

嗜水气单胞菌3种疫苗免疫的青鱼外周血免疫指标的变化

张波^{1,2} 曾令兵^{1,2} 罗晓松¹ 高正勇² 周勇¹ 安伟²

1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223; 2. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070

摘要 将福尔马林灭活的嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、菌体外膜蛋白(OMP)和菌体脂多糖(LPS)作为免疫原,分别免疫健康青鱼。在免疫1、2、4、7、14、21、28 d后进行外周血的血细胞计数和白细胞分类计数,测定细胞吞噬活性和抗体效价,结果表明:3种免疫原均可诱导红细胞和白细胞数量增加,并引起各种白细胞分类百分比变化,提高吞噬活性和抗体效价;免疫应答早期(第1周)主要是红细胞、单核细胞和中性粒细胞数量明显增加,吞噬细胞的吞噬活性迅速提高,吞噬百分比(PP)和吞噬指数(PI)第4天达峰值,F-AH组、OMP组和LPS组的PP、PI值依次分别为39.84%、46.53%、41.59%及3.94、4.26、3.77;随后则是淋巴细胞大量增殖,第21天淋巴细胞数量和抗体效价达峰值,F-AH组、OMP组和LPS组的抗体效价分别为1:426.67、1:341.33和1:213.33。免疫28 d后活菌攻毒的结果表明,OMP组的免疫保护率为75%;LPS组为67.8%,均明显优于F-AH组(50%)。可见3种免疫原均能通过促进青鱼血细胞增殖、提高吞噬细胞的吞噬活性、产生特异性抗体等方式增强机体的免疫保护力。

关键词 青鱼;嗜水气单胞菌;外膜蛋白;脂多糖;凝集抗体效价;吞噬活性

中图分类号 S 943 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)01-0100-06

青鱼(*Mylopharyngodon piceus*),为我国淡水养殖的“四大家鱼”之一^[1]。近年来,青鱼的病害问题不断发生^[2],严重制约了青鱼养殖业的健康发展。目前国内对鱼类细菌性疾病的控制主要以抗生素等化学药物为主,但细菌对抗生素易产生抗药性^[3],而且使用抗生素会产生残留等不良后果。

免疫接种已经被证实是预防鱼类疾病最有效的途径,包括全菌灭活疫苗,菌体成分亚单位疫苗等,它们均能在不同程度上提高鱼类的抗病性,减少疾病的发生^[4-5]。研究表明革兰氏阴性菌的外膜蛋白(OMP)和脂多糖(LPS)均具有良好的免疫原性^[6]。鱼类的免疫应答特征包括非特异性免疫和特异性免疫,迄今已有不少对抗体效价等特异性免疫方面的研究^[7-9],近来也有学者通过注射全菌灭活疫苗研究鱼类的非特异性免疫的报道^[10-11],但是国内有关菌体成分亚单位疫苗(如OMP,LPS等)对鱼类非特异性免疫的报道却比较少。

本研究将3种免疫原免疫人工饲养的健康青鱼,通过测定各个免疫组青鱼外周血的免疫指标的

变化和相对免疫保护率的高低,探讨鱼类非特异性免疫和特异性免疫在鱼类疫苗免疫保护中的作用,旨在为全菌灭活疫苗以及菌体成分疫苗在鱼病防治中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及其培养

用于本研究的嗜水气单胞菌(编号为BCB01)分离自湖北省荆州市某青鱼养殖示范区域患典型肠道出血病的青鱼肝脏。将菌株BCB01在BHI培养基32℃条件下培养24 h后,离心法集菌并以PBS清洗3次,稀释至一定浓度,冷藏为制备疫苗用。

1.2 3种免疫原和吞噬原的制备

将BCB01菌液加入终体积分数为0.3%的福尔马林,恒温水浴锅28℃灭活48 h,即成福尔马林灭活的嗜水气单胞菌全菌苗(formalin killed *Aeromonas hydrophila* cell, F-AH),检查细菌灭活效果后,稀释至 1×10^8 cfu/mL,即为F-AH免疫原;参照Filip等^[12]和Dilip等^[13]的sarkosyl法(十二烷基肌

收稿日期: 2011-03-03

基金项目: 农业部公益性行业科研专项(200803013)、荆州市水产养殖病害预警预报与防控体系建设项目(P2009001)

张波, 硕士研究生, 研究方向: 鱼病防治技术, E-mail: zhangbo-24@163.com

通讯作者: 曾令兵, 研究员, 研究方向: 水产养殖病害基础理论与防控技术, E-mail: zenglingbing@gmail.com

酸钠)从灭活 BCB01 菌体中提取外膜蛋白(OMP),采用紫外分光光度法测定其含量,调整质量浓度至 0.2 mg/mL,即为 OMP 免疫原;参照 Westphal 等^[14]的酚水法从灭活 BCB01 菌体中提取脂多糖(LPS),采用苯酚-硫酸法测定其含量,调整质量浓度至 0.2 mg/mL,即为 LPS 免疫原。将制备好的 3 种免疫原置 4℃冰箱中备用。

金黄色葡萄球菌吞噬原(formalin killed *Staphylococcus aureus* cells, F-SA)制备方法同 F-AH,置于 4℃冰箱备用。

1.3 试验鱼及饲养条件

试验青鱼取自长江水产研究所窑湾试验基地,平均体质量(50±5)g,平均体长(12±2)cm。室内暂养 1 周后开始试验,试验期间水温控制在(25±1)℃。

1.4 安全性试验

120 尾试验鱼随机分为 3 个试验组和 1 个对照组,每组 30 尾。3 个试验组通过腹腔分别注射 F-AH、OMP 和 LPS,每尾 0.2 mL,对照组注射等量的 PBS,观察 1 周。

1.5 免疫与采血

320 尾试验鱼随机分为 3 个免疫组和 1 个对照组,每组 80 尾。3 个免疫组通过腹腔分别注射 F-AH、OMP 和 LPS 免疫原,每尾 0.2 mL,对照组注射等量的 PBS。注射免疫 1、2、4、7、14、21、28 d 后,分别随机从每组中各取 5 尾试验鱼,尾静脉采血,血液不混合。其中 2 尾血液抗凝,用于血细胞计数、白细胞分类计数及吞噬活性测定;另外 3 尾血液不抗凝,室温静置 1 h,4℃冰箱静置 24 h,离心取上层血清,用于抗体效价的检测。

1.6 免疫指标检测

1)血细胞计数。利用 Dacie 氏稀释液将血液稀释,Neubarer 计数板计数红细胞(red blood cell, RBC)和白细胞(white blood cell, WBC),每个样品重复 3 次。

2)白细胞分类计数(differential leucocyte count, DLC)。采用常规方法每尾鱼制血涂片 3 张, Wright-Giemsa 染液混合染色,冲洗晾干,油镜下随机观察 100 个左右白细胞,计数各类白细胞数量,得出某种白细胞所占分类百分比。

3)吞噬细胞吞噬活性。0.2 mL 抗凝血中加入 0.05 mL F-SA,充分混匀后置 25℃恒温水浴锅中孵育 60 min,每 10 min 摇匀 1 次;1 000 r/min 离心

10 min;吸取白细胞层制涂片 3 张。Wright-Giemsa 染液混合染色,油镜下观察。吞噬活性以吞噬百分比(phagocytic percentage, PP)和吞噬指数(phagocytic index, PI)表示,并按下式计算:

吞噬百分比(PP)=

$$(100 \text{ 个白细胞中参与吞噬的细胞数}/100) \times 100\%$$

吞噬指数(PI)=

$$(100 \text{ 个吞噬细胞内细菌总数}/100) \times 100\%$$

4)血清抗体效价。采用 96 孔血凝板法进行,反应抗原采用 F-AH,显微镜观察血清凝集反应的强度。

1.7 攻毒试验

免疫后第 28 天,从每个试验组和对照组中各取 30 尾鱼,免疫组分别通过腹腔每尾注射 0.2 mL 的 1.0×10^8 cfu/mL BCB01 活菌,对照组注射等量 PBS,观察 14 d,记录感染发病和死亡情况,计算相对免疫保护力(relative percent survival, RPS)。

2 结果与分析

2.1 安全性试验

注射 F-AH、OMP 和 LPS 及生理盐水的健康青鱼经 14 d 饲养后,未发现死亡现象或染病症状,表明所用免疫原及其剂量对青鱼是安全的。

2.2 血细胞计数

经 F-AH、OMP 和 LPS 3 种免疫原分别免疫后,各免疫组青鱼外周血细胞计数结果如图 1 所示。从图 1-A 可见免疫后第 1 天开始,对照组红细胞数一直在 1.75×10^9 /mL 上下浮动,各个免疫组红细胞数(RBC)迅速增多,到第 4 天达到最高值,均显著高于对照组($0.01 < P < 0.05$),第 4 天后都逐渐下降。免疫后的第 4、7 和 14 天各个免疫组白细胞数(WBC)均显著高于对照组($0.01 < P < 0.05$),对照组白细胞数一直在 5×10^7 /mL 上下浮动(图 1-B)。无论是红细胞数还是白细胞数,3 个免疫组之间在各个时间均无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3 白细胞分类计数

经 3 种免疫原分别免疫后,各免疫组青鱼外周血细胞白细胞分类百分比(DLC)如图 2 所示。3 个免疫组之间单核细胞(monocyte)分类百分比变化趋势较为接近,均在第 7 天达到峰值,F-AH 组、OMP 组和 LPS 组依次分别为 7.21%、6.58% 和 6.32%,随后降低。3 个免疫组第 4 和第 7 天均极显著高于对照组($P < 0.01$),在第 14 天显著高于对

对照组 ($0.01 < P < 0.05$), 而各个免疫组之间差异不显著 ($P > 0.05$) (图 2-A)。中性粒细胞 (neutrophil) 分类百分比从第 2 天开始升高, 第 4 天达到峰值, F-AH 组、OMP 组和 LPS 组依次分别为 21.53%、25.31% 和 23.18%, 随后降低。3 个免疫组在第 4 天和 7 天均显著高于对照组 ($0.01 < P < 0.05$), OMP 组在第 4 天和 7 天略高于 F-AH 组和 LPS 组, 但差异不显著 ($P > 0.05$) (图 2-B)。3 个免疫组淋巴细胞

(lymphocyte) 分类百分比在第 21 天达峰值, F-AH 组、OMP 组和 LPS 组依次分别为 41.25%、39.58% 和 38.77%; 在第 14、21 和 28 天显著高于对照组 ($0.01 < P < 0.05$), 各个免疫组之间差异不显著 ($P > 0.05$) (图 2-C)。第 7、14 和 21 天血栓细胞 (thrombocyte) 分类百分比显著低于对照组 ($0.01 < P < 0.05$), 其他时间无显著差异 ($P > 0.05$) (图 2-D)。

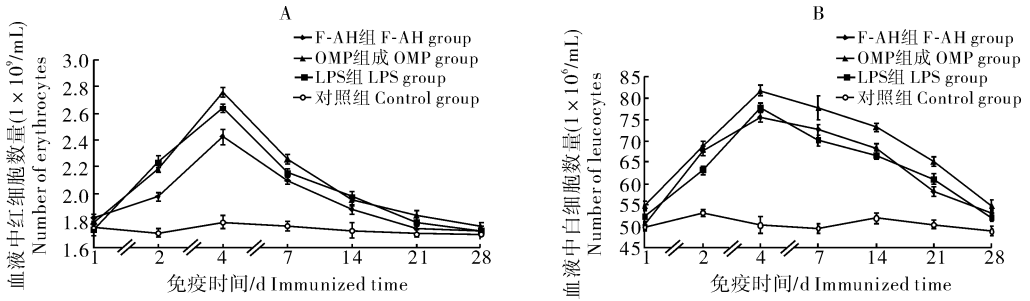


图 1 免疫组和对照组青鱼外周血血细胞数量变化

Fig. 1 The variation of hematocyte numbers in peripheral blood of black carp in immunized groups and control group

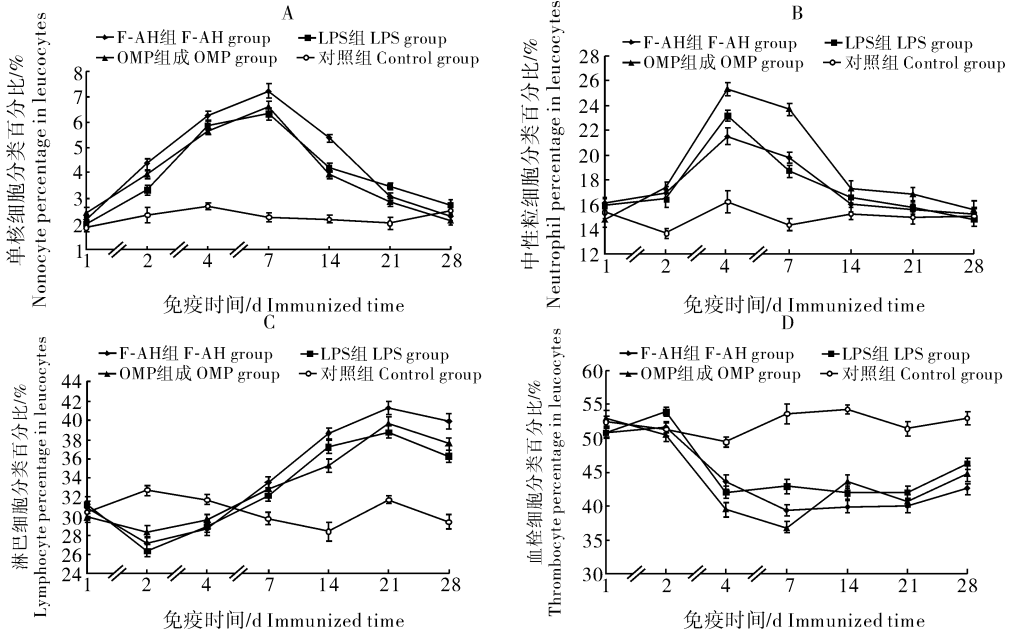


图 2 免疫组和对照组青鱼外周血白细胞分类百分比变化

Fig. 2 The variation of differential leucocyte count in peripheral blood of black carp in immunized groups and control group

2.4 吞噬细胞吞噬活性

经 3 种免疫原免疫后各免疫组青鱼外周血吞噬细胞的 PP、PI 变化如图 3 所示。3 个免疫组 PP、PI 迅速上升, 均在第 4 天达峰值, F-AH 组、OMP 组和 LPS 组的 PP、PI 值依次分别为 39.84%、46.53%、41.59% 和 3.94、4.26、3.77, 随后缓慢降低。3 个免

疫组在第 4、7 和 14 天其 PP 值均极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 在第 21 天显著高于对照组 ($0.01 < P < 0.05$) (图 3-A); 在第 4 天其 PI 值均极显著高于对照组 ($P < 0.01$), 第 7 和 14 天显著高于对照组 ($0.01 < P < 0.05$) (图 3-B)。3 个免疫组的 PP、PI 略高于 F-AH 组和 LPS 组, 但没有显

著性差异 ($P>0.05$)。在体外观察到青鱼的单核细胞和中性粒细胞吞噬了多个金黄色葡萄球菌,同时在混有红细胞的涂片中发现许多红细胞也有吞噬金黄色葡萄球菌的现象。

2.5 血清抗体效价

经 3 种免疫原免疫后的各组青鱼血清抗体效价缓慢升高,均在第 21 天达到峰值,其中 F-AH 免疫组最高,抗体效价为 1 : 426.67;OMP 免疫组次之,

达到 1 : 341.33;LPS 免疫组为 1 : 213.33,随后免疫组抗体效价均逐渐下降。对照组血清抗体效价低下,稳定在 1 : 4 左右。

免疫组和对照组差异极显著 ($P<0.01$),第 7、14、21 和 28 天,F-AH 免疫组抗体效价显著高于 OMP 免疫组和 LPS 免疫组(表 1)。由此可见,F-AH、OMP 和 LPS 3 种免疫原均能明显提高青鱼抗体水平。

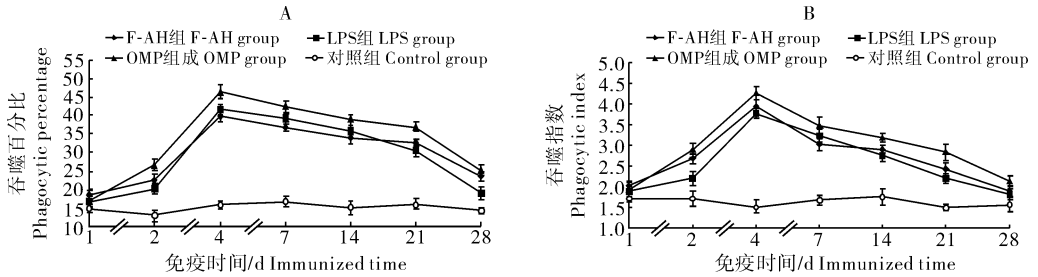


图 3 免疫组和对照组青鱼外周血吞噬细胞吞噬活性变化

Fig. 3 The variation of phagocytic activity of phagocytes in peripheral blood of black carp in immunized groups and control group

表 1 免疫和对照青鱼血清中凝集抗体效价¹⁾

Table 1 Agglutinating antibody titers in the sera of immunized and control black carp (*Mylopharyngodon piceus*)

| 分组 Group | 免疫时间/d Immunized time | | | | | | |
|-------------|-----------------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|
| | 1 | 2 | 4 | 7 | 14 | 21 | 28 |
| F-AH | 1 : 8 | 1 : 13.33 | 1 : 53.33 | 1 : 170.67 | 1 : 341.33 | 1 : 426.67 | 1 : 298.67 |
| OMP | 1 : 6.67 | 1 : 13.33 | 1 : 26.67 | 1 : 106.67 | 1 : 298.67 | 1 : 341.33 | 1 : 192 |
| LPS | 1 : 5.33 | 1 : 10.67 | 1 : 21.33 | 1 : 85.33 | 1 : 170.67 | 1 : 213.33 | 1 : 128 |
| 对照组 CK | 1 : 4 | 1 : 5.33 | 1 : 4 | 1 : 4 | 1 : 4 | 1 : 4 | 1 : 4 |

1)数据用平均值表示 ($n=3$)。The data were expressed as mean($n=3$)。

2.6 相对免疫保护力

攻毒 14 d 后,3 个免疫组青鱼均表现出较好的相对免疫保护力(RPS),其顺序是 OMP 组最高,LPS 组其次,F-AH 组最低,分别达到 75.0%、67.8%和 50.0%(表 2)。对攻毒感染试验死亡鱼进行解剖检查、分离培养细菌并进行鉴定,证实该试验鱼的死因为人工感染该病菌致死。

表 2 活菌攻毒后青鱼的死亡率和相对免疫保护力

Table 2 Mortality and relative percent survival of black carp after challenge with live *A. hydrophila*

| 分组 Group | 试验鱼尾数 No. of fish | 死亡尾数 No. of death | 死亡率/% Mortality | 相对免疫保护力/% RPS |
|-------------|----------------------|----------------------|--------------------|---------------|
| F-AH | 30 | 14 | 46.7 | 50.0 |
| OMP | 30 | 7 | 23.3 | 75.0 |
| LPS | 30 | 9 | 30.0 | 67.8 |
| 对照组 CK | 30 | 28 | 93.3 | |

3 讨论

OMP 和 LPS 作为革兰氏阴性菌的主要抗原,

国内外学者对于它们的免疫原性以及疫苗的开发也做了大量的研究。Francis 等^[15]研究表明,OMP 本身能够直接激活巨噬细胞,而且还能刺激白细胞增生;Solem 等^[16]的研究结果表明 LPS 能够刺激鱼体白细胞的增殖。在本试验中,青鱼经 F-AH、OMP 和 LPS 3 种免疫原分别免疫后,其外周血白细胞数量均显著提高,都在第 4 天达到峰值。单核细胞和中性粒细胞数量从免疫后第 2 天开始增殖,至第 7 天达到最高值。而淋巴细胞数量在免疫后 1 周内没有明显变化,其增殖从第 7 天开始,逐渐上升至第 21 天达到最大值。这是因为淋巴细胞在接受免疫刺激后,其增殖首先发生在脾脏内,然后随血液循环而进入外周,故其增长趋势较单核细胞和中性粒细胞滞后^[17]。由此可以推断,免疫应答早期是非特异性的单核细胞和中性粒细胞先发挥作用,之后则主要是特异性的淋巴细胞发挥作用。

研究表明,鱼类单核细胞和中性粒细胞是体内

的主要吞噬细胞,而吞噬作用是鱼类主要的非特异性免疫机制之一^[18]。本研究在体外观察到青鱼的单核细胞和中性粒细胞吞噬了多个金黄色葡萄球菌,各个免疫组吞噬细胞吞噬百分比(PP)和吞噬指数(PI)均在第 4 天达到最高随后逐渐降低,这与单核细胞和中性粒细胞的数量变化保持一致,研究结果与单红等^[10]的结果类似。表明在免疫早期,青鱼主要是通过单核细胞和中性粒细胞的吞噬作用(非特异性细胞免疫)来提高抗病力。3 个免疫组之间 OMP 组的 PP、PI 要略高于另外 2 个免疫组,F-AH 组和 LPS 组之间则差异不明显。同时,蔡完其等^[19]研究发现青鱼的红细胞具有免疫作用,这与我们免疫后第 2 和第 4 天,3 个试验组的青鱼红细胞数量明显增加,在混有红细胞的涂片发现许多红细胞也有吞噬金黄色葡萄球菌的现象相吻合,与罗芬等^[11]的观察结果也类似,表明青鱼的红细胞参与了免疫反应。

抗体是由淋巴细胞产生的一类能与相应抗原特异性结合的具有免疫功能的球蛋白,抗体效价反映了鱼类特异性体液免疫水平^[20]。本研究结果表明,青鱼经 3 种免疫原分别免疫后,各组抗体效价缓慢升高,并在第 21 天达到峰值,随后逐渐下降,而对照组抗体效价一直处于 1:4 左右。3 个免疫组之间其抗体效价水平由高到低顺序是 F-AH 组>OMP 组>LPS 组,这与试验中淋巴细胞分类百分比的变化趋势一致。同时,本研究发现相对于 F-AH 组(相对免疫保护率为 50%),OMP 组和 LPS 组免疫接种刺激鱼体产生的血清凝集抗体效价稍低,但却能够提供更有效的免疫保护,分别达到 75.0% 和 67.8%,与孟小亮等^[21]的结果相似。这可能是因为受免鱼对菌苗等抗原产生的免疫应答中,虽然 F-AH 组能诱导受免草鱼产生比较高的凝集抗体,但抗体中可能存在一些无效抗体而产生不了保护效果,而提取 OMP 和 LPS 因为去除了菌体上的部分无效抗原,所以在刺激受免青鱼产生的抗体中,有效抗体所占的比例相对较高,其相对免疫保护力(RPS)也较好。

从本试验结果可以得出,在免疫早期抗体尚未大量形成时,青鱼是依靠吞噬细胞数量和吞噬活性的增加来吞噬病原菌以保护机体,吞噬细胞首先发挥重要的非特异性细胞免疫作用;随后是淋巴细胞和抗体效价升高来抵抗病原菌攻击,特异性细胞和体液免疫起主要作用。3 种免疫原中,OMP 组和

LPS 组免疫效果要优于 F-AH 组,表明 OMP 和 LPS 都能显著提高青鱼血液中吞噬细胞数量和吞噬活性以及血清凝集抗体效价,进而提高受免鱼的免疫保护力。

参 考 文 献

- [1] LI S F, LU G Q, ZHOU B Y. Evaluation on the potential capacity of the swan oxbow for the conservation of the major Chinese carps[J]. *Aquaculture*, 1995, 137: 46-47.
- [2] 张波, 曾令兵, 罗晓松, 等. 青鱼肠道出血症病原菌的分离与鉴定[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(5): 607-612.
- [3] 王美珍, 陈昌福, 刘振兴, 等. 嗜水气单胞菌对四环素类和氟喹诺酮类药物的耐药性研究[J]. *华中农业大学学报*, 2011, 30(1): 89-93.
- [4] 杨先乐. 鱼用疫苗的现状及其发展趋势[J]. *水产学报*, 1996, 20(2): 159-167.
- [5] SOMMERSET I, KROSSOY B, BIERING E, et al. Vaccines for fish in aquaculture[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2005, 4(1): 89-101.
- [6] 闫茂昌. 哈氏弧菌外膜蛋白和脂多糖的研究[D]. 武汉: 华中农业大学水产学院, 2005.
- [7] 陈昌福, 陈超然. 鱼类三种致病菌的粗脂多糖对异育银鲫的免疫原性[J]. *水生生物学报*, 2002, 26(5): 483-488.
- [8] 贺蓉, 陈礼强, 王金胜, 等. 南方大口鲇对温和气单胞菌的免疫反应[J]. *西南农业大学学报: 自然科学版*, 2005, 27(5): 692-695.
- [9] 董传甫, 林天龙, 龚晖, 等. 嗜水气单胞菌主要外膜蛋白对欧洲鳊的免疫保护试验[J]. *水生生物学报*, 2005, 29(3): 285-290.
- [10] 单红, 张其中, 刘强平, 等. 灭活菌苗免疫的南方鲇外周血液细胞免疫指标的变化[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(3): 275-280.
- [11] 罗芬, 张其中, 冯汉茹, 等. 灭活菌苗免疫的中华倒刺鲃外周血液免疫指标的变化[J]. *水产学报*, 2010, 34(4): 626-634.
- [12] FILIP C, FLETCHER G, WULFF J L, et al. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate[J]. *Journal of Bacteriology*, 1973, 115(3): 717-722.
- [13] DILIP K S, TAPAS K S, ASOKE C G. Major outer membrane proteins of *Vibrio cholerae* and the role in induction of protective immunity through inhibition of intestinal colonization[J]. *Infect Immun*, 1992, 60(11): 4848-4855.
- [14] WESTPHAL O, JANN K. Bacterial lipopolysaccharides: extraction with phenol-water and further application of the procedure[J]. *Method Car Chemistry*, 1969, 5: 83-96.
- [15] FRANCIS C H, ELLIS A E. Production of a lymphokine (macrophage activating factor) by salmon (*Salmo salar*) leucocytes stimulated with outer membrane protein antigens of *Aeromonas salmonicida*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1994, 4: 489-497.
- [16] SOLEM S T, JORGENSEN J B, ROBERTSEN B. Stimulation

of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide[J]. Fish & Shellfish Immunology, 1995, 5(7): 475-491.

- [17] KOLLNER B, KOTTERBA G. Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunisation with *Aeromonas salmonicida* [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2002, 12(1): 35-48.
- [18] YAKHNENKO V M, KLIMENLOV I V. Specific features of

blood cell composition and structure in fishes from the pelagial and coastal zones of Lake Baikal[J]. Biology Bulletin, 2009, 36(1): 37-44.

- [19] 蔡完其, 孙佩芳. “四大家鱼”对暴发性鱼病的抗病力的种间差异[J]. 中国水产科学, 1995, 2(2): 71-77.
- [20] 张永安, 聂品. 鱼类体液免疫因子研究进展[J]. 水产学报, 2000, 24(4): 376-381.
- [21] 孟小亮, 陈昌福, 吴志新, 等. 嗜水气单胞菌 3 种疫苗对斑点叉尾鲷免疫原性比较研究[J]. 淡水渔业, 2009, 39(4): 49-53.

Responses of immune parameters in periphery blood of black carp (*Mylopharyngodon piceus*) immunized with three vaccines of *Aeromonas hydrophila*

ZHANG Bo^{1,2} ZENG Ling-bing^{1,2} LUO Xiao-song¹
GAO Zheng-yong² ZHOU Yong¹ AN Wei²

1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

2. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Black carp (*Mylopharyngodon piceus*) were immunized with three vaccines (formalin killed *Aeromonas hydrophila*: F-AH, outer membrane protein: OMP and lipopolysaccharide: LPS). Then, the blood was taken from each fish caudal vein of all groups on day 1, 2, 4, 7, 14, 21 and 28 post injection to study the related responses of immune parameters. The results were as follows: the number of erythrocytes and leucocytes in peripheral blood of fish immunized by three vaccines all increased during the first 4 days post injection, peaked on day 4. The differential leucocyte count (DLC) of fish immunized by three vaccines all increased and were significantly higher than that of control group for monocytes and neutrophils from day 4 to day 7, for lymphocytes from day 14 to day 28, and peaked on day 21. The phagocytic percentage (PP) and phagocytic index (PI) of phagocytes in fish immunized by three vaccines were significantly higher than those of the non-immunized fish between day 2 and day 7, with the maximum value observed on day 4. The serum antibody titers gradually increased in fish immunized by three vaccines during the first 21 days post injection, reached the greatest value on day 21, then gradually dropped off. The result of challenging with live *Aeromonas hydrophila* showed that black carp immunized by three vaccines had good relative percent survival (RPS). OMP had the highest RPS, which was 75.0%, followed by LPS (67.8%) and F-AH (50%). All the results suggested that three vaccines made black carp enhance immunity against the bacterial pathogen infection.

Key words black carp; *Aeromonas hydrophila*; outer membrane protein (OMP); lipopolysaccharide (LPS); agglutinating antibody titers; phagocytic activity