

# 灿烂弧菌灭活菌苗对美国红鱼免疫效果的研究

马爱敏, 闫茂仓, 胡利华, 谢起浪, 陈少波, 单乐州

(浙江省海洋水产养殖研究所 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 浙江 温州 325005)

**摘要:**制备灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)福尔马林灭活菌苗,通过浸泡、注射和口服3种方式接种美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*),分别在接种免疫后第7、14、21、28、35天采鱼血,检测其血清抗体效价、溶菌酶活力和白细胞吞噬活性;第28天用 $1.0 \times 10^8$  CFU/mL的灿烂弧菌悬液进行攻毒试验,检测菌苗的免疫效果。结果表明,各免疫组血清抗体效价在第21天达到峰值,且浸泡组和注射组血清抗体效价高于口服组;在35 d实验期内,各免疫组血清溶菌酶活力有明显提高,各浸泡组和注射组于免疫接种后14 d显著高于对照组( $P < 0.05$ );除浸泡3组外,其余各免疫组的白细胞吞噬百分比(PP)和吞噬指数(PI)在免疫接种后14 d均较对照组有显著差异( $P < 0.05$ );各组受免鱼对人工攻毒均具有保护作用,以注射2组的免疫保护率最高,达77.8%。

**关键词:**美国红鱼;灿烂弧菌;菌苗

**中图分类号:**S942.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2010)03-0137-05

随着海水鱼类集约化养殖规模的不断扩大,病害问题日益严重,其中,爆发性弧菌病是危害海水养殖鱼类最严重的疾病之一(Austin & Austin, 1999)。养殖生产中,对其病害防治所采用的主要手段仍然是抗生素等化学药物,但是这些药物疗效不太理想,且易诱导细菌产生抗药性,破坏水环境的微生物生态,造成药物残留或污染等问题(孙翰昌等, 2007)。因此,开展水产养殖动物免疫防病的研究,在养殖生产中具有十分重大的意义。

应用疫苗免疫接种防病方面的研究已取得很大进展,采用新方法、新技术研制高效价菌苗,如亚单位疫苗、基因工程疫苗等(肖慧等, 2003)。国外已有多种商品疫苗生产和销售(杨先乐和陈远新, 1996),我国也开始了鱼用疫苗及免疫预防鱼病方面的研究(陈月英等, 1998)。而目前利用灿烂弧菌(*Vibrio splendidus*)菌苗接种免疫防治海水鱼的研究基本处于空白。本试验研究了美国红鱼(*Sciaenops ocellatus*)对灿烂弧菌菌苗的免疫应答,从其非特异性和特异性免疫功能及对人工攻毒的免疫保护率等方面对菌苗的免疫效果进行评价,旨在为灿烂弧菌菌苗的研制开发和应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验鱼及饲养管理

试验用的美国红鱼来自浙江海洋水产养殖研究所清江基地,体重( $190.00 \pm 0.76$ )g,于室内水泥池中暂养,每天投饵1次,吸污换水1次,24 h充气,2周后开始试验。养鱼用水为二级沙过滤海水,试验期间水温为20℃左右,盐度26, pH 8.2。

### 1.2 试验菌株

本实验室分离并鉴定的灿烂弧菌,具有强致病性。

### 1.3 灿烂弧菌灭活菌苗的制备

将灿烂弧菌接种于Zobell 2216E斜面,28℃培养24 h后,以无菌生理盐水洗下,加入终浓度为0.5%的福尔马林,28℃灭活24 h后,以平板培养法检查灭活效果,确认彻底灭活后,即为FKC免疫原。

### 1.4 实验设计

供试鱼在2 m × 1 m × 1 m玻璃缸中暂养1周后进行实验。

#### 1.4.1 免疫效果实验

1.4.1.1 分组 共分9组,3个浸泡组、2个注射组、3个口服组和1个对照组,每组30尾鱼。3个浸泡组疫苗终浓度分别为 $2 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^6$  CFU/mL,浸泡时间均为30 min;2个注射组疫苗终浓度分别为 $2 \times 10^8$  CFU/mL和 $2 \times 10^7$  CFU/mL,以胸腔注射法进行,每尾鱼接种0.2 mL疫苗;3个口服组疫苗终浓度同浸泡组,将疫苗均匀地喷洒于饵料中,连续投喂供试鱼10 d后改投正常饵料。

收稿日期:2009-09-01

基金项目:浙江省科技厅科研院所青年人才计划项目(2006R20001);浙江省科技厅科研院所专项公益技术攻关项目(2007F10009);温州市科技兴海项目(S20070051)联合资助。

通讯作者:闫茂仓。E-mail: yanmaocang@126.com

作者简介:马爱敏,1983年生,女,河南郑州人,硕士,主要从事鱼类病害方面的研究。E-mail: ammaimin@163.com

1.4.1.2 采样 分别在免疫接种后的第7、14、21、28、35天,每组取5尾鱼,以尾静脉取血,取血后的鱼放回相应组继续进行实验。将每尾鱼的血液分成2份,1份血液首先在室温下静置2h,然后在4℃冰箱中保持4h后,于4℃条件下,以4000 r/min离心10 min,收集上层血清,供血清抗体效价和血清溶菌酶活性的测定;另1份以肝素抗凝,制备抗凝血,供血液白细胞吞噬活性的测定。

1.4.1.3 血清抗体效价的测定 以常规血凝板法进行。

1.4.1.4 血清溶菌酶活性的测定 血清溶菌酶活性的测定参照王雷等(1994)的方法。以溶菌酶(Amresco公司产品,活性为2000 U/mg)为标准品,以溶壁微球菌(*Micrococcus lysodeikticus*)冻干粉(Sigma公司产品)为敏感菌株,采用冰浴终止法,测其在570 m处的光密度值。按公式计算溶菌酶的活力: $U = (A_0 - A) / A$

1.4.1.5 白细胞吞噬活性的测定 白细胞吞噬活性的测定参照罗琳等(2001)的方法。取100 $\mu$ L抗凝血,加入100 $\mu$ L的金黄色葡萄球菌液,摇匀,25℃水浴60 min,水浴期间,每隔10 min摇动1次。用吸管吸取混合液涂片(每个血样涂5片),甲醇固定10 min, Giemsa染色1.0~1.5 h,水洗风干后油镜观察。按下式计算吞噬百分比(phagocytic percentage, PP)和吞噬指数(phagocytic index, PI)。

$$PP = \frac{100 \text{ 个吞噬细胞中参与吞噬的细胞数}}{100} \times 100\%$$

$$PI = \frac{\text{吞噬细胞内的细菌总数}}{\text{被记数参与吞噬的细胞数}}$$

1.4.2 攻毒实验 于免疫接种后的第28天,从实验组和对照组各取10尾美国红鱼,每尾鱼胸鳍基部注射0.2 mL浓度为 $1.0 \times 10^8$  CFU/mL灿烂弧菌活

菌液,置于二级沙滤水饲养,连续观察14 d,记录死亡状况,并进行解剖和病原的再分离,以确定是否死于攻毒活菌引起的感染。实验结束后计算相对免疫保护率(Relative percentage of survival, RPS):

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

采用STATISTICA 6.0统计软件作单因素方差分析处理,显著水平为 $P < 0.05$ ,极显著水平为 $P < 0.01$ 。

## 2 结果

### 2.1 美国红鱼血清抗体凝集效价的变化

美国红鱼血清抗体凝集效价变化如表1所示。各免疫组血清中的抗体凝集效价均从第7天开始迅速上升,于第21天达到峰值,之后呈下降趋势,第28天仍显著高于对照组。各免疫组之间凝集抗体效价也有差异,其中以注射2组最高,21 d时峰值为211,其后依次为注射1组,浸泡1、2、3组和口服1、2、3组。而对对照组的凝集抗体效价一直都很低,几乎没有变化。

### 2.2 美国红鱼血清溶菌酶活性的变化

所测美国红鱼血清溶菌酶活性的变化如图1所示。35 d的实验期内,对照组血清溶菌酶的活性为488.31~554.41 U/mL,无显著差异( $P > 0.05$ );各免疫组美国红鱼血清溶菌酶活性变化不一,各浸泡组和注射组于免疫接种后14 d显著高于对照组水平( $P < 0.05$ ),而口服组血清溶菌酶活性在免疫接种后21 d迅速升高,显著高于对照组水平( $P < 0.05$ ),直到35 d实验结束仍与对照组差异显著( $P < 0.05$ ),而此时各浸泡组和注射组血清溶菌酶活性很低,与对照组无显著差异( $P > 0.05$ )。

表1 美国红鱼接种免疫原后的血清凝集抗体效价

Tab.1 Serum antibody titers in *Sciaenops ocellatus* inoculated immunogen

| 组别  | 免疫后时间/d    |             |             |            |           |
|-----|------------|-------------|-------------|------------|-----------|
|     | 7          | 14          | 21          | 28         | 35        |
| 浸泡1 | 1: 128~256 | 1: 256~512  | 1: 256~1024 | 1: 64~128  | 1: 32~64  |
| 浸泡2 | 1: 32~256  | 1: 128~512  | 1: 128~1024 | 1: 32~64   | 1: 32~64  |
| 浸泡3 | 1: 64~128  | 1: 128~256  | 1: 128~1024 | 1: 32~128  | 1: 32~64  |
| 注射1 | 1: 128~256 | 1: 256~1024 | 1: 256~1024 | 1: 64~128  | 1: 32     |
| 注射2 | 1: 128~256 | 1: 256~2048 | 1: 512~2048 | 1: 32~256  | 1: 32~64  |
| 口服1 | 1: 64~128  | 1: 256~512  | 1: 1024     | 1: 256~512 | 1: 32~128 |
| 口服2 | 1: 32~128  | 1: 128~512  | 1: 256~512  | 1: 128~512 | 1: 16~32  |
| 口服3 | 1: 32~64   | 1: 128~512  | 1: 256~512  | 1: 64~128  | 1: 32~64  |
| 对照组 | 1: 32~64   | 1: 64       | 1: 64~128   | 1: 32~128  | 1: 32~64  |

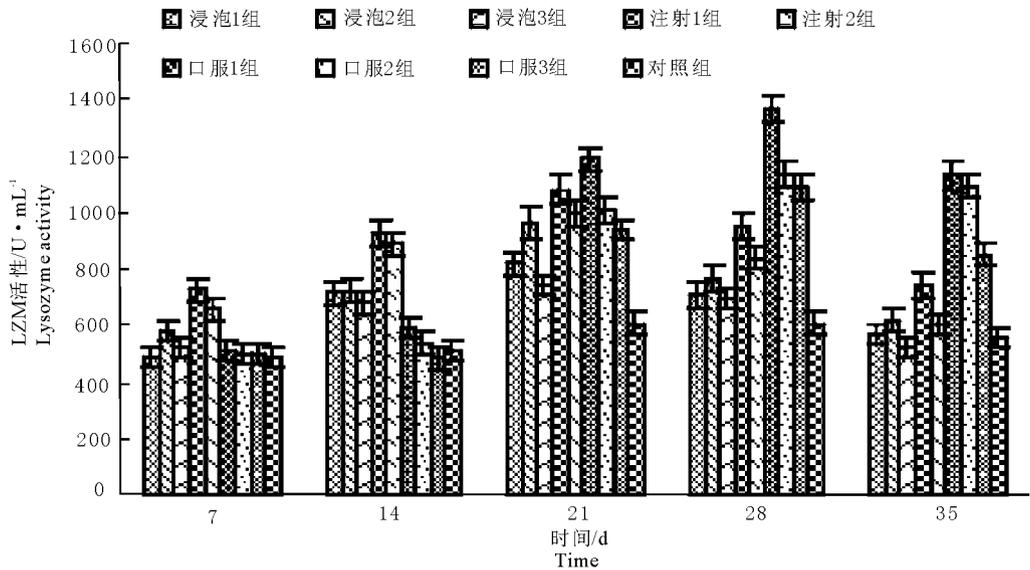


图1 免疫原对美国红鱼血清溶菌酶活性的影响

Fig.1 Effects of immunogen on serum lysozyme activity of *Sciaenops ocellatus*

### 2.3 美国红鱼白细胞吞噬活性的变化

接种免疫后,美国红鱼血液白细胞的吞噬百分比(PP)和吞噬指数(PI)的变化如表2所示。在35 d的试验期内,对照组的吞噬百分比(PP)为16.5%~16.8%,吞噬指数(PI)为1.94~2.01,均无显著差异( $P > 0.05$ )。接种免疫后14 d,除浸泡3组和

口服3组外,其余各组的PP与对照组之间均差异极显著( $P < 0.01$ ),口服3组在免疫后21 d,PP与对照组之间极显著差异( $P < 0.01$ ),而浸泡3组的PP在整个实验期内与对照组均无显著差异( $P > 0.05$ )。接种后14 d,各免疫组的PI与对照组均差异极显著( $P < 0.01$ )。

表2 美国红鱼接种免疫原后血液中白细胞吞噬活性的变化

Tab.2 The change of phagocytic activity in blood after *Sciaenops ocellatus* immunized antigen

| 组别  | 吞噬活性 | 免疫接种时间/d        |                 |                 |                     |                 |
|-----|------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|
|     |      | 7               | 14              | 21              | 28                  | 35              |
| 浸泡1 | PP/% | 20.60 ± 0.51 ** | 24.60 ± 0.62 ** | 28.60 ± 0.67 ** | 27.10 ± 0.59 **     | 25.30 ± 0.56 ** |
|     | PI   | 2.65 ± 0.23 **  | 3.86 ± 0.32 **  | 4.55 ± 0.53 **  | 4.38 ± 0.43 **      | 4.06 ± 0.36 **  |
| 浸泡2 | PP/% | 18.30 ± 0.47    | 20.90 ± 0.51 ** | 23.20 ± 0.61 ** | 21.80 ± 0.6 = 58 ** | 20.70 ± 0.62 ** |
|     | PI   | 2.42 ± 0.26 **  | 3.58 ± 0.35 **  | 4.01 ± 0.47 **  | 3.92 ± 0.39 **      | 3.53 ± 0.34 **  |
| 浸泡3 | PP/% | 16.50 ± 0.58    | 17.70 ± 0.55    | 18.60 ± 0.62    | 17.50 ± 0.59        | 16.40 ± 0.63    |
|     | PI   | 2.32 ± 0.31     | 3.34 ± 0.30 **  | 3.67 ± 0.38 **  | 3.62 ± 0.32 **      | 3.21 ± 0.29 **  |
| 注射1 | PP/% | 23.20 ± 0.57 ** | 26.20 ± 0.63 ** | 29.30 ± 0.68 ** | 30.20 ± 0.70 **     | 28.20 ± 0.61 ** |
|     | PI   | 3.42 ± 0.33 **  | 5.06 ± 0.45 **  | 5.36 ± 0.59 **  | 5.56 ± 0.56 **      | 5.41 ± 0.53 **  |
| 注射2 | PP/% | 25.10 ± 0.54 ** | 28.70 ± 0.57 ** | 31.70 ± 0.71 ** | 32.30 ± 0.69 **     | 29.90 ± 0.57 ** |
|     | PI   | 3.51 ± 0.34 **  | 5.27 ± 0.48 **  | 6.01 ± 0.57 **  | 6.29 ± 0.61 **      | 5.98 ± 0.62 **  |
| 口服1 | PP/% | 21.70 ± 0.46 ** | 26.20 ± 0.53 ** | 29.20 ± 0.58 ** | 29.70 ± 0.52 **     | 27.60 ± 0.61 ** |
|     | PI   | 2.58 ± 0.26 **  | 3.96 ± 0.37 **  | 4.89 ± 0.37 **  | 4.68 ± 0.38 **      | 4.49 ± 0.41 **  |
| 口服2 | PP/% | 19.90 ± 0.49    | 21.30 ± 0.53 ** | 25.70 ± 0.62 ** | 27.60 ± 0.63 **     | 25.30 ± 0.54 ** |
|     | PI   | 2.31 ± 0.24     | 3.87 ± 0.33 **  | 4.31 ± 0.41 **  | 4.29 ± 0.43 **      | 3.98 ± 0.32 **  |
| 口服3 | PP/% | 18.30 ± 0.63    | 19.50 ± 0.57 *  | 21.50 ± 0.67 ** | 22.20 ± 0.62 **     | 20.20 ± 0.59 ** |
|     | PI   | 2.15 ± 0.19     | 3.21 ± 0.29 **  | 3.97 ± 0.34 **  | 3.79 ± 0.37 **      | 3.54 ± 0.36 **  |
| 对照组 | PP/% | 16.50 ± 0.44    | 16.80 ± 0.52    | 16.20 ± 0.46    | 16.60 ± 0.54        | 16.20 ± 0.44    |
|     | PI   | 1.98 ± 0.13     | 1.96 ± 0.20     | 1.96 ± 0.16     | 2.01 ± 0.21         | 1.94 ± 0.14     |

注: \* 表示差异显著( $P < 0.05$ ), \*\* 表示差异极显著( $P < 0.01$ )。

Notes: \* denotes difference ( $P < 0.05$ ), \*\* denotes extremely difference ( $P < 0.01$ ).

### 2.4 相对免疫保护率的测定

实验鱼经活菌攻毒后,各组的免疫保护效果如表3所示。注射2组、注射1组和口服1组的美国

红鱼相对免疫保护效果较好,以注射2组的相对免疫保护率最高,达77.8%。

表3 保护性抗原对美国红鱼的免疫保护效果

Tab. 3 Relative percentage of survival in *Sciaenops Ocellatus*

| 组别  | 攻毒数/<br>尾 | 死亡数/<br>尾 | 死亡率/<br>% | 相对免疫保护<br>率(RPS)/% |
|-----|-----------|-----------|-----------|--------------------|
| 浸泡1 | 10        | 4         | 40        | 55.6               |
| 浸泡2 | 10        | 5         | 50        | 44.4               |
| 浸泡3 | 10        | 6         | 60        | 33.3               |
| 注射1 | 10        | 3         | 30        | 66.7               |
| 注射2 | 10        | 2         | 20        | 77.8               |
| 口服1 | 10        | 3         | 30        | 66.7               |
| 口服2 | 10        | 5         | 50        | 44.4               |
| 口服3 | 10        | 5         | 50        | 44.4               |
| 对照组 | 10        | 9         | 90        |                    |

### 3 讨论

#### 3.1 抗体效价

鱼类的免疫系统包括非特异性免疫和特异性免疫,非特异性免疫可以在微生物入侵时立即发挥作用,有效地清除并降解病原微生物和其它有害物质,而此时抗体尚未产生(聂品,1997)。罗晓春和李正秋(2000)以草鱼出血病病毒和牛血清白蛋白(BSA)为抗原接种草鱼,结果显示,在接种了BSA的草鱼中,14 d后检测到抗体,其效价在28 d达到峰值;而接种了出血病病毒的草鱼,在21 d后检测到抗体,抗体效价在35 d达到峰值;罗霞等(2007)进行了嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)疫苗浸泡免疫鳊(*Siniperca chuatsi*)的实验,各免疫组血清中的抗体滴度在加强免疫后14 d达到峰值,之后呈下降趋势,在第4周仍显著高于对照组。本实验结果显示,各免疫组血清中的抗体凝集效价均从第7天开始迅速上升,于第21天达到峰值,之后呈下降趋势,这与罗晓春和李正秋(2000)及罗霞等(2007)人的研究结果相似。

#### 3.2 溶菌酶活力

溶菌酶作为鱼类的非特异性免疫物质之一,主要在肝脏内合成,分布于体液及体表黏液中,它能水解革兰氏阳性菌细胞壁中粘肽的乙酰氨基多糖并使之裂解被释放出来,形成一个水解体系,破坏和消除侵入体内的异物,在鱼体抵抗感染性致病菌的最前沿防御机制中起着重要作用(Bayne & Gerwick, 2001)。安利国等(1999)制备的豚鼠气单胞菌灭活疫苗免疫鲤鱼后,血清溶菌酶活力有明显提高;Paige & George (2000)的研究表明,杀蛙气单胞菌(*A. salmonicida*)疫苗对虹鳟幼体溶菌酶活力也有明显提高。本实验研究表明,接种免疫后,美国红鱼血清溶菌酶活力有明显提高,各浸泡组和注射组于免疫接种

后14 d显著高于对照组( $P < 0.05$ ),而口服组血清溶菌酶活性在免疫接种后28 d达到峰值,直到35 d实验结束仍与对照组差异显著( $P < 0.05$ ),这与上述学者的研究结果一致。

#### 3.3 吞噬活力

吞噬细胞担负捕捉和消化侵入到机体的微生物及其它异物的任务,粒细胞、单核细胞及巨噬细胞在鱼类非特异性防御的细胞免疫中起重要作用。许多研究表明,鱼类吞噬细胞有潜在的杀菌和杀幼虫的活力,但其杀伤机制还不太清楚(刘毅等,2000)。王海芳等(2008)研究了溶藻弧菌疫苗能显著提高黑鲷的白细胞吞噬百分比和吞噬指数;王军等(2001)采用低聚糖益力素、稳定型维生素C、渔用多维等免疫、营养添加剂定期投喂大黄鱼,结果表明,免疫添加剂可以提高大黄鱼血细胞吞噬能力,增强大黄鱼的非特异性免疫功能。本实验研究了疫苗的接种对美国红鱼血细胞的吞噬百分比(PP)和吞噬指数(PI)的影响,结果表明,除浸泡3组外,其余各免疫组PP和PI在免疫接种后14 d均较对照组有显著差异( $P < 0.05$ )。动物机体吞噬功能的提高,也许是由于疫苗的抗原成份(如细菌细胞壁成份LPS等)作为免疫刺激物,从而提高机体免疫力,具体原因还有待进一步的研究。

#### 参考文献:

- 安利国,冯程强,邢维贤,等. 1999. 灭活疫苗对鲤鱼血清溶菌酶和腹腔吞噬细胞活性的作用[J]. 山东师范大学学报:自然科学版,14(2):175-179.
- 陈月英,钱冬,沈智华,等. 1998. 淡水鱼类细菌性败血症疫苗浸浴免疫研究[J]. 海洋与湖泊,29(6):597-602.
- 刘毅,张元柱,陈昌福,等. 2000. 翘嘴鲮肝肾坏死症免疫预防的研究[J]. 江西科学,(6):90-93.
- 罗琳,陈孝煊,曹雪峰,等. 2001. 穿心莲对草鱼血液吞噬细胞吞噬活性的影响[J]. 西南农业大学学报,23(1):33-34,38.
- 罗霞,潘厚军,巩华,等. 2007. 鳊浸泡嗜水气单胞菌全菌疫苗后皮肤黏液抗体的变化[J]. 中国水产科学,14(5):823-828.
- 罗晓春,李正秋. 2000. 草鱼的体液免疫应答及抗体产生细胞[J]. 华中农业大学学报,19(6):581-584.
- 聂品. 1997. 鱼类非特异性免疫研究的新进展[J]. 水产学报,21(1):69-74.
- 孙翰昌,耿晓修,张芬,等. 2007. 肠型点状产气单胞菌口服疫苗对草鱼的免疫保护效应研究[J]. 西南大学学报:自然科学版,29(9):115-118.
- 王海芳,孙际佳,赵典惠,等. 2008. 溶藻弧菌疫苗对黑鲷的免疫效果研究[J]. 华南农业大学学报,(1):97-100,

- 104.
- 王军, 郡庆批, 苏永全, 等. 2001. 免疫添加物对大黄鱼血液白细胞数量及其吞噬功能的影响[J]. 海洋科学, 25(9): 44 - 49.
- 王雷, 李光友, 毛远兴, 等. 1994. 口服免疫型药物对养殖中国对虾病害防治作用的研究[J]. 海洋与湖沼, 25(5): 486 - 492.
- 肖慧, 李军, 王祥红, 等. 2003. 鲈鱼鳃弧菌病疫苗的制备及免疫防治效果[J]. 青岛海洋大学学报, 33(2): 226 - 232.
- 杨先乐, 陈远新. 1996. 鱼用疫苗的现状及其发展趋势[J]. 水产学报, 20(2): 159 - 167.
- Austin B, Austin D A. 1999. Bacterial Fish Pathogens; Disease in Farmed and Wild Fish Third Edition [M]. Chichester; Praxis Publishing Ltd, UK, 237 - 241.
- Bayne C J, Gerwick L. 2001. The acute phase response and innate immunity of fish [J]. Dev Comp Immunol, 25: 725 - 743.
- Paige A Ackerman, George K lwama. 2000. Physiological and immunological effects of adjuvanted *Aeromonas salmonicida* vaccines on juvenile rainbow trout [J]. Journal of Aquatic Animal Health, 12: 157 - 164.

(责任编辑 万月华)

### Study on Immune Efficacy Induced by Killed *Vibrio splendidus* Vaccine on *Sciaenops ocellatus*

MA Ai-min, YAN Mao-cang, Hu Li-hua, XIE Qi-lang, CHEN Shao-bo, SHAN Le-zhou

(Zhejiang Mariculture Research Institute Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-resource, Wenzhou 325005, China)

**Abstract:** *Sciaenops ocellatus* were vaccinated with a formalin - killed *Vibrio splendidus* vaccine via immersion, injection and oral route, respectively. Antibody titers, lysozymes, leucocyte phagocytosis were examined on the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup>, 28<sup>th</sup> d after first-ivaccination. A dosage of 0.2 mL of *V. splendidus*  $1.0 \times 10^8$  CFU/mL was intraperitoneally injected to the vaccinated fish to evaluate the protective efficiency of the vaccine. The results indicated that; the antibody titers of all immunized group was the highest on the 21<sup>st</sup> d and that of all immersion group and injection group were higher than all oral route group; lysozyme of all immunization groups increased, and all immersion group and injection group showed significant difference compared with controlled group ( $P < 0.05$ ) after the 14<sup>th</sup> - vaccination; The phagocytic percentage (PP) and phagocytic index (PI) of all immunized groups except the immersion group 3 were showed significant difference compared with controlled group ( $P < 0.05$ ) after the 14<sup>th</sup> - vaccination, 14 d after challenge with *V. splendidus*, the relative percentage survival (RPS) values showed that the vaccination of injection group 2 was the best of all.

**Key words:** *Sciaenops ocellatus*; *Vibrio splendidus*; Vaccine