

1819882

编 号: 0170

内 部

科学技术成果报告

兽用疫苗细胞培养的研究

科学技术文献出版社

科学技术成果报告

兽用疫苗细胞培养的研究

(内部发行)

编辑者：中国科学技术情报研究所

出版者：科学技术文献出版社

印刷者：中国科学技术情报研究所印刷厂

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

※

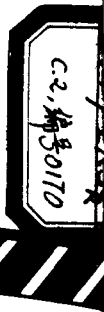
开本：787×1092 ¹/₁₆。 印张：1.75 字数：43.2千字

1980年10月北京第一版第一次印刷

印数：1—1,760册

科技新书目：173—27

统一书号：14176·49 定价：0.30元



14176·49

目 录

一、前言.....	(1)
二、猪瘟细胞疫苗的研究.....	(1)
(一) 试验材料和方法.....	(1)
(二) 试验结果.....	(2)
(三) 小结.....	(5)
(四) 冻干疫苗制造及检验试行规程.....	(5)
(五) 附录.....	(7)
三、鸡新城疫 I 系细胞苗的研究.....	(8)
(一) 试验材料和方法.....	(8)
(二) 试验结果.....	(8)
(三) 小结.....	(12)
(四) 冻干苗制造及检验试行规程.....	(12)
四、羊痘弱毒羊羣丸细胞苗试验.....	(13)
(一) 试验材料和方法.....	(13)
(二) 试验结果.....	(14)
(三) 小结.....	(19)
(四) 冻干疫苗制造及检验参考办法.....	(21)
(五) 附录.....	(22)
五、鸭瘟鸡胚化弱毒细胞冻干疫苗试验.....	(23)
(一) 试验材料和方法.....	(23)
(二) 小结.....	(27)
(三) 冻干苗制造及检验试行参考办法.....	(27)

兽用疫苗细胞培养的研究

细胞培养研究协作组*

一、前言

利用细胞培养生产疫苗,早在50年代国外就有报道。我国兽用疫苗生产过去一直是用动物来制苗。如猪瘟疫苗,最早是用猪生产猪瘟结晶紫疫苗。兔化弱毒研究成功后,则用家兔和乳兔生产疫苗。羊痘疫苗需用绵羊来生产,生产工艺比较复杂,成本高。1974年黑龙江省富裕兽医研究所用小量静置法培养猪瘟病毒获得成功,制出的疫苗对猪有良好免疫力。但由于小量静置法培养,不能适应大生产需要,从1975年开始,农业部兽医药品监察所,组织有关兽医生物药品厂在兰州会战,利用大瓶旋转法培养猪瘟病毒,通过三批大量培养,所制冻干苗,对猪安全,并有良好的免疫力。同年黑龙江省兽医药品一厂亦证明,用大瓶旋转法培养生产猪瘟细胞疫苗是可行的。在猪瘟疫苗用细胞培养成功的基础上,1976年至1978年继续进行鸡新城疫、羊痘、鸭瘟等疫苗的细胞苗试验,均已获得良好的结果,现将试验研究情况报告如下:

二、猪瘟细胞疫苗的研究

(一) 试验材料和方法

1. 种毒:系由农业部中监所供给猪瘟兔化弱毒482代冻干种毒,通过家兔复壮,取其新鲜脾毒制成10倍稀释脾乳剂,加青霉素500单位/ml,链霉素500mg/ml,4℃冰箱处理4小时左右,接毒量0.1~0.3%,或采用上述的脾毒经细胞培养传1~5代细胞毒做生产种毒,接毒量2~4%。

2. 乳猪的选择:选用未经猪瘟疫苗兔化的,7~20日龄的健康仔猪,心脏放血致死,用自来水刷洗体表后,用0.1%新洁而灭溶液刷洗消毒体表,再经0.1%新洁而灭溶液浸泡15~20分钟,无菌剖取肾。

3. 细胞的制备:无菌手术取肾脏,经含400单位/ml的双抗LH液洗涤后,除去肾脏脂肪,被膜及髓质部分,再经含400单位/ml双抗LH溶液洗涤,剪成1~3毫米小块,移入三角瓶内,然后用含200单位/ml的双抗LH溶液反复洗涤至上清液清亮即可,再移入盛有玻璃珠的消化瓶中,加入4~8倍的0.25%胰酶液(胰酶: Difco,活力1:250),调pH7.6~7.8,加双抗各100单位/ml,37℃水溶液消化60分钟,弃去酶液,用LH液脱酶2~3次,用力摇打分散细胞,并用生长液稀释,使细胞悬液中含细胞数为120万个/ml左右,按装量为容器的1/10,分装10立升瓶中,每瓶100ml,包扎好瓶口,置每小时8~10转的转瓶机上,37℃温室培养,一般经4~5天即形成良好的致密细胞单层。

* 主要参加单位:农业部兽医药品监察所、黑龙江省富裕兽医研究所,兰州、黑龙江、郑州、成都、广东、广西、湖南兽医生物药品厂。此稿由胡嘉骥,刘众心整理。

4. 猪瘟弱毒细胞培养毒的制备：当细胞形成良好单层时，更换维持液同时接毒，经转瓶培养4天收获一次。如此可收获4~5次，将各次收获液，密封放在-15℃条件下冻结保存，经检验纯粹，毒价达5万倍时可用于配苗。

生长液：（营养液）LH液中含10%牛血清，含青霉素、链霉素各90~100单位/ml，pH7.0左右。

维持液：LH液中含牛血清5%，含青霉素、链霉素各100单位/ml，pH7.6。

注：LH液——为含0.5%水解乳蛋白的汉克氏液。

5. 疫苗的配制和冻干：配制细胞苗的保护剂为5%蔗糖脱脂奶，一般每毫升收获液加保护剂4毫升，配苗按每毫升疫苗加入青霉素500单位/ml，链霉素500微克/ml，进行冻干。

（二）试验结果

1. 猪瘟细胞毒对家兔的毒价测定：利用大瓶旋转培养猪瘟细胞毒，每四天收毒一次。根据各厂多次试验结果，除一次收毒毒价较低外，二、三、四、五次收毒，用家兔测毒，均能达到20000倍至50000倍，个别批毒价可达100000倍。其毒价能达到用家兔和乳兔制苗的质量标准。猪瘟弱毒接种仔猪肾细胞，不产生细胞病变，用家兔测毒是衡量疫苗的主要指标。

2. 猪瘟细胞苗对猪的免疫原性试验：为了明确猪瘟细胞毒对猪的免疫原性，曾先后在成都、黑龙江、北京五次进行18批试验，将猪瘟细胞冻干疫苗，稀释成10000倍、20000倍、50000倍，以一毫升接种断奶仔猪（体重20~35斤），于接种后14天攻击猪瘟强毒（血毒1毫升）。对照猪全部发病死亡，免疫猪10000倍和20000倍免疫组均能全部保护，50000倍免疫猪，除个别批，个别猪不能保护外，其余均能保护。说明对猪的免疫原性是坚强的。

3. 不同日龄猪肾细胞与产毒关系：一般情况幼龄动物细胞成活率比老龄动物为高，在生产中根据猪源条件曾用9~21日龄乳猪肾制备细胞，一般4~5天均可形成致密单层，其细胞与产毒的结果如表1：

表1 不同日龄乳猪肾细胞与产毒的关系

批 号	培养瓶数	乳猪日龄	成片日龄	细胞培养物的毒价	
				5万倍	10万倍
7701	9	14	5	++ ++	
7702	10	9	3	++ +	
7703	12	14	3	++ ++	
7704	11	18	4	++ +	
7705	13	16	5	+ +	
7706	4	18	5	++ +	
7708	12	21	5	++-→+++*	
7709	10	21	5	++-→++ +	
77010	12	21	5	++ ++	
77013	13	9	5	++ ++	
77014	11	12	5	++ ++	++ ++
77015	14	18	4	++ ++	
77016	12	16	5	++ ++	
77017	12	16	4	++ ++	

*注：“++-”表示注射两只兔，一只兔（++）代表定型热，另一只兔（-）代表无反应→（+++）代表分离病毒（有热反应）。

从表 1 看出, 用 9~21 日龄猪肾细胞 4~5 天即可形成单层, 毒价可达 5 万倍。“++”是表示接种家兔呈定型热反应, “+”表示是轻热反应。

4. 猪瘟兔化弱毒在猪肾细胞连传 3~5 代, 对猪免疫原性及猪兔平行关系的测定: 由于猪瘟细胞苗的推广和应用, 对于生产工艺也不断提出新的要求, 初期在制造细胞苗所用的种毒仍然是热反应兔的新鲜脾毒, 生产上不方便, 且易造成污染, 因此在实践中出现用细胞传代做为生产用种毒。为了明确细胞传代的抗原性及其猪兔平行关系, 特于 1978 年进行了测定, 其材料与方法如下:

(1) 细胞传代种毒: 选用辽宁兽医生物药品厂的 27~1 (3 代)、303 (5 代)、304 (5 代), 广西生药厂的 78014 (3 代)、78016 (5 代) 冻干毒。

(2) 试验动物: ①家兔: 中监所自繁自养大耳白品种, 1.5~2 公斤体重。②仔猪: 北京郊区购入非免疫猪, 健康观察 15 天, 81 日龄体重 40 斤左右。③猪瘟强毒: 石门系猪瘟强毒 118 代冻干毒。④方法: 将上述批 (组) 的细胞毒用生理盐水稀释成 5 万倍和 10 万倍, 每个滴度同时注射家兔和猪, 每兔耳静脉注射 1 ml, 每猪股内侧皮下 1 ml, 家兔按常规测温, 猪在注射后 14 天攻击强毒 (石门系 118 代强毒冻干毒) 原血 1 ml (耳根皮下), 其结果见表 2:

表 2 猪肾细胞传代毒 (3~5 代) 对猪免疫原性及猪兔平行关系测定

种毒类别	免 疫 组 保 护								对照死亡
	10 万 倍				5 万 倍				
	猪	%	兔	%	猪	%	兔	%	
辽宁厂 27-1 3 代	1/3	33	2/2	100	2/3 ^③	83.8	2/2	100	3/3
广西厂 7814 3 代	1/3		2/2		3/3		2/2		
辽宁厂 303 5 代	2/3	67	2/2	67	3/3	100	1/2	83	
辽宁厂 304 5 代	2/3 ^①		0/2		3/3		2/2		
广西厂 7816 5 代	2/3 ^②		2/2		3/3		2/2		

注: ① 1 头 41℃ 以上 2 天, ② 1 头 40℃ 以上 2 天, ③ 1 头 41℃ 以上 1 天。

从表 2 看, 在 5 万倍以内 3、5 代毒对猪和兔的免疫原性基本平行, 在 10 万倍滴度内, 3 代毒对猪的保护率为 33%, 5 代毒为 67%, 在 5 万倍滴度内, 3 代毒为 83%, 5 代毒为 100%。总的看来猪瘟兔化毒在猪肾原代细胞上连传 3~5 代, 病毒对猪的免疫原性仍然保持良好, 5 万倍滴度内猪兔基本平行。无论是 10 万倍或是 5 万倍 5 代细胞毒对猪的保护作用比 3 代毒坚强。

应用通过仔猪肾细胞培养 5 代以内的, 第 2~3 次收的毒做为生产种毒, 试产结果: 据 1978 年 6 月份统计: 湖南厂接毒量 2~4% 试产 10 批, 广西厂接毒 4~5% 28 批, 辽宁厂接毒 2~5% 9 批, 兰州厂接毒量 1~2% 13 批, 其冻干苗效价均良好。用细胞毒做生产种毒, 具有效价高, 耐保存, 便于成批生产和检验, 易作到无菌等优点。

5. 扩大血清来源试产: 兰州生药厂, 用 3~5 岁成年牦牛血清, 成年马血清, 湖南、广西等厂用 3 岁以内小黄牛血清, 所制细胞苗, 其效价与犏牛血清无明显差异。现在已用于生产中。

6. 在培养温度及维持液 pH 方面进一步做了试验, 认为细胞培养宜放 36.5~37℃, 接

种病毒后保持35°~36°C, 如在同一温室可分别放上、下层(下层温度约低1~1.5°C), 以低温培养病毒比较理想。pH调节乳汉液做维持液, 其收获液一般pH6.8~7.0, 以乳欧液做维持液, 其收获液pH7.0~7.4为宜。

7. 猪瘟兔化弱毒细胞培养冻干苗免疫期试验, 其材料和方法如下:

(1) 猪瘟强毒: 系成都生药厂提供(石门系1134代7604批, 用猪复壮4、5代血毒)。

(2) 试验用猪: 日龄90天以上, 体重15~25公斤, 均未接种过猪瘟疫苗。试验前经过30天以上健康观察。

(3) 猪瘟细胞苗: ①兰州生药厂提供的7711批兔测效价5万倍合格, 瓶装细胞液1ml100头份。②黑龙江一厂提供的7724批, 每瓶含细胞毒0.75ml50头份, 兔测效价2万倍合格。

(4) 猪瘟细胞苗免疫期测定: 1977年5月13日取上二批苗用生理盐水稀释后, 每头猪股内肌肉注射1ml(150个免疫量), 经3、6、9、12个月与同批对照猪一起攻毒, 攻毒时每头猪注射血毒1ml, 攻毒后观察16天。试验结果: 接种猪瘟细胞苗的试验猪, 在观察期间, 精神、食欲均良好, 增重很快, 分别在接种后3、6、9、12个月取出部分猪与同批对照猪攻击强毒测定结果见表3:

表3 免疫期测定结果

接种疫苗时间	攻毒时间	免疫期(日)	苗别	免疫保护数	对照死亡数
1977. 5. 13	1977. 8. 13	3	7711	2/2	3/3
1977. 5. 13	1977. 8. 13	3	7724	2/2	
1977. 5. 13	1977. 11. 13	6	7711	3/3	3/3
1977. 5. 13	1977. 11. 13		7724	3/3	
1977. 5. 13	1978. 2. 13	9	7711	3/3	3/3
1977. 5. 13	1978. 2. 13		7724	3/3	
1977. 5. 13	1978. 5. 13	12	7711	4/4	3/3
1977. 5. 13	1978. 5. 13		7724	2/2	

由表3看出: 接种猪瘟细胞苗的试验猪经强毒攻击后, 全部健活, 而同批对照猪全部死亡。说明猪瘟细胞苗免疫猪只后, 在猪体内可产生良好的免疫力。家兔效价5万倍或2万倍合格的疫苗, 免疫持续时间可达1年。

表4 细胞苗保存期试验(28°~30°C)

保存温度	保存时间	批号	原毒价	保存后毒价		
				2万倍	4万倍	5万倍
28—30°C	-15°C冷库保存8个月后移入28—30°C 7天	702	++ +	++ ± → ++	++ ++	± - 攻 +
		707	++ ++	++ +	未做	
		710	++ ++	++ ++	++ ++	- - 攻 ++
		711	++ ++		++ ++	++ - 攻 +++
-15°C冷库	一年	711		++ ± → ++ +		++ ± → ++ ++
		712	++ +	++ ± → ++ +		++ 攻 - -
		713	++ ++	++ ++		++ ++

8. 猪瘟细胞苗保存期试验: 将猪瘟冻干细胞苗702、707、710、711批在-15°C冰库中

保存8个月,取出放在28°~30℃温箱内保存7天,毒价稍有损失,一般由5万倍降至4万倍,但个别批号仍能保持原效价。同批苗在冰库保存一年测定毒价,其结果仍保持原效价,见表4:

细胞苗在25℃保存10天试验结果如表5:

表 5

批 号	收 毒 日 期	冻 干 日 期	原毒价 5 万倍	-15℃冷库 存 放	25℃保存10 天 5 万倍	低温样品 5 万 倍
77036—1	76. 12. 21	77. 3. 25	++ ++	1 年	++ ++	++ ++
77038—2	76. 12. 21	77. 3. 29	++ ++	1 年	++ -	++ ++
7801—1	77. 11. 13	77. 12. 30	++ ++	3 个月	++ ++	++ ++
7802—1	77. 11. 13	78. 1. 2	++ ++	76 天	++ ++	++ ++
7803—1	77. 11. 17	78. 1. 6	+ ++	72 天	++ ++	++ ++

表5中,采取77036—1, 77038—2, 7801—1, 7802—1, 7803—1细胞冻干苗,从低温冷库取出样品作对照,用兔测毒结果,保存前后无明显差异。

(三) 小结

1. 猪瘟兔化弱毒能在仔猪肾细胞上生长繁殖,但不产生病变,利用大瓶旋转培养能生产疫苗,并能连续四次收毒,产量大。

2. 用仔猪肾细胞生产的猪瘟细胞苗,对家兔的毒价可达5万倍,对猪有良好的免疫力,使用时以100倍稀释1毫升给猪免疫,相当于500个免疫剂量,其质量优于用乳兔生产疫苗。注苗后,其免疫期可达一年。疫苗在低温-15℃保存一年,毒价没有变化,在高温(28°~30℃)保存其毒价稍有下降。

3. 利用细胞毒作种毒生产疫苗,控制在5代以内,具有毒价高,生产方便,减少污染的缺点,对猪的免疫原性没有变化。

4. 初步明确了在营养液中用牦牛血清,2~3岁黄牛血清和马血清可以代替初生犏牛血清。为生产细胞苗扩大了血清来源。

(四) 冻干疫苗制造及检验试行规程

1. 毒种

(1) 制造猪瘟兔化弱毒细胞培养冻干疫苗的毒种,由农业部兽医药品监察所鉴定、保管和供应。

(2) 毒种必须符合下列标准:

- ① 用作毒种的材料,必须是定型热反应兔的脾脏。
- ② 脾毒对兔的最小感染量不低于10,000倍稀释1毫升。
- ③ 脾毒对猪的最小免疫量不低于10,000倍稀释1毫升。
- ④ 毒种仅使家兔产生热反应,不致死家兔。
- ⑤ 毒种通过仔猪肾细胞不产生病变。
- ⑥ 毒种必须无菌。

(3) 制造细胞苗的毒种应用新鲜含毒的脾组织,在-15℃以下保存不得超过1个月。

亦可用仔猪肾细胞培养三代以内,第2—3批收含毒培养液,对兔最小感染量不低于5万倍者作生产种毒。生产种毒在-15℃保存不得超过两个月。

2. 仔猪肾单层细胞的制备

(4) 仔猪的选择: 选用20日龄以内的健康仔猪采取猪肾制备肾细胞。其猪群可作传染病预防注射, 应注意猪群不得有猪瘟及其它传染病流行。

(5) 肾细胞制备:

仔猪放血致死后经体表消毒, 以无菌手续采取肾脏, 去被膜及肾盏、肾盂部分, 剪成1~3毫米小块, 用洗液洗涤至上清液清亮为止。

消化: 将组织块移入装有4~6倍量0.25%胰酶溶液的容器中, 塞紧瓶口。置37℃水浴消化30~60分钟(不包括预热时间), 中间每隔10分钟轻摇一次。消化到时不再振摇, 以便除去胰酶溶液。

(6) 细胞分散及培养:

弃去胰酶溶液后, 加入营养液, 以玻璃珠振摇法或吹打法分散细胞, 反复进行3~6次, 用2~4层纱布过滤, 收集细胞悬浮, 以营养液稀释至每毫升含细胞50~80万个; 分装培养瓶, 装量为容器容积的十分之一, 塞紧瓶口, 置35~37℃进行培养。

旋转培养的转速以每小时8~10转为宜, 已培养的细胞一般于第3~5天长成致密单层。

3. 接毒和收获

(7) 接毒: 取单层细胞形成良好的培养瓶弃去营养液, 接种含0.1~0.3%脾毒或2~4%细胞毒的维持液继续培养。

(8) 收获:

接毒后每四天收获换液一次, 收1~5批及连同细胞收获的全毒, 对家兔毒价不低于5万倍并经检验无菌者作为制苗材料。收获液应在-15℃以下保存, 时间不超过2个月。在培养过程中如有细胞发生异常变化或污染不得用于制苗。

4. 疫苗的配制和冻干

(9) 配制细胞苗的保护剂为5%蔗糖脱脂牛奶, 一般每毫升收获液加保护剂4毫升配苗, 可按每毫升疫苗加入青霉素和链霉素各500单位。

疫苗的冻干按猪瘟兔化弱毒冻干苗曲线进行。

5. 疫苗的检验

(10) 无菌检验: 按《成品检验的有关规定》进行, 冻干后每毫升收获液含非病原菌不得超过5000个。

(11) 安全检验:

①同批配制的原苗, 同时分若干柜批冻干者, 可各柜抽样品1~2瓶, 10倍稀释等量混合, 肌肉注射未经猪瘟免疫体重10~20公斤断奶仔猪2头, 每头5毫升。测量观察10~14日, 允许有轻微体温反应, 但不得有猪瘟及其他传染病的临床病状及死亡。如有可疑, 应用加倍动物重检一次, 发现不安全, 经确证来自疫苗, 则疫苗应全部废弃。

②生产口蹄疫苗的厂, 应按上述规定抽样混合, 加用乳鼠进行安检, 将疫苗10倍稀释, 注射3~5日龄乳鼠5只, 每只皮下注射0.2毫升, 观察7日, 应健活。或以10倍稀释疫苗肌肉注射7~10日龄健康乳猪2头, 每头5毫升, 观察10日应健活。

③每批疫苗均应用海猪、小白鼠安检。

(12) 效力检验: 检验办法和制定标准与猪瘟乳兔苗相同。

①用家兔效检: 每批疫苗抽样一瓶(或两瓶混合)按收获液量稀释至50,000倍或20,000倍, 接种两只家兔; 每兔耳静脉1毫升。其判定方法和重检次数均按猪瘟兔化弱毒冻干疫苗

的规程。

②用猪效检：同猪瘟兔化弱毒冻干疫苗检验。

(13) 剩余水分测定：按《成品检验的有关规定》进行。

(14) 真空度测定：按《成品检验的有关规定》进行。

(15) 物理性状检验：按《成品检验的有关规定》进行。

(16) 留样：按《成品检验的有关规定》进行。

6. 疫苗的使用剂量

(17) 用家兔测定，效检50,000倍合格的疫苗按猪效检10,000倍计算，每头份100个免疫剂量使用，20,000倍合格的疫苗按猪效检10,000倍计算，每头份150个免疫剂量使用。

7. 疫苗的保存和运输

同猪瘟兔化弱毒冻干疫苗。

(五) 附录

溶 液 配 制 法

(1) 汉氏液

成份：	1000毫升	10倍浓缩液含
甲、	氯化钠	80.0克
	氯化钾	4.0克
	氯化钙（无水）	1.4克（单溶）
	硫酸镁（7H ₂ O）	2.0克
乙、	磷酸氢二钠（12H ₂ O）	1.52克
	磷酸氢二钾	0.6克
	葡萄糖	10克
	酚红（0.4%）	50毫升

配法：甲、乙分别用无离子水或双蒸水溶液，将乙液倒入甲液，补足水量至1000毫升，置4℃保存，配用时，以无离子水稀释10倍116℃高压灭菌10~20分钟。

(2) 洗液

汉氏液用碳酸氢钠溶液调pH7.0~7.2，青霉素和链霉素各100单位/毫升。

(3) 0.5%乳汉液

成分：水解乳蛋白 5克

汉氏液 1000毫升

溶解，分装。116℃高压灭菌10~20分钟。

(4) 0.25%胰酶溶液

成分：胰蛋白酶（细胞培养用活力1:250）1克

汉氏液 400毫升

配法：室温充分溶解后，滤过除菌，结冻保存。用前用碳酸氢钠溶液调pH7.4~7.6。

(5) 7.5%碳酸氢钠溶液

成分：碳酸氢钠（试剂）75克

无离子水 1000毫升

配法：充分溶解后，滤过除菌，置0~4℃保存。

(6) 细胞营养液

成分：犏牛血清 10毫升
0.5%乳汉液 100毫升
青霉素和链霉素各加 100单位/毫升。
用碳酸氢钠溶液pH调7.0~7.2。

(7) 维持液:

同营养液, 但血清含量可减少至 5%, pH调至7.4~7.6。

(8) 亦可用欧氏 (Earle) 液作基础盐溶液、成分

每1000毫升	10倍浓缩液含
氯化钠	68.5克
氯化钾	4 克
硫酸镁 (7 H ₂ O)	2 克
磷酸二氢钠 (2 H ₂ O)	1.6克
氯化钙	2 克
葡萄糖	10克
酚 红 (1%)	2 毫升

三、鸡新城疫 I 系细胞苗的研究

(一) 试验材料和方法

1. 种毒: 中监所16代冻干毒, 传鸡胚一代, 用鸡胚测毒 10^{-5} 0.1cc5/5、 10^{-6} 0.1cc5/5。

2. 鸡胚成纤维细胞的制备方法按常规:

营养液成份: 水解乳蛋白 0.5%
犏牛血清 5~10%
双抗 (1万单位、微克/毫升) 1%
7.5%碳酸氢钠溶液 0.5%
pH 7.0~7.2。

选用10日龄鸡胚, 用无菌操作, 采取胎儿, 去眼、嘴、足, 剪碎, 用0.25%胰酶 (Difco活力1:250) 于37℃~38℃水浴箱中消化23分钟左右, 脱酶1~2次再用营养液稀释到所需要的细胞后, 分装于1万毫升玻璃瓶中, 每瓶装量1000毫升, 置于卧式转瓶机上, 每小时12.5转, 培养温度为37~37.5℃。

3. 接毒: 细胞形成单层后, 按细胞瓶中营养液量分别按0.1%、0.01%、0.001%三种不同种毒量接种, 在接种时补加7.5%碳酸氢钠10毫升, 调整pH7.3~7.4左右, 继续培养。

4. 收获: 接毒后24小时, 细胞陆续出现病变, 细胞圆缩病变区呈网眼状, 在细胞较稀处, 可看到明显的干枝梅样, 振摇, 连细胞收获, 冻结保存。

5. 收获液经冻融后, 按兽医生物药品规程, 用鸡进行测毒。

6. 用 10^{-6} 胚检全死, 合格的收获液按 1:7 加 5%蔗糖脱脂奶作保护剂, 瓶装 4 毫升制成冻干苗。

(二) 试验结果

1. 鸡新城疫 I 系细胞毒对鸡胚毒价测定: 根据各协作单位多次进行试验, 证明鸡新城疫 I 系弱毒能在鸡胚细胞上繁殖, 并产生病变, 以不同稀释度的细胞毒对鸡胚测定毒价, 一

般其毒价均能达到 10^{-5} 。对鸡有良好的免疫效力, 但比原鸡胚疫苗毒价低 1~2 个滴度, 为了提高毒价, 成都兽医生物药品厂提出了用 1/10 万的接毒量, 可以提高毒价到 10^{-6} 。经各协作单位试验, 明确了不同接毒量对毒价有一定关系。其主要试验结果如表 1, 2, 3

表 1 不同接毒量与毒价关系

批 次	细胞数 (万/ml)	接毒量	鸡胚测毒毒价			批 次	细胞数 (万/ml)	接毒量	鸡胚测毒毒价		
			10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}				10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
7502	150	0.001%		5/5	5/5	7610	187	0.1%	5/5	3/5	1/5
7505	150	0.001%		5/5	5/5	7611	134	0.1%	5/5	4/5	2/5
7607	201	0.1%	5/5	5/5	3/5	7612	175	0.1%	5/5	4/5	3/5
7609	185	0.1%	5/5	5/5	0/5	7613	166.5	0.1%	5/5	5/5	1/5

表 2 不同接毒量对毒价关系

批 号	瓶 号	接 毒				收 毒			效价测定 (胚检)				备 注
		细胞培 养时间 (时)	细胞 生长 情况	接毒量 %	加Na 量 (ml)	时 间 (时)	病 变	pH	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	血	
									0.1 cc	0.1 cc	0.1 cc	凝	
1	1	48	良好	0.1	10	40	井	7.0		3/4		80×	
	2	48	良好	0.01	10	40	〃	7.0		4/4		〃	
	3	48	一般	0.01	10	40	〃	7.0		2/4		〃	
2	1	46	一般	0.01	10	37	井	7.0	4/4	2/4		80×	
	2	46	良好	0.01	10	37	〃	7.0	4/4	4/4		〃	
	3	46	良好	0.001	10	37	〃	7.0	4/4	4/4	1/3	〃	
	4	46	良好	0.001	10	37	〃	7.0	4/4	4/4	0/4	〃	
3	1	32	良好	0.001	10	38	井	7.0	4/4	3/4	0/4	80×	入冷库后 ⁴ 天未冻结
	2	32	良好	0.001	10	38	〃	〃	4/4	5/5	3/4	〃	
	3	32	良好	0.001	10	38	〃	〃	4/4	5/5	3/4	〃	
	4	32	一般	0.001	10	38	〃	〃	4/4	2/4	2/4	〃	
4	1	32	良好	0.001	10	38	井	7.0	3/4	5/5	2/3	80×	
	2	32	一般	0.001	16	38	〃	7.2	3/4	0/5	2/3	〃	
	3	32	良好	0.001	10	38	〃	7.0	4/4	5/5	1/4	〃	
	4	32	较差	0.001	10	38	〃	7.0	3/3	1/4	0/4	〃	

表 3 不同接毒量对毒价关系

批 号	接 毒 量 %	鸡 胚 测 定 毒 价			批 号	接 毒 量 %	鸡 胚 测 定 毒 价		
		10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}			10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
7714-1	0.5	5/5	0/4	—	7711-2	0.001	—	4/4	1/4
	0.001	—	4/4	—	7712-1	0.001	3/3	3/3	—
7715-1	0.5	—	0/4	—	7712-2	0.001	—	3/3	—
	0.001	—	4/4	—	7713	0.001	4/4	4/4	3/4
7711-1	0.001	—	4/4	1/4					

注: 表内分母为接种鸡胚数, 分子为死亡数。

从以上三个表看出, 接毒量与毒价高低有一定关系; 0.001%接毒量, 其毒价一般均能达到 10^{-6} 以上。而0.1%至0.5%的接毒量毒价达不到 10^{-6} 。

2. 鸡新城疫 I 系细胞苗冻干前后, 对鸡胚最小致死量比较如表 4。

表 4

批 次	冻 干 前	冻 干 后
7601	10^{-5}	10^{-5}
7607	10^{-6}	10^{-5}
7609	10^{-6}	10^{-6}
7610	10^{-5}	10^{-5}
7612	10^{-5}	10^{-5}
7613	10^{-6}	10^{-6}

从表 4 看, 除一批 (7607 批) 外, 其余各批毒价经冻干均未见下降。

3. 鸡新城疫 I 系细胞冻干苗对鸡的安全性及免疫性试验。

(1) 安全性试验: 共做了 5 批苗安全性试验, 每批疫苗使用 3 只鸡, 鸡龄为 2~4 月, 四川广汉县本地鸡, 注苗后观察 14 天, 结果如表 5:

表 5

批 次	稀 释 倍 数	注 射 剂 量 (毫升)	观 察 时 间 (天)	保 护 数 / 攻 毒 数
7602	10^{-2}	1	14	3/3
7603	10^{-2}	1	14	3/3
7604	10^{-2}	1	14	3/3
7606	10^{-2}	1	14	3/3
7701	10^{-2}	1	14	3/3

各批注射鸡只全部健活, 说明疫苗对鸡是安全的。

(2) 对鸡的免疫力测定

亦做了五批, 每批苗使用 3~8 月龄鸡, 并设对照鸡 5 只, 未作免疫, 攻击鸡新城疫强毒 (中监所供给的 F48 E 7 冻干毒种) 10^{-3} 稀释 1 毫升剂量, 相当于一万个致死量。结果如表 6:

表 6

批 次	稀 释 倍 数	注 射 剂 量 (毫升)	免 疫 日 数	保 护 数 / 攻 毒 数
7602	10^{-6}	1	14	3/3
7603	10^{-6}	1	14	3/3
7604	10^{-6}	1	14	3/3
7606	10^{-6}	1	14	3/3
7701	10^{-6}	1	14	3/3
对 照	未免疫、攻毒后死亡 4 只, 有 1 只耐过。			

注: 攻毒后观察 14 天。

从表 6 看出, 细胞培养冻干苗对鸡有很好的免疫力。

(3) 用鸡胚测毒与用鸡效价的比较结果如表 7:

表 7

批 次	免 疫 剂 量 (毫升)	鸡 检	鸡 胚 测 毒 毒 价	
		保护数/攻毒数	10^{-5}	10^{-6}
7602	10^{-6} 1	3/3	5/5	3/5
7603	10^{-6} 1	3/3	5/5	5/5
7604	10^{-6} 1	3/3	5/5	3/5
7606	10^{-6} 1	3/3	5/5	4/5
7701	10^{-6} 1	3/3	5/5	5/5

从表 7 看出, 冻干苗鸡胚测毒的最小致死滴度能达 10^{-5} 时, 则对鸡有坚强的免疫力。

(4) 鸡新城疫 I 系细胞苗免疫期试验结果如表 8。

表 8

批 号	免 疫 剂 量	免疫至攻毒时间	鸡 数	攻 毒 结 果	对 照
7601	10^{-2} 1 毫升	一 年	3	3/3 保护	2/3
	10^{-3} 1 毫升	一 年	2	2/2 保护	
7615	10^{-2} 1 毫升	一 年	2	2/2 保护	死亡
	10^{-3} 1 毫升	一 年	2	2/2 保护	
7617	10^{-2} 1 毫升	一 年	2	2/2 保护	2/3
	10^{-3} 1 毫升	一 年	3	3/3 保护	死亡
7601	10^{-3} 1 毫升	一年四个月	3	2/3 保护	3/3 死亡

从表 8 看出, 鸡新城疫 I 系细胞苗, 对鸡的免疫期至少一年以上。

(5) 鸡新城疫 I 系细胞冻干苗保存性测定结果如表 9、10。

表 9 30℃ 保 存 性 测 定

批 号	保 存 前 鸡 胚 毒 价			保存后10天鸡胚毒价	
	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-5}	10^{-6}
7801	4/4	4/4	3/4	5/5	2/5
7802	4/4	4/4	2/4	5/5	3/5
7803	4/4	2/4	1/4	5/5	1/5

表10 28℃保存 7天和10天测定结果

批 号	原 毒 价	保存天数	鸡 胚 毒 价 及 血 凝 价			
			10^{-5}	血凝价	10^{-6}	血凝价
C ₅	10^{-6} 5/5	7 天	3/5	160	1/4	—
		10天	3/5	320	1/4	—
C ₇	10^{-6} 4/5	7 天	5/5	160	1/4	160
		10天	3/5	160	1/4	—

注: 分母为接种鸡胚数, 分子为死亡数。

疫苗在高温保存7~10天,毒价有下降,尚需进一步提高疫苗的保存性能。

疫苗在低温的保存性能试验结果如表11:

表 11

批 号	原冻干苗毒价	-15℃保存时间	鸡 胚 毒 价 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁶
7703	10 ⁻⁵ 5/5	11个月	5/5 5/5
	10 ⁻⁵ 5/5	11个月	5/5 5/5
7713	10 ⁻⁵ 5/5	一年零15天	5/5 5/5
	10 ⁻⁶ 5/5	一年零15天	5/5 5/5
70—3	10 ⁻⁶ 5/5	一 年	5/5 4/5

注:疫苗在-15℃保存一年,毒价无下降。

(6) 其他试验:为提高鸡新城疫I系细胞苗的毒价、曾用IBRS₂猪肾传代细胞进行试验,将鸡新城疫I系病毒,连续在IBRS₂传代细胞传9~10代,毒价没有表现提高,其毒价仍能达到10⁻⁵~10⁻⁶。免疫鸡均能得到保护。为代替用鸡胚测毒、曾进行了细胞管测毒与鸡胚测毒的对比试验。初步看出细胞管(观察病变)比鸡胚测毒要高1~2个滴度,若用于检验细胞苗的效价,尚需进一步测定,加以明确。

(三) 小结

鸡新城疫I系弱毒,能在鸡胚细胞上繁殖,并能产生病变,用细胞培养方法生产的疫苗,对鸡胚毒价可达到10⁻⁶。对鸡有良好免疫效力。疫苗的免疫期初步测定可达1年以上。疫苗在低温(-15℃)保存一年,毒价没有变化。在高温(28~30℃)条件下、其毒价有明显下降,一般降低1个滴度。

(四) 冻干苗制造及检验试行规程

1. 毒种 同“鸡新城疫I系弱毒疫苗制造及检验规程”有关毒种的规定。供生产用的毒种传代不应超过两代。

2. 鸡胚单层细胞的制备

(1) 鸡蛋的选择及孵化:制造疫苗用的鸡蛋,宜采用受精率较高、确为健康鸡群所产的新鲜鸡蛋,清除蛋壳外的污物,置38.5~39℃孵卵器内孵化,其相对湿度最好保持60~70%。

(2) 鸡胚细胞的制备:选择9~11日龄发育良好的鸡胚,用0.1%新洁尔灭消毒卵壳,再由碘酒棉消毒气室部位,按无菌操作手续,取其胎儿,去眼,剪碎,用0.25%的胰酶溶液,37~38℃水浴消化,制成细胞悬液。然后以含5~10%的牛血清,0.5%水解乳蛋白汉克氏液,加入青霉素100单位/毫升,链霉素100微克/毫升,pH7.0~7.2作为营养液,稀释成每毫升含细胞数80~150万,分装于培养瓶中,36~37℃进行培养,在形成良好单层,即可进行接毒。

3. 培养和收获

(3) 接毒:取良好的单层细胞瓶,按培养液量直接接入1/万~1/10万的毒种,pH不低于7.2,继续培养。

(4) 培养:接毒后观察细胞病变,待75%以上的细胞单层出现病变,即病变在(+++)

以上，细胞圆缩，色暗不透明，折光率变强、或呈现干枝梅样，即可收毒，一般在40小时左右。

(5) 收获：将病变达(++)以上的培养瓶摇下细胞收获全毒，即为原苗。分装于无菌容器内，经无菌留样后，保存于 $-15^{\circ}\sim-20^{\circ}\text{C}$ 冷库中，以备冻干。保存时间不得超过二个月。

4. 原苗毒价测定

(6) 取经冻融的原苗，以灭菌生理盐水稀释成 10^{-6} 和 10^{-7} 二个滴度，用0.1毫升剂量分别接种5个鸡胚，观察24~72小时鸡胚死亡情况，并观察病变，判定原苗毒价。

5. 疫苗的配制和冻干

(7) 选取 10^{-6} 滴定测毒，鸡胚全死的原苗进行冻干，以5%蔗糖脱脂乳作保护剂，按每毫升加入青霉素、链霉素各500~1000单位，充分混合后，分装冻干、冻干曲线与鸡I系弱毒冻干苗相同。

6. 疫苗的检验

(8) 无菌检验，按《成品检验有关规定》进行。

(9) 安全检验，同鸡新城疫I系弱毒冻干苗。

(10) 效力检验，每批疫苗用 10^{-6} 稀释度接种10日龄鸡胚5个，每个胚尿囊0.1毫升，观察24~72小时，鸡胚应全部死亡，血凝价在1:80以上、疫苗判合格，允许重检一次。疫苗的使用剂量同I系弱毒冻干苗。鸡胚检验不及格，可再用 10^{-6} 稀释度，用鸡作效检，方法同鸡新城疫I系弱毒冻干疫苗。

(11) 水份测定按《成品检验的有关规定》进行。

(12) 真空度测定按《成品检验的有关规定》进行。

(13) 物理性状检验按《成品检验的有关规定》进行。

(14) 成品留样按《成品检验的有关规定》进行。

7. 疫苗的保存 自细胞毒液收获日期算起，疫苗在 -15°C 以下保存暂定不超过一年。疫苗在 $0^{\circ}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存暂定不超过3个月。在 $10^{\circ}\sim 15^{\circ}\text{C}$ 保存暂定不超过一个月。在 $25^{\circ}\sim 30^{\circ}\text{C}$ 保存不超过5天。

8. 疫苗的使用 同鸡新城疫I系弱毒冻干疫苗。

四、羊痘弱毒羊睾丸细胞苗试验

(一) 试验材料和方法：

1. 种毒：系农业部兽医药品监察所提供的羊痘鸡胚化弱毒，在绵羊丘疹疫苗生产中，用绵羊继代至第8~9代，对绵羊毒力 10^{-5} 。

2. 细胞：绵羊睾丸原代细胞，用初生至性成熟前公羊睾丸制备细胞。细胞营养液为含0.5%水解乳蛋白的而氏(Earle)液，含牛血清5~10%。培养瓶有三种：100毫升小方瓶装12毫升，有效培养面 36cm^2 。2500毫升圆瓶旋转培养装250毫升，有效培养面 720cm^2 ，转速每小时15转；15000毫升圆瓶装1500毫升培养面积 3060cm^2 ，转速每小时10转。培养温度 $36\sim 37^{\circ}\text{C}$ ，一般于培养4~6天长成单层。

羊胎睾丸，羊胎肾，羊胎皮肤继代细胞：系杀母取胎制备细胞，细胞营养液为0.5%水解乳蛋白而氏液和Eaglas-MEM各半加10%小牛血清，用胰酶-EDTA溶液分散再培养，在

试验室传至第九代废弃。

3. 接毒和收获：丘疹毒初代接种细胞在小方瓶进行。将生长良好单层细胞弃去培养液。每瓶接种10倍稀释丘疹乳剂（乳钵捣碎加E—LH液抽上液）36℃吸附30~50分钟，充分洗净细胞，换入维持液继续培养。

用细胞毒接毒方法，细胞病变在后文细胞苗试制中将提到。病毒收获采用冻融方法。

4. 疫苗的检验：无菌、水份、杂菌计数由监察室检验，安全、效力、保存期、本动物效检等由试验组自检。检验羊购自甘肃会宁等县，未注射过羊痘苗，1~4岁，对羊痘敏感。量痘时，局部进行剪毛，以期与尾部测量结果相近。

（二）试验结果：

1. 羊痘弱毒对四种细胞的适应性：表1、2系羊痘弱毒在不同细胞适应性两次比较结果，试验中，种毒、维持液、接毒操作、测毒羊等条件尽可能一致，其结果如下：

表1 羊痘弱毒对不同细胞的适应性

日期	种 毒		种 毒 毒 价	细 胞				收 获		毒 价		备 注
	羊代数	羊号		种 类	代数	日 龄	密 度	时 间 (时)	病(变 (%)	《规程》	《规程》 下	
11/3 1977	8	85	10 ⁻⁵	胎 辜	6	4	井	158	50	10 ⁻⁵		
	8	85		胎 皮	6	4	"	84	70	10 ⁻⁵		
	8	85		胎 肾	6	3	"	96	60	10 ⁻⁴		
	8	85		IBRS ₂	100	7	"	60	80	—		
"	"	86	10 ⁻⁵	胎 辜	6	4	"	158	50	10 ⁻⁵	10 ⁻³	
	"	"		胎 皮	6	4	"	70	70			
	"	"		胎 肾	6	3	"	128	50	10 ⁻³		
	"	"		IBRS ₂	100	7	"					
"	9	30	10 ⁻⁵	胎 辜	6	4	"	158	50	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
	"	"		胎 皮	6	4	"	60	70	—		
	"	"		胎 肾	6	3	"	158	30	10 ⁻³		
	"	"		IBRS ₂	100	7	"	60	80	10 ⁻³		
"	"	33	10 ⁻⁵	胎 辜	6	4	"	158	50		10 ⁻⁴	
	"	"		胎 皮	6	4	"	60	60	—		
	"	"		胎 肾	6	3	"	84	50			10 ⁻³
	"	"		IBRS ₂	100	7	"	60	60	—		

注：《规程》反应系按规程标准潜伏期稽留期判定合格者。

《规程》下反应系潜伏期长稽留达不到标准者。

试验表明，羊痘弱毒可以在胎羊辜丸、胎羊肾、胎羊皮肤细胞繁殖。

2. 羊痘弱毒在羊辜丸细胞传代试验：将羊痘弱毒（E116S₁反8）在羊辜丸细胞传10代，其安全性和对羊毒价无明显变化，结果如表3。

又根据《规程》规定，将干苗7708批（5代毒）10倍稀释静脉注射敏感绵羊2只，观察14天，无全身痘出现，符合规程标准。

3. 细胞冻干苗的试制：从七七年四月开始，共试制辜丸细胞苗14批，其中扁瓶苗4批小转瓶苗5批，大转瓶（15000毫升瓶）苗5批，质量均达到《规程》标准。试制工艺简述如下：