

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.09.10

# 细菌类动物疫苗安全检验方法概述

刘元杰,王团结,王秀丽,张一帆,李建,张媛\*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2022-02-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 09-0066-05 [中图分类号] S859.797

**[摘要]** 安全检验是判定疫苗安全性的重要检验项目,涉及实验动物的筛选、不同免疫方法的选择以及免疫后的观察等方面。从免疫方法、实验动物两方面对细菌类动物疫苗安全检验方法进行综述,以为动物疫苗安全检验提供参考。

**[关键词]** 安全检验;免疫方法;实验动物;筛选;观察

## Summary of Safety Inspection Methods for Bacterial Animal Vaccines

LIU Yuan-jie, WANG Tuan-jie, WANG Xiu-li, ZHANG Yi-zhi, LI Jian, ZHANG Yuan\*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: ZHANG Yuan, E-mail: 12301675@qq.com

**Abstract:** Safety inspection is an important inspection item to judge the safety of vaccines, which involves the screening of experimental animals, the selection of different immunization methods and the observation after immunization. This paper summarizes the safety inspection methods of bacterial animal vaccines from the aspects of immunization methods and experimental animals, in order to provide reference for the safety inspection of animal vaccines.

**Key words:** safety inspection; inspection methods; experimental animals; screening; observation

疫苗的安全检验是指通过特定剂量接种实验动物,根据实验动物的反应来确定疫苗是否安全的方法。目前我国动物疫苗的安全检验采用的是接种实验动物法。在常规的注册检验、复核检验和监督检验中,安全检验只需要按照质量标准中安全检验项目进行。而在产品研发过程中,针对特定产品,还需要进行特殊项目的安全性评价。如对部分活疫苗,需要评价其水平传播对其他易感动物和环

境的影响;对于以基因工程技术研制的动物疫苗产品,要按照农业农村部有关规定,进行转基因生物安全评价等。本文重点阐述常规安全检验中涉及的技术方法。

### 1 安全检验概述

1.1 免疫剂量 在细菌类动物疫苗产品安全检验质量标准对免疫剂量的叙述中,灭活疫苗主要以体积为计量单位,如免疫 2 mL、3 mL 等。活疫苗多为

作者简介:刘元杰,硕士,从事细菌制品的检验和研究工作。

通讯作者:张媛。E-mail: 12301675@qq.com

冻干苗,主要以头份/羽份数为计量单位,同时规定稀释液体积。2020 版《中国兽药典》中,对个别产品进行了规范,如沙门氏菌马流产活疫苗(C355 株),从以菌落形成单位为计量单位变更为体积同时标注头份数的方式。虽然计量单位不同,但安全检验的接种剂量都与使用剂量遵循一定的比例原则。在使用本动物进行安全检验时,接种剂量一般活疫苗不少于 10 个使用剂量,灭活疫苗不少于 2 个使用剂量<sup>[1]</sup>。疫苗研发安全试验有一次单剂量接种、单剂量重复接种和一次超剂量接种三个过程<sup>[2]</sup>,而在安全检验中以一次超剂量接种为主。对于需要多次接种的产品,安全检验需要进行多次超剂量接种,如猪支原体肺炎灭活疫苗(CJ 株)<sup>[3]</sup>。

**1.2 免疫方法** 在细菌类动物疫苗的安全检验中,免疫方法以皮下注射和肌肉注射为主。部分产品的要求更加细化,如对小鼠规定背部皮下、腿部皮下或腿部肌肉,对鸡规定颈背部皮下或腿部肌肉等。除皮下注射和肌肉注射以外,在特定产品中还有其他的免疫方法。如沙门氏菌马流产活疫苗用腹腔注射的方法接种小鼠,鸡毒支原体活疫苗用点眼的方法接种 SPF 鸡,鸡毒支原体活疫苗(MG 6/85 株)用喷雾方法接种 SPF 鸡<sup>[4]</sup>,猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗(C20 株)用口服疫苗稀释液的方法接种猪。安全检验的接种方法与疫苗使用方法一致,在安全检验实验中,应严格按照质量标准规定的接种方法操作。

**1.3 实验动物的替代** 1959 年,英国动物学家 William 和 Rex 提出在动物实验中的减少(reduction)、替代(replacement)、优化(Refinement)三个原则(简称 3R 原则),后来逐渐成为现今动物替代方法的核心内容<sup>[5]</sup>。使用替代动物可以从根本上减少动物实验成本,同时也是保障动物福利的重要内容。但随着疫苗产品安全标准不断提高,不使用替代动物成为一种趋势。美国联邦法规第九卷(9CFR)中对于动物疫苗安全检验要求必须使用本动物进行,部分对小鼠有天然毒性的疫苗还需要以小鼠进行安全检验<sup>[6]</sup>。我国农业部 2006 年发布的《兽用生物制品实验室安全试验技术指导原则》

也在这方面进行了补充,要求禽类制品安全检验使用本动物,其他制品除了使用靶动物以外,还须用敏感小动物进行试验,从本动物和小动物两个不同的角度把控疫苗产品的质量安全。

**1.4 实验动物的筛选** 在实验动物应用中,禽类要求为 SPF 级,小鼠、大鼠为清洁级,兔、豚鼠要求为普通级。SPF 猪饲养成本较高,且目前在国内尚未形成完整的质量控制体系,在实际中很少应用。大动物在实际应用中通常使用普通级,所以需要对本动物进行筛选。质量标准中带有“健康易感”的则认为需要进行筛选,部分产品质量标准中没有附加具体的动物筛选方法,需要根据抗原或抗体特性选取合适的方法进行筛选。筛选实验动物一般以抗原或抗体阴性为原则,具体有以下几种方法:

**1.4.1 背景追溯** 背景追溯是筛选实验动物的基本方法。具体要求为未使用过同种类型的疫苗产品,无相关病史。背景追溯是对实验动物进行初筛的最简单、有效的方法,但只能从动物的饲养历史上进行初步判断。无清洁级别实验动物筛选都要进行背景追溯,但多数产品还需要辅以其他筛选方法。

**1.4.2 凝集反应** 凝集反应分为平板凝集、试管凝集和微量凝集。三种凝集方法的原理本质上都是抗原抗体产生的凝集反应。平板凝集只需要 2~4 min 即可根据凝集情况判定结果,代表产品有副猪嗜血杆菌病二价灭活疫苗(1 型 LC 株+5 型 LZ 株)等<sup>[7]</sup>。试管凝集与微量凝集方法的区别在于反应体系的大小,均需要反应 6 h 以上,但是灵敏度要高于平板凝集方法。试管凝集在近几年的产品中已经很少应用,以微量凝集为主。微量凝集可以对实验动物进行批量筛选,提高工作效率。如仔猪大肠杆菌病基因工程灭活疫苗(GE-3 株)就是使用微量凝集的方法进行实验动物筛选<sup>[8]</sup>。

**1.4.3 间接血凝(IHA)** 间接血凝是将可溶性抗原或抗体吸附在具有载体和指示功能的红细胞上,借助抗原抗体反应将红细胞凝集进行观察的方法。同凝集方法相比,间接血凝的灵敏度更高,如猪支原体肺炎灭活疫苗(NJ 株)就是采用的间接血凝的

方法来筛选实验动物<sup>[9]</sup>。

1.4.4 ELISA ELISA 是目前应用最为广泛的实验动物筛选方法,以检测抗体为主。ELISA 方法的敏感性高于凝集反应和 IHA。通过借助酶标仪对反应结果 OD 值进行读数,根据公式计算结果,可以减少因人为观察所造成的误差。

1.4.4 PCR PCR 方法一般用来检测抗原,如副猪嗜血杆菌病二价灭活疫苗(4 型 JS 株 + 5 型 ZJ 株)是进行鼻拭子采样后通过 PCR 方法进行实验动物筛选<sup>[10]</sup>。在目前已有的检测方法中,PCR 的敏感性最高。但是 PCR 方法操作相对复杂,在采样后需要进行增菌培养,然后离心将菌体重悬作为模板,按规定体系反应后通过琼脂糖凝胶电泳确定结果。且在整个实验过程中需用到 PCR 仪、摇床、电泳系统和凝胶成像系统,对实验室硬件设施要求较高。

在实际实验动物筛选的过程中,有时也会同时用到多种筛选方法。如副猪嗜血杆菌病三价灭活疫苗(4 型 SH 株 + 5 型 GD 株 + 12 型 JS 株)<sup>[11]</sup>,由于筛选要求需要抗原抗体双阴性,所以同时采用了 PCR 和凝集两种方法。

1.4.5 群体筛选 上述几种方法均为针对动物个体进行筛选。除个体筛选以外,部分产品也会应用到群体筛选方法。在猪萎缩性鼻炎灭活疫苗(TK - MB6 株 + TK - MD8 株)安全检验实验动物筛选过程中,选取 3 ~ 5 头符合标准的猪进行剖检,观察肺部和鼻甲骨,以此来确定备选猪群是否符合要求<sup>[12]</sup>。鸭传染性浆膜炎三价灭活疫苗(1 型 YBRA01 株 + 2 型 YBRA02 株 + 4 型 YBRA04 株)以不低于使用鸭数量 20% 的比例对鸭群抽样,通过采取收集血清筛选合格后来确定本批鸭是否符合要求,最后选取未采血鸭作为实验动物<sup>[13]</sup>。

产品质量标准中尚未明确“群体筛选”这一概念,只在实际应用中以样品代表群体。在进行群体筛选的过程中,应注意检测样品背景和来源相同,如多个来源,应对不同来源背景的动物群体分别抽样进行筛选。

1.5 实验动物的观察 在接种疫苗前,需要对实

验动物进行为期 1 ~ 3 d 的观察,使其充分适应新环境。在接种疫苗后需观察 6 ~ 21 d,以 10 d、14 d 居多。观察 6 d 的如布氏杆菌活疫苗,21 d 的如仔猪副伤寒活疫苗。2020 版《中国兽药典》中对免疫后实验动物的观察时间做了规定,如小鼠、豚鼠、兔等观察时间不低于 6 d,禽类和大动物观察时间不低于 7 d。大部分产品观察指标为健活,即动物存活且保持健康。健活的具体要求包括“注射部位无炎症”、“未出现疫苗引起的局部或全身不良反应”等。“健活”是最基本简便的观察指标,对于部分以本动物进行安全检验的产品,还需要用到其他方法。

1.5.1 剖检法 剖检法多数针对不致死但感染动物特定部位的病原,通过剖检后观察病原感染部位的病变程度来确定产品是否安全。如鸡毒支原体活疫苗安全检验,需要对实验鸡气囊进行剖检,应无临床损伤。剖检法有时候还需要辅以记分法,根据分值进行更精确的判定。

1.5.2 测温法 测温法一般需要在接种疫苗前 3 ~ 5 d 进行体温测定,取其平均值作为基础体温。然后在疫苗接种后进行体温测定。一般体温升高不超过一定值或者升高后在规定天数内恢复即为正常。不同产品的体温具体观测方法略有不同,如猪败血性链球菌病活疫苗(ST171 株)是在 14 ~ 21 d 进行观察,体温超过正常 1 °C 不应超过 3 d。而猪链球菌病灭活疫苗(马链球菌兽疫亚种 + 猪链球菌 2 型)则是在前三日进行观察,体温不超过 1 °C。测温法可以根据动物的体温反应来确定疫苗的安全性,一般以本动物、大动物为主。

1.5.3 记分法 记分法是根据动物接种疫苗后反应或剖检后感染部位的病变程度来赋予分值,根据分值来确定动物是否符合要求。如猪大肠杆菌病、C 型产气荚膜梭菌病、诺维氏梭菌病三联灭活疫苗就是根据动物的临床反应判定分值,进而确定产品是否符合要求<sup>[14]</sup>。在动物剖检观察方面,应用记分法较多的是寄生虫类产品。如鸡球虫病四价活疫苗,在接种疫苗后剖检,分别在几种寄生虫适宜寄生部位进行观察记分,根据分值来确定产品是否符合要求。

## 2 欧美相关法规概述

美国 9CFR 中,对细菌类动物疫苗安全检验免疫剂量的规定与《中国兽药典》略有不同,根据不同实验动物制定安全检验方法。对于小鼠和豚鼠等替代动物,以体积为单位进行免疫;对于非替代动物,按一倍或多倍使用剂量进行免疫。禽用疫苗的安全检验则是与效力检验合并进行,通过观察效力检验接种后动物的反应来检验疫苗的安全性<sup>[15]</sup>。美国 9CFR 还对细菌类疫苗和病毒类疫苗的免疫剂量上加以区分,如猪和绵羊安全检验,细菌疫苗接种 2 头份,病毒疫苗接种 10 头份,但对活疫苗和灭活疫苗并没有明确接种剂量的不同。

针对国内外差异,可在后期的修订工作中有针对地进行研究论证。比如,以小鼠动物替代猪等大动物时,由于动物体重相差巨大,以猪的使用剂量做为接种小鼠的参考单位是否具有实际意义。美国 9CFR 禽用疫苗安全检验效力检验合并,节省了实验动物数量,但是在安全检验免疫剂量即使用剂量的前提下。对于安全检验高于使用剂量的接种剂量对产品质量控制的必要性论证,也可以作为一个研究方向。值得注意的是,《欧洲药典》在对实验动物的要求中规定了最小使用日龄<sup>[16]</sup>,而《中国兽药典》在实验动物中规定了日龄或体重范围,却没有明确规定使用最小使用日龄或体重的实验动物。针对这方面的差异,也可作为后期药典修订工作中的一个研究方向。

## 3 安全检验中存在的问题

3.1 替代动物的使用 在安全检验过程中,小鼠操作简便且成本较低,是优先考虑的替代动物。但因替代动物与本动物易感性和体重差异巨大,建立对比关系难以准确把握。猪丹毒活疫苗 G4T10 株是经历市场考验的经典产品,但在近些年的安全检验项目中,以小鼠为实验动物不合格率较高。由于使用猪进行安全检验结果合格,故推断当前小鼠的集约化饲养方式可能导致了小鼠敏感性的变化,具体原因还需要进一步实验来验证。

3.2 实验动物筛选方法有待进一步研究和规范 近些年通过新兽药注册的产品一般附加了详细的

动物筛选方法,但对于同种产品,不同研发单位的筛选方法不同,评价方法也不同,缺少针对同类产品的统一标准。部分收录在《中国兽药典》中的产品,没有明确动物筛选方法。根据常规的实验室方法进行抗原或抗体的检测虽然可以达到筛选目的,但缺少具体依据。应不断规范和完善实验动物筛选方法,针对同类产品,建立统一的评价标准,为安全检验结果提供依据。

3.3 检测技术有待进一步加强 目前企业自主研发的疫苗产品,质量标准参考农业农村部公告。在监管过程中,缺少现实可行的统一标准,依赖企业提供的菌毒种、试剂和方法等。特别是对于进口产品,难以做到有效监管。针对这种情况,应对特定病原加强通用检验方法研究,完善质量控制方法,为实际监管提供技术支撑。

## 4 展望

在养殖业中,针对细菌感染,往往使用抗生素即可达到治疗的目的,这使细菌类动物疫苗在很长时间内占国内市场比重不大。但是,近年来,农业农村部大力推进兽药“减抗”,细菌类动物疫苗的重要性在一定程度上有所提升。同时,这也对细菌类动物疫苗的技术评价和监管提出了新的要求。随着我国经济的不断发展,兽用生物制品领域技术也是日新月异。疫苗在生产、检验过程中涉及的原辅材料工艺不断更新的同时对疫苗本身和检验过程可能有潜在影响,从而影响最终检验结果。一些历经考验的经典产品标准是上一代兽医学者留下的宝贵财富,应不断研究和完善,使其可以适应新的技术环境。

虽然在动物疫苗安全检验中还存在诸多问题,但是随着兽药质量控制体系的不断完善,安全检验整体在不断往规范化前进。在检验技术的不断提高和标准的不断完善的背景下,相信动物疫苗安全检验的标尺会在产品质控中发挥越来越重要的作用。

## 参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(2020年版三部)[S].

- Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Pharmacopoeia of People's Republic of China, Volume III, 2020 Edition[S].
- [2] 农业部公告第 863 号. 兽用生物制品实验室安全试验技术指导原则[S].  
Notice of the Ministry of Agriculture no. 683. Technical guidelines for laboratory safety test of veterinary biological products[S].
- [3] 农业部公告第 2574 号. 猪支原体肺炎灭活疫苗(CJ 株)质量标准[S].  
Notice of the Ministry of Agriculture no. 2574. Quality standard of inactivated vaccine against *Mycoplasma hyopneumoniae* (CJ strain)[S].
- [4] 农业部公告第 1767 号. 鸡毒支原体活疫苗(MG 6/85 株)质量标准[S].  
Notice of the Ministry of Agriculture no. 1767. Quality standard of *Mycoplasma gallisepticum* Live Vaccine (MG 6/85 Strains)[S].
- [5] 王晓卉, 李翠, 蒋卉, 等. 动物试验替代方法在兽用疫苗检验中的应用概况[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(4): 60-64.  
Wang X H, Li C, Jiang H, et al. Application of alternative methods of animal testing in testing of veterinary vaccines [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2015, 49(4): 60-64.
- [6] 张媛, 蒋玉文, 魏财文, 等. 我国与美国在兽用细菌类活疫苗安全检验方法上的比较[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(7): 41-44.  
Zhang Y, Jiang Y W, Wei C W, et al. A comparative analysis of safety test method for veterinary bacteria live vaccine in Code of Federal Regulations 9 and Chinese Veterinary Pharmacopoeia[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2009, 43(7): 41-44.
- [7] 农业部公告第 2318 号. 副猪嗜血杆菌二价灭活疫苗(1 型 LC 株 + 5 型 LZ 株)质量标准[S].  
Notice of the Ministry of Agriculture no. 2318. Quality standard of bivalent inactivated vaccine against *Haemophilus parasuis* (type 1 LC strain + type 5 LZ strain)[S].
- [8] 农业部公告第 2338 号. 仔猪大肠杆菌病基因工程灭活疫苗(GE-3 株)质量标准[S].  
Notice of the Ministry of Agriculture no. 2338. Quality standard of genetically engineered inactivated vaccine against piglet colibacillosis (GE-3 strain)[S].
- [9] 农业农村部公告第 74 号. 猪支原体肺炎灭活疫苗(NJ 株)质量标准[S].  
Notice of the Ministry and Rural Affairs of Agriculture no. 74. Quality standard of inactivated vaccine of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NJ strain)[S].
- [10] 农业部公告第 2381 号. 副猪嗜血杆菌病二价灭活疫苗(4 型 JS 株 + 5 型 ZJ 株)质量标准[S].  
Notice of the Ministry of Agriculture no. 2381. Quality standard of bivalent inactivated vaccine against *Haemophilus parasuis* (JS strain 4 + ZJ strain 5)[S].
- [11] 农业农村部公告第 315 号. 副猪嗜血杆菌病三价灭活疫苗(4 型 SH 株 + 5 型 GD 株 + 12 型 JS 株)质量标准[S].  
Notice of the Ministry and Rural Affairs of Agriculture no. 315. Quality standard of trivalent inactivated vaccine against *Haemophilus parasuis* (SH strain 4 + GD strain 5 + JS strain 12)[S].
- [12] 农业农村部公告第 72 号. 猪萎缩性鼻炎灭活疫苗(TK-MB6 株 + TK-MD8 株)质量标准[S].  
Notice of the Ministry and Rural Affairs of Agriculture no. 72. Quality standard of inactivated swine atrophic rhinitis vaccine (TK-MB6 strain + TK-MD8 strain)[S].
- [13] 农业部公告第 2231 号. 鸭传染性浆膜炎三价灭活疫苗(1 型 YBRA01 株 + 2 型 YBRA02 株 + 4 型 YBRA04 株)质量标准[S].  
Notice of the Ministry of Agriculture no. 2231. Quality standard of trivalent inactivated vaccine of infectious serositis in ducks (YBRA01 strain + YBRA02 strain + YBRA04 strain)[S].
- [14] 农业农村部公告第 70 号. 猪大肠杆菌病、C 型产气荚膜梭菌病、诺维氏梭菌三联灭活疫苗质量标准[S].  
Notice of the Ministry and Rural Affairs of Agriculture no. 70. Quality standard of triple inactivated vaccine against porcine colibacillosis, *Clostridium perfringens* type C and *Clostridium norvegicus*[S].
- [15] 美国联邦法规第九卷[S]. 2007: 67-69.  
Code of Federal Regulations[S]. 2007: 67-69.
- [16] 欧洲药典 8.0[S]. 2011: 847-857.  
European Pharmacopoeia 8.0[S]. 2011: 847-857.

(编辑:李文平)