

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.12.9

犬细小病毒 YA-16-C66 株纸片载体培养工艺优化及其与转瓶培养工艺的比较分析

朱明媛,刘静,李艳玲,董建伟,黄韬,李润*

(唐山怡安生物工程有限公司,河北唐山 063020)

[收稿日期] 2020-07-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 12-0049-07 [中图分类号] S852.6

[摘要] 采用微型生物反应器确定纸片载体上 F81 细胞最佳的接种密度和最佳接毒剂量,在 NBS 反应器中验证温度对犬细小病毒 YA-16-C66 株增殖的影响。经过三次重复试验,确定利用 NBS 生物反应器培养犬细小病毒 YA-16-C66 株最佳工艺为:采用同步接毒法,培养基为含 1% 新生牛血清的 199 溶液,细胞接种密度为 $1.5 \times 10^7/\text{g}$,接毒剂量为 0.05 MOI,在 pH 7.2 条件下,37.0 °C 培养 48 h 后降温到 35.0 °C 继续培养 72 h,细胞病变达到 80%~90% 时收获上清液。三批次反应器与转瓶工艺产品比较结果表明:反应器比转瓶收获液病毒含量高 $10^{1.1} \sim 10^{1.9} \text{ TCID}_{50}/100\mu\text{L}$; 相同培养面积,反应器所得病毒总量是转瓶所得病毒总量的 2.8~18.5 倍;相同抗原含量的灭活苗,反应器与转瓶工艺产品无显著性差异,血凝抑制效价均 ≥ 896 。

[关键词] 犬细小病毒;生物反应器;纸片载体;转瓶;培养工艺

基金项目: 河北省重点研发计划自筹项目(18222411)

作者简介: 朱明媛,硕士,从事动物疫苗开发工作。

通讯作者: 李润。E-mail:lr@yan-bio.cn

Wang MD, Bai B, Yun JCh, *et al.* Study on the control of mite disease in livestock and poultry[J]. *Animal Husbandry and Veterinary Science*, 2019, 80(3): 1-4.

- [9] 杨海燕,张传美,单虎. 11 种中药对犬螨虫病的治疗效果观察[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2013, 50(16): 109-110.

Yang HY, Zhang CM, Shan H. Observation on the effect of 11 kinds of traditional Chinese medicine on dog mitosis[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2013, 50(16): 109-110.

- [10] 巩忠福,杨国林,王建华,等. 19 种植物提取物的杀螨活性观察[J]. *中国兽药杂志*, 2002, 36(1): 6-8.

Gong ZhF, Yang GL, Wang JH, *et al.* In vitro acaricidal effect of 19 plant extracts on psoroptic mange[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2002, 36(1): 6-8.

- [11] 华海婴,归振华,乔淑会,等. 紫苏醇软膏的制备及其体外经皮渗透研究[J]. *中草药*, 2013, 44(14): 1911-1917.

Hua HY, Gui ZhH, Qiao NH, *et al.* Study on the preparation of perillyl alcohol ointment and its percutaneous penetration *in vitro* [J]. *Chinese herbal medicine*, 2013, 44(14): 1911-1917.

- [12] 李幸,高静,吕俭霞,等. 猪肤汤软膏制备工艺研究[J]. *亚太*

传统医药, 2018, 14(10): 51-54.

Li X, Gao J, Lu JX, *et al.* Study on the preparation technology of Zhufutang ointment [J]. *Asia-Pacific Traditional Medicine*, 2018, 14(10): 51-54.

- [13] 黄芝瑛. 中药新药一般毒理试验及评价[J]. *药品评价*, 2004, 11(1): 50-52.

Huang Zhiying. General Toxicology Test and Evaluation of New Chinese Medicine[J]. *Drug Evaluation*, 2004, 11(1): 50-52.

- [14] 顾亚凤. 蝇蛆油对实验动物皮肤的刺激性、过敏性及烫伤治疗药效研究[J]. *中国兽药杂志*, 2004, 38(10): 16-17, 38.

Gu YF. Effects of grease of housefly larva on toxicology-physiology and pharmacology in experimental animals[J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2004, 38(10): 16-17, 38.

- [15] 马琪. 犬皮肤真菌病治疗药物的筛选与治疗疗效试验[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.

Ma Q. Selection and clinical trial of the treatment pharmaceuticals for canine dermatomycosis[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008.

(编辑:陈希)

Optimization of Flake Disks Culture of Canine Parvovirus YA - 16 - C66 Strain and Comparative Analysis of Its Culture Technology with Spinner Bottle

ZHU Ming - yuan, LIU Jing, LI Yan - ling, DONG Jian - wei, HUANG Tao, LI Run *

(Tangshan Yian Biological Engineering Co. Ltd., Tangshan, Hebei 063020, China)

Corresponding author: LI Run, E - mail: lr@yian - bio. cn

Abstract: The optimal inoculation density and dose of F81 cells on flake disks were determined in a mini - bioreactor, and the effect of temperature on the proliferation of YA - 16 - C66 strain of canine parvovirus was verified in the NBS reactor. After three repeated experiments, the optimal culture process for the cultivation of YA - 16 - C66 strain of Canine Parvovirus by NBS bioreactor was determined; In the synchronous inoculation method, the culture medium was 199 solution containing 1% newborn bovine serum, the cell inoculation density was $1.5 \times 10^7/\text{g}$, and the inoculation dose was 0.05 MOI. Under the condition of pH 7.2, the cells were cultured at 37.0 °C for 48 h, then the temperature was lowered to 35.0 °C for 72 h, and the supernatant was harvested when the cytopathod reached 80% ~ 90%. The results showed that the virus content in the reactor was $10^{1.1} \sim 10^{1.9}$ TCID₅₀/100μL higher than that in the reactant. With the same culture area, the total amount of virus obtained from the reactor was 2.8 ~ 18.5 times that of the total amount of virus obtained from the spinner bottle. The hemagglutination inhibition titers (HI) was no significant difference between the reactor and the spinner process products with the same TCID₅₀, and the HI ≥ 896.

Key words: canine parvovirus; bioreactor; flake disks; spinner bottle; cultivation process;

犬细小病毒病 (Canine parvovirus disease, CPVD) 是由犬细小病毒 (Canine parvovirus, CPV) 引起的犬的一种急性高度接触性传染病, 与病犬接触后 100% 感染, 致死率高达 70%^[1]。该病既严重威胁家养宠物的健康, 又对我国养犬业和野生动物保护业构成较大危害。犬细小病毒病目前没有特效药物, 除依靠动物自身的免疫系统抵抗外, 接种疫苗是预防犬细小病毒感染的最有效方法。活疫苗、灭活疫苗、弱毒疫苗均有报道能一定程度预防犬细小病毒病^[2-4], 目前国内常用弱毒疫苗预防犬细小病毒病, 但弱毒疫苗通常因母源抗体干扰发生免疫失败, 接种后动物可长期排毒, 存在毒力返强风险。犬细小灭活疫苗具备免疫原性而不具有致病性, 接种后动物能产生免疫应答, 达到保护作用, 越来越受到科研工作者的青睐, 但制备灭活疫苗对抗原的滴度要求很高, 所以获得高产量、高质量的抗原是实现犬细小灭活疫苗产业化的基础。

目前国内报道的获得犬细小病毒的方法主要有转瓶法、鸡胚法, 鲜见有利用生物反应器培养犬细小病毒的报道。传统培养工艺培养病毒普遍存在病毒滴度低、批间差大、劳动力成本高、易污染等问题^[5-6], 因此找到一种新的培养犬细小病毒的方法颇为急切。本文利用微型生物反应器及 NBS 反应器摸索培养犬细小病毒 YA - 16 - C66 株最佳工艺, 并将利用该工艺生产的抗原同传统的转瓶工艺产品做对比, 以期对犬细小病毒的高产、高质培养提供一种新的可行方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与病毒 F81 细胞, 唐山怡安生物工程有限公司驯化、保藏; 犬细小病毒 YA - 16 - C66 株, 唐山怡安生物工程有限公司筛选、保藏。

1.1.2 主要溶液与试剂 199 培养基, 天信合生物科技有限公司; 新生牛血清, 武汉三利生物科技

有限公司; β -丙内酯(BPL), 德国 SERVA; MONTANIDE GEL 02, 赛彼科(上海)特殊化学品有限公司。

1.1.3 载体 聚酯纤维纸片载体, 上海楚怡生物科技有限公司。

1.1.4 仪器设备 微型转管生物反应器, 杭州安普生物工程有限公司; CO_2 培养箱, 三洋 MCO-15AC; BioFlo 310 型生物反应器(5L), 美国 NBS 生物工程有限公司; SBA 生化分析仪, 济南延和生物科技有限公司。

1.1.5 实验动物 比格犬, 北京玛斯生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 F81 细胞的最佳接种密度确定 利用微型生物反应器, 内含 0.6 g 聚酯纤维纸片载体。培养条件为: $37.0\text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱, 培养基为 1% 新生牛血清的 199 培养基, 分别按照 $0.5 \times 10^7/\text{g}$ 、 $1.5 \times 10^7/\text{g}$ 、 $2.5 \times 10^7/\text{g}$ 密度接种细胞。每个密度平行设置 9 支。为了确保细胞增殖不受营养及代谢产物的影响, 培养基每 24 h 更换一次, 并测定残糖浓度。每 24 h 取一支转管, 将载体用 0.25% 胰酶消化后计数, 分析细胞密度与葡萄糖消耗之间的关系。

1.2.2 犬细小病毒 YA-16-C66 株最佳接种剂量确定 利用微型生物反应器, 以 $1.5 \times 10^7/\text{g}$ 密度接种细胞, 同时以不同感染复数(MOIs: 0.05、0.1、0.2、0.4)接种病毒。每个接毒剂量平行设置 9 支, 将微型反应器置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱培养。接毒后每 24 h 完全换液, 测定葡萄糖消耗和上清液的病毒含量 TCID_{50} , TCID_{50} 测定方法参照《中国兽药典》^[7]。每 24 h 取一支转管, 将载体用 0.25% 胰酶消化后计数, 直到纸片载体上细胞几乎全部脱落时结束培养。结合病毒含量和细胞病变情况, 确定犬细小病毒 YA-16-C66 株最佳接种剂量。

1.2.3 犬细小病毒 YA-16-C66 株生物反应器培养工艺优化 按照工艺流程, 将 150 g 纸片载体装入 5L NBS 生物反应器中, 经高压蒸汽灭菌后备用。将生长成良好致密单层的 F81 细胞制成悬液,

以 $1.5 \times 10^7/\text{g}$ 密度接种, 犬细小病毒 YA-16-C66 株用培养基稀释后, 以感染复数 0.05 MOI 接种。培养基为含 1% 新生牛血清的 199 培养基, 培养参数设置为 $37\text{ }^\circ\text{C}$, pH7.2, 溶氧 50%, 搅拌速度 50 r/min, 24 h 后开启灌流。1#反应器温度维持在 $37.0\text{ }^\circ\text{C}$; 2#反应器培养温度在接种细胞 48 h 后降至 $35.0\text{ }^\circ\text{C}$ 。24 h 开始每天取样测定葡萄糖消耗, 根据糖耗及细胞病变清情况调整灌流速度, 使反应器内葡萄糖浓度控制在 0.5 g/L 以上。48 h 开始收获并每天测定病毒含量 TCID_{50} , 直到纸片载体上细胞几乎全部脱落时结束培养, 测定总病毒含量 TCID_{50} 。经过 3 批次验证, 比较两种不同温度培养对犬细小病毒 YA-16-C66 株产毒质量的影响, 确定利用 F81 细胞生产犬细小病毒 YA-16-C66 株的纸片载体培养工艺。

1.2.4 反应器与转瓶培养犬细小病毒 YA-16-C66 株工艺比较

1.2.4.1 纸片载体培养工艺 按照 1.2.3 确定的工艺, 在 5L 生物反应器中连续培养 3 批病毒。当糖耗降低, 纸片载体上细胞几乎全部脱落时结束培养, 收获上清液, 测定病毒含量 TCID_{50} 。

1.2.4.2 转瓶培养工艺 将生长成致密单层的 F81 细胞消化成悬液, 与稀释过的犬细小病毒 YA-16-C66 株同步接入 3L 转瓶, 每批次使用 10 个 3L 转瓶。病毒接种剂量为 0.05 MOI, 培养温度为 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 转瓶机转速设置为 10 r/h。当细胞病变达到 80%~90% (CPE) 以上时, 收获病毒液, 测定病毒含量 TCID_{50} 。

1.2.4.3 犬细小病毒 YA-16-C66 株 HI 效价测定 将反应器与转瓶获得的犬细小病毒 YA-16-C66 株分别经浓缩、 β -丙内酯灭活, 加入 10% 比例的 MONTANIDE GEL 02, 依据浓缩液 TCID_{50} 结果制成抗原含量为 $10^{7.0}\text{TCID}_{50}/100\mu\text{L}$ 、符合质量标准的犬细小病毒灭活疫苗, 产品名称依据抗原生产批次依次命名为 CPV-C1910-001、CPV-C1911-002、CPV-C1912-003。

将 6~8 周龄的犬细小病毒抗体阴性、健康的比格犬分为 6 组, 每组 7 只。取 5 只按 0、7 日免疫

程序免疫,每只 1 mL/次,作免疫组;2 只不免疫,作对照组。首免后 28 日采血,依据《兽医微生物学实验指导》^[8]进行血清抗体效价测定。

2 结果

2.1 F81 细胞最佳接种密度 以不同密度接种, F81 细胞最大密度差异较小,但达到最大密度的时间不同,如图 1 所示。按 $0.5 \times 10^7/\text{g}$ 接种时,细胞增长较慢,到 168 h 细胞达到最大量。按 $2.5 \times 10^7/\text{g}$ 接种细胞比按 $1.5 \times 10^7/\text{g}$ 接种细胞提前一天达到最大密度,但达到最大密度后糖耗下降较快。按 $1.5 \times 10^7/\text{g}$ 接种时, F81 细胞在纸片载体上生长和糖耗关系如图 2 所示,细胞生长与糖耗呈正相关,培养 120 h 后,细胞从 9.0×10^6 增加到 8.92×10^7 ,糖耗最大达到 3.58 mg/mL。因此,确定 F81 细胞最佳接种密度为 $1.5 \times 10^7/\text{g}$ 。

2.2 犬细小病毒 YA-16-C66 株最佳接种剂量 不同感染复数(MOIs:0.05、0.1、0.2、0.4)接毒对生物反应器中犬细小病毒 YA-16-C66 株扩增的影响如图 3 所示,按 0.05 MOI 与 0.1 MOI 接毒,病毒达最大增殖能力的时间分别为 96 h 和 72 h,且维持时间较长;高于 0.1 MOI 接种病毒时,细胞病变过快,细胞维持时间短,导致最终病毒滴度下降较快。由图 4、图 5 可知,犬细小病毒 YA-16-C66 株病毒含量与糖耗呈正相关,四种接毒剂量的收获液病毒含量均能达到 $10^{6.0} \text{ TCID}_{50}/100\mu\text{L}$ 以上。综合考虑,确定犬细小病毒 YA-16-C66 株接毒剂量为 0.05 MOI。

2.3 生物反应器培养工艺优化 两种温度不同时间收获液病毒含量 TCID_{50} 结果如图 6 所示,1#反应器收获液病毒含量在 72 h 达到峰值,为 $10^{7.7} \text{ TCID}_{50}/100\mu\text{L}$,但病毒含量下降较快,96 h 降为 $10^{6.8} \text{ TCID}_{50}/100\mu\text{L}$ 。2#反应器收获液病毒含量达到峰值的时间为 96 h,且到 120 h 病毒含量仍能维持在 $10^{7.4} \text{ TCID}_{50}/100\mu\text{L}$,温度适当降低能维持细胞较长存活时间,对总病毒含量的提升更有利。综合分析,确定犬细小病毒 YA-16-C66 株反应器培养工艺为:采用同步接毒法,培养基为含 1% 新生牛血清的 199 溶液,细胞接种密度为 $1.5 \times 10^7/\text{g}$,接

毒剂量为 0.05 MOI,在 pH 7.2 条件下,37.0 °C 培养 48 h 后降温到 35.0 °C 继续培养 72 h,且待细胞病变达到 80% ~ 90% 时收获上清液。

2.4 反应器与转瓶培养犬细小病毒 YA-16-C66 株工艺比较 3 批次反应器与转瓶收获液病毒含量和总量结果如表 1;接毒后反应器中细胞能维持 4 ~ 5 d,收获液病毒含量在 $10^{7.6} \sim 10^{7.8} \text{ TCID}_{50}/100\mu\text{L}$ 之间,收获液体积约为 10.5 L;转瓶系统能维持 4 d,收获液产量约为 3 L,收获液病毒含量在 $10^{5.9} \sim 10^{6.5} \text{ TCID}_{50}/100\mu\text{L}$ 之间。反应器比转瓶收获液病毒含量高 1.1 ~ 1.9 $\lg \text{TCID}_{50}/100\mu\text{L}$;相同培养面积,反应器所得病毒总量是转瓶所得病毒总量的 2.8 ~ 18.5 倍。

2.5 犬细小病毒 YA-16-C66 株 HI 抗体效价测定 3 批次反应器与转瓶工艺产品 HI 抗体效价结果如表 2;所有试验犬只免疫 28 d 的血清凝集效价均 $\geq 1:896$,能达到有效保护,同时对照组犬只的血清 HI 效价均显示为 1:10,即无抗体产生。

3 分析与讨论

3.1 F81 细胞培养载体 对于贴壁细胞而言,传统的小型培养容器有培养瓶、细胞工厂、转瓶等,利用反应器培养贴壁细胞一般借助于微载体和纸片载体。相比于培养瓶和细胞工厂的静置培养,转瓶培养系统具有结构简单、技术成熟的特点,而且细胞接种在旋转的圆柱状瓶中,培养过程中转瓶不停旋转,使细胞交替接触营养液并进行空气交换,更有利于细胞生长。因为重复性好,放大只需要简单的增加转瓶数量,转瓶培养系统常用于小量培养到大规模培养的过渡阶段,或作为生物反应器接种细胞的一种途径。

纸片载体是顺应反应器大规模培养而发展起来的细胞培养载体,相对于转瓶培养系统,利用反应器进行纸片载体培养细胞具有节省劳动力、占地空间小,单位体积提供细胞生长的表面积大,细胞生长密度高,培养时能实时监测并控制环境条件等优点。纸片载体多层张力结构能保证培养基与细胞充分接触,培养基流过载载体层,搅拌剪切力和通气气泡对细胞生长不产生影响,更有利于细胞生

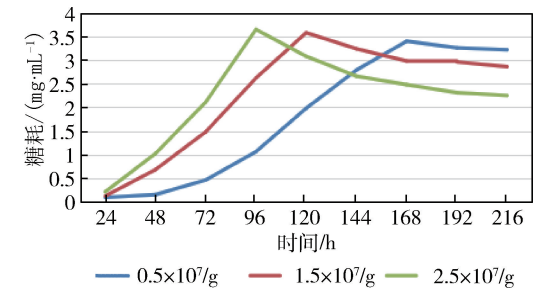


图 1 不同接种密度葡萄糖消耗曲线

Fig 1 Glucose consumption curve of different inoculation densities

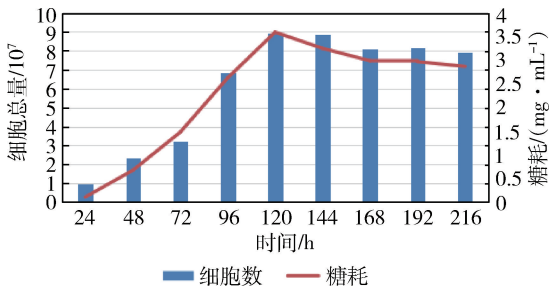


图 2 初始接种密度为 1.5×10^7 /g 时的糖耗与细胞总量关系

Fig 2 The relationship between glucose consumption and cell density with the initial concentration densities was 1.5×10^7 /g

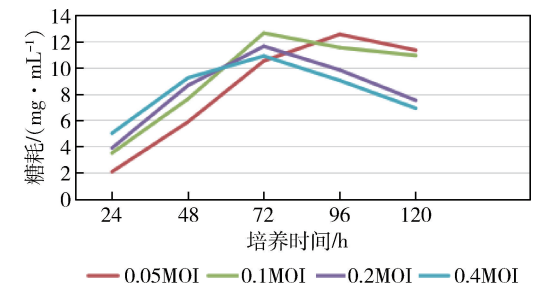


图 3 按不同 MOI 接种病毒的糖耗曲线

Fig 3 Glucose consumption curve of virus inoculation according to different MOI

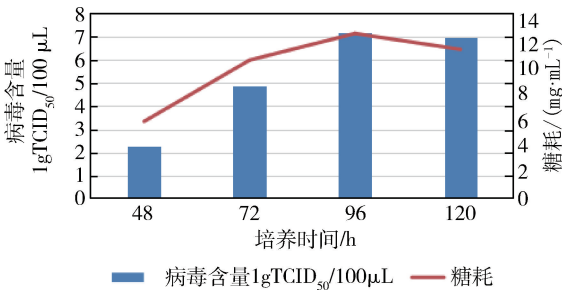


图 4 按 0.05 MOI 接种病毒时的糖耗与病毒含量关系

Fig 4 The relationship between glucose consumption and lgTCID₅₀ with the virus inoculated at 0.05 MOI

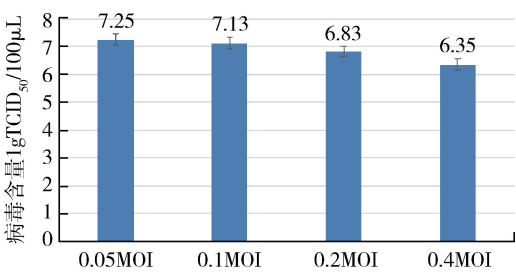


图 5 按不同 MOI 接种时收获液的病毒含量

Fig 5 The lgTCID₅₀ in harvest fluid inoculated with different MOI

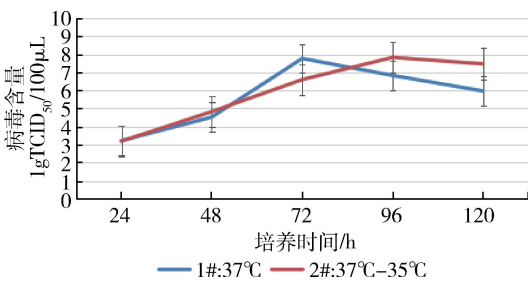


图 6 不同温度下犬细小病毒 YA-16-C66 株增值曲线

Fig 6 Proliferation curve of YA-16-C66 strain of Canine Parvovirus at different temperatures

表 1 反应器与转瓶收获液病毒含量和产量

Tab 1 The content and yield of virus in the reactor and the spinner harvester

毒种	批次	病毒含量(TCID ₅₀ /100μL)/收获液总量(L)/病毒总量(×10 ⁶)	
		转瓶(总面积:1.5×10 ⁴ cm ²)	反应器(总面积:2.25×10 ⁵ cm ²)
YA-16-C66 株	CPV-F1910-001	10 ^{5.9} /3.0/2.38	10 ^{7.8} /10.5/663
	CPV-F1911-002	10 ^{6.5} /3.2/10.12	10 ^{7.6} /10.5/418
	CPV-F1912-003	10 ^{6.0} /2.9/2.90	10 ^{7.8} /10.4/656

表 2 反应器与转瓶工艺产品 HI 抗体效价

Tab 2 HI antibody titer of the reactor and spinner technology products

产品类别	组别	各犬只 CPV 抗体效价 (1: X)	CPV 抗体效价平均值 (1: X)
反应器	CPV - C1910 - 001	640	896
		1280	
		1280	
		640	
		640	
	对照	10	10
		10	
	CPV - C1911 - 002	640	896
		1280	
		640	
		1280	
		640	
	对照	10	10
		10	
	CPV - C1912 - 003	1280	896
		1280	
		640	
		640	
		640	
	对照	10	10
		10	
转瓶	CPV - C1910 - 001	1280	896
		640	
		640	
		1280	
		640	
	对照	10	10
		10	
	CPV - C1911 - 002	1280	896
		1280	
		640	
		640	
		640	
	对照	10	10
		10	
	CPV - C1912 - 003	1280	896
		1280	
		640	
		640	
		640	
	对照	10	10
		10	

长^[9]。在 5L NBS 反应器中,150 g 纸片载体能提供细胞生长的表面积为 2.25 × 10⁵ cm²,相当于 150 个 3L 转瓶提供的表面积,根据糖耗与细胞生长之间的关系,F81 细胞在 5L 反应器中生长的最大量能

达到 3.02 × 10¹⁰/g,而具有同样生长面积的转瓶中 F81 细胞最多能达 4.90 × 10⁹,相差 6 倍。

3.2 F81 细胞培养犬细小病毒工艺 利用转瓶培养病毒属于劳动密集型方法,需要众多人员,步骤繁琐,比较容易发生污染,而且转瓶单位体积产量较低,培养过程中环境差异及人员操作误差常导致不同批次毒价不稳定^[10]。

利用生物反应器培养 F81 细胞,可根据细胞生长特性实时监测与调控温度、pH、溶氧等参数,细胞密度和活力高于转瓶或者固定的平面等培养系统。随着细胞灌流技术的发展,对于细胞培养与病毒生产条件不一致的工艺,降低培养温度,提高代谢所需物质,最终能有效提高病毒的产量与质量^[11-12]。利用 5L 反应器与 3L 转瓶同时培养犬细小病毒 YA - 16 - C66 株,生物反应器收获液病毒含量均在 10^{7.0}TCID₅₀/100μL 以上,而转瓶收获液病毒含量从 10^{5.9}TCID₅₀/100μL 到 10^{6.5}TCID₅₀/100μL;相同培养面积,反应器所得病毒总量是转瓶所得病毒总量的 2.8 ~ 18.5 倍;相同抗原含量的灭活苗,反应器与转瓶工艺产品无显著性差异,血凝抑制效价均为 1: 896。

4 结 语

本试验确定了 NBS 生物反应器培养 F81 细胞生产犬细小病毒 YA - 16 - C66 株的工艺,属于该毒株在 NBS 生物反应器中培养的初步探索。利用该工艺培养的犬细小病毒 YA - 16 - C66 株,抗原滴度达到 10^{7.8}TCID₅₀/100μL,工艺产品血凝抑制效价 HI 在 1: 768 以上,完全达到犬细小灭活苗制备的要求^[13],且比转瓶工艺抗原产量高,极大的节约了生产成本,为犬细小病毒 YA - 16 - C66 株的产业化提供了一种经济有效的方法。

参考文献:

[1] 范超玥,刘 蕾,阚 饶,等. 犬细小病毒病的研究进展[C]. 第四届西南宠物医师大会暨第九届中国畜牧兽医学会小动物医学分会学术交流大会,2015. 302 ~ 304.

Fan C Y, Liu L, Kan R, *et al.* Advances in research canine parvovirus disease[C]. The 4th Southwest Pet Doctor Congress

- and the 9th Small Animal Medicine Branch of China Animal Husbandry and Veterinary Association Academic Exchange Conference, 2015. 302 – 304.
- [2] N Spibey, N Greenwood, I Tarpey, *et al.* 英特威犬细小病毒 C154 毒株对新分离 2c 型株攻毒犬的保护作用[C]. 中国畜牧兽医学学会 2010 学年会暨第二届中国兽医临床大会, 2010. 864 – 866.
- N Pibey, N Reenwood, I T – PEy, *et al.* The protective effect of Intway parvovirus C154 on a newly isolated 2c challenge dog [C]. The 2010 Scientific Meeting and the Second Chinese Veterinary Clinical Congress of Chinese Society of Animal Husbandry and Veterinary, 2010. 864 – 866.
- [3] 一种犬温热、细小病毒病二联活疫苗及其制备方法[P]. 2017.
- A live vaccine combined with mild and parvovirus disease in dogs and its preparation method [P]. 2017.
- [4] 李敏, 朱盛和, 畅翊然, 等. 犬细小病毒灭活疫苗的制备及免疫效果研究[J]. 中国兽药杂志, 2017, 51(11): 1 – 8.
- Li M, Zhu S H, Chang Y R, *et al.* Study on the preparation and immune effect of inactivated canine parvovirus vaccine [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 51(11): 1 – 8.
- [5] 陈文庆, 王建超, 刘华杰, 等. 悬浮培养工艺与转瓶培养工艺的比较[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(10): 37 – 41.
- Chen W Q, Wang J C, Liu H J, *et al.* Comparison of suspension culture and flask culture [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2010, 44(10): 37 – 41.
- [6] 杨凡, 李峦峰, 宋羚羚, 等. 应用一次性生物反应器大规模培养 BHK – 21 细胞[J]. 中国制药装备, 2011, 4, 30 – 33.
- Yang F, Li L F, Song L L, *et al.* Large – scale culture of BHK – 21 cells in a disposable bioreactor [J]. China Pharmaceutical Equipment, 2011, 4: 30 – 33.
- [7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版三部[S]. Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2015 edition, Volume III [S].
- [8] 姚火春. 兽医微生物学实验指[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- Yao H C. The experimental guidance of veterinary microbiology [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2001.
- [9] Rajendran R, Lingala R, Vuppu S K, *et al.* Assessment of packed bed bioreactor systems in the production of viral vaccines [J]. AMB Express, 2014, 4(1): 25.
- [10] 梅建国, 庄金秋, 王金良, 等. 细胞大规模培养技术[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(7): 127 – 132.
- Mei J G, Zhuang J Q, Wang J L, *et al.* Large – scale cell culture technology [J]. Chinese Journal of Bioengineering, 2012, 32(7): 127 – 132.
- [11] Bock A, Schulze – Horsel J, Schwarzer J, *et al.* High – density microcarrier cell cultures for influenza virus production [J]. Biotechnology Progress, 2011, 27(1): 241 – 250.
- [12] Tapia F, Vdquez Ramfrez D, Genzel Y, *et al.* Bioreactors for high cell density and continuous multi – stage cultivations: Options for process intensification in cell culture – based viral vaccine production[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2016, 100(5): 2121 – 2123.
- [13] 秦海斌, 温海, 贺星量, 等. 犬细小病毒抗体效价监测与疫苗免疫效果分析[J]. 中国工作犬业, 2014(6): 19 – 21.
- Qin H B, Wen H, He X L, *et al.* The monitoring of the antibody efficacy and analysis of immunological effects induced by canine parvovirus[J]. Zhongguo Gongzuo Quanye, 2014(6): 19 – 21.

(编辑: 李文平)