

## 兽用生物制品实验室效力试验技术指导原则

**1 目的** 为兽用生物制品实验室效力试验研究提供原则性指导。

**2 背景** 兽用生物制品的效力是考察其质量的最重要指标之一。《兽药注册办法》中对兽用生物制品的实验室效力试验项目进行了详细规定。

### **3 基本要求**

3.1 实验室及动物实验室的生物安全条件 应符合国家有关实验室生物安全标准。

3.2 实验动物的要求 实验室效力试验中所用实验动物应是普通级或清洁级易感动物，必要时应使用 SPF 级动物。

实验室效力试验应使用靶动物进行。如果在规模化生产的每批产品出厂时的效力检验中使用小型实验动物（如啮齿类动物）替代靶动物进行，则在实验室效力试验中除使用靶动物以外，还应使用这种替代动物进行。

每批制品的实验室效力试验中所用动物应不少于 10 只（头），来源困难或经济价值高的动物应不少于 5 只（头），鱼、虾应不少于 50 尾。

3.3 对制品的要求 实验室效力试验中所用制品的生产用菌（毒、虫）种、制品组成和配方等，应与规模化生产的产品相同。试验性产品应经过必要的检验，且结果须符合要求。试验性产品中主要成分的含量应接近或低于产品规程中规定的最低标准。

为了同时证明产品“规程”中所规定的基础种子使用代次范围的合理性，通常用于最高代次水平的病毒（或细菌）悬液制备疫苗后，进行效力试验。一旦试验结果证明最高代次水平的疫苗具有令人满意的免疫效果，则可认为规定范围内的基础种子均具有令人满意的免疫原性。

如果每批规模化生产的产品出厂时的“效力检验”采取与参考疫苗对比的方法，则在实验室效力试验中，除应使用实验室制品进行效力试验外，还应用参考疫苗进行系统的效力试验，或提供有关参考疫苗效力试验资料。

3.4 对攻击用强毒的要求 在多数实验室效力试验中可能会使用攻毒用强毒。对已

经有国家标准强毒株的，应使用标准强毒株，必要时增加使用当时的流行株。对没有国家标准强毒株的，可使用自行分离的强毒株，但需报告其来源、历史和有关鉴定结果。

使用一类病原微生物的，应按有关规定事先获得农业部批准。

3.5 试验设计 在试验开始前，必须制定详细的实验室效力试验方案，其内容应包括受试制品的种类，试验开始和结束的日期，试验动物的年龄、品种、性别等特征，制品的配方，对照组的设置，每组动物的数量，实验动物来源、圈舍、试验管理和观察方式，动物个体是否发病或保护的判定标准，最终结果的判定方法及标准等。

#### 4 实验室效力试验的内容及方法

4.1 靶动物免疫攻毒试验 该方法是考察所有兽用疫苗效力的最基本方法，也是评价治疗用生物制品效力的基本方法。其基本方法是：用实验室制品接种一定数量的动物，经一定时间后，采用攻毒用强毒株对上述免疫动物和对照动物一起进行攻毒，在攻毒后一定时间内，观察动物的发病及死亡情况，统计免疫及对照动物发病率或/及死亡率，评估制品的效力；必要时在观察期结束时，将所有动物扑杀，进行病理剖检及病理组织学检查，有些生物制品还应进行病原分离，根据免疫动物和对照动物的病理剖检变化、病理组织学病变或病原分离情况评估制品的免疫效力。

靶动物免疫攻毒试验的具体方法有：定量免疫定量强毒攻击法、变量免疫定量强毒攻击法、定量免疫变量强毒攻击法及抗血清被动免疫攻毒法等，根据制品的具体情况可选择一种最佳的方法：

4.1.1 定量免疫定量强毒攻击法 这种方法是以待检制品接种动物，经一定时间后，用定量的强毒攻击，观察动物接种后所建立的自动免疫力。

4.1.2 定量免疫变量强毒攻击法 这种方法是把动物分为两大组，一为免疫组，一为对照组，两大组又各分为相等的若干小组，每小组的动物数相等。免疫动物均用同一剂量的制品接种免疫，经一定时间后，与对照组同时用不同稀释倍数强毒攻击，观察、统计免疫组与对照组的发病率、死亡率、病变率或感染率，计算免疫组与对照组的  $LD_{50}$ （或  $ID_{50}$ ），比较免疫组与对照组动物对不同剂量强毒攻击的耐受力。

4.1.3 变量免疫定量强毒攻击法（ $PD_{50}$  试验） 即将疫苗稀释为各种不同的免疫剂量，并分别接种动物，间隔一定时间待动物的免疫力建立以后，各免疫组均用同一剂量的强毒攻击，观察一定时间，用统计学方法计算能使 50% 的动物得到保护的免疫剂量（ $PD_{50}$ ）。

4.1.4 抗血清或卵黄抗体被动免疫攻毒法 用经高度免疫的动物抗病血清或卵黄抗

体注射易感动物，经一定时间（一般 1~3 日）用相应的强毒攻击，观察血清抗体或卵黄抗体被动免疫所引起的保护作用。

4. 2 疫苗抗原（细菌或病毒）含量与靶动物免疫攻毒保护力相关性的研究（最小免疫剂量试验） 疫苗内细菌（或病毒）含量与免疫攻毒保护率之间，通常存在明显平行关系，此时，就可以根据最小免疫剂量试验结果建立疫苗成品的细菌（或病毒）含量标准，对符合细菌（或病毒）含量标准的疫苗，就无需对每批疫苗进行免疫攻毒试验。最小免疫剂量的试验方法如下：用不同剂量的疫苗分别接种动物，经一定时间后进行攻毒或采用已经证明与免疫攻毒方法具有平行关系的替代方法进行免疫效力试验，统计出使动物获得较好保护力（通常应达到 80%~100%）的最低的疫苗接种量，就是最小免疫剂量。如果疫苗使用对象包括多种动物或多种日龄动物，则应针对各种靶动物测定最小免疫剂量。

#### 4. 3 免疫产生期及免疫持续期试验

4. 3. 1 基本试验方法 用实验室制品接种一定数量的动物，同时用足够数量的未接种动物作为对照。接种后，每隔一定时间，用攻毒用强毒对一定数量的免疫动物和对照动物同时进行攻毒或采用已经确认与攻毒保护率具有平行关系的血清学方法测定抗体水平，观察其产生免疫力的时间、免疫力达到高峰期的时间及高峰期持续时间，一直测到免疫力下降至保护力水平以下。以接种后最早出现良好免疫力的时间为该制品的免疫产生期，以接种后保持良好免疫力的最长时间为免疫持续期。

4. 3. 2 如果没有推荐进行一次以上的疫苗接种，或只推荐进行一次接种，则意味着疫苗接种后可以获得终身保护。由于动物的生命期因品种、类别不同以及地区性因素的影响而有所不同，因此，对所提出的免疫期应详细陈述，并提交充分的数据。

4. 3. 3 如果是季节性疾病，只要能够证明疫苗的免疫力能持续到接种后的一年中疾病的自然发生期末。不论是否进行加强免疫接种，均应提出在此后一年（或几年）的发病季节中的免疫力情况。

4. 3. 4 为获得免疫期数据而进行的试验应在严格控制的实验室条件下进行。若所需试验很难在实验室条件下进行，则可能只完成田间试验。在进行田间免疫期试验的过程中，应该确保疫苗接种的靶动物不发生并发性田间感染，因为田间感染将加强动物的免疫力。通常有必要设未接种的靶动物与接种的靶动物接触作对照（哨兵动物），以监视动物是否受到田间感染。

4. 3. 5 主动免疫的免疫期 即由基础接种提供的保护作用的持续期。通常应在所推荐

的加强接种开始的时间之前，对接种过的动物进行攻毒来确定。

4.3.6 被动免疫的免疫期 即由免疫种畜（禽）的子代通过被动获得的抗体而提供免疫保护作用的持续期。通常应在分娩或产蛋前进行免疫接种，在最大间隔时间后，对经过免疫接种的种畜（禽）子代在其自然易感期内进行攻毒来确定。还应提交数据来支持所提出的子代免疫期。

4.3.7 免疫期试验的成本高，费时长，还牵涉到动物保护问题。因此，为了限制在免疫期试验中进行频繁的动物攻毒，可以考虑用最低数量的免疫动物进行攻毒；采用适当的判定指标或参数（如抗体水平），而不采用攻毒试验来衡量疫苗接种后的免疫力。为了使这种替代指标或参数被认可，应提供充分的试验依据，证明这种指标或参数在靶动物的保护作用中起着相当大的作用，且该指标或参数与靶动物对该病的免疫保护力间存在良好的定性和定量关系。

4.3.8 通常情况下，不接受用非靶动物试验获得的免疫期试验数据。

4.3.9 对于鱼用疫苗，通常难以在实验室条件下进行长期的试验，因此，有必要设计合理的田间免疫期试验。

4.4 血清学效力检验与靶动物免疫攻毒保护相关性的研究 当成品的效力检验中采用血清学方法测定免疫动物抗体反应，而不采用免疫攻毒试验时，就应该事先进行这样的平行关系试验，以证明选用该血清学方法的合理性，并为建立判定标准提供依据。具体试验方法是：用不同剂量的疫苗免疫接种动物，以便获得具有不同抗体水平的动物，根据抗体水平的高低，将动物分为若干组，用已经选定的强毒株按照预定剂量进行攻毒。对抗体水平与攻毒保护率之间的关系进行分析。

4.5 不同血清型或亚型间的交叉保护力试验 有些传染病病原存在多个血清型（如传染性支气管炎病毒）或血清亚型（如口蹄疫病毒），对预防这类传染病的制品，应进行交叉保护力试验。其方法为：分别用不同血清型或血清亚型的菌（毒、虫）种制备疫苗，接种一定数量的动物，在产生免疫力后，分别用不同血清型或血清亚型的强毒株进行攻毒，观察其交叉保护力。通过本试验筛选疫苗菌（毒、虫）株，并为合理使用疫苗提供依据。

4.6 实验动物效力检验与靶动物效力检验结果相关性的研究 一些制品的效力检验用靶动物（主要是大动物）来源困难、费用高，可使用敏感小动物代替，但必须要进行本动物与敏感小动物免疫攻毒保护力平行关系的试验研究，证明具有平行关系者，方可用敏感小动物代替靶动物。当使用敏感小动物作效力检验时，如遇有某种原因难以判定者，应改用靶

动物进行效力检验，但使用靶动物效检不合格者不能再用小动物重检。

4.7 子代通过母源抗体获得被动免疫力的效力和免疫期试验 某些疫苗的使用对象为怀孕母畜或种禽，但其主要作用是使怀孕母畜或种禽获得高水平的抗体，通过初乳或卵黄使其后代获得被动免疫力，保护这些子代在出生后的疾病易感期内不感染发病。对这些疫苗的效力试验，不仅应测定免疫后怀孕母畜及种禽的免疫力，而且应测定其后代的抗攻毒保护力及免疫期（详见4.3项）。

4.8 不同接种途径对靶动物的效力试验 兽用生物制品的接种途径主要包括注射（皮下、皮内、肌肉、腹腔、穴位）、口服（滴口、饮水、拌料等）、点眼/滴鼻、气雾、刺种、浸泡等。根据制品的种类和特点，可选用最有效的接种途径。对采用特殊接种途径的兽用生物制品，应对采用该途径与常规途径接种的动物所产生的免疫效力进行比较试验。

4.9 接种后动物体内抗体消长规律的研究 此项研究属于免疫产生期及持续期的内容。采用生物制品免疫动物后，定期采血测定免疫动物最早产生抗体的时间、抗体高峰期、抗体持续期，为制定合理的免疫程序提供依据。

4.10 相关说明 上述效力试验研究项目中，4.1、4.2及4.3项的内容在新制品研制中是必须要做的，而4.4、4.5、4.6、4.7、4.8及4.9项的内容，根据制品的种类、使用对象等不同，在新制品研制中也应部分或全部进行。通常4.1项是生物制品规程常用的效力检验的内容，应有连续3~5批实验室制品的试验数据。

[注] 大动物系指牛、马、骡、驴、骆驼等。

中小动物系指猪、羊、犬、狐、鹿、麝等。

小动物系指兔、貂、獭等。

禽类系指鸡、鸭、鹅、鸽等。