



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101738467 A

(43) 申请公布日 2010.06.16

(21) 申请号 200810202810.X

(22) 申请日 2008.11.17

(71) 申请人 上海海洋大学

地址 201300 上海市南汇区临港新城沪城环路 999 号

(72) 发明人 杨先乐 邱军强 李圆圆 姜有声
曹海鹏

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗免疫效果的评价方法

(57) 摘要

本发明涉及疫苗技术领域,具体涉及鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗免疫效果的评价方法。本发明公开了一种鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗免疫效果的评价方法,包括下列步骤:待免鲟鱼健康检查;免疫接种;免疫后养殖管理工作;免疫效果评价。本发明首次公开了鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗的评价方法,该方法步骤少,能对鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗进行科学地的量化评价,可为鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗的研发和生成提供了可靠的评价基础。

1. 一种鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗免疫效果的评价方法,包括下列步骤:
 - a) 待免鲟鱼健康检查:免疫接种的鲟鱼需摄食活动正常、体质健康;
 - b) 免疫接种:采用注射方式进行鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗免疫接种,注射部位可为胸鳍基部、背鳍基部或腹鳍基部,其中以背鳍基部为佳;
 - c) 免疫后养殖管理工作:监测水温、水质的理化因子溶解氧、pH、氨氮、亚硝酸盐,确保水质良好;
 - d) 免疫效果评价:从鲟鱼特异性免疫和非特异性免疫两方面评价全菌灭活疫苗的免疫效果,测定五个指标:溶菌酶含量,总蛋白含量,抗体效价, γ -免疫球蛋白含量。
2. 如权利要求1所述的评价方法,其特征在于步骤b中所述鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗为嗜水气单胞菌 X1 全菌灭活疫苗或嗜水气单胞菌 ATCC35654 全菌灭活疫苗。
3. 如权利要求2所述的评价方法,其特征在于步骤b中所述鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗每尾接种量为 5.0×10^8 CFU。
4. 如权利要求1所述的评价方法,其特征在于步骤b中免疫接种注射部位为背鳍基部。
5. 如权利要求1所述的评价方法,其特征在于步骤c中水温为 20-25℃。
6. 如权利要求1所述的评价方法,其特征在于步骤d中所述溶菌酶含量,总蛋白含量,抗体效价, γ -免疫球蛋白含量分别采用血清学方法及相关 ELISA 试剂盒检测。

鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗免疫效果的评价方法

技术领域

[0001] 本发明涉及疫苗技术领域,具体涉及鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗免疫效果的评价方法。

背景技术

[0002] 鲟鱼为软骨硬鳞鱼,具有很高的经济价值,有“黑色黄金”之称。随着其野生资源的减少,人工增养殖相继出现,与之相关的商品规模化养殖相继开展。由于鲟鱼骨板坚硬,鳃部分裸露,在人工环境下进行高密度养殖,相互磨伤而容易受到感染,病害也逐渐增加,但有关其病害病原的分离、鉴定以及防治的研究资料极少。因此,疾病防治的研究是当务之急,这是保证鲟鱼养殖持续、稳定发展的关键之一。

[0003] 鲟鱼细菌性疾病的发生目前已成为鲟鱼养殖业的瓶颈,鲟鱼的细菌性疾病主要有细菌性肠炎、细菌性败血症和细菌性出血病(肿嘴病),病原主要是气单胞菌,具有极强的传染性,患病鲟鱼死亡率高,给生产造成了很大的损失。在鲟鱼疾病防治时多采用药物防治,但药物防治容易污染水质,造成药物残留现象,药量过大还会对鲟鱼的生长产生负面影响。此外,大多数药物的长期使用还造成了病原性细菌耐药性的产生,最终给疾病的防治造成了困难。近年来,免疫防治在水产病害防治中的应用已日益广泛。利用疫苗等,活化或加强动物自身的特异性免疫和非特异性免疫功能,提高抗病能力,被公认为是目前防治病害最为有效的方法之一。国内外已应用的渔用疫苗有 20 余种。水产病害的疫苗防治是今后的发展方向,疫苗防治既可克服治疗困难影响疗效的弊病,又可避免药物残留现象。目前关于鲟鱼细菌病的疫苗防治尚未见报道,我国对鲟鱼病的预防治疗主要还是依靠药物手段,因此开发病原菌疫苗将是鲟鱼细菌病有效的防治方法之一。

[0004] 疫苗是将病原体或其代谢产物,经过人工灭活、减毒或利用基因工程等方法制成的用于预防传染病的生物制剂。疫苗保留了病原体刺激鱼类免疫系统的特性,当鱼体接种疫苗后,免疫系统便会产生一定的保护物质,并形成免疫记忆;当鱼体再次接触到与所接种疫苗原性一致的病原体时,免疫系统就会迅速产生更多的保护物质来阻止病原体对鱼体的伤害。全菌灭活疫苗具有操作简便、安全等优点,因此适合于目前阶段推广防治鲟鱼细菌病。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题提供了一种鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗免疫效果的评价方法。

[0006] 为此,本发明公开了一种鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗免疫效果的评价方法,包括下列步骤:

[0007] a) 待免鲟鱼健康检查:免疫接种的鲟鱼需摄食活动正常、体质健康;

[0008] b) 免疫接种:采用注射方式进行鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗免疫接种,注射部位可为胸鳍基部、背鳍基部或腹鳍基部,其中以背鳍基部为佳;

[0009] c) 免疫后养殖管理工作:监测水温、水质的理化因子溶解氧、pH、氨氮、亚硝酸盐,确保水质良好;

[0010] d) 免疫效果评价:从鲟鱼特异性免疫和非特异性免疫两方面评价全菌灭活疫苗的免疫效果,测定五个指标:溶菌酶含量,总蛋白含量,抗体效价, γ -免疫球蛋白含量。

[0011] 在一些实施方式里,所述鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗为嗜水气单胞菌菌株可为 X1(登录号:EU669667)全菌灭活疫苗或嗜水气单胞菌 ATCC35654(登录号:X74676.1)全菌灭活疫苗,灭活疫苗每尾接种量为 5.0×10^8 CFU。

[0012] 在一些实施方式里,温度是鲟鱼免疫应答的重要影响因子,一般免疫时水温以 20-25℃ 为宜。水温过低,鲟鱼难以产生有效的免疫反应;水温过高,免疫时鲟鱼易产生强烈的应激反应。

[0013] 在一些实施方式里,所述溶菌酶含量,总蛋白含量,抗体效价, γ -免疫球蛋白含量分别采用血清学方法及相关 ELISA 试剂盒检测;

[0014] 在一些实施方式里,本发明所述鲟鱼细菌性疾病可为鲟鱼细菌性肠炎、鲟鱼细菌性败血症或鲟鱼细菌性出血病,最优为鲟鱼细菌性败血症。

[0015] 本发明首次公开了鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗的评价方法,该方法步骤少,能对鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗进行科学地的量化评价,可为鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗的研发和生成提供了可靠的评价基础。

附图说明

[0016] 图 1 各实验组西伯利亚鲟的血清抗体效价随时间的变化曲线。

[0017] 图 2 各实验组西伯利亚鲟的血清总蛋白含量随时间的变化曲线。

[0018] 图 3 各实验组西伯利亚鲟的血清免疫球蛋白含量随时间的变化曲线。

[0019] 图 4 各实验组西伯利亚鲟的血清溶菌酶含量随时间的变化曲线。

具体实施方式

[0020] 以下结合具体实施例,进一步阐明本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。比例和百分比基于重量,除非特别说明。

[0021] 1 待免鲟鱼健康检查

[0022] 免疫前,需确认待免疫鲟鱼处于健康状态,环境条件适宜,并进行鱼体接种疫苗的安全性预试验。

[0023] 1.1、待免鲟鱼健康检查:免疫接种的鲟鱼需摄食活动正常、体质健康。先观察全池或整个网箱鲟鱼的摄食及活动情况,再抽样检测待免鲟鱼 3-5 尾,肉眼观察体表及鳃等处是否正常,按常规方法镜检寄生虫、必要时开展细菌性病原检测。凡鱼体瘦弱、鱼池发病出现死鱼或有较多寄生虫寄生的鲟鱼,不能接种疫苗。

[0024] 1.2、考察免疫的外界条件:温度是鲟鱼免疫应答的重要影响因子,一般免疫时水温以 20-25℃ 为宜。水温过低,鲟鱼难以产生有效的免疫反应;水温过高,免疫时鲟鱼易产生强烈的应激反应。此外,溶解氧、pH、氨氮、亚硝酸盐等水质理化因子,与鱼体健康、免疫效果关系密切,在免疫前需按常规方法进行水质理化因子检查,并结合经验性水色观察,判断

水体质量,确认水质在正常范围之内。通常选择在天气晴朗的早晨进行免疫,尽量减少鲟鱼损伤。

[0025] 1.3、鱼体安全免疫测定:为确保安全,在进行批量免疫处理前,有必要对待免鲟鱼进行安全性预测试。

[0026] 适当加大疫苗注射剂量考察鱼体的注射安全性,一般采取疫苗使用剂量 1.5-2 倍,并在规定的条件下进行试验,观察 1-2 天内免疫鲟鱼有无异常。

[0027] 2 免疫接种

[0028] 通常选择在天气晴朗、水温适宜的早晨进行鱼体免疫,整个操作过程要轻、快、稳、尽量减少鱼体的损伤。合理控制饵料鱼的投放量,避免养殖密度过大而对鲟鱼产生不利刺激。

[0029] 在鱼体免疫测定确认安全的前提下,才能进行批量免疫鱼处理。批量免疫操作具体方法:

[0030] 2.1 工具选择。接种器、针头以及稀释器皿须用 75% 的酒精消毒或用开水煮沸消毒。规格在 10 厘米以下的鱼一般选用 4.5 号或 5 号接种针头,规格在 11.7 厘米以上的鱼一般选用 5.5 号或 6 号接种针头,规格在 16.7 厘米以上的鱼一般选用 7 号接种针头。为了防止接种时入针太深伤及鱼体内脏,可在接种针头上套一小截塑料管,使暴露出的针尖长度略长于鱼体腹肌厚度。

[0031] 2.2 注射剂量,体重在 1 ~ 1.5 千克的鲟鱼每尾注射 0.5ml。体重在 2 千克以上的鲟鱼每尾注射 1ml。

[0032] 2.3 注射部位与注射深度:胸鳍基部、背鳍基部、腹鳍基部均可,其中以背鳍基部为宜。在腹鳍基部接种,针头与鱼体成 45 度刺入鱼体。皮下注射的注射部位是背鳍前方厚的背脊上层结缔组织及其下较柔软的肌肉组织层的间隙,注射时拨针头要轻,防止药液渗出,此方法优点一是快速,二是操作容易,三是安全,皮下接种部位不会伤害鱼的脏器和重要组织。腹腔注射的注射部位是腹鳍前沿,进针时与体表呈 25 度角,要防止伤及鱼的脏器。此方法优点是抗原吸收最快。肌肉注射同皮下注射部位一样,优点是抗原可以缓慢而稳定地吸收。采用注射方法,要求针头锋利,注射剂量根据鱼体大小而定,一般为 0.5 毫升,实际操作一般采用腹腔注射法。

[0033] 注射深度:0.2-0.5cm 为宜,原则上以疫苗注射入身体内而不伤及内脏为准。在注射前要视鱼的规格大小,确定注射深度,以免刺伤鱼的内脏。注射时,针头、针管严格消毒;同时,要做到稳、准、快,避免弄伤鱼体。

[0034] 2.4 降低活动:为了便于注射操作方便,应将鱼种活动量降低疫苗注射一定要找熟练的人员操作。

[0035] 3 免疫后的管理

[0036] 3.1、缓解受免鱼的环境胁迫后效应:施行免疫时鲟鱼因在环境胁迫(拥挤胁迫、捕捉胁迫、体表损伤、疫苗的使用等)的作用下,鱼体抗病、抗逆能力受到一定影响,须加强日常养殖管理工作,监测水质的理化因子(溶解氧、pH、氨氮、亚硝酸盐),确保水质良好;仔细观察受免鱼的报信情况,适时适量投放饵料鱼。

[0037] 3.2、加强综合防治:目前研制的鲟鱼疫苗针对的是特异的细菌病(嗜水气单胞菌病),而养殖过程中可能会遇到寄生虫和其它病原菌等病原性疾病及一些非病原性疾病,因

此必须增强综合防治管理意识,通过病原早期监控和水质、饵料鱼的精心管理(为防止病原从饵料鱼环节带入,饵料鱼投放前应做消毒处理),以保障养殖全过程的安全。

[0038] 3.3 做好免疫效果检查

[0039] 如果是池塘养殖鲟鱼,注射后要适当加注新水增加鱼的活动量,做好详细记录,如时间、水温、剂量等,并注意观察注射后鱼有无异常情况发生。随着气温、水温升高,鱼发病率也越来越高,这时候巡塘特别重要,要观察鱼的吃食情况、生长速度、发病情况,并且一一记录,以便验证疫苗质量好坏,从中找出成功或失败的原因,给今后养鱼提供参考依据。

[0040] 4 全菌灭活疫苗免疫效果评价

[0041] 从鲟鱼特异性免疫和非特异性免疫两方面评价全菌灭活疫苗的免疫效果,测定五个指标:溶菌酶含量,总蛋白含量,抗体效价, γ -免疫球蛋白含量。同时,检测了佐剂对疫苗免疫效果的影响。各指标测定分别采用血清学方法及相关试剂盒

[0042] 每个实验分为3组分别为对照组——注射生理盐水,实验组1——注射全菌苗+氟氏不完全佐剂,实验组2——只注射全菌苗,每周抽血一次。共10周。

[0043] 相关实验结果:

[0044] 4.1 血清中抗体效价变化

[0045] 实验结果(图1)表明,嗜水气单胞菌X1全菌苗能够明显提高西伯利亚鲟的血清抗体水平。具体表现在:在加强免疫后28天,全菌苗组西伯利亚鲟血清抗体凝集效价达到最大值,为 4.77 ± 0.70 ,较对照组西伯利亚鲟血清抗体凝集效价高42.5% ($P < 0.05$)。此外,在嗜水气单胞菌X1全菌苗中加入弗氏不完全佐剂,有利于进一步提高增强西伯利亚鲟血清抗体水平。具体表现在:在加强免疫后35天,全菌苗+FIA组西伯利亚鲟血清抗体凝集效价达到最大值,为 5.71 ± 0.50 ,较全菌苗组西伯利亚鲟血清抗体凝集效价最大值高19.71% ($P > 0.05$)。

[0046] 4.2 血清总蛋白含量变化

[0047] 实验结果(图2)表明,嗜水气单胞菌X1全菌苗能够明显提高西伯利亚鲟的血清总蛋白含量。具体表现在:在加强免疫后35天,全菌苗组西伯利亚鲟血清总蛋白含量达到最大值,为 $25.0 \pm 0.7\text{g/L}$,较对照组西伯利亚鲟血清总蛋白含量高20% ($P < 0.05$)。此外,在嗜水气单胞菌X1全菌苗中加入弗氏不完全佐剂,有利于进一步提高增强西伯利亚鲟血清总蛋白含量。具体表现在:在加强免疫后35天,全菌苗+FIA组西伯利亚鲟血清总蛋白含量达到最大值,为 $31.3 \pm 0.9\text{g/L}$,较全菌苗组西伯利亚鲟血清总蛋白含量最大值高25.2% ($P < 0.05$)。

[0048] 4.3 血清免疫球蛋白含量变化

[0049] 实验结果(图2)表明,嗜水气单胞菌X1全菌苗能够明显提高西伯利亚鲟的血清免疫球蛋白含量。具体表现在:在加强免疫后28天,全菌苗组西伯利亚鲟血清免疫球蛋白含量达到最大值,为 $5.48 \pm 0.50\text{g/L}$,较对照组西伯利亚鲟血清免疫球蛋白含量高36% ($P < 0.05$)。此外,在嗜水气单胞菌X1全菌苗中加入弗氏不完全佐剂,有利于进一步提高增强西伯利亚鲟血清免疫球蛋白含量。具体表现在:在加强免疫后28天,全菌苗+FIA组西伯利亚鲟血清免疫球蛋白含量达到最大值,为 $6.42 \pm 0.30\text{g/L}$,较全菌苗组西伯利亚鲟血清免疫球蛋白含量最大值高17.15% ($P < 0.05$)。

[0050] 4.4 血清溶菌酶含量变化

[0051] 实验结果(图4)表明,嗜水气单胞菌 X1 全菌苗能够明显提高西伯利亚鲟的血清溶菌酶含量。具体表现在:在加强免疫后7天,全菌苗组西伯利亚鲟血清溶菌酶含量达到最大值,为 $171.1 \pm 5.9 \text{U/mL}$,较对照组西伯利亚鲟血清溶菌酶含量高 44.4% ($P < 0.05$)。此外,在嗜水气单胞菌 X1 全菌苗中加入弗氏不完全佐剂,有利于进一步提高增强西伯利亚鲟血清溶菌酶含量。具体表现在:在加强免疫后7天,全菌苗 +FIA 组西伯利亚鲟血清溶菌酶含量达到最大值,为 $192.0 \pm 3.2 \text{U/mL}$,较全菌苗组西伯利亚鲟血清溶菌酶含量最大值高 12.22% ($P < 0.05$)。

[0052] 4.5 免疫保护率测定结果

[0053] 实验结果(表1)表明,嗜水气单胞菌 X1 全菌苗对西伯利亚鲟抗嗜水气单胞菌 X1 人工感染具有较好的免疫保护作用,其对西伯利亚鲟的免疫保护率为 50%,而且在嗜水气单胞菌 X1 全菌苗中加入弗氏不完全佐剂,嗜水气单胞菌 X1 全菌苗对西伯利亚鲟抗嗜水气单胞菌 X1 人工感染的免疫保护作用更好,其对西伯利亚鲟的免疫保护率为 70%。

[0054] 表1 全菌苗对西伯利亚鲟的免疫保护率

[0055]

组别 Group	浓度 Concentration (cfu/mL)	死亡数目 Death number							死亡率 (%)	相对免疫 保护率 (%)
		1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d		
对照	1.0×10^6	2	5	7	8	10	10	10	100%	0
全菌苗	1.0×10^6	0	0	0	1	1	2	3	30%	70%
全菌苗	1.0×10^6	0	0	1	2	4	4	5	50%	50%

[0056] 本发明的范围不受所述具体实施方案的限制,所述实施方案只欲作为阐明本发明各个方面的单个例子,本发明范围内还包括功能等同的方法和组分。实际上,除了本文所述的内容外,本领域技术人员参照上文的描述和附图可以容易地掌握对本发明的多种改进。所述改进也落入所附权利要求书的范围之内。

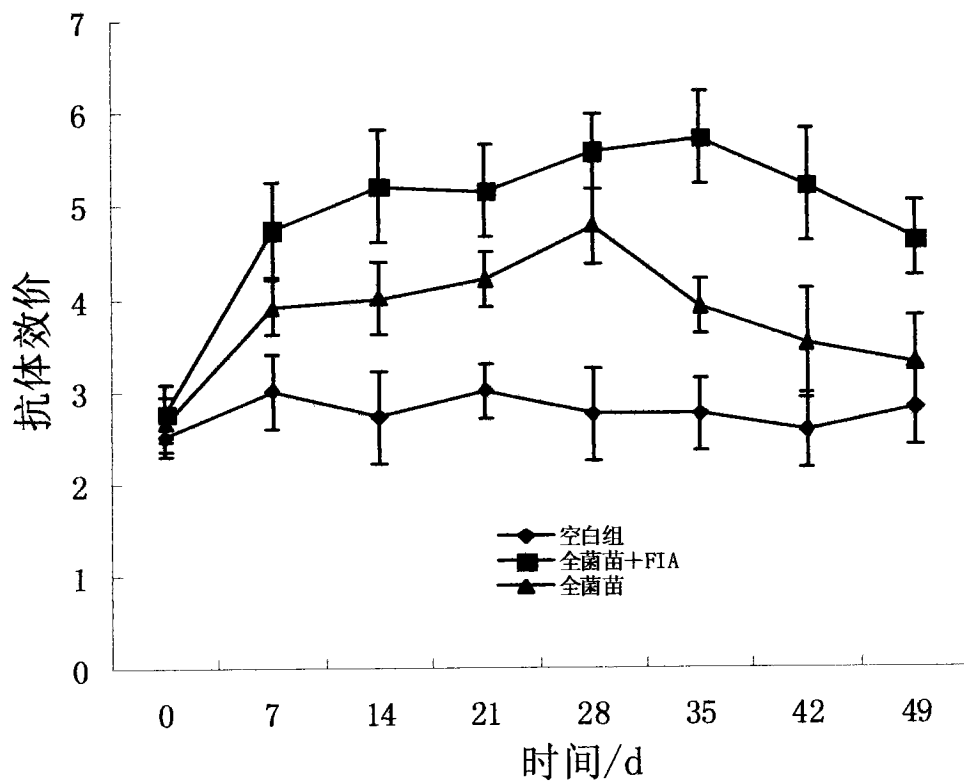


图 1

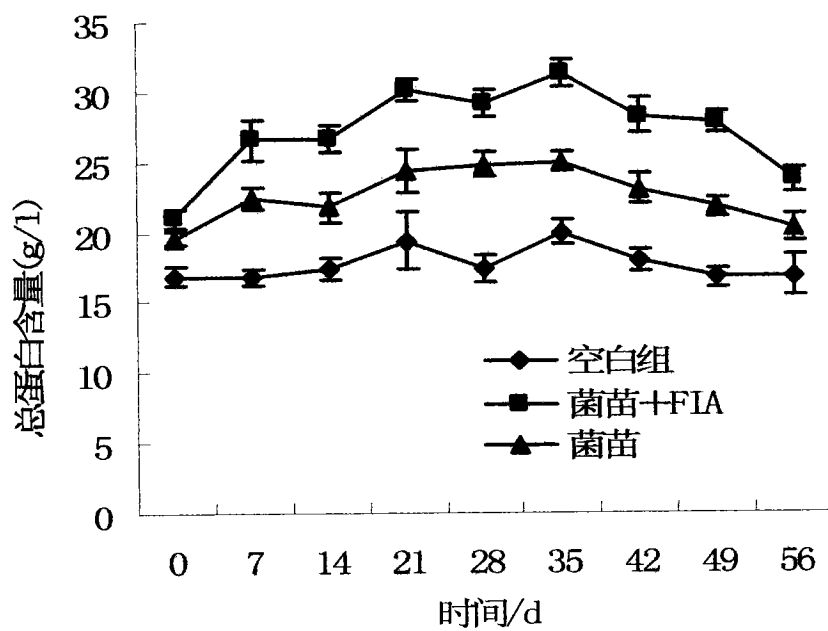


图 2

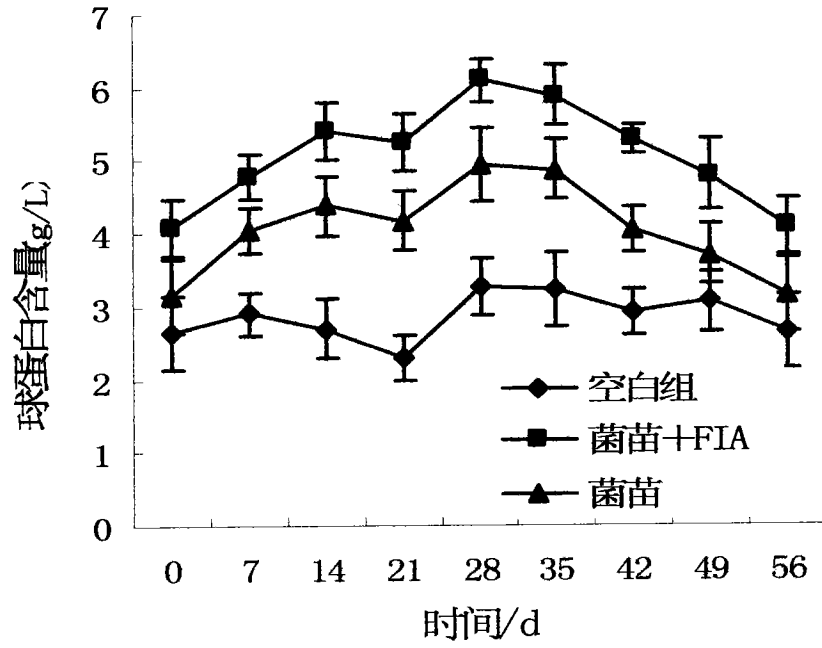


图 3

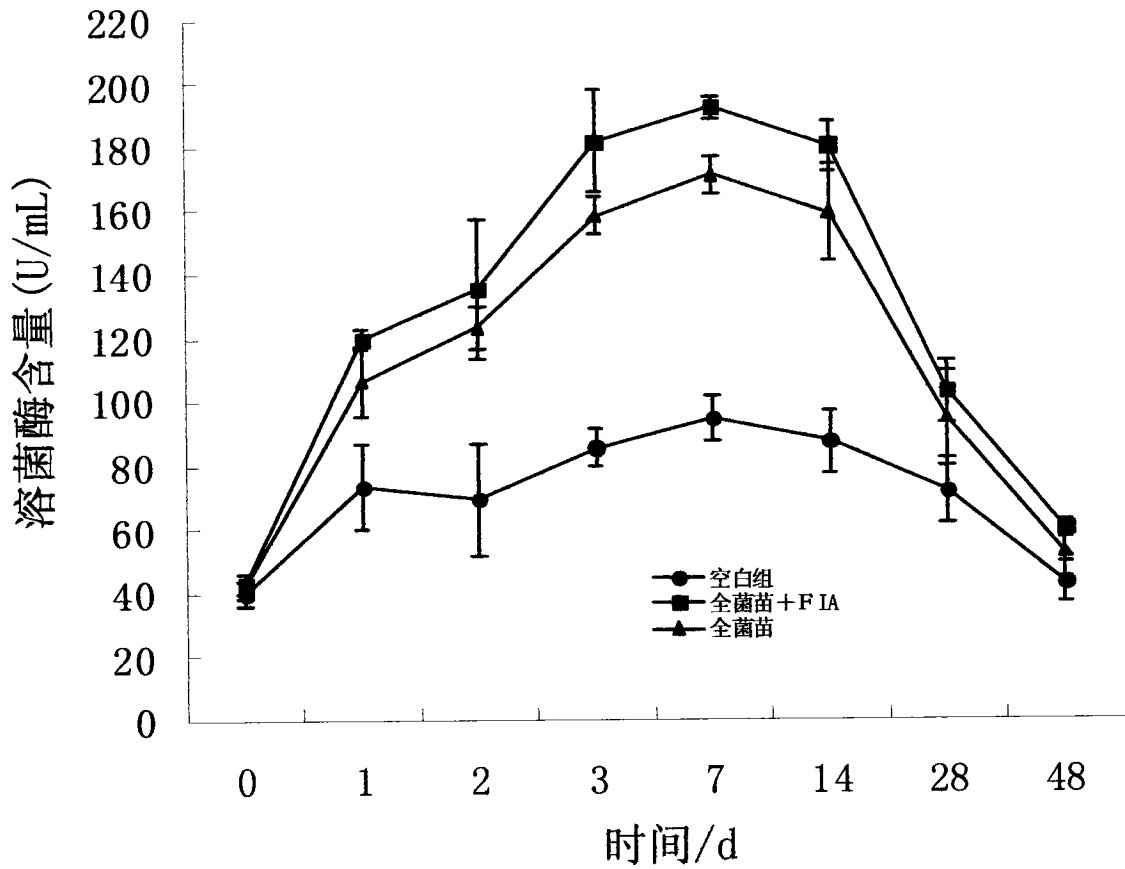


图 4

专利名称(译)	鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗免疫效果的评价方法		
公开(公告)号	CN101738467A	公开(公告)日	2010-06-16
申请号	CN200810202810.X	申请日	2008-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海海洋大学		
[标]发明人	杨先乐 邱军强 李圆圆 姜有声 曹海鹏		
发明人	杨先乐 邱军强 李圆圆 姜有声 曹海鹏		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/02		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及疫苗技术领域，具体涉及鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗免疫效果的评价方法。本发明公开了一种鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗免疫效果的评价方法，包括下列步骤：待免鲟鱼健康检查；免疫接种；免疫后养殖管理工作；免疫效果评价。本发明首次公开了鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗的评价方法，该方法步骤少，能对鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗进行科学地的量化评价，可为鲟鱼细菌性疾病全菌灭活疫苗的研发和生成提供了可靠的评价基础。