

## 附件 3. 猪链球菌病灭活疫苗（猪链球菌 2 型）（标准草案）

### 猪链球菌病灭活疫苗（猪链球菌 2 型）

Zhu LianqiuJunbing Miehuoyimiao (ZhuLianQiuJun 2 Xing)

Swine Streptococcosis Disease Vaccine, Inactivated (*Streptococcus suis* type 2)

**1 定义** 本品系用猪链球菌 2 型菌株接种适宜培养基培养，收获培养物，灭活后加适宜佐剂制成。用于预防猪链球菌 2 型感染引起的猪链球菌病。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阳性球菌，呈单个、成对或短链排列。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中猪链球菌 2 型的生化特性。

2.3 培养特性 在含有 10%绵羊脱纤血平板上，置 37℃培养 20~24 小时，菌落圆形、微凸、表面光滑、湿润，呈 $\alpha$ 或 $\beta$ 溶血。

2.4 血清型鉴定 与猪链球菌 2 型阳性血清应产生凝集反应。

2.5 安全性 用菌种制备灭活疫苗，用推荐使用最小日龄健康易感仔猪至少 10 头，按各种推荐使用途径接种疫苗不少于 2 个推荐使用剂量，至少观察 21 日。应全部健活，所有接种猪精神状态、采食饮水均应正常；接种后连续测温 7 日（接种疫苗当日不测温），接种后体温与接种前 3 日基础体温相比，应不超过基础体温 1.5℃；若超过 1.5℃，应在 3 日内恢复。应无由疫苗引起的其他局部或全身不良反应。

2.6 免疫原性 用菌种制备灭活疫苗，用 4 周龄左右健康易感仔猪至少 10 头，每种推荐使用途径各接种疫苗 1 个最小免疫剂量，免疫后 21 日，连同对照猪至少 5 头，各静脉注射强毒菌液 1MLD，观察 14 日。对照猪应至少 80%死亡，免疫猪应至少 80%保护。

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 4 周龄左右健康易感仔猪 5 头，各肌肉注射疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 15 日。精神状态、采食饮水均应正常；免疫后连续测温 7 日（接种疫苗当日不测温），每日测温 1 次，体温与免疫前 3 日基础体温相比，升高不超过基础体温 1.5℃，若超过 1.5℃，应在 3 日内恢复。应无由疫苗引起的其他局部或全身不良反应。

4.3 效力检验 用 4 周龄左右健康易感仔猪 5 头，各肌肉注射疫苗 1 个推荐使用剂量，免疫后 21 日，连同对照仔猪 5 头，各静脉注射强毒菌液 1MLD，观察 14 日。对照猪应至少 80%死亡，免疫猪应至少 80%保护。

4.4 甲醛残留量测定（适用于用甲醛灭活） 按附录 3203 进行测定，应符合规定。

4.5 汞类防腐剂残留量测定（适用于使用硫柳汞灭活或防腐） 按附录 3202 进行测定，应符合规定。

#### 起草说明：

1. 本标准系在参考 2020 年版《中国兽药典》收录的“猪链球菌病灭活疫苗（马链球菌兽疫亚种+猪链球菌 2 型）”以及 2011 年农业农村部公告第 1548 号批准的注册标准“猪链球

菌病灭活疫苗(马链球菌兽疫亚种+猪链球菌血清 2 型+猪链球菌血清 7 型)”、2012 年农业部公告第 1719 号批准的注册标准“猪链球菌病灭活疫苗(马链球菌兽疫亚种+猪链球菌 2 型)规程”(简称“1719 公告”)、2016 年农业农村部公告第 2479 号批准的注册标准“猪链球菌病、传染性胸膜肺炎二联灭活疫苗(LT 株+MD0322 株+SH0165 株)”(简称“2479 公告”)、2021 年农业农村部公告第 433 号批准的注册标准“猪链球菌病灭活疫苗(2 型, HA 9801 株)制造及检验试行规程”(简称“433 公告”)、2021 年农业农村部公告第 450 号批准的注册标准“猪链球菌病、传染性胸膜肺炎二联灭活疫苗规程”(简称“450 公告”)等标准的基础上起草而成。本标准属于首次起草。

2. 菌种标准中形态特性、生化特性结合多个已经批准的菌株标准, 取其共性部分起草: (①呈单个、成对或短链排列(433 公告, HA 9801 株)。②呈单个、成对或短链排列, 不形成芽孢, 无鞭毛, 幼龄培养菌可形成荚膜(1719 公告, BHZZ-L4 株)。③呈单个、成对或短链排列, 不形成芽孢, 无鞭毛, 幼龄培养菌可形成荚膜(450 公告, ZY-2 株)。④呈单个、成对或短链排列(1548 或 2479 号公告, LT 株)。

3. 纯粹 同“猪链球菌病灭活疫苗(2 型, HA 9801 株)制造及检验规程”, 未作改动。血清学特性参考“猪链球菌(2 型, HA 9801 株)”(433 公告)表述。

4. 培养特性 结合批准菌株标准共性部分起草。(①37℃培养 20~24 小时, 形成灰白色、半透明、湿润、凸起、粘稠、表面光滑、边缘整齐、油滴样菌落, 呈 $\alpha$ 溶血。接种含血清的马丁肉汤, 37℃培养 18~24 小时, 呈均匀混浊(433 公告, HA 9801 株)。②37℃培养 20~24 小时形成灰白色、湿润、突起、粘稠、表面光滑、边缘整齐的半透明菌落。在鲜血马丁琼脂培养基上, 经 37℃培养 24 小时, 形成湿润、光滑、圆形透明或不透明菌落, 呈 $\alpha$ 溶血。在缓冲马丁肉汤培养基中 37℃培养 18~20 小时呈均匀混浊状(1719 公告, BHZZ-L4 株)。③36.5~37.5℃培养 12~24 小时, 肉眼观察, 形成圆形灰白色、表面光滑、边缘整齐、突起粘稠、半透明菌落。在鲜血培养基呈 $\alpha$ 溶血。在血清马丁肉汤培养基中, 36.5~37.5℃培养 12 小时, 呈均匀混浊(450 公告, ZY-2 株)。④在含 10%的绵羊脱纤血 TSA 平板上培养 12~18 小时, 菌落灰色, 半透明、湿润, 24 小时后呈 $\beta$ 溶血, 在缓冲肉汤中培养, 呈均匀浑浊生长。(1548 或 2479 号公告, LT 株)。

5. 对于菌种标准中毒力 (1) 鉴于已经批准菌株相关标准中均含有 4 周龄健康易感仔猪共性之处。(433 公告, HA9801 株, 21~30 日龄; 2479 公告, LT 株, 28~35 日龄; 450 公告, ZY-2 株, 4~5 周龄; 1719 公告, BHZZ-L4 株, 1~2 月龄)。明确“使用动物及日龄”其共性表述为“4 周龄左右健康易感猪”。健康易感即表示: 猪群近两年来未发生过猪链球菌病, 无猪链球菌临床症状和未免疫猪链球菌病相关疫苗的健康猪, 且猪链球菌 2 型 ELISA 血清抗体检测为阴性。(2) 鉴于已经批准菌株标准中有 2 株观察时间为 7 日, 2 株为 14 日。另 4 种菌株毒力标准有差异, 拟采用 3/4 株通用的 1 个致死量最低毒力标准(含活菌数约  $1 \times 10^7$ CFU) 作为通用标准, 并确定观察时间为 14 日。(①用 21~28 日龄健康易感仔猪 20 头, 分为 5 组, 每组 4 头, 分别耳静脉注射 HA9801 株菌数  $1.56 \times 10^{10}$ CFU、 $1.56 \times 10^9$ CFU、 $1.56 \times 10^8$ CFU、 $1.56 \times 10^7$ CFU、 $1.56 \times 10^6$ CFU, 观察 7 日, 对仔猪的半数致死量(LD<sub>50</sub>)应  $\leq 7.4 \times 10^6$ CFU(433 公告)。②用 1~2 月龄健康易感猪 5 头, 耳静脉注射 BHZZ-L4 株菌液 1ml(含活菌数约  $1 \times 10^7$ CFU), 逐日观察 14 日, 应全部死亡(1719 公告)。③取 4~5 周龄健康易感仔猪 5 头, 耳静脉注射 ZY-2 株菌液 2ml(约含活菌  $6.5 \times 10^6$ CFU), 观察 7 日, 应全部死亡(450 公告)④用 56~63 日龄健康易感仔猪 5 头, 分别经耳静脉注射 LT 株菌液 2.0ml(含活菌数为  $6.0 \times 10^5$ CFU), 连续观察 14 日, 应全部死亡(2479 号公告)。

6. 对于免疫原性与成品检验中的效力检验。鉴于参考的已经批准注册标准共性表述均为健康易感仔猪，并且仔猪日龄、免疫量、免疫攻毒时间、强毒的攻毒量及接种途径、攻毒后临床观察时间，免疫攻毒保护及对照攻毒标准均有交叉，结合动物福利。通用标准定为“按本试行规程制成单价灭活疫苗，用4周龄健康易感仔猪（猪链球菌2型ELISA抗体阴性）5头，颈部肌肉注射疫苗1头份，21日后，连同对照猪5头，各静脉注射1个最小致死剂量的强毒菌液2.0ml，对照组至少死亡4头，免疫组应至少4头保护”。①按本规程制成灭活疫苗（每ml疫苗含灭活前菌数 $4 \times 10^8$ CFU）。用1~2月龄健康易感仔猪5头，每头肌肉疫苗2.0ml，21日连同对照猪5头，各静脉注射1MLD的猪链球菌ZY强毒菌液2.0ml，观察14日，对照猪应全部发病且至少死亡4头，免疫组至少4头保护（433公告）。②1~2月龄的健康易感猪6头，各颈部肌肉注射疫苗2ml，21日后连同条件相同的对照猪5头，耳静脉注射一个最小致死量（MLD）的BHZZ-L4株菌液1ml，逐日观察14日。对照组应全部死亡，免疫组应至少保护5头（1719公告）。③用4~5周龄健康易感仔猪5头，颈部肌肉注射疫苗1.0ml，21日后，连同对照猪5头，各静脉注射一个最小致死剂量的ZY-2株强毒菌液2.0ml，观察14日，对照组至少死亡4头，免疫组应至少4头存活（450公告）。④用LT株制备单价灭活疫苗（抗原含量为 $1.0 \times 10^9$ CFU/ml），经颈部肌肉注射28~35日龄健康易感仔猪5头，2.0ml/头，免疫后28日，连同对照猪5头，分别耳静脉注射1个致死剂量的LT株菌液2.0ml，观察14日。对照猪应全部死亡，免疫猪应至少4头保护（2479号公告）。

7. 对于成品检验的安全性。参考2020年版《中国兽药典》（三部）、433公告、1719公告及450号公告规定，鉴于共性表述均为健康易感仔猪，并且仔猪日龄、免疫量、临床观察时间均有交叉。通用标准定为用4周龄左右健康易感仔猪5头，每头肌肉注射2头份，逐日观察15日。应健活，免疫猪均应无不良反应。①采用21~30日龄健康仔猪5头，每头肌肉注射4.0ml，逐日观察15日。免疫猪均应无不良反应（注射后3日内试验猪体温不得超过正常体温 $1^{\circ}\text{C}$ ，减食不超过1日），应健活（2020年版《中国兽药典》）。②采用12~14日龄健康易感仔猪，各颈部肌肉注射疫苗4.0ml，观察10日，免疫猪均应无不良反应，且全部健活（130公告）。③采用4~5周龄健康易感猪5头，接种前2日，每日上午定点测量体温，以测定的各温次平均值作为每头猪的基础体温。试验猪各颈部肌肉注射疫苗4.0ml（分两点注射，每点注射2.0ml）。接种疫苗当日不测温，接种后3日每日上午测量体温，继续观察至14日。免疫猪均应不出现疫苗引起的局部或全身不良反应，应5/5健活（450号公告）。④用28~35日龄健康易感仔猪（ELISA抗体检测阴性，见附注）5头，各颈部肌肉注射疫苗4ml，观察14日，均应无由疫苗引起的全身和局部不良反应。注射前测温一次，注射后3日内每日测温一次，与注射前体温相比，第1日均不得超过 $1.5^{\circ}\text{C}$ ，第2日和第3日均不得超过 $1^{\circ}\text{C}$ （1548号公告）。

8. 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。

9. 成品检验中无菌检验、甲醛和汞类防腐剂残留量测定与2020年版《中国兽药典》通用表述一致，未改动。

10. 依据2023年第6次兽药标准评审评价会议意见进行了修改和完善：（1）去掉毒力；（2）对菌种免疫原性，成品的安全检验、效力检验进行规范性表述；（3）增加健活及保护判定标准。

11. 依据2024年第10次兽药标准评审评价会意见，对标准文本再次进行了修改和完善：（1）增加菌株中安全性检验内容；（2）完善及规范文字描述：a）血清学特性鉴定。b）菌株项中制品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及保护标准。（4）鉴于对照组与免疫组仔猪，经静脉注射猪链球菌2型强毒后，对照攻毒猪死亡（80%

以上死亡)与免疫攻毒猪不死亡(80%以上存活),本身就是重大显著差异,可直接证明该疫苗免疫效力。根据某生物股份有限公司提供结果,在观察期末,免疫攻毒存活猪不出现体温升高、食欲废绝等临床症状,但个体体重、被毛及运动状态等相对于健康猪(不接种空白对照)有差异。经讨论后,进一步完善标准表述如下:“对照组至少死亡4头,免疫组应至少4头存活,且免疫攻毒存活猪在观察期末不应出现体温升高、食欲废绝等临床症状。”

12. 依据2025年度第3次会议审查意见再次进行了修改与完善:(1)对2023年度第6次会议及2024年度第10次会议审查意见中“菌株免疫原性及成品效力检验发病及保护的具体标准”文字难以准确规范表述,最后确定为“对照猪80%发病或免疫猪80%保护”,其他不作太具体细化要求,其具体发病或保护的细化标准由申报单位根据产品特性自己明确。(2)专家委员对于菌株安全性内容中,1MLD(含活菌数不高于 $1 \times 10^7$ CFU)及观察时间(原定14日)有疑议,特取消1MLD中的菌数限制要求,并按照农业部公告第683号公告延长观察时间(定21日)。(3)菌种项下,已修改完善安全性项。明确了每一种推荐使用途径均应进行安全性评价,并按照683号公告要求,将观察期调整为21日。具体表述为:用菌种制备灭活疫苗,用推荐最小使用日龄健康易感仔猪至少10头,按各种推荐使用途径接种疫苗至少2个推荐使用剂量,观察21日。应全部健活,所有接种猪精神状态、采食饮水均应正常;接种后连续测温7日(接种疫苗当日不测温),接种后体温与接种前3日基础体温相比,应不超过基础体温 $1.5^{\circ}\text{C}$ ;若超过 $1.5^{\circ}\text{C}$ ,应在3日内恢复。应无由疫苗引起的其他局部或全身不良反应。(4)修改完善免疫原性项。明确每一种推荐使用途径均应进行免疫原性试验;接种动物至少10头,对照至少5头;攻毒剂量删除对1MLD菌数限制的文字表述;判定标准修改为免疫组80%保护,对照组80%死亡。已按要求调整为“按推荐的最小免疫剂量制备灭活疫苗,用4周龄左右健康易感仔猪至少10头,每种推荐使用途径各接种1个最小免疫剂量,免疫后21日,连同对照猪至少5头,各静脉注射1MLD的强毒菌液,观察14日。对照组应至少80%死亡,免疫组应至少80%保护。”(5)“成品检验”项下删除4.2安全检验项中第一句话“应符合……(附录3010)”;效力检验已参照免疫原性标准进行修改。”