

DOI: 10.12131/20240085

文章编号: 2095-0780-(2024)05-0176-10

## 抗副溶血弧菌卵黄抗体制备及其与不同血清型菌株交叉反应研究

陈静妮<sup>1,2</sup>, 仲颖<sup>1,2</sup>, 黄春萍<sup>2</sup>, 李硕<sup>1,2</sup>, 黄锦炉<sup>1,3</sup>, 王贵平<sup>1,2</sup>, 赵立宁<sup>1,2</sup>

1. 广东海大集团股份有限公司, 广东广州 511440

2. 广东海大畜牧兽医研究院有限公司, 广东广州 511400

3. 清远海贝生物技术有限公司, 广东清远 511800

**摘要:** 为探索卵黄抗体对防控凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 养殖中副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 病的潜在作用, 将 2 种血清型 (O1:KUT 和 OUT:KUT) 的 3 株副溶血弧菌制备成灭活疫苗, 分别免疫产蛋鸡制备卵黄抗体。通过 ELISA 实验和试管凝集实验, 评估了卵黄抗体的效价消长规律、抑菌效果和交叉反应情况。结果显示: 3 株副溶血弧菌均能诱导高特异性水平的卵黄抗体, 抗体凝集效价和 ELISA 效价的消长趋势相近, 均在 4 免后 10~60 d 达到卵黄抗体的效价平台期, 凝集效价在 1:8 以上, ELISA 效价在 1:6 400 以上; 卵黄抗体与血清型相同的其他副溶血弧菌发生强烈的交叉 ELISA 和交叉凝集反应, 但与血清型不同的副溶血弧菌有较低的交叉 ELISA 反应, 无交叉凝集反应。研究表明副溶血弧菌能刺激产蛋鸡产生高特异性水平的卵黄抗体, 对不同血清型菌株不具有交叉保护效果, 可为抗副溶血弧菌卵黄抗体产品的开发与应用提供参考。

**关键词:** 副溶血弧菌; 凡纳滨对虾; 高特异性卵黄抗体; ELISA; 凝集

中图分类号: S 945.4

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



## Preparation of anti-*Vibrio parahaemolyticus* IgY and its cross-reaction with different serotype strains

CHEN Jingni<sup>1,2</sup>, ZHONG Ying<sup>1,2</sup>, HUANG Chunping<sup>2</sup>, LI Shuo<sup>1,2</sup>, HUANG Jinlu<sup>1,3</sup>, WANG Guiping<sup>1,2</sup>, ZHAO Lining<sup>1,2</sup>

1. Guangdong Haid Group Co., Ltd., Guangzhou 511400, China

2. Guangdong Haid Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Guangzhou 511400, China

3. Qingyuan Haibe Biotechnology Co., Ltd., Qingyuan 511800, China

**Abstract:** In order to investigate the potential role of immunoglobulin of egg yolk (IgY) in the prevention and control of *Vibrio parahaemolyticus* in *Litopenaeus vannamei* culture, we prepared three *V. parahaemolyticus* strains from serotypes (O1: KUT and OUT: KUT) as inactivated vaccines and immunized against laying hens to prepare IgY, respectively. Then we evaluated the titer, inhibitory effect and cross reaction of anti-*V. parahaemolyticus* IgY by ELISA and tube agglutination tests. The results show that all the three strains induced high specific level of IgY. The trends of antibody agglutination titer and ELISA titer were similar, both reaching the plateau of antibody titer from 10 to 60 d after the fourth immunization, with agglutination titer above 1:8 and ELISA titer above 1:6 400. The prepared IgY showed strong cross-ELISA and cross-agglutination reaction with other

收稿日期: 2024-04-24; 修回日期: 2024-07-02

基金项目: 2023 年度清远市清新区科技计划项目 (2023QJ01001)

作者简介: 陈静妮 (1995—), 女, 硕士, 研究方向为水生动物医学。E-mail: chenjn7@haid.com.cn

通信作者: 赵立宁 (1993—), 男, 博士, 研究方向为水产动物病害与免疫。E-mail: zln\_818@163.com

*V. parahaemolyticus* for the same serotype, but had lower cross-ELISA reaction and no cross-agglutination reaction with other serotype strains. This study clarifies that *V. parahaemolyticus* can stimulate the production of high specific level of IgY in laying hens, but does not have cross-protective potency against different serotypes of strains, which provides references for the development and application of anti-*V. parahaemolyticus* IgY products.

**Keywords:** *Vibrio parahaemolyticus*; *Litopenaeus vannamei*; Highly specific yolk antibody egg yolk (IgY); ELISA; Agglutination

凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 又称南美白对虾, 是中国主要的养殖虾类之一, 近3年其养殖产量呈持续增长态势。据统计, 2022年凡纳滨对虾海水养殖产量较上一年增长66 648 t, 增幅5.23%, 隔年增长率为11.88%; 淡水养殖产量较上一年增长54 583 t, 增幅7.76%, 隔年增长率为14%<sup>[1]</sup>。

副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 是危害我国凡纳滨对虾养殖的主要病原菌之一<sup>[2]</sup>, 可引起对虾急性肝胰腺坏死, 患病虾伴有空肠、空胃、白便等症状, 严重时可造成100%的死亡率<sup>[3-4]</sup>。副溶血弧菌血清型众多, 主要通过细菌表面O抗原脂多糖和K抗原荚膜多糖进行血清型分型, 并通过组合血清型来表示不同分型, 目前已鉴定出了13种O抗原和71种K抗原<sup>[5]</sup>。O3:K6和O4:KUT血清型的副溶血弧菌是国内外最常见的致病菌株<sup>[6-7]</sup>, 但因地域差异, 副溶血弧菌具有高度的遗传多样性<sup>[8]</sup>。此外, 新的血清型不断出现, 其中O1:KUT血清型的副溶血弧菌作为病原菌, 在国内外水产品和致人腹泻病原菌中均有报道<sup>[9-11]</sup>。笔者课题组前期研究分离出6种血清型的副溶血弧菌, 并通过毒力评估确定O1:KUT和OUT:KUT血清型的副溶血弧菌对凡纳滨对虾的毒力明显强于O1:K25、O1:K33、O1:K36、O1:K68血清型<sup>[12]</sup>。抗生素是防控水产养殖动物弧菌病的普遍方法, 但往往会导致耐药菌株的产生<sup>[13]</sup>。卵黄抗体<sup>[14]</sup>、疫苗<sup>[15]</sup>、益生菌<sup>[16]</sup>和噬菌体<sup>[17]</sup>等均是潜在的减抗替抗方式。

卵黄抗体 (Egg yolk immunoglobulin, IgY) 是卵黄中的一类免疫球蛋白, 是禽类在特定抗原刺激下, 体内B淋巴细胞分泌并转移至卵黄中的特异性抗体<sup>[18]</sup>。近年来, 卵黄抗体在防治水产动物细菌性疾病方面应用广泛。抗哈维氏弧菌 (*V. harveyi*) 卵黄抗体能够体外中和哈维氏弧菌并提高凡纳滨对虾的生存率<sup>[19]</sup>; 服用抗鳗弧菌 (*V. anguilarum*) 卵黄抗体的半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 生存率达70%<sup>[20]</sup>; 抗希瓦氏菌 (*Shewanella*) 卵黄抗体能够预防和治疗海参皮肤溃疡综合症<sup>[21]</sup>。卵黄

抗体在防控对虾副溶血弧菌中的作用同样显著。有研究发现, 凡纳滨对虾幼虾口服采用副溶血弧菌全菌制备的卵黄抗体后, 对虾育苗成活率可由19%提高至50%<sup>[22]</sup>; 口服抗副溶血弧菌毒力蛋白PirA卵黄抗体的凡纳滨对虾的生存率提高至86%<sup>[23]</sup>。然而, 凡纳滨对虾养殖中副溶血弧菌血清型众多, 卵黄抗体对不同血清型的副溶血弧菌是否具备交叉反应和抑菌效果尚未见报道。因此, 有必要探究不同血清型副溶血弧菌卵黄抗体的交叉反应, 阐明交叉抑菌效果, 为副溶血弧菌卵黄抗体产品在凡纳滨对虾养殖生产中的开发提供依据, 推动对虾养殖业的绿色健康发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

6种血清型的副溶血弧菌由本实验室分离、鉴定和保存<sup>[12]</sup>(表1)。200日龄海兰灰蛋鸡 (*Hermetia illucens*) 由山东丰牧禽业提供, 蛋鸡的免疫和高免蛋的采集在山东丰牧禽业开展。胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)和硫代硫酸盐柠檬酸盐胆盐蔗糖(TCBS)琼脂培养基购自广东环凯公司, 氯化钠、无水乙酸钠、冰醋酸购自国药集团, 正辛酸购自天津市科密欧化学试剂有限公司, PBS缓冲液购自白鲨生物科技有限公司, Marcol 52白油佐剂购自美国埃克森美孚公司, 吐温-80购自上海生工生物工程股份有限公司, 包被液、终止液、TMB显色液购自湖州英创生物科技有限公司, 牛血清白蛋白购自广州瑞舒生物科技有限公司, 酶标板购自美国康宁公司, 酶标羊抗鸡二抗购自英国Abcam公司(按照说明书1:50 000倍稀释后使用)。

### 1.2 副溶血弧菌的扩培和灭活

取冻存的血清型为OUT:KUT的副溶血弧菌V.p.25、血清型为O1:KUT的副溶血弧菌V.p.27和V.p.29, 按照2%(φ)比例加入5mL TSB液体培养基中, 33℃、180r·min<sup>-1</sup>摇菌过夜复苏菌株; 取过夜活化的菌液, 按照2%(φ)比例加入100mL灭菌的TSB液体培养基中, 33℃、180r·min<sup>-1</sup>摇菌5~

表1 副溶血弧菌菌株信息  
Table 1 *V. parahaemolyticus* strain information

菌株编号 Strain No.	菌种来源 Source of strain	分离时间(年份) Isolation time (Year)	分离地点 Isolation location	血清型 Serotype
V.p.20	凡纳滨对虾	2020	珠海	O1:K25
V.p.24	凡纳滨对虾	2020	珠海	O1:K33
V.p.25	凡纳滨对虾	2020	珠海	OUT:KUT
V.p.26	凡纳滨对虾	2021	珠海	O1:K36
V.p.27	凡纳滨对虾	2021	珠海	O1:KUT
V.p.28	凡纳滨对虾	2021	珠海	O1:K68
V.p.29	凡纳滨对虾	2021	珠海	O1:KUT

6 h 扩大培养。取摇匀的菌液 1 mL, 使用无菌 PBS 稀释 10 倍后在分光光度计 600 nm 的波长下测定吸光值 ( $OD_{600}$ ), 代入前期建立的副溶血弧菌菌浓度与 OD 值标准曲线, 计算菌液浓度。其中: V.p.25:  $y=-1.1045x+8.5209$ ,  $r^2=0.9968$ ; V.p.27:  $y=-1.0143x+8.7905$ ,  $r^2=0.9979$ ; V.p.29:  $y=-0.9694x+8.7741$ ,  $r^2=0.9957$ 。

按照 0.2% ( $\varphi$ ) 的比例, 将商品化甲醛缓慢加入扩培的副溶血弧菌菌液中, 在 25 °C、100 r·min<sup>-1</sup> 条件下灭活 20 h, 加入 0.2% ( $\varphi$ ) 的硫代硫酸钠终止灭活<sup>[24]</sup>。取 0.1 mL 灭活菌液涂布平板, 35 °C 倒置培养 48 h, 无菌落生长表示灭活成功。灭活菌液用 PBS 清洗 3 次后, 等体积加入 40% ( $\varphi$ ) 灭菌甘油, 混匀分装后于 -20 °C 冻存备用。

### 1.3 副溶血弧菌灭活疫苗的制备

取适量灭活菌液, 按照 V(菌液) : V(吐温-80) = 96 : 4, 将吐温-80 加入灭活菌液中, 均质机 10 000 r·min<sup>-1</sup> 连续剪切 10 min 制备成水相抗原。按照 V(水相抗原) : V(Marcol52 白油佐剂) = 1 : 2, 将水相抗原缓慢加入白油佐剂中, 均质机 12 000 r·min<sup>-1</sup> 连续剪切 15 min, 剪切 3 轮, 期间暂停机器 10 min 防止疫苗过热, 所有剪切步骤均在冰上进行。取 1 mL 制备好的油乳剂疫苗, 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 疫苗不发生水油相分层表示乳化成功, 可用于后续蛋鸡的免疫。

### 1.4 蛋鸡免疫和卵黄抗体样品的制备

将制备好的疫苗采用肌肉多点注射免疫 200 日龄海兰灰蛋鸡, 根据不同菌株分为 3 组, 每株副溶血弧菌灭活疫苗注射免疫 20 只蛋鸡, 每只蛋鸡免疫 1 mL, 连续 3 次免疫后进行加强免疫。首次免疫剂量不同, V.p.25 组每只免疫  $2.5 \times 10^5$  CFU 的灭

活菌液、V.p.27 组每只免疫  $6 \times 10^5$  CFU 的灭活菌液、V.p.29 组每只免疫  $8 \times 10^5$  CFU 的灭活菌液; 第 2 次和第 3 次各组蛋鸡均免疫  $10^8$  CFU 的灭活副溶血弧菌, 每次免疫间隔 14 d。在效价降低时, 以  $10^9$  CFU 的灭活副溶血弧菌进行加强免疫。以 1.5% ( $\varphi$ ) NaCl 溶液代替灭活副溶血弧菌制备的疫苗免疫蛋鸡作为阴性对照。在第 3 次免疫和加强免疫后的第 10、第 20、第 30、第 40 和第 50 天采集蛋样。

采集的鸡蛋经消毒、清洗后, 无菌条件下分离蛋黄, 每组 20 枚蛋黄混匀后备用, 参照实验室前期建立的方法进行卵黄抗体的提取<sup>[25]</sup>。取 3 倍蛋黄液体积的无菌水预热至 48 °C, 加入 0.88% ( $\varphi$ ) 无水乙酸钠和 2.82% ( $\varphi$ ) 冰醋酸, 调节 pH=4.8; 将上述水溶液加入蛋黄液中, 48 °C 恒温搅拌 20 min; 加入总体积 3% ( $\varphi$ ) 的正辛酸, 48 °C 搅拌 1 h; 使用丙纶过滤布过滤获得卵黄抗体粗提液, 调节 pH=7.0, 4 °C 保存备用。

### 1.5 间接 ELISA 检测副溶血弧菌卵黄抗体的效价

使用间接 ELISA 法分别检测抗 V.p.25、V.p.27 和 V.p.29 卵黄抗体 3 免前至 3 免后 50 d、4 免前至 4 免后 50 d 的 ELISA 效价, 每批卵黄抗体重复测定 3 次作为平行组, 步骤如下: 将灭活的副溶血弧菌使用包被液稀释至  $5 \times 10^6$  CFU·mL<sup>-1</sup>, 加入酶标板中, 每孔 100 μL, 37 °C 孵育 2 h, 弃包被液, 使用含有 0.5% ( $\varphi$ ) 吐温-20 的 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 每孔加入 200 μL 含 5% ( $\varphi$ ) 牛血清白蛋白的 PBS 溶液, 4 °C 封闭 20 h, 同上洗涤; 待检样品使用含 5% ( $\varphi$ ) 牛血清白蛋白的 PBS 溶液 1 : 100 倍起 2 倍倍比稀释 12 个梯度后加入酶标板中, 每孔 100 μL, 25 °C 孵育 1 h, 同上洗涤; 酶标羊抗鸡二抗使用 PBS 溶液 1 : 50 000 倍稀释后加入酶标板中, 每孔 100 μL, 25 °C 孵育 30 min, 同上洗涤; 每孔加入 100 μL TMB 底物显色液, 37 °C 避光孵育 10 min 后, 每孔加入 50 μL 终止液, 终止显色反应, 使用酶标仪读取波长 450 nm 的 OD 值 ( $OD_{450}$ )。实验组卵黄抗体  $OD_{450}/$  对照组卵黄抗体  $OD_{450}$  (P/N)  $\geq 2.1$  时的卵黄抗体最大稀释倍数即为该卵黄抗体样品的效价, 根据效价值建立副溶血弧菌卵黄抗体效价的消长曲线。

### 1.6 试管凝集实验检测副溶血弧菌卵黄抗体效价、抑菌效果

使用试管凝集实验分别检测抗 V.p.25、V.p.27

和 V.p.29 卵黄抗体 3 免前至 3 免后 50 d、4 免前至 4 免后 50 d 的凝集效价, 每批卵黄抗体重复测定 3 次作为平行组, 步骤如下: 复苏保种的 V.p.25、V.p.27 和 V.p.29 甘油菌, 将复苏的菌液按照 2% ( $\varphi$ ) 比例加入 5 mL TSB 培养基中培养 4 h, 测量菌液吸光值并计算菌液浓度, 使用 6% ( $\varphi$ ) 氯化钠溶液将菌液稀释至  $1.0 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  备用。取待测卵黄抗体样品 1 mL 加入到含 1 mL PBS 的试管中, 涡旋仪振荡混匀后吸取 1 mL 加入到第 2 支含 1 mL PBS 的试管中, 如此连续稀释至第 8 管, 最后 1 管混匀后吸取 1 mL 弃去, 获得 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512 倍稀释的卵黄抗体样品; 同时准备阴性对照组梯度稀释样品。将稀释好的菌液分别加入上述梯度稀释的实验组和阴性对照组卵黄抗体样品中, 每管 1 mL, 制备成 2 mL 的凝集反应体系, 涡旋仪振荡混匀后 28 °C 静置孵育 16 h, 第 2 天观察凝集现象, 以出现凝集颗粒的最高抗体稀释度为该待测样品的凝集效价, 建立副溶血弧菌卵黄抗体凝集效价的消长曲线。

对 4 免 30 d 的卵黄抗体样品进行抑菌效果检测, 每实验组取 6 个 1.5 mL 离心管, 每个离心管中加入 900  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液; 取凝集后的样品 100  $\mu\text{L}$  加入到第 1 管, 涡旋仪振荡混匀后吸取 100  $\mu\text{L}$  加入到第 2 管, 如此连续稀释至第 6 管, 获得稀释 1:10、1:10<sup>2</sup>、1:10<sup>3</sup>、1:10<sup>4</sup>、1:10<sup>5</sup>、1:10<sup>6</sup> 倍的稀释液。取 1:10<sup>4</sup>、1:10<sup>5</sup>、1:10<sup>6</sup> 稀释度样品各 100  $\mu\text{L}$ , 涂布至 TCBS 固体平板上, 作为 3 组平行。将涂布好的平板置于 28 °C 培养箱倒置培养过夜, 第 2 天计数菌落数量。选择平板上菌落个数在 30~300 内的稀释度作为有效计算组别, 按照以下公式计算相对抑菌率:  $P_b = (1 - N_p/N_n) \times 100\%$ , 其中,  $P_b$  为相对抑菌率,  $N_p$  为实验组菌落数,  $N_n$  为对照组菌落数。

构建相对抑菌率的曲线, 通过 GraphPad Prism 9 软件的变斜率算法 (Variable slope) 计算卵黄抗体的半数抑制浓度 IC<sub>50</sub>, 定义为当卵黄抗体稀释度达到 IC<sub>50</sub> 时, 菌株活性被抑制 50%。进一步利用 ELISA 方法测定卵黄抗体 IC<sub>50</sub> 时的抗体效价值。具体操作简述如下: 将抗 V.p.25 卵黄抗体稀释至 IC<sub>50</sub>, 再 1:10 倍起以 2 倍倍比稀释 12 个梯度, 参考 1.5 的步骤, 与  $5 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  灭活的 V.p.25 副溶血弧菌检测 ELISA 效价值, 实验重复

3 次。同上步骤获得抗 V.p.27 卵黄抗体 IC<sub>50</sub> 和抗 V.p.29 卵黄抗体 IC<sub>50</sub> 时的 ELISA 效价值。

### 1.7 间接 ELISA 检测副溶血弧菌卵黄抗体的交叉反应

取 4 免 40 d 和 4 免 50 d 的抗 V.p.25 卵黄抗体 1:100 倍起以 2 倍倍比稀释 12 个梯度, 参考 1.5 的步骤, 与  $5 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$  灭活的 V.p.25、V.p.27 和 V.p.29 副溶血弧菌检测 ELISA 效价交叉情况。以 3 免 20 d 抗 V.p.25 卵黄抗体样品作为阳性对照, 以 3 免 20 d 的阴性组样品作为阴性对照, 实验重复 3 次。

采用同样的步骤测定 4 免 40 d、4 免 50 d 抗 V.p.27 卵黄抗体和抗 V.p.29 卵黄抗体分别与 V.p.25、V.p.27 和 V.p.29 副溶血弧菌的 ELISA 效价, 检测卵黄抗体与不同血清型菌株的交叉反应情况。以各自 3 免 20 d 的卵黄抗体样品作为阳性对照、阴性组样品作为对照, 实验重复 3 次。

### 1.8 试管凝集实验检测副溶血弧菌卵黄抗体的交叉反应

将抗 V.p.27 和抗 V.p.29 卵黄抗体分别与血清型相同的副溶血弧菌 (V.p.27 和 V.p.29) 进行交叉凝集效价检测。操作如 1.6 所示, 选取 4 免 20 d 的抗 V.p.27 卵黄抗体、抗 V.p.29 卵黄抗体样品, 分别与 V.p.29、V.p.27 菌液进行反应, 测定交叉凝集效价, 以各组的卵黄抗体阴性样品作为对照, 实验重复 3 次。

卵黄抗体分别与不同血清型的副溶血弧菌进行交叉凝集效价检测。操作如 1.6 所示, 选取 4 免 20 d 的抗 V.p.25、抗 V.p.27 和抗 V.p.29 卵黄抗体样品分别与不同血清型的副溶血弧菌菌液 (V.p.20: O1:K25; V.p.24: O1: K33; V.p.26: O1:K36; V.p.27: O1:KUT; V.p.28: O1:K68; V.p.29: O1:KUT) 进行反应, 测定交叉凝集效价, 以各组阴性组样品作为阴性对照, 实验重复 3 次。

### 1.9 统计分析

实验数据以“平均值±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )”表示, 采用 SPSS 24.0 软件进行数据录入和统计学分析, 通过 GraphPad Prism 9 软件构建多样数据变化趋势。

## 2 结果

### 2.1 副溶血弧菌卵黄抗体 ELISA 效价消长规律

利用 ELISA 方法检测了 V.p.25、V.p.27 和 V.p.29 3 株副溶血弧菌免疫蛋鸡后, 特异性卵黄抗

体效价的消长情况(图1)。每一批样品的3次重复实验效价值无差异(标准差为0),因此在消长趋势图中每一批样品呈现出单一的效价值。结果显示,3株弧菌免疫蛋鸡后刺激卵黄抗体效价的消长规律基本一致,在3免后第20天(48 d),卵黄抗体效价出现峰值,随后逐渐降低;在4免后卵黄抗体效价快速升高并达到峰值,峰值水平为3免效价峰值的2~4倍,分别为1:6 400、1:51 200、1:12 800。此外,V.p.25菌株在4免后第10天(88 d)进入抗体效价平台期,持续第20天;V.p.27菌株在4免后第20天(98 d)进入抗体效价平台期,持续第

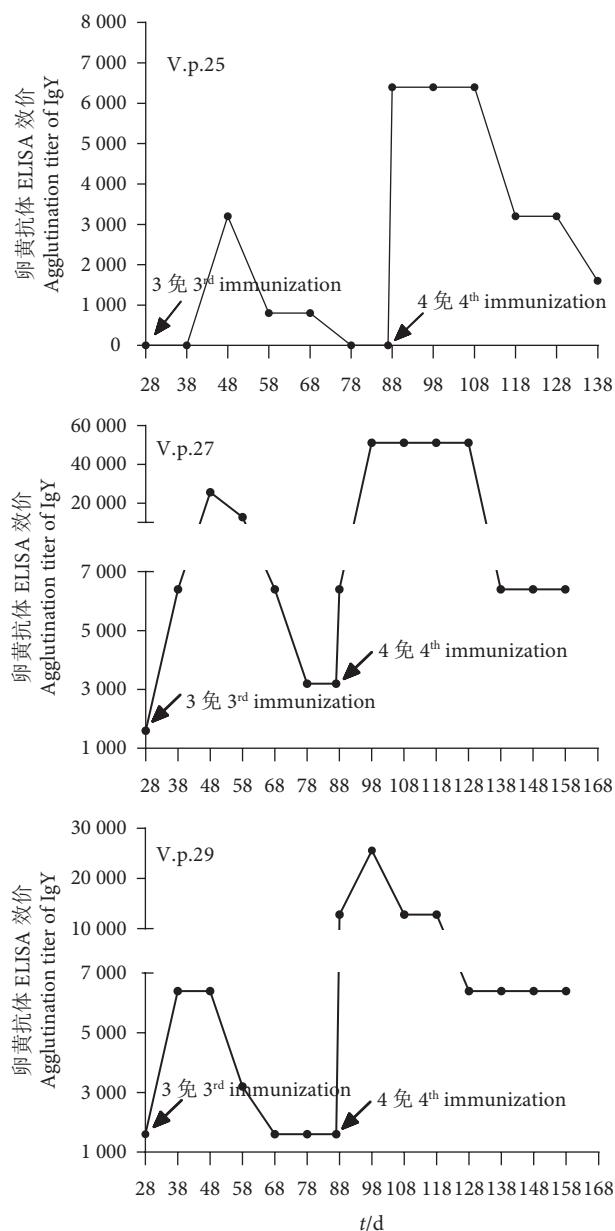


图1 副溶血弧菌卵黄抗体的ELISA效价消长规律

Fig. 1 Dynamic regularity of ELISA titers of *V. parahaemolyticus* IgY

30天;而V.p.29菌株在4免后第10天(88 d)达到抗体效价峰值后,持续30 d。

## 2.2 副溶血弧菌卵黄抗体凝集效价的消长规律

利用试管凝集实验检测了V.p.25、V.p.27和V.p.29 3株副溶血弧菌免疫蛋鸡后,卵黄抗体凝集效价的消长情况(图2)。每一批样品的3次重复实验效价值无差异(标准差为0),因此在消长趋势图中每一批样品呈现出单一的效价值。结果显示,3株弧菌特异性卵黄抗体凝集效价的消长规律基本一致,在3免后第20天(48 d),抗体凝集效价出现峰值,随后逐渐降低;在4免后第20天(98 d),卵黄抗体凝集效价快速升高,达到峰值后进入平台期,分别为1:8、1:64和1:64,持续至少30 d。

## 2.3 副溶血弧菌卵黄抗体的抑菌效果

对V.p.25、V.p.27和V.p.29菌株疫苗4免后第30天(108 d)的卵黄抗体进行抑菌效果检测,计算抑菌率(图3)。菌液与抗体发生凝集反应后,菌落生长数量明显下降,随着抗体稀释度的提高,抗体抑菌率呈现逐渐降低的趋势。抗V.p.27和V.p.29卵黄抗体的抑菌率随稀释度的变化曲线基本吻合,均高于同等稀释度下抗V.p.25卵黄抗体的抑菌率。

计算抗V.p.25、V.p.27和V.p.29卵黄抗体的IC<sub>50</sub>,分别为2<sup>-3.3</sup>(即原液稀释9.6倍)、2<sup>-4.4</sup>(即原液稀释20.8倍)和2<sup>-4.2</sup>(即原液稀释17.9倍)。采用ELISA方法检测了抗V.p.25、V.p.27和V.p.29卵黄抗体IC<sub>50</sub>时的抗体效价,结果分别为1:640、1:2 560和1:640,即在此抗体效价下,3种副溶血弧菌卵黄抗体对各自菌株的抑制率为50%。

## 2.4 副溶血弧菌卵黄抗体的交叉ELISA反应

利用ELISA方法检测了抗V.p.25、V.p.27和V.p.29卵黄抗体与非免疫菌株的交叉效价情况(图4)。结果发现,各组样品的3次重复实验值无差异(标准差为0),4免40 d(108 d)和4免50 d(128 d)是3组卵黄抗体的效价平台期。

对于抗V.p.25卵黄抗体,采用V.p.25菌株检测的ELISA效价为1:3 200,而孵育V.p.27或V.p.29菌株均检测不出效价。对于抗V.p.27卵黄抗体,其与V.p.27菌株结合的ELISA效价值为1:51 200;与V.p.25菌株结合的效价值为1:800(下降98%);与V.p.29菌株结合的效价值为1:25 600(下降50%)。对于抗V.p.29卵黄抗体,其与

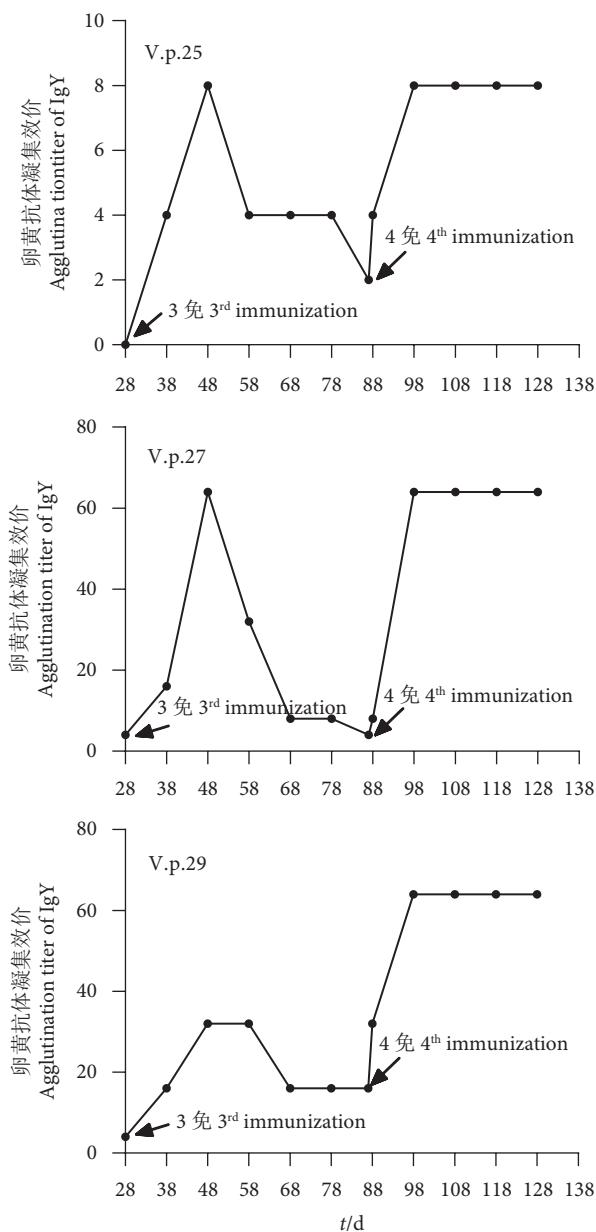


图2 副溶血弧菌卵黄抗体的凝集效价消长规律

Fig. 2 Dynamic regularity of agglutination titers of *V. parahaemolyticus* IgY

V.p.29 菌株结合的 ELISA 效价值为 1 : 12 800；与 V.p.25 菌株结合的效价值为 1 : 800 (下降 94%)；与 V.p.27 菌株结合的效价值为 1 : 6 400 (下降 50%)。

V.p.25 菌株为 OUT:KUT 血清型，V.p.27 和 V.p.29 菌株同为 O1:KUT 血清型，结果显示了抗 V.p.25 卵黄抗体与 O1:KUT 血清型的菌株几乎不能发生交叉反应，而抗 V.p.27 和 V.p.29 卵黄抗体与相同血清型的菌株交叉反应强烈，且交叉效价值与免疫菌株效价值差异小。

## 2.5 副溶血弧菌卵黄抗体的交叉凝集反应

使用抗 V.p.27 卵黄抗体和抗 V.p.29 卵黄抗体

4 免 30 d 的样品，检测对相同血清型副溶血弧菌的交叉凝集效价。

凝集结果如表 2 所示，抗 V.p.27 卵黄抗体对 V.p.27 和 V.p.29 菌株的凝集效价均为 1 : 64，抗 V.p.29 卵黄抗体对 V.p.27 和 V.p.29 菌株的凝集效价均为 1 : 64，阴性对照无凝集现象。结果说明相同血清型的菌株可以检测到交叉凝集，且交叉凝集效价与自身菌株的凝集效价相同。

使用抗 V.p.25 卵黄抗体、抗 V.p.27 卵黄抗体和抗 V.p.29 卵黄抗体 4 免 10 d 和 4 免 20 d 的样品，检测对不同血清型副溶血弧菌的交叉凝集效价。

抗 V.p.25 卵黄抗体的交叉凝集结果如表 3 所示，4 免 10 d 和 4 免 20 d 卵黄抗体样品对 V.p.25 菌株的凝集效价分别为 1 : 4 和 1 : 8，对 V.p.20、V.p.24、V.p.26、V.p.27、V.p.28 和 V.p.29 菌株均无凝集现象，阴性对照卵黄抗体样品均无凝集现象。

抗 V.p.27 卵黄抗体的交叉凝集结果如表 4 所示，4 免 10 d 和 4 免 20 d 卵黄抗体样品对 V.p.27 菌株的凝集效价分别为 1 : 8 和 1 : 64，对 V.p.20、V.p.24、V.p.25、V.p.26 和 V.p.28 菌株均无凝集现象，阴性对照卵黄抗体样品均无凝集现象。

抗 V.p.29 卵黄抗体的交叉凝集结果如表 5 所示，4 免 10 d 和 4 免 20 d 卵黄抗体样品对 V.p.29 菌株的凝集效价分别为 1 : 32 和 1 : 64，对 V.p.20、V.p.24、V.p.25、V.p.26 和 V.p.28 菌株均无凝集现象，阴性对照卵黄抗体样品均无凝集现象。

## 3 讨论

副溶血弧菌是革兰氏阴性细菌，在河口、海洋和沿海地区广泛分布，导致多种鱼类和甲壳类的感染死亡<sup>[26]</sup>，甚至通过食物传播至人类，引起急性胃炎、腹泻等症状<sup>[27]</sup>。卵黄抗体是禽类受抗原刺激后产生的富集在卵黄中的特异性抗体，能够通过注射、口服等方式在多种动物体内发挥被动免疫保护功能<sup>[14]</sup>。对虾作为无脊椎动物，主要依赖先天性免疫发挥免疫防御作用，缺乏体液免疫等适应性免疫系统，因此，卵黄抗体的被动免疫作用在对虾病害防治中具有重要的应用价值<sup>[28]</sup>。据已有研究报道，由副溶血弧菌全菌或毒力蛋白免疫蛋鸡制备的卵黄抗体在凡纳滨对虾体内显示出良好的抗副溶

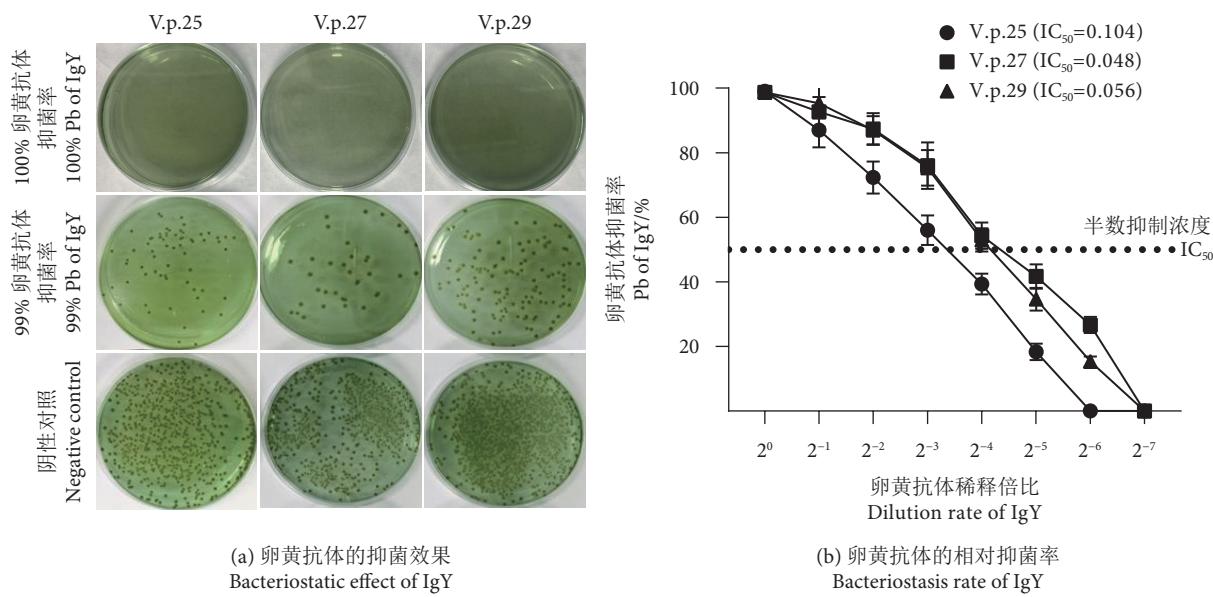


图3 副溶血弧菌卵黄抗体的抑菌作用  
Fig. 3 Bacteriostasis of *V. parahaemolyticus* IgY

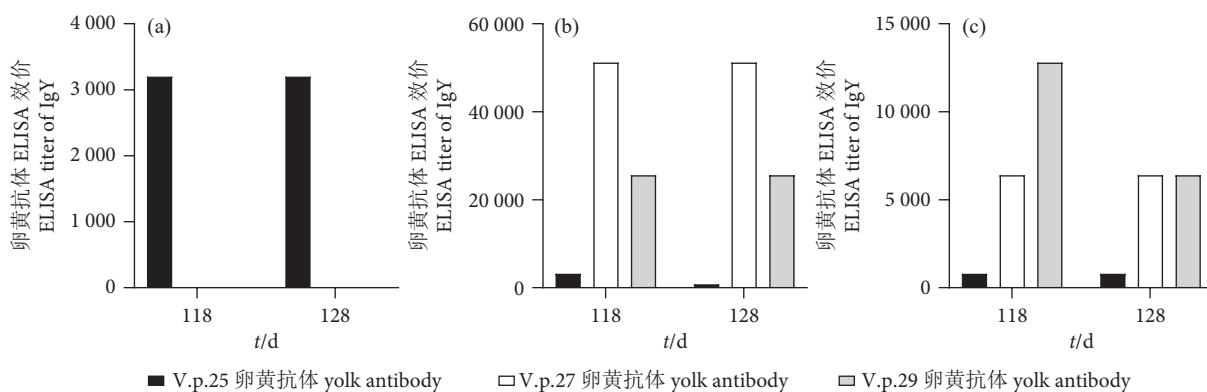


图4 卵黄抗体与非免疫菌株的 ELISA 交叉效价  
Fig. 4 Cross titer of IgY and non-immune strains by ELISA

注: a. V.p.25 菌株与 3 种卵黄抗体的 ELISA 反应;  
b. V.p.27 菌株与 3 种卵黄抗体的 ELISA 反应;  
c. V.p.29 菌株与 3 种卵黄抗体的 ELISA 反应。

Note: a. ELISA reaction between V.p.25 strain and three kinds of IgY; b. ELISA reaction between strain V.p.27 and three kinds of IgY;  
c. ELISA reaction of between V.p.29 strain with three kinds of IgY.

表2 相同血清型副溶血弧菌的交叉凝集  
Table 2 Cross-agglutination of same serotype of *V. parahaemolyticus*

卵黄抗体/血清型 IgY /Serotype	V.p.27		V.p.29	
	O1:KUT	O1:KUT	O1:KUT	O1:KUT
V.p.27 4 免 30 d	—	—	—	—
30 d V.p.27 4 <sup>th</sup> immunization	1 : 64	1 : 64	—	—
对照 4 免 30 d	—	—	—	—
30 d control 4 <sup>th</sup> immunization	—	—	—	—
V.p.29 4 免 30 d	—	—	—	—
30 d V.p.29 4 <sup>th</sup> immunization	1 : 64	1 : 64	—	—
对照 4 免 30 d	—	—	—	—
30 d control 4 <sup>th</sup> immunization	—	—	—	—

注: “—”表示无凝集现象。

Note: “—” represents no agglutination.

血弧菌作用<sup>[22-23]</sup>。笔者课题组前期从珠海地区凡纳滨对虾发病塘口鉴定出致病力较强的 OUT:KUT、O1:KUT 血清型的副溶血弧菌<sup>[12]</sup>, 本研究选取了毒力较强的 3 株副溶血弧菌进行蛋鸡免疫, 探究了卵黄抗体的效价消长规律和体外抑菌效果, 结果发现 3 株副溶血弧菌均能刺激蛋鸡产生较高水平的特异性抗体, ELISA 效价达到 1 : 6 400 以上, 说明 2 种血清型的强毒株均具有良好的免疫原性。

目前, 卵黄抗体含量通常采用 ELISA、免疫印迹等免疫学方法进行定量<sup>[29]</sup>, 而抗细菌卵黄抗体还常用体外凝集实验评估 IgY 的抑菌效果<sup>[19]</sup>。本研究同时采用了 ELISA、凝集实验测定卵黄抗体效价

**表3 抗 V.p.25 卵黄抗体对不同血清型副溶血弧菌的交叉凝集**  
**Table 3 Cross-agglutination of anti-V.p.25 IgY to different serotypes of *V. parahaemolyticus***

卵黄抗体/血清型 IgY /Serotype	V.p.25	V.p.20	V.p.24	V.p.26	V.p.27	V.p.28	V.p.29
	OUT:KUT	O1:K25	O1:K33	O1:K36	O1:KUT	O1:K68	O1:KUT
V.p.25 4 免 10 d 10 d V.p.25 4 <sup>th</sup> immunization	1 : 4	—	—	—	—	—	—
对照 4 免 10 d 10 d control 4 <sup>th</sup> immunization	—	—	—	—	—	—	—
V.p.25 4 免 20 d 20 d V.p.25 4 <sup>th</sup> immunization	1 : 8	—	—	—	—	—	—
对照 4 免 20 d 20 d control 4 <sup>th</sup> immunization	—	—	—	—	—	—	—

注: “—”表示无凝集现象。

Note: “—” represents no agglutination.

**表4 抗 V.p.27 卵黄抗体对不同血清型副溶血弧菌的交叉凝集**  
**Table 4 Cross-agglutination of anti-V.p.27 IgY to different serotypes of *V. parahaemolyticus***

卵黄抗体/血清型 IgY /Serotype	V.p.27	V.p.20	V.p.24	V.p.25	V.p.26	V.p.28
	O1:KUT	O1:K25	O1:K33	OUT:KUT	O1:K36	O1:K68
V.p.27 4 免 10 d 10 d V.p.27 4 <sup>th</sup> immunization	1 : 8	—	—	—	—	—
对照 4 免 10 d 10 d control 4 <sup>th</sup> immunization	—	—	—	—	—	—
V.p.27 4 免 20 d 20 d V.p.27 4 <sup>th</sup> immunization	1 : 64	—	—	—	—	—
对照 4 免 20 d 20 d control 4 <sup>th</sup> immunization	—	—	—	—	—	—

注: “—”表示无凝集现象。

Note: “—” represents no agglutination.

**表5 抗 V.p.29 卵黄抗体对不同血清型副溶血弧菌的交叉凝集**  
**Table 5 Cross-agglutination of anti-V.p.29 IgY to different serotypes of *V. parahaemolyticus***

卵黄抗体/血清型 IgY /Serotype	V.p.29	V.p.20	V.p.24	V.p.25	V.p.26	V.p.28
	O1:KUT	O1:K25	O1:K33	OUT:KUT	O1:K36	O1:K68
V.p.29 4 免 10 d 10 d V.p.29 4 <sup>th</sup> immunization	1 : 32	—	—	—	—	—
对照 4 免 10 d 10 d control 4 <sup>th</sup> immunization	—	—	—	—	—	—
V.p.29 4 免 20 d 20 d V.p.29 4 <sup>th</sup> immunization	1 : 64	—	—	—	—	—
对照 4 免 20 d 20 d control 4 <sup>th</sup> immunization	—	—	—	—	—	—

注: “—”表示无凝集现象。

Note: “—” represents no agglutination.

水平, 结果发现抗副溶血弧菌卵黄抗体效价值在4次免疫后达到高峰, 且ELISA效价和凝集效价消长规律基本一致。这与抗JB080708副溶血弧菌卵黄抗体<sup>[30]</sup>的效价消长趋势类似, 说明2种方法均可用于评价抗副溶血弧菌卵黄抗体效价水平。此外, 3株副溶血弧菌卵黄抗体的ELISA效价峰值, 从高至低依次为抗V.p.27、抗V.p.29和抗V.p.25卵黄抗体, 均高于效价峰值为1:4 096的

抗JB080708副溶血弧菌卵黄抗体。需要指出的是, 本研究选定3株副溶血弧菌的首免剂量不同, 是用活菌涂板计数定量并统一菌浓度后, 重新利用菌浓度与OD值标准曲线修定的结果, 而后续免疫的剂量均采用OD值进行菌浓度的换算。但结果显示3株菌诱导卵黄抗体的效价峰值水平与首免剂量并不相关, 其可能更取决于菌株的免疫原性。进一步通过活菌计数对凝集效果进行统计分析, 发现卵

黄抗体原液对免疫菌株的相对抑菌率可达 100%，随着抗体浓度减少，相对抑菌率降低，与已报道的抗摩尔梭菌 IgY 和抗白色念珠菌 IgY 研究结果一致。这说明抗副溶血弧菌卵黄抗体有可能通过黏附病原菌的方式，阻断了与病原菌生长增殖相关的功能蛋白，从而抑制弧菌的生长增殖<sup>[31-32]</sup>。进一步的测定结果显示，抗 V.p.25、V.p.27 和 V.p.29 卵黄抗体效价分别在 1:640、1:2560 和 1:640 时，能够抑制 50% 免疫菌株的生长。后续计划在此效价剂量参考下，进一步开展体内试验，评估卵黄抗体的抑菌效果及使用剂量。

目前有关卵黄抗体的交叉反应报道非常少，畜牧业中，抗犬细小病毒卵黄抗体对 2 种不同抗原性毒株具有交叉保护效价<sup>[33]</sup>；而在水产养殖业中，抗柱状黄杆菌 (*Flavobacterium columnare*) 卵黄抗体对嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、哈维氏弧菌无交叉反应<sup>[34]</sup>。本研究首次探究了不同血清型副溶血弧菌特异性卵黄抗体对不同菌株的交叉反应，结果发现 O1:KUT 血清型的 V.p.27 制备的卵黄抗体和 O1:KUT 血清型的 V.p.29 菌株具有强烈的 ELISA 效价、凝集效价和抑菌效果的交叉；反之，V.p.29 菌株制备的卵黄抗体和 V.p.27 菌株也能发生强烈的交叉反应。但是，V.p.27 和 V.p.29 菌株制备的卵黄抗体均不与 O4:KUT 血清型的 V.p.25 菌株发生凝集效价和抑菌效果的交叉，同样，V.p.25 菌株制备的卵黄抗体和 V.p.27、V.p.29 菌株也几乎不发生 ELISA 效价、凝集效价和抑菌效果的交叉反应。究其原因是卵黄抗体与抗原之间的结合具有高度的特异性，其对其他血清型菌株的抗原结构不具备识别和结合的能力。这种交叉保护效果局限性在抗鸭疫里默氏杆菌 (*Riemerella anatum*) 卵黄抗体的研究中也有体现<sup>[35]</sup>，因此共性抗原的亚单位疫苗或多联苗的应用将会是解决不同血清型副溶血弧菌卵黄抗体交叉保护的研发方向。

综上所述，本研究明确了 2 种不同血清型的副溶血弧菌均能够刺激蛋鸡产生高特异性水平的卵黄抗体，并且所产生的卵黄抗体体外能够明显抑制相同血清型副溶血弧菌的增殖，这种高度特异性关系为副溶血弧菌的防治提供了理论基础。另一方面，所产生的卵黄抗体不能高效识别和抑制血清型不同的副溶血弧菌，可能会限制抗副溶血弧菌卵黄抗体

的进一步开发与应用。后续有必要对不同养殖区域中的凡纳滨对虾副溶血弧菌开展流行病学调查，制备不同血清型流行菌株的卵黄抗体，再结合实际塘口需求进行混合使用，或筛选不同血清型副溶血弧菌的共性抗原，制备广谱的抗副溶血弧菌卵黄抗体，同时建立体内保护模型，验证卵黄抗体对由副溶血弧菌引起的凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病的预防和治疗效果，为该病的有效防控奠定研究基础。

### 参考文献:

- [1] 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. 2023 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2023: 22-24.
- [2] 张晓君, 陈翠珍, 阎斌伦, 等. 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 病原副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 的表型及分子特征[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 654-662.
- [3] 高晓华, 张海强, 安伟. 凡纳滨对虾急性肝胰腺坏死病致病菌的分离鉴定、药敏特性及其组织病理学观察[J]. 淡水渔业, 2022, 52(3): 82-90.
- [4] 李吉云, 沈辉, 孟庆国, 等. 急性肝胰腺坏死病病原菌毒力的初步研究[J]. 水产科学, 2022, 41(5): 868-875.
- [5] GONZÁLEZ-ESCALONA N, MARTINEZ-URTAZA J, ROMERO J, et al. Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing[J]. J Bacteriol, 2008, 190(8): 2831-2840.
- [6] ESPEJO R T, GARCÍA K, PLAZA N. Insight into the origin and evolution of the *Vibrio parahaemolyticus* pandemic strain[J]. Front Microbiol, 2017, 8: 1397.
- [7] CHEN X, LI Y, YAO W, et al. A new emerging serotype of *Vibrio parahaemolyticus* in China is rapidly becoming the main epidemic strain[J]. Clin Microbiol Infec, 2020, 26(5): 644.e1-644.e7.
- [8] 魏大伟. 中国沿海地区副溶血弧菌流行病学调查及遗传多样性分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018: 7-8.
- [9] CHONSIN K, SUPHA N, NAKAJIMA C, et al. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from clinically asymptomatic seafood workers[J]. FEMS Microbiol Lett, 2020, 1: 368.
- [10] AHSAN C R, FERDOUS T. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* organisms isolated from shrimps and shrimp fields located in the coastal areas of Bangladesh[J]. Int J Infect Dis, 2020, 101: 150.
- [11] CHEN X, ZHU Q Y, LIU Y C, et al. Pathogenic Characteristics of and variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from acute diarrhoeal patients in southeastern China from 2013 to 2017[J]. DOAJ, 2020, 3: 1307-1318.
- [12] ZHONG Y, CHEN J N, HUANG C P, et al. Isolation, identification, and pathogenicity of pathogens from *Litopenaeus vannamei* with acute hepatopancreatic necrosis disease[J]. Pakistan J Zool, 2024, 56(5): 2339-2350.

- [13] 魏文娟, 赵姝, 王元, 等. 副溶血弧菌养殖对虾分离株耐药性及耐药基因分析[J]. *南方水产科学*, 2020, 16(1): 9-16.
- [14] 徐永平, 徐乐, 李纪彬, 等. 卵黄抗体饲料添加剂在畜牧及水产养殖病害防控中的研究进展[J]. *饲料工业*, 2021, 42(18): 1-11.
- [15] PENG B, YE J Z, HAN Y, et al. Identification of polyvalent protective immunogens from outer membrane proteins in *Vibrio parahaemolyticus* to protect fish against bacterial infection[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 54: 204-210.
- [16] 刘钢, 胡晓娟, 苏浩昌, 等. 嗜酸乳杆菌对3种弧菌的拮抗效果及对凡纳滨对虾肠道菌群结构的影响[J]. *南方水产科学*, 2024, 20(2): 83-91.
- [17] XIA H, YANG H J, YAN N, et al. Bacteriostatic effects of phage F23s1 and its endolysin on *Vibrio parahaemolyticus*[J]. *J Basic Microbiol*, 2022, 62(8): 963-974.
- [18] CLEM L W, SMALL P A. Phylogeny of immunoglobulin structure and function: I. immunoglobulins of the lemon shark[J]. *J Exp Med*, 1967, 125(5): 893-920.
- [19] KUMARAN T, THIRUMALAIKUMAR E, LELIN C, et al. Physicochemical properties of anti *Vibrio harveyi* egg yolk antibody (IgY) and its immunological influence in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2018, 74: 349-362.
- [20] GAO X J, ZHANG X J, SUN J J, et al. Passive protection effect of anti-*Vibrio anguillarum* IgY-encapsulated feed on half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevi*) against *V. anguillarum*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2016, 56: 483-488.
- [21] XU L, XU Y P, HE L Y, et al. Immunomodulatory effects of chicken egg yolk antibodies (IgY) against experimental *Shewanella marisflavi* AP629 infections in sea cucumbers (*Apostichopus japonicus*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 84: 108-119.
- [22] 闫茂仓, 王瑶华, 胡利华, 等. 副溶血弧菌特异性卵黄抗体(AHPND-VpIgY)对凡纳滨对虾幼体被动免疫和育苗成活率的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(2): 443-448.
- [23] NAKAMURA R, PEDROSA-GERASMO I R, ALENTON R R R, et al. Anti-PirA-like toxin immunoglobulin (IgY) in feeds passively immunizes shrimp against acute hepatopancreatic necrosis disease[J]. *J Fish Dis*, 2019, 42(8): 1125-1132.
- [24] 陶家发, 赖迎迢, 任燕, 等. 弧菌福尔马林灭活条件的初步研究[J]. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24(1): 64-66.
- [25] 李硕, 陈静妮, 赵立宁, 等. 抗大口黑鲈虹彩病毒卵黄抗体的制备及其间接ELISA检测方法的建立[J]. *南方水产科学*, 2024, 20(2): 129-139.
- [26] TRAN L, NUNAN L, REDMAN R M, et al. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp[J]. *Dis Aquat Org*, 2013, 105(1): 45-55.
- [27] LETCHUMANAN V, CHAN K G, LEE L H. *Vibrio parahaemolyticus*: a review on the pathogenesis, prevalence, and advance molecular identification techniques[J]. *Front Microbiol*, 2014, 5: 705.
- [28] LU Y N, LIU J J, JIN L J, et al. Passive protection of shrimp against white spot syndrome virus (WSSV) using specific antibody from egg yolk of chickens immunized with inactivated virus or a WSSV-DNA vaccine[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2008, 25(5): 604-610.
- [29] SCHADE R, HLINAK A. Egg yolk antibodies, state of the art and future prospects[J]. *ALTEX*, 1996, 13(5): 5-9.
- [30] GAO X J, ZHANG X J, LIN L, et al. Passive immune-protection of litopenaeus vannamei against *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus* infections with anti-*Vibrio* egg yolk (IgY)-encapsulated feed[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(5): 723.
- [31] LI X Y, LIU H, XU Y P, et al. Chicken egg yolk antibody (IgY) controls *Solobacterium moorei* under in vitro and in vivo conditions[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2012, 168(6): 1448-1458.
- [32] IBRAHIM E S M, RAHMAN A K M S, ISODA R, et al. *In vitro* and *in vivo* effectiveness of egg yolk antibody against *Candida albicans* (anti-CA IgY)[J]. *Vaccine*, 2008, 26(17): 2073-2780.
- [33] 陆田甜. 成都市犬细小病毒的检测和分离鉴定及精制卵黄抗体的研制[D]. 成都: 西南民族大学, 2021: 41-42.
- [34] 李思泉, 李娜, 罗玉双, 等. 草鱼细菌性烂鳃病病原菌的分离及其特异性卵黄抗体的初步研究[J]. *贵州畜牧兽医*, 2019, 43(3): 37-42.
- [35] 刘婷. 鸭疫里默氏杆菌几种蛋白免疫保护性初步研究[D]. 重庆: 西南大学, 2021: 14-17.