

草鱼出血病细胞培养弱毒疫苗的制备及其免疫效果

许淑英 李焕林 邓国成 姜兰

(珠江水产研究所, 广州 510380)

提要 本文报道经筛选的 GCHV-841 毒株在草鱼吻端成纤维细胞系 (PSF) 中进行适应性培养, 弱毒驯化, 细胞培养弱毒疫苗的制备, 安全性观察, 不同稀释度和剂量的免疫保护率测定及保存试验。GCHV-841 毒株在 PSF 细胞中继代驯化至 53 代达到减毒目的。筛选得 53~59 代作毒种制备的细胞弱毒疫苗使用安全。用稀释 $10^3 \sim 10^4$ 倍的疫苗, 0.1~0.3 毫升/尾剂量注射草鱼, 其免疫保护率均在 85% 以上。生产上使用疫苗的适宜浓度和剂量是稀释 10^3 倍和 0.2 毫升/尾。冻干疫苗宜保存于 4°C 以下。较合适的保存期是 6 个月 (4°C) 和 18 个月 (-20°C)。

关键词 草鱼出血病, 细胞培养, 弱毒疫苗, 免疫效果

草鱼出血病是一种病毒性鱼病, 而免疫预防是该病最有效的防治方法之一。因此, 疫苗研制对该病的防治意义重大。鱼用疫苗研制在我国起步虽较晚, 然而自 1969 年珠江水产研究所首次研制试用获得成功以来 (广东省农科站水产队, 1972; 李焕林等, 1979), 免疫预防已有了很大发展。在生产上的应用规模我国已走在世界前列。

多年来鱼用疫苗制品为组织灭活疫苗。但它取材来源于病鱼肝、脾、肾等显症组织, 要在发病流行季节从自然界收集, 因而使大批量生产几乎不可能。往往冬末春初放养草鱼种期间因缺乏疫苗而错过了免疫预防时机。

采用离体细胞培养法制备疫苗就能克服上述缺点, 我国自从鱼类细胞建株 (系) 获得成功以来, 浙江淡水水产研究所、长江水产研究所等单位先后利用草鱼出血病病毒敏感细胞株 (系) 进行室内离体培养病毒, 研制出细胞培养灭活疫苗, 获得一定效果 [杨广智等, 1981; 杨先乐等, 1986] (杨广智等, 1990)。但迄今尚未有关于草鱼出血病细胞培养弱毒疫苗研制的报道。作者自 1986 年草鱼成纤维细胞系 PSF 建立后 (李焕林等, 1988), 便开始进行细胞培养弱毒疫苗 (以下简称弱毒疫苗) 的研制及其免疫效果的观察。现将结果报道如下。

一、材料和方法

1. 材料的来源和处理 材料来源于珠江三角洲池塘中出现典型草鱼出血病症状病

收稿日期: 1993-08-13。

- (1) 广东省农科站水产队, 1972。土法免疫预防鲢鱼病的研究。农业科技资料(7), 8—10。
- (2) 李焕林等, 1979。草鱼传染性烂鳃、肠炎、赤皮病组织苗免疫技术的研究。全国鱼病防治技术总结暨经验交流会资料汇编, 27—33。
- (3) 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。
- (4) 李焕林等, 1988。草鱼吻端成纤维细胞系 PSF 的建立及其生物学特性。中国水产科学研究院学报, (1): 1—8。

作为弱毒驯化的毒种。几年来在 PSF 细胞中进行适应性培养,一直保持较强毒力。但在某一定培养条件下传至 50 代毒力显著减弱,回归感染死亡率仅 30%,传至 52 代降为 10%,53 代毒力更弱,草鱼注射后不出现显症或其他异常现象。连续传至 59 代均能保持这种弱毒化性状(表 1)。作者采用 53—59 代毒种制备弱毒疫苗,均能达到安全性检验的要求(表 2)。

表 1 GCHV-841 毒株 49—59 代毒力变化及弱毒化后的免疫原性

Table 1 Virulence variation and immunogenicity after attenuation in 49—59 generations of GCHV—841

毒株代数	免 疫			攻 毒		
	稀释倍数	剂 量 (毫升/尾)	显症死亡率 (%)	试验组成活率 (%)	对照组成活率 (%)	免疫保护率 (%)
49	10	0.3	30			
50	10	0.3	30			
51	10	0.3	0			
52	10	0.3	10			
53	10	0.3	0	100	30	100
54	10	0.3	0	90	30	85.7
55	10	0.3	0	100	30	100
56	1	0.3	0	100	50	100
57	10	0.3	0	100	30	100
58	1	0.3	0	100	20	100
59	1	0.3	0	100	30	100

表 2 弱毒疫苗的安全性观察

Table 2 Observation on innocuity of attenuated live vaccine

疫苗批号	稀释倍数	存活尾数/试验尾数	成活率(%)
湿 疫 苗	1	1	10/10
		10 ²	10/10
		10 ³	10/10
	2	1	10/10
		10 ²	10/10
		10 ³	10/10
	3	1	10/10
		10 ²	10/10
	冻 干 疫 苗	1	1
10			10/10
10 ²			10/10
10 ³			10/10
2		1	10/10
		10 ²	10/10

2. 弱毒疫苗免疫保护率测定

(1) 弱毒疫苗不同稀释度的保护率 用GCHV—841毒株 53—59 代分别制备的弱毒

疫苗注射当年草鱼种,其免疫保护率均在 85%以上(表 1)。其中用 55—57 代分别制备的弱毒疫苗,当稀释倍数为 10^8 时,免疫保护率仍达 100%,当稀释倍数为 10^4 时,免疫保护率也可达 50%(表 3)。

表 3 弱毒疫苗不同稀释度的保护率

Table 3 Percent relative protection of A. L. V. in different dilutions

毒株代数	稀释倍数	剂量(毫升/尾)	免疫组成活率(%)	对照组成活率(%)	免疫保护率(%)
55	1	0.2	100	0	100
	10	0.2	100	0	100
	10^2	0.2	100	0	100
	10^3	0.2	100	0	100
	10^4	0.2	50	0	50
56	1	0.2	100	10	100
	10^2	0.2	100	10	100
	10^3	0.2	100	10	100
57	1	0.2	100	10	100
	10^2	0.2	100	10	100
	10^3	0.2	100	10	100

(2) 弱毒疫苗不同注射剂量的免疫保护率 用同一批弱毒疫苗对草鱼免疫后进行攻毒试验表明,稀释倍数为 $10—10^8$ 的疫苗,分别以 0.1、0.2、0.3 毫升/尾注射草鱼种,其免疫保护率都相同,均为 100%(表 4)。

表 4 弱毒疫苗不同剂量的保护率

Table 4 Percent relative protection of A. L. V. in different dosages

剂量(毫升/尾)	疫苗稀释倍数	免疫组成活率(%)	对照组成活率(%)	免疫保护率(%)
0.1	10	100	0	100
	10^2	100	0	100
	10^3	100	0	100
	10^4	100	0	100
0.2	10	100	0	100
	10^2	100	0	100
	10^3	100	0	100
	10^4	100	0	100
0.3	10	100	0	100
	10^2	100	0	100
	10^3	100	0	100
	10^4	88.9	0	88.9

(3) 弱毒疫苗不同保存期试验 同一批弱毒冻干疫苗分别保存于室温、4°C和 -20°C三种温度,试验结果,保存于 4°C和 -20°C6 个月的,用稀释倍数 $10—10^8$ 注射草鱼,其免

疫保护率均达 100%，疫苗效价不变，用 10^4 注射草鱼，保存于 -20°C 的，其免疫保护率仍然达 100%，但保存于 4°C 的，其免疫保护率降为 88.9%；另外在 -20°C 保存 18—24 个月的疫苗，用稀释倍数为 $10-10^3$ 注射草鱼，疫苗效价仍不变，免疫保护率仍达 100%；保存于室温的疫苗免疫效价下降较快，保存 2 个月（春季）， 10^3 稀释倍数的保护率降为 80%，保存 6 个月（春、夏季），其保护率只剩 33.3%（表 5）。

表 5 弱毒冻干疫苗不同温度和时间保存比较
Table 5 Comparison of storage period for freeze-dried vaccine
in different temperatures

保存温度 ($^{\circ}\text{C}$)	保存期 (月)	疫苗稀 释倍数	免疫组成活率 (%)	对照组成活率 (%)	免疫保护率 (%)
室温	2	10	100	44.4	100
		10^2	100	44.4	100
		10^3	88.9	44.4	80
		10^4	88.9	44.4	80
	6	10	80	0	80
		10^2	11.1	0	11.1
		10^3	33.3	0	33.3
		10^4	0	0	0
4	6	10	100	0	100
		10^2	100	0	100
		10^3	100	0	100
		10^4	88.9	0	88.9
-20	6	10	100	0	100
		10^2	100	0	100
		10^3	100	0	100
		10^4	100	0	100
	18	10	100	70	100
		10^2	100	70	100
		10^3	100	70	100
		10	100	70	100
	24	10^2	100	70	100
		10^3	100	70	100

三、讨 论

1. 医学和兽医学方面早已广泛应用疫苗制品对各种疾病进行免疫预防。疫苗制品主要是弱毒疫苗，其次是灭活疫苗〔殷震等, 1985; Kisary 等, 1978; Specter 等, 1978〕。据报道灭活疫苗一般来说具有较好的安全性。但也存在一定的缺点。主要是：①须含足够

的病毒才能引起免疫应答。而大剂量(常常是必须的)又可引起局部或全身的反应;②所获得的免疫性一般是短暂的,须激发注射[莫汉蒂和杜德,1978年中译本]。弱毒疫苗通常是较好的免疫原。因为致弱的活病毒能在宿主体内增殖,这样就能产生类似自然的亚临床症状感染所产生的持续较为长久的免疫力。小剂量就能引起良好的免疫应答。同时它能诱导产生抗所有病毒抗原的体液抗体。现今大多数人和动物用的有效病毒疫苗都属于这一类型[莫汉蒂和杜德,1978年中译本]。鱼类应用疫苗免疫防病的研究起步较晚,且进展也较慢。然而国外对鱼用疫苗的研究仍相当重视,并且取得了不少成就[Duff,1942; Wolf和Quimby,1970]。我国近年来才开始研究和应用鱼用细胞疫苗预防草鱼出血病。一些研究单位报道研制细胞灭活疫苗预防该病获得良好效果[杨先乐等,1989]、(杨广智等,1990)。作者则研制细胞弱毒疫苗。几年来在实验室和生产实践应用结果证明预防该病效果显著。因此,应用疫苗进行免疫预防鱼病前景是乐观的。根据医学和兽医学方面的大量理论和实践经验,作者认为应该重视研究和推广使用细胞弱毒疫苗进行免疫防病。这无论在理论上和实践上都具有重要意义。

2. 要制备一种安全、可靠、免疫效价高的细胞培养弱毒疫苗,关键是驯化一种毒性低,安全性稳定,免疫原性强,以及适应细胞培养的弱毒株。GCHV-841毒株几年来在PSF细胞中经过长期的适应性细胞培养,在一定的培养条件下传至53代达到弱毒化目的。草鱼注射后不出现出血病症状或其他异常现象。用筛选代53—59代作毒种制备的弱毒疫苗安全性好,免疫保护率高。多年来生产实践证明该弱毒疫苗对预防草鱼出血病效果显著,取得较大的经济效益。不过传至60—70代,某些代数曾出现返祖现象。用细胞病毒原液注射草鱼后出现10%—30%显症死亡率。但70代以后安全性又回复稳定,且免疫原性不变。为了筛选出适合工厂化大批量生产的理想弱毒株。目前作者已采用稀释法克隆,进一步纯化毒株。

3. 本文研制的弱毒疫苗在小型试验稀释倍数为 10^8 时,其免疫保护率均达100%,但稀释倍数为 10^4 时,免疫保护率开始下降。因而在生产应用上,作者认为使用 10^3 稀释倍数较为适宜,可以有10倍以上的保险系数。关于使用的剂量问题,根据本研究结果,对于同一批疫苗,稀释倍数为 $10-10^8$ 的0.1与0.3毫升/尾的免疫效果相同,免疫保护率均达100%。因此,建议在生产上使用0.2毫升/尾的剂量较为适宜,亦可以有10倍以上的保险系数。一种生物制品的保存期与温度关系密切。细胞弱毒疫苗是活疫苗,不耐热,因此必须低温保存。判断疫苗效价稳定性常以其免疫保护率作为一项主要的衡量指标。根据观察结果,本冻干疫苗在室温(春、夏季)条件下,它的稳定性较差,免疫保护率下降较快。而在 4°C 保存则比较稳定,在 -20°C 保存则更为稳定。由此看来,温度的升高对疫苗的抗原性损失较大。本冻干疫苗保存于 4°C 6个月,用 10^8 稀释倍数免疫注射草鱼时,保护率达100%,保存于 -20°C 18—24个月,免疫注射 10^8 倍数时,保护率仍达100%。因此,作者认为弱毒冻干疫苗适宜保存于 4°C 以下,较合适的保存期是6个月(4°C)和18个月(-20°C)。

(5) 见本文脚注(3),“杨广智等,1990”。

四、小 结

1. 经筛选的 GCHV-841 毒株在 PSF 细胞中进行适应性培养, 传至 53—59 代毒力显著减弱。均可作为毒种制备弱毒疫苗。其免疫保护率均为 85% 以上, 达到安全检验要求。
2. 在生产应用上使用本弱毒疫苗的适宜浓度和剂量分别是稀释 10^7 倍和 0.2 毫升/尾。
3. 弱毒冻干疫苗宜保存于 4°C 以下, 较合适的保存期分别为 6 个月 (4°C) 和 18 个月 (-20°C)。

参 考 文 献

- [1] 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, (2): 9—11.
- [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—143.
- [4] 莫汉蒂, S. B. 和 S. K. 杜德(罗伏根等译), 1978. 兽医病毒学, 76—78. 农业出版社(京).
- [5] 殷 震等, 1985. 动物病毒学, 131—135. 科学出版社(京).
- [6] Duff, D. C. B., 1942. The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. *Journal of Immunology*, 44: 87—93.
- [7] Kisary, J. et al., 1978. Attenuation of the goose parvovirus strain B.—Laboratory and field trials of the attenuated mutant for vaccination against Derzsy's disease. *Avian Pathol.* 7(3): 397—406.
- [8] Specter, S. et al., 1978. Viruses and the immune response. *Pharmacol. Ther. A.*, 2(3): 595—622.
- [9] Wolf, K. and M. C. Quimby. 1970. Infectious pancreatic necrosis: clinical and immune response of adult trouts to inoculation with live virus. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 26: 2511—2516.

THE PREPARATION AND IMMUNE EFFECT OF ATTENUATED LIVE VACCINE OBTAINED THROUGH CELI. CULTURE FOR HEMORRHAGE OF GRASS CARP

Xu Shuying, Li Huanlin, Deng Guocheng and Jiang Lan

(Pearl River Fisheries Research Institute, Guangzhou 510380)

ABSTRACT This paper expounded that GCHV-841 sifted is cultured with adaptability in cell line (PSF) from the fibroblast cell of grass carp (*Ctenopharyngodon Idella*) snout tissue, attenuated domestication, preparation of attenuated live vaccine obtained through cell culture, observation on innocuity, determination of percent relative protection with different dilutions and dosages, and test of storage. GCHV-841 has been domesticated continuously for 53 generations and has been attenuated. The attenuated live vaccine prepared with generation 53—59 is safe for use. The percent relative protection of vaccine is above

85%, when it was injected to grass carp with vaccine of diluted $10-10^4$ times and dosage 0.1--0.3ml/ind. The suitable concentration and dosage are diluted 10^2 times and 0.2ml/ind. It is suitable to store the freeze-dried vaccine below 4°C . The comparatively suitable storage time is 6 months in 4°C or 18 months in -20°C .

KEYWORDS hemorrhage of grass carp, cell culture, attenuated live vaccine, immune effect