

# 草鱼出血病病毒减毒的研究

许淑英 李焕林 邓国成 姜 兰 白岳强

(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广州 510380)

**摘 要** 草鱼出血病病毒 GCHV-892野毒株在 PSF 细胞连续传代过程,于培养液中加入一定浓度的按液,传至19代已达减毒目的。继续传至29代其减毒效果保持稳定。27代后不再加入按液,继续传至37代其减毒效果仍然保持稳定不变。致弱病毒对草鱼的安全性好,免疫原性强。用该弱毒株制备的弱毒疫苗免疫草鱼后,草鱼的成活率和免疫保护率均达100%。表明按液是草鱼出血病病毒的一种良好减毒剂。经按液减毒的 GCHAV-892是一株良好的减毒株。

**关键词** 草鱼,出血病病毒,按液,减毒

**中图分类号** S94

草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)是我国传统的优质养殖鱼类,养殖面积广。但其鱼种阶段易受出血病危害,成活率低。草鱼出血病是一种病毒性疾病,免疫预防是该病最有效的防治方法。作者对草鱼出血病细胞培养弱毒疫苗进行了多年的研究,现已成功地研制出免疫效果良好的弱毒疫苗[许淑英等 1994]。弱毒疫苗的研制关键是要将强毒株进行减毒,最后筛选出安全性好、免疫原性强的弱毒株。弱毒株可以通过不同途径和方法获得[章以浩等 1966, Kisary 1978]。几年来,作者对草鱼出血病病毒株进行了减毒研究。现将结果综合报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒

具有强毒力的 GCHV-892野毒株(下称892株)来源于珠江三角洲池塘出现典型病症的草鱼肝、脾、肾组织,取样后作如下处理:剪碎、匀浆后用不含小牛血清的199培养液稀释 $10^6$ 倍,置冰箱4℃预冷。用10000rpm离心20分钟,上清液即为除菌组织病毒液,经无菌检验后即可用于本试验。

### 1.2 细胞

由本所建立的草鱼吻端成纤维细胞系 PSF 是对草鱼出血病病毒敏感的细胞系(李焕林等 1988)。将细胞培养于含10%小牛血清的199培养液(日本产培养基)中,待细胞长成致密单层后

1998-06-01收到

(1)李焕林,许淑英,邓国成等. 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.

供减毒研究用。

### 1.3 药物

在野外采集的细叶桉树叶,用自来水洗净,室内凉干。称10克老叶并剪成小片,用双蒸水100mL煮沸约2分钟,纱布过滤。补足失去的水分,得10%桉叶药液(下称桉液)。再经10磅高压蒸气消毒30分钟,置4℃冰箱备用,此即为试验原液。用时加培养液稀释至所需浓度。

### 1.4 892株减毒过程观察

取长成致密单层的PSF细胞,用0.25%胰蛋白酶和0.02%乙二胺四乙酸二钠混合消化液消化约1分钟,倒掉消化液,加入培养液,用吸管吹打使细胞分散,然后加入除菌组织病毒液,使病毒最终浓度为1:500。分装入细胞瓶(细胞浓度 $1.5 \times 10^5$ 个/mL)。置28℃培养。2~3天细胞长成致密单层。镜检PSF细胞无产生病变。根据出血病病毒感染草鱼后,草鱼的发病时间为1周左右,因而8~10天收获。收获后的细胞病毒液置-70℃保存,作为试验用的细胞毒种。

(1)在PSF细胞培养液中加入桉液,使桉液浓度分别为1:100、1:200、1:500、1:1000、1:5000、1:10000。每一试验(浓度)组和对照组各分装4瓶细胞,置28℃培养。连续观察96小时,每隔24小时镜检并记录细胞生长情况。

(2)在细胞传代和接入病毒的同时,在各组培养液中加入桉液(病毒的最终浓度为1:20),使它们含桉液的浓度分别为1:1000、1:5000、1:10000,置28℃培养8~10天收获,并置-30℃冰冻。融化后的细胞病毒液用0.65%生理盐水稀释 $10^2$ 倍,以每尾0.2mL接种草鱼种。观察15天,检查892株在上述三种桉液浓度作用下的毒力变化。

(3)通过对草鱼感染试验证实892株在上述三种桉液浓度作用下都能正常增殖后,按上述接种病毒的方法在PSF细胞中连续继代驯化。每隔5~7代将收获的细胞病毒液用0.65%生理盐水稀释 $10^2$ 倍,以每尾0.2mL剂量接种草鱼。检查892株在不同浓度桉液作用下的减毒效果。

(4)将桉液稀释度为1:1000的组在PSF细胞中继续传代驯化,并将每一代的细胞病毒液按上述方法进行检查,观察桉液对892株的减毒效果。

(5)经桉液作用减毒的892株传至27代后,不再加入桉液,继续传至37代。观察致弱病毒的安全性和免疫原性。

(6)观察用892株25~27代制备的冻干弱毒疫苗对草鱼的安全性和免疫原性。

### 1.5 试验鱼

试验用鱼为全长9~12cm的当年草鱼种,在水泥池暂养期间用药物杀灭体表及鳃的寄生虫和细菌等病原体,确保鱼体健康。

各试验组和对照组的鱼数均为每组10尾。

## 2 结果

### 2.1 桉液对PSF细胞生长的影响

结果见表1。由表1可知前三种桉液浓度的毒性较大,影响细胞正常生长。而后三种浓度对

细胞无不良影响,细胞生长正常。

表1 PSF 细胞系在含不同浓度桉的培养液中的生长情况

Tab. 1 Growth of cell line (PSF) in culture solution with different concentration of liquid being from An leaves

桉液浓度	培养时间(小时)			
	24	48	72	96
1:100	多数细胞聚成小团,呈星状生长	多数细胞呈星状生长	尚有部分细胞呈星状生长	不能长成单层细胞
1:200	多数细胞聚成小团,呈星状生长	细胞生长较均匀	长成单层细胞(90%长满)	部分细胞离壁或贴壁不牢
1:500	多数细胞聚成小团,呈星状生长	细胞生长较均匀	长成单层细胞(90%长满)	少部分细胞离壁
1:1000	生长正常(细胞分散,生长均匀)	生长正常	长成单层细胞(90%长满)	长成致密单层细胞
1:5000	生长正常(细胞分散,生长均匀)	生长正常	长成单层细胞(90%长满)	长成致密单层细胞
1:10000	生长正常(细胞分散,生长均匀)	生长正常	长成单层细胞(90%长满)	长成致密单层细胞
对照	生长正常(细胞分散,生长均匀)	生长正常	长成单层细胞(90%长满)	长成致密单层细胞

### 2.2 三种不同浓度桉对892株的减毒效果

将 PSF 细胞分别在含桉为1:1000、1:5000和1:10000三种浓度的培养液中传代并接入病毒,置28℃培养8~10天。将收获后的三种浓度细胞原(1)代病毒液稀释 $10^2$ 倍,分别接种草鱼。结果三组草鱼的发病死亡率均高达90%~100%。表明原代病毒均具强的毒力。将上述的892株在细胞中传至19代,每隔5~7代取病毒稀释液分别接种草鱼,结果见图1。从图1可以看出,三种浓度的桉液对892株毒力减弱迅速。三组病毒传至第6代引起草鱼发病死亡率降至20%~70%,传至第13代引起草鱼发病死亡率降至0~10%,传至第19代草鱼均不致病。表明病毒在该三种桉浓度中传代都几乎同时达到减毒目的。

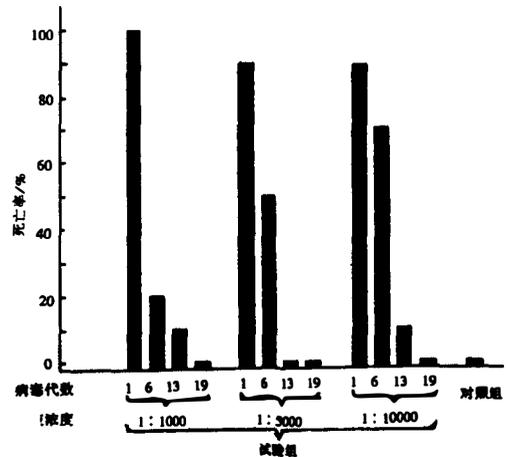


图1 三种桉液浓度作用下收获的细胞病毒液对草鱼致病减弱的情况

Fig. 1 Effect of virus solution of cell under 3 different concentrations of An liquid on ability of coningdisease of grass carp

注:病毒稀释度 $10^2$ ,剂量0.2mL/尾

### 2.3 桉液对19~29代病毒的减毒效果

在1:1000浓度桉液作用下,病毒在 PSF 细胞中从19代连续传至29代,取各代细胞病毒液分别稀释 $10^1$ 和 $10^2$ 倍注射草鱼。观察15天草鱼均不发病。再以草鱼出血病强毒(毒价为 $10^4 LD_{50}/0.2mL$ )攻毒。观察15天,其免疫保护率均达100%(见表2)。结果表明,病毒在这一浓度的桉液作用下减毒明显,减毒效果稳定,安全性好,且免疫保护率高。

### 2.4 不再加桉液的第28~37代病毒液的安全性和免疫原性

通过桉液减毒的892株传至27代,培养液中不再加入桉液。对28~37代的细胞病毒液分别稀释 $10^1$ ~ $10^2$ 倍,注射草鱼后的成活率和免疫保护率均达100%(见表3)。表明病毒株经桉液作

用在细胞中传至一定代数后,病毒毒力已减弱,并且相当稳定。其后不需再加按液作用传代的致弱病毒对草鱼的安全性和免疫原性仍然保持稳定不变。

表2 GCHV-892弱毒化后的19~29代病毒液对草鱼的安全性和免疫保护率  
Tab. 2 Innocuity and percent relative protection of virus solution  
in 19~29 gen. of GCHV-892 attenuated for grass carp

按液浓度	注射剂量 (mL/尾)	毒株代数	稀释倍数	免 疫		攻 毒		
				试验组死亡率 (%)	对照组死亡率 (%)	免疫组死亡率 (%)	对照组死亡率 (%)	免疫保护率 (%)
1:1000	0.2	19	10 <sup>1</sup>	0	0	0	90	100
			10 <sup>2</sup>	0	0	0	90	100
		22	10 <sup>1</sup>	0	0	0	100	100
			10 <sup>2</sup>	0	0	0	100	100
		23	10 <sup>1</sup>	0	0	0	100	100
			10 <sup>2</sup>	0	0	0	100	100
		24	10 <sup>1</sup>	0	0	0	100	100
			10 <sup>2</sup>	0	0	0	100	100
		25	10 <sup>1</sup>	0	0	0	100	100
			10 <sup>2</sup>	0	0	0	100	100
		26	10 <sup>1</sup>	0	0	0	100	100
			10 <sup>2</sup>	0	0	0	100	100
		28	10 <sup>1</sup>	0	0	0	100	100
			10 <sup>2</sup>	0	0	0	100	100
		29	10 <sup>1</sup>	0	0	0	100	100
			10 <sup>2</sup>	0	0	0	100	100

注:免疫保护率(%) =  $(1 - \frac{\text{免疫组死亡率}}{\text{对照组死亡率}}) \times 100$

表3 不再经按液作用的892株28~37代的安全性和免疫原性

Tab. 3 Innocuity and immunogenicity of 28~37 generations of strain-892 out of affect of An liquid

毒株代数	稀释倍数	免 疫		攻 毒		
		试验组死亡率 (%)	对照组死亡率 (%)	免疫组死亡率 (%)	对照组死亡率 (%)	免疫保护率 (%)
28	10 <sup>1</sup>	0	0	0	50	100
	10 <sup>2</sup>				50	100
29	10 <sup>1</sup>	0	0	0	50	100
	10 <sup>2</sup>				50	100
30	10 <sup>1</sup>	0	0	0	50	100
	10 <sup>2</sup>				50	100
31	10 <sup>1</sup>	0	0	0	50	100
	10 <sup>2</sup>				50	100
32	10 <sup>1</sup>	0	0	0	100	100
	10 <sup>2</sup>				100	100
33	10 <sup>1</sup>	0	0	0	50	100
	10 <sup>2</sup>				50	100
34	10 <sup>1</sup>	0	0	0	50	100
	10 <sup>2</sup>				50	100
35	10 <sup>1</sup>	0	0	0	50	100
	10 <sup>2</sup>				50	100
36	10 <sup>1</sup>	0	0	0	100	100
	10 <sup>2</sup>				100	100
37	10 <sup>1</sup>	0	0	0	50	100
	10 <sup>2</sup>				50	100

## 2.5 冻干弱毒疫苗对草鱼的安全性和免疫原性

用892株25~27代细胞病毒液分别制备4批冻干弱毒疫苗。每批疫苗随机抽取2瓶(每瓶含病毒和保护剂5mL)。用生理盐水稀释 $10^1 \sim 10^3$ 倍。草鱼经分别免疫后成活率都达100%。再以草鱼出血病强毒攻毒。观察15天,免疫鱼几乎全部成活,而对照鱼死亡率高达80%~100%(表4)。表明经按液减毒后的弱毒株制备的冻干弱毒疫苗仍能保持原有的安全性和免疫原性。作者将这一弱毒株定名为GCHAV-892。

表4 各批冻干弱毒疫苗的安全性和免疫原性

Tab. 4 Innocuity and immunogenicity of 4 batches of attenuated live vaccine

疫苗批号	稀释倍数	免 疫		攻 毒		
		试验组死亡率 (%)	对照组死亡率 (%)	免疫组死亡率 (%)	对照组死亡率 (%)	免疫保护率 (%)
9401	$10^1$	0	0	0	100	100
	$10^2$	0	0	0	100	100
	$10^3$	0	0	0	100	100
9402	$10^1$	0	0	0	100	100
	$10^2$	0	0	0	100	100
	$10^3$	0	0	20	100	80
9501	$10^1$	0	0	0	90	100
	$10^2$	0	0	0	90	100
	$10^3$	0	0	0	90	100
9502	$10^1$	0	0	0	80	100
	$10^2$	0	0	0	80	100
	$10^3$	0	0	0	80	100

## 3 讨论

(1)本研究采用的细叶桉树叶是一种具有一定毒性的中草药。其叶供药用,有消炎杀菌的功效。桉叶的挥发油中主要含有7种有毒成分,如1,8-桉叶素、蒎烯、芸香甙等[朱正峰 1991]。一般来说,具有改变和破坏病毒核酸和蛋白质的理化因子,包括热、辐射、pH和化学剂等对病毒具有灭活作用。但是这些理化因子较低程度或稍低剂量的处理,往往导致病毒变异,并不引起病毒灭活。故在一定意义上讲,灭活剂和诱变剂只是“量”或“程度”上的差别。较少剂量或较低浓度的灭活剂,常常呈现诱变作用[殷震和刘景华 1985]。病毒的变异类型有多种,其中一种是“毒力”变异;病毒变异后,或增强毒力,或减弱毒力。后者可用于制成弱毒活疫苗[余潋 1983]。本文使用某一浓度范围的桉液对草鱼出血病病毒株进行减毒的结果,强毒株的毒力迅速减弱,且致弱病毒的安全性和免疫原性又能保持稳定不变。由此可见草鱼出血病病毒对某一浓度范围的桉液是适应的,并且能够增殖和产生变异。桉液起了诱变剂的作用。至于桉液的减毒作用机理,尚有待进一步深入研究。

(2)本研究采用桉液某一浓度作为GCHV-892毒株的减毒剂,结果减毒迅速、明显,且稳定。传至第6代毒力已下降,第13代毒力明显下降,传至19代时已达到减毒目的。用该病毒液注射草鱼种后均不发病,成活率100%。过去没有加入桉液而用同样方法传代的GCHV-841株,需

要传至50代左右毒力才明显减弱。传至53代的病毒液才对草鱼不致病[许淑英等 1994]。由此可见桉液对该病毒的减毒作用是十分有效的。同时桉叶取材较易,成本低,处理方法较简便。因而作者认为桉(叶)液是草鱼出血病病毒的一种良好减毒剂。采用桉液对鱼类病毒进行减毒研究,这在国内外尚未见报道。因此,若对其他鱼类病毒进行减毒研究时,本方法可供参考。

(3)本文的 GCHV-892 毒株在含桉的培养液中继代驯化至19代已达到减毒目的。再继续代至37代,安全性都能一直保持稳定不变。同时亦能保持强的免疫原性。通过接种草鱼试验,其免疫保护率均达100%。因此 GCHAV-892 是一株良好的减毒株。

(4)用 GCHAV-892 株制备的4批冻干弱毒疫苗免疫草鱼共12试验组,成活率都达100%。再经草鱼出血病强毒攻毒,其中11组免疫保护率都为100%。只有9402批的稀释 $10^3$ 倍1组试验鱼经强毒攻毒后,免疫鱼有20%死亡,免疫保护率为80%。这主要与疫苗中的致弱病毒量过少有关。而导致病毒量过少的原因是多方面的。本研究中估计是与该批疫苗在冻干处理过程中的温度变化很有关,致使部分致弱病毒被灭活。

### 参 考 文 献

- 朱正峰(编著). 1991. 中药中成药解毒手册. 北京:人民军医出版社. 369~370.
- 许淑英,李焕林,邓国成等. 1994. 草鱼出血病细胞培养弱毒疫苗的制备及其免疫效果. 水产学报, 13(2):110~117.
- 余 演(主编). 1983. 医学微生物学. 北京:人民卫生出版社. 571.
- 章以浩,吴绍沅,卢宝兰等. 1966. 麻疹病毒减毒过程的观察. 微生物学报, 12(1):15~23.
- 殷 震,刘景华(主编). 1985. 动物病毒学. 北京:科学出版社. 57.
- Kisary J. 1978. Attenuation of the goose parvovirus strain B. —laboratory and field trials of the attenuated mutant for vaccination against Derzsys disease. Avian Pathol. 7(3):397~406.

## STUDY ON ATTENUATION OF VIRUS OF HEMORRHAGE OF GRASS CARP, *CTENOPHARYNGODON IDELLA*

XU Shu-Ying, LI Huan-Lin, DENG Guo-Cheng, JIANG Lan, BAI Yue-Qiang  
(Pearl River Fishery Research Institute, CAFS, Guangzhou 510380)

**ABSTRACT** This paper describes that GCHV-892 has been domesticated continuously for 19 generations in cell line (PSF) in culture solution with certain concentration of liquid being from An (*Eucalyptus*) leaves, and has been attenuated. Effect of attenuation has been stabilized for continuous domestication from 19 to 29 gen. The effect of attenuation has still been stabilized for continuous domestication up to 37 gen. After the An liquid did not add to the culture solution from 27~37 gen., there are good innocuity and strong immunogenicity of virus for grass carp. Attenuated live vaccine prepared with the attenuated strain for grass carp is 100% in innocuity survival rate and immune protection rate. It shows that the An liquid is a good attenuated medicine for virus of hemorrhage of grass carp, and GCHAV-892 attenuated with An liquid is a good attenuated strain.

**KEYWORDS** *Ctenopharyngodon idella*, virus of hemorrhage, An (*Eucalyptus*) liquid, attenuation