
附件：3302 外源病毒因子检查法公示稿

通则 3302 外源病毒因子检查法

病毒类制品在毒种选育和生产过程中，经常使用动物或细胞基质培养，因此，有可能受到外源因子的污染。为了保证制品质量，需要对毒种和对照细胞进行外源病毒因子的检测。

对病毒主种子批或工作种子批，应抽取足够检测试验需要量的供试品进行外源病毒因子检测。根据病毒的特性，有些检测需要在试验前中和病毒。病毒中和时尽可能不稀释，但当中和抗体不能有效中和病毒而需要稀释病毒时，应选择可被中和的最大病毒量，但至少不得超过生产接种时毒种的稀释倍数。进行病毒中和时，应采用非人源和非猴源（特殊情况除外）的特异性抗体中和本病毒，为降低样品中外源病毒被中和的可能性，最好采用单克隆抗体，中和过程不应干扰外源病毒的检测。制备抗血清（或单克隆抗体）所用的免疫原应采用与生产疫苗（或制品）不同种而且无外源因子污染的细胞（或动物）制备。如果病毒曾在禽类组织或细胞中繁殖过，则抗体不能用禽类来制备。若用鸡胚，应来自 SPF 鸡群。

病毒种子批外源因子检查

第一法 动物试验法

（1）小鼠试验法 取 15~20g 小鼠至少 10 只，取病毒种子批或经抗血清中和后的病毒悬液，每只脑内接种 0.03ml，同时腹腔接种 0.5ml，至少观察 21 天。解剖每只在试验 24 小时后死亡或有患病体征的小鼠，直接肉眼观察其病理改变，并将有病变的相应组织制成悬液，通过脑内和腹腔接种另外至少 5 只小鼠，并观察 21 天。接种 24 小时内小鼠死亡超过 20%，试验无效。在观察期内最初接种的小鼠以及每个盲传组的小鼠至少有 80% 健存，且小鼠未出现与待测毒种无关的可传播性因子或其他病毒感染，为符合要求。

（2）乳鼠试验法 取出生后 24 小时内的乳鼠至少 10 只，取病毒种子批或经抗血清中和后的病毒悬液，每只脑内接种 0.01ml，同时腹腔接种至少 0.1ml，每天观察至少 14 天。解剖每只在试验 24 小时后死亡或有患病体征的乳

鼠，直接肉眼观察其病理改变，并取有病变的相应组织和脑、脾制备成悬液，通过脑内和腹腔接种另外至少 5 只乳鼠，并每天观察至接种后 14 天。接种 24 小时内乳鼠死亡超过 20%，试验无效。在观察期内最初接种的乳鼠以及每个盲传组的乳鼠至少有 80% 健存，且乳鼠未出现与待测毒种无关的可传播性因子或其他病毒感染，为符合要求。

第二法 细胞培养法

(1) 非血吸附病毒检查 取病毒种子批或用抗血清中和后的病毒悬液，分别接种于人源、猴源和与生产用细胞同种细胞。除另有规定外，每种细胞至少接种 10ml 病毒悬液或取 10ml 病毒悬液用抗血清中和后接种。用人二倍体细胞或猴源细胞生产的，还应接种另外一株人二倍体细胞或猴源细胞。每种细胞至少接种 6 瓶，每瓶病毒悬液接种量不少于每瓶培养液总量的 25%。于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养，观察 14 天。每种细胞均设置未接种病毒的阴性对照瓶及阳性病毒对照瓶。必要时可更换细胞培养液或传代 1 次，但传代时间距观察期末不得少于 7 天。阴性、阳性对照应成立，接种待测病毒样本的每种细胞培养物未见细胞病变，则判为阴性，符合要求。

(2) 血吸附病毒检查 于接种后第 6~8 天和第 14 天，分别取上述接种病毒的每种细胞培养物 2 瓶进行血吸附病毒检查。用 0.2%~0.5% 鸡和豚鼠红细胞混合悬液覆盖于细胞表面，一瓶于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 放置 30 分钟、另一瓶于 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 放置 30 分钟，吸弃多余红细胞后观察红细胞吸附情况。阴性、阳性对照应成立，接种待测病毒样本的细胞应均为阴性。

第三法 鸡胚检查法

在禽类组织或细胞中繁殖过的病毒种子需用鸡胚检查禽类病毒的污染。

除另有规定外，取 10ml 病毒种子批或 10ml 病毒悬液用抗血清中和后接种，选用 9~11 日龄和 5~7 日龄的两组 SPF 鸡胚，每组至少 10 枚，分别于尿囊腔和卵黄囊接种，每胚 0.5ml。置于 35°C 孵育 7 天后，观察鸡胚存活，并取尿囊液用 0.2%~0.5% 鸡和豚鼠红细胞混合悬液做血细胞凝集试验。接种的每组鸡胚至少 80% 存活 7 天，且尿囊液血凝试验为阴性，为符合要求。

生产用对照细胞外源病毒因子检查

第一法 非血吸附病毒检查

(1) 细胞直接观察 每批生产用细胞应留取 5%或不少于 500ml 细胞悬液不接种病毒，作为对照细胞加入与疫苗生产相同的细胞维持液，置与疫苗生产相同的条件下培养至少 14 天或至病毒收获时（取时间较长者），在显微镜下观察是否有细胞病变出现，无细胞病变出现者为阴性，符合要求。在观察期末至少有 80%的对照细胞培养物存活，试验才有效。

(2) 细胞培养试验 上述试验观察期末，收取上清液混合后，取适量接种于猴源和人源的细胞培养物，如果疫苗病毒在非猴源或非人源的其他细胞系上生产，还应接种于同种不同批细胞。每种细胞至少接种 5ml 上清混合液，且接种量应不少于每瓶细胞培养液总量的 25%。置与生产相同的培养条件下至少培养 14 天。无细胞病变者为阴性，符合要求。

第二法 血吸附病毒检查

对上述“细胞直接观察”及“细胞培养试验”的细胞培养物，在观察期末取至少 25%的细胞培养瓶进行血吸附病毒检查（方法同病毒种子批外源因子检查的血吸附病毒检查）。如对照细胞为悬浮细胞（如昆虫细胞），无法进行血吸附检查，可进行血凝集检查。

1、修订说明：

按照“生物制品生产检定用动物细胞基质制备及质量控制”修订情况，增加昆虫细胞的内容。

2、起草单位：中国食品药品检定研究院

联系电话：010-53851709

国家药典委员会