

3407 狂犬病灭活疫苗效力检验方法（NIH 法）

本法系将待检疫苗和参考疫苗免疫小鼠后，产生抗体，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 材料

1.1 待检疫苗稀释液 每次免疫时，任取复溶或摇匀后的待检疫苗至少 3ml，再用 PBS（0.01mol/L，pH7.4~7.6）进行 5 倍系列稀释，取 1:5、1:25、1:125 和 1:625 等 4 个稀释度，稀释后冰浴保存备用。

1.2 参考疫苗稀释液 每次免疫时，任取 1 支参考疫苗用 5ml PBS（0.01mol/L，pH7.4~7.6）复溶后，再用稀释液进行 5 倍系列稀释，取 1:25、1:125、1:625 和 1:3125 等 4 个稀释度，稀释后冰浴保存备用。

2 方法

2.1 小鼠免疫 分别用注射器从最高稀释度至最低稀释度吸取参考疫苗和待检疫苗的稀释液（冰盒内保存，使用不得超过 3 小时），腹腔接种小鼠各 20 只，0.5ml/只。7 日后，按照相同方法进行第二次免疫。

2.2 攻毒

2.2.1 攻击强毒半数致死量（LD₅₀）的测定

将狂犬病病毒 CVS-24 株悬液用 PBS（0.01mol/L，pH7.4~7.6）进行 10 倍系列稀释，取 10⁻² 至 10⁻⁷ 稀释度，每个稀释度脑内接种小鼠 10 只，0.03 ml/只，连续观察 14 日。接种后 4 日内（包括第 4 日）死亡的小鼠为非特异性死亡，弃去不计。记录各组小鼠 5 至 14 日的每日死亡数，用 Reed-Muench 法计算狂犬病病毒 CVS-24 株的 LD₅₀。

2.2.2 小鼠攻毒 首次免疫后 14 日，根据上述狂犬病病毒 CVS-24 株 LD₅₀测定结果，用 PBS（0.01mol/L，pH7.4~7.6）稀释成含有 50 LD₅₀/0.03ml 的 CVS-24 株工作毒液，脑内接种免疫组小鼠，0.03ml/只；同时将工作毒液用 PBS（0.01mol/L，pH7.4~7.6）进行 10 倍系列稀释，取 10⁰ 至 10⁻³ 稀释度，每个稀释度脑内接种同条件的对照小鼠各 10 只，0.03ml/只，攻毒后连续观察 14 日。接种后 4 日内（包括第 4 日）死亡的小鼠为非特异性死亡，弃去不计。记录各组小鼠 5 至 14 日的每日死亡数，用 Reed-Muench 法计算待检疫苗和参考疫苗的 ED₅₀。

3 结果

3.1 试验成立条件

试验必须满足下列条件，结果方为有效。

3.1.1 各免疫组小鼠脑内接种 4 日内死亡数量不超过 4 只。

3.1.2 接种最高稀释度参考疫苗和待检疫苗的小鼠至少 50%死亡。接种最低稀释度参考疫苗和待检疫苗的小鼠至少 50%存活。

3.1.3 攻击强毒的病毒回归效价必须不低于 10 LD₅₀/0.03ml。

3.1.4 如果未达到上述有效试验的要求，则认为该试验为无效试验，必须要重新检验。如果第一次检验不符合规定，须另外进行两个独立的重复检验，取 3 次试验的 RP 值的几何平均数作为待检疫苗的最终结果。

3.2 结果的计算

按照下列公式计算待检疫苗（TV）的相对效价（RP）：

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

备注：本标准为中国兽药典委员会新拟定标准。