

提纯牛型结核菌素（标准草案）

Tichun Niuxing Jiehejunsu

Purified Protein Derivative of Bovine Tuberculin (PPDB)

1 定义

本品系用牛分枝杆菌（CVCC 68001、CVCC 68002）分别接种适宜培养基培养，收获培养物，经灭活、混合、浸泡、滤过除菌后提纯制成液体制品或冻干制品。用于皮内变态反应诊断动物牛结核病。

2 菌种

2.1 形态特性 为细长、直或稍弯的杆菌，长约 $1.5\sim 4\mu\text{m}$ ，宽 $0.2\sim 0.6\mu\text{m}$ ，为革兰氏阳性、抗酸染色杆菌。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中本菌的特性。

2.3 培养特性 在 P 氏固体培养基上缓慢生长，菌落为蛋黄白色颗粒状，较为干燥。

2.4 纯粹 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

2.5 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。

2.6 菌素含量 接种于苏通合成培养基，置 37°C 静置培养 2 个月，灭活后过滤除去菌体，从滤液中获得的牛结核菌素经纯化后效价应与标准品基本一致。

3 生产用原辅料

苏通合成培养基，培养基标准应符合附录 3009 要求。

4 成品检验

4.1 性状 液体制品为澄清液体；冻干制品为海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离，加注射用水稀释后迅速溶解为澄清液体。

4.2 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

4.3 安全检验 用灭菌生理盐水将冻干制品稀释成 10 头份/ml（液体制品不稀释），各皮下注射体重 $16\sim 22\text{g}$ 小鼠 10 只， $0.5\text{ml}/\text{只}$ ，观察 10 日，应全部健活；或用灭菌生理盐水将冻干制品稀释成 10 头份/ml（液体制品不稀释），腹腔注射体重 $350\sim 450\text{g}$ 豚鼠 5 只， $1.0\text{ml}/\text{只}$ ，观察 10 日，应全部健活。

4.4 效价测定

4.4.1 致敏原 采用国家标准品或参考品。

4.4.2 致敏 用体重 $500\sim 700\text{g}$ 豚鼠 6 只，各后腿肌肉注射 1mg 牛分枝杆菌致敏原，致敏 33~37 日。

4.4.3 注射 提前 24 小时在致敏豚鼠背部脊柱两侧脱毛，用灭菌生理盐水将 10 头份/ml 的被检菌素和 32500IU/ml 的标准菌素作 25 倍、50 倍、100 倍稀释，每个稀释度在脱毛部位皮内注射 0.1ml 。

4.4.4 测量 注射后 24~28 小时，用游标卡尺进行测量，以注射点皮肤红肿部位最大直径及其垂直直径的乘积表示该点皮肤红肿反应面积。

4.4.5 计算 被检菌素皮肤红肿总面积应为标准菌素的 80%~120%。

4.5 特异性检验 用体重 $350\sim 450\text{g}$ 豚鼠 6 只，提前 24 小时在豚鼠背部脱毛，用灭菌生理盐水将冻干制品稀释成 10 头份/ml（液体制品不稀释），各皮内注射 0.1ml 的被检菌素，注射后 24~28 小时观察，注射部位红肿反应直径应小于 3mm 。

4.6 蛋白含量测定 用凯氏定氮法测定，应为 $0.8\sim 1.2\text{mg}/\text{ml}$ 。冻干制品用注射用水复溶至 10 头份/ml 后测定。

4.7 pH 值 应为 $6.5\sim 7.5$ 。冻干制品用注射用水复溶至 10 头份/ml 后测定。

4.8 剩余水分测定（冻干制品适用） 按附录 3204 进行测定，应符合规定。

4.9 真空度测定（冻干制品适用） 按附录 3103 进行测定，应符合规定。

5 注意事项

5.1 2~8℃避光保存和运输。

5.2 注射后可能出现一过性体温升高或生产性能下降。

5.3 单次皮内注射试验未得出结论，应间隔 42 日以上再进行复检。

5.4 皮内试验后应间隔 60 日以上再进行血清学试验。

起草说明：

1. 本标准是在 2020 年版《中国兽药典》三部“提纯牛型结核菌素”标准（第 114 页）的基础上进行制修订而来。增加了菌种部分，删除了【作用与用途】【用法与判定】【规格】【贮藏与有效期】项目。

2. 本标准中菌种部分参照 1992 年版规程第 259 页对菌种进行补充和完善。原标准写为 1~2 株，实际上是两株均用。

3. 参考细菌灭活疫苗（冻干）格式体例修改。鉴于该品种存在冻干生产工艺，且属于体内诊断用诊断试剂，故应有“剩余水分测定”和“真空度测定”项。

4. 修订效价测定致敏原项，因致敏原的质量直接影响豚鼠致敏效果进而影响效价测定的准确性，应使用标准化的致敏原（国家标准品或参考品）。

5. 关于豚鼠标准，原效价测定用豚鼠体重规定偏低，会影响致敏效果，修改为 500~700g（修改理由见下表）。

6. 关于效价测定注射点数量，明确表述每侧 3 个注射点；稀释度的选择明确 3 个稀释度，取消轮回换点方法，试验方法更为科学。修订了效价测定结果测量和计算方法，明确红肿面积的测量时间、精度、测量方式和计算方法，使检测方法更为科学。

7. 参考美国和欧洲药典做法，成品检验项下特异性检验项中仅保留用豚鼠检验，删除了用牛检验。

8. 参照 WOH 的 CHAPTER 3.1.13，修改完善了对制品质量影响较大的注意事项。

9. 提纯菌素为多种成分混合物，其中有效成分为特异性分泌蛋白，其含量决定了制品的效价和特异性，参考欧美同类产品标准及标准品蛋白含量与效价的关系，增加了蛋白含量测定项。

10. 依据 2023 年度第 10 次会议审查意见和 2024 年度第 7 次会议审查意见的修订说明：

修订内容	依据	修订理由（会议审查意见）
修订定义的表述	2024 年度第 7 次会议审查意见	制品由 2 个菌株共同制备而成，应简要阐明操作步骤，修改为“经灭活、混合、浸泡、滤过除菌后提纯制成”。
修订菌种项	2023 年度第 10 次会议审查意见	非疫苗产品删除菌种毒力项及相应内容，修订其他项表述。删除抗原性相应内容。
增加菌素含量项	2024 年度第 7 次会议审查意见	简要说明制备过程及要求。
增加性状项	2023 年度第 10 次会议审查意见	体内诊断制品涉及固定菌株的应明确性状，但不加颜色的限定。
修订安全检验项	2023 年度第 7 次会议审查意见	动物接种数量应符合附录 3010 要求，小鼠改为 10 只，豚鼠改为 5 只

修订效价测定	2023 年度第 7 次会议审查意见 美国 CVB 113.409, 887 页 欧洲药典第 10 版, 01/2008:0536	确致敏原所用菌株, 致敏原直接影响豚鼠致敏效果进而影响效价测定的准确性, 应使用标准化的致敏原 (国家标准品或参考品); 原效价测定用豚鼠体重规定偏低, 会影响致敏效果, 将豚鼠体重修改为“500~700g; 修订效价测定稀释度的选择, 选取 3 个适宜稀释度使红肿面积直径在 8~25mm, 取消轮回换点方法; 明确了红肿面积的测量时间、皮肤红肿面积测量方式为红肿部位最大直径及最大直径垂直直径的乘积; 明确待检菌素与标准菌素的相对值要求为 80%~120%
修订特异性检验	美国 CVB 113.409, 887 页 欧洲药典第 10 版, 01/2008:0536	仅保留用豚鼠检验, 删除了用牛检验。取消轮回换点。将观察时间明确为注射后 24~28 小时, 皮内注射易出现破溃, 为排除非迟发型变态反应引起的红肿对结果判定的干扰, 注射部分允许有红点, 直径不超过 3mm。
增加蛋白含量项	美国 CVB 113.409; 109 页	有效蛋白含量决定了产品的效价和特异性, 为该产品重要的质量控制目标。美国牛结核菌素标准为蛋白含量 0.9~1.1mg/ml, 考虑制备工艺的差别和凯氏定氮法的误差, 本标准给出合理范围。
增加 pH 测定项	欧洲药典第 10 版, 01/2008:0536、	生产工艺中会涉及使用强酸、强碱, 在成品中应予以控制。明确冻干制品复溶试剂为注射用水。
修订注意事项	WOAH 的 CHAPTER 3.1.13	说明了常见使用问题。