

附件 9. 布鲁氏菌病活疫苗（标准草案）

布鲁氏菌病活疫苗

Bulushijunbing Huoyimiao

Brucellosis Vaccine, Live

1 定义 本品系用布鲁氏菌弱毒株接种适宜培养基培养，收获培养物，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防羊、牛等动物布鲁氏菌病。

2 菌种

2.1 形态特性 菌体为球杆状，单个散在，无鞭毛，不形成芽孢和荚膜。大小约在 0.3~2.5 μm 之间，可被碱性染料着色，革兰氏染色阴性，姬姆萨染色为紫红色，柯氏法染色为红色。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中布鲁氏菌的生化特性。

2.3 培养特性 在 pH 值 6.4~6.8 的胰蛋白胍琼脂或其他适宜培养基上生长良好。培养物平板划线，在 36~37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48~120 小时，光滑型布鲁氏菌菌落边缘整齐，圆润、露滴状、略微带蓝色乳光。在马丁肉汤等液体培养基中生长均匀、浑浊、不透明。粗糙型布鲁氏菌菌落边缘不整齐，黏稠、干燥，在马丁肉汤等液体培养基中生长可形成絮状沉淀。

2.4 鉴别检验 在碱性复红或硫堇（最终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）培养基上的生长情况应符合本菌的特性。将菌种培养物制成抗原，分别与光滑型布鲁氏菌阳性血清、粗糙型布鲁氏菌阳性血清、布鲁氏菌 A 因子血清、布鲁氏菌 M 因子血清反应，应出现与本菌特性符合的凝集反应。基因工程方法改造的菌株进行分子生物学鉴定，应符合相应特征。鉴别诊断的候选菌株对靶动物应符合相应血清学特征。

2.5 变异检查 将菌种稀释后接种胰蛋白胍琼脂平板或其他适宜培养基，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至少 72 小时，用布鲁氏菌菌落结晶紫染色法（附录 3301）检查，光滑型菌株 99% 以上的菌落应属光滑型，粗糙型菌株 100% 的菌落应属粗糙型。

2.6 毒力 含活菌 1.0×10^9 CFU/ml 的悬液，皮下注射体重 350~400g 雌性豚鼠 5 只，1ml/只，14~15 日后剖杀，脏器不应有肉眼可见的病变。取其脾脏、混合称重，研磨，接种胰蛋白胍琼脂或其他适宜培养基平板，计算豚鼠脾脏的含菌量，每克脾脏含菌量应不超过 2.0×10^5 CFU。

2.7 安全性

2.7.1 用靶动物试验 牛种菌株用牛检，羊种菌株用羊检，用于多种动物的疫苗用菌株，每一种靶动物均须进行安全性评价。将健康易感性成熟靶动物分成 2 组，每组不少于 6 只（头），分别按推荐接种途径接种菌液 1 个推荐使用剂量、10 个推荐使用剂量的，接种后至少观察 45 日，应不发生明显的局部或全身反应。如果出现体温升高、食欲减退等，应不超过 3 日。

如果菌株可用于免疫怀孕动物，还应选用怀孕中后期动物进行安全性试验。将健康易感怀孕动物至少 10 只（头），按推荐接种途径接种菌液 1 个最大推荐使用剂量，接种后观察至分娩，应不引起流产，且分娩动物胎衣进行布鲁氏菌分离鉴定，应为布鲁氏菌阴性。

2.7.2 用小鼠试验 候选菌种稀释成每 1.0ml 含有 1.0×10^9 CFU，皮下注射体重 18~20g 雌性 BALB/c 小鼠至少 5 只，0.25ml/只，观察 14 日，应全部健活。

2.8 毒力返强 牛种菌株用牛，羊种菌株用羊进行毒力返强试验。用怀孕中后期健康易感孕畜 3 只，按推荐接种途径接种菌液不少于 1 个推荐使用最大剂量，接种后在最适时

间内采集含菌最高组织，如接种后出现流产则收集流产动物胎衣，采集的组织经适当处理后作为第1代接种物。将第1代接种物按同样方法接种怀孕中后期孕畜，如此连续传代5次。收集第5代接种物进行活菌计数和布鲁氏菌分离，如果第5代接种物的活菌数满足2.7项的试验要求，直接按2.7.1和2.7.2进行安全性试验；如果第5代接种物活菌数无法满足2.7项的试验要求，应进行布鲁氏菌分离，扩繁1代后按2.6项、2.7项方法进行毒力测定和安全性试验，试验结果应与基础菌种一致。

2.9 免疫原性 牛种菌株用牛，羊种菌株用羊，如用于多种动物的制苗用菌株，每一种靶动物均须进行免疫原性测定。将健康易感动物随机分成2组，每组至少10只（头），免疫组菌种按照推荐剂量、方式和次数免疫1个最小免疫剂量，对照组不接种。免疫或加强免疫45~60日，试验用羊的以1~3个MID剂量皮下注射羊种布鲁氏菌强毒（M28株），试验用牛的以1~3个MID剂量皮下注射牛种布鲁氏菌强毒（2308株），观察40~45日剖杀，取脾脏和双侧颌下淋巴结、肩前淋巴结、腹股沟淋巴结分别研磨分离培养细菌，任一组织分离出攻毒菌株记为布鲁氏菌分离阳性。对照组应90%以上布鲁氏菌分离阳性，免疫组应至少70%布鲁氏菌分离阴性。

2.10 水平传播 牛种菌株用牛，羊种菌株用羊进行水平传播试验。将健康易感性成熟靶雌性动物分成2组，每组不少于6只（头），第1组按推荐接种途径接种菌液1个最大推荐使用剂量，接种后第2日将第二组6只动物移入同群饲养，至少观察45日。观察期结束后，逐一采集阴道拭子进行布鲁氏菌分离鉴定，两组动物均应为布鲁氏菌阴性；另对两组动物分别采血、分离血清，用虎红平板凝集试验进行布鲁氏菌抗体检测，接种组应为抗体阳性，同居动物应为抗体阴性。

如安全性用怀孕动物进行试验，则取健康易感怀孕动物至少10只（头），按推荐接种途径接种菌液1个最大推荐使用剂量，接种后第2日，将至少5只（头）健康易感怀孕动物移入同群饲养，观察至分娩。观察期间，应不引起流产，且分娩动物胎衣进行布鲁氏菌分离鉴定，应为布鲁氏菌阴性；另对两组动物采血，用虎红平板凝集试验进行布鲁氏菌抗体检测，接种组抗体应为阳性，同居动物抗体应为阴性。

2.11 纯粹 按附录3306进行检验，应纯粹。

2.12 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 稳定剂 应符合附录3009要求。

4 疫苗配制 应根据菌株特性合理控制疫苗活菌数，活菌数原则上应不超过最低推荐使用剂量的2倍。

5 成品检验

5.1 纯粹检验 按附录3306进行检验，应纯粹。

5.2 变异检查 将疫苗稀释后接种胰蛋白胍琼脂平板或其他适宜培养基，在37℃培养至少72小时，用布鲁氏菌菌落结晶紫染色法（附录3301）检查，光滑型菌株生产的疫苗，粗糙型菌落应不超过5.0%；粗糙型菌株生产的疫苗，应不出现光滑型菌落。

5.3 活菌计数 按瓶签注明头份，用适宜稀释液将疫苗稀释，用胰蛋白胍琼脂平板或其他适宜培养基培养，按附录3405进行活菌计数，每头份疫苗含活菌数应在说明书标示的菌数范围内。

5.4 安全检验

5.4.1 羊用疫苗 按瓶签注明头份，用PBS（0.01mol/L，pH值7.0~7.2）将羊用疫苗

稀释成每 1.0ml 含有 1 推荐使用剂量，皮下注射体重 18~20g 雌性 BALB/c 小鼠至少 5 只，0.25ml/只，观察至少 14 日，应全部健活。

5.4.2 牛用疫苗 按瓶签注明头份，用 PBS (0.01mol/L, pH 值 7.0~7.2) 将牛用疫苗稀释成每 1.0ml 含有 1/60 个推荐使用剂量，皮下注射体重 18~20g 雌性 BALB/c 小鼠至少 5 只，0.25ml/只，观察至少 14 日，应全部健活。

5.5 剩余水分测定 按附录 3204 进行测定，应符合规定。

5.6 真空度测定 按附录 3103 进行测定，应符合规定。

6 注意事项 本品对人有一定感染风险，大量接触时可引起感染；疫苗预防接种工作人员应做好个人防护，避免黏膜（眼、鼻、口等黏膜）、皮肤等直接接触；疫苗接种操作时，出现疫苗溅入眼睛，注射时扎伤皮肤等意外，应当立即采取冲洗、消毒等局部处理措施并及时就医。

起草说明：

1. 本标准系在参考 2000 年版《中国兽用生物制品规程》、2020 年版《中国兽药典》三部、欧洲药典、WOAH 陆生动物诊断与疫苗手册、2025 年 1 月前批准的布鲁氏菌病活疫苗注册标准、美国兽医生物制品法规和技术标准等基础上起草而成。本标准属于首次起草。

2. 布鲁氏菌弱毒株包括光滑型和粗糙型。

3. 培养特性 依据 WOH 手册中对于生产用菌种变异检查规定，光滑型菌种应 99% 的菌落为光滑型，粗糙型菌种应不出现光滑型菌落。

4. 鉴别检验 增加了基因工程方法改造的菌株和鉴别诊断的要求。

5. 毒力 与 2000 年版《中国兽用生物制品规程》中的标准一致。

6. 安全性 依据该病感染特性和部分产品注册资料档案，要求用性成熟靶动物、怀孕靶动物和小鼠均进行安全性试验。

7. 增加水平传播能力试验项。

8. 毒力返强 选择最易感的孕畜进行毒力返强试验，分菌部位为流产动物胎衣，或根据菌种在动物组织动态分布中含量最高时间采集含菌最高组织，判定标准是 5 代后不能超过毒力标准要求的上限，即不能成为强毒株。与安全性检验和免疫原性试验不同，不同种的布鲁氏菌具有种属嗜性，试验用动物采用种型对应动物开展。

9. 免疫原性 动物选择依据候选菌株使用动物，考虑到包含粗糙型候选菌株，免疫方式和剂量不做规定，免疫天数选取免疫菌株在体内能被完全清除的时间。攻毒用菌株采取我国的标准菌株，也是绝大多数产品使用的强毒株，同时牛用疫苗增加国际标准株。结果判定采用所有申报材料中的通用分离方法和最低标准免疫组保护 70%，对照组 90% 应能分离出攻毒菌。

10. 疫苗配制 成品检验中不再对活菌数的范围进行规定，但是要求配制疫苗时合理控制半成品的活菌数，确保冻干后成品活菌数应不超过说明书标示量的 2 倍

11. 成品检验 对现行兽药典中的 A19 株、S2 株、M5 株 3 种布鲁氏菌病活疫苗进行了整合，参考了新批准的 5 种产品。纯粹检验、变异检查、剩余水分测定和真空度的标准都是通用的、且一致。

12. 本标准参考 WOH 手册的疫苗安全性检验统一用雌性 BALB/c 小鼠。(1) 关于稀释头份数，因疫苗使用剂量和使用对象不同，分为羊用和牛用疫苗进行 2 种方式稀释。(2) 关于稀释液，本标准参考 WOH 手册的疫苗安全性检验建议统一用 PBS (0.01mol/L, pH 值 7.0~7.2)。

13. 依据 2025 年度第 3 次审查意见，（1）删除了光滑型菌种的限制条件，改为布鲁氏菌弱毒株，包括粗糙型菌种，相应地在菌种培养特性、鉴别检验、变异检查和成品变异检查项做了修改；（2）菌种鉴别检验增加了标记疫苗和抗性疫苗的检查方法。（3）菌种安全检验增加了小鼠的安全检验，同时为了体现不允许水平传播的要求，增加了试验对照组，并做相应规定。（4）毒力返强试验规定了，怀孕动物的分菌时间和分菌部位。（5）另外，经起草小组会讨论，没有采纳每种靶动物对应使用不同种菌株进行攻毒。

14. 注意事项 依据上报稿（中监所标准〔2022〕1 号文）对注意事项进行修改：本品对人有一定感染风险，大量接触时可引起感染；疫苗预防接种工作人员应做好个人防护，避免黏膜（眼、鼻、口等黏膜）、皮肤等直接接触；疫苗接种操作时，出现疫苗溅入眼睛，注射时扎伤皮肤等意外，应当立即采取冲洗、消毒等局部处理措施并及时就医。