

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102166350 B

(45) 授权公告日 2012. 11. 21

(21) 申请号 201110092121. X

(22) 申请日 2011. 04. 13

(73) 专利权人 中国水产科学研究院黄海水产研究所

地址 266071 山东省青岛市市南区南京路106号

(72) 发明人 张正 王印庚 邓楠楠 廖梅杰 王岚 荣小军 李彬

(74) 专利代理机构 北京中伟智信专利商标代理事务所 11325

代理人 张岱

(51) Int. Cl.

A61K 39/116(2006. 01)

A61K 39/39(2006. 01)

A61P 31/04(2006. 01)

A61K 39/106(2006. 01)

A61K 39/12(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2008/027235 A1, 2008. 03. 06, 全文.

CN 1293066 A, 2001. 05. 02, 全文.

WO 2009/056629 A1, 2009. 05. 07, 全文.

王瑞旋等. 海水鱼类细菌性疾病病原及其检测、疫苗研究概况.《南方水产》. 2005, 第1卷(第6期), 72-79.

姚秀娟. 黄芪多糖药理作用及在动物生产中的应用研究进展.《饲料工业》. 2009, 第30卷(第18期), 1-3.

秦玉广等. 细菌性鱼病研究现状与展望.《井冈山大学学报(自然科学版)》. 2010, 第31卷(第3期), 49-57.

审查员 李洋

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

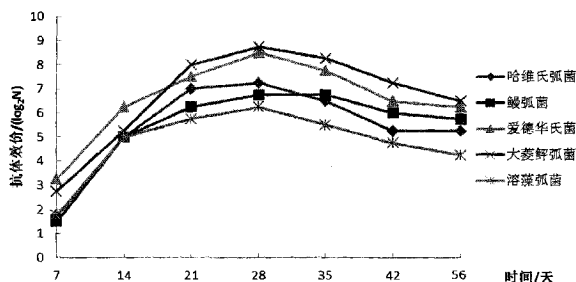
(54) 发明名称

鲆鲽鱼类五联灭活疫苗及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种鲆鲽鱼类五联灭活疫苗和它的制备方法。疫苗的主要成分是由鳗弧菌、大菱鲆弧菌、哈维氏弧菌、溶藻胶弧菌、迟钝爱德华氏菌五种细菌的灭活菌体混合而成。它的制备方法是将上述五种细菌分别制成 10^9~10^10cfu/mL 的菌悬液经福尔马林灭活后按 1:1:1:1:1 比例等体积混合制成鲆鲽鱼类五联灭活疫苗原液, 然后将鲆鲽鱼类五联灭活疫苗原液与浓度为 15~35mg/mL 的黄芪多糖佐剂原液按 1:1 的比例均匀混合后制成。本发明具有多重的免疫效果, 一次接种后可以有效预防鲆鲽鱼类五种细菌性病原菌的感染, 为海水鱼类多联灭活疫苗的研发提供了依据。

含黄芪多糖佐剂疫苗组抗体效价



1. 一种鲟鳃鱼类五联灭活疫苗,其特征在于它是由含有鳃弧菌、大菱鲆弧菌、哈维氏弧菌、溶藻胶弧菌、迟钝爱德华氏菌五种灭活细菌菌悬液和黄芪多糖佐剂原液混合而成。

2. 根据权利要求1所述的鲟鳃鱼类五联灭活疫苗,其特征在于所述的鲟鳃鱼类五联灭活疫苗中五种灭活细菌的终浓度均为  $10^8 \sim 10^9$ cfu/mL,所述的黄芪多糖佐剂的终浓度为  $7.5 \sim 17.5$ mg/mL。

3. 一种鲟鳃鱼类五联灭活疫苗的制备方法,它的步骤为:

(1) 将能够感染鲟鳃类发病的鳃弧菌、大菱鲆弧菌、哈维氏弧菌、溶藻胶弧菌、迟钝爱德华氏菌接种到胰蛋白胨大头肉汤培养基平板上,28℃培养 24h-48h 进行复苏;

(2) 分别挑取上述 5 株病原菌到胰蛋白胨大头肉汤液体培养基中,28℃振荡培养 24h,收集培养液在 4℃条件下 5000rpm 离心 5 分钟,将离心后的沉积菌体用 pH = 7.2 的 PBS 缓冲液冲洗 3 遍后,用灭菌后的 1.5% (重量比) 的 NaCl 溶液分别制成  $10^9 \sim 10^{10}$ cfu/mL 的菌悬液原液;

(3) 将五种病原菌的菌悬液原液分别灭活后,1 : 1 : 1 : 1 : 1 等体积混合,即为鲟鳃鱼类五联灭活疫苗原液;

(4) 将上述步骤得到的鲟鳃鱼类五联灭活疫苗原液与黄芪多糖佐剂原液按 1 : 1 的体积比混合,振荡均匀得到含黄芪多糖的鲟鳃鱼类五联灭活疫苗。

4. 根据权利要求3所述的鲟鳃鱼类五联灭活疫苗的制备方法,其特征在于所述的五种病原菌灭活方法分别为在哈维氏弧菌和溶藻胶弧菌菌悬液原液中添加 0.5% (v/v) 的福尔马林溶液;在大菱鲆弧菌和鳃弧菌菌悬液原液中添加 1.0% (v/v) 的福尔马林溶液;在爱德华氏菌菌悬液原液中添加 1.5% (v/v) 的福尔马林溶液,28℃、110 ~ 120r/min 的转速振荡灭活处理 48h 后,用 PH = 7.2 的 PBS 缓冲液洗脱 3 次去除福尔马林。

5. 根据权利要求3所述的鲟鳃鱼类五联灭活疫苗的制备方法,其特征在于所述的黄芪多糖佐剂原液,是将多糖含量  $\geq 78.2\%$  黄芪多糖原粉用蒸馏水溶解,配制成黄芪多糖浓度为  $15 \sim 35$ mg/mL 的溶液,经 115℃ 高压灭菌 10min 后,自然冷却制备而成。

## 鲆鲽鱼类五联灭活疫苗及其制备方法

### 技术领域：

[0001] 本发明属于海水鱼类疫苗的制备技术,是通过增加疫苗中灭活的鱼类病原菌种类和添加黄芪多糖来增强疫苗免疫效果的一种技术方法。

### 背景技术：

[0002] 鲆鲽鱼类是我国北方工厂化海水养殖的主要品种,对我国沿海地区的渔业经济发展做出了重要贡献。近几年,随着鲆鲽类养殖产业规模和产量的迅速扩大,疾病成为养殖生产面临的主要问题之一。疾病频繁的发生,对养殖的成活率形成直接威胁,造成的经济损失已经在一定程度上制约了产业的健康平稳发展。

[0003] 中国水产科学研究院黄海水产研究所已对我国的养殖鲆鲽类进行了全面、系统的疾病流行病学研究,发现了鲆鲽类 20 余种典型的疾病症状,并对它们的病原进行了细致、深入的研究。研究发现鲆鲽类的大多数疾病是由细菌性病原引起的,而鳃弧菌、大菱鲆弧菌、哈维氏弧菌、溶藻胶弧菌、迟钝爱德华氏菌是鲆鲽类养殖过程中最为常见的五种病原菌,可以造成烂鳍、腹水、肠炎、红体、肌肉脓肿等多种明显的表观症状。因为细菌性疾病是我国养殖鲆鲽类的主要疾病,广大鲆鲽类养殖者在国内没有商业化的鲆鲽类疫苗可用的情况下,主要依赖抗生素和化学类药物来防御疾病。而长期使用抗生素,不仅容易使病原菌产生耐药性,增加后续预防疾病的困难,而且其药残问题也关联到养成商品鱼的食品质量安全。因此,开发鲆鲽类养殖专用疫苗迫在眉睫。

[0004] 通过注射疫苗来预防病原感染,是具有特异性免疫系统的动物行之有效的无公害疾病防治技术。这一技术方法在海水养殖鱼类中同样适用。在本发明作出之前,国内外有 N. Castro 等 (Development of an effective *Edwardsiella tarda* vaccine for cultured turbot *Scophthalmus maximus*. Fish & Shellfish Immunology, Volume 25, Issue 3, September 2008) 对大菱鲆的爱德华菌疫苗,曹宏梅等对鳃弧菌和溶藻弧菌二联疫苗对大菱鲆的免疫效果 (中国水产科学,2006 年 13 卷第 3 期),朱开玲等对大菱鲆的鳃弧菌灭活疫苗等方面展开了研究 (高级技术通讯,2004 年第 2 期)。他们的研究主要集中在用 1 种或 2 种大菱鲆的细菌病原制备疫苗,而且没有使用黄芪多糖作为疫苗佐剂,与本发明相比,无论在疫苗组成还是疫苗功能上都存在明显的不同。

### 发明内容：

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种鲆鲽鱼类的五联灭活疫苗,它具有多重的免疫效果,对鲆鲽鱼类一次接种免疫后可以有效预防 5 种细菌性病原菌的感染,能够显著降低细菌性疾病的发病率。

[0006] 本发明采用如下技术方案：

[0007] 鲆鲽鱼类的五联灭活疫苗是由灭活的鳃弧菌、大菱鲆弧菌、哈维氏弧菌、溶藻胶弧菌、迟钝爱德华氏菌的菌悬液等体积混合制成。

[0008] 所述的鲆鲽鱼类的五联灭活疫苗,优选的由灭活的鳃弧菌、大菱鲆弧菌、哈维氏弧

菌、溶藻胶弧菌、迟钝爱德华氏菌的菌悬液和黄芪多糖溶液混合制成。

[0009] 所述的鲢鳙鱼类的五联灭活疫苗,优选的各成份浓度为:鳃弧菌  $10^8 \sim 10^9$ cfu/mL,大菱鲃弧菌  $10^8 \sim 10^9$ cfu/mL,哈维氏弧菌  $10^8 \sim 10^9$ cfu/mL,溶藻胶弧菌  $10^8 \sim 10^9$ cfu/mL,迟钝爱德华氏菌  $10^8 \sim 10^9$ cfu/mL,黄芪多糖 7.5 ~ 17.5mg/mL。

[0010] 本发明所要解决的另一技术问题是提供一种鲢鳙鱼类的五联灭活疫苗的制备方法。

[0011] 本发明为解决上述技术问题,所采用的技术方案如下:

[0012] (1) 将能够感染鲢鳙类发病的鳃弧菌、大菱鲃弧菌、哈维氏弧菌、溶藻胶弧菌、迟钝爱德华氏菌接种到胰蛋白胨大头肉汤培养基(TSB)平板上,28℃培养 24h-48h 进行复苏;

[0013] (2) 分别挑取上述 5 株病原菌到 TSB 液体培养基中,28℃条件下 110 ~ 120r/min 的转速振荡培养 24h,收集培养液在 4℃条件下 5000rpm 离心 5 分钟,将离心后的沉积菌体用 pH = 7.2 的 PBS 缓冲液(成份:NaCl 8.0g/L;KCl 0.2g/L;Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.15g/L;KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g/L,去离子水配制。)冲洗 3 遍后,用灭菌后的 1.5% (重量比)的 NaCl 溶液分别制成  $10^9 \sim 10^{10}$ cfu/mL 的菌悬液原液;

[0014] (3) 将五种病原菌的菌悬液原液分别灭活后,1 : 1 : 1 : 1 : 1 等体积混合,即为鲢鳙鱼类五联灭活疫苗原液。

[0015] (4) 将上述步骤(3)得到的鲢鳙鱼类五联灭活疫苗原液和黄芪多糖佐剂原液按 1 : 1 的体积比混合,振荡均匀后即为含黄芪多糖佐剂的鲢鳙鱼类五联灭活疫苗。

[0016] 所述的五种病原菌菌悬液的灭活,为分别在哈维氏弧菌和溶藻胶弧菌菌悬液中添加 0.5% (v/v) 的福尔马林溶液;在大菱鲃弧菌和鳃弧菌菌悬液中添加 1.0% (v/v) 的福尔马林溶液;在爱德华氏菌菌悬液中添加 1.5% (v/v) 的福尔马林溶液,28℃条件下 110 ~ 120r/min 的转速振荡灭活处理 48h 后,用 PH = 7.2 的 PBS 缓冲液洗脱 3 次去除福尔马林。

[0017] 所述的黄芪多糖佐剂原液,是将多糖含量  $\geq 78.2\%$  的黄芪多糖 (APS) 原粉用蒸馏水溶解,配制成黄芪多糖浓度为 15 ~ 35mg/mL 的溶液,经 115℃高压灭菌 10min 后,自然冷却制备而成。

[0018] 本发明与已有技术对比其特点是:

[0019] 1、本发明的疫苗菌种是经过鲢鳙类流行病学和病原学研究而筛选出来的,菌株的致病力强,具有较强的针对性和代表性,经灭活后可显著提高接种对象的特异和非特异性免疫指标。

[0020] 2、本发明实现了鲢鳙鱼类疫苗的多重免疫效果,一次接种就可以有效预防鲢鳙类 5 种重要病原细菌的感染,能够有效降低由这些病原菌引发的疾病的发生率,对鲢鳙鱼类的保护率为 30% -71.4%。

[0021] 3、本发明适用对象多,能够用于现有中国全部养殖鲢鳙类品种的免疫接种。

附图说明:

[0022] 图 1 为含黄芪多糖佐剂的鲢鳙类五联灭活疫苗接种大菱鲃后 56 天内的抗体效价变化图;

[0023] 图 2 为不含黄芪多糖佐剂的鲢鳙类五联灭活疫苗原液接种大菱鲃后 56 天内的抗体效价变化图。

### 具体实施方式：

[0024] 下面通过实施例详细叙述本发明的材料、使用方法和免疫效果：

[0025] 本实施案例是按如下技术方案做出的：进行鲢鳙类的流行病学调查，分离纯化细菌性病原并确定用于制备疫苗的重要病原菌株，对菌株进行甲醛灭活实验并优化灭活参数，以大菱鲃为对象接种疫苗并检验免疫指标，通过人工攻毒实验检验免疫保护率等过程。

[0026] 1、流行病学调查与重要致病原的筛选：

[0027] 通过对养殖大菱鲃、牙鲢、半滑舌鲷等我国主要的鲢鳙鱼类养殖品种 9 年的流行病学调查和研究，发现烂鳍、腹水、肠炎、鼓眼、疥疮、红体等病症是养殖过程中的常见疾病。经过分离这些疾病的病原，并经过纯化培养和人工攻毒实验，发现鳃弧菌、大菱鲃弧菌、哈维氏弧菌、溶藻胶弧菌、迟钝爱德华氏菌这 5 种细菌都可以导致上述鲢鳙鱼类疾病的多种症状。因此确定这 5 种细菌为鲢鳙鱼类最具代表性的细菌性病原，并将它们作为制备鲢鳙类五联疫苗的源菌株。

[0028] 2、菌株的甲醛灭活及疫苗制备：

[0029] 将低温保存的鳃弧菌、大菱鲃弧菌、哈维氏弧菌、溶藻胶弧菌、迟钝爱德华氏菌这 5 株鲢鳙类病原菌接种到胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 平板培养基上 28℃ 培养 24h-48h 进行活化复苏。分别挑取复苏后的 5 株病原菌单菌落接种到 TSB 液体培养基中，28℃ 条件下 110 ~ 120r/min 的转速振荡培养 24h 后，收集培养液在 4℃ 条件下 5000rpm 离心 5 分钟，将离心后的沉积菌体用 PH = 7.2 的 PBS 缓冲液冲洗 3 遍后，用灭菌的 1.5% (重量比) 的 NaCl 溶液分别制成  $10^9$ cfu/mL 的菌悬液原液。

[0030] 上述 5 株菌的菌悬液原液每种取 5 份，分别加入不同浓度 (v/v) 的福尔马林溶液，即 0.01%、0.03%、0.05%、0.10%、0.15%，28℃ 条件下 110 ~ 120r/min 的转速振荡灭活数小时。期间每隔 4h 取 0.1mL 的菌液涂布于 TSB 平板，每组 2 个平行，置于 28℃ 培养一周，观察平板上是否有菌落生长。若无菌落生长则证明菌株已被完全灭活。

[0031] 多次重复上述实验，最终确定 5 株病原菌用福尔马林溶液灭活的最佳条件分别为：哈维氏弧菌和溶藻胶弧菌以 0.5% (v/v) 终浓度的福尔马林溶液、大菱鲃弧菌和鳃弧菌以 1.0% (v/v) 终浓度的福尔马林溶液、爱德华氏菌以 1.5% (v/v) 终浓度的福尔马林溶液处理 48h 能够达到最佳灭活效果 (见表 1)。

[0032] 将五种病原菌的菌悬液原液按上述最佳条件分别灭活后，用 PH = 7.2 的 PBS 缓冲液，洗脱已被完全灭活的菌液 3 次以去除福尔马林。将洗脱好的 5 种菌液 1 : 1 : 1 : 1 : 1 等体积混合即为鲢鳙鱼类五联灭活疫苗原液，4℃ 条件下保存备用。

[0033] 将多糖含量  $\geq 78.2\%$  的黄芪多糖 (APS) 原粉用蒸馏水溶解，配制成浓度为 25mg/mL 的黄芪多糖佐剂原液，以 115℃ 高压灭菌 10min，自然冷却后放置于 4℃ 条件下保存备用。

[0034] 将上述鲢鳙鱼类五联灭活疫苗原液与灭菌的黄芪多糖佐剂原液以 1 : 1 的体积比混合均匀，即为含黄芪多糖的鲢鳙鱼类五联灭活疫苗。

[0035] 表 1 五株病原菌的福尔马林灭活效果

[0036]

时间(h)	浓度(v/v) (%)	哈维氏弧菌	鳃弧菌	爱德华氏菌	大菱鲆弧菌	溶藻胶弧菌
4	0.1	+	+	+	+	+
	0.3	+	+	+	+	+
	0.5	+	+	+	+	+
	1.0	-(+)	+	+	+	+
	1.5	-	+	+	+	-
12	0.1	+	+	+	+	+
	0.3	+	+	+	+	+
	0.5	-	+	+	+	-(+)
	1.0	-	+	+	+	-
	1.5	-	-(+)	-(+)	-	-
24	0.1	+	+	+	+	+
	0.3	-(+)	+	+	+	+
	0.5	-	+	+	+	-
	1.0	-	+	+	+	-
	1.5	-	-	-(+)	-	-
48	0.1	+	+	+	+	+
	0.3	-	+	+	+	-
	0.5	-	+	+	-(+)	-
	1.0	-	-(+)	+	-	-
	1.5	-	-	-	-	-

[0037] 注：实验在 28℃ 条件下进行。+ 表示 TSB 培养基上有菌落生长；- 表示 TSB 培养基上无菌落生长；+(-) 表示有两种实验结果。

[0038] 3、接种大菱鲆并检验免疫指标：

[0039] 取 180 条平均体重为 50g 的大菱鲆作为实验用鱼，按每组 60 条鱼分为 3 组，每组分别注射含黄芪多糖佐剂的鲆鲽类五联灭活疫苗、不含黄芪多糖佐剂的鲆鲽类五联灭活疫苗原液和灭菌的 1.5%（重量比）NaCl 溶液。其中注射含黄芪多糖佐剂的鲆鲽类五联灭活疫苗组为实验组 1，注射不含黄芪多糖佐剂的鲆鲽类五联灭活疫苗原液组为实验组 2，注射 1.5%（重量比）NaCl 溶液为对照组。每尾大菱鲆的注射剂量为 0.2ml（体重的 4%），首次注射 7d 后用同样方法加强注射一次，共注射 2 次。

[0040] 实验进行过程中的第 7、14、21、28、35、42、56d 分别采血一次，测定受免大菱鲆的抗体效价和各项免疫指标。结果显示实验组 1 和实验组 2 的大菱鲆对哈维氏弧菌、鳃弧菌、爱德华氏菌、溶藻胶弧菌、大菱鲆弧菌的特异性抗体在初次免疫后第 7 天开始上升，在第 28 天达到最大，然后缓慢下降。其中实验组 1 的受免大菱鲆在第 28 天抗体效价哈维氏弧菌、鳃弧菌、爱德华氏菌、大菱鲆弧菌和溶藻弧菌分别为  $2^{7.25}$ 、 $2^{6.75}$ 、 $2^{8.5}$ 、 $2^{8.75}$ 、 $2^{6.25}$ （附图 1），实验组 2 上述数据分别为  $2^6$ 、 $2^{5.75}$ 、 $2^{6.75}$ 、 $2^{7.5}$ 、 $2^5$ （附图 2）。本实验跟踪实验组 1 和实验组 2 抗体效价到第 56 天，结果显示各组仍然具有比对照组高的抗体效价。

[0041] 溶菌酶结果（表 2）显示，实验组 1 和实验组 2 的大菱鲆血清中的溶菌酶活力从注射后第 14 天开始明显升高，并都在第 28 天达到最大值，此后开始逐渐下降，但到 56d 时仍然保持比对照组高的活力，显著高于对照组。而对照组在整个实验中没有明显变化。

[0042] 表 2 受免大菱鲆血清溶菌酶活力

[0043]

溶菌酶 Lysozyme(unit ml <sup>-1</sup> )								ANVO A	F 值	P 值
组别	7d	14d	21d	28d	35d	42d	56			
实验组 1	1.183±	1.183±	1.262±	1.312±	1.275±	1.185±	1.177±	34.086	0.000	
	0.013 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	0.013 <sup>c</sup> <sub>A</sub>	0.009 <sup>c</sup> <sub>B</sub>	0.010 <sup>c</sup> <sub>C</sub>	0.007 <sup>c</sup> <sub>BC</sub>	0.008 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	0.005 <sup>c</sup> <sub>A</sub>			
实验组 2	1.117±	1.138±	1.152±	1.237±	1.173±	1.145±	1.133±	6.389	0.000	
	0.007 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	0.010 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	0.015 <sup>b</sup> <sub>A</sub>	0.010 <sup>b</sup> <sub>B</sub>	0.008 <sup>b</sup> <sub>AB</sub>	0.033 <sup>ab</sup> <sub>A</sub>	0.011 <sup>b</sup> <sub>A</sub>			
对照组	1.095±	1.090±	1.113±	1.122±	1.115±	1.083±	1.095±	2.166	0.070	
	0.012 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	0.007 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	0.008 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	0.008 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	0.007 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	0.011 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	0.014 <sup>a</sup> <sub>A</sub>			
ANVOA										
F 值	18.312	21.275	57.375	96.971	127.356	6.017	15.624			
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012	0.000			

[0044] 注：上标英文小写字母不同，代表同一列各数据差异显著；下标大写字母不同，代表同一行数据差异显著。

[0045] SOD(超氧化物歧化酶)测定结果(表 2)显示，在五联灭活疫苗中添加黄芪多糖佐剂有利于进一步提高大菱鲆血清中 SOD 活力。2 个实验组与对照组相比都表现了更高的活力( $P < 0.05$ )，第 28 天实验组 1 和实验组 2 的 SOD 活力同时达到最高值，并且实验组 1 显著高于实验组 2( $P < 0.05$ )；第 56d 实验组 1 仍显著高于免实验组 2( $P < 0.05$ )，结果证实实验组 1 的 SOD 活力相对于实验组 2 更为稳定而且持久。

[0046] 表 3 免疫大菱鲆血清 SOD 活力的比较

[0047]

SOD(unit ml <sup>-1</sup> )								ANV OA	F 值	P 值
组别	7d	14d	21d	28d	35d	42d	56			
实验组 1	16.47±	17.70± 0.21 <sup>c</sup>	21.85±	24.35±	21.83±	18.64±	15.13±	218.642	0.000	
	0.24 <sup>b</sup> <sub>B</sub>		0.24 <sup>d</sup> <sub>D</sub>	0.21 <sup>e</sup> <sub>E</sub>	0.34 <sup>d</sup> <sub>D</sub>	0.16 <sup>c</sup> <sub>C</sub>	0.09 <sup>b</sup> <sub>A</sub>			
实验组 2	14.99±	16.67±	19.20±	21.60±	17.34±	16.66±	15.07±	134.320	0.000	
	0.14 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	0.22 <sup>b</sup> <sub>B</sub>	0.33 <sup>c</sup> <sub>C</sub>	0.18 <sup>b</sup> <sub>D</sub>	0.23 <sup>b</sup> <sub>B</sub>	0.15 <sup>b</sup> <sub>B</sub>	0.06 <sup>b</sup> <sub>A</sub>			
对照组	14.94±	14.90±	15.00±	15.24±	14.88±	15.22±	14.73±	1.516	0.221	
	0.16 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	0.15 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	0.17 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	0.11 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	0.19 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	0.15 <sup>a</sup> <sub>A</sub>	0.10 <sup>a</sup> <sub>A</sub>			
F 值	148.677	515.629	359.158	650.249	1149.833	752.145	64.961			
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			

[0048] 注：上标英文小写字母不同，代表同一列各数据差异显著；下标大写字母不同，代表同一行数据差异显著。

[0049] 3、大菱鲆免疫保护率测定：

[0050] 对上述 2 组实验组和 1 组对照组大菱鲆进行人工攻毒实验，以测定免疫保护率。在首次接种后的第 56 天，分别从实验组 1、实验组 2 和对照组各取 50 尾大菱鲆，将每组的 50 条大菱鲆再随机分为 5 个平行组，每组 10 尾。分别以 50 倍的半致死浓度(LC<sub>50</sub>)的哈维氏弧菌、鳃弧菌、爱德华氏菌、溶藻胶弧菌、大菱鲆弧菌活菌悬液进行腹腔注射，每尾注射 0.2mL，对照组腹腔注射 0.2mL 无菌的 1.5%浓度(重量比)的 NaCl 溶液。根据公式计算疫苗的免疫保护率(RPS)，计算公式为：

[0051]

$$RPS = \frac{1 - \text{实验组死亡率}}{\text{对照组死亡率}} \times 100\%$$

[0052] 人工攻毒实验共进行了 7 天。实验结果显示实验组 1 和实验组 2 的大菱鲆都产生了一定的免疫保护率。其中实验组 1 对哈维氏弧菌、鳃弧菌、爱德华氏菌、大菱鲆弧菌和溶藻弧菌 5 种菌的免疫保护率分别为 50.0%、50.0%、71.4%、62.5%、44.4%；实验组 2 这 5 种菌的免疫保护率分别为 37.5%、30.0%、57.1%、50%、33.3%；而对照组注射这五种菌的死亡率分别为 90%、100%、70%、80%、80%。

[0053] 以上实验结果证明本发明能够提升大菱鲆特异性免疫和非特异性免疫指标，在有病原菌感染的情况下明显提高了大菱鲆的相对免疫保护力。

### 含黄芪多糖佐剂疫苗组抗体效价

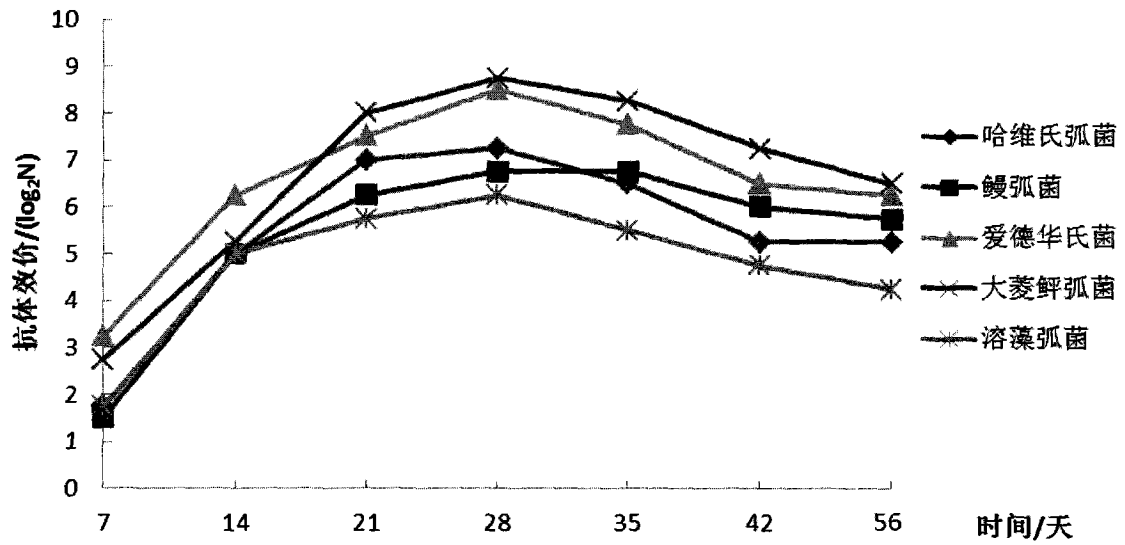


图 1

### 不含黄芪多糖佐剂疫苗原液组抗体效价

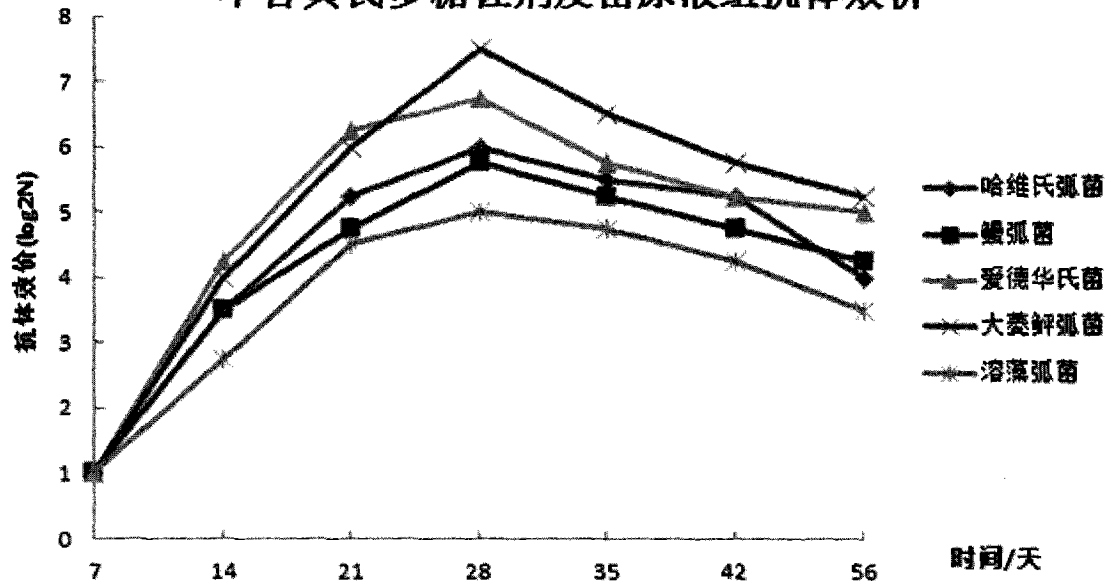


图 2