

# 石斑虹彩及神經壞死病毒不活化疫苗之研發

黃淑敏\*<sup>1</sup>、涂堅<sup>1</sup>、蘇杰夫<sup>1</sup>、廖培志<sup>2</sup>、林上海<sup>3</sup>、張惟茗<sup>1</sup>

<sup>1</sup>行政院農業委員會家畜衛生試驗所

<sup>2</sup>雲林縣家畜疾病防治所

<sup>3</sup>上海水產動物醫院

## 摘要

本研究利用本所分離的虹彩病毒及神經壞死病毒病毒株，分別選取 90-點帶石斑株之虹彩病毒及 94-471 棕點石斑株之神經壞死病毒為疫苗株，進行宿主感受性測試並測定其半致死劑量 (LD<sub>50</sub>)，以決定其攻毒劑量，評估其不同之不活化條件、搭配不同佐劑、不同的抗原與佐劑比及不同之免疫途徑，以研發單價不活化病毒疫苗，評估疫苗之效力。結果顯示，在宿主感受性試驗發現金目鱸、紅魚及點帶石斑對虹彩病毒都非常敏感，其 LD<sub>50</sub> 力價分別位於 10<sup>4.5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL、10<sup>6.5</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 及 10<sup>5.9</sup> TCID<sub>50</sub>/mL。神經壞死病毒之敏感性宿主試驗發現金目鱸及點帶石斑其 LD<sub>50</sub> 力價分別為 10<sup>4.6</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 及 10<sup>6.9</sup> TCID<sub>50</sub> /mL。在不活化病毒試劑比較結果，以 0.1% 福馬林於 4°C 不活化虹彩病毒之疫苗效力之保護指數為 60% 較 37°C 不活化之疫苗效力為高。在不同佐劑及投予方式之比較結果發現，單價點帶石斑虹彩病毒不活化疫苗其混以佐劑 B 之疫苗效力之保護指數為 53.4% 較佐劑 A 及佐劑 C 為高；以腹腔注射混有佐劑 B 之疫苗，其保護指數為 73%；混有 MVP 佐劑疫苗之保護指數只有 50%；腹腔注射的免疫效果較肌肉注射效果為佳。在單純溫度不活化結果顯示，單價棕點石斑神經壞死病毒不活化疫苗之初步結果發現，以 37°C 不活化之疫苗效力較 56°C 及 70°C 不活化為佳。

**關鍵字:** 虹彩病毒、神經壞死病毒、病毒性疾病、免疫

## 前言

我國石斑魚苗養殖業目前成長受限於石斑虹彩病毒感染症 (Grouper Iridovirus Infection) 及神經壞死病毒 (Nervous necrosis virus, NNV)，損失高達八成 (1,2)。此兩種病毒皆會造成二十餘種之魚類感染且使現今養殖產業變成疾病發生高風險之產業。為提昇養殖魚類之產量又兼顧優良、安全之生產品質，以發展疫苗控制上述疾病成為唯一的對策。日本針對嘉納魚之虹彩病毒已有不活化單價疫苗及雙價疫苗

上市，作為防疫之策略。因此，本研究擬利用本所自行分離的虹彩病毒及病毒神經壞死病毒株，測試病毒不活化條件及搭配不同佐劑研發單價或二價不活化病毒疫苗，評估疫苗之效力以及免疫的最佳投予時間，期待能研發出具有經濟效益、穩定有效益的疫苗，也能立即解決現今養殖業的窘境，並提昇養殖產業之國際競爭力。

\*抽印本索取作者  
行政院農業委員會家畜衛生試驗所

## 材料與方法

### 病毒分離、增殖及力價測定

收集 2000 年至 2004 年之點帶石斑、龍膽石斑、棕點石斑、赤鰭笛鯛及黃臘鰻等重要經濟養殖海水魚種之發病魚體，將病材以研材鉢及杵加以研磨，並加入 10 倍 Leibovitz' s L-15 Medium 培養液，取上清液以 0.45  $\mu$ m 過濾膜過濾，海水魚病材接種 0.5 mL 過濾液於自行開發之石斑魚腎臟 (GK cell)、胚胎細胞株 (GE cell) 及 E11 細胞株進行虹彩病毒、神經壞死病毒之分離及增殖，於 25°C 感作 1 小時，加入含 2% 胎牛血清之 L-15 培養液，每日觀察細胞病變之出現。若 10 日後無細胞病變出現，則再冷凍解凍細胞一次，重新盲目繼代後予以判定結果。病毒力價測試方法依據 (5)。

### 石斑虹彩病毒及神經壞死病毒之不活化條件測試

比較福馬林 (formaline) 及二乙二胺 (binary ethyleneimine; BEI) 兩種試劑於不同濃度 (0.1% formaline、0.2% formaline、0.3% formaline 及 1%、2% 及 5% BEI) 及不同溫度 (37°C、25°C、4°C) 於不同時間 (3 天、5 天、7 天、10 天及 12 天) 對石斑虹彩病毒進行不活化條件之測試，以細胞接種感染方式進行評估。依文獻指出 (Frenichs et al., 2000) 神經壞死病毒對福馬林之感受性不強，擬設計不同處理之溫度 (75°C、56°C、37°C) 及 37°C 混合 0.3% 福馬林於不同之不活化時間 (45 分、2 小時、4 小時、3 天、6 天、8 天及 12 天) 進行神經壞死病毒之不活化條件之測試，並依各種不活化病毒之條件，製成疫苗，進行疫苗效力之評估。

### 石斑虹彩病毒及神經壞死病毒之感受性宿主測試並測定其半致死計量 LD<sub>50</sub>

將病毒力價為  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL 以上之虹彩病毒，依等量 10 倍連續稀釋後以 0.1 mL 腹腔接種於點帶石斑 (平均體重 4.7 克重)、赤鰭笛鯛 (平均體重 1.8 克重)、金目鱸 (平均體重 1.5 克重)，於接種感染後 20 天每天觀查及記錄死亡隻數。將病毒力

價為  $10^{7.2}$  TCID<sub>50</sub>/mL 之神經壞死病毒，依等量 10 倍連續稀釋後以 0.1 mL 肌肉接種於點帶石斑 (平均體重 4.2 克重) 及金目鱸 (平均體重 5.5 克重)，於接種感染後 20 天每天觀查及記錄死亡隻數，以瞭解其致病性並測定其半致死計量以決定其攻毒計量。

### 單價石斑虹彩病毒不活化疫苗之不同免疫途徑之比較

本試驗主要仿照 (4) 之報告，以 0.1% 福馬林於 4°C 下不活化 12 天，製成不活化之病毒液上清液，以培養基測試其無細菌及黴菌生長，另以細胞接種並測試病毒不活化狀態，證實病毒已完全不活化。將不活化之病毒液與 MVP 及佐劑 B 依等比例混合，分別採以腹腔注射 0.1 mL、肌肉注射 0.1 mL 等之免疫方式進行免疫，14 天後分別以  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL 腹腔注射攻毒 0.1 mL，觀察 14 天，計算其防禦指數，以決定最佳免疫途徑。

### 單價石斑虹彩病毒不活化疫苗包被不同劑型佐劑之比較

本試驗主要仿照 (4) 之報告，以 0.1% 福馬林於 4°C 下不活化 12 天，製成不活化之病毒液上清液，以培養基測試其無細菌及黴菌生長，另以細胞接種並測試其安全性，證實病毒已完全不活化。取出部份上清液分別與不同劑型佐劑依比例加以混合，於實驗室內進行疫苗效力測定：選取每組 15 尾平均體重為 2.4 克之點帶石斑魚苗，分別為以佐劑 A (油包水佐劑)、佐劑 B (油包水佐劑)、佐劑 C (油性佐劑)、不活化病毒上清液浸潤 30 分、不活化病毒上清液 0.1 mL 腹腔免疫、陽性對照組及陰性對照組。每組 15 尾魚，每尾腹腔接種 0.1 mL 之各種劑型之試製疫苗，於免疫後第 14 天，分別以  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL 腹腔注射攻毒 0.1 mL，觀察 14 天，計算其防禦指數。

### 單價棕點石斑神經壞死病毒之不同不活化溫度之疫苗效力評估試驗

將含有  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL 之神經壞死病毒，以

37°C 不活化 12 天、37°C 加 0.3% 福馬林不活化 12 天、56°C 不活化 4 小時及 70°C 不活化 40 分〔2〕，將病毒完全不活化。以培養基測試其無細菌及黴菌生長，另以細胞接種測試其安全性，證實病毒已完全不活化。取出部份上清液與佐劑 B 依等比例加以混合，每組 15 尾魚，每尾腹腔接種 0.1 mL 試製疫苗，於免疫後第 14 天，分別以每毫升含  $10^7$  TCID<sub>50</sub> 之神經壞死病毒，以肌肉注射 0.1 mL 進行攻毒，觀察 14 天，計算其防禦指數。

## 結果

### 2001-2004 年石斑虹彩病毒及神經壞死病毒力價測定

利用本所已開發出 GE cell、GK cell 及 E11 之細胞株進行病毒分離及力價之測定。自野外分離所測得的石斑虹彩病毒之力價皆介於  $10^7$ - $10^8$  TCID<sub>50</sub>/mL 之間（表 1）。選定病毒力價可分別高達  $10^{8.3}$  TCID<sub>50</sub>/mL 之 90-點帶石斑及  $10^{8.14}$  TCID<sub>50</sub>/mL 之 92-1634 石斑病毒株進行半致死劑量 LD<sub>50</sub> 之測定。神經壞死病毒所測得的病毒之力價皆介於  $10^4$ - $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL 之間（表 2），選定病毒力價可分別高達  $10^{7.4}$  TCID<sub>50</sub>/mL 之 94-471 棕點石斑病毒株進行半致死劑量 LD<sub>50</sub> 之測定。

### 點帶石斑虹彩病毒及棕點石斑神經壞死病毒之不活化條件測試及疫苗效力之比較

以細胞接種方式比較不同的不活化試劑（formaline or binary ethyleneimine）、試劑濃度及不活化之溫度（4°C、25°C、37°C）對病毒毒力的影響，其結果為以 0.1% 之福馬林於 37°C 下不活化 5 天，此條件之不活化的速度最快，其次為以 0.1% 之福馬林於 25°C 不活化 5 天及 4°C 不活化 10 天均可將病毒殺死（表 4）。比較 0.1% 之福馬林於 37°C 下不活化 5 天及 4°C 不活化 10 天之試製疫苗之效力評估後發現，以 37°C 下不活化 5 天之疫苗保護效力只有二成或甚至不具保護之效果，而於 4°C 不活化 10 天之疫苗效力有 6 成（表 11）。另以不同溫度

（70°C、56°C、37°C）將神經壞死病毒不活化，結果發現以 70°C 不活化 40 分及 56°C 不活化 2 小時及 37°C 不活化 12 天才能將病毒不活化成功（表 3）。

### 點帶石斑虹彩病毒及棕點石斑神經壞死病毒之感受性宿主測試並測定其半致死計量 LD<sub>50</sub>

將 90-點帶石斑病毒株，其病毒力價為  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL，依等量 10 倍連續稀釋後以 0.1 mL 腹腔接種於點帶石斑（平均體重 4.7 克重）、赤鰭笛鯛（平均體重 1.8 克重）、金目鱸（平均體重 1.5 克重），於接種感染後 20 天，每天觀察及記錄死亡隻數，以計算病毒在各感受性宿主之半致死計量 LD<sub>50</sub>，其結果點帶石斑之 LD<sub>50</sub> 為  $10^{5.9}$  TCID<sub>50</sub>/mL、赤鰭笛鯛之 LD<sub>50</sub> 為  $10^{6.5}$  TCID<sub>50</sub>/mL、金目鱸為  $10^{5.9}$  TCID<sub>50</sub>/mL（表 5、表 6、表 7）。在感受性宿主試驗發現金目鱸、紅魚及點帶石斑對虹彩病毒都非常敏感。神經壞死病毒之敏感性宿主試驗，擬採以每 mL 含有  $10^{7.2}$  TCID<sub>50</sub> 之棕點石斑神經壞死病毒以肌肉接種於平均體重為 5.5 克之金目鱸苗及 4.2 克之點帶石斑以進行半致死計量之測定，其半致死計量之結果分別為  $10^{4.46}$  TCID<sub>50</sub>/mL 及  $10^{6.9}$  TCID<sub>50</sub>/mL（表 8、表 9），由以可知神經壞死病毒對金目鱸較點帶石斑為敏感。

### 單價點帶石斑不活化疫苗初步實驗室接種疫苗之效力評估

本試驗主要仿照〔4〕之報告，以 0.1% 福馬林於 4°C 下不活化 12 天，製成不活化之病毒液上清液，並混以不同之佐劑（MVP 及佐劑 B），分別以肌肉注射及腹腔注射接種於平均體重 4.2 克石斑魚，並於接種疫苗後 14 天，以  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL 的病毒進行攻毒，以評估疫苗效力。初步結果顯示：以腹腔注射之混有佐劑 B 之疫苗，其保護指數為 73%；而混有 MVP 佐劑其疫苗的保護指數只有 50%；腹腔注射所產生的免疫效果較肌肉注射效果為佳（表 10）。由以上結果得知，以腹腔注射福馬林不活化之單價虹彩疫苗其保護指數為 73%，應具有研究及開

發的之潛力。此外以不含佐劑之不活化病毒上清液以浸潤方式浸泡 30 分鐘，亦發現具有近五成的保護效果（表 11）。

#### 單價點帶石斑虹彩病毒不活化疫苗之不活化溫度及佐劑劑型之比較

以 0.1% 福馬林於 4°C 下不活化 12 天，製成不活化之病毒液上清液，於接種疫苗後 14 天，以  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL 的病毒量攻毒，評估疫苗效力。以不同之佐劑（A、B、C）、不含佐劑之病毒上清液、不同不活化病毒之溫度（4°C 及 37°C）、不同抗原及佐劑含量比製成疫苗，以進行疫苗效力之評估，結果發現，以 4°C 不活化病毒之疫苗效力大於 37°C 不活化之疫苗，佐劑 B 效果大於佐劑 A 及佐劑 C，其中佐劑 C 之毒性非常大，於注射後 3 日，15 尾魚全數死光。此外再次以不含佐劑之不活化病毒上清液以浸潤方式浸泡 30 分鐘，發現具有近五成的保護效果（PI=46.7%）。由初步結果顯示：以 4°C 不活化病毒之疫苗效力較佳（表 11）。

#### 單價棕點石斑神經壞死病毒之不活化疫苗含有量效力評估試驗

以每毫升含有  $10^7$  TCID<sub>50</sub> 之棕點石斑神經壞死病毒於 37°C 不活化 12 天後，以 10 倍連續稀釋為  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL、 $10^5$  TCID<sub>50</sub>/mL、 $10^3$  TCID<sub>50</sub>/mL 後，以等比例方式混以佐劑 B，並接種於平均體重為 22.5 克之金目鱸苗以進行疫苗含有量效力評估試驗，於接種疫苗後 14 天，以  $10^{7.2}$  TCID<sub>50</sub>/mL 的病毒量攻毒，其結果為陽性對照組於接種病毒後 14 天，並無死亡之發生，以致試驗無法評估（表 12）。

#### 單價棕點石斑神經壞死病毒之不同不活化溫度之疫苗效力評估試驗。

將含有  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/mL 之神經壞死病毒，以 37°C 不活化 12 天、37°C 加 0.3% 福馬林不活化 12 天、56°C 不活化 4 小時及 70°C 不活化 40 分，將病毒完全不活化。以培養基測試其無細菌及黴菌生長，另以細胞接種測試其安全性，證實病毒已完全不

活化。取出部份上清液與佐劑 B 依等比例加以混合，每組 15 尾魚，每尾腹腔接種 0.1 mL 試製疫苗，於免疫後第 14 天，分別以每毫升含  $10^7$  TCID<sub>50</sub> 之神經壞死病毒，以肌肉注射 0.1 mL 進行攻毒，觀察 14 天，計算其防禦指數。但可由初步結果顯示以 70°C 進行病毒不活化，病毒於 40 分鐘之內即被不活化完全，但以此不活化條件所製成之疫苗，其效力不佳；相似結果亦於 56°C 不活化 4 小時之疫苗發現，由以上結果發現以 37°C 不活化神經壞死病毒所製成之疫苗效果為最好（表 13）。

## 討論

虹彩病毒為雙股 DNA 具有封套之病毒，對環境具有強的抵抗力，本病毒於鹼性環境下非常穩定，於 pH 值 2-11 的環境中作用 24 小時，其病毒力價仍可維持原病毒力價，無任何改變其力價之變化〔1〕，此結果亦可解釋病毒液添加二乙二胺不活化仍須要不活化 10 天後，才具有不活化之效果。神經壞死病毒對福馬林不敏感，對溫度較為敏感，以 60°C 不活化 30 分即可將病毒殺死、37°C 不活化 4 天即有顯著不活化效果，其他如 25°C 不活化 3 個月及 15°C 不活化 6 個月至 1 年皆無法不活化病毒〔3〕，以上兩種病毒對環境之抵抗力強，相對亦增加病毒不活化之困難。

本試驗以金目鱸測試單價棕點石斑神經壞死病毒之不活化疫苗含有量之效力評估發現，以  $10^{7.2}$  TCID<sub>50</sub>/mL 的病毒量攻毒，其結果為陽性對照組於接種病毒後 14 天，並無死亡之發生，以致試驗無法評估其保護指數，其可能原因為攻毒之病毒力價不高，或水的溫度不高所致，而導致對照組無法發病，但因依據文獻指出神經壞死病毒對金目鱸之感受性並無年齡之限制（從魚苗至大於 140 克之成魚皆有感受性），但文獻中有指出發病之水溫必須大於 25°C，有些文獻更指出溫度越高，發病率越高，28°C 下的發病率及死亡率為最高〔6〕，而本試驗過程中雖有放置加溫棒以控制水溫，但其水溫亦位於 21-24°C 之間，是否因水溫太低而無法致病則須再作進一步之

證明。

疫苗為達到完善、安全、有效的預防及控制病毒性疾病的方法之一。Nakajima 等人以福馬林不活化之日本 RSIV 疫苗，使用於石斑的免疫，其免疫成效可達七成〔4〕。此外，以田間試驗測試腹腔注射 RSIV 不活化疫苗對 red sea bream 疫苗效力評估，結果為疫苗組的死亡率（19.2%）顯著優於對照組的死亡率（68.5%），且發現疫苗組之增重明顯高於對照組。因此，開發一種具有經濟效益、穩定有效益的疫苗，也能立即解決現今養殖業的窘境，本試驗以腹腔注射混有佐劑 B 之疫苗，其保護指數為 73；混有 MVP 佐劑疫苗之保護指數只有 50；腹腔注射的免疫效果較肌肉注射效果為佳。由以上結果顯示以福馬林不活化之單價虹彩疫苗應具有研究及開發之潛力。

表 1. 2001-2004 年石斑虹彩病毒力價測定結果

	病毒株編號						
	90-1628	90-石斑	90-1247	92-1634	92-1864	91-935	94-232
魚種名稱	點帶石斑	點帶石斑	龍膽石斑	龍膽石斑	點帶石斑	點帶石斑	龍膽石斑
病毒代數	3	3	3	3	3	3	3
CPE 出現 時間	24hrs	24hrs	24hrs	48hrs	48hrs	48hrs	72hrs
TCID <sub>50</sub> /mL	10 <sup>7.7</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>8.2</sup>	10 <sup>8.14</sup>	10 <sup>7.38</sup>	10 <sup>6.89</sup>	10 <sup>7.91</sup>

表 2. 2001-2004 年神經壞死病毒力價測定結果

	病毒株編號						
	91-2004	91-918	93-1245	93-1386	94-224	94-374	94-471
魚種名稱	龍膽石斑	棕點石斑	赤鰭笛鯛	點帶石斑	點帶石斑	黃臘鯪	棕點石斑
病毒代數	3	3	3	3	3	3	3
CPE 出現 時間 (天)	10	11	10	7	10	12	3
TCID <sub>50</sub> /mL	10 <sup>4.2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6.4</sup>	10 <sup>6.8</sup>	10 <sup>6.8</sup>	10 <sup>4.8</sup>	10 <sup>7.2</sup>

表 3. 棕點石斑神經壞死病毒不活化條件測試結果

不同溫度及藥劑處理	不活化後時間/細胞分離結果						
	45 分	2 小時	4 小時	3 日	6 日	8 日	12 日
70°C	- <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-
56°C	+ <sup>3</sup>	+	-	-	-	-	-
37°C	+	+	+	+	+	+	-
37°C+0.3%Formaline	No cell <sup>1</sup>	No cell					

1：no cell:以福馬林不活化病毒液進行細胞分離接種對細胞株毒害太大而導致細胞無法存活。

2：不活化之病毒經細胞接種後分離結果為陰性。

3：不活化之病毒經細胞接種後分離結果為陽性。

表 4. 點帶石斑虹彩病毒不活化條件測試結果

不活化 藥劑	濃度 (%)	溫度 (°C)	不活化後時間/細胞分離結果				
			3 日	5 日	7 日	10 日	12 日
Formaline	0.1	37	No cell <sup>1</sup>	-/-*	-/-	-/-	-/-
	0.1	25	No cell	No cell/- <sup>2</sup>	-/-	-/-	-/-
	0.1	4	No cell	No cell/no cell	No cell/no cell	-/-	-/-
	0.2	37	No cell	No cell/no cell	No cell/no cell	-/-	-/-
	0.2	25	No cell	No cell/no cell	No cell/no cell	-/-	-/-
	0.2	4	No cell	No cell/no cell	No cell/no cell	No cell/-	-/-
	0.3	37	No cell	No cell/no cell	No cell/no cell	No cell/no cell	No cell/-
	0.3	25	No cell	No cell/no cell	No cell/no cell	No cell/no cell	No cell/-
	0.3	4	No cell	No cell/no cell	No cell/no cell	No cell/no cell	No cell/no cell
BEI	1	37	+ <sup>3</sup>	+	+	+	+
	1	25	+	+	+	+	+
	1	4	+	+	+	+	+
	2	37	+	+	+	+	-
	2	25	+	+	+	+	+
	2	4	+	+	+	+	+
	5	37	+	+	+	-	-
	5	25	+	+	+	+	+
	5	4	+	+	+	+	+

\*-/-：代表不活化病毒液接種結果為陰性/代表不活化病毒稀釋液接種結果為陰性

1：no cell:以福馬林不活化病毒液進行細胞分離接種對細胞株毒害太大而導致細胞無法存活。

2：不活化之病毒經細胞接種後分離結果為陰性。

3：不活化之病毒經細胞接種後分離結果為陽性。

表 5. 點帶石斑虹彩病毒接種於點帶石斑以測試其宿主感受性並測定其半致死計量 (LD<sub>50</sub>)

稀釋後病毒力價 <sup>1</sup>	點帶石斑虹彩病毒攻毒後之死亡天數/隻數 <sup>2</sup>							死亡數/存活數
	2	4	6	7	8	9	11	
10 <sup>6</sup>	0	1	1	1	0	2	1	6/4
10 <sup>5</sup>	0	0	0	1	0	1	1	3/7
10 <sup>4</sup>	0	0	0	0	1	1	1	3/7
10 <sup>3</sup>	0	0	0	1	0	1	0	2/8
10 <sup>2</sup>	0	0	1	0	0	1	0	2/8

**LD<sub>50</sub>**=10<sup>5.9</sup> TCID<sub>50</sub>/MI

1：虹彩病毒原液力價為 10<sup>8.33</sup> TCID<sub>50</sub>/ml

2：點帶石斑魚平均體重 4.7 克重；腹腔注射 0.1mL

表 6. 點帶石斑虹彩病毒接種於赤鰭笛鯛以測試其宿主感受性並測定其半致死計量 (LD<sub>50</sub>)

稀釋後病毒力價 <sup>1</sup>	點帶石斑虹彩病毒攻毒於赤鰭笛鯛後之死亡天數/隻數 <sup>2</sup>						死亡數/存活數
	2	3	7	8	9	10	
10 <sup>7</sup>	2	1	1	0	0	3	7/3
10 <sup>6</sup>	1	1	0	0	0	1	3/7
10 <sup>5</sup>	0	0	2	0	1	0	3/7
10 <sup>4</sup>	1	1	0	1	0	0	3/7
陽性對照組	0	7	3	0	0	0	10/0

**LD<sub>50</sub>**=10<sup>6.5</sup> TCID<sub>50</sub>/MI

1：虹彩病毒原液力價為 10<sup>8.33</sup> TCID<sub>50</sub>/mL

2：赤鰭笛鯛平均體重 1.8 克重；腹腔注射 0.1mL

表 7. 點帶石斑虹彩病毒接種於金目鱸以測試其宿主感受性並測定其半致死計量 (LD<sub>50</sub>)

稀釋後病毒力價 <sup>1</sup>	點帶石斑虹彩病毒攻毒於金目鱸後之死亡天數/隻數 <sup>2</sup>								死亡數/存活數
	2	4	6	8	11	13	17	20	
10 <sup>7</sup>	1	7	4	1	2	1	0	0	16/0
10 <sup>6</sup>	4	2	2	3	1	0	0	0	12/4
10 <sup>5</sup>	3	2	1	0	1	1	2	0	11/5
10 <sup>4</sup>	2	4	2	1	1	0	0	0	10/6
10 <sup>3</sup>	0	5	1	0	0	0	0	1	7/9
10 <sup>2</sup>	0	2	1	0	0	0	0	0	3/13
10 <sup>1</sup>	2	0	0	2	0	0	0	0	4/12

$$LD_{50}=10^{4.46} \text{ TCID}_{50} / \text{mL}$$

1：虹彩病毒原液力價為 10<sup>7.4</sup> TCID<sub>50</sub> /mL

2：金目鱸平均體重 1.5 克重；腹腔注射 0.1mL

表 8. 棕點石斑神經壞死病毒接種於金目鱸以測試其宿主感受性並測定其半致死計量 (LD<sub>50</sub>)

稀釋後病毒力價 <sup>1</sup>	棕點石斑神經壞死病毒攻毒於金目鱸魚後之死亡天數/隻數 <sup>2</sup>							死亡數/存活數
	2	4	7	10	11	14	16	
10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0	1	0	1/5
10 <sup>6</sup>	0	0	0	0	1	2	3	6/6
10 <sup>4</sup>	0	0	0	4	2	0	0	6/6

$$LD_{50}=10^{4.6} \text{ TCID}_{50} / \text{mL}$$

1：神經壞死病毒原液力價為 10<sup>7.2</sup> TCID<sub>50</sub> /mL

2：病毒株為 94-471 棕點石斑神經壞死病毒；金目鱸魚體平均體重 5.5 克

表 9. 棕點石斑神經壞死病毒接種於點帶石斑以測試其宿主感受性並測定其半致死計量 (LD<sub>50</sub>)

稀釋後病毒力價 <sup>1</sup>	棕點石斑神經壞死病毒攻毒於點帶石斑後之死亡天數/隻數 <sup>2</sup>							死亡數/存活數
	2	4	7	10	11	14	16	
10 <sup>7</sup>	0	0	2	4	2	2	0	10/2
10 <sup>6</sup>	0	0	0	1	1	2	0	4/8
10 <sup>5</sup>	0	0	0	0	1	1	0	2/10
10 <sup>4</sup>	0	0	0	0	1	1	0	2/10
10 <sup>3</sup>	0	0	0	1	0	0	0	1/11

LD<sub>50</sub>=10<sup>6.9</sup> TCID<sub>50</sub>/mL

1：神經壞死病毒原液力價為 10<sup>7.2</sup> TCID<sub>50</sub>/mL

2：病毒株為 94-471 棕點石斑神經壞死病毒；點帶石斑魚體平均體重 4.2 克

表 10. 點帶石斑虹彩病毒單價不活化疫苗之不同免疫途徑及不同佐劑劑型之疫苗效力評估

組別/免疫途徑	攻毒前隻數	攻毒後存活隻數	保護指數 (PI) *
MVP <sup>1</sup> , IM <sup>2</sup>	15	0	0
佐劑 B <sup>1</sup> , IM	15	5	33
MVP, IP <sup>2</sup>	6 <sup>3</sup>	3	50
佐劑 B, IP	15	11	73
陽性對照組	10	0	
陰性對照組	10	10	

\*：Protective index = (Positive control mortality – Experiment group mortality) × 100% / Positive control mortality

1：不活化疫苗混以 MVP 佐劑及佐劑 B；平均魚體重為 3.5 克，該組對照組死亡率為 100%

2：IM 為肌肉注射免疫；IP 為腹腔注射免疫

3：該組於攻毒前水質改變致魚體隻數減少

表 11. 單價點帶石斑虹彩病毒不活化疫苗之不同溫度及佐劑種類之疫苗效力評估

組別	攻毒前隻數	攻毒後存活隻數	保護指數*
0.1%福馬林 4°C 不活化 <sup>1</sup>	15	9	60
佐劑 B (5): 抗原 (5)			
0.1%福馬林 4°C 不活化 <sup>1</sup>	15	9	60
佐劑 B (3): 抗原 (7)			
0.1%福馬林 37°C 不活化 <sup>1</sup>	15	4	26.7
佐劑 B (5): 抗原 (5)			
0.1%福馬林 37°C 不活化 <sup>1</sup>	15	0	0
佐劑 B (3): 抗原 (7)			
佐劑 (A) <sup>1</sup>	15	7	46.7
佐劑 (B) <sup>1</sup>	15	8	53.4
佐劑 (C) <sup>1</sup>	15	0	0
不活化病毒上清液 <sup>1</sup>	15	7	46.7
浸潤 30 分鐘			
不活化病毒上清液 <sup>1</sup>	15	4	26.7
腹腔免液 0.1ml			
陽性對照組	15	0	
陰性對照組	15		

\* : Protective index = (Positive control mortality – Experiment group mortality) × 100  
%/ Positive control mortality

1 : 此次不活化虹彩病毒疫苗含有量為 10<sup>6.5</sup> TCID<sub>50</sub> /mL

2 : 點帶石斑魚平均體重 2.4 克

表 12. 單價棕點石斑神經壞死病毒之不活化疫苗含有量效力評估試驗

稀釋後病毒力價 <sup>1</sup>	攻毒前隻數	攻毒後存活隻數	保護指數*
10 <sup>7</sup>	6	6	無法計算
10 <sup>5</sup>	6	6	無法計算
10 <sup>3</sup>	6	6	無法計算
陽性對照組 <sup>2</sup>	6	6	
陰性對照組	6	6	

\* : Protective index = (Positive control mortality – Experiment group mortality) × 100  
%/ Positive control mortality

1 : 神經壞死病毒原液力價為 10<sup>7.2</sup> TCID<sub>50</sub> /mL

2 : 病毒株為 94-471 棕點石斑神經壞死病毒；金目鱸魚體平均體重 22.5 克

表 13. 不同溫度不活化棕點石斑神經壞死病毒之疫苗效力評估

組別 <sup>1</sup>	攻毒前隻數	攻毒後存活隻數	保護指數*
37°C 不活化 12 天	17	13	66.5
37°C +3%福馬林不活化 12 天	18	4	-11
70°C 不活化 40 分	19	4	-12.7
56 不活化 4 小時	10	0	-42
陽性對照組 <sup>2</sup>	10	3	
陰性對照組	10		

\* : Protective index = ( Positive control mortality – Experiment group mortality )  
 × 100% / Positive control mortality

1 : 神經壞死病毒原液力價為  $10^{7.2}$  TCID<sub>50</sub> /mL

2 : 病毒株為 94-471 棕點石斑神經壞死病毒；點帶石斑魚體平均體重 7.2 克

## 參考文獻

1. Chou HY, Hsu CC, Peng TY. Isolation and characterization of a pathogenic iridovirus from cultured Grouper (*Epinephelus sp.*) in Taiwan. Fish Pathology 33 (4), 201-206, 1998.
2. Coeurdacier JL, Laporte F, Pepin JF. Preliminary approach to find synthetic peptides from nodavirus capsid potentially protective against sea bass viral encephalopathy and retinopathy. Fish & Immunology 14:435-447, 2003.
3. Frenichs G.N, Tweedie A, Starkey WG., Richards RH. Temperature, pH and electrolyte sensitivity, and heat, UV and disinfectant inactivation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) neuropathy nodavirus. Aquaculture 185: 13-24, 2000.
4. Nakajima K, Ito T, Kurita J, Kawakami H, Itano T, Fukuda Y, Aoi Y, Tooriyama T, Manabe S. Effectiveness of a vaccine against red sea bream iridoviral disease in various cultured marine fish under laboratory conditions. Fish Pathology 37 (2), 90-91, 2002.
5. Reed, LJ, and Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am. J. Hyg. 27:493-497, 1938.
6. Skliris G.P, Richards, RH. Induction of nodavirus disease in seabass, *Dicentrarchus labrax*, using different infection models. Virus research 63: 85-93, 1999.

## Development inactive vaccine of iridovirus and nervous necrosis virus for grouper

Haung SM\*<sup>1</sup>, Tu C<sup>1</sup>, Su JF<sup>1</sup>, Liao PC<sup>2</sup>, Lin SH<sup>3</sup>, Chang WM<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Animal Health Research Institute, Counci of Agriculture, Executive Yuan

<sup>2</sup>Animal Disease Control Center of Yun-Lin

<sup>3</sup>Shang-Hai Aquatic Hospital

**Abstract** In this project, we select the field virus with high virulence and antigenicity as the seed virus for vaccine, strain 90-grouper for iridovirus and strain 94-471 for nervous necrosis virus. To evaluate the efficacy of vaccine, we determine the half lethal dose of suspected hosts like sea bass, grouper, crimson snapper to decide challenge dose, different combination of adjuvants and routes of administration for development an univalent or bivalent vaccine. The results shows the suspected hosts like sea bass, grouper and crimson snapper all sensitive to iridovirus, whose LD<sub>50</sub> for sea bass, grouper and crimson snapper were to 10<sup>4.5</sup>TCID<sub>50</sub>/ml, 10<sup>6.5</sup>TCID<sub>50</sub>/ml and 10<sup>5.9</sup>TCID<sub>50</sub>/ml respectively. In nervous necrosis virus, the suspected hosts were sea bass and grouper, whose LD<sub>50</sub> were 10<sup>4.6</sup>TCID<sub>50</sub>/ml and 10<sup>6.9</sup> TCID<sub>50</sub> /ml respectively. We found 0.1% formalin inactive vaccine at 4°C had 60% protective index higher than at 37°C; the efficacy of univalent inactive iridovirus vaccine with adjuvants B is better than with adjuvants A and C. The protective indexes in vaccine mixed with adjuvants B and delivered by intraperitoneal injection is 73%; the vaccine mixed with MVP adjuvants and delivered by intramuscularly injection is 50%. The route of vaccine delivery by intraperitoneal injection is better than intramuscularly injection. The preliminary results for the efficacy of univalent inactive nervous necrosis virus or bivalent vaccine indicated that the inactivation of virus at 37°C was better than at 56°C and 70°C.

*Keyword : iridovirus, nervous necrosis virus , viral diseases, Vaccination*