

牛多杀性巴氏杆菌病灭活疫苗（标准草案）

Niu Duoshaxingbashiganjunbing Miehuoyimiao
Bovine *Pasteurella multocida* Vaccine, Inactivated

1 定义

本品系用牛源 B 型多杀性巴氏杆菌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 B 型多杀性巴氏杆菌引起的牛多杀性巴氏杆菌病。

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% 新生小牛血清及 0.1% 裂解绵羊血细胞全血的（改良）马丁琼脂平板上，36~37°C 培养 16~20 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，呈鲜明的蓝绿色虹彩，边缘的一部分有狭窄的红黄光带，属于 Fg 菌落型。

2.4 血清型鉴定 采用血清学方法或分子生物学定型法鉴定，应为 B 型。

2.5 安全性 将菌种制备灭活疫苗。

2.5.1 对小鼠的安全性 用体重 18~22g 小鼠 10 只，各皮下注射疫苗 0.3 个推荐使用剂量，观察 21 日。接种鼠应全部健活，精神、食欲与接种前无明显变化，且注射局部不应发生坏死、硬结、破溃；如出现精神不振、食欲减退等现象，应在 4 日内恢复。

2.5.2 对家兔的安全性 用体重 1.5~2kg 多杀性巴氏杆菌抗体阴性健康易感家兔 5 只，各皮下注射疫苗至少 2 个推荐使用剂量，观察 21 日。接种兔应全部健活，精神、食欲与接种前无明显变化，且注射局部不应发生坏死、硬结、破溃；如出现精神不振、食欲减退等现象，应在 4 日内恢复。

2.5.3 对牛的安全性 用推荐使用最小日龄健康易感牛 5 头，各经推荐使用途径（如皮下注射、肌肉注射）注射疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 21 日。接种牛应全部健活，精神、食欲与接种前无明显变化，且注射局部不应发生坏死、硬结、破溃；所有牛在接种前观察并测温 3 日，接种后连续测温 7 日，每日测温 1 次，接种后体温与接种前基础体温相比，应不超过 1.5°C，并且应在 3 日内恢复。

2.6 免疫原性 将菌种制备灭活疫苗。用 5~7 月龄健康易感牛 5 头，各经推荐使用途径（如皮下注射、肌肉注射）注射疫苗最小免疫剂量，接种后 21 日，连同对照牛 5 头，各皮下注射多杀性巴氏杆菌强毒菌液 10MLD，至少观察 14 日。对照牛应至少死亡 3 头；免疫牛应至少存活 3 头，且存活牛在观察期末，应不出现体温升高（超过正常体温 1.5°C），精神不振、食欲减退等败血性症状。

2.7 纯粹 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

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 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

4.2.1 用小鼠检验 用体重 18~22g 小鼠 10 只，各皮下注射疫苗 0.3 个推荐使用剂量，观察 10 日。接种鼠应全部健活，精神、食欲与接种前无明显变化，且注射局部不应发生坏

死、硬结、破溃；如出现精神不振、食欲减退等现象，应在 4 日内恢复。

4.2.2 用家兔检验 用体重 1.5~2kg 多杀性巴氏杆菌抗体阴性健康兔 5 只，各皮下注射疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 10 日。接种兔应全部健活，精神、食欲与接种前无明显变化，且注射局部不应发生坏死、硬结、破溃；如出现精神不振、食欲减退等现象，应在 4 日内恢复。

4.2.3 用牛检验 用推荐使用最小日龄健康易感牛 5 头，每头皮下（或肌肉）注射疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 14 日。接种牛应全部健活，精神、食欲、体温与接种前无明显变化，且注射局部不应发生坏死、硬结、破溃；所有牛在接种前观察并测温 3 日，接种后连续测温 7 日，每日测温 1 次，如接种后体温超过基础体温，应不超过 1.5℃，并且应在 3 日内恢复。

4.3 效力检验 用 5~7 月龄健康易感牛 5 头，各皮下（或肌肉）注射疫苗 1 个推荐使用剂量。接种后 21 日，连同对照牛 5 头，各皮下注射多杀性巴氏杆菌强毒菌液 10MLD，观察 14 日。对照牛应至少死亡 3 头；免疫牛应至少存活 3 头，且存活牛在观察期末，应不出现体温升高（超过基础体温 1.5℃），精神不振、食欲减退等败血性症状。

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 版《中国兽药典》中收录的“牛多杀性巴氏杆菌病灭活疫苗”、2000 年版《兽用生物制品规程》中收录的“牛多杀性巴氏杆菌病灭活疫苗制造及检验规程”以及农业农村部公告第 658 号中“牛多杀性巴氏杆菌病二价灭活疫苗(A 型 Pm-TJ 株+B 型 C45-2 株)”工艺规程及质量标准等标准的基础上起草而成。本标准属于首次起草。

2. 依据 2024 第 11 次会议审查意见，本标准仅限定用于 B 型多杀性巴氏杆菌制备的灭活疫苗。因此，在“1 定义”项中，进行了明确和限定，“本品系用牛源 B 型多杀性巴氏杆菌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 B 型多杀性巴氏杆菌引起的牛多杀性巴氏杆菌病”。

3. 菌种标准中形态特性、生化特性、培养特性、纯粹参照 2000 年版《兽用生物制品规程》中收录的“牛多杀性巴氏杆菌病灭活疫苗制造及检验规程”中的规定，为确保 B 型菌通用性，对培养特性中模糊文字进行规范性修改，如去掉“菌落结构粗细不等，边缘的一部分有狭窄的红黄光带”等；血清型鉴定除荚膜抗原分群法外，对于 NY/T 563-2016 中提及的多重 PCR 荚膜定型法，统一表述为分子生物学定型法。

4. 菌种标准中安全性，依据 2024 第 11 次会议审查意见，“增加实验动物小鼠或/和家兔的安全性要求，对靶动物的安全性应延长观察时间，建议改为 21 日”。（1）2000 年版《兽用生物制品规程》中收录的“牛多杀性巴氏杆菌病灭活疫苗制造及检验规程”检验标准规定，小鼠采用皮下注射 0.3ml（相当于 0.3 个推荐使用剂量）；农业农村部公告第 658 号中“牛多杀性巴氏杆菌病二价灭活疫苗（A 型 Pm-TJ 株+B 型 C45-2 株）”工艺规程及质量标准，小鼠采用皮下注射 0.3ml（相当于 0.3 个推荐使用剂量）。结合农业部公告第 683 号动物数量相关规定，以及牛多杀性巴氏杆菌病二价灭活疫苗（A 型 Pm-TJ 株+B 型 C45-2 株）工艺规程，完善了接种后精神、食欲等表述。确定“用体重 18~22g 小鼠 10 只，各皮下注射疫苗 0.3 个推荐使用剂量，观察 21 日，接种鼠精神、食欲与接种前无明显变化，如出现精神不振、食欲减退等现象，应在 4 日内恢复；应不出现由疫苗引起的其他局部或全身不良反应”。（2）根据 2000 年版《兽用生物制品规程》中收录的“牛多杀性巴氏杆菌病灭活疫苗制造及检验规程”检验标准规定，兔采用皮下注射 5ml（相当于 2.5 个推荐使用剂量）；农业农村部公告第

658号中“牛多杀性巴氏杆菌病二价灭活疫苗（A型Pm-TJ株+B型C45-2株）工艺规程及质量标准，兔采用皮下注射4ml（相当于2个推荐使用剂量）。结合农业部公告第683号关于动物数量相关规定（经济类动物至少5只），以及牛多杀性巴氏杆菌病二价灭活疫苗（A型Pm-TJ株+B型C45-2株）工艺规程，完善了接种后精神、食欲等表述。确定“用体重1.5~2kg多杀性巴氏杆菌抗体阴性健康兔5只，各皮下注射疫苗至少2个推荐使用剂量，观察10日，接种兔精神、食欲与接种前无明显变化，如出现精神不振、食欲减退等现象，应在4日内恢复；应不出现由疫苗引起的其他局部或全身不良反应。”（3）根据2021年版“牛多杀性巴氏杆菌病灭活疫苗检验操作规程”，以及农业部公告第683号关于动物数量和观察时间表述，对靶动物安全性进行修改。将推荐使用最小日龄动物确定为5头，接种剂量为2倍的推荐使用剂量，观察时间定为21日，并完善了接种后精神、食欲、体温等表述。根据疫苗【用法与用量】，将皮下注射和肌肉注射两个途径一并表述。

5. 菌种标准中免疫原性，参照2000年版《兽用生物制品规程》中收录的“牛多杀性巴氏杆菌病灭活疫苗制造及检验规程”以及农业部公告第683号关于动物数量表述，统一将免疫及对照动物数量确定为5头；时间依据“牛多杀性巴氏杆菌病灭活疫苗制造及检验规程”基础上起草，并参考农业农村部公告第658号中“牛多杀性巴氏杆菌病二价灭活疫苗（A型Pm-TJ株+B型C45-2株）工艺规程及质量标准”，考虑标准通用性，确定为至少观察14日。

6. 影响产品质量的主要生产用原辅料为培养基及佐剂，规定符合附录中相关要求。

7. 成品检验项下，无菌检验和甲醛残留量测定与2020年版《中国兽药典》中规定相同。

8. 依据2023年第10次会议审查意见，（1）删除菌种标准中毒力项。（2）对菌种免疫原性，成品的安全检验、效力检验中文字进行规范性表述。（3）完善保护判定标准。

9. 参考2024年第11次会议审查意见，对文本进行了完善：（1）增加菌株中安全性检验内容。（2）规范相关文字描述。a）血清学鉴定。b）菌株项中安全性检验及成品安全检验表述。c）菌株免疫原性及成品效力检验发病或保护标准。（3）鉴于2020年版《中国兽药典》及农业农村部公告第658号中“牛多杀性巴氏杆菌病二价灭活疫苗（A型Pm-TJ株+B型C45-2株）中，免疫原性及成品效力检验中免疫牛采用4头，对照牛采用3头。免疫牛发病或保护标准均不低于3头（即75%），对照牛发病或死亡标准均不低于2头（即66.7%）。经过起草小组讨论及并结合农业部公告第683号相关规定，将4头提升为5头。为便于统计以及标准的通用性，将发病或保护标准定为均不低于3/5头（即60%）。并将2020年版《中国兽药典》中约100kg牛，统一为“5~7月龄”表述。

10. 依据2024年第11次会议审查意见（1）删除血清A型菌（肺炎型）内容，仅按血清B型菌（败血型）起草。（2）对成品的安全检验、效力检验进行规范性表述。结合农业农村部公告第658号中“牛多杀性巴氏杆菌病二价灭活疫苗（A型Pm-TJ株+B型C45-2株）工艺规程及质量标准以及2020年版《中国兽药典》“牛多杀性巴氏杆菌病灭活疫苗”表述，将成品安全检验及效力检验，确定为两种途径任选其一。另外安全及效力检验时间均定为14日。适当简化了安全检验中牛精神、食欲、体温的相关表述。（3）成品的安全检验增加实验动物标准。根据菌种安全性标准，参考农业农村部公告第658号中“牛多杀性巴氏杆菌病二价灭活疫苗（A型Pm-TJ株+B型C45-2株）工艺规程及质量标准”中体例和实验动物检验表述，结合牛源B型多杀性巴氏杆菌特性，经讨论确定：“用体重18~22g小鼠10只，各皮下注射疫苗0.3个推荐使用剂量；用体重1.5~2kg多杀性巴氏杆菌抗体阴性健康兔5只，各皮下注射疫苗2个推荐使用剂量，连续观察10日，小鼠和兔接种疫苗后精神、食欲与接种前无明显变化，应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应；如出现精神不振、食欲减退等现象，应在4日内恢复。”