

## 兽用生物制品菌（毒、虫）种毒力返强试验技术指导原则

**1 目的** 为兽用活疫苗进行菌（毒、虫）种的毒力返强试验提供指导。

**2 背景** 《兽药注册管理办法》中规定，在申请注册活疫苗的申报资料中必须提交菌（毒、虫）种的毒力返强试验报告。毒力返强试验是评估疫苗的基础种子经靶动物连续传代后的毒力或遗传稳定性，以确保疫苗接种动物后不会导致毒力增强。

### 3 毒力返强试验方法

#### 3.1 一般要求

3.1.1 试验设计 应根据菌（毒、虫）种的特点制定毒力返强试验的试验方案，包括试验动物的品种、日龄、数量，接种时间、途径和接种量，传代方法，观察内容和时间，微生物分离鉴定方法，以及传代后毒力返强程度的评价标准。

3.1.2 试验动物 试验所用动物应为 SPF 级（如鸡）或健康易感靶动物。试验时动物日龄应对被检微生物最易感，动物数量应根据动物种类而定，但每次传代时一般应使用 2~5 头（只）。在正式试验前，应测定试验动物对被测试菌（毒、虫）种的敏感性，以确保菌（毒、虫）种能在动物体内正常增殖。

3.1.3 传代方法 在传代过程中，应根据菌（毒、虫）种在靶动物体内的增殖特点，在适宜的时间采集含菌（毒、虫）量最高的组织、分泌物或排泄物，经适当处理作为继代接种物，以确保微生物的重分离率和传代的成功率。对于一些易水平传播的微生物，也可以经动物直接接触感染进行传代。在每一次传代过程中，必须采用适当方法对采集的样品进行微生物鉴定和含量测定，以证实传代接种物中是否存在被检微生物。传代过程中，禁止将重分离的微生物在体外增殖后再进行传代。

3.1.4 接种剂量 在首次传代试验时，应根据菌（毒、虫）种在试验动物体内的增殖特性，选择适宜的接种剂量（一般采用大剂量）进行接种，以确保菌（毒、虫）种在试验动物体内充分增殖。继代时，应保证接种的分离材料中有足量的微生物；必要时可加大接种剂量或者对分离材料进行适当浓缩。

#### 3.2 试验程序

3.2.1 第一次接种 按预先制订的返强试验方案，使用基础种子的最低代次对第一组试验动物进行接种，使其在靶动物体内适当增殖。

3.2.2 微生物的重分离 接种后的分离时间应在靶动物感染后菌（毒、虫）的增殖高峰期，要采用接种动物最适当的组织、分泌物或排泄物来分离微生物。

3. 2. 3 分离物的鉴定 应采用适当的检测方法，鉴定分离物中是否存在被检微生物。

3. 2. 4 继代 由前次接种动物分离到的材料，按照与第一次传代相同的途径接种继代动物。每一次继代后的病原重新分离与鉴定同第一次传代。如采用接触感染方式进行继代，应将前次感染动物在其菌（毒、虫）的增殖高峰期转移至新的隔离器（或动物舍）与易感靶动物混合饲养，以此进行接触感染传代。

3. 2. 5 观察 每一次继代后应在适当的时间内观察接种动物是否出现由于疫苗株毒力返强所导致的临床症状指标和病理变化。

3. 2. 6 传代次数 在靶动物体内连续传代次数一般应不少于 5 代（即首次接种后要要进行 4 次继代）。

3. 2. 7 最后一次传代观察时间 将重新分离的微生物接种最后一次传代的试验动物后，应逐日观察至少 21 日。

3. 2. 8 微生物重分离失败 在继代过程中，如果适易的动物组织或分泌物或排泄物中不能重分离到微生物，则应适当增加接种剂量或试验动物数量，以提高重分离率。

3. 2. 9 继代试验失败确证 如果经进一步试验确证继代后不能重新分离到接种微生物，该毒力返强试验结果可判成立。

### 3. 3 返强试验结果判定

3. 3. 1 临床症状及病理变化比较 根据菌（毒、虫）种对易感靶动物的致病性，比较不同代次接种动物的临床症状及病理变化，特别应对最后一代传代动物与第一代传代动物的临床症状和病理变化进行对比。

3. 3. 2 病原学鉴定 必要时，应对最后一次传代的分离物进行表型和基因型鉴定，并与基础种菌（毒、虫）种进行比较，以评估其遗传稳定性和毒力返强的可能性。