

左晓昕,赵艳红,邓碧华,等. 猪瘟耐热活疫苗节能冻干曲线的优化研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(5):156-161.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.05.033

猪瘟耐热活疫苗节能冻干曲线的优化研究

左晓昕¹, 赵艳红¹, 邓碧华¹, 牟和平², 胡来根^{1,2}, 宋伟¹, 吕芳^{1,2,3}, 卢宇^{1,4,5}, 侯继波^{1,3,4}

(1. 江苏省农业科学院动物免疫工程研究所/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014;

2. 成都天邦生物制品有限公司, 四川成都 610100; 3. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏扬州 225009;

4. 江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 江苏扬州 225009; 5. 江苏大学药学院, 江苏镇江 212013)

摘要:猪瘟疫苗真空冷冻干燥工艺,可减少冻干对制品活性的影响,降低制品冻干过程的耗能,缩短冻干周期,故研制安全、耐热、节能的猪瘟减毒冻干疫苗极为重要。选用甘露醇、甘氨酸等成分设计猪瘟耐热保护剂配方,通过间接免疫荧光法比较制品在 37℃、10 d 的冻干和耐热损失,并用兔体热反应法复核。检测优化配方的共晶点和塌陷温度设计冻干程序,比较不同预冻方式对猪瘟耐热疫苗冻干的影响,调整冻干周期。猪瘟耐热保护剂配方 A-4 的冻干和耐热损失最小,分别为 0.30 lg 和 0.45 lg。根据制品的共晶点 -27.51℃,对预冻方式筛选,发现快冻冻干和耐热损失最小,分别为 0.17 lg 和 0.38 lg,根据塌陷温度 -24.3℃,成功将冻干曲线缩短至 24 h。调整后的配方可使猪瘟活苗在 37℃ 保存 15 d、45℃ 保存 7 d;内毒素和动物试验表明该疫苗安全、无副反应。上述结果表明,试验成功筛选出猪瘟耐热保护剂配方 A-4,在保证疫苗质量的前提下优化冻干曲线,调整后的保护剂配方保证疫苗耐热性能,安全无副反应。

关键词:猪瘟病毒;耐热保护剂配方;冻干工艺;耐热性能;安全性

中图分类号: S859.79⁺7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)05-0156-06

猪瘟(classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)引起的急性、接触性传染病,在各国均有暴发疫情,尤其是东南亚地区,呈散发性且流行范围广的特点^[1]。猪瘟作为我

国重大动物疫病,已经在国家中长期动物疫病防治规划中列为优先防治的动物疫病^[2]。

疫苗是控制猪瘟的重要手段,我国相继用 4 株猪瘟病毒诱导猪瘟发病,并成功筛选出能够减少对猪的致病能力但能保存免疫原性的猪瘟病毒,即猪瘟兔化弱毒疫苗 C 株。CSFV 增殖方法多样,目前在生产上多在猪睾丸细胞和牛睾丸原代细胞上扩繁,生产工艺成熟。但是该疫苗的耐热性差,极易失活^[3],在生产后期必须要添加一些保护剂,并进行真空冷冻干燥。但是,目前市场上的猪瘟冻干活疫苗在传输中仍无法脱离冷链环境,需要在

收稿日期:2019-05-06

基金项目:国家重点研发计划(编号:2017YFD0500706-2);江苏省农业科学院探索性颠覆性创新计划[编号:ZX(17)2016]。

作者简介:左晓昕(1992—),女,江苏泰州人,硕士,从事兽用疫苗耐热剂型研究。E-mail: zuoxiaoxin08@163.com。

通信作者:吕芳,硕士,副研究员,从事兽用疫苗耐热剂型研究。E-mail: lvfang31@163.com。

[7]梁华芳,黄东科,吴耀华,等. 温度和盐度对龙虎斑耗氧率和排氮率的影响[J]. 渔业科学进展,2014,35(2):30-34.

[8]王成桂,梁华芳,黄东科,等. 不同盐度对龙虎斑生长和摄食的影响[J]. 广东海洋大学学报,2014,34(4):40-44.

[9]李国聪,陈刚,黄建盛,等. 照度对龙虎斑幼鱼行为活动的影响[J]. 广东海洋大学学报,2015,35(1):43-50.

[10]刘晓勇,齐茜,王国峰,等. 养殖密度对饲料驯化期西伯利亚鲟生长的影响[J]. 淡水渔业,2012,42(5):79-82.

[11]吴遵霖,李蓓,李桂云,等. 鳊鱼配合饲料驯饲与养殖研究[J]. 淡水渔业,1996,26(1):16-19.

[12]赵晓临,夏大明,李军,等. 斑鳊网箱配合饲料驯养及其活动与摄食行为的初步观察[J]. 水产学杂志,2008,21(2):37-41.

[13]叶继丹,孙大江,曲秋芝,等. 用配合饲料驯饲中华鲟仔鱼研究

初报[J]. 水产学杂志,1998,11(2):17-19.

[14]盛竹梅,黄文. 江鲢鱼种利用人工配合饲料驯化养殖技术[J]. 中国水产,2014(1):60-61.

[15]齐志宏. 浮性颗粒饲料驯化养殖加州鲈 *Micropterus salmoides* (Lacépède) 试验研究[J]. 现代渔业信息,2008(6):12-14.

[16]侯冠军,李海洋,汪留全,等. 不同蛋白水平饲料对美洲鲟鱼苗种食性驯化的影响[J]. 粮食与饲料工业,2013(3):51-54.

[17]陈远见. 黄鳊人工驯饲及科学投喂技术[J]. 河北渔业,2000(2):20-21.

[18]严太明,刘小帅,杨淞,等. 重口裂腹鱼鳞片发育和覆盖过程[J]. 动物学杂志,2014,49(3):391-398.

[19]李思发,杨小林,何超刚. 草鱼的鳞片出现和复盖过程的初步研究[J]. 江西水产科技,1986(1):45-52.

-15 ℃ 以下保存^[4], 现有疫苗的冻干工艺周期较长, 一般在 42 ~ 50 h, 极大增加生产的成本^[5]。在近期研究中, 有报道指出, 蔗糖、甘氨酸、表面活性剂等复合组方能够延长腺病毒在 4 ℃ 和室温的保存期^[6-7]; 使黄热病毒在 4 ℃ 下可保存 11 周左右^[8]。该复合组方在猪瘟活疫苗上也有应用, 使用甘氨酸、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖等能够使疫苗在 2 ~ 8 ℃ 保存 2 年, 在 37 ℃ 保存 10 d 耐热损失在 0.9 lg, 该复合组方安全、无副反应, 避免了外源蛋白给动物带来的过敏反应^[9-10], 但目前这些配方对不同细胞培养的 CSFV 保护效果报道较少。

耐热保护剂配方与冷冻干燥工艺相互配套, 保护剂是冻干工艺的基础, 合理的保护剂配方和适宜的冻干曲线是制品顺利冻干的保证。在保证质量的前提下需要减少能耗、降低成本。冻干工艺主要分为预冻阶段和干燥阶段, 在不同阶段需要通过参考制品的热参数, 如共晶点、塌陷温度等进行设计。其中, 塌陷温度是在真空冷冻的过程中测得的, 能够真实反映制品的特性^[11]。当温度超过塌陷温度会造成制品底部熔融、塌陷、萎缩, 损害干燥制品的多孔结构, 增加残余水分, 降低生物制品的效价^[12]。因此, 以塌陷温度作为临界温度, 可以提高升华干燥速度, 缩短冻干时间。

本研究针对猪瘟冻干工艺周期长、耗能高及猪瘟耐热保护剂配方通用性等问题, 以吕芳等的无明胶、无蛋白的猪瘟耐热保护剂配方^[8]为基础, 添加甘露醇、甘氨酸等成分, 通过间接免疫荧光法筛选耐热保护组方。将筛选的配方分别和猪睾丸、牛睾丸细胞冻干, 初步对配方的通用性进行探索。并根据共晶点和塌陷温度科学设计冻干程序, 获得耗能低、冻干周期短的冻干曲线, 研制安全、耐热、节能的猪瘟减毒冻干疫苗冻, 为猪瘟耐热保护剂配方在实际生产上的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

猪瘟兔化弱毒株(猪睾丸原代细胞毒)和 ST 细胞, 均由成都天邦生物制品有限公司提供; 猪瘟兔化弱毒株(牛睾丸原代细胞毒), 由南京天邦生物制品有限公司提供; 甘露醇、甘氨酸等, 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; DMEM 培养基、谷氨酸钠等其他试剂耗材, 均购自 Sigma 公司; 鲎试剂盒、细菌内毒素标准品(0.25 EU/mL)和检查用水,

均购自湛江安度斯生物有限公司。

1.2 试验仪器

冻干机(美国 Virtis, Advantage Plus 型号); 37 ℃ 和 45 ℃ 恒温干燥箱(上海新苗医疗器械制造有限公司); 荧光显微镜(德国蔡司)、磁力搅拌器(金坛荣华仪器制造有限公司)、低温冻干显微镜(英国林肯, 型号 FDCS196)、DSC 热分析仪(美国 PerkinElmer 公司)。

1.3 猪瘟耐热保护剂活疫苗配制

以无明胶、无蛋白的猪瘟耐热保护剂配方 A 为基础^[8], 添加甘露醇、甘氨酸等成分, 设计出组方 A(1) ~ A(6)。配制时, 根据配方成分的性质将其分为 A、B 部分制备, 其中 A 为不耐热成分, 超纯水溶解后用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌; B 为耐热成分, 采用高温高压法灭菌。耐热保护剂配方与 CSFV 病毒液等比例混合, 进行冷冻干燥, 冻干程序参照文献^[8]。

1.4 加速热稳定性试验

将不同配方配制的猪瘟耐热冻干活苗置于 37 ℃ 保存 10 d, 每组取 5 瓶样品进行加速耐老化试验。根据参考文献^[13-14], 通过间接免疫荧光法检测猪瘟 TCID₅₀, 比较不同保护剂配方对猪瘟的耐热效果。为比较耐热保护剂配方对不同细胞下扩繁的猪瘟病毒的通用性, 采用牛睾丸原代细胞培养的猪瘟兔化弱毒 C 株与筛选出来的耐热保护剂配方进行冻干, 37 ℃ 保存 10 d, 采用《中国兽药典(2015 年版)》兔体感染量(rabbit infection dose, RID)方法进行复核^[15]。

1.5 耐热保护剂配方热参数的测定

将筛选的猪瘟耐热保护剂与猪瘟病毒等比例混合, 测定混合液的共晶点和塌陷温度。共晶点采用 DSC 热分析仪测定, 检测条件为: 对液体状态疫苗以 10 ℃/min 升温速率, 从 -50 ℃ 升至 30 ℃, 通过记录热焓变化曲线, 分析得到共晶点温度。

塌陷温度采用低温冻干显微镜测定, 检测指标为: 起始温度 -45 ℃, 真空为 20.0 Pa, 升温速率 2 ℃/s, 最终温度 20 ℃; 由上海东富龙科技股份有限公司进行检测。

1.6 疫苗预冻方式的筛选

预冻环节是冷冻干燥的起始环节, 也是冻干技术的基础, 不同类型的药品成分其理化性质存在差异, 在预冻方式上也存在差异^[16]。根据“1.5”节方法测定的热参数指标, 确定预冻温度和主干燥温

度,并设计快速冷冻、慢速冷冻和退火 3 种方式对猪瘟耐热疫苗进行冻干。冻干样品采用“1.4”节方法进行加速耐老化试验,根据《中国药典》第 3 部通则 0832 检测残水分,残水率应不高于 3%^[17]。

1.7 疫苗冻干时长的优化

在保证猪瘟疫苗耐热性能的前提下,降低制品冻干过程的能耗,节约成本是冷冻干燥工艺研究生产中必须考虑的因素。物料的性质是影响冻干效率和时长的关键因素。需要提高一次干燥阶段疫苗的干燥速率,缩短冻干时长。根据“1.5 节”检测的塌陷温度和“1.6”节节选预冻方式,对冻干时长进一步优化,将缩短冻干程序至 24 h。冻干样品采用“1.4”节方法进行加速耐老化试验。

1.8 猪瘟耐热活疫苗耐热性能检测

根据筛选出的猪瘟耐热保护剂配方和冻干程序,重新制备 3 批次猪瘟耐热冻干活苗,置于 37 ℃ 和 45 ℃ 保存,在不同时间点取出,检测猪瘟耐热疫苗效价,以保存期内病毒滴度下降 1.0 lg 为判定终点。

1.9 内毒素含量检测

猪瘟耐热活疫苗中内毒素含量过高是引起动物产生过敏反应的主要原因之一,为检测猪瘟耐热配方和猪瘟耐热活疫苗的内毒素限制,试验参考《中国兽药典(2015 年版)》^[15]中的鲎试剂方法进行检测,根据参考文献[18],用内毒素标准用水分别将耐热保护剂和猪瘟耐热活苗稀释 10、50、100 倍,用标示灵敏度为 0.25 EU/mL 的鲎试剂进行比较。

1.10 猪瘟耐热活疫苗安全性能检测

参照《中国兽药典(2015 年版)》对疫苗进行安全检验^[15]。选用 30 日龄三元仔猪,将筛选的猪瘟耐热冻干活疫苗用灭菌生理盐水稀释成 1 mL 含 20

头份和 30 头份,1 mL/头,每个剂量组肌肉注射猪 10 头,对照组不免疫。接种后隔离观察,主要观察接种后仔猪的精神、采食、排泄等临床情况,按质量标准判定疫苗合格情况。

1.11 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行单因素方差分析处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示组间差异显著, $P < 0.01$ 表示组间差异极显著。

2 结果与分析

2.1 耐热保护剂的初步筛选

将耐热保护剂配方 A(1) ~ A(6)分别与猪瘟病毒混合后冻干,于 37 ℃ 放置 10 d 进行加速耐老化试验。由表 1 可知,与基础配方 A 进行对比,在冻干损失方面,配方 A(4)的冻干损失最小,仅为 0.3 lg,显著低于其他试验配方($P < 0.05$)。在耐热损失方面,配方 A(4)的耐热损失为 0.45 lg,显著低于基础配方 A($P < 0.05$)。综合冻干损失和耐热损失 2 个指标,配方 A(4)的冻干耐热保护效果最好。将 A 和 A(4)配方分别与牛睾丸原代细胞扩繁的 CSFV 冻干,通过兔体热试验检测耐热效果,结果发现,A(4)配方的耐热损失为 0.44 lg,显著优于基础配方 A($P < 0.05$)。A(4)配方对不同细胞培养的 CSFV 均具有耐热效果。

2.2 热参数

根据筛选出来的猪瘟耐热保护剂配方 A(4)与猪瘟混合,进行热参数的测定。由表 2 可知,混合液的共晶点为 -27.51 ℃,塌陷温度为 -24.30 ℃。根据共晶点参数,将预冻的温度设置为 -42.00 ℃,保证样品在该阶段充分冻实。在主干燥阶段,由于隔板温度比样品温度高 10 ℃ 左右^[19],为防止样品发生熔

表 1 猪瘟耐热保护剂配方筛选

配方代码	病毒含量(lg)			病毒滴度损失(lg)		兔体反应热复核 RID check 耐热损失 (lg)
	原毒	冻干 0 d	37 ℃ 10 d	冻干损失	耐热损失	
A	6.0	5.53 ± 0.07	4.92 ± 0.04	0.42 ± 0.02AC	0.68 ± 0.04AC	0.63 ± 0.03A
A(1)		5.34 ± 0.04	4.35 ± 0.05	0.66 ± 0.04BD	1.05 ± 0.05B	
A(2)		5.39 ± 0.02	4.58 ± 0.04	0.61 ± 0.01B	0.82 ± 0.04C	
A(3)		5.53 ± 0.07	5.08 ± 0.08	0.53 ± 0.07BC	0.62 ± 0.07A	
A(4)		5.7 ± 0.05	5.3 ± 0.05	0.3 ± 0.05A	0.45 ± 0.05D	0.44 ± 0.04B
A(5)		5.34 ± 0.14	4.74 ± 0.08	0.66 ± 0.04bD	0.56 ± 0.04AD	
A(6)		5.22 ± 0.03	4.58 ± 0.04	0.79 ± 0.04BD	0.67 ± 0.04AC	

注:猪瘟兔化弱毒株 C 株(猪睾丸细胞)冻干前病毒含量 ≥ 10^{5.5} TCID₅₀/mL;猪瘟兔化弱毒株 C 株(牛睾丸原代细胞)冻干前含量 > 50 × 10⁴ RID/mL;同列数据后不同小写、大写字母分别表示组间差异显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)。表 3 同。

表 2 配方 A(4) 的热参数

配方	共晶点 (℃)	塌陷温度 (℃)
A(4)	-27.51	-24.30

融、塌陷、萎缩,要将制品温度控制在塌陷温度以下。

2.3 疫苗冻干程序筛选

参考“2.2”节热参数性能指标,设定预冻温度为 -42.00 ℃,主干燥温度为 -15.00 ℃。在冻干过程中,预冻程序是影响冻干效率的关键步骤,物料不同,预冻的速率也存在差异,降温速度影响冻结快慢从而影响冰晶颗粒的大小和冻干时间。为筛

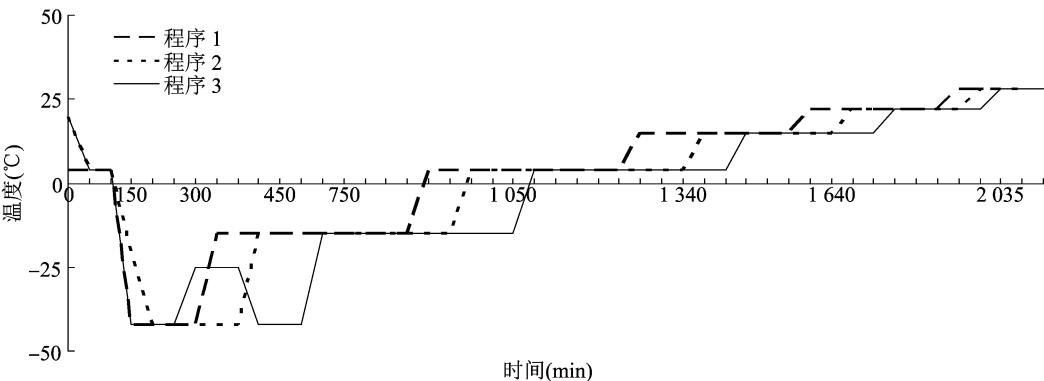


图1 3种不同预冻方式的冻干曲线

表 3 不同预冻方式对猪瘟疫苗效价的影响

程序	病毒含量(lg)			病毒滴度损失(lg)	
	原毒	冻干 0 d	37 ℃ 10 d	冻干损失	耐热损失
1	5.75	5.50 ± 0.03	5.37 ± 0.01	0.17 ± 0.04A	0.38 ± 0.01a
2	5.50	4.90 ± 0.15	4.40 ± 0.05	0.65 ± 0.15B	0.71 ± 0.05b
3	5.75	5.30 ± 0.12	4.70 ± 0.17	0.22 ± 0.07A	0.87 ± 0.03c

2.4 冻干时长缩短

作为冷冻干燥工艺研究的重要任务之一,需要对冻干时长进行缩短、降低能耗,以节约成本。根据制品的塌陷温度,程序 4(图 2 - A)以程序 1(图 1 - 程序 1)为基础,提高主干燥温度,将冻干时长缩短至 24 h。在程序 4 中将主干燥温度提高,缩短主干燥时长,观察程序 4 的制品冻干实时曲线,发现在主干燥阶段,制品的温度仍维持在塌陷温度以下;在 20 ℃左右,制品线与隔板重合,制品干燥完全,残水率检测合格。程序 4 在保证冻形同时提高缩干燥效率,缩短冻干时长(图 2)。对程序 4 冻干的疫苗检测冻干损失和耐热损失,与原冻干程序 2 无明显差异($P > 0.05$),冻干损失在 0.5 lg,耐热损失在 0.3 lg(表 4)。

选合适的预冻程序,分别采用快冻(图 1 - 程序 1),慢冻(图 1 - 程序 2)和退火(图 1 - 程序 3)对 A(4)配制的猪瘟耐热疫苗进行冻干,冻干时长在 32 ~ 35 h。

将 3 种程序冻干的疫苗在 37 ℃放置 10 d,进行加速热稳定试验。由表 3 可知,快冻和退火程序下猪瘟苗的冻干损失约 0.2 lg,冻干效果显著优于慢冻程序($P < 0.05$)。由表 3 可知,快冻程序下的耐热损失为 0.38 lg,极显著低于慢冻和退火程序($P < 0.01$)。在快冻程序下,猪瘟苗的冻干损失和耐热损失最小。因此,选择快冻方式作为猪瘟耐热配方 A(4)的预冻方式,对冻干程序继续进行优化。

2.5 猪瘟冻干疫苗的耐热性能

将 3 批次猪瘟耐热冻干疫苗分别放置于 37 ℃和 45 ℃保存,在指定时间点取出,检测样品的耐热性能。图 3 - A 显示,冻干苗在 37 ℃放置 15 d 时耐热损失在 0.8 lg 左右;20 d 时耐热损失在 1.1 lg 左右。图 3 - B 显示,冻干苗在 45 ℃保存 7 d,耐热损失在 1.0 lg 左右。

2.6 猪瘟耐热保护剂活疫苗内毒素含量

内毒素是引起仔猪发生过敏反应的原因之一,本研究将内毒素含量作为判断配方副作用的指标。对耐热保护剂和耐热保护剂活疫苗进行 10、50、100 倍稀释后,在阴性和阳性对照组成立的条件下,各稀释倍数下的样品组均对灵敏度为 0.25 EU/mL 的鲎试剂无干扰(表 5),说明其内毒素含量低于

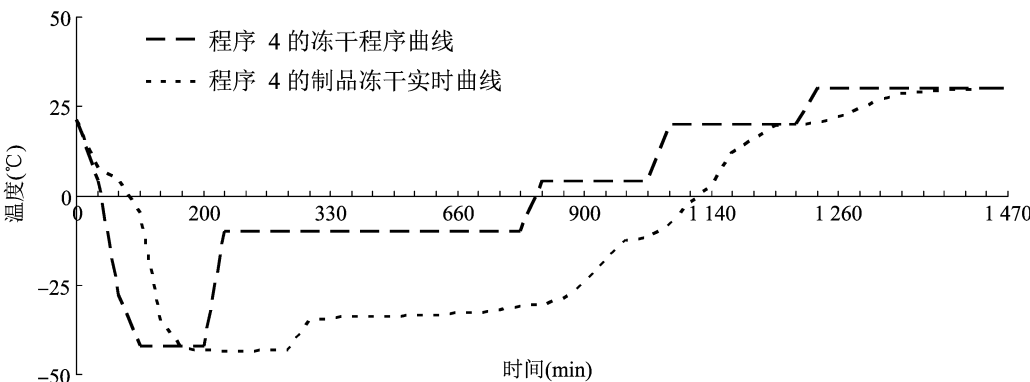


图2 冻干程序优化曲线

表 4 不同冻干程序对猪瘟疫苗效价的影响

程序	病毒含量 (lg)			病毒滴度损失 (lg)		残水率 (%)
	原毒	冻干 0 d	37 ℃ 10 d	冻干损失	耐热损失	
1	6	5.7 ± 0.05	5.3 ± 0.07	0.35 ± 0.05	0.48 ± 0.07	1.6 ± 0.14
4	6	5.5 ± 0.05	5.3 ± 0.05	0.50 ± 0.06	0.30 ± 0.05	1.8 ± 0.11

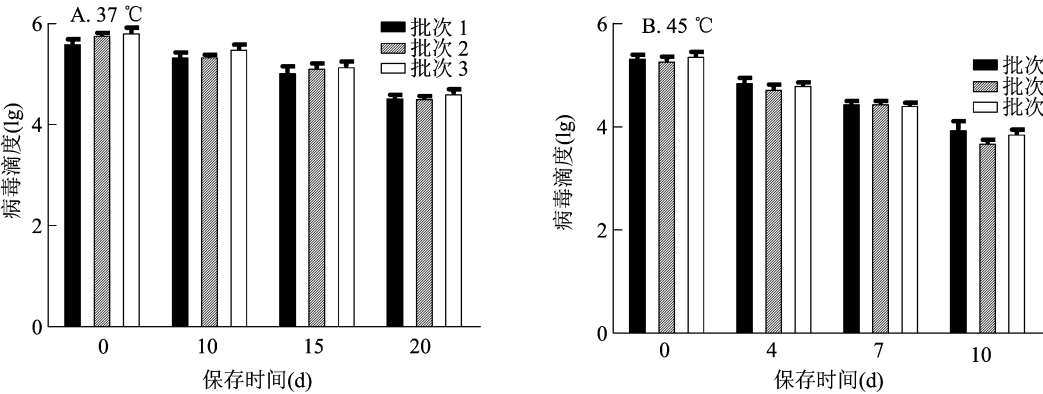


图3 猪瘟耐热冻干疫苗在不同温度下效价损失情况

表 5 耐热保护剂内毒素含量

配方	内毒素含量 (EU/mL)
S5	<1
猪瘟耐热冻干疫苗	<1

1 EU/mL,耐热保护剂和耐热保护剂活疫苗是安全的。

2.7 猪瘟耐热冻干疫苗的安全性

将筛选的猪瘟冻干活苗复溶,颈部肌肉注射,观察仔猪的采食、体温、精神状态等,发现所有仔猪均无不良反应,体温及精神状态正常,根据兽用生物制品质量标准判定疫苗对猪体是安全,筛选的配方无不良反应。

3 讨论

选用合适的保护剂对疫苗的质量和长期保存

的稳定性至关重要。市场上现有的猪瘟活疫苗通常会添加蔗糖、脱脂奶粉和明胶等保护剂,组方简单、保护功能差,脱脂奶粉和明胶作为外源性蛋白容易引起猪,尤其是仔猪的过敏反应^[20]。试验前期,吕芳等成功筛选出无明胶、无蛋白的耐热保护配方能够使猪瘟疫苗在37 ℃保存15 d,且安全无副反应,但是冻干耗时长在40~42 h^[9]。本试验在该配方基础上进一步优化,缩短冻干时长,提高干燥效率^[8]。

在对疫苗进行冷冻干燥处理时,起始环节是预冻阶段,在该阶段要保证制品充分冻实,制品温度要低于共晶点温度10 ℃左右。不同类型的药品成分理化性质不同,对预冻阶段程序的设定也存在差异。预冻速率是影响冰晶大小、兽用疫苗存活率和升华速率的关键因素^[21]。根据预冻速率将其分为快冻、慢冻和退火。本次试验对预冻程序进行筛选

优化,结果发现在快冻程序下猪瘟的冻干和耐热损伤最小。这可能是降温速率影响冰晶成核大小,快冻形成的冰晶颗粒更小,对病毒造成的机械损伤较轻^[22]。

在冷冻过程中,一次干燥是整个冻干工艺中耗时最长的阶段,一次干燥周期与制品的塌陷温度有关。塌陷温度是指制品干燥过程中失去刚性,开始变黏,发生类似塌方的崩解、融化或产生发泡现象的临界温度,在冻干过程发生塌陷会严重影响冻干制品品质,因此制品在一次干燥的温度必须要低于塌陷温度。塌陷温度取决于制品本身的性质和保护剂的种类。制品的塌陷温度提高,有利于提高主干燥温度,提高干燥效率,节省冻干能耗和时长^[23]。氨基酸是常用的蛋白保护剂之一,有研究指出,甘氨酸能提高生物制品的可塑性,提高制品的塌陷温度^[24]。此外,甘露醇是常用的赋形剂,杨智等发现 2% 甘露醇在升华过程中未发生崩解,能够提高配方的塌陷温度^[11]。本次试验通过添加甘露醇、甘氨酸等成分,将制品塌陷温度从 -31 ℃ 提高至 -24 ℃。基于制品塌陷温度的提高,在一次干燥阶段,提高板层设置温度,提高干燥效率,将冻干时长缩短至 24 h,残水率合格,猪瘟耐热疫苗冻干损失 0.5 lg,耐热损失 0.3 lg,极大地减少了冻干能耗、时长,降低了经济成本。在耐热性能方面,研究报道的猪瘟活苗 37 ℃ 能保存 7 ~ 10 d^[25],本研究中猪瘟活苗在 37 ℃ 可保存 15 d 左右,在 45 ℃ 可保存 7 d 左右。内毒素和动物试验均显示该配方是安全、无副反应的,本研究成功筛选出耐热性能好、无副作用、低耗能的猪瘟耐热保护剂配方,成功将冻干时长缩短至 24 h,初步探索了配方对不同细胞扩繁的猪瘟病毒的通用性,可为猪瘟耐热冻干保护剂配方在实际生产中的应用提供科学依据。

参考文献:

- [1] 夏铭崎. 猪瘟国内外流行新趋势[J]. 今日养猪业,2017(3): 41 - 44.
- [2] 王元元. 规模化养猪场猪瘟流行特征、原因分析及疫苗研究进展[J]. 中国畜牧兽医文摘,2018(5):165.
- [3] Chenut G, Saintilan A F, Burger C, et al. Oral immunisation of swine with a classical swine fever vaccine (Chinese strain) and transmission studies in rabbits and sheep[J]. Veterinary Microbiology, 1999, 64 (4): 265 - 276.
- [4] Kartoglu U, Milstien J. Tools and approaches to ensure quality of vaccines throughout the cold chain[J]. Expert Review of Vaccines, 2014, 13(7): 843 - 854.
- [5] 管清江, 邹桂荣. 改进蓝耳病疫苗冻干工艺提高产品质量的工艺探索[J]. 中国农资, 2013(28): 139.
- [6] Evans R K, Nawrocki D K, Isopi L A, et al. Development of stable liquid formulations for adenovirus - based vaccines[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2004, 93(10): 2458 - 2475.
- [7] Stewart M, Ward S J, Drew J. Use of adenovirus as a model system to illustrate a simple method using standard equipment and inexpensive excipients to remove live virus dependence on the cold - chain[J]. Vaccine, 2014, 32(24): 2931 - 2938.
- [8] Wiggan O, Livengood J A, Silengo S J, et al. Novel formulations enhance the thermal stability of live - attenuated flavivirus vaccines[J]. Vaccine, 2011, 29(43): 7456 - 7462.
- [9] 吕芳, 赵艳红, 张小飞, 等. 猪瘟无明胶无蛋白耐热活疫苗的研制及冻干工艺[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(12): 2014 - 2018.
- [10] 邹立宏, 何平有, 翟含流. 猪瘟耐热保护剂活疫苗生产工艺研究[J]. 兽医导刊, 2018, 293(7): 71 - 72.
- [11] 杨智, 李代禧, 张燕, 等. 冷冻干燥过程中重要参数塌陷温度的研究[J]. 应用化工, 2014(5): 962 - 965.
- [12] 马兆堂, 丁敏. 浅谈药物冻干曲线的制定及常见问题分析[J]. 当代化工研究, 2017(4): 146 - 147.
- [13] 李晶梅, 朱薇, 秦红刚, 等. IFA 和 IPMA 方法测定猪瘟兔化弱毒病毒含量[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(10): 35 - 38.
- [14] 王遵宝, 李俊辉, 张先锋, 等. 利用荧光定量 RT - PCR 法与间接免疫荧光法比较测定猪瘟兔化弱毒病毒含量[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(3): 410 - 414.
- [15] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典: 3 部[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [16] 贾立峰. 冷冻技术在制药工艺中的应用[J]. 中国新技术新产品, 2018(8): 37 - 38.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [18] 郭广君, 吕素芳, 苗立中, 等. 猪瘟脾淋毒耐热保护剂活疫苗内毒素检测方法的建立与应用[J]. 中国动物检疫, 2010, 27(2): 35 - 37.
- [19] 滕有寿, 姜海艳. 制订生物制品冻干曲线的探讨[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(11): 53 - 55.
- [20] 谭长江, 孟宇航. 兽用疫苗耐热冻干保护剂的研究进展[J]. 中国畜禽种业, 2011, 7(6): 16 - 18.
- [21] Nakagawa K, Murakami W, Andrieu J, et al. Freezing step controls the mannitol phase composition heterogeneity[J]. Chemical Engineering Research & Design, 2009, 87(8): 1017 - 1027.
- [22] 钱应璞. 制剂药品的冻结真空干燥技术[J]. 机电信息, 2004(15): 3 - 11.
- [23] 徐成海, 张志军, 张斌. 冻干技术的几个热点问题[J]. 干燥技术与设备, 2010(5): 205 - 210.
- [24] Flood A, Estrada M, McAdams D, et al. Development of a freeze - dried, heat - stable influenza subunit vaccine formulation[J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0164692.
- [25] 汪宏才, 杨峻, 杨涛, 等. 猪瘟活疫苗耐热保护剂研究[J]. 湖北农业科学, 2009, 48(11): 2795 - 2797.