

三种免疫制剂对真鲷弧菌病的免疫保护性

吴后波 潘金培

(中国科学院南海海洋研究所, 广州 510301)

摘要: 菌体疫苗按不同的方式对真鲷进行免疫 2 周后, 对实验鱼均具有免疫保护性, 免疫保护性最好的免疫组, 免疫保护率在初次免疫后高达 60%, 强化免疫后免疫保护率可提高到 80%; 粗制 LPS 经去毒处理后初次免疫真鲷, 不同浓度的 IPS 对实验鱼具有不同程度的免疫保护性, 强化免疫后, 免疫保护率均有明显的提高, 浓度越高, 免疫保护性越强, 对真鲷的免疫保护率最高可达 90%; 最小弧菌产生的外毒素经福尔马林灭活后制成毒素苗, 这种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。

关键词: 真鲷弧菌病; 最小弧菌; 菌体疫苗; 粗制 LPS; 毒素苗

中图分类号: S941.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2002)05-0457-08

真鲷(*Pagrus major* Temminck et Schlegel), 在分类学上属于鲈形目、鲈亚目、鲈总科、鲷科、真鲷属, 俗称红鳞加吉鱼, 在我国广东等沿海省份又称红腊, 深受我国、日本及东南亚各国消费者的欢迎。近 20 年来, 真鲷养殖业发展迅猛, 但由于高密度集约化养殖所带来的多种负因子影响, 其病害种类、发病频率及其危害性亦逐年增加。弧菌病(Vibriosis)是我国南方沿海省份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—25cm 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。

真鲷弧菌病的研究在我国基本上是空白, 近年来笔者对该病进行了一系列的研究, 在调查了其流行规律、明确其致病菌是最小弧菌(*Vibrio mimicus*)^[1]的基础上, 对其病理、免疫防治及病原菌致病机理等方面进行了深入的研究, 并取得了重要进展, 本文是对该病免疫防治的研究报道。

1 材料与方法

1.1 菌种 实验菌株 96-63 为海水网箱养殖真鲷弧菌病的病原菌最小弧菌。

1.2 福尔马林灭活菌体疫苗的制备 最小弧菌接种海水普通营养培养基, 30℃、200r/min

收稿日期: 2001-09-25; 修订日期: 2001-12-25

基金项目: 中国科学院知识创新工程资助(KSCX2-F04); 广东省“科技创新百项工程”资助项目(99B06201G); 国家高技术研究发展计划(2001 AA 622050 资助)

作者简介: 吴后波(1967—), 男, 湖北省洪湖市人; 博士, 副研究员; 研究方向: 海洋生物病害。E-mail: hb.w@netease.com

摇床培养 24h, 10 000r/min 离心 30min, 用 PBS (pH7.2) 收集菌体, 洗涤细菌悬液 3 次后制成菌悬液, 细菌计数按 McF 浊度管结合活菌计数方法确定。按菌液量加入一定量的福尔马林溶液, 使福尔马林在菌液中的浓度为 0.2% (V/V)。在磁力搅拌器轻轻搅拌下, 4℃ 灭活 24h。用 PBS 离心洗涤灭活疫苗 3 次, 最后用 PBS 制成一定浓度的菌体疫苗悬液。

1.3 菌体疫苗的安全性检查 将菌体疫苗接种普通海水营养琼脂平板, 通过是否有病原菌生长来检查菌体疫苗中是否含有未灭活的病原菌。采用肌肉注射的方法, 将菌体疫苗对平均体长 14cm、体重 50g 的健康真鲷进行人工攻毒感染, 检查菌体疫苗对真鲷的致死性, 以病原菌强毒菌株作对照。

1.4 菌体疫苗的免疫保护性实验 实验免疫组分加佐剂 (福氏安全佐剂 FCA) 和不加佐剂组, 免疫方式采用每尾实验鱼注射菌体疫苗 0.2mL 的腹腔注射方式和将实验鱼在含 10^8 cells/mL 菌体疫苗的海水中浸泡 3min 的直接浸泡方式, 对平均体长 14cm、体重 50g 的健康真鲷进行免疫, 对照组注射 0.85% 的生理盐水。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 周后免疫组及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, 检查菌体福尔马林灭活疫苗的免疫保护性。

1.5 粗制 LPS 的提取 最小弧菌培养物 6 000r/min 离心 30min, 取菌体参照 Westphal 等人^[2]的酚水法提取脂多糖 LPS 粗提物, 参照 Dubois 等人^[3]的方法进行 LPS 的含量测定。

1.6 粗制 LPS 对真鲷的致病性 用 PBS (pH7.2) 粗制 LPS 倍比稀释, 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, 用生理盐水作对照。

1.7 粗制 LPS 的免疫保护性实验 用 PBS (pH7.2) 将一定浓度的粗制 LPS 倍比稀释, 加热煮沸 30min 以除其毒性, 然后对平均体长 14cm、体重 50g 的健康真鲷进行免疫, 每尾实验鱼腹腔注射 0.2mL 的粗制 LPS, 对照组注射 0.85% 的生理盐水 0.2mL。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 周后免疫组及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, 检查粗制 LPS 的免疫保护性。

1.8 外毒素的分离纯化 按吴后波等人^[4]的方法进行。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。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。

1.9 毒素苗的免疫保护性 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。

强化免疫 2 周后, 采用肌肉注射的方法, 利用病原菌对初次免疫及强化免疫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。

2 结 果

2.1 菌体疫苗的免疫保护性

2.1.1 菌体疫苗的安全性检查 通过与 McF 浊度管比较,并结合活菌计数的方法算出福尔马林灭活疫苗中的含菌量为 2.1×10^9 个/mL。将该菌体疫苗 0.1mL 接种于普通海水营养琼脂平板,在 30℃下培养 24h,没有细菌生长。将菌体疫苗对健康真鲷进行攻毒感染,以强毒病原菌作对照(表 1)。由表 1 可知,菌体疫苗对实验鱼没有致病性。这表明浓度为 0.2% (V/V) 的福尔马林在 4℃的条件下对病原菌进行 24h 的灭活,已经将病原菌彻底灭活。

表 1 菌体疫苗的安全性检查												
Tab. 1 The pathogenicity of the whole cell bacterin (WCB)												
实验组	试验鱼数 (尾)	菌体浓度 (个/mL)	注射剂量 (mL/尾)	症 状	感染后死亡数及死亡时间(d)							死亡率 (%)
					1	2	3	4	5	6	7	
菌体疫苗	5	2.1×10^9	0.3	—	0	0	0	0	0	0	0	0
病原菌	5	1.5×10^9	0.3	+++	0	2	1	2	0	0	0	100

注:“+”示有症状,“++”示症状较严重,“+++”示症状最严重,“—”示无症状。

2.1.2 菌体疫苗的免疫保护性 该菌体疫苗按不同的方式对真鲷进行免疫 2 周后,利用病原菌强毒菌株对免疫后的实验鱼进行攻毒感染(表 2)。由表 2 可知,采取 4 种不同的免疫方式,菌体疫苗对实验鱼均具有免疫保护性,但以免疫组 2 的免疫保护率最高,免疫组 3 的免疫保护率最低。

表 2 菌体疫苗初次免疫的免疫保护性													
Tab. 2 The protective effect of the whole cell bacterin(WCB) for the first time													
实验组	试验鱼数 (尾)	病原菌 感染浓度 (个/mL)	病原菌 注射剂量 (mL/尾)	感染后死亡数及死亡时间(d)							死亡数	死亡率 (%)	免 疫 保护率 (%)
				1	2	3	4	5	6	7			
免疫组 1	10	1.8×10^9	0.3	0	0	1	2	2	0	0	5	50	50
免疫组 2	10	1.8×10^9	0.3	0	0	2	0	1	1	0	4	40	60
免疫组 3	10	1.8×10^9	0.3	0	0	0	3	2	2	0	7	70	30
免疫组 4	10	1.8×10^9	0.3	0	0	0	2	2	2	0	6	60	40
对照组	10	1.8×10^9	0.3	0	3	3	2	2	0	0	10	100	0

注:免疫组 1 的抗原为菌体疫苗,免疫方式为腹腔注射;免疫组 2 的抗原为菌体疫苗+ FCA,免疫方式为腹腔注射;免疫组 3 的抗原为菌体疫苗,免疫方式为浸泡;免疫组 4 的抗原为菌体疫苗+ FCA,免疫方式为浸泡。

实验鱼强化免疫 2 周后,利用病原菌强毒菌株对实验鱼进行攻毒感染(表 3)。由表 3 可知,强化免疫后,菌体疫苗对实验鱼的免疫保护性均有提高,但还是以免疫组 2 的免疫保护率最高。

表 3 菌体疫苗强化免疫后的免疫保护性
Tab.3 The protective effect of the whole cell bacterin(WCB) for the second time

实验组	试验鱼数	病原菌	病原菌	感染后死亡数及死亡时间(d)										免 疫		
	(尾)	感染浓度 (个/mL)	注射剂量 (mL/尾)											死亡数	死亡率	保护率
				1	2	3	4	5	6	7		(%)	(%)			
免疫组 1	10	1.6×10 ⁹	0.3	0	0	2	1	0	1	0		4	40	60		
免疫组 2	10	1.6×10 ⁹	0.3	0	0	1	0	0	1	0		2	20	80		
免疫组 3	10	1.6×10 ⁹	0.3	0	0	0	3	1	2	0		6	60	40		
免疫组 4	10	1.6×10 ⁹	0.3	0	0	0	1	2	2	0		5	50	50		
对照组	10	1.6×10 ⁹	0.3	0	3	3	2	2	0	0		10	100	0		

注: 免疫组 1 的抗原为菌体疫苗, 免疫方式为腹腔注射; 免疫组 2 的抗原为菌体疫苗+ FCA, 免疫方式为腹腔注射; 免疫组 3 的抗原为菌体疫苗, 免疫方式为浸泡; 免疫组 4 的抗原为菌体疫苗+ FCA, 免疫方式为浸泡。

2.2 粗制 LPS 的免疫保护性

2.2.1 粗制 LPS 对真鲷的致病性 利用酚—水法提取的粗制 LPS 中含 LPS 的量为 2.4mg/mL, 利用 PBS(pH7. 2) 将粗制 LPS 倍比稀释后, 对健康真鲷进行人工攻毒(表 4)。由表 4 可知,LPS 对真鲷的毒性极低, 浓度为 2.4mg/mL 的 LPS 对真鲷的致死率只有 40%。

表 4 粗制 LPS 对真鲷的致死性
Tab.4 The pathogenicity of the crude LPS

实验组	试验鱼数	LPS 浓度	注射剂量	感染后死亡数及死亡时间(d)								死亡数	死亡率
	(尾)	(mg/mL)	(mL/ 尾)	1	2	3	4	5	6	7			(%)
粗制 LPS	5	2.4	0.3	0	0	0	0	1	1	0		2	40
	5	1.2	0.3	0	0	0	0	1	0	0		1	20
	5	0.6	0.3	0	0	0	0	0	0	0		0	0
对照组	5	生理盐水	0.3	0	0	0	0	0	0	0		0	0

2.2.2 粗制 LPS 的免疫保护性 去毒粗制 LPS 初次免疫真鲷后, 利用病原菌强毒菌株对实验免疫鱼进行攻毒感染(表 5)。由表 5 可知, 不同浓度的 LPS 对实验鱼具有不同程度的免疫保护性, 浓度越高的 LPS 免疫保护性越强, 免疫浓度为 2.4mg/mL 的 LPS 对真鲷的免疫保护率高达 70%。

表 5 粗制 LPS 初次免疫的免疫保护性
Tab.5 The protective effect of the crude LPS for the first time

LPS	试验鱼数	病原菌	病原菌	感染后死亡数及死亡时间(d)										免 疫		
免疫浓度		感染浓度	注射剂量											死亡数	死亡率	保护率
(mg/ mL)	(尾)	(个/mL)	(mL/尾)	1	2	3	4	5	6	7		(%)	(%)			
2.4	10	1.7×10 ⁹	0.3	0	0	0	1	2	0	0	3	30	70			
1.2	10	1.7×10 ⁹	0.3	0	0	2	1	1	1	0	5	50	50			
0.6	10	1.7×10 ⁹	0.3	0	0	2	3	2	0	0	7	70	30			
对照组	10	1.7×10 ⁹	0.3	0	2	3	3	2	0	0	10	100	0			

LPS 强化免疫真鲷后, 利用病原菌强毒菌株对实验免疫鱼进行攻毒感染(表 6)。由表 6 可知, 不同浓度的 LPS 对实验鱼强化免疫后, 其免疫保护率均有明显的提高, 免疫浓度最低的 LPS, 其免疫保护率有 50%。

表 6 粗制 LPS 强化免疫的免疫保护性													
Tab. 6 The protective effect of the crude LPS for the second time													
LPS	试验鱼数	病原菌	病原菌	感染后死亡数及死亡时间(d)								死亡数	死亡率
免疫浓度		感染浓度	注射剂量										保护率
(mg/ mL)	(尾)	(个/mL)	(mL/尾)	1	2	3	4	5	6	7		(%)	(%)
2.4	10	1.5×10 ⁹	0.3	0	0	0	0	0	1	0	1	10	90
1.2	10	1.5×10 ⁹	0.3	0	0	0	2	0	1	0	3	30	70
0.6	10	1.5×10 ⁹	0.3	0	0	2	1	2	0	0	5	50	50
对照组	10	1.5×10 ⁹	0.3	0	3	2	3	0	2	0	10	100	0

2.3 毒素苗的免疫保护性

2.3.1 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。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。

2.3.2 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 7, 强化免疫后的攻毒感染结果见表 8。由表 7 与表 8 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 7 毒素苗初次免疫的免疫保护性													
Tab. 7 The protective effect of toxoid for the first time													
实验组	毒素疫苗	实验鱼数	感染后死亡数及死亡时间(d)								死亡数	死亡率	免疫保护率
	稀释度	(尾)	1	2	3	4	5	6	7		(尾)	(%)	(%)
注射免疫	10 ⁰	5	0	0	1	0	1	0	0		2	40	60
	10 ¹	5	0	0	1	1	0	0	0		2	40	60
	10 ²	5	0	0	1	1	1	0	0		3	60	40
	10 ³	5	0	1	1	0	1	0	0		3	60	40
浸泡免疫	10 ⁰	5	0	0	1	1	1	0	0		3	60	40
	10 ¹	5	0	0	1	1	1	0	0		3	60	40
	10 ²	5	0	0	1	2	1	0	0		4	80	20
	10 ³	5	0	0	1	1	1	1	0		4	80	20
对照组	注射生理盐水	5	0	0	1	3	1	0	0		5	100	0

表 8 毒素苗强化免疫的免疫保护性
Tab. 8 The protective effect of toxoid for the second time

实验组	毒素疫苗	实验鱼数	感染后死亡数及死亡时间(d)								死亡数	死亡率	免疫保护率
	稀释度	(尾)	1	2	3	4	5	6	7	(尾)	(%)	(%)	
注射免疫	10 ⁰	5	0	0	0	0	1	0	0	1	20	80	
	10 ¹	5	0	0	0	1	0	0	0	1	20	80	
	10 ²	5	0	0	0	1	1	0	0	2	40	60	
	10 ³	5	0	0	1	0	1	0	0	2	40	60	
浸泡免疫	10 ⁰	5	0	0	0	1	1	0	0	2	40	60	
	10 ¹	5	0	0	0	1	1	0	0	2	40	60	
	10 ²	5	0	0	0	2	1	0	0	3	60	40	
	10 ³	5	0	0	0	1	1	1	0	3	60	40	
对照组	注射生理盐水	5	0	0	1	3	1	0	0	5	100	0	

3 讨 论

3.1 菌体疫苗的免疫保护性 菌体疫苗按不同的方式对真鲷进行免疫 2 周后,对实验鱼均具有免疫保护性,强化免疫后,菌体疫苗对实验鱼的免疫保护性均有所提高,在 4 组免疫实验中,免疫组 2 的免疫保护性最好,其免疫保护率在初次免疫后高达 60%,强化免疫后其免疫保护率可提高到 80%,这不仅说明病原菌菌体疫苗对真鲷是较好的保护性抗原,具有较高的免疫原性,能刺激真鲷在较短的时间内产生免疫应答,同时还表明菌体疫苗的免疫效果与免疫方式关系很大,注射免疫比浸泡免疫的免疫效果好。因此,在利用菌体疫苗进行免疫防治时,一定要选择有效的免疫途径及免疫剂量,同时还要进行强化免疫,这样才能达到预期的免疫效果,对真鲷弧菌病进行有效的防治。

3.2 粗制 LPS 的免疫保护性 利用酚—水法提取的粗制 LPS 中含 LPS 的量为 2.4mg/mL,攻毒感染的结果表明,LPS 对真鲷的毒性不大,浓度为 2.4mg/mL 的 LPS 对真鲷的致死率只有 40%。这表明 LPS 并不是病原菌最小弧菌的主要毒力因子,Baxa 等人^[5]在研究真鲷屈挠杆菌病时,同样发现病原菌的脂多糖 LPS 不是真正的致死因子。

Hasting^[6]、Lund^[7]及 Amesen^[8]分别证明了 LPS 能促进鱼体产生特异性的抗体,提高鱼体的免疫力,因此可见,LPS 是病原菌的有效抗原成分,本实验结果也支持这一结论。最小弧菌的粗制 LPS 经去毒处理后初次免疫真鲷,不同浓度的 LPS 对实验鱼具有不同程度的免疫保护性,强化免疫后,不同浓度的 LPS,其免疫保护率均有明显的提高,浓度越高,

免疫保护性越强, 对真鲷的免疫保护率最高可达 90%, 最低的免疫保护率也有 50%。

LPS 浓度并不是越高越好, LPS 用量过大也会导致鱼体慢性中毒, 有时甚至导致死亡, 这可能是因为过量的 LPS 抑制了鱼体的免疫机制^[9]。本试验结果是浓度越高的 LPS 免疫保护性越强, 可能有几个原因: LPS 在免疫前经过去毒处理; LPS 的免疫剂量还没达到抑制真鲷免疫机制的水平; 病原菌不同产生的 LPS 成分不同, 不同的鱼体对过量 LPS 的反应不同, 因此, 免疫过量的 LPS 并不是对所有的鱼体都产生致死性。在使用 LPS 疫苗时, 必需把握好 LPS 的剂量。

3.3 毒素苗的免疫保护性 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, 这一点很有意义。众所周知, 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, 此外由于细菌易变异, 导致菌体疫苗免疫效果的稳定性较差, 因此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。

参考文献:

- [1] 吴后波, 潘金培. 海水网箱养殖真鲷弧菌病病原生物学[C]. 迈向 21 世纪的渔业科技创新. 北京: 海洋出版社, 2000, 672—677
- [2] Whistler R L. Methods in carbohydrate chemistry Vol V, New York: Academic Press, 1965, 83—91
- [3] Dubois M, Furer E, Sandoff J. C. et al. Colorimetric methods for the determination of sugars and related substances [J]. *Anal Chem*, 1956, **28**(2): 350—356
- [4] 吴后波, 潘金培. 海水养殖真鲷弧菌病病原菌外毒素的分离、纯化及生物学活性[J]. 海洋与湖沼(已接受)
- [5] Baxa D V, Kawai K, Kusuda R. In vitro and in vivo activities of *Flexibacter maritimus* toxins[J]. *Rep. Usa Mar. Bio. Inst., Kochi Univ.*, 1988, 10: 1—8
- [6] Hastings T S, Ellis A E. Detection of antibodies induced in rainbow trout by different *Aeromonas salmonicida* vaccine preparations[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1990, **2**: 135—140
- [7] Lund V, Jorgensen T, et al. Humoral immune response in Atlantic Salmon, *Salmo Salar*, to cellular and extracellular antigens of *Aeromonas salmonicida* [J]. *Journal of Fish Disease*, 1991 **14**: 443—452
- [8] Arnesen J A, Bjomsdottir R, et al. Immunological responses in Atlantic Salmon, *Salmo Salar L*, against purified serine protease and haemolysins from *Aeromonas salmonicida* [J]. *Journal of Fish Disease*, 1993, **16**: 409—423
- [9] 陈昌福. 草鱼对鱼害粘球菌类脂多糖的免疫反应[J]. 淡水渔业, 1989, **4**: 3—5

THE IMMUNE PROTECTIVE EFFECTS OF THREE KINDS OF VACCINATION AGAINST VIBRIOSIS IN MARINE- CAGE CULTURED RED SEA BREAM(*PAGRUS MAJOR*)

WU Hou-bo and PAN Jin-pei

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

Abstract: Red sea bream(*Pagrus major*) were injected intramuscularly and direct immersion with *Vibrio mimicus* formalin killed cells (FKC), crude lipopolysaccharide(LPS) preparations and formalinized extracellular toxin(toxoid) of *V. mimicus*, respectively. The crude LPS prepared by the phenol-water method had a little toxicity. The crude LPS was being heated to reduce its toxicity. The effectiveness of vaccination against *Vibrio mimicus* were evaluated two weeks after the immunization. The results showed that good protections were induced in red sea bream by FKC, LPS and toxoid. After booster immunization, the degrees of protection were enhanced.

Key words: Vibrosis of Marine-cage cultured red sea bream(*Pagrus major*); *Vibrio mimicus*; Bacteria vaccine; Crude lipopolysaccharide (LPS) ; Formalinized extracellular toxin (toxoid)