

# 猪细小病毒病灭活疫苗（标准草案）

Zhu Xixiaobingdubing Miehuoyimiao  
Swine Parvovirus Vaccine, Inactivated

## 1 定义

本品系用猪细小病毒适宜毒株接种适宜细胞培养，收获细胞培养物，灭活后加入适宜佐剂制成。用于预防猪细小病毒病。

## 2 毒种

2.1 安全性 用推荐剂量的毒种与适宜佐剂制备灭活疫苗，用 1.5~2 月龄健康易感猪（猪细小病毒 HI 抗体效价不高于 1:8）5 头，各肌肉注射疫苗 2 倍推荐使用剂量，观察 14 日。所有猪应精神、呼吸、采食正常；接种部位应无红肿、硬结；所有猪在接种前观察并测温 3 日，接种后连续测温 5 日，接种后体温与接种前基础体温相比，应不超过基础体温 1.0℃。若超过 1.0℃，但不超过 1.5℃，稽留应不超过 2 个温次（每日测温 1 次）。

### 2.2 免疫原性

#### 2.2.1 血清学方法

2.2.1.1 用最小抗原含量的毒种与适宜佐剂制备灭活疫苗。用健康后备母猪 10 头（猪细小病毒 HI 抗体不高于 1:8），其中 5 头配种前 2~3 周各肌肉注射疫苗 1 头份，另 5 头作对照。接种后 28 日，分别采血，分离血清，测定猪细小病毒 HI 抗体效价。对照猪 HI 抗体效价均应不高于 1:8，免疫猪 HI 抗体效价应至少有 4 头不低于 1:64。

2.2.1.2 用豚鼠检验 用体重 300~450g 猪细小病毒抗体阴性健康豚鼠（HI 抗体效价不高于 1:8）10 只，其中 5 只各肌肉注射疫苗推荐最小使用剂量 1/4 头份，另 5 只作对照。接种后 28 日，分别采血，分离血清，测定猪细小病毒 HI 抗体。对照豚鼠血清 HI 抗体效价均应不高于 1:8，免疫豚鼠应至少 4 只血清 HI 抗体效价不低于 1:64。

2.2.2 免疫攻毒法 用最小抗原含量的毒种与适宜佐剂制备灭活疫苗。用健康后备母猪 10 头（猪细小病毒 HI 抗体不高于 1:8），其中 5 头配种前 2~3 周各肌肉注射疫苗 1 头份，另 5 头作对照。妊娠 6~7 周时，各肌肉注射猪细小病毒强毒株，观察至分娩。对照猪应至少 4 头出现流产、死胎、木乃伊胎或胎儿重吸收等繁殖障碍症状，免疫猪应至少 4 头不出现特异性临床症状，如流产、死胎、木乃伊胎或所产仔猪瘦小、体弱，或出现不同程度震颤、共济失调等神经症状。

### 2.3 纯净

2.3.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.3.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

2.3.3 外源病毒检验 按附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2.4 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 生产用原辅材料

3.1 细胞 应符合附录 3502 要求。

3.2 培养基 应符合附录 3009 要求。

3.3 佐剂 应符合附录 3309 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 安全检验 用 1.5~2 月龄猪细小病毒抗体阴性健康猪（HI 抗体效价不高于 1:8）5 头，各肌肉注射疫苗 2 倍推荐使用剂量，观察 14 日，所有猪应精神、呼吸、采食正常；接种部位应无红肿、硬结；所有猪在接种前观察并测温 3 日，接种后连续测温 5 日，接种后

体温与接种前基础体温相比，应不超过基础体温 1.0℃。若超过 1.0℃，但不超过 1.5℃，稽留应不超过 2 个温次（每日测温 1 次）。

4.3 效力检验 用体重 300~450g 猪细小病毒抗体阴性健康豚鼠（HI 抗体效价不高于 1:8）10 只，其中 5 只各肌肉注射疫苗 1/4 头份，另 5 只作对照。接种后 28 日，分别采血，分离血清，测定猪细小病毒 HI 抗体。对照豚鼠血清 HI 抗体效价均应不高于 1:8，免疫豚鼠应至少 4 只血清 HI 抗体效价不低于 1:64。

4.4 甲醛残留量测定（适用于甲醛灭活制品） 按附录 3203 进行测定，应符合规定。

### 附注：

#### 1 猪细小病毒红细胞凝集试验及抑制试验方法

##### 1.1 红细胞凝集试验

1.1.1 在微量板上，从第 1 孔至 12 孔或所需之倍数孔，用移液器每孔加入 PBS (0.01mol/L, pH 值 7.0~7.4, 下同) 或生理盐水 0.025ml，用移液器吸取被检样品 0.025ml，从第 1 孔起，依次作 2 倍系列稀释，至最后 1 个孔，弃去移液器内 0.025ml 液体（稀释倍数依次为 2、4、8、16、32.....4096）。

1.1.2 每孔加入 1%豚鼠红细胞悬液 0.025ml（见表 1），并设不加样品的红细胞对照孔，立即在微量板振摇器上摇匀，置室温 60~80 分钟，当对照孔中的红细胞呈显著纽扣状时判定结果。

1.1.3 以使红细胞完全凝集的最高稀释度作为判定终点。

表 1 血凝试验术式

单位：ml

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8.....	对照
样品稀释倍数	2	4	8	16	32	64	128	256.....	
PBS 或生理盐水	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	
样品（病毒原液）	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	
1%豚鼠红细胞悬液	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025

##### 1.2 红细胞凝集抑制试验法

###### 1.2.1 血凝素工作液配制

1.2.1.1 血凝素凝集价测定 96 孔微量板法按表 2 术式进行。用 PBS 或生理盐水将血凝素稀释成不同倍数，加入与抑制试验中血清量等量的 PBS 或生理盐水，再加入 1%豚鼠红细胞悬液。将 96 孔微量板在振摇器上摇匀，置室温 60~80 分钟，当对照孔中的红细胞呈显著纽扣状时判定结果。以使红细胞完全凝集的最高稀释度作为判定终点。

###### 1.2.1.2 血凝素工作液配制及检验

1.2.1.2.1 4 HAU 血凝素的配制 如果血凝素凝集价测定结果为 1:1024（举例），4 个血凝单位（即 4 HAU）=1024/4=256（即 1:256）。取 PBS 或生理盐水 9.0ml，加血凝素 1.0ml，即成 1:10 稀释液，将 1:10 稀释液 1.0ml 加入到 24.6ml PBS 或生理盐水中，使最终浓度为 1:256。

1.2.1.2.2 检验 检查 4 HAU 的红细胞凝集价是否准确，应将配制的 1:256 稀释液分别以 1.0ml 的量加入 PBS 1.0ml、2.0ml、3.0ml、4.0ml、5.0ml 和 6.0ml 中，使最终稀释度分别为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6 和 1:7。然后，从每一稀释度中取 0.025ml，加入 PBS 或生理盐水 0.025ml，再加入 1%豚鼠红细胞悬液 0.025ml，混匀。将血凝板置室温 60~80 分钟，如果配制的抗原液为 4 HAU，则 1:4 稀释度将给出凝集终点；如果 4 HAU 高于 4 个单位，可能 1:5 或 1:6 为终点；如果较低，可能 1:2 或 1:3 为终点。应根据检验结果将血凝素稀释度做适当调整，使工作液确为 4 HAU。

表2 血凝素凝集价测定术式

单位: ml

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8.....	对照
稀释倍数	2	4	8	16	32	64	128	256.....	
PBS 或生理盐水	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
		↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	弃 0.025
样品 (病毒原液)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	
PBS 或生理盐水	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
1%豚鼠红细胞悬液	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025

## 1.2.2 红细胞凝集抑制试验

1.2.2.1 待检血清的处理 取 100 $\mu$ l 待检血清, 经 56 $^{\circ}$ C 水浴灭活 30 分钟后, 加入 300 $\mu$ l 25% 白陶土悬液, 混匀, 置室温下作用 30 分钟; 以 10000r/min 离心 10 分钟, 吸取上清, 加入 100 $\mu$ l 20% 的豚鼠红细胞泥, 振荡混匀后 37 $^{\circ}$ C 作用 1 小时; 以 4000r/min 离心 10 分钟, 收集上清, 即为 1:4 稀释的血清样品。

1.2.2.2 96 孔微量板法 按表 3 用 PBS 或生理盐水对处理后的血清作 2 倍系列稀释, 加入含 4 HAU 的血凝素液, 并设 PBS 或生理盐水和血凝素对照, 充分振摇后, 置 37 $^{\circ}$ C 60 分钟, 再加入 1% 豚鼠红细胞悬液, 置室温 60~80 分钟或 37 $^{\circ}$ C 作用 30~60 分钟, 当对照孔中的红细胞呈显著纽扣状时判定结果。以使红细胞凝集被完全抑制的血清最高稀释度作为判定终点。

表3 血凝抑制试验术式

单位: ml

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8.....	抗原 对照	红细 胞 对照
稀释倍数	2	4	8	16	32	64	128	256.....		
PBS 或生理盐水	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.05
		↘	↘	↘	↘	↘	↘	↘	弃 0.025	
样品 (血清)	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025		
4 HAU 抗原	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	
1%豚鼠红细胞悬液	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025

## 附: 1%豚鼠红细胞悬液的标定

对首次配制的豚鼠红细胞悬液应进行标定。取配好的红细胞悬液 60ml, 自然沉淀后, 弃掉上部 PBS 或生理盐水 50ml, 混匀后装入刻度离心管内, 以 10000r/min 离心 5 分钟, 红细胞压积应为 6.0%。

## 起草说明:

1. 该标准在我国已经注册的 9 个猪细小病毒病灭活疫苗制品标准提取共性部分起草而成。涉及的参考毒株 YBF01 株、WH-1 株、S-1 株、NJ 株、L 株、CP-99 株、BJ-2 株、CG-05 株、SC1 共 9 种。

2. 英文名称参照 2020 年版《中国兽药典》中的同品种标准的名称进行规范性修改, 修改为“Swine Parvovirus Vaccine, Inactivated”。

3. 删除了毒种后面的“毒种在适宜细胞上、在适宜培养条件下培养, 收获细胞培养物作为生产或检验用毒种。生产用毒种应符合生产用毒种的通用标准及该生产毒种的含量、安全性 (毒力)、免疫原性等相应要求。检验用毒种应符合检验用毒种的通用标准及该检验用毒种的含量、毒力等相应要求。”

4.2.2 项中因使用妊娠猪数量多达 10 头，为保障试验可操作性，便于试验动物的选择和试验的开展，妊娠母猪日龄“40 日”，参考猪细小病毒病灭活疫苗（CP-99 株）的标准修改为“6~7 周”；将“毒种用最小免疫剂量按工艺规程制备疫苗”改为“用最小抗原含量的毒种与适宜佐剂制备灭活疫苗”。

5. 种毒的纯净项，按照药典附录方法，将无菌、支原体和外源病毒 3 项分开描述。

6. 将“对照豚鼠血清抗体效价均应不高于 1:8，免疫豚鼠应至少 4 只不低于 1:64。”进行规范性修订，修改为“对照豚鼠血清 HI 抗体效价均应不高于 1:8，免疫豚鼠应至少 4 只血清 HI 抗体效价不低于 1:64”。

7. 依据 2024 年第 9 次会议审查意见，毒种项下增加了安全性项，并对安全性内容文字进行了规范修改，删除了基础体温后扩号中内容。查阅猪病学等参考资料，明确了种毒免疫原性项里，配种前 2~3 周免疫，妊娠 6~7 周时攻毒。

8. 依据 2024 年第 9 次会议审查意见，删除了毒种项下的特异性项；删除了成品检验项下效力检验中的用猪检验，仅保留用豚鼠检验；删除了不必要的一般性的注意事项；进一步完善了标准的起草说明。