

草鱼出血病病毒株的筛选*

罗毅志 杨广智 叶雪平

(浙江省淡水水产研究所, 湖州 313001)

提要 为筛选适用草鱼出血病细胞疫苗工厂化生产的病毒株, 于 1987—1989 年, 在浙江湖州地区采集了 12 个具典型草鱼出血病症状的病鱼材料。通过比较它们的毒力, 对细胞的适应性、免疫原性, 研究病毒在细胞内的增殖动态、细胞病变特征, 毒株保存。结果表明, 筛选出的 ZV-8802 和 ZV-8909 两毒株, 其毒力高, 免疫原性强, 并能在细胞中大量增殖。应用这两株毒株制备的细胞疫苗, 其免疫保护率在 85% 以上。

关键词 草鱼出血病 病毒株

草鱼出血病是病毒性疾病, 从 70 年代开始全国各地相继应用组织疫苗和细胞疫苗进行免疫防治, 并取得较好效果。细胞疫苗效价高而且稳定, 并能进行工厂化生产, 但是细胞疫苗的制备必须解决两个基本物质条件, 一是能繁殖病毒的敏感细胞株, 二是免疫原性强的病毒株。本文系这方面的研究。

1 材料和方法

1.1 病鱼材料 于 1987—1989 年在浙江湖州地区的发病鱼塘采集具有典型草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 出血病症状的未死亡病鱼, 取患病草鱼的肌肉、肠、肝脾肾组织于 50% 磷酸甘油缓冲液中 4℃ 保存。1987 年采集 3 个, 1988 年采集 5 个, 1989 年采集 4 个, 共 12 个病鱼材料。

1.2 病毒液的制备 取保存的病鱼组织, 用预冷的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH = 7.2) 洗涤 3—4 次, 称量, 按 10 倍量加入 PBS 液, 冰浴匀浆 30min, 以 5 000r/min 转速离心 30min, 上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌, 4℃ 冰箱保存备用。

1.3 细胞和病毒的培养 使用我所建立的草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 和草鱼胚胎细胞 CP-80, 细胞和病毒的培养方法按杨广智(1981)的进行。

1.4 病毒毒力的测定 以鱼体感染法 (LD₅₀) 和细胞病变法 (TCID₅₀) 测定病毒毒力。

1.5 染毒细胞病变特征观察 光镜逐日观察细胞病变状况, 并用“飞片”制成标本, 以酶标法和 Selles 法观察病变细胞。

1.6 细胞疫苗的制备和效价测定 按杨广智等(1990)方法进行。

1.7 病毒的纯化、电镜观察和兔抗血清的制备 病鱼组织及细胞培养的病毒纯化参考殷震等(1985), 兔抗血清的制备按闵淑琴(1986)方法。病毒的纯化样品磷钨酸负染于

* “七五”国家科技攻关项目, 75-06-03-11 号。

本研究病毒纯化部分得到毛树坚教授和邵健忠老师的指导和帮助, 均此一并志谢。

收稿日期: 1991 年 1 月 28 日, 接受日期: 1991 年 5 月 16 日。

Formvar 膜铜网上,以 H300 型电镜观察。

2 结果

2.1 病毒株筛选的过程 每年以收集的病鱼组织制备病毒悬液,用 PBS 作 10 倍系列稀释,以鱼体感染法注射感染一龄健康草鱼, LD₅₀ 法测定毒力。然后将毒力较高的毒种稀释至 10⁻³ 接种到 ZC-7901 或 CP-80 细胞,以适应培养法培养病毒至第 5—10 代,收集培养的病毒,以 LD₅₀ 和 TCID₅₀ 测定其毒力,从中筛选出能在细胞内繁殖的病毒适应株。将适应株接入两接种细胞进行病毒增殖培养,逐日收集,随后进行鱼体感染试验,测定 LD₅₀, 确定病毒的最佳收获时间。将收获的病毒制成细胞疫苗,注射免疫一龄健康草鱼,饲养 3 周再以原毒注射感染,测定疫苗的免疫保护率,从中筛选出免疫原性较强的病毒株。

2.2 病毒株的筛选结果

2.2.1 毒力高的毒种 结果(表 1)表明,1987 年的 8706,8766,8710;1988 年的 8802,8806,8877 和 1989 年的 8901,8909 的毒力较高,其 LD₅₀(0.3ml) ≥ 3.0。

表 1 原始毒种筛选结果

Tab. 1 The selection of the wild viruses

年 份	1987			1988					1989			
	8706	8766	8710	8802	8806	8807	8877	8808	8901	8906	8907	8909
LD ₅₀ (0.3ml)	3.42	3.00	3.11	3.40	3.00	2.30	3.22	2.81	3.33	2.84	2.82	3.50

2.2.2 适应细胞内繁殖的毒种 结果(表 2)表明,8706,8802,8909 毒种能适应 ZC-7901 和 CP-80 细胞培养并能增高毒力, LD₅₀(ml) 均在 4.0 以上, TCID₅₀(ml) 在 10^{5.0} 以上。

表 2 病毒适应株筛选结果

Tab. 2 The selection of the viruses multiplication in cells

毒 种	8706	8766	8710	8802		8806		8877		8901		8909	
	ZC-7901	ZC-7901	ZC-7901	ZC-7901	CP-80	ZC-7901	CP-80	ZC-7901	CP-80	ZC-7901	CP-80	ZC-7901	CP-80
LD ₅₀ (ml)	4.0	2.5	3.0	4.5	4.3	3.0	3.0	3.2	3.5	3.5	3.5	4.5	4.7
TCID ₅₀ (ml)	—	—	—	10 ^{5.5}	10 ^{5.0}	10 ^{4.0}	10 ^{4.0}	10 ^{4.0}	10 ^{4.5}	10 ^{4.5}	10 ^{5.0}	10 ^{5.5}	10 ^{6.0}

2.2.3 免疫原性强的毒株 免疫保护率的测定结果(表 3)表明,用 8706,8802,8909 三个毒种制成的细胞疫苗,其平均免疫保护率均在 85%,说明具有较强的免疫原性。目前用于批量制备细胞疫苗的病毒株为 8802,8909,毒株名分别为 ZV-8802 和 ZV-8909。

2.3 病毒在细胞内的增殖动态 用 ZV-8802 毒株接入 CP-80 和 ZC-7901 细胞, LD₅₀ 测定结果表明,在培养的第 5—6d, LD₅₀ 值最大,说明病毒增殖量达到最高峰,提示

表 3 疫苗的免疫保护率测定 (%)

Tab. 3 The detection of immune protective rate of the cell vaccine

疫苗批号		8706	8802	8909
测定次数		3	2	6
试验组(存活鱼数/总鱼数)		74/80	46/48	126/136
对照组(存活鱼数/总鱼数)		3/40	2/24	5/68
免疫保护率	平均	85	87.5	85
	范围	80—90	80—95	82—95

此时收获病毒是制备细胞疫苗的最佳时间。

2.4 细胞病变特征 ZV-8802 或 ZV-8909 接入 ZC-7901 和 CP-80 细胞, 其病变特征基本相似, 在病毒培养的第 1—3 代病变不规则; 第 4 代后逐渐明显。开始病变时细胞变暗, 细胞上堆有较多颗粒, 随之细胞开始不均等收缩, 继之细胞拉长, 失去原有的多角性, 出现破损性空洞。经 Selles 法染色, 在细胞质中可见到嗜酸性的包涵体, 呈月牙形或块形, 位于细胞核的周围, 经免疫酶(HRP-SPA) 染色, 胞质着染棕黄色, 部分细胞可见深棕色颗粒。

2.5 草鱼出血病病原 经过纯化 ZV-8802 和 ZV-8909 感染草鱼的组织和第 5—10 代病毒培养物, 均能观察到两种病毒颗粒, 一是直径为 70—80nm 的呼肠弧病毒科(Reoviridae) 的病毒(柯丽华, 1990); 另一种是直径为 24—30nm 的小 RNA 病毒科(Picornaviridae) 的病毒(毛树坚, 1989), 球形, 外部无囊膜。将两种提纯病毒回归草鱼试验, 均获得 90% 以上的显症死亡率, 表明这两种病毒均为草鱼出血病的致病病原。

2.6 毒株的保存 病毒可随同 ZC-7901 和 CP-80 细胞传代增殖并保存, 毒株组织置于 50% 磷酸甘油缓冲液中, 4℃ 冰箱保存 6, 9, 12 个月, 其致死率分别为 100%, 90%, 80%, 但保存 18 个月后毒力下降, 致死率在 40% 左右。因此 4℃ 冰箱保存病毒组织以不超过 12 个月为宜。

3 讨论与结语

3.1 筛选免疫原性强的病毒株是提高细胞疫苗效价的关键之一, 在本研究的筛选过程中, 从原始毒种筛选毒力较高的毒种, 再行筛选免疫原性强的毒株。结果表明, 毒力高的毒株, 其免疫原性也较强, 两者之间具有正相关性。但是, 毒力较弱的毒株, 其免疫原性如何? 这方面工作还有待研究。

3.2 病毒株的保存, 本研究采用在细胞中传代保存和病鱼组织置于 50% 磷酸甘油缓冲液中 4℃ 冰箱保存, 该法比较简便实用。根据人类医学病毒保存的经验, 对病毒材料采用冷

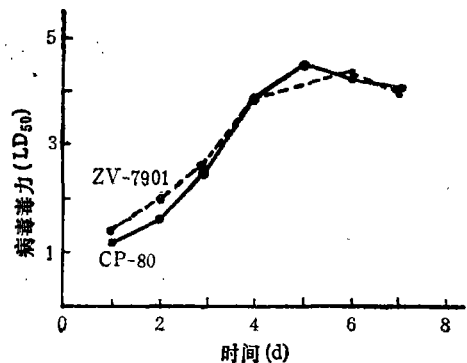


图 1 病毒在细胞中的增殖曲线

Fig. 1 The growth curves of viruses in cell cultured

冻干燥或深低温(-80℃)保存,其保存有效期将会更长,病毒株保存工作有待今后改进和提高。

3.3 ZV-8802 和 ZV-8909 两毒株是在不同年份但均在浙江湖州地区采集的,两毒株在血清型上有什么关系?为探讨这一问题,我们应用葡萄球菌A蛋白协同凝集试验(SPA-COA)(Takahisa Kimur et al., 1984)进行探索,以免抗 ZV-8802 血清与上述病毒株进行反应。结果表明,兔抗 ZV-8802 血清与 ZV-8802 毒株的阳性反应敏感度为 1:320,与 ZV-8909 毒株的阳性反应敏感度为 1:640,说明两者之间在血清型上差别不大。

3.4 从 12 个草鱼出血病病鱼材料中筛选出 ZV-8802 和 ZV-8909 两病毒株,它们毒力高,免疫原性强,并能在细胞中大量增殖,用这两株毒株制备的细胞疫苗,其免疫保护率在 85% 以上。本文研究了鱼类病毒株的筛选过程和方法,为草鱼出血病细胞疫苗的制备提供了基本物质基础。

参 考 文 献

- 毛树坚等, 1989, 草鱼出血病的病原研究, 水产学报, **13**(1): 1-4。
 闵淑琴等, 1986, 鱼呼肠孤病毒(FRV)抗血清的制备及其应用, 水产学报, **10**(4): 383-387。
 杨广智等, 1981, 草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 培养草鱼出血病病毒的研究初报, 淡水渔业, **3**: 9-12。
 杨广智等, 1990, 草鱼出血病细胞疫苗制备技术研究, 鱼类病害研究, **12**(1): 12-16。
 柯丽华等, 1990, 一株新的草鱼出血病病毒分离物的特性, 水生生物学报, **14**(2): 153-159。
 殷霞等, 1985, 动物病毒学, 科学出版社(北京), 244-261。
 Takahisa Kimur et al., 1984, Rapid, simple serological diagnosis of infections pancreatic necrosis by coagglutination test using antibody-sensitized staphylococci, *Fish Pathology*, **19**(1):25-33.

SELECTION OF HAEMORRHAGIC VIRUS STRAINS FROM GRASS CARP (CTENOPHARYNGODON IDELLUS)

Luo Yizhi, Yang Guangzhi, Ye Xueping

(Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313001)

ABSTRACT

To select virus strains for industrial production of cellular vaccine against haemorrhagic disease of grass carp (*ctenopharyngodon idellus*), 12 wild tissue samples of diseased fish were collected in Huzhou, Zhejiang in 1987-1989. Comparity study of the strains' virulence, immunogenicity and adaptability to cultured cells were studied by the methods of body infection, CPE, immuno-protectivity assay and virus purity showed that two strains (ZV-8802, ZV-8909) characterized by high virulence and immuno-protectivity could proliferate extensively in the sensitive cultured cells of ZC-7901 and CP-80. The virus numbers peaked after 5-6 days of inoculation in cultured cells when the immuno-protectivity of the cellular vaccine produced by the virus harvested then reached 85%. After infection with these pathogens, virus particles could be observed and isolated from both cultured cells and the fish body.

This research provides the basic know-how for industrial production of cellular vaccine against haemorrhagic disease of grass carp.

Key words Grass carp haemorrhage Virus strains