

附件 4. 山羊痘/绵羊痘活疫苗（标准草案）

山羊痘/绵羊痘活疫苗

Shanyangdou/Mianyangdou Huoyimiao
Goat Pox/Sheep Pox Vaccine, Live

1 定义 本品系用山羊痘/绵羊痘病毒弱毒株接种适宜细胞培养，收获细胞培养物，加入适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防山羊痘、绵羊痘。免疫期应不低于 12 个月。

2 毒种

2.1 安全性

2.1.1 对山羊的安全性 用无菌生理盐水将毒种稀释为不少于 4 个推荐使用剂量，经易感部位皮内接种 12~48 月龄健康易感山羊和 1~3 月龄山羊羔各 3 只，每只每点接种不少于 2 个推荐使用剂量，接种前测定体温应不少于 3 日，接种后观察 28 日，每日测定体温，接种羊注射部位可出现直径不超过 4.0cm 的微红色或无色痘肿反应，且应在观察期内逐渐消退，痘肿不应出现紫红色、严重水肿、化脓、结痂等反应，间或可有轻度体温反应，但精神、食欲应正常。接种羊不应出现继发痘肿。

2.1.2 对绵羊的安全性 用无菌生理盐水将毒种稀释为不少于 4 个推荐使用剂量，经皮内注射 12~48 月龄健康易感绵羊和 1~3 月龄健康易感绵羔各 3 只，每只每点接种不少于 2 个推荐使用剂量，接种前测定体温应不少于 3 日，接种后观察 28 日，每日测定体温，接种羊注射部位可出现直径不超过 4.0cm 的微红色或无色痘肿反应，且应在观察期内逐渐消退，痘肿不应出现紫红色、严重水肿、化脓、结痂等反应，间或可有轻度体温反应，但精神、食欲应正常。接种羊不应出现继发痘肿。如毒种为绵羊痘病毒，羊的品种应增加细毛羊尤其是美利奴羊。

2.1.3 对怀孕羊的安全性 用无菌生理盐水将毒种稀释为不少于 4 个推荐使用剂量，经皮内注射怀孕 3~5 月龄健康易感山羊/绵羊 3 只，每只每点接种不少于 2 个推荐使用剂量，注射时动作应轻柔，避免出现因抓羊引起的机械性流产，接种后观察至母羊产羔，接种母羊注射部位可出现直径不超过 4.0cm 微红色或无色痘肿反应，且应在观察期内逐渐消退，痘肿不应出现紫红色、严重水肿、化脓、结痂等反应，间或可有轻度体温反应，但精神、食欲应正常。接种羊不应出现继发痘肿，所产羔羊均应健活。

2.2 毒力返强 用无菌生理盐水将毒种稀释至不少于 1 个推荐使用最大剂量，经胸腹皮内注射 12~48 月龄健康易感山羊/绵羊 5 只，每只每点接种不少于 0.5 个推荐使用最大剂量，接种后第 4~7 日，采血并扑杀接种羊，观察有无继发痘肿，无菌采集痘肿、眼鼻分泌物、血液、体表淋巴结等，分别制成组织悬液，取样进行病毒检测，将检测为阳性的组织悬液等量混合均匀，经胸腹部皮内接种健康易感山羊/绵羊 5 只，连续传代 5 次。第 5 代接种羊在接种后观察 30 日，观察期满后剖检，观察有无继发痘肿。第 5 代接种羊注射部位可出现直径不超过 4.0cm 的微红色或无色痘肿反应，且应在观察期内逐渐消退，痘肿不应出现紫红色、严重水肿、化脓、结痂等反应，间或可有轻度体温反应，但精神、食欲应正常。接种羊不应出现继发痘肿。

2.3 免疫原性

2.3.1 最小发痘量 用无菌生理盐水将毒种作 10 倍系列稀释，取 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 3 个稀释度或适宜稀释度，每个稀释度经敏感部位皮内注射 12~48 月龄健康易感山羊/绵羊 3 只，每只 2 点，0.5ml/点（也可在每只羊体上同时注射不同稀释度，每个稀释度 2 点，0.5ml/点）。观察 15 日， 10^{-4} 或 10^{-5} 稀释度（含不高于 60 TCID₅₀）至少应有 1 只羊在接种后出现直径为

0.5~3.0cm 微红色或无色痘肿反应，且持续 4 日以上，观察期内逐渐消退。

2.3.2 免疫攻毒 用 12~48 月龄健康易感山羊/绵羊 6 只，按推荐途径接种羊 3 只，每只 1 个最小免疫剂量，接种后 21 日，连同对照羊 3 只，各皮内注射山羊痘/绵羊痘病毒强毒。将山羊痘/绵羊痘病毒强毒株用 PBS 进行 10 倍系列稀释，取 6 个适宜稀释度，沿肋部纵向皮内注射四排，每个稀释度接种 4 点，0.1ml/点。对照羊 24 个接种位点可能形成 24 个肿块，最高稀释度的 4 个接种位点反应较小或无反应，免疫羊 24 小时应在其接种位点形成初期过敏反应，然后消失，最高稀释度的注射位点可能会形成小坏死区，攻毒后 8~10 日测量斑疹/丘疹/痘肿。计算免疫羊和对照羊形成斑疹/丘疹/痘肿的滴度，如两者差值 $> \log_{10} 2^5$ ，说明免疫具有保护作用。

2.4 水平传播 用适宜日龄健康易感山羊/绵羊 3 只，各接种病毒液不少于 1 个推荐使用最大剂量，接种后 1 日，将对照山羊/绵羊 3 只，与免疫羊同居饲养，进行水平传播试验。观察同居羊的健康状况，应至少观察 28 日，在观察期内（第 14、28 日）无菌采血并分离血清，检测病毒核酸和抗体，均应为阴性；同居健康易感山羊/绵羊应无异常临床反应。

2.5 纯净

2.5.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.5.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

2.5.3 外源病毒检验 按附录 XX（外源病毒检验的一般要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2.6 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 原代细胞或其他适宜细胞系 应符合附录 3502 要求。

3.2 牛血清 应符合附录 3503 要求。

3.3 特定生物原材料 应符合附录 3009 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 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

4.3 外源病毒检验 按附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

4.4 鉴别检验 用无血清细胞培养液将疫苗稀释至 1/10 个推荐使用剂量/ml，取 0.5ml 与等体积山羊痘阳性血清混合均匀，置 37℃ 中和 60 分钟，取中和液 1.0ml 接种绵羊羔睾丸细胞或适宜细胞单层 1 瓶（25cm²），补足细胞培养液，置 37℃、含 5%CO₂ 培养箱培养 6 日，应不出现 CPE。

4.5 安全检验 按瓶签注明头份，用无菌生理盐水将疫苗稀释至 4 个推荐使用剂量/ml，经胸腹部皮内注射 12~48 月龄山羊/绵羊 3 只，每只 2 点，0.5ml/点，观察 15 日。接种羊可出现直径不超过 4.0cm 的微红色或无色痘肿反应，且在观察期内逐渐消退，间或可有轻度体温反应，但精神、食欲应正常。

4.6 病毒含量测定 按瓶签注明头份，用无血清细胞培养液将疫苗稀释至 1 个推荐使用剂量/ml，以此为基础作 10 倍系列稀释，取 3 个适宜稀释度，接种 96 孔细胞板，每个稀释度接种 8 孔，每孔 0.1ml，接种后每孔加入绵羊羔睾丸细胞或适宜细胞悬液 0.1ml，置 37℃、含 5%CO₂ 培养箱培养 6 日。根据出现 CPE 的细胞孔数，按 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀，每头份疫苗病毒含量应不低于说明书标示量。

4.7 发痘检验 按瓶签注明头份，用无菌生理盐水将疫苗稀释至 0.02 个推荐使用剂量/ml，经胸腹部皮内注射 12~48 月龄山羊/绵羊 3 只，每只 2 点，0.5ml/点，观察 15 日。接

种羊应至少有 2 只在接种后 5~7 日出现直径为 0.5~3.0cm 微红色或无色痘肿反应，且持续 4 日以上，观察期内逐渐消退。

4.8 剩余水分测定 按附录 3204 进行测定，应符合规定。

4.9 真空度测定 按附录 3103 进行测定，应符合规定。

5 注意事项 注射时，应避免保定不当引起的怀孕母羊机械性流产。不同品种的羊使用时应开展小规模田间试验。

起草说明：

1. 本标准系在参考 2000 年版《中国兽用生物制品规程》和 2020 年版《中国兽药典》收载的“山羊痘活疫苗”质量标准的基础上，补充完善了毒种对山羊安全性、对绵羊安全性、免疫原性（最小发痘量）、特异性鉴定、效力检验（发痘检验）等内容起草而成。本标准属于首次起草。

2. 对毒种的特异性检验和成品鉴别检验进行细化，规定了中和用量，接种细胞瓶规格等，观察时间统一为 6 日，便于检验操作。依据 2024 年第 9 次会议审查意见，将制品名称修改为“山羊痘/绵羊痘”活疫苗，其英文名和汉语拼音作了相应修改。对免疫期应不少于 12 个月作了限定，并放在定义最后。与狂犬病灭活疫苗等免疫期要求类似。

3. 由于实际生产过程中已经不使用乳汉液或乳欧液，将所有涉及内容删除，统一为无血清细胞培养液。同时还涉及了较多的规范性修改：删除了一般性的没有必要说明的注意事项，没有必要的注意事项基本可以不写常规的注意事项；删除了作用与用途、用法与用量、规格、保存期等项；纯净项中，鉴于附录方法进行无菌、支原体和外源病毒检验，各自独立进行（并按已定的附录代号）；按照统一体例格式要求，病毒活疫苗毒种部分的安全性中，增加了毒力返强的要求。

4. 对成品病毒含量测定进行了修改，删除培养 3~5 日，第 5 日判定等内容，规范为培养 6 日。

5. 按照 2020 年版《中国兽药典》收载的“山羊痘活疫苗”中成品检验按点注射的表述方式，将安全性、免疫原性中羊的注射表述进行了规范性修改。

6. 注意事项中把“抓羊”改成“保定不当”。

7. 参考 2000 年版《中国兽用生物制品规程》，在毒种安全性、免疫原性、纯净性方面增加了羊痘毒种的通用标准要求。

8. 参考 2000 年版《中国兽用生物制品规程》和农业农村部公告第 8 号，生产和检验用细胞增加了山羊肾细胞。随后考虑到通用标准，改为了适宜细胞。

9. 依据 2025 年度第 3 次会议审查意见，将安全性项和安全检验项的接种剂量确定为 4 个推荐使用剂量；羊怀孕后期改为怀孕 3~5 月龄；修改了毒力返强项，接种剂量改为“不少于 1 个推荐使用最大剂量。删除了免疫后 4~5 日产生免疫力；将效力检验项改为发痘检验。

10. 根据统一要求，将“水平传播”单独列项，病毒含量标准修改为“每头份疫苗病毒含量应不低于说明书标示量”。