



传染性造血器官坏死病灭活疫苗的制备及免疫保护效果

陈桂花^{1,2}, 徐黎明¹, 赵景壮¹, 任广明¹,
邵轶智¹, 卢彤岩^{1*}

- (1. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 黑龙江省水产动物疾病与免疫技术重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150070;
2. 上海海洋大学, 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 为了研发用于预防传染性造血器官坏死病 (infectious hematopoietic necrosis, IHN) 灭活疫苗, 实验以不同感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 在胖头鲢上皮细胞 (Epithelioma papulosum cyprinid, EPC) 上对传染性造血器官坏死病毒 (infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV) 进行连续传代培养, 通过测定各代病毒滴度, 结合病毒收获时间确定最佳增殖方案; 采用不同浓度的 β -丙内酯 (β -propanolactone, BPL) 在 24 °C 下灭活, 经安全性实验验证后确定最佳灭活条件。以不同剂量腹腔注射免疫虹鳟, 以磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 为阴性对照组, 通过检测攻毒后相对免疫保护率 (relative percent survival, RPS)、免疫相关因子表达量及血清中和抗体效价来分析该疫苗的保护效果。结果显示, 最佳增殖方案为以 MOI 为 0.000 1 接种, 15 °C 培养 3 d; 最佳灭活条件为以终浓度 3.0 mmol/L 的 BPL 将 IHNV 在 24 °C 下灭活 24 h; 以最佳免疫剂量 10 μ L/尾腹腔注射免疫虹鳟, 免疫后 7、21、45 和 60 d 的相对免疫保护率分别为 91.37%、84.28%、84.15% 和 47.5%, 免疫后 60 d 时 RPS 显著低于其他时间点免疫组; 免疫相关基因的实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 结果显示, 与阴性对照组相比, *Mx-1* 和 *IFN- γ* 表达量在免疫后 7、15 和 30 d 脾脏和头肾中均显著上调, 在第 7 天时达到最大值 (5 倍); *CD4* 和 *IgM* 表达量在免疫后 15 d 脾脏和头肾中均显著上调; 在免疫后第 30、45 和 60 天虹鳟血清 IHNV 中和抗体效价依次为 67.25、43.40 和 29.78, 呈下降趋势且各组间差异显著。研究表明, 该灭活疫苗可诱导虹鳟产生特异性免疫和非特异性免疫反应, 对虹鳟具有显著的免疫保护作用。本研究为 IHNV 灭活疫苗研发提供参考。

关键词: 虹鳟; 传染性造血器官坏死病; 胖头鲢上皮细胞; 灭活疫苗; β -丙内酯 (BPL)

中图分类号: S 942.5

文献标志码: A

传染性造血器官坏死病 (infectious hematopoietic necrosis, IHN) 是一种致死性极强的病毒

病, 多发生于鲢鳙幼鱼, 死亡率最高达 100%^[1-2]。我国最早于 20 世纪 80 年代在辽宁本溪暴发 IHN

收稿日期: 2021-05-11 修回日期: 2021-08-23

资助项目: 国家自然科学基金 (31802345); 国家重点研发计划 (2019YFE0115500); 中央公益性事业单位基本科研业务费专项 (HSY2019M, 2020GH05); 中国博士后科学基金 (2018M630893, 2019T12027)

第一作者: 陈桂花, 从事鱼类病毒学研究, E-mail: 2670285762@qq.com

通信作者: 卢彤岩 (照片), E-mail: lutongyan@hrfri.ac.cn



疫情,从2006年开始,我国虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 主要养殖省份开始陆续大规模暴发 IHN, 养殖虹鳟幼鱼死亡率高达 90% 以上^[3-4], 严重威胁了我国虹鳟养殖业的健康可持续发展。传染性造血器官坏死病毒 (infectious hematopoietic necrosis virus, IHNV) 基因组从 3' 端至 5' 端依次为 3'N-P-M-G-NV-L 5'^[5], 对 G 基因全部或部分基因序列进行系统发育分析, 发现 IHNV 共分为 5 个基因型, 北美国家主要为 U、M 和 L 型^[6], 欧洲等国家主要为 E 型^[7-8], 亚洲等国家主要为 J 型^[9-10]。中国目前主要流行 IHNV 毒株基因型主要为 J 基因型^[11-12], 但 2012 年辽宁省首次监测到 M 基因型 MN 基因亚型 IHNV(LN12-17)^[12], 于 2013 年分离的 BjLL 株属于 U 基因型^[13]。与此同时, 研究发现不同基因型的 IHNV 毒株对虹鳟具有不同的致死性, J 基因型对虹鳟的致死率大于 U 基因型和 M 基因型^[14]。为了有效防控 IHN 的暴发, 国内外学者开展了大量关于 IHN 疫苗的研究, 主要包括灭活疫苗、减毒活疫苗、亚单位疫苗和 DNA 疫苗^[15-16], 但大多数疫苗研究仍停留于实验室水平, 仅加拿大具有允许商业化生产的 IHN DNA 疫苗 (Apex-IHN)^[17], 而我国目前尚无防治 IHN 的商业化疫苗和药物。

灭活疫苗因抗原含量高、质量稳定、安全性高、生产成本低等优点成为现今获批的商业化疫苗中的主流疫苗产品^[18]。细胞培养灭活疫苗在制备时首要决定条件是稳定、高效体外增殖方案和简单、安全的灭活工艺, 不同毒株需建立最合适的体外增殖方法和灭活工艺。前期研究发现, 采用 β -丙内酯 (β -propanolactone, BPL) 灭活 IHNV 制备疫苗的免疫保护效果比甲醛和二元乙烯亚胺 (BEI) 好^[19-20], 但目前尚无 IHNV 体外增殖方案系统性研究的相关报道。因此, 本实验开展了关于 J 基因型 IHNV 毒株在胖头鲩上皮细胞 (Epithelioma papulosum cyprinid, EPC) 的增殖方案、BPL 灭活 IHNV 制备灭活疫苗并对其进行免疫保护效力分析等一系列研究, 以期今后 IHN 灭活疫苗的研制提供技术支撑, 加速我国自主 IHN 疫苗的研究进程。

1 材料与方法

1.1 主要材料

MEM 培养基 (minimum essential medium,

MEM)、双抗 (Penicillin Streptomycin) 和胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 购自 Gibco 生物公司, BPL 购自德国 Serva 公司, 硫代硫酸钠 (Sodium thiosulfate) 购自 Sigma-Aldrich[®] 化学试剂公司。

IHNV 毒株由本课题组分离保存^[11], EPC 细胞由中国水产科学院长江水产研究所曾令兵教授惠赠, 用细胞培养液 (MEM 培养基+10% 胎牛血清+1% 双抗) 将其静置培养于 25 °C 二氧化碳细胞培养箱; 健康虹鳟 [(10±1) g] 购自辽宁本溪艾格莫林实业有限公司, 实验用鱼饲养于温度为 (13±0.5) °C 的室内循环水系统中。

1.2 IHNV 最佳增殖方案的确定

病毒接种剂量的确定 将 IHNV 分离株病毒原液用细胞维持液 (MEM 培养基+2% 胎牛血清+1% 双抗) 分别稀释为 1 mL 的感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 0.1、0.01、0.001、0.0001 和 0.000 01 的病毒培养液, 接种到 6 孔单层 EPC 细胞上, 于 15 °C CO₂ 恒温培养箱内孵育 1 h 后弃去含有病毒的培养液, 每孔更换为 2 mL 细胞维持液, 于 15 °C 静置培养, 当细胞病变达 80% 以上时, 收获病毒于 -80 °C 冰箱反复冻融后, 以 12 000 r/min 离心 10 min (4 °C), 取上清液为第 1 代 IHNV。将第 1 代 IHNV 作为感染液以同样的方法传代, 传至第 10 代时结束病毒连续传代。将每次传代收获的上清液分装后保存于 -80 °C 冰箱, 并对其进行病毒滴度的测定。

病毒收获时间的确定 取出以 MOI 为 0.01、0.001、0.000 1 和 0.000 01 在 EPC 细胞中传代时获得的第 2 代、第 5 代和第 10 代病毒液, 分别按照与原病毒液相对应的 MOI 接种于 6 孔细胞培养板的单层 EPC 细胞。分别在接种后第 1、2、3、4 和 5 天收获病毒, 冻存于 -80 °C 冰箱。按照已有文献^[21]的方法对收获的病毒进行滴度测定, 绘制各组 IHNV 生长曲线。

1.3 IHNV 灭活条件的确定

将 BPL 溶液用细胞维持液稀释后, 在 IHNV 病毒液中分别加入终浓度为 3.5、3.0 和 2.5 mmol/L 的 BPL 溶液, 加入后迅速混匀。将加入 BPL 的病毒液放置于摇床, 于 24 °C (室温)、100 r/min 条件下分别在灭活 1、6、12、24 和 48 h 后加入终浓度为 20 mmol/L 的硫代硫酸钠中和 BPL, 以此终止灭活。将上述灭活液保存于 -80 °C 冰箱备用。

细胞水平验证灭活效果 将灭活液用细胞维持液稀释 10 倍后接种于 6 孔单层 EPC 细胞, 于 15 °C CO₂ 培养箱孵育 1 h, 弃去含有灭活液的培养基, 补加 2 mL 细胞维持液。连续 7 d 观察是否出现 IHNV 典型的细胞病变, 若出现细胞病变, 说明该灭活条件不可以使 IHNV 完全灭活; 若未出现病变, 需将其置于 -80 °C 冰箱反复冻融 2 次后, 于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 将细胞上清液进行盲传 3 代, 若盲传 3 次均未出现细胞病变, 说明该灭活条件可使 IHNV 完全灭活。

动物水平验证灭活效果 将健康虹鳟分为 5 组, 每组 20 尾, 第 1~4 组为上述确定完全灭活的 IHNV 灭活液, 第 5 组为磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 对照组, 每尾腹腔注射 100 μL 灭活液或 PBS, 连续 21 d 观察虹鳟摄食是否正常、有无 IHN 临床症状以及有无因接种疫苗引起的毒性反应。若灭活疫苗注射免疫虹鳟后一切正常, 结合生产实际筛选灭活时间短、灭活剂量小的灭活条件作为最佳灭活 IHNV 的灭活工艺。

1.4 最佳免疫剂量的确定

将健康虹鳟随机分成 4 组, 第 1~3 组分别每尾腹腔注射 5、10 和 20 μL IHN BPL 灭活疫苗, 作为免疫组; 第 4 组腹腔注射 PBS, 作为阴性对照组。在免疫后第 7、14 天, 从各免疫组和对照组分别随机各取 60 尾虹鳟, 每 20 尾 1 个平行, 每尾腹腔注射 50 μL 100 TCID₅₀ IHNV^[22], 连续观察 21 d, 统计各组虹鳟 21 d 累积死亡数, 并计算相对免疫保护率 (RPS, %), 计算公式:

相对免疫保护率 = [1 - (免疫组死亡率 / 对照组死亡率)] × 100%。

1.5 IHN-BPL 灭活疫苗免疫保护效果的评价

注射免疫虹鳟及样品采集 将 680 尾健康虹鳟分为 2 组, 每组 340 尾, 免疫组腹腔注射 IHN-BPL 灭活疫苗, 免疫剂量为上述得出的最佳免疫剂量; 对照组腹腔注射等剂量的 PBS。在免疫后 3、7、15、30 d 分别从各组中随机挑选 5 尾虹鳟采集其头肾和脾脏组织, 冻存于 -80 °C 冰箱用于免疫相关因子表达分析; 在免疫后 30、45 和 60 d 分别从各组中随机挑选 10 尾虹鳟进行尾静脉采血, 血样于 4 °C 过夜, 500 r/min 离心 10 min, 取上清液制备血清, 用于血清中和抗体效价测定。

攻毒及 RPS 的测定 在免疫后 7、21、45 和 60 d, 分别从免疫组和对照组随机取 60 尾虹鳟, 每 20 尾 1 个平行, 每尾腹腔注射 50 μL 100 TCID₅₀ IHNV 原液进行攻毒实验^[21], 连续观察 21 d, 统计各组虹鳟 21 d 累积死亡数, 并计算 RPS。

中和抗体效价的测定 将血清样品利用细胞维持液进行连续 2 倍系列稀释 (1 : 4~1 : 256) 后, 与 100 TCID₅₀ 的 IHNV 病毒液以 1 : 1 (体积比) 的比例混合, 置于 15 °C CO₂ 培养箱中孵育 1 h, 接种于 96 孔单层 EPC 细胞, 于 15 °C CO₂ 培养箱孵育 1 h 后弃去含有血清和 IHNV 的细胞培养液, 更换为每孔 100 μL 的细胞维持液。将细胞培养板置于 15 °C 静置培养, 连续观察 7 d, 记录病变及未病变孔数, 以抑制 50% 细胞病变的血清最高稀释度作为血清中和效价, 按 Reed-Muench 氏法计算血清中和抗体效价^[23]。

免疫相关因子的测定及分析 利用 TRIzol 法提取虹鳟头肾和脾脏组织中 RNA, 将 β -actin 作为内参基因, 利用 One Step SYBR Prime Script Plus RT-PCR 试剂盒检测各个组织 RNA 中 *IFN- γ* ^[24]、*Mx-1*^[25]、*CD8*、*CD4*^[26] 和 *IgM*^[27] 表达量变化, 并通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算各基因的相对表达水平。以 PBS 对照组的头肾和脾脏组织 RNA 作为阴性对照。

2 结果

2.1 IHNV 最佳增殖方案的筛选

最佳接种剂量的确定 将 IHNV 毒株以不同的 MOI 在 EPC 细胞中连续传代, 待细胞病变达 80% 以上时收获病毒, 测定其 TCID₅₀。结果显示, 当 MOI 为 0.1 时, 随着传代次数的增加, TCID₅₀ 逐渐下降, 传至第 6 代时再无任何细胞病变, TCID₅₀ 降为 0 (图 1-a); 而当 MOI 为 0.01、0.001、0.000 1 和 0.000 01 时, 在传代的过程中病毒滴度均有少量下降, 但随着传代次数的增多逐渐趋于稳定, 稳定时 IHNV 的 TCID₅₀ 依次为 10^{7.42}、10^{7.42}、10^{7.50} 和 10^{7.40}。结果表明, 当以 MOI 为 0.1 进行连续传代时, IHNV 无法持续在 EPC 细胞中进行增殖; 当以 MOI 为 0.01、0.001、0.000 1 和 0.000 01 进行连续传代时, IHNV 滴度均能稳定地保持在较高水平, 但是 MOI 为 0.000 1 时, 获得的 IHNV 滴度均高于其余 MOI

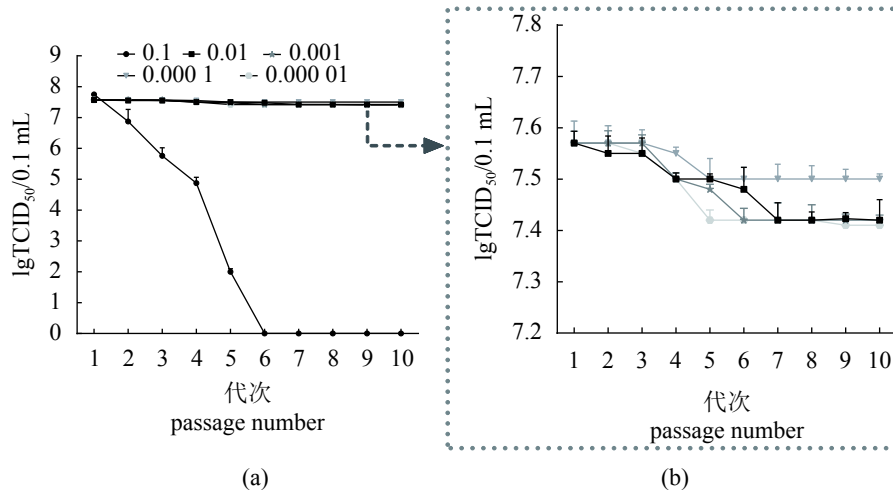


图 1 不同 MOI 病毒收获液的滴度

(b) 为 (a) 中 MOI 分别为 0.01、0.001、0.0001、0.00001 病毒收获液的滴度放大图

Fig. 1 Virus titers of IHNV inoculated with different MOIs

(b) is the enlarged plot of titers of IHNV that were inoculated with MOI of 0.01, 0.001, 0.0001 and 0.00001 in (a)

组 (图 1-b)。综上所述, MOI 0.1 的接种浓度不适合用于 IHNV 在 EPC 细胞上的体外连续传代, MOI 0.000 1 的接种浓度更适合用于 IHNV 在 EPC 细胞中的体外连续传代。

病毒收获最佳时间的确定 将以不同 MOI 接种 EPC 细胞后获得的第 2、第 5 及第 10 代 IHNV 接种于单层 EPC 细胞, 接种后 5 d 内, 每天收获病毒液进行滴度测定, 并绘制生长曲线。结果发现, 当 MOI 为 0.01、0.001 和 0.000 1 时, IHNV 的滴度在接种后 3 d 即趋于稳定, 总体上表现为在接种后第 1~3 天呈对数增长, 第 3~4 天缓慢增长并达到峰值, 第 3~5 天的 TCID₅₀ 依次分别为 $10^{7.42}$ 、 $10^{7.50}$ 和 $10^{7.52}$ (MOI=0.01); $10^{7.34}$ 、 $10^{7.49}$ 和 $10^{7.49}$ (MOI=0.001); $10^{7.44}$ 、 $10^{7.55}$ 和 $10^{7.55}$ (MOI=0.000 1)。当 MOI 为 0.000 01 时, IHNV 滴度在接种后 5 d 才到达峰值, 第 3~5 天的 TCID₅₀ 依次为 $10^{6.95}$ 、 $10^{7.28}$ 和 $10^{7.42}$ (图 2)。该结果表明, 以 MOI 为 0.01、0.001 和 0.000 1 接种 IHNV 时, 病毒增殖达到平台期需要的时间相对较短, 在接种后 3 d 即可达到 $10^{7.00}$ 以上, 更适合用于 IHNV 的大规模培养。

综合考虑病毒滴度、传代稳定性及病毒收获时间的长短等因素, 本研究推荐病毒收获时间最短、病毒滴度最高、传代最稳定的最小接种剂量——MOI 0.000 1 为 IHNV 在 EPC 细胞上连续传代的最佳接种剂量。即 IHNV 在 EPC 细胞中的最佳增殖方案为接种浓度 MOI 0.000 1, 15 °C 培养 3 d。

2.2 IHNV 最佳灭活条件的确定

在 24 °C 下, 分别利用终浓度为 3.5、3.0 和 2.5 mmol/L 的 BPL 溶液于摇床 (100 r/min) 灭活 IHNV 病毒液, 在不同时间点用 20 mmol/L 硫代硫酸钠终止灭活。将处理后的病毒灭活液接种于单层 EPC 细胞以确定灭活病毒的感染性 (表 1), 同时腹腔注射于健康虹鳟来验证其是否对鱼体产生毒副作用。在 24 °C 下, 采用终浓度分别为 3.5 和 3.0 mmol/L 的 BPL 在灭活 24 和 48 h 后均可完全灭活 IHNV。将其腹腔注射免疫 21 d, 免疫虹鳟均摄食正常、未出现毒副作用、未出现 IHN 临床症状及死亡。综合灭活时间短、灭活剂量小等实际生产因素, 最终选择以终浓度为 3.0 mmol/L 的 BPL 在 24 °C 下灭活 24 h 来制备 IHN 灭活疫苗。

2.3 最佳免疫剂量的确定

将以最佳灭活条件制备的 IHN-BPL 灭活疫苗, 分别以每尾 5、10 和 20 μL 免疫剂量免疫虹鳟, 并在免疫后 7、14 d 进行攻毒, RPS 结果表明, 当免疫剂量为 10 μL/尾时, RPS 在各个免疫时间都最高, 依次为 76.67% 和 73.33%, 且与其余 2 个免疫剂量组间差异显著 ($P < 0.05$) (图 3)。因此, 该灭活疫苗对虹鳟的最佳免疫剂量为 10 μL/尾。

2.4 IHN-BPL 灭活疫苗免疫保护效果评价

相对免疫保护率分析 将以最佳灭活条件制备的 IHN-BPL 灭活疫苗, 腹腔注射免疫虹

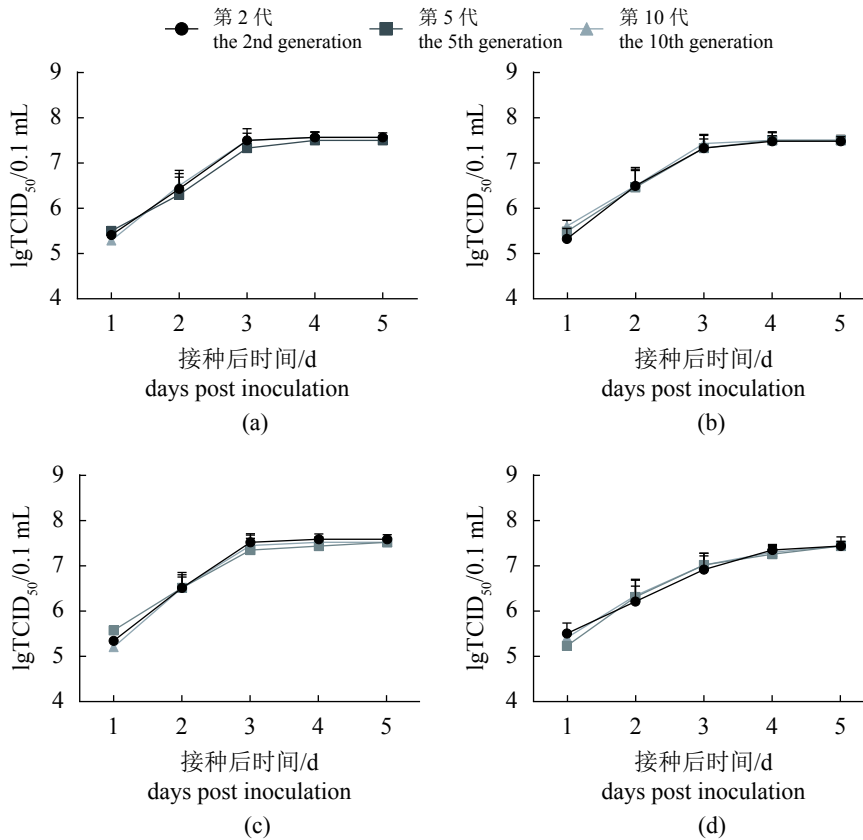


图 2 各 MOI 下 IHNV 生长曲线

Fig. 2 Growth curve of IHNV at MOIs

(a) MOI=0.01, (b) MOI=0.001, (c) MOI=0.0001, (d) MOI=0.00001

表 1 不同灭活条件对 IHNV 的灭活效果

Tab. 1 Inactivation effect of IHNV by different inactivation conditions

BPL 终浓度/(mmol/L) BPL final concentration	灭活时间/h inactivation time				
	1	6	12	24	48
2.5	+++	+++	+++	++	++
3.0	+++	+++	+++	---	---
3.5	+++	+++	+++	---	---

注: +++. 盲传3代均发生了细胞病变; ++. 盲传时第1代未病变, 其余2代均病变了; ---. 盲传3代时均未发生细胞病变

Notes: +++. the cytopathic effect occurred in all 3 generations of blind transmission; ++. only the first generation has no cytopathic effect occurred in 3 generations of blind transmission; ---. no cytopathic effect occurred in each of the 3 generations of blind transmission

鳟 (10 μL/尾), 分别在免疫后 7、21、45 和 60 d 进行攻毒, 分别计算 21 d 累积死亡率和 RPS。疫苗组在不同免疫时间段的 21 d 累积死亡率均低于对照组, 且差异极显著 ($P < 0.05$) (图 4-a); 疫苗组的相对免疫保护率从免疫后 7 d 至 60 d 依次为 91.37%、84.28%、84.15% 和 47.50%, 第 60 天时

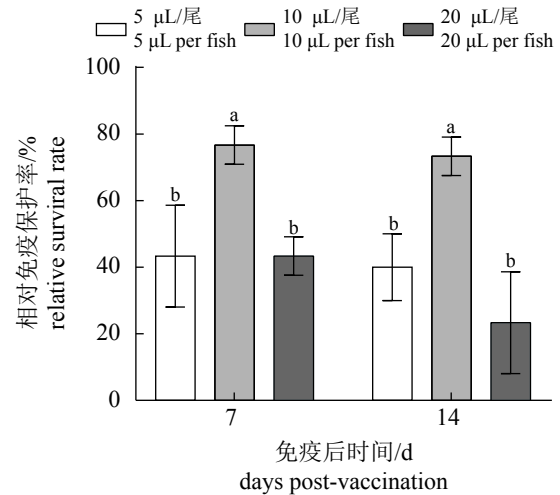


图 3 灭活疫苗在虹鳟体内的相对免疫保护率

不同字母表示组间存在差异显著 ($P < 0.05$); 下同

Fig. 3 Relative percent survival of *O. mykiss* immunized with inactivated vaccine

Different letters indicate difference between different groups ($P < 0.05$), the same below

相对免疫保护率最低, 与其他时间点差异显著 ($P < 0.05$) (图 4-b)。

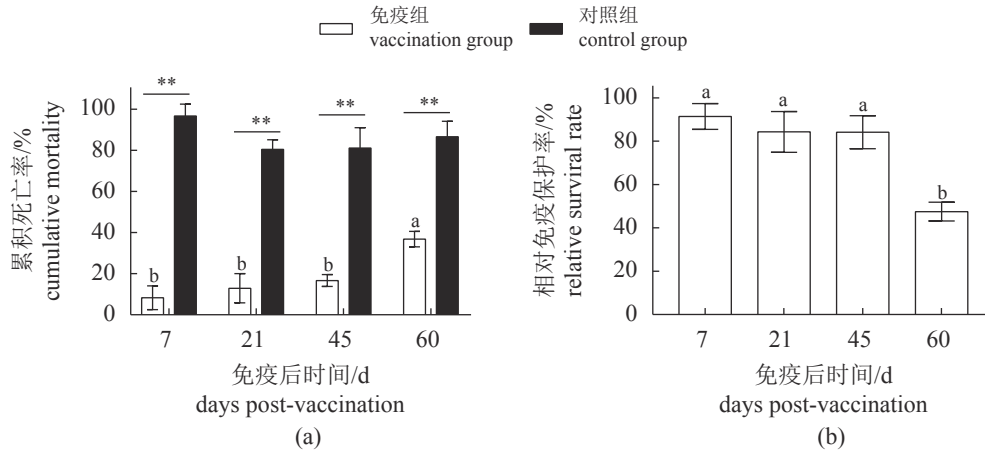


图 4 攻毒后虹鳟累计死亡率和疫苗相对免疫保护率

** 与对照组差异极显著 ($P < 0.01$); 下同

Fig. 4 Cumulative mortality and relative percent survival of *O. mykiss* immunized with inactivated vaccine

** highly significant difference compared with the control ($P < 0.01$); the same below

中和抗体效价分析 于免疫后 30、45 和 60 d, 尾静脉采血, 分别测定各组 10 尾虹鳟血清 IHNV 中和抗体效价 (表 2), 平均中和抗体效价依次为 62.25、43.40 和 29.78。免疫组中和抗体效价均与对照组间差异极显著 ($P < 0.01$), 免疫组中和抗体效价从第 30 天至第 60 天呈下降趋势, 且彼此间差异极显著 ($P < 0.01$)(图 5)。

表 2 IHN BPL 灭活疫苗免疫虹鳟后的中和抗体效价

Tab. 2 Neutralizing antibody titer of *O. mykiss* immunized with IHN BPL inactivated vaccine

免疫时间/d immune time	中和抗体效价 neutralizing antibody titer	
	免疫组(n=10) immune group	对照组(n=10) control group
	30	41.00, 117.41, 44.92, 50.81, 62.75, 39.61, 102.81, 36.00, 44.44, 132.75
45	38.03, 31.98, 39.46, 47.05, 32.00, 109.54, 32.00, 40.29, 31.65, 32.00	4, 2, 2, 4, 4, 4, 4, 2, 2, 2
60	29.62, 36.54, 26.03, 31.03, 31.18, 55.08, 26.08, 20.00, 36.10, 6.10	4, 2, 4, 4, 2, 2, 4, 4, 2, 2

免疫相关因子的分析 在免疫后 3、7、15 和 21 d 分别测定虹鳟头肾和脾脏中 *Mx-1* 和 *IFN-γ* 相对表达量, 并在免疫后 15 和 30 d 测定 *IgM*、*CD4* 和 *CD8* 相对表达量。以 PBS 注射虹鳟组为阴性对照。在免疫组虹鳟脾脏中, *Mx-1* 在第 3、7、15、30 天时均显著上调 ($P < 0.05$), 第 7 天时表达倍数最高 (5 倍), *IFN-γ* 在第 7 天时极显著上调 ($P < 0.01$), 且表达量最高; 免疫的虹鳟头肾和脾脏中, *Mx-1* 和 *IFN-γ* 均在免疫后第 7 天显著上调, 此时表达量倍数最大分别为 5 倍

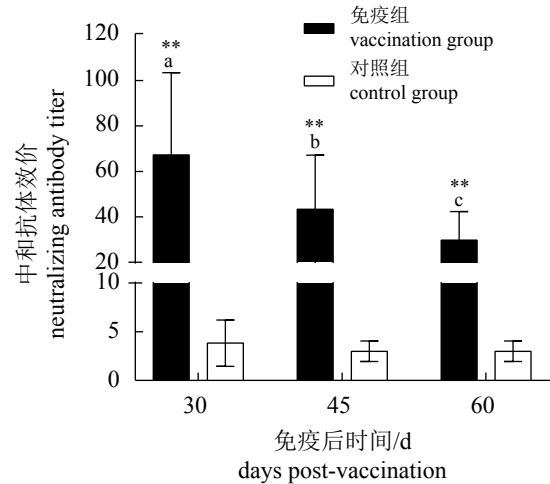


图 5 血清中和抗体效价

Fig. 5 Neutralizing antibody titers of serum

和 10 倍 (图 6)。表明 BPL 灭活疫苗在免疫后第 3 天时, 即可诱导鱼体产生非特异性免疫应答。在免疫后第 15 和第 30 天虹鳟脾脏中, *CD4*、*CD8* 和 *IgM* 均显著上调 ($P < 0.05$), 这 3 种基因间差异不显著; 在头肾中, *CD4* 和 *IgM* 分别在第 15 天显著上调 ($P < 0.05$) (图 7)。综上所述, 该疫苗免疫虹鳟后可使 *CD4*、*CD8* 和 *IgM* 表达上调, 激发机体产生免疫应答反应。

3 讨论

3.1 IHN 疫苗候选毒株的选择

自我国于 1985 年首次分离获得 IHN 毒株以来, 已公布的我国 IHN 有上百余株, 主要来

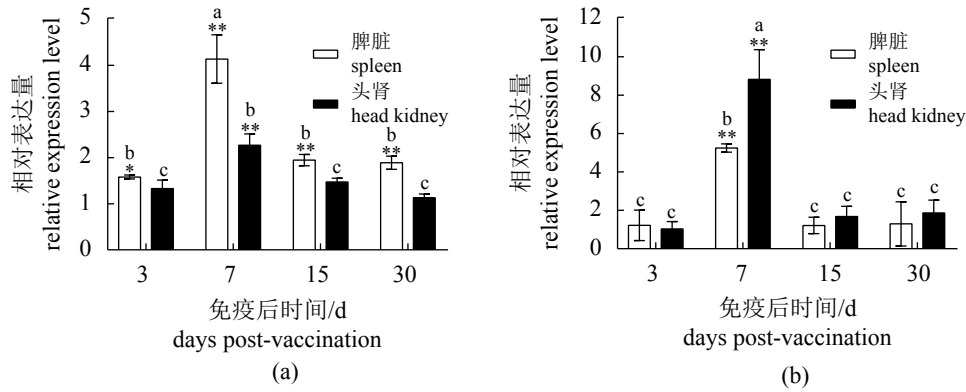


图 6 *Mx-1*(a) 和 *IFN-γ* (b) 在虹鳟脾脏和头肾中的相对表达量

*表示与对照组差异显著 ($P<0.05$): 下同

Fig. 6 Relative expression level of *Mx-1* (a) and *IFN-γ* (b) genes in spleen and head kidney of *O. mykiss*

* means significant difference compared with the control ($P<0.05$); the same below

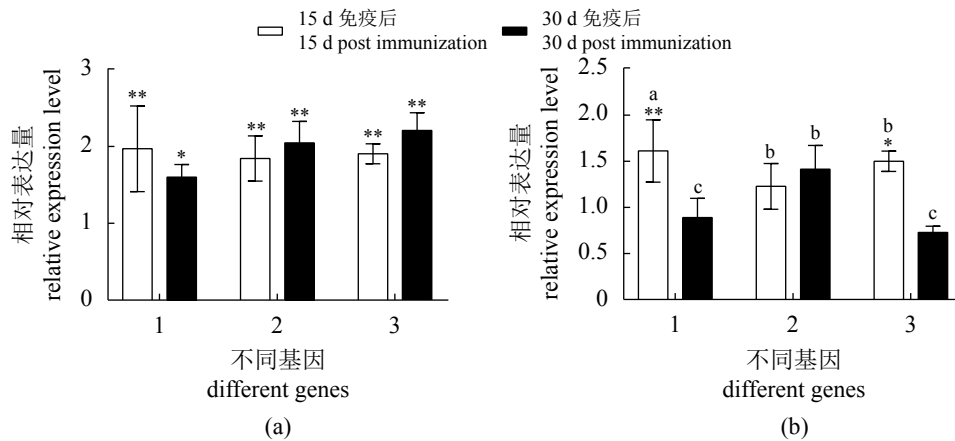


图 7 *CD4*、*CD8* 和 *IgM* 在虹鳟脾脏 (a) 和头肾 (b) 中的相对表达量

Fig. 7 Relative expression of *CD4*, *CD8* and *IgM* genes in *O. mykiss* spleen (a) and head kidney (b)

1. *CD4*, 2. *CD8*, 3. *IgM*

源于我国甘肃、辽宁、河北、北京、云南、四川、新疆、青海、山东及黑龙江等地区。对其 G 基因全部或部分基因序列进行系统发育分析发现, 我国现行 IHN 毒株大部分属于 J 基因型^[11-12], 病毒滴度测定为 $10^{6.15} \sim 10^{8.36}$ TCID₅₀/0.1 mL^[21, 28-29]。本课题组对 2012 年至今流行病学调查分离到的百余株 IHN 的生物学特性、免疫原性、毒力等进行综合分析, 筛选出了一株免疫原性好、毒力强的 IHN 分离株。Xu 等^[22] 利用该分离株的 G 基因构建 IHN DNA 疫苗免疫虹鳟后, 利用我国不同省份 IHN 分离株进行攻毒, 该疫苗均能有效抵抗 IHN 的感染, RPS 高达 90% 以上, 进一步证明该毒株可被选为 IHN 灭活疫苗候选毒株。因此, 本研究也选择该毒株用于制备 IHN 灭活疫苗。

3.2 IHN 体外增殖方案的优化

稳定高效的病毒体外增殖方案是灭活疫苗产业化的首要条件。IHN 病毒滴度的差异性主要取决于不同分离毒株和不同体外增殖方案, 而同一 IHN 分离株病毒滴度稳定性主要取决于其体外增殖方案。因此, 本研究就 IHN 体外增殖方案开展了一系列实验, 筛选出了一种病毒滴度稳定、病毒收获时间短、接种剂量小的最佳增殖方案, 旨在为 IHN 灭活疫苗或减毒活疫苗的大规模制备提供保障。

病毒体外增殖方案主要决定因素有细胞系、温度、接种病毒剂量、血清浓度和 pH。自 IHN 首次暴发后, 国内外学者对其病原 IHN 进行了大量研究, 研究发现 IHN 对 EPC 细胞、胖头鲢肌肉细胞 (muscle cells of fathead minnow, FHM)

和蓝鳃太阳鱼成纤维细胞 (bluegill fry, BF-2) 最敏感^[30], 世界动物卫生组织 (World Organization for Animal Health, OIE) 推荐使用 EPC 作为 IHN 体外增殖检测细胞系^[31], 故本研究选用 EPC 细胞为 IHN 的体外增殖细胞系。EPC 细胞是鱼类病毒学研究中常用的细胞系, 且其培养条件简单, 对血清含量要求低, 常用含有 10% FBS 和 1% 双抗的 MEM 基础培养基, 于 25 °C 培养。研究表明, 在适当的 pH 和体积比为 2% 的血清浓度下, 病毒的增殖效果几乎不受影响^[32], 故本研究未进行关于血清浓度和 pH 值对 IHN 增殖影响的研究, 直接采用含 2% 胎牛血清的 MEM 培养基作为 IHN 培养液。IHN 在 4~20 °C 均可在细胞上增殖, 最适增殖温度为 15 °C^[33], 故本研究选择将接种 IHN 的 EPC 细胞置于 15 °C CO₂ 培养箱进行病毒扩增。病毒接种剂量的大小不仅对宿主细胞的生长状态有影响, 还对病毒自身的增殖有影响。前期研究发现, 在 IHN 传代培养过程中, 当接种剂量过大时, 会出现错误包装形成大量的缺陷病毒, 而缺陷病毒不具备繁殖能力, 随着传代次数的增加, 缺陷病毒会快速累积, 最终导致 IHN 无法连续进行体外传代; 当接种剂量过小时, 病毒繁殖所需时间较长, 延长了生产周期, 增加了污染概率, 提高了疫苗生产成本。本研究结果同样发现, IHN 在 EPC 中的最佳接种剂量为 MOI 0.000 1, MOI 过大或过小均会影响 IHN 滴度的稳定性和细胞病变的快慢程度。综合生产实际考虑, IHN 在 EPC 细胞中的最佳增殖方案: 接种浓度为 MOI 0.000 1, 15 °C 培养 3 d 即可收获病毒。该病毒增殖方案可为大规模培养 IHN 提供技术支持, 有利于促进 IHN 灭活疫苗和减毒活疫苗规模化制备。

Anderson 等^[20] 分别应用 MOI 10 同步接毒法和 MOI 0.01 异步接毒法扩增 IHN, 制备灭活疫苗, 发现以 MOI 0.01 扩增病毒后制备的灭活疫苗免疫保护率显著高于 MOI 10, 而 MOI 0.1 制备的疫苗分别在免疫 56 和 14 d 后攻毒, RPS 均大于 90%^[28], 综上可知, 用不同接种剂量扩增的 IHN 制备灭活疫苗, 免疫保护率不同, 本研究采用的接种剂量为 MOI=0.000 1, 制备灭活疫苗免疫虹鳟 7 d 后, 相对免疫保护率最高达 90% 以上, 在制备灭活疫苗时大大减少了疫苗候选毒株病毒原液的消耗, 降低了生产成本。

3.3 IHN 灭活条件的优化

近 20 年来, 关于 IHN 灭活疫苗的研究越来越多。IHN 灭活疫苗是指将细胞培养获得的 IHN 经物理或化学方法灭活制成的疫苗。至今应用于制备 IHN 灭活疫苗的灭活剂主要有 BPL、甲醛和二乙烯亚胺 (BEI), 其中甲醛虽然便宜且易获得, 但其相较于 BPL 和 BEI 更容易使病毒蛋白质发生变性, 使病毒免疫原性在一定程度上减弱^[18, 34]。Anderson 等^[20] 和 Tang 等^[19] 分别用上述 3 种灭活剂灭活 IHN 细胞培养液, 并用灭活液免疫虹鳟, 发现 BPL 相较于其他 2 种灭活剂免疫效果最好, 高达 90%; 故本研究选择 BPL 作为灭活 IHN 的灭活剂。目前已有的 IHN 灭活疫苗大多在 4~6 °C 下灭活^[19, 28, 35], 仅 Anderson 等^[20] 在室温 (22 °C) 下灭活 IHN, 而在实际生产中, 灭活温度为室温时, 可有效减少耗能, 降低生产成本, 故本研究选择在室温 (24 °C) 下灭活 IHN。Anderson 等^[20] 应用终浓度为 2.7 mmol/L 的 BPL 在 22 °C 下灭活 48 h 可完全灭活 IHN, 而本研究应用终浓度为 3 mmol/L 的 BPL 在 24 °C 下灭活 24 h 完全灭活 IHN, 相较而言, 本研究筛选出的 IHN 最佳灭活条件耗时更短, 更贴合实际生产, 有利于推进 IHN 灭活疫苗产业化的进程。

3.4 IHN-BPL 灭活疫苗的免疫保护效果评价

现有 IHN-BPL 灭活疫苗研究中未见相关最佳免疫剂量的报道, 本研究在开展最佳免疫剂量筛选实验时, 发现大免疫剂量 (20 μL) 在免疫后第 7、14 天的相对免疫保护率均显著低于小免疫剂量 (10 μL), 这可能是 IHN 灭活液中抗原含量不均一导致的, 这一现象曾在 IHN DNA 疫苗^[21] 免疫实验中也出现过。以最佳免疫剂量免疫虹鳟后, 随着免疫时间的延长, 免疫保护率呈下降趋势, 平均相对免疫保护率从最初 91.37% (第 7 天) 降为 47.5% (第 60 天), Anderson 等^[20] 应用 IHN-BPL 灭活疫苗免疫虹鳟后, 免疫保护率变化趋势与本研究一致, 但其添加弗氏完全佐剂 (FCA) 后制备的 IHN-BPL 灭活疫苗免疫虹鳟后第 28 至第 56 天, 免疫保护率均显著提高。因此, 下一步可通过筛选合适的免疫佐剂提高该疫苗的免疫保护率。

虹鳟免疫接种含 G 蛋白的重组疫苗后, 可诱发虹鳟产生 IFN 介导的先天性免疫反应, 诱

导 *Mx* 的表达上调, 并且在一定程度上可以抵抗机体感染病毒^[21, 36-37], $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 细胞和 IgM 免疫球蛋白在免疫保护反应中发挥着重要的作用^[26-27]。本研究发现, 在免疫后第 7 天时 *Mx-1* 和 *IFN- γ* 在免疫虹鳟脾脏和头肾中均显著上调; 在第 15 天时, *CD4* 和 *IgM* 在免疫虹鳟脾脏和头肾中均显著上调, 表明该疫苗免疫虹鳟后第 7 天可诱导机体产生非特异性免疫应答反应, 可持续到第 15 天, 并有效抵御 IHNV 的感染。免疫后第 30、45、60 天免疫虹鳟血清中和抗体效价与相对免疫保护率趋势相对应, 均逐渐降低, 但攻毒后累积死亡率与对照组差异显著 ($P < 0.05$), Tang 等^[19] 测定血清中特异性 IgM 抗体效价于免疫后第 5 周显著上调达最大值, 故该疫苗可在免疫后第 30 天刺激机体产生一定的特异性免疫反应。

4 结论

本实验就 IHNV 体外增殖方案和 IHNV 灭活疫苗制备及免疫保护效力分析开展了研究, 制定了一种接种剂量小、收毒时间短、病毒滴度稳定的 IHNV 体外增殖方案, 成功制备了具有较好保护效果的 IHNV 灭活疫苗实验室产品。

参考文献 (References):

- [1] Amend D F. Detection and transmission of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout[J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 1975, 11(4): 471-478.
- [2] Amend D F, Yasutake W T, Mead R W. A hematopoietic virus disease of rainbow trout and sockeye salmon[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 1969, 98(4): 796-804.
- [3] 徐黎明, 刘红柏, 尹家胜, 等. 传染性造血器官坏死病毒糖蛋白原核表达及免疫原性分析[J]. *病毒学报*, 2013, 29(5): 529-534.
- Xu L M, Liu H B, Yin J S, *et al.* Prokaryotic expression and immunogenicity analysis of glycoprotein from infectious hematopoietic necrosis virus[J]. *Chineses Journal of Virology*, 2013, 29(5): 529-534 (in Chinese).
- [4] 韩硕, 赵前程, 吴斌, 等. 传染性造血器官坏死病毒毒株核蛋白基因片段的克隆及序列分析[J]. *大连海洋大学学报*, 2011, 26(3): 232-237.
- Han S, Zhao Q C, Wu B, *et al.* Cloning and sequencing of nucleocapsid protein in infectious hematopoietic necrosis virus strain[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2011, 26(3): 232-237 (in Chinese).
- [5] Ammayappan A, Lapatra S E, Vakharia V N. Molecular characterization of the virulent infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) strain 220-90[J]. *Virology Journal*, 2010, 7(1): 1-11.
- [6] Troyer R M, Lapatra S E, Kurath G. Genetic analyses reveal unusually high diversity of infectious haematopoietic necrosis virus in rainbow trout aquaculture[J]. *Journal of General Virology*, 2000, 81(12): 2823-2832.
- [7] Nichol S T, Rowe J E, Winton J R. Molecular epizootiology and evolution of the glycoprotein and non-virion protein genes of infectious hematopoietic necrosis virus, a fish rhabdovirus[J]. *Virus Research*, 1995, 38(2-3): 159-173.
- [8] Nishizawa T, Kinoshita S, Kim W S, *et al.* Nucleotide diversity of Japanese isolates of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) based on the glycoprotein gene[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2006, 71(3): 267-272.
- [9] Enzmann P J, Kurath G, Fichtner D, *et al.* Infectious hematopoietic necrosis virus: monophyletic origin of European isolates from North American genogroup M[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2005, 66(3): 187-195.
- [10] Rudakova S L, Kurath G, Bochkova E V. Occurrence and genetic typing of infectious hematopoietic necrosis virus in Kamchatka, Russia[J]. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2007, 75(1): 1-11.
- [11] Xu L M, Zhao J Z, Liu M, *et al.* Phylogeography and evolution of infectious hematopoietic necrosis virus in China[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2019, 131: 19-28.
- [12] Jia P, Breyta R B, Li Q, *et al.* Insight into infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in Chinese rainbow trout aquaculture from virus isolated from 7 provinces in 2010-2014[J]. *Aquaculture*, 2018, 496: 239-246.

- [13] Huo C Y, Ma Z H, Li F B, *et al.* First isolation and pathogenicity analysis of a genogroup U strain of infectious hematopoietic necrosis virus from rainbow trout in China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2021.
- [14] Lapatra S E. Factors affecting pathogenicity of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) for salmonid fish[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1998, 10(2): 121-131.
- [15] Yong C Y, Ong H K, Tang H C, *et al.* Infectious hematopoietic necrosis virus: advances in diagnosis and vaccine development[J]. *PeerJ*, 2019, 7: e7151.
- [16] 陈桂花, 卢彤岩, 赵景壮, 等. 传染性造血器官坏死病疫苗的研究进展[J]. *水产学杂志*, 2021, 34(2): 1-7.
Chen G H, Lu T Y, Zhao J Z, *et al.* A review: research progress on development of vaccines against infectious hematopoietic necrosis[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2021, 34(2): 1-7 (in Chinese).
- [17] Saloni K, Simard N, Harland R, *et al.* The road to licensure of a DNA vaccine[J]. *Current Opinion in Investigational Drugs*, 2007, 8(8): 635-641.
- [18] 王璐瑶, 李宁求, 张鹏, 等. 渔用疫苗灭活剂研究进展[J]. *中国生物制品学杂志*, 2018, 31(12): 1402-1408.
Wang L Y, Li N Q, Zhang P, *et al.* Progress in research on inactivating agent of fish vaccines[J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2018, 31(12): 1402-1408 (in Chinese).
- [19] Tang L J, Kang H Y, Duan K X, *et al.* Effects of three types of inactivation agents on the antibody response and immune protection of inactivated IHNV vaccine in rainbow trout[J]. *Viral Immunology*, 2016, 29(7): 430-435.
- [20] Anderson E, Clouthier S, Shewmaker W, *et al.* Inactivated infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) vaccines[J]. *Journal of Fish Diseases*, 2008, 31(10): 729-745.
- [21] 徐黎明, 刘淼, 曾令兵, 等. 一株传染性造血器官坏死病病毒的致病性研究[J]. *水产学报*, 2014, 38(9): 1584-1591.
Xu L M, Liu M, Zeng L B, *et al.* Pathogenicity analysis of infectious haematopoietic necrosis virus isolate[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2014, 38(9): 1584-1591 (in Chinese).
- [22] Xu L M, Zhao J Z, Liu M, *et al.* A effective DNA vaccine against diverse genotype J infectious hematopoietic necrosis virus strains prevalent in China[J]. *Vaccine*, 2017, 35(18): 2420-2426.
- [23] Lapatra S E, Turner T, Lauda K A, *et al.* Characterization of the humoral response of rainbow trout to infectious hematopoietic necrosis virus[J]. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1993, 5(3): 165-171.
- [24] Robertsen B. Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(4): 351-357.
- [25] Acosta F, Petrie A, Lockhart K, *et al.* Kinetics of Mx expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to VHS-DNA vaccination[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2005, 18(1): 81-89.
- [26] Munang'andu H M, Fredriksen B N, Mutoloki S, *et al.* The kinetics of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell gene expression correlate with protection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) vaccinated against infectious pancreatic necrosis[J]. *Vaccine*, 2013, 31(15): 1956-1963.
- [27] Piazzon M C, Galindo-Villegas J, Pereiro P, *et al.* Differential modulation of IgT and IgM upon parasitic, bacterial, viral, and dietary challenges in a perciform fish[J]. *Frontiers in Immunology*, 2016, 7: 637.
- [28] 高欣. 虹鳟鱼 IHNV 甘肃分离株全基因组图谱的绘制及灭活疫苗的研制 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
Gao X. Whole genome mapping and development of inactivated vaccine for rainbow trout IHNV of Gansu strain[D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [29] 赵羽涵, 徐黎明, 刘淼, 等. 传染性造血器官坏死病毒新疆株的分离与鉴定[J]. *水产学杂志*, 2016, 29(1): 12-16.
Zhao Y H, Xu L M, Liu M, *et al.* Isolation and identification of an infectious hematopoietic necrosis virus from Xinjiang uygur autonomous region[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2016, 29(1): 12-16 (in Chinese).
- [30] 国家技术监督局. GB/T 15805.1—1995 淡水鱼类检疫

- 方法 第一部分 [S]. 北京: 中国标准出版社, 1996.
- The State Bureau of Quality and Technical Supervision. GB/T 15805.1—1995 The quarantine methods for freshwater fish - Part 1[S]. Beijing: Standards Press of China, 1996 (in Chinses).
- [31] Pilcher K S, Fryer J L. The viral diseases of fish: a review through 1978. Part 1: diseases of proven viral etiology[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 1980, 7(4): 287-363.
- [32] 周小愿, 张星朗, 韩亚慧, 等. 大鲵虹彩病毒转瓶规模化培养条件研究[J]. *山地农业生物学报*, 2015, 34(1): 32-35, 40.
- Zhou X Y, Zhang X L, Han Y H, *et al.* Condition optimization for large-scale cultivation of Chinese giant salamander iridovirus by rotary bottle[J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2015, 34(1): 32-35, 40 (in Chinese).
- [33] 黄琪琰. 水产动物疾病学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1993.
- Huang Q Y. Diseases of aquatic animals [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1993 (in Chinses).
- [34] Delrue I, Verzele D, Madder A, *et al.* Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2012, 11(6): 695-719.
- [35] 魏文燕, 汪开毓, 李良玉, 等. 一种虹鳟传染性造血器官坏死病毒 (IHNV) 灭活疫苗的制备方法及其应用: 中国, CN108114275A[P]. 2018-06-05.
- Wei W Y, Wang K Y, Li L Y, *et al.* Preparation and application of an infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) inactivated vaccine with rainbow trout: China, CN108114275A[P]. 2018-06-05 (in Chinese).
- [36] Purcell M K, Kurath G, Garver K A, *et al.* Quantitative expression profiling of immune response genes in rainbow trout following infectious haematopoietic necrosis virus (IHNV) infection or DNA vaccination[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2004, 17(5): 447-462.
- [37] Verjan N, Ooi E L, Nochi T, *et al.* A soluble nonglycosylated recombinant infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) G-protein induces IFNs in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25(1-2): 170-180.

Preparation and immune protective efficacy analysis of an inactivated vaccine against infectious hematopoietic necrosis (IHN)

CHEN Guihua^{1,2}, XU Liming¹, ZHAO Jingzhuang¹, REN Guangming¹,
SHA O Yizhi¹, LU Tongyan^{1*}

(1. Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Immune Technology of Heilongjiang Province,
Heilongjiang River Fisheries Research Institute,

Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China;

2. National Demonstration Centre for Experimental Fisheries Science Education,
Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Infectious hematopoietic necrosis disease (IHN) is an acute infectious viral disease that can cause sudden death of salmon. Vaccine immunization is the most effective way to prevent and control the disease. At present, there is no commercial vaccine to prevent the disease in China. The objective of the present study was to prepare an inactivated vaccine against IHN and evaluate its protective immunity in *Oncorhynchus mykiss*. In this study, infectious hematopoietic necrosis viruses (IHNV) were successively cultured on Epithelioma papulosum cyprinid (EPC) cells with different multiplicity of infection (MOI). The optimal proliferation pattern of IHNV on EPC cells was determined by measuring the titer of IHNV in each passage combined with the virus harvest time. IHNV was inactivated by β -propanolactone (BPL) at different final concentrations at 24 °C, and the inactivity was then verified *in vitro* and *in vivo* to determine the optimal inactivation condition. Inactivated IHNV prepared with the optimal inactivation protocol was intraperitoneally injected into *O. mykiss* [(10±2) g] with different doses, and the protective effect of the inactivated vaccine was analyzed by detecting relative percent survival (RPS) after challenge, expression levels of immune-related factors and serum neutralizing antibody titers at different time post vaccination. It was shown that different proliferation patterns had some effects on the proliferation of IHNV on EPC. We chose MOI of 0.0001 as the best inoculation dose on EPC cells, and the virus was harvested on the 3rd day post inoculation at 15 °C. The *in vivo* and *in vitro* safety tests showed that the best inactivation condition was to inactivate IHNV at 24 °C for 24 h with the final concentration of 3.0 mmol/L BPL. 10 μ L per fish was chosen as the optimal immunization dose, and more *O. mykiss* were immunized. The RPS was 91.37%, 84.28%, 84.15% and 47.5% at 7, 21, 45 and 60 d post immunization (d.p.i), respectively, and significant difference was observed on RPS between 60 d.p.i and other time points. Compared with the negative group, the expression levels of *Mx-1* and *IFN- γ* were significantly up-regulated in spleen and head-kidney at 7, 15 and 30 d.p.i, and reached the maximum at 7 d.p.i (5 folds). The expressions of *CD4* and *IgM* genes were significantly up-regulated in spleen and head-kidney at 15 d.p.i. In the detection of neutralizing antibody titer, the average neutralizing antibody titer in *O. mykiss* serum was 67.25, 43.40 and 29.78 at 30, 45 and 60 d.p.i respectively, with a decreasing trend and significant differences among different groups. The results indicated that the IHN-BPL inactivated vaccine developed in this study could induce specific and non-specific immune response in *O. mykiss*, and could provide significant immunoprotection, which will provide references for the development of inactivated vaccines against IHN.

Key words: *Oncorhynchus mykiss*; infectious hematopoietic necrosis (IHN); Epithelioma papulosum cyprinid (EPC); inactivated vaccine; β -propiolactone (BPL)

Corresponding author: LU Tongyan. E-mail: lutongyan@hrfri.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31802345); National Key R & D Plan (2019YFE0115500); Special Fund for Basic Scientific Research Business of Central Public Welfare Institutions (HSY2019M, 2020GH05); China Postdoctoral Science Foundation (2018M630893, 2019T12027)