

# 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究： 疫苗的稳定性及佐剂和加强免疫 对草鱼免疫应答的影响\*

杨先乐 左文功

(长江水产研究所, 沙市 434000)

## 提 要

CFRV 疫苗具有较好的稳定性。4℃保存 8 个月, 其免疫保护力仍为 83.6%, 草鱼免疫后的血清中和抗体效价为  $119.2 \pm 8.8(2)$ , 与保存开始时相比, 没有显著的差别。28℃保存 8d, 其免疫原性也基本上保持在原来的水平。CFRV 疫苗在此两温度下的免疫有效期分别为 8 个月和 8d。不完全弗氏佐剂对 CFRV 疫苗有明显的增效作用; 用 CFRV 疫苗对草鱼进行加强免疫, 可明显地增强草鱼对该疫苗的免疫应答, 由此证明草鱼具有免疫回忆反应。

**关键词** 草鱼出血病, 细胞培养灭活疫苗, 稳定性, 佐剂, 加强免疫

草鱼 (*Ctenopharyngodon idella* C. et V.) 出血病细胞培养灭活疫苗(以下简称 CFRV 疫苗)是预防草鱼出血病的途径之一, 目前已对它的免疫原性、有效免疫剂量、灭活方法、种株保藏及生产性试验的免疫效果进行了研究和探讨<sup>[1-3]</sup>, 为其应用提供了一定的理论和实践依据。

疫苗的稳定性是疫苗的一个重要特性, 鱼用疫苗在这方面的研究, 国内外鲜有报道。佐剂对鱼类免疫应答的影响, 至今尚有争议<sup>[4,5]</sup>。加强免疫能否增强鱼类的免疫应答水平, 也有不同的意见<sup>[6]</sup>。CFRV 疫苗与佐剂共同使用及 CFRV 疫苗加强免疫对草鱼免疫应答的影响, 国内外均未涉及。鉴此, 作者对 CFRV 疫苗 4℃和 28℃保存时的稳定性进行了研究, 对不完全弗氏佐剂与氢氧化铝凝胶佐剂能否增强 CFRV 疫苗的免疫效果进行了探讨, 并通过该疫苗对草鱼的加强免疫试验, 对草鱼免疫应答水平的变化进行了初步的研究。

## 材 料 和 方 法

**1. 疫苗** 用疫苗株 FR-854 作为种株制备 CFRV 疫苗, 其制备、检定和效价测定参照报道的方法进行。

\* 本文承卫生部上海生物制品研究所研究员焦永真先生审阅并提出宝贵意见, 谨此致谢。

1990 年 8 月 6 日收到。

**2. 试验鱼、免疫接种及其免疫应答水平的测定** 10cm 左右的草鱼在试验网箱中暂养 7d 左右后进行免疫接种，每尾腹腔注射 CFRV 疫苗 0.4ml。20d 后测定免疫鱼的血清中和抗体效价和强毒攻击后的免疫保护力，以此衡量其免疫应答水平。

**3. 疫苗的稳定性** 将同一批次的 CFRV 疫苗分成若干瓶置于 4℃ 医用冰箱或 28℃ 恒温箱保存。间隔一定时间，分别取出一瓶免疫草鱼种若干尾，并同时设立未免疫的草鱼作对照。试验重复进行两次，第一次不仅测定血清中和抗体效价，还测定免疫保护力。比较在各温度下一定保存期的 CFRV 疫苗的稳定性。

**4. 佐剂对疫苗免疫效果的影响** 不完全弗氏佐剂（以下简称 IFA）按石蜡油与羊毛脂 8:2 的比例配制；20% 氢氧化铝凝胶[以下简称 Al(OH)<sub>3</sub>]为南昌生物制药厂产品。使用前将疫苗和佐剂(8:2)充分乳化。不加佐剂的 CFRV 疫苗免疫前用 Eagle's MEM 稀释（疫苗：MEM = 8:2）。每次试验设立使用 IFA、Al(OH)<sub>3</sub> 和无佐剂的三个免疫组及一个不免疫的对照组，测定各组的免疫应答水平。试验重复两次，统计分析两次试验结果，评价佐剂的作用。此外，1988 年在本所试验场还进行了使用 IFA 和不使用佐剂的 CFRV 疫苗免疫二龄草鱼种的生产性对比试验，为进一步确定 IFA 在 CFRV 疫苗免疫应用中的作用。

**5. 加强免疫对草鱼免疫应答的影响** 先后用 CFRV 疫苗对草鱼进行两次免疫，每次间隔一个月，并分别测定两次免疫一个月后的草鱼的免疫应答水平。试验重复两次，对结果进行统计分析并比较一次免疫和两次免疫后的应答水平的差异。

## 结 果

### （一）疫苗的稳定性

效价（指灭活前病毒的滴度，以下同）为  $10^{4.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml 的 CFRV 疫苗 4℃ 保存 2 个月后，免疫保护力只由保存开始时的 93.6% 下降到 93.4%，基本维持在原来的水平上；免疫后的草鱼血清中和抗体效价为  $119.4 \pm 30.3(2)$ ，与保存开始时的状况  $171.9 \pm 26.6(2)$  相比，没有显著的差别（t 测验， $0.4 > p > 0.3$ ）。第 5、8 个月后，免疫保护力虽有下降，但仍达 80% 以上（分别为 85.0% 和 83.6%），免疫后的草鱼血清中和抗体效价在保存 2 个月后的水平上徘徊[分别为  $120.1 \pm 7.7(2)$ ,  $119.2 \pm 8.8(2)$ ]，与保存开始时相比无显著差别（t 测验， $0.3 > p > 0.2$ ）。第 11 个月后，免疫保护力下降到 72%，免疫后的草鱼血清中和抗体效价下降到  $104.3 \pm 1.7(2)$ ，与保存开始时相比差别比较显著（t 测验， $0.2 > p > 0.1$ ）。到第 13 个月免疫保护力下降到 60.8%，免疫后的草鱼血清中和抗体效价只达  $93.0 \pm 3.9(2)$ ，t 测验的结果表明，此时血清中和抗体水平和保存开始时相比有显著的差别（ $p < 0.1$ ）（图 1）。

28℃ 保存的 CFRV 疫苗（效价  $10^{4.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml），第 4d 和第 8d 后免疫保护力均为 83.4%，基本处在保存开始时 84.2% 的水平，第 10d 降到 60.6%，第 15d 就只有 44.1%。它们免疫草鱼后的血清中和抗体效价开始保存时为  $237.7 \pm 43.4(2)$ ，第 4、8d 后分别为  $288.1 \pm 79.6(2)$ ,  $149.9 \pm 19.2(2)$ ，第 10d 降到  $96.1 \pm 7.0(2)$ ，第 15d 只达  $93.0 \pm 3.9(2)$ ；t 测验结果表明，它们免疫草鱼后的血清中和抗体水平与保存开始时相比，第 4、8d 均无显著差别（ $0.7 > p < 0.6$ ,  $0.3 > p > 0.2$ ），第 10、15d 后 p 值均小于 0.1，差别显著（图 2）。

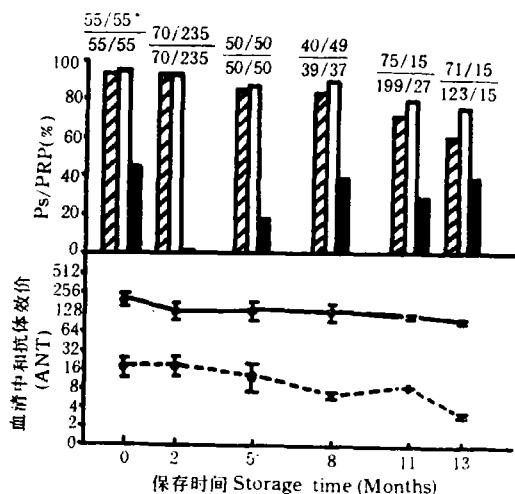


图1 CFRV 疫苗 4℃保存时的稳定性  
Fig.1 The stability of vaccine CFRV at 4°C.  
■ 免疫保护力 PRP (PRP: Percent Relative Protection); □ 试验组成活率 PS of Test (PS: Percent Survival); ■ 对照组成活率 PS of Control; —— 试验组 Test; - - - 对照组 Control  
(ANT: Antiserum Neutralization Titre)  
\* 各次试验样本数 (免疫组)  
对照组  
The number of sample in each test ( $\frac{\text{Immunization group}}{\text{Control}}$ )

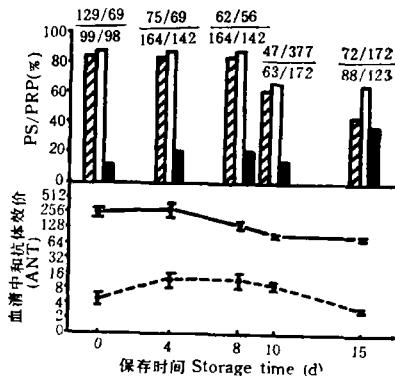


图2 CFRV 疫苗 28℃保存时的稳定性  
Fig. 2 The stability of vaccine CFRV at 28°C. 图注同图1。

## (二) 佐剂对 CFRV 疫苗免疫效果的影响

佐剂-CFRV 疫苗免疫草鱼的试验表明, 使用 IFA 可使 CFRV 疫苗的免疫保护力由不使用佐剂的  $76.5 \pm 10.9(2)\%$  提高到  $100 \pm 0(2)\%$ , 免疫后的草鱼血清中和抗体效价由  $163.5 \pm 43.5(2)$  提高到  $319.2 \pm 62.7(2)$ , t 测验的结果表示它们的免疫效果有比较显著的差别; 用  $\text{Al}(\text{OH})_3$ -CFRV 疫苗免疫后的草鱼免疫保护力为  $76.8 \pm 9.9(2)\%$ , 血清中和抗体效价为  $228.9 \pm 97.2(2)$ , 与不使用佐剂的免疫组相比差别不明显(表1)。生产性试验的结果进一步揭示, 使用 IFA-CFRV 疫苗免疫, 其成活率可达 87.9%, 比不使用佐剂的免疫组提高  $12.4 \pm 2.3(2)\%$ (表 2)。

## (三) 加强免疫对草鱼免疫应答的影响

用 CFRV 疫苗对草鱼进行一次免疫和二次免疫后的结果如表 3 所示。加强免疫后的草鱼的成活率、免疫保护力比一次免疫的要分别提高  $13.4 \pm 0.4(2)\%$ ,  $23.5 \pm 10.9(2)\%$ , 免疫后的草鱼血清中和抗体效价前者比后者提高  $162.8 \pm 107.3(2)$ , t 测验的结果也表明加强免疫后的草鱼的成活率、免疫保护力及血清中和抗体水平和一次免疫者相比均有较显著的差异。

Tab. 1 Influence of adjuvants on immune response of grass carp.

组别 Group	每次试验样本数 The number of fish in each test	存活率 PS (%)	免疫保护力 PRP (%)	血清中和抗体效价 ANT	t 测验		t test <sup>2</sup>	
					成活率 PS	免疫保护力 PRP		
免疫组 Immunization	CFRV	109/129	86.4±0.4(2) <sup>1</sup>	76.5±10.9(2)	163.5±43.5(2)	P<0.1*	P<0.1**	0.2>P>0.1
	IFA-CFRV	63/52	100±0(2)	100±0(2)	319.2±62.7(2)	P>0.9	P>0.9	0.7>P>0.6
	Al(OH) <sub>3</sub> - CRFV	70/66	79.5±8.8(2)	76.8±9.9(2)	228.9±97.2(2)	P<0.1*	P<0.05**	P<0.05**
对照组 Control		78/99	27.1±26.5(3)		6.4±2.8(3)			

<sup>①</sup>平均数±方差(试验次数) Mean±Standard Deviation (Test times); <sup>②</sup>均与 CFRV 免疫组进行比较 All compared with immune group of CFRV.

\* 差别显著 Significant difference; \*\* 差别极显著 Highly significant difference

PS: Percent Survival; PRP: Percent Relative Protection; ANT: Antisera Neutralization Titre

Tab. 2 Comparison of immune test between IFA-CFRV and CFRV in pond-cultured grass carp.

组别 Group	塘号 Pond	面积 Area (ha)	放养尾数 The number of stocked fish	起捕尾数 The number of harvested fish	成活率 Percent survival (%)	
					IFA-CFRV	CFRV
对照组 Control	4	0.09	1044	918	87.9	77.1
	3	0.09	1194	921	75.5±2.3(2) <sup>①</sup>	73.9
	2	0.09	1192	881		
	1	0.09	1383	570	41.2	

①同表1注①

表3 CFRV 疫苗一次免疫与二次免疫对草鱼应答水平的比较  
 Tab. 3 Comparison of immune response of grass carp immunized with CFRV between single and booster.

组别 Group	各次试验样本数 The number of fish in each test	成活率 PS (%)	免疫保护力 PRP (%)	血清中和抗体效价 ANT	t 测验 t test①		
					成活率 PS	免 疫 保 护 力 PRP	血清中和 抗 体 效 价 ANT
免疫组 Immunization	一次免疫 single	109/129	86.4±0.4(2)	76.5±10.9(2)	163.5±43.5(2)		
	二次免疫 Booster	56/46	100±0(2)	100±0(2)	326.3±63.4(2)	P<0.1*	P<0.2 P<0.2②
对照组 Control	78/164	34.8±32.5(2)		5.6±3.4(2)	P>0.3		P<0.05**

① 均与一次免疫组进行比较 All Compared with the single immune group.

② 同表1注④；\*、\*\*表示同表1。

## 讨 论

1. 稳定性是疫苗的一个重要特性。人、兽用疫苗在对其稳定性的研究时，常以疫苗的效价。免疫保护力及其免疫应答的变化作为衡量指标，而鱼用疫苗目前国内对外对此尚无系统的研究，更无统一的规定。本文从免疫保护力和血清中和抗体的变化对 CFRV 疫苗的稳定性进行了探讨。根据试验结果可以认为该疫苗在 4℃ 保存时是比较稳定的，而在室温(28℃)条件下，它的稳定性则较差，保存 10d 的 CFRV 疫苗的免疫效果只相当于 4℃ 保存 13 个月的水平。由此看来，温度的升高对 CFRV 疫苗的抗原性损失较大。CFRV 疫苗适宜于 4℃ 保存。

疫苗的有效期是根据它在某种保存条件下的稳定性和能保持它的免疫效力的最长期限而定。根据当前国内防治草鱼出血病的情况和本试验的结果，我们认为 CFRV 疫苗在 4℃ 保存时的有效期为 8 个月，室温下(28℃)有效期为 8d。

2. 一般认为佐剂能使抗原在鱼体内缓慢持续地释放，增强巨噬细胞和浆细胞的活性，加快抗体的生成，从而提高免疫效果<sup>[7]</sup>，但有的学者却持反对意见，他们认为佐剂没有明显的增效作用，甚至还会产生佐剂病。本试验证明，不完全弗氏佐剂能比较明显地增强 CFRV 疫苗的免疫效果，它能使免疫后的草鱼获得较高的血清中和抗体，较大地提高 CFRV 疫苗的免疫保护力，生产性试验也证明了它的这种增效作用。本试验也表明氢氧化铝凝胶佐剂的增效作用不明显，与 Dunier(1983, 1984)<sup>[8,9]</sup> 和 Horne *et al.* (1984) 的试验结果较吻合。我们认为 CFRV 疫苗对草鱼出血病的保护作用是刺激鱼体产生体液免疫和细胞免疫综合作用的结果，细胞介导的致敏反应在草鱼免疫应答中占有一定的地位，IFA 不仅具有 Al(OH)<sub>3</sub> 一样延缓免疫原在机体内存留的时间，使之持续缓慢释放刺激鱼体产生体液免疫的机理，而且还能增强细胞介导的致敏反应能力，产生更有效的保护性免疫作用。另一方面，氢氧化铝作为免疫吸附剂，它的免疫增效作用与其乳化状态、pH 及吸附活性等因素相关，本试验所使用的氢氧化铝佐剂只是一个生产厂家的产品，因此尚不

能完全否定它的增效作用。关于这个问题还待进一步研究。

3. 我们曾报告用 CFRV 疫苗免疫草鱼后，第 20d 时其血清中和抗体水平达到峰值，该峰值水平可持续 10d 左右，到第 30d 开始缓慢下降。从本试验的结果进一步看到，当草鱼的免疫应答水平第 30d 开始下降时予以加强免疫，血清中和抗体水平则又明显地提高，其免疫保护力也显著地高于一次免疫者。这一结果不仅证明了草鱼和其它一些鱼类一样<sup>[10,11]</sup>具有免疫回忆反应，而且也表明两次免疫能使草鱼获得比较牢固的免疫保护。这样就提示了一条增强 CFRV 疫苗免疫效果的途径。虽然在生产上进行两次注射的方法是不可取的，但是我们亦可通过 CFRV 疫苗的其它给予途径予以加强。

### 参 考 文 献

- [1] 杨先乐。草鱼出血病细胞培养灭活疫苗研究初步报告。淡水渔业, 1986,(3): 1—5。
- [2] 杨先乐、夏春、左文功。草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究——疫苗株的免疫原性及其有效免疫剂量。水产学报, 1989,(2): 138—144。
- [3] 杨先乐、左文功、陈远新。草鱼出血病细胞灭活疫苗的研究——疫苗株的保藏。淡水渔业, 1990,(4): 1—3。
- [4] Horne M T. The effect of the use of potassium alum adjuvant in vaccines against vibriosis in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Fish. Dis.*, 1984, 7(2): 91—99.
- [5] Krantz G E, Reddecliff J M, Heist C E. Development of antibodies against *Aeromonas salmonicida* in trout. *J. Immunol.*, 1963, 91: 757—760.
- [6] Dorson M. Applied immunology of fish. In Symposium on Fish Vaccination (P. de Kinkelin Ed.), Paris, 1984: 20—22, 39—74.
- [7] Stephen G N, John J M. Immunization of salmonids against Furunculosis. *Fish. Path.*, 1985, 20(2/3): 403—411.
- [8] Dunier M. La production d'anticorps sériques chez La truite Arc-en-Ciel (*Salmo gairdneri* Richardson): influence du rappel et des adjuvants. These presentée à L' Institut National Agronomique Paris-Grignon. 1983.
- [9] Dunier M. Absence of anamnestic response to DNP-Hemocyanin and DNP-Ficoll in rainbow trout. In Proceedings of the Fish immunology Symposium, 11—13 July 1984, Plymouth.
- [10] Anderson D P, et al. Investigations of immunological memory in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to DNP conjugates. *Dev. Comp. Immunol., Supplement*, 1982, 2: 115—122.
- [11] Larmers C H J, De Haas M J H, Van Muiswinkel W B. The reaction of the immune system of fish to vaccination: Development of immunological memory in carp, *Cyprinus carpio* L., following direct immersion in *Aeromonas hydrophila* bacterin. *J. Fish. Dis.*, 1985, 8: 253—262.

# INACTIVATED VACCINE OBTAINED THROUGH CELL CULTURE FOR HEMORRHAGE OF GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLA*): THE STABILITY OF VACCINE AND INFLUENCE OF ADJUVANTS AND BOOSTER IMMUNIATION ON THE IMMUNE RESPONSE

Yang Xianle and Zuo Wengong

(Yangtze River Fisheries Research Institute, Shashi 434000)

## Abstract

The stability of the vaccine is relatively high. After 8 months' storage at 4°C, the antiserum neutralization titre (ANT) were  $119.2 \pm 8.8$  (2), and was not significantly different from that at start of storage period; the relative protection of grass carp immunized with the vaccine was 83.6%. After a storage period of 8 days at 28°C, the ANT and relative protection remained the same as those at start of the storage period. The incomplete Freund's adjuvant enhanced the immune effect of the vaccine. Both relative and ANT in the booster immunized grass carp were significantly different from those in the single immunized group.

**Key words** Hemorrahage of grass carp, Inactivated vaccine obtained through cell culture, Stably, Adjuvant, Booster