



维氏气单胞菌弱毒株 FS12001 及其疫苗对 异育银鲫的免疫效果

王艳娇^{1,2,3,4}, 张德锋^{1,2,3}, 任燕^{1,2,3*}, 王庆^{1,2,3}, 王英英^{1,2,3},
李莹莹^{1,2,3}, 潘厚军^{1,2,3}, 石存斌^{1,2,3}, 莫绪兵^{1,2,3}, 尹纪元^{1,2,3}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;

2. 广东省水产动物免疫与绿色养殖重点实验室, 广东 广州 510380;

3. 农业农村部渔用药物创制重点实验室, 广东 广州 510380;

4. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 为探究由维氏气单胞菌(Av)弱毒株 FS12001 制备的疫苗免疫效果, 将 Av 弱毒株 FS12001 制备活疫苗、灭活疫苗、ISA763A-灭活疫苗和蜂胶-灭活疫苗, 腹腔注射免疫异育银鲫, 同时设 ISA763A 佐剂、蜂胶佐剂及 0.65% NaCl 作为对照组。于免疫后 1、3、5、7 和 14 d 经实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测脾脏组织中 *IgM*、*IL-1 β* 及 *LZM* 的基因表达量; 于免疫后 7、14、21、28、42 和 48 d 尾静脉采血分离血清, 检测 IgM 抗体水平, 测定 SOD 和 LZM 酶活性; 于免疫 28 d 后用 2 株 Av 强毒株分别攻毒各组实验鱼, 连续观察记录 7 d, 计算各免疫组的相对保护率。结果显示, 各免疫组脾脏组织中 *IgM*、*IL-1 β* 及 *LZM* 的基因表达量高于对照组, 且 ISA763A-灭活疫苗组和蜂胶-灭活疫苗组的表达量显著高于其他各实验组。各疫苗免疫组血清特异性抗体水平均显著高于 0.65% NaCl 对照组和佐剂对照组。各疫苗免疫组的 LZM 活性均在 28 d 最高, 灭活疫苗组、ISA763A-灭活疫苗组及蜂胶-灭活疫苗组 SOD 活性均在 7 d 最高。菌株 AVCA07 攻毒后, 活疫苗组、灭活疫苗组、ISA763A-灭活疫苗组和蜂胶-灭活疫苗组的 RPS 分别为 63%、56%、100% 和 56%; 菌株 YC170511 攻毒后, 以上 4 个免疫组 RPS 分别为 59%、55%、93% 和 72%。研究表明, 用弱毒株 FS12001 制备疫苗, 注射免疫异育银鲫后均可增加脾脏中 *IgM*、*IL-1 β* 及 *LZM* 的基因表达量, 提高血清抗体水平, 增强 SOD 和 LZM 酶活性, 增强其抵抗 Av 感染的能力。

关键词: 异育银鲫; 维氏气单胞菌; 弱毒株; 疫苗; 免疫效果

中图分类号: S 942.5

文献标志码: A

鲫 (*Carassius auratus*) 是重要的淡水养殖品种, 在养殖过程中, 易感染由气单胞菌 (*Aeromonas* spp.) 引起的淡水鱼细菌性败血症^[1]。淡水鱼细菌性败血症是农业农村部公布的二类动物疫病, 危

害常见淡水养殖鱼类。该病流行高峰期通常为每年的 6—9 月, 常常出现急性暴发, 死亡率高。在感染初期, 患病鱼鱼体会出现轻微的充血肿胀。病情加重后, 鱼体表面全部充血, 眼眶周围充血

收稿日期: 2023-11-09 修回日期: 2024-03-26

资助项目: 广东省重点领域研发计划“精准农业”重点专项 (2021B0202040002); 国家大宗淡水鱼产业技术体系 (CARS-45); 广东省现代农业产业技术体系创新团队建设专项 (2023KJ1150); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费 (2023TD49)

第一作者: 王艳娇 (照片), 从事水产动物免疫与病害防控研究, E-mail: 2628669794@qq.com

通信作者: 任燕, 从事水产动物免疫与病害防控研究, E-mail: renyanj@126.com



较明显, 眼球突出, 腹部膨胀, 内部脏器组织出现严重的败血症。对病鱼解剖可观察到腹腔内存在淡黄色透明或红色浑浊的腹水^[2], 给鱼类养殖业造成巨大的经济损失。

疫苗免疫具有防控水产病害发生、减少养殖业经济损失、减少或消除由大量使用抗生素带来的健康危害、生态风险和食品安全等问题的优点。截至 2020 年, 已有超过 20 种工厂化养殖鱼类有各自的商业化疫苗, 这些疫苗能够针对 20 余种细菌性疾病和 6 种病毒性疾病提供免疫保护^[3]。当前, 挪威、美国、加拿大、荷兰和韩国等国家, 渔用疫苗的产业化程度高, 市场成熟。相比之下, 中国的渔用疫苗研究起步较晚, 仍处于发展阶段。截至 2021 年, 有 9 个鱼类疫苗获得中国新兽药证书^[4]。嗜水气单胞菌 (*A. hydrophila*) 败血症灭活疫苗 [(2001) 新兽药证字 06 号] 是唯一针对淡水鱼细菌性败血症的商品化疫苗。但气单胞菌属细菌种类多且血清型复杂, 造成嗜水气单胞菌败血症灭活疫苗的应用有很大的局限性。流行病学调查表明淡水鱼细菌性败血症的病原种类中维氏气单

胞菌 (*A. veronii*, Av) 占比最高, 其次为嗜水气单胞菌, 并且混合感染普遍存在^[5], 亟需开展新流行菌株的疫苗研究。

本实验室分离保存的 Av 菌株 FS12001, 为弱毒菌株^[6], 具有良好的凝集抗原性, 浸泡和注射免疫鲫有一定的免疫保护效果^[7]。本实验将利用菌株 FS12001 制备活疫苗和灭活疫苗 (添加和不添加佐剂), 注射免疫接种异育银鲫, 通过检测免疫相关基因表达量、血清抗体水平, 测定血清 SOD 和 LZM 酶活性, 用 Av 强毒株攻毒并计算相对免疫保护率, 综合评价疫苗的免疫效果, 旨在丰富 Av 疫苗研究, 为细菌性败血症疫苗开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

Av 菌株 FS12001、AVCA07 和 YC170511 由中国水产科学研究院珠江水产研究所水产病害与免疫研究室分离、鉴定和保藏。本研究用到的菌株信息见表 1。

表 1 本研究用到的菌株信息

Tab. 1 *A. veronii* strains in this study

菌种 species	菌株 strain	分离时间 isolated time	分离地区 isolated area	宿主 host
维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	FS12001	2016.12	广东 Guangdong	草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>
维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	AVCA07	2013.09	贵州 Guizhou	鲫 <i>C. auratus</i>
维氏气单胞菌 <i>A. veronii</i>	YC170511	2017.05	江苏 Jiangsu	鲫 <i>C. auratus</i>

1.2 主要试剂

脑心浸出液培养基 (BHI) 购自广东环凯微生物科技有限公司; Hifair III 1st Stand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR、Hieff qPCR SYBR Green Master Mix 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 单抗为美国 Jackson 公司产品, 兔抗鲫 IgM 多抗由杭州华安生物技术有限公司制备; 总超氧化物歧化酶 (T-SOD) 测定试剂盒 (WST-1 法)(A001-3-2) 和溶菌酶 (LZM) 测试盒 (比浊法)(A050-1-1) 均购自南京建成生物工程研究所; 5% 绵羊血琼脂平板购自北京陆桥技术有限责任公司; 其余试剂为进口或国产分析纯。

1.3 实验鱼

异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) [体重

(10±2) g, 体长 (8.5±0.5) cm]、斑马鱼 (*Danio rerio*) [体重 (0.6±0.1) g, 体长 (4±1) cm] 均来自中国水产科学研究院珠江水产研究所水产良种基地。实验前移放至水生动物房鱼缸暂养 2 周, 观察异育银鲫的摄食状态, 确认健康后用于实验, 在实验期间养殖用水为曝气自来水、水温 (28±1) °C, 氧气泵 24 h 持续充气。本研究获得了中国水产科学研究院珠江水产研究所实验动物管理和使用伦理委员会批准 (LAEC-PRFRI-2023-02-01)。

1.4 菌株毒力测定

将菌株 FS12001、AVCA07 和 YC170511 划线接种绵羊血琼脂平板上, 28 °C 活化 16~18 h, 挑取菌落用灭菌的 0.65% NaCl 悬浮制备菌液。利用分光光度计测定菌液 OD₆₀₀ 值, 采用 BHI 平板活菌计数, 然后进行 10 倍梯度稀释, 制备成不同

浓度的菌液。每个菌株各浓度菌液攻毒 20 尾斑马鱼, 每尾腹腔注射 20 μL , 对照组注射等量灭菌的 0.65% NaCl。注射前停喂饲料 1 d, 注射后水温控制在 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, 每天观察并记录斑马鱼的累计死亡情况, 连续观察记录 7 d。按 Reed-Muench 法^[8] 计算半数致死量 (LD_{50})。

1.5 疫苗制备

菌液培养 将 FS12001 菌株接种于 BHI 固体培养基复壮, 28°C 温箱培养 16~18 h, 挑取单菌落, 转接到 BHI 液体培养基, 28°C 摇床培养 16~18 h, 再以 1:100 (体积比) 转接到 BHI 液体培养基, 28°C 摇床 16~18 h 进行大量扩培, 通过活菌计数, 调整菌液浓度为 3.0×10^9 CFU/mL。

活疫苗 制备的菌液 3 500 r/min, 离心 15 min, 弃上清液, 菌苔用 0.65% 无菌生理盐水 (0.65% NaCl) 重悬, 调整浓度为 3.0×10^8 CFU/mL, 制成 FS12001 活疫苗。

灭活疫苗 在制备的菌液中加入终浓度 3% 的甲醛溶液灭活 48 h, 无菌检验合格即灭活完全。将灭活菌液 3 500 r/min, 离心 15 min, 弃上清液, 菌苔用 0.65% NaCl 重悬, 调整菌液浓度为 1.5×10^9 CFU/mL, 制成 FS12001 灭活疫苗。

ISA763A-灭活疫苗 ISA763A 佐剂与 3×10^9 CFU/mL 灭活菌液按照 1:1 (体积比) 混合, 用搅拌器充分乳化, 制成油包水 (W/O) 白色乳状 ISA763A-灭活疫苗^[9]。

蜂胶-灭活疫苗 参照马光强等^[10] 方法制备浓度 200 mg/mL 蜂胶乙醇浸提物。蜂胶乙醇浸提液与 1.5×10^9 CFU/mL 灭活菌液按照 1:99 (体积比) 混合, 用搅拌器搅拌均匀, 制成蜂胶-灭活疫苗。

1.6 鱼体免疫

将银鲫随机分为 7 组, 每组 120 尾。其中 4 组分别从腹鳍基部注射制备的 FS12001 活疫苗、灭活疫苗、ISA763A-灭活疫苗和蜂胶-灭活疫苗,

每尾鱼注射 0.2 mL。另外 3 组分别注射等量的 ISA763A-0.65% NaCl、蜂胶-0.65% NaCl、0.65% NaCl。每组中 60 尾用于取样进行免疫相关基因表达量、血清抗体及酶活性等测定, 60 尾用于不同强毒菌株攻毒并计算相对保护率。

1.7 样品采集和处理

脾脏组织 免疫后 1、3、5、7 和 14 d 分别采集异育银鲫脾脏组织, 每个实验组随机取 5 尾鱼, 取 20~30 mg 组织用液氮急冻后存于 -80°C 冰箱。TRIzol 法提取总 RNA 后, 测定其 $\text{OD}_{260/280}$ 值及含量。合格的 RNA 反转录成 cDNA 作为实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 的模板。

异育银鲫血液 免疫后 7、14、21、28、42 和 56 d 从鱼的尾静脉采血, 每组每次随机采集 5 尾, 血液放入无菌无酶离心管中, 室温放置 4 h 后, 4°C 条件下, 3 600 r/min 离心 5 min, 分离上层血清保存于 -80°C 冰箱用于酶活性及抗体水平测定。

1.8 qRT-PCR 检测免疫相关基因表达量

参考时云朵等^[11] 引物和方法, 以 18S rRNA 为内参、检测 *IgM*、*IL-1 β* 和 *LZM* 基因表达量。引物如表 2 所示。qRT-PCR 反应程序: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 60°C 34 s, 40 循环; 95°C 15 s, 60°C 60 s, 95°C 15 s。

1.9 血清抗体测定

抗体水平测定参考 Shoemaker 等^[12] 的方法, 用间接 ELISA 方法测定各实验组鲫血清抗体水平。用 FS12001 菌液包被 ELISA 板, 待测鲫血清稀释 400 倍, 第一抗体为兔抗鲫 IgM 多抗 (1:4 000), 第二抗体为 HRP 标记的羊抗兔 IgG 单抗 (1:5 000)。同时设磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 空白对照。按常规操作流程洗涤, 加入显色液显色和终止液终止后, 测定 $\text{OD}_{450/630}$ 值。

1.10 血清酶活性测定

酶活性反应于 96 孔细胞培养板中进行, 所用

表 2 qRT-PCR 扩增引物

Tab. 2 Primer sequences for qRT-PCR

引物名称 primer	上游序列(5'-3') forward primer (5'-3')	下游序列(5'-3') reverse primer (5'-3')
18s rRNA	GGACACGGAAAGGATTGACAG	CGGAGTCTCGTTTCGTTATCGG
IgM	GTCAATCTTCGGCTTGCTCA	GGGTATAATCTCCATCGGGTC
IL-1 β	ACCAATGCGACATACAAGAGG	ATCAAACCACCAGAAGCCAGT
LZM	GGATTCTCACTGGCAACTAT	TGATTTCAGTCCTTCGGTTTT

方法根据超氧化物歧化酶 (SOD)、溶菌酶 (LZM) 试剂盒中的说明书操作, 并按照说明书上的公式计算各组 SOD、LZM 活性。

1.11 相对保护率测定

异育银鲫注射免疫 28 d 后, 分别用 Av 强毒株 AVCA07、YC170511 腹腔注射攻毒各组实验鱼, 攻毒浓度为 7.5×10^6 CFU/mL, 每尾注射 0.2 mL。每天记录死亡数, 连续观察 7 d, 计算相对保护率 (RPS), $RPS (\%) = (\text{对照组死亡率} - \text{免疫组死亡率}) / \text{对照组死亡率} \times 100\%$ 。

1.12 统计分析

数据经 Excel 2018 初步处理, 所有目的基因相对表达量的结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算得到。实验数据采用 Graphpad prism8.0 统计软件进行样本检验分析, 对数据进行单因素方差分析 (one-way

ANOVA), $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ 和 $P < 0.0001$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 菌株的毒力

菌株 FS12001、AVCA07 和 YC170511 对成年斑马鱼的半数致死量 LD_{50} 分别为 2.8×10^6 CFU、 1.5×10^3 CFU 和 1.1×10^3 CFU。根据 Santos 等^[13] 的研究, 细菌半数致死量 $10^4 \sim 10^5$ CFU 的为强毒株; $10^6 \sim 10^7$ CFU 的为弱毒株; 大于 10^8 CFU 的为无毒株。可见, 菌株 FS12001 为弱毒株, AVCA07 和 YC170511 为强毒株 (表 3~表 5)。

2.2 IgM、IL-1 β 和 LZM 的基因表达量

与 0.65%NaCl 对照组相比, 各免疫组 IgM 基因表达量明显升高, 整体上呈现先上升后下降趋

表 3 菌株 FS12001 对斑马鱼的半数致死量

Tab. 3 LD_{50} of *A.veronii* strain FS12001 to *D. rerio*

菌液浓度/(CFU/mL) bacterial concentration	注射剂量/ μ L injection dosage	攻毒尾数/尾 challenged fish	死亡数/尾 dead fish	累计存活数/尾 cumulative survival	累计死亡数/尾 cumulative death	死亡率/% mortality	半数致死量/CFU LD_{50}
1.4×10^9	20	20	20	0	30	100	2.8×10^6
1.4×10^8	20	20	10	10	10	50	
1.4×10^7	20	20	0	20	0	0	
1.4×10^6	20	20	0	20	0	0	
1.4×10^5	20	20	0	20	0	0	

表 4 菌株 AVCA07 对斑马鱼的半数致死量

Tab. 4 LD_{50} of *A.veronii* strain AVCA07 to *D. rerio*

菌液浓度/(CFU/mL) bacterial concentration	注射剂量/ μ L injection dosage	攻毒尾数/尾 challenged fish	死亡数/尾 dead fish	累计存活数/尾 cumulative survival	累计死亡数/尾 cumulative death	死亡率/% mortality	半数致死量/CFU LD_{50}
1.5×10^7	20	20	20	0	55	100	1.5×10^3
1.5×10^6	20	20	18	2	35	95	
1.5×10^5	20	20	13	9	17	65	
1.5×10^4	20	20	4	25	4	14	
1.5×10^3	20	20	0	45	0	0	

表 5 菌株 YC170511 对斑马鱼的半数致死量

Tab. 5 LD_{50} of *A.veronii* strain YC170511 to *D. rerio*

菌液浓度/(CFU/mL) bacterial concentration	注射剂量/ μ L injection dosage	攻毒尾数/尾 challenged fish	死亡数/尾 dead fish	累计存活数/尾 cumulative survival	累计死亡数/尾 cumulative death	死亡率/% mortality	半数致死量/CFU LD_{50}
2.3×10^7	20	20	20	0	64	100	1.1×10^3
2.3×10^6	20	20	20	0	44	100	
2.3×10^5	20	20	20	0	24	100	
2.3×10^4	20	20	4	16	4	20	
2.3×10^3	20	20	0	36	0	0	

势, 蜂胶-灭活疫苗组、ISA763A-灭活疫苗组分别于 5、7 d 达到最大值 3.44 倍和 3.32 倍 ($P < 0.05$), 其余各免疫组在 1~2 倍之间变化。各免疫组 *IL-1 β* 基因表达量整体呈现先上升后下降的趋势, 灭活疫苗组、蜂胶-灭活疫苗组分别于 5 d 达到最大值 4.05 倍 ($P < 0.01$) 和 6.13 倍 ($P < 0.0001$), 其余 4 组均在 5 d 达到最大值, 但与对照组之间无显著差异 ($P > 0.05$)。各免疫组 *LZM* 基因表达量高于 0.65% NaCl 组, 其中活疫苗组、ISA763A-灭活疫苗组均在免疫后 1 d 达到高峰, 分别是 0.65% NaCl 对照组的 8.10 倍和 9.56 倍 ($P < 0.01$), 其余各组在 0.5~2.0 倍 ($P > 0.05$)(图 1)。

2.3 血清的抗体水平

在免疫后 7、14、21、28、42 和 56 d, 经活疫苗、灭活疫苗、ISA763A-灭活疫苗及蜂胶-灭活疫苗免疫后的血清中, 特异性抗体水平与 0.65% NaCl 对照组相比都显著上调 ($P < 0.05$), 并且在免疫后 56 d 仍有较高的抗体水平。其中, ISA763A-灭活疫苗组抗体水平最高, 其次是蜂胶-灭活疫苗组。活疫苗组抗体水平高于灭活疫苗组。ISA763A 组和蜂胶组抗体水平略高于 0.65% NaCl 对照组, 但差异不显著 ($P > 0.05$)(图 2)。

2.4 血清的酶活性

超氧化物歧化酶 (SOD) 活性 异育银鲫经腹腔注射免疫后, 血清中 SOD 活性变化结果显示, 整体上在免疫后 7 d SOD 活性有显著升高, 之后呈现下降趋势。免疫后第 7 天, 灭活疫苗组、ISA763A-灭活疫苗及蜂胶-灭活疫苗的 SOD 活性值达到最大值, 且显著高于 0.65% NaCl 组 ($P < 0.001$), 免疫后第 14 天下降和 0.65% NaCl 组无显著差异 ($P > 0.05$); 免疫后第 28 天, ISA763A-灭活疫苗组和蜂胶-灭活疫苗组的 SOD 活性再次上升, 显著高于 0.65% NaCl 组 ($P < 0.001$)。免疫后第 56 天, 除蜂胶-灭活免疫组外, 其余各组 and 0.65% NaCl 组无显著差异 ($P > 0.05$)(图 3)。

溶菌酶 (LZM) 活性 异育银鲫经腹腔注射免疫后, 血清中 LZM 活性整体上呈现先上升后下降的趋势 (图 4), 免疫后 28 d, 各免疫组的 LZM 活性均达到最高值 ($P < 0.0001$)。

2.5 免疫效果

攻毒实验结果显示, 各实验组异育银鲫死亡时间在攻毒后 12~60 h, 60 h 后无死亡发生。

AVCA07 菌株攻毒后, 0.65% NaCl 对照组的死亡率为 90%, 活疫苗组、灭活疫苗组、ISA763A-灭活疫苗组、蜂胶-灭活疫苗组、ISA763A-0.65% NaCl 组和蜂胶-0.65% NaCl 组的死亡率分别为 33%、40%、0、40%、77% 和 73%, 相对保护率分别为 63%、56%、100%、56%、14% 和 19%。

YC170511 菌株攻毒后, 0.65% NaCl 对照组的死亡率为 97%, 活疫苗组、灭活疫苗组、ISA763A-灭活疫苗组、蜂胶-灭活疫苗组、ISA763A-0.65% NaCl 组和蜂胶-0.65% NaCl 组的死亡率分别为 57%、43%、7%、27%、67% 和 60%, 相对保护率分别为 59%、55%、93%、72%、31% 和 38%(图 5, 表 6)。

3 讨论

3.1 免疫相关基因表达

由 Av 天然弱毒株 FS12001 制备的活疫苗、灭活疫苗、ISA763A-灭活疫苗和蜂胶-灭活疫苗均能引起异育银鲫脾脏中 *IgM*、*IL-1 β* 及 *LZM* 免疫相关基因上调表达, 说明疫苗有效引起了异育银鲫的免疫反应, 这些基因参与了鱼体对疫苗的应答。本研究中, 2 种佐剂灭活疫苗组的基因表达量达到峰值的时间早、表达量高, 其余各免疫组达到峰值的时间迟、表达量低。如免疫后 5 d, 蜂胶-灭活疫苗组 *IgM* 上调表达峰值约为对照组的 3.4 倍, 而活疫苗组, 而活疫苗组, 而活疫苗组 7 d 达到峰值, 约为对照组的 1.9 倍; ISA763A-灭活疫苗组 *LZM* 1 d 上调表达峰值约为对照组的 9.6 倍, 而灭活疫苗组 7 d 达到峰值, 约为对照组的 1.8 倍; 免疫后 7 d, 蜂胶-灭活疫苗组 *IL-1 β* 表达峰值约为对照组的 6.1 倍, 而活疫苗组中约为 1.9 倍。Labarca 等^[14]用杀鲑气单胞菌 (*A. salmonicida*) 疫苗免疫虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*), *IL-1 β* 基因表达量最高可达对照组的 10 倍。含 CpG 基序的寡核苷酸佐剂的神经坏死病毒 (*nerve necrosis virus*) 疫苗注射免疫点带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*), 增强 *IFN*、*TNF- α* 和 *IRF3* 免疫相关基因的表达^[15]。含佐剂 IMS1312VG 的疫苗接种牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*), 其 *IL-1 β* 、*IL-6*、*IL-8* 和 *TLR3* 基因的相对表达量均出现上调^[16]。迟缓爱德华菌 (*Edwar hypheidsiella tarda*) 的主要菌毛亚单位蛋白作为佐剂与哈维氏弧菌 (*Vibrio harveyi*) 重组亚单位疫苗联用注射免疫大菱鲆 (*Scophthal-*

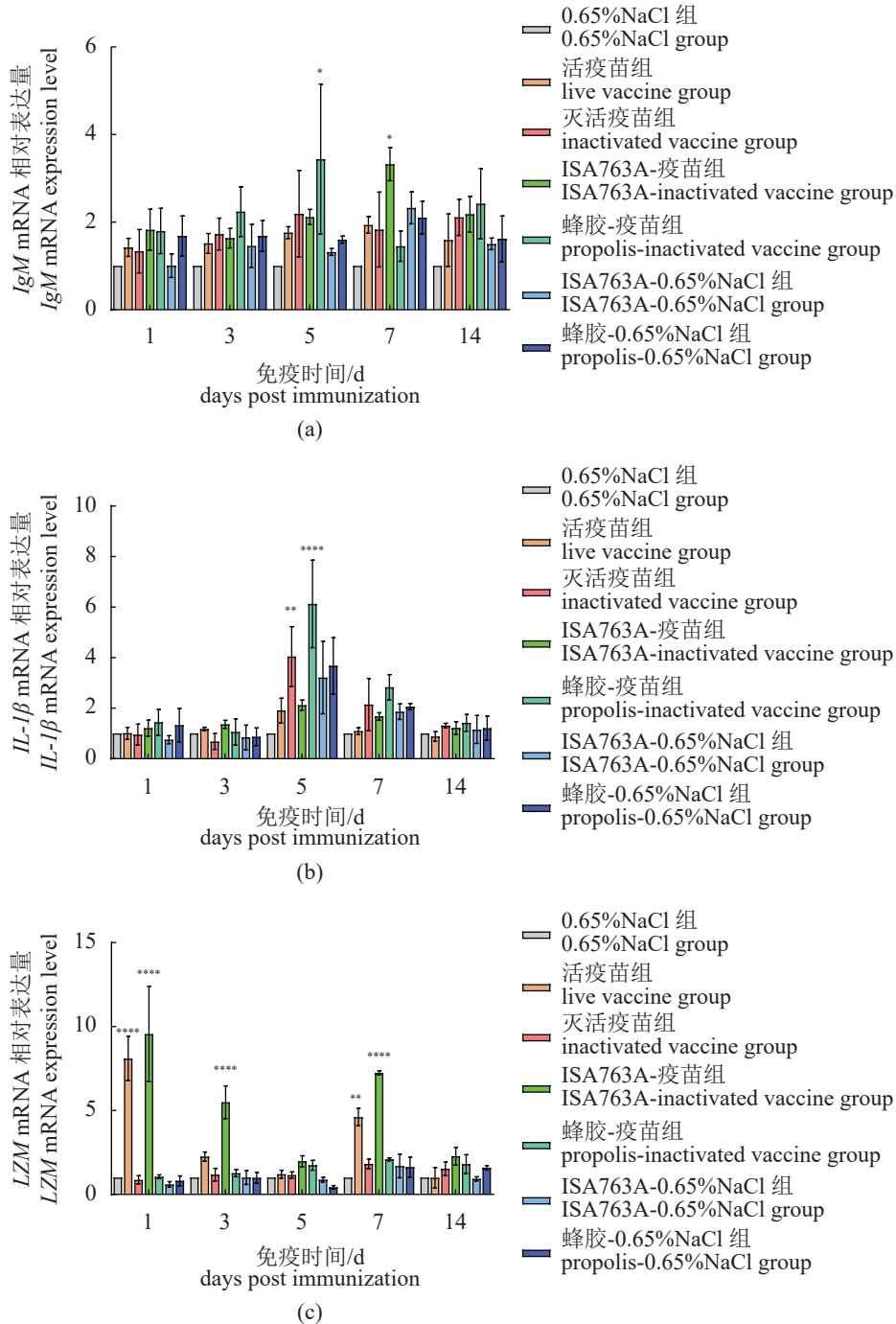


图 1 IgM(a), IL-1β(b) 和 LZM(c) 相对表达量

“*”代表具有显著差异 ($P < 0.05$); “***”, “****”和 “*****”代表具有极显著差异 ($P < 0.01$, $P < 0.001$ 和 $P < 0.0001$); 下同。

Fig. 1 Relative expression levels of IgM (a), IL-1β (b) and LZM (c) in spleen

“*” represents significant difference ($P < 0.05$); “***”, “****” and “*****” represent extremely significant difference ($P < 0.01$, $P < 0.001$ and $P < 0.0001$, respectively); the same blow.

mus maximus), 显著提高了脾脏中 IgM 基因的表达量^[17]。可见, 疫苗接种引起鱼体免疫相关基因表达量上调, 且添加佐剂的疫苗使鱼体基因表达时间更早、表达量更高, 推断佐剂能提高免疫相关基因的表达量。

3.2 血清特异性抗体水平

抗体或许是鱼类疫苗免疫效果最可靠的相关要素^[18-19]。本实验中各免疫组免疫 7 d 的血清中可以检测到特异性抗体, 56 d 仍有较高的水平。佐

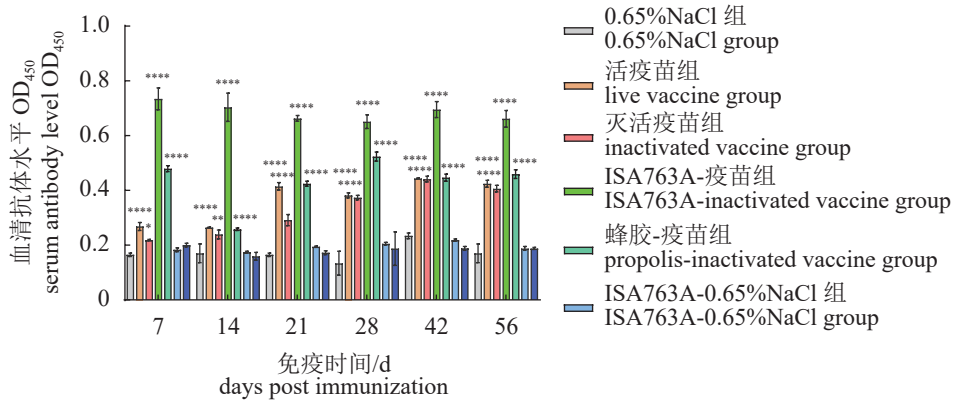


图 2 血清抗体水平

Fig. 2 Serum antibody level

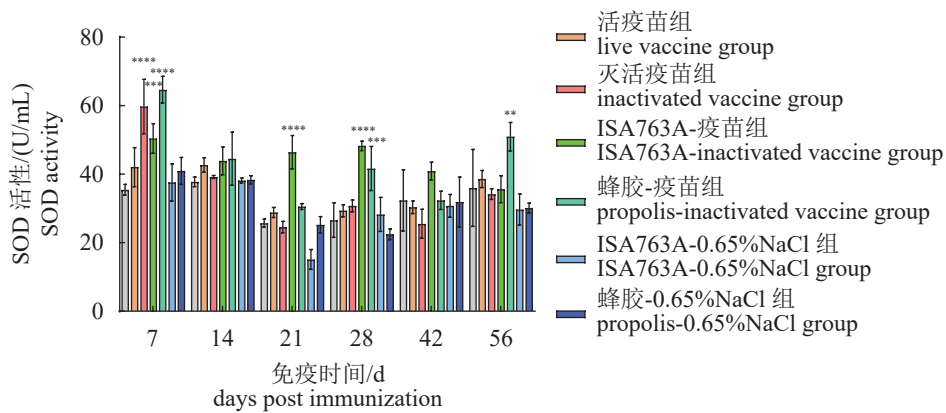


图 3 SOD 活性

Fig. 3 SOD activity

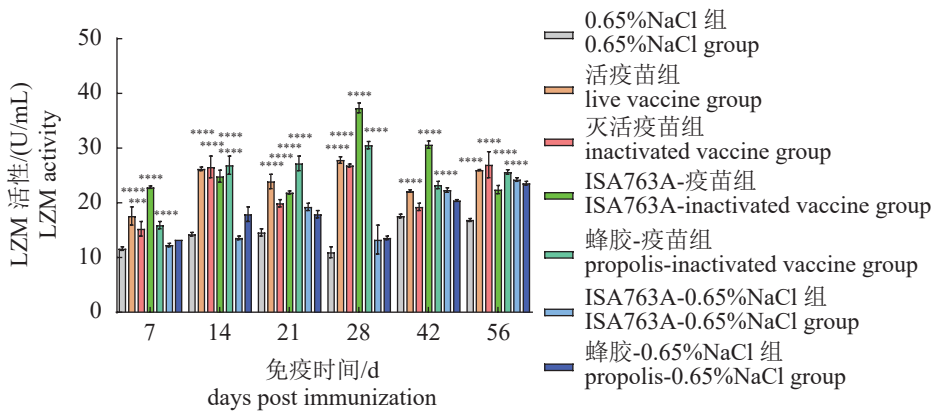


图 4 LZM 活性

Fig. 4 Lysozyme activity

剂-灭活疫苗组的抗体水平高于无佐剂组, 且出现峰值的时间早于其他组。无乳链球菌 (*Streptococcus agalactiae*) Sip 蛋白乳酸菌活载体疫苗口服免疫尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*), 能够显著提高血清抗体水平^[20]。Av 灭活疫苗免疫的锦鲤

(*Cyprinus carpio haematopterus*) 抗体水平于 3 周达到最大值, 并持续一段时间^[21]。将弗氏佐剂与人的 γ 球蛋白混合后注射接种大西洋庸鲈 (*Hippoglossus hippoglossus*), 结果发现佐剂疫苗组抗体水平显著高于无佐剂疫苗组^[22]。B 族链球菌的细胞

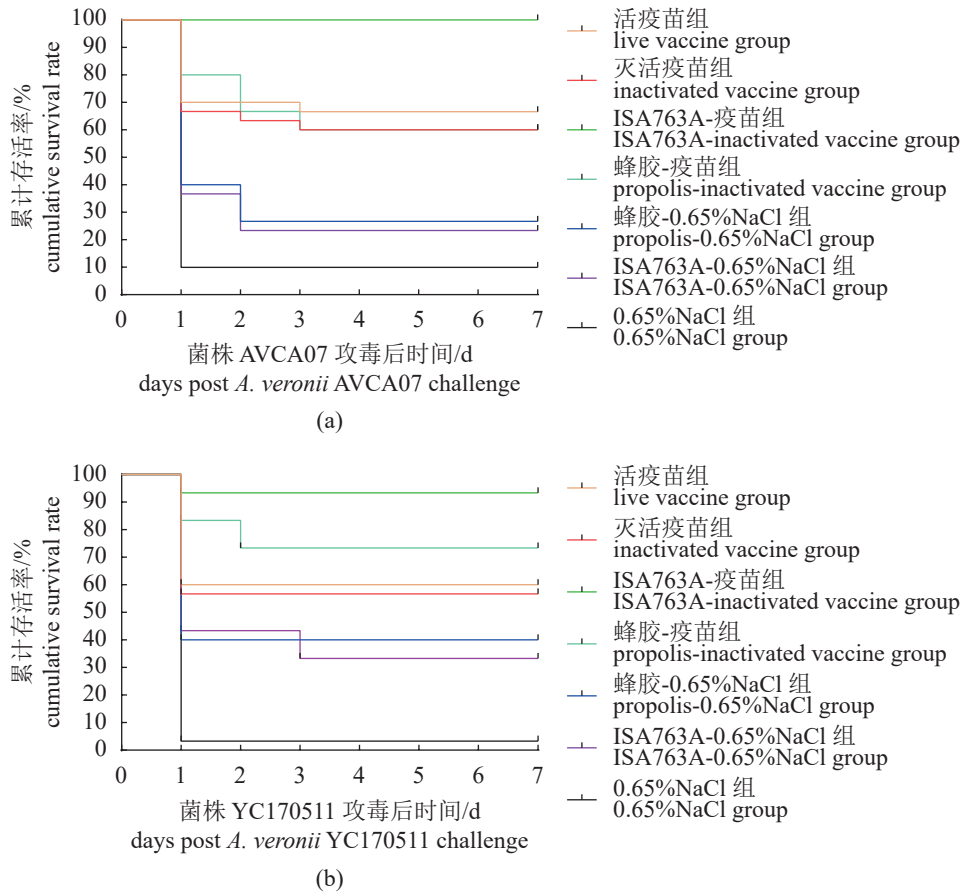


图 5 菌株 AVCA07(a) 和 YC170511(b) 攻毒后各实验组累计存活率

Fig. 5 The cummulative survival rate with *A. veronii* AVCA07 (a) and YC170511 (b) challenge

表 6 菌株 AVCA07 和 YC170511 攻毒结果

Tab. 6 The relative percent survival with *A. veronii* AVCA07 and YC170511 challenge

攻毒菌株 strain	分组 group	攻毒数/尾 challenged fish	死亡数/尾 dead fish	死亡率/% mortality	相对保护率/% relative percent survival
AVCA07	活疫苗组	30	10	33	63
	灭活疫苗组	30	12	40	56
	ISA763A-灭活疫苗组	30	0	0	100
	蜂胶-灭活疫苗组	30	12	40	56
	ISA763A-0.65%NaCl组	30	23	77	14
	蜂胶-0.65%NaCl组	30	22	73	19
	0.65%NaCl组	30	27	90	
YC170511	活疫苗组	30	12	40	59
	灭活疫苗组	30	13	43	55
	ISA763A-灭活疫苗组	30	2	7	93
	蜂胶-灭活疫苗组	30	8	27	72
	ISA763A-0.65%NaCl组	30	20	67	31
	蜂胶-0.65%NaCl组	30	18	60	38
	0.65%NaCl组	30	29	97	

表面蛋白与黏膜免疫佐剂免疫小鼠 (*Mus musculus*) 后, 能诱导较高的全身和局部抗体应答^[23]。

杨星等^[24]发现佐剂疫苗注射免疫大鲵 (*Andrias davidianus*) 后能有效刺激血清抗体的产生。本实

验表明, 菌株 FS12001 具有良好的免疫原性, 其活疫苗和灭活疫苗(添加或不添加佐剂)均能够诱导异育银鲫产生较高水平的抗体, 且在第 56 天仍维持较高水平。

3.3 血清 LZM 和 SOD 酶活性

LZM 是一种在宿主抵御细菌侵害过程中发挥作用的广泛存在的先天免疫分子, 对鱼类的免疫防御机制至关重要^[25]。鱼类特异性免疫反应差异较小, 对先天性免疫的依赖性更大^[26]。环境压力、细菌感染及营养条件等因素都会促进 LZM 活性的提升^[27]。本研究中疫苗注射后, 血清中 LZM 含量与 0.65% NaCl 对照组相比均增加。免疫后 28 d, 各免疫组的 LZM 活性均达到最高值, 总体上佐剂-灭活疫苗组增加的活性较为显著。松鼠葡萄球菌 (*Staphylococcus sciuri*) 灭活疫苗注射免疫鲫后, 血清中 LZM 含量与对照组相比增加^[28]。Ju 等^[29]研究发现鲤 (*C. carpio*) 通过口服免疫乳酸菌后 LZM 活性显著升高。实验表明, 菌株 FS12001 制备的疫苗能够提高血清中 LZM 含量, 对鱼体的保护性免疫发挥重要的作用。

超氧化物歧化酶(SOD)是机体重要的抗氧化酶^[30], 可以清除机体多余的自由基从而免除其对生物分子的损伤。机理是将体内有害的氧自由基还原成过氧化氢和氧气, 然后在过氧化氢酶的作用下生成无害的水和氧气。有研究表明 SOD 活性与机体免疫力紧密相关^[31]。锦鲤在注射 Av 灭活疫苗后, 4 周内 SOD 活性均显著高于对照组^[21]。异源无乳链球菌胞外产物灭活疫苗免疫罗非鱼, 28 d 血清 SOD 活性显著高于对照组^[32]。溶藻弧菌 (*V. alginolyticus*) 疫苗免疫黑棘鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*) 28 d 的 SOD 显著提高^[33]。本实验中, 4 个免疫组 SOD 活性均在第 7 天达到峰值。SOD 活性的增强促进鱼体对外来物质的清除作用, 以此提高机体的免疫力。

3.4 鱼体保护效果

弱毒疫苗是人工处理或自然因素致弱的失去致病能力而保留免疫原性的弱毒株制备的一种活疫苗^[34]。机体接种弱毒疫苗的过程与自然感染相似, 短期内迅速繁殖并激发机体的免疫系统, 随后被机体防御系统清除, 因此, 弱毒疫苗接种剂量较低, 并能获得持久免疫^[35]。灭活疫苗是将病原体扩大培养后, 采用物理或化学方法在保证免疫原性不受影响的情况下杀死病原菌的生物制

品^[36]。无佐剂的前提下, 弱毒活疫苗可能比灭活疫苗具有更好的应用前景。FS12001 活疫苗、灭活疫苗腹腔注射接种异育银鲫, 28 d 后用 AVCA07 攻毒, 相对保护率分别达到 63% 和 56%; 用 YC170511 攻毒, 相对保护率分别达到 59% 和 55%, 弱毒活疫苗比灭活疫苗保护效果更好, 与 Zhang 等^[37] 研究结论一致。这可能是因为弱毒活疫苗的抗原具有活性, 在鱼体内存在相对较长的时间, 而灭活疫苗失去活性, 进入机体后会快速清除, 缩短了其在机体内的停留时间, 不利于适应性免疫的激活^[38]。

佐剂能非特异性增强抗原的免疫原性, 使抗原在鱼体内缓慢持续地释放或改变免疫反应类型, 提高巨噬细胞和浆细胞的功能活性, 并加速抗体的生成, 从而增强灭活疫苗的免疫效果^[39]。张晓佩^[40] 研究发现, ISA763A 与迟缓爱德华氏菌鞭毛蛋白的融合蛋白乳化制备的疫苗, 对日本鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 免疫保护率为 100%, 而不加佐剂疫苗组则没有保护力。Jaafar 等^[41] 将 ISA763 A 与鲁氏耶尔森菌 (*Yersinia ruckeri*) 疫苗混合乳化后用于抗虹鳟的肠炎红口病, 商业化疫苗相对保护率只有 40%, 而添加佐剂疫苗组相对保护率达到 97.5%。本研究中 ISA763A- FS12001 灭活疫苗腹腔注射接种异育银鲫 28 d 后, 能抵抗 2 株 Av 强毒株感染, 相对保护率分别达到 100% 和 93%; 而不加佐剂的灭活疫苗组相对保护率分别仅为 56% 和 55%。可见, 加入 ISA763A 佐剂的疫苗能使鱼体产生更强的免疫力。蜂胶是中国兽药典批准的一种佐剂和免疫增强剂。Chu^[42] 用蜂胶佐剂疫苗注射免疫异育银鲫后, 与无佐剂全菌疫苗相比, 可显著提高异育银鲫的相对免疫保护率。杨星等^[24] 将蜂胶佐剂疫苗注射大鲵后能够快速刺激机体产生特异性免疫反应, 增强其机体的免疫保护能力。本研究中, 蜂胶-灭活疫苗腹腔注射接种异育银鲫 28 d 后用两株 Av 强毒株攻毒, 相对保护率分别达到 56% 和 72%。ISA763A 和蜂胶对异育银鲫也有一定的保护作用, 与 Jaafar 等^[41] 结论一致。其他佐剂也能提高疫苗对鱼体免疫保护力^[16, 43-46]。另外, 与一次免疫相比, 加强免疫可以提高宿主的抗体水平、延长抗体持续时间, 从而延长疫苗的免疫保护期, 增强保护作用^[47-49]。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

[1] Wang J T, Fang C T, Hsueh P R, et al. Spontaneous bac-

- terial empyema caused by *Aeromonas veronii* biotype sobria[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2000, 37(4): 271-273.
- [2] 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 淡水鱼细菌性败血症 [J]. *中国水产*, 2011(3): 54-55.
Chen A P, Jiang Y L, Qian D, *et al.* Freshwater fish bacteria septicemia[J]. *China Fisheries*, 2011(3): 54-55 (in Chinese).
- [3] 王启要. 中国鱼类疫苗技术研发及应用研究进展 [J]. *大连海洋大学学报*, 2022, 37(1): 1-9.
Wang Q Y. Fish vaccine technology development and application in China: a review[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2022, 37(1): 1-9 (in Chinese).
- [4] Ma J, Bruce T J, Jones E M, *et al.* A review of fish vaccine development strategies: conventional methods and modern biotechnological approaches[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(11): 569.
- [5] 张德锋, 刘礼辉, 李宁求, 等. 我国南方地区鱼源气单胞菌不同种类的流行特征 [J]. *水产科学*, 2015, 34(11): 673-682.
Zhang D F, Liu L H, Li N Q, *et al.* Epidemic characteristics of different species of *Aeromonas* in diseased fish in southern China[J]. *Fisheries Science*, 2015, 34(11): 673-682 (in Chinese).
- [6] 任燕, 高彩霞, 曾伟伟, 等. 两株草鱼源维氏气单胞菌菌株的主要表型特征及致病力比较 [J]. *中国预防兽医学报*, 2019, 41(2): 145-150.
Ren Y, Gao C X, Zeng W W, *et al.* Pathogenicity and main phenotype characteristics of two *Aeromonas veronii* isolated from diseased grass carp[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2019, 41(2): 145-150 (in Chinese).
- [7] 任燕, 王艳娇, 张德锋, 等. 一种鱼类维氏气单胞菌弱毒疫苗株及其应用: 中国, 117106613A[P]. 2023-11-24.
Ren Y, Wang Y J, Zhang D F, *et al.* An attenuated vaccine strain of *Aeromonas veronii* in fish and its application: CN, 117106613A[P]. 2023-11-24 (in Chinese).
- [8] 杨昆明, 郭爱民, 马江霞, 等. 河鲈细菌性肠炎致病菌的分离、鉴定及药敏实验 [J]. *渔业科学进展*, 2018, 39(6): 42-51.
Yang K M, Guo A M, Ma J X, *et al.* Isolation, identification, and antibiotic sensitivity of bacillary enteritis in *Perca fluviatilis* linnaeus[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(6): 42-51 (in Chinese).
- [9] Wangkahart E, Thongsrisuk A, Vialle R, *et al.* Comparative study of the effects of Montanide™ ISA 763A VG and ISA 763B VG adjuvants on the immune response against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 134: 108563.
- [10] 马光强, 刘丽娟, 陈国权, 等. 鸭疫里默氏杆菌贵州流行株蜂胶灭活疫苗制备 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(8): 3163-3170.
Ma G Q, Liu L J, Chen G Q, *et al.* Preparation of propolis inactivated vaccine of *Riemerella anatipestifer* epidemic strain in Guizhou[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2022, 49(8): 3163-3170 (in Chinese).
- [11] 时云朵, 任燕, 张德锋, 等. 山萘碱提高嗜水气单胞菌灭活疫苗浸泡免疫鲫的效果 [J]. *水产学报*, 2015, 39(5): 720-727.
Shi Y D, Ren Y, Zhang D F, *et al.* Anisodamine increases efficacy of *Aeromonas hydrophila* inactivated vaccine in gibel carp *Carassius auratus gibelio* by immersion immunization[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2015, 39(5): 720-727 (in Chinese).
- [12] Shoemaker C A, Lafrentz B R, Klesius P H, *et al.* Protection against heterologous *Streptococcus iniae* isolates using a modified bacterin vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2010, 33(7): 537-544.
- [13] Santos Y, Toranzo A E, Barja J L, *et al.* Virulence properties and enterotoxin production of *Aeromonas* strains isolated from fish[J]. *Infection and Immunity*, 1988, 56(12): 3285-3293.
- [14] Labarca C C, Makhutu M, Lumsdon A E, *et al.* The adjuvant effect of low frequency ultrasound when applied with an inactivated *Aeromonas salmonicida* vaccine to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Vaccine*, 2015, 33(11): 1369-1374.
- [15] 朱志煌, 林建伟. 神经坏死病毒疫苗免疫后 3 种免疫相关基因在斜带石斑鱼 (*Epinephelus coioides*) 组织中的表达研究 [J]. *渔业研究*, 2019, 41(6): 470-477.
Zhu Z H, Lin J W. Expression patterns of three immune-related genes in tissues of *Epinephelus coioides* after injecting nerve necrosis virus vaccine[J]. *Journal of Fisheries Research*, 2019, 41(6): 470-477 (in Chinese).
- [16] Hwang J Y, Kwon M G, Kim Y J, *et al.* Montanide IMS 1312 VG adjuvant enhances the efficacy of immersion vaccine of inactivated viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in olive flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 60: 420-425.
- [17] Wang C, Hu Y H, Chi H, *et al.* The major fimbrial subunit protein of *Edwardsiella tarda*: vaccine potential, adjuvant effect, and involvement in host infection[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2013, 35(3): 858-865.
- [18] Munang'andu H M, Evensen Ø. Correlates of protective immunity for fish vaccines[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2023, 134: 108563.

- logy, 2019, 85: 132-140.
- [19] Press C M, Evensen Ø, Reitan L J, *et al.* Retention of furunculosis vaccine components in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following different routes of vaccine administration[J]. *Journal of Fish Diseases*, 1996, 19(3): 215-224.
- [20] 蔡玉臻, 刘志刚, 卢迈新, 等. 尼罗罗非鱼无乳链球菌 Sip 蛋白乳酸菌活载体口服疫苗的研制及其免疫效果 [J]. *水产学报*, 2019, 43(3): 661-670.
- Cai Y Z, Liu Z G, Lu M X, *et al.* Preparation of live recombinant *Lactococcus lactis* vaccine expressing Sip protein of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*) and immunogenicity analysis[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(3): 661-670. (in Chinese).
- [21] 陈亨利, 莫金龙, 康元环, 等. 维氏气单胞菌灭活疫苗的制备及对锦鲤免疫效果评价 [J]. *中国兽医杂志*, 2016, 52(5): 110-113.
- Chen H L, Mo J L, Kang Y H, *et al.* Preparation of *Aeromonas veronii* inactivated vaccine and evaluate of immune effect on *koï*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2016, 52(5): 110-113 (in Chinese).
- [22] Bowden T J, Adamson K, MacLachlan P, *et al.* Long-term study of antibody response and injection-site effects of oil adjuvants in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, 14(4): 363-369.
- [23] Larsson C, Holmgren J, Lindahl G, *et al.* Intranasal immunization of mice with group B streptococcal protein rib and cholera toxin B subunit confers protection against lethal infection[J]. *Infection and Immunity*, 2004, 72(2): 1184-1187.
- [24] 杨星, 张美彦, 周勇, 等. 不同佐剂对大鲮嗜水气单胞菌灭活疫苗的免疫效果 [J]. *水生生态学杂志*, 2015, 36(5): 69-73.
- Yang X, Zhang M Y, Zhou Y, *et al.* Effect of adjuvants on the response of *Andrias davidianus* immunized with inactivated *Aeromonas hydrophila* vaccine[J]. *Journal of Hydroecology*, 2015, 36(5): 69-73 (in Chinese).
- [25] 张永安, 聂晶. 鱼类体液免疫因子研究进展 [J]. *水产学报*, 2000, 24(4): 376-381.
- Zhang Y A, Nie P. Humoral immune factors of fish: a review[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(4): 376-381 (in Chinese).
- [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] Cecchini S, Terova G, Caricato G, *et al.* Lysozyme activity in embryos and larvae of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), spawned by broodstocks fed with vitamin C enriched diets[J]. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 2000, 20(3): 120-124.
- [28] 马爽, 蒋弥, 李艳红, 等. 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 [J]. *水产学报*, 2022, 46(9): 1669-1679.
- Ma S, Jiang M, Li Y H, *et al.* Pathogenicity and inactivated vaccine protection of *Staphylococcus sciuri* JS-1 on *Carassius auratus*[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(9): 1669-1679 (in Chinese).
- [29] Ju A Q, Yang S B, Zhang H P, *et al.* Construction and immune efficacy of recombinant *Lactobacillus casei* strains expressing *Malt* from *Aeromonas veronii*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 141: 103918.
- [30] 闫文杰, 李兴民. 动物血液主要功能成分制备及应用研究进展 [J]. *食品研究与开发*, 2018, 39(16): 215-219.
- Yan W J, Li X M. Progress in preparation and application of main functional components from animal blood[J]. *Food Research and Development*, 2018, 39(16): 215-219 (in Chinese).
- [31] Chiu S T, Tsai R T, Hsu J P, *et al.* Dietary sodium alginate administration to enhance the non-specific immune responses, and disease resistance of the juvenile grouper *Epinephelus fuscoguttatus*[J]. *Aquaculture*, 2008, 277(1-2): 66-72.
- [32] 祝璟琳, 邹芝英, 李大宇, 等. 异源无乳链球菌胞外产物灭活疫苗对罗非鱼的免疫效果 [J]. *中国水产科学*, 2022, 29(2): 325-340.
- Zhu J L, Zou Z Y, Li D Y, *et al.* Immune efficacy of inactivated vaccine of heterologous *Streptococcus agalactiae* extracellular product in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀×*O. aureus*♂)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(2): 325-340 (in Chinese).
- [33] 王海芳, 孙际佳, 赵典惠, 等. 溶藻弧菌疫苗对黑鲷的免疫效果研究 [J]. *华南农业大学学报*, 2008, 29(1): 97-100,104.
- Wang H F, Sun J J, Zhao D H, *et al.* Studies on the vaccination against *Vibrio alginolyticus* in farmed marine *Sparus macrocephalus*[J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2008, 29(1): 97-100,104 (in Chinese).
- [34] Liu L, Wang X W, Mao R Q, *et al.* Research progress on live attenuated vaccine against African swine fever virus[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 158: 105024.
- [35] Mo X B, Wang J, Guo S, *et al.* Potential of naturally attenuated *Streptococcus agalactiae* as a live vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Aquaculture*,

- 2020, 518: 734774.
- [36] 孙恒昌, 陈庭金, 黄艳, 等. 鱼用疫苗研究进展 [J]. *热带医学杂志*, 2014, 14(12): 1651-1656.
Sun H C, Chen T J, Huang Y, *et al.* Research progress on fish vaccine[J]. *Journal of Tropical Medicine*, 2014, 14(12): 1651-1656 (in Chinese).
- [37] Zhang D F, Gao Y X, Li Q Y, *et al.* An effective live attenuated vaccine against *Streptococcus agalactiae* infection in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 98: 853-859.
- [38] Kim H J, Park J S, Choi M C, *et al.* Comparison of the efficacy of Poly (I: C) immunization with live vaccine and formalin-killed vaccine against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 48: 206-211.
- [39] Newman S G, Majnarich J J. Immunization of salmonids against furunculosis[J]. *Fish Pathology*, 1985, 20(2-3): 403-411.
- [40] 张晓佩. 迟缓爱德华氏菌鞭毛蛋白的研究 [D]. 福州: 福建师范大学, 2008.
Zhang X P. Research for the flagllin of *Edwardsiella tarda*[D]. Fuzhou: Fujian Normal University, 2008 (in Chinese).
- [41] Jaafar R M, Chettri J K, Dalsgaard I, *et al.* Effects of adjuvant Montanide™ ISA 763 A VG in rainbow trout injection vaccinated against *Yersinia ruckeri*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(2): 797-806.
- [42] Chu W H. Adjuvant effect of propolis on immunisation by inactivated *Aeromonas hydrophila* in carp (*Carassius auratus gibelio*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2006, 21(1): 113-117.
- [43] Strem R, Meiri-Ashkenazi I, Segal N, *et al.* Evaluation of flathead grey mullets (*Mugil cephalus*) immunization and long-term protection against *Vibrio harveyi* infection using three different vaccine preparations[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(9): 8277.
- [44] Evans J J, Klesius P H, Shoemaker C A. Efficacy of *Streptococcus agalactiae* (group B) vaccine in tilapia (*Oreochromis niloticus*) by intraperitoneal and bath immersion administration[J]. *Vaccine*, 2004, 22(27-28): 3769-3773.
- [45] Bastardo A, Ravelo C, Castro N, *et al.* Effectiveness of bivalent vaccines against *Aeromonas hydrophila* and *Lactococcus garvieae* infections in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 32(5): 756-761.
- [46] Lin Y J, Ren G M, Zhao J Z, *et al.* Long-term protection elicited by an inactivated vaccine supplemented with a water-based adjuvant against infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(6): e0324522.
- [47] 丁山, 李淑芳, 李杰, 等. 鳃弧菌三价灭活疫苗的长期免疫保护效果 [J]. *渔业科学进展*, 2018, 39(5): 137-142.
Ding S, Li S F, Li J, *et al.* Long-term protection effect of *Vibrio anguillarum* trivalent inactivated vaccine[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(5): 137-142. (in Chinese).
- [48] 杨先乐, 左文功. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究: 疫苗的稳定性和佐剂和加强免疫对草鱼免疫应答的影响 [J]. *水生生物学报*, 1993, 17(1): 46-52.
Yang X L, Zuo W G. Inactivated vaccine obtained through cell culture for hemorrhage of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*): the stability of vaccine and influence of adjuvants and booster immunisation on the immune response[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1993, 17(1): 46-52 (in Chinese).
- [49] Jaafar R, Al-Jubury A, Chettri J K, *et al.* Secondary immune response of rainbow trout following repeated immersion vaccination[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2018, 41(1): 117-123.

Immune effect of *Aeromonas veronii* vaccines prepared with a low pathogenic strain FS12001 to *Carassius auratus gibelio*

WANG Yanjiao^{1,2,3,4}, ZHANG Defeng^{1,2,3}, REN Yan^{1,2,3*}, WANG Qing^{1,2,3}, WANG Yingying^{1,2,3},
LI Yingying^{1,2,3}, PAN Houjun^{1,2,3}, SHI Cunbin^{1,2,3}, MO Xubing^{1,2,3}, YIN Jiyuan^{1,2,3}

- (1. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Aquatic Animal Immunology and Sustainable Aquaculture, Guangzhou 510380, China;
3. Key Lab of Fishery Drug Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510380, China;
4. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: *Aeromonas veronii* can infect a variety of aquatic and terrestrial animals and cause motile aeromonad septicemia (MAS). To explore the immune effect of the vaccine prepared with *A. veronii* low pathogenic strain FS12001, *Carassius auratus gibelio* were immunized with live vaccine, inactivated vaccine, ISA763A-inactivated vaccine and propolis-inactivated vaccine prepared with FS12001 through intraperitoneal injection, with ISA763A-0.65% NaCl, propolis-0.65% NaCl and 0.65% NaCl used as controls. The gene expressions of *IgM*, *IL-1 β* and *LZM* were detected by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) in spleen tissues at 1, 3, 5, 7 and 14 d post immunization (dpi). Sera were collected from the tail vein at 7, 14, 21, 28, 42 and 48 dpi. The specific antibody IgM levels were detected through indirect ELISA. SOD activity and LZM activity were measured. The experimental groups were challenged with two *A. veronii* virulent strains at 28 dpi, and the relative percent survival (RPS) was calculated. The gene expressions of *IgM*, *IL-1 β* and *LZM* in spleen tissues of each immunized group were higher than those of the 0.65% NaCl control, and the expressions of ISA763A-inactivated vaccine group and propolis-inactivated vaccine group were significantly higher than those of all other groups. The serum-specific antibody levels of each vaccine-immunized group were significantly higher than those of the 0.65% NaCl and adjuvant controls. LZM activity values were highest at 28 dpi in all vaccine-immunized groups, and SOD activity values were the highest at 7 dpi in the inactivated vaccine group, ISA763A-inactivated vaccine group and propolis-inactivated vaccine group. The RPSs of live vaccine group, inactivated vaccine group, ISA763A-inactivated vaccine group and propolis-inactivated vaccine group challenged with AVCA07 were 63%, 56%, 100% and 56%, respectively, and the RPSs of these immune groups challenged with YC170511 were 59%, 55%, 93% and 72%, respectively. This study shows that the several vaccines prepared with *A. veronii* FS12001 can increase the gene expressions of *IgM*, *IL-1 β* and *LZM*, serum specific antibody level, SOD activity and LZM activity, and enhance the ability of *C. auratus gibelio* to resist *A. veronii* infection. This study can provide the basis for *A. veronii* vaccines and prevention and control of MAS.

Key words: *Carassius auratus gibelio*; *Aeromonas veronii*; low pathogenic strain; vaccine; immune effect

Corresponding author: REN Yan. E-mail: renyannj@126.com

Funding projects: Guangdong Province Key Areas of Research and Development Plan ' Precision Agriculture ' Key Projects (2021B0202040002) ; China Agriculture Research System (CARS-45); Guangdong Province Modern Agricultural System Innovation Team Building Special Project (2023KJ150); Central Public-interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2023TD49)