



一株松鼠葡萄球菌 JS-1 对鲫的致病性及其灭活疫苗保护作用

马爽, 蒋弥, 李艳红, 刘炆, 孙瑜, 唐晓琪, 吴正理*

(西南大学水产学院, 西南大学渔业资源环境研究中心, 重庆 400715)

摘要: 为探究松鼠葡萄球菌 JS-1 对鲫的致病性及其灭活疫苗保护作用, 本实验设计了注射感染实验、投喂感染实验和灭活疫苗保护实验, 通过组织病理学观察、实时荧光定量 PCR (qPCR) 和酶活性检测等方法进行分析。结果显示, 注射实验中鲫全身性出血、肝脏充血肿大, 96 h LD₅₀ 为 5×10^6 CFU/mL。投喂含不同浓度 JS-1 的饲料后, 鲫肝脏、脾脏、肾脏出现病变, 细胞坏死; 血清中转氨酶呈先增加后减少的趋势, 高浓度 (HG) 组降低趋势最明显, 溶菌酶活性显著升高; 鲫肝脏和脾脏中 *TNF- α* 和 *IFN- γ* 表达量均先增加后减少, 且显著高于对照组。注射灭活疫苗后, 血清中溶菌酶活性显著高于对照组, 而碱性磷酸酶、转氨酶、超氧化物歧化酶活性显著低于对照组, 过氧化氢酶活性显著升高; 经灭活疫苗免疫后的血清中, 特异性 IgM 和总 IgM 与对照组相比都显著增加, 注射感染 JS-1 10 d 后鲫的存活率达 83.3%。研究表明, 松鼠葡萄球菌 JS-1 对鲫的致病性强, 其灭活疫苗可为鲫提供有效的保护, 为松鼠葡萄球菌疫苗的开发提供了理论基础。

关键词: 鲫; 松鼠葡萄球菌; 致病性; 免疫基因表达; 非特异性免疫; 灭活疫苗

中图分类号: S 941.42

文献标志码: A

鲫 (*Carassius auratus*) 是我国最常见的淡水养殖鱼类之一^[1], 2020 年中国渔业统计年鉴表明, 2019 年鲫养殖产量共 276 万 t, 位列淡水养殖品种第 5 位, 占淡水养殖总产量 10.8%^[2]。而且鲫是较好的水生动物模型, 与许多具有重要经济和生态意义的鱼类物种关系密切, 研究鲫对不同环境因素的行为反应, 有利于分析潜在的环境影响因子^[3]。

目前水产养殖业面临的重大问题之一, 是有效改善养殖环境、提高鱼类的生存率、预防疾病带来的生产损失。事实证明, 大量药物的使用会造成药物在鱼体内蓄积、耐药菌株出现、破坏生态环境。随着无抗时代的到来, 环境友好型疾病防治方案尤为重要。因此, 寻找一种安全环保的方法来防治水产动物疾病具有重要意义。近年来

松鼠葡萄球菌 (*Staphylococcus sciuri*) 已被证实为一种潜在的人类和动物病原体^[4], 也是水产养殖生产中较为常见的致病菌, 但其致病机理、疫苗保护等方面的研究还有待深入。

松鼠葡萄球菌可引起黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 肛门红肿, 尾鳍溃烂^[5]; 也可引起马面鲈 (*Thamnaconus modestus*) 背鳍溃烂、腹部产生腹水^[6]; 还能引起黄喉拟水龟 (*Mauremys mutica*) 伤口化脓、内脏出血等症状, 发病率高达 60%^[7]。尽管使用药物来控制疾病的做法行之有效, 但药物容易对养殖鱼类产生副作用, 且引起耐药菌株的出现, 破坏水体生态环境^[8]。在早期研究中发现, 硬骨鱼类有先天性和适应性的免疫应答^[9-10], 考虑经济、环境和伦理方面的问题, 接种疫苗是控制由细菌和病毒引起的鱼类疾病的最合适、最

收稿日期: 2021-07-23 修回日期: 2021-11-23

资助项目: 国家自然科学基金 (31770965); 财政部和农业农村部-国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-49)

第一作者: 马爽 (照片), 从事水产微生物与免疫研究, E-mail: 2356521731@qq.com

通信作者: 吴正理, 从事水产微生物与免疫研究, E-mail: zh20140202@swu.edu.cn



有效的方法。早在1938年, Snieszko 尝试使用灭活疫苗来防治鲤 (*Cyprinus carpio*) 的点状气单胞菌 (*Aeromonas punctata*) 感染^[8]。1970年代美国开发了第一种用于商品鱼的鳃弧菌 (*Vibrio anguillarum*) 疫苗, 随后在1980年代初引入商业水产养殖^[11]。自1990年以来, 疫苗使用已经常态化, 在一定情况下减少了水产养殖中抗生素的应用^[12], 国内外已有许多使用灭活疫苗免疫鱼类的研究^[13-15]。

本实验室从重庆任河患病多鳞白甲鱼 (*Onychostoma macrolepis*) 病灶组织中分离出一株优势病原菌, 经鉴定为松鼠葡萄球菌 JS-1。本研究通过注射感染实验、投喂感染实验和疫苗保护实验等来阐释 JS-1 菌株对鲫的致病机理及免疫保护作用, 以期对松鼠葡萄球菌的防治提供新思路, 为水产疫苗的开发提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

松鼠葡萄球菌 JS-1 分离自重庆任河患病多鳞白甲鱼。所用鱼种为当年生健康鲫, 体质量 (45.07±3.21) g, 购自重庆市北碚区歇马镇水产养殖场, 商业饲料购自重庆大发饲料公司。PCR 反应试剂 2×Taq PCR Master Mix 购自上海翌圣生物科技有限公司。IgG 抗体购自北京博雷德生物科技有限公司。

1.2 注射感染实验

配制 5 个浓度梯度的菌液 (10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 CFU/mL) 备用。将 110 尾健康鲫随机分配到 11 个 500 L 圆形养殖桶中, 设置 1 个对照组, 其余每 2 桶为 1 个实验组。养殖条件为水温 (28.0±1.3)°C, 充足溶解氧 (下同)。实验组每尾鱼腹腔注射 100 μL 菌液, 对照组每尾鱼注射 100 μL 生理盐水, 养殖用水为曝气自来水, 实验期内封闭不换水。实验开始后在 15、30、60 min 和 2、4、8、(14±2)、24、(33±3)、48 h 观察, 48 h 后每天观察记录 1 次, 连续观察 7 d, 记录死亡个体数并及时处理死鱼。

JS-1 的 LD₅₀ 按改进寇氏法^[16] 计算: $\lg LD_{50} = X_k - d (\sum P_i - 0.5)$ 。式中, X_k 为最大对数剂量, d 为相邻 2 组对数剂量之差, P_i 为死亡率, i 为组号。

1.3 投喂感染实验

设定对照组 (CG, 0 CFU/g 饲料)、低浓度组

(LG, 10^4 CFU/g 饲料)、中浓度组 (MG, 10^5 CFU/g 饲料) 和高浓度组 (HG, 10^6 CFU/g 饲料) 4 个实验组, 每组设 3 个平行。拌菌饲料每天现用现配, 以保证细菌活性。选取大小相近的健康鲫 240 尾, 随机分到 12 个养殖桶中, 每桶 20 尾。分别投喂不同浓度的拌菌饲料, 投喂量为鱼体质量的 2%, 每天 9:00 和 17:00 投喂, 保证鱼进食完全。实验进行 28 d, 每天换水量为 1/3。

1.4 灭活疫苗免疫实验

在培养好的 JS-1 菌液中加入甲醛水溶液, 使其终浓度为 0.02%^[17], 将灭活的细菌菌液配制成浓度为 10^7 CFU/mL, 加入等量的弗氏佐剂制成乳剂, 即为灭活疫苗。将 180 尾健康鲫随机放置在 6 个养殖桶中, 设置 1 个实验组, 1 个对照组, 每组 3 个平行, 每平行桶 30 尾鱼。实验组鲫从腹鳍基部注射配制好的 JS-1 灭活疫苗 100 μL, 对照组注射相同剂量的生理盐水。第 29 天时, 对实验鲫注射浓度为 1×10^8 CFU/mL 的活菌 100 μL, 测定免疫保护率。

1.5 组织样品的采集、解剖及处理

投喂感染实验第 1、7、14、21、28 天, 从每个养殖桶采集并解剖 3 尾鱼, 取血液、肝脏、脾脏和肾脏等组织样品。血液在无菌无酶离心管中常温放置 4 h 后, 4°C 条件下 4 000 r/min 离心 5 min, 分离上层血清后保存在 -80°C 冰箱用于后续测定; 部分肝脏、脾脏组织立即用液氮速冻, 用于实时荧光定量 PCR (qPCR) 检测; 部分组织用甲醛水溶液固定, 用于组织切片分析。

1.6 组织病理观察

新鲜组织用固定液固定 24 h 以上。将目的部位组织修平整, 放于脱水盒内, 依次用乙醇进行梯度脱水, 再用石蜡对组织进行包埋, 修整蜡块。将修整好的蜡块切片, 贴于载玻片上, 烘干、脱蜡、渗水后进行苏木精-伊红 (H.E) 染色, 用中性树胶封片。光学显微镜下观察主要病理变化并记录。

1.7 酶活性测定

南京建成生物工程研究所的试剂盒测定血清谷丙转氨酶 (GPT)、谷草转氨酶 (GOT)、碱性磷酸酶 (AKP)、过氧化物酶 (POD)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和溶菌酶 (LZM) 活性。

1.8 qPCR

取保存的组织 30~50 mg 置于无菌无酶的 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL RNA Plus 充分匀浆, 提取并检测总 RNA, 反转录成 cDNA, -20 °C 保存。引物信息见表 1, PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。qPCR 反应根据 Hieff qPCR SYBR Green Master Mix 说明进行。

表 1 实验所需引物

Tab. 1 Primers required for the experiment	
引物 primers	引物序列(5'-3') primer sequences
TNF- α F	ATGGCAGCTACAAGCCACTT
TNF- α R	AGGTCCTTCCGTTGTCGCTT
IFN- γ F	AGAATTGCACACGTTCAAGAGC
IFN- γ R	TTGGCTTGTGCTCTCCTGTC
β -action F	GCCTCCTCTCTCTCTGGA
β -action R	AATGCCAGGGTACATGGTGG

1.9 Elisa 法测定鲫血清 IgM

将 JS-1 活菌加至包被缓冲液中, 每孔加 100 μ L, 4 °C 过夜后洗涤。实验孔加入 100 μ L 20% 鲫血清, 对照孔加等量磷酸盐缓冲溶液 (PBS), 空白孔不加液, 37 °C 孵育 1 h 后洗涤。每孔加入抗 IgM 抗体 IgG 100 μ L, 封闭 2 h 后洗涤。每孔加 100 μ L 辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 抗体溶液, 孵育 30 min 后洗涤。加 100 μ L 显色液, 观察颜色变化, 加 50 μ L 2 mol/L 硫酸终止反应。用酶标仪读取 OD₄₅₀ 值。

1.10 数据分析

采用 Excel 2010 软件进行数据初步处理, 实

验数据用平均值 \pm 标准误 (mean \pm SE) 表示。采用 SPSS 23.0 软件对数据进行统计分析, 对数据进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 利用 Duncan 氏检验进行多重比较, $P < 0.05$ 即认为有显著差异。使用 GraphPad Prism 7 软件绘制图表。

2 结果

2.1 JS-1 致病率

注射感染实验中, HG 组 (10⁸ CFU/mL) 鲫均无存活, 解剖后见明显的肛门红肿、尾鳍基部充血, 内脏及肠道严重充血 (图 1)。实验鱼在 48 h 时开始出现死亡 (表 2)。根据实验结果计算, JS-1 的 96 h 半致死浓度 LD₅₀=5 \times 10⁶ CFU/mL。

2.2 JS-1 对鲫组织的病理影响

投喂感染实验中, 取第 28 天的组织进行组织病理学分析。对照组肝脏的间质组织少, 相邻的肝小叶常互相连接, 分界不明显, 只能根据中央静脉和小叶间胆管的部位来区分肝小叶。肝细胞呈圆形或椭圆形, 排列紧密, 细胞核大而圆 (图版-1)。MG 组鲫肝脏颜色变深, 充血肿大, 观察肝切片, 难以辨认肝脏的实质结构, 与正常鱼肝脏差异明显, 细胞核不规则, 可见细胞变质坏死 (图版-2)。对照组鲫的脾脏组织中细胞清晰, 细胞核无变化, 细胞形态正常 (图版-3)。MG 组脾脏颜色变深, 充血, 观察切片发现脾脏局部坏死严重 (图版-4)。对照组肾脏切片中, 能清晰地分辨出肾小球、肾小囊和肾小管, 细胞界限清晰、排列整齐 (图版-5)。MG 组鲫肾脏充血肿胀, 观察切片发现肾小管和肾小球周围间隙增大, 泡内的



图 1 注射感染实验鲫患病症状

(a) 肛门及尾鳍基部充血, (b) 内脏及肠道充血

Fig. 1 Symptoms of *C. auratus* in injected challenge studies

(a) anal and caudal fin base engorged with blood, (b) internal organs and intestinal congestion

表 2 JS-1 注射感染实验死亡记录

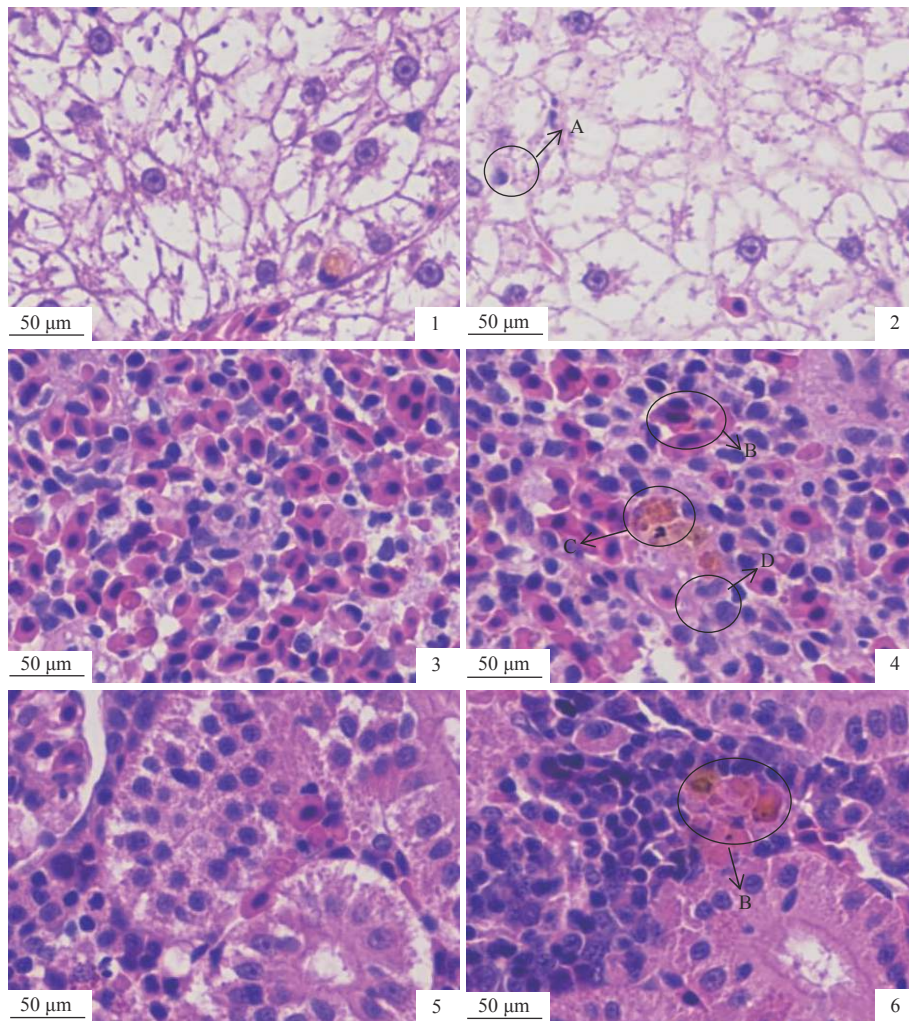
Tab. 2 JS-1 injected challenge studies death records

组别 groups	注射剂量/(CFU/mL) dosage	个体数/尾 no.	死亡数/尾 no. of death						
			1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
1	10^8	10	0	4	6	0	0	0	0
2	10^7	10	0	0	1	6	3	0	0
3	10^6	10	0	0	0	1	1	1	1
4	10^5	10	0	0	0	0	0	1	1
5	10^4	10	0	0	0	0	0	0	0

细胞之间界限不明且细胞核形状变化。肾间质比例增大，管腔界限不清。病鱼肾小体肿胀，肾小囊腔隙增大 (图版-6)。结果表明，JS-1 的致病能力强，可对鲫的组织器官和细胞造成损伤。

2.3 JS-1 对鲫血清中酶活性的影响

投喂含不同浓度梯度 JS-1 的饲料后，鲫血清转氨酶均呈先增加后减少的趋势。1~14 d 处理组酶活性高于对照组，21~28 d 处理组酶活性总体上



图版 投喂感染实验第 28 天鲫组织病理学

1、3、5. 对照组，2、4、6. MG 组；1、2. 肝脏，3、4. 脾脏，5、6. 肾脏；A. 细胞核溶解，B. 充血，C. 局灶性坏死，D. 细胞核变形

Plate Histopathology of *C. auratus* on day 28 of feeding infection test

1, 3, 5. control group, 2, 4, 6. medium concentration group; 1, 2. liver, 3, 4. spleen, 5, 6. kidney; A. nuclear lysis, B. blood congestion, C. focal necrosis, D. nuclear deformation

变化趋势不明显。第 1 天, 处理组和对照组相比, 血清 GOT (图 2-a) 和 GPT (图 2-b) 活性显著升高 ($P < 0.05$)。实验组鲫血清 LZM 活性与对照组相比均增加, 第 1 天 MG 组显著高于 CG 组 ($P < 0.05$); 第 7 天 LG 和 HG 组 LZM 活性显著高于 CG 组 ($P < 0.05$); 第 14 天 HG 组 LZM 活性显著高于 CG 组 ($P < 0.05$); 第 28 天 LG 组 LZM 活性显著高于 CG 组 ($P < 0.05$) (图 2-c)。结果表明, 鲫在持

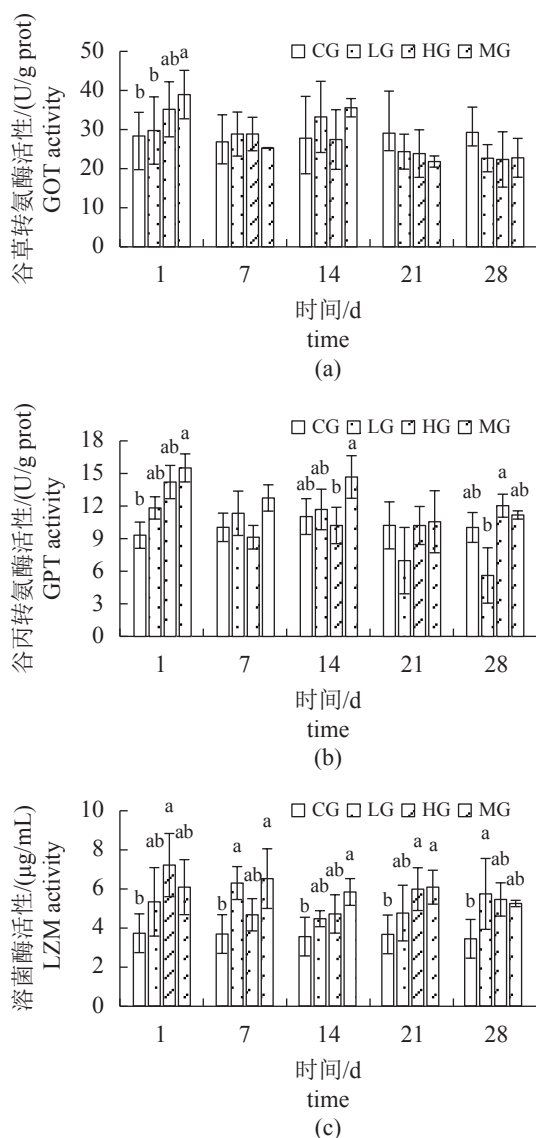


图 2 不同浓度 JS-1 对鲫血清酶活性的影响

(a) 谷草转氨酶活性, (b) 谷丙转氨酶活性, (c) 溶菌酶活性; 不同字母表示差异显著, 下同

Fig. 2 Effects of different concentrations of JS-1 on serum enzyme activities of *C. auratus*

(a) glutamic oxalacetic transaminase activity, (b) glutamic pyruvic transaminase activity, (c) lysozyme activity; different letters indicate significant differences, the same below

续摄食病原菌 14 d 后, 对病原菌逐渐形成了免疫耐受, 导致转氨酶活性先增加后降低, HG 组降低趋势最明显, 不同浓度的 JS-1 均会增加鲫血清中 LZM 活性, 可见 JS-1 对鲫的致病作用强。

2.4 肝脏和脾脏免疫基因表达量

投喂感染实验 MG 组中, 鲫肝脏和脾脏中细胞因子基因 $TNF-\alpha$ (图 3-a, c) 和 $IFN-\gamma$ (图 3-b, d) 表达量均呈先增加后减少的趋势。第 14 天, MG 组鲫肝脏和脾脏中 $TNF-\alpha$ 和 $IFN-\gamma$ 的表达量达到峰值, 均显著高于对照组基因表达量 ($P < 0.05$), 且脾脏 $TNF-\alpha$ (图 3-c) 和 $IFN-\gamma$ (图 3-d) 的表达量更加丰富。直到第 21 天, MG 组 $TNF-\alpha$ 和 $IFN-\gamma$ 的表达量与 CG 组仍存在显著差异 ($P < 0.05$)。说明 JS-1 菌株能刺激鲫免疫基因的表达, 且免疫刺激能维持较长的时间, 21 d 后鲫对 JS-1 菌株形成了免疫耐受。

2.5 注射灭活疫苗对鲫酶活性的影响

注射灭活疫苗后, 对鲫血清酶影响总体不大。其中溶菌酶、碱性磷酸酶、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶等非特异性免疫酶虽然部分取样时间点存在显著差异, 但差异量均较小。谷草转氨酶和谷丙转氨酶, 实验组与对照组相比有显著降低, 尤其是谷草转氨酶活性在实验第 7 天时显著降低 ($P < 0.05$), 且一直维持到实验结束 (图 4)。结果表明, 注射 JS-1 灭活疫苗对鲫非特异性免疫无影响, 且降低了血清中的转氨酶含量, 有利于对鲫肝脏的保护。

2.6 注射灭活疫苗后血清中 IgM 含量及保护率

注射 JS-1 灭活疫苗实验期间, 鲫血清中特异性 IgM 和总 IgM 与 CG 组相比都显著增加 ($P < 0.05$), 特异性 IgM 的含量占总 IgM 含量的 50%~60% (图 5-a, b)。表明注射灭活疫苗能有效刺激鲫的特异性免疫应答, 产生特异性的 IgM。且 JS-1 灭活疫苗免疫刺激能力强, 在免疫第 7 天已产生大量的特异性抗体。灭活疫苗免疫 28 d 后, 接种 JS-1 新鲜培养菌液, 计算 10 d 内鲫死亡数据。在第 4 天时, 对照组鲫全部死亡, 而接种疫苗组仍存活 83.3%, 且后期未发现鲫死亡, 表明灭活疫苗对鲫有很好地保护作用。根据计算, 注射 JS-1 新鲜培养菌液 10 d 后, 免疫保护率为 83.3% (图 5-c)。

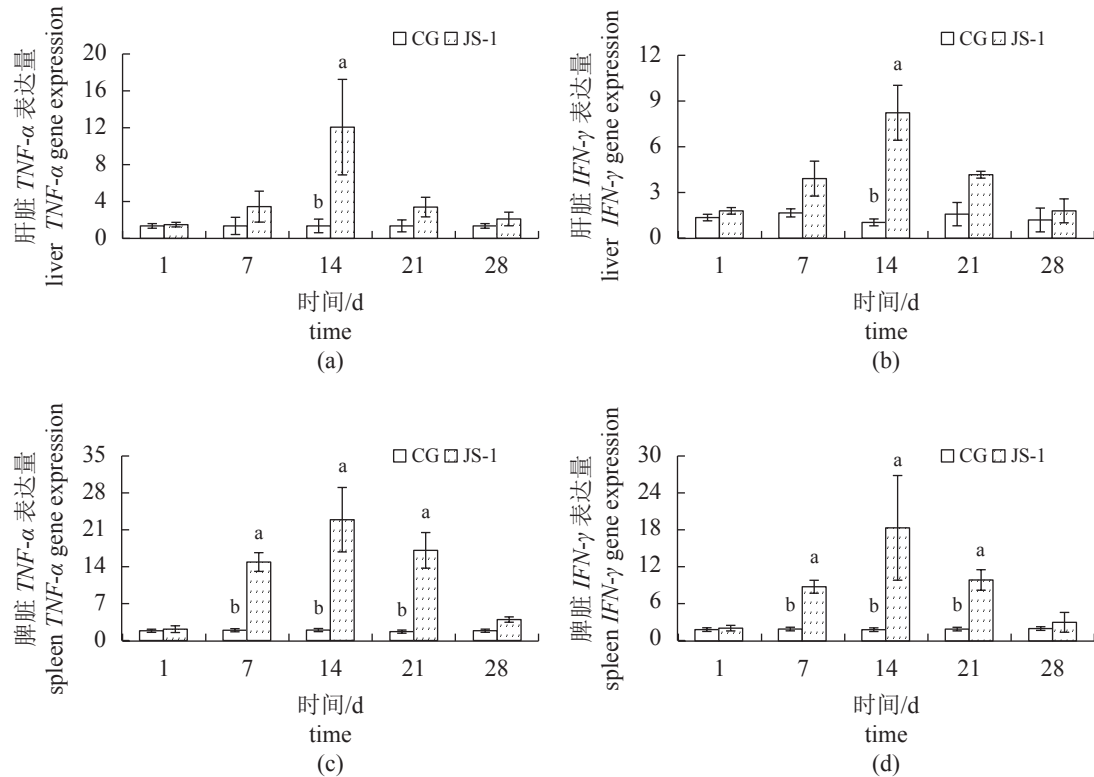


图3 JS-1处理后MG组鲫组织 *TNF-α* 和 *IFN-γ* 表达量

(a) 肝脏 *TNF-α* 表达量, (b) 肝脏 *IFN-γ* 表达量, (c) 脾脏 *TNF-α* 表达量, (d) 脾脏 *IFN-γ* 表达量

Fig. 3 Expression of *TNF-α* and *IFN-γ* genes in MG *C. auratus* tissues after JS-1 treatment

(a) liver *TNF-α* gene expression, (b) liver *IFN-γ* gene expression, (c) spleen *TNF-α* gene expression, (d) spleen *IFN-γ* gene expression

3 讨论

组织病理学方法是揭示鱼类中毒后内脏病理变化的有效方法^[18]。在毒理学研究中,经常对肝脏、肾脏和脾脏等器官进行组织病理学检查^[19]。本研究通过临床症状及组织切片结果观察,投喂JS-1后,鲫的肛门、尾鳍、肝脏、脾脏和肾脏均出现不同程度的病变,主要表现为肛门红肿、尾鳍充血、细胞核破裂、溶解,脏器充血以及局灶性坏死,与黄颡鱼^[5]、黄喉拟水龟^[20]、乌龟 (*Mauremys reevesii*)^[21] 等感染松鼠葡萄球菌后的症状相似。

肿瘤坏死因子- α (*TNF-α*) 首次发现于1975年^[22],其在机体的防御反应,代谢反应,促进细胞增殖分化以及杀伤或抑制肿瘤细胞等方面发挥重要作用^[23]。*IFN-γ* 是具有多效免疫和生物学效应的II类细胞因子,充当关键的免疫调节剂^[24],参与对病原体(如病毒、细菌和原生动物的免疫反应,并且还参与细胞生长、细胞死亡和抗肿瘤活性^[25]。本研究中,实验组肝脏、脾脏的 *TNF-α* 和 *IFN-γ* 表达量均呈先增加后减少的趋势。脾是免疫器官,

因此,2种非特异性免疫基因表达量比肝脏中多,约是肝脏中的2倍,14d后基因表达量减少,原因可能是病原菌的持续刺激,使鱼体形成了免疫耐受。

鱼类属于低等脊椎动物,对先天性免疫的依赖性较大^[26]。谷丙转氨酶和谷草转氨酶在血清水平取决于受损细胞的释放速率,并且可以反映肝脏受损的程度^[27]。*LZM* 是参与宿主防御细菌入侵的非特异性先天免疫分子,在鱼类的保护性免疫中起着重要的作用。本研究结果显示,实验组鲫血清的 *GOT* 和 *GPT* 活性均出现低于对照组的情况,血清中 *LZM* 含量与对照组相比增加。推测持续投喂拌有病原菌的饲料,使机体出现了非特异性免疫,致使肝细胞 *GOT* 和 *GPT* 持续释放到血清中,直到14d后,机体逐渐形成免疫耐受,导致血清中 *GOT* 和 *GPT* 活性出现降低趋势。

在本研究中,灭活疫苗处理组血清中 *AKP* 和 *GOT* 活性均有显著降低,因此判断,此灭活疫苗对降低转氨酶有较强的作用,有利于对机体肝脏的保护,这与潘吉脉^[28] 将嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) 灭活疫苗注射到鲟体内的结果

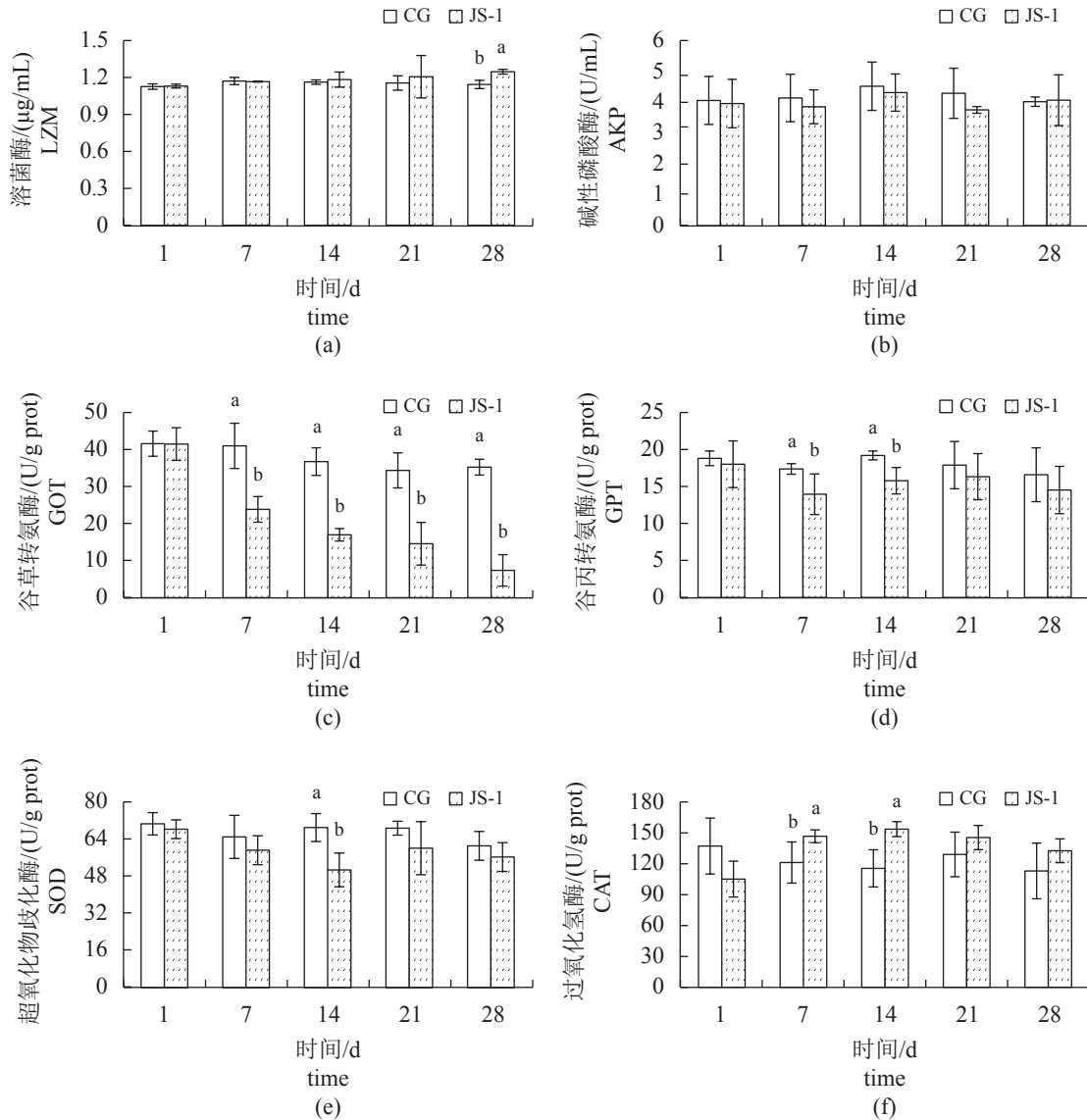


图4 注射 JS-1 灭活疫苗对鲫血清中酶活性的影响

(a) 溶菌酶, (b) 碱性磷酸酶, (c) 谷草转氨酶, (d) 谷丙转氨酶, (e) 超氧化物歧化酶, (f) 过氧化氢酶

Fig. 4 Effects of injection of JS-1 inactivated vaccine on enzyme activities in the serum of *C. auratus*

(a) lysozyme, (b) alkaline phosphatase, (c) glutamic oxaloacetic transaminase, (d) glutamic pyruvic transaminase, (e) superoxide dismutase, (f) catalase

相同。SOD 是保护酶系统的重要组成部分^[29-30], 其与 CAT 在减少活性氧自由基和维持生物体内的细胞稳态方面起着至关重要的作用^[31]。因此, 常将 2 种酶一起测定, 其含量及活性高低间接反映养殖对象的健康状态及生理状况。本研究中, 灭活疫苗实验组与对照组相比, SOD 活性先有所降低, 后升高至正常水平, 而 CAT 有所升高, 表明灭活疫苗对机体氧化还原系统没有产生负面影响, 维持正常代谢水平。

鱼的适应性免疫是由免疫球蛋白(Ig)介导的^[32], 有研究表明, 分泌型 IgM 存在于鱼类血清和黏液中, 作为抗体在全身免疫和黏膜免疫中发

挥重要作用^[33-35]。与 Park 等^[36]使用灭活巨轮状病毒疫苗接种条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)后, 血清中 7 d 内 s-IgM 上调的结果相似, 本研究使用 JS-1 灭活疫苗免疫鲫后, 各实验组的特异性 IgM 和总 IgM 均显著高于对照组($P < 0.05$), 说明浆细胞被刺激后分化记忆 B 细胞产生抗体, 在遇到相似病原菌入侵时机体能很快产生应答, 对鱼的免疫能力起到促进作用。

4 结论

实验结果表明, 松鼠葡萄球菌 JS-1 对鲫具有

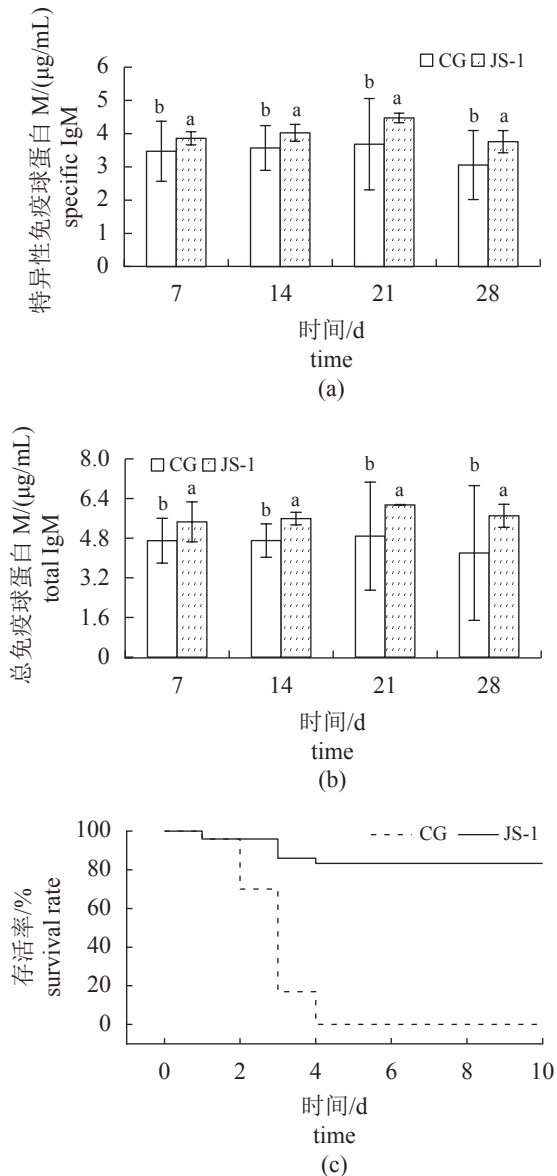


图5 灭活疫苗免疫保护效果

(a) 特异性 IgM, (b) 总 IgM, (c) 存活率

Fig. 5 Immune protective effect of inactivated vaccine

(a) specific immunoglobulin M, (b) total immunoglobulin M, (c) survival

强致病性, 可引起机体全身性出血, 内脏器官损伤; 其灭活疫苗能刺激机体产生较强的免疫应答, 7 d 内可产生特异性的抗体, 免疫保护率达 80% 以上。本研究为松鼠葡萄球菌的致病机理和免疫防治提供了理论基础。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] Wu S J, Xu B. Effect of dietary astaxanthin administration on the growth performance and innate immunity of

<https://www.china-fishery.cn>

juvenile crucian carp (*Carassius auratus*)[J]. *3 Biotech*, 2021, 11(3): 151.

[2] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国渔业统计年鉴 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.

Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, National Fisheries Technology Extension Center, the China Society of Fisheries. China fishery statistical yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021 (in Chinese).

[3] Maximino C, do Carmo Silva R X, de Nazaré Santos da Silva S, *et al.* Non-mammalian models in behavioral neuroscience: consequences for biological psychiatry[J]. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 2015, 9: 233.

[4] Nemeghaire S, Argudin M A, Feßler A T, *et al.* The ecological importance of the *Staphylococcus sciuri* species group as a reservoir for resistance and virulence genes[J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 171(3-4): 342-356.

[5] 王光锋, 李舫, 朱明恩, 等. 1株黄颡鱼源松鼠葡萄球菌的分离鉴定及其耐药性分析[J]. *畜牧与兽医*, 2017, 49(2): 73-78.

Wang G F, Li F, Zhu M E, *et al.* Isolation, identification and drug resistance of one strain *Staphylococcus sciuri* from yellow catfish[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2017, 49(2): 73-78 (in Chinese).

[6] 段荟芹, 王利. 耗儿鱼松鼠葡萄球菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 42(5): 1288-93.

Duan H Q, Wang L. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Staphylococcus sciuri* of *Corydoras*[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, 42(5): 1288-93 (in Chinese).

[7] 黄国秋, 童桂香, 黎小正, 等. 黄喉拟水龟松鼠葡萄球菌 16S *rDNA* 的序列测定和系统进化分析[J]. *广西农业科学*, 2009, 40(9): 1234-1238.

Huang G Q, Tong G X, Li X Z, *et al.* Sequencing and phylogenetic analysis of the 16S *rDNA* of *Staphylococcus sciuri* from *Mauremys mutica* Cantor[J]. *Guangxi Agricultural Sciences*, 2009, 40(9): 1234-1238 (in Chinese).

[8] Gudding R, Van Muiswinkel W B. A history of fish vaccination: science-based disease prevention in aquaculture[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(6): 1683-1688.

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- [9] Råberg L, Vestberg M, Hasselquist D, *et al.* Basal metabolic rate and the evolution of the adaptive immune system[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2002, 269(1493): 817-821.
- [10] Rombout J H W M, Yang G W, Kiron V. Adaptive immune responses at mucosal surfaces of teleost fish[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2014, 40(2): 634-643.
- [11] Shao Z J. Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: current perspectives and future possibilities[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, 50(3): 229-243.
- [12] Gudding R, Goodrich T. The history of fish vaccination[M]//Gudding R, Lillehaug A, Evensen Ø. *Fish vaccination*. Chichester: Wiley, 2014.
- [13] 李联泰, 卫明亮, 刘煜恒, 等. 杀鲑气单胞菌疫苗的研制[J]. *江苏海洋大学学报(自然科学版)*, 2020, 29(2): 1-5. Li L T, Wei M L, Liu Y H, *et al.* Development of *Aeromonas salmonicida* vaccine[J]. *Journal of Jiangsu Ocean University (Natural Science Edition)*, 2020, 29(2): 1-5 (in Chinese).
- [14] 任燕, 时云朵, 曾伟伟, 等. 维氏气单胞菌灭活疫苗对草鱼免疫相关基因表达的影响及其保护效果[J]. *中国生物制品学杂志*, 2019, 32(7): 726-731. Ren Y, Shi Y D, Zeng W W, *et al.* Expression of immunity-associated genes and protective effect in grass carps immunized by inactivated *Aeromonas veronii* vaccine[J]. *Chinese Journal of Biological*, 2019, 32(7): 726-731 (in Chinese).
- [15] Farias T H V, Arijo S, Medina A, *et al.* Immune responses induced by inactivated vaccine against *Aeromonas hydrophila* in pacu, *Piaractus mesopotamicus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 101: 186-191.
- [16] 谢庄, 贾青. 兽医统计学 (全国高等学校农林规划教材)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2005. Xie Z, Jia Q. *Statistics for veterinary science*[M]. Beijing: Higher Education Press, 2005 (in Chinese).
- [17] 李正伟. 维氏气单胞菌灭活疫苗的制备及其免疫保护效应研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2014. Li Z W. Preparation of *Aeromonas veronii* inactivated vaccine and test of its immunological efficacy in crucian carp and grass carp[D]. Chongqing: Southwest University, 2014 (in Chinese).
- [18] Altinok I, Capkin E. Histopathology of rainbow trout exposed to sublethal concentrations of methiocarb or endosulfan[J]. *Toxicologic Pathology*, 2007, 35(3): 405-410.
- [19] Öz M, Yavuz O, Bolukbas F. Histopathology changes in the rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) consuming boric acid supplemented fish fodder[J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2020, 62: 126581.
- [20] 黎小正, 韦信贤, 童桂香, 等. 黄喉拟水龟致病菌——松鼠葡萄球菌的分离鉴定及药敏实验[J]. *大连水产学院学报*, 2009, 24(4): 371-374. Li X Z, Wei X X, Tong G X, *et al.* Isolation, identification and medicine sensitivity test of *Staphylococcus sciuri*, the pathogen of in turtle *Mauremys mutica*[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2009, 24(4): 371-374 (in Chinese).
- [21] 方振华, 魏来, 丁利, 等. 龟源松鼠葡萄球菌的分离鉴定及药敏特性分析[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2019(7): 29-32. Fang Z H, Wei L, Ding L, *et al.* Isolation, identification and drug susceptibility analysis of *Staphylococcus sciuri* from *Mauremys reevesii*[J]. *Chinese Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2019(7): 29-32 (in Chinese).
- [22] Carswell E A, Old L J, Kassel R L, *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1975, 72(9): 3666-3670.
- [23] Bemelmans M H A, Van Tits L J H, Buurman W A. Tumor necrosis factor: function, release and clearance[J]. *Critical Reviews™ in Immunology*, 1996, 16(1): 1-11.
- [24] Li L, Chen S N, Laghari Z A, *et al.* Receptor complex and signalling pathway of the two type II IFNs, IFN- γ and IFN- γ rel in mandarin fish or the so-called Chinese perch *Siniperca chuatsi*[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2019, 97: 98-112.
- [25] Schröder K, Hertzog P J, Ravasi T, *et al.* Interferon - γ : an overview of signals, mechanisms and functions[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 2004, 75(2): 163-189.
- [26] Jiménez-Cantizano R M, Infante C, Martín-Antonio B, *et al.* Molecular characterization, phylogeny, and expression of c-type and g-type lysozymes in brill (*Scophthalmus rhombus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(1-2): 57-65.

- [27] Kori-Siakpere O, Ogbe M G, Ikomi R B. Haematological response of the African catfish: *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) to sublethal concentrations of potassium permanganate[J]. Scientific Research and Essays, 2009, 4(5): 457-466.
- [28] 潘吉脉. 鲟鱼嗜水气单胞菌灭活疫苗研制及其免疫效果分析 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2020.
- Pan J M. Preparation of inactivated *Aeromonas hydrophila* vaccine and analysis of its immune effect[D]. Guiyang: Guizhou University, 2020 (in Chinese).
- [29] 任洪涛, 林霖. Cr⁶⁺对草鱼脑和肝胰脏组织结构及其超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 水产科学, 2016, 35(6): 644-648.
- Ren H T, Lin L. Effects of concentrations of chromium Ion on histological structure of brain and hepatopancreas and hepatopancreatic SOD activity in grass carp[J]. Fisheries Science, 2016, 35(6): 644-648 (in Chinese).
- [30] Panigrahi A, Kiron V, Kobayashi T, et al. Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2004, 102(4): 379-388.
- [31] Kong X H, Wang S P, Jiang H X, et al. Responses of acid/alkaline phosphatase, lysozyme, and catalase activities and lipid peroxidation to mercury exposure during the embryonic development of goldfish *Carassius auratus*[J]. Aquatic Toxicology, 2012, 120-121: 119-125.
- [32] Bag M R, Makesh M, Rajendran K V, et al. Characterization of IgM of Indian major carps and their cross-reactivity with anti-fish IgM antibodies[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 26(2): 275-278.
- [33] Xing J, Xu H S, Tang X Q, et al. A DNA vaccine encoding the VAA Gene of *Vibrio anguillarum* induces a protective immune response in flounder[J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 499.
- [34] Sheng X Z, Qian X Y, Tang X Q, et al. Polymeric immunoglobulin receptor mediates immune excretion of mucosal IgM-antigen complexes across intestinal epithelium in Flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Frontiers in Immunology, 2018, 9: 1562.
- [35] Yang S, Tang X Q, Sheng X Z, et al. Development of monoclonal antibodies against IgM of sea bass (*Lateolabrax japonicus*) and analysis of phagocytosis by mIgM+ lymphocytes[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 78: 372-382.
- [36] Park I S, Choi H J, Noh C H, et al. Induced morphological changes in larval rock bream, *Oplegnathus fasciatus*, under Starvation[J]. Development & Reproduction, 2013, 17(4): 399-407.

Pathogenicity and inactivated vaccine protection of *Staphylococcus sciuri* JS-1 on *Carassius auratus*

MA Shuang, JIANG Mi, LI Yanhong, LIU Yang, SUN Yu, TANG Xiaoqi, WU Zhengli*

(College of Fisheries, Research Center of Fishery Resources and Environment,
Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: *Staphylococcus sciuri* is a common zoonotic pathogen to humans, animals and fish. It can cause a variety of diseases and a high fatality rate to aquatic animals. *Carassius auratus* is one of the most important aquaculture species in the world, and can be used as a good aquatic animal model. In order to explore the pathogenicity and inactivated vaccine protectivity of *S. sciuri* JS-1 on *C. auratus*, we designed the JS-1 injected infection experiment, the JS-1 supplemented feeding experiment, and the inactivated vaccine protection experiment, and samples were detected by histopathological observation, quantitative real-time PCR (qPCR) and enzyme activity detection. Results showed that in the JS-1 injected infection samples, *C. auratus* showed systemic hemorrhage, and its liver was congested and enlarged, and the 96-hour LD₅₀ was 5×10⁶ CFU/mL. In the JS-1 supplemented feeding experiment, the liver of *C. auratus* showed congestion and enlargement with irregular nucleus shape, the spleen was congested and had serious necrosis, the renal corpuscle was swollen and the space of renal capsule was enlarged, and the transaminase in serum increased at first and then decreased, and reached the highest level on day 14. The high concentration group showed the most obvious decrease trend, and the activity of lysozyme was significantly increased, compared with control group. On day 14, the lysozyme activity of the high concentration group was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$), on day 28, the lysozyme activity of the low concentration group was significantly increased ($P<0.05$). The expression of *TNF-α* and *IFN-γ* genes in the liver and spleen of *C. auratus* increased at first and then decreased, and was significantly higher than that of the control group, and on day 21, the difference still existed. After injection of the inactivated vaccine, the activity of lysozyme in serum was significantly higher than that in the control group, while activities of alkaline phosphatase, transaminase, and superoxide dismutase were significantly lower than those in the control group, and the catalase activity was significantly increased; the specific IgM and total IgM in the serum immunized with inactivated vaccine were significantly higher than those in the control group. The content of specific IgM accounts for 50%-60% of the total IgM content, and the survival rate of crucian carp reached 83.3% on 10th day after JS-1 injection. This study showed that *S. sciuri* JS-1 is highly pathogenic to *C. auratus*, causing systemic hemorrhage and internal organ damage, and inactivated vaccine of *S. sciuri* can stimulate the body to produce a strong immune response. The immune protection rate is more than 80%, and its inactivated vaccine can provide effective protection for *C. auratus*. This study provides a research basis for the development of *S. sciuri* vaccine.

Key words: *Carassius auratus*; *Staphylococcus sciuri*; pathogenicity; immune gene expression; non-specific immunity; inactivated vaccine

Corresponding author: WU Zhengli. E-mail: zh20140202@swu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31770965); China Agriculture Research System of MOF and MARA (CARS-49)