cells/mL 的金黄色葡萄球菌液，混匀后置于 28℃ 水浴中孵育 1h，离心 10min 弃上清液，加入 0.5 mL Hank's 液重悬。在原温度下继续孵育 80min、100min、120min 和 150min，定时从中吸取 0.2 mL 细胞悬液于另一试管中，加入 1.0 mL 0.2% 的 Tween20 破碎白细胞，并加入 0.5 mL MEM 培养液培养 16h，再加入 0.06 mL 的 5.0 mg/mL 的 MTT，摇动 15min 后用分光光度计在 600 nm 处测定吸光度^[21]。按下列公式计算杀菌指数(BI)：

杀菌指数(BI) = $\frac{T_x \text{时间还原MTT的OD}}{T_0 \text{时间还原MTT的OD}}$

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。

1.7 血清补体 C3 含量的测定

血清补体 C3 含量采用伊利康生物技术有限公司生产的试剂盒测定。

1.8 血清抗体 IgM 的测定

血清抗体 IgM 采用北京莱博实验材料研究所生产的试剂盒测定。

1.9 血清凝集效价测定

参照相关方法^[22]测定血清凝集效价。

1.10 活菌攻毒试验

在试验的第 56 天时，随机从各组捞取试验鱼 60 尾，先用 1%(v/v) 的乙醚对斑点叉尾鲷进行轻度麻醉，再以 0.2 mL 每尾的剂量腹腔注射浓度为 1.0×10^8 cfu/mL 嗜麦芽寡养单胞菌活菌液，连续观察 14d，记录各组试验鱼的死亡率，按以下公式计算相对免疫保护率。

相对免疫保护率 =

$\frac{\text{对照组死亡率} - \text{实验组死亡率}}{\text{对照组死亡率}} \times 100\%$

1.11 数据分析

实验数据采用 SPSS 15.0 软件的 LSD 和 Duncans 两种方法进行分析，实验结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示。

2 结果

2.1 白细胞杀菌活性测定

首免后，I、II 组斑点叉尾鲷白细胞杀菌活性均在试验第 7 天时首次达峰，而III组斑点叉尾鲷白细胞杀菌活性保持平缓升高趋势；加强免疫后，I、II 组斑点叉尾鲷白细胞杀菌活性均在试验第 35 天时再次达峰，而III组斑点叉尾鲷的白细胞杀菌活性则持续升高，在试验第 35 天时达最高峰；I、II 和III组斑点叉尾鲷白细胞杀菌活性则在试验第 35 天后均表现下降趋势(图 1)。由表 2 可知，试验第 7 天时，I、II 组斑点叉尾鲷白细胞杀菌活性均极显著高于IV组(对照组)的($P<0.01$)，且 II 组却显著高于 I 组的($P<0.05$)，同时也与III组的无显著性差异($P>0.05$)。

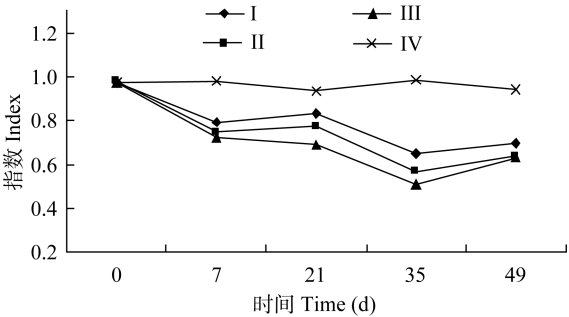


图 1 不同组斑点叉尾鲷白细胞杀菌活性变化趋势
Fig. 1 The tendency of the activity of leucocytes of channel catfish in different groups

表 2 不同组斑点叉尾鲷白细胞杀菌活性
Tab. 2 The bactericidal activity of leucocytes of channel catfish in different groups

组别 Group	时间 Time (d)				
	0	7	21	35	49
I	0.970±0.004	0.792±0.009 ^{Bb}	0.829±0.018 ^{ABb}	0.648±0.006 ^B	0.694±0.003 ^{Bb}
II	0.981±0.008	0.744±0.016 ^{BCc}	0.775±0.0218 ^{BCb}	0.565±0.003 ^C	0.640±0.003 ^{Bb}
III	0.974±0.006	0.721±0.014 ^{Cc}	0.692±0.006 ^{Cc}	0.511±0.016 ^D	0.632±0.013 ^{Bb}
IV Control	0.971±0.003	0.978±0.013 ^{Aa}	0.932±0.039 ^{Aa}	0.988±0.012 ^A	0.937±0.047 ^{Aa}

注：同列标注不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$)，不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。表 3、4、6 同此表
Note: In the same column, values with different capital letter superscripts mean significant difference($P<0.01$), values with different small letter superscripts mean difference($P<0.05$). The notes of Tab. 3, Tab. 4 and Tab. 6 are the same as Tab. 2

试验第 21 天时, II 组斑点叉尾鲷白细胞杀菌活性极显著的高于 IV 组的 ($P<0.01$), 却显著低于 III 组的 ($P<0.05$); I 组斑点叉尾鲷白细胞杀菌活性显著高于 IV 组的 ($P<0.05$), 而与 II 组的无显著性差异 ($P>0.05$)。试验第 35 天时, I、II 组斑点叉尾鲷白细胞杀菌活性极显著高于 IV 组的, 却极显著低于 III 组的 ($P<0.01$)。试验第 49 天时, I、II 组斑点叉尾鲷白细胞杀菌活性显著高于 IV 组的 ($P<0.05$), 而与 III 组的无显著性差异 ($P>0.05$)。结果表明, 嗜麦芽寡养单胞菌全菌灭活苗能显著的增强受免斑点叉尾鲷白细胞的杀菌活性, 而其脂多糖对斑点叉尾鲷白细胞杀菌活性也有显著的增强作用, 以无花果多糖加脂多糖免疫源对白细胞杀菌活性的增强效果更明显。

2.2 血清补体 C3 含量测定

首免后, I、II、III 组斑点叉尾鲷血清补体 C3 含量保持平缓上升趋势, 在试验的第 35 天时(即加强免疫后 1 周时), I、II、III 组的血清补体 C3 含量达到峰值, 之后虽表现下降趋势, 然而在试验第 49 天时, I、II、III 组斑点叉尾鲷血清补体 C3 含量水平仍明显高于试验第 0 天时的(图 2)。由表 3 可知, 试验第 35 天时, I、II 组的血清补体 C3 的含量依次显著 ($P<0.05$) 和极显著 ($P<0.01$) 的高于 IV 组的; 而试验第 7、第 21、第 49 天时, I、II 组斑点叉尾鲷血清补体 C3 含量虽明显高于 IV 组的, 然而 I、II 组与

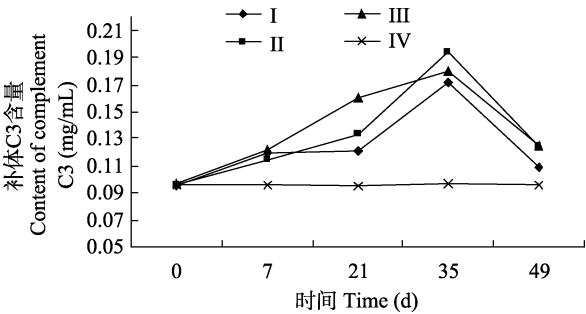


图 2 不同组斑点叉尾鲷血清补体 C3 含量变化趋势

Fig. 2 The tendency of the content of complement C3 of channel catfish in different groups

IV 组间的差异不显著 ($P>0.05$)。结果表明, 与以生理盐水为免疫源组相比, 嗜麦芽寡养单胞菌脂多糖对斑点叉尾鲷血清补体 C3 含量升高促进作用更明显, 以添加了无花果多糖的脂多糖加强免疫后对血清补体 C3 含量升高促进作用优于灭活苗组。

2.3 IgM 含量测定

首免后, I、II、III 组斑点叉尾鲷血清 IgM 含量均表现出相似的平缓上升趋势, 在加强免疫后 1 周时(即试验第 35 天时)均达到各组内峰值, 之后血清 IgM 含量虽表现下降趋势, 然而在试验第 49 天时的 IgM 含量仍明显高于试验第 0 天时的水平(图 3)。由表 4 可知, 试验第 7 天时, II 组斑点叉尾鲷 IgM 的含量显著高于 I 组的 ($P<0.05$), 而 I、II 组斑点叉尾鲷 IgM 的含量极显著高于 IV 组的, 同时也极显著低于 III 组的 ($P<0.01$); 试验第 21、第 35、第 49 天时, I、II 组斑点叉尾鲷 IgM 的含量均极显著 ($P<0.01$) 或显著高于 IV 组的 ($P<0.05$), 这期间 II 与 III 组间的 IgM 的含量无显著性差异 ($P>0.05$)。结果表明, 与对照组相比, 脂多糖和添加了无花果多糖的脂多糖均能极显著的提高斑点叉尾鲷血清 IgM 的水平, 虽然这两组的试验鱼在首免时血清 IgM 含量水平显著低于全细胞灭活苗注射组的 ($P<0.05$), 但是在加强免疫后的第 35 天和第 49 天时, I、II 组、III 组试验鱼血清 IgM 含量水平之间不存在显著性差异 ($P>0.05$)。

2.4 血清凝集效价测定

首免后, I、II、III 组受免鱼血清凝集效价明显升高。加强免疫后, 以上三组的血清凝集效价快速升高, 在试验的第 49 天时仍保持着较高的凝集效价水平(表 5)。对照组试验鱼的血清凝集抗体效价几乎检测不到。

2.5 相对免疫保护率

试验第 49 天人工攻毒试验后的 14d 内, I、II、III 组的免疫保护率均极显著的高于对照组的 ($P<0.01$) 其中以 II 组受免鱼的免疫保护率最高, 分别显

表 3 不同组斑点叉尾鲷血清补体 C3 含量

Tab. 3 The content of complement C3 of channel catfish in different groups (mg/mL)

组别 Group	时间 Time (d)				
	0	7	21	35	49
I	0.095±0.004	0.119±0.014	0.121±0.019 ^{ab}	0.171±0.025 ^{ABa}	0.109±0.022
II	0.096±0.003	0.114±0.008	0.133±0.016 ^{ab}	0.194±0.015 ^{Aa}	0.124±0.016
III	0.097±0.006	0.122±0.010	0.160±0.023 ^a	0.180±0.014 ^{Aa}	0.125±0.008
IV Control	0.096±0.001	0.096±0.003	0.095±0.007 ^b	0.097±0.005 ^{Bb}	0.096±0.002

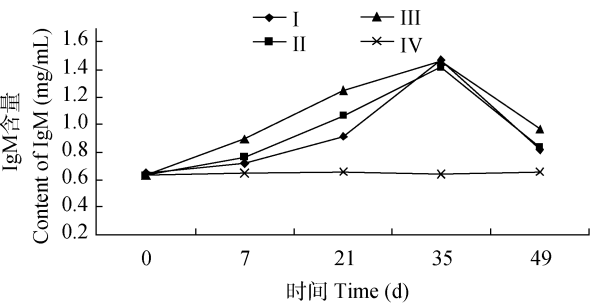


图 3 不同组斑点叉尾鲷血清 IgM 含量变化趋势

Fig. 3 The tendency of the content of IgM of channel catfish in different groups

著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)的高于 I、III 组,而生理盐水注射组的斑点叉尾鲷则全部死亡(表 6)。

3 讨论

脂多糖是一种 T-非依赖性抗原,在没有激活 T 细胞或是免疫记忆形成的条件下,能直接刺激 B 细胞诱导抗体介导的免疫反应^[15, 23]。脂多糖的部分保守结构对动物机体的免疫系统具有较大的影响,它

通过影响 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞和其他免疫组分从而调节机体的免疫力^[24, 25]。在水环境中,细菌对鱼类的致病力与脂多糖密切相关,特别以革兰氏阴性菌更是如此^[26]。然而,脂多糖对多种鱼类也具有良好免疫原性,既能促进鱼类多种免疫成分的表达,也可引起受免鱼的免疫耐受^[27, 28]。由于不同细菌的脂多糖-蛋白复合物表面抗原存在差异,因此菌源不同的脂多糖对鱼的免疫保护效果也是存在差异的,如接种杀鲑气单胞菌和血清 I 型鳗弧菌脂多糖粉末并不能保护大西洋鲑鱼,而接种鳗弧菌血清 II 型脂多糖却能产生较高的保护力^[29]。当脂多糖与某些化合物(如牛犊血清或油酸)联用后,也可以促进免疫系统产生持续性的免疫应答,其免疫效果比单一接种脂多糖的效果好^[30]。本实验在对嗜麦芽寡养单胞菌脂多糖半数致死量和安全性试验前期研究的基础上,确定的脂多糖接种剂量对斑点叉尾鲷具有良好安全性和免疫作用,而在脂多糖中添加无花果多糖免疫剂对斑点叉尾鲷的免疫作用则更为显著。

表 4 不同组斑点叉尾鲷 IgM 的含量

Tab. 4 The content of IgM of channel catfish in different groups (mg/mL)

组别 Group	时间 Time (d)				
	0	7	21	35	49
I	0.647±0.008	0.722±0.016 ^{Bc}	0.913±0.035 ^{ABb}	1.471±0.148 ^{Aa}	0.820±0.026 ^{ABa}
II	0.636±0.010	0.767±0.012 ^{Bb}	1.062±0.115 ^{ABab}	1.415±0.040 ^{Aa}	0.834±0.017 ^{ABa}
III	0.628±0.015	0.894±0.157 ^{Aa}	1.254±0.200 ^{Aa}	1.464±0.128 ^{Aa}	0.969±0.121 ^{Aa}
IV Control	0.635±0.018	0.646±0.019 ^{Cd}	0.655±0.012 ^{Bc}	0.641±0.0247 ^{Bb}	0.657±0.020 ^{Bb}

表 5 不同组斑点叉尾鲷血清凝集效价

Tab. 5 The agglutinating antibody titers in the sera of channel catfish in different groups

组别 Group	时间 Time (d)				
	0	7	21	35	49
I	—	1 64	1 64	1 256	1 128
II	—	1 64	1 64	1 256	1 128
III	—	1 256	1 128	1 512	1 256
IV Control	—	—	—	—	—

表 6 不同组试验鱼相对免疫保护率

Tab. 6 The relative percentage survival of channel catfish in different groups

组别 Groups	存活数/总数 Survival No./Total No.	相对免疫保护率 RPS (%)
I	40/60	66.7 ^{ABb}
II	42/60	70.0 ^{Aa}
III	39/60	65.0 ^{Bc}
IV Control	0/60	0 ^{Cd}

由表 4 可知, 接种脂多糖和脂多糖加无花果多糖对斑点叉尾鲷血清补体 C3 具有良好的激活作用, 使血清补体 C3 含量得到显著或极显著的提高, 这有利于受免鱼对入侵微生物的主动清除能力。然而脂多糖对受免鱼的激活途径是依赖于经典途径或旁路途径, 还是两个途径都同时参与, 这还有待进一步的研究。脂多糖是一种强力免疫源, 通过 O-多糖链和分子核心区域等抗原表位发挥重要的生物学作用^[36]。在鱼类中, 脂多糖也可直接激活非旁路途径依赖性抗体^[37]。接种脂多糖可激活鱼类产生抗 O-侧链抗体, 也可产生抗核心区域抗体, 或两种抗体皆有之^[36, 38]。幼鱼经脂多糖免疫后其血清球蛋白水平也显著性增加^[39]。在本实验中, 接种脂多糖、脂多糖加无花果多糖和全菌灭活苗的受免斑点叉尾鲷的抗体比对照组显著提高, 而加强免疫后, 受免鱼的抗体水平也分别达各组峰值, 这说明加强免疫能更好的激活受免鱼抗体的产生, 对受免鱼的免疫防御能力的提高具有良好的促进作用。受免鱼的血清凝集效价滴度水平也表现出与血清 IgM 含量相似的变化。而从人工攻毒试验分析, 接种嗜麦芽寡养单胞菌脂多糖、脂多糖加无花果多糖和全菌灭活苗的斑点叉尾鲷对活菌攻击都具有良好的防御能力, 脂多糖和脂多糖加无花果多糖免疫保护效果更加显著, 而注射生理盐水的试验鱼则全部死亡。嗜麦芽寡养单胞菌是一种条件性致病菌, 由该菌感染斑点叉尾鲷引起的传染性“肠套叠”症已经造成严重的经济损失^[40]。在生产上, 使用抗生素类药物防治该菌的弊端也日益显现, 如病原耐药谱增加或多重耐药趋势加快、药物残留污染环境等问题极为普遍^[41]。采取免疫接种途径有望使这些严峻的问题得到缓解。本实验结果表明, 注射免疫嗜麦芽寡养单胞菌脂多糖和脂多糖加无花果多糖能有效的提高受免斑点叉尾鲷的免疫防御能力和免疫保护率。虽然本实验尚属实验室试验阶段, 但对开展田间防控嗜麦芽寡养单胞菌感染试验提供了科学的数据支撑。

参考文献:

- [1] Geng Y, Wang K Y, Chen D F, *et al.* Progress on research of *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2006, 27(5): 28—31 [耿毅, 汪开毓, 陈德芳, 等. 嗜麦芽寡养单胞菌研究进展. 动物医学进展, 2006, 27(5): 28—31]
- [2] Laing F P, Ramotar K, Read R R, *et al.* Molecular epidemiology of *Xanthomonas maltophilia* colonization and infection in the hospital environment [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, 33(3): 513—518
- [3] Vartivarian S E, Papadakis K A, Palacios J A, *et al.* Muco-cutaneous and soft tissue infections caused by *Xanthomonas maltophilia*: a new spectrum [J]. *Annals of Internal Medicine*, 1994, 121(12): 969—973
- [4] Muder R R, Harris A P, Muller S, *et al.* Bacteremia due to *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia*: a prospective multicenter study of 91 episodes [J]. *Clinical Infectious Diseases*, 1996, 22(3): 508—512
- [5] Morrison A J, Hoffman K K, Wenzel R P. Associated mortality and clinical characteristics of nosocomial *Pseudomonas maltophilia* in a university hospital [J]. *Journal Clinical Microbiology*, 1986, 24(1): 52—55
- [6] MacDiarmid J A, Burrell D H. Characterization of *Pseudomonas maltophilia* isolates from fleece rot [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 51(2): 346—348
- [7] Draper C S, Walker R D, Lawler H E. Patterns of oral bacterial infection in captive snakes [J]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1981, 179(11): 1223—1226
- [8] Harris N B, Rogers D G. Septicemia associated with *Stenotrophomonas maltophilia* in a West African dwarf crocodile (*Osteolaemus tetraspis* subsp. *tetraspis*) [J]. *Journal of veterinary diagnostic investigation*, 2001, 13(3): 255—258
- [9] Zhou Y C, Zhu C H, Zhang B, *et al.* Isolation and prevention of the pathogen causing large scale death on *Trachinotus ovatus* [J]. *Marine Sciences*, 2001, 25(4): 40—44 [周永灿, 朱传华, 张本, 等. 卵形鲳鲹大规模死亡的病原及其防治. 海洋科学, 2001, 25(4): 40—44]
- [10] Wang K Y, Geng Y, Huang X L, *et al.* Infectious intussusception of channel catfish and its control [J]. *Freshwater Fisheries*, 2006, 36(6): 61—64 [汪开毓, 耿毅, 黄小丽, 等. 斑点叉尾鲷传染性套肠症及其防治. 淡水渔业, 2006, 36(6): 61—64]
- [11] Wang K Y, Geng Y, Huang X L, *et al.* Infectious intussusception of channel catfish (II CC) [J]. *Modern Fisheries Information*, 2006, 21(9): 3—8 [汪开毓, 耿毅, 黄小丽, 等. 斑点叉尾鲷 *Ictalurus punctatus* (Rafinesque) 传染生套肠叠症 (Infectious intussusception). 现代渔业信息, 2006, 21(9): 3—8]
- [12] Geng Y, Wang K Y, Chen D F, *et al.* Isolation, identification and phylogenetic analysis of a pathogenic bacterium in channel catfish [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(4): 649—652 [耿毅, 汪开毓, 陈德芳, 等. 斑点叉尾鲷一株致病菌的分离鉴定及系统发育分析. 微生物学报, 2006, 46(4): 649—652]
- [13] Nayak S K, Swain P, Nanda P K, *et al.* Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 24(4): 394—399
- [14] Swain P, Nayak S K, Nanda P K, *et al.* Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review [J].

- Fish & Shellfish Immunology*, 2008, **25**(3): 191—201
- [15] Hastings T S, Ellis A E. Detection of antibodies induced in rainbow trout by different *Aeromonas salmonicida* vaccine preparations [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1990, **2**(2): 135—140
- [16] Neumann N F, Fagan D, Belosevic M. Macrophage activating factor(s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 1995, **19**(6): 473—478
- [17] Yan Q P, Su Y Q, Wang J, *et al.* Impacts of *Vibrio alginolyticus* lipopolysaccharide (LPS) on toxicity and immune protection of *Pseudosciaena crocea* [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2003, **22**(2): 163—167 [鄢庆彬, 苏永全, 王军, 等. 溶藻弧菌脂多糖对大黄鱼的毒性与免疫保护性试验. 台湾海峡, 2003, **22**(2): 163—167]
- [18] Sritunyalucksana K, Sithisarnb P, Withayachumnarnku B, *et al.* Activation of prophenoloxidase, agglutinin and antibacterial activity in haemolymph of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, by immunostimulants [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, **9**(1): 21—30
- [19] Westphal O, Jann K. Bacterial lipopolysaccharides. extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In: Whistler R L, BeMiller J N, Wolf from M L (Eds.), *Methods in Carbohydrate Chemistry* [M]. New York: Academic Press. 1965, 83—91
- [20] Wu Y L, Huang J, Pan Y J. Isolation, purification and identification of polysaccharide of *Ficus carica* [J]. *Journal of Zhejiang University* (Science edition), 2004, **31**(2): 177—179 [吴亚林, 黄静, 潘远江. 无花果多糖的分离、纯化和鉴定. 浙江大学学报(理学版), 2004, **31**(2): 177—179]
- [21] Li J, Chen C F. The intracellular bactericidal activity of peripheral blood phagocytes of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. ETV. against *Edwardsiella fujianensis* [J]. *Journal of Sichuan University* (Natural Science Edition), 1998, **35**(4): 619—623 [李静, 陈昌福. 草鱼白细胞对福建爱德华氏菌 (*Edwardsiella fujianensis*) 杀菌活性的研究. 四川大学学报(自然科学版), 1998, **35**(4): 619—623]
- [22] Shen P, Fan X R, Li G W. Experiment of Microbiology [M]. Beijing: Higher Education Publishing Company. 1999, 165—168 [沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社. 1999, 165—168]
- [23] Elkins K L, Stashak P W, Baker P J. Specific immunological unresponsiveness to bacterial lipopolysaccharides develops in a cyclic manner [J]. *Infection and Immunity*, 1989, **57**(7): 2253—2255
- [24] Uchiyama T, Kamagata Y, Yoshioka M. Mechanism of lipopolysaccharide induced immunosuppression, immunological activity of B cells subset responding to T dependent and T independent antigens in lipopolysaccharide preinjected mice [J]. *Infection and Immunity*, 1984, **45**(2): 367—371
- [25] Uchiyama T. Modulation of immune response by bacterial lipopolysaccharide (LPS): roles of macrophages and T cells in vitro adjuvant effects of LPS on antibody response to T cell dependent and T cell independent antigens [J]. *Microbiological Immunology*, 1982, **26**(3): 213—225
- [26] Rodkhun C, Hirono I, Stork M, *et al.* Putative virulence-related genes in *Vibrio anguillarum* identified by random genome sequencing [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2006, **29**(3): 157—166
- [27] Ackerman P A, Iwama G K, Thornton J C. Physiological and immunological effects of adjuvanted *Aeromonas salmonicida* vaccines on juvenile rainbow trout [J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 2000, **12**(2): 157—164
- [28] Selvaraj V, Samapath K, Sekar V. Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila* [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006, **114**(1—2): 15—24
- [29] Bogwald J, Stensvag K, Hoffman J, *et al.* Vaccination of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., with particulate lipopolysaccharide antigens from *Vibrio salmonicida* and *Vibrio anguillarum* [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 1992, **5**(2): 251—261
- [30] Nakhla A N, Szalai A J, Banoub J H, *et al.* Serum anti LPS antibody production by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to the administration of free and liposomally incorporated LPS from *Aeromonas salmonicida* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1997, **7**(6): 387—401
- [31] Zhou Y C, Xing Y N, Feng Q Y. Research advance in the haemocytes of fishes [J]. *Natural Science Journal of Hainan University*, 2003, **21**(2): 171—176 [周永灿, 邢玉娜, 冯全英. 鱼类血细胞研究进展. 海南大学学报(自然科学版), 2003, **21**(2): 171—176]
- [32] Avtalion R R, Weiss E, Moalem T, *et al.* Evidence for cooperation of T and B cells in fish [J]. *Israel Journal of Medical Sciences*, 1975, **11**(12): 1385
- [33] Selvaraj V, Sampath K, Sekar V. Extraction and characterization of lipopolysaccharide from *Aeromonas hydrophila* and its effects on survival and hematology of the carp, *Cyprinus carpio* [J]. *Asian Fisheries Science*, 2004, **17**(2): 163—173
- [34] Ellis A E. Immunity to bacteria in fish [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, **9**(4): 291—308
- [35] Boshra H, Li J, Sunyer J O. Recent advances on the complement system of teleost fish [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, **20**(2): 239—262
- [36] Jakobsen R A, Gutierrez M A, Wergeland H I. Antibodies to *Aeromonas salmonicida* Lipopolysaccharide and cell wall antigens in rabbit and salmon immune sera [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1999, **9**(8): 609—620
- [37] Sunyer J O, Tort L. Natural hemolytic and bactericidal ac-

- tivities of sea bream *Sparus aurata* serum are effected by the alternative complement pathway [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1995, **45**(3—4): 333—345
- [38] Lund V, Jorgensen T, Holm K O, *et al.* Humoral immune response in Atlantic salmon, *Salmo salar* L, to cellular and extracellular antigens of *Aeromonas salmonicida* [J]. *Journal of Fish Diseases*, 1991, **14**(4): 443—452
- [39] Hanif A, Bakopoulos V, Leonardos I, *et al.* The effect of sea bream (*Sparus aurata*) brood stock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and on the humoral immune parameters [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, **19**(4): 345—361
- [40] Geng Y, Wang K Y, Xiao D, *et al.* Pathological studies on channel catfish induced by extracellular products of *Stenotrophomonas maltophilia* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, **34**(2): 345-352 [耿毅, 汪开毓, 肖丹, 等. 嗜麦芽寡养单胞菌胞外产物对斑点叉尾鲷损伤的病理学研究. 水生生物学报, 2010, **34**(2): 345—352]
- [41] Geng Y, Wang K Y. Side effects and the countermeasures from the use of antibiotics in aquaculture [J]. *Hebei Fisher*, 2004, **2**: 4—7 [耿毅, 汪开毓. 抗生素在水产养殖中应用的负面效应及对策. 河北渔业, 2004, **2**: 4—7]

THE IMMUNOPROTECTION OF *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA* LIPOPOLYSACCHARIDE IN CHANNEL CATFISH

WANG Kai-Yu^{1,2}, HUANG Jin-Lu¹, XIAO Dan³, PENG Lang^{1,2} and HUANG Yi-Dan^{1,2}

(1. Fisheries Department of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 3. Tongwei Co. Ltd., Chengdu 610041, China)

Abstract: *Stenotrophomonas maltophilia* is a vital pathogenic bacteria of a high-lethal infectious diseases affecting channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in recent years. In order to evaluate the immune protective effect of *Stenotrophomonas maltophilia* lipopolysaccharide (LPS) on channel catfish, four hundred healthy channel catfish were chosen and divided into I, II, III and IV groups randomly. Each group included two horizontal treatments which were treated with LPS, LPS plus polysaccharide of *Ficus carica*, whole cell inactivated vaccine and the saline source respectively by intraperitoneal injection. The initial immunization was carried out at the beginning and so was the booster immunization at the 28th day. During the trial period, the blood leukocyte bactericidal activity, complement C3 levels, IgM levels and agglutinating antibody titers were determined at intervals of 7 days. The challenge with live *Stenotrophomonas maltophilia* was carried out at the 49th day. The results showed that the agglutinating antibody titers in the sera of channel catfish treated with LPS and LPS plus adjuvant of polysaccharide of *Ficus carica*. And the leukocyte bactericidal activity, complement C3 levels, IgM levels and the relative percentage survival of the fish treated with LPS, LPS plus polysaccharide of *Ficus carica* were both significant after the initial immunization. After the booster immunization, to the channel catfish treated with LPS and LPS plus adjuvant of polysaccharide of *Ficus carica*, the agglutinating antibody titers in the sera of those were 1 256 and 1 512, the leukocyte bactericidal activity of those were 0.565 and 0.511, the complement C3 levels of those were 0.194 and 0.180mg/mL, the IgM levels of those were 1.415 and 1.464mg/mL respectively, and the relative percentage survival of those were 70.0% and 65%, respectively. Conclusion: the above index of the fish treated with LPS and LPS plus polysaccharide of *Ficus carica* were significant ($P < 0.05$) or most significant ($P < 0.01$) than those treated with the whole cell inactivated vaccine and saline. The protective effect of LPS and LPS plus polysaccharide of *Ficus carica* on the channel catfish was better than the whole cell inactivated vaccine.

Key words: *Stenotrophomonas maltophilia*; Channel catfish; LPS; Polysaccharide of *Ficus carica*; Immunization