

## 新增附录 外源病毒检验的一般要求（标准草案）

除另有规定外，兽用生物制品用毒种、动物源性材料及活疫苗等外源病毒检验应遵循以下要求，其他制品可参照执行。

### 1 毒种

所有兽用生物制品用毒种均应进行外源病毒检验，应根据毒种来源动物和所生产的生物制品使用动物，按照但不限于附录 3305 进行检验。

#### 1.1 禽源毒种

##### 1.1.1 基本原则

1.1.1.1 对于禽源毒种一般应采用鸡胚检查法和细胞检查法进行外源病毒检验。必要时，还应同时采用鸡检查法进行检验。任一项不符合规定的，判定该毒种外源病毒检验不符合规定。

1.1.1.2 对于水禽源毒种，除按 1.1.1.1 项进行检验外，还应增加接种敏感鸭（鹅）胚以及鸭（鹅）胚成纤维细胞的检查。

1.1.1.3 如禽源毒种分离或培养过程中使用了非禽源细胞，应增加对该特定细胞来源的外源病毒检验。

##### 1.1.2 检查方法

1.1.2.1 胚检查法 应包括尿囊腔、绒毛尿囊膜和卵黄囊 3 种接种方式，按照附录 3305 进行检验，应符合规定。

1.1.2.2 细胞检查法 所有毒种应接种 CEF、鸡胚肾细胞、鸡胚肝细胞进行致细胞病变检查、红细胞凝集和红细胞吸附性外源病毒检查；对于水禽源毒种，还应同时接种相应鸭胚或鹅胚成纤维细胞，至少培养 10 日，并按附录 3305 进行检验，应符合规定。特定病原检查应至少包括禽白血病病毒检验法（附录 3302）、禽网状内皮组织增生症病毒检验法（附录 3304）、鸡传染性贫血病毒检验法（附录 XXX）等，均应符合规定。

1.1.2.3 鸡检查法 应至少接种 2 次，并进行临床观察，最后 1 次接种后 21 日，按照附录 3305 进行相应病原的血清抗体检测，应符合规定。

1.1.2.4 其他方法 根据毒种来源，必要时可增加其他特定病原的检查方法。

#### 1.2 非禽源毒种

1.2.1 基本原则 对于非禽源毒种一般应采用细胞检查法进行外源病毒的检查。必要时，应增加动物检查法或其他检查法。检查细胞的选择应至少包括：①Vero 细胞；②种毒来源动物的胚、胚胎细胞、新生动物细胞或细胞系；③靶动物胚胎细胞、新生动物细胞或细胞系（如与前述细胞不同时）。任一项不符合规定的，判定该毒种外源病毒检验不符合规定。

##### 1.2.2 检查方法

1.2.2.1 致细胞病变检查 应至少接种以下细胞，按附录 3305 进行检验，应符合规定。

猪源毒种：Vero 细胞、PK15（或 ST）细胞。

牛源毒种：Vero 细胞、MDBK 细胞。

绵羊和山羊源毒种：Vero 细胞、羊肾细胞（或羊睾丸）。

犬科、猫科或鼬科源毒种：Vero 细胞、MDCK 细胞、CRFK（或 F81）细胞。

马源毒种：Vero 细胞。

1.2.2.2 红细胞凝集和红细胞吸附性外源病毒检查 接种细胞同 1.2.2.1 项，按附录 3305 进行检验，均应符合规定。

1.2.2.3 荧光抗体检查 针对不同毒种至少进行下列特定病原检查：

（1）所有来源毒种：应接种 MDBK 细胞检查牛病毒性腹泻病毒/黏膜病病毒（BVDV）；接种 Vero（或 BHK21）细胞检查狂犬病毒（RV）。

(2) 猪源毒种:接种 ST(或 PK15)细胞检查猪瘟病毒(CSFV)、猪圆环病毒 2 型(PCV2)、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV);接种 Vero 细胞检查猪流行性腹泻病毒(PEDV);接种 MA104 细胞检查猪轮状病毒(PoRV)。

(3) 牛源毒种: /。

(4) 绵羊和山羊源毒种:接种羊肾(或羊睾丸)细胞检查边界病病毒(BDV)。

(5) 犬科、猫科或鼬科源毒种:接种 CRFK(或 F81)细胞检查犬细小病毒(CPV)。

(6) 马源毒种: /。

1.2.2.4 其他方法 根据毒种来源,必要时可增加其他特定病原的检查。

## 2 动物源性材料

2.1 细胞、血清、胰酶、鸡胚、明胶等所有动物源性材料均应进行外源病毒检验,应根据动物源性材料的来源动物,参照 1.1 和 1.2 项进行外源病毒检验。

2.2 应对动物源材料中可能存在的外源病毒污染风险进行评估,并根据评估结果制定合理的外源病毒检验频次以及其他新增的外源病毒检验等要求。

2.3 应加强对兽用生物制品生产和检验过程中涉及的动物源性材料制备或生产的原材料或动物群体的外源病毒控制,应至少不含有现行《中国兽药典》规定的外源病毒污染。

## 3 成品

### 3.1 禽用活疫苗

3.1.1 禽用活疫苗一般采用鸡胚法检验,并同时检查禽白血病病毒,分别按附录 3305 和 3302 进行,均应符合规定。鸡胚法应同时经尿囊腔、绒毛尿囊膜两种途径接种。用鸭(鹅)胚及相应细胞生产的水禽活疫苗,除按上述进行检查外,还应增加易感鸭(鹅)胚或易感鸭(鹅)胚成纤维细胞的接种。

3.1.2 必要时,水禽用活疫苗还应增加鸡检查法进行外源病毒检验,按附录 3305 进行检验,应符合规定。

### 3.2 非禽用活疫苗

3.2.1 非禽用活疫苗一般采用细胞检查法进行外源病毒检验。

3.2.2 接种细胞的选择应至少包括:(1) Vero 细胞;(2) 靶动物胚胎细胞、新生动物细胞或细胞系。

猪用活疫苗 采用 Vero、PK15(或 ST)细胞进行致细胞病变检查、红细胞凝集及红细胞吸附性外源病毒检查。

牛用活疫苗 接种 Vero、MDBK 细胞进行致细胞病变检查、红细胞凝集及红细胞吸附性外源病毒检查;接种 MDBK 进行 BVDV 的检查。

绵羊和山羊用活疫苗 接种 Vero、羊肾(或羊睾丸)细胞进行致细胞病变检查、红细胞凝集及红细胞吸附性外源病毒检查。

犬科、猫科或鼬科用活疫苗 接种 Vero 细胞、MDCK 细胞、CRFK(或 F81)细胞进行致细胞病变检查、红细胞凝集及红细胞吸附性外源病毒检查;接种 Vero(或 BHK21)细胞检查狂犬病毒(RV)。

马用活疫苗 接种 Vero 细胞进行致细胞病变检查、红细胞凝集及红细胞吸附性外源病毒检查。

### 起草说明:

1. 本标准的起草主要针对兽用生物制品用毒种、动物源性材料以及成品的外源病毒检验提出了一般性要求。本标准属于首次起草。

2. 起草依据 本标准本着“风险前移,关注重点”的原则,对毒种、动物源性材料等兽用生物制品等基础性材料提升了外源病毒控制要求,特别是增加了特定性外源病毒检测种类

(如 PEDV、TGEV、PoRV)防患于未然;也是针对近年来生物学材料出现较高污染风险的现实需要。对于成品,在提升毒种和动物源材料外源控制标准的基础上,基于风险管理原则和减轻企业检验成本角度,简化了成品中外源病毒检验方法以及特定病原的检测,主要体现在:一是除需净化的禽白血病外,成品外源主要通过尿囊腔、绒毛尿囊膜两种鸡胚接种途径控制,若为鸭胚或鹅胚源的水禽活疫苗,应增加易感鸭(鹅)胚或其成纤维细胞接种,并在必要时增加鸡检查法。非禽源制品成品外源病毒检验方面,以致细胞病变检查、红细胞凝集及红细胞吸附检验为主,删减了特定病原检测的数量,仅保留了部分制品中 BVDV 的检测及宠物类疫苗中 RV 的检测。

3. 特定外源病毒检验方法 为了丰富《中国兽药典》附录外源病毒检验方法,对禽源种毒、动物源性材料制定了特定外源病毒检验的具体附录方法,在原 2020 年版《中国兽药典》三部附录中已记载有禽白血病病毒检验法(附录 3302)、禽网状内皮组织增生症病毒检验法(附录 3304)、禽腺病毒 I 群检验法(附录 3309)方法。同时基于现有产品、种毒和细胞外源病毒污染风险偏高的现实,将鸡传染性贫血病毒纳入特定外源病毒检验,主要从基础种毒、细胞和动物源性材料等“源头”进行控制。统计近年来风险监测结果,发现鸡传染性贫血病毒、禽偏肺病毒(B 亚型)、鸡产蛋下降综合症病毒等 3 种禽用活疫苗的风险监测中污染风险偏高,考虑到禽腺病毒 I 群、禽偏肺病毒(B 亚型)、鸡产蛋下降综合症病毒可在 CEF、鸡肝细胞等产生 CPE,可通过增加细胞检查法中细胞种类(如胚鸡肝细胞、鸡胚肾细胞),以此增加以上外源病毒的检出率。

常见的对鸡胚肝细胞敏感的病毒至少有禽偏肺病毒(禽鼻气管炎病毒)、禽腺病毒 I 群、鹌鹑支气管炎病毒、禽呼肠孤病毒、鸡产蛋下降综合症病毒、禽轮状病毒、肠道病毒样病毒等 7 种,基本与卵黄囊接种的病毒一致,具体见起草说明第 4 项中的表格。

4. 关于鸡胚检查法中增加卵黄囊接种途径 根据近年来我国新发禽病的流行情况以及近年来对 SPF 胚、毒种的风险监测结果,鸡传染性贫血病毒、禽偏肺病毒(B 亚型)、禽呼肠孤病毒等污染风险持续存在,上述病毒采用卵黄囊途径接种鸡胚时,分离成功率较高。此外,上述病毒采用细胞分离时难度较大,因此有必要在鸡胚检查法里增加卵黄囊途径,适宜卵黄囊接种的主要禽病毒及其特点如下表。关于卵黄囊接种接种鸡胚的日龄和观察时间等具体方法,主要参考了《欧洲药典》方法。

病毒名称	适宜细胞或细胞系	鸡胚接种方式
禽副黏病毒	/	9~11 日龄鸡胚尿囊腔、卵黄囊 APMV-5 采用羊膜腔、番鸭胚
禽偏肺病毒(禽鼻气管炎病毒)	鸡胚或者火鸡胚肾细胞、鸡胚肝细胞、CEF、VERO、BS-C-1、MA104、QT-35	6~7 日龄鸡胚或火鸡胚卵黄囊或尿囊腔接种(病毒经 3~5 次传代后可引起胚胎发育受阻、胚体表面出血,甚至死亡。病毒滴度低)。A 型 B 型可接种气管环培养物
鸡传染性贫血病毒	鸡 T 淋巴细胞系(MSB-1、MDCC-JP2)、B 淋巴细胞系 LSCC-1104B1、MSB-1	1 日龄雏鸡、1 日龄鸡胚卵黄囊接种(可能看不到 CPE,部分可引起死亡)、肝脏中可复制分离病毒
禽腺病毒 I 群	CK、鸡胚肝细胞、CEF(敏感性较差)、雄性来航鸡肝癌 LMH 细胞系可用于分离和增殖、QT35	鸡胚卵黄囊(初次培养不敏感)

鹌鹑支气管炎病毒	鸡胚肾细胞、鸡胚肝细胞	鸡胚尿（囊腔、卵黄囊）
禽呼肠孤病毒	鸡胚细胞、肝、肺、肾、巨噬细胞、睾丸培养细胞、CEF、VERO、BHE21/13、TTT、CRFK、GBK、RK、PK、QT35、鸡淋巴母细胞	鸡胚卵黄囊（更敏感，可在接种后3~5日出现死亡）、绒毛尿囊腔（可在接种后7~8日出现死亡）

5. 关于禽外源病毒检验细胞培养法增加鸡胚肾细胞、鸡胚肝细胞（水禽增加鸭或鹅胚成纤维细胞）传代要求等 经统计，对鸡胚肾细胞敏感或可以作为分离系统的主要禽病病毒有鸡传染性支气管炎病毒、禽疱疹病毒1型、传染性法氏囊病病毒、产蛋下降综合征病毒、鹌鹑支气管炎病毒、鸡痘病毒、禽呼肠孤病毒、禽轮状病毒、鸡星状病毒、禽脑脊髓炎病毒、鸡喉气管炎病毒、鸡马立克氏病病毒肠道病毒样病毒等13种常见病毒，对于外源病毒检验而言具有较广的适宜性。从欧洲药典来看，鸡胚肾细胞也作为细胞培养法的推荐细胞。常见的对鸡胚肝细胞敏感的病毒至少有禽偏肺病毒（禽鼻气管炎病毒）、禽腺病毒I群、鹌鹑支气管炎病毒、禽呼肠孤病毒、鸡产蛋下降综合症病毒、禽轮状病毒、肠道病毒样病毒等7种，特别是对近年来筛查到污染风险较高或新发疫病[如鸡产蛋下降综合症病毒以及禽腺病毒I群、禽偏肺病毒（B亚型）]可产生CPE。通过增加鸡胚肝细胞作为细胞检查法细胞，可增加可能存在的外源病毒的检出率。因此，无论是从增加可能存在的外源病毒检出率来看，还是与国际接轨的角度，在细胞培养法中增加鸡胚肾细胞、鸡胚肝细胞都很有必要。

对于水禽种毒和细胞增加鸭胚成纤维细胞，也是基于疱疹病毒血清1型、鹅/番鸭细小病毒、鸭肝炎病毒1型/3型、鸭肠炎病毒对于鸭胚成纤维细胞分离较为敏感。至于增加传代要求也是基于上述同样理由，不再赘述，参考了欧洲药典和美国9CFR的规定，传代2次，进行CPE观察。

6. 关于非禽外源病毒检验 结合近年来的风险分析和检测，在猪源毒种部分增加了检测PEDV、TGEV、PoRV等3种病毒培养时需要胰酶处理或辅助的病原，该3种病原在胰酶里污染风险较高。通过所级课题研究，并进行了诊断试剂及国家标准研制等技术储备，建立了相应的单抗和方法，且均经过充分的验证。此外，基于风险监测情况在羊源毒种和羊源动物源材料部分增加了边界病病毒的检测。