



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108421037 A

(43)申请公布日 2018.08.21

(21)申请号 201810312293.5 *A61K 39/205*(2006.01)
(22)申请日 2018.04.09 *A61P 31/20*(2006.01)
(71)申请人 武汉科前生物股份有限公司 *A61P 31/22*(2006.01)
地址 430070 湖北省武汉市东湖新技术开 *C12N 7/00*(2006.01)
发区高新二路419号 *C12N 7/04*(2006.01)
(72)发明人 尹争艳 徐高原 周明光 钟恩
陈斌 方玉林 苏顺攀 陈章表
苏秀婵 黄慧君 洪灯 陈关平
曹毅 张洁 金建云
(74)专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限
公司 42102
代理人 乔宇 徐晓琴
(51)Int.Cl.
A61K 39/295(2006.01)
A61K 39/125(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页

(54)发明名称

一种猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗及其悬浮培养制备方法

(57)摘要

本发明属于兽用生物制品技术领域,具体涉及一种猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗及其悬浮培养制备方法。所述制备方法包括:猪伪狂犬病毒悬浮培养抗原和猪细小病毒悬浮培养抗原的制备;将灭活后的猪伪狂犬病毒和猪细小病毒抗原液按比例混合,再加入佐剂充分乳化后,即得猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗。本发明建立了猪伪狂犬病毒抗原液和猪细小病毒抗原液的悬浮培养工艺,采用所述悬浮培养工艺制备所得病毒抗原液具有抗原含量高、抗原批量大、批次稳定等优点,所述制备方法大大减少了人工使用,减少了培养系统占地面积和空间,降低了企业的生产成本;同时,采用本发明所述猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗,一针免两毒,减少了动物的免疫次数,降低了动物应激次数,大大降低了疫苗的生产成本和养殖户的养殖成本。

1. 一种悬浮培养猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 猪伪狂犬病毒悬浮培养抗原的制备:a) 生产用BHK-21细胞的培养,包括种子培养、一级生物反应器扩大培养和二级生物反应器扩大培养;b) 接种猪伪狂犬病毒株后继续培养;c) 收获猪伪狂犬病毒抗原液,经灭活得到猪伪狂犬病毒灭活液;

(2) 猪细小病毒悬浮培养抗原的制备:a) 生产用ST细胞的培养,包括ST细胞转瓶培养、一级生物反应器扩大培养和二级灌流式生物反应器扩大培养;b) 接种猪细小病毒株后继续培养;c) 收获猪细小病毒抗原液,经灭活得到猪细小病毒灭活液;

(3) 将猪伪狂犬病毒灭活液和猪细小病毒灭活液按比例混合,再加入佐剂充分乳化后,即得猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述猪伪狂犬病毒株为猪伪狂犬病病毒gE基因缺失株HNX-12株,所述猪细小病毒株为猪细小病毒WH-1株。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述猪伪狂犬病毒抗原液中猪伪狂犬病毒的含量 $\geq 10^{8.0}$ TCID₅₀/ml,所述细小病毒抗原液中细小病毒的含量 $\geq 10^{7.0}$ TCID₅₀/ml或病毒血凝价 $\geq 2^{10}$ 。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述猪伪狂犬病毒灭活液和猪细小病毒灭活液的体积比为1:1~1:2。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述佐剂为水包油包水佐剂,所述佐剂的质量与猪伪狂犬病毒灭活液和猪细小病毒灭活液的总质量相同。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述一级生物反应器扩大培养和二级生物反应器扩大培养的条件包括:装液量为60%~70%,细胞接种密度为 $5\sim 7 \times 10^5$ cells/mL,培养温度为37℃,pH值7.2~7.4,溶氧值40%。

7. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述猪伪狂犬病毒株的接种量体积比为1%~2%,接种后,保持转速50~60r/min,pH值7.2~7.4,溶氧值40%,温度37℃,继续培养24h~36h,当细胞活率 $< 20\%$ 时收获猪伪狂犬病毒抗原液。

8. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述ST细胞转瓶培养的条件为:转速为9~10转/小时,温度37℃,培养时间36~48小时,待细胞长满单层时,停止培养,用0.25%胰酶溶液消化细胞。

9. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述一级生物反应器扩大培养和二级灌流式生物反应器扩大培养的条件包括:接种后反应器内ST细胞的密度为 $4 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/ml,微载体含量5~9g/L,培养液的装液量60%~70%,溶氧为60%,pH值7.2~7.4,温度37℃,一级生物反应器扩大培养的时间为96h~120h,二级生物反应器扩大培养的时间为72h~96h。

10. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述猪细小病毒株的接种量体积比为2%~5%,接种后继续培养,控制搅拌速度为50~60r/min,溶氧为60%,pH值7.2~7.4,温度37℃,继续培养48h~72h后,当80%以上ST细胞出现病变时,收获细小病毒抗原。

一种猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗及其悬浮培养制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于兽用生物制品技术领域,具体涉及一种猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗及其悬浮培养制备方法。

背景技术

[0002] 猪伪狂犬病(Pseudorabies,PR)是由伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus,PRV)引起的多种家畜及野生动物的一种以发热、奇痒(猪除外)、呼吸和神经系统疾病为特征的急性传染病,其中对猪危害最大,主要引起怀孕母猪流产、产死胎、木乃伊胎、返情和屡配不孕;新生仔猪大量死亡;育肥猪增重变缓及种公猪丧失种用能力。世界卫生组织(OIE)将其列为B类动物疫病,我国将其列为二类动物疫病。本病的流行在全球范围内呈持续上升趋势。日前已成为养猪业危害最大的疾病之一。

[0003] 猪细小病毒病(porcine parvovirus infection,PPI)又称猪繁殖障碍病。是由猪细小病毒引起的一种猪的繁殖障碍病。以怀孕母猪发生流产、死产、产木乃伊为特征。猪细小病毒病是由猪细小病毒(PPV)引起的一种猪繁殖障碍病,该病主要表现为胚胎和胎儿的感染和死亡,特别是初产母猪发生死胎、畸形胎和木乃伊胎,但母猪本身无明显的症状。

[0004] 目前预防种猪的猪伪狂犬病和猪细小病毒病的有效手段是免疫猪伪狂犬病灭活疫苗和猪细小病毒病灭活疫苗。目前市面销售的该类产品均为单苗,需要分别免疫,增加人工和动物的应激次数,且均为转瓶工艺培养,工艺落后,耗费人工,转瓶培养占用面积较大,抗原含量低,影响疫苗的使用效果。

发明内容

[0005] 本发明针对现有技术的不足,目的在于提供一种猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗及其悬浮培养制备方法。

[0006] 为实现上述发明目的,本发明采用的技术方案为:

[0007] 一种悬浮培养猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗的制备方法,包括如下步骤:

[0008] (1)猪伪狂犬病毒悬浮培养抗原的制备:a)生产用BHK-21细胞的培养,包括种子培养、一级生物反应器扩大培养和二级生物反应器扩大培养;b)接种猪伪狂犬病毒株后继续培养;c)收获猪伪狂犬病毒抗原;

[0009] (2)猪细小病毒悬浮培养抗原的制备:a)生产用ST细胞的培养,包括ST细胞转瓶培养、一级生物反应器扩大培养和二级灌流式生物反应器扩大培养;b)接种猪细小病毒株后继续培养;c)收获猪细小病毒抗原;

[0010] (3)将猪伪狂犬病毒抗原和猪细小病毒抗原按比例混合,再加入佐剂充分乳化后,即得猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗。

[0011] 上述方案中,所述猪伪狂犬病毒株为猪伪狂犬病病毒gE基因缺失株HNX-12株,所

述猪细小病毒株为猪细小病毒WH-1株。

[0012] 上述方案中,步骤(1)所述生产用BHK-21细胞的培养过程中,当BHK-21细胞种子培养瓶内的细胞活率达到95%以上、细胞密度达到 $4\sim 6\times 10^6$ 个/ml时,接种至一级生物反应器扩大培养,当一级生物反应器内BHK-21细胞的密度达到 $2\sim 3\times 10^6$ cells/ml,转接至二级生物反应器继续扩大培养,当二级生物反应器内BHK-21细胞的密度达到 $2\sim 3\times 10^6$ cells/ml,接种猪伪狂犬病毒株。

[0013] 上述方案中,步骤(1)中所述一级生物反应器培养的条件:反应器内培养液的装液量为60%~70%,反应器内BHK-21细胞的接种密度为 $5\sim 7\times 10^5$ cells/mL,培养温度为37℃,转速80~100r/min,pH值7.2~7.4,溶氧(DO)值40%。

[0014] 上述方案中,步骤(1)中所述二级生物反应器培养的条件为:反应器内培养液的装液量为60%~70%,反应器内BHK-21细胞的接种密度为 $5\sim 7\times 10^5$ cells/mL,培养温度为37℃,转速50~60r/min;pH值7.2~7.4;溶氧(DO)值40%。

[0015] 上述方案中,步骤(1)中所述猪伪狂犬病毒株的接种量为1%~2%(体积比),接种后,继续培养的条件为:转速50~60r/min,pH值7.2~7.4,溶氧(DO)值40%,温度37℃。

[0016] 上述方案中,步骤(1)中所述收获猪伪狂犬病毒抗原的条件为:接种后继续培养24h~36h,当细胞活率<20%时收获病毒液。

[0017] 上述方案中,步骤(2)中所述ST细胞转瓶培养的条件为:转速为9~10转/小时,温度37℃,培养时间36~48小时,待细胞长满单层时,停止培养,用0.25%胰酶溶液消化细胞。

[0018] 上述方案中,步骤(2)中所述一级生物反应器扩大培养的条件为:反应器内ST细胞的接种密度为 $4\times 10^5\sim 5\times 10^5$ 个/ml,微载体含量5~9g/L,培养液的装液量60%~70%,搅拌速度60~75r/min,溶氧(DO)为60%,pH值7.2~7.4,温度37℃,培养时间96h~120h。

[0019] 上述方案中,步骤(2)中所述二级灌流式生物反应器扩大培养的条件为:反应器内ST细胞的接种密度为 $4\times 10^5\sim 5\times 10^5$ 个/ml,微载体含量5~9g/L,培养液的装液量60%~70%,搅拌速度50~60r/min,溶氧(DO)为60%,pH值7.2~7.4,温度37℃,培养时间72h~96h。

[0020] 上述方案中,所述微载体为直径60~250 μ m、适用于贴壁细胞生长的微珠,其组成成分为葡聚糖类。

[0021] 上述方案中,步骤(2)中所述猪细小病毒株的接种量为2%~5%,接种后继续培养的条件:搅拌速度为50~60r/min,溶氧(DO)为60%,pH值7.2~7.4,温度37℃。

[0022] 上述方案中,步骤(2)中所述收获细小病毒株的条件为:继续培养48h~72h后,当80%以上ST细胞出现病变时,收获细小病毒抗原。

[0023] 上述方案中,步骤(3)所述猪伪狂犬病毒抗原中猪伪狂犬病毒含量 $\geq 10^{8.0}$ TCID₅₀/ml,所述细小病毒抗原中细小病毒的含量 $\geq 10^{7.0}$ TCID₅₀/ml或病毒血凝(HA)价 $\geq 2^{10}$ 。

[0024] 上述方案中,步骤(3)中所述猪伪狂犬病毒抗原和猪细小病毒抗原的体积比为1:1~1:2。

[0025] 上述方案中,步骤(3)中所述佐剂为水包油包水佐剂,所述佐剂的质量与猪伪狂犬病毒抗原和猪细小病毒抗原总质量相同。

[0026] 本发明中所使用的微载体是指Cytodex 1,是以交联葡聚糖基架(cross-linked dextran matrix)为基础,该基架被带正电荷的N,N二乙胺基乙基基团(N,N-

diethylaminoethyl groups) 取代, 该带电基团遍布于整个微载体基架中; 所使用的灌流式生物反应器是指一种是用搅拌式生物反应器悬浮培养细胞的装置, 这种生物反应器具有细胞截流装置, 可使细胞稳定的处在较好的营养环境中, 有害代谢废物浓度积累较低, 有利于维持较高的细胞密度, 从而较大的提高了产品的产量。

[0027] 本发明的有益效果如下: 本发明建立了猪伪狂犬病毒抗原液和猪细小病毒抗原液的悬浮培养工艺, 采用所述悬浮培养工艺制备所得病毒抗原液具有抗原含量高、抗原批量大、批次稳定等优点, 所述制备方法大大减少了人工使用, 减少了培养系统占地面积和空间, 降低了企业的生产成本; 同时, 采用本发明所述猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗, 一针免两毒, 减少了动物的免疫次数, 降低了动物应激次数, 大大降低了养殖户的成本。

具体实施方式

[0028] 为了更好地理解本发明, 下面结合实施例进一步阐明本发明的内容, 但本发明的内容不仅仅局限于下面的实施例。

[0029] 实施例1猪伪狂犬病毒悬浮培养抗原的制备

[0030] 1.1 猪伪狂犬病病毒gE基因缺失株(HNX-12株)

[0031] 1.1.1 生产用毒种制备

[0032] 1.1.1.1 毒种繁殖

[0033] 将悬浮型BHK-21细胞接种细胞摇瓶, 置37℃、120r/min摇床培养, 取细胞活率95%以上, 细胞密度 $4\sim 6\times 10^6$ 个/ml的种子细胞加入接种瓶, 混匀后取样计数, 转接至生物反应器。生物反应器接种细胞前进行溶氧(DO)电极、pH电极、温度电极校准, 罐体高压灭菌。根据培养体积预先泵入70%培养体积的培养液, 设置最佳培养条件: 温度37℃, 接种密度 $5\sim 7\times 10^5$ cells/ml, 转速50~60r/min, pH值7.2~7.4, 溶氧(DO)值40%, 培养悬浮型BHK-21细胞, 当细胞密度长至 $2\sim 3\times 10^6$ cells/ml, 以1%(v/v)的比例将PRV HNX-12株接种于悬浮型BHK-21细胞, 转速50~60r/min, pH值7.2~7.4, 溶氧(DO)值40%, 37℃继续培养。接种24h左右, 当细胞活率<20%时收获病毒液, 定量分装, 置-70℃以下保存, 注明名称, 日期, 毒种代次等。

[0034] 1.1.1.2 毒种检验 病毒含量和纯净性, 应符合规定。

[0035] 1.1.1.3 毒种保存 湿毒-15℃以下保存, 有效期为6个月。

[0036] 1.1.1.4 毒种继代 应不超过5代。

[0037] 1.1.2 制苗用病毒液的制备及检验

[0038] 1.1.2.1 生产用细胞的制备

[0039] 1.1.2.1.1 一级生物反应器中BHK-21细胞培养

[0040] 悬浮型BHK-21细胞培养采用种子级联扩大培养方式, 细胞摇瓶培养的种细胞进行取样计数和计算细胞活率, 取细胞活率95%以上, 细胞密度 4×10^6 个/ml~ 6×10^6 个/ml的种子细胞加入接种瓶, 混匀后取样计数, 用管道转移至一级生物反应器中, 使罐内细胞密度达到 $5\sim 7\times 10^5$ cells/ml。

[0041] 一级生物反应器接种细胞前进行溶氧(DO)电极、pH电极、温度电极校准, 罐体高压灭菌。根据培养体积预先泵入70%培养体积的培养液, 设置最佳培养条件: 温度37℃, 接种密度 $5\sim 7\times 10^5$ cells/ml, 转速80~100r/min, pH值7.2~7.4, 溶氧(DO)值40%, 培养悬浮型

BHK-21细胞。

[0042] 1.1.2.1.2 二级生物反应器中BHK-21细胞培养

[0043] 当一级生物反应器中细胞密度达到 $2\sim 3\times 10^6$ cells/ml左右后,通过管道转移至二级生物反应器内,混匀后取样计数,使罐内细胞密度达到 $5\sim 7\times 10^5$ cells/ml。

[0044] 二级生物反应器接种细胞前进行溶氧(DO)电极、pH电极、温度电极校准,罐体高压灭菌。根据培养体积预先泵入70%培养体积的培养液,设置最佳培养条件:温度 37°C ,接种密度 $5\sim 7\times 10^5$ cells/ml;转速 $50\sim 60$ r/min;pH值 $7.2\sim 7.4$;溶氧(DO)值40%,进行扩大培养。

[0045] 1.1.2.2 病毒接种

[0046] 当二级生物反应器内悬浮型BHK-21细胞密度达到 $2\sim 3\times 10^6$ cells/ml时,以1% (v/v)的比例将PRV HNX-12株接种于悬浮型BHK-21细胞,转速 $50\sim 60$ r/min,pH值 $7.2\sim 7.4$,溶氧(DO)值40%, 37°C 继续培养。

[0047] 1.1.2.3 病毒收获

[0048] 接种24小时左右,当细胞活率 $<20\%$ 时收获病毒液,注明名称、收获日期、代次等,取样按下列要求检验合格后灭活待用。

[0049] 1.1.2.3.1 无菌检验 按现行《中国兽药典》附录进行检验,应无菌生长。

[0050] 1.1.2.3.2 病毒含量测定 应 $\geq 10^{8.0}$ TCID₅₀/ml。

[0051] 1.1.2.4 灭活及半成品检验

[0052] 1.1.2.4.1 病毒液灭活 将检验合格的病毒原液或稀释后加入灭活灌,加入浓度为 0.2mol/l 的BEI至终浓度为 0.005mol/l ,边加边搅拌,混合均匀后,保持 $36\sim 37^{\circ}\text{C}$,灭活48小时,期间 $2\sim 4$ 小时搅拌1次。

[0053] 1.1.2.4.2 阻断 灭活终止时,立即在灭活病毒液中加入过滤除菌的 $50\% \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (硫代硫酸钠)溶液,使其终浓度为 2.0% ,充分搅拌均匀。置 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存,取样按下列要求检验合格后待用。

[0054] 1.1.2.4.4 无菌检验 按现行《中国兽药典》附录进行检验,应无菌生长。

[0055] 1.1.2.4.5 灭活检验 将灭活后的病毒液,接种生长良好的BHK-21细胞单层(25cm^2 细胞瓶),每瓶2ml, 37°C 吸附1小时后弃掉病毒液,加入细胞维持液5ml,置 37°C 下培养3日后收获,反复冻融2次,离心取上清2ml再次接种BHK-21细胞,如此再盲传2代,应观察不到细胞病变。

[0056] 1.2 猪细小病毒WH-1株

[0057] 1.2.1 生产用毒种制备

[0058] 1.2.1.1 毒种繁殖

[0059] 采用同步接种法按病毒液与生长液1:10的量将毒种接种于ST细胞,置 37°C 旋转培养,当细胞病变(CPE)达到 80% 以上时,收取病毒液。将检验合格的病毒液混合,定量分装, -15°C 以下保存,注明名称、收获日期、毒种代次等。

[0060] 1.2.1.2 毒种检验 病毒含量和纯净性,应符合规定。

[0061] 1.2.1.3 毒种保存 湿毒 -15°C 以下保存,有效期为6个月。

[0062] 1.2.1.4 毒种继代 应不超过5代。

[0063] 1.2.2 制苗用病毒液的制备及检验

[0064] 1.2.2.1 生产用细胞的制备

[0065] 1.2.2.1.1 细胞增殖:用0.25%胰酶溶液消化已长成单层的ST细胞,按1:3比例传代增殖培养。将扩大培养的ST细胞转接到转瓶中,调整转速为9~10转/小时,37℃下培养,待细胞长满单层时(36~48小时),用0.25%胰酶溶液消化细胞,按1:3比例传代增殖培养。

[0066] 1.2.2.1.2 一级生物反应器培养细胞 用0.25%胰酶溶液消化转瓶中已长成单层的ST细胞,计数后按 $4 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/ml的密度接种一级生物反应器,装有微载体(所述微载体直径60~250 μm 、适用于贴壁细胞生长,其组分为葡聚糖组成)5~9g/L,培养基的装液量60%~70%,调整搅拌速度为60~75r/min,溶氧(DO)为60%,pH值7.2~7.4,温度37℃,培养96h~120h;

[0067] 1.2.2.1.3 二级灌流式生物反应器培养细胞:当一级生物反应器中的细胞在微载体上长满单层后,排出罐中生长液,用PBS(0.01mol/L,pH值7.2)洗涤细胞2次。注入0.25%胰酶消化进行消化,待载体上细胞消化下来后,注入适量的细胞生长液,终止消化。取细胞悬液,计数后接种二级灌流式生物反应器,细胞接种密度为 $4 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个/ml,加入的微载体(所述微载体直径60~250 μm 、适用于贴壁细胞生长,其组分为葡聚糖组成)5~9g/L,培养基的装液量60%~70%,搅拌速度调整为50~60r/min,溶氧(DO)为60%,pH值7.2~7.4,温度37℃,培养72h~96h;

[0068] 1.2.2.2 病毒接种 当生物反应器中载体上的细胞长满单层前(72h~96h),排出罐中生长液,加入含2%血清的DMEM培养液,按2%~5%的量接种种毒,调整生物反应器搅拌速度为50~60r/min,溶氧(DO)为60%,pH值7.2~7.4,37℃继续培养。

[0069] 1.2.2.3 病毒收获 接毒后从18小时开始每隔6小时取样观察细胞病变,当80%以上细胞出现病变时(48~72小时),收获病毒,注明名称、收获日期、代次等,取样按下列要求检验合格后灭活待用。

[0070] 1.2.2.3.1 无菌检验 按现行《中国兽药典》附录进行检验,应无菌生长。

[0071] 1.2.2.3.2 病毒含量测定 猪细小病毒WH-1株每毫升病毒含量应 $\geq 10^{7.0}$ TCID₅₀,或病毒血凝(HA)价应 $\geq 2^{10}$ 。

[0072] 1.2.2.4 灭活及半成品检验

[0073] 1.2.2.4.1 病毒液灭活 将检验合格的病毒原液或稀释后加入灭活灌,加入浓度为0.2mol/l的BEI至终浓度为0.005mol/l,边加边搅拌,混合均匀后,保持36~37℃,灭活48小时,期间2~4小时搅拌1次。

[0074] 1.2.2.4.2 阻断 灭活终止时,立即在灭活病毒液中加入过滤除菌的50%Na₂S₂O₃(硫代硫酸钠)溶液,使其终浓度为2.0%,充分搅拌均匀。置2~8℃保存,取样按下列要求检验合格后待用。

[0075] 1.2.2.4.3 无菌检验 按现行《中国兽药典》附录进行检验,应无菌生长。

[0076] 1.2.2.4.4 灭活检验

[0077] 取灭活后的病毒液,采用同步法按病毒液与生长液按5%比例接种于ST细胞2瓶,37℃培养观察2~3天后收获,反复冻融2次,收获冻融的细胞培养物如上再接种ST细胞,如此盲传2代,细胞应无病变产生。

[0078] 实施例2猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗

[0079] 2 疫苗制备

[0080] 2.1 水相制备 将灭活好的两种病毒液(猪伪狂犬病毒:猪细小病毒)按1:1(体积比)混合均匀。其中猪伪狂犬病毒灭活前病毒含量应 $\geq 10^{8.0}$ TCID₅₀/ml、猪细小病毒灭活前病毒含量应 $\geq 10^{7.0}$ TCID₅₀/ml或病毒血凝(HA)价 $\geq 2^{10}$ 。

[0081] 2.2 乳化:将水相与佐剂按照1:1的比例(质量比)混合后乳化。取样,吸取疫苗10.0ml加入离心管中,以3000r/min离心15分钟,管底析出的水相应不超过0.5ml。

[0082] 2.3 分装:将乳化合格的疫苗定量分装,轧盖、贴签。

[0083] 实施例3抗原的毒价测定

[0084] 3 猪伪狂犬病毒TCID₅₀的测定

[0085] 3.1.1 将病毒用DMEM维持液(含2%新生牛血清)作10倍系列稀释,取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 5个稀释度,每个稀释度接种96孔微量细胞培养板一纵排共8孔,同时设细胞对照8孔,每孔100 μ l。

[0086] 3.1.2 再在每孔加入100 μ l BHK-21细胞悬液。

[0087] 3.1.3 在37℃含5%CO₂的培养箱中培养观察4~6日,当80%细胞病变(细胞聚集隆起、细胞轮廓模糊、圆缩,最后脱落崩解)判为感染,记录细胞病变孔数,按Reed-Muench法计算TCID₅₀。结果见下表1,通过表1的实验数据说明,同批次的BHK-21细胞,采用本发明所述悬浮工艺培养的悬浮抗原比采用传统转瓶工艺培养的转瓶抗原的抗原效价提升了近10倍,大大提高了抗原含量,降低了生产成本。

[0088] 表1同批次细胞悬浮抗原和转瓶抗原的毒价对比

[0089]

细胞批次	细胞代次	抗原批号	悬浮抗原	抗原批号	转瓶抗原
0301	F6	0403	$10^{9.0}$ TCID ₅₀ /ml	0402	$10^{7.5}$ TCID ₅₀ /ml
0301	F7	0405	$10^{8.7}$ TCID ₅₀ /ml	0404	$10^{7.7}$ TCID ₅₀ /ml
0301	F8	0407	$10^{8.8}$ TCID ₅₀ /ml	0406	$10^{7.8}$ TCID ₅₀ /ml

[0090] 3.2 猪细小病毒的TCID₅₀测定方法

[0091] 3.2.1 将病毒用DMEM维持液(含2%新生牛血清)作10倍系列稀释,取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 5个稀释度,每个稀释度接种96孔微量细胞培养板一纵排共8孔,同时设细胞对照8孔,每孔100 μ l。

[0092] 3.2.2 再在每孔加入100 μ l ST细胞悬液。

[0093] 3.2.3 在37℃含5%CO₂的培养箱中培养观察4~6日,当80%细胞病变(细胞聚集隆起、细胞轮廓模糊、圆缩,最后脱落崩解)判为感染,记录细胞病变孔数,按Reed-Muench法计算TCID₅₀。结果见表2,通过表2的实验数据说明,同批次的ST细胞,采用本发明所述悬浮工艺培养的悬浮抗原比采用传统转瓶工艺培养的转瓶抗原的抗原效价提升了近10倍,提高了抗原含量,降低了生产成本。

[0094] 表2同批次细胞培养的悬浮抗原和转瓶抗原的毒价对比

[0095]

细胞批次	细胞代次	抗原批号	悬浮抗原	抗原批号	转瓶抗原
0401	F10	0517	$10^{8.0}$ TCID ₅₀ /ml	0516	$10^{6.5}$ TCID ₅₀ /ml
0401	F11	0520	$10^{7.6}$ TCID ₅₀ /ml	0519	$10^{6.7}$ TCID ₅₀ /ml
0401	F12	0523	$10^{7.7}$ TCID ₅₀ /ml	0522	$10^{6.6}$ TCID ₅₀ /ml

[0096] 实施例4安全研究用

[0097] 4 安全检验28~35日龄健康易感仔猪5头,每头颈部肌肉注射2倍免疫剂量(4ml)的本发明制备所得猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗,连续观察14日,免疫猪应均无不良反应,且全部健活。通过表3的实验数据说明,用悬浮培养的抗原制备的猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗2倍剂量免疫后,安全无不良反应。

[0098] 表3疫苗的安全性

[0099]

实验苗批次	试验猪	实验苗批次	试验猪	实验苗批次	试验猪
150701	5/5 无不良反应, 且全部健活	150702	5/5 无不良反应, 且全部健活	150703	5/5 无不良反应, 且全部健活

[0100] 实施例5效力研究

[0101] 5.1 猪伪狂犬病毒部分,下列方法任选其一

[0102] (1) 小鼠免疫攻毒法:用4~5周龄Ba1b/c小鼠10只,各后腿肌肉注射本发明制备所得猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗0.2ml、商品单苗猪伪狂犬病gE基因缺失灭活疫苗(HNX-12株),免疫28日后,连同对照小鼠10只,各足垫注射PRV HNX株病毒液0.1ml($5 \times 10^{4.0}$ TCID₅₀/ml),观察14日。对照小鼠应至少死亡9只,免疫小鼠应至少存活9只。

[0103] 表4猪伪狂犬病毒部分—小鼠攻毒法

实验苗批次	免疫组	对照组
150701	10/10 保护	10/10 死亡
150702	9/10 保护	
150703	10/10 保护	
150710 (商品单苗)	9/10 保护	

[0105] 通过表4的实验数据说明,用悬浮培养的抗原制备的猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗免疫后,参照《猪伪狂犬病gE基因缺失灭活疫苗(HNX-12株)》的效力检验方法,小鼠攻毒实验中,对照组实验成立的情况下,三批实验苗免疫组达到90%的保护率,商品单苗的免疫组达到90%的保护率,与商品单苗相比,二联灭活疫苗也能达到较好的免疫效果。

[0106] (2) 仔猪免疫攻毒法 用28~35日龄健康易感仔猪5头,每头颈部肌肉注射本发明制备所得猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗2ml、商品单苗猪伪狂犬病gE基因缺失灭活疫苗(HNX-12株),免疫28日后,连同对照猪5头,各滴鼻接种PRV HNX株病毒液1ml($10^{7.0}$ TCID₅₀/ml),观察14日。对照猪应至少4头发病,且至少2头死亡,免疫猪应至少4头保护。

[0107] 表5猪伪狂犬病毒部分—仔猪攻毒法免疫攻毒后体温反应

[0108]

批号	猪号	基础体温	攻毒剂量	攻毒后不同时间(日)体温反应 °C						
				1	2	3	4	5	6	7
150701	A01	39.3	$10^{7.0}TCID_{50}$	39.4	40.5	40.2	39.6	39.8	39.5	39.6
	A02	39.4		39.5	40.2	40.1	39.5	39.7	39.5	39.7
	A03	39.5		39.8	40.7	40.3	39.9	39.6	39.6	39.5
	A04	39.6		39.5	41.0	41.2	40.7	40.1	39.8	39.9
	A05	39.5		39.9	40.6	39.7	39.5	39.6	39.5	39.4
150702	A06	39.7	$10^{7.0}TCID_{50}$	39.5	40.3	39.7	39.5	39.3	39.4	39.6
	A07	39.5		39.7	40.1	40.3	39.4	40.0	39.6	39.7
	A08	39.4		39.4	40.4	40.3	39.7	39.4	39.6	39.5
	A09	39.7		39.6	39.9	39.8	39.4	39.7	39.3	39.6
	A10	39.5		39.9	40.1	39.6	40.0	39.6	39.7	39.6
150703	A11	39.7	$10^{7.0}TCID_{50}$	39.7	40.5	40.0	39.6	39.5	39.4	39.5
	A12	39.5		39.6	40.7	39.9	39.8	39.6	39.5	39.3
	A13	39.6		39.5	40.4	40.2	39.8	39.4	39.7	39.4
	A14	39.5		39.9	40.2	40.2	39.7	39.5	39.8	39.7
	A15	39.7		39.9	40.1	39.7	39.5	39.6	39.6	39.5
150710 (商品 单苗)	A16	39.6	$10^{7.0}TCID_{50}$	39.5	39.8	39.8	39.3	39.7	39.4	39.6
	A17	39.4		39.7	40.5	39.9	39.7	39.6	39.7	39.5
	A18	39.7		39.5	40.3	40.1	39.6	39.5	39.8	39.4
	A19	39.3		39.8	40.4	40.0	39.7	39.5	39.6	39.3
	A20	39.4		39.9	40.8	40.3	40.0	39.6	39.7	39.6
对照	A21	39.7	$10^{7.0}TCID_{50}$	39.9	41.1	42.0	死亡	---	---	---
	A22	39.9		39.8	41.0	40.9	40.8	40.6	39.8	40.0
	A23	39.7		40.4	41.4	41.2	41.1	41.5	39.5	39.4
	A24	39.5		40.1	42.2	死亡	---	---	---	---
	A25	39.8		39.9	41.9	41.5	40.4	40.8	死亡	---

[0109] 表6猪伪狂犬病毒部分一仔猪攻毒法免疫攻毒后体温反应

[0110]

批号	猪号	攻毒后临床症状	攻毒结果	保护率
150701	A01	轻微体温反应	保护	4/5
	A02	未见异常	保护	
	A03	轻微体温反应	保护	
	A04	体温 $\geq 40.5^{\circ}\text{C}$ 持续 3 日；呼吸困难	发病	
	A05	未见异常	保护	
150702	A06	未见异常	保护	5/5
	A07	未见异常	保护	
	A08	轻微体温反应	保护	
	A09	未见异常	保护	
	A10	未见异常	保护	
150703	A11	轻微体温反应	保护	5/5
	A12	轻微体温反应	保护	
	A13	未见异常	保护	
	A14	未见异常	保护	
	A15	未见异常	保护	
150710 (商品 单苗)	A16	未见异常	保护	5/5
	A17	轻微体温反应	保护	
	A18	轻微体温反应	保护	
	A19	轻微体温反应	保护	
	A20	轻微体温反应	保护	
对照组	A21	体温 $\geq 40.5^{\circ}\text{C}$ 持续 2 日；神经症状；死亡	发病	0/5
	A22	体温 $\geq 40.5^{\circ}\text{C}$ 持续 4 日；呼吸困难	发病	
	A23	体温 $\geq 40.5^{\circ}\text{C}$ 持续 4 日；呼吸困难	发病	
	A24	神经症状；死亡	发病	
	A25	体温 $\geq 40.5^{\circ}\text{C}$ 持续 2 日；神经症状；死亡	发病	

[0111] 通过表5和表6的实验数据说明,用悬浮培养的抗原制备的猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗免疫后,参照《猪伪狂犬病gE基因缺失灭活疫苗(HNX-12株)》的效力检验方法,仔猪攻毒实验中,对照组实验成立的情况下,免疫组达到90%以上的保护率,商品单

苗的免疫组达到90%的保护率,与商品单苗相比,二联灭活疫苗也能达到较好的免疫效果。

[0112] 5.2 猪细小病毒部分

[0113] 用体重350g以上HI抗体阴性豚鼠4只,各肌肉注射本发明制备所得猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗0.5ml、商品单苗猪细小病毒病灭活疫苗(WH-1株)。28日后,连同条件相同的对照豚鼠2只,采血,测定抗体。对照豚鼠血清HI抗体效价均应不超过1:8,应至少有3只免疫豚鼠血清HI抗体效价不低于1:64。如达不到上述要求,可复检1次。

[0114] 表7猪细小病毒部分的抗体水平

[0115]

实验苗批次	豚鼠号	免疫组	实验苗批次	豚鼠号	免疫组
150701	001	1: 128	150702	005	1: 128
	002	1: 64		006	1: 128
	003	1: 128		007	1: 256
	004	1: 256		008	1: 64
150703	009	1: 128	150714 (商品单苗)	013	1: 256
	010	1: 128		014	1: 128
	011	1: 256		015	1: 64
	012	1: 128		016	1: 128
对照组	017	1: 2			
	018	1: 2			

[0116] 通过表7的实验数据说明,参照《猪细小病毒病灭活疫苗(WH-1株)》的效力检验标准,用悬浮培养的抗原制备的猪伪狂犬病/猪细小病毒病二联灭活疫苗免疫,免疫组4/4抗体水平不低于1:64,对照组为阴性,实验成立,同时商品单苗的免疫组4/4抗体水平不低于1:64,与商品单苗相比,二联灭活疫苗也能达到较好的免疫效果。

[0117] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的实例,而并非对实施方式的限制。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而因此所引申的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。