

鸡马立克氏病活疫苗（标准草案）

Ji Malikeshibing Huoyimiao
Marek's Disease Vaccine, Live

1 定义 本品系用适宜鸡马立克氏病病毒或火鸡疱疹病毒接种 SPF 鸡胚成纤维细胞培养，收获细胞培养液，加入适宜冷冻保护液制成，或加入适宜稳定剂经裂解、冷冻真空干燥制成。用于预防鸡马立克氏病。

2 毒种

2.1 安全性

2.1.1 对鸡的安全性 1 日龄鸡免疫用毒种，用 1 日龄 SPF 鸡 20 只，各腹腔接种病毒液 10 个推荐使用剂量，至少观察 90 日。观察结束后，非特异性死亡不得超过 2 只，剖检所有存活鸡，观察各组织和脏器病变，取卵巢或睾丸、肾脏、脾脏、肝脏、心脏、肺、法氏囊、腺胃和坐骨神经等组织，进行组织病理学检查。应无马立克氏病临床症状和特异性死亡，剖检应无肉眼可见变化和组织病理学变化。

2.1.2 对鸡胚的安全性 鸡胚内免疫用毒种，用 18 日龄 SPF 鸡胚 20 枚，各胚内接种病毒液 10 个推荐使用剂量，孵化率应至少 80%，鸡胚孵出后，至少观察 90 日。观察结束后，非特异性死亡不得超过 2 只，剖检所有存活鸡，观察各组织和脏器病变，取卵巢或睾丸、肾脏、脾脏、肝脏、心脏、肺、法氏囊、腺胃和坐骨神经等组织，进行组织病理学检查。应无马立克氏病临床症状和特异性死亡，剖检应无肉眼可见变化和组织病理学变化。

2.2 毒力返强 用 1 日龄 SPF 鸡至少 10 只，各腹腔注射病毒液不少于 1 个推荐使用最大剂量，接种后 5~7 日，逐只采集抗凝血，分离白细胞后混合作为第 1 代。第 1 代白细胞混悬液按前述方法接种、分离白细胞，依次传代至少至第 5 代。最后 1 代接种的 SPF 鸡观察至少 90 日，与第 1 代进行比较，安全性应无差异。对基因缺失候选疫苗毒株，检测缺失基因的稳定性，最后 1 代病毒用针对缺失基因的特异引物进行 PCR 扩增，扩增结果应为阴性。

2.3 免疫原性

2.3.1 用鸡检验 用推荐使用的各种接种途径接种病毒液 1 个最小免疫剂量，每种途径各接种 1 日龄 SPF 鸡 20 只，另 20 只作对照。接种后 5~8 日，毒种为 I、II 型鸡马立克氏病毒时，免疫组和对照组各腹腔接种超强毒株攻毒；毒种为火鸡疱疹病毒时，免疫组和对照组各腹腔接种标准强毒株攻毒。攻毒后观察 70 日，记录死亡和出现临床症状的存活鸡数量。观察期结束，剖检所有存活鸡并观察 MD 大体病变。I、II 型鸡马立克氏病毒种对照组应至少 80% 发病，免疫组相对保护率应至少 80%；火鸡疱疹病毒毒种对照组应至少 60% 发病，免疫组相对保护率应至少 60%。

马立克氏病疫苗相对保护率计算方法

计算公式如下：
$$\frac{V-C}{100\%-C} \times 100\%$$

V=观察期结束免疫鸡无显著临床症状和 MD 大体病变的存活鸡的百分比

C=观察期结束攻毒对照鸡无显著临床症状和 MD 大体病变的存活鸡的百分比

2.3.2 用鸡胚检验 鸡胚内接种毒种，用 18 日龄 SPF 鸡胚 20 枚，接种病毒液最小免疫剂量，另 20 枚作对照。两组孵化率应至少 80%，且免疫组孵化率不得低于对照组。鸡胚孵出后 5~8 日，毒种为 I、II 型鸡马立克氏病毒时，免疫组和对照组各腹腔接种超强毒株攻

毒；毒种为火鸡疱疹病毒时，免疫组和对照组各腹腔接种标准强毒株攻毒。攻毒后观察 70 日，记录死亡和出现临床症状的存活鸡数量。观察期结束，剖检所有存活鸡并观察 MD 大体病变。I、II 型鸡马立克氏病毒种免疫组相对保护率应至少 80%，对照组应至少 80% 发病；火鸡疱疹病毒毒种免疫组相对保护率应至少 60%，对照组应至少 60% 发病。

2.4 纯净

2.4.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.4.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

2.4.3 外源病毒检验 按附录 XX（外源病毒检验的一般要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2.5 代次限定 除另有规定外，从基础种子到生产种子传代一般不超过 5 代。

3 生产用原辅料

3.1 生产用细胞 应符合附录 3502 要求。

3.2 保护剂 应符合附录 3009 要求。

4 成品检验

4.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

4.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

4.3 外源病毒检验 按附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

4.4 鉴别检验 用稀释液将疫苗适当稀释后接种 CEF 细胞，用相应单克隆抗体进行间接免疫荧光试验，应与同型单克隆抗体反应出现特异性荧光，与不同型单克隆抗体均不应出现特异性荧光。

4.5 安全检验

4.5.1 用鸡检验 1 日龄鸡免疫用疫苗，用 1 日龄 SPF 鸡 20 只，各按推荐使用途径接种疫苗 10 个推荐使用剂量，另 20 只不接种作为对照，观察 21 日。应全部健活，若有非特异性死亡，两组鸡非特异性死亡总数不得超过 3 只，且免疫组非特异性死亡数不得超过对照组。

4.5.2 用鸡胚检验 鸡胚内免疫用疫苗，用 18 日龄 SPF 鸡胚 20 枚，按推荐使用途径接种疫苗 10 个推荐使用剂量，另 20 枚不接种作为对照，观察 10 日。两组孵化率应至少 80%，且免疫组孵化率不得低于对照组。

4.6 蚀斑计数 每批疫苗抽样 3 瓶进行蚀斑计数。以 3 瓶疫苗各稀释度中的最低平均数核定该批疫苗每羽份中所含的蚀斑。每羽份蚀斑数应不低于说明书标示量。

4.7 效力检验

4.7.1 用鸡检验 1 日龄鸡免疫用疫苗，用 1 日龄 SPF 鸡 20 只，皮下接种疫苗 1 个推荐使用剂量，另 20 只作对照。接种后 5~8 日，I、II 型活疫苗检验鸡各腹腔接种超强毒攻毒，III 型活疫苗检验鸡各腹腔接种标准强毒株攻毒。攻毒后观察 70 日，记录死亡和出现临床症状的存活鸡只数。观察期结束，剖检所有存活鸡并观察 MD 大体病变（包括卵巢或睾丸、肾脏、脾脏、肝脏、心脏、肺、法氏囊、腺胃和坐骨神经等组织）。I、II 型鸡马立克氏病活疫苗对照组应至少 80% 发病，免疫组相对保护率应至少 80%；III 型鸡马立克氏病活疫苗对照组应至少 60% 发病，免疫组相对保护率应至少 60%。

4.7.2 用鸡胚检验 鸡胚内免疫用疫苗，用 18 日龄 SPF 鸡胚 20 枚，经胚内接种疫苗 1 个推荐使用剂量，另 20 枚鸡胚作对照。两组孵化率应至少 80%，且免疫组孵化率不得低于对照组。鸡胚孵出后 5~8 日，I、II 型活疫苗检验鸡各腹腔接种超强毒攻毒，III 型活疫苗检验鸡各腹腔接种标准强毒株攻毒。攻毒后观察 70 日，记录死亡和出现临床症状的存活鸡只

数。观察期结束，剖检所有存活鸡并观察 MD 大体病变（包括卵巢或睾丸、肾脏、脾脏、肝脏、心脏、肺、法氏囊、腺胃和坐骨神经等组织）。I、II 型鸡马立克氏病活疫苗对照组应至少 80% 发病，免疫组相对保护率应至少 80%；III 型鸡马立克氏病活疫苗对照组应至少 60% 发病，免疫组相对保护率应至少 60%。

4.8 剩余水分测定（冻干疫苗适用） 按附录 3204 进行测定，应符合规定。

4.9 真空度测定（冻干疫苗适用） 按附录 3103 进行测定，应符合规定。

附注：

疫苗稀释液的稳定性检验 用 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 的稀释液稀释疫苗后：（1）立即测定疫苗的蚀斑总数；（2） $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 置 1 小时后测定疫苗的蚀斑总数。放置 1 小时后的疫苗蚀斑总数应不低于疫苗稀释后立即测定的 60%。

起草说明：

1. 本标准系在《欧洲药典》和我国已经批准的 MDV I 型、III 型活疫苗至少 11 种制品的标准基础上编制而成。定义根据常用的 MD 疫苗 I、III 型工艺制定。本标准属于首次起草。

2. 参照农业部公告第 502 号、1553 号等，成品检验鉴别检验增加间接免疫荧光试验。参照文献《2020-2021 年市售马立克病疫苗的效价测定及质量评估》细化毒种特异性鉴定所用 IFA 方法。

3. 关于毒种安全性，参照文献《一例鸡马立克氏病的病理组织学诊断》，马立克肿瘤侵害多种器官，最常见于性腺、肝、脾、肾、其次为肺、心、腺胃、法氏囊等，偶见于肌肉。细化组织病理学标准和要求。参照文献《皮肤型和内脏型鸡马立克病的病理学诊断》180 只日龄大鸡有胸腺萎缩等病变，删除小鸡免疫抑制规定。

4. 参考欧洲药典，增加毒种残留致病性试验。

5. 毒种增加毒力返强规定。

6. 参照文献《鸡马立克氏病免疫失败的原因及防制对策》，III 型 10~14 日产生免疫力，I 型 5 日产生免疫力。修改毒种免疫原性攻毒时间。

7. 免疫原性，I 和 III 毒种分开描述。细化 MD 大体病变观察，观察卵巢、肾脏、脾脏、肝脏、心脏、肺、法氏囊、腺胃和坐骨神经等组织的大体病变。

8. 参照文献《马立克氏病的研究进展》，血清 I 型强毒株：HRPS-16 株、GA 株、BJ-1 株、JM 株；超强毒株：Md-5 株、RB1/B 株；特超强毒株：584A。目前已批 MD 活疫苗，大多用京-1 血毒攻毒。对 I 型 MD 活疫苗，用京-1 血毒攻毒，能满足 80% 保护率的规定，用更强的 Md-5 攻毒，也能满足 80% 保护率。对 III 型 MD 活疫苗，用京-1 血毒攻毒，能满足规程 60% 保护率的规定，能否满足欧洲药典 80% 保护率的规定，需做试验，若用更强的 Md-5 株攻毒，不能保证 60% 或 80% 的保活率，因此建议 I 型 MD 毒株免疫原性可用京-1 血毒或更强的 Md-5 株攻毒，而 III 型 MD 毒种建议用京-1 血毒攻毒。攻毒剂量为京-1 株强毒 0.5ml（含 100LD₅₀）或 Md-5 株超强毒 0.2ml（含 500PFU）。

9. 蚀斑计数 根据 MD 毒株的特点分开描述。每羽份标准依据各型大多数标准含量最低标准进行制定。毒种 I 型每羽份至少含 2000PFU，III 型含 1000PFU，该项标准的制定依据大多数制品标准进行。I 型代表株 814 株、CVI988 株或 CVI988/Rispens 株；III 型代表株主要是 HVT Fc126 株。梅里亚转国内生产 CVI988 株不低于 3000PFU，马立克氏病基因缺失苗也不低于 3000PFU。

10. 工艺中都是接种 SPF 鸡成纤维细胞培养，收获感染细胞。加适宜保护剂经冷冻真空干燥制成（冻干制品）或直接加冷冻液制成（细胞悬液）。

11. 删除稀释液配方，保留稀释液稳定性检验。

12. 依据 2025 年度第 2 次会议审查意见，定义已修改为：本品系用适宜鸡马立克氏病毒或火鸡疱疹病毒；毒种项下的安全性，接种剂量已修改为“10 个推荐使用剂量”；明确非特异性死亡的上限不超过 10%（即 2 只鸡）；增加了不应有特异性死亡的规定；毒力返强中删除“适用于 I 型马立克病毒”；接种剂量明确为不少于 1 个推荐使用最大剂量；对首次及继代接种鸡的数量规定不少于 1 只；将 meq 基因缺失株修改为“基因缺失候选疫苗毒株”。免疫原性中接种剂量修改为最小免疫剂量；“接种后 8 日”修改为“免疫后 5~8 日”；I、II 型和 III 型分开描述，分别规定相对保护率和发病率；成品检验中鉴别检验项，经哈尔滨兽医研究所高玉龙委员进行试验验证，证实所里供应的 I 和 III 型单克隆抗体特异性良好，仅与本型毒种发生 IFA 反应，与不同型毒株不发生 IFA 反应。因次鉴别检验采用 IFA 进行；成品检验中安全检验，增加胚内疫苗相关规定；免疫原性和成品效力检验，增加胚内疫苗相关规定，和用 1 日龄鸡检验分开描述。