

DOI: 10.11758/yykxjz.20161106001

http://www.yykxjz.cn/

李淑芳, 唐磊, 李杰, 李贵阳, 王晓冉, 王小鹿, 丁山, 莫照兰. 3株O3血清型鳃弧菌灭活疫苗的免疫原性和免疫保护效果. 渔业科学进展, 2018, 39(1): 137-143

Li SF, Tang L, Li J, Li GY, Wang XR, Wang XL, Ding S, Mo ZL. Immunogenicity and protective efficacy of three inactivated *Vibrio anguillarum* serotype O3 vaccine preparations. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(1): 137-143

3 株 O3 血清型鳃弧菌灭活疫苗的 免疫原性和免疫保护效果*

李淑芳^{1,2} 唐磊^{1,3} 李杰¹ 李贵阳¹ 王晓冉^{1,3}
王小鹿^{1,3} 丁山^{1,2} 莫照兰^{1,2①}

(1. 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
农业部海水养殖病害防治重点实验室 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. 中国海洋大学海洋生命学院 青岛 266003)

摘要 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*) O3 血清型菌株是感染鱼类的重要病原菌, 本文研究了 3 株 O3 血清型鳃弧菌(SMP1、SMP3 和 SMP4)灭活疫苗的免疫原性和免疫保护。首先在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)体内对 3 株鳃弧菌进行复壮; 检测复壮后的菌株毒力, 检测的 3 株鳃弧菌对蓝鳃龙(*Trichogaster trichopterus*)的半数致死量(LD₅₀)分别为 10^{5.1} CFU/ml (SMP1)、10^{4.7} CFU/ml (SMP3)和 10^{5.4} CFU/ml (SMP4); 制备了 3 株菌的甲醛灭活疫苗, 注射免疫牙鲆, 免疫后第 7 天可检测到牙鲆的血清特异性抗体产生, 免疫后第 28 天的血清特异性抗体效价为 1:1280(SMP1)、1:640 (SMP3)和 1:905 (SMP4), 提供的免疫保护率(Relative percent survival rate, RPS)为 94.4% (SMP1)、100% (SMP3)和 73.7% (SMP4)。研究表明, 3 株致病性 O3 血清型鳃弧菌菌株具有良好的免疫原性, 其中 SMP3 为最适疫苗候选株。本研究为鳃弧菌 O3 血清型疫苗的开发应用奠定了基础。

关键词 鳃弧菌 O3 血清型; LD₅₀; 灭活疫苗; 血清抗体效价; 免疫保护率

中图分类号 S942 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2018)01-0137-07

随着我国海水鱼类养殖规模和产量逐年增加, 各种疾病日益增多, 给养殖业造成了巨大的经济损失。在我国, 抗生素等化学药物依然是控制水产动物疾病的首要手段, 但长期频繁使用会引起水环境污染恶化、病原菌耐药性增加、水产动物抗病力降低、食品

安全隐患等问题。在国际上, 通过疫苗接种预防动物疾病被认为是一种安全有效的手段, 目前, 已有 100 多种商品化鱼用疫苗在北美、欧洲、日本等国家的市场上销售, 有效地预防了鲑鳟鱼、鳕鱼(*Gadus morhua*)、鲈鱼(*Perca fluviatilis*)、鲷(*Chrysophrys*

* 山东省自主创新及成果转化专项经费项目(2014ZZCX06205)、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 the Special Independent Innovation and Achievement Transformation of Shandong Province (2014ZZCX06205), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund (2016HY-ZD0505) and the Scientific and Technological Innovation Project Financially Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2015ASKJ02)].
李淑芳, E-mail: lsf891106@163.com

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

收稿日期: 2016-11-06, 收修改稿日期: 2016-12-29

major)、黄条鲷(*Seriola aureovittata*)等重要经济品种的疾病。

鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是水产养殖动物的一种主要致病菌,可引起多种养殖鱼类发生弧菌病,严重危害牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)、大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)、大西洋鲑(*Salmo salar*)、鲈鱼、日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)等我国的重要经济鱼类。该病原可引起鱼类出血性败血症,导致鳍部严重出血、眼球突出、体表溃烂直至死亡(边慧慧, 2009; 陈吉祥等, 2005)。鳃弧菌至少有 23 种血清型,其中 O1、O2 和部分 O3 血清型是主要的致病菌(Wang *et al.*, 2009; Colwell, 1984),而 O2 血清型又有 O2a、O2b 和 O2c 三种血清亚型, O3 血清型有 O3a 和 O3b 两种血清亚型(Buch *et al.*, 2003; Mikkelsen *et al.*, 2011),不同血清亚型的菌株在生理生化特征、血清学反应、遗传特征等方面有所差别(Mikkelsen *et al.*, 2007)。O1 和 O2 血清型分布在世界各地,是感染鲑鱼、鳕鱼和大菱鲆等海水养殖鱼类最主要的病原菌, O3 血清型在丹麦、意大利和日本等国家偶有发现,曾在患病的欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)中分离得到(Pedersen *et al.*, 1999)。国际上已经商品化的鳃弧菌疫苗有灭活三价疫苗(含 O1、O2a、O2b 血清型)(Mikkelsen *et al.*, 2011; Schröder *et al.*, 2006),主要用于挪威的养殖鳕鱼;其他为多联疫苗,如杀鲑气单胞菌(*Aeromonas salmonicida*)-鳃弧菌二联灭活疫苗、杀鲑气单胞菌-鳃弧菌-耶尔森氏菌(*Yersinia ruckeri*)三联灭活疫苗、杀鲑气单胞菌-鳃弧菌-海水病弧菌-冷水病弧菌(*Vibrio salmonicida*)四联灭活疫苗等,主要用于欧洲、美洲的鲑鱼、鳗鱼养殖。我国学者研发了多种鳃弧菌疫苗,如用于鲈鱼的灭活疫苗(肖慧等, 2003),用于鲆鲽类的灭活疫苗(莫照兰等, 2002; 朱开玲等, 2004)、口服疫苗(肖鹏等, 2007)和减毒疫苗(潘燕华等, 2009),但上述疫苗制剂的免疫效果评价均停留在实验室条件阶段,很少进入中试阶段,更没有获得生产批文且正式用于生产的鳃弧菌疫苗。造成我国鱼用疫苗产业化缓慢的一个重要原因是缺乏系统深入的流行病学调查工作,对流行于疫区的病原种类和抗原的变化缺乏明确的了解,对现有疫苗株的血清型或基因型的背景不清晰,因而不能预估疫苗对流行疾病提供的免疫保护,影响了疫苗中试阶段的进展。

本实验室对危害我国海水鱼类养殖的鳃弧菌开展了血清学分型研究,发现流行于我国鲆鲽类养殖的鳃弧菌主要有 O1、O2、O3 血清型,以 O1 血清型为主,其次为 O2 和 O3 血清型,其中 O3 血清型来源于发病大菱鲆(赵鲁宁, 2014)。本研究在确定鳃弧菌 O3

血清型菌株致病性的基础上,制备了灭活疫苗,进一步研究了灭活疫苗对牙鲆的免疫保护效果,为鳃弧菌 O3 血清型及多价疫苗的研发提供前期基础。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株和培养基

鳃弧菌 O3 血清型菌株 SMP1、SMP3 和 SMP4 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提供(赵鲁宁, 2014),保存于 -80°C 冰箱。用胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)液体或胰蛋白胨大豆琼脂平板(TSA)培养,培养温度为 28°C 。

1.2 实验用鱼

蓝蔓龙(*Trichogaster trichopterus* Pallas)(Hao *et al.*, 2013)购自山东青岛南山花鸟虫鱼市场,用于鳃弧菌菌株的毒力分析。其平均体长为 7 cm,暂养于 60 L 水箱进行海水养殖驯化,养殖水温为 $25\sim 28^{\circ}\text{C}$,连续充气,每天在养殖淡水中加适量海水直至盐度为 10(窦海鸽等, 2006)。牙鲆购自山东日照某养殖场,用于疫苗免疫实验。其平均体重为 4.8 g,平均体长为 8.5 cm,于 500 L 水箱暂养,水温为 $13\sim 16^{\circ}\text{C}$,连续通气。实验前,暂养鱼随机取 3~5 尾进行细菌学分析,取鱼的肝、脾、肾组织,于 TSA 平板划线,在 28°C 培养 24~48 h,确定未有细菌生长时,暂养鱼方可用于后续实验。

1.3 菌株复壮

取保存于 -80°C 冰箱的鳃弧菌菌种,于 TSA 平板划线,挑取单菌落,接种于 TSB 液体培养基中, 28°C 、140 r/min 培养过夜,得到浓度为 10^8 CFU/ml 的菌液。取 2 尾健康牙鲆,以 0.1 ml/尾的剂量进行背部肌肉注射。取濒死牙鲆的肝、脾、肾组织于 TSA 平板划线分菌,挑取形态特征一致的优势菌进行分离纯化,经血清学反应鉴定后,同上方法进行第 2 次复壮,菌液浓度为 10^7 CFU/ml,注射剂量为 0.1 ml/尾。复壮 2 次的菌株保种进行后续实验。

1.4 鳃弧菌菌株毒力检测

取上述复壮菌株于 TSA 平板划线,挑取单菌落,接种于 TSB 过夜培养,取培养液按 1%接种量转接新鲜 TSB,继续摇床培养 3 h,菌液于 4°C 、6000 r/min 离心 10 min,用无菌 PBS 重悬,调节 $\text{OD}_{540\text{nm}}=0.5$,进行 10 倍梯度稀释,制备稀释度为 $10^3\sim 10^6$ CFU/ml 的菌液。取健康蓝蔓龙分组,采用背部肌肉注射方式,每组注射一个稀释度的菌液 0.1 ml,对照组注射同等

体积的 PBS。定时观察蓝鳃龙的发病症状和死亡情况,对死亡鱼进行细菌分离,并进行形态学和血清学鉴定。统计 14 d 的累计死亡率,采用改良寇氏法(杨茂成,1990)计算 LD_{50} 。

1.5 鳃弧菌灭活疫苗制备和安全性检验

取上述复壮菌株于 TSA 平板划线,挑取单菌落接种于 TSB 过夜培养,取培养液按 1% 接种量转接新鲜 TSB 培养 24 h,测定 $OD_{540\text{ nm}}$ 后,加入终浓度为 0.2% 的甲醛,在 28℃、140 r/min 摇床条件下进行灭活。进行灭活检验时,取灭活 12 h 和 24 h 的菌液各 0.1 ml 涂布 TSA 平板,同时取灭活菌液按 1% 比例接种 TSB 培养基,培养后观察是否有细菌生长。灭活后的菌液以 6000 r/min 离心 10 min,沉淀菌体用灭菌 PBS 离心洗涤 2 次,重悬菌体至 $OD_{540\text{ nm}}=0.5$,制成疫苗,置于 4℃ 保存。进行安全性检验时,将灭活疫苗以 0.1 ml/尾的剂量腹腔注射牙鲈,每种疫苗注射 5 尾,对照组注射同等体积的 PBS,实验鱼观察 2 周,记录鱼的症状及存活情况。

1.6 疫苗免疫与攻毒实验

健康牙鲈随机分组,每组 50 尾,取浓度为 10^8 CFU/ml 的疫苗,以 0.1 ml/尾的接种量从腹腔注射牙鲈,则每尾鱼的接种剂量为 10^7 CFU;对照组注射等量的无菌 PBS。在免疫后的 7、14、21、28 d,从每个实验组随机取 3 尾鱼,从尾柄静脉采血制备血清,采用微量凝集法(沈萍,1999)检测血清特异性抗体效价。

在免疫后第 28 天进行攻毒实验,取浓度为 10^7 CFU/ml 的活菌从背部肌肉注射免疫组鱼和对照组鱼,每组鱼 20 尾,每尾 0.1 ml。攻毒后,观察鱼临床症状,统计 14 d 内的死亡数,按照如下公式计算:

疫苗免疫保护率(Relative percent survival rate, RPS)=(1-免疫组死亡率/对照组死亡率)×100%

1.7 统计分析

血清抗体水平测定数据采用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鳃弧菌菌株复壮

在进行菌株复壮时,将-80℃ 保存的鳃弧菌菌种 SMP1、SMP3 和 SMP4 在 TSA 平板上活化,用 TSB 培养得到菌悬液,以 10^8 CFU/ml 的剂量分别注射感

染牙鲈,感染的牙鲈在注射后 24~48 h 内全部死亡,注射部位红肿、内脏充血、全身性肌肉出血等典型症状,从濒死鱼的肝、脾、肾组织分离得到形态一致的菌落。得到的菌落经血清学鉴定为原发菌株后,以此菌落为菌种,以 10^7 CFU/ml 的剂量再次注射感染牙鲈,感染的牙鲈在注射后 24~48 h 内全部死亡,从濒死鱼的内脏分离得到的菌落经过血清学鉴定后,用于毒力实验和疫苗制备。

2.2 鳃弧菌菌株毒力分析

以 $10^3\sim10^6$ CFU/ml 系列浓度的鳃弧菌 SMP1、SMP3 和 SMP4 感染蓝鳃龙,在感染后的第 1 天,SMP3 组开始出现死亡,在感染后的第 2 天 SMP1 和 SMP4 开始出现死亡,死亡高峰出现在第 2~3 天,第 7 天后不再出现死亡情况。濒死鱼的症状为全身性肌肉出血,肝充血,脾脏肿大。计算得到 SMP1、SMP3 和 SMP4 的 LD_{50} 依次为 $10^{5.1}$ 、 $10^{4.7}$ 和 $10^{5.4}$ CFU/ml (表 1)。

表 1 O3 血清型鳃弧菌的毒力检测

Tab.1 Virulence of *V. anguillarum* serotype O3 strains

菌株 Strain	细菌浓度 Bacteria concentration (CFU/ml)	累计死亡率 Cumulative mortality rate (%)	半数致死量 Lethal dose 50% (CFU/ml)
SMP1	1.1×10^6	62.5	$10^{5.1}$
	1.1×10^5	37.5	
	1.1×10^4	37.5	
	1.1×10^3	12.5	
SMP3	0.9×10^6	83.3	$10^{4.7}$
	0.9×10^5	66.7	
	0.9×10^4	33.3	
	0.9×10^3	0	
SMP4	1.1×10^6	62.5	$10^{5.4}$
	1.1×10^5	37.5	
	1.1×10^4	0	
	1.1×10^3	12.5	
PBS	/	0	/

2.3 鳃弧菌疫苗灭活及安全性检验

在扩大培养 24 h 的 3 株鳃弧菌(SMP1、SMP3 和 SMP4)的菌悬液中加入终浓度为 0.2% 的甲醛进行细菌灭活,定时取菌液在 TSA 和 TSB 培养,检测灭活情况。结果显示,加入甲醛后 12 h,在 3 种菌悬液中未检测到细菌的生长。灭活后的菌液注射牙鲈,在 14 d 观察期间,牙鲈生长、进食正常,未有死亡,说明灭活的疫苗对动物安全。

2.4 免疫鱼的血清抗体效价

3种鳎弧菌灭活疫苗以 10^7 CFU/尾的剂量注射免疫牙鲆,在免疫后的第7、14、21、28天取血,测定抗体效价。结果如图1所示,在免疫后第7天,各免疫组牙鲆的血清均可检测到明显的抗体效价,并随着时间的延长呈上升趋势,其中,SMP1组和SMP3组在第1~3周呈显著性上升($P<0.05$);在第28天时,SMP1、SMP3和SMP4组的血清抗体效价分别为1:1280、1:640和1:905(图1)。在相同采样时间点,各免疫组之间的血清效价没有显著性差异($P>0.05$)。未免疫的对照组鱼血清未检测到抗体效价。

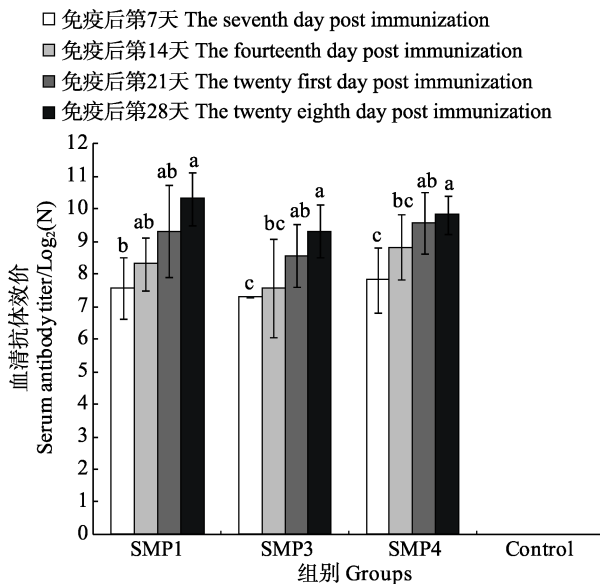


图1 免疫血清效价测定

Fig.1 Determination of serum antibody titer

不同字母表示显著差异($P<0.05$)

Different letters denoted significant differences ($P<0.05$)

2.5 疫苗免疫保护效果

在免疫后的第28天,用浓度为 10^7 CFU/ml的

SMP1、SMP3和SMP4活菌分别攻毒对应的免疫组和对照组,检测疫苗的免疫保护力。结果显示,攻毒后,未免疫组出现大量死亡,死亡高峰出现在攻毒后第2~5天;而免疫组中,仅SMP1和SMP4组出现少量死亡。根据累积死亡率计算SMP1、SMP3、SMP4组的相对免疫保护率分别为94.4%、100%和73.7%(表2)。

3 讨论

我国学者研制了针对不同养殖品种的鳎弧菌灭活疫苗,但未明确疫苗株的血清型或基因型,在一定程度上限制了疫苗的田间应用示范。本研究开展了3株鳎弧菌O3血清型菌株(SMP1、SMP3和SMP4)的免疫原性和免疫保护效果的初步研究,在确定3株鳎弧菌菌株致病力的基础上,用福尔马林作为灭活剂制备了3种安全的灭活菌剂,比较了3种灭活菌剂免疫牙鲆后的血清抗体效价和免疫保护,结果证明,3种疫苗制剂具有较强的免疫原性,对牙鲆起到了有效的免疫保护。

用于制备疫苗的菌种由于传代次数多、保存时间长,其生长、繁殖以及毒力等会减弱,为了恢复疫苗株的原始毒力和免疫原性,本研究将冷冻保存的鳎弧菌菌株注射感染牙鲆进行2次复壮,从病鱼的内脏组织均分离到与原始菌株表型特征一致的细菌,感染病菌的牙鲆出现典型的出血性败血病症状,结果显示,鳎弧菌菌株的毒力得到了恢复。本研究在致病性实验中选取了蓝曼龙作为实验动物,蓝曼龙也称丝足鱼,是一种繁殖快、饲养简单、便宜的淡水观赏鱼,作为实验动物用于多种水产致病菌的免疫和致病性研究(Ling *et al.*, 2001; Fang *et al.*, 2000; Srinivasa *et al.*, 2003)。本实验室对蓝曼龙的耐盐性和盐度驯化进行了研究(窦海鸽等, 2006),并将盐度驯化的鱼应用于海水病原菌的致病性研究和海水疫苗评价(窦海鸽, 2006; 李杰等, 2010; 潘海建等, 2013; Hao *et al.*,

表2 鳎弧菌灭活疫苗的免疫保护力

Tab.2 Relative percent survival rate (RPS) of immunized *P. olivaceus* challenged by 10^7 CFU/ml *V. anguillarum* bacteria

组别 Groups	攻毒后 Post infection		免疫保护率 RPS (%)
	死亡数/总鱼数 Death number/Total number	累积死亡率 Cumulative mortality rate (%)	
SMP1 免疫组 SMP1 vaccinated group	1/20	5	94.4
对照组 Control group	18/20	90	
SMP3 免疫组 SMP3 vaccinated group	0/20	0	100.0
对照组 Control group	19/20	95	
SMP4 免疫组 SMP4 vaccinated group	5/20	25	73.7
对照组 Control group	19/20	95	

2013), 证明了蓝曼龙作为海水鱼实验动物用于病原毒力分析和疫苗评价的可行性。本研究将海水驯化的蓝曼龙用于检测复壮的鳃弧菌的毒力, 结果显示, 3 株菌表现出较强的致病力, LD_{50} 在 $10^{4.7} \sim 10^{5.4}$ CFU/ml, 其中, SMP4 最低剂量组 (10^3 CFU/ml) 出现 12.5% 的死亡率, 而 10^4 CFU/ml 组没有死亡, 可能由于实验动物个体差异所导致。鳃弧菌的致病性与外膜蛋白、脂多糖、胞外产物等多种因子有关 (Frans *et al.*, 2011), 这些致病因子是宿主免疫系统识别的抗原分子, 毒力越强的鳃弧菌被认为具有越强的免疫原性。根据上述结果, 3 株菌株可作为候选疫苗株进行免疫原性和免疫保护效果的评价。

采用甲醛灭活的方法可以得到安全和有效的鳃弧菌疫苗 (肖慧等, 2003; 莫照兰等, 2002)。本研究采用终浓度为 0.2% (v/v) 的甲醛作为灭活剂, 在 28°C 、140 r/min 的条件下处理 12 h, 可以完全灭活细菌, 用此方法灭活的 3 种菌剂对牙鲆没有致病性。制备的 3 种疫苗免疫牙鲆, 免疫后第 7 天便可检测到明显的血清抗体产生, 且在一个月抗体效价呈上升趋势, 到第 28 天时, 各免疫组血清效价高于 1 : 640。一般认为较低的温度不适合刺激鱼体的免疫反应, 牙鲆的适合生长温度为 $12 \sim 23^\circ\text{C}$, 本研究期间, 养殖牙鲆的水温为 $13 \sim 16^\circ\text{C}$, 表明在较低的养殖温度鳃弧菌疫苗可以刺激牙鲆产生较强的体液免疫反应。攻毒实验显示, 各免疫组牙鲆均能够抵抗剂量为 10^7 CFU/ml 的鳃弧菌感染, RPS 在 73.7%~100% 范围内, 因此, 可以认为牙鲆血清中针对鳃弧菌疫苗的特异抗体水平与该疫苗提供的免疫保护力相关。从数据来看, 免疫牙鲆后, 每种疫苗在各个检测点的血清抗体效价没有明显区别, 但 RPS 有所不同, 即毒力强的菌株提供的 RPS 更高。因此, 可以选择毒力强的鳃弧菌菌株作为疫苗候选株。其中, SMP3 菌株毒力最强, 免疫牙鲆后产生的血清效价相对较低, 但保护率最高。推测可能由于 SMP3 存在不同于其他菌株的某些毒力因子, 这些毒力因子在体外表达水平不高 (但可能在宿主内有较高水平表达), 因而不能诱导高水平的体液免疫应答; 另外, 某些毒力因子可能参与细胞免疫应答而检测不到抗体水平。上述机制需要进一步的研究进行确证。

本研究利用 3 株 O3 血清型鳃弧菌菌株制备灭活疫苗, 对牙鲆均起到了良好的免疫保护效果, 具有作为疫苗株的开发应用价值。我们将进一步比较不同血清型鳃弧菌菌株的毒力强弱、分布特征等数据, 为鳃弧菌疫苗的开发应用提供基础。

参 考 文 献

- Bian HH. Primary study on a new method of oral *Vibrio anguillarum* vaccine for flounder. Master's Thesis of Hebei University, 2009, 3 [边慧慧. 牙鲆鳃弧菌口服疫苗免疫新途径的初步研究. 河北大学硕士研究生学位论文, 2009, 3]
- Buch C, Sigh J, Nielsen J, *et al.* Production of acylated homoserine lactones by different serotypes of *Vibrio anguillarum* both in culture and during infection of rainbow trout. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, 26(3): 338-349
- Chen JX, Li CF, Yan XH, *et al.* Studies on biological characteristics of five pathogenic *Vibrio anguillarum* strains isolated from diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) in Shandong Province of China. *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]
- Colwell RR, Grimes DJ. *Vibrio* diseases of marine fish populations. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 1984, 37(1-4): 265-287
- Dou HG, Huang J, Wang XH, *et al.* Salinity tolerance and salt water acclimation of gourami *Trichogaster trichopterus*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2006, 13(5): 775-780 [窦海鸽, 黄健, 王秀华, 等. 丝足鱼 (*Trichogaster trichopterus*) 耐盐性及盐度驯化. 中国水产科学, 2006, 13(5): 775-780]
- Dou HG. Tentative application of freshwater gourami *Trichogaster trichopterus* on virulence analysis and vaccine evaluation for bacteria isolates from seawater fish. Master's Thesis of Shanghai Fisheries University, 2006, 31-37 [窦海鸽. 淡水丝足鱼用于海水鱼细菌分离物毒力分析和疫苗评价的初步研究. 上海水产大学硕士研究生学位论文, 2006, 31-37]
- Fang HM, Ling KC, Ge R, *et al.* Enhancement of protective immunity in blue gourami, *Trichogaster trichopterus* (Pallas) against *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio anguillarum* by *A. hydrophila* major adhesion. *Journal of Fish Diseases*, 2000, 23: 137-145
- 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
- Hao B, Mo ZL, Xiao P, *et al.* Role of alternative sigma factor 54 (RpoN) from *Vibrio anguillarum* M3 in protease secretion, exopolysaccharide production, biofilm formation and virulence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(6): 2575-2585
- Li J, Mo ZL, Mao YX, *et al.* Effect of *esaC* gene on *Edwardsiella tarda*'s virulence and secretion of T3SS proteins. *High Technology Letters*, 2010, 20(2): 199-203 [李杰, 莫照兰, 茅云翔, 等. *esaC* 基因对迟缓爱德华氏菌

- 的毒力和 T3SS 蛋白分泌的影响. 高技术通讯, 2010, 20(2): 199–203]
- Ling SHM, Wang XH, Lim TM, *et al.* Green fluorescent protein-tagged *Edwardsiella tarda* reveals portal of entry in fish. FEMS Microbiology Letters, 2001, 194(2): 239–243
- Mikkelsen H, Lund V, Larsen R, *et al.* Vibriosis vaccines based on various sero-subgroups of *Vibrio anguillarum* O2 induce specific protection in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles. Fish and Shellfish Immunology, 2011, 30(1): 330–339
- Mikkelsen H, Lund V, Martinsen LC, *et al.* Variability among *Vibrio anguillarum* O2 isolates from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): Characterisation and vaccination studies. Aquaculture, 2007, 266(1–4): 16–25
- Mo ZL, Xu YL, Zhang PJ. Vaccination against *Vibrio anguillarum* on cultured flounder, *Paralichthys olivaceus*. Marine Sciences, 2002, 26(4): 63–66 [莫照兰, 徐永立, 张培军. 养殖牙鲆鳃弧菌疫苗的研究. 海洋科学, 2002, 26(4): 63–66]
- Pan HJ, Hao B, Li J, *et al.* Impact of Cpx on the virulence of *Edwardsiella tarda*. Marine Sciences, 2013, 37(2): 17–21 [潘海建, 郝斌, 李杰, 等. Cpx 对迟缓爱德华氏菌毒力的影响. 海洋科学, 2013, 37(2): 17–21]
- 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, 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. 食品与药品, 2009, 11(5): 12–15]
- Pedersen K, Grisez L, Houdt R, *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
- Shrøder MB, Mikkelsen H, Børdal S, *et al.* Early vaccination and protection of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles against classical vibriosis. Aquaculture, 2006, 254(1–4): 46–53
- Shen P, Fan XR, Li GW. Microbiology experiment (3rd ed). Higher Education Press, 1999, 154–165 [沈萍, 范秀容, 李广武. 微生物学实验(第三版). 高等教育出版社, 1999, 154–165]
- Srinivasa Rao PS, Lim TM, Leung KY. Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis. Infection and Immunity, 2003, 71(3): 1343–1351
- Wang Z, Vinogradov E, Li J, *et al.* Structural characterization of the lipopolysaccharide O-antigen from atypical isolate of *Vibrio anguillarum* strain 1282. Carbohydrate Research, 2009, 344(11): 1371–1375
- Xiao H, Li J, Wang XH, *et al.* Preparation of vaccine against vibriosis of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) and its immune efficiency evaluation. Journal of Ocean University of Qingdao, 2003, 33(2): 226–232 [肖慧, 李军, 王祥红, 等. 鲈鱼鳃弧菌病疫苗的制备及免疫防治效果. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(2): 226–232]
- 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*). 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. 高技术通讯, 2007, 17(9): 979–985]
- Yang MC. Veterinary statistics. Beijing: China Prospect Publishing House, 1990, 232–234 [杨茂成. 兽医统计学. 北京: 中国展望出版社, 1990, 232–234]
- Zhao LN. Characterization of serotype and genotype of *Vibrio anguillarum* strains isolated from marine fish. Master's Thesis of Qingdao Agricultural University, 2014, 25–30 [赵鲁宁. 海水养殖鱼类鳃弧菌分离株的血清型和基因型鉴定. 青岛农业大学硕士研究生学位论文, 2014, 25–30]
- 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 马瑾艳)

Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Inactivated *Vibrio anguillarum* Serotype O3 Vaccine Preparations

LI Shufang^{1,2}, TANG Lei^{1,3}, LI Jie¹, LI Guiyang¹, WANG Xiaoran^{1,3},
WANG Xiaolu^{1,3}, DING Shan^{1,2}, MO Zhaolan^{1,2①}

(1. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Key Laboratory of Maricultural Organism Disease Control, Ministry of Agriculture, 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. College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

Abstract *Vibrio anguillarum*, an etiological agent of fish septicemia, has caused great economic losses in many marine and fresh water fish. Vaccination is an effective and safe approach to control fish septicemia. The pathogenicity *V. anguillarum* serotype O3 in cultured marine fish of China promotes us to evaluate the immunogenicity and protective efficacy of three *V. anguillarum* serotype O3 inactivated vaccine. Three *V. anguillarum* serotype O3 strains (SMP1, SMP3, and SMP4) were rejuvenated in flounder *Paralichthys olivaceus* and then were determined for lethal dose 50% (LD₅₀) in *Trichogaster trichopterus* which had been acclimated to 10 salinity. The result showed that LD₅₀ of SMP1, SMP3 and SMP4 were 10^{5.1} CFU/ml, 10^{4.7} CFU/ml and 10^{5.4} CFU/ml, respectively. Three inactivated vaccine were obtained by incubation of *V. anguillarum* with 0.2% formaldehyde for 36 h at 28°C. Each vaccine was used to vaccinate flounder *P. olivaceus* via intraperitoneal injection with a dosage of 10⁸ CFU/ml. Specific serum antibody titers against *V. anguillarum* cells were detected evidently ($P < 0.05$) at 7 d post vaccination, and the highest titers of 1:1280(SMP1), 1:640 (SMP3) and 1:905 (SMP4) were detected at 4 weeks post vaccination ($P < 0.05$). Meanwhile, the relative percent survival rates (RPS) were 94.4% (SMP1), 100% (SMP3) and 73.7% (SMP4). These results indicated that *V. anguillarum* serotype O3 inactivated vaccines were able to induce immune response in fish and provide effective protection against *V. anguillarum* infection, and SMP3 is the best candidate for vaccine development and application.

Key words *Vibrio anguillarum* serotype O3; LD₅₀; Inactivated vaccine; Serum antibody titer; Relative percent survival rate

① Corresponding author: MO Zhaolan, Email: mozl@ysfri.ac.cn