



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110893235 A

(43)申请公布日 2020.03.20

(21)申请号 201911103607.1

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2019.11.13

A61K 39/245(2006.01)

(83)生物保藏信息

A61P 31/22(2006.01)

CCTCC NO:C2018211 2018.09.28

C12N 5/079(2010.01)

(71)申请人 浙江省淡水水产研究所

C12N 7/00(2006.01)

地址 313001 浙江省湖州市杭长桥南路999号

C12N 7/02(2006.01)

申请人 成都天邦生物制品有限公司

(72)发明人 沈锦玉 曹铮 潘晓艺 夏焱春

姚嘉赞 蔺凌云 尹文林 刘忆瀚

陆裕肖 邢刚 岳丰雄 黄杰

(74)专利代理机构 成都天汇致远知识产权代理

事务所(普通合伙) 51264

代理人 韩晓银

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种鲫造血器官坏死病灭活疫苗及其制备方法

(57)摘要

本发明提供一种鲫造血器官坏死病灭活疫苗及其制备方法,该疫苗包括异育银鲫脊髓组织细胞系和鲤疱疹病毒Ⅱ型,并且异育银鲫脊髓组织细胞系的保藏编号为CCTCC NO:C2018211。制备方法包括以下步骤:培养异育银鲫脊髓组织细胞系;将培养的异育银鲫脊髓组织细胞系进行CyHV-2病毒扩增,获得CyHV-2病毒液;将CyHV-2病毒液进行灭活处理。本发明制备的疫苗免疫保护效果好,可应用于鲫造血器官坏死病的预防免疫,提高养殖鲫鱼的存活率和养殖效率。

1. 一种鲫造血器官坏死病灭活疫苗,其特征在于:包括异育银鲫脊髓组织细胞系和鲤疱疹病毒Ⅱ型,所述异育银鲫脊髓组织细胞系的保藏编号为CCTCC NO:C2018211。

2. 根据权利要求1所述的一种鲫造血器官坏死病灭活疫苗,其特征在于:所述灭活疫苗还包括佐剂IMS1312。

3. 权利要求1或2所述的一种鲫造血器官坏死病灭活疫苗的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

步骤1,培养异育银鲫脊髓组织细胞系;

步骤2,将培养的异育银鲫脊髓组织细胞系进行CyHV-2病毒扩增,获得CyHV-2病毒液;

步骤3,将CyHV-2病毒液进行灭活处理。

4. 根据权利要求3所述的一种鲫造血器官坏死病灭活疫苗的制备方法,其特征在于:所述步骤1中培养异育银鲫脊髓组织细胞系,具体包括:

步骤1.1,无菌条件下取出异育银鲫脊髓组织,处理成30~60mm³的组织块,放入含L15培养液的培养皿中;再将组织块均匀放入T25细胞培养瓶中,放组织块的一面朝上,培养瓶中添加3ml L15培养液,过夜,慢慢将培养瓶侧过来,使组织块浸润培养液,再将组织块的一面朝上,期间不定期操作一次直至组织块边缘长出CSC细胞,将细胞培养瓶正置培养,每2~3天更换培养液一次;

步骤1.2,将长满单层CSC的培养皿中的培养基去除,加入体积浓度为0.25%的胰蛋白酶消化液消化1~2min,再加入pH在7.4~7.6的含有体积百分比10%的小牛血清的199培养基,用移液管轻吹细胞瓶底,再添加含有体积百分比10%的小牛血清的199培养基悬浮细胞,于23~25℃或37℃进行培养扩增,待CSC细胞在培养皿中铺满即得到异育银鲫脊髓组织细胞系。

5. 根据权利要求3所述的一种鲫造血器官坏死病灭活疫苗的制备方法,其特征在于:所述步骤2中将培养的异育银鲫脊髓组织细胞系进行CyHV-2病毒扩增,具体包括:

步骤2.1,在获得的异育银鲫脊髓组织细胞系中按照 1/10 的培养基体积接种感染复数1~5PFU/cell的CyHV-2病毒悬液,待病毒吸附细胞30~60min,补加含有体积百分比 2%的小牛血清的 199 培养基进行病毒增殖3~6天,获得病变细胞;

步骤2.2,将病变细胞反复冻融2~3次,于2000~3000r/min离心10~15min,收集上清液即CyHV-2病毒液。

6. 根据权利要求5所述的一种鲫造血器官坏死病灭活疫苗的制备方法,其特征在于:所述步骤2.2中冻融条件为:于-80℃冻存,然后于20~25℃自然溶解。

7. 根据权利要求3所述的一种鲫造血器官坏死病灭活疫苗的制备方法,其特征在于:所述步骤3中将CyHV-2病毒液进行灭活处理,具体包括:在CyHV-2病毒液中加入二乙烯亚胺至其终浓度为10mmol/L,得到的混合液于37℃灭活72h。

一种鲫造血器官坏死病灭活疫苗及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于兽用生物医药技术领域,具体涉及一种鲫造血器官坏死病灭活疫苗及其制备方法。

背景技术

[0002] 鲫造血器官坏死病(俗称鲫鳃出血病)是由鲤疱疹病毒Ⅱ型(Cyprinid herpesvirus Ⅱ, CyHV-2)感染引起,与鲤科鱼类的其他两种疱疹病毒CyHV-1 (Carp pox)和CyHV-3 (Koi herpesvirus, KHV)同属Alloherpesviridae科, Cypriniviruse属。CyHV-2于1995年首次被报道,1992~1993年间给日本西部养殖的金鱼造成巨大的经济损失,患病金鱼死亡率达100%。观赏鱼的国际贸易很大程度上促进了该病的全球传播。2011年匈牙利报道了养殖的银鲫也发现了CyHV-2感染。2009年起,在我国鲫鱼的主要养殖区江苏省暴发了由CyHV-2引起的鲫鱼造血器官坏死病,截至2019年9月中旬,江苏省内射阳、大丰、宝应、高邮、东台等地病害发生面积超过10万亩,发病塘口的死亡率高达90%,造成的经济损失已达数亿元。与此同时,在湖北、湖南、江西、浙江等省份,也相继在患病鲫鱼体内检测出CyHV-2。该病毒传染性强、致死率高,给鲫鱼养殖业造成了重大的经济损失,严重威胁该产业的健康发展。因此,如何预防和治疗鲫造血器官坏死病已成为当今鲫鱼养殖业急需解决的重要问题。

[0003] 疫苗免疫被认为是控制水生动物病毒性传染性疾病的最佳手段。疫苗作为化学药品和抗生素的替代品,是治疗疾病、特别是病毒病的最好选择。灭活疫苗具有较强的安全性和免疫原性,在哺乳动物和鸟类中,已有利用细胞系大规模繁殖病毒和生产灭活病毒疫苗的成功先例。病毒的灭活可采用物理的或化学的方法,在各种化学灭活剂中,二乙烯亚胺(BEI)直接与病毒核酸作用,灭活效果好,不作用于壳蛋白,不破坏病原体的免疫原性。而且灭活时间短,极易水解,无残留,并且水解产物无毒无害,已广泛应用于多种人和动物疫苗的生产。因此,针对鲫鱼造血器官坏死病,本发明首次利用鱼类细胞系——异育银鲫脊髓组织细胞系(Spinal cord tissue cell lines of *Carassius auratus gibelio*, CSC),建立了一种高效、安全、可规模生产的鲫造血器官坏死病病毒细胞培养灭活疫苗的制备方法,并制备出鲫造血器官坏死病细胞培养灭活疫苗。

发明内容

[0004] 针对现有技术存在的问题,本发明提供一种鲫造血器官坏死病灭活疫苗及其制备方法,效果良好,可广泛应用于水产养殖中疾病的防控。本发明的技术方案为:

[0005] 第一个方面,本发明提供一种鲫造血器官坏死病灭活疫苗,包括异育银鲫脊髓组织细胞系(CSC)和鲤疱疹病毒Ⅱ型,所述异育银鲫脊髓组织细胞系的保藏编号为CCTCC NO: C2018211,所述鲤疱疹病毒Ⅱ型可在CSC细胞中高拷贝复制,是中国流行的毒株。

[0006] 进一步地,所述灭活疫苗还包括佐剂IMS1312。

[0007] 第二个方面,本发明提供上述鲫造血器官坏死病灭活疫苗的制备方法,包括以下

步骤:

[0008] 步骤1,培养异育银鲫脊髓组织细胞系;

[0009] 步骤2,将培养的异育银鲫脊髓组织细胞系进行CyHV-2病毒扩增,获得 CyHV-2病毒液;

[0010] 步骤3,将CyHV-2病毒液进行灭活处理。

[0011] 进一步的,所述步骤1中培养异育银鲫脊髓组织细胞系,具体包括:

[0012] 步骤1.1,无菌条件下取出异育银鲫脊髓组织,处理成30~60mm³的组织块,放入含L15培养液的培养皿中;再将组织块均匀放入T25细胞培养瓶中,放组织块的一面朝上,培养瓶中添加3ml L15培养液,过夜,慢慢将培养瓶侧过来,使组织块浸润培养液,再将组织块的一面朝上,期间不定期操作一次直至组织块边缘长出CSC细胞,将细胞培养瓶正置培养,每2~3天更换培养液一次;

[0013] 步骤1.2,将长满单层CSC的培养皿中的培养基去除,加入体积浓度为0.25%的胰蛋白酶消化液消化1~2min,再加入pH在7.4~7.6的含有体积百分比10%的小牛血清的199培养基,用移液管轻吹细胞瓶底,再添加含有体积百分比10%的小牛血清的199培养基悬浮细胞,于23~25℃或37℃进行培养扩增,待CSC 细胞在培养皿中铺满即得到异育银鲫脊髓组织细胞系。

[0014] 进一步的,所述步骤2中将培养的异育银鲫脊髓组织细胞系进行CyHV-2 病毒扩增,具体包括:

[0015] 步骤2.1,在获得的异育银鲫脊髓组织细胞系中按照1/10的培养基体积接种感染复数1~5PFU/cell的CyHV-2病毒悬液,待病毒吸附细胞30~60min,补加含有体积百分比2%的小牛血清的199培养基进行病毒增殖3~6天,获得病变细胞;

[0016] 步骤2.2,将病变细胞反复冻融2~3次,于2000~3000r/min离心10~15min,收集上清液即CyHV-2病毒液。

[0017] 进一步的,所述步骤2.2中冻融条件为:于-80℃冻存,然后于20~25℃自然溶解。

[0018] 进一步的,所述步骤3中将CyHV-2病毒液进行灭活处理,具体包括:在 CyHV-2病毒液中加入二乙烯亚胺至其终浓度为10mmol/L,得到的混合液于37℃灭活72h。

[0019] 本发明的有益效果在于:本发明成功建立了一种对CyHV-2敏感的异育银鲫脊髓组织细胞系(Spinal cord tissue cell lines of *Carassius auratus gibelio*, CSC), CyHV-2能在该细胞系上进行连续稳定传代,能进行病毒的大规模培养,这对于开展疫苗的规模化生产与病害的免疫预防具有重要意义。此外,本发明的灭活疫苗的免疫实验证实其对于鲫造血器官坏死病的免疫保护效果良好,最高可达100%,提高养殖鲫鱼的存活率和养殖效率。并且,该灭活疫苗生产成本低、工艺简单且安全性能好,可广泛应用于水产养殖中的疾病防控。

具体实施方式

[0020] 在本发明的描述中,需要说明的是,实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0021] 下面结合具体的实施例对本发明做进一步详细说明,所述是对本发明的解释而不

是限定。

[0022] 实施例1

[0023] 本实施例提供一种鲫造血器官坏死病灭活疫苗的制备方法,包括以下步骤:

[0024] 步骤1,CSC细胞培养:无菌条件下取出异育银鲫脊髓组织,处理成 $30\sim 60\text{mm}^3$ 的组织块,放入含L15培养液的培养皿中;再将组织块均匀放入T25 细胞培养瓶中,放组织块的一面朝上,培养瓶中添加3ml L15培养液,过夜,慢慢将培养瓶侧过来,使组织块浸润培养液,再将组织块的一面朝上,期间不定期操作一次直至组织块边缘长出CSC细胞,将细胞培养瓶正置培养,每2~3 天更换培养液一次;取长满单层的CSC 1瓶,在无菌超净台里吸弃旧培养基,每瓶添加2ml浓度为0.25% (V/V) 胰蛋白酶消化液,消化1min左右,迅速添加2ml pH在7.4的含10% (V/V) 小牛血清的199培养基,用移液管轻吹细胞瓶底,再添加6ml含10% (V/V) 小牛血清的199培养基悬浮细胞。取2个T25细胞培养瓶,每瓶加4ml细胞悬液,置于25℃或37℃培养箱中培养,待细胞形成汇合单层并铺满培养皿后得到异育银鲫脊髓组织细胞系,用于扩增病毒,将该异育银鲫脊髓组织细胞系向中国典型培养物保藏中心CCTCC提交保藏,名称为:异育银鲫脊髓组织细胞系CSC,保藏日期为2018年9月28日,保藏编号为CCTCC NO:C2018211。保藏地址为中国武汉。

[0025] 步骤2,CyHV-2病毒扩增:吸出异育银鲫脊髓组织细胞系中的培养液,然后按1/10的培养基体积加入感染的病毒悬液,病毒的感染复数 MOI (Multiplicity of infection) 为1~5PFU/cell,在病毒吸附细胞60分钟后,补加含2% (V/V) 小牛血清的199 (pH7.2~7.5) 维持液进行病毒增殖。

[0026] 病毒的收获:病毒连续培养3~6天,在显微镜下观察,待CSC细胞出现典型细胞病变效应时,将T25细胞瓶置于-80℃冰箱冻存,结冻后取出细胞瓶放室温 (20~25℃,以下相同) 慢慢溶解,如此反复冻融两次,在超净台里用移液管轻吹培养瓶壁,将病毒感染的细胞悬液装入50ml无菌离心管里,以 2500r/min离心10min,收集离心后上清液,即获得扩增病毒原液,用于后续滴度实验以及灭活疫苗制备。

[0027] 病毒滴度测定:将CyHV-2疫苗毒株进行传代扩增,收集病变细胞和病毒裂解液后,进行TCID₅₀测定。首先,在96孔细胞培养板中将CSC细胞培养至单层细胞备用,用维持液将CyHV-2病毒液作连续10倍稀释,即 10^{-1} 、 10^{-2} …… 10^{-10} 每个稀释度取100μL加入96孔细胞培养板中,每个稀释度作8个重复,并设空白细胞培养对照。置24℃培养箱中。逐日观察细胞病变,并记录细胞病变孔数,直到对照细胞老化脱落为止。按Reed-Muench法计算病毒滴度TCID₅₀值,如表1所示。病毒接种细胞后不同天数的病毒感染量,第10天TCID₅₀最高为 $10^{9.67}$ 。

[0028] 表1CyHV-2TCID₅₀检测

	感染时间(d)						
	5	6	7	8	9	10	11
[0029] TCID ₅₀	$10^{6.33}$	$10^{6.6}$	$10^{8.4}$	$10^{8.8}$	$10^{9.2}$	$10^{9.67}$	$10^{8.8}$

[0030] 步骤3,病毒的灭活:取100ml病毒原液,加入二乙烯亚胺 (BEI),病毒液与BEI混合均匀后BEI终浓度为10mmol/L,将混合液于37℃灭活72h,待灭活结束后添加终浓度为10mmol/L的亚硫酸钠中和残余BEI,即获得病毒灭活疫苗原液,并置于4℃冰箱保存备用。

[0031] 灭活病毒疫苗的使用:将病毒灭活疫苗原液用鱼用生理盐水 (0.65%) 稀释至效价

为 $2 \times 10^{7.3}$ TCID₅₀/ml, 加入1:1的佐剂IMS1312混匀, 即得到可直接使用的鲫鱼造血器官坏死病细胞培养灭活疫苗。

[0032] 实施例2

[0033] CyHV-2灭活条件的确定及安全性试验。

[0034] 按照实施例1的方法获得扩增病毒原液, 分成3等分, 分别加入BEI至BEI 终浓度分别为5mmol/L、8mmol/L、10mmol/L, 在37℃恒温摇床中120r/min灭活24h、48h、72h后, 用同等浓度硫代硫酸钠溶液终止灭活并取样。取制备好的疫苗按上述病毒增殖的方法接种CSC细胞, 同时设置阴性对照, 观察7~10天, 若出现细胞病变效应则表明病毒灭活不完全; 若未见细胞病变效应, 再盲传2次, 若盲传出现细胞病变, 则表明病毒灭活仍不完全, 若盲传2次均未出现细胞病变, 则表明病毒灭活完全, 疫苗安全。检测结果见表2。

[0035] 表2不同浓度的BEI处理病毒不同时间后的细胞盲传结果

[0036]	灭活终浓度	灭活时间 (h)	CPE	备注
	(mmol/L)			
[0037]	5	24	+++	灭活温度和转速 37℃ ; 120r/min
		48	+++	
		72	+++	
	8	24	+++	
		48	+++	
		72	++	
	10	24	+++	
		48	++	
		72	-	

[0038] (+++表示未传代即检测到CPE, ++表示第1次盲传后检测到CPE, +表示第2次盲传后检测到CPE, -表示3次盲传均未检测到CPE)

[0039] 从表2可知, 病毒液与BEI混合均匀后终浓度10mmol/L 37℃灭活72小时的安全性检测结果显示, 灭活病毒液不会引起细胞病变, 证明病毒已被有效灭活。后续的疫苗安全性试验中, 也证明了该灭活条件可有效灭活病毒。

[0040] 实施例3

[0041] 灭活疫苗的安全性检验

[0042] 无菌检验: 取实施例1制备好的疫苗, 接种脑浸液细菌培养基(BHI) 平板, 用划线法涂平板后于30℃培养15天, 若有菌落生长, 则表明疫苗有细菌污染; 若无菌落生长, 则表明疫苗是无菌的。

[0043] 鱼体安全性实验: 取上述制备好的疫苗, 注射健康300g左右的鲫鱼30尾, 注射剂量为0.2~0.4ml/尾, 阴性对照注射相同剂量的生理盐水。饲养15~30天, 若疫苗组出现死亡或有临床症状, 而阴性对照组未出现临床症状或死亡, 表明疫苗不安全; 若疫苗组和阴性对照组均未见临床症状或死亡, 则表明疫苗安全。

[0044] 鱼体注射疫苗后的应激性测试及摄食影响: 单剂量(0.2ml/尾) 和双倍剂量(0.4ml/尾) 接种鲫鱼的临床症状观察如下:

[0045] 分别将300g鲫鱼随机分为空白对照组、和免疫组,每组30尾,暂养水温维持在 $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的循环水池 $(60\text{cm} \times 60\text{cm} \times 50\text{cm})$ 中,7日后进行疫苗腹腔注射免疫;对照组注射无菌磷酸盐缓冲溶液PBS,试验前停食2日。注射后连续4周,详细观察记录免疫鲫鱼的临床症状,单剂量和双倍剂量接种后1~14日临床症状观察结果未见任何异常,各组鲫鱼精神状态良好,无食欲下降或不采食,无浮头,未出现异常游泳姿势如倒立、异常转圈、底部持续横游等,无间歇性或持续性侧游、竖游、旋转游泳、呆滞。有明显的受惊反应,体表体色正常,注射部位无病变,排便正常。后续观察结果相同,未见不良反应,也没有出现因为疫苗注射而造成的特异性死亡及畸形发生。结果表明单剂量和双倍剂量腹腔注射接种该灭活疫苗对鲫鱼的临床症状、存活情况及生长情况不产生任何不良影响,安全性良好。

[0046] 灭活疫苗乳化佐剂筛选

[0047] 选取IMS1312、Montanide ISA 763A、铝胶作为佐剂,与实施例1制备的病毒灭活疫苗原液混合乳化制备成终浓度为含TCID₅₀为 $10^{7.3}$ 的佐剂疫苗,免疫300g的健康鲫鱼。每种佐剂疫苗免疫20尾,免疫剂量0.2ml/尾,另设磷酸缓冲液(PBS)对照组。免疫1个月采用CyHV-2强毒进行攻毒,评价不同佐剂乳化后疫苗的效果。结果表明,佐剂IMS1312和铝胶乳化后的灭活疫苗,免疫保护率最高(表3)。表3的数据表明,采用佐剂IMS1312,免疫保护率更高,且IMS1312为水佐剂,与疫苗混合方便,因此,选择IMS1312佐剂作为与灭活疫苗乳化的使用佐剂。

[0048] 表3不同佐剂疫苗的免疫保护率

[0049]	佐剂种类	IMS1312	ISA763 A	铝胶	PBS
	死亡尾数	6	14	8	20
	存活尾数	14	6	12	0
	免疫保护率	70%	30%	60%	0%

[0050] 灭活疫苗保护率及最小免疫剂量的测定

[0051] 按照实施例1的方法制备TCID₅₀为 $10^9/\text{mL}$ 的CyHV-2病毒液,采用BEI进行灭活,制备灭活疫苗,并将疫苗进行稀释,稀释度为10、50、100、500、1000倍,设置对照PBS组,每组都用IMS1312佐剂进行乳化,乳化后进行鲫鱼免疫,每组免疫20尾300g健康鲫鱼,腹腔注射免疫剂量0.2ml/尾,免疫4周后进行攻毒,每日统计死亡鱼数,根据统计出来的各组的死亡率,依下列公式计算相对保护率(Relative percentage survival, RPS):相对保护率(RPS) = $[1 - (\text{免疫组死亡率} / \text{对照组死亡率})] \times 100\%$ 。以确定疫苗的免疫保护率及最小免疫剂量。具体结果见表4。

[0052] 表4疫苗保护率及最小免疫剂量试验

[0053]

疫苗稀释 倍数	攻毒后 14 天累计 死亡尾数	攻毒后 14 天累 计存活尾数	保护率
10	0	20	100%
50	6	14	70%
100	12	8	40%
500	16	4	20%
1000	18	2	10%
对照	20	0	0%

[0054] 攻毒结果表明(表4),最小免疫剂量为稀释50倍组,换算的病毒滴度TCID₅₀为 $10^{7.3}$, 0.2ml/尾(鲫鱼300g)。最佳免疫剂量为TCID₅₀为 10^8 , 0.2ml/尾(鲫鱼300g)。将每组中的另一部分鱼以强毒攻击,测定其免疫保护率。经试验测定免疫保护率分别达70%、100%。因此,确定鲫造血器官坏死病灭活疫苗的抗原为灭活前病毒含量不低于TCID₅₀为 $10^{7.3}$, 0.2ml/尾。

[0055] 灭活疫苗在生产上的示范试验

[0056] 在江苏盐城某养鱼场实施,按照实施例1的方法制备TCID₅₀为 $10^{7.3}$ /mL的 CyHV-2灭活疫苗,0.2ml/尾免疫鲫鱼(±100g) 6000尾,养殖6个月后,随机取鱼20尾以强毒攻击,测定其免疫保护率。经测定免疫保护率达70%。

[0057] 综上,本发明制备的疫苗免疫保护效果好,可应用于鲫造血器官坏死病的预防免疫,提高养殖鲫鱼的存活率和养殖效率。

[0058] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。