

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170906001

http://www.yykxjz.cn/

丁山, 李淑芳, 李杰, 唐磊, 王晓冉, 莫照兰, 李杰, 陈娟. 鳎弧菌三价灭活疫苗的长期免疫保护效果. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 137-142

Ding S, Li SF, Li J, Tang L, Wang XR, Mo ZL, Li J, Chen J. Long-term protection effect of *Vibrio anguillarum* trivalent inactivated vaccine. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 137-142

鳎弧菌三价灭活疫苗的长期免疫保护效果*

丁 山^{1,2} 李淑芳^{1,2} 李 杰^{2,3} 唐 磊⁴ 王晓冉⁴
莫照兰^{2,3①} 李 杰⁵ 陈 娟⁵

- (1. 农业农村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;
2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306; 3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物
产出过程功能实验室 青岛 266071; 4. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266100;
5. 山东东方海洋科技股份有限公司 烟台 264003)

摘要 鳎弧菌(*Vibrio anguillarum*)是一种能感染多种鱼类的条件致病菌,引起高致死率出血性败血症,流行于我国海水养殖环境,造成极大的经济损失。为此,本研究以鳎弧菌 O1、O2 和 O3 血清型菌株为抗原,制备了鳎弧菌三价灭活疫苗,以腹腔注射途径对健康大菱鲆(*Scophthalmus maximus*) (80.2±4.7) g 进行一次免疫,在一次免疫后 60 d 以同等剂量和途径进行二次免疫。对一免组进行 150 d 的观测,结果显示,大菱鲆血清的 3 种抗原的特异抗体水平在免疫后 14 d 显著升高 ($P<0.05$),免疫后 28 d 达到最大值 1:320,免疫后 28~150 d 稳定在 1:106.7~1:320,在免疫后 14~150 d 血清抗体效价均显著高于对照组 ($P<0.05$); 相对免疫保护率(RPS)的检测结果显示,免疫后 7 d 大菱鲆抵抗鳎弧菌 3 种血清型病原感染的 RPS 分别为 43.8%、38.9%和 16.7%,免疫后 28 d RPS 均达最大值 100%,免疫后 28~120 d 的 RPS 值保持在 70%~100%,免疫后 150 d 的 RPS 值为 35%~100%。对二免大菱鲆观测了 90 d,二免后 3~60 d 的大菱鲆血清抗体水平显著高于同期一免的大菱鲆 ($P<0.05$),二免后 60~90 d 抗体水平下降,与同期一免鱼无显著差异 ($P>0.05$); 二免大菱鲆的 RPS 值均高于 70%,高于同期一免大菱鲆。上述结果显示,以鳎弧菌三价灭活疫苗一次免疫大菱鲆,抗体持续期不少于 150 d,有效免疫保护期(RPS>70%)不少于 120 d; 二次免疫大菱鲆,抗体持续期和有效免疫保护期(RPS>70%)均不少于 150 d。空白组最终体重略高于免疫组,但 2 组的特定增长率(SGR)无明显差异,说明三价疫苗对大菱鲆生长没有影响。

关键词 鳎弧菌疫苗; 抗体效价; RPS; 抗体持续期; 免疫保护期

中图分类号 S942.1 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)05-0137-06

鳎弧菌(*Vibrio anguillarum*)是一种分布广泛的条件致病菌,能感染多种经济鱼类,引起宿主出血性败

血症,严重时可导致宿主死亡,造成水产业巨大经济损失。自首例鳎弧菌商品疫苗——抗弧菌引起的红嘴

* 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2016HY-ZD0505)和青岛海洋科学与技术国家实验室鳌山科技创新计划项目(2015ASKJ02)共同资助 [This work was supported by Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, Chinese Academy of Fishery Science (2016HY-ZD0505), and Aoshan S&T Innovation Project from Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02)]. 丁 山, E-mail: 13122410021@163.com

① 通讯作者: 莫照兰, 研究员, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-09-06, 收修改稿日期: 2017-10-10

病疫苗问世以来,许多学者投入到鳃弧菌疫苗免疫的研发中,目前,鳃弧菌疫苗已成功用于养殖鱼类的鳃弧菌病防治,如针对大西洋鲑(*Salmo salar*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、鳕鱼(*Gadus morhua*)、鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*)、鲷鱼(*Sparus aurata*)、香鱼(*Plecoglossus altivelis*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)的商品化鳃弧菌疫苗已经在挪威、西班牙、日本、韩国及欧洲等国家和地区得到广泛应用(Plant *et al.*, 2011)。我国不少学者也相继开展了鳃弧菌疫苗的研究,在实验室阶段评价了灭活疫苗(朱开玲等, 2004; 张振冬等, 2007; 潘燕华等, 2009; Zhang *et al.*, 2012)、口服疫苗(肖鹏等, 2007)、减毒疫苗(Zhang *et al.*, 2012)、DNA疫苗(Hui *et al.*, 2009)、亚单位疫苗(Xing *et al.*, 2017)、疫苗佐剂(Liu *et al.*, 2015)的免疫保护效果。其中,灭活疫苗因成本低廉,且能有效对抗胞外细菌侵袭,被认为是水产行业最理想的疫苗(Sommerset *et al.*, 2005)。

鳃弧菌血清型十分复杂,在已知的23种血清型中(Grisez *et al.*, 1995; Pedersen *et al.*, 1999), O1、O2以及部分 O3 血清型为致病血清型(Pedersen *et al.*, 1999),从流行病学调查结果来看, O1、O2和 O3 血清型鳃弧菌均在我国海水鱼养殖环境中流行(赵鲁宁等, 2011)。然而,目前国内鳃弧菌疫苗的研究均为以单个血清型为抗原的单价疫苗,而且很少进入中试临床研究阶段。为填补这一空白,本研究以鳃弧菌 O1、O2和 O3 血清型菌株为疫苗株,制备了三价疫苗,免疫大菱鲆后监测该疫苗的抗体持续期和免疫保护期,旨在获取鳃弧菌三价疫苗的免疫效力数据,推动鳃弧菌三价疫苗的临床中试研究。

1 材料与方法

1.1 实验菌株、培养基和培养条件

鳃弧菌 VAM003(O1 血清型)、VAM007(O2 血清型)和 M2016261(O3 血清型)分离自患病海水养殖鱼,由中国水产科学研究院黄海水产研究所病研室保藏,复壮后保存于 -80°C 冰箱。实验所用液体培养基为胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)或含有3%葡萄糖的TSB,固体培养基为胰蛋白胨大豆肉汤平板(TSA, TSB+1.5%琼脂)。培养温度为 28°C ,转速为150 r/min。

1.2 实验用鱼

实验大菱鲆购自山东省烟台市东方海洋科技有限公司,体重为 (80.2 ± 4.7) g,体长为 (12.0 ± 0.34) cm。实验鱼暂养于 $7\text{ m}\times 7\text{ m}\times 1\text{ m}$ 水泥池中,每天早、中、晚各投喂1次,按鱼体重的1.2%~1.5%进行投喂,每

次投喂后均换水1次,每次换水量约为池水总体积的2/3,养殖水温为 $14\sim 16^{\circ}\text{C}$ 。实验前,随机取3~5尾鱼进行细菌分离,确定从鱼的肝、脾、肾中均无细菌检出后,暂养鱼方可用于后续实验。

1.3 疫苗制备

将3株菌(VAM003、VAM007和M2016261)从 -80°C 冰箱接出,在TSA平板上活化, 28°C 恒温培养。挑取3~5个单菌落接种到5 ml TSB试管,在 28°C 、150 r/min 摇床培养过夜得到种子液,再将种子液按1%接种量转接到200 ml TSB(含3%葡萄糖), 28°C 、150 r/min 摇床培养。取24 h培养产物,向培养产物中加入37%福尔马林溶液至甲醛终浓度为0.2% (V/V),在 28°C 、150 r/min 条件下灭活。取灭活12 h和24 h时的菌液分别种到TSA平板和TSB试管,均无活菌检出后,确定完全灭活。将灭活完全的菌液6000 r/min、 4°C 离心10 min,收集菌体,用PBS缓冲液(0.2 mol/L, pH=7.6)洗涤2遍,再用含有0.1%甲醛的PBS缓冲液悬浮菌体,将3种菌悬液调整到相同 $\text{OD}_{600\text{ nm}}$,按1:1:1比例混合制备 10^9 cells/ml的三价灭活,在 4°C 保存待用。

1.4 疫苗免疫大菱鲆

实验于2016年5月~2016年10月在山东东方海洋科技股份有限公司进行,共计150 d。将暂养大菱鲆分为2组(免疫组和对照组),每组2500尾。免疫组用连续注射器(德国汉克萨斯)将浓度为 10^9 cells/ml的三价疫苗腹腔注射大菱鲆,注射量为0.1 ml/尾,即免疫剂量为 10^8 cells/尾;对照组注射等量的灭菌PBS。在一次免疫后60 d,以同等剂量对疫苗免疫的大菱鲆进行二次免疫,二免鱼尾鳍打上橘色标签后与一免鱼混养。

1.5 血清抗体效价检测

在首次免疫后3、7、14、21、28、44、56、63、70、77、90、120、150 d,免疫组和空白组分别随机取5尾鱼,从尾静脉取血;二次免疫后3、7、14、21、28、44、60、90 d,从二免组中随机取5尾鱼,从尾静脉取血。所得血液析出血清后,将各尾鱼的血清等体积混合,分装后于 -80°C 保存。分别以VAM003、VAM007和M2016261灭活细胞(10^8 cells/ml)为抗原,用微量凝集法(Nguyen *et al.*, 2017)检测血清抗体效价。具体方法步骤为:将血清按 2^n 梯度稀释,将各组稀释好的血清按稀释倍数由低到高逐孔加入96孔板中,每孔50 μl ,每个血清样品设置3个重复。将抗原等体积逐孔加入96孔板并吹打混匀,放入 28°C 培养箱孵育4 h后,转入 4°C 静置15 h,用倒置显微

镜观察凝集情况。以能观察到凝集反应的最大血清稀释倍数为血清抗体效价, 效价值以 $\log_2 N$ (N 为最大稀释倍数) 表示。

1.6 相对免疫保护率检测

在免疫后 7、14、28、60、90、120 及 150 d, 二免后 30、60 和 90 d, 从各免疫组和 PBS 对照组大菱鲆取鱼, 20 尾/组, 用 VAM003、VAM007 和 M2016261 活菌进行攻毒。攻毒前取对照组鱼评估各菌株的 LD_{50} (50% lethal dose, 半数致死量), 以 10 倍 LD_{50} 作为攻毒浓度, 确定 7~90 d 的攻毒浓度为 10^7 CFU/ml, 120~150 d 的攻毒浓度为 10^8 CFU/ml。攻毒时, 从鱼的背部肌肉注射 0.1 ml/尾。攻毒后观察鱼发病症状, 待死亡情况稳定后(即攻毒后 14 d)统计累计死亡数, 按照如下公式计算疫苗的相对免疫保护率(Relative percent survival, RPS):

$$RPS = (1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$$

(Amend, 1981)。

1.7 实验鱼体重检测

分别于首次免疫后 0、67、83、126、150 d, 从免疫组和对照组随机取鱼 30 尾检测实验鱼体重, 并计算其特定生长率(SGR):

$$SGR = (\ln W_f - \ln W_i) / t \times 100\%$$

式中, W_f 、 W_i 和 t 分别为终末体重(g)、初始体重(g)和养殖天数(d)。

1.8 数据处理

血清抗体效价表示为平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD), 用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析(One-way ANOVA), 检验标准采用 Duncan 法, 以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 血清特异性抗体效价

以剂量为 10^8 cells/尾的三价菌苗一次注射免疫大菱鲆后, 在不同的时间取免疫组鱼和对照组的血清, 检测 VAM003、VAM007 和 M2016261 的抗体效价。如图 1 所示, 在整个实验期间对照组的抗体效价在 1 : 2.0~1 : 5.1 波动, 而免疫鱼的血清抗体效价呈现先快速升高后保持相对稳定的趋势。免疫后 14 d 即可检测到 3 种抗体水平在 1 : 66.7~1 : 80, 显著高于对照组(1 : 2.0~1 : 2.9) ($P < 0.05$), 3 种抗体水平在免疫后 28 d 均上升到最高水平 1 : 320.0 ($P < 0.05$), 在 28~150 d 稳定保持在较高水平, 为 1 : 106.7~1 :

320.0, 显著高于同时期对照组的抗体水平(1 : 3.0~1 : 5.1) ($P < 0.05$)。结果表明, 以剂量为 10^8 cells/尾的鳎弧菌三价菌苗一次注射免疫大菱鲆, 3 种抗体的持续期超过 150 d。

二次免疫后 60 d 内, 与同期一免鱼相比, 二免鱼 3 种抗体水平均显著提高 ($P < 0.05$) (图 1)。在二免后 3 d 可检测到二免组抗体水平快速上升, 3 种抗体水平分别为 1 : 160.0 (VAM003)、1 : 213.3 (VAM007) 和 1 : 320.0 (M2016261), 均不低于同期一免鱼(63 d)的抗体水平, 1 : 160.0 (VAM003)、1 : 160.0 (VAM007) 和 1 : 177.7 (M2016261); 在二免后 14 d, 3 种抗体水平分别为 1 : 320.0 (VAM003)、1 : 640.0 (VAM007) 和 1 : 640.0 (M2016261), 显著高于同时期一免鱼(70 d)的抗体水平, 1 : 133.3 (VAM003)、1 : 151.1 (VAM007) 和 1 : 284.4 (M2016261), 并且二免后 14~60 d, M2016261 的抗体效价保持在最高水平; 二免后 90 d, 3 种抗体水平分别下降至 1 : 213.3 (VAM003)、1 : 68.9 (VAM007) 和 1 : 151.1 (M2016261), 与同期一免鱼(150 d)的抗体水平无显著差异 ($P > 0.05$)。上述结果表明, 二次免疫能够显著提高三价疫苗的抗体水平。

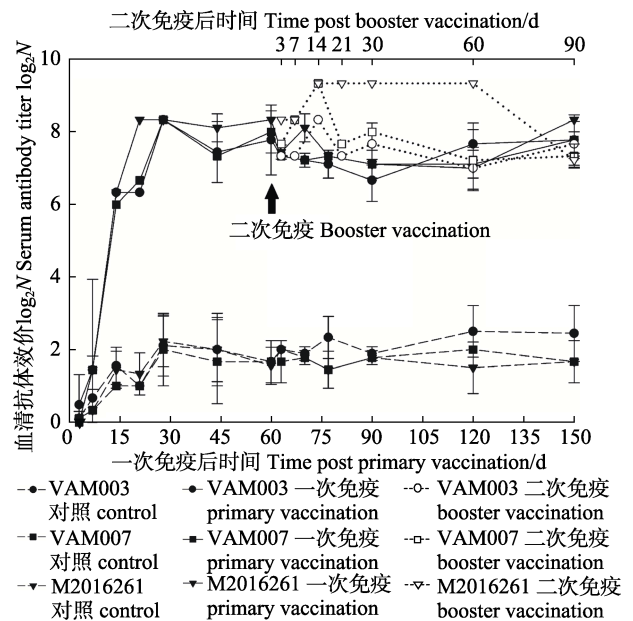


图 1 鳎弧菌三价疫苗免疫大菱鲆后的血清抗体效价
Fig.1 The serum antibody titer of turbot immunized with *V. anguillarum* trivalent vaccine

2.1 相对免疫保护率

在一次免疫后的不同时间, 用 VAM003、VAM007 和 M2016261 分别对免疫大菱鲆进行攻毒, 评估三价疫苗的免疫保护率。如图 2 所示, 大菱鲆免疫后 7 d 获得 RPS 分别为 43.8% (VAM003)、38.9% (VAM007)、

16.7%(M2016261); 在一免后 14~120 d, 针对 3 种病原的攻毒, 免疫大菱鲂的 RPS 为 70%~100%; 一免后 150 d, 免疫鱼获得的 RPS 分别为 35%(VAM003)、65%(VAM007)和 100%(M2016261)。

在二免后 30、60 和 90 d 进行疫苗 RPS 的检测。与同期的一免大菱鲂相比, 二免大菱鲂的 RPS 均有所提高; 特别是, 二免后 90 d 的大菱鲂获得的 RPS 为 75%(VAM003)、90%(VAM007)、100%(M2016261), 高于同期一免后 150 d 的大菱鲂。结果表明, 加强免疫后, 大菱鲂获得的 RPS 提高。若以 RPS>70%为有效免疫保护期, 则一免大菱鲂的有效免疫保护期为 14~120 d, 加强免疫后有效免疫保护期超过 150 d, 加强免疫后免疫保护期明显延长。

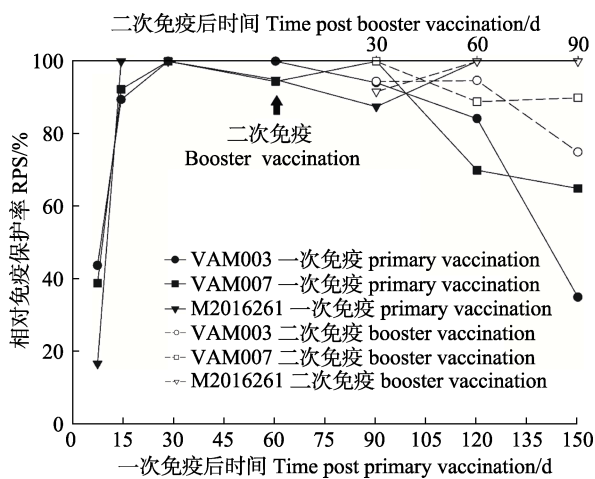


图2 鳗弧菌三价疫苗免疫大菱鲂后的免疫保护率
Fig.2 The RPS of of turbot after immunization with *V. anguillarum* trivalent vaccine

2.2 免疫过程中鱼体长和体重的变化

实验过程中, 不定期从免疫组和对照组取鱼测量其体重, 并计算特定增长率(SGR), 结果如图 3 所示。免疫组的 SGR(0.76)稍低于对照组(0.78), 但二者没有

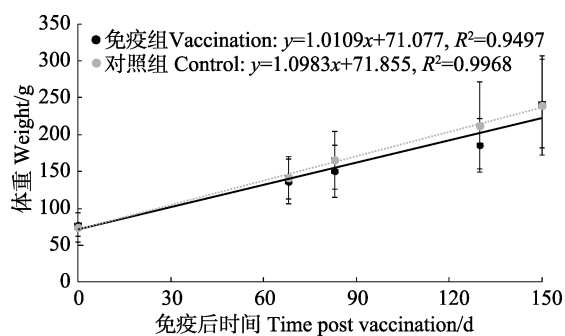


图3 免疫后大菱鲂体重增长
Fig.3 Weight growth of turbot after immunization with *V. anguillarum* trivalent vaccine

明显差别, 表明鳗弧菌三价疫苗对大菱鲂的生长未产生不良影响。

3 讨论

本研究以鳗弧菌的 O1、O2 和 O3 血清型菌株为抗原, 制备了鳗弧菌三价灭活疫苗对养殖大菱鲂进行了一次免疫和二次免疫, 结果显示, 鳗弧菌三价疫苗对大菱鲂起到了有效的免疫保护作用。在整个实验期间, 免疫组大菱鲂的生长与未免疫大菱鲂未有明显区别, 表明该疫苗对大菱鲂的生长没有影响。免疫血清抗体效价是评价疫苗免疫保护效果的重要参数之一, 实验结果显示, 鳗弧菌三价疫苗能够有效地刺激大菱鲂产生特异抗体, 3 种抗原的抗体水平在短期内快速上升到最高水平, 之后进入稳定期, 在检测的 150 d 里保持较高水平。Spinosa 等(2017)的实验也得到了相似结果, 他们以鳗弧菌 O1 血清型菌株和美人鱼发光杆菌(*Photobacterium damsela*)为抗原制备的二联疫苗免疫欧洲鲈鱼(*Dicentrarchus labrax*), 免疫后 22~29 d 针对鳗弧菌的特异抗体水平上升到最高, 并在免疫后 346 d 保持相对稳定的抗体水平。本研究发现, 一免后 7 d 免疫组的 3 种特异抗体的水平迅速升高, 说明鳗弧菌疫苗抗原能够快速地被大菱鲂机体免疫系统识别并产生特异性免疫应答。鳗弧菌灭活疫苗的主要抗原成分为脂多糖 LPS(O 抗原)(Schröder *et al.*, 2006), LPS 不需要抗原递呈细胞的加工处理便能直接激活 B 细胞诱导体液免疫, 因而, 能在较短时间内刺激特异抗体的产生。

相对免疫保护率 RPS 是评价免疫保护效果的另一个重要参数, 结果表明, 鳗弧菌三价疫苗能为免疫鱼提供很好的免疫保护。大菱鲂在一免后 7 d 便获得较高的 RPS, 在免疫后 14~120 d 针对 3 种抗原的 RPS 维持在 70%以上。这些结果表明, 鳗弧菌三价疫苗一次免疫大菱鲂, 能提供至少 120 d 的有效免疫保护期。一次免疫大菱鲂获得的 RPS 的变化趋势与特异抗体水平的变化趋势一致, 一免后 14 d 血清抗体显著升高的同时, RPS 也明显升高; 免疫后 28 d, 血清抗体效价达最大值, RPS 也达到最大值 100%; 免疫后 28~120 d 血清抗体水平维持在较高水平(>1:106), RPS 维持在 70%以上。RPS 与特异抗体水平的一致性说明疫苗产生的免疫保护作用主要来自于抗体介导的免疫应答, Sun 等(2011)也提出了相同观点。此外, RPS 与抗体效价间的相关性提示, 可以通过免疫鱼的特异抗体水平来预测 RPS, 但还需要多次重复实验来建立抗体水平与 RPS 的数值关系。

二次免疫能够提高宿主的抗体水平、延长抗体持续时间,从而延长疫苗的免疫保护期。为了探究鳎弧菌三价疫苗二次免疫的免疫保护效果,在一免后 60 d 对大菱鲆进行了二次免疫,并对比了二免鱼和一免鱼特异抗体的变化和 RPS。结果显示,在二免后 3 d 便检测到二免鱼的特异抗体水平显著高于同期一免鱼的抗体水平,并在 60 d 内维持较高于一免鱼的抗体水平,表明大菱鲆的免疫系统对鳎弧菌疫苗快速产生了二次免疫应答,并合成和分泌更多的特异抗体。同时,二免后,大菱鲆获得的 RPS 也显著高于同期的一免大菱鲆,有效免疫保护期(RPS>70%)大于 150 d,表明鳎弧菌三价疫苗进行二次免疫后能够提高大菱鲆的免疫保护率、延长免疫保护时间。加强免疫时残留的疫苗抗体滴度直接影响抗体应答,且通常表现为负影响。可能是形成了抗原-抗体复合物,降低了可与 B 细胞结合的抗原量。通常一般会在宿主的特异抗体效价下降到较低、RPS 也较低的时候进行二次免疫,以便有效延长抗体持续时间和免疫保护期。在本研究中,一免大菱鲆的特异抗体水平在免疫后 150 d 仍保持较高水平,而 RPS 在 120 d 已下降至 70%,因此,认为鳎弧菌三价灭活疫苗的二免时间在首次免疫后 120 d 左右较合适。

综上所述,鳎弧菌三价灭活疫苗为大菱鲆提供了有效的免疫保护,一次免疫的抗体持续期大于 150 d,有效免疫保护期不低于 120 d;二次免疫的抗体持续期大于 150 d,有效免疫保护期不低于 150 d。在整个实验期间,免疫后的大菱鲆的生长与未免疫大菱鲆没有明显区别。

参 考 文 献

- Amend DF. Potency testing of fish vaccine. *Developments in Biological Standardization*, 1981, 49: 447-454
- Frans I, Michiels CW, Bossier P, *et al.* *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: Virulence factors, diagnosis and prevention. *Journal of Fish Diseases*, 2011, 34(9): 643-661
- Grisez L, Ollevier F. Comparative serology of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Applied & Environmental Microbiology*, 1995, 61(12): 4367
- Hui Y, Chen JX, Yang GP, *et al.* Protection of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Vibrio anguillarum* with a DNA vaccine containing the mutated zinc-metalloprotease gene. *Vaccine*, 2009, 27(15): 2150
- Liu X, Hua Z, Yuan G, *et al.* Efficacy of chitosan oligosaccharide as aquatic adjuvant administrated with a formalin-inactivated *Vibrio anguillarum*, vaccine. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 47(2): 855-860
- Nguyen HT, Thu Nguyen TT, Tsai MA, *et al.* A formalin-inactivated vaccine provides good protection against *Vibrio harveyi* infection in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Fish & Shellfish Immunology*, 2017, 65: 118-126
- Pan YH, Ma Y, Zhao DL, *et al.* Study on immune response of *Paralichthys olivaceus* induced by live attenuated *V. anguillarum* vaccine. *Food and Drug*, 2009(5): 12-15 [潘燕华, 马悦, 赵东玲, 等. 鳎弧菌减毒活疫苗对牙鲆免疫效果的研究. *食品与药品*, 2009(5): 12-15]
- Pedersen K, Grisez L, Houdt RV, *et al.* Extended serotyping scheme for *Vibrio anguillarum* with the definition and characterization of seven provisional o-serogroups. *Current Microbiology*, 1999, 38(3): 183-189
- Plant KP, Lapatra SE. Advances in fish vaccine delivery. *Developmental & Comparative Immunology*, 2011, 35(12): 1256
- Schröder MB, Mikkelsen H, Børdal S. Early vaccination and protection of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles against classical vibriosis. *Aquaculture*, 2006, 254(1): 46-53
- Sommerset I, Krossøy B, Biering E, *et al.* Vaccines for fish in aquaculture. *Expert Review of Vaccines*, 2005, 4(1): 89-101
- Spinou E, Kokkoris GD, Bakopoulos V. Prevention of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L. 1758) photobacteriosis and vibriosis. Long term efficacy study of intraperitoneally administered bivalent commercial vaccines. *Aquaculture*, 2017, 471: 172-184
- Sun Y, Liu C, Sun L. A multivalent killed whole-cell vaccine induces effective protection against *Edwardsiella tarda* and *Vibrio anguillarum*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 31(4): 595-599
- Xiao P, Mo ZL, Zou YX, *et al.* Immune responses and efficacy of an oral-emulsified bivalent vaccine against *Vibrio anguillarum* in turbot (*Scophthalmus maximus*). *Chinese High Technology Letters*, 2007, 17(9): 979-985 [肖鹏, 莫照兰, 邹玉霞, 等. 鳎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*, 2007, 17(9): 979-985]
- Xing J, Xu H, Wang Y, *et al.* Protective efficacy of six immunogenic recombinant proteins of *Vibrio anguillarum* and evaluation them as vaccine candidate for flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Microbial Pathogenesis*, 2017, 107: 155
- Zhang Z, Wu H, Xiao J, *et al.* Immune responses of zebrafish (*Danio rerio*) induced by bath-vaccination with a live attenuated *Vibrio anguillarum* vaccine candidate. *Fish & Shellfish Immunology*, 2012, 33(1): 36
- Zhang ZD, Zhang PJ, Mo ZL, *et al.* Effect of inactivated *Vibrio anguillarum* vaccine on phagocytosis of *Paralichthys olivaceus* peripheral blood cells. *Studia Marine Sinica*, 2007, 48: 132-137 [张振冬, 张培军, 莫照兰, 等. 鳎弧菌灭活疫苗对牙鲆外周血细胞吞噬活性的影响. *海洋科学集刊*, 2007, 48: 132-137]
- Zhao LN, Li GY, Li J, *et al.* Serotyping and antibiotics

sensitivity of *Vibrio anguillarum* strains isolated from marine farmed fish. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(5): 1109–1118 [赵鲁宁, 李贵阳, 李杰, 等. 海水养殖鱼类鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)临床分离株的血清型和抗生素耐药谱. *海洋与湖沼*, 2011, 46(5): 1109–1118]

Zhu KL, Chen JX, Li Y, *et al.* Study on the vaccination against *V. anguillarum* in farmed marine turbot. *High Technology Letters*, 2004, 14(2): 76–80 [朱开玲, 陈吉祥, 李筠, 等. 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*, 2004, 14(2): 76–80]

(编辑 冯小花)

Long-Term Protection Effect of *Vibrio anguillarum* Trivalent Inactivated Vaccine

DING Shan^{1,2}, LI Shufang^{1,2}, LI Jie^{2,3}, TANG Lei⁴, WANG Xiaoran⁴,
MO Zhaolan^{2,3①}, LI Jie⁵, CHEN Juan⁵

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306;

3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071; 4. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266100;

5. Shandong Oriental Ocean Technology Limited Liability Company, Yantai 264003)

Abstract *Vibrio anguillarum* is a pathogen that can infect a variety of fish and causes highly fatal hemorrhagic septicemia. Its O1, O2, and O3 serotype strains are prevalent in the mariculture environment of China, causing great economic loss. However, the study of polyvalent vaccines of different pathogenic serotypes of *V. anguillarum* has not been undertaken. For this purpose, a trivalent inactivated vaccine *V. anguillarum* was made, and its antibody duration and immune protection period were evaluated. The trivalent vaccine was administered to turbot (80.2±4.7 g) at a dose of 10⁸ cells/individual *via* intraperitoneal injection; booster vaccination was given at 60 days post vaccination (dpv), and the serum antibody titer and RPS of the vaccinated group and control group were compared. Fish vaccinated only once were observed for 150 days, and the results showed that during 14~150 dpv, the antibody level of the vaccinated *V. anguillarum* group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$), and rose to 1 : 6.7 at 7 dpv, reached peak value at 28 dpv, and during 28~150 dpv hovered between 1 : 106.7~1 : 320. RPS of three serotype *V. anguillarum* were 16.7%~43.8% for 7 dpv, then reached 100% at 28 dpv; during 28~120 dpv was 70%~100%, 35%~100% for 150 dpv. The fish vaccinated twice were observed for 90 days; during 3~60 days post-second vaccination (dpsv), their antibody titer was significantly higher ($P<0.05$) than those vaccinated only once, then went down and was not significantly different ($P>0.05$) than that of those vaccinated only once. RPS of three serotype *V. anguillarum* were still higher than 70% and higher than those of fish only vaccinated once. All in all, antibody durability and efficient immune protection period (RPS>70%) of fish vaccinated with *V. anguillarum* trivalent inactivated vaccine once was longer than 150 days and 120 days respectively, and 150 days for fish that were vaccinated twice. Control group fish reached higher weight in comparison to the vaccinated fish, while SGR between groups for the whole period was not statistically significant ($P>0.05$).

Key words *Vibrio anguillarum* vaccine; Serum antibody titer; RPS; Antibodies durability; Immune protection period

① Corresponding author: MO Zhaolan, E-mail: mozl@ysfri.ac.cn