

## 海水养殖真鲷最小弧菌外毒素的免疫学特性初步研究

吴后波 苏晓波 潘金培

(中国科学院南海海洋研究所LED重点实验室,广州 510301)

**摘要:**按常规方法免疫健康家兔进行外毒素抗体的制备。将制备的兔抗血清与等体积的外毒素混合,37℃下作用1 h后,观察毒素的溶血性及细胞毒性。取免疫前家兔血清(零号血清)作阴性对照,用毒素作阳性对照。结果表明,兔抗毒素血清能中和毒素,抑制毒素对人血细胞的溶血性及对Vero细胞的细胞毒性,中和毒素的兔抗毒素血清最高稀释度为1:256,毒素对照显示出溶血性及细胞毒性。毒素与一定浓度的嗜水气单胞菌HEC毒素抗血清、霍乱肠毒素抗血清在37℃下分别作用1 h后,观察其溶血性及细胞毒性。结果表明,这2种抗血清都不能中和毒素,毒素与这2种抗血清作用后,仍然保持其溶血性及细胞毒性。用浓度为0.2%的福尔马林对浓度为5 mg/mL的外毒素进行灭活处理,得到的灭活疫苗为毒素苗。一定稀释度的毒素苗,在初次免疫真鲷2周后利用病原菌对免疫组及对照组的实验鱼进行人工攻毒感染,毒素苗的免疫保护率可达80%,强化免疫后,免疫保护率有所提高。注射免疫的免疫保护率比浸泡免疫的高。

**关键词:**VmrPm外毒素;HEC毒素;霍乱肠毒素;毒素苗

**中图分类号:**S941 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2006)05-0535-06

弧菌病(Vibriosis)是我国南方沿海地区养殖真鲷中发生的主要细菌性疾病,一年四季均有发生,流行期为5—9月的夏秋季节,高峰期为7—8月份,受害最严重的为体长10—25 cm的当年鱼,该病的爆发性流行给整个真鲷养殖业造成了巨大的经济损失。近年来我们在明确其病原菌是最小弧菌(*Vibrio mimicus*)的基础上<sup>[1]</sup>,对该菌的致病机理,特别是其产生的外毒素进行了一系列的研究,已经证实该菌产生的外毒素是其真正的致病因子,这种外毒素为单一的多肽,分子量为30.456 kD,具有溶血性、细胞毒性和动物致死性等多种生物学活性,该外毒素不同于最小弧菌产生的其他毒力因子,作者将其命名为VmrPm毒素<sup>[2]</sup>。在此工作的基础上,作者还对该外毒素的免疫学特性进行了初步研究。

作者选择了家养鲤科鱼爆发性传染病的病原菌嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)产生的HEC毒素<sup>[3]</sup>以及人体医学上重要的病原菌霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)产生的霍乱肠毒素<sup>[4]</sup>,对HEC毒

素、霍乱肠毒素以及VmrPm毒素的抗原结构的同源性进行了比较。此外,用浓度为0.2%的福尔马林对浓度为5 mg/mL的VmrPm毒素进行灭活处理,探讨了这种毒素苗对真鲷弧菌病的免疫保护性,为进一步寻找有效的防治措施打下了坚实的基础。本文是有关VmrPm毒素的免疫学特性的研究报告。

### 1 材料与方法

#### 1.1 外毒素的分离纯化

按吴后波等人<sup>[2]</sup>的方法进行。

#### 1.2 毒素抗体制备

按常规方法免疫健康家兔2只,免疫程序如下:1 mL提纯毒素与等体积弗氏完全佐剂充分混合,于家兔背部皮下多点注射,2周后,再取1 mL提纯毒素与等体积不完全佐剂充分混匀,于家兔颈部皮下,后肢肌肉注射,1周后再取1 mL提纯毒素与等体积不完全佐剂充分混匀,于家兔颈部皮下,后肢肌肉

收稿日期:2004-08-03;修订日期:2006-03-28

基金项目:“十五”国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2003AA622050);国家自然科学基金资助项目(30371106);中国科学院知识创新工程资助项目(KSCX2-1-04)

作者简介:吴后波(1967—),男,湖北洪湖人,博士,副研究员,主要从事海洋生物病害研究 E-mail:wuhoub@scsio.ac.cn

注射。

用琼扩试验检测抗体效价,当效价达到 1 16 时采血取血清。

1.3 Vnr Pm 毒素与 Vnr Pm 毒素抗血清中和

按病毒中和试验方法稍加改进。将制备的兔抗血清作倍比稀释,与等体积的毒素混合,37 ℃下作用 1h 后,按吴后波等人<sup>[2]</sup>的方法观察其溶血性及细胞毒性,实验重复 3 次。取免疫前家兔血清(零号血清)作阴性对照,用毒素作阳性对照。

1.4 Vnr Pm 毒素与 HEC 毒素抗血清、霍乱肠毒素抗血清的中和试验

按病毒中和试验方法,用制备的兔抗血清作阳性对照,取免疫前家兔血清(零号血清)作阴性对照。Vnr Pm 毒素与嗜水气单胞菌产生的 HEC 毒素的抗血清及与霍乱弧菌产生的霍乱肠毒素抗血清在 37 ℃下作用 1h,然后观察其溶血性及细胞毒性,实验重复 3 次。

1.5 毒素疫苗的免疫保护性  
外毒素的灭活

用浓度为 0.2 % 的福尔马林对浓度为 5mg/ mL 的外毒素进行灭活处理,得到的灭活疫苗为毒素苗。毒素苗的安全性检查

将毒素苗 10 倍稀释后,采用肌肉注射的方法,

对平均体长 14cm、体重 50g 的健康真鲷进行人工攻毒感染,检查毒素苗对真鲷的毒性。

毒素苗的免疫保护性实验

一定浓度的毒素苗,福氏完全佐剂乳化后,采用腹腔注射和浸泡 2 种方法,对平均体长 14cm、体重 50g 的健康真鲷进行免疫,对照组注射生理盐水。在初次免疫 2 周后采用同法进行强化免疫。采用肌肉注射的方法,利用病原菌对初次免疫 2 周后及强化免疫 2 周后免疫组与对照组的实验鱼进行人工攻毒感染,每尾实验鱼注射病原菌 0.3mL,检查毒素苗的免疫保护性。实验重复 3 次。

2 结果

2.1 Vnr Pm 毒素与 Vnr Pm 毒素抗血清中和

将制备的兔抗血清作倍比稀释,与等体积的毒素混合,37 ℃下作用 1 h 后,对 Vnr Pm 毒素的溶血性及细胞毒性进行了观察,结果见表 1。结果表明,兔抗毒素血清能中和 Vnr Pm 毒素,抑制 Vnr Pm 毒素对人血细胞的溶血性及对 Vero 细胞的细胞毒性,中和 Vnr Pm 毒素的兔抗毒素血清最高稀释度为 1 256,零号血清无中和作用。毒素对照显示出溶血性及细胞毒性。

表 1 兔抗 Vnr Pm 毒素血清对 Vnr Pm 毒素的中和

Tab. 1 Sensitivity of toxin Vnr Pm to neutralization with anti-sera of rabbit against toxin Vnr Pm

实验组 test groups	毒素溶血性 haemolytic activity	毒素细胞毒性 cytotoxic activity
兔抗 Vnr Pm 毒素血清(没有稀释) anti-sera of rabbit against toxin Vnr Pm(no dilution)	-	-
兔抗 Vnr Pm 毒素血清(1 2 稀释) anti-sera of rabbit against toxin Vnr Pm(1 2 dilution)	-	-
兔抗 Vnr Pm 毒素血清(1 4 稀释) anti-sera of rabbit against toxin Vnr Pm(1 4 dilution)	-	-
兔抗 Vnr Pm 毒素血清(1 8 稀释) anti-sera of rabbit against toxin Vnr Pm (1 8 dilution)	-	-
兔抗 Vnr Pm 毒素血清(1 16 稀释) anti-sera of rabbit against toxin Vnr Pm(1 16 dilution)	-	-
兔抗 Vnr Pm 毒素血清(1 32 稀释) anti-sera of rabbit against toxin Vnr Pm(1 32 dilution)	-	-
兔抗 Vnr Pm 毒素血清(1 64 稀释) anti-sera of rabbit against toxin Vnr Pm(1 64 dilution)	-	-
兔抗 Vnr Pm 毒素血清(1 128 稀释) anti-sera of rabbit against toxin Vnr Pm(1 128 dilution)	-	-
兔抗 Vnr Pm 毒素血清(1 256 稀释) anti-sera of rabbit against toxin Vnr Pm(1 256 dilution)	-	-
兔抗 Vnr Pm 毒素血清(1 512 稀释) anti-sera of rabbit against toxin Vnr Pm(1 512 dilution)	+	+
零号血清 negative control (rabbit serum)	+	+
阳性对照 (Vnr Pm 毒素) positive control (toxin Vnr Pm)	+	+

注:“+”表示阳性,即存在溶血性及细胞毒性,“-”表示阴性,即失去溶血性及细胞毒性。

Notes:“+” means positive reaction,“-” means negative reaction.

2.2 Vnr Pm 毒素与 HEC 毒素抗血清、霍乱肠毒素抗血清的中和

血性及细胞毒性 ,结果见表 2 与表 3。结果表明 ,这 2 种抗血清都不能中和 Vnr Pm 毒素 ,Vnr Pm 毒素与这 2 种抗血清作用后 ,仍然保持其溶血性及细胞毒性。

Vnr Pm 毒素与一定浓度的 HEC 毒素抗血清、霍乱毒素抗血清在 37 ℃ 下分别作用 1 h 后 ,观察其溶血性及细胞毒性。

表 2 兔抗 HEC 毒素血清对 Vnr Pm 毒素的中和

Tab. 2 Sensitivity of toxin Vnr Pm to neutralization with anti-sera of rabbit against toxin HEC

实验组 test groups	毒素溶血性 haemolytic activity	毒素细胞毒性 cytotoxic activity
兔抗 HEC 毒素血清(没有稀释)anti-sera of rabbit against toxin HEC(no dilutions)	+	+
兔抗 HEC 毒素血清(1 2 稀释)anti-sera of rabbit against toxin HEC(1 2 dilutions)	+	+
兔抗 HEC 毒素血清(1 4 稀释)anti-sera of rabbit against toxin HEC(1 4 dilutions)	+	+
兔抗 HEC 毒素血清(1 8 稀释)anti-sera of rabbit against toxin HEC(1 8 dilutions)	+	+
兔抗 HEC 毒素血清(1 16 稀释)anti-sera of rabbit against toxin HEC(1 16 dilutions)	+	+
兔抗 HEC 毒素血清(1 32 稀释)anti-sera of rabbit against toxin HEC(1 32 dilutions)	+	+
兔抗 HEC 毒素血清(1 64 稀释)anti-sera of rabbit against toxin HEC(1 64 dilutions)	+	+
兔抗 HEC 毒素血清(1 128 稀释)anti-sera of rabbit against toxin HEC(1 128 dilutions)	+	+
兔抗 HEC 毒素血清(1 256 稀释)anti-sera of rabbit against toxin HEC(1 256 dilutions)	+	+
兔抗 HEC 毒素血清(1 512 稀释)anti-sera of rabbit against toxin HEC(1 512 dilutions)	+	+
零号血清 negative control (rabbit serum)	+	+
阳性对照(HEC 毒素)positive control (toxin HEC)	+	+

注 :同表 1。  
Notes :The same as table 1.

表 3 兔抗霍乱肠毒素血清对 Vnr Pm 毒素的中和

Tab. 3 Sensitivity of toxin Vnr Pm to neutralization with anti-sera of rabbit against cholera enterotoxin

实验组 test groups	毒素溶血性 haemolytic activity	毒素细胞毒性 cytotoxic activity
兔抗霍乱肠毒素血清(没有稀释)anti-sera of rabbit against cholera enterotoxin(no dilutions)	+	+
兔抗霍乱肠毒素血清(1 2 稀释)anti-sera of rabbit against cholera enterotoxin(1 2 dilutions)	+	+
兔抗霍乱肠毒素血清(1 4 稀释)anti-sera of rabbit against cholera enterotoxin(1 4 dilutions)	+	+
兔抗霍乱肠毒素血清(1 8 稀释)anti-sera of rabbit against cholera enterotoxin(1 8 dilutions)	+	+
兔抗霍乱肠毒素血清(1 16 稀释)anti-sera of rabbit against cholera enterotoxin(1 16 dilutions)	+	+
兔抗霍乱肠毒素血清(1 32 稀释)anti-sera of rabbit against cholera enterotoxin(1 32 dilutions)	+	+
兔抗霍乱肠毒素血清(1 64 稀释)anti-sera of rabbit against cholera enterotoxin(1 64 dilutions)	+	+
兔抗霍乱肠毒素血清(1 128 稀释)anti-sera of rabbit against cholera enterotoxin(1 128 dilutions)	+	+
兔抗霍乱肠毒素血清(1 256 稀释)anti-sera of rabbit against cholera enterotoxin(1 256 dilutions)	+	+
兔抗霍乱肠毒素血清(1 512 稀释)anti-sera of rabbit against cholera enterotoxin(1 512 dilutions)	+	+
零号血清 negative control (rabbit serum)	+	+
阳性对照(霍乱肠毒素)positive control (cholera enterotoxin)	+	+

注 :同表 1。  
Notes :The same as table 1.

2.3 毒素苗的免疫保护性

毒素苗的安全性检查

取一定浓度的毒素苗 ,对健康真鲷进行人工攻毒 ,检查毒素苗对真鲷的毒性。结果见表 4 ,不同浓度的毒素苗对真鲷均无致死性 ,这表明毒素苗灭活彻底。

表 4 毒素苗对真鲷的致死性  
Tab. 4 The pathogenicity of the toxoid

实验组 Test groups	试验鱼数(尾) Fish number	毒素苗浓度 (mg/ mL) Concentration	注射剂量 (mL/ 尾) Injection	感染后死亡数及死亡时间(天) Time of death (d)							死亡数 Death	死亡率( %) Mortality
				1	2	3	4	5	6	7		
毒素苗 Toxoid	10	5.0	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0.5	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0.05	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
对照组 Control	10	生理盐水 0.85 %NaCl	0.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0

毒素苗的免疫保护性实验

一定稀释度的毒素苗,在初次免疫 2 周后利用病原菌对免疫组及对照组的实验鱼进行人工攻毒感染,感染结果见表 5,强化免疫后的攻毒

感染结果见表 6。由表 5 与表 6 可知,毒素苗的免疫保护率可达 80 %,强化免疫后,免疫保护率有所提高。注射免疫的免疫保护率比浸泡免疫的高。

表 5 毒素苗初次免疫的免疫保护性  
Tab. 5 The protective effect of toxoid for the first time

实验组 Test groups	毒素疫苗稀释度 Dilutions	实验鱼数 (尾) Fish number	感染后死亡数及死亡时间(天) Time of death (d)							死亡数 (尾) Death	死亡率 ( %) Mortality	免疫保护率( %) Protective effect
			1	2	3	4	5	6	7			
注射免疫 Injection	10 <sup>0</sup>	20	0	0	4	0	4	0	0	8	40	60
	10 <sup>1</sup>	20	0	0	4	4	0	0	0	8	40	60
	10 <sup>2</sup>	20	0	0	4	4	4	0	0	12	60	40
	10 <sup>3</sup>	20	0	4	4	0	4	0	0	12	60	40
浸泡免疫 Immersion	10 <sup>0</sup>	20	0	0	4	4	4	0	0	12	60	40
	10 <sup>1</sup>	20	0	0	4	4	4	0	0	12	60	40
	10 <sup>2</sup>	20	0	0	4	8	4	0	0	16	80	20
	10 <sup>3</sup>	20	0	0	4	4	4	4	0	16	80	20
对照组 Control	注射生理盐水 0.85 % NaCl	20	0	0	4	12	4	0	0	20	100	0

表 6 毒素苗强化免疫的免疫保护性  
Tab. 6 The protective effect of toxoid for the second time

实验组 Test groups	毒素疫苗稀释度 Dilutions	实验鱼数 (尾) Fish number	感染后死亡数及死亡时间(天) Time of death (d)							死亡数 (尾) Death	死亡率 ( %) Mortality	免疫保护率( %) Protective effect
			1	2	3	4	5	6	7			
注射免疫 Injection	10 <sup>0</sup>	20	0	0	0	0	4	0	0	4	20	80
	10 <sup>1</sup>	20	0	0	0	4	0	0	0	4	20	80
	10 <sup>2</sup>	20	0	0	0	4	4	0	0	8	40	60
	10 <sup>3</sup>	20	0	0	4	0	4	0	0	8	40	60
浸泡免疫 Immersion	10 <sup>0</sup>	20	0	0	0	4	4	0	0	8	40	60
	10 <sup>1</sup>	20	0	0	0	4	4	0	0	8	40	60
	10 <sup>2</sup>	20	0	0	0	8	4	0	0	12	60	40
	10 <sup>3</sup>	20	0	0	0	4	4	4	0	12	60	40
对照组 Control	注射生理盐水 0.85 % NaCl	20	0	0	4	12	4	0	0	20	100	0

### 3 讨论

最小弧菌广泛存在于海水环境、养殖鱼体及野生鱼体内<sup>[5,6]</sup>,近年来大量的研究表明,该菌产生的胞外产物对鱼类及实验动物都具有很强的毒性<sup>[7,8]</sup>,是水产养殖动物的重要致病菌<sup>[9]</sup>,同时该菌也可以感染人类,引起人体腹泻及呕吐等临床症状<sup>[10]</sup>,是人类与水产养殖业的共同病原菌。

最小弧菌与霍乱弧菌不仅形态特征相似,而且引起人体的临床症状也相似,同时都是水产养殖业的重要致病菌,因此逐渐引起医学界及水产学界的重视,但迄今为止,还没有对这2种菌的致病机理进行比较研究的报道。霍乱弧菌肠毒素是霍乱弧菌引起人体腹泻及呕吐等临床症状的真正致病因子,本文以霍乱弧菌肠毒素为比较对象,从免疫血清学的角度出发,通过观察霍乱弧菌肠毒素与 Vnr Pm 毒素的血清学交叉反应来比较这2种毒素的致病机制,同时还希望通过这种比较找出最小弧菌在鱼体及人体致病机制方面的不同。实验结果表明,霍乱肠毒素抗血清不能中和 Vnr Pm 毒素,这说明这2种毒素在抗原结构上不同,不存在共同抗原,同时也说明最小弧菌引起人体腹泻及呕吐的真正致病因子可能不是 Vnr Pm 毒素,而是最小弧菌产生的其他致病因子,因此,最小弧菌在鱼体与人的致病机制上存在差异,至于最小弧菌在鱼体与人的致病机制上究竟有何不同还有待进一步的研究。

嗜水气单胞菌是重要的淡水养殖病原菌,HEC 毒素是其产生的真正致病因子,该毒素与最小弧菌产生的 Vnr Pm 毒素很相似,都是单一的多肽分子,不具备典型的细菌毒素的 A、B 亚基结构,但通过血清学交叉反应的比较,发现这2种毒素的抗原结构也不同。

本文探讨了毒素苗对真鲷弧菌病的免疫保护性。通过福尔马林灭活处理,得到的毒素苗能产生较好的免疫保护性,其免疫保护率可达 80%,这表明外毒素不仅是病原菌最小弧菌产生的毒力因子,同时也是菌体产生的有效保护性抗原。

外毒素经过减毒后对鱼体具有较强的免疫保护性,这一点在养殖生产实践中潜在的应用价值大。长期以来,鱼类的免疫以浸泡法较为实用,易于推广,但这种方法由于牵涉到抗原的吸收等问题,效果并不十分理想,实际上的免疫效果往往还没有注射免疫的效果好,而注射免疫由于其操作的复杂性及专业性而限制了在养殖生产中的进一步推广应用,

此外由于细菌的变异性大,导致菌体疫苗免疫效果的稳定性较差,种种原因限制了菌体疫苗的发展,至今商品化的菌体疫苗尚不多见。LPS 作为疫苗虽然很有效,但不易提取,难以大量生产,因此在生产中广泛应用的可能性不大,同时与菌体疫苗一样,也存在免疫方式的问题,因此开发 LPS 疫苗也受一定的限制。毒素苗能产生较好的免疫保护性,这样可以通过诱导产生突变菌株,产生弱毒甚至无毒但仍保持其抗原性的产物,为采用同居感染等较温和的免疫方法提供了可能性。

**致谢:**本研究在南京农业大学动物医学院院长陆承平教授亲自指导下完成,谨致谢忱!

### 参考文献:

- [1] Wu H B, Pan J P. Studies on the pathogenic bacteria of the vibriosis of marine cage-cultured red sea bream (*Pagrus major*) [A]. The collection of papers presented at the 2000 symposium by Chinese fishery society[C]. Beijing: Ocean Press, 2000, 672—677 [吴后波, 潘金培. 海水网箱养殖真鲷弧菌病原生物学. 中国水产学会 2000 年度学术交流会议论文集. 北京: 海洋出版社, 2000, 672—677]
- [2] Wu H B, Pan J P. Purification and characterization of the exotoxin Vnr Pm produced by *Vibrio mimicus* [J]. *Oceanologia et Limnologia sinica*, 2002, 33(1): 83—89 [吴后波, 潘金培. 海水养殖真鲷弧菌病原菌外毒素的分离、纯化及生物学活性. 海洋与湖泊, 2002, 33(1): 83—89]
- [3] Tu X L, Lu C P. Purification and characterization of HEC toxin produced by *Aeromonas hydrophila* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 1992, 32(6): 432—438 [涂小林, 陆承平. 嗜水气单胞菌毒素的提纯及其特性分析. 微生物学报, 1992, 32(6): 432—438]
- [4] Zhu W X. Progress of bacteria toxin [M]. Beijing, People Press, 1987, 4—5 [祝文娴. 细菌毒素研究进展. 北京: 人民出版社, 1987, 4—5]
- [5] Chowdhury M A R, Miyoshi S, Yamanaka H *et al.* Ecology of *Vibrio mimicus* in aquatic environments [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989, 55: 2073—2078
- [6] Lupiani B, Baya A M, Magarinos B *et al.* *Vibrio mimicus* and *Vibrio cholerae* non-01 isolated from wild and hatchery-reared fish [J]. *Gyobyo Kenkyu*, 1993, 28: 15—26
- [7] Chowdhury M A R, Yamanaka H, Miyoshi S *et al.* Virulence potential of *Vibrio mimicus* in aquatic environments [J]. *Biomed. Lett.*, 1991, 46: 97—101
- [8] Yoshida H, Honda T, Miwatani T. Purification and characterization of a hemolysin of *Vibrio mimicus* that relates to thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1991, 84: 249—254
- [9] Thune R L, Hawke J P, Sibeling R J. Vibriosis in the red swamp crawfish [J]. *J. Aquat. Anim. Health.*, 1991, 3: 188—191

- [10] Wilson R, Lieb S, Roberts A *et al.* Norr-01 grouper 1 *Vibrio cholerae* *demiol.*, 1981, **114**:293—298  
gastroenteritis associated with eating raw oysters [J]. *Am. J. Epi-*

## THE IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE EXOTOXIN Vnr Pm PRODUCED BY VIBRIO MIMICUS

WU Hou-Bo, SU Xiao-Bo and PAN Jin-Pei

(South China Sea Institute of Oceanology, LED, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301)

**Abstract :** The culture of red sea bream (*Pagrus major*) has undergone rapid development in recent years in China, however, successful production is increasingly hampered by diseases. Vibriosis, caused by *Vibrio mimicus*, has become a major cause of serious economical losses in the farming of red sea bream along the coast of southern China. Vnr Pm toxin was successfully purified from the culture supernatant of *Vibrio mimicus* strain 96-6-3, using sequential ammonium sulfate precipitation and column chromatography on DEAE-cellulose and Sephadex G100. In the present paper, the immunological characteristics of Vnr Pm toxin were studied. Rabbits were immunized with three kinds of exotoxins to raise the anti-sera. After the exotoxins reacted with the anti-sera, their haemolytic and cytotoxic activities were examined. The results showed that the Vnr Pm toxin was neutralized by anti-sera, then lost its haemolytic and cytotoxic activities. On the contrary, the HEC toxin and cholera enterotoxin still kept their haemolytic and cytotoxic activities after neutralization. Red sea breams (*P. major*) were injected intramuscularly and direct immersion with formalinized Vnr Pm toxin (toxoid). The effectiveness of vaccination against *V. mimicus* was evaluated two weeks after the immunization. The results showed that stronger protection was induced in red sea bream by toxoid. After booster immunization, this protection was enhanced.

**Key words :** Vnr Pm toxin ; HEC toxin ; Cholera enterotoxin ; Toxoid