

徐 洋,尹文林,姚嘉赞,等. 黄颡鱼鲇鱼爱德华氏菌弱毒株的分离、鉴定及免疫原性[J]. 江苏农业科学,2018,46(20):187-190.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.20.048

黄颡鱼鲇鱼爱德华氏菌弱毒株的 分离、鉴定及免疫原性

徐 洋,尹文林,姚嘉赞,蔺凌云,袁雪梅,潘晓艺,沈锦玉

(农业部淡水渔业健康养殖重点实验室/浙江省鱼类健康与营养重点实验室/浙江省淡水水产研究所,浙江湖州 313001)

摘要:为了研发 1 种黄颡鱼鲇鱼爱德华氏菌弱毒活疫苗,以开展候选弱毒株的筛选,从湖州地区患“裂头病”的黄颡鱼体内分离到 1 株细菌,暂命名为 AW30726K。应用理化特性及 16S rRNA 对其进行鉴定,并展开致病性和免疫原性研究。结果显示,AW30726K 为鲇鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*),该菌对黄颡鱼(100 ± 2) g 的 LD_{50} 为 9.33×10^9 CFU/mL,不同免疫途径下的活菌免疫保护率为 74%~100%,血清抗体效价均在 21 d 达到峰值,且免疫效果以注射免疫为最佳,而浸泡与口服免疫效果相近。上述研究表明,新分离的 AW30726K 为鲇鱼爱德华氏菌弱毒株,能有效防御鲇鱼爱德华氏菌的感染,可作为弱毒疫苗的候选株。

关键词:黄颡鱼;鲇鱼爱德华氏菌;弱毒株;分离鉴定;免疫原性

中图分类号: S941.42 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)20-0187-04

鲇鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)是一种兼性的胞内寄生菌,为革兰氏阴性短杆菌,隶属于肠杆菌科、爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)^[1]。该菌最早发现于美国患肠道败血症(enteric septicemia of catfish,ESC)的斑点叉尾鲶,其感染宿主主要为鲇形目鱼类^[2],在我国易感染鲇形目鱼类黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*),并导致“裂头病”,主要症状为感染病鱼严重时下颌皮肤破损出血呈圆形孔洞,头骨裂开,在头顶出现 1 条狭长的溃烂出血带,呈现典型的“裂头”。该病在每年 6—9 月间黄颡鱼主养地区大规模暴发,发病率在 50%以上,发病后死亡率为 70%~100%,给养殖业造成巨大经济损失。目前,黄颡鱼“裂头病”的防治主要依赖消毒剂及抗生素等化学杀菌药物^[3-4],但收效甚微,且产生了大量的耐药性菌株,造成药物残留,同时导致严重的环境污染。而鲇鱼爱德华氏菌是胞内寄生菌,传统灭活疫苗收效甚微。本试验从浙江省湖州市的黄颡鱼“裂头病”病料中分离到鲇鱼爱德华氏菌并对其进行鉴定和致病性试验,同时对其免疫原性进行初步分析,为进一步研究毒力因子与弱毒菌苗等提供材料。

1 材料与方法

1.1 材料

试验鱼:病鱼采集自浙江省湖州市东林镇保丰村黄颡鱼养殖场;健康黄颡鱼购自浙江省湖州市东林镇南星田黄颡鱼养殖场,平均体质量(100 ± 2) g。

主要试剂:TSB、TSA 和药物敏感试纸,均购自杭州天和

收稿日期:2017-01-15

基金项目:浙江省公益技术应用研究项目(编号:2017C32051);浙江省科研院所扶持专项(编号:2018F10014)。

作者简介:徐 洋(1985—),女,浙江永康人,副研究员,主要从事水产病害防治研究。E-mail:fionxu@foxmail.com。

通信作者:沈锦玉,研究员,主要从事水产病害防治研究。E-mail:sjinyu@126.com。

微生物试剂有限公司;细菌 16S rDNA 基因扩增通用引物合成和基因测序,均由生工生物工程(上海)有限公司完成;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 试剂盒和 DNA Marker,均为 Biomiga 公司产品。

1.2 细菌的分离

取所采集病样的脑、肝、脾、肾脏接种于 TSA 培养基,置于 28℃ 恒温培养 48 h,挑选单个优势菌落进行纯化培养,于 TSB 培养基中扩大培养,菌液加甘油于 -80℃ 保存,备用。

1.3 细菌的鉴定

1.3.1 形态特征 将病原菌接种于 TSB 培养基,28℃ 恒温培养 48 h,观察菌落的形态;挑取单菌落进行革兰氏染色,100 倍油镜下观察菌体颜色与形态。

1.3.2 生理生化鉴定 参照《伯杰细菌鉴定手册》第八版、《常见细菌系统鉴定手册》和《细菌属的鉴定指导》,将病原菌交由嘉兴蓝诺盛生物科技有限公司进行生理生化鉴定。

1.3.3 16S rDNA 基因序列测定 采用 16S rDNA 的通用引物,正向引物 sgF:5'-AGAGTTTGATCATGCTCAG-3';反向引物 SgR:5'-TAGCGTTACCTTGTACGACTT-3'进行扩增,目的片段长度 1 500 bp。扩增条件为:94℃ 预变性 4 min;94℃ 40 s,54℃ 40 s,72℃ 90 s,35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物交由生工生物工程(上海)有限公司测序,测序结果进行 Blast 比对分析。

1.4 毒力测定试验

将菌株 10 倍稀释成 $10^6 \sim 10^{11}$ CFU/mL 的菌悬液,肌肉注射健康黄颡鱼(100 ± 2) g,注射 0.1 mL/尾,对照组注射等量无菌 PBS,每组放养 30 尾,试验组设置 2 组重复。水温控制在 (28 ± 1) ℃,饲养观察 14 d,随后记录发病症状和死亡情况,并对死亡病料进行细菌分离鉴定,细菌的半数致死量根据死亡率用改良寇氏法计算。

1.5 免疫原性试验

1.5.1 免疫原的制备 AW30726K 于 TSB 培养基中扩大培

养,活菌计数后离心用生理盐水进行稀释,使菌浓度达到 10⁹ CFU/mL,无需灭活即为弱毒株免疫原。

1.5.2 免疫接种 将所制备免疫原通过注射、浸泡及口服 3 种途径对健康黄颡鱼进行免疫。注射免疫:采用腹腔注射接种 0.1 mL/尾,每组注射 50 尾健康黄颡鱼;对照组注射 0.1 mL/尾 无菌 PBS,共注射 50 尾。浸泡免疫:采用短时浸泡免疫法,将免疫原以无菌 PBS 稀释 100 倍,浸泡 5 min,每组浸泡 50 尾健康黄颡鱼;对照组浸泡无菌 PBS 共 50 尾。口服免疫:0.1 mL/尾连续灌喂 7 d,每组灌喂 50 尾健康黄颡鱼;对照组灌喂 0.1 mL/尾 无菌 PBS,连续灌喂 7 d,共计 50 尾。试验期间,试验鱼及对照组均每天早晚投喂饲料。

1.5.3 血清样本的采集 上述免疫、对照组的黄颡鱼分别于免疫接种 7、14、21、28 d 时,随机采集 3 尾黄颡鱼进行尾静脉采血,收集血清。

1.5.4 免疫效果评价

1.5.4.1 免疫保护力 免疫接种结束 28 d 后,腹腔注射 1 mL/尾 50 倍 LD₅₀ 强毒株,免疫鱼和对照鱼一同攻毒,记录各组的死亡情况,计算免疫保护率。

免疫保护率(RPS) =
$$\frac{\text{攻毒对照组阳性率} - \text{免疫组阳性率}}{\text{攻毒对照组阳性率}} \times 100\%。$$

1.5.4.2 三抗体夹心酶联免疫吸附法 将收集的血清用三抗体夹心酶联免疫吸附法进行检测。具体方法如下:包被 AW30726K 抗原 10⁸ CFU/mL,100 μL/孔,4 ℃ 过夜;PBST 洗涤 3 次,加入封闭液,200 μL/孔,37 ℃ 孵育 3 h;PBST 洗涤 3 次,加入 1 : 100 的免疫后待测鱼血清,100 μL/孔,37 ℃ 孵育 1.5 h;PBST 洗涤 3 次,加入 1 : 1 000 的黄颡鱼免疫球蛋白单克隆抗体,100 μL/孔,37 ℃ 孵育 1.5 h;PBST 洗涤 3 次,加入 1 : 1 000 的辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG,100 μL/孔,

37 ℃ 孵育 1.5 h;PBST 洗涤 3 次,加入 TMB 显色液,100 μL/孔,37 ℃ 孵育 20 ~ 30 min,加入 2 mol/L 硫酸溶液终止反应,500 μL/孔;结果判定用自动酶标仪读取 D_{450 nm} 值 (P/N ≥ 2.1 判为阳性,P/N < 2.1 判为阴性)。

2 结果与分析

2.1 细菌的分离结果

从典型“裂头病”病样的肾脏中分离到 1 株细菌,暂命名为 AW30726K。菌落特征为在 TSA 培养基上呈圆形光滑、隆起、半透明的灰白色小菌落,该菌落生长缓慢,28 ℃ 培养 48 h 才能形成直径为 0.2 mm 菌落。

2.2 病原菌的鉴定结果

2.2.1 形态学鉴定 经革兰氏染色镜检,该菌为革兰氏阴性菌,0.8 μm × 2.0 μm。其形态特征为短杆状、单生、不生芽孢、无荚膜(图 1)。

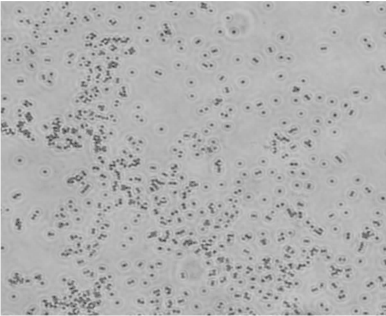


图1 菌株革兰氏染色结果

2.2.2 生理生化鉴定 参照《伯杰细菌鉴定手册》第八版、《常见细菌系统鉴定手册》及《细菌属的鉴定指导》,由表 1 可知,初步确定病原菌为鲇鱼爱德华氏菌 *Edwardsiella ictaluri*。

表 1 菌株的生化鉴定结果

| 测定项目 | 结果 | 测定项目 | 结果 |
|--|----|--------------------------------|----|
| L - 吡咯烷基芳胺酶 (PyrA) | - | L - 阿拉伯醇 (IARL) | - |
| D - 纤维二糖 (Dcel) | - | β - 半乳糖苷酶 (β - GAL) | - |
| H ₂ S 产生 (H ₂ S) | - | β - N - 乙酰葡萄糖胺酶 (BNAG) | + |
| 谷氨酰芳胺酶 (AGLTp) | - | D - 葡萄糖 (dGLU) | + |
| γ - 谷氨酰转移酶 (GGT) | - | 葡萄糖发酵 (OFF) | - |
| 黄色素 | - | β - 葡萄糖苷酶 (BGLU) | - |
| D - 麦芽糖 (dMAL) | - | D - 甘露醇 (dMAN) | - |
| D - 甘露糖 (dMNE) | + | β - 木糖苷酶 (BXYL) | - |
| β - 丙氨酸芳胺酶 (BALap) | - | L - 脯氨酸芳胺酶 (ProA) | - |
| 酯酶 (LIP) | - | 古老糖 (PLE) | - |
| 酪氨酸芳胺酶 (TyrA) | - | 尿素酶 (URE) | - |
| D - 山梨醇 (dSOR) | - | α - 丙氨酸 - 苯丙氨酸 - 脯氨酸芳胺酶 (APPA) | - |
| 侧金盏花醇 (ADO) | - | 蔗糖 (SAC) | - |
| D - 塔格糖 (Dtag) | - | D - 海藻糖 (dTRE) | - |
| 丙二酸盐 (MNT) | - | 柠檬酸盐 (钠) (CIT) | - |
| 5 - 酮 - 葡萄糖酸盐 (5KG) | - | 乳酸盐产碱 (ILATk) | - |
| α - 葡萄糖苷酶 (AGLU) | - | 琥珀酸盐产碱 (SUCT) | - |
| N - 乙酰 - β - 半乳糖胺酶 (NAGA) | - | α - 半乳糖苷酶 (AGAL) | - |
| 磷酸酶 (PHOS) | + | 氨基乙酸芳胺酶 (GlyA) | - |
| 鸟氨酸脱羧酶 (ODC) | - | 赖氨酸脱羧酶 (LDC) | - |
| L - 组氨酸同化 (IHISa) | - | COURMARATE (CMT) | - |
| β - 葡萄糖苷酶 (BGUR) | - | 谷氨酸 - 甘氨酸 - 精氨酸芳胺酶 (GGAA) | - |
| O/129 耐受 (O129R) | - | L - 苹果酸盐同化 (IMLTa) | - |
| ELLMAN (ELLM) | + | | |

注: + 指阳性; - 指阴性; F 指发酵型。

2.2.3 16S rDNA 基因序列测定 病原菌经细菌 16S rRNA 基因通用引物扩增后得到 1 kb 的片段,对基因核苷酸序列的同源性分析发现与鲑鱼爱德华氏菌标准菌株(ATCC33202)的保守性片段同源性为 99%,结合形态学及生理生化特征判定为鲑鱼爱德华氏菌。

2.3 菌株的毒力

腹腔注射细菌悬液的人工感染方法能使健康的黄颡鱼发病,且人工感染症状与自然发病症状相似,即病鱼头顶发红、

溃烂,腹腔有腹水等症状。人工感染的结果见表 2。

改进的寇氏法公式计算半数致死量的公式: $lgLD_{50} = X_k - d(\sum P_i - 0.5)$,其中 X_k 为最大对数剂量, d 为相邻 2 组对数剂量之差数, P_i 为死亡率, i 为组号,可以计算出菌株对黄颡鱼的半数致死量。

AW30726K 株对黄颡鱼的半数致死量 $lgLD_{50} = lg(10^{10}) - 1 \times (10/30 + 6/30 - 0.5) = 9.97$,所以 $LD_{50} = 9.33 \times 10^9$ CFU/mL。

表 2 人工回感试验 7 d 内死亡情况

| 细菌编号 | 菌浓度 (CFU/mL) | 试验鱼数 (尾) | 感染后每日平均死亡数(尾) | | | | | | | 死亡总数 (尾) | 死亡率 (%) |
|----------|-----------------|-------------|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|------------|
| | | | 第 1 天 | 第 2 天 | 第 3 天 | 第 4 天 | 第 5 天 | 第 6 天 | 第 7 天 | | |
| AW30726K | 10^{11} | 30 | 0 | 1 | 2 | 2 | 3 | 1 | 1 | 10 | 33.3 |
| | 10^{10} | 30 | 0 | 0 | 3 | 0 | 2 | 1 | 0 | 6 | 20.0 |
| | 10^9 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 |
| | 10^8 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 |
| | 10^7 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 |
| | 10^6 | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 |
| 生理盐水 | | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.0 |

2.4 免疫保护力

由表 3 可知,免疫效果以注射最佳,浸泡与口服的效果相近。

表 3 弱毒株免疫试验结果

| 免疫原 | 免疫途径 | 死亡数 (尾) | 死亡率 (%) | 免疫保护率 (%) |
|-----|------|------------|------------|--------------|
| 弱毒株 | 注射 | 0 | 0 | 100 |
| | 浸泡 | 13 | 26 | 74 |
| | 口服 | 13 | 26 | 74 |
| 对照组 | 注射 | 50 | 100 | 0 |
| | 浸泡 | 50 | 100 | 0 |
| | 口灌 | 50 | 100 | 0 |

2.5 免疫效果评价

将所收集血清用三抗体夹心酶联免疫吸附法进行检测,由图 2 可知,注射免疫效价最高,AW30726K 弱毒活疫苗在免疫后 21 d 出现峰值。浸泡免疫效价次之,AW30726K 弱毒活疫苗在免疫后 21 d 出现峰值。口服免疫效价不高,且与 PBS 对照差异不大。

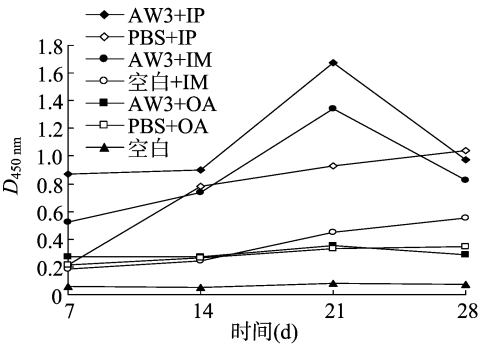


图2 免疫组和对照组血清抗体效价变化趋势

3 讨论

黄颡鱼“裂头病”最早报道于 2008 年^[2],其后在浙江、湖南、湖北等黄颡鱼主养区相继发现该病例^[3-8]。目前,对该病

的病原研究已较为深入,大部分学者认为其病原是鲑鱼爱德华氏菌^[3-6],但也有相关研究表明引起该病的病原菌为迟钝爱德华氏菌^[9-10],考虑与地域、环境等因素有关^[11]。本研究从患“裂头病”的黄颡鱼体内分离得到 1 株优势菌株,通过人工注射感染健康黄颡鱼成功复制典型“裂头病”症状,且从人工感染病样体内分离到相同菌株,证明这株优势菌为“裂头病”病原菌。根据形态特征、理化特性结果,结合 16S rDNA 基因序列测定及系统分析,最终确定其为鲑鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)。这与周冬仁等、郑善坚等、徐进等和耿毅等的研究结果^[3-6]一致。

鲑鱼爱德华氏菌为革兰氏阴性短杆菌,隶属于肠杆菌科、爱德华氏菌属(*Edwardsiella*)。该菌最早发现自美国患肠道败血病(enteric septicemia of catfish, ESC)的斑点叉尾鲷^[12],目前世界卫生组织已将 ESC 列为重要的鱼病^[13],ESC 的暴发给斑点叉尾鲷养殖业造成了巨大的损失,占全部死亡的 47%^[14]。鲑鱼爱德华氏菌感染宿主主要为鲑形目鱼类,是一种重要的鱼类病原菌^[15-20]。目前,对黄颡鱼裂头病的防治依赖于抗生素^[21],该菌对四环素类、磺胺类、头孢类药物敏感,但由于药物很难通过血脑屏障到达脑部,并且易诱导产生耐药菌,因此建议以预防为主。

疫苗是预防疾病最有效的方法,20 世纪 90 年代 Vinitnantharat 等就已对斑点叉尾鲷注射 *E. ictaluri* 细胞提取物与全细胞疫苗^[22];Klesius 等用利福平处理鲑鱼爱德华氏菌制备弱毒疫苗,对不同血清型的平均相对免疫保护率为 64.6%^[23]。近年来,我国也研发了黄颡鱼鲑鱼爱德华氏菌灭活疫苗,免疫保护率达 70.2%^[24];以及斑点叉尾鲷菌蛻疫苗免疫保护率达到 89.3%^[25]。考虑鲑鱼爱德华氏菌是胞内寄生菌^[26],传统的菌体灭活疫苗效果不佳,因此致力于研发一种黄颡鱼鲑鱼爱德华氏菌弱毒活疫苗。为此开展弱毒疫苗候选菌株的筛选工作,通过致病性研究明确 AW30726K 对黄颡鱼(100 ± 2) g 的 LD₅₀ 为 9.33 × 10⁹ CFU/mL,证明 AW30726K 是天然弱毒株。同时,对 AW30726K 开展免疫原性研究,在菌浓度为 10⁹ CFU/mL,注射组免疫保护率达 100%,浸泡和口

服组均为 74%, 相较隗黎丽等利用从患病黄颡鱼脑部组织分离出的致病菌株 JXHS 制备黄颡鱼鲇鱼爱德华氏菌的灭活疫苗, 免疫保护率为 70.2%^[24], 其效果更显著。

血清抗体效价结果表明, 不同的免疫途径效果差异明显, 注射效果优于浸泡, 浸泡效果优于口服, 但都在免疫后 21 d 出现峰值。虽然浸泡组和口服组免疫保护力相差不大, 但血清抗体效价结果却差距很大, 这或许和口服组的细胞免疫和黏膜免疫有关, 弱毒活疫苗诱导特异性的细胞免疫反应也会产生有效的免疫保护。结合生产实际, 注射组虽然效果最佳, 但在生产中难以操作, 因为黄颡鱼通常在放苗前进行疫苗免疫, 其个体仅约 20 g, 注射免疫对其应激较大, 且操作成本很高^[27], 浸泡和口服免疫保护率相近, 虽然浸泡免疫最易操作, 但由于弱毒活疫苗在浸泡中存在诸多的安全隐患^[28], 因此研发适合口服的弱毒活疫苗将成为预防该病的最佳方式。

参考文献:

- [1] 黄 峰, 严安生, 熊传喜, 等. 黄颡鱼的含肉率与鱼肉营养评价[J]. 淡水渔业, 1999, 29(10): 3-6.
- [2] 叶仕根. 黄颡鱼“红头病”——一种新的细菌性传染病[J]. 科学养鱼, 2008(1): 56-57.
- [3] 周冬仁, 叶雪平, 罗毅志, 等. 黄颡鱼鲇鱼爱德华氏菌的鉴定及生物学特性研究[J]. 水生生物学报, 2010, 34(4): 862-865.
- [4] 郑善坚. 黄颡鱼红头病病原研究[J]. 水产科学, 2009(12): 757-759.
- [5] 徐 进, 罗晓松, 曾令兵. 3 黄颡鱼鲇鱼爱德华氏菌的分离鉴定及其致病性研究[J]. 淡水渔业, 2009, 39(6): 47-53.
- [6] 耿 毅, 汪开毓, 范方玲, 等. 养殖黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(1): 61-67.
- [7] 陈保立, 李 丹. 黄颡鱼“裂头病”病因调查[J]. 吉林农业, 2010(4): 57-58.
- [8] Ye S, Li H, Qiao G, et al. First case of *Edwardsiella ictaluri* infection in China farmed yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. Aquaculture, 2009, 292(1/2): 6-10.
- [9] 邓先余, 罗 文, 谭树华, 等. 黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)“红头病”病原菌迟钝爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)的分离及鉴定[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(5): 511-516.
- [10] 陈飞鹏. 黄颡鱼“裂头病”病原、病理及同工酶研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2010.
- [11] 隗黎丽, 吴华东, 阮记明. 黄颡鱼鲈鱼爱德华氏菌的分离及鉴定[J]. 江西农业大学学报, 2014, 36(1): 187-192.
- [12] Hawke J P. Bacterium associated with disease of pond cultured channel catfish, *Ictalurus punctatus* [J]. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 1979, 36(12): 1508-1512.
- [13] 世界动物卫生组织鱼病专家委员会. 国际水生动物卫生法典第三版(2000)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 59.
- [14] Hawke J P, Durborow R M, Thune R L, et al. ESC - Enteric

- septicemia of catfish [M]. Southern Regional Aquaculture Center, 1998.
- [15] 邓显文, 谢芝勋, 刘加波, 等. 广西斑点叉尾鲷爱德华氏菌的分离鉴定[J]. 广西农业科学, 2008, 39(2): 231-235.
- [16] Crumlish M, Dung T T, Turnbull J F, et al. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (sauvage), cultured in the Mekong delta, Vietnam [J]. Journal of Fish Diseases, 2002, 25(12): 733-736.
- [17] Iwanowicz L R, Griffin A R, Cartwright D D, et al. Mortality and pathology in brown bullheads *Amieurus nebulosus* associated with a spontaneous *Edwardsiella ictaluri* outbreak under tank culture conditions[J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2006, 70(3): 219-225.
- [18] Yuasa K, Kholidin E B, Panigoro N, et al. First isolation of *Edwardsiella ictaluri* from cultured striped catfish *Pangasius hypophthalmus* in Indonesia [J]. Fish Pathology, 2003, 38(4): 181-183.
- [19] Kasornchandra J, Rogers W A, Pulmb J A, et al. *Edwardsiella ictaluri* from walking catfish[J]. Journal of Fish Diseases, 1987, 10(2): 137-138.
- [20] Keskin O, Secer S U, Izgür M, et al. *Edwardsiella ictaluri* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences, 2004, 28(4): 649-653.
- [21] McGinnis A, Gaunt P, Santucci T, et al. *In vitro* evaluation of the susceptibility of *Edwardsiella ictaluri*, etiological agent of enteric septicemia in Channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), to florfenicol[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2003, 15(6): 576-579.
- [22] Vinitnantharat S, Plumb J A. Kinetics of the immune response of Channel catfish to *Edwardsiella ictaluri* [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1992, 4(3): 207-214.
- [23] Klesius P H, Shoemaker C A, Rot D S. Development and use of modified live *Edwardsiella ictaluri* vaccine against enteric septicemia of catfish [J]. Advances in veterinary medicine, 1999, 41: 523-537.
- [24] 隗黎丽, 刘 毅, 周秋白, 等. 鲈鱼爱德华氏菌灭活疫苗对黄颡鱼免疫效果[J]. 南昌大学学报(理科版), 2014, 38(3): 263-267.
- [25] 王荣华. 鲈鱼爱德华氏菌(*Edwardsiella ictaluri*)菌蛻疫苗的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.
- [26] 陈翠珍. 爱德华氏菌及鱼类爱德华氏菌病[J]. 河北科技师范学院学报, 2004, 18(3): 70-76.
- [27] Nakanishi T, Kiryu I, Otodate M. Development of a new vaccine delivery method for fish: *percutaneous* administration by immersion with application of a multiple puncture instrument [J]. Vaccine, 2002, 20(31/32): 3764-3769.
- [28] 甘玲玲, 王蔚芳, 雷霖霖, 等. 鲆鲽类渔用疫苗研究现状及展望[J]. 渔业科学进展, 2013, 34(2): 125-131.