



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105548536 B

(45)授权公告日 2018.10.16

(21)申请号 201510907101.1

(22)申请日 2015.12.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105548536 A

(43)申请公布日 2016.05.04

(73)专利权人 天津瑞普生物技术股份有限公司
地址 300308 天津市滨海新区空港经济区
环河北路与中心大道交口空港商务园
西区W2

(72)发明人 丁旭娜 吕茂杰 杨保收 付旭彬
梁武

(74)专利代理机构 天津合志慧知识产权代理事
务所(普通合伙) 12219
代理人 张勇

(51)Int.Cl.
C07K 16/08(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)
G01N 21/76(2006.01)

(56)对比文件

CN 104208668 A,2014.12.17,
CN 103864931 A,2014.06.18,
CN 103123350 A,2013.05.29,
CN 102012433 A,2011.04.13,
CN 101915850 A,2010.12.15,
CN 101839914 A,2010.09.22,
CN 103777022 A,2014.05.07,
CN 101524536 A,2009.09.09,
CN 102327607 A,2012.01.25,
CN 102327609 A,2012.01.25,
周志军等.人抗乙脑病毒IgG抗体检测试剂
盒的研制和应用.《微生物学免疫学进展》.2006,
第34卷(第3期),
周志军等.人抗乙脑病毒IgG抗体检测试剂
盒的研制和应用.《微生物学免疫学进展》.2006,
第34卷(第3期),

审查员 黄晓丽

权利要求书1页 说明书12页

(54)发明名称

一种猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清的制备
方法

(57)摘要

本发明提供了一种猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清的制备方法,该方法包括疫苗的制备、阴性猪的筛选、免疫接种、阳性血清的收获及鉴定。本发明首先通过猪乙型脑炎活疫苗(SA14-14-2株)进行对阴性猪进行基础免疫,然后使用经浓缩纯化技术制备的高效价的猪乙型脑炎灭活疫苗(SA14-14-2株)进行强化免疫制备猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清。以本发明制备的猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清,相对于使用乙脑强毒制备阳性血清,避免了使用强毒的风险,具有安全性高的优点;同时使用猪制备阳性血清较小鼠收获的血清量大,相对成本较低,具有突出的规模化应用前景。

1. 一种猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清的制备方法,包括以下步骤:

1) 制备猪乙型脑炎疫苗;

2) 取步骤1) 所述疫苗对猪瘟病毒及其抗体、猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体、猪伪狂犬病毒及其抗体、猪圆环Ⅱ型病毒及其抗体均呈阴性的猪进行免疫接种;

3) 从步骤2) 免疫接种后的猪体内收获血清;

其特征在于:步骤1) 所述疫苗是以猪乙型脑炎病毒SA14-14-2株为抗原制备的;

同时:

步骤2) 所述的猪是2~3月龄健康猪,其猪乙型脑炎HI效价不高于1:4;

步骤2) 所述的免疫接种方法为:

A) 基础免疫:取步骤1) 制备的猪乙型脑炎活疫苗,每次以1~5头份的剂量注射2次,每次间隔13~17d;

B) 强化免疫:基础免疫13~17d后,取步骤1) 制备的猪乙型脑炎灭活疫苗,以肌肉注射的方式接种3~5次,相邻两次接种的时间间隔为7~10d,后一次接种的剂量是前一次接种剂量的1.5~2倍;

步骤B) 中首次注射的剂量为3~5mL。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于步骤3) 中所述血清的中和抗体效价高于1:400。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于步骤1) 所述的疫苗包括猪乙型脑炎活疫苗,其猪乙型脑炎病毒滴度高于 $10^{6.0}$ TCID₅₀/头份。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于步骤1) 所述的疫苗包括猪乙型脑炎灭活疫苗,该疫苗是将猪乙型脑炎病毒液进行超滤浓缩纯化后,使用β-丙内酯灭活,再使用ISA760VG佐剂进行乳化制备得到的;其中超滤浓缩的孔径是300KD,浓缩倍数是5~10倍。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于步骤1) 所述的疫苗包括猪乙型脑炎灭活疫苗,该疫苗的效价高于 $10^{9.0}$ TCID₅₀/ml。

6. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于步骤1) 所述的疫苗包括猪乙型脑炎灭活疫苗,该疫苗是将猪乙型脑炎病毒液进行超滤浓缩纯化后,使用β-丙内酯灭活,再使用ISA760VG佐剂进行乳化制备得到的;其中灭活包括以下步骤:以1:2000~1:8000的质量比向超滤浓缩后的猪乙型脑炎病毒液中加入β-丙内酯,于2~8℃灭活24~96h,而后置于35~39℃水浴水解1.5~2.5h。

7. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于步骤1) 所述的疫苗包括猪乙型脑炎灭活疫苗,该疫苗是将猪乙型脑炎病毒液进行超滤浓缩纯化后,使用β-丙内酯灭活,再使用ISA760VG佐剂进行乳化制备得到的;其中猪乙型脑炎病毒液与ISA760VG佐剂的混合比例为1:2~1:3,乳化时间5~10min。

一种猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物制品技术领域,具体涉及一种猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清的制备方法。

背景技术

[0002] 流行性乙型脑炎是由黄病毒科(Flaviviridae)黄病毒属(Flavivirus)的乙型脑炎病毒(Japanese Encephalitis Virus,JEV)引起的一种人兽共患虫媒性传染病。猪感染乙型脑炎形成病毒血症,被认为是人类乙型脑炎流行的主要传染源,因此,防制猪乙型脑炎不但可以减少养猪业的损失,而且也是预防人患乙型脑炎的重要措施。其主要引起母猪和公猪的繁殖障碍,主要表现为怀孕母猪流产、死胎、产弱仔、公猪睾丸炎等,常常给养猪业造成严重的经济损失。

[0003] 疫苗是预防该病的主要方法之一。目前,我国商品化的猪乙型脑炎疫苗主要是鼠脑灭活疫苗和弱毒疫苗,为保证疫苗的特异性和纯净性,鉴别检验和外源病毒检验为该疫苗质量检验的必检项目。目前,猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清主要应用于猪乙型脑炎活疫苗的鉴别检验、外源病毒检验以及诊断检测等用途。

[0004] 目前尚未见有猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清制备方法的报道。一般高免血清的制备方法为:首先使用疫苗或弱毒株进行基础免疫,然后使用强毒进行强化免疫以刺激机体产生强免疫应答,获取高免血清,如猪瘟高免血清的制备方法。猪乙型脑炎作为人兽共患传染病,采用强毒攻击,制备环节中对于人的防护及攻毒设施要求较高,并对人类健康存在较大的潜在威胁。

发明内容

[0005] 本发明旨在针对现有技术的技术缺陷,提供一种猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清的制备方法,以解决现有技术中缺乏相关方法的技术问题。

[0006] 本发明要解决的另一技术问题是猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清制备环节安全性较低。

[0007] 为实现以上技术目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 一种猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清的制备方法,包括以下步骤:

[0009] 1) 制备猪乙型脑炎疫苗;

[0010] 2) 取步骤1)所述疫苗对猪瘟病毒及其抗体、猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体、猪伪狂犬病毒及其抗体、猪圆环Ⅱ型病毒及其抗体均呈阴性的猪进行免疫接种;

[0011] 3) 从步骤2)免疫接种后的猪体内收获血清;

[0012] 在此基础上,步骤1)所述疫苗是以猪乙型脑炎病毒SA14-14-2株为抗原制备的。

[0013] 作为优选,步骤2)所述的猪是2~3月龄健康猪,其猪乙型脑炎HI效价不高于1:4。

[0014] 作为优选,步骤2)所述的免疫接种方法为:

[0015] A) 基础免疫:取步骤1)制备的猪乙型脑炎活疫苗,每次以1~5头份的剂量注射2

次,每次间隔13~17d;

[0016] B) 强化免疫:基础免疫13~17d后,取步骤1) 制备的猪乙型脑炎灭活疫苗,以肌肉注射的方式接种3~5次,相邻两次接种的时间间隔为7~10d,后一次接种的剂量是前一次接种剂量的1.5~2倍。

[0017] 在此基础上进一步优选的,步骤B) 中首次注射的剂量为3~5mL。

[0018] 作为优选,步骤3) 中所述血清的中和抗体效价高于1:400。

[0019] 作为优选,步骤1) 所述的疫苗包括猪乙型脑炎活疫苗,其猪乙型脑炎病毒滴度高于 $10^{6.0}$ TCID₅₀/头份。

[0020] 作为优选,步骤1) 所述的疫苗包括猪乙型脑炎活疫苗,该活疫苗是将JEV毒液加入冻干保护剂经冷冻干燥制成的。

[0021] 作为优选,步骤1) 所述的疫苗包括猪乙型脑炎灭活疫苗,该疫苗是将猪乙型脑炎病毒液进行超滤浓缩纯化后,使用β-丙内酯灭活,再使用ISA760VG佐剂进行乳化制备得到的;其中超滤浓缩的孔径是300KD,浓缩倍数是5~10倍。

[0022] 作为优选,步骤1) 所述的疫苗包括猪乙型脑炎灭活疫苗,该疫苗的效价高于 $10^{9.0}$ TCID₅₀/ml。

[0023] 作为优选,步骤1) 所述的疫苗包括猪乙型脑炎灭活疫苗,该疫苗是将猪乙型脑炎病毒液进行超滤浓缩纯化后,使用β-丙内酯灭活,再使用ISA760VG佐剂进行乳化制备得到的;其中灭活包括以下步骤:以1:2000~1:8000 (w/w) 的比例向超滤浓缩后的猪乙型脑炎病毒液中加入β-丙内酯,于2~8℃灭活24~96h,而后置于35~39℃水浴水解1.5~2.5h。

[0024] 作为优选,步骤1) 所述的疫苗包括猪乙型脑炎灭活疫苗,该疫苗是将猪乙型脑炎病毒液进行超滤浓缩纯化后,使用β-丙内酯灭活,再使用ISA760VG佐剂进行乳化制备得到的;其中猪乙型脑炎病毒液与ISA760VG佐剂的混合比例为1:2~1:3,乳化时间5~10min。

[0025] 作为优选,步骤3) 中在收获血清之前,先使用猪乙型脑炎病毒ELISA抗体试剂盒以及蚀斑减少中和试验测定血清中和效价;在此基础上进一步优选的,上述效价的测定时间是步骤2) 最后一次免疫接种后第5~10d。

[0026] 作为优选,步骤3) 中是通过前腔静脉放血的方式收获血清的。

[0027] 在以上技术方案中,所述猪乙型脑炎病毒SA14-14-2株是常规毒株,由本公司种毒室鉴定、保存;ISA760VG佐剂是商品名,特指由法国赛比克公司出品的、型号为ISA760VG的疫苗佐剂产品,亦可自市面购得。

[0028] 本发明方法所制备的猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清可用于猪乙型脑炎活疫苗的鉴别检验和外源病毒检验以及诊断检测等用途。在该技术方案中,乙型脑炎病毒SA14-14-2株具有可靠的安全性和良好的免疫原性,乙型脑炎的仅有一个血清型,不同毒株在毒力和血凝特性上存在差异,但在抗原性上无明显差异。因此,使用SA14-14-2株免疫猪制备猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清,避免使用强毒,具有安全性高的优点。此外,乙型脑炎在实验动物以小鼠最为敏感,豚鼠、大鼠和家兔不敏感,然而使用小鼠制备阳性血清,收获的血清量较少,不适合大规模应用。使用猪制备阳性血清较小鼠收获的血清量大,相对成本较低,具有突出的规模化应用前景。

具体实施方式

[0029] 以下将对本发明的具体实施方式进行详细描述。为了避免过多不必要的细节,在以下实施例中对于属于公知的结构或功能将不进行详细描述。

[0030] 以下实施例中所使用的近似性语言可用于定量表述,表明在不改变基本功能的情况下可允许数量有一定的变动。因此,用“大约”、“左右”等语言所修正的数值不限于该准确数值本身。在一些实施例中,“大约”表示允许其修正的数值在正负百分之十(10%)的范围内变化,比如,“大约100”表示的可以是90到110之间的任何数值。此外,在“大约第一数值到第二数值”的表述中,大约同时修正第一和第二数值两个数值。在某些情况下,近似性语言可能与测量仪器的精度有关。

[0031] 除有定义外,以下实施例中所用的技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员普遍理解相同含义。

[0032] 以下实施例中所用的试验试剂耗材,如无特殊说明,均为常规生化试剂;所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值;以下实施例中的%,如无特别说明,均为质量百分含量。

[0033] 实施例1(猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清的制备)

[0034] 1 疫苗的制备

[0035] 1.1 猪乙型脑炎活疫苗(SA14-14-2株)的制备与检验

[0036] 1.1.1 活疫苗制备将经无菌检验合格的JEV毒液,加入适宜的冻干保护剂,同时加入适宜的抗生素,充分均匀,按规定头份定量分装后,迅速进行冷冻真空干燥制成猪乙型脑炎活疫苗(SA14-14-2株)。

[0037] 1.1.2 活疫苗检验将1.1.1制成的猪乙型脑炎活疫苗进行物理性状、真空度、剩余水分、无菌检验、支原体检验、外源病毒检验、鉴别检验、安全性检验和效力检验(病毒含量测定),结果全部合格。其中配苗用JEV毒液的病毒含量经测定为 $10^{8.0}$ TCID₅₀/ml,制成猪乙型脑炎活疫苗(SA14-14-2株)后的病毒含量经测定为 $10^{6.6}$ TCID₅₀/头份。

[0038] 1.2 猪乙型脑炎灭活疫苗(SA14-14-2株)的制备

[0039] 1.2.1 灭活疫苗制备

[0040] 1.2.1.1 毒液浓缩、灭活将经无菌检验合格的JEV毒液使用300KD的超滤膜包进行7倍浓缩后按1:4000的比例加入β-丙内酯,置2~8℃搅拌灭活44h后,置37℃水解2h。

[0041] 1.2.1.2 乳化将上述1.2.1.1项水解完成的毒液与赛比克的新型佐剂ISA760VG以2:3的比例使用剪切机进行乳化,剪切的时间共为6min,将乳化好的疫苗定量分装即制成猪乙型脑炎灭活疫苗(SA14-14-2株)。

[0042] 1.2.1 灭活疫苗检验将1.2.1项制成的猪乙型脑炎灭活疫苗进行剂型、稳定性和无菌检验等,结果各项检验全部合格。配苗用JEV毒液的病毒含量经测定为 $10^{8.6}$ TCID₅₀/ml,经浓缩后毒液的病毒含量经测定为 $10^{9.25}$ TCID₅₀/ml。将灭活后的毒液进行灭活检验,在细胞上盲传三代,结果表明该毒液不致细胞病变,即灭活完全。

[0043] 2 阴性猪的筛选选择3月龄健康易感营养良好的断奶仔猪1头(猪乙型脑炎HI效价不高于1:4),经检测猪瘟病毒及其抗体、猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体、猪伪狂犬病毒及其抗体、猪圆环Ⅱ型病毒及其抗体均为阴性,转入试验用猪栏隔离饲养观察7日,结果试验猪营养状况良好,未发现应激和其他疾病的发生。

[0044] 3 免疫接种

[0045] 3.1 活疫苗基础免疫:共2次。第一次每头猪颈部肌肉注射5头份的猪乙型脑炎活疫苗(SA14-14-2株),间隔14日,以同等剂量进行加强免疫1次。

[0046] 3.2 强化免疫:共3次。基础免疫完成后15日进行第一次猪乙型脑炎灭活疫苗(SA14-14-2株)的免疫,每头猪颈部肌肉注射4ml;间隔10天进行第二次灭活疫苗加强免疫,每头猪肌肉注射6ml;间隔7日进行第三次灭活疫苗加强免疫,每头猪肌肉注射8ml。

[0047] 4 阳性血清收获及鉴定

[0048] 4.1 阳性血清效价的检测最后1次免疫接种后10天采集少量猪血清,使用猪乙型脑炎病毒ELISA抗体试剂盒以及蚀斑减少中和试验测定中和效价,确认猪乙型脑炎病毒抗体为阳性且中和抗体效价为1:636。

[0049] 4.1.1 猪乙型脑炎病毒ELISA抗体的检测采用猪乙型脑炎病毒ELISA抗体检测试剂盒(购自武汉科前动物生物制品有限责任公司)对不同免疫时期采取的血清进行检测,操作参照产品说明书进行。结果见表1。

[0050] 表1 检测免疫前后的猪血清样ELISA抗体

[0051]

不同免疫期	S/P 值
免疫前	0.188
第一次基础免疫后 14 日	0.247
第二次基础免疫后 14 日	0.287
第一次加强免疫后 10 日	0.505
第二次加强免疫后 10 日	1.152
第三次加强免疫后 10 日	1.461
[0052] 第三次加强免疫后 15 日	1.388

[0053] 注:阴性对照OD值=0.08<0.2,P值等于1.539大于1.0。样品S/P值 \geq 0.21,判为猪乙型脑炎病毒抗体阳性,样品S/P值<0.21,判为猪乙型脑炎病毒抗体阴性。

[0054] 4.1.2 蚀斑减少中和试验测定中和抗体将第三次加强免疫后10日的血清,于0.22 μ m滤膜过滤后经56 $^{\circ}$ C灭活30分钟后进行此试验,步骤如下。

[0055] 4.1.2.1 选取适当稀释度的病毒液(约1000PFU/ml)500 μ l与等量倍比稀释(1:10,1:20,1:40,1:80,1:160,1:320,1:640,1:1280)待检血清混匀,另用同样稀释度的病毒液加上等量如上述稀释的稀释正常血清作对照,置37 $^{\circ}$ C作用90min,期间每隔15~20分钟摇匀一次。

[0056] 4.1.2.2 接种长满BHK-21的6孔细胞培养板,每个滴度接2孔,每孔0.2ml,吸附90分钟。

[0057] 4.1.2.3 加入甲基纤维素覆盖物,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中培养5日后,吸出覆盖物,用结晶紫染色,进行空斑计数。

[0058] 4.1.2.4 结果计算与正常血清对照相比,使蚀斑减少50%的血清稀释度为中和效价。待检血清中和效价 $Lg=L+d(S-0.5)L=1,d=0.3,S=$ 中和比值之和。经计算所测血清的

中和效价为1:636。

[0059] 4.2 阳性血清的收获于第三次加强免疫后15日采用前腔静脉放血的方式收获阳性血清500ml。将收获的阳性血清进行无菌检验、支原体检验及外源病毒检验,结果各项检验全部合格。

[0060] 4.3 阳性血清的应用效果将收获的阳性血清经56℃灭活30分钟后进行下述试验。

[0061] 4.3.1 特异性试验(鉴别检验)将灭活好的阳性血清用PBS(0.015mol/L,pH值7.4~7.6)稀释成不同的稀释度的阳性血清与 $2 \times 10^{2.0}$ TCID₅₀/0.1ml的毒液等量混合,在37℃下中和90分钟后,接种地鼠肾原代细胞,每个稀释度接种6孔,置37℃培养,连续观察7日,判定结果。结果见表2。结果表明收获的阳性血清1:40倍稀释即可满足猪乙型脑炎活疫苗鉴别检验的需要。

[0062] 表2 不同浓度阳性血清特异性试验结果

[0063]

	稀释倍数	细胞病变观察
[0064]	1:8	0/6
	1:16	0/6
	1:32	0/6
	1:40	0/6
	1:64	1/6
	1:128	5/6
	1:256	6/6
	细胞对照	0/6

[0065] 4.3.2 外源病毒检验中和试验取3瓶猪乙型脑炎活疫苗用DMEM稀释至10头份/ml后混合,10000rpm离心10min,取上清与等量灭活好的阳性血清混匀,置37℃中和90min。然后取适量的中和物接种地鼠肾原代细胞,吸附60min后弃去吸附液,加入DMEM细胞维持液培养,如此盲传3代,各代次均未出现细胞病变,表明中和完全,即阳性血清可满足外源性病毒检验的需要。

[0066] 4.3.2 猪乙型脑炎病毒ELISA抗体试剂盒用阳性血清4.1.1项中我们收获的阳性血清的OD值高于其标准阳性血清对照,即通过适当的标定和检验我们制备的阳性血清应可作为诊断检测使用。

[0067] 实施例2(猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清的制备)

[0068] 1 疫苗的制备

[0069] 1.1 猪乙型脑炎活疫苗(SA14-14-2株)的制备与检验

[0070] 1.1.1 活疫苗制备将经无菌检验合格的JEV毒液,加入适宜的冻干保护剂,同时加入适宜的抗生素,充分均匀,按规定头份定量分装后,迅速进行冷冻真空干燥制成猪乙型脑炎活疫苗(SA14-14-2株)。

[0071] 1.1.2 活疫苗检验将1.1.1制成的猪乙型脑炎活疫苗进行物理性状、真空度、剩余

水分、无菌检验、支原体检验、外源病毒检验、鉴别检验、安全性检验和效力检验(病毒含量测定),结果全部合格。其中配苗用JEV毒液的病毒含量经测定为 $10^{8.6}$ TCID₅₀/ml,制成猪乙型脑炎活疫苗(SA14-14-2株)后的病毒含量经测定为 $10^{7.0}$ TCID₅₀/头份。

[0072] 1.2 猪乙型脑炎灭活疫苗(SA14-14-2株)的制备

[0073] 1.2.1 灭活疫苗制备

[0074] 1.2.1.1 毒液浓缩、灭活将经无菌检验合格的JEV毒液使用300KD的超滤膜包进行7倍浓缩后按1:2000的比例加入 β -丙内酯,置2~8℃搅拌灭活36h后,置37℃水解2h。

[0075] 1.2.1.2 乳化将上述1.2.1.1项水解完成的毒液与赛比克的新型佐剂ISA760VG以1:2的比例使用剪切机进行乳化,剪切的时间共为7min,将乳化好的疫苗定量分装即制成猪乙型脑炎灭活疫苗(SA14-14-2株)。

[0076] 1.2.1 灭活疫苗检验将1.2.1项制成的猪乙型脑炎灭活疫苗进行剂型、稳定性和无菌检验等,结果各项检验全部合格。配苗用JEV毒液的病毒含量经测定为 $10^{8.6}$ TCID₅₀/ml,经浓缩后毒液的病毒含量经测定为 $10^{9.25}$ TCID₅₀/ml。将灭活后的毒液进行灭活检验,在细胞上盲传三代,结果表明该毒液不致细胞病变,即灭活完全。

[0077] 2 阴性猪的筛选选择3月龄健康易感营养良好的断奶仔猪1头(猪乙型脑炎HI效价不高于1:4),经检测猪瘟病毒及其抗体、猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体、猪伪狂犬病毒及其抗体、猪圆环Ⅱ型病毒及其抗体均为阴性,转入试验用猪栏隔离饲养观察10日,结果试验猪营养状况良好,未发现应激和其他疾病的发生。

[0078] 3 免疫接种

[0079] 3.1 活疫苗基础免疫:共2次。第一次每头猪颈部肌肉注射2头份的猪乙型脑炎活疫苗(SA14-14-2株),间隔14日,以同等剂量进行加强免疫1次。

[0080] 3.2 强化免疫:共4次。基础免疫完成后15日进行第一次猪乙型脑炎灭活疫苗(SA14-14-2株)的免疫,每头猪颈部肌肉注射2ml;间隔10天进行第二次灭活疫苗加强免疫,每头猪肌肉注射4ml;间隔10日进行第三次灭活疫苗加强免疫,每头猪肌肉注射9ml,间隔7日进行第四次灭活疫苗加强免疫,每头猪肌肉注射8ml。

[0081] 4 阳性血清收获及鉴定

[0082] 4.1 阳性血清效价的检测最后1次免疫接种后7天采集少量猪血清,使用猪乙型脑炎病毒ELISA抗体试剂盒以及蚀斑减少中和试验测定中和效价,确认猪乙型脑炎病毒抗体为阳性且中和抗体效价为1:568。

[0083] 4.1.1 猪乙型脑炎病毒ELISA抗体的检测采用猪乙型脑炎病毒ELISA抗体检测试剂盒(购自武汉科前动物生物制品有限责任公司)对不同免疫时期采取的血清进行检测,操作参照产品说明书进行。结果见表3。

[0084] 表3 检测免疫前后的猪血清样ELISA抗体

[0085]

不同免疫期	S/P 值
免疫前	0.179
第二次加强免疫后 10 日	0.795
第三次加强免疫后 7 日	1.177
第四次加强免疫后 7 日	1.370

[0086] 注:阴性对照OD值=0.08<0.2,,P值等于1.539。样品S/P值 \geq 0.21,判为猪乙型脑炎病毒抗体阳性,样品S/P值<0.21,判为猪乙型脑炎病毒抗体阴性。

[0087] 4.1.2 蚀斑减少中和试验测定中和抗体将第三次加强免疫后10日的血清,于0.22 μ m滤膜过滤后经56℃灭活30分钟后进行此试验,步骤如下。

[0088] 4.1.2.1 选取适当稀释度的病毒液(约1000PFU/ml) 500 μ l与等量倍比稀释(1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280)待检血清混匀,另用同样稀释度的病毒液加上等量如上述稀释的稀释正常血清作对照,置37℃作用90min,期间每隔15~20分钟摇匀一次。

[0089] 4.1.2.2 接种长满BHK-21的6孔细胞培养板,每个滴度接2孔,每孔0.2ml,吸附90分钟。

[0090] 4.1.2.3 加入甲基纤维素覆盖物,37℃,5%CO₂培养箱中培养5日后,吸出覆盖物,用结晶紫染色,进行空斑计数。

[0091] 4.1.2.4 结果计算与正常血清对照相比,使蚀斑减少50%的血清稀释度为中和效价。待检血清中和效价 $Lg=L+d(S-0.5)L=1,d=0.3,S=$ 中和比值之和。经计算所测血清的中和效价为1:568。

[0092] 4.2 阳性血清的收获于第四次加强免疫后12日采用前腔静脉放血的方式收获阳性血清约520ml。将收获的阳性血清进行无菌检验、支原体检验及外源病毒检验,结果各项检验全部合格。

[0093] 4.3 阳性血清的应用效果将收获的阳性血清经56℃灭活30分钟后进行下述试验。

[0094] 4.3.1 特异性试验(鉴别检验)将灭活好的阳性血清用PBS(0.015mol/L,pH值7.4~7.6)稀释成不同的稀释度的阳性血清与 $2 \times 10^{2.0}$ TCID₅₀/0.1ml的毒液等量混合,在37℃下中和90分钟后,接种小鼠肾原代细胞,每个稀释度接种6孔,置37℃培养,连续观察7日,判定结果。结果见表4。结果表明收获的阳性血清1:32倍稀释即可满足猪乙型脑炎活疫苗鉴别检验的需要。

[0095] 表4 不同浓度阳性血清特异性试验结果

[0096]

稀释倍数	细胞病变观察
1 : 32	0/6
1 : 40	1/6
1 : 64	2/6
1 : 128	5/6
1 : 256	6/6
细胞对照	0/6

[0097] 4.3.2 外源病毒检验中和试验取3瓶猪乙型脑炎活疫苗用DMEM稀释至10头份/ml后混合,10000rpm离心10min,取上清与等量灭活好的阳性血清混匀,置37℃中和90min。然后取适量的中和物接种地鼠肾原代细胞,吸附60min后弃去吸附液,加入DMEM细胞维持液培养,如此盲传3代,各代次均未出现细胞病变,表明中和完全,即阳性血清可满足外源性病毒检验的需要。

[0098] 4.3.2 猪乙型脑炎病毒ELISA抗体试剂盒用阳性血清4.1.1项中我们收获的阳性血清的OD值高于其标准阳性血清对照,即通过适当的标定和检验我们制备的阳性血清应可作为诊断检测使用。

[0099] 实施例3(猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清的制备)

[0100] 1 疫苗的制备

[0101] 1.1 猪乙型脑炎活疫苗(SA14-14-2株)的制备与检验

[0102] 1.1.1 活疫苗制备将经无菌检验合格的JEV毒液,加入适宜的冻干保护剂,同时加入适宜的抗生素,充分均匀,按规定头份定量分装后,迅速进行冷冻真空干燥制成猪乙型脑炎活疫苗(SA14-14-2株)。

[0103] 1.1.2 活疫苗检验将1.1.1制成的猪乙型脑炎活疫苗进行物理性状、真空度、剩余水分、无菌检验、支原体检验、外源病毒检验、鉴别检验、安全性检验和效力检验(病毒含量测定),结果全部合格。其中配苗用JEV毒液的病毒含量经测定为 $10^{8.4}$ TCID₅₀/ml,制成猪乙型脑炎活疫苗(SA14-14-2株)后的病毒含量经测定为 $10^{6.75}$ TCID₅₀/头份。

[0104] 1.2 猪乙型脑炎灭活疫苗(SA14-14-2株)的制备

[0105] 1.2.1 灭活疫苗制备

[0106] 1.2.1.1 毒液浓缩、灭活将经无菌检验合格的JEV毒液使用300KD的超滤膜包进行10倍浓缩后按1:6000的比例加入β-丙内酯,置2~8℃搅拌灭活72h后,置37℃水解2h。

[0107] 1.2.1.2 乳化将上述1.2.1.1项水解完成的毒液与赛比克的新型佐剂ISA760VG以2:3的比例使用剪切机进行乳化,剪切的时间共为7min,将乳化好的疫苗定量分装即制成猪乙型脑炎灭活疫苗(SA14-14-2株)。

[0108] 1.2.1 灭活疫苗检验将1.2.1项制成的猪乙型脑炎灭活疫苗进行剂型、稳定性和无菌检验等,结果各项检验全部合格。配苗用JEV毒液的病毒含量经测定为 $10^{8.4}$ TCID₅₀/ml,经浓缩后毒液的病毒含量经测定为 $10^{9.25}$ TCID₅₀/ml。将灭活后的毒液进行灭活检验,在细胞上盲传三代,结果表明该毒液不致细胞病变,即灭活完全。

[0109] 2 阴性猪的筛选选择2月龄健康易感营养良好的断奶仔猪1头(猪乙型脑炎HI效价不高于1:4),经检测猪瘟病毒及其抗体、猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体、猪伪狂犬病毒及其抗体、猪圆环Ⅱ型病毒及其抗体均为阴性,转入试验用猪栏隔离饲养观察15日,结果试验猪营养状况良好,未发现应激和其他疾病的发生。

[0110] 3 免疫接种

[0111] 3.1 活疫苗基础免疫:共2次。第一次每头猪颈部肌肉注射5头份的猪乙型脑炎活疫苗(SA14-14-2株),间隔15日,以同等剂量进行加强免疫1次。

[0112] 3.2 强化免疫:共3次。基础免疫完成后15日进行第一次猪乙型脑炎灭活疫苗(SA14-14-2株)的免疫,每头猪颈部肌肉注射1ml;间隔10天进行第二次灭活疫苗加强免疫,每头猪肌肉注射2ml;间隔10日进行第三次灭活疫苗加强免疫,每头猪肌肉注射4ml;间隔10日进行第四次灭活疫苗加强免疫,每头猪肌肉注射6ml;间隔7日进行第五次灭活疫苗加强免疫,每头猪肌肉注射10ml。

[0113] 4 阳性血清收获及鉴定

[0114] 4.1 阳性血清效价的检测最后1次免疫接种后5天采集少量猪血清,使用猪乙型脑炎病毒ELISA抗体试剂盒以及蚀斑减少中和试验测定中和效价,确认猪乙型脑炎病毒抗体为阳性且中和抗体效价为1:600。

[0115] 4.1.1 猪乙型脑炎病毒ELISA抗体的检测采用猪乙型脑炎病毒ELISA抗体检测试剂盒(购自武汉科前动物生物制品有限责任公司)对不同免疫时期采取的血清进行检测,操作参照产品说明书进行。结果见表5。

[0116] 表5 检测免疫前后的猪血清样ELISA抗体

[0117]

不同免疫期	S/P 值
免疫前	0.191
第三次加强免疫后 7 日	0.905
第四次加强免疫后 7 日	1.220
第五次加强免疫后 7 日	1.344

[0118] 注:阴性对照OD值=0.08<0.2,,P值等于1.539。样品S/P值 \geq 0.21,判为猪乙型脑炎病毒抗体阳性,样品S/P值<0.21,判为猪乙型脑炎病毒抗体阴性。

[0119] 4.1.2 蚀斑减少中和试验测定中和抗体将第五次加强免疫后5日的血清,于0.22 μ m滤膜过滤后经56 $^{\circ}$ C灭活30分钟后进行此试验,步骤如下。

[0120] 4.1.2.1 选取适当稀释度的病毒液(约1000PFU/ml)500 μ l与等量倍比稀释(1:10,1:20,1:40,1:80,1:160,1:320,1:640,1:1280)待检血清混匀,另用同样稀释度的病毒液加上等量如上述稀释的稀释正常血清作对照,置37 $^{\circ}$ C作用90min,期间每隔15~20分钟摇匀一次。

[0121] 4.1.2.2 接种长满BHK-21的6孔细胞培养板,每个滴度接2孔,每孔0.2ml,吸附90分钟。

[0122] 4.1.2.3 加入甲基纤维素覆盖物,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱中培养5日后,吸出覆盖物,用结晶紫染色,进行空斑计数。

[0123] 4.1.2.4 结果计算与正常血清对照相比,使蚀斑减少50%的血清稀释度为中和效价。待检血清中和效价 $Lg=L+d(S-0.5)L=1, d=0.3, S=$ 中和比值之和。经计算所测血清的中和效价为1:600。

[0124] 4.2 阳性血清的收获于第五次加强免疫后10日采用前腔静脉放血的方式收获阳性血清550ml。将收获的阳性血清进行无菌检验、支原体检验及外源病毒检验,结果各项检验全部合格。

[0125] 4.3 阳性血清的应用效果将收获的阳性血清经56℃灭活30分钟后进行下述试验。

[0126] 4.3.1 特异性试验(鉴别检验)将灭活好的阳性血清用PBS(0.015mol/L, pH值7.4~7.6)稀释成不同的稀释度的阳性血清与 $2 \times 10^{2.0} \text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$ 的毒液等量混合,在37℃下中和90分钟后,接种地鼠肾原代细胞,每个稀释度接种6孔,置37℃培养,连续观察7日,判定结果。结果见表6。结果表明收获的阳性血清1:32倍稀释即可满足猪乙型脑炎活疫苗鉴别检验的需要。

[0127] 表6 不同浓度阳性血清特异性试验结果

[0128]

稀释倍数	细胞病变观察
1 : 32	0/6
1 : 40	1/6
1 : 64	1/6
1 : 128	5/6
1 : 256	6/6
细胞对照	0/6

[0129] 4.3.2 外源病毒检验中和试验取3瓶猪乙型脑炎活疫苗用DMEM稀释至10头份/ml后混合,10000rpm离心10min,取上清与等量灭活好的阳性血清混匀,置37℃中和90min。然后取适量的中和物接种地鼠肾原代细胞,吸附60min后弃去吸附液,加入DMEM细胞维持液培养,如此盲传3代,各代次均未出现细胞病变,表明中和完全,即阳性血清可满足外源性病毒检验的需要。

[0130] 4.3.2 猪乙型脑炎病毒ELISA抗体试剂盒用阳性血清4.1.1项中我们收获的阳性血清的OD值高于其标准阳性血清对照,即通过适当的标定和检验我们制备的阳性血清应可作为诊断检测使用。

[0131] 实施例4

[0132] 一种猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清的制备方法,包括以下步骤:

[0133] 1) 制备猪乙型脑炎疫苗;

[0134] 2) 取步骤1)所述疫苗对猪瘟病毒及其抗体、猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体、猪伪狂犬病毒及其抗体、猪圆环II型病毒及其抗体均呈阴性的猪进行免疫接种;

[0135] 3) 从步骤2)免疫接种后的猪体内收获血清;

[0136] 其中:步骤1)所述疫苗是以猪乙型脑炎病毒SA14-14-2株为抗原制备的。

[0137] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:

- [0138] 步骤2)所述的猪是2月龄健康猪,其猪乙型脑炎HI效价不高于1:4。
- [0139] 步骤2)所述的免疫接种方法为:
- [0140] A) 基础免疫:取步骤1)制备的猪乙型脑炎活疫苗,每次以1头份的剂量注射2次,每次间隔13d;
- [0141] B) 强化免疫:基础免疫13d后,取步骤1)制备的猪乙型脑炎灭活疫苗,以肌肉注射的方式接种3次,相邻两次接种的时间间隔为7d,后一次接种的剂量是前一次接种剂量的1.5倍。
- [0142] 步骤B)中首次注射的剂量为3mL。
- [0143] 步骤3)中所述血清的中和抗体效价高于1:400。
- [0144] 步骤1)所述的疫苗包括猪乙型脑炎活疫苗,其猪乙型脑炎病毒滴度高于 $10^{6.0}$ TCID₅₀/头份。
- [0145] 步骤1)所述的疫苗包括猪乙型脑炎灭活疫苗,该疫苗是将猪乙型脑炎病毒液进行超滤浓缩纯化后,使用β-丙内酯灭活,再使用ISA760VG佐剂进行乳化制备得到的;其中超滤浓缩的孔径是300KD,浓缩倍数是5倍。
- [0146] 步骤1)所述的疫苗包括猪乙型脑炎灭活疫苗,该疫苗的效价高于 $10^{9.0}$ TCID₅₀/ml。
- [0147] 步骤1)所述的疫苗包括猪乙型脑炎灭活疫苗,该疫苗是将猪乙型脑炎病毒液进行超滤浓缩纯化后,使用β-丙内酯灭活,再使用ISA760VG佐剂进行乳化制备得到的;其中灭活包括以下步骤:以1:2000(w/w)的比例向超滤浓缩后的猪乙型脑炎病毒液中加入β-丙内酯,于2℃灭活24h,而后置于35℃水浴水解1.5h。
- [0148] 步骤1)所述的疫苗包括猪乙型脑炎灭活疫苗,该疫苗是将猪乙型脑炎病毒液进行超滤浓缩纯化后,使用β-丙内酯灭活,再使用ISA760VG佐剂进行乳化制备得到的;其中猪乙型脑炎病毒液与ISA760VG佐剂的混合比例为1:2,乳化时间5min。
- [0149] 实施例5
- [0150] 一种猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清的制备方法,包括以下步骤:
- [0151] 1) 制备猪乙型脑炎疫苗;
- [0152] 2) 取步骤1)所述疫苗对猪瘟病毒及其抗体、猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体、猪伪狂犬病毒及其抗体、猪圆环Ⅱ型病毒及其抗体均呈阴性的猪进行免疫接种;
- [0153] 3) 从步骤2)免疫接种后的猪体内收获血清;
- [0154] 其中:步骤1)所述疫苗是以猪乙型脑炎病毒SA14-14-2株为抗原制备的。
- [0155] 在以上技术方案的基础上,满足以下条件:
- [0156] 步骤2)所述的猪是3月龄健康猪,其猪乙型脑炎HI效价不高于1:4。
- [0157] 步骤2)所述的免疫接种方法为:
- [0158] A) 基础免疫:取步骤1)制备的猪乙型脑炎活疫苗,每次以5头份的剂量注射2次,每次间隔17d;
- [0159] B) 强化免疫:基础免疫17d后,取步骤1)制备的猪乙型脑炎灭活疫苗,以肌肉注射的方式接种5次,相邻两次接种的时间间隔为10d,后一次接种的剂量是前一次接种剂量的2倍。
- [0160] 步骤B)中首次注射的剂量为5mL。
- [0161] 步骤1)所述的疫苗包括猪乙型脑炎灭活疫苗,该疫苗是将猪乙型脑炎病毒液进行

超滤浓缩纯化后,使用 β -丙内酯灭活,再使用ISA760VG佐剂进行乳化制备得到的;其中超滤浓缩的孔径是300KD,浓缩倍数是10倍。

[0162] 步骤1)所述的疫苗包括猪乙型脑炎灭活疫苗,该疫苗是将猪乙型脑炎病毒液进行超滤浓缩纯化后,使用 β -丙内酯灭活,再使用ISA760VG佐剂进行乳化制备得到的;其中灭活包括以下步骤:以1:8000 (w/w)的比例向超滤浓缩后的猪乙型脑炎病毒液中加入 β -丙内酯,于8℃灭活96h,而后置于39℃水浴水解2.5h。

[0163] 步骤1)所述的疫苗包括猪乙型脑炎灭活疫苗,该疫苗是将猪乙型脑炎病毒液进行超滤浓缩纯化后,使用 β -丙内酯灭活,再使用ISA760VG佐剂进行乳化制备得到的;其中猪乙型脑炎病毒液与ISA760VG佐剂的混合比例为1:3,乳化时间10min。

[0164] 实施例6

[0165] 一种猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清的制备方法,包括以下步骤:

[0166] 1) 制备猪乙型脑炎疫苗;

[0167] 2) 取步骤1)所述疫苗对猪瘟病毒及其抗体、猪繁殖与呼吸综合征病毒及其抗体、猪伪狂犬病毒及其抗体、猪圆环II型病毒及其抗体均呈阴性的猪进行免疫接种;

[0168] 3) 从步骤2)免疫接种后的猪体内收获血清;

[0169] 其中:步骤1)所述疫苗是以猪乙型脑炎病毒SA14-14-2株为抗原制备的。

[0170] 以上对本发明的实施例进行了详细说明,但所述内容仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明。凡在本发明的申请范围内所做的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清的制备方法		
公开(公告)号	CN105548536B	公开(公告)日	2018-10-16
申请号	CN201510907101.1	申请日	2015-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	天津瑞普生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津瑞普生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津瑞普生物技术股份有限公司		
[标]发明人	丁旭娜 吕茂杰 杨保收 付旭彬 梁武		
发明人	丁旭娜 吕茂杰 杨保收 付旭彬 梁武		
IPC分类号	C07K16/08 G01N33/531 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/531 G01N33/56983		
代理人(译)	张勇		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN105548536A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)
 本发明提供了一种猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清的制备方法，该方法包括疫苗的制备、阴性猪的筛选、免疫接种、阳性血清的收获及鉴定。本发明首先通过猪乙型脑炎活疫苗(SA14-14-2株)进行对阴性猪进行基础免疫，然后使用经浓缩纯化技术制备的高效价的猪乙型脑炎灭活疫苗(SA14-14-2株)进行强化免疫制备猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清。以本发明制备的猪乙型脑炎病毒抗体阳性血清，相对于使用乙脑强毒制备阳性血清，避免了使用强毒的风险，具有安全性高的优点；同时使用猪制备阳性血清较小鼠收获的血清量大，相对成本较低，具有突出的规模化应用前景。

不同免疫期	S/P 值
免疫前	0.188
第一次基础免疫后 14 日	0.247
第二次基础免疫后 14 日	0.287
第一次加强免疫后 10 日	0.505
第二次加强免疫后 10 日	1.152
第三次加强免疫后 10 日	1.461