

附件 8. 猪瘟活疫苗（标准草案）

猪瘟活疫苗

Zhuwen Huoyimiao

Classical Swine Fever Vaccine, Live

1 定义 本品系用猪瘟病毒兔化弱毒株（CVCC AV1412）接种兔或乳兔，收获兔的脾脏及淋巴结或乳兔的肌肉及实质脏器制成的乳剂；或接种适宜细胞培养，收获细胞培养物，加入适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防猪瘟。

2 毒种

2.1 对家兔的感染性 用无菌生理盐水将毒种进行 50 倍稀释，耳静脉接种家兔 2 只，每只 1ml。接种后测温观察 96 小时，2 只家兔应均呈现定型热反应（++）或 1 只兔呈定型热反应（++），另 1 只兔呈轻热反应（+）（见附注），但不出现死亡。

2.2 病毒含量 将毒种进行适当稀释后接种兔，按附注进行判定，每毫升含量应不低于 10^5 MID（家兔感染量）。

2.3 安全性

2.3.1 对仔猪的安全性 用无菌生理盐水将毒种进行 10 倍稀释，用 3~5 周龄健康易感断奶仔猪 10 头，各颈部肌肉接种病毒液 5ml。接种后至少连续观察 21 日，每日定时测温、观察 1 次。体温、精神、食欲应正常。观察结束后，对所有实验猪进行剖检，应无猪瘟引起的大体剖检病变（如扁桃体、淋巴结充血、出血，脾脏边缘梗死、肾脏点状出血、回盲瓣纽扣状坏死等）。

2.3.2 对妊娠母猪的安全性 用无菌生理盐水将毒种进行 10 倍稀释，接种妊娠 30~90 日的健康易感母猪 5 头，每头肌肉注射 5ml。接种后每日观察直至分娩。接种母猪在分娩前血清转阳，试验有效，否则试验无效。观察期内，母猪应无猪瘟特异临床症状或死亡，且不发生流产、死胎、弱仔等繁殖障碍。

2.4 免疫原性 用 3~5 周龄健康易感断奶仔猪 5 头，肌肉注射最小免疫剂量（毒种至少稀释至 10^{-5} ）。免疫后 14 日，连同对照猪 5 头，各经肌肉注射猪瘟石门系血毒 1.0ml（不低于 $10^{5.0}$ MLD）。攻毒后连续观察 16 日，每日定时测温 1 次。5 头对照猪攻毒后 24~72 小时内，体温上升且不低于基础体温 1.5°C ，稽留至少 48 小时，出现精神萎靡、食欲减退或废绝、结膜炎、便秘或腹泻等典型的猪瘟临床症状，且至少死亡 3 头；免疫猪应全部健活；如免疫猪攻毒后稍有体温反应，体温升高不应超过基础体温 1.0°C ，或体温升高超过基础体温 1.0°C ，但稽留不超过 1 个温次，且无猪瘟临床症状。

2.5 水平传播 用 3~5 周龄健康易感断奶仔猪 5 头，各经颈部肌肉接种病毒液不少于 1 个推荐使用最大剂量，接种后 24 小时，将对照猪 5 头猪移入同群饲养。同居后 45 日，对所有猪采血，分离血清进行猪瘟病毒抗体检测，接种猪应为阳性，同居猪应为阴性。

2.6 纯净

2.6.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.6.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

2.6.3 外源病毒检验 按附录 XX（外源病毒检验的一般要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2.7 代次限定 基础种子代次为 478~490 代。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 若用兔或乳兔生产，兔或乳兔应符合附录 3501 要求。

3.2 若用细胞生产，细胞应符合附录 3502 要求。

3.3 牛血清 应符合附录 3503 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。猪瘟活疫苗（兔源）如果有菌生长，应进行杂菌计数和病原性鉴定（附录 3307）。每头份疫苗含非病原菌应不超过 75 个。

4.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

4.3 外源病毒检验 按附录 3305 进行，应无外源病毒污染。猪瘟活疫苗（兔源）还需用兔检验：用无菌生理盐水将疫苗稀释为 10 个推荐使用剂量/ml，以 10000g 离心 30~40 分钟，取上清液，经耳静脉注射接种 1.5~2.0kg 兔（兔出血症病毒 HI 抗体效价不高于 1:8 或 SPF 兔）4 只，每只 1.0ml（含 10 头份），观察 7 日。应全部健活。

4.4 安全检验

4.4.1 用猪检验 用 3~5 周龄健康易感断奶仔猪，接种前观察 3 日，每日固定时间测温 1 次，取平均值作为每头猪的基础体温。挑选体温、精神、食欲正常者使用。每批疫苗按瓶签注明推荐使用剂量，用无菌生理盐水将疫苗稀释成 6 个推荐使用剂量/ml，经肌肉注射健康易感猪 5 头，每头 5.0ml。接种后，每日固定时间测温 1 次，观察 21 日。体温、精神、食欲与接种前相比，没有明显变化；或体温升高超过 0.5℃，但不超过 1.0℃，稽留不超过 2 个温次；或减食不超过 1 日，疫苗可判为合格。如有 1 头猪体温升高 1.0℃ 以上，但不超过 1.5℃，稽留不超过 1 个温次，疫苗也可判为合格。如有 1 头猪的反应超过上述标准，或出现可疑的其他体温反应和其他异常现象时，可用 5 头猪重检 1 次。重检的猪仍出现同样反应，疫苗应判为不合格。也可在猪高温期采血复归猪 2 头，每头肌肉注射可疑猪原血 5.0ml，测温观察 16 日。若均无反应，疫苗可判为合格。如第 1 次检验结果已经确证疫苗不安全，则不应进行重检。

4.4.2 用小动物检验 若疫苗为兔源，还需用小鼠和豚鼠进行检验。按瓶签注明头份，用无菌生理盐水将疫苗稀释为 5 个推荐使用剂量/ml，经皮下注射体重 18~22g 小鼠 5 只，每只 0.2ml；经肌肉注射体重 350~400g 豚鼠 2 只，每只 1.0ml，观察 10 日。均应全部健活。

4.5 病毒含量测定 用体重为 1.5~3.0kg 健康易感兔 2 只进行检验。接种前至少观察 3 日，每日定时测温 1 次，以体温平均值作为基础体温。按瓶签注明推荐使用剂量，用无菌生理盐水将疫苗进行适当稀释，将传代细胞源疫苗至少稀释成 1/7500 个推荐使用剂量/ml，或将原代细胞源疫苗至少稀释成 1/750 个推荐使用剂量/ml，或将兔源疫苗至少稀释成 1/150 个推荐使用剂量/ml，经耳静脉注射，每只 1.0ml。接种后，上、下午各测温 1 次，48 小时后，每隔 6 小时测体温 1 次。按附注进行判定，疫苗应符合规定，即传代细胞源疫苗每头份至少含 7500 MID，原代细胞源疫苗每头份至少含 750 MID，兔源疫苗每头份至少含 150 MID。

或产品为细胞源的，也可用细胞法进行病毒含量测定。用适宜稀释液将疫苗稀释成 1 个推荐使用剂量/ml 后进行 10 倍系列稀释，取 4 个适宜稀释度，接种已长成良好单层的 96 孔细胞板，每个稀释度接种 6 孔，每孔 100μl，37℃、含 5%CO₂ 温箱培养 3~4 日，用间接免疫荧光法测定病毒感染，按附录 3402 计算病毒半数感染量。每头份疫苗病毒含量应不低于说明书标示量。

4.6 效力检验 按瓶签注明推荐使用剂量，用无菌生理盐水将疫苗进行稀释：将传代细胞源疫苗稀释成 1/3000 个推荐使用剂量/ml；或将原代细胞源疫苗稀释成 1/300 个推荐使用剂量/ml；或将兔源疫苗稀释成 1/150 个推荐使用剂量/ml，肌肉注射健康易感猪 5 头，每

头 1.0ml。接种后 14 日,连同对照猪 5 头,各经注射猪瘟石门系血毒 1.0ml(不低于 $10^{5.0}$ MLD),每日固定时间测温 1 次,连续观察 16 日。所有对照猪攻毒后 24~72 小时内,体温上升且不低于基础体温 1.5°C ,稽留至少 48 小时,出现精神萎靡、食欲减退或废绝、结膜炎、便秘或腹泻等典型的猪瘟临床症状,且至少死亡 3 头;免疫猪应全部健活或稍有体温反应(与基础体温相比,体温升高不超过 1.0°C ;或体温升高超过 1.0°C ,稽留不超过 1 个温次,但无猪瘟临床症状)。

4.7 剩余水分测定 按附录 3204 进行测定,应符合规定。

4.8 真空度测定 按附录 3103 进行测定,应符合规定。

附注:接种兔体温反应标准及结果判定

1 体温反应标准

定型热反应(++) 潜伏期 48~96 小时,体温上升呈明显曲线,与基础体温相比至少有 3 个温次升高 1.0°C 以上,并稽留 18~36 小时。如稽留 42 小时以上,则必须攻毒攻毒后如果兔无反应,可判为定型热。

轻热反应(+) 潜伏期 48~96 小时,体温上升呈明显曲线,至少有 2 个温次升高 0.5°C 以上,并稽留 12~36 小时。

可疑反应($\pm$) 潜伏期 48~96 小时,体温曲线起伏不定,稽留不到 12 小时,或潜伏期在 24 小时以上,不足 48 小时及超过 96 小时至 120 小时出现热反应。

体温反应呈二次高峰,有一次高峰符合定型热反应(++)或轻热反应(+)标准者,均须攻毒。攻毒后无反应时,该兔的热反应可判为定型热或轻热反应。

无反应(-) 体温正常。

2 结果判定 疫苗接种家兔后,按下述结果进行判定。

(1) 当 2 只兔均呈定型热反应(++),或 1 只兔呈定型热反应(++),另 1 只兔呈轻热反应(+)时,疫苗判为合格。

(2) 当 1 只兔呈定型热反应(++),或轻热反应(+),另 1 只兔呈现可疑反应($\pm$);或 2 只兔均呈轻热反应(+)时,可在接种后 7~10 日攻毒,攻毒时应设对照兔 2 只。每只兔耳静脉注射 50~100 倍稀释的脾淋毒 1.0ml。

接种兔攻毒后体温反应标准如下:

热反应(+) 潜伏期 24~72 小时,体温上升呈明显曲线,升高 1.0°C 以上,稽留 12~36 小时。

可疑反应($\pm$) 潜伏期不到 24 小时或 72 小时以上,体温曲线起伏不定,稽留不到 12 小时或超过 36 小时而不下降。

无反应(-) 体温正常。

攻毒后,当 2 只对照兔均呈定型热反应(++),或 1 只兔呈定型热反应(++),另 1 只兔呈轻热反应(+),而 2 只接种兔均无反应(-),疫苗判合格。

(3) 接种疫苗后,如果有 1 只兔呈定型热(++)或轻热反应(+),另 1 只兔呈可疑反应($\pm$)或无反应(-),可对可疑反应兔或无反应兔采用扑杀剖检或采心血进行病毒分离,判定是否隐性感染;或接种疫苗后,2 只兔均呈轻热反应(+),亦可对其中 1 只兔分离病毒。

病毒分离方法:接种疫苗后 96~120 小时,将兔扑杀,采取脾脏,用无菌生理盐水制成 50 倍稀释的乳剂(脾脏乳剂应无菌),或采取心血(全血),耳静脉注射 2 只兔,每只 1.0ml。凡有 1 只兔潜伏期 24~72 小时出现定型热反应(++),疫苗可判为合格。

3 重检 接种疫苗后,由于出现其他反应情况而无法判定时,可重检,但应不超过 2

次。

起草说明：

1. 本标准系在依据 2020 年版《中国兽药典》、现有批准的猪瘟活疫苗公告涉及至少 8 种猪瘟活疫苗单苗和 2 种联苗标准、2000 年版《中国兽用生物制品规程》、世界动物卫生组织《陆生动物疫苗与诊断试剂手册》第 3.9.2 章（2022 年）等标准拟定而成。本标准属于首次起草。

2. 依据标准体例格式要求对格式再次进行了规范性及个别文字进行了修改。如：“纯净依附录方法进行检验，应无细菌、霉菌（附录 3306）、支原体（附录 3308）及外源病毒污染（附录 3305）。”中，增加了“以附录 XX（外源病毒检验的一般要求）进行检验”字样，同时在细菌、支原体、外源病毒后分别补充了附录方法编号。格式体例上与其他标准保持统一。

3. 根据农业农村部公告第 303 号，附注中补充了“免疫猪稍有体温反应的判定标准”。

4. 删除了一般性的不必要的注意事项。

5. 依据 2024 年度第 5 次兽药标准审查会议要求，限定猪瘟兔化弱毒；删除效检用强毒和原 2.2 项中相关内容等进行了修改和完善。

6. “2 毒种”部分对毒种的定义明确为：“制造本品用的毒种为猪瘟兔化弱毒株，经兔体继代，采集定型热反应兔的脾脏作毒种（简称脾毒）。”

7. “2 毒种”的“免疫原性”部分，增加了免疫后攻毒标准及发病和保护标准。

8. 根据现有产品的安检动物数量和要求，将安检健康易感猪的数量确定为 5 头，日龄为 3~5 周龄断奶仔猪。

9. 根据审定会上专家意见，毒种安全性检验项中增加“水平传播”和“对妊娠母猪安全性”检验项。

10. 参考其他毒种标准格式，删除了毒种特异性项。

11. 成品安全检验标准中，对免疫猪测温次数由原来的上、下午各 1 次，改为每日固定时间测温 1 次，因此，随后的体温持续温次标准也进行了相应修改，即：体温升高超过 0.5℃，但不超过 1℃，稽留不超过 4 个温次改为“稽留不超过 2 个温次”，同时，体温升高 1.0℃不超过 1.5℃，稽留不超过 2 个温次修改为“稽留不超过 1 个温次”。

12. 依据 2025 年度第 3 次会议审查意见，进行了如下修改和完善：（1）将最小感染量和最小免疫剂量相关描述进行合并，修改为：2.2 病毒含量：每毫升含量不低于 10^5 MID（对家兔）。（2）增加水平传播和垂直传播的具体要求和检验标准。（3）仔猪安全检验由 5 头增加为 10 头。（4）将安检时间改为“至少 21 日”，同时增加了大体剖检结果；（5）完善免疫原性检验项，明确攻毒毒株的编号及攻毒剂量，增加攻毒对照猪发病标准及免疫保护猪标准；（6）简化了生产用原辅料 3.3 项表述，删除最后一句；（7）将原效检标准效力检验中的用兔检验划归为 4.5 病毒含量项下，同时细化用细胞测定病毒含量操作步骤。。兔体温测定方法作为附注收载；（8）按照意见将免疫攻毒仅作为效力检验项；（9）删除了标准附注中抗体测定的相关方法内容，如有必要，可在附录中收载。（10）进一步规范文字表述，完善起草说明，并提供修改的理由和依据。（11）效检仅规定采用本动物攻毒试验。

13. 毒种对家兔感染性标准中，将采用 4 只家兔进行检验，改为 2 只检验，与现行兽药典的兔热判定标准保持一致。

14. 经小组讨论，疫苗标准中凡例及需要对疫苗菌毒株进行水平传播试验的，将水平传播作为单独一项标准列项，不包括在安全性项内。