ICS 65.020
B 15

JAASS

团　　体　　标　　准

T/JAASS X-2021

猪瘟活疫苗耐热保护剂质量检验规程

Inspecting regulation of heat-resistant protective agent for live swine fever vaccine

2021－××－××发布　　2021－××－××实施

江苏省农学会　发 布

目　　次

前　　言.....II
1 范围.....1
2 规范性引用文件.....1
3 术语和定义.....1
4 操作规程.....1
4.1 猪瘟活疫苗耐热保护剂配制.....1
4.2 猪瘟活疫苗耐热保护剂内毒素检验.....1
4.3 猪瘟活疫苗耐热保护剂热稳定性检验.....1
5 主要检测指标要求.....2
6 检验规则.....2
6.1 出厂检验项目.....2
6.2 产品批次.....2
6.3 产品检验.....2
6.4 检验结果的判定.....3
附录 A（资料性） 猪瘟活疫苗耐热保护剂检测项目指标说明及检测注意事项.....3
A.1 性状.....4
A.2 pH 值的测定.....4
A.3 细菌内毒素的测定.....4
A.4 猪瘟活疫苗耐热保护剂病毒含量的检验.....6

前　　言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》给出的规则编写。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由江苏省农业科学院动物免疫工程研究所提出。

本文件由江苏省农学会归口。

本文件起草单位：江苏省农业科学院动物免疫工程研究所。

本文件主要起草人：吕芳、左晓昕、赵艳红、卢宇、邓碧华。

猪瘟活疫苗耐热保护剂质量检验规程

1 范围

本文件规定了猪瘟活疫苗耐热保护剂的配制原则、检验规则、检验方法等要求。

本文件适用于猪瘟活疫苗耐热保护剂的质量检验。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

《中华人民共和国药典》2015年版二部附录

《中华人民共和国药典》2015年版三部附录

《中华人民共和国兽药典》2015年版

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 操作规程

4.1 猪瘟活疫苗耐热保护剂配制

除非另有说明，在本文件中涉及的所有试剂均为分析纯。

每升标示量猪瘟活疫苗耐热保护剂根据不同灭菌方法分为 A 部分和 B 部分，其配制方法如下所示。

（1）将 A 部分用注射用水加热溶解至指定体积（用 2 mol/L KOH 或 2 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0~7.5），110℃高压灭菌 20 min。

（2）将 B 部分用注射用水充分溶解至指定体积（2 mol/LKOH 或 2 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0~7.5），0.22 μm 过滤除菌。

（3）将灭菌后的 A 部分与 B 部分按一定比例充分混匀，按中华人民共和国药典 2015 年版三部通则 0631 进行 pH 值检验（应在 7.0~7.5），2~8℃保存，1 月内使用完毕。

4.2 猪瘟活疫苗耐热保护剂内毒素检验

按中华人民共和国药典 2015 年版三部通则 1143 细菌内毒素检查法进行，应不超过 50 EU/mL。

4.3 猪瘟活疫苗耐热保护剂热稳定性检验

将配制好的耐热保护剂与猪瘟弱毒抗原液混合冻干后，对疫苗进行加速耐老化检验，以“45℃保存

3 天或 37℃保存 10 天，疫苗耐热损失不超过 1 个滴度为标准”确定耐热保护剂的热稳定性。

猪瘟活疫苗的配制与冻干：将猪瘟弱毒抗原液与猪瘟活疫苗耐热保护剂等体积混匀、分装，2.5~3.0 mL/瓶，半加塞，将分装好的样品放入冻干机样品仓，将隔板迅速降温至-40℃后保温 4 小时，冷井降至-40℃以下开启真空至 500 mTorr，此时冻干机隔板在 30 分钟内升温至-10℃维持 10 小时，同时真空降至 100 mTorr；隔板在 30 分钟内升温至 4℃维持 200 分钟，同时真空维持 100mTorr；隔板在 120 分钟内升温至 20℃维持 150 分钟，同时真空维持 100 mTorr；解析干燥阶段隔板迅速升温至 28℃维持 200 分钟，同时极限真空，待冻干程序结束后压盖出仓。

猪瘟活疫苗耐热保护剂热稳定性检验：将冻干好的猪瘟活疫苗置于 45℃保存 3 天或 37℃保存 10 天，验证耐热保护剂的热稳定性。以每毫升猪瘟疫苗的病毒含量耐热损失不超过 1 个滴度判为合格。

5 主要检测指标要求

猪瘟活疫苗耐热保护剂应符合表1所示的技术要求。

表 1 具体检测指标要求

项　　目	具体检测指标
物理性状	固体粉末
溶解后 pH 值[a]（每升表示量/L）	7.0~7.5
细菌内毒素/（EU/mL）	≤ 50
热稳定性检验	45℃保存 3 天或 37℃保存 10 天，以每毫升猪瘟疫苗的病毒含量耐热损失不超过 1 个滴度判为合格。

注：[a]表示允许 pH 偏差范围为±0.3

6 检验规则

6.1 出厂检验项目

均为表 1 技术要求中的所有项目。

6.2 产品批次

同一日期生产的产品为1批，每批需检验。

6.3 产品检验

每批次产品均需留样，粘贴标签，注明生产企业名称、产品名称、批号、生产日期，留样日期和留样姓名，由生产企业的质量检验部门进行检验。生产企业应保证出厂的产品均符合本标准要求，每批出厂的产品都应附有一定格式的质量证明书，其内容包括：生产企业名称和地址、产品名称、批号、生产日期和本标准编号等。

6.4 检验结果的判定

留样产品检验结果如果有一项指标不符合本标准要求时，则整批产品为不合格。

附　录　A
（资料性）
猪瘟活疫苗耐热保护剂检测项目指标说明及检测注意事项

A.1 性状

目测法检测。

A.2 pH 值的测定

A.2.1 仪器设备与耗材

pH计（FiveEasyPlus台式pH计）、烧杯、玻璃棒、pH计校正液（4.01、6.86、9.18）

A.2.2 操作方法

A.2.2.1 猪瘟活疫苗耐热保护剂配制

每升标示量的A部分用注射用水加热溶解并定容至400 mL。

每升标示量的B部分用注射用水充分溶解（25~30℃）并定容至600 mL。

待瘟活疫苗耐热保护剂A部分和B部分温度回到室温，进行pH值检测。

A.2.2.2 pH 计校正

pH计电极和温度补偿电极与主机连接，用pH计校正液进行三点校正。

用蒸馏水冲洗电极，用吸水纸吸干水分，将电极插入校正液（4.01），点击“校准”进行第一次校正。

用蒸馏水冲洗电极，用吸水纸吸干水分，将电极插入校正液（6.86），点击“校准”进行第二次校正。

用蒸馏水冲洗电极，用吸水纸吸干水分，将电极插入校正液（9.18），点击“校准”进行第三次校正。然后自动回到pH测量模式，用蒸馏水冲洗，检待测样品。

A.2.2.3 pH 值测量

将pH计用蒸馏水冲洗干净，用吸水纸吸干剩余水分后，将电极插入被测

溶液中，快速搅拌晃动以排除电极内的气泡，静置，点击“测量”，所显示数据为该样品的pH值。

A.3 细菌内毒素的测定

A.3.1 仪器设备与耗材

鲎试剂、细菌内毒素标准品、细菌内毒素检测用水、反应试管、无内毒素吸头、移液器、恒温箱、漩涡混合器、试管架、计时器。

A.3.2 细菌内毒素检测操作方法

A.3.2.1 猪瘟活疫苗耐热保护剂配制

每升标示量的A部分用注射用水加热溶解并定容至400 mL。用2 mol/L KOH调PH至7.0~7.5，110℃高压灭菌20 min。

每升标示量的B部分用注射用水充分溶解（25~30℃）并定容至600 mL。用2 mol/L KOH调PH至7.0~7.5，0.22 μm滤膜过滤除菌。

将灭菌后的A部分与B部分充分混匀（如体积不足1 L，加灭菌注射用水补足至1 L即可）。

A.3.2.2 **内毒素标准品稀释**

稀释内毒素标准品时应按使用说明要求，加入细菌内毒素检测用水，用漩涡混合器混合，使其充分溶解，制成原液，用这一原液制作合适的系列稀释。用前，用旋转搅拌器强力搅拌至少3 min，每一步稀释，至少搅拌30 s，然后才能用它稀释下一步。经稀释的参考内毒素不得贮存待以后使用，因为吸附作用会使其失去活性。

A.3.2.3 **供试品稀释**

当供试品需要控制的内毒素限值大于鲎试剂的灵敏度值时，需要用检查用水对供试品进行稀释，确定最大有效稀释倍数（MVD）。最大有效稀释倍数是指在试验中供试品溶液被允许稀释的最大倍数，在不超过此稀释倍数的浓度下进行内毒素限值的检测。计算公式：MVD=cL/λ

L：供试品需控制的细菌内毒素限值（EU/mL）；

λ：为凝胶法鲎试剂的标示灵敏度（EU/mL）。

c：为供试品溶液的浓度。当L以EU/mL表示时则c=1.0 mL/mL，当L以EU/mg或EU/U表示时，则c的单位需要为mg/mL或U/mL。如供试品为注射用无菌粉末或原料药时，则MVD取1，可计算供试品的最小有效浓度：c=λ/L

A.3.2.4 **检查操作**

（1）使用0.1 mL规格的鲎试剂时：

a. 取鲎试剂8支，其中2支作阴性对照管，2支作阳性对照管，2支作供试品阳性对照，2支作供试品检查管。

b. 阴性对照管加入0.2 mL检查用水，其余各管加入0.1 mL检查用水；阳性对照管加入0.1 mL浓度为2 λ的内毒素溶液；每支供试检查管另加入0.1 mL供试品；供试品阳性对照管加入0.1 mL含2 λ内毒素供试品。

c. 封闭管口，轻轻摇匀，垂直放入37±1℃恒温器中孵育60±2 min，然后取出观察结果。试管在孵育期间应避免任何振动。

（2）使用其它规格的鲎试剂时：

a. 取鲎试剂若干支，按照使用说明加入检查用水溶解，轻轻摇匀备用。

b. 取10×75 mm试管8支，其中2支作供试品检查管，2支作阴性对照管，2支作阳性对照管，2支作供试品阳性对照管。

c. 每支试管加入0.1 mL已溶解的鲎试剂。

d. 每支供试品检查管加入0.1 mL供试品；阴性对照管加入0.1 mL检查用水；阳性对照管加入0.1 mL浓度为2 λ的内毒素溶液；检品阳性对照管加入0.1 mL含2 λ内毒素供试品。

e. 封闭管口，轻轻摇匀，垂直放入37±1℃恒温器中孵育60±2 min，然后取出观察结果。试管在孵育期间应避免任何振动。

A.3.2.5 **结果判断**

将试管从恒温器中轻轻取出，缓慢倒转180°时，若管内形成结实的凝胶，并且凝胶不变形，不从管壁滑脱者为阳性，记（+）号；不形成凝胶或形成的凝胶不结实、变形并从管壁滑脱者，则判为阴性，记（-）号。拿取试管时，要轻拿轻放，避免不必要的碰撞，而出现假阴性结果。

阴性对照管必须是阴性，阳性对照管、供试品阳性对照管必须是阳性，否则试验应判为无效。

A.3.2.6 **注意事项**

鲎试剂的灵敏度应经过确证试验中使用的所有容器和用具，都必须进行灭菌，用足够的时间进行加热处理、破坏这些用具表面上可能存在的外源性内毒素。内毒素试验的结果是否可靠，还必须从试验使用的各种用具、溶液、洗涤用品中取样或提取样品，并用适当的方法证明它们对反应没有抑制或拉强或其它干扰作用。可按下述方法进行抑制试验或增强试验。试验中应设置阴性对照。如果鲎试剂的原材料、生产方法或处方发生改变时都要重新进行试验。

A.4 **猪瘟活疫苗耐热保护剂病毒含量的检验**

A.4.1 **用兔检验**

选用体重1.5~3.0 kg健康家兔，接种前至少测温观察3日，基础体温应在38.5℃~39.5℃，并且温差波动不超过0.5℃。

按瓶签注明头份，将疫苗用灭菌生理盐水稀释成1/750头份/mL，耳静脉注射1.5~3.0 kg兔2只，各1.0 mL，接种后，上、下午各测体温一次，48小时后，每隔6小时测体温一次，根据体温反应和攻毒结果进行综合判定。

接种疫苗后，兔的体温反应标准如下：

定型热反应（++）潜伏期48~96小时，体温上升呈明显曲线，至少有3个温次超过1℃以上，并稽留18~36小时。如稽留42小时以上，则必须进行攻毒（接种新鲜脾淋毒或冻干），攻毒后如果无反应，可判定为定型热。

轻热反应（+）潜伏期48~96小时，体温上升呈明显曲线，至少有2个温次超过0.5℃以上，并稽留12~36小时。

可疑反应（±）潜伏期48~96小时，体温曲线起伏不定，稽留不到12小时。或潜伏期在24小时以上，不足48小时及超过96小时至120小时出现热反应。

体温反应呈二次高峰，有一次高峰符合定型热反应（++）或轻热反应（+）标准者，均需攻毒，攻毒后无反应时则可判定为定型热或轻热反应。

无反应（-）体温正常。

结果判定：

接种疫苗后，当2只对照兔均呈定型热反应（++），或1只呈定型热反应（++）、另1只呈轻热反应（+），疫苗判为合格。

接种疫苗后，当1只家兔呈定型热反应（+）或轻热反应（+），另1只呈可疑反应（±），或2只均呈轻热反应（+）时，可在接种后7~10日攻毒（接种新鲜脾淋毒或冻干毒）。攻毒时，加对照兔2只，攻毒剂量为50~100倍乳剂。每兔耳静脉注射1.0ml。

攻毒后的体温反应标准如下：

热反应（+）潜伏期24~72小时，体温上升呈明显曲线，超过常温1℃以上，稽留12~36小时。

可疑反应（±）潜伏期不到24小时或72小时以上，体温曲线起伏不定，稽留不到12小时或超过36小时而不下降。

无反应（-）体温正常。

攻毒后，当2只对照兔均呈定型热反应（++），或1只呈定型热反应（++）另1只兔呈轻热（+）反应，而2只注苗兔均无反应（-）时，疫苗判为合格。

接种疫苗后，如果有1只兔呈定型热（++）或者轻热反应（+），另1只呈可疑反应（±）或无热反应（-），可对可疑反应兔或无热反应兔采用剖杀或采心血分离病毒的方法，判明是否隐性感染；或接种疫苗后，2只兔均呈轻热反应，亦可对其中1只兔分离病毒。方法是：接种疫苗后96~120小时之间，将兔扑杀，采取脾脏，用生理盐水制成50倍稀释的乳剂（脾脏乳剂应无菌），或采取心血（全血），耳静脉注射2只兔，每只1.0ml。凡有1只兔潜伏期24~72小时出现定型热反应（++），疫苗可判为合格。

接种疫苗后，由于出现其他反应情况而无法判定时，可重检。用家兔作效力检验，应不超过3次。

A.4.2 用猪效检

选用符合国家实验动物标准的饲养场或定点猪场供应，并经中和试验方法检测无猪瘟抗体的健康易感断奶猪。

按瓶签注明头份，将疫苗用灭菌生理盐水稀释成每毫升含有 1/300 头份，肌肉注射无猪瘟病毒中和抗体的健康易感猪 2 头，每头 1.0 ml。接种后 10～14 日，连同条件相同的对照猪 3 头，各注射猪瘟病毒石门系血毒 1.0 ml（不低于 $10^{5.0}$MLD），观察 16 日。对照猪全部发病，且至少死亡 2 头，免疫猪全部健活或稍有体温反应，但无猪瘟临床症状为合格。如对照猪死亡不到两头，可重检。

A.4.3 用细胞检验

采用猪瘟病毒间接免疫荧光法（IFA）进行检验。按冻干疫苗中抗原分装初始量的 10 倍体积、以 DMEM 维持液（含 2%血清）复溶，其后进行十倍比稀释，然后将梯度稀释的病毒液接入长满单层的 ST 细胞 96 孔板中，每个稀释度 6 孔，每孔 100 μL，然后每孔加入 100 mL DMEM 维持液，置于 37℃、5%CO_2 恒温培养箱中培养。

72 小时后，弃去培养上清，以 80%冷丙酮固定 96 孔板，每孔 100μL，4℃固定 45 min，弃丙酮，PBS 洗涤 2 次，每孔 200 μL，每次 2 min，轻微震荡混匀（手动震摇/振荡器轻微震摇均可），拍干；加入含 0.2% Triton X-100 液，每孔 100 μL，常温 10 min，弃掉，PBS 洗涤 2 次，每孔 200 μL，每次 2 min，轻微震荡混匀，拍干；用 PBS 以 1：400 稀释 Anti-csfv E2（WH303，货号 0826，AHVLA），每孔 50 μL，于 37℃孵育 1.5 h，弃一抗，PBS 洗涤 2 次，每孔 200 μL，每次 2 min，轻微震荡混匀，拍干；用 PBS 以 1：200（稀释度为 1:100-1:200）稀释的 FITC 标记的羊抗鼠 IgG（Sigma 公司，货号：F0257-2 mL），每孔 50 μL 于 37℃避光孵育 1 h，弃二抗，PBS 洗涤 2 次，每孔 200 μL，每次 2 min，轻微震荡混匀，拍干；荧光显微镜观察结果，猪瘟特异性荧光(团块荧光)判为阳性；最后，根据 Reed-Muench 法计算

$TCID_{50}$。

T/JAASS X-2021

江苏省农学会团体标准

猪瘟活疫苗耐热保护剂质量检验规程

2021年××月第一版　　2021年××月第一次印刷

版权专有　不得翻印