

鸡毒支原体灭活疫苗（标准草案）

Jiduzhiyuanti Miehuoyimiao

Mycoplasma gallisepticum Vaccine, Inactivated

1 定义

本品系用鸡毒支原体接种适宜培养基培养，收获培养物，灭活后加适宜佐剂制成。用于预防由鸡毒支原体引起的鸡慢性呼吸道疾病。

2 菌种

2.1 形态特性 菌体经姬姆萨或瑞氏染色后，镜下观察，呈多形态，有细小球杆状，圆形等。

2.2 培养特性 在 CM 改良液体培养基培养 24~48 小时，呈轻度浑浊生长，能发酵葡萄糖产酸，使培养基 pH 值下降 0.5 以上；在 CM 改良固体培养基上长，菌落呈圆形、中央突起的“煎蛋”状。

2.3 代谢抑制试验 将菌种培养物稀释 10^5 倍，取 1ml 接种含 10% 阳性血清的 1ml CM 改良液体培养基中，充分混匀。将稀释好的菌液接种不含阳性血清的液体培养基作为对照管。设 2ml 液体培养基作为空白对照，同时置 37°C 培养 10 日，空白对照不变色，试验组培养物颜色应不出现明显改变，阴性对照培养物颜色应出现明显变化。

2.4 安全性 将菌种培养物制成灭活疫苗，用 40~47 日龄 SPF 鸡 10 只，各肌肉或颈背部皮下注射疫苗 2 个推荐使用剂量（羽份），观察 14 日。应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应，且无慢性呼吸道症状，剖检后气囊病变分数应不高于 1 分。

2.5 免疫原性 将菌种培养物制成灭活疫苗，用 40~47 日龄 SPF 鸡 10 只各颈背部皮下注射疫苗 1 个推荐使用剂量（羽份）。免疫后 30 日，连同对照鸡 10 只，各气囊注射鸡毒支原体 R 株培养物 0.2ml (10^9 CCU/ml)，观察 14 日，是否有呼吸道症状出现，14 日后剖检，观察气囊病变并进行病变记分（见附注）。对照鸡应至少 7 只出现 2 分及以上气囊病变，免疫鸡的平均气囊保护率应不低于 60%。

2.6 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.7 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 培养基 应符合附录 3009 要求。

3.2 佐剂 应符合附录 3009 要求。若用矿物油佐剂，应符合附录 3605 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 40~47 日龄 SPF 鸡 10 只，各肌肉或颈背部皮下注射疫苗 2 个推荐使用剂量（羽份），观察 14 日。应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

4.3 效力检验 用 40~60 日龄 SPF 鸡 10 只，各颈背部皮下注射疫苗 1 个推荐使用剂量（羽份），免疫后 30 日，连同对照鸡 10 只，各气囊注射鸡毒支原体 R 株培养物 0.2ml (10^9 CCU/ml)，观察 14 日后剖检，观察气囊病变并进行病变记分（见附注）。对照鸡应至少 7 只鸡出现 2 分及以上气囊病变，免疫鸡的平均气囊保护率应不低于 60%。

4.4 甲醛、苯酚和汞类防腐剂残留量测定 分别按附录 3203、3201、3202 进行测定，应符合规定。

附注：

1 气囊病变记分标准和平均气囊保护率计算公式

1.1 气囊病变记分标准

0分—气囊正常，清洁透明而薄。

1分—气囊稍有增厚和轻度浑浊，局部有少数灰色或黄色渗出物斑点。

2分—部分气囊区域有可见的灰色和黄色渗出物，同时伴有气囊中度增厚。

3分—大片气囊布满黄色干酪样渗出物。

4分—整个气囊布满黄色干酪样渗出物，气囊失去弹性。

1.2 保护率计算公式

$$\text{平均气囊保护率} = \frac{\text{对照鸡平均气囊病变分数} - \text{试验鸡平均气囊病变分数}}{\text{对照鸡平均气囊病变分数}} \times 100\%$$

2 CM 改良培养基配制

2.1 CM 改良液体培养基配制

组分	数量
脑心浸液	17.5g
注射用水	750ml
猪血清（或马血清）	150ml
25%酵母浸液	100ml
1%酚红	2ml
青霉素	终浓度 1000U/ml

上述成分混合溶解后，用 1mol/L 的氢氧化钠溶液调 pH 值为 7.6~7.8，过滤除菌，定量分装后使用。

2.2 CM 改良固体培养基配制 取 17.5g 脑心浸液和 12.5g 琼脂加入 750ml 注射用水后，加热充分溶解后，冷却至 55±5℃，用 1mol/L 的氢氧化钠溶液调 pH 值为 7.6~7.8，121℃ 高压 20 分钟，待冷却至 55±5℃，按 CM 改良培养基的比例无菌加入预热的血清、酵母浸液和青霉素，充分混匀后，制备固体培养基平板。

起草说明：

1. 本标准在 2020 年版《中国兽药典》中收载的“鸡毒支原体灭活疫苗”和 2000 年版《兽用生物制品规程》中收载的“鸡毒支原体灭活疫苗制造及检验试行规程”以及我国已批准的鸡毒支原体疫苗制品（2 个灭活疫苗、1 个活疫苗）标准（见下表）基础上起草而成。本标准属于首次起草。

制品名称	批准文件
鸡毒支原体、传染性鼻炎（A、C 型）二联灭活疫苗	2006.12.12 农业部公告第 780 号
鸡毒支原体油乳剂灭活疫苗	2003.09.02 农业部公告第 297 号
鸡毒支原体活疫苗	1998.12.14 农牧函 [1998] 38 号

2. 增加了菌种标准。

3. 培养特性 MG 的生化特性为发酵葡萄糖，不水解精氨酸，不利用尿素。但目前市面上没有可以用于其生化鉴定的生化管，实践中，用自己配制的培养基加减成分进行鉴定，且生化结果也不是关键指标，故参考“鸡毒支原体灭活疫苗制造及检验试行规程”的写法，将其归入“培养特性”。

4. 基础菌种代次限定 按统一格式体例规定为“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”。

5. 标准中以附注的形式列出了 CM 改良液体和固体培养基的配制方法。制备牛心汤做鸡毒支原体培养基质量不易控制，工艺繁琐，参考 ATCC 鸡毒支原体培养基改进了疫苗用菌株的培养基配方及配制方法，其中除菌方式按照现在的配制方式，由之前的高压灭菌改为过滤除菌。相关培养基及制备方法已在日常工作中进行了验证。

6. 规程中疫苗菌株有毒力测定，考虑到其用途是作疫苗株，应重点考察其免疫原性，故去掉了毒力测定的指标。

7. 效力检验 效力检验将喷雾攻毒法更改为气囊注射攻毒方法。气囊注射具有易定位、易操作和接种量更准确的优点，已有详细研究报告证实（鸡毒支原体灭活疫苗效力检验攻毒替代方法的研究报告），气囊注射法攻毒优于气雾免疫法攻毒。用气囊注射法代替气雾攻毒法可行。

8. 对照成立的效力检验标准 将效力检验对照成立标准原来的表述“对照鸡应至少有 4 只鸡的气囊出现 2 分以上病变，”修改为“2 分及以上气囊病变”。按照公文书写习惯，2 分以上含 2 分的情况，但因为企业咨询过该问题，所以考虑加以进一步明确。同时按照替代方法研究中使用的动物数量，将免疫组和对照组修改为各 10 只。对照组成立条件修改为至少 7 只以上出现 2 分及以上气囊病变。

9. 依据 2024 年第 10 次会议审查意见，补充了本实验室做代谢抑制试验的方法和体系，可能由不同效价的阳性血清对菌种培养物的抑制作用会有所不同。