

口蹄疫灭活疫苗（标准草案）

Koutiyi Miehuoyimiao

Foot and Mouth Disease Vaccine, Inactivated

1 定义

本品系用口蹄疫病毒毒株接种适宜细胞培养，收获细胞培养物，经浓缩、纯化、灭活后，加入适宜佐剂制成。用于预防口蹄疫。

2 毒种

2.1 安全性 用本动物检验 猪疫苗用猪检验，反刍动物疫苗用牛检验。

2.1.1 对猪的安全性 用最小推荐使用剂量的毒种灭活抗原与适宜佐剂制备灭活疫苗，用 30~40 日仔猪（细胞中和抗体效价不高于 1:8 或液相阻断 ELISA 抗体效价不高于 1:8 或乳鼠中和抗体效价不高于 1:4；且非结构蛋白 3ABC 抗体检测为阴性）2 头，各两侧耳根后肌肉分点注射疫苗 2 头份（或 2 个推荐使用剂量），观察 14 日。均应不出现口蹄疫症状或由接种疫苗引起的明显异常反应。

2.1.2 对牛的安全性 用最小推荐使用剂量的毒种灭活抗原与适宜佐剂制备灭活疫苗，用至少 6 月龄的健康易感牛（细胞中和抗体效价不高于 1:8 或液相阻断 ELISA 抗体效价不高于 1:8 或乳鼠中和抗体效价不高于 1:4；且非结构蛋白 3ABC 抗体检测为阴性）3 头，每头舌背面皮内分多点注射，共 2 头份疫苗（或 2 个推荐使用剂量），逐日观察至少 4 日，之后每头牛按推荐途径接种 3 头份疫苗（或 3 个推荐使用剂量），观察 6 日。均应不出现口蹄疫症状或由接种疫苗引起的明显异常反应。

2.2 免疫原性 将口蹄疫病毒株的乳鼠或 BHK21 细胞适应毒制备灭活抗原，并调整为该种毒株确定的最小抗原量，与适宜佐剂制成灭活疫苗。猪用疫苗用猪检验，反刍动物用疫苗用牛检验，猪及反刍动物共用疫苗用猪检验。

2.2.1 猪用疫苗 用体重 40kg 左右的架子猪（细胞中和抗体效价不高于 1:8 或液相阻断 ELISA 抗体效价不高于 1:8 或乳鼠中和抗体效价不高于 1:4；且非结构蛋白 3ABC 抗体检测为阴性）15 头，分为 3 组，每组 5 头。将灭活疫苗分为推荐使用的最小免疫剂量 1 头份、1/3 头份、1/9 头份 3 个剂量组，每一剂量组分别耳根后肌肉注射 5 头猪，接种 28 日后，连同对照猪 2 头，每头猪耳根后肌肉注射国家批准的同型口蹄疫病毒强毒 10^3ID_{50} ，观察 10 日。对照猪均应至少有 1 蹄出现水疱或溃疡。免疫猪出现任何口蹄疫症状即判为不保护。出现发病猪后要及时进行隔离。按 Reed-Muench 法计算，每头份疫苗应至少含 6PD_{50} 。

2.2.2 反刍动物（牛羊骆驼等）用疫苗 用至少 6 月龄的健康易感牛（细胞中和抗体效价不高于 1:8 或液相阻断 ELISA 抗体效价不高于 1:8 或乳鼠中和抗体效价不高于 1:4；且非结构蛋白 3ABC 抗体检测为阴性）15 头，分为 3 组，每组 5 头。将疫苗分为推荐使用的最小免疫剂量 1 头份、1/3 头份、1/9 头份 3 个剂量组，每一剂量组份别颈部肌肉注射 5 头牛，接种 21 日后，将各组免疫牛和对照牛 2 头，分别于舌上表面两侧分 2 点皮内注射国家批准的牛源同型口蹄疫病毒强毒株，每点均为 0.1ml（0.2ml，含 10^4ID_{50} ）。观察 10 日。对照牛均应至少 3 个蹄出现水疱或溃疡。免疫牛仅在舌面出现水疱或溃疡，而其他部位无病变时判为保护，除舌面以外任一部位出现典型口蹄疫水疱或溃疡时判为不保护。根据免疫牛的保护数，按 Reed-Muench 法计算被检疫苗的 PD_{50} ，每头份疫苗应至少含 6PD_{50} 。

2.3 纯净

2.3.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.3.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

2.3.3 外源病毒检验 按附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2.4 代次限定 除另有规定外，从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 应符合附录 3502 要求。

3.2 生产用动物 应符合附录 3501 要求。

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 纯度检验（适用于监督检验及注册检验）

4.2.1 供试品制备 从待检的同批疫苗中随机抽取 3 瓶，等量混合，作为供试品疫苗。

4.2.2 动物试验 将供试品疫苗接种健康靶动物（未感染口蹄疫或未免疫口蹄疫疫苗，牛为 6 月龄以上，或猪为 2~4 月龄；且乳鼠中和抗体效价不超过 1:4 或细胞中和抗体效价不超过 1:4 或液相阻断 ELISA 抗体效价不超过 1:8，且非结构蛋白（NSP）抗体阴性）8 头，每头动物颈部肌肉注射供试品疫苗 2 次，每次接种 1 头份，间隔 28~30 日。第二次接种后 28~30 日，采血，分离血清。用口蹄疫病毒非结构蛋白（NSP）ELISA 抗体检测方法（WOAH 推荐方法或国标推荐方法）检测。

4.2.3 结果判定

如有不多于 1 头动物血清 NSP 抗体呈阳性，则判该批疫苗的纯度检验结果符合规定。

如有 3 头或 3 头以上动物血清 NSP 抗体呈阳性，则判该批疫苗纯度检验结果不符合规定。

如有 2 头动物血清 NSP 抗体呈阳性，可按本方法重检 1 次。重检后，如有不多于 1 头动物血清 NSP 抗体呈阳性，则判该批疫苗纯度检验结果符合规定；如仍有 2 头或 2 头以上动物血清 NSP 抗体呈阳性，则判该批疫苗纯度检验结果不符合规定。

4.3 安全检验

4.3.1 用小动物检验

4.3.1.1 用豚鼠检验 用体重 350~450g 豚鼠 2 只，各皮下注射疫苗 1 头份，观察 7 日，均不应出现因疫苗引起的死亡或明显的局部反应或全身不良反应。

4.3.1.2 用小鼠检验 用体重 18~22g 小鼠 5 只，各皮下注射疫苗 1/2 头份，观察 7 日，均不应出现因疫苗引起的死亡或明显的局部反应或全身不良反应。

4.3.2 用本动物检验 猪用疫苗用猪检验，反刍动物疫苗用牛检验。

4.3.2.1 用猪检验 用 30~40 日龄健康易感仔猪（细胞中和抗体效价不高于 1:8 或液相阻断 ELISA 抗体效价不高于 1:8 或乳鼠中和抗体效价不高于 1:4；且非结构蛋白 3ABC 抗体检测为阴性）2 头，各两侧耳根后分点肌肉注射疫苗推荐剂量 2 头份，每侧 1 头份，逐日观察 14 日。均不应出现口蹄疫症状或明显的因注射疫苗引起的异常反应。

4.3.2.2 用牛检验 用至少 6 月龄的健康易感牛（细胞中和抗体效价不高于 1:8 或液相阻断 ELISA 抗体效价不高于 1:8 或乳鼠中和抗体效价不高于 1:4；且非结构蛋白 3ABC 抗体检测为阴性）3 头，各舌背面皮内多点注射共 2 头份疫苗。逐日观察至少 4 日，之后每头牛按推荐途径接种 3 头份疫苗，继续观察 6 日。均不应出现口蹄疫症状或由接种疫苗引起的明显异常反应。

4.4 效力检验 猪用疫苗用猪检验，反刍动物用疫苗用牛检验，猪及反刍动物共用疫苗用猪检验。

4.4.1 用猪检验 用体重 40kg 左右的健康易感猪（细胞中和抗体效价不高于 1:8 或液相阻断 ELISA 抗体效价不高于 1:8 或乳鼠中和抗体效价不高于 1:4；且非结构蛋白 3ABC 抗体检测为阴性）15 头，分为 3 组，每组 5 头。将待检疫苗分为 1 头份、1/3 头份、1/9 头份 3 个剂量组，每一剂量组分别耳根后肌肉注射 5 头猪。接种后 28 日，连同对照猪 2 头，

每头猪耳根后肌肉注射国家批准的猪源同型口蹄疫病毒强毒株 2.0ml (含 10^3ID_{50}), 观察 10 日, 对照猪均应至少有 1 个蹄出现水疱或溃疡。免疫猪出现任何口蹄疫症状即判为不保护。根据免疫猪的保护数, 按 Reed-Muench 法计算被检疫苗的 PD_{50} 。每头份疫苗应至少含 $6PD_{50}$ 。

4.4.2 用牛检验 用至少 6 月龄的健康易感牛(细胞中和抗体效价不高于 1:8 或液相阻断 ELISA 抗体效价不高于 1:8 或乳鼠中和抗体效价不高于 1:4; 且非结构蛋白 3ABC 抗体检测为阴性) 15 头, 分为 3 组, 每组 5 头。将待检疫苗分为 1 头份、1/3 头份、1/9 头份 3 个剂量组, 每一剂量组分别颈部肌肉注射 5 头牛。接种 21~28 日后, 连同对照牛 2 头, 每头牛舌上表面两侧分 2 点皮内注射国家批准的牛源同型口蹄疫病毒强毒株, 每点均为 0.1ml (共 0.2ml, 含 10^4ID_{50}); 观察 10 日, 对照牛均应至少有 3 个蹄出现口蹄疫病变(水疱或溃疡)。免疫牛仅在舌面注射点出现水疱或溃疡, 而其他部位无病变时, 判为保护, 除舌注射点以外的任一部位出现典型口蹄疫水泡或溃疡时, 判为不保护。根据免疫牛的保护数, 按 Reed-Muench 法计算被检疫苗的 PD_{50} 。每头份疫苗应至少含 $6PD_{50}$ 。

起草说明:

1. 口蹄疫灭活疫苗是比较成熟规范的灭活疫苗, 其生产工艺和安全效力检验标准化程度高, 国际认可度高。本标准参照了 WOA 的口蹄疫灭活疫苗标准并结合我国实际情况, 在《中国兽药典》(2020 版)“猪口蹄疫(O 型)灭活疫苗”“口蹄疫(A 型)灭活疫苗(AF/72 株)”“猪口蹄疫(O 型)灭活疫苗(OZK/9+OR/80 株或 OS/99 株)”“猪口蹄疫(O 型)灭活疫苗(OZK/93 株)”“口蹄疫(O 型、亚洲 1 型)二价灭活疫苗”基础上起草。适用范围不包括合成肽疫苗, 但是合成肽疫苗的安全与效力检验可以参照此标准进行检验。

2. 定义项明确为口蹄疫强毒株、细胞培养、适宜灭活剂、适宜佐剂(未规定油佐剂或水佐剂), 用于猪或牛羊骆驼等反刍动物预防。

3. 种毒项主要强调的是制苗种毒(效力检验用毒在效力检验中简述), 原始种子我国与国际上有差异, 故仍然使用乳鼠种毒, 关注种毒的免疫原性、型特异性、纯净性、代次等, 毒种项下安全性对猪是 2 个推荐剂量。对牛首免 2 个推荐剂量, 观察 4 日后, 再接种 3 个推荐剂量。

4. 免疫原性项强调了用毒株研究确定的最小抗原量制备疫苗。

5. 依据 2024 年第 9 次会议审查意见, 删除了毒种项下的特异性项。

6. 生产用原辅料要求符合附录要求。

7. 安全检验仍采用小鼠、豚鼠和本动物, 检测疫苗毒副作用和灭活不彻底活毒残留。另将牛的安全检验国际上通用的“20 个点, 每个 0.1ml, 共 2 头份”的描述修改为“各舌背面皮内多点注射共 2 头份疫苗”, 更符合中国实际情况。

8. 效力检验 国际上基本对猪不进行免疫, 考虑到猪和反刍动物在口蹄疫疫苗免疫中确实存在差异, 特别是需要的抗原量不同, 猪中流行 Cathay 毒株。效力检验时根据疫苗的靶动物进行效力检验。为了鼓励替代方法的研究和使用, 减少猪牛等动物的使用量和生物安全风险, 强调在新制品注册时全检验, 注册发证后产品可选择本动物或替代方法进行检验。效力检验用毒一般与基础种毒一致, 国家监督检验中, 产品检验毒株可能与生产毒株不同, 用国家批准同源同型强毒进行。

9. 纯度检验 鉴于我国是 WOA 第 143 个成员国，我国“国家口蹄疫控制策略”已经报 FAO 和 WOA，并得到了国际组织的认可，国际组织也进行了现场核查，其中关于我国免疫动物非结构蛋白抗体阳性比例高的解释一直是“问题”，经过近几年企业和中监所的检测，只要国产口蹄疫灭活疫苗按照“悬浮培养、纯化浓缩工艺生产”均能达到 WOA 的检测要求，所以在修订中增加了新注册产品纯度检验的要求，以证明工艺规程能应达到标准要求，确保生产过程中严格执行即可达到纯度标准要求。确保多次免疫非结构蛋白抗体不会阳转，从而满足 WOA 要求，进一步推动口蹄疫的带毒及小规模流行的净化。关于其中方法，采用国标“口蹄疫诊断技术”最新版推荐或 WOA 推荐的方法。依据 2024 年第 9 次会议审查意见，鉴于成品检验中纯度检验项中非结构蛋白抗体检测方法不固定，具体步骤不再以附注形式详列。