

水生动物疫苗实验室效力试验 技术指导原则

一、目的

为水生动物疫苗实验室效力试验研究提供原则性指导。

二、背景

水生动物疫苗的免疫效力是考察其质量的最重要指标之一。农业部公告第 442 号对兽用疫苗的实验室效力试验项目进行了详细规定。

三、基本要求

(一) 生物安全要求

实验室及动物实验室的生物安全条件应符合国家有关实验室生物安全标准。

(二) 实验用动物的要求

1. 实验室效力试验应使用靶动物进行。有充分资料证明与靶动物效力试验结果有平行关系的,可使用其他动物作为替代动物。

2. 实验室效力试验中所用试验用动物应健康易感,不携带影

响试验结果判定的特定病原或特定抗体。必要时应使用普通级或SPF级易感实验动物。

3. 试验用动物的种类、年龄、个体大小、体重和生理状态(如性成熟)应与疫苗说明书中拟规定的靶动物相一致。试验用动物的来源/遗传背景应尽量避免存在差异性。

4. 每批疫苗制品的实验室效力试验中所用水生动物应不少于30尾,来源困难或经济价值高的动物应不少于5尾。

(三) 养殖水质的要求

在疫苗接种期间,实验养殖用水的水质参数,如温度和盐度(如淡水与海水)应与疫苗应用的实际养殖环境相似。必要时应设置合理的温度梯度。

(四) 对制品的要求

实验室效力试验中所用实验室疫苗制品的生产用菌(毒、虫)种、制品组成和配方等,应与规模化生产的产品相同。实验室疫苗制品应经过必要的性状、含量、纯粹/纯净性等初步检验,且结果须在预期的可接受范围内。

为了同时证明产品“规程”中所规定的基础种子使用代次范围的合理性,通常用处于最高代次水平的病毒(或细菌)抗原制备疫苗后,进行效力试验。一旦试验结果证明最高代次水平的疫苗具有令人满意的免疫效果,则可认为规定范围内的基础种子均具有令人满意的免疫原性。

如果每批规模化生产的产品出厂时的“效力检验”采取与参考疫苗对比的方法,则在实验室效力试验中,除应使用实验室制品进行效力试验外,还应用参考疫苗进行系统的效力试验。

(五)对攻击用强毒的要求

1. 在多数实验室效力试验中可能会使用攻毒用强毒。对已经有国家标准强毒株的,应使用标准强毒株,必要时增加使用当时的流行株。对没有国家标准强毒株的,可使用自行分离的强毒株,但需报告其来源、历史和有关鉴定结果。

2. 使用高致病性病原微生物的,应按有关规定事先获得有关部门批准。

(六)试验设计

1. 在试验开始前,应制定详细的实验室效力试验方案,其内容应包括受试疫苗的种类,试验开始和结束的日期,试验用动物的年龄、种类等特征,疫苗配方,对照组的设置,每组动物的来源和数量、饲养条件、试验管理和观察方式,结果的判定方法及标准等。

2. 试验时应设置空白对照组。如有对照疫苗,还可设对照疫苗组。

四、实验室效力试验的内容及方法

(一)靶动物免疫攻毒试验

该方法是考察水生动物疫苗免疫效力的常规方法。其基本方法是:用实验室疫苗制品接种一定数量的动物,经一定时间后,采

用攻毒用强毒株同时对上述免疫动物和对照动物进行攻毒,在攻毒后一定时间内,观察动物的发病或死亡情况,统计免疫及对照动物发病率或死亡率,或计算相对保护率,评估制品的效力;必要时,在观察期结束时,将所有动物扑杀,进行病理组织学检查,有时还应进行病原分离,根据免疫动物和对照动物的眼观病理学变化、组织病理学变化或病原分离情况评估制品的免疫效力。靶动物免疫攻毒试验的具体方法可分为定量免疫定量强毒攻击法、变量免疫定量强毒攻击法、定量免疫变量强毒攻击法等,具体试验中可根据疫苗制品和疾病的具体情况选择一种或数种适宜方法。

1. 定量免疫定量强毒攻击法。该方法中以定量的受试疫苗接种适宜动物,经一定时间后,用定量的强毒进行攻击,观察动物接种后所建立的免疫力。

2. 定量免疫变量强毒攻击法。该方法中将动物分为两大组,一为免疫组,一为对照组,两大组又各分为相等的若干小组,每小组的动物数相等。免疫组各小组动物均用同一剂量的受试疫苗进行免疫接种,经一定时间后,与对照组一起,同时用不同稀释度强毒进行攻击,观察、统计免疫组与对照组各小组的发病率、死亡率、病变率或感染率,分别计算免疫组与对照组的 LD₅₀(或 ID₅₀),比较免疫组与对照组动物对不同剂量强毒攻击的耐受力。

3. 变量免疫定量强毒攻击法(PD₅₀ 试验)。该方法中疫苗稀释为不同的免疫剂量,并分别接种动物,间隔一定时间待动物的免

疫力建立以后,各免疫组均用同一剂量的强毒攻击,观察一定时间,用统计学方法计算能使 50% 的动物得到保护的免疫剂量 (PD50)。

4. 有关说明。如因动物来源困难等导致无法用靶动物建立适宜的攻毒模型,并有充分的科学依据证明采用替代动物抗体测定法、替代动物免疫攻毒法等其他方法与靶动物免疫攻毒效力之间有一定相关性时,可采用替代方法取代靶动物免疫攻毒试验。

(二)疫苗抗原(细菌或病毒)含量与靶动物免疫攻毒保护力相关性的研究(最小免疫剂量试验)

疫苗内抗原(细菌或病毒)含量与免疫攻毒保护率之间,在一定范围内通常存在明显平行关系,可根据最小免疫剂量试验结果建立疫苗成品的抗原(细菌或病毒)含量标准,对符合抗原(细菌或病毒)含量标准的疫苗,就无需对每批疫苗进行免疫攻毒效力检验。最小免疫剂量的试验方法如下:用不同剂量的疫苗分别接种动物,经一定时间后进行攻毒或采用已经证明与免疫攻毒方法具有平行关系的替代方法进行免疫效力试验,统计出使动物获得较好保护力(通常应达到 80% ~ 100%)的最低的疫苗接种量,就是最小免疫剂量。如果疫苗使用对象包括多种动物或多种日龄动物,则应针对各种或各日龄段靶动物测定最小免疫剂量。

(三)免疫产生期及免疫持续期试验

1. 用实验室疫苗制品接种一定数量的动物。接种后,每隔一

定时间,用攻毒用强毒对一定数量的免疫动物和未接种的对照动物同时进行攻毒或采用已经确认与攻毒保护率具有平行关系的血清学方法测定抗体水平,观察其产生免疫力的时间、免疫力达到高峰期的时间及高峰期持续时间。以接种后最早出现良好免疫力的时间为该疫苗制品的免疫产生期,以接种后保持良好免疫力的最长时间为免疫持续期。

2. 如果是季节性疾病,只要能够证明疫苗的免疫力能持续到接种后的一年中疾病的自然发生期末。不论是否进行加强免疫接种,均应提出在此后一年(或几年)的发病季节中的免疫力情况。

3. 免疫期试验应在严格控制的实验室条件下进行。若因免疫期过长、人工饲养对实验用动物影响过大等原因导致已有实验室条件不足以满足整个免疫期内的试验,则可在临床试验中进行免疫期验证。在进行临床免疫期试验的过程中,应确保疫苗接种的靶动物不发生并发性感染,有必要设同池未接种的靶动物作对照(哨兵动物),以监视动物是否受到田间感染。

4. 主动免疫的免疫期通常是指用受试疫苗进行一次接种后提供的保护作用的持续期。通常应在所推荐的加强接种开始的时间之前,对接种过的动物进行攻毒来确定。

5. 如有充分的试验依据证明适当指标(如抗体水平)与靶动物免疫攻毒保护率间存在良好的定性或定量关系,则可用替代指标来衡量疫苗接种后的免疫力。

6. 通常情况下,不接受用非靶动物试验获得的免疫期试验数据。

(四)血清学效力检验与靶动物免疫攻毒保护相关性的研究

当成品的效力检验中采用血清学方法测定免疫动物抗体反应,而不采用免疫攻毒试验时,应事先进行平行关系验证试验,以证明选用该血清学方法的科学性。具体试验方法是:用不同剂量的受试疫苗免疫接种动物,以便获得具有不同抗体水平的动物,根据抗体水平的高低,将动物分为若干组,用已经选定的强毒株按照预定剂量进行攻毒。对抗体水平与攻毒保护率之间的关系进行分析。

(五)不同血清型或亚型间的交叉保护力试验

有些传染病病原存在多个血清型或血清亚型,应进行交叉保护力试验。其方法为:用推荐使用剂量疫苗接种一定数量的动物,在产生免疫力后,分别用不同血清型或血清亚型的强毒株进行攻毒,观察其交叉保护力。通过本试验筛选疫苗菌(毒、虫)株,并为合理使用疫苗提供依据。

(六)替代动物的效力检验与靶动物效力检验结果相关性的研究

一些制品的效力检验用靶动物来源困难、费用高,可使用替代动物,但应进行靶动物与替代动物免疫攻毒保护力平行关系的试验研究,证明具有平行关系者,方可用替代动物代替靶动物。

(七)不同接种途径对靶动物的效力试验

水生动物疫苗的接种途径主要包括注射、口服和浸泡等。根据制品的种类、特点,以及相关试验数据,选用合适的接种途径作为推荐接种途径。

(八)接种后动物体内抗体消长规律的研究

免疫动物后,定期采血测定免疫动物产生抗体的最早时间、抗体高峰期、抗体持续期,为制定免疫程序提供依据。

(九)相关说明

上述实验室效力试验项目中,第(一)、(二)、(三)通常是必不可少的,第(四)、(五)、(六)、(七)、(八)项有时不是必须的,应根据制品的种类、性质、靶动物、质量标准等具体情况选择进行。第(一)项通常是成品效力检验标准的最直接依据,应有连续3批实验室制品的试验数据。