

· 研究综述 ·

## 鲆鲽类渔用疫苗研究现状及展望

甘玲玲<sup>1,2</sup> 王蔚芳<sup>2</sup> 雷霖霖<sup>2\*</sup> 刘新富<sup>2</sup> 温海深<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 青岛 266003)

(<sup>2</sup>农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 青岛市海水鱼类种子工程与生物技术重点实验室  
中国水产科学研究院黄海水产研究所, 266071)

**摘 要** 我国是世界鲆鲽类养殖大国, 近年来产业开始由开放式流水工厂化养殖向循环水工厂化养殖转变, 但是受病害问题的困扰, 产业转型提升受到巨大的制约, 为此探讨疾病有效防控方法成为水产界的紧迫任务之一。目前, 鱼病防治仍以化学药物防治为主, 生态预防、免疫预防的研究与应用刚刚起步, 渔用疫苗具有无残留、不会造成耐药性并能保证环境安全等优点而备受业界的关注。本综述分析了鲆鲽类疫苗的研制应用现状和存在的问题, 并对其发展前景作了初步预测, 以期为鲆鲽类养殖技术的转型提升, 也为工业化养殖建立一条安全、高效的鱼病防控体系提供参考。

**关键词** 鲆鲽类 疫苗 疾病 工厂化养殖

**中图分类号** S942.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)02-0125-07

## Fishery vaccine research and prospects in flatfish

GAN Ling-ling<sup>1,2</sup> WANG Wei-fang<sup>2</sup> LEI Ji-lin<sup>2\*</sup> LIU Xin-fu<sup>2</sup> WEN Hai-shen<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003)

(<sup>2</sup> Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture,  
Qingdao Key Laboratory for Marine Fish Breeding and Biotechnology,  
Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, 266071)

**ABSTRACT** Flow-through system for flatfish farming is transforming into industrialized Recirculation Aquaculture Systems in China, but development of the industry is greatly hampered by fish diseases. Currently, the main control methods against aquatic animal diseases include drug treatment, ecological prevention, and immunoprophylaxis. With the advantages of no pollution, no residue, and no drug tolerance, fishery vaccine possesses an overwhelming superiority, and its related research has attracted more and more attention. In this review, progresses and challenges on the study of fishery vaccine were summarized and analyzed to provide references for disease prevention and control in flatfish.

**KEY WORDS** Flatfish Fishery vaccine Disease Industrialized aquaculture

国家鲆鲽类产业技术体系(CARS-50)、中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费项目(20603022011018)和 2012 年度留学人员科技活动项目择优资助(优秀类)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: lejilin@seacul.com

收稿日期: 2012-03-23; 接受日期: 2012-10-29

作者简介: 甘玲玲(1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事鱼类免疫研究。E-mail: ganling\_de@hotmail.com, Tel: 18766228692

鲆鲽类俗称比目鱼,分类隶属于硬骨鱼类,鲽形目,有鲆科、鲽科、鲷科之分,是我国海水养殖种类中的重要组成部分,其肉质鲜美细嫩,胶质丰富,具有很高的营养和经济价值(雷霖霖 2005)。中国是当前鲆鲽类养殖产量最高和品种最多的国家,已有大菱鲆 *Scophthalmus maximus*、牙鲆 *Paralichthys olivaceus*、大西洋牙鲆 *Paralichthys dentatus*、石鲽 *Kareius bicoloratus*、圆斑星鲽 *Verasper variegatus*、条斑星鲽 *Verasper moseri*、川鲽 *Platichthys flesus*、半滑舌鲷 *Cynoglossus semilaevis*、塞内加尔鲷 *Solea senegalensis* 等 10 余个养殖品种(杨正勇等 2009)。自从中国水产科学研究院黄海水产研究所率先突破了大菱鲆苗种生产关键技术,以及在我国北方沿海开辟了以大菱鲆和牙鲆为代表的工厂化养殖以来,鲆鲽类的养殖发展迅猛,2003 年全国产量为 4.1 万 t(杨正勇等 2009),2011 年时上升到了 7.81 万 t(雷霖霖 2012)。目前,以鲆鲽类为样板工程的工业化养殖方向正在主产区逐步推进(雷霖霖 2010)。

但随着我国鲆鲽类工厂化养殖业的快速发展,群众性的小产业不断扩大,其疾病流行情况也越来越严重(王印庚等 2004;秦 蕾等 2008)。现已发现的有病毒性出血性败血症(Ross *et al.* 1994)、淋巴囊肿病(曲 径等 2001)、弧菌病(张 正等 2004;邹玉霞等 2004;Angulo *et al.* 1994;范文辉等 2005)、腹水病(李 筠等 2006)、纤毛虫病(王印庚等 2005)等。给养殖业带来了严重的经济损失,因此研究安全、高效的疾病防控方法已刻不容缓。

免疫防治技术的研究与应用越来越受到全世界的高度重视,其中疫苗的研制和应用已成为研究的热点。据不完全统计,目前国外针对 24 种水产病原已有 100 余种渔用疫苗批准上市,其中包括迟缓爱德华氏菌、溶藻弧菌、鳗弧菌、杀鲑气单胞菌疫苗,鳗弧菌-杀鲑气单胞菌二联疫苗,气单胞菌-鳗弧菌-杀鲑弧菌疫苗等(Gud-ding *et al.* 1999;Sommerset *et al.* 2005;杨先乐等 2006;孙修勤 2012)。而我国仅有 4 个疫苗产品获得国家新兽药证书,包括草鱼出血病活疫苗、草鱼出血病细胞灭活疫苗、鱼嗜水气单胞菌败血症灭活疫苗和牙鲆溶藻弧菌/鳗弧菌/迟缓爱德华氏菌病多联抗独特型抗体疫苗,其中仅草鱼出血病活疫苗(GCHV-892 株)、鱼嗜水气单胞菌败血症灭活疫苗获得生产批准文号,这与发达国家相比无论从产品数量还是普及率等方面都存在着较大差距(宋迁红 2011;巩 华 2012)。鲆鲽类的产业已在国内形成规模,已经开始由开放式流水工厂化养殖向循环水工业化养殖转变,渔用疫苗研究需求显得特别迫切。作者针对鲆鲽类渔用疫苗研究现状及其发展趋势进行综述,以利于进一步探讨国产疫苗研究生产和普及应用的方向。

## 1 鲆鲽类渔用疫苗分类

### 1.1 灭活疫苗

灭活疫苗是选用免疫原性强的细菌、病毒、立克次体、螺旋体等,经人工大量培养,用物理或化学方法将其杀死或者灭活后制成的疫苗,又称死疫苗。灭活疫苗是目前报道和应用于鲆鲽类最多的疫苗种类,其中包括鳗弧菌(Quentel *et al.* 1995;Bricknell *et al.* 2000;Bowden *et al.* 2002;朱开玲等 2004;肖 鹏等 2007)、迟缓爱德华氏菌(Castro *et al.* 2008;王 燕等 2009;张 丽等 2011)、溶藻弧菌(程顺峰 2009)、杀鲑气单胞菌(Ingilæ *et al.* 2000)、鳗弧菌-溶藻弧菌二联疫苗(曹宏梅等 2006)、迟缓爱德华氏菌-溶藻弧菌-杀鲑气单胞菌-鳗弧菌四联疫苗(王雪惠等 2008)、淋巴囊肿病毒(Jang *et al.* 2011)、虹彩病毒(Fan *et al.* 2012)等灭活疫苗。Fan 等(2012)制备的虹彩病毒灭活疫苗肌肉注射大菱鲆获得的免疫保护率为 83.3%,于养殖场浸泡免疫大菱鲆,免疫保护率达 90.5%。Bowden 等(2002)用鳗弧菌灭活疫苗分别通过腹腔注射、口腔插管注射、肛门插管注射、浸泡方式免疫庸鲽,免疫 84d 后进行攻毒,结果显示腹腔注射和浸泡免疫组存活率近 100%,口腔插管注射组存活率为 80%,肛门插管注射组存活率为 50%,对照组死亡率为 100%。肖 鹏等(2007)以鳗弧菌 M3 和 SMP1 为细菌抗原制备的油乳化二价疫苗口服免疫大菱鲆,受免鱼对 M3 和 SMP1 的感染分别获得 100%和 50%的免疫保护率,而未乳化疫苗获得的免疫保护率分别为 57.9%和 0%。王雪惠等(2008)用分离鉴定的腹水病、溃烂病致病菌——迟缓爱德华氏菌、溶藻弧菌、杀鲑气单胞菌和鳗弧菌制备四联疫苗,腹腔注射牙鲆,初免 49d 后对牙鲆进行腹腔注射攻毒,测定相对免疫保护率为 60%。上述实验表明,灭活疫苗对鲆鲽类疾病具有一定的预防作用。灭活疫苗具有制备容易、安全性好、易保存、保质期较长等特

点,但由于部分抗原成分被破坏,存在免疫效果不理想、免疫力持久性差等问题,常采用在疫苗中加入佐剂,并制成多价苗或联合疫苗等方法改善其不足。

## 1.2 减毒活疫苗

减毒活疫苗主要指利用基因工程技术,定向控制变异,或将保护性病原体蛋白编码基因插入活载体中制备的能够在机体内增殖并且能够诱发免疫应答的疫苗,包括遗传重组疫苗、基因缺失活疫苗和活载体疫苗3种。目前国内外已见报道的应用于鲟鳃类的减毒活疫苗有鳃弧菌苗(潘燕华等 2009; Zhou *et al.* 2010; 王秀华等 2011)、荧光假单胞菌疫苗(Wang *et al.* 2009)、迟缓爱德华氏菌苗(Cheng *et al.* 2010; Sun *et al.* 2010; Hu *et al.* 2011; Choi *et al.* 2011)、病毒性出血性败血症病毒活疫苗(Kim *et al.* 2011; Nishizawa *et al.* 2011)、卡介苗(Kato *et al.* 2012)等。卡介苗(BCG)是一种预防结核病的减毒活疫苗,能有效对抗各种传染病。Kato等(2012)用卡介苗免疫接种牙鲟,以诺卡氏菌对受免鱼进行攻毒,获得保护率为55.9%。张元兴等采用无标记缺失突变技术制备了缺失pEIB202质粒、aroC基因及T3SSeseBCD基因操纵子的迟缓爱德华氏菌减毒活疫苗WED,通过腹腔注射和浸泡方式免疫大菱鲆,免疫保护率均达70%以上(雷霖霖 2011)。Hu等(2011)以哈维氏弧菌抗原蛋白DegQ作为迟缓爱德华氏菌ATCC15947的胞外蛋白制备重组活疫苗Et15VhD,通过不同的接种方式免疫大菱鲆,腹腔注射组对迟缓爱德华氏菌和哈维氏弧菌的免疫保护率分别为89.2%、90.9%,口服组为76.1%、82.6%,浸泡组为42.1%、47.1%,口服加浸泡组为84.7%、88.9%,基于以上结果,该课题组通过口服加浸泡免疫大菱鲆的方式进行了现场模拟实验,结果显示对迟缓爱德华氏菌和哈维氏弧菌的免疫保护率分别为75%、81.8%。

活疫苗具有用量少、免疫持续时间长、效果好等特点,但其不易保存。传统的活疫苗是通过物理、化学方法使病原菌减毒或从自然界筛选某病原体的无毒株或微毒株所制成,具有在水体中扩散和毒力回归的危险,而通过应用基因技术制备的新型减毒活疫苗一般没有感染性,性能较稳定,且利用活载体同时构建多价疫苗具有显著优势,为今后减毒活疫苗的研制指明了方向。

## 1.3 亚单位疫苗

亚单位疫苗是去除病原体中与激发保护性免疫无关甚至有害的成分,但保留有效免疫原成分制成的疫苗。亚单位疫苗具有免疫效果好、毒力小、副作用小、性能稳定、易于保存的特点,但免疫原性不强。传染性胰脏坏死病毒VP2(Biering *et al.* 1997)、哈维氏弧菌外膜蛋白VhhP2(Sun *et al.* 2009)、海豚链球菌输出蛋白Sip11(Cheng *et al.* 2010)、爱德华氏菌外膜蛋白OMPs(熊静等 2011)、迟缓爱德华氏菌寡肽透过酶OppA蛋白(王妍妍等 2011)、热休克蛋白DnaK(Hu *et al.* 2012)及鞭毛蛋白FlgD(Zhang *et al.* 2012)等已证明具有作为鲟鳃类亚单位疫苗的潜力。Sun等(2009)以重组VhhP2作为亚单位疫苗腹腔注射牙鲟,免疫保护率为89.3%。Cheng等(2010)用纯化的重组海豚链球菌输出蛋白Sip11作为亚单位疫苗腹腔注射免疫牙鲟,获得免疫保护率为69.7%。Zhang等(2012)用重组FlgD制备亚单位疫苗,肌肉注射免疫大菱鲆,结果显示对迟缓爱德华氏菌的免疫保护率为62.5%。近年来,与鲟鳃类病原体致病性及免疫保护性相关的蛋白逐渐被发现,这为今后单价甚至多价亚单位疫苗的准备奠定了基础。

## 1.4 核酸疫苗

核酸疫苗,也称DNA疫苗,是指将含有编码的蛋白基因序列的质粒载体导入宿主体内,通过宿主细胞表达抗原蛋白,诱导宿主细胞产生对该抗原蛋白的免疫应答,以达到免疫效果。与灭活疫苗、亚单位疫苗相比,核酸疫苗具有以下优点:免疫保护力增强、同种异株交叉保护、应用较安全、免疫持续时间长、提纯质粒工艺简便、适于大批量生产、储存运输方便等,且质粒本身具有佐剂的功效,因此使用核酸疫苗可不加佐剂。但这种疫苗易导致免疫耐受,而且质粒DNA有较低概率整合到宿主基因组,并造成自体免疫疾病和插入突变(Joel *et al.* 2000)。

目前国内外研究应用于鲟鳃类的有鳃弧菌外金属蛋白酶重组质粒pm-EmpA7(Yang *et al.* 2009)、海豚

链球菌抗原重组质粒 pSia10(Sun *et al.* 2010)、迟缓爱德华菌 HB01 外膜蛋白 OmpS<sub>2</sub> 重组质粒 pET-28a-OmpS<sub>2</sub>(张亚宁等 2011)、哈维氏弧菌抗原蛋白 DegQ、Vhp1 基因单价及二价 DNA 疫苗(Zhang *et al.* 2008;Hu *et al.* 2011)、副溶血弧菌 tdh2 基因和鳃弧菌 ompU 基因二联 DNA 疫苗 pEGFP-N1/tdh2-ompU(刘瑞等 2011)、海豚链球菌抗原 Sia10 基因和鳃弧菌外膜蛋白 OmpU 基因二联 DNA 疫苗(Sun *et al.* 2012)、日本牙鲆弹状病毒(HIRRV)糖蛋白基因重组质粒 pCMV-HRVg(Tomokazu *et al.* 2004)及 pHRV-G(Yasuike *et al.* 2007)、淋巴囊肿病毒(LCDV)核衣壳蛋白基因的重组质粒 pEGFP-N2-LCDV-cn MCP 0.6 kb(郑凤荣等 2006;张进兴等 2010)和 pEGFP-N2-MCP(Tian *et al.* 2011)、病毒性出血性败血症病毒(VHSV)糖蛋白基因的重组质粒 pVHSV-G(Ingunn *et al.* 2003)及 pMCV1.4-G<sub>860</sub>(Pereiro *et al.* 2012)等核酸疫苗。Tomokazu 等(2004)根据 HIRRV 的糖蛋白基因构建了重组质粒 pCMV-HRVg,将这种质粒(1 $\mu$ g、10 $\mu$ g)通过肌肉注射到日本牙鲆幼鱼体内,结果显示免疫保护率分别为 70.5%、90.1%。Sun 等(2012)利用海豚链球菌抗原 Sia10 和鳃弧菌外膜蛋白 OmpU 制备的二价 DNA 疫苗,通过肌肉注射免疫日本牙鲆,结果显示其对两种病原菌的免疫保护率为 80%~87%。Pereiro 等(2012)根据 VHSV 糖蛋白基因构建了重组质粒 pMCV1.4-G<sub>860</sub>,通过肌肉注射免疫大菱鲆,免疫保护率为 80%以上。用于鲆鲽类疾病防治的核酸疫苗的研究还处于实验室的阶段,但已体现出一定的优越性。

## 2 鲆鲽类渔用疫苗存在的问题及其发展方向

经过多年研究,鲆鲽类渔用疫苗已经取得了一定的成果,但还面临着诸多严峻挑战。第一,目前用于疾病防治的鲆鲽类渔用疫苗基本上处于实验室研究阶段,少见中间试验,商品性疫苗还未上市,在养殖生产中的普及应用为时尚早,这也是当前所有渔用疫苗亟待解决的共性问题;第二,鲆鲽类的扁平体型对疫苗的研制和应用具有一定的特殊性。例如疫苗的给予方式,目前有注射、口服、浸浴和喷雾等几种途径,以注射免疫的免疫保护效果最好,但不适用于幼鱼;口服、浸浴和喷雾对鱼苗处理时间短,操作方便,对鱼体不造成伤害,生产上较适用,但其免疫效果往往受所用抗原和具体操作方法等因素的影响(Quentel *et al.* 1995;Gudding *et al.* 1999;Zhou *et al.* 2002;Plant *et al.* 2011);第三,由于鲆鲽类引入我国仅有 20 年历史,所以国内对其疫苗的研究积累相对于一般鱼类而言还很少,涉及面也很窄。2011 年 11 月华东理工大学获得的“缺失 aroC 基因和 pEIB1 质粒的海洋鳃弧菌疫苗 MVAV6203 的安全证书”是目前我国首例海水养殖鱼类弧菌病基因工程活疫苗农业转基因生物安全证书(生产应用,证书号:农基安证字(2011)65 号);2012 年 5 月该团队研制的大菱鲆腹水病迟缓爱德华氏菌弱毒活疫苗获农业部兽用生物制品临床试验批件([http://www.flatfishfarming.ac.cn/myinfo\\_2.aspx?Id=205](http://www.flatfishfarming.ac.cn/myinfo_2.aspx?Id=205)),这是一个巨大的进步。目前我国尚无一例海水养殖疫苗获得商业许可,使鲆鲽类渔用疫苗产品的生产和应用陷入无先例、无规程和无标准的境地。

针对目前鲆鲽类渔用疫苗存在的问题,建议今后应着力做好以下几项工作:

第一,目前鲆鲽类重要细菌性疾病疫苗的研发工作已经取得重要进展,今后将继续加强系统性的研究工作,并制定相关的标准与规程,力争早日实现商品化生产,为今后鲆鲽类渔用疫苗的研制奠定坚实的基础;

第二,在已报道的研究中,减毒活疫苗因其显著的优势将会在鲆鲽类工业化养殖中具有良好的应用前景,因此,今后应在其制备方式、保存方法、单一的免疫原性等不足之处开展深入研究;

第三,虽然少见合成肽疫苗、细胞工程疫苗及微胶囊疫苗应用于鲆鲽类的研究报道,但这几种疫苗在一些鱼类上的研究与应用已经体现出良好效果(Manning *et al.* 1990;Falco *et al.* 2007;张奇亚等 2006;余俊红等 2001;Tian *et al.* 2008),预示其可以借鉴鲆鲽类渔用疫苗的研制方向之一;

第四,目前渔用疫苗连续注射器与与计算机联机自动注射方法已开发成功(王刚 2010),且由于鲆鲽类工厂化养殖的鱼体大小一致,符合机械化注射疫苗的操作条件,因此将其应用于成体鲆鲽类应该是可行的。但鲆鲽类幼鱼期体型犹同一张薄纸,至今尚无安全、快捷的注射给药方法,这就需要研究其他给药方式,如改进或加强浸泡免疫等,因此,可以针对与浸泡免疫相关的制约因素,如浸泡浓度、抗原制备等进行深入探讨以开辟新的给药方法和途径;

第五,传统灭活疫苗和新型疫苗各有其优缺点,传统灭活疫苗安全性能好、制备更容易,而新型疫苗的免疫

力更强、持续时间更久,在今后研究中应兼顾目前的研究水平、鲑鳟类的特点以及学科的交叉发展等因素,使两种类型的渔用疫苗在研制和应用上相互渗透,最终要为鲑鳟类工业化养殖的疾病防控提供更加安全有效的保障。

## 参 考 文 献

- 王印庚, 张 正, 秦 蕾, 史成银, 陈洁君, 杨少丽, 马爱军. 2004. 养殖大菱鲆主要疾病及防治技术. 海洋水产研究, 25(6): 61-68
- 王印庚, 陈洁君, 秦 蕾. 2005. 养殖大菱鲆蟹柄异阿脑虫感染及其危害. 中国水产科学, 12(5): 594-601
- 王 刚. 2010. 中国水产疫苗, 千呼万唤何时来. 海洋与渔业, (10): 29-31
- 王秀华, 周凌云, 王玉娟, 刘 琴. 2011. 多效价载体疫苗免疫大菱鲆效果评价. 中国水产科学, 18(4): 918-923
- 王妍妍, 李贵阳, 李 杰, 肖 鹏, 莫照兰. 2011. 迟缓爱德华氏菌 OppA 蛋白的免疫原性及免疫保护分析. 海洋科学, 35(5): 19-23
- 王雪惠, 耿绪云, 孙金生. 2008. 腹水病和溃烂病致病病原四联疫苗制备及免疫牙鲆效果评价. 现代渔业信息, 23(12): 16-20
- 王 燕, 张晓华, 吕俊超, 徐子男, 陈吉祥, 韩 茵. 2009. 养殖大菱鲆病原菌迟缓爱德华氏菌的分离鉴定及其疫苗研制. 中国水产科学, 16(3): 394-403
- 朱开玲, 陈吉祥, 李 筠, 王祥红, 纪伟尚, 徐怀恕. 2004. 鳃弧菌灭活疫苗对海水养殖大菱鲆的免疫预防研究. 高技术通讯, 2: 76-80
- 巩 华. 2012. 水产疫苗添新军——嗜水气单胞菌败血症灭活疫苗获生产批文. 海洋与渔业, 3: 49
- 曲 径, 沈海平, 李笑刚, 潘雁甲, 连建华, 冯玉安. 2001. 威海地区养殖牙鲆鱼淋巴囊肿病流行病学调查. 检验检疫科学, 11(6): 34-35
- 孙修勤主编. 2012. 牙鲆淋巴囊肿病与基因工程疫苗. 北京: 科学出版社, 37-77
- 刘 瑞, 赵明君, 杨 慧, 陈吉祥. 2011. 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)tdh2 基因和鳃弧菌(*V. anguillarum*)ompU 基因二联 DNA 疫苗制备及其对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)免疫保护作用. 海洋与湖沼, 42(4): 580-586
- 张 正, 王印庚, 韩文君, 李秋芬. 2004. 养殖大菱鲆烂鳍病病原菌的鉴定及系统发育学研究. 海洋科学进展, 22(2): 193-197
- 张亚宁, 李晓玥, 耿晓娜, 赵宝华. 2011. 迟缓爱德华氏菌 HB01 外膜蛋白 OmpS<sub>2</sub> 基因的克隆表达及其免疫原性研究. 细胞与分子免疫学杂志, 27(10): 1075-1082
- 张 丽, 王 菁, 窦华杰, 马文婷, 杨 凯, 李 军, 冯守明, 孙志景. 2011. 大菱鲆迟缓爱德华氏菌福尔马林灭活疫苗研究. 水产养殖, 32(7): 22-25
- 张进兴, 郑风荣, 郑明刚, 曲凌云. 2010. 牙鲆淋巴囊肿病核酸疫苗的免疫效果评价. 科学养鱼, (6): 48-49
- 张奇亚, 李正秋, 袁秀平, 桂建芳. 2006. 牙鲆淋巴囊肿病毒毒株及其制备方法和应用. 中国, ZL200310116249.0
- 杨正勇, 王春晓. 2009. 全球视野下中国鲑鳟类养殖业的发展. 中国渔业经济, 27(6): 115-121
- 杨先乐, 曹海鹏. 2006. 我国渔用疫苗的研制. 水产学报, 30(2): 264-271
- 邹玉霞, 张培军, 莫兆兰, 刘 婷, 徐永立. 2004. 大菱鲆出血症病原菌的分离和鉴定. 高技术通讯, (4): 89-93
- 宋迁红. 2011. 我国水产疫苗的研究现状及发展方向——访珠江水产研究所所长吴淑勤. 科学养鱼, 6: 1-3
- 李 筠, 颜显辉, 陈吉祥, 王印庚, 李秋芬. 2006. 养殖大菱鲆腹水病病原的研究. 中国海洋大学学报, 36(4): 649-654
- 肖 鹏, 莫照兰, 邹玉霞, 王 波, 徐永立, 张培军. 2007. 鳃弧菌油乳化二价口服疫苗免疫养殖大菱鲆的免疫应答及免疫效果的研究. 高技术通讯, 17(9): 979-985
- 余俊红, 沈继红, 王祥红, 王宝坤, 纪伟尚, 胡应劭, 徐怀恕. 2001. 鳃弧菌口服微胶囊疫苗的制备及其对鲈鱼的免疫效果. 中国水产科学, 8(2): 76-79
- 范文辉, 黄 健, 王秀华, 史成银, 刘 莉. 2005. 养殖大菱鲆溃疡症病原菌的分离鉴定及系统发育分析. 微生物学报, 45(5): 665-670
- 郑风荣, 孙修勤, 刘洪展, 吴谡琦, 张进兴, 曲凌云, 洪旭光. 2006. 牙鲆淋巴囊肿病毒核酸疫苗的安全性研究. 高技术通讯, 16(1): 106-110
- 秦 蕾, 王印庚, 阎斌伦. 2008. 大菱鲆微生物性疾病研究进展. 水产科学, 27(11): 598-602
- 曹宏梅, 李 健, 战文斌. 2006. 鳃弧菌和溶藻弧菌二联疫苗对大菱鲆的免疫效果. 中国水产科学, 13(3): 397-402
- 程顺峰. 2009. 溶藻弧菌疫苗对牙鲆免疫效果的研究. 青岛农业大学学报, 26(2): 124-127
- 雷霖霖主编. 2005. 海水鱼类养殖理论与技术. 北京: 中国农业出版社, 428-645
- 雷霖霖. 2010. 迎接鲑鳟类工业化养殖新时代: 鲑鳟类走工业化养殖发展之路的战略思考. 科学养鱼, (10): 1-4
- 雷霖霖主编. 2011. 国家鲑鳟类产业技术体系年度报告(2010). 青岛: 中国海洋大学出版社, 92-99
- 雷霖霖主编. 2012. 国家鲑鳟类产业技术体系年度报告(2011). 青岛: 中国海洋大学出版社, 4
- 熊 静, 关瑞章, 郭松林, 黄文树. 2011. 鱼类病原菌外膜蛋白及其免疫原性研究进展. 水生生物学报, 35(1): 163-169
- 潘燕华, 马 悦, 赵东玲, 孙修勤, 王启要, 吴海珍, 张元兴. 2009. 鳃弧菌减毒活疫苗对牙鲆免疫效果的研究. 食品与药品, 11(5): 12-15
- Angulo L, Lopez JE, Vicente JA, Saborido AM. 1994. Haemorrhagic areas in the mouth of farmed turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). Journal of Fish Diseases 17(2): 163-169
- Biering E. 1997. Immune response of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). Fish &

- Shellfish Immunology 7(3):137-149
- Bowden TJ, Menoyo-Luque D, Bricknell IR, Wergeland H. 2002. Efficacy of different administration routes for vaccination against *Vibrio anguillarum* in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). Fish & Shellfish Immunology 12(3): 283-285
- Bricknell IR, Bowden TJ, Verner-Jeffreys DW. 2000. Susceptibility of juvenile and sub-adult Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) to infection by *Vibrio anguillarum* and efficacy of protection induced by vaccination. Fish & Shellfish Immunology 10(4): 319-327
- Castro N, Toranzi AE, Nunez S, Magarinos B. 2008. Development of an effective *Edwardsiella tarda* vaccine for cultured turbot (*Scophthalmus maximus*). Fish & Shellfish Immunology 25(3): 208-212
- Cheng S, Hu YH, Sun L. 2010. Analysis of the vaccine potential of a natural avirulent *Edwardsiella tarda* isolate. Vaccine 28(15): 2716-2721
- Cheng S, Hu YH, Jiao XD, Sun L. 2010. Identification and immunoprotective analysis of a *Streptococcus iniae* subunit vaccine candidate. Vaccine 28(14): 2636-2642
- Choi SH, Kim KH. 2011. Generation of two auxotrophic genes knock-out *Edwardsiella tarda* and assessment of its potential as a combined vaccine in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish & Shellfish Immunology 31(1): 58-65
- Falco A, Mas V, Tafalla C and 3 others. 2007. Dual antiviral activity of human alpha-defensin-1 against viral haemorrhagic septicaemia rhabdovirus (VHSV): Inactivation of virus particles and induction of a type I interferon-related response. Antiviral Research 76(2): 111-123
- Fan TJ, Hu XZ, Wang LY and 4 others. 2012. Development of an inactivated iridovirus vaccine against turbot viral reddish body syndrome. Journal of Ocean University of China 11(1): 65-69
- Gudding R, Lillehaug A, Evensen Ø. 1999. Recent developments in fish vaccinology. Veterinary Immunology and Immunopathology 72(1): 203-212
- Hu YH, Sun L. 2011. A bivalent *Vibrio harveyi* DNA vaccine induces strong protection in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Vaccine 29(26): 4328-4333
- Hu YH, Cheng S, Zhang M, Sun L. 2011. Construction and evaluation of a live vaccine against *Edwardsiella tarda* and *Vibrio harveyi*: Laboratory vs. mock field trial. Vaccine 29(24):4081-4085
- Hu YH, Dang W, Deng T, Sun L. 2012. *Edwardsiella tarda* DnaK: Expression, activity, and the basis for the construction of a bivalent live vaccine against *E. tarda* and *Streptococcus iniae*. Fish & Shellfish Immunology 32(4): 616-620
- Ingilæ M, Arnesen JA, Lund V, Eggset G. 2000. Vaccination of Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L., and spotted wolffish *Anarhichas minor* L., against atypical *Aeromonas salmonicida*. Aquaculture 183(1): 31-44
- Ingunn S, Lorenzen E, Lorenzen N and 2 others. 2003. A DNA vaccine directed against a rainbow trout rhabdovirus induces early protection against a nodavirus challenge in turbot. Vaccine 21(32): 4661-4667
- Jang HB, Kim YR, Cha IS and 6 others. 2011. Detection of antigenic proteins expressed by lymphocystis virus as vaccine candidates in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). Journal of Fish Diseases 34(7): 555-562
- Joel H, Heather LD. 2000. Application of DNA vaccine technology to aquaculture. Advanced Drug Delivery Reviews 43(1): 29-43
- Kato G, Kondo H, Aoki T, Hirono I. 2012. Mycobacterium bovis BCG vaccine induces non-specific immune responses in Japanese flounder against nocardia seriolae. Fish & Shellfish Immunology, doi: 10.1016/j.fsi.2012.05.002
- Kim MS, Kim KH. 2011. Protection of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, against viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) by immunization with NV gene-knockout recombinant VHSV. Aquaculture 314(1-4): 39-43
- Manning DS, Leong JC. 1990. Expression in *Escherichia coli* of the large genomic segment of infectious pancreatic necrosis virus. Virology 179(1): 16-25
- Nishizawa T, Takami I, Yang MJ, Oh MJ. 2011. Live vaccine of viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) for Japanese flounder at fish rearing temperature of 21°C instead of Poly(I:C) administration. Vaccine 29(46):8397-8404
- Pereiro P, Martinez-Lopez A, Falco A and 5 others. 2012. Protection and antibody response induced by intramuscular DNA vaccine encoding for viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) G glycoprotein in turbot (*Scophthalmus maximus*). Fish & Shellfish Immunology 32(6):1088-1094
- Plant KP, LaPatra SE. 2011. Advances in fish vaccine delivery. Developmental and Comparative Immunology 35(12):1256-1262
- Quentel C, Ogier de Baulny M. 1995. Vaccination of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L., against vibriosis. Aquaculture 132(1-2): 125-131
- Ross K, Mccarthy U, Huntly PJ and 5 others. 1994. An outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in turbot (*Scophthalmus maximus*) in Scotland. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (14): 213-214
- Sommerset I, Krossoy B, Biering E, Frost P. 2005. Vaccines for fish in aquaculture. Expert Review of Vaccines 4(1): 89-101
- Sun K, Zhang WW, Hou JH, Sun L. 2009. Immunoprotective analysis of VhhP2, a *Vibrio harveyi* vaccine candidate. Vaccine 27(21): 2733-2740
- Sun Y, Hu YH, Liu CS, Sun L. 2010. Construction and analysis of an experimental *Streptococcus iniae* DNA vaccine. Vaccine 28(23): 3905-3912

- Sun Y, Liu CS, Sun L. 2010. Isolation and analysis of the vaccine potential of an attenuated *Edwardsiella tarda* strain. *Vaccine* 28(38): 6344-6350
- Sun Y, Zhang M, Liu CS and 2 others. 2012. A divalent DNA vaccine based on Sia 10 and OmpU induces cross protection against *Streptococcus iniae* and *Vibrio anguillarum* in Japanese flounder. *Fish & Shellfish Immunology* 32: 1216-1222
- Tian JY, Yu J. 2011. Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles as candidate DNA vaccine carrier for oral immunization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against lymphocystis disease virus. *Fish & Shellfish Immunology* 30(1): 109-117
- Tian JY, Sun XQ, Chen XG and 3 others. 2008. The formulation and immunisation of oral poly (DL-lactide-co-glycolide) microcapsules containing a plasmid vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *International Immunopharmacology* 8(6): 900-908
- Tomokazu T, Akiko I, Ikuo H, Takashi A. 2004. Development of a DNA vaccine against hirame rhabdovirus and analysis of the expression of immune-related genes after vaccination. *Fish & Shellfish Immunology* 17(4): 367-374
- Wang HR, Hu YH, Zhang WW, Sun L. 2009. Construction of an attenuated *Pseudomonas fluorescens* strain and evaluation of its potential as a cross-protective vaccine. *Vaccine* 27(30): 4047-4055
- Yang H, Chen JX, Yang GP and 3 others. 2009. Protection of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Vibrio anguillarum* with a DNA vaccine containing the mutated zinc-metalloprotease gene. *Vaccine* 27(15): 2150-2155
- Yasuike M, Kondo H, Hirono I, Aok T. 2007. Difference in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* gene expression profile following hirame rhabdovirus (HIRRV) G and N protein DNA vaccination. *Fish & Shellfish Immunology* 23(3): 531-541
- Zhang M, Wu HZ, Li XY and 5 others. 2012. *Edwardsiella tarda* flagellar protein FlgD: A protective immunogen against edwardsiellosis. *Vaccine* 30(26): 3849-3856
- Zhang WW, Sun K, Cheng S, Sun L. 2008. Characterization of DegQ<sub>Vh</sub>, a serine protease and a protective immunogen from a pathogenic *Vibrio harveyi* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 74(20): 6254-6262
- Zhou LY, Wang XH, Liu Q and 3 others. 2010. A novel multivalent vaccine based on secretory antigen-delivery induces protective immunity against *Vibrio anguillarum* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Biotechnology* 146(1-2): 25-30
- Zhou YC, Huang H, Wang J, Su YQ. 2002. Vaccination of the grouper, *Epinephelus awoara*, against vibriosis using the ultrasonic technique. *Aquaculture* 203(3): 229-238