

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2013.06.015

· 综述 ·

罗非鱼链球菌病疫苗的研究进展

吴南¹, 郭佳^{1,2}, 熊丽², 张永安¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北 武汉 430072;
2. 华中师范大学生命科学学院, 湖北省遗传调控与整合生物学重点实验室, 湖北 武汉 430079)

摘要: 通过提高鱼体自身免疫力的免疫预防是防控罗非鱼链球菌病的重要对策, 其中新型高效疫苗的研制将是罗非鱼链球菌病预防的主要发展方向。目前在研的罗非鱼链球菌病疫苗有灭活疫苗、减毒疫苗、亚单位疫苗、DNA疫苗、被动免疫疫苗等多种形式。而疫苗的接种途径、佐剂、鱼体状态和环境因素等对疫苗的效果有重要影响。文章对罗非鱼链球菌病疫苗的研究现状做一综述, 以期为该疫苗的设计和应用提供科学对策。

关键词: 疫苗; 链球菌病; 罗非鱼

中图分类号: S 943.125.42

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2013)06-0090-07

Research progress on vaccine of streptococcosis in tilapia

WU Nan¹, GUO Jia^{1,2}, XIONG Li², ZHANG Yong'an¹

(1. State Key Lab. of Freshwater Ecology & Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Hubei Key Lab. of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

Abstract: Immune prevention, especially developing new effective vaccine, is important in preventing and controlling streptococcosis outbreak in tilapia. Currently, the developing streptococcosis vaccines for tilapia include inactivated vaccine, attenuated vaccine, subunit vaccine, DNA vaccine, passive immunization vaccine, etc.. However, the inoculating way, adjuvants, physiological status of fish and environment factors also have great impact on the effects of vaccine. The paper reviews the research progress on vaccines of streptococcosis in tilapia, so as to provide scientific solutions for the design and application of those vaccines.

Key words: vaccine; streptococcosis; tilapia

罗非鱼(*Oreochromis* spp.)因其具有适应性强、生长快、繁殖力高和食性广等优点, 作为联合国粮农组织推荐的养殖品种, 已被世界各地广泛引种与养殖^[1]。中国的环境和气候等条件均适宜罗非鱼生长, 是罗非鱼养殖的主要国家之一。然而, 随着罗非鱼产业的迅速发展, 病害给罗非鱼养殖业造成极大的损失。其中链球菌病成为罗非鱼健康养殖的最大威胁, 其病原菌是海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)或者无乳链球菌(*S. agalactiae*)^[2]。近年来在罗非鱼主要养

殖区多次大规模暴发链球菌病, 发病形势凶猛且呈低龄化趋势^[1]。目前, 链球菌病不仅威胁罗非鱼, 还危害多种淡水鱼类, 如虹鳉(*Oncorhynchus mykiss*)、牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆(*Psetta maxima*)、真鲷(*Pagrosomus major*)和眼斑拟石首鱼(*Sciaenops ocellatus*)^[3]。海豚链球菌的血清型分为 I 型和 II 型, II 型荚膜提供更多的表面抗原, 从而赋予细菌额外的抗吞噬性能, 因而 II 型的海豚链球菌可以在吞噬细胞中成活, 致病性更强^[4]。无乳链球菌又称

收稿日期: 2013-04-26; 修回日期: 2013-06-25

资助项目: 中共中央组织部“青年千人计划”项目(Y12Z121501); 湖北省自然科学基金面上项目“致病性嗜水气单胞菌靶标酶 FNR 的生物活性及杀菌剂筛选研究”(2011CDB153)

作者简介: 吴南(1981-), 女, 博士, 从事鱼类分子免疫学研究。E-mail: wunan@ihb.ac.cn

通信作者: 张永安(1972-), 男, 博士, 研究员, 从事鱼类分子免疫学研究。E-mail: yzhang@ihb.ac.cn

B群链球菌(group B streptococcal, GBS)^[5]。至今,已鉴定出无乳链球菌的血清型有10种(I a、I b、II~IX),而其主要的表面抗原包括alpha-C、Rib、Alp2、Alp3、Alp4和epsilon蛋白^[6]。最近有研究表明,罗非鱼感染的无乳链球菌的分子血清型均为I a型,表面抗原均为alpha-C蛋白^[6]。从广东、海南、福建等地区养殖的患病罗非鱼体内分离到多株致病菌均为无乳链球菌^[5-6];而引起广西罗非鱼链球菌病暴发的菌株虽有少量无乳链球菌,但大多数是海豚链球菌^[2]。

目前,中国罗非鱼链球菌病的防治多采用抗生素,效果欠佳且易产生耐药性并引发食品安全问题。疫苗是根据脊椎动物能对抗原产生特异性抗体和免疫记忆的原理,将细菌等病原微生物或其成分作为抗原而制成的用于预防传染病的免疫制剂。鱼体一旦接种了针对某种病菌设计的疫苗后便会产生抗体,当真正接触到该病菌时便会启动免疫记忆,从而产生更多的抗体来阻止其侵袭。因此,疫苗能够提高鱼类自身的免疫力,同时还可避免耐药菌株的产生和食品质量安全等问题,势必成为链球菌病免疫预防研究的主要发展方向。

1 罗非鱼链球菌病疫苗的类型

自20世纪90年代以来,对罗非鱼链球菌病疫苗的研制大致经历了从传统灭活全菌疫苗以及以生化方法抽提的亚单位疫苗,到基于分子生物学方法的减毒疫苗、亚单位疫苗和DNA疫苗,另外基于抗体制备技术的被动免疫疫苗也是有效补充。传统疫苗的优点是操作简便、普及广,但是存在一些缺点,比如灭活疫苗和生化方法抽提的亚单位疫苗的部分抗原成分被破坏,并且还存在一定的区域限制性。灭活疫苗对30 g的鱼苗免疫保护效果较好,但是对5 g的鱼苗的保护效果较差^[7],而减毒活疫苗可能解决这个问题,有报道多联减毒疫苗能够对3~5 g罗非鱼苗有免疫保护效果^[8]。采用分子生物学手段发展的亚单位疫苗和DNA疫苗,因其具有针对性的抗原设计,可能克服传统疫苗的效果不稳定及免疫鱼体的年龄限制等弊端。

1.1 灭活疫苗

灭活疫苗是通过物理或化学方法杀死病原菌,但保留其免疫原性,其中物理方法有超声处理、热处理等,化学方法有福尔马林、氯仿浸泡等。灭活疫苗虽然制备容易、成本低廉、易于贮藏运输,但其成分复杂、对不同个体免疫效率差异大、对细胞内寄生的细菌保护效果相对较弱^[9]。海豚链球菌灭活疫苗能够刺激罗非鱼产生抗体,从而保护其免受海豚链球菌的感染^[10]。余晓丽等^[11]通过2次攻毒试验筛选到一株具有交叉免疫保护的海豚链球菌,用甲醛灭活制备成疫苗,注射罗非鱼后最佳保护率达到90.5%;张俊等^[12-13]制备的海水和淡水株的海豚链球菌灭活疫苗对罗非鱼的免疫保护率分别达到93.8%和100%。无乳链球菌灭活疫苗也可预防罗非鱼链球菌病,其单一苗和复合苗分

别通过腹腔或肌肉注射至罗非鱼体内能产生明显的免疫保护力^[14]。也有将灭活的无乳链球菌用其胞外分泌产物的浓缩液包裹起来制备疫苗的做法^[7,15]。EVANS等^[7]研制的将福尔马林灭活海豚链球菌及其胞外产物的混合物制备成的疫苗对鱼体的免疫保护力可持续180 d。广西水产研究所2012年获得的专利“罗非鱼二联链球菌灭活疫苗的制备方法”,是将从发病罗非鱼体内分离出的海豚链球菌和无乳链球菌分别灭活,然后等比例混合制成二联疫苗,适用于胸腔或腹腔注射^[16]。

菌株的分型对全菌疫苗效果的重复性和稳定性有指导意义。罗非鱼链球菌的抗原性不仅和血清型有关,还和基因分型有关。目前,随机扩增多态性DNA(RAPD)、脉冲场凝胶电泳(PFGE)、细菌基因组重复序列PCR(REP-PCR)等分子分型技术已在罗非鱼链球菌分型中应用^[17-18],可为稳定筛选具有较好免疫原性的候选菌株提供技术保障。

1.2 减毒疫苗

减毒活疫苗主要指利用人工致弱(如剔除毒力因子)或自然筛选弱毒菌株而制成的活菌疫苗,接种后可在一定程度上模拟自然感染的过程,在避免致病性的前提下可有效刺激机体产生特异性的免疫保护力。减毒活疫苗具有用量小、免疫原性好、免疫保护期长等优点,但也存在毒力可能恢复的风险和贮藏运输条件高等缺点^[19]。

当前流行的细菌减毒的方法主要包括抗生素减毒和基因工程改造基因组减毒。抗生素减毒的原理在于细菌发展了抗性的同时即牺牲了毒力,一些抗性菌株的转录组学研究表明编码毒力因子的基因下调表达^[8]。但只有某些抗生素具有减毒的功效,并且不是所有已减毒的抗性菌株都具有免疫保护力^[20]。已见报道的抗生素减毒的罗非鱼链球菌减毒活疫苗为:1)具有新生霉素抗性的海豚链球菌强毒株制备成的减毒疫苗可对10 g左右的鱼苗有效^[21];2)具有司帕沙星抗性的无乳链球菌的多联减毒疫苗(含有30株具抗性的不同血清型的无乳链球菌)可有效保护3~5 g和15~20 g的鱼苗^[8]。基因工程改造致弱的减毒疫苗是将与病原菌致病力相关的基因删除后构建的活疫苗。基因工程改造的链球菌的减毒疫苗中,具有明显效果的包括荚膜多糖基因转录调控因子*cpsD*的缺失突变体^[22-23]以及*CpsA*的负显性(dominant negative)突变体^[24]、葡萄糖磷酸变位酶基因*pgmA*缺失突变体^[23,25-26]等。另外,细胞黏附因子*simA*缺失突变体^[27]、多糖脱乙酰酶*pdi*缺失突变体^[28]、荚膜多糖相关的*cpsY*、*cpsH*、*cpsM*、*cpsI*基因各自的缺失突变体^[22]等都能降低链球菌的毒力。

1.3 亚单位疫苗

亚单位疫苗是利用病菌的特定抗原成分制备而成。链球菌胞内和胞外的一些成分都有免疫保护性,可作为亚单位疫苗的候选。传统的亚单位疫苗指的是采用生化的方法提取的病原菌的抗原成分;而目前对链球菌亚单位疫苗的研究主要是采用分子生物学手段,从链球菌的表面蛋白或

毒力因子中筛选保护性抗原来生产基因工程亚单位疫苗。通过对无乳链球菌的基因组学分析,从其表面蛋白基因中筛选出4个(其一为 *Sip11*,其他3个还未得到准确鉴定)在小鼠中具有免疫保护作用的抗原^[29]。重组表达的 *Sip* 能使小鼠免受无乳链球菌的感染^[30],并且其对罗非鱼也可产生较好的免疫保护作用^[5]。可降解宿主免疫分子的毒力因子也可被用来设计疫苗。C5a 肽酶作为一种高度保守的无乳链球菌表面蛋白,存在于绝大多数血清型中,因而其部分片段可能诱导产生不依赖血清型的保护性抗体^[22]。链球菌 *cepl* 基因编码的蛋白质是可降解宿主细胞因子 IL-8 的蛋白酶^[22],也可能具有抗原性从而产生免疫保护力。此外,还有许多其他毒力因子也可能具有免疫保护性,如穿孔毒素 CAMP^[22]、荚膜蛋白^[22]、烯醇化酶^[22]、C α 和 C β 蛋白^[31-32]、LrrG 蛋白^[33]、膜蛋白 mtsB^[34] 等。蛋白组学分析海豚链球菌的全细胞裂解液蛋白样品得到的免疫原性蛋白中有3个被鉴定为烯醇酶(enolase)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、果糖二磷酸醛缩酶(fructose-bisphosphate aldolase)^[35]。在患病罗非鱼抗血清可识别的无乳链球菌胞外产物中,大小为55 kDa的蛋白只在新鲜分离菌株中存在,而在保种菌株内不存在,这可能与致病性直接相关^[36]。以上这些抗原都可以作为亚单位疫苗的候选。

1.4 DNA 疫苗

DNA 疫苗又称基因疫苗,是继全菌疫苗和亚单位疫苗之后的第三代疫苗,是用编码病原微生物保护性抗原的基因与真核表达载体构建成为质粒,通过肌肉注射等方式免疫动物,使保护性抗原在肌肉细胞内表达,诱导机体产生针对该抗原的免疫应答,从而达到预防病原微生物感染的目的。与传统疫苗相比,DNA 疫苗具有很多优点,如结构简单、易于标准化、安全性好、成本较低、易于保存和运输等^[37]。针对鱼类链球菌病的 DNA 疫苗的研究已有新进展,SUN 等^[38]发现海豚链球菌 DNA 疫苗 pSia10 能有效引起大菱鲆的先天性和适应性免疫反应,同时具有很好的免疫保护效应;而将海豚链球菌的 *Sia10* 和鳃弧菌的外膜蛋白 *OmpU* 制成二价 DNA 疫苗,对2种细菌都有免疫保护效果^[39]。另外,基于链球菌溶血素 S 簇成分的基因 *sagF*、*sagG*、*sagI* 而分别设计的单价 DNA 疫苗都能在鱼体中起效,并且三者的多联疫苗具有更强的免疫保护力^[40]。DNA 疫苗既可以表达质粒的形式直接使用;也可采用大肠杆菌的菌蛻作为质粒的载体注射使用,称之为重组菌蛻疫苗(recombinant ghost bacterial vaccine)^[41-42],例如将含有海豚链球菌 *GADPH* 基因的质粒装入大肠杆菌的菌蛻内制成的疫苗具有免疫保护作用^[43]。另外,从口服 DNA 疫苗开发的角度来看,凡是可作为鱼类饲料的生物表达系统,都可用作 DNA 疫苗的潜在载体生物。

1.5 被动免疫疫苗

被动免疫是将已产生特定抗体的动物血清注入易感个体内来进行免疫预防的方法。含有针对某病原的特定抗体

的血清即可称为被动免疫疫苗。被动免疫疫苗作为水产疫苗的优点是注射之后短期内(24~72 h)即可获得免疫保护力,而且基本无副作用^[35,44-45],但缺点是抗血清制备和尾静脉注射需要一定的专业知识和操作技巧。在罗非鱼的链球菌被动免疫疫苗的实验中,未灭活和灭活的血清的免疫保护率并无显著差别^[44],说明血清中的补体在被动免疫的过程中作用并不大,主要起作用的是识别特定抗原的抗体。对罗非鱼而言,被动免疫方法大致如下:1)为制备抗血清,首先给成年罗非鱼腹腔注射灭活疫苗,然后在免疫后30 d左右(具体时间范围需要根据不同疫苗各自的效果来确定)从尾静脉取血,血液在室温静置2 h后低速离心(1 000 $\times$ g, 10 min),收集上清液即为抗血清,分装保存在-20 $^{\circ}$ C;2)免疫鱼苗,从尾静脉给鱼苗注射抗血清(对于15~20 g 鱼苗^[35,46],每条注射100 μ L),即可使鱼苗获得免疫保护力^[35,44,46]。

2 影响疫苗效果的因素

疫苗对鱼体的免疫保护效果受多种因素影响,主要来自3个方面:抗原方面(包括疫苗性质、接种剂量、接种途径和佐剂等)、鱼体方面(鱼体的生理状态,包括年龄、体重和营养状况等)和环境方面(包括温度、水质、养殖密度、季节等)。因此,要使罗非鱼链球菌疫苗充分发挥作用,除了要在疫苗特性方面精心设计外,还要充分考虑下述一些影响因素。

2.1 接种途径

不同接种途径激发的免疫应答方式不同,因此应根据疫苗类型选择适当的免疫途径。目前鱼类疫苗的免疫途径主要有腹腔注射、肌肉注射、浸泡和口服。全菌疫苗和亚单位疫苗多用腹腔注射;而 DNA 疫苗则以肌肉注射方式接种为主。一般来说,腹腔或肌肉注射易于控制剂量,免疫应答效果较好(主要诱导系统免疫反应),但是鱼体的应激反应大,伤口易发生二次感染^[47];而口服和浸泡免疫操作简单,虽然免疫效果相对较弱(主要诱导粘膜免疫反应),但是鱼体的应激反应小,也更易大规模推广^[48]。因此对于鱼类来说,如果用特殊的微囊材料[如聚乳酸-羟基乙酸共聚物(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA)^[49]、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)^[50]]包裹疫苗,或者采用生物表达载体,比如微藻^[51]、酵母^[52-53]、农作物^[54]等,使其能够耐受胃部或前肠的酸性环境并在后肠缓释,口服无疑是适合疫苗大规模接种的方式。

2.2 佐剂

佐剂本身作为无免疫原性的物质,先于疫苗或与疫苗同时使用,能够非特异性地增强机体对抗原的特异性免疫应答,在一定程度上还可以延长疫苗免疫保护力的持续时间。理想的佐剂应具有以下特征:能促进抗原识别以及体液免疫和/或细胞免疫,不引起毒副作用,易于生产,稳定,价廉等。目前用于链球菌疫苗接种的佐剂有弗氏佐剂、

白油佐剂、铝胶佐剂、激素类佐剂和脂质体等,但是弗氏佐剂等油性佐剂的副作用很大,会引起鱼体的损伤和自身免疫^[47,55]。而在新型佐剂设计中,也有采用模式识别受体的相应配体(比如细菌的鞭毛蛋白、CpG等)来达到免疫刺激和避免组织损伤的效果^[49]。另外,动物自身免疫系统中一些先天性免疫分子也可用以设计分子佐剂。补体成分C5a和C3d分别具有促进T细胞和B细胞激活的作用^[56-57]、补体成分C4b结合蛋白可以激活T细胞^[58],这些补体成分都可被开发为分子佐剂;某些细胞因子也是候选的分子佐剂^[59],如IL-15^[60]和IFN- α ^[61];也有报道显示趋化因子(如CCL2^[62]和CCL5^[63])和免疫共刺激分子^[64]具有佐剂活性。但是免疫分子的佐剂作用对不同抗原是不同的,也有效果不够理想的例子^[65]。因而采用鱼体自身免疫分子(特别是先天性免疫分子)作为新型分子佐剂的研究具有重要意义,并且有必要对具体的抗原进行佐剂分子的选择和功能验证。

2.3 鱼体生理状态和环境因素

罗非鱼在接种链球菌灭活疫苗12 h后差异表达的ESTs中17%参与蛋白质合成,11%与免疫反应、能量代谢、信号转导有关^[66]。这表明鱼体中一些与基本生理活动相关的基因也参与到疫苗起效的过程。鱼体的生理状态,如年龄、体质量和营养状况等因素,也会影响疫苗的效果^[67]。一般接种都选择鱼苗下塘前进行,此时操作方便,节省人工。对3~5 g、15~20 g、30 g左右的鱼苗进行注射免疫均有报道,但无论是从可操作性还是从免疫效果来说,太小的罗非鱼苗(3~5 g,出苗1~2周,苗场出售的规格)不是接种疫苗的最佳选择,其免疫系统很可能尚未发育完善^[68-70]。另外,在喂食促生长的功能性饲料条件下,鱼类为保持较快的生长速度,免疫基因的表达水平就会下降^[71];而喂食添加免疫增强剂(比如酿酒酵母细胞壁^[72]和葡聚糖^[73])的饲料,可增强疫苗在鱼体中的免疫保护效果。因此,最好在正常营养状态下的幼鱼阶段(15~30 g)接种疫苗,并进行加强免疫以形成稳固的免疫记忆。在接种后喂食添加免疫增强剂的饲料也有助于疫苗发挥免疫保护作用。

此外,疫苗引起鱼类的抗体生成还易受水温、养殖密度等环境因素的影响。温度是影响鱼类免疫系统功能的最重要的环境因素^[74-75]。对大多数温水性鱼类而言,抗体产生的最适温度为20~30℃,而低温会影响鱼体的免疫应答,其中初次抗体生成和二次应答都会不同程度的受到低温的抑制^[74]。且拥挤的养殖环境也会导致鱼体的免疫力下降^[76]。因而,接种疫苗要选择水温适宜、天气情况稳定的季节,并且在保持较低的养殖密度的情况下进行。

3 总结与展望

传统的全菌疫苗对罗非鱼链球菌病有一定的预防效果,并且在近期内还是预防罗非鱼链球菌病的主要手段。然而,从长远来看,要确保有效防控罗非鱼链球菌病,还需要研

制更加安全、高效、低廉的新型疫苗。采用现代分子生物学技术研制新型罗非鱼链球菌疫苗,包括亚单位疫苗和DNA疫苗,或者在分子水平进行疫苗和分子佐剂的联合应用,将会为罗非鱼链球菌病预防注入新的活力。同时采用适当的包裹材料或生物载体将疫苗口服化,将简化罗非鱼链球菌疫苗的接种程序、扩大其应用范围。

笔者认为未来新型高效的罗非鱼链球菌疫苗的研制将通过以下3个方面的研究工作来实现:1)对罗非鱼链球菌的毒力因子、外膜蛋白和分泌蛋白等潜在保护性抗原成分的功能鉴定和免疫保护力分析是高效疫苗研发的基础;2)对包裹材料或生物载体的研究也是保证口服疫苗在鱼体内起效的重要保障;3)基于鱼类自身免疫分子的新型佐剂的发掘也是提高鱼类疫苗免疫效果的重要途径。

参考文献:

- [1] 卢迈新. 罗非鱼链球菌病研究进展[J]. 南方水产, 2010, 6(1): 75-79.
- [2] 李波, 陈明, 李莉萍, 等. 广西罗非鱼链球菌病原的生化鉴定及药敏试验[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(10): 93-95.
- [3] CHENG S, HU Y H, JIAO X D, et al. Identification and immunoprotective analysis of a *Streptococcus iniae* subunit vaccine candidate [J]. Vaccine, 2010, 28(14): 2636-2641.
- [4] 程爽. 一株海豚链球菌的分离鉴定及其亚单位疫苗研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 中国科学院大学, 2010.
- [5] 黎炯, 叶星, 可小丽, 等. 罗非鱼无乳链球菌 *Sip* 基因的克隆、表达及免疫原性分析[J]. 水生生物学报, 2012, 36(4): 626-633.
- [6] 郭玉娟, 张德锋, 樊海平, 等. 中国南方地区罗非鱼无乳链球菌的分子流行病学研究[J]. 水产学报, 2012, 36(3): 399-406.
- [7] EVANS J J, KLESIOUS 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.
- [8] PRIDGEON J W, KLESIOUS P H. Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* as potential vaccines by selecting for resistance to sparflaxacin[J]. Vaccine, 2013, 31(24): 2705-2727.
- [9] PARRA M, DERRICK S C, YANG A, et al. Malaria infections do not compromise vaccine-induced immunity against tuberculosis in mice[J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28164.
- [10] EVANS J J, KLESIOUS P H, SHOEMAKER C A. Therapeutic and prophylactic immunization against *Streptococcus iniae* infection in hybrid striped bass (*Morone chrysops* $\times$ *Morone saxatilis*) [J]. Aquac Res, 2006, 37(7): 742-750.
- [11] 余晓丽, 陈明, 李莉萍, 等. 罗非鱼海豚链球菌疫苗及其免疫效果的研究[J]. 淡水渔业, 2008, 38(6): 31-37.
- [12] 张俊, 黄木珍, 李安兴. 海豚链球菌灭活疫苗对罗非鱼免疫效果的初步研究[J]. 淡水渔业, 2011, 41(6): 50-53.
- [13] 张生, 曾忠良, 王凡, 等. 海豚链球菌灭活疫苗对罗非鱼免

- 疫效果的研究[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2007, 32(5): 65-70.
- [14] KLESIUS P H, SHOEMAKER C A, EVANS J J. Efficacy of single and combined *Streptococcus iniae* isolate vaccine administered by intraperitoneal and intramuscular routes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Aquaculture, 2000, 188(3/4): 237-246.
- [15] SHOEMAKER C A, KLESIUS P H, EVANS J J. Prevalence of *Streptococcus iniae* in tilapia, hybrid striped bass, and channel catfish on commercial fish farms in the United States [J]. Am J Vet Res, 2001, 62(2): 174-177.
- [16] 陈明, 梁万文, 甘西, 等. 罗非鱼二联链球菌灭活疫苗的制备方法: 中国, CN 101890159 B [P]. 2012-07-25.
- [17] CHEN M, WANG R, LI L P, et al. Screening vaccine candidate strains against *Streptococcus agalactiae* of tilapia based on PFGE genotype [J]. Vaccine, 2012, 30(42): 6088-6092.
- [18] AMAL M N, ZAMRI-SAAD M, SITI-ZAHRAH A, et al. Molecular characterization of *Streptococcus agalactiae* strains isolated from fishes in Malaysia [J]. J Appl Microbiol, 2013, 115(1): 20-29.
- [19] FREY J. Biological safety concepts of genetically modified live bacterial vaccines [J]. Vaccine, 2007, 25(30): 5598-5605.
- [20] PRIDGEON J W, KLESIUS P H, YILDIRIM-AKSOY M. Attempt to develop live attenuated bacterial vaccines by selecting resistance to gossypol, proflavine hemisulfate, novobiocin, or ciprofloxacin [J]. Vaccine, 2013, 31(18): 2222-2230.
- [21] PRIDGEON J W, KLESIUS P H. Development and efficacy of a novobiocin-resistant *Streptococcus iniae* as a novel vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) [J]. Vaccine, 2011, 29(35): 5986-5993.
- [22] BAIANO J C F, BARNES A C. Towards control of *Streptococcus iniae* [J]. Emerg Infect Dis, 2009, 15(12): 1891-1896.
- [23] LOCKE J B, VICKNAIR M R, OSTLAND V E, et al. Evaluation of *Streptococcus iniae* killed bacterin and live attenuated vaccines in hybrid striped bass through injection and bath immersion [J]. Dis Aquat Org, 2010, 89(2): 117-123.
- [24] HANSON B R, RUNFT D L, STREETER C, et al. Functional analysis of the CpsA protein of *Streptococcus agalactiae* [J]. J Bacteriol, 2012, 194(7): 1668-1678.
- [25] BUCHANAN J T, STANNARD J A, LAUTH X, et al. Novel isolated *Streptococcus iniae* bacterium comprising deficient phosphoglucomutase, useful for preventing *S. iniae* disease, preferably meningoencephalitis [P]. United States, WO2006089121-A2; US2009162401-A1.
- [26] BUCHANAN J T, STANNARD J A, LAUTH X, et al. *Streptococcus iniae* phosphoglucomutase is a virulence factor and a target for vaccine development [J]. Infect Immun, 2005, 73(10): 6935-6944.
- [27] LOCKE J B, AZIZ R K, VICKNAIR M R, et al. *Streptococcus iniae* M-like protein contributes to virulence in fish and is a target for live attenuated vaccine development [J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2824.
- [28] MILANI C J, AZIZ R K, LOCKE J B, et al. The novel polysaccharide deacetylase homologue *Pdi* contributes to virulence of the aquatic pathogen *Streptococcus iniae* [J]. Microbiology, 2010, 156(Pt 2): 543-554.
- [29] MAIONE D, MARGARIT I, RINAUDO C D, et al. Identification of a universal group B streptococcus vaccine by multiple genome screen [J]. Science, 2005, 309(5731): 148-150.
- [30] 于丽华, 李慎涛, 岳丽琴, 等. B族链球菌表面免疫原性蛋白的免疫原性及其抗体保护功能 [J]. 中国生物制品学杂志, 2007, 11(20): 798-801.
- [31] GRAVEKAMP C, KASPER D L, PAOLETTI L C, et al. Alpha C protein as a carrier for type III capsular polysaccharide and as a protective protein in group B streptococcal vaccines [J]. Infect Immun, 1999, 67(5): 2491-2496.
- [32] KONG F R, GIDDING H F, BERNER R, et al. *Streptococcus agalactiae* C beta protein gene (bac) sequence types, based on the repeated region of the cell-wall-spanning domain: relationship to virulence and a proposed standardized nomenclature [J]. J Med Microbiol, 2006, 55(7): 829-837.
- [33] SEEPERSAUD R, HANNIFFY S B, MAYNE P, et al. Characterization of a novel leucine-rich repeat protein antigen from group B streptococci that elicits protective immunity [J]. Infect Immun, 2005, 73(3): 1671-1683.
- [34] ZOU L L, WANG J, HUANG B F, et al. MtsB, a hydrophobic membrane protein of *Streptococcus iniae*, is an effective subunit vaccine candidate [J]. Vaccine, 2011, 29(3): 391-394.
- [35] LAFRENTZ B R, SHOEMAKER C A, KLESIUS P H. Immuno-proteomic analysis of the antibody response obtained in Nile tilapia following vaccination with a *Streptococcus iniae* vaccine [J]. Vet Microbiol, 2011, 152(3/4): 346-352.
- [36] PASNIK D J, EVANS J J, PANANGALA V S, et al. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy [J]. J Fish Dis, 2005, 28(4): 205-212.
- [37] 陈振海, 林天龙, 夏春. 鱼类 DNA 疫苗研究的新进展 [J]. 水生生物学报, 2003, 27(6): 648-652.
- [38] SUN Y, HU Y H, LIU C S, et al. Construction and analysis of an experimental *Streptococcus iniae* DNA vaccine [J]. Vaccine, 2010, 28(23): 3905-3912.
- [39] SUN Y, ZHANG M, LIU C S, et al. A divalent DNA vaccine based on Sia10 and OmpU induces cross protection against *Streptococcus iniae* and *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder [J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 32(6): 1216-1222.
- [40] SUN Y, HU Y H, LIU C S, et al. Construction and comparative study of monovalent and multivalent DNA vaccines against *Streptococcus iniae* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 33(6): 1303-1310.
- [41] PARK S J, LEE S J, KIM K H, et al. High cell density fed-batch fermentation for the production of recombinant *E. coli* K-12 ghost vaccine against streptococcal disease [J]. Biotechnol Bioproc E, 2011, 16(4): 733-738.
- [42] HU Y H, DANG W, DENG T, et al. *Edwardsiella tarda* DnaK:

- expression, activity, and the basis for the construction of a bivalent live vaccine against *E. tarda* and *Streptococcus iniae*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2012, 32(4): 616–620.
- [43] RA C H, KIM Y J, PARK S J, et al. Evaluation of optimal culture conditions for recombinant ghost bacteria vaccine production with the antigen of *Streptococcus iniae* GAPDH[J]. J Microbiol Biotech, 2009, 19(9): 982–986.
- [44] PASNIK D J, EVANS J J, KLESIUS P H. Passive immunization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) provides significant protection against *Streptococcus agalactiae*[J]. Fish Shellfish Immunol, 2006, 21(4): 365–371.
- [45] LAFRENTZ B R, LAPATRA S E, JONES G R, et al. Passive immunization of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Flavobacterium psychrophilum*, the causative agent of bacterial coldwater disease and rainbow trout fry syndrome[J]. J Fish Dis, 2003, 26(7): 371–384.
- [46] SHELBY R A, KLESIUS P H, SHOEMAKER C A, et al. Passive immunization of tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), with anti-*Streptococcus iniae* whole sera[J]. J Fish Dis, 2002, 25(1): 1–6.
- [47] KOPPANG E O, HAUGARVOLL E, HORDVIK I, et al. Vaccine-associated granulomatous inflammation and melanin accumulation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., white muscle[J]. J Fish Dis, 2005, 28(1): 13–22.
- [48] SOLTANI M, ALISHAHI M, MIRZARGAR S, et al. Vaccination of rainbow trout against *Streptococcus iniae* infection: comparison of different routes of administration and different vaccines[J]. Iran J Fish Sci, 2007, 7(1): 129–140.
- [49] TAFALLA C, BOGWALD J, DALMO R A. Adjuvants and immunostimulants in fish vaccines: current knowledge and future perspectives [J]. Fish Shellfish Immunol, doi: 10.1016/j.fsi.2013.02.029.
- [50] ADELMANN M, KOLLNER B, BERGMANN S M, et al. Development of an oral vaccine for immunisation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against viral haemorrhagic septicaemia [J]. Vaccine, 2008, 26(6): 837–844.
- [51] GREGORY J A, TOPOL A B, DOERNER D Z, et al. Algae-produced cholera toxin-Pfs25 fusion proteins as oral vaccines[J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(13): 3917–3925.
- [52] ALLNUTT F C, BOWERS R M, ROWE C G, et al. Antigenicity of infectious pancreatic necrosis virus VP2 subviral particles expressed in yeast[J]. Vaccine, 2007, 25(26): 4880–4888.
- [53] SEO J Y, CHUNG H J, KIM T J. Codon-optimized expression of fish iridovirus capsid protein in yeast and its application as an oral vaccine candidate[J]. J Fish Dis, 2013, 36(9): 763–768.
- [54] AHMAD P, ASHRAF M, YOUNIS M, et al. Role of transgenic plants in agriculture and biopharming[J]. Biotechnol Adv, 2012, 30(3): 524–540.
- [55] KOPPANG E O, BJERKAS I, HAUGARVOLL E, et al. Vaccination-induced systemic autoimmunity in farmed Atlantic salmon [J]. J Immunol, 2008, 181(7): 4807–4814.
- [56] HUNG C Y, HURTGEN B J, BELLECOURT M, et al. An agonist of human complement fragment C5a enhances vaccine immunity against *Coccidioides* infection [J]. Vaccine, 2012, 30(31): 4681–4690.
- [57] ZHANG D, XIA Q, WU J, et al. Construction and immunogenicity of DNA vaccines encoding fusion protein of murine complement C3d-p28 and GP5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Vaccine, 2011, 29(4): 629–635.
- [58] FORBES E K, DE CASSAN S C, LLEWELLYN D, et al. T cell responses induced by adenoviral vectored vaccines can be adjuvanted by fusion of antigen to the oligomerization domain of C4b-binding protein[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44943.
- [59] THOMPSON A L, STAATS H F. Cytokines: the future of intranasal vaccine adjuvants [J]. Clin Dev Immunol, 2011: 289597.
- [60] PERERA P Y, LICHY J H, WALDMANN T A, et al. The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use [J]. Microbes Infect, 2012, 14(3): 247–261.
- [61] ARICO E, BELARDELLI F. Interferon-alpha as antiviral and anti-tumor vaccine adjuvants: mechanisms of action and response signature[J]. J Interferon Cytokine Res, 2012, 32(6): 235–247.
- [62] WATSON D, ZHENG G, WU H, et al. CCL2 DNA vaccine to treat renal disease[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(4): 729–732.
- [63] LAPTEVA N, HUANG X F. CCL5 as an adjuvant for cancer immunotherapy[J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10(5): 725–733.
- [64] AHLERS J D, BELYAKOV I M, BERZOFISKY J A. Cytokine, chemokine, and costimulatory molecule modulation to enhance efficacy of HIV vaccines[J]. Curr Mol Med, 2003, 3(3): 285–301.
- [65] WEISS R, GABLER M, JACOBS T, et al. Differential effects of C3d on the immunogenicity of gene gun vaccines encoding *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium berghei* MSP1 (42) [J]. Vaccine, 2010, 28(28): 4515–4522.
- [66] PRIDGEON J W, KLESIUS P H. Identification and expression profile of multiple genes in Nile tilapia in response to formalin killed *Streptococcus iniae* vaccination [J]. Vet Immunol Immunop, 2011, 142(3/4): 201–206.
- [67] CONCEICAO L E, ARAGAO C, DIAS J, et al. Dietary nitrogen and fish welfare[J]. Fish Physiol Biochem, 2012, 38(1): 119–141.
- [68] PARKER S, LA FLAMME A, SALINAS I. The ontogeny of New Zealand groper (*Polyprion oxygeneios*) lymphoid organs and IgM [J]. Dev Comp Immunol, 2012, 38(2): 215–223.
- [69] PATEL S, SORHUS E, FIKSDAL I U, et al. Ontogeny of lymphoid organs and development of IgM-bearing cells in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2009, 26(3): 385–395.
- [70] TIAN J Y, XIE H X, ZHANG Y A, et al. Ontogeny of IgM-pro-

- ducing cells in the mandarin fish *Siniperca chuatsi* identified by in situ hybridisation[J]. *Vet Immunol Immunop*, 2009, 132(2/3/4): 146–152.
- [71] TACCHI L, BICKERDIKE R, DOUGLAS A, et al. Transcriptional responses to functional feeds in Atlantic salmon (*Salmo salar*)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 31(5): 704–715.
- [72] SALVADOR R, TOAZZA C S, DE MORAES J R E, et al. Inflammatory responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* to *Streptococcus agalactiae*: effects of vaccination and yeast diet supplement [J]. *Dis Aquat Org*, 2012, 98(3): 235–241.
- [73] SKOV J, KANIA P W, HOLTEN-ANDERSEN L, et al. Immunomodulatory effects of dietary beta-1, 3-glucan from *Euglena gracilis* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immersion vaccinated against *Yersinia ruckeri* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2012, 33(1): 111–120.
- [74] LE MORVAN C, TROUTAUD D, DESCHAUX P. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defences in fish[J]. *J Exp Biol*, 1998, 201(Pt 2): 165–168.
- [75] WATSON L R, MILANI A, HEDRICK R P. Effects of water temperature on experimentally-induced infections of juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) with the white sturgeon iridovirus (WSIV)[J]. *Aquaculture*, 1998, 166(3/4): 213–228.
- [76] MAGNADOTTIR B. Innate immunity of fish (overview)[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2006, 20(2): 137–151.