

### 3 种免疫途径下迟缓爱德华菌菌蜕疫苗 对欧洲鳗的免疫保护效果

李宁求, 余露军, 付小哲, 刘礼辉, 林 强, 张德锋, 石存斌, 吴淑勤\*

(中国水产科学研究院珠江水产研究所,农业部渔用药物创制重点实验室,  
广东省水产动物免疫技术重点实验室,广东 广州 510380)

**摘要:** 为了探讨迟缓爱德华菌菌蜕疫苗预防鳗鲡爱德华菌病的可行性,实验采用腹腔注射、口服、浸泡 3 种途径探讨了迟缓爱德华菌菌蜕疫苗对欧洲鳗的免疫保护效果。结果表明,免疫后欧洲鳗血清抗体效价均明显升高,但菌蜕疫苗(ETG)组与福尔马林灭活疫苗(FKC)组间血清抗体效价无显著性差异。欧洲鳗注射、口服、浸泡 ETG 组的相对免疫保护率分别为 75.0%、52.5%、37.5%,分别高于 FKC 组的 55.0%、40.0%、32.5%,且 ETG 组欧洲鳗死亡时间明显推后,表明菌蜕疫苗的免疫保护效果优于福尔马林灭活疫苗。易操作、对鱼体应激少的 ETG 疫苗口服免疫欧洲鳗获得了 52.5% 的免疫保护率,在预防鳗鲡爱德华菌病中具有良好的应用前景。

**关键词:** 欧洲鳗; 迟缓爱德华菌; 菌蜕疫苗; 免疫效果

**中图分类号:** S 941

**文献标志码:** A

迟缓爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)是一种肠杆菌科的革兰氏阴性菌,被 Ewing 等<sup>[1]</sup>最早报道,是鱼类爱德华菌病的病原,对全球许多海淡水养殖鱼类造成重大经济损失<sup>[2]</sup>。多个国家鳗鲡养殖业受到爱德华菌病的危害<sup>[3-5]</sup>,我国的鳗鲡养殖业也因此遭受严重经济损失<sup>[6-8]</sup>,已成为鳗鲡养殖最为严重的疾病之一。传统的抗生素等化学药物对爱德华菌病的防治起到了一定作用,但也导致了病原抗药性及药物残留等问题。作为我国重要的出口创汇品种,鳗鲡的药物残留问题受到格外关注,因此,疫苗免疫成为防治鳗鲡爱德华菌病首选,但迟缓爱德华菌为兼性胞内寄生,机体抗胞内菌感染以细胞免疫为主,而传统的灭活疫苗和亚单位疫苗主要诱导机体体液免疫,其免疫保护效果不是很理想。因此,开发新型高效的迟缓爱德华菌疫苗成为解决这一问题的有效途径。

菌蜕(bacterial ghosts)是革兰氏阴性菌被噬菌体裂解酶 E 裂解形成的不含细胞内容物的细

菌空壳,由奥地利学者 Witte 等<sup>[9]</sup>首先提出。这种基因灭活过程不会改变细菌本身内外膜结构,细菌表面的鞭毛和纤毛等结构完整,易于在特定组织和细胞中黏附,更容易被巨噬细胞和树突状细胞识别,增加了抗原提呈的机会,既能使机体产生体液免疫反应,也能产生细胞免疫反应<sup>[10]</sup>。为了探讨鳗鲡迟缓爱德华菌菌蜕疫苗的可行性,本研究在前期构建的鳗源迟缓爱德华菌菌蜕的基础上<sup>[11]</sup>,探讨了不同免疫途径下迟缓爱德华菌菌蜕疫苗对欧洲鳗(*Anguilla anguilla*)的免疫保护效果,为鳗鲡爱德华菌病防控奠定基础。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 菌株与实验鱼

含噬菌体 phi X174 裂解酶基因 E 的迟缓爱德华菌 AnGH080301(pBVLysis E)由本实验室构建<sup>[11]</sup>。实验用欧洲鳗购自广东清远某鳗鲡养殖场,健康,无病史,规格(60.0 ± 5.0)g/尾,在水泥

收稿日期:2014-06-13 修回日期:2014-09-17

资助项目:国家自然科学基金(31202032);广州市珠江科技新星专项(2012J2200078);广东省海洋渔业科技推广专项(A201301B06)

通信作者:吴淑勤,E-mail:gzwushuqin@163.com

池中暂养 2 周,确定无病,随机抽取 5 尾采血,分离血清经 ELISA 检测无迟缓爱德华菌抗体后,用于后续实验,实验期间水温( $26.0 \pm 2.0$ ) $^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.2 仪器与试剂

酶标仪:Multiskan MK3;一抗为鼠抗鳗 IgM 单抗,为福建省农业科学院生物技术研究所龚晖研究员赠送,二抗为辣根过氧化酶标记羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司,辣根过氧化酶新型底物 TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)为 TIANGEN 公司产品,其他试剂为国产分析纯。

### 1.3 疫苗制备

迟缓爱德华菌菌蛻疫苗(*Edwardsiella tarda* ghosts,ETG)制备:按本实验室优化的迟缓爱德华菌菌蛻制备方法<sup>[11]</sup>获得菌蛻,冻干后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,经无菌检验及安全性实验后用于免疫接种。

迟缓爱德华菌全菌灭活疫苗(formalin killed cell,FKC)制备:将迟缓爱德华菌 AnGH080301 接种至 BHI 培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 过夜培养,离

心收集菌体,用无菌 PBS 调整细菌浓度为  $1.0 \times 10^9$  CFU/mL,加入福尔马林至终浓度 0.3%,室温放置 3 d,涂布平板检测无菌后,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

### 1.4 免疫分组

将暂养欧洲鳗随机分成 9 组,每组 50 尾。其中腹腔注射分为 3 组,每组分别注射  $5.4 \times 10^8$  CFU/mL 的 FKC 0.2 mL (FKC + IP)、 $5.7 \times 10^8$  CFU/mL 的 ETG 0.2 mL (ETG + IP),对照组注射 0.2 mL PBS (PBS + IP);浸泡免疫分为 3 组,分别在  $5.4 \times 10^8$  CFU/mL 的 FKC 中浸泡 30 min (FKC + IM)、 $5.7 \times 10^8$  CFU/mL 的 ETG 中浸泡 30 min (ETG + IM),对照组 PBS 中浸泡 30 min (PBS + IM);口服免疫分为 3 组,分别连续 7 d 投喂约  $1.0 \times 10^8$  CFU/(尾·天)的 FKC (FKC + OA)或 ETG (ETG + OA),间隔 1 周再投喂 7 d,对照组正常投喂饲料(C + OA)(表 1)。实验鱼饲养在水泥池中,实验过程中保持增氧。

表 1 欧洲鳗 3 种免疫途径下迟缓爱德华菌菌蛻疫苗和福尔马林灭活疫苗免疫效果测试实验分组

Tab.1 The immune experiment design of ETG and FKC vaccine to European eels in 3 kinds of inoculation routes

免疫途径 inoculation routes	实验组别 experiment groups	说明 note
腹腔注射 intrapertitoneal injection	FKC + IP	每尾注射 FKC 0.2 mL ( $5.4 \times 10^8$ CFU/mL)
	ETG + IP	每尾注射 ETG 0.2 mL ( $5.7 \times 10^8$ CFU/mL)
	PBS + IP	每尾注射 PBS 0.2 mL
浸泡 immersion	FKC + IM	在 $5.4 \times 10^8$ CFU/mL 疫苗中浸泡 30 min
	ETG + IM	在 $5.7 \times 10^8$ CFU/mL 疫苗中浸泡 30 min
	PBS + IM	PBS 中浸泡 30 min
口服 oral administration	FKC + OA	每天约 $5.0 \times 10^9$ CFU 拌入适量饲料中,上、下午各投喂 1 次,约 $1.0 \times 10^8$ CFU/(尾·天),连续投喂 7 d 后,隔 1 周再投喂 7 d
	ETG + OA	每天约 $5.4 \times 10^9$ CFU 拌入适量饲料中,上、下午 2 次投喂,约 $1.0 \times 10^8$ CFU/(尾·天),连续投喂 7 d 后,隔 1 周再投喂 7 d
	C + OA	正常投喂饲料

### 1.5 抗体滴度的测定

样品收集与处理 分别于免疫后的第 7、14、21、28、42 天收集欧洲鳗血清。每组随机挑取 5 尾欧洲鳗,1 mL 无菌注射器尾部静脉采血后,分别装于离心管中,室温静置 2 h 后,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜,3 000  $\times$  g,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min,取上清液,最后将同组 5 尾欧洲鳗的血清等体积混合,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

模式抗原的制备 将迟缓爱德华菌 AnGH080301 接种至 BHI 培养基中,28 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 过夜培养,加入福尔马林至终浓度 0.3%,室温放置 3 d,涂布平板检测无菌后,离心收集菌体,用包被液调整细菌浓度为  $6.0 \times 10^9$  CFU/mL,置于冰上超声波破碎,程序 time 10 min, pulse on, 8 s; pulse off, 8 s; amplitude, 100%,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

**ELISA 工作浓度的确定** 通过棋盘法,确定检测欧洲鳗血清抗体所需的抗原、一抗鼠抗鳗单抗和羊抗鼠二抗抗体的最佳工作浓度。抗原(迟缓爱德华菌全菌)的包被浓度分别为  $1.0 \times 10^8$ 、 $4.0 \times 10^8$ 、 $1.5 \times 10^9$  和  $6.0 \times 10^9$  CFU/mL;鼠抗鳗单抗稀释浓度为 1:500、1:1 000、1:2 000;羊抗鼠稀释浓度为 1:2 000、1:4 000。以显色反应后  $OD_{450}$  值在 1.0 左右为最佳结合浓度。

**ELISA 工作程序** 灭活的迟缓爱德华菌全菌抗原  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$  包被 96 孔酶标板,  $4^\circ\text{C}$  过夜, PBST 洗涤 3 次; 5% 脱脂奶粉  $37^\circ\text{C}$  水浴封闭 1.5 h, PBST 洗涤 3 次; 加入倍比稀释的待测血清样品  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ , 每个样品 3 个重复,  $37^\circ\text{C}$  温育 1 h, PBST 洗涤 3 次; 加入一抗鼠抗鳗单抗稀释液  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ ,  $37^\circ\text{C}$  温育 1 h, PBST 洗涤 3 次; 加入羊抗鼠 IgG 二抗稀释液  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ ,  $37^\circ\text{C}$  温育 1 h, PBST 洗涤 5 次; 加 TMB  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$ ,  $37^\circ\text{C}$  避光显色 20 min; 加入  $100 \mu\text{L}/\text{孔}$  终止液, 终止反应, 20 min 内测定结果。在酶标检测仪 (Multiskan Mk3) 上, 于  $450 \text{ nm}$  处, 以空白对照组调零后测各孔 OD 值, 大于阴性对照 OD 值 2.1 倍判断为阳性。

### 1.6 相对免疫保护率的测定

免疫后第 28 天, 每组随机抽取 40 尾, 分别用  $6.0 \times 10^7$  CFU/mL 的迟缓爱德华菌 AnGH080301 进行腹腔注射攻毒, 每尾注射 0.2 mL, 水温  $(28.0 \pm 1.0)^\circ\text{C}$ , 连续观察 7 d, 记录结果, 对死亡欧洲鳗进行病原分离鉴定, 并计算相对免疫保护率 (relative percent survival, RPS):

相对免疫保护率 (%) =  $(1 - \text{免疫组死亡数} / \text{对照组死亡数}) \times 100\%$ 。

### 1.7 数据分析

实验所得数据均表示为平均值  $\pm$  标准差, 采用软件 OriginPro6.0 进行数据处理, 并采用  $t$  检验进行差异性分析, 当  $P < 0.05$  时差异显著。

## 2 结果

### 2.1 ELISA 最佳工作浓度的确定

棋盘法确定的 ELISA 最佳工作浓度为, 抗原(迟缓爱德华菌全菌)的包被浓度为  $1.5 \times 10^9$  CFU/mL, 一抗鼠抗鳗单抗的稀释浓度为 1:1 000, 二抗羊抗鼠 IgG-HRP 的稀释浓度为 1:4 000。

### 2.2 免疫后欧洲鳗血清抗体效价动力学

迟缓爱德华菌菌蛻疫苗 (ETG) 和福尔马林灭

活疫苗 (FKC) 腹腔注射、浸泡、口服免疫欧洲鳗后, 其血清抗体效价与对照组相比均有明显上升。其中 ETG + IP 组第 7 天效价可达  $2^7$ , 至 21 d 时达高峰 ( $2^{10}$ ); FKC + IP 组第 7 天达  $2^7$ , 至 28 d 时达到高峰 ( $2^{12}$ ), 对照组 PBS + IP 一直维持在  $2^2 \sim 2^3$ , 免疫组血清抗体效价均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 但 ETG + IP 组与 FKC + IP 组之间没有显著差异 (图 1)。ETG + IM 组和 FKC + IM 组血清抗体效价维持在  $2^4 \sim 2^7$ , 对照组 PBS + IM 维持在  $2^2 \sim 2^3$ , 免疫组与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ), 但 ETG + IP 组与 FKC + IP 组之间没有显著差异 (图 2)。ETG + OA 组在第 7 天血清抗体效价达  $2^6$ , 21 d 达峰值 ( $2^8$ ), FKC + OA 组第 7 天血清抗体效价仅为  $2^4$ , 第 28 天达峰值 ( $2^8$ ), 从 14 d 开始免疫组与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ), 但 ETG + OA 组与 FKC + OA 组之间没有显著差异 (图 3)。

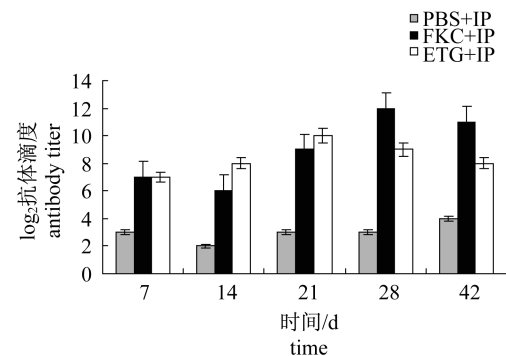


图 1 欧洲鳗注射免疫迟缓爱德华菌蛻疫苗和福尔马林灭活疫苗后血清抗体效价动力学

Fig. 1 Serum antibody titer of European eel immunized intraperitoneally with ETG and FKC

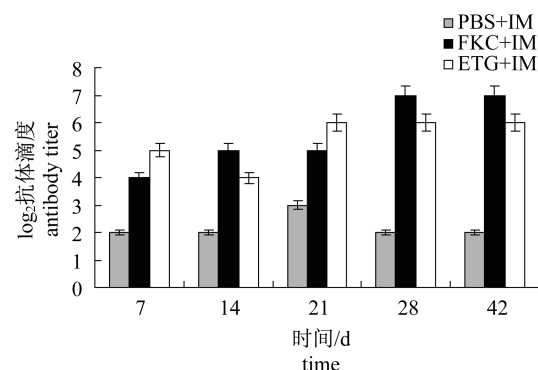


图 2 欧洲鳗浸泡免疫迟缓爱德华菌蛻疫苗和福尔马林灭活疫苗后血清抗体效价动力学

Fig. 2 Serum antibody titer of European eel immunized immersely with ETG and FKC

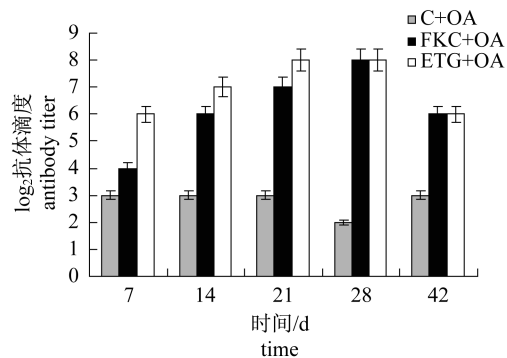


图3 欧洲鳗口服免疫迟缓爱德华菌菌蛻疫苗和福尔马林灭活疫苗后血清抗体效价动力学  
Fig. 3 Serum antibody titer of European eel immunized orally with ETG and FKC

### 2.3 相对免疫保护率

免疫后第28天攻毒,对照组24h开始出现死亡,死亡欧洲鳗腹部、鳍条充血,肝脏可见明显肿大,从死亡的欧洲鳗中均可分离到致病性迟缓爱德华菌。攻毒后ETG+IP组第3至第6天出现死亡,累积死亡率为25.0%,FKC+IP组第2至第7天出现死亡,累积死亡率为45.0%,ETG+IP组相对于FKC+IP组欧洲鳗死亡时间延迟,PBS+IP组3d累积死亡率达100%,各组之间差异显著( $P < 0.05$ ) (图4)。攻毒后ETG+IM和FKC+IM组均在第2至第7天出现死亡,ETG+IM组累积死亡率为62.5%,FKC+IM组累积死亡率为67.5%,两者之间差异不显著,PBS+IM组3d累积死亡率达100%,与ETG+IM和FKC+IM组差异显著( $P < 0.05$ ) (图5)。攻毒后ETG+OA和FKC+OA组均在第1至第7天出现死亡,ETG+OA组累积死亡率为47.5%,FKC+OA组累积死亡率为60.0%,对照组C+OA3d累积死亡率达100%,各组之间差异显著( $P < 0.05$ ) (图6)。经计算迟缓爱德华菌菌蛻疫苗注射(ETG+IP)、浸泡(ETG+IM)、口服免疫组(ETG+OA)相对免疫保护率分别为75.0%、37.5%、52.5%,高于福尔马林灭活疫苗的55.0%、32.5%、40.0% (表2),尤其是易操作、对鱼体应激少的口服免疫途径获得了52.5%的免疫保护率,比浸泡途径获得的保护率高15.0%,在预防鳗爱德华菌病中具有良好的应用前景。

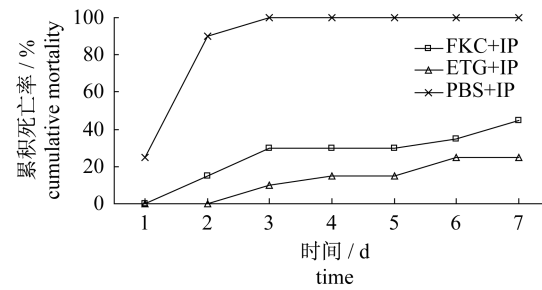


图4 注射免疫迟缓爱德华菌菌蛻疫苗(ETG+IP)组和福尔马林灭活疫苗(FKC+IP)组攻毒后累积死亡率曲线  
Fig. 4 Cumulative mortality of eels immunized intraperitoneally with ETG and FKC after being challenged with virulent *E. tarda*

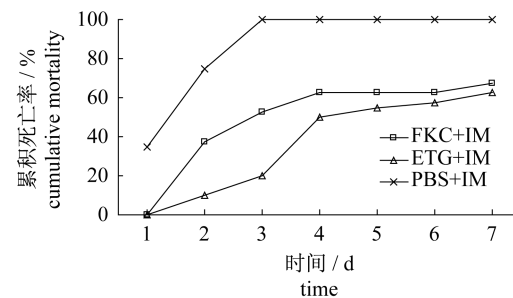


图5 浸泡免疫迟缓爱德华菌菌蛻疫苗(ETG+IM)组和福尔马林灭活疫苗(FKC+IM)组攻毒后累积死亡率曲线  
Fig. 5 Cumulative mortality of eels immersion immunized with ETG and FKC after being challenged with virulent *E. tarda*

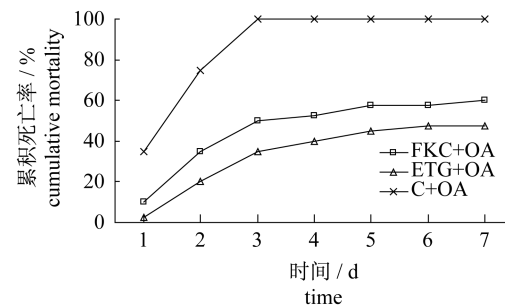


图6 口服免疫迟缓爱德华菌菌蛻疫苗(ETG+OA)组和福尔马林灭活疫苗(FKC+OA)组累积死亡率曲线  
Fig. 6 Cumulative mortality of eels immunized by oral administration with ETG and FKC after being challenged with virulent *E. tarda*

表 2 3 种免疫途径下迟缓爱德华菌菌蛻疫苗和福尔马林灭活疫苗对欧洲鳗相对免疫保护率  
Tab.2 The relative percent survival of ETG and FKC to European eels by 3 inoculation routes

实验组别 experiment group	实验鱼总数 total number for test	死亡数 number of death	累积死亡率/% cumulative mortality	相对免疫保护率/% relative protective survival
FKC + IP	40	18	45.0	55.0
ETG + IP	40	10	25.0	75.0
PBS + IP	40	40	100	0
FKC + IM	40	27	67.5	32.5
ETG + IM	40	25	62.5	37.5
PBS + IM	40	40	100	0
FKC + OA	40	24	60.0	40.0
ETG + OA	40	19	47.5	52.5
C + OA	40	40	100	0

### 3 讨论

由于菌蛻在制备过程中保留了完整的表面抗原结构,具有与活细菌相媲美的免疫原性,成为迟缓爱德华菌等胞内寄生菌疫苗构建的重要选择。迟缓爱德华菌菌蛻疫苗在牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*)<sup>[12-13]</sup> 和大菱鲆 (*Scophthalmus maximus*)<sup>[14]</sup> 上取得良好的免疫保护效果。本研究在前期构建的鳗源迟缓爱德华菌菌蛻的基础上,探讨了该疫苗在注射、口服和浸泡 3 种免疫途径下对欧洲鳗的免疫保护效果,结果表明迟缓爱德华菌菌蛻疫苗通过 3 种免疫途径均可产生一定的免疫保护作用,特别是易操作、对鱼体应激少的口服免疫效果明显,为鳗鲡爱德华菌病的防控提供了一种新选择。

迟缓爱德华菌免疫后欧洲鳗血清抗体效价显著高于对照组,表明该疫苗可诱导机体产生体液免疫应答,其抗体水平从高到低依次为注射组、口服组和浸泡组,与对应的相对免疫保护率成正相关关系,说明引起的体液免疫应答水平越高免疫保护效果越好。菌蛻疫苗组和福尔马林灭活疫苗组欧洲鳗血清抗体效价无显著差异,但菌蛻疫苗注射组 (ETG + IP)、菌蛻疫苗口服组 (ETG + OA) 相对免疫保护率分别显著高于福尔马林灭活疫苗注射组 (FKC + IP)、福尔马林灭活疫苗口服组 (FKC + OA),可能原因是菌蛻保留了活细菌表面结构,有抗原递呈细胞靶向性及佐剂功能<sup>[15]</sup>,相对于甲醛灭活疫苗能够激发鱼体产生更好的细胞免疫,因此推测菌蛻疫苗引起的细胞免疫反应在免疫保护中可能发挥了一定作用<sup>[16]</sup>。

本研究结果表明迟缓爱德华菌菌蛻疫苗对欧

洲鳗注射免疫相对免疫保护率为 75.0%,与 Kwon 等<sup>[17]</sup> 报道在罗非鱼 (*Oreochromis mosambicus*) 上 94.4% 的相对免疫保护率存在一定的差距。究其原因可能是实验所采用的攻毒剂量较大,掩盖了部分保护效果,从累积死亡率曲线可看出菌蛻疫苗组相对于对照组鳗鲡死亡时间明显延后,表明菌蛻疫苗虽然不能完全保护迟缓爱德华菌强毒攻击,但能在攻毒早期对欧洲鳗产生保护,延缓其死亡时间。同时,菌株来源的不同和鱼种类的差异也可能是导致相对免疫保护率存在差异的原因。就口服免疫而言,本研究的迟缓爱德华菌菌蛻疫苗对欧洲鳗相对免疫保护率为 52.5%,与迟缓爱德华菌菌蛻在牙鲆<sup>[13]</sup>、嗜水气单胞菌菌蛻在鲫 (*Carassius auratus*)<sup>[18]</sup> 上超过 70.0% 的相对免疫保护率相比有一定的差距,除了上面提到的原因外,可能还与口服抗原的剂量和免疫程序等有关。

### 参考文献:

- [1] Ewing W H, Mewhorter A C, Escobar M R, et al. *Edwardsiella*, a new genus of *Enterobacteriaceae* based on a new species, *E. tarda*. International Bulltin Bacteriology Nomenclature and Taxonomy [J], 1965, 15(1): 33-38.
- [2] Mohanty B R, Sahoo P K. Edwardsiellosis in fish: a brief review. Journal of Biosciences [J], 2007, 32(7): 1331-1344.
- [3] Alcaide E, Herraiz S, Esteve C. Occurrence of *Edwardsiella tarda* in wild European eels *Anguilla anguilla* from Mediterranean Spain [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2006, 73(1): 77-81.
- [4] Eaves L E, Ketterer P J, Anderson I G, et al. The

- isolation and identification of *Edwardsiella tarda* from a diseased native Australian eel (*Anguilla reinhardtii*) [J]. Australian Veterinary Journal, 1990, 67(9):336-337.
- [5] Joh S J, Kim M J, Kwon H M, et al. Characterization of *Edwardsiella tarda* isolated from farm-cultured eels, *Anguilla japonica*, in the Republic of Korea [J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2011, 73(1):7-11.
- [6] Chen C F, Wu Z X, Gao H J. Isolation and Identification of Pathogenic Bacteria Causing Edwardsiellosis in Eel (*Anguilla japonica*) [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 1998, 17(4):82-88. [陈昌福, 吴志新, 高汉娇. 日本鳗鲡爱德华氏菌病原菌的分离与鉴定. 华中农业大学学报, 1998, 17(4):82-88.]
- [7] Chen Q, Gong H, Yang J X. Isolation and Identification of *Edwardsiella tarda* in *Anguilla anguilla* [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2011, 27(1):7-10. [陈强, 龚晖, 杨金先. 欧洲鳗迟钝爱德华氏菌的分离鉴定. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(1):7-10.]
- [8] Yu L J, Li N Q, Liu L H, et al. Isolation and identification of pathogenic bacteria from *Anguilla anguilla* mixed infected with *Edwardsiella tarda* and *Vibrio vulnificus* [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2009, 25(8):799-803. [余露军, 李宁求, 刘礼辉, 等. 日本鳗鲡混合感染迟缓爱德华氏菌与创伤弧菌的分离与鉴定. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(8):799-803.]
- [9] Witte A, Lubitz W, Bakker E P. Proton-motive-force-dependent step in the pathway to lysis of *Escherichia coli* induced by bacteriophage phi X174 gene E product [J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(4):1750-1752.
- [10] Haslberger A G, Kohl G, Felnerova D, et al. Activation, stimulation and uptake of bacterial ghosts in antigen presenting cells [J]. Journal of Biotechnology, 2000, 83(1-2):57-66.
- [11] Li N Q, Yu L J, Fu X Z, et al. Construction of *Edwardsiella tarda* ghosts from eel and their optimization of preparation condition [J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(11):1754-1762. [李宁求, 余露军, 付小哲, 等. 鳗源迟缓爱德华氏菌菌蛻的构建及制备条件优化. 水产学报, 2012, 36(11):1754-1762.]
- [12] Kwon S R, Nam Y K, Kim S K, et al. Generation of *Edwardsiella tarda* ghosts by bacteriophage PhiX174 lysis gene E [J]. Aquaculture, 2005, 250(1-2):16-21.
- [13] Kwon S R, Lee E H, Nam Y K, et al. Efficacy of oral immunization with *Edwardsiella tarda* ghosts against edwardsiellosis in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Aquaculture, 2007, 269(1-4):84-88.
- [14] Castro N, Toranzo A E, Nunez S, et al. Development of an effective *Edwardsiella tarda* vaccine for cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2008, 25(3):208-212.
- [15] Jalava K, Eko F O, Riedmann E, et al. Bacterial ghosts as carrier and targeting systems for mucosal antigen delivery [J]. Expert Review of Vaccines, 2003, 2(1):45-51.
- [16] Tu F P, Chu W H, Zhuang X Y, et al. Effect of oral immunization with *Aeromonas hydrophila* ghosts on protection against experimental fish infection [J]. Letters in Applied Microbiology, 2010, 50(1):13-17.
- [17] Kwon S R, Nam Y K, Kim S K, et al. Protection of tilapia (*Oreochromis mosambicus*) from edwardsiellosis by vaccination with *Edwardsiella tarda* ghosts [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(4):621-626.
- [18] Chu W H, Zhuang X Y, Lu C P. Generation of *Aeromonas hydrophila* ghosts and their evaluation as oral vaccine candidates in *Carassius auratus gibelio* [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(2):202-206. [储卫华, 庄禧懿, 陆承平. 嗜水气单胞菌菌蛻的制备及其对银鲫的口服免疫. 微生物学报, 2008, 48(2):202-206.]

## Immune efficacy of *Edwardsiella tarda* ghosts vaccine for European eel (*Anguilla anguilla*) by 3 kinds of inoculation routes

LI Ningqiu, YU Lujun, FU Xiaozhe, LIU Lihui, LIN Qiang,  
ZHANG Defeng, SHI Cunbin, WU Shuqin \*

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Aquatic Animal Immune Technology, Guangdong Province, Guangzhou 510380, China)

**Abstract:** Edwardsiellosis caused by *Edwardsiella tarda* is one of the most serious diseases in the eel culture industry. Bacterial ghosts, which have native surface antigenic structures and can induce humoral and cellular immune response, have become an important candidate of vaccine development. In present study, immune efficacy of *E. tarda* ghosts vaccine for European eel was detected in 3 kinds of inoculation routes. Results indicate that antibody titer of European eel shows significant increase after immunization with *E. tarda* ghost (ETG) and Formalin killed cell (FKC), but there is no significant difference between ETG group and FKC group. The relative protective survival (RPS) of ETG by intraperitoneal injection and immersion and oral administration are 75.0%, 52.5%, 37.5% respectively, is higher than FKC's 55.0%, 40.0%, 32.5% respectively. Moreover, the beginning of death time of eel immunization with ETG has a delay compared with FKC. Above results indicate that immune efficacy of ETG was superior to FKC. In particular RPS of ETG is 52.5% by oral administration. Considering easily operating and less stress, oral immunization of ETG has a favorable application prospect in preventing Edwardsiellosis of eel industry.

**Key words:** *Anguilla anguilla*; *Edwardsiella tarda*; ghost vaccine; immune efficacy

**Corresponding author:** WU Shuqin, E-mail: gzwshuqin@163.com