

猪多杀性巴氏杆菌病（B 型）活疫苗（标准草案）

Zhu Duoshaxingbashiganjunbing(B xing) Huoyimiao
Swine *Pasteurella multocida* (Type B) Vaccine, Live

1 定义

本品系用 B 型多杀性巴氏杆菌接种适宜培养基培养，收获培养物，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防由 B 型多杀性巴氏杆菌引起的猪多杀性巴氏杆菌病。

2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阴性球杆菌。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中多杀性巴氏杆菌的生化特性。

2.3 培养特性 在含有 4.0%健康动物血清及 0.1%裂解血细胞全血的（改良）马丁琼脂平板或其他适宜固体培养基（如 TSA 等）上，置 36~37°C 培养 16~22 小时，肉眼观察，菌落表面光滑，呈微蓝色。在低倍显微镜下，45 度折光观察，边缘整齐，呈蓝绿色虹彩，边缘一部分有狭窄的红黄光带，属 Fg 菌落型。

2.4 血清型鉴定 用血清学方法或分子生物学方法进行鉴定，应为 B 型。

2.5 安全性 用推荐最小使用日龄的健康易感猪 2 头，各经推荐的免疫途径接种活菌 10 个推荐使用剂量，观察至少 10 日，应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

2.6 毒力返强 使用基础种子的最低代次，用最适日龄、品种的健康易感猪 2~5 头，各肌肉注射适宜剂量的活菌，在适宜的时间采集含菌量最高的组织，将混合组织样品作适当处理作为接种物，并采用适合的方法进行微生物学鉴定和含量测定，将处理后的接种物，按照第一次传代相同的途径、剂量接种相同数量的继代动物。每一次继代后在适当时间内观察接种动物是否出现由于疫苗株毒力返强所导致的临床症状指标和病理变化（尤其是比较最后一次继代和第一次传代之间的变化）。连续传代不应少于 5 代，最后一次传代动物应不少于 5 头，观察时间应不少于 21 日，观察结果应符合 2.5 的要求。

2.7 免疫原性 用 35~56 日龄（体重 15~30kg）健康易感猪 8 头，各经推荐的免疫途径注射活菌 1 个推荐使用剂量，接种后 14 日，连同对照猪 3 头，每头猪各肌肉注射 1MLD 的猪多杀性巴氏杆菌 C44-1 株（CVCC44401）强毒菌液，观察 10 日。对照猪全部死亡时，免疫猪应至少 6 头保护；对照猪死亡 2 头时，免疫猪应全部保护。

2.8 纯粹 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

2.9 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 动物源性材料 应符合附录 3008 要求。

3.3 原材料及辅料 应符合附录 3009 要求。

4 成品检验

4.1 纯粹检验 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

4.2 活菌计数 按瓶签注明头份，将疫苗用马丁肉汤稀释后，用含有 4.0%健康动物血清及 0.1%裂解血细胞全血的（改良）马丁琼脂平板培养，按附录 3405 进行活菌计数。每头份疫苗含活菌应不低于瓶签标示量。

4.3 安全检验 用 15~30kg 健康易感猪 2 头，各肌肉接种疫苗 10 个推荐使用剂量，观察 10 日，应全部健活，且应不出现由疫苗引起的任何局部或全身不良反应。

4.4 效力检验 用 35~56 日龄（体重 15~30kg）健康易感猪 8 头，各经推荐的免疫途径注射用适宜稀释液稀释的疫苗 1 个推荐使用剂量，接种后 14 日，连同对照猪 3 头，各皮

下注射 1MLD 的猪多杀性巴氏杆菌 C44-1 株 (CVCC44401) 强毒菌液, 观察 14 日。对照猪全部死亡时, 免疫猪应至少 6 头保护; 对照猪死亡 2 头时, 免疫猪应全部保护。

4.5 剩余水分测定 按附录 3204 进行测定, 应符合规定。

4.6 真空度测定 按附录 3103 进行测定, 应符合规定。

起草说明:

1. 本标准在 2020 版《中国兽药典》中收录的“猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗 (679-230 株)”“猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗 (E0630 株)”以及 2000 年版《中国兽用生物制品规程》中收录的“猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗制造及检验规程 (I、II)”基础上起草。本标准属于首次起草。

2. 农业农村部公告第 573 号发布了一、二、三类动物疫病病种名录, 统一将此类疫病命名为猪巴氏杆菌病, 但巴氏杆菌种属较多, 各类菌种特性有比较大的差异, 难以统一描述, 且目前生产菌种多为荚膜 B 型多杀性巴氏杆菌, 故仍保留“猪多杀性巴氏杆菌活疫苗”的命名。

3. 菌种项下形态特性、生化特性、培养特性、纯粹参考了 2000 年版《中国兽用生物制品规程》收录的“猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗制造及检验规程”, 并做规范性修改; 生化特性未明确具体的鉴定方法, 既可以采取传统的培养基方法进行鉴定, 也可以用 16srDNA 方法进行鉴定; 血清学特性改为血清型特性, 除荚膜抗原分群法外, 参照“NY/T 564-2016 猪巴氏杆菌病诊断技术”补充了多重 PCR 荚膜定型法; 代次限定按统一格式体例表述。

4. 2020 版《中国兽药典》中收录的“猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗 (679-230 株)”和“猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗 (E0630 株)”以及 2000 年版中收录的《中国兽用生物制品规程》“猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗制造及检验规程 (I、II)”标准中, 菌种的安全性、免疫原性、成品的安全检验和效力检验所使用的动物差异较大, 虽有“尽量使用体外生物学方法或其他替代方法取代本动物攻毒法进行检验”的规定, 且有普遍遵循的实验动物福利“3R”基本原则, 但考虑到采用不同菌株生产的疫苗检验方法的一致性和统一性, 在缺少试验验证的情况下, 标准中有相同动物的均进行统一, 删除了各不相同的动物检验方法, 以尽可能实现其普适性。如以后有试验验证数据的支持, 可再进行补充甚至用替代动物进行替代。

5. 菌种项下的安全性, 679-230 株采用小鼠、豚鼠和猪作为试验动物, 而 EO630 株采用兔和猪作为试验动物, 且二者使用的实验动物猪体重及数量一致。综合考虑标准的通用性, 剔除其他试验动物, 确定 15~30kg 健康易感猪 2 头作为通用的动物标准。

6. 菌种项下的免疫原性, 679-230 株采用小鼠和猪作为试验动物, 而 EO630 株采用兔和猪作为试验动物, 且二者采用的攻毒菌株一致。但二者采用的本动物数量有一定差异, 679-230 株采用 4 头猪, 而 EO630 株采用 5 头猪, 对照猪均为 3 头, 总体 EO630 株免疫原性标准略高于 679-230 株 (如, 对照组全部死亡, 679-230 株攻毒组至少 3/4 保护, EO630 株攻毒组至少 4/5 保护; 对照组 2/3 死亡, 679-230 株攻毒组至少 4/4 保护, EO630 株攻毒组 5/5 保护)。综合考虑标准的通用性, 剔除其他实验动物, 确定 15~30kg 健康易感猪 8 头作为通用的动物标准, 标准确定为“对照全部死亡, 免疫猪至少 3/4 保护, 对照 2/3 死亡, 免疫猪全部保护”。明确使用标准攻毒菌进行检验, 标准攻毒菌定为 C44-1 株 (CVCC44401), 与原攻毒菌株相一致。明确攻毒剂量为 1MLD。依据 2024 年第 10 次会议审查意见, 牵头人确定安全性观察 10 日。理由: 成品观察时间为原标准规定, 不宜在无研究数据情况下进行改动, 暂且确定为 10 日。

7. 2000 年版《中国兽用生物制品规程》收录的“猪多杀性巴氏杆菌病活疫苗制造及检验规程 (I、II)”中使用的是 (改良) 马丁琼脂, 但在实际应用过程中, (改良) 马丁琼脂、(改

良) 马丁肉汤受其配方中的牛肉汤等原料质量影响较大, 培养基质量不太稳定, 故在标准中增加其他适宜固体培养基 (如 TSA 等) 进行补充。

8. 影响产品质量的主要生产用原辅料为培养基、动物性原材料、辅料和血清, 应符合《中国兽药典》附录相关要求。

9. 成品检验中纯粹检验、剩余水分测定、真空度均与 2020 版《中国兽药典》标准一致; 活菌计数明确了检验用稀释液和固体培养基平板。

10. 鉴于不同菌株成品安全检验采用动物不一样, 679-230 株采用小鼠、豚鼠和猪, EO630 株采用兔, C20 株采用兔和猪, TA₅₃ 株采用小鼠和兔, CA 株采用猪。考虑标准的通用性以及本动物评价的可靠性, 综合 EO630 株菌种安全性指标, 将成品安全检验统一成采用本动物检验, 并明确了检验动物体重及数量。

11. 鉴于不同菌株成品效力检验采用动物不一样, 679-230 株采用小鼠和猪, EO630 株采用小鼠、兔和猪, C20 株采用小鼠和猪, TA₅₃ 株采用小鼠、兔和猪, CA 株采用小鼠和猪。考虑标准的通用性, 结合 20204 年第 10 次会议审查意见, 删除了效力检验中用小鼠检验的内容, 仅保留用猪检验。