

# 凡例、品种正文和附录标准

## 目 录

一、凡例（标准草案） .....	5
二、品种正文 .....	12
I. 灭活疫苗 .....	12
1.牛多杀性巴氏杆菌病（B型）灭活疫苗（标准草案） .....	12
2.羊大肠杆菌病灭活疫苗（标准草案） .....	14
3.羊黑疫灭活疫苗（标准草案） .....	16
4.羊快疫灭活疫苗（标准草案） .....	18
5.羊猝狙灭活疫苗（标准草案） .....	20
6.羔羊痢疾灭活疫苗（标准草案） .....	23
7.羊肠毒血症灭活疫苗（标准草案） .....	26
8.猪多杀性巴氏杆菌病（B型）灭活疫苗（标准草案） .....	29
9.猪链球菌病灭活疫苗（猪链球菌2型）（标准草案） .....	31
10.猪支原体肺炎灭活疫苗（标准草案） .....	32
11.猪伪狂犬病灭活疫苗（标准草案） .....	34
12.猪细小病毒病灭活疫苗（标准草案） .....	35
13.口蹄疫灭活疫苗（标准草案） .....	37
14.猪丹毒灭活疫苗（标准草案） .....	39
15.狂犬病灭活疫苗（标准草案） .....	41
16.新城疫灭活疫苗（标准草案） .....	43
17.传染性法氏囊病灭活疫苗（标准草案） .....	45
18.禽流感（H9亚型）灭活疫苗（标准草案） .....	46
19.高致病性禽流感灭活疫苗（标准草案） .....	48
20.禽多杀性巴氏杆菌病（A型）灭活疫苗（标准草案） .....	50
21.鸡传染性鼻炎灭活疫苗（标准草案） .....	51
22.鸡毒支原体灭活疫苗（标准草案） .....	52
23.兔出血症灭活疫苗（标准草案） .....	54
24.兔产气荚膜梭菌病（A型）灭活疫苗（标准草案） .....	56
25.鸡传染性支气管炎灭活疫苗（标准草案） .....	57
II. 活疫苗 .....	59
1.小反刍兽疫活疫苗（标准草案） .....	59
2.布鲁氏菌病活疫苗（标准草案） .....	61
3.山羊痘/绵羊痘活疫苗（标准草案） .....	63
4.猪丹毒活疫苗（标准草案） .....	65
5.猪多杀性巴氏杆菌病（B型）活疫苗（暂不刊载） .....	67
6.猪日本脑炎活疫苗（标准草案） .....	67
7.猪伪狂犬病活疫苗（标准草案） .....	69
8.猪瘟活疫苗（标准草案） .....	71
9.仔猪副伤寒活疫苗（标准草案） .....	74
10.猪败血性链球菌病活疫苗（标准草案） .....	76
11.水貂犬瘟热活疫苗（标准草案） .....	78
12.鸡球虫病活疫苗（标准草案） .....	80

13.新城疫活疫苗（标准草案） .....	84
14.传染性法氏囊病活疫苗（低毒力）（标准草案） .....	86
15.鸡传染性支气管炎活疫苗（标准草案） .....	88
16.鸡马立克氏病活疫苗（标准草案） .....	90
17.鸡传染性喉气管炎活疫苗（标准草案） .....	92
18.鸡痘活疫苗（标准草案） .....	94
19.鸭瘟活疫苗（标准草案） .....	96
20.鸡毒支原体活疫苗（标准草案） .....	98
21.禽多杀性巴氏杆菌病（A型）活疫苗（标准草案） .....	100
III. 抗体.....	102
1.破伤风抗毒素（标准草案） .....	102
IV. 诊断试剂 .....	104
1.提纯牛型结核菌素（标准草案） .....	104
2.提纯副结核菌素（标准草案） .....	106
3.提纯禽型结核菌素（标准草案） .....	108
4.鼻疽菌素（标准草案） .....	110
三、附录.....	112
●3000 生物制品通用要求.....	112
3002 兽用生物制品的标签、说明书与包装（标准草案） .....	112
3003 兽用生物制品的贮藏、运输及使用（标准草案） .....	112
3004 兽用生物制品的组批与分装（标准草案） .....	113
3005 生产和检验用菌（毒、虫）种通用要求（标准草案） .....	114
3007 兽用生物制品国家标准物质的制备与标定（标准草案） .....	115
3008 动物源性原材料的通用要求（标准草案） .....	116
3009 兽用生物制品生产用原材料及辅料的通用要求（标准草案） .....	117
3010 安全检验的通用要求（标准草案） .....	120
3011? ★新增附录 禽安全检验（标准草案） .....	121
3012? ★新增附录 小鼠安全检验（标准草案） .....	121
3013? ★新增附录 豚鼠安全检验（标准草案） .....	122
3014? ★新增附录 羊安全检验（标准草案） .....	122
3015? ★新增附录 牛安全检验（标准草案） .....	123
3016? ★新增附录 猪安全检验（标准草案） .....	124
3017? ★新增附录 犬安全检验（标准草案） .....	124
3018? ★新增附录 猫安全检验（标准草案） .....	125
3019? ★新增附录 兔安全检验（标准草案） .....	126
3020? ★新增附录 细菌灭活疫苗的通用要求（标准草案） .....	126
3021? ★新增附录 细菌活疫苗的通用要求（标准草案） .....	127
3022? ★新增附录 病毒灭活疫苗的通用要求（标准草案） .....	128
3023? ★新增附录 病毒活疫苗的通用要求（标准草案） .....	129
3024? ★新增附录 基因工程亚单位疫苗的通用要求（标准草案） .....	129
3025? ★新增附录 外源病毒检验的通用要求（标准草案） .....	130
●3100 物理检验法 .....	133
3101 pH 值测定法（标准草案） .....	133
3102 黏度测定法（标准草案） .....	134

3103	真空度测定法（标准草案）	137
3104	最低装量检查法（标准草案）	137
3105?	★新增附录 性状检验（标准草案）	138
●3200	化学残留物测定法	140
3201	苯酚（石炭酸）残留量测定法（标准草案）	140
3202	汞类防腐剂残留量测定法（标准草案）	140
3203	甲醛残留量测定法（标准草案）	141
3204	剩余水分测定法（标准草案）	142
3205?	★新增附录 辛酸残留量测定法（标准草案）	143
●3300	微生物检查法	144
3301	布鲁氏菌菌落结晶紫染色法（标准草案）	144
3302	禽白血病病毒检验法（标准草案）	144
3303	禽沙门氏菌检验法（标准草案）	147
3304	禽网状内皮组织增生症病毒检验法（标准草案）	147
3305	外源病毒检验法（标准草案）	148
3306	无菌检验或纯粹检验法（标准草案）	150
3307	杂菌计数和病原性鉴定法（标准草案）	154
3308	支原体检验法（标准草案）	154
3309	（空白）	158
3310?	★新增附录 鸡传染性贫血病毒检验法（标准草案）	158
3311?	★新增附录 禽腺病毒 III 群抗原/抗体间接免疫荧光检测法（标准草案）	159
3312?	★新增附录 禽偏肺病毒（B 亚群）抗原/抗体间接免疫荧光检测法（标准草案）	161
3313?	★新增附录 禽腺病毒 I 群抗原/抗体间接免疫荧光检测法（标准草案）	163
3314?	★新增附录 支原体检验法（指示细胞培养法）（标准草案）	164
●3400	生物活性/效价测定法	166
3401	半数保护量（PD <sub>50</sub> ）测定法（标准草案）	166
3402	病毒半数致死量、感染量、有效感染量（LD <sub>50</sub> 、ELD <sub>50</sub> 、ID <sub>50</sub> 、EID <sub>50</sub> 、TCID <sub>50</sub> 、ED <sub>50</sub> ）测定法（标准草案）	167
3403	红细胞凝集试验法（标准草案）	167
3404	红细胞凝集抑制试验法（标准草案）	168
3405	活菌（芽孢）计数法（标准草案）	170
3406	中和试验法（标准草案）	171
3407	狂犬病灭活疫苗小鼠效力检验法（NIH 法）（标准草案）	172
3408?	★新增附录 球虫孢子化卵囊计数法（标准草案）	173
3409?	★新增附录 气管环纤毛摆动停滞试验（标准草案）	174
●3500	特定生物原材料/动物	175
3501	生产、检验用动物标准（标准草案）	175
3502	生产用细胞标准（标准草案）	176
3503	生物制品生产和检验用牛血清质量标准（标准草案）	178
3504	检验用细胞单层制备法（标准草案）	179
3505	兽用生物制品用胰酶质量标准（标准草案）	180
●3600	特定辅料	182
3601	丁基橡胶瓶塞质量标准（标准草案）	182
3602	管制玻璃瓶质量标准（标准草案）	183

3603 氢氧化铝胶质量标准（标准草案） .....	184
3604 兽用液体疫苗塑料瓶质量标准（标准草案） .....	187
3605 注射用白油（轻质矿物油）质量标准（标准草案） .....	189
●3700 试剂、试液、培养基.....	193
3701 标准溶血比色液配制法（标准草案） .....	193
3702 红细胞悬液制备法（标准草案） .....	193
3703 缓冲溶液配制法（标准草案） .....	194
3704 检验用培养基配制法（标准草案） .....	198
●3800 生物安全防控.....	203
3801 活毒废水灭活效果检测法（标准草案） .....	203

标准草案 yaodianbanshengyao

## 一、凡例（标准草案）

### 凡 例

### 总 则

一、《中华人民共和国兽药典》（简称《中国兽药典》）依据《兽药管理条例》组织制定和颁布实施，是国家监督管理兽药质量的法定技术标准。

《中国兽药典》由一部、二部和三部组成。除特别注明版次外，《中国兽药典》均指现行版《中国兽药典》。

本部为《中国兽药典》三部。

二、《中国兽药典》三部内容主要包括凡例、品种正文和附录。

凡例系正确使用《中国兽药典》进行质量检定的基本原则，是对《中国兽药典》品种正文、附录及与质量检定有关的共性问题的统一规定。

品种正文为《中国兽药典》各品种项下收录的同类制品的国家标准规定。

附录主要包括《中国兽药典》收录的通用要求、检测方法等。

三、本版兽药典收录的凡例和附录对未载入本版兽药典的其他兽用生物制品具有同等效力。

四、凡例和附录中采用“除另有规定外”这一用语，表示存在与凡例或附录有关规定不一致的情况时，则在品种正文中另作规定，并按此规定执行。

五、正文所设各项规定是针对符合《兽药生产质量管理规范》（Good Manufacturing Practices for Veterinary Drugs，简称兽药 GMP）的制品而言。任何违反兽药 GMP 或有未经批准添加物质所生产的兽药，即使符合《中国兽药典》或按照《中国兽药典》不能检出其添加物质、相关杂质，以及检出暂不能定性为何物质，均不能认为其符合规定。

六、兽用生物制品研究、生产和检验单位必须遵守《生物安全法》《动物防疫法》《兽药管理条例》《病原微生物实验室生物安全管理条例》《兽医实验室生物安全管理规范》《高致病性动物病原微生物实验室生物安全管理审批办法》等规定，防止散毒，确保生物安全。

七、《中国兽药典》的英文名称为 Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China；英文简称为 Chinese Veterinary Pharmacopoeia；英文缩写为 CVP。

### 品 种 正 文

八、本部兽药典各品种项下收录的内容统称为品种正文，系根据兽用生物制品自身的理化性质与生物学特性，按照其生产用原材料、生产工艺、贮藏、运输条件等所制定的、用以检测兽用生物制品质量是否达到兽药要求并衡量其质量是否稳定均一的技术规定。

九、正文项下根据制品类别不同，按顺序分别列有：品名（包括中文通用名称、汉语拼音名和英文名）；1 定义；2 菌（毒、虫）种（包括下列项目中部分项目）形态特性、生化特性、培养特性、分型鉴定、安全性（或毒力）、免疫原性、纯净（或纯粹）、代次限定；3 生产用原辅料；4 成品检验（包括下列项目中部分项目）无菌检验、纯粹检验、纯度检验、支原体检验、外源病毒检验、鉴别检验、安全检验、病毒含量测定、活菌计数、卵囊计数、效力检验、甲醛、苯酚和/或汞类防腐剂残留量测定、剩余水分测定、真空度测定；5 注意事项等。

## 附 录

十、附录主要收载兽用生物制品通用管理规定、检测方法、特定生物原材料和辅料的质量标准以及试剂培养基等配制方法。

兽用生物制品通用管理规定系为兽用生物制品生产企业生产与质量管理的原则性要求。包括兽用生物制品的标签、说明书与包装，兽用生物制品的贮藏、运输及使用，兽用生物制品的组批与分装，生产和检验用菌（毒、虫）种通用要求，兽用生物制品国家标准物质的制备与标定，动物源性原材料的通用要求，兽用生物制品生产用原材料及辅料的通用要求，安全检验的通用要求，外源病毒检验的通用要求，细菌灭活疫苗的通用要求，细菌活疫苗的通用要求，病毒灭活疫苗的通用要求，病毒活疫苗的通用要求，基因工程亚单位疫苗的通用要求等。

检测方法系各正文品种进行特定项目检验时应采用的统一的设备、方法及限度等。

特定生物原材料和辅料的质量标准系兽用生物制品生产企业对生产用原材料和辅料进行检验的指导性要求。包括生物制品生产和检验用牛血清质量标准、检验用细胞单层制备法、兽用生物制品用胰酶质量标准、活毒废水灭活效果检测法。

## 名称与编排

十一、本版兽药典收载的兽用生物制品的中文通用名称系参照《兽用生物制品通用命名指导原则》中要求命名，本部兽药典收载的中文通用名称均为法定通用名称，英文名称系采用国际惯用名称。

十二、本版兽药典品种正文收载的兽用生物制品包括灭活疫苗、活疫苗、抗体和体内诊断试剂4个部分，分别按汉语拼音顺序排列；附录按分类编码排列；中文索引按汉语拼音顺序排序，英文索引对照中文索引排序。

## 基本要求

### 十三、菌（毒、虫）种

1 生产、检验用菌（毒、虫）种繁殖、检定、保藏、供应以及销毁应当遵守生产和检验用菌（毒、虫）种通用要求（附录 3005）的相关规定。品种正文中的菌（毒、虫）种系指基础菌（毒、虫）种。

2 国家兽医微生物菌（毒）种保藏中心为国务院兽医行政管理部门指定的菌（毒、虫）种保藏机构，负责收集、保藏、鉴定、供应和交换各类兽医微生物菌（毒、虫）种和传代细胞系等。兽用生物制品生产和检验用菌（毒、虫）种、细胞等材料以及鉴定资料应当提交至该中心保藏。

### 十四、原材料和辅料

1 制品中使用的原材料，如动物组织、细胞、培养细胞用牛血清、消化细胞用的胰蛋白酶应来源于无牛海绵状脑病、痒病地区的健康群体，应符合“特定生物原材料/动物”（附录 3500）相关规定。

2 制品中使用的辅料，其质量应符合“特定辅料”（附录 3600）的相关规定。

3 佐剂、冻干保护剂各组分应符合本版兽药典或其他相关标准要求。

### 十五、成品质量控制

1 **性状检验** 兽用生物制品必须符合其“性状检验”项下的要求，除另有规定外，矿物油佐剂疫苗的黏度应不超过 200cP。

2 **无菌检验** 除另有规定外，每批制品均应按规定进行无菌检验，且应无菌生长。

**3 支原体检验** 除另有规定外,每批病毒类活疫苗均应按规定进行支原体检验,且应无支原体生长。

**4 外源病毒检验** 除另有规定外,每批病毒类活疫苗均应按规定进行外源病毒检验,且应无外源病毒污染。

**5 活菌(芽孢、卵囊)计数** 每批制品任抽3个样品,分别计数,以其中最低菌数核定制品的每头份菌(卵囊)数或头份数。若成品同时规定每头份菌(卵囊)数上下限的,3个样品的菌(卵囊)数均应符合规定范围。

**6 病毒含量测定** 除另有规定外,每批任抽1瓶,按各制品质量标准的规定进行检验和判定。每头份/羽份活疫苗病毒含量应不低于说明书标示量。

**7 安全检验** 各种制品的安全检验,除另有规定外,每批抽取不少于3瓶,混合后,按各制品质量标准规定进行检验和判定。

7.1 使用的动物必须符合其制品质量标准规定的要求。如果安全检验动物出现死亡,须明确原因,确属意外死亡时,且死亡数量超过规定数量时,本次检验作无结果论,可重检1次;如果重检结果可疑,难以判定时,应以增加一倍数量的同种动物重检;如果重检结果仍可疑,难以判定,则该批制品应判为不符合规定。

7.2 凡规定用多种动物进行安全检验的制品,如果有一种动物的安全检验结果不符合该制品质量标准规定,则该批制品应判为不符合规定。

**8 效力检验** 各种制品的效力检验,除另有规定外,每批任抽1瓶,按照各制品质量标准的规定进行检验和判定。

8.1 使用的动物必须符合其制品质量标准中规定的要求。凡规定多种检验方法时,任一种方法的检验结果不符合该制品质量标准规定,则该批制品应判为不符合规定。

8.2 效力检验中的免疫动物有意外死亡时,以发病保护作为判定标准的,如果存活数量仍能达到规定的保护数量以上,可以进行攻毒和结果判定;以几何平均值或算术平均值作为判定标准的,如果存活数达到免疫数的80%及以上,可以进行结果判定。

8.3 在效力检验中攻击强毒时,免疫动物与对照动物必须同时进行。对免疫动物攻毒时,应尽量避免在接种疫苗的同一部位进行。

**8.4 效力重检和判定**

8.4.1 应对首次检验结果作详细分析,当检验结果受到其他因素影响,不能正确反映制品质量时,除另有规定外,可用原方法重检1次,按重检结果进行判定。

8.4.2 对不规律的效力检验结果,如高稀释度(或低剂量)合格,低稀释度(或高剂量)不符合规定,判定为无结果;重检后仍为无结果,则该批制品应判为不符合规定。

8.4.3 效力检验中,攻毒后对照动物的发病数达不到规定数而免疫动物保护数达到规定数时,判为无结果;重检后仍为无结果,则该批制品应判为不符合规定。当对照动物发病数和免疫动物保护数均达不到规定数时,则该批制品应判为不符合规定。

**8.5 效力检验用强毒,应使用国家标准菌(毒、虫)种或经批准使用的菌(毒、虫)种。**

**9 真空度测定** 真空干燥类制品应在包装前测定真空度,无真空的制品,应予剔除报废。

**10 剩余水分测定** 每批干燥制品任抽4个样品,各样品剩余水分均应不超过4.0%。如果有超过时,可重检1次;重检后如果有1个样品超过规定,则该批制品应判为不符合规定。

## 11 甲醛、苯酚和/或汞类防腐剂残留量测定

11.1 含梭状芽孢杆菌的制品中，甲醛残留量不得超过 0.50%的甲醛溶液（含 40%甲醛）量；其他制品中应不超过 0.20%甲醛溶液（含 40%甲醛）量。

11.2 制品中的苯酚残留量应不超过 0.50%。

11.3 制品中的汞类防腐剂残留量应不超过 0.010%。

**十六、生产、检验用动物** 生产、检验用动物应符合生产、检验用动物标准（附录 3501）的相关规定。

**十七、贮藏、运输和使用** 制品贮藏、运输和使用应符合兽用生物制品的贮藏、运输及使用（附录 3003）的相关规定。

## 十八、其他要求

**1 抽样和留样** 按照国家有关规定进行抽样和留样。同批疫苗分为若干个亚批时，必须按亚批进行抽样、留样和检验。

**2 关于外源病毒检验** 用同一批生产种子和同一批原材料（动物、组织、胚胎、细胞培养物）制造的同批病毒类活疫苗，可任抽一亚批进行外源病毒检验以代表全批。

### 3 关于成品效力检验

3.1 活疫苗 对于成品项下有病毒含量测定或活菌（芽孢、卵囊）计数项的，企业不需对每批产品进行效力检验，但在更换种子批、关键生产工艺变更、重要原材料变更等情况下，应采用免疫攻毒法对代表性批次进行效力检验。

3.2 灭活疫苗 当效力检验项下列有两种或多种检验方法时，可仅用一种方法进行检验；当效力检验项含有血清学和免疫攻毒两种或多种检验方法时，企业可优先采用血清学方法进行检验；当效力检验项含有非靶动物和靶动物检验方法时，企业可优先采用非靶动物进行检验；当效力检验仅有靶动物免疫攻毒方法，企业可采用经批准的其他方法进行检验。

在更换种子批、关键生产工艺变更、重要原材料变更时，应采用靶动物免疫攻毒法对代表性批次进行效力检验。

**4 对照组的设立** 应按规定设立对照组。对照组的結果必须符合规定，试验才成立。对照组动物的各项状态指标（如品种、年龄、来源、体重等）和饲养管理条件应与试验组动物一致。

**5 制品的有效期计算** 灭活制品自分装日开始；抗血清自分离血清日开始；液体活疫苗自分装日开始；冻干制品自冻干完成日开始。

**6 关于联苗或多价疫苗** 原则上，联苗或多价疫苗中各组分的标准均应与不低于本药典同品种标准。

## 检验方法和限度

**十九、** 本版兽药典正文收載的所有品种，均应按规定的方法进行检验。

**二十、** 本版兽药典中规定的各种纯度和限度数值以及制品的重（装）量差异，系包括上限和下限两个数值本身及中间数值，规定的这些数值不论是百分数还是绝对数字，其最后一位数字都是有效位。

试验结果在运算过程中，可比规定的有效数字多保留一位数，而后根据《数值修约规则与极限数值的表示与判定》（GB/T 8170-2008）采用全数值比较法，不经修约处理，取数值与标准中规定的限度数值比较，以判定是否符合规定的限度。

试验结果不需要运算的，采用全数值比较法，不经修约处理，将试验得到的结果与标准中规定的数值比较，以判定是否符合规定的限度。

## 标准物质

二十一、标准物质包括国家标准品及参考品，系指用于兽用生物制品效价、活性和含量等质量检验或对其特性鉴别、检查或技术验证的标准品、参考品。其制备与标定应符合兽用生物制品国家标准物质的制备与标定（附录 3007）要求。

工作标准品系指质量控制、实验室分析、日常检测和校准或方法验证的参照物质。国家标准品或参考品建立后，工作标准品或参考品必须采用国家标准品或参考品标化后方能使用。

## 计 量

二十二、试验用的计量仪器均应符合国务院质量技术监督部门的规定。

### 二十三、本版兽药典采用的计量单位

1 法定计量单位名称和单位符号如下：

长度	米 (m)	分米 (dm)	厘米 (cm)
	毫米 (mm)	微米 ( $\mu\text{m}$ )	纳米 (nm)
体积	升 (L)	毫升 (ml)	微升 ( $\mu\text{l}$ )
质 (重) 量	千克 (kg)	克 (g)	毫克 (mg)
	微克 ( $\mu\text{g}$ )	纳克 (ng)	皮克 (pg)
物质的量	摩尔 (mol)	毫摩尔 (mmol)	
压力	兆帕 (MPa)	千帕 (kPa)	帕 (Pa)
温度	摄氏度 ( $^{\circ}\text{C}$ )		
黏度	厘泊 (cP)		

2 本版兽药典使用的滴定液和试液的浓度，以 mol/L（摩尔/升）表示者，其浓度要求精密标定的滴定液用“XXX 滴定液 (YYYmol/L)”表示，作其他用途不需精密标定其浓度时，用“YYYmol/L XXX 溶液”表示，以示区别。

3 有关的温度描述，一般以下列名词术语表示：

室温（常温）	系指 10~30 $^{\circ}\text{C}$ 。
冷水	系指 2~10 $^{\circ}\text{C}$ 。
冰浴	系指约 0 $^{\circ}\text{C}$ 。
冷藏	系指 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 。
冷冻	除另有规定外，系指 -15 $^{\circ}\text{C}$ 以下。

4 符号“%”表示百分比，系指重量的比例；但溶液的百分比，除另有规定外，系指溶液 100ml 中含有溶质若干克；乙醇的百分比，系指在 20 $^{\circ}\text{C}$  时容量的比例。此外，根据需要可采用下列符号：

% (g/g)	表示溶液 100g 中含有溶质若干克。
% (ml/ml)	表示溶液 100ml 中含有溶质若干毫升。
% (ml/g)	表示溶液 100g 中含有溶质若干毫升。

% (g/ml) 表示溶液 100ml 中含有溶质若干克。

5 液体的滴，除另有规定外，系指在 20℃ 时，以 1.0ml 水为 20 滴进行换算。

6 溶液后标示的“(1→10)”或“1:10”或 10 倍等符号和文字，系指固体溶质 1.0g 或液体溶质 1.0ml 加溶剂使成 10ml 的溶液；未指明用何种溶剂时，均系指水溶液；两种或两种以上液体的混合物，名称间用半字线“-”隔开，其后括号内所示的“:”符号，系指各液体混合时的体积（重量）比例。

## 精 确 度

二十四、本版兽药典规定取样量的准确度和试验精密度。

1 试验中供试品与试药等“称重”或“量取”的量，均以阿拉伯数码表示，其精确度可根据数值的有效数位来确定。如：

称取“0.1g”，系指称取重量可为 0.06~0.14g。

称取“2g”，系指称取重量可为 1.5~2.5g。

称取“2.0g”，系指称取重量可为 1.95~2.05g。

称取“2.00g”，系指称取重量可为 1.995~2.005g。

“精密称定”系指称取重量应准确至所取重量的千分之一。

“称定”系指称取重量应准确至所取重量的百分之一。

“精密量取”系指量取体积的准确应符合国家标准中对该体积移液管的精密度要求；“量取”系指可用量筒或按照量取体积的有效数位选用量具。取用量为“约”若干时，系指取用量不得超过规定量的±10%。

2 恒重 除另有规定外，恒重系指供试品连续两次干燥或炽灼后的重量差异在 0.3mg 以下的重量；干燥至恒重的第二次及以后各次称重均应在规定条件下继续干燥 1 小时后进行；炽灼至恒重的第二次称重应在继续炽灼 30 分钟后进行。

3 试验中规定“按干燥品（或无水物，或无溶剂）计算”时，除另有规定外，应取未经干燥（或未去水、或未去溶剂）的供试品进行试验，并将计算中的取用量按检查项下测得的干燥失重（或水分、或溶剂）扣除。

4 试验中的“空白试验”，系指在不加供试品或以等量溶剂替代供试液的情况下，按同法操作所得的结果；含量测定中的“并将滴定的结果用空白试验校正”，系指按供试品所耗滴定液的量（ml）与空白试验中所耗滴定液的量（ml）之差进行计算。

5 试验时的温度，未注明者，系指在室温下进行；温度高低对试验结果有显著影响者，除另有规定外，应以 25℃±2℃ 为准。

## 标签、说明书、包装

二十五、兽用生物制品标签、说明书、包装应符合附录 3002 相关规定。

## 英文常用名缩写与注释

CCU	颜色变化单位	IFA	免疫荧光测定
CFU	菌落形成单位	IU	国际单位
CPE	致细胞病变效应	LD <sub>50</sub>	半数致死量

CVCC	国家兽医微生物菌（毒）种保藏中心	MEM	最低必需培养基
DNA	脱氧核糖核酸	MID	最小感染量
ED <sub>50</sub>	半数有效量	MLD	最小致死量
EID <sub>50</sub>	半数胚感染量	PBS	磷酸盐缓冲溶液
ELISA	酶联免疫吸附试验	PCR	聚合酶链反应
ELD <sub>50</sub>	半数胚致死量	PD <sub>50</sub>	半数保护量
EU	内毒素单位	PFU	蚀斑形成单位
GMP	生产质量管理规范	RNA	核糖核酸
HA	红细胞凝集反应	SPF	无特定病原体
HI	红细胞凝集抑制反应	TCID <sub>50</sub>	半数细胞培养物感染量
ID <sub>50</sub>	半数感染量		

标准草案 yaodianbanshengyao

## 二、品种正文

### 1. 灭活疫苗

#### 1. 牛多杀性巴氏杆菌病（B 型）灭活疫苗（标准草案）

##### 牛多杀性巴氏杆菌病（B 型）灭活疫苗

Niu Duoshaxingbashiganjunbing (B Xing) Miehuoyimiao

##### **Bovine *Pasteurella multocida* Vaccine (Type B), Inactivated**

**1 定义** 本品系用牛源 B 型多杀性巴氏杆菌接种适宜培养基培养，收获培养物，灭活后加适宜佐剂制成。用于预防由 B 型多杀性巴氏杆菌引起的牛多杀性巴氏杆菌病。

##### **2 菌种**

2.1 形态特性 应为革兰氏阴性球杆菌。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中多杀性巴氏杆菌的生化特性。

2.3 培养特性 在含有 4.0% 新生小牛血清及 0.1% 裂解绵羊血细胞全血的（改良）马丁琼脂平板上，36~37°C 培养 16~20 小时，肉眼观察，菌落表面光滑，呈微蓝色。在低倍显微镜下，45 度折光观察，边缘整齐，呈鲜明的蓝绿色虹彩，边缘的一部分有狭窄的红黄光带，属于 Fg 菌落型。

2.4 血清型鉴定 采用血清学方法或分子生物学定型法分型鉴定，应为 B 型。

2.5 安全性 将菌种制备灭活疫苗。

2.5.1 对小鼠的安全性 用体重 18~22g 小鼠 10 只，各皮下注射疫苗不少于 0.3ml，观察 21 日。接种鼠应全部健活，精神、食欲与接种前无明显变化，且注射局部应不发生坏死、破溃；如出现精神不振、食欲减退等现象，应在 4 日内恢复。

2.5.2 对家兔的安全性 用体重 1.5~2kg 健康易感家兔 5 只，各皮下注射疫苗至少 1 个推荐使用剂量，观察 21 日。接种兔应全部健活，精神、食欲与接种前无明显变化，且注射局部应不发生坏死、破溃；如出现精神不振、食欲减退等现象，应在 4 日内恢复。

2.5.3 对牛的安全性 用推荐使用最小日龄健康易感牛 5 头，各经推荐使用途径（如皮下注射、肌肉注射）注射疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 21 日。接种牛应全部健活，精神、食欲与接种前无明显变化，且注射局部应不发生坏死、破溃；所有牛在接种前观察并测温 3 日，接种后连续测温 7 日，每日测温 1 次，接种后体温与接种前基础体温相比，应不超过 1.5°C，并且应在 3 日内恢复。

2.6 免疫原性 将菌种制备灭活疫苗。用 5~7 月龄健康易感牛 5 头，各经推荐使用途径（如皮下注射、肌肉注射）注射疫苗 1 个最小免疫剂量，接种后 21 日，连同对照牛 5 头，各皮下注射多杀性巴氏杆菌强毒菌液 10MLD，至少观察 14 日。对照牛应至少死亡 3 头；免疫牛应至少存活 3 头，且存活牛在观察期末，应不出现体温升高（超过基础体温 1.5°C），精神不振、食欲减退等败血性症状。

2.7 纯粹 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

2.8 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 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

4.2.1 用小鼠检验 用体重 18~22g 小鼠 5 只, 各皮下注射疫苗不少于 0.3ml, 观察 10 日, 应全部健活。

4.2.2 用家兔检验 用体重 1.5~2kg 健康易感兔 2 只, 各皮下注射疫苗不少于 1 个推荐使用剂量, 观察 10 日。接种兔精神、食欲与接种前无明显变化, 且注射局部不应发生坏死、破溃, 应全部健活。

#### 4.3 效力检验

4.3.1 用兔检验 用体重 1.5~2kg 多杀性巴氏杆菌抗体阴性健康兔 4 只, 各皮下(或肌肉)注射 1/4 个推荐使用剂量。接种后 21 日, 连同对照兔 2 只, 各皮下注射 1MLD 的 B 型多杀性巴氏杆菌强毒菌液, 观察 8 日。对照兔应全部死亡; 免疫兔应至少存活 2 只, 且存活兔在观察期末, 应不出现体温升高、精神不振、食欲减退等败血性症状。

4.3.2 用牛检验 用 5~8 月龄健康易感牛 4 头, 各皮下(或肌肉)注射疫苗 1 个推荐使用剂量。接种后 21 日, 连同对照牛 3 头, 各皮下注射 10MLD 的 B 型多杀性巴氏杆菌强毒菌液, 观察 14 日。对照牛应至少死亡 3 头; 免疫牛应至少存活 3 头, 且存活牛在观察期末, 应不出现体温升高(超过基础体温 1.5℃), 精神不振、食欲减退等败血性症状。

4.4 甲醛残留量测定 按附录 3203 进行测定, 应符合规定。

标准草案 yaodianbanshengyao

## 2.羊大肠杆菌病灭活疫苗（标准草案）

### 羊大肠杆菌病灭活疫苗

Yang Dachangganjunbing Miehuoyimiao

#### Ovine /Caprine Colibacillosis Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用适宜大肠杆菌接种适宜培养基培养，收获培养物，灭活后加适宜佐剂制成。用于预防绵羊、山羊败血型大肠杆菌病。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阴性杆菌。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中大肠杆菌的生化特性。

2.3 培养特性 在普通琼脂平板上，36~37℃培养 24 小时，菌落光滑圆整；普通肉汤培养 24 小时，呈均匀混浊。用吡啶黄作玻片凝集试验为阴性。

2.4 血清型鉴定 用大肠杆菌 O、K 单因子血清鉴定，应符合菌种的血清型特征。

2.5 安全性 将菌种制备灭活疫苗，用推荐使用最小日龄健康易感绵羊或山羊不少于 5 只，各经推荐使用途径接种疫苗至少 2 个推荐使用剂量，观察至少 21 日。逐日观察接种羊饮食、精神状态、行动、粪便、体温等全身反应情况，允许在注射疫苗后出现体温升高（高于基础体温 1.0℃，但不高于基础体温 2.0℃）、不食及跛行等反应，但 48 小时内应恢复正常，48 小时后应不出现精神沉郁、不愿走动、厌食、腹泻等临床症状，体温应不高于基础体温 1℃。注射疫苗后观察注射部位，应无破溃、坏死等情况，如出现注射局部肿胀，应在 14 日内消除。

2.6 免疫原性 将菌种制备灭活疫苗。

2.6.1 用 2~3 月龄健康易感绵羊或山羊 5 只，各经推荐使用途径接种疫苗最小免疫剂量，免疫后 14 日，连同对照羊 5 只，各皮下注射对羊的 1MLD 大肠杆菌强毒菌液，观察 21 日。对照组羊应至少死亡 3 只，免疫组羊允许在攻毒后出现体温升高（高于基础体温 1.0℃，但不高于基础体温 2.0℃）、不食及跛行等反应，但 3 日内应恢复正常，3 日后应不出现精神沉郁、不愿走动、跛行、厌食、腹泻等临床症状，体温应不高于基础体温 1.0℃，攻毒后 21 日剖检免疫组羊，心、肝、脾、肾、肠道均应无肉眼可见病变。

2.6.2 用体重 300~400g 豚鼠 10 只，各皮下注射疫苗 1/2 个推荐使用剂量，免疫后 14 日，连同对照豚鼠 5 只，各腹腔注射对豚鼠 1MLD 大肠杆菌强毒菌液，观察 21 日。对照豚鼠应全部死亡，免疫豚鼠应至少 7 只健活。

2.7 纯粹 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

2.8 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 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 3~8 月龄羊 2 只，每只皮下注射疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 10 日，应全部健活。接种后允许有体温升高、不食及跛行等反应，但应在 48 小时内恢复。

4.3 效力检验

4.3.1 用豚鼠检验 用体重 300~400g 豚鼠 4 只，各皮下注射疫苗 1/2 个推荐使用剂量，免疫后 14 日，连同对照豚鼠 2 只，各腹腔注射对豚鼠的 1MLD 大肠杆菌攻毒菌液，观察 10 日。对照豚鼠应全部死亡，免疫豚鼠应至少 3 只健活保护。

4.3.2 用羊检验 用 2~3 月龄健康易感绵羊 4 只，各经推荐使用途径接种疫苗 1 个推荐使用剂量，免疫后 14 日，连同对照羊 3 只，各皮下注射对羊 1MLD 大肠杆菌强毒菌液，观察 10 日。对照羊应至少 2 只死亡，免疫羊允许在攻毒后出现体温升高（高于基础体温 1.0℃，但不高于基础体温 2.0℃）、不食及跛行等反应，但 3 日内应恢复正常。

4.4 甲醛、苯酚和汞类防腐剂残留量测定 分别按附录 3203、3201 和 3202 进行测定，应符合规定。

**5 注意事项** 严禁接种怀孕羊。

标准草案 yaodianbanshengyao

### 3.羊黑疫灭活疫苗（标准草案）

#### 羊黑疫灭活疫苗

Yang Heiyi Miehuoyimiao

#### Ovine/Caprine Black Disease Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用 B 型诺维梭菌接种适宜培养基培养，收获培养物，灭活脱毒后加适宜佐剂制成。用于预防绵羊、山羊黑疫。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阳性大杆菌，可形成偏端芽孢，但人工培养不易形成。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中诺维梭菌的生化特性。

2.3 培养特性 在厌氧肉肝汤中生长，初为一致浑浊，后变清并产生絮状沉淀，产气。在普通琼脂斜面上和普通肉汤中不生长。在鲜血葡萄糖琼脂平板上，在厌氧条件下培养，形成不规则的溶血菌落，周边有树根状分枝。

2.4 血清型鉴定 用诺维梭菌定型血清进行中和试验检查，应为诺维梭菌 B 型（含诺维梭菌  $\alpha$ 、 $\beta$  毒素）。鉴定方法为：取诺维梭菌 B 型定型血清 1.0ml（至少可中和 2000 个小鼠 MLD）和毒素 1.0ml（含 2000 个小鼠 MLD）混合，37°C 作用 45 分钟后，尾静脉注射小鼠 5 只，0.2ml/只。同时用同批小鼠 5 只，每只尾静脉注射 0.2ml 毒素（含 5 个小鼠 MLD）作对照，观察 3 日。对照小鼠应全部死亡，血清中和小鼠应全部存活。

2.5 毒力 接种肉肝胃酶消化汤（接种前按培养基量的 1/10 加入灭菌的铁钉）培养 60~72 小时，以 4000g 离心 15 分钟，取上清，用 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤。将滤液经尾静脉注射体重 16~20g 健康小鼠 5 只，0.0001~0.00025ml/只，应于 72 小时内全部死亡。

2.6 安全性 将菌种制备灭活疫苗。

2.6.1 对家兔的安全性 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只，各肌肉注射疫苗 1 个推荐使用剂量，观察 21 日。应全部健活，精神、呼吸、采食正常，且注射局部应不发生坏死、破溃；所有家兔在接种前观察并测温 3 日，接种后连续测温 7 日，接种后体温与接种前基础体温相比，应不超过基础体温 1.0°C，若超过 1.0°C，但不超过 1.5°C，稽留应不超过 1 个温次。

2.6.2 对绵羊的安全性 用 2~3 月龄健康易感绵羊 4 只，各肌肉注射疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 21 日。应全部健活，精神、呼吸、采食正常，且注射局部应不发生坏死、硬结、破溃；所有绵羊在接种前测温 3 日，接种后连续测温 7 日，接种后体温与接种前基础体温相比，应不超过基础体温 1.0°C，若超过 1.0°C，但不超过 1.5°C，稽留应不超过 1 个温次。

2.7 免疫原性 按照推荐的最小免疫剂量制备灭活疫苗。

#### 2.7.1 血清学方法

2.7.1.1 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只，各肌肉注射疫苗 1/2 个最小免疫剂量。接种后 14~21 日，分别采血，分离血清。将 4 只免疫兔的血清等量混合，取 1.0ml 混合血清与 1.0ml 的诺维梭菌毒素（含 50 个小鼠 MLD）混合，置 37°C 作用 40 分钟，经尾静脉注射 16~20g 小鼠 5 只，0.2ml/只。同时用同批小鼠 5 只，各尾静脉注射含 1 个小鼠 MLD 的诺维梭菌毒素作对照，观察 5 日。对照小鼠应全部死亡，血清中和小鼠应全部存活。

2.7.1.2 用 12 月龄左右体重相近的健康易感绵羊 4 只，各肌肉注射疫苗 1 个最小免疫剂量。接种后 14~21 日，采血，分离血清。将 4 只免疫羊的血清等量混合，取 1.0ml 混合血清与 1.0ml 的诺维梭菌毒素（含 50 个小鼠 MLD）混合，置 37°C 作用 40 分钟，经尾静脉注射 16~20g 小鼠 5 只，0.2ml/只。同时用同批小鼠 5 只，各尾静脉注射 1 个小鼠 MLD 的诺维梭菌毒素作对照，观察 5 日。对照小鼠应全部死亡，血清中和小鼠应全部存活。

## 2.7.2 免疫攻毒法

2.7.2.1 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只, 各肌肉注射疫苗 1/2 个最小免疫剂量, 接种后 21 日, 连同对照兔 2 只, 各皮下注射不低于 50 个家兔 MLD 的诺维梭菌毒素, 观察 5 日。对照兔应全部死亡, 免疫兔应全部保护。

2.7.2.2 用 12 月龄左右体重相近的健康易感绵羊 4 只, 各肌肉注射 1 个最小免疫剂量, 接种后 14~21 日, 连同对照羊 2 只, 各静脉注射不低于 2 个绵羊 MLD 的诺维梭菌毒素, 观察 5 日。对照羊应全部死亡, 免疫羊应全部保护。

2.8 纯粹 按附录 3306 进行检验, 应纯粹。

2.9 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

## 3 生产用原辅料

3.1 培养基 适宜培养基 (如厌气肉肝汤、肉肝胃酶消化汤等), 应符合附录 3009 要求。

3.2 动物源性材料 应符合附录 3008 要求。

3.3 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 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只, 各肌肉注射疫苗 1 个推荐使用剂量, 观察 21 日。应全部健活, 且注射部位应不出现坏死、破溃。

4.3 效力检验

4.3.1 血清学方法 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只, 各肌肉注射疫苗 3/5 个推荐使用剂量。接种后 14~21 日, 分别采血, 分离血清。将 4 只免疫兔的血清等量混合, 取 0.4ml 混合血清与 0.8ml 的诺维梭菌毒素 (含 30 个小鼠 MLD) 混合。置 37°C 作用 40 分钟, 经尾静脉注射 16~20g 小鼠 2 只, 0.2ml/只。同时用同批小鼠 2 只, 每只尾静脉注射含 1 个小鼠 MLD 的诺维梭菌毒素作对照, 观察 3 日。对照小鼠应全部死亡, 血清中和小鼠应全部存活。如果采血时免疫组家兔只剩余 3 只, 可分别用每只家兔血清单独进行中和试验, 若对照小鼠和血清中和小鼠均达上述标准, 亦判为合格。

4.3.2 免疫攻毒法 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只, 各肌肉注射疫苗 3/5 个推荐使用剂量, 接种后 21 日, 连同对照兔 2 只, 各皮下注射不低于 50 个家兔 MLD 的诺维梭菌毒素, 观察 5 日。对照兔应全部死亡, 免疫兔应全部保护。

4.4 甲醛残留量测定 按附录 3203 进行测定, 应符合规定。

## 4.羊快疫灭活疫苗（标准草案）

### 羊快疫灭活疫苗

Yang Kuaiyi Miehuoyimiao

#### Ovine/Caprine Braxy Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用腐败梭菌接种适宜培养基培养，收获培养物，灭活脱毒后加适宜佐剂制成。用于预防绵羊、山羊快疫。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阳性大杆菌，死亡动物肝脏压片检查可见长丝状结构。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中腐败梭菌的生化特性。

2.3 培养特性 在厌氧肉肝汤中生长较快，36~37℃培养 12~20 小时后，呈均匀浑浊状并产生气体，以后培养基渐变透明，在管底形成大量灰白色絮状沉淀。在普通肉汤和普通琼脂斜面上不生长。在葡萄糖鲜血琼脂平板上，36~37℃厌氧培养 24 小时，形成灰白色或半透明、边缘不整、粗糙、微隆起的菌落，周围有较明显的溶血区。菌落很容易融合成片，似压扁的棉絮状菌落，甚至布满平板表面。

2.4 血清型鉴定 用腐败梭菌定型血清进行中和试验检查，应为腐败梭菌毒素（含腐败梭菌  $\alpha$ 、 $\beta$  毒素等）。鉴定方法为：取腐败梭菌定型血清 1.0ml（至少可中和 400 个小鼠 MLD）和毒素 1.0ml（含 400 个小鼠 MLD）混合，37℃作用 45 分钟，经尾静脉注射健康小鼠 5 只，0.2ml/只。同时用同批小鼠 5 只，各尾静脉注射 0.2ml 毒素（含 1 个小鼠 MLD）作对照，连续观察 3 日。对照小鼠应全部死亡，血清中和小鼠应全部存活。

2.5 毒力 将菌种接种肉肝胃酶消化汤培养 24 小时，将培养物经肌肉注射体重 16~20g 健康小鼠 5 只，0.005~0.01ml/只，应于 24 小时内全部死亡；或接种胰酶牛肉消化汤培养 36~48 小时，以 4000g 离心 15 分钟，取上清用 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤，将滤液经尾静脉注射体重 16~20g 健康小鼠 5 只，0.005~0.01ml/只，应于 48 小时内全部死亡。

2.6 安全性 将菌种制备灭活疫苗。

2.6.1 对家兔的安全性 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只，各肌肉注射疫苗 1 个推荐使用剂量，观察 21 日。应全部健活，精神、呼吸、采食正常，且注射局部应不发生坏死、破溃；所有家兔在接种前测温 3 日，接种后连续测温 7 日，接种后体温与接种前基础体温相比，应不超过基础体温 1.0℃，若超过 1.0℃，但不超过 1.5℃，稽留应不超过 1 个温次。

2.6.2 对绵羊的安全性 用 2~3 月龄健康易感易感绵羊 4 只，各经推荐使用的途径（如肌肉注射、皮下注射）接种疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 21 日。应全部健活，精神、呼吸、采食正常，且注射局部应不发生坏死、硬结、破溃；所有绵羊在接种前测温 3 日，接种后连续测温 7 日，接种后体温与接种前基础体温相比，应不超过基础体温 1.0℃，若超过 1.0℃，但不超过 1.5℃，稽留应不超过 1 个温次。

2.7 免疫原性 按照推荐的最小免疫剂量制备灭活疫苗。

#### 2.7.1 血清学方法

2.7.1.1 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只，各肌肉注射 1/2 个最小免疫剂量，接种后 14~21 日，分别采血，分离血清。将 4 只免疫兔的血清等量混合，取 1.0ml 混合血清与 1.0ml 的腐败梭菌毒素（含 10 个小鼠 MLD）混合，置 37℃作用 40 分钟，经尾静脉注射 16~20g 小鼠 5 只，0.2ml/只。同时用同批小鼠 5 只，各尾静脉注射 1 个小鼠 MLD 的腐败梭菌毒素作对照，观察 5 日。对照小鼠应全部死亡，血清中和小鼠应全部存活。

2.7.1.2 用 12 月龄左右体重相近的健康易感绵羊 4 只，各肌肉注射 1 个最小免疫剂量，接种后 14~21 日，分别采血，分离血清。将 4 只免疫羊的血清等量混合，取 1.0ml 混

取合血清与 1.0ml 的腐败梭菌毒素（含 10 个小鼠 MLD）混合，置 37℃作用 40 分钟，经尾静脉注射 16~20g 小鼠 5 只，0.2ml/只。同时用同批小鼠 5 只，各尾静脉注射 1 个小鼠 MLD 的腐败梭菌毒素作对照，观察 5 日。对照小鼠应全部死亡，血清中和小鼠应全部存活。

## 2.7.2 免疫攻毒法

2.7.2.1 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只，各经推荐使用的途径（肌肉注射、皮下注射）接种疫苗 1/2 个最小免疫剂量，接种后 21 日，连同对照兔 2 只，各肌肉注射 1 个家兔 MLD 的腐败梭菌菌液，观察 14 日（若为胰酶牛肉消化汤制备的疫苗，可静脉注射 1 个家兔 MLD 的腐败梭菌毒素，观察 5 日）。对照兔应全部死亡，免疫兔应至少 3 只保护。

2.7.2.2 用 12 月龄左右体重相近的健康易感绵羊 4 只，各经推荐使用的途径（肌肉注射、皮下注射）接种疫苗 1 个最小免疫剂量，接种后 14~21 日，连同对照羊 2 只，各肌肉注射 1 个绵羊 MLD 的腐败梭菌菌液，观察 14 日（若为胰酶牛肉消化汤制备的疫苗，可静脉注射 1 个绵羊 MLD 的腐败梭菌毒素，观察 5 日）。对照羊应全部死亡，免疫羊应至少 3 只保护。

2.8 纯粹 按附录 3306 用适宜培养基进行检验，应纯粹。

2.9 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

## 3 生产用原辅料

3.1 培养基 适宜培养基（如厌气肉肝汤、肉肝胃酶消化汤等），应符合附录 3009 要求。

3.2 动物源性材料 应符合附录 3008 要求。

3.3 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 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只，各肌肉注射疫苗 1 个推荐使用剂量，观察 10 日。应全部健活，且注射部位应不出现坏死、破溃。

### 4.3 效力检验

4.3.1 血清学方法 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只，各肌肉注射疫苗 3/5 个推荐使用剂量。接种后 14~21 日，分别采血，分离血清。将 4 只免疫兔的血清等量混合，取 0.4ml 混合血清与 0.8ml 的腐败梭菌毒素（含 6 个小鼠 MLD）混合，置 37℃作用 40 分钟，经尾静脉注射 16~20g 小鼠 2 只，0.2ml/只。同时用同批小鼠 2 只，每只尾静脉注射 1 个小鼠 MLD 腐败梭菌毒素作对照，观察 3 日。对照小鼠应全部死亡，血清中和小鼠应全部存活。如果采血时免疫组家兔只剩余 3 只，可分别用每只家兔血清单独进行中和试验，若对照小鼠和血清中和组小鼠均达上述标准，亦判为合格。

4.3.2 兔免疫攻毒法 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只，各肌肉注射疫苗 3/5 个推荐使用剂量，接种后 14~21 日，连同对照兔 2 只，各肌肉注射不低于 1 个家兔 MLD 的腐败梭菌毒素，观察 14 日。对照兔应全部死亡，免疫兔应至少保护 3 只。若使用 2 株抗原性不同（无交互免疫力）腐败梭菌生产的疫苗，应设置 2 个免疫组（各 4 只健康家兔）和 2 个对照组（各 2 只健康家兔），按上述剂量和途径分别注射对应的腐败梭菌毒素。判定标准同上。

4.3.3 羊免疫攻毒法 用 12~36 个月的绵羊 4 只，各皮下或肌肉注射疫苗 1 个推荐使用剂量，接种后 14~21 日，连同对照羊 2 只，各静脉注射不低于 1 个绵羊 MLD 的腐败梭菌毒素，观察 3~5 日。对照羊应全部死亡，免疫羊应至少 3 只保护。

4.4 甲醛残留量测定 按附录 3203 进行测定，应符合规定。

## 5.羊猝狙灭活疫苗（标准草案）

### 羊猝狙灭活疫苗

Yang Cuju Miehuoyimiao

#### Ovine/Caprine Struck Vaccine, Inactivated

1 定义 本品系用产气荚膜梭菌接种适宜培养基培养，收获培养物，灭活脱毒后加适宜佐剂制成。用于预防绵羊、山羊猝狙。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阳性粗大杆菌，陈旧培养物往往变成阴性，菌体两端钝圆，有荚膜。产生中间或偏端芽孢，但在人工培养时不易形成。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中产气荚膜梭菌的生化特性。

2.3 培养特性 在厌氧肉肝汤中生长迅速，36~37℃培养4~5小时，生长旺盛，产生大量气体。在普通肉汤中亦能生长，用固体培养基好氧培养时表面不生长。接种于血液琼脂平板上，置36~37℃厌氧条件下培养24小时，形成1~3mm、半透明、灰白色、表面光滑、边缘整齐的圆形菌落，菌落周围呈现 $\alpha$ 、 $\beta$ 双溶血环。在牛奶培养基中产生爆发性发酵反应。

2.4 血清型鉴定 用产气荚膜梭菌定型血清进行中和试验检查，应为产气荚膜梭菌B型（含产气荚膜梭菌 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 毒素）或C型（含产气荚膜梭菌 $\alpha$ 、 $\beta$ 毒素）。鉴定方法为：用产气荚膜梭菌定型血清A、B、C、D型4个血清，每种血清取0.6ml（至少可中和9个小鼠MLD）各加入1.2ml未经胰酶活化的毒素（含9个小鼠MLD），混合后置37℃作用45分钟，再尾静脉注射健康小鼠，每种血清中和物注射5只，0.2ml/只。同时用同批次小鼠5只，每只尾静脉注射0.2ml毒素（含1个小鼠MLD）作对照，观察24小时。对照小鼠应全部死亡，若血清中和组小鼠全部死亡，表明待检毒素可被该型血清中和。对于经胰酶活化有毒性的毒素，则用活化后毒素与D型血清进行中和试验。综合试验结果，按下表进行血清型判定。

毒素	血清	能否中和	结果
待检毒素 (未经胰酶 活化)	与A型血清作用	能	仅含有 $\alpha$ 毒素
		否	可能含有 $\beta$ 、 $\epsilon$ 毒素
	与C型血清作用	能	可能仅含有 $\alpha$ 、 $\beta$ 毒素
		否	可能含有 $\epsilon$ 毒素
	与D型血清作用	能	可能含有 $\alpha$ 、 $\epsilon$ 毒素
		否	含有 $\beta$ 毒素
	与B型血清作用	能	可能含有 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 毒素
		否	含有 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$ 毒素以外的其它毒素

毒素	有无 毒性	判断	与D型血清作用 能否中和	结果
待检毒素（经 胰酶活化）	有	可能含有 $\epsilon$ 毒素	能	含有 $\epsilon$ 毒素
	有	可能含有 $\epsilon$ 毒素	否	含有 $\alpha$ 、 $\epsilon$ 毒素以外的 其它毒素

2.5 毒力 将菌种接种肉肝胃酶消化汤或适宜培养基培养10~20小时，以4000g离心15分钟，取上清用0.22 $\mu$ m滤膜过滤，将滤液经尾静脉注射体重16~20g健康小鼠5只，0.001ml/只，应于24小时内全部死亡。

2.6 安全性 将菌种制备灭活疫苗。

2.6.1 对家兔的安全性 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只, 各肌肉注射疫苗 1 个推荐使用剂量, 观察 21 日。应全部健活, 精神、呼吸、采食正常, 且注射局部应不发生坏死、硬结、破溃; 所有家兔在接种前测温 3 日, 接种后连续测温 7 日, 接种后体温与接种前基础体温相比, 应不超过基础体温 1.0°C, 若超过 1.0°C, 但不超过 1.5°C, 稽留应不超过 1 个温次。

2.6.2 对绵羊的安全性 用 2~3 月龄健康易感绵羊 4 只, 各肌肉注射疫苗 2 个推荐使用剂量, 观察 21 日。应全部健活, 精神、呼吸、采食正常, 且注射局部应不发生坏死、硬结、破溃; 所有绵羊在接种前测温 3 日, 接种后连续测温 7 日, 接种后体温与接种前基础体温相比, 应不超过基础体温 1.0°C, 若超过 1.0°C, 但不超过 1.5°C, 稽留应不超过 1 个温次。

2.7 免疫原性 按照推荐的最小免疫剂量制备灭活疫苗。

2.7.1 血清学方法

2.7.1.1 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只, 各肌肉注射疫苗 1/2 个最小免疫剂量, 接种后 14~21 日, 分别采血, 分离血清。将 4 只免疫家兔的血清等量混合, 取 1.0ml 混合血清与 1.0ml 的 C 型产气荚膜梭菌毒素 (含 10 个小鼠 MLD) 混合, 置 37°C 作用 40 分钟, 经尾静脉注射 16~20g 小鼠 5 只, 0.2ml/只。同时用同批小鼠 5 只, 各尾静脉注射 1 个小鼠 MLD 的 C 型产气荚膜梭菌毒素作对照, 观察 5 日。对照小鼠应全部死亡, 血清中和小鼠应全部存活。

2.7.1.2 用 12 月龄左右体重相近的健康易感绵羊 4 只, 各肌肉注射疫苗 1 个最小免疫剂量, 接种后 14~21 日, 分别采血, 分离血清。将 4 只免疫羊的血清等量混合, 取 1.0 ml 混合血清与 1.0ml 的 C 型产气荚膜梭菌毒素 (含 10 个小鼠 MLD) 混合, 置 37°C 作用 40 分钟, 经尾静脉注射 16~20g 小鼠 5 只, 0.2ml/只。同时用同批小鼠 5 只, 各尾静脉注射 1 个小鼠 MLD 的 C 型产气荚膜梭菌毒素作对照, 观察 24 小时。对照小鼠应全部死亡, 血清中和小鼠应全部存活。

2.7.2 免疫攻毒法

2.7.2.1 用体重 1.5~2kg 健康家兔 4 只, 各经推荐使用的途径 (皮下注射、肌肉注射) 接种疫苗 1/2 个最小免疫剂量, 接种后 14~21 日, 连同对照兔 2 只, 各静脉注射不低于 1 个家兔 MLD 的 C 型产气荚膜梭菌毒素, 连续观察 5 日。对照兔应全部死亡, 免疫兔应至少 3 只保护。

2.7.2.2 用 12 月龄左右体重相近的健康易感绵羊 4 只, 各经推荐使用的途径 (皮下注射、肌肉注射) 接种疫苗 1 个最小免疫剂量, 接种后 14~21 日, 连同对照羊 2 只, 各静脉注射不低于 1 个绵羊 MLD 的 C 型产气荚膜梭菌毒素, 观察 5 日。对照羊应全部死亡, 免疫羊应至少 3 只保护。

2.8 纯粹 按附录 3306 用适宜培养基进行检验, 应纯粹。

2.9 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

### 3 生产用原辅料

3.1 培养基 适宜培养基 (如厌气肉肝汤、肉肝胃酶消化汤等), 应符合附录 3009 要求。

3.2 动物源性材料 应符合附录 3008 要求。

3.3 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 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只,各肌肉注射疫苗 1 个推荐使用剂量,观察 10 日。应全部健活,且注射部位应不发生坏死、破溃。

#### 4.3 效力检验

4.3.1 血清学方法 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只,各肌肉注射疫苗 3/5 个推荐使用剂量,接种后 14~21 日,分别采血,分离血清。将 4 只免疫兔的血清等量混合,取 0.4ml 混合血清与 0.8ml 的 C 型产气荚膜梭菌毒素(含 6 个小鼠 MLD)混合,置 37℃作用 40 分钟,经尾静脉注射 16~20g 小鼠 2 只,0.2ml/只。同时用同批小鼠 2 只,各尾静脉注射 1 个小鼠 MLD 的 C 型产气荚膜梭菌毒素作对照,观察 1 日。对照小鼠应全部死亡,血清中和小鼠应全部存活。如果采血时免疫组家兔只剩余 3 只,可分别用每只家兔血清单独进行中和试验,若对照小鼠和血清中和小鼠均达上述标准,亦判为合格。

4.3.2 兔免疫攻毒法 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只,各皮下或肌肉注射疫苗 3/5 个推荐使用剂量,接种后 14~21 日,连同对照兔 2 只,各静脉注射不低于 1 个家兔 MLD 的 C 型产气荚膜梭菌毒素,观察 3~5 日。对照兔应全部死亡,免疫兔应至少 3 只保护。

4.3.3 羊免疫攻毒法 用 12~36 个月的绵羊 4 只,各皮下或肌肉注射疫苗 1 个推荐使用剂量,接种后 14~21 日,连同对照羊 2 只,各静脉注射不低于 1 个绵羊 MLD 的 C 型产气荚膜梭菌毒素,观察 3~5 日。对照羊应全部死亡,免疫羊应至少 3 只保护。

4.4 甲醛残留量测定 按附录 3203 进行测定,应符合规定。

标准草案 yaodianbarishuoyao

## 6. 羔羊痢疾灭活疫苗（标准草案）

### 羔羊痢疾灭活疫苗

Gaoyanglijì Mièhuoyímiao

#### Ovine/Caprine Lamb Dysentery Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用 B 型产气荚膜梭菌接种适宜培养基培养，收获培养物，灭活脱毒后加适宜佐剂制成。用于预防绵羊、山羊的羔羊痢疾。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阳性粗大杆菌，陈旧培养物往往变成阴性，菌体两端钝圆，有荚膜。产生中间或偏端芽孢，但在人工培养时不易形成。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中产气荚膜梭菌的生化特性。

2.3 培养特性 在厌氧肉肝汤中生长迅速，36~37℃培养 4~5 小时，生长旺盛，产生大量气体。在普通肉汤中亦能生长，用固体培养基好氧培养时表面不生长。接种于血液琼脂平板上，置 36~37℃厌氧条件下培 24 小时，形成 1~3mm、半透明、灰白色、表面光滑、边缘整齐的圆形菌落，菌落周围呈现 β、α 双溶血环。在牛奶培养基中产生暴发性发酵反应。

2.4 血清型鉴定 用产气荚膜梭菌定型血清进行中和试验检查，应为产气荚膜梭菌 B 型（含产气荚膜梭菌 α、β、ε 毒素）。鉴定方法为：用产气荚膜梭菌定型血清 A、B、C、D 型 4 个血清，每种血清取 0.6ml（至少可中和 9 个小鼠 MLD）各加入 1.2ml 未经胰酶活化的毒素（含 9 个小鼠 MLD），混合后置 37℃作用 45 分钟，再尾静脉注射健康小白鼠，每种血清中和物注射 5 只，0.2ml/只。同时用同批次小鼠 5 只，每只静脉注射 0.2ml 毒素（含 1 个小鼠 MLD）作对照，观察 24 小时。对照小鼠应全部死亡，若血清中和组小鼠全部死亡，表明待检毒素可被该型血清中和。对于经胰酶活化有毒性的毒素，则用活化后毒素与 D 型血清进行中和试验。综合试验结果，按下表进行血清型判定。

毒素	血清	能否中和	结果
待检毒素（未经胰酶活化）	与 A 型血清作用	能	仅含有 α 毒素
		否	可能含有 β、ε 毒素
	与 C 型血清作用	能	可能仅含有 α、β 毒素
		否	可能含有 ε 毒素
	与 D 型血清作用	能	可能含有 α、ε 毒素
		否	含有 β 毒素
与 B 型血清作用	能	可能含有 α、β、ε 毒素	
	否	含有 α、β、ε 毒素以外的其它毒素	

毒素	有无毒性	判断	与 D 型血清作用能否中和	结果
待检毒素（经胰酶活化）	有	可能含有 ε 毒素	能	含有 ε 毒素
	有		否	含有 α、ε 毒素以外的其它毒素

2.5 毒力 将菌种接种肉肝胃酶消化汤或适宜培养基培养 10~20 小时，以 4000g 离心 15 分钟，取上清用 0.22μm 滤膜过滤。将滤液尾静脉注射体重 16~20g 健康小鼠 2 只，0.001ml/只，应于 24 小时内全部死亡。

2.6 安全性 将菌种制备灭活疫苗。

2.6.1 对家兔的安全性 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只,各肌肉注射疫苗 1 个推荐使用剂量,观察 21 日。应全部健活,精神、呼吸、采食正常,且注射局部应不发生坏死、破溃;所有家兔在接种前测温 3 日,接种后连续测温 7 日,接种后体温与接种前基础体温相比,应不超过基础体温 1.0°C,若超过 1.0°C,但不超过 1.5°C,稽留应不超过 1 个温次。

2.6.2 对绵羊的安全性 用 2~3 月龄健康易感绵羊 4 只,各肌肉注射疫苗 2 个推荐使用剂量,连续观察 21 日。应全部健活,精神、呼吸、采食正常,且注射局部应不发生坏死、硬结、破溃;所有绵羊在接种前测温 3 日,接种后连续测温 7 日,接种后体温与接种前基础体温相比,应不超过基础体温 1.0°C,若超过 1.0°C,但不超过 1.5°C,稽留应不超过 1 个温次。

2.7 免疫原性 按照推荐的最小免疫剂量制备灭活疫苗。

2.7.1 血清学方法

2.7.1.1 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只,各肌肉注射疫苗 1/2 个最小免疫剂量,接种后 14~21 日,分别采血,分离血清。将 4 只免疫兔的血清等量混合,取 1.0ml 混取合血清与 1.0ml 的 B 型产气荚膜梭菌毒素(含 10 个小鼠 MLD)混合,置 37°C 作用 40 分钟,然后尾静脉注射 16~20g 小鼠 5 只,0.2ml/只。同时用同批小鼠 5 只,各尾静脉注射 1 个小鼠 MLD 的 B 型产气荚膜梭菌毒素作对照,观察 5 日。对照小鼠应全部死亡,血清中和小鼠应全部存活。

2.7.1.2 用 12 月龄左右体重相近的健康易感绵羊 4 只,各肌肉注射疫苗 1 个最小免疫剂量,接种后 14~21 日,分别采血,分离血清。将每组 4 只免疫羊的血清等量混合,取 1.0ml 混合血清与 1.0ml 的 B 型产气荚膜梭菌毒素(含 10 个小鼠 MLD)混合,置 37°C 作用 40 分钟,尾静脉注射 16~20g 小鼠 5 只,0.2ml/只。同时用同批小鼠 5 只,各尾静脉注射 1 个小鼠 MLD 的 B 型产气荚膜梭菌毒素作对照,观察 5 日。对照小鼠应全部死亡,血清中和小鼠应全部存活。

2.7.2 免疫攻毒法

2.7.2.1 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只,各经推荐使用的途径接种疫苗 1/2 个最小免疫剂量,接种后 14~21 日,连同对照兔 2 只,各静脉注射不低于 1 个家兔 MLD 的 B 型产气荚膜梭菌毒素,观察 5 日。对照兔应全部死亡,免疫兔应至少 3 只保护。

2.7.2.2 用 12 月龄左右体重相近的健康易感绵羊 4 只,各经推荐使用的途径接种疫苗 1 个最小免疫剂量,接种后 14~21 日,连同对照羊 2 只,各静脉注射 1 个绵羊 MLD 的 B 型产气荚膜梭菌毒素,观察 5 日。对照羊应全部死亡,免疫羊应至少 3 只保护。

2.8 纯粹 按附录 3306 用适宜培养基进行检验,应纯粹。

2.9 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

### 3 生产用原辅料

3.1 培养基 适宜培养基(如厌气肉肝汤、肉肝胃酶消化汤等),应符合附录 3009 要求。

3.2 动物源性材料 应符合附录 3008 要求。

3.3 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 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只,各肌肉注射疫苗 1 个推荐使用剂量,观察 10 日。应全部健活,且注射部位应不发生坏死、破溃。

4.3 效力检验

4.3.1 血清学方法 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只,各肌肉注射疫苗 3/5 个推荐使用剂量,接种后 14~21 日,分别采血,分离血清。将 4 只免疫兔的血清等量混合,取 0.4ml 混合血清与 0.8ml 的 B 型产气荚膜梭菌毒素(含 6 个小鼠 MLD)混合,置 37℃作用 40 分钟,然后尾静脉注射 16~20g 小鼠 2 只,0.2ml/只。同时用同批小鼠 2 只,各尾静脉注射 1 个小鼠 MLD 的 B 型产气荚膜梭菌毒素作对照,观察 1 日。对照小鼠应全部死亡,血清中和小鼠应全部存活。如果采血时免疫家兔只剩余 3 只,可分别用每只家兔血清单独进行中和试验,若对照小鼠和血清中和组小鼠均达上述标准,亦判为合格。

4.3.2 兔免疫攻毒法 用体重 1.5~2.0kg 的抗体阴性健康家兔 4 只,各肌肉注射疫苗 3/5 个推荐使用剂量,接种后 14~21 日,连同对照兔 2 只,各静脉注射不低于 1 个家兔 MLD 的 B 型产气荚膜梭菌毒素,观察 3~5 日。对照兔应全部死亡,免疫兔应至少 3 只保护。

4.3.3 羊免疫攻毒法 用 12~36 个月的绵羊 4 只,各皮下或肌肉注射疫苗 1 个推荐使用剂量,接种后 14~21 日,连同对照羊 2 只,各静脉注射不低于 1 个绵羊 MLD 的 B 型产气荚膜梭菌毒素,观察 3~5 日。对照羊应全部死亡,免疫羊应至少 3 只保护。

4.4 甲醛残留量测定 按附录 3203 进行测定,应符合规定。

标准草案 yaodianbanshengyao

## 7.羊肠毒血症灭活疫苗（标准草案）

### 羊肠毒血症灭活疫苗

Yangchangduxuezheng Miehuoyimiao

#### Ovine/Caprine Enterotoxaemia Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用 D 型产气荚膜梭菌接种适宜培养基培养，收获培养物，灭活脱毒后加适宜佐剂制成。用于预防绵羊、山羊肠毒血症。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阳性粗大杆菌，陈旧培养物往往变成阴性，菌体两端钝圆，有荚膜。产生中间或偏端芽孢。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中产气荚膜梭菌的生化特性。

2.3 培养特性 在肉肝胃酶消化汤中生长迅速，36~37℃培养4~5小时后，生长旺盛，产生大量气体。在普通肉汤中亦能生长，用固体培养基好氧培养时表面不生长。接种于血液琼脂平板上，置36~37℃厌氧条件下培24小时，形成1~3mm、半透明、灰白色、表面光滑、边缘整齐的圆形菌落，菌落周围呈现β、α双溶血环。在牛奶培养基中产生暴发性发酵反应。

2.4 血清型鉴定 用产气荚膜梭菌定型血清进行中和试验检查，应为产气荚膜梭菌 D 型（含产气荚膜梭菌 α、ε 毒素）。鉴定方法为：用产气荚膜梭菌定型血清 A、B、C、D 型 4 个血清，每种血清取 0.6ml（至少可中和 9 个小鼠 MLD）各加入 1.2ml 未经胰酶活化的毒素（含 9 个小鼠 MLD），混合后置 37℃作用 45 分钟，再尾静脉注射健康小鼠，每种血清中和物注射 5 只，0.2ml/只。同时用同批次小鼠 5 只，每只尾静脉注射 0.2ml 毒素（含 1 个小鼠 MLD）作对照，观察 24 小时。对照小鼠应全部死亡，若血清中和组小鼠全部死亡，表明待检毒素可被该型血清中和。对于经胰酶活化有毒性的毒素，则用活化后毒素与 D 型血清进行中和试验。综合试验结果，按下表进行血清型判定。

毒素	血清	能否中和	结果
待检毒素（未经胰酶活化）	与 A 型血清作用	能	仅含有 α 毒素
		否	可能含有 β、ε 毒素
	与 C 型血清作用	能	可能仅含有 α、β 毒素
		否	可能含有 ε 毒素
	与 D 型血清作用	能	可能含有 α、ε 毒素
		否	含有 β 毒素
与 B 型血清作用	能	可能含有 α、β、ε 毒素	
		否	含有 α、β、ε 毒素以外的其它毒素

毒素	有无毒性	判断	与 D 型血清作用能否中和	结果
待检毒素（经胰酶活化）	有	可能含有 ε 毒素	能	含有 ε 毒素
			否	含有 α、ε 毒素以外的其它毒素

2.5 毒力 将菌种接种肉肝胃酶消化汤培养 16~24 小时，将经胰酶活化后的菌液以 4000g 离心 15 分钟，取上清经尾静脉注射体重 16~20g 小白鼠 2 只，每只 0.00025~0.0001ml，应于 24 小时内全部死亡。

2.6 安全性 将菌种制备灭活疫苗。

2.6.1 对家兔的安全性 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只,各经推荐使用的途径(肌肉注射、皮下注射)接种疫苗 1 个推荐使用剂量,观察 21 日。应全部健活,精神、呼吸、采食正常,且注射局部不应发生坏死、硬结、破溃;所有家兔在接种前观察并测温 3 日,接种后连续测温 7 日,接种后体温与接种前基础体温相比,应不超过基础体温 1.0℃,若超过 1.0℃,但不超过 1.5℃,稽留应不超过 1 个温次。

2.6.2 对绵羊的安全性 用 2~3 月龄健康绵羊 4 只,各经推荐使用的途径(肌肉注射、皮下注射)疫苗 2 个推荐使用剂量,观察 21 日。应全部健活,精神、呼吸、采食正常,且注射局部不应发生坏死、硬结、破溃;所有绵羊在接种前观察并测温 3 日,接种后连续测温 7 日,接种后体温与接种前基础体温相比,应不超过基础体温 1.0℃,若超过 1.0℃,但不超过 1.5℃,稽留应不超过 1 个温次。

2.7 免疫原性 按照推荐的最小免疫剂量制备灭活疫苗。

2.7.1 血清学方法

2.7.1.1 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只,各经推荐使用的途径(肌肉注射、皮下注射)接种疫苗 1/2 个最小免疫剂量。接种后 14~21 日,分别采血,分离血清。将 4 只免疫兔血清等量混合,取混合血清 1.0ml 与 1.0ml 的 D 型产气荚膜梭菌毒素(含 12 个小鼠 MLD)混合,置 37℃作用 40 分钟,然后尾静脉注射 16~20g 小鼠 5 只,0.2ml/只。同时用同批小鼠 5 只,各尾静脉注射小鼠 1MLD 的 D 型产气荚膜梭菌毒素作对照,观察 1 日。对照小鼠全部死亡,血清中和小鼠应全部存活。血清中和效价对 D 型产气荚膜梭菌毒素达到 3 (0.1ml 免疫动物血清可中和 3 个小鼠 MLD 毒素)即判为合格。如果采血时免疫组只剩余 3 只,可用每只动物血清单独进行中和试验,如果每只动物血清中和抗体效价均达上述标准,亦判为合格。

2.7.1.2 用 12 月龄左右的健康易感绵羊 4 只,各经推荐使用的途径(肌肉注射、皮下注射)接种疫苗 1 个最小免疫剂量,接种后 14~21 日,分别采血,分离血清。将 4 只免疫绵羊血清等量混合,取混合血清 1.0ml 与 1.0ml 的 D 型产气荚膜梭菌毒素(含 12 个小鼠 MLD)混合,置 37℃作用 40 分钟,然后静脉注射 16~20g 小鼠 5 只,0.2ml/只。同时用同批小鼠 5 只,各肌肉注射 1MLD 的 D 型产气荚膜梭菌毒素作对照,观察 1 日。对照小鼠应全部死亡,血清中和小鼠应全部存活。血清中和效价对 D 型产气荚膜梭菌毒素达到 3 (0.1ml 免疫动物血清可中和 3 个小鼠 MLD 毒素)即判为合格。如果采血时免疫组只剩余 3 只,可用每只动物血清单独进行中和试验,如果每只动物血清中和抗体效价均达上述标准,亦判为合格。

2.7.2 免疫攻毒法

2.7.2.1 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只,各经推荐使用的途径(肌肉注射、皮下注射)接种疫苗 1/2 个最小免疫剂量。接种后 14~21 日,连同对照兔 2 只,各静脉注射 1 个家兔 MLD 的 D 型产气荚膜梭菌毒素,观察 3~5 日。对照兔应全部死亡,免疫兔应至少 3 只保护。

2.7.2.2 用 12 月龄左右的健康易感绵羊 4 只,各经推荐使用的途径(肌肉注射、皮下注射)接种疫苗 1 个最小免疫剂量,接种后 14~21 日,连同对照绵羊 2 只,各静脉注射 1 个绵羊 MLD 的 D 型产气荚膜梭菌毒素,观察 5 日。对照羊应全部死亡,免疫羊应至少 3 只保护。

2.8 纯粹 按附录 3306 用适宜培养基进行检验,应纯粹。

2.9 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

### 3 生产用原辅料

3.1 培养基 适宜培养基（如肉肝胃酶消化汤），应符合附录 3009 要求。

3.2 动物源性材料 应符合附录 3008 要求。

3.3 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，应符合规定。

4.2 安全检验 用体重 1.5~2.0kg 的抗体阴性健康家兔 4 只，各经推荐使用的途径（肌肉注射、皮下注射）接种疫苗 1 个推荐使用剂量，观察 10 日，应全部健活，且注射部位应不发生坏死、破溃。

4.3 效力检验

4.3.1 血清学方法 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只，各经推荐使用的途径（肌肉注射、皮下注射）接种疫苗 1/2 个推荐使用剂量。14~21 日后，分别采血，分离血清。将 4 只免疫兔血清等量混合，取混合血清 1.0ml 与 1.0ml 的 D 型产气荚膜梭菌毒素（含 12 个小鼠 MLD）混合，37℃作用 40 分钟，然后静脉注射 16~20g 小鼠 5 只，0.2ml/只。同时各用同批小鼠 5 只，各注射 1MLD 的 D 型产气荚膜梭菌毒素作对照。观察 1 日。对照小鼠应全部死亡，血清中和小鼠应全部存活。血清中和效价对 D 型产气荚膜梭菌毒素达到 3（0.1ml 免疫动物血清可中和 3 个小鼠 MLD 毒素）即判为合格。如果采血时免疫组只剩余 3 只，可用每只动物血清单独进行中和试验，如果每只动物血清中和抗体效价均达上述标准，亦判为合格。

4.3.2 免疫攻毒法 用体重 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只，各经推荐使用的途径（肌肉注射、皮下注射）接种疫苗 1/2 个推荐使用剂量。接种后 14~21 日，连同对照兔 2 只，各静脉注射 1 个家兔 MLD 的 D 型产气荚膜梭菌毒素，观察 3~5 日。对照兔应全部死亡，免疫兔应至少 3 只保护。

4.3.3 羊免疫攻毒法 用 12~36 个月的绵羊 4 只，各皮下或肌肉注射疫苗 1 个推荐使用剂量，接种后 14~21 日，连同对照羊 2 只，各静脉注射不低于 1 个绵羊 MLD 的 D 型产气荚膜梭菌毒素，观察 3~5 日。对照羊应全部死亡，免疫羊应至少 3 只保护。

4.4 甲醛残留量测定 按附录 3203 进行测定，应符合规定。

## 8.猪多杀性巴氏杆菌病（B型）灭活疫苗（标准草案）

### 猪多杀性巴氏杆菌病（B型）灭活疫苗

Zhu Duoshaxingbashiganjunbing (B Xing) Miehuoyimiao

#### Swine *Pasteurella multocida* (Type B) Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用 B 型多杀性巴氏杆菌接种适宜培养基培养，收获培养物，灭活后加适宜佐剂制成。用于预防由 B 型多杀性巴氏杆菌引起的猪多杀性巴氏杆菌病。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阴性球杆菌。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中多杀性巴氏杆菌的生化特性。

2.3 培养特性 在含有 4.0%健康动物血清及 0.1%裂解血细胞全血的改良马丁琼脂平板或其他适宜固体培养基（如 TSA 等）上，置 36~37℃培养 16~22 小时，肉眼观察，菌落表面光滑，呈微蓝色。在低倍显微镜下，45 度折光观察，菌落结构细致，边缘整齐，呈鲜明的蓝绿色虹彩，边缘一部分有狭窄的红黄光带，属 Fg 菌落型。

2.4 血清型鉴定 用血清学方法或分子生物学方法进行鉴定，应为 B 型。

2.5 安全性 将菌种制备灭活疫苗。

2.5.1 对猪的安全性 用推荐使用最小日龄的健康易感猪 2 头，各经推荐的免疫途径接种疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 14 日，应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

2.5.2 对家兔的安全性 用体重 1.5~2.0kg 健康易感家兔 2 只，各经推荐的免疫途径接种疫苗 1 个推荐使用剂量，观察 14 日，应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

2.5.3 对小鼠的安全性 用体重 18~22g 小鼠 10 只，各经推荐的免疫途径接种疫苗 1/10 个推荐使用剂量（头份），观察 14 日，应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

2.6 免疫原性 将菌种制备灭活疫苗。用 35~56 日龄健康易感猪 5 头，各经推荐的各免疫途径接种疫苗 1 个最小免疫剂量，免疫后 21 日，连同对照猪 3 头，各皮下注射 1MLD 的猪多杀性巴氏杆菌强毒菌液，观察 10 日。对照猪全部死亡时，免疫猪应至少保护 4 头；或对照猪死亡 2 头，免疫猪应全部保护。

2.7 纯粹 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

2.8 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

3.1 培养基 适宜培养基（如改良马丁肉汤等），应符合附录 3009 要求。

3.2 动物源性材料 应符合附录 3008 要求。

3.3 原材料及辅料 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 用体重 1.5~2.0kg 健康易感家兔 2 只，各皮下注射疫苗 1 个推荐使用剂量；用体重 18~22g 小鼠 5 只，各皮下注射疫苗不少于 0.3ml，观察 10 日，应全部健活。

4.3 效力检验

4.3.1 兔免疫攻毒法 用 1.5~2.0kg 健康家兔 4 只，各皮下或肌肉注射疫苗 2/5 个推荐使用剂量，免疫后 21 日，连同对照兔 2 只，各皮下注射 1MLD 的猪多杀性巴氏杆菌强毒菌液，观察 8 日。对照兔全部死亡，免疫兔应至少保护 2 只。

4.3.2 猪免疫攻毒法 用 35~56 日龄健康易感猪 5 头，各皮下注射疫苗 1 个推荐使用

剂量，免疫后 21 日，连同对照猪 3 头，各皮下注射 1MLD 的猪多杀性巴氏杆菌强毒菌液，观察 10 日。对照猪全部死亡时，免疫猪应至少保护 4 头；或对照猪死亡 2 头，免疫猪应全部保护。

4.4 甲醛、苯酚和汞类防腐剂残留量测定 分别按附录 3203、3201、3202 进行测定，应符合规定。

标准草案 yaodian banshengyao

## 9.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 Vaccine, Inactivated (*Streptococcus suis* type 2)

**1 定义** 本品系用猪链球菌 2 型菌株适宜培养基培养，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 1.0℃；若超过 1.0℃，应在 2 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 3~5 周龄健康易感仔猪至少 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 从基础种子到生产种子传代不超过 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 用推荐使用日龄的健康易感仔猪 5 头，各肌肉注射疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 14 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 1.0℃，若超过 1.0℃，应在 2 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 用推荐使用日龄的健康易感仔猪 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 1MLD 的强毒菌液，观察 14 日。对照猪应至少 4 头死亡，免疫猪应至少 4 头保护。

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（适用于用硫柳汞灭活或防腐） 按附录 3202 进行测定，应符合规定。

## 10.猪支原体肺炎灭活疫苗（标准草案）

### 猪支原体肺炎灭活疫苗

Zhu Zhiyuantifeiyan Miehuoyimiao

Swine *Mycoplasma Hyopneumoniae* Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用猪肺炎支原体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。用于预防猪支原体肺炎。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏染色阴性。瑞氏染色或吉姆萨染色镜检，菌体呈多形性。

2.2 生化特性 应符合代谢葡萄糖产酸的生化特性。

2.3 培养特性 在适宜的液体培养基中，37℃培养3~10日，pH值下降0.5以上，培养液呈轻度浑浊。在固体培养基上37℃培养3~10日，呈露滴状、中间致密的灰白色菌落。

2.4 代谢抑制试验 将菌种培养物按照10%接种量接种于含葡萄糖和酚红指示剂的液体培养基中，各加入20%猪肺炎支原体阳性血清和阴性血清，作为试验组和对照组，在37℃培养观察10日，对照组培养基颜色出现明显变化时试验成立，试验组培养基颜色应不发生明显改变。

2.5 安全性 将菌种在适宜培养基上培养，收获培养物，制备灭活疫苗。用14~21日龄健康易感仔猪5头，各经推荐使用途径接种疫苗2个推荐使用剂量，观察并测温14日。应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。所有仔猪接种前观察并测温3日，计算基础体温。与接种前相比，体温、精神、食欲、排便应无明显变化；接种部位应不出现溃烂、脓肿、结节等局部不良反应。若体温升高，应不超过基础体温1.0℃；若超过基础体温1.0℃，应不超过1.5℃，且稽留热不超过两个温次（每日测温1次）。

2.6 免疫原性 将菌种制备灭活疫苗。用14~28日龄健康易感仔猪5头，经肌肉注射疫苗1个最小免疫剂量。首次免疫后14~21日，以相同途径和剂量进行二免，二免疫后21~28日，连同对照猪5头，各经气管注射猪肺炎支原体强毒（含100MID）。攻毒后25~28日，全部剖杀，按Goodwin氏55分评分法对猪肺部病变进行判分（见附注），统计免疫猪肺炎病变减少率。对照猪肺炎病变平均分应不低于10分，免疫猪肺炎病变减少率应不低于60%。

2.7 无菌检验 按附录3306进行检验，应无菌生长。

2.8 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过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14~21日龄健康易感仔猪5头，各颈部肌肉注射疫苗2个推荐使用剂量，观察并测温14日。所有猪均应不出现由疫苗引起的全身或局部不良反应，与接种前相比，体温、精神、食欲、排便应无明显变化；接种部位应不出现溃烂、脓肿、结节等局部不良反应。若体温升高，应不超过基础体温1.0℃；若超过基础体温1.0℃，应不超过1.5℃，且稽留热不超过两个温次（每日测温1次）。

4.3 效力检验 用推荐使用日龄的健康易感仔猪5头，各经推荐的免疫途径接种疫苗1个推荐使用剂量。首次免疫后14~21日，以相同途径和剂量进行二次免疫，二免疫后21~28日，连同对照猪5头，每头猪各经气管注射的猪肺炎支原体强毒（含100MID），攻毒后25~28日，全部剖杀，按Goodwin氏55分评分法对猪肺部病变进行判分（见附注），统计免疫猪肺炎病变减少率。对照猪肺炎病变平均分应不低于10分，免疫猪肺炎病

变减少率应不低于 60%。

4.4 甲醛、汞类防腐剂残留量测定 分别按附录 3203 和 3202 进行测定,应符合规定。

**附注:猪支原体肺炎肺部病变评分标准和肺炎病变减少率计算方法**

**1 评分标准** 55 分评分法。每个肺脏尖叶、心叶满分各为 10 分,膈叶前 1/3 满分为 5 分,中间叶满分为 5 分。按照“肉样变”或“胰样变”典型病变标准,分别对每个肺叶病变面积占该肺叶的比例进行打分。例如满分为 10 分的肺叶有 3/10 的面积产生病变,则该肺叶打 3 分;如满分为 5 分的肺叶有 3/10 的面积产生病变则该肺叶打 1.5 分。记分只对肺叶的一面进行记分,如肺叶正反两面均有病变,以病变面积较大的一面进行记分。各肺叶打分总合即为该头猪的肺炎病变得分。

**2 肺炎减少率计算方法** 分别计算对照组和免疫组的肺炎病变得分算术平均值,按以下公式计算免疫组猪肺炎病变减少率:

$$\text{肺炎病变减少率} = \frac{\text{对照猪肺炎病变平均分} - \text{免疫猪肺炎病变平均分}}{\text{对照猪肺炎病变平均分}} \times 100\%$$

标准草案 yaodianbanshengyao

## 11.猪伪狂犬病灭活疫苗（标准草案）

### 猪伪狂犬病灭活疫苗

Zhu Weikuanguanbing Miehuo Yimiao

Swine Pseudorabies Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系采用适宜基因缺失的猪伪狂犬病病毒接种适宜细胞培养，收获细胞培养物，灭活后加适宜佐剂制成灭活疫苗。用于预防猪伪狂犬病。

#### 2 毒种

**2.1 安全性** 用毒种制备灭活疫苗，用推荐使用日龄健康易感猪 5 头，经推荐的各种免疫途径接种疫苗 2 个推荐使用剂量，如需二免，间隔至少 14 日后二免，免疫后逐日观察至少 14 日，应不出现由疫苗引起的任何局部或全身不良反应。

**2.2 免疫原性** 用毒种制备灭活疫苗，用 3~5 周龄健康易感仔猪不少于 15 头，其中不少于 10 头经推荐的免疫途径接种疫苗 1 个最小免疫剂量，14 日后按相同剂量和途径进行二免，二免 14 日后，连同对照 5 头，对所有猪采用肌肉注射或滴鼻接种猪伪狂犬病病毒强毒株，观察至少 21 日。攻毒后对照猪应至少 4 头出现猪伪狂犬病特异性临床症状或死亡，免疫猪应全部保护。

#### 2.3 纯净

**2.3.1 无菌检验** 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

**2.3.2 支原体检验** 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

**2.3.3 外源病毒检验** 按附录 XX（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

**2.4 基因的鉴定** 取毒种适量，提取病毒核酸进行基因鉴定。鉴定结果应至少缺失 gE 基因。

**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。

#### 3 生产用原辅料

**3.1 细胞** 应符合附录 3502 要求。

**3.2 血清** 应符合附录 3503 要求。

**3.3 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** 用推荐使用日龄健康易感仔猪 5 头，各肌肉注射疫苗 2 个推荐使用剂量，14 日后二免，第二次免疫剂量不低于 1 个推荐使用剂量。二免后观察至少 14 日，所有接种猪应精神、呼吸、采食正常；接种部位应无红肿、硬结；所有仔猪在接种前观察并测温 3 日，接种后连续测温 5 日，接种后体温与接种前基础体温相比，应不超过基础体温 1.0℃。若超过 1.0℃，但不超过 1.5℃，稽留应不超过 2 个温次（每日测温 1 次）。

**4.3 效力检验** 用推荐使用日龄的健康易感仔猪 5 头，各按推荐使用途径接种疫苗 1 个推荐使用剂量，14 日后按相同剂量和途径进行二免，二免后 14 日，连同对照仔猪 5 头，所有仔猪经颈部肌肉注射或滴鼻猪伪狂犬病病毒强毒株（至少  $10^6$ TCID<sub>50</sub>/头），观察 14 日。对照猪应至少 4 头出现伪狂犬病的特异性临床症状或死亡，免疫猪应至少 4 头保护。

**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（适用于硫柳汞灭活或防腐）** 按附录 3203 进行测定，应符合规定。

## 12.猪细小病毒病灭活疫苗（标准草案）

### 猪细小病毒病灭活疫苗

Zhu Xixiaobingdubing Miehuoyimiao  
**Swine Parvovirus Vaccine, Inactivated**

1 定义 本品系用猪细小病毒适宜毒株接种适宜细胞培养，收获细胞培养物，灭活后加入适宜佐剂制成。用于预防猪细小病毒病。

#### 2 毒种

2.1 安全性 用毒种制备灭活疫苗，用 1.5~2 月龄健康易感猪 5 头，各肌肉注射疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 14 日。所有猪应精神、呼吸、采食正常；接种部位应无红肿、硬结；所有猪在接种前观察并测温 3 日，接种后连续测温 5 日，接种后体温与接种前基础体温相比，应不超过基础体温 1.0℃。若超过 1.0℃，但不超过 1.5℃，稽留应不超过 2 个温次（每日测温 1 次）。

#### 2.2 免疫原性

##### 2.2.1 血清学方法

2.2.1.1 用猪检验 用毒种制备灭活疫苗。用配种前 2~3 周健康易感后备母猪 5 头，各肌肉注射疫苗 1 个最小免疫剂量，接种后 28 日，连同对照猪 5 头，分别采血，分离血清，测定猪细小病毒 HI 抗体效价。对照猪 HI 抗体效价均应不高于 1:8，免疫猪 HI 抗体效价应至少有 4 头不低于 1:64。

2.2.1.2 用豚鼠检验 用体重 300~450g 猪细小病毒抗体阴性健康豚鼠 5 只，各肌肉注射疫苗推荐最小免疫剂量 1/4 头份，接种后 28 日，连同对照豚鼠 5 只，分别采血，分离血清，测定猪细小病毒 HI 抗体效价。对照豚鼠血清 HI 抗体效价均应不高于 1:8，免疫豚鼠应至少 4 只血清 HI 抗体效价不低于 1:64。

2.2.2 免疫攻毒法 用毒种制备灭活疫苗。用配种前 2~3 周健康易感后备母猪 5 头，各肌肉注射疫苗 1 个最小免疫剂量，妊娠 6~7 周时，连同对照母猪 5 头，各肌肉注射猪细小病毒强毒株，观察至分娩。对照猪应至少 4 头出现流产、死胎、木乃伊胎或胎儿重吸收等繁殖障碍症状，免疫猪应至少 4 头不出现特异性临床症状，如流产、死胎、木乃伊胎或所产仔猪瘦小、体弱，或出现不同程度震颤、共济失调等神经症状。

#### 2.3 纯净

2.3.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.3.2 支原体检 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

2.3.3 外源病毒检验 按附录 XX（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2.4 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅材料

3.1 细胞 应符合附录 3502 要求。

3.2 培养基 应符合附录 3009 要求。

3.3 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 1.5~2 月龄健康易感猪 5 头，各肌肉注射疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 14 日，所有猪应精神、呼吸、采食正常；接种部位应无红肿、硬结；所有猪在接种前观察并测温 3 日，接种后连续测温 5 日，接种后体温与接种前基础体温相比，应不超过基础

体温 1.0℃。若超过 1.0℃，但不超过 1.5℃，稽留应不超过 2 个温次（每日测温 1 次）。

4.3 效力检验 用体重 300~450g 健康豚鼠 5 只，各肌肉注射疫苗 1/4 个推荐使用剂量，接种后 28 日，连同对照豚鼠 5 只，分别采血，分离血清，进行 HI 抗体效价测定。对照豚鼠血清 HI 抗体效价均应不高于 1:8，免疫豚鼠血清 HI 抗体效价应至少 4 只不低于 1:64。

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

标准草案 yaodianbanshengyao

## 13.口蹄疫灭活疫苗（标准草案）

### 口蹄疫灭活疫苗

Koutiyi Miehuoyimiao

#### Foot and Mouth Disease Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用口蹄疫病毒毒株接种适宜细胞培养，收获细胞培养物，经浓缩、纯化、灭活后，加入适宜佐剂制成。用于预防口蹄疫。

#### 2 毒种

**2.1 安全性** 用本动物检验：猪用疫苗用猪检验，反刍动物用疫苗用牛检验，猪和反刍动物共用疫苗用猪检验。

**2.1.1 对猪的安全性** 用毒种制备灭活疫苗，用 30~40 日仔猪（细胞中和抗体效价不高于 1:8 或液相阻断 ELISA 抗体效价不高于 1:8 或乳鼠中和抗体效价不高于 1:4；且非结构蛋白 3ABC 抗体检测为阴性）2 头，各两侧耳根后肌肉分点注射疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 14 日。均应不出现口蹄疫症状或由接种疫苗引起的明显异常反应。

**2.1.2 对牛的安全性** 用毒种制备灭活疫苗，用至少 6 月龄的健康易感牛（细胞中和抗体效价不高于 1:8 或液相阻断 ELISA 抗体效价不高于 1:8 或乳鼠中和抗体效价不高于 1:4；且非结构蛋白 3ABC 抗体检测为阴性）3 头，每头舌背面皮内分多点注射，共 2 个推荐使用剂量疫苗，逐日观察至少 4 日，之后每头牛按推荐途径接种疫苗 3 个推荐使用剂量，观察 6 日。均应不出现口蹄疫症状或由接种疫苗引起的明显异常反应。

**2.2 免疫原性** 将口蹄疫病毒株的乳鼠或 BHK21 细胞适应毒制成灭活疫苗。猪用疫苗用猪检验，反刍动物用疫苗用牛检验，猪和反刍动物共用疫苗用猪检验。

**2.2.1 猪用疫苗** 用体重 40kg 左右的架子猪（细胞中和抗体效价不高于 1:8 或液相阻断 ELISA 抗体效价不高于 1:8 或乳鼠中和抗体效价不高于 1:4；且非结构蛋白 3ABC 抗体检测为阴性）15 头，分为 3 组，每组 5 头。将灭活疫苗分为 1 个、1/3 个、1/9 个推荐使用剂量 3 个剂量组，每一剂量组分别经耳根后肌肉注射 5 头猪，接种 28 日后，连同对照猪 2 头，每头猪耳根后肌肉注射同型口蹄疫病毒强毒  $10^3ID_{50}$ ，观察 10 日。对照猪均应至少有 1 蹄出现水疱或溃疡。免疫猪出现任何口蹄疫症状即判为不保护。出现发病猪后要及时进行隔离。按 Reed-Muench 法计算，每个推荐使用剂量的疫苗应至少含 6.0 PD<sub>50</sub>。

**2.2.2 反刍动物（牛羊骆驼等）用疫苗** 用至少 6 月龄的健康易感牛（细胞中和抗体效价不高于 1:8 或液相阻断 ELISA 抗体效价不高于 1:8 或乳鼠中和抗体效价不高于 1:4；且非结构蛋白 3ABC 抗体检测为阴性）15 头，分为 3 组，每组 5 头。将疫苗分为 1 个、1/3 个、1/9 个推荐使用剂量 3 个剂量组，每一剂量组份别经颈部肌肉注射 5 头牛，接种 21 日后，将各组免疫牛和对照牛 2 头，分别于舌上表面两侧分 2 点皮内注射牛源同型口蹄疫病毒强毒株，每点均为 0.1ml（共 0.2ml，含  $10^4ID_{50}$ ）。观察 10 日。对照牛均应至少 3 个蹄出现水疱或溃疡。免疫牛仅在舌面出现水疱或溃疡，而其他部位无病变时判为保护，除舌面以外任一部位出现典型口蹄疫水疱或溃疡时判为不保护。根据免疫牛的保护数，按 Reed-Muench 法计算被检疫苗的 PD<sub>50</sub>，每个推荐使用剂量的疫苗应至少含 6.0 PD<sub>50</sub>。

#### 2.3 纯净

**2.3.1 无菌检验** 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

**2.3.2 支原体检验** 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

**2.3.3 外源病毒检验** 按附录 XX（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

**2.4 代次限定** 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

### 3 生产用原辅料

3.1 细胞 应符合附录 3502 要求。

3.2 生产用动物 应符合附录 3501 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

##### 4.2.1 用小动物检验

4.2.1.1 用豚鼠检验 用体重 350~450g 豚鼠 2 只，各皮下注射疫苗 1 个推荐使用剂量，观察 7 日，均不应出现因疫苗引起的死亡或明显的局部反应或全身不良反应。

4.2.1.2 用小鼠检验 用体重 18~22g 小鼠 5 只，各皮下注射疫苗 1/2 个推荐使用剂量，观察 7 日，均不应出现因疫苗引起的死亡或明显的局部反应或全身不良反应。

4.2.2 用靶动物检验 猪用疫苗用猪检验，反刍动物疫苗用牛检验，猪和反刍动物共用疫苗用牛检验。

4.2.2.1 用猪检验 用 30~40 日龄健康易感仔猪（细胞中和抗体效价不高于 1:8 或液相阻断 ELISA 抗体效价不高于 1:8 或乳鼠中和抗体效价不高于 1:4；且非结构蛋白 3ABC 抗体检测为阴性）2 头，各两侧耳根后分点肌肉注射疫苗 2 个推荐使用剂量，每侧 1 个推荐使用剂量，逐日观察 14 日，均不应出现口蹄疫症状或明显的因注射疫苗引起的异常反应。

4.2.2.2 用牛检验 用至少 6 月龄的健康易感牛（细胞中和抗体效价不高于 1:8 或液相阻断 ELISA 抗体效价不高于 1:8 或乳鼠中和抗体效价不高于 1:4；且非结构蛋白 3ABC 抗体检测为阴性）3 头，各舌背面皮内多点注射疫苗 2 个推荐使用剂量。逐日观察至少 4 日，之后每头牛按推荐途径接种疫苗 3 个推荐使用剂量，继续观察 6 日。均不应出现口蹄疫症状或由接种疫苗引起的明显异常反应。

4.3 效力检验 猪用疫苗用猪检验，反刍动物用疫苗用牛检验，猪和反刍动物共用疫苗用猪检验。

4.3.1 用猪检验 用体重 40kg 左右的健康易感猪（细胞中和抗体效价不高于 1:8 或液相阻断 ELISA 抗体效价不高于 1:8 或乳鼠中和抗体效价不高于 1:4；且非结构蛋白 3ABC 抗体检测为阴性）15 头，分为 3 组，每组 5 头。将待检疫苗分为 1 个、1/3 个、1/9 个推荐使用剂量 3 个剂量组，每一剂量组分别耳根后肌肉注射 5 头猪。接种后 28 日，连同对照猪 2 头，每头猪耳根后肌肉注射猪源同型口蹄疫病毒强毒株 2.0ml（含  $10^3$  ID<sub>50</sub>），观察 10 日，对照猪均应至少有 1 个蹄出现水疱或溃疡。免疫猪出现任何口蹄疫症状即判为不保护。根据免疫猪的保护数，按 Reed-Muench 法计算被检疫苗的 PD<sub>50</sub>。每个推荐的疫苗应至少含 6.0 PD<sub>50</sub>。

4.3.2 用牛检验 用至少 6 月龄的健康易感牛（细胞中和抗体效价不高于 1:8 或液相阻断 ELISA 抗体效价不高于 1:8 或乳鼠中和抗体效价不高于 1:4；且非结构蛋白 3ABC 抗体检测为阴性）15 头，分为 3 组，每组 5 头。将待检疫苗分为 1 个、1/3 个、1/9 个推荐使用剂量 3 个剂量组，每一剂量组分别颈部肌肉注射 5 头牛。接种 21~28 日后，连同对照牛 2 头，每头牛舌上表面两侧分 2 点皮内注射牛源同型口蹄疫病毒强毒株，每点均为 0.1ml（共 0.2ml，含  $10^4$  ID<sub>50</sub>）；观察 10 日，对照牛均应至少有 3 个蹄出现口蹄疫病变（水疱或溃疡）。免疫牛仅在舌面注射点出现水疱或溃疡，而其他部位无病变时，判为保护，除舌注射点以外的任一部位出现典型口蹄疫水泡或溃疡时，判为不保护。根据免疫牛的保护数，按 Reed-Muench 法计算被检疫苗的 PD<sub>50</sub>。每个推荐使用剂量疫苗应至少含 6.0 PD<sub>50</sub>。

## 14.猪丹毒灭活疫苗（标准草案）

### 猪丹毒灭活疫苗

Zhudandu Miehuoyimiao

Swine Erysipelas Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用猪丹毒杆菌接种适宜培养基培养，收获培养物，灭活后加适宜佐剂制成。用于预防猪丹毒。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阳性纤细小杆菌。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中猪丹毒杆菌的生化特性。

2.3 培养特性 在含有 10%血清或 4%血清及 0.1%裂解血细胞全血马丁琼脂平板上，置 36~37℃培养 36~48 小时，肉眼观察，菌落表面圆整光滑，呈微蓝灰色露珠状。

2.4 血清型鉴定 用猪丹毒杆菌分型血清定型，应符合菌种的血清型特征。

2.5 安全性

2.5.1 用小鼠检验 用体重 18~22g 小鼠不少于 10 只，各皮下注射疫苗不少于 1/10 个推荐使用剂量，至少观察 10 日，应全部健活。

2.5.2 用猪检验 用推荐使用最小日龄健康易感猪不少于 5 头，按推荐的每种使用途径，各接种疫苗 2 个推荐使用剂量，至少观察 14 日。逐日观察接种猪饮食、精神状态、行动、被毛、体温等全身反应情况，观察期内应不出现疫苗引起的明显的局部不良反应（结节直径大于 3 厘米）或全身不良反应（精神沉郁，对强刺激无反应）或死亡，允许在注射疫苗后出现体温升高（高于基础体温 1℃，但不高于基础体温 2.0℃），但应在 2 日内恢复正常。

2.6 免疫原性

2.6.1 用小鼠检验 用体重 16~18g 小鼠 16 只，分成 3 组，第 1 组 10 只，第 2、3 组各 3 只。第 1 组小鼠各皮下注射不高于 1/30 个推荐使用剂量，免疫后 21 日，第 1 组 10 只免疫小鼠，连同第 2 组对照小鼠 3 只，各皮下注射含 1000 个对小鼠最小致死剂量的适宜猪丹毒杆菌攻毒菌液，另取第 3 组对照小鼠 3 只，各皮下注射含 1 个对小鼠最小致死剂量的适宜血清型猪丹毒杆菌攻毒菌液，观察 10 日。第 2 组对照小鼠应全部死亡，第 3 组对照小鼠应至少死亡 2 只，10 只免疫小鼠应至少保护 8 只。

2.6.2 用猪检验 用 56~63 日龄健康易感猪 10 头，按推荐的每种使用途径，各接种疫苗 1 个最小免疫剂量，免疫后 21 日，连同对照猪 5 头，各静脉注射含 1 个对猪最小致死剂量的适宜猪丹毒杆菌攻毒菌液，观察 14 日。对照猪应至少 4 头发病（出现精神沉郁、不愿走动、厌食、暗红色皮肤丘疹、体温至少持续 2 日超过基础体温 1.0℃等），且至少 2 头死亡，免疫猪应至少 4 头保护（未出现猪丹毒典型症状，若体温升高超过基础体温 0.5℃，应在 3 日内恢复正常）。

2.7 纯粹 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

2.8 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 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 用体重 18~22g 小鼠 5 只，各皮下注射疫苗 0.3ml，观察 10 日，应全

部健活。

#### 4.3 效力检验

4.3.1 用小鼠检验 用体重 16~18g 小鼠 16 只，分成 3 组，第 1 组 10 只，第 2、3 组 3 只/组。第 1 组小鼠各皮下注射疫苗 1/30 个推荐使用剂量，免疫后 21 日，第 1 组 10 只免疫小鼠，连同第 2 组对照小鼠 3 只，各皮下注射含 1000 个对小鼠最小致死剂量的适宜猪丹毒杆菌攻毒菌液，另取第 3 组对照小鼠 3 只，各皮下注射含 1 个对小鼠最小致死剂量的适宜猪丹毒杆菌攻毒菌液。观察 10 日，第 2 组对照小鼠应全部死亡，第 3 组对照小鼠应至少死亡 2 只，10 只免疫小鼠应至少保护 8 只。

4.3.2 用猪检验 用推荐使用日龄健康易感猪 5 头，按推荐的每种使用途径，各接种疫苗 1 个推荐使用剂量，免疫后 21 日，连同对照猪 5 头，各静脉注射含 1 个对猪最小致死剂量的猪丹毒杆菌攻毒菌液，观察 14 日。对照猪应至少 4 头发病（出现精神沉郁、不愿走动、厌食、暗红色皮肤丘疹、体温至少持续 2 日超过基础体温 1.0℃等），且至少 2 头死亡，免疫猪应至少 4 头保护（未出现猪丹毒典型症状，若体温升高超过基础体温 0.5℃，应在 3 日内恢复正常）。

4.4 甲醛、苯酚和汞类防腐剂残留量测定 分别按附录 3203、3201 和 3202 进行测定，应符合规定。

标准草案 yaodianbanshengyao

## 15.狂犬病灭活疫苗（标准草案）

### 狂犬病灭活疫苗

Kuangquanbing Miehuoyimiao

Rabies Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用狂犬病病毒固定毒接种适宜细胞培养，收获细胞培养物，经浓缩纯化（如有必要），灭活后加入适宜佐剂制成灭活疫苗。用于预防犬的狂犬病。免疫期应不低于12个月。

#### 2 毒种

##### 2.1 毒力

2.1.1 对犬的毒力 将毒种肌肉注射 2 月龄以上健康易感比格犬（狂犬病病毒抗体 FAVN 效价不高于 0.06 IU/ml）4 只，每只 1ml，观察 3 个月。犬应全部存活且无明显临床异常变化。

2.1.2 对家兔的毒力 将毒种肌肉注射 3~6 月龄健康易感家兔（狂犬病病毒抗体 FAVN 效价不高于 0.06 IU/ml）4 只，每只 1ml，观察 28 日。家兔均应不出现任何狂犬病症状。

2.2 安全性 将毒种稀释成  $10^{6.0}TCID_{50}/0.1ml$  后制成灭活疫苗，皮下或肌肉注射 2 月龄以上健康易感比格犬（狂犬病病毒抗体 FAVN 效价不高于 0.06 IU/ml）4 只，每只 2ml，观察至少 28 日。犬应全部存活并无明显临床异常变化。

##### 2.3 免疫原性

2.3.1 血清学方法 将毒种稀释成  $10^{6.0}TCID_{50}/0.1ml$  后制成灭活疫苗，按推荐使用途径（如肌肉注射等）接种 2~3 月龄健康易感比格犬（狂犬病病毒抗体 FAVN 效价不高于 0.06 IU/ml）10 只，每只接种推荐的最小免疫剂量。免疫后 2 周和 24 周分别采血，分离血清，以 FAVN 方法检测各免疫犬血清中和抗体效价，两次检测的中和抗体效价平均值均应不低于 0.5IU/ml。

2.3.2 免疫攻毒法 将毒种稀释成  $10^{6.0}TCID_{50}/0.1ml$  后制成灭活疫苗，按推荐使用途径（如肌肉注射等）接种 2~3 月龄健康易感比格犬（狂犬病病毒抗体 FAVN 效价不高于 0.06 IU/ml）5 只，每只接种推荐的最小免疫剂量，免疫后 21~28 日，连同对照犬 5 只，所有犬经咬肌接种的狂犬病病毒强毒（含 50 LD<sub>50</sub>），观察 90 日。对照犬应至少 4 只死亡，免疫犬应至少 4 只不出现任何狂犬病病毒引起的特征性症状或死亡。

##### 2.4 纯净

2.4.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.4.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

2.4.3 外源病毒检验 按附录 XX（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2.5 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

3.1 细胞 应符合附录 3502 要求。

3.2 血清 应符合附录 3503 要求。

3.3 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 2~3 月龄健康易感比格犬（狂犬病病毒抗体 FAVN 效价不高于 0.06

IU/ml) 3 只, 各皮下或肌肉接种疫苗 2 个推荐使用剂量, 观察 21 日。应全部健活, 且应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

4.3 效力检验 按附录 3407 进行检验, 每头份疫苗应至少含 2.0 个国际单位(2.0IU)。

4.4 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。

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

标准草案 yaodianbanshengyao

## 16.新城疫灭活疫苗（标准草案）

### 新城疫灭活疫苗

Xinchengyi Miehuoyimiao

#### Newcastle Disease Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用新城疫病毒弱毒株接种易感鸡胚或适宜细胞培养，收获感染鸡胚液或细胞培养液，经适宜灭活剂灭活后，加适宜佐剂制成。用于预防新城疫。

#### 2 毒种

2.1 脑内致病指数（ICPI），应不高于 0.4。

2.2 鸡胚最小致死量的平均死亡时间（MDT/MLD），应不少于 103 小时。

2.3 安全性 用毒种制备灭活疫苗，用推荐使用的最小日龄 SPF 鸡或其他新城疫抗体阴性靶动物 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 2 个推荐使用剂量，至少观察 14 日。应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

#### 2.4 免疫原性

2.4.1 鸡用新城疫灭活疫苗 用毒种制备灭活疫苗，用 21~28 日龄 SPF 鸡 35 只，30 只分 3 组，每组 10 只，分别皮下或肌肉注射疫苗 1/25、1/50、1/100 推荐使用剂量；另 5 只作对照。接种后 21~28 日，所有鸡各肌肉注射鸡新城疫病毒，每只  $10^{5.0}$ ELD<sub>50</sub>，观察 14 日，每日记录鸡只发病情况。对照鸡应全部死亡。观察期结束，根据每组鸡保护只数计算 PD<sub>50</sub>，每羽份应不低于 50PD<sub>50</sub>。

2.4.2 其他禽（如鸽）用新城疫灭活疫苗 将毒种制成灭活疫苗，用推荐使用的、新城疫抗体阴性靶动物不少于 20 只，各按推荐使用途径和推荐最小使用剂量接种疫苗，另不少于 10 只作对照。接种后 21~28 日，每只动物各肌肉注射新城疫病毒强毒，至少观察 14 日，对照动物应至少 70% 出现新城疫特异性临床症状或死亡，免疫动物应至少 90% 健活。

#### 2.5 纯净

2.5.1 无菌检验 按附录 3306 方法进行检验，应无菌生长。

2.5.2 支原体检验 按附录 3308 方法进行检验，应无支原体生长。

2.5.3 外源病毒检验 按附录 XX（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 方法进行检验，应无外源病毒污染。

2.6 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

3.1 鸡胚 应选择来源于健康易感鸡群的易感鸡胚。

3.2 细胞 应符合附录 3502 要求。

3.2 白油 应符合附录 3605 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

4.2.1 鸡用新城疫灭活疫苗 用推荐使用日龄 SPF 鸡 10 只，各肌肉或颈部皮下注射疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 14 日，应不出现由疫苗引起的任何局部或全身不良反应。

4.2.2 其他禽用新城疫灭活疫苗 用推荐使用最小日龄且新城疫抗体阴性靶动物 10 只，各肌肉或颈部皮下注射疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 14 日，应不出现由疫苗引起的任何局

部或全身不良反应。

#### 4.3 效力检验

##### 4.3.1 鸡用新城疫灭活疫苗

4.3.1.1 血清学方法 用推荐使用日龄 SPF 鸡 10 只，各皮下或肌肉注射疫苗 1/25 个推荐使用剂量，另 5 只作对照。接种后 21~28 日，每只鸡采血，分离血清，按附录 3404 进行 HI 抗体效价测定。对照鸡 HI 抗体效价均应不高于 1:4，免疫鸡 HI 抗体效价的几何平均值应不低于 1:16。

4.3.1.2 免疫攻毒法 用推荐使用日龄 SPF 鸡 10 只，各皮下或肌肉注射疫苗 1/25 个推荐使用剂量，另 5 只作对照。接种后 21~28 日，每只鸡各肌肉注射鸡新城疫病毒强毒  $10^{5.0}$ ELD<sub>50</sub>，观察 14 日。对照鸡应全部死亡，免疫鸡应至少 7 只保护。

4.3.2 其他禽用新城疫灭活疫苗 用推荐使用的新城疫抗体阴性靶动物 20 只，各按推荐使用途径和推荐剂量接种疫苗，接种后 21~28 日，连同对照 10 只，每只各肌肉注射的新城疫病毒强毒，至少观察 14 日，对照组动物至少 70% 出现新城疫特异性临床症状或死亡，免疫组动物应至少 90% 健活。

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。

标准草案 yaodianbarshengyao

## 17. 传染性法氏囊病灭活疫苗（标准草案）

### 传染性法氏囊病灭活疫苗

Chuanranxingfashinangbing Miehuoyimiao

#### Infectious Bursal Disease Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用传染性法氏囊病病毒适宜毒株接种易感鸡胚或适宜细胞培养，收获感染鸡胚液或细胞培养液，经适宜灭活剂灭活后，加适宜佐剂制成。用于预防传染性法氏囊病。

#### 2 毒种

**2.1 安全性** 用毒种制备灭活疫苗，用推荐最小使用日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 2 个推荐使用剂量，至少观察 14 日。应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

**2.2 免疫原性** 用毒种制备灭活疫苗，用 21~28 日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 1 个最小免疫剂量，另设 5 只攻毒对照和 5 只空白对照（不免疫，不攻毒）。接种后 28 日，免疫鸡和攻毒对照鸡各点眼接种适传传染性法氏囊病强毒（不低于  $10^{2.0}$  ID），观察 72~96 小时后全部剖杀，检查法氏囊病变。攻毒对照鸡应至少 4 只出现法氏囊特异性病变或死亡，免疫鸡应至少 8 只无任何临床症状且法氏囊正常，空白对照鸡法氏囊正常。

#### 2.3 纯净

**2.3.1 无菌检验** 按附录 3306 方法进行检验，应无菌生长。

**2.3.2 支原体检验** 按附录 3308 方法进行检验，应无支原体生长。

**2.3.3 外源病毒检验** 按附录 XX（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 方法进行检验，应无外源病毒污染。

**2.4 代次限定** 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

**3.1 鸡胚** 应选择来源于健康鸡群的易感鸡胚。

**3.2 细胞** 应符合附录 3502 要求。

**3.3 白油** 应符合附录 3605 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** 用推荐使用日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 14 日，应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

**4.3 效力检验** 用推荐使用日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 1 个推荐使用剂量，另设 5 只攻毒对照和 5 只空白对照（不免疫，不攻毒）。接种后 21~28 日，免疫鸡和攻毒对照鸡各点眼接种传染性法氏囊病强毒（不低于  $10^{2.0}$  ID），逐日观察并记录发病和死亡情况，72~96 小时后全部剖杀，检查法氏囊病变。攻毒对照鸡应至少 4 只出现法氏囊特异性病变或死亡，免疫鸡应至少 8 只法氏囊正常，空白对照鸡法氏囊正常。

**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。

## 18. 禽流感（H9 亚型）灭活疫苗（标准草案）

### 禽流感（H9 亚型）灭活疫苗

Qinliugan (H9 Yaxing) Miehuoyimiao

#### Avian Influenza (Subtype H9) Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用 A 型禽流感病毒（H9 亚型）接种易感鸡胚或适宜细胞培养，收获感染鸡胚液或细胞培养液，经适宜灭活剂灭活后，加适宜佐剂制成。用于预防由 H9 亚型禽流感病毒引起的禽流感。

#### 2 毒种

2.1 红细胞凝集价 按附录 3403 进行测定，对鸡红细胞凝集效价应不低于 1:256。

2.2 安全性 用毒种制备灭活疫苗，用推荐最小使用日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 2 个推荐使用剂量，至少观察 14 日，应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

2.3 免疫原性 用毒种制备灭活疫苗，用 3~4 周龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 1 个最小免疫剂量，接种后 21~28 日，连同对照鸡 5 只，每只鸡用适宜的禽流感（H9 亚型）病毒株攻毒，观察 14 日，观察并记录攻毒鸡临床症状。攻毒后第 3~5 日，分别采集每只鸡喉头和泄殖腔拭子，混合处理后进行病毒分离。对照鸡应至少有 4 只病毒分离阳性，免疫鸡应至少 9 只病毒分离阴性。

#### 2.4 纯净

2.4.1 无菌检验 按附录 3306 方法进行检验，应无菌生长。

2.4.2 支原体检验 按附录 3308 方法进行检验，应无支原体生长。

2.4.3 外源病毒检验 按附录 XX（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 方法进行检验，应无外源病毒污染。

2.5 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

3.1 鸡胚 应选择来源于健康鸡群的易感鸡胚。

3.2 细胞 应符合附录 3502 要求。

3.3 白油 应符合附录 3605 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 用推荐使用日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 14 日，应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

#### 4.3 效力检验

4.3.1 血清学方法 用 21~28 日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 1 个推荐使用剂量，另 5 只作对照。接种后 21~28 日，每只鸡分别采血、分离血清，测定 HI 抗体效价。对照鸡 HI 抗体效价均应不高于 1:4，免疫鸡 HI 抗体效价的几何平均值应不低于 1:64。

4.3.2 免疫攻毒法 用 21~28 日龄 SPF 鸡 10 只，各按推荐使用的免疫途径接种疫苗 1 个推荐使用剂量，接种后 21~28 日，连同对照鸡 5 只，每只鸡各用禽流感（H9 亚型）病毒株攻毒。攻毒后第 3~5 日，分别采集每只鸡喉头和泄殖腔拭子，混合处理后进行病毒分离（阴性样品应盲传 1 代）。对照鸡应至少 4 只病毒分离阳性，免疫鸡应至少 9 只病毒分离阴性。

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。

标准草案 yaodianbanshengyao

## 19. 高致病性禽流感灭活疫苗（标准草案）

### 高致病性禽流感灭活疫苗

Gaozhibingxing Qinliugan Miehuoyimiao

#### High Pathogenicity Avian Influenza Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用 H5 亚型（或 H7 亚型）禽流感病毒接种易感鸡胚或适宜细胞培养，收获感染鸡胚液或细胞培养液，经适宜灭活剂灭活后，加适宜佐剂制成。用于预防由 H5 亚型（或 H7 亚型）禽流感病毒引起的高致病性禽流感。

#### 2 毒种

2.1 红细胞凝集效价 按附录 3403 进行测定，对鸡红细胞凝集效价不低于 1:256。

2.2 对鸡胚的毒力 将毒种用无菌生理盐水稀释至不低于  $10^{4.0}$ EID<sub>50</sub>/0.1ml，经尿囊腔内接种 10~11 日龄 SPF 鸡胚 10 枚，每枚 0.1ml。置 37℃ 孵育 72 小时，鸡胚应至少存活 9 枚。

2.3 对鸡的致病性 将毒种接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚，置 37℃ 孵育 72 小时，取新鲜尿囊液，用无菌生理盐水作 10 倍稀释，静脉接种 6 周龄 SPF 鸡 10 只，每只 0.1ml，静脉接种致病指数应为 0；滴鼻接种 3~4 周龄 SPF 鸡 10 只，每只 0.2ml（含  $10^{6.0}$ EID<sub>50</sub>），另取 SPF 鸡 10 只，不接种作为对照，观察 14 日，均应不出现死亡或典型临床症状。

2.4 HA 基因鉴定 取毒种适量，用 RNA 提取试剂盒提取毒种 RNA，用 RT-PCR 方法扩增含 HA 基因裂解位点的基因片段，对扩增产物进行序列测定和分析，HA 基因裂解位点氨基酸序列应符合 H5 亚型（或 H7 亚型）禽流感病毒低致病力特征。

2.5 安全性 用毒种制备灭活疫苗，用推荐最小使用日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 2 倍推荐使用剂量，至少观察 14 日，应不出现由疫苗引起的任何局部或全身不良反应。

2.6 免疫原性 用毒种制备灭活疫苗，用 21~28 日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 1 个最小免疫剂量，接种后 21 日，连同对照鸡 5 只，每只鸡各经滴鼻接种 H5 亚型（或 H7 亚型）高致病性禽流感病毒（至少含 100LD<sub>50</sub>），观察 14 日。对照鸡应全部死亡，免疫鸡应全部健活。攻毒后不同适宜时间点分离病毒。采集每只免疫鸡喉头和泄殖腔拭子，混合处理后进行病毒分离（阴性样品应盲传 1 代），应均为阴性。

#### 2.7 纯净

2.7.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.7.2 支原体检 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

2.7.3 外源病毒检验 按附录 XX（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2.8 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

3.1 鸡胚 应选择来源于健康鸡群的易感鸡胚。

3.2 细胞 应符合附录 3502 要求。

3.3 白油 应符合附录 3605 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 21~28 日龄 SPF 鸡 10 只, 各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 2 个推荐使用剂量, 观察 10 日, 应全部健活, 且不出现由疫苗引起的任何局部或全身不良反应。

#### 4.3 效力检验

4.3.1 血清学方法 用 21~28 日龄 SPF 鸡 10 只, 各经推荐使用途径接种疫苗 1 个推荐使用剂量, 接种后 21 日, 连同对照鸡 5 只。每只鸡分别采血, 分离血清, 测定 HI 抗体效价。对照鸡 HI 抗体效价均应不高于 1:4, 免疫鸡 HI 抗体效价的几何平均值应不低于 1:64。

4.3.2 免疫攻毒法 用 21~28 日龄 SPF 鸡 10 只, 各经推荐使用途径接种疫苗 1 个推荐使用剂量, 接种后 21 日, 连同对照鸡 5 只, 每只鸡各经滴鼻接种 H5 亚型 (或 H7 亚型) 高致病性禽流感病毒 (至少含 100LD<sub>50</sub>), 观察 14 日。对照鸡应全部死亡, 免疫鸡应全部健活。攻毒后第 5 日, 采集每只免疫鸡喉头和泄殖腔拭子, 混合处理后进行病毒分离 (阴性样品应盲传 1 代), 应均为阴性。

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。

标准草案 yaodianbansheng

## 20.禽多杀性巴氏杆菌病（A型）灭活疫苗（标准草案）

### 禽多杀性巴氏杆菌病（A型）灭活疫苗

Qin Duoshaxingbashiganjunbing (A Xing) Miehuoyimiao

#### Avian *Pasteurella multocida* (Type A) Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用禽多杀性巴氏杆菌接种适宜培养基培养，收获培养物，灭活后加适宜佐剂制成。用于预防由A型禽多杀性巴氏杆菌引起的鸡多杀性巴氏杆菌病。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阴性杆菌。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中多杀性巴氏杆菌的生化特性。

2.3 培养特性 在含0.1%裂解血细胞全血及4.0%血清的改良马丁琼脂平板上，置36~37℃培养16~22小时，肉眼观察，菌落表面光滑，呈微蓝色；在低倍显微镜下，45度折光观察，菌落结构细致，边缘整齐，呈桔黄（桔红）色，属Fo菌落型。

2.4 血清型鉴定 用血清学方法或分子生物学方法鉴定，应为A型。

2.5 安全性 将菌种制备灭活疫苗，用推荐使用的最小日龄SPF鸡不少于10只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗2个推荐使用剂量，观察至少14日。逐日观察接种鸡饮食、精神状态、行动等全身反应情况，应不出现畏寒、精神沉郁、跛行等临床症状，允许在注射疫苗后出现饮食减少等应激反应，但3日内应恢复正常。注射疫苗后观察注射部位，应无破溃、坏死等情况，如出现注射局部肿胀，应在14日内消除。剖检鸡，心、肝、脾、肾、胸腺、睾丸均应无肉眼可见病变。

2.6 免疫原性 将菌种制备灭活疫苗，用2~4月龄SPF鸡10只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗1个最小免疫剂量。免疫后21日，连同对照鸡5只，各肌肉注射1MLD禽多杀性巴氏杆菌强毒株菌液（不超过10CFU活菌），观察14日。对照鸡应全部死亡，免疫鸡应至少5只在观察期内精神、采食、行动均正常，若攻毒后出现饮食减少等应激反应，应在3日内恢复正常。

2.7 纯粹 按附录3306进行检验，应纯粹。

2.8 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过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 用推荐使用的日龄的SPF鸡4只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗2个推荐使用剂量（羽份），至少观察10日。逐日观察接种动物饮食、精神状态、行动等全身反应情况，应不出现畏寒、精神沉郁、跛行等临床症状，允许在注射疫苗后出现饮食减少等应激反应，但3日内应恢复正常。注射疫苗后观察注射部位，应无破溃、坏死等情况，如出现注射局部肿胀，应在10日内消除。

4.3 效力检验 用推荐使用的日龄的SPF鸡10只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗1个推荐使用剂量。免疫后21日，连同对照鸡5只，各肌肉注射禽多杀性巴氏杆菌强毒株菌液1MLD（不超过10CFU活菌），观察14日。对照鸡应全部死亡，免疫鸡应至少5只在观察期内精神、采食、行动均正常，若攻毒后出现饮食减少等症状，应在3日内恢复正常。

4.4 甲醛、苯酚和汞类防腐剂残留量测定 分别按附录3203、3201和3202进行测定，应符合规定。

## 21.鸡传染性鼻炎灭活疫苗（标准草案）

### 鸡传染性鼻炎灭活疫苗

Ji Chuanranxingbiyan Miehuoyimiao  
**Infectious Coryza Vaccine, Inactivated**

**1 定义** 本品系用副鸡禽杆菌接种适宜培养基培养，收获培养物，灭活后加适宜佐剂制成。用于预防鸡传染性鼻炎。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阴性菌，呈球杆状或小杆状形态，无芽孢，无运动性。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中副鸡禽杆菌的特性。

2.3 培养特性 在含烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD，辅酶I）或其还原型（NADH，还原型辅酶I）和鸡血清的 TSB 培养基中生长。接种添加 NAD（或 NADH）和鸡血清的胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA）或其它适宜培养基，在含 5%~10%CO<sub>2</sub> 的条件下 37℃ 培养 24~48 小时，形成圆形、光滑、灰白色、半透明露珠状菌落，用低倍镜以 45 度折光观察可见较强荧光。在无 NAD（或 NADH）的含鸡血清普通琼脂平板上与金黄色葡萄球菌交叉划线后，在含 5%~10%CO<sub>2</sub> 的条件下 37℃ 培养 24~48 小时，呈现典型卫星生长现象。

2.4 血清型鉴定 用血凝抑制试验方法进行鉴定，应为 Page 氏血清 A 型或 B 型或 C 型。

2.5 安全性 将菌种制备灭活疫苗，用推荐使用最小日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 2 个推荐使用剂量，观察至少 14 日。应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

2.6 免疫原性 将菌种制备灭活疫苗，用 5~8 周龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 1 个最小免疫剂量，接种后 21~28 日，连同对照鸡 10 只，各眶下窦内注射 1 个发病剂量血清同型副鸡禽杆菌菌液，观察 7 日。对照鸡应至少 7 只出现鸡传染性鼻炎典型症状（有浆液性或黏液性鼻分泌物流出，和/或面部一侧或两侧眶下窦及周围肿胀，或流鼻涕或兼有流泪者），免疫鸡应至少 7 只保护。

2.7 纯粹 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

2.8 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

3.1 培养基 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 用推荐使用日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 2 个推荐使用剂量，至少观察 14 日，应不出现因疫苗引起的局部或全身不良反应。

4.3 效力检验 用推荐使用日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用的免疫途径接种疫苗 1 个推荐使用剂量。接种后 21~30 日，连同对照鸡 10 只，各眶下窦内注射 1 个发病剂量的血清同型副鸡禽杆菌菌液，观察 7 日。对照鸡应至少 7 只出现鸡传染性鼻炎典型症状（有浆液性或黏液性鼻分泌物流出，和/或面部一侧或两侧眶下窦及周围肿胀，或流鼻涕或兼有流泪者），免疫鸡应至少保护 7 只。

4.4 甲醛、苯酚和汞类防腐剂残留量测定 分别按附录 3203、3201 和 3202 进行测定，应符合规定。

## 22.鸡毒支原体灭活疫苗（标准草案）

### 鸡毒支原体灭活疫苗

Jiduzhiyuanti Miehuoyimiao

#### *Mycoplasma gallisepticum* Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用鸡毒支原体接种适宜培养基培养，收获培养物，灭活后加适宜佐剂制成。用于预防由鸡毒支原体引起的鸡慢性呼吸道疾病。

#### **2 菌种**

**2.1 形态特性** 菌体经姬姆萨或瑞氏染色后，镜下观察，呈多形态，有细小球杆状，圆形等。

**2.2 培养特性** 在CM改良液体培养基（附注1）培养24~48小时，呈轻度浑浊生长，能发酵葡萄糖产酸，使培养基pH值下降0.5以上。在CM改良固体培养基（附注1）上长，菌落呈圆形、中央突起的“煎蛋”状。

**2.3 代谢抑制试验** 将菌种培养物稀释 $10^5$ 倍，取1ml接种含10%阳性血清的1mlCM改良液体培养基中，充分混匀。将稀释好的菌液接种不含阳性血清的液体培养基作为对照管。设2ml液体培养基作为空白对照，同时置37℃培养10日，空白对照不变色，试验组培养物颜色应不出现明显改变，阴性对照培养物颜色应出现明显变化。

**2.4 安全性** 将菌种培养物制成灭活疫苗，用推荐使用日龄SPF鸡10只，各肌肉或颈背部皮下注射疫苗2个推荐使用剂量，观察14日。应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应，且应无慢性呼吸道症状，剖检后气囊病变分数应不高于1分。

**2.5 免疫原性** 将菌种培养物制成灭活疫苗，用推荐使用日龄SPF鸡10只，各颈背部皮下注射疫苗1个最小免疫剂量。免疫后30日，连同对照鸡10只，各气囊注射鸡毒支原体R株强毒菌液0.2ml（含10MID），观察14日，是否有呼吸道症状出现，14日后剖检，观察气囊病变并进行病变记分（见附注2）。对照鸡应至少7只出现2分及以上气囊病变，免疫鸡的平均气囊保护率应不低于60%。

**2.6 无菌检验** 按附录3306进行检验，应无菌生长。

**2.7 代次限定** 从基础种子到生产种子传代不超过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。若用矿物油佐剂，应符合附录3605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** 用推荐使用日龄SPF鸡10只，各肌肉或颈背部皮下注射疫苗2个推荐使用剂量，观察14日。应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

**4.3 效力检验** 用推荐使用日龄SPF鸡10只，各颈背部皮下注射疫苗1个推荐使用剂量，免疫后30日，连同对照鸡10只，各气囊注射鸡毒支原体强毒菌液0.2ml（含10MID），观察14日后剖检，观察气囊病变并进行病变记分（见附注2）。对照鸡应至少7只鸡出现2分及以上气囊病变，免疫鸡的平均气囊保护率应不低于60%。

**4.4 甲醛、苯酚和汞类防腐剂残留量测定** 分别按附录3203、3201、3202进行测定，应符合规定。

**附注：**

## 1 CM 改良培养基配制

### 1.1 CM 改良液体培养基配制

组分	数量
脑心浸液	17.5g
注射用水	750ml
猪血清（或马血清）	150ml
25%酵母浸液	100ml
1%酚红	2ml
青霉素	终浓度 1000U/ml

上述成分混合溶解后，用 1mol/L 的氢氧化钠溶液调 pH 值为 7.6~7.8，过滤除菌，定量分装后使用。

1.2 CM 改良固体培养基配制 取 17.5g 脑心浸液和 12.5g 琼脂加入 750ml 注射用水后，加热充分溶解后，冷却至 55±5℃，用 1mol/L 的氢氧化钠溶液调 pH 值为 7.6~7.8，121℃ 高压 20 分钟，待冷却至 55±5℃，按 CM 改良培养基的比例无菌加入预热的血清、酵母浸液和青霉素，充分混匀后，制备固体培养基平板。

### 2 气囊病变记分标准和平均气囊保护率计算公式

#### 2.1 气囊病变记分标准

0 分—气囊正常，清洁透明而薄。

1 分—气囊稍有增厚和轻度浑浊，局部有少数灰色或黄色渗出物斑点。

2 分—部分气囊区域有可见的灰色和黄色渗出物，同时伴有气囊中度增厚。

3 分—大片气囊布满黄色干酪样渗出物。

4 分—整个气囊布满黄色干酪样渗出物，气囊失去弹性。

#### 2.2 保护率计算公式

$$\text{平均气囊保护率} = \frac{\text{对照鸡平均气囊病变分数} - \text{试验鸡平均气囊病变分数}}{\text{对照鸡平均气囊病变分数}} \times 100\%$$

## 23.兔出血症灭活疫苗（标准草案）

### 兔出血症灭活疫苗

Tu Chuxuezheng Miehuoyimiao

#### Rabbit Haemorrhagic Disease Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用兔出血症病毒接种健康易感兔,收获感染兔肝脏、脾脏等含毒组织;或用适宜表达系统表达兔出血症病毒 VP60 蛋白,收获表达蛋白,灭活或适宜工艺处理后,加保护剂或适宜佐剂制成。用于预防兔出血症。

#### 2 毒种

**2.1 安全性** 用毒种制备灭活疫苗。用推荐使用最小日龄健康易感兔 5 只,接种前定时测量体温应不少于 3 日,以体温平均值作为基础体温。按推荐使用途径,每只兔接种疫苗至少 2 个推荐使用剂量,接种后测量体温(与接种前测温时段一致)至少 5 日,至少观察 14 日,观察期内兔应全部健活。接种疫苗后兔体温与基础体温相比,应不超过 1°C;若超过 1°C,但不超过 1.5°C,稽留应不超过 2 日。

#### 2.2 免疫原性

**2.2.1 血清学方法** 用毒种制备灭活疫苗,用 2 月龄以上的健康易感兔 5 只,用推荐使用途径各接种疫苗 1 个最小免疫剂量,接种后 14~21 日,连同对照兔 5 只,每只兔采血、分离血清,用 1%人红细胞按附录 3403 和 3404 进行 HI 抗体效价测定。对照兔 HI 抗体效价均应不高于 1:4,免疫兔 HI 抗体效价均应不低于 1:32。

**2.2.2 免疫攻毒法** 将毒种制备灭活疫苗,用 2 月龄以上健康易感兔 5 只,用推荐使用途径各接种疫苗 1 个最小免疫剂量,接种后 14~21 日,连同对照兔 5 只,每只兔各皮下注射兔出血症病毒强毒(至少含 1000LD<sub>50</sub>),至少观察 7 日。对照兔应不少于 4 只死亡,免疫兔应全部健活。

#### 2.3 纯净

**2.3.1 无菌检验** 按附录 3306 进行检验,应无菌生长。

**2.3.2 支原体检验** 按附录 3308 进行检验,应无支原体生长。

**2.3.3 外源病毒检验** 按附录 XX(外源病毒检验的通用要求)和附录 3305 进行检验,应无外源病毒污染。

**2.4 代次限定** 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

**3.1 兔** 通常采用 2 月龄以上健康易感兔,应符合附录 3501 要求。

**3.2 细胞** 应符合附录 3502 要求。

**3.3 灭活剂和佐剂** 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** 用推荐使用日龄健康易感兔 4 只,接种前定时测量体温应不少于 3 日,以体温平均值作为基础体温;按推荐使用途径,每只兔接种疫苗至少 2 个推荐使用剂量,接种后测量体温至少 5 日,至少观察 7 日,观察期内兔应全部健活。兔接种疫苗后体温与基础体温相比,应不超过 1°C;若超过 1°C,但不超过 1.5°C,且不超过 2 日。

#### 4.3 效力检验

**4.3.1 血清学方法** 用 2 月龄以上的健康易感兔 5 只,用推荐使用途径各接种疫苗 1 个推荐使用剂量,接种后 14~21 日,连同对照兔 5 只,每只兔各采血、分离血清,进行血

清 HI 抗体效价测定。对照兔 HI 抗体效价均应不高于 1:4，免疫兔 HI 抗体效价均应不低于 1:32。

4.3.2 免疫攻毒法 用 2 月龄以上的健康易感兔 5 只，用推荐使用途径各接种疫苗 1 个推荐使用剂量，接种后 14~21 日，连同对照兔 5 只，每只兔各皮下注射兔出血症病毒强毒（至少含 1000LD<sub>50</sub>），至少观察 7 日。对照兔应至少 4 只死亡，免疫兔应全部健活。

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。

标准草案 yaodianbanshengyao

## 24.兔产气荚膜梭菌病（A 型）灭活疫苗（标准草案）

### 兔产气荚膜梭菌病（A 型）灭活疫苗

Tu Chanqijiamosuojunbing(A Xing) Miehuoyimiao

#### Rabbit *Clostridium perfringens* (Type A) Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用 A 型产气荚膜梭菌接种适宜培养基培养，收获培养物，用适宜灭活剂灭活脱毒后，加适宜佐剂制成。用于预防由兔 A 型产气荚膜梭菌引起的兔产气荚膜梭菌病。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阳性粗大杆菌，有荚膜。芽孢呈卵圆形。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中产气荚膜梭菌的生化特性。

2.3 培养特性 在鲜血琼脂平板上厌氧培养，菌落呈正圆形、光滑、隆起，周围呈现  $\alpha$ 、 $\beta$  双溶血环。在厌气肉肝汤中生长较快，接种后 4~6 小时即生长旺盛、产气。

2.4 血清型鉴定 用血清中和试验鉴定产生的毒素类型，应为产气荚膜梭菌 A 型毒素。鉴定方法为：取产气荚膜梭菌 A 型定型血清 0.3ml 和毒素 0.6ml（含 3MLD）混合，37℃ 作用 45 分钟后静脉注射小鼠 2 只，每只 0.3ml，对照注射 0.2ml 毒素（含 1MLD）观察 24 小时。对照组应全部死亡，试验组应全部健活。

2.5 毒素毒力 用体重 16~20g 小鼠 2 只，以肉肝胃膜消化汤 5 小时培养物，各腹腔注射滤过的无菌毒素 0.05~0.1ml，应在 24 小时内全部死亡；用体重 1.5~2.0kg 健康易感家兔 2 只，每只静脉注射 1~3ml，应在 24 小时内全部死亡。

2.6 安全性 将菌种制备灭活疫苗，用体重 1.5~2.0kg 健康易感家兔 5 只，各皮下注射疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 21 日。应全部健活，所有接种家兔应精神、呼吸、采食正常，且注射局部不应发生坏死、破溃；所有家兔在接种前观察并测温 3 日，接种后连续测温 7 日，接种后体温与接种前基础体温相比，应不超过基础体温 1.0℃，若超过 1.0℃，但不超过 1.5℃，稽留应不超过 1 个温次。

2.7 免疫原性 按推荐的最小免疫剂量制成灭活疫苗。用体重 1.5~2.0kg 健康易感家兔 4 只，各皮下注射疫苗 1 个最小免疫剂量，免疫后 21 日，连同对照家兔 2 只，各静脉注射 1MLD 的 A 型产气荚膜梭菌毒素，观察 7 日。对照兔应全部死亡，免疫兔应至少 3 只健活。

2.8 纯粹 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

2.9 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 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，应符合规定。

4.2 安全检验 用体重 1.5~2.0kg 健康易感家兔 2 只，各皮下注射疫苗 2 个推荐使用剂量，观察 10 日。家兔应全部健活，且注射局部不应发生坏死、破溃。

4.3 效力检验 用体重 1.5~2.0kg 健康易感家兔 4 只，各皮下注射疫苗 1 个推荐使用剂量，免疫后 21 日，连同对照家兔 2 只，各静脉注射 1MLD 的 A 型产气荚膜梭菌毒素，观察 7 日。对照兔应全部死亡，免疫兔应至少 3 只健活。

4.4 甲醛、苯酚和汞类防腐剂残留量测定 分别按附录 3203、3201、3202 进行测定，应符合规定。

## 25.鸡传染性支气管炎灭活疫苗（标准草案）

### 鸡传染性支气管炎灭活疫苗

Ji Chuanranxingzhiqiguanyan Miehuoyimiao

Infectious Bronchitis Vaccine, Inactivated

**1 定义** 本品系用鸡传染性支气管炎病毒适宜毒株接种健康易感鸡胚培养，收获感染鸡胚液，灭活后，加适宜佐剂制成。用于预防由鸡传染性支气管炎马萨型病毒引起的产蛋下降或蛋品质下降。如疫苗可用于预防由鸡传染性支气管炎病毒引起的呼吸道症状等，则需增加对呼吸道等保护的免疫效力试验。

#### 2 毒种

**2.1 安全性** 将毒种制备灭活疫苗，用推荐使用最小日龄 SPF 鸡，按推荐使用的各种途径免疫，每种途径接种 10 只，每只接种 2 个推荐使用剂量，至少观察 14 日。应不出现由疫苗引起的全身和局部不良反应。

**2.2 免疫原性** 将毒种制成灭活疫苗。试验分为 4 组，每组不少于 30 只 SPF 产蛋鸡，按疫苗推荐的免疫途径和 1 个最小使用剂量进行接种。

第 1 组，不接种疫苗对照组。

第 2 组，接种鸡传染性支气管炎灭活疫苗。

第 3 组，按推荐的免疫程序接种鸡传染性支气管炎活疫苗（H120 株）和灭活疫苗。

第 4 组，接种鸡传染性支气管炎活疫苗（H120 株）。

从产蛋开始时持续观察每一组的产蛋量及蛋品质直至攻毒后 4 周。在产蛋高峰期，用可导致 SPF 蛋鸡攻毒后连续 3 周产蛋下降或蛋品质下降的适量传染性支气管炎病毒 M41 强毒株病毒液攻毒。攻毒后至少观察 4 周，记录各组的产蛋数量和蛋质量（如薄壳、软壳、畸形蛋，蛋白稀薄、水样化等）。与攻毒前相比，第 1 组的产蛋量应至少下降 35%，试验成立。经统计学分析，第 3 组应显著好于第 4 组，且第 2 组应显著好于第 1 组。

#### 2.3 纯净

**2.3.1 无菌检验** 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

**2.3.2 支原体检验** 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

**2.3.3 外源病毒检验** 按附录 XX（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

**2.4 代次限定** 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

**3.1 鸡胚** 应选择来源于健康鸡群的易感鸡胚。

**3.1 注射用白油** 应符合附录 3605 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** 用推荐使用日龄 SPF 鸡 10 只，各按推荐免疫途径接种疫苗 2 个推荐使用剂量，连续观察 14 日，应不出现由接种疫苗引起的任何局部或全身不良反应。

**4.3 效力检验** 用推荐使用日龄 SPF 鸡 20 只，各经滴鼻或者点眼接种鸡传染性支气管炎活疫苗（H120 株）每只  $10^{3.5}EID_{50}$ ；另取 5 只不免疫作对照。接种后 21~28 日，所有鸡分别采血，分离血清，同时免疫组每只鸡再经推荐途径接种疫苗 1 个推荐使用剂量。二次接种后 21~28 日，对所有鸡再次采血，分离血清。将两次血清分别测定 HI 抗体效价。对照鸡 HI 抗体效价均应不高于 1:8，免疫鸡二免血清 HI 抗体效价的几何平均值应不低于首免血

清 HI 抗体效价几何平均值的 **4 倍**。

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。

标准草案 yaodianbanshengyao

## II. 活疫苗

### 1. 小反刍兽疫活疫苗（标准草案）

#### 小反刍兽疫活疫苗

Xiaofanchushouyi Huoyimiao

#### Peste Des Petits Ruminants Vaccine, Live

**1 定义** 本品系用小反刍兽疫弱毒株接种适宜细胞,收获细胞培养物,加适宜稳定剂,经冷冻真空干燥制成。用于预防羊小反刍兽疫。免疫期应不低于 36 个月。

#### 2 毒种

##### 2.1 安全性

**2.1.1 对山羊的安全性** 将毒种用无血清 MEM 细胞培养液稀释成  $10^{5.0}TCID_{50}/ml$ , 用 1~4 月龄健康易感山羊 3 只,各颈部皮下接种病毒液 1.0ml,另 3 只同群饲养作对照,所有山羊在接种前 3 日测定体温,计算平均值作为基础体温。接种后每日测定体温 1 次并观察临床症状,观察 21 日。接种山羊除一过性体温升高外,精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等应无异常临床症状。同居山羊可在观察期间(第 7、14、21 日)采集口鼻拭子检测小反刍兽疫病毒,应为阴性;精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等应无异常临床症状,同居后 21 日采血,分离血清并测定其中和抗体效价,应不高于 1:4。

**2.1.2 对绵羊的安全性** 将毒种用无血清 MEM 细胞培养液稀释成  $10^{5.0}TCID_{50}/ml$ , 用 1~4 月龄健康易感绵羊 3 只,各颈部皮下接种病毒液 1.0ml,另 3 只同群饲养作对照,所有绵羊在接种前 3 日测定体温,计算平均值作为基础体温。接种后每日测定体温 1 次并观察临床症状,观察 21 日。接种绵羊除一过性体温升高外,精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等均应无异常临床症状。同居绵羊可在观察期间(第 7、14、21 日)采集口鼻拭子检测小反刍兽疫病毒,应为阴性;精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等应无异常临床症状,同居后 21 日采血,分离血清并测定其中和抗体效价,应不高于 1:4。

**2.1.3 对怀孕山羊的安全性** 将毒种用无血清 MEM 细胞培养液稀释成  $10^{5.0}TCID_{50}/ml$ , 用不同怀孕阶段的山羊(小反刍兽疫病毒中和抗体不高于 1:4) 3 只,各颈部皮下注射病毒液 1.0ml,另 3 只作对照,所有山羊在接种前 3 日测定体温,计算平均值作为基础体温。接种后每日测定体温 1 次并观察临床症状,观察至母羊产羔。接种山羊除一过性体温升高外,精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等均应无异常临床症状,不应出现因接种毒种引起的流产,与对照组相比,所产羔羊数量应无显著差异。

**2.1.4 对小鼠的安全性** 将毒种用无血清 MEM 细胞培养液稀释成  $10^{5.0}TCID_{50}/ml$ , 用体重为 18~22g 小鼠 6 只,各腹腔注射病毒液 0.1ml,另 4 只作为对照,观察 14 日,所有小鼠均应健活。

**2.1.5 对豚鼠的安全性** 将毒种用无血清 MEM 细胞培养液稀释成  $10^{5.0}TCID_{50}/ml$ , 用体重为 200~250g 豚鼠 6 只: 2 只各肌肉注射病毒液 0.5ml; 2 只各腹腔注射病毒液 0.5ml, 2 只作对照,观察 14 日,所有豚鼠均应健活。

##### 2.2 免疫原性

**2.2.1 血清学方法** 将毒种用灭菌生理盐水稀释成  $10^{3.0}TCID_{50}/ml$ , 用 1~4 月龄健康易感山羊 5 只,各颈部皮下注射病毒液 1.0ml (含 1 个最小免疫剂量),接种后 21 日,连同对照山羊 3 只,分别采血测定中和抗体效价。对照羊中和抗体效价均应不高于 1:4,免疫羊血清中和抗体效价均应不低于 1:10。

**2.2.2 免疫攻毒法** 将毒种用灭菌生理盐水稀释成  $10^{3.0}TCID_{50}/ml$ , 用 1~4 月龄健康易

感山羊 5 只，各颈部皮下注射病毒液 1.0ml（含 1 个最小免疫剂量），接种后 21 日，连同对照山羊 3 只，所有羊颈部皮下注射小反刍兽疫强毒 1.0ml（含 1000LD<sub>50</sub>），攻毒后观察 14 日。对照羊应全部出现发热、口炎、腹泻等小反刍兽疫特征性临床症状，攻毒后 14 日剖检，应出现小反刍兽疫特征性病理变化。免疫羊应全部健活，攻毒后 14 日剖检，应无小反刍兽疫特征性病理变化。

### 2.3 纯净

2.3.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.3.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生产。

2.3.3 外源病毒检验 按附录 XX（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2.4 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

## 3 生产用原辅料

3.1 细胞 细胞应符合附录 3502 要求。

3.2 血清 应符合附录 3503 要求。

3.3 培养基、稳定剂等特定生物原材料 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 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 进行检验，应无外源病毒污染。

4.4 鉴别检验 按瓶签注明头份，将疫苗用无血清 MEM 细胞培养液稀释至 2 头份/ml，加入等体积小反刍兽疫阳性血清，病毒对照组加入等体积无血清 MEM 细胞培养液，置 37℃ 作用 1 小时后，接种 96 孔细胞培养板，病毒中和液和病毒对照液各接种 5 孔，每孔 0.1ml，同时设立正常细胞对照 5 孔。所有孔均加入浓度为 20~30 万/ml Vero 细胞悬液 0.1ml，置 37℃、含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 6 日，期间每日观察细胞病变，中和组及正常细胞对照组均不应出现细胞病变，病毒对照组均应出现细胞融合等细胞病变。

4.5 安全检验 按瓶签注明头份，将疫苗用无菌生理盐水稀释成 100 头份/ml，用 12 月龄左右健康易感山羊 3 只，各颈部皮下注射疫苗 1.0ml。接种前 3 日测定体温，计算平均值作为基础体温。接种后每日测定体温 1 次并观察临床症状，连续观察 14 日，除一过性体温升高（体温升高超过基础体温 1.5℃，连续不超过 2 个温次）外，应无其它异常临床症状。

4.6 病毒含量测定 按瓶签注明头份，将疫苗用无血清 MEM 细胞培养液稀释成 1 头份/ml，再作 10 倍系列稀释，取 10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup> 4 个稀释度，接种 96 孔细胞培养板，每个稀释度接种 5 孔，每孔 0.1ml。每孔再加入浓度为 20~30 万/ml Vero 细胞悬液 0.1ml，同时设立正常细胞对照 5 孔，置 37℃、含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 6 日，期间每日观察细胞病变，正常细胞对照不应出现细胞病变，根据各稀释度出现细胞病变孔数，按 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>，每头份病毒含量应不低于说明书标示量。

4.7 效力检验 按瓶签注明头份将疫苗用灭菌生理盐水稀释成 1 个推荐使用剂量/ml，用 12 月龄左右健康易感山羊 5 只，各颈部皮下注射疫苗 1.0ml，接种后 21 日采血，测定中和抗体效价，均应不低于 1:10。

4.8 剩余水分测定 按附录 3204 进行检验，应符合规定。

4.9 真空度测定 按附录 3103 进行检验，应符合规定。

## 2.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 $\mu\text{m}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ ）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

**2.6.1 对豚鼠的毒力** 取含活菌 $1.0\times 10^9$ CFU/ml的悬液，经皮下注射体重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，制成混悬液，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 $2.0\times 10^5$ CFU。

**2.6.2 对小鼠的毒力** 取含活菌 $1.0\times 10^9$ CFU/ml的悬液，经皮下注射18~20g雌性BA1B/c小鼠至少32只，0.1ml/只，接种后3、6、9、12周随机选取小鼠8只处死，分别取脾脏、研磨，制成混悬液，全部接种TSA培养基平板，分别统计各采样时间脾脏分离到布鲁氏菌的小鼠数量，有4只以上的小鼠分离到候选菌株的时间应不超过9周。

#### 2.7 安全性

**2.7.1 对靶动物的安全性** 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随机分成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个推荐使用剂量的最大活菌数，接种后至少观察45日，应不发生明显的局部或全身不良反应。如果出现体温升高、食欲减退等，应不超过3日。

如果疫苗可用于免疫怀孕动物，还应选用怀孕中后期健康易感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1个推荐使用剂量最大活菌数，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 对小鼠的安全性 候选菌种稀释成每 1.0ml 含有不少于  $1.0 \times 10^9$ CFU 的活菌数，经皮下注射体重 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 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 个最小免疫剂量的活菌数，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。

2.9 纯粹 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

2.10 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 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 配苗时，应根据菌株特性合理控制疫苗活菌数。

### 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 按瓶签注明的推荐使用剂量最小活菌数核算，用 PBS（0.01mol/L，pH 值 7.0~7.2）将疫苗稀释为每 0.1ml 含有活菌数不低于  $1.0 \times 10^9$ CFU，经皮下注射 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

6.1 本疫苗必须制定每头份活菌数上限。

6.2 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。

### 3.山羊痘/绵羊痘活疫苗（标准草案）

#### 山羊痘/绵羊痘活疫苗

Shanyangdou/Miayangdou Huoyimiao

Goat Pox/Sheep Pox Vaccine, Live

**1 定义** 本品系用山羊痘/绵羊痘病毒弱毒株接种适宜细胞培养，收获细胞培养物，加入适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防山羊痘、绵羊痘。免疫期应不低于 12 个月。

#### 2 毒种

##### 2.1 安全性

2.1.1 对山羊的安全性 用无菌生理盐水将毒种稀释为不少于 4 个推荐使用剂量，经易感部位皮内接种 12~48 月龄健康易感山羊和 1~3 月龄山羊羔羊各 3 只，每只每点接种不少于 2 个推荐使用剂量，接种前测定体温应不少于 3 日，接种后观察 28 日，每日测定体温，接种羊注射部位可出现直径不超过 4.0cm 的微红色或无色痘肿反应，且应在观察期内逐渐消退，痘肿不应出现紫红色、严重水肿、化脓、结痂等反应，间或可有轻度体温反应，但精神、食欲应正常。接种羊应不出现继发痘肿。

2.1.2 对绵羊的安全性 用无菌生理盐水将毒种稀释为不少于 4 个推荐使用剂量，经皮内注射 12~48 月龄健康易感绵羊和 1~3 月龄健康易感绵羔羊各 3 只，每只每点接种不少于 2 个推荐使用剂量，接种前测定体温应不少于 3 日，接种后观察 28 日，每日测定体温，接种羊注射部位可出现直径不超过 4.0cm 的微红色或无色痘肿反应，且应在观察期内逐渐消退，痘肿不应出现紫红色、严重水肿、化脓、结痂等反应，间或可有轻度体温反应，但精神、食欲应正常。接种羊应不出现继发痘肿。如毒种为绵羊痘病毒，羊的品种应增加细毛羊尤其是美利奴羊。

2.1.3 对怀孕羊的安全性 用无菌生理盐水将毒种稀释为不少于 4 个推荐使用剂量，经皮内注射怀孕 3~5 月龄健康易感山羊/绵羊 3 只，每只每点接种不少于 2 个推荐使用剂量，注射时动作应轻柔，避免出现因保定不当引起的机械性流产，接种后观察至母羊产羔，接种母羊注射部位可出现直径不超过 4.0cm 微红色或无色痘肿反应，且应在观察期内逐渐消退，痘肿不应出现紫红色、严重水肿、化脓、结痂等反应，间或可有轻度体温反应，但精神、食欲应正常。接种羊应不出现继发痘肿，所产羔羊均应健活。

##### 2.2 免疫原性

2.2.1 最小发痘量 用无菌生理盐水将毒种作 10 倍系列稀释，取  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  3 个稀释度或适宜稀释度，每个稀释度经敏感部位皮内注射 12~48 月龄健康易感山羊/绵羊 3 只，每只 2 点，0.5ml/点（也可在每只羊体上同时注射不同稀释度，每个稀释度 2 点，0.5ml/点）。观察 15 日， $10^{-4}$  或  $10^{-5}$  稀释度（含不高于 60 TCID<sub>50</sub>）至少应有 1 只羊在接种后出现直径为 0.5~3.0cm 微红色或无色痘肿反应，且持续 4 日以上，观察期内逐渐消退。

2.2.2 免疫攻毒 用 12~48 月龄健康易感山羊/绵羊 6 只，按推荐途径接种羊 3 只，每只 1 个最小免疫剂量，接种后 21 日，连同对照羊 3 只，各皮内注射山羊痘/绵羊痘病毒强毒。将山羊痘/绵羊痘病毒强毒株用 PBS 进行 10 倍系列稀释，取 6 个适宜稀释度，沿肋部纵向皮内注射 4 排，每个稀释度接种 4 点，0.1ml/点。对照羊 24 个接种位点可能形成 24 个肿块，最高稀释度的 4 个接种位点反应较小或无反应，免疫羊 24 小时应在其接种位点形成初期过敏反应，然后消失，最高稀释度的注射位点可能会形成小坏死区，攻毒后 8~10 日测量斑疹/丘疹/痘肿。计算免疫羊和对照羊形成斑疹/丘疹/痘肿的滴度，如两者差值  $> \log 10^{2.5}$ ，说明免疫具有保护作用。

## 2.3 纯净

2.3.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验, 应无菌生长。

2.3.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验, 应无支原体生长。

2.3.3 外源病毒检验 按附录 XX (外源病毒检验的通用要求) 和附录 3305 进行检验, 应无外源病毒污染。

2.4 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

## 3 生产用原辅料

3.1 原代细胞或其他适宜细胞系 应符合附录 3502 要求。

3.2 牛血清 应符合附录 3503 要求。

3.3 特定生物原材料 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 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 进行检验, 应无外源病毒污染。

4.4 鉴别检验 用无血清细胞培养液将疫苗稀释至 1/10 头份/ml, 取 0.5ml 与等体积山羊痘阳性血清混合均匀, 置 37℃ 中和 60 分钟, 取中和液 1.0ml 接种绵羊羔睾丸细胞或适宜细胞单层 1 瓶 (25cm<sup>2</sup>), 补足细胞培养液, 置 37℃、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 6 日, 应不出现 CPE。

4.5 安全检验 按瓶签注明头份, 用无菌生理盐水将疫苗稀释至 4 个头份/ml, 经胸腹部皮内注射 12~48 月龄山羊/绵羊 3 只, 每只 2 点, 0.5ml/点, 观察 15 日。接种羊可出现直径不超过 4.0cm 的微红色或无色痘肿反应, 且在观察期内逐渐消退, 间或可有轻度体温反应, 但精神、食欲应正常。

4.6 病毒含量测定 按瓶签注明头份, 用无血清细胞培养液将疫苗稀释至 1 个推荐使用剂量/ml, 以此为基础作 10 倍系列稀释, 取 3 个适宜稀释度, 接种 96 孔细胞板, 每个稀释度接种 5 孔, 每孔 0.1ml, 接种后每孔加入绵羊羔睾丸细胞或适宜细胞悬液 0.1ml, 置 37℃、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 5 日。根据出现 CPE 的细胞孔数, 按 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>, 每头份疫苗病毒含量应不低于说明书标示量。

4.7 效力检验 按瓶签注明头份, 用无菌生理盐水将疫苗稀释至 0.02 头份/ml, 经胸腹部皮内注射 12~48 月龄健康易感山羊/绵羊 3 只, 每只 2 点, 0.5ml/点, 观察 15 日。接种羊应至少有 2 只在接种后 5~7 日出现直径为 0.5~3.0cm 微红色或无色痘肿反应, 且持续 4 日以上, 观察期内逐渐消退。

4.8 剩余水分测定 按附录 3204 进行测定, 应符合规定。

4.9 真空度测定 按附录 3103 进行测定, 应符合规定。

5 注意事项 注射时, 应避免保定不当引起的怀孕母羊机械性流产。不同品种的羊使用时应开展小规模田间试验。

## 4.猪丹毒活疫苗（标准草案）

### 猪丹毒活疫苗

Zhudandu Huoyimiao

#### Swine Erysipelas Vaccine, Live

**1 定义** 本品系用猪丹毒杆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。用于预防猪丹毒。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阳性纤细小杆菌。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中猪丹毒杆菌的生化特性。

#### 2.3 培养特性

2.3.1 明胶平板培养 置 15~18℃培养 3~5 日，肉眼观察呈灰白色、不透明的圆形小菌落。用低倍显微镜观察，呈浅黄色，中心可见核样结构，周边有向外生长的短毛样分枝。

2.3.2 明胶穿刺培养 置 15~18℃培养 3~5 日，肉眼观察为乳白色线状生长。用放大镜观察，应呈线状生长或呈不规则的间断短毛生长线。

2.3.3 马丁琼脂平板培养 在含有 4.0%血清及 0.1%裂解血细胞全血的马丁琼脂平板上，置 36~37℃培养 36~48 小时，为圆整光滑型菌落。在低倍显微镜下观察，周围有微小波纹，中部有黄褐色点状颗粒。

2.4 血清型鉴定 用猪丹毒杆菌分型血清作沉淀试验进行鉴定，应符合菌种的血清型特征。

#### 2.5 安全性

2.5.1 对小鼠的安全性 用 20%氢氧化铝胶生理盐水稀释活菌，用体重 20~22g 小鼠 10 只，每只皮下注射活菌 2 个推荐使用剂量，观察至少 14 日。小鼠应至少 9 只健活。

2.5.2 对猪的安全性 用 20%氢氧化铝胶生理盐水稀释活菌。用推荐使用最小日龄健康易感猪 5 头，各经推荐使用的途径接种活菌至少 10 个推荐使用剂量，观察至少 14 日，应不出现精神沉郁、不愿走动、厌食、暗红色皮肤丘疹（打火印）等临床症状，允许个别猪有体温反应（高于基础体温 1℃），但稽留时间应不超过 1 日。

#### 2.6 免疫原性

2.6.1 用 20%氢氧化铝胶生理盐水稀释活菌，用体重 16~18g 小鼠 16 只，分成 3 组，第 1 组 10 只，第 2、3 组各 3 只。第 1 组各皮下注射活菌 1/50 个推荐使用剂量，免疫后 14 日，第 1 组 10 只免疫小鼠，连同第 2 组 3 只对照小鼠，各皮下注射含 1000 个对小鼠最小致死剂量（MLD）的适宜血清型猪丹毒杆菌菌液，另取第 3 组 3 只对照小鼠，各皮下注射含 1 个对小鼠最小致死剂量（MLD）的适宜血清型猪丹毒杆菌攻毒菌液，观察 14 日。第 2 组对照小鼠应全部死亡，第 3 组对照小鼠应至少 2 只死亡，免疫小鼠应至少 8 只保护。

2.6.2 用 20%氢氧化铝胶生理盐水稀释活菌。用 58~63 日龄健康易感猪 5 头，各经推荐途径接种活菌最小免疫剂量。免疫后 14 日，连同对照猪 5 头，各静脉注射含 1 个对猪最小致死剂量（MLD）的适宜血清型猪丹毒杆菌菌液，观察 14 日。对照猪应全部死亡，免疫猪应至少 4 头精神、被毛、采食、行动均正常，若攻毒后出现体温升高（高于基础体温 1℃），应在 3 日内恢复正常；若对照猪至少 4 头出现精神沉郁、不愿走动、厌食、暗红色皮肤丘疹（打火印）、体温至少持续 2 日出现体温升高（高于基础体温 1.0℃）等症状，且至少死亡 2 头，免疫猪应 5 头精神、被毛、采食、行动均正常，若攻毒后出现体温升高（高于基础体温 1℃），应在 3 日内恢复正常。

2.7 纯粹 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

2.8 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

### 3 生产用原辅料

3.1 培养基 应符合附录 3009 要求。

3.2 冻干保护剂 应符合附录 3009 要求。

### 4 成品检验

4.1 纯粹检验 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

4.2 活菌计数 按瓶签注明推荐使用剂量，将疫苗用马丁肉汤稀释后，用含 10% 血清的马丁琼脂平板培养，按附录 3405 进行活菌计数。每头份疫苗中含活菌数应不低于说明书标示量。

4.3 安全检验 用小鼠检验 将疫苗用 20% 氢氧化铝胶生理盐水稀释，经皮下注射体重 20~22g 小鼠 10 只，每只 2 个推荐使用剂量，观察 14 日。小鼠应至少 8 只健活。否则，可用小鼠按上述方法重检 1 次，如果仍不符合规定，可用猪检验 1 次。

用猪检验 将疫苗用 20% 氢氧化铝胶生理盐水稀释，用推荐使用日龄健康易感猪 5 头，各按推荐免疫途径接种疫苗至少 30 个推荐使用剂量，观察 10 日。应不出现精神沉郁、不愿走动、厌食、暗红色皮肤丘疹（打火印）等猪丹毒症状，允许个别猪有体温反应（高于基础体温 1℃），但稽留时间应不超过 1 日。

#### 4.4 效力检验

4.4.1 用小鼠检验 用 20% 氢氧化铝胶生理盐水稀释疫苗，用体重 16~18g 小鼠 16 只，分成 3 组，第 1 组 10 只，第 2、3 组各 3 只。第 1 组各皮下注射疫苗 1/50 个头份，免疫后 14 日，第 1 组 10 只免疫小鼠，连同第 2 组 3 只对照小鼠，各皮下注射含 1000 个对小鼠最小致死剂量（MLD）的适宜血清型猪丹毒杆菌攻毒菌液，另取第 3 组 3 只对照小鼠，各皮下注射含 1 个对小鼠最小致死剂量（MLD）的适宜血清型猪丹毒杆菌攻毒菌液，观察 14 日。第 2 组对照小鼠应全部死亡，第 3 组对照小鼠应至少 2 只死亡，免疫小鼠应至少 8 只保护。

4.4.2 猪免疫攻毒法 用 20% 氢氧化铝胶生理盐水稀释疫苗成 1.0ml 含 1/50 头份。用推荐使用日龄健康易感猪 5 头，各经推荐途径接种疫苗 1.0ml，接种后 14 日，连同对照猪 5 头，各静脉注射含 1 MLD 的猪丹毒杆菌 1 型和 2 型（各 1 株）强毒混合菌液，观察 14 日。对照猪应全部死亡，免疫猪应至少 4 头精神、被毛、采食、行动均正常，若观察 14 日，当对照猪全部死亡时，免疫猪应至少保护 4 头；当对照猪至少发病 4 头，且至少死亡 2 头时，免疫猪应全部健活。

4.5 剩余水分测定 按附录 3204 进行测定，应符合规定。

4.6 真空度测定 按附录 3103 进行测定，应符合规定。

## 5.猪多杀性巴氏杆菌病（B型）活疫苗（暂不收录）

## 6.猪日本脑炎活疫苗（标准草案）

### 猪日本脑炎活疫苗

Zhu Riben Naoyan Huoyimiao

#### Swine Japanese Encephalitis Vaccine, Live

**1 定义** 本品系用日本脑炎病毒弱毒株接种适宜细胞培养，收获细胞培养物，加入适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防猪日本脑炎。

#### 2 毒种

##### 2.1 对小鼠的致病性

2.1.1 脑内接种 用12~14g小鼠10只，每只脑内注射毒种0.03ml(含 $1.5 \times 10^{4.0}$  PFU)，3日内死亡数不得超过2只。其余小鼠继续观察14日，应全部健活。

2.1.2 皮下接种 用10~12g小鼠10只，每只皮下注射毒种0.1ml(含 $5 \times 10^{4.0}$  PFU)，同时进行脑内空刺，3日内死亡数不得超过2只。其余小鼠继续观察14日，应全部健活。

##### 2.2 安全性

2.2.1 对母猪的安全性 用健康易感母猪2头，配种前1个月每头肌肉注射毒种10个推荐使用剂量。同时设2头健康易感母猪作为对照，配种前1个月肌肉注射同等剂量的稀释液，观察母猪至分娩，所有免疫猪应接种部位无溃烂、脓肿、坏死，若出现肿块、结节，观察期内可消退，免疫猪应不出现流产、早产、死胎或弱仔等繁殖障碍，所产仔猪的活仔率、健仔率等与对照猪相比，应无统计学差异。

2.2.2 对公猪的安全性 用健康易感成年公猪2头，肌肉注射毒种 $10^{6.0}$ PFU，接种前观察并连续测温3日，以平均值作为基础体温，接种后连续测温7日，并连续观察21日，体温升高应不超过基础体温 $1^{\circ}\text{C}$ ，应不出现睾丸肿大，采集公猪精液，经核酸检测猪日本脑炎病毒核酸应为阴性。

##### 2.3 免疫原性

2.3.1 用母猪检验 用健康易感母猪5头，配种前1个月，经肌肉注射最小免疫剂量猪日本脑炎病毒种毒。在母猪妊娠后30~40日，连同对照组怀孕母猪5头，各皮下注射日本脑炎病毒强毒P3株(含小鼠脑内毒力为 $5 \times 10^{6.0}$ LD<sub>50</sub>)，观察母猪至分娩，对照猪应至少4头出现流产、早产、死胎或弱仔等繁殖障碍，免疫猪应至少4头不出现流产、早产、死胎或弱仔等繁殖障碍。

2.3.2 用小鼠检验 用培养基将毒种进行10倍系列稀释，取 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 3个稀释度，分别皮下接种10~12g小鼠10只，每只0.1ml。免疫后14日，连同对照小鼠10只，各腹腔注射日本脑炎病毒强毒P3株(含500LD<sub>50</sub>)，同时每只小鼠进行脑内空刺，3日内死亡数不得超过2只，连续观察14日，对照小鼠应至少8只死亡，每0.1ml毒种应至少含10PD<sub>50</sub>。

##### 2.4 纯净

2.4.1 无菌检验 按附录3306进行检验，应无菌生长。

2.4.2 支原体检验 按附录3308进行检验，应无支原体生长。

2.4.3 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。

2.5 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过5代。

#### 3 生产用原辅料

3.1 细胞 应符合附录3502要求。

- 3.2 牛血清 应符合附录 3503 要求。
- 3.3 培养基和冻干保护剂 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 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 进行检验, 应无外源病毒污染。

4.4 鉴别检验 用疫苗稀释液将疫苗稀释成 500PFU/ml(或 200TCID<sub>50</sub>/0.1ml), 取 0.5ml 与猪日本脑炎病毒特异性血清等量混合, 同时设立病毒对照和空白对照。病毒对照为乙型脑炎病毒液与含 2%新生牛血清的适宜培养基等量混合, 空白对照为猪乙型脑炎病毒阳性血清与含 2%新生牛血清的适宜培养基等量混合。将上述混合液置 37℃作用 1.5 小时, 分别接种长满 BHK-21 细胞单层的 6 孔培养板中, 各混合液接种 2 孔(每孔 0.5ml), 置 37℃吸附 1 小时。吸附完毕后, 加入含 2%新生牛血清的适宜培养基至 2ml/孔, 置 37℃培养, 每日观察 1 次, 连续观察 5~7 日。试验组和空白对照组均应无 CPE, 病毒对照应出现 CPE。

4.5 安全检验 用 10~12g 小鼠 10 只, 各皮下注射疫苗 0.2ml(含 0.5 头份), 同时脑内空刺, 3 日内死亡应不超过 2 只, 其余小鼠继续观察至 14 日, 应全部健活。

4.6 病毒含量测定 将疫苗稀释至 1 个推荐使用剂量/ml, 进行病毒含量测定。每头份疫苗病毒含量应不低于说明书标示量。

4.7 效力检验 用 10~12g 小鼠 10 只, 各皮下注射疫苗 0.1ml(含 0.1 头份)。免疫后 14 日, 连同对照小鼠 10 只, 每只腹腔注射日本脑炎病毒强毒(含腹腔滴定的 500LD<sub>50</sub>), 同时每只小鼠进行脑内空刺, 3 日内死亡数不得超过 2 只。连续观察 14 日。免疫小鼠应全部健活, 对照小鼠应至少 8 只死亡。

- 4.8 剩余水分测定 按附录 3204 进行测定, 应符合规定。
- 4.9 真空度测定 按附录 3103 进行测定, 应符合规定。

## 7.猪伪狂犬病活疫苗（标准草案）

### 猪伪狂犬病活疫苗

Zhu Weikuanguanbing Huoyimiao  
Swine Pseudorabies Vaccine, Live

**1 定义** 本品系用猪伪狂犬病病毒弱毒株接种适宜细胞培养，收获细胞培养物，加入适宜保护剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防猪伪狂犬病。

#### 2 毒种

##### 2.1 安全性

2.1.1 对仔猪的安全性 用推荐使用最小日龄健康易感仔猪，每种推荐使用途径接种数量不少于 10 头，各接种病毒液不少于 10 个推荐使用最大剂量，接种后至少观察 21 日。观察期内，所有接种猪应体温正常，无精神沉郁、食欲减退、呼吸急促、以及肌肉震颤、流涎、歪头、共济失调、角弓反张、抽搐、转圈、侧卧划水状运动等伪狂犬病典型临床症状。

2.1.2 对神经系统的安全性 用 3~5 日龄健康易感仔猪至少 10 头，各经鼻内途径接种病毒液不少于 10 个推荐使用最大剂量，至少观察 21 日。所有仔猪应均健活，且应不出现由疫苗毒种接种引起的神经系统异常症状。

2.1.3 对妊娠母猪的安全性 用妊娠 70~90 日龄健康易感母猪不少于 5 头，各经肌肉注射接种病毒液不少于 10 个推荐使用剂量，同时设不免疫对照母猪 5 头，观察至分娩。母猪应无流产、死胎、弱仔等繁殖障碍，所产仔猪的活仔率、健仔率等与对照组相比，应无统计学差异；所产仔猪吮吸初乳前血清中抗伪狂犬病病毒抗体应为阴性；对出现异常的仔猪，检测肝脏和肺脏中的伪狂犬病病毒抗原，应为阴性。

2.1.4 对绵羊的安全性 用 6~18 月龄健康易感绵羊 2 只，各肌肉注射接种病毒液 1 个推荐使用剂量，接种后至少观察 21 日，观察期内，绵羊体温应正常，且无伪狂犬病相关临床症状及死亡。

2.3 免疫原性 用 21~28 日龄健康易感仔猪，每种推荐使用途径接种不少于 5 头，各接种病毒液 1 个最小免疫剂量，接种后 21 日，连同对照猪 5 头，用适宜猪伪狂犬病病毒强毒株进行攻毒，连续测量 7 日体温，至少观察 14 日。对照猪应至少 4 头发病（出现体温升高、神经症状等特异性临床症状或死亡），免疫猪应至少 4 头保护。

对于说明书明确用于母猪接种提供仔猪被动免疫保护的制品，应经推荐免疫途径接种不少于 4 头健康易感妊娠母猪，各接种病毒液 1 个最小免疫剂量，同时设同条件对照母猪 2 头。在所产仔猪第 6~10 日龄时，用适宜猪伪狂犬病病毒强毒株进行攻毒，攻毒后至少观察 21 日。与对照母猪所产仔猪相比，免疫母猪所产仔猪的保护率应不低于 80%。

##### 2.4 纯净

2.4.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.4.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

2.4.3 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。必要时，采用分子生物学方法或者猪检查法检测，应无其他病毒污染。

##### 2.5 毒种鉴别

2.5.1 基因检测 采用适宜的 PCR 方法进行基因检测与鉴定。若为人工基因缺失制备的毒株，至少 TK、gE 基因检测为阴性。

2.5.2 血清学检测 针对种毒免疫血清检测，gE 抗体检测结果应为阴性。

2.6 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

### 3 生产原辅料

3.1 细胞 应符合附录 3502 要求。

3.2 培养基 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 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 进行检验，应无外源病毒污染。

4.4 鉴别检验 用适宜的基因鉴定 PCR 检测法，应缺失该疫苗毒株相关基因。

4.5 安全检验 用推荐使用最小日龄健康易感仔猪 5 头，各肌肉注射疫苗 10 头份，连续观察 14 日，应不出现由疫苗引起的全身和局部不良反应。

4.6 病毒含量测定 用含 2%新生牛血清的 DMEM 细胞培养液将疫苗稀释为 1 头份/ml，再作 10 倍系列稀释，取 4 个适宜稀释度，分别接种已长成良好单层（弃去细胞培养液）的 96 孔适宜细胞培养板，每个稀释度接种 4~6 孔，每孔 0.1ml，同时设正常细胞对照 4~6 孔。置 37℃、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 5~7 日，观察 CPE，按 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>。每头份疫苗病毒含量应不低于说明书标示量。

4.7 效力检验 用推荐使用日龄健康易感仔猪 5 头，各颈部肌肉注射疫苗 1 头份。接种后 21 日，连同不接种的攻毒对照仔猪 5 头，用猪伪狂犬病病毒强毒株攻毒，连续测量 7 日体温，并连续观察 14 日。攻毒对照仔猪应至少 4 头发病或死亡，免疫仔猪应至少 4 头保护。

4.8 剩余水分测定 按附录 3204 进行测定，应符合规定。

4.9 真空度测定 按附录 3103 检测测定，应符合规定。

## 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（CVCCAV1412）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（+）（接种兔体温反应标准及结果判定见附注），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，应无毒种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  $1.0^{\circ}\text{C}$ ，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  $1.0^{\circ}\text{C}$ ，或体温升高超过基础体温  $1.0^{\circ}\text{C}$ ，但稽留不超过 1 个温次，且无猪瘟临床症状。

#### 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（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2.7 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

3.1 兔或乳兔 应符合附录 3501 要求。

3.2 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)。每个推荐使用剂量的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。若疫苗为兔源, 用 1.5~2.0kg 健康易感兔 4 只, 各经耳静脉注射 1.0ml (含 10 头份), 观察 7 日, 应全部健活。

4.4 安全检验 若疫苗为兔源, 除用猪检验外, 还需用小动物进行检验。

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 5~7 日, 每日上、下午各测体温 1 次。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, 经肌肉注射猪 4 头, 每头 5.0ml。接种后, 每日上、下午各观察并测体温 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 4 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 2 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 4 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。

4.4.2 用小动物检验 按瓶签注明头份, 用无菌生理盐水将疫苗稀释为 5 个头份/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。

若产品为细胞源的, 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 100 $\mu$ l, 37℃、含 5%CO<sub>2</sub> 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 按瓶签注明头份, 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 头份/ml; 或将原代细胞源疫苗稀释成 1/300 头份/ml; 或将兔源疫苗稀释成 1/150 头份/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, 各经肌肉注射猪瘟石门系血毒 1.0ml (不低于 10<sup>5.0</sup> 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 1.0℃, 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℃; 或体温升高超过 1.0℃, 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℃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℃以上，并稽留 12~36 小时。

可疑反应(±) 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(±); 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℃以上，稽留 12~36 小时。

可疑反应(±) 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(±)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，判明是否隐性感染；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。

## 9.仔猪副伤寒活疫苗（标准草案）

### 仔猪副伤寒活疫苗

Zizhu Fushanghan Huoyimiao

#### Paratyphus Vaccine for Piglets, Live

**1 定义** 本品系用猪霍乱沙门氏菌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。用于预防猪霍乱沙门氏菌引起的仔猪副伤寒。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阴性小杆菌。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中猪霍乱沙门氏菌的生化特性。

2.3 培养特性 在普通琼脂平板上，经 37℃培养 18~20 小时，菌落为圆形、边缘整齐、突起、半透明、略湿润的光滑型。

2.4 血清型鉴定 普通琼脂新鲜培养物用玻片凝集试验检查法，与沙门氏菌属 O7 因子血清反应应出现凝集。

2.5 鉴别检验 用普通琼脂培养物与 1/500 吡啶黄溶液进行玻片凝集试验，应不出现凝集反应。

2.6 安全性 用 pH 值为 7.4~7.6 的普通肉汤或蛋白胨水，将培养 24~48 小时的普通琼脂斜面培养物洗下并做活菌计数，注射下列动物应符合其标准：

2.6.1 对小鼠的安全性 用体重 18~22g（30~35 日龄）小鼠 10 只，各皮下注射活菌 1/30 个推荐使用剂量，观察 21 日。小鼠应至少存活 9 只，存活鼠精神状态、采食、运动状态均正常，允许个别鼠出现精神不振等症状，但应在 3 日内自行恢复。

2.6.2 对家兔的安全性 用体重 1.5~2kg 的健康易感家兔 5 只，各皮下注射活菌 3 个推荐使用剂量，观察 21 日。家兔精神状态、采食、饮水均正常，如出现精神不振、减食等症状，但应在 3 日内恢复。

#### 2.6.3 对仔猪的安全性

2.6.3.1 口服途径 用推荐的最小使用日龄健康易感断奶仔猪 5 头，各口服免疫活菌 10 个推荐使用剂量，观察 30 日。猪精神状态、采食、饮水均应正常，且应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

2.6.3.2 肌肉注射途径 用推荐的最小使用日龄健康易感断奶仔猪 5 头，各肌肉注射活菌 10 个推荐使用剂量，观察 30 日。猪精神状态、采食、饮水均应正常，如仔猪出现体温升高、发抖、呕吐或减食等症状，但应在 3 日内恢复。

2.7 免疫原性 用 1~3 月龄（体重 12kg 以上）健康易感断奶仔猪 5 头，各口服免疫或肌肉注射（用 20% 的氢氧化铝胶生理盐水稀释）活菌 1 个最小免疫剂量，免疫后 30 日，连同对照猪 5 头，各静脉注射 1MLD 的猪霍乱沙门氏菌强毒菌液，观察 30 日。如对照猪全部死亡，免疫猪应至少保护 3 头；如对照猪死亡 4 头，免疫猪应至少保护 4 头；如对照猪死亡 3 头，免疫猪应全部保护。

2.8 纯粹 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

2.9 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 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 成品检验

4.1 纯粹检验 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

4.2 活菌计数 按瓶签注明头份，用普通琼脂平板培养，按附录 3405 进行活菌计数。每头份含活菌数应不低于说明书标示量。

4.3 安全检验 将疫苗用普通肉汤或蛋白胨水稀释，皮下注射 1.5~2.0kg 兔 2 只，各 1.0ml（含 2 头份），观察 21 日，兔精神状态、采食、饮水均正常，如出现精神不振、减食等症状，但应在 3 日内恢复。

4.4 效力检验 用 1~3 月龄（体重 12kg 以上）健康易感断奶仔猪 5 头，各口服免疫或肌肉注射（注射时用 20%的氢氧化铝胶生理盐水稀释）疫苗 1 头份。免疫后 30 日，连同对照猪 5 头，各静脉注射 1MLD 的猪霍乱沙门氏菌强毒菌液，观察 30 日。当对照猪全部死亡时，免疫猪应至少保护 3 头；当对照猪死亡 4 头时，免疫猪应至少保护 4 头；当对照猪死亡 3 头时，免疫猪应全部保护。

4.5 剩余水分测定 按附录 3204 进行测定，应符合规定。

4.6 真空度测定 按附录 3103 进行测定，应符合规定。

标准草案 yaodianbanshengyao

## 10.猪败血性链球菌病活疫苗（标准草案）

### 猪败血性链球菌病活疫苗

Zhu Baixuexinglianqiujunbing Huoyimiao

#### Swine Streptococcosis Septicemia Vaccine, Live

**1 定义** 本品系用猪源马链球菌兽疫亚种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。用于预防由马链球菌兽疫亚种引起的猪败血性链球菌病。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阳性球杆菌。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中马链球菌兽疫亚种的生化特性。

2.3 培养特性 在缓冲肉汤中，37℃培养 10~18 小时，菌液一致混浊，不形成菌膜。在鲜血马丁琼脂平板上，37℃培养 24 小时，其菌落圆形、湿润、光滑、半透明，呈 β 溶血。

2.4 血清型鉴定 血清学方法或分子生物学方法分型鉴定，应为兰氏 C 群。

#### 2.5 安全性

2.5.1 对小鼠的安全性 用体重 18~22g（30~35 日龄）小鼠 10 只，各皮下注射菌液 0.2ml（含 1/50 头份的活菌），观察 14 日。小鼠精神状态、被毛、行动均应正常，且无疫苗引起的局部或全身不良反应。

#### 2.5.2 对猪的安全性

2.5.2.1 口服途径 用 2~4 月龄健康易感猪 5 头，各口服免疫活菌至少 10 头份，观察 21 日。猪精神状态、采食、饮水均应正常，且应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

2.5.2.2 皮下注射途径 用 2~4 月龄健康易感猪 5 头，各皮下注射活菌至少 10 个头份，观察 21 日，精神状态、采食、饮水均应正常，允许个别猪体温升高超过基础体温 1℃ 或减食等症状，但应在 3 日内自行恢复。

#### 2.6 免疫原性

2.6.1 口服途径 用生理盐水稀释活菌。用 2~4 月龄健康易感猪 5 头，各口服活菌 1 个推荐使用剂量，免疫后 14 日，连同对照猪 5 头，各静脉注射 1MLD（活菌数不高于  $1.6 \times 10^7$  CFU）的猪链球菌强毒菌液，观察 21 日。对照猪全部死亡，免疫猪应至少存活 4 头；或对照猪死亡 4 头，免疫猪应全部存活。免疫存活猪在观察期末应不出现体温升高、精神不振、关节炎等临床症状。

2.6.1 皮下注射途径 用 20% 氢氧化铝胶生理盐水稀释活菌。用 2~4 月龄健康易感猪 5 头，各皮下注射 1/2 个推荐使用剂量活菌，免疫后 14 日，连同对照猪 5 头，各静脉注射 1MLD（活菌数不高于  $1.6 \times 10^7$  CFU）的猪链球菌强毒菌液，观察 21 日。对照猪全部死亡，免疫猪应至少存活 4 头；或对照猪死亡 4 头，免疫猪应全部存活。免疫存活猪在观察期末应不出现体温升高、精神不振、关节炎等临床症状。

2.7 纯粹 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

2.8 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 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 成品检验

4.1 纯粹检验 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

4.2 活菌计数 按瓶签注明头份，用缓冲肉汤或马丁肉汤稀释，用含 10% 鲜血（或血清）马丁琼脂平板，按附录 3405 进行活菌计数。每头份含活菌数应不低于说明书标示量。

### 4.3 安全检验

4.3.1 用小鼠检验 按瓶签注明头份，用 20%氢氧化铝胶生理盐水稀释疫苗。用体重 18~22g 小鼠 5 只，各皮下注射疫苗 0.2ml（含 1/50 个推荐使用剂量），观察 14 日。小鼠精神状态、被毛、行动均应正常，且应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

4.3.2 用猪检验 按瓶签注明头份，用 20%氢氧化铝胶生理盐水稀释疫苗。用 2~4 月龄健康易感猪 2 头，各皮下注射疫苗 10 头份，观察 21 日，除体温可升高超过基础体温 1°C 或减食等症状（均应在 3 日内恢复）外，应无其他临床症状。

4.4 效力检验 按瓶签注明头份，用 20%氢氧化铝胶生理盐水稀释疫苗。用 2~4 月龄健康易感猪 4 头，各皮下注射疫苗 1/2 个头份，免疫后 14 日，连同对照 4 头猪，各静脉注射 1MLD 的猪源马链球菌兽疫亚种强毒菌液，观察 21 日。对照猪全部死亡，免疫猪应至少保护 3 头；如对照猪死亡 3 头，免疫猪应全部保护。

4.5 剩余水分测定 按附录 3204 进行测定，应符合规定。

4.6 真空度测定 按附录 3103 进行测定，应符合规定。

标准草案 yaodianbanshengyao

## 11.水貂犬瘟热活疫苗（标准草案）

### 水貂犬瘟热活疫苗

Shuidiao Quanwenre Huoyimiao

Mink Distemper Vaccine, Live

**1 定义** 本品系用犬瘟热病毒弱毒株接种适宜细胞培养，收获细胞培养物，加入适宜稳定剂，经冷冻真空干燥或冻结制成。用于预防水貂犬瘟热。

#### 2 毒种

**2.1 安全性** 用推荐使用最小日龄健康易感水貂 5 只，按各种推荐使用途径，接种毒种 10 个推荐使用剂量（病毒含量不低于  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>），至少观察 28 日。所有水貂应不出现精神不振、食欲减退、粪便异常、眼鼻分泌物等水貂犬瘟热相关临床症状。

**2.2 免疫原性** 用推荐使用日龄健康易感水貂 5 只，经推荐途径接种毒种 1 个最小免疫剂量，接种后 21 日，连同对照水貂 5 只，各皮下注射和滴鼻接种适宜的水貂犬瘟热病毒强毒（病毒含量不低于  $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>）。观察 21 日。对照水貂应至少 4 只出现精神不振、食欲减退、眼鼻有水样或粘性分泌物、排粘性便、稀便或血样便、体温升高  $40.5^{\circ}\text{C}$  以上持续至少 2 日或死亡等犬瘟热相关临床症状两种以上，免疫水貂应至少 4 只不出现任何犬瘟热相关临床症状。

#### 2.3 纯净

**2.3.1 无菌检验** 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

**2.3.2 支原体检验** 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

**2.3.3 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。

**2.4 代次限定** 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

**3.1 细胞** 应符合附录 3502 要求。

**3.2 血清** 应符合附录 3503 要求。

**3.3 培养基、稳定剂等特定生物原料** 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 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 进行检验，应无外源病毒污染。

**4.4 鉴别检验** 按标签注明头份，将疫苗稀释成 200 个 TCID<sub>50</sub>/0.1ml 的病毒悬液，与犬瘟热病毒特异性阳性血清等量混合， $37^{\circ}\text{C}$  中和 1 小时后，接种适宜的已长成良好细胞单层的 96 孔细胞培养板 4 孔，每孔 0.1ml，补加细胞营养液 0.1ml。同时设正常细胞对照、病毒对照和阴性血清对照各 4 孔，置  $37^{\circ}\text{C}$ 、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养并观察 5 日。病毒对照孔和阴性血清对照孔应全部出现 CPE，阳性血清中和孔和正常细胞孔均应不出现 CPE。

**4.5 安全检验** 用 2~10 月龄健康易感水貂 5 只，各按推荐途径接种疫苗 10 个推荐使用剂量，观察 21 日。应不出现由疫苗注射引起的不良反应。

**4.6 病毒含量测定** 用含 2% 牛血清的细胞培养液将疫苗稀释成 1 头份/ml，再作 10 倍系列稀释，取  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  4 个稀释度，分别接种适宜的已长成良好细胞单层的 96 孔细胞培养板，每个稀释度接种 8 孔，每孔 0.1ml，同时设立正常细胞对照孔 8 孔，置  $37^{\circ}\text{C}$ 、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养并观察 5 日，每日观察 CPE，按 Reed-Muench 法计算病毒含量。每

头份病毒含量应不低于说明书标示量。

4.7 效力检验 用2~10月龄接种健康易感水貂5只,各按推荐途径接种疫苗1头份。接种后21日,连同对照水貂5只,各皮下注射和滴鼻途径接种水貂犬瘟热病毒强毒(病毒含量不低于 $10^{5.0}TCID_{50}$ ),连续观察21日。对照水貂应至少4只出现精神不振、食欲减退、眼鼻有水样或粘性分泌物、排粘性便、稀便或血样便、体温升高 $40.5^{\circ}C$ 以上且至少持续2日或死亡等犬瘟热相关临床症状两种以上,免疫水貂应至少4只不出现任何犬瘟热相关临床症状。

4.8 剩余水分测定(冻干疫苗适用) 按附录3204进行测定,应符合规定。

4.9 真空度测定(冻干疫苗适用) 按附录3103进行测定,应符合规定。

标准草案 yaodianbanshengyao

## 12.鸡球虫病活疫苗（标准草案）

### 鸡球虫病活疫苗

Ji Qiuchongbing Huoyimiao

#### Coccidiosis Vaccine for Chickens, Live

**1 定义** 本品系用鸡球虫（鸡柔嫩艾美耳球虫或毒害艾美耳球虫或堆型艾美耳球虫或巨型艾美耳球虫）的适宜虫种经口接种无球虫感染健康易感鸡，收获卵囊、经纯化，置适宜溶液经适宜条件下孵育，获得孢子化卵囊制成疫苗。用于预防鸡球虫病。

#### 2 虫种

**2.1 生物学特性** 应在该球虫寄生相对应部位寄生且表现出其相应形状：柔嫩艾美耳球虫，应寄生于鸡的盲肠，卵囊呈宽卵圆形；若为毒害艾美耳球虫，应寄生于鸡的小肠中段，卵囊呈长卵圆形；若为堆型艾美耳球虫，应寄生于鸡的十二指肠，卵囊呈卵圆形；若为巨型艾美耳球虫，应寄生于鸡的小肠近端和中段，卵囊呈卵圆形。虫种的大小、形状指数及潜隐期应符合相应艾美耳球虫的虫种特性。

**2.2 药物敏感性** 柔嫩艾美耳球虫（或毒害艾美耳球虫或堆型艾美耳球虫或巨型艾美耳球虫），均对相应的抗球虫药物敏感。

**2.3 对 SPF 鸡的毒力** 用推荐使用最小日龄的 SPF 鸡 20 只，随机分成 2 组，感染组 10 只鸡，每只经推荐使用途径接种 10 个推荐使用剂量的该早熟减毒株孢子化卵囊；另 10 只鸡不免疫作为空白对照组，置隔离器中饲养，观察 7 日，应不出现该球虫引起的特异性症状：柔嫩艾美耳球虫感染鸡应不出现排鲜红色血便，若为毒害艾美耳球虫感染鸡，应不出现排粘稠血便，且均不出现精神萎靡、羽毛逆立，缩头闭眼，扎堆表现；若为巨型艾美耳球虫感染鸡，应不出现水样黄褐色粪便或粘液样粪便，且不出现精神不振、脱水引起的鸡爪干瘪表现；若为堆型艾美耳球虫感染鸡，应不出现排粘液粪便或未消化的饲料便，且感染鸡临床表现正常。分别称量感染组与空白对照组鸡体重，计算相对增重率，柔嫩艾美耳球虫感染鸡相对增重率应不低于 90%，或毒害艾美耳球虫感染鸡相对增重率应不低于 85%，或巨型艾美耳球虫感染鸡相对增重率应不低于 85%，或堆型艾美耳球虫感染鸡相对增重率应不低于 90%。剖检所有试验鸡，按病变记分标准进行评分（附注），感染组各试验鸡该球虫虫种对应的寄生部位病变记分均应不高于 1 分，空白对照组各试验鸡该球虫虫种对应的寄生部位均应无病变。

**2.4 毒力返强** 取最低代次的基础虫种口服感染接种产品推荐使用日龄的 SPF 鸡 10 只，收集该虫种潜隐期之后一定时间内排出的含卵囊粪便，混匀后取样计算其 OPG 和卵囊总量，评价其繁殖性能，同时将收集的子代卵囊经分离纯化、孢子孵化发育获得孢子化卵囊，记为第 1 代，按照第一次传代相同的途径连续接种继代，共传 5 代（含首次接种），观察记录每次接种后 SPF 鸡精神状态、粪便状态等临床症状及剖检后的肠道病变记分。第 5 代接种后观察 21 日，应不出现该球虫引起的症状和肠道病变。非选择性连续传代 5 代内的子代卵囊潜隐期、繁殖性能应稳定，且不应出现该虫种引起的临床症状和明显肠道病变，子代卵囊对 SPF 鸡的致病力无发生明显变化，毒力稳定。

**2.4 免疫原性** 用推荐使用日龄的 SPF 鸡 30 只，随机分成 3 组，每组 10 只。免疫组各经推荐使用途径接种早熟减毒株孢子化卵囊 1 个最小免疫剂量；另 2 组不免疫，分别作为空白对照组和攻虫对照组，置隔离器中饲养。接种后 21 日，免疫组和攻虫对照组各经口感染推荐攻虫剂量的该球虫强毒株孢子化卵囊。观察攻虫后发病情况：柔嫩艾美耳球虫感染后 5 日，攻虫对照组应出现排鲜红色血便，发病鸡精神萎靡、羽毛逆立，缩头闭眼，扎堆；若为毒害艾美耳球虫感染后 6 日，攻虫对照组应出现排粘稠血便，发病鸡精神萎靡、羽毛逆

立，缩头闭眼，扎堆；若为巨型艾美耳球虫感染后 6 日，攻虫对照组部分鸡只应出现水样黄褐色粪便或粘液样粪便，发病鸡精神不振、脱水引起的鸡爪干瘪；若为堆型艾美耳球虫感染后 5 日，攻虫对照组应出现排粘液粪便或未消化的饲料便，观察结束时，免疫组和空白对照组均不应出现上述临床症状。剖检所有试验鸡，按病变记分标准进行评分（附注）。攻虫对照组至少 9 只该球虫虫种对应的寄生部位病变记分均应不少于 3 分；免疫组至少 8 只该球虫虫种对应的寄生部位病变记分均应不高于 1 分；空白对照组该球虫虫种对应的寄生部位均无病变。

若为柔嫩艾美耳球虫疫苗，攻虫后观察 5 日，观察鸡只是否出现排鲜红色血便，发病鸡精神萎靡、羽毛逆立，缩头闭眼，扎堆等临床症状；观察期结束时进行剖检，并按附注 1 进行记分。攻虫对照组部分鸡应出现临床症状，且至少 9 只鸡相应肠道病变记分不少于 3 分；免疫组应无临床症状，且至少 8 只鸡相应肠道病变记分不高于 1 分；空白对照组所有鸡应无临床症状，且相应部位均无病变。

若为毒害艾美耳球虫疫苗，攻虫后观察 6 日。剖检所有试验鸡，按附注 2 进行记分。对照组至少 9 只鸡相应肠道病变记分均应不少于 3 分；免疫组至少 8 只鸡相应肠道病变记分均应不高于 1 分；空白对照组所有鸡的相应部位均无病变。

若为巨型艾美耳球虫疫苗，攻虫后观察 6 日。观察期内，部分鸡只应出现水样黄褐色粪便或粘液样粪便，发病鸡精神不振、脱水引起的鸡爪干瘪；剖检所有试验鸡，按附注 3 进行记分。对照组至少 9 只鸡相应肠道病变记分均应不少于 3 分；免疫组至少 8 只鸡相应肠道病变记分均应不高于 1 分；空白对照组所有鸡的相应部位均无病变。

若为堆型艾美耳球虫疫苗，攻虫后观察 5 日。剖检所有试验鸡，按附注 4 进行记分。对照组至少 9 只鸡相应肠道病变记分均应不少于 3 分；免疫组至少 8 只鸡相应肠道病变记分均应不高于 1 分；空白对照组所有鸡的相应部位均无病变。

**2.5 纯粹检验** 用 7~21 日龄 SPF 鸡 20 只，其中，感染组 10 只鸡，各经口感染推荐使用剂量的该早熟减毒株孢子化卵囊，另 10 只为空白对照组，置隔离器中饲养。感染组试验鸡感染潜隐期后粪检应发现卵囊，在 10×40 倍显微镜下测量 30~50 个卵囊，卵囊应符合 2.1 中该虫种的生物学特性；若为感染柔嫩艾美耳球虫或堆型艾美耳球虫的试验鸡，感染后第 5 日剖检；若为感染毒害艾美耳球虫或巨型艾美耳球虫的试验鸡，感染后第 6 日剖检；感染球虫对应的寄生部位应出现相应球虫引起的病变，其他肠段应无球虫引起的病变；空白对照组所有试验鸡各肠段均应无病变，粪检应无卵囊。

**2.6 虫种鉴定** 取 1ml 卵囊液，作适当稀释，在 10×40 倍显微镜下观察并测量 30~50 个卵囊，卵囊应符合相应该球虫虫种的生物学特性。

**2.7 虫种代次限定** 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

**3 生产用原辅料** 生产用鸡应为 4 周龄以内的健康易感鸡，粪便检查应无球虫卵囊。

#### **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 卵囊计数** 用计数板进行卵囊计数，计算每羽份疫苗中的孢子化卵囊数，应在产品规定的范围内。

**4.3 安全检验** 用推荐使用最小日龄的 SPF 鸡 20 只，随机分为 2 组，每组 10 只，其中 1 组各经推荐使用途径接种疫苗 10 羽份作为接种组，另 1 组不免疫作为空白对照组。分置隔离器内饲养，免疫后观察 7 日，所有试验鸡均应健活，且不应出现由疫苗引起的球虫病症状，包括精神沉郁，食欲减退，腹泻，血便及死亡。剖检所有试验鸡，按“病变记分标准”对肠道部位的病变进行记分（附注）。所有接种组鸡相应肠道病变记分均不应超过 1 分；空

白对照组所有鸡的相应部位均应无病变。

**4.4 效力检验** 用推荐使用日龄的 SPF 鸡 30 只，随机分为 3 组，每组 10 只，其中免疫组鸡各经推荐使用途径接种疫苗 1 个推荐使用剂量，另 2 组不免疫，分别作为空白对照组和攻虫对照组，分置隔离器中饲养。免疫后 21~28 日，用与疫苗虫种对应的强毒孢子化卵囊进行灌服攻虫：

若为柔嫩艾美耳球虫疫苗，攻虫后观察 5 日。剖检所有试验鸡，按附注 1 进行记分。对照组至少 9 只鸡相应肠道病变记分均应不少于 3 分；免疫组至少 8 只鸡相应肠道病变记分均应不高于 1 分；空白对照组所有鸡的相应部位均应无病变。

若为毒害艾美耳球虫疫苗，攻虫后观察 6 日。剖检所有试验鸡，按附注 2 进行记分。对照组至少 9 只鸡相应肠道病变记分均应不少于 3 分；免疫组至少 8 只鸡相应肠道病变记分均应不高于 1 分；空白对照组所有鸡的相应部位均应无病变。

若为巨型艾美耳球虫疫苗，攻虫后观察 6 日。剖检所有试验鸡，按附注 3 进行记分。对照组至少 9 只鸡相应肠道病变记分均应不少于 3 分；免疫组至少 8 只鸡相应肠道病变记分均应不高于 1 分；空白对照组所有鸡的相应部位均应无病变。

若为堆型艾美耳球虫疫苗，攻虫后观察 5 日。剖检所有试验鸡，按附注 4 进行记分。对照组至少 9 只鸡相应肠道病变记分均应不少于 3 分；免疫组至少 8 只鸡相应肠道病变记分均应不高于 1 分；空白对照组所有鸡的相应部位均应无病变。

**5 注意事项** 疫苗接种前 24 小时及接种后两周内不得使用抗球虫药物。

#### 附注：病变记分标准

**1 柔嫩艾美耳球虫引起的盲肠病变**（两侧盲肠病变不一致时，以严重一侧为准）。

0 分 无肉眼可见病变。

1 分 盲肠内容物正常，肠壁黏膜面可见少量散在出血点，或出血斑。

2 分 盲肠内容物带血，肠壁黏膜面出血点或出血斑数量较为密集，肠壁增厚。

3 分 盲肠轻度肿大，肠腔内没有正常的盲肠粪便，肠道黏膜增厚，盲肠腔内充满暗红色血液或出现盲肠芯（呈灰白色干酪样香蕉型块状物）。

4 分 盲肠高度肿大，盲肠腔内没有盲肠粪或已被包在肠芯中，肠腔内充满坏死凝血块和盲肠黏膜碎片。因本球虫致死的鸡记为 4 分。

**2 毒害艾美耳球虫引起的小肠中段病变**

0 分 无肉眼可见病变。

1 分 小肠中段浆膜面可见针尖状大小散在的出血点和白点，肠腔内可见少量橘红色内容物，肠壁略增厚。

2 分 肠壁增厚，浆膜面有大量的出血点和白点，小肠中段出现轻度胀气，肠腔局部混有凝血块。

3 分 浆膜面布满红色出血点和白点，肠腔鼓气扩张，肠壁明显增厚，整个肠内容物中含有多量的血凝块和坏死脱落的上皮组织，肠黏膜面粗糙，没有正常的肠内容物。

4 分 小肠中段高度肿胀，肠段出现萎缩、明显缩短，病变延伸至十二指肠和小肠后段，小肠内容物中含有酱油色或棕色粘液，肠道黏膜出血，坏死。因本球虫致死的鸡记为 4 分。

**3 巨型艾美耳球虫引起的小肠中段病变**

0 分 无肉眼可见病变。

1 分 小肠中段黏膜面可见较小的出血点，肠腔中有少量桔黄色粘液。

2 分 小肠中段出现轻度胀气，浆膜面可见许多出血点，延伸至十二指肠，肠腔内可见

大量的桔黄色粘液。

3分 肠管扩张,没有正常的肠内容物,肠内容物混有血凝块和桔黄色粘液,肠壁变薄,黏膜面粗糙。

4分 肠管肿胀,肠内容物粘稠,呈红棕色,并混有大量血凝块,呈淡洗肉水色,肠黏膜充血、出血、脱落。因本球虫致死的鸡记为4分。

#### 4 堆型艾美耳球虫引起的十二指肠病变

0分 无肉眼可见病变。

1分 十二指肠浆膜面和黏膜面均可见有散在横纹状白斑,横向排列,外观呈梯形。

2分 病变较为密集,但未融合,十二指肠黏膜上覆以横向排列的横纹状白斑,外观呈梯状,病变延伸至空肠,消化道内容物较稀薄,肠黏膜增厚。

3分 十二指肠黏膜面可见密集的灰白色病灶,病变延伸至卵黄囊蒂处,肠道苍白,肠腔内有多量水分,内容物呈水样液体。

4分 十二指肠黏膜面呈浅灰色,横纹状白斑完全融合,肠腔内充满奶油状渗出物,肠壁增厚,因本球虫致死的鸡记为4分。

标准草案 yaodianbanshenqiyao

## 13.新城疫活疫苗（标准草案）

### 新城疫活疫苗

Xinchengyi Huoyimiao

#### Newcastle Disease Vaccine, Live

**1 定义** 本品系用新城疫病毒弱毒株接种 SPF 鸡胚或适宜细胞培养，收获感染鸡胚液或细胞培养液，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥或冻结制成。用于预防鸡新城疫。

#### 2 毒种

2.1 F0 裂解位点氨基酸序列 应符合新城疫病毒弱毒株氨基酸序列特征。

2.2 脑内致病指数（ICPI） 应不高于 0.4。

2.3 对鸡胚最小致死量的平均死亡时间（MDT/MLD） 应不低于 103 小时。

2.4 安全性 用推荐使用最小日龄 SPF 鸡，经推荐使用途径接种，每种途径接种不少于 10 只，每只接种病毒液不少于 10 个推荐使用剂量；另 10 只不接种作为对照。至少观察 14 日，应不出现新城疫特异性临床症状或死亡。观察期结束对所有鸡只进行剖检，检查呼吸道、消化道等器官，应不出现病变。

2.5 免疫原性 用 3~4 周龄 SPF 鸡，经推荐使用途径接种，每种途径接种不少于 10 只，每只鸡接种剂量不高于  $10^{4.0}$ EID<sub>50</sub>。接种后 14~21 日，连同对照鸡 10 只，各经肌肉注射鸡新城疫病毒强毒（含  $10^{4.0}$ ELD<sub>50</sub>），观察 14 日。对照鸡应全部死亡，免疫鸡应至少 9 只存活且无新城疫特异性临床症状。

#### 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（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2.7 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

3.1 鸡胚 应为 SPF 鸡胚，应符合附录 3501 要求。

3.2 细胞 应符合附录 3502 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。鸡胚疫苗如有菌生长，应进行杂菌计数和病原性鉴定（附录 3307）以及禽沙门氏菌检验（附录 3303）。每羽份疫苗含非病原菌数应不超过 1 个，且病原菌和禽沙门氏菌检验符合规定。

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 进行检验，应无外源病毒污染。

4.4 鉴别检验 用无菌生理盐水将疫苗稀释至 1 羽份/ml，分成两组，一组与鸡新城疫阳性血清等量混合作为中和组，另一组与生理盐水等量混合作为病毒对照组，均置室温作用 60 分钟，经尿囊腔接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚各 10 枚，每胚 0.2ml，置 37°C 孵育 120 小时。对照组鸡胚液进行红细胞凝集试验，应为阳性；中和组在 24~120 小时内应不引起特异性死亡且至少存活 8 枚，鸡胚液进行红细胞凝集试验，应为阴性。

4.5 安全检验 用推荐使用最小日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用途径接种疫苗 10 羽份；另 10 只不接种作为对照。同条件分别饲养，接种后至少观察 10 日，应全部健活。如有非特异性死亡，免疫鸡和对照鸡均应不超过 1 只。

4.6 病毒含量测定 如为鸡胚疫苗，按瓶签注明的羽份，将疫苗用无菌生理盐水稀释至 1 羽份/0.1ml，再作 10 倍系列稀释，取 3 个适宜稀释度，分别尿囊腔内接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚 5 枚，每胚 0.1ml，置 37℃ 孵育，48 小时以内死亡的鸡胚弃去不计，在 48~120 小时死亡的鸡胚随时取出放置 4℃，至 120 小时，取出所有死胚和活胚，分别测定红细胞凝集价，凝集价不低于 1:128（微量法）者判为感染，计算 EID<sub>50</sub>。每羽份疫苗病毒含量应不低于说明书标示量。如为细胞疫苗，可用适宜细胞进行病毒含量测定。每羽份疫苗病毒含量应不低于说明书标示量。

4.7 效力检验 用 3~4 周龄的 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用途径接种疫苗 1/100 羽份。接种后 14~21 日，连同对照鸡 5 只，各肌肉注射鸡新城疫病毒强毒（含 10<sup>4.0</sup>ELD<sub>50</sub>），观察 14 日。对照鸡应全部死亡，免疫鸡应至少保护 9 只。

4.8 剩余水分测定（冻干疫苗适用） 按附录 3204 进行测定，应符合规定。

4.9 真空度测定（冻干疫苗适用） 按附录 3103 进行测定，应符合规定。

标准草案 yaodianbanshengyao

## 14. 传染性法氏囊病活疫苗（低毒力）（标准草案）

### 传染性法氏囊病活疫苗（低毒力）

Chuanranxingfashinangbing Huoyimiao (Diduli)

#### Infectious Bursal Disease Vaccine, Live (Low Virulence)

**1 定义** 本品系用传染性法氏囊病病毒低毒力株接种 SPF 鸡胚或适宜细胞培养，收获感染鸡胚（研磨、离心）或细胞培养液，加适宜保护剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防鸡传染性法氏囊病。

#### 2 毒种

##### 2.1 安全性

2.1.1 对鸡的毒力 用推荐使用最小日龄（不超过 3 周龄）SPF 鸡，每种使用途径至少接种 20 只，每只接种病毒液 10 个推荐使用剂量；另取 20 只不接种作为对照，分别隔离饲养。接种后 72 小时，每组各剖检 10 只，对照鸡法氏囊应正常，接种鸡法氏囊应不出现出血、肿胀、炎性渗出等传染性法氏囊病特征性病变。其余鸡继续观察至 21 日，在观察期内所有鸡均应不出现精神沉郁、食欲不振等临床症状；21 日时剖检，测定 B:B 指数，其均值应  $\geq 0.7$ 。

2.1.2 免疫抑制 用推荐使用最小日龄（不超过 2 周龄）SPF 鸡 30 只，随机分为 3 组，每组 10 只。第 1 组各接种病毒液不少于 1 个推荐使用最大剂量。接种后 14 日，第 1、2 组各点眼接种新城疫病毒活疫苗 La Sota 株 ( $10^{6.0} \text{EID}_{50}$ )。接种 14 日后，所有组各经肌肉注射鸡新城疫病毒强毒北京株 ( $10^{4.0} \text{ELD}_{50}$ )，观察 14 日。第 3 组鸡应全部死亡，第 1、2 组均应至少 9 只保护。

2.2 免疫原性 用推荐使用日龄 SPF 鸡，每种使用途径至少接种 10 只，各接种病毒液 1 个最小免疫剂量；另 10 只不接种作为对照，分别隔离饲养。接种后 21 日，全部免疫鸡连同攻毒对照鸡 5 只各点眼接种适宜鸡传染性法氏囊病病毒强毒（至少含 10 个 ID）。72~96 小时将所有鸡扑杀、剖检。健康对照鸡的法氏囊均应无任何变化，攻毒对照鸡应至少 4 只鸡的法氏囊出现特征性病变，免疫鸡的法氏囊应至少 8 只无病变。

##### 2.3 纯净

2.3.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.3.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

2.3.3 外源病毒检验 按附录 XX（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2.4 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

3.1 鸡胚 应为 SPF 鸡胚，应符合附录 3501 要求。

3.2 细胞 应符合附录 3502 要求。

3.3 保护剂 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。鸡胚苗如有菌生长，应进行杂菌计数和病原性鉴定（附录 3307）以及禽沙门氏菌检验（附录 3303）。每羽份疫苗含非病原菌数应不超过 1 个，且病原菌和禽沙门氏菌检验符合规定。

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 进行检验，应无外源病毒污染。

4.4 鉴别检验 用无菌生理盐水将疫苗稀释至 1 羽份/0.1ml，与抗鸡传染性法氏囊病毒特异性血清等量混合，37℃作用 60 分钟。经绒毛尿囊膜接种 10~12 日龄 SPF 鸡胚 10 枚，每胚 0.2ml；同时设疫苗对照鸡胚 10 枚，每胚接种稀释的疫苗液 0.2ml（含 1 羽份），同条件培养观察 168 小时。疫苗对照鸡胚应至少 8 枚死亡，中和鸡胚应全部健活，且鸡胚尿囊液对鸡红细胞凝集试验（HA）应为阴性。或接种已长成良好细胞单层的适宜细胞 2 瓶（25cm<sup>2</sup>），0.2ml/瓶，同时设正常细胞对照和未中和对照，置 37℃、含 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 5 日，每日观察 CPE 产生情况。未中和对照应出现 CPE，中和细胞和正常细胞对照应均无 CPE。

4.5 安全检验 用推荐使用最小日龄 SPF 鸡 10 只，各按推荐途径接种疫苗，每只鸡 10 羽份，另 10 只不接种作为对照，两组分别饲养观察 14 日，均应健活。试验结束后，剖检免疫组鸡和对照组鸡，法氏囊的色泽、弹性应无明显变化。如出现非特异性死亡，两组鸡死亡总数应不超过 3 只，且免疫鸡死亡数应不超过对照鸡死亡数。

4.6 病毒含量测定 用无菌生理盐水将疫苗作适当稀释，取适宜稀释度，每个稀释度分别经绒毛尿囊膜途径接种 10~12 日龄 SPF 鸡胚或适宜细胞培养；分别记录鸡胚情况或细胞病变，按 Reed-Muench 法计算。每个推荐使用剂量的病毒含量应不低于说明书标示量。

4.7 效力检验 用推荐使用日龄 SPF 鸡 10 只，按推荐用途接种疫苗 1 羽份，另 10 只不接种作为对照，分别隔离饲养。免疫后 21 日，取全部免疫鸡连同攻毒对照鸡 5 只，各点眼接种传染性法氏囊病毒强毒（至少含 10 个 ID<sub>50</sub>），72~96 小时将所有鸡扑杀、剖检。攻毒对照鸡的法氏囊应至少有 4 只出现法氏囊特征性病变，免疫鸡的法氏囊应至少有 8 只无病变，健康对照鸡的法氏囊均应无任何变化。

4.8 剩余水分测定 按附录 3204 进行测定，应符合规定。

4.9 真空度测定 按附录 3103 进行测定，应符合规定。

## 15.鸡传染性支气管炎活疫苗（标准草案）

### 鸡传染性支气管炎活疫苗

Ji Chuanranxingzhiqiguanyan Huoyimiao

#### Infectious Bronchitis Vaccine, Live

**1 定义** 本品系用鸡传染性支气管炎病毒弱毒株接种 SPF 鸡胚或适宜细胞培养，收获感染鸡胚尿囊液或细胞培养液，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥或冻结制成。用于预防鸡传染性支气管炎。

#### 2 毒种

##### 2.1 安全性

**2.1.1 对呼吸道及肾脏的安全性** 用推荐使用最小日龄 SPF 鸡至少 15 只，各经滴鼻/点眼途径接种至少 10 个推荐使用剂量病毒液。接种后每日观察接种鸡临床症状，并在接种后第 5、7 和 10 日，分别剖杀至少 5 只鸡，取气管和肾脏（前、中及后肾）组织进行检查。气管组织按附录 XX（气管环纤毛摆动停滞试验）进行纤毛活力评分。肾脏固定后进行组织病理学观察：接种鸡应不出现鸡传染性支气管炎临床症状（如张口呼吸、呼吸啰音、排泄白色尿酸盐粪便等）或死亡；气管环纤毛摆动停滞评分应不高于 20 分；肾脏应不出现中度以上炎症病变（中性细胞、单核巨噬细胞系统细胞及淋巴细胞等炎性细胞浸润低于 50%）。

**2.1.2 对母鸡生殖系统的安全性** 若产品推荐用于 3 周龄内的种鸡/蛋鸡，应评价毒种对母鸡生殖系统的安全性。用推荐使用最小日龄 SPF 鸡或者健康易感母鸡至少 40 只，各经推荐使用途径接种病毒液至少 1 个推荐使用剂量，接种后至少观察 12 周，观察结束后剖杀，检查输卵管病理变化。输卵管异常率应不超过 5%。

**2.2 免疫原性** 取推荐使用日龄 SPF 鸡，经推荐使用途径接种，每种途径不少于 10 只，每只接种病毒液 1 个最小免疫剂量病毒液。同时设不免疫对照鸡 10 只。免疫后 14~21 日，连同不免疫对照鸡 10 只，经点眼或滴鼻接种鸡传染性支气管炎病毒强毒。按下列方法进行判定：通常应符合 2.2.1 和 2.2.3，或 2.2.2 和 2.2.3。

**2.2.1 临床症状及病理变化** 攻毒后观察至少 10 日，对照组至少 80% 出现鸡传染性支气管炎特异性临床症状（如张口呼吸、甩头、流鼻涕、排泄白色尿酸盐粪便、剖检肾脏肿大或花斑肾等）或死亡，免疫组至少 80% 不出现任何鸡传染性支气管炎特异性临床症状或死亡。

**2.2.2 气管组织纤毛活力** 如某些特定型毒株不适宜用 2.2.1 进行结果判定时，可进行气管环纤毛活力试验。在攻毒后 4~7 日，随机取 5 只，所有鸡剖检后采集气管，观察气管纤毛活力，对照组至少 80% 鸡气管环纤毛摆动停滞评分应高于 20 分，免疫组至少 80% 鸡气管纤毛摆动停滞评分应不高于 20 分（按附录 XX 进行判定）。

**2.2.3 病毒分离** 攻毒后 4~7 日，随机取 5 只，对所有鸡采集气管拭子或其他适宜组织进行病毒分离。对照组应至少 80% 病毒分离阳性，免疫组应至少 80% 病毒分离阴性。

##### 2.3 纯净

**2.3.1 无菌检验** 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

**2.3.2 支原体检査** 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

**2.3.3 外源病毒检验** 按附录 XX（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2.4 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

### 3 生产用原辅料

3.1 若用鸡胚生产，鸡胚应为 SPF 鸡胚，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。

### 4 成品检验

4.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。鸡胚苗如有菌生长，应进行杂菌计数和病原性鉴定（附录 3307）以及禽沙门氏菌检验（附录 3303）。每羽份疫苗含非病原菌数应不超过 1 个，且病原菌和禽沙门氏菌检验符合规定。

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 进行检验，应无外源病毒污染。

4.4 鉴别检验 用无菌生理盐水将疫苗稀释至每 1.0ml 含 1 羽份，与抗鸡传染性支气管炎病毒特异性血清等量混合，置 20~25℃作用 60 分钟，经尿囊腔途径接种 9~10 日龄 SPF 鸡胚 10 枚，每胚 0.2ml。置 37℃孵育 24~144 小时，应不出现特异性死亡及鸡胚病变，且应至少有 8 只鸡胚健活。

4.5 安全检验 用推荐使用最小日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用途径接种疫苗 10 羽份。免疫后观察 10~14 日，应全部健活，不出现鸡传染性支气管炎临床症状。

4.6 病毒含量测定 按瓶签注明羽份，用无菌生理盐水将疫苗稀释成每 0.1ml 含 1 羽份，再继续作 10 倍系列稀释，取 3 个适宜稀释度，各尿囊腔内接种 10~11 日龄 SPF 鸡胚 5 枚，每胚 0.1ml 置 37℃孵育 144 小时，24 小时以内死亡的鸡胚弃去不计，根据鸡胚特异性病变（如死亡、胎儿失水、蜷缩发育小等），或用其他方法判定鸡胚感染。按 Reed-Muench 法计算。每羽份疫苗病毒含量应不低于说明书标示量。

4.7 效力检验 用推荐使用日龄 SPF 鸡 10 只，各经推荐使用途径接种疫苗 1 羽份。免疫后 14~28 日，连同对照鸡 10 只，各经点眼或滴鼻途径接种鸡传染性支气管炎病毒强毒株。攻毒后逐日观察至少 10 日。按 2.3 免疫原性进行判定，结果应符合规定。

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

4.9 真空度测定（冻干苗适用） 按附录 3103 进行测定，应符合规定。

## 16.鸡马立克氏病活疫苗（标准草案）

### 鸡马立克氏病活疫苗

Ji Malikeshibing Huoyimiao  
Marek's Disease Vaccine, Live

**1 定义** 本品系用适宜鸡马立克氏病病毒或火鸡疱疹病毒接种 SPF 鸡胚成纤维细胞培养，收获细胞培养液，加入适宜冷冻保护液制成，或加入适宜稳定剂经裂解、冷冻真空干燥制成。用于预防鸡马立克氏病。

#### 2 毒种

##### 2.1 安全性

**2.1.1 对鸡的安全性** 1日龄鸡免疫用毒种，用1日龄 SPF 鸡 20 只，各腹腔接种病毒液 10 个推荐使用剂量，至少观察 90 日。观察结束后，非特异性死亡不得超过 2 只，剖检所有存活鸡，观察各组织和脏器病变，取卵巢或睾丸、肾脏、脾脏、肝脏、心脏、肺、法氏囊、腺胃和坐骨神经等组织，进行组织病理学检查。应无马立克氏病临床症状和特异性死亡，剖检应无肉眼可见变化和组织病理学变化。

**2.1.2 对鸡胚的安全性** 鸡胚内免疫用毒种，用 18 日龄 SPF 鸡胚 20 枚，各胚内接种病毒液 10 个推荐使用剂量，孵化率应至少 80%，鸡胚孵出后，至少观察 90 日。观察结束后，非特异性死亡不得超过 2 只，剖检所有存活鸡，观察各组织和脏器病变，取卵巢或睾丸、肾脏、脾脏、肝脏、心脏、肺、法氏囊、腺胃和坐骨神经等组织，进行组织病理学检查。应无马立克氏病临床症状和特异性死亡，剖检应无肉眼可见变化和组织病理学变化。

##### 2.2 免疫原性

**2.2.1 用鸡检验** 用推荐使用的各种接种途径接种病毒液 1 个最小免疫剂量，每种途径各接种 1 日龄 SPF 鸡 20 只，另 20 只作对照。接种后 5~8 日，毒种为 I、II 型鸡马立克氏病毒时，免疫组和对照组各腹腔接种超强毒株攻毒；毒种为火鸡疱疹病毒时，免疫组和对照组各腹腔接种标准强毒株攻毒。攻毒后观察 70 日，记录死亡和出现临床症状的存活鸡数量。观察期结束，剖检所有存活鸡并观察 MD 大体病变。I、II 型鸡马立克氏病毒种对照组应至少 80% 发病，免疫组相对保护率应至少 80%；火鸡疱疹病毒毒种对照组应至少 60% 发病，免疫组相对保护率应至少 60%。

马立克氏病疫苗相对保护率计算方法

计算公式如下：
$$\frac{V-C}{100\%-C} \times 100\%$$

V=观察期结束免疫鸡无显著临床症状和 MD 大体病变的存活鸡的百分比

C=观察期结束攻毒对照鸡无显著临床症状和 MD 大体病变的存活鸡的百分比

**2.2.2 用鸡胚检验** 鸡胚内接种毒种，用 18 日龄 SPF 鸡胚 20 枚，接种病毒液最小免疫剂量，另 20 枚作对照。两组孵化率应至少 80%，且免疫组孵化率不得低于对照组。鸡胚孵出后 5~8 日，毒种为 I、II 型鸡马立克氏病毒时，免疫组和对照组各腹腔接种超强毒株攻毒；毒种为火鸡疱疹病毒时，免疫组和对照组各腹腔接种标准强毒株攻毒。攻毒后观察 70 日，记录死亡和出现临床症状的存活鸡数量。观察期结束，剖检所有存活鸡并观察 MD 大体病变。I、II 型鸡马立克氏病毒种免疫组相对保护率应至少 80%，对照组应至少 80% 发病；火鸡疱疹病毒毒种免疫组相对保护率应至少 60%，对照组应至少 60% 发病。

##### 2.3 纯净

2.3.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验, 应无菌生长。

2.3.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验, 应无支原体生长。

2.3.3 外源病毒检验 按附录 XX(外源病毒检验的通用要求)和附录 3305 进行检验, 应无外源病毒污染。

2.4 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

### 3 生产用原辅料

3.1 细胞 应符合附录 3502 要求。

3.2 保护剂 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 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 进行检验, 应无外源病毒污染。

4.4 鉴别检验 用稀释液将疫苗适当稀释后接种 CEF 细胞, 用相应单克隆抗体进行间接免疫荧光试验, 应与同型单克隆抗体反应出现特异性荧光, 与不同型单克隆抗体均不应出现特异性荧光。

4.5 安全检验 用推荐使用最小日龄 SPF 鸡至少 10 只, 各按推荐使用途径接种疫苗 10 个推荐使用剂量, 另 10 只不接种作为对照, 观察 21 日, 应全部健活。若有非特异性死亡, 免疫组非特异性死亡数不得超过对照组非特异性死亡数。

4.6 蚀斑计数 每批疫苗抽样 3 瓶进行蚀斑计数。以 3 瓶疫苗各稀释度中的最低平均数核定该批疫苗每羽份中所含的蚀斑。每羽份疫苗中的蚀斑数应不低于说明书标示量。

4.7 效力检验 用推荐使用日龄 SPF 鸡 20 只, 皮下接种疫苗 1 羽份, 另 20 只作对照。接种后 5~8 日, I、II 型活疫苗检验鸡各腹腔接种超强毒攻毒, III 型活疫苗检验鸡各腹腔接种标准强毒株攻毒。攻毒后观察 70 日, 记录死亡和出现临床症状的存活鸡只数。观察期结束, 剖检所有存活鸡并观察 MD 大体病变(包括卵巢或睾丸、肾脏、脾脏、肝脏、心脏、肺、法氏囊、腺胃和坐骨神经等组织)。I、II 型鸡马立克氏病活疫苗对照组应至少 80%发病, 免疫组相对保护率应至少 80%; III 型鸡马立克氏病活疫苗对照组应至少 60%发病, 免疫组相对保护率应至少 60%。

4.8 剩余水分测定(冻干疫苗适用) 按附录 3204 进行测定, 应符合规定。

4.9 真空度测定(冻干疫苗适用) 按附录 3103 进行测定, 应符合规定。

## 17. 鸡传染性喉气管炎活疫苗（标准草案）

### 鸡传染性喉气管炎活疫苗

Ji Chuanranxing Houqiguanyan Huoyimiao  
**Avian Infectious Laryngotracheitis Vaccine, Live**

**1 定义** 本品系用鸡传染性喉气管炎弱毒株接种 SPF 鸡胚或适宜细胞培养，收获感染的鸡胚绒毛尿囊膜经研磨或收获细胞培养液，加入适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防鸡传染性喉气管炎。

#### 2 毒种

##### 2.1 安全性

2.1.1 用推荐使用最小日龄 SPF 鸡，经推荐接种途径接种，每种途径接种不少于 10 只，每只接种病毒液不低于 10 个推荐使用剂量，至少观察 14 日。应不出现鸡传染性喉气管炎特异性临床症状或死亡；若出现轻度眼炎或轻微咳嗽，应在 2~3 日内恢复正常。

2.1.2 用 21 日龄 SPF 鸡至少 10 只，各经气管接种病毒液 10 个推荐使用剂量，至少观察 14 日，应不出现死亡。

2.2 免疫原性 用推荐使用日龄 SPF 鸡，经推荐接种途径接种，每种途径接种不少于 10 只，每只鸡接种病毒液 1 个最小免疫剂量。接种后 21 日，连同对照鸡 10 只，各气管内注射适宜鸡传染性喉气管炎病毒强毒，观察 10 日。对照鸡应至少 80% 出现鸡传染性喉气管炎特异性临床症状，免疫鸡应至少 80% 保护。

##### 2.3 纯净

2.3.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.3.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

2.3.3 外源病毒检验 按附录 XX（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2.4 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

3.1 鸡胚 应为 SPF 鸡胚，应符合附录 3501 要求。

3.2 细胞 应符合附录 3502 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。鸡胚苗如有菌生长，应进行杂菌计数和病原性鉴定（附录 3307）以及禽沙门氏菌检验（附录 3303）。每羽份疫苗含非病原菌数应不超过 1 个，且病原菌和禽沙门氏菌检验符合规定。

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 用鸡检查法进行检验，应无外源病毒污染。

4.4 鉴别检验 将疫苗稀释至 100EID<sub>50</sub>/0.1ml，分成两组，一组与鸡传染性喉气管炎阳性血清等量混合作为中和组，另一组与稀释液等量混合作为病毒对照组，均置室温中和 1 小时后，经绒毛尿囊膜接种 10~11 日龄 SPF 鸡胚各 5 枚，每枚 0.2ml，置 37℃ 孵育 120 小时。病毒对照组的鸡胚绒毛尿囊膜应有明显病斑，中和组的鸡胚应全部存活，且绒毛尿囊膜应无任何病斑。如为细胞苗，可用适宜细胞进行鉴别检验，病毒对照组应出现特异性病变，中和组无任何病变。

4.5 安全检验 用推荐使用最小日龄 SPF 鸡 10 只，经推荐途径接种疫苗 10 羽份，观察 14 日。应不出现鸡传染性喉气管炎特异性临床症状或死亡；若在接种后 3~5 日出现轻度

眼炎或轻微咳嗽，应在 3 日内恢复正常。

4.6 病毒含量测定 按瓶签注明的羽份，用适宜稀释液将疫苗稀释至 1 羽份/0.2ml，再作 10 倍系列稀释。取 3 个适宜稀释度，每个稀释度经绒毛尿囊膜接种 10~11 日龄 SPF 鸡胚各 5 枚，每枚 0.2ml，置 37°C 孵育 120 小时。鸡胚绒毛尿囊膜呈明显增厚，有灰白色病斑，判为感染，按 Reed-Muench 法计算 EID<sub>50</sub>。如为细胞苗，可用适宜细胞进行病毒含量测定。每羽份疫苗病毒含量应不低于说明书标示量。

4.7 效力检验 用推荐使用日龄的 SPF 鸡 10 只，经推荐途径接种疫苗 1 羽份，接种后 21 日，连同对照鸡 10 只，各气管内注射鸡传染性喉气管炎病毒强毒，观察 10 日。对照鸡应至少 80% 出现鸡传染性喉气管炎特异性临床症状，免疫鸡应至少 80% 保护。

4.8 剩余水分测定 按附录 3204 进行测定，应符合规定。

4.9 真空度测定 按附录 3103 进行测定，应符合规定。

标准草案 yaodianbanshengyao

## 18.鸡痘活疫苗（标准草案）

### 鸡痘活疫苗

Jidou Huoyimiao

Fowl Pox Vaccine, Live

**1 定义** 本品系用鸡痘病毒弱毒接种 SPF 鸡胚或适宜细胞培养，收获感染的鸡胚绒毛尿囊膜或细胞培养物，加入适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防鸡痘。

#### 2 毒种

**2.1 安全性** 用推荐使用最小日龄 SPF 鸡，每种推荐使用途径至少接种 10 只，每只鸡接种病毒液不少于 10 个推荐使用剂量，接种后每日观察临床症状，至少观察 14 日。接种鸡应不出现因毒种引起的特异性临床症状或死亡，注射或刺种部位在 5~14 日有痘肿、结痂和脱落的过程。

**2.2 免疫原性** 采用推荐使用日龄 SPF 鸡 20 只，用推荐使用的各种接种途径接种病毒液 1 个最小免疫剂量。接种后 21 日，连同不接种对照鸡 10 只，各经毛囊法接种适宜强毒（含 100 个最小发痘量），观察 21~28 日。记录死亡和发病的存活鸡只数，观察每只存活鸡的皮肤和黏膜等肉眼病理变化。对照鸡应至少 80% 出现皮肤和黏膜病变或死亡，免疫鸡应至少 80% 存活且无皮肤和黏膜病变。

#### 2.3 纯净

**2.3.1 无菌检验** 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

**2.3.2 支原体检验** 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

**2.3.3 外源病毒检验** 按附录 XX（外源病毒检验通用要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

**2.4 代次限定** 从基础种子到生产种子传代应不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

**3.1 鸡胚** 应为 SPF 鸡胚，应符合附录 3501 要求。

**3.2 细胞** 应符合附录 3502 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。鸡胚苗如果有菌生长，应进行杂菌计数和病原性鉴定（附录 3307）以及禽沙门氏菌检验（附录 3303）。每羽份疫苗含非病原菌数应不超过 1 个，且病原菌和禽沙门氏菌检验符合规定。

**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 鸡检查法进行检验，应无外源病毒污染。

**4.4 安全检验** 用 7~14 日龄 SPF 鸡 10 只，各肌肉注射或翅内侧无血管处刺种疫苗 10 羽份，观察至少 10 日，应全部健活。

**4.5 病毒含量测定** 按瓶签注明羽份，用适当稀释液将疫苗稀释至 1 羽份/0.2ml，再作 10 倍系列稀释。取 3 个适宜稀释度，鸡胚苗每个稀释度经绒毛尿囊膜接种 11~12 日龄 SPF 鸡胚各 5 枚；细胞苗每个稀释度接种适宜细胞各 5 孔，置 37°C 培养适宜时间。观察记录鸡胚或细胞病变，按 Reed-Muench 法计算 EID<sub>50</sub> 或 TCID<sub>50</sub>。每羽份疫苗病毒含量应不低于说明书标示量。

**4.6 效力检验** 用推荐使用日龄 SPF 鸡 10 只，采用推荐使用途径接种疫苗 1 羽份，接种后 21 日，连同对照鸡 10 只，每只鸡各经毛囊法接种的强毒，观察 21~28 日。记录死亡和发病的存活鸡只数，观察每只存活鸡的皮肤和黏膜等肉眼病理变化。对照鸡应至少 80% 出现皮肤和黏膜病变或死亡，免疫鸡应至少 80% 存活且无皮肤和黏膜病变。

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。

---

标准草案 yaodianbanshengyao

## 19.鸭瘟活疫苗（标准草案）

### 鸭瘟活疫苗

Yawen Huoyimiao

#### Duck Plague Vaccine, Live

**1 定义** 本品系用鸭瘟病毒弱毒株接种 SPF 鸡胚或适宜细胞培养，收获感染鸡胚液、胎儿和绒毛尿囊膜，混合研磨，或收获细胞培养物，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防鸭瘟。

#### 2 毒种

2.1 安全性 按推荐途径接种，每种途径接种至少 10 只推荐使用最小日龄健康易感鸭，每只接种病毒液不少于 10 个推荐使用剂量，观察至少 21 日。应健活，如果有精神沉郁等轻微反应，应在 7 日内恢复。

2.2 免疫原性 用推荐使用日龄健康易感鸭 10 只，每只按推荐使用途径接种病毒液 1 个最小免疫剂量，接种 7~10 日后，连同对照鸭 5 只，所有鸭经肌肉注射鸭瘟病毒强毒，每只  $10^{3.0}$ MLD，观察 14 日。对照鸭应全部发病，且至少死亡 4 只，免疫鸭应至少保护 8 只。

#### 2.3 纯净

2.3.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.3.2 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

2.3.3 外源病毒检验 按附录 XX（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2.4 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

3.1 鸡胚 应为 SPF 鸡胚，应符合附录 3501 要求。

3.2 细胞 应符合附录 3502 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。鸡胚苗如有菌生长，应进行杂菌计数和病原性鉴定（附录 3307）以及禽沙门氏菌检验（附录 3303）。每羽份疫苗含非病原菌数应不超过 1 个，且病原菌和禽沙门氏菌检验符合规定。

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 进行检验，应无外源病毒。如血清不能满足中和试验要求，应采用鸡检查法。如种毒对鸡有致病性，鸡检查法时应增加鸡的日龄、减少首次接种剂量。

4.4 鉴别检验 用无菌生理盐水将疫苗稀释至  $100\text{ELD}_{50}/0.1\text{ml}$  或  $100\text{TCID}_{50}/0.1\text{ml}$ ，与鸭瘟病毒特异性抗血清等量混合，置室温作用 60 分钟后，接种 SPF 鸡胚（至少 10 枚），或适宜细胞（至少 5 孔），同时设立空白对照组和病毒对照组，置  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 168 小时。病毒对照组的鸡胚或细胞应全部病变，中和组和空白对照组应均不出现病变。

4.5 安全检验 用推荐使用最小日龄健康易感鸭 5 只，以推荐途径接种疫苗，每只不少于 10 羽份，观察 14 日。应不出现由疫苗引起的任何局部或全身不良反应。如果有轻微反应，应在 14 日内恢复。

4.6 病毒含量测定 按瓶签注明羽份，用无菌生理盐水进行适当稀释，每个稀释度经绒毛尿囊膜接种鸡胚或接种细胞，培养 168 小时，每日观察记录鸡胚死亡情况或细胞病变，按 Reed-Muench 法计算。每羽份疫苗病毒含量应不低于说明书标示量。

4.7 效力检验 用推荐使用日龄健康易感鸭 10 只，各经推荐使用途径接种疫苗 1 羽份，接种后 14 日，连同对照鸭 5 只，所有鸭经肌肉注射鸭瘟病毒强毒，每只  $10^{3.0}$ MLD，观察 14 日。对照鸭应全部发病，且至少 4 只死亡，免疫鸭应至少 8 只保护。

4.8 剩余水分测定 按附录 3204 进行测定，应符合规定。

4.9 真空度测定 按附录 3103 进行测定，应符合规定。

标准草案 yaodianbanshengyao

## 20.鸡毒支原体活疫苗（标准草案）

### 鸡毒支原体活疫苗

Jiduzhiyuanti Huoyimiao

*Mycoplasma gallisepticum* Vaccine, Live

**1 定义** 本品系用鸡毒支原体弱毒株接种适宜培养基培养，收获培养物加入适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防鸡毒支原体引起的鸡慢性呼吸道疾病。

#### 2 菌种

**2.1 形态特性** 菌体经姬姆萨或瑞氏染色后，镜下观察，呈多形态，有细小球杆状、圆形等。

**2.2 培养特性** 接种 CM 改良培养基培养 48~72 小时，培养液呈均匀浑浊，能发酵葡萄糖产酸；在 CM 改良固体培养基上生长，呈圆形且中央突起的菌落。

**2.3 代谢抑制试验** 将菌株培养物稀释到  $10^3$ CCU/ml，取稀释好的菌液分别接种 1ml 含 10%阳性血清和不含阳性血清的 CM 改良液体培养基中各 1ml，充分混匀。同时设空白对照 2 支，其中一支加入 10%阳性血清，另一支不加。置 37℃培养 10 日，空白对照不变色，加阳性血清组培养物颜色应不出现明显改变，不加阳性血清组培养物颜色应出现明显变化。

**2.4 安全性** 用 8 日龄 SPF 鸡 10 只，经推荐使用途径（点眼或喷雾）接种，每种途径接种不少于 10 只，每只接种不少于 10 个推荐使用剂量，同时设对照鸡 5 只，观察 21 日。应无呼吸道临床症状；解剖，观察出现气囊病变的鸡应不超过 3 只，且每只气囊病变记分不应高于 1 分。

气囊病变记分标准：

0 分 气囊正常，清洁透明而薄。

1 分 气囊稍有增厚和轻度浑浊，局部有少数灰色或黄色渗出物斑点。

2 分 部分气囊区域有可见的灰色和黄色渗出物，同时伴有气囊中度增厚。

3 分 大片气囊布满黄色干酪样渗出物。

4 分 整个气囊布满黄色干酪样渗出物，气囊失去弹性。

**2.5 免疫原性** 用 10 日龄 SPF 鸡 10 只，按点眼途径接种活菌 1 个最小免疫剂量，接种后 20 日采血，进行血清平板凝集试验，应 8 只以上为阳性反应；接种 30 日后，连同对照鸡 10 只，各气囊注射鸡毒支原体强毒株菌液 0.2ml(含 10MID)，攻毒后观察有无呼吸道症状，14 日后剖检，观察气囊病变并进行病变记分。对照鸡应至少 7 只出现 2 分及以上气囊病变，免疫鸡的平均气囊保护率应不低于 60%。

平均气囊保护率计算公式：

$$\text{平均气囊保护率} = \frac{\text{对照鸡平均气囊病变分数} - \text{试验鸡平均气囊病变分数}}{\text{对照鸡平均气囊病变分数}} \times 100\%$$

**2.6 无菌检验** 按附录 3306 页进行检验，应无菌生长。

**2.7 代次限定** 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

**3.1 培养基** 适宜培养基（如 CM 改良培养基，见鸡毒支原体灭活疫苗），应符合附录 3009 要求。

**3.2 动物源性材料** 应符合附录 3008 要求。

**3.3 原材料及辅料** 应符合附录 3009 要求。

#### 4 成品检验

**4.1 无菌检验** 按附录 3306 页进行检验，应无菌生长。

4.2 鉴别检验 按菌种代谢抑制试验进行检验，应符合规定。

4.3 安全检验 按瓶签注明羽份，用无菌生理盐水或注射用水溶解。用 10~20 日龄 SPF 鸡 10 只，各点眼接种疫苗 10 羽份，同时设同条件对照鸡 5 只，观察 21 日。应无呼吸道临床症状，解剖，观察出现气囊病变的鸡应不超过 3 只，且每只气囊病变记分不应高于 1 分。

4.4 活菌计数 按瓶签注明羽份加 CM 改良液体培养基稀释后，测定 CCU。每羽份疫苗活菌计数应不低于说明书标示量。

4.5 效力检验 按瓶签注明的羽份用无菌生理盐水或注射用水溶解，并稀释到 1 羽份/0.05ml，用 10~20 日龄 SPF 鸡 10 只，各点眼接种疫苗 1 羽份，接种后 30 日，连同对照鸡 10 只，各气囊注射鸡毒支原体强毒菌液 0.2ml（含 10MID），攻毒后 14 日观察有无呼吸道症状，14 日后剖检，观察气囊病变并进行病变记分。对照鸡应至少 7 只出现 2 分及以上气囊病变，免疫鸡的平均气囊保护率应不低于 60%。

4.6 剩余水分测定 按附录 3204 进行测定，应符合规定。

4.7 真空度测定 按附录 3103 进行测定，应符合规定。

标准草案 yaodianbanshengyao

## 21.禽多杀性巴氏杆菌病（A 型）活疫苗（标准草案）

### 禽多杀性巴氏杆菌病（A 型）活疫苗

Qin Duoshaxingbashiganjunbing (A Xing) Huoyimiao  
*Avian Pasteurella multocida* (Type A)Vaccine, Live

**1 定义** 本品系用禽源多杀性巴氏杆菌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 A 型禽多杀性巴氏杆菌病（即禽霍乱）。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 应为革兰氏阴性球杆菌。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中多杀性巴氏杆菌的生化特性。

2.3 培养特性 在含有 4.0%血清及 0.1%裂解血细胞全血的（改良）马丁琼脂平板上，置 36~37℃培养 16~20 小时，肉眼观察，菌落表面光滑，呈微蓝色或灰白色。在低倍显微镜下，45 度折光观察，菌落结构细致，边缘整齐，呈灰蓝色无荧光或呈橘红色边缘呈浅蓝色虹彩。

2.4 血清型鉴定 血清学方法或分子生物学方法鉴定，应为 A 型。

2.5 安全性 用推荐使用最小日龄动物（鸭、鹅用健康易感动物检验，鸡用 SPF 鸡检验），经推荐使用途径接种，每种途径接种不少于 10 只，各接种用 20%铝胶生理盐水稀释的活菌不少于 10 个推荐使用剂量，至少观察 14 日。逐日观察接种动物饮食、精神状态、行动等全身反应情况，不应出现畏寒、精神沉郁、跛行等临床症状及死亡，允许在接种后出现饮食减少等症状，但 3 日内应恢复正常。注射后观察注射部位，应无破溃、坏死等情况。剖检鸡，心、肝、脾、胸腺均应无肉眼可见病变。

2.6 免疫原性 用推荐使用日龄动物（鸭、鹅用健康易感动物检验，鸡用 SPF 鸡检验），经推荐使用途径接种，每种途径接种不少于 10 只，各接种用 20%铝胶生理盐水稀释的活菌 1 个最小免疫剂量。接种后 14 日，连同对照动物 10 只，各肌肉注射 1MLD 禽多杀性巴氏杆菌强毒菌液，观察 10 日。10 只对照动物应至少死亡 8 只，10 只免疫动物应至少 8 只在观察期内精神、采食、行动均正常，若攻毒后出现精神沉郁、饮食减少等症状，应在 3 日内恢复正常。

2.7 纯粹 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

2.8 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

#### 3 生产用原辅料

3.1 培养基 应符合附录 3009 要求。

3.2 冻干保护剂 应符合附录 3009 要求。

#### 4 成品检验

4.1 纯粹检验 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

4.2 活菌计数 按瓶签注明羽份，用马丁肉汤将疫苗稀释后，用含有 4.0%血清及 0.1%裂解血细胞全血的（改良）马丁琼脂平板培养，按附录 3405 进行活菌计数。每羽份疫苗中含活菌应不低于说明书标示量。

4.3 安全检验 用推荐使用最小日龄 SPF 鸡 4 只，各肌肉接种用 20%铝胶生理盐水稀释的疫苗至少 10 羽份，观察不少于 14 日。逐日观察接种动物饮食、精神状态、行动等全身反应情况，应不出现畏寒、精神沉郁、跛行等临床症状及死亡，允许在接种后出现饮食减少等症状，但 3 日内应恢复正常。注射后观察注射部位，应无破溃、坏死等情况。

4.4 效力检验 用推荐使用日龄 SPF 鸡 8 只，各肌肉接种用 20% 铝胶生理盐水稀释的疫苗 1 羽份。接种后 14 日，连同对照鸡 4 只，各肌肉注射 1MLD 禽多杀性巴氏杆菌强毒菌液，观察 14 日。对照鸡应全部死亡，免疫鸡应至少 6 只在观察期内精神、采食、行动均正常，若攻毒后出现精神沉郁、饮食减少等症状，应在 3 日内恢复正常。

4.5 剩余水分测定 按附录 3204 进行测定，应符合规定。

4.6 真空度测定 按附录 3103 进行测定，应符合规定。

标准草案 yaodianbanshengyao

### III. 抗体

#### 1.破伤风抗毒素（标准草案）

##### 破伤风抗毒素

Poshangfeng Kangdusu

##### Tetanus Antitoxin

**1 定义** 本品系用适宜破伤风梭状芽孢杆菌制备的破伤风类毒素作为免疫原对马进行基础免疫后，再用含佐剂的破伤风类毒素进行多次加强免疫，采血，分离血清，经处理制成破伤风抗毒素。用于紧急预防和治疗家畜破伤风。

##### 2 菌种

2.1 形态特性 应为中等大小革兰氏阳性杆菌，老龄培养物易形成鼓槌状的芽孢，芽孢多位于菌体一端。

2.2 生化特性 应符合细菌分类学中破伤风梭状芽孢杆菌的生化特性。

2.3 培养特性 本菌严格厌氧。在牛肉汤中生长良好，产气，35℃培养 48 小时后，染色镜检，呈孤立的革兰氏阳性杆菌，并有少量芽孢；在厌氧肉肝汤中生长稍混浊；在普通琼脂斜面上和普通肉汤中不生长；在葡萄糖鲜血琼脂上，经厌氧培养形成较小的稍凸略透明的似珍珠状菌落，或长成片状菌落（培养基湿润时）。

2.4 毒素含量及毒力 将菌种经适宜培养基（如制造抗原用培养基：8%甘油冰醋酸肉汤或破伤风培养基）培养 96~120 小时，所产毒素每毫升应含 4000 个以上 L+/100；小鼠最小致死量应在 200 万个以上，每毫升类毒素的结合力单位应在 200EC 以上。

2.5 纯粹 按附录 3306 进行检验，应纯粹，无杂菌生长。

2.6 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

##### 3 生产用原辅料

3.1 培养基 适宜培养基（如厌氧肉肝汤、牛肉汤、破伤风培养基、8%甘油冰醋酸肉汤等），应符合附录 3009 要求。

3.2 生产用动物 马应符合附录 3501 要求。

##### 4 成品检验

4.1 性状 澄清液体。长期贮存后，可有微量能摇散的沉淀。

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 用体重 350~400g 豚鼠 5 只，各分两侧皮下注射 5.0ml（共 10.0ml），观察 14 日。应不出现明显的局部反应，且全部健活。

4.4 效价测定 将待检抗毒素用灭菌生理盐水稀释成不同稀释度，取各个稀释度的抗毒素 1.0ml，分别盛于 5ml 棕色玻璃管中，标明样品号数及稀释度（每稀释 1 个滴度，换 1 次吸管）。分别在每个稀释度的小管中各加入用 1%蛋白胍水稀释好的试验毒素 1.0ml（含 5 个 L+/10），作为待检组。另取 1 管，先加入用灭菌生理盐水稀释好的抗毒素国家标准品 1.0ml（含 0.5IU/ml），再加入用 1%蛋白胍水稀释好的试验毒素 1.0ml（含 5 个 L+/10），作为对照组。将上述各管充分振摇，加塞密封，置 37~38℃结合 45~60 分钟。取待检组每个稀释度

的结合液，各皮下注射体重 17~19g 小鼠 2 只，0.4ml/只。对照组小鼠 2 只，各皮下注射 0.4ml。小鼠分开饲养，观察 120 小时。对照小鼠应在 72~120 小时内全部死亡，与对照小鼠同时死亡或之后死亡的待检抗毒素的最高稀释度的一半即为待检抗毒素的效价（IU）。每毫升抗毒素效价应不少于 2400IU。

4.5 汞类防腐剂残留量测定(适用于使用汞类防腐剂的制品) 按附录 3202 进行测定，应符合规定。

**5 注意事项** 注射后个别动物可能出现过敏反应，应注意观察，必要时，采取注射肾上腺素等脱敏措施抢救。

标准草案 yaodian banshengyao

## IV. 诊断试剂

### 1. 提纯牛型结核菌素（标准草案）

#### 提纯牛型结核菌素

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 1.5~4 $\mu$ m，宽 0.2~0.6 $\mu$ 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 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

2.6 菌素含量 接种于苏通合成培养基，置 37 $^{\circ}$ 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 16~22g 小鼠 10 只，0.5ml/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 350~450g 豚鼠 5 只，1.0ml/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 500~700g 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、50、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 350~450g 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 0.8~1.2mg/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 6.5~7.5。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。

标准草案 yaodianbanshengyao

## 2.提纯副结核菌素（标准草案）

### 提纯副结核菌素

Tichun Fujiehejunsu

#### Purified Paratuberculin

**1 定义** 本品系用副结核分枝杆菌（CVCC 320）接种适宜培养基培养，收获培养物，经灭活后收集培养滤液提纯制成液体制品或冻干制品。用于皮内变态反应诊断反刍动物副结核。

#### 2 菌种

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

2.2 生化特性 生化特性应符合细菌分类学中本菌的特性。

2.3 培养特性 本菌接种马铃薯汤蛋黄培养基培养，20 日以上才能生长。菌落为淡黄色颗粒状，较为干燥。通过地鼠复壮后的初代分离物应具有分枝菌素依赖性。

2.4 纯粹 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

2.5 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

2.6 菌素含量 接种于 W-R 液体合成培养基，置 37 $^{\circ}$ C 静置培养 1 个月，灭活后过滤除去菌体，从滤液中获得副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** W-R 液体合成培养基，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 16~22g 小鼠 10 只，0.5ml/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 350~450g 豚鼠 5 只，1.0ml/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 500g~700g 豚鼠 6 只，各后腿肌肉注射 1mg 副结核分枝杆菌致敏原，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 0.5mg/ml 的标准菌素作 25、50、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 350~450g 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 0.4~0.6mg/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 6.5~7.5。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** 本品无法鉴别诊断禽结核病和副结核病。

标准草案 yaodianbanshengyao

### 3.提纯禽型结核菌素（标准草案）

#### 提纯禽型结核菌素

Tichun Qinxing Jiehejunsu

#### Purified Protein Derivative of Avian Tuberculin (PPDA)

**1 定义** 本品系用禽分枝杆菌（CVCC 68201、CVCC 68202、CVCC 68203）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禽结核、副结核病。

#### 2 菌种

**2.1 形态特性** 为细长、直或稍弯的杆菌，长约 1.5~4 $\mu$ m，宽 0.2~0.6 $\mu$ m，具多形性，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 37 $^{\circ}$ C 培养 10~20 日，菌落为淡黄白色奶油状，菌落粘稠，挑取菌落时可呈拉丝状。

**2.4 纯粹** 按附录 3306 进行检验，应纯粹。

**2.5 代次限定** 从基础种子到生产种子传代不超过 5 代。

**2.6 菌素含量** 接种于苏通合成培养基，置 37 $^{\circ}$ C 静置培养 2 个月，灭活后过滤除去菌体，从滤液中获得的禽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，加稀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 16~22g 小鼠 10 只，0.5ml/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 350~450g 豚鼠 5 只，1.0ml/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 500~700g 豚鼠 6 只，各后腿肌肉注射 1mg 禽结核分枝杆菌致敏原标准品或参考品，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 25000IU/ml 的标准菌素做 25、50、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 350~450g 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 0.4~0.6mg/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 6.5~7.5。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** 本品无法鉴别诊断禽结核病和副结核病。

标准草案 yaodianbanshengyao

## 4.鼻疽菌素（标准草案）

### 鼻疽菌素

Biju Junsu

Mallein

**1 定义** 本品系用鼻疽伯氏菌（CVCC 67001、CVCC 67002）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。用于诊断马属动物鼻疽。

#### 2 菌种

2.1 形态特性 短小杆菌，无运动性。不形成芽孢和荚膜、革兰氏阴性、陈旧培养物胞浆分布不匀，美蓝染色，可见到着色不匀的颗粒。

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4%甘油琼脂培养基上生长，菌落为光滑型，在低倍显微镜下45°折射光下检查有蓝绿色虹彩；在浸有4%甘油肉汤的马铃薯块培养基上，可形成蜂蜜样菌苔。

2.4 纯粹 按附录3306进行检验，应纯粹。

2.5 代次限定 从基础种子到生产种子传代不超过5代。

2.6 菌素含量 接种于苏通合成培养基，置37℃静置培养2个月，灭活后过滤除去菌体，从滤液中获得的鼻疽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16~22g小鼠10只，0.5ml/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350~450g豚鼠5只，1.0ml/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500~700g豚鼠6只，各后腿肌肉注射1mg鼻疽伯氏菌致敏原，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1mg/ml的标准菌素作25、50、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350~450g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0.8~1.2mg/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6.5~7.5。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。

标准草案 yaodian bansheng yao

### 三、附录

#### ● 3000 生物制品通用要求

#### 3002 兽用生物制品的标签、说明书与包装（标准草案）

##### 3002 兽用生物制品的标签、说明书与包装

1 兽用生物制品标签和说明书应符合《兽药管理条例》及《兽药标签和说明书管理办法》等农业农村部对标签和说明书的规定。

2 直接接触兽用生物制品的包装材料和容器应符合农业农村部的有关规定，均应无毒、洁净，与内容物不发生化学反应，并不得影响内容物的质量。

3 凡在境内生产、经营和使用的兽药，标签和说明书应按照农业农村部批准的兽药产品标签和说明书样稿印制。除另有规定外，内包装标签须标明兽药用标识、兽药名称、作用与用途、用法与用量、批准文号、生产批号、规格、有效期至、贮藏与有效期、生产企业、电子追溯码等内容。某些特定制品还应标明效价。安瓿、西林瓶等注射或内服产品由于内包装尺寸的限制而无法注明内包装标签全部内容的，可适当减少项目，须标明兽药名称、规格、生产批号和兽药标识。

4 入库的每瓶制品均须粘贴标签。制品的包装箱（盒）须粘贴外包装标签，并附说明书。

5 标签、说明书、包装材料的入库、发放、回收及销毁均应有记录。

#### 3003 兽用生物制品的贮藏、运输及使用（标准草案）

##### 3003 兽用生物制品的贮藏、运输及使用

兽用生物制品贮藏、运输及使用管理应符合国家对兽用生物制品贮藏、运输及使用的相关要求。

原辅料、中间产品、半成品的贮藏和运输管理应符合本版药典各论或批准的要求。

##### 1 贮藏管理要求

1.1 制品的贮藏条件（包括温、湿度，是否需避光）应经验证，并符合相关各论或批准的要求。

1.2 应配备专用的冷藏设备或设施用于制品贮藏，并按照现行《兽药生产质量管理规范》《兽药经营管理规范》的要求划分区域，并分门别类有序存放。

1.2.1 仓储区的设计和建造应合理。仓储区应当有足够的空间，确保有序存放成品。

1.2.2 仓储区的贮存条件应符合制品规定的条件（如温度、湿度，避光）和安全要求，应配备用于冷藏设备或设施的温度监控系统。

1.2.3 应对冷库，储运温、湿度监测系统以及冷藏运输的设施或设备进行使用前验证，并保持持续的验证状态。

1.2.4 应对贮存、运输设施设备进行定期检查、清洁和维护，并建立记录和档案。

1.3 应建立制品出、入库记录，应建立成品销售、出库复核、退回、运输、采购、验收、不合格制品处理等相关记录，记录应真实、完整、准确、有效和可追溯。

##### 2 运输管理要求

2.1 兽用生物制品中所含活性成分对温度敏感，运输方式及路径应予以确认。

2.2 除另有规定外，应采用冷链运输。冷链运输全过程应当都能使制品始终保持在规

定的贮藏温度环境下。冷链运输记录应当真实准确记录起运和到达时的温度。

2.3 采用冷链运输时,应由专人负责冷链运输设施设备进行定期检查、清洁和维护,并建立记录和档案。

2.4 制品的运输温度应符合各论或批准制品的温度要求。

2.5 兽用生物制品生产、经营企业自行配送兽用生物制品的,应当具备相应的冷链运输条件,也可以委托具备相应冷链运输条件的配送单位配送,并对委托配送的产品质量负责。

### 3 使用要求

3.1 使用前,应仔细检查制品外包装、标签、生产日期、有效期以及制品性状。外包装、标签破损、制品过期、性状出现油乳分离、冻干团块塌陷等异常现象不得使用。

3.2 免疫应严格按照标签说明书规定的用法与用量、推荐免疫途径接种相应品种和日龄的动物。

3.3 接种时应严格无菌操作,注射器具和注射部位应消毒,注射针头应逐头更换,不得使用同一注射器接种不同种类的疫苗。接种细菌类疫苗前后(10日左右)不得使用抗菌抑菌药物。

3.4 接种操作人员应根据接种疫苗特性,做好个人防护。对人有一定感染风险的制品应避免黏膜(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情况,应当立即采取冲洗、消毒等局部处理措施并及时就医。

3.5 接种后应注意观察,如个别动物出现过敏反应,必要时采取注射肾上腺素等脱敏措施抢救。

3.6 接种后,应对装过制品的包装瓶、器具和未用完的制品等进行无害化处理。

## 3004 兽用生物制品的组批与分装(标准草案)

### 3004 兽用生物制品的组批与分装

1 除另有规定外,所有兽用生物制品成品均应按本规定组批。

2 兽用生物制品的批号由企业相关职能部门编制,并经审核后使用。

3 兽用生物制品按品种进行批号的编码,编码原则为年-(月)-流水号(可添加字母用来区分品种、亚批或不同规格)。

4 用同一生产种子批和同一原材料生产,并在同一容器内混匀后分装的生物制品称为一批,其所含内容物完全一致,即同一批中任何一瓶制品的来源与质量必须与其他任何一瓶完全相同,抽检其中任何一瓶的结果,即能代表整批制品。

5 同一批制品如在不同冻干柜中进行冻干,或分为数次冻干时,应按冻干柜或冻干次数划分为亚批,并标明亚批号。

6 当半成品的检验周期较长时,除灭活检验外,允许其他检验完成前进行分装,但只有全部检验结果均符合要求时,成品才能放行。

7 分装制品应在规定的空气净化条件和适宜的温度下进行(必要时应采取措,避免分装过程中有效成分的活性降低)。在分装过程中应随时搅动,以保持均匀。按规定的头(羽)份定量分装(应加一定附加量),分装量应符合规定。

## 3005 生产和检验用菌（毒、虫）种通用要求（标准草案）

### 3005 生产和检验用菌（毒、虫）种通用要求

1 兽用生物制品生产和检验用菌（毒、虫）种须经国务院兽医行政管理部门批准。

2 兽用生物制品生产用菌（毒、虫）种应实行种子批和分级管理制度。种子分三级：原始种子、基础种子和生产种子，各级种子均应建立种子批，组成种子批系统。

2.1 原始种子批 必须按原始种子自身特性进行全面、系统检定，如培养特性、生化特性、血清学特性、基因特征和纯粹（净）检验等，应符合其生物学特性；分装容器上应标明名称、代号、代次和冻存日期等；同时应详细记录其背景，如名称、时间、地点、来源、代次、菌（毒、虫）株代号和历史等。

2.2 基础种子批 必须按菌（毒、虫）种检定标准进行全面、系统检定，如培养特性、生化特性、血清学特性、基因特征、毒力、免疫原性和纯粹（净）等，应符合其生物学特性；分装容器上应标明名称、批号（代次）识别标志、冻存日期等；并应规定限制使用代次、保存条件和推荐的繁殖方式。同时应详细记录名称、代次、来源、库存量和存放位置等。

2.3 生产种子批 必须根据特定生产种子批的检定标准逐项进行检定，合格后方可用于生产。生产种子批应达到一定规模，并含有足量活细菌（或病毒、虫），以确保用生产种子复苏、传代增殖后细菌（或病毒、虫）培养物的数量能满足一段时间内生产需要。

生产种子批由生产企业用基础种子繁殖、制备并检定，应符合其标准规定；同时应详细记录繁殖方式、代次、识别标志、冻存日期、库存量和存放位置等。用生产种子增殖获得的培养物（菌液或病毒、虫培养液），不得再作为生产种子批使用。

3 检验用菌（毒、虫）种应建立种子批 按检定标准进行全面系统检定，如培养特性、血清学特性、基因特征、毒力和纯粹（净）等，应符合其生物学特性。

4 用于菌（毒、虫）种制备和检定的实验动物、细胞和有关原材料，应符合本兽药典规定。

5 生产用菌（毒、虫）种的制备和检定 应在与其微生物类别相适应的生物安全实验室和动物生物安全实验室内进行。

#### 6 菌（毒、虫）种的保藏与管理

6.1 生产、检验菌（毒、虫）种的保管必须有专人负责；菌（毒、虫）种应分类存放于规定的条件下；应当设单独保藏一、二类菌（毒、虫）种；应实行双人双锁管理。

6.2 菌（毒、虫）种的保管应有严密的登记制度，建立菌（毒、虫）种档案，并长期保存。

6.3 生物制品注册时，申报单位送交国务院兽医行政管理部门指定保藏机构保藏的生产、检验用菌（毒、虫），应为基础种子，且至少 5 个最小包装。

7 菌（毒、虫）种的运输 运输菌（毒、虫）种时，应按国家有关规定进行包装和办理，确保菌（毒、虫）种安全，严防发生被盗、被抢、丢失、泄露等意外事件。未经审批，不得跨省运输高致病性病原微生物菌（毒、虫）种和不得从国外进口菌（毒、虫）种或者将菌（毒、虫）种运出国外。

8 菌（毒、虫）种的领取与使用 应按照规定程序领取与使用，并及时记录菌（毒、虫）种的使用情况，在使用完毕时要对废弃物进行有效的无害化处理并填写记录，确保生物安全。

## 3007 兽用生物制品国家标准物质的制备与标定（标准草案）

### 3007 兽用生物制品国家标准物质的制备与标定

**1 定义** 兽用生物制品国家标准物质系指用于兽用生物制品效价、活性或含量等质量检验或对其特性鉴别、检查或技术验证的标准品、参考品。

#### **2 分类**

2.1 兽用生物制品国家标准物质分为国家标准品和国家参考品两类。

2.2 兽用生物制品国家标准品，系指经国际标准品标定的或在尚无国际标准品溯源时，由我国自行研制和定值的，且用于定量测定某一兽用生物制品的效价、活性、含量的标准物质，其生物学活性或效价以国际单位（IU）、特定活性值单位（U）或以质（重）量单位（g、mg 等）表示。

2.3 兽用生物制品国家参考品，系指经国际参考品标定的或在尚无国际参考品时，由我国自行研制的用于兽医微生物及其产物的定性检测或动物疫病诊断的生物试剂、生物材料或特异性抗血清等；或指用于定量测定兽用生物制品效价、含量等特性值或验证检验或诊断方法准确性的参考物质，其生物特性值一般不定国际单位（IU），而以国际参考品对比值或效价、含量等特定活性值单位（U 等）表示。

#### **3 制备和标定**

3.1 兽用生物制品国家标准物质制备用实验室应符合《病原微生物实验室生物安全管理条例》的要求。

3.2 兽用生物制品国家标准物质的标定由中国兽医药品监察所负责。

3.3 新建兽用生物制品国家标准物质的研制

3.3.1 候选物的筛选 候选物系指可直接用于制备标准物质的原（材）料，其材料性质可以是天然或人工制备，其来源可以是向国内外有生产能力的单位购买、委托制备或自行制备，但其特性应与供试品同质，不应含有干扰性物质，应有足够的稳定性和高度的特异性，每批原（材）料应有足够数量，以满足供应的需要。

3.3.2 标准物质的配制、分装

3.3.2.1 候选物筛选、确定后，应根据标准物质的要求进行配制、稀释。需加入适当的保护剂等物质的。该类物质对所制标准物质的活性、稳定性和检验操作过程无影响和干扰。

3.3.2.2 经检定合格后，精确分装，标准物质的实际装量与标示装量应符合规定的允差要求。

3.3.2.3 标准物质的分装容器应能保证内容物的稳定性。安瓿主要用于易氧化及冻干的标准物质，液体标准物质可采用玻璃瓶或塑料瓶（管）包装。

3.3.2.4 标准物质的配制、分装环境应符合相应洁净度、温度和湿度的要求，同时还应符合相应品种标准物质的特殊要求。

3.3.2.5 需要冷冻干燥保存者，分装后应立即进行冻干和熔封。

3.3.2.6 分装、冻干和熔封过程中，应密切关注能造成各分装容器之间标准物质特性值发生差异变化的各种影响因素，并采取有效措施，确保每个分装容器之间标准物质特性值的

一致性。

### 3.3.3 标准物质的标定

3.3.3.1 检测项目 生产单位应根据标准物质的特性和使用目的,进行分装精度、水分、无菌、生物活性/效价检测,以及稳定性研究,并根据需要增加其他必要的检测项目。冻干的标准物质应进行剩余水分测定,其含量应不高于3.0%。

3.3.3.2 协作标定 新建标准物质的标定,一般需经至少3个认可实验室协作进行。参加单位应采用统一的设计方案,标定结果须经统计学处理(标定结果至少需取得5次独立的有效结果)。

活性值(效价单位或活性单位)的确定一般用各协作认可实验室结果的均值表示,由兽药检验机构收集标定结果,采用适宜的统计学方法进行统计分析并赋值,经批准后使用。

3.4 换批制备与标定 兽用生物制品国家标准物质换批制备的候选物或原材料,其理化特性和生物学特性应尽可能与上批标准物质一致或相近。

## 4 标签和说明书

4.1 标签内容一般包括:名称、代码、批号、规格/装量、用途、贮存条件、提供单位等信息。

4.2 兽用生物制品国家标准物质应附有说明书,其内容应包括:名称、代码、批号、组成和性状、标准值、规格/装量、贮存条件、用途、使用方法、稳定性及注意事项等信息。

## 5 审批

5.1 新建兽用生物制品国家标准物质由中国兽医药品监察所对协作标定结果进行审查并认可。

5.2 换批兽用生物制品国家标准物质由中国兽医药品监察所审查并认可。

5.3 新建生物制品国家标准物质在取得批准后,方可使用。

## 6 持续稳定性检验

6.1 研制过程中应进行加速破坏试验,根据制品性质放置不同温度(一般放置4℃、25℃、37℃、-20℃)、不同时间,进行生物学活性或含量测定,以评估其稳定情况。标准物质建立以后,应定期期间核查,观察生物学活性或含量等是否变化。

6.2 标准物质更换的信息发布 当出现换代或换批标准物质,或者经持续稳定性监测发现在用标准物质特性值已偏离规定的标准时,应立即停止该批兽用生物制品国家标准物质发放和使用。

## 7 使用、供应和保管

7.1 兽用生物制品国家标准物质供执行兽药国家标准使用,所赋量值只在规定的用途内使用有效。

7.2 中国兽医药品监察所负责兽用生物制品国家标准物质的统一保管和供应。

7.3 兽用生物制品国家标准物质应在规定的条件下贮存,其保存条件应定期检查并记录。

7.4 兽用生物制品国家标准物质的供应和发放应有专人负责,并作供应和发放记录。

## 3008 动物源性原材料的通用要求(标准草案)

### 3008 动物源性原材料的通用要求

1 动物源性原材料 系指直接来源于动物的组织、体液、细胞或经分离提取的衍生

物，经过充分的安全评估，能够在兽用生物制品生产中使用，具体为：

1.1 动物组织、体液、直接来源于动物的物质等，包括鸡胚、血清、血液等。

1.2 细胞 包括原代细胞、传代细胞。

1.3 衍生物 通过制造过程从动物材料中获得的物质，包括透明质酸、胶原、明胶、壳聚糖、白蛋白、胰酶、水解乳蛋白等。

## 2 动物源性原材料应符合以下标准

### 2.1 动物组织和体液

2.1.1 用于禽类生物制品菌（毒、虫）种制备、病毒活疫苗生产的 SPF 鸡胚，应符合中华人民共和国国家现行标准；用于禽病毒灭活疫苗生产的鸡胚应不携带相应特异性病原。

2.1.2 用于兽用生物制品生产、检定和检测的动物血清（如牛血清、马血清、猪血清、鸡血清等）应无菌生长、无支原体生长和无外源病毒污染，且应对影响其使用用途的相应抗体进行测定并符合要求。动物血清中原则上不应含有抗生素。细胞培养用牛血清应符合附录 3503。

2.1.3 马血清以及用于马传染性贫血活疫苗生产、检定用的驴血液中马传染性贫血抗体应为阴性。

2.2 动物细胞 用于制备兽用生物制品的细胞应符合附录 3502。

2.3 衍生物 制备兽用生物制品使用的动物衍生物如明胶、水解乳蛋白等应符合药用原辅材料的相关标准，或符合国内外已有相关标准的规定。胰酶应符合附录 3505。

3 动物组织、体液、细胞及其衍生物等原材料 不得来源于疯牛病、痒病等疫病流行区域、存在风险区域及国家禁止进口区域。

## 3009 兽用生物制品生产用原材料及辅料的通用要求（标准草案）

### 3009 兽用生物制品生产用原材料及辅料的通用要求

1 兽用生物制品生产用原材料的通用要求 兽用生物制品生产用原材料系指兽用生物制品生产过程中使用的所有生物原材料和化学原材料。生物原材料包括来源于微生物，动物细胞、组织、体液或分离提取的衍生物等成分，以及采用重组技术或生物合成技术生产的生物原材料等；化学原材料包括无机和有机化学材料。

1.1 兽用生物制品生产用原材料的分级 根据原材料的来源、生产以及对兽用生物制品潜在的毒性和外源因子污染风险等将兽用生物制品生产用原材料按风险级别从低到高分级为四级。

第一级为低风险原材料，包括已获得上市许可的生物制品或无菌制剂。

第二级为较低风险原材料，包括已有国家标准、取得批准文号并按照中国现行《兽药生产质量管理规范》生产的用于兽用生物制品培养基成分，以及提取、纯化、灭活等过程中所使用的化学原料药和药用非动物来源的蛋白水解酶等。

第三级为中等风险原材料，包括非药用的培养基成分，非动物来源蛋白水解酶，用于靶

向纯化的单克隆抗体，以及提取、纯化、与灭活过程中所使用的化学试剂等。

第四级为高风险原材料，包括已知具有生物作用机制的毒性化学物质（如细菌毒素），以及大部分成分复杂的动物源性组织和体液（如用于细胞培养基成分的牛血清、用于细胞消化或蛋白质水解的动物来源的酶，以及用于选择或去除免疫靶向性成分的腹水来源的抗体或蛋白质等）。

1.2 兽用生物制品生产用原材料的质量控制要求 原材料用于兽用生物制品生产时，应进行质量控制。对于不同风险等级原材料的质量控制，应充分考虑来源于动物的生物原材料可能带来的外源因子污染的安全性风险。动物源性原材料应符合附录 3008 动物源性原材料的一般要求。生产过程中应避免使用毒性较大的化学原材料，有机溶剂的使用应符合相关标准的规定。

对兽用生物制品生产用原材料应按照不同风险等级进行相应的常规检验，具体检验项目见表 1。其中，第三级抽检的频率、样本数量与检测关键项目的范围等要求应高于第二级。兽用生物制品生产企业应参考国家已有规定制定内控质量检验项目和标准，兽用生物制品生产企业不具备检测能力的项目，可以委托有资质的第三方检测。

表 1 不同风险等级兽用生物制品生产用原材料的质控要求

原材料等级	按照国家标准或生物制品生产企业内控质量标准全检	关键项目检测（如鉴别、微生物限度、细菌内毒素、异常毒性检查等）
第一级	—	√
第二级	抽检（批）	√
第三级	抽检（批）	√
第四级	√	—

注：“√”为对每批原材料使用前的质控要求；“—”为不要求项目；“抽检（批）”为抽样全检+每批次检测关键项目。

1.3 残留物的去除及限度要求 生产用原材料在兽用生物制品中的残留物可能因其直接的毒性反应、外源因子污染或有害的免疫应答，引发动物产生不良反应或影响产品效力，因此，在生产过程中应尽可能采用经去除和（或）灭活外源因子的生物原材料，或采取相应措施对这些原材料中可能存在的外源因子、致病物质或与该材料相关的特定污染物予以去除和（或）灭活，去除和（或）灭活工艺应进行验证。应通过验证结果评价生产工艺对已知毒性原材料去除的一致性，或采用批放行检测，以证实所去除的毒性原材料已达到安全水平，残留有机溶剂应符合相关要求。

## 2 兽用生物制品生产用辅料的通用要求

兽用生物制品生产用辅料系指兽用生物制品配方中所使用的辅助材料，如佐剂、稳定剂或保护剂、防腐剂、赋形剂、助溶剂、矫味剂、稀释剂或缓冲剂等。

2.1 兽用生物制品生产用辅料的分级 根据辅料的来源、生产以及对兽用生物制品潜在的毒性和安全性的影响等，将辅料按风险等级从低到高分级为四级。

第一级为低风险辅料，包括已获得上市许可的生物制品或无菌制剂。

第二级为较低风险辅料，包括已有国家标准、取得批准文号并按照中国现行《兽药生产质量管理规范》生产的化学原料药，如各种无机和有机化学原料药。

第三级为中等风险辅料，包括按照现行《兽药生产质量管理规范》生产，取得国家药用辅料批准文号，或按照国家备案管理的非动物源性药用辅料，如用作稀释剂、缓冲剂配制的各种化学材料，用作保护剂/稳定剂的各种糖类，用作防腐剂的硫柳汞及软膏基质的单、双硬脂酸甘油酯等。

第四级为高风险辅料，包括除上述一至三级以外的其他辅料（如：用作疫苗赋形剂的动物来源的明胶等）。非化学原料药或非药用辅料用作兽用生物制品辅料、非注射用的化学原料药或药用辅料用作兽用生物制品注射剂辅料时，应按风险等级第四级的辅料进行质量控制。

2.2 兽用生物制品生产用辅料的质量控制要求 辅料用于兽用生物制品生产时，应进行质量控制。除需进行理化、含量/活性等检验项目外，还应包括安全性检查（如：微生物限度或无菌检查、热原和/或细菌内毒素检查、异常毒性检查等）。动物源性辅料应符合附录3008 动物源性原材料的一般要求。对同时存在几种风险等级的同一种辅料，应根据兽用生物制品产品特性和生产工艺特性选用风险等级低的辅料。对于高风险等级的辅料，应在产品研发的早期评价使用这些辅料的必要性，并寻找其他替代物或替代来源。

对兽用生物制品生产用辅料应按照不同风险等级进行相应的常规检验，具体检验项目见表2。其中，第三级抽检的频率、样本数量与检测关键项目的范围等要求应高于第二级。兽用生物制品生产企业应参考国家已有规定制定内控质量检验项目和标准，兽用生物制品生产企业不具备检测能力的项目，可以委托有资质的第三方检测。

**表2 不同风险等级兽用生物制品生产用辅料的质控要求**

辅料等级	按照国家标准或兽用生物制品生产企业内控质量标准全检	关键项目检测(如鉴别、微生物限度、细菌内毒素、异常毒性检查等)
第一级	—	√
第二级	抽检(批)	√
第三级	抽检(批)	√
第四级	√	—

注：“√”为对每批辅料使用前的质控要求；“—”为不要求项目；“抽检(批)”为抽样全检+每批次检测关键项目。

2.3 辅料限度的控制 应根据兽用生物制品、制剂工艺和产品的安全性、有效性研究结果，以发挥有效作用的最小添加量确定制剂配方中辅料的加量。具有明确功能且可采用适宜方法进行性能测试的辅料，还应结合辅料性能测试结果综合考虑配方中辅料的添加量，如防腐剂抑菌效力检查等。

具有毒副作用或特定功能的辅料以及其他需要在兽用生物制品中控制含量的辅料，应在成品检定或适宜的中间产物阶段设定辅料含量检查项并规定限度要求。

## 3010 安全检验的通用要求（标准草案）

### 3010 安全检验的通用要求

除另有规定外，兽用生物制品（体外诊断制品除外）的安全检验应符合以下通用要求。

**1 动物标准** 检验用动物应符合附录3501中检验用动物标准。

**2 样品要求** 根据制品每瓶（支）头（羽）份数，每批制品至少任抽3瓶（支）；液体制品混匀后作为待检样品，冻干制品先复溶（若配有稀释液的，应采用其进行复溶）后混匀作为待检样品。

#### **3 动物数量、接种剂量与接种途径的要求**

动物数量，小鼠不少于10只，豚鼠不少于5只，鸡不少于10只，其他禽类不少于4只，豚鼠不少于5只；兔、水貂等经济动物及宠物不少于2只；猪、马、牛、羊不少于2只（头），鱼不少于15尾，其他特种动物不少于2只（头）。

接种剂量，在使用本动物进行安全检验时，一般活疫苗接种应不少于10个推荐使用剂量；灭活疫苗接种应不少于2个推荐使用剂量；其他制品应不少于5个推荐使用剂量。在使用替代动物进行安全检验时，接种剂量可酌情减少或增加。

接种途径，一般按照制品推荐的使用途径进行接种。如推荐多种使用途径，则选择对受试动物最敏感的途径进行接种。

**4 接种前观察** 应根据所选动物和待检制品特性制定合理的观察期限。一般情况下，有实验动物级别的动物观察不少于1日、无实验动物级别的动物观察不少于3日，需要测温的动物至少每日测温1次。

**5 接种后观察** 应根据所选动物和待检制品特性制定合理的观察期限。一般小鼠、豚鼠、兔、水貂等动物应不少于6日；禽类、鱼应不少于7日；马、牛、羊、猪等中、大动物应不少于7日；宠物类动物应不少于14日；其他动物不少于7日。

**6 观察指标** 在接种前观察期限内，应观察动物的临床指标，并根据制品特性和试验动物选择体温或生产性能指标进行测定；在接种后观察期限内，应观察动物的临床指标和接种部位局部反应指标，并根据制品特性选择体温、生产性能或剖检指标进行判定。

**6.1 临床指标** 应观察接种动物的精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等。对需要观察特殊临床指标的制品，应根据制品特点明确相应的临床观察指标。

**6.2 局部反应指标** 应观察接种部位制品是否吸收良好、有无眼观病变，如红肿、溃疡、结节、肉芽肿等。必要时，可取样进行组织病理学观察。如果制品接种后允许出现一定的局部反应，如红肿、溃疡和结节等，则应明确其持续或消退的时间、严重程度及大小限度等。

**6.3 体温指标** 可根据制品特性规定观察期、测温频次和体温变化范围。原则上，接种前应至少观察3日，每日应在固定时段测温至少1次，以接种前所测体温的平均值作为基础体温（如上、下午各测温1次，则上、下午分别计算基础体温）。接种制品后，每日应在相同时段测温应不少于1次，且连续测定不少于5日。如制品规定接种后当日必须测温，则应在接种4小时后进行。如果接种制品后允许出现体温反应，则应明确体温变化允许的范围和温次。

**6.4 生产性能指标** 可根据制品特性规定接种组与对照组生产性能（增重、产蛋量、产奶量或产仔数等）的比较，明确允许出现的差异范围。

**6.5 剖检指标** 如动物出现死亡或临床指标异常或非典型症状，应进行剖检，观察肉

眼变化或组织病理学变化。如有必要，可在观察期末对所有存活动物进行剖检，以判定制品的安全性。

**7 结果判定** 按制品安全检验标准进行判定，应符合规定。

## 3011? ★新增附录 禽安全检验（标准草案）

### 新增附录 禽安全检验

本要求适用于用禽进行的安全检验。除另有规定外，相关制品的安全检验应符合以下要求。

**1 动物标准** 应符合附录 3501 和制品标准要求。

**2 样品要求** 应符合凡例和附录 3010 通用要求。

**3 动物数量、接种剂量与接种途径的要求** 动物数量、接种剂量应符合附录 3010 通用要求。接种途径应与制品推荐的使用途径一致，有多种使用途径的，应采用最敏感的途径进行。

**4 接种前观察** 必要时，根据禽的级别、种类及日龄对动物进行隔离、观察。应观察禽的全身症状，包括精神、食欲、粪便等症状均正常的禽方可用于安全检验。

**5 接种后观察** 接种后观察时间应符合附录 3010 通用要求，一般不少于 7 日。必要时，还要依据制品的特性适当增加观察时间。观察包括动物的全身及局部反应，必要时进行剖检。

**5.1 全身反应** 应观察接种动物的精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等。

**5.2 局部反应** 肌肉注射、皮下注射途径接种的局部反应，应符合附录 3010 通用要求。

对于下列特定途径的，还应注意观察如下症状：

滴鼻、点眼以及喷雾途径接种的，应主要观察呼吸道、眼结膜炎、鼻炎等症状。

翅膀内侧无血管处皮下刺种途径接种的，应观察局部微红肿、结痂等炎症反应程度及持续时间。

**6 结果判定** 按制品标准进行判定，应符合规定。

## 3012? ★新增附录 小鼠安全检验（标准草案）

### 新增附录 小鼠安全检验

本要求适用于用小鼠进行的非禽源生物制品的安全检验，不适用于制品所含活性成分对小鼠有毒性或致死作用的制品。除另有规定外，相关制品的安全检验应符合以下要求。

**1 动物标准** 应符合附录 3501 和制品标准要求。

**2 样品要求** 应符合凡例和附录 3010 通用要求。

**3 动物数量、接种剂量与接种途径的要求** 动物数量应符合附录 3010 通用要求，接种剂量和接种途径应符合制品标准，**一般应不低于 1/5 个推荐使用剂量。**

**4 接种前观察** 根据小鼠的级别，必要时，对动物进行隔离、观察，符合要求后方可用于安全检验。

**5 接种后观察** 接种后观察时间应符合附录 3010 通用要求，一般**不少于 6 日**，脑内接

种的应至少观察 14 日。必要时，还要依据制品的特性适当增加观察时间。观察包括动物的全身或局部反应，必要时进行剖检。

5.1 全身反应 应观察接种小鼠的精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等。

5.2 局部反应 肌肉注射、皮下注射和腹腔注射途径接种的局部反应，应符合附录 3010 通用要求。脑内注射途径接种的，应主要观察神经症状。

6 结果判定 按制品标准进行判定，应符合规定。

## 3013? ★新增附录 豚鼠安全检验（标准草案）

### 新增附录 豚鼠安全检验

本要求适用于用豚鼠进行的安全检验。除另有规定外，相关制品的安全检验应符合以下要求。

1 动物标准 应符合附录 3501 和制品标准要求。

2 样品要求 应符合凡例和附录3010通用要求。

3 动物数量、接种途径与接种剂量的要求 动物数量、接种剂量应符合附录 3010 通用要求。接种途径应与制品推荐的使用途径一致，有多种使用途径的，应采用最敏感的途径进行。

4 接种前观察 必要时，根据豚鼠的级别和日龄对动物进行隔离、观察。检验用豚鼠的精神、食欲等正常后方可用于安全检验。

5 接种后观察 接种后观察时间应符合附录 3010 通用要求，一般不少于 6 日。在接种后的观察期限内，应观察动物的全身及局部反应，必要时进行剖检。

5.1 全身反应 应观察接种动物的精神、采食、饮水、粪便、行动等。

5.2 局部反应 肌肉或皮下注射途径接种的局部反应，应符合附录 3010 通用要求。腹腔注射途径接种的，还应注意观察是否产生过敏反应，如皮疹和呼吸困难等。

6 结果判定 按制品标准进行判定，应符合规定。

## 3014? ★新增附录 羊安全检验（标准草案）

### 新增附录 羊安全检验

本要求适用于用羊进行的安全检验。除另有规定外，相关制品的安全检验应符合以下要求。

1 动物标准 应符合附录3501和制品标准的要求。

2 样品要求 除另有规定外，应符合凡例和附录3010通用要求。

3 动物数量、接种剂量与接种途径的要求 除另有规定外，动物数量、接种剂量应符合附录3010通用要求。接种途径应与制品推荐的使用途径一致，有多种使用途径的，应采用最敏感的途径进行。

4 接种前观察 根据动物来源、品种及日龄制定合理的观察期，一般观察期限应不少于3日。观察期间应对动物进行隔离、检疫，并观察其精神食欲、体温状况等。符合要求后方可用于安全检验。

**5 接种后观察** 接种后观察时间和观察指标应符合附录 3010 通用要求。应根据制品特性选择适宜的临床指标进行观察，并详细记录动物的全身及局部反应。

5.1 全身反应 一般应观察接种羊的精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等。根据制品特性应明确生长性能、生产性能等观察指标，如怀孕羊应观察是否出现死胎、流产等。

5.2 局部反应 根据制品的接种途径设置重点观察指标。对于局部出现不良反应的，可取样进行组织病理学检查。如果制品接种后允许出现局部反应，如红肿、溃疡和结节等，则应明确其持续或消退的时间、严重程度及大小限度等。

5.2.1 肌肉接种 重点观察接种部位是否出现红肿、结节、肌肉坏死和按压性疼痛等。

5.2.2 皮下、皮内接种 重点观察接种部位是否出现红肿、溃疡、结节、瘙痒和按压性疼痛等。

5.2.3 粘膜划痕 重点观察接种部位是否出现红肿、溃疡、水疱、脓疱等。

**6 结果判定** 按制品标准进行判定，应符合规定。

## 3015? ★新增附录 牛安全检验（标准草案）

### 新增附录 牛安全检验

本要求适用于用牛进行的安全检验。除另有规定外，相关制品的安全检验应符合以下要求。

**1 动物标准** 应符合附录 3501 和制品标准的要求。

**2 样品要求** 除另有规定外，应符合凡例和附录 3010 通用要求。

**3 动物数量、接种剂量与接种途径的要求** 除另有规定外，动物数量、接种剂量应符合附录 3010 通用要求。接种途径应与制品推荐的使用途径一致，有多种使用途径的，应采用最敏感的途径进行。

**4 接种前观察** 根据动物来源、品种及日龄制定合理的观察期，一般观察期限应不少于 3 日。观察期间应对动物进行隔离、检疫，并观察其精神食欲、体温状况等。符合要求后方可用于安全检验。

**5 接种后观察** 接种后观察时间和观察指标应符合附录 3010 通用要求。应根据制品特性选择适宜的临床指标进行观察，并详细记录动物的全身及局部反应。

5.1 全身反应 一般应观察接种牛的精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等。根据制品特性应明确生长性能、生产性能等观察指标，如怀孕牛应观察是否出现死胎、流产等。

5.2 局部反应 根据制品的接种途径设置重点观察指标。对于局部出现不良反应的，可取样进行组织病理学检查。如果制品接种后允许出现局部反应，如红肿、溃疡和结节等，则应明确其持续或消退的时间、严重程度及大小限度等。

5.2.1 肌肉接种 重点观察接种部位是否出现红肿、结节、肌肉坏死和按压性疼痛等。

5.2.2 皮下、皮内接种 重点观察接种部位是否出现红肿、溃疡、结节、瘙痒和按压

性疼痛等。

5.2.3 舌背面接种 重点观察接种部位制品的吸收程度，是否出现红肿、水泡、溃疡、结节等。

5.2.4 喷鼻接种 重点观察接种部位是否出现黏膜炎，试验牛是否出现明显的呼吸道症状，如喘气、咳嗽、甩头等。

6 结果判定 按制品标准进行判定，应符合规定。

## 3016? ★新增附录 猪安全检验（标准草案）

### 新增附录 猪安全检验

本要求适用于用猪进行的安全性检验。除另有规定外，相关制品的安全检验应符合以下要求。

1 动物标准 应符合附录 3501 和制品标准要求。

2 样品要求 应符合凡例和附录 3010 通用要求。

3 动物数量、接种剂量与接种途径的要求 动物数量、接种剂量，应符合附录 3010 通用要求。接种途径应与制品推荐的使用途径一致，有多种使用途径的，应采用最敏感的路径进行。

4 接种前观察 根据动物来源、品种及日龄必要时进行隔离、检疫和观察，一般观察期限应不少于 3 日。在接种前的观察期限内，应观察猪的全身反应，并根据猪用制品的特性，选择精神、食欲、体温（14 日龄以下可不测温）均正常的猪方可用于安全检验。

5 接种后观察 接种后观察时间和观察指标应符合附录 3010 通用要求。观察包括动物的全身及局部反应，必要时进行剖检。

5.1 全身反应 应观察接种动物的精神、采食、体温、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等。体温指标除另有规定外，按附录 3010 通用要求进行。如果接种制品后允许出现体温反应，则应明确体温变化允许的范围和稽留温次。

5.2 局部反应 肌肉注射、皮下注射、皮内接种途径接种的局部反应，应符合附录 3010 通用要求。对于下列特定途径的，还应观察以下指标：

滴鼻接种 观察试验猪是否出现明显呼吸症状，如喘气、咳嗽、甩头等。

胸腔接种 观察试验猪是否出现咳嗽、呼吸困难、俯卧、呕吐、震颤和死亡等。

皮内接种 观察试验猪是否出现红肿、疼痛、硬结、瘙痒、皮疹以及其它过敏症状等。

饮水、口服接种 观察试验猪是否出现呕吐、腹泻、抽搐、卧地不起以及其它过敏症状等。

6 结果判定 按制品标准进行判定，应符合规定。

## 3017? ★新增附录 犬安全检验（标准草案）

### 新增附录 犬安全检验

本要求适用于用犬进行的安全检验。除另有规定外，相关制品的安全检验应符合以下要求。

**1 动物标准** 应符合附录 3501 和制品标准要求。

**2 样品要求** 除另有规定外，应符合凡例和附录 3010 通用要求。

**3 动物数量、接种剂量与接种途径的要求** 动物数量、接种剂量应符合附录 3010 通用要求。接种途径应与制品推荐的使用途径一致，有多种使用途径的，应采用最敏感的途径进行。

对于规格为 1 个推荐使用剂量/瓶的制品，至少抽取接种剂量所需的样品数，所有样品混匀后进行接种，每只犬至少接种 2 个推荐使用剂量。接种时可根据实际需要分 2~3 点接种。

**4 接种前观察** 根据动物来源、品种及日龄制定合理的观察期，一般观察期限应不少于 3 日。观察期间应对动物进行隔离，并观察其精神食欲、体温状况等。符合要求后方可用于安全检验。

**5 接种后观察** 接种后观察时间和观察指标应符合附录 3010 的通用要求。应根据制品特性选择适宜的临床指标进行观察，并详细记录动物的全身及局部反应。

**5.1 全身反应** 一般应观察接种犬的精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等。

**5.2 局部反应** 根据制品的接种途径设置重点观察指标。对于局部出现不良反应的，可取样进行组织病理学检查。如果制品接种后允许出现局部反应，如红肿、溃疡和结节等，则应明确其持续或消退的时间、严重程度及大小限度等。

**5.2.1 肌肉接种** 重点观察接种部位是否出现红肿、结节、肌肉坏死和按压性疼痛等。

**5.2.2 皮下、皮内接种** 重点观察接种部位是否出现红肿、溃疡、结节、瘙痒和按压性疼痛等。

**6 结果判定** 按制品标准进行判定，应符合规定。

## 3018? ★新增附录 猫安全检验（标准草案）

### 新增附录 猫安全检验

本要求适用于用猫进行的安全检验。除另有规定外，相关制品的安全检验应符合以下要求。

**1 动物标准** 应符合附录 3501 和制品标准要求。

**2 样品要求** 除另有规定外，应符合凡例和附录 3010 通用要求。

**3 动物数量、接种剂量与接种途径的要求** 动物数量、接种剂量应符合附录 3010 通用要求。接种途径应与制品推荐的使用途径一致，有多种使用途径的，应采用最敏感的途径进行。

对于规格为 1 个推荐使用剂量/瓶的制品，至少抽取接种剂量所需的样品数，所有样品混匀后进行接种，每只犬至少接种 2 个推荐使用剂量。接种时可根据实际需要分 2~3 点接种。

**4 接种前观察** 根据动物来源、品种及日龄制定合理的观察期，一般观察期限应不少于 3 日。观察期间应对动物进行隔离，并观察其精神食欲、体温状况等。符合要求后方可

用于安全检验。

**5 接种后观察** 接种后观察时间和观察指标应符合附录 3010 通用要求。应根据制品特性选择适宜的临床指标进行观察，并详细记录动物的全身及局部反应。

5.1 全身反应 一般应观察接种猫的精神、食欲、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等。

5.2 局部反应 根据制品的接种途径设置重点观察指标。对于局部出现不良反应的，可取样进行组织病理学检查。如果制品接种后允许出现局部反应，如红肿、溃疡和结节等，则应明确其持续或消退的时间、严重程度及大小限度等。

5.2.1 肌肉接种 重点观察接种部位是否出现红肿、结节、肌肉坏死和按压性疼痛等。

5.2.2 皮下、皮内接种 重点观察接种部位是否出现红肿、溃疡、结节、瘙痒和按压性疼痛等。

**6 结果判定** 按制品标准进行判定，应符合规定。

## 3019? ★新增附录 兔安全检验（标准草案）

### 新增附录 兔安全检验

本方法适用于用兔进行的安全检验。除另有规定外，相关制品的安全检验应符合以下要求。

**1 动物标准** 应符合附录 3501 和制品标准要求。

**2 样品要求** 应符合凡例和附录 3010 通用要求。

**3 动物数量、接种剂量与接种途径的要求** 作为靶动物，动物数量、接种剂量应符合附录 3010 通用要求。接种途径应与制品推荐的使用途径一致，有多种使用途径的，应采用最敏感的途径进行。作为非靶动物，接种剂量不低于 1/2 个靶动物推荐使用剂量。

**4 接种前观察** 应根据动物来源、品种和日龄制定合理的观察期限。接种前试验兔的观察期限应不少于 3 日，在接种前观察期限内，应观察试验兔的全身症状，根据制品特性按照质量标准要求选择进行体温测定，体温平稳、精神、食欲均正常的兔方可用于安全检验。

**5 接种后观察** 接种后观察时间和观察指标应符合附录 3010 通用要求。应在接种后的观察期限内，观察动物的全身及局部反应，并根据制品特性按照标准要求选择进行体温测定。

5.1 全身反应 应观察接种动物的精神、采食、饮水、呼吸、被毛、粪便、行动等。

5.2 局部反应 肌肉、皮下注射途径接种的，应观察接种部位制品是否吸收良好、有无眼观病变。如红肿、溃疡、结节、坏死等。

**6 结果判定** 按制品标准进行判定，应符合规定。

## 3020? ★新增附录 细菌灭活疫苗的通用要求（标准草案）

### 细菌灭活疫苗的通用要求

**1 定义** 细菌灭活疫苗系用细菌接种适宜培养基培养，收获菌体（蛋白或毒素或其它活性成分），经适当工艺处理后进行灭活或脱毒，加适宜佐剂或保护剂制成。用于预防动物相关疫病。

**2 菌种** 基础菌种应进行全面系统鉴定，至少鉴定到种，必要时还应对菌种的血清型、

变异型、亚型、纤毛型等进行鉴定。检定项目原则上应包括形态特性、生化特性、培养特性、血清型鉴定、安全性、免疫原性、纯粹等。

### 3 生产用原辅料

3.1 生产用培养基 培养基的成分应明确且能满足其使用目的，应制定检验方法对培养基质量进行控制。

3.2 生产用动物 除另有规定外，应符合附录 3501 要求。

3.3 动物源性原材料 应尽可能避免使用可引起动物机体过敏反应的原材料，除另有规定外，其成分应符合附录 3008 要求，如使用牛血清，应符合附录 3503 要求。

3.4 佐剂 除另有规定外，氢氧化铝胶应符合附录 3603 要求；白油（轻质矿物油）应符合附录 3605 要求；《中国兽药典》或《中国药典》未收录的其他佐剂应提供主要组分及其质量标准。

4 生产 细菌（蛋白或毒素或其它活性成分）灭活疫苗抗原生产时，应对培养过程、杂质及有毒有害成分的产生、灭活或脱毒方法等关键工艺进行控制。

4.1 代次 应严格控制细菌增殖代次。自基础菌种至疫苗应不超过规定的最高限定代次限定。

4.2 培养 应对生产工艺严格控制，尽量减少细菌培养过程中杂质或有毒有害成分的产生，必要时可采用适宜的方法对抗原进行纯化。

4.3 灭活和脱毒 应选择适当的灭活或脱毒剂，应对灭活或脱毒工艺进行验证，有效控制灭活剂或脱毒剂残留量。

4.4 半成品 除另有规定外，应进行灭活前菌数或菌液浓度、脱毒前或脱毒后毒素或蛋白等活性成分的检验，并对可能影响有效性和安全性的降解产物进行检测，必要时应进行细菌内毒素检测。

4.5 成品制备 应按配方进行疫苗配制，所有组分、配制比例应固定。

5 成品检验 应依据生产工艺和制品特性设定检测项目，原则上应包含性状、无菌检验、安全检验、效力检验、灭活剂或脱毒剂残留量测定等。

## 3021? ★新增附录 细菌活疫苗的通用要求（标准草案）

### 细菌活疫苗的通用要求

1 定义 细菌活疫苗系用细菌接种适宜培养基培养，收获培养物，经冷冻真空干燥或加适宜稳定剂制成。用于预防动物相关疫病。

2 菌种 菌种应进行全面系统鉴定，至少鉴定到种，必要时还应对菌种的血清型、变异型、亚型、纤毛型等进行鉴定。鉴定项目原则上应包括形态特性、生化特性、培养特性、血清型鉴定、安全性、免疫原性、纯粹、毒力返强等，必要时依据疾病特征及病原特性还需进行水平传播试验。

### 3 生产用原辅料

3.1 生产用培养基 培养基的成分应明确且能满足其使用目的，应制定检验方法对培养基质量进行控制。

3.2 生产用动物 除另有规定外，应符合附录 3501 要求。

3.3 动物源性原材料 应尽可能避免使用可引起动物机体过敏反应的原材料，除另有规定外，其成分应符合附录 3008 要求，如使用牛血清，应符合附录 3503 要求。

3.4 冻干保护剂（稳定剂） 应明确主要组分及其质量标准。

**4 生产** 细菌活疫苗抗原生产时，应对培养过程、杂质及有毒有害成分产生等关键工艺进行控制。

4.1 代次 应严格控制细菌增殖代次。自基础菌种至疫苗应不超过规定的最高代次限定。

4.2 培养 应对生产工艺严格控制，尽量减少细菌培养过程中杂质或有毒有害成分的产生，必要时可采用适宜的方法对抗原进行纯化。

4.3 半成品 除另有规定外，应进行纯粹检验、活菌计数等检测，并对可能影响有效性和安全性的降解产物进行检测，必要时应进行细菌内毒素检测。

4.4 成品制备 应按配方进行疫苗配制，所有组分、配制比例应固定。

**5 成品检验** 应依据生产工艺和制品特性设定检测项目，原则上应包含性状、纯粹检验、活菌（芽孢）计数、安全检验、效力检验、剩余水分测定（冻干苗）、真空度测定（冻干苗）。

**6 疫苗稀释液** 若成品配备专用稀释液，应明确组分及配方，制定质量标准。

## 3022? ★新增附录 病毒灭活疫苗的通用要求（标准草案）

### 病毒灭活疫苗的通用要求

**1 定义** 病毒灭活疫苗系用病毒接种适宜组织或细胞等基质培养，收获感染组织或病毒培养物，经适当工艺处理后进行灭活，加适宜佐剂制成。用于预防动物相关疫病。

**2 毒种** 毒种应进行全面系统鉴定，至少鉴定到属和种，必要时还应对毒种的血清型、亚型等进行鉴定。鉴定项目原则上应包括安全性（或毒力）、免疫原性、纯净等。

#### **3 生产用原辅料**

3.1 生产用基质 生产用培养基应符合该病毒培养需求，并对其进行质量控制；生产用细胞应符合附录 3502 要求；生产用鸡胚应根据制品特点对其质量进行控制。

3.2 生产用动物 除另有规定外，应符合附录 3501 要求。

3.3 动物源性原材料 应尽可能避免使用可引起动物机体过敏反应的原材料，除另有规定外，其成分应符合附录 3008 要求，如使用牛血清，应符合附录 3503 要求。细胞生产过程中，若用到胰酶，应符合附录 3505 要求。

3.4 佐剂 除另有规定外，氢氧化铝胶应符合附录 3603 要求；白油（轻质矿物油）应符合附录 3605 要求；《中国兽药典》或《中国药典》未收录的其他佐剂应提供主要组分及其质量标准。

**4 生产** 利用细胞（胚、组织）培养生产病毒灭活疫苗抗原的生产过程，包括组织培养、病毒培养、灭活、半成品及成品制备等。若成品配备专用稀释液，应明确组分及配方，制定质量标准。

4.1 代次 应严格控制细胞及病毒代次。自毒种开启到疫苗抗原应不超过规定的最高代次限定。除另有规定外，细胞应不超过 20 代。

4.2 培养 应选择适当的培养基及培养工艺，尽量减少抗原液中的杂蛋白及细胞碎片，必要时可采用适宜的方法对抗原进行纯化。

4.3 灭活 应选择适当的灭活剂并对灭活工艺进行验证，有效控制灭活剂的残留量。

4.4 半成品 除另有规定外，应进行灭活前病毒或蛋白等活性成分的检验。必要时对可能影响有效性和安全性的杂蛋白进行检测。

4.6 成品制备 应按配方进行疫苗配制，所有组分、配制比例应固定。

5 成品检验 应依据生产工艺和制品特性设定检测项目，原则上应包含性状、无菌检验、安全检验、效力检验、灭活剂/防腐剂残留量测定等。

## 3023? ★新增附录 病毒活疫苗的通用要求（标准草案）

### 病毒活疫苗的通用要求

1 定义 病毒活疫苗系用病毒接种适宜组织或细胞等基质培养，收获感染组织或病毒培养物，加适宜冻干保护剂，经冷冻真空干燥或加适宜稳定剂制成。用于预防动物相关疫病。

2 毒种 毒种应进行全面系统鉴定，至少鉴定到属和种，必要时还应对毒种的血清型、亚型等进行鉴定。鉴定项目原则上应包括安全性（或毒力）、免疫原性、纯净、毒力返强等、必要时依据疾病特征及病原特性还需进行水平传播试验。

#### 3 生产用原辅料

3.1 生产用基质 生产用培养基应符合该病毒培养需求，并对其进行质量控制；生产用细胞应符合附录 3502 要求；生产用鸡胚应符合附录 3501 要求。

3.2 生产用动物 除另有规定外，应符合附录 3501 要求。

3.3 动物源性原材料 应尽可能避免使用可引起动物机体过敏反应的原材料，除另有规定外，其成分应符合附录 3008 要求，如使用牛血清，应符合附录 3503 要求。细胞生产过程中，若用到胰酶，应符合附录 3505 要求。

3.4 冻干保护剂（稳定剂） 应明确主要组分、配方及其质量标准。

4 生产 病毒活疫苗抗原生产时，应对细胞培养、病毒培养等关键工艺进行控制。

4.1 代次 应严格控制细胞及病毒代次。自毒种开启到疫苗抗原应不超过规定的最高代次限定。除另有规定外，细胞应不超过 20 代。

4.2 病毒培养 应选择适当的培养基及培养工艺，尽量减少抗原液中的杂蛋白及细胞碎片，必要时可采用适宜的方法对抗原进行纯化。

4.3 半成品 除另有规定外，应进行无菌检验、病毒含量测定。必要时对可能影响有效性和安全性的杂蛋白进行检测。

4.4 成品制备 应按配方进行疫苗配制，所有组分、配制比例应固定。

5 成品检验 应依据生产工艺和制品特性设定检测项目，原则上应包含性状、无菌检验、支原体检验、外源病毒检验、病毒含量测定、安全检验、效力检验等。

6 稀释液 若成品还配备专用稀释液，应明确组分及配方，制定质量标准。

## 3024? ★新增附录 基因工程亚单位疫苗的通用要求（标准草案）

### 基因工程亚单位疫苗的通用要求

**1 定义** 基因工程亚单位疫苗系将含有特定目的抗原基因的重组细菌（真菌）、重组病毒或重组细胞经适宜方式培养纯化，收获目的抗原，加适宜佐剂或稳定剂制成。用于预防动物相关疫病。

## **2 菌（毒）种和/细胞**

2.1 重组细菌（真菌） 生产用菌种除应符合附录 XX（细菌灭活疫苗的通用要求）要求外，还应采用适宜方法对目的基因及表达蛋白进行分析，如适用，还应符合附录 XX（病毒灭活疫苗通用要求）评估重组菌种的遗传或基因稳定性、蛋白表达稳定性。

2.2 重组病毒 生产用毒种除应符合附录 XX（病毒灭活疫苗的通用要求）要求外，还应采用适宜方法对目的基因及表达蛋白进行分析，以评估重组毒种的遗传或基因稳定性、蛋白表达稳定性。

2.3 重组细胞 生产用细胞应符合附录 3502 要求。还应采用适宜方法对目的蛋白的表达完整性、稳定性及表达量等进行分析，评估重组细胞的遗传或基因稳定性、蛋白表达稳定性。

**3 生产用原辅料** 除另有规定外，生产用原辅料应符合附录 XX（细菌灭活疫苗的通用要求）或附录 XX（病毒灭活疫苗的通用要求）对原辅材料的规定。

**4 生产** 目的抗原生产时，应对培养过程、杂质等关键工艺进行控制。

4.1 代次 生产用重组细菌（真菌）、重组病毒或/和重组细胞的代次，均不应超过规定的最高代次限制。

4.2 重组细菌（真菌）或重组病毒或重组细胞培养及纯化 应对生产工艺严格控制，尽量减少培养过程中杂质或有毒有害成分的产生，且应采用适当工艺对目的抗原进行纯化。

4.3 灭活 对采用具有致癌性的人源重组细胞生产抗原时，除非有明确生产工艺证明抗原不含细胞 DNA 或 DNA 稳定在一定限度内，否则必须采用适宜灭活工艺进行灭活。

4.4 半成品 除另有规定外，应对目的抗原的含量、纯度进行检验，如采用重组细菌生产抗原，则必须进行细菌内毒素检测。

4.5 成品制备 应按配方进行疫苗配制，所有组分、配制比例应固定。

**5 成品检验** 应依据生产工艺和制品特性设定检测项目，原则上应包含性状检验、无菌检验、内毒素检验（必要时）、安全检验、效力检验等。

## **3025? ★新增附录 外源病毒检验的通用要求（标准草案）**

### **新增附录 外源病毒检验的通用要求**

除另有规定外，兽用生物制品生产检验用毒种、动物源性材料及活疫苗等按下列要求进行外源病毒检验应遵循以下要求，其它制品可参照执行。

**1 毒种** 所有兽用生物制品生产检验用毒种均应进行外源病毒检验，应根据毒种来源动物和制品使用动物，按照但不限于附录 3305 进行检验。

#### **1.1 禽源毒种**

##### **1.1.1 基本原则**

1.1.1.1 对于禽源毒种一般应采用鸡胚检查法和细胞检查法进行外源病毒检验。必要时，还应同时采用鸡检查法进行检验。任一项不符合规定的，判定该毒种外源病毒检验不符合规定。

1.1.1.2 对于水禽源毒种，除按 1.1.1.1 项进行检验外，还应增加接种敏感鸭（鹅）胚以

及鸭（鹅）胚成纤维细胞进行外源病毒检验。

1.1.1.3 如禽源毒种分离或培养过程中使用了非禽源细胞，还应按细胞来源进行外源病毒检验。

#### 1.1.2 检查方法

1.1.2.1 胚检查法 应采用尿囊腔、绒毛尿囊膜和卵黄囊 3 途径进行接种，按照附录 3305 进行检验，应符合规定。

1.1.2.2 细胞检查法 所有毒种应接种接胚成纤维细胞、鸡胚肾细胞、鸡胚肝细胞进行致细胞病变检查、红细胞凝集和红细胞吸附性外源病毒检查；对于水禽源毒种，还应同时接种相应鸭胚或鹅胚成纤维细胞，至少培养 10 日，并按附录 3305 进行检验，应符合规定。除此之外，还应对禽白血病毒检验法（附录 3302）、禽网状内皮组织增生症病毒检验法（附录 3304）、鸡传染性贫血病毒检验法（附录 XXX）等进行检查，均应符合规定。

1.1.2.3 鸡检查法 应至少接种 2 次，并进行临床观察，最后 1 次接种后 21 日，按附录 3305 进行相应病原的血清抗体检测，应符合规定。

1.1.2.4 其他方法 对于特定毒种，必要时可增加其他方法进行特定外源病毒检查。

#### 1.2 非禽源毒种

1.2.1 基本原则 对于非禽源毒种一般应采用细胞检查法进行外源病毒的检查。必要时，可增加动物检查法或其他检查法。检查细胞的选择应至少包括：①Vero 细胞；②种毒来源动物的胚、胚胎细胞、新生动物细胞或细胞系；③制品靶动物胚胎细胞、新生动物细胞或细胞系（如与前述细胞不同时）。任一项不符合规定的，判定该毒种外源病毒检验不符合规定。

#### 1.2.2 检查方法

1.2.2.1 致细胞病变检查 所有毒种均应接种 Vero 细胞进行致细胞病变检查。不同来源的毒种还应至少增加下列细胞的接种，按附录 3305 进行检验，应符合规定。

- (1) 猪源毒种：PK15（或 ST）细胞。
- (2) 牛源毒种：MDBK 细胞。
- (3) 绵羊和山羊源毒种：羊肾细胞（或羊睾丸）。
- (4) 犬科、猫科或鼬科源毒种：MDCK 细胞和/或 CRFK（或 F81）细胞。

1.2.2.2 红细胞凝集和红细胞吸附性外源病毒检查 接种细胞同 1.2.2.1 项，按附录 3305 进行检验，均应符合规定。

1.2.2.3 荧光抗体检查 所有毒种均应接种 MDCK 细胞检查牛病毒性腹泻/黏膜病病毒（BVDV）；接种 Vero（或 BHK21）细胞检查狂犬病病毒（RV）。不同来源的毒种还应至少增加下列特定病原检查：

(1) 猪源毒种：接种 ST（或 PK15）细胞检查猪瘟病毒（CSFV）、猪圆环病毒 2 型（PCV2）、猪传染性胃肠炎病毒（TGEV）；接种 Vero 细胞检查猪流行性腹泻病毒（PEDV）；接种 MA104 细胞检查猪轮状病毒（PoRV）。

(2) 绵羊和山羊源毒种：接种羊肾（或羊睾丸）细胞检查边界病病毒（BDV）。

(3) 犬科、猫科或鼬科源毒种：接种 CRFK（或 F81）细胞检查犬细小病毒（CPV）。

1.2.2.4 其他方法 根据毒种来源，必要时可增加其他特定病原的检查。

#### 2 动物源性材料

2.1 细胞、血清、胰酶、明胶等动物源性材料均应进行外源病毒检验，应根据动物源性材料的来源动物，参照 1.1 和 1.2 项进行外源病毒检验。

2.2 应对动物源材料中可能存在的外源病毒污染风险进行评估，并根据评估结果制定合理的外源病毒检验频次以及其他新增的外源病毒检验等要求。

2.3 应对兽用生物制品生产和检验过程中使用的动物源性材料的动物群体所带的病原进行监测，确保降低动物性原材料无外源病毒污染风险。

### 3 成品

#### 3.1 禽用活疫苗

3.1.1 禽用活疫苗一般采用鸡胚法（经尿囊腔和绒毛尿囊膜两种途径）进行外源病毒检验，同时采用细胞法进行禽白血病病毒污染检验，均应符合规定。用鸭（鹅）胚及相应细胞生产的水禽活疫苗，还应增加鸭（鹅）胚或鸭（鹅）胚成纤维细胞的接种。

3.1.2 当采用 3.1.1 项进行检验难以判定结果或不适用时，应增加鸡检查法进行外源病毒检验，应符合规定。

#### 3.2 非禽用活疫苗

3.2.1 非禽用活疫苗一般采用细胞检查法进行外源病毒检验。

3.2.2 接种细胞的选择应至少包括：（1）Vero 细胞；（2）靶动物胚胎细胞、新生动物细胞或细胞系。

猪用活疫苗 采用 Vero、PK15（或 ST）细胞进行致细胞病变检查、红细胞凝集及红细胞吸附性外源病毒检查。

牛用活疫苗 接种 Vero、MDBK 细胞进行致细胞病变检查、红细胞凝集及红细胞吸附性外源病毒检查；接种 MDBK 进行 BVDV 的检查。

绵羊和山羊用活疫苗 接种 Vero、羊肾（或羊睾丸）细胞进行致细胞病变检查、红细胞凝集及红细胞吸附性外源病毒检查。

犬科、猫科或鼬科用活疫苗 接种 Vero 细胞、MDCK 细胞、CRFK（或 F81）细胞进行致细胞病变检查、红细胞凝集及红细胞吸附性外源病毒检查；接种 Vero（或 BHK21）细胞检查狂犬病毒（RV）。

马用活疫苗 接种 Vero 细胞进行致细胞病变检查、红细胞凝集及红细胞吸附性外源病毒检查。

## ● 3100 物理检验法

### 3101 pH 值测定法 (标准草案)

#### 3101 pH 值测定法

除另有规定外,水溶液的 pH 值应以玻璃电极为指示电极,饱和甘汞电极为参比电极的酸度计进行测定。酸度计应定期进行计量检定,并符合国家有关规定。滴定前,应采用下列标准缓冲液校正仪器,也可用国家标准物质管理部门提供的标示 pH 值准确至 0.01 pH 值单位的各种标准缓冲液校正仪器。

**1 仪器校正用的标准缓冲液** 应使用标准缓冲物质配制,配制方法如下。

1.1 草酸盐标准缓冲液 精密称取在 51~53℃干燥 4~5 小时的草酸三氢钾 12.71g,加水使其溶解并定容至 1000ml。

1.2 邻苯二甲酸盐标准缓冲液 精密称取在 110~120℃干燥 2~3 小时的邻苯二甲酸氢钾 10.12g,加水使其溶解并定容至 1000ml。

1.3 磷酸盐标准缓冲液 精密称取在 115℃±5℃干燥 2~3 小时的无水磷酸氢二钠 3.55g 与磷酸二氢钾 3.40g,加水使其溶解并定容至 1000ml。

1.4 硼砂标准缓冲液 精密称取硼砂 3.81g (注意避免风化),加水使其溶解并定容至 1000ml,置聚乙烯塑料瓶中,密塞,避免与空气中二氧化碳接触。

1.5 氢氧化钙标准缓冲液 于 25℃,用无二氧化碳的水制备氢氧化钙饱和溶液,取上清液使用。存放时应防止空气中二氧化碳进入。一旦出现浑浊,应弃去重配。

上述标准缓冲溶液必须用基准试剂配制。

不同温度时各种标准缓冲液的 pH 值如下表:

温度 (°C)	草酸盐标准缓冲液	邻苯二甲酸盐标准缓冲液	磷酸盐标准缓冲液	硼砂标准缓冲液	氢氧化钙标准缓冲液 (25℃饱和溶液)
0	1.67	4.01	6.98	9.64	13.43
5	1.67	4.00	6.95	9.40	13.21
10	1.67	4.00	6.92	9.33	13.00
15	1.67	4.00	6.90	9.28	12.81
20	1.68	4.00	6.88	9.23	12.63
25	1.68	4.01	6.86	9.18	12.45
30	1.68	4.02	6.85	9.14	12.29
35	1.69	4.02	6.84	9.10	12.13
40	1.69	4.04	6.84	9.07	11.98
45	1.70	4.05	6.83	9.04	11.84
50	1.71	4.06	6.83	9.01	11.71
55	1.72	4.08	6.83	8.99	11.57
60	1.72	4.09	6.84	8.96	11.45

**2 注意事项** 测定 pH 值时，应严格按仪器说明书操作，并注意下列事项。

2.1 测定前，按各品种项下的规定，选择两种 pH 值相差约 3 个 pH 值单位的标准缓冲液，使供试液的 pH 值处于二者之间。

2.2 取与供试液 pH 值较接近的第一种标准缓冲液对仪器进行校正（定位），使仪器示值与表列数值一致。

2.3 仪器定位后，再用第二种标准缓冲液核对仪器示值，误差应不大于  $\pm 0.02$  pH 值单位。如果大于此偏差，则应小心调节斜率，使示值与第二种标准缓冲液的表列数值相符。重复上述定位与斜率调节操作，至仪器示值与标准缓冲液的规定数值相差不大于 0.02 pH 值单位。否则，须检查仪器或更换电极后，再进行校正至符合要求。

2.4 每次更换标准缓冲液或供试液前，应用纯化水充分洗涤电极，然后将水吸尽，也可用所换的标准缓冲液或供试液洗涤。

2.5 在测定高 pH 值的供试品时，应注意碱误差的问题，必要时选用适宜的玻璃电极测定。

2.6 对弱缓冲液（如水）的 pH 值测定，先用邻苯二甲酸盐标准缓冲液校正仪器后测定供试液，并重取供试液再测，直至 pH 值的读数在 1 分钟内改变不超过  $\pm 0.05$  为止；然后再用硼砂标准缓冲液校正仪器，再如上法测定；两次 pH 值的读数相差应不超过 0.1，取两次读数的平均值为其 pH 值。

2.7 配制标准缓冲液与溶解供试品的水，应是新煮沸过并放冷的纯化水，其 pH 值应为 5.5~7.0。

2.8 标准缓冲液一般可保存 2~3 个月，但发现有混浊、发霉或沉淀等现象时，不能继续使用。

## 3102 黏度测定法（标准草案）

### 3102 黏度测定法

黏度系指流体对流动的阻抗能力，本法以动力黏度或运动黏度数表示，用于检测注射用白油及矿物油佐剂灭活疫苗黏度。

流体分牛顿流体和非牛顿流体两类。牛顿流体流动时所需剪应力不随流速的改变而改变，纯液体和低分子物质的溶液属于此类，如生产矿物油佐剂灭活疫苗所使用的注射用白油；非牛顿流体流动时所需剪应力随流速的改变而改变，高聚物的溶液、混悬液、乳剂和表面活性剂的溶液属于此类，如矿物油佐剂灭活疫苗。

液体以 1.0cm/s 的速度流动时，在每 1.0cm<sup>2</sup> 平面上所需剪应力的大小，称为动力黏度（ $\eta$ ），以 Pa·s 为单位。在相同温度下，液体的动力黏度与其密度（kg/m<sup>3</sup>）的比值，再乘 10<sup>-6</sup>，即等于该液体的运动黏度（ $\nu$ ），以 mm<sup>2</sup>/s 为单位。

黏度的测定用黏度计。黏度计有多种类型，本法采用毛细管式和旋转式两类黏度计。毛细管类黏度计因不能调节线速度，不便测定非牛顿流体的黏度，但对高聚物的稀薄溶液或低黏度液体的黏度测定较方便，如检测注射用白油的运动黏度；旋转式黏度计一般适用于牛顿

及非牛顿流体的黏度测定，如检测注射用白油及矿物油佐剂灭活疫苗黏度。

### 1 本法测定所需仪器用具

1.1 恒温水浴 可选用直径 30cm 以上、高 40cm 以上的玻璃缸或有机玻璃缸，附有电动搅拌器与电热装置，除说明书另有规定外，在  $20^{\circ}\text{C}\pm 0.1^{\circ}\text{C}$  测定运动黏度或动力黏度。

1.2 温度计 分度为  $0.1^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 秒表 分度为 0.2 秒。

1.4 黏度计

1.4.1 平氏黏度计（见图 1） 可用于注射用白油的检测，根据需要分别选用毛细管内径为  $0.8\text{mm}\pm 0.05\text{mm}$ 、 $1.0\text{mm}\pm 0.05\text{mm}$ 、 $1.2\text{mm}\pm 0.05\text{mm}$ 、 $1.5\text{mm}\pm 0.1\text{mm}$  或  $2.0\text{mm}\pm 0.1\text{mm}$  的平氏黏度计。在规定条件下测定供试品在平氏黏度计中的流出时间（秒），与该黏度计用已知黏度的标准液测得的黏度计常数（ $\text{mm}^2/\text{s}^2$ ）相乘，即得供试品的运动黏度。

1.4.2 旋转式黏度计（见图 2） 旋转式黏度计通过一个经校验过的合金弹簧带动一个转子在流体中持续旋转，旋转扭矩传感器测得弹簧的扭变程度即扭矩，它与浸入样品中的转子被黏性拖拉形成的阻力成比例，扭矩因而与液体的黏度也成正比。旋转式黏度计测定黏度范围与转子的大小和形状以及转速有关。对于一个黏度已知的液体，弹簧的扭转角会随着转子转动的速度和转子几何尺寸的增加而增加，所以在测定低黏度液体时，使用大体积的转子和高转速组合，相反，测定高黏度液体时，则用细小转子和低转速组合。液体黏度变化取决于测量条件的选择，旋转式黏度计目前多采用液晶显示，显示信息包括黏度、温度、剪切应力/剪切率、扭矩、转子号/转速等，数字显示输出为 cP 或  $\text{mPa}\cdot\text{s}$ ，1 cP 相当于  $1 \text{mPa}\cdot\text{s}$ 。

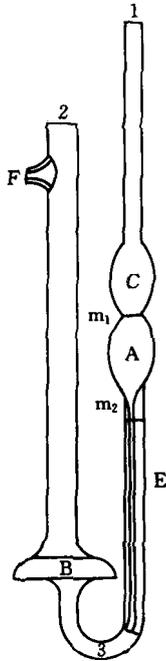


图 1 平氏黏度计

1—主管；2—宽管；3—弯管；

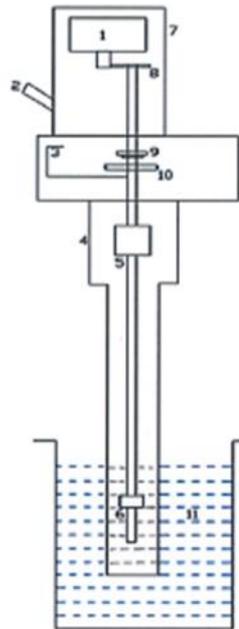


图 2 旋转式黏度计

1—电动机；2—离合器；3—指针；4—轴承外壳；

A—测定球；B—储器；C—缓冲球；5—轴承；6—转子；7—外壳；8—变速器；  
E—毛细管；F—支管；m<sub>1</sub>，m<sub>2</sub>—环形测定线 9—拨号器；10—校正弹簧；11—测试样品

## 2 方法

2.1 第一法（平氏黏度计法） 选择合适的转子，取毛细管内径符合要求的平氏黏度计 1 支，在支管 F 上连接一橡皮管，用手指堵住管口 2，倒置黏度计，将管口 1 插入供试品（或供试品溶液，下同）中，自橡皮管的另一端抽气，使供试品充满球 C 与 A 并达到测定线 m<sub>2</sub> 处，提出黏度计并迅速倒转，抹去黏附于管外的供试品，取下橡皮管使连接于管口 1 上，将黏度计垂直固定于恒温水浴中，并使水浴的液面高于球 C 的中部，放置 15 分钟后，自橡皮管的另一端抽气，使供试品充满球 A 并超过测定线 m<sub>1</sub>，开置橡皮管口，使供试品在管内自然下落，用秒表准确记录液面自测定线 m<sub>1</sub> 下降至测定线 m<sub>2</sub> 处的流出时间。依法重复测定 3 次以上，每次测定值与平均值的差值不得超过平均值的±5%。另取一份供试品同样操作，并重复测定 3 次以上。以先后两次取样测得的总平均值按下式计算，即为供试品的运动黏度或供试品溶液的动力黏度。

$$v = Kt$$

$$\eta = 10^{-6} \cdot Kt \cdot \rho$$

式中 K 为用已知黏度的标准液测得的黏度计常数，mm<sup>2</sup>/s<sup>2</sup>；

t 为测得的平均流出时间，s；

ρ 为供试溶液在相同温度下的密度，kg/m<sup>3</sup>。

2.2 第二法（旋转式黏度计法） 根据在旋转过程中作用于液体介质中的切应力大小来完成测定的，并按下式计算供试品的动力黏度。

$$\eta = K (T/\omega)$$

式中 K 为用已知黏度的标准液测得的旋转式黏度计常数；

T 为扭力矩；

ω 为角速度。

常用的旋转式黏度计有以下几种：

2.2.1 单筒转动黏度计 在单筒类型的黏度计中，将单筒浸入供试品溶液中，并以一定的角速度转动，测量作用在圆筒表面上的扭力矩来计算黏度。

2.2.2 锥板型黏度计 在锥板型黏度计中，供试品注入锥体和平板之间，平板不动，锥体转动，测量作用在锥体或平板上的扭力矩或角速度以计算黏度。

2.2.3 标准转子型旋转黏度计 按品种项下的规定选择合适的转子浸入供试品溶液中，使转子以一定的角速度旋转，测量作用在锥体的扭力矩再计算黏度。

常用的旋转式黏度计有多种类型，可根据供试品的实际情况和黏度范围适当选用。

按照各检验品种项下所规定选用所需使用的仪器，并按照仪器说明书操作，测定供试品的黏度。

## 3103 真空度测定法（标准草案）

### 3103 真空度测定法

对采用真空密封并用玻璃容器盛装的冻干制品，可以使用高频火花真空测定器进行密封后容器内的真空度测定。测定时，将高频火花真空测定器指向容器内无制品的部位，如果容器内出现辉光，则判制品为合格。

## 3104 最低装量检查法（标准草案）

### 3104 最低装量检查法

本法适用于剂型为液体、以容积为计量单位的兽用生物制品的装量检查。除另有规定外，应符合下列规定。

取供试品 5 个（装量在 50ml 和 50ml 以上者，取 3 个），使之恢复至室温，开启时注意避免损失。参照最低装量检查使用量具参考表，用经标化的吸管（或注射器）或/和量筒进行装量检查。

对仅需使用吸管或注射器进行装量检查的样品，直接用干燥并预经标化的吸管或注射器（含针头），尽量吸尽，读数。

对仅需使用量筒进行装量检查的样品，直接将检验瓶中所有内容物全部倒入适宜的量筒中，将检验瓶倒置 15 分钟，尽量倾净，读数。

对需使用量筒和吸管（或注射器）进行装量检查的样品，将检验瓶中的内容物倒入适宜的量筒中，接近量筒的最大容量时，用干燥并预经标化的吸管（或注射器）将额外的量加入量筒，直至量筒的最大容量。对剩余的内容物，直接用干燥并预经标化的吸管（或注射器）检查。根据量筒和吸管中的总量计算装量。

每个供试品的装量，均应不低于瓶签的标示量。如果有 1 个容器装量不符合规定，则另取 5 个（装量在 50ml 和 50ml 以上者，取 3 个）复查，应全部符合规定，否则判为不合格。

表 最低装量检查使用量具参考表

标示装量	吸管/量筒
小于 1ml	1ml 吸管（或注射器，或适宜量程的移液器）
1ml	2ml 吸管（或注射器）
2ml	5ml 吸管（或注射器）
4ml	5ml 吸管（或注射器）
5ml	10ml 吸管（或注射器）
6ml	10ml 吸管（或注射器）
10ml	25ml 量筒或吸管

20ml	25ml 量筒或吸管
40ml	50ml 量筒
50ml	100ml 量筒
100ml	100ml 量筒+10ml 吸管
150ml	250ml 量筒
200ml	250ml 量筒
250ml	250ml 量筒+10ml 吸管
500ml	500ml 量筒+10ml 吸管
1000ml	1000ml 量筒+10ml 吸管

## 3105? ★新增附录 性状检验（标准草案）

### XXXX 性状检验

本要求适用于兽用生物制品（油乳剂类制品、非油乳剂类液体制品和冻干类生物制品）的性状检验。不同类型的兽用生物制品因其组分、佐剂、生产工艺等差异而具有不同的性状，应根据制品类型的特点进行相应的性状检验。

**1 样品数量** 除另有规定外，每批取样不少于3瓶（或包装）。

**2 样品检验前处理** 油乳剂类制品应提前放室温静置，回温至18~20℃后再进行性状检验。冻干类生物制品无需处理直接进行性状检验。

#### 3 样品检验

##### 3.1 油乳剂类制品

**3.1.1 外观** 采用非透明瓶包装的样品应将内容物全部倒至容量略大的透明玻璃瓶中，在自然光下观察样品状态；采用透明瓶包装的样品应在自然光下直接观察样品状态，观察结果应符合制品质量标准规定。

**3.1.2 剂型** 油包水型标准描述为：取一清洁吸管，吸取少量疫苗滴于冷水表面，除第1滴外，均应不扩散。检测方法：水包油包水型标准描述为：取一清洁吸管，吸取少量疫苗滴于冷水表面，应呈云雾状扩散。取400~500ml冷水至500ml透明烧杯中，待液面平静后，用1ml吸管吸取适量摇匀后的样品，在距液面上方2~3cm处，滴一滴样品于冷水表面，3~5秒后再滴入2~3滴样品，从烧杯上方观察疫苗在液面的扩散情况，从烧杯侧面观察疫苗向下扩散的情况，并记录观察结果。除第1滴外，均应不扩散，判为油包水型；呈云雾状扩散，判为水包油型或水包油包水型。

**3.1.3 稳定性** 吸取疫苗10ml加入离心管中，以3000r/min离心15分钟，管底析出的水相应不超过0.5ml。

3.1.4 黏度 按附录3102进行检验,除另有规定外,油乳剂灭活疫苗黏度应不超过200cP。

### 3.2 非油乳剂类液体制品

3.2.1 外观 非透明包装的样品应全部倒至透明玻璃瓶中,加瓶盖或硅胶塞后,在自然光下观察产品样品颜色(产品质量标准如有相关要求)、澄清度和分层情况;透明包装的样品直接自然光下观察产品样品颜色(产品质量标准如有相关要求)、澄清度和分层情况。对于有振摇要求的样品,应快速上下翻转30秒后,再进行样品状态观察。样品外观应符合制品质量标准规定。

3.2.2 pH值 按附录3101方法进行测定,应符合质量标准规定。

3.3 冻干类生物制品 除另有规定外,一般冻干制品性状描述为:海绵状疏松团块,易与瓶壁脱离,加稀释液后迅速溶解。检测方法:在自然光照下观察各瓶样品的状态,检查冻干团块表面杂质,翻转疫苗瓶观察制品与瓶壁粘连,手指轻弹瓶壁观察团块在瓶中滑动等情况。在生物安全柜内打开待检样品,用适宜的稀释液复溶,观察团块溶解情况。样品状态、溶解性观察结果应符合制品质量标准规定。

**4 结果判定** 根据上述指标的观察结果,对制品的性状进行判定。

标准草案 yaodianbanshenqiao

## ● 3200 化学残留物测定法

### 3201 苯酚（石炭酸）残留量测定法（标准草案）

#### 3201 苯酚（石炭酸）残留量测定法

1 对照品溶液的制备 取苯酚（精制品，见附注4）适量，精密称定，加水制成每1.0ml含0.1mg的溶液，即得。

2 供试品溶液的制备 取供试品1.0ml，置50ml量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，即得。

3 测定法 分别精密量取对照品溶液和供试品溶液各5.0ml，置100ml量瓶中，加水30ml，分别加醋酸钠试液2.0ml，对硝基苯胺、亚硝酸钠混合试液1.0ml，混合，再加碳酸钠试液2.0ml，加水至刻度，充分混匀，放置10分钟后，按紫外-可见分光光度法（《中国药典》一部通则0401）在550nm的波长处测定吸光度，计算即得。

$$\text{苯酚含量}\%(\text{g/ml}) = 0.005 \times \frac{\text{供试品溶液的吸光度}}{\text{对照品溶液的吸光度}} \times 100\%$$

#### 附注：

1 碳酸钠试液的配制 取碳酸钠10.5g，加水100ml，使溶解。

2 对硝基苯胺、亚硝酸钠混合试液的配制

2.1 取对硝基苯胺1.5g，加盐酸40ml，加水至500ml，加热使溶解。

2.2 取亚硝酸钠10.0g，加水100ml，使溶解。

使用时，取2.1中溶液25ml，加2.2中溶液0.75ml，混合。

3 醋酸钠试液的配制 取醋酸钠25.0g，加水溶解成100ml，即得。

4 苯酚精制品的制备及其含量标定

4.1 制备 取苯酚，直火蒸馏，弃去初馏液，接收181~182℃的馏分。

4.2 含量标定 取本品约0.5g，精密称定，置500ml量瓶中，加水适量使溶解并稀释至刻度，摇匀；精密量取25ml，置碘瓶中，精密加溴滴定液（0.1mol/L）25ml，再加盐酸5.0ml，立即密塞，振摇30分钟，静置15分钟后，注意微开瓶塞，加碘化钾试液6.0ml，立即密塞，充分振摇后，加三氯甲烷1.0ml，摇匀，用硫代硫酸钠滴定液（0.1mol/L）滴定，至近终点时，加淀粉指示液，继续滴定至蓝色消失，并将滴定的结果用空白试验校正，即得。每1.0ml溴滴定液（0.1mol/L）相当于1.569mg的苯酚。

### 3202 汞类防腐剂残留量测定法（标准草案）

#### 3202 汞类防腐剂残留量测定法

1 对照品溶液的制备

1.1 取置硫酸干燥器中干燥至恒重的二氯化汞 0.1354g, 精密称定, 置 100ml 量瓶中, 加 0.5mol/L 硫酸溶液使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即为对照汞贮备液。

1.2 临用前精密量取对照汞贮备液 5.0ml 置 100ml 量瓶中, 用 0.5mol/L 硫酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 即为 1.0ml 相当于 50 $\mu$ g 汞的对照汞溶液。

## 2 测定法

2.1 油乳剂疫苗消化 用经标定的 1.0ml 注射器 (附 15cm 长针头) 正确量取摇匀的被检品 1.0ml, 置 25ml 凯氏烧瓶 (瓶口加小漏斗) 底, 加硫酸 3.0ml、硝酸溶液 (1 $\rightarrow$ 2) 0.5ml, 小心加热, 待泡沸停止, 稍冷, 加硝酸溶液 (1 $\rightarrow$ 2) 0.5~1.0ml, 再加热消化, 如此反复加硝酸溶液 (1 $\rightarrow$ 2) 0.5~1.0ml 消化, 加热达白炽化, 继续加热 15 分钟后, 溶液与上次加热后的颜色无改变为止, 置冷 (溶液应无色), 加水 20ml, 置冷至室温, 即得。

2.2 其他疫苗消化 精密量取摇匀的被检品 (约相当于汞 25~50 $\mu$ g) 置 25ml 凯氏烧瓶 (瓶口加小漏斗) 中, 加硫酸 2.0ml、硝酸溶液 (1 $\rightarrow$ 2) 0.5ml, 加热沸腾 15 分钟, 如果溶液颜色变深, 再加硝酸溶液 (1 $\rightarrow$ 2) 0.5~1.0ml, 加热沸腾 15 分钟, 置冷, 加水 20ml, 置冷至室温, 即得。

2.3 滴定 将上述消化液由凯氏烧瓶转移置 125ml 分液漏斗中, 用水分多次洗涤凯氏烧瓶, 使总体积为 80ml, 加 20% 盐酸羟胺试液 5.0ml, 摇匀, 用 0.00125% 双硫脲滴定液滴定, 开始时每次滴加 3.0ml 左右, 以后逐渐减少, 至每次 0.5ml, 最后可减少至 0.2ml, 每次加入滴定液后, 强烈振摇 10 秒, 静置分层, 弃去四氯化碳层, 继续滴定, 直至双硫脲的绿色不变, 即为终点。

2.4 对照品滴定 精密量取对照品溶液 1.0ml (含汞 50 $\mu$ g), 置 125ml 分液漏斗中, 加硫酸 2.0ml、水 80ml、20% 盐酸羟胺溶液 5.0ml, 用双硫脲滴定液滴定, 操作同 2.3。

## 2.5 计算

$$\text{汞类含量 \% (g/ml)} = \frac{\text{供试品滴定毫升数}}{\text{对照品滴定毫升数}} \times \frac{0.000101}{\text{供试品毫升数}} \times 100\%$$

以上计算公式用于非油乳剂疫苗, 油乳剂疫苗应为上述公式结果再除以 0.6。

### 附注: 溶液的配制

1 **0.05% 双硫脲浓溶液** 取双硫脲 50mg, 加三氯甲烷 100ml 使溶解, 即得。本品应置棕色瓶内, 在冷暗处保存。

2 **0.00125% 双硫脲滴定液** 取 0.05% 双硫脲浓溶液 2.5ml, 用四氯化碳稀释至 100ml, 即得。本液应临用前配制。

3 **20% 盐酸羟胺试液** 取盐酸羟胺 1.0g, 加水 5.0ml 使溶解, 即得。

## 3203 甲醛残留量测定法 (标准草案)

### 3203 甲醛残留量测定法

**1 对照品溶液的制备** 取已标定的甲醛溶液适量,配成每 1.0ml 含甲醛 1.0mg 的溶液,精密量取 5.0ml 置 50ml 量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得。如果被测样品为油乳剂疫苗,则精密量取上述稀释的溶液 5.0ml 置 50ml 量瓶中,加 20%吐温-80 乙醇溶液 10ml,再加水至刻度,摇匀,即得。

## 2 供试品溶液的制备

**2.1 油乳剂疫苗** 用 5.0ml 刻度吸管量取供试品 5.0ml,置 50ml 量瓶中,用 20%吐温-80 乙醇溶液 10ml,分次洗涤吸管,洗液并入 50ml 量瓶中,摇匀,加水稀释至刻度,强烈振摇,静置分层,下层液如果不澄清,滤过,弃去初滤液,取澄清续滤液,即得。

**2.2 其他疫苗** 用 5.0ml 刻度吸管量取供试品 5.0ml,置 50ml 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,溶液如果不澄清,滤过,弃去初滤液,取澄清续滤液,即得。

**3 测定法** 精密吸取对照品溶液、供试品溶液和水各 0.5ml,分别加醋酸-醋酸铵缓冲液 10ml,乙酰丙酮试液 10ml,置 60°C 恒温水浴 15 分钟,冷水冷却 5 分钟,放置 20 分钟后,按紫外-可见分光光度法(《中国兽药典》一部通则 0401),以空气为参比,在 410nm 的波长处测定吸光度,即得  $A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{供试}}$ 、 $A_{\text{空白-1}}$ ;另精密吸取供试品溶液和水各 0.5ml,分别加醋酸-醋酸铵缓冲液 20ml,置 60°C 恒温水浴 15 分钟,冷水冷却 5 分钟,放置 20 分钟后,以空气为参比,在 410nm 的波长处测定吸光度,即得  $A_{\text{本底}}$ 、 $A_{\text{空白-2}}$ ,按下式计算即得。

$$\text{甲醛溶液(40\%)} \text{含量\% (g/ml)} = 0.0025 \times \frac{A_{\text{供试}} - A_{\text{本底}} - (A_{\text{空白-1}} - A_{\text{空白-2}})}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白-1}}} \times 100\%$$

附注:

### 1 醋酸-醋酸铵缓冲液(pH 值 6.25)的配制

醋酸液 取醋酸 12.9ml,加水至 100ml。

醋酸铵液 取醋酸铵 173.4g,加水至 1000ml,使溶解。

取醋酸液 40ml,与醋酸铵液 1000ml 混合,置冷暗处保存。

### 2 乙酰丙酮试液的配制

取乙酰丙酮 7.0ml,加乙醇 14ml 混合,加水至 1000ml。

**3 甲醛溶液含量标定** 取甲醛溶液约 1.5ml,精密称定,置锥形瓶中,加水 10ml,与溴麝香草酚蓝指示液 2 滴,滴加氢氧化钠滴定液(1.0mol/L)至溶液呈蓝色,加过氧化氢试液 25ml,再精密加入氢氧化钠滴定液(1.0mol/L) 25ml,瓶口置一玻璃小漏斗,在水浴上加热 15 分钟,不时振摇,冷却,用水洗涤漏斗,加溴麝香草酚蓝指示液 2 滴,用盐酸滴定液(1.0mol/L)滴定至溶液显黄色,并将滴定结果用空白试验校正。每 1.0ml 的氢氧化钠滴定液(1.0mol/L)相当于 30.03mg 的甲醛。

## 3204 剩余水分测定法(标准草案)

### 3204 剩余水分测定法

采用真空烘干法。测定前将洗净干燥的称量瓶置 150°C 干燥箱烘干 2 小时,放入有适宜干燥剂的干燥器中冷却后称重。在适宜环境迅速打开真空良好的疫苗瓶,将制品倒入称量瓶盖好,在天平上称重。每批 4 个样品,每个样品的重量应控制在 100~300mg 之

间。单个样品重量低于 100mg 时，可按需多瓶混合以达到 100~300（要求达到 100mg 下限即可），称后立即将称量瓶置于有适宜干燥剂的真空干燥箱中，打开瓶盖，关闭真空干燥箱后，抽真空至 2.67kPa（20mmHg）以下，加热至 60~70℃，干燥 3 小时。然后通入经过适宜干燥剂吸水的干燥空气，待干燥箱压力表指针归零后打开箱门，迅速盖好称量瓶盖，取出所有称量瓶，移入含有适宜干燥剂的干燥器中，冷却至室温称重，称重后再放回真空干燥箱继续干燥 1 小时，两次干燥至恒重，减失的重量即为含水量。

$$\text{剩余水分}\% = \frac{\text{样品干燥前重} - \text{样品第二次干燥后重}}{\text{样品干燥前重}} \times 100\%$$

## 3205? ★新增附录 辛酸残留量测定法（标准草案）

### 3205? 辛酸残留量测定法

**1 辛酸对照溶液的制备** 精密量取辛酸适量，加三氯甲烷溶解并稀释制成浓度为 0.1%（V/V）的溶液。

**2 蛋黄三氯甲烷溶液的制备** 取蛋黄内容物 1 份、磷酸盐缓冲液（pH 值 6.4）3 份，混匀，加入三氯甲烷 4 份，强力振摇，混匀，以 3500r/min 离心 5 分钟，取上清液。

**3 测定法** 量取辛酸对照溶液、蛋黄三氯甲烷溶液、供试品各 0.3ml，置于不同的干燥具塞试管中，分别加入磷酸盐缓冲液（pH 值 6.4）0.1ml 与铜试剂 2.0ml，再向辛酸对照溶液管中加三氯甲烷 5.7ml、向其余各管中加三氯甲烷 6.0ml。强力振摇 15 分钟，静置 10 分钟，以 3500r/min 离心 5 分钟，弃去上层液体与蛋白凝块，吸取下层液体 4.0ml，分别置于另一组干燥试管中，加显色剂 0.5ml，混匀，放置 5 分钟。另取水 0.3ml，同法操作，作为空白溶液。

按紫外-可见分光光度法（《中国兽药典》一部附录 0401），在 440nm 的波长处测定吸光度。供试品溶液的吸光度减去蛋黄三氯甲烷溶液的吸光度应小于辛酸对照溶液的吸光度。

#### 4 注意事项

4.1 显色前吸取下层液体时，吸管不得触碰管壁。

4.2 检验中涉及溶液移取、配制、存放等操作，均应使用玻璃器具，不得使用或接触塑料、橡胶类器具。

#### 附注：

##### 1 磷酸盐缓冲液（pH 值 6.4）的配制

磷酸二氢钾溶液：取磷酸二氢钾 4.54g，加水 1000ml，使溶解。

磷酸氢二钠溶液：取磷酸氢二钠 11.94g，加水 1000ml，使溶解。

取磷酸二氢钾溶液 73.3ml、磷酸氢二钠溶液 26.7ml，混合。

**2 显色剂的配制** 取二乙基二硫代氨基甲酸钠（ $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CS}_2\text{Na}$ ）100mg，加正丁醇 100ml，使溶解。

**3 铜试剂的配制** 取 1mol/L 三乙醇胺溶液 9 份、1mol/L 醋酸溶液 1 份、64.5g/L 硝酸铜溶液 10 份，混匀。

## ● 3300 微生物检查法

### 3301 布鲁氏菌菌落结晶紫染色法（标准草案）

#### 3301 布鲁氏菌菌落结晶紫染色法

取已长成布鲁氏菌菌落的胰蛋白胨琼脂或其他适宜培养基平板，每个平板上菌落数量不低于 200 个 CFU，用稀释的染色液覆盖全部菌落表面，染色 15~20 秒，弃去染色液后，立即用放大镜或显微镜检查菌落。

光滑型菌落不着色，边缘整齐、圆润，呈黄绿色；粗糙型菌落被染成红、蓝或紫等不同颜色，边缘不整齐，粗糙，有时有裂纹。

#### 附注：结晶紫原液配制

A 液 结晶紫 2.0g 溶于 20ml 无水乙醇中。

B 液 草酸铵 0.8g 溶于 80ml 纯化水或蒸馏水中。

将 A 液和 B 液混合即为原液。原液保存在棕色密封瓶中，保存期不超过 3 个月。

使用前，用纯化水或蒸馏水将原液作 40 倍稀释。

### 3302 禽白血病病毒检验法（标准草案）

#### 3302 禽白血病病毒检验法

1 细胞制备 鸡胚成纤维细胞制备，按附录 3504 进行。

#### 2 样品的处理及接种

2.1 样品的处理 除另有规定外，每批毒种或病毒性活疫苗均用无血清 M-199 培养基复原，2~8℃、以 10000~12000g 离心 10~15 分钟，取上清备用。

2.1.1 含鸡新城疫病毒的样品 取 1000（或以上）羽份样品，用适量不含血清的 M-199 培养液溶解，使最终为 200 羽份/1.0ml；2~8℃、以 10000g 离心 10 分钟；取上清液 1.0ml，加入等体积的鸡新城疫病毒特异性抗血清置 37℃左右中和 60 分钟，全部接种到 CEF 单层。

2.1.2 含鸡马立克氏病细胞结合毒的样品 取 1000（或以上）羽份样品，加无菌注射用水，使每 4.0ml 溶液中含 500 羽份样品；置 2~8℃ 1 小时，冻融 3 次；按 10% 体积加 10 倍浓度的 M-199 浓缩培养液；2~8℃、以 5000g 离心 10 分钟，取上清液经 0.22μm 滤器过滤 1~3 次，取滤液 4.0ml 接种 CEF 单层。如果含有鸡马立克氏病火鸡疱疹病毒，取上述滤液与等体积的鸡马立克氏病火鸡疱疹病毒特异性抗血清混匀，置 37℃作用 60 分钟，全部接种 CEF 单层。

2.1.3 含鸡马立克氏病火鸡疱疹病毒的样品 取 1000（或以上）羽份样品，用 4.0ml（或适量）不含血清的 M-199 培养液溶解，使最终为 500 羽份/2.0ml；2~8℃、以 10000g 离心 15 分钟；上清液经 0.45μm 滤器过滤 1 次，用 0.22μm 滤器过滤 2 次，取滤液 2.0ml 与等体积的鸡马立克氏病火鸡疱疹病毒特异性抗血清混匀，置 37℃作用 60 分钟，全部接种 CEF 单层。

2.1.4 含鸡痘病毒的样品 取 1000（或以上）羽份样品，用 4.0ml（或适量）不含血清的 M-199 培养液溶解，使最终为 500 羽份/2.0ml；2~8℃、以 12000g 离心 15 分钟；上清液

经 0.8 $\mu$ m、0.45 $\mu$ m、0.22 $\mu$ m 和 0.1 $\mu$ m 滤器各逐级过滤 1 次，取滤液 2.0ml 接种 CEF 单层。含鸡痘病毒的二联疫苗应先进行上述过滤处理。

2.1.5 含鸡传染性法氏囊病病毒的样品 取 1000（或以上）羽份样品，用 4.0ml（或适量）不含血清的 M-199 培养液溶解，使最终为 500 羽份/2.0ml；2~8 $^{\circ}$ C、以 10000g 离心 10 分钟；取上清液 2.0ml 与等体积的鸡传染性法氏囊病病毒特异性抗血清混匀，置 37 $^{\circ}$ C 作用 60 分钟，全部接种 CEF 单层。

2.1.6 含禽脑脊髓炎病毒的样品 取稀释的疫苗 2.0ml（含 500 羽份），加入等体积的禽脑脊髓炎病毒特异性抗血清进行中和（禽脑脊髓炎病毒-鸡痘病毒二联苗，则先按含鸡痘病毒的样品进行滤过处理），接种 CEF 单层。

2.1.7 鸡传染性支气管炎病毒和传染性喉气管炎病毒的样品 不中和（不在鸡胚成纤维细胞上增殖），直接取稀释后的样品 2.0ml（含 500 羽份）接种 CEF 单层。

2.1.8 含呼肠孤病毒的样品（包括鸭呼肠孤病毒） 取 1000（或以上）羽份样品，用 4.0ml（或适量）不含血清的 M-199 培养液溶解，使最终为 500 羽份/2.0ml；2~8 $^{\circ}$ C、以 10000g 离心 10 分钟；取上清液经 0.45 $\mu$ m 滤器过滤，取 2.0ml 滤液与等体积的相应特异性抗血清混匀，置 37 $^{\circ}$ C 作用 60 分钟，全部接种 CEF 单层。

2.1.9 含重组病毒的活疫苗 按疫苗载体病毒方法进行处理。

2.1.10 细胞 取至少已长成单层的 75cm<sup>2</sup> 细胞培养物，反复冻融 3 次；2~8 $^{\circ}$ C、以 5000g 离心 10 分钟，取上清液 5ml 用于接种 CEF。

2.2 接种与培养 处理好的样品接种 2 个 25cm<sup>2</sup> 左右的 CEF 单层，置 37 $^{\circ}$ C 吸附 45~60 分钟，弃去接种液，加入细胞持液。同时设立正常细胞作对照。

### 3 细胞培养的传代与处理

3.1 待细胞培养 5~7 日后，按常规方法消化、收获细胞，将其中 1/2 细胞，置 -60 $^{\circ}$ C 以下保存，作检验用（P1），其余细胞分散到 2 个细胞培养瓶中。培养 5~7 日后，按同样方法收获细胞，留样（P2）。如此继续传第 3 代，收获（P3）。所有对照组按相同方法处理。

3.2 处理 将 P1、P2、P3 的细胞培养物（包括样品和所有对照组）冻融 3 次，以 5000g 离心 3 分钟，待用。

4 病毒对照 去掉细胞生长液，分别加入 RAV-1（含 100TCID<sub>50</sub>）和 RAV-2（含 100TCID<sub>50</sub>）0.5ml，置 37 $^{\circ}$ C 下吸附 45~60 分钟，直接加入培养液，同样品连传至第 3 代，传代时病毒对照应在最后进行。

5 样品检测 所有样品用 COFAL 试验或 ELISA 试验进行禽白血病病毒检测。

#### 5.1 COFAL 试验（两日试验）

##### 5.1.1 第一日试验

5.1.1.1 在 96 孔微量板中，按下表所示加入缓冲液 0.025ml，对照孔 A、B 各 0.025ml，C、D、E 各 0.05ml，F 加 0.1ml。

5.1.1.2 样品的加入与稀释 在 A、D、E 和 H 各孔中分别加入 0.025ml 样品，并用微量吸管从 A→B→C 和 E→F→G 进行连续稀释，最后 C 孔和 G 孔中弃去 0.025ml，D 和 H 孔中混合后弃去 0.025ml；其他对照孔中 B、G 各加病毒对照 0.025ml。

5.1.1.3 在 D 和 H 排各孔中加入缓冲液 0.025ml。

5.1.1.4 在 A、B、C 和 E、F、G 排各孔中加入灭活抗血清 0.025ml，其他对照孔中 A、G 各加入 0.025ml，混匀包板后，置室温下作用 30~45 分钟（其间配制补体）。

5.1.1.5 所有孔中均加入适当浓度的补体（全量）0.05ml，对照孔中 A、B、C、G 各加入 0.05ml（全量）补体，D 孔加 0.05ml（1/2 浓度）的补体，E 孔加入 0.05ml（1/4 浓度）的

补体，轻摇平板，混匀密封后，置 2~8°C 过夜。

表 1 第一日试验 (96 孔板) 反应术式

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:2	NCP <sub>1</sub>	NCP <sub>2</sub>	NCP <sub>3</sub>	S <sub>1</sub> P <sub>1</sub>	S <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	S <sub>1</sub> P <sub>3</sub>	S <sub>2</sub> P <sub>1</sub>	S <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	S <sub>2</sub> P <sub>3</sub>		
B	1:4	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓			
C	1:8	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓			
D	1:2	—————			—————			—————				
E	1:2	S <sub>3</sub> P <sub>1</sub>	S <sub>3</sub> P <sub>2</sub>	S <sub>3</sub> P <sub>3</sub>	RAV <sub>1</sub> P <sub>1</sub>	RAV <sub>1</sub> P <sub>2</sub>	RAV <sub>1</sub> P <sub>3</sub>	RAV <sub>2</sub> P <sub>1</sub>	RAV <sub>2</sub> P <sub>2</sub>	RAV <sub>2</sub> P <sub>3</sub>		
F	1:4	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓			
G	1:8	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓			
H	1:2	—————			—————			—————				

注：NC，代表正常细胞对照。P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>，分别代表第 1 代、第 2 代、第 3 代。S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>、S<sub>3</sub>，分别代表样品 1、样品 2、样品 3。

### 5.1.2 第二日试验

#### 5.1.2.1 配制含 2.8% 绵羊红细胞悬液。

5.1.2.2 致敏红细胞悬液的制备 在含 2.8% 的绵羊红细胞悬液中缓缓加入等量经适当稀释（如 1:2000）的溶血素，磁力搅拌混合 10 分钟后，置 37°C 水浴 30 分钟，其间搅动 2~3 次。

#### 5.1.2.3 制备标准比色板

5.1.2.3.1 将含 2.8% 绵羊红细胞悬液用缓冲液稀释成 0.28% 绵羊红细胞悬液。

5.1.2.3.2 取含 2.8% 绵羊红细胞悬液 1.0ml，加无菌纯化水 7.0ml，再加 5×缓冲液 2.0ml，即为溶解红细胞液。

5.1.2.3.3 按表 2 术式的顺序加入下列试剂，第 12 管只加缓冲液 1.0ml。

表 2 第二日试验反应术式

单位：ml

试管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
溶血率 (%)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	—
溶解红细胞液	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	—
0.28% 绵羊红细胞悬液	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	—
缓冲液	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.0

5.1.2.3.4 在标准比色板中，从 0 溶血率开始，在 11 列的 A→H 和 10 列的 H→F 相应孔内加入上述红细胞悬液 0.125ml。

5.1.2.4 其余各孔内加入致敏红细胞悬液 0.025ml，并用胶带密封好，置 37°C 水浴 30 分钟，再以 1500r/min 离心 5 分钟，或置 2~8°C 放置 3~6 小时。

5.1.2.5 判定 以 50% 为反应终点，任何孔溶血率高于 50% 时判为阴性，低于 50% 时判为阳性。

### 5.2 ELISA 试验

5.2.1 加样 每个被检样品加 2 孔，100μl/孔。设阳性、阴性对照孔各 2 孔，用封口膜封板后，置 37°C 作用 60 分钟。

5.2.2 洗涤 弃去样品，每孔加 300μl 洗涤液，置 1 分钟，弃去洗涤液，同法洗涤 4~5 次。

5.2.3 加酶标抗体 每孔 100μl，用封口膜封板后，置 37°C 作用 60 分钟。

5.2.4 洗涤 同 5.2.2 项。

5.2.5 加显色液 每孔加 100 $\mu$ l 显色液，室温避光作用 10 分钟。

5.2.6 加终止液 每孔加 100 $\mu$ l。

5.2.7 读数 置酶联读数仪读取各孔 OD<sub>650nm</sub> 值。

5.2.8 结果判断

5.2.8.1 当阴性对照 OD<sub>650nm</sub> 值小于 0.2，阳性对照 OD<sub>650nm</sub> 值大于 0.4 时，ELISA 试验结果成立。

5.2.8.2 当正常细胞对照每个代次各孔 OD<sub>650nm</sub> 值均小于 0.3，RAV-1 和 RAV-2 病毒对照三个代次中均应至少有一个代次 OD<sub>650nm</sub> 值高于 0.5 时，检验结果成立。

5.2.8.3 被检样品任一代次任一孔 OD<sub>650nm</sub> 值大于或等于 0.3 即判为阳性，每代次每孔 OD<sub>650nm</sub> 值均小于 0.3 判为阴性。

### 3303 禽沙门氏菌检验法（标准草案）

#### 3303 禽沙门氏菌检验法

将供试品划线接种麦康凯琼脂（附录 3704）平皿或 SS 琼脂（附录 3704）平皿 2 个，置 37 $^{\circ}$ C 培养 18~24 小时。如出现呈无色、半透明、边缘整齐、表面光滑且稍凸起等特征的可疑菌落，挑取可疑菌落，用 A~F 群沙门氏菌特异性血清作玻片凝集试验，出现阳性反应，即为沙门氏菌污染，则判定该批制品为不合格。

如无可疑菌落出现，继续培养 24~48 小时，出现可疑菌落，挑取可疑菌落作玻片凝集试验，出现阳性反应的，则判定该批制品为不合格。

### 3304 禽网状内皮组织增生症病毒检验法（标准草案）

#### 3304 禽网状内皮组织增生症病毒检验法

1 细胞制备 按附录 3504 制备鸡胚成纤维细胞。

2 样品的处理及接种

2.1 样品的处理 同附录 3302 禽白血病病毒检验法。

2.2 接种与培养 处理好的样品接种 1 个 25cm<sup>2</sup> 左右的 CEF 单层，置 37 $^{\circ}$ C 吸附 60 分钟，弃去接种液，用含 3% 牛血清的 M-199 培养液洗 CEF 单层 2 次，2.0ml/次，每瓶细胞加含 3% 牛血清的 M-199 培养液 7.0~8.0ml，置 37 $^{\circ}$ C 培养 5~7 日。同时设立正常细胞对照 1 瓶，将禽网状内皮组织增生症病毒（REV）稀释至 10TCID<sub>50</sub>/ml，取 1.0ml 接种至 1 个 CEF 单层作为病毒对照。

3 细胞培养的传代 细胞培养 5~7 日后，按常规方法消化、收获细胞，将其中 1/10 的细胞用 2.0ml 含 3% 牛血清的 M-199 细胞培养液悬浮，接种 4 孔 48 孔板，每孔接种 0.5ml，同时设置正常细胞对照孔和病毒对照孔各 4 孔。将接种细胞的 48 孔板置 37 $^{\circ}$ C、含 5% CO<sub>2</sub> 培养 5~7 日，然后进行荧光染色。

4 荧光染色

4.1 固定 弃去 48 孔板的细胞培养液，每孔约加 0.5ml PBS（0.01mol/L，pH 值 7.2~7.4，下同）轻洗细胞表面 1 次，尽量弃尽 PBS，然后每孔加入 0.3ml 冷甲醇，置室温固定 10~15 分钟，弃去甲醇，自然晾干 2~5 分钟。

4.2 加一抗 自然晾干后，用 PBS 洗细胞面 1 次，每孔加入工作浓度的一抗，置 37 $^{\circ}$ C

作用 1 小时。

4.3 洗涤 弃去一抗,先用含 0.05%吐温-20 的 PBS 洗 3 次,每次每孔加入洗液 0.5ml,轻微振荡洗涤 1 分钟。用 PBS 以同样的方法洗 2 次。

4.4 荧光二抗染色 尽量弃尽洗液,每孔加入工作浓度的二抗,置 37°C作用 1 小时。

4.5 洗涤 方法同 4.3 项。

5 观察 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光(波长 490nm)观察。被感染的 CEF 细胞呈现绿色荧光,有完整的细胞形态,周围未被感染的细胞不着色,视野发暗。

## 6 结果判定

6.1 当病毒对照接种的 4 个孔中全部出现特异性绿色荧光,正常细胞对照孔均未出现特异性绿色荧光时,检验结果成立。

6.2 被检样品接种的 4 个孔中,只要有 1 孔出现特异性绿色荧光,即判定该样品中 REV 阳性。

## 3305 外源病毒检验法(标准草案)

### 3305 外源病毒检验法

#### 1 禽源外源病毒检验

1.1 样品处理 除另有规定外,取样品至少 2 瓶,将毒种按所生产疫苗推荐使用羽份进行稀释,对活疫苗按瓶签注明羽份稀释后,用相应的特异性血清中和后作为检品(除另有规定外),如待检疫苗毒在检验用细胞上不增殖,可不进行中和;对细胞进行检验时,经 3 次冻融后混合作为检品;用鸡检查法检验时,样品不作处理。

#### 1.2 鸡胚检查法

##### 1.2.1 接种与观察

1.2.1.1 鸡胚接种 尿囊腔和绒毛尿囊膜接种 用 9~11 日龄 SPF 鸡胚 20 枚,等分成 2 组,第 1 组鸡胚 10 枚,各经尿囊腔内接种样品 0.1~0.2ml(除另有规定外,至少含 10 羽份),第 2 组鸡胚 10 枚,各经绒毛尿囊膜接种样品 0.1~0.2ml(除另有规定外,至少含 10 羽份),置 37°C培养 7 日。每日照胚,弃去接种后 24 小时内死亡的鸡胚。每组鸡胚应至少存活 8 枚,试验方可成立。

1.2.1.2 卵黄囊接种 用 5~6 日龄 SPF 鸡胚 10 枚,各经卵黄囊接种样品 0.1~0.2ml(除另有规定外,至少含 10 羽份),置 37°C培养 12 日。每日照胚,弃去接种后 24 小时内死亡的鸡胚。每组鸡胚应至少存活 8 枚,试验方可成立。

1.2.1.3 必要时,可将接种后的异常鸡胚和死亡胚分别收取绒毛尿囊膜(研磨后用无菌生理盐水 1:1 混匀)、尿囊液、胚体(研磨后用无菌生理盐水 1:1 混匀),将每个混合样品分别接种 10 枚 SPF 鸡胚,绒毛尿囊膜样品经绒毛尿囊膜接种,尿囊液样品经尿囊腔接种,胚体样品经卵黄囊接种,按 1.2.1.1 和 1.2.1.2 进行观察、检查与判定。

1.2.2 判定 胎儿应发育正常,绒毛尿囊膜应无病变。鸡胚液作红细胞凝集试验应为阴性。

#### 1.3 细胞检查法

1.3.1 细胞的制备 按附录 3504 制备鸡胚成纤维细胞、鸡胚肾细胞、鸡胚肝细胞。

1.3.2 样品的接种与培养 分别取上述已长成良好细胞单层的(培养 24 小时左右)细胞培养瓶(面积不小于 25cm<sup>2</sup>)各 2 个,接种处理过的样品 0.1~0.2ml(除另有规定外,至

少含 10 羽份), 培养 10~14 日, 期间应至少继代 1 次, 另分别设正常细胞对照 2 瓶。最后一次继代的细胞单层数量和培养面积应符合检查的要求。

### 1.3.3 检查方法

1.3.3.1 致细胞病变检查 样品接种后培养期间, 任何一代培养细胞出现 CPE, 而正常细胞未出现 CPE, 则判为不符合规定。

1.3.3.2 红细胞凝集及红细胞吸附性外源病毒检查 培养结束, 取培养液采用 1% 鸡红细胞按照附录 3403 的方法进行红细胞凝集试验检测。弃去培养液, 用 PBS (0.01mol/L, pH 值 7.2~7.4, 下同) 洗涤细胞面, 加入 0.1% (v/v) 鸡红细胞悬液覆盖细胞面, 置 2~8°C 60 分钟后, 用 PBS 轻轻洗涤细胞, 在显微镜下检查红细胞吸附情况。当正常对照细胞不出现红细胞凝集和红细胞吸附现象, 而被检样品出现外源病毒所致的红细胞凝集或红细胞吸附现象时, 则判为不符合规定。

1.3.3.3 禽淋巴白血病毒检验 按附录 3302 进行检验。

1.3.3.4 禽网状内皮增生症病毒检验 按附录 3304 进行检验。

1.3.3.5 鸡传染性贫血病毒检验 按附录 XX (3310?) 进行检验。

1.4 鸡检查法 除另有规定外, 用适于接种本疫苗日龄的 SPF 鸡 20 只, 同时按点眼、滴鼻途径各接种疫苗 10 个推荐使用剂量 (毒种检验时应不少于 0.1ml), 肌肉注射疫苗 100 个推荐使用剂量 (毒种检验时应不少于 1.0ml)。21 日后, 按上述方法和剂量重复接种 1 次。第 1 次接种后 42 日采血, 进行有关病原 (见下表 1, 水禽源外源病毒检查应同时增加表 2 中病原) 的血清抗体检测。在 42 日内, 应不发生由疫苗引起的局部或全身症状或死亡。如果有死亡, 应进行病理学检查, 以证明是否由毒种或疫苗所致。进行血清抗体检测时, 除本毒种或疫苗所产生的特异性抗体外, 不应有其他病原的抗体存在。

表 1 用鸡检查法检验外源病毒时检查的病原及其检验方法

病原	检验方法
鸡传染性支气管炎病毒	HI/ELISA
鸡新城疫病毒	HI/ELISA
禽腺病毒 I 群	AGP/ELISA
禽腺病毒 III 群 (EDS)	IFA/HI
禽 A 型流感病毒	AGP/HI
鸡传染性喉气管炎病毒	SN/ELISA
禽呼肠孤病毒	AGP/ELISA
鸡传染性法氏囊病病毒	AGP/ELISA
禽网状内皮组织增生症病毒	IFA/ELISA
鸡马立克氏病病毒	AGP
禽淋巴白血病毒	ELISA
禽脑脊髓炎病毒	AGP/ELISA
鸡传染性贫血病毒	IFA/ELISA
B 亚型禽偏肺病毒	IFA/ELISA
鸡痘病毒	AGP/临床观察

注: HI, 血凝抑制试验; ELISA, 酶联免疫吸附试验; SN, 血清中和试验; AGP, 琼脂扩散试验; IFA, 间接免疫荧光试验。

表 2 水禽源样品鸡检查法检验外源病毒时应增加的病原及其检验方法

病原	检验方法
鸭和鹅细小病毒	SN
鸭瘟病毒	ELISA/SN
鸭肝炎病毒 I 型	SN

鸭肝炎病毒 III 型	SN
鸭坦布苏病毒	HI/SN
小鹅瘟病毒	AGP/SN

注：HI，血凝抑制试验；ELISA，酶联免疫吸附试验；SN，血清中和试验；AGP，琼脂扩散试验。

## 2 非禽源外源病毒检验

2.1 样品处理 取样品至少 2 瓶。除另有规定外，毒种取原液（冻干制品恢复至冻干前装量）；活疫苗按瓶签注明头份稀释至每 1.0ml 至少含 10 头份。混匀，离心，取上清液，用等体积的特异性抗血清中和后作为检品；如待检毒种或疫苗毒在检验用细胞上不增值，可进行不中和。对细胞样品进行检验时，待检细胞应至少培养 14 日（期间至少继代 1 次，每代培养面积不低于  $75\text{cm}^2$ ），经 3 次冻融后离心，取上清液作为检品。

2.2 样品的接种与培养 取处理好的样品 2.0ml（除另有规定外，成品应不低于 10 个推荐使用剂量，接种到已长成良好单层（或同步接种）的所选细胞上，另至少设一瓶正常细胞对照，每一种细胞培养时间应不低于 14 日，培养期间应至少继代 2 次。最后一次继代的细胞单层数量和培养面积应符合 2.3 项要求。在对毒种或活疫苗进行检验时，如特异性血清不能完全中和待检样品，可在培养过程中加入特异性抗血清（一般不超过细胞维持液体积的 10%）。如样品传代培养期间，任何一代培养细胞出现 CPE，则判为不符合规定。如无 CPE，培养结束时，细胞单层应按 2.3 项进行检验。

### 2.3 检查方法

2.3.1 致细胞病变检查法 将最后一次继代（至少为第 3 代）的培养物培养 4~7 日，显微镜下观察 CPE 情况，至少观察  $6.0\text{cm}^2$  的细胞面积。若未观察到明显的 CPE，再用适宜染色液对细胞单层进行染色。观察细胞单层，检查包涵体、巨细胞或其他由外源病毒引起的 CPE 的出现情况。当正常对照细胞无 CPE，而被检样品出现外源病毒所致的 CPE，则判为不符合规定。

2.3.2 红细胞凝集和红细胞吸附性外源病毒检查法 将最后一次继代（至少为第 3 代）的培养物培养 4~7 日，取上清分别采用 0.5% 的豚鼠红细胞和 0.5% 鸡红细胞按照附录 3403 的方法进行红细胞凝集检测。再用 PBS 洗涤细胞单层 2~3 次，加入适量 0.2% 的豚鼠红细胞和鸡红细胞的等量混合悬液，以覆盖整个单层表面为准。选 2 个细胞单层，分别在  $2\sim 8^\circ\text{C}$  和  $20\sim 25^\circ\text{C}$  放置 30 分钟，用 PBS 洗涤，检查红细胞吸附情况，至少观察  $6.0\text{cm}^2$  的细胞面积。当正常对照细胞不出现红细胞凝集和红细胞吸附现象，而被检样品出现外源病毒所致的血凝或红细胞吸附现象时，则判为不符合规定。

2.3.3 荧光抗体检查法 将最后一次继代（至少为第 3 代）的培养物冻融 3 次，以  $3000g$  离心 10 分钟，取适量培养物的上清液（一般取培养量的 10%）接种已长成良好单层（或同步接种）的所选细胞，培养 4~7 日后用于荧光抗体检查。对每一种特定外源病毒的检测应至少包含 3 组细胞单层：（1）被检样品细胞培养物；（2）接种适量（一般为  $100\sim 300\text{FA-TCID}_{50}$ ）特定病毒的阳性对照；（3）正常细胞对照。每组细胞单层检查面积应不小于  $6.0\text{cm}^2$ 。

细胞单层样品经 80% 丙酮（或其他适宜固定液）固定后，用适宜的荧光抗体进行染色，检查每一组单层是否存在特定外源病毒的荧光。当阳性对照出现特异性荧光，正常细胞无荧光，而被检样品出现外源性病毒特异性荧光，则判为不符合规定。如果阳性对照未出现特异性荧光，或者正常细胞出现特异性荧光，则判为无结果，应重检。

## 3306 无菌检验或纯粹检验法（标准草案）

### 3306 无菌检验或纯粹检验法

除另有规定外，无菌检验或纯粹检验按照下列方法进行。

### 1 抽样 应随机抽样并注意代表性。

1.1 制造疫苗用的各种原菌液、毒液和其他配苗组织乳剂、稳定剂及半成品的无菌或纯粹检验，应每瓶（罐）分别抽样进行，抽样量为2~10ml。

1.2 成品的无菌检验或纯粹检验应按每批或每个亚批进行，每批按瓶数的百分之一抽样，但应不少于5瓶，最多不超过10瓶，每瓶分别进行检验。

### 2 培养基

2.1 无菌检验用培养基 硫乙醇酸盐流体培养基（Fluid Thioglycollate Medium，简称TG），用于厌氧菌和需氧菌的检查；酪胨琼脂培养基（Peptone from casein Agar Medium，简称GA），用于需氧菌的检查；胰酪大豆胨液体培养基（Trypticase Soy Broth，简称TSB；亦称大豆酪蛋白消化物培养基，Soybean-Casein Digest Medium），用于真菌和需氧菌的检查。

#### 2.1.1 培养基的配制

##### 2.1.1.1 硫乙醇酸盐流体培养基（TG）

胰酪蛋白胨	15g
酵母浸出粉	5.0g
无水葡萄糖	5.0g
硫乙醇酸钠	0.5g
（或硫乙醇酸）	（或0.3ml）
L-半胱氨酸盐酸盐（或L-胱氨酸）	0.5g
氯化钠	2.5g
新配制的0.1%刃天青溶液	1.0ml
琼脂	0.75g
纯化水	加至1000ml

除葡萄糖和0.1%刃天青溶液外，将上述成分混合，加热溶解，然后加入葡萄糖和0.1%刃天青溶液，摇匀，将加热的培养基放至室温，用1.0mol/L氢氧化钠溶液调整pH值，使灭菌后的培养基pH值为6.9~7.3，分装，116°C灭菌30分钟。若培养基氧化层（粉红色）的高度超过培养基深度的1/3，需用水浴或自由流动的蒸汽加热驱氧，至粉红色消失后，迅速冷却，只限加热1次，并防止污染。

##### 2.1.1.2 酪胨琼脂培养基（GA）

胰酪蛋白胨	15g
酵母浸出粉	5.0g
无水葡萄糖	5.0g
L-半胱氨酸盐酸盐（或L-胱氨酸）	0.5g
氯化钠	2.5g
琼脂	12.0g
纯化水	加至1000ml

除葡萄糖外，将上述成分混合，加热溶解，然后加入葡萄糖，混匀，将加热的培养基放至室温，用1.0mol/L氢氧化钠溶液调整pH值，使灭菌后的培养基pH值为6.9~7.3，分装，经116°C灭菌30分钟。

##### 2.1.1.3 胰酪大豆胨液体培养基（TSB）

葡萄糖（含1个结晶水）	2.5g
胰酪蛋白胨	17g

大豆粉木瓜蛋白酶消化物（大豆胨）	3.0g
磷酸氢二钾（含 3 个结晶水）	2.5g
氯化钠	5.0g
纯化水	加至 1000ml

将上述成分混合，微热溶解，将培养基放至室温，调节 pH 值，使灭菌后的培养基 pH 值为 7.1~7.5，分装，经 116℃灭菌 30 分钟。

2.1.2 培养基的质量控制 使用每批培养基应符合以下检查规定，可与制品的检验平行操作，也可提前进行下列检测。

#### 2.1.2.1 性状

2.1.2.1.1 硫乙醇酸盐流体培养基（TG） 流体，氧化层的高度（上层粉红色）不超过培养基深度的 1/3。

2.1.2.1.2 酪胺琼脂培养基（GA） 淡黄色固体。

2.1.2.1.3 胰酪大豆胨液体培养基（TSB） 澄清液体。

#### 2.1.2.2 pH 值

2.1.2.2.1 硫乙醇酸盐流体培养基（TG）的 pH 值为 6.9~7.3。

2.1.2.2.2 酪胺琼脂培养基（GA）的 pH 值为 6.9~7.3。

2.1.2.2.3 胰酪大豆胨液体培养基（TSB）的 pH 值为 7.1~7.5。

2.1.2.3 无菌检验 每批培养基随机抽取 10 支（瓶），5 支（瓶）置 35~37℃，另 5 支（瓶）置 23~25℃，均培养 7 日，逐日观察。培养基 10/10 无菌生长，判该培养基无菌检验符合规定。

#### 2.1.2.4 微生物促生长试验

##### 2.1.2.4.1 质控菌种

需氧菌（Aerobic bacteria）	菌种代号
金黄色葡萄球菌（ <i>Staphylococcus aureus</i> ）	CVCC 2086
铜绿假单胞菌（ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ）	CVCC 2000
厌氧菌（Anaerobic bacteria）	
生孢梭菌（ <i>Clostridium sporogenes</i> ）	CVCC 1180
真菌（Fungi）	
白假丝酵母（亦称白色念珠菌）（ <i>Candida albicans</i> ）	CVCC 3597
巴西曲霉（黑曲霉） [ <i>Aspergillus brasiliensis</i> （ <i>Aspergillus niger</i> ）]	CVCC 3596

2.1.2.4.2 培养基检验 取装有 9.0ml 硫乙醇酸盐流体培养基的小管 10 支，分别接金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和生孢梭菌质控菌种标准品，每个菌种接种 3 支，另 1 支不接种，作为阴性对照，置 35~37℃培养 3 日；取装有 6.0ml 酪胺琼脂培养基的斜面 7 支，分别接种金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌质控菌种标准品，每个菌种接种 3 支，另 1 支不接种，作为阴性对照，置 35~37℃培养 3 日；取装有 7.0ml 胰酪大豆胨液体培养基的小管 7 支，分别接种白假丝酵母、巴西曲霉质控菌种标准品，每个菌种接种 3 支，另 1 支不接种，作为阴性对照，置 23~25℃培养 5 日，逐日观察结果。接种管 3/3 有菌生长，阴性对照管无菌生长，判定该批培养基微生物促生长试验符合规定。

2.2 纯粹检验用培养基 无菌检验培养基和适用于本菌生长的培养基。

### 3 检验方法

#### 3.1 半成品的检验

3.1.1 细菌原液（种子液）、细菌活疫苗半成品的纯粹检验 取供试品接种 TG 小管、GA 斜面及适宜于本菌生长的其他培养基各 2 管，每支 0.2ml，1 支置 35~37℃培养，1 支置 23~25℃培养，观察 3~5 日，应纯粹。

3.1.2 病毒原液和其他配苗组织乳剂、稳定剂及半成品的无菌检验 取供试品接种 TG 小管和 GA 斜面各 2 支，每支 0.2ml，1 支置 35~37℃培养，1 支置 23~25℃培养，另取 0.2ml，接种 1 支 TSB 小管，置 23~25℃培养，均培养 7 日，应无菌生长。

#### 3.1.3 灭活抗原的无菌检验

3.1.3.1 灭活细菌菌液的无菌检验 细菌灭活后，用适于本菌生长的培养基 2 支，各接种 0.2ml，置 35~37℃培养 7 日，应无菌生长。

3.1.3.2 灭活病毒液的无菌检验 病毒液灭活后，接种 TG 小管和 GA 斜面各 2 支，每支 0.2ml，1 支置 35~37℃培养，1 支置 23~25℃培养，另取 0.2ml，接种 1 支 TSB 小管，置 23~25℃培养，均培养 7 日，应无菌生长。

3.1.3.3 类毒素的无菌检验 毒素脱毒过滤后，接种 TG 小管和 GA 斜面各 2 支，每支 0.2ml，1 支置 35~37℃培养，1 支置 23~25℃培养，另取 0.2ml，接种 1 支 TSB 小管，置 23~25℃培养，均培养 7 日，应无菌生长。

#### 3.2 成品检验

##### 3.2.1 无菌检验

###### 3.2.1.1 样品的处理

3.2.1.1.1 液体制品样品的处理 当样品装量大于 1.0ml 时，不做处理，直接取样进行检验；当样品的装量小于 1.0ml 时，其内容物全部取出，用于检验。

3.2.1.1.2 冻干制品样品的处理 当样品的原装量大于 1.0ml 时，用适宜的稀释液恢复至原量，取样进行检验；当样品的原装量小于 1.0ml 时，用适宜的稀释液复溶后，全部取出用于检验。

3.2.1.2 检验 样品（原）装量大于 1.0ml 的，取处理好的样品 1.0ml，样品（原）装量小于 1.0ml 的，取其处理好的样品的全部内容物，接种 50mlTG 培养基，置 35~37℃培养，3 日后吸取培养物，接种 TG 小管、GA 斜面各 2 支，必要时接种 2 支适宜疫苗株生长的培养基，每支 0.2ml，1 支置 35~37℃培养，1 支置 23~25℃培养，另取 0.2ml，接种 1 支 TSB 小管，置 23~25℃培养，均培养 7 日，应无菌生长。

如果允许制品中含有一定数量的非病原菌，应进一步做杂菌计数和病原性鉴定。

##### 3.2.2 纯粹检验

###### 3.2.2.1 样品的处理

3.2.2.1.1 液体制品样品的处理 当样品装量大于 1.5ml 时，不做处理，直接取样进行检验；当样品的装量小于 1.5ml 时，适宜的稀释液稀释至 1.5ml。

3.2.2.1.2 冻干制品样品的处理 当样品的原装量大于 1.5ml 时，用适宜的稀释液恢复至原量，取样进行检验；当样品的原装量小于 1.5ml 时，用适宜的稀释液复溶至 1.5ml，取样进行检验。

3.2.2.2 检验 取处理好的样品，接种 TG 小管、GA 斜面和适于本菌生长的其他培养基各 2 支，每支 0.2ml，1 支置 35~37℃培养，1 支置 23~25℃培养，另用 1 支 TSB 小管，接种 0.2ml，置 23~25℃培养，均培养 5 日，应纯粹。

4 结果判定 每批抽检的样品必须全部无菌或纯粹生长。如果纯粹检验发现个别瓶有

杂菌生长或无菌检验发现个别瓶有菌生长或结果可疑，应抽取加倍数量的样品重检，如果仍有杂菌生长或有菌生长，则作为污染杂菌处理。如果允许制品中含有一定数量非病原菌，应进一步作杂菌计数和病原性鉴定。

## 3307 杂菌计数和病原性鉴定法（标准草案）

### 3307 杂菌计数和病原性鉴定法

#### 1 杂菌计数及病原性鉴定用培养基

1.1 杂菌计数 用含4%血清及0.1%裂解血细胞全血的马丁琼脂培养基或GA。

1.2 病原性鉴定 用TG培养基、马丁肉汤、厌气肉肝汤或其他适宜培养基。

2 杂菌计数方法及判定 每批有杂菌污染的制品至少抽样3瓶，用普通肉汤或蛋白胨水分别按头（羽）份数作适当稀释，接种含4%血清及0.1%裂解血细胞全血的马丁琼脂（或GA琼脂）培养基平皿上，每个样品接种平皿4个，每个平皿接种0.1ml（禽苗的接种量不少于10羽份，其他产品的接种量按各自的质量标准），置37℃培养48小时，再移至25℃放置24小时，数杂菌菌落，分别计算杂菌数。如果污染霉菌，亦作为杂菌计算。任何1瓶制品每头（羽）份（或每克组织）的杂菌应不超过规定。超过规定时，判该批制品不符合规定。

#### 3 病原性鉴定

3.1 检查需氧性细菌时，将所有污染需氧性杂菌的液体培养管的培养物等量混合后，移植1支TG管或马丁肉汤，置相同条件下培养24小时，取培养物，用蛋白胨水稀释100倍，皮下注射体重18~22g小鼠3只，各0.2ml，观察10日。

3.2 检查厌氧性细菌时，将所有液体杂菌管延长培养时间至96小时，取出置65℃水浴30分钟后等量混合，移植TG管或厌气肉肝汤1支，在相同条件下培养24~72小时。如有细菌生长，将培养物接种体重350~450g豚鼠2只，各肌肉注射1.0ml，观察10日。必要时，接种前对TG管或厌氧肉肝汤采用隔热水煮沸15分钟进行驱氧。

3.3 如发现制品同时污染需氧性及厌氧性细菌，则按上述要求同时注射小鼠及豚鼠。

3.4 判定 小鼠、豚鼠应全部健活。如果有死亡或局部化脓、坏死，则证明有病原菌污染，判该批制品不符合规定。

## 3308 支原体检验法（标准草案）

### 3308 支原体检验法

#### 1 培养基

1.1 培养基及配方 改良Frey氏液体培养基和改良Frey氏固体培养基用于禽源性支原体检验，支原体液体培养基和支原体固体培养基用于非禽源性支原体检验，无血清支原体培养基用于血清检验。

1.1.1 改良Frey氏液体培养基

氯化钠

5.0g

氯化钾	0.4g
硫酸镁（含 7 个结晶水）	0.2g
磷酸氢二钠（含 12 个结晶水）	1.6g
无水磷酸二氢钾	0.2g
葡萄糖（含 1 个结晶水）	10g
乳蛋白水解物	5.0g
酵母浸出粉	5.0g
（或 25% 酵母浸出液）	（或 100ml）
1% 辅酶 I	10ml
1% L-半胱氨酸溶液	10ml
2% 精氨酸溶液	20ml
猪（或马）血清	100ml
1% 酚红溶液	1.0ml
8 万单位/ml 青霉素	10ml
注射用水	加至 1000ml

将上述成分混合溶解，用 1.0mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 7.6~7.8，过滤除菌，定量分装，置-20℃以下保存。

#### 1.1.2 改良 Frey 氏固体培养基

##### 固体培养基基础成分

氯化钠	5.0g
氯化钾	0.4g
硫酸镁（含 7 个结晶水）	0.2g
磷酸氢二钠（含 12 个结晶水）	1.6g
无水磷酸二氢钾	0.2g
葡萄糖（含 1 个结晶水）	10.0g
乳蛋白水解物	5.0g
酵母浸出粉	5.0g
（或 25% 酵母浸出液）	（或 100ml）
琼脂	15g
注射用水	加至 1000ml

上述成分混合后加热溶解，用 1.0mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 7.6~7.8，定量分装，经 116℃灭菌 20 分钟后，置 2~8℃保存。使用前将 100ml 固体培养基加热融化，当温度降到 60℃左右时，添加培养基辅助成份。

##### 注：培养基辅助成分

猪（或马）血清	10ml
2% 精氨酸溶液	2.0ml
1% 辅酶 I 溶液	1.0ml

1%L-半胱氨酸溶液	1.0ml
8 万单位/ml 青霉素	1.0ml

上述成分混合后，过滤除菌，定量分装，置-20℃以下保存。

#### 1.1.3 支原体液体培养基

PPLO 肉汤粉	21g
葡萄糖（含 1 个结晶水）	5.0g
10%精氨酸溶液	10ml
10 倍浓缩 MEM 培养液	10ml
酵母浸出粉	5.0g
（或 25%酵母浸出液）	（或 100ml）
8 万单位/ml 青霉素	10ml
猪（或马）血清	100ml
1%酚红溶液	1.0ml
注射用水	加至 1000ml

将上述成分混合溶解，用 1.0mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 7.6~7.8，过滤除菌，定量分装，置-20℃以下保存。

#### 1.1.4 支原体固体培养基

##### 固体培养基基础成分

PPLO 肉汤粉	21g
葡萄糖（含 1 个结晶水）	5.0g
酵母浸出粉	5.0g
（或 25%酵母浸出液）	（或 100ml）
琼脂	15g
注射用水	加至 1000ml

上述成分混合后加热溶解，用 1.0mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 7.6~7.8，定量分装，116℃灭菌 20 分钟后，置 2~8℃保存。使用前将 100ml 固体培养基加热融化，当温度降到 60℃左右时，添加培养基辅助成份。

##### 注：培养基辅助成分

血清	10ml
10%精氨酸溶液	1.0ml
10 倍浓缩 MEM 培养液	1.0ml
8 万单位/ml 青霉素溶液	1.0ml

上述成分混合后，过滤除菌，定量分装，置-20℃以下保存。

#### 1.1.5 无血清支原体培养基

PPLO 肉汤粉	21g
葡萄糖（含 1 个结晶水）	5.0g
10%精氨酸溶液	10ml

10 倍浓缩 MEM 培养液	10ml
酵母浸出粉	5.0g
(或 25% 酵母浸出液)	(或 100ml)
8 万单位/ml 青霉素	10ml
1% 酚红溶液	1.0ml
注射用水	加至 1000ml

将上述成分混合溶解, 用 1.0mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值为 7.6~7.8, 过滤除菌, 定量分装, 置-20℃以下保存。

## 1.2 培养基的质量控制

### 1.2.1 性状

1.2.1.1 改良 Frey 氏液体培养基 澄清、无杂质, 呈玫瑰红色的液体。

1.2.1.2 改良 Frey 氏固体培养基 基础成分呈淡黄色, 加热融化后无絮状物或沉淀。

1.2.1.3 支原体液体培养基 澄清、无杂质, 呈玫瑰红色的液体。

1.2.1.4 支原体固体培养基 基础成分呈淡黄色, 加热融化后无絮状物或沉淀。

1.2.1.5 无血清支原体培养基 澄清、无杂质, 呈玫瑰红色的液体。

1.2.2 pH 值 改良 Frey 氏液体培养基、改良 Frey 氏固体培养基、支原体液体培养基、支原体固体培养基、无血清支原体培养基 pH 值均为 7.6~7.8。

1.2.3 无菌检验 按附录 3306 进行检验, 应无菌生长。

### 1.2.4 灵敏度检查和微生物促生长试验

#### 1.2.4.1 质控菌种及培养基

质控菌种	CVCC 菌种编号	培养基
滑液支原体 ( <i>Mycoplasma synoviae</i> )	CVCC 2960	改良 Frey 氏液体培养基 改良 Frey 氏固体培养基 支原体液体培养基
猪鼻支原体 ( <i>Mycoplasma hyorhinis</i> )	CVCC 361	支原体固体培养基 无血清支原体培养基

1.2.4.2 灵敏度检查 改良 Frey 氏液体培养基、支原体液体培养基、无血清支原体培养基采用灵敏度试验进行质量控制。将质控菌种标准品接种待检的液体培养基小管 2 支, 同时设 2 支未接种的液体培养基小管作为阴性对照, 置 35~37℃培养 5~7 日。质控菌株标准品接种管均变色, 且阴性对照不变色时, 判定该液体培养基灵敏度检查符合规定, 其他情况判为不符合规定。

1.2.4.3 微生物促生长试验 改良 Frey 氏固体培养基和支原体固体培养基采用微生物促生长试验进行质量控制。将不大于 50CFU 质控菌种标准品接种 2 个待检的固体培养基平板, 同时设 2 个未接种的固体培养基平板作为阴性对照, 均置 35~37℃、含 5%CO<sub>2</sub> 的潮湿环境下培养 5~7 日。当接种的固体培养基平板上有支原体菌落生长且个数在 1~50 个之间, 且阴性对照无菌落生长时, 判定该固体培养基微生物促生长试验符合规定, 其他情况判为不

符合规定。

## 2 检查法

2.1 样品处理 每批制品（毒种、细胞）取样 5 瓶。液体制品混合后备用；冻干制品，则加液体培养基或无菌生理盐水复溶后混合；检测血清时，用血清直接接种。

### 2.2 疫苗与毒种的检测

2.2.1 接种与观察 每个样品需同时用以下两种方法检测。

2.2.1.1 液体培养基培养 将样品混合物 5.0ml 接种装有 20ml 液体培养基的小瓶，摇匀后，再从小瓶中取 0.4ml 移植到 2 支含有 1.8ml 培养基的小管（1.0cm×10cm），每支各接种 0.2ml，将小瓶与小管置 35~37℃培养，分别于接种后 5 日、10 日、15 日从小瓶中取 0.4ml 培养物移植到 2 支含有 1.8ml 培养基的小管内，逐日观察培养物有无颜色变化（变黄或变红），如果无变化，则在最后一次移植培养 14 日后停止观察。在观察期内，如果小瓶或任意一支液体培养基小管培养物出现明显颜色变化，应立即将小瓶中的培养物移植于液体培养基小管中，观察在液体培养基中是否出现恒定的颜色变化。

2.2.1.2 固体培养基培养 在每次液体培养物移植液体培养基小管培养的同时，取 0.1~0.2ml/培养物接种固体培养基平板，置 35~37℃、含 5%~10%CO<sub>2</sub> 的潮湿环境下培养。当液体培养基出现明显颜色变化时，需同时接种固体培养基平板。每 3~5 日，在低倍显微镜下观察各固体培养基平板上有无支原体菌落出现，观察 14 日，仍无菌落生长时，停止观察。

2.2.2 每次检查需同时设阴、阳性对照，液体培养基小管及固体培养基平板各 2 支（个），阳性对照接种量为不超过 50 个 CFU 的质控菌，阴性对照不接种，阳性对照、阴性对照、检测样品在同条件下培养观察。检测禽类疫苗时用滑液支原体作为阳性对照，检测其他疫苗时用猪鼻支原体作为阳性对照。

2.3 血清的检测 取被检血清 10ml 接种 90ml 的无血清支原体培养基，培养基按 2.2.1 项接种、移植、培养，观察液体培养基小管的颜色变化情况和固体培养基平板上有无菌落生长。

## 3 结果判定

3.1 接种样品的任何一个固体培养基平板上出现支原体菌落时，判不符合规定。

3.2 当阳性对照中所有固体培养基平板均出现支原体菌落，且阴性对照中无支原体生长时，检验有效。

## 3309 （空白）

## 3310? ★新增附录 鸡传染性贫血病毒检验法（标准草案）

### 新增附录 鸡传染性贫血病毒检验法

1 细胞制备 用含 10%胎牛血清的 RPM1640 培养液将 MDCC-MSB1 细胞制备成浓度约  $5.0 \times 10^5 \sim 6.0 \times 10^5$  个细胞/ml 的细胞悬液，分装至 6 个 25cm<sup>2</sup> 细胞瓶，每瓶 15ml 悬液，备用。

#### 2 样品的接种、培养与观察

2.1 样品的处理 除含禽腺病毒 III 群、禽网状内皮组织增生症病毒的样品需用特异性阳性血清中和，其他禽源病毒或疫苗样品无需处理。

2.2 接种 将处理好的样品(至少含 200 羽份)接种上述 MDCC-MSB1 细胞悬液 2 瓶，每瓶接种 1.0ml；同时取 2 瓶细胞悬液作为阳性对照，每瓶分别接种 1.0ml 鸡传染性病毒 (CIAV) 液 (含量为 2.5TCID<sub>50</sub>/ml~10 TCID<sub>50</sub>/ml)，另取 2 瓶细胞悬液作为正常细胞对照，置 37℃培养。

2.3 细胞培养与传代 所有细胞培养至少 21 日。培养期间，每间隔 2~3 日传代 1 次，共传 10 代。传代时，将同一样品的培养物混合，以 1000r/min 离心 7~10 分钟收获细胞，按 1:2 比例进行传代。每代保持 4 瓶细胞。最后一代细胞培养 2~3 日后，将培养物混合，以 1000r/min 离心 7~10 分钟收获细胞，用 PBS 洗涤细胞 3 次，重悬至细胞浓度达到 1.0×10<sup>6</sup> 细胞/ml 待检。

2.4 观察 细胞培养期间，应对细胞培养液进行观察，当待检样品、阳性对照培养物与正常细胞对照相比，培养液颜色偏红，应在显微镜下观察是否出现 CIAV 引起的特异性细胞病变。当细胞出现由 CIAV 引起的特异性细胞病变时，可终止培养，按 3 进行免疫荧光检测。

### 3 免疫荧光检测与判定

3.1 细胞板制备 取 96 孔细胞培养板，加入 0.05mg/ml 的多聚 L 赖氨酸进行预处理。每孔 100μl，室温孵育 1 小时，弃去多聚 L 赖氨酸，然后用 PBS (0.01mol/l, pH 值 7.2, 下同) 洗涤 1 次，风干。将收获的待检样品、阳性对照及正常细胞对照悬液加入到处理好的 96 孔细胞培养板各 10 孔，每孔 200μl，加样后，室温孵育 1.5 小时待细胞沉降。

3.2 固定 小心弃去上清，每孔加入 150μl 甲醇，2~8℃固定 45~60 分钟。弃去甲醇，风干备用。

3.3 加一抗 (CIAV 阳性血清或单克隆抗体) 用 PBS 轻洗细胞表面 1 次。每孔加入 0.05ml 用 PBS 适当稀释的 CIAV 阳性血清或单克隆抗体，置 37℃作用 1 小时，弃去一抗。用 PBS 洗涤 3 次。

3.4 荧光二抗染色 每孔加入用 PBS 适当稀释的 FITC 荧光标记的抗鸡或抗小鼠 IgG，置 37℃作用 1 小时，弃去荧光抗体，用 PBS 洗涤 3 次。

3.5 伊文氏兰复染 每孔加入 0.01%伊文氏兰 100μl，37℃作用 30 分钟，弃去伊文氏兰，用 PBS 洗涤 3 次。

3.6 观察 将培养板放在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光(波长 490nm)观察。被 CIAV 感染的 MDCC-MSB1 细胞呈现绿色荧光；未被感染的细胞不着色，视野发暗。

#### 3.7 结果判定

3.7.1 当阳性对照所有孔中均出现特异性绿色荧光、正常细胞对照所有孔中均不出现特异性绿色荧光时，试验成立。否则结果无效。

3.7.2 当被检样品接种的 10 个孔中，只要有 1 个孔出现特异性绿色荧光，即判该样品为 CIAV 阳性。

## 3311? ★新增附录 禽腺病毒 III 群抗原/抗体间接免疫荧光检测法 (标准草案)

### 禽腺病毒 III 群抗原/抗体间接免疫荧光检测法

本方法适用于生物性原材料中禽腺病毒 III 群抗原或禽腺病毒 III 群) 抗体的鉴别检验。

#### 1 抗原检测

1.1 细胞培养 按附录 3504 制备鸡胚肝细胞 (CEL), 用含 10%胎牛血清的 M-199 培养液将细胞悬液稀释为 100~140 万个细胞/ml, 接种 96 孔细胞培养板, 每孔 0.1ml, 置 37°C、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 小时。

1.2 样品接种与培养 当细胞板细胞长成良好单层, 弃去 96 孔细胞板的细胞培养液, 将待检样品作适宜稀释后接种到细胞孔, 每个样品接种 4 孔, 每孔 0.1ml。同时, 将禽腺病毒 III 群适宜毒株用无血清 M-199 培养液稀释为 10~100TCID<sub>50</sub>/0.1ml, 接种 4 孔, 每孔 0.1ml, 另设正常细胞对照 4 孔。接种后每孔补加含 4%胎牛血清的 M-199 培养液 0.1ml, 置 37°C、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 96~144 小时。

### 1.3 荧光染色

1.3.1 固定 弃去 96 孔板的细胞培养液, 每孔加入 0.2ml PBS (0.1mol/L, pH 值 7.2~7.4, 下同), 轻洗细胞表面 1 次, 尽量弃尽 PBS, 每孔加入 0.2ml 冷甲醇, 置室温固定 15~30 分钟, 弃去甲醇, 室温自然晾干 3~5 分钟。

1.3.2 加抗体 自然晾干后, 用 PBS 轻洗细胞表面 1 次, 然后每孔加入 0.1ml 用 PBS 适当稀释的禽腺病毒 III 群阳性血清, 置 37°C 作用 1 小时。

1.3.3 洗涤 弃去孔中液体, 每孔加入 0.2ml 含 0.05%吐温-20 的 PBS, 轻微振荡洗涤 1 分钟, 弃去洗液, 如此洗涤 3 次。

1.3.4 加荧光抗体 尽量弃尽洗液, 每孔加入 0.1ml 用 PBS 适当稀释的 FITC 标记的抗鸡 IgG, 置 37°C 作用 1 小时。

1.3.5 洗涤 方法同 1.3.3。

1.4 观察 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光 (波长 490nm) 观察。禽腺病毒 III 群感染的 CEL 细胞呈现绿色荧光; 未被感染的细胞不着色。

### 1.5 结果判定

1.5.1 当阳性对照孔均出现特异性绿色荧光, 正常细胞对照孔无绿色荧光时, 试验成立。

1.5.2 被检样品接种的 4 个孔中, 只要有 1 孔出现特异性绿色荧光, 则判该样品为禽腺病毒 III 群病毒阳性。否则, 判为禽腺病毒 III 群病毒阴性

## 2 抗体检测

2.1 病毒培养 将禽腺病毒 III 群适宜毒株用含 4%胎牛血清的 M-199 培养液稀释为 100TCID<sub>50</sub>/0.1ml, 接种已长成良好 CEL 单层的 96 孔细胞板 (按附录 3504 制备 CEL) 48 孔, 每孔 0.1ml。同时, 设正常细胞对照孔 48 孔, 每孔加入含 4%胎牛血清的 M-199 培养液 0.1ml。置 37°C、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 96 小时, 按 1.3.1 固定干燥。

### 2.2 荧光染色

2.2.1 加待检样品 将待检血清、禽腺病毒 III 群阴性血清对照和阳性血清对照分别用 PBS 作 1:100 稀释, 分别加入病毒感染孔和细胞对照板各 4 孔, 0.1ml/孔, 置 37°C 作用 1 小时。

2.2.2 洗涤 方法同 1.3.3。

2.2.3 加荧光抗体 尽量弃尽洗液, 每孔加入 0.1ml 用 PBS 适当稀释的 FITC 标记的抗鸡 IgG, 置 37°C 作用 1 小时。

2.2.4 洗涤 方法同 1.3.3。

2.3 观察 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光 (波长 490 nm) 观察。但待检血清中禽腺病毒 III 群抗体阳性时, 病毒感染细胞孔呈现绿色荧光, 而正常细胞孔无绿色荧光; 当待检血清中禽腺病毒 III 群抗体阴性时, 病毒感染孔和正常细胞孔均无绿色荧光出现。

### 2.4 结果判定

2.4.1 当加入阳性血清处理的病毒感染孔均出现典型的特异性绿色荧光，而加入阳性血清处理的正常细胞孔、加入阴性血清的病毒感染孔和正常细胞孔均不出现特异性绿色荧光时，试验成立。

2.4.2 被检样品接种的 4 个孔中，只要有 1 孔出现特异性绿色荧光，则判该样品为禽腺病毒 III 群抗体阳性。否则，判为禽腺病毒 III 群抗体阴性。

## 3312? ★新增附录 禽偏肺病毒（B 亚群）抗原/抗体间接免疫荧光检测法（标准草案）

### 禽偏肺病毒（B 亚群）抗原/抗体间接免疫荧光检测法

本方法适用于生物性原材料中禽偏肺病毒（B 亚群）抗原或禽偏肺病毒（B 亚群）抗体的鉴别检验。

#### 1 抗原检测

1.1 细胞培养 将已长成良好单层的 Vero 细胞用 8%胎牛血清的 DMEM 培养液稀释为 15~20 万个细胞/ml，接种 96 孔细胞培养板，每孔 0.1ml，置 37℃、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 48 小时。

1.2 样品接种与培养 当细胞板细胞长成良好单层，弃去 96 孔细胞板的细胞培养液，将待检样品作适宜稀释后接种到细胞孔，每个样品接种 4 孔，每孔 0.1ml。同时，将禽偏肺病毒（B 亚群）适宜毒株用无血清 DMEM 培养液稀释为 10~100TCID<sub>50</sub>/0.1ml，接种 4 孔，每孔 0.1ml，另设正常细胞对照 4 孔。接种后每孔补加含 4%胎牛血清的 DMEM 培养液 0.1ml，置 37℃、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 96~144 小时。

#### 1.3 荧光染色

1.3.1 固定 弃去 96 孔板的细胞培养液，每孔加入 0.2ml PBS（0.1mol/L，pH 值 7.2~7.4，下同）轻洗细胞表面 1 次，尽量弃尽 PBS；每孔加入 0.2ml 冷甲醇，置室温固定 15~30 分钟，弃去甲醇，室温自然晾干 3~5 分钟。

1.3.2 加抗体 自然晾干后，用 PBS 轻洗细胞表面 1 次；每孔加入 0.1ml 用 PBS 适当稀释的禽偏肺病毒（B 亚群）阳性血清，置 37℃作用 1 小时。

1.3.3 洗涤 弃去孔中液体，每孔加入 0.2ml 含 0.05%吐温-20 的 PBS，轻微振荡洗涤 1 分钟，弃去洗液，如此洗涤 3 次。

1.3.4 加荧光抗体 尽量弃尽洗液，每孔加入 0.1ml 用 PBS 适当稀释的 FITC 标记的兔抗鸡 IgG，置 37℃作用 1 小时。

1.3.5 洗涤 方法同 1.3.3。

1.4 观察 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光（波长 490 nm）观察。禽偏肺病毒（B 亚群）感染的 Vero 细胞呈现绿色荧光；未被感染的细胞不着色。

#### 1.5 结果判定

1.5.1 当阳性对照孔出现典型的特异性绿色荧光，阴性对照孔未出现特异性绿色荧光时，试验成立。

1.5.2 被检样品接种的 4 个孔中，只要有 1 个孔出现特异性绿色荧光，则判该样品为禽偏肺病毒（B 亚群）阳性。否则，判为禽偏肺病毒（B 亚群）阴性。

#### 2 抗体检测

2.1 病毒培养 将禽偏肺病毒（B 亚群）适宜毒株用含 4%胎牛血清的 DMEM 稀释为

100TCID<sub>50</sub>/0.1ml, 接种到已长成良好 Vero 单层的 96 孔细胞板 (细胞制备同 1.1) 48 孔, 每孔 0.1ml。同时, 设正常细胞对照孔 48 孔, 每孔加入含 4%胎牛血清的 DMEM 培养液 0.1ml。置 37°C、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 48 小时, 按 1.3.1 固定干燥。

## 2.2 荧光染色

2.2.1 加待检样品 将待检血清、禽偏肺病毒 (B 亚群) 阴性血清对照和阳性血清对照分别用 PBS 作 1:64 稀释, 分别加入病毒感染孔和细胞对照孔各 4 孔, 0.1ml/孔, 置 37°C 作用 1 小时。

2.2.2 洗涤 方法同 1.3.3。

2.2.3 加荧光抗体 尽量弃尽洗液, 每孔加入 0.1ml 用 PBS 适当稀释的 FITC 标记的抗鸡 IgG, 置 37°C 作用 1 小时。

2.2.4 洗涤 方法同 1.3.3。

2.3 观察 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光 (波长为 490nm) 观察。当待检血清禽偏肺病毒 (B 亚群) 抗体阳性时, 病毒感染细胞孔呈现绿色荧光, 而正常细胞孔无绿色荧光; 当待检血清禽偏肺病毒 (B 亚群) 抗体阴性时, 病毒感染孔和正常细胞孔均无绿色荧光出现。

## 2.4 结果判定

2.4.1 当加入阳性血清处理的病毒感染孔均出现典型的特异性绿色荧光, 而加入阳性血清处理的正常细胞孔和加入阴性血清的病毒感染孔以及正常细胞孔均不出现特异性绿色荧光时, 试验成立。

2.4.2 被检血清接种的 4 个病毒感染孔中, 只要有 1 孔出现特异性绿色荧光, 则判为禽偏肺病毒 (B 亚群) 抗体阳性。否则, 判为禽偏肺病毒 (B 亚群) 抗体阴性。

## 3313? ★新增附录：禽腺病毒 I 群抗原/抗体间接免疫荧光检测法（标准草案）

### 禽腺病毒 I 群抗原/抗体间接免疫荧光检测法

本方法适用于生物性原材料中禽腺病毒 I 群抗原或禽腺病毒 I 群抗体的鉴别检验。

#### 1 抗原检测

1.1 细胞培养 将已长成良好单层的鸡肝癌细胞系（LMH 细胞）用含 8%胎牛血清的 DMEM 培养液稀释为 100~140 万个细胞/ml，接种于 96 孔细胞培养板，每孔 0.1ml，置 37°C、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 小时。

1.2 样品接种 弃去 96 孔细胞板的细胞培养液，将待检样品作适宜稀释后接种到细胞孔，每个样品接种 4 孔，每孔 0.1ml。同时，将禽腺病毒 I 群（FAdV-I）4 型适宜毒株用无血清 DMEM 培养液稀释为 10~100TCID<sub>50</sub>/0.1ml，接种 4 孔，每孔 0.1ml，另设正常细胞对照 4 孔。接种后每孔补加含 4%胎牛血清的 DMEM 培养液 0.1ml，置 37°C、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 72~120 小时。

#### 1.3 荧光染色

1.3.1 固定 弃去 96 孔板的细胞培养液，每孔加入 0.2ml PBS（pH 值 7.2~7.4，下同）轻洗细胞表面 1 次，尽量弃尽 PBS；每孔加入 0.2ml 冷甲醇，置室温固定 15~30 分钟，弃去甲醇，室温自然晾干 3~5 分钟。

1.3.2 加抗体 用 PBS 轻洗细胞表面 1 次；每孔加入 0.1ml 用 PBS 适当稀释的抗 FAdV-I 单克隆抗体，置 37°C 作用 1 小时。

1.3.3 洗涤 弃去抗体，每孔加入 0.2ml 含 0.05%吐温-20 的 PBS，轻微振荡洗涤 1 分钟，弃去洗液，如此洗涤 3 次。

1.3.4 加荧光抗体 尽量弃尽洗液，每孔加入 0.1ml 用 PBS 适当稀释的 FITC 标记的抗鼠 IgG，置 37°C 作用 1 小时。

1.3.5 洗涤 方法同 1.3.3。

1.4 观察 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光（波长为 490nm）观察。FAdV-I 感染的 LMH 细胞呈现绿色荧光；未被感染的细胞不着色。

#### 1.5 结果判定

1.5.1 当阳性对照孔出现典型的特异性绿色荧光，正常细胞对照孔未出现特异性绿色荧光时，试验成立。

1.5.2 被检样品接种的 4 个孔中，只要有 1 个孔出现特异性绿色荧光，则该样品判为 FAdV-I 阳性。否则，判为 FAdV-I 阴性。

#### 2 抗体检测

2.1 病毒培养 将 FAdV-I 适宜毒株用含 4%胎牛血清的 DMEM 培养液稀释为 100TCID<sub>50</sub>/0.1ml，接种到已长成良好 LMH 单层的 96 孔细胞板（细胞制备同 1.1）48 孔，每孔 0.1ml。同时，设正常细胞对照孔 48 孔，每孔加入含 4%胎牛血清的 DMEM 培养液 0.1ml。置 37°C、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 72 小时，按 1.3.1 固定干燥后。

#### 2.2 荧光染色

2.2.1 加待检样品 将待检血清、FAdV-I 阴性血清对照和 FAdV-I 阳性血清对照分别用 PBS 作 1:100 稀释，分别加入到病毒接种孔和正常细胞对照孔各 4 孔，0.1ml/孔，置 37°C 作用 1 小时。

2.2.2 洗涤 方法同 1.3.3。

2.2.3 加荧光抗体 尽量弃尽洗液，每孔加入 0.1ml 用 PBS 适当稀释的 FITC 标记的抗鸡 IgG，置 37℃作用 1 小时。

2.2.4 洗涤 方法同 1.3.3。

2.3 观察 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光(波长为 490nm)观察。当待检血清 FAdV-I 抗体阳性时，病毒感染孔呈现绿色荧光，而正常细胞孔无绿色荧光；当待检血清 FAdV-I 抗体阴性时，病毒感染孔和正常细胞孔均无绿色荧光出现。

2.4 结果判定

2.4.1 当加入阳性血清处理的病毒感染孔均出现典型的特异性绿色荧光，而加入阳性血清处理的正常细胞孔、加入阴性血清的病毒感染孔和正常细胞孔均不出现特异性绿色荧光时，试验成立。

2.4.2 加入被检血清处理的 4 个病毒感染孔，只要有 1 孔出现特异性绿色荧光，则该样品判为 FAdV-I 抗体阳性。否则，判为 FAdV-I 抗体阴性。

## 3314? ★新增附录 支原体检验法（指示细胞培养法）（标准草案）

### 支原体检验法（指示细胞培养法）

本方法适用于生产用细胞的支原体检验。

#### 1 溶液的配制

1.1 二苯甲酰胺荧光染料（Hoechst 33258）浓缩液 称取二苯甲酰胺荧光染料 5mg，加入 100ml 不含酚红和碳酸氢钠的汉氏液（Hank's 液）中，室温磁力搅拌 30~40 分钟，使完全溶解，-20℃以下避光保存。

1.2 二苯甲酰胺荧光染料工作液 使用无酚红和碳酸氢钠的汉氏液（Hank's 液）将二苯甲酰胺荧光染料浓缩液稀释至终浓度为 0.25~0.5μg/ml。

1.3 固定液 乙酸:甲醇（1:3）混合溶液。

1.4 封片液 量取 0.1mol/L 枸橼酸溶液 22.2ml、0.2mol/L 磷酸氢二钠溶液 27.8ml、甘油 50.0ml 混匀，调节 pH 值至 5.5。

#### 2 培养基、指示细胞及阳性对照菌种

2.1 DMEM 完全培养基 DMEM 培养基，含有 5%~10%胎牛血清。

2.2 DMEM 无抗生素培养基 无抗生素或抑制支原体生长成分的 DMEM 完全培养基。

2.3 指示细胞 Vero 细胞，应纯净。

2.4 阳性对照菌株 滑液支原体（*Mycoplasma synoviae*）编号 CVCC 2960；猪鼻支原体（*Mycoplasma hyorhinis*）编号 CVCC 361。

#### 3 检查法

3.1 样品处理 每批细胞取样 5 支，将冻存管中的细胞悬液混合后复苏，应至少培养 7 日，期间用 DMEM 或其他适宜无抗生素培养基至少继代 1 次，每代培养面积不低于 75cm<sup>2</sup>，取继代后至少培养 3 日、且未换液的细胞培养上清液作为待检样品。

3.2 指示细胞准备 将培养的 Vero 细胞单层经消化后，制成细胞悬液，接种 6 孔细胞培养板或其他容器，置 35~38℃、含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养，待长成良好 Vero 细胞培养板后备用。

3.3 接种与培养 取出长成良好 Vero 细胞培养板，吸弃培养液，分别加入等体积待检样品、阳性对照菌种（当检测禽源细胞时，用滑液支原体作为阳性对照；当检测非禽源细胞时，用猪鼻支原体作为阳性对照，接种量不高于 100 个 CFU），每个样品应分别在不同的 6 孔细胞培养板接种 1 孔，每孔至少 2ml，置 35~38℃、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 3~5 日，按常规方法消化传代 1 次，分别接种至不同的含盖玻片的 6 孔细胞培养板或其他容器，每个样品各接种 2 孔。同时用 DMEM 无抗生素培养基替代样品，同法操作，作为阴性对照。将接种后的 6 孔 Vero 细胞培养板置 35~38℃、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 3~5 日。

3.4 染色 取出培养板，吸弃培养板孔中的培养液，用 PBS（0.01mol/L，pH 值 7.2~7.4）洗涤细胞单层 1 次，加入固定液 5ml，置室温放置 5 分钟，吸弃固定液，加入固定液 5ml 固定 10 分钟，吸弃固定液，使盖玻片在空气中自然干燥，加二苯甲酰胺荧光染料（或其他 DNA 染料）工作液 5ml，加盖，室温避光放置 15~30 分钟，吸弃染液，每孔用纯化水 5ml 进行洗涤，洗 3 次后使盖玻片于空气中干燥，取洁净载玻片加封片液 1 滴，分别将盖玻片面向下盖在封片液上制成封片。用荧光显微镜观察。

#### 4 结果判定

4.1 当阴性对照接种的 2 孔指示细胞的细胞核均仅出现蓝绿色荧光，阳性对照接种的 2 孔指示细胞的细胞核均出现蓝绿色荧光以及大小不等、不规则的荧光着色颗粒时，检验结果成立。

4.2 如被检样品接种的 2 孔指示细胞，只要有 1 孔细胞核出现蓝绿色荧光以及大小不等、不规则的荧光着色颗粒，则判定该样品支原体阳性。

## ● 3400 生物活性/效价测定法

### 3401 半数保护量 (PD<sub>50</sub>) 测定法 (标准草案)

#### 3401 半数保护量 (PD<sub>50</sub>) 测定法

将样品按适宜的倍数进行倍比稀释, 取至少 3 个剂量组, 按产品推荐的使用途径, 每个剂量组接种 1 组动物, 同时设 1 组动物作为对照。接种一定时间后, 连同对照动物, 每头(只)攻击一定剂量的强毒, 观察一定时间。记录各组动物的发病情况, 动物发病即判为不保护。计算各剂量组免疫动物保护的百分率。对照动物的发病率应符合规定。按 Reed-Muench 法计算 PD<sub>50</sub>。

计算公式为:

$$\lg PD_{50} = \text{高于或等于 } 50\% \text{ 保护时的稀释对数} + \text{距离比例} \times \text{稀释系数的对数}$$

表 以口蹄疫灭活疫苗的试验示例

疫苗接种剂量	观察结果			累计结果		
	发病数	保护数	保护比例	发病数	保护数	保护率 (%)
1 头份	0	5	5/5	0	9	100
1/3 头份	2	3	3/5	2	4	67
1/9 头份	4	1	1/5	6	1	14

高于或等于 50% 保护时(上例中为 67%)疫苗接种剂量(1/3 头份)的对数值为-0.48。  
稀释系数(1/3)的对数为-0.48。

$$\text{距离比例} = \frac{\text{高于或等于 } 50\% - 50\%}{\text{高于或等于 } 50\% - \text{低于 } 50\%} = \frac{67\% - 50\%}{67\% - 14\%} = 0.32$$

$$\lg PD_{50} = -0.48 + 0.32 \times (-0.48) = -0.63$$

则:  $PD_{50} = 10^{-0.63}$  头份, 即疫苗的一个 PD<sub>50</sub> 为 0.23 头份, 表示该疫苗接种 0.23 头份可以使 50% 的动物获得保护。每头份疫苗含 4.3PD<sub>50</sub>。

## 3402 病毒半数致死量、感染量、有效感染量 (LD<sub>50</sub>、ELD<sub>50</sub>、ID<sub>50</sub>、EID<sub>50</sub>、TCID<sub>50</sub>、ED<sub>50</sub>) 测定法 (标准草案)

### 3402 病毒半数致死量、感染量、有效感染量 (LD<sub>50</sub>、ELD<sub>50</sub>、ID<sub>50</sub>、EID<sub>50</sub>、TCID<sub>50</sub>、ED<sub>50</sub>) 测定法

将病毒悬液作 10 倍系列稀释, 取适宜稀释度, 定量接种实验动物、胚或细胞。由最高稀释度开始接种, 每个稀释度接种 4~6 只 (枚、管、瓶、孔), 观察记录实验动物、胚或细胞的死亡数或病变情况, 计算各稀释度死亡或出现病变的实验动物 (胚、细胞) 的百分率。按 Reed-Muench 法计算半数致死 (感染、有效) 量 (LD<sub>50</sub>、ELD<sub>50</sub>、ID<sub>50</sub>、EID<sub>50</sub>、TCID<sub>50</sub>、ED<sub>50</sub>)。

计算公式为:

$$\lg \text{TCID}_{50} = \text{高于或等于 } 50\% \text{ 的病毒稀释度的对数} + \text{距离比例} \times \text{稀释系数的对数}$$

表 试验示例 (以 TCID<sub>50</sub> 为例, 接种量为 0.1ml)

病毒稀释度	观察结果			累计结果		
	CPE 数	无 CPE 数	CPE (%)	CPE 数	无 CPE 数	CPE (%)
10 <sup>-4</sup>	6	0	100	13	0	100
10 <sup>-5</sup>	5	1	83	7	1	88
10 <sup>-6</sup>	2	4	33	2	5	29
10 <sup>-7</sup>	0	6	0	0	11	0

高于或等于 50% 感染时 (上例中为 88%), 病毒稀释度 (10<sup>-5</sup>) 的对数值为 -5。稀释系数 (1/10) 的对数为 -1。

$$\text{距离比例} = \frac{\text{高于或等于 } 50\% - 50\%}{\text{高于或等于 } 50\% - \text{低于 } 50\%} = \frac{88\% - 50\%}{88\% - 29\%} = 0.64$$

$$\lg \text{TCID}_{50} = -5 + 0.64 \times (-1) = -5.64$$

则: TCID<sub>50</sub> = 10<sup>-5.64</sup>/0.1ml。表示该病毒悬液作 10<sup>-5.64</sup> 稀释后, 每孔 (瓶) 细胞接种 0.1ml, 可以使 50% 的细胞孔 (瓶) 产生细胞病变 (CPE)。病毒含量 (毒价或滴度) 可表述为每 0.1 毫升含 10<sup>5.64</sup>TCID<sub>50</sub> (或 10<sup>6.64</sup>TCID<sub>50</sub>/ml)。

## 3403 红细胞凝集试验法 (标准草案)

### 3403 红细胞凝集试验法

1 50 孔板或试管法 按下表用 PBS (0.1mol/L, pH 值 7.0~7.2, 下同) 将被检样品稀

释成不同倍数，加入 1%鸡红细胞悬液，置 15~25°C、20~40 分钟或置 2~8°C、40~60 分钟，当对照孔中的红细胞呈显著纽扣状时判定结果，以使红细胞完全凝集（++++）的最高稀释度作为判定终点。

表 红细胞凝集试验术式（以 1%鸡红细胞悬液为例） 单位：ml

孔或管号	1	2	3	4	5	6	7	8...	对照
样品稀释倍数	10	20	40	80	160	320	640	1280	
PBS	0.9	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
	} ▢	} ▢	} ▢	} ▢	} ▢	} ▢	} ▢	} ▢	弃 0.5
样品（病毒原液）	0.1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	
1%鸡红细胞悬液	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5

## 2 96 孔微量板法

2.1 在微量板上，从第 1 孔至 12 孔或所需之倍数孔，用移液器每孔加入 PBS 0.025ml，用移液器吸取被检样品 0.025ml，从第 1 孔起，依次作 2 倍系列稀释，至最后 1 个孔，弃去移液器内 0.025ml 液体（稀释倍数依次为 2、4、8、16、32...4096）。

2.2 每孔加入 1%鸡红细胞悬液 0.025ml，并设不加样品的红细胞对照孔，立即在微量板振荡器上摇匀，置 15~25°C、20~40 分钟或置 2~8°C、40~60 分钟，当对照孔中的红细胞呈显著纽扣状时判定结果。

2.3 以使红细胞完全凝集（++++）的最高稀释度作为判定终点。

## 3 结果判定标准

++++：红细胞全部凝集，均匀铺于孔底，即 100%红细胞凝集。

+++：红细胞凝集基本同++++，但孔底有大圈。

++：红细胞于孔底形成中等大的圈，四周有小凝块。

+

—：红细胞于孔底呈小圆点，边缘光滑整齐，即红细胞完全不凝集。

## 3404 红细胞凝集抑制试验法（标准草案）

### 3404 红细胞凝集抑制试验法

#### 1 血凝素工作液配制

1.1 血凝素凝集价测定 50 孔板或试管法按表 1，96 孔微量板法按表 2 术式进行。用 PBS（0.1mol/L，pH 值 7.0~7.2，下同）将血凝素稀释成不同倍数，加入与抑制试验中血清量等量的 PBS，再加入 1%鸡红细胞悬液。将 50 孔板或试管前后左右摇匀，将 96 孔微量板在振荡器上摇匀，置 15~25°C、20~40 分钟或置 2~8°C、40~60 分钟，当对照孔中的红细胞呈显著纽扣状时判定结果。结果判定标准见附录 3403，以使红细胞完全凝集（++++）的最高稀释度作为判定终点。

#### 1.2 血凝素工作液配制及检验

1.2.1 4HAU 血凝素的配制 如果血凝素凝集价测定结果为 1:1024（举例），4 个血凝单位（即 4HAU）=1024/4=256（即 1:256）。取 PBS 9.0ml，加血凝素 1.0ml，即成 1:10 稀释，将 1:10 稀释液 1.0ml 加入到 24.6ml PBS 中，使最终浓度为 1:256。

1.2.2 检验 检查 4 HAU 的红细胞凝集价是否准确，应将配制的 1:256 稀释液分别以

1.0ml 的量加入 PBS 1.0ml、2.0ml、3.0ml、4.0ml、5.0ml 和 6.0ml 中，使最终稀释度为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6 和 1:7。然后，从每一稀释度中取 0.25ml，加入 PBS 0.25ml，再加入 1%鸡红细胞悬液 0.25ml，混匀。

如果用微量板，方式相同。即从每一稀释度中取 0.025ml，加入 PBS 0.025ml，再加入 1%鸡红细胞悬液 0.025ml，混匀。

将血凝板置 15~25℃、20~40 分钟或置 2~8℃、40~60 分钟，如果配制的抗原液为 4HAU，则 1:4 稀释度将给出凝集终点；如果 4HAU 高于 4 个单位，可能 1:5 或 1:6 为终点；如果较低，可能 1:2 或 1:3 为终点。应根据检验结果将血凝素稀释度做适当调整，使工作液确为 4HAU。

表 1 血凝素凝集价测定 (50 孔板或试管法) 术式 (以 1%鸡红细胞悬液为例) 单位: ml

孔或管号	1	2	3	4	5	6	7	8...	对照
血凝素稀释倍数	5	10	20	40	80	160	320	640	
PBS	0.4	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘弃 0.25	
血凝素	0.1	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	
PBS	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
1%鸡红细胞悬液	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

表 2 血凝素凝集价测定 (96 孔微量板法) 术式 (以 1%鸡红细胞悬液为例) 单位: ml

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8...	对照
血凝素稀释倍数	2	4	8	16	32	64	128	256	
PBS	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘弃 0.025	
血凝素	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	
PBS	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
1%鸡红细胞悬液	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025

## 2 红细胞凝集抑制 (HI) 试验

2.1 50 孔板法或试管法 按表 3 用 PBS 将本血清作 2 倍系列稀释，加入含 4HAU 的血凝素液，并设 PBS 和血凝素对照，充分振摇后，置 15~25℃、至少 20 分钟或置 2~8℃、40~60 分钟，再加入 1%鸡红细胞悬液，置 15~25℃、20~40 分钟或置 2~8℃、40~60 分钟，当对照孔中的红细胞呈显著纽扣状时判定结果。以使红细胞凝集被完全抑制的血清最高稀释度作为判定终点。

表 3 红细胞凝集抑制试验 (50 孔板或试管法) 术式 (以 1%鸡红细胞悬液为例) 单位: ml

孔或管号	1	2	3	4	5	6	7...	病毒对照	红细胞对照
稀释倍数	5	10	20	40	80	160	320		
PBS	0.4	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5
	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘弃 0.25		
本血清	0.1	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25		

4HAU 抗原	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
1%鸡红细胞悬液	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

2.2 96 孔微量板法 与 50 孔板法方式相同，各分量及加样顺序见表 4。

表 4 微量红细胞凝集抑制试验 (96 孔板或试管法) 术式 (以 1%鸡红细胞悬液为例) 单位: ml

孔号	1	2	3	4	5	6	7...	病毒对照	红细胞对照
稀释倍数	2	4	8	16	32	64	128		
PBS	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.05
	}∇	}∇	}∇	}∇	}∇	}∇	}∇弃	0.025	
本血清	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025		
4HAU 抗原	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	
1%鸡红细胞悬液	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025

附注: 1%鸡红细胞悬液的标定 对首次配制的鸡红细胞悬液应进行标定。取配好的红细胞悬液 (附录 3702) 60ml, 自然沉淀后, 弃掉上部 PBS 50ml, 混匀后装入离心管内, 以 10000r/min 离心 5 分钟, 红细胞压积应为 6.0%。

## 3405 活菌 (芽孢) 计数法 (标准草案)

### 3405 活菌 (芽孢) 计数法

取菌 (芽孢) 液或疫苗用适宜的稀释液进行稀释 (冻干苗宜用 10~40 ml 稀释液进行放大稀释), 接种适宜本菌 (芽孢) 生长的琼脂培养基, 在一定条件下培养, 所得细菌菌落 (芽孢) 数乘以稀释倍数, 即为其活菌 (芽孢) 数。

1 测定方法 活菌计数可按下列任一方法进行, 芽孢计数按 1.1 项进行。

1.1 表面培养测定法 每个样品取 1.0ml, 用各制品适宜的稀释液进行 10 倍系列稀释, (每个稀释度换 1 支吸管)。具体稀释方法是: 取一系列的试管, 每管加入 9.0ml 稀释液, 然后准确吸取菌 (芽孢) 液 1.0ml, 放入盛有稀释液的第 1 支试管中 (不接触液面), 将菌 (芽孢) 液与稀释液混合均匀, 另取 1 支吸管从第 1 支试管中吸取 1.0ml 放入第 2 支试管中, 依次稀释至最后一管。根据对样品含菌 (芽孢) 数的估算, 选择适宜的稀释度, 吸取最终稀释度的菌液接种适宜的琼脂培养基平板 3 个, 每个平板 0.1ml, 使菌 (芽孢) 液散开, 置 36~38°C 晾干后, 翻转平板, 培养 16~48 小时 (可适当延长)。

1.2 混合培养测定法 稀释方法同上。取平板 3 个, 每个平板接种 1.0ml 最终稀释度的菌液, 然后将溶化并冷却至 45°C 左右的适宜琼脂培养基倾注入平板中, 轻轻摇动平板, 使稀释的菌液与培养基混合均匀, 待琼脂凝固后翻转平板, 除另有规定外, 置 36~38°C 培养 16~48 小时 (可适当延长)。

#### 2 菌落 (芽孢) 数计算

肉眼观察菌落, 并在平板底面点数, 算出 3 个平板的平均菌落数, 乘以稀释倍数 (表面培养法应再乘以 10), 即为每 1.0ml 样品所含的活菌数。最终稀释度一般选择每个平板菌落数为 40~200CFU 的稀释度。如果菌落呈片状生长, 或同一稀释度 3 个平板间菌落数标准差 (SD, 计算公式如下) 值大于 20, 应重检。

$$SD = \sqrt{\frac{(X1-X)^2 + (X2-X)^2 + (X3-X)^2}{3}}$$

其中, X1、X2、X3 分别表示同一样品相同稀释度 3 个平板上的菌落数, X 表示 X1、X2、X3 的算术平均数。

## 3406 中和试验法 (标准草案)

### 3406 中和试验法

**1 固定病毒稀释血清法** 将病毒稀释成每单位剂量含 200 或 100LD<sub>50</sub> (EID<sub>50</sub>, TCID<sub>50</sub>), 与等量的 2 倍系列稀释的被检血清混合, 置 37°C 下作用 60 分钟 (除另有规定外)。每一稀释度接种 3~6 只 (枚、管、瓶、孔) 实验动物、胚或细胞。接种后, 记录每组实验动物、胚或细胞的存活数和死亡数或感染数或有无 CPE 的细胞瓶或孔数, 按 Reed-Muench 法计算其半数保护量 (PD<sub>50</sub>), 然后计算该血清的中和效价。该法用于测定血清的中和效价。

计算公式为:

$$\lg PD_{50} = \text{高于或等于 } 50\% \text{ 保护率的血清稀释度的对数} + \text{距离比} \times \text{稀释系数的对数}$$

表 1 中和试验结果示例

血清稀释度	观察结果				累计结果		
	死亡数 (CPE)	存活数 (无 CPE)	死亡比例 (CPE)	死亡数 (CPE)	存活数 (无 CPE)	死亡比例	保护率 %
1:4 (10 <sup>-0.6</sup> )	0	4	0/4	0	9	0/9	100
1:16 (10 <sup>-1.2</sup> )	1	3	1/4	1	5	1/6	83
1:64 (10 <sup>-1.8</sup> )	2	2	2/4	3	2	3/5	40
1:256 (10 <sup>-2.4</sup> )	4	0	4/4	7	0	7/7	0
1:1024 (10 <sup>-3.0</sup> )	4	0	4/4	11	0	11/11	0

高于或等于 50% 保护时 (上例中为 83%), 血清稀释度 (10<sup>-1.2</sup>) 的对数值为 -1.2。稀释系数 (1/4) 的对数为 -0.60。

$$\text{距离比例} = \frac{\text{高于或等于 } 50\% - 50\%}{\text{高于或等于 } 50\% - \text{低于 } 50\%} = \frac{83\% - 50\%}{83\% - 40\%} = 0.77$$

$$\lg PD_{50} = -1.2 + 0.77 \times (-0.60) = -1.66$$

则: 该血清的中和效价为 10<sup>-1.66</sup> (1:45.9), 表明该血清在 1:45.9 稀释时可保护 50% 的实验动物、胚或细胞免于死亡或感染或不出现 CPE。

**2 固定血清稀释病毒法** 将病毒原液作 10 倍系列稀释, 分装到 2 列无菌试管中, 第 1 列加等量阴性血清 (对照组), 第 2 列加被检血清 (试验组), 混合后置 37°C 下作用 60 分钟 (除另有规定外), 然后每组分别接种 3~6 只 (枚、管、瓶、孔) 实验

动物、胚或细胞，记录每组实验动物、胚或细胞死亡数或感染数或出现 CPE 数，按 Reed-Muench 法分别计算 2 组的 LD<sub>50</sub> (EID<sub>50</sub>、TCID<sub>50</sub>)，最后计算中和指数。

表 2 中和试验结果示例

病毒稀释度	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	LD <sub>50</sub>	中和指数
对照组				4/4	3/4	1/4	0/4	10 <sup>-5.5</sup>	10 <sup>3.3</sup> =1995
试验组	4/4	2/4	1/4	0/4	0/4	0/4	0/4	10 <sup>-2.2</sup>	

$$\text{中和指数} = \frac{\text{试验组 LD}_{50}}{\text{对照组 LD}_{50}} = \frac{10^{-2.2}}{10^{-5.5}} = 10^{3.3} = 1995$$

### 3407 狂犬病灭活疫苗小鼠效力检验法 (NIH 法) (标准草案)

#### 3407 狂犬病灭活疫苗小鼠效力检验法 (NIH 法)

本法系将待检疫苗和参考疫苗分别免疫小鼠后，通过免疫攻毒法计算待检疫苗的相对效力。主要用于兽用狂犬病灭活疫苗的效力检验。

##### 1 样品处理

1.1 参考疫苗的稀释 取参考疫苗 1 瓶，用 5.0ml PBS (0.01mol/L, pH 值 7.4~7.6, 下同) 复溶，再用 PBS 进行 5 倍系列稀释，取 1:25、1:125、1:625 和 1:3125 4 个适当稀释度的样品，冰浴保存备用 (应在 3 小时内用完)。

1.2 待检疫苗的稀释 取待检疫苗 1 瓶，按瓶签注明头份数用 PBS 进行 5 倍系列稀释，取 1:5、1:25、1:125、1:625 4 个适当稀释度的样品，冰浴保存备用 (应在 3 小时内用完)。

##### 2 检验方法

###### 2.1 免疫

2.1.1 首免 取按 1.1 和 1.2 稀释的各稀释度参考疫苗和待检疫苗，分别从最高稀释度到最低稀释度进行接种，每个稀释度各腹腔注射 3~4 周龄、体重 11~16g 的雌性小鼠 16 只，0.5ml/只。

2.1.2 二免 首免后 7 日，取按 1.1 和 1.2 稀释的各稀释度参考疫苗和待检疫苗，并按照 2.1.1 方法和剂量对首免的小鼠进行第二次免疫。

2.2 攻毒 首免后 14 日，所有免疫小鼠经脑内接种 50LD<sub>50</sub>/0.03ml 狂犬病病毒 CVS-24 株病毒液，0.03ml/只。同时将攻毒病毒液进行回归测定，即取病毒液再进行适当稀释液后，取每个稀释度各脑内接种 10 只雌性小鼠，0.03ml/只。攻毒后所有小鼠连续观察 14 日，前 4 日内 (含第 4 日) 死亡的小鼠记为非特异性死亡，从第 5 日起记录各组每日死于狂犬病的小鼠数量，第 14 日出现麻痹或痉挛等典型狂犬病症状的小鼠也按死亡计算。对 5~14 日内死亡和存活的小鼠进行统计。采用 Reed-Muench 法计算待检疫苗和参考疫苗的 ED<sub>50</sub>，并按下列公式计算待检疫苗的相对效力 (RP)。

$$RP = \frac{\text{待检疫苗 ED}_{50} \text{ 的倒数}}{\text{参考疫苗效价 (IU/ml)}} \times \text{参考疫苗效价 (IU/ml)}$$

**3 检验成立的有效条件** 试验必须满足下列条件，结果方为有效。

3.1 各免疫组小鼠攻毒后 4 日内（含第 4 日）死亡数量应不超过 2 只。

3.2 接种最高稀释度参考疫苗和待检疫苗小鼠的特异性死亡数量应不少于总数（不含非特异性死亡小鼠）的 70%。接种最低稀释度参考疫苗和待检疫苗的小鼠存活数量应不少于总数（不含非特异性死亡小鼠）的 70%（如疫苗进行 1:5、1:25、1:125 和 1:625 稀释，本条所述最低稀释度即指 1:5，最高稀释度即为 1:625）。

3.3 攻击病毒液回归测定的滴度应不小于 10LD<sub>50</sub>/0.03ml。

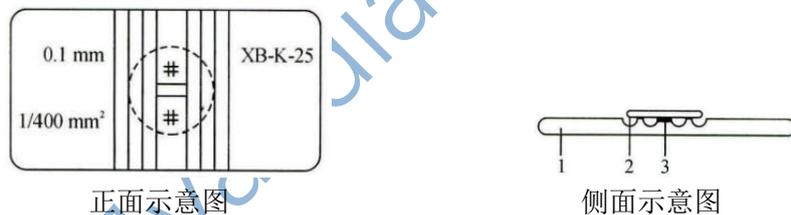
**3408? ★新增附录 球虫孢子化卵囊计数法（标准草案）**

**新增附录 球虫孢子化卵囊计数法**

对于球虫类制品，除另有规定外，卵囊计数均采用此方法。

**1 检品处理** 随机取检品 3 瓶，充分混匀后各自作为卵囊计数用样品，分别按下列步骤进行计数。

**2 加样** 吸取检品 1 滴（约 20μl），通过毛细管虹吸效应沿盖玻片与血细胞计数板间的加样缝隙加入两侧计数室（下图所示），以铺满计数室为宜。加样过程中若产生气泡应更换血球计数板重新加样。



正面示意图

侧面示意图

图 1 血细胞计数板示意图

1—血细胞计数板；2—盖玻片；3—加样位置

**3 计数**

3.1 将血细胞计数板置于显微镜的载物台上夹稳，静置 3~5 分钟，待卵囊沉降到血细胞计数板上，不再随盖玻片及液体漂移后观察。

3.2 用 10×20 倍镜头下采用暗视野观察并计数。按对角线方位，数左上、左下、右上、右下的 4 个角方格（即 64 小格）的孢子化卵囊数，如卵囊位于角方格的线上，上线和左线上的卵囊计入本角方格，下线和右线上的卵囊不计入。血细胞计数板两个计数室 4 个角方格中含有的孢子化卵囊总和分别为第 1 次（S<sub>1</sub>）和第 2 次计数（S<sub>2</sub>）。

3.3 按步骤 2 和步骤 3 中的 3.1~3.2 进行两次重复，计数结果分别为第 3 次（S<sub>3</sub>）、第 4 次（S<sub>4</sub>）、第 5 次（S<sub>5</sub>）和第 6 次计数（S<sub>6</sub>）。

**3.4 结果计算**

3.4.1 分别计算每瓶中的孢子化卵囊数 每瓶孢子化卵囊数 = (S<sub>1</sub>+S<sub>2</sub>+S<sub>3</sub>+S<sub>4</sub>+S<sub>5</sub>+S<sub>6</sub>) ÷ 6 × 2500 × 装量 (ml) ÷ 每瓶羽 (头) 份数

3.4.2 检品中每羽 (头) 份中的孢子化卵囊数 检品中每羽 (头) 份的孢子化卵囊数 = (瓶 1 中孢子化卵囊数 + 瓶 2 中孢子化卵囊数 + 瓶 3 中孢子化卵囊数) ÷ 3

4 结果判定 根据制品标准进行判定，应符合规定。

## 3409? ★新增附录 气管环纤毛摆动停滞试验（标准草案）

### 新增附录 气管环纤毛摆动停滞试验

**1 气管采集** 将试验鸡经颈静脉或颈动脉放血处死，剪开鸡颈部表皮，将气管与周围组织剥离，在喉头部和气管底部剪断气管，放入含有3~5ml MEM或M199培养液的离心管，使气管完全浸入到培养液中，迅速送至实验室制作气管环。

**2 气管环制作与观察** 将100~200 $\mu$ l的MEM或M199培养液加入到96孔细胞培养板中，预热到37 $^{\circ}$ C。将气管转移到平皿，完全去除气管周围的脂肪、肌肉等组织，用眼科剪或者手术刀片在气管上段取3节气管环、中段取4节气管环、下段取3节气管环，每节气管环厚度应在0.5~2mm，将10节气管环放入96孔细胞培养板，每个细胞培养孔放置1节，置于倒置显微镜下观察每只鸡每节气管环的纤毛活性及摆动停滞情况，做好记录并进行分析。对气管环样品应尽快操作，整个操作过程应在气管采集后2小时内完成。

**3 气管环纤毛摆动停滞评价及标准** 根据气管环纤毛摆动停滞的程度进行评分，分值0~4分，评分标准如下：75%以上纤毛活动停滞记为4分；50%~75%（包含75%）纤毛活动停滞记为3分；25%~50%（包含50%）纤毛活动停滞记为2分；25%及以下纤毛活动停滞记为1分；纤毛无活动停滞记为0分。每只鸡观察10节气管环，每只鸡最大分值为40分，最小分值为0分。

## ● 3500 特定生物原材料/动物

### 3501 生产、检验用动物标准（标准草案）

#### 3501 生产、检验用动物标准

##### 1 生产用动物标准

1.1 用于兽用生物制品菌（毒、虫）种的制备、制品生产的实验动物中，兔、豚鼠、仓鼠、犬等应符合国家普通级动物标准，大鼠、小鼠应符合国家无特定病原体（SPF）级动物标准。菌（毒、虫）种的制备、活疫苗制品生产的鸡和鸡胚应符合国家无特定病原体（SPF）级动物标准。

1.2 菌（毒、虫）种的制备、制品的生产用猪、羊、牛、马和兔的病原微生物检测项目见下表，相关检测方法应使用相关病原的国家标准、行业标准等或使用已经农业农村部审批的检测试剂盒（试纸条）。

表 生产用猪、羊、牛、马、兔病原微生物检测项目

检测项目	动物种类				
	猪	羊	牛	马	兔
猪瘟病毒	△				
非洲猪瘟病毒	△				
猪细小病毒	△				
猪繁殖与呼吸综合征病毒	△				
伪狂犬病病毒	△				
口蹄疫病毒	△	△	△		
猪链球菌 2 型	△				
猪圆环病毒	△				
猪肺炎支原体	△				
山羊/绵羊痘病毒		△			
小反刍兽疫病毒		△			
蓝舌病病毒		△	△		
兔出血症病毒（I型和II型）					△
沙门氏菌					△
布鲁氏菌		△	△		
梨形虫			△	△	
弓形虫					△
伊氏锥虫				△	
牛病毒性腹泻-黏膜病病毒			△		
牛疱疹病毒 1 型			△		
牛型结核分枝杆菌			△		
牛白血病病毒			△		
马传染性贫血病毒				△	
马鼻疽伯氏菌				△	
皮肤真菌		△	△		
体外寄生虫	△	△	△	△	△

1.3 所有制品生产用动物，除符合 1.1 和 1.2 各项规定外，还应无本制品的特异性病原和抗体，并符合该制品规程和质量标准规定的有关动物标准的要求。

1.4 各等级的啮齿类动物和 SPF 鸡的质量检测，按照相应级别实验动物的国家标准进行。

1.5 饲喂实验动物的配合饲料如有国家标准或行业标准应符合各自实验动物饲料国家标准或行业标准。

1.6 实验动物生产和动物试验的环境设施应符合国家实验动物环境和设施标准。

1.7 引入动物，必要时应进行隔离观察、检验合格后，方可用于生产。治疗后的动物不得用于生产。

## 2 检验用动物标准

2.1 原则上，所有兽用生物制品菌（毒、虫）种检定和制品检验用动物标准如有国家无特定病原体（SPF）级动物的标准，应优先采用 SPF 级动物，其中鸡、小鼠必须使用 SPF 级动物。

2.2 所有制品的检验用动物，除符合 2.1 项规定外，动物大小、日龄、体重应基本一致。还应无本制品的特异性病原和抗体，并符合该制品规程和质量标准规定的有关动物标准的要求。

2.3 检验用动物的标准和检测方法应符合制品标准规定。各等级的啮齿类动物和 SPF 鸡的质量检测，按照相应级别实验动物的国家标准进行。

2.4 饲喂实验动物的配合饲料如有国家标准或行业标准应符合各自实验动物饲料国家标准或行业标准。

2.5 实验动物生产和动物试验的环境设施应符合国家实验动物环境和设施标准。

2.6 引入动物，必要时应进行隔离观察、检验合格后，才能用于检验。治疗后的动物不得用于检验。

## 3502 生产用细胞标准（标准草案）

### 3502 生产用细胞标准

1 禽源或非禽源原代细胞 生产用禽源或非禽源原代细胞应来自 SPF 级或健康动物的正常组织。细胞均应按下列各项要求进行检验，任何一项不合格者，不得用于生产。

1.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

1.2 支原体检验 按附录 3308 或附录 XX[支原体检验法（指示细胞培养法）]进行检验，应无支原体生长。

1.3 外源病毒检验 按附录 XX（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2 细胞系 生产用细胞系一般由人或动物肿瘤组织或发生突变的正常细胞传代转化而来；或者是通过选择或克隆培养，从原代培养物或细胞系中获得的具有特殊遗传、生化性质或特异标记的细胞群。

2.1 一般要求

2.1.1 应保存细胞系的完整记录，如细胞来源、传代史、培养基等。

2.1.2 细胞库实行分级管理，一般包括原始细胞库、基础细胞库及工作细胞库。

2.1.3 应根据需要，选择适宜代次保留一定数量细胞，以便随时进行检验。

2.1.4 应对每批细胞的可见特征进行监测，如镜检特征、生长速度、产酸等。

2.1.5 细胞检验主要包括：无菌检验、支原体检验、外源病毒检验、胞核学检验和致瘤性检验等。基础细胞库细胞、工作细胞库细胞、最高限制代次细胞的检验项目见表 1。

表 1 不同细胞检验项目的基本要求

检定项目	基础细胞库	工作细胞库	最高限制代次细胞
无菌检验	+	+	+
支原体检验	+	+	+
外源病毒检验	+	+	+
胞核学检验	+	—	+
致瘤性检验	+	—	+

注：“+”为必检项目，“—”为非强制检定项目

2.2 按下列各项要求进行检验，任何一项不合格的细胞系不能用于生产，已用于生产的，产品应予以销毁。

2.2.1 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

2.2.2 支原体检验 按附录 3308 或附录 XX[支原体检验法（指示细胞培养法）]进行检验，应无支原体生长。

2.2.3 外源病毒检验 按附录 XX（外源病毒检验的通用要求）和附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

2.2.4 胞核学检验 从基础细胞库细胞和生产中所用最高代次的细胞，各取 50 个处于有丝分裂中的细胞进行检查。在基础细胞库中存在的染色体标志，在最高代次细胞中也应找到。这些细胞的染色体模式数不得比基础细胞库高 15%。核型必须相同。如果模式数超过所述标准，最高代次细胞中未发现染色体标志或发现核型不同，则该细胞系不得用于生物制品生产。

2.2.5 致瘤性检验 对基础细胞库细胞和生产中所用最高代次的细胞进行检验。

2.2.5.1 用无胸腺小鼠至少 10 只，各皮下或肌肉注射  $10^7$  个被检活细胞，或用 3~5 日龄乳鼠或体重为 8.0~10g 小鼠 6 只，用抗胸腺血清处理后，各皮下接种  $10^7$  个被检活细胞；同时用 HeLa 或 Hep-2 细胞或其他适宜细胞系作为阳性对照细胞，每只小鼠各注射  $10^6$  个活细胞；用二倍体细胞株或其他适宜活细胞作为阴性对照细胞。

接种后的动物观察 14 日，检查有无结节或肿瘤形成。如果有结节或可疑病灶，应继续观察至少 1~2 周，然后解剖，进行病理组织学检查，应无肿瘤形成。对未发生结节的动物，取其中半数，观察 21 日，对另外半数动物观察 12 周，对接种部位进行解剖和病理学检查，观察各淋巴结和各器官中是否有结节形成，如果有怀疑，应进行病理组织学检查，不应有转移瘤形成。阳性对照组观察 21 日，应出现明显的肿瘤。阴性对照组观察 21 日，应为阴性。

2.2.5.2 采用新生（出生 3 日龄内）裸鼠或新生仓鼠、新生大鼠 10 只，各皮下注射  $10^8$  个冻融破碎后的被检细胞；同时用 HeLa 或 Hep-2 细胞或其他适宜细胞系作为阳性对照细胞，每只小鼠各注射  $10^6$  个细胞；用二倍体细胞株或其他适宜细胞作为阴性对照细胞。

接种后的动物观察 14 日，检查有无结节或肿瘤形成。如果有结节或可疑病灶，应继续观察至少 1~2 周，然后解剖，进行病理组织学检查，应无肿瘤形成。对未发生结节的动物，

取其中半数，观察 21 日，对另外半数动物观察 12 周，对接种部位进行解剖和病理学检查，观察各淋巴结和各器官中有无结节形成，如果有怀疑，应进行病理组织学检查，不应有转移瘤形成。阳性对照组观察 21 日，应出现明显的肿瘤。阴性对照组观察 21 日，应为阴性。

用于活疫苗生产的细胞，除另有规定外，按照 2.2.5.1 进行检验，应无肿瘤产生。

用于灭活疫苗生产的细胞，按照 2.2.5.1 进行检验，应无肿瘤产生；如有肿瘤产生，按照 2.2.5.2 进行检验，应无肿瘤产生。如使用满足 2.2.5.2 检验要求的细胞进行灭活疫苗生产，应通过工艺验证研究或出厂检验分析，确保成品中不含宿主活细胞或者其他肿瘤性成分。

2.2.6 对于高度纯化且不含细胞的制品，通过工艺验证研究或出厂检验分析，制品中宿主细胞 DNA 残留稳定保持在可控限度内，则其生产用细胞系可豁免胞核学检验、致癌性检验。

2.3 重组细胞的特殊要求 对于通过 DNA 重组技术获得的含有特定基因序列的细胞系，除按本标准 2.2 项的规定进行检验外，还应进行以下检验：

2.3.1 稳定性检验 对基础细胞库细胞和生产中所用最高代次的细胞进行检验，包括遗传稳定性（如插入基因拷贝数、插入位点、插入基因的序列等）、目的基因表达稳定性、目的产品持续生产的稳定性、以及保存期内的稳定性等。

2.3.2 鉴别检验 通过检测目的蛋白基因或目的蛋白进行鉴别检验。

## 3503 生物制品生产和检验用牛血清质量标准（标准草案）

### 3503 生物制品生产和检验用牛血清质量标准

用于生物制品生产和检验的新生牛血清系为从出生 14 小时内未进食初乳的新生小牛经采血，分离血清，经滤过除菌制成；胎牛血清系为经心脏采集 230~240 日龄的胎牛全血，分离血清，经滤过除菌制成。主要用于细胞培养。

1 性状 澄清稍黏稠液体，无溶血或异物，冻融后可能存在少量絮状沉淀。

2 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。

3 支原体检验 按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

4 外源病毒检验 取被检血清样品 10ml，以 3000r/min 离心 10 分钟，取上清液，按附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

5 特异性抗体测定 根据血清的用途确定测定的抗体种类，采用血清学方法进行检验，应符合规定。

6 细菌内毒素测定 按《中国兽药典》一部通则 1143 进行检验，每毫升血清的内毒素含量应低于 10EU。

7 细胞增殖试验 下列方法任择其一。

7.1 Sp2/0 增殖试验法 取生长良好的 Sp2/0 小鼠骨髓瘤细胞，弃营养液，用无血清 MEM 配成每毫升 30 万~50 万细胞悬液，计数细胞后，用无血清 MEM 在 96 孔细胞板上作 1:200、1:400、1:800、1:1600 稀释，每稀释度加 8 孔，每孔 0.1ml，每孔再分别补加 0.1ml 含 20% 参考血清或 20% 被检血清 MEM 营养液，置 37℃、含 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养至 48 小时，倒置显微镜下计数，取每孔克隆数均在 30~50 之间的稀释度的 8 个孔，求和计为总克隆数。计算被检血清和参考血清的绝对克隆形成率和相对克隆形成率。

$$\text{绝对克隆形成率 (\%)} = \frac{\text{该稀释度形成的细胞克隆总数}}{\text{该稀释度接种 Sp2/0 悬液细胞总数}} \times 100\%$$

$$\text{相对克隆形成率 (\%)} = \frac{\text{胎牛血清 (或新生牛血清) 的绝对克隆形成率}}{\text{参考血清的绝对克隆形成率}} \times 100\%$$

判定标准：参考血清的绝对克隆形成率应不低于 20%

胎牛血清的相对克隆形成率应不低于 80%

新生牛血清相对克隆形成率应不低于 50%

7.2 Vero 细胞增殖试验法 将已长成良好的单层 Vero 细胞按常规传代方法，用 0.25% 胰酶消化分散制备成悬液，300~450g 离心 10 分钟，弃去上清。将细胞沉淀用含 10% 待检血清的 MEM 细胞培养液重悬，计数后配制成  $10^4$  个细胞/ml 的细胞悬液。接种  $25\text{cm}^2$  细胞瓶 2 个，每瓶接种 10ml。将细胞置  $37^\circ\text{C}$  培养箱中连续培养 48 小时后，分别消化分散，300~450g，离心 10 分钟，弃去上清，每瓶细胞沉淀分别用 1.0ml 无血清的 MEM 吹散混匀，进行计数，计算 2 瓶细胞数的算术平均数作为该细胞的细胞数。新生牛血清培养的细胞增殖数应不低于原浓度的 3 倍 ( $3.0 \times 10^4$  个细胞/ml)，胎牛血清培养的细胞增殖数应不低于原浓度的 5 倍 ( $5.0 \times 10^4$  个细胞/ml)。

## 3504 检验用细胞单层制备法（标准草案）

### 3504 检验用细胞单层制备法

1 鸡胚成纤维细胞（CEF）单层的制备 选择 9~11 日龄发育良好的 SPF 鸡胚，先用碘酒棉消毒蛋壳气室部位，再用酒精棉脱碘，无菌取出鸡胚，去除头、四肢和内脏，放入灭菌的玻璃器皿内，用 M199 培养基或 PBS（0.01mol/L，pH 值 7.2~7.4，下同）洗涤胚体，用灭菌的剪刀剪成米粒大小的组织块，再用 M199 培养基或 PBS 洗 2~3 次，然后加适宜浓度的胰酶溶液（每枚鸡胚约加 4.0ml），置  $37\sim 38^\circ\text{C}$  水浴中消化 20~30 分钟，吸出胰酶溶液，用 M199 培养基或 PBS 洗 2~3 次，再加入适量的营养液（用含 5%~10% 胎牛血清或犊牛血清或新生牛血清 M199 培养基，加适宜的抗生素适量）吹打，用 8 层纱布（或 80~100 目尼龙网）滤过，制成每 1.0ml 中含活细胞约  $10^6\sim 1.5 \times 10^6$  个的细胞悬液，分装于培养瓶中，置  $37^\circ\text{C}$  进行培养，约 24 小时后形成单层。

#### 2 鸡胚皮肤细胞单层的制备

方法 1 选择 12~13 日龄发育良好的 SPF 鸡胚，先用碘酒棉消毒蛋壳气室部位，再用酒精棉脱碘，无菌取出鸡胚，放入无菌的容器内，用 M199 培养基或 PBS（0.01mol/L，pH 值 7.2~7.4，下同）洗涤胚体，再用灭菌的眼科镊子将皮肤轻轻地扒下，并将其放入灭菌的广口离心瓶中，用剪刀在广口离心瓶中剪碎，用 M199 培养基或 PBS 洗 2 次后，用适宜浓度的胰酶溶液（每枚鸡胚约加 4.0ml）置  $37\sim 38^\circ\text{C}$  水浴中消化 20~25 分钟，然后吸出胰酶溶液，加入适量的营养液（用含 5%~10% 胎牛血清或犊牛血清或新生牛血清 M199 培养基，加适宜的抗生素适量）吹打，用 8 层纱布（或 80~100 目尼龙网）滤过，制成每 1.0ml 中含活细胞数约 100 万个的细胞悬液，分装于培养瓶中置  $37^\circ\text{C}$  进行培养，约 24 小时后形成单层。

方法 2 选择 12~13 日龄发育良好的 SPF 鸡胚，先用碘酒棉消毒蛋壳气室部位，再用酒精棉脱碘，无菌取出鸡胚，置灭菌的烧杯中，用 M199 培养基或 PBS（0.01mol/L，pH 值 7.2~7.4）洗涤胚体，再用灭菌的镊子将胚夹入另一个放有磁棒的灭菌三角瓶中，加  $37^\circ\text{C}$  的适宜浓度的胰酶溶液（每枚鸡胚 8.0~10ml），置磁力搅拌器上以低速搅拌消化约 20~25 分

钟，取出，加入适量含血清的 M199 培养基中止消化。将胰酶及消化下来的细胞（即鸡胚皮肤细胞）液倒出，底部液用 1 层纱布（或 30 目尼龙网）滤过。以 1000r/min 离心 10 分钟，吸去上清液，加入适量培养液，吹打分散细胞，用 8 层纱布（或 80~100 目尼龙网）滤过。根据细胞数加入所需的营养液（用含 5%~10% 胎牛血清或犊牛血清或新生牛血清 M199 培养基，加适宜的抗生素适量），制成每 1.0ml 中含活细胞约 100 万个的细胞悬液，分装于培养瓶中，置 37℃ 进行培养，约 24 小时后形成单层。

**3 鸡胚肝细胞单层的制备** 选择 14~16 日龄发育良好的 SPF 鸡胚，先用碘酒棉消毒蛋壳气室部位，再用酒精棉脱碘。无菌取出胎儿肝脏放置在含有 PBS (0.01mol/L, pH 值 7.2~7.4) 的无菌容器内，并用 PBS 润洗肝脏组织 2~3 次，然后用无菌剪刀将肝脏剪至 2.0mm<sup>3</sup> 的碎块，加入适宜浓度的 EDTA-胰蛋白酶溶液，10ml/胚，放置于灭菌玻璃器皿内，加无菌的磁力搅拌棒后，置 37℃ 水浴磁力搅拌 5~30 分钟，静止 1 分钟后，弃去上清液。肝组织中再加入适宜浓度的 EDTA-胰蛋白酶溶液，置 37℃ 搅拌 5 分钟，静止 1 分钟，将上清液倒入或用无菌吸管吸至冰浴的无菌容器中，加约 20% 的胎牛血清或新生牛血清。可根据肝组织消化情况，重复用适宜浓度 EDTA-胰蛋白酶溶液消化 2~3 次。收集的上清液用 8 层纱布过滤后，2~8℃ 条件下，以 2000r/min 离心 10 分钟，弃上清，细胞沉淀用培养基（含 5%~10% 胎牛血清或犊牛血清或新生牛血清和适量适宜抗生素的 M199 培养基，7.5% 碳酸氢钠溶液调 pH 值至 7.0）恢复至适宜浓度后进行细胞计数。根据细胞计数结果，用培养基将细胞悬液的浓度调整至 1.0×10<sup>6</sup>~1.4×10<sup>6</sup> 个/ml，加入到细胞培养瓶或细胞板中置 37℃、含 5%CO<sub>2</sub> 条件下培养，约 24 小时后形成单层。

**4 仓鼠或乳兔肾细胞单层的制备** 选择 10~20 日龄仓鼠或乳兔，放血致死，无菌条件下，由仓鼠或乳兔背部摘取肾脏，用 MEM 培养基洗 2~3 次后，剖开肾脏，剔除髓质部组织，将其皮质部组织剪成 1~2mm<sup>3</sup> 小块，用 MEM 培养基洗 2~3 次后，按组织重量的 5 倍加入适宜浓度的胰酶溶液，置 37℃ 水浴消化 30~40 分钟，除去胰酶溶液后，加入适量的细胞生长液（用含 10%~20% 胎牛血清或犊牛血清或新生牛血清的 MEM 培养基，加适宜的抗生素适量）吹打，用 12 层纱布滤过后，以 2000r/min 离心 5~10 分钟，弃上清，然后用适量含 10%~20% 胎牛血清或新生牛血清的 MEM 培养基重悬细胞沉底至适宜浓度后进行细胞计数，根据细胞计数结果，用细胞生长液（含 10%~20% 胎牛血清或犊牛血清或新生牛血清的 MEM 培养基）制成每 1.0ml 中含 6×10<sup>5</sup>~8×10<sup>5</sup> 个细胞的悬液。将细胞置 37℃ 培养，2~4 日后形成单层。

**5 鸡胚肾细胞单层的制备** 选择 17~20 日龄发育良好的 SPF 鸡胚，先用碘酒棉消毒蛋壳气室部位，再用酒精棉脱碘，无菌取出鸡胚胚体放置于无菌的容器内。将胚体剥皮去毛，打开胚体的胸腔和腹腔，小心用无菌镊子仔细分离肾脏包膜，取出肾脏放置于另一无菌玻璃器皿内，并用 PBS (0.01mol/L, pH 值 7.2~7.4, 下同) 洗 2~3 次，然后用无菌剪刀将其剪至 1.0mm<sup>3</sup> 的组织碎块。肾组织碎块继续用 PBS 洗 2 次，加入适宜浓度的胰酶溶液 (5ml/胚)，置 37℃ 水浴消化 20~30 分钟，间隔 5 分钟轻轻摇晃 1 次。消化结束后静置 5 分钟，吸弃胰酶上清，加入 PBS 洗 2~3 次，每次轻轻摇晃后静置 5 分钟，吸弃上清。最后加入适量的营养液（含 5%~10% 胎牛血清和适量适宜抗生素的 M199 培养基）吹打，用 8 层纱布（或 80~100 目尼龙网）滤过，制成每 1.0ml 中含活细胞约 10<sup>6</sup> 个的细胞悬液，加入到细胞培养瓶或细胞板中置 37℃、含 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。

## 3505 兽用生物制品用胰酶质量标准（标准草案）

### 3505 兽用生物制品用胰酶质量标准

生物制品用胰酶系由猪胰脏提取的多种酶的混合物，主要成分为胰蛋白酶。主要用于动物来源的组织和细胞的解离或分散。

**1 性状** 白色或乳白色结晶体或无定形粉末。

**2 鉴别** 取 2.0mg 胰酶，置白色点滴板上，加入对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯盐酸溶液（配制方法见附注 1）0.2ml，搅匀，应呈紫红色。

**3 支原体检验** 将胰酶用灭菌注射用水制成 10g/L 溶液，经 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤后，取滤液按附录 3308 进行检验，应无支原体生长。

**4 外源病毒检验** 胰酶外源病毒检验前处理方法 将胰酶用预冷（2~8℃）的灭菌注射用水配制成 10g/L 溶液，2~8℃、以 10 000g 离心 15 分钟，取上清液经 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤后，加入适量胎牛血清，混匀，2~8℃作用 30 分钟，作为检验用材料。

如果加入的胎牛血清量不能抑制胰酶活性，可适当增加胎牛血清用量。但在进行外源病原检验接种时，也应适当增加样品的接种量，以确保接种样品中的原胰酶量不少于 1.0ml。（胰酶前处理后，按附录 3305 进行检验，应无外源病毒污染。

根据需要，可采用其他方法（如分子生物学方法等）增加对特定病原的检测。

**5 细胞解离试验** 将已长成良好单层的 Vero 细胞和 PK-15 细胞用含 8%胎牛血清的 DMEM 分散为 15~20 万个细胞/ml，各分装 2 个细胞瓶（75cm<sup>2</sup>/瓶），每瓶 30ml，37℃培养 3 日后弃去培养液，先用 3.0ml-PBS（1/15 mol/L pH 值 7.2）洗涤 2 次，然后加入本品配制的 0.25%胰酶 3.0ml 洗涤 1 次，弃去胰酶，置 37℃培养箱放置。按细胞解离判定标准（细胞变圆隆起、间隙变大、聚团甚至出现轻微脱落；轻轻拍打，80%以上细胞出现脱落）进行判定。Vero 细胞应在 5 分钟内发生解离；PK-15 细胞应在 15 分钟内发生解离。

**附注：对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯盐酸盐溶液的配制** 取对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯盐酸盐 98.5mg，加三羟甲基氨基甲烷缓冲液（pH 值 8.1）<sup>注</sup> 5.0ml 使溶解，加指示液（取 0.1%甲基红的乙醇溶液和 0.05%亚甲蓝的乙醇溶液，等量混匀）0.25ml，用水稀释至 25ml。

**注：**取氯化钙 294mg，加 0.2mol/L 三羟甲基氨基甲烷溶液 40ml 使溶解，用 1.0mol/L 盐酸溶液调节 pH 值至 8.1，用水稀释至 100ml 即为三羟甲基氨基甲烷缓冲液（pH 值 8.1）。

## ●3600 特定辅料

### 3601 丁基橡胶瓶塞质量标准 (标准草案)

#### 3601 丁基橡胶瓶塞质量标准

1 外观 取样品数个,目视检测,应符合下列规定。

- 1.1 表面不应有污点、杂质。
- 1.2 表面不应有气泡、裂纹。
- 1.3 表面不应缺胶、粗糙。
- 1.4 表面不应有胶丝、胶屑、海绵状、毛边。
- 1.5 不应有除边造成的残缺或锯齿现象。
- 1.6 不应有模具造成的明显痕迹。
- 1.7 表面的色泽应均匀。

2 物理性能 供试品准备:取瓶塞若干进行清洁、干燥并高压灭菌,另取与瓶塞相配的且同数量的洁净瓶子,瓶中装入半瓶水,将胶塞分别装在瓶子上,盖上铝盖用封口机封口,打开穿刺部位。

2.1 针刺落屑 随机待检瓶塞 10 个,用记号笔在瓶塞中央区域画圈标记,取吸有 1ml 清洁的水注射器,用针头垂直向瓶塞标记区域内穿刺,重复三次,每次穿刺后均推注注射器内水约 0.2ml,最后一次拔出针头前将剩余的水全部注入瓶内。每只胶塞重复同样的操作。所有胶塞被各穿刺四次后取下被测胶塞,将瓶中水全部通过滤纸过滤,用肉眼观察滤纸上的落屑数,10 个被测瓶塞针刺落屑总数应不超过 5 粒。

2.2 穿刺力 取待检瓶塞 10 个,用穿刺器以  $200\pm 20\text{mm/分钟}$  的速度垂直穿刺瓶塞中心,记录刺透瓶塞所施加的压力,直至所有胶塞被穿刺一次,穿刺瓶塞所需的力应不超过 10N。

2.3 瓶塞与容器密合性 取待检瓶塞 10 个,倒置放进装有 10g/L 亚甲蓝溶液的容器中,使胶塞部分完全浸没。将容器放入真空箱中,抽真空至真空度为 25kPa,维持 30 分钟,真空箱恢复至常压,再维持 30 分钟。取出,用水冲洗瓶外,以目测观察。亚甲蓝溶液不得渗入瓶内。

2.4 自密封性 取供试品 10 个,在所有胶塞标记区域内不同位置穿刺 3 次。将穿刺过胶塞的瓶子倒置放进装有 10g/L 亚甲蓝溶液的容器中,使瓶塞部分完全浸没。将容器放入真空箱中,抽真空至真空度为 25kPa,维持 30 分钟,真空箱恢复至常压,再维持 30 分钟。取出,用水冲洗瓶外,以目测观察。亚甲蓝溶液不得渗入瓶内。

3 化学性能 供试液的制备:取样品若干经清洁干燥处理后装入玻璃容器中,加入同体积的水,高压灭菌后冷却至室温,即得供试液。同法制备空白液,进行下列试验。

3.1 挥发性硫化物 取供试液适量,按硫化物检查法(《中国兽药典》一部通则 0803)进行检测,挥发性硫化物(以  $\text{Na}_2\text{S}/20\text{cm}^2$  橡胶表面计),不得超过 50 $\mu\text{g}$ 。

3.2 紫外吸光度 取供试液适量,以空白液为对照,按紫外-可见分光光度法(《中国兽药典》一部通则 0401)进行检测,在 220-360nm 波长范围内,最大吸光度不得超过 0.2。

3.3 还原物质 用移液管吸取 20.0ml 试验液,加入 250ml 具塞三角瓶中,加 2.0ml 硫酸溶液(1mol/L)和 20.0ml 高锰酸钾标准溶液(0.1mol/L),煮沸 3 分钟,迅速冷却,加 1.0g 碘化钾,立即用 0.01mol/L 硫代硫酸钠标准溶液滴定至淡黄色,再加 0.25ml 淀粉指示液(5g/L),继续用 0.01mol/L 硫代硫酸钠标准溶液滴定至无色。用同样方法滴定空白液。以 20.0ml 试验液与 20.0ml 空白液所消耗的高锰酸钾标准溶液的体积之差表示结果,不得超过 7.0ml。

3.4 电导率 取供试液适量,按制药用水电导率测定法(《中国兽药典》一部通则 0681)进行检测,供试液电导率不得超过 4.0Ms/m。

3.5 混浊度 将供试液与浊度标准液在适宜的背景下进行比较,混浊度不得超过 3.0 级。

3.6 pH 变化值 取供试液适量,按 pH 测定法(《中国兽药典》一部通则 0631)进行测定,pH 变化值不超过 1.0。

3.7 重金属 取供试液适量,按重金属检查法(《中国兽药典》一部通则 0821)进行测定,重金属(以  $\text{Pb}^{2+}$  计)不超过 1.0mg/L。

3.8 铵 取供试液适量,按铵盐检查法(《中国兽药典》一部通则 0808)进行测定,铵(以  $\text{NH}_4^+$  计)不超过 2.0mg/L。

3.9 锌 取供试液适量,用孔径 0.45 $\mu\text{m}$  的滤膜过滤,精密量取滤液 10.0ml,加 2mol/L

亚铁氰化钾溶液（需新鲜配制）3滴混合，不得浑浊；若显浑浊，与标准锌溶液 3.0ml 加空白液 7.0ml 再加 2mol/L 亚铁氰化钾溶液 3滴制成的对照液比较，不得更深。

3.10 不挥发物 瓷蒸发皿预先在 105℃ 恒温干燥箱中烘至恒重。用移液管吸取 100.0ml 供试液至蒸发皿中，置水浴锅中蒸干，置 105℃ 恒温干燥箱中烘至恒重。恒温箱不得鼓风。同法测定空白液。用供试液与空白液不挥发物之差表示结果，不得超过 4.0mg。

#### 4 生物性能

4.1 致热原 取样品若干，加入 0.9%氯化钠注射液，振摇数分钟，使样品完全浸没为止，已灭菌的样品置 37℃ 2 小时，未灭菌的样品置 60℃ 2 小时。按热原检查法（《中国兽药典》一部通则 1142）进行检测，应无致热原。

4.2 急性毒性 将本品放入一无菌具塞器皿内，按表面积每 3.0cm<sup>2</sup> 加入 0.9%氯化钠注射液 1ml，振摇数分钟，使样品完全浸没为止，置 60℃ 8 小时。取体重 17~23g 小鼠 5 只，将供试液经尾静脉接种，小鼠每 1.0g 体重注射剂量为 50 μl，观察 3 日，应全部健活。

4.3 溶血作用 取样品 15g，切成 0.5cm×2.0cm 条状或块状。供试品组 3 支试管，每管加入样品 5.0g 及 0.9%氯化钠注射液 10ml；阴性对照组 3 支试管，每管加入 0.9%氯化钠注射液 10.0ml；阳性对照组 3 支试管，每管加入注射用水 10.0ml。全部试管放入恒温水浴中 37℃ 保温 30 分钟后，每支试管加入 0.2ml 稀释兔血（由健康兔心脏采血 20ml，加 2%草酸钾 1.0ml，制备成新鲜抗凝兔血。取新鲜抗凝兔血 8.0ml，加 0.9%氯化钠注射液 10.0ml 稀释），轻轻混匀，置 37℃ 水浴继续保温 60 分钟。倒出管内液体，以 2500r/min 离心 5 分钟。吸取上清液，移入比色皿内，按紫外-可见分光光度法（《中国兽药典》一部通则 0401）在 545nm 波长处测定吸光度。供试组和对照组吸光度均取 3 支试管的平均值。阴性对照管的吸光度应不高于 0.03；阳性对照管的吸光度应为 0.8±0.3。

溶血率（%）按下式计算：

$$\text{溶血率}(\%) = (A-B)/(C-B) \times 100\%$$

式中

A——供试品组吸光度；

B——阴性对照组吸光度；

C——阳性对照组吸光度。

溶血率应小于 5.0%。

## 3602 管制玻璃瓶质量标准（标准草案）

### 3602 管制玻璃瓶质量标准

#### 1 外观质量

1.1 外形 取本品适量，在自然光线明亮处，正视目测。应透明；表面应平整光洁。

#### 1.2 结石和透明结点

1.2.1 直径 0.5~1.0mm 的结石，不超过 1 个。

1.2.2 直径不大于 0.5mm 的结石，不超过 2 个。

1.2.3 0.5~1.0mm 透明结点，不超过 2 个。

1.2.4 小于 0.5mm 密集透明结点，不允许有。

#### 1.3 气泡线

1.3.1 宽度大于 0.2mm 的气泡线，不允许有。

1.3.2 宽度 0.1~0.2mm 的气泡线，不超过 4 条。

1.3.3 宽度小于 0.1mm 的密集气泡线，不允许有。

#### 1.4 瓶底瓶口气泡

- 1.4.1 直径大于 0.5mm 的气泡，不允许有。
- 1.4.2 直径不大于 0.5mm 的气泡，不超过 2 个。
- 1.4.3 直径不大于 0.1mm 的密集气泡，不允许有。
- 1.5 裂纹 任何部位不允许有裂纹（表面点状碰伤、坑、疤，不导致泄漏的不计在内）。

## 2 理化性能

- 2.1 耐水性 应符合 HC1、HC2、HC3 任何一级耐水性规定。
- 2.2 内应力 瓶身内应力应小于 40nm/mm 玻璃厚度。

## 3603 氢氧化铝胶质量标准（标准草案）

### 3603 氢氧化铝胶质量标准

用于制造兽用生物制品的氢氧化铝胶（简称铝胶），应符合以下标准。

- 1 性状 乳白色或淡灰白色、细腻无臭的胶体，薄层半透明，静置能析出少量水分，不得含有异物。
- 2 无菌检验 按附录 3306 进行检验，应无菌生长。
- 3 pH 值测定 将灭菌后的氢氧化铝胶，用新煮沸冷却后的注射用水稀释至 5 倍，按附录 3101 方法进行测定，pH 值应为 6.0~7.2。
- 4 氯化物含量测定 按氯化物检查法（《中国兽药典》一部通则 0801）进行测定，应不超过 0.3%。
- 5 硫酸盐含量测定 按硫酸盐检查法（《中国兽药典》一部通则 0802）进行测定，应不超过 0.4%。
- 6 氨含量测定 按氨盐检查法（《中国兽药典》一部通则 0808）进行测定，应不超过万分之一。
- 7 重金属含量测定 按重金属检查法（《中国兽药典》一部通则 0821）进行测定，应不超过百万分之五。
- 8 砷盐含量测定 按砷盐检查法（《中国兽药典》一部通则 0822）进行测定，应不超过千万分之八。
- 9 氧化铝含量测定 取待检品适量（含铝不超过 12mmol），精密称定（m），加盐酸与水各 10ml，煮沸溶解后，放冷，全部转移至 250ml 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀；精密量取 25ml（V<sub>2</sub>），加氨试液中中和至恰析出沉淀，再滴加稀盐酸至沉淀恰溶解为止，加醋酸-醋酸铵缓冲液（pH 值 6.0）10ml。再精密加乙二胺四醋酸二钠滴定液（0.05mol/L）25ml（每 1ml 乙二胺四醋酸二钠滴定液（0.05mol/L）可结合 3.900mg 的 Al(OH)<sub>3</sub>）。煮沸 3~5 分钟，放冷，加二甲酚橙指示液 1ml，用经标定的锌滴定液（0.05mol/L）（c）滴定至溶液自黄色转变为红色获得 V<sub>1</sub>，并将滴定的结果用空白试验（以水代替）校正获得 V<sub>0</sub>。按氧化铝含量计，应不超过 3.9%。

氧化铝含量计算公式如下：

$$\text{氧化铝含量 (\%)} = \frac{(V_0 - V_1) \times c \times 509.8}{m} \times 100\%$$

式中：V<sub>0</sub>：空白实验消耗锌滴定液的体积（ml）

V<sub>1</sub>: 供试品所消耗的锌滴定液的体积 (ml)

m: 待检品重量 (mg)

c: 锌滴定液浓度 (mol/L)

## 10 吸附率测定

**10.1 样品制备** 取供试品适量,用 0.85%~0.90%氯化钠溶液稀释至铝含量为 1mg/ml,调节 pH 值至 6.0~7.0,即为样品溶液。同一种铝佐剂不同批次的 pH 值应调节为固定值,以保证不同批次检测的批间一致性。

**10.2 牛血清白蛋白(简称 BSA)溶液** 取 BSA 适量,用 0.85%~0.90%氯化钠溶液配制成 10mg/ml 溶液,调节 pH 值与样品溶液 pH 值一致。

**10.3 测定法** 取 15m 离心管 5 支,分别加 BSA 溶液(10mg/ml) 0.08ml、0.16ml、0.4ml、0.8ml、1.2ml,并补 0.85%~0.90%氯化钠溶液至 4.0ml,混匀后,每管分别加入样品溶液 1.0ml,混匀,使各管 BSA 分别为 0.8mg、1.6mg、4mg、8mg、12mg,各管含铝为 1mg。

将上述各管室温放置 1 小时(期间每隔 10 分钟用力振摇 1 次)后,以 5000g 离心 10 分钟,收集上清液,采用福林酚法(Lowry 法)或 2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸法(BCA 法)或其他适宜方法测定各管上清液中游离 BSA 含量,记录各管吸光度值并计算蛋白质含量,以各管上清液游离的 BSA 含量对应其 BSA 总量计算各管吸附率。上清液体积按 5ml 计算。

$$\text{吸附率}(\%) = \left( \frac{\text{牛血清白蛋白总量} - \text{上清游离蛋白含量}}{\text{牛血清白蛋白总量}} \right) * 100$$

**10.4 结果判定** BSA 含量为 0.8mg、1.6mg 的 2 管上清蛋白质应为未检出或吸附率应不低于 90%;且 BSA 含量为 4mg、8mg、12mg 各管吸光度值应呈总体递增趋势(如吸光度值无法判定,需通过检测上清蛋白质含量判定其总体递增趋势),吸附率判为合格。

如供试品铝含量低于 1mg/ml,可按适当比例调整上述各管铝含量和 BSA 含量后进行。结果判定以每 1mg 铝吸附 1.6mg BSA 的吸附率应不低于 90%或上清蛋白质未检出,且每 1mg 铝与更高浓度 BSA 吸附时,随 BSA 含量的递增各管吸光度值应呈总体递增趋势(如吸光度值无法判定,需通过检测上清蛋白质含量判定其呈总体递增趋势),吸附率判为合格。

附注:

**1 氢氧化铝胶中的铝含量计算(举例)** 若根据氧化铝含量为 1.9%,计算出铝含量为 10 mg/ml。

计算方法: 1.9%氧化铝含量理论是指 100g(约为 100ml)产品含 Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 有 1.9g。

1.9/102=Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的摩尔量=0.0186mol

0.0186\*54=铝元素的重量=1.006g

1.006\*1000/100=铝的含量浓度 mg/ml=10.06mg/ml,即铝含量约为 10mg/ml。

**2 福林酚法(Lowry 法)** 本法系依据蛋白质分子中含有的肽键在碱性溶液中与 Cu<sup>2+</sup>螯合形成蛋白质-铜复合物,此复合物使酚试剂的磷钼酸还原,产生蓝色化合物,同时在碱性条件下酚试剂易被蛋白质中酪氨酸、色氨酸、半胱氨酸还原呈蓝色反应。在一定范围内其颜色深浅与蛋白质浓度呈正比,以蛋白质对照品溶液作标准曲线采用比色法测定供试品中蛋白质的含量。本法灵敏度高,测定范围为 20~250μg。但对本法产生干扰的物质较多,对双缩脲反应产生干扰的离子,同样容易干扰福林酚反应,且影响更大。如还原物质、酚类、枸橼酸、硫酸铵、三羟甲基氨基甲烷缓冲液、甘氨酸、糖类、甘油等均有干扰作用。

除另有规定外，按方法 2.1 操作；如有干扰物质时，除另有规定外，按方法 2.2 操作并需经方法学验证。

## 方法 2.1

### 2.1.1 溶液配制

2.1.1.1 碱性铜试液 取氢氧化钠 10g，碳酸钠 50g，加水 400ml 使溶解，作为甲液；取酒石酸钾 0.5g，加水 50ml 使溶解，另取硫酸铜 0.25g，加水 30ml 使溶解，将两液混合作为乙液。临用前，合并甲、乙液，并加水至 500ml。

2.1.2 对照品溶液的制备 除另有规定外，取血清白蛋白（牛）对照品或蛋白质含量测定国家标准品，加水溶解并制成每 1ml 中含 0.2mg 的溶液。

2.1.3 供试品溶液的制备 照各品种项下规定的方法制备（蛋白质浓度应与对照品溶液基本一致）。

2.2 测定法 精密量取对照品溶液 0.0ml、0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1.0ml（对照品溶液取用量可在本法测定范围内进行适当调整），分别置具塞试管中，各加水至 1.0ml，再分别加入碱性铜试液 1.0ml，摇匀，室温放置 10 分钟，各加入福林酚试液[取福林试液中的贮备液（2mol/L 酸浓度）1→16]4.0ml，立即混匀，室温放置 30 分钟，照紫外-可见分光光度法，在 650nm 的波长处测定吸光度；同时以 0 号管作为空白。以对照品溶液浓度与其相对应的吸光度计算线性回归方程。另精密量取供试品溶液适量，同法测定。从线性回归方程计算供试品溶液中的蛋白质浓度，并乘以稀释倍数，即得。

**方法 2.2；** 测定前将脱氧胆酸盐-三氯醋酸加入样品中，通过将蛋白质沉淀来去除干扰物质。这种方法也可用于将稀溶液中的蛋白质浓集。

### 2.2.1 溶液配制

2.2.1.1 试液 A 取 1%氢氧化钠溶液 200ml 与 5%碳酸钠溶液 200ml 混合，加水稀释至 500ml。

2.2.1.2 试液 B 取 2.98%二水合酒石酸二钠溶液 100ml 与 1.25%硫酸铜溶液 100ml 混合，加水稀释至 250ml，临用新制。

2.2.1.3 试液 C 取试液 A 与试液 B 按 50:1 的比例混合，临用新制。

2.2.1.4 福林酚试液 取福林试液中的贮备液（2mol/L 酸浓度）1→2（所配得的福林酚试液应满足以下要求：取供试品溶液 1ml，加试液 C 5ml 和配好的福林酚试液 0.5ml，所得溶液的 pH 值应为 10.3±0.3。若溶液 pH 值超出范围，应适当调整福林酚试液的稀释倍数）。

2.2.1.5 去氢胆酸钠试液 取去氢胆酸钠适量，加水制成每 1ml 中含 1.5mg 的溶液。

2.2.1.6 对照品溶液的制备 除另有规定外，取血清白蛋白（牛）对照品或蛋白质含量测定国家标准品适量，加水分别制成每 1ml 中含 0.00mg、0.01mg、0.02mg、0.03mg、0.04mg、0.05mg 的溶液（对照品溶液浓度可在本法测定范围内进行适当调整）。

2.2.2 测定法 精密量取各对照品溶液 1.0ml，分别置玻璃试管中，加入去氧胆酸钠试液 0.1ml，涡旋混匀，室温放置 10 分钟，加入 72%三氯醋酸溶液 0.1ml，涡旋混匀，在 3000g 条件下离心 30 分钟，轻轻倒出上清液，用吸管将剩余液体移除。蛋白质沉淀用试液 C 1ml 复溶后，再加入试液 C 5ml，混匀，室温放置 10 分钟，加入福林酚试液 0.5ml，立即混匀，室温放置 30 分钟，照紫外-可见分光光度法，在 750nm 的波长处测定吸光度；同时以 0 号管作为空白。以对照品溶液浓度与其相对应的吸光度计算线性回归方程。另精密量取供试品溶液 1.0ml，同法测定。从线性回归方程计算供试品溶液中的蛋白质浓度并乘以稀释倍数，即得。

**3 2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸法(BCA法)** 本法系依据蛋白质分子在碱性溶液中将  $\text{Cu}^{2+}$  还原为  $\text{Cu}^+$ , 2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸(BCA)与  $\text{Cu}^+$ 结合形成紫色复合物,在一定范围内其颜色深浅与蛋白质浓度呈正比,以蛋白质对照品溶液作标准曲线,采用比色法测定供试品中蛋白质的含量。本法灵敏度较高,测定范围可达 80~400 $\mu\text{g}$ 。本法测定的供试品中不能有还原剂和铜螯合物,否则干扰测定。

### 3.1 溶液配制

**3.1.1 铜-BCA 试液制备** 取 2,2'-联喹啉-4,4'-二羧酸钠 1g,无水碳酸钠 2g,酒石酸钠 0.16g,氢氧化钠 0.4g 与碳酸氢钠 0.95g,加水使溶解成 100ml,调节 pH 值至 11.25,作为甲液;另取 4%硫酸铜溶液作为乙液。临用前取甲液 100ml,加入乙液 2ml,混匀,即得。

**3.1.2 对照品溶液的制备** 除另有规定外,取血清白蛋白(牛)对照品或蛋白质含量测定国家标准品,加水溶解并制成每 1ml 中含 0.8mg 的溶液。

**3.1.3 供试品溶液的制备** 照各品种项下规定的方法制备(蛋白质浓度应与对照品溶液基本一致)。

**3.2 测定法** 精密量取对照品溶液 0.0ml、0.1ml、0.2ml、0.3ml、0.4ml、0.5ml(对照品溶液取用量可在本法测定范围内进行适当调整),分别置具塞试管中各加水至 0.5ml,再分别加入铜-BCA 试液 10.0ml,立即混匀,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中保温 30 分钟,放冷,照紫外-可见分光光度法,立即在 562nm 的波长处测定吸光度;同时以 0 号管作为空白。以对照品溶液浓度与其相对应的吸光度计算线性回归方程。另精密量取供试品溶液适量,同法测定。从线性回归方程计算供试品溶液中的蛋白质浓度,并乘以稀释倍数,即得。

此法亦可采用商品化试剂盒。

## 3604 兽用液体疫苗塑料瓶质量标准(标准草案)

### 3604 兽用液体疫苗塑料瓶质量标准

本标准适用于以高密度聚乙烯(HDPE)或聚丙烯(PP)为主要原料,采用注吹成型工艺生产的兽用液体疫苗塑料瓶。

**1 外观** 取本品 20 个,在自然光线明亮处,正视目测。应具有均匀一致的色泽,不得有明显色差。瓶的表面应光洁、平整,不得有变形和明显的擦痕。不得有砂眼、油污、气泡。瓶口应平整、光滑。

**2 鉴别** 取本品 5 个,按下列方法进行检验。

**2.1 红外光谱** 取本品适量,敷于微热的溴化钾晶片上,按红外分光光度法(《中国药典》一部通则 0402)进行测定,本品的红外光吸收图谱应与对照的图谱基本一致。

**2.2 密度** 取本品 2.0g,加水 100ml,回流 2 小时,放冷,80 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 2 小时后,精密称定( $W_a$ )。再置适宜的溶剂(密度为  $d$ )中,精密称定( $W_s$ )。按下式计算:

$$\text{密度} = \frac{W_a}{W_a - W_s} \times d$$

注: HDPE 的密度应为 0.935~0.965 $\text{g}/\text{cm}^3$ ; PP 的密度应为 0.90~0.915 $\text{g}/\text{cm}^3$ 。

**3 密封性** 取本品 20 个,分别在瓶内装入适量玻璃珠,旋紧瓶盖(带有螺旋盖的试瓶用测力扳手将瓶与盖旋紧,扭力见表 1)或经封盖装置封盖后置于带抽气装置的容器中,用水浸没,抽真空至真空度为 27 kPa,维持 2 分钟,瓶内不得有进水或冒泡现象。

表 1 疫苗瓶与盖的扭力

盖直径(mm)	扭力(N·cm)
15~20	25~110

21~30	25~145
31~40	25~180

**4 抗跌性** 取本品 10 个,加水至标示容量,从规定高度(表 2)自然跌落至水平刚性光滑表面,不得破裂。

**表 2 跌落高度**

规格 (ml)	跌落高度 (m)
<120	1.2
≥120	1.0

**5 水蒸气渗透** 取本品 10 个,在瓶中加水至标示容量,盖紧瓶盖,加铝盖后,精密称重。在相对湿度 65%±5%和温度 20°C±2°C条件下,放置 14 日,取出后,再精密称重。按下式计算,重量损失不得超过 0.2%。

$$\text{水蒸气渗透量}\% = \frac{W_1 - W_2}{W_1 - W_0} \times 100\%$$

式中:  $W_1$ ——试验前液体瓶及水溶液的重量, g;

$W_0$ ——空液体瓶的重量, g;

$W_2$ ——试验后液体瓶及水溶液的重量, g。

**6 溶出物试验** 取本品 5 个,按下列方法进行检验。

**6.1 溶出物试液的制备** 分别取本品平整部分内表面积 600cm<sup>2</sup>(分割成长 5.0cm,宽 0.3cm 的小片)3 份置具塞锥形瓶中,加水适量,振摇洗涤小片,弃去水,重复操作 1 次。在 30~40°C干燥后,分别用水(70°C±2°C)、65%乙醇(70°C±2°C)和正己烷(58°C±2°C)各 200ml 浸泡,24 小时后,取出放冷至室温。用同批试验用溶剂补充至原体积作为浸出液,以同批水、65%乙醇、正己烷为空白液,进行下列试验。

**6.2 溶液澄清度** 取水浸液 20ml 置纳氏比色管中,按澄清度检查法(《中国兽药典》一部通则 0902)进行测定,溶液应澄清;如显浑浊,与 2 号浊度标准液比较,不得更浓。

**6.3 重金属** 精密量取水浸液 20ml,加醋酸盐缓冲液(pH 值 3.5) 2.0ml,按重金属检查法(《中国兽药典》一部通则 0821)进行测定,应不得超过百万分之一。

**6.4 pH 值** 取水浸液与水空白液各 20ml,分别加入氯化钾溶液(1→1000) 1.0ml,按 pH 值测定法(附录 3101)测定,二者之差不得超过 1。

**6.5 紫外吸光度:**除另有规定外,取水浸液适量,以水空白液为对照,按紫外-可见分光光度法(《中国兽药典》一部通则 0401)进行测定,220~360nm 波长间的最大吸光度不得超过 0.1。

**6.6 易氧化物** 精密量取水浸液 20ml,精密加入高锰酸钾滴定液(0.002mol/L) 20ml 与稀硫酸 1.0ml,煮沸 3 分钟,迅速冷却,加入碘化钾 0.1g,在暗处放置 5 分钟,用硫代硫酸钠滴定液(0.01mol/L)滴定,滴定至近终点时,加入淀粉指示液 0.25ml,继续滴定至无色,另取水空白液同法操作,二者消耗滴定液之差不得超过 1.5ml。

**6.7 不挥发物** 分别精密量取水、65%乙醇、正己烷浸出液与空白液各 50ml 置于已恒重的蒸发皿中,水浴蒸干,105°C干燥 2 小时,冷却后,精密称定,水浸液残渣与其空白液残渣之差不得超过 12.0mg;65%乙醇浸液残渣与其空白液残渣之差不得超过 50.0mg;正己烷浸液残渣与其空白液残渣之差不得超过 75.0mg。

**7 炽灼残渣试验** 取本品 5 个,称取 2.0g,按炽灼残渣检查法(《中国兽药典》一部通则 0841)进行测定,遗留残渣不得超过 0.1%。(含遮光剂的瓶炽灼残渣不得超过 3.0%)。

**8 脱色试验** 着色瓶分别取 5 个试瓶表面积 50cm<sup>2</sup>(以内表面计),剪成 2.0cm×0.3cm

小片，分置3个具塞锥形瓶中，分别加入4%醋酸溶液（60℃±2℃，2小时），65%乙醇溶液（25℃±2℃，2小时），正己烷（25℃±2℃，2小时）各50ml浸泡，以同批4%醋酸溶液、65%乙醇溶液、正己烷为空白液，浸泡液颜色不得深于空白液。白色瓶不作此项检验。

**9 微生物限度** 取本品10个，每瓶加入1/2标示容量的氯化钠注射液，将盖盖紧，振摇1分钟，取提取液进行薄膜过滤，按非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法（《中国兽药典》一部附录1105）测定，细菌数每瓶不得超过100个，霉菌、酵母菌数每瓶不得超过100个；按非无菌产品微生物限度检查：控制菌检查法（《中国兽药典》一部附录1106）测定，大肠杆菌每瓶不得检出。

**10 异常毒性试验** 取本品10个，将试瓶用水清洗干净，干燥后，取1000cm<sup>2</sup>（以内表面积计），剪碎，其中500cm<sup>2</sup>加入氯化钠注射液50ml；另500cm<sup>2</sup>加入兽用白油50ml。经110℃湿热灭菌30分钟后取出，冷却备用。氯化钠注射液浸液静脉注射；兽用白油浸液肌肉注射。按异常毒性检查法（《中国兽药典》一部通则1141）进行测定，应符合规定。

## 3605 注射用白油（轻质矿物油）质量标准（标准草案）

### 3605 注射用白油（轻质矿物油）质量标准

本品系自石油中制得的多种液状烃的混合物。

**1 性状** 无色透明、无臭、无味的油状液体，在日光下不显荧光。

**1.1 相对密度** 本品的相对密度（《中国兽药典》一部通则0601）为0.805~0.880。

**1.2 黏度** 在40℃时，本品的运动黏度（附录3102，毛细管内径为1.0mm）应为4~13mm<sup>2</sup>/s。

**2 酸度** 取本品5.0ml，加中性乙醇5.0ml，煮沸，溶液遇湿润的石蕊试纸应显中性反应。

**3 稠环芳烃** 取供试品25.0ml，置125ml分液漏斗中，加正己烷25ml，混匀（注意：正己烷预先用五分之一体积的二甲亚砷洗涤2次，使用无润滑油、无水的塞子，或者使用配备高聚物塞子的分液漏斗）；加二甲亚砷5.0ml，强力振摇1分钟，静置分层；下层分至另一分液漏斗中，再加正己烷2.0ml，强力振摇使均匀，静置分层，取下层作为供试品溶液，按紫外-可见分光光度法（《中国兽药典》一部通则0401），在260~420nm波长范围内测定供试品溶液的吸光度。以5.0ml二甲亚砷与25ml正己烷置分液漏斗中强力振摇1分钟，静置分层后的下层作为空白溶液。其最大吸光度不得超过0.10。

**4 固形石蜡** 取本品在105℃干燥2小时，置干燥器中冷却后，装满于内径约25mm的具塞试管中，密塞，在0℃冰水中冷却4小时，溶液应清亮；如果发生混浊，与同体积的对照溶液[取盐酸滴定液（0.01mol/L）0.15ml，加稀硝酸6.0ml与硝酸银试剂1.0ml，加水至50ml]比较，不得更浓。

**5 易碳化物** 取本品5.0ml，置长约160mm、内径25mm的具塞试管中，加硫酸（含H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>94.5%~95.5%）5.0ml，置沸水浴中，30秒后迅速取出，加塞，用手指按紧，上下强力振摇3次，振幅应在12cm以上，但时间不得超过3秒，振摇后置回水浴中，每隔30秒再取出，如上法振摇，自试管浸入水浴中起，经过10分钟后取出，静置分层，石蜡层不得显色；酸层如果显色，与对照溶液（取比色用重铬酸钾溶液1.5ml，比色用氯化钴溶液1.3ml，比色用硫酸铜溶液0.5ml与水1.7ml，加本品5.0ml制成）比较，颜色不得更深。

**6 重金属** 含重金属应不超过百万分之十（附注1）。按重金属检查法（《中国兽药典》

一部通则 0821) 进行测定, 应不超过百万分之五。

**7 铅** 含铅应不超过百万分之一(附注 2)。

**8 砷** 含砷应不超过百万分之一(附注 3)。

按砷盐检查法(《中国兽药典》一部通则 0822) 进行测定, 应不超过千万分之八。

**附注:**

**1 重金属含量测定法** 取本品 1.0g, 置瓷坩埚中, 缓缓炽灼至完全炭化, 置冷; 加硫酸 0.5~1.0ml 使其湿润, 低温加热至硫酸蒸气除尽后, 在 500~600°C 炽灼使完全灰化, 置冷, 加硝酸 0.5ml, 蒸干, 至氧化氮蒸气除尽后, 置冷, 加盐酸 2.0ml, 置水浴上蒸干后加水 15ml, 滴加氨试液至对酚酞指示液显中性, 再加醋酸盐缓冲液(pH 值 3.5) 2.0ml, 微热溶解后, 移到纳氏比色管甲中, 加水稀释成 25ml, 另取配制供试品溶液的试剂, 置瓷皿中蒸干后, 加醋酸盐缓冲液(pH 值 3.5) 2.0ml 与水 15ml, 微热溶解后, 移置纳氏比色管乙中, 加标准铅溶液 1.0ml, 再用水稀释成 25ml, 在甲乙两管中分别加硫代乙酰胺试液各 2.0ml, 摇匀, 静置 2 分钟, 同置白色背景上。自上而下透视, 甲管中显出的颜色与乙管比较, 不得更深。

**标准铅溶液的制备** 称取硝酸铅 0.1598g, 置 100ml 容量瓶中, 加硝酸 5.0ml 与水 50ml 溶解后, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为贮备液。

临用前精密量取贮备液 10ml, 置 100ml 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1.0ml 相当于 10 $\mu$ g 的 Pb)。

**2 铅含量测定法** 取本品 5.0g 置瓷坩埚中, 加入适量硫酸湿润供试品, 缓缓炽灼至完全炭化, 加 2.0ml 硝酸和 5 滴硫酸, 缓缓加热至白色烟雾挥尽, 在 550°C 炽灼使完全炭化, 置冷, 加 1.0ml 硝酸溶液(1 $\rightarrow$ 2), 加热使灰分溶解, 并移置 50ml 量瓶中(必要时滤过), 并用少量水洗涤坩埚, 洗液并入量瓶中, 加水至刻度, 摇匀。每 10ml 供试液相当于供试品 1.0g。

**测定** 精密量取供试液 50ml 和标准铅溶液 5.0ml, 分别置 125ml 分液漏斗中, 各加 1% 硝酸 20ml, 各加 50% 柠檬酸氢二铵溶液 1.0ml、20% 盐酸羟胺溶液 1.0ml 和酚红指示液 2 滴, 滴加氢氧化铵溶液(1 $\rightarrow$ 2) 使成红色, 再各加 10% 氰化钾溶液 2.0ml, 摇匀, 加双硫脲溶液, 强烈振摇 1 分钟, 静置使分层, 氯仿层经脱脂棉滤过, 目视或按紫外-可见分光光度法(《中国兽药典》一部通则 0401), 在 510nm 的波长处以氯仿为空白测定吸光度, 供试液的颜色或吸光度不得超过标准溶液的颜色或吸光度。

**标准铅溶液的制备** 取硝酸铅 0.1598g, 置 100ml 容量瓶中, 加硝酸 5.0ml 与水 50ml 溶解后, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为贮备液。

临用前精密量取贮备液 10ml, 置 100ml 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得(每 1.0ml 相当于 10 $\mu$ g 的 Pb)。

**20% 盐酸羟胺溶液制备** 取盐酸羟胺 20g, 加水 40ml 使溶解, 加酚红指示液 2 滴, 滴加氢氧化铵溶液(1 $\rightarrow$ 2) 使溶液由黄色变为红色后再加 2 滴(pH 值 8.5~9.0), 用双硫脲氯仿溶液提取数次, 每次 10~20ml, 直至氯仿层无绿色, 再用氯仿洗涤 2 次, 每次 5.0ml, 弃去氯仿层, 水层加盐酸溶液(1 $\rightarrow$ 2) 使呈酸性, 加水至 100ml, 即得。

**50% 柠檬酸氢二铵制备** 取柠檬酸氢二铵 100g, 加水 100ml 使溶解, 加酚红指示液 2 滴, 滴加氢氧化铵溶液(1 $\rightarrow$ 2) 使溶液由黄色变为红色后再加 2 滴(pH 值 8.5~9.0), 用双硫脲氯仿溶液提取数次, 每次 10~20ml, 直至氯仿层无绿色, 再用氯仿洗涤 2 次, 每次 5.0ml, 弃去氯仿层, 水层加盐酸溶液, 加水至 200ml, 即得。

**双硫脲溶液制备** 取 0.05% 氯仿溶液作为贮备液(冰箱中保存),必要时按下述方法纯化。

取已研细的双硫脲 0.5g, 加氯仿 50ml 使溶解(必要时滤过), 置 250ml 分液漏斗中, 用氢氧化铵溶液(1→100)提取 3 次, 每次 100ml, 将提取液用棉花滤过, 滤液并入 500ml 分液漏斗中, 加盐酸溶液(1→2)使呈酸性, 将沉淀出的双硫脲用 222ml、200ml、100ml 氯仿提取 3 次, 合并氯仿层即为双硫脲贮备液。

取双硫脲贮备液 1.0ml, 加氯仿 9.0ml, 混匀, 按紫外-可见分光光度法(《中国兽药典》一部通则 0401), 在 510nm 的波长处以氯仿为空白测定吸光度(A), 用如下公式算出配制 100ml 双硫脲溶液(70%透光率)所需双硫脲贮备液的体积(V)。

$$V = \frac{10(2 - \lg 70)}{A} = \frac{1.55}{A} \quad (\text{ml})$$

用前取通过上面公式计算出的双硫脲贮备液的毫升数, 置 100ml 量瓶中, 加氯仿至刻度, 摇匀, 即得。

**3 砷含量测定法** 取本品 5.0g, 置瓷坩埚中, 加 15% 硝酸镁溶液 10ml, 其上覆盖氧化镁粉末 1.0g, 混匀, 浸泡 4 小时, 置水浴上蒸干, 缓缓炽灼至完全炭化, 在 550°C 炽灼使完全灰化, 冷却, 加适量水湿润灰分, 加酚酞指示液 1 滴, 缓缓加入盐酸溶液(1→2)至酚酞红色褪去, 定量转移到 50ml 量瓶中(必要时滤过), 并用少量水洗涤坩埚 3 次, 洗液并入量瓶中, 加水至刻度, 摇匀。每 10ml 供试品溶液相当于供试品 1.0g。

**仪器装置** 如图 1。A 为 100~150ml 19 号标准磨口锥形瓶。B 为导气管, 管口为 19 号标准口, 与锥形瓶 A 密合时不应漏气, 管尖直径 0.5~1.0mm, 与吸收管 C 接合部为 14 号标准口, 插入后, 管尖距管 C 底为 1.0~2.0 mm。C 为吸收管, 管口为 14 号标准口, 5.0ml 刻度, 高度不低于 8.0cm。吸收管的质料应一致。

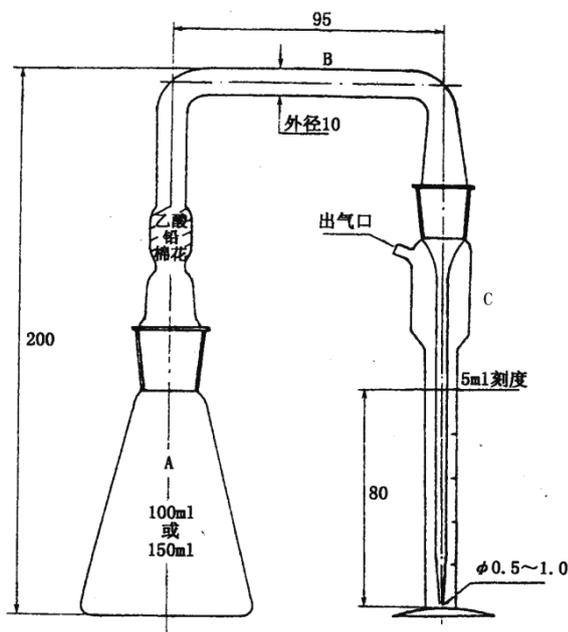


图 1 砷含量测定装置示意图

**测定** 精密吸取 50ml 和标准砷溶液 5.0ml, 分别置 A 瓶中, 加硫酸至 5.0ml, 加水至 50ml, 加 15% 碘化钾溶液 3.0ml, 混匀, 静置 5 分钟。加 40% 氯化亚锡溶液 1.0ml, 混匀, 静置 15 分钟, 加入无砷锌粒 5.0g, 立即塞上装有醋酸铅棉花的导气管 B, 并使导气管 B 的

尖端插入盛有 5.0ml 吸收液的吸收管 C 中，室温置 1 小时，取下吸收管 C，用三氯甲烷将吸收液体积补充至 5.0ml。目视或按紫外—可见分光光度法（《中国兽药典》一部通则 0401），在 515nm 的波长处测定吸光度，供试液的颜色或吸光度不得超过标准溶液的颜色或吸光度。

**标准砷溶液的制备** 称取 0.1320g 于硫酸干燥器中干燥至恒重的三氧化二砷（ $As_2O_3$ ），置 1000ml 量瓶中，加氢氧化钠溶液（1→5）5.0ml 溶解后，加 1.0mol/L 硫酸溶液 25ml，用新煮沸的冷水稀释至刻度，摇匀，作为贮备液。

临用前精密量取 10ml 置 1000ml 量瓶中，加 10mol/L 硫酸溶液 10ml，用新煮沸的冷水稀释至刻度，摇匀，即得（每 10ml 相当于 1.0 $\mu$ g 的 As）。

标准草案 yaodianbanshengyao

## ●3700 试剂、试液、培养基

### 3701 标准溶血比色液配制法（标准草案）

#### 3701 标准溶血比色液配制法

1 1.5%溶血液的配制 取洗涤过的沉淀红细胞 0.15ml, 加入注射用水 8.85ml, 使红细胞完全溶解, 再加入 8.5%氯化钠溶液 1.0ml。

2 1.5%红细胞悬液的配制 按附录 3702 制备。

3 标准溶血比色液配制法 (见下表)

单位: ml

成分	溶血比 (%)										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
生理盐水	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
1.5%溶血素	—	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40	0.45	0.50
1.5%红细胞悬液	0.50	0.45	0.40	0.35	0.30	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	—

### 3702 红细胞悬液制备法（标准草案）

#### 3702 红细胞悬液制备法

在兽用生物制品检验中, 具有血凝性的病毒 (抗原) 血凝价测定 (红细胞凝集试验法) 及其抗血清血凝抑制效价测定 (红细胞凝集抑制试验法)、病毒类疫苗毒种和病毒类活疫苗成品外源病毒检验、COFAL 试验等均需使用红细胞悬液。本方法以 15ml 尖底离心管进行离心为例, 列举了以下常用红细胞悬液的制备方法。

1 鸡红细胞悬液的配制 将 2~6 月龄 SPF 鸡的血液, 与等量阿氏液混合, 然后用 PBS (0.1mol/L, pH 值 7.0~7.2, 下同) 洗涤 3~4 次, 每次以 1500r/min 离心 5~10 分钟, 将沉积的红细胞用 PBS 配制成一定比例的红细胞悬液。

2 豚鼠红细胞悬液的配制 将体重 350g 以上豚鼠血液, 与等量阿氏液混合, 用乳依液或乳汉液 PBS 反复洗涤 3 次, 每次以 1800r/min 离心 10 分钟, 最后将沉积的红细胞配制成一定比例的红细胞悬液。

3 绵羊红细胞悬液的配制 将公绵羊血液, 脱纤后, 用 PBS 洗涤 3 次, 每次以 2000r/min 离心 10 分钟, 最后取沉积的红细胞配制成一定比例的红细胞悬液。

4 人 O 型红细胞悬液的配制 将人 O 型红细胞悬液以 2000r/min 离心 10 分钟, 弃上清液; 用 PBS 洗涤红细胞 3 次, 每次以 2000r/min 离心 10 分钟, 最后将沉积的红细胞配制成一定比例的红细胞悬液。

5 猪红细胞悬液的配制 将 2~6 月龄猪血液, 与等量阿氏液混合, 用 PBS 反复洗涤 3 次, 每次以 2000r/min 离心 10 分钟, 最后将沉积的红细胞配制成一定比例的红细胞悬液。

6 红细胞悬液的标定（以 1%鸡红细胞悬液为例） 对首次配制的 1%鸡红细胞悬液应进行标定。取配好的红细胞悬液 60ml，自然沉淀后，弃掉上部 PBS 50ml，混匀后装入刻度离心管内，以 10000r/min 离心 5 分钟，红细胞压积应为 6.0%。

### 3703 缓冲溶液配制法（标准草案）

#### 3703 缓冲溶液配制法

##### 1 0.15mol/L 磷酸缓冲液的配制

甲液 0.15mol/L 磷酸氢二钠溶液

磷酸氢二钠 21.3g

纯化水 加至 1000ml

乙液 0.15mol/L 磷酸二氢钾溶液

磷酸二氢钾 20.42g

纯化水 加至 1000ml

如果用含结晶水的磷酸盐，则称量时要按带水的摩尔质量乘以 0.15 称量。

表 1 各种 pH 值缓冲液的配制比例表（100ml 缓冲液）

pH 值	甲液 (ml)	乙液 (ml)	pH 值	甲液 (ml)	乙液 (ml)
5.2	1.8	98.2	7.0	61.1	38.9
5.4	3.6	96.4	7.2	72.0	28.0
5.6	5.2	94.8	7.6	87.0	13.0
5.8	8.4	91.6	8.2	97.0	3.0
6.4	27.0	73.0			

配毕，测 pH 值，经 121°C 灭菌 30 分钟，备用。

##### 2 0.15mol/L 磷酸缓冲盐水的配制（以 pH 值 7.6 为例，参照表 1）

甲液 87.0ml

乙液 13.0ml

氯化钠 0.85g

其他 pH 值溶液的配制参照此法，配毕，测 pH 值。经 121°C 灭菌 30 分钟，备用。

##### 3 1/15mol/L 磷酸缓冲液的配制

甲液 1/15mol/L 磷酸二氢钾溶液

磷酸二氢钾 9.074g

纯化水 加至 1000ml

乙液 1/15mol/L 磷酸氢二钠溶液

磷酸氢二钠 9.465g

纯化水 加至 1000ml

如果用含结晶水的磷酸盐，则称量时要按带水的摩尔质量除以 15 称量。

表 2 各种 pH 值磷酸缓冲液的配制比例表（100ml 缓冲液）

pH 值	甲液 (ml)	乙液 (ml)	pH 值	甲液 (ml)	乙液 (ml)
6.2	82.0	18.0	7.4	19.0	81.0

6.4	73.0	27.0	7.6	13.2	86.8
6.6	63.0	37.0	7.8	8.5	91.5
6.8	51.0	49.0	8.0	5.6	94.4
7.0	37.0	63.0	8.2	3.2	96.8
7.2	27.0	73.0	8.4	2.0	98.0

配毕，测 pH 值，经 121℃灭菌 30 分钟，备用。

#### 4 1/15mol/L 磷酸缓冲盐水的配制（以 pH 值 8.0 为例，参照表 2）

甲液	5.6ml
乙液	94.4ml
氯化钠	0.85g

其他 pH 值磷酸缓冲盐水的配制依照此法，配毕，经 121℃灭菌 30 分钟，备用。

#### 5 0.2mol/L 磷酸缓冲液的配制

甲液 0.2mol/L 磷酸氢二钠溶液

磷酸氢二钠	28.4g
纯化水	加至 1000ml

乙液 0.2mol/L 磷酸二氢钠溶液

磷酸二氢钠	24.0g
纯化水	加至 1000ml

如果用含结晶水的磷酸盐，则称量时要按带水的摩尔质量乘以 0.2 称量。

表 3 各种 pH 值磷酸缓冲液的配制比例表（100ml 缓冲液）

pH 值	甲液 (ml)	乙液 (ml)	pH 值	甲液 (ml)	乙液 (ml)
5.8	8.0	92.0	7.0	61.0	39.0
6.0	12.3	87.7	7.2	72.0	28.0
6.2	18.5	81.5	7.4	81.0	19.0
6.4	26.5	73.5	7.6	87.0	13.0
6.6	37.5	62.5	7.8	91.5	8.5
6.8	49.0	51.0	8.0	94.7	5.3

配毕，测 pH 值，经 121℃灭菌 30 分钟，备用。

#### 6 0.2mol/L 磷酸缓冲盐水的配制（以 pH 值 7.2 为例，参照表 3）

甲液	72.0ml
乙液	28.0ml
氯化钠	0.85g

其他 pH 值磷酸缓冲盐水的配制参照此法，配毕，测 pH 值。经 121℃灭菌 30 分钟，备用。

注：如果需要其他摩尔浓度的磷酸缓冲液和磷酸缓冲盐水，可根据上述 6 种配制方法作不同倍数稀释即可。

#### 7 0.2mol/L 醋酸缓冲液的配制

甲液 0.2mol/L 醋酸钠溶液

醋酸钠（含 3 个结晶水）	27.22g
纯化水	加至 1000ml

乙液 0.2mol/L 冰醋酸溶液

冰醋酸 11.46ml  
 纯化水 加至 1000ml

**表 4 各种 pH 值醋酸缓冲液的配制比例表 (10ml 缓冲液)**

pH 值	甲液 (ml)	乙液 (ml)	pH 值	甲液 (ml)	乙液 (ml)
3.6	0.75	9.25	4.8	5.9	4.1
3.8	1.20	8.80	5.0	7.0	3.0
4.0	1.80	8.20	5.2	7.9	2.1
4.2	2.65	7.35	5.4	8.6	1.4
4.4	3.70	6.30	5.6	9.6	0.4
4.6	4.90	5.10	5.8	9.4	0.6

配毕, 测 pH 值, 经 121°C 灭菌 30 分钟, 备用。

### 8 硼酸缓冲液

甲液 0.05mol/L 硼砂溶液  
 硼砂 (含 10 个结晶水) 19.07g  
 纯化水 加至 1000ml

乙液 0.2mol/L 硼酸溶液  
 硼酸 12.07g  
 纯化水 加至 1000ml

**表 5 各种 pH 值硼酸缓冲液的配制比例表 (10ml 缓冲液)**

pH 值	甲液 (ml)	乙液 (ml)	pH 值	甲液 (ml)	乙液 (ml)
7.4	1.0	9.0	8.2	3.5	6.5
7.6	1.5	8.5	8.4	4.5	5.5
7.8	2.0	8.0	8.7	6.0	4.0
8.0	3.0	7.0	9.0	8.0	2.0

配毕, 测 pH 值, 经 121°C 灭菌 30 分钟, 备用。

**9 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 值 9.5)** 称取无水碳酸钠 3.18g (如果用含 10 个结晶水的碳酸钠, 则称取 8.58g), 碳酸氢钠 5.88g, 加纯化水至 1000ml。

**10 0.02mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 值 9.5)** 取 0.1mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 值 9.5) 10.0ml, 加纯化水至 50.0ml。

### 11 0.05mol/L Tris 盐酸缓冲液

甲液 0.2mol/L Tris (三羟甲基氨基甲烷) 溶液  
 三羟甲基氨基甲烷 24.23g  
 纯化水 加至 1000ml

乙液 0.1mol/L 盐酸溶液  
 盐酸 8.33ml  
 纯化水 加至 1000ml

缓冲液配制 如果配制 0.05mol/L Tris 盐酸缓冲液 (pH 值 8.05, 23°C)

甲液 25.0ml  
 乙液 27.5ml  
 纯化水 加至 100ml

其他 pH 值的 Tris 盐酸缓冲液配制参照此法, 各种比例如表 6 所示。配毕, 测 pH 值, 经 121°C 灭菌 30 分钟, 备用。

表6 不同温度、各种 pH 值的 Tris 盐酸缓冲液的配制比例 (100ml 缓冲液)

pH 值		甲液	乙液	pH 值		甲液	乙液
23°C	37°C	(ml)	(ml)	23°C	37°C	(ml)	(ml)
9.10	8.95	25.0	5.0	8.05	7.90	25.0	27.5
8.92	8.78	25.0	7.5	7.96	7.82	25.0	30.0
8.74	8.60	25.0	10.0	7.87	7.73	25.0	32.5
8.62	8.48	25.0	12.5	7.77	7.63	25.0	35.0
8.50	8.37	25.0	15.0	7.66	7.52	25.0	37.5
8.40	8.27	25.0	17.5	7.54	7.40	25.0	40.0
8.32	8.18	25.0	20.0	7.36	7.22	25.0	42.5
8.23	8.10	25.0	22.5	7.20	7.05	25.0	45.0
8.14	8.00	25.0	25.0				

## 12 明胶缓冲液及明胶缓冲盐水

### 12.1 明胶缓冲液

明胶	2.0g
磷酸氢二钠 (含 12 个结晶水)	9.25g
磷酸二氢钠 (含 2 个结晶水)	8.34g
纯化水	加至 1000ml

### 12.2 明胶缓冲盐水

明胶	2.0g
磷酸氢二钠 (含 12 个结晶水)	2.4g
磷酸二氢钠 (含 2 个结晶水)	0.7g
氯化钠	6.8g
纯化水	加至 1000ml

将明胶蒸汽溶化后, 混合、煮开、滤过, 经 116°C 灭菌 30 分钟, 备用。

## 13 磷酸盐缓冲液

### 13.1 磷酸盐缓冲液 (pH 值 6.0)

磷酸氢二钾	2.0g
磷酸二氢钾	8.0g
纯化水	加至 1000ml

滤过, 以 116°C 灭菌 30 分钟, 即得。

### 13.2 磷酸盐缓冲液 (pH 值 7.8)

磷酸氢二钾	5.59g
磷酸二氢钾	0.41g
纯化水	加至 1000ml

滤过, 经 116°C 灭菌 30 分钟, 即得。

### 13.3 磷酸盐缓冲液 (pH 值 10.5)

磷酸氢二钾	35.0g
10mol/L 氢氧化钾溶液	2.0ml
纯化水	加至 1000ml

滤过, 经 116°C 灭菌 30 分钟, 即得。

## 3704 检验用培养基配制法（标准草案）

### 3704 检验用培养基配制法

1 普通肉汤 有新鲜培养基和干粉培养基两个配方，可任选其一。该培养基用于细菌类疫苗的检验。

配方一：

蛋白胨	10g
氯化钠	5.0g
牛肉汤 <sup>[附注1]</sup>	加至 1000ml

将上述成分混合，微热溶解后放至室温，调 pH 值至 7.4~7.6，滤过，分装，经 116℃ 灭菌 30 分钟，灭菌后培养基的 pH 值应为 7.2~7.4。

配方二：

蛋白胨	10g
牛肉浸粉	5.0g
酵母浸出粉	5.0g
氯化钠	5.0g
纯化水	加至 1000ml

将上述成分混合，微热溶解，将加热的培养基放至室温，调 pH 值至 7.4~7.6，分装，经 116℃ 灭菌 30 分钟，灭菌后培养基 pH 值为 7.2~7.4。

#### 2 普通琼脂（营养琼脂）

蛋白胨	10g
氯化钠	5.0g
琼脂	12g
牛肉汤 <sup>[附注1]</sup>	加至 1000ml

将上述成分混合，然后加热溶解。待琼脂完全溶化后，以氢氧化钠溶液调 pH 值至 7.4~7.6。以卵白澄清法（注 1）或凝固沉淀法（注 2）除去沉淀，分装，经 116℃ 灭菌 30 分钟。该培养基用于细菌类疫苗的检验。

##### 注 1：卵白澄清法

- （1）取鸡蛋白 2 个，加等量纯化水，充分搅拌，加至 1000ml 50℃ 左右的培养基中，搅匀。
- （2）置流通蒸汽锅内，加热 1 小时，使蛋白充分凝固。
- （3）取出，在蒸汽加温下以脱脂棉或滤纸滤过。

##### 注 2：凝固沉淀法

- （1）将调 pH 值后的琼脂培养基放入流通蒸汽锅中，通入少量蒸汽，经 1 小时左右后，使其逐渐冷却自行凝固。
- （2）待完全冷却后，将琼脂倾出，切去底层沉淀。
- （3）将上层透明部分，加热溶化后分装。

### 3 马丁肉汤

氯化钠	2.5g
猪胃消化液 <sup>[附注 2]</sup>	500ml
牛肉汤 <sup>[附注 1]</sup>	500ml

将上述成分混合，调 pH 值至 7.6~7.8，煮沸 20 分钟后，加入纯化水恢复至原体积，滤清，滤液应为澄清淡黄色，分装，经 116°C 灭菌 30~40 分钟，灭菌后培养基的 pH 值应为 7.2~7.6。该培养基用于细菌类疫苗的检验。

### 4 马丁琼脂

氯化钠	2.5g
琼脂	13g
猪胃消化液 <sup>[附注 2]</sup>	500ml
牛肉汤 <sup>[附注 1]</sup>	500ml

除琼脂外，将上述成分混合，调 pH 值至 7.6~7.8，加入琼脂，加热溶解，以卵白澄清法（注）除去沉淀，分装，经 116°C 灭菌 30~40 分钟，灭菌后培养基的 pH 值应为 7.2~7.6。该培养基适用于细菌类疫苗的检验。

#### 注：卵白澄清法

- （1）取鸡蛋白 2 个，加等量纯化水，充分搅拌，加至 1000ml 50°C 左右的培养基中，搅匀。
- （2）置流通蒸汽锅内，加热 1 小时，使蛋白充分凝固。
- （3）取出，在蒸汽加温下以脱脂棉或滤纸滤过。

### 5 缓冲肉汤

蛋白胨	20g
氯化钠	2.0g
磷酸氢二钠	1.0g
碳酸氢钠	2.0g
牛肉汤 <sup>[附注 1]</sup>	1000ml
葡萄糖（含 1 个结晶水）	2.0g

除葡萄糖、磷酸氢二钠和碳酸氢钠外，将上述成分混合，加热至 80~90°C，调 pH 值至 7.2 左右，徐徐加入磷酸氢二钠和碳酸氢钠，煮沸 90 分钟，静置 1 小时，滤过，分装，经 116°C 灭菌 30 分钟，灭菌后培养基 pH 值为 7.6~8.0。同时，将葡萄糖配成 50% 溶液，116°C 灭菌 15~30 分钟，在使用前加入。该培养基用于链球菌病疫苗安全检验等项目的检验。

### 6 含 1% 醋酸铊普通肉汤

蛋白胨	10g
氯化钠	5.0g
醋酸铊	10g
牛肉汤 <sup>[附注 1]</sup>	加至 1000ml

除醋酸铊外，将上述成分混合，微热溶解，将加热的培养基放至室温，调 pH 值至 7.4~

7.6, 滤过, 加入醋酸铊, 分装, 经 116°C 灭菌 30 分钟, 灭菌后培养基 pH 值为 7.2~7.4。该培养基用于沙门氏菌马流产活疫苗鉴别检验等项目的检验。

#### 7 4%甘油琼脂

蛋白胨	10g
氯化钠	5.0g
甘油	40g
琼脂	11~13g
牛肉汤 <sup>[附注 1]</sup>	加至 1000ml

除琼脂外, 将上述成分混合, 调 pH 值至 6.8~7.0, 加入琼脂, 加热溶解, 分装, 经 116°C 灭菌 30 分钟, 灭菌后培养基 pH 值为 6.6~6.8。该培养基用于鼻疽毒素效价测定等项目的检验。

#### 8 明胶培养基

明胶	230g
蛋白胨	10g
氯化钠	5.0g
牛肉汤 <sup>[附注 1]</sup>	加至 1000ml

取明胶加入牛肉汤中, 蒸汽加温溶解, 待明胶完全溶解后, 加入蛋白胨和氯化钠, 调 pH 值至 7.8~8.0。用卵白澄清法(同前)滤过, 分装, 经 116°C 灭菌 30 分钟, 灭菌后培养基 pH 值为 7.6~7.8, 置 2~8°C 保存。该培养基用于猪丹毒活疫苗鉴别检验等项目的检验。

#### 9 厌气肉肝汤

牛肉	250g
肝(牛、羊、猪)	250g
蛋白胨	10g
氯化钠	5g
葡萄糖(含 1 个结晶水)	2g
纯化水	加至 1000ml

取牛肉除去脂肪及筋膜, 绞碎, 与肝混合, 加入纯化水充分搅拌, 冷浸 20~24 小时。煮沸 50 分钟, 用滤布粗滤, 取出肝块待用。在滤液中加入蛋白胨和氯化钠加热溶解, 调 pH 值至 8.0~8.2, 加热煮沸 20 分钟。静置、滤过, 加入葡萄糖, 搅拌溶解。将煮过的肝块洗净, 切成小方块。用纯化水充分冲洗后, 称量, 重量约为分装肉肝汤量的 1/10。将滤液分装于含有肝块的适宜容器中(试管类容器, 加入适量液体石蜡; 非试管类容器, 不需加入液体石蜡), 经 116°C 灭菌 30 分钟, 灭菌后培养基 pH 值为 7.0~7.2。该培养基用于肉毒梭菌(C 型)中毒症灭活疫苗无菌检验等项目的检验。

#### 10 胰蛋白胨琼脂

胰蛋白胨	20g
氯化钠	5.0g
葡萄糖(含 1 个结晶水)	1.0g

琼脂	11~13g
纯化水	加至 1000ml

除葡萄糖外，将上述成分混合，加热溶解后加入葡萄糖，调 pH 值至 6.8~7.0。分装，经 116°C 灭菌 30~40 分钟，灭菌后培养基 pH 值为 6.6~6.8。该培养基用于布鲁氏菌病疫苗变异检验、活菌计数及布鲁氏菌菌落结晶紫染色法等项目的检验。

### 11 SS 琼脂

牛肉浸粉	5.0g
蛋白胨	5.0g
蛋白胨	10g
胆盐	2.5g
乳糖	10g
硫代硫酸钠	8.5g
柠檬酸钠	8.5g
柠檬酸铁	1.0g
1% 中性红溶液	2.5ml
0.01% 煌绿溶液	3.3ml
琼脂	12g
纯化水	加至 1000ml

除乳糖、1% 中性红溶液、0.01% 煌绿溶液和琼脂外，将上述成分混合，微热溶解，调 pH 值至 7.1~7.3。加入琼脂，加热溶解后，再加入其他成分，混匀，分装，经 116°C 灭菌 20~30 分钟，灭菌后培养基 pH 值为 6.9~7.1。该培养基用于禽沙门氏菌检验法等项目的检验。

### 12 麦康凯琼脂

蛋白胨	20g
乳糖	10g
氯化钠	5.0g
胆盐	5.0g
1% 中性红溶液	7.5ml
琼脂	11~13g
纯化水	加至 1000ml

除乳糖、1% 中性红溶液和琼脂外，将上述成分混合，微热溶解，调 pH 值至 7.2~7.6，加入琼脂，加热溶解，再加入其余成分，混匀，分装，经 116°C 灭菌 20~30 分钟，灭菌后培养基 pH 值为 7.0~7.4。该培养基用于禽沙门氏菌检验法等项目的检验。

### 13 蛋白胨水

蛋白胨	1.0g 或 10g
氯化钠	5.0g
纯化水	加至 1000ml

将上述成分混合，加热溶解，放至室温，调 pH 值至 7.0~7.4，分装，经 116°C 灭菌 30~

40 分钟，灭菌后培养基 pH 值为 6.8~7.2。1%蛋白胨水（含蛋白胨 10g）用于细菌类疫苗活菌计数等项目的检验，0.1%蛋白胨水（含蛋白胨 1.0g）用于检验稀释液。

**附注 1：牛肉汤**

牛肉	500g
纯化水	加至 1000ml

将牛肉切除脂肪、筋腱，绞碎，放入适宜容器中，加入纯化水，搅匀，置 2~8℃浸泡 18~20 小时。加热搅拌，至煮沸，并维持煮沸 60 分钟，用滤布粗滤，分装，经 116℃灭菌 30 分钟，冷却后置 2~8℃保存备用。

**附注 2：猪胃消化液**

猪胃	300g
盐酸	10~11ml
纯化水	加至 1000ml

将猪胃冲洗干净（清洗时注意保护胃膜），切除脂肪，绞碎，放入适宜容器中，加入 65℃左右纯化水混匀，用盐酸消化，调 pH 值至 1.7~2.0，使消化液维持在 52~54℃，消化 18~24 小时。前 12 小时搅拌 6~10 次，静置消化。以胃组织溶解，液体澄清为消化完全，如消化不完全，可适当延长消化时间。除去脂肪和浮物，吸取中间清液，煮沸 10~15 分钟，静置沉淀，冷却至 80~90℃，调 pH 值至 4.0~5.0，静置 1~2 小时，滤清，分装，116℃灭菌 30 分钟，冷却后置 2~8℃保存备用。

标准草案 yaodianbiaozhunbiao

## ●3800 生物安全防控

### 3801 活毒废水灭活效果检测法（标准草案）

#### 3801 活毒废水灭活效果检测法

根据生产兽用生物制品的种类，选用下列一种（或多种）动物至少每半年对活毒废水进行 1 次检测，注射动物后，连续观察 10 日（用乳鼠检测的，观察 7 日），应全部健活。

动物名称	体重 (或日龄)	数量（只）	接种途径	接种剂量 (ml)
乳鼠*	3~5 日龄	不低于 8	颈背皮下注射	0.2
小鼠	18~22g	不低于 3	皮下注射	0.5
豚鼠	300~400g	不低于 3	肌肉注射	1.0
兔	1.5~2.0kg	不低于 3	皮下注射	2.0
鸡	20~60 日龄	不低于 3	皮下或肌肉注射	1.0

注：\*乳鼠为口蹄疫灭活疫苗生产企业检测活毒废水灭活效果时的必选动物。