

DOI: 10.12264/JFSC2021-0367

异源无乳链球菌胞外产物灭活疫苗对罗非鱼的免疫效果

祝璟琳^{1,2}, 邹芝英¹, 李大宇¹, 肖炜¹, 喻杰¹, 陈炳霖¹, 马文静², 杨弘¹, 沈锦玉³

1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业农村部淡水渔业和种质资源利用重点实验室, 江苏 无锡 214081;
2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;
3. 农业农村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: 为了研究异源无乳链球菌胞外产物灭活疫苗免疫罗非鱼后的免疫效果, 本研究采用 10% 甲醛溶液灭活法制备了无乳链球菌 HN0901 和 GX1101 胞外产物灭活疫苗, 通过腹腔注射途径免疫健康奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*♀×*O. aureus*♂), 在免疫后 28 d 用同/异源无乳链球菌攻毒, 测定了免疫后和攻毒后罗非鱼的免疫应答反应和血清抗体效价, 并比较了罗非鱼在腹腔注射 1×10^8 CFU/尾无乳链球菌后的相对免疫保护率和交叉免疫保护率。结果显示, 免疫鱼谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)在免疫后 28 d 显著高于对照组, 但在攻毒后显著低于对照组; 与对照鱼相比, 免疫鱼的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)水平在免疫和攻毒后均有不同程度的提高, 丙二醛(MDA)显著降低($P < 0.05$)。实时定量 PCR 结果显示, 炎性细胞因子基因 *TNF- α* 、*IL-1 β* 和 *TGF- β* , 体液免疫相关基因 *HSP70*, MHC II 和 IgM 在免疫和攻毒后也呈现显著升高趋势, 并显著高于对照组($P < 0.05$)。血清抗体效价于免疫后第 28 天达到 1 : 6400, 显著高于对照组($P < 0.05$)。攻毒实验结果显示, 免疫组在同源和异源无乳链球菌攻毒后相对的免疫保护率在 31.6%~47.4%。结果表明, 研制的灭活疫苗免疫罗非鱼后, 能够显著诱导罗非鱼体内的免疫应答, 产生中等疫苗效力, 对同/异源无乳链球菌都具有免疫保护能力。本研究结果为深入研究罗非鱼链球菌病的免疫预防技术和研制二价疫苗奠定了基础。

关键词: 无乳链球菌; 胞外产物; 灭活疫苗; 免疫保护; 奥尼罗非鱼

中图分类号: S941

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2022)02-0325-16

罗非鱼(*Oreochromis* spp.)是原产于非洲的暖水性鱼类, 具有生长快、产量高、肉质好、无肌间刺等优点。据《中国渔业统计年鉴》最新统计结果, 2020 年我国罗非鱼总产量 165.54 万 t, 产量稳居世界第一位^[1]。随着罗非鱼养殖规模的迅速扩大和高密度养殖, 由无乳链球菌(*Streptococcus agalactiae*)引起的链球菌病给我国罗非鱼产业造成了巨大的经济损失^[2-3]。在罗非鱼养殖场, 常规

的抗生素防治是目前控制无乳链球菌感染的主流方法, 但耐药性菌株出现、药残和环境污染对抗生素治疗提出了严峻的挑战^[4-5]。免疫接种是一种环境友好、安全有效的疾病预防方法, 目前已研发的罗非鱼的无乳链球菌疫苗包括细胞外产物(ECP)灭活疫苗^[6-7]、亚单位疫苗^[8-10]、DNA 疫苗^[11-13], 以及减毒活疫苗^[14-17]。虽然各类疫苗各有优缺点, 但相比较之下, 灭活疫苗因为安全性高和制备便

收稿日期: 2021-08-09; 修订日期: 2021-09-06.

基金项目: 农业农村部淡水渔业健康养殖重点实验室开放课题项目(ZJK202012); 财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系项目(CARS-46); 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心基本科研业务费项目(2021JBFM04); 中国水产科学研究院院级基本科研业务费-罗非鱼和鲤鱼遗传育种创新团队项目(2020TD37).

作者简介: 祝璟琳(1983-), 博士, 副研究员, 研究方向为淡水鱼抗病育种研究. E-mail: zhujinglin@ffrc.cn

通信作者: 杨弘, 研究员, 研究方向为淡水鱼遗传育种. E-mail: yanghong@ffrc.cn; 沈锦玉, 研究员, 研究方向为水产病害防治与免疫. E-mail: sjinyu@126.com

捷,只要解决好免疫剂量大和异源菌株间交叉保护力差的问题,可能比其余 3 类疫苗更适合于生产实践。

我国罗非鱼无乳链球菌的血清型主要是 I a 型,且多为 β 溶血,同时也发现少量的 I b 和 I c 型无乳链球菌^[18]。Chen 等^[2]发现无乳链球菌全菌灭活疫苗的免疫保护率不仅与菌株血清型有关,也与其 PFGE 基因型有关,很难获得一个单一的疫苗候选毒株,可以保护来自同一血清型的所有基因型毒株。本课题组对 2009 年以来在海南、广东、广西和福建分离的 42 株罗非鱼源无乳链球菌进行多重 PCR 血清型分析和脉冲场凝胶电泳(PFGE)基因型分型,发现它们都属于血清型 I a 型,以 HN0901 菌株为代表的 I 型和以 GX1101 菌株为代表的 IV 型是我国罗非鱼无乳链球菌的主要基因型。胞外产物是病原菌分泌的代谢产物,其中的某些蛋白质具有良好的免疫原性,能够引发宿主的免疫应答,是一种有效的保护性抗原。无乳链球菌胞外产物单价疫苗已被开发用于链球菌病控制,腹腔注射是最有效的递送途径^[6-7]。本研究研制了一种针对同一血清型、不同基因型的异源无乳链球菌胞外产物的单价灭活疫苗,评价了它们对无乳链球菌感染的免疫应答和免疫保护效果,并测定了它们对罗非鱼感染异源无乳链球菌的交叉保护能力。

1 材料与方法

1.1 菌株与实验用鱼

无乳链球菌保存于本实验室 -80°C 冰箱,菌株 HN0901 血清型为 I a 型,基因型为 I 型,在中国典型微生物保藏中心编号为 CCTCC NO: M 2020546;菌株 GX1101 血清型为 I a 型,基因型为 IV 型,在中国典型微生物保藏中心编号为 CCTCC NO: M 2020547。健康奥尼罗非鱼(*Oreochromis niloticus*♀×*O. aureus*♂)来自农业农村部罗非鱼遗传育种中心南泉基地,体重为 (180 ± 20) g。实验前暂养于循环养殖系统 1 周,水温 $(32\pm 1)^{\circ}\text{C}$,日投喂两次,检测无细菌感染后开展正式实验。

1.2 实验方法

1.2.1 无乳链球菌胞外产物灭活疫苗制备 从超

低温冰箱取出无乳链球菌 HN0901 和 GX1101,分别以 10^8 CFU/mL 的菌液浓度攻毒 10 尾健康罗非鱼进行复壮,2~3 d 后随机抽检濒死罗非鱼并做细菌分离和 API 20 strep 快速鉴定,确认为无乳链球菌后接种于脑心浸液(BHI)培养基, 28°C 摇床 200 r/min 扩大培养 72 h,然后加 10%甲醛溶液使终浓度为 3%,继续放在摇床中灭活 24 h。将灭活菌液经 4°C 、7000 g 离心 30 min,收集离心后上清液和沉淀菌体, 4°C 保存。上清液使用 3 kD 的 Amicon® Ultra-15 离心过滤器浓缩 20 倍,用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤器灭菌,浓缩的上清液即为胞外产物;细菌沉淀用无菌生理盐水进行重悬稀释后离心,重复重悬 3 次,浓缩液 10:1 (V/V)重悬菌体沉淀。疫苗的最终浓度为 4×10^9 CFU/mL,或在 540 nm 光密度下吸光值为 1.9,置于 4°C 冰箱保存备用。

1.2.2 疫苗无菌性及安全性检测 取 100 μL 灭活菌液分别涂布于血平板, 28°C 培养 48 h,观察有无细菌生长。将两种无乳链球菌灭活疫苗分别腹腔注射健康罗非鱼各 20 尾,免疫剂量为 0.2 mL/尾;另取健康罗非鱼 20 尾注射等剂量的无菌 PBS,连续观察 14 d,观察鱼体状况并进行记录,检测其安全性。

1.2.3 疫苗的免疫和采样 将无乳链球菌 HN0901 和 GX1101 灭活疫苗经腹腔注射分别免疫 120 尾健康罗非鱼,免疫剂量为 0.2 mL/尾。另取健康罗非鱼 120 尾腹腔注射等剂量的脑心浸液培养基(BHI)作为对照组。免疫后 28 d 每组各取 80 尾分别进行攻毒实验 1:免疫组分别腹腔注射浓度为 2.2×10^7 CFU/mL 的无乳链球菌 HN0901 或 GX1101,剂量为 0.2 mL/尾,每组 40 尾;对照组注射等量的菌液。免疫后 0 d、28 d 以及攻毒后 14 d、21 d,每组罗非鱼随机取 6 尾,尾静脉采血,室温静置 2~4 h 后,4000 r/min 离心 15 min 分离血清。同时取肝脏放入含 1 mL Trizol 试剂的无 RNA 酶的冻存管中,液氮速冻后保存于 -80°C 冰箱。

1.2.4 罗非鱼血清酶活力指标测定 将采集的罗非鱼血清进行酶活力测定,谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)活性的测定采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒,所用测试方法

参考试剂盒上的说明书操作。

1.2.5 qRT-PCR 检测免疫相关基因 将肝脏样品从-80 ℃超低温冰箱中取出,用高通量组织研磨机(Sceintz-48 型,宁波新芝公司)匀浆研磨,采用 Trizol 法提取总 RNA,按照 RT-PCR 试剂盒(PrimeScriptTM, TaKaRa 公司)说明书将 RNA 反转录成 cDNA。荧光定量 PCR 检测基因 *TNF-α*、*IL-1β*、*TGF-β*、*HSP70*、MHC II 和 IgM 相对表达量变化,引物(表 1)由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 本研究所用引物序列
Tab. 1 Primer sequences used in the study

基因 gene	正向引物(5'-3') forward primer sequence	反向引物(5'-3') reverse primer sequence
<i>TNF-α</i>	ATATGGAAAGTGTGCG CCGT	TTGTGTCATCCTTTCT GGCC
<i>IL-1β</i>	GGCATCAAAGGCACA AACCT	TCGCTTTCAGCGCTTA TCCT
<i>TGF-β</i>	TGGGACTATGAGCAG GAGGG	AACAGCAGTTGTGTGA TTGGGT
<i>HSP70</i>	CATCGCCTACGGTCTG GACAA	TGCCGTCTTCAATGGT CAGGAT
MHC II	AGTGTGGGGAAGTTT GTTGGAT	ATGGTGACTGGAGAG AGGCG
IgM	ACGAGGAAGCAGACT CAAGTTAT	ACAATAGCTCTAGTTG TGTTAACC
<i>β-actin</i>	GTTGCCATCCAGGCTG TGCT	TCTCGGCTGTGGTGGT GAAG

在 7900HT Fast Real Time PCR 仪(ABI 公司,美国)上进行 qRT-PCR 检测。20 μL 反应体系为: 2×SYBR Green I real-time PCR Master Mix (Toyobo 公司, 日本) 10 μL, cDNA 模板 1 μL, 上下游引物(10 μmol/L)各 0.8 μL, 无 RNA 水 7.4 μL; PCR 扩增程序: 95 ℃预变性 5 min; 95 ℃变性 15 s, 60 ℃退火 20 s, 72 ℃延伸 40 s, 40 个循环。目的基因和内参基因扩增效率基本一致的前提下,用 2^{-ΔΔCt} 法分析计算目的基因的相对表达量。

1.2.6 血清抗体效价测定 参考 Shoemaker 等^[19]的方法,用间接 ELISA 方法测定免疫和攻毒后罗非鱼血清抗体效价。罗非鱼 IgM 单克隆抗体购于英国 Aquatic Diagnostic Ltd, HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购于天根生化科技(北京)有限公司。

1.2.7 免疫保护率测定 在免疫后第 28 天,在 2 个免疫组和 1 个对照组随机各取 40 尾,用无乳链

球菌菌株 HN0901、GX1101 进行攻毒实验 2: 每尾鱼注射 0.2 mL (菌浓度为 50 倍 LD₅₀, 即 5×10⁸ CFU/mL), 水温 32 ℃, 观察鱼发病症状, 连续记录 14 d。免疫保护率(RPS)=(1-免疫组死亡率/对照组死亡率)×100%。

1.3 统计分析

数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示,用 SPSS 25 分析各实验组之间的差异性,若差异显著($P < 0.05$),用 Duncan 检验法进行多重比较。所有数据用 GraphPadPrism8 软件作图。

2 结果与分析

2.1 疫苗质量检测结果

HN0901、GX1101 灭活疫苗分别涂布在血平板上, 28 ℃培养 48 h 后均未见细菌生长, 表明两种疫苗均被完全灭活。将浓缩后的灭活疫苗原液分别腹腔注射罗非鱼, 连续观察 14 d, 所有鱼无死亡, 摄食状况正常, 表明疫苗的安全性良好。

2.2 血清中谷丙转氨酶和谷草转氨酶的活性变化

免疫前奥尼罗非鱼血清 ALT 和 AST 活力各组之间没有显著性差异, 免疫后 28 d HN0901 免疫组和 GX1101 免疫组血清 ALT 和 AST 活力显著高于对照组($P < 0.05$)。用 HN0901 和 GX1101 菌株对各组进行攻毒后, 对照组 ALT 和 AST 活力显著升高, 且都高于免疫组($P < 0.05$); HN0901 菌株攻毒后 HN0901 免疫组在攻毒 14 d 血清 ALT 和 AST 活力恢复到攻毒前水平, GX1101 免疫组则在攻毒后 21 d 恢复到攻毒前水平(图 1 和图 2)。用 GX1101 菌株对各组进行攻毒, HN0901 免疫组在攻毒 14 d 血清 ALT 和 AST 活力就恢复到攻毒前水平, GX1101 免疫组血清 AST 和 ALT 活力分别在攻毒后 14 d 和攻毒后 21 d 恢复到攻毒前水平(图 1 和图 2)。

2.3 血清中抗氧化酶活力的变化

免疫前各组罗非鱼血清 SOD 活力无显著性差异($P > 0.05$), 免疫 28 d 两组免疫组的血清 SOD 活力显著高于对照组($P < 0.05$), 而对照组血清 SOD 活力没有显著性差异($P > 0.05$)。在同/异源无乳链球菌攻毒后, HN0901 免疫组的罗非鱼血清 SOD 活力无显著性差异($P > 0.05$), GX1101 免疫组的血清 SOD 活力与免疫 28 d 相比显著降低($P < 0.05$),

同时显著高于免疫前血清 SOD 活力($P<0.05$); 对照组在攻毒后 14 d 和 21 d 血清 SOD 活力显著下降($P<0.05$); 攻毒后两个免疫组的血清 SOD 活力

显著高于对照组($P<0.05$, 图 3)。

HN0901 免疫组和 GX1101 免疫组血清 CAT 活力在免疫后 28 d 显著升高, 在同/异源无乳链球

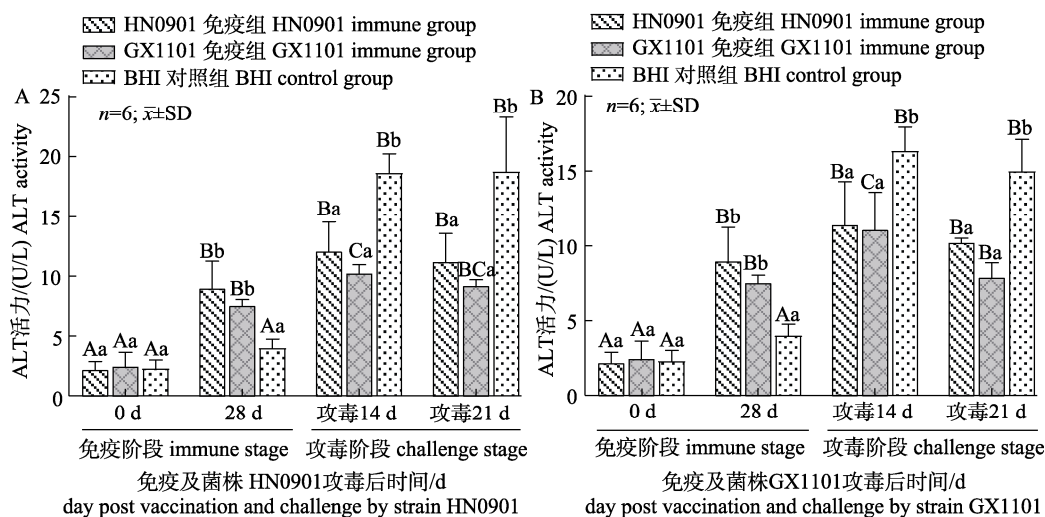


图 1 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901(A)和 GX1101 (B)菌株攻毒后的谷丙转氨酶(ALT)变化

图中不同大写字母表示同一免疫组在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);

不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 1 Serum ALT activity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀×*O.aureus*♂) after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

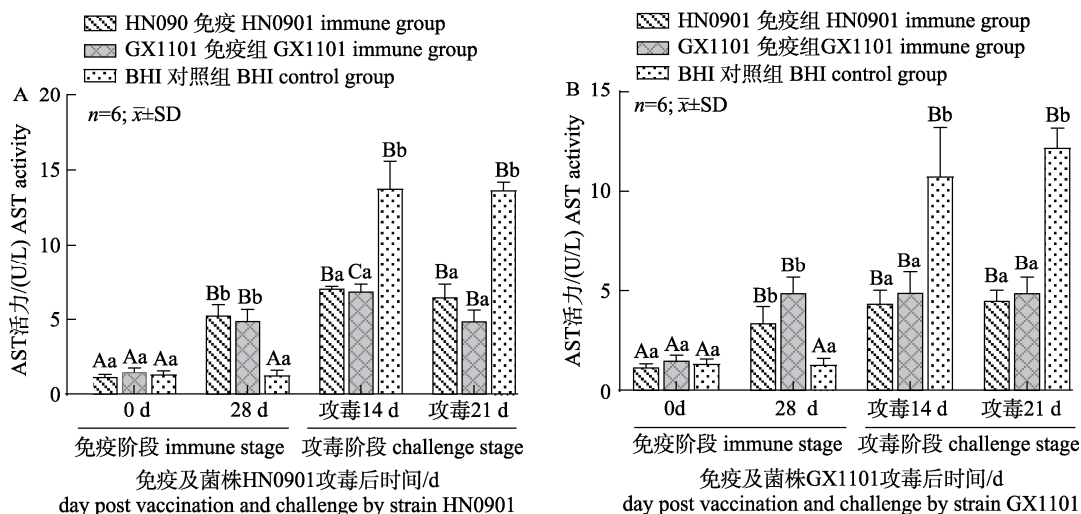


图 2 奥尼罗非鱼免疫后及攻毒 HN0901 (A)和 GX1101 (B)菌株后血清谷草转氨酶(AST)活力

图中不同大写字母表示同一免疫组在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);

不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 2 Serum AST activity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀×*O.aureus*♂) after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

菌攻毒后 14 d 和 21 d 均显著高于对照组($P<0.05$), 但与免疫后 28 d 没有显著性差异($P>0.05$)。BHI 对照组血清 CAT 活力免疫后 28 d 与免疫前无显

著性变化($P>0.05$), 在攻毒后 14 d 和 21 d 显著性降低($P<0.05$, 图 4)。免疫前各组罗非鱼之间血清 MDA 含量不存

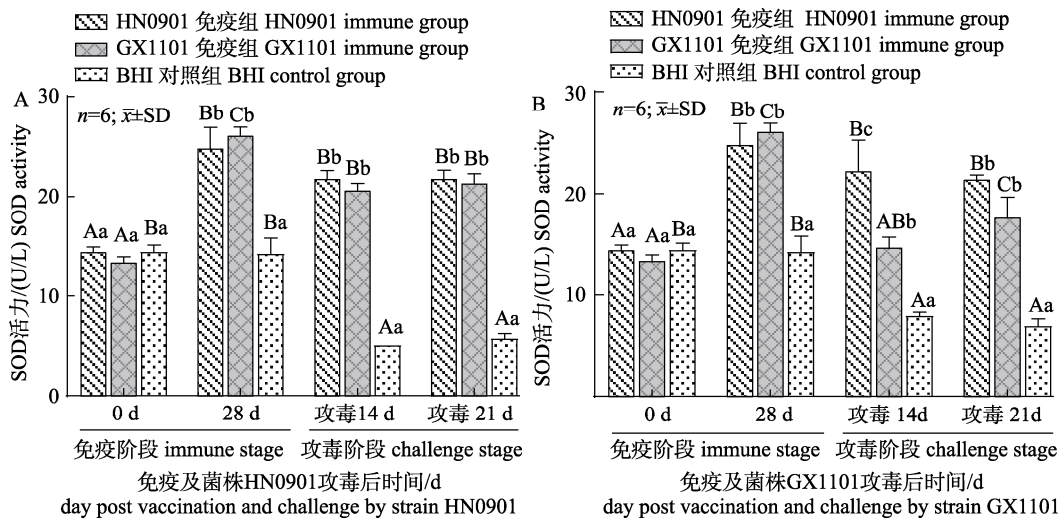


图 3 奥尼罗非鱼免疫后及攻毒 HN0901 (A)和 GX1101 (B)菌株后血清超氧化物歧化酶(SOD)活力
图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);
不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 3 Serum SOD activity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀ × *O. aureus*♂) after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

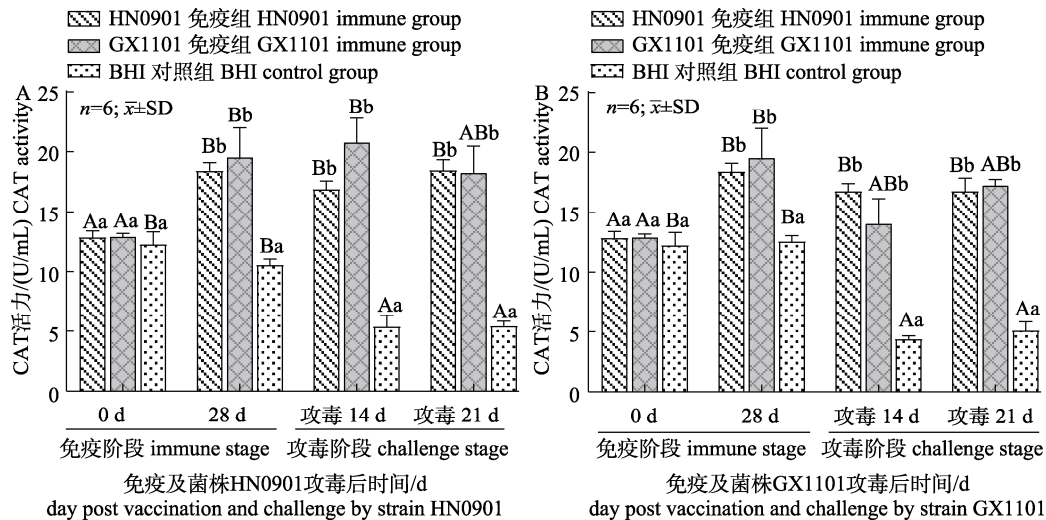


图 4 奥尼罗非鱼免疫后及攻毒 HN0901 (A)和 GX1101 (B)菌株后血清过氧化氢酶(CAT)活力
图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);
不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 4 Serum CAT activity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀ × *O. aureus*♂) after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

在显著性差异($P>0.05$), 免疫后 28 d HN0901 免疫组和 GX1101 免疫组罗非鱼血清 MDA 含量显著低于对照组($P<0.05$)。在同/异源无乳链球菌攻毒

后, 各组在攻毒后 14 d 的血清 MDA 含量显著升高($P<0.05$), 但对照组的值显著高于免疫组; 在攻毒后 21 d 恢复到免疫前水平(图 5)。

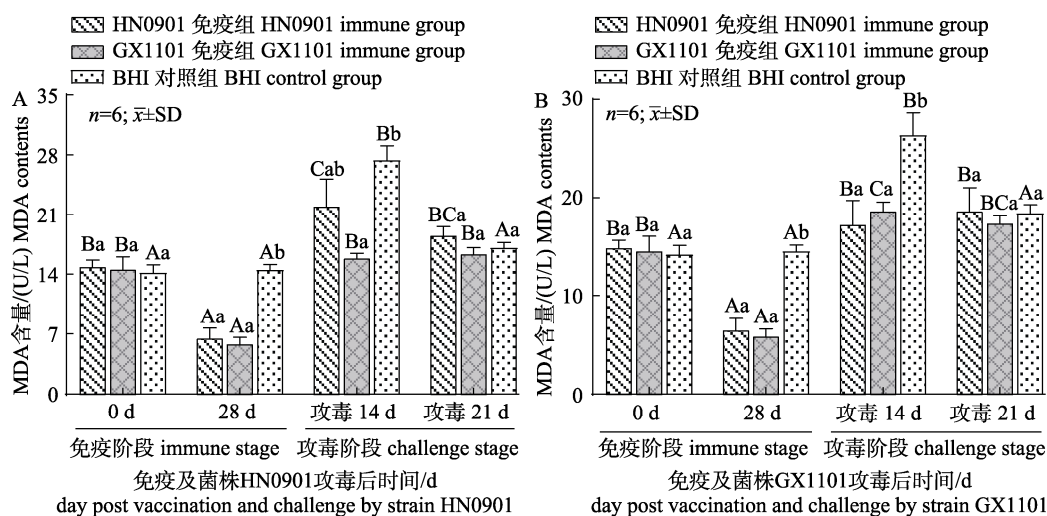


图 5 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901 (A) 和 GX1101 (B) 菌株攻毒后血清丙二醛(MDA)活力

图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);

不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$)。

Fig. 5 Serum MDA activity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀×*O. aureus*♂) after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

2.4 免疫相关基因的表达量变化

免疫前和免疫 28 d 各组罗非鱼肝脏 *TNF-α* 表达量无显著性差异($P>0.05$)。各组攻毒 HN0901 菌株后 14 d 两个免疫组肝脏 *TNF-α* 表达量显著高于对照组($P<0.05$), 其中 HN0901 免疫组肝脏 *TNF-α* 表达量显著升高($P<0.05$); 各组攻毒 GX1101 菌株后 14 d 两个免疫组肝脏 *TNF-α* 表达量显著升高($P<0.05$), 而且显著高于对照组($P<0.05$)。同/异源无乳链球菌攻毒后 21 d, 两个免疫组 *TNF-α* 下降至免疫后 28 d 时水平, 与对照组不存在显著性差异; 对照组在攻毒前后的 *TNF-α* 表达量无显著性差异($P>0.05$, 图 6)。

免疫前各组罗非鱼肝脏 *IL-1β* 表达量无显著性差异($P>0.05$), 免疫 28 d 两个免疫组肝脏 *IL-1β* 表达量显著高于对照组($P<0.05$)。对两组进行 HN0901 和 GX1101 菌株攻毒, 攻毒后 14 d 两组肝脏 *IL-1β* 表达量都显著升高($P<0.05$), 两个免疫组肝脏 *IL-1β* 表达量在攻毒后 14 d 和 21 d 都显著高

于对照组($P<0.05$, 图 7)。

免疫前各组罗非鱼肝脏 *TGF-β* 表达量无显著性差异($P>0.05$), 免疫 28 d HN0901 免疫组肝脏 *TGF-β* 表达量显著升高($P<0.05$)。对两组进行 HN0901 和 GX1101 菌株攻毒, 攻毒后 14 d 免疫组肝脏 *TGF-β* 表达量显著高于对照组($P<0.05$), GX1101 免疫组肝脏 *TGF-β* 表达量比免疫后 28 d 显著性升高($P<0.05$)。攻毒后 21 d 两个免疫组肝脏 *TGF-β* 表达量下降至与对照组同一水平(图 8)。

免疫前和免疫后 28 d 各组罗非鱼肝脏 *HSP70* 表达量无显著性差异($P>0.05$)。对两组进行 HN0901 和 GX1101 菌株攻毒, 攻毒后 14 d 免疫组肝脏 *HSP70* 表达量显著高于对照组($P<0.05$), 且比免疫期间显著升高($P<0.05$), 对照组在攻毒前后的 *HSP70* 表达量无显著性差异($P>0.05$)。其中 HN0901 菌株攻毒后 21 d HN0901 免疫组 *HSP70* 表达量下降, 但仍高于攻毒前 *HSP70* 表达量; GX1101 菌株攻毒后 21 d 两个免疫组的肝脏 *HSP70* 表达量降至免疫

28 d 时的水平(图 9)。

免疫前和免疫后 28 d 各组罗非鱼肝脏 MHC II 表达量无显著性差异($P>0.05$)。对各组进行

HN0901 和 GX1101 菌株攻毒, 攻毒 14 d 后两个免疫组肝脏 MHC II 表达量显著升高($P<0.05$), 并且显著高于对照组($P<0.05$)。对照组在 HN0901

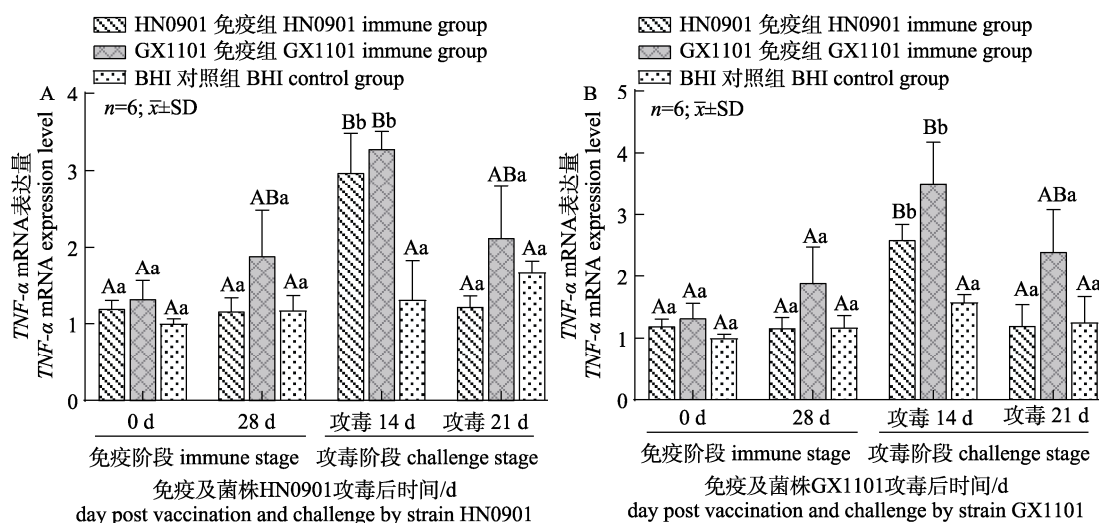


图 6 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901 (A) 和 GX1101 (B) 菌株攻毒后肝脏 *TNF-α* mRNA 表达量的变化
图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);
不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 6 The change of *TNF-α* mRNA expression level in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀×*O. aureus*♂) liver after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

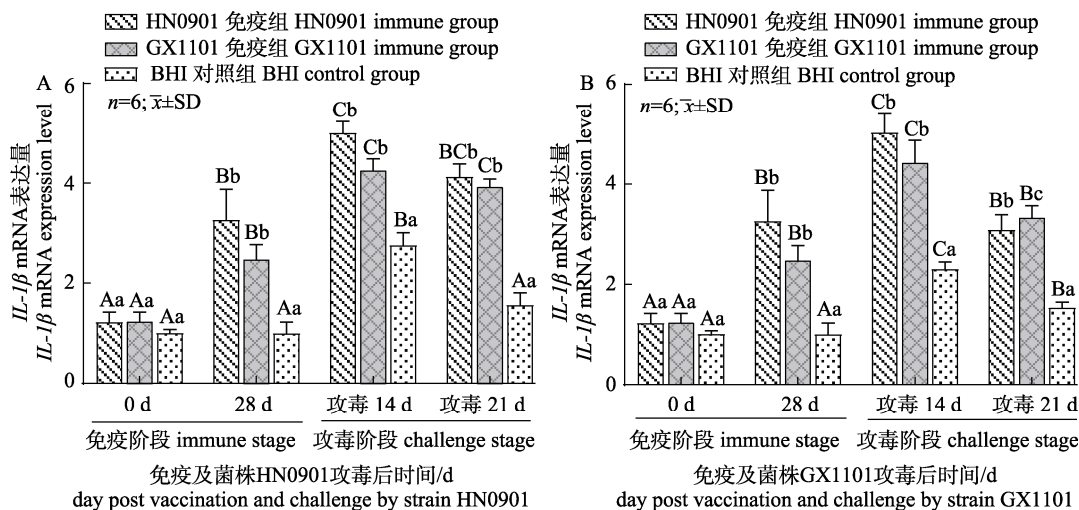


图 7 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901 (A) 和 GX1101 (B) 菌株攻毒后肝脏 *IL-1β* mRNA 表达量的变化
图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);
不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 7 The change of *IL-1β* mRNA expression level in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀×*O. aureus*♂) liver after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

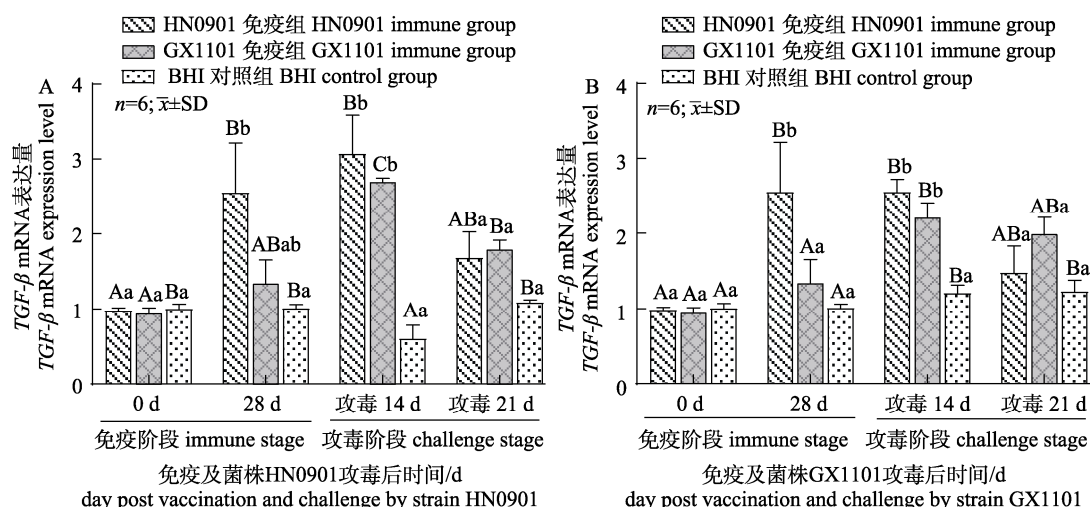


图 8 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901 (A) 和 GX1101 (B) 菌株攻毒后肝脏 $TGF-\beta$ mRNA 表达量的变化

图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著 ($P < 0.05$);

不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 8 The change of $TGF-\beta$ mRNA expression level in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) liver after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P < 0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P < 0.05$).

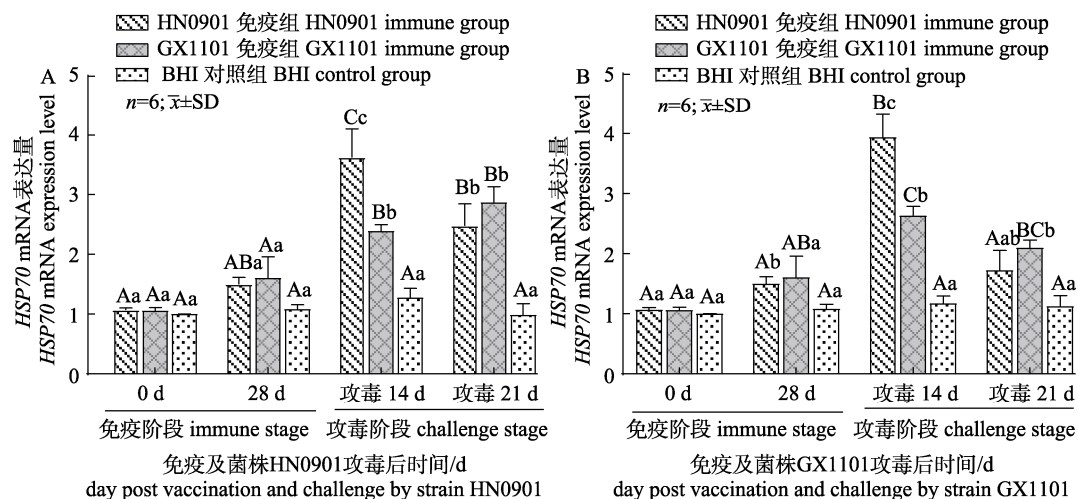


图 9 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901 (A) 和 GX1101 (B) 菌株攻毒后肝脏 $HSP70$ mRNA 表达量的变化

图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著 ($P < 0.05$);

不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著 ($P < 0.05$).

Fig. 9 The change of $HSP70$ mRNA expression level in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) liver after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P < 0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P < 0.05$).

菌株攻毒前后的 MHC II 表达量无明显差异 ($P > 0.05$), 在 GX1101 菌株攻毒后 14 d MHC II 表达量显著升高 ($P < 0.05$). GX1101 菌株攻毒后 21 d, 各组 MHC II 表达量恢复至免疫水平 (图 10)。

免疫前各组罗非鱼肝脏 IgM 表达量无显著性差异 ($P > 0.05$), 免疫 28 d 两个免疫组肝脏 IgM 表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$)。对各组进行 HN0901 和 GX1101 菌株攻毒, 攻毒后 14 d 和 21 d

两个免疫组 IgM 表达量显著高于对照组($P<0.05$), 对照组在攻毒后 14 d 的 IgM 表达量已恢复到攻毒前水平($P>0.05$, 图 11)。

2.5 抗体效价

ELISA 检测结果表明, 罗非鱼注射无乳链球菌胞外产物灭活疫苗后血清的抗体效价可达到

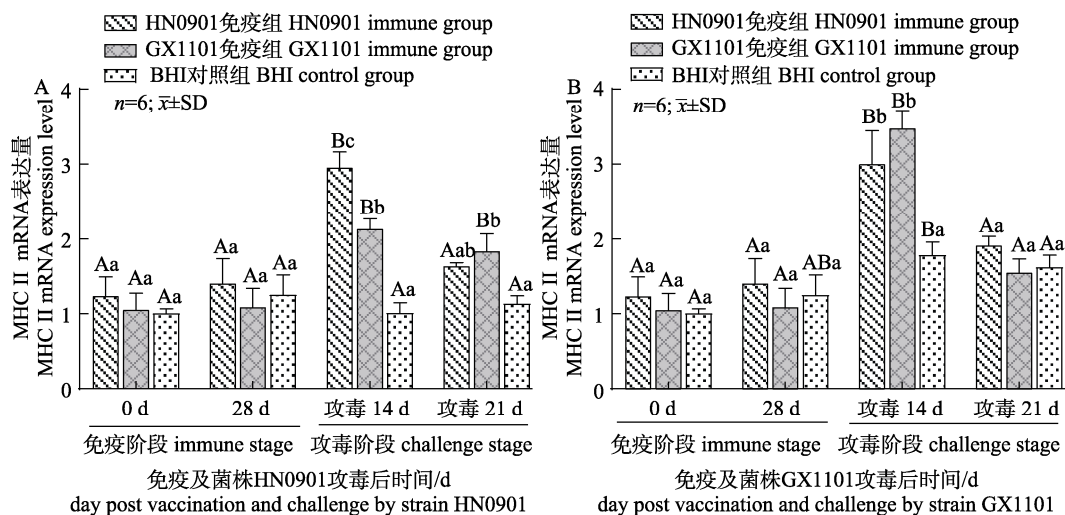


图 10 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901 (A) 和 GX1101 (B) 菌株攻毒后肝脏 MHC II mRNA 表达量的变化
图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);
不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 10 The change of MHC II mRNA expression level in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀ × *O. aureus*♂) liver after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

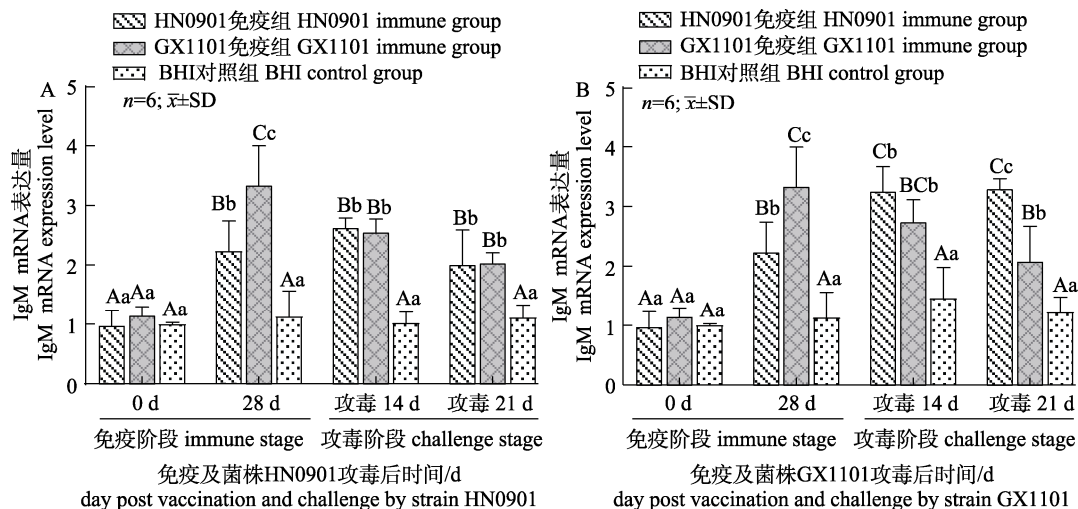


图 11 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901 (A) 和 GX1101 (B) 菌株攻毒后肝脏 IgM mRNA 表达量的变化
图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);
不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 11 The change of IgM mRNA expression level in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀ × *O. aureus*♂) liver after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)

Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

1 : 6400。从图 12 可见, 免疫前各组之间血清抗体效价无显著性差异($P>0.05$), 免疫后 28 d HN0901 免疫组和 GX1101 免疫组的抗体效价均显著高于对照组($P<0.05$)。用菌株 HN0901 攻毒后, HN0901 免疫组的抗体效价显著高于免疫 28 d 时的抗体效价。用菌株 GX1101 攻毒后, 两个免疫组在攻毒后 14 d 和 21 d 的抗体效价都显著高于攻毒后的对照组。

2.6 疫苗的免疫保护实验

罗非鱼免疫 28 d 后各组分别腹腔注射无乳链球菌 HN0901 菌株和 GX1101 菌株, 12 h 开始出现

死亡, 对照组罗非鱼在攻毒后 4 d 死亡率就达到 95%; 免疫组死亡持续一周, 死亡率在 50%~65% 之间, 一周后鱼不再死亡。攻毒后, 病鱼表现出典型链球菌病症状, 病鱼转圈, 泳姿失衡, 眼球突出; 分离并鉴定了死亡罗非鱼脑中的病原菌, 通过 API 20 Strep 试剂条检测均为无乳链球菌。无乳链球菌 HN0901 菌株攻毒后, HN0901 免疫组和 GX1101 免疫组的相对保护率分别为 31.6% 和 36.8%。GX1101 菌株攻毒后, HN0901 免疫组和 GX1101 免疫组的相对保护率分别为 47.4% 和 42.2% (表 2)。

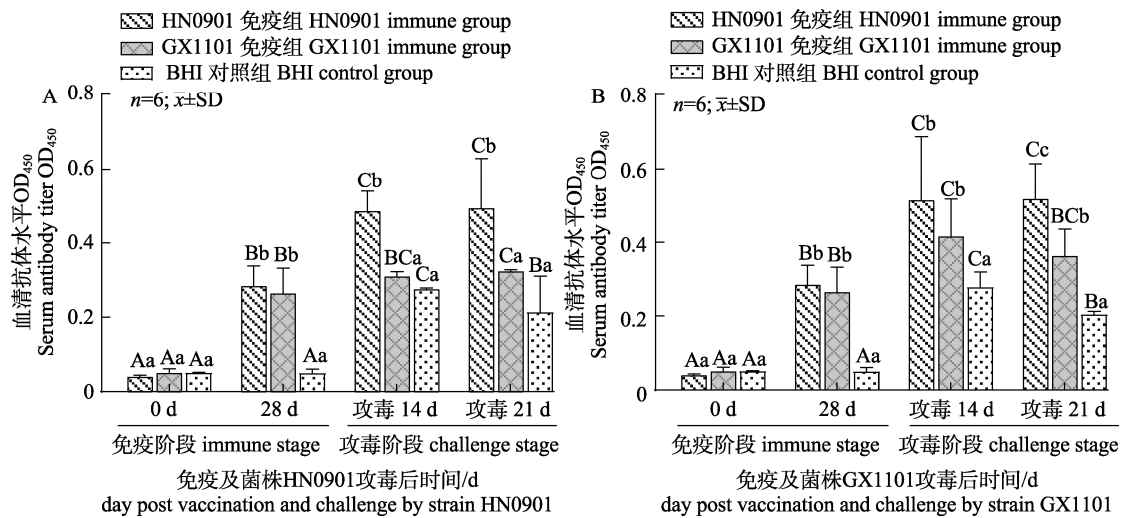


图 12 奥尼罗非鱼免疫后及 HN0901 (A)和 GX1101 (B)菌株攻毒后的血清效价
图中不同大写字母表示同一免疫罗非鱼在免疫和攻毒后不相同时间点差异显著($P<0.05$);
不同小写字母表示在相同时间点不同免疫组罗非鱼差异显著($P<0.05$).

Fig. 12 Serum antibody levels in in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀×*O. aureus*♂) after immunization and infected by HN0901 (A) and GX1101 (B)
Different uppercase letters indicate significant difference between different time points in the same group after immunization and challenge ($P<0.05$), and different lowercase letters indicate significant difference between different immune groups at the same time point after immunization and challenge ($P<0.05$).

表 2 HN0901 和 GX1101 菌株攻毒后各组奥尼罗非鱼免疫保护率
Tab. 2 Relative protection rate of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀×*O. aureus*♂) challenged by HN0901 and GX1101 strains

攻毒菌株 strain	组别 group	鱼总数/尾 fish number	死亡数/尾 death number	死亡率/% death rate	存活率/% survival rate	免疫保护率/% RPS	P
HN0901	BHI 对照组 BHI control group	20	19	95	5		
	HN0901 免疫组 HN0901 immune group	20	13	65	35	31.6	<0.05
	GX1101 免疫组 GX1101 immune group	20	12	60	40	36.8	<0.05
GX1101	BHI 对照组 BHI control group	20	19	95	5		
	HN0901 免疫组 HN0901 immune group	20	10	50	50	47.4	<0.05
	GX1101 免疫组 GX1101 immune group	20	11	55	45	42.2	<0.05

3 讨论

无乳链球菌作为引起罗非鱼链球菌病的主要病原之一,对全世界罗非鱼产业具有严重的危害性^[20-21]。疫苗接种仍然是控制致病病原体最合适的方法,用单一细菌分离株制备的疫苗免疫的鱼总是缺乏对其他菌株或血清型的交叉保护。经过近10年的流行病学调查,发现无乳链 I a 型是罗非鱼感染中最常见的血清型,占无乳链球菌分离株的90%以上^[18]。本实验选用两株无乳链球菌 HN0901 和 GX1101 血清型都是 I a 型,基因型 I 型和 IV 型分别对应 Chen 等^[2]研究中的基因型 F 型和 D 型,是我国罗非鱼源无乳链球菌的优势基因型。作者分别制备 10% 甲醛溶液灭活的胞外产物疫苗,采用腹腔注射的方法对罗非鱼进行免疫,以诱导鱼体产生抗体,减少罗非鱼感染链球菌后死亡。

3.1 疫苗对罗非鱼血清谷丙转氨酶和谷草转氨酶的影响

ALT 和 AST 是肝脏中最重要的转氨酶之一,肝损伤会改变它们的转运功能和膜通透性,导致 ALT 和 AST 从细胞渗漏到血清,血清中转氨酶的活性明显升高,可作为肝脏受损的指示指标^[22]。Chen 等^[23]研究表明罗非鱼感染创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)和海豚链球菌(*Streptococcus iniae*)后肝脏受损程度与 AST、ALT 呈正相关。罗非鱼感染无乳链球菌后 ALT 和 AST 都显著升高^[24]。在本实验中,免疫 28 d 后免疫组血清 AST 和 ALT 活性显著高于对照组,说明免疫接种对罗非鱼肝脏造成了一定的损伤;但攻毒后对照组血清 AST 和 ALT 活性在攻毒后 21 d 都是成倍性显著上升,且显著高于免疫组,而 HN0901 免疫组在同/异源无乳链球菌攻毒后 14 d 血清 ALT 和 AST 活力恢复到攻毒前水平, GX1101 免疫组在攻毒后 21 d 恢复到攻毒前水平,表明无乳链球菌胞外产物灭活疫苗虽然对罗非鱼肝脏有一定的应激,但能对无乳链球菌感染造成的肝损伤起到修复作用。

3.2 疫苗对罗非鱼血清中抗氧化指标和丙二醛含量的影响

在鱼类中, SOD 和 CAT 的抗氧化反应是抵御

氧化应激的第一道防御措施。超氧化物歧化酶催化细胞内的氧自由基生成过氧化氢,而过氧化氢酶将过氧化氢分解为水和氧^[25]。本实验中免疫后 28 d 两个免疫组罗非鱼血清中 CAT 和 SOD 活性显著高于对照组,说明灭活疫苗免疫后可以提高罗非鱼血清中 CAT 和 SOD 酶活性,这与 Wang 等^[26]的研究结果一致。免疫组无乳链球菌攻毒后血清 CAT 和 SOD 活性无显著性差异,而对照组血清 CAT 和 SOD 活性显著下降,这与之前研究不同,可能是因为采样的时间点不同,鱼体免疫状态不同。据报道,在感染迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)后 7 d 牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)中 SOD、CAT 和 GST 活性显著升高^[27]。对照组血清 CAT 和 SOD 活性的下调表明,清除超氧阴离子自由基、氧代谢和免疫反应的作用减弱,而免疫组提高了鱼体抗氧化能力提高^[28]。

丙二醛(MDA)是脂质过氧化的产物,具有细胞毒性,它的含量代表了膜的过氧化程度,间接反映了机体的抗氧化能力^[25]。祝璟琳等^[29]研究表明吉富罗非鱼(*Oreochromis niloticus* GIFT strain)感染无乳链球菌后体内 MDA 含量显著提高。在本实验中,免疫组的 MDA 含量显著低于对照组,对各组的罗非鱼分别攻毒不同无乳链球菌菌株,对照组的血清 MDA 含量显著高于免疫组,说明对照组罗非鱼机体受到损伤,而免疫组则减少了脂质过氧化 MDA 的产生。

3.3 疫苗对罗非鱼免疫相关基因表达量的影响

硬骨鱼的肝脏是感染期间免疫调节的重要部位。*TNF- α* 和 *IL-1 β* 是疫苗效力的促炎指标,它们通过促进吞噬、淋巴细胞活化和白细胞的迁移,在对细菌感染的即时和早期反应中发挥重要作用^[30]。*TGF- β* 是重要的抗炎细胞因子,可以抵消促炎细胞因子的产生,限制炎症反应、病原体感染和组织炎症^[31]。接种无乳链球菌后,应激组罗非鱼炎症相关基因(*TNF- α* 、*IL-1 β* 和 *IL-10*)的转录水平显著升高^[28]。但持续的炎症反应也可能造成组织损伤,降低对无乳链球菌的抵抗力,这对鱼类可能是致命的^[32]。Wang 等^[33]研究表明在免疫后 35 d 整个观察期内,福尔马林灭活疫苗接种后的免疫罗非鱼中头肾和脾脏的 *IL-1 β* 、*TNF- α* 和 *TGF- β* 的

基因表达显著高于 PBS 假免疫的对照组。本实验中两个免疫组在同/异源无乳链球菌攻毒后 14 d 肝脏 $TNF-\alpha$ 和 $TGF-\beta$ 表达量显著高于对照组, $IL-1\beta$ 表达量在免疫和攻毒后的表达量都显著高于对照组, 而对照组 $TNF-\alpha$ 在免疫和攻毒后表达没有显著性变化。推测疫苗刺激鱼体产生促炎因子 $TNF-\alpha$ 和 $IL-1\beta$ 与抗炎因子 $TGF-\beta$, 彼此相互作用, 起到控制炎症和对抗病原体感染的作用; 之前报道罗非鱼 $TNF-\alpha$ 表达水平在攻毒后 7 d 也显著升高^[28], 但本实验结果表明 $TNF-\alpha$ 在攻毒后 14 d 已降低到免疫和攻毒前水平。

HSP70 是一种高度保守的应激蛋白, 有助于促进变性蛋白的重新折叠, 并靶向降解受损蛋白^[34]。细菌刺激后大量诱导的 HSP70 可能参与了鱼类的免疫反应^[35]。硬骨鱼 HSP70 可能通过诱导产生促炎细胞因子参与免疫调节^[36]。本实验中, 在同/异源无乳链球菌攻毒后 14 d 免疫组肝脏 HSP70 表达量显著高于对照组, 且比免疫期间显著升高, 说明灭活疫苗对机体产生了免疫刺激, 使机体在受到病原菌刺激时能够迅速做出反应。而对照组 HSP70 在免疫和攻毒后表达没有显著性变化, 可能是因为本实验采样间隔时间较长, 应激蛋白 HSP70 的表达水平已经恢复正常。高度多态的 MHC 分子在抗原处理和提呈途径中起着核心作用, MHC I 将内源性抗原递呈给 $CD8^+$ T 细胞, MHC II 结合细胞外抗原并呈递给 $CD4^+$ T 细胞^[37]。对于罗非鱼抵抗嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染来说, MHC II 比 MHC I 更重要^[38]。在本实验中, 免疫组和对照组在免疫后 28 d 和免疫前没有显著性变化, 在同/异源无乳链球菌攻毒后 14 d 免疫组肝脏 MHC II 表达量显著高于对照组, 21 d 后恢复至攻毒前水平。表明灭活疫苗在免疫后能够使机体在受到外源病原体侵害时, 通过提升抗原呈递能力增强罗非鱼的获得性免疫。IgM 被称为鱼类的主要抗体, 也是硬骨鱼体液免疫系统的主要组成部分, 可能有助于确定中和外来抗原, 如细菌和病毒^[39]。Mo 等^[16]研究表明免疫鱼体中 IgM 的表达水平与抗体水平相关。宋晓青等^[40]研究表明牙鲆经注射和浸泡免疫鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)灭活疫苗后, IgM 在脾和头

肾中的表达量在 14 d 内逐渐上升。类似的, 本实验中两个免疫组肝脏 IgM 表达量免疫后 28 d 显著上调, 且在免疫后和攻毒后都显著高于对照组, 而对照组 IgM 在免疫后 28 d 无显著性变化, 说明免疫组在攻毒前就产生了抗体, 对照组在感染前没有产生抗体。对照攻毒结果, 说明免疫球蛋白 IgM 在罗非鱼抵御无乳链球菌中起着至关重要的作用。

3.4 疫苗对罗非鱼抗体效价的影响

硬骨鱼具有一个相对完善的免疫系统, 当鱼体受到病原菌刺激时, 免疫器官被激活, 产生相应的应答反应调节机体免疫。Munang'Andu 等^[41]提出抗体可能是鱼类疫苗保护性免疫的最可靠的相关因素。Pasnik 等^[42]研究表明抗无乳链球菌的特异性抗体在鱼类对无乳链球菌的免疫中起主要作用。酶联免疫吸附试验(ELISA)等免疫分析方法被广泛用于评价疫苗诱导的抗体反应, 本实验研制的两种无乳链球菌胞外产物灭活疫苗在免疫后和攻毒期的抗体效价显著提高, 且显著高于对照组。其结果与海豚链球菌胞外产物灭活疫苗接种的结果一致, 罗非鱼抗体滴度显著升高^[19,43], 以及通过被动免疫实验证明了抗体的特异性保护作用^[44]。浓缩的胞外产物上清液在巨噬细胞中诱导趋化反应, 并且这种促炎反应可能有助于有效的免疫反应^[45]。

3.5 疫苗对罗非鱼的免疫保护效果

国外对罗非鱼无乳链球菌疫苗的研究较早, 并取得了一定的成效。用无乳链球菌胞外产物疫苗攻毒罗非鱼, 在 30~32 °C 下每尾鱼腹腔注射 $1.5 \times 10^4 \sim 3 \times 10^6$ CFU 的无乳链球菌后, 产生 62%~96.4% 的相对免疫保护率^[6,46-47]。本实验的两个单一灭活疫苗在罗非鱼腹腔注射接种后, 在同源和异源无乳链球菌攻毒后对相应病原体的感染均有保护作用, 相对免疫保护率在 31.6%~47.4% 不等, 与 Ramos-Espinoza 等^[48]的结果类似。其研究发现无乳链球菌替代灭活疫苗和常规甲醛疫苗之间具有同等的中等疫苗效力, 相对保护率在 33.3%~60%^[48]。关于无乳链球菌注射攻毒实验的研究表明, 鱼体死亡率取决于几个因素, 包括注射的菌量、鱼的重量、禁食和水质条件^[28]。本研究无乳

链球菌攻毒菌量为 1×10^8 CFU/尾鱼, 远高于之前的研究^[6,46-47], 造成了免疫组较高的死亡率, 因此推断攻毒细菌浓度过高影响了两个灭活疫苗的效力^[48]。一些研究表明, 与单价疫苗相比, 多价疫苗中不同细菌的某些组合可以增强保护作用, 如创伤弧菌和海豚链球菌合在一起可以诱导协同免疫效应^[49]。因此下一步可以在本研究基础上开展双价疫苗的研究, 预期可以取得更高的免疫保护率。

本研究针对我国血清型 I a 型, 但分属不同优势基因型的两株无乳链球菌, 研制了异源无乳链球菌胞外产物灭活疫苗, 使其免疫罗非鱼后, 能够显著诱导罗非鱼体内的免疫应答, 产生中等疫苗效力, 并对同源和异源无乳链球菌都具有免疫保护能力。本研究结果为深入研究罗非鱼链球菌病的免疫预防技术和研制二价疫苗奠定了基础。

参考文献:

- [1] Bureau of Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Fisheries Technology Extension Center, China Society of Fisheries. 2020 China Fishery Statistical Yearbook[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021: 25. [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. 2020 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021: 25.]
- [2] Chen M, Li L P, Wang R, et al. PCR detection and PFGE genotype analyses of streptococcal clinical isolates from tilapia in China[J]. Veterinary Microbiology, 2012, 159(3-4): 526-530.
- [3] Zhu J L, Yang H, Zou Z Y, et al. Isolation, identification and drug sensitivity test of pathogenic *Streptococcus* from tilapias *Oreochromis niloticus* cultured in Hainan[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(4): 590-596. [祝璟琳, 杨弘, 邹芝英, 等. 海南养殖罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)致病链球菌的分离、鉴定及其药敏试验[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(4): 590-596.]
- [4] Baquero F, Martínez J L, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2008, 19(3): 260-265.
- [5] Squadrone S. Water environments: Metal-tolerant and antibiotic-resistant bacteria[J]. Environmental Monitoring and Assessment, 2020, 192(4): 238.
- [6] 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.
- [7] Pasnik D J, Evans J J, Panangala V S, et al. Antigenicity of *Streptococcus agalactiae* extracellular products and vaccine efficacy[J]. Journal of Fish Diseases, 2005, 28(4): 205-212.
- [8] He Y, Wang K Y, Xiao D, et al. A recombinant truncated surface immunogenic protein (tSip) plus adjuvant FIA confers active protection against Group B *Streptococcus* infection in tilapia[J]. Vaccine, 2014, 32(51): 7025-7032.
- [9] 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. [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.]
- [10] Li Q Y, Ke X L, Lu M X, et al. Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of C5a peptidase (ScpB) of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(1): 169-179. [李庆勇, 可小丽, 卢迈新, 等. 罗非鱼无乳链球菌 C5a 肽酶(ScpB)的原核表达及其免疫原性[J]. 中国水产科学, 2014, 21(1): 169-179.]
- [11] Huang L Y, Wang K Y, Xiao D, et al. Safety and immunogenicity of an oral DNA vaccine encoding Sip of *Streptococcus agalactiae* from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* delivered by live attenuated *Salmonella typhimurium*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 38(1): 34-41.
- [12] Zhu L, Yang Q, Huang L Y, et al. Effectivity of oral recombinant DNA vaccine against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2017, 77: 77-87.
- [13] Wang B, Li G H, Lu Y S, et al. Chimeric DNA vaccine development and protective immunity analysis of Sip-GAPDH of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2014, 38(11): 1926-1936. [王蓓, 李桂欢, 鲁义善, 等. 无乳链球菌 Sip-GAPDH 嵌合核酸疫苗的制备及免疫效果评价[J]. 水产学报, 2014, 38(11): 1926-1936.]
- [14] Li L P, Wang R, Liang W W, et al. Development of live attenuated *Streptococcus agalactiae* vaccine for tilapia via continuous passage *in vitro*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 45(2): 955-963.
- [15] Liu L, Lu D Q, Xu J, et al. Development of attenuated erythromycin-resistant *Streptococcus agalactiae* vaccine for tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture[J]. Journal of Fish Diseases, 2019, 42(5): 693-701.

- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Zhang D F, Liu L H, Ren Y, et al. Isolation, identification, and molecular characteristics of a new genotype of *Streptococcus agalactiae* from cultured tilapia in China[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(5): 1044-1054. [张德锋, 刘礼辉, 任燕, 等. 我国罗非鱼源新型无乳链球菌的分离、鉴定及其分子特征[J]. 中国水产科学, 2015, 22(5): 1044-1054.]
- [19] 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.
- [20] Legario F S, Choresca C H, Turnbull J F, et al. Isolation and molecular characterization of streptococcal species recovered from clinical infections in farmed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in the Philippines[J]. Journal of Fish Diseases, 2020, 43(11): 1431-1442.
- [21] Syuhada R, Zamri-Saad M, Ina-Salwany M Y, et al. Molecular characterization and pathogenicity of *Streptococcus agalactiae* serotypes Ia ST7 and III ST283 isolated from cultured red hybrid tilapia in Malaysia[J]. Aquaculture, 2020, 515: 734543.
- [22] Mao X B, Tian Y, Wen H S, et al. Effects of *Vibrio harveyi* infection on serum biochemical parameters and expression profiles of interleukin-17 (IL-17) / interleukin-17 receptor (IL-17R) genes in spotted sea bass[J]. Developmental & Comparative Immunology, 2020, 110: 103731.
- [23] Chen C Y, Wooster G A, Bowser P R. Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate[J]. Aquaculture, 2004, 239(1-4): 421-443.
- [24] Zhu J L, Zou Z Y, Li D Y, et al. Study on resistant difference among four bleeding species of tilapia *Oreochromis* spp. following *Streptococcus agalactiae* challenge[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2017, 6(41): 1222-1241. [祝璟琳, 邹芝英, 李大宇, 等. 四个罗非鱼选育品种抗链球菌病能力差异研究[J]. 水生生物学报, 2017, 6(41): 1232-1241.]
- [25] Lee J W, Choi H, Hwang U K, et al. Toxic effects of lead exposure on bioaccumulation, oxidative stress, neurotoxicity, and immune responses in fish: A review[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2019, 68: 101-108.
- [26] Wang Q S, Fu T Z, Li X C, et al. Cross-immunity in Nile tilapia vaccinated with *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* vaccines[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 97: 382-389.
- [27] Kim J H, Sohn S, Kim S K, et al. Effects on hematological parameters, antioxidant and immune responses, AChE, and stress indicators of olive flounders, *Paralichthys olivaceus*, raised in bio-floc and seawater challenged by *Edwardsiella tarda*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 97: 194-203.
- [28] He R Z, Li Z C, Li S Y, et al. Development of an immersion challenge model for *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)[J]. Aquaculture, 2021, 531: 735877.
- [29] Zhu J L, Ji H T, Xiao W, et al. Protective effects from *Houttuynia cordata* against *Streptococcus agalactiae*-induced liver injury of GIFT *Oreochromis niloticus* strain[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(7): 1187-1197. [祝璟琳, 季桓涛, 肖炜, 等. 鱼腥草对无乳链球菌引起吉富罗非鱼肝脏损伤的修复作用[J]. 水产学报, 2020, 44(7): 1187-1197.]
- [30] Wang Q C, Ji W, Xu Z. Current use and development of fish vaccines in China[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 96: 223-234.
- [31] Wang J X, Liang D Z, Yang Q H, et al. The effect of partial replacement of fish meal by soy protein concentrate on growth performance, immune responses, gut morphology and intestinal inflammation for juvenile hybrid grouper (*Epinephelus fuscoguttatus* ♀ × *Epinephelus lanceolatus* ♂)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2020, 98: 619-631.
- [32] Ishibe K, Yamanishi T, Wang Y J, et al. Comparative analysis of the production of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) from macrophages exposed to high virulent and low virulent strains of *Edwardsiella tarda*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27(2): 386-389.
- [33] Wang Q S, Wang X P, Wang X M, et al. Generation of a novel *Streptococcus agalactiae* ghost vaccine and examination of its immunogenicity against virulent challenge in tilapia[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2018, 81: 49-56.
- [34] Roberts R J, Agius C, Saliba C, et al. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: A review[J]. Journal of Fish Diseases, 2010, 33(10): 789-801.
- [35] Han Y L, Hou C C, Du C, et al. Molecular cloning and expression analysis of five heat shock protein 70 (HSP70) family members in *Lateolabrax maculatus* with *Vibrio harveyi* infection[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2017, 60: 299-310.
- [36] Zhang A Y, Guo Y F, Zhang S N, et al. Cytokine effects and

- cellular signaling pathways of grass carp HSP70 in head kidney leukocytes[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 46(2): 550-556.
- [37] Ackerman A L, Cresswell P. Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens[J]. *Nature Immunology*, 2004, 5(7): 678-684.
- [38] Zhang L G, Wang C, Liu H, et al. The important role of phagocytosis and interleukins for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to defense infection of *Aeromonas hydrophila* based on transcriptome analysis[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 92: 54-63.
- [39] Yılmaz S, Ergün S. Trans-cinnamic acid application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): I. Effects on haematological, serum biochemical, non-specific immune and head kidney gene expression responses[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2018, 78: 140-157.
- [40] Song X Q, Xing J, Zhan W B. Variations of seven immune related genes expression in flounder (*Paralichthys olivaceus*) injected and immersed with inactivated *Vibrio anguillarum*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(4): 747-758. [宋晓青, 邢婧, 战文斌. 牙鲆经注射和浸泡免疫鳃弧菌灭活疫苗后7种免疫相关基因表达的变化[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(4): 747-758.]
- [41] Munang'Andu H M, Evensen Ø. Correlates of protective immunity for fish vaccines[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 85: 132-140.
- [42] 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 Immunology*, 2006, 21(4): 365-371.
- [43] 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.
- [44] 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]. *Journal of Fish Diseases*, 2002, 25(1): 1-6.
- [45] Klesius P H, Evans J J, Shoemaker C A. The macrophage chemotactic activity of *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus iniae* extracellular products (ECP)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 22(5): 443-450.
- [46] Pretto-Giordano L G, Müller E E, Klesius P, et al. Efficacy of an experimentally inactivated *Streptococcus agalactiae* vaccine in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) reared in Brazil[J]. *Aquaculture Research*, 2009, 41(10): 1539-1544.
- [47] Pasnik D J, Evans J J, Klesius P H. Duration of protective antibodies and correlation with survival in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* following *Streptococcus agalactiae* vaccination[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 66(2): 129-134.
- [48] Ramos-Espinoza F C, Cueva-Quiroz V A, Yunis-Aguinaga J, et al. A comparison of novel inactivation methods for production of a vaccine against *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus*[J]. *Aquaculture*, 2020, 528: 735484.
- [49] Shoemaker C A, LaFrentz B R, Klesius P H. Bivalent vaccination of sex reversed hybrid tilapia against *Streptococcus iniae* and *Vibrio vulnificus*[J]. *Aquaculture*, 2012, 354-355: 45-49.

Immune efficacy of inactivated vaccine of heterologous *Streptococcus agalactiae* extracellular product in hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀ × *O. aureus*♂)

ZHU Jinglin^{1,2}, ZOU Zhiying¹, LI Dayu¹, XIAO Wei¹, YU Jie¹, CHEN Binglin¹, MA Wenjing², YANG Hong¹, SHEN Jinyu³

1. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Freshwater Fisheries and Germplasm Resources Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuxi 214081, China;
2. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;
3. Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Key Laboratory of Fish Health and Nutrition of Zhejiang Province, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001, China

Abstract: To study the immune efficacy of inactivated vaccine of heterologous *Streptococcus agalactiae* extracellular product in tilapia (*Oreochromis niloticus*), two strains of *S. agalactiae* (HN0901 and GX1101) were cultured, and highly efficacious vaccines were developed using extracellular products and formalin-killed whole cells of HN0901 and GX1101. The vaccine was administered by intraperitoneal (i.p.) injection in a volume of 0.2 mL, and sham-vaccinated (control) fish were i.p. injected with the same volume of sterile BHI. At 28 d post-vaccination (DPV), the fish were challenged, i.p. injection, with approximately 1.0×10^8 CFU of homologous or heterologous *S. agalactiae* to determine the efficacy of protective immunity. The immune response and serum antibody titer of the immunized and post-injected tilapia were measured, and the relative immune protection rate and cross-immune protection rate were compared. The results showed that the alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase levels of immunized fish were significantly higher than those of control fish at 28 DPV but significantly lower than those of control fish post injection. Compared with the control fish, the levels of superoxide dismutase and catalase in immunized fish increased in varying degrees after immunization and challenge, while malondialdehyde levels decreased significantly ($P < 0.05$). The results of real-time quantitative polymerase chain reaction also indicated that *TNF- α* , *IL-1 β* , *TGF- β* , *HSP 70*, MHC II, and IgM expression levels showed different degrees of significant increase and were higher than those in the control group after immunization and challenge ($P < 0.05$). Serum antibody titer reached 1 : 6400 at 28 DPV, which was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$). The relative percentage of survival ranged from 31.6% to 47.4% after the homologous or heterologous *S. agalactiae* challenge. Furthermore, the developed inactivated vaccines significantly induced an immune response in tilapia and produced moderate vaccine efficacy. Administration of the single isolate HN0901 or GX1101 vaccine via i.p. injection was marginally protective in preventing streptococcal disease caused by homologous or heterologous isolates of *S. agalactiae*. Our findings laid a foundation for further studies on immune prevention technology against streptococcosis in tilapia and the development of bivalent vaccines.

Key words: *Streptococcus agalactiae*; extracellular product; inactivated vaccine; immune protection; hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀ × *O. aureus*♂)

Corresponding author: YANG Hong, E-mail: yanghong@ffrc.cn; SHEN Jinyu, E-mail: sjinyu@126.com