

## 5 株鲆鲽鱼类病原菌多克隆抗体的制备与应用

朱岩松<sup>1,2</sup> 王秀华<sup>2\*</sup> 韩雯<sup>1,2</sup> 王锐<sup>1,2</sup> 黄捷<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

(<sup>2</sup> 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

**摘 要** 本研究制备了鳃弧菌 *Vibrio anguillarum*、杀鲑气单胞菌 *Aeromonas salmonicida*、副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus*、哈维氏弧菌 *V. harveyi* 和腐败希瓦氏菌 *Shewanella putrefaciens* 5 株鲆鲽鱼类病原菌的免抗血清, 建立了 5 种菌的间接 ELISA 检测方法, 并将该检测方法用于鱼类细菌分离物病原检测。人工感染结果显示, 5 株菌对大菱鲆的半数致死量 ( $LD_{50}$ ) 在  $10^2 \sim 10^7$  CFU/fish; 制备的免抗血清效价分别为 1 : 2 048 000、1 : 16 000、1 : 16 000、1 : 1 024 000、1 : 128 000; 交叉反应结果显示, 鳃弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌 3 株弧菌与抗血清相互之间存在交叉反应; 抗血清特异检测灵敏度分别为  $10^4$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^5$ 、 $10^6$  cell/ml; 对 13 株海水鱼类细菌分离物进行检测, 有 1 株腐败希瓦氏菌阳性, 两株哈维氏弧菌阳性; 1 株副溶血弧菌和哈维氏弧菌均为阳性, 该结果与 16S rDNA 序列的分子分析方法一致。

**关键词** 鱼类病原菌 间接 ELISA 多克隆抗体 交叉反应 病原检测

**中图分类号** S917.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)03-0068-07

## Preparation and application of polyclonal antibodies against five pathogenic bacteria isolated from flounder

ZHU Yan-song<sup>1,2</sup> WANG Xiu-hua<sup>2\*</sup>

HAN Wen<sup>1,2</sup> WANG Rui<sup>1,2</sup> HUANG Jie<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

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

**ABSTRACT** Five marine fish pathogens, including *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas salmonicida*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *Shewanella putrefaciens* were previously isolated and identified. In this study, virulence of these pathogens were determined by artificial infection experiments. The results showed that  $LD_{50}$  value of the five bacteria against turbot *Scophthalmus maximus* were  $10^2 \sim 10^7$  CFU/fish. The polyclonal antibodies against them were produced from five New Zealand white rabbits respectively, and the titers of the polyclonal antibodies were 1 : 2 048 000, 1 : 16 000, 1 : 16 000, 1 : 1 024 000, 1 : 128 000 respectively. The poly-

国家自然科学基金项目(31172440)资助

\* 通讯作者。E-mail: wangxh@ysfri. ac. cn

收稿日期: 2012-05-08; 接受日期: 2012-06-07

作者简介: 朱岩松(1987-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产养殖动物疾病免疫防治研究。E-mail: zhuyansong3@126. com

clonal antibodies were used in indirect ELISA as primary antibody, and the goat anti-rabbit IgG-HRP was used as a secondary antibody. The indirect ELISA method of rapid detection of five pathogens was developed. The sensitivity of the serum was tested, and the lowest concentrations of five pathogens that can be detected were  $10^4$ ,  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^5$ , and  $10^6$  cell/ml, respectively. Obvious cross reactions were present between three strains of vibrio and the antisera. By using the developed indirect ELISA method, 13 bacterial strains isolated from the infected fish were detected. One strain from the flounder and black rockfish *Sebastes fuscescens* samples in the area of Jiaonan, Shandong Province, was positive for *S. putrefaciens* and two were positive for *V. harveyi*; one strain from *Cynoglossus semilaevis* in the area of Wudi, Shandong Province, was positive for both *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi*. This result is consistent with the result of 16S rDNA method.

**KEY WORDS** Fish pathogens Indirect ELISA Polyclonal antibody  
Cross reaction Pathogen detection

海水鱼类养殖为我国沿海渔业经济的支柱性产业,至2010年全国养殖产量达80.8万t(农业部渔业局2010)。近年来因鱼病频发,给养殖生产带来了极大的经济损失。鉴于海水养殖鱼类病原呈现多样性(王瑞旋等2010;吕俊超等2009;杨春志等2008;范文辉等2005;Shi *et al.* 2004),明确主要养殖鱼类病原、建立快速的检测方法以及开发相应的疫苗产品已成为当前鱼病领域研究的重点。

鲆鲽鱼类为我国北方沿海主要的养殖种类,因普遍采用地下水工厂化养殖模式,全年水温恒定,生长速度快,但由于养殖密度高,极易发病并导致大批量死亡。研究发现,病原菌感染是近年导致养殖鲆鲽鱼类发病的主要原因,耐药性分析表明,许多病原菌已经出现广泛耐药(房海等2006;张晓君等2008),因此养殖生产迫切需要疫苗防治技术。

鱼类病原菌多克隆抗体是鱼病研究中被普遍应用的一类抗体,常用于病原菌血清学检测(白方方等2009)、病原抗原蛋白分析等领域(张兴虎等2007;余旭平等2008)。本研究利用从养殖鲆鲽鱼中分离出的鳃弧菌、杀鲑气单胞菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌和腐败希瓦氏菌5株病原菌,分别制备了多克隆抗体,建立了该5种病原菌的间接ELISA检测方法,分析了病原菌与抗血清间的交叉反应,并将目标病原的检测方法进行了实际应用效果测试,以为细菌病多联疫苗的研制提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验用菌株

鳃弧菌 MN 分离株 *Vibrio anguillarum*、副溶血弧菌 *V. parahaemolyticus*、哈维氏弧菌 *V. harveyi* 和腐败希瓦氏菌 *Shewanella putrefaciens* 4 株病原菌分别于2004年5月、2007年6月、2006年7月及2005年10月分离自山东省养殖患病大菱鲆 *Scophthalmus maximus*, 杀鲑气单胞菌 *Aeromonas salmonicida* 于2006年11月分离自辽宁省养殖患病石鲈 *Kareius bicoloratus*, 5 株菌均由中国水产科学研究院黄海水产研究所海水养殖生物疾病控制与分子病理学实验室分离鉴定并保藏。

### 1.2 细菌毒力测试

将5株菌接种于2216E固体培养基(蛋白胨5g,酵母膏1g,磷酸高铁0.01g,陈海水1L,琼脂20g;pH7.7),28℃培养17h,分别用无菌生理盐水洗下菌落,稀释成浓度为 $2 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^6$ 和 $2 \times 10^5$  CFU/ml菌悬液。腹腔注射感染体长7~8cm的大菱鲆(0.1 ml/尾),每组10尾,对照组注射等量生理盐水。感染后实验鱼置于有效水体25L的整理箱中养殖,连续充气,实验用海水盐度为30,水温17℃,每天投饵、吸污及换水1

次,养殖观察 14 d,记录死亡鱼数。实验结束后用 Reed 等(1938)的方法计算半致死剂量(LD<sub>50</sub>)。

### 1.3 抗原的制备

将 5 株菌分别接种于 2216E 液体培养基中,28℃ 摇床发酵 20h(160 r/min);用浓度 0.5% 的甲醛常温灭活 24 h,经涂布法检测灭活效果后,5 000 ×g 离心 10 min,分别收集上清液及菌体;菌体暂时放在 4℃ 保存,上清液用于提取细菌的胞外蛋白(何青芳等 2002;刘永峰等 2005)。然后调整菌液浓度至浓度 3×10<sup>9</sup> cells/ml,将胞外蛋白按照原发酵菌液的浓度加入菌悬液中,制备成免疫用抗原。

### 1.4 抗血清的制备

选择 5 只重量为 2 kg 左右的健康新西兰白兔(购于山东省青岛市药品检验所),第 1 次免疫将抗原与等量的完全弗氏佐剂混合振荡至油包水状态,在兔背部 4~6 点皮下多点注射,每点 0.1 ml。第 2 次免疫开始注射与不完全弗氏佐剂混合的抗原,在兔颈背部皮下多点注射。第 2 次免疫和第 1 次免疫的间隔期为 14 d,此后每 21 d 加强免疫 1 次,共免疫 4 次。于最后一次免疫 14 d 后,当效价达到 1:2 048 以上时,心脏采血,常温放置 1 h,然后 4℃ 放置过夜,低速离心分离血清,分装后于-80℃ 冰箱保藏备用。取第 1 次免疫试验前血清,为阴性血清。

### 1.5 间接 ELISA 方法的建立

#### 1.5.1 间接 ELISA 检测方法

抗原包被参照王秀华等(2011)所述方法,后续步骤采用常规间接 ELISA 流程(白方方等 2009)。酶标二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(购于南京金斯瑞公司),使用浓度 1:10 000。采用 TMB 为显色底物,在 450nm 处测吸光值。

#### 1.5.2 抗原最适包被浓度和抗血清最适稀释浓度确定

采用棋盘法确定抗原、抗体最适浓度,具体操作步骤按照白方方等(2009)的方法,5 株菌悬液浓度梯度均为 10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>9</sup> 和 10<sup>10</sup> CFU/ml,每种抗血清稀释分别为 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400 和 1:12 800。以能产生 OD<sub>450</sub> 值接近 1.0 且 P/N 值(样品 OD<sub>450</sub> 值-空白对照 OD<sub>450</sub> 值)/(阴性对照 OD<sub>450</sub> 值-空白对照 OD<sub>450</sub> 值)最大的抗原稀释度为最佳稀释度,相应的血清稀释度为最佳稀释度。

#### 1.5.3 血清效价测定

采用间接 ELISA 法测定效价,方法同 1.5.1。以 P/N 值≥2.1 判为阳性。

#### 1.5.4 抗体灵敏度确定

将 5 株菌分别用 PBS 配制成浓度为 10<sup>2</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>7</sup> 和 10<sup>8</sup> CFU/ml 7 个梯度,包被 96 孔板(100 μl/well),用最适工作浓度的相应抗血清为一抗,进行抗原检测,以出现阳性结果的最小的抗原浓度为抗体的灵敏度。

#### 1.5.5 5 株细菌与抗血清间的交叉反应

用最适包被浓度的 5 株菌的菌悬液包被酶标板,各血清均从 1:250 开始按两倍梯度稀释,检测不同的菌和血清之间是否有交叉反应。

### 1.6 海水养殖鱼类病原菌的检测

取 2010 年与 2012 年从沿海养殖鱼类中分离的 13 株细菌,采用建立的 5 株菌的间接 ELISA 检测方法分别进行鉴定,样品相关信息见表 4。同时用 16S rDNA 序列比对法(范文辉等 2005)对其进行细菌鉴定,以验证结果可靠性,实验设两个平行。

## 2 结果与分析

### 2.1 5 株菌的毒力测试结果

将 5 株菌分别注射感染大菱鲂后,养殖观察 14 d,根据各组的死亡数,计算得各株菌的 LD<sub>50</sub> 结果(表 1),期间对照组没有死亡。从表 1 可知,5 株菌对大菱鲂均具有一定毒力,其中鳃弧菌毒力最强,LD<sub>50</sub> 为 7.00×10<sup>2</sup> CFU/fish,腐败希瓦氏菌毒力最弱,LD<sub>50</sub> 为 3.73×10<sup>7</sup> CFU/fish,其他 3 株菌毒力适中。

### 2.2 抗原最适包被浓度和抗血清最适浓度

经棋盘法确定出了 5 株菌用于抗体效价分析时的最适包被浓度和用于抗原检测时的抗体最适浓度。各最适浓度见表 2。

表 2 5 株菌的最适包被浓度和抗血清最适稀释浓度

Table 2 Optimum coating concentration of the five pathogens and optimum dilution concentration of antisera for detecting of the antigens

抗原 Antigen	鳃弧菌 <i>V. anguillarum</i>	杀鲑气单胞菌 <i>A. salmonicida</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	腐败希瓦氏菌 <i>S. putrefaciens</i>
抗原最适包被浓度 Optimum concentration of antigens for coating (CFU/ml)	1×10 <sup>8</sup>	1×10 <sup>10</sup>	1×10 <sup>9</sup>	1×10 <sup>9</sup>	1×10 <sup>9</sup>
血清最适稀释浓度 Optimum dilute concentration of antisera	1 : 6 400	1 : 3 200	1 : 100	1 : 1 600	1 : 1 600

### 2.3 5 种菌抗体效价测定

采用间接 ELISA 方法测定 5 种抗体的效价(图 1)。测得鳃弧菌、杀鲑气单胞菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌和腐败希瓦氏菌 5 种菌的抗体效价分别为 1 : 2 048 000、1 : 16 000、1 : 16 000、1 : 1 024 000 和 1 : 128 000。

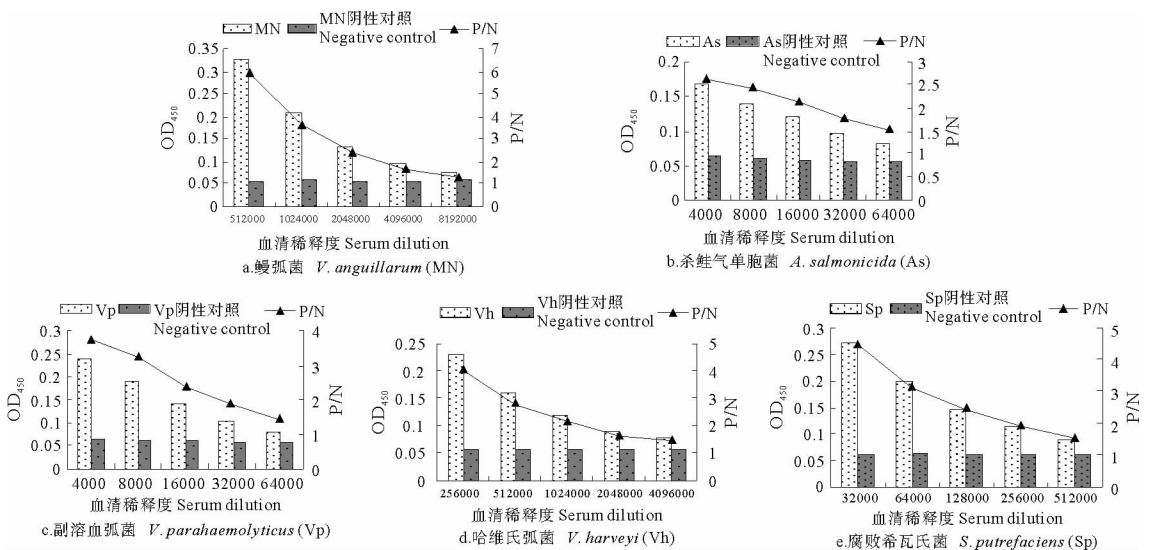


图 1 5 株菌的抗体效价测定结果

Fig. 1 Titer analysis of antibodies against the five bacteria

## 2.4 5种抗体的灵敏度

用最适稀释浓度的抗血清检测抗原,得到抗体的灵敏度结果(图2)。测得鳗弧菌、杀鲑气单胞菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌和腐败希瓦氏菌的菌悬液的最低包被浓度分别为 $10^4$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^5$ 和 $10^6$  cells/ml。

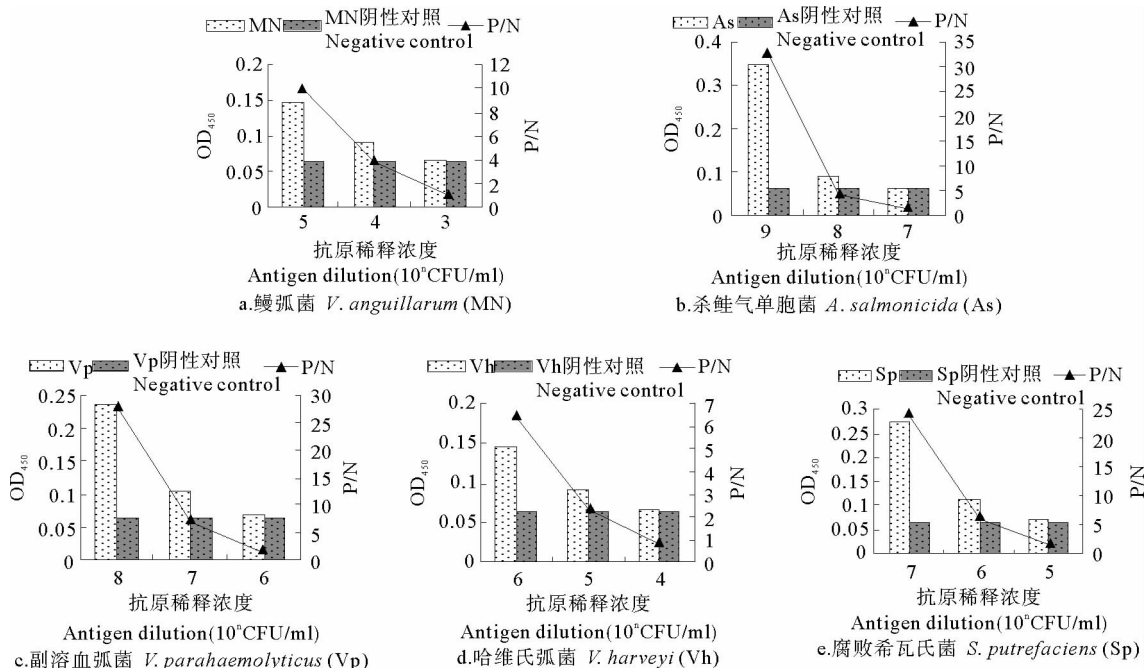


图2 5株菌的抗体灵敏度分析

Fig. 2 Sensitivity determination of antibodies against the five bacteria

## 2.5 5株细菌与抗血清间的交叉反应

5株细菌与抗血清间的交叉反应结果(表3)显示,鳗弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌3株弧菌与抗血清之间有比较明显的交叉反应。3株弧菌与杀鲑气单胞菌及腐败希瓦氏菌抗血清间没有交叉反应。

表3 5株菌与抗血清间的交叉反应结果

Table 3 Cross reaction between the five bacteria and the polyclonal antibodies

抗血清 Antisera	鳗弧菌 <i>V. anguillarum</i>	哈维氏弧菌 <i>V. harveyi</i>	副溶血弧菌 <i>V. parahaemolyticus</i>	杀鲑气单胞菌 <i>A. salmonicida</i>	腐败希瓦氏菌 <i>S. putrefaciens</i>
抗鳗弧菌抗体 Anti <i>V. anguillarum</i>	/	1 : 256 000	1 : 8 000	—	—
抗哈维氏弧菌抗体 Anti <i>V. harveyi</i>	ND	/	1 : 16 000	—	—
抗副溶血弧菌抗体 Anti <i>V. parahaemolyticus</i>	ND	ND	/	—	ND
抗杀鲑气单胞菌抗体 Anti <i>A. salmonicida</i>	ND	ND	ND	/	ND
抗腐败希瓦氏菌抗体 Anti <i>S. putrefaciens</i>	ND	ND	—	—	/

注:表中的数字是存在交叉反应的血清最低稀释浓度;“—”代表没有发现交叉反应;“ND”表示未测试

Note: The numbers in the table are the minimum diluted concentrations of cross reaction; “—” represents that no cross reaction was found; “ND” means no data

## 2.6 海水养殖鱼中病原菌的检测

应用制备的多克隆抗体,对从不同海水养殖场采集的海水鱼类细菌分离物应用建立的间接 ELISA 检测方法,对鳎弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌、杀鲑气单胞菌及腐败希瓦氏菌 5 种菌进行检测(表 4)。结果显示,从胶南的牙鲆样品中检出编号为 2010071003 的 1 株腐败希瓦氏菌阳性,从黑鲟样品中检出编号分别为 2010072201 和 2010072205 的两株哈维氏弧菌阳性;从无棣的半滑舌鳎样中分离的菌株 2012031203,ELISA 检测结果显示副溶血弧菌及哈维氏弧菌均为阳性,初步判断为弧菌属,其他非目标菌株均为阴性。而根据 16S rDNA 序列比对结果显示,ELISA 阴性菌株均为检测目标外的菌株,ELISA 确定的菌株与 16S rDNA 序列比对结果基本一致。

表 4 2010~2012 年海水养殖鱼分离菌株信息和 ELISA 检测结果

Table 4 Information and ELISA test results of bacteria isolated from infected marine fish during 2010~2012

采集地点 Sampling site	宿主 Host	菌株编号 Code of bacteria	ELISA 检测结果(P/N)与判定 Results of ELISA and judgement	16S rDNA 序列比对结果(最大相似性) Blast results for 16S rDNA (maximum identity)
山东胶南 Jiaonan, Shandong	牙鲆 <i>Paralichthys oliuceus</i>	2010071001	所有抗体检测(<2.1)- Using 5 antibodies	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (98%)
		2010071002	所有抗体检测(<2.1)- Using 5 antibodies	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (99%)
		2010071003	腐败希瓦氏菌抗体(4.5)+ Antibody against <i>S. putrefaciens</i> 其他抗体(<2.1)- Other antibodies	<i>S. loihica</i> (99%)
	黑鲟 <i>Sebastes fuscescens</i>	2010082815	所有抗体检测(<2.1)- Using 5 antibodies	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (99%)
		2010082816	所有抗体检测(<2.1)- Using 5 antibodies	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (99%)
		2010072201	哈维氏弧菌抗体(6.0)+ Antibody against <i>V. harveyi</i> 其他抗体(<2.1)- Other antibodies	<i>V. harveyi</i> (99%)
山东无棣 Wudi, Shandong	半滑舌鳎 <i>Cynoglossus semilaevis</i>	2010072205	哈维氏菌抗体(5.4)+ Antibody against <i>V. harveyi</i> 其他抗体(<2.1)- Other antibodies	<i>V. harveyi</i> (99%)
		2010072210	所有抗体检测(<2.1)- Using 5 antibodies	<i>Alcanivorax</i> sp. (100%)
		2012031202	所有抗体检测(<2.1)- Using 5 antibodies	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (99%)
		2012031203	副溶血弧菌抗体(5.6)+ Antibody against <i>V. parahaemolyticus</i> 哈维氏菌抗体(4.4)+ Antibody against <i>V. harveyi</i> 其他抗体(<2.1)- Other antibodies	<i>V. scopthalmi</i> (99%)
		2012031204	所有抗体检测(<2.1)- Using 5 antibodies	<i>Marinomonas pontica</i> (99%)
		2012031205	所有抗体检测(<2.1)- Using 5 antibodies	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (99%)
		2012031206	所有抗体检测(<2.1)- Using 5 antibodies	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (99%)

注:“+”代表 ELISA 结果阳性,“-”代表 ELISA 结果阴性

Note:“+”means the results of ELISA was positive, and “-”means the results of ELISA was negative

### 3 讨论

近年来,随着分子生物学技术的进步,利用细菌核酸、全细胞脂肪酸及蛋白指纹等微生物鉴定技术得到了迅速的发展,但由于该类技术所需要配套的设备价格较高,因而尚不能广泛普及。同时由于每种鉴定方法中其菌种库信息量有限,许多细菌的鉴定受到限制。利用病原菌制备多克隆抗体,建立病原的血清学检测技术是传统微生物检测的方法之一,该检测方法具有特异性强、检测时间短等特点,可针对性地进行病原筛选,在实际研究中有广泛应用(Wang *et al.* 2001;鄢庆枇等 2005;樊景风等 2006;Panangala *et al.* 2006)。本研究以鲢鳙鱼类病原鳗弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌、杀鲑气单胞菌和腐败希瓦氏菌为抗原,制备了兔抗血清,通过优化抗原及抗体工作浓度,建立了间接酶联免疫检测方法,为鱼类病原菌的检测提供了有效的手段,也为病原菌的后续研究提供了宝贵材料。

鱼类病原菌种类多,其中鳗弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌和杀鲑气单胞菌均为海水养殖鱼类的主要病原菌,课题组在近年来的鱼类病原菌筛查中,发现腐败希瓦氏菌检出率较高,结合本感染实验结果(表1)与已有的文献报道(高晓田等 2011),认为该菌对海水鱼类具有致病性。通过对5种实验菌株与其血清间的交叉反应分析,显示鳗弧菌、副溶血弧菌、哈维氏弧菌3株弧菌之间存在血清学交叉反应,表明该3株弧菌之间存在共同抗原,而3株弧菌与杀鲑气单胞菌及腐败希瓦氏菌的血清交叉反应不明显,该研究结果可以为后续多联疫苗设计提供参考信息。

本研究利用建立的5株鱼类病原菌的间接ELISA检测方法,对从养殖现场采集的鱼类细菌分离物进行了血清学检测,从检测结果可知,除菌株2012031203经血清学检测出现两个阳性结果,且与16S rDNA比对鉴定结果存在差异外,菌株2010071003、2010072201及2010072205均能准确得到鉴定,而其他经16S rDNA鉴定出的非目标细菌,ELISA检测结果均呈阴性。结果提示,如果利用弧菌抗血清进行病原检测,抗血清的特异性需要提高,如利用杂菌反向吸附法(牛瑞江等 2011),相关的研究有待进一步开展。

### 参 考 文 献

- 王瑞旋,冯娟,苏友禄,蓝祥宾,王江勇. 2010. 卵形鲳鲆美人鱼发光杆菌杀鱼亚种的分离鉴定. 中国水产科学, 17(5):1020-1027
- 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
- 牛瑞江,赖卫华,熊齐荣,魏华,熊勇华. 2011. 鼠伤寒沙门氏菌特异性多克隆抗体的纯化方法. 食品科学, 32(13):151-155
- 白方方,兰建新,王燕,韩茵,张晓华. 2009. 迟缓爱德华氏菌间接ELISA快速检测法. 中国水产科学, 16(4):619-625
- 刘永峰,陈志谊,张杰,刘邮洲,周明国. 2005. 枯草芽孢杆菌B-916胞外抗菌蛋白质的性质. 江苏农业学报, 21(4):288-293
- 吕俊超,张晓华,王燕,兰建新,韩茵,刘云. 2009. 养殖大菱鲆病原菌——杀鲑气单胞菌无色亚种的分离鉴定和组织病理学研究. 中国海洋大学学报, 39(1):91-95
- 中国渔业统计年鉴. 2010. 农业部渔业局. 北京:中国农业出版社
- 何青芳,陈卫良,马志超. 2002. 枯草芽孢杆菌A30菌株产生的拮抗肽的分离纯化与理化性质研究. 中国水稻科学, 16(4):361-365
- 杨春志,王秀华,黄健. 2008. 养殖大菱鲆迟缓爱德华氏菌的分离鉴定与系统发育分析. 上海水产大学学报, 17(3):280-284
- 余旭平,郭栋栋,刘晓宁,胡东建,杜鑫,陈玉银. 2008. 血清1和3型多杀性巴氏杆菌铁调控外膜蛋白共同抗原的初步分析. 畜牧兽医学报, 39(2):245-250
- 张晓君,秦国民,陈翠珍,房海,阎斌伦. 2008. 大菱鲆病原鳗利斯顿氏菌的药物敏感性测定与分析. 海洋通报, 27(5):35-38
- 张兴虎,齐玉琴,黄方,万文辉. 2007. 1型嗜肺军团菌和其他常见肺炎致病菌共同抗原的研究. 中国误诊学杂志, 7(4):674-676
- 房海,陈翠珍,张晓君. 2006. 牙鲆格氏乳球菌感染症及其病原. 中国水产科学, 13(3):403-409
- 范文辉,黄健,王秀华,窦海鸽. 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
- 高晓田,肖国华. 2011. 大菱鲆红嘴病的病原分离鉴定与系统发育分析. 河北渔业, 4:8-10
- 鄢庆枇,苏永全,王军,纪荣兴. 2002. 用LPS抗血清进行溶藻弧菌间接ELISA检测. 青岛海洋大学学报, 32(增刊):267-271
- Panangala, VS, Shoemaker CA, McNulty ST and 2 others. 2006. Intra-and interspecific phenotypic characteristics of fish-pathogenic *Edwardsiella ictaluri* and *E. tarda*. Aquaculture Research 37 (1): 49-60
- Reed LJ, Muench H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. American Journal of Epidemiology 27(3):493-497
- Shi CY, Wang YG, Yang SL and 2 others. 2004. The first report of an iridovirus-like agent infection in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*, in China. Aquaculture 236(1-4): 11-25
- Wang J, Yan QP, Su YQ and 2 others. 2001. Study on indirect ELISA method for detecting *Vibrio parahaemolyticus* in cultured *Pseudosciaena crocea*. Journal of Oceanography in Taiwan Strait 20 (3): 346-350