



禽流感灭活疫苗生产工艺技术

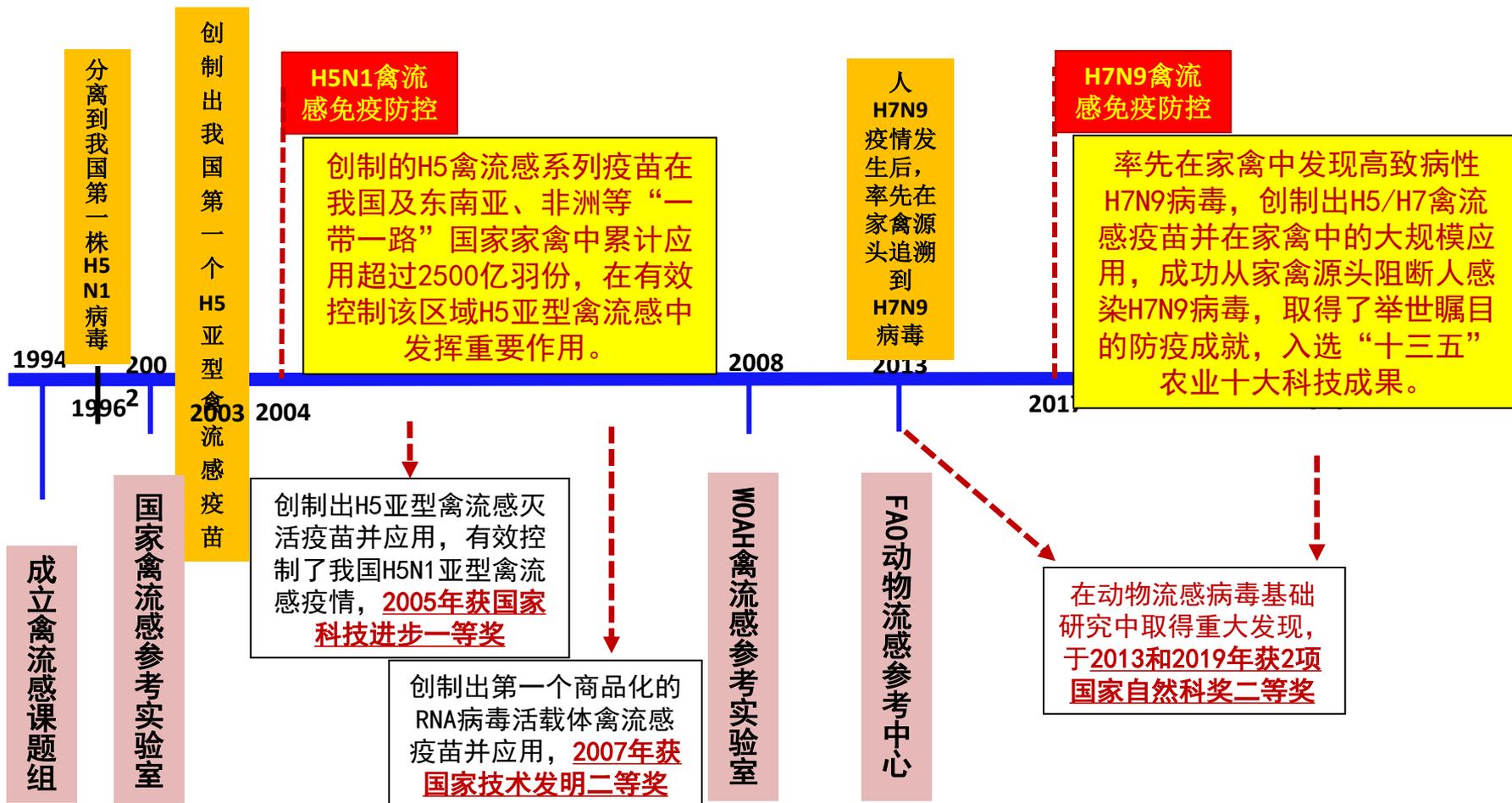
毛胜刚

2024年08月

山东枣庄



国家禽流感参考实验室历史和成就



汇报内容

- 哈尔滨维科生物技术有限公司简介
- 胚培养禽流感灭活疫苗半成品生产工艺
- 细胞悬浮培养禽流感灭活疫苗半成品生产工艺
- 禽流感灭活疫苗成品生产工艺

哈尔滨维科生物技术有限 公司简介





1992年

2003年

2018年

HARVAC 哈兽维科

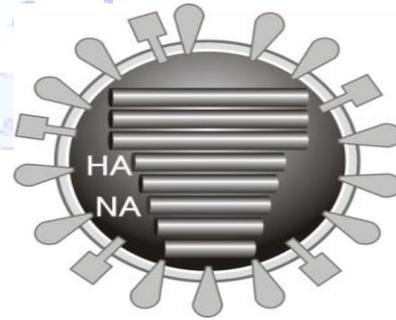
哈兽维科

- 注册资金一亿元人民币。
- 5个生产单元共有**23**条生产线
 - 禽流感疫苗生产线**3**条
 - 非洲猪瘟活疫苗生产线**2**条
 - 禽流感核酸疫苗生产线
- 国家高新技术企业
- 连续数年被评为“中国兽药市场用户首选品牌”
- “中国畜牧业最具影响力品牌”
- “中国兽用生物制品十强生产企业”
- 首批“龙标品质认可”企业



Avian influenza virus

$$16 \times 9 = 144$$



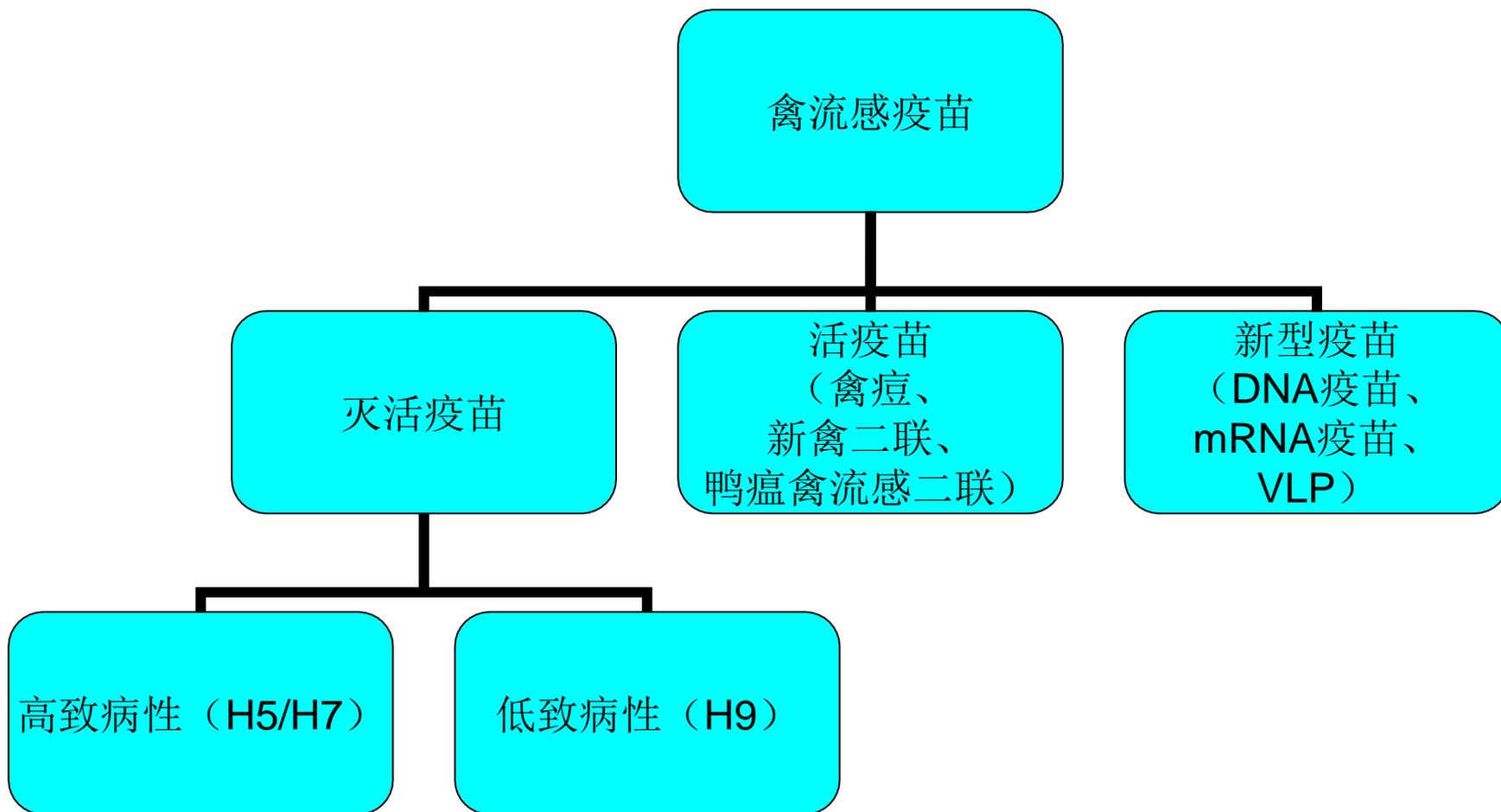
- 亚型众多;
- 宿主广泛;
- 变化复杂。

H1	N1
H2	N2
H3	N3
H4	N4
H5	N5
H6	N6
H7	N7
H8	N8
H9	N9
H10	
H11	
H12	
H13	
H14	
H15	
H16	

16 HA

9 NA

禽流感疫苗的分类



我国禽流感H5灭活疫苗的使用

Seed of HA-Donor Virus	Clade	Designations	2004~ 2005	2006~ 2007	2008~ 2009	2010~ 2011	2012~ 2013	2014~ 2015	2016~ 2017	2018~ 2019	2020~ 2021	2022~ 2023
A/GS/GD/1/1996(H5N1)	0	Re-1	√	√	√							
A/CK/SX/2/2006(H5N1)	7.2	Re-4		√	√	√	√					
A/CK/AH/1/2006(H5N1)	2.3.4	Re-5			√	√	√					
A/DK/GD/S1311/2010(H5N1)	2.3.2	Re-6					√					
A/CK/LN/S4092/2011(H5N1)	7.2	Re-7					√		√			
A/CK/GZ/4/2013(H5N1)	2.3.4.4g	Re-8							√			
A/DK/GZ/S4184/2017(H5N6)	2.3.4.4h	Re-11								√		
A/CK/LN/SD007/2017(H5N1)	2.3.2.1f	Re-12								√	√	
A/DK/FJ/S1424/2020(H5N6)	2.3.4.4h	Re-13										√
A/WS/SX/4-1/2020(H5N8)	2.3.4.4b	Re-14										√

我国禽流感H9单苗灭活疫苗的使用

序号	品种	批签发数量(批)				
		2019年	2020年	2021年	2022年	2023年
1	禽流感 (H9亚型) 灭活疫苗 (SS株)	124	105	127	121	114
2	禽流感 (H9亚型) 灭活疫苗 (SZ株)	14	10	9	6	15
3	禽流感 (H9亚型) 灭活疫苗 (NJ01株)	19	14	13	12	10
4	禽流感 (H9亚型) 灭活疫苗 (HN106株)	5	7	7	10	7
5	禽流感灭活疫苗 (H9亚型, Sy株)	10	11	10	9	5
6	禽流感 (H9亚型) 灭活疫苗 (LG1株)	4	0	3	0	1
7	禽流感 (H9亚型) 灭活疫苗 (HN03株)	3	2	0	6	0
8	禽流感 (H9亚型) 灭活疫苗 (SD696株)	8	6	2	1	0
9	禽流感灭活疫苗 (H9亚型, F株)	43	21	4	0	0
合计		236	178	175	168	153

我国禽流感H9二联苗灭活疫苗的使用

序号	通用名	批签发数量(批)				
		2019年	2020年	2021年	2022年	2023年
1	鸡新城疫、禽流感（H9亚型）二联灭活疫苗（La Sota株+WD株）	373	421	350	287	262
2	鸡新城疫、禽流感（H9亚型）二联灭活疫苗（La Sota株+F株）	317	240	175	157	164
3	鸡新城疫、禽流感（H9亚型）二联灭活疫苗（La Sota株+HP株）	129	138	116	106	100
4	鸡新城疫病毒（La sota株）、禽流感病毒（H9亚型，SS株）二联灭活疫苗	129	138	105	103	81
5	鸡新城疫病毒（La Sota株）、禽流感病毒（H9亚型，HL株）二联灭活疫苗	107	104	86	84	74
6	鸡新城疫、禽流感（H9亚型）二联灭活疫苗（La Sota株+JY株）	65	78	74	73	73
7	鸡新城疫病毒（La sota株）、禽流感病毒（H9亚型，SS/94株）二联灭活疫苗	52	80	78	68	73
8	鸡新城疫、禽流感（H9亚型）二联灭活疫苗（La sota株+HN106株）	128	76	78	72	72
9	重组新城疫病毒、禽流感病毒（H9亚型）二联灭活疫苗（A-VII株+WJ57株）	75	147	111	107	66
10	重组新城疫病毒、禽流感病毒（H9亚型）二联灭活疫苗（aSG10株+G株）	2	19	30	37	34
11	鸡新城疫、禽流感（H9亚型）二联灭活疫苗（La Sota株+JD株）	2	6	8	14	21
12	鸡新城疫、禽流感（H9亚型）二联灭活疫苗（La Sota株+SZ株）	23	10	20	20	20
13	鸡新城疫、禽流感（H9亚型）二联灭活疫苗（La Sota株+LG1株）	44	44	34	34	15
14	鸡新城疫、禽流感（H9亚型）二联灭活疫苗（N7a株+SZ株）	0	0	0	0	1
15	鸡新城疫、禽流感（H9亚型）二联灭活疫苗（La Sota株+SY株）	3	4	4	1	0

我国禽流感H9三联苗灭活疫苗的使用

简称	序号	通用名	批签发数量(批)					备注
			2019年	2020年	2021年	2022年	2023年	
新支流	1	鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感 (H9亚型) 三联灭活疫苗 (La Sota株+M41株+L株)	40	37	49	63	78	
	2	鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感 (H9亚型) 三联灭活疫苗 (La Sota株+M41株+YBF003株)	54	47	42	46	69	
	3	鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感 (H9亚型) 三联灭活疫苗 (La Sota株+M41株+HP株)	58	59	54	70	65	
	4	鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感 (H9亚型) 三联灭活疫苗 (La Sota株+M41株+HZ株)	23	31	30	31	48	
	5	鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感 (H9亚型) 三联灭活疫苗 (La Sota株+M41株+Re-9株)	71	64	45	45	46	
	6	鸡新城疫病毒 (La Sota株)、传染性支气管炎病毒 (M41株)、禽流感病毒 (H9亚型, HL株) 三联灭活疫苗	70	49	43	39	45	
	7	鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感 (H9亚型) 三联灭活疫苗 (La Sota株+M41株+HN106株)	34	25	25	42	34	
	8	鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感 (H9亚型) 三联灭活疫苗 (La Sota株+M41株+NJ02株)	36	30	21	27	29	
	9	鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感 (H9亚型) 三联灭活疫苗 (La Sota株+M41株+WD株)	38	46	25	29	26	
	10	鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感 (H9亚型) 三联灭活疫苗 (La Sota株+M41株+SS株)	40	58	24	23	22	
	11	鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感 (H9亚型) 三联灭活疫苗 (N7a株+M41株+SZ株)	0	0	0	6	8	2020年新增
	12	鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感 (H9亚型) 三联灭活疫苗 (La Sota株+M41株+LG1株)	13	15	8	13	7	
	13	鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感 (H9亚型) 三联灭活疫苗 (La Sota株+M41株+SS/94株)	2	7	3	6	5	
	14	鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感 (H9亚型) 三联灭活疫苗 (La Sota株+M41株+SY株)	15	10	9	5	4	
	15	重组新城疫病毒、传染性支气管炎病毒、禽流感病毒 (H9亚型) 三联灭活疫苗 (A-VII株+M41株+WJ57株)	0	0	0	0	2	2023年新增

我国禽流感H9四联苗灭活疫苗的使用

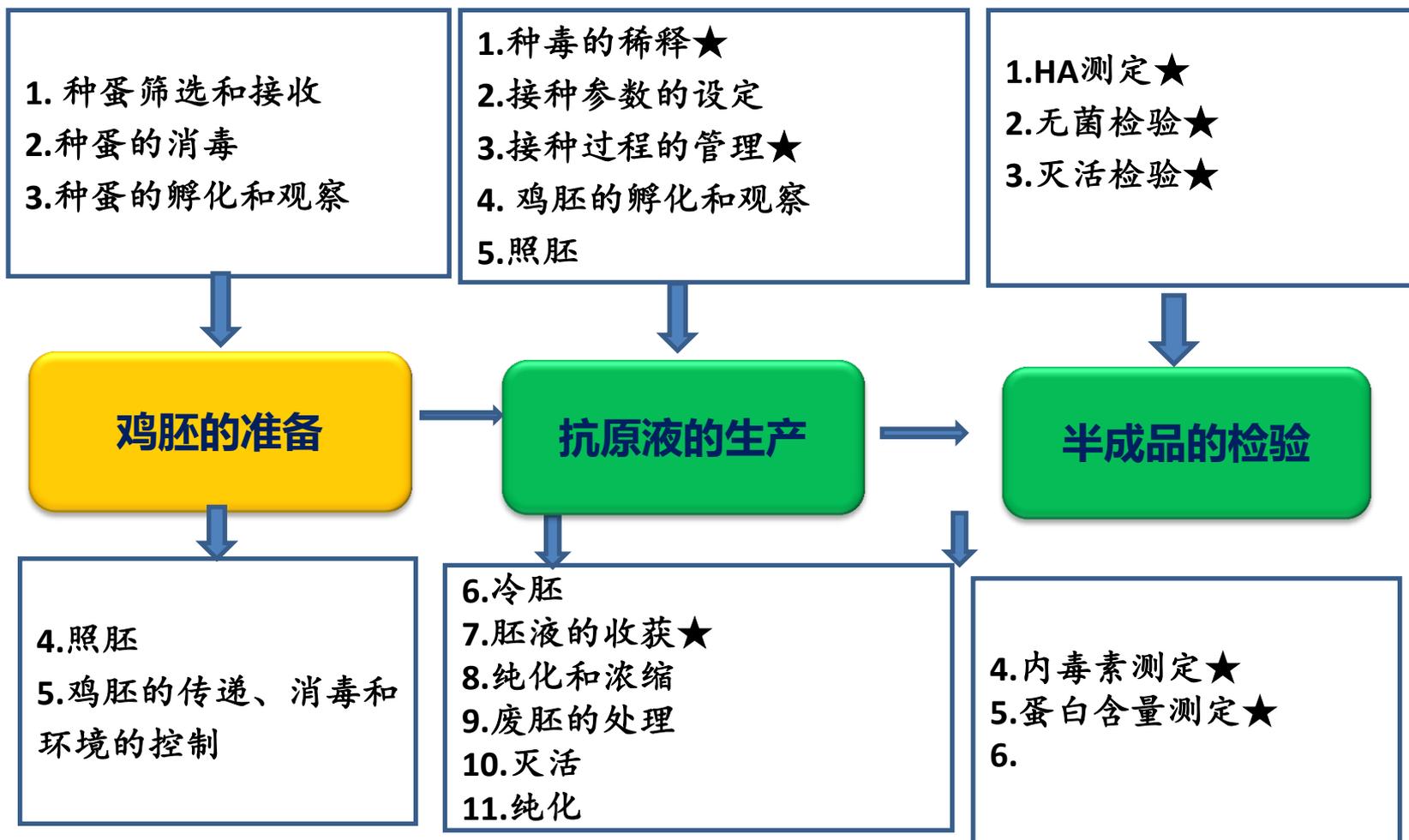
序号	简称	品种名称	批签发数量(批)				
			2019年	2020年	2021年	2022年	2023年
1	新 支 减 流	鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征、禽流感（H9亚型）四联灭活疫苗（La Sota株+M41株+AV127株+NJ02株）	37	50	64	62	73
2		鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征、禽流感（H9亚型）四联灭活疫苗（La Sota株+M41株+NE4株+YBF003株）	34	31	27	31	38
3		鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征、禽流感（H9亚型）四联灭活疫苗（La Sota株+M41株+HSH23株+WD株）	23	34	27	38	37
4		鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征、禽流感H9亚型四联灭活疫苗（La Sota株+M41株+AV127株+HL株）	46	40	32	30	32
5		鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征、禽流感（H9亚型）四联灭活疫苗（La Sota株+M41株+HS25株+HZ株）	16	17	27	29	31
6		鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征、禽流感（H9亚型）四联灭活疫苗（La Sota株+M41株+HE02株+HN106株）	22	23	24	28	28
7		鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征、禽流感（H9亚型）四联灭活疫苗（La Sota株+M41株+Z16株+HP株）	32	34	18	23	19
8		鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征、禽流感（H9亚型）四联灭活疫苗（La Sota株+M41株+AV-127株+S2株）	14	13	13	10	8
9		鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征、禽流感（H9亚型）四联灭活疫苗（La Sota株+M41株+K-11株+SS/94株）	0	5	4	3	6
新支减流合计			224	247	236	254	272

我国禽流感H9四联苗灭活疫苗的使用

序号	简称	品种名称	批签发数量(批)				
			2019年	2020年	2021年	2022年	2023年
1	新支流法	鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感（H9亚型）、传染性氏法氏囊四联灭活疫苗（La Sota株+M41株+SZ株+rVP2蛋白）	159	85	175	105	190
2		鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感（H9亚型）、传染性氏法氏囊四联灭活疫苗（La Sota株+M41株+YBF003株+S-VP2蛋白）	44	26	19	39	43
3		鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感（H9亚型）、传染性氏法氏囊四联灭活疫苗（N7a株+M41株+SZ株+rVP2蛋白）	0	0	0	0	5
新支流法合计			203	111	194	144	238

胚培养禽流感灭活疫苗半成品 生产工艺

● 禽流感灭活疫苗（鸡胚源）生产工艺图



一、鸡胚的准备

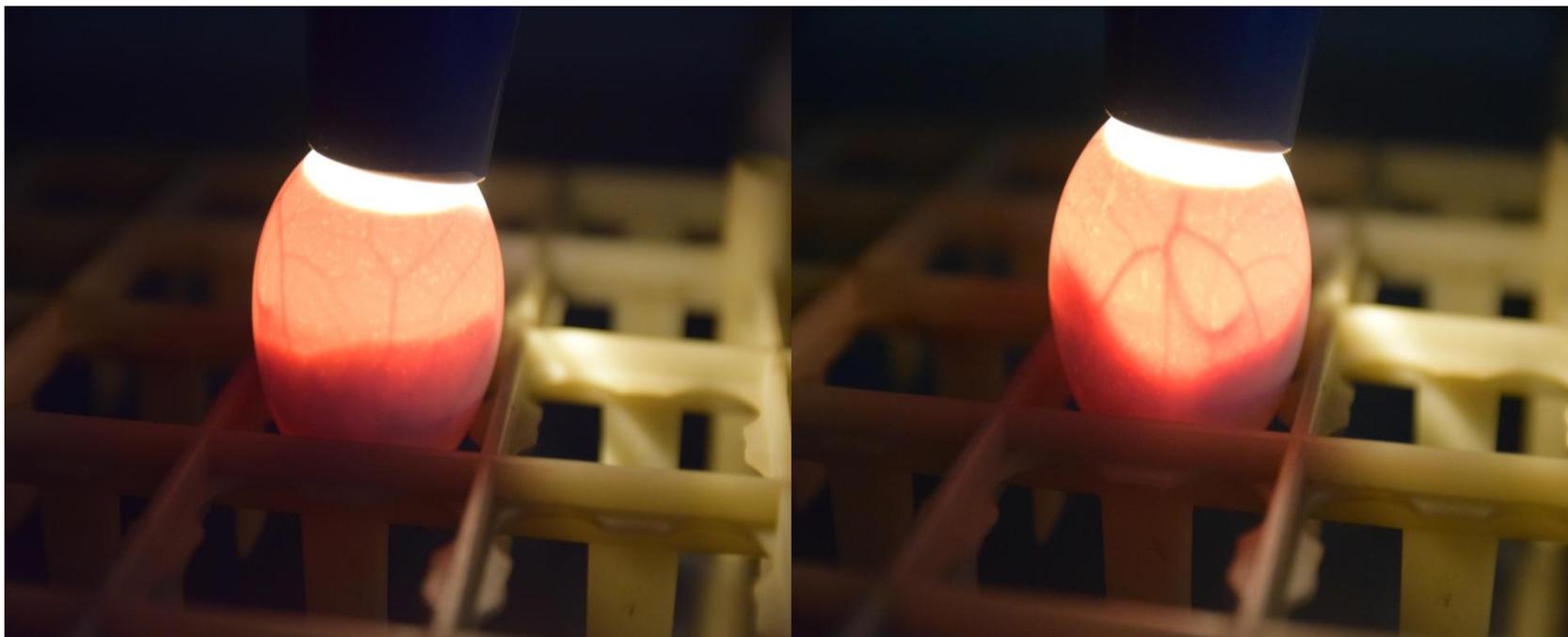
- 1.种蛋筛选及清洗消毒：**选用新鲜的非免疫种蛋（产蛋5日之内），每枚种蛋重量在52~70g，装入蛋盘中，经除尘消毒后放入孵化车中；
- 2.种蛋前孵化：**将消毒完成后的鸡蛋推入孵化器内孵化，孵化器的相对湿度为60~70%，孵化温度为 $37.8 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 。孵化期间，每2小时翻蛋一次；



一、鸡胚的准备

3.照胚：孵化11天后照胚。通过照胚，剔除无精、中止及破损蛋；

4.鸡胚的传递、消毒和环境的控制。



二、抗原液的生产

1. **种毒稀释**：在无菌条件下用灭菌的0.85%生理盐水将生产用种毒做 10^{-4} 稀释，并分装于种毒瓶内，混匀后备用；
2. **接种**：开启接种机，将蛋盘通过传送带装入接种机逐盘进行接种。每胚接种0.1ml；



二、抗原液的生产

3.入孵：将蛋车推入后孵化器内孵化，孵化器的相对湿度为60~70%，温度为 $36.0 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ，不翻蛋；

4.照胚：孵化72小时后进行照胚。检出死胚。活胚推入2~8℃冷库冷却待次日收获；

5.收获：开启收获机，将冷却好的鸡胚，经收获机对鸡胚尿囊液进行收获。



二、抗原液的生产

6.纯化：通过离心机对收获的鸡胚尿囊液离心，离心过程中根据离心后物料的浊度，适当调整离心速度；

7.浓缩：启动超滤系统。根据半成品的数量设定残液的体积。抽取不低于10ml透出液测定HA；



二、抗原液的生产

8. 灭活：将甲醛在加样器中稀释后按照半成品的体积，以终浓度不超过0.2%的配比加入后混匀；37.0℃，灭活24小时（以温度达到37.0℃开始计时）。抽取不低于10ml样品用于无菌检验和灭活检验。

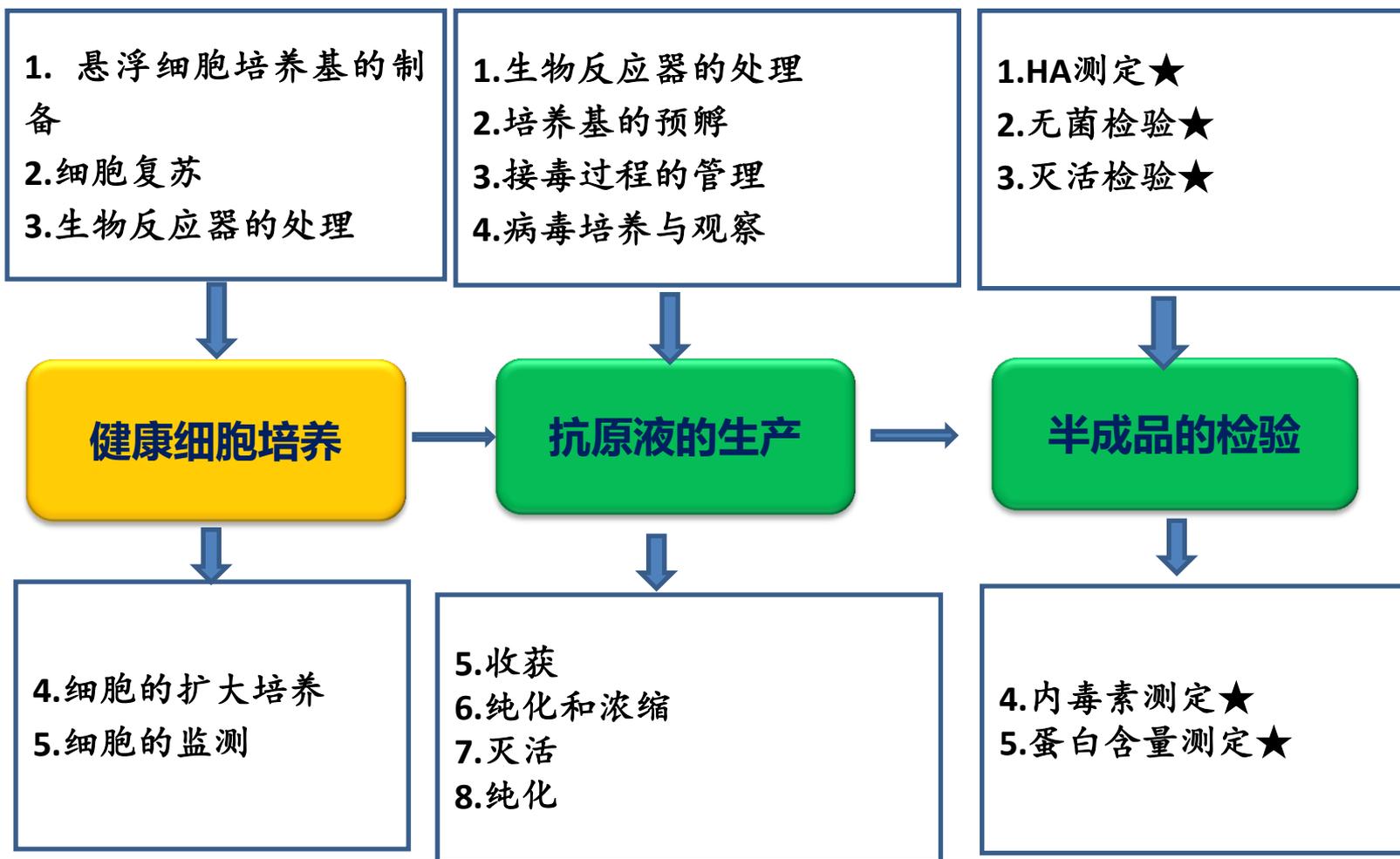
9. 存储：检验合格的半成品转移至半成品储罐内，2-8℃保存。

10. 纯化：做苗前，将半成品纯化后转入预混罐中。



- 1.HA测定:** 25 μ l体系对倍稀释, 室温下反应35至40分钟, 以全凝集判定。
- 2.无菌检验:**接种TG小管和GA斜面各2支, 每支0.2ml, 1支置35~37°C培养, 1支置23~25°C培养, 另取0.2ml, 接种1支TSB小管, 置23~25°C培养, 均培养7日, 应无菌生长。
- 3.灭活检验:**10日龄SPF鸡胚10枚, 每枚接种0.1毫升, 孵化72小时测HA, 并盲传1代。
- 4.内毒素测定:**动态浊度法利用内毒素浓度与鲎试剂反应达到某一设定吸光度(OD值)所用的时间之间的对数线性关系, 做出标准曲线, 再利用标准曲线分析, 推算出样品中内毒素含量的一种方法。
- 5.蛋白含量测定:**向96孔板中依次加入稀释好的标准蛋白样品溶液, 以及待检蛋白样本, 各25 μ l。每孔中加入配制好BCA工作液200 μ L, 振荡器振荡30秒, 混合均匀。37°C作用30分钟后取出, 冷却至室温。用酶标仪, 测定562nm处的OD值, 根据蛋白标准曲线计算出待检蛋白含量。

● 禽流感灭活疫苗（细胞源）生产工艺图



一、健康细胞培养

1. **悬浮培养基制备**：在配液罐中加入注射用水，开启搅拌。按照配方量加入培养基粉末，充分搅拌至粉末完全溶解；
2. **细胞复苏**：复苏悬浮种细胞，置于CO₂摇床内。控制CO₂浓度为5%，温度为37℃，振幅120~140转/分进行培养



一、健康细胞培养

3.生物反应器的处理：滤器的完整性测试、生物反应器的保压、传感器的校验、反应器的清洗消毒、培养基的除菌过滤；

4.细胞的扩大培养：将密度达标的细胞转入提前灭菌并预孵培养基的反应器中，设定好转速、pH值、溶氧、温度等培养条件，进行细胞的扩大培养，监测细胞的生产条件和生长状况。



二、抗原液的生产

- 1.生物反应器的处理：**滤器的完整性测试、生物反应器的保压、传感器的校验、反应器的清洗消毒、培养基的除菌过滤；
- 2.培养基的预孵：**在配液罐中加入注射用水，开启搅拌。按照配方量加入培养基粉末（和添加成分），充分搅拌至粉末完全溶解，过滤至毒区生物反应器内预孵化。
- 3.接毒过程的管理：**将密度达标的细胞转入预孵病毒培养液的反应器中，搅拌均匀后将生产毒种按MOI感染复数接种于生长良好的悬浮MDCK细胞，同时加入胰酶，使其终浓度为100 μ g/ml。设定转速、pH值、溶氧、温度等参数进行病毒培养；



二、抗原液的生产

4.病毒培养与观察：观察生物反应器中细胞各生长状态的参数，判定细胞与病毒的繁殖情况。细胞感染病毒后，生长分裂明显受阻，耗氧周期变长。



二、抗原液的生产

5.收获：当细胞病变达到75%以上时（也可取样用细胞计数仪测定，细胞活率低于75%，HA效价不低于1：256时），收获病毒液；

6.纯化：通过离心机对收获的抗原液离心，离心过程中根据离心后物料的浊度，适当调整离心速度；



二、抗原液的生产

7. **超滤**：启动超滤系统。根据半成品的数量设定残液的体积。抽取不低于10ml透出液测定HA；
8. **灭活**：将甲醛在加样器中稀释后按照半成品的体积，以终浓度不超过0.2%的配比加入后混匀；37.0℃，灭活24小时（以温度达到37.0℃开始计时）。抽取不低于10ml样品用于无菌检验和灭活检验。
9. **存储**：检验合格的半成品转移至半成品储罐内，2-8℃保存。
10. 做苗前，将半成品纯化后转入预混罐中。



- 1.HA测定:** 25 μ l体系对倍稀释, 室温下反应35至40分钟, 以全凝集判定。
- 2.无菌检验:**接种TG小管和GA斜面各2支, 每支0.2ml, 1支置35~37°C培养, 1支置23~25°C培养, 另取0.2ml, 接种1支TSB小管, 置23~25°C培养, 均培养7日, 应无菌生长。
- 3.灭活检验:**10日龄SPF鸡胚10枚, 每枚接种0.1毫升, 孵化72小时测HA, 并盲传1代。
- 4.内毒素测定:**动态浊度法利用内毒素浓度与鲎试剂反应达到某一设定吸光度(OD值)所用的时间之间的对数线性关系, 做出标准曲线, 再利用标准曲线分析, 推算出样品中内毒素含量的一种方法。
- 5.蛋白含量测定:**向96孔板中依次加入稀释好的标准蛋白样品溶液, 以及待检蛋白样本, 各25 μ l。每孔中加入配制好BCA工作液200 μ L, 振荡器振荡30秒, 混合均匀。37°C作用30分钟后取出, 冷却至室温。用酶标仪, 测定562nm处的OD值, 根据蛋白标准曲线计算出待检蛋白含量。

● 产成品生产工艺图

- 1.白油佐剂的制备
- 2.预混
- 3.乳化
- 4.分装★
- 5.轧盖★

成品生产

- 6.贴标、打码
- 7.抽样成品检验
- 8.扫码
- 9.装箱、码垛
- 10.入库

一、乳化

- 1. 油相制备：**向熬油罐转入定量的白油；加热至70℃左右加入表面活性剂（司本80），继续加热至122℃开始计时，持续20分钟后停止加热，转入凉油罐内冷却备用；
- 2. 水相制备：**向预混罐内转入抗原液，当抗原液没过搅拌桨时，开启搅拌桨，定量向罐内加入所需量的表面活性剂（司盘80）；
- 3. 乳化：**先定量向乳化罐内加入油相，开启乳化机，定速将抗原液注入乳化罐内。注入完毕后继续乳化至设定时间，停止乳化转入成品罐内；



二、分装和轧盖

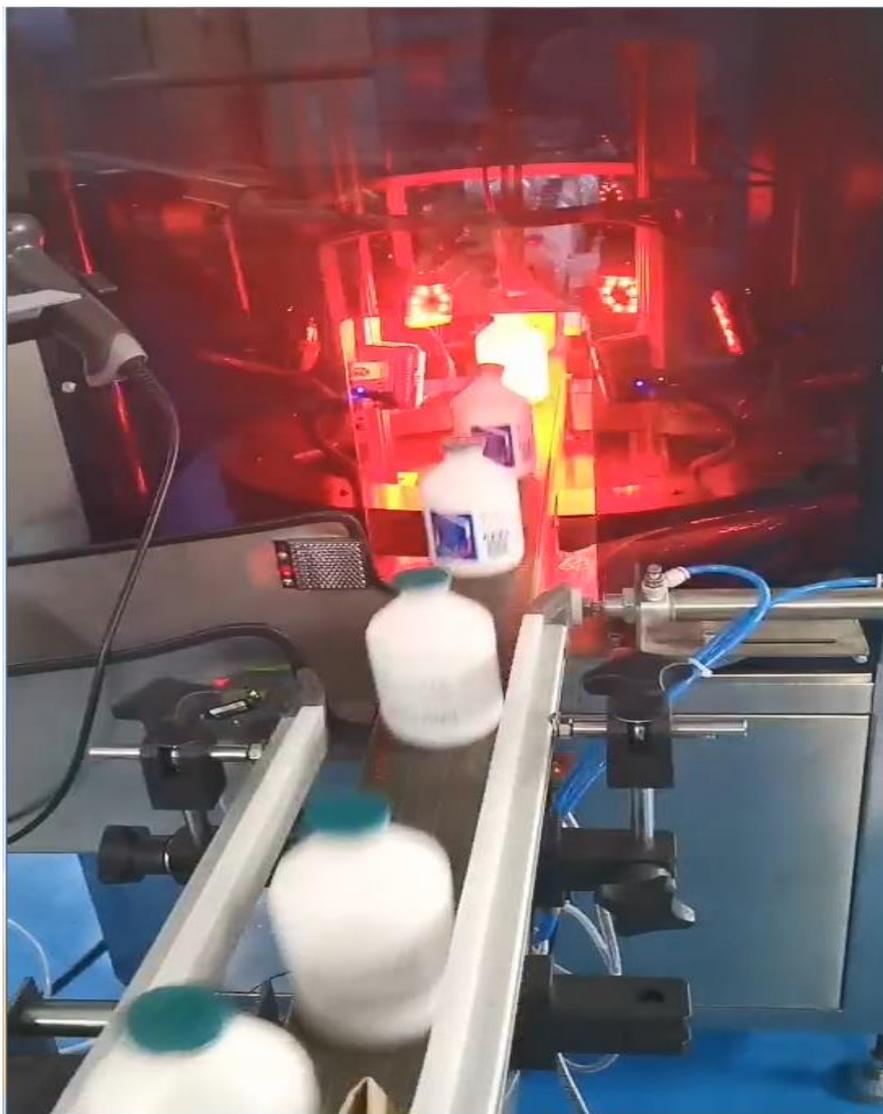
4. **分装**：乳化完成后，将疫苗成品罐混匀，注入分装缓冲罐进行分装、加塞；
5. **轧盖**：加塞完成后的疫苗轧盖；



成品生产

三、包装

6. **贴标、喷码**：调整贴标及喷码速度进行贴标；
7. **二维码扫描**：设置产品规格、附码比例、包装单位、附码最小单位等参数，扫描疫苗的二维码；
8. **装箱、码垛、入库**



敬请批评指正！