

羊大肠杆菌病灭活疫苗（标准草案）

Yang Dachangganjunbing Miehuoyimiao
Ovine /Caprine Colibacillosis Vaccine, Inactivated

1 定义

本品系用适宜大肠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。用于预防绵羊、山羊败血型大肠杆菌病。

2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阴性杆菌。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中大肠杆菌的生化特性。

2.3 培养特性 在普通琼脂平板上，36~37°C培养 24 小时，菌落光滑圆整；普通肉汤培养 24 小时，呈均匀混浊。用吡啶黄作玻片凝集试验为阴性。

2.4 血清型鉴定 用大肠杆菌 O、K 单因子血清鉴定，应符合菌种的血清型特征。

2.5 安全性 将菌种制备灭活疫苗，用推荐使用最小日龄健康易感绵羊或山羊（养殖场未暴发过羊大肠杆菌病，且未接种过大肠杆菌病疫苗的羊）不少于 5 只，各经推荐使用途径接种疫苗至少 2 个推荐使用剂量，观察至少 21 日。逐日观察接种羊饮食、精神状态、行动、粪便、体温等全身反应情况，允许在注射疫苗后出现体温升高（不高于基础体温 2.0°C）、不食及跛行等反应，但 48 小时内应恢复正常，48 小时后应不出现精神沉郁、不愿走动、厌食、腹泻等临床症状，体温应不高于 40.0°C。注射疫苗后观察注射部位，应无硬结、破溃、坏死等情况，如出现注射局部肿胀，应在 14 日内消除。

2.6 免疫原性 将菌种制备灭活疫苗。

2.6.1 用 2~3 月龄健康易感绵羊或山羊（养殖场未暴发过羊大肠杆菌病，且未接种过大肠杆菌病疫苗的羊）5 只，各经推荐使用途径接种疫苗最小免疫剂量，免疫后 14 日，连同对照羊 5 只，各皮下注射对羊的 1MLD 大肠杆菌攻毒菌液，观察 21 日。对照组羊应至少死亡 3 只，免疫组羊允许在攻毒后出现体温升高（不高于基础体温 2.0°C）、不食及跛行等反应，但 3 日内应恢复正常，3 日后应不出现精神沉郁、不愿走动、跛行、厌食、腹泻等临床症状，体温应高不于 40.0°C，攻毒后 21 日剖检免疫组羊，心、肝、脾、肾、肠道均应无肉眼可见病变。

2.6.2 用体重 300~400g 豚鼠 10 只，各皮下注射疫苗 1/2 个推荐使用剂量，免疫后 14 日，连同对照豚鼠 5 只，各腹腔注射对豚鼠的 1MLD 大肠杆菌攻毒菌液，观察 21 日。对照豚鼠应全部死亡，免疫豚鼠应至少 7 只健活。

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 用推荐的最小日龄健康易感绵羊（养殖场未暴发过羊大肠杆菌病，且未接种过大肠杆菌病疫苗的羊）5 只，各经推荐使用途径接种疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 14 日，逐日观察接种羊饮食、精神状态、行动、粪便、体温等全身反应情况，允许在注射疫苗后出现体温升高（不高于基础体温 2.0°C）、不食及跛行等反应，但 48 小时内应恢复正常，48 小时后应不出现精神沉郁、不愿走动、厌食、腹泻等临床症状，体温应不高于 40.0°C。

注射疫苗后观察注射部位，应无硬结、破溃、坏死等情况，如出现注射局部肿胀，应在 14 日内消除。

4.3 效力检验 下列方法任择其一。

4.3.1 用豚鼠检验 用体重 300~400g 豚鼠 10 只，各皮下注射疫苗 1/2 个推荐使用剂量，免疫后 14 日，连同对照豚鼠 5 只，各腹腔注射对豚鼠的 1MLD 大肠杆菌攻毒菌液，观察 10 日。对照豚鼠应全部死亡，免疫豚鼠应至少 7 只健活。

4.3.2 用羊检验 用 2~3 月龄健康易感绵羊（养殖场未暴发过羊大肠杆菌病，且未接种过大肠杆菌病疫苗的羊 5 只，各经推荐使用途径接种疫苗 1 个推荐使用剂量，免疫后 14 日，连同对照羊 5 只，各皮下注射对羊的 1MLD 大肠杆菌攻毒菌液，观察 10 日。对照羊应至少 3 只死亡，免疫羊允许在攻毒后出现体温升高（不高于基础体温 2.0℃）、不食及跛行等反应，但 3 日内应恢复正常，3 日后应不出现精神沉郁、不愿走动、跛行、厌食、腹泻等临床症状，体温应不高于 40.0℃。

4.4 甲醛、苯酚和汞类防腐剂残留量测定 分别按附录 3203、3201 和 3202 进行测定，应符合规定。

5 注意事项

严禁接种怀孕羊。

起草说明：

1. 本标准在 2020 年版《中国兽药典》中收录的“羊大肠杆菌病灭活疫苗”以及 2000 年版《兽用生物制品规程》中收录的“羊大肠埃希氏菌病灭活疫苗制造及检验规程”基础上起草。本标准属于首次起草。

2. 定义项中将佐剂描述为“适宜佐剂”，简化了工艺概述，不强调浓缩工艺，明确“适宜大肠杆菌菌株接种”“用于预防绵羊、山羊败血型大肠杆菌病”。

3. 菌种项下形态特性、生化特性、培养特性、纯粹均与“羊大肠埃希氏菌病灭活疫苗制造及检验规程”相关标准相一致；“血清学特性”改为“血清型鉴定”，不限定具体血清型；代次限定按统一要求表述。

4. 依据 2023 年第 10 次会议审查意见，删除菌种项下的毒力项。

5. 菌种项下的安全性，（1）明确用菌种制备灭活疫苗后进行；（2）要求用羊对标签上推荐的每个接种途径进行安全性评价；（3）用推荐使用最小日龄健康易感绵羊或山羊不少于 5 只进行试验，易感羊标准定为养殖场未暴发过羊大肠杆菌病，且未接种过大肠杆菌病疫苗的羊；（4）参考农业部公告第 683 号将羊接种剂量定为疫苗至少 2 个推荐使用剂量；观察时间为至少 21 日；（5）逐日观察，观察指标包括饮食、精神状态、行动、粪便、体温等全身反应情况和注射局部反应情况；（6）合格标准定为允许在注射疫苗后出现体温升高（不高于基础体温 2.0℃）、不食及跛行等反应，但 48 小时内应恢复正常，48 小时后应不出现精神沉郁、不愿走动、厌食、腹泻等临床症状，体温不应高于 40.0℃。注射疫苗后观察注射部位，应无硬结、破溃、坏死等情况，如出现注射局部肿胀，应在 14 日内消除。

6. 菌种项下的免疫原性，在原标准基础上分别表述，其中用羊检验（1）要求对标签上推荐的每个接种途径均要进行免疫原性评价；（2）将“健康易感羔羊”改为“健康易感绵羊或山羊”；（3）将易感羊标准定为“养殖场未暴发过大肠杆菌病，且未接种过大肠杆菌病疫苗的羊”；（4）最小使用月龄为 3 月龄以下，用最小使用月龄羊进行检验，将检验羊日龄定为 2~3 月龄；（5）检验动物数量改为 10 只（5 只免疫、5 只对照）；（6）免疫剂量定为最小免疫剂量；（7）攻毒后观察时间延长为 21 日；（8）判定标准由“4/4 保护、2/3 死亡”改为“5/5 保护、

3/5 死亡”，免疫组 100%保护率维持不变，考虑到动物数量增加，对照组由 67%死亡率下调到 60%死亡率；（8）归纳菌种免疫原性检定工作中观察到的症状，将羊保护标准均定为“允许在攻毒后出现体温升高（不高于基础体温 2.0℃）、不食及跛行等反应，但 3 日内应恢复正常，3 日后应不出现精神沉郁、不愿走动、跛行、厌食、腹泻等临床症状，体温应不高于 40.0℃，攻毒后 21 日剖检免疫组羊，心、肝、脾、肾、肠道均应无肉眼可见病变”；（9）文字表述上统一规范修改。用豚鼠检验（1）检验动物数量改为 15 只（10 只免疫、5 只对照）；（2）按 3 月龄以下羊每头注射 0.5~1.0ml 计算，将豚鼠的免疫剂量核算为 1/2 头份（0.5ml）；（3）攻毒后观察时间延长为 21 日；（4）判定标准由“3/4 保护、2/2 死亡”改为“7/10 保护、5/5 死亡”，对照组 100%死亡率维持不变，考虑到动物数量增加，免疫组由 75%保护率下调到 70%保护率。

7. 影响产品质量的主要生产用原辅料为培养基和佐剂，应规定符合附录 3009 要求。

8. 成品检验中无菌检验及甲醛、苯酚和汞类防腐剂残留量测定均与 2020 年版《中国兽药典》一致；安全检验和效力检验将“羊”改为“健康易感绵羊”，安全检验注射剂量由“5.0ml”改为“2 个推荐使用剂量”，效力检验羊免疫剂量由“1.0ml”改为“1 个推荐使用剂量”，豚鼠免疫剂量由“0.5ml”改为“1/2 个推荐使用剂量”；考虑接种局部不良反应应在观察期内全部消除，将安全检验观察时间延长为 14 日，其他改动内容同菌种检定标准。

9. 注意事项中，删除一般性不需要说明的注意事项，仅规定“严禁接种怀孕羊”。