

猪支原体肺炎灭活疫苗（标准草案）

Zhu Zhiyuantifeiyan Miehuoyimiao

Swine *Mycoplasma Hyopneumoniae* Vaccine, Inactivated

1 定义

本品系用猪肺炎支原体菌株接种适宜培养基培养，收获培养物，灭活后加适宜佐剂制成。用于预防猪支原体肺炎。

2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏染色阴性；瑞氏染色或吉姆萨染色镜检，菌体呈多形性。

2.2 生化特性 应符合代谢葡萄糖产酸的生化特性。

2.3 培养特性 在适宜的液体培养基中，37℃培养3~10日，pH值下降0.5以上，培养液呈轻度浑浊；在固体培养基上37℃培养3~10日，呈露滴状、中间致密的灰白色菌落。

2.4 代谢抑制试验 将菌种培养物按照10%接种量接种于含葡萄糖和酚红指示剂的液体培养基中，各加入20%猪肺炎支原体阳性血清和阴性血清，作为试验组和对照组，在37℃培养观察10日，对照组培养基颜色出现明显变化时试验成立，试验组培养基颜色应不发生明显改变。

2.5 安全性 将菌种在适宜培养基上培养，收获培养物，制备灭活疫苗。用14~21日龄健康易感仔猪5头，各经推荐使用途径接种疫苗2个推荐使用剂量，观察并测温14日。应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。所有仔猪接种前观察并测温3日，计算基础体温。与接种前相比，体温、精神、食欲、排便应无明显变化；接种部位应不出现溃烂、脓肿、结节等局部不良反应。若体温升高，应不超过基础体温1.0℃；若超过基础体温1.0℃，应不超过1.5℃，且稽留热不超过两个温次（每日测温1次）。

2.6 免疫原性 将毒种制备灭活疫苗。用14~28日龄健康易感仔猪5头，各1次或2次肌肉注射疫苗1个推荐使用剂量。免疫后21~42日，连同对照猪5头，各经气管注射猪肺炎支原体强毒（含100MID）。攻毒后25~28日，全部剖杀，按Goodwin氏55分评分法对猪肺部病变进行判分（见附注），统计免疫猪肺炎病变减少率。对照猪肺炎病变平均分应不低于10分，免疫猪肺炎病变减少率应不低于60%。

2.7 无菌检验 按附录3306进行检验，应无菌生长。

2.8 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基本要求。

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14~21日龄健康易感仔猪5头，各颈部肌肉注射疫苗2个推荐使用剂量（2头份），观察并测温14日。所有猪均应不出现由疫苗引起的全身或局部不良反应，与接种前相比，体温、精神、食欲、排便应无明显变化；接种部位应不出现溃烂、脓肿、结节等局部不良反应。若体温升高，应不超过基础体温1.0℃；若超过基础体温1.0℃，应不超过1.5℃，且稽留热不超过两个温次（每日测温1次）。

4.3 效力检验 用推荐使用日龄的健康易感仔猪5头，各经推荐的免疫程序肌肉注射疫苗1个推荐使用剂量。免疫后21~42日，连同对照猪5头，每头猪各经气管注射猪肺炎支原体强毒（含100MID），攻毒后25~28日，全部剖杀，按Goodwin氏55分评分法对猪肺部病变进行判分（见附注），统计免疫猪肺炎病变减少率。对照猪肺炎病变平均分应不低于10分，免疫猪肺炎病变减少率应不低于60%。

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

附注：猪支原体肺炎肺部病变评分标准和肺炎病变减少率计算方法

1 评分标准 55 分评分法。每个肺脏尖叶、心叶满分各为 10 分，膈叶前 1/3 满分为 5 分，中间叶满分为 5 分。按照“肉样变”或“胰样变”典型病变标准，分别对每个肺叶病变面积占该肺叶的比例进行打分。例如满分为 10 分的肺叶有 3/10 的面积产生病变，则该肺叶打 3 分；如满分为 5 分的肺叶有 3/10 的面积产生病变则该肺叶打 1.5 分。记分时只对肺叶的一面进行记分，如肺叶正反两面均有病变，以病变面积较大的一面进行记分。各肺叶打分总合即为该头猪的肺炎病变得分。

2 肺炎减少率计算方法 分别计算对照组和免疫组的肺炎病变得分算术平均值，按以下公式计算免疫组猪肺炎病变减少率：

$$\text{肺炎病变减少率} = \frac{\text{对照猪肺炎病变平均分} - \text{免疫猪肺炎病变平均分}}{\text{对照猪肺炎病变平均分}} \times 100\%$$

起草说明：

1. 本标准在参考我国已批准的猪支原体肺炎灭活疫苗质量标准基础上起草而成，目前已批准的猪支原体肺炎灭活疫苗菌种标准大体相同；所用培养基有一定差异；灭活剂包括 BEI、甲醛溶液、硫柳汞等；佐剂包括矿物油佐剂、氢氧化铝胶、水溶性佐剂 GEL01、603 佐剂等；安全性检验均用靶动物进行；效力检验包括靶动物猪免疫攻毒法、家兔 IHA 抗体法、小鼠 ELISA 抗体法、相对效力检验法、抗原含量测定法等，但大多数均含有靶动物猪免疫攻毒肺炎减少率方法。本标准汇总各项标准共性信息起草而来，力争做到通用、全覆盖。本标准属于首次起草。

2. 关于产品定义 因为不同产品培养基存在差异，尚无法做到统一，因此描述为“适宜培养基”；因灭活剂选择也不同，因此概述为“经灭活”或“经适宜灭活剂灭活”；佐剂选择也不同，因此概述为“加入适宜佐剂”。

3. 关于菌种标准 菌种项下的形态特性、生化特性、培养特性、血清学特性均参考猪肺炎支原体通用特性起草而来。关于标准中的培养时间，因为不同厂家菌种的差异和培养基配方的差异，培养时间可能会有偏差，因此将鉴定培养时间规定为 3~10 日，增加了培养时间的范围。关于菌种的纯粹性，因为纯粹性检验仅针对细菌而言，支原体不属于细菌类微生物，也因猪肺炎支原体在固体培养基上难以生长，难以判定菌落是否纯粹、均一，即使有均一菌落，也难以判定是否为特异的猪肺炎支原体，而且采用兽药典的无菌检验方法完全可对该菌种进行无菌检验。因此为了科学、严谨、规范起见，将“纯粹检验”修改为“无菌检验”。

4. 关于特异性标准 根据支原体“代谢抑制性”的生长特点，补充了代谢抑制试验标准。按照大量的数据证实，菌种按照 10%左右的接种量接种含 10%~20%猪血清的适宜培养基，即可生长。因此，采用加入 20%猪肺炎支原体阳性血清的培养基进行代谢抑制试验。

5. 关于菌种的安全性 依据 2024 年第 10 次会议审查意见，新增了将菌种制苗进行安全性检验的标准要求。目的是提前验证采用该菌种制备的疫苗制品是否安全。至于安全性检验标准制定依据，起草小组建议基本采用与成品安全检验相同的方法和标准进行。

6. 关于生产用原辅料 影响产品质量的主要生产用原辅料为培养基和佐剂，因此规定

符合附录中相关标准的基本要求即可。关于佐剂目前生产中用到的有油佐剂、铝胶佐剂、水佐剂等，为了通用性考虑，修改为应符合附录 3009 一般要求。

7. 关于免疫原性和效力检验标准 因为猪肺炎支原体只有一个血清型，不同厂家的生产菌种有较高的交叉保护性，而且目前多数产品均采用靶动物猪免疫攻毒法，而针对本制品的效力检验替代方法，包括抗体测定法和抗原测定法等，方法繁多，又不尽相同，尚缺乏列入通用标准的充分依据，因此建议采用国家标准强毒株进行效检攻毒即可。另外，攻毒保护率目前均采用“肺炎减少率”，现在计算方法有 2 种，一种是 55 分法，一种是 28 分法，但不论采用那种方法，目前已获批产品的肺炎病变减少率均规定为不低于 60%。因为 60% 的肺炎减少率均采用 55 分计分法和 28 分计分法得来，考虑到以后是否有新的方法和标准，但起草小组认为，60%肺炎减少率标准是最基本要求。考虑到 55 分法和 28 分法差异不大，因此建议通用标准中仅采用 55 分计分法进行。

8. 关于对照猪攻毒后发病的基本规定 一部分产品未对对照猪的肺炎打分进行规定，一部分产品规定“对照猪肺炎病变平均分应不低于 10 分”，根据 2023 年第 6 次会议审查意见，要求规定对照猪的发病判定标准，因此在标准中新增对照猪的发病判定标准，即“对照猪肺炎病变平均分应不低于 10 分”，也使得标准更为严谨。

9. 关于免疫原性和效力检验用猪的日龄 目前获批的产品采用猪日龄为 14~28 日龄不等，研究也表明 14 以上不同日龄对产品的效力检验结果没有显著影响，但为了监督检验的可操作性，因此建议仍旧规定效力检验用猪日龄采用一个涵盖性较广的范围，规定为 14~28 日龄。

10. 关于攻毒时间和攻毒后剖检时间 大多数产品攻毒时间为免疫后 21~28 日攻毒，有的产品还要间隔 14 日再加强免疫 1 次后攻毒。因此为了做到通用性，将攻毒时间修改为“免疫后 21~42 日攻毒”，尽量涵盖免疫两次和只免一次的所有产品。针对攻毒后的剖检时间，大多数产品为攻毒后 28 日剖杀，也有产品 25 日剖杀，因此标准规定为攻毒后第 25~28 日全部剖杀。

11. 关于成品的安全性检验 根据大多数安全检验用猪日龄，建议规定采用 14~21 日龄仔猪进行本产品的安全检验。

12. 成品检验中无菌检验、甲醛、汞类防腐剂残留量检验 按照附录 3306、3203、3202 进行，应符合规定，与 2020 年版《中国兽药典》中规定相同。