

小反刍兽疫活疫苗（Clone 9 株）

本品系用小反刍兽疫弱毒 Clone9 株接种 Vero 细胞，收获细胞培养物，加适宜稳定剂经冷冻真空干燥制成。用于预防羊的小反刍兽疫。

【性状】 乳白色或淡黄色海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离，加稀释液后迅速溶解。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录 3306 进行检验，应无菌生长。

【支原体检验】 按现行《中国兽药典》附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

【鉴别检验】 按瓶签注明头份将疫苗用无血清 MEM 细胞培养液稀释成 2 头份/ml，加入等体积小反刍兽疫阳性血清，病毒对照管加入等体积无血清 MEM 细胞培养液，在 37℃ 下作用 1 小时后接种 96 孔细胞培养板，病毒中和液和病毒对照液各接种 5 孔，每孔 0.1ml，同时设立不接毒细胞对照 5 孔，所有孔均加入浓度为 20~30 万/ml Vero 细胞悬液 0.1ml，置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 6 日，期间每日观察细胞病变，病毒对照孔均应出现细胞融合等典型细胞病变，中和组及不接毒细胞对照孔均不得出现细胞病变。

【外源病毒检验】 按附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

【病毒含量测定】 按瓶签注明头份用无血清 MEM 细胞培养液稀释成 1 头份/ml，再作 10 倍系列稀释，取 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 四个稀释度，接种 96 孔细胞培养板，每个稀释度接种 5 孔，每孔 0.1ml，每孔再加入浓度为 20~30 万/ml 的 Vero 细胞悬液 0.1ml，同时设立正常细胞对照，37℃、5%CO₂ 培养箱培养 6 日，期间每日观察细胞病变，根据出现细胞病变的孔数，按 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀，每头份的病毒含量应不低于 10^{3.0}TCID₅₀。

【安全检验】 （1）用豚鼠检验 将疫苗按瓶签注明头份用无菌生理盐水稀释成含 100 头份/ml，选取体重为 200~250g 豚鼠 6 只，肌肉注射 2 只，每只 0.5ml；腹腔注射 2 只，每只 0.5ml；2 只不接种，作为对照。逐日观察 14 日，所有动物均应健活。

（2）用小鼠检验 将疫苗按瓶签注明头份用无菌生理盐水稀释成含 100 头份/ml，用体重为 18~22g 小白鼠 10 只，其中腹腔注射 6 只，每只 0.1ml；4 只不接种，作为对照。逐日观察 14 日，所有动物均应健活。

（3）用山羊检验 将疫苗按瓶签注明头份用无菌生理盐水稀释成含 100 头份/ml，颈部皮下接种 1 岁左右健康易感山羊（小反刍兽疫病毒中和抗体效价小于 1:4）3 只，每只 1ml。接种后每日测定体温 1 次并观察临床症状，连续观察 14 日，除一过性体温升高外（持续不超过 2 个温次），应无其它异常临床症状。

【效力检验】 将疫苗用灭菌生理盐水稀释成含 1/10 头份/ml，颈部皮下接种 1 岁左右健康易感山羊（小反刍兽疫病毒中和抗体效价小于 1:4）5 只，每只 1ml，接种后 21 日采血测定中和抗体（附注 1）。免疫羊血清和阳性对照血清先作 1:5 稀释，再进行 2 倍系列稀释，阴性血清作 1:2、1:4、1:8 稀释，将各稀释度血清加入 96 孔细胞培养板，每个稀释度接种 5 孔，每孔 0.1ml，同时设立病毒回归对照，向所有血清孔加入 100TCID₅₀/0.1ml 病毒工作液 0.1ml，向细胞对照孔加入 0.2ml 无血清 MEM 细胞培养液，向病毒对照孔中加入 0.1ml 无血清 MEM 细胞培养液，37℃ 作用 1 小时。加入浓度为 20~30 万/ml 的 Vero 细胞悬液 0.1ml，

置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 6 日，期间每日观察细胞病变。10TCID₅₀ 以上病毒对照及阴性血清对照孔均应出现小反刍兽疫病毒特有的细胞融合等细胞病变，1TCID₅₀ 病毒对照部分孔出现细胞病变，0.1TCID₅₀ 病毒回归、阳性血清对照 1:160 稀释度以下细胞孔和细胞对照孔应不出现细胞病变。记录被检血清各稀释度细胞病变孔数，以 5 个试验孔均未出现细胞病变的血清最高稀释度为中和抗体效价。免疫羊血清中和抗体效价均应不低于 1:10。

【**剩余水分测定**】 按现行《中国兽药典》附录 3204 进行检验，应符合规定。

【**真空度测定**】 按现行《中国兽药典》附录 3103 进行检验，应符合规定。

【**作用与用途**】 用于预防羊小反刍兽疫，免疫期为 36 个月。

【**用法与用量**】 按瓶签注明头份，用灭菌生理盐水稀释成每毫升含 1 头份，每只羊颈部皮下注射 1ml。

【**注意事项**】 （1） 稀释后的疫苗应避免阳光直射，气温过高时在接种过程中应冷水浴保存，稀释后的疫苗应限 3 小时内用完。

（2） 用过的疫苗瓶，剩余疫苗及接种用注射器均应消毒处理。

（3） 仅用于接种健康动物。

（4） 怀孕母羊接种疫苗时，保定动作应轻柔，避免因保定不当引起的流产。

【**规格**】 （1）50 头份/瓶 （2）100 头份/瓶

【**贮藏与有效期**】 置-20℃以下保存，有效期为 24 个月。

附注 4: ~~小反刍兽疫血清中和试验操作方法~~

1 ~~将小反刍兽疫 Clone9 株病毒液用无血清 MEM 细胞培养液稀释成 10^{-2.0} TCID₅₀/0.1ml。~~

2 ~~将被检羊血清、阳性对照血清、阴性对照血清在 56℃水浴灭能 30 分钟。~~

3 ~~试验操作~~

3.1 ~~将非免疫羊血清和阴性血清用无血清 MEM 细胞培养液作 1:2、1:4、1:8 稀释，将免疫羊血清和阳性对照血清先作 1:5 稀释，再进行 2 倍系列稀释，将各稀释度被检血清及阳性和阴性对照血清分别加入 96 孔细胞培养板，每个稀释度接种 5 孔，每孔 0.1ml。~~

3.2 ~~同时设立病毒回归对照，即将 100 TCID₅₀/0.1ml 病毒工作液用无血清 MEM 细胞培养液 10 倍系列稀释成 10TCID₅₀/0.1ml、1TCID₅₀/0.1ml、0.1TCID₅₀/0.1ml，取病毒工作液和 3 个稀释度病毒液，每个病毒液接种 5 孔，每孔 0.1ml。~~

3.3 ~~向所有血清孔加入 100TCID₅₀/0.1ml 病毒工作液 0.1ml，向细胞对照孔加入 0.2ml 无血清 MEM 细胞培养液，向病毒对照孔中加入 0.1ml 无血清 MEM 细胞培养液，37℃作用 1 小时。~~

3.4 ~~向所有孔中加入浓度为 20~30 万/ml 的 Vero 细胞悬液 0.1ml，置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 6 日，期间每日观察细胞病变。~~

4 ~~试验结果判定~~

~~10TCID₅₀ 以上病毒对照及阴性血清对照孔均应出现小反刍兽疫病毒特有的细胞融合等细胞病变，1TCID₅₀ 病毒对照部分孔出现细胞病变，0.1TCID₅₀ 病毒回归、阳性血清对照 1:160 稀释度以下细胞孔和细胞对照孔应不出现细胞病变。记录被检血清各稀释度细胞病变孔数，以 5 个试验孔均未出现细胞病变的血清最高稀释度为中和抗体效价。~~

附注 2: ~~疫苗冻干保护剂配方~~

~~蔗糖 75g 右旋糖苷 40g 山梨醇 40g~~

~~明胶 25 g Na₂HPO₄ 0.51g NaH₂PO₄ 1.25g~~

加适量注射用水溶解，1mol/LKOH调pH值至7.2，用注射用水补至1000ml，115℃高压灭菌30分钟。

附注3 小反刍兽疫中和试验抗原及阴、阳性血清制造和质量标准

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 制备用动物：1岁左右山羊，用微量细胞中和试验测定小反刍兽疫病毒抗体、山羊痘病毒抗体和伪狂犬病毒抗体效价，均应低于1:4；用口蹄疫抗体液相阻断-ELISA检测试剂盒测定口蹄疫病毒（O型和亚洲1型）抗体，应低于1:4。

1.1.2 小反刍兽疫病毒 Clone9 株：每毫升病毒含量不低于 $10^{5.5}$ TCID₅₀。

1.1.3 口蹄疫抗体液相阻断-ELISA检测试剂盒，O型抗体检测试剂盒，亚洲1型抗体检测试剂盒。

1.1.4 山羊痘病毒 AV41 株病毒液：每毫升病毒含量不低于 $10^{5.0}$ TCID₅₀。

1.1.5 伪狂犬病毒 Bartha-k61 株病毒液：每毫升病毒含量不低于 $10^{5.0}$ TCID₅₀。

1.1.6 小反刍兽疫病毒阴性血清、阳性血清，自OIE参考实验室引进。

2 方法

2.1 小反刍兽疫中和试验抗原的制备—按照小反刍兽疫活疫苗（Clone9 株）制造和检验规程中疫苗制造方法进行制备。

2.2 小反刍兽疫病毒阴性血清的制备

2.2.1 取1岁左右山羊，用微量细胞中和试验测定小反刍兽疫病毒抗体、山羊痘病毒抗体和伪狂犬病毒抗体效价，均应低于1:4；用口蹄疫抗体液相阻断-ELISA检测试剂盒测定口蹄疫病毒（O型和亚洲1型）抗体，应低于1:4。

2.2.2 采血及血清提取—对每只羊颈动脉采血，将血液收集在灭菌容器内，置37℃孵育2小时，2~8℃过夜。无菌提取血清。将羊血清混合后用0.22 μm 滤器过滤除菌。

2.2.3 分装及冻干 2ml/瓶，冷冻干燥后置-20℃以下保存。

2.3 小反刍兽疫病毒阳性血清的制备

2.3.1 取1岁左右山羊，用微量细胞中和试验测定小反刍兽疫病毒抗体、山羊痘病毒抗体和伪狂犬病毒抗体效价，均应低于1:4；用口蹄疫抗体液相阻断-ELISA检测试剂盒测定口蹄疫病毒（O型和亚洲1型）抗体，应低于1:4。

2.3.2 免疫—每只山羊颈部皮下注射小反刍兽疫病毒液 2ml，接种后14日同剂量接种1次。

2.3.3 血清抗体效价测定—三次免疫后14日采血，分离血清，用细胞中和试验测定中和抗体效价。

2.3.4 采血及血清提取—将血清中和抗体效价不低于1:320的羊经颈动脉采血，将血液收集在灭菌容器内，置37℃孵育2小时，2~8℃过夜。无菌提取血清。将羊血清混合后用0.22 μm 滤器过滤除菌。

2.3.5 分装及冻干 2ml 瓶，冷冻干燥后置-20℃以下保存。

2.4 小反刍兽疫中和试验抗原、阴性血清、阳性血清质量标准

2.4.1 小反刍兽疫中和试验抗原质量标准

—【性状】—海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离，加稀释液后迅速溶解。

—【无菌检验】—按现行附录 3306 进行检验，应无菌生长。

—【支原体检验】—按现行附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

—【特异性检验】—将抗原用无血清 MEM 细胞培养液稀释成每 0.1ml 含 200TCID₅₀，加入等体积小反刍兽疫阳性血清，病毒对照管加入等体积无血清 MEM 细胞培养液，在 37℃下作用 1 小时后接种 96 孔细胞培养板，病毒中和液和病毒对照液各接种 5 孔，每孔 0.1ml，同

时设立不接毒细胞对照 5 孔，所有孔均加入浓度为 20~30 万/ml Vero 细胞悬液 0.1ml，在 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 6 日，期间每日观察细胞病变，病毒对照孔均应出现细胞融合等典型细胞病变，中和组及不接毒细胞对照孔均不得出现细胞病变。

~~【外源病毒检验】按附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。~~

~~【病毒含量测定】按瓶签注明装量用无血清 MEM 细胞培养液溶解后作 10 倍系列稀释，取 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 4 个稀释度，接种 96 孔细胞培养板，每个稀释度接种 5 孔，每孔 0.1ml，每孔再加入浓度为 20~30 万/ml 的 Vero 细胞悬液 0.1ml，同时设立正常细胞对照，37℃、5%CO₂ 培养箱培养 6 日，期间每日观察细胞病变，根据出现细胞病变的孔数，按 Reed-Muench 法计算 TCID₅₀，每毫升抗原液病毒含量应不低于 10^{5.5} TCID₅₀。~~

2.4.2 阴性血清、阳性血清质量标准

~~【性状】应为浅红色疏松团块。~~

~~【无菌检验】按现行附录 3306 进行检验，应无菌生长。~~

~~【特异性检验】将阳性血清和阴性血清作 1:4 稀释，56℃灭能 30 分钟，每份样品接种 2 块 96 孔细胞板，各 5 孔，每孔 0.1ml。第 1 块板每孔加入 100TCID₅₀/0.1ml 的山羊痘病毒 AV41 株病毒液 0.1ml，第 2 块板每孔加入 100TCID₅₀/0.1ml 的伪狂犬病毒 BarthaK-61 株病毒液 0.1ml，分别设立病毒对照孔和细胞对照孔，37℃中和 1 小时，山羊痘病毒中和孔、病毒对照孔和细胞对照孔，每孔加入 0.1ml 绵羊睾丸细胞；伪狂犬病毒中和孔，病毒对照孔和细胞对照孔，每孔加入 0.1 ml BHK21 细胞，置 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 6 日，每日观察细胞病变，伪狂犬病毒中和孔和病毒对照孔应在 24~48 小时出现细胞病变，山羊痘病毒中和孔和病毒对照孔应在 96~120 小时出现细胞病变。~~

~~用 O 型和亚洲 1 型口蹄疫液相阻断 ELISA 抗体检测试剂盒测定口蹄疫病毒抗体，应低于 1:4。~~

~~【血清抗体效价测定】将阴性血清作 1:2、1:4、1:8 稀释，将阳性血清用无血清 MEM 细胞培养液作 1:5 稀释，56℃灭能 30 分钟，再在 96 孔细胞板上进行 2 倍系列稀释至 1:1280，每个稀释度接种 5 孔，每孔 0.1ml，每孔加入 100TCID₅₀/0.1ml 小反刍兽疫病毒液 0.1ml，混匀后，37℃中和 1 小时，每孔再加入浓度为 20~30 万/ml 的 Vero 细胞悬液 0.1ml。同时设立正常细胞对照和病毒对照，置 37℃培养 6 日，观察细胞病变情况。记录被检血清各稀释度细胞病变孔数，以 5 个试验孔均未出现细胞病变的血清最高稀释度为中和抗体效价。~~

~~阴性血清效价应低于 1:4，阳性血清效价应不低于 1:160。~~

备注：本标准替代农业部公告第 2325 号中中国兽医药品监察所、北京中海生物科技有限公司、新疆天康畜牧生物技术股份有限公司注册的同品种标准。