

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

杨先乐 夏春 左文功

(中国水产科学研究院长江水产研究所)

摘要 本文比较了疫苗株 FR-854 和 FR-836-w 的免疫原性,及其对三寸左右草鱼种的有效免疫剂量。疫苗株 FR-854 和 FR-836-w 均有较强的免疫原性,其保护力可达70%以上。但试验结果初步证明,FR-854 疫苗比 FR-836-w 疫苗免疫原性更强。经统计分析,FR-854 疫苗的免疫保护力可达 $88.9 \pm 12.0(6)\%$,血清中和抗体效价为 $160.5 \pm 58.9(6)$;而 FR-836-w 疫苗分别只有 $71.3 \pm 14.2(6)\%$ 、 $88.3 \pm 26.2(6)$;二者有显著的差异($0.05 > P > 0.01$)。注射免疫三寸左右的草鱼种,FR-854 的免疫剂量在 $3-5 \times 10^{4.5}$ TCID₅₀/尾左右,FR-836-w 在 $3-5 \times 10^{7.0}$ TCID₅₀/尾左右,其免疫保护力可达80%左右,同时我们测得 FR-854 的半数免疫量为 $10^{6.1}$ TCID₅₀/ml。

关键词 草鱼出血病,鱼呼肠孤病毒,细胞培养灭活疫苗,疫苗株,免疫剂量

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus* C. et V.)出血病是鱼呼肠孤病毒(FRV)引起的病毒性疾病(中国科学院武汉病毒所,中国水产科学研究院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病研究协作组,1983;1984a;1984b),严重影响着草鱼的成活率,目前尚无理想的防治方法。1985年以来,我们开始对草鱼肾细胞系(GIK)培养的鱼呼肠孤病毒灭活疫苗进行研究,通过对其安全性、免疫原性和抗攻击保护力试验,初步证实了该疫苗防治草鱼出血病的可行性,并且测得草鱼对该疫苗的应答时间(水温28°C左右)为10天,在第20天时,免疫后的草鱼血清中和抗体水平达到峰值,免疫保护力也达到较高水平(杨先乐等,1986)。

对疫苗株的筛选及其抗原性的研究,是制备高效细胞培养灭活疫苗的一个重要方面。但在水产领域,国内外对此报道甚少。疫苗的有效免疫剂量是疫苗的一个重要参数,学者们曾作过一些研究(高汉蛟等,1986⁽¹⁾;De Kinkelin *et al.* 1984),但各具特性。为此我们从十几株野毒株中,初步筛选出二株具有较强免疫原性的病毒株,对其免疫原性进行了详细的比较,并对它们所制备的细胞培养灭活疫苗的有效免疫剂量作了研究。

* 本文承卫生部上海生物制品研究所焦永真教授,中国农科院哈尔滨兽医研究所徐振东副研究员审阅,并提出宝贵意见,在此一并致谢。

收稿年月:1988年8月;同年12月修改。

(1) 高汉蛟等,1986.草鱼出血病GCK-84细胞培养灭活疫苗实验研究,疫苗浓度对出血病免疫力的影响.鱼病简讯,(4):1。

材 料 和 方 法

1. 疫苗的制备与检定 将在 CIK 细胞上增殖稳定的种子毒株 FR-854 和 FR-836-w, 分别接种于已呈单层的 CIK 细胞, 收获后灭活前测定其病毒滴度(TCID₅₀/ml)。疫苗制备和检定参照杨先乐等(1986)所采用的方法。由此所得的细胞培养灭活疫苗, 分别简称为 FR-854 和 FR-836-w 疫苗。病毒灭活前的滴度, 作为确定疫苗免疫剂量的依据。

2. 疫苗的接种及免疫原性测定 采用腹腔注射的方法, 对三寸左右的草鱼种进行免疫(水温 28°C 左右)。疫苗注射量为 0.3—0.5ml, 以测定免疫鱼的免疫保护力和血清中和抗体效价评价疫苗的免疫效果(杨先乐等, 1986)。

3. FR-854 和 FR-836-w 疫苗株免疫原性的比较 用滴度相近、各批次未作任何稀释的 FR-854 和 FR-836-w 疫苗, 分别对草鱼种进行 6 次免疫接种试验(同时设立不注射疫苗的对照组, 以下试验同)。免疫后 20 天左右, 检测中和抗体及保护力, 并将试验结果进行统计分析, 以比较二疫苗株的免疫原性。另一方面, 用无血清的 Eagle's MEM 准确将 FR-854 和 FR-836-w 疫苗稀释成同一滴度后, 同时免疫一冬龄草鱼或当年草鱼, 20 天后, 比较其免疫原性。

4. 疫苗有效免疫剂量和半数免疫量的测定 用无血清的 Eagle's MEM 将 FR-854 疫苗或 FR-836-w 疫苗作序列稀释后, 同时免疫一冬龄草鱼, 然后根据免疫 20 天后的免疫效果, 衡量疫苗的有效免疫剂量和半数免疫量。

试 验 结 果

一、疫苗株免疫原性的比较

用滴度基本接近的各批次 FR-854 和 FR-836-w 疫苗, 不进行任何稀释, 直接免疫一冬龄或当年草鱼种, 试验统计结果表明, 二疫苗对草鱼出血病均有一定的抗攻击保护作用, 免疫保护力分别为 $88.9 \pm 12.0(6)\%$ 、 $71.3 \pm 14.2(6)\%^{**}$ 。它们的中和抗体效价分别达 $160.5 \pm 58.9(6)$ 、 $88.3 \pm 26.2(6)^*$, 与对照组有极其显著的差别(P 值均小于 0.001)(表 1)。但是 FR-854 疫苗与 FR-836-w 疫苗相比, 前者的免疫原性显著高于后者, 无论从免疫保护力还是血清中和抗体水平分析, 二者均有显著的差异(t 检验, $0.05 > p > 0.01$)。

另将 FR-854 疫苗和 FR-836-w 疫苗稀释成同一病毒滴度含量后, 同时免疫一冬龄草鱼 70 尾, 当年草鱼 50 尾, 其结果如表 2。对一冬龄和当年草鱼种, FR-854 疫苗的免疫保护力和血清中和抗体效价都要高于或略高于 FR-836-w 疫苗。

二、疫苗有效免疫剂量

将滴度为 $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml 和 $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml 的 FR-854 疫苗分别稀释成 10^0 、 10^{-1} 、 2×10^{-2} 、 10^{-2} 和 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} , 使其最终含量为 $10^{7.5}$ 、 $10^{6.5}$ 、 $2 \times 10^{5.5}$ 、 $10^{5.5}$ 、 $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml, 然后分成二组免疫一冬龄的草鱼种。试验结果表明, 免疫剂量在 $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml($\times 0.3$ — 0.5 ml)以上的 FR-854 疫苗, 保护力均在 80% 以上, 血清中和抗体水平也较高; 当免疫剂量下降到 $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml($\times 0.3$ — 0.5 ml)时, 免疫效果明显下降, 免疫保护力只有 6%, 血清中和抗体效价也下降到 $12.2 \pm 14.4(2)$, 基本上保持在对照水平(表 3)。同时, 根

表1 各批次未稀释的近滴度 FR-854 和 FR-836-w 疫苗免疫原性比较
Table 1 Comparison of immunogenicity between FR-854s and FR-836-ws which were delivered at approximate doses

疫苗名称	疫苗批号	试验尾数 (免疫组/ 对照组)	免疫组		对照组		免疫保护力** (%)
			存活率 (%)	血清中和* 抗体效价	存活率 (%)	血清中和* 抗体效价	
FR-854	7-1	100/100	95.0	256.0	0	99.8	95.0
	8-1	50/50	70.0	74.8	0	5.6	70.0
	9-1	150/150	90.0	149.7	15	98.0	88.2
	10-1	55/55	96.4	189.1	43.6	—	80.1
	10-2	70/295	100.0	149.7	0	11.2	100.0
	11-1	50/50	100.0	149.7	16.7	18.8	100.0
	检测统计 $\bar{X} \pm S.D.(N)$		91.9 ± 11.4(6)	160.5 ± 58.9(6)	12.6 ± 17.1(6)	22.7 ± 15.5(5)	88.9 ± 12.0(6)
FR-836-w	5-1	50/170	70.0	89.1	21.4	8.0	64.6
	5-2	75/78	83.0	89.3	0	11.2	83.0
	5-3	17/17	88.2	128.0	31.2	4.0	83.8
	23-1	45/50	60.0	45.2	0	5.6	60.0
	23-2	50/50	60.0	89.1	16.7	18.8	52.0
	24-1	104/150	85.7	89.1	6.7	38.0	84.6
	检测统计 $\bar{X} \pm S.D.(N)$		74.5 ± 12.9(6)	88.3 ± 26.2(6)	12.7 ± 12.6(6)	14.3 ± 12.8(6)	71.3 ± 14.2(6)
FR-854 与 FR-836-w 比较				0.05 > p > 0.01			0.05 > p > 0.01

* 血清中和抗体效价:能保护 50%的细胞不产生病变的最终血清稀释度的倒数。

** 免疫保护力(%) = $(1 - \frac{\text{试验组的死亡率}}{\text{对照组的死亡率}}) \times 100$

表2 稀释成同滴度的 FR-854 疫苗与 FR-836-w 疫苗免疫原性的比较
Table 2 Comparison of immunogenicity between FR-854 and FR-836-w which were diluted to the equal titre with Eagle's MEM

试验日期			1987年7月7日~8月28日	1987年8月14日~9月15日
免疫对象			一冬龄草鱼种	当年草鱼种
疫苗滴度 Titre(TCID ₅₀ /ml)			10 ^{7.7}	10 ^{7.5}
FR-854 疫苗*	免疫保护力	存活尾数/试验尾数	7/10	10/10
		存活率(%)	70	100
		免疫保护力(%)	70	100
血清中和抗体效价			74.8	112.4
FR-836-w 疫苗**	免疫保护力	存活尾数/试验尾数	6/10	6/10
		存活率(%)	60	60
		免疫保护力(%)	60	52
血清中和抗体效价			45.2	97.5
对 照		存活尾数/试验尾数	0/10	2/12
		存活率(%)	0	16.7
		血清中和抗体效价	5.6	11.1

* 经适当处理后使用前在 4℃ 冰箱中已分别保存 111天和 150天。

** 经适当处理后使用前在 4℃ 冰箱中已分别保存 111天和 139天。

据表 3 的试验结果,我们初步得到 FR-854 疫苗的半数免疫量为 $10^{5.4}TCID_{50}/ml$ 。

表 4 是 $10^{8.5}$ 和 $10^{7.5}TCID_{50}/ml$ ($\times 0.3-0.5ml$) 两种免疫剂量的 FR-836-w 疫苗对一冬龄草鱼种的免疫效果的比较。结果表明,当免疫剂量下降到 $10^{7.5}TCID_{50}/ml$ ($\times 0.3-0.5ml$) 时,该疫苗的免疫保护力下降到 $56.0 \pm 5.7(2)\%$, 血清中和抗体效价也相应降低。经 t 测验,它的免疫保护力与 $10^{8.5}TCID_{50}/ml$ ($\times 0.3-0.5ml$) 剂量的给予组有比较显著的区别 ($0.1 > p > 0.05$)。

表 3 不同给予剂量的 FR-854 疫苗的免疫效果

Table 3 Immunity of vaccine FR-854s which were delivered at different dose

试验日期	检测项目		疫苗给予剂量($TCID_{50}/ml \times 0.3-0.5ml$)					对 照
			$10^{7.5}$	$10^{6.5}$	$2 \times 10^{5.5}$	$10^{5.5}$	$10^{4.5}$	
1987年5月18日—7月1日	实际稀释度		10^0	10^{-1}	2×10^{-2}	10^{-2}		
	免疫保护力	存活尾数/试验尾数	8/9	13/13	13/15	F*		0.15
		存活率(%)	88.9	100	86.7	F*		0
		保护力(%)	88.9	100	86.7	F*		
血清中和抗体效价 $\bar{X} \pm S.D(N)$		$106.9 \pm 60.5(2)$	$112.3 \pm 52.8(2)$	$115.8 \pm 39.4(2)$	$89.1 \pm 0(2)$		$16.3 \pm 7.2(2)$	
1987年6月19日—7月24日	实际稀释度			10^0		10^{-1}	10^{-2}	
	免疫保护力	存活尾数/试验尾数		53/55		53/55	26.55	24.55
		存活率(%)		96.4		96.4	47.2	43.6
		保护力(%)		80.1		80.1	6.0	
血清中和抗体效价 $\bar{X} \pm S.D(N)$			$180.3 \pm 4.0(2)$		$163.5 \pm 50.2(2)$	$12.2 \pm 74.4(2)$	11.2	

* 因故障未获得数据。

表 4 两种给予剂量的 FR-836-w 疫苗的免疫效果

Table 4 Immunity of vaccine FR-836-w which were delivered at two different dose

疫苗给予剂量 (剂量*/实际稀释度)	免疫保护力(%)	血清中和抗体效价	对 照	
			存活率(%)	血清中和抗体效价
$10^{8.5}/10^0$	$92.3 \pm 10.9(2)$	$172.6 \pm 89.5(2)$	$8.3 \pm 11.8(2)$	$8.4 \pm 3.9(2)$
$10^{7.5}/10^{-1}$	$56.0 \pm 5.7(2)$	$71.3 \pm 37.0(2)$		
t 测验	$0.1 > p > 0.05$	$0.3 > p > 0.2$		

* $TCID_{50}/ml \times (0.3-0.5ml)$

讨 论

1. 自 Duff(1942)率先报告使用疫苗防治鱼类疔疮病以来,已有四十多年的历史,但是鱼用疫苗的使用还相当有限,研究进展也比较缓慢,尤其是鱼类病毒疫苗,至今仍处在探索之中,即使目前工作做得较多的病毒性出血性败血症(VHS)疫苗,也还处在实验室试验阶段,尚无商品性疫苗投入使用(De Kinkelin *et al.* 1984)。尽管如此,国外对鱼

用疫苗的研究仍很火热,也取得了不少成就,初步展示了鱼用疫苗的应用前景。我国关于鱼用疫苗的研究起步较晚,应用尚处于空白(不考虑组织浆疫苗)。从我们的研究结果可以看出,无论是FR-854疫苗,还是FR-836-w疫苗,都能获得较理想的免疫效果,这就进一步证明了用免疫预防的方法防治草鱼出血病是一条很有希望的途径。

2. Dorson (1984)在概述鱼类应用免疫学时说,免疫原的质和量是判断一种疫苗好坏的重要根据之一;一种疫苗成功与否,很大程度上决定该抗原能否诱导鱼体产生保护性抗体。因而筛选具有强抗原性的疫苗株是进行鱼类疫苗研究的一个重要方面,它不仅能提高疫苗的免疫效果,而且也能降低疫苗的成本,为疫苗实际应用和商品化生产奠定基础。我们从分离到的十几株野毒株中,初步筛选出FR-854和FR-836-w疫苗株,通过对二毒株所制备的疫苗免疫接种后的抗体应答及抗攻击保护作用比较观察,初步证实了FR-854比FR-836-w疫苗株的免疫原性更强。

FR-854与FR-836-w毒株于不同年份采集于湖北荆沙地区,关于其免疫原性差异的原因我们正在深入研究之中。

3. 以病毒灭活前的滴度作为疫苗免疫剂量的参考标准,我们认为是一个可行又较合理的方法。De Kinkelin等(1984)在研究灭活的病毒性出血性败血症疫苗时,曾以此作为确定疫苗免疫剂量的方法,而高汉姣等(1986)在研究疫苗免疫剂量对免疫力的影响时,却把疫苗的稀释度作为疫苗免疫剂量的衡量标准。从我们对FR-854疫苗两个同等稀释度(10^{-2})而不同病毒滴度(灭活前)所获得的不同免疫效果的试验(表3),我们认为以病毒灭活前的滴度作为疫苗免疫剂量的衡量标准较为合适。

疫苗的有效免疫剂量是疫苗的一个重要参数。关于VHSV灭活疫苗,De Kinkelin等(1984)确定以每克鱼体重注射 2×10^6 pfu(空斑形成单位)的给予量时,其成活率可达90%左右,根据试验结果,我们初步认为FR-854疫苗的半数免疫量为 $10^{5.1}$ TCID₅₀/ml。以FR-854疫苗和FR-836-w疫苗对3寸左右的草鱼种注射免疫接种,其免疫剂量分别约为 $10^{5.5}$ TCID₅₀/ml($\times 0.3-0.5$ ml)和 $10^{8.5}$ TCID₅₀/ml($\times 0.3-0.5$ ml),即 $3-5 \times 10^{4.5}$ TCID₅₀/尾和 $3-5 \times 10^{7.5}$ TCID₅₀/尾时,对草鱼出血病的免疫保护力可达80%左右。

分析不同免疫剂量的FR-854疫苗的免疫效果,我们发现 $10^{6.5}$ TCID₅₀/ml似乎比 $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml接种量对草鱼的免疫效果要好一些。同样,表2中也有类似的现象,只保存111天的FR-854疫苗(灭活前病毒滴度为 $10^{7.7}$ TCID₅₀/ml)却比保存了150天(灭活前滴度为 $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml)的该疫苗的免疫保护力和血清中和抗体效价要低。这是因为偶然的异常,还是因为疫苗免疫过程中导致部分免疫耐受性?假若如此,这就提示我们在使用疫苗时要做到免疫剂量适宜。Avtalian(1980)研究鲤鱼的免疫效果时发现,注射过量的牛血清白蛋白会导致免疫耐受。Manning *et al.* (1980)用人类r球蛋白注射1—14日龄的硬头鲮也得到了同样的结果。关于FR-854疫苗能否引起草鱼免疫耐受性的问题,有待于进一步研究。

4. 从试验统计的结果,我们发现草鱼出血病细胞培养灭活疫苗的免疫保护力,大致上与血清中和抗体水平相平行,也就是免疫保护力较高时,血清中和抗体水平也较高。然而有个别时候,却也存在免疫保护力与血清中和抗体水平不一致的现象,这种情况在疮疮病疫苗和弧菌疫苗的研究中也有发现(Michel C. *et al.* 1984)。Smith(1982)提出,疮疮

病疫苗免疫虹鳟后能导致细胞免疫应答, T 淋巴细胞在清除感染菌过程中起着很重要的作用, 然而体液免疫也不容忽视, 它在中和细菌抗原中也很重要。这提示我们, 草鱼出血病细胞培养灭活疫苗对出血病的保护力, 可能是刺激鱼体产生体液免疫和细胞免疫的综合作用的结果。弄清楚二者相互关系的规律, 不仅有助于丰富鱼类免疫学理论, 而且能为评价疫苗的优劣, 提供准确可信的依据。

参 考 文 献

- [1] 中国科学院武汉病毒研究所、中国水产科学研究院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病研究协作组, 1983。草鱼出血病病毒的电镜显微镜观察初报, 淡水渔业, (3): 39。
- [2] 中国科学院武汉病毒研究所、中国水产科学研究院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病研究协作组, 1984a。草鱼出血病病毒精细结构的研究。淡水渔业, (2): 21~22。
- [3] 中国科学院武汉病毒研究所、中国水产科学研究院长江水产研究所沙市分所草鱼出血病研究协作组, 1984b。草鱼出血病病原—鱼呼肠孤病毒核酸特性的研究。淡水渔业, (4): 7~9。
- [4] 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。
- [5] Avtalin R. R. *et al.*, 1980. Regulatory effect of temperature on specific superession and enhancement of the humoral responce in fish. In *Immunological Memory*. Edited by Manning M. J., pp. 113—121, Elsevier/Amsterdam.
- [6] De Kinkelin P. *et al.*, 1984. Immunization against viral diseases occurring in cold warte. In *Symposium on Fish Vaccination*, Edited by pierre de Kinkelin, pp. 167—198.
- [7] Duff D. C. B., 1942. The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. *Journal of Immunology*, 44: 87—94.
- [8] Dorson M., 1984. Applied immunology of fish. In *Immunological Memory*, Edited by Manning M. J., pp. 39—47, Elsevier/ Amsterdam.
- [9] Manning M. J. *et al.*, 1982. Developmental aspects of immunity and tolerace in fish. In *Roberts R. J., Micorobial Diseases of Fish*, Academic press, pp. 31—48.
- [10] Michel C. *et al.*, 1984. Evaluation of the protection activity and economic efficacy of vaccines for fish. In *Symposium on Fish Vaccination*, Edited by Pierre de Kinkelin, pp. 75—96.
- [11] Smith P. D. *et al.*, 1980. Further studies on furunculosis vaccination. In *"Fish Disease" 3rd COPEAQ Session* Edited by Ahne W., Springerverlay, pp. 113—119.

INACTIVE VACCINE FOR HEMORRHAGE OF GRASS CARP: COMPARISON OF IMMUNOGENICITY AND IMMUNIZING DOSE BETWEEN TWO STRAINS

Yang Xianle, Xia Chun and Zuo Wengong

(Changjiang Fisheries Research Institute)

ABSTRACT Vaccine FR-854 and FR-836-w have high immunogenicity and their PRP (percentage relative protection) are both more than 70%. However, it is preliminarily demonstrated that strain FR-854 has much higher immunogenicity than strain FR-836-w by means of measuring the PRP and ANT (antiserum neutralization titre) of vaccinated grass carp with them. It has been obtained that PRP and ANT are $88.9 \pm 12.0(6)\%$ and $160.5 \pm 58.9(6)$ respectively for FR-854, while

71.3 ± 14.2(6)% and 88.3 ± 26.2 (6) for FR-836-w. Also, the effective immunizing doses to 1+ or 0+ grass carp, 3—5 × 10^{4.5} TCID₅₀/fish for FR-854 and 3—5 × 10^{7.5} TCID₅₀/fish for FR-836-w, are all determined. The results show that immunoprophylaxis to the hemorrhage of grass carp with this inactive vaccine is in prospect.

KEYWORDS hemorrhage of grass carp, FRV, inactive vaccine by passage in CIK cells, vaccine strain, immunizing dose

上接第 107 页(continued from page 107)

were 1.20—68.0 × 10⁶ cells/g and 1.94—19.90 × 10⁵ cells/g respectively. Data analysis showed that fluctuations of the bacterial load of pond were correlated with several environmental factors. 11 genera of heterotrophic bacteria were found in pond water, of which the nitrogen-fixing bacteria (e. g. *Azomonas*) were dominating. 8 genera of heterotrophic bacteria were found in pond sediment, of which gram positive bacteria (e. g. *Bacillus*) were dominating. *Pseudomonas* commonly occurred in pond water and sediments. Results of the experiment indicated that the changes of bacterial load in high-yielding polycultured fish pond revealed certain regularity and the fish yield had a bearing upon the composition of the bacterial community in the pond.

KEYWORDS heterotrophic bacteria, dominating species, high-yielding fish pond, composition of bacterial community