

羔羊痢疾灭活疫苗（标准草案）

Gaoyanglijì Mièhuoyímiao

Ovine/Caprine Lamb Dysentery Vaccine, Inactivated

1 定义

本品系用 B 型产气荚膜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、山羊的羔羊痢疾。

2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阳性粗大杆菌，陈旧培养物往往变成阴性，菌体两端钝圆，有荚膜。产生中间或偏端芽孢，但在人工培养时不易形成。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中产气荚膜梭菌的生化特性。

2.3 培养特性 在厌氧肉肝汤中生长迅速，36~37℃培养 4~5 小时，生长旺盛，产生大量气体。在普通肉汤中亦能生长，用固体培养基好氧培养时表面不生长。接种于血液琼脂平板上，置 36~37℃厌氧条件下培 24 小时，形成 1~3mm、半透明、灰白色、表面光滑、边缘整齐的圆形菌落，菌落周围呈现β、α双溶血环。在牛奶培养基中产生暴发性发酵反应。

2.4 血清型鉴定 用产气荚膜梭菌定型血清进行中和试验检查，应为产气荚膜梭菌 B 型（含产气荚膜梭菌α、β、ε毒素）。鉴定方法为：用产气荚膜梭菌定型血清 A、B、C、D 型 4 个血清，每种血清取 0.6ml（至少可中和 9 个小鼠 MLD）各加入 1.2ml 未经胰酶活化的毒素（含 9 个小鼠 MLD），混合后置 37℃作用 45 分钟，再静脉注射健康小白鼠，每种血清中和物注射 5 只，0.2ml/只。同时用同批次小白鼠 5 只，每只静脉注射 0.2ml 毒素（含 1 个小鼠 MLD）作对照，观察 24 小时。对照小鼠应全部死亡，若血清中和组小数全部死亡，表明待检毒素可被该型血清中和。对于经胰酶活化有毒性的毒素，则用活化后毒素与 D 型血清进行中和试验。综合试验结果，按下表进行血清型判定。

毒素	血清	能否中和	结果
待检毒素 (未经胰酶 活化)	与 A 型血清作用	能	仅含有α毒素
		否	可能含有β、ε毒素
	与 C 型血清作用	能	可能仅含有α、β毒素
		否	可能含有ε毒素
	与 D 型血清作用	能	可能含有α、ε毒素
	否	含有β毒素	
	与 B 型血清作用	能	可能含有α、β、ε毒素
		否	含有α、β、ε毒素以外的其它毒素

毒素	有无 毒性	判断	与 D 型血清作用 能否中和	结果
待检毒素（经胰 酶活化）	有	可能含有ε毒素	能	含有ε毒素
			否	含有α、ε毒素以外的其 它毒素

2.5 毒力 将菌种接种肉肝胃酶消化汤或适宜培养基培养 10~20 小时，以 4000g 离心 15 分钟，取上清用 0.22μm 滤膜过滤。滤液尾静脉注射体重 16~20g 健康小白鼠 2 只，0.001ml/只，应于 24 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，且注射局部应不发生坏死、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绵羊4只，各肌肉注射疫苗2个推荐使用剂量，连续观察21日。应全部健活，精神、呼吸、采食正常，且注射局部应不发生坏死、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。每个血清中和组尾静脉注射16~20g小鼠2只，0.2ml/只。同时设对照小鼠2只，尾静脉注射1MLD毒素2只，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，且血清中和小鼠0/2~1/2死亡，即每0.1ml动物血清可中和至少1MLD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，各肌肉注射疫苗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混匀血清与1.0ml的B型产气荚膜梭菌毒素（含10个小鼠MLD）混合，置37℃作用40分钟，然后尾静脉注射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B型产气荚膜梭菌毒素作对照，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，各肌肉注射疫苗1个最小免疫剂量，接种后14~21日，分别采血，分离血清。将每组4只免疫羊的血清等量混合，取1.0ml混合血清与1.0ml的B型产气荚膜梭菌毒素（含10个小鼠MLD）混合，置37℃作用40分钟，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B型产气荚膜梭菌毒素作对照，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接种疫苗1/2个最小免疫剂量，接种后14~21日，连同对照兔2只，各静脉注射B型产气荚膜梭菌毒素不低于1个家兔MLD，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，各静脉注射B型产气荚膜梭菌毒素1个绵羊MLD，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。

3.3 佐剂 应符合附录 3009 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，且注射部位应不发生坏死、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 B 型产气荚膜梭菌毒素（含 10 个小鼠 MLD）混合，置 37℃ 作用 40 分钟，然后尾静脉注射 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 B 型产气荚膜梭菌毒素作对照，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，各静脉注射 B 型产气荚膜梭菌毒素不低于 1 个家兔 MLD，观察 5 日。对照兔应全部死亡，免疫兔应至少 3 只保护。

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》收录的“羊快疫、猝狙（或羔羊痢疾）、肠毒血症三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“羊快疫、猝狙（或羔羊痢疾）、肠毒血症三联灭活疫苗制造及检验规程”，并做规范性修改。采用其他适宜培养基，培养时间一般在 10~17 小时，故将培养时间改为 10~20 小时。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 α 、 β 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，规定应符合《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》中规定一致。

8. 成品检验项下的安全检验，与 2020 年版《中国兽药典》中收录的“羊快疫、猝狙、羔羊痢疾、肠毒血症三联四防灭活疫苗”和 2000 年版《中国兽用生物制品规程》中收录的“羊快疫、猝狙（或羔羊痢疾）、肠毒血症三联灭活疫苗制造及检验规程”标准基本一致。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“羊快疫、猝狙、羔羊痢疾、肠毒血症三联四防灭活疫苗”，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 2023 年度第 10 次会议审查意见，删除安全检验、效力检验中“若为含有羔羊痢疾组分的联苗，也可参照说明书中绵羊临床推荐使用剂量进行接种”。；对相关文字（例如“h”改为“小时”、“min”改为“分钟”、“每只 0.001ml”改为“0.001ml/只”等）进行规范性修改；删除定义中灭活剂及佐剂名称；删除菌种“帽段”部分；将“血清学特性”改为“血清型鉴定”。

11. 依据 2024 年度第 11 次会议审查意见，进一步规范标准文字，例如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。