

# 羊快疫灭活疫苗（标准草案）

Yang Kuaiyi Michuoyimiao

## Ovine/Caprine Braxy Vaccine, Inactivated

### 1 定义

本品系用腐败梭菌接种适宜培养基培养，收获培养物，灭活脱毒后加适宜佐剂制成。用于预防绵羊、山羊快疫。

### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阳性大杆菌，死亡动物肝脏压片检查可见长丝状结构。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中腐败梭菌的生化特性。

2.3 培养特性 在厌氧肉肝汤中生长较快，36~37℃培养 12~20 小时后，呈均匀浑浊状并产生气体，以后培养基渐变透明，在管底形成大量灰白色絮状沉淀。在普通肉汤和普通琼脂斜面上不生长。在葡萄糖鲜血琼脂平板上，36~37℃厌氧培养 24 小时，形成灰白色或半透明、边缘不整、粗糙、微隆起的菌落，周围有较明显的溶血区。菌落很容易融合成片，似压扁的棉絮状菌落，甚至布满平板表面。

2.4 血清型鉴定 用腐败梭菌定型血清进行中和试验检查，应为腐败梭菌毒素（含腐败梭菌 $\alpha$ 、 $\beta$ 毒素等）。鉴定方法为：取腐败梭菌定型血清 1.0ml（至少可中和 400 个小鼠 MLD）和毒素 1.0ml（含 400 个小鼠 MLD）混合，37℃作用 45 分钟，经尾静脉注射健康小鼠 5 只，0.2ml/只。同时用同批小鼠 5 只，各尾静脉注射 0.2ml 毒素（含 1 个小鼠 MLD）作对照，连续观察 3 日。对照小鼠应全部死亡，血清中和小鼠应全部存活。

2.5 毒力 接种肉肝胃酶消化汤培养 24 小时，将培养物经肌肉注射体重 16~20g 健康小鼠 5 只，0.005~0.01ml/只，应于 24 小时内全部死亡；或接种胰酶牛肉消化汤培养 36~48 小时，以 4000g 离心 15 分钟，取上清用 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤，将滤液经尾静脉注射体重 16~20g 健康小白鼠 5 只，0.005~0.01ml/只，应于 48 小时内全部死亡。

2.6 安全性 将菌种制备灭活疫苗。

2.6.1 对家兔的安全性 用体重 1.5~2.0kg 的抗体阴性健康家兔 4 只，各肌肉注射疫苗 1 个推荐使用剂量，观察 21 日。应全部健活，精神、呼吸、采食正常，且注射局部不发生坏死、硬结、破溃；所有家兔在接种前测温 3 日，接种后连续测温 7 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 1 个温次。

2.6.2 对绵羊的安全性 用 2~3 月龄的抗体阴性健康易感易感绵羊 4 只，各经推荐使用的途径（如肌肉注射、皮下注射）接种疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 21 日。应全部健活，精神、呼吸、采食正常，且注射局部不发生坏死、硬结、破溃；所有绵羊在接种前测温 3 日，接种后连续测温 7 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 1 个温次。

抗体阴性动物检测标准：取动物血清 0.4ml 加入毒素 0.4ml（含 4 个小鼠 MLD），充分混合后置 37℃作用 40 分钟。每个血清中和组各尾静脉注射 16~20g 小鼠 2 只，0.2ml/只。同时设对照小鼠 2 只，各尾静脉注射 1MLD 毒素，0.1ml/只。连续观察 3 日，记录小鼠死亡情况。若对照小鼠 2/2 死亡，且血清中和组小鼠 2/2 死亡，即为每 0.1ml 动物血清不可中和 1MLD 毒素，为抗体阴性动物；若对照小鼠 2/2 死亡，且血清中和组小鼠 0/2~1/2 死亡，即每 0.1ml 动物血清可中和至少 1 MLD 毒素，非抗体阴性动物；若对照小鼠 0/2~1/2 死亡，应重检。

2.7 免疫原性 按照推荐的最小免疫剂量制备灭活疫苗。

2.7.1 血清学方法

2.7.1.1 用体重 1.5~2.0kg 的抗体阴性健康家兔 4 只,各肌肉注射 1/2 个最小免疫剂量,接种后 14~21 日,分别采血,分离血清。将 4 只免疫兔的血清等量混合,取 1.0ml 混合血清与 1.0ml 的腐败梭菌毒素(含 10 个小鼠 MLD)混合,置 37℃作用 40 分钟,经尾静脉注射 16~20g 小鼠 5 只,0.2ml/只。同时用同批小鼠 5 只,各尾静脉注射 1 个小鼠 MLD 的腐败梭菌毒素作对照,观察 5 日。对照小鼠应全部死亡,血清中和小鼠应全部存活。

2.7.1.2 用 12 月龄左右体重相近的抗体阴性健康易感绵羊 4 只,各肌肉注射 1 个最小免疫剂量,接种后 14~21 日,分别采血,分离血清。将 4 只免疫羊的血清等量混合,取 1.0ml 混合血清与 1.0ml 的腐败梭菌毒素(含 10 个小鼠 MLD)混合,置 37℃作用 40 分钟,经尾静脉注射 16~20g 小鼠 5 只,0.2ml/只。同时用同批小鼠 5 只,各尾静脉注射 1 个小鼠 MLD 的腐败梭菌毒素作对照,观察 5 日。对照小鼠应全部死亡,血清中和小鼠应全部存活。

### 2.7.2 免疫攻毒法

2.7.2.1 用体重 1.5~2.0kg 的抗体阴性健康家兔 4 只,各经推荐使用的途径(肌肉注射、皮下注射)接种疫苗 1/2 个最小免疫剂量,接种后 21 日,连同对照兔 2 只,各肌肉注射 1 个家兔 MLD 的腐败梭菌菌液,观察 14 日(若为胰酶牛肉消化汤制备的疫苗,可静脉注射 1 个家兔 MLD 的腐败梭菌毒素,观察 5 日)。对照兔应全部死亡,免疫兔应至少 3 只保护。

2.7.2.2 用 12 月龄左右体重相近的抗体阴性健康易感绵羊 4 只,各经推荐使用的途径(肌肉注射、皮下注射)接种疫苗 1 个最小免疫剂量,接种后 14~21 日,连同对照羊 2 只,各肌肉注射 1 个绵羊 MLD 的腐败梭菌菌液,观察 14 日(若为胰酶牛肉消化汤制备的疫苗,可静脉注射 1 个绵羊 MLD 的腐败梭菌毒素,观察 5 日)。对照羊应全部死亡,免疫羊应至少 3 只保护。

2.8 纯粹 按附录 3306 用适宜培养基进行检验,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 适宜培养基(如厌气肉肝汤、肉肝胃酶消化汤等),应符合附录 3009 要求。

3.2 动物源性材料 应符合附录 3008 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 用体重 1.5~2.0kg 的抗体阴性健康家兔 4 只,各肌肉注射疫苗 1 个推荐使用剂量,观察 10 日。应全部健活,且注射部位应不出现坏死、硬结、破溃。

4.3 效力检验 下列方法任择其一。

4.3.1 血清学方法 用体重 1.5~2.0kg 的抗体阴性健康家兔 4 只,各肌肉注射疫苗 1/2 个推荐使用剂量。接种后 14~21 日,分别采血,分离血清。将 4 只免疫兔的血清等量混合,取 1.0ml 混合血清与 1.0ml 的腐败梭菌毒素(含 10 个小鼠 MLD)混合,置 37℃作用 40 分钟,经尾静脉注射 16~20g 小鼠 5 只,0.2ml/只。同时用同批小鼠 5 只,每只尾静脉注射 1 个小鼠 MLD 腐败梭菌毒素作对照,观察 5 日。对照小鼠应全部死亡,血清中和小鼠应全部存活。如果采血时免疫组家兔只剩余 3 只,可分别用每只家兔血清单独进行中和试验,若对照小鼠和血清中和组小鼠均达上述标准,亦判为合格。

4.3.2 免疫攻毒法 用体重 1.5~2.0kg 的抗体阴性健康家兔 4 只,各肌肉注射疫苗 1/2 个推荐使用剂量,接种后 14~21 日,连同对照兔 2 只,各肌肉注射不低于 1 个家兔 MLD 的腐败梭菌菌液,观察 14 日(若为胰酶牛肉消化汤制备的疫苗可静脉注射 1 个家兔 MLD 的腐败梭菌毒素,连续观察 5 日)。对照兔应全部死亡,免疫兔应至少保护 3 只。若使用 2

株抗原性不同（无交互免疫力）腐败梭菌生产的疫苗，应设置 2 个免疫组（各 4 只健康家兔）和 2 个对照组（各 2 只健康家兔），按上述剂量和途径分别注射对应的腐败梭菌菌液或毒素。判定标准相同。

4.4 甲醛残留量测定 按附录 3203 进行测定，应符合规定。

#### 起草说明：

1. 本标准在 2020 年版《中国兽药典》中收录的“羊黑疫、羊快疫二联灭活疫苗”“羊快疫、猝狙、肠毒血症三联灭活疫苗”“羊快疫、猝狙、羔羊痢疾、肠毒血症三联四防灭活疫苗”以及 2000 年版《中国兽用生物制品规程》中收录的“羊黑疫、羊快疫二联灭活疫苗制造及检验规程”标准基础上起草。考虑到羊梭菌病干粉灭活疫苗在检验项目和检验标准上与其他灭活疫苗存在较大差异，本标准并未将干粉灭活疫苗考虑在内。本标准属于首次起草。

2. 菌种项下的形态特性、生化特性、培养特性、毒力、免疫原性、纯粹均参考 2000 年版《中国兽用生物制品规程》中收录的“羊黑疫、羊快疫二联灭活疫苗制造及检验规程”标准，并做规范性修改。代次限定按统一格式体例表述。

3. 菌种项下的血清型鉴定，依据 2024 年度第 11 次会议审查意见，将鉴定的 A、B、C、D 型毒素修改成 $\alpha$ 、 $\beta$ 等相应毒素名称，未明确定型血清效价，原因如下：①目前国内缺少相应毒素的单因子血清，难以对菌种产生的毒素类型进行准确鉴定，不宜现在就将毒素型鉴定方法列入兽药典，待制备出相应标准物质后再行修订为宜。而且通过血清型鉴定可理论上界定出菌种可产生的毒素类型。②定型血清效价是以可中和多少小鼠 MLD 为衡量标准，无需给出一个定值，只需在标准中模糊表述为“至少可中和 1000 个小鼠 MLD”，实际鉴定时可对定型血清进行适当稀释，达到标准要求即可。目前仅能将血清型鉴定和毒素型鉴定合并为血清型鉴定。按通用要求适当增加试验小鼠数量，小鼠接种血清毒素混合液的剂量偏大，将接种剂量统一调整为 0.2ml，并相应调整毒素含量。

4. 菌种项下的安全性，依据 2023 年度第 10 次会议审查意见，增加该项；依据 2024 年度第 11 次会议审查意见，增加对靶动物绵羊的安全性，明确绵羊日龄为 12 月左右，试验动物数量应符合通用要求，将家兔和绵羊分开表述，并对抗体阴性动物检测标准进行了简单界定。

5. 菌种项下的免疫原性，增加用家兔进行的血清学方法，免疫剂量按照通用要求明确为 1/2 个最小免疫剂量；进一步确认靶动物攻毒剂量和攻毒途径，明确攻毒后应至少观察 5 日，进一步细化免疫保护标准；缩小绵羊日龄要求范围，修改为 12 月左右。

6. 影响产品质量的主要生产用原辅料为培养基和佐剂，应符合《中国兽药典》附录相关要求。

7. 成品检验项下的无菌检验、甲醛残留量测定标准与 2020 年版《中国兽药典》附录标准一致。

8. 成品检验项下的安全检验，在 2020 年版《中国兽药典》中收录的“羊黑疫、羊快疫二联灭活疫苗”标准中观察时间为 21 日，而在“羊快疫、猝狙、肠毒血症三联灭活疫苗”和“羊快疫、猝狙、羔羊痢疾、肠毒血症三联四防灭活疫苗”标准中观察时间均为 10 日；在 2020 年版《中国兽药典》收录的相关标准和 2000 年版《中国兽用生物制品规程》收录的“羊黑疫、羊快疫二联灭活疫苗制造及检验规程”中，有的注射途径为肌肉注射，有的为皮下注射，有的为肌肉注射或皮下注射。本标准将注射途径统一规定为肌肉注射，将观察时间统一为 10 日。依据 2024 年度第 11 次会议审查意见，删除了用绵羊检验的内容。

9. 成品检验项下的效力检验，基本参考 2020 年版《中国兽药典》中收录的“羊黑疫、

羊快疫二联灭活疫苗”。免疫攻毒法中家兔的免疫剂量参考了联苗的免疫剂量，将其控制在联苗免疫剂量的 1/2 左右（绵羊推荐使用剂量的 0.5 倍），既可保证免疫效果，又可防止过量免疫导致对效力检验结果的影响。血清学方法要求相同，为 1/2 个推荐使用剂量。依据 2024 年度第 11 次会议审查意见，删除了用绵羊检验的内容。

10. 依据 2024 年第 11 次会议审查意见，标题英文部分明确为绵羊、山羊，用途上明确用于绵羊、山羊；删除“免疫原性良好”等内容表述；删除灭活和脱毒之间的顿号；删除“作为联苗”的相关表述、明确各 MLD 对应的动物、重新准确表述健康易感动物标准要求等；血清型鉴定、免疫原性和效力检验项中将小鼠尾静脉注射剂量从 0.3ml/只调整到 0.2ml/只，并相应修改血清和毒素体积、毒素含量以保持与原标准一致。