

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.17262

鳗弧菌 O1/O2 二价灭活疫苗免疫大菱鲂的抗体持续期和免疫保护期

李杰^{1,2}, 李淑芳^{1,3}, 丁山^{1,3}, 唐磊⁴, 李贵阳^{1,2}, 莫照兰^{1,2}, 李杰⁵, 陈娟⁵

1. 农业农村部海水养殖病害防治, 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;
2. 青岛海洋科学与技术国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071;
3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;
4. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;
5. 山东东方海洋科技股份有限公司, 山东 烟台 264003

摘要: 本研究分析了鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)O1/O2 血清型二价灭活疫苗免疫大菱鲂后的抗体持续期和免疫保护期。以鳗弧菌 O1 血清型 VAM003 株和 O2 血清型 VAM007 株为抗原制备了福尔马林灭活二价疫苗, 将疫苗按照三种剂量(10^7 cells/尾、 10^8 cells/尾、 10^9 cells/尾)以腹腔注射途径免疫大菱鲂, 在免疫后 3 d、7 d、14 d、30 d、60 d、90 d、120 d、150 d, 用血清凝集实验检测了免疫鱼血清的 VAM003 和 VAM007 抗体效价, 用攻毒实验检测了疫苗的免疫保护率(RPS)。结果显示, 在免疫后 7 d 三个剂量组的大菱鲂均产生了特异抗体, 并获得 27%~60% 的 RPS。三个剂量组大菱鲂的 O1 血清型抗体持续期分别>90 d (10^7 cells/尾组)、>150 d (10^8 cells/尾组)、>150 d (10^9 cells/尾组), 而三个剂量组大菱鲂的 O2 血清型抗体持续期均>150 d。三个剂量组的大菱鲂获得的免疫保护持续期均>150 d; 以 RPS>75%为有效免疫保护, 各剂量组大菱鲂抵抗 O1 血清型病原感染的有效免疫保护期为: 14~120 d (10^7 cells 组)、14~120 d (10^8 cells/尾)、14~150 d (10^9 cells/尾), 抵抗 O2 血清型病原感染的有效免疫保护期为: 14~60 d (10^7 cells 组)、14~120 d (10^8 cells/尾)、14~120 d (10^9 cells/尾)。研究结果表明鳗弧菌二价灭活疫苗可为大菱鲂提供有效而稳定的免疫保护, 获得的抗体持续期和免疫保护期为该疫苗的临床中试研究提供了基础。

关键词: 鳗弧菌 O1/O2 血清型二价灭活疫苗; 大菱鲂; 抗体持续期; 免疫保护期

中图分类号: S947

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)02-0397-07

鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)可以感染水生动物引起出血性败血症^[1], 是我国海水养殖鱼类的重要病原, 对牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲂(*Scophthalmus maximus*)、花鲈(*Lateolabrax japonicus*)等经济水产动物的养殖造成了严重的影响^[2-5]。在目前报道的 23 种鳗弧菌血清型中, O1、O2 和部分 O3 血清型是主要的致病型^[6], 我国海水养殖环境也存在 O1、O2 和 O3 血清型的鳗弧菌^[7]。疫苗免疫已成功用于养殖鱼类的鳗弧菌病防治, 国际上商品化的鳗弧菌疫苗是以联苗

的形式进行应用, 如用于大西洋鲑(*Salmo salar*)、鳗(*Anguilla anguilla*)的杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)–鳗弧菌二联灭活疫苗、杀鲑气单胞菌–鳗弧菌–耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)三联灭活疫苗、杀鲑气单胞菌–鳗弧菌–海水病弧菌(*Vibrio ordalii*)–冷水病弧菌(*Vibrio salmonicida*)四联灭活疫苗等。多年来我国学者也相继开展了鳗弧菌疫苗的研究, 在实验室阶段评价了灭活菌苗^[8-10]、口服疫苗^[11]、减毒疫苗^[12]、DNA 疫苗^[13]的免疫保护效果。上述疫苗多为以单个血清型为

收稿日期: 2017-07-11; 修订日期: 2018-02-26.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2016HY-ZD0505); 中国水产科学研究院黄海水产研究所基本科研业务费(20603022017008); 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).

作者简介: 李杰, 博士, 助理研究员, 主要从事鱼类病害防控研究. E-mail: lijie@ysfri.ac.cn

通信作者: 莫照兰, 博士, 研究员, 主要从事水产流行病与免疫学研究. E-mail: mozl@ysfri.ac.cn

抗原的单价疫苗,很少进入中试临床研究阶段。为了实现鳎弧菌疫苗的产业化生产和应用,亟待开展鳎弧菌疫苗的临床前和临床中试研究。

在实施海水养殖生物流行病学调查工作中,本课题组分离鉴定了多株鳎弧菌临床菌株及其血清型^[7],并评价了 O1、O2 和 O3 血清型临床菌株的免疫原性和免疫保护,为开发鳎弧菌多价疫苗奠定了基础。本文在前期工作基础上,筛选免疫原性和保护效力好的菌株作为候选疫苗株制备鳎弧菌 O1/O2 二价灭活疫苗,以大菱鲆为实验动物,检测了二价疫苗的抗体持续期和免疫保护期,旨在获取鳎弧菌二价疫苗的免疫效力数据,推动鳎弧菌二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

鳎弧菌 O1 血清型菌株 VAM003 和 O2 血清型菌株 VAM007 由中国水产科学院黄海水产研究所养殖生物疾病控制与分子病理学研究室保藏,培养温度 25℃。

1.2 实验鱼

实验所用大菱鲆购自山东东方海洋科技股份有限公司,日龄 180 d,体重(80.2±4.7) g,体长(11.98±0.34) cm。实验前暂养于四个水泥池(7 m×7 m×1 m),按照日常管理方式进行投饵和换水:饲料日投喂量为体重的 1.2%~1.5%,每天投喂 4 次,日换水量为 6~9 个池程。暂养期间观察大菱鲆运动、摄食、体表等情况,确定无异常后从各水池随机取 3~5 尾大菱鲆,观察体表、鳃有无寄生虫感染,然后取鱼的肝、脾、肾组织进行细菌分离,检测有无细菌感染,在确定未有寄生虫及细菌感染后,暂养鱼方可用于后续实验。

1.3 鳎弧菌二价灭活疫苗制备

从-80℃冰箱取 VAM003 和 VAM007 菌株于 TSA 平板划线,经血清学、16S rRNA 分析确定菌种正确后,挑取单菌落接种于 TSB 培养过夜,取过夜培养的菌液按 1%(V:V)接种量转接至新鲜 TSB(含 3%葡萄糖)培养 24 h,测定 OD₅₄₀后,加入 37%福尔马林溶液至甲醛终浓度为 0.2%,在 28℃、

140 r/min 的条件下进行灭活。分别取灭活 12 h 和 24 h 的菌液进行灭活情况检测:每瓶菌液取 200 μL 分别涂布 TSA 平板,设 3 个平行组;同时取每瓶菌液按 1%(V:V)比例接种 TSB,设 3 个平行组;接种的培养基培养 24~48 h,观察没有细菌生长后,确定菌液灭活完全情况。将灭活菌液在 6000 g、4℃下离心 10 min,沉淀菌体用无菌 PBS(0.2 mol, pH 7.6)离心洗涤 2 次后,用 PBS(含 0.1%甲醛)重悬菌体。将得到的 VAM003 和 VAM007 菌悬液按照 1:1 (V:V)比例混合,分别制备浓度为 1×10¹⁰ cells/mL、1×10⁹ cells/mL、1×10⁸ cells/mL 的二价疫苗,置 4℃保存。

1.4 疫苗免疫大菱鲆

实验地点在山东东方海洋科技股份有限公司,实验时间为 2016 年 6 月—2017 年 1 月,共计 150 d。将暂养大菱鲆分为 5 组,每组 2500 尾,分别设 3 个疫苗免疫组和 2 个对照组:10⁷ cells/尾、10⁸ cells/尾、10⁹ cells/尾、PBS 对照组、空白对照组。免疫时,用连续注射器(汉克萨斯,德国)将浓度为 10⁸ cells/mL、10⁹ cells/mL、10¹⁰ cells/mL 的二价疫苗分别腹腔注射大菱鲆,注射量为 0.1 mL/尾;PBS 对照组注射等量的灭菌 PBS;空白对照组不做任何处理。

1.5 血清抗体效价检测

在免疫后 3 d、7 d、14 d、21 d、30 d、45 d、60 d、90 d、120 d 和 150 d,从各免疫组和对照组随机取鱼 5 尾,从后尾柄静脉采血制备血清,将每尾鱼的血清等量混合、分装,然后保存于-20℃。以浓度为 10⁹ cells/mL 的灭活 VAM003 和 VAM007 细胞为抗原,用微量凝集法检测血清抗体效价^[14]。

1.6 免疫保护率检测

在免疫后 3 d、7 d、14 d、30 d、60 d、90 d、120 d、150 d,从各免疫组和 PBS 对照组大菱鲆取鱼,20 尾/组,用 VAM003 和 VAM007 进行攻毒。攻毒前取空白对照组鱼评估 VAM003 和 VAM007 的 LD₅₀(半数致死量,50% lethal dose),以 10×LD₅₀ 作为攻毒浓度。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,统计死亡数,按照如下公式计算疫苗的免疫保护率(relative

percent survival rate, RPS): $RPS = (1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}) \times 100\%$ 。

1.7 统计学分析

血清抗体效价表示为平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$), 采用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素分析, 以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 免疫大菱鲂的血清抗体效价

以剂量分别为 10^7 cells/尾、 10^8 cells/尾、 10^9 cells/尾的二价菌苗注射免疫大菱鲂后, 在不同的时间取鱼血清, 以 PBS 对照组鱼的血清为对照, 分别检测 VAM003 和 VAM007 的抗体效价。如图 1、图 2 所示, 在整个实验期间几乎检测不到对照组鱼的 VAM003 和 VAM007 抗体效价 ($1:2 \sim 1:4$)。以 O1 血清型 VAM003 为抗原检测血清抗体效价时, 各个剂量组大菱鲂在免疫后 3 d 均检测到明显的抗体水平 ($1:8$), 免疫后 7 d 的效价为 $1:20 \sim 1:32$, 显著高于对照组 ($P < 0.05$); 免疫后 21~45 d 各组效价值达到最高, 为 $1:320$; 在免疫后 45~

150 d, 各组效价平稳而缓慢下降, 其中 10^7 cells/尾组的抗体效价下降较快, 在 120 d 时几乎检测不出来 ($1:4$); 在 150 d 时 10^8 cells/尾组和 10^9 cells/尾组抗体效价分别降至 $1:20$ 和 $1:26.7$ (图 1)。

以 O2 血清型 VAM003 为抗原检测血清抗体效价时, O2 血清型的抗体效价变化趋势与 O1 血清型类似, 各个剂量组鱼在免疫后 3 d 也检测到明显的抗体效价 ($1:4 \sim 1:8$), 免疫后 7 d 的抗体效价显著高于对照组 ($1:80 \sim 1:100.8$); 免疫后 14~30 d 效价值最高, 为 $1:320 \sim 1:1280$; 免疫后 45~150 d, 血清抗体效价平稳而缓慢下降, 在 150 d 时三个剂量组的 VAM007 抗体效价分别为 $1:40$ (10^7 cells/尾组)、 $1:80$ (10^8 cells/尾组) 和 $1:100.8$ (10^9 cells/尾组) (图 2)。

上述结果说明, 鳃弧菌二价疫苗以三种剂量免疫大菱鲂时, 在免疫后 7 d 即可明显地促进大菱鲂特异抗体的产生, 免疫剂量越高, 抗体持续时间越长; 除了 10^7 cells/尾剂量组的 VAM003 的抗体持续时间为 90 d 外, 其他剂量组的 VAM003 和 VAM007 的抗体持续时间均超过 150 d。

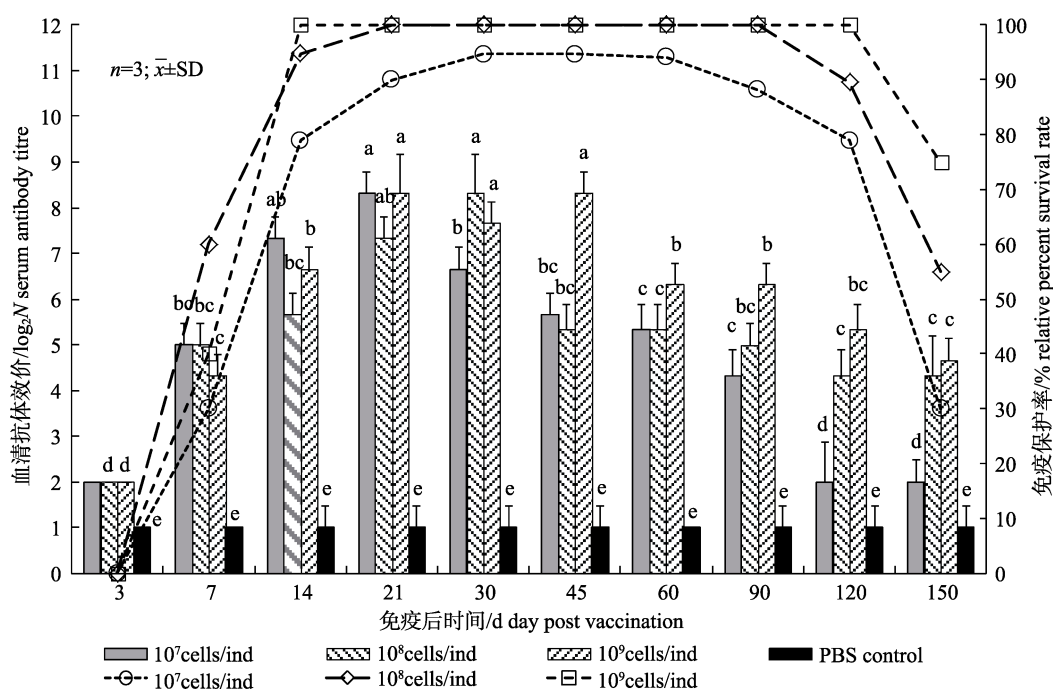


图 1 三个免疫剂量组大菱鲂的 VAM003 抗体效价和 RPS

血清效价上方的不同字母表示数值间差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 1 The anti-VAM003 serum titre and the RPS against VAM003 infection in the turbot *Scophthalmus maximus* after immunized with *Vibrio anguillarum* activated bivalent vaccine preparation. Upper the serum titre, different letters mean significant difference among different groups ($P < 0.05$).

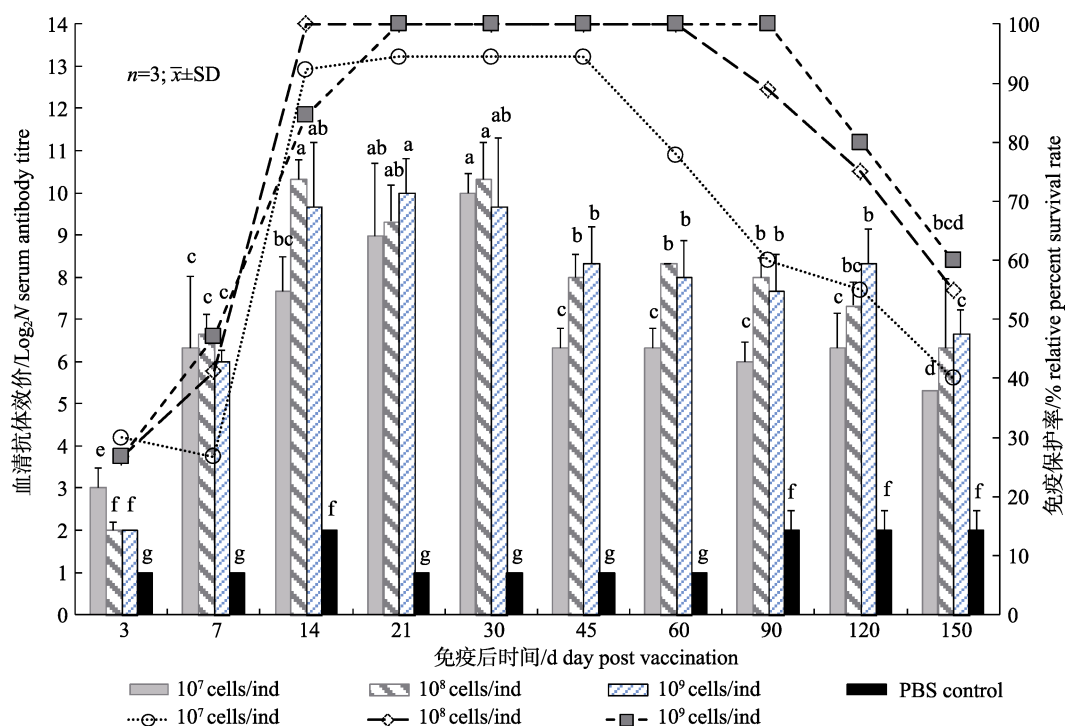


图 2 三个免疫剂量组大菱鲂的 VAM007 抗体效价和抗 VAM007 感染的 RPS

血清效价上方的不同字母表示数值间差异显著($P < 0.05$).

Fig. 2 The anti-VAM007 serum titre and the RPS against VAM007 infection in the turbot *Scophthalmus maximus* after immunized with *Vibrio anguillarum* activated bivalent vaccine preparation Upper the serum titre, different letters mean significant difference among different groups ($P < 0.05$).

2.2 疫苗的免疫保护效果

通过感染实验测定, VAM003 和 VAM007 对大菱鲂的半数致死量(LD₅₀)分别为 6.4×10^5 cfu/尾和 3.2×10^6 cfu/尾。在免疫后不同的时间, 以 10 倍的 LD₅₀, 对免疫大菱鲂进行攻毒以评估二价疫苗的免疫保护率 RPS, 感染后大菱鲂累计死亡率如表 1 和表 2 所示。结果如图 1 所示, 当以 O1 血清型菌株 VAM003 进行攻毒时, 三个剂量组的大菱鲂在免疫后 7 d 获得 30%~60% 的 RPS; 在免疫后 14~120 d 保持 RPS 在 79%~100%, 其中 10^7 cells/尾组大菱鲂在 30~60 d 保持 90%~95% 的 RPS, 10^8 cells/尾组在 21~90 d 保持 100% RPS, 10^9 cells/尾组大菱鲂在 14~120 d 保持 100% RPS; 在免疫后 150 d 各剂量组的 RPS 分别下降至 30%(10^7 cells/尾)、55%(10^8 cells/尾)和 75%(10^9 cells/尾)。

以 O2 血清型菌株 VAM007 进行攻毒时, 三个剂量组的大菱鲂在免疫后 3 d 便获得 27%~30% 的 RPS, 在免疫后 7 d 获得的 RPS 为 27%~47%; 在免疫后 14~120 d 保持 RPS 在 55%~100%, 其中 10^9

cells/尾组大菱鲂在 21~90 d 保持 100% RPS, 10^8 cells/尾组在 14~60 d 保持 100% RPS, 而 10^7 cells/尾组大菱鲂在 14~45 d 保持 92%~94% 的 RPS; 在免疫后 150 d 各剂量组大菱鲂的 RPS 下降至 40%(10^7 cells/尾)、55%(10^8 cells/尾)和 60%(10^9 cells/尾)(图 2)。

上述结果表明, 鳃弧菌二价疫苗以三种剂量(10^7 cells/尾、 10^8 cells/尾、 10^9 cells/尾)免疫大菱鲂时, 在免疫后 3 d 即提供明显的免疫保护, 免疫剂量越高, 免疫保护持续时间越长。若以 RPS > 75% 为有效免疫保护基准, 则各剂量组抵抗 O1 血清性鳃弧菌感染的有效免疫保护期分别为 14~120 d (10^7 cells/尾)、14~150 d (10^8 cells/尾)、14~150 d (10^9 cells/尾), 抵抗 O2 血清性鳃弧菌感染的有效免疫保护期分别为 14~60 d (10^7 cells/尾)、14~120 d (10^8 cells/尾)、14~120 d (10^9 cells/尾)。

3 讨论

本研究评价了鳃弧菌 O1/O2 血清型二价灭活疫苗的抗体持续期和免疫保护期, 结果表明三种

表 1 鳎弧菌 VAM003 对免疫大菱鲆的攻毒实验结果

Tab. 1 Infected test results of immunized *Scophthalmus maximus* challenged by *Vibrio anguillarum* VAM003

免疫后时间/d post-vaccination time	死亡鱼数/实验总鱼数 death number/test total number							
	3	7	14	30	60	90	120	150
免疫组 I 10 ⁷ cells/ind	30/30	14/20	4/20	2/20	0/20	2/20	2/20	14/20
免疫组 II 10 ⁸ cells/ind	30/30	8/20	1/20	0/20	0/20	0/20	4/20	9/20
免疫组 III 10 ⁹ cells/ind	30/30	12/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	5/20
空白组 control group	30/30	20/20	19/20	20/20	14/20	17/20	19/20	20/20

表 2 鳎弧菌 VAM007 对免疫大菱鲆的攻毒实验结果

Tab. 2 Infected test results of immunized *Scophthalmus maximus* challenged by *Vibrio anguillarum* VAM007

免疫后时间/d post-vaccination time	死亡鱼数/实验总鱼数 death number/test total number							
	3	7	14	30	60	90	120	150
免疫组 I 10 ⁷ cells/ind	21/30	16/20	1/20	1/20	4/20	0/20	9/20	12/20
免疫组 II 10 ⁸ cells/ind	22/30	10/20	0/20	0/20	2/20	0/20	5/20	9/20
免疫组 III 10 ⁹ cells/ind	22/30	9/20	5/20	0/20	1/20	0/20	8/20	4/20
空白组 control group	30/30	17/20	14/20	18/20	18/20	8/20	20/20	20/20

剂量(10⁷ cells/尾、10⁸ cells/尾、10⁹ cells/尾)的二价疫苗注射免疫大菱鲆,能够有效刺激大菱鲆持续产生特异抗体,获得了较长的抗体持续期和免疫保护期。

从图 1、图 2 可以看到,在免疫后 7 d 即可检测到 大菱鲆产生明显的 O1、O2 血清型抗体,免疫大菱鲆获得了较高的免疫保护,即抗 O1 血清性鳎弧菌感染的 RPS 为 30%~60%,抗 O2 血清性鳎弧菌感染的 RPS 为 27%~47%。同时注意到在免疫后 3 d,虽然没有在免疫大菱鲆检测到显著的抗体水平,但是免疫鱼获得了 30%左右的抵抗 O2 血清型病原感染的能力,说明二价疫苗在免疫后 3 d 便可为大菱鲆提供免疫保护。肖鹏等^[11]的研究发现鳎弧菌油乳化二价口服免疫大菱鲆后的第 2 天便可以检测到肠道特异抗体水平的提高,宋晓青等^[15]、邢婧等^[16]、薛洁等^[17]的研究报道了鳎弧菌全菌灭活疫苗注射或浸泡牙鲆后 4 h 便检测到多种免疫相关基因表达量的提高。从上述报道来看,本研究在疫苗免疫后 3 d 未检测到特异抗体效价的主要原因是不同检测方法的灵敏度存在区别。

研究结果也显示,随着抗体水平的提高,大菱鲆获得的免疫保护率也提高,表明免疫鱼特异抗体的产生和抗体水平与免疫保护的产生和保护率有关。一般认为疫苗的免疫抗体水平与免疫保

护力之间存在一定的平行关系。本研究用一次线性回归尝试建立血清抗体效价与免疫保护率相关性关系时,发现两者之间存在低度线性相关(R^2 为 0.27~0.67,未提供分析过程);当用目测分析抗体水平与免疫保护率的关系时,发现当免疫大菱鲆的 O1 血清型抗体效价>1:40 时,则其抵抗 O1 血清型鳎弧菌感染的 RPS>75%;当 O2 血清型抗体效价>1:160 时,则抵抗 O2 血清型鳎弧菌感染的 RPS>75%。要获得准确的免疫保护率与抗体水平的相关性关系,还需要进行多次实验获取重复性稳定的结果,以建立疫苗效力检验的评估方法,为鳎弧菌二价疫苗的效力检验研究提供依据。

综上所述,本研究获得了鳎弧菌二价疫苗免疫大菱鲆的抗体消长规律和免疫保护效力等基础数据,为鳎弧菌疫苗的临床中试申请积累了实验数据。

参考文献:

[1] Frans I, Michiels C W, Bossier P, et al. *Vibrio anguillarum* as a fish pathogen: virulence factors, diagnosis and prevention [J]. Journal of Fish Disease, 2011, 34: 643-661.

[2] Xiao H, Li J, Wang X H, et al. Studies on pathogens of rotted gill and rotted caudal fins of seaperch (*Lateolabrax japonicus*) fry[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 1999, 29(1): 87-93. [肖慧, 李军, 王祥红, 等. 鲈鱼苗烂鳃、烂尾病原菌的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(1): 87-93.]

- [3] Mo Z L, Mao Y X, Chen S Y, et al. Classification for one pathogenic *Vibrio anguillarum* strain isolated from skin-ulcer flounder[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2002, 42(3): 263-269. [莫照兰, 茅云翔, 陈师勇, 等. 一株牙鲆皮肤溃烂症病原菌的鉴定[J]. 微生物学报, 2002, 42(3): 263-269.]
- [4] Zou Y X, Zhang P J, Mo Z L, et al. Isolation and identification of a pathogenic bacterium from haemorrhagic turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Chinese High Technology Letters, 2004, 14(4): 89-93. [邹玉霞, 张培军, 莫照兰, 等. 大菱鲆出血症病原菌的分离和鉴定[J]. 高技术通讯, 2004, 14(4): 89-93.]
- [5] Chen J X, Li C F, Yan X H, et al. Studies on biological characteristics of five pathogenic *Vibrio anguillarum* strains isolated from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) in Shandong province of China[J]. Chinese High Technology Letters, 2005, 15(6): 92-96. [陈吉祥, 李彩凤, 颜显辉, 等. 大菱鲆病原鳃弧菌生物学及分子特征研究. 高技术通讯, 2005, 15(6): 92-96.]
- [6] Larsen J L, Pedersen K, Dalsgaard I. *Vibrio anguillarum* serovars associated with vibriosis in fish[J]. Journal of Fish Disease, 1994, 7: 259-267.
- [7] Zhao L N, Li G Y, Li J, et al. Serotyping and antibiotics sensitivity of *Vibrio anguillarum* strains isolated from marine farmed fish[J]. 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[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(5): 1109-1118.]
- [8] Xiao H, Li J, Wang X H, et al. Preparation of vaccine against vibriosis of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) and its immune efficiency evaluation[J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2003, 33(2): 226-232. [肖慧, 李军, 王祥红, 等. 鲈鱼鳃弧菌疫苗的制备及免疫防治效果[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(2): 226-232.]
- [9] Mo Z L, Xu Y L, Zhang P J. Vaccination against *Vibrio anguillarum* on cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*[J]. Marine Sciences, 2002, 26(4): 63-67. [莫照兰, 徐永立, 张培军. 养殖牙鲆鳃弧菌疫苗的研究[J]. 海洋科学, 2002, 26(4): 63-67.]
- [10] Zhu K L, Chen J X, Li Y, et al. Study on the vaccination against *V. anguillarum* in farmed marine turbot[J]. Chinese 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[J]. 高技术通讯, 2004, 14(2): 76-80.]
- [11] Xiao P, Mo Z L, Zou Y X, et al. Immune responses and efficacy of an oral-emulsified bivalent vaccine against *Vibrio anguillarum* in turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Chinese High Technology Letters, 2007, 17(9): 979-985. [肖鹏, 莫照兰, 邹玉霞, 等. 鳃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[J]. 高技术通讯, 2007, 17(9): 979-985.]
- [12] Liu R, Zhao M J, Yang H, et al. Construction and protection evaluation of a bivalent DNA vaccine containing *tdh2* of *Vibrio parahaemolyticus* and *ompU* of *V. anguillarum* on turbot on turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2011, 42(4): 580-586. [刘瑞, 赵明君, 杨慧, 等. 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) *tdh2* 基因和鳃弧菌(*V. anguillarum*) *ompU* 基因二联 DNA 疫苗制备及其对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)免疫保护作用[J]. 海洋与湖沼, 2011, 42(4): 580-586.]
- [13] Pan Y H, Ma Y, Zhao D L, et al. Study on immune response of *Paralichthys olivaceus* induced by live attenuated *V. anguillarum* vaccine[J]. Food and Drug, 2009, 11(5): 12-15. [潘燕华, 马悦, 赵东玲, 等. 鳃弧菌减毒活疫苗对牙鲆免疫效果的研究[J]. 食品与药品, 2009, 11(5): 12-15.]
- [14] Shen P, Fan X R, Li G W. Experiment of Microbiology[M]. Ver. 3. Beijing: Higher Education Press, 1999. [沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验[M]. 第三版. 北京: 高等教育出版社, 1999.]
- [15] Song X Q, Xing J, Zhan W B. Variations of seven immune related genes expression in flounder (*Paralichthys olivaceus*) injected and immersed with inactivated *Vibrio anguillarum* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2014, 21(4): 747-758. [宋晓青, 邢婧, 战文斌. 牙鲆经注射和浸泡免疫鳃弧菌灭活疫苗后 7 种免疫相关基因表达的变化[J]. 中国水产科学, 2014, 21(4): 747-758.]
- [16] Xing J, Wang Y, Song X Q, et al. Variations in expression of eleven immune related genes in flounder (*Paralichthys olivaceus*) injected with inactivated *Vibrio anguillarum*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2015, 46(5): 1024-1033. [邢婧, 王洋, 宋晓青, 等. 牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)浸泡免疫鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)灭活疫苗后 11 种免疫相关基因的表达变化[J]. 海洋与湖沼, 2015, 46(5): 1024-1033.]
- [17] Xue J, Song X Q, Xing J, et al. Expression analysis of thirteen immune related genes of flounder (*Paralichthys olivaceus*) vaccinated with formalin-inactivated *Vibrio anguillarum*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2016, 46(2): 42-53. [薛洁, 宋晓青, 邢婧, 等. 牙鲆注射免疫鳃弧菌灭活疫苗后 13 种免疫相关基因表达的变化[J]. 中国海洋大学学报, 2016, 46(2): 42-53.]

Antibody persistence and immune protection duration in turbot vaccinated by a *Vibrio anguillarum* inactivated bivalent vaccine based on O1 and O2 serotype strains

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

1. Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;
3. College of Fishery and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;
4. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;
5. Shandong Oriental Ocean Sci-Tech Co. Ltd, Yantai 264003, China

Abstract: *Vibrio anguillarum* is an important bacterial fish pathogen that can cause vibriosis extensively in economically-important fish including *Scophthalmus maximus*, *Paralichthys olivaceus*, *Anguilla anguilla*, and *Lateolabrax japonicus* in China. In our previous studies, we have carried out the epidemiological work of *V. anguillarum* in China, and demonstrated that *V. anguillarum* O1, O2, and O3 serotype strains are prevalent in marine fish farms. Vaccination is proven to be a safe and efficient route to prevent and control vibriosis. However, no commercial *V. anguillarum* vaccine is available in China. In this study, the antibody persistence and immune protection duration of a *V. anguillarum* inactivated bivalent vaccine based on O1 and O2 serotype strains were evaluated in turbot (*Scophthalmus maximus*). The *V. anguillarum* formalin-inactivated bivalent vaccine was prepared using O1 serotype VAM003 and O2 serotype VAM007 strains. Groups of turbot were injected intraperitoneally with three dosages of vaccine preparation, i.e., 10^7 cells/ind, 10^8 cells/ind, and 10^9 cells/ind. At 3 d, 7 d, 14 d, 30 d, 60 d, 90 d, 120 d, and 150 d after injection, each immunized fish group was evaluated for their serum-antibody titers against VAM003 and VAM007 using a serum-agglutination test, and the relative percent survival (RPS) was evaluated by challenge with a 10 LD₅₀ (50% lethal dose) of VAM003 or VAM007. The results showed that specific antibodies against VAM003 and VAM007 were noticeably induced in the immunized fish as early as 7 d post-immunization, and an RPS of 27%–60% was detected in these fish. Specifically, the induced VAM003 antibody persisted in three dosage fish groups for at least 90 d for 10^7 cells/ind, 150 d for 10^8 cells/ind, and 150 d for 10^9 cells/ind, respectively, while anti-VAM007 persisted in each of three dosage fish groups for more than 150 d. The immune protection duration for each of the three dosage groups all exceeded 150 d. With an RPS of more than 75% as an effective immune protection, the effective immune protection duration against O2 serotype *V. anguillarum* was 14–120 d for 10^7 cells/ind fish group, 14–120 d for 10^8 cells/ind group, and 14–150 d for 10^9 cells/ind group, respectively, while the effective immune protection duration against O1 serotype were 14 d–60 d for 10^7 cells/ind group, 14–120 d for 10^8 cells/ind group, and 14–120 d for 10^9 cells/ind group, respectively. We also analyzed the relationship between serum antibody titer and RPS of bivalent vaccine. When the serum antibody titer was over 1 : 40 for the O1 serotype and 1 : 160 for the O2 serotype, the corresponsive RPS to *V. anguillarum* O1 or O2 serotype were all over 75%. These results suggest that the *V. anguillarum* inactivated bivalent vaccine could provide effective immune protection for turbot, and the data of antibody persistence and immune protection duration obtained in this study will provide support for clinical trials of this vaccine.

Key words: *Vibrio anguillarum* inactivated bivalent vaccine preparation; *Scophthalmus maximus*; antibody persistence; immune protection duration

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