

附件 6. 猪日本脑炎活疫苗（标准草案）

猪日本脑炎活疫苗

Zhu Riben Naoyan Huoyimiao
Swine Japanese Encephalitis Vaccine, Live

1 定义 本品系用日本脑炎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。用于预防猪日本脑炎。

2 毒种

2.1 对小鼠的致病性

2.1.1 脑内接种 用 12~14g 小鼠 10 只，每只脑内注射毒种 0.03ml(含 $1.5 \times 10^{4.0}$ PFU)，3 日内死亡数不得超过 2 只。其余小鼠继续观察 14 日，应全部健活。

2.1.2 皮下接种 用 10~12g 小鼠 10 只，每只皮下注射毒种 0.1 ml(含 $5 \times 10^{4.0}$ PFU)，同时进行脑内空刺，3 日内死亡数不得超过 2 只。其余小鼠继续观察 14 日，应全部健活。

2.2 安全性

2.2.1 对母猪的安全性 用健康易感母猪 2 头，配种前 1 个月每头肌肉注射毒种 10 个推荐使用剂量。同时设 2 头健康易感母猪作为对照，配种前 1 个月肌肉注射同等剂量的稀释液，观察母猪至分娩，所有免疫猪应接种部位无溃烂、脓肿、坏死，若出现肿块、结节，观察期内可消退，免疫猪应不出现流产、早产、死胎或弱仔等繁殖障碍，所产仔猪的活仔率、健仔率等与对照猪相比，应无统计学差异。

2.2.2 对公猪的安全性 用健康易感成年公猪 2 头，肌肉注射毒种 $10^{6.0}$ PFU，接种前观察并连续测温 3 日，以平均值作为基础体温，接种后连续测温 7 日，并连续观察 21 日，体温升高应不超过基础体温 1°C ，应不出现睾丸肿大，采集公猪精液，经核酸检测猪日本脑炎病毒核酸应为阴性。

2.2.3 毒力返强 将毒种以适宜的剂量经静脉接种 2~3 日龄未吃初乳的健康乳猪 2 只，接种后在猪日本脑炎病毒增殖高峰期采脑组织样品，经适当处理作为继代接种物，继代 4 次且最后一代（第 5 代）肌肉接种猪配种前 1 个月的母猪 2 头，同时设 2 头对照。观察至母猪分娩，免疫猪应不出现流产、早产、死胎或弱仔等繁殖障碍，所产仔猪的活仔率、健仔率等与对照猪相比，应无统计学差异。

2.3 免疫原性

2.3.1 用母猪检验 用健康易感母猪 5 头，配种前 1 个月经肌肉注射最小免疫剂量猪日本脑炎病毒种毒。在母猪妊娠后 30~40 日，连同对照组怀孕母猪 5 头，各皮下注射日本脑炎病毒强毒 P3 株(含小鼠脑内毒力为 $5 \times 10^{6.0}$ LD₅₀)，观察母猪至分娩，对照猪应至少 4 头出现流产、早产、死胎或弱仔等繁殖障碍，免疫猪应至少 4 头不出现流产、早产、死胎或弱仔等繁殖障碍。

2.3.2 用小鼠检验 用培养基将毒种进行 10 倍系列稀释，取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 3 个稀释度，分别皮下接种 10~12g 小鼠 10 只，每只 0.1ml。免疫后 14 日，连同对照小鼠 10 只，各腹腔注射日本脑炎病毒强毒 P3 株（含 500LD₅₀），同时每只小鼠进行脑内空刺，3 日内死亡数不得超过 2 只，连续观察 14 日，对照小鼠应至少 8 只死亡，每 0.1ml 毒种应至少含 10PD₅₀。

2.4 纯净

2.4.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.4.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

2.4.3 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。

2.5 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 细胞 应符合附录 3502 要求。

3.2 牛血清 应符合附录 3503 要求。

3.3 培养基和冻干保护剂 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 用疫苗稀释液将疫苗稀释成 500PFU/ml(或 200TCID₅₀/0.1ml)，取 0.5ml 与猪乙型脑炎病毒特异性血清等量混合，同时设立病毒对照和空白对照。病毒对照为乙型脑炎病毒液与含 2%新生牛血清的适宜培养基等量混合，空白对照为猪乙型脑炎病毒阳性血清与含 2%新生牛血清的适宜培养基等量混合。将上述混合液置 37℃作用 1.5 小时，分别接种长满 BHK-21 细胞单层的 6 孔培养板中，各混合液接种 2 孔（每孔 0.5ml），置 37℃吸附 1 小时。吸附完毕后，加入含 2%新生牛血清的适宜培养基至 2ml/孔，置 37℃培养，每日观察 1 次，连续观察 5~7 日。试验组和空白对照组均应无 CPE，病毒对照应出现 CPE。

4.5 安全检验 用 10~12g 小鼠 10 只，各皮下注射疫苗 0.2ml(含 0.5 个推荐使用剂量)，同时脑内空刺，3 日内死亡应不超过 2 只，其余小鼠继续观察至 14 日，应全部健活。

4.6 病毒含量测定 将疫苗稀释至 1 个推荐使用剂量/ml，进行病毒含量测定。每头份疫苗病毒含量应不低于说明书标示量。

4.7 效力检验 用 10~12g 小鼠 10 只，各皮下注射疫苗 0.1ml(含 0.1 个推荐使用剂量)。免疫后 14 日，连同对照小鼠 10 只，每只腹腔注射乙型脑炎病毒强毒 P3 株(含腹腔滴定的 500LD₅₀)，同时每只小鼠进行脑内空刺，3 日内死亡数不得超过 2 只。连续观察 14 日。免疫小鼠应全部健活，对照小鼠应至少 8 只死亡。

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。

起草说明：

1. 本标准系在参考 2020 年版《中国兽药典》收载“猪乙型脑炎活疫苗”【地鼠肾原代细胞】和 2017 年版《兽药质量标准·生物制品卷》“猪乙型脑炎活疫苗（SA14-14-2 株）”以及农业农村部公告第 406 号批准的“猪乙型脑炎活疫苗（传代细胞源，SA14-14-2 株）3 个注册标准基础上、参考有关文献资料以及农业农村部公告第 573 号规定的病种名录等要求起草而成。本标准属于首次起草。

2. 本标准在命名上，依据 2024 年度第 9 次会议审查意见，将制品通用名称修改为“日本脑炎活疫苗”。结合制品命名原则，将制品名称修改为“猪日本脑炎活疫苗”。对于各企业按注册标准生产的猪乙型脑炎活疫苗产品在监督检验中，对应国家标准均按照猪日本脑炎活疫苗国家标准进行。综合考虑同类型产品的名称，保留“猪日本脑炎活疫苗”的命名方式。

3. 本标准“定义”描述中由于同类型产品使用生产细胞不同，如农业部公告第 875 号中猪乙型脑炎活疫苗（SA14-14-2 株）和 2020 年版《中国兽药典》猪乙型脑炎活疫苗明确接种地鼠原代肾细胞，农业农村部公告第 406 号猪乙型脑炎活疫苗（SA14-14-2 株）明确接种 vero 细胞，故在此处未明确接种细胞种类，用“接种适宜细胞”进行描述。

4. 在种毒致病性检验方法中，农业部公告第 875 号中的猪乙型脑炎活疫苗（SA14-14-2 株）和 2020 年版《中华人民共和国药典》中乙型脑炎减毒活疫苗中均未对小鼠品系做出规定，因此本标准中未对小鼠品系做出规定。在毒力检验方法中明确了脑内和皮下接种毒种的具体含量。

5. 在种毒的安全性检验方法中，本标准参考活疫苗成品按照 10 个推荐使用剂量开展安全性检验的要求，增加了对照组，并细化了安全性评价指标。参考农业部公告第 875 号中注册标准，完善了种毒对母猪的毒力返强试验标准。

6. 在种毒免疫原性检验方法中，本标准参考农业农村部公告第 406 号和农业部公告第 875 号中的猪乙型脑炎活疫苗（SA14-14-2 株）的免疫原性方法，保留了种毒对母猪和小鼠的免疫原性的检验方法，对母猪的免疫原性检验方法中增加了对照组。

7. 根据 2024 年第 9 次会议审查意见，删除种毒的特异性检验项目。

8. 在成品的鉴别检验方法中，本标准将每日观察 2 次调整为每日观察 1 次，简化检验流程。

9. 在检验用细胞方面，本标准参考农业农村部公告第 406 号和《农业部公告第 875 号的猪乙型脑炎活疫苗（SA14-14-2 株）的检测方法，并参考 2020 年版《中华人民共和国药典》中收录的乙型脑炎减毒活疫苗标准中的检测用细胞均为 BHK-21 细胞，将毒种特异性检验、鉴别检验、病毒含量测定使用的检验用细胞调整为 BHK-21 细胞。

10. 在病毒含量测定方法中，《兽药质量标准》（2017 年版·生物制品卷）》（P375～P378）和农业农村部公告第 406 号中猪乙型脑炎活疫苗（SA14-14-2 株）标准均明确使用 BHK-21 细胞（传代细胞）进行 PFU 测定，合格标准为 $10^{5.0}$ PFU/头份，在 2020 年版《中国兽药典》中收录的猪乙型脑炎活疫苗的病毒含量检验方法中，明确使用地鼠原代细胞进行 TCID₅₀ 检测，合格标准为 $10^{5.7}$ TCID₅₀/头份，考虑到在 TCID₅₀ 方法中，病毒接种后需要培养 7 日，正常细胞容易出现变圆老化的情况，导致出现误判为病变的现象，同时参考 2020 年版《中华人民共和国药典》中收录的乙型脑炎减毒活疫苗的病毒滴定采用蚀斑计数的方法，因此将病毒含量测定方法调整为 PFU 测定，每头份病毒含量 $\geq 10^{5.0}$ PFU 或者规定为不低于说明书标示量。

11. 在成品安全检验方法中，2020 年版《中国兽药典》中收录的“猪乙型脑炎活疫苗”检测方法中明确用仔猪检验作为必选项目，小鼠检验方法从脑内致病力、皮下感染入脑和毒性试验三个方法中任择其一，2017 年版《兽药质量标准·生物制品卷》》和农业农村部公告第 406 号批准的猪乙型脑炎活疫苗（SA14-14-2 株）检验方法中明确使用仔猪检验和小鼠脑内致病力检验方法，和 2020 年版《中国兽药典》中收录的要求原则上类似，因此参考以上依据，将安全检验方法明确为对小鼠的安全检验方法（脑内致病力）方法。

12. 在健康易感动物筛选方面，明确“用适宜方法检测猪乙型脑炎病毒抗原抗体应为阴性”。

13. 在成品的检验方法方面，由于农业部公告第 875 号批准的“猪乙型脑炎活疫苗（SA14-14-2 株）”、2017 年版《兽药质量标准·生物制品卷》》收录的猪乙型脑炎活疫苗（SA14-14-2 株）、2020 年版《中国兽药典》中收录的“猪乙型脑炎活疫苗”、农业农村部公告第 406 号批准的“猪乙型脑炎活疫苗标准（传代细胞源，SA14-14-2 株）”标准，均进行了病毒含量测定，故将病毒含量测定方法单独列出作为评价疫苗效力的方法。

14. 根据 2024 年度第 9 次会议审查意见，保留了效力检验方法（用小鼠免疫攻毒法）。

15. 依据 2025 年度第 3 次会议审查意见，制品名称改为“猪日本脑炎活疫苗”。毒种项下完善修改了安全性、毒力返强、免疫原性，重新编制了小鼠免疫原性效力标准，用 PD₅₀

作为效力评价标准，并列出了计算方法。此外，将病毒含量统一改为“病毒含量应不低于说明书标示量”。

国家药监局