

小反刍兽疫活疫苗（标准草案）

Xiaofanchushouyi Huoyimiao
Peste Des Petits Ruminants Vaccine, Live

1 定义

本品系用小反刍兽疫弱毒株接种适宜细胞，收获细胞培养物，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防羊小反刍兽疫。免疫期应不低于 36 个月。

2 毒种

2.1 安全性

2.1.1 对山羊的安全性 将毒种用无血清 MEM 细胞培养液稀释成 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml，用 1~4 月龄健康易感山羊（小反刍兽疫病毒中和抗体不高于 1:4）6 只，其中 3 只各颈部皮下接种病毒液 1.0ml，另 3 只同群饲养作对照，所有山羊在接种前 3 日测定体温，计算平均值作为基础体温。接种后每日测定体温 1 次并观察临床症状，观察 21 日。接种山羊除一过性体温升高外，精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等应无异常临床症状。同居山羊可在观察期间（第 7、14、21 日）采集口鼻拭子检测小反刍兽疫病毒，应为阴性；精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等应无异常临床症状，同居后 21 日采血，分离血清并测定其中和抗体效价，应不高于 1:4。

2.1.2 对绵羊的安全性 将毒种用无血清 MEM 细胞培养液稀释成 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml，用 1~4 月龄健康易感绵羊（小反刍兽疫病毒中和抗体不高于 1:4）6 只，其中 3 只各颈部皮下接种病毒液 1.0ml，另 3 只同群饲养作对照，所有绵羊在接种前 3 日测定体温，计算平均值作为基础体温。接种后每日测定体温 1 次并观察临床症状，观察 21 日。接种绵羊除一过性体温升高外，精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等均应无异常临床症状。同居绵羊可在观察期间（第 7、14、21 日）采集口鼻拭子检测小反刍兽疫病毒，应为阴性；精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等应无异常临床症状，同居后 21 日采血，分离血清并测定其中和抗体效价，应不高于 1:4。

2.1.3 对怀孕山羊的安全性 将毒种用无血清 MEM 细胞培养液稀释成 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml，用不同怀孕阶段的山羊（小反刍兽疫病毒中和抗体不高于 1:4）6 只，其中 3 只各颈部皮下注射病毒液 1.0ml，另 3 只作对照，所有山羊在接种前 3 日测定体温，计算平均值作为基础体温。接种后每日测定体温 1 次并观察临床症状，观察至母羊产羔。接种山羊除一过性体温升高外，精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等均应无异常临床症状，不应出现因接种毒种引起的流产，与对照组相比，所产羔羊数量应无显著差异。

2.1.4 对小鼠的安全性 将毒种用无血清 MEM 细胞培养液稀释成 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml，用体重为 18~22g 小鼠 10 只，其中 6 只各腹腔注射病毒液 0.1ml，另 4 只作为对照，逐日观察 14 日，所有小鼠均应健活。

2.1.5 对豚鼠的安全性 将毒种用无血清 MEM 细胞培养液稀释成 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml，用体重为 200~250g 豚鼠 6 只，2 只各肌肉注射病毒液 0.5ml；2 只各腹腔注射病毒液 0.5ml，2 只作对照，逐日观察 14 日，所有豚鼠均应健活。

2.2 毒力返强 将最低代次基础毒种用无血清 MEM 细胞培养液稀释成 $10^{5.0}$ TCID₅₀/ml，用 1~4 月龄健康易感山羊及绵羊各 5 只，各颈部皮下注射病毒液 1.0ml，接种后连续观察 10 日，至第 10 日剖检，采集血液、淋巴结（特别是肠系膜淋巴结和支气管淋巴结）、肺、脾脏和肠粘膜等样本，RT-PCR 检测小反刍兽疫病毒核酸，将检测结果为阳性的样本研磨制成组织悬液，在羊体内连续回传 5 代，应不出现毒力返强。第 5 代接种羊精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等均应无异常临床症状。

2.3 免疫原性

2.3.1 血清学方法 将毒种用灭菌生理盐水稀释成 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml, 用 1~4 月龄健康易感山羊 8 只, 其中 5 只各颈部皮下注射病毒液 1.0ml, 另 3 只作对照。接种后 21 日, 分别采血测定中和抗体效价。对照羊中和抗体效价均应不高于 1:4, 免疫羊血清中和抗体效价均应不低于 1:10。

2.3.2 免疫攻毒法 将毒种用灭菌生理盐水稀释成 $10^{3.0}$ TCID₅₀/ml, 用 1~4 月龄健康易感山羊 8 只, 其中 5 只各颈部皮下注射病毒液 1.0ml, 另 3 只作对照。接种后 21 日, 所有羊颈部皮下注射小反刍兽疫强毒 1.0ml (含 1000LD₅₀), 攻毒后观察 14 日。对照羊应全部出现发热、口炎、腹泻等小反刍兽疫特征性临床症状, 攻毒后 14 日剖检, 应出现小反刍兽疫特征性病理变化。免疫羊应全部健活, 攻毒后 14 日剖检, 应无小反刍兽疫特征性病理变化。

2.4 纯净

2.4.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验, 应无菌生长。

2.4.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验, 应无支原体生产。

2.4.3 外源病毒检验 按附录 3305 进行检验, 应无外源病毒污染。

2.5 代次限定 除另有规定外, 基础种子到生产种子传代一般不超过 5 代。

3 生产用原辅料

3.1 细胞 细胞应符合附录 3502 要求。

3.2 血清 应符合附录 3503 要求。

3.3 培养基、稳定剂等特定生物原材料 应符合附录 3009 规定的标准。

4 成品检验

4.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验, 应无菌生长。

4.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验, 应无支原体生长。

4.3 外源病毒检验 按附录 3305 进行检验, 应无外源病毒污染。

4.4 鉴别检验 按瓶签注明头份, 将疫苗用无血清 MEM 细胞培养液稀释至 2 头份/ml, 加入等体积小反刍兽疫阳性血清, 病毒对照组加入等体积无血清 MEM 细胞培养液, 置 37°C 作用 1 小时后, 接种 96 孔细胞培养板, 病毒中和液和病毒对照液各接种 5 孔, 每孔 0.1ml, 同时设立正常细胞对照 5 孔。所有孔均加入浓度为 20~30 万/ml Vero 细胞悬液 0.1ml, 置 37°C、含 5% CO₂ 培养箱培养 6 日, 期间每日观察细胞病变, 中和组及正常细胞对照组均不应出现细胞病变, 病毒对照组均应出现细胞融合等细胞病变。

4.5 安全检验 按瓶签注明头份, 将疫苗用灭菌生理盐水稀释成 100 头份/ml, 用 12 月龄左右健康易感山羊 3 只, 各颈部皮下注射疫苗 1.0ml。接种前 3 日测定体温, 计算平均值作为基础体温。接种后每日测定体温 1 次并观察临床症状, 连续观察 14 日, 除一过性体温升高 (体温升高超过基础体温 1.5°C, 连续不超过两个温次) 外, 应无其它异常临床症状。

4.6 病毒含量测定 按瓶签注明头份, 将疫苗用无血清 MEM 细胞培养液稀释成 1 头份/ml, 再作 10 倍系列稀释, 取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 4 个稀释度, 接种 96 孔细胞培养板, 每个稀释度接种 5 孔, 每孔 0.1ml。每孔再加入浓度为 20~30 万/ml Vero 细胞悬液 0.1ml, 同时设立正常细胞对照 5 孔, 置 37°C、含 5% CO₂ 培养箱培养 6 日, 期间每日观察细胞病变, 正常细胞对照不应出现细胞病变, 根据各稀释度出现细胞病变孔数, 按 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀, 每头份病毒含量应不低于瓶签标示量。

4.7 效力检验 按瓶签注明头份将疫苗用灭菌生理盐水稀释成 1 头份/ml, 用 12 月龄左右健康易感山羊 5 只, 各颈部皮下注射疫苗 1.0ml, 接种后 21 日采血测定中和抗体效价, 均应不低于 1:10。

4.8 剩余水分测定 按附录 3204 进行检验，应符合规定。

4.9 真空度测定 按附录 3103 进行检验，应符合规定。

起草说明：

1. 本标准在《中国兽药典》（2020 版）“小反刍兽疫活疫苗（Clone9 株）”和中华人民共和国公告第 2335 号《小反刍兽疫活疫苗（Clone9 株）试行规程》基础上起草。

2. 考虑《中国兽药典》2020 年版已经收录了小反刍兽疫活疫苗（Clone9 株），说明小反刍兽疫活疫苗至少目前我国已经批准 2 个毒株，即 75/1 株和 Clone9 株，另 Clone9 株还批准有 1 个联苗，因此将该标准名定为“小反刍兽疫活疫苗”。

3. 依据 2024 年第 9 次会议审查意见，“1 定义”项下，将“用于预防羊小反刍兽疫”修改为“用于预防羊小反刍兽疫。免疫期应不低于 36 个月”。

5. 毒种检定中病毒含量、安全性、特异性、免疫原性、纯净性、代次限定均同中华人民共和国公告第 2335 号中《小反刍兽疫活疫苗（Clone9 株）试行规程》。

6. 参考 OIE 手册、农业部公告第 2335 号、农业农村部公告第 8 号，在毒种安全性、免疫原性、纯净指标中增加通用标准要求。

7. 依据 2024 年第 9 次会议审查意见，明确了用 1~4 月龄左右健康易感山羊和绵羊进行安全性评价，接种剂量为 $10^{5.0}TCID_{50}$ ，为免疫原性接种剂量的 100 倍，增加水平传播的要求和标准，观察期延长至 21 日。对于 2.1.3 项中接种怀孕山羊的妊娠日期问题，因各个怀孕阶段的羊均易感，标准中明确为“不同怀孕阶段的的山羊”。

8. 依据 2024 年第 9 次会议审查意见，建议删除 2.1.4 和 2.1.5 项。复查 OIE 手册，手册要求毒种对啮齿动物、山羊、绵羊均应安全，故此保留 2.1.4 和 2.1.5 项，不作删除。

9. 依据 2024 年第 9 次会议审查意见，修改完善了“毒力返强”项。经查阅相关资料，确认山羊对小反刍兽疫易感。同时，明确了接种动物日龄、采集病毒时间、采集组织、第 5 代接种动物的观察指标及判定标准。

10. 依据 2024 年第 9 次会议审查意见，修改完善了“免疫原性”项。将中和抗体检测和免疫攻毒 2 种方法分别编制，明确了免疫攻毒的方法及判定标准。在免疫原性项中增加了攻毒方法及判定标准。

11. 关于生产用原辅料，影响产品质量的主要为 Vero 细胞、牛血清、培养基、稳定剂等。细胞应符合附录 3502 要求，血清应符合附录 3503 要求，培养基、稳定剂应符合制品质量标准要求。

12. 依据 2024 年第 9 次会议审查意见，在成品检验项下，安全检验仅保留用山羊检验，接种剂量明确为 100 个推荐使用剂量。病毒含量测定标准应采用“不低于瓶签标示量”表述。

13. 成品检验中其他标准在《中国兽药典》（2020 版）“小反刍兽疫活疫苗（Clone 株）”和中华人民共和国公告第 2335 号中《小反刍兽疫活疫苗（Clone9 株）试行规程》标准基础上起草，仅对文字进行了规范性修改。

14. 依据 2024 年第 9 次会议审查意见，进一步完善了编制说明或起草说明，并提供修改的理由和依据。