

3407 狂犬病灭活疫苗小鼠效力检验法（NIH 法）（标准草案）

本法系将待检疫苗和参考疫苗分别免疫小鼠后，通过免疫攻毒法计算待检疫苗的相对效力。主要用于兽用狂犬病灭活疫苗的效力检验。

1 疫苗处理样品处理

1.1 参考疫苗的稀释 取参考疫苗 1 瓶，用 5.0ml PBS（0.01mol/L，pH 值 7.4~7.6，下同）复溶，再用 PBS 进行 5 倍系列稀释，取 1：25、1：125、1：625 和 1：3125 等 4 个适当稀释度的样品，冰浴保存备用（应在 3 小时内用完）。

1.2 待检疫苗的稀释 取待检疫苗 1 瓶，按瓶签注明头份数用 PBS 进行 5 倍系列稀释，取 1：5、1：25、1：125 和 1：625 等 4 个适当稀释度的样品，冰浴保存备用（应在 3 小时内用完）。

2 检验方法

2.1 免疫

2.1.1 首次免疫 取按 1.1 和 1.2 稀释的各稀释度参考疫苗和待检疫苗，分别从最高稀释度到最低稀释度进行接种，每个稀释度各腹腔注射 3~4 周龄、体重 11~16g 的雌性小鼠 16 只，0.5ml/只。

2.1.2 第二次免疫 首免后 7 日，取按 1.1 和 1.2 稀释的各稀释度参考疫苗和待检疫苗，并按照 2.1.1 方法和剂量对首免的小鼠进行第二次免疫。

2.2 攻毒 首免后 14 日，所有免疫小鼠经脑内接种 50LD₅₀/0.03ml 狂犬病病毒 CVS-24 株病毒液，0.03ml/只。同时将攻毒病毒液进行返滴定回归测定，即取病毒液再进行适当稀释液后，取每个稀释度各脑内接种 10 只雌性小鼠，0.03ml/只。攻毒后所有小鼠连续观察 14 日，前 4 日内（含第 4 日）死亡的小鼠记为非特异性死亡，从第 5 日起记录各组每日死于狂犬病的小鼠数量，第 14 日出现麻痹或痉挛等典型狂犬病症状的小鼠也按死亡计算。对 5~14 日内死亡和存活的小鼠进行统计。采用 Reed-Muench 法计算待检疫苗和参考疫苗的 ED₅₀，并按下列公式计算待检疫苗的相对效价（RP）。

$$RP = \frac{\text{待检疫苗 ED}_{50} \text{ 的倒数}}{\text{参考疫苗 ED}_{50} \text{ 的倒数}} \times \text{参考疫苗效价 (IU/ml)}$$

3 注意事项检验成立的有效条件

试验必须满足下列条件，结果方为有效。

3.1 各免疫组小鼠攻毒后 4 日内（含第 4 日）死亡数量应不超过 2 只。

3.2 接种最高稀释度参考疫苗和待检疫苗小鼠的特异性死亡数量应不少于总数（不含非特异性死亡小鼠）的 70%。接种最低稀释度参考疫苗和待检疫苗的小鼠存活数量应不少于总数（不含非特异性死亡小鼠）的 70%（如疫苗进行 1：5、1：25、1：125 和 1：625 稀释，本条所述最低稀释度即指 1：5，最高稀释度即为 1:625）。

3.3 攻击病毒液回归测定的滴度应不小于 10LD₅₀/0.03ml。