

高致病性禽流感灭活疫苗（标准草案）

Gaozhibingxing Qinliugan Miehuoyimiao

High Pathogenicity Avian Influenza Vaccine, Inactivated

1 定义

本品系用 H5 亚型（或 H7 亚型）禽流感病毒接种易感鸡胚或适宜细胞培养，收获感染鸡胚液或细胞培养液，经适宜灭活剂灭活后，加适宜佐剂制成。用于预防由 H5 亚型（或 H7 亚型）禽流感病毒引起的高致病性禽流感。

2 毒种

2.1 红细胞凝集效价 按附录 3403 进行测定，对鸡红细胞凝集效价不低于 1:256。

2.2 对鸡胚的毒力 将毒种用灭菌生理盐水稀释至不低于 $10^{4.0}$ EID₅₀/0.1ml，经尿囊腔内接种 10~11 日龄 SPF 鸡胚 10 枚，每枚 0.1ml。置 37℃ 孵育 72 小时，鸡胚应至少存活 9 枚。

2.3 对鸡的致病性 将毒种接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚，置 37℃ 孵育 72 小时，取新鲜尿囊液，用灭菌生理盐水作 10 倍稀释，静脉接种 6 周龄 SPF 鸡 10 只，每只 0.1ml，静脉接种致病指数应为 0；滴鼻接种 3~4 周龄 SPF 鸡 10 只，每只 0.2ml（含 $10^{6.0}$ EID₅₀），另取 SPF 鸡 10 只，不接种作为对照，观察 14 日，均应不出现死亡或典型临床症状。

2.4 HA 基因鉴定 取毒种适量，用 RNA 提取试剂盒提取毒种 RNA，用 RT-PCR 方法扩增含 HA 基因裂解位点的基因片段，对扩增产物进行序列测定和分析，HA 基因裂解位点氨基酸序列应符合 H5 亚型（或 H7 亚型）禽流感病毒低致病力特征。

2.5 安全性 用毒种制备灭活疫苗，用推荐最小使用日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 2 倍推荐使用剂量，至少观察 14 日，应不出现由疫苗引起的任何局部或全身不良反应。

2.6 免疫原性 用毒种制备灭活疫苗，用 21~28 日龄 SPF 鸡 15 只，其中 10 只各经推荐使用的免疫途径接种疫苗适宜剂量（如最小免疫剂量），另 5 只作对照。接种后 21 日，每只鸡各滴鼻接种经批准使用的 H5 亚型（或 H7 亚型）高致病性禽流感病毒（至少含 100LD₅₀），观察 14 日。对照鸡应全部死亡，免疫鸡应全部健活。攻毒后不同适宜时间点分离病毒。采集每只免疫鸡喉头和泄殖腔拭子，混合处理后进行病毒分离，应均为阴性。

2.7 纯净

2.7.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.7.2 支原体检 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

2.7.3 外源病毒检验 按附录 3305 进行检验，应无外源病毒感染。

2.8 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 若用鸡胚生产 鸡胚应选择来源于健康鸡群的易感鸡胚。

3.2 若用细胞生产 细胞应符合附录 3502 要求。

3.3 若用注射用白油 白油应符合附录 3605 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 安全检验 用推荐最小使用日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 14 日，应全部健活，且不出现由疫苗引起的任何局部或全身不良

反应。

4.3 效力检验 下列方法任择其一。

4.3.1 血清学方法 用 21~28 日龄 SPF 鸡 15 只, 其中 10 只各经推荐使用途径接种疫苗 1 个推荐使用剂量, 另 5 只作对照。接种后 21 日, 每只鸡分别采血, 分离血清, 测定 HI 抗体效价。对照鸡 HI 抗体效价均应不高于 1:4, 免疫鸡 HI 抗体效价的几何平均值应不低于 1:128。

4.3.2 免疫攻毒法 用 21~28 日龄 SPF 鸡 15 只, 其中 10 只各经推荐使用途径接种疫苗 1 个推荐使用剂量, 另 5 只作对照。接种后 21 日, 每只鸡各滴鼻接种经批准使用的 H5 亚型 (或 H7 亚型) 高致病性禽流感病毒 (至少含 100LD₅₀), 观察 14 日。对照鸡应全部死亡, 免疫鸡应全部健活。攻毒后第 5 日, 采集每只免疫鸡喉头和泄殖腔拭子, 混合处理后进行病毒分离 (阴性样品应盲传 1 代), 应均为阴性。

4.4 甲醛残留量测定 (适用于用甲醛灭活) 按附录 3203 进行测定, 应符合规定。

4.5 汞类防腐剂残留量测定 (适用于使用硫柳汞灭活或防腐) 按附录 3202 进行测定, 应符合规定。

5 注意事项

5.1 高致病性禽流感灭活疫苗不允许使用高致病性禽流感病毒作为制苗用毒。

5.2 效检用种毒为批准使用的高致病性禽流感病毒毒株。

起草说明:

1. 本标准的制定 主要是依据目前使用的高致病性禽流感 H5 亚型 (或 H7 亚型) 灭活疫苗标准文件 (农业农村部公告第 513 号和 523 号, 包括二价、三价胚苗和细胞苗, 主要用于预防 2.3.4.4h 分支和 2.3.4.4b 分支 H5 亚型和 H7 亚型高致病性禽流感)。

2. 目前高致病性禽流感灭活疫苗标准相对比较统一, 现将公告第 513 号、523 号批准的 6 个产品合并, 提取其公共部分, 制定本通用标准。

3. 关于制品名称 依据 2023 年度第 4 次会议审查意见, 删除了名称中重组及亚型。制品定义中, 依据 2024 年度第 8 次会议审查意见, 增加了“由 H5 亚型 (或 H7 亚型) 病毒引起的高致病性禽流感”限定。

4. 关于培养基质 现行的高致病性禽流感灭活疫苗包括胚苗和细胞苗, 故定义部分采取 2 种培养基质。

5. 关于是否需要浓缩 这对于单个制品来说不是必需的, 故定义中删去浓缩。

6. 关于佐剂 将来使用的佐剂可能不限于油佐剂, 故修改为适宜佐剂。

7. 关于生产用种毒 目前批准的高致病性禽流感灭活疫苗 (H5 亚型或 H7 亚型或 H5+H7 亚型) 生产用种毒均为重组的低致病力禽流感病毒。

8. 关于效检用种毒 目前高致病性禽流感变异较快, 种毒更换采取备案措施进行, 且基因型比较统一, 本次药典标准为通用标准, 故效检用种毒采取经批准使用的毒株。

9. 关于对雏鸭毒力 依据 2023 年度第 4 次会议审查意见删除此部分内容。

10. 关于基因鉴定 不一一列出裂解位点序列, 只说明应符合低致病力序列特征。

11. 关于生产用种毒免疫原性 依据 2023 年度第 4 次会议审查意见, 采用适宜剂量进行免疫, 删除了血清学标准规定。依据 2024 年度第 8 次会议审查意见, 在毒种的免疫原性中, SPF 鸡的日龄采用 3~4 周龄 (或 21~28 日龄), 免疫后连续观察 10 日改为 14 日, 病毒

分离不限于 5 日，修改为攻毒后不同适宜时间点分离病毒。

12. 关于纯净 依据 2023 年度第 4 次以及第 8 次会议审查意见，将无菌检验、支原体检验、外源病毒检验分开进行描述。

13. 关于代次 通用标准暂按照宽泛的要求为好，指导原则规定也是病毒不超过 5 代。

14. 关于生产用原辅料 目前高致病性禽流感灭活疫苗包括鸡胚苗和细胞苗，对所需原辅料鸡胚和细胞分开进行要求，同时提出注射用白油的要求。

15. 关于安全检验动物年龄 不同产品使用的 SPF 鸡日龄不一致，建议采用推荐最小使用日龄。已批准的 6 个制品最低使用日龄均为 2 周龄。

16. 关于效力检验 目前批准的高致病性禽流感灭活疫苗效力检验出厂标准均为 1:128，WOAH 中规定高致病性禽流感灭活疫苗免疫达到阻止排毒的 HI 抗体效价为 1:128，2023 年度第 4 次会议讨论将高致病性禽流感灭活疫苗效力检验血清学效价暂提高到 1:128（参考中监所所有批签发数据，均不低于 1:128）；依据 2024 年度第 8 次会议审查意见，将效力检验项中免疫攻毒法观察时间由 10 日改为 14 日。