

(6) 在进行疫苗稀释、接种时，应无菌操作。严禁使用消毒剂对连续注射器、针头及连接胶管进行浸泡消毒。

(7) 稀释液中出现沉淀、霉团、混浊、异物时，不得使用。严禁在稀释液中加入抗菌素、维生素和其他疫苗。

(8) 疫苗必须在液氮(-196℃)中保存和运输，并保证疫苗安瓿始终浸在液氮液面以下。严禁用其它方式保存或运输疫苗。

(9) 接种后 10~14 日方可产生有效的免疫力。

**【规格】** (1) 500 羽份/瓶 (2) 1000 羽份/瓶

**【贮藏与有效期】** 在液氮中保存，有效期为 12 个月。

#### 附注：疫苗稀释液标准

**【性状】** 橘红色透明液体，无沉淀。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》进行检验，应无菌生长。

**【pH 值】** 按现行《中国兽药典》进行检验，应为 6.8~7.0。

**【稳定性检验】** 将疫苗在 37~38℃温水中融解，用待检稀释液稀释疫苗后，立即测定其病毒含量，并在室温放置 1 小时再次测定疫苗病毒含量。放置 1 小时的疫苗中，I 型病毒损失量应≤20%，II 型病毒损失量应≤30%，III 型病毒损失量应≤30%。

**【规格】** (1) 100ml / 瓶 (2) 200ml / 瓶

**【贮藏与有效期】** 在室温下保存，有效期均为 12 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由中国农业科学院生物制品工程技术中心提出。
2. 本标准于 2005 年 1 月 20 日经农业部公告第 456 号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》要求，将活疫苗生产用鸡胚成纤维细胞改为 SPF 鸡胚成纤维细胞。

## 鸡传染性喉气管炎重组鸡痘病毒基因工程疫苗

Ji Chuanranxinghouqiguanyan Chongzu Jidoubingdu Jiyingongcheng Yimiao

Recombinant Vaccine for Infectious Laryngotracheitis and Fowlpox, Live

本品系用表达鸡传染性喉气管炎病毒 gB 基因的重组鸡痘病毒接种 SPF 鸡胚成纤维细胞培养，收获细胞培养物，反复冻融后，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防鸡传染性喉气管炎和鸡痘。

**【性状】** 淡黄色疏松团状，易与瓶壁脱离，加稀释液后迅速溶解成粉红色液体。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》进行检验，应无菌生长。

**【支原体检验】** 按现行《中国兽药典》进行检验，应无支原体生长。

**【外源病毒检验】** 按现行《中国兽药典》进行检验，应符合规定。

**【鉴别检验】** (1) 项为必检项，(2) 和 (3) 项任择其一。

(1) 传染性喉气管炎病毒 gB 蛋白检测 按“gB 蛋白 Western-blot 检测法”进行（详见附注），在 90ku 处应观察到一条特异性的条带。

(2) 鸡胚检查法 用灭菌生理盐水将本品作 10000 倍稀释，加入等量抗鸡痘病毒特异性阳性血清，室温中和 1 小时后，绒毛尿囊膜接种 10 日龄 SPF 鸡胚 5 个，每胚 0.2ml，置 37℃ 培养，观察 168 小时，应无病变。

(3) 细胞检查法 用灭菌生理盐水将本品作 10000 倍稀释，加入等量抗鸡痘病毒特异性阳性血清，同时设病毒对照，室温中和 1 小时后，分别接种已长成单层的鸡胚成纤维细胞各 4 瓶，每瓶 0.5ml，另加细胞维持液 4.5ml，置 37℃ 培养，观察 168 小时。病毒对照组应出现细胞圆缩、融合形成空斑等细胞病变，中和组应不出现 CPE。

**【安全检验】** 用 7~10 日龄 SPF 鸡 10 只，皮下刺种 0.1ml（含 10 羽份）疫苗。观察 21 日，均应健活。

**【效力检验】** (1) 鸡传染性喉气管炎部分 用 21~28 日龄 SPF 鸡 10 只，各皮下刺种疫苗 0.1ml（含 1 羽份），28 日后，连同条件相同的 SPF 鸡 10 只，分别喉囊内接种传染性喉气管炎病毒 WG 株病毒液 0.4ml（含  $10^{4.2}$ EID<sub>50</sub>），观察 21 日。对照鸡应至少 7 只发病；免疫鸡应至少保护 7 只。

(2) 鸡痘部分 下列方法，任择其一。

病毒含量测定 用细胞培养维持液将疫苗作 10 倍系列稀释，取  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  3 个稀释度分别接种生长良好的 CEF 单层上，37℃ 吸附 2 小时后弃去病毒液，用含 5% 犊牛血清的 DMEM 营养琼脂覆盖，待其凝固后，将瓶倒置，37℃ 培养 72 小时。然后，再用含 0.01% 中性红的营养琼脂覆盖，待其凝固后，将瓶倒置，37℃ 培养 24 小时，记录蚀斑数，计算平均值。每羽份病毒含量应  $\geq 1.0 \times 10^4$  PFU。

用鸡检验 用 21~28 日龄 SPF 鸡 10 只，各皮下刺种疫苗 0.1ml（含 1 羽份），28 日后，连同条件相同的 SPF 鸡 10 只，分别羽毛囊接种鸡痘病毒 102 株病毒液 0.1ml（含  $10^{3.9}$ EID<sub>50</sub>），观察 21 日。对照鸡应至少 7 只发病；免疫鸡应至少保护 7 只。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于预防鸡传染性喉气管炎和鸡痘。免疫期为 5 个月。

**【用法与用量】** 按照瓶签所注明的羽份，用生理盐水稀释，于翅膀内侧无血管处皮下刺种 21 日龄以上雏鸡。接种后 3~4 日，刺种部位出现轻微红肿，偶有结痂，14 日恢复正常。

**【注意事项】** (1) 本品仅用于接种健康鸡。体质瘦弱或接触过鸡痘病毒的鸡不能使用，否则影响免疫效果。

(2) 使用前应仔细检查，如发现疫苗瓶破裂、无瓶签、苗中混有杂质等，均不能使用。

(3) 稀释后的疫苗应放冷暗处，限 4 小时内用完。

(4) 用过的疫苗瓶、接种器具等应作灭菌处理。

**【规格】** (1) 500 羽份/瓶 (2) 1000 羽份/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃ 以下保存，有效期为 18 个月。

**附注：** gB 蛋白 Western-blot 检测法

## 1 SDS-PAGE 电泳

1.1 样品制备 将疫苗和亲本鸡痘病毒分别接种 SPF 鸡胚成纤维细胞 (CEF), 培养 72 小时后, 弃去培养液, 用 PBS (pH7.4) 洗涤 2 次。加入适量的 85℃ 的 2×SDS 凝胶电泳加样缓冲液裂解细胞, 用细胞刮棒把黏稠状细胞裂解物收集于一个微量离心管中, 将样品置于沸水中加热 10 分钟, 即为被检样品。

1.2 凝胶灌制及电泳 分别配制 10% 分离胶、5% 浓缩胶, 按《分子克隆》中所述方法进行灌制。待其聚合后, 用微量加样器加样, 同时加蛋白分子量 Marker 作为对照, 在 BIO-RAD 垂直电泳槽上 180V 电泳, 待染料移至底部时停止电泳, 将蛋白分子量 Marker 切下用 0.25% 考马斯亮蓝 G250 (0.25% R250, 40% 甲醇, 10% 冰乙醇) 染色 2 小时, 用脱色液 (40% 甲醇, 10% 乙酸) 脱色, 余下的凝胶置于转印装置, 用于 Western-blot 印迹。

## 2 Western-blot 检测

2.1 电转印 将 6 张 Whatman 滤纸、硝酸纤维素 (NC) 膜剪成与凝胶同样大小, 在转移液 (48mmol/L Tris, 39mmol/L 甘氨酸, 0.037% SDS) 中浸泡 3~5 分钟。将 3 块定性滤纸对齐, 依次放置 NC 膜、凝胶, 再依次放置另 3 张滤纸, 放置每一层时均要除去它们之间的气泡, 然后在转印装置 (TRANS-BLOT SD, BIO-RAD) 中电转印 45 分钟 (22V 电压, NC 膜置于正极, 胶置于负极), 取出 NC 膜并作标记, 夹于两层滤纸之间, 室温干燥 30 分钟。

2.2 免疫检测 将 NC 膜放在一个平皿中, 加封闭液 (含 0.2% 叠氮钠、1% BSA 的 PBS), 室温下轻振 2~3 小时。然后用 PBS 洗 3 次, 加传染性喉气管炎病毒阳性血清 (1:100 稀释, 浸过 NC 膜即可), 37℃ 作用 2 小时, 再用 PBS 洗 3 次, 用 Buffer I (150mmol/L NaCl, 50mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 洗 10 分钟, 加入碱性磷酸酶标记的兔抗鸡 IgG (用含 1% BSA 的 Buffer I 作 1:10000 稀释), 37℃ 作用 1 小时。用 Buffer I 洗 3 次, 用 Buffer II (10mmol/L Tris-HCl, 150mmol/L NaCl, pH7.5) 洗 1 次, 弃去余液, 置于显色液中。显色完毕, 加 0.5mmol EDTA (pH8.0) 终止显色。

显色缓冲液配制方法如下: 在 10ml 碱性磷酸酶缓冲液 (100mmol/L NaCl; 5mmol/L MgCl<sub>2</sub>; 100mmol/L Tris-HCl) 中加 66μl NBT 液 (取 0.5g NBT 溶于 10ml 70% 的二甲基甲酰胺中), 再加 33μl BCIP 液 (取 0.5g BICP 溶于 10ml 100% 的二甲基甲酰胺中) 混匀。

3 结果判定 当 gB 蛋白存在时, 在 90ku 处应观察到一条特异性的条带。

### 附加说明:

1. 本标准由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提出。
2. 本标准于 2005 年 1 月 25 日经农业部公告第 461 号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》的要求, 在帽子中增加“用于预防鸡传染性喉气管炎和鸡痘。”
4. 根据现行《中国兽药典》要求, 将活疫苗生产和检验用鸡胚成纤维细胞改为 SPF 鸡胚成纤维细胞。

# 鸡球虫病三价活疫苗

Jiqiuchongbing Sanjia Huoyimiao

Coccidiosis Trivalent Vaccine for Chickens, Live

本品系由鸡柔嫩艾美耳球虫早熟弱毒株、巨型艾美耳球虫自然弱毒株和堆型艾美耳球虫自然弱毒株分别经口接种 SPF 雏鸡，收获粪便中的卵囊，经次氯酸钠溶液消毒后，悬浮于重铬酸钾溶液中，在适宜条件下，获得孢子化卵囊，将 3 种卵囊按一定比例混合制成。用于预防鸡的球虫病。

**【性状】** 桔黄色均匀悬浮液，静置后，底部有少量沉淀，上部为桔黄色澄明液体。每瓶装量为 5ml ± 5%。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》进行检验，应无菌生长。

**【安全检验】** 取 7~14 日龄 SPF 鸡 20 只，分成 2 组，每组 10 只。其中一组，每只口服 10 羽份疫苗；另一组不接种，作为对照。将两组鸡在相同条件下隔离饲养，观察 5~7 日，应不出现由球虫病引起的症状和死亡。剖检所有鸡只，检查每只鸡适宜部位（柔嫩艾美耳球虫检查盲肠、堆型艾美耳球虫检查十二指肠、巨型艾美耳球虫检查小肠中段）的病变，并记分（记分方法见附注）。免疫组平均病变记分应 ≤ +1 分；对照组中每只鸡的所有部位均应无病变。

**【卵囊计数】** 按瓶签注明羽份进行适当稀释后，用麦克马斯特计数法或血细胞计数法进行卵囊计数。每羽份孢子化卵囊含量为 1700 个 ± 10%。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

(1) 取 10 日龄以内 SPF 鸡 20 只，分成两组，每组 10 只。其中一组，每只口服 1 羽份疫苗；另一组不接种，作为对照。将两组鸡分别在相同条件下隔离饲养（垫料上饲养）。28 日后，两组均用强毒孢子化卵囊（柔嫩艾美耳球虫  $5 \times 10^4$  个、巨型艾美耳球虫  $2 \times 10^4$  个、堆型艾美耳球虫  $1 \times 10^5$  个）口服攻击，观察 5~7 日，将所有鸡扑杀，剖检所有鸡，检查每只鸡适宜部位（柔嫩艾美耳球虫检查盲肠、堆型艾美耳球虫检查十二指肠、巨型艾美耳球虫检查小肠中段）的病变，并进行记分。对照组平均病变记分盲肠 ≥ +3.5 分、十二指肠 ≥ +2 分、小肠中段 ≥ +2 分；免疫组平均病变记分应 ≤ +1 分。

(2) 取 7 日龄以内 SPF 鸡 20 只，分成两组，每组 10 只。其中一组，每只口服 1 羽份疫苗；另一组不接种，作为对照。将两组鸡分别在相同条件下隔离饲养。5~7 日后，将所有鸡扑杀，剖检，刮取每只鸡盲肠、小肠中部、十二指肠的粘膜，在显微镜下检查卵囊，观察到卵囊者记为阳性。对照组应无任何球虫卵囊，免疫组中表现为各疫苗虫株阳性的鸡应不少于 9 只。

**【作用与用途】** 用于预防鸡球虫病。接种后 4~7 日开始产生免疫力，免疫力可持续至饲养期末。

**【用法与用量】** 10 日龄以内雏鸡，经口滴服或经饲料拌服，每只鸡 1 羽份。

**【注意事项】** (1) 使用时应充分摇匀。

(2) 接种后的鸡群应经常接触原垫料。

(3) 接种本品前 2 日至接种后 21 日内，禁止使用任何抗球虫药物。但是接种本疫苗后 10~14 日部分鸡可能出现轻微的疫苗反应（如食少、轻度血便等）时，建议：可用 2~3 日

预防量的抗球虫药。

(4) 接种后 6~14 日内垫料应保持适宜湿度(垫料湿度应控制在 20%~30%之间。如果是稻壳类垫料,手捏不出水,松手不全散开即为湿度适宜的标志)。

(5) 切勿将疫苗冷冻或加热。

**【规格】** (1) 500 羽份/瓶(5ml) (2) 1000 羽份/瓶(5ml)

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存,有效期为 6 个月。

#### **附注: 病变记分标准**

1 柔嫩艾美耳球虫引起的病变 感染后 5~7 日剖检盲肠,两侧盲肠病变不一致时,以严重的一侧为准。

0 分 无肉眼可见病变。

+1 分 盲肠壁有很少量散在的出血点或出血斑,肠壁不增厚,内容物正常。

+2 分 出血点或出血斑数量增多,盲肠内容物明显带血,肠壁稍增厚,内容物正常。

+3 分 盲肠内有大量血液或有盲肠芯(血凝块或灰白色干酪样的香蕉型块状物);盲肠壁极度增厚;盲肠腔没有或仅有少量的盲肠粪便。

+4 分 因出血量大和干酪样盲肠芯大,盲肠极度扩张;盲肠腔内没有粪便或粪便已被包在肠芯中;死亡鸡记为+4 分。

2 巨型艾美耳球虫引起的病变 感染后 6~7 日剖解小肠。

0 分 无肉眼可见病变。

+1 分 小肠中段浆膜面有小的出血点;没有胀气,肠壁也不增厚,肠腔中可能有少量桔黄色粘液。

+2 分 浆膜面有许多红色出血点;肠腔中充满桔黄色粘液;肠壁增厚。

+3 分 有胀气且肠壁增厚;粘膜面粗糙;肠内容物中充满小的凝血块和粘液。

+4 分 小肠大部分胀气;肠壁显著增厚;肠内容物因含有大量凝血块和消化的红细胞而呈红褐色;死亡鸡记为+4 分。

3 堆型艾美耳球虫引起的病变 感染后 5~7 日剖解十二指肠。

0 分 无肉眼可见病变。

+1 分 含有正在发育的卵囊的散在的白色结节局限于十二指肠;结节长形,横向排列,外观呈梯形;浆膜面和粘膜面都可见到结节;每平方米不超过 5 个结节。

+2 分 病变较为密集但未融合;3 周龄以上的鸡病变可能延伸至十二指肠后 20 厘米处,肠壁不增厚;内容物正常。

+3 分 病变融合成片,肠壁增厚,内容物呈水样;病变可延伸至卵囊蒂处。

+4 分 粘膜面浅灰色,白色结节完全融合;充血状况可能仅表现为小的瘀点,或者在极其严重感染下整个粘膜面呈鲜红色;在小肠上段可能已经分辨不出单个病变;在小肠中段可见典型的梯形病变;肠壁高度增厚,肠腔内充满奶油状渗出物,渗出物中可能有大量卵囊;死亡鸡记为+4 分。

#### **附加说明:**

1. 本标准由齐鲁动物保健品有限公司提出。
2. 本标准于 2005 年 1 月 25 日经农业部公告第 461 号发布。

## 禽流感病毒 H5 亚型荧光 RT-PCR 检测试剂盒

Qinliuganbingdu H5 Yaxing Yingguang RT-PCR Jiance Shijihe

Avian Influenza Virus (AIV) Subtype H5 RT-PCR Fluorescence Diagnostic Kit

本品系用一对禽流感病毒 H5 亚型的特异性引物、一条特异性荧光探针,采用逆转录酶、耐热 DNA 聚合酶 (Taq 酶)、4 种核苷酸单体 (dNTPs)、等成分组装而成。用于禽流感病毒 H5 亚型的检测。

**【性状】** 外观 试剂盒的外包装应洁净、无破损,标签应符合国家有关规定,内包装应无破损、无裂痕、无渗漏,品名、批号、保存条件、有效期和合格证清晰。

取出试剂盒,放在室温下,使各种试剂融化。RT-PCR 反应液、DEPC 水、Taq 酶、阳性对照品,均应为无色透明液体;裂解液应为粉红色液体;阴性对照品应为无色液体,有少量悬浮物。将 Taq 酶以 6000r/min 离心 5 秒,应无沉淀。将 Taq 酶以外的各种试剂以 10000r/min 离心 1 分钟。阴性对照管底部有少量沉淀,其他各管应无沉淀。

装量 试剂盒中各内容物的装量应符合下列要求: DEPC 水, 1ml/管×1 管; RT-PCR 反应液, 750μl/管×1 管; RT-PCR 酶, 1 颗/管×12 管; Taq 酶, 12μl/管×1 管; 阳性对照品, 1ml/管×1 管; 阴性对照品, 1ml/管×1 管; 样品裂解液, 15ml/瓶×2 管。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》进行检验,阴性对照、阳性对照、酶、RT-PCR 反应液均无菌生长。

**【灵敏度检验】** 取禽流感病毒 H5 亚型荧光 RT-PCR 检测试剂盒灵敏度参比品 (AIV H5/QY/L1、AIV H5/QY/L2、AIV H5/QY/L3、AIV H5/QY/L4) (见附注 1),按照【用法与判定】进行检测和判定。AIV H5/QY/L1、AIV H5/QY/L2 和 AIV H5/QY/L3 均应为阳性,AIV H5/QY/L4 的结果可阳性或阴性。当 AIV H5/QY/L4 为阳性时,4 个参比品的 Ct 值应符合以下关系: AIV H5/QY/L1<AIV H5/QY/L2<AIV H5/QY/L3<AIV H5/QY/L4。

**【敏感性检验】** 取禽流感病毒 H5 亚型荧光 RT-PCR 检测试剂盒阳性参比品 (AIV H5/QY/Y1、AIV H5/QY/Y2、AIV H5/QY/Y3、AIV H5/QY/Y4 和 AIV H5/QY/Y5) (见附注 2),按照【用法与判定】进行检测和判定。均应为阳性。

**【特异性检验】** 取禽流感病毒 H5 亚型荧光 RT-PCR 检测试剂盒阴性参比品 (AIV H5/QY/T1、AIV H5/QY/T2、AIV H5/QY/T3、AIV H5/QY/T4、AIV H5/QY/T5、AIV H5/QY/T6、AIV H5/QY/T7、AIV H5/QY/T8 和 AIV H5/QY/T9) (见附注 3),按照【用法与判定】进行检测和判定。均应为阴性。

**【作用与用途】** 用于检测多种样本 (如肌肉、脏器、咽喉拭子、泄殖腔拭子、血清或血浆、组织渗出液等) 中的 H5 亚型禽流感病毒 RNA。

### 【用法与判定】

#### 1 样本采集、保存及运输

1.1 样本采集 所用取样器材必须经高压湿热或干热灭菌。

1.1.1 若检测对象为活禽，建议采集咽喉拭子和泄殖腔拭子作为检测样本。采集咽喉拭子时，将拭子深入喉头口及上颚裂来回刮几次，取咽喉分泌液；采集泄殖腔拭子时，将拭子深入泄殖腔，转 1 圈，蘸取粪便。将采集的拭子一起放入 1 支盛有 2ml PBS（含抗菌素）的试管中，充分洗涤拭子，然后在管壁挤干液体，转移到灭菌离心管中备用。

1.1.2 若检测对象为新鲜肌肉或脏器，则取待检样品 2g，放在洁净、干燥的灭菌研钵中，充分研磨，加 10ml PBS 混匀，取上清，转移到灭菌离心管中，备用。为了使采集的样品更具代表性，也可取 50g 肉样，加至 50ml 灭菌的 PBS 中，用均质器处理后，取上清，备用。

1.1.3 若检测对象为血清、血浆或冷冻组织渗出液，则直接取样。

1.2 样本保存 2~8℃ 保存，应不超过 24 小时；-70℃ 以下，可长期保存，但应避免反复冻融（最多冻融 3 次）。

1.3 样本运输 采用冰壶或泡沫箱中加冰密封后进行运输。

## 2 样本处理

2.1 取 n (n-样本数+2) 支 1.5ml 灭菌离心管，作好标记（每个待检样本和阴、阳性对照，各用 1 支离心管）。

2.2 首先向每支离心管中加入 600μl 裂解液（裂解液有很强的腐蚀性，切勿沾到皮肤或衣物上，否则，立即用大量清水冲洗并擦干）；然后分别加入待测样本、阴性对照、阳性对照各 200μl（一份样本换用一个吸头）；再加入 200μl 氯仿，混匀器上振荡混匀 5 秒（不宜过于强烈，以免产生乳化层，也可用手颠倒混匀）。

2.3 以 12000r/min 离心 15 分钟（如有条件，最好在 4℃ 下进行离心）。

2.4 取 n 支 1.5ml 灭菌离心管，分别加入经 -20℃ 预冷的异丙醇 400μl，作好标记。吸取步骤 2.3 各管中的上清液至少吸取 500μl（注意不要吸出中间层，该层富含 DNA 和蛋白质），颠倒混匀。

2.5 以 12000 r/min 离心 15 分钟（注意：固定离心管方向，使离心管开口朝向离心机的转轴方向）。轻轻倒去上清，倒置在吸水纸上，沾干液体（注意：不同样品应在吸水纸不同地方沾干）。分别加入经 -20℃ 预冷的 75% 乙醇 600μl，颠倒洗涤。

2.6 以 12000 r/min 离心 10 分钟（注意：固定离心管方向，使离心管开口朝向离心机转轴方向）。轻轻倒去上清，倒置在吸水纸上，尽量沾干液体（注意：不同样品应在吸水纸不同地方沾干）。

2.7 以 4000 r/min 离心 10 秒（注意：固定离心管方向，使离心管开口朝向离心机转轴方向），使管壁上的残余液体甩到离心管底部，用微量加样器尽量将其吸干（注意：一份样本换用一个吸头；吸头不要触及沉淀物），在室温下干燥 3 分钟（注意：不宜过于干燥，以免 RNA 不溶）。

2.8 加入 11μl DEPC 水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，2000r/min 离心 5 秒，冰上保存，备用（注意：此时的 RNA 最易受 RNA 酶降解，请在 2 小时内进行 PCR 扩增）。

3 扩增试剂准备（PCR 前准备区） 从试剂盒中取出 RT-PCR 反应液、Taq 酶，在室温下融化后，2000r/min 离心 5 秒。设所需 PCR 管数为 n (n-样本数+2)（其中 1 管为阴性

对照，另 1 管为阳性对照），每个测试反应体系中含有 RT-PCR 反应液 15 $\mu$ l，Taq 酶 0.25 $\mu$ l。计算出各试剂的使用量，加入一适宜容量试管中，再向其中加入 n/4 颗 RT-PCR 酶颗粒，充分混合均匀，分装到 PCR 管中，每管 15 $\mu$ l，转移至样本处理区。

4 加样（样本处理区） 分别向上述 PCR 管中加入 2.8 中相应的 RNA 溶液各 10 $\mu$ l，盖紧管盖，于 400r/min 离心 5 秒。将 PCR 管排好，放入荧光 PCR 检测仪内，记录样本排列顺序。

#### 5 RT-PCR 反应（检测区）

5.1 循环条件的设置如下：42 $^{\circ}$ C 反转录 30 分钟；92 $^{\circ}$ C 预变性 3 分钟；92 $^{\circ}$ C 变性 10 秒，45 $^{\circ}$ C 退火 30 秒，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 分钟，5 个循环；92 $^{\circ}$ C 变性 10 秒，60 $^{\circ}$ C 退火 30 秒，40 个循环；60 $^{\circ}$ C 时设置收集荧光。

5.2 结果分析条件的设定 读取检测结果。阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线的最高点，结果显示阴性为准。或可根据仪器噪音情况进行调整。

#### 6 结果判定

6.1 试验成立的条件 阴性对照的检测结果为阴性；阳性对照的 Ct 值应不高于 28.0。否则，判定为无效，可重检。

6.2 无 Ct 值时，判为阴性。

6.3 Ct 值 $\leq$ 30.0 时，判为阳性。

6.4 Ct 值大于 30.0 时，应重检。重检后，无 Ct 值时，判为阴性，否则为阳性。

**【注意事项】** （1）使用本品的实验室，应严格按照国家有关行政主管部门颁布的有关基因扩增检验的实验室的管理规范进行管理。

（2）各区物品均为专用，不得交叉使用，以免污染。检测结束后，应立即对工作台进行清洁。

（3）由于阳性样品中的病毒滴度一般均较高，因此，在整个检测过程中应注意避免交叉污染。如，提取核酸时应用灭菌的镊子夹取离心管；打开离心管盖时，应避免将样本粘在手上或溅出，否则应立即更换手套。

（4）裂解液有很强的腐蚀性，切勿粘到皮肤或衣物上，否则应立即用大量清水冲洗并擦干。

（5）分装反应液时，应尽量避免产生气泡。上机前，应注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄漏并污染检测仪器。

（6）检测过程中使用过的吸头，应直接打入盛有 1%次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃。

（7）工作台及各种实验用品应定期用 1%次氯酸钠、75%酒精或紫外灯进行消毒。

（8）由于禽流感病毒为 RNA 病毒，因此，在提取过程中应特别注意防止 RNA 酶对 RNA 的降解作用。如：所使用的器皿、加样器等，均应为专用；离心管、吸头等，在实验前应全部进行高压灭菌。

（9）RT-PCR 酶颗粒极易吸潮失活，因此，应置于干燥器内并在室温下保存，使用时，取出所需数量，剩余部分立即放回干燥器中。

（10）试剂盒中各种组分，应避免反复冻融。

**【规格】** 48 份/盒

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存（裂解液），RT-PCR 酶开封后在室温条件下置于干燥器内保存，其他试剂-20℃ 以下保存，有效期为 12 个月。

**附注：**

1 禽流感病毒 H5 亚型荧光 RT-PCR 检测试剂盒灵敏度参比品的制备和检验

1.1 制备 取禽流感病毒 H5 亚型毒株 A（由北京出入境检验检疫局分离、保存，经国家流感中心鉴定）灭活的鸡胚尿囊液，用 PBS 稀释成  $10^{-4}$  倍、 $10^{-5}$  倍、 $10^{-6}$  倍、 $10^{-7}$  倍 4 个稀释度。分装，每管 200 $\mu$ l，分别标记为 AIV H5/QY/L1、AIV H5/QY/L2、AIV H5/QY/L3 和 AIV H5/QY/L4。置-70℃ 保存。

1.2 检验 用禽流感病毒 H5 亚型荧光 RT-PCR 检测试剂盒检测，AIV H5/QY/L1、AIV H5/QY/L2、AIV H5/QY/L3 均应为阳性，AIV H5/QY/L4 可阳性或阴性。

2 禽流感病毒 H5 亚型荧光 RT-PCR 检测试剂盒阳性参比品的制备和检验

2.1 制备 取禽流感病毒 H5 亚型毒株 H5-1、H5-2、H5-3、H5-4、H5-5 灭活鸡胚尿囊液（由北京出入境检验检疫局分离、保存，经国家流感中心鉴定），用 PBS 稀释成  $10^{-5}$ ，分装，每管 200 $\mu$ l，分别标记为 AIV H5/QY/Y1、AIV H5/QY/Y2、AIV H5/QY/Y3、AIV H5/QY/Y4 和 AIV H5/QY/Y5。置-70℃ 保存。

2.2 检验 用禽流感病毒 H5 亚型荧光 RT-PCR 检测试剂盒检测，均应为阳性。

3 禽流感病毒 H5 亚型荧光 RT-PCR 检测试剂盒阴性参比品的制备和检验

3.1 制备 分别取禽流感病毒 H7 亚型、禽流感病毒 H9 亚型、传染性法氏囊病病毒、鸡新城疫病毒、马立克氏病病毒、鸡传染性支气管炎病毒、嗜肾型传染性支气管炎病毒、鸭瘟弱毒疫苗、鸭传染性肝炎病毒灭活病毒液（均由北京出入境检验检疫局分离、保存，经国家流感中心鉴定），适当分装，分别标记为 AIV H5/QY/T1、AIV H5/QY/T2、AIV H5/QY/T3、AIV H5/QY/T4、AIV H5/QY/T5、AIV H5/QY/T6、AIV H5/QY/T7、AIV H5/QY/T8 和 AIV H5/QY/T9。

3.2 检验 用禽流感病毒 H5 亚型荧光 RT-PCR 试剂盒检测，均应为阴性。

**附加说明：**

1. 本标准由中华人民共和国北京出入境检验检疫局、深圳市匹基生物工程股份有限公司提出。

2. 本标准于 2005 年 2 月 3 日经农业部公告第 466 号发布。

## 猪繁殖与呼吸综合征灭活疫苗

Zhufanzhiyuhuxizonghezheng Miehuoyimiao

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Vaccine, Inactivated

本品系用猪繁殖与呼吸综合征病毒 CH-1a 株接种 Marc-145 细胞进行培养，收获细胞培养物，经甲醛溶液灭活后，与矿物油佐剂混合乳化制成。用于预防猪繁殖与呼吸综合征。

**【性状】** 外观 乳白色乳剂。

剂型 为油包水型。取一洁净吸管，吸取少许疫苗滴于冷水中，除第 1 滴外，应呈油滴状不扩散。

稳定性 取 5ml 疫苗，装于 10~12mm 离心管中，经 3000r/min 离心 15 分钟，应不破乳。

黏度 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【装量检查】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》进行检验，应无菌生长。

**【安全检验】** 下列方法任择其一。

(1) 母猪安全检验 用怀孕 65~70 日的母猪 3 头，每头颈部肌肉注射疫苗 8ml，观察至母猪分娩为止，应无因接种疫苗引起的不良反应，并能产下健康的活仔。

(2) 仔猪安全检验 用 28~35 日龄健康易感（中和抗体效价 $<1:4$ ）仔猪 5 头，每头颈部肌肉注射疫苗 4ml，连续观察 14 日，应无不良反应。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

(1) 中和抗体测定 用 28~35 日龄健康易感（中和抗体效价 $<1:4$ ）仔猪 5 头，每头颈部肌肉注射疫苗 2ml。21 日后，连同对照猪 3 头，分别静脉采血，分离血清，检测血清中和抗体效价（附注 3）。对照猪的中和抗体效价均应 $<1:4$ ；免疫猪应至少有 4 头血清中和抗体效价 $\geq 1:26$

(2) 免疫攻毒 用 28~35 日龄健康易感（中和抗体效价 $<1:4$ ）仔猪 5 头，每头颈部肌肉注射疫苗 2ml。21 日后，连同对照仔猪 3 头，用 PRRSV VR-2332 株（ $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml）攻击，每头滴鼻 2ml，连续观察 21 日。扑杀剖检，根据临床症状、病理变化和抗原检测（见附注 1）进行判定。对照猪应至少有 2 头发病；免疫猪应至少保护 4 头。

**【甲醛和汞类防腐剂残留量测定】** 分别按现行《中国兽药典》进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于预防猪繁殖与呼吸综合征。免疫期为 6 个月。

**【用法与用量】** 颈部肌肉注射。母猪，在怀孕 40 日内进行初次免疫接种，间隔 20 日后进行第 2 次接种，以后每隔 6 个月接种 1 次，每次每头 4ml；种公猪，初次接种与母猪同时进行，间隔 20 日后进行第 2 次接种，以后每隔 6 个月接种 1 次，每次每头为 4ml；仔猪，21 日龄接种 1 次，每头 2ml。

**【注意事项】** (1) 疫苗使用前应恢复至室温，并摇匀。

(2) 注射部位应严格消毒。

(3) 对妊娠母猪进行接种时，要注意保定，避免引起机械性流产。

(4) 本疫苗接种后，有少数猪接种部位出现轻度肿胀，21 日后基本消失。

(5) 屠宰前 21 日不得进行接种。

(6) 应在兽医的指导下使用。注射该疫苗时，有个别猪会出现局部肿胀，可在短时间内消失。

**【规格】** (1) 50 ml/瓶 (2) 100ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为 10 个月。

#### 附注:

##### 1 仔猪发病判定标准

1.1 临床症状 仔猪体温升高 ( $\geq 40^{\circ}\text{C}$ ), 至少持续 4 日; 食欲减退, 明显呼吸道症状。

1.2 病理变化 剖检观察, 仔猪肺组织呈红褐色花斑状, 不塌陷; 淋巴结中度到重度肿大; 个别猪的脾脏头部明显肿大, 切面红髓增生。肺泡隔不均匀增宽, 可见肿大、增生的毛细血管内皮细胞、巨噬细胞和浸润的淋巴细胞。

1.3 抗原检测 用 IFA 方法检测脾脏、脾脏和淋巴结, 应检测到大量的 PRRSV 抗原。符合 1.1、1.2 和 1.3 项中的任何 2 项, 即可判为发病。

##### 2 怀孕母猪发病判定标准

2.1 临床症状 对母猪出现体温升高 ( $\geq 40^{\circ}\text{C}$ ), 至少持续 2 日; 食欲减退和呼吸困难; 并多在临产前 1~2 周发生早产。

2.2 病理变化 母猪所产的不正常胎儿、新生弱仔进行剖检, 可见脐带部分和全部出血; 镜检可见局部坏死性脐动脉炎, 以及脐动脉内膜和中膜坏死, 并伴有血管壁和血管周围出血; 肺组织可见间质性肺炎的特征变化; 部分猪的脾脏和淋巴结肿大。

2.3 抗原检测 用 IFA 方法检测脾脏和淋巴结, 检测到大量的 PRRSV 抗原即判为发病。符合 2.1、2.2 和 2.3 项中的任何 2 项, 即可判为发病。

3 中和抗体效价测定方法 被检血清应在  $56^{\circ}\text{C}$  水浴中处理 30 分钟, 用细胞维持液对被检血清作 2 倍系列稀释, 分别取  $2^{-1}$ 、 $2^{-2}$ 、 $2^{-3}$ 、 $2^{-4}$ 、 $2^{-5}$ 、 $2^{-6}$ 、 $2^{-7}$  7 个稀释度各  $100\mu\text{l}$ , 与等量含  $100\text{TCID}_{50}$  PRRSV 的细胞维持液混合, 在室温下感作 60 分钟, 分别接种于生长良好的 Marc-145 细胞单层的 96 孔细胞培养板上 (接种前弃去生长液), 每个稀释度作 4 个孔, 每孔  $200\mu\text{l}$ 。同时设正常细胞对照、病毒对照、血清毒性对照和阴、阳性血清对照。置  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  培养箱中培养 5 日, 观察细胞病变。能使 50% 细胞培养物保护的最低血清稀释度即为该血清的中和效价。

#### 附加说明:

1. 本标准由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提出。

2. 本标准于 2005 年 4 月 11 日经农业部公告第 488 号发布。

3. 根据现行《中国兽药典》要求改变黏度测定方法, 为黏度计法。

4. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

### 鸡新城疫低毒力耐热保护剂活疫苗 (La Sota 株)

Ji Xinchengyi Diduli Nairebaohuji Huoyimiao (La Sota Zhu)

Newcastle Disease Virus Thermo-stable Vaccine, Live (La Sota Strain)

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株接种 SPF 鸡胚培养, 收获感染胚液, 加入适宜保护剂, 经冷冻真空干燥制成。用于预防鸡新城疫。

【性状】 乳白色海绵状疏松团块, 易与瓶壁脱离, 加稀释液后迅速溶解。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》进行检验, 应无菌生长。如有菌生长, 应作杂

菌计数，并作病原性鉴定和禽沙门氏菌检验，应符合规定。每羽份疫苗中的非病原菌数应不超过1个。

**【支原体检验】** 按现行《中国兽药典》进行检验，应无支原体生长。

**【外源病毒检验】** 按现行《中国兽药典》进行检验，应符合规定。

**【鉴别检验】** 将疫苗用灭菌生理盐水稀释至 $10^{5.0}EID_{50}/0.1ml$ ，与等量抗鸡新城疫病毒特异性血清混合，室温中和1小时后，接种SPF鸡胚10个，观察120小时，在24~120小时内，应不引起特异性死亡，且至少存活8个，鸡胚液作红细胞凝集试验，应为阴性。

**【安全检验】** 下列方法任择其一。

(1) 用鸡胚检验 将疫苗用灭菌生理盐水稀释，尿囊腔内接种10日龄SPF鸡胚10个，每胚0.1ml（含10羽份），接种后24~72小时，鸡胚死亡率不超过20%为合格。如超过20%，可加倍重检1次，死亡率仍超过20%，该疫苗判为不合格。

(2) 用鸡检验 用2~7日龄SPF鸡20只，分成2组，第1组10只，每只滴鼻接种10羽份疫苗（0.05ml）；第2组10只，不接种作为对照。两组在同等条件下分别饲养，观察10日，应无不良反应。如有非特异性死亡，免疫组与对照组均应不超过1只。

**【效力检验】** 下列方法任选其一。

(1) 用鸡胚检验 按瓶签注明的羽份，将疫苗用灭菌生理盐水稀释至1羽份/0.1ml，再做10倍系列稀释，取3个适宜的稀释度，各尿囊腔内接种10日龄SPF鸡胚5个，每胚0.1ml，置37℃继续孵育，接种后48小时以前死亡的鸡胚弃去不计，在48~120小时死亡的鸡胚，随时取出，收获鸡胚液，将同一稀释度的鸡胚液等量混合，分别测定红细胞凝集价。至120小时，取出所有活胚，逐个收获鸡胚液，分别测定凝集价；凝集价 $\geq 1:160$ （微量法1:128）者判为感染，计算半数感染量，每羽份 $\geq 10^{6.0}EID_{50}$ ，判为合格。

(2) 用鸡检验 用1~2月龄的SPF鸡10只，各滴鼻接种1/100羽份疫苗，10~14日后，连同对照鸡3只，各肌肉注射鸡新城疫北京株强毒1ml（含 $10^{4.0}ELD_{50}$ ）。观察10~14日，对照鸡应全部发病死亡，免疫鸡应至少保护9只。

**【耐老化试验】** 取5瓶疫苗置于37℃放置7日，取其中3瓶测定病毒含量，与放置前相比，病毒含量下降应不超过1个滴度。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于预防鸡新城疫。

**【用法与用量】** 按瓶签注明的羽份，用灭菌生理盐水或适宜的稀释液稀释，滴鼻或点眼，每只鸡0.05ml；饮水或喷雾免疫时，剂量加倍。

**【注意事项】** (1) 有鸡支原体感染的鸡群，禁用喷雾免疫。

(2) 疫苗稀释后，应放冷暗处，限在4小时内用完。

(3) 当接种已被支原体感染的鸡群时，可能会引起不同程度的呼吸道反应。

**【规格】** (1) 500羽份/瓶 (2) 1000羽份/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为24个月。

附加说明：

1. 本标准由瑞普（保定）生物药业有限公司提出。
2. 本标准于 2005 年 9 月 22 日经农业部公告第 547 号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》要求，将检验用鸡胚均改为 SPF 鸡胚。

## 鸡传染性法氏囊病中等毒力耐热保护剂活疫苗

Ji Chuanranxing Fashinangbing Zhongdengduli Nairebaohuji Huoyimiao

Infectious Bursal Disease Virus Thermo-stable Vaccine, Live

本品系用鸡传染性法氏囊病病毒 B87 株接种 SPF 鸡胚培养，收获感染鸡胚，加入适宜保护剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防鸡传染性法氏囊病。

**【性状】** 微红色海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离，加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》进行检验，应无菌生长。如有细菌生长，应作杂菌计数，并作病原性鉴定和禽沙门氏菌检验，应符合规定。每羽份疫苗中非病原菌数应不超过 1 个。

**【支原体检验】** 按现行《中国兽药典》进行检验，应无支原体生长。

**【外源病毒检验】** 按现行《中国兽药典》进行检验，应符合规定。

**【鉴别检验】** 将疫苗用灭菌生理盐水稀释至  $10^{3.0} \text{ELD}_{50}/0.1\text{ml}$ ，与等量抗鸡传染性法氏囊病特异性血清混合， $37^{\circ}\text{C}$  中和 1 小时后，绒毛尿囊膜接种 10 日龄 SPF 鸡胚 5 个，每胚 0.2ml；同时设病毒对照鸡胚 5 个，每胚接种病毒液 0.1ml（含  $10^{3.0} \text{ELD}_{50}$ ），同条件培养观察 168 小时。中和组鸡胚应全部健活，对照组鸡胚应至少死亡 3 个，鸡胚尿囊液对鸡红细胞凝集试验应为阴性。

**【安全检验】** 用 7~14 日龄 SPF 鸡 20 只，其中 10 只，各点眼或口服疫苗 10 羽份，另 10 只不接种作对照，两组分别饲养观察 14 日，均应健活。试验结束后，剖检免疫组和对照组鸡，法氏囊应无明显变化（色泽、弹性及大小等），如有非特异性死亡，两组总和应不超过 3 只，且免疫组死亡数应不超过对照组。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

(1) 病毒含量测定 将疫苗用灭菌生理盐水作 10 倍系列稀释，以绒毛尿囊膜途径接种 10 日龄 SPF 鸡胚，每胚 0.2ml，观察 168 小时，计算半数致死量。每羽份  $\geq 1000 \text{ELD}_{50}$ ，判为合格。

(2) 对雏鸡的保护力测定 用 14~28 日龄 SPF 鸡 20 只，其中 10 只，各点眼或口服疫苗 1/5 羽份，另 10 只不接种作为对照，隔离饲养。20 日后，取全部免疫鸡连同对照鸡 5 只，每只点眼攻击鸡传染性法氏囊病病毒强毒 BC6-85 株（含 10<sup>10</sup>BID），72 小时后剖杀所有的鸡，检查法氏囊。攻毒对照组应至少有 4 只鸡法氏囊发生病变，免疫组应至少有 8 只鸡法氏囊无病变，健康对照组 5 只鸡法氏囊应无任何变化。

**【耐老化试验】** 取 5 瓶疫苗于  $37^{\circ}\text{C}$  放置 7 日，取其中 3 瓶，测定病毒含量，与放置前相比，病毒含量下降应不超过 1 个滴度。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于预防鸡传染性法氏囊病。

**【用法与用量】** (1) 可用于各种雏鸡, 依据母源抗体水平, 宜在 14~28 日龄时使用。(2) 按瓶签注明的羽份, 采用点眼、口服、注射途径接种。

**【注意事项】** (1) 免疫对象必须为健康雏鸡。

(2) 饮水免疫时, 其水质必须不含氯等消毒剂, 饮水要清洁, 忌用金属容器。

(3) 饮水前应视地区、季节、饲料等情况, 停水 4~8 小时。饮水器应置于不受日光照射的凉爽地方, 应在 1 小时内饮完。

(4) 严防散毒, 用过的疫苗瓶、器具等应消毒处理。

(5) 当接种已被支原体感染的鸡群时, 可能会引起不同程度的呼吸道反应。

**【规格】** (1) 500 羽份/瓶 (2) 1000 羽份/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存, 有效期为 24 个月。

**附加说明:**

1. 本标准由瑞普(保定)生物药业有限公司提出。

2. 本标准于 2005 年 9 月 22 日经农业部公告第 547 号发布。

## 猪伪狂犬病灭活疫苗

Zhu Weikuanguanbing Miehuoyimiao

Porcine Pseudorabies Vaccine, Inactivated

本品系用猪伪狂犬病毒鄂 A 株接种地鼠肾细胞(BHK-21)增殖, 收获病毒, 经福尔马林灭活后, 加矿物油佐剂混合乳化制成。用于预防猪伪狂犬病。

**【性状】** 外观 白色均匀乳剂。

剂型 油包水型(W/O)。取一清洁吸管, 吸取少量疫苗滴于冷水中, 应呈油滴状, 不扩散。

稳定性 将疫苗加入离心管中, 经 3500r/min 离心 15 分钟, 应不出现分层。

黏度 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应符合规定。

**【装量检查】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应符合规定。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》进行检验, 应无菌生长。

**【安全检验】** (1) 用体重 16~18g 小白鼠 5 只, 各皮下注射疫苗 0.3ml, 观察 14 日, 应健活。

(2) 用体重 1.5~2kg 家兔 2 只, 各臀部皮下注射疫苗 5ml, 观察 14 日, 应健活, 且无不良反应。

**【效力检验】** 用体重 10~20kg 伪狂犬病抗体阴性的断奶仔猪 4 头, 各颈部肌肉注射疫苗 2ml, 28 日后, 采血, 分离血清, 按现行《中国兽药典》附录测定抗体中和指数。免疫猪血清中和指数应 $\geq 316$ 。

**【甲醛和汞类防腐剂残留量测定】** 分别按现行《中国兽药典》进行测定, 应符合规定。

**【作用与用途】** 用于预防猪伪狂犬病。免疫期为 6 个月。

**【用法与用量】** 颈部肌肉注射。育肥仔猪，断奶时每头 2ml，种用仔猪，断奶时每头 2ml，间隔 28~42 日，加强免疫接种 1 次，每头 3ml，以后每隔半年加强免疫接种 1 次。妊娠母猪产前一个月加强免疫 1 次。

**【注意事项】** (1) 使用前摇匀，使疫苗的温度恢复到室温。

(2) 启封后应当天用完。

(3) 切勿冻结。

(4) 一般反应 少数猪注射部位肿胀、体温升高，减食或停食 1~2 日，随着时间延长，症状逐渐减轻，直至消失。严重反应：因品种、个体的差异，少数猪接种后可能出现急性过敏反应，如焦躁不安、呼吸加快、肌肉震颤、可视粘膜充血等，甚至因抢救不及时而死亡，部分怀孕母猪可能出现流产。建议及时使用肾上腺素等药物进行治疗，同时采用适当的辅助治疗措施，以减少损失。

**【规格】** (1) 4ml/瓶 (2) 20ml/瓶 (3) 50ml/瓶 (4) 100ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 12 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由华中农业大学提出。

2. 本标准于 1999 年 12 月 30 日经 (1999) 农牧发 27 号发布。

3. 本标准于 2005 年 11 月 16 日经农业部公告第 573 号批准变更注册。**变更内容：**(1) 变更注册单位。原为华中农业大学，变更后为华中农业大学、中牧股份实业有限公司；(2) 变更兽药生产工艺。原乳化水相与油相比例 1:5 变更为 1:1；(3) **变更免疫剂量，原断奶仔猪 3ml、种猪 5ml，变更为断奶仔猪 2ml、种猪 3ml。**

4. 本标准于 2013 年 7 月 26 日经农业部公告第 1972 号批准变更注册：**增加“50ml/瓶”的规格和“50ml/瓶×1 瓶/盒”的包装，未发布新标准。**

5. 根据现行《中国兽药典》要求改变黏度测定方法，为黏度计法。

6. 根据现行《中国兽药典》要求增加**【装量检查】**项。

## 鸡新城疫、传染性支气管炎二联活疫苗（液氮，VG/GA+H120 株）

Ji Xinchengyi Chuanranxingzhiqiguanyan Erlianhuoyimiao (Yedan, VG/GA +H120 Zhu)

Newcastle Disease and Infectious Bronchitis Vaccine, Live (Frozen, VG/GA +H120 Strain)

本品系用鸡新城疫病毒 VG/GA 株和传染性支气管炎病毒 H120 株分别接种 SPF 鸡胚培养，收获感染鸡胚液，按比例混合，保存于液氮中。用于预防鸡新城疫和传染性支气管炎。

**【性状】** 淡黄色或乳白色均一悬液。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。如有菌生长，应进行杂菌计数和病原性鉴定（现行《中国兽药典》附录）、禽沙门氏菌检验（现行《中国兽药典》附录），应符合规定。每羽份的非病原菌应不超过 1 个。

**【支原体检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无支原体生长。

**【鉴别检验】** 将疫苗用生理盐水作适当稀释（0.1羽份/0.1ml），与等量抗鸡新城疫、传染性支气管炎病毒特异性血清混合，在室温中和1小时，尿囊腔内接种10日龄SPF鸡胚10个，每胚0.2ml。置37℃观察24~144小时，应不引起特异死亡及鸡胚病变，并至少有8个鸡胚健活，鸡胚液对鸡红细胞凝集应呈阴性。

**【外源病毒检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【安全检验】** 取5日龄SPF鸡25只，每只点眼接种疫苗0.05ml（含10个使用剂量），观察21日，均应无异常反应。如有非特异性死亡，应不超过2只。如达到3只，则需重检1次。重检用鸡数量应加倍，非特异性死亡数应不超过5只。

**【效力检验】**（1）鸡新城疫部分 按瓶签注明的羽份，将疫苗用PBS作10倍系列稀释，取 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 和 $10^{-8}$ 4个稀释度分别尿囊腔内接种9~11日龄SPF鸡胚5个，每胚0.2ml，置37℃继续孵育，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，收获鸡胚液，将同一稀释度的鸡胚液等量混合，分别测定红细胞凝集价。至120小时，取出所有活胚，逐一收获鸡胚液，分别测定红细胞凝集价，凝集价 $\geq 1:160$ （微量法 $\geq 1:128$ ）者判为感染，计算半数感染量。每羽份疫苗的病毒含量应 $\geq 10^{6.0}$ EID<sub>50</sub>。

（2）传染性支气管炎部分 按瓶签注明的羽份，将疫苗用PBS稀释至1羽份/ml，即为 $10^{-1}$ ，取1ml，加入等量的鸡新城疫抗血清，在室温下中和30分钟，再作1:5稀释即为 $10^{-2}$ ，再进行10倍系列稀释，取 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 和 $10^{-6}$ 4个稀释度分别尿囊腔内接种9~11日龄SPF鸡胚5个，每胚0.2ml，置37℃继续孵育，观察168小时，24小时以内死亡的鸡胚弃去不计，根据接种后24~168小时死胚及168小时的活胚中，其胎儿具有失水、蜷缩、发育小等特异性病痕者的总和，计算EID<sub>50</sub>，每羽份疫苗的病毒含量应 $\geq 10^{3.5}$ EID<sub>50</sub>。

**【作用与用途】** 用于预防鸡新城疫、传染性支气管炎。

**【用法与用量】** 按瓶签注明羽份，用不含防腐剂或消毒剂的水稀释疫苗。

接种途径 喷雾。

推荐接种程序 首次接种，最早可用于1日龄雏鸡；2周后进行加强接种。

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】**（1）本品仅用于接种健康鸡。

（2）稀释和接种时，应执行常规无菌操作。

（3）只能用清洁、不含防腐剂和消毒剂的器具稀释疫苗。

（4）未用完的疫苗和已使用过的疫苗瓶应按有关规定进行处理。

（5）请记录所使用疫苗之批号、有效期、接种日期、使用的鸡场及所发现的任何反应。

（6）鸡新城疫病毒能引起人眼持续2至3日的轻度炎症，在处理疫苗时应小心避免接触人眼。

**【规格】**（1）1000羽份/瓶（2）2000羽份/瓶（3）5000羽份/瓶（4）10000羽份/瓶

**【贮藏与有效期】** 液氮内保存，有效期为36个月。

**附加说明：**

1. 本标准由梅里亚动物保健有限公司提出。
2. 本标准于 2006 年 2 月 23 日经农业部公告第 608 号发布。

## 鸡新城疫、传染性支气管炎二联活疫苗（VG/GA+H120 株）

Ji Xinchengyi Chuanranxingzhiqiguanyan Erlianhuoyimiao (VG/GA +H120 Zhu)

Newcastle Disease and Infectious Bronchitis Vaccine, Live (VG/GA +H120 Strain)

本品系用鸡新城疫病毒 VG/GA 株和传染性支气管炎病毒 H120 株分别接种 SPF 鸡胚培养，收获感染鸡胚液，混合并加入保护剂，经分装、冻干制成疫苗。用于预防鸡新城疫和传染性支气管炎。

**【性状】** 淡黄色与淡红色海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离，加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。如有菌生长，应进行杂菌计数和病原性鉴定（现行《中国兽药典》附录）、禽沙门氏菌检验（现行《中国兽药典》附录），应符合规定。每羽份的非病原菌应不超过 1 个。

**【支原体检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无支原体生长。

**【鉴别检验】** 将疫苗用生理盐水作适当稀释（0.1 羽份/0.1ml），与等量抗鸡新城疫、传染性支气管炎病毒特异性血清混合，在室温中和 1 小时，尿囊腔内接种 10 日龄 SPF 鸡胚 10 个，每胚 0.2ml。置 37℃ 观察 24~144 小时，应不引起特异死亡及鸡胚病变，并至少有 8 个鸡胚健活，鸡胚液对鸡红细胞凝集应呈阴性。

**【外源病毒检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【安全检验】** 取 5 日龄 SPF 鸡 25 只，每只点眼接种疫苗 0.05ml（含 10 个使用剂量），观察 21 日，均应无异常反应。如有非特异性死亡，应不超过 2 只。如达到 3 只，则需重检 1 次。重检用鸡数量应加倍，非特异性死亡数应不超过 5 只。

**【效力检验】** （1）鸡新城疫部分 按瓶签注明的羽份，将疫苗用 PBS 作 10 倍系列稀释，取  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  和  $10^{-8}$  4 个稀释度分别尿囊腔内接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚 5 个，每胚 0.2ml，置 37℃ 继续孵育，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，收获鸡胚液，将同一稀释度的鸡胚液等量混合，分别测定红细胞凝集价。至 120 小时，取出所有活胚，逐一收获鸡胚液，分别测定红细胞凝集价，凝集价  $\geq 1:160$ （微量法  $\geq 1:128$ ）者判为感染，计算半数感染量。每羽份疫苗的病毒含量应  $\geq 10^{6.0} \text{EID}_{50}$ 。

（2）传染性支气管炎部分 按瓶签注明的羽份，将疫苗用 PBS 稀释至 1 羽份/ml，即为  $10^{-1}$ ，取 1ml，加入等量的鸡新城疫抗血清，在室温下中和 30 分钟，再作 1:5 稀释即为  $10^{-2}$ ，再进行 10 倍系列稀释，取  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  和  $10^{-6}$  4 个稀释度分别尿囊腔内接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚 5 个，每胚 0.2ml，置 37℃ 继续孵育，观察 168 小时，24 小时以内死亡的鸡胚弃去不计，根据接种后 24~168 小时死胚及 168 小时的活胚中，其胎儿具有失水、蜷缩、发育小等特异性病痕者的总和，计算  $\text{EID}_{50}$ ，每羽份疫苗的病毒含量应  $\geq 10^{3.5} \text{EID}_{50}$ 。

**【作用与用途】** 用于预防鸡新城疫、传染性支气管炎。

**【用法与用量】** 按瓶签注明羽份，用不含防腐剂或消毒剂的饮用水稀释疫苗。  
接种途径 个体接种 点眼；群体接种 饮水（用于 4 日龄以上鸡群）、喷雾。

推荐接种程序 首次接种，最早可用于 1 日龄雏鸡；2 周后进行加强接种。

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】** (1) 本品仅用于接种健康鸡。

(2) 稀释和接种时，应执行常规无菌操作。

(3) 只能用清洁、不含防腐剂和消毒剂的器具稀释疫苗。

(4) 未用完的疫苗和已使用过的疫苗瓶应按有关规定进行处理。

(5) 请记录所使用疫苗之批号、有效期、接种日期、使用的鸡场及所发现的任何反应。

(6) 鸡新城疫病毒能引起人眼持续 2 至 3 日的轻度炎症，在处理疫苗时应小心避免接触人眼。

**【规格】** (1) 1000 羽份/瓶 (2) 2000 羽份/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 12 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由梅里亚动物保健有限公司提出。

2. 本标准于 2006 年 2 月 23 日经农业部公告第 608 号发布。

## 小鹅瘟精制蛋黄抗体

Xiaoewen Jingzhi Danhuang Kangti

Gosling Plague Antibodies 本品系用小鹅瘟弱毒 SYG61-24 株接种易感鹅胚培养，收获死亡鹅胚绒毛尿囊液、胚体及绒尿膜混合成匀浆制成灭活抗原，接种产蛋鸡，从蛋黄中提取抗体精制而成。用于治疗 and 紧急预防小鹅瘟。

**【性状】** 略带棕色或淡黄色的透明液体。放置 48 小时后瓶底有少许微细白色沉淀。pH 值为 6.4~7.2。

**【装量检查】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【支原体检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无支原体生长。

**【外源病毒检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【安全检验】** 用 1 日龄健康易感雏鹅 5 只，各皮下注射 2ml；用 18~22g 清洁级小鼠 5 只，各皮下注射 0.5ml。观察 10 日，雏鹅和小鼠均应全部健活。

**【效力检验】** 琼扩抗体效价测定 8.0%氯化钠溶液 100ml 中加入 1g 优质琼脂粉，加热融化后，加入终浓度为 0.01% 硫柳汞防腐，浇制凝胶板。按中央 1 孔外围 6 孔打孔，孔径 3mm，间距 4mm。加样量为 15~20 $\mu$ l，加样后置 37~38℃ 湿盒孵育 24 小时，在室温放置 24~48 小时判定结果。与标准抗原形成白色沉淀线的抗体最大稀释倍数即为蛋黄抗体的效价。琼扩抗体效价应 $\geq$ 1:8。

用雏鹅效检 取 4~7 日龄雏鹅 30 只，随机分为 3 组，每组 10 只。第 1 组各皮下注射蛋黄抗体 0.5ml，第 2 组各皮下注射生理盐水 0.5ml。24 小时后，用小鹅瘟强毒 SYG61 株病毒液皮下注射第 1 组和第 2 组鹅，每只 1ml (约含 100LD<sub>50</sub>)。第 3 组为空白对照组，不注

射任何物品。观察 10 日。第 1 接种蛋黄抗体组，雏鹅应至少 8 只保护。第 2 攻毒对照组，雏鹅应至少 8 只死亡。第 3 空白对照组，应全部健活。

**【甲醛残留量测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【辛酸含量测定】** 按附注进行测定，辛酸含量应 $\leq 0.1\%$ 。

**【作用与用途】** 用于治疗 and 紧急预防小鹅瘟。

**【用法与用量】** 皮下或肌肉注射均可。

紧急预防用量 1 日龄雏鹅，每只 0.5ml；2~5 日龄雏鹅，每只 0.5~0.8ml。

治疗用量 感染发病的雏鹅，每只 1.0~1.5ml。

**【不良反应】** 无可见的不良反应。

**【注意事项】** (1) 本品注射后的被动免疫保护期为 5~7 日。

(2) 本品口服无效。

(3) 本品可连续应用 2~3 次。

(4) 本品应用后对小鹅瘟弱毒疫苗接种有干扰作用，7 日内不宜接种小鹅瘟弱毒疫苗。

(5) 本品可与抗菌素混合 1 次注射。

(6) 本品久置后瓶底有微量白色沉淀，对疗效无影响。

**【规格】** (1) 50ml/瓶 (2) 100ml/瓶 (3) 250ml/瓶 (4) 500ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为 18 个月。

**附注：**辛酸含量检测方法（一次提取比色法）

1 原理 游离脂肪酸能与铜离子结合形成脂肪酸的铜盐而溶于氯仿中，其量与游离脂肪酸含量成正比。用铜试剂测定其中铜离子的含量，即可推算出游离脂肪酸的含量。

2 器材 721 型分光光度计、震荡器、普通离心机。

3 试剂

3.1 氯仿 (AR)。

3.2 pH 值 6.4 磷酸盐缓冲液 (1/30mol/L)

3.2.1 1/30mol/L 磷酸二氢钾溶液 取磷酸二氢钾 4.54g，加蒸馏水至 1L。

3.2.2 1/30mol/L 磷酸氢二钠溶液 取磷酸氢二钠（带 12 个结晶水）11.94g，加蒸馏水至 1L。

3.2.3 取 1/30mol/L 磷酸二氢钾溶液 73.3ml，加入 1/30mol/L 磷酸氢二钠溶液 26.7ml，混合。

3.3 显色剂 称取二乙基二硫代氨基甲酸钠 $[N(C_2H_5)_2CS_2Na]$ 100mg，加正丁醇至 100ml。置 2~8℃可保存 7~14 日。

3.4 铜试剂 取 1mol/L 三乙醇胺溶液 9 份，1mol/L 醋酸溶液 1 份及 64.5g/L 硝酸铜溶液 10 份，混合即成。混合液置 2~8℃可保存 21 日；三乙醇胺、醋酸及硝酸铜溶液可长期分别保存。

3.5 辛酸标准液[0.1% (V/V)] 精确吸取辛酸 (BR) 10 $\mu$ l 与 9.99ml 氯仿充分混匀即可。

3.6 蛋黄氯仿萃提液 按 1 份蛋黄与 3 份 pH 值 6.4 磷酸盐缓冲液混匀后，加入 4 份氯

仿充分振摇，3500r/min 离心 10 分钟，取上清液即可。

#### 4 操作

##### 4.1 标准曲线制定

4.1.1 取洁净干燥的具塞试管 4 支，编为 1~4 号。每管中加入氯仿 5.0ml，然后依次加入辛酸原液 8、4、2 和 1 $\mu$ l，加塞后充分振摇混匀。

4.1.2 另取洁净干燥具塞试管 5 支，编为 1~5 号。1~4 号管分别从 4.1.1 对应号数的试管中吸取 0.3ml 辛酸溶液，5 号试管中加入蒸馏水 0.3ml。

4.1.3 各管分别加入 pH 值 6.4 1/30mol/L 磷酸盐缓冲液 0.1ml、铜试剂 2ml，1~4 号管加氯仿 5.7ml，5 号管加氯仿 6ml。

4.1.4 加塞，振摇 15 分钟，静置 10 分钟后，以 3500r/min 离心 5 分钟。

4.1.5 仔细吸去上层液体及蛋白凝块，弃之。

4.1.6 各管吸氯仿层 4ml 于另一组洁净试管中，加入显色剂 0.5ml，充分混合后放置 5 分钟。

4.1.7 440nm 波长比色，以空白管调零，读取各管吸光度 (A) 值。

4.1.8 绘制标准曲线 以辛酸含量为 X 轴， $A_{440}$  为 Y 轴绘制辛酸浓度 ( $A_{440}$ ) 标准曲线。

##### 4.2 待测样品测定

4.2.1 抽样 按 0.05% 抽样。超滤浓缩液在采样前应充分搅拌混匀。

##### 4.2.2 检测

4.2.2.1 取洁净干燥具塞试管 5 支 (每增加 1 个样，试管增加 2 支)，编为 1~5 号，1、2 号管分别加入待检样品 0.3ml (平行试验)，3、4 和 5 号管分别加入 0.1% 辛酸标准液 0.3ml、蛋黄氯仿萃提液 0.3ml 和蒸馏水 0.3ml。

4.2.2.2 各管分别加入 pH 值 6.4 1/30mol/L 磷酸盐缓冲液 0.1ml、铜试剂 2ml，除标准管加氯仿 5.7ml 外，其余各管加氯仿 6ml。

4.2.2.3 加塞，振摇 15 分钟，静置 10 分钟后离心 5 分钟。

4.2.2.4 仔细吸去上层液体及蛋白凝块弃之。

4.2.2.5 各管吸氯仿层 4ml 于另 1 组洁净试管中，加入显色剂 0.5ml，充分混合后放置 5 分钟。

4.2.2.6 440nm 波长处比色，以空白管调零，读取各管吸光度 (A) 值。

5 结果判定 待检样品  $A_{440}$  - 蛋黄氯仿萃提液  $A_{440}$  < 0.1% 辛酸溶液  $A_{440}$ ，判定为合格。

#### 6 注意事项

6.1 用氯仿提取游离脂肪酸时，加入 pH 值 6.4 磷酸盐缓冲液可以消除磷脂的干扰。但此 pH 值不是脂肪酸铜皂形成的最适条件，经实验证明以 pH 值 8 左右为最好。因此本法测定结果较实际值略偏低。

6.2 显色前吸氯仿层时要注意吸管不要触及管壁，以免沾染管壁上粘着的铜试剂。氯仿层必须清澈，否则会使结果偏高。

6.3 对照管可不加显色剂，而用正丁醇代替，在测定管吸光度读数中减去此对照管的吸光度。

- 6.4 显色后色泽稳定，5分钟到3小时吸光度值不变。
- 6.5 全部容器应为玻璃器皿，不能沾污胶塞，否则结果混乱。

**附加说明：**

1. 本标准由四川绵阳宝莱生物药业有限公司、扬州立华生物技术研究所有限公司提出。
2. 本标准于2006年2月23日经农业部公告第608号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。
4. 【效力检验】项“8.0%氯化钠溶液”改为“8.0%氯化钠溶液 100ml”——明确加入量，完善具体操作方法。

## 鸭病毒性肝炎精制蛋黄抗体

Ya Bingduxingyanan Jingzhi Danhuang Kangti

Duck Virus Hepatitis Antibodies 本品系用鸭病毒性肝炎弱毒 AV2111-30 株接种鸡胚，收获死亡鸡胚绒毛尿囊液、胚体及绒尿膜混合成匀浆制成灭活抗原，接种产蛋鸡，从蛋黄中提取抗体精制而成。用于治疗 and 紧急预防鸭病毒性肝炎。

**【性状】** 略带棕色或淡黄色的透明液体。放置 48 小时后瓶底有少许微细白色沉淀。pH 值为 6.4~7.2。

**【装量检查】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【支原体检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无支原体生长。

**【外源病毒检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【安全检验】** 用 1 日龄健康易感雏鸭 5 只，各皮下注射 2ml；用 18~22g 清洁级小鼠 5 只，各皮下注射 0.5ml。观察 10 日，雏鸭和小鼠均应全部健活。

**【效力检验】** 中和试验 按现行《中国兽药典》附录进行检验，中和抗体效价应 $\geq 1:256$ 。

用雏鸭效检 取 4~7 日龄雏鸭 30 只，随机分为 3 组，每组 10 只。第 1 组各皮下注射蛋黄抗体 0.5ml，第 2 组各皮下注射生理盐水 0.5ml。24 小时后，用鸭病毒性肝炎强毒 AV2111 株病毒液皮下注射第 1 组和第 2 组鸭，每只 1ml（约含 100LD<sub>50</sub>）。第 3 组为空白对照组，不注射任何物品。观察 10 日。第 1 接种蛋黄抗体组，雏鸭应至少 8 只保护。第 2 攻毒对照组，雏鸭应至少 8 只死亡。第 3 空白对照组，应全部健活。

**【甲醛残留量测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【辛酸含量测定】** 按附注进行测定，辛酸含量应 $\leq 0.1\%$ 。

**【作用与用途】** 用于治疗 and 紧急预防鸭病毒性肝炎。

**【用法与用量】** 皮下或肌肉注射均可。

紧急预防用量 1 日龄雏鸭，每只 0.5ml；2~5 日龄雏鸭，每只 0.5~0.8ml。

治疗用量 感染发病的雏鸭，每只 1.0~1.5ml。

**【不良反应】** 无可见的不良反应。

**【注意事项】** (1) 本品注射后的被动免疫保护期为 5~7 日。

- (2) 本品口服无效。
- (3) 本品可连续应用 2~3 次。
- (4) 本品应用后对鸭病毒性肝炎弱毒疫苗接种有干扰作用，7 日内不宜接种鸭病毒性肝炎弱毒疫苗。
- (5) 本品可与抗菌素混合 1 次注射。
- (6) 本品久置后瓶底有微量白色沉淀，对疗效无影响。

**【规格】** (1) 50ml/瓶 (2) 100ml/瓶 (3) 250ml/瓶 (4) 500ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为 18 个月。

**附注：** 辛酸含量检测方法（一次提取比色法）

1 原理 游离脂肪酸能与铜离子结合形成脂肪酸的铜盐而溶于氯仿中，其量与游离脂肪酸含量成正比。用铜试剂测定其中铜离子的含量，即可推算出游离脂肪酸的含量。

2 器材 721 型分光光度计、震荡器、普通离心机。

3 试剂

3.1 氯仿（AR）。

3.2 pH 值 6.4 磷酸盐缓冲液（1/30mol/L）

3.2.1 1/30mol/L 磷酸二氢钾溶液 取磷酸二氢钾 4.54g，加蒸馏水至 1L。

3.2.2 1/30mol/L 磷酸氢二钠溶液 取磷酸氢二钠（带 12 个结晶水）11.94g，加蒸馏水至 1L。

3.2.3 取 1/30mol/L 磷酸二氢钾溶液 73.3ml，加入 1/30mol/L 磷酸氢二钠溶液 26.7ml，混合。

3.3 显色剂 称取二乙基二硫代氨基甲酸钠 $[N(C_2H_5)_2CS_2Na]$ 100mg，加正丁醇至 100ml。置 2~8℃可保存 7~14 日。

3.4 铜试剂 取 1mol/L 三乙醇胺溶液 9 份，1mol/L 醋酸溶液 1 份及 64.5g/L 硝酸铜溶液 10 份，混合即成。混合液置 2~8℃可保存 21 日；三乙醇胺、醋酸及硝酸铜溶液可长期分别保存。

3.5 辛酸标准液[0.1%（V/V）] 精确吸取辛酸（BR）10 $\mu$ l 与 9.99ml 氯仿充分混匀即可。

3.6 蛋黄氯仿萃提液 按 1 份蛋黄与 3 份 pH 值 6.4 磷酸盐缓冲液混匀后，加入 4 份氯仿充分振摇，3500r/min 离心 10 分钟，取上清液即可。

4 操作

4.1 标准曲线制定

4.1.1 取洁净干燥的具塞试管 4 支，编为 1~4 号。每管中加入氯仿 5.0ml，然后依次加入辛酸原液 8、4、2 和 1 $\mu$ l，加塞后充分振摇混匀。

4.1.2 另取洁净干燥具塞试管 5 支，编为 1~5 号。1~4 号管分别从 4.1.1 对应号数的试管中吸取 0.3ml 辛酸溶液，5 号试管中加入蒸馏水 0.3ml。

4.1.3 各管分别加入 pH 值 6.4 1/30mol/L 磷酸盐缓冲液 0.1ml、铜试剂 2ml，1~4 号管加氯仿 5.7ml，5 号管加氯仿 6ml。

- 4.1.4 加塞，振摇 15 分钟，静置 10 分钟后，以 3500r/min 离心 5 分钟。
- 4.1.5 仔细吸去上层液体及蛋白凝块，弃之。
- 4.1.6 各管吸氯仿层 4ml 于另一组洁净试管中，加入显色剂 0.5ml，充分混合后放置 5 分钟。
- 4.1.7 440nm 波长比色，以空白管调零，读取各管吸光度（A）值。
- 4.1.8 绘制标准曲线 以辛酸含量为 X 轴， $A_{440}$  为 Y 轴绘制辛酸浓度（ $A_{440}$ ）标准曲线。
- 4.2 待测样品测定
- 4.2.1 抽样 按 0.05% 抽样。超滤浓缩液在采样前应充分搅拌混匀。
- 4.2.2 检测
- 4.2.2.1 取洁净干燥具塞试管 5 支（每增加 1 个样，试管增加 2 支），编为 1~5 号，1、2 号管分别加入待检样品 0.3ml（平行试验），3、4 和 5 号管分别加入 0.1% 辛酸标准液 0.3ml、蛋黄氯仿萃提液 0.3ml 和蒸馏水 0.3ml。
- 4.2.2.2 各管分别加入 pH 值 6.4 1/30mol/L 磷酸盐缓冲液 0.1ml、铜试剂 2ml，除标准管加氯仿 5.7ml 外，其余各管加氯仿 6ml。
- 4.2.2.3 加塞，振摇 15 分钟，静置 10 分钟后离心 5 分钟。
- 4.2.2.4 仔细吸去上层液体及蛋白凝块弃之。
- 4.2.2.5 各管吸氯仿层 4ml 于另一组洁净试管中，加入显色剂 0.5ml，充分混合后放置 5 分钟。
- 4.2.2.6 440nm 波长处比色，以空白管调零，读取各管吸光度（A）值。

## 5 结果判定

待检样品  $A_{440}$ —蛋黄氯仿萃提液  $A_{440} < 0.1\%$  辛酸溶液  $A_{440}$ ，判定为合格。

## 6 注意事项

6.1 用氯仿提取游离脂肪酸时，加入 pH 值 6.4 磷酸盐缓冲液可以消除磷脂的干扰。但此 pH 值不是脂肪酸铜皂形成的最适条件，经实验证明以 pH 值 8 左右为最好。因此本法测定结果较实际值略偏低。

6.2 显色前吸氯仿层时要注意吸管不要触及管壁，以免沾染管壁上粘着的铜试剂。氯仿层必须清澈，否则会使结果偏高。

6.3 对照管可不加显色剂，而用正丁醇代替，在测定管吸光度读数中减去此对照管的吸光度。

6.4 显色后色泽稳定，5 分钟到 3 小时吸光度值不变。

6.5 全部容器应为玻璃器皿，不能沾污胶塞，否则结果混乱。

## 附加说明：

1. 本标准由四川绵阳宝莱生物药业有限公司提出。
2. 本标准于 2006 年 2 月 23 日经农业部公告第 608 号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。
4. 删除【白血病病毒检验】项——现版《中国兽药典》附录“外源病毒检验”中已含有“白

血病病毒检验”的内容。

## 猪伪狂犬病活疫苗（HB-98 株）

Zhu Weikuangquanbing Huoyimiao（HB-98 Zhu）

Swine Pseudorabies Vaccine, Live（HB-98 Strain）

本品系用双基因(TK、gG)缺失的伪狂犬病毒 HB-98 株接种 SPF 鸡胚成纤维细胞培养，收获细胞培养物，加适宜的保护剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防猪伪狂犬病。

**【性状】** 乳白色或淡黄色海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离，加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【支原体检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无支原体生长。

**【鉴别检验】** 用 DMEM 生长液将疫苗稀释成 200TCID<sub>50</sub>/0.1ml，取 2ml 与等量抗伪狂犬病毒特异性血清混合，置 37℃ 中和 1 小时。同时设病毒对照（2ml 含 200TCID<sub>50</sub>/0.1ml 的病毒悬液与等量的 DMEM 培养基混合）和空白对照（2ml 抗伪狂犬病毒特异性血清与等量的 DMEM 培养基混合），置 37℃ 作用 1 小时。然后将上述作用后的混合液各接种 PK-15 或 IBRS-2 细胞已长成单层的 6 孔细胞培养板 3 孔（每孔 500μl），吸附 1 小时，补充 DMEM 维持液（含 5% 犊牛血清、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素的 DMEM 培养液）至 3ml，置 37℃ 培养，每日观察 2 次，共观察 3 日，对无病变者应盲传 3 代。试验组和空白对照组应无细胞病变，病毒对照应出现细胞病变（CPE）。

**【外源病毒检验】** 鄂 A 野毒的检测按附注进行，应符合规定；其它外源病毒的检验按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无外源病毒污染。

**【病毒含量测定】** 将疫苗用 DMEM 生长液（含 10% 犊牛血清、100U/ml 青霉素、100μg/ml 链霉素的 DMEM 培养液）稀释至冻干前体积，然后做 10 倍系列稀释，取 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 4 个稀释度，每个稀释度接种 96 孔微量细胞培养板一纵排共 8 孔，每孔 100μl，再在每孔加入 PK-15 或 IBRS-2 细胞悬液 100μl，在 37℃ 下培养观察 5 日，80% 以上细胞病变（细胞黑色颗粒增多、圆缩、拉网、脱落）判为感染，计算 TCID<sub>50</sub>。每头份病毒含量应 ≥10<sup>5.0</sup>TCID<sub>50</sub>。

**【安全检验】** 用 18~21 日龄仔猪（PRV 中和抗体效价 ≤1:2）4 头，各肌肉注射或滴鼻接种疫苗 10 头份，连续测量体温 7 日，仔猪应体温正常并无其它不良反应。

**【效力检验】** 用 1 日龄猪（PRV 中和抗体效价 ≤1:2）4 头，各肌肉注射疫苗 1 头份，21 日后，连同对照猪 3 头，各滴鼻攻击 PRV 鄂 A 株病毒液 1ml（含 10<sup>7.0</sup> TCID<sub>50</sub>），观察 14 日。对照猪应全部发病（体温 ≥40℃，至少持续 2 日、精神沉郁），免疫猪应全部保护。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于预防猪伪狂犬病。注苗第 7 日产生免疫力，免疫期为 6 个月。

**【用法与用量】** （1）按瓶签注明头份，用灭菌生理盐水稀释，各皮下或肌肉注射 1ml（1 头份）。

（2）推荐免疫程序为 PRV 抗体阴性仔猪，在出生后 1 周内滴鼻或肌肉注射；具有 PRV

母源抗体的仔猪，在 45 日龄左右肌肉注射；经产母猪每 4 个月免疫 1 次；后备母猪 6 月龄左右肌肉注射免疫 1 次，间隔 1 个月加强免疫 1 次，产前 1 个月左右再免疫 1 次；种公猪每年春、秋季各免疫 1 次。

**【不良反应】** 无。

**【注意事项】** (1) 疫苗在运输、保存、使用过程中应防止高温、消毒剂和阳光照射。

(2) 应对注射部位进行严格消毒。

(3) 疫苗稀释后限 2 小时内用完。

(4) 剩余的疫苗及用具，应经消毒处理后废弃。

**【规格】** (1) 10 头份/瓶 (2) 20 头份/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为 6 个月；-20℃以下保存，有效期为 12 个月。

#### 附注：

1 鄂 A 野毒的检验 设计特异扩增 PRV TK 基因的引物和 LacZ 基因的引物对疫苗毒中的鄂 A 野毒进行检测，若有鄂 A 野毒应扩增至 953bp 的带，而 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup>疫苗毒应只扩增至 748bp 的特异性条带和 433bp 的 LacZ 基因片段。

1.1 PCR 用模板 DNA 的提取 将病毒按细胞原培养液 10% 的量接种 PK-15 或 BHK-21 细胞，80% 以上细胞病变后用吸管吹下病变的细胞，取 500μl 病变的细胞悬液，4000r/min 离心 5min。弃上清，沉淀用 20μl ddH<sub>2</sub>O 重悬。加入 20μl 10% SDS、20μl 0.1mol/L EDTA 和 2μl 20mg/ml 蛋白酶 K，混匀后 50℃ 水浴作用 2~3 小时或 37℃ 水浴作用 10~12 小时。加等量苯酚：氯仿：异戊醇（25：24：1），涡旋混匀。12000r/min 离心 10min。将上清移入另一 EP 管，加入 2 倍体积的无水乙醇，混匀后 -20℃ 放置 30min。12000r/min 离心 10min。倒掉乙醇，加入 200μl 75% 乙醇漂洗 1 次。吸弃乙醇，将沉淀抽干或自然风干。加 20μl ddH<sub>2</sub>O 溶解沉淀，-20℃ 保存备用。

1.2 PCR 引物、扩增基因及大小（见表 1）。

表 1 PCR 引物、扩增基因及大小

种类	引物	目的基因	扩增大小 (bp)	
猪伪狂犬病毒	5'-TCTGTTTCGACACGGACAC-3'	TK	缺失毒	748
	5'-GGGATGACATACACACATGGC-3'		野毒	953

1.3 TK 基因扩增的反应体系：

10×Buffer	5μl
15mmol/L MgCl <sub>2</sub>	5μl
2mmol/L dNTPs	1μl
上游引物 (20μmol/L)	1μl
下游引物 (20μmol/L)	1μl
模板	5μl
Taq DNA 聚合酶	0.5μl (2.5U)
20% 甘油	25μl
ddH <sub>2</sub> O	6.5μl

总体积 50 $\mu$ l

1.4 LacZ 基因的 PCR 扩增 引物:

Ps: 5'-GAACTGCCTGAACTACC-3'

Pr: 5'-ACTGCAACAACGCTGC-3'

反应体系:

10 $\times$ Buffer	5 $\mu$ l
1.5mol/L MgCl <sub>2</sub>	1.67 $\mu$ l
2mmol/L dNTPs	1 $\mu$ l
上游引物 (20 $\mu$ mol/L)	1 $\mu$ l
下游引物 (20 $\mu$ mol/L)	1 $\mu$ l
模板	5 $\mu$ l
Taq DNA 聚合酶	0.5 $\mu$ l (2.5U)
20%甘油	25 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	9.83 $\mu$ l
总体积	50 $\mu$ l

1.5 反应条件 95 $^{\circ}$ C 变性 5min 后进入循环: 95 $^{\circ}$ C 1min、50 $^{\circ}$ C 1min、72 $^{\circ}$ C 1min, 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.6 结果判定 反应完成以后,取 10 $\mu$ lPCR 产物于 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳,同时上 DNA Marker 作参照,电泳后 EB 染色,紫外灯下观察。

结果判定标准: 用 TK<sup>-</sup>/gG<sup>-</sup>/LacZ<sup>+</sup> 疫苗毒接种后病变的细胞为模板,应只能扩增出大小为 748bp 的 PRV HB-98 株的 TK 基因片段和 433bp 的 LacZ 基因片段,而不能扩增出 953bp 的片段,但以 PRV 鄂 A 野毒接种的细胞为模板应扩增出 953bp 的特异性片段。

#### 附加说明:

1. 本标准由华中农业大学、中牧实业股份有限公司提出。
2. 本标准于 2006 年 3 月 10 日经农业部公告第 623 号发布。

## 狂犬病活疫苗 (Flury 株)

Kuangquanbing Huoyimiao (Flury Zhu)

Rabies Vaccine, Live (Flury Strain)

本品系用狂犬病病毒 Flury 株鸡胚低代毒 (LEP), 接种 BHK21 细胞培养, 收获其细胞培养物, 加适宜保护剂, 经冷冻真空干燥制成。用于预防犬的狂犬病。

**【性状】** 微红色或乳白色海绵状疏松团块, 易与瓶壁脱离, 加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无菌生长。

**【支原体检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无支原体生长。

**【外源病毒检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无外源病毒污染。

**【安全检验】** (1) 将疫苗用注射用水 (或 pH 值为 7.2~7.4 的磷酸盐缓冲盐水) 充

分溶解后，肌肉注射成年家兔 4 只，每只 2.5 头份，观察 21~28 日，应不出现任何狂犬病症状（兴奋或抑郁型脑炎症状）。

试验兔若在观察期内，出现死亡但无神经症状，应剖取脑组织，用注射用水制成  $10^{-3}$  乳剂，离心后取上清，脑内注射 11~13 g 小鼠 5 只，每只 0.03 ml。观察 12 日，若全部健活，疫苗判为合格；若有小鼠死亡，可重检 1 次。

(2) 选用至少 3 月龄（无狂犬病抗体）犬 2 只，每只 肌肉注射疫苗 10 头份，观察 21~28 日，应健活。

**【效力检验】** 将疫苗用 pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲液恢复为每毫升含 5 头份，再作 10 倍系列稀释至  $10^{-5}$ 。取  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ ，分别脑内注射 11~13 g（20~21 日龄）小鼠 4 只，每只 0.03 ml，观察至 14 日，计算  $LD_{50}$ ，应  $\geq 10^{4.0}/0.03$  ml。

**【特异性检验】** 将疫苗用 pH 值为 7.2 的磷酸盐缓冲液恢复为每毫升含 5 头份，再作  $10^{-2}$  稀释，与等量狂犬病病毒阳性血清（中和指数 1000 以上）混合，置 37℃ 水浴中和 1 小时后，脑内注射 11~13 g（20~21 日龄）小鼠 4 只，每只 0.03 ml，观察至 14 日，应健活。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于预防犬的狂犬病。免疫期暂定为 12 个月。

**【用法与用量】** 肌肉注射。按瓶签注明头份，用注射用水或 pH 值为 7.2~7.4 的磷酸盐缓冲盐水稀释（1 ml 含 1 头份）。2 月龄以上的犬，每只 1 ml。

**【不良反应】** 无可见的不良反应。

**【注意事项】** （1）仅用于健康犬。

（2）疫苗稀释后，放置阴凉处（装有冰的冰瓶更好），限当日用完。

（3）宠物犬免疫，建议使用灭活疫苗。

**【规格】** （1）5 头份/瓶 （2）10 头份/瓶

**【贮藏与有效期】** 25℃ 保存，应不超过 7 日；2~8℃ 保存，有效期为 6 个月；-15℃ 以下保存，有效期为 12 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由农业部组织拟定。

2. 本标准于 2006 年 3 月 13 日经农业部公告第 625 号发布。

## 猪囊尾蚴细胞油乳剂灭活疫苗

Zhu Nangweiyoubao Youruji Miehuoyimiao

Cysticercus Cellulosae Cell Vaccine, Inactivated

本品系用猪囊尾蚴 CC-97 细胞系经传代培养，收获其细胞及代谢产物，经冻融、超声波裂解，加甲醛溶液灭活后，与油佐剂混合乳化制成。用于预防猪囊尾蚴病。

**【性状】** 外观 为乳白色的乳状液。

剂型 为油包水型。取一清洁吸管，吸取少量疫苗滴于冷水中，除第 1 滴呈云雾状扩散

外，以后各滴均不扩散。

**稳定性** 吸取疫苗 10 ml 加入离心管，以 3000 rpm 离心 15 分钟，管底析出水相应 $\leq 0.5$ ml。

**黏度** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【装量检查】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【安全检验】** 用 20~30 日龄健康易感仔猪（ELISA 抗体效价 $\leq 1:80$ ）5 头，各颈部肌肉注射疫苗 2 头份（4ml），逐日观察 14 日，应全部健活，且应不出现因注射疫苗引起的严重局部或全身不良反应。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

（1）**抗体法** 用 20~30 日龄健康易感（按附注中的方法检测，ELISA 抗体效价 $\leq 1:80$ ）猪 10 头，其中 5 头各颈部肌肉注射疫苗 2ml，14 日后，按相同途径、用相同剂量进行第 2 次接种，另 5 头不接种，作为对照。接种后 28~30 日，对所有猪分别采血，分离血清，用 ELISA 方法测定血清抗体效价（见附注）。对照猪中和抗体效价均 $\leq 1:80$ ，免疫组应至少有 4 头猪的抗体效价 $\geq 1:2560$ 。

（2）**攻虫法** 用 20~30 日龄健康易感（按附注中的方法检测，ELISA 抗体效价 $\leq 1:80$ ）猪 9 头，其中 4 头各颈部肌肉注射疫苗 2ml，14 日后，按相同途径、用相同剂量进行第 2 次接种，另 5 头不接种，作为对照。30 日后，每头猪口服攻击用灭菌生理盐水稀释的猪带绦虫卵 2ml（含虫卵  $2.5 \times 10^3 \sim 3 \times 10^3$  个），90 日后扑杀，检虫。对照猪应至少有 4 头检出虫体，免疫猪应至少保护 3 头。

**【甲醛和汞类防腐剂残留量测定】** 分别按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于预防猪囊尾蚴病。接种后 21~28 日产生免疫力。免疫期为 4 个月。

**【用法与用量】** 颈部肌肉注射。20~30 日龄仔猪首免，14 日后第二次免疫，每次 2ml/头。

**【注意事项】** （1）本品只用于接种健康猪。

（2）使用前应使疫苗达到室温，用前振摇，用于接种的器具应清洁无菌。

（3）免疫时应深部肌肉注射，免疫前及免疫后两周内圈养以防止接触病原。

（4）防止疫苗冻结。疫苗瓶开封后，应于当日用完。

（5）接种后，个别猪可能出现体温升高、减食等反应，一般在 2 日内自行恢复，重者可注射肾上腺素，并采取辅助治疗措施。

**【规格】** （1）10 头份/瓶 （2）50 头份/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 12 个月。

**附注：** 酶联免疫吸附试验（ELISA）操作方法

1 材料

1.1 包被用抗原 取培养 10~15 代的猪囊尾蚴细胞液，以 3000r/min 离心 15 分钟，弃上清，用生理盐水悬浮为  $1 \times 10^7$  个细胞/ml，冻融 3 次，然后用超声波破膜器（在 0.3~0.5A

下)裂解 20 分钟,在 4℃下,以 8000r/min 离心 10 分钟,取上清液,置-20℃保存。

1.2 包被液 0.1mol/L (pH 值 9.6) 碳酸盐缓冲液。

1.3 稀释液 0.05mol/L (pH 值 7.2、0.05%吐温-20) 磷酸盐缓冲液。

1.4 酶标记抗体 酶标兔抗猪 IgG。

1.5 底物 16mg TMB 溶于 8ml 无水乙醇中。

1.6 底物缓冲液 甲液: 0.1mol/L 枸橼酸 乙液: 0.2mol/L 磷酸氢二钠。现用现配,按甲液(0.85ml):乙液(1.15ml)的比例混合制成。

1.7 底物液 取底物缓冲液,加入底物,使其终浓度为 5%,再按每 ml 加入 20 $\mu$ l 0.3% 过氧化氢溶液制成

1.8 终止液 2mol/L 硫酸溶液。

1.9 待检血清

1.10 阳性血清 猪囊尾蚴高免血清。

1.11 阴性血清 无猪囊尾蚴抗体的健康猪血清。

## 2 方法

2.1 包被抗原 用包被液将  $1\times 10^7$  个细胞/ml 的猪囊尾蚴细胞抗原稀释成  $3\times 10^4$  个细胞/ml 浓度,加入酶标板中,100 $\mu$ l/孔,置 37℃ 1 小时,然后放入 2~8℃ 过夜。

2.2 封闭 取出包被过夜的酶标板,拍干,加入含 10%小牛血清的稀释液,100 $\mu$ l/孔,置 37℃ 1 小时,用稀释液洗涤 3 次,每次 3 分钟,拍干。

2.3 加被检血清 将被检血清从 1:80 开始做 2 倍系列稀释,分别加入上述包被的酶标板中,100 $\mu$ l/孔。将阴性血清作 1:160 稀释,加至 4 个孔,100 $\mu$ l/孔。将阳性血清作 1:160 稀释,加至 2 个孔中,100 $\mu$ l/孔。置 37℃ 1 小时,用稀释液洗涤 3 次,每次 3 分钟,拍干。

2.4 加酶标记抗体 将酶标记兔抗猪 IgG 按产品说明稀释,加入酶标板中,100 $\mu$ l/孔,置 37℃ 1 小时,用稀释液洗涤 3 次,每次 3 分钟,拍干。

2.5 加底物液 加入底物液,100 $\mu$ l/孔,室温放置 10 分钟。

2.6 终止 加终止液,50 $\mu$ l/孔。

2.7 测定 在酶标仪上测定波长为 490nm 的光密度 (OD<sub>490nm</sub> 值)。

2.8 临界值的确定 阴性血清 OD<sub>490nm</sub> 平均值+3SD。

## 3 判定标准

3.1 阳性对照孔 OD<sub>490nm</sub> 值应 $\geq$ 0.3, 试验方有效。

3.2 OD<sub>490nm</sub> 值大于或等于临界值的被检血清最高稀释度为被检血清的 ELISA 效价。

## 附加说明:

1. 本标准由天津实验动物中心提出。

2. 本标准于 2006 年 4 月 4 日经农业部公告第 634 号发布。

3. 根据现行《中国兽药典》要求改变黏度测定方法,为黏度计法。

4. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

## 鸡传染性法氏囊病活疫苗（Gt 株）

Ji Chuanranxing Fashinangbing Huoyimiao (Gt Zhu)

Infectious Bursal Disease Vaccine (Gt Strain), Live

本品系用鸡传染性法氏囊病病毒 Gt 株，接种 SPF 鸡胚成纤维细胞（CEF）培养，收获细胞培养物，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防鸡传染性法氏囊病。

**【性状】** 淡黄色海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离，加稀释液后迅速溶解，为橙红色液体，透明、无味，有少量絮状。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【支原体检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无支原体生长。

**【外源病毒检验】** 按《中国兽药典》附录进行检验，应无外源病毒污染。

**【病毒含量】** 将疫苗用 Hank's 液作 10 倍系列稀释，接种于生长良好的 CEF 单层（每瓶 100ml）上，每瓶 1ml，37℃ 吸附 1 小时，然后倒去病毒液，覆盖含 5% 犊牛血清的 MEM 营养琼脂，每瓶 8ml，待凝固，将瓶倒置，37℃ 培养 48 小时，再覆盖含 0.01% 中性红的营养琼脂，每瓶 8ml，待凝固，将瓶倒置，37℃ 培养，观察 72 小时，每 24 小时，记录蚀斑数，计算平均值。细胞培养 72 小时，每羽份疫苗病毒含量  $\geq 4.0 \times 10^5$  PFU。

**【安全检验】** 用 9~11 日龄 SPF 鸡 20 只，分成 2 组，各 10 只。第 1 组每只按 10 羽份疫苗的剂量口服及滴鼻、点眼接种；第 2 组不接种疫苗作为对照，两组分别隔离饲养。观察 7 日后，全部扑杀，分别称体重，解剖，取法氏囊并称量，接毒组与对照组的法氏囊均不应有出血、坏死、黄色粘液样变化，且 B:B 指数应  $\geq 0.7$ 。

**【效力检验】** （代表批次进行）

用 9~11 日龄 SPF 鸡 10 只，每只滴鼻、点眼接种 0.5 羽份疫苗，14 日后，连同 SPF 对照鸡 10 只，每只滴鼻、点眼攻击鸡传染性法氏囊病病毒 IBDV-Gx 株 0.2ml（含  $4.0 \times 10^3$  EID<sub>50</sub>）。观察 7 日，对照鸡应至少死亡 6 只，免疫鸡应至少保护 9 只，临床不发病，不死亡。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于预防鸡传染性法氏囊病。

**【用法与用量】** 按瓶签注明的羽份，用生理盐水或其他适宜稀释液稀释。每只点眼或滴鼻接种 0.03~0.05ml。饮水免疫，剂量加倍。

推荐的免疫程序为：无母源抗体的鸡，7 日龄首免，14 日龄 2 免；有母源抗体的鸡，14 日龄首免，21 日龄 2 免，28 日龄 3 免。

**【注意事项】** （1）疫苗为淡黄色疏松块状，若出现失真空、变色等现象则不能使用。

（2）饮水免疫接种前，鸡群停止饮水 2 小时。

（3）稀释液应用灭菌生理盐水或灭菌蒸馏水；饮水免疫时，应注意饮水槽的消毒与清洁，忌用金属容器。

（4）疫苗运输与保存时，应注意冷藏。

**【规格】** 500 羽份/瓶

**【贮藏与有效期】** -20℃ 以下保存，有效期为 24 个月。

附加说明：

1. 本标准由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提出。
2. 本标准于 2006 年 4 月 25 日经中华人民共和国农业部公告第 644 号发布。

## 禽流感灭活疫苗（H9 亚型，Sy 株）

Qinliugan Miehuo Yimiao (H9 Yaxing, Sy Zhu)

Avian Influenza Vaccine (H9 Subtype, Sy Strain), Inactivated

本品系用免疫原性优良的 A 型禽流感病毒 A/chicken/shaanxi/SY/97 (H9N2) 株（简称 SY 株）接种易感鸡胚培养，收获感染鸡胚液，经甲醛溶液灭活后，与油佐剂混合乳化制成。用于预防由 H9 亚型禽流感病毒引起的禽流感。

**【性状】** 外观 白色均质乳剂。

剂型 油包水型。取一清洁吸管，吸取少量疫苗滴于冷水中，除第一滴呈云雾状扩散外，以后各滴均应不扩散。

稳定性 取疫苗 10ml 加入离心管中，以 3000r/min 离心 15 分钟，除管底出现微量(≤0.5ml) 水相外，应不出现分层。

黏度 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【装量检查】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【安全检验】** 用 21~28 日龄 SPF 鸡 10 只，颈背侧皮下或胸肌注射疫苗，每只 1.0ml，观察 21 日，应不出现由疫苗引起的局部或全身不良反应。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

(1) 用 21~28 日龄 SPF 鸡 10 只，各颈背侧皮下注射疫苗 0.3ml，接种后 21 日，连同对照鸡 10 只，采血，分离血清，测定 HI 抗体效价，免疫鸡至少有 9 只 HI 抗体效价 $\geq 6\log_2$ ，对照鸡 HI 抗体效价均 $\leq 2\log_2$ 。

(2) 用 21~28 日龄 SPF 鸡 10 只，各颈背侧皮下注射疫苗 0.3ml，接种后 21 日，连同对照鸡 10 只，各肌肉注射禽流感病毒 Sy 株病毒液 0.5ml（含  $5 \times 10^{8.0}$  EID<sub>50</sub>），攻毒后第 5 日，从鸡喉头和泄殖腔采样，用 9~11 日龄 SPF 鸡胚分离病毒。免疫鸡病毒分离应均为阴性；对照组鸡应至少有 8 只病毒分离为阳性。

**【甲醛残留量测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于预防 H9 亚型禽流感病毒引起的禽流感。小鸡免疫期为 3 个月；成年鸡免疫期为 9 个月。

**【用法与用量】** 30 日龄以下小鸡，每只颈背侧皮下注射 0.3ml，30 日龄以上鸡，每只颈背侧皮下或胸肌注射 0.5ml。

**【注意事项】** (1) 注射前应将疫苗恢复到室温。

(2) 疫苗使用前应充分摇匀。

(3) 宰前 28 日内禁止使用。

【规格】 (1) 100ml/瓶 (2) 250ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为12个月。

**附加说明:**

1. 本标准由杨凌绿方生物工程有限公司提出。
2. 本标准于2006年4月25日经农业部公告第644号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》要求改变黏度测定方法，为黏度计法。
4. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

### 鸡新城疫低毒力活疫苗（ZM10株）

Ji Xinchengyi Diduli Huoyimiao (ZM10 Zhu)

Newcastle Disease Vaccine, Live (ZM10 Strain)

本品系用鸡新城疫病毒弱毒株（ZM10株）接种SPF鸡胚培养，收获感染胚液，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防鸡新城疫。

【性状】 微黄色海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离，加稀释液后迅速溶解。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。如有细菌生长，应进行杂菌计数和病原性鉴定（现行《中国兽药典》附录）、禽沙门氏菌检验（现行《中国兽药典》附录），应符合规定。每羽份的非病原菌应不超过1个。

【支原体检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无支原体生长。

【鉴别检验】 将疫苗稀释至0.1羽份/0.1ml，与等量抗鸡新城疫病毒特异性血清混合，室温中和1小时后，尿囊腔接种SPF鸡胚10枚，每胚0.1ml，置37℃继续孵育，观察120小时，在24~120小时内不引起特异死亡且至少存活8枚，鸡胚液作红细胞凝集试验，应为阴性。

【外源病毒检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无外源病毒污染。

【安全检验】 取1日龄SPF雏鸡20只，分成两组，第1组10只，每只滴鼻接种0.05ml（10个使用剂量）的疫苗；第2组10只，不接种作为对照，两组在相同条件下分别饲养管理，观察10日，应无不正常反应。如有非特异性死亡，免疫组与对照组均不应超过1只。

【效力检验】 下列方法任择其一。

(1) 用鸡胚检验 按瓶签注明的羽份，将疫苗用灭菌生理盐水稀释至1羽份/0.1ml，再作10倍系列稀释，取 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 3个稀释度，分别尿囊腔内接种10日龄SPF鸡胚5枚，每胚0.1ml，置37℃继续孵育，48小时前死亡的鸡胚弃去不计，在48~120小时死亡的鸡胚，随时取出，收获鸡胚液，将同一稀释度的鸡胚液等量混合，分别测定红细胞凝集价。至120小时，取出所有活胚，逐个收获鸡胚液，分别测定红细胞凝集价，凝集价 $\geq 1:128$ （微量法）者判为感染，计算半数感染量，每羽份 $\geq 10^6$ EID<sub>50</sub>，判为合格。

(2) 用鸡检验 用1~2月龄SPF鸡10只，每只滴鼻接种1/100使用剂量，10~14日后连同未免疫的SPF对照鸡3只，各肌肉注射含 $10^4$ ELD<sub>50</sub>的鸡新城疫北京株强毒1ml，观察10~14日，对照鸡全部发病死亡，免疫鸡至少保护9只，判为合格。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于预防鸡新城疫。

**【用法与用量】** 按瓶签注明羽份，用生理盐水或适宜的稀释液稀释。滴鼻或点眼免疫，每只 0.05ml；饮水或喷雾免疫，剂量加倍。

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】** （1）有鸡支原体感染的鸡群，禁用喷雾免疫。

（2）疫苗加水稀释后，应放在冷暗处，必须在 4 小时内用完。

**【规格】** （1）500 羽份/瓶 （2）1000 羽份/瓶 （3）2000 羽份/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃以下保存，有效期为 24 个月；2~8℃保存，有效期为 12 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由乾元浩股份有限公司南京生物药厂提出。

2. 本标准于 2006 年 5 月 29 日经农业部公告第 659 号发布。

## 口蹄疫病毒非结构蛋白抗体单抗阻断酶联免疫吸附试验诊断试剂盒

Koutiyibingdu Feijiegoudanbaikangti Dankangzuduan Meilianmianyixifushiyan  
Zhenduanshijihe

Foot and Mouth Disease Virus NS Protein Monoclonal Antibody Blocking ELISA Kit

本品系用基因工程技术表达的口蹄疫病毒 VPg1 抗原包被聚苯乙烯酶联反应板、辣根过氧化物酶标记的抗口蹄疫病毒 VPg1 单克隆抗体、阴性对照血清、阳性对照血清、样品稀释液、底物溶液、终止液和洗涤液等组分组装制成。用于检测口蹄疫病毒非结构蛋白抗体，并可区分感染动物及灭活疫苗免疫动物。

**【性状】** 密封完好、无变形、组分齐全、无破损、无渗漏、标签字迹清晰。其中：

（1）抗原包被 96 孔板 包装袋无裂纹、真空严密，装量为 1 块板。

（2）酶结合物溶液 应为淡黄色澄清溶液，无臭、无味，无沉淀物，装量为 12ml。

（3）阴性对照血清 应为淡黄色澄清溶液，无臭、无味，无沉淀物，装量为 1.5ml。

（4）阳性对照血清 应为淡黄色澄清溶液，无臭、无味，无沉淀物，装量为 1.0ml。

（5）TMB 底物溶液 A 液 应为无色澄清溶液，无沉淀物，装量为 8ml。

（6）TMB 底物溶液 B 液 应为无色澄清溶液，无沉淀物，装量为 8ml。

（7）20 倍浓缩洗涤液 应为无色澄清、无臭、无味、无沉淀的溶液，装量为 30ml。

（8）样品稀释液 应为金黄色澄清溶液，无臭、无味、无沉淀物，装量为 15ml。

（9）终止液 应为无色澄清溶液，无沉淀物，装量为 8ml。

（10）样品稀释板 包装袋严密，装量为 1 块板。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，阴性对照血清、阳性对照血清、酶结合物均应无菌生长。

**【敏感性检验】** 用试剂盒检测 7 份敏感性质控血清（由北京世纪元亨动物防疫技术有限公司提供），每份血清重复检测 4 孔，取 OD<sub>450nm</sub> 平均值计算阻断率，每份敏感性质控血清的阻断率均应在合格范围内，判定结果均应为阳性（见表 1）。

表 1 敏感性质控血清检测值合格标准

质控血清号	3	4	5	8	9	12	13
阻断率范围 (%)	78.7~95.3	58.2~77.7	40.1~63.9	77.7~94.8	42.1~68.3	76.5~92.2	47.0~67.1
判定结果合格标准	+	+	+	+	+	+	+

**【特异性检验】** 用试剂盒检测 6 份特异性质控血清（由北京世纪元亨动物防疫技术有限公司提供），每份血清重复检测 4 孔，取 OD<sub>450nm</sub> 平均值计算阻断率，每份特异性质控血清的阻断率均应在合格范围内，判定结果均应为阴性（见表 2）。

表 2 特异性质控血清检测值合格标准

质控血清号	1	2	6	7	10	11
阻断率范围 (%)	-19.0~19.5	-2.3~27.0	-20.6~18.4	-18.0~20.4	-14.1~25.7	-5.8~29.5
判定结果合格标准	-	-	-	-	-	-

**【作用与用途】** 检测牛、羊、猪及其它动物血清中口蹄疫病毒非结构蛋白抗体，可用于检测口蹄疫病毒（FMDV）感染，并区分感染动物及灭活疫苗免疫动物。

**【用法与判定】** 1 用法

1.1 样品准备

1.1.1 样品的采集、运输应按照国家有关规定进行。

1.1.2 在实验前应将样品以 10000r/min 离心 5 分钟。

1.2 洗涤工作液配制 使用前将 20 倍浓缩洗涤液恢复至室温，并振摇，然后用去离子水或双蒸水作 20 倍稀释。配制的洗涤工作液限 8 小时内用完。

1.3 操作方法

1.3.1 试剂在使用前应于室温（20~30℃）放置 1 小时，试剂应轻轻旋转并振摇均匀。

1.3.2 样品稀释板 A1、B1、C1 3 孔作为阴性对照孔；D1、E1 两孔作为阳性对照孔；其余孔作为稀释待检样品之用，每孔 1 个样品。按 1:1 的体积比稀释待检血清（100μl 样品稀释液+100μl 待检血清），轻振混匀，阴性和阳性对照不稀释。

1.3.3 剪开抗原包被板的铝箔包装袋，取出口蹄疫病毒抗原包被板，在记录表上记录阳性对照、阴性对照和样品的位置，并分别在相应孔中加入阴性对照（3 孔）原液和阳性对照（2 孔）原液（不用稀释）、稀释好的待检血清各 100μl。贴上封板膜，置 20~30℃，孵育 18~20 小时。

1.3.4 小心揭掉封板膜，弃去各孔中液体、拍干。向各孔中加洗涤工作液约 350μl，静置约 30 秒，弃去各孔中液体，如此重复洗涤 5 次，最后在吸水纸上拍干。

1.3.5 每孔加入酶结合物溶液 100μl，轻振混匀，贴上封板膜，置 36.5~37.5℃，孵育 59~61 分钟。

1.3.6 重复步骤 1.3.4。

1.3.7 每孔加入底物液 A 50 $\mu$ l，再加入底物液 B 50 $\mu$ l，轻振混匀，置 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 分钟。

1.3.8 每孔加入终止液 50 $\mu$ l，轻振混匀，应在 10 分钟内，用酶标仪测定 450nm 波长的 OD<sub>450nm</sub> 值。

## 2 判定

2.1 试验结果同时符合下列条件，判为有效：

2.1.1 阴性对照 OD<sub>450nm</sub> 平均值-阳性对照 OD<sub>450nm</sub> 平均值应 $\geq$ 0.5；

2.1.2 阳性对照阻断率平均值应在 70%~90%之间。

2.2 阻断率（%）的计算：

$$\text{阻断率} = \frac{(\text{阴性对照孔 OD}_{450\text{nm}} \text{ 平均值} - \text{样品孔 OD}_{450\text{nm}} \text{ 值})}{\text{阴性对照孔 OD}_{450\text{nm}} \text{ 平均值}} \times 100\%$$

## 2.3 结果判定

2.3.1 被检样品阻断率 $\geq$ 40%，判为口蹄疫病毒非结构蛋白抗体初检阳性。

2.3.2 被检样品阻断率 $<$ 40%，判为口蹄疫病毒非结构蛋白抗体初检阴性。

2.3.3 初检阳性的样品，应取原样品重复测试，每份平行测定 2 孔，若重复测试中任何 1 孔为阳性，则样品判为口蹄疫病毒非结构蛋白抗体阳性，否则判为口蹄疫病毒非结构蛋白抗体阴性。

2.4 结果解释 根据检测结果，临床上可做出初步判断：口蹄疫病毒非结构蛋白抗体阳性，说明该动物曾经感染过口蹄疫病毒。

**【注意事项】**（1）本试剂盒仅供体外诊断用。

（2）试剂盒从冷藏环境中取出后，应恢复至室温后再使用；未用完的抗原包被板加干燥剂放于自封袋中密封，置 2~8 $^{\circ}$ C 保存。

（3）加液时应使用加液器并经常校对其准确性，以减少试验误差，吸取每个血清样品后都要更换吸头。

（4）待检血清样品数量较多时，应使用八或十二通道微量移液器，从稀释板转移到反应板中，以便缩短加样时间。

（5）洗涤时各孔均需加满洗涤液，防止因洗涤不充分造成非特异性显色。

（6）封板膜只限一次使用，以避免交叉污染。

（7）结果判定必须以酶标仪读数为准，且终止反应后应尽快（应在 10 分钟内）测定其 OD<sub>450nm</sub> 值。

（8）在实验全过程中需戴一次性手套，废弃溶液和其它废弃物等应做为传染性物质来处理。

（9）不同批次试剂不能混用，勿使用过期的试剂盒。

（10）底物 B 液中含有 TMB 成份，对强光和氧化剂敏感，勿将暴露于强光下。

（11）终止液为 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，应避免与眼、皮肤接触；如接触，立刻用大量自来水冲洗。

(12) 请严格按照实验操作步骤操作；严格控制反应温度和时间；可对样品设置重复取平均值，以减小操作误差的影响。

(13) 根据厂家提供的说明书对酶标仪和洗板机进行安装、使用、校对和维护。

(14) 对漏洒的试剂要用 0.25% 的次氯酸钠溶液进行彻底清洗。对含有酸性的漏洒液，要先擦干，再用次氯酸钠溶液擦净。

(15) 本试剂盒部分防腐剂使用了叠氮钠。在倾倒含有叠氮钠的溶液时，应用大量的水冲洗。

**【规格】** 96 头份/盒

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 9 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由农业部兽医诊断中心、北京世纪元亨动物防疫技术有限公司提出。
2. 本标准于 2006 年 5 月 29 日经农业部公告第 659 号发布。

### 鸡传染性法氏囊病活疫苗（BJV 株）

Ji Chuanranxingfashinangbing Huoyimiao (BJV Zhu)

Infectious Bursal Disease Vaccine, Live (BJV Strain)

本品系用鸡传染性法氏囊病病毒 BJV 株接种 SPF 鸡胚成纤维细胞（CEF）培养，收获感染细胞培养液，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防雏鸡传染性法氏囊病。

**【性状】** 类白色或黄褐色海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离，加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【支原体检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无支原体生长。

**【外源病毒检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无外源病毒污染。

**【病毒含量测定】** 按瓶签注明的羽份，用无菌乳欧液做 10 倍系列稀释，取  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  4 个稀释度，分别接种生长良好的 CEF 单层 4 孔，每孔 0.1ml，37℃ 培养 96 小时，观察 CPE，计算 TCID<sub>50</sub>，每羽份病毒含量应  $\geq 10^{4.0}$  TCID<sub>50</sub>。

**【鉴别检验】** 用灭菌汉氏液将疫苗作  $10^{-5}$  稀释后，与等量抗鸡传染性法氏囊病病毒单特异性血清混合，经 37℃ 中和 1 小时后，接种 CEF 单层 4 瓶，每瓶 0.5 ml，另加细胞维持液 4.5 ml，同时设病毒对照 4 瓶、血清对照 4 瓶、细胞对照 4 瓶。置 37℃ 培养，观察 7 日，试验组和其他对照组均应不产生 CPE。病毒对照组 24 小时出现 CPE，7 日时应有 85% 以上的细胞圆缩、脱落。

**【安全检验】** 用 7~10 日龄 SPF 雏鸡 25 只，分成 2 组。第 1 组 15 只，每只点眼口服接种 10 羽份疫苗；第 2 组 10 只，不接种病毒作为对照。2 组分别隔离饲养。观察 21 日后，均应健活，扑杀，剖检，观察法氏囊，应无明显变化，同时称囊重、体重，计算囊指数，平均囊指数应不低于 0.70。

**【效力检验】** （代表批次进行）

用雏鸡检验 用 7~14 日龄 SPF 雏鸡 25 只，其中 10 只鸡每只经点眼、口服接种 1/5

羽份疫苗，另 15 只作为对照，分别隔离饲养，21 日后，取全部免疫鸡连同对照组 10 只鸡，各点眼、口服接种 IBDV 强毒 LX 株病毒液 0.20ml（含  $10^{4.0}EID_{50}$ ），5 日后，扑杀所有存活鸡和死亡鸡，检查法氏囊变化，免疫鸡法氏囊应至少 8 只无病变，健康对照鸡法氏囊不应有任何变化，攻毒对照鸡应全部有法氏囊病变，并且至少死亡 5 只，法氏囊呈胶胨样水肿、质脆或严重出血呈“血葫芦状”等病症。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于预防雏鸡传染性法氏囊病。

**【用法与用量】** （1）可供各品种雏鸡使用。

（2）按瓶签注明羽份，每羽份加入 0.2ml 无菌生理盐水，充分摇匀，用滴管吸取疫苗，每只鸡点眼 1 滴，余下口服。饮水免疫，剂量加倍。

（3）对于无母源抗体或母源抗体不明的鸡群，推荐的首免时间为 10~14 日龄，间隔 14~21 日进行第 2 次免疫；对已知的高母源抗体鸡群，首免在 14~21 日龄，二免在首免后的 14~21 日进行。

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】** （1）10 日龄以下雏鸡禁用。

（2）在饮水免疫前，一般停水 4~8 小时。

（3）饮水免疫时，水中不得含有氯等消毒剂，饮水器应清洁，忌用金属制品。饮水器应放置在不受阳光照射的地方，限 1 小时内饮完。

（4）应将用过的疫苗瓶、器皿等作消毒处理，严禁散毒。

**【规格】** （1）500 羽份/瓶 （2）1000 羽份/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃ 以下保存，保存期为 18 个月。

附加说明：

1. 本标准由北京市农林科学院畜牧兽医研究所提出。
2. 本标准于 2006 年 8 月 17 日经农业部公告第 704 号发布。

## 仔猪水肿病灭活疫苗

Zizhushuizhongbing Miehuoyimiao

Piglet Edema Disease Vaccine, Inactivated

本品系用血清型分别为 O138、O139、O141 的大肠杆菌 C83905、C83684、C83527 株接种适宜培养基培养，收获培养物，用甲醛溶液灭活后、浓缩，加氢氧化铝胶制成。用于预防仔猪水肿病。

**【性状】** 静置后，上层为棕黄色澄明液体，下层为灰白色沉淀，振摇后呈均匀混悬液。

**【装量检查】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【安全检验】** 用 14 日龄健康易感仔猪 4 头，各肌肉注射疫苗 4ml，连续观察 7 日，应不出现由疫苗接种引起的全身不良反应和明显的局部反应。

**【效力检验】** (1) 用体重为 16~18g 的清洁级昆明系小鼠 10 只，各皮下注射疫苗 0.05ml，10 日后，连同对照小鼠 5 只，各腹腔注射一个致死剂量的 C83905、C83684、C83527 混合菌液（各含  $2 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$  个活菌），连续观察 7 日。对照小鼠应全部死亡，免疫鼠应至少保护 8 只。

(2) 用 14~18 日龄健康易感仔猪 5 头，每头肌肉注射疫苗 2ml，14 日后，连同对照仔猪 2 头，各静脉注射致死量的 C83905、C83684、C83527 的混合毒素，连续观察 7 日。对照猪应全部死亡，免疫猪应至少保护 4 头（发病判定标准见附注）。

**【甲醛和汞类防腐剂残留量测定】** 分别按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于预防仔猪水肿病。免疫期 3 个月。

**【用法与用量】** 颈部深层肌肉注射，14~18 日龄仔猪每头 2ml。

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】** (1) 疫苗恢复至室温 ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ )，摇匀后使用。

(2) 凡疫苗瓶破裂、瓶盖松脱及内含异物者，严禁使用。

**【规格】** (1) 10ml/瓶 (2) 20ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 12 个月。

**附注：** 仔猪的发病判定标准

± 无任何症状，突然死亡；

+ 体温不高，触之惊叫，叫声嘶哑；

++ 除“+”外，病猪倒地，四肢划动，似游泳状，先拉稀，后便秘；

+++ 除“++”外，病猪脸部、眼睑水肿，重者颜面、颈部变“胖”；

++++ 除“+++”外，病猪死亡，剖检后可见上下眼睑、下颌部、头顶皮下呈灰白色凉粉样水肿，胃大弯、贲门部水肿，在胃的粘膜层与肌肉层之间呈胶冻样水肿；结肠间肠系膜及淋巴结水肿。

出现“++”以上反应者，可判为发病。

**附加说明：**

1. 本标准由辽宁益康生物制品有限公司提出。

2. 本标准于 2006 年 8 月 17 日经农业部公告第 704 号发布。

3. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

## 兔病毒性出血症、多杀性巴氏杆菌病二联灭活疫苗（CD85-2 株 + C51-17 株）

Tu Bingduxingchuxuezheng Duoshaxingbashiganjunbing Erlian Miehuoyimiao (CD85-2 Zhu +

C51-17 Zhu)

Rabbit Hemorrhagic disease and Pasteurella multocida Vaccine (CD85-2 Strain+C51-17 Strain),  
Inactivated

本品系用兔病毒性出血症病毒 CD85-2 株和兔源荚膜 A 群多杀性巴氏杆菌 C51-17 株分别接种家兔和适宜培养基增殖, 收获感染兔的肝、脾、肾等脏器和培养物, 经甲醛溶液灭活后, 再向兔多杀性巴氏杆菌灭活菌液中加入氢氧化铝胶佐剂并浓缩, 然后按适当比例混合制成。用于预防兔病毒性出血症(兔瘟)和兔多杀性巴氏杆菌病。

**【性状】** 本品静置后上层为淡黄色澄明液体, 下层为灰白色沉淀; 振摇后呈灰褐色均匀混悬液。

**【装量检查】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应符合规定。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无菌生长。

**【安全检验】** 用体重为 1.5~2.0 kg 的家兔 4 只, 每只皮下注射疫苗 4ml, 观察 10 日, 应全部健活。

**【效力检验】** 用体重为 1.5~2.0kg 健康易感家兔 8 只, 每只皮下注射疫苗 1ml, 另设不免疫对照兔 8 只, 将免疫组与对照组均分为 2 组, 在同等条件下饲养。一组于免疫后 14 日, 各皮下注射 1:10 稀释兔病毒性出血症 CD<sub>85-2</sub> 株组织毒 1ml, 观察 10 日, 免疫兔应全部健活, 对照兔应至少死亡 3 只为合格。另一组于免疫后 21 日, 各皮下注射一个致死量的 C51-17 强毒菌液 1ml, 观察 10 日, 免疫兔应至少保护 3 只, 对照兔应全部死亡为合格。

**【甲醛和汞类防腐剂残留量测定】** 分别按现行《中国兽药典》附录进行测定, 应符合规定。

**【作用与用途】** 用于预防兔病毒性出血症和兔 A 型多杀性巴氏杆菌病。免疫期: 兔病毒性出血症病为 12 个月, 兔 A 型多杀性巴氏杆菌病为 5 个月。

**【用法与用量】** 1 月龄以上的健康家兔, 每只颈背皮下注射 1ml。

**【不良反应】** 注射本品后可能在注射部位形成 0.5cm 左右的硬节, 2~4 周会自然消失, 不影响其使用效果。

**【注意事项】** (1) 注射前应了解当地兔病的流行情况, 病弱兔、怀孕兔不宜注射。

(2) 本品应在规定条件下保存, 严防冻结。冻结过的疫苗禁用。

(3) 使用本苗时, 针头、注射器均应灭菌, 方能使用。

(4) 用前应充分摇动疫苗并使其升至室温, 使用时充分摇匀。开口后的疫苗在当日内用完, 未用完的疫苗不得再次使用。

(5) 注射本疫苗时, 每注射一只兔更换一根针头。

(6) 本品在使用前应仔细检查, 如发现玻璃破裂, 没有瓶签或瓶签不清楚或苗中混有杂质、已过失效期或未在规定条件下保存者, 都不能使用。

(7) 其它注意事项见使用兽用生物制品一般注意事项。

**【规格】** (1) 10ml/瓶 (2) 20ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存, 有效期为 12 个月。

附加说明:

1. 本标准由中牧实业股份有限公司提出。
2. 本标准于 2006 年 9 月 11 日经农业部公告第 717 号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

## 鸡新城疫病毒（La Sota 株）、禽流感病毒（H9 亚型，SS 株）二联灭活疫苗

Jixinchengyibingdu (La Sota Zhu) Qinliuganbingdu (H9 Yaxing, SS Zhu) Erlian  
Miehuoyimiao

Newcastle Disease Virus (La Sota Strain) and Avian Influenza Virus (H9 Subtype, SS Strain)  
Vaccine, Inactivated

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株和 A 型禽流感病毒 A/Chicken/Guangdong/SS/94(H9N2) 株（简称 SS 株）分别接种易感鸡胚，收获感染胚液，浓缩，经甲醛溶液灭活，与油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡新城疫和 H9 亚型禽流感。

**【性状】** 外观 乳白色乳剂。

剂型 为油包水型。取一清洁吸管，吸取少量疫苗滴于冷水中，应呈油滴状不扩散。

稳定性 取 10ml 疫苗加入离心管中，以 3500r/min 离心 15 分钟，应不出现分层。

黏度 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【装量检查】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【安全检验】** 用 4~5 周龄 SPF 鸡 10 只，各颈部皮下注射疫苗 2ml，观察 14 日，应不出现由疫苗引起局部和全身不良反应。

**【效力检验】** （1）鸡新城疫部分 采用血清学方法进行检验，结果不符合规定时，可采用免疫攻毒法进行效力检验。

血清学方法 用 30~60 日龄 SPF 鸡 15 只，10 只各皮下或肌肉注射疫苗 20 $\mu$ l（1/25 羽份），另 5 只作对照。接种后 21~28 日，每只鸡各采血，分离血清，按现行《中国兽药典》附录进行 HI 抗体效价测定。免疫组 HI 抗体效价的几何平均值应 $\geq 4\log_2$ ，未免疫对照组 HI 抗体效价的几何平均值应 $\leq 2\log_2$ 。

免疫攻毒法 用 30~60 日龄 SPF 鸡 15 只，10 只各皮下或肌肉注射疫苗 20 $\mu$ l（1/25 羽份），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北京株（CVCC AV1611 株） $10^5$ ELD<sub>50</sub>，观察 14 日，对照组应全部死亡，免疫组应至少保护 7 只。

（2）禽流感 H9 亚型部分 下述方法任择其一。

血清学方法 用 4~5 周龄 SPF 鸡 15 只，其中 10 只各颈部皮下注射疫苗 0.25ml，另 5 只不接种，作为对照。21 日后采血，分离血清，用 H9 亚型 SS 株灭活抗原测定 HI 抗体效价。免疫组 HI 抗体几何平均滴度应 $\geq 6\log_2$ ，对照组 HI 抗体效价的几何平均值应 $\leq 2\log_2$ 。

免疫攻毒法 用 4~5 周龄 SPF 鸡 15 只，其中 10 只各颈部皮下注射疫苗 0.25ml，另 5 只不接种，作为对照。21 日后，各静脉注射禽流感病毒 SS 株病毒液 0.2ml（约  $10^{7.4}$ EID<sub>50</sub>），攻毒后第 5 日，分别采集泄殖腔拭子分离病毒，各尿囊腔接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚 5 枚，

每胚 0.2ml，孵育 120 小时，测定所有鸡胚液 HA 效价，每个拭子样品接种鸡胚中只要有 1 枚鸡胚的 HA 效价 $\geq$ 1:16，即可判定为病毒分离阳性，对阴性样品应盲传 1 代。仍为阴性的判病毒分离阴性。免疫鸡应至少 8 只病毒分离阴性，对照鸡应全部阳性。

**【甲醛和汞类防腐剂残留量测定】** 分别按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于预防鸡新城疫和 H9 亚型禽流感。免疫期为 6 个月。

**【用法与用量】** 4 周龄以内雏鸡，颈部皮下注射 0.25ml；4 周龄以上的鸡，肌肉注射 0.5ml。

**【不良反应】** 接种后一般无明显不良反应，有的在接种后 1~2 日内可能有减食现象，对产蛋鸡的产蛋率稍有影响，几日内即可恢复。

**【注意事项】** 疫苗出现明显的水、油分层不能使用，应废弃。疫苗久置，在表面有少量白油，经振荡混匀后不影响使用。

**【规格】** (1) 250ml/瓶 (2) 500ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为 12 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由华南农业大学兽医学院提出。
2. 本标准于 2006 年 9 月 30 日经农业部公告第 724 号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》要求改变黏度测定方法，为黏度计法。
4. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

## 口蹄疫病毒多重 RT-PCR 检测试剂盒

Koutiyibingdu Duochong RT-PCR Jianceshijihe

Foot-and-Mouth Disease Multiplex RT-PCR Detection kit

本品是从样品中提取病毒总 RNA，再利用一步法多重 RT-PCR 方法对 RNA 进行特异扩增的试剂盒。用于多血清型（包括 A、O 和亚洲 I 型）口蹄疫病毒的检测。尤其适用于动物淋巴结、扁桃体、肉品及 OP 液等病毒含量低微样品的检测。

**【性状】** 试剂盒组分如下：

- (1) 溶液 A（裂解液）1 瓶（20ml），粉红色，澄清溶液。
- (2) 溶液 B（三氯甲烷）1 瓶（20 ml），为无色透明溶液。
- (3) 溶液 C（异丙醇）1 瓶（10 ml），为无色透明溶液。
- (4) 溶液 D（无 RNA 酶水）1 瓶（20 ml），无色，透明溶液。
- (5) 溶液 E（一步 RT-PCR 混合液）1 瓶（400 $\mu$ l），无色，透明溶液。
- (6) 溶液 F（反转录酶，5U/ $\mu$ l）1 瓶（10 $\mu$ l），无色，透明溶液。
- (7) 溶液 G（RNA 酶抑制剂，40U/ $\mu$ l）1 瓶（10 $\mu$ l），无色，透明溶液。
- (8) 溶液 H（DNA 聚合酶，5U/ $\mu$ l）1 瓶（10 $\mu$ l），无色，透明溶液。

(9) 溶液 I (阳性对照) 1 瓶 (200 $\mu$ l), 粉红色, 澄清。

(10) 说明书 1 份。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无菌生长。

**【特异性检验】** 按试剂盒说明书操作, 检测 10 份阴性样品, 包括健康细胞培养物和健康小鼠组织, 结果应全为阴性; 检测 10 份阳性样品, 包括口蹄疫病毒培养物和口蹄疫鼠毒, 结果应 100% 为阳性。

**【敏感性检验】** 按试剂盒说明书操作, 检测 10 $\times$ 递进稀释的口蹄疫病毒鼠毒, 检测到 0.07LD<sub>50</sub> 的病毒量。

**【空白检验】** 按试剂盒说明书操作, 检测 H<sub>2</sub>O, 结果应为阴性。

**【作用与用途】** 用于多血清型 (包括 A、O 和亚洲-I 型) FMDV 的检测, 也适用于动物淋巴结、扁桃体、肉品及 OP 液等样品的检测。

**【用法与判定】** (1) 总 RNA 萃取 取 500 $\mu$ l 组织样品研磨上清液置 1.5ml eppendorf 管中, 加 500 $\mu$ l 溶液 B, 快速振荡数秒, 8000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 离心 5 分钟。水泡液不经此步处理。取上清液 200 $\mu$ l 置 1.5ml eppendorf 管中, 加入 1000 $\mu$ l 溶液 A, 反复混匀, 冰上放置 5 分钟。加 200 $\mu$ l 溶液 B, 小心盖上帽盖, 用力摇动 eppendorf 管 15 秒, 室温放置 5 分钟。12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 离心 15 分钟, 可见分为三层, 上层水相含 RNA。转移水相至一洁净 eppendorf 管, 加入等量溶液 C (约 500 $\mu$ l), 混匀, 室温放置 15 分钟。12,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 离心 10 分钟, 离心后在 eppendorf 管边和底部可见有胶样 RNA 沉淀。洗 RNA: 弃上清, 加 1000 $\mu$ l 75% 乙醇 (使用前用溶液 D 加无水乙醇配置而成, -20 $^{\circ}$ C 预冷) 漂洗沉淀, 重复 1 次; 10,000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 离心 5 分钟。室温充分干燥 RNA 沉淀。加 10 $\mu$ l 无 RNase 水, 即可用于 PCR 扩增。在 -20 $^{\circ}$ C 以下保存备用。

(2) 多重 RT-PCR 反应总体积 25 $\mu$ l。向扩增管中加入下列反应物:

一步法 RT-PCR 混合液	18.5 $\mu$ l
反转录酶	0.5 $\mu$ l
RNA 酶抑制剂	0.5 $\mu$ l
DNA 聚合酶	0.5 $\mu$ l
RNA	5 $\mu$ l

空白对照 以无 RNA 酶水代替模板, 同样条件下扩增。

高速离心 10 秒后, 将反应管放入扩增仪中, 指令设定程序开始工作。

反应程序 50 $^{\circ}$ C, 30 分钟; 94 $^{\circ}$ C, 2 分钟; 94 $^{\circ}$ C 变性 50 秒, 58 $^{\circ}$ C 退火 50 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 秒, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 分钟。

(3) PCR 产物的电泳 1.5% 琼脂糖凝胶板的制备 称取 1.5g 琼脂糖, 加入 100ml 1 $\times$ TAE 缓冲液中。加热融化后加 5 $\mu$ l (10mg/ml) 溴乙锭, 混匀后倒入放置在水平面上的凝胶盘中, 胶板厚 5mm 左右。依据样品数选用适宜的梳子。待凝胶冷却凝固后拔出梳子 (胶中形成加样孔), 放入电泳槽中, 加 1 $\times$ TAE 缓冲液淹没胶面。

加样 取 6~8 $\mu$ l PCR 扩增产物和 2 $\mu$ l 加样缓冲液混匀后加入一个加样孔。每次电泳同时上样标准 DNA Marker 和空白对照。

电泳 电压 80~100 V, 或电流 40~50mA。电泳 30~40 分钟。

(4) 结果观察和判定 电泳结束后,取出凝胶板置于紫外透射仪上打开紫外灯观察。强阳性样品电泳结果应为3条分别为634bp、483bp和278bp的条带。如某一待检样品扩增产物的DNA带至少有一条与以上条带大小相符,同时空白对照无扩增条带,则该样品判定为阳性。

**【注意事项】** (1) 检测临床样品应在生物安全3级实验室进行。

(2) 舌皮、淋巴结等组织样品的前期处理和病毒总RNA提取必须在生物安全柜中进行,吸取液体的枪头、废料以2%碳酸氢钠溶液处理。

(3) 电泳后的废胶收集在固定容器中,集中焚烧做无害化处理。

(4) 贮存条件:严格按标签注明的温度贮存。

(5) 用户在操作过程中应戴一次性塑料手套,所使用的离心管、吸头均需经过DEPC水处理并高压灭菌。

(6) 一步RT-PCR混合液(溶液E)在第一次使用时最好分装为小管,应尽量避免反复冻融。溶液E、溶液F、溶液G、溶液H在开盖前请做简短离心。

**【规格】** 20份/盒

**【贮藏与有效期】** 试剂盒A部分:2~8℃保存;试剂盒B部分:-20℃以下保存,有效期为6个月。

**附注:**

1 TAE缓冲液

1.1 50×TAE缓冲液

三羟甲基氨基甲烷(Tris) 242.0 g

冰乙酸 57.1ml

0.5mol/L 乙二胺四乙酸(EDTA)(pH8.0) 100.0ml

加双蒸水至 1000ml

1.2 1×TAE缓冲液 使用前将50×TAE作50倍稀释即可。

2 电泳加样缓冲液

溴酚兰 0.25g

甘油 30.0ml

双蒸水 70.0ml

**附加说明:**

1. 本标准由中国农业科学院兰州兽医研究所提出。

2. 本标准于2006年11月8号经农业部公告第741号发布。

## 口蹄疫病毒(O、A、C、Asia-I型)定型RT-PCR诊断试剂盒

Koutiyibingdu Dingxing RT-PCR Zhenduanshijihe

FMDV Sero-typing Diagnostic RT-PCR Kit

本品系从样品中提取总 RNA，再采用 RT-PCR 方法扩增出口蹄疫病毒的型特异性基因片段，根据电泳观测扩增片段的大小对样品中所含口蹄疫病毒的血清型做出鉴别诊断。本品由总 RNA 抽提系统、RT-PCR 扩增系统和套式 PCR 扩增系统组成，并提供有阴性和阳性样品对照。用于 O、A、C 和亚洲-I 型口蹄疫病毒血清型的鉴别诊断。

**【性状】** 应密封完好、组分齐全、无破损、无渗漏。其中：

- (1) 变性液 主要成分为 TRIzol 试剂，粉红色，澄清溶液。
- (2) 抽提液 为酚氯仿混合溶液，无色透明。
- (3) 浓缩液 主要成分为异丙醇，含 2mol/L 乙酸钠 (pH 值为 4.0)，无色透明溶液。
- (4) 漂洗液 为 80% 乙醇溶液，不含 RNase，无色透明。
- (5) 一步 RNA PCR 混合液 无色透明溶液。
- (6) 反转录酶 (AMV) 无色透明溶液。
- (7) RNA 酶抑制剂 无色透明溶液。
- (8) DNA 聚合酶 无色透明溶液。
- (9) 套式 PCR 扩增混合液 无色透明溶液。
- (10) DNA 聚合酶 无色透明溶液。
- (11) 阳性样品 为粉红色透明溶液，无明显可见的沉渣。
- (12) 阴性样品 为粉红色透明溶液或灰色微浊悬液。
- (13) 说明书 1 份。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，均应无细菌生长。

**【特异性检验】** 按试剂盒说明书操作，检测各型病毒样品阳性对照，结果应能良好扩增出各个型特异性片段 (O、A、C 和亚洲-I 型分别为 400bp、730bp、600bp 和 300bp)；检测 2 份阴性病毒样品对照 (细胞毒和鼠毒上清各 1 份)、1 份猪水泡病鼠组织毒，电泳观测均不可见口蹄疫病毒的特异性核酸片段。

**【敏感性检验】** 按试剂盒说明书操作，检测 10× 递进稀释的口蹄疫病毒样品阳性对照 (细胞毒液)，最低可检测到 2~10TCID<sub>50</sub> 的病毒量 (10<sup>-7</sup> 细胞毒液)；对临床发病动物的阳性病料的检出率不低于 95%。

**【符合率检验】** 与其它定型方法做平行对比研究，在样品预处理相同的前提下，与 Vp1 基因测序定型方法的符合率为 100%，与反向间接血凝试验的符合率应在 95% 以上。

**【空白检验】** 按试剂盒说明书操作，以双蒸水为 PCR 模板，结果为扩增条带阴性。

**【作用与用途】** 用于 O、A、C 和亚洲-I 型口蹄疫病毒血清型的鉴别诊断；主要适用于临床发病动物的水泡皮 (液) 和舌皮组织以及鼠毒组织和细胞毒液等样品的检测。

**【用法与判定】** (1) 样品预处理 在生物安全环境中，将采集的动物病料 (如舌、鼻、蹄部水泡皮) 置乳钵中，剪碎，添加灭菌石英砂用力研磨，然后加入 0.01mol/L PBS (pH 值为 7.6~7.8) 制成 1:5 的悬液，置 4℃ 冰箱浸毒 6~8 小时或过夜；-20℃ 冻融 2 次，8000rpm 离心 5 分钟，吸取上清液提取总 RNA。液体样品 (如水泡液和 OP 液) 可直接用于提取总 RNA。其中组织浸毒液和 OP 液若混有脂肪，在提取总 RNA 之前，需要用等量抽提液清除之。

(2) 总 RNA 提取 取 200μl 样品浸毒上清液加入 1.5ml 离心管，再加 800μl 变性液混

匀，冰浴 5 分钟；加 60 $\mu$ l 的 2mol/L pH 值为 4.0 乙酸钠（自备），混匀；加 300 $\mu$ l 抽提液，用力振摇混匀、冰浴 5 分钟；10000rpm 离心 10 分钟，将上清转入另一洁净管；加等量浓缩液，混匀后在 -20 $^{\circ}$ C 静置 20 分钟或过夜；12000rpm 离心 10 分钟，尽量倒弃或吸干液体，管底留下胶样 RNA 沉淀；加 1ml 80%乙醇（预冷），轻轻颠倒摇晃，12000rpm 离心 5 分钟；吸弃液体，确保残留的乙醇完全挥发，加 10~30 $\mu$ l 无 RNase 水溶解 RNA 沉淀，即可用于 RT-PCR。

(3) RT-PCR 反应体系 (25 $\mu$ l) 配制 RT-PCR 扩增混合液中加入 3 种酶、总 RNA。

一步 PCR 混合液 11 $\mu$ l; AMV Reverse Transcriptase XL 0.5 $\mu$ l; RNA 酶抑制剂 0.5 $\mu$ l; DNA 聚合酶 0.5 $\mu$ l; 总 RNA 水溶液 12.5 $\mu$ l;

扩增程序 50 $^{\circ}$ C, 30 分钟; 94 $^{\circ}$ C, 3 分钟; 94 $^{\circ}$ C 变性 50 秒, 59 $^{\circ}$ C 退火 40 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 秒, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 分钟。

结果观察与判定 取 RT-PCR 产物 5~10 $\mu$ l 加样到浓度为 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳，同时加 100bp 梯度的 DNA 标准 Marker (100-1000bp) 作分子量对照。在电压 80-100V、电流 25-40mA 条件下电泳 10~15 分钟后，观察 PCR 产物的大小；O、A、C 和亚洲-I 型对应的扩增产物长度分别为 400bp、730bp、600bp 和 300bp。

(4) 套式 PCR 当 RT-PCR 扩增的目的条带不太显亮（或有非特异性条带）时，可采用套式 PCR 进行套式扩增确认。

反应体系配制 向套式 PCR 扩增混合液中加入聚合酶和 RT-PCR 产物。

套式 PCR 扩增混合液 22.75 $\mu$ l

DNA 聚合酶 0.25 $\mu$ l

RT-PCR 扩增产物 2 $\mu$ l

扩增程序为 94 $^{\circ}$ C, 3 分钟; 94 $^{\circ}$ C 变性 50 秒, 60 $^{\circ}$ C 退火 40 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 秒, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 分钟。

结果观察与判定 取套式 PCR 产物 5~10 $\mu$ l 加样到浓度为 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳，同时加 100bp 梯度的 DNA 标准 Marker (100-1000bp) 作分子量对照。在电压 80~100V、电流 25~40mA 条件下电泳 10~15 分钟后，观察 PCR 产物的大小；O、A、C 和亚洲-I 型对应的扩增产物长度分别为 270bp、600bp、470bp 和 170bp。

**【注意事项】** 实验操作过程中务必做好生物安全防范及自身防护工作。

(1) 检测操作必须在 P3 级生物安全实验室进行；

(2) 实验用过的吸头、离心管等废料须用 2% 氢氧化钠溶液消毒处理；

(3) 检测所用的吸头、离心管需经 DEPC 水处理并高压灭菌，在实验操作过程中应戴一次 PVC 手套；

(4) PCR 混合液在首次使用时最好按扩增体系分装到 PCR 管中保存，既避免反复冻融又避免试剂污染。

**【规格】** 20 份/盒

**【贮藏与有效期】** 试剂盒中的总 RNA 抽提系统：2~8 $^{\circ}$ C 保存；RT-PCR 扩增系统、套式 PCR 扩增系统和阴、阳性对照制品：-20 $^{\circ}$ C 以下保存，有效期为 9 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由中国农业科学院兰州兽医研究所提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 741 号发布。

## 口蹄疫琼脂扩散抗原、阳性血清及阴性血清

Koutiyi Qiongzhuosan Kangyuan Yangxingxueqing Ji Yinxingxueqing  
Antigen and positive sera and negative sera for AGID for FMD

抗原系采用口蹄疫 A、O、C、AsiaI 型标准鼠组织毒经离心、浓缩、灭活制成。用于检测相应型的抗体；阳性血清系采用口蹄疫 A、O、C、AsiaI 型标准豚鼠蹄皮毒免疫成年豚鼠，采血分离血清制成。用于琼扩试验阳性对照；阴性血清系采用成年健康豚鼠采血分离血清制成。用于琼扩试验阴性对照。

### 琼 扩 抗 原

**【性状】** 橙黄色透明液体。久置后出现微量沉淀，可离心除去，对效价无影响。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【安全检验】** 用灭活后的病毒抗原接种 2~3 日龄乳鼠 8 只，每只接种灭活的抗原 0.2ml，设对照乳鼠 2 只。48 小时人工致死 2 只，用 PB 液制成 1:10 悬液，再接种 6 只乳鼠，传第二代，同时设对照乳鼠 2 只。两代乳鼠，均观察 7 日，均不得出现因口蹄疫病毒引起的临床症状和死亡，判定为琼脂扩散抗原安全。

**【特异性检验】** 取待检抗原与口蹄疫 A、O、C、AsiaI 型参考阳性血清进行琼脂扩散试验，在 24 小时内，应与同型参考阳性血清形成清晰、致密的沉淀线；与异型参考阳性血清未形成沉淀线为合格。

**【作用与用途】** 用于检测动物血清中抗口蹄疫 A、O、C、AsiaI 型病毒抗体的琼脂扩散试验。

**【用法与判定】** (1) 琼脂板的制备 浇板：1g 琼脂糖加 99ml AGB（甘氨酸 15.0g，巴比妥钠 0.52g，叠氮钠 1.0g，加无离子水 200ml，用 0.2mol/L 盐酸调 pH 值为 7.9）液，15 磅 10 分钟高压溶解，吸取 8ml 浇入直径 6cm 平皿内，凝胶层厚度 3mm，室温冷却后置潮湿小室中，4℃过夜，备用。打孔：孔径 3mm，孔距 3mm。中央 1 孔，周围 6 孔。用烧热的大头针绕孔底周围划一圈，融化的琼脂将封住孔底部，防止样品从底部流失。

(2) 琼脂扩散试验 每块平皿周围孔，按逆时针方向分别编号为 1、2、3、4、5、6 孔。用 4 块平皿检查 4 个样品。每平皿的中央孔分别加 A、O、C、AsiaI 型琼扩抗原 30μl；每平皿的 1、4 孔加入相应 A、O、C、AsiaI 型阳性血清 30μl，作为阳性对照；每平皿的 2 孔加入 1 号血清样品 30μl，每平皿的 3 孔加入 2 号血清样品 30μl，依次类推。室温放置 2~3 小时，待样品渗入琼脂后，置于饱和湿度的潮湿小室中，于 37℃扩散。设阴性血清对照皿一块，中央孔加阴性血清 30μl，1、2、3、4 孔分别加 A、O、C、AsiaI 型琼扩抗原 30μl。

(3) 结果的观察及判定 扩散 24 小时后开始观察记录。每个平皿的 1、4 孔与中央孔之间应出现清晰沉淀线且阴性血清对照皿未出现沉淀线；每个平皿的 2、3、5、6 孔与中央孔之间，某孔若出现沉淀线，则判为阳性，型别与中央孔所加的抗原同型；若未出现沉淀线，

则判为阴性。阴性血清对照皿应未出现沉淀线。观察 5 日后作最终判定。

**【注意事项】** (1) 琼扩抗原应冷藏运输, 空运或快递应尽快运到使用地点。

(2) 试验所用化学试剂为 AR 级。

(3) 未用完的琼扩抗原和阳、阴性血清, 加盖密封后置 4℃ 中可继续使用。

(4) 琼扩抗原和阳、阴性血清在保存过程中瓶底可能出现少量沉淀, 不影响使用。

(5) 检测临床样品应在生物安全 3 级实验室进行。组织样品的前期处理必须在生物安全柜中进行, 吸取液体的枪头、废料以 2% 碳酸氢钠溶液处理。

**【规格】** 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存, 有效期 12 个月。

#### 阳性血清

**【性状】** 稍粘稠的淡黄色液体, 无可见悬浮物和沉淀。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无细菌和霉菌生长。

**【特异性检验】** 取样与口蹄疫 A、O、C、AsiaI 型琼扩抗原进行扩散试验, 在 24 小时内, 应与同型琼扩抗原形成清晰、致密的沉淀线; 与异型琼扩抗原未形成沉淀线为合格。

**【作用与用途】** 用于口蹄疫琼脂扩散试验对照。

**【规格】** 4ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存, 有效期为 12 个月。

#### 阴性血清

**【性状】** 稍粘稠的淡黄色液体, 无可见悬浮物和沉淀。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无细菌和霉菌生长。

**【作用与用途】** 用于口蹄疫琼脂扩散试验阴性血清对照。

**【规格】** 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存, 有效期为 12 个月。

#### 附加说明:

1. 本标准由中国农业科学院兰州兽医研究所提出。

2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 741 号发布。

### 口蹄疫病毒 3ABC 抗体竞争 ELISA 检测试剂盒

Koutiyi Bingdu 3ABC kangti Jingzheng ELISA Jiance Shijihe

Competitive ELISA Kit for detecting 3ABC Antibody of FMDV

本品系用牛 O 型口蹄疫病毒的非结构蛋白基因 (3ABC) 的原核表达产物为抗原包被酶标板与特异性高免血清、阴性对照血清、阳性对照血清、样品稀释液、酶结合物、洗液和终止液等组装而成。用于鉴别口蹄疫野毒感染血清和疫苗免疫血清。

**【性状】** 试剂盒应密封完好、组分齐全、无破损、无渗漏。其中:

(1) 抗原包被板 (96 孔板) 表面光洁、无裂纹、无异物, 装量为 1 块。

(2) 牛/羊阴性对照血清 应为淡黄色澄清溶液, 无臭、无味、无沉淀物, 装量为 0.2ml。

- (3)牛/羊强阳性对照血清 应为淡黄色澄清溶液,无臭、无味、无沉淀物,装量为 0.2ml。
- (4)牛/羊弱阳性对照血清 应为淡黄色澄清溶液,无臭、无味、无沉淀物,装量为 0.2ml。
- (5)猪阴性对照血清 应为淡黄色澄清溶液,无臭、无味、无沉淀物,装量为 0.2ml。
- (6)猪强阳性对照血清 应为淡黄色澄清溶液,无臭、无味、无沉淀物,装量为 0.2ml。
- (7)猪弱阳性对照血清 应为淡黄色澄清溶液,无臭、无味、无沉淀物,装量为 0.2ml。
- (8)高免血清 应为淡黄色澄清溶液,无臭、无味、无沉淀物,装量为 0.2ml。
- (9)酶结合物 应为淡黄色澄清溶液,无臭、无味、无沉淀物,装量为 10ml。
- (10)牛羊样品稀释液 应为无色澄清溶液,无臭、无味、无沉淀物,装量为 5ml。
- (11)猪样品稀释液 应为无色澄清溶液,无臭、无味、无沉淀物,装量为 5ml。
- (12)洗涤液(10×) 应为无色澄清溶液,无臭、无味、无沉淀物,装量为 20ml。
- (13)底物 A 液 应为无色澄清溶液,无沉淀物,装量为 5ml。
- (14)底物 B 液 应为无色澄清溶液,无沉淀物,装量为 5ml。
- (15)终止液 应为无色澄清溶液,无臭、无味、无沉淀物,装量为 10ml。
- (16)说明书1份。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验,阴性对照血清、阳性对照血清、弱阳性对照血清、高免血清、酶结合物、样品稀释液、洗涤液、底物A液、底物B液、终止液应无菌生长。

**【敏感性检验】** 用人工感染10日后的血清按“用法与结果判定”进行竞争ELISA检测,结果均为阳性。将强阳性对照血清用样品稀释液系列倍比稀释,按“用法与结果判定”进行竞争ELISA检测,血清稀释度应达1:80以上。

**【特异性检验】** 用阴性参考血清、免疫血清和水泡病阳性血清一起按“用法与结果判定”进行竞争ELISA检测,结果均应为阴性。

**【作用与用途】** 用于区分口蹄疫病毒感染抗体与免疫抗体。

**【用法与判定】** 1 用法

1.1 样品准备 阳性对照血清、弱阳性对照血清、阴性对照血清与被检血清用相应的稀释液做 1:5 稀释,备用。根据待检样品宿主,选择相应的稀释液,将高免血清作 1:2000 稀释,备用。

1.2 操作步骤

1.2.1 稀释好的对照血清和被检血清样品加入酶标板,对照血清加 2 孔,被检样品加 1 孔,每孔 50 $\mu$ l;然后每孔再加入高免血清 50 $\mu$ l;轻轻振荡 1 分钟,置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时;

1.2.2 用洗涤液连续洗涤 6 遍;

1.2.3 以 100 $\mu$ l/孔加入 HRP 标记的酶标二抗,置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时;

1.2.4 用洗涤液连续洗涤 6 遍;

1.2.5 将底物 A、B 按 1:1 比例混合,以 100 $\mu$ l/孔加入底物,37 $^{\circ}$ C 作用 10 分钟;

1.2.6 以 100 $\mu$ l/孔加入终止液。

1.2.7 置酶标仪上测定 OD<sub>450nm</sub> 值。

2 判断

(阴性血清 OD<sub>450nm</sub> - 样品血清 OD<sub>450nm</sub>)

抑制率 PI=  ×100%

(阴性血清 OD<sub>450nm</sub> - 阳性血清 OD<sub>450nm</sub>)

若抑制率大于 50%，则判定为阳性；小于 40%，则判定为阴性；40%~50%之间，可疑。判为可疑的血清样品应重做一遍进行确证，如仍为可疑则判为弱阳性。

**【注意事项】** (1) 铝箔袋有破损时，建议不作为仲裁使用。

(2) 试剂盒必须在 2~8℃ 冰箱保存，使用后应放回冰箱，防止污染。

(3) 试剂盒必须平衡至室温方可进行试验。

(4) 目测时，阳性对照血清和阴性对照血清孔的颜色无明显区别；机测时，阳性对照血清 OD<sub>450nm</sub> > 0.3 或阴性对照血清 OD<sub>450nm</sub> < 0.7，试验不成立，需要重新做试验。

(5) 用于区分口蹄疫病毒感染抗体与免疫抗体。

(6) 实验时需戴一次性保护手套，及时消毒和妥善处理废弃物。

(7) 注意生物安全。

**【规格】** 96 孔/板×1 板/盒

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 6 个月。

**附加说明：**

1. 本标准由中国动物卫生与流行病学中心提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 741 号发布。

## 口蹄疫病毒 RT-PCR 检测试剂盒

Koutiyibingdu RT-PCR Jianceshijihe

Foot and Mouth Disease Virus RT-PCR detection Kit

本试剂盒由人工合成的可扩增口蹄疫病毒 VP1 基因 131bp 片段的引物、病毒 RNA 提取试剂、反转录试剂、PCR 扩增试剂及电泳试剂组成。用于测定动物组织、血液、水疱皮、水疱液、咽部分泌物（O-P 液）及细胞培养物中可能存在的口蹄疫病毒 RNA。

**【性状】** 应密封完好、无变形、组分齐全、无破损、无渗漏、标签字迹清晰。其中：

(1) 阴性对照样品 应为淡红色液体，仅有少量悬浮物，装量为 700μl。

(2) 阳性对照样品 应为淡红色液体，仅有少量悬浮物，装量为 700μl。

(3) 变性液 应为无色透明液体，有臭味，装量为 7ml。

(4) 醋酸钠溶液 应为无色透明液体，有酸味，装量为 350μl。

(5) 酚/氯仿/异戊醇混合液 应为无色透明液体，上层有保护液，有异味，装量为 3.5ml。

(6) 异丙醇 应为无色透明液体，有异味，装量为 3.5ml。

(7) 75%乙醇 应为无色透明液体，无杂质，无沉淀，装量为 12ml。

(8) 无菌 DEPC 水 应为无色透明液体，无杂质，无沉淀，装量为 900μl。

(9) RNA 酶抑制剂 应为无色无味油性液体，装量为 15μl。

(10) RT-PCR 反应液 应为溶液为无色无味液体，装量为 250μl。

(11) AMV 反转录酶 应为无色无味油性液体，装量为 3μl。

- (12) TaqDNA 聚合酶 应为无色无味油性液体，装量为 12 $\mu$ l。
- (13) 矿物油 应为无色无味透明的油性液体，装量为 300 $\mu$ l。
- (14) 50 $\times$ TAE 电泳缓冲液 应为无色透明液体，有冰乙酸味，无沉淀，装量为 20ml。
- (15) 溴化乙锭溶液 应为红色液体，无沉淀，装量为 100 $\mu$ l。
- (16) 上样缓冲液 应为铁锈色粘稠液体，无沉淀，装量为 50 $\mu$ l。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，阴性对照样品、反转录阳性对照样品、RT-PCR 反应液均应无菌生长。

**【敏感性检验】** 用试剂盒检测 1 份敏感性质控样品（由中国动物疫病预防控制中心提供），该样品进行  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  稀释、每个稀释度重复检测 3 次，判定合格标准为  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$  稀释样品均为阳性， $10^{-5}$  样品检测结果可为阳性或阴性，当  $10^{-5}$  为阴性时，检测阳性带的亮度为  $10^{-1} > 10^{-2} > 10^{-3} > 10^{-4}$ 。

**【特异性检验】** 用试剂盒检测 8 份特异性质控样品，包括有猪瘟病毒、猪伪狂犬病毒、牛病毒性腹泻病毒、羊痘病毒，作为特异性质控样本 N1~N4；SPF 猪皮组织、SPF 猪血液和 BHK-21 细胞培养液以及 SPF 乳鼠肌肉组织作为特异性质控样品 N5~N8，均由中国动物疫病预防控制中心提供。每份样品重复检测 3 次。判定合格标准为每份样品 3 次检测全部为阴性。

**【作用与用途】** 本试剂盒系采用反转录和 PCR 扩增一步法对口蹄疫感病毒的 RNA 进行检测。用于可能感染口蹄疫病毒动物组织、水疱皮、水疱皮液、细胞培养物中口蹄疫病毒 RNA 的检测和鉴定。

#### **【用法与判定】** 1 用法

##### 1.1 样品准备

##### 1.1.1 样本采集、保存及运输

1.1.1.1 样品采集 采集发病动物（牛、羊或猪）未破裂的舌面或蹄部、鼻镜、乳头等部位的水泡皮和水泡液；采集样品均置于 2ml 50% 甘油生理盐水，2~8 $^{\circ}$ C 保存。送实验室检测。（要求送检病料新鲜，严禁反复冻融病料。）

1.1.1.2 样本保存 采集的样品在 2~8 $^{\circ}$ C 条件下保存应不超过 24 小时；-70 $^{\circ}$ C 条件以下可长期保存，在保存期间要避免反复冻融，最多冻融 3 次。

1.1.1.3 样本运输 置于加冰的冰壶或泡沫箱内运输，运输过程中保证容器内温度保持在 2~8 $^{\circ}$ C，24 小时 内运至检测地点。

##### 1.2 样品处理

1.2.1 组织样品处理 称取待检病料 0.05g 置研磨器中剪碎并研磨，加入 600 $\mu$ l A 液继续研磨。取已研磨好的待检病料上清 300 $\mu$ l 和 100 $\mu$ l A 液，置 1.5 ml 灭菌离心管中。

1.2.2 液态样品处理 取 200 $\mu$ l，置 1.5 ml 灭菌离心管中，加入 200 $\mu$ l A 液，混匀。

1.2.3 反转录阳性对照处理 取 200 $\mu$ l，置 1.5 ml 灭菌离心管中，加入 200 $\mu$ l A 液，混匀。

1.2.4 阴性对照处理 取 200 $\mu$ l，置 1.5 ml 灭菌离心管中，加入 200 $\mu$ l A 液，混匀。

1.3 病毒 RNA 提取 取已处理的待检样品、阴性对照样品、阳性对照样品，每管依次加入醋酸钠溶液 30  $\mu$ l、酚/氯仿/异戊醇混合液 300  $\mu$ l（取酚/氯仿/异戊醇混合液之前不要晃

动，不要吸到酚/氯仿/异戊醇混合液上层保护液；此液有很强的腐蚀性，切勿沾到皮肤或衣物，否则立即用大量清水冲洗并擦干），颠倒 10 次，混匀（不宜过于强烈震荡，以免产生乳化而不分层），冰浴 15 min，4℃ 13000 g 离心 15 min。取 300μl 上清置于新的经无菌 DEPC 水处理过的 1.5 ml 灭菌离心管中（注意不要吸出和破坏分界层），加入 300μl 异丙醇，混匀，置液氮 3 min 或 -70℃ 冰箱中 30 min。室温融化，4℃ 20000g 离心 20 min（注意固定离心管方向，即将离心管开口朝离心机转轴方向放置）。弃上清，沿离心管开口方向管壁缓缓滴入 -20℃ 预冷的 75% 乙醇溶液 1ml，轻轻旋转一周后倒掉，将离心管倒扣于吸水纸上 1min（不同样品严禁放在吸水纸同一地方吸干），真空抽干 15min（以无乙醇味为准）。用 9μl 无菌 DEPC 水和 1μl RNA 酶抑制剂沿离心管开口相反方向溶解沉淀，备用。

#### 1.4 RT-PCR 操作程序

1.4.1 RT-PCR 反应液体系配制 N 个检测样品反应体系配制为：取  $21.5 \times (N+4)$  μl RT-PCR 反应液（用前融化，混匀）、 $0.3 \times (N+4)$  μl RNA 酶抑制剂、 $0.2 \times (N+4)$  μl 反转录酶、 $1 \times (N+4)$  μl TaqDNA 聚合酶，混匀。取 N+3 个 0.2ml 薄壁 PCR 管作好标记，将配制的混合液以每管 23μl 分配至薄壁 PCR 管中。根据标记分别加入 2μl 提取的样品 RNA（一份样本换用一个吸头），其中 3 管分别作为反转录阳性对照、PCR 扩增阳性对照和阴性对照。反转录阳性对照加入 1μl 反转录阳性对照样品 RNA 和反转录阳性对照引物各 1μl；PCR 扩增阳性对照加入 PCR 扩增对照模板 2μl；阴性对照样品加入阴性对照样品 RNA 2μl。混匀。加入矿物油一滴（约 15μl）覆盖。

1.4.2 反转录和 PCR 扩增程序 将 0.2ml 薄壁 PCR 管放置在 PCR 扩增仪上进行以下温度控制程序：42℃ 45min，95℃ 3min；直接进入 95℃ 15s，60℃ 30s，35 个循环后，60℃ 延伸 3min。

1.5 电泳 称 3g 琼脂糖置 500ml 锥形瓶中，加入 1×TAE 电泳缓冲液 200 ml（取 4ml 50×TAE 电泳缓冲液，用双蒸水稀释至 200ml），于微波炉中或电热器上溶解，再加入 20μl 溴化乙锭溶液混匀。在电泳槽内放好梳子，倒入琼脂糖凝胶，待凝固后将 PCR 扩增产物 15μl 混合 3μl 上样缓冲液，加样于琼脂糖凝胶孔中，以 5V/cm 电压电泳 30min，紫外灯下观察结果，照相。

1.6 结果判定 在 PCR 扩增阳性对照样品出现 131bp 扩增带，阴性对照样品无扩增带出现（引物带除外）时，实验结果成立。被检样品出现 131bp 扩增带为口蹄疫病毒阳性，否则为阴性。

**【注意事项】**（1）本品仅供体外诊断用。

（2）所有用于检测的废弃物品均应放入含 1% 次氯酸钠溶液的废物缸内，高压灭菌处理。

（3）RT-PCR 实验室应分配液区、模板提取区、扩增区和电泳区。RT-PCR 工作流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区→电泳区。各区器材试剂专用，不可跨区使用。实验结束后立即用 1% 次氯酸钠或 75% 酒精或紫外灯消毒工作台。

（4）所有试剂应在规定的温度下保存，使用时先将 RT-PCR 反应液拿到室温融化后使用，用毕立即放回原处，其它试剂现用现取，用完立即放回原处，不同批次试剂不能混用；勿使用过期的试剂盒。

(5) 在提取 RNA 时, 尽量缩短操作时间, 避免 RNA 酶污染。离心管、吸头等在实验前应全部高压灭菌。用灭菌的镊子夹取离心管, 打开和盖上离心管盖时避免手和手套接触离心管口。

(6) 使用前将 RT-PCR 反应液、RNA 酶抑制剂、AMV 反转录酶和 TaqDNA 聚合酶, 5 000g 离心 15s, 使液体全部沉于管底。配制和分装 RT-PCR 反应液体系时应尽量避免产生气泡。

(7) 按试剂盒说明书要求准确吸取各种试剂, 移液器、PCR 仪等应定期校验。

(8) 溴化乙锭溶液具有致癌性, 应小心操作。若沾到皮肤或衣物上, 应立即用大量清水冲洗。

(9) 本试剂盒为 10 头份包装, 在有效期内应在 3 次以内用完。不同批次的试剂盒成分不能混用。

**【规格】** 10 头份/盒

**【贮藏与有效期】** 试剂盒 2~8℃ 保存, 其中阴性对照样品、阳性对照样品、RT-PCR 反应液、75%乙醇、RNA 酶抑制剂、TaqDNA 聚合酶、AMV 反转录酶保存于-20℃。有效期为 6 个月。

**附加说明:**

1. 本标准由中国动物疫病预防控制中心提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 741 号发布。

## 口蹄疫病毒亚洲 I 型 RT-PCR 检测试剂盒

Koutiyibingdu Yazhouyixing RT-PCR Jianceshijihe

Foot and Mouth Disease Virus Type Asia I RT-PCR detection Kit

本品系由变性液、醋酸钠溶液、酚/氯仿/异戊醇混合液、异丙醇、无菌 DEPC 水、矿物油、溴化乙锭溶液、50×TAE 电泳缓冲液、上样缓冲液、阴性对照样品、反转录阳性对照样品、RT-PCR 反应液、75%乙醇、RNA 酶抑制剂、TaqDNA 聚合酶、AMV 反转录酶、PCR 扩增对照模板、反转录阳性对照引物 18 种试剂组成。用于可能感染亚洲 I 型口蹄疫病毒动物组织、水疱皮、水疱皮液、细胞培养物中口蹄疫病毒亚洲 I 型 RNA 的检测和鉴定。

**【性状】** 应密封完好、无变形、组分齐全、无破损、无渗漏、标签字迹清晰。其中:

- (1) 阴性对照样品 应为淡红色液体, 仅有少量悬浮物, 装量为 700 $\mu$ l。
- (2) 反转录阳性对照样品 应为白色液体, 仅有少量悬浮物, 装量为 700 $\mu$ l。
- (3) 变性液 应为无色透明液体, 有臭味, 装量为 7ml。
- (4) 醋酸钠溶液 应为无色透明液体, 有酸味, 装量为 350 $\mu$ l。
- (5) 酚/氯仿/异戊醇混合液 应为无色透明液体, 上层有保护液, 有异味, 装量为 3.5ml。
- (6) 异丙醇 应为无色透明液体, 有异味, 装量为 3.5ml。
- (7) 75%乙醇 应为无色透明液体, 无杂质, 无沉淀, 装量为 12ml。
- (8) 无菌 DEPC 水 应为无色透明液体, 无杂质, 无沉淀, 装量为 900 $\mu$ l。
- (9) RNA 酶抑制剂 应为无色无味油性液体, 装量为 15 $\mu$ l。

- (10) RT-PCR 反应液 应为溶液为无色无味液体，装量为 250 $\mu$ l。
- (11) AMV 反转录酶 应为无色无味油性液体，装量为 3 $\mu$ l。
- (12) TaqDNA 聚合酶 应为无色无味油性液体，装量为 12 $\mu$ l。
- (13) 矿物油 应为无色无味透明的油性液体，装量为 300 $\mu$ l。
- (14) 50 $\times$ TAE 电泳缓冲液 应为无色透明液体，有冰乙酸味，无沉淀，装量为 20ml。
- (15) 溴化乙锭溶液 应为红色液体，无沉淀，装量为 100 $\mu$ l。
- (16) 上样缓冲液 应为铁锈色粘稠液体，无沉淀，装量为 50 $\mu$ l。
- (17) 反转录阳性对照引物 应为溶液为无色无味液体，装量为 6 $\mu$ l。
- (18) PCR 扩增阳性对照模板 应为溶液为无色无味液体，装量为 10 $\mu$ l。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，阴性对照样品、反转录阳性对照样品、RT-PCR 反应液均应无菌生长。

**【敏感性检验】** 用试剂盒检测反转录阳性样品敏感性质控样品 RS1、RS2、RS3、RS4，按反转录阳性对照样品检测方法进行检测（在反应体系中加入反转录对照引物 1 $\mu$ l），反转录阳性对照成立的情况下，检测样品出现与反转录阳性对照相同大小片段时（约 292bp），判定为阳性；否则，为阴性。重复检测 3 次，试剂盒合格的判定标准为 RS1、RS2、RS3 样品均为阳性，RS4 样品检测结果可为阳性或阴性，当 RS4 为阳性时，检测阳性带的亮度：RS1>RS2>RS3>RS4。

用试剂盒对 PCR 扩增阳性对照模板敏感度质控样品 AS1、AS2、AS3、AS4 检测 3 次。合格试剂盒的标准为：AS1、AS2、AS3 样品均为阳性，AS4 样品检测结果可阳性或阴性，当 AS4 为阳性时，检测阳性带的亮度：AS1>AS2>AS3>AS4。

**【特异性检验】** 用试剂盒检测 11 份特异性质控样品：猪瘟病毒、猪伪狂犬病毒、牛病毒性腹泻病毒、羊痘病毒疫苗株、口蹄疫病毒 OM II 系毒株、口蹄疫病毒 O 型弱毒疫苗、口蹄疫病毒 A 型弱毒疫苗，均由中国动物疫病预防控制中心提供。每份样品重复检测 3 次。判定合格标准为每份样品 3 次检测全部为阴性。

**【作用与用途】** 本试剂盒系采用反转录和 PCR 扩增一步法对亚洲 I 型口蹄疫感病毒的 RNA 进行检测。用于可能感染亚洲 I 型口蹄疫病毒动物组织、水疱皮、水疱皮液、细胞培养物中亚洲 I 型口蹄疫病毒 RNA 的检测和鉴定。

#### **【用法与判定】** 1 用法

##### 1.1 样品准备

##### 1.1.1 样本采集、保存及运输

1.1.1.1 样品采集 采集发病动物（牛、羊或猪）未破裂的舌面或蹄部、鼻镜、乳头等部位的水疱皮和水疱液；采集样品均置于 2ml 50%甘油生理盐水，2~8 $^{\circ}$ C 保存。送实验室检测。（要求送检病料新鲜，严禁反复冻融病料。）

1.1.1.2 样本保存 采集的样品在 2~8 $^{\circ}$ C 条件下保存应不超过 24 小时；-70 $^{\circ}$ C 条件以下可长期保存，在保存期间要避免反复冻融，最多冻融 3 次。

1.1.1.3 样本运输 置于加冰的冰壶或泡沫箱内运输，运输过程中保证容器内温度保持在 2~8 $^{\circ}$ C，24 小时内运至检测地点。

##### 1.2 样品处理

1.2.1 组织样品处理 称取待检病料 0.05g 置研磨器中剪碎并研磨，加入 600 $\mu$ l A 液继续研磨。取已研磨好的待检病料上清 300 $\mu$ l 和 100 $\mu$ l A 液，置 1.5 ml 灭菌离心管中。

1.2.2 液态样品处理 取 200 $\mu$ l，置 1.5 ml 灭菌离心管中，加入 200 $\mu$ l A 液，混匀。

1.2.3 反转录阳性对照处理：取 200 $\mu$ l，置 1.5 ml 灭菌离心管中，加入 200 $\mu$ l A 液，混匀。

1.2.4 阴性对照处理 取 200 $\mu$ l，置 1.5 ml 灭菌离心管中，加入 200 $\mu$ l A 液，混匀。

1.3 病毒 RNA 提取 取已处理的待检样品、阴性对照样品、阳性对照样品，每管依次加入醋酸钠溶液 30  $\mu$ l、酚/氯仿/异戊醇混合液 300  $\mu$ l（取酚/氯仿/异戊醇混合液之前不要晃动，不要吸到酚/氯仿/异戊醇混合液上层保护液；此液有很强的腐蚀性，切勿沾到皮肤或衣物，否则立即用大量清水冲洗并擦干），颠倒 10 次，混匀（不宜过于强烈震荡，以免产生乳化而不分层），冰浴 15 min，4 $^{\circ}$ C 13000 g 离心 15 min。取 300 $\mu$ l 上清置于新的经无菌 DEPC 水处理过的 1.5 ml 灭菌离心管中（注意不要吸出和破坏分界层），加入 300 $\mu$ l 异丙醇，混匀，置液氮 3 min 或 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中 30 min。室温融化，4 $^{\circ}$ C 20000g 离心 20 min（注意固定离心管方向，即将离心管开口朝离心机转轴方向放置）。弃上清，沿离心管开口方向管壁缓缓滴入 -20 $^{\circ}$ C 预冷的 75%乙醇溶液 1ml，轻轻旋转一周后倒掉，将离心管倒扣于吸水纸上 1min（不同样品严禁放在吸水纸同一地方吸干），真空抽干 15min（以无乙醇味为准）。用 9 $\mu$ l 无菌 DEPC 水和 1 $\mu$ l RNA 酶抑制剂沿离心管开口相反方向溶解沉淀，备用。

#### 1.4 RT-PCR 操作程序

1.4.1 RT-PCR 反应液体系配制 N 个检测样品反应体系配制为：取 21.5 $\times$  (N+4)  $\mu$ l RT-PCR 反应液（用前融化，混匀）、0.3 $\times$  (N+4)  $\mu$ l RNA 酶抑制剂、0.2 $\times$  (N+4)  $\mu$ l 反转录酶、1 $\times$  (N+4)  $\mu$ l TaqDNA 聚合酶，混匀。取 N+3 个 0.2ml 薄壁 PCR 管作好标记，将配制的混合液以每管 23 $\mu$ l 分配至薄壁 PCR 管中。根据标记分别加入 2 $\mu$ l 提取的样品 RNA（一份样本换用一个吸头），其中 3 管分别作为反转录阳性对照、PCR 扩增阳性对照和阴性对照。反转录阳性对照加入 1 $\mu$ l 反转录阳性对照样品 RNA 和反转录阳性对照引物各 1 $\mu$ l；PCR 扩增阳性对照加入 PCR 扩增对照模板 2 $\mu$ l；阴性对照样品加入阴性对照样品 RNA 2 $\mu$ l。混匀。加入矿物油一滴（约 15 $\mu$ l）覆盖。

1.4.2 反转录和 PCR 扩增程序 将 0.2ml 薄壁 PCR 管放置在 PCR 扩增仪上进行以下温度控制程序：42 $^{\circ}$ C 45 min，95 $^{\circ}$ C 3min，直接进入 95 $^{\circ}$ C 30s、50 $^{\circ}$ C 40s、72 $^{\circ}$ C 40s 循环，35 个循环后，72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.5 电泳 称 3g 琼脂糖置 500ml 锥形瓶中，加入 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液 200 ml（取 4ml 50 $\times$ TAE 电泳缓冲液，用双蒸水稀释至 200ml），于微波炉中或电热器上溶解，再加入 20 $\mu$ l 溴化乙锭溶液混匀。在电泳槽内放好梳子，倒入琼脂糖凝胶，待凝固后将 PCR 扩增产物 15 $\mu$ l 混合 3 $\mu$ l 上样缓冲液，加样于琼脂糖凝胶孔中，以 5V/cm 电压电泳 30min，紫外灯下观察结果，照相。

2 判定 在反转录阳性对照样品出现 292bp 扩增带，PCR 扩增阳性对照样品出现 415bp 扩增带，阴性对照样品无扩增带出现（引物带除外）时，实验结果成立。被检样品出现 292bp 扩增带或 415bp 扩增带为亚洲 I 型口蹄疫病毒阳性，否则为阴性。

**【注意事项】**（1）本品仅供体外诊断用。

(2) 所有用于检测的废弃物品均应放入含 1% 次氯酸钠溶液的废物缸内，高压灭菌处理。

(3) RT-PCR 实验室应分配液区、模板提取区、扩增区和电泳区。RT-PCR 工作流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区→电泳区。各区器材试剂专用，不可跨区使用。实验结束后立即用 1% 次氯酸钠或 75% 酒精或紫外灯消毒工作台。

(4) 所有试剂应在规定的温度下保存，使用时先将 RT-PCR 反应液拿到室温融化后使用，用毕立即放回原处，其它试剂现用现取，用完立即放回原处，不同批次试剂不能混用；勿使用过期的试剂盒。

(5) 在提取 RNA 时，尽量缩短操作时间，避免 RNA 酶污染。离心管、吸头等在实验前应全部高压灭菌。用灭菌的镊子夹取离心管，打开和盖上离心管盖时避免手和手套接触离心管口。

(6) 使用前将 RT-PCR 反应液、RNA 酶抑制剂、AMV 反转录酶和 TaqDNA 聚合酶，5 000g 离心 15s，使液体全部沉于管底。配制和分装 RT-PCR 反应液体系时应尽量避免产生气泡。

(7) 按试剂盒说明书要求准确吸取各种试剂，移液器、PCR 仪等应定期校验。

(8) 溴化乙锭溶液具有致癌性，应小心操作。若沾到皮肤或衣物上，应立即用大量清水冲洗。

(9) 本试剂盒为 10 头份包装，在有效期内应在 3 次以内用完。不同批次的试剂盒成分不能混用。

**【规格】** 10 头份/盒

**【贮藏与有效期】** 试剂盒 2~8℃ 保存，其中阴性对照样品、PCR 扩增对照模板、反转录阳性对照引物、反转录阳性对照样品、RT-PCR 反应液、75% 乙醇、RNA 酶抑制剂、TaqDNA 聚合酶、AMV 反转录酶保存于 -20℃。有效期为 6 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由中国动物疫病预防控制中心提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 741 号发布。

### 鸡马立克氏病病毒琼脂扩散试验抗原与阴、阳性血清

Ji Malikeshibingbingdu Qiongzhi Kuosanshiyan Kangyuan Yu Yin Yangxing Xueqing

Marek's Disease Virus Agar Gel Precipitation Antigen and Negative, Positive Sera  
抗原系用鸡马立克氏病病毒京-1 株强毒接种 SPF 鸡胚成纤维细胞培养，收获细胞培养物，离心、浓缩后经冷冻真空干燥制成。用于鸡马立克氏病琼脂扩散试验。

阳性血清系用马立克氏病病毒强毒株接种 SPF 鸡，采血、分离血清，经冷冻真空干燥制成，用于马立克氏病琼脂扩散试验的阳性对照；阴性血清系采自 SPF 鸡血、分离血清，经冷冻真空干燥制成，用于马立克氏病琼脂扩散试验的阴性对照。

#### 抗 原

**【性状】** 淡黄色疏松团块，用 PBS 液稀释后为淡黄色液体。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** 每批抗原抽样 3 瓶。用含 0.01% 硫柳汞的 PBS 液制备 1% 琼脂平板，并在其上按六角形打孔，孔径为 5mm，孔距为 3mm。将抗原与鸡马立克氏病病毒阳性血清分别作 2 倍系列稀释后进行方阵试验，抗原及阳性血清的加量以孔满为度。然后将琼脂平板置 37℃，在有湿度的条件下，反应 24~48 小时。抗原应与 4 倍稀释的鸡马立克氏病病毒阳性血清反应并产生明显沉淀线。

**【特异性检验】** 与抗 REV、抗 IBDV、抗 ALV、抗 CIAV、抗 NDV 阳性血清和阴性血清均呈阴性反应。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于鸡马立克氏病琼脂扩散试验。

**【用法与判定】** 按【效价测定】项中的方法制备琼脂平板。按六角形打孔，孔径为 5mm，孔距为 3mm。中心孔滴加抗原，阳性血清滴加 2、4、6 孔，被检血清滴加 1、3、5 孔，滴加时以孔满为度。置 37℃ 温箱中，于 24、48 小时各观察 1 次。当阳性血清和被检血清与抗原孔间有明显沉淀线，而阴性血清与抗原孔间无沉淀线，该被检血清为阳性。当阳性血清与抗原孔间有明显沉淀线，而被检血清与抗原孔间无沉淀线，该被检血清为阴性。

**【注意事项】** (1) 在低温条件下运送，抗原稀释后，避免反复冻融。

(2) 在处理和滴加每份受检样品后，必须把玻璃棒充分洗涤擦干，更换加样头。

(3) 对于含羽髓少的羽根，需加 2~3 滴水浸提（水量不宜过多，以防由于稀释过度而影响反应结果）。

(4) 加样时，以把孔加满为度，切忌样品溢出，影响判定结果；与邻接孔连片时，应作废重做。

(5) 所有样品加样完毕后，样品应暂放冰箱内保存，待次日判定结果后，如无复查必要，则取出废弃。

(6) MDV 阳性血清避免反复冻融，以防降低效价而影响检出结果。

**【规格】** 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -20℃ 以下保存，有效期为 24 个月；2~8℃ 保存，有效期为 12 个月。

### 阳性血清

**【性状】** 淡黄色疏松团块，加 PBS 后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** 每批血清抽样 3 瓶。每瓶加 PBS 液至 1ml 后再作 2 倍系列稀释至 8 倍，按抗原[效价测定]项中的方法进行琼脂扩散试验。当 4 倍稀释的血清孔与抗原孔间有明显的沉淀线，该血清为合格。

**【特异性检验】** 与 REV、IBDV、ALV、CIAV、NDV 琼脂扩散抗原进行琼脂扩散试验均呈阴性反应，与鸡胚成纤维细胞培养物进行琼脂扩散试验呈阴性反应。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 -20℃以下保存，有效期为 24 个月；2~8℃保存，有效期为 12 个月。

#### 阴性血清

【性状】 淡黄色疏松团块，加 PBS 后迅速溶解

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

【效价测定】 每批血清抽样 3 瓶。每瓶加 PBS 液至 1ml，按抗原[效价测定]项中的方法进行琼脂扩散试验。血清孔与抗原孔间应无沉淀线产生。

【特异性】 与 MDV、REV、IBDV、ALV、CIAV、NDV 琼脂扩散抗原进行琼脂扩散试验均呈阴性反应，与鸡胚成纤维细胞培养物进行琼脂扩散试验呈阴性反应。

【剩余水分测定】 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

【真空度测定】 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 -20℃以下保存，有效期为 24 个月；2~8℃保存，有效期为 12 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 742 号发布。

### 鸡传染性法氏囊病毒琼脂扩散试验抗原与阴、阳性血清

Ji Chuanranxingfashinangbingbingdu Qiongzhikuosanshiyan Kangyuan yu Yin, Yangxing Xueqing

Infectious Bursal Disease Virus Agar Gel Precipitation Antigen, Negative and Positive Sera

抗原系用鸡传染性法氏囊病中等毒力病毒株接种 SPF 鸡胚，收获感染胚液、绒毛尿囊膜和胚体，经研磨、冻融、浓缩、甲醛溶液灭活后，冷冻真空干燥制成。阳性血清系用鸡传染性法氏囊病病毒强毒株接种 SPF 鸡后，采血，分离血清，经冷冻真空干燥制成。阴性血清系采用 SPF 鸡血，分离血清，经冷冻干燥制成。用于鸡传染性法氏囊病琼脂扩散试验。

#### 抗 原

【性状】 微黄色海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离，加稀释液后迅速溶解。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【效价测定】 按用法与判定项进行，效价应 $\geq 1:2$ 。

【特异性检验】 按用法与判定项进行，抗原孔与鸡传染性法氏囊病病毒阳性血清孔之间应出现明显的沉淀线，与鸡新城疫、鸡传染性喉气管炎、鸡马立克氏病、禽流感病毒阳性血清孔和阴性血清孔之间均不出现任何沉淀线。

【剩余水分测定】 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

【真空度测定】 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于鸡传染性法氏囊病琼脂扩散试验。

**【用法与判定】** 1 琼脂板制备

1.1 称取优质琼脂粉 1~1.2 克，氯化钠 8.5 克，加入 pH 值 7.2 的 PBS 溶液 100ml 中。

1.2 置沸水中水浴 60 分钟以上。中间振荡数次，使其融化均匀。

1.3 将融化的琼脂液以两层纱布夹一层薄脱脂棉过滤，收集滤液。

1.4 将直径 90~100mm 的平皿放在水平台上，每个平皿倒入滤过的琼脂液 20~25ml，厚度约 3.0mm，注意不要产生气泡，冷凝后加盖倒置平皿，防止水份蒸发，在 2~8℃ 中可保存 1 周。

2 琼脂扩散试验方法

2.1 打孔 现用现打，用六角打孔器直接打孔，或将六角形图案垫在平皿下面，用直径为 3mm 的单孔打孔器按图形打孔。孔径 3mm，孔间距离 3mm。

2.2 封底 挑出孔中琼脂后，将平皿底部置酒精灯上微微加热，使孔底琼脂稍微融化而封底。

2.3 加样 根据试验的目的不同，加样的方式如下。

2.3.1 抗原效价测定 中央孔加满阳性血清，外周孔加满 0.01mol/L pH 值 7.2 的 PBS 溶液倍比稀释的待检抗原。

2.3.2 阳性血清效价测定 中央孔加满抗原，外周孔加满 0.01mol/L pH 值 7.2 的 PBS 溶液倍比稀释的待检阳性血清。

2.3.3 临床检测 检抗原时，中央孔加满阳性血清，周边孔加满待检抗原；检抗体时，中央孔加满抗原，周边孔加满待检血清。

上述试验均应设阳性及阴性对照。

2.4 温育 置 37℃ 湿盒内作用 24~48 小时。

3 结果判定

试验成立 当抗原孔与对照阳性血清孔之间出现 1 条清晰的乳白色沉淀线，与阴性血清孔之间无沉淀线出现时，试验成立。

阳性 抗原孔与被检血清样品孔之间出现 1 条清晰的乳白色沉淀线，且和抗原孔与对照阳性血清孔之间的沉淀线相吻合者判定为阳性。

弱阳性 抗原孔与被检血清样品孔之间未出现沉淀线，但抗原孔与对照阳性血清孔之间的沉淀线末端弯向被检血清孔内侧者判定为弱阳性。

阴性 抗原孔与被检血清样品孔之间未出现沉淀线，且抗原孔与对照阳性血清孔之间的沉淀线末端直向被检血清孔或弯向被检血清孔外侧者判定为阴性。

**【注意事项】** 在低温条件下运送，使用过程中避免反复冻融。稀释后当日用完。

**【规格】** 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃ 以下保存，有效期为 24 个月。

### 阳性血清

**【性状】** 黄色海绵状疏松团块，加 PBS 后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** 按用法与判定项进行，效价应 $\geq 1:4$ 。

**【特异性检验】** 按用法与判定项进行，阳性血清孔与鸡传染性法氏囊病毒琼脂扩散抗原孔之间出现明显的沉淀线，与鸡新城疫、鸡马立克氏病、鸡传染性喉气管炎和禽流感病毒琼脂扩散抗原孔之间均不出现任何沉淀线。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【规格】** 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃以下保存，有效期为24个月。

#### 阴性血清

**【性状】** 淡黄色透明液体。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【特异性检验】** 按用法与判定项进行，阴性血清孔与鸡传染性法氏囊病、鸡新城疫、鸡马立克氏病、鸡传染性喉气管炎和禽流感病毒琼脂扩散抗原孔之间均不出现任何沉淀线。

**【规格】** 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃以下保存，有效期为24个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由中国动物卫生与流行病学中心提出。
2. 本标准于2006年11月8号经农业部公告第742号发布。

## 鸡减蛋综合征病毒血凝抑制试验抗原与阴、阳性血清

Ji Jiandanzonghezhengbingdu Xueningyizhishiyang Kangyuan yu Yin, Yangxing Xueqing  
Eggs Drop Syndrome Virus Hemagglutination Inhibition Assay Antigen, Negative and Positive  
Sera

抗原系用鸡减蛋综合征病毒京911株接种易感鸭胚，培养并收获感染胚液，经纯化、甲醛溶液灭活后加入适宜稳定剂冻干制成。阳性血清系用鸡减蛋综合征疫苗免疫SPF鸡，采血、分离血清，加入冻干保护剂冻干制成。阴性血清系采自6~8周龄的SPF鸡血、分离血清制成。用于鸡减蛋综合征血凝抑制试验（HI）。

#### 抗原

**【性状】** 微黄色海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离，加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** 按用法与判定项进行，对1%鸡红细胞凝集价应 $\geq 1:8192$ 。

**【特异性检验】** 按用法与判定项进行，抗原的血凝性能被减蛋综合征病毒阳性血清抑制，而不能被其他禽流感、鸡新城疫病毒阳性血清抑制。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于鸡减蛋综合征血凝抑制试验。

**【用法与判定】** 1 血凝试验（HA）操作方法

- 1.1 在 V 型微量反应板中，每孔加 0.025ml PBS 溶液；
- 1.2 第 1 孔加入 0.025ml 抗原，依次作 2 倍系列稀释至第 15 孔；
- 1.3 每孔加入 0.025ml 1% (V/V) 鸡红细胞悬液；
- 1.4 将反应板在震荡器上震荡 1~2 分钟或轻叩反应板混合反应物，室温 (20~25℃) 静置 15~30 分钟或 2~8℃ 45~60 分钟，在对照孔的红细胞显著呈纽扣状时判定结果。
- 1.5 结果判定 将反应板倾斜 60°，观察红细胞有无呈泪珠样流淌，完全无泪珠样流淌 (100%凝集) 的最高稀释倍数为血凝效价。

## 2 血凝抑制试验 (HI) 操作方法

2.1 根据 HA 测定的效价，计算配制 4 个血凝单位 (4HAU) 抗原。HA 效价除以 4 即为含 4HAU 抗原的稀释倍数。例如，HA 效价为 1 : 256，则 4HAU 抗原的稀释倍数应是 1 : 64 (256 除以 4)。

2.2 反应板中第 1~11 孔加入 0.025ml PBS，第 12 孔加入 0.05ml PBS；

2.3 第 1 孔中加入 0.025ml 血清。充分混匀后吸 0.025ml 于第 2 孔，依次对倍稀释至第 10 孔，从第 10 孔吸取 0.025ml 弃去；

2.4 第 1~11 孔均加入 0.025ml 的 4HAU 抗原，室温下 (20~25℃) 静置 30 分钟或 2~8℃ 45~60 分钟。

2.5 每孔加入 0.025ml 1% (V/V) 的鸡红细胞悬液，轻晃混匀后，室温 (20~25℃) 静置 20~40 分钟或 2~8℃ 45~60 分钟，当对照孔红细胞呈显著纽扣状时判定结果。

2.6 判定结果 以完全抑制 4HAU 抗原的最高血清稀释倍数为该血清的 HI 效价。当阳性的 HI 效价与已知效价误差不超过 1 个滴度，阴性血清效价不高于 1 : 4 时，试验方可成立。被检样品 HI 效价  $\leq 1 : 4$  判为阴性；1 : 8 判为可疑 (可疑样品应重检，重检效价  $\geq 1 : 8$  判为阳性， $\leq 1 : 4$  判为阴性)； $\geq 1 : 16$  判为阳性。

**【注意事项】** (1) 红细胞凝集和红细胞凝集抑制试验影响因素甚多，应严格控制试验条件，准确控制红细胞悬液和抗原工作浓度，同时应严格控制温度和作用时间。

(2) 用 0.01mol/L pH 值 7.0~7.2 的 PBS 溶液作稀释液。

(3) 抗原若有污染，应废弃。

(4) 抗原使用时应先测抗原的血凝价，依此计算配制 4 个血凝单位的抗原，配好后的抗原应在 2 小时内用完。

(5) 抗原开启后，2~8℃ 保存，不超过 3 个月。切忌反复冻融。

**【规格】** (1) 1ml/瓶 (2) 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃ 以下保存，有效期为 24 个月。

## 阳性血清

**【性状】** 微黄色或淡红色海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离，加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** 按用法与判定项进行，HI 抗体效价应  $\geq 1 : 256$ 。

**【特异性检验】** 按用法与判定项进行，能抑制减蛋综合征病毒抗原的血凝性，而不能抑制禽流感、鸡新城疫病毒的血凝性。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

【真空度测定】 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

【规格】 (1) 1ml/瓶 (2) 2ml/瓶

【贮藏与有效期】 -15℃以下保存，有效期为 24 个月。

### 阴性血清

【性状】 淡黄色透明液体。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【效价测定】 按现行《中国兽药典》附录进行测定，HI 效价应 $\leq 1:2$ 。

【特异性检验】 按用法与判定项进行，不能抑制减蛋综合征、禽流感、鸡新城疫病毒的血凝性。

【规格】 (1) 1ml/瓶 (2) 2ml/瓶

【贮藏与有效期】 -15℃以下保存，有效期为 24 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由中国动物卫生与流行病学中心提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 742 号发布。

## 猪圆环病毒聚合酶链反应检测试剂盒

Zhuyuanhuanbingdu PCR Jianceshijihe

Porcine circovirus Polymerase Chain Reaction (PCR) detection Kit

本试剂盒由人工合成的可扩增猪圆环病毒的特异性引物、病毒 DNA 提取试剂、PCR 扩增试剂及电泳试剂组成。用于可能感染猪圆环病毒的猪血清、肺脏、淋巴结等病料以及细胞培养物中猪圆环病毒 DNA 的检测。

【性状】 应密封完好、无变形、组分齐全、无破损、无渗漏、标签字迹清晰。其中：

- (1) 阴性对照样品 红色液体，仅有少量沉淀物，装量为 350 $\mu$ l/管，1 管。
- (2) PCV-1 阳性对照样品 无色液体，装量为 350 $\mu$ l/管，1 管。
- (3) PCV-2 阳性对照样品 无色液体，装量为 350 $\mu$ l/管，1 管。
- (4) 消化液 无色透明液体，有臭味，装量为 12ml/瓶，1 瓶。
- (5) 2%蛋白酶 K 溶液 无色透明液体，装量为 110 $\mu$ l/管，1 管。
- (6) 酚/氯仿/异戊醇混合液 淡黄色透明液体，上层有保护液，有异味，装量为 7ml/管，1 管。
- (7) 异丙醇 无色透明液体，有异味，装量为 6ml/瓶，1 瓶。
- (8) 75%乙醇 无色透明液体，无杂质，无沉淀，装量为 12ml/瓶，1 瓶。
- (9) 无菌去离子水 无色透明液体，无杂质，无沉淀，装量为 650 $\mu$ l/管，1 管。
- (10) PCR 反应液 无色无味液体，装量为 200 $\mu$ l/管，1 管。
- (11) 0.5U/ $\mu$ l TaqDNA 聚合酶 无色无味油性液体，装量为 25 $\mu$ l/管，1 管。
- (12) 矿物油 无色无味透明的油性液体，装量为 300 $\mu$ l/管，1 管。

(13) 50×TAE 电泳缓冲液 无色透明液体，有冰乙酸味，无沉淀，装量为 20ml/管，1 管。

(14) 溴化乙锭溶液 红色液体，无沉淀，装量为 100μl/管，1 管。

(15) 上样缓冲液 铁锈色粘稠液体，无沉淀，装量为 50μl/管，1 管。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，阴性对照样品、PCR 反应液均应无菌生长。

**【灵敏度检验】** 用试剂盒对 PCV-2 灵敏度质控样品 2S0、2S1、2S2、2S3 和 PCV-1 灵敏度质控样品 1S0、1S1、1S2、1S3 进行检验。合格标准为：2S0、2S1、2S2 样品均为 PCV-2 阳性，2S3 样品检测结果可 PCV-2 阳性或阴性，当 2S3 为 PCV-2 阳性时，检测阳性带的亮度：2S0>2S1>2S2>2S3；1S0、1S1、1S2 样品均为 PCV-1 阳性，1S3 样品检测结果可 PCV-1 阳性或阴性，当 1S3 为 PCV-1 阳性时，检测阳性带的亮度：1S0>1S1>1S2>1S3。

**【敏感性检验】** 用试剂盒检测敏感性质量控制样品 N1~N8（由中国动物疫病预防控制中心提供见附注 3 敏性质控样品制备），合格标准见表 1.1。检测结果完全符合表 1.1 标准时判定为合格。

表 1.1 试剂盒敏感性检验合格标准

质控样本编号	质控检测标准	
P1	PCV-2 +	PCV-1 -
P2	PCV-2 -	PCV-1 +
P3	PCV-2 -	PCV-1 +
P4	PCV-2 -	PCV-1 +
P5	PCV-2 +	PCV-1 -
P6	PCV-2 +	PCV-1 -
P7	PCV-2 +	PCV-1 -
P8	PCV-2 +	PCV-1 -

**【特异性检验】** 用试剂盒检测 9 份特异性质控样品，N1（猪日本乙型脑炎病毒）、N2（猪瘟病毒）、N3（猪细小病毒）、N5（猪繁殖与呼吸综合征病毒）、N6（猪传染性胃肠炎病毒）、N7（SPF 猪肺）、N8（SPF 猪淋巴结）、N9（SPF 猪血清），均由农业部兽医诊断中心提供。9 份样品全部为阴性时判定合格。

**【作用与用途】** 用于可能感染猪圆环病毒的猪血清、肺脏、淋巴结等病料以及细胞培养物中猪圆环病毒 DNA 的检测。

**【用法与判断】** 1 样本采集、保存及运输

1.1 样品采集

1.1.1 器材要求 所有采集样品的器材必须经高压或干烤灭菌。

1.1.2 采集部位 病死或扑杀猪，取肺、淋巴结等组织病变部与健康部交界处组织；幼龄猪取心脏；待检活猪，用注射器取血 5ml，2~8℃ 保存，送实验室检测（要求送检病料新鲜，严禁反复冻融病料）。

1.1.3 采集方法

1.1.3.1 组织样品 直接剪取肺、淋巴结或心肌样品约 2g，放入灭菌容器内即可。

1.1.3.2 全血样品 用 1 一次性注射器取血 5ml。

1.2 样本保存 2~8℃ 保存，不超过 24 小时；-70℃ 以下可长期保存，在保存期间要避免反复冻融，最多冻融 3 次。

1.3 样本运输 置于加冰的冰壶或泡沫箱内运输，运输过程中保证容器内温度保持在 2~8℃，24 小时内运至检测地点。

## 2 样本处理

2.1 组织样品处理 取待检病料约 0.2g 置研磨器中剪碎并研磨，加入 2ml 消化液继续研磨。取已研磨好的待检病料上清 100μl，置 1.5 ml 灭菌离心管中，再加入 500μl 消化液和 10μl 蛋白酶 K 溶液，混匀后，置 55℃ 水浴中（4~16）小时。

2.2 全血样品处理 待血液凝固后，取上清放于离心管中，4℃ 8 000g 离心 5 分钟，取上清 100μl，置 1.5ml 灭菌离心管中，加入 500μl 消化液和 10μl 蛋白酶 K 溶液，混匀，置 55℃ 水浴中（4~16）小时。

2.3 阳性对照处理 分别取 PCV-1 阳性对照样品和 PCV-2 阳性对照样品各 100μl，置 1.5 ml 灭菌离心管中，每管加入 500μl 消化液和 10μl 蛋白酶 K 溶液，混匀，置 55℃ 水浴中（4~16）小时。

2.4 阴性对照处理 取阴性对照液 100μl，置 1.5 ml 灭菌离心管中，加入 500μl 消化液和 10μl 蛋白酶 K 溶液，混匀，置 55℃ 水浴中（4~16）小时。

## 3 DNA 模板的提取

3.1 取出已处理的待检样品及阴性、阳性对照样品，每管加入 600μl 酚/氯仿/异戊醇混合液，用力颠倒 10 次混匀，13 000g 离心 10 分钟。

3.2 取上清 500μl 置 1.5ml 灭菌离心管中，加入等体积异丙醇，混匀，置液氮中 1 分钟或-70℃ 冰箱中 30 分钟。取出离心管，室温融化，20 000g 离心 15 分钟。

3.3 弃上清，沿离心管开口方向管壁缓缓滴入 1ml -20℃ 预冷的 75% 乙醇溶液，轻轻旋转洗 1 次后倒掉，将离心管倒扣于吸水纸上 1 分钟，真空抽干 15 分钟。

3.4 取出离心管，用 50μl 灭菌双蒸水溶解沉淀，作为模板备用。

## 4 PCR 操作程序

4.1 PCR 反应液体系配制，N 个检测样品反应体系配制为：取 16×(N+4) μl PCR 反应液（用前融化，混匀）、2(N+4) μl 0.5U/μl Taq DNA 聚合酶，混匀。取 N+3 个 0.2ml 薄壁 PCR 管作好标记，将配制的混合液以每管 18μl 分配至薄壁 PCR 管中，分别加入检测样品、PCV-1 阳性对照样品、PCV-2 阳性对照样品以及阴性对照样品提取的 DNA 2μl（1 份样本换用 1 个吸头），作好标记，混匀。加入矿物油 1 滴（约 15μl）覆盖。

4.2 PCR 程序 将 0.2ml 薄壁 PCR 管放置在 PCR 扩增仪上进行以下温度控制程序：94℃ 预变性 3 分钟；94℃ 变性 30 秒，62℃ 退火 45 秒，72℃ 延伸 45 秒，35 个循环后，72℃ 延伸 10 分钟。

5 电泳 将 PCR 扩增产物 15μl 与 3μl 上样缓冲液混合，点样于 1% 琼脂糖凝胶孔中，以 5 V/cm 电压电泳 40 分钟，紫外凝胶成像仪下观察结果。

6 结果判定 当 PCV-1 阳性对照样品出现 652bp 扩增带，PCV-2 阳性对照样品出现

1154bp 扩增带，阴性对照未出现目的带时，实验结果成立。被检样品出现 652bp 扩增带为 PCV-1 阳性，出现 1154bp 扩增带为 PCV-2 阳性，未出现相应扩增带的样品判为阴性；出现 652bp 和 1154bp 扩增带都出现时，判定样品 PCV-1 和 PCV-2 均为阳性。

**【注意事项】** (1) 本品仅供体外诊断用。

(2) 所有用的废弃物品均应放入含 1% 次氯酸钠溶液的废物缸内，高压灭菌处理。

(3) PCR 实验室应分配液区、模板提取区、扩增区和电泳区。PCR 工作流程顺序为配液区→模板提取区→扩增区→电泳区。各区器材试剂专用，不可跨区使用。实验结束后立即用 1% 次氯酸钠或 75% 酒精或紫外灯消毒工作台。

(4) 所有试剂应在规定的温度下保存，使用时先将和 PCR 反应液拿到室温融化后使用，用毕立即放回原处，其它试剂现用现取，用完立即放回原处，不同批次试剂不能混用；勿使用过期的试剂盒。

(5) 离心管、吸头等在实验前应全部高压灭菌。用灭菌的镊子夹取离心管，打开和盖上离心管盖时避免手和手套接触离心管口。

(6) 用 PCR 反应液和 0.5U/μl TaqDNA 聚合酶前，将其 5 000g 离心 15s，使液体全部沉于管底。配制和分装 PCR 反应液体系时应尽量避免产生气泡。

(7) 按试剂盒说明书要求准确吸取各种试剂，移液器、PCR 仪等应定期校验。

(8) 溴化乙锭溶液具有致癌性，小心操作。若沾到皮肤或衣物上，应立即用大量清水冲洗。

(9) 本试剂盒为 10 头份包装，在有效期内应 3 次以内用完。不同批次的试剂盒成分不能混用。

**【规格】** 10 头份/盒

**【贮藏与有效期】** 试剂盒 2~8℃ 保存，其中阴性对照样品、PCV-1 阳性对照样品、PCV-2 阳性对照样品、2% 蛋白酶 K 溶液、PCR 反应液、75% 乙醇、0.5U/μl TaqDNA 聚合酶、保存于 -20℃。有效期为 6 个月。

**附加说明：**

1. 本标准由中国动物疫病预防控制中心提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 742 号发布。

## 猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 检测试剂盒

Zhu Fanzhiyuhuxizonghezhengbingdu RT-PCR Jianceshijihe

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus RT-PCR Detection Kit

本试剂盒由人工合成的可扩增猪繁殖与呼吸综合征病毒的 RNA 引物、病毒 RNA 提取试剂、反转录试剂、PCR 扩增试剂及电泳试剂组成。用于检测猪组织、血液中 PRRS 病毒的核酸；可能感染 PRRS 病毒猪的肺、淋巴结等病料和血清以及细胞培养物中 PRRS 病毒 RNA 的检测。

**【性状】** 应密封完好、无变形、组分齐全、无破损、无渗漏、标签字迹清晰。

- (1) 阴性对照样品 无色液体, 仅有少量悬浮物, 装量为 350 $\mu$ l $\times$ 1 管。
- (2) 阳性对照样品 粉色液体, 装量为 350 $\mu$ l $\times$ 1 管。
- (3) 变性液 无色透明液体, 有臭味, 装量 7ml $\times$ 1 瓶。
- (4) 醋酸钠溶液 无色透明液体, 有酸味, 装量为 350 $\mu$ l $\times$ 1 管。
- (5) 酚/氯仿/异戊醇混合液 无色透明液体, 上层有保护液, 有异味 装量 3.5ml $\times$ 1 瓶。
- (6) 异丙醇 无色透明液体, 有异味, 装量为 3.5ml $\times$ 1 瓶。
- (7) 75%乙醇 无色透明液体, 无杂质, 无沉淀, 装量为 12ml $\times$ 1 瓶。
- (8) 无菌 DEPC 水 无色透明液体, 无杂质, 无沉淀, 装量为 450 $\mu$ l $\times$ 1 管。
- (9) RNA 酶抑制剂 无色、无味油性液体, 装量为 24 $\mu$ l $\times$ 1 管。
- (10) RT 反应液 无色、无味液体, 装量为 250 $\mu$ l $\times$ 1 管。
- (11) PCR 反应液 无色、无味液体, 装量为 250 $\mu$ l $\times$ 1 管。
- (12) AMV 反转录酶 无色、无味油性液体, 装量为 12 $\mu$ l $\times$ 1 管。
- (13) 0.5U/ $\mu$ l TaqDNA 聚合酶 无色无味油性液体, 装量为 25 $\mu$ l $\times$ 1 管。
- (14) 矿物油 无色、无味透明的油性液体, 装量为 300 $\mu$ l $\times$ 1 管。
- (15) 50 $\times$ TAE 电泳缓冲液 无色透明液体, 有冰乙酸味, 无沉淀, 装量为 20ml $\times$ 1 瓶。
- (16) 溴化乙锭溶液 红色液体, 无沉淀, 装量为 100 $\mu$ l $\times$ 1 管。
- (17) 上样缓冲液 应为铁锈色粘稠液体, 无沉淀, 装量为 50 $\mu$ l。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 阴性对照样品、阳性对照样品、RT 反应液、PCR 反应液均应无菌生长。

**【灵敏度检验】** 用试剂盒对灵敏度质控样品 S1、S2、S3、S4 样品进行检验 (由农业部兽医诊断中心提供), 判定合格标准为 S1、S2、S3 样品均为阳性, S4 样品检测结果可为阳性或阴性, 当 S4 为阳性时, 检测阳性带的亮度应为 S1>S2>S3>S4。

**【敏感性检验】** 用试剂盒检测 5 份敏感性质控样品: 猪繁殖与呼吸综合征病毒参考毒株 VR-2332 株、猪繁殖与呼吸综合征病毒欧洲株、PRSSV/hebei/2002、PRSSV/Beijing /2001、PRSSV/guangdong/2002 进行敏感性检测 (由农业部兽医诊断中心提供), 重复检测 3 次。5 份 3 次检测的敏感性质控样品应均为阳性。

**【特异性检验】** 用试剂盒检测 8 份特异性质控样品: N1 (猪日本乙型脑炎病毒)、N2 (猪瘟病毒)、N3 (猪细小病毒)、N4 (猪伪狂犬病毒)、N5 (猪圆环病毒)、N6 (猪传染性胃肠炎病毒)、N7 (SPF 猪肺)、N8 (SPF 猪血清), 均由农业部兽医诊断中心提供。每份样品重复检测 3 次。8 份样品 3 次检测应全部为阴性。

**【作用与用途】** 用于检测猪组织、血液中 PRRS 病毒的核酸; 可能感染 PRRS 病毒猪的肺、淋巴结等病料和血清以及细胞培养物中 PRRS 病毒 RNA 的检测。

**【用法与判定】** 1 样本采集、保存及运输

#### 1.1 样品采集

1.1.1 器材要求 所有采集样品的器材必须经高压或干烤灭菌。

1.1.2 采集部位 病死或扑杀猪, 取肺、扁桃体、肺门淋巴结等组织病变边缘处组织; 待检活猪, 用注射器取血 5ml, 2~8 $^{\circ}$ C 保存, 送实验室检测 (要求送检病料新鲜, 严禁反复冻融病料)。

### 1.1.3 采集方法

1.1.3.1 组织样品 直接剪取肺和淋巴结样品约 2g, 放入灭菌容器内即可。

1.1.3.2 全血样品 用一次性注射器取血 5ml。

1.1.4 样品保存 2~8℃保存应不超过 24 小时; -70℃条件以下可长期保存, 在保存期间要避免反复冻融, 最多冻融 3 次。

1.1.5 样本运输 置于加冰的冰壶或泡沫箱内运输, 运输过程中保证容器内温度保持在 2~8℃, 24 小时内运至检测地点。

## 2 样本处理

2.1 组织样品处理 称取待检组织 0.05g 置研磨器中剪碎并研磨, 加入 400μl 变性液继续研磨。取 200μl 已研磨好的待检组织上清, 置 1.5 ml 灭菌离心管中, 再加入 200μl 变性液, 混匀。

2.2 全血样品处理 待血凝后取血清 200μl, 置 1.5 ml 灭菌离心管中, 加入 200μl 变性液, 混匀。

2.3 阳性对照样品处理 取阳性对照样品 200μl, 置 1.5 ml 灭菌离心管中, 加入 200μl 变性液, 混匀。

2.4 阴性对照样品处理 取阴性对照样品 200μl, 置 1.5 ml 灭菌离心管中, 加入 200μl 变性液, 混匀。

3 病毒 RNA 提取 取已处理的待检样品、阴性对照样品、阳性对照样品, 每管依次加入醋酸钠溶液 30 μl、酚/氯仿/异戊醇混合液 300 μl (取酚/氯仿/异戊醇混合液之前不要晃动, 不要吸到酚/氯仿/异戊醇混合液上层保护液; 此液有很强的腐蚀性, 切勿沾到皮肤或衣物, 否则立即用大量清水冲洗并擦干), 颠倒 10 次, 混匀 (不宜过于强烈震荡, 以免产生乳化而不分层), 冰浴 15 分钟, 4℃13 000 g 离心 15 分钟。取 300μl 上清置于新的经无菌 DEPC 水处理过的 1.5 ml 灭菌离心管中 (注意不要吸出和破坏分界面), 加入 300μl 异丙醇, 混匀, 置液氮 3 分钟或 -70℃冰箱中 30 分钟。室温融化, 4℃20 000g 离心 20 分钟 (注意固定离心管方向, 即将离心管开口朝离心机转轴方向放置)。弃上清, 沿离心管开口方向管壁缓缓滴入 -20℃预冷的 75%乙醇溶液 1ml, 轻轻旋转一周后倒掉, 将离心管倒扣于吸水纸上 1 分钟 (不同样品严禁放在吸水纸同一地方吸干), 真空抽干 15min (以无乙醇味为准)。用 9μl 无菌 DEPC 水和 1μl RNA 酶抑制剂沿离心管开口相反方向溶解沉淀, 备用。

## 4 RT 操作程序

4.1 RT 反应液体系配制, N 个检测样品反应体系配制为: 取 16×(N+3) μl RT 反应液 (用前融化, 混匀)、(N+3) μl RNA 酶抑制剂、(N+3) μl 反转录酶, 混匀。取 N+2 个 0.2ml 薄壁 PCR 管作好标记, 将配制的混合液以每管 18μl 分配至薄壁 PCR 管中。根据标记分别加入 2μl 提取的样品 RNA (一份样本换用一个吸头), 其中 2 管分别加入 2μl 阳性对照和阴性对照样品 RNA, 混匀。

4.2 反转录程序 将 0.2ml 薄壁 PCR 管放置在 PCR 扩增仪上进行以下温度控制程序: 42℃ 1 小时, 98℃ 5 分钟。

## 5 PCR 操作程序

5.1 PCR 反应液体系配制, N 个检测样品反应体系配制为 取 16×(N+3) μl PCR 反

应液（用前融化，混匀）、2（N+3） $\mu$ l 0.5U/ $\mu$ l Taq DNA 聚合酶，混匀。取 N+2 个 0.2ml 薄壁 PCR 管作好标记，将配制的混合液以每管 18 $\mu$ l 分配至薄壁 PCR 管中。根据标记分别加入 2 $\mu$ l 1.1.4.4 中产物 cDNA（一份样本换用一个吸头），混匀。加入矿物油一滴（约 15 $\mu$ l）覆盖。

5.2 PCR 程序 将 0.2ml 薄壁 PCR 管放置在 PCR 扩增仪上进行以下温度控制程序：94 $^{\circ}$ C 30 秒、55 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 30 秒循环，35 个循环后，72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。

6 电泳 称 2g 琼脂糖置 500ml 锥形瓶中，加入 1 $\times$ TAE 电泳缓冲液 200 ml（取 4ml 50 $\times$ TAE 电泳缓冲液，用双蒸水稀释至 200ml），于微波炉中或电热器上溶解，再加入 20 $\mu$ l 溴化乙锭溶液混匀。在电泳槽内放好梳子，倒入琼脂糖凝胶，待凝固后将 PCR 扩增产物 15 $\mu$ l 混合 3 $\mu$ l 上样缓冲液，加样于琼脂糖凝胶孔中，以 5V/cm 电压电泳 30 分钟，紫外灯下观察结果，照相。

7 结果判定 在阳性对照样品出现 660bp 扩增带、阴性对照样品无扩增带出现（引物带除外）时，实验结果成立。被检样品出现 660bp 扩增带为猪繁殖与呼吸综合征感病毒阳性，否则为阴性。

**【注意事项】**（1）本品仅供体外诊断用。

（2）所有用于检测的废弃物品均应放入含 1% 次氯酸钠溶液的废物缸内，高压灭菌处理。

（3）PCR 实验室应分配液区、模板提取区、扩增区和电泳区。PCR 工作流程顺序为配液区 $\rightarrow$ 模板提取区 $\rightarrow$ 扩增区 $\rightarrow$ 电泳区。各区器材试剂专用，不可跨区使用。实验结束后立即用 1% 次氯酸钠或 75% 酒精或紫外灯消毒工作台。

（4）所有试剂应在规定的温度下保存，使用时先将 RT 反应液和 PCR 反应液拿到室温融化后使用，用毕立即放回原处，其它试剂现用现取，用完立即放回原处，不同批次试剂不能混用；勿使用过期的试剂盒。

（5）在提取 RNA 时，尽量缩短操作时间，避免 RNA 酶污染。离心管、吸头等在实验前应全部高压灭菌。用灭菌的镊子夹取离心管，打开和盖上离心管盖时避免手和手套接触离心管口。

（6）用前将 RT 反应液、PCR 反应液、RNA 酶抑制剂、AMV 反转录酶和 0.5U/ $\mu$ l TaqDNA 聚合酶，5000g 离心 15 秒，使液体全部沉于管底。配制和分装 RT、PCR 反应液体系时应尽量避免产生气泡。

（7）按试剂盒说明书要求准确吸取各种试剂，移液器、PCR 仪等应定期校验。

（8）溴化乙锭溶液具有致癌性，小心操作。若沾到皮肤或衣物上，应立即用大量清水冲洗。

（9）试剂盒为 10 头份包装，在有效期内应 3 次以内用完。不同批次的试剂盒成分不能混用。

**【规格】** 10 头份/盒

**【贮藏与有效期】** 试剂盒 2 $\sim$ 8 $^{\circ}$ C 保存，其中阴性对照样品、阳性对照样品、RT 反应液、PCR 反应液、75% 乙醇、RNA 酶抑制剂、0.5u/ $\mu$ l TaqDNA 聚合酶、AMV 反转录酶保存于 -20 $^{\circ}$ C。有效期为 6 个月。

**附加说明：**

1. 本标准由中国动物疫病预防控制中心提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 742 号发布。

## 猪乙型脑炎胶乳凝集试验抗体检测试剂盒

Zhu Yixingnaoyan Jiaoruningjishiyan Kangti Jianceshijihe

Latex Agglutination test Kit to Detect Swine Antibody against Japanese Encephalitis

猪乙型脑炎胶乳凝集试验抗体检测试剂盒由抗原、阳性血清、阴性血清、稀释液、橡皮乳头、玻片、微量吸头等所组成。用于猪乙型脑炎抗体检测及流行病学调查。

- 【性状】** (1) 胶乳抗原为乳白色均匀混悬液体，装量 2ml/瓶，1 瓶/盒。  
(2) 阳性对照血清为橙黄色或淡棕黄色液体，装量 2ml/瓶，1 瓶/盒。  
(3) 阴性对照血清为橙黄色或淡棕黄色液体，装量 2ml/瓶，1 瓶/盒。  
(4) 稀释液为无色透明液体，装量 4ml/瓶，4 瓶/盒。  
(5) 说明书 1 份。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，胶乳抗原、阳性对照血清、阴性对照血清和稀释液均应无菌生长。

**【敏感性检验】** 将血凝抑制效价为 1:320 的标准血清进行 2 倍系列稀释后，各取 20 $\mu$ l 与等量抗原混合，与 1:64 稀释的阳性血清呈“++”凝集反应为合格。

**【特异性检验】** 取 10 $\mu$ l、20 $\mu$ l、40 $\mu$ l 和 80 $\mu$ l 阴性血清分别与 20 $\mu$ l 胶乳抗原作胶乳凝集试验，应不出现凝集反应。

将 20 $\mu$ l 抗原分别与生理盐水、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、细小病毒病、猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征、猪伪狂犬病阳性血清、衣原体阳性血清进行胶乳凝集试验，应不出现凝集反应。

**【作用与用途】** 用于猪乙型脑炎抗体水平检测及流行病学调查。

**【用法与判定】** 1 定性试验 取被测样品（血清、全血或乳汁）、阳性血清、阴性血清、稀释液各 20 $\mu$ l，分别置于玻片上。各加胶乳抗原 20 $\mu$ l，搅拌混匀，并摇动 1~2 分钟，于 3~5 分钟内观察结果。

2 定量试验 先将血清在微量反应板或小试管内作连续稀释，各取 20 $\mu$ l 依次滴加于玻片上，另设对照同上。随后各加胶乳抗原 20 $\mu$ l。如上搅拌并摇动，判定。

3 结果判定 凝集反应强度表示如下：

- “++++” 全部胶乳凝集，颗粒聚于液滴边缘，液体完全透明；
- “+++” 大部分胶乳凝集，颗粒明显，液体稍混浊；
- “++” 约 50% 胶乳凝集，但颗粒较细，液体较混浊；
- “+” 有少许凝集，液体呈混浊；
- “-” 液滴呈原有的均匀乳状。

判定标准 当阳性血清加抗原呈“++++”凝集；阴性血清加抗原呈“-”凝集；抗原加稀释

液呈“-”凝集。以呈现“++”及其以上凝集反应判为阳性。

**【注意事项】** (1) 抗原为乳白色均匀混悬液，如出现分层，使用前轻轻摇匀。

(2) 试剂盒使用前各试剂应平衡至室温。

(3) 不同批号试剂盒的试剂组分不得混用。

**【规格】** 100 头份/盒

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为 12 月。

**附加说明：**

1. 本标准由武汉科前动物生物制品有限责任公司提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 742 号发布。

## 猪圆环病毒 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒

Zhuyuanhuanbingduerxing ELISA Kangti Jiance Shijihe

ELISA Kit for Porcine Circovirus 2 Antibody Detection

本试剂盒系用猪圆环病毒2型ORF2基因巴斯德毕赤酵母表达抗原作为包被抗原的抗原包被板与稀释板、阳性对照血清、阴性对照血清、样品稀释液、洗涤液、酶结合物及稀释液、TMB底物A液、TMB底物B液、终止液等组装而成。用于监测猪群中猪圆环病毒2型抗体。

**【性状】** 试剂盒的外包装应洁净、无破损，标签应符合国家有关规定，内包装应无破损、无裂痕、无渗漏，品名、批号、保存条件、有效期和合格证清晰。其中：

- (1) 抗原包被板（96孔板） 表面光洁、无裂纹、无异物，装量为1块。
- (2) 阳性对照血清 淡黄色液体，无臭、无味，有少量悬浮物，装量为50μl/管×1管。
- (3) 阴性对照血清 淡黄色液体，无臭、无味，有少量悬浮物，装量为50μl/管×1管。
- (4) 辣根过氧化物酶标记的抗猪抗体 桔黄色澄清溶液，无臭、无味、无沉淀物，装量为 6ml/瓶×2瓶。
- (5) 样品稀释液 无色澄清溶液，无臭、无味、无沉淀物，装量为20ml/瓶×2瓶。
- (6) 洗涤液 无色澄清溶液，无臭、无味、无沉淀物，装量为（10×）20ml/瓶×2瓶。
- (7) TMB底物A液 无色澄清溶液，无臭、无味、无沉淀物，装量为6ml/瓶×1瓶
- (8) TMB底物B液 无色澄清溶液，无臭、无味、无沉淀物，装量为6ml/瓶×1瓶。
- (9) 终止液 无色澄清溶液，无臭、无味、无沉淀物，装量为6ml/瓶×1瓶。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，各成分均应无菌生长。

**【作用与用途】** 用于监测猪群中猪圆环病毒2型抗体水平。

**【用法与判定】** 用法 酶标板上血清对照和血清样品添加模式如图所示。酶标板上对照和样品添加模式图酶标板上对照和样品添加示意图。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	P	N	N	S1	S2	S3	S4				
B												
C												

D												
E												
F												
G												
H												

注：P-表示加阳性血清；N-表示加阴性血清；S1，S2，S3，S4，等表示加各被检样品。

在抗原包被孔A1和A2加入稀释好的阳性血清100μl；在抗原包被孔A3和A4加入稀释好的阴性血清100μl；用样品稀释液将被标准血清被检血清作40倍稀释，加入样品孔中，37℃作用30分钟，弃去反应孔中的液体；将每个孔用约200μl的洗涤液充分清洗5次，在每次洗涤后将反应孔中的液体除去；最后一次除去洗涤液后，在吸水纸上拍打，除去残留的液体；每孔加入辣根过氧化物酶标记的抗猪抗体100μl，37℃作用30分钟，洗涤5次。每孔中加入底物溶液A液和底物溶液B液各50μl，室温避光作用10分钟；向每孔中加入100μl的终止液，终止反应。用酶标仪在620~650nm的波长下测定各孔吸光度OD值，读值计算结果。计算方法如下：

由阳性血清与抗原反应孔OD均值 $P_p = (A_1 + A_2) / 2$ 和阴性血清与抗原反应孔OD均值 $N_p = (A_3 + A_4) / 2$ ，计算样品与阳性血清的比值（S/P）：

$$S/P = \frac{S_p}{P_p}$$

其中 $S_p$ 为被检血清与抗原反应孔OD值。

判定  $P_p$ 与 $N_p$ 的比值必须 $\geq 2$ ，试验结果才成立。否则，应进行重复试验。如果 $S/P \leq 0.3$ ，说明样品中无抗猪圆环病毒2型的抗体；如果 $S/P > 0.3$ ，且 $< 0.4$ ，判定该样品为可疑，应重复试验；如仍然在此范围，则判为阳性；如果 $S/P \geq 0.4$ ，判定样品为猪圆环病毒2型抗体阳性。

**【敏感性检验】** 用1:5、1:10、1:20、1:40、1:60、1:120 6份不同稀释度的阳性对照血清一起按照“用法与判定”进行检测。其敏感性应符合下表标准：

阳性对照血清稀释度	S/P
1: 5	$\geq 1.4$
1:10	$\geq 1.2$
1:20	$\geq 1.1$
1:40	$\geq 1.0$
1:80	$\geq 0.6$
1:160	$\geq 0.4$

**【特异性检验】** 用30份PCV2阴性参考血清（由中国动物卫生与流行病学中心提供）一起按照“用法与判定”进行检测，至少27份血清的S/P值应 $< 0.3$ 。

**【注意事项】** （1）本试剂盒严禁冻结。

（2）铝箔袋有破损时，建议不作为仲裁使用。

（3）试剂盒必须平衡至室温方可进行试验。

（4）目测时，阳性对照血清和阴性对照血清孔的颜色无明显区别，结果不能判定。

(5) 运用质控血清进行检测，结果不在质控范围之内，实验不成立，需要重做试验。

(6) 试剂盒各种组分均为专用，取用时不得交叉使用，以免污染。

(7) 底物A和底物B应避光保存，使用后应立刻拧紧试剂瓶盖，并放试剂盒内。

**【规格】** 96孔/盒

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为6个月。

**附加说明：**

1. 本标准由中国动物卫生与流行病学中心提出。
2. 本标准于2006年11月8号经农业部公告第742号发布。

## 猪伪狂犬抗体免疫金标检测试纸卡

Zhu Weikuangquan Kangtimianyijinbiao Jianceshizhika

Collidal Gold Immuno-chromatographic Assay Card for Pseudorabies Antibody

本品系用伪狂犬病病毒 Bartha-K61 弱毒株接种鸡胚成纤维细胞培养，收获细胞培养物，浓缩纯化后用氯金酸标记，将金标伪狂犬抗原喷于玻璃纤维膜上，组装在硝酸纤维膜检测线（T）的下面，把伪狂犬抗原和伪狂犬阳性血清分别喷在硝酸纤维膜上的检测线区（T）和对照线区（C），组装后固定在一塑料卡中制成检测试纸卡。用于检测猪伪狂犬抗体。

**【性状】** 浅灰色铝箔密封真空包装。密封完好，无破损，无渗漏。试剂卡外观均匀一致，卡内紧夹着宽度一致的试纸条，NC膜无损伤，卡板严实。1 检份/卡，每盒装量为 10 卡、20 卡、50 卡、100 卡。

**【有效性检验】** 用试纸卡检测 PRV 阳性血清，15 分钟内在检测线（T）和对照线（C）都出现紫红色线；用试纸卡检测 PRV 阴性血清，只在对照线（C）出现紫红色线。

**【特异性检验】** 用试纸卡检测 PRV 阳性血清，阳性检出率为 100%；检测伪狂犬阴性血清、猪繁殖与呼吸综合征阳性血清、猪瘟阳性血清、口蹄疫阳性血清、圆环病毒阳性血清、细小病毒阳性血清，均应为阴性。

**【敏感性检验】** 将 8 份标准阳性血清用生理盐水做系列稀释后，同时做试制检测和 ELISA 方法检测，血清最大稀释度达 1：20，此时阳性检出率达 100%。

**【作用与用途】** 用于检测猪伪狂犬抗体。

**【用法与判定】** （1）用法 撕开铝箔袋，将检测卡平放桌面上，取待检血清样品 50~100μl 加入加样孔（S）内，在室温内静置 15 分钟后判定结果。

（2）判定 有效性检验 用试纸卡检测猪伪狂犬阳性血清，15 分钟内在检测线（T）和对照线（C）都出现紫红色线；用试纸检测猪伪狂犬阴性血清，只在对照线（C）出现紫红色线。

只在对照线（C）上出现一条紫红色线，检测线（T）处不出现色线，则待检血清为猪伪狂犬抗体阴性。

在对照线处（C）出现一条颜色较深的紫红色线，在检测线（T）处出现一条颜色很浅的紫红色线，则待检血清为猪伪狂犬抗体弱阳性。

在对照线（C）和检测线（T）区各出现一条颜色较深的紫红色线，则待检血清为猪伪狂犬抗体阳性。色线颜色深度与抗体滴度高低成正比，色线颜色越深说明抗体滴度越高。

**【注意事项】**（1）撕开铝箔袋取出试纸卡，应立即使用，切忌受潮。

（2）试纸卡只能使用 1 次。

（3）如果被检血清太粘稠，可先用生理盐水或自来水将血清适当稀释，或加血清同时，在加样孔加 1 滴生理盐水或自来水。

（4）检测时试纸卡不显示任何色线，表明操作有误或试纸卡失效。

（5）用过的试纸卡、器械及被检样品应作消毒处理。

**【规格】** 1 份/卡；（1）10 卡/盒 （2）20 卡/盒 （3）50 卡/盒 （4）100 卡/盒

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为 12 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由中国动物卫生与流行病学中心提出。

2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 742 号发布。

## 猪传染性胸膜肺炎间接血凝试验抗原与阴、阳性血清

Zhu Chuanranxing Xiongmofeiyan Jianjiexuening Shiyang kangyuan Yu Yinyangxing Xueqing  
Porcine Contagious Pleuropneumoniae Indirect Haemagglutination Assay Antigen and Negative,  
Positive Sera

本品系用 App1~10 型菌株分别接种改良 3 号脓液体培养基培养，经纯粹检验后，进行灭活，用 0.15mol/L 的 PBS（pH 值为 6.4）洗涤，配成 20 倍浓缩抗原，在冰浴中以超声波粉碎器间歇破碎，离心，收集上清液，即为致敏用抗原。再将上述抗原致敏戊二醛化—鞣酸化处理的绵羊红细胞，冻干后作为诊断抗原。用于间接血凝试验检测猪传染性胸膜肺炎抗体。

阳性血清是用弗氏完全佐剂抗原、弗氏不完全佐剂抗原进行免疫及活菌液进行加强免疫健康家兔，采血分离血清制成。阴性血清系用健康猪，采血，分离血清制成。用于猪传染性胸膜肺炎间接血凝反应对照。

### 抗原

**【性状】** 褐色疏松团块。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】**（1）待检抗原的稀释 用含 1% 健兔血清 0.15M pH7.2 的 PBS 将抗原稀释成 1% 的诊断液。

（2）血清的稀释 用 0.15mol/L pH 值为 7.2 的 PBS 将标准阳性血清、阴性血清分别稀释成 1ml。准备好上述材料后，按下述操作方式进行。

将稀释液滴于 V 型反应板各孔中，每孔 25 $\mu$ l。

取阴、阳性血清 25 $\mu$ l 于第 1 孔中，与稀释液混匀后吸 25 $\mu$ l 加于第 2 孔，依次作对倍稀释。

每孔加抗原 25 $\mu$ l，加完后将反应板置微型震荡器上震荡 1~2 分钟，直至诊断液中的血

球分布均匀，从震荡器上取下反应板，盖上一块与反应板大小相近的玻璃片，置 37℃ 下 2~3 小时，观察结果。

判定标准：

- “++++” 红细胞全部凝集，形成一层均匀膜，布满整个孔底。
  - “+++” 红细胞在孔底形成一层薄膜，面积比前者稍小。
  - “++” 红细胞在孔底形成薄膜凝集，边缘松散或呈锯齿状。
  - “+” 红细胞在孔底呈稀薄、散在、少量凝集，孔底有小圆点。
  - “±” 红细胞沉于孔底，但周围不光滑或中心有空斑。
  - “-” 红细胞完全沉于孔底，呈光滑的圆点。
- “++”以上凝集者判为阳性。

在阴性血清除第 1 孔允许存在前滞现象（+）外，其余各孔均为（-），稀释液对照为（-）的前提下，阳性血清效价不低于 1：512，为合格。

**【特异性检验】** 用含 1% 健兔血清 0.15mol/L pH 值为 7.2 的 PBS 将冻干的抗原稀释成 1% 的诊断液，分别检测 10 份阴性血清，应全部阴性；检测 10 份阳性血清，应全部阳性，效价在 1：512 或以上；检测 1~10 型定型血清各 2 份，应均为阳性；检测猪萎缩性鼻炎、副猪嗜血杆菌、猪瘟、猪肺疫和猪喘气病阳性血清各 2 份，应均为阴性。

**【作用与用途】** 用于间接血凝反应检测猪传染性胸膜肺炎抗体。

**【用法与判定】** 将被检血清与本抗原作正向间接血凝试验。被检血清效价 $\geq$ 1：8（+）者判为阳性，效价 $\leq$ 1：4 者判为阴性，介于二者之间判为可疑。

**【注意事项】** 冻结抗原不能使用。

**【规格】** 10ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 36 个月。

#### 阳性血清

**【性状】** 乳白色疏松团块，加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** 与猪传染性胸膜肺炎间接血凝试验抗原作正向间接血凝试验。在阴性血清除第 1 孔允许存在前滞现象（+）外，其余各孔均为（-），稀释液对照为（-）的前提下，效价应不低于 1：512。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于间接血凝反应阳性血清对照。

**【规格】** 1ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 36 个月。

#### 阴性血清

**【性状】** 乳白色疏松团块，加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【特异性检验】** 对猪传染性胸膜肺炎间接血凝试验抗原应为阴性反应。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于间接血凝反应阴性血清对照。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为36个月。

**附加说明：**

1. 本标准由中国农业科学院兰州兽医研究所提出。
2. 本标准于2006年11月8号经农业部公告第742号发布。

## 疯牛病免疫组化诊断试剂

Fengniubing Mianyizuhua Zhenduan Shiji

Immunohistochemistry Detection Regents for Bovine Spongiform Encephalopathy

本试剂系用牛朊毒体 PrPSc 核心片段 (PrP27~30) 杂交瘤细胞株腹腔接种小鼠制备的腹水单克隆抗体 4C11 与生物素标记的抗鼠 IgG (A 液)、亲和素辣根过氧化物酶结合物 (B 液) 和 AEC/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 底物溶液 (C 液) 组成。用于检测疯牛病 (学名为牛海绵状脑病) 病原。

### 单克隆抗体 4C11

【性状】 微黄色均质液体，无臭、无味、无沉淀物。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【效价测定】 用间接 ELISA 测定 (见附注 1) 效价，应≥1:163840。

【特异性检验】 用免疫印迹试验检测腹水单抗能否特异识别中国黄牛重组朊蛋白 (PrPC) 成熟蛋白 (见附注 2)，结果应为阳性。

【作用与用途】 用于疯牛病的免疫组织化学诊断，检测疯牛病病原。

【用法与断定】 1 仪器、设备和器材准备

1.1 病理切片机、光学显微镜、高压锅、水浴锅、电磁炉、恒温培养箱；

1.2 直径不小于 10cm 的不锈钢杯或陶瓷容器 1 个；免疫组化湿盒 1 个；不掉毛吸水纸若干；一次性手套；橡胶检查手套；不小于 5000ml 的广口玻璃瓶 2 个；染色架 5 个；方形或竖形染色缸 5 个；圆柱形染色缸 9 个；50ml、100ml、500ml 的干净玻璃瓶各 5 个；干净的 20mm×20mm 盖玻片若干。

2 相关试剂配制

2.1 PK 酶母液配制 称取蛋白酶 K 1.47g，加入蒸馏水 100ml，搅拌充分溶解，保存在 -20℃ 下备用。

2.2 PK 酶工作液配制 量取 1mol/L pH 值为 8.0 Tris-Cl 2.5ml，0.1mol/L CaCl<sub>2</sub> 0.75ml，加蒸馏水至 50ml，混匀并预热至 37℃，加入 PK 酶母液 17μl，充分溶解。

2.3 甘油明胶配制 称取明胶 10g，量取甘油 30ml，加入蒸馏水 35ml，在 70~80℃ 下混匀溶解后趁热使用。

2.4 甲醇-双氧水 使用前 5 分钟配制。量取甲醇 50ml，加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) 1.5ml，混匀备用。

2.5 0.01mol/L PBS (pH 值为 7.4) 配制 称取 NaCl 8g，KCl 0.2g，Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1.44g，KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g，加蒸馏水 800ml 溶解，调 pH 值为至 7.4，加蒸馏水至 1000ml，混

匀备用。

2.6 5%正常猪血清（NSS）配制 量取 NSS 200 $\mu$ l，加入 0.01 mol/L PBS 4ml，混匀备用。

2.6 疯牛病阳性对照切片和阴性对照切片各 4 张。

### 3 检测程序

3.1 取已烘烤好的组织切片，包括至少一张疯牛病阳性对照切片和一张阴性对照切片，放于染色架上，然后依次进行如下处理：

A 二甲苯 I 中 12 分钟；B 二甲苯 II 中 12 分钟；C 100%酒精 I 中 2 分钟；D 100%酒精 II 中 2 分钟；E 95%酒精 I 中 2 分钟；F 95%酒精 II 中 2 分钟；G 85%酒精中 2 分钟；H 75%酒精中 2 分钟；I 自来水洗 5 分钟；J PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。

3.2 将切片立即放入预热至 37 $^{\circ}$ C 的蛋白酶 K 工作液中，确保切片上的组织全部浸入液体，在 37 $^{\circ}$ C 下消化 15 分钟。

3.3 将切片放在染色架，然后立即放入盛有煮沸蒸馏水的不锈钢杯中，确保切片上的组织完全浸入水中，盖好杯盖，在 121 $^{\circ}$ C 0.13MPa 条件下高压 20 分钟，而后自然冷却取出切片。

3.4 PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。

3.5 将切片置于 3%的甲醇-双氧水中室温处理 5 分钟，以灭活（封闭）内源性过氧化物酶。

3.6 PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。

3.7 洗完后用吸水纸吸干切片组织四周的液体，然后在切片组织上滴加 5%的正常猪血清，确保组织全部覆盖，室温作用 20 分钟，注意反应过程中不能让组织干燥。

3.8 将切片上的猪血清倾去，然后滴加工作浓度的 PrP 单抗溶液，确保组织完全浸没，37 $^{\circ}$ C 下在湿盒中作用 2 小时，也可在湿盒中 2~8 $^{\circ}$ C 下过夜处理。

3.9 PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。

3.10 洗完后用吸水纸吸干组织四周的液体，然后在切片组织上滴加试剂中的 A 瓶溶液，确保组织全部覆盖，室温作用 10 分钟，注意反应过程中不能让组织干燥。

3.11 PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。

3.12 洗完后用吸水纸吸干组织四周的液体，然后在切片组织上滴加试剂中的 B 瓶溶液，确保组织全部覆盖，室温作用 10 分钟，注意反应过程中不能让组织干燥。

3.13 PBS 洗 3 次，每次 5 分钟。

3.14 将切片在蒸馏水中放 1~2 分钟。

3.15 取出切片，用吸水纸吸干组织四周的液体，然后在组织切片上滴加试剂中的 C 瓶溶液，确保组织全部覆盖，室温作用 3~5 分钟，注意反应过程中不能让组织干燥。

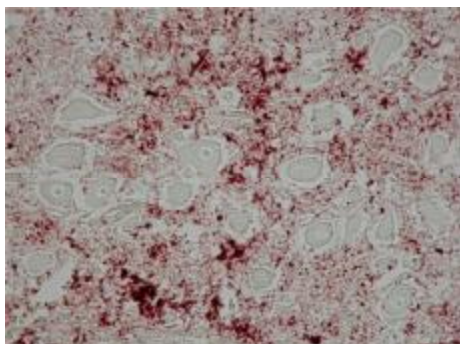
3.16 将切片放于蒸馏水中 1~2 分钟。

3.17 取出切片，用吸水纸吸干组织四周的液体，然后在组织切片上滴加甘油明胶溶液，封片。

3.18 光学显微镜观察并分析。

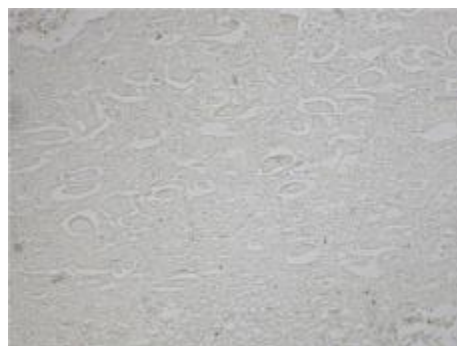
4 结果判定 用光学显微镜在 10 $\times$ 10、10 $\times$ 20 的倍数下观察，阳性对照片出现特异性

紫红色颗粒，阴性对照片未见特异性染色颗粒，试验成立。如果在脑干部的孤束核、迷走神经背核或其他灰质部位出现特异性紫红色颗粒，则可判断该切片为疯牛病阳性。如果在上述部位没有出现特异性紫红色颗粒，则可判断该切片为疯牛病阴性。判断时可以参照下面的阳性和阴性显微照片。



疯牛病阳性照片（10×20）

灰质部出现特异性紫红色染色颗粒



疯牛病阴性照片（10×20）

灰质部未见特异性紫红色染色颗粒

- 【注意事项】**（1）本试剂严禁冻结，所有试剂在使用前恢复至室温。  
（2）本检测试验仅在生物安全实验室进行。  
（3）检测过程中，不能让组织干燥。  
（4）污染的二甲苯、甲醇和酒精统一收集在一个广口瓶中，焚烧处理。  
（5）污染的 PBS、水和其他溶液统一收集在另一个广口瓶中，加入适量的 NaOH 固体，使其浓度达到 2M 并消毒处理 1 小时以上，然后加入盐酸中和后废弃。

**【规格】** 5ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -20℃ 保存，有效期为 36 个月；2~8℃ 保存，有效期为 6 个月。

#### 生物标记的抗鼠 IgG（A 液）

**【性状】** 黄色均质液体，无臭、无味、无沉淀物。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【活性检验】** 用标准 ABC 试剂盒中的 B 瓶和 C 瓶溶液，结合疯牛病免疫组织化学方法进行检验，检验结果 A 液应为有效。

**【规格】** 5ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 12 个月。

#### 亲和素辣根过氧化物酶结合物（B 液）

**【性状】** 粉红色均质液体，无臭、无味、无沉淀物。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【活性检验】** 用标准 ABC 试剂盒中的 A 瓶和 C 瓶溶液，结合疯牛病免疫组织化学方法进行检验，检验结果 B 液应为有效。

**【规格】** 5ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 12 个月。

#### ACE/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 底物溶液（C 液）

**【性状】** 棕褐色均质液体，无臭、无沉淀物。

【**无菌检验**】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【**活性检验**】 用标准 ABC 试剂盒中的 A 瓶和 B 瓶溶液，结合疯牛病免疫组织化学方法进行检验，检验结果 C 液应为有效。

【**规格**】 5ml/瓶

【**贮藏与有效期**】 2~8℃保存，有效期为 24 个月。

**附注：1 间接 ELISA 测定牛朊毒体核心片段单克隆抗体 4C11 的效价**

1.1 材料

1.1.1 包被用抗原 中国黄牛重组 PrPC 成熟蛋白。

1.1.2 阳性对照 单克隆抗体 6H4，Roche 公司产品，

1.1.3 阴性对照 正常 PrP 基因敲除小鼠血清。

1.1.4 平底聚丙烯酶标板 Labsystem 公司产品。

1.1.5 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG Sigma 公司产品。

1.1.6 抗原包被液 抗原包被液为 0.05mol/L pH 值为 9.6 碳酸盐缓冲液。配制方法：称取碳酸钠 1.59g，碳酸氢钠 2.93g，溶于 1000ml 去离子水中。

1.1.7 洗涤液 (PBST) 为 0.05 mol/L pH 值为 7.4 的 PBST。配制方法是：取 0.2mol/L 磷酸氢二钠 210ml，0.2mol/L 磷酸二氢钾 210ml，吐温-20 0.5ml，加去离子水至 1000ml。

1.1.8 显色系统 KPL 公司产品。

1.1.9 反应终止液 0.2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

1.2 ELISA 抗原反应板的制备

1.2.1 抗原包被 中国黄牛重组 PrPC 成熟蛋白按 100ng/100μl 浓度用抗原包被液稀释，每孔加 100μl，置 2~8℃过夜。

1.2.2 洗涤 加入洗涤液，室温下浸泡 2 分钟，甩去洗涤液，同法重复洗两次。

1.2.3 封闭 加入用洗涤液稀释的 10g/L 牛血清白蛋白，37℃封闭 30 分钟。同 1.2.2 用洗涤液洗涤 3 次。

1.2.4 保存 置-20℃保存，保存期 2 个月。

1.3 测定流程

1.3.1 加样 按下表所示进行加样。

	1	2	3
A	1 : 10 (待测样品)	1 : 2560 (待测样品)	1 : 655360 (待测样品)
B	1 : 20 (待测样品)	1 : 5120 (待测样品)	1 : 1310720 (待测样品)
C	1 : 40 (待测样品)	1 : 10240 (待测样品)	阳性对照
D	1 : 80 (待测样品)	1 : 20480 (待测样品)	阳性对照
E	1 : 160 (待测样品)	1 : 40960 (待测样品)	阴性对照
F	1 : 320 (待测样品)	1 : 81920 (待测样品)	阴性对照
G	1 : 640 (待测样品)	1 : 163840 (待测样品)	空白对照

H	1 : 1280 (待测样品)	1 : 327680 (待测样品)	空白对照
---	-----------------	-------------------	------

注：待测样品用 0.05mol/L pH 值为 7.4 PBS 按图示依次倍比稀释；阳性对照按产品说明书用 0.05mol/L pH 值为 7.4 PBS 稀释至工作浓度；阴性对照用 0.05mol/L pH 值为 7.4 PBS 做 1 : 400 稀释。

1.3.2 室温作用 60 分钟，弃去反应孔中的液体，将每个孔用约 200 $\mu$ l 的洗涤液充分清洗 3~5 次，在每次洗涤后将反应孔中的液体除去，最后一次除去洗涤液后，孔口朝下在吸水纸上拍打，除去残留的液体。

1.3.3 每孔加入稀释至工作浓度的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 100 $\mu$ l，室温作用 45 分钟，空白对照除外，同 1.3.2 洗涤。

1.3.4 每孔加入 50 $\mu$ l 显色液，室温避光作用 10 分钟后，每孔中加入 50 $\mu$ l 的终止液；用酶标仪在 620nm 的测量波长下测定各孔 OD 值，P/N $\geq$ 2.1 为阳性。

#### 1.4 结果判定

1.4.1 细胞培养上清 效价不低于 1 : 1280，判为合格。

1.4.2 腹水单克隆抗体：效价不低于 1 : 163840，判为合格。

## 2 Western-Blot 检测牛肮毒体核心片段单克隆抗体 4C11 的反应特异性

### 2.1 溶液配制

#### 2.1.1 上样缓冲液 (4 $\times$ )

200mmol/L Tris·Cl (pH 值为 6.8)	20ml
400mmol/L DTT20 (二硫糖苏醇)	40ml (临用前加入)
溴酚蓝	0.4g
400ml/L 甘油 (GIYCEROL)	40ml
2.1.2 15ml 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶	
水	3.4ml
30% 丙烯酰胺溶液	7.5ml
1.5mol/L Tris (pH 值为 8.8)	3.8ml
10% SDS	0.15ml
10% 过硫酸铵	0.15ml
TEMED (N, N, N', N'-四甲基乙二胺)	0.006ml

#### 2.1.3 电泳缓冲液

甘氨酸 (GIYCINE)	188g
Tris 碱	30g
100g/L 十二烷基磺酸钠 (SDS)	100ml
水	10L

#### 2.1.4 转移电泳缓冲液

甘氨酸 (GIYCINE)	144g
Tris 碱	30.3g
甲醇	2 L

水	8 L
2.1.4 底物	
二氨基联苯胺 (DAB)	20mg
100mmol/L Tris·Cl (pH 值为 7.4)	20ml
双氧水	6.8μl

2.2 操作步骤 中国黄牛重组 PrPC 成熟蛋白 2μg 按体积比 3:1 加入上样缓冲液(4×), 置 100℃ 水浴 3 分钟。将样品加入 15%SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 于 120 伏电压下电泳约 2 小时。在 90 伏电压、2~8℃ 下将蛋白转印到硝酸纤维素膜上。将膜置于小塑料盒内, 倒入 PBST (同附注 1.1.7 项) 洗 3 次, 用 50g/L 的脱脂奶溶液封闭 2 小时, 再用 PBST 洗 3 次; 向塑料盒内加入 0.01mol/L pH 值为 7.4 PBS 做 1:8000 稀释的腹水单克隆抗体, 室温下作用 1 小时; 用 PBST 洗 3 次, 再加入 0.01mol/L pH 值为 7.4 的 PBS 稀释至工作浓度的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 反应约 1 小时, DAB 显色至条带清晰, 用清水漂洗中止。

2.3 结果判定 如在 23kDa 处, 出现棕褐色的条带者, 判为阳性, 否则判为阴性。

#### 附加说明:

1. 本标准由中国动物卫生与流行病学中心提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 742 号发布。

## 痒病免疫组化诊断试剂

Yangbing Mianyizuhua Zhenduan Shiji

Immunohistochemistry Detection Regents for Scrapie

本试剂系用羊朊毒体 PrP<sup>Sc</sup> 核心片段 (PrP<sup>27~30</sup>) 杂交瘤细胞株腹腔接种小鼠制备的腹水单克隆抗体 13B11 与生物素标记的抗鼠 IgG (A 液)、亲和素辣根过氧化物酶结合物 (B 液) 和 AEC/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 底物溶液 (C 液) 组成。用于检测羊痒病病原。

### 单克隆抗体 13B11

【性状】微黄色均质液体, 无臭、无味、无沉淀物。

【无菌检验】按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无菌生长。

【效价测定】用间接 ELISA 测定 (见附注 1) 效价, 应 ≥ 1:163840。

【特异性检验】用免疫印迹试验检测腹水单抗能否特异识别中国绵羊重组朊蛋白 (PrPC) 成熟蛋白 (见附注 2), 结果应为阳性。

【作用与用途】用于羊痒病的免疫组织化学诊断, 检测羊痒病病原。

【用法与判定】1 仪器、设备和器材准备

1.1 病理切片机、光学显微镜、高压锅、水浴锅、电磁炉、恒温培养箱;

1.2 直径不小于 10cm 的不锈钢杯或陶瓷容器 1 个; 免疫组化湿盒 1 个; 不掉毛吸水纸若干; 一次性手套; 橡胶检查手套; 不小于 5000ml 的广口玻璃瓶 2 个; 染色架 5 个; 方形或竖形染色缸 5 个; 圆柱形染色缸 9 个; 50ml、100ml、500ml 的干净玻璃瓶各 5 个; 干净的 20mm×20mm 盖玻片若干。

## 2 相关试剂配制

2.1 PK 酶母液配制 称取蛋白酶 K 1.47g, 加入蒸馏水 100ml, 搅拌充分溶解, 保存在-20℃下备用。

2.2 PK 酶工作液配制 量取 1mol/L pH 值为 8.0 Tris·Cl 2.5ml, 0.1mol/L CaCl<sub>2</sub> 0.75ml, 加蒸馏水至 50ml, 混匀并预热至 37℃, 加入 PK 酶母液 17μl, 充分溶解。

2.3 甘油明胶配制 称取明胶 10g, 量取甘油 30ml, 加入蒸馏水 35ml, 在 70~80℃下混匀溶解后趁热使用。

2.4 甲醇-双氧水 使用前 5 分钟配制。量取甲醇 50ml, 加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) 1.5ml, 混匀备用。

2.5 0.01mol/L PBS (pH 值为 7.4) 配制 称取 NaCl 8g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1.44g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24g, 加蒸馏水 800ml 溶解, 调 pH 值为至 7.4, 加蒸馏水至 1000ml, 混匀备用。

2.6 5% 正常猪血清 (NSS) 配制 量取 NSS 200μl, 加入 0.01 mol/L PBS 4ml, 混匀备用。

2.6 痒病阳性对照切片和阴性对照切片各 4 张。

## 3 检测程序

3.1 取已烘烤好的组织切片, 包括至少 1 张疯牛病阳性对照切片和 1 张阴性对照切片, 放于染色架上, 然后依次进行如下步骤处理:

A 二甲苯 I 中 12 分钟; B 二甲苯 II 中 12 分钟; C 100% 酒精 I 中 2 分钟; D 100% 酒精 II 中 2 分钟; E 95% 酒精 I 中 2 分钟; F 95% 酒精 II 中 2 分钟; G 85% 酒精中 2 分钟。

H 75% 酒精中 2 分钟; I 自来水洗 5 分钟; J PBS 溶液洗 3 次, 每次 5 分钟。

3.2 将切片立即放入预热至 37℃ 的蛋白酶 K 工作液中, 确保切片上的组织全部浸入液体, 在 37℃ 下消化 15 分钟。

3.3 将切片放在染色架, 然后立即放入盛有煮沸蒸馏水的不锈钢杯中, 确保切片上的组织完全浸入水中, 盖好杯盖, 在 121℃ 0.13MPa 条件下高压 20 分钟, 而后自然冷却取出切片。

3.4 PBS 溶液洗 3 次, 每次 5 分钟。

3.5 将切片置于 3% 的甲醇-双氧水中室温处理 5 分钟, 以灭活 (封闭) 内源性过氧化物酶。

3.6 PBS 溶液洗 3 次, 每次 5 分钟。

3.7 洗完后用吸水纸吸干切片组织四周的液体, 然后在切片组织上滴加 5% 的正常猪血清, 确保组织全部覆盖, 室温作用 20 分钟, 注意反应过程中不能让组织干燥。

3.8 将切片上的猪血清倾去, 然后滴加工作浓度的单抗 13B11 溶液, 确保组织完全浸没, 37℃ 下在湿盒中作用 2 小时, 也可在湿盒中 2~8℃ 过夜处理。

3.9 PBS 溶液洗 3 次, 每次 5 分钟。

3.10 洗完后用吸水纸吸干组织四周的液体, 然后在切片组织上滴加试剂中的 A 瓶溶液, 确保组织全部覆盖, 室温作用 10 分钟, 注意反应过程中不能让组织干燥。

3.11 PBS 溶液洗 3 次，每次 5 分钟。

3.12 洗完后用吸水纸吸干组织四周的液体，然后在切片组织上滴加试剂中的 B 瓶溶液，确保组织全部覆盖，室温作用 10 分钟，注意反应过程中不能让组织干燥。

3.13 PBS 溶液洗 3 次，每次 5 分钟。

3.14 将切片在蒸馏水中放 1~2 分钟。

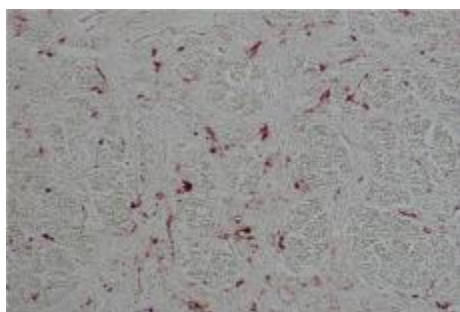
3.15 取出切片，用吸水纸吸干组织四周的液体，然后在组织切片上滴加试剂中的 C 瓶溶液，确保组织全部覆盖，室温作用 3~5 分钟，注意反应过程中不能让组织干燥。

3.16 将切片放于蒸馏水中 1~2 分钟。

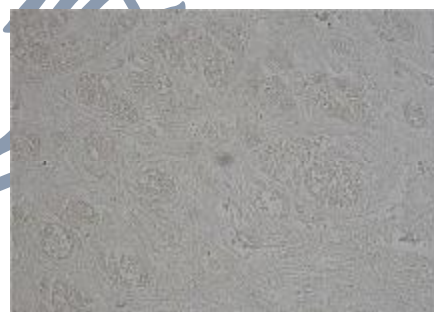
3.17 取出切片，用吸水纸吸干组织四周的液体，然后在组织切片上滴加甘油明胶溶液，封片。

3.18 光学显微镜观察并分析。

4 结果判定 用光学显微镜在 10×10、10×20 的倍数下观察，阳性对照片出现特异性紫红色颗粒，阴性对照片未见特异性染色颗粒，试验成立。如果在脑干部的孤束核、迷走神经背核或其他灰质部位出现特异性紫红色颗粒，则可判断该切片为羊痒病阳性。如果在上述部位没有出现特异性紫红色颗粒，则可判断该切片为羊痒病阴性。判断时可以参照下面的阳性和阴性显微照片。



羊痒病阳性照片（10×20）  
灰质部出现特异性紫红色染色颗粒



羊痒病阴性照片（10×20）  
灰质部未见特异性紫红色染色颗粒

**【注意事项】**（1）本试剂严禁冻结，所有试剂在使用前恢复至室温。

（2）本检测试验仅在生物安全室内进行。

（3）检测过程中，不能让组织干燥。

（4）污染的二甲苯、甲醇和酒精统一收集在一个广口瓶中，焚烧处理。

（5）污染的 PBS 溶液、水和其他溶液统一收集在另一个广口瓶中，加入适量的 NaOH 固体，使其浓度达到 2mol/L 并消毒处理 1 小时以上，然后加入盐酸中和后废弃。

**【规格】** 5ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -20℃ 保存，有效期为 36 个月；2~8℃ 保存，有效期为 6 个月。

#### 生物标记的抗鼠 IgG（A 液）

**【性状】** 黄色均质液体，无臭、无味、无沉淀物。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【活性检验】** 用标准 ABC 试剂盒中的 B 瓶和 C 瓶溶液，结合羊痒病免疫组织化学方

法进行检验，检验结果 A 液应为有效。

【规格】 5ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为 12 个月。

#### 亲和素辣根过氧化物酶结合物 (B 液)

【性状】 粉红色均质液体，无臭、无味、无沉淀物。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【活性检验】 用标准 ABC 试剂盒中的 A 瓶和 C 瓶溶液，结合羊痒病免疫组织化学方法进行检验，检验结果 B 液应为有效。

【规格】 5ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为 12 个月。

#### ACE/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 底物溶液 (C 液)

【性状】 棕褐色均质液体，无臭、无沉淀物。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【活性检验】 用标准 ABC 试剂盒中的 A 瓶和 B 瓶溶液，结合羊痒病免疫组织化学方法进行检验，检验结果 C 液应为有效。

【规格】 5ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为 24 个月。

### 附注：1 间接 ELISA 测定羊朐毒体核心片段单克隆抗体 13B11 的效价

#### 1.1 材料

1.1.1 包被用抗原 中国绵羊重组 PrPC 成熟蛋白。

1.1.2 阳性对照 单克隆抗体 6H4, Roche 公司产品。

1.1.3 阴性对照 正常 PrP 基因敲除小鼠血清。

1.1.4 平底聚丙烯酶标板 Labsystem 公司产品。

1.1.5 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG Sigma 公司产品。

1.1.6 抗原包被液 抗原包被液为 0.05mol/L pH 值为 9.6 碳酸盐缓冲液。配制方法：称取碳酸钠 1.59g，碳酸氢钠 2.93g，溶于 1000ml 去离子水中。

1.1.7 洗涤液 (PBST) 为 0.05 mol/L pH 值为 7.4 的 PBST。配制方法是：取 0.2mol/L 磷酸氢二钠 210ml，0.2mol/L 磷酸二氢钾 210ml，吐温-20 0.5ml，加去离子水至 1000ml。

1.1.8 显色系统 KPL 公司产品。

1.1.9 反应终止液 0.2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

#### 1.2 ELISA 抗原反应板的制备

1.2.1 抗原包被 中国绵羊重组 PrPC 成熟蛋白按 100ng/100μl 浓度用抗原包被液稀释，每孔加 100μl，置 2~8℃过夜。

1.2.2 洗涤 加入洗涤液，室温下浸泡 2 分钟，甩去洗涤液，同法重复洗 2 次。

1.2.3 封闭 加入用洗涤液稀释的 10g/L 牛血清白蛋白，37℃封闭 30 分钟。同 1.2.2 用洗涤液洗涤 3 次。

1.2.4 保存 置-20℃保存，保存期 2 个月。

### 1.3 测定流程

1.3.1 加样 按下表所示进行加样。

	1	2	3
A	1 : 10 (待测样品)	1 : 2560 (待测样品)	1 : 655360 (待测样品)
B	1 : 20 (待测样品)	1 : 5120 (待测样品)	1 : 1310720 (待测样品)
C	1 : 40 (待测样品)	1 : 10240 (待测样品)	阳性对照
D	1 : 80 (待测样品)	1 : 20480 (待测样品)	阳性对照
E	1 : 160 (待测样品)	1 : 40960 (待测样品)	阴性对照
F	1 : 320 (待测样品)	1 : 81920 (待测样品)	阴性对照
G	1 : 640 (待测样品)	1 : 163840 (待测样品)	空白对照
H	1 : 1280 (待测样品)	1 : 327680 (待测样品)	空白对照

注：待测样品用 0.05mol/L pH 值为 7.4 PBS 按图示依次倍比稀释；阳性对照按产品说明书用 0.05mol/L pH 值为 7.4 PBS 稀释至工作浓度；阴性对照用 0.05mol/L pH 值为 7.4 PBS 做 1 : 400 稀释。

1.3.2 室温作用 60 分钟，弃去反应孔中的液体，将每个孔用约 200 $\mu$ l 的洗涤液充分清洗 3~5 次，在每次洗涤后将反应孔中的液体除去，最后一次除去洗涤液后，孔口朝下在吸水纸上拍打，除去残留的液体。

1.3.3 每孔加入稀释至工作浓度的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 100 $\mu$ l，室温作用 45 分钟，空白对照除外，同 1.3.2 洗涤。

1.3.4 每孔加入 50 $\mu$ l 显色液，室温避光作用 10 分钟后，每孔中加入 50 $\mu$ l 的终止液；用酶标仪在 620nm 的测量波长下测定各孔 OD 值，P/N $\geq$ 2.1 为阳性。

### 1.4 结果判断

1.4.1 细胞培养上清 效价不低于 1 : 1280，判为合格。

1.4.2 腹水单克隆抗体 效价不低于 1 : 163840，判为合格。

## 2 Western-Blot 检测羊肌毒体核心片段单克隆抗体 13B11 的反应特异性

### 2.1 溶液配制

#### 2.1.1 上样缓冲液 (4 $\times$ )

200mmol/L Tris·Cl (pH 值为 6.8)	20ml
400mmol/L DTT20 (二硫糖苏醇)	40ml (临用前加入)
溴酚蓝	0.4g
400ml/L 甘油 (GLYCEROL)	40ml
2.1.2 15ml 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶	
水	3.4ml
30% 丙烯酰胺溶液	7.5ml
1.5mol/L Tris (pH 值为 8.8)	3.8ml

10%SDS	0.15ml
10%过硫酸铵	0.15ml
TEMED (N, N, N', N'-四甲基乙二胺)	0.006ml

#### 2.1.3 电泳缓冲液

甘氨酸 (GLYCINE)	188g
Tris 碱	30g
100g/L 十二烷基磺酸钠 (SDS)	100ml
水	10L

#### 2.1.4 转移电泳缓冲液

甘氨酸 (GLYCINE)	144g
Tris 碱	30.3g
甲醇	2 L
水	8 L

#### 2.1.4 底物

二氨基联苯胺 (DAB)	20mg
100mmol/L Tris·Cl (pH 值为 7.4)	20ml
双氧水	6.8μl

2.2 操作步骤 中国绵羊重组 PrPC 成熟蛋白 2μg 按体积比 3:1 加入上样缓冲液(4×), 置 100℃ 水浴 3 分钟。将样品加入 15%SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 于 120 伏电压下电泳约 2 小时。在 90 伏电压、2~8℃ 下将蛋白转印到硝酸纤维素膜上。将膜置于小塑料盒内, 倒入 PBST (配方同附注 1.1.7 项) 洗 3 次, 用 50g/L 的脱脂奶溶液封闭 2 小时, 再用 PBST 洗 3 次; 向塑料盒内加入 0.01mol/L pH 值为 7.4 PBS 溶液做 1:8000 稀释的腹水单克隆抗体, 室温下作用 1 小时; 用 PBST 溶液洗 3 次, 再加入 0.01mol/L pH 值为 7.4 的 PBS 稀释至工作浓度的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 反应约 1 小时, DAB 显色至条带清晰, 用清水漂洗中止。

2.3 结果判定 如在 23kDa 处, 出现棕褐色的条带者, 判为阳性, 否则判为阴性。

#### 附加说明:

1. 本标准由中国动物卫生与流行病学中心提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 742 号发布。

### 禽流感病毒 H5 亚型血凝抑制试验抗原与阴、阳性血清

Qinliuganbingdu H5 Yaxing Xueningyizhishiyuan Kangyuan Yu Yin, Yangxing Xueqing  
Avian Influenza Virus (H5 Sub-type) Hemagglutination Inhibition Test Antigen and Negative,  
Positive Sera

抗原系用高致病性 A 型禽流感病毒 A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1) 株接种 SPF 鸡胚, 收获感染鸡胚液, 经甲醛溶液灭活、浓缩后, 加适宜稳定剂冻干制成。用于血凝抑制 (HI)

试验检测禽流感 H5 亚型病毒抗体。

阳性血清系用禽流感病毒 H5 亚型灭活疫苗免疫 SPF 鸡，采血、分离血清，冻干制成；阴性血清系采自 SPF 鸡血、分离血清制成。用于禽流感病毒 H5 亚型 HI 试验对照。

### 抗 原

**【性状】** 白色或淡黄色海绵状疏松团块，易于与瓶壁脱离，加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** 对 1% 鸡红细胞的凝集价应  $\geq 7\log_2$ 。

**【特异性】** 抗原的血凝性能被禽流感病毒 H5 亚型阳性血清所抑制，而不能被 H7 和 H9 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒阳性血清所抑制。

**【安全检验】** 将冻干抗原按瓶签上标明的量用生理盐水稀释，滴鼻接种 4~5 周龄 SPF 鸡 10 只，每只 0.1ml。另取条件相同的 SPF 鸡 5 只，不接种作为对照，在同条件下分别饲养。观察 10 日，接种和对照鸡均应不出现死亡或明显异常反应。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于 HI 试验检测禽流感病毒 H5 亚型抗体。

**【用法与判定】** 冻干制品按瓶签规格标注量用 PBS 稀释，按微量法进行红细胞凝集抑制试验。以完全凝集（100%）的最高稀释倍数为抗原 HA 效价，以完全抑制 4HAU 抗原的最高血清稀释倍数判为该血清的 HI 效价。被检血清 HI 效价  $\leq 31\log_2$  判为阴性； $= 41\log_2$  判为可疑（可疑样品应重检，重检效价  $\geq 41\log_2$  判为阳性， $\leq 31\log_2$  判为阴性）； $\geq 51\log_2$  判为阳性。详见附注。

**【注意事项】** （1）HA 和 HI 试验影响因素甚多，应严格控制试验条件。每加一试剂或样品后需更换吸头，同时应严格控制作用温度和时间。

（2）准确配制红细胞悬液，使用时应随时振摇。

（3）用 pH 值为 7.0~7.2 的 PBS 作为稀释液。

（4）抗原和阴、阳性血清若有污染，应废弃。

（5）准确配制 4HAU 抗原，使用前需进行滴定，滴定好的抗原应在 2 小时内用完。

（6）抗原和血清按规定保存。冻干试剂应按规定的体积用 PBS 溶解。溶解后 2~8℃ 保存不超过 1 个月；可分装成小包装，-70℃ 冻存，随用随取。切忌反复冻融。

（7）鸭、鹅以及哺乳动物的血清一般需进行非特异性凝集和抑制素的处理。

（8）同一亚型不同毒株的 HI 试验抗原，若抗原性存在差异，则检测同一血清的 HI 效价不同。

**【规格】** （1）1ml/瓶 （2）2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃ 以下保存，有效期为 24 个月。

### 阳 性 血 清

**【性状】** 微黄色或淡红色，海绵状疏松团块，易与瓶壁分离，加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** HI 抗体效价应  $\geq 7\log_2$ 。

**【特异性】** 将禽流感病毒 H5 亚型阳性血清在同一条件下，分别与禽流感、鸡新城疫、

减蛋综合征病毒抗原进行红细胞凝集抑制试验，仅与禽流感病毒 H5 亚型抗原呈阳性反应 ( $HI \geq 7\log_2$ )，与 H7 和 H9 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原均应为阴性反应 ( $HI \leq 2\log_2$ )。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于禽流感病毒 H5 亚型 HI 试验阳性对照。

**【规格】** (1) 1ml/瓶 (2) 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃以下保存，有效期为 24 个月。

#### 阴性血清

**【性状】** 微黄色或淡红色，海绵状疏松团块，易与瓶壁分离，加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【HI 效价测定】** HI 抗体效价应  $\leq 2\log_2$ 。

**【特异性】** 用微量法进行 HI 试验。血清对禽流感病毒 H5、H7、H9 亚型、鸡新城疫、减蛋综合征抗原均应为阴性反应。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于禽流感病毒 H5 亚型 HI 试验阴性对照。

**【规格】** (1) 1ml/瓶 (2) 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃以下保存，有效期为 24 个月。

#### 附注：1 禽流感血凝 (HA) 和血凝抑制 (HI) 试验

##### 1.1 材料

1.1.1 96 孔 V 型 (90 度) 微量反应板、单道及多道微量移液器 (配有吸头)、加样槽、吸管、烧杯等。

1.1.2 pH 值为 7.2 的 0.01mol/L PBS

1.1.2.1 配制 25 倍 PB 称量 2.74g  $Na_2HPO_4$  和 0.79g  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ ，加蒸馏水至 100ml；

1.1.2.2 配制 1 倍 PBS 量取 40ml 25 倍 PB，加入 8.5g NaCl，加蒸馏水至 100ml；

1.1.2.3 用 NaOH 或 HCl 调 pH 值至 7.2；

1.1.2.4 69Kpa 15min 高压灭菌或用微孔滤膜过滤除菌。

1.1.2.5 PBS 一经使用，于 2~8℃保存不超过 3 周。

1.1.3 阿氏 (Alsevers) 液 称葡萄糖 2.05g、柠檬酸钠 0.8g、柠檬酸 0.055g、氯化钠 0.42g，加蒸馏水至 100ml，加热溶解后调 pH 值至 6.1，69Kpa 15min 高压灭菌，2~8℃保存备用。

1.1.4 1% 鸡红细胞悬液 采集 2~3 只 SPF 公鸡或无禽流感和新城疫等抗体的健康公鸡的血液与等体积阿氏液混合，用 pH 值 7.2 0.01mol/L PBS 液洗涤 3 次，每次均以 3000rpm/min 离心 5min，洗涤后用 PBS 配成 1% (V/V) 红细胞悬液，2~8℃保存备用。

1.1.5 抗原溶解 冻干的抗原和血清均按瓶贴上规格标注的量，用 PBS 溶液溶解。

## 1.2 操作术式

### 1.2.1 血凝 (HA) 试验

1.2.1.1 在 V 型微量反应板中, 每孔加 0.025ml PBS 溶液。

1.2.1.2 第 1 孔加 0.025ml 抗原, 反复抽打 3~5 次混匀。

1.2.1.3 从第 1 孔吸取 0.025ml 抗原加入第 2 孔, 混匀后吸取 0.025ml 加入第 3 孔, 如此进行对倍稀释至第 11 孔, 从第 11 孔吸取 0.025ml 弃去。

1.2.1.4 每孔加 0.025ml PBS 溶液。

1.2.1.5 每孔加入 0.025ml 1% (V/V) 鸡红细胞悬液。

1.2.1.6 将反应板在振荡器上震荡 1~2 分钟或轻扣反应板混合反应物, 在室温 (20~25℃) 下静置 20~30 分钟或 2~8℃ 45~60 分钟。在对照孔红细胞显著呈钮扣状时判定结果。

1.2.1.7 结果判定 将反应板倾斜 60 度, 观察红细胞有无泪珠状流淌, 完全无泪珠样流淌 (100%凝集) 的最高稀释倍数为血凝效价。

### 1.2.2 血凝抑制 (HI) 试验

1.2.2.1 根据 HA 试验测定的效价, 计算配制 4 个血凝单位 (4HAU) 抗原。HA 效价除以 4 即为含 4HAU 抗原的稀释倍数。例如, HA 效价为 1:256, 则 4HAU 抗原的稀释倍数应是 1:64 (256 除以 4)。

1.2.2.2 第 1~11 孔加入 0.025ml PBS, 第 12 孔加入 0.05ml PBS。

1.2.2.3 第 1 孔加入 0.025ml 血清, 充分混匀后吸 0.025ml 于第 2 孔, 依次对倍稀释至第 10 孔, 从第 10 孔吸取 0.025ml 弃去。

1.2.2.4 第 1~11 孔均加入 0.025ml 的 4HAU 抗原, 在室温 (20~25℃) 下静置 30 分钟或 2~8℃ 50 分钟。

1.2.2.5 每孔加入 0.025ml 1% (V/V) 的鸡红细胞悬液, 震荡混匀, 在室温 (20~25℃) 下静置 20~30 分钟或 2~8℃ 45~60 分钟, 对照红细胞将呈明显钮扣状沉于孔底。

1.3 结果判定 以完全抑制 4 HAU 抗原的最高血清稀释倍数判为该血清的 HI 效价。当阳性对照血清的 HI 效价与已知效价误差不超过 1 个滴度, 阴性对照血清效价不高于  $2\log_2$  时, 试验方可成立。被检血清 HI 效价  $\leq 3\log_2$  判为阴性;  $= 4\log_2$  判为可疑 (可疑样品应重检, 重检效价  $\geq 4\log_2$  判为阳性,  $\leq 3\log_2$  判为阴性);  $\geq 5\log_2$  判为阳性。

#### 附加说明:

1. 本标准由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 743 号发布。

## 禽流感病毒 H7 亚型血凝抑制试验抗原与阴、阳性血清

Qinliugan Bingdu H7 Yaxing Xueningyizhishiyuan Kangyuan Yu Yin, Yangxing Xueqing  
Avian Influenza Virus (H7 Sub-type) Hemagglutination Inhibition Test Antigen and  
Negative, Positive Sera

抗原系用 A 型禽流感病毒 A/African Starling/ England—Q/983/79 (H7N1) 株接种 SPF 鸡胚, 收获感染鸡胚液, 用甲醛溶液灭活, 经浓缩后, 冻干制成。用于血凝抑制 (HI) 试验检测禽流感病毒 H7 亚型抗体。

阳性血清系用禽流感病毒 H7 亚型灭活疫苗免疫 SPF 鸡, 采血、分离血清, 冻干制成; 阴性血清系采自 SPF 鸡血、分离血清、冻干制成。用于禽流感病毒 H7 亚型 HI 试验对照。

### 抗 原

**【性状】** 白色或淡黄色海绵状疏松团块, 易于与瓶壁脱离, 加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无菌生长。

**【效价测定】** 对 1% 鸡红细胞的凝集价应 $\geq 7\log_2$ 。

**【特异性】** 抗原的血凝性能被禽流感病毒 H7 亚型阳性血清所抑制, 而不能被 H5 和 H9 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒阳性血清所抑制。

**【安全检验】** 将冻干抗原按瓶签上标明的量用生理盐水稀释, 取 10~11 日龄 SPF 鸡胚 5 个, 各尿囊腔内接种稀释的抗原 0.1ml, 37℃ 孵育 72 小时, 收获鸡胚液, 测定血凝性, 应为阴性, 并盲传 1 代, 测定血凝性, 应为阴性。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定, 应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定, 应符合规定。

**【作用与用途】** 用于 HI 试验检测禽流感病毒 H7 亚型抗体。

**【用法与判定】** 冻干制品按瓶签规格标注量用 PBS 稀释, 按微量法进行红细胞凝集抑制试验。以完全凝集 (100%) 的最高稀释倍数为抗原 HA 效价, 以完全抑制 4HAU 抗原的最高血清稀释倍数判为该血清的 HI 效价。被检血清 HI 效价 $\leq 3\log_2$  判为阴性;  $= 4\log_2$  判为可疑 (可疑样品应重检, 重检效价 $\geq 4\log_2$  判为阳性,  $\leq 3\log_2$  判为阴性);  $\geq 5\log_2$  判为阳性。详见附注。

**【注意事项】** (1) HA 和 HI 试验影响因素甚多, 应严格控制试验条件。每加一试剂或样品后需更换吸头, 同时应严格控制作用温度和时间。

(2) 准确配制红细胞悬液, 使用时应随时振摇。

(3) 用 pH 值 7.0~7.2 的 PBS 作为稀释液。

(4) 抗原和阴、阳性血清若有污染, 应废弃。

(5) 准确配制 4HAU 抗原, 使用前需进行滴定, 滴定好的抗原应在 2 小时内用完。

(6) 抗原和血清按规定保存。冻干试剂应按规定的体积用 PBS 溶解。溶解后 2~8℃ 保存不超过 1 个月; 可分装成小包装, -70℃ 冻存, 随用随取。切忌反复冻融。

(7) 鸭、鹅以及哺乳动物的血清一般需进行非特异性凝集和抑制素的处理。

(8) 同一亚型不同毒株的 HI 试验抗原, 若抗原性存在差异, 则检测同一血清的 HI 效价不同。

**【规格】** (1) 1ml/瓶 (2) 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃ 以下保存, 有效期为 24 个月。

### 阳 性 血 清

**【性状】** 微黄色或淡红色, 海绵状疏松团块, 易与瓶壁分离, 加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无菌生长。

**【效价测定】** HI 抗体效价应 $\geq 7\log_2$ 。

**【特异性】** 将禽流感病毒 H7 亚型阳性血清在同一条件下,分别与禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原进行红细胞凝集抑制试验,仅与禽流感病毒 H7 亚型抗原呈阳性反应 ( $HI \geq 7\log_2$ ),与 H5 和 H9 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原均应为阴性反应 ( $HI \leq 2\log_2$ )。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定,应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定,应符合规定。

**【作用与用途】** 用于禽流感病毒 H7 亚型 HI 试验阳性对照。

**【规格】** (1) 1ml/瓶 (2) 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】**  $-15^\circ\text{C}$ 以下保存,有效期为 24 个月。

#### 阴性血清

**【性状】** 微黄色或淡红色,海绵状疏松团块,易与瓶壁分离,加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验,应无菌生长。

**【HI 效价测定】** HI 抗体效价应 $\leq 2\log_2$ 。

**【特异性】** 用微量法进行 HI 试验。血清对禽流感病毒 H5、H7、H9 亚型、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原均应为阴性反应。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定,应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定,应符合规定。

**【作用与用途】** 用于禽流感病毒 H7 亚型 HI 试验阴性对照。

**【规格】** (1) 1ml/瓶 (2) 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】**  $-15^\circ\text{C}$ 以下保存,有效期为 24 个月。

#### 附注: 1 禽流感血凝 (HA) 和血凝抑制 (HI) 试验

##### 1.1 材料

1.1.1 96 孔 V 型 (90 度) 微量反应板、单道及多道微量移液器 (配有吸头)、加样槽、吸管、烧杯等。

1.1.2 pH 值 7.2 0.01mol/L PBS

1.1.2.1 配制 25 倍 PB 称量 2.74g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和 0.79g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 加蒸馏水至 100ml;

1.1.2.2 配制 1 倍 PBS 量取 40ml 25 倍 PB, 加入 8.5g  $\text{NaCl}$ , 加蒸馏水至 1000ml;

1.1.2.3 用  $\text{NaOH}$  或  $\text{HCl}$  调 pH 值至 7.2;

1.1.2.4 69Kpa 15min 高压灭菌或用微孔滤膜过滤除菌。

1.1.2.5 PBS 一经使用,于  $2\sim 8^\circ\text{C}$  保存不超过 3 周。

1.1.3 阿氏 (Alsevers) 液 称葡萄糖 2.05g、柠檬酸钠 0.8g、柠檬酸 0.055g、氯化钠 0.42g, 加蒸馏水至 100ml, 加热溶解后调 pH 值至 6.1, 69Kpa 15min 高压灭菌,  $2\sim 8^\circ\text{C}$  保存备用。

1.1.4 1% 鸡红细胞悬液 采集 2~3 只 SPF 公鸡或无禽流感和新城疫等抗体的健康公鸡的血液与等体积阿氏液混合,用 pH 值 7.2 0.01mol/L PBS 液洗涤 3 次,每次均以

3000rpm/min 离心 5min, 洗涤后用 PBS 配成 1% (V/V) 红细胞悬液, 2~8℃ 保存备用。

1.1.5 抗原溶解 冻干的抗原和血清均按瓶签上规格标注的量, 用 PBS 溶解。

## 1.2 操作术式

### 1.2.1 血凝 (HA) 试验

1.2.1.1 在 V 型微量反应板中, 每孔加 0.025ml PBS。

1.2.1.2 第 1 孔加 0.025ml 抗原, 反复抽打 3~5 次混匀。

1.2.1.3 从第 1 孔吸取 0.025ml 抗原加入第 2 孔, 混匀后吸取 0.025ml 加入第 3 孔, 如此进行对倍稀释至第 11 孔, 从第 11 孔吸取 0.025ml 弃去。

1.2.1.4 每孔加 0.025ml PBS。

1.2.1.5 每孔加入 0.025ml 1% (V/V) 鸡红细胞悬液。

1.2.1.6 将反应板在振荡器上震荡 1~2 分钟或轻扣反应板混合反应物, 在室温 (20~25℃) 下静置 20~30 分钟或 2~8℃ 45~60 分钟。在对照孔红细胞显著呈纽扣状时判定结果。

1.2.1.7 结果判定 将反应板倾斜 60 度, 观察红细胞有无泪珠状流淌, 完全无泪珠样流淌 (100%凝集) 的最高稀释倍数为血凝效价。

### 1.2.2 血凝抑制 (HI) 试验

1.2.2.1 根据 HA 试验测定的效价, 计算配制 4 个血凝单位 (4HAU) 抗原。HA 效价除以 4 即为含 4HAU 抗原的稀释倍数。例如, HA 效价为 1:256, 则 4HAU 抗原的稀释倍数应是 1:64 (256 除以 4)。

1.2.2.2 第 1~11 孔加入 0.025ml PBS, 第 12 孔加入 0.05ml PBS。

1.2.2.3 第 1 孔加入 0.025ml 血清, 充分混匀后吸 0.025ml 于第 2 孔, 依次对倍稀释至第 10 孔, 从第 10 孔吸取 0.025ml 弃去。

1.2.2.4 第 1~11 孔均加入 0.025ml 的 4HAU 抗原, 在室温 (20~25℃) 下静置 30 分钟或 2~8℃ 50 分钟。

1.2.2.5 每孔加入 0.025ml 1% (V/V) 的鸡红细胞悬液, 震荡混匀, 在室温 (20~25℃) 下静置 20~30 分钟或 2~8℃ 45~60 分钟, 对照红细胞将呈明显纽扣状沉于孔底。

1.3 结果判定 以完全抑制 4 HAU 抗原的最高血清稀释倍数判为该血清的 HI 效价。当阳性对照血清的 HI 效价与已知效价误差不超过 1 个滴度, 阴性对照血清效价不高于  $2\log_2$  时, 试验方可成立。被检血清 HI 效价  $\leq 3\log_2$  判为阴性;  $= 4\log_2$  判为可疑 (可疑样品应重检, 重检效价  $\geq 4\log_2$  判为阳性,  $\leq 3\log_2$  判为阴性);  $\geq 5\log_2$  判为阳性。

#### 附加说明:

1. 本标准由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 743 号发布。

## 禽流感病毒 H7 亚型血凝抑制试验抗原与阴、阳性血清

Qinliugan Bingdu H7 Yaxing Xueningyizhishiyan Kangyuan Yu Yin, Yangxing Xueqing

Avian Influenza (H7 Sub-type) Hemagglutination Inhibition Test Antigen and Negative, Positive  
Sera

本品系用 A 型禽流感病毒 A/Chicken /England/12/03 (LPAI-H7N2) 株接种 SPF 鸡胚, 收获感染鸡胚液, 经甲醛溶液灭活后, 加适宜稳定剂冻干制成。用于血凝抑制 (HI) 检测禽流感病毒 H7 亚型抗体。

阳性血清系用禽流感病毒 H7 亚型灭活疫苗免疫 SPF 鸡, 采血、分离血清, 加保护剂冻干制成; 阴性血清系采自 6~8 周龄的 SPF 鸡血、分离血清制成。用于禽流感病毒 H7 亚型 HI 试验对照。

### 抗 原

**【性状】** 微黄色海绵状疏松团块, 易与瓶壁脱离, 加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无菌生长。

**【效价测定】** 对 1% 鸡红细胞的凝集价应 $\geq 1:256$ 。

**【特异性】** 抗原的血凝性能被禽流感病毒 H7 亚型阳性血清抑制, 而不能被其他亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征阳性血清抑制。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定, 应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定, 应符合规定。

**【作用与用途】** 用于检测禽流感 H7 亚型抗体的 HI 试验。

**【用法与判定】** 1 血凝 (HA) 试验操作方法

1.1 在 V 型微量反应板中, 每孔加 0.025ml PBS;

1.2 第 1 孔加入 0.025ml 抗原, 依次作 0.025ml 的对倍稀释至第 11 孔;

1.3 每孔加 0.025ml PBS;

1.4 每孔加入 0.025ml 1% (V/V) 鸡红细胞悬液;

1.5 将反应板在振荡器上振荡 1~2 分钟或轻叩反应板混合反应物, 室温 (20~25℃) 静置 15~30 分钟或 2~8℃ 45~60 分钟, 在对照孔的红细胞显著呈钮扣状时判定结果。

1.6 结果判定 将反应板倾斜 60°, 观察红细胞有无呈泪珠样流淌, 完全无泪珠样流淌 (100%凝集) 的最高稀释倍数为血凝效价。

2 血凝抑制 (HI) 试验操作方法

2.1 根据 HA 试验测定的效价, 计算配制 4 个血凝单位 (4HAU) 抗原。HA 效价除以 4 即为含 4HAU 抗原的稀释倍数。例如, HA 效价为 1:256, 则 4HAU 抗原的稀释倍数应是 1:64 (256 除以 4)。

2.2 反应板中第 1~11 孔加入 0.025ml PBS, 第 12 孔加入 0.05ml PBS;

2.3 第 1 孔加入 0.025ml 血清, 充分混匀后吸 0.025ml 于第 2 孔, 依次对倍稀释至第 10 孔, 从第 10 孔吸取 0.025ml 弃去;

2.4 第 1~11 孔均加入 0.025ml 的 4HAU 抗原, 室温下 (20~25℃) 静置 30 分钟或 2~8℃ 45~60 分钟。

2.5 每孔加入 0.025ml 1% (V/V) 的鸡红细胞悬液, 轻晃混匀后, 室温 (20~25℃) 静置 20~40 分钟或 2~8℃ 45~60 分钟, 当对照孔红细胞呈显著钮扣状时判定结果。

2.6 结果判定 以完全抑制 4HAU 抗原的最高血清稀释倍数为该血清的 HI 效价。当阳

性血清的 HI 效价与已知效价误差不超过 1 个滴度，阴性血清效价不高于 1:4 时，试验方可成立。被检样品 HI 效价 $\leq 1:8$  判为阴性； $= 1:16$  判为可疑（可疑样品应重检，重检效价 $\geq 1:16$  判为阳性， $\leq 1:8$  判为阴性）； $\geq 1:32$  判为阳性。

**【注意事项】**（1）HA 和 HI 试验影响因素甚多，应严格控制试验条件，准确控制红细胞悬液和抗原工作浓度，同时应严格控制温度和作用时间。

（2）用 pH 值 7.0~7.2 的 PBS 作稀释液。

（3）抗原和阴、阳性血清若有污染，应废弃。

（4）使用时应先测抗原的血凝价，根据所测结果，配制 4 个血凝单位的抗原，配好后的抗原应在 2 小时内用完。

（5）抗原开封后 2~8℃ 保存，应不超过 3 个月。切忌反复冻融。

**【规格】**（1）1ml/瓶 （2）2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃ 以下保存，有效期为 24 个月。

#### 阳性血清

**【性状】** 微黄色或淡红色海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离，加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** HI 效价应在 1:256~1:512 之间

**【特异性检验】** 将禽流感病毒 H7 亚型阳性血清在同一条件下，分别与禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征抗原进行红细胞凝集抑制试验，仅与禽流感病毒 H7 亚型抗原应呈阳性反应（HI $\geq 1:256$ ），与其它亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征抗原应为阴性反应（HI $\leq 1:4$ ）。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【规格】**（1）1ml/瓶 （2）2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃ 以下保存，有效期为 24 个月。

#### 阴性血清

**【性状】** 淡黄色透明液体

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** HI 效价应 $\leq 1:4$ 。

**【特异性检验】** 用微量法进行 HI 试验。血清对禽流感 H5、H7、H9 亚型、鸡新城疫和减蛋综合征抗原均应为阴性反应。

**【规格】**（1）1ml/瓶 （2）2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃ 以下保存，有效期为 12 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由中国动物卫生与流行病学中心提出。

2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 743 号发布。

## 禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制试验抗原与阴、阳性血清

Qinliugan Bingdu H9 Yaxing Xueningyizhishiyuan Kangyuan Yu Yin, Yangxing Xueqing  
Avian Influenza Virus (H9 Sub-type) Hemagglutination Inhibition Test Antigen and  
Negative, Positive Sera

抗原系用 A 型禽流感病毒 A/Chicken/Shanghai/10/01 (H9N2) 株接种 SPF 鸡胚, 收获感染鸡胚液, 用甲醛溶液灭活, 经浓缩后, 加适宜稳定剂冻干制成。用于血凝抑制 (HI) 试验检测禽流感病毒 H9 亚型抗体。

阳性血清系用禽流感病毒 H9 亚型灭活疫苗免疫 SPF 鸡, 采血、分离血清, 冻干制成; 阴性血清系采自 SPF 鸡血、分离血清、冻干制成。用于禽流感病毒 H9 亚型 HI 试验对照。

### 抗 原

**【性状】** 白色或淡黄色海绵状疏松团块, 易于与瓶壁脱离, 加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无菌生长。

**【效价测定】** 对 1% 鸡红细胞的凝集价应  $\geq 7 \log_2$ 。

**【特异性】** 抗原的血凝性能被禽流感病毒 H9 亚型阳性血清所抑制, 而不能被 H5 和 H7 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒阳性血清所抑制。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定, 应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定, 应符合规定。

**【作用与用途】** 用于 HI 试验检测禽流感病毒 H9 亚型抗体。

**【用法与判定】** 冻干制品按瓶签规格标注的量用 PBS 复原, 按微量法进行红细胞凝集抑制试验。以完全凝集 (100%) 的最高稀释倍数为抗原 HA 效价, 以完全抑制 4HAU 抗原的最高血清稀释倍数判为该血清的 HI 效价。被检血清 HI 效价  $\leq 3 \log_2$  判为阴性;  $= 4 \log_2$  判为可疑 (可疑样品应重检, 重检效价  $\geq 4 \log_2$  判为阳性,  $\leq 3 \log_2$  判为阴性);  $\geq 5 \log_2$  判为阳性。详见附注。

**【注意事项】** (1) HA 和 HI 试验影响因素甚多, 应严格控制试验条件。每加一试剂或样品后需更换吸头, 同时应严格控制作用温度和时间。

(2) 准确配制红细胞悬液, 使用时应随时振摇。

(3) 用 pH 值 7.0~7.2 的 PBS 作为稀释液。

(4) 抗原和阴、阳性血清若有污染, 应废弃。

(5) 准确配制 4HAU 抗原, 使用前需进行滴定, 滴定好的抗原应在 2 小时内用完。

(6) 抗原和血清按规定保存。冻干试剂应按规定的体积用 PBS 溶解。溶解后 2~8℃ 保存不超过 1 个月; 可分装成小包装, -70℃ 冻存, 随用随取。切忌反复冻融。

(7) 鸭、鹅以及哺乳动物的血清一般需进行非特异性凝集和抑制素的处理。

(8) 同一亚型不同毒株的 HI 试验抗原, 若抗原性存在差异, 则检测同一血清的 HI 效价不同。

**【规格】** (1) 1ml/瓶 (2) 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃ 以下保存, 有效期为 24 个月。

### 阳 性 血 清

**【性状】** 微黄色或淡红色, 海绵状疏松团块, 易与瓶壁分离, 加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** HI 抗体效价应 $\geq 7\log_2$ 。

**【特异性】** 将禽流感病毒 H9 亚型阳性血清在同一条件下，分别与禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原进行红细胞凝集抑制试验，仅与禽流感病毒 H9 亚型抗原呈阳性反应（HI $\geq 7\log_2$ ），与 H5 和 H7 亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原均应为阴性反应（HI $\leq 2\log_2$ ）。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于禽流感病毒 H9 亚型 HI 试验阳性对照。

**【规格】** (1) 1ml/瓶 (2) 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃以下保存，有效期为 24 个月。

#### 阴性血清

**【性状】** 微黄色或淡红色，海绵状疏松团块，易与瓶壁分离，加稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【HI 效价测定】** HI 抗体效价应 $\leq 2\log_2$ 。

**【特异性】** 用微量法进行 HI 试验。血清对禽流感 H5、H7、H9 亚型、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原均应为阴性反应。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【真空度测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于禽流感病毒 H9 亚型 HI 试验阴性对照。

**【规格】** (1) 1ml/瓶 (2) 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃以下保存，有效期为 24 个月。

#### 附注：1 禽流感血凝（HA）和血凝抑制（HI）试验

##### 1.1 材料

1.1.1 96 孔 V 型（90 度）微量反应板、单道及多道微量移液器（配有吸头）、加样槽、吸管、烧杯等。

1.1.2 pH 值为 7.2 的 0.01mol/L PBS

1.1.2.1 配制 25 倍 PB 称量 2.74g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和 0.79g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ，加蒸馏水至 100ml；

1.1.2.2 配制 1 倍 PBS 量取 40ml 25 倍 PB，加入 8.5g NaCl，加蒸馏水至 1000ml；

1.1.2.3 用 NaOH 或 HCl 调 pH 值至 7.2；

1.1.2.4 69Kpa 15min 高压灭菌或用微孔滤膜过滤除菌。

1.1.2.5 PBS 一经使用，于 2~8℃保存不超过 3 周。

1.1.3 阿氏（Alsevers）液 称葡萄糖 2.05g、柠檬酸钠 0.8g、柠檬酸 0.055g、氯化钠 0.42g，加蒸馏水至 100ml，加热溶解后调 pH 值至 6.1，69Kpa 15min 高压灭菌，2~8℃保存备用。

1.1.4 1%鸡红细胞悬液 采集 2~3 只 SPF 公鸡或无禽流感和新城疫等抗体的健康公鸡的血液与等体积阿氏液混合，用 pH 值 7.2 0.01mol/L PBS 液洗涤 3 次，每次均以 3000rpm/min

离心 5min，洗涤后用 PBS 配成 1% (V/V) 红细胞悬液，2~8℃ 保存备用。

1.1.5 抗原溶解 冻干的抗原和血清均按瓶签上规格标注的量，用 PBS 溶解。

## 1.2 操作术式

### 1.2.1 血凝 (HA) 试验

1.2.1.1 在 V 型微量反应板中，每孔加 0.025ml PBS。

1.2.1.2 第 1 孔加 0.025ml 抗原，反复抽打 3~5 次混匀。

1.2.1.3 从第 1 孔吸取 0.025ml 抗原加入第 2 孔，混匀后吸取 0.025ml 加入第 3 孔，如此进行对倍稀释至第 11 孔，从第 11 孔吸取 0.025ml 弃去。

1.2.1.4 每孔加 0.025ml PBS。

1.2.1.5 每孔加入 0.025ml 1% (V/V) 鸡红细胞悬液。

1.2.1.6 将反应板在振荡器上震荡 1~2 分钟或轻扣反应板混合反应物，在室温 (20~25℃) 下静置 20~30 分钟或 2~8℃ 45~60 分钟。在对照孔红细胞显著呈纽扣状时判定结果。

1.2.1.7 结果判定 将反应板倾斜 60 度，观察红细胞有无泪珠状流淌，完全无泪珠样流淌 (100% 凝集) 的最高稀释倍数为血凝效价。

### 1.2.2 血凝抑制 (HI) 试验

1.2.2.1 根据 HA 试验测定的效价，计算配制 4 个血凝单位 (4HAU) 抗原。HA 效价除以 4 即为含 4HAU 抗原的稀释倍数。例如，HA 效价为 1:256，则 4HAU 抗原的稀释倍数应是 1:64 (256 除以 4)。

1.2.2.2 第 1~11 孔加入 0.025ml PBS，第 12 孔加入 0.05ml PBS。

1.2.2.3 第 1 孔加入 0.025ml 血清，充分混匀后吸 0.025ml 于第 2 孔，依次对倍稀释至第 10 孔，从第 10 孔吸取 0.025ml 弃去。

1.2.2.4 第 1~11 孔均加入 0.025ml 的 4HAU 抗原，在室温 (20~25℃) 下静置 30 分钟或 2~8℃ 50 分钟。

1.2.2.5 每孔加入 0.025ml 1% (V/V) 的鸡红细胞悬液，震荡混匀，在室温 (20~25℃) 下静置 20~30 分钟或 2~8℃ 45~60 分钟，对照红细胞将呈明显纽扣状沉于孔底。

1.3 结果判定 以完全抑制 4 HAU 抗原的最高血清稀释倍数判为该血清的 HI 效价。当阳性对照血清的 HI 效价与已知效价误差不超过 1 个滴度，阴性对照血清效价不高于  $2\log_2$  时，试验方可成立。被检血清 HI 效价  $\leq 3\log_2$  判为阴性； $= 4\log_2$  判为可疑 (可疑样品应重检，重检效价  $\geq 4\log_2$  判为阳性， $\leq 3\log_2$  判为阴性)； $\geq 5\log_2$  判为阳性。

### 附加说明：

1. 本标准由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 743 号发布。

## 禽流感病毒 H5 亚型 RT-PCR 检测试剂盒

Qinliuganbingdu H5 Yaxing RT-PCR Jianceshijihe

### Avian Influenza Virus H5 Subtype RT-PCR Detection kit

本试剂盒系用一对 A 型禽流感病毒 M 基因和一对 H5 亚型流感病毒 HA 基因特异性引物，采用复合 RT-PCR 技术，由变性液、酚/氯仿/异戊醇混合液、异丙醇、75%乙醇、醋酸钠溶液、DEPC 水、阳性对照、阴性对照、上样缓冲液、扩增对照和 RT-PCR 反应体系组成。用于 H5 亚型禽流感病毒的检测。

**【性状】** 外观应密封完好、无变形、组分整齐、无破损、无渗漏、标签字迹清晰。

其中：

- (1) 变性液 为无色透明液体，有  $\beta$ -巯基乙醇的臭味，无沉淀，装量 6ml。
- (2) 酚/氯仿/异戊醇混合液 无色透明液体，有异味，无沉淀，装量 6ml。
- (3) 异丙醇 无色透明液体，有异味，无沉淀，装量 9ml。
- (4) 75%乙醇 无色透明液体，有酒精味，无沉淀，装量 10ml/瓶，2 瓶。
- (5) 2mol/L 醋酸钠溶液 无色透明液体，有酸醋味，无沉淀，装量 700 $\mu$ l。
- (6) DEPC 水 无色透明液体，无异味，无沉淀，装量 500 $\mu$ l。
- (7) 阳性对照 淡黄色透明液体，无异味，有少许沉淀，装量 100 $\mu$ l。
- (8) 阴性对照 淡黄色透明液体，无异味，有少许沉淀，装量 100 $\mu$ l。
- (9) RT-PCR 反应体系 无色透明液体，无异味，无沉淀，装量 22.5 $\mu$ l/管，22 管。
- (10) 扩增对照 无色透明液体，无异味，无沉淀，装量 30 $\mu$ l/管，1 管。
- (11) 6 倍上样缓冲液 蓝色不透明液体，无异味，无沉淀，装量 100 $\mu$ l/管，1 管。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，变性液、酚/氯仿/异戊醇混合液、异丙醇、75%乙醇、2mol/L 醋酸钠溶液、DEPC 水、阳性对照、阴性对照、RT-PCR 反应体系、扩增对照、6 倍上样缓冲液应无菌生长。

**【敏感性检验】** 用试剂盒检测敏感性质控样品 P1~P5（由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所国家禽流感参考实验室提供，详见附注 1）进行检验，5 个样品均为阳性判定为合格。

**【特异性检验】** 用试剂盒检测特异性质控样品 N1~N15（由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所国家禽流感参考实验室提供，详见附注 2），15 份全部为 H5 亚型阴性判定为合格。

**【作用与用途】** 用于 H5 亚型禽流感病毒的检测。适用于可能感染 H5 亚型禽流感病毒的咽喉拭子、泄殖腔拭子、组织、鸡胚尿囊液以及细胞培养物中 H5 亚型禽流感病毒 RNA 的检测。

**【用法与判定】** 1 取 1.5ml DEPC 处理过的离心管，加入待检样品 100 $\mu$ l，加 300 $\mu$ l 变性液，继续加入 30 $\mu$ l 2mol/L 醋酸钠（pH 值 4.0）。反复颠倒离心管 4~5 次，以混合均匀。

2 加入酚/氯仿/异戊醇混合液 300 $\mu$ l，反复颠倒离心管 3~5 次，再摇晃 10 秒，置冰上静置 15 分钟。

3 4 $^{\circ}$ C 12000r/min 离心 20 分钟，吸取上清置另一个离心管中。

4 加入等体积的异丙醇，-20 $^{\circ}$ C 静置 10~15 分钟，沉淀 RNA。

5 4 $^{\circ}$ C 12000r/min 离心 10 分钟。弃上清，加入 75%的冰乙醇，温和地反复颠倒离心管 3~5 次。

6 4 $^{\circ}$ C 12000r/min 离心 5 分钟。弃上清，用滤纸吸干管壁余液，真空抽干或者 37 $^{\circ}$ C 烘干 5~20 分钟。

- 7 加入 10 $\mu$ l DEPC 水，溶解 RNA。
- 8 取 2.5 $\mu$ l RNA 转移到 RT-PCR 反应体系管中。
- 9 置于 PCR 仪中，循环参数为 45 $^{\circ}$ C 逆转录 45 分钟，94 $^{\circ}$ C 预变性 2 分钟，94 $^{\circ}$ C 30 秒、52 $^{\circ}$ C 45 秒、68 $^{\circ}$ C 45 秒，35 个循环，最后 68 $^{\circ}$ C 延伸 8 分钟。
- 10 取 5 $\mu$ l PCR 产物，混合 1 $\mu$ l 上样缓冲液，1.0%的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。以 DNA 分子量 Marker 为参考。
- 11 结果判定，同时出现 372bp 和 229bp 大小的扩增片段时，判定为 H5 血凝素亚型禽流感病毒阳性，只出现 229bp 片段判定为其它亚型 A 型流感病毒阳性，只出现 372bp 定为 H5 亚型疑似，不出条带，判定为阴性。

**【注意事项】**（1）本试剂盒 RNA 提取液 2~8 $^{\circ}$ C 存放；RT-PCR 反应体系 -20 $^{\circ}$ C 以下存放。尽量不要反复冻融。

（2）RT-PCR 反应体系，用前要先在冰上彻底溶化，并瞬时离心将液体甩至管底。

（3）病料的处理很重要，现地采集的病料，先进行研磨，再按照每克重量加入 1ml PBS，混匀，按 10<sup>-1</sup>~10<sup>-2</sup> 比例稀释后用于 RNA 的提取。棉拭子病料直接加入 1ml PBS，混合后取溶液用于 RNA 的提取，不需要稀释。

（4）RNA 的提取直接会影响到 RT-PCR 结果，需要特别注意 RNA 提取过程的操作。

（5）注意废弃物的无害化处理。可疑待检样品及其接触过器材要消毒灭菌，防止实验室散毒；含有 EB 的物品需要高温处理。

（6）注意防止 PCR 操作过程中的环境污染，有条件情况下可以采用独立房间分别进行 RNA 提取、RT-PCR、电泳等操作环节，无条件时应该尽可能划分不同功能的工作区，并且电泳时采用单独移液器。

**【规格】** 20 份/盒

**【贮藏与有效期】** RNA 提取试剂置 4~8 $^{\circ}$ C 保存；RT-PCR 反应体系置 -20 $^{\circ}$ C 以下保存。有效期 6 个月。

#### 附注：1 敏感性质控样品的制备和检验

1.1 制备 将禽流感参考毒株 A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1)、A/Chicken/Hebei/29/2001 (H5N1)、A/Duck/Shanghai/8/2001 (H5N1)、A/Duck/Guangxi/35/2001 (H5N1) 和 A/Duck/Guangxi/22/2001 (H5N1) 的灭活鸡胚尿囊液进行 1:100 稀释，分别标记为 P1、P2、P3、P4、P5，作为 H5 亚型禽流感病毒 RT-PCR 检测试剂盒的敏感性质控样品。定量分装，100 $\mu$ l/管，置 -70 $^{\circ}$ C 以下保存，备用。

1.2 检验 随机用 RT-PCR 试剂盒检测，结果均为阳性，符合质控检验合格标准（见表 1）。

表 1 敏感性质控样品的制备和检验合格标准

编号	禽流感病毒株名称	稀释倍数	质控检测标准
P1	A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1)	1:100	+
P2	A/Chicken/Hebei/29/2001 (H5N1)	1:100	+
P3	A/Duck/Shanghai/8/2001 (H5N1)	1:100	+

P4	A/Duck/Guangxi/35/2001 (H5N1)	1:100	+
P5	A/Duck/Guangxi/22/2001 (H5N1)	1:100	+

## 2 特异性质控样品的制备和检验

2.1 制备 分别将 H7 和 H9 亚型禽流感病毒、新城疫病毒 (NDV)、减蛋综合征病毒 (EDS-76)、鸡传染性支气管炎病毒 (IBV)、传染性法氏囊病病毒 (IBDV)、马立克氏病病毒 (MDV)、鸡病毒性关节炎 (VA)、鸡传染性贫血因子 (CIA), 编号为特异性质控样本 N1~N9; 取 SPF 鸡的喉气管、脑、肌肉组织、咽拭子、泄殖腔拭子以及 SPF 鸡胚尿囊液, 编号为特异性质控样品 N10~N15。定量分装, 100 $\mu$ l/管, 置-70 $^{\circ}$ C 以下保存, 备用。

2.2 检验 用 RT-PCR 试剂盒检测, 结果均为阴性, 符合质控检验合格标准 (见表 2)。

表 2 特异性质控样品和检验合格标准

质控样本编号	样品名称	质控检测合格标准
N1	H7 亚型禽流感病毒	—
N2	H9 亚型禽流感病毒	—
N3	新城疫病毒	—
N4	减蛋综合征病毒	—
N5	鸡传染性支气管炎病毒	—
N6	传染性法氏囊病病毒	—
N7	马立克氏病病毒	—
N8	鸡病毒性关节炎	—
N9	鸡传染性贫血因子	—
N10	SPF 鸡喉气管组织	—
N11	SPF 鸡脑组织	—
N12	SPF 鸡肌肉组织	—
N13	SPF 鸡咽拭子	—
N14	SPF 鸡泄殖腔拭子	—
N15	SPF 鸡胚尿囊液	—

### 附加说明:

1. 本标准由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 743 号发布。

## 禽流感病毒 H7 亚型 RT-PCR 检测试剂盒

Qinliuganbingdu H7 Yaxing RT-PCR Jianceshijihe

Avian Influenza Virus H7 Subtype RT-PCR Detection kit

本试剂盒系用一对 H7 亚型流感病毒 HA 基因特异性引物, 采用 RT-PCR 技术, 由变性液、酚/氯仿/异戊醇混合液、异丙醇、75%乙醇、醋酸钠溶液、DEPC 水、阳性对照、阴性对照、上样缓冲液、扩增对照和 RT-PCR 反应体系组成。用于 H7 亚型禽流感病毒的检测。

**【性状】** 外观应密封完好、无变形、组分整齐、无破损、无渗漏、标签字迹清晰。

其中：

- (1) 变性液 为无色透明液体，有 $\beta$ -巯基乙醇的臭味，无沉淀，装量 6ml。
- (2) 酚/氯仿/异戊醇混合液 无色透明液体，有异味，无沉淀，装量 6ml。
- (3) 异丙醇 无色透明液体，有异味，无沉淀，装量 9ml。
- (4) 75%乙醇 无色透明液体，有酒精味，无沉淀，装量 10ml/瓶，2 瓶。
- (5) 2mol/L 醋酸钠溶液 无色透明液体，有酸醋味，无沉淀，装量 700 $\mu$ l。
- (6) DEPC 水 无色透明液体，无异味，无沉淀，装量 500 $\mu$ l。
- (7) 阳性对照 淡黄色透明液体，无异味，有少许沉淀，装量 100 $\mu$ l。
- (8) 阴性对照 淡黄色透明液体，无异味，有少许沉淀，装量 100 $\mu$ l。
- (9) RT-PCR 反应体系 无色透明液体，无异味，无沉淀，装量 22.5 $\mu$ l/管，22 管。
- (10) 扩增对照 无色透明液体，无异味，无沉淀，装量 30 $\mu$ l/管，1 管。
- (11) 6 倍上样缓冲液 蓝色不透明液体，无异味，无沉淀，装量 100 $\mu$ l/管，1 管。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，变性液、酚/氯仿/异戊醇混合液、异丙醇、75%乙醇、2mol/L 醋酸钠溶液、DEPC 水、阳性对照、阴性对照、RT-PCR 反应体系、扩增对照、6 倍上样缓冲液应无菌生长。

**【敏感性检验】** 用试剂盒检测敏感性质控样品 P1~P3（由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所国家禽流感参考实验室提供，详见附注 1）进行检验，3 个样品均为阳性判定为合格。

**【特异性检验】** 用试剂盒检测特异性质控样品 N1~N15（由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所国家禽流感参考实验室提供，详见附注 2），15 份全部为阴性判定为合格。

**【作用与用途】** 用于 H7 亚型禽流感病毒的检测。适用于可能感染 H7 亚型禽流感病毒的咽拭子、泄殖腔拭子、组织、鸡胚尿囊液以及细胞培养物中 H7 亚型禽流感病毒 RNA 的检测。

**【用法与判定】** 1 取 1.5ml DEPC 处理过的离心管，加入待检样品 100 $\mu$ l，加 300 $\mu$ l 变性液，继续加入 30 $\mu$ l 2mol/L 醋酸钠（pH 值为 4.0）。反复颠倒离心管 4~5 次，以混合均匀。

2 加入酚/氯仿/异戊醇混合液 300 $\mu$ l，反复颠倒离心管 3~5 次，再摇晃 10 秒，置冰上静置 15 分钟。

3 4℃ 12000r/min 离心 20 分钟，吸取上清置另一个离心管中。

4 加入等体积的异丙醇，-20℃ 静置 10~15 分钟，沉淀 RNA。

5 4℃ 12000r/min 离心 10 分钟。弃上清，加入 75%的冰乙醇，温和地反复颠倒离心管 3~5 次。

6 4℃ 12000r/min 离心 5 分钟。弃上清，用滤纸吸干管壁余液，真空抽干或者 37℃ 烘干 5~20 分钟。

7 加入 10 $\mu$ l DEPC 水，溶解 RNA。

8 取 2.5 $\mu$ l RNA 转移到 RT-PCR 反应体系管中。

9 置于 PCR 仪中，循环参数为 45℃ 逆转录 45 分钟，94℃ 预变性 2 分钟，94℃ 30 秒、52℃ 45 秒、68℃ 45 秒，35 个循环，最后 68℃ 延伸 8 分钟。

10 取 5 $\mu$ l PCR 产物, 混合 1 $\mu$ l 上样缓冲液, 1.0%的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。以 DNA 分子量 Marker 为参考。

11 结果判定, 出现 501bp 片段判定为 H7 亚型流感病毒阳性, 不出条带, 判定为阴性。

**【注意事项】** (1) 本试剂盒 RNA 提取液 2~8 $^{\circ}$ C 存放; RT-PCR 反应体系-20 $^{\circ}$ C 以下存放。尽量不要反复冻融。

(2) RT-PCR 反应体系, 用前要先在冰上彻底溶化, 并瞬时离心将液体甩至管底。

(3) 病料的处理很重要, 现地采集的病料, 先进行研磨, 再按照每克重量加入 1ml PBS, 混匀, 按 10<sup>-1</sup>~10<sup>-2</sup> 比例稀释后用于 RNA 的提取。棉拭子病料直接加入 1ml PBS, 混合后取溶液用于 RNA 的提取, 不需要稀释。

(4) RNA 的提取直接会影响到 RT-PCR 结果, 需要特别注意 RNA 提取过程的操作。

(5) 注意废弃物的无害化处理。可疑待检样品及其接触过器材要消毒灭菌, 防止实验室散毒; 含有 EB 的物品需要高温处理。

(6) 注意防止 PCR 操作过程中的环境污染, 有条件情况下可以采用独立房间分别进行 RNA 提取、RT-PCR、电泳等操作环节, 无条件时应该尽可能划分不同功能的工作区, 并且电泳时采用单独移液器。

**【规格】** 20 份/盒

**【贮藏与有效期】** RNA 提取试剂置 4~8 $^{\circ}$ C 保存; RT-PCR 反应体系置-20 $^{\circ}$ C 以下保存, 有效期 6 个月。

#### 附注: 1 敏感性质控样品的制备和检验

1.1 制备 将禽流感参考毒株 A/African Starling/ England-Q/983/79 (H7N1)、A/FPV/Rostock/34 (H7N1)、A/Chicken/Hebei/01/03 (H7N2) 的灭活鸡胚尿囊液进行 1:100 倍稀释, 分别标记为 P1、P2、P3, 作为 H7 亚型禽流感病毒 RT-PCR 检测试剂盒的敏感性质控样品。定量分装, 100 $\mu$ l/管, 置-70 $^{\circ}$ C 以下保存, 备用。

1.2 检验 随机用 RT-PCR 试剂盒检测, 结果均为阳性, 符合敏感性质控检验合格标准 (见表 1)。

表 1 敏感性质控样品的制备和检验合格标准

编号	禽流感病毒株名称	稀释倍数	质控检测标准
P1	A/African Starling/ England-Q/983/79 (H7N1)	1:100	+
P2	A/FPV/Rostock/34 (H7N1)	1:100	+
P3	A/Chicken/Hebei/01/03 (H7N2)	1:100	+

#### 2 特异性质控样品的制备和检验

2.1 制备 分别将 H5 和 H9 亚型禽流感病毒、新城疫病毒 (NDV)、减蛋综合征病毒 (EDS-76)、鸡传染性支气管炎病毒 (IBV)、传染性法氏囊病病毒 (IBDV)、马立克氏病病毒 (MDV)、鸡病毒性关节炎 (VA)、鸡传染性贫血因子 (CIA), 作为特异性质控样本 N1~N9; 取 SPF 鸡的喉气管、脑、肌肉组织、咽拭子、泄殖腔拭子以及 SPF 鸡胚尿囊液作为特异性质控样品 N10~N15。定量分装, 100 $\mu$ l/管, 置-70 $^{\circ}$ C 以下保存, 备用。

2.2 检验 用 RT-PCR 试剂盒检测, 结果均为阴性, 符合特异性质控检验合格标准 (见

表 2)。

表 2 特异性质控样品和检验合格标准

质控样本编号	样品名称	质控检测合格标准
N1	H5 亚型禽流感病毒	—
N2	H9 亚型禽流感病毒	—
N3	新城疫病毒	—
N4	减蛋综合征病毒	—
N5	鸡传染性支气管炎病毒	—
N6	传染性法氏囊病病毒	—
N7	马立克氏病病毒	—
N8	鸡病毒性关节炎	—
N9	鸡传染性贫血因子	—
N10	SPF 鸡喉气管组织	—
N11	SPF 鸡脑组织	—
N12	SPF 鸡肌肉组织	—
N13	SPF 鸡咽拭子	—
N14	SPF 鸡泄殖腔拭子	—
N15	SPF 鸡胚尿囊液	—

**附加说明：**

1. 本标准由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 8 号经农业部公告第 743 号发布。

**禽流感病毒 RT-PCR 检测试剂盒**

Qinliugan Bingdu RT-PCR Jianceshijihe

Avian Influenza Virus RT-PCR Detection kit

本试剂盒系用一对 A 型禽流感病毒 M 基因特异性引物,采用 RT-PCR 技术,由变性液、酚/氯仿/异戊醇混合液、异丙醇、75%乙醇、醋酸钠溶液、DEPC 水、阳性对照、阴性对照、上样缓冲液、扩增对照和 RT-PCR 反应体系组成。用于 A 型禽流感病毒的检测。

**【性状】** 外观应密封完好、无变形、组分整齐、无破损、无渗漏、标签字迹清晰。  
其中:

- (1) 变性液 为无色透明液体,有  $\beta$ -巯基乙醇的臭味,无沉淀,装量 6ml。
- (2) 酚/氯仿/异戊醇混合液 无色透明液体,有异味,无沉淀,装量 6ml。
- (3) 异丙醇 无色透明液体,有异味,无沉淀,装量 9ml。
- (4) 75%乙醇 无色透明液体,有酒精味,无沉淀,装量 10ml/瓶,2 瓶。
- (5) 2mol/L 醋酸钠溶液 无色透明液体,有酸醋味,无沉淀,装量 700 $\mu$ l。
- (6) DEPC 水 无色透明液体,无异味,无沉淀,装量 500 $\mu$ l。