

# 《中华人民共和国兽药典》二〇一〇年版三部 非禽源细胞及其制品外源病毒检验解读

吴华伟, 郎洪武, 陈晓春, 高金源, 邓 永

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2012-05-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2013) 01-0048-05 [中图分类号] S851.66

**[摘 要]** 对《中华人民共和国兽药典》二〇一〇年版三部中“非禽源细胞及其制品外源病毒检验”新变化和关键点进行了解读, 为规范和完善非禽源外源病毒检验提供了参考。

**[关键词]** 中华人民共和国兽药典; 非禽源外源病毒检验; 解读

## Interpretation of Detection of Extraneous Agents in Non-avian Cells and the Products Propagated in Them in Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2010 Edition, Volume III)

WU Hua-wei, LANG Hong-wu, CHEN Xiao-chun, GAO Jin-yuan, DENG Yong

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

**Abstract:** This paper interpreted the new changes and the key points in detection of extraneous agents in non-avian cells and the products propagated in these cells in Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2010 Edition, Volume III), and provided reference to standardize and improve detection of extraneous agents in non-avian cells and the products.

**Key words:** Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China; non-avian extraneous agents detection; interpretation

《中华人民共和国兽药典》(二〇一〇年版三部)(以下简称为《中国兽药典》2010年版三部)已于2010年12月27日由农业部公告第1521号颁布,并于2011年7月1日起施行。在贯彻执行2010年版《中国兽药典》“外源病毒检验法”过程中,非禽源细胞及其制品的外源病毒检验一直是困扰各兽用生物制品生产企业检验人员的难点内容,为帮助企业检验人员理解和掌握相关内容,本文结合实际检验工作,对非禽源细胞及其制品外源病毒检验法进行了梳理和解读,为规范非禽源外源病毒

检验工作提供了参考。

### 1 《中国兽药典》2010年版三部非禽源细胞及其制品外源病毒检验的新变化<sup>[1-2]</sup>

1.1 明确了外源病毒检验时细胞种类的选择原则  
与《中国兽药典》2005年版三部相比,《中国兽药典》2010年版三部明确了检测时应选择的细胞种类,即每一种样品应至少接种2种细胞:一种为绿猴肾(Vero)传代细胞,为所有制品外源病毒必选细胞,另一种为疫苗靶动物的细胞(胚胎细胞或新生动物细胞)或细胞系。在非禽源外源病毒检验时一

**作者简介:** 吴华伟,硕士,助理研究员,从事兽用病毒类生物制品检测与研究。

**通讯作者:** 陈晓春。E-mail: chenxiaochun@ivdc.gov.cn

般可采用规定的 2 种细胞进行检验。但在具体检验时,往往都需要采用 2 种以上的细胞进行检验。例如在荧光抗体检测时需要选择该病毒最敏感的细胞或细胞系(病毒敏感可能是规定的 2 种细胞之外)进行培养,才能保证外源病毒污染检出的可能性最大。因此,针对某个具体的样品在检验时应选择几种细胞,应在《中国兽药典》2010 年版三部规定的细胞选择原则基础上,再依据具体情况灵活掌握。

1.2 明确了应接种检测样品的剂量 与《中国兽药典》2005 年版三部相比,《中国兽药典》2010 年版三部明确应接种到选择的细胞单层或敏感动物的已处理样品(用特异性血清中和或其他方法)的最少剂量,即至少 1.0 mL(疫苗制品至少含 10 头份),增加了检验的可操作性。

1.3 明确了样品接种后细胞的最少培养时间和最少继代次数 与《中国兽药典》2005 年版三部相比,《中国兽药典》2010 年版三部明确规定了样品接种细胞后总培养时间应不少于 14 d,培养期间应至少继代 1 次,在满足总原则的基础上,规定了采用不同方法最终检验时所用的细胞应培养的最少时间,即荧光抗体检查法使用的细胞应培养 5~7 d,致细胞病变和红细胞吸附性外源病毒检验使用的细胞应至少培养 7 d,从而解决了 2005 年版《中国兽药典》实施时对该条款理解和执行上的偏差。鉴于以上原则和要求,外源病毒检验时采用传代细胞应该是首选,但具体的细胞传代过程(培养时间、传代次数)应根据细胞的生长特性而定。

1.4 调整明晰了非禽源外源病毒检验三种检验方法的层次关系 2010 年版《中国兽药典》三部将 2005 年版《中国兽药典》三部中“致细胞病变检查法和红细胞吸附性外源病毒检验”一项拆分为两个并列的检验项目,保留了荧光抗体检查法,删除了“绿猴肾(Vero)传代细胞检查法”,而在细胞选择项中明确了 Vero 细胞为必选细胞,使得非禽源外源病毒检验的层次关系更趋清晰,避免了检验项目间的交叉,便于理解和执行。

1.5 调整了荧光抗体检测法每种细胞应选择的荧光抗体类别 与《中国兽药典》2005 年版三部相比,《中国兽药典》2010 年版三部规定牛病毒性腹泻病毒(BVDV)为所有细胞及其制品均应检验的病毒,犬源细胞增加了犬细小病毒(CPV)的检验,猪源细胞删除了伪狂犬病毒(PRV)的检验,原因为 PRV 具有泛嗜性,能在多种组织细胞内繁殖并产生

明显细胞病变,特别在猪肾细胞及其细胞系上很敏感,可通过致细胞病变检查法检出,减少了检验的重复。

1.6 调整了红细胞吸附性外源病毒检验中所使用红细胞的类别 与 2005 年版《中国兽药典》相比,2010 年版《中国兽药典》中红细胞吸附外源病毒检验用红细胞的数量由原来的 3 种减少为 2 种,删除了人“O”型红细胞成分,保留了豚鼠红细胞和鸡红细胞。

## 2 《中国兽药典》2010 年版三部非禽源细胞及其制品外源病毒检验关键点解析

2.1 样品处理 待检样品必须以适当方法进行处理,可以分为四种情况:(1)对毒种或活疫苗进行检验时,样品应取 2~3 瓶混合后,用特异性抗血清进行中和(特异性血清使用前应经灭活处理);(2)对细胞进行检验时,应进行 3 次冻融(-70℃)处理;(3)如果特异性抗血清不能完全中和病毒样品,可采用效价更高的抗血清重做,也可以将样品接种使用对象动物,接种剂量应满足 1.2 项要求,然后采用测特定病毒的抗体(中和试验、ELISA 等)或抗原(PCR、FA 或 IFA 等)的方法进行结果判定;(4)如待检样品不感染选用的细胞或不使选用的细胞产生细胞病变且不引起红细胞吸附时,可不用血清中和。

2.2 细胞的选择 应符合 1.1 项。非禽源细胞及其制品外源病毒检验法选用的细胞列表见表 1。

表 1 不同非禽源细胞及其制品外源病毒检验法选用的细胞

| 制苗用非禽源细胞来源或疫苗靶动物 | 选用细胞            |
|------------------|-----------------|
| 所有靶动物            | Vero            |
| 猪                | PK15 或 ST       |
| 牛                | MDBK 或牛睾丸细胞     |
| 绵羊和山羊            | 绵羊睾丸细胞          |
| 犬                | MDCK、CRFK 或 F81 |
| 马                | 马源敏感细胞          |

2.3 疫苗接种与培养 应符合 1.2、1.3 项和 2.1 项。在进行细胞传代时,应将上一代细胞培养物-70℃冻融三次,然后 1000 g 离心 10 min,取上清液接种新的相应细胞单层(剩余的上清液应置-70℃保存),每次继代均应设立正常细胞对照。最后一次继代的细胞单层数量、面积和培养时间应符合荧光抗体检查法、致细胞病变检查法和红细胞吸附性外源病毒检验的要求。

2.4 检查方法

2.4.1 荧光抗体检查法 荧光抗体检查法为检测特定病毒的方法,应选择该病毒的最敏感细胞进行病毒增殖和检测,同时设立病毒阳性对照和细胞对照。通常用 80% 的冷丙酮进行细胞固定,可选择直接免疫荧光或间接免疫荧光检查法进行检测。结果判定:当阳性对照出现特异性荧光,细胞对照无荧光时,如果被检样品出现荧光,判为不合格。如果阳性对照组荧光不明显,或者正常细胞出现荧光,判为无结果,应重检。2010 年版《中国兽药典》采用荧光抗体检查法所要求检测的外源性病毒的敏感细胞和阳性对照参考毒株见表 2。

| 表 2 荧光抗体检查法选择的细胞及阳性对照参考毒株 |        |              |             |
|---------------------------|--------|--------------|-------------|
| 疫苗靶动物                     | 待检外源病毒 | 选用细胞         | 阳性对照参考毒株    |
| 所有靶动物                     | BVDV   | MDBK 或牛睾丸细胞  | AV69、AV67   |
| 猪                         | PPV    | PK15 或 ST    | AV30、AV31   |
|                           | CSFV   | PK15 或 ST    | AV65        |
|                           | BTB    | Vero 或绵羊睾丸细胞 | /           |
| 犬                         | RV     | Vero 或 BHK   | CVS-11 株    |
|                           | CPV    | CRFK 或 F81   | CPV-DD 株    |
| 马源细胞                      | EIAV   | Vero 或驴白细胞   | AV109、AV110 |

2.4.2 致细胞病变检查法<sup>[3]</sup> 选用细胞见表 1,应设立细胞对照。通常用姬姆萨染色来检验外源病毒引起的细胞病变,该方法可对 DNA 和 RNA 核蛋白进行鉴别染色,其中 DNA 核蛋白为紫红色,而 RNA 核蛋白染为蓝色。用显微镜检查单层细胞,观察包涵体、巨细胞数量异常和其他由病毒引起的细胞病变是否存在。接种的单层细胞与细胞对照相比较,如发现外源性病毒引起的特异性病变,判为不合格。

2.4.3 红细胞吸附性外源病毒检验<sup>[3]</sup> 选用细胞见表 1,应设细胞对照。通常用其第二代的单层细胞来做,常在 25 cm<sup>2</sup> 塑料瓶中培养,检测时可向每一细胞培养瓶中加入 5 mL 0.2% 的豚鼠红细胞和鸡红细胞的等量混合物,将培养瓶同时在 2~8℃ 和 20~25℃ 放置 30 min,然后用无钙镁离子的 PBS(可防止大部分非特异性吸附现象)洗涤 2~3 次,可用肉眼(如利用照明手套式无菌箱)或 30~60 倍显微镜检查吸附情况。如发现外源性病毒引起的特异性红细胞吸附,则判为不合格。常见的能产生血凝现象的动物病毒及红细胞见表 3。

| 表 3 产生血凝现象的常见动物病毒及红细胞 <sup>[4]</sup> |               |                     |
|--------------------------------------|---------------|---------------------|
| 病毒名称                                 | 产生血凝的红细胞      | 产生红细胞吸附最适温度         |
| 正粘病毒                                 | 鸡、人、豚鼠        | 4~37℃, 最适 22℃       |
| 副粘病毒                                 | 鸡、豚鼠、人或猴      | 4~37℃               |
| 黄病毒                                  | 鹅、鸡、母绵羊       | 4℃或 37℃, pH 6.4~7.0 |
| 腺病毒                                  | 猴、大鼠          | 37℃                 |
| 呼肠孤病毒                                | 人、牛           | 4℃                  |
| 弹状病毒                                 | 鹅             | 4℃                  |
| 冠状病毒                                 | 鸡、大鼠、小鼠       | 4℃                  |
| 细小病毒                                 | 豚鼠、猪、1 日龄鸡雏   | 4℃                  |
| 杯状病毒(兔出血症病毒)                         | 人             | 4℃~37℃              |
| 痘病毒                                  | 30%~50% 的鸡呈阳性 | 22℃~37℃, 最适 37℃     |
| 小 RNA 病毒(主要指其中的肠道病毒)                 | 人             |                     |

3 讨论与建议

3.1 非禽源细胞及其制品外源病毒检验时的细胞选择 适宜的细胞选择是检出可能污染的外源病毒的基础。OIE《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(哺乳动物、禽鸟与蜜蜂)、欧洲药典、美国兽用生物制品质量标准(1994)等均将基础种子细胞和毒种外源病毒检验时需要使用的检验细胞种类作了明确规定<sup>[3,5-7]</sup>,而在 2010 年版及之前的《中国兽药典》中毒种、细胞与其制品的外源病毒检验时规定的需要选择的细胞相同,在实际操作中可能存在一定的缺陷和不足。按照《中国兽药典》2010 年版三部现行规定,对毒种和待检细胞进行外源病毒检测时,仅选择 Vero 和疫苗靶动物来源的两类细胞,不能全面地检出潜在的其他病原。如对细胞的外源病毒检验而言,可能因为没有选择来自细胞来源动物的其他细胞,可能无法检出来自细胞来源动物的一些外源病毒污染;对种毒而言,若毒种采用非使用对象动物细胞培养,可能无法检出来自毒种增殖所用细胞来源动物的一些病原。因此,建议在 2015 年版《中国兽药典》编纂时,应明确并完善对毒种、细胞以及细胞制品进行外源病毒检验时应当选择哪些细胞的详细规定(针对非特定病毒的检测部分),并同时修订附录 36“生产用细胞标准”的

“外源病毒检验”相关内容。也可考虑将中华人民共和国农业部 683 号公告中“生产用细胞系”和“基础种毒”的外源病毒检测相关规定在《中国兽药典》附录中独立成章,规定其他细胞和毒种的外源病毒检验参照基础细胞和基础种毒的外源病毒检测执行,而将现行《中国兽药典》附录中的“外源病毒检验”限定在成品检验使用,从而可切实提高疫苗生产企业或科研机构应对基础细胞和基础种毒的外源病毒检验力度,转变目前我国“重成品检验,轻基础细胞和种毒检验”的不良倾向。

**3.2 个别特殊产品的外源病毒检测** 《中国兽药典》2010 年版三部中主要有三类特殊产品的外源病毒检测容易引起检验人员的困惑。一是采用禽源材料制备的非禽用活疫苗(如伪狂犬活疫苗)该按禽源还是非禽源外源病毒检验方法进行检验的问题。考虑到中华人民共和国农业部 683 号公告《兽用生物制品生产用细胞系试验指导原则》中已规定了基础种毒和基础细胞的系统鉴定方法,因成品使用对象为猪、牛和绵羊,建议该产品外源病毒检验可按非禽源细胞及其制品外源病毒检验方法执行。二是采用非禽源非靶动物细胞生产的非禽用活疫苗,如狂犬活疫苗(Vero 细胞)、猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(Marc-145 细胞)等。此类产品在进行外源病毒检测时,建议参考文献<sup>[3]</sup>的细胞选择原则,除《中国兽药典》2010 年版三部中规定的细胞外,增加制造产品用的动物传代或原代细胞。以猪繁殖与呼吸综合征活疫苗为例,外源病毒检测时,除选用 Vero、MDBK 或牛睾丸细胞(用于荧光检查法检测 BVDV)、ST 或 PK15 外,还应增加 Marc-145 进行致细胞病变检查和红细胞吸附性外源病毒检查。三是产品质量标准中已采用其他方法作为非禽源外源病毒检测。此类产品如研发单位在产品申报注册时,采用其他方法进行外源病毒检测,并经农业部兽药评审委员会评定、认可的,仍可作为该产品认可的外源病毒检测方法。例如,猪伪狂犬病活疫苗(HB-98 株)除采用《中国兽药典》中规定方法外,还增加了 PCR 方法对鄂 A 野毒的检测,水貂犬瘟热活疫苗中外源病毒检测采用了鸡胚接种试验和水貂接种试验等。针对以上情况,建议在《中国兽药典》2015 年版三部编纂时,有必要在“外

源病毒检验”相关内容中增加对此类特殊产品如何进行外源病毒检验的具体规定,以增加新版《中国兽药典》的可操作性。

**3.3 荧光抗体检查法的改进建议** 荧光抗体检查法是非禽源外源病毒检验中的一种检测特定病毒的方法。2010 年版《中国兽药典》规定了所有非禽源细胞及其活疫苗除均应检测 BVDV 之外,还规定了各类细胞应检测的特定病毒种类:即猪源细胞 2 种(PPV 和 CSFV);牛、绵羊和山羊细胞 1 种(BTV);犬源细胞 2 种(RV 和 CPV)以及马源细胞 1 种(EIAV)。这些需荧光抗体检测法进行检测的特定必检病毒的确定是基于国内动物疫病流行状况、相关生物制品外源病毒检测的实际情况以及国内相关诊断试剂的供应情况所作的科学的判断,基本符合中国现阶段非禽源活疫苗外源病毒检测的实际。但随着我国动物疫病流行性情况的变化,如猪圆环病毒病、猪流行性腹泻、猪繁殖与呼吸综合征、猪腺病毒病等的发生,建议 2015 年版《中国兽药典》三部编纂时应当考虑这些情况,有必要将猪圆环病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪流行性腹泻病毒等逐步纳入外源病毒检测范围。此外,为进一步提高荧光抗体检查法的可操作性,建议可参考国外有关经验,针对每种细胞及其制品不应检出的特定病毒,可明确规定其应接种的具体敏感细胞及做阳性对照时应选用的参考病毒毒株。如美国兽用生物制品中心发布的《减毒活疫苗中外源性牛病毒性腹泻病毒的补充检测方法》就明确规定,在用荧光抗体检测法进行外源性 BVDV 检测时,应选择的敏感细胞为牛鼻甲(BT)次代细胞或其他许可的细胞,应选择的阳性对照病毒有 4 种:即非致细胞病变型 BVDV 1 型毒株(New York-1 株)、非致细胞病变 2 型毒株(890 株)、致细胞病变 BVDV 1 型毒株(Singer 株)以及致细胞病变 BVDV 2 型毒株(125 株)。

**3.4 红细胞吸附性外源病毒检验中使用的红细胞种类** 红细胞吸附性病毒的检测是利用某些病毒感染细胞后,能在细胞表面产生能与动物血红细胞吸附的物质,在一定温度及适宜的 pH 条件下,与动物血红细胞吸附,从而检查是否有外源性病毒的存在。不同的病毒,甚至同种病毒的不同毒株,能结

合的血红细胞种类、结合时需要的温度和 pH 不完全相同。有的红细胞能被多种病毒吸附,如鸡、豚鼠等,许多病毒也能吸附多种细胞(表3)。《中国兽药典》2010年版三部规定在进行红细胞吸附性外源病毒检验时使用的鸡红细胞和豚鼠红细胞的混合体,基本可以检测出绝大部分常见的红细胞吸附性动物病毒,但对于呼肠孤病毒、杯状病毒(兔出血症病毒)等对人红细胞更敏感的红细胞吸附性病毒而言,漏检的可能较大。因此,在红细胞吸附性外源病毒检验中,应根据不同的病毒,选用相应的动物红细胞,若选用多种红细胞,则检测阴性结果的可靠性将增加,放置多个温度进行检查,也能增加检测的可靠性。建议在《中国兽药典》2015年版三部编纂时应当考虑这些特殊情况,鉴于在实际检验过程中购买人的O型红细胞困难及可能存在的生物安全隐患,可考虑通过建立检测这些特殊病毒的特定方法,以弥补红细胞吸附性病毒检测时可能漏检的情况,增加检测结果的可靠性和准确性。

**3.5 外源病毒检测用试剂问题** 单特异抗血清以及敏感、特异的荧光抗体检测试剂是外源病毒检验的重要物质基础。与国外先进国家相比,目前我国提供的非禽源标准抗血清和诊断用试剂种类还比较少,质量参差不齐,且兽用生物制品行业使用的抗血清大都是多克隆抗体,单克隆抗体较少。这些日益成为制约我国兽用生物制品行业持续、健康发展的瓶颈,应进一步加大我国兽用标准物质研制工作,同时积极拓展渠道加大引进力度,尽快解决困扰兽用生物制品行业的基础性物质短缺问题。建议可由国家兽药监管部门牵头,整合国内诊断试剂研制和生产单位现有资源,以建立我国兽用生物制品检测用单克隆抗体试剂库为切入点,指定生产单位定点生产,由中监所统一鉴定并对外供应,实现资源和利益共享,并逐步建立和完善其他检测用标准物质的生产-供应新模式。

**3.6 分子生物学等新型检测方法在外源病毒检测中的应用** 目前,OIE以及美国、欧盟等发达国家尚未将PCR等分子生物学方法确定为法定的外源病毒检测方法。但在国际贸易指定试验或各国的

农业国家标准中,PCR已作为一种快速、灵敏、便宜的诊断方法被广泛使用,特别是在取代传统方法不易或不能培养或检测的病原体的检测方面具有重要的意义。如OIE已将检测蓝舌病病毒(BTV)、非洲猪瘟病毒(ASFV)、牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)等病毒的PCR方法列为国际贸易指定试验方法<sup>[3]</sup>,我国已将检测猪瘟病毒(CSFV)、猪圆环病毒(PCV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)等病毒的PCR方法列为国家标准。目前,我国部分兽用生物制品在外源病毒检测及其他项目检测方面已经开始使用PCR等方法。因此,《中国兽药典》作为我国兽药行业的最高技术法典,不管是从与国际接轨的角度,还是从提升我国兽用生物制品行业整体检测水平的角度,都有必要考虑尽早引入分子生物学等新型检测方法,特别是针对目前欠缺或质量不理想的检测试剂,如BTV荧光抗体。当然,在确定相应的PCR方法时,可优先考虑OIE指定的方法或国家标准,并做必要的验证,同时加强对相关试剂定点生产企业的质量管理和监督。

**致谢:**感谢中国兽医药品监察所病毒制品检测室李慧姣、李俊平以及其他同志在本文撰写过程中给予的指导和帮助。

## 参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2010 年三部[S].
- [2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2005 年三部[S].
- [3] 世界动物卫生组织. 陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽鸟与蜜蜂)第五版[S].
- [4] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京:科学出版社, 1997:344.
- [5] 中华人民共和国农业部公告第 683 号. 兽用生物制品菌(毒、虫)种子批建立试验技术指导原则[S].
- [6] 张万清,蒋厚生(译). 美国兽用生物制品质量标准[M]. 北京:中国农业科技出版社,1995.
- [7] European Pharmacopoeia Commission. European pharmacopoeia 6.0[S].

(责任编辑:侯向辉)