

仔猪副伤寒耐热保护剂活疫苗 C500 株 生产工艺的优化

马明^{1,2}, 王帅^{1,2}, 刘涛^{1,2}, 杨保收^{1,2}, 朱秀同^{1,2}, 郁宏伟^{1,2*}, 赵玉龙^{1,2}

(1. 瑞普(保定)生物药业有限公司, 河北保定 071000; 2. 河北省兽医生物技术工程技术研究中心, 河北保定 071000)

[收稿日期] 2016-12-13 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 03-0027-05 [中图分类号] S859.797

[摘要] 为优化仔猪副伤寒耐热保护剂活疫苗生产工艺, 对细菌生长曲线、耐热保护剂和冻干曲线进行了研究, 建立了发酵体积 1%、2% 和 3% 的二级种子接种量下分别发酵 12 h ~ 20 h 的细菌生长曲线, 检测 3 个配苗比例、4 种耐热保护剂和 3 条冻干曲线下成品疫苗的冻干菌存率、活菌存活率 and 安全性, 确定了接种 3% 二级种子液发酵培养 17 h 为最佳发酵培养条件, 发酵菌数达到 428×10^8 CFU/mL; 最佳配苗比例为菌液: 耐热保护剂 1:1 (V:V), 优化保护剂 B 作为最佳耐热保护剂, 设定冻干程序 3# 作为最佳冻干曲线。基于此, 仔猪副伤寒耐热保护剂活疫苗抗原含量达到 40 头份/瓶, 冻干菌存率和活菌存活率均达到 95% 以上, 大幅度降低了猪体免疫副反应, 极大提升了疫苗的产品品质。

[关键词] 仔猪副伤寒; 耐热保护剂; 发酵; 配苗; 冻干曲线

Optimization of Production Process of Piglet Paratyphus Thermo-stable Live Vaccine Strain C500

MA Ming^{1,2}, WANG Shuai^{1,2}, LIU Tao^{1,2}, YANG Bao-shou^{1,2}, ZHU Xiu-tong^{1,2},

YU Hong-wei^{1,2*}, ZHAO Yu-long^{1,2}

(1. Ringpu (Baoding) Biological Pharmaceutical Co, Ltd, Baoding, Hebei 071000, China;

2. Hebei Engineering and Technology Research Center of Veterinary Biological Products, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: In order to optimize the production process of piglet paratyphus thermo-stable live vaccine, the bacterial growth curve, heat-resistant protective agent and freeze-drying curve were studied. The bacterial growth curves were established by fermentation between 12 h to 20 h after inoculation of 1%, 2% and 3% secondary seed inoculation respectively. The vaccines' freeze-dried bacteria survival rate, survival rate of live bacteria and safety were detected on the condition of three rations of bacteria solution and heat-resistant protective agent, four heat-resistant protective agents and three freeze-drying curves. It was confirmed that 3% secondary seed liquid fermentation for 17 h was the best fermentation condition, the number of fermentation

基金项目: 河北省现代农业科技奖励性后补助项目 (16252908H)

作者简介: 马明, 硕士, 兽医师, 从事兽用生物制品研究。

通讯作者: 郁宏伟。E-mail: yuhw@ringpu.com

bacteria reached 428×10^8 CFU/mL. The best proportion of seedlings was antigen : protective agent 1:1 (V:V). Freeze-drying program 3# was set as the best freeze-drying curve. Based on our research results, the antigen contents of paratyphus thermo-stable live vaccine reach 40 doses/vial, and the freeze-dried bacteria survival rate and survival rate of the vaccine were both more than 95%. The vaccine side reactions to pig were greatly reduced. The research has provided technical basement for providing high quality vaccine for the prevention and control of paratyphoid.

Key words: paratyphoid; heat-resistant protective agent; fermentation; ratio of vaccine; freeze-drying curve

仔猪副伤寒又称猪沙门氏菌病,主要是由猪霍乱沙门氏菌引起的一种仔猪高热性传染病,接种疫苗是主要预防手段,对于减少抗生素使用也有积极意义。猪霍乱沙门氏菌 C500 弱毒株于 1965 年开始试用,1976 年被批准列入兽医生物制品规程,由最初的扁瓶培养发展到现在的发酵罐培养^[1-2],该疫苗的推广和使用使我国仔猪副伤寒得到了有效控制。仔猪副伤寒常规活疫苗生产过程中存在细菌发酵工艺不稳定、冻干菌存率低、需低温冷冻储存的问题,由于冻干和储存而死亡的细菌易引起猪体副反应。仔猪副伤寒耐热保护剂活疫苗 C500 株已由北京中海生物科技有限公司研制成功^[3-4],使用耐热保护剂能够大幅提高冻干菌存率和活菌存活率,降低温度对疫苗品质影响,实现疫苗冷藏保存,大幅度减少仔猪免疫副反应。本试验对仔副耐热活疫苗 C500 株的关键生产工艺进行了筛选和优化。

1 材料

1.1 菌种 生产用菌种为猪霍乱沙门氏菌弱毒株 C500 株 (CVCC79500) (2010.03.23 冻干, 0.2 ~ 0.3 mL/支),由中国兽医药品监察所鉴定、保管和供应。

1.2 试剂 胰酪蛋白胨购自 MERCK 公司;酵母浸粉购自 OXOID 公司;营养肉汤粉剂、营养琼脂粉剂购自北京奥博星生物技术有限责任公司;磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、碳酸钠、葡萄糖等均为分析纯,购自国药化学试剂公司。

1.3 发酵罐 编号 05FX05-01,福州福尔流体设备有限公司,容积 0.20 m³。

2 方法

2.1 种子液制备 参照仔猪副伤寒耐热保护剂活疫苗 (CVCC79500 株) 制造与检验试行规程^[5] (后

简称规程) 进行制备。

2.2 接菌量和收获时间的确定 在配液罐内配制 70 L 合成培养基, 116 °C 灭菌 30 min, 打入发酵罐内。将检验合格的二级细菌种子液分别按照发酵体积的 1%、2% 和 3% 加入, 在发酵培养 12 h、14 h、16 h、17 h、18 h、19 h、20 h 时取样, 按照规程^[5] 方法进行活菌计数。分别将 16 h、17 h、18 h、19 h 和 20 h 菌液样品进行离心, 弃去上清液, 加入原菌液同体积量的耐热保护剂进行配苗和冻干, 检测冻干菌存率和活菌存活率。

$$\text{冻干菌存率}(\%) = \frac{\text{冻干后每头份活菌数}}{\text{冻干前每头份活菌数}} \times 100\%$$

$$\text{活菌存活率}(\%) = \frac{\text{耐老化试验后每头份活菌数}}{\text{耐老化试验前每头份活菌数}} \times 100\%$$

2.3 配苗比例的优化 将检验合格的二级细菌种子液按照发酵体积的 3% 量加入, 在发酵培养 17 h 时收获, 按照规程^[5] 方法进行活菌计数。将收获菌液分 3 批经连续流离心机进行离心, 加入原菌液 1/1、1/2 和 1/3 体积量的耐热保护剂, 按照 3 mL/瓶进行定量分装、冻干, 检测细菌冻干菌存率、活菌存活率和兔体安全性。

2.4 耐热保护剂筛选 设计 4 种耐热保护剂, 分别命名为保护剂 A、保护剂 B、保护剂 C 和保护剂 D。发酵培养方法同 2.3, 将收获菌液分批经连续流离心机进行离心, 分别加入原菌液同体积量的保护剂 A、保护剂 B、保护剂 C 和保护剂 D 进行冻干, 观察冻干疫苗物理性状, 检测细菌冻干菌存率、活菌存活率和兔体安全性。

2.5 冻干曲线优化 发酵培养方法同 2.3, 收获菌液经连续流离心机进行离心, 加入原菌液同体积量

的保护剂 B 进行冻干,分别按照设定冻干程序 1、程序 2 和程序 3(表 1)进行冻干,观察冻干疫苗物理性状,测定剩余水分,检测细菌冻干菌存率和活菌存活率。

表 1 冻干曲线设定

程序		冻干曲线参数设定							
程序 1	温度/℃	-50	-8	2	12	22	28		
	时间/h	2	18	2	2	2	9		
程序 2	温度/℃	-50	-30	-15	-8	6	18	28	
	时间/h	2	8	1	20	5	2	12	
程序 3	温度/℃	-50	-23	-15	-8	0	10	20	28
	时间/h	2	1	1	33	2	2	1	12

3 结 果

3.1 接菌量和收获时间的确定 按照发酵体积 1%、2% 和 3% 接入二级种子液后,发酵 12 h~20 h 样品的活菌计数结果见表 2,生长曲线见图 1。根据不同接菌量的生长曲线数据分析,从发酵 12 h 到 20 h 随着收获时间的延长,收获菌液的活菌数有一定增长。1% 接菌量在发酵 18 h 后进入细菌增殖平台期,2% 和 3% 接菌量均在发酵 17 h 后进入平台期。

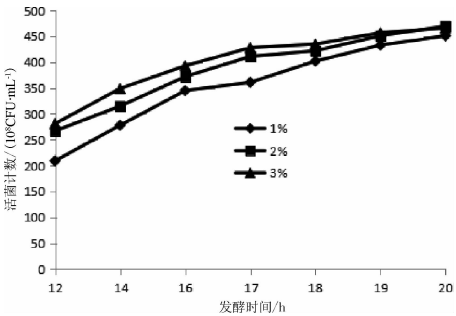


图 1 细菌生长曲线

表 2 不同发酵时间活菌计数结果

接种比例	不同培养时间活菌计数/(10 ⁸ CFU·mL ⁻¹)						
	12 h	14 h	16 h	17 h	18 h	19 h	20 h
1%	209	278	345	361	402	433	451
2%	267	315	372	411	422	451	470
3%	281	349	393	428	435	457	466

不同接菌量、不同收获时间的冻干疫苗样品,其细菌冻干菌存率和活菌存活率有一定差别。随着收获时间延长,体现冻干菌存率和活菌存活率下降(表 3)。1% 接菌量 18 h 收获、2% 接菌量 17 h

收获和 3% 接菌量 17 h 收获的各项检验数据良好,1% 接菌量导致收获时间延长,二级种子液的活菌数可控性差,因此确定接菌量 3%、发酵 17 h 收获作为接种、收获最佳条件。

表 3 不同收获时间的冻干菌存率和活菌存活率测定结果

接种比例	%									
	16 h		17 h		18 h		19 h		20 h	
	菌存率	存活率	菌存率	存活率	菌存率	存活率	菌存率	存活率	菌存率	存活率
1%	98.1	88.3	97.5	92.5	96.0	95.8	94.3	94.5	87.5	89.0
2%	97.5	92.6	96.5	98.0	97.0	93.0	92.0	90.3	87.0	82.5
3%	98.5	93.4	98.0	97.6	95.0	92.3	82.2	88.4	81.9	75.3

3.2 配苗比例的优化 通过比较不同浓缩倍数产出成品的检验数据(表 4),发现随着浓缩比例加大从 1:1 到 3:1,能够提高成品疫苗的头份数,但是冻干菌存率和活菌存活率出现明显下降,同时成品疫

苗出现注射部位局部反应和一过性发热的免疫副反应。因此,确定最佳配苗比例为菌液:保护剂=1:1(V:V)。

表 4 不同配苗比例对冻干菌存率和活菌存活率的影响

菌液:保护剂(V:V)	成品疫苗头份数	冻干菌存率/%	活菌存活率/%	兔体安全性
1:1	40	97.8	96.6	健活
2:1	74	86.5	83.2	健活,注射部位有红肿
3:1	100	79.4	76.5	健活,有一过性发热,注射部位有红肿

3.3 耐热保护剂的筛选 通过比较不同耐热保护剂活疫苗各项指标检测结果(表5),可以发现,4种耐热保护剂冻干成品效价均合格,保护剂A的活菌存活率不合格(规程^[5]规定应不低于70%),保护剂D的冻干菌存率和活菌存活率偏低,保护剂B和

保护剂C的冻干菌存率和活菌存活率均高,但是保护剂C的冻干成品物理性状出现一部分结晶。因此,优选保护剂B作为仔猪耐热保护剂活疫苗的冻干保护剂。

表 5 不同配方耐热保护剂对疫苗物理性状、冻干菌存率和活菌存活率的影响

耐热保护剂种类	半成品菌数/ (10 ⁸ CFU·头份 ⁻¹)	成品菌数/ (10 ⁸ CFU·头份 ⁻¹)	外观物理性状	冻干菌存率/%	活菌存活率/%	兔体安全性
A	43.8	32.2	无结晶、有少量塌陷	73.5	60.7	健活,有一过性发热,注射部位有红肿
B	43.8	42.0	无结晶、无塌陷	95.8	93.2	健活
C	43.8	42.5	有20%成品出现结晶、无塌陷	97.1	92.9	健活
D	43.8	38.7	无结晶、有10%出现底部塌陷	88.3	84.7	健活,注射部位有红肿

3.4 冻干曲线的筛选 从不同冻干曲线下成品检测结果分析(表6),设定的3种冻干程序均可获得剩余水分合格的疫苗成品;但其外观物理性状有所差别,程序1和程序2均出现结晶或底部塌陷缺

陷;程序2和程序3的成品冻干菌存率和活菌存活率差别不明显。综合4项指标检测结果,优选程序3作为仔猪副伤寒耐热保护剂活疫苗的冻干曲线。

表 6 不同冻干曲线下成品指标检测结果

冻干程序	剩余水分	外观物理性状	冻干菌存率/%	活菌存活率/%
程序1	1.8%	5%成品出现结晶,30%成品底部塌陷	94.3	86.5
程序2	1.5%	无结晶、有20%成品底部塌陷	97.1	90.2
程序3	0.9%	无结晶、无塌陷	96.9	93.4

4 讨论

仔猪副伤寒耐热保护剂活疫苗为细菌类疫苗,其生产工艺的核心是获得稳定且高的发酵菌数、高冻干菌存率和高活菌存活率,以降低猪体副反应、提高免疫效力、降低生产成本。

在细菌发酵环节对接种量和发酵时间的选择有3个标准:一是细菌增殖平台期的初期作为收获最佳时间;二是平台期发酵菌数多;三是发酵时间短。细菌增殖平台期的初期细菌状态稳定且茁壮,

因此冻干菌存率和活菌存活率均高,随着收获时间的延长,则冻干菌存率和活菌存活率均降低。二级种子液制备完毕后未进行活菌计数,种子液具有批间差异,因此3%接种量对于生产工艺稳定更有利。综合以上因素,选择3%接种量发酵17h作为最佳接种、收获参数。

仔猪副伤寒耐热保护剂活疫苗收获工艺是将培养基全部经过离心弃去,剩余菌泥加入耐热保护剂进行配苗,因此,浓缩配苗成为提高成品疫苗

头份数最直接的途径。配苗比例实验结果表明,当菌液:保护剂3:1(V:V)时成品疫苗活菌数含量达到100头份/瓶,且活菌存活率能够达标($\geq 70\%$),但是由于相对较高比率的细菌死亡,会产生有害物质,在兔体安全性检测中出现一过性发热和注射部位红肿等免疫副反应。因此,最终选择菌液:保护剂1:1(V:V)作为最佳配苗比例,其冻干菌存率和活菌存活率均能达到95%以上,兔体反应安全。

在原有耐热保护剂基础上,通过改变保护剂配制方法、增减个别试剂含量、增加或更换个别试剂成分设计了4种耐热保护剂。耐热保护剂对成品疫苗外观物理性状、提高冻干菌存率和活菌存活率、兔体安全性有决定性作用。最终选择保护剂B作为仔猪副伤寒耐热保护剂活疫苗的耐热保护剂。

由于细菌类疫苗与病毒类疫苗在抗原组成成分和粘稠度等方面均有差异,常用的冻干曲线易出现疫苗结晶和底部塌陷等外观缺陷,但是不影响疫苗的冻干菌存率和活菌存活率。通过设定3个冻干程序结果表明,一次升华的程度决定了疫苗外观性状的好坏,程序3的一次升华缓慢而充分,其成品外观性状最好,因此,优选程序3作为仔猪副伤

寒耐热保护剂活疫苗的冻干曲线。同时发现,成品疫苗剩余水分偏多会降低活菌存活率。

通过优化接种量、收获时间、配苗比例、耐热保护剂和冻干曲线,本研究建立了一套仔猪副伤寒耐热保护剂活疫苗优化的生产工艺,成品疫苗抗原含量达到40头份/瓶,冻干菌存率和活菌存活率均达到95%以上。

参考文献:

- [1] 刘芹防,崔尚金. 猪沙门氏菌病原学、流行病学、诊断与治疗进展[J]. 猪业科学, 2009, 12: 24-28.
- [2] 苏丹萍,张艳萍,贺东生. 猪沙门氏菌疫苗研究进展[J]. 猪业科学, 2009, 12: 42-44.
- [3] 朱良全,孙晔,刘延亭,等. 仔猪副伤寒活疫苗合成培养基发酵工艺应用研究[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(3): 16-20.
- [4] 朱良全,孙晔,李聪研,等. 仔猪副伤寒活疫苗生产用菌株生长曲线的建立及合成培养基初步应用[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(2): 51-56.
- [5] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告第2214号[S].

(编辑:李文平)