

## 棘胸蛙虹彩病毒免疫方法研究

胡金春<sup>1,2</sup>, 胡霭臻<sup>1</sup>, 金米雪<sup>1</sup>, 林威丞<sup>1</sup>, 谢梦佳<sup>1</sup>, 包伊鹏<sup>1</sup>, 李柯<sup>1</sup>, 郑善坚<sup>1\*</sup>

(1. 浙江师范大学野生动物保护与利用技术中心, 浙江金华 321004; 2. 浙江省衢州市水产技术推广站, 浙江衢州 324002)

**摘要** [目的] 研究棘胸蛙虹彩病毒疫苗体表喷雾和肌肉注射的免疫效果, 为其免疫方法提供理论依据。[方法] 用不同浓度棘胸蛙虹彩病毒灭活疫苗进行体表喷雾免疫和肌肉注射免疫, 并进行血清抗体效价检测和相对免疫保护率测定。[结果] 注射  $0.2 \text{ mL } 1 \times 10^8 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$  疫苗组 21 d 血清中和抗体效价最高达到 380.2, 相对免疫保护率达到 80%; 体表喷雾  $1 \times 10^7 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$  疫苗组, 28 d 最高抗体效价为 320.0, 相对免疫保护率为 60%。[结论] 肌肉注射疫苗和体表喷雾疫苗对棘胸蛙都有较好的免疫效果, 肌肉注射疫苗组的免疫效果最佳, 但喷雾免疫可作为棘胸蛙快速无损免疫的一种有效途径。

**关键词** 棘胸蛙; 虹彩病毒; 喷雾免疫; 注射免疫**中图分类号** S947.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)07-0086-02**Study on the Immunological Method of Iridescent Virus in *Quasipaa spinosa*****HU Jin-chun<sup>1,2</sup>, HU Ai-zhen<sup>1</sup>, JIN Mi-xue<sup>1</sup> et al** (1. Wildlife Conservation and Utilization Technology Center, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004; 2. Aquatic Technology Promotion Station in Quzhou City, Quzhou, Zhejiang 324002)

**Abstract** [Objective] To determine the immune effect of body surface spray and intramuscular injection of iridescent virus vaccine on *Quasipaa spinosa*, and provide theoretical basis for its immunization. [Method] *Q. spinosa* was immunized with inactivated vaccine of iridescent virus by body surface spraying and muscle injection to determine serum antibody titer and relative immunity protection rate. [Result] The highest titer of serum neutralizing antibody was 380.2 in  $0.2 \text{ mL } 1 \times 10^8 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$  vaccine group after 21 days, and the relative immune protection rate was 80%. In the body surface spraying group ( $1 \times 10^7 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ ), the highest antibody titer was 320.0 after 28 days, and the relative immune protection rate was 60%. [Conclusion] Intramuscular vaccine and body surface spray vaccine both had good immune effects on *Q. spinosa*, and the immunization effect of intramuscular injection group was better, but the body surface spray immunization could be used as an effective way for fast and non-injury immunization of *Q. spinosa*.

**Key words** *Quasipaa spinosa*; Iridescent virus; Spray immunization; Injection immunization

棘胸蛙 (*Quasipaa spinosa*), 又名石蛙, 是我国棘蛙属中分布最广的物种之一, 主要分布于我国云南、贵州、安徽、江苏、浙江、江西、湖北、湖南、福建、广东、广西和香港等地区<sup>[1]</sup>。随着人工养殖的发展, 棘胸蛙病害也逐渐增多, 近年来在浙江丽水等地区养殖的棘胸蛙出现了较为严重的蛙病, 主要表现出体表腹部充血、头部和四肢皮肤出现溃烂等症状, 死亡率高达 90% 以上, 常规用药治疗效果不明显, 严重制约了棘胸蛙的养殖发展。经鉴定, 病原为虹彩病毒科 (Iridovirus) 蛙病毒属 (*Ranavirus*) 的种类, 暂命名为棘胸蛙虹彩病毒 (QSIV)。

虹彩病毒是一类感染低等脊椎动物和无脊椎动物的二十面体状、大型双链 DNA 病毒, 是水生动物的病毒性病原。蛙病毒最早于 20 世纪 60 年代从蝌蚪期的豹蛙 (*Rana pipiens*) 上分离<sup>[2]</sup>, 目前蛙病毒感染呈世界性分布, 包括北美、欧洲和亚洲, 病毒宿主广泛, 有超过 80 种爬行动物和两栖动物感染蛙病毒的报告, 且大部分病毒对宿主有较强的致病性和致死性<sup>[3-7]</sup>。疫苗免疫被认为是防治蛙病毒等病毒性疾病最安全、最有潜力的方法之一<sup>[8-9]</sup>。棘胸蛙胆小怕惊, 捕捉及疫苗注射容易造成其应激性损伤及机械性损伤, 体表喷雾免疫操作方便, 对棘胸蛙的应激及损伤小, 但上述 2 种免疫方法的免疫效果研究则鲜见报道。笔者对棘胸蛙虹彩病毒疫苗的不同免疫方法进行了研究, 以期对棘胸蛙等两栖

蛙类开展疫苗免疫提供技术支撑。

**1 材料与方法**

**1.1 材料** 棘胸蛙虹彩病毒 QSIV 由浙江省野生动物生物技术与保护利用重点实验室分离; 健康棘胸蛙, 购自浙江绿谷清泉石蛙养殖合作社, 平均规格 ( $52.0 \pm 3.5$ ) g; EPC 细胞由浙江省淡水水产研究所提供; ELISA 试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

**1.2 疫苗制备** 选择生长良好的鲤鱼上皮瘤细胞 (EPC 细胞), 接种棘胸蛙虹彩病毒 QSIV, 23 °C 条件下培养, 待细胞脱落 75% 以上时收集病毒, -20 °C 下保存。将所有制备的病毒液混合, 采用 Reed - Muench 法计算病毒滴度<sup>[10]</sup>。将病毒液稀释至  $1 \times 10^8 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ , 用 0.1%  $\beta$  - 丙内酯 4 °C 下灭活 72 h, 制备疫苗。

**1.3 免疫试验** 免疫前将棘胸蛙随机均分为 6 组, 每组 20 只, 分别饲养在实验室人工蛙槽中适应 3 d。①、②、③组为注射组, 分别肌肉注射  $0.2 \text{ mL } 1 \times 10^7 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ 、 $1 \times 10^8 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$  的疫苗和等剂量的 PBS。④、⑤、⑥组为喷雾组, 用喷壶将浓度稀释为  $1 \times 10^7 \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$  的疫苗喷雾到棘胸蛙的体表皮肤, 其中④组仅喷雾 1 次; ⑤组每 10 min 喷雾 1 次, 连续喷雾 5 次; ⑥组喷洒纯水, 喷洒后 10 min 放回养殖槽。免疫后每隔 7 d 随机取 1 只棘胸蛙心脏采血 1 次, 共采血 4 次。将血样先室温静置 1 h, 4 °C 冰箱中静置 24 h, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清用于血清抗体效价检测。

**1.4 免疫效果评价**

**1.4.1 血清抗体效价检测。** 将疫苗 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清用包被液稀释, 在 96 孔酶标板各孔中加入稀

**基金项目** 浙江省公益性项目 (2016C32057)。**作者简介** 胡金春 (1969—), 男, 浙江龙游人, 高级工程师, 从事水生动物养殖及技术推广工作。\* 通讯作者, 副教授, 从事水生动物疾病防控技术研究。**收稿日期** 2017-11-20; **修回日期** 2018-01-09

释过的抗原 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱孵育 2 h 后, 取出用干各孔包被液, 每孔加入封闭液 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h 后用干封闭液, 用洗涤液洗板 2 次。将待测血清用洗涤液从 1:5 倍比稀释至 1:1 280, 每个稀释度 8 个重复, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  不同稀释度的血清, 并设置洗涤液为空白对照。37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱温浴 1 h 后洗板 4 次, 在酶标板各孔加入 1:5 000 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgG 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育, 1 h 后洗板 5 次, 各孔加入 TMB 显色液 100  $\mu\text{L}$ , 室温避光静置 10 min 后, 加入终止剂终止反应。在 405 nm 波长下, 测定光密度值。按照以下公式计算  $P/N$ :  $P/N = \text{检测孔 OD 值} / \text{阴性孔 OD 值}$ 。若  $P/N > 2.1$  则为阳性, 若  $P/N < 1.5$  则为阴性, 介于二者之间为可疑。以出现阳性孔的最高稀释度作为待检血清效价<sup>[11-12]</sup>。

**1.4.2 相对免疫保护率检测。** 免疫后 35 d, 选择抗体效价较高的喷雾免疫组(将浓度稀释为  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL 的疫苗每隔 10 min 进行 1 次体表喷雾, 连续 5 次)和注射免疫组(0.2 mL  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL)进行攻毒试验, 另设置未经免疫的空白对照(CK), 每组 6 只棘胸蛙, 分别肌肉注射 0.2 mL 的  $1 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL 病毒液。攻毒后每天观察并记录感染发病与死亡情况, 连续观察 21 d, 计算相对免疫保护率。相对免疫保护率的计算公式<sup>[13]</sup>如下: 相对免疫保护率 =  $[1 - \text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率}] \times 100\%$ 。

## 2 结果与分析

**2.1 血清中和抗体效价检测** 采用 2 种不同免疫方法对棘胸蛙接种疫苗后, 14 d 开始产生较高的抗体, 其血清中和抗

体效价与对照组相比有显著升高(表 1)。注射免疫组在 21 d 达到最高的抗体效价, 注射 0.2 mL  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL 组的血清中和抗体效价达到 380.2。喷雾免疫组出现最高抗体效价要比注射免疫组晚, 喷雾免疫组在 28 d 出现最高抗体效价, 其中⑤组的抗体效价达到 320.0, 即喷雾组需要更长的时间才能发挥较好的免疫作用。对照组的血清抗体效价都小于 5。

表 1 棘胸蛙虹彩病毒免疫血清抗体效价

Table 1 Serum antibody titers of iridescent virus in *Q. spinosa* after immunization

组别 Group	免疫后天数 Days after immunization//d				
	1	7	14	21	28
①	<5.0	12.0	33.9	190.5	190.5
②	<5.0	17.0	87.2	380.2	320.0
③	<5.0	<5.0	<5.0	<5.0	<5.0
④	<5.0	8.5	47.9	112.2	160.0
⑤	<5.0	17.0	67.6	158.5	320.0
⑥	<5.0	<5.0	<5.0	<5.0	<5.0

**2.2 相对免疫保护率** 由表 2 可知, 对照组第 10 天出现症状, 第 11 天开始死亡, 第 21 天总死亡率为 83.3%。注射免疫组第 21 天总死亡率为 16.7%, 相对免疫保护率为 80%; 喷雾免疫组第 21 天的总死亡率为 33.3%, 相对免疫保护率为 60%。注射免疫组效果较好, 但喷雾免疫组也显示出较好的免疫保护率。

表 2 各组相对免疫保护效果

Table 2 Relative immune protection effect in each group

组别 Group	感染发病死亡数 Diseased and dead number after infection													
	8 d	9 d	10 d	11 d	12 d	13 d	14 d	15 d	16 d	17 d	18 d	19 d	20 d	21 d
注射免疫组 Injection immunization group	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
喷雾免疫组 Spraying immunization group	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
对照组 CK	0	0	0	1	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0

## 3 讨论与结论

血清抗体水平的高低与动物机体的免疫保护效果有着密切的关系。采用注射和喷雾的免疫方法, 棘胸蛙都产生了抗体, 喷雾免疫和注射免疫都可作为棘胸蛙虹彩病毒疫苗的免疫途径。其中注射 0.2 mL  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL 疫苗免疫组在 21 d 的血清中和抗体效价达到最高(380.2), 相对免疫保护率达到 80%; ⑤组在 28 d 的血清中和抗体效价达到最高(320.0), 相对免疫保护率为 60%。注射免疫的免疫效果要好于喷雾免疫。与注射免疫相比, 喷雾免疫需要更长的时间才能发挥较好的免疫保护作用。

目前, 疫苗免疫主要采用注射免疫, 喷雾免疫主要应用在禽类生产中, 通过气雾发生器将稀释后的疫苗形成一定大小的雾化离子, 均匀地悬浮于空气中, 随呼吸进入家禽体内产生抗体<sup>[14]</sup>。棘胸蛙属于两栖动物, 其可在陆地上生活, 体表裸露, 皮肤有丰富的微血管, 采用喷雾免疫, 可以利用体表皮肤及微血管吸收后进入体内产生抗体。该研究结果表明, 棘胸蛙虹彩病毒疫苗采用喷雾免疫, 可以产生有效的血清抗

体效价和较高的免疫保护力, 且操作简便, 对棘胸蛙不造成损伤。虽然其免疫效果不如注射免疫, 但若结合免疫增强剂、体表高效渗透剂等相关研究, 喷雾免疫将成为两栖类动物的一种高效、便捷的无损伤免疫途径, 为蛙病疫苗的研究与使用提供良好前景。

## 参考文献

- [1] 梅玮芸, 叶容晖, 宋婷婷, 等. 浙江省棘胸蛙养殖现状及发展对策[J]. 浙江农业科学, 2015, 56(7): 1122-1125.
- [2] GRANOFF A, CAME P E, BREEZE D C. Viruses and renal carcinoma of *Rana pipiens*. I. The isolation and properties of virus from normal and tumor tissue[J]. Virology, 1966, 29(1): 133-148.
- [3] 王广军. 虹彩病毒生物学研究现状及展望[J]. 湛江海洋大学学报, 2004, 24(3): 74-78.
- [4] ALLENDER M. Characterizing the epidemiology of ranavirus in North American chelonians: Diagnosis, surveillance, pathogenesis, and treatment [D]. Illinois; University of Illinois at Urbana-Champaign, 2012.
- [5] CHEN Z X, ZHEN J C, JIANG Y L. A new iridovirus isolated from soft-shelled turtle[J]. Virus research, 1999, 63(1/2): 147-151.
- [6] 刘晓东, 杨金先, 龚晖, 等. 一株牛蛙源虹彩病毒的分离及鉴定[J]. 中国动物传染病学报, 2012, 20(1): 16-21.

2.1.5.6 盐酸标准溶液浓度合成标准不确定度。 $u_r(C_{\text{HCl}}) = 0.003\ 24$ 。

2.2 合成不确定度分量的计算及分析 由上述可得到计算蛋白质含量不确定度的有关量值。

根据公式(2)得到  $X$  的相对合成标准不确定度为  $u_r(X) = 0.008\ 03$ ,  $u(X) = 0.010\ 4\%$ 。

对各影响蛋白质含量的测定因素的分量进行分析,从表4可以看出,仪器自动滴定的体积对测定结果影响最大,占分量总和的34.94%,是影响测定结果不确定度来源的主要分量。其次是重复性试验、盐酸标准溶液的浓度以及数字修约的影响,样品称量所引入的不确定度是最弱小的,可以忽略不计。

表4 合成标准不确定度分量的分析

Table 4 Analysis of combined standard uncertainty components

参数 Parameter	$u_r$	各分量占总和的百分比 The percentage of each component as a sum//%
$X$	0.004 49	29.16
仪器滴定体积 Instrument titration volume	0.005 38	34.94
$m$	0.000 066 6	0.43
数字修约 Data rounding	0.002 22	14.42
$C$	0.003 24	21.04
分量总和 Total of component	0.015 4	—

2.3 扩展不确定度 取包含因子  $k = 2$  (置信概率95%),则  $U = 2 \times u(X) = 0.020\ 8\%$ , 蛋白质含量为  $(1.30 \pm 0.03)\%$ 。

### 3 结论与讨论

(1)影响样品测定结果的不确定度分量很多,此次采用

全自动凯氏定氮仪测定核桃花生奶中蛋白质含量,其测量不确定度主要来源于仪器自动滴定体积的不确定度,其次是检测过程重复性试验的不确定度,即随机效应导致的不确定度、盐酸标准溶液浓度的不确定度以及数字修约引入的不确定度。因此,仪器的先进性成为减小合成不确定度的主要因素。

(2)从检测过程重复性的不确定度即随机效应导致的不确定度部分可以看出:重复性产生的不确定度主要来源于样品的称量、消化及自动蒸馏、滴定全过程的重复性试验,综合上述的各分量所占比重,得出为减少重复性检测所产生的不确定度,需要特别注意样品消化、自动蒸馏、滴定的过程。

(3)从盐酸标准溶液浓度的不确定度可以看出:主要来源于盐酸标定过程中滴定体积引入的不确定度,因此要特别注意在滴定过程中,准确判定终点,以减少因此产生的不确定度。

### 参考文献

- [1] 黄奕娜,侯晓东,张树潮,等.乳粉中蛋白质含量测定结果的不确定度评定[J].食品研究与开发,2008,29(10):98-100.
- [2] 姜诚,沙祎炜.婴幼儿奶粉中蛋白质测定的不确定度的评定[J].乳业科学与技术,2008(3):123-125.
- [3] 程树维,顾金玲,逢晶.自动凯氏定氮仪测定大豆中蛋白质含量的不确定度评定[J].食品科技,2007(5):231-233.
- [4] 潘葳,宋永康,黄星.自动凯氏定氮仪测定灵芝中蛋白质的不确定度评定[J].现代科学仪器,2009(2):92-95.
- [5] 徐志飞,李芳.凯氏定氮法测定蛋白粉中蛋白质含量的不确定度分析[J].中国卫生工程学,2015,14(4):361-362,365.
- [6] 国家质量技术监督局.测量不确定度评定与表示:JJF 1059—1999[S].北京:中国计量出版社,1999:7-10.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会.化学试剂 标准滴定溶液的制备:GB/T 601—2016[S].北京:中国标准出版社,2016.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会,国家食品药品监督管理局.食品中蛋白质的测定:GB 5009.5—2016[S].北京:中国标准出版社,2017.

(上接第87页)

- [7] 薛颖,白世卓,王晓龙.2株东北林蛙源蛙病毒 MCP 基因序列分析[J].经济动物学报,2011,15(4):187-189.
- [8] 盛慧英,吴小平,张奇亚.单克隆抗体技术在水生动物病毒研究中的应用[J].中国病毒学,2003,18(2):187-190.
- [9] 奕志娟.草鱼出血病细胞灭活疫苗的免疫效果评价[D].温州:温州医科大学,2015.
- [10] REED L J, MUENCH H. A simple method of estimating fifty percent endpoints[J]. Am J Hyg, 1938, 27(3):493-497.
- [11] 王琳琳,杨娜,袁悦,等.人叶酸受体自身抗体 IgG 酶联免疫吸附试验

检测方法的建立及评价[J].北京大学学报(医学版),2014,46(3):483-487.

- [12] 黄立平,刘长明,危艳武,等.猪圆环病毒2型血清中和抗体阻断 ELISA 检测方法的建立及应用[J].中国兽医科学,2009,39(9):779-785.
- [13] 曾宪辉,曾令兵,周勇,等.大鲵虹彩病毒主衣壳蛋白 MCP 基因 DNA 疫苗的构建及其免疫效果[J].中国水产科学,2015,22(5):1055-1067.
- [14] 邵磊,何琴.鸡喷雾免疫技术要点[J].家禽科学,2015(7):20-21.

## 科技论文写作规范——缩略语

采用国际上惯用的缩略语。如名词术语 DNA(脱氧核糖核酸)、RNA(核糖核酸)、ATP(三磷酸腺苷)、ABA(脱落酸)、ADP(二磷酸腺苷)、CK(对照)、CV(变异系数)、CMS(细胞质雄性不育性)、IAA(吲哚乙酸)、LD(致死剂量)、NAR(净同化率)、PMC(花粉母细胞)、LAI(叶面积指数)、LSD(最小显著差)、RGR(相对增长率),单位名缩略语 IRRI(国际水稻研究所)、FAO(联合国粮农组织)等。对于文中有些需要临时写成缩写的词(如表及图中由于篇幅关系以及文中经常出现的词而写起来又很长时),则可取各主要词首字母写成缩写,但需在第一次出现处写出全称,表及图中则用注解形式在下方注明,以便读者理解。