

兽用生物制品菌（毒、虫）种种子批建立试验技术指导原则

1 目的 为兽用新生物制品研制人员进行兽用生物制品菌（毒、虫）种子批建立及各级种子鉴定提供原则性指导。

2 背景 《兽药注册办法》和农业部第 442 号公告规定，兽用生物制品的制造应以种子批系统为基础。种子批分三级：原始种子、基础种子和生产种子。只有按照规定项目和方法进行检验证明合格的种子，方可用于生产兽用生物制品。

3 定义

3.1 原始种子 具有一定数量、背景明确、组成均一、经系统鉴定免疫原性和繁殖特性良好、生物学特性和鉴别特征明确、纯净的病毒（细菌、虫）株。

3.2 基础种子 由原始种子制备、处于规定代次水平、一定数量、组成均一、经系统鉴定符合有关规定的活病毒（菌体、虫）培养物。

3.3 生产种子 由基础种子制备、处于规定代次范围内、经鉴定符合有关规定的活病毒（菌体、虫）培养物。

4 种子批的建立

4.1 原始种子批的建立 选用某一菌（毒、虫）株用于兽用生物制品研制和生产后，即应建立原始种子批，以确保在制品的持续生产期内，能充分供应质量均一的种子。

原始种子批建立基本原则为对选定的菌（毒、虫）株进行纯培养，并将培养物分成一定数量、装量和成分一致的小包装（如安瓿），于液氮中或其他适宜条件下保存。对原始种子批要按照有关要求做系统鉴定。通常情况下，应对原始种子的繁殖或培养特性、免疫原性、血清学特性、鉴别特征和纯净性进行鉴定。

4.2 基础种子批的建立

4.2.1 基础种子由原始种子经适当方式传代扩增而来，增殖到一定数量后，将相同代次的所有培养物均匀混合成一批，定量分装（如安瓿），保存于液氮中或其他适宜条件下备用。按照规定项目和方法进行系统鉴定合格后，方可作为基础种子使用。基础种子批应达到足够的规模，以便能够保证相当长时间内的生产需要。

4.2.2 基础种子代次的确定 通常情况下，将基础种子传代至规定最高代次以上第 3 代，取不同代次水平的培养物进行含量、免疫原性试验，考察其繁殖特性和免疫原性的稳定性。必要时，还须考察基础种子的遗传稳定性。

4.3 生产种子批的建立 生产种子由基础种子经适当方式传代扩增而来，达到一定数量

后，均匀混合，定量分装，保存于液氮或其他适宜条件下备用。根据特定生产种子批的检验标准逐项（一般应包括纯净性检验、特异性检验和含量测定等）进行检验，合格后方可用于生产。并须确定生产种子在特定保存条件下的保存期。

生产种子批应达到一定规模，并含有足量活病毒（或细菌、虫），以确保能满足生产一批或一个亚批产品。

5 基础种子的鉴定

对基础种子应进行系统鉴定，一般应进行下列鉴定项目。

5.1 含量测定 应尽量采用通行方法，并确保在全部试验过程中采用相同的测定指标（如半数感染量、半数致死量等）。

5.2 安全或毒力试验

5.2.1 本试验主要考察基础种子对本动物的致病性，为制定相应标准提供依据，并为试验设施、生产设施、培养物灭活前或诊断试剂使用过程中应采取的安全措施等提供依据。

5.2.2 参照《兽用生物制品实验室安全试验指导原则》设计、实施安全试验。

5.2.3 对于人工构建的基因工程菌（毒）株，应该按照《农业转基因生物安全管理条例》和《农业转基因生物安全评价管理办法》有关规定进行安全或稳定性试验。

5.3 免疫抑制试验（如果适用） 有证据表明疫苗毒（如鸡传染性法氏囊病病毒）可能存在免疫抑制作用时，则应按照国际标准（或通行）方法进行本试验。

5.4 毒力返强试验（如果适用） 参照《兽用生物制品菌毒种毒力返强试验指导原则》的要求设计、实施本试验。

5.5 免疫原性（或最小免疫剂量）试验 活疫苗，用不同剂量的菌（毒、虫）种分别接种动物；灭活疫苗，用最高代次基础种子制备疫苗菌（毒）液，取不同含量的细菌（病毒）悬液，按成品生产工艺制备抗原含量不同的疫苗，或用固定含量的细菌（病毒）液制备疫苗后，取不同剂量的疫苗，分别接种不同组动物；在接种后的适宜时间进行攻毒或采用已经证明与免疫攻毒方法具有平行性关系的替代方法进行免疫效力检验，统计出使 90% 免疫动物获得保护的细菌（病毒）量就是最小免疫量。如果疫苗使用对象包括多种动物或多种日龄动物，则应针对各种靶动物进行免疫原性（最小免疫剂量）试验。

5.6 纯净性检验 按照《中华人民共和国兽药典》中的有关方法进行检验，必要时需自行建立方法并加以验证。应无细菌、霉菌、外源病毒污染；应无杂菌污染；应无支原体污染。对于禽用疫苗毒种而言，除应按照《中华人民共和国兽药典》中的方法进行外源病毒检测外，还应采用适宜方法进行禽网状内皮组织增生症病毒和鸡传染性贫血因子等外源病毒检测。

5.7 鉴别检验

5.7.1 应采用适宜方法（如荧光抗体试验、毒种的血清中和试验、菌种的试管凝集试验、

菌种的玻片凝集试验或菌种的生长特性检验) 鉴别疫苗株, 并尽可能与相关毒株相区别。

5.7.2 血清学特性鉴定, 应采用通行的分型方法。种特异性鉴定时, 应用血清中和试验; 若进行进一步的血清型或亚型鉴定时, 则用型或亚型特异性单克隆抗体进行中和试验、免疫荧光试验或用其他已知具有型或亚型特异性的试验进行。

5.8 稳定性试验 确定基础种子在特定保存条件下的保存期。

6 种子批管理基本原则

6.1 对原始种子, 应详细说明其背景, 如名称、时间、地点、来源、代次、菌(毒、虫)株代号和历史等, 并进行有关特性鉴定。对于自行分离并致弱的弱毒菌(毒)株原始种子, 应详细报告致弱株的选育方法和过程。对通过基因工程技术人工构建的菌(毒)株原始种子, 应提供详细的基因操作方法和对工程株的系统鉴定报告。

6.2 一批基础种子接近全部用完时, 必须按规定方法重新制备培养物, 并按照规定项目和方法进行系统鉴定合格后, 方可作为新的一批基础种子使用。

6.3 对基础种子批和生产种子批, 应详细记录代次、安瓿的存放位置、识别标志、冻存日期和库存量。

应将基础种子批和生产种子批分别放置在生产区中相距较远的两处、多个容器存放, 避免种子丢失。非生产用细菌(病毒、虫)应严格与生产用细菌(病毒、虫)分开存放。为了容易区分, 每个基础种子批要有一个指定代码。

6.4 一般不能用基础毒种传代 5 代以上或基础菌种传代 10 代以上制备疫苗。如果将这种代次范围之外的基础种子用于生产, 应通过进一步的试验加以证明。

6.5 从生产种子批中取出的种子, 增殖一次后获得的病毒(细菌、虫)培养物, 即应用于制备疫苗。用生产种子增殖获得的病毒(细菌、虫)培养物, 不得再回冻保存和再次用于生产。

6.6 应阐述基础种子和生产种子的保存与使用方法, 包括在生产过程中如何确保所用种子不超过批准的最高代次等详细情况。应保存有足够量的基础种子, 供有关部门进行检验用。