

# 鹅细小病毒灭活疫苗种子批建立

黄宇翔,刘力威,王志强,张军,邹越,杨旭东,李洪彬

(黑龙江省兽医科学研究所,黑龙江齐齐哈尔 161006)

[收稿日期] 2015-11-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 04-0001-04 [中图分类号] S

**[摘要]** 为保证制苗所用毒种质量和稳定性,在对制苗毒种病毒含量、病毒纯净性、特异性、免疫原性及扩繁代次等研究的基础上,建立了鹅细小病毒灭活疫苗毒种种子批。试验使用鹅胚对鹅细小病毒 YA98 株进行了 20 次传代。传代毒种的鉴定结果表明:抽检的各代次的毒种均无细菌、支原体、外源病毒污染,且病毒含量检测稳定,每 0.3 mL 含  $10^{4.78-4.85}$  ELD<sub>50</sub>;各代次特异性检测均能被鹅细小病毒抗血清中和;将各代次病毒液制成灭活疫苗,免疫成鹅后均能产生完全保护。以此为依据,最终确定原始毒种和基础毒种的扩繁代次宜控制在 5 代以内,生产毒种的最高扩繁代次宜控制在 15 代以内。种子批的建立,为鹅细小病毒灭活疫苗的生产奠定了基础。

**[关键词]** 种子批建立;YA98 株;培养特性;特异性

## The Seed Lots Built of Goose Parvovirus Inactivated Vaccine Candidate

HUANG Yu-xiang, LIU Li-wei, WANG Zhi-qiang, ZHANG Jun,

ZOU Yue, YANG Xu-dong, LI Hong-bin

(Heilongjiang Institute of Veterinary Science, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China)

**Abstract:** In order to ensure vaccine-made virus seed quality and stability, we established a goose parvovirus inactivated vaccine virus seed lot, on the research basis of vaccine-made virus seed virus content, virus pure, specific, immunogenicity and expanding propagation generations. The goose parvovirus YA98 strain was propagated and passaged 20 generations on goose embryo. Passage of virus identification results show that there were not found bacteria, mycoplasma, contamination with exogenous virus in sampling of each propagation generations virus; and virus content test was stable, per 0.3ml containing  $10^{4.78-4.85}$  ELD<sub>50</sub>; and it can be neutralized by goose parvovirus antiserum in specific detection; when it was made inactivated vaccine to inject geese, they could produce complete protection. On this basis, we ultimately determined that the propagation generations of the original virus and virus should be controlled within 5 ones and the highest propagation generation of production virus should be controlled within 15 ones. The establishment of the seed lot laid the foundation for the goose parvovirus inactivated vaccine production.

**Key words:** seed lots built; strain YA98; culture characteristics; specificity

鹅细小病毒(Goose parvovirus, GPV)病又称小鹅瘟(Gosling plague),是由鹅细小病毒引起的急性或亚急性的败血性传染病<sup>[1]</sup>,对雏鹅具有高度的致死性,给养鹅业造成巨大的经济损失。目前,疫苗接种仍是控制小鹅瘟的主要措施之一<sup>[2]</sup>。现有疫苗为活疫苗,在小鹅瘟的防疫中起到了良好的效果,由于,在小鹅瘟病发生流行的地区,种、雏鹅都存在水平不一的相应抗体,对现有活疫苗的接种免疫起到了中和、干扰,使活疫苗不能正常发挥免疫作用。因此,研制出不受残余抗体干扰的油乳剂灭活疫苗,对小鹅瘟病防治将起到更好的效果。

强毒株因有较好的免疫原性,被广泛用于灭活疫苗的制备<sup>[3]</sup>。近年,国内分离的鹅细小病毒有十余株,但用于鹅细小病毒灭活疫苗的研究不是很多,目前还没有研制出鹅细小病毒灭活疫苗正规产品。研究表明,小鹅瘟病毒只有一个血清型,不同毒株具有相同的抗原性,能起到免疫交叉保护作用,由于各毒株的培养特性存在一定的差异,将导致免疫原性存在着一定的差异,以至临床免疫动物后产生的抗体效价参差不齐。因此,具有较强的毒力和免疫原性的优质毒株,是制备疫苗的关键。本实验室分离鉴定的鹅细小病毒 YA98 株,经动物回归试验(前期试验)表明,毒力较强,经鹅胚传代,得到了鹅胚适应毒<sup>[4,5]</sup>。与国内近年分离的 8 毒株鹅细小病毒 VP3 基因核苷酸和推导氨基酸同源性比较<sup>[6]</sup>,核苷酸同源性为 93.0%~97.9%,推导的氨基酸同源性为 96.8%~99.7%,毒株的亲缘性很近。应用该毒株病毒制备灭活疫苗,通过本动物免疫攻毒试验表明,对后代雏鹅完全包保护,可作为鹅细小病毒灭活疫苗的制苗用种毒。本试验在对 GPV YA98 株传代培养以及对各代次的生物学特性和免疫原性的研究基础上,建立了种子批,以期对小鹅瘟灭活疫苗生产奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 毒种 小鹅瘟病毒 YA98 株,鹅细小病毒强毒(HH98 株),由黑龙江省兽医科学研究所鉴定保存。

1.2 鹅胚 12 日龄易感鹅胚,在孵化前用琼脂扩

散试验检测同批鹅蛋的卵黄抗体,小鹅瘟抗体呈阴性。

1.3 鹅只 120 日龄健康鹅,试验前用琼脂扩散试验检测血清,小鹅瘟抗体呈阴性。

1.4 小鹅瘟阳性血清 东北农业大学王君伟教授惠赠。

1.5 种子批的建立 试验以前期经过系统鉴定确认具有良好免疫原性、繁殖特性、特异性和纯净性的 YA98 毒株,为原始种子,将原始种子用灭菌生理盐水作 10 倍稀释,尿囊腔接种 12 日龄易感鹅胚连续传代,每胚 0.3 mL,收取各代次 48~120 h 死亡鹅胚液,进行病毒培养特性、病毒含量、特异性、免疫原性、病毒纯净性及保存期试验。将检验合格的鹅胚液与冻干保护剂,1:1 混合均匀,进行定量分装,各代次命名为 YA98F1~20。抽取原始毒种、YA98F3、YA98F5、YA98F7、YA98F10、YA98F12、YA98F15、YA98F20 冻干后产物用于后续检验,依据检验结果建立种子批。

1.6 培养特性 将毒种用灭菌生理盐水作 10 倍稀释,经尿囊腔内接种 12 日龄易感鹅胚 10 枚,每胚 0.3 mL,置 37~38℃ 继续孵育,观察并记录鹅胚接种后 24~168 h 死亡与剖检情况。

1.7 病毒含量 随机抽取 10% 冻干产品,用灭菌生理盐水作 10 倍系列稀释,取  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  4 个稀释度,每个稀释度,经尿囊腔接种 12 日龄鹅胚,5 枚,每胚 0.3 mL,置 37℃ 孵育观察 168 h,24 h 前死亡鹅胚不计,记录 24~168 h 鹅胚死亡情况,计算 ELD<sub>50</sub>。

1.8 特异性 将毒种稀释至病毒含量为 200ELD<sub>50</sub>/0.3 mL,与等量抗小鹅瘟病毒特异性血清混合,置 37℃ 水浴中和 1 h 后,尿囊腔接种 12 日龄易感鹅胚 5 枚,每胚 0.3 mL;同时设病毒对照组 5 枚,每胚接种同条件处理的病毒液和生理盐水混合液 0.3 mL,37℃ 孵育观察 168 h,记录 24~168 h 鹅胚死亡情况,并取病毒液做鸡红细胞凝集试验(HA)。

1.9 免疫原性 将甲醛灭活后的含毒尿囊液与油相,按 1:1 制备油乳剂灭活疫苗。肌肉接种 120

日龄易感鹅 10 只(公、母比例为 1 : 4), 每只 1 mL, 于接种疫苗后的 28 日, 连同对照鹅 5 只, 分别采血, 分离血清, 测定鹅细小病毒的琼扩抗体 (AGP) 效价。并收集种蛋孵育后代雏鹅, 于 3 日龄进行攻毒保护试验, 试验组与对照组各皮下接种鹅细小病毒强毒 (HH98 株) 病毒液, 每组 10 只, 每只 0.2 mL。观察 10 日, 统计保护率。

1.10 纯净性检查 无菌检验、支原体检验、外源病毒检验, 按现行《中国兽药典》<sup>[7]</sup> 附录进行。

1.11 毒种保存期试验 抽检保存时间分别为 2 年、3 年、4 年的 YA98F5、YA98F10、YA98F15 三个代次的毒种, 经鹅胚培养复壮, 测定 ELD<sub>50</sub>。

## 2 结果

2.1 培养特性 将原始毒种、YA98F3、YA98F5、YA98F7、YA98F10、YA98F12、YA98F15、YA98F20 抽检样品, 在接种鹅胚后 72 ~ 168 h, 各批次病毒均至 8 枚以上鹅胚死亡, 剖检死亡胎儿, 头部、颈部及绒毛尿囊膜呈明显水肿, 胚头、颈部、胸部、爪、翅尖及喙旁均有出血, 病变特征明显。对鹅胚培养特性稳定。

2.2 病毒含量 结果见表 1。抽样检测的原始毒种、YA98F3、YA98F5、YA98F7、YA98F10、YA98F12、YA98F15 和 YA98F20 病毒含量的测定结果 ELD<sub>50</sub> 都在 10<sup>4.7</sup>/0.3 mL 以上, 表明连续传代 20 次时各代次毒株对冻干处理的耐受能力未发生明显改变。

表 1 鹅胚半数致死量 (ELD<sub>50</sub>) 的测定

代次	ELD <sub>50</sub> /0.3 mL
原始毒种	10 <sup>4.78</sup>
YA98F3	10 <sup>4.78</sup>
YA98F5	10 <sup>4.83</sup>
YA98F7	10 <sup>4.85</sup>
YA98F10	10 <sup>4.78</sup>
YA98F12	10 <sup>4.83</sup>
YA98F15	10 <sup>4.78</sup>
YA98F20	10 <sup>4.78</sup>

2.3 特异性检验 结果见表 2。抽样检测的原始毒种、YA98F3、YA98F5、YA98F7、YA98F10、YA98F12、YA98F15 和 YA98F20 各代次病毒均能被抗小鹅瘟血清中和, 接种鹅胚全部存活, 且各代次病毒液做鸡红细胞凝集试验, 均无血凝性, 符合小鹅瘟病毒特性。

表 2 病毒特异性鉴定结果

种毒	中和组	对照组
原始毒种	5/5	0/5
YA98F3	5/5	1/5
YA98F5	5/5	0/5
YA98F7	5/5	1/5
YA98F10	5/5	0/5
YA98F12	5/5	0/5
YA98F15	5/5	1/5
YA98F20	5/5	0/5

分母为试验鹅胚数, 分子为存活鹅胚数。

2.4 免疫原性 各批次毒种制备灭活疫苗, 接种易感鹅后 28 日分别采血, 用琼脂扩散试验进行鹅细小病毒琼扩抗体 (AGP) 效价检测, 结果见表 3。可以看出, 各代次免疫抗体效价无明显差异, 免疫组血清抗体效价 ≥ 1 : 1, 连续传代未影响免疫效果, 对后代雏鹅有良好的保护作用, 有效保护率可达 90%。

表 3 免疫原性试验结果

疫苗	免疫途径	免疫剂量/(mL · 只 <sup>-1</sup> )	琼扩抗体效价		后代雏鹅保护率/%	
			试验组	对照组	试验组	对照组
原始毒种	肌肉	1.0	1:2	-	100	10
YA98F3	肌肉	1.0	1:2	-	100	0
YA98F5	肌肉	1.0	1:2	-	100	0
YA98F7	肌肉	1.0	1:2	-	90	0
YA98F10	肌肉	1.0	1:2	-	100	10
YA98F12	肌肉	1.0	1:2	-	90	10
YA98F15	肌肉	1.0	1:2	-	100	10
YA98F20	肌肉	1.0	1:1	-	90	10

“-”表示检验结果为阴性

2.5 纯净性检验 将原始毒种、YA98F3、YA98F5、YA98F7、YA98F10、YA98F12、YA98F15 和 YA98F20 按现行《中国兽药典》附录进行检验,结果显示:检测的各代次种毒,分别接种于三种培养基中,进行细菌和霉菌检验,结果均无细菌和霉生长;在液体

和固体两种培养基上进行的支原体检验也均未见支原体生长;各代次种毒外源病毒检验,分别进行了鸡胚和细胞检验,结果均未检测到外源病毒(表4),各代次种毒纯净。

表4 外源病毒检验(鸡胚和细胞检查法)结果

种毒代次	鸡胚检查				鸡胚成纤维细胞检查		
	绒毛尿囊膜接种		尿囊腔接种		CPE	红细胞吸附	
	健活比例	绒毛尿囊膜	健活比例	红细胞凝集			
原始毒种	10/10	无病变	-	10/10	-	2/2 无 CPE	无吸附
YA98F3	10/10	无病变	-	10/10	-	2/2 无 CPE	无吸附
YA98F5	10/10	无病变	-	10/10	-	2/2 无 CPE	无吸附
YA98F7	10/10	无病变	-	10/10	-	2/2 无 CPE	无吸附
YA98F10	10/10	无病变	-	10/10	-	2/2 无 CPE	无吸附
YA98F12	10/10	无病变	-	10/10	-	2/2 无 CPE	无吸附
YA98F15	10/10	无病变	-	10/10	-	2/2 无 CPE	无吸附
YA98F20	10/10	无病变	-	10/10	-	2/2 无 CPE	无吸附

“-”表示红细胞凝集阴性

2.6 基础种毒保存期测定 将-70℃保存2年、3年、4年的YA98F5、YA98F10、YA98F15种毒(冻干毒)取出,接种12日龄鹅胚,测定 $ELD_{50}$ ,并与保

存前的结果进行比较,结果见表5。可以看出,冻干毒种于-70℃经4年保存,种毒的病毒含量未见降低。

表5 基础种毒保存期测定结果

种毒代次	保存时间	保存温度/℃	检测时间	保存期/年	病毒含量/( $ELD_{50} \cdot 0.3mL^{-1}$ )	
					保存前	保存后
YA98F5	2006.06	-70	2008.06	2		$10^{4.73}$
			2009.06	3	$10^{4.83}$	$10^{4.52}$
			2010.06	4		$10^{4.50}$
YA98F10	2007.06	-70	2009.06	2		$10^{4.68}$
			2010.06	3	$10^{4.78}$	$10^{4.52}$
			2011.06	4		$10^{4.38}$
YA98F15	2008.06	-70	2010.06	2		$10^{4.73}$
			2011.06	3	$10^{4.78}$	$10^{4.50}$
			2012.06	4		$10^{4.68}$

### 3 小结

通过对YA98株各代次冻干种毒的病毒含量测定、纯净性、特异性和免疫原性等鉴定证明,各代次病毒传代稳定;纯净性检验均无细菌、霉菌、支原体和外源病毒污染;特异性检验均能够被小鹅瘟抗血清特异性中和;各代次病毒制成灭活疫苗免疫动物后,均能够产生完全的攻毒保护,以此为依据,建

立了毒种的种子批,确定原始毒种和基础毒种的扩繁代次宜控制在5代以内,适宜的保存方法和保存期为-70℃保存3年;生产毒种的最高扩繁代次宜控制在15代以内,适宜的保存方法和保存期为-70℃保存3年。

本试验种子批的建立可为小鹅瘟灭活疫苗的研制,以及将来的规模化生产提供稳定、可靠的生

产用种毒。

### 参考文献:

- [1] B W 卡尔尼克. 禽病学[M]. 高福, 主译. 第10版. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [2] 费恩阁, 李德昌, 丁壮. 动物疫病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [3] 宁宜宝. 兽用疫苗学[M]. 第1版. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [4] 黄宇翔, 刘力威, 李洪彬, 等. 鹅细小病毒、鹅副黏病毒流行病学调查及病原分离鉴定[J]. 中国家禽, 2013, 2: 22-26.
- [5] 黄宇翔, 李洪彬, 刘力威, 等. 鹅细小病毒的分离鉴定与生物学特性研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008, 2: 77-78.
- [6] 王志强, 刘力威, 杨旭东, 等. 鹅细小病毒 VP1-VP3 非重叠区基因的克隆与序列分析[J]. 中国家禽, 2011, 19: 28-31.
- [7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二〇一〇年版三部[S].

(编辑: 李文平)