

草鱼对 CFRV 疫苗免疫应答的研究

杨先乐 曾令兵

(中国水产科学研究院长江水产研究所, 沙市 434000)

提 要 本文研究了草鱼对 CFRV 疫苗的免疫应答水平、规律性、免疫效应期及免疫持久性。用该疫苗免疫后的草鱼能产生很强的应答反应,免疫保护力可达 80% 以上,血清中和抗体效价非常明显地高于对照组。它的免疫效应期在 5 天以内,第 10 天血清中和抗体达到较高水平,第 20 天处于峰值,并可维持 20 余天,以后在第 10 天的水平上波动。草鱼对 CFRV 疫苗的免疫持久性在 13 个月以上。

关键词 草鱼, CFRV 疫苗, 免疫应答, 效应期

应用疫苗预防鱼类疾病,国外从四十年代初就开始进行研究[Duff, 1942],取得了一些进展,目前已有一些商品性疫苗上市[杨先乐, 1986b]。八十年代末 Gilmore 等[1988]又成功地研制出了传染性造血器官坏死症基因工程疫苗,使鱼用疫苗的研究步入了一个新的阶段。以上一些研究大多集中于疫苗制备和应用效果等方面,对其被免疫者免疫应答的特性尚无较多的涉及。

使用草鱼出血病细胞培养灭活疫苗(CFRV 疫苗)是预防草鱼出血病的一个有效途径[杨先乐等, 1986; 1989]。但是目前对该疫苗免疫后的草鱼免疫应答的总体水平、规律、免疫效应期及其免疫持久性尚无系统的报道。为了探索草鱼免疫应答的特点,为生产上合理、有效地免疫接种提供理论依据,我们对 CFRV 疫苗免疫草鱼后的应答状况进行了较全面的研究。本文报告了这一研究结果。

一、材料与方 法

1. 疫苗、试验鱼及其免疫接种 CFRV 疫苗参照杨先乐等[1986; 1989]的方法制备和检定;试验鱼为在网箱中暂养了一星期 10cm 左右的健康一龄或二龄草鱼种;以腹腔注射或高渗浸渍的方法进行免疫接种[杨先乐等, 1992]。

2. 免疫应答水平 以 CFRV 疫苗注射免疫 16 组一龄草鱼和 16 组二龄草鱼,高渗浸泡免疫 5 组一龄草鱼(每组 40 尾左右),并设立未免疫的草鱼作对照,测定免疫 20 天后的血清中和抗体效价(能保护 50% 的细胞不产生病变的最高血清稀释度的倒数)和强毒攻击后的免疫保护力[免疫保护力 = (试验组成活率 - 对照组成活率) / 对照组死亡率]。统计分析后,评价它们的免疫应答水平。

3. 免疫应答的一般规律 用 CFRV 疫苗注射免疫草鱼若干组。分别在免疫后的第 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80 和 105 天后测定其血清中和抗体效价和免疫保护力,以

此探索免疫应答变化的规律。用 CFRV 疫苗免疫 1 个月后的草鱼,再次用该疫苗进行一次加强免疫,1 个月后测定它们的血清中和抗体效价,并将其与初次免疫后 1 个月和 2 个月后的草鱼血清中和抗体效价相比较,确定其有否免疫回忆反应。

4. 免疫效应期 免疫后初期的水温状况,是决定草鱼免疫应答发生与否的重要因素(杨先乐、左文功,1990)。本试验根据免疫后的草鱼处在免疫临界温度(10°C)之上,能使免疫应答发生的最短时间确认为免疫效应期。根据二次试验免疫后第 5,10,20,30,40 天后的血清中和抗体效价统计分析的结果,判断其免疫应答发生与否。本试验设立 5 个组。A 组:免疫后一直置于免疫临界温度之上;B、C 组:免疫后第 5,10 天置于免疫临界温度之上,此后一直置于免疫临界温度之下;D 组:免疫后一直于免疫临界温度之下。E 组:未免疫的对照。

5. 免疫持久性 90 年 3 月 20 日用 CFRV 疫苗注射免疫二龄草尾 1027 尾,套养于 866 平方米的成鱼塘中,并取未免疫的同等数量的草鱼,放养于相邻同等条件的成鱼塘作。分别于 0,2,5,8,13 个月后从各塘中随机取 40 尾鱼测定免疫保护力和血清中和抗体效价,并将第 13 个月的结果与第 2 个月后的结果进行比较,确定它们的免疫持久性。

二、结 果

(一) 免疫应答水平

对 CFRV 疫苗的免疫应答水平如表 1 所示。16 组次的注射免疫试验结果揭示,无论是一龄草鱼还是二龄草鱼,它们用 CFRV 免疫后的免疫保护力均可达 80% 以上,血清中和抗体效价均非常明显地高于对照组。浸泡免疫的结果也证明,草鱼对 CFRV 疫苗能产生很强的免疫应答。

表 1 草鱼对 CFRV 疫苗的免疫应答水平

Table 1 The immune response of grass carp to vaccine CFRV

| 免疫途径 | 免疫对象 | 免疫保护力 (%) | 血清中和抗体效价 | | |
|------|------|--------------------------|----------------------|---------------------|-----------------|
| | | | 免疫组 | 对照组 | 二者比较 (t 检验) |
| 注 射 | 一龄草鱼 | $83.6 \pm 9.8(16)^{[1]}$ | $196.2 \pm 85.8(16)$ | $10.0 \pm 5.9(16)$ | $P < 0.05^{**}$ |
| | 二龄草鱼 | $87.5 \pm 11.3(16)$ | $152.0 \pm 81.7(16)$ | $11.6 \pm 10.7(16)$ | $P < 0.05^{**}$ |
| 高渗浸泡 | 一龄草鱼 | $73.9 \pm 8.3(3)$ | $109.3 \pm 24.8(5)$ | $3.8 \pm 1.0(2)$ | $P < 0.05^{**}$ |

注:角标[1]为平均数±方差(试验次数); **示差异非常显著。

(二) 免疫应答水平变化的一般规律

以 CFRV 疫苗免疫草鱼后,第 5 天草鱼的血清中和抗体效价还很低($26.0 \pm 3.2(6)$),第 10 天剧增到 $123.7 \pm 17.8(6)$,第 20 天达到最高水平($228.1 \pm 50.3(6)$)。以后 20 余天,血清中和抗体水平虽有下降,但基本维持在这个水平上[第 25, 30, 40 天时分别为 $209.4 \pm 33.6(3)$, $195.6 \pm 27.2(6)$, $175.0 \pm 34.8(4)$]。第 50 天血清中和抗体水平回复到

(1) 杨先乐、左文功,1990。水温对草鱼免疫应答的影响。中国水产科学研究院学报,3(1):29—34。

第 10 天的水平〔 $115.1 \pm 40.9(4)$ 〕,以后又在这个水平上波动,直到第 105 天〔第 60,80,105 天时分别为 $128.0 \pm 0(2)$, $89.1 \pm 0(2)$, $134.9 \pm 31.8(4)$ 〕(图 1)。从抗强毒攻击的免疫保护力看,也基本上与血清中和抗体效价相平行,第 10 天为 $77.1 \pm 8.9(3)\%$,第 20,30,40 天时分别为 $84.4 \pm 9.3(7)\%$, $86.3 \pm 10.9(6)\%$, $83.4 \pm 8.8(5)\%$,第 50 天稍有下降〔 $83.3 \pm 12.9(2)\%$ 〕,第 105 天时降到 79.6% (图 1)。

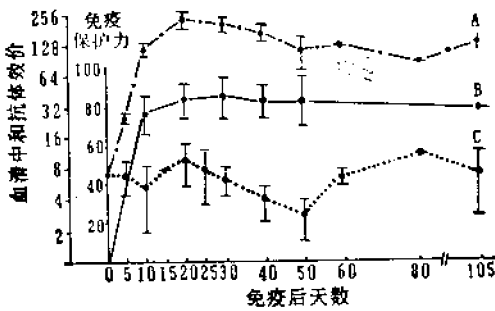


图 1 草鱼对 CFRV 疫苗免疫应答的一般规律

Fig. 1 The general pattern of immune response of grass carp immunized with vaccine CFRV

A. 免疫组血清中和抗体效价; B. 免疫组免疫保护力; C. 对照组血清中和抗体效价。

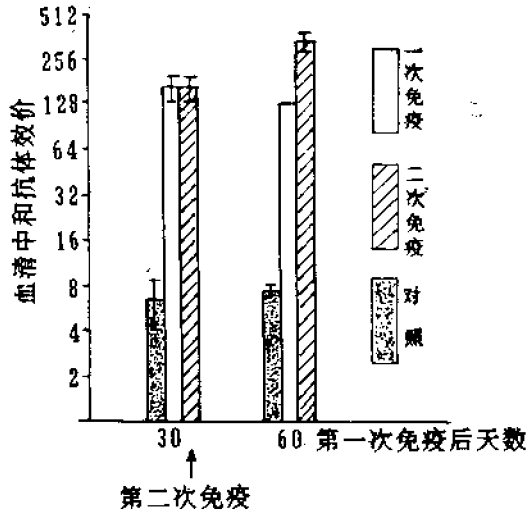


图 2 加强免疫后的草鱼血清中和抗体效价与一次免疫者的比较

Fig. 2 Comparison of antiserum neutralization titre of grass carp between single and booster immunization

图 2 比较了一次免疫和二次免疫对草鱼免疫应答的影响。一次免疫的草鱼,血清中和抗体效价由免疫后第 30 天的 $163.5 \pm 43.5(2)$ 下降到第 60 天的 $128.0 \pm 0(2)$,而在一次免疫后第 30 天给予一次加强免疫,第 60 天时血清中和抗体效价却上升到 $326.3 \pm 63.9(2)$,与一次免疫者相比,有非常显著的区别($P < 0.05$)。

(三) 免疫效应期

图 3 比较了 CFRV 疫苗免疫后前 5 天、10 天和一直处在免疫临界温度之上或之下的草鱼的应答反应。试验表明,在整个试验期间一直处在免疫临界温度之下的 D 组,免疫应答基本不发生,血清中和抗体水平在低水平上徘徊〔第 5,10,20,30,40 天分别为 $5.6 \pm 1.0(2)$, $22.5 \pm 8.5(2)$, $7.7 \pm 3.0(2)$, $22.0 \pm 0(2)$, $13.3 \pm 0(2)$ 〕,仅略高于未免疫的对照组。而免疫后仅在免疫临界温度上饲养了 5 天的 B 组,与饲养了 10 天的 C 组和一直饲养在免疫临界温度之上的 A 组一样,不仅能产生较强的免疫应答反应,而且其血清中和抗体变化的规律与后二者基本相同:第 5 天其血清中和抗体效价分别为 $32.0 \pm 0(2)$ (B 组), $32.0 \pm 0(2)$ (C 组), $14.5 \pm 1.5(2)$ (A 组),到第 10 天均急剧上升,分别达 $140.0 \pm 9.1(2)$, $122.8 \pm 7.4(2)$, $108.6 \pm 19.5(2)$,到第 20 天达到峰值: $270.2 \pm 25.7(2)$, 197.3 ± 76.2

(2), $217.0 \pm 39.0(2)$ 。第 30 天有的虽稍微下降,但都基本上保持在原有水平[B、C、A 组分别为 $183.4 \pm 0(2)$, $186.5 \pm 3.5(2)$, $217.0 \pm 39.0(2)$]。第 40 天时都下降到第 10 天的水平上[分别为 $145.7 \pm 6.2(2)$, $137.7 \pm 56.7(2)$, $128.0 \pm 0(2)$]。E 组为未免疫草鱼体内的血清中和抗体水平变化情况,其血清中和抗体最高水平低于 $7.0 \pm 0(2)$ 。

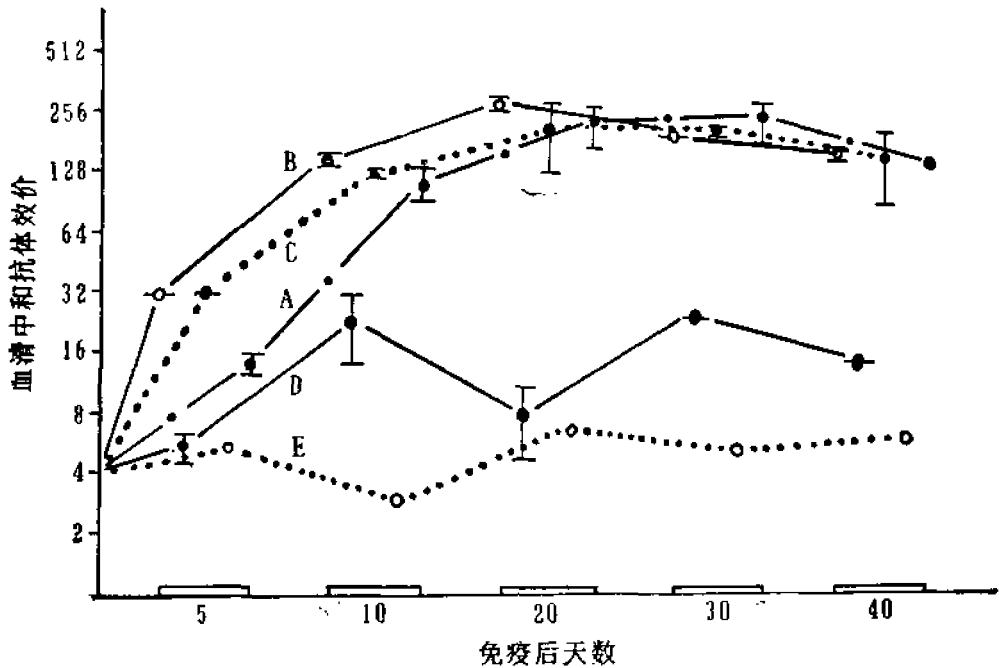


图 3 草鱼对 CFRV 疫苗的免疫效应期

Fig. 3 The effective phase of grass carp immunized with vaccine CFRV

注: 图中的 A、B、C、D、E 均为组别。

(四) 免疫持久性

CFRV 疫苗免疫的草鱼, 第 2 个月后免疫保护力达 87.5%, 血清中和抗体效价为 $117.4 \pm 60.3(3)$, 到第 8 个月其免疫保护力和血清综合抗体效价仍为 86.9 和 $116.4 \pm$

表 2 草鱼对 CFRV 疫苗免疫应答的持久性

Table 2 The continuance of immune response of grass carp immunized with vaccine CFRV

| 免疫后月数 | 免 疫 组 | | | 对 照 组 | |
|-------|--------|--------------|---------------------|--------|-------------------|
| | 存活率(%) | 免疫保护力(%) | 血清中和抗体效价 | 存活率(%) | 血清中和抗体效价 |
| 0 | | | $8.0 \pm 2.5(3)$ | | $8.0 \pm 2.5(3)$ |
| 2 | 88.9 | 87.5 | $117.4 \pm 60.3(3)$ | 11.1 | $7.3 \pm 3.2(3)$ |
| 5 | 86.7 | 76.4 | $127.4 \pm 33.3(3)$ | 43.7 | $9.0 \pm 4.5(3)$ |
| 8 | 88.9 | 86.9 | $116.4 \pm 19.8(3)$ | 15.4 | $9.8 \pm 7.0(3)$ |
| 13 | | | $74.3 \pm 5.3(3)$ | | $17.1 \pm 4.6(3)$ |
| | | 第13个月与第2个月比较 | $0.4 > P > 0.3$ | | $0.1 > P > 0.05$ |

19.8(3)。第13个月后血清中和抗体水平虽下降到 $74.3 \pm 5.3(3)$,但仍非常显著地高于对照组($P < 0.01$),具较高水平,与免疫后的第2个月相比,没有显著差异($0.4^{-5} > 0.3$) (表2)。

三、讨 论

1. 鱼类虽是低等脊椎动物,但仍具有较强的免疫应答反应。Song和Kou [1981]用灭活的爱德华氏菌苗(*Edwardsiella tarda*)免疫鳊鱼后其凝集抗体可达1:4096; Tatner & Horne [1983]研究了鳊弧菌苗对硬头鳊幼鱼的免疫保护力,发现用浸泡免疫者可达50%,而注射免疫者可达100%;用经超滤膜过滤浓缩的红嘴病菌苗浸泡免疫硬头鳊,70天后以强毒攻击,免疫组的死亡率仅10%,而对照组达72% [Bullock和Anderson, 1984]。从我们的试验也可看到,用CFRV疫苗注射免疫草鱼后,免疫保护力在80%以上,即使采用浸泡的方法免疫,免疫保护力也有 $73.9 \pm 8.3(3)\%$,它们的血清中和抗体效价都非常明显地高于对照组。这一结果说明了草鱼跟其它鱼类一样,有较强的免疫应答能力和较高的免疫应答水平。另一方面,也说明了CFRV疫苗具有较强的抗原性,能刺激草鱼产生较强的免疫应答,使草鱼获得对草鱼出血病的免疫保护力。由此证明用CFRV疫苗预防草鱼出血病是一条可靠的途径。

2. 进行草鱼免疫效应期的研究,有利于疫苗合理、有效地使用。以往人们对免疫效应期的确定,都以鱼体免疫后抗体达到较高水平或具有抗攻击免疫保护力所需的时间而定 [林青龙, 1982]。我们认为,这不够确切。有时鱼体体液免疫或细胞免疫的水平虽然较低,免疫保护力不高,但机体已开始对免疫原产生效应。正如Anderson [1974]所说,这期间是激发机体产生机制活动的过程。有了这个过程,就能产生正常的免疫应答。试验揭示,免疫后的草鱼在免疫临界温度之上仅保持5天,草鱼已对免疫原(CFRV疫苗)产生免疫应答。尽管以后温度降至免疫临界温度之下,其抗体的合成与释放、病原的捕获与清除与一直饲养在免疫临界温度之上的草鱼一样照样进行。因此我们认为,草鱼对CFRV疫苗的效应期在5天以内。这一结果也提示我们,在结合冬放用CFRV疫苗对草鱼进行免疫预防时只要环境水温在免疫临界温度(10°C)之上5天,即可获得较好的免疫效果。

3. 鱼类对免疫原产生效应之后,在肾脏和脾中即会产生相应的抗体,释放到血液中,并逐渐达到峰值 [Dorson, M., 1984.]。Dixon & Hill [1983]用灭活的传染性造血器官坏死症病毒疫苗免疫硬头鳊后,第2周才发现血清中有中和抗体,以后逐步上升,第8周时达到高峰。我们的试验也发现,CFRV疫苗免疫的草鱼,第10天血清中和抗体效价才达到较高水平,第20天时处于峰值,第30天开始缓慢下降,直至第105天仍基本上保持在第10天的水平上。免疫保护力也基本上与此相平行。由此可以看出,草鱼跟其它鱼类一样,抗体形成期较长,滴度增高也较缓慢,且维持期较长。另一方面,草鱼也正如鲤鱼、鲫鱼、鲢鳊鱼类一样具有免疫回忆反应。当第一次免疫后第30天,血清中和抗体开始下降时予以加强免疫,第60天后则出现另一高峰,并与一次免疫的抗体效价相比较,有非常显著的差别。这一结果与O'Neill [1980]和Dunier [1984]对硬头鳊鱼予以加强免疫

后二次应答与初次应答抗体效价没有区别的结论是相佐的。我们认为鱼类种属之间遗传性状的差异是造成这一相反结果的原因。

4. 免疫持久性是鱼类免疫应答的一个重要特性,它既与机体自身的遗传性状息息相关,也与免疫原的性质、免疫接种的途径及环境状况有关。Kenji 和 Riichi [1985]用弧菌苗口服免疫香鱼,认为免疫有效期至少达 59 天;而见奈美[1985]用浸泡的方法免疫,其免疫有效期可达 90 天以上;林青龙[1982]用同样的方法免疫遮目鱼,免疫效力则可高达 5 个月。进而, Ross 和 Klontz [1965]用疳疮病菌苗口服免疫硬头鲮,他们认为硬头鲮的免疫持久期可以达到 408 天。根据本试验,我们认为草鱼对 CFRV 疫苗的免疫效应在 13 个月以上。CFRV 疫苗能导致草鱼产生这种持久的免疫效果,我们认为其原因在于,①中和抗体可在草鱼机体内维持较长的时间(实验室试验在 105 天以上);②免疫后的草鱼可能经常受到自然界病毒抗原的侵袭,在清除病毒的过程中,无形中又对它们予以了一次又一次的免疫加强,而使其免疫效力持久不息。这一结果为 CFRV 疫苗在生产上的应用提供了可靠的保证。

参 考 文 献

- [1] 杨先乐,1989. 鱼类免疫学研究进展. 水产学报,13(3):271—284.
- [2] 杨先乐等,1986. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗研究初步报告. 淡水渔业,(3):1—5.
- [3] 杨先乐等,1989. 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的比较. 水产学报,13(2):138—144.
- [4] 杨先乐等,1992. 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的研究—生产性试验. 水产科技情报,19(1):10—14.
- [5] 林青龙,1982. 再探讨 HIVAX *Vibrio anguillarum* 疫苗免疫虱目鱼(*Chanos chanos*)鱼苗的效果. 农发会渔业特刊第八号(台刊). 鱼病研究专集(四):80—83.
- [6] 见奈美,1985. アエのピリオ病ククテンにフびて. 养殖,2:53—56.
- [7] Anderson, D. P., 1974. *Fish Immunology* 125—140. T. F. H. Publications, Inc. Ltd.
- [8] Bullock, G. J. & D. P. Anderson, 1984. Immunization against *Yersinia ruckeri* cause of enteric redmouth disease. *Symposium on Fish Vaccination* (P. de Kinkelin Ed.), O. I. E., Paris, Feb. 151—166.
- [9] Dixon, P. F. & B. J. Hill, 1983. Inactivation of infectious pancreatic necrosis virus for vaccine use. *J. Fish Dis.*, 6: 399—409.
- [10] Dorson, M., 1984. Applied immunology of fish. *Symposium of Fish vaccination* (P. de Kinkelin, Ed.). O. I. E., Paris, Feb. 20—24.
- [11] Duff, D. C. B., 1942. The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. *Journal of Immunology*, 44: 87—94.
- [12] Dunier, M., 1984. Absence of anamnestic response to DNP-Haemocyanin and DNP-Ficoll in rainbow trout. *Proceedings of the Fish Immunology Symposium*, 11—13 July 83, Plymouth.
- [13] Gilmore, R. D. Jr. et al., 1988. Expression in *Escherichia coli* of an epitope of the glycoprotein of IHNV protects against virus challenge. *Biotechnology*, 6: 295—300.
- [14] Kenji, K. & K. Riichi, 1985. Field testing of oral *Vibrio anguillarum* bacterin in pond-cultured Ayu. *Fish Pathology*, 20(2/3). 413—419.
- [15] O'Neill, J. G., 1980. Temperature and the primary and secondary immune responses of three teleosts, *Salmo trutta*, *Cyprinus carpio* and *Notthenius rossii*, to MS2 bacteriophage. *Phylogeny of Immunological Memory*. M. J. Manning, Ed
- [16] Ross, A. J. & G. W. Klontz, 1965. Oral immunization of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) against the etiologic agent of "redmouth disease". *J. Fish. Res. Board Can.*, 22(3), 713—719.
- [17] Song, Y. L. & G. H. Kou, 1981. Immune response of eels (*Anguilla japonica*) against *Aeromonas hydrophila* and *Edwardsiella anguillimortiferum* (*E. tarda*) infection. *Proc. Repub. of China. U. S.*

Coop. Sci. Seminar on Fish Dis. Nat. Sci. Conn. Series No. 3 107—115.

- [18] Tatner, M. F. & M. T. Horne, 1983. Susceptibility and immunity to *vibrio anguillarum* in post-hatching rainbow trout fry, *Salmo gairdneri* Richardson 1836. *Dev. Comp. Immunol.*, 7(3), 465—472.

THE IMMUNE RESPONSE OF GRASS CARP IMMUNIZED WITH VACCINE CFRV

Yang Xianle and Zeng Lingbing

(*Changjiang Fisheries Research Institute, CAFS, Shashi 434000*)

ABSTRACT The level, regularity, effective phase and continuance of immune response of grass carp immunized with vaccine CFRV were approached in this paper. Strong response, both more than 80% of percent relative protection (PRP) and significantly higher antiserum neutralization titre (ANT) than control, could be produced after immunization. The effective phase of immune response was within five days and the high level of ANT was reached on the tenth day. On the twentieth day, ANT went up to peak level and remained for twenty days then it fluctuated at this level. This research proved that the continuance of immune response of grass carp immunized with vaccine CFRV was beyond thirteen months.

KEYWORDS grass carp, vaccine CFRV, immune response, effective phase