ICS 11.220

B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

口蹄疫疫苗效力检验用毒制备方法

Method for preparation of virus for foot and mouth disease Vaccine efficacy test

（征求意见稿）

中国兽医协会 CVMA

XXXX-XX-XX 发布　　XXXX-XX-XX 实施

中国兽医协会　发布

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》的规定起草。

本文件不涉及专利。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院兰州兽医研究所、中农威特生物科技股份有限公司、广东省农业科学院动物卫生研究所。

本文件主要起草人：何继军、杨帆、翟国元、向华、吕律、马维民、俞宗佑、靳野、刘永杰、吴锦艳、杨文龙、郑海学、郭建宏、刘湘涛。

中国兽医协会 CVMA

口蹄疫疫苗效力检验用毒制备方法

1 范围

本文件规定了口蹄疫疫苗效力检验用毒制备材料、制备步骤、种子批建立及本动物毒价测定方法。

本文件适用于口蹄疫疫苗效力检验用毒（乳鼠组织毒）的制备。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

GB/T 18935 口蹄疫诊断技术

GB 19489 实验室生物安全通用要求

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 制备材料

4.1 生物材料

4.1.1 口蹄疫病毒：分离自口蹄疫发病动物组织，培养适应于 3 日龄乳鼠，-70℃以下冰箱保存备用。采用 GB/T 18935 所述方法进行口蹄疫病毒血清型鉴定。口蹄疫病毒分离培养、动物攻毒等相关实验，应符合 GB 19489 规定。

4.1.2 乳鼠：3 日龄吮乳小白鼠。

中国兽医协会 CVMA

4.1.3 健康猪：应采购自口蹄疫非疫区，未接种口蹄疫疫苗，口蹄疫病毒O型和A型抗体检测阴性（抗体效价不高于1:8），非结构蛋白抗体检测为阴性，体重40kg左右。

4.1.4 健康牛：应采购自口蹄疫非疫区，未接种口蹄疫疫苗，口蹄疫病毒O型和A型抗体检测阴性（抗体效价不高于1:8），非结构蛋白抗体检测为阴性，6月龄以上。

4.2 设备和试剂

4.2.1 设备和器皿：组织匀浆机，离心机，酶标仪，恒温培养箱，PCR扩增仪，电泳仪，一次性注射器，手术剪刀、镊子，微量移液器及配套吸头（0.5μL-10μL；10μL-100μL，100μL-1000μL），吸管，试管，离心管（2mL、15mL）、PCR扩增管等。

4.2.2 溶液：0.04mol/L，pH值7.6的磷酸缓冲液（PB）。配制方法见附录A。

4.2.3 主要试剂：商品化口蹄疫A、O型液相阻断ELISA（LPB-ELISA）试剂盒，口蹄疫病毒定型ELISA试剂盒，口蹄疫3ABC阻断ELISA试剂盒；RT-PCR试剂盒、RNA提取试剂盒等。

5 制备步骤

5.1 筛选确定口蹄疫疫苗效力检验用毒

按照GB/T 18935所述方法进行口蹄疫病毒分离、血清型鉴定和VP1基因序列测定。综合病毒血清型、遗传关系、口蹄疫流行病学信息、毒株生物学特性等指标，筛选确定口蹄疫疫苗效力检验用毒。

5.2 乳鼠组织毒传代

取已经适应于乳鼠的口蹄疫流行毒株，加适量无菌石英砂和PB（0.04 mol/L，pH值7.6），研磨制备1:10（W/V）悬液，4℃浸毒 24小时，4000 r/min离心20分钟，上清液接种3日龄乳鼠8~10只，每只颈背部皮下注射0.2ml，同时设健康对照乳鼠2只。连续观察，收取发病症状典型、发病死亡时间集中的乳鼠，剖检取其胴体，加保存液（0.04 mol/L，pH值 7.6的50%甘油-磷酸缓冲液）后，保存于-70℃以下冰箱。按照相同方法再次连续传代3代，记录不同代次病毒接种乳鼠后的发病、死亡时间等信息。

5.3 乳鼠组织毒毒价测定

将上述连续传代4代的乳鼠组织毒上清液，用PB（0.04 mol/L，pH 7.6）进行10倍连续梯度稀释，稀释成10^{-1}，10^{-2}，10^{-3}……10^{-8}，取10^{-4}~10^{-8}等5个稀释度，分别颈背部皮下接种3日龄乳鼠各4只，每只接种0.2ml，观察7日。根据发病死亡乳鼠数，按Reed-Muench法计算乳鼠毒价（LD_{50}）。效力检验用毒对乳鼠毒价应不低于$10^{-7.0}$/0.2ml。

5.4 乳鼠组织毒扩繁

依据5.2和5.3结果，按照最低代次原则，确定最适传代代次范围。按照5.2接种乳鼠的方法进行扩繁。1g/瓶分装，置于-70℃以下冰箱保存备用。

6 效力检验用毒种子批的建立

取扩繁后保存的乳鼠组织毒1瓶，按照5.2方法研磨制成1:10（W/V）的悬液，4℃浸毒 24小时，4000 r/min离心20分钟，取上清液进行毒价（对乳鼠的LD_{50}和对健康猪或健康牛的ID_{50}）测定、血清型鉴定和VP1基因序列测定，合格者建立检验用毒种种子批。

7 本动物毒价测定

7.1 猪毒价测定

乳鼠组织毒上清，用PB（0.04 mol/L，pH 7.6）进行10倍连续梯度稀释，即乳鼠组织毒稀释成10^{-1}，10^{-2}，10^{-3}……10^{-8}，取10^{-3}~10^{-7}等5个稀释度，每个稀释度接种40kg左右猪4头，耳根后肌肉注射3ml/头，观察10日，以蹄部或鼻镜出现水泡判为感染，按Reed-Muench计算ID_{50}。效力检验用毒对猪毒价应不低于$10^{-4.5}$/3ml。

7.2 牛毒价测定

按7.1稀释方法，取10^{-4}~10^{-8}等5个稀释度，每个稀释度接种6月龄以上健康牛4头，舌皮内注射2个点，每点0.l ml，观察10日，除舌面接种部位以外任何部位出现水泡判为感染，按Reed-Muench计算ID_{50}。效力检验用毒对牛毒价应不低于$10^{-5.5}$/0.2ml。

中国兽医协会 CVMA

附 录 A

（规范性附录）

溶液配制

0.04 mol/L pH值 7.6磷酸缓冲液的配置

甲液 0.04mol/L磷酸氢二钠溶液	5.68g
纯化水	加至1000ml
乙液 0.04mol/L磷酸二氢钠溶液	4.8g
纯化水	加至1000ml

如果用含结晶水的磷酸盐，则称量时要按带水的克分子量乘以0.2称量。

取甲液87.0ml,乙液13.0ml,充分混匀后以121℃灭菌30分钟，置于4℃备用。

中国兽医协会 CVMA