

T/GARIRPA

广西农业农村产业振兴促进会团体标准

T/GARIRPA XXXX—XXXX

畜禽用噬菌体制剂

Bacteriophage Preparation for Livestock

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

广西农业农村产业振兴促进会 发布

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由广西农业工程职业技术学院提出。

本文件由广西农业农村产业振兴促进会归口。

本文件起草单位：广西农业工程职业技术学院、广西壮族自治区兽医研究所、南宁美智生物科技有限公司。

本文件主要起草人：李显、李振科、彭昊、马敏、王乐平、马春霞、吕冠霖、赖玉燊、唐榕泽、蒙鸿燕、韩幸、谭兵兵、韦宏干、李静然、杨彪、廖聪、闭添淇。

畜禽用噬菌体制剂

1 范围

本文件规定了畜禽用噬菌体制剂的术语和定义、质量要求和理化指标、试验方法、标签、包装、运输及贮存要求。

本文件适用于裂解大肠杆菌、沙门氏菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌等的单株或多株噬菌体为主要原料并可用于预防或治疗由上述病原引起的畜禽细菌感染的畜禽用噬菌体制剂质量控制。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB 10648 饲料标签
- GB4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定
- GB/T191 包装储运图示标志
- GB/T9742 化学试剂pH值测定通则
- GB/T 36911 运输包装指南
- GB/T 14699.1 饲料 采样

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

噬菌体 bacteriophage, phage

一类能感染细菌、真菌、藻类、放线菌、支原体及螺旋体等微生物的一类病毒的总称，亦称细菌病毒。

3.2

噬菌斑 plaque

噬菌体侵染细菌，导致宿主细胞溶解死亡，在琼脂培养基生长的菌苔上形成的空斑。

3.3

畜禽用噬菌体制剂 bacteriophagepreparation

含有一株或多株噬菌体为主要成分的制剂。

4 质量要求及其理化指标

4.1 噬菌体制剂安全要求

4.1.1 噬菌体产品应符合《中华人民共和国生物安全法》和农业农村部《兽用生物制品注册分类及注册资料要求》。

4.1.2 噬菌体制剂中的噬菌体应安全、有效。

4.1.3 噬菌体制剂中的噬菌体应为裂解性噬菌体，遗传背景明确，不携带毒力基因、整合基因，并通过全基因组测序验证，测序数据保存≥5年。

4.1.4 噬菌体制剂产品应符合相应的企业标准。

4.2 噬菌体制剂理化指标

噬菌体制剂（液体/固体）的理化指标见附录A.1，附录A.2。

5 试验方法

5.1 性状

将样品放置在洁净的烧杯内，在光线充足、非直射日光、无异味的环境中，用眼观的方法观察其色泽，用按GB/T 14699.1规定的方法检测其气味。

5.2 pH值

按照 GB/T 9742 规定执行。

5.3 效价

按照附录B中的 B. 4. 1 的规定执行。

5.4 杂菌数

噬菌体制剂中仍存活的细菌视为杂菌。杂菌数按照GB4789.2规定的微生物菌落总数测定方法执行。

5.5 裂解效率

按照附录B中 B. 4. 2的规定执行。

6 标签、包装、运输、贮存

6.1 标签

噬菌体制剂的标签应符合GB 10648的规定。标完整、清晰，标签说明上应注明噬菌体制剂的种类、含量、用法、贮藏条件和方法、保质期、企业名称、生产地址、联系方式等，并说明开启后保存期限。

6.2 包装

噬菌体制剂包装应符合GB/T191规定。液体制剂采用塑料瓶或玻璃瓶，规格为：100mL、200 mL、500mL/瓶等，或按用户指定要求。粉末制剂的小包装采用铝箔袋，规格为50g、100g、200g、500g、1kg/袋等，或根据用户提出的净含量要求进行包装。粉末制剂的大包装采用内衬塑料袋的编织袋或瓦楞纸箱，每袋（或箱）的规格为5kg、10kg、20kg、25kg等，或根据用户提出的净含量要求进行包装。净含量应符合国家质量监督检验检疫总局《定量包装商品计量监督管理办法》的规定。

6.3 运输

噬菌体制剂运输应符合GB/T36911运输包装指南。

6.4 贮存

噬菌体制剂应保存于干燥、避光处，2℃~8℃冷藏保存，在符合运输、贮存条件的情况下，原包装（未开封）产品的保质期为3个月以上。

附 录 A
(规范性)
噬菌体制剂理化指标

A.1 液体噬菌体制剂理化指标

表 A.1 液体噬菌体制剂理化指标

项目	指标
性状	制剂颜色为无色至淡黄色澄清液体，无沉淀、无异味。
水分含量	≥95%
效价, PFU/mL	≥1.0×10 ⁸
裂解效率, %	≥90
pH值	6.0~8.5
杂菌数, CFU/mg	<100

A.2 固体噬菌体制剂理化指标

表 A.2 固体噬菌体制剂理化指标

项目	指标
性状	制剂颜色为白色至淡黄色的粉末或细小颗粒状，色泽一致，无发霉、结块现象，有培养基自然气味无酸败等气味。
水分含量	≤15%
效价, PFU/mg	≥1.0×10 ⁸
裂解效率, %	≥90
pH值	6.0~8.5
杂菌数, CFU/mg	<100

附录 B

(规范性)

噬菌斑、噬菌体效价及噬菌体裂解效率测定方法

B.1 仪器设备

- B.1.1 恒温培养箱:36℃±1℃
- B.1.2 离心机:转速12000r/min
- B.1.3 超净工作台
- B.1.4 高压蒸汽灭菌锅
- B.1.5 恒温振荡培养器:36℃±1℃~42℃±1℃
- B.1.6 电子分析天平:感量0.001g
- B.1.7 电热恒温鼓风干燥箱:10℃~200℃
- B.1.8 冰箱:-40℃以下和-20℃~8℃
- B.1.9 无菌培养皿:Φ90 mm
- B.1.10 微量移液器:0.5 μL~10 μL、10 μL~200 μL、100 μL~1000 μL
- B.1.11 漩涡混合仪
- B.1.12 细菌涂布器

B.2 试剂和材料

- B.2.1 LB培养基
- B.2.2 LB固体培养基
- B.2.3 氢氧化钠
- B.2.4 盐酸
- B.2.5 宿主菌(增殖对应的噬菌体)

B.3 双层琼脂培养基制备

B.3.1 上层固体培养基配置:

LB固体培养基2.5% (g/100 mL)
 琼脂粉 0.75% (g/100 mL)
 pH值调节到7.2~7.4。

B.3.2 下层固体培养基配置:

LB固体培养基2.5% (g/100 mL)
 琼脂粉 1.5% (g/100 mL)
 pH值调节到7.2~7.4。

B.3.3 液体培养基配置:

LB培养基2.5% (g/100 mL)
 琼脂粉 1.5% (g/100 mL)
 pH值调节到7.2~7.4。

B.3.4 灭菌

配制的培养基于121℃高压灭菌20 min。

B.4 检测步骤

B.4.1 噬菌体效价测定

取噬菌体制剂样本1 mL(1 mg),加入9 mL生理盐水中,涡旋混匀,重复上述操作,按照制剂标注的噬菌体含量,将噬菌体制剂样本依次稀释到 1×10^2 PFU/mL。每次检测设三个平行,取100 μ L噬菌体稀释液样品,加入至100 μ L敏感宿主菌的增殖液中,混匀,于宿主菌最佳培养温度条件下孵育5 min,加入5 mL上层半固体培养基,混匀后,倾倒在底层固体培养基上,室温静置至上层半固体培养基凝固。于宿主菌最佳培养条件下倒置培养3 h~8 h,统计噬菌斑个数,按照 B.4.2.3要求,根据公式(B.1)计算噬菌体效价,三个平行结果取算术平均值。该试验重复三次,报告结果取三次噬菌体效价的算术平均值,结果保留2位有效数字。

$$\text{噬菌体效价} = \text{噬菌斑数} \times \text{稀释倍数} \dots\dots\dots (B.1)$$

B.4.2 噬菌体裂解效率测定

B.4.2.1 宿主菌稀释

选择用于增殖噬菌体的宿主菌,取1 mL 新鲜制备的宿主菌增殖液,加入9 mL生理盐水中,涡旋混匀,重复上述操作,根据宿主菌增殖液的初始效价直至将宿主菌效价稀释到 1×10^5 CFU/mL。

B.4.2.2 裂解效率测定

取1 mL(1 mg)待测定的菌体制剂样本,加入1 mL浓度为 1×10^5 CFU/mL的宿主菌稀释液中,25 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C,100 rpm振荡孵育30 min,轻轻混匀后用无菌生理盐水将混合液稀释到 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 三个梯度,每个梯度分别取100 μ L加到宿主菌适宜的固体培养基平板上,用无菌涂布器涂布均匀,每个梯度做三个平行,在宿主菌最适培养条件下倒置培养12h~48h。同时,吸取1 mL效价为 1×10^5 CFU/mL的宿主菌稀释液,加入1 mL无菌生理盐水作为空白对照处理,重复上述操作步骤。按照GB4789.2中6.3的规定进行平板上菌落计数,按照公式(B.2)计算噬菌体的裂解效率。该试验重复三次,报告结果取平均值。

$$\text{裂解效率(\%)} = (1 - \text{处理组菌落数} / \text{对照组菌落数}) \times 100\% \dots\dots\dots (B.2)$$

B.4.2.3 计算要求及允许误差范围

噬菌斑数量根据GB4789.2中6.3的规定菌落计数原则进行计数。从接种后的三个稀释度中,选择一个合适的稀释度,进行噬菌斑计数或菌落计数,同一稀释度三个重复的菌数或噬菌斑数相近。三次重复试验测定结果的相对偏差 $\leq 20\%$,以三次测定结果的算术平均值为最终测定结果。