

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。

- (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~N10 (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), 10 份全部为阴性判定为合格。

**【作用与用途】** 用于 A 型禽流感病毒的检测。适用于可能感染 A 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 A 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 $^{\circ}$ 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, 出现 229bp 片段判定为 A 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 $^{-1}$ ~10 $^{-2}$  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℃ 保存; RT-PCR 反应体系置 -20℃ 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/Turkey/England/N28/73 (H5N2)、A/Chicken/Hebei/29/2001 (H5N1)、A/Duck/Shanghai/8/2001 (H5N1)、A/African Starling /983/79 (H7N1) 和 A/Turkey/ Wisconsin/1/66 (H9N2) 的灭活鸡胚尿囊液进行 1:100 倍稀释, 分别标记为 P1、P2、P3、P4、P5, 作为 A 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, 100μl/管, 置 -70℃ 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/Turkey/England/N28/73 (H5N2)	1:100	+
P2	A/Chicken/Hebei/29/2001 (H5N1)	1:100	+
P3	A/Duck/Shanghai/8/2001 (H5N1)	1:100	+
P4	A/African Starling/983/79 (H7N1)	1:100	+
P5	A/Turkey/Wisconsin/1/66 (H9N2)	1:100	+

### 2 特异性质控样品的制备和检验

2.1 制备 分别将新城疫病毒 (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), 作为特异性质控样本 N1~N4; 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 N5~N10。定量分装, 100μl/管, 置 -70℃ 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)。

质控样本编号	样品名称	质控检测合格标准
N1	新城疫病毒	—
N2	减蛋综合征病毒	—
N3	鸡传染性支气管炎病毒	—
N4	传染性法氏囊病病毒	—
N5	SPF 鸡喉气管组织	—

N6	SPF 鸡脑组织	—
N7	SPF 鸡肌肉组织	—
N8	SPF 鸡咽拭子	—
N9	SPF 鸡泄殖腔拭子	—
N10	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 H5 亚型病毒 RT-PCR 检测试剂盒

Qinliuganbingdu H5 Yaxing RT-PCR Jianceshijihe

Avian Influenza Virus Subtype H5 RT-PCR Detection Kit

本品系针对禽流感病毒 H5 亚型 HA 基因设计合成引物，采用了 RT-PCR 检测技术，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 倍 TAE 电泳缓冲液、上样缓冲液、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 16 种试剂组成。用于禽流感病毒 H5 亚型 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。其中：

- (1) 阴性对照样品 无色液体，仅有少量悬浮物，装量为 700 $\mu$ l。
- (2) 阳性对照样品 无色液体，仅有少量悬浮物，装量为 700 $\mu$ l。
- (3) 变性液 无色透明液体，有臭味，装量为 7ml。
- (4) 醋酸钠溶液 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 无色透明液体，上层有保护液，有异味，装量为 3.5ml。
- (6) 异丙醇 无色透明液体，有异味，装量为 3.5ml。
- (7) 75%乙醇 无色透明液体，无杂质，无沉淀，装量为 12ml。
- (8) 无菌 DEPC 水 无色透明液体，无杂质，无沉淀，装量为 900 $\mu$ l。
- (9) RNA 酶抑制剂 无色无味油性液体，装量为 15 $\mu$ l。
- (10) RT-PCR 反应液 无色无味液体，装量为 250 $\mu$ l。
- (11) AMV 反转录酶 无色无味油性液体，装量为 3 $\mu$ l。
- (12) Taq DNA 聚合酶 无色无味油性液体，装量为 12 $\mu$ l。
- (13) 矿物油 无色无味透明的油性液体，装量为 300 $\mu$ l。
- (14) 50 倍 TAE 电泳缓冲液 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 红色液体，无沉淀，装量为 100 $\mu$ l。
- (16) 上样缓冲液 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-PCR 反应液均应无菌生长。

**【敏感性检验】** 将禽流感病毒参考毒株 A/Chicken/Guangdong SZ/1129/2000(H5N1)、A/Chicken/Fujian DT/1/2000 (H5N1)、A/Goose/Jiangsu/1/2001 (H5N1)、A/Duck/Guangxi NN/12/2000 (H5N1) 和 A/Duck/Hong Kong/820/80/ (H5N3) 的灭活鸡胚尿囊液, 作为灵敏度质控样品母液, 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 检测试剂盒检测的敏感性质控样品。敏感性质控样品均由中国动物疫病预防控制中心提供。用试剂盒检测 5 份敏感性质控样品, 每份样品重复检测 3 次。判定合格标准为每份样品 3 次检测全部为阳性。

**【特异性检验】** 将其它禽类病毒包括 H7 和 H9 亚型禽流感病毒、新城疫病毒(NDV)、减蛋综合征病毒(EDS-76V)、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)、鸭瘟弱毒疫苗株、鸭病毒性肝炎弱毒疫苗株, 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; 特异性质控样品均由中国动物疫病预防控制中心提供。用试剂盒检测 15 份特异性质控样品, 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 H5 亚型禽流感病毒的 RNA 进行检测。用于可能感染 H5 亚型禽流感病毒禽的咽拭子、泄殖腔拭子、肌肉组织、脑、喉气管等病料和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 用法

##### 1.1 样本采集、保存及运输

###### 1.1.1 样品采集

1.1.1.1 器材要求 所有采集样品的器材必须经高压或干烤灭菌。

1.1.1.2 采集部位 病死或扑杀禽, 采集喉气管、脑、胸肌和心肌组织或采集咽拭子、泄殖腔拭子; 待检活禽, 采集咽拭子、泄殖腔拭子。

###### 1.1.1.3 采集方法

1.1.1.3.1 咽拭子 用棉拭子深入喉头口及上颚裂来回刮几次取咽喉分泌液, 取呼吸道分泌物或排泄物, 置 1ml 50% 甘油生理盐水中, 充分洗涤拭子, 然后在管壁挤干液体, 弃掉, 加入每毫升含 1 万单位链霉素和 1 万单位青霉素抗生素液 1 滴, 保存备用。

1.1.1.3.2 泄殖腔拭子 用棉拭子深入泄殖腔转 2 圈沾取粪便。置 1ml 50% 甘油生理盐水中, 充分洗涤拭子, 然后在管壁挤干液体, 弃掉, 加入每毫升含 1 万单位链霉素和 1 万单位青霉素抗生素液 1 滴, 保存备用。

1.1.1.3.3 组织样品 直接剪取喉气管、脑、胸肌和心肌样品约 2g, 放入无菌容器内即可。

1.1.2 样本保存 采集的样品在 2~8℃ 保存应不超过 24 小时; -70℃ 以下保存, 要避免反复冻融, 最多冻融 3 次。

1.1.3 样本运输 在 2~8℃ 运输, 并于 24 小时内运至检测地点。

##### 1.2 样本处理

1.2.1 咽拭子和泄殖腔拭子的处理 取 200μl 待检样品液, 置 1.5ml 无菌离心管中, 加入 200μl 变性液, 混匀。

1.2.2 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 400 $\mu$ l 变性液继续研磨。取 200 $\mu$ l 已研磨好的待检组织上清, 置 1.5ml 无菌离心管中, 再加入 200 $\mu$ l 变性液, 混匀。

1.2.3 阳性对照样品处理 取阳性对照样品 200 $\mu$ l, 置 1.5ml 无菌离心管中, 加入 200 $\mu$ l 变性液, 混匀。

1.2.4 阴性对照样品处理 取阴性对照样品 200 $\mu$ l, 置 1.5ml 无菌离心管中, 加入 200 $\mu$ l 变性液, 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, 颠倒 10 次, 混匀, 冰浴 15 分钟, 4 $^{\circ}$ C 13000 g 离心 15 分钟。取 300 $\mu$ l 上清置于新的经无菌 DEPC 水处理过的 1.5ml 无菌离心管中, 加入 300 $\mu$ l 异丙醇, 混匀, 置液氮 3 分钟或 -70 $^{\circ}$ C 冰箱中 30 分钟。室温融化, 4 $^{\circ}$ C 20000g 离心 20 分钟。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 1 周后倒掉, 将离心管倒扣于吸水纸上 1 分钟, 真空抽干 15 分钟。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+3)  $\mu$ l RT-PCR 反应液、0.3 $\times$ (N+3)  $\mu$ l RNA 酶抑制剂、0.2 $\times$ (N+3)  $\mu$ l 反转录酶、1 $\times$ (N+3)  $\mu$ l TaqDNA 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 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, 其中 2 管分别加入 2 $\mu$ l 阳性对照和阴性对照样品 RNA, 混匀。加入矿物油 1 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 分钟, 95 $^{\circ}$ C 3 分钟, 直接进入 95 $^{\circ}$ C 30 秒、50 $^{\circ}$ C 40 秒、72 $^{\circ}$ C 40 秒循环, 35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。

1.5 电泳 称 3g 琼脂糖置 500ml 锥形瓶中, 加入 1 倍 TAE 电泳缓冲液 200ml (取 4ml 50 倍 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。

2 判定 当阳性对照样品出现 545bp 扩增带、阴性对照样品无扩增带出现 (引物带除外) 时, 试验结果成立。被检样品出现 545bp 扩增带为禽流感病毒 H5 亚型阳性, 否则为阴性。

**【注意事项】** (1) 仅供体外诊断用。

(2) 所有用于检测的废弃物均放入含 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 $\rightarrow$ 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-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。用无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 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) 溴化乙锭溶液具有潜在的致癌性，应小心操作。若沾到皮肤或衣物上，应立即用大量清水冲洗。

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

**【规格】** 10 份/盒

**【贮藏与有效期】** 试剂盒中阴性对照样品和阳性对照样品在-20℃以下保存，有效期为 12 个月。RT-PCR 反应液、75%乙醇、RNA 酶抑制剂、TaqDNA 聚合酶、AMV 反转录酶在-20℃以下保存，其余组（成）份在 2~8℃保存，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 743 号发布。

## 禽流感病毒 H7 亚型病毒 RT-PCR 检测试剂盒

Qinliuganbingdu H7 Yaxing RT-PCR Jianceshijihe

Avian Influenza Virus Subtype H7 RT-PCR Detection Kit

本品系针对禽流感病毒 H7 亚型 HA 基因设计合成引物，采用了 RT-PCR 检测技术，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 倍 TAE 电泳缓冲液、上样缓冲液、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 16 种试剂组成。用于禽流感病毒 H7 亚型 RNA 的检测。

**【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) 阴性对照样品 无色液体，仅有少量悬浮物，装量为 700μl。
- (2) 阳性对照样品 无色液体，仅有少量悬浮物，装量为 700μl。
- (3) 变性液 无色透明液体，有臭味，装量为 7ml。
- (4) 醋酸钠溶液 无色透明液体，有酸味，装量为 350μl。
- (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，装量为 3.5ml。
- (6) 异丙醇 无色透明液体，有异味，装量为 3.5ml。
- (7) 75%乙醇 无色透明液体，无杂质，无沉淀，装量为 12ml。
- (8) 无菌 DEPC 水 无色透明液体，无杂质，无沉淀，装量为 900μl。

- (9) RNA 酶抑制剂 无色无味油性液体，装量为 15 $\mu$ l。
- (10) RT-PCR 反应液 无色无味液体，装量为 250 $\mu$ l。
- (11) AMV 反转录酶 无色无味油性液体，装量为 3 $\mu$ l。
- (12) *Taq*DNA 聚合酶 无色无味油性液体，装量为 12 $\mu$ l。
- (13) 矿物油 无色无味透明的油性液体，装量为 300 $\mu$ l。
- (14) 50 倍 TAE 电泳缓冲液 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 红色液体，无沉淀，装量为 100 $\mu$ l。
- (16) 上样缓冲液 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-PCR 反应液均应无菌生长。

**【敏感性检验】** 将禽流感病毒参考毒株 A/Duck/Hong Kong/301/78/ (H7N2) 和分离株 A/Chicken/Hebei /1/2002 (H7N2)、A/Chicken/Hebei /2/2002 (H7N2) 的灭活鸡胚尿囊液，作为灵敏度质控样品母液，1:100 稀释，分别标记为 P1、P2、P3，作为禽流感病毒 H7 亚型 RT-PCR 检测试剂盒检测的敏感性质控样品（由中国动物疫病预防控制中心提供）。用试剂盒检测 3 份敏感性质控样品，每份样品重复检测 3 次。判定合格标准为每份样品 3 次检测全部为阳性。

**【特异性检验】** 将其它禽类病毒包括 H5 和 H9 亚型禽流感病毒、新城疫病毒(NDV)、减蛋综合征病毒(EDS-76V)、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)、鸭瘟弱毒疫苗株、鸭病毒性肝炎弱毒疫苗株，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，均由中国动物疫病预防控制中心提供。用试剂盒检测 15 份特异性质控样品，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 H7 亚型禽流感病毒的 RNA 进行检测。用于可能感染 H7 亚型禽流感病毒禽的咽拭子、泄殖腔拭子、肌肉组织、脑、喉气管等病料和鸡胚尿囊液以及细胞培养物中 H7 亚型禽流感病毒 RNA 的检测和鉴定。

#### **【用法与判定】** 1 用法

##### 1.1 样本采集、保存及运输

###### 1.1.1 样品采集

1.1.1.1 器材要求 所有采集样品的器材必须经高压或干烤灭菌。

1.1.1.2 采集部位 病死或扑杀禽，采集喉气管、脑、胸肌和心肌组织或采集咽拭子、泄殖腔拭子；待检活禽，采集咽拭子、泄殖腔拭子。

###### 1.1.1.3 采集方法

1.1.1.3.1 咽拭子 用棉拭子深入喉头口及上颚裂来回刮几次取咽喉分泌液，取呼吸道分泌物或排泄物，置 1ml 50% 甘油生理盐水中，充分洗涤拭子，然后在管壁挤干液体，弃掉，加入每毫升含 1 万单位链霉素和 1 万单位青霉素抗生素液 1 滴，保存备用。

1.1.1.3.2 泄殖腔拭子 用棉拭子深入泄殖腔转 2 圈沾取粪便。置 1ml 50% 甘油生理盐水中，充分洗涤拭子，然后在管壁挤干液体，弃掉，加入每毫升含 1 万单位链霉素和 1 万单位青霉素抗生素液 1 滴，保存备用。

1.1.1.3.3 组织样品 直接剪取喉气管、脑、胸肌和心肌样品约 2g，放入无菌容器内即可。

1.1.2 样本保存 采集的样品在 2~8℃保存应不超过 24 小时；-70℃以下保存，要避免反复冻融，最多冻融 3 次。

1.1.3 样本运输 2~8℃运输，并于 24 小时内运至检测地点。

## 1.2 样本处理

1.2.1 咽拭子和泄殖腔拭子的处理 取 200μl 待检样品液，置 1.5ml 无菌离心管中，加入 200μl 变性液，混匀。

1.2.2 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 1.5ml 无菌离心管中，再加入 200μl 变性液，混匀。

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

1.2.4 阴性对照样品处理 取阴性对照样品 200μl，置 1.5ml 无菌离心管中，加入 200μl 变性液，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 μl、酚/氯仿/异戊醇混合液 300 μl，颠倒 10 次，混匀，冰浴 15 分钟，4℃ 13000 g 离心 15 分钟。取 300μl 上清置于新的经无菌 DEPC 水处理过的 1.5ml 无菌离心管中，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℃ 20000g 离心 20 分钟。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 1 周后倒掉，将离心管倒扣于吸水纸上 1 分钟，真空抽干 15 分钟。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×(N+3) μl RT-PCR 反应液、0.3×(N+3) μl RNA 酶抑制剂、0.2×(N+3) μl 反转录酶、1×(N+3) μl TaqDNA 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 23μl 分配至薄壁 PCR 管中。根据标记分别加入 2μl 提取的样品 RNA，其中 2 管分别加入 2μl 阳性对照和阴性对照样品 RNA，混匀。加入矿物油 1 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℃ 45 分钟，95℃ 3 分钟，直接进入 95℃ 30 秒、50℃ 40 秒、72℃ 40 秒循环，35 个循环后，72℃延伸 10 分钟。

1.5 电泳 称 3g 琼脂糖置 500ml 锥形瓶中，加入 1 倍 TAE 电泳缓冲液 200ml（取 4ml 50 倍 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 30 分钟，紫外灯下观察结果，照相。

2 判定 当阳性对照样品出现 634bp 扩增带、阴性对照样品无扩增带出现（引物带除外）时，试验结果成立。被检样品出现 634bp 扩增带为禽流感病毒 H7 亚型阳性，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。用无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 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) 溴化乙锭溶液具有潜在的致癌性，应小心操作。若沾到皮肤或衣物上，应立即用大量清水冲洗。

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

**【规格】** 10 份/盒

**【贮藏与有效期】** 试剂盒中阴性对照样品和阳性对照样品在 -20℃ 以下保存，有效期为 12 个月。RT-PCR 反应液、75% 乙醇、RNA 酶抑制剂、TaqDNA 聚合酶、AMV 反转录酶在 -20℃ 以下保存，其余组（成）份在 2~8℃ 条件下保存，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 743 号发布。

**牙鲆鱼溶藻弧菌、鳎弧菌、迟缓爱德华菌病多联抗独特型抗体疫苗**

Yapingyu Rongzaohujun Manhujun Chihuanaidhuaajunbing Duolian

Kangdutexingkangtiyimiao

Combined *Vibrio Alginolytica*. *Vibrio Anguillarum* and *Edwardsiella* disease Anti-idiotypic Antibody Vaccine

本品系用能稳定分泌溶藻弧菌抗独特型单克隆抗体的杂交瘤细胞 1B2 株和 2F4 株、分泌鳎弧菌抗独特型单克隆抗体的杂交瘤细胞 1E10 株和 1D1 株、分泌迟缓爱德华菌抗独特型单克隆抗体的杂交瘤细胞 1E11 株，分别接种适宜的培养基培养后，转入生物反应器培养，收获培养物，离心取上清，混合制成。用于预防牙鲆鱼溶藻弧菌、鳎弧菌、迟缓爱德华菌病。

**【性状】** 粉红色块状固体，加生理盐水后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【安全检验】** 用体重 5~7g、4~5 月龄牙鲆鱼 200 尾，其中 100 尾分别腹腔内注射 10 倍剂量疫苗；另外 100 尾不接种疫苗作对照，同条件饲养，观察 30 日，应全部存活。若有非特异死亡应不超过 10 尾，且免疫组非特异性死亡不得超过对照组。

**【效力检验】** 用注射型和浸泡型疫苗分别经腹腔内注射和浸泡免疫接种体重 5~7g、4~5 月龄的牙鲆鱼各 100 尾。30 日后，分别各取 60 尾。随机各分成 3 组，每组 20 尾，每组连同对照 10 尾，分别用溶藻弧菌（ATCC33838）株、鳃弧菌（ATCC19106）株，迟缓爱德华菌（ATCC23657）株腹腔注射攻击牙鲆鱼，每尾注射 0.1ml（含 5 个 LD<sub>50</sub>）。观察 7 日，对照组应至少 70% 死亡；接种注射型疫苗组，保护率至少应为 60%；接种浸泡型疫苗组，保护率至少应为 30%。

保护率（%）=（1—免疫组死亡率/对照组死亡率）×1000%

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于预防牙鲆鱼溶藻弧菌、鳃弧菌、迟缓爱德华菌病。免疫期为 5 个月。

**【用法与用量】** 注射型疫苗 用注射用生理盐水将每一瓶内的疫苗稀释到 25ml。再将 25ml 的不完全佐剂与 25ml 疫苗混合搅匀，取体重 5~7g、4~5 月龄的幼鱼，用 1ml 的注射器进行接种，每尾腹腔注射 50μl，含疫苗量为 3.75μg。

浸泡型疫苗 用生理盐水将药盒内 3 只瓶内的疫苗溶解混合后，倒入装有 90 升海水的容器内充分搅匀，将体重 5~7g、4~5 月龄的幼鱼 1000 尾，分 2~3 批放入其中浸泡，每批浸泡 30 分钟，如一次浸泡不完，可分几批浸泡。每尾鱼的疫苗量为 11.25μg

**【不良反应】** 无。

**【注意事项】** （1）本品仅用于接种健康鱼。

（2）接种、浸泡前应停食至少 24 小时。浸泡时向海水内充气。

（3）注射型疫苗使用时应将疫苗和等量的不完全佐剂充分混合。浸泡型疫苗倒入海水后也要充分搅拌，使疫苗均匀分布于海水中。

（4）不完全佐剂在 2~8℃ 储藏。疫苗开封后，应限当日用完。

（5）注射接种时，抓鱼最好带上细线布手套，而且轻抓轻放，尽量避免因操作对鱼造成损伤。

（6）接种疫苗时，应使用 1ml 的一次性注射器。注射中应注意避免针孔堵塞。

（7）浸泡的海水温度在 15~20℃ 为好。

**【规格】** 1000 尾份/盒。注射型疫苗 每盒含 1 只瓶，瓶内装有 3.75mg 多联疫苗。  
浸泡型疫苗 每盒含 3 只瓶，每只瓶内装有 3.75mg 多联疫苗。

**【贮藏与有效期】** -25℃ 以下保存，有效期为 11 个月。

#### 附注：不完全佐剂制备及其检验办法和标准

##### 1 不完全佐剂制备办法

###### 1.1 组成成分 羊毛脂、石蜡油

1.2 配方 羊毛脂和石蜡油的体积比为 1:9。

1.3 配制方法 按以上比例,将羊毛脂与石蜡油装到三角烧瓶内,加热、摇荡,使两者混匀。高压灭菌。在室温下放置使其温度降到室温后,在 2~8℃ 保存备用。

## 2 不完全佐剂检验办法和标准

2.1 性状检测 用肉眼检测,不完全佐剂为淡黄色清亮液体。

2.2 无菌检验 按现行《中国兽药典》附录进行检验,应无菌生长。

2.3 安全检测 取体重 5~7g、4~5 月龄牙鲆鱼 40 尾,其中 20 尾腹腔内注射 50μl 不完全佐剂;另外 20 尾不接种作为对照,同条件饲养,观察 30 日,应全部存活。若有非特异死亡应不超过 2 尾,且接种组非特异性死亡不得超过对照组。

### 附加说明:

1. 本标准由北京卓越海洋生物科技有限公司、中国人民解放军第四军医大学提出。

2. 本标准于 2006 年 11 月 24 日经农业部公告第 750 号发布。

## 禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制试验抗原、阳性血清与阴性血清

Qinliuganbingdu H9 Yaxing Xueningyizhishiyan Kangyuan Yangxing Xueqing Yu Yinxing

Xueqing,

Avian Influenza Virus Hemagglutination Inhibition Test Antigen, Positive Sera and Negative Sera

抗原系用 A 型禽流感病毒 A/Chicken/Shanghai/1/98 (H9N2) 株接种 SPF 鸡胚,收获感染鸡胚液,经纯化、甲醛溶液灭活后,加适宜稳定剂,经冷冻真空干燥制成。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 亚型灭活疫苗接种 SPF 鸡,采血、分离血清,经冷冻真空干燥制成;阴性血清系用 SPF 鸡血清,经冷冻真空干燥制成。用于禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制试验对照。

### 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% 鸡红细胞凝集价应 $\geq 1:256$ 。

**【特异性】** 在同一条件下,分别与禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒阳性血清进行 HI 试验,仅与禽流感病毒 H9 亚型阳性血清呈阳性反应 (HI 效价应 $\geq 1:256$ ),与其他亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒阳性血清应为阴性反应 (HI 效价 $\leq 1:4$ )。

**【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。

**【作用与用途】** 用于血凝抑制试验检测禽流感病毒 H9 亚型抗体。

**【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,依次横向做 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纽扣状时判定结果。

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, 表示 1 个血凝 (HA) 单位。

## 2 血凝抑制 (HI) 试验操作方法

2.1 根据 HA 测定的效价, 计算配制 4 个血凝单位 (4HAU) 抗原。

2.2 反应板中, 在第 1 孔至第 11 孔中每孔加入 0.025ml PBS; 在第 12 孔中每孔加入 0.05ml PBS;

2.3 第 1 孔中加入 0.025ml 血清, 在反应板上将血清作横向 0.025ml 的对倍稀释至第 10 孔;

2.4 在第 1 孔至第 11 孔中, 每孔加入 0.025ml 的 4 HAU 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 结果判定 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。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 ≤ 1:4 判为阴性; 等于 1:8 判为可疑 (可疑样品应重检 1 次, 重检效价 ≥ 1:8 判为阳性, 小于 1:8 判为阴性); ≥ 1:16 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 值为 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】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, HI 效价应在 1:256~1:512 之间。

**【特异性检验】** 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 HI 试验, 仅与禽流感病毒 H9 亚型抗原呈阳性反应 (HI 效价应 ≥ 1:256), 与其他亚型禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原应为阴性反应 (HI 效价 ≤ 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】** 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】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，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。

**【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。

#### 附加说明：

1. 本标准由青岛易邦生物工程有限公司提出。
2. 本标准于 2006 年 11 月 29 日经农业部公告第 752 号发布。

## 猪传染性胸膜肺炎三价灭活疫苗

Zhu Chuanranxingxiongmo-feiyan Sanjia Miehuoyimiao

Swine Infectious Pleuropneumonia Trivalent vaccine, Inactivated

本品系用猪胸膜肺炎放线杆菌 (APP) 血清 1 型 JL9901 菌株、血清 2 型 XT9904 菌株和血清 7 型 GZ9903 菌株，分别接种适宜培养基培养，收获培养物，经甲醛溶液灭活后，与油佐剂混合乳化制成。用于预防 1、2、7 型猪胸膜肺炎放线杆菌引起的猪传染性胸膜肺炎。

**【性状】** 外观 乳白色乳剂。

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

**稳定性** 取疫苗装于试管内，以 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》附录进行检验，应无菌生长。

**【安全检验】** 用 35~40 日龄健康仔猪 (APP 间接血凝抗体效价 $\leq 1:4$ ) 4 头，各肌肉注射疫苗 4ml (2 个使用剂量)，观察 14 日，应无不良反应。

**【效力检验】** 取 35~40 日龄健康易感仔猪 (APP 间接血凝抗体效价 $\leq 1:4$ ) 12 头，分 3 组，每组 4 头，各颈部肌肉注射疫苗 2ml，免疫 28 日后，每组连同对照猪 4 头分别气管内注射 1 个最小发病剂量的血清 1 型 JL9901 菌株 (含活菌量约为  $1 \times 10^8$  CFU)、2 型 XT9904

菌株（含活菌量约为 $2 \times 10^8$ CFU）、血清 7 型 GZ9903 菌株菌液（含活菌量约为 $2 \times 10^8$ CFU）各 2ml 进行攻击检验。观察 14 日，对攻击 APP1、2、7 血清型的每组免疫猪应至少保护 3 头，对照猪应全部发病。

**【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 1、2、7 型胸膜肺炎放线杆菌引起的猪传染性胸膜肺炎。免疫期为 6 个月。

**【用法与用量】** （1）肌肉注射。按瓶签注明头份，不论猪只大小，各种猪均每头份 2ml。（2）推荐免疫程序 仔猪 35~40 日龄进行第 1 次免疫接种，首免后 4 周加强免疫 1 次。母猪在产前 6 周和 2 周各注射 1 次，以后每 6 个月免疫 1 次。

**【不良反应】** 注射局部可能出现肿胀，短期可消退。一般情况下有轻微体温反应，但不引起流产、死胎和畸胎等不良反应，由于个体差异或者其它原因（如营养不良、体弱发病、潜伏感染、感染寄生虫、运输或环境应激、免疫机能减退等等），个别猪在注射后可能出现过敏反应，可用抗过敏药物（如地塞米松、肾上腺素等）进行治疗，同时采用适当的辅助治疗措施。

**【注意事项】** （1）本品适用于接种健康猪。

（2）疫苗瓶开封后应限当日用完。

（3）使用前应使疫苗达到室温；用前充分振摇；用于接种的工具应清洁无菌。

（4）对于爆发该病的猪场，应选用敏感药物拌料、饮水或注射，疫情控制后再全部注射疫苗。

（5）疫苗注射后，个别猪可能会出现体温升高、减食，注射部位红肿等不正常反应，一般很快自行恢复。

**【规格】** （1）4ml/瓶 （2）6ml/瓶 （3）20ml/瓶 （4）100ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为 12 个月。

#### 附注：发病的判定标准

攻毒猪同时出现如下反应者，判为发病：发病猪出现体温升高（40.5℃以上，持续 1~5 日）、精神萎靡、嗜睡、厌食、咳嗽、呼吸困难等临床症状，剖检可见肺部散在出血，胸腔和心包积液，后期（攻击 7 日后）可见胸膜和心包表面有纤维样渗出物。

#### 附加说明：

1. 本标准由华中农业大学、武汉科前动物生物制品有限责任公司、中牧实业股份有限公司提出。

2. 本标准于 2006 年 11 月 29 日经农业部公告第 752 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。

## 鸡衣原体病基因工程亚单位疫苗

Ji Yiyuantibing Jiyingongcheng Yadanweiyimiao

Chlamydia Psittaci Recombinant Vaccine

本品系用基因工程菌种 E.coli-CpsMOMP 发酵生产并提取纯化的免疫抗原成份鹦鹉热衣原体主要外膜蛋白 (MOMP) 加油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡衣原体病。

**【性状】** 外观 乳白色乳剂。

剂型 油包水型。取一清洁吸管，吸取少量疫苗滴于冷水中，应呈油滴状不扩散。

稳定性 在 37℃ 条件下放置 10 日或取疫苗 10ml 装于离心管中，以 3000r/min 离心 15 分钟，应不分层。

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 7~10 日龄 SPF 鸡 20 只，分成 2 组，第 1 组 10 只，各颈部皮下注射疫苗 0.4ml (2 个使用剂量)；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 21 日，均应健活。除第 1 组注射部位出现小结节外，应无其它不良反应，剖检所有鸡，喉头、气管、支气管、肺、输卵管等均无明显的肉眼病变。如果有非特异性死亡，对照组和免疫组均不得超过 1 只。

**【效力检验】** 用 7~10 日龄 SPF 鸡 20 只，分成 2 组，第 1 组 10 只，各颈部皮下注射疫苗 0.2ml (1 个使用剂量)；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。28 日后，将免疫组和对照组鸡分别腹腔注射鹦鹉热衣原体 BJF5 株菌液 0.5ml (含 5ELD<sub>50</sub>)，观察 14 日。对照鸡应至少 8 只发病或死亡 (判定标准见附注)。免疫鸡应至少保护 9 只。

**【作用与用途】** 用于预防鹦鹉热衣原体感染引起的鸡衣原体病。

**【用法与用量】** 颈部皮下或肌肉注射。5~7 日龄肉鸡，每只 0.2ml；80~90 日龄蛋鸡 (即开产前 14~28 日)，每只 0.5ml。

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】** (1) 鸡衣原体病鸡或健康状态异常的鸡切忌使用。

(2) 仅用于预防鸡衣原体病。

(3) 严禁冷冻或过热，使用前应先使疫苗达到室温并充分摇匀。

(4) 如出现破损、异物或破乳分层等异常现象切忌使用。

(5) 一经使用，限当日用完。

**【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。

### 附注：鸡衣原体病发病判定标准

- 脏器无肉眼可见病变，肺脏压片用衣原体单克隆抗体荧光染色，未见衣原体颗粒；

+ 剖检可见肺脏出现轻度纤维性渗出病变，肺脏压片用衣原体单克隆抗体荧光染色，

未见衣原体颗粒；

++ 喘式呼吸。剖检见肺脏出现明显纤维性渗出病变，肺脏压片用衣原体单克隆抗体荧光染色，可见衣原体颗粒；

+++ 喘式呼吸。剖检见肺脏有大量纤维性渗出物，严重心包膜炎，并与胸膜发生粘连。肺脏压片用衣原体单克隆抗体荧光染色，可见大量衣原体颗粒；

++++ 试验鸡死亡，临床体症和病理检查同（++++）。

“++”以上判为发病。

#### 附加说明：

1. 本标准由中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病研究所、北京市兽医生物药品厂提出。

2. 本标准于 2006 年 11 月 29 日经农业部公告第 752 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。

### 猪细小病毒病灭活疫苗（WH-1 株）

Zhu Xixiaobingdubing Miehuoyimiao (WH-1 Zhu)

Swine Parvovirus Vaccine, Inactivated (WH-1 Strain)

本品系用猪细小病毒强毒 WH-1 株接种猪肾传代细胞（PK-15 或 IBRS-2）增殖，收获病毒液，经甲醛溶液灭活后，加矿物油佐剂乳化制成。用于预防猪细小病毒病。

**【性状】** 外观 乳白色乳剂。

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 10ml 疫苗装于试管内，以 3000r/min 离心 15 分钟，应不出现破乳现象，但允许出现轻微分层，管底析出水相层深度不超过 0.5ml 为合格。

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 10~20kg 猪细小病毒 HI 抗体阴性（HI 抗体效价 $\leq 8$ ）猪 2 头，各深部肌肉注射疫苗 4ml（2 头份），观察 14 日，应无不良反应。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

（1）用体重为 350g 以上、HI 抗体阴性（HI 抗体效价 $\leq 8$ ）豚鼠 4 只各肌肉注射疫苗 0.5ml。28 日后，连同对照豚鼠 2 只，采血，分离血清，测定抗体，对照豚鼠应为阴性，免疫豚鼠至少应有 3 只出现抗体反应，其 HI 效价应 $\geq 64$ 。

（2）用猪细小病毒 HI 抗体阴性（HI 抗体效价 $\leq 8$ ）猪 4 头，各肌肉注射疫苗 2ml（1 头份）。28 日后，连同对照猪 2 头，采血，分离血清，测定抗体，对照猪应为阴性，免疫猪应全部出现抗体反应，其 HI 效价应 $\geq 64$ 。

**【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】** 用于预防猪细小病毒病。免疫期为6个月。

**【用法与用量】** (1) 使用前使疫苗恢复到室温并充分摇匀。

(2) 颈部肌肉注射，每头份2ml。

(3) 推荐免疫程序为 初产母猪5~6月龄免疫1次，2~4周后加强免疫1次；经产母猪于配种前3~4周免疫1次；公猪每年免疫两次。

**【不良反应】** 无不良反应。

**【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) 疫苗使用前应认真检查，如出现破乳、变色、包装瓶有裂纹等均不可使用。

(3) 疫苗应在表明的有效期内使用。使用前必须摇匀。疫苗瓶开封后，应于当日用完，切忌冻结和高温。

(4) 应对注射部位进行严格消毒。

(5) 剩余的疫苗及用具，应经消毒处理后废弃。

(6) 怀孕母猪不宜使用。

(7) 其它注意事项见兽用生物制品一般注意事项。

**【规格】** (1) 4ml/瓶 (2) 6ml/瓶 (3) 20ml/瓶 (4) 100ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为12个月。

#### 附注：1 猪细小病毒血凝抑制抗体效价（HI）测定

1.1 待检血清的处理 取100μl待检血清，56℃水浴灭活30分钟后，加入300μl 25%白陶土悬液，混匀后室温作用30分钟，10000r/min离心5分钟，吸取上清，加入100μl 20%豚鼠红细胞泥，振荡混匀后37℃作用1小时，6000r/min离心5分钟，收集上清即为1:4稀释后的血清样品。

1.2 试验操作 在96孔血凝反应板每孔加入50μl生理盐水，红细胞对照孔加100μl，随后在第1孔中加入经处理的待检血清50μl，混匀后取出50μl加到第2孔中，依此类推，直到第10孔，弃去50μl，此时待检血清的稀释度分别为1:8、1:16、...、1:4096。除红细胞对照孔外，每孔再加入4×血凝单位的猪细小病毒液50μl，此时第11孔即为病毒对照孔，振荡后37℃作用1小时，然后每孔加入1%豚鼠红细胞悬液50μl，振荡混匀后置室温（25℃）作用2小时，观察结果。

1.3 结果判定 能抑制50%红细胞凝集的血清最高稀释倍数为被检血清血凝抑制抗体效价。

#### 附加说明：

1. 本标准由华中农业大学、武汉科前动物生物制品有限责任公司、中牧实业股份有限公司提出。

2. 本标准于2006年11月29日经农业部公告第752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。

## 鸡新城疫血凝抑制试验抗原、阳性血清与阴性血清

Jixinchengyi Xueningyizhishiyan Kangyuan,

Yangxingxueqing Yu Yinxingxueqing

Newcastle Disease Hemagglutination Inhibition Test Antigen, Positive Sera and Negative Sera

抗原系用鸡新城疫病毒 La Sota 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, 经冷冻真空干燥制成。用于血凝抑制 (HI) 试验检测鸡新城疫抗体。

阳性血清系用鸡新城疫灭活疫苗接种 SPF 鸡, 采血、分离血清; 阴性血清系用 SPF 鸡血清, 加适宜稳定剂, 经冷冻真空干燥制成。用于鸡新城疫血凝抑制试验对照。

### 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】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 对 1% 鸡红细胞的凝集 (100% 凝集) 价, 应  $\geq 1:512$ 。

**【特异性检验】** 抗原的 HA 特性应能被 ND 抗血清抑制, 而不能被 AI、EDS 阳性血清、PBS、小牛血清抑制。

**【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】** 用于血凝抑制试验检测鸡新城疫抗体。

**【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 溶液;

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; 为精确计算血凝单位, 病毒悬液开始需作一系列密集稀释, 如 1/3, 1/4, 1/5, 1/6 等。

1.3 每孔加 0.025ml PBS 溶液;

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, 当对照孔的红细胞显著呈纽扣状时判定结果。

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。表示 1 个 HA 单位 (HAU), 再根据开始的稀释倍数精确计算血凝效价。

2 血凝抑制 (HI) 试验操作方法

2.1 根据 HA 测定的效价, 计算配制 4 个血凝单位 (4HAU) 抗原。

2.2 反应板中每孔加入 0.025ml PBS;

2.3 第 1 孔中加入 0.025ml 血清。

2.4 在反应板上将血清作横向 0.025ml 的对倍稀释, 至第 10 孔;

2.5 在第 1 至第 11 孔中, 每孔加入 0.025ml 的 4 HAU 抗原, 室温下 (20~25℃) 静

置 30 分钟或 2~8℃45~60 分钟。

2.6 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。

2.7 结果判定 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。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 $\leq$ 1:4 判为阴性; 等于 1:8 判为可疑 (可疑样品应重检, 重检效价 $\geq$ 1:8 判为阳性,  $<$ 1:8 判为阴性);  $\geq$ 1:16 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】** 2~8℃保存, 有效期为 24 个月。

#### 阳性血清

**【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】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 阳性血清的血凝抑制 (完全抑制) 效价应 $\geq$ 1:512。

**【特异性检验】** 将鸡新城疫阳性血清在同一条件下, 分别与 ND、EDS、AI 抗原进行红细胞凝集抑制试验, 仅与 ND 抗原呈阳性反应 (HI $\geq$ 1:256), 与 EDS、AI 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】** 2~8℃保存, 有效期为 24 个月。

#### 阴性血清

**【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】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定, HI 效价应 $\leq$ 1:4。

**【特异性检验】** 用微量法进行 HI 试验。血清对鸡新城疫、禽流感和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。

**【规格】** (1) 1ml/瓶 (2) 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存, 有效期为 24 个月。

**附加说明:**

1. 本标准由青岛易邦生物工程有限公司提出。
2. 本标准于 2006 年 12 月 12 日经农业部公告第 780 号发布。

## 鸡毒支原体、传染性鼻炎（A、C 型）二联灭活疫苗

Jiduzhiyuanti Chuanranxingbiyan (A, C Xing) Erlian Miehuoyimiao

Mycoplasma gallisepticum and Coryza (A, C serotypes) Vaccine, Inactivated

本品系用鸡毒支原体 R 株、副鸡嗜血杆菌 A 型 221 株和 C 型 668 株分别接种适宜培养基培养, 收获培养物, 经甲醛溶液灭活浓缩后, 按适当比例加矿物油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡传染性鼻炎和鸡毒支原体引起的慢性呼吸道疾病。

**【性状】** 外观 乳白色乳状液。

剂型 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 吸取疫苗 10ml 加入离心管中, 以 3000r/min 离心 15 分钟, 管底析出的水相应  $\leq 0.5\text{ml}$ 。

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, 并增加适宜培养基 (见附注 1) 培养, 均应无菌生长。

**【安全检验】** 用 2~3 周龄 SPF 鸡 10 只, 每只肌肉或皮下注射疫苗 1ml, 观察 14 日, 应不出现因注射疫苗而产生的局部或全身反应。

**【效力检验】** (1) 鸡毒支原体部分 用 2 月龄左右 SPF 母鸡 10 只, 各皮下注射疫苗 0.5ml, 21 日后, 连同对照组 10 只, 每只鸡经气囊注射鸡毒支原体 R 株 (MG-R) 强毒 0.2ml (含  $1 \times 10^8$  个 CFU), 观察 14 日, 剖杀所有鸡, 统计气囊的损伤程度, 免疫组气囊保护率应  $\geq 75\%$ 。(判定标准见附注 2 和附注 3)。

(2) 鸡传染性鼻炎部分 用 2 月龄左右 SPF 母鸡 20 只, 各皮下注射疫苗 0.5ml, 21 日后, 连同对照鸡 20 只, 均分为 2 组, 1 组经眶下窦注射鸡副嗜血杆菌 221 株菌液 0.2ml ( $1 \times 10^7$  个 CFU/ml); 另一组经眶下窦注射副鸡嗜血杆菌 668 株菌液 0.2ml ( $1 \times 10^7$  个 CFU/ml); 观察 7 日。对照组均至少 8 只发病 (流鼻涕, 眼睑肿胀), 而免疫组均至少 8 只保护。

**【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】** 用于预防鸡传染性鼻炎和鸡毒支原体引起的慢性呼吸道疾病。

**【用法与用量】** 颈部皮下注射或肌肉注射。10~20 日雏鸡, 每只 0.3ml; 成鸡于开产前接种, 每只 0.5ml; 12 月龄以上肉、蛋、种鸡强化免疫每只 1.0ml。

**【不良反应】** 无。

**【注意事项】** (1) 健康状况异常的鸡切忌使用。

(2) 注射器具应灭菌, 接种时应及时更换针头, 最好 1 只鸡 1 个针头。

- (3) 本品不能冻结和加热。
- (4) 使用前应将疫苗恢复到常温并充分摇匀。
- (5) 如出现破损、异物或破乳分层等异常现象，切勿使用。
- (6) 疫苗启封后，限当日用完。
- (7) 屠宰前 28 日内禁止使用。

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

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期 12 个月。

### 附注：1 培养基配方

#### 1.1 鸡毒支原体 (MG) 选择培养基

##### 1.1.1 牛心汤培养基 (pH 值为 8.3)

50%牛心浸汁	1000ml	葡萄糖	3g
蛋白胨	10g	25%酵母浸汁	40ml
NaCl	5g	1%酚红	2ml (可不加)
4%辅酶 I (或烟酰胺)	10ml	10%醋酸铊	5ml
血清 (鸡、猪、马)	120ml	青霉素	100 万 IU

1.1.2 牛心汤琼脂培养基 用上述完全培养基 100ml，加入 1.4g 琼脂 (或琼脂糖)，煮沸灭菌后，制成 1.4%琼脂培养鉴定平板 (15ml/板)，备鸡毒支原体 R 株鉴定和计数用。

#### 1.2 副鸡嗜血杆菌培养基 (pH 值 7.2)

##### 1.2.1 鸡肉汤培养基

25%鸡胸肉浸汁	1000ml	4%辅酶 I (或烟酰胺)	10ml
胰蛋白胨	5g	鸡血清	50ml
大豆蛋白胨	5g	蔗糖	10g
氯化钠	5g		

1.2.2 鸡肉汤琼脂培养基 完全鸡肉汤培养基 100ml，加入琼脂 (或琼脂糖) 1.4g，煮沸，灭菌后，分倒平板 (15ml/板)，用于副鸡嗜血杆菌鉴定和计数。

### 2 对鸡毒支原体保护的判定

气囊损伤差异 试验鸡在 MG 强毒攻击 2 周后，剖检胸、腹气囊可见明显损伤差异。按 H.W.Yoder 氏气囊损伤评分标准评价，免疫组鸡大部分气囊无损伤 (0 级)，或少数鸡轻度损伤 (1 级)；而对照组鸡气囊损伤则在 1~3 级范围，按 Yoder 氏计算公式计算保护率大于 75%。

### 3 对鸡毒支原体发病的判定

气囊损伤的判定标准和保护率计算方法，按 H·W·Yode 氏的气囊损伤标准分为 5 个等级积分：

0 级 表示正常气囊，清洁透明而薄，计 0 分；

1 级 表示气囊稍有增厚和轻度混浊，或在个别局部有黄白色水样斑点，计 1 分；

2 级 表示在气囊的部分区域有显而易见的灰白色或黄白色渗出物，同时伴有中度增厚，计 2 分；

3级 表示大部分气囊布满黄白色干酪样渗出物和气囊炎，计3分；

4级 表示出现严重的气囊炎，整个气囊布满干酪样渗出物，气囊增厚似典型乳白塑料布样，计4分。

在记录每只试验鸡的气囊损伤计分后，按免疫组和对照组算出对照组鸡气囊损伤计分均值和免疫组鸡的气囊损伤计分均值，按下列公式计算免疫保护率：

$$\text{气囊损伤保护率} = \frac{\text{对照鸡气囊损伤分均值} - \text{免疫鸡气囊损伤分均值}}{\text{对照鸡气囊损伤分均值}} \times 100\%$$

#### 附加说明：

1. 本标准中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提出。
2. 本标准于2006年12月12日经农业部公告第780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。

## 鸡新城疫病毒（La Sota 株）、传染性支气管炎病毒（M41 株）二联灭活疫苗

Jixinchengyibingdu (La Sota Zhu) Chuanranxingzhiqiguanyanbingdu (M41 Zhu) Erlian Miehuoyimiao

Newcastle Disease Virus (La Sota Strain) and Infectious Bronchitis Virus (M41 strain) Vaccine, Inactivated

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株、传染性支气管炎病毒 M41 株分别接种易感鸡胚，收获感染胚液，超滤浓缩，经甲醛溶液灭活后，按一定比例混合，与矿物油佐剂乳化制成。用于预防鸡新城疫和鸡传染性支气管炎。

**【性状】** 外观 乳白色均匀乳剂。

剂型 呈油包水型。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 吸取疫苗 10ml 加入离心管中，以 3000r/min 离心 15 分钟，管底析出的水相应 ≤0.5ml。

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 2~3 周龄的 SPF 鸡 10 只，各肌肉或皮下注射疫苗 1.0ml，观察 14 日，应不出现因注射疫苗而引起的任何局部和全身反应。

**【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 20μl，另 5 只作对照。接种后 21~28 日，每只鸡各采血，分离血清，进行 HI 抗体效价测定。免疫组 HI 抗体效价的几何平均值应 ≥4log<sub>2</sub>，未免疫对照组 HI 抗体效价的几何平均值应 ≤2log<sub>2</sub>。

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, 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强毒 10<sup>5.0</sup>ELD<sub>50</sub>, 观察 14 日。对照组应全部死亡, 免疫组应保护至少 7 只。

(2) 鸡传染性支气管炎部分 用 3~4 周龄 SPF 鸡 10 只, 点眼接种鸡传染性支气管炎活疫苗 (H120) 1 羽份, 21 日后, 分别采血, 各加强免疫接种 (肌肉注射) 灭活疫苗 1 羽份, 28 日后, 分别采血。将两次血清分别做 HI 试验 (抗原标准见附注 1; 操作规程见附注 2)。若二免血清的 HI 抗体几何平均滴度较首免接种血清 HI 抗体几何平均滴度高 3 倍以上时, 疫苗鸡传染性支气管炎部分判合格。

**【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。

**【作用用途】** 用于预防鸡新城疫和鸡传染性支气管炎。免疫期为 4 个月。

**【用法用量】** 皮下或肌肉注射, 2~4 周龄鸡, 每只 0.3ml; 成鸡每只 0.5ml。

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】** (1) 用前和使用中应充分摇匀。

(2) 用前应使疫苗温度升至室温。

(3) 一经开瓶启用, 应尽快用完 (限当日用完)。

(4) 本品严禁冻结, 破乳后切勿使用。

(5) 仅供健康鸡只预防接种。

(6) 接种工作完毕, 双手应立即洗净并消毒, 疫苗瓶及剩余的疫苗, 应以燃烧或煮沸破坏, 并做无害化处理。

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

**【贮藏与有效期】** 2~8 $^{\circ}$ C 保存, 有效期为 12 个月。

#### 附注: 1. 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验抗原质量标准

本品系用鸡传染性支气管炎病毒 M41 株制备的血凝抑制抗原。所用 IB-HI 抗原应达到如下标准:

**【性状】** 无色疏松团块, 加稀释液后迅速溶解。

**【效价测定】** 按标识体积稀释后, HA 效价应 $\geq$ 1:128。

**【特异性检验】** 抗原与阴性血清、鸡新城疫、禽流感、减蛋综合征等病毒阳性血清的 HI 效价应 $\leq$ 3log<sub>2</sub>。

**【作用和用途】** 用于鸡传染性支气管炎血凝抑制抗体的检测。

**【规格】** 1ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8 $^{\circ}$ C 保存, 有效期为 180 个月。

#### 2 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验操作方法

##### 2.1 鸡传染性支气管炎 HI 抗原工作液配制

2.1.1 鸡传染性支气管炎 HI 抗原血凝价测定 取 96 孔 V 型微量反应板 1 块, 每孔加 25 $\mu$ l PBS 溶液 (0.01mol/L, pH 值为 7.0~7.4), 第一排加 25 $\mu$ l 抗原, 并做 2~4 个重复孔,

然后将抗原进行 2 倍系列稀释，稀释后每孔再加入 25 $\mu$ l PBS，最后再加入 1% 鸡红细胞悬液 25 $\mu$ l，用微量振荡器混匀，2~8 $^{\circ}$ C 静置 40 分钟判定结果，以使 100% 红细胞凝集的抗原最高稀释倍数作为判定终点。

### 2.1.2 鸡传染性支气管炎 HI 抗原工作液配制

2.1.2.1 4HA 单位抗原的配制 根据测定的 HI 抗原 HA 效价，用 PBS 溶液配制 4HA 单位抗原。将配制好的 4HA 单位抗原用 PBS 稀释，使其稀释度为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7。在每一稀释度的 25 $\mu$ l 抗原中加 25 $\mu$ l PBS，再加入 1% 鸡红细胞悬液 25 $\mu$ l，混匀，2~8 $^{\circ}$ C 静置 40 分钟，判定结果。如果 1:4 稀释为 100% 红细胞凝集终点，表明配制的是 4HA 单位抗原；如果 100% 红细胞凝集终点是 1:5 或 1:6，表明配制的 4HA 单位抗原实际上是高于 4 个单位；如果 100% 红细胞凝集终点是 1:2 或 1:3，表明配制的 4HA 单位抗原实际上是低于 4 个单位。应根据检验结果适当调整，使抗原工作液为 4HA 单位。

### 2.2 血凝抑制试验 (HI)

2.2.1 取 96 孔 V 型微量反应板，每孔加 25 $\mu$ l PBS 溶液。

2.2.2 分别吸取 25 $\mu$ l 待检血清，加至每块板的第一排各相应孔内，并在每块板上设标准阳性血清和阴性血清对照，然后 2 倍系列稀释。

2.2.3 分别向各孔中加入含 4HA 单位的抗原 25 $\mu$ l，2~8 $^{\circ}$ C 静置 30 分钟。

2.2.4 每孔中加入 1% (V/V) 鸡红细胞悬液 25 $\mu$ l，轻轻混匀，2~8 $^{\circ}$ C 静置 40 分钟。

2.2.5 结果判定 将反应板倾斜，凡血清反应孔与红细胞对照孔中红细胞以同样速度从孔底流淌者判为血凝抑制。当阴性血清 HI 效价 $\leq 3\log_2$ 、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差 $\leq 1\log_2$ 时，试验方可成立。以完全抑制 4HA 单位抗原的血清最高稀释度作为 HI 效价。

#### 附加说明:

1. 本标准由洛阳普莱柯生物工程股份有限公司提出。
2. 本标准于 2007 年 1 月 25 日经农业部公告第 804 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。
5. 删除附注 1 帽子中的“因目前国内暂无商品化的 IB-HI 抗原，暂采用国际通用的进口的 IB-HI 抗原”——已经规定了 IB-HI 抗原标准，凡符合该标准的抗原，均可使用。

## 猪伪狂犬病病毒 ELISA 抗体检测试剂盒

Zhu Weikuanguanbingbingdu Meilianmianyixifushiyan Kangtijiancangshijihe

ELISA Kit For Swine Pseudorabies Virus Antibodies

本品系用纯化的猪伪狂犬病病毒抗原包被的酶标板，并配以阳性血清、阴性血清、羊抗猪 IgG 酶标二抗、样品稀释液、20 倍浓缩洗涤液、底物 A 液、底物 B 液及终止液组装而成。用于检测猪伪狂犬病病毒抗体。

**【性状】** 试剂盒组成如下:

- (1) 抗原包被板系用锡箔袋包装，包装袋封闭良好，内附干燥剂 1 包，包被板孔底清

洁透明，无异物，96孔/块，2块/盒。

- (2) 阳性对照血清 橙黄或淡黄色透明液体，装量 0.5ml/管，1管/盒。
- (3) 阴性对照血清 橙黄或淡黄色透明液体，装量 0.5ml/管，1管/盒。
- (4) 羊抗猪酶标二抗 无色透明液体，装量 20ml/瓶，1瓶/盒。
- (5) 样品稀释液 无色透明液体，装量 50ml/瓶，1瓶/盒。
- (6) 底物 A 液 无色透明液体，装量 10ml/瓶，1瓶/盒。
- (7) 底物 B 液 无色透明液体，装量 10ml/瓶，1瓶/盒。
- (8) 终止液 无色透明液体，装量 10ml/瓶，1瓶/盒。
- (9) 20 倍浓缩洗涤液为无色透明液体，装量 30ml/瓶，1瓶/盒。
- (10) 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、羊抗猪酶标二抗、20 倍浓缩洗涤液、样品稀释液、底物 A 液、底物 B 液、终止液均应无菌生长。

**【敏感性检验】** 检测阳性参考样品和阴性参考样品，参考样品由 8 份不同稀释度的阳性血清，操作方法按“用法与判定”进行，每份参考样品的测定值，均应在合格范围内，合格标准见下表；阳性对照 OD<sub>630nm</sub> 值应 $\geq 1.0$ ，且 $\leq 2.0$ ；阴性对照 OD<sub>630nm</sub> 值应 $< 0.2$ 。

参考样品	OD <sub>630nm</sub> 值
1 : 5 稀释的阳性血清	$> 1.8$
1 : 10 稀释的阳性血清	$> 1.6$
1 : 20 稀释的阳性血清	$> 1.5$
1 : 40 稀释的阳性血清	$> 1.2$
1 : 80 稀释的阳性血清	$> 1.0$
1 : 160 稀释的阳性血清	$> 0.8$
1 : 320 稀释的阳性血清	$> 0.6$
1 : 640 稀释的阳性血清	$> 0.4$
阳性对照血清	应 $\geq 1.0$ ，且 $\leq 2.0$
阴性对照血清	$< 0.2$

**【特异性检验】** 检测 30 份阴性参考血清。操作方法按“用法与判定”进行，合格标准为全部检测为阴性；阳性对照 OD<sub>630nm</sub> 值应 $\geq 1.0$ ，且 $\leq 2.0$ ；阴性对照 OD<sub>630nm</sub> 值应 $< 0.2$ 。

**【作用与用途】** 用于检测猪伪狂犬病病毒抗体。

**【用法与判定】** (1) 用样品稀释液将待检血清样品 1 : 40 稀释后加入酶标板中，每孔加 100 $\mu$ l。同时设阴、阳性对照孔 (1 : 40 稀释)，每孔 100 $\mu$ l。轻轻振匀孔中样品 (勿溢出)，置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟；

(2) 甩掉板孔中的溶液，用洗涤液洗板 3 次，200 $\mu$ l /孔，每次静置 3 分钟倒掉，最后一次在吸水纸上拍干；

(3) 每孔加酶标二抗 (抗猪 IgG-HRP 酶标二抗) 100 $\mu$ l，置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟；

(4) 洗涤 5 次，方法同 2；

(5) 每孔加底物 A 液、B 液各 50 $\mu$ l，混匀，室温避光显色 10 分钟；

(6) 每孔加终止液 50 $\mu$ l, 15 分钟内测定结果;

(7) 判定 在酶标仪上测各孔 OD<sub>630nm</sub> 值。试验成立条件为阳性对照孔 OD<sub>630nm</sub> 值平均值 $\geq$ 1.0, 阴性对照孔 OD<sub>630nm</sub> 值平均值 $<$ 0.2。样品孔 OD<sub>630nm</sub> 值 $\geq$ 0.4 时, 判为阳性;  $<$ 0.4 判为阴性。

**【注意事项】** (1) 试剂盒使用前各试剂应平衡至室温。

(2) 请在试剂盒规定的有效期内使用。

(3) 微孔板拆封后避免受潮或沾水。

**【规格】** 192 孔/盒

**【贮藏与有效期】** 2~8 $^{\circ}$ C 保存, 有效期 6 个月。

**附加说明:**

1. 本标准由华中农业大学、武汉科前动物生物制品有限责任公司提出。
2. 本标准于 2007 年 3 月 14 日经农业部公告第 830 号发布。

## 鸡新城疫病毒 (La Sota 株)、传染性支气管炎病毒 (M41 株)、减蛋综合征病毒 (AV127 株) 三联灭活疫苗

Jixinchengyibingdu (La Sota Zhu) Chuanranxingzhiqiguanyanbingdu (M41 Zhu)

Jiandanzonghezhengbingdu (AV127 Zhu) Sanlian Miehuoyimiao

Newcastle Disease (La Sota Strain) Infectious Bronchitis (M41 Strain) and Egg Drop Syndrome (AV127 Strain) Vaccine, Inactivated

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株、鸡传染性支气管炎病毒 M41 株和鸡减蛋综合征病毒 AV127 株分别接种易感鸡胚或鸭胚, 收获感染胚液, 超滤浓缩, 经甲醛溶液灭活后, 按一定比例混合, 与矿物油佐剂乳化制成。用于预防鸡新城疫、鸡传染性支气管炎和鸡减蛋综合征。

**【性状】** 外观 乳白色均匀乳剂。

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

稳定性 吸取疫苗 10ml 加入离心管中, 以 3000r/min 离心 15 分钟, 管底析出的水相应 $\leq$ 0.5ml。

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 3~6 周龄的 SPF 鸡 10 只, 各肌肉或皮下注射疫苗 1.0ml, 观察 14 日, 应不出现因注射疫苗而引起的任何局部和全身反应。

**【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检验。

血清学方法 用 30~60 日龄 SPF 鸡 15 只, 10 只各肌肉或皮下注射疫苗 20 $\mu$ l, 另 5 只作对照。接种后 21~28 日, 每只鸡各采血, 分离血清, 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 只各肌肉或皮下注射疫苗 20 $\mu$ l，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强毒  $10^{5.0}$ ELD<sub>50</sub>，观察 14 日。对照组应全部死亡，免疫组应保护至少 7 只。

(2) 鸡传染性支气管炎部分 用 3~4 周龄 SPF 鸡 10 只，点眼接种鸡传染性支气管炎活疫苗 (H<sub>120</sub>) 1 羽份，接种后 21 日，分别采血，分离血清，各加强免疫接种 (肌肉注射) 灭活疫苗 0.5ml，接种后 28 日，分别采血，分离血清。将两次血清分别做 HI 试验 (抗原标准见附注 1；操作规程见附注 2)，若二免血清 HI 抗体效价的几何平均值较首免血清 HI 抗体效价的几何平均值高 3 倍以上时，疫苗鸡传染性支气管炎部分判合格。

(3) 鸡减蛋综合征部分 用 3~6 周龄 SPF 鸡 15 只，10 只各皮下或肌肉注射疫苗 0.5ml，另 5 只作对照。接种后 21~35 日，每只鸡各采血，分离血清，进行 HI 抗体效价测定。免疫组 HI 抗体效价的几何平均值应 $\geq 7\log_2$ ，未免疫对照组 HI 抗体效价的几何平均值应 $\leq 2\log_2$ 。

**【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、鸡传染性支气管炎和鸡减蛋综合征。免疫期为 5 个月。

**【用法与用量】** 皮下或肌肉注射，开产前 2~4 周的蛋鸡及种鸡，每只鸡 0.5ml。

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】** (1) 用前和使用中应充分摇匀。

(2) 用前应使疫苗温度升至室温。

(3) 一经开瓶启用，应尽快用完 (限当日用完)。

(4) 本品严禁冻结，破乳后切勿使用。

(5) 仅供健康鸡只预防接种。

(6) 接种工作完毕，双手应立即洗净并消毒，疫苗瓶及剩余的疫苗，应以燃烧或者煮沸破坏，并做无害化处理。

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

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为 12 个月。

#### 附注：1 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验抗原质量标准

本品系用鸡传染性支气管炎病毒 M<sub>41</sub> 株制备的血凝抑制抗原。所用 IB-HI 抗原应达到如下标准：

**【性状】** 无色疏松团块，加稀释液后迅速溶解。

**【效价测定】** 按标识体积稀释后，HA 效价应 $\geq 1:128$ 。

**【特异性检验】** 抗原与阴性血清、鸡新城疫、禽流感、减蛋综合征等病毒阳性血清的 HI 效价应 $\leq 3\log_2$ 。

**【作用和用途】** 用于鸡传染性支气管炎血凝抑制抗体的检验。

**【规格】** 1ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为 180 个月。

## 2 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验操作方法

### 2.1 鸡传染性支气管炎 HI 抗原工作液配制

2.1.1 鸡传染性支气管炎 HI 抗原血凝价测定 取 96 孔 V 型微量反应板 1 块, 每孔加 25 $\mu$ l PBS (0.01mol/L, pH 值为 7.0~7.4), 第一排加 25 $\mu$ l 抗原, 并做 2~4 个重复孔, 然后将抗原进行 2 倍系列稀释, 稀释后每孔再加入 25 $\mu$ l PBS, 最后再加入 1%鸡红细胞悬液 25 $\mu$ l, 用微量振荡器混匀, 2~8 $^{\circ}$ C 静置 40 分钟判定结果, 以使 100%红细胞凝集的抗原最高稀释倍数作为判定终点。

### 2.1.2 鸡传染性支气管炎 HI 抗原工作液配制

2.1.2.1 4HA 单位抗原的配制 根据测定的 HI 抗原 HA 效价, 用 PBS 配制 4HA 单位抗原。将配制好的 4HA 单位抗原用 PBS 稀释, 使其稀释度为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7。在每一稀释度的 25 $\mu$ l 抗原中加 25 $\mu$ l PBS, 再加入 1%鸡红细胞悬液 25 $\mu$ l, 混匀, 2~8 $^{\circ}$ C 静置 40 分钟, 判定结果。如果 1:4 稀释为 100%红细胞凝集终点, 表明配制的是 4HA 单位抗原; 如果 100%红细胞凝集终点是 1:5 或 1:6, 表明配制的 4HA 单位抗原实际上是高于 4 个单位; 如果 100%红细胞凝集终点是 1:2 或 1:3, 表明配制的 4HA 单位抗原实际上是低于 4 个单位。应根据检验结果适当调整, 使抗原工作液为 4HA 单位。

### 2.2 血凝抑制试验 (HI)

2.2.1 取 96 孔 V 型微量反应板, 每孔加 25 $\mu$ l PBS。

2.2.2 分别吸取 25 $\mu$ l 待检血清, 加至每块板的第一排各相应孔内, 并在每块板上设标准阳性血清和阴性血清对照, 然后 2 倍系列稀释。

2.2.3 分别向各孔中加入含 4HA 单位的抗原 25 $\mu$ l, 2~8 $^{\circ}$ C 静置 30 分钟。

2.2.4 每孔中加入 1% (V/V) 鸡红细胞悬液 25 $\mu$ l, 轻轻混匀, 2~8 $^{\circ}$ C 静置 40 分钟。

2.2.5 结果判定 将反应板倾斜, 凡血清反应孔与红细胞对照孔中红细胞以同样速度从孔底流淌者判为血凝抑制。当阴性血清 HI 效价 $\leq 3\log_2$ 、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差 $\leq 1\log_2$ 时, 试验方可成立。以完全抑制 4HA 单位抗原的血清最高稀释度作为 HI 效价。

### 附加说明:

1. 本标准由洛阳普莱柯生物工程有限公司提出。
2. 本标准于 2007 年 3 月 14 日经农业部公告第 830 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。
5. 删除附注 1 帽子中的“因目前国内暂无商品化的 IB-HI 抗原, 暂采用国际通用的进口的 IB-HI 抗原”——已经规定了 IB-HI 抗原标准, 凡符合该标准的抗原, 均可使用。

## 猪支原体肺炎活疫苗 (168 株)

Zhu Zhiyuantifeiyan Huoyimiao (168 Zhu)

Swine Enzootic Pneumonia Vaccine, Live (168 Strain)

本品系用猪肺炎支原体 168 弱毒菌株接种于 KM<sub>2</sub> 培养基培养, 收获培养物, 加适宜稳

定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防猪支原体肺炎（猪喘气病）。

**【性状】** 白色或淡黄色疏松团块，易与瓶壁脱离，加稀释液后应迅速溶解。

**【纯粹检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应纯粹。

**【鉴别检验】** 将疫苗用  $KM_2$  培养基（见附注 1） $1:10^4$  稀释后，与等量抗猪肺炎支原体特异性血清（AGP 效价 $\geq 1:8$ ）混合，在  $37^\circ\text{C}$  水浴中中和 2 小时后，接种  $KM_2$  培养基，培养、观察 15 日。应 pH 值无变化或 pH 值变化量低于阴性血清生长对照组并至少保持 24 小时。

**【安全检验】** （1）小鼠安检 每批疫苗任取 5 瓶加灭菌生理盐水稀释混合后，接种  $18\sim 22\text{g}$  清洁级小鼠 5 只，每只皮下接种 5 头份，观察 10 日，应全部健活。如个别死亡，可重检 1 次。重检应全部健活。

（2）猪安检 用  $5\sim 15$  日龄健康易感猪 3 头，各右侧肺内注射疫苗 10 头份，观察 25 日。记录如下重要的症状：咳嗽、呼吸困难、俯卧、呕吐、食欲不振、震颤和死亡，注射后第 1~25 日的每日上午检测直肠温度。根据猪安检试验临床症状评判标准（附注 3），猪安检试验应全部累计总分不大于 2 判为安全，累计总分大于 5 判为不安全，累计总分  $2\sim 5$ ，可重检 1 次。重检累计总分不大于 2 判为安全。

**【效力检验】** CCU 含量测定 按 CCU 含量测定方法测定（见附注 5），每头份冻干疫苗菌数应 $\geq 10^6$ CCU。

**【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】** 用于预防猪支原体肺炎（猪喘气病）。免疫期为 6 个月。

**【用法与用量】** 猪肺内注射。按瓶签注明头份，用无菌生理盐水稀释后，由猪右侧肩胛后缘  $2\text{cm}$  肋间隙进针注射接种，每头接种 1 头份。

**【不良反应】** 一般无严重不良反应。

**【注意事项】** （1）稀释的疫苗应在 2 小时内用完，剩余疫苗液煮沸后废弃。

（2）在免疫接种前后  $5\sim 15$  日内，不使用含有抗支原体的抗菌药物。可以使用青霉素、阿莫西林及磺胺类药物。

（3）疫苗注射后  $1\sim 3$  日内少数猪可能有  $40.5^\circ\text{C}$  以下的轻微发烧，以后恢复正常。无其它不良反应。

（4）本品仅供健康猪使用。对有猪传染性胸膜肺炎或副猪嗜血杆菌感染的猪场慎用。

**【规格】** （1）5 头份/瓶 （2）10 头份/瓶 （3）20 头份/瓶

**【贮藏与有效期】**  $-15^\circ\text{C}$  以下保存，有效期为 18 个月。

#### 附注：1 液体培养基（ $KM_2$ ）的制备

1.1 成分 Eagle's 液 50%、1% 水解乳蛋白磷酸缓冲液 29%、健康猪血清 20%、鲜酵母浸出汁 1%、青霉素 200 单位/ml、酚红 0.002%。

1.2 制法 上述溶液除血清外，用灭菌的 6 号玻璃滤器过滤后，分装备用。健康猪血清经  $56^\circ\text{C}$  灭活 30 分钟后，过滤除菌，按 20% 比例混合，然后用  $1\text{mol/L}$  氢氧化钠溶液调 pH 值为  $7.4\sim 7.6$ 。 $37^\circ\text{C}$  培养 24 小时，进行无菌检验。无菌检验合格后， $4^\circ\text{C}$  保存，有效期 3 个

月。

## 2 固体培养基的制备

2.1 成分 Eagle's 液 50%、1%水解乳蛋白磷酸缓冲液 29%、健康猪血清 20%、鲜酵母浸出汁 1%、青霉素 200 单位/ml、酚红 0.002%、琼脂 1%。

2.2 制法 先称琼脂加入 1%水解乳蛋白 Hank's 液中，高压灭菌后冷却至 56℃，无菌操作分别加入经过滤除菌的 Eagle's 液，青霉素溶液，健康猪血清，鲜酵母浸出汁及酚红。倒平板，平板凝固后 37℃培养 24 小时，进行无菌检验。无菌检验合格后，4℃保存，有效期 1 个月。

3 猪安检试验临床症状判定标准 记录如下症状：咳嗽、呼吸困难、俯卧、呕吐、食欲不振、震颤、死亡和直肠温度等。发病猪临床症状评判标准见表 1。

表 1 猪支原体肺炎发病猪临床症状评判标准

判定参数	0	1	2	10	最高分
咳嗽	无	有	严重		2
呼吸困难	无	有	严重		2
呕吐	无	有	严重		2
俯卧	无	有	严重(躺卧)		2
食欲不振	无	有			1
震颤	无	有			1
死亡	无			有	10
注射后 4 小时 (D0, 4h) 直肠温度高出范围	1.0℃以下	1.0℃~1.5℃	1.5℃以上		2
注射后第 1 日 (D1) 直肠温度高出范围	1.0℃以下	1.0℃~1.5℃	1.5℃以上		2
注射后第 2 日 (D2) 直肠温度高出范围	1.0℃以下	1.0℃~1.5℃	1.5℃以上		2
注射后第 3~25 日 (D3~25) 直肠温度有 4 日较对照组高出范围	0.5℃以下	0.5~1.0℃	1.0℃以上		2
累计总分					28

猪安检试验中，每头试验猪症状全部累计，总分不大于 2 判为安全，累计总分大于 5 判为不安全，累计总分 2~5，可重检 1 次，重检累计总分不大于 2 安全。

4 攻毒发病与免疫保护判定标准 试验猪扑杀后，分别记录左尖叶、左心叶、左膈叶、右尖叶、右心叶、右膈叶、副叶病变百分比率，将 0%~25% 记为 1；26%~50% 记为 2；51%~75% 记为 3；76%~100% 记为 4，统计每个试验猪肺病变指数（最高为 28）。试验猪病变指数大于 10 判为发病，小于 4 为健康（排除猪肺炎支原体感染），根据肺病变指数，按以下公式计算试验猪攻毒保护指数。

试验猪攻毒保护指数 = (攻毒不免疫对照组肺病变指数平均值 - 试验猪肺病变指数) / (攻毒不免疫对照组肺病变指数平均值 - 不攻毒不免疫对照组肺病变指数平均值) %

试验猪攻毒保护指数小于 60% 为无保护，大于或等于 60% 为有保护，再按以下公式计算试验猪攻毒保护率。

试验猪攻毒保护率 = 有保护试验猪数 / 试验猪数

试验在阳性对照组全部发病、阴性对照组至少全部健康时有效。

**5 CCU 含量测定方法** 将猪肺炎支原体待测定培养物用  $KM_2$  培养基进行 10 倍连续稀释，即 1.8ml  $KM_2$  培养基接种 0.2ml 样品，依次 1:10 递减连续稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ …… $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$ 、 $10^{-12}$ ，另设  $KM_2$  培养基对照 3 管，共 15 管，同批作 3 个重复，置  $37^\circ C$  培养，每日观察记录培养基颜色变化和混浊度的变化直至第 10 日，并对培养物涂片，染色，镜检，检查有无典型猪肺炎支原体菌体形态。稀释培养后，菌体生长、变色的最高稀释度为待检培养物 CCU 含量。

**附加说明：**

1. 本标准由南京天邦生物科技有限公司、江苏省农业科学院兽医研究所提出。
2. 本标准于 2007 年 3 月 14 日经农业部公告第 830 号发布。

## 猪繁殖与呼吸综合征活疫苗（CH-1R 株）

Zhu fanzhi yu huxi zonghezheng huoyimiao (CH-1R Zhu)

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Vaccine, live (CH-1R Strain)

本品系用猪繁殖与呼吸综合征病毒 CH-1R 株，接种 Marc-145 细胞，收获细胞培养物，加入适当的冻干保护剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防猪繁殖与呼吸综合征。

**【性状】** 黄白色海绵状疏松团块，加稀释液后迅速溶解，并呈均匀的混悬液。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【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。

**【鉴别检验】** 将疫苗稀释至病毒含量为  $10^{2.0}TCID_{50}/0.1ml$ ，取 100 $\mu l$  与等量灭能的猪繁殖与呼吸综合征病毒抗血清（中和抗体价  $\geq 1:8$ ）混合，置  $37^\circ C$  作用 1 小时后，接种生长良好的 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 $\mu l$ 。同时设正常细胞对照、病毒对照、血清毒性对照和阴性血清对照。置  $37^\circ C$ 、5%  $CO_2$  培养箱中培养 5 日，PRRSV 抗血清中和病毒组应不出现 CPE。病毒和阴性血清对照组应出现 CPE。

**【安全检验】** 用 28~35 日龄健康易感（IFA 抗体效价  $\leq 1:4$ ）仔猪 5 头，每头颈部肌肉注射活疫苗  $10^{6.0}TCID_{50}$ ，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）病毒含量测定 用细胞维持液将 1 头份疫苗作 10 倍系列稀释，取  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  5 个稀释度，接种于已生长良好的 Marc-145 细胞单层的 96 孔细胞培养板上，每滴度接种 8 孔， $37^\circ C$  5%  $CO_2$  培养 5~7 日，观察细胞病变，计算  $TCID_{50}/ml$ ，每头份疫苗病毒含量应  $\geq 10^{5.0}TCID_{50}$ 。

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

**【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】** 用于预防猪繁殖与呼吸综合征。免疫持续期为 4 个月。

**【用法与用量】** 颈部肌肉注射。3~4 周龄仔猪免疫, 1 头份/头; 母猪于配种前 1 周免疫, 2 头份/头。

**【注意事项】** (1) 初次应用本疫苗的猪场, 应先做小群试验。

(2) 种公猪应慎用。

(3) 注射部位应严格消毒。

(4) 使用后的疫苗瓶和相关器具应严格消毒。

(5) 屠宰前 30 日不得进行接种。

(6) 应在兽医的指导下使用。

(7) 目前尚未进行该疫苗对变异株的免疫效力试验, 尚不能确定疫苗对变异株的效果。

**【规格】** (1) 5 头份/瓶 (2) 10 头份/瓶 (3) 25 头份/瓶

**【贮藏与有效期】** -20℃以下保存, 有效期为 18 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 3~4 日; 食欲减退, 出现明显的呼吸道症状。

##### 1.2 病理变化剖检

大体病理变化 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。

显微病理变化 肺泡膈不均匀增宽, 可见肿大、毛细血管内皮增生, 并有巨噬细胞和淋巴细胞浸润。

1.3 抗原检测 用 IFA 方法检测肺脏、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 IFA 效价测定

2.1 检测方法 将 CH-1a 株 ( $10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>/ml) 接种 Marc-145 细胞, 培养 48~60 小时后刮取涂片, 冷丙酮固定 10 分钟, 分别滴加作  $2^{-2}$ 、 $2^{-3}$ 、 $2^{-4}$ 、 $2^{-5}$ 、 $2^{-6}$ 、 $2^{-7}$  倍比稀释的被检血清 30 $\mu\text{l}$ , 同时设 PRRSV 阳性和阴性血清对照, 未接毒的 Marc-145 细胞也作同样处理, 37℃作用 45 分钟, 用 PBS 冲洗后, 分别滴加荧光二抗于 37℃作用 45 分钟, PBS 溶液冲洗后荧光显微镜下观察。

2.2 判定 观察到特异性荧光者, 判为阳性; 否则, 为阴性。以出现特异性荧光的被检血清样品的最大稀释度, 定为被检血清的 IFA 效价。

#### 附加说明:

1. 本标准中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、哈尔滨维科生物技术开发公司和上海海利生物药品有限公司提出。

2. 本标准于 2007 年 4 月 23 日经农业部公告第 852 号发布。

3. 根据现行《中国兽药典》要求增加【外源病毒检验】项。

4. 删除原附注 2“怀孕母猪发病判定标准”——现有标准未涉及怀孕母猪的发病。

### 猪繁殖与呼吸综合征病毒 ELISA 抗体检测试剂盒

Zhu Fanzhiyuhuxizonghezheng Bingdu ELISA Kangti Jiance Shijihe

ELISA Kit for Detecting Antibody of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

本品系用猪繁殖与呼吸综合征病毒核衣壳蛋白表达抗原包被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、TMB 底物 A 液、TMB 底物 B 液和终止液等组装而成。用于检测猪群中猪繁殖与呼吸综合征美洲型病毒抗体。

【性状】 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 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 50 $\mu$ l/管 $\times$ 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 50 $\mu$ l/管 $\times$ 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 10ml/瓶 $\times$ 1 瓶。
- (5) 样品稀释液 红色澄清溶液, 无臭、无味、无沉淀物, 装量 10ml/瓶 $\times$ 2 瓶。
- (6) 洗涤液 无色澄清溶液, 无臭、无味、无沉淀物, 装量 (10 $\times$ ) 10ml/瓶 $\times$ 3 瓶。
- (7) TMB 底物 A 液 无色澄清溶液, 无臭、无味、无沉淀物, 装量 6ml/瓶 $\times$ 1 瓶
- (8) TMB 底物 B 液 无色澄清溶液, 无臭、无味、无沉淀物, 装量 6ml/瓶 $\times$ 1 瓶。
- (9) 终止液 无色澄清溶液, 无臭、无味、无沉淀物, 装量为 10ml/瓶 $\times$ 1 瓶。
- (10) 说明书 1 份。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 各成份均应无菌生长。

【敏感性检验】 用 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:160 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	$\geq 1.1$
1:10	$\geq 1.05$
1:20	$\geq 1.0$
1:40	$\geq 1.0$
1:80	$\geq 0.8$
1:160	$\geq 0.6$

【特异性检验】 用 30 份 PRRS 阴性血清一起按“用法与判定”进行检测, 每份血清的

S/P 值均应 < 0.4。

**【用法与判定】** 1 用法 酶标板上血清对照和血清样品添加模式如图 1 所示。在阳性抗原包被孔 A1 和 B1 及阴性抗原包被孔 A2 和 B2 中加入 1:40 稀释的阳性血清 100 $\mu$ l；在阳性抗原包被孔 C1 和 D1 及阴性抗原包被孔 C2 和 D2 加入 1:40 稀释的阴性血清 100 $\mu$ l；用样品稀释液将被检血清作 100 倍稀释，加入样品孔中，室温作用 30~40 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，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 100 $\mu$ l，室温作用 30~40 分钟，洗涤 3~5 次；每孔中加入底物溶液 A 液和底物溶液 B 液各 50 $\mu$ l，室温避光作用 10 分钟；向每孔中加入 100 $\mu$ l 的终止液，终止反应。用酶标仪在 620nm 的波长下测定各孔吸光度 OD<sub>620nm</sub> 值，读值计算结果。

图 1 酶标板上对照和样品添加模式图

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	P	S5	S5								
B	P	P	S6	S6								
C	N	N										
D	N	N										
E	S1	S1										
F	S2	S2										
G	S3	S3										
H	S4	S4										
	阳性抗原	阴性抗原	阳性抗原	阴性抗原	阳性抗原	阴性抗原	阳性抗原	阴性抗原	阳性抗原	阴性抗原	阳性抗原	阴性抗原

注：1, 3, 5, 7, 9, 11 列用阳性抗原包被 P-表示加阳性血清

2, 4, 6, 8, 10, 12 列用阴性抗原包被 N-表示加阴性血清

S1, S2, S3, S4, S5, S6 等表示加各被检样品

计算方法：

阳性血清与阳性抗原反应孔 OD<sub>620nm</sub> 均值: Pp= (A1+B1) /2

阳性血清与阴性抗原反应孔 OD<sub>620nm</sub> 均值: Pn= (A2+B2) /2

阴性血清与阳性抗原反应孔 OD<sub>620nm</sub> 均值: Np= (C1+D1) /2

阴性血清与阴性抗原反应孔 OD<sub>620nm</sub> 均值: Nn= (C2+D2) /2

计算样品与阳性血清的比值 (S/P) :

$$S/P = \frac{S_p - S_n}{P_p - P_n}$$

Sp: 被检血清与阳性抗原反应孔 OD<sub>620nm</sub> 值

Sn: 被检血清与阴性抗原反应孔 OD<sub>620nm</sub> 值

2 判定

2.1 Pp-Pn 与 Np-Nn 的比值必须 $\geq 2$ ，试验结果才有效。否则，应进行重复试验。

2.2 如果  $S/P \leq 0.4$ ，说明样品中无抗猪繁殖与呼吸综合征病毒美洲型的抗体；如果  $0.5 > S/P > 0.4$ ，判定该样品为可疑，应重复试验；如果  $S/P \geq 0.5$ ，样品为猪繁殖与呼吸综合征病毒美洲型抗体阳性。

**【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，不能判定结果。

(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 2007 年 4 月 23 日经农业部公告第 852 号发布。

## 猪繁殖与呼吸综合征灭活疫苗（NVDC-JXA1 株）

Zhu Fanzhiyuhuxizonghezheng Miehuoyimiao (NVDC-JXA1 Zhu)

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Vaccine, Inactivated (NVDC-JXA1 Strain)

本品系用猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）（NVDC-JXA1 株）接种于 Marc-145 细胞培养，将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。用于预防高致病性猪蓝耳病。

**【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，除第 1 滴外，均不应扩散。

稳定性 取疫苗 10ml 加入离心管中，以 3000 转/分离心 15 分钟，应不分层，管底析出的水相应不大于 0.5ml。

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 3~4 周龄 PRRSV 抗原、抗体阴性（附注 3、4）猪 5 头，每头耳后部肌肉注射疫苗 4.0ml，观察 21 日，应不出现由疫苗引起的局部和全身不良反应。

**【效力检验】** 用 3~6 周龄 PRRSV 抗原、抗体阴性（附注 3、4）猪 10 头，其中 5 头耳后部肌肉注射疫苗 2ml，另 5 头作为对照，同条件下饲养。28 日后，所有猪对侧耳后部肌肉注射 PRRSV NVDC-JXA1 株强毒 3ml（含  $10^5$ TCID<sub>50</sub>），每日测温并观察 21 日。5 头

对照猪应全部发病（发病判定标准见附注 1），且至少 2 头死亡；免疫猪应至少 4 头健活。

**【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】** 用于预防高致病性猪蓝耳病。

**【用法与用量】** 耳后部肌肉注射。3 周龄及以上仔猪，每头 2ml，根据当地疫病流行状况，可在首免后 28 日加强免疫 1 次；母猪，配种前接种 4ml；种公猪，每隔 6 个月接种 1 次，每次 4ml。

**【不良反应】** 一般无可见不良反应。

**【注意事项】** （1）本品只用于接种健康猪。

（2）疫苗使用前应恢复到室温并充分振摇。

（3）接种用器具应无菌，注射部位应严格消毒。

（4）对妊娠母猪应慎用，避免引起机械性流产。

（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。

（6）疫苗开封后，应限当日用完。

（7）剩余疫苗、疫苗瓶及注射器具等应无害化处理。

（8）屠宰前 21 日不得进行接种。

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

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期暂定为 12 个月。

#### 附注：1 发病猪的判定标准

1.1 至少 3 日体温在 41℃以上；

1.2 精神食欲下降，眼结膜炎，咳嗽、喘等呼吸道症状；

1.3 大体剖检，肺尖叶或心叶出现片状实变。

符合以上 3 条，即可判为发病。

#### 2 PRRSV NVDC-JXA1 株基因鉴定

2.1 引物 RT: 5'-TCGCCCTAAT-3' PRRSJBU: 5'- GTCCTAACGGTTCGGAAGAAAC  
-3'

PRRSJBD: 5'-GAGCTGAGTATTTTGGGCGTGT-3'

##### 2.2 样品处理

2.2.1 病毒培养液处理 取病毒培养液 100μl，置 1.5 ml 灭菌离心管中，加入 300 μl 变性液，混匀。

2.2.2 阳性对照样品处理 以已鉴定过的 PRRSV NVDC-JXA1 株病毒液作为阳性对照，取 100μl 置 1.5 ml 灭菌离心管中，加入 300μl 变性液，混匀。

2.2.3 阴性对照样品处理：以未接种病毒的 Marc-145 细胞培养物和经典 PRRSV 作为阴性对照，分别取 100μl 置 1.5 ml 灭菌离心管中，加入 300μl 变性液，混匀。

2.3 RNA 提取 将已处理的样品依次加入醋酸钠溶液 30μl、酚/氯仿/异戊醇混合液 300μl，颠倒 10 次混匀，冰浴 15 分钟，4℃ 13000g 离心 15 分钟。取上清 300μl 置于新的

经 DEPC 水处理过渡 1.5ml 灭菌离心管中,加入等体积异丙醇,混匀,置液氮中 3 分钟或-70℃ 冰箱 20 分钟。取出样品管,室温融化,4℃ 20000g 离心 20 分钟。弃上清,沿管壁缓缓滴入-20℃ 预冷 75%乙醇 1ml,轻轻旋转洗一次后倒掉,将离心管倒扣于吸水纸上 1 分钟,真空干燥 15 分钟。用 10 $\mu$ l 无 RNA 酶的灭菌双蒸水和 1 $\mu$ lRNA 酶抑制剂溶解沉淀。-20℃ 保存备用。

#### 2.4 反转录 (RT) RT 反应液体系配制如下:

无菌 DEPC 水	8 $\mu$ l
2.5mmol/L dNTP	2 $\mu$ l
16pmol/L 引物 RT	2 $\mu$ l
5 倍 RT 缓冲液	4 $\mu$ l
AMV 反转录酶	1 $\mu$ l
RNA 酶抑制剂	1 $\mu$ l
提取的 RNA	2 $\mu$ l

混匀并作好标记,在 PCR 仪上进行以下反转录程序:42℃ 60 分钟,95℃ 5 分钟。

#### 2.5 PCR 操作 PCR 反应液体系配制如下:

无菌 DEPC 水	8.8 $\mu$ l
2.5mmol/L dNTP	2 $\mu$ l
8pmol/L 引物 PRRSJBU 和 PRRSJBD	2 $\mu$ l
25 mmol/L 氯化镁	1.2 $\mu$ l
10 倍 PCR 缓冲液	2 $\mu$ l
0.5U/ $\mu$ l Taq DNA 聚合酶	2 $\mu$ l
cDNA	2 $\mu$ l

混匀并作好标记,加入 20 $\mu$ l 矿物油覆盖,在 PCR 仪上进行以下扩增程序:94℃ 30 秒、55℃ 30 秒、72℃ 30 秒,共 35 个循环;72℃ 延伸 10 分钟。

2.6 电泳 将 PCR 扩增产物 15 $\mu$ l 混合 3 $\mu$ l 上样缓冲液,加样于 2%琼脂糖凝胶孔中,以 5V/cm 电压电泳 40 分钟,紫外灯下观察结果。

2.7 结果判定 在阳性对照样品出现 400bp 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。病毒培养液出现 400bp 扩增带为 PRRSV NVDC-JXA1 株 阳性,否则为阴性。

### 3 猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体检测方法

3.1 试剂盒 猪繁殖与呼吸综合征(蓝耳病)抗体酶联免疫吸附试验试剂盒,购自北京元亨 IDEXX 公司。

#### 3.2 方法

3.2.1 样本准备 在加样前将血清以 8000 转/分钟离心 4 分钟。

3.2.2 稀释样品 在预稀释板上将待检血清按 1:40 稀释(390 $\mu$ l 样品稀释液+10 $\mu$ l 待检血清),阴性和阳性对照不稀释。

3.2.3 加样 取出包被板,按下图在记录表上记录样本在 96 孔反应板上的位置:在 A1, B1 和 A2, B2 孔加入阳性对照,在 C1, D1 和 C2, D2 孔加入阴性对照,其余孔加入稀释

好的待检血清，每个样品加两孔（PRRS 和 NHC 各 1 孔），100μl/孔。贴上封板膜，置室温（18~25℃），孵育 30 分钟。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	阳性	阳性	样 5	样 5								
B	阳性	阳性	样 6	样 6								
C	阴性	阴性	样 7	样 7								
D	阴性	阴性	样 8	样 8								
E	样 1	样 1	样 9	样 9								
F	样 2	样 2										
G	样 3	样 3										
H	样 4	样 4										
	PRR	NH	PRR	NH	PRR	NH	PRR	NH	PRR	NH	PRR	NH
	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C	S	C

3.2.4 洗板 小心揭掉封板膜，弃去各孔中液体、拍干。向各孔中加满洗涤工作液，静置约 1 分钟，弃去各孔中液体，如此重复洗涤 3~5 次，最后在吸水纸上拍干。

3.2.5 加酶标记物 每孔加入 100μl 辣根过氧化物酶标记的抗猪抗体，贴上封板膜，置室温（18~25℃），孵育 30 分钟。

3.2.6 重复步骤 3.2.4。

3.2.7 显色 每孔加入 100μl 底物溶液，置室温（18~25℃），孵育 15 分钟。

3.2.8 终止反应 每孔加入终止液 100μl，轻振混匀，应在 15 分钟内，用酶标仪测定 650nm 波长的 OD650 值。

3.3 判定

3.3.1 试验结果符合下列条件，方为有效：

阳性对照 OD650 平均值 (PC  $\bar{X}$ ) - 阴性对照 OD650 平均值 (NC  $\bar{X}$ )  $\geq 0.150$ ;

阴性对照 OD650 平均值 (NC  $\bar{X}$ )  $\leq 0.150$

PC  $\bar{X} = [(A1+B1) - (A2+B2)]/2$

NC  $\bar{X} = [(C1+D1) - (C2+D2)]/2$

3.3.2 计算方法 S/P = (PRRS 样品孔 OD650 - NHC 样品孔 OD650) / PC  $\bar{X}$

3.3.3 结果判定

3.3.3.1 S/P  $\geq 0.4$ ，判为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阳性；

3.3.3.2 S/P  $< 0.4$ ，判为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体阴性。

#### 4 猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原检测方法

4.1 试剂盒 北京世纪元亨动物防疫技术有限公司生产的 PRRSV RT-PCR 检测试剂盒。

4.2 方法 按照试剂盒说明书要求进行以下操作。

4.2.1 病毒 RNA 的提取

4.2.1.1 取已处理的待检样品及阴性、阳性对照样品，每管依次加入 300μl 变性液，醋酸钠溶液 30 μl，酚/氯仿/异戊醇混合液 300μl，颠倒 10 次混匀，冰浴 15 分钟，4℃ 12000 转/分离心 15 分钟。

4.2.1.2 取上清 300 $\mu$ l 置于新的经 DEPC 水处理过的 1.5 ml 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 $^{\circ}$ C 冰箱中 30 分钟。取出离心管, 室温融化, 将离心管开口侧朝离心机转轴方向放入离心机内, 4 $^{\circ}$ C 15000rpm 离心 20 分钟。

4.2.1.3 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 1mL, 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。

4.2.1.4 用 10  $\mu$ l 无 RNA 酶的灭菌双蒸水和 1  $\mu$ l RNA 酶抑制剂沿离心管开口相反方向溶解沉淀。-20 $^{\circ}$ C 储存备用。

4.2.2 RT-PCR 扩增 总体系为 25 $\mu$ l。每管取 RT-PCR 反应液 21.5 $\mu$ l (12.5 $\mu$ L DEPC 水, 2.5 $\mu$ l 2.5mmol/L dNTP, 5 $\mu$ l 5 倍 PCR 缓冲液, 1.5 $\mu$ l 10pmol/ $\mu$ l 上、下游引物混合液), 0.2 $\mu$ l 10U/ $\mu$ l AMV 反转录酶, 0.3 $\mu$ l 50U/ $\mu$ l RNA 酶抑制剂, 1 $\mu$ l 5U/ $\mu$ l Taq DNA 聚合酶, 2 $\mu$ l 提取的样品 RNA。混匀, 作好标记, 加入矿物油约 20 $\mu$ l 覆盖 (有热盖的 PCR 扩增仪不用加矿物油)。运行程序为: 42 $^{\circ}$ C 45 分钟, 95 $^{\circ}$ C 3 分钟; 扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 30 秒, 55 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 30 秒, 35 个循环后; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。

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

4.3 结果判定 当阳性对照出现 660bp 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 660bp 扩增带为猪繁殖与呼吸综合症病毒阳性, 未出现相应扩增带的样品判为阴性。

#### 附加说明:

1. 本标准农业部组织拟定。
2. 本标准于 2007 年 5 月 11 日经农业部公告第 858 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。

## 鸡新城疫病毒 (La Sota 株)、禽流感病毒 (H9 亚型, SS/94 株) 二联灭活疫苗

JiXinchengyibingdu (La Sota Zhu) Qinliuganbingdu (H9 Yaxing, SS/94 Zhu) Erlian Miehuoyimiao  
Newcastle Disease Virus (La Sota Strain) and Avian Influenza Virus (H9 Subtype, SS/94 Strain)  
Vaccine, Inactivated

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株、A 型禽流感病毒 A/Chicken/Guangdong/SS/94(H9N2) 株 (简称 SS/94 株) 分别接种易感鸡胚, 收获感染鸡胚液, 经甲醛溶液灭活、超滤浓缩后, 按一定比例与油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡新城疫、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, 除第 1 滴外, 均应不扩散。

稳定性 吸取 10ml 疫苗加入离心管中, 以 3000r/min 离心 15 分钟, 管底析出水相应不

大于 0.5ml。

**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】** 取 7~14 日龄 SPF 鸡 10 只，各肌肉或颈部皮下注射疫苗 1.0ml，观察 14 日，应全部健活，且不出现因注射疫苗而引起的任何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，另 5 只作对照。接种后 21~28 日，每只鸡各采血，分离血清，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，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强毒  $10^{5.0}$ ELD<sub>50</sub>，观察 14 日。对照组应全部死亡，免疫组应保护至少 7 只。

(2) 禽流感 (H9 亚型) 部分 下列方法任择其一。

取 28~42 日龄 SPF 鸡 15 只，10 只各颈部皮下或肌肉注射疫苗 0.3ml，另 5 只作对照。接种后 21 日，每只鸡分别采血，分离血清，用禽流感病毒 H9 亚型抗原测定 HI 抗体。免疫组 HI 抗体效价的几何平均值应 $\geq 6\log_2$ ，对照组 HI 抗体效价的几何平均值应 $\leq 2\log_2$ 。

取 28~42 日龄 SPF 鸡 15 只，10 只各颈部皮下或肌肉注射疫苗 0.3ml，另 5 只作对照。接种后 21 日，各静脉注射禽流感 H9 亚型 SS/94 株病毒液 0.2ml (含  $2 \times 10^6$ EID<sub>50</sub>)。攻毒后第 5 日，采集每只鸡喉头和泄殖腔拭子，分别经尿囊腔接种 9~10 日龄 SPF 鸡胚 5 枚，每胚 0.2ml，孵育观察 72 小时，测定所有鸡胚液 HA 效价。每个拭子样品接种的 5 枚鸡胚中只要有 1 枚鸡胚的鸡胚液的 HA 效价 $\geq 1:16$  (微量法)，即可判为病毒分离阳性。对病毒分离阴性的样品，应盲传 1 代后再进行判定。免疫组应至少有 9 只鸡病毒分离阴性，对照鸡应至少有 4 只鸡病毒分离阳性。

**【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由 H9 亚型禽流感病毒引起的禽流感。免疫期为 4 个月。

**【用法与用量】** 颈部皮下或肌肉注射。1~5 周龄鸡，每只 0.3ml；5 周龄以上鸡，每只 0.5ml；母鸡在开产前 2~3 周接种，每只 0.5ml。

**【注意事项】** (1) 本品严禁冻结，在运输过程中应避免日光直射。

(2) 使用前应先放置室温，摇匀后使用。

(3) 若出现破损、异物或破乳分层，切勿使用。

(4) 仅用于健康家禽预防接种。

(5) 疫苗开启后限当日用完，残留的疫苗要报废。

(6) 接种器具必须灭菌。

(7) 屠宰前 28 日内禁用。

(8) 当鸡群新城疫或禽流感 H9 亚型的 HI 抗体少于  $4.0\log_2$  时, 应根据生产需要合理安排免疫。

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

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存, 有效期为 12 个月。

**附加说明:**

1. 本标准由广东大华农动物保健品有限公司提出。
2. 本标准于 2007 年 6 月 1 日经农业部公告第 865 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。

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

Jixinchengyibingdu (La Sota Zhu) Qinliuganbigndu (H9 Yaxing, HL Zhu) Erlian Miehuoyimiao  
Newcastle Disease Virus (La Sota Strain) and Avian Influenza Virus (H9 Subtype, HL 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/Henan Luoyang/HL/2001 (H9N2) 株 (简称 HL 株) 分别接种易感鸡胚, 收获胚液, 超滤浓缩, 经甲醛溶液灭活后, 按一定比例混合, 与矿物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 乳白色均匀乳剂。

剂型 呈油包水型。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 吸取 10ml 疫苗加入离心管中, 以 3000r/min 离心 15min, 管底析出水相应 $\leq 0.5\text{ml}$ 。

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 2~3 周龄 SPF 鸡 10 只, 各肌肉或皮下注射疫苗 1.0ml, 观察 14 日, 应不出现因注射疫苗而引起的任何局部和全身反应。

**【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 $\mu\text{l}$ , 另 5 只作对照。接种后 21~28 日, 每只鸡各采血, 分离血清, 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 $\mu\text{l}$ , 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强毒  $10^{5.0}\text{ELD}_{50}$ , 观察 14 日。对照组应全部死亡, 免疫组应保护至少 7 只。

(2) 禽流感部分 下列二种方法任择其一。

取 30 日龄左右 SPF 鸡 15 只, 10 只各颈部皮下或肌肉注射疫苗 0.3ml, 另 5 只作对照。

接种后 21 日，每只鸡各采血，分离血清，用禽流感病毒 H9 亚型抗原测定 HI 抗体。免疫组 HI 抗体效价的几何平均值应 $\geq 6.5\log_2$ ，对照组 HI 抗体效价的几何平均值应 $\leq 2\log_2$ 。

或上述免疫鸡和对照鸡，用 1:10 稀释的毒种进行静脉注射，每只鸡 0.2ml。攻毒后第 5 日，采集每只鸡的泄殖腔拭子，分别经尿囊腔接种 10~11 日龄 SPF 鸡胚 5 枚，每胚 0.2ml，孵育观察 5 日，测定所有鸡胚液 HA 效价。每个拭子样品接种的 5 枚鸡胚中只要有 1 枚鸡胚的鸡胚液的 HA 效价 $\geq 1:16$ （微量法），即可判为病毒分离阳性。对病毒分离阴性的样品，应盲传 1 次后再进行判定。免疫组应至少有 9 只鸡病毒分离阴性，对照组应全部为阳性。

**【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 4 个月。

**【用法与用量】** 皮下或肌肉注射。2~5 周龄鸡，每只 0.3ml，5 周龄以上鸡，每只 0.5ml。

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】** （1）用前和使用中应充分摇匀。

（2）用前应使疫苗温度升至室温。

（3）一经开瓶启用，应尽快用完（限当日用完）。

（4）本品严禁冻结，破乳后切勿使用。

（5）仅供健康鸡只预防接种。

（6）接种工作完毕，双手应立即洗净并消毒，疫苗瓶及剩余的疫苗，应以燃烧或煮沸破坏，并做无害化处理。

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

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 12 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由洛阳普莱柯生物工程有限公司提出。
2. 本标准于 2007 年 6 月 1 日经农业部公告第 865 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。

## 羊棘球蚴（包虫）病基因工程亚单位疫苗

Yangjiqiuyou (Baochong) bing Jiyingongcheng Yadanweiyimiao  
Recombinant Hydatids Subunit Vaccine

本品系用羊棘球蚴（包虫）基因工程菌株接种培养基进行增殖后，对细菌进行灭活、破碎，提取保护性抗原 EG95，并与免疫佐剂 Quil A 混合后经冷冻真空干燥而成，呈白色海绵状疏松团块。用于预防羊棘球蚴（包虫）病。

**【性状】** 白色海绵状疏松团块，加入稀释液后迅速溶解。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【羊棘球蚴（包虫）病基因工程亚单位疫苗 EG95 抗原含量测定】** 按照羊棘球蚴（包

虫)病基因工程亚单位疫苗质量检验操作方法中“SDS-PAGE 胶的制备和电泳方法”以及“用密度分析法定量测定抗原含量”(附注1)进行,保护性抗原 EG95 占总蛋白的百分含量应 $\geq 15\%$ ,每头份疫苗保护性抗原 EG95 含量应 $\geq 50\mu\text{g}$ 。

**【安全检验】** 用灭菌生理盐水将疫苗适当稀释。用 2~4 月龄羔羊 10 只,其中 5 只每只颈部皮下注射二倍剂量疫苗 2ml,另 5 只不注射疫苗,仅每只注射 2ml 灭菌生理盐水,作为对照。在相同的饲养条件下,定时测量试验羊、对照羊的直肠温度,观察羊的临床表现,并检查注射部位的反应,注射后允许有体温升高等反应,但应在下述标准范围之内。

(1) 直肠温度 试验羊在注射疫苗后 2 小时、6 小时、24 小时、48 小时、72 小时和 96 小时分别测定每只羊的体温,如果试验羊平均体温同对照组相比 $\geq 1^\circ\text{C}$ ,同时到注射疫苗后第 4 日时试验羊的平均体温仍高于对照组平均体温  $0.3^\circ\text{C}$  以上,则疫苗安全检验不合格;反之,为合格。

(2) 临床症状观察 如果试验羊的临床表现出现不能站立,则疫苗安检不合格。如果试验羊的临床表现仅为精神沉郁和行动迟缓,则疫苗安检为合格。

(3) 注射部位反应 如果在注射疫苗后 21 日,5 只试验羊中仍有 3 只或 3 只以上注射部位肿胀面积 $\geq 400\text{mm}^2$ ,则疫苗安检为不合格;否则,为合格。

**【效力检验】** 用灭菌生理盐水将疫苗适当稀释。用 2~4 月龄羔羊 10 只,每只颈部皮下注射疫苗 1ml (1 头份),28 日后按相同接种剂量和途径再加强免疫 1 次,分别在一免前和二免后 2 周采血,分离血清,用 ELISA (附注 2) 测定其抗体水平 (OD492nm 值)。当 10 只试验羊二免后 2 周至少有 8 只羊的血清 ELISA 抗体水平 (OD492nm 值) $\geq 1.0$ ,且 10 只试验羊二免后 2 周血清同一免前血清相比 ELISA 的 P/N 值均应 $\geq 2.0$ ,为免疫有效,被检疫苗判为合格。否则,需用新的试验羊进行重复检验 1 次;如果重复试验结果仍然不符合要求,被检疫苗判为不合格。所有试验羊在一免前采集的血清 ELISA 抗体水平 (OD492nm 值) 均应 $\leq 0.3$ 。

**【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】** 用于预防绵羊、山羊棘球蚴(包虫)病。

**【配制】** 先将 10ml 灭菌生理盐水加入疫苗瓶中,轻轻摇动让疫苗充分溶解,然后转入 40 (90) ml 灭菌生理盐水中,混匀即可。忌剧烈摇荡。

**【用法与用量】** 按瓶签注明的头份,用灭菌生理盐水稀释,每只羊颈部皮下注射 1ml。未用本疫苗免疫过的羊,应间隔 4 周进行加强免疫;妊娠母羊可以进行免疫,以使羔羊获得良好的免疫力;羔羊通过初乳可从免疫母羊获得免疫力,免疫母羊所产羔羊应在 16 周龄进行首次免疫,20 周龄进行 2 次免疫;没有免疫过的母羊所产羔羊应分别在 8 周龄和 12 周龄进行两次免疫;已经用本疫苗免疫过的羊每 12 个月需加强免疫 1 次。

**【不良反应】** 羊接种疫苗后可出现一过性发热和精神沉郁,但很快恢复。

**【注意事项】** (1) 疫苗应避免日光直射。用后的疫苗、空瓶及其用具等应消毒处理,勿随意弃置。

(2) 疫苗瓶破裂或失真空的疫苗禁止使用。

(3) 疫苗稀释后,如不能当日用完,可在 $-20^\circ\text{C}$ 冻存,但是只能冻融 1 次,不可反复冻

融使用。

(4) 羊在接种本疫苗后可能出现暂时的精神沉郁、嗜睡、行动迟缓、体温升高等症状，属正常反应，可在数日内消失；接种部位可能出现轻微肿胀，属于正常反应，可在4周内消失。

(5) 体弱或有病羊禁用。

**【规格】** (1) 50 头份/瓶 (2) 100 头份/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为12个月。

### 羊棘球蚴（包虫）病基因工程亚单位疫苗免疫佐剂 Quil A 标准

**【性状】** 呈淡黄色疏松粉末，易溶于水。

**【免疫安全性和有效性检验】** 按“羊棘球蚴（包虫）病基因工程亚单位疫苗免疫佐剂 Quil A 免疫安全性和有效性检验方法”（附注3）进行，应符合规定的要求。

#### 附注：1 用密度分析法定量测定抗原含量

本操作程序对如何测定包涵体中疫苗保护性抗原 EG95 的百分含量进行了描述。本实验结果和总蛋白测定结果一起即可计算出 EG95 的含量。

##### 1.1 安全性

1.1.1 Bio-Rad 测定试剂染料中含有磷酸和甲醇，如果被人吸入或吞食将有危害性，而且易燃，本测定应在通风较好的房间内进行，而且操作时应戴手套。

1.1.2 SDS-PAGE 法所用的试剂丙烯酰胺和双丙烯酰胺有很强的神经毒性，容易吸附在皮肤上，并有累积性，称量时应小心，戴好口罩和手套。

##### 1.2 材料与设备

1.2.1 材料 Bio-Rad 蛋白质测定法所用染料浓缩液为 Bio-Rad 公司生产，牛血清白蛋白为 Sigma 公司生产；分子量标准蛋白、丙烯酰胺、双丙烯酰胺、十二烷基硫酸钠 (SDS) 等为 GIBCO 公司产品。

1.2.2 设备 20 $\mu$ l~5ml 可调移液器 (Gilson 公司产品)，分光光度计及比色杯、电泳槽、电泳仪、摇床均为上海光学仪器厂产品。

##### 1.3 操作程序

###### 1.3.1 Bio-Rad 蛋白质测定法测定包涵体中总蛋白含量

对经过离心并通过 0.22 $\mu$ m 滤器的无菌可溶性蛋白质，按 Bio-Rad 蛋白质测定法进行总蛋白的测定。

1.3.2 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定包涵体中疫苗保护性抗原 EG95 的百分含量

1.3.2.1 胶的制备 按常规方法制备 2 块 5%~25% 密度梯度胶。

1.3.2.2 羊棘球蚴 Eg95 对照抗原（即含有 Eg95-谷光苷肽-S-转移酶的融合蛋白）和被检样品的准备

1.3.2.2.1 羊棘球蚴 Eg95 对照抗原 根据羊棘球蚴 Eg95 对照抗原总蛋白含量，将其稀释至 1mg/ml，从稀释后的 Eg95 对照抗原溶液中吸出 500 $\mu$ l 加入另一 Eppendorf 管中，再在

该管中加入 125 $\mu$ l 5 倍样品稀释缓冲液，混匀后在开水中水浴 3.5 分钟。

1.3.2.2.2 被检样品 根据总蛋白含量测定的结果将样品稀释至 1mg/ml，从稀释后的被检样品液中吸出 500 $\mu$ l 加入另一 Eppendorf 管中，再在该管中加入 125 $\mu$ l 5 倍样品稀释缓冲液，混匀后在开水中水浴 3.5 分钟。

1.3.2.3 胶的安装与加样 按表 1 进行。

表 1 胶的泳道与加样量

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Eg95	Eg95	Eg95	Eg95											
对	对	对	对		检	检	检	检	检	检	检	检	检	检
照	照	照	照	M	样	样	样	样	样	样	样	样	样	样
抗	抗	抗	抗	W	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3
原	原	原	原	M										
20	20	20	20		20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l		$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l	$\mu$ l

注：MWM 为分子量标记物 (Marker)。

1.3.2.4 电泳 按常规方法进行电泳。

1.3.2.5 胶的染色

1.3.2.5.1 染色液

考马斯亮兰 (0.05% ) 0.5 g  
 异丙醇 (25% ) 250 ml  
 冰醋酸 (10% ) 100 ml  
 蒸馏水至 1000 ml

1.3.2.5.2 脱色液 (10%冰醋酸)

冰醋酸 100 ml  
 蒸馏水至 1000 ml

1.3.2.5.3 操作方法 向装有胶的微波炉盒内加入 150ml 染色液，用微波炉专用薄膜密封，用针头刺几个小孔，在微波炉内用高温作用 1.5 分钟，然后在摇床上摇动 5 分钟，倒掉染液，用蒸馏水冲洗；向装有胶的微波炉盒内加入 150ml 脱色液，在微波炉内用高温作用 1.5 分钟，在盒的两端放一些吸水纸，然后在摇床上摇动 5 分钟，用蒸馏水冲洗。重复上述脱色步骤，共进行 4 次脱色。此时的湿胶即可用于扫描。

1.3.2.6 胶的扫描与分析 用扫描仪将凝胶图象进行扫描并存入计算机，用凝胶分析软件分析保护性抗原 EG95 电泳条带占有电泳条带的相对百分含量，即可求出 EG95 占总蛋白的百分比。

1.4 结果

1.4.1 将 EG95 相对百分含量的结果填写于工作单，计算被检样品的平均百分含量和羊棘球蚴 Eg95 对照抗原的变异系数。胶最外侧左右各一个泳道不进行分析，以尽量减少误差。

1.4.2 被检样品 EG95 抗原含量 (mg/ml) = 总蛋白含量  $\times$  EG95 条带占总蛋白的平均百

分含量。

如果被检样品保护性抗原 EG95 的相对含量低于 15.0%，则被检样品为不合格。

1.4.3 实验准确度检验的判断标准 当羊棘球蚴 Eg95 对照抗原三个重复的变异系数低于 10%，则实验测定数据有效；如果羊棘球蚴 Eg95 对照抗原的变异系数超过上述标准，则实验应进行重复。

1.5 结果报告 将签过字的所有实验结果和工作单移交质量检验部门，将同一批次的所有文件保存在一起。

## 2 ELISA 方法的操作术式

2.1 材料 待检血清、阳性血清、阴性血清，ELISA 包被抗原、兔抗羊 IgG HRP 结合物、邻苯二胺（OPD）底物。

2.2 设备 聚苯乙烯酶标板、微量移液器、NUNC12 道酶标板清洗仪、酶标读数仪。

2.3 操作步骤

2.3.1 溶液的配制 按照常规方法分别配制磷酸盐缓冲液（PBS）10 倍贮存液、磷酸盐缓冲液+吐温 20（洗涤缓冲液）、碳酸盐缓冲液（抗原稀释缓冲液）、封闭液、邻苯二胺（OPD）底物、底物缓冲液（2 倍浓缩液）、1mol/L 硫酸。

2.3.2 血清稀释 将待检血清、阳性血清、阴性血清用封闭液进行 1:200 倍稀释。

2.3.3 稀释与包被抗原 用碳酸盐缓冲液（包被液）将 ELISA 包被抗原进行 1:600 稀释，用多管道移液器在酶标板中每孔加入 100 $\mu$ l，4 $^{\circ}$ C 过夜，进行包被。用 PBS-吐温 20 洗液，洗涤酶标板 3 次，每次 3 分钟。

2.3.4 封闭 每孔加入 200 $\mu$ l 封闭液，37 $^{\circ}$ C 作用 45 分钟，进行封闭。洗板 3 次，每次 3 分钟。

2.3.5 加入血清 每孔加入 1:200 倍稀释的被检血清 100 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 作用 45 分钟，同时设阳性血清和阴性血清对照。洗板 3 次，每次 3 分钟。

2.3.6 加入兔抗羊 IgG HRP 结合物 将兔抗羊 IgG HRP 进行 1:2000 稀释，每孔 100 $\mu$ l，37 $^{\circ}$ C 作用 45 分钟。洗板 3 次，每次 3 分钟。

2.3.7 加入 OPD 底物 每孔加入 100 $\mu$ l OPD 底物溶液，37 $^{\circ}$ C 作用 5 分钟。

2.3.8 加入终止液 每孔加入 1mol/L 硫酸 50 $\mu$ l 终止反应。

2.3.9 在 492nm 处用酶标读数仪测定 OD<sub>492nm</sub> 值并记录结果。

2.4 判定标准 试验羊间隔 28 日经过 2 次免疫后，分别在一免前和二免后 2 周采血，分离血清，用 ELISA 测定其 OD<sub>492nm</sub> 值，当 10 只试验羊注射被检疫苗二免后 2 周有 8 只以上羊的血清抗体水平（OD<sub>492nm</sub> 值） $\geq$ 阳性血清抗体水平（OD<sub>492nm</sub> 值）时，且 10 只试验羊注射被检疫苗二免后 2 周血清同一免前血清相比 ELISA P/N 值均 $\geq$ 2.0，被检疫苗判为合格，否则，为不合格。

当任何试验羊在首免前采集的血清抗体水平（OD<sub>492nm</sub> 值） $>$ 0.3，则应重复 ELISA 试验，如果 ELISA 重复试验结果仍然不符合要求，则应另用新的试验羊进行重复检验。

## 3 羊棘球蚴（包虫）病基因工程亚单位疫苗免疫佐剂 Quil A 免疫安全性和有效性检验方法

3.1 材料与方法

3.1.1 Quil A 被检样品 每批次 Quil A 随机取 1 克，作为被检样品进行检验。

3.1.2 羊棘球蚴 Eg95 对照抗原 羊棘球蚴 Eg95 对照抗原检验合格后，-80℃贮存备用。

3.1.3 试验分组 25 只羊随机分为 5 组，每组 5 只，各组试验羊的免疫接种方案如表 1。

表 1 Quil A 安全性和有效性检验试验方案

试验羊分组		Quil A 用量	羊棘球蚴 Eg95 对照抗原
试验组	1	被检 Quil A 500μg	50μg
	2	被检 Quil A 1000μg	50μg
	3	被检 Quil A 2000μg	50μg
Quil A 对照	4	被检 Quil A 1000μg	0
阴性对照	5	0	0

### 3.2 操作程序

3.2.1 免疫程序 按表 1 所示剂量配制试验用疫苗，每只羊各颈部皮下注射 1ml（1 头份），间隔 28 日后再按相同剂量和接种途径加强免疫 1 次。阴性对照组仅颈部皮下注射 1ml 灭菌生理盐水。

#### 3.2.2 安全性测定

3.2.2.1 直肠温度 接种疫苗后 2 小时、6 小时、24 小时、48 小时、72 小时和 96 小时分别测定每只羊的体温，及时做好记录。

3.2.2.2 临床症状 接种疫苗后 2 小时、6 小时、24 小时进行临床症状观察，结果以数字形式记录于工作单，具体数字代表如下：

- 0 正常
- 1 行动迟缓，耷耳，精神沉郁
- 2 低头、不食、跛行、呼吸加快
- 3 腹泻、步态僵直
- 4 不能站立

3.2.2.3 局部反应 接种疫苗后 7 日、14 日、21 日进行观察并测量注射部位肿胀面积，及时做好记录。

3.2.3 有效性测定 分别在第一次接种前和第二次接种后 2 周采血，分离血清，采用 ELISA 方法测定其抗体水平（OD<sub>492nm</sub> 值）。

### 3.3 判定标准

#### 3.3.1 安全性测定

3.3.1.1 直肠温度 试验羊在注射每头份含 50μg EG95 抗原和 1mg 免疫佐剂 Quil A 的疫苗后 2 小时、6 小时、24 小时、48 小时、72 小时和 96 小时分别测定每只羊的体温，如果试验羊平均体温同对照组平均体温相比 $\geq 1^{\circ}\text{C}$ ，同时到注射疫苗后第 4 日时试验羊的平均体温同对照组平均体温相比 $\geq 0.3^{\circ}\text{C}$ ，则疫苗安全检验不合格；反之，为合格。

3.3.1.2 临床症状 接种每头份含 50μg EG95 抗原和 1mg 免疫佐剂 Quil A 的疫苗后观察 24 小时，如果试验羊的临床表现出现不能站立，则疫苗安检不合格。如果试验羊的临床表现仅为精神沉郁和行动迟缓，则疫苗安检为合格。

3.3.1.3 局部反应 接种每头份含 50 $\mu$ g EG95 抗原和 1mg 免疫佐剂 Quil A 的疫苗后观察 21 日, 如果 5 只试验羊中仍有 3 只或 3 只以上注射部位肿胀面积 $\geq 400\text{mm}^2$ , 则疫苗安检为不合格; 否则, 为合格。

3.3.2 有效性测定 第一次接种前, 所有试验羊的血清抗体水平 (OD<sub>492nm</sub> 值) 均应 $\leq 0.3$ , 否则, 应重复 ELISA 试验, 如仍不符合要求, 则应另选试验羊进行接种。第二次接种每头份含 50 $\mu$ g EG95 抗原和 1mg 免疫佐剂 Quil A 的疫苗后 2 周, 应至少有 4 只羊的血清抗体水平 (OD<sub>492nm</sub> 值)  $\geq 1.0$ , 且 5 只羊的 P/N 值均应 $\geq 2.0$ 。

3.3.3 在安全性测定和有效性测定符合要求, 同时对照组成立的情况下, 判定被检 Quil A 免疫安全性和有效性检验合格, 否则为不合格。

#### 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 2007 年 6 月 1 日经农业部公告第 865 号发布。

## 副猪嗜血杆菌病灭活疫苗

Fuzhushixueganjunbing Miehuoyimiao

Haemophilus Parasuis Bacterin, Inactivated

本品系用血清 4 型 MD0322 株和血清 5 型 SH0165 株副猪嗜血杆菌分别接种适宜培养基培养, 收获培养物, 经甲醛溶液灭活后, 与油佐剂混合乳化制成。用于预防副猪嗜血杆菌病。

**【性状】** 外观 乳白色乳剂。

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 1 滴呈云雾状扩散外, 以后各滴均应不扩散。

稳定性 将 10ml 疫苗加入洁净离心管, 经 3000 转/分钟离心 15 分钟, 水分析出应 $\leq 0.2\text{ml}$ 。

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 28~35 日龄健康易感断奶仔猪 5 头, 各颈部肌肉注射疫苗 4ml, 观察 14 日, 注苗局部无严重反应, 且全部健活为合格。

**【效力检验】** 用 28~35 日龄健康易感断奶仔猪 10 头, 分 2 组, 每组 5 头, 每头猪颈部肌肉注射疫苗 2ml, 3 周后二免每头猪颈部肌肉注射疫苗 2ml。每组二免后 14 日连同对照猪 5 头, 分别腹腔内注射 1 个致死量的血清 4 型和 5 型菌液各 3ml, 观察 14 日。每组免疫猪至少保护 4 头; 对照猪至少 3 头死亡或 4 头发病为合格。

**【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】** 用于预防副猪嗜血杆菌病。免疫期为 6 个月。

**【用法与用量】** 使用前使疫苗平衡至室温并充分摇匀。颈部肌肉注射。按瓶签注明头份, 不论猪只大小, 每次均肌肉注射 1 头份 (2ml)。推荐免疫程序为: 种公猪每半年接种

1次；后备母猪在产前8~9周首免，3周后二免，以后每胎产前4~5周免疫1次；仔猪在2周龄首免，3周后二免。

**【不良反应】** 疫苗注射后可能引起轻微体温反应，但不引起流产、死胎和畸胎等不良反应，由于个体差异或者其它原因（如营养不良、体弱发病、潜伏感染、感染寄生虫、运输或环境应激、免疫机能减退等），个别猪在注射后可能出现过敏反应，可用抗过敏药物（如地塞米松、肾上腺素等）进行治疗，同时采用适当的辅助治疗措施。

**【注意事项】** （1）本疫苗在贮藏及运输过程中切勿冻结，长时间暴露在高温下会影响疫苗效力，使用前使疫苗平衡至室温并充分摇匀。

（2）使用前应仔细检查包装，发现破损、残缺、文字模糊、过期失效等，应禁止使用。

（3）被免疫猪必须健康，体质瘦弱、有病、食欲不振者、术后未愈者，严禁使用。

（4）注射器具应严格消毒，每头猪更换1次针头，接种部位严格消毒后进行深部肌肉注射，若消毒不严或注入皮下易形成永久性肿包，并影响免疫效果。

（5）启封后应限8小时内用完。

（6）接种动物仅限于猪，其它动物禁用。

（7）禁止与其他疫苗合用，接种同时不影响其它抗病毒类、抗生素类药物的使用。

**【规格】** （1）4ml/瓶 （2）6ml/瓶 （3）20ml/瓶 （4）100ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃避光保存，有效期为12个月。

#### 附注：发病的判定标准

发病猪出现发热（体温40.5℃以上，持续1~5日）、精神萎靡、咳嗽、呼吸困难、消瘦、跛行和被毛粗乱等临床症状。对濒死猪的剖检可见多发性浆膜炎（胸膜炎、心包炎、腹膜炎等）、关节炎和脑膜炎等病变，各浆膜面（关节囊、心包膜、胸膜和腹膜等）出现浆液性或纤维素性渗出物。

#### 附加说明：

1. 本标准由华中农业大学、武汉科前动物生物制品有限责任公司、中牧实业股份有限公司提出。

2. 本标准于2007年6月1日经农业部公告第865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。

5. 【规格】改为按照从小到大排序。

## 抗小鹅瘟血清

Kang Xiaowen Xueqing

Gosling Plague Antisera

本品系用小鹅瘟灭活疫苗，接种健康奶牛或黄牛，采血、分离血清，加适当防腐剂制成。用于雏鹅小鹅瘟的预防和治疗。

**【性状】** 橙黄色至茶色澄明液体，久置后有少量白色沉淀。

**【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，应无外源病毒污染。

**【安全检验】** 用 1~3 日龄易感雏鹅 10 只，每只腿部肌肉注射血清 2.0ml，观察 10 日，应全部健活。

**【效力检验】** 以下方法任择其一。

(1) 抗体效价测定 按照琼扩试验方法进行（见附注 1），抗血清琼扩效价应 $\geq$ 1:16。

(2) 预防保护 用 1~3 日龄易感雏鹅 20 只，随机分为试验和对照 2 组，每组 10 只，试验组每只腿部肌肉注射抗血清 0.5ml，对照组每只腿部肌肉注射生理盐水 0.5ml。24 小时后，分别肌肉注射小鹅瘟 GB 株强毒，每只 1ELD，连续观察 10 日。对照组至少死亡 7 只；试验组至少保护 8 只，并无相应的临床症状及剖检无病理变化（见附注 2）。

**【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】** 用于雏鹅小鹅瘟的预防和治疗。

**【用法与用量】** 皮下注射。预防：每羽 0.5ml；治疗：每羽 1~1.5ml。

**【不良反应】** 无。

**【注意事项】** (1) 使用前应仔细检查包装，如发现破损、标签残缺等，则禁止使用。

(2) 启封后应在 8 小时内用完。

(3) 如发现本品有沉淀或浑浊，禁用。

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

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为 12 月；20~25℃保存，有效期为 2 个月。

#### 附注：1 抗原制备、检测及琼扩试验操作术式

1.1 抗原制备 将小鹅瘟病毒 GD 株生产种毒 10 倍稀释，接种 8~9 日龄易感鸭胚，每胚 0.3ml，取出 96~216 小时死亡鸭胚，冷却，无菌收集合格鸭胚液。将每 0.3ml 病毒含量 $\geq 10^{4.0}$ ELD<sub>50</sub> 的病毒液加适宜抗生素，并经 40% 聚乙二醇透析浓缩至原体积 1/20，分装备用。

1.2 抗原检测 按琼扩试验进行检测，应出现直径达 10~12mm 清晰、单一沉淀线。

1.3 琼扩试验操作术式

1.3.1 琼脂板的制备 用生理盐水制备 1.5% 琼脂凝胶，隔水煮化至琼脂充分溶解。在载玻片上浇成琼脂凝胶板，每片 5ml。冷凝后，按孔径 4mm，空间距 3mm 打孔，中央 1 孔，周围 5 孔，置湿盒备用。

1.3.2 在制备好的琼脂凝胶板中央孔加入抗原，边缘孔加阴、阳性血清或被检血清，加样后置湿盒内，室温放置 18~36 小时，观察结果。

1.3.3 结果判定

1.3.3.1 阴性血清与抗原空之间不出现沉淀线；阳性血清与抗原之间出现直径达 10~

12mm 清晰、单一沉淀线，试验方可成立。

1.3.3.2 被检血清与抗原之间，或被检抗原与阳性血清之间出现直径达 10~12mm 清晰、单一沉淀线者判为被检抗原阳性。

## 2 雏鹅发病判定标准

2.1 临床症状 患病雏鹅表现明显精神萎顿，食欲废绝，严重下痢和神经症状，排含气泡的水便，喙端和蹼发绀，鼻孔有浆液性分泌物，易离群站立。死前出现神经症状：颈部扭转、两腿麻痹至全身抽搐死亡。

2.2 病理变化 死亡雏鹅剖检，小肠中有明显的粘膜发炎、坏死和有大量的渗出物，肠腔中有脱落的假膜、栓塞，外层有坏死的肠粘膜组织和纤维素性渗出物。

### 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 2007 年 6 月 1 日经农业部公告第 865 号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

## 鸡传染性法氏囊病基因工程亚单位疫苗

JiChuanranxingfashinangbing Jiyingongcheng Yadanwei Yimiao

Gene Engineering Subunit Vaccine of Infectious Bursal Disease

本品系用能表达鸡传染性法氏囊病病毒 VP2 蛋白的重组大肠杆菌 E.coli BL21/pET28a-VP2 株经过发酵培养、诱导表达、菌体破碎、离心去除菌体碎片、经甲醛溶液灭活残留细菌后，加入矿物油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡传染性法氏囊病。

**【性状】** 外观 乳白色乳剂。

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 1 滴外，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，管底析出的水相应不大于 0.5ml；或 37℃ 放置 21 日，应不分层。

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】** 取 3~8 周龄 SPF 鸡 10 只，每只肌肉或颈部皮下注射疫苗 1.0ml，观察 14 日，应不出现由疫苗引起的任何局部和全身不良反应。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

(1) 血清学方法 取 3~8 周龄 SPF 鸡 20 只，其中 10 只肌肉或颈部皮下注射疫苗，每只 0.25ml，另外 10 只不接种，作为对照，同群饲养。接种后 21 日，采血，分离血清，用琼脂扩散试验检测 IBD 抗体滴度，免疫鸡应至少有 8 只琼扩抗体效价 $\geq 1:8$ ，对照鸡应全部阴性。

(2) 免疫攻毒法 取 3~8 周龄 SPF 鸡 20 只，其中 10 只肌肉或颈部皮下注射疫苗，每只 0.25ml，另外 10 只不接种，作为对照，同条件下隔离饲养。接种后 21 日，所有免疫

鸡和对照鸡,每只经点眼途径接种 100 倍稀释的鸡传染性法氏囊病病毒 BC6-85 株毒液 0.1ml (内含毒量 $\geq 100$  个 BID)。攻毒后,每天观察鸡只的临床表现,记录发病和死亡鸡数,剖检观察死亡鸡法氏囊病变,至 72~96 小时扑杀存活鸡,逐只剖解,观察法氏囊病变。免疫鸡应至少 8 只不发病,不出现法氏囊病变;对照鸡应至少 8 只发病或出现明显的法氏囊病变(如胸肌或腿肌条状出血、法氏囊肿大或萎缩、发黄、内有胶冻样分泌物等一种以上病变)。

**【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】** 用于预防鸡传染性法氏囊病。

**【用法与用量】** 颈部皮下或肌肉注射。雏鸡,1~3 周龄接种,每只 0.25ml,免疫期为 3 个月;种鸡,开产前 2 周接种,每只 0.5ml,免疫期为 6 个月。

**【不良反应】** 一般无明显的不良反应。

**【注意事项】** (1) 仅用于接种健康鸡。

(2) 疫苗开封后,应当日用完。

(3) 用前应将疫苗升至室温,并充分摇匀。

(4) 疫苗勿冻结。

(5) 接种时,应执行常规无菌操作。

(6) 剩余疫苗、疫苗瓶及注射器具等应无害化处理。

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

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存,有效期为 12 个月。

#### 附加说明:

1. 本标准由长江大学、青岛易邦生物工程有限公司、浙江易邦生物技术有限公司提出。

2. 本标准于 2007 年 6 月 1 日经农业部公告第 865 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。

## 猪旋毛虫抗体快速检测试纸条

Zhuxuanmaochongkangti Kuaisujiance Shizhitiao

Swine Trichinella Spiralis Antibody Rapid Diagnostic Strip

本品系用胶体金标记经单抗亲和层析纯化的猪旋毛虫肌幼虫排泄—分泌抗原,通过特定的生产工艺组装而成。用于猪旋毛虫抗体的快速检测。

**【性状】** 试纸条的规格为 0.3×6.0cm。试纸条宽度均匀一致,材料附着牢固,NC 印膜无损伤,蓝、白色胶膜粘贴规范无破损。

**【检测线和对照线检验】** 用试纸条检测猪旋毛虫阳性血清,5~10 分钟内出现清晰可见的检测线和对照线;生理盐水对照,只出现一条对照线。

**【特异性检验】** 用试纸条分别对猪囊虫、猪住肉孢子虫、猪弓形虫、猪蛔虫、猪肺丝虫、猪细颈囊尾蚴病的阳性血清、猪旋毛虫阳性血清、健康猪血清及生理盐水进行检测。检

测猪旋毛虫阳性血清时应出现两条线（检测线 and 对照线），检测其他血清及生理盐水时均应出现一条线（对照线）。

**【敏感性检验】** 用猪旋毛虫抗体快速检测试纸条和 ELISA 诊断试剂盒分别测定旋毛虫猪阳性血清或肌肉组织液中的抗体滴度，试纸条检测的抗体滴度与 ELISA 试剂盒检测的抗体滴度相似或低 1 个滴度。

**【作用与用途】** 用于猪旋毛虫抗体的快速检测。

**【用法与判定】** （1）用法 待检血清用生理盐水作 50~100 倍稀释、待检全血用生理盐水作 10~20 倍稀释后直接检测；待检猪的肌肉组织，将其剪碎或匀浆，用生理盐水作 5~10 倍稀释，静置 20 分钟，取组织悬液上清检测。将试纸条的测试端插入组织悬液上清、稀释后的血清或全血中 10~20 秒，取出后平放 5~10 分钟，然后判定结果。

（2）判定 试纸条出现两条线（检测线 and 对照线）时判为阳性；试纸条只出现一条对照线时，判为阴性。

**【注意事项】** （1）试纸条只能使用 1 次，并切忌受潮。

（2）检测时试纸条不显示任何棕红色线时，表明操作有误或试纸条失效。

（3）用过的试纸条、器械和被检验样品应作煮沸处理。

**【规格】** （1）2 支/包 （2）10 支/包 （3）50 支/包 （4）100 支/包

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 18 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由河南省动物免疫学重点实验室提出。
2. 本标准于 2007 年 7 月 4 日经农业部公告第 875 号发布。

## 猪乙型脑炎活疫苗（SA14-14-2 株）

Zhu Yixingnaoyan Huoyimiao（SA14-14-2 Zhu）

Swine Japanese Encephalitis Vaccine, Live（SA14-14-2 Strain）

本品系用猪乙型脑炎病毒减毒株（SA14-14-2 株）接种原代地鼠肾（PHK）单层细胞培养，收获细胞培养物，加适宜保护剂（附注 3），经冷冻真空干燥制成。用于预防猪乙型脑炎病。

**【性状】** 淡黄色或乳白色海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离，加稀释液（附注 4）后迅速溶解成橘红色透明液体。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【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。

**【鉴别检验】** 用稀释液（见附件 4）将疫苗稀释成 500PFU/ml，取 1ml 与等量抗乙脑病毒特异性血清混合，置 37℃ 中和 1.5 小时。同时设病毒对照（病毒悬液与 MEM 生长液等量混合）和空白对照（抗乙脑病毒特异性血清与 MEM 生长液等量混合），置 37℃ 作用 1.5 小时。然后将上述作用后的混合液各接种已长成单层的 BHK-21 细胞（或 PHK 细胞）6 孔

细胞培养板 2 孔（每孔 500 $\mu$ l），吸附 1 小时，补充 MEM 维持液至 4ml，置 37 $^{\circ}$ C 培养，每日观察 2 次，共观察 5~7 日，判定结果，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。

**【安全检验】**（1）用体重 10~12g 小白鼠 10 只，各皮下注射疫苗 0.2ml（含 0.5 头份），同时右侧脑内空刺，3 日内死亡数不得超过 2 只，其余小白鼠继续观察至 14 日，小白鼠应全部健活。

（2）用稀释液（见附注 4）将疫苗稀释后，以  $10^{6.0}$  PFU（含 10 头份）剂量耳后肌肉注射 40~45 日龄乙脑抗体阴性（见附注 2）仔猪 4 头，观察 14 日，仔猪应无不良反应。

**【效力检验】** 用稀释液（见附注 4）将疫苗稀释成每毫升 1 头份后，用 MEM 生长液进行 10 倍系列稀释，取  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  3 个稀释度，分别接种于 BHK-21 细胞单层，用蚀斑试验（见附注 1）进行滴定，每头份病毒含量应  $\geq 10^{5.0}$  PFU 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】** 用于预防猪乙型脑炎。对仔猪的免疫期为 6 个月，对母猪的免疫期为 9 个月。

**【用法与用量】** 肌肉注射。仔猪、母猪和公猪，均注射 1 头份。推荐免疫程序：种用公、母猪于配种前（6~7 月龄）或每年蚊虫出现前 20~30 日肌注 1 头份，热带地区每半年接种 1 次。

**【不良反应】** 无不良反应。

**【注意事项】**（1）疫苗在运输、保存、使用过程中应防止高温和阳光照射。使用本疫苗前应仔细检查包装，如发现破损、标签不清、过期或失真空等现象时禁止使用。

（2）被注射猪必须健康，如体质瘦弱、有病、食欲不振者均不应注射。

（3）免疫所用器具均应事先消毒，用过的空疫苗瓶及器具应及时消毒处理。每注射 1 头猪必须更换 1 次消毒过的针头。

（4）本疫苗必须用专用稀释液稀释，应随用随稀释，并保证在稀释后 2 小时内用完。

（5）其它注意事项见兽用生物制品一般注意事项。

**【规格】**（1）2 头份/瓶（2）5 头份/瓶（3）10 头份/瓶（4）20 头份/瓶

**【贮藏与有效期】** -15 $^{\circ}$ C 以下保存，有效期为 18 个月；2~8 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 6 个月。

#### 附注：1 蚀斑试验

1.1 病毒稀释 每批病毒方法如下

稀释度	1 : 10	1 : $10^2$	1 : $10^3$	1 : $10^4$	1 : $10^5$
病毒液	0.2 ml	0.2ml	0.2 ml	0.2 ml	0.2ml
稀释液	1.8 ml	1.8 ml	1.8 ml	1.8 ml	1.8ml

1.2 接种 将  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  稀释度的病毒液接种在已长满单层的 BHK-21 细胞上（6 孔聚苯乙烯板）0.2ml/孔，每个稀释度接种 2 孔。

1.3 培养及记数 置 37 $^{\circ}$ C 吸附 90 分钟后加入 1% 甲基纤维素覆盖物，37 $^{\circ}$ C 继续培养，

5 日后染色计数。

1.4 染色 吸出 6 孔板中培养物，加入染色液 2ml，15~20 分钟后弃去染色液，用流动水冲洗 10 分钟即可看斑。

1.5 蚀斑计数 计算被检疫苗平均蚀斑数。

1.5.1 甲基纤维素覆盖物配制

2%甲基纤维素	50ml
1×MEM	10ml
牛血清（无乙脑抗体）	10ml
7.5%NaHCO <sub>3</sub>	3ml
双抗	1ml
蒸馏水	26ml
总量	100ml

1.5.2 染色液

1.5.2.1 母液 5%结晶紫母液配制

结晶紫粉末	25g
无水乙醇	475ml
过滤去掉残渣	

1.5.2.2 染色使用液配制

5%结晶紫母液	100ml
0.85%NaCl 溶液	375ml
40%甲醛溶液	25ml

## 2 猪乙型脑炎血凝抑制试验（HI）操作方法

2.1 血清处理 取 0.1ml 血清，加 0.9ml 12.5% 高岭土溶液混合，放室温中 20 分钟，以 2500r/min 离心 15~20 分钟，上清液即为 1:10 的血清。然后加入 40% 鹅或鸽红细胞悬液（用 pH 值 6.4 磷酸盐缓冲液配制）0.1ml，混合 2~3 次，在 37℃ 下吸附 1 小时，以 1500r/min 离心 10 分钟，取上清液，即为 HI 试验血清。

2.2 血凝素单位测定 取 pH 值 9.0 硼酸盐缓冲液加入清洁干燥的 96 孔 V 型微量板中，每孔 25 $\mu$ l。再加 25 $\mu$ l 血凝素于第 1 孔中，作 2 倍系列稀释，从最后 1 孔中混匀后弃掉 25 $\mu$ l。最后每孔中加入 25 $\mu$ l 0.5% 鹅或鸽红细胞悬液，充分混合，置室温下 1 小时后判定结果。

结果判定：

“++++”为一层粉红色的红细胞均匀分散于孔底；

“+++”基本同上，但边缘不整齐有下垂趋势；

“++”红细胞于孔底形成环状，环中央内径 3mm 以上；

“+”红细胞于孔底形成一个圈，但边缘不光滑，四周有小凝集块；

“-”红细胞于孔底形成圆点。

以出现“++”凝集时，血凝素最高稀释度为一个血凝素单位。

2.3 血凝抑制试验 取 pH 值 9.0 硼酸盐缓冲液加于清洁干燥的 96 孔 V 型微量板中，每孔 25 $\mu$ l。再加 25 $\mu$ l 1:10 血清于清洁干燥 96 孔 V 型微量板中的第 1 孔，作 2 倍系列稀释，

最后 1 孔中弃掉 25 $\mu$ l。再向每孔中加入 25 $\mu$ l 血凝素，充分混匀、加盖置室温 2 小时。最后向每孔中加入 50 $\mu$ l 0.5% 鹅或鸽红细胞溶液，充分混合，置室温下 1 小时后判定结果。

结果判定：HI 效价大于 1:20 判为阳性。

血凝抑制操作方法如下表

成分	稀释度							血清对照	血球对照
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280		
盐水 ( $\mu$ l)	25	25	25	25	25	25	25	25	25
血清 (1:10)	25	25	25	25	25	25	25	25	25
血凝素 ( $\mu$ l)	25	25	25	25	25	25	25	25	25
混匀、加盖置 4 $^{\circ}$ C 过夜或室温 2 小时									
0.5% 鹅血球 ( $\mu$ l)	50	50	50	50	50	50	50	50	50

操作完毕后，混匀，放室温 1~2 小时后观察结果。

实验孔全部呈现“+++”~“++++”的红细胞凝集为阴性结果。

阳性结果以“++”凝集孔作为该份血清的终点抑制效价。

### 3 猪乙型脑炎活疫苗明胶蔗糖保护剂组分

明胶粉 8g  
蔗糖 20g  
蒸馏水定容至 100ml

### 4 猪乙型脑炎活疫苗 (SA14-14-2 株) 稀释液组分 (10<sup>5</sup>ml)

注射用水 10<sup>5</sup>ml  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 46 或 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 116g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 16.4g  
NaCl 850g  
1% 酚红 160ml

用 NaOH 调 pH 值至 7.4~7.6。

#### 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、武汉科前动物生物制品有限责任公司提出。

2. 本标准于 2007 年 7 月 4 日经农业部公告第 875 号发布。

## 禽流感病毒 ELISA 检测试剂盒

Qinliugan Bingdu Meilianmianyixifushiyuan Jianceshijihe

Avian Influenza Virus ELISA Kit

本品系用抗禽流感病毒蛋白 (NP) 的单抗包被酶标板，和兔抗 AIV-NP 抗体 (一抗)，

羊抗兔 IgG 酶标抗体、样品处理液、阳性对照、阴性对照、底物液 A、底物液 B、终止液及 20 倍浓缩洗涤液组装而成。用于检测禽流感病毒。

**【性状】** 密封完好、组分齐全、无破损、无渗漏。其中：

- (1) 单抗包被板 包装袋应封闭良好，孔底应清洁透明，无异物，96 孔/块，1 块/盒。
- (2) 一抗（兔抗 AIV-NP） 应为无色透明液体，装量 10ml/瓶，1 瓶/盒。
- (3) 羊抗兔酶标抗体 应为无色透明液体，装量 10ml/瓶，1 瓶/盒。
- (4) 样品处理液 应为无色透明液体，装量 100ml/瓶，1 瓶/盒。
- (5) 阳性对照 应为无色透明液体，装量 1ml/管，1 管/盒。
- (6) 阴性对照 应为淡红色透明液体，装量 1ml/管，1 管/盒。
- (7) 底物 A 液 应为无色透明液体，装量 10ml/瓶，1 瓶/盒。
- (8) 底物 B 液 应为无色透明液体，装量 10ml/瓶，1 瓶/盒。
- (9) 终止液 应为无色透明液体，装量 10ml/瓶，1 瓶/盒。
- (10) 20 倍浓缩洗涤液 应为无色透明液体，装量 30ml/瓶，1 瓶/盒。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，一抗（兔抗 AIV-NP）、羊抗兔 IgG 酶标抗体、样品处理液、阳性对照、阴性对照、底物液 A、底物液 B、终止液、20 倍浓缩洗涤液均应无菌生长。

**【敏感性检验】** 取 10 份阳性参考样品，其中人工感染鸡心脏、肝脏、脾脏、肾脏组织样品各 1 份，喉头拭子、泄殖腔拭子、肺脏组织样品各 2 份，按“用法与判定”进行检测，每份阳性参考样品的  $OD_{630nm}$  值均应  $>0.3$ ；阳性对照  $OD_{630nm}$  值应  $\geq 0.8$ ，且  $\leq 2.0$ ；阴性对照  $OD_{630nm}$  值应  $< 0.2$ 。

**【特异性检验】** 取阴性参考样品 10 份，其中 SPF 鸡心脏、肝脏、脾脏、肾脏组织样品各 1 份，喉头拭子、泄殖腔拭子、肺脏组织样品各 2 份；另取鸡新城疫病毒（La Sota 株）鸡胚尿囊液 1 份、鸡传染性法氏囊病病毒鸡胚尿囊液 1 份、鸡减蛋综合征病毒鸭胚尿囊液 1 份。按“用法与判定”进行检测。所有样品  $OD_{630nm}$  值均应  $< 0.3$ ；阳性对照  $OD_{630nm}$  值应  $\geq 0.8$ ，且  $\leq 2.0$ ；阴性对照  $OD_{630nm}$  值应  $< 0.2$ 。

**【稳定性检验】** 将试剂盒于  $36\sim 38^{\circ}\text{C}$  放置 72 小时后检测阳性对照和阴性对照。阳性对照  $OD_{630nm}$  值下降应小于 0.2，且阳性对照  $OD_{630nm}$  值应  $\geq 0.8$ 、 $\leq 2.0$ ；阴性对照  $OD_{630nm}$  值应  $< 0.2$ 。

**【作用与用途】** 用于检测禽流感病毒。

**【用法与判定】** 1 用法

#### 1.1 样品处理

1.1.1 鸡胚尿囊液样品处理 用样品处理液等体积稀释后，置  $36\sim 38^{\circ}\text{C}$  作用 15 分钟，应间隔 3~5 分钟混匀 1 次，以 10000r/min 离心 30~60 秒，取上清待检。

1.1.2 内脏组织样品处理 称取内脏组织块约 1g，置匀浆器中，加入样品处理液 1ml，匀浆，冻融 3 次后，于  $36\sim 38^{\circ}\text{C}$  作用 15 分钟，以 10000r/min 离心 5 分钟，取上清待检。

1.1.3 喉头拭子和泄殖腔拭子样品处理 用无菌棉拭子于禽类喉头或泄殖腔中蘸取渗出液，然后浸泡于 1ml 样品处理液中，剧烈震荡 1 分钟后，挤出棉拭子中的液体，弃棉拭子，液体冻融 3 次后于  $36\sim 38^{\circ}\text{C}$  作用 15 分钟，在  $2\sim 8^{\circ}\text{C}$  下以 12000r/min 离心 5 分钟，取上清

待检。

1.2 取酶标板（根据样品多少可拆开分次使用），将 20 倍浓缩洗涤液用蒸馏水稀释 20 倍后，洗板 1 次（200 $\mu$ l/孔）后拍干。

1.3 加入待检样品，每孔 100 $\mu$ l，同时设阴、阳性对照孔，每孔 100 $\mu$ l，各 1 孔，置 36~38 $^{\circ}$ C 作用 30 分钟。

1.4 洗涤 5 次，每次 200 $\mu$ l/孔，每次约 3 分钟。

1.5 加入一抗（兔抗 AIV-NP），100 $\mu$ l/孔，置 36~38 $^{\circ}$ C 作用 30 分钟。

1.6 洗涤 5 次，每次 200 $\mu$ l/孔，每次约 3 分钟。

1.7 加入羊抗兔 IgG 酶标抗体，100 $\mu$ l/孔，置 36~38 $^{\circ}$ C 作用 30 分钟。

1.8 洗涤 5 次，每次 200 $\mu$ l/孔，每次约 3 分钟。

1.9 每孔加底物液 A、底物液 B 各 50 $\mu$ l，混匀，室温避光显色 10 分钟。

1.10 每孔加入终止液 50 $\mu$ l，混匀后测定结果。

2 判定 在酶标仪上测各孔的 OD<sub>630nm</sub> 值。试验成立的条件是：阳性对照孔的 OD<sub>630nm</sub> 值 $\geq$ 0.8，且 $\leq$ 2.0；阴性对照孔的 OD<sub>630nm</sub> 值 $<$ 0.2。样品 OD<sub>630nm</sub> 值 $>$ 0.3 时判为阳性；样品 OD<sub>630nm</sub> 值 $\leq$ 0.3 时判为阴性。

**【注意事项】** （1）各液体试剂使用前应充分摇匀。

（2）不同批号试剂盒的试剂组份不能混用。

（3）酶标板拆封后应避免受潮。

**【规格】** 96 孔/盒

**【贮藏与有效期】** 2~8 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 6 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由华中农业大学、武汉科前动物生物制品有限责任公司提出。

2. 本标准于 2007 年 7 月 31 日经农业部公告第 890 号发布。

3. 根据现行《中国兽药典》要求，在帽子中增加“用于检测禽流感病毒。”

## 禽流感病毒乳胶凝集试验检测试剂盒

Qinliugan Bingdu Rujiaoningjishiyan Jianceshijihe

Avian Influenza Virus Detection Kit with Latex Agglutination Test

本品系从 H9N2 亚型禽流感病毒中提取核蛋白，免疫家兔得到免疫血清并提取 IgG，用该 IgG 致敏羧化聚苯乙烯胶乳得到乳胶诊断试剂，并配以样品处理液 A，样品处理液 B，阳性对照、阴性对照组装而成。用于检测禽流感病毒。

**【性状】** 应密封完好、组分齐全、无破损、无渗漏。其中：

（1）乳胶 装量不少于 1ml，呈白色均匀的乳状。

（2）阳性对照 装量不少于 1ml，为无色透明液体。

（3）阴性对照 装量不少于 1ml，为无色透明液体。

（4）样品处理液 A 装量不少于 100ml，为无色透明液体。

(5) 样品处理液 B 装量不少于 100ml, 为无色透明液体, 轻摇有泡沫产生。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 乳胶诊断试剂、阳性对照样品、阴性对照样品、样品稀释液 A、样品稀释液 B 均应无细菌生长。

**【敏感性检验】** 检测 10 份阳性参考样品, 其中人工感染鸡心脏、肝脏、脾脏、肾脏组织样品各 1 份, 喉头拭子、泄殖腔拭子、肺脏组织样品各 2 份, 操作方法按试剂盒说明书进行, 每份参考样品的检测结果, 均应在合格范围内, 合格标准见下表; 1:16 倍稀释的禽流感 (H9N2) 病毒液 (血凝价 $\geq 7\log_2$ ) 与乳胶诊断液反应为阳性; 阳性对照样品与乳胶诊断液进行乳胶凝集反应, 应出现“++”以上凝集; 阴性对照样品与乳胶诊断液进行乳胶凝集反应, 应不凝集。

参考样品	反应的凝集程度
心脏组织阳性样品 1	“++”以上
肝脏组织阳性样品 2	“++”以上
脾脏组织阳性样品 3	“++”以上
肾脏组织阳性样品 4	“++”以上
喉头拭子阳性样品 5	“++”以上
喉头拭子阳性样品 6	“++”以上
泄殖腔拭子阳性样品 7	“++”以上
泄殖腔拭子阳性样品 8	“++”以上
肺脏组织阳性样品 9	“++”以上
肺脏组织阳性样品 10	“++”以上
1:16 倍稀释的禽流感 (H9N2) 病毒液	“++”以上
阳性对照	“++”以上
阴性对照	不凝集

**【特异性检验】** 检测阴性参考样品 10 份。其中健康鸡心脏、肝脏、脾脏、肾脏组织样品各 1 份, 喉头拭子、泄殖腔拭子、肺脏组织样品各 2 份, 操作方法按试剂盒说明书进行。10 份阴性参考样品与乳胶诊断液进行乳胶凝集反应均不凝集; 阳性对照样品与乳胶诊断液进行乳胶凝集反应, 应出现“++”以上凝集; 阴性对照样品与乳胶诊断液进行乳胶凝集反应, 应不凝集。

**【稳定性检验】** 将试剂盒置 37℃ 72 小时, 在加速和强化条件下进行乳胶凝集试验。阳性对照应出现“++”以上凝集; 阴性对照应不出现凝集。

**【作用与用途】** 用于禽流感病毒的检测。

**【用法与判定】** 1 用法

1.1 样本处理

1.1.1 分离病毒鸡胚尿囊液样本的处理方法 尿囊液样本于 12000r/min 离心 5 分钟取上清待检。

1.1.2 内脏组织检测样本的处理方法 称取内脏组织块 0.5g, 置于研磨器中, 加样本处理液 A 1ml, 研磨完全后取出组织浸出液, 冻融 3 遍, 然后于 2~8℃, 12000r/min 离心 15 分钟, 取上清待检。

1.1.3 喉头拭子检测样本的处理方法 用无菌棉拭子于鸡喉头部沾取渗出液，然后浸泡于 0.8ml 样本处理液 B 中，在涡旋仪上剧烈震荡 1 分钟后挤出棉拭子中的液体并冻融 3 次后，于 37℃ 温箱中作用 15 分钟，置 2~8℃，12000r/min 离心 15 分钟，取上清待检。

## 1.2 乳胶凝集试验操作步骤

1.2.1 取检测样品、阳性对照、阴性对照各 8~10μl，分置于黑色背景的玻璃片上。

1.2.2 各加等量的乳胶试剂，用纤细洁净物（牙签等）搅匀，使液面直径达到 1.0cm 左右，前后左右缓慢连续摇动 30 秒，并在 1 分钟内观察记录结果。

## 2 判定

2.1 对照试验 30~60 秒内出现如下结果，试验方可成立：阳性对照样品与乳胶诊断液进行乳胶凝集反应，应出现“++”以上凝集；阴性对照样品与乳胶诊断液进行乳胶凝集反应，应不凝集。

2.2 30~60 秒内出现“++”以上凝集，判为阳性；30~60 秒内液滴呈原有的均匀乳状为阴性。

**【注意事项】**（1）不同试剂组分不得混用。

（2）放置较长时间后乳胶颗粒会沉淀至管底，将乳胶诊断液轻轻摇匀后再使用。

（3）2~8℃ 避光保存，切勿长时间放置室温，不得冻结。

（4）使用者应遵守国家有关禽流感疫情报告、病毒分离、无害化处理等相关法律、法规。

**【规格】** 100 羽份/盒

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期 6 个月。

### 附注：凝集反应强度标准

“++++” 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。

### 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、武汉科前动物生物制品有限责任公司提出。

2. 本标准于 2007 年 7 月 31 日经农业部公告第 890 号发布。

## 鸡新城疫冻结活疫苗（VG/GA 株）

Ji Xinchengyi Dongjie Huoyimiao（VG/GA Zhu）

Newcastle Disease vaccine, Live（VG/GA Strain）

本品系用鸡新城疫病毒 VG/GA 株接种 SPF 鸡胚，培养，收获感染鸡胚液，配制成疫苗，

液氮中保存。用于预防鸡新城疫。

**【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。

**【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。

**【鉴别检验】** 用灭菌 PBS 将疫苗稀释  $10^{-1}$  至  $10^{-4}$ ，每个稀释度分两组，分别与等量鸡新城疫抗血清和鸡阴性血清充分混合，置  $36^{\circ}\text{C}$  中和 30 分钟，每组、每个稀释度分别接种 5 枚 SPF 鸡胚，每胚 0.2ml。37 $^{\circ}\text{C}$  观察 168 小时。24 小时前死胚不计结果，24 小时后每个滴度应有 4 枚胚存活。计算中和指数，应  $\geq 10^2$ 。

**【安全检验】** 取 1~5 日龄 SPF 雏鸡 25 羽，每羽点眼接种 0.05ml（含 10 羽份），观察 21 日，雏鸡应不出现因疫苗引起的不良反应，且非特异性死亡不超过 2 羽。如达到 3 羽，则需进行第 2 阶段安全检验。第 2 阶段安全检验，用 5 日龄 SPF 雏鸡 50 羽，每羽点眼接种 0.05ml（含 10 羽份），观察 21 日，雏鸡应不出现因疫苗引起的不良反应，且非特异性死亡不超过 5 羽。

**【效力检验】** 按瓶签注明羽份，将疫苗用 PBS 稀释至每 1ml 含 1 羽份，再进行 10 倍系列稀释，取 3 个适宜稀释度，分别尿囊腔内接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚 5 枚，每胚 0.1ml，置  $37^{\circ}\text{C}$  继续孵育 120 小时。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，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  $\geq 1:160$ （微量法  $\geq 1:128$ ）者判为感染，计算  $\text{EID}_{50}$ 。每羽份病毒含量应  $\geq 10^{6.0}\text{EID}_{50}$ 。

**【作用与用途】** 用于预防鸡新城疫。

**【用法与用量】** 每次从液氮罐中取出 1 安瓿疫苗，浸入  $20\sim 30^{\circ}\text{C}$  的水中使疫苗快速解冻并立即使用。按瓶签注明的羽份，用不含防腐剂或消毒剂的饮用水稀释疫苗。

免疫途径 点眼，饮水（用于 4 日龄以上的鸡群）、喷雾。

推荐免疫程序 首次接种，最早可用于 1 日龄雏鸡；2 周后进行加强免疫。

**【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）使用清洁、不含防腐剂和消毒剂的器具稀释疫苗。

（4）不要使用曾经解冻过的疫苗。

（5）销毁开启后未使用完的疫苗和空疫苗瓶。

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

**【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 2007 年 7 月 31 日经农业部公告第 890 号发布。

## 政府采购专用猪瘟活疫苗（脾淋源）

Zhengfucaigouzhuanyong Zhuwen Huoyimiao (Pilinyuan)

Swine Fever Vaccine, only for Government Procurement, Live (Spleen and Lymph Tissue Origin)

本品系用猪瘟兔化弱毒株接种家兔，收获感染家兔的脾脏及淋巴结（简称脾淋），制成乳剂，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防猪瘟。

**【性状】** 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）。每头份疫苗含非病原菌应不超过 75 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。

**【外源病毒检验】** (1) 用兔检验 将疫苗用灭菌生理盐水稀释为 10 头份/ml, 8000g 离心 10 分钟，取上清液耳静脉注射接种 1.5~2.0 kg 兔 4 只，每只 1.0ml（含 10 头份），观察 14 日，应健活。

(2) 其他检验 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无外源病毒污染。

**【鉴别检验】** 将疫苗用灭菌生理盐水稀释成为每毫升含有 100 个兔的最小感染量的病毒悬液，与等量的抗猪瘟病毒特异性血清充分混合，置 10~15℃ 中和 1 小时，其间振摇 2~3 次。同时设立阳性对照组（病毒对照）和阴性对照组（灭菌生理盐水）。中和结束后，分别接种家兔 2 只，每兔耳静脉注射 1ml，测温方法及体温反应标准同效力检验项。除阳性对照组应出现热反应外，其余 2 组在接种后 120 小时内不引起热反应。

**【安全检验】** (1) 每批或每亚批疫苗，按瓶签注明的头份用灭菌生理盐水稀释成每毫升含 5 头份疫苗，皮下注射体重 18~22g 小白鼠 5 只，各 0.2ml；肌肉注射体重 350~400g 豚鼠 2 只，各 1ml。观察 10 日，应全部健活。

(2) 选用符合国家实验动物标准的饲养场或定点猪场供应，并经中和试验方法（见附注）检测无猪瘟抗体的健康易感断奶猪（注苗前观察 5~7 日，每日上下午各测体温 1 次。挑选体温、精神、食欲正常者使用）。每批冻干疫苗样品或同批各亚批样品等量混合，按瓶签注明的头份用灭菌生理盐水稀释成每毫升含 6 头份疫苗，肌肉注射猪 4 头，每头 5ml（含 30 个使用剂量）。注苗后，每日上、下午各观察并测体温 1 次，观察 21 日。体温、精神、食欲与注苗前相比没有明显变化；或体温升高超过 0.5℃，但不超过 1℃，稽留不超过 2 日（4 个温次）；或减食不超过 1 日，疫苗可判为合格。如有 1 头猪体温超过常温 1℃ 以上，但不超过 1.5℃，稽留不超过 2 个温次，疫苗也可判为合格。如有 1 头猪的反应超过上述标准；或出现可疑的其它体温反应和其它异常现象时，可用 4 头猪重检 1 次。重检的猪仍出现同样反应，疫苗应判为不合格。也可在猪高温期采血复归猪 2 头，每头肌肉注射可疑猪原血 5ml，测温观察 16 日。如均无反应，疫苗可判合格。如第 1 次检验结果已经确证疫苗不安全，则不应进行重检。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

(1) 用家兔效检 按瓶签注明头份用灭菌生理盐水将每头份疫苗稀释 150 倍, 耳静脉注射体重 1.5~3.0kg 家兔 2 只, 每只兔耳静脉注射 1ml。家兔接种后, 上下午各测体温 1 次, 48 小时后, 每隔 6 小时测体温 1 次, 根据体温反应和攻毒结果进行综合判定。

①家兔接种疫苗后, 体温反应标准如下:

定型热反应(++) 潜伏期 48~96 小时, 体温上升呈明显曲线, 至少有 3 个温次超过常温 1℃以上, 并稽留 18~36 小时。如稽留 42 小时以上, 必须攻毒, 攻毒后无反应可判为定型热。

轻热反应(+) 潜伏期 48~96 小时, 体温上升呈明显曲线, 至少有 2 个温次超过常温 0.5℃以上, 并稽留 12~36 小时。

可疑反应(±) 潜伏期 48~96 小时, 体温曲线起伏不定, 稽留不到 12 小时; 或潜伏期在 24 小时以上, 不足 48 小时及超过 96 小时至 120 小时出现热反应。

体温反应呈二次高峰, 有一次高峰符合定型热反应(++) 或轻热反应(+) 标准者, 均须攻毒。攻毒后无反应时, 该兔热反应可判为定型热或轻热反应。

无反应(-) 体温正常。

②结果判定:

注苗后, 当 2 只家兔均呈定型热反应(++), 或 1 只兔呈定型热反应(++), 另 1 只兔呈轻热反应(+) 时, 疫苗判为合格。

注苗后, 当 1 只家兔呈定型热反应(++), 或轻热反应(+), 另 1 只兔呈可疑反应(±); 或 2 只兔均呈轻热反应(+) 时, 可在注苗后 7~10 日攻毒(接种新鲜脾淋毒或冻干毒)。攻毒时, 加对照兔 2 只, 攻毒剂量为 50~100 倍乳剂。每兔耳静脉注射 1ml。

攻毒后的体温反应标准如下:

热反应(+) 潜伏期 24~72 小时, 体温上升呈明显曲线, 超过常温 1℃以上, 稽留 12~36 小时。

可疑反应(±) 潜伏期不到 24 小时或 72 小时以上, 体温曲线起伏不定, 稽留不到 12 小时或超过 36 小时而不下降。

无反应(-) 体温正常。

攻毒后, 当 2 只对照兔均呈定型热反应(++), 或 1 只兔呈定型热反应(++), 另 1 只兔呈轻热反应(+), 而 2 只注苗兔均无反应(-), 疫苗判合格。

注苗后, 如有 1 只兔呈定型热(++), 或轻热反应(+), 另 1 只兔呈可疑反应(±) 或无热反应(-), 可对可疑反应兔或无反应兔采用剖杀或采心血分离病毒的方法, 判定是否隐性感染; 或注苗后, 2 只兔均呈轻热反应, 亦可对其中 1 只兔分离病毒。方法是: 接种疫苗后 96~120 小时之间, 将兔剖杀, 采取脾脏, 用生理盐水制成 50 倍稀释乳剂(脾乳剂应无菌), 或采取心血(全血), 接种 2 只家兔, 每只兔耳静脉注射 1ml。凡有 1 只兔潜伏期 24~72 小时出现定型热反应(++), 疫苗可判为合格。

注苗后, 出现其它反应情况无法判定时, 可重检。用家兔做效检, 不应超过 3 次。

(2) 用猪效检 将疫苗用灭菌生理盐水稀释成 1/150 头份/ml, 肌肉注射无猪瘟中和抗体的健康易感猪 4 头, 每头 1ml。10~14 日后, 连同对照猪 3 头, 注射猪瘟石门系血毒 1ml ( $10^5$  最小致死量), 观察 16 日。对照猪全部发病, 且至少死亡 2 头, 免疫猪全部健活或稍

有体温反应，但无猪瘟临床症状为合格。如对照猪死亡不到 2 头，可重检，重检后应符合规定。

**【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】** 用于预防猪瘟。注射 4 日后，即可产生坚强的免疫力。断奶后无母源抗体仔猪的免疫期为 18 个月。

**【用法与用量】** (1) 按瓶签注明的头份加生理盐水稀释，大小猪均肌肉或皮下注射 1ml。

(2) 在没有猪瘟流行的地区，断奶后无母源抗体的仔猪，注射 1 次即可。有疫情威胁时，仔猪可于生后 21~30 日龄和 65 日龄左右各注射 1 次。

(3) 断奶前仔猪可接种 4 头剂疫苗，以防母源抗体干扰。

**【注意事项】** (1) 注苗后应注意观察，如出现过敏反应，应及时注射抗过敏药物。

(2) 疫苗应在 8℃ 以下的冷藏条件下运输。

(3) 使用单位收到冷藏包装的疫苗后，如保存环境超过 8~25℃ 以下时，从接到疫苗时算起，在 10 日内用完。

(4) 使用单位所在地区的气温在 25℃ 以上时，如无冷藏条件，应采用冰瓶领取疫苗，随领随用。

(5) 疫苗稀释后，如气温在 15℃ 以下，6 小时内用完；如气温在 15~27℃，则应在 3 小时内用完。

**【规格】** (1) 5 头份/瓶 (2) 10 头份/瓶 (3) 20 头份/瓶 (4) 40 头份/瓶 (5) 50 头份/瓶 (6) 60 头份/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃ 以下保存，有效期为 12 个月。

#### 附注：1 猪瘟中和试验方法

1.1 先测定猪瘟兔化弱毒（抗原）对家兔的最小感染量。试验时，将抗原用生理盐水稀释，使每毫升含有 100 个兔的最小感染量，作为工作抗原（如抗原对兔的最小感染量为  $10^{-5}$ /ml，则将抗原稀释成 1000 倍使用）。

1.2 将被检猪血清分别用灭菌生理盐水作 2 倍稀释，与含有 100 个兔的最小感染量工作抗原等量混合，摇匀后，置 10~15℃ 中和 2 小时，其间振摇 2~3 次。同时设含有相同工作抗原量加等量生理盐水（不加血清）的对照组，与被检组在同样条件下处理。

1.3 中和完毕，被检组各注射家兔 1~2 只，对照组注射家兔 2 只，各兔耳静脉注射 1ml，观察体温反应，并判定结果。

1.4 结果判定 体温反应标准同效力检验项。当对照组 2 只家兔均呈定型热反应(++)，或 1 只兔呈定型热反应(++)，另 1 只兔呈轻热反应(+) 时，方能判定结果。被检组如用 1 只家兔，须呈定型热反应；如用 2 只家兔，每只家兔应呈定型热或轻热反应，被检血清判为阴性。

1.5 注意 如被检组用 2 只家兔，其中 1 只家兔无反应或呈可疑反应时，可采血复归或对 2 只家兔进行攻毒。如被检血清出现阳性反应或复归的家兔仍为可疑反应时，则该头被

检猪不得用于猪瘟疫苗的安全（或效力）检验。被检组用 1 只家兔，不得复归或攻毒。用中和试验方法选择易感猪，无论是否同窝猪，均须逐头检测。

**附加说明：**

1. 本标准由农业部在原来猪瘟疫苗（I、II）规程的基础上拟定。

2. 本标准于 2007 年 9 月 18 日经农业部公告第 913 号发布。

3. 根据现行《中国兽药典》的要求增加【外源病毒检验】项，内容同《中国兽药典》中的同类产品。

## 政府采购专用猪瘟疫苗（细胞源）

Zhengfugaigouzhuanyong Zhuwen Huoyimiao (Xibaoyuan)

Swine Fever Vaccine, Only For Government Procurement, Live (Tissue culture origin)

本品系用猪瘟疫化弱毒株接种易感细胞培养，收获细胞培养物，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防猪瘟。

**【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》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。

**【鉴别检验】** 将疫苗用灭菌生理盐水稀释成为每毫升含有 100 个兔的最小感染量的病毒悬液，与等量的抗猪瘟病毒特异性血清充分混合，置 10~15℃中和 1 小时，其间振摇 2~3 次。同时设立阳性对照组（病毒对照）和阴性对照组（生理盐水）。中和结束后，分别接种家兔 2 只，每兔耳静脉注射 1ml，测温方法及体温反应标准同效力检验项。除阳性对照组应出现热反应外，其余 2 组在接种后 120 小时内不引起热反应。

**【安全检验】** 选用符合国家实验动物标准的饲养场或定点猪场供应，并经中和试验方法（见附注）检测无猪瘟抗体的健康易感断奶猪（注苗前观察 5~7 日，每日上下午各测体温 1 次。挑选体温、精神、食欲正常者使用）。每批冻干疫苗样品或同批各亚批样品等量混合，按瓶签注明的头份用灭菌生理盐水稀释成每毫升含 2 头份疫苗，肌肉注射猪 4 头，每头 5ml（含 10 个使用剂量）。注苗后，每日上、下午各观察并测体温 1 次，观察 21 日。体温、精神、食欲与注苗前相比没有明显变化；或体温升高超过 0.5℃，但不超过 1℃，稽留不超过 2 日（4 个温次）；或减食不超过 1 日，疫苗可判为合格。如有 1 头猪体温超过常温 1℃以上，但不超过 1.5℃，稽留不超过 2 个温次，疫苗也可判为合格。如有 1 头猪的反应超过上述标准；或出现可疑的其它体温反应和其它异常现象时，可用 4 头猪重检 1 次。重检的猪仍出现同样反应，疫苗应判为不合格。也可在猪高温期采血复归猪 2 头，每头肌肉注射可疑猪原血 5ml，测温观察 16 日。如均无反应，疫苗可判合格。如第 1 次检验结果已经确证疫苗不安全，则不应进行重检。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

(1) 用家兔效检 按瓶签注明头份用无菌生理盐水将每头份疫苗稀释 7500 倍，耳静脉

注射体重为 1.5~3kg 家兔 2 只，每只 1ml。家兔接种后，上下午各测体温 1 次，48 小时后，每隔 6 小时测体温 1 次，根据体温反应和攻毒结果进行综合判定。

①家兔接种疫苗后，体温反应标准如下：

定型热反应(++) 潜伏期 48~96 小时，体温上升呈明显曲线，至少有 3 个温次超过常温 1℃以上，并稽留 18~36 小时。如稽留 42 小时以上，必须攻毒，攻毒后无反应可判为定型热。

轻热反应(+) 潜伏期 48~96 小时，体温上升呈明显曲线，至少有 2 个温次超过常温 0.5℃以上，并稽留 12~36 小时。

可疑反应(±) 潜伏期 48~96 小时，体温曲线起伏不定，稽留不到 12 小时；或潜伏期在 24 小时以上，不足 48 小时及超过 96 小时至 120 小时出现热反应。

体温反应呈二次高峰，有一次高峰符合定型热反应(++)或轻热反应(+)标准者，均须攻毒。攻毒后无反应时，该兔热反应可判为定型热或轻热反应。

无反应(-) 体温正常。

②结果判定：

注苗后，当 2 只家兔均呈定型热反应(++)，或 1 只兔呈定型热反应(++)、另 1 只兔呈轻热反应(+)时，疫苗判为合格。

注苗后，当 1 只家兔呈定型热反应(++)或轻热反应(+)，另 1 只兔呈可疑反应(±)；或 2 只兔均呈轻热反应(+)时，可在注苗后 7~10 日攻毒(接种新鲜脾淋毒或冻干毒)。攻毒时，加对照兔 2 只，攻毒剂量为 50~100 倍乳剂。每兔耳静脉注射 1ml。

攻毒后的体温反应标准如下：

热反应(+) 潜伏期 24~72 小时，体温上升呈明显曲线，超过常温 1℃以上，稽留 12~36 小时。

可疑反应(±) 潜伏期不到 24 小时或 72 小时以上，体温曲线起伏不定，稽留不到 12 小时或超过 36 小时而不上升。

无反应(-) 体温正常。

攻毒后，当 2 只对照兔均呈定型热反应(++)，或 1 只兔呈定型热反应(++)，另 1 只兔呈轻热反应(+)，而 2 只注苗兔均无反应(-)，疫苗判合格。

注苗后，如有 1 只兔呈定型热(++)或轻热反应(+)，另 1 只兔呈可疑反应(±)或无热反应(-)，可对可疑反应兔或无反应兔采用剖杀或采心血分离病毒的方法，判明是否隐性感染；或注苗后，2 只兔均呈轻热反应，亦可对其中 1 只兔分离病毒。方法是：接种疫苗后 96~120 小时之间，将兔剖杀，采取脾脏，用生理盐水制成 50 倍稀释乳剂(脾乳剂应无菌)，或采取心血(全血)，接种 2 只家兔，每只兔耳静脉注射 1ml。凡有 1 只兔潜伏期 24~72 小时出现定型热反应(++)，疫苗可判为合格。

注苗后，出现其它反应情况无法判定时，可重检。用家兔做效检，不应超过 3 次。

(2)用猪效检 按瓶签注明头份，用灭菌生理盐水将每头份稀释 3000 倍，肌肉注射无猪瘟中和抗体的健康易感猪 2 头，每头 1ml。10~14 日后，连同对照猪 3 头，注射猪瘟石门系血毒 1ml (10<sup>5</sup> 最小致死量)，观察 16 日。对照猪全部发病，且至少死亡 2 头，免疫猪全部健活或稍有体温反应，但无猪瘟临床症状为合格。如对照猪死亡不到 2 头，可重检，重检

后应符合规定。

**【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】** 用于预防猪瘟，注射4日后，即可产生免疫力。断奶后无母源抗体仔猪的免疫期为12个月。

**【用法与用量】** (1) 按瓶签注明的头份加生理盐水稀释，大小猪均肌肉或皮下注射1ml。

(2) 在没有猪瘟流行的地区，断奶后无母源抗体的仔猪，注射1次即可。有疫情威胁时，仔猪可于生后21~30日龄和65日龄左右各注射1次。

(3) 断奶前仔猪可接种4头剂疫苗，以防母源抗体干扰。

**【注意事项】** (1) 注苗后应注意观察，如出现过敏反应，应及时注射抗过敏药物。

(2) 疫苗应在8℃以下的冷藏条件下运输。

(3) 使用单位收到冷藏包装的疫苗后，如保存环境超过8~25℃以下时，从接到疫苗时算起，限10日内用完。

(4) 使用单位所在地区的气温在25℃以上时，如无冷藏条件，应采用冰瓶领取疫苗，随领随用。

(5) 疫苗稀释后，如气温在15℃以下，限6小时内用完；如气温在15~27℃，则应在3小时内用完。

**【规格】** (1) 20头份/瓶 (2) 40头份/瓶 (3) 50头份/瓶 (4) 60头份/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃以下保存，有效期为18个月。

#### 附注：1 猪瘟中和试验方法

1.1 先测定猪瘟兔化弱毒（抗原）对家兔的最小感染量。试验时，将被检抗原用生理盐水稀释，使每毫升含有100个兔的最小感染量，作为工作抗原（如抗原对兔的最小感染量为 $10^{-5}$ /ml，则将抗原稀释成1000倍使用）。

1.2 将被检猪血清分别用生理盐水作2倍稀释，与含有100个兔的最小感染量工作抗原等量混合，摇匀后，置10~15℃中和2小时，其间振摇2~3次。同时设含有相同工作抗原量加等量生理盐水（不加血清）的对照组，与被检组在同样条件下处理。

1.3 中和完毕，被检组各注射家兔1~2只，对照组注射家兔2只，每只耳静脉注射1ml，观察体温反应，并判定结果。

1.4 结果判定 体温反应标准同效力检验项。当对照组2只家兔均呈定型热反应(++)，或1只兔呈定型热反应(++)，另一只兔呈轻热反应(+)时，方能判定结果。被检组如用1只家兔，须呈定型热反应；如用2只家兔，每只家兔应呈定型热或轻热反应，被检血清判为阴性。

1.5 注意 如被检组用2只家兔，其中1只家兔无反应或呈可疑反应时，可采血复归或对2只家兔进行攻毒。如被检血清出现阳性反应或复归的家兔仍为可疑反应时，则该头被检猪不得用于猪瘟疫苗的安全（或效力）检验。被检组用1只家兔，不得复归或攻毒。用中和试验方法选择易感猪，无论是否同窝猪，均须逐头检测。

#### 附加说明:

1. 本标准由农业部在原来猪瘟活疫苗（I、II）规程的基础上拟定。
2. 本标准于 2007 年 9 月 18 日经农业部公告第 913 号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》的要求增加【外源病毒检验】项，内容同《中国兽药典》中的同类产品。

### 鸡新城疫、传染性法氏囊病二联灭活疫苗（La Sota 株+SD 株）

JiXinchengyi Chuanranxingfashinangbing Erlian Miehuoyimiao（La sota Zhu+SD Zhu）

Newcastle Disease and Infectious Bursal Disease Vaccine（La Sota Strain+SD Strain），Inactivated

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株接种易感鸡胚培养，传染性法氏囊病病毒 SD 株接种 SPF 鸡胚成纤维细胞培养，分别收集胚液和细胞液，经超滤浓缩，甲醛溶液灭活后，与油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡新城疫和传染性法氏囊病。

**【性状】** 外观 乳白色乳剂。

剂型 油包水型。取一清洁吸管，吸取少量疫苗滴入冷水中，除第 1 滴外，均应不扩散。

稳定性 吸取疫苗 10ml 加入离心管中，以 3000r/min 离心 15 分钟，管底析出的水相应  $\leq 0.5\text{ml}$ 。

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 30~60 日龄 SPF 鸡 10 只，每只肌肉或颈部皮下注射疫苗 1ml，观察 14 日，应不出现由疫苗引起的任何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 $\mu\text{l}$ ，另 5 只不免疫作对照。接种后 21~28 日，每只鸡分别采血，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 $\mu\text{l}$ ，另 5 只不免疫作对照。接种后 21~28 日，每只鸡各肌肉注射鸡新城疫病毒北京株强毒（CVCC AV1611 株） $10^{5.0}\text{ELD}_{50}$ ，观察 14 日。对照组应全部死亡，免疫组应保护至少 7 只。

（2）鸡传染性法氏囊病部分 下列方法任择其一。

血清学方法 取 21~28 日龄 SPF 鸡 15 只，10 只各肌肉或皮下注射疫苗 0.2ml，另 5 只不免疫作对照。28 日后，连同对照鸡 5 只，分别采血，测定 IBDV 中和抗体，免疫鸡 IBDV 中和抗体几何平均滴度应  $\geq 1:5000$ ，对照鸡应  $\leq 1:10$ 。

免疫攻毒法 取 21~28 日龄 SPF 鸡 15 只，10 只各肌肉或皮下注射疫苗 0.2ml，另 5 只不接种作对照。28 日后，经口接种 10 倍稀释的鸡传染性法氏囊病病毒 BC6/85 株（CVCC

AV7 株), 每只 0.2ml (含  $2 \times 10^4$  BID)。72 小时后全部扑杀, 观察法氏囊病病变。对照组应至少有 4 只鸡出现明显病变 (如胸肌或腿肌条状出血、法氏囊肿大或萎缩、发黄、内有胶冻样分泌物等一种以上病变)。免疫鸡应全保护。

**【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传染性法氏囊病。免疫期: 商品肉鸡为 80 日; 雏鸡为 4 个月; 成鸡为 6 个月。

**【用法与用量】** 颈部皮下或肌肉注射。雏鸡、商品肉鸡, 每只 0.1ml; 成鸡开产前 2~4 周接种, 每只 0.2ml。

**【不良反应】** 一般无明显的不良反应。

**【注意事项】** (1) 本品用于接种健康鸡。体质瘦弱、患有其他疾病者, 不应使用。

(2) 使用前应仔细检查疫苗, 如发现破乳、疫苗中混有异物等情况时, 不能使用。

(3) 使用前应先使疫苗恢复到常温并充分摇匀, 启封后, 限当日使用。

(4) 本品严禁冻结。

(5) 注射针头等用具, 用前需经消毒, 注射部位应涂擦 5% 碘酒消毒。

(6) 接种时, 应执行常规无菌操作。

(7) 剩余疫苗、疫苗瓶及注射器具等应无害化处理。

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

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存, 有效期为 12 个月。

#### 附注: 1 测定鸡传染性法氏囊病中和抗体的抗原标准

测定鸡传染性法氏囊病病毒中和抗体的抗原是用鸡传染性法氏囊病病毒 SD 株制备的。抗原应符合以下标准。

1.1 性状 淡粉红色液体。

1.2 病毒含量

1.2.1 将毒种用灭菌生理盐水作 10 倍系列稀释, 取  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  3 个稀释度, 各绒毛尿囊膜接种 9~10 日龄 SPF 鸡胚 5 个, 每胚 0.2ml, 观察 168 小时, 记录 24~168 小时内死亡且胎儿特异性病变明显鸡胚, 计算  $ELD_{50}$ 。每 0.2ml 病毒含量应  $\geq 10^{5.5} ELD_{50}$ 。

1.2.2 将毒种用灭菌生理盐水作 10 倍系列稀释, 取  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  4 个稀释度, 分别接种已长成单层的 SPF 鸡胚成纤维细胞, 观察 96 小时, 计算  $TCID_{50}$ 。每 0.1ml 病毒含量应  $\geq 10^{6.5} TCID_{50}$ 。

1.3 特异性 将毒种用灭菌生理盐水稀释至  $10^{3.0} ELD_{50}/0.1ml$ , 与等量抗鸡传染性法氏囊病特异性血清混合, 室温中和 1 小时后, 以绒毛尿囊膜途径接种 10~12 日龄 SPF 鸡胚 5 个, 每胚接种 0.2ml; 同时设病毒对照 5 个, 观察 168 小时。中和组鸡胚应全部健活, 对照组鸡胚应死亡 3 个以上, 鸡胚尿囊液对鸡红细胞凝集试验应为阴性。

1.4 纯净 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无细菌、霉菌、支原体及外源病毒污染。

#### 2 鸡传染性法氏囊病中和抗体测定方法

2.1 病毒稀释 根据传染性法氏囊病病毒 SD 株病毒的效价,用细胞维持液(含 2%犊牛血清的 MEM)稀释成每 100ul 含 200TCID<sub>50</sub> 病毒。

2.2 血清稀释 将待检血清、IBDV 阳性对照血清、IBDV 阴性对照血清分别用稀释液(细胞维持液或灭菌生理盐水,下同)稀释 10 倍,然后用稀释液进行 2 倍系列稀释。

2.3 中和 取各稀释度血清与等量稀释好的病毒液混合,37℃中和 1 小时。

2.4 加样 取已长成单层、长势良好的 96 孔细胞培养板,弃去培养液,加入已中和的各稀释度血清-病毒混合液,每个稀释度血清-病毒混合液加 4 孔,每孔 200ul,同时设病毒对照和细胞对照各 4 孔。

2.5 培养观察 将 96 孔细胞培养板置 37℃培养 72~120 小时,观察各孔的细胞病变(CPE)。

2.6 试验成立判定标准 细胞对照孔细胞生长良好,病毒对照孔均出现 75%以上的 CPE,阳性对照血清的中和效价 $\geq 1:5000$ ,阴性对照血清 $\leq 1:10$ 。

2.7 判断 根据各稀释度待检血清接种后出现 CPE 的情况判定是否被保护,50%以上的细胞不出现 CPE 的最高血清稀释度即为该血清的中和效价。

#### 附加说明:

1. 本标准由青岛易邦生物工程有限公司提出。
2. 本标准于2007年12月25日经农业部公告第942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、传染性支气管炎、减蛋综合征、传染性脑脊髓炎四联灭活疫苗

Ji Xinchengyi Chuanranxingzhiqiguanyan Jiandanzonghezheng Chuanranxingnaojisuiyan  
Silian Miehuoyimiao

Newcastle Disease, Infectious Bronchitis, Egg Drop Syndrome and Avian Encephalomyelitis  
Vaccine, Inactivated

本品系用鸡新城疫病毒(NDV) La Sota 株、传染性支气管炎病毒(IBV) M41 株、减蛋综合征病毒(EDS<sub>76V</sub>) HSH<sub>23</sub> 株、传染性脑脊髓炎病毒(AEV) Van Roekel 株分别接种鸡胚或鸭胚培养,收获感染胚液,经浓缩后,用甲醛溶液灭活,然后按一定比例混合,加油佐剂乳化制成。用于预防鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征和传染性脑脊髓炎。

**【性状】** 外观 白色均匀乳剂。

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 1 滴外,均应不扩散。

稳定性 用长度为 100mm、直径为 10mm 的小圆底试管,加入 5ml 疫苗,以 3500r/min 离心 15 分,应不出现明显分层。

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 3~5 周龄 SPF 鸡 10 只，每只颈背部皮下或胸部肌肉注射疫苗 2 羽份（1.0ml），观察 21 日，应不出现由疫苗引起的局部和全身反应。

**【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 3~6 周龄 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，每只鸡分别采血，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不小于 4log<sub>2</sub>，未免疫对照组 HI 抗体效价的几何平均值应不大于 2log<sub>2</sub>，疫苗鸡新城疫部分判合格。

免疫攻毒法 用 3~6 周龄 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<sup>5</sup>ELD<sub>50</sub>，观察 14 日，对照组全部死亡，免疫组至少保护 7 只，疫苗鸡新城疫部分判合格。

（2）鸡传染性支气管炎部分 用 3~6 周龄 SPF 鸡 10 只，点眼接种鸡传染性支气管炎活疫苗（H<sub>120</sub>）1 羽份，接种后 21 日，分别采血，各肌肉注射灭活疫苗 1 羽份，21~28 日后再分别采血。将两次血清分别做 HI 试验（抗原标准见附注 1；操作术式见附注 2）。若二免血清的 HI 几何平均滴度较首免血清 HI 几何平均滴度高 3 倍以上时，疫苗鸡传染性支气管炎部分判合格。

（3）减蛋综合征部分 用 3~6 周龄 SPF 鸡 10 只，每只肌肉注射疫苗 1 羽份（0.5ml），21 日后，连同条件相同的对照鸡 5 只一起采血，检测 EDS<sub>76</sub> HI 抗体，计算几何平均滴度。对照鸡抗体效价均应  $\leq$  1:4；免疫鸡抗体效价应  $\geq$  1:128。

（4）传染性脑脊髓炎部分 用 3~6 周龄 SPF 鸡 10 只，每只颈背部皮下或胸部肌肉注射疫苗 1 羽份（0.5ml），28 日后，连同对照鸡 5 只，用 AEV VR 株强毒脑内注射，每只 0.03~0.05ml（含毒量为 10<sup>3.2</sup>EID<sub>50</sub>），观察 21 日。对照组应至少发病（表现出精神沉郁、站立不稳、步态蹒跚、瘫痪、头颈部震颤等 AE 症状）4 只，免疫组应至少保护 8 只。

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

**【作用与用途】** 用于预防鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征和传染性脑脊髓炎。免疫接种后 14~21 日产生免疫力。免疫持续期：鸡新城疫为 10 个月，减蛋综合征为 12 个月，传染性支气管炎和传染性脑脊髓炎为 7 个月。

**【用法与用量】** 用于开产前（16~20 周龄）的种鸡，颈部皮下或肌肉注射，每只 0.5ml。

**【不良反应】** 一般无可见不良反应。

**【注意事项】** （1）只能对健康鸡群进行免疫接种。

（2）用鸡新城疫活疫苗进行基础免疫后，再接种本疫苗，可提高对鸡新城疫的免疫预防效果。

（3）疫苗使用前应充分摇匀，并使疫苗升到室温。

（4）疫苗开启后应于 24 小时内用完。

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

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为12个月。

### 附注：1 鸡传染性支气管炎血凝抑制（HI）试验抗原质量标准

本品系用鸡传染性支气管炎病毒（IBV）M41株接种易感鸡胚培养，收获感染胚液，经超速离心浓缩后，经磷酸酯酶C处理制成。用于检测鸡传染性支气管炎病毒抗体。

【性状】 白色半透明液体，底部有少量沉淀。

【特异性检验】 将IB、ND、AI、EDS<sub>76</sub>、IBD标准阳性血清及SPF鸡血清按附注2.3.1项处理后，与本抗原进行血凝抑制试验，IB标准阳性血清HI抗体效价应≥1:16，ND、AI、EDS<sub>76</sub>、IBD阳性血清及SPF鸡血清HI抗体价应≤1:8。

【效价测定】 将抗原在96孔微量板上进行2倍系列稀释，加入1%鸡红细胞悬液，振荡后，置2~8℃作用45分钟，判定结果。抗原的HA价应≥1:128。

【作用与用途】 用于检测鸡传染性支气管炎病毒抗体的血凝抑制试验。

【注意事项】 使用时应将抗原充分摇匀。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 -20℃以下保存，有效期为18个月；2~8℃保存，有效期为12个月。

## 2 鸡传染性支气管炎血凝抑制（HI）试验操作术式

### 2.1 试验材料

2.1.1 IB HI 抗原 系用IBV M41株病毒液经100倍浓缩后加入磷酸酯酶C（或加入含磷酸酯酶C的A型魏氏梭菌滤液）处理制成。

### 2.1.2 试剂

2.1.2.1 HA 缓冲液 将5.96g HEPES、8.19g 氯化钠、0.15g 氯化钙依次溶解于1000ml双蒸水中，用0.1mol/L 氢氧化钠溶液或盐酸溶液调至pH值6.5，用0.2μm微孔滤器滤过，分装，置2~8℃保存备用。

2.1.2.2 生理盐水 取9g氯化钠溶解1000ml蒸馏水中，即成。

2.1.2.3 红细胞悬液 采集公鸡血液（加入阿氏液抗凝），加入生理盐水，离心，洗涤5次，最后用HA缓冲液将血球泥稀释至1%（V/V）。

2.1.2.4 25%高岭土悬液 取高岭土25g，加水至100ml，再加入0.1mol/L盐酸溶液250ml，摇匀，静置60分，弃上清，用去离子水反复洗涤至中性，置37℃，直至水份完全蒸发，用pH值7.2 PBS配成25%悬液，置2~8℃保存备用。

### 2.2 IB HI 工作抗原的制备

#### 2.2.1 IB HI 抗原效价测定

2.2.1.1 在96孔微量板上，从第1孔至第12孔，用加液器每孔加入HA缓冲液25μl。

2.2.1.2 取25μl HA 抗原，从第1孔起，依次作2倍系列稀释至第12孔，混合，弃去25ul。

2.2.1.3 每孔加入25ul 1%鸡红细胞悬液，每块板上设稀释液和红细胞悬液对照孔。

2.2.1.4 将微量板置振荡器上振荡30秒，置2~8℃作用45分钟，判定结果。判定时，将微量板倾斜45度。对照孔的红细胞完全沉淀到孔底中心，呈泪珠样流淌，HA阳性孔的

红细胞则均匀分布于孔底或呈锯齿样凝集。使红细胞完全凝集的最大稀释倍数为该抗原的 HA 效价。

2.2.2 IB HI 工作抗原的配制 如果 IB HI 抗原凝集价测定结果为 1:1024 (举例), 则 4 个 HA 单位为 1:256 ( $1024 \div 4 = 256$ ), 这时可将 HI 抗原用 HA 缓冲液稀释 256 倍, 即成 4 HA 单位的工作抗原液。

### 2.3 HI 试验操作方法

2.3.1 待检血清的处理 取 0.1ml 血清, 加入 0.3ml 25% 高岭土悬液, 混匀, 置 37℃ 60 分, 以 6000r/min 离心 15 分, 取上清, 即为 1:4 稀释的待检血清。

#### 2.3.2 HI 试验操作方法

2.3.2.1 在 96 孔微量板上, 每行从第 2 孔开始, 每孔加入 25 $\mu$ l HA 缓冲液, 直至第 12 孔。

2.3.2.2 分别在第 1、2、12 孔中加入处理过的待检血清 25 $\mu$ l。

2.3.2.3 用加样器从第 2 孔起作 2 倍系列稀释, 直至第 10 孔 (血清稀释倍数从第 1 孔的 1:4、第 2 孔的 1:8……至第 10 孔的 1:2048), 弃去 25 $\mu$ l。

2.3.2.4 向第 1~11 孔中加入 25 $\mu$ l 4 HA 单位的抗原, 在微量振荡器上振荡 30 秒, 室温下作用 30 分钟。

2.3.2.5 每孔加入 25 $\mu$ l 红细胞悬液, 振荡 30 秒, 放 2~8℃ 下反应 30~45 分钟, 判定结果。

2.3.3 判定 判定时, 将反应板倾斜 45 度。只有当抗原对照孔 (第 11 孔) 中红细胞完全凝集、血清对照孔 (第 12 孔) 中的红细胞完全沉淀时, 试验结果方为有效。若红细胞沉淀呈泪珠样流淌, 判为 HI 阳性; 若红细胞在孔底均匀分布或呈锯齿状凝集, 判为 HI 阴性。以完全抑制红细胞凝集的最高血清稀释倍数作为待检血清的 HI 抗体效价。

#### 附加说明:

1. 本标准由中国农林科学院畜牧兽医研究所、北京信得威特科技有限公司提出。
2. 本标准于 2002 年 3 月 19 日经农牧发[2002] 2 号发布。
3. 本标准于 2007 年 12 月 5 日经农业部公告第 942 号批准变更注册。变更内容: 变更制造及检验试行规程和注册单位名称。注册单位名称变更为: 北京市农林科学院、北京信得威特科技有限公司。重新发布标准。

4. 根据现行《中国兽药典》要求改变黏度测定方法, 为黏度计法。

5. 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、减蛋综合征、禽流感 H9 亚型四联灭活疫苗 (La Sota 株+M41 株+ AV127 株+HL 株)

Jixinchengyi Chuanranxingzhiqiguanyan Jiandanzonghezheng Qinliugan H9 Yaxing Silian

Miehuoyimiao (La Sota Zhu+ M41 Zhu+ AV127 Zhu+ HL Zhu)

Newcastle Disease, Infectious Bronchitis, Egg Drop Syndrome and Avian Influenza (H9

Subtype) Vaccine, Inactivated (La Sota strain+M41 strain+AV127 strain+HL strain)

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株、鸡传染性支气管炎病毒 M41 株、鸡减蛋综合征病毒 AV127 株和 A 型禽流感病毒 A/Chicken/Henan Luoyang/HL/2001 (H9N2) (简称 HL 株) 分别接种易感鸡胚或鸭胚, 收获感染胚液, 超滤浓缩, 经甲醛溶液灭活后, 按一定比例混合, 与矿物油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡新城疫、鸡传染性支气管炎、鸡减蛋综合征和 H9 亚型禽流感。

**【性状】** 外观 乳白色均匀乳剂。

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 吸取疫苗 10ml 加入离心管中, 以 3000r/min 离心 15 分钟, 管底析出的水相应  $\leq 0.5\text{ml}$ 。

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 3~6 周龄的 SPF 鸡 10 只, 各肌肉或皮下注射疫苗 1.0ml, 观察 14 日, 应不出现因注射疫苗而引起的任何局部和全身反应。

**【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检验。

血清学方法 用 30~60 日龄 SPF 鸡 15 只, 10 只各肌肉或皮下注射疫苗 20 $\mu\text{l}$ , 另 5 只作对照。接种后 21~28 日, 每只鸡各采血, 分离血清, 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 只各肌肉或皮下注射疫苗 20 $\mu\text{l}$ , 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强毒  $10^{5.0}\text{ELD}_{50}$ , 观察 14 日。对照组应全部死亡, 免疫组应至少保护 7 只。

(2) 鸡传染性支气管炎部分 用 3~4 周龄 SPF 鸡 10 只, 点眼接种鸡传染性支气管炎活疫苗 (H120) 1 羽份, 接种后 21 日, 分别采血, 分离血清, 各加强免疫接种 (肌肉注射) 灭活疫苗 0.5ml, 接种后 28 日, 分别采血, 分离血清。将两次血清分别做 HI 试验 (抗原标准见附注 1; 操作规程见附注 2), 若二免血清 HI 抗体效价的几何平均值较首免血清 HI 抗体效价的几何平均值高 3 倍以上时, 疫苗鸡传染性支气管炎部分判合格。

(3) 鸡减蛋综合征部分 用 3~6 周龄 SPF 鸡 15 只, 10 只各皮下或肌肉注射疫苗 0.5ml, 另 5 只作对照。接种后 21~35 日, 每只鸡各采血, 分离血清, 进行 HI 抗体效价测定。免疫组 HI 抗体效价的几何平均值应  $\geq 7\log_2$ , 未免疫对照组 HI 抗体效价的几何平均值应  $\leq 2\log_2$ 。

(4) 禽流感 H9 亚型部分 下列二种方法任择其一。

取 3~4 周龄 SPF 鸡 15 只, 其中 10 只各皮下或肌肉注射疫苗 0.3ml, 另 5 只作对照, 接种后 21 日, 每只鸡各采血, 分离血清, 用禽流感病毒 H9 亚型抗原测定 HI 抗体效价。免疫组 HI 抗体效价的几何平均值应  $\geq 6.5\log_2$ , 对照组 HI 抗体效价的几何平均值应  $\leq 2\log_2$ 。

或上述免疫鸡和对照鸡, 用 1:10 稀释的毒种进行静脉注射, 每只鸡 0.2ml。攻毒后第 5 日, 采集每只鸡的泄殖腔拭子, 分别经尿囊腔接种 10~11 日龄 SPF 鸡胚 5 枚, 每胚 0.2ml, 孵育观察 5 日, 测定所有鸡胚液 HA 效价。每个拭子样品接种的 5 枚鸡胚中只要有 1 枚鸡胚

的鸡胚液的 HA 效价 $\geq 1:16$ （微量法），即可判为病毒分离阳性。对病毒分离阴性的样品，应盲传 1 次后再进行判定。免疫组应至少有 9 只鸡病毒分离阴性，对照组应全部为阳性。

**【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。

**【作用用途】** 用于预防鸡新城疫、鸡传染性支气管炎、鸡减蛋综合征和 H9 亚型禽流感。免疫期为 5 个月。

**【用法用量】** 皮下或肌肉注射，开产前 2~4 周的蛋鸡及种鸡，每只 0.5ml。

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】** （1）用前和使用中应充分摇匀。

（2）用前应使疫苗温度升至室温。

（3）一经开瓶启用，应尽快用完（限当日用完）。

（4）本品严禁冻结，破乳后切勿使用。

（5）仅供健康鸡只预防接种。

（6）接种工作完毕，双手应立即洗净并消毒，疫苗瓶及剩余的疫苗，应以燃烧或煮沸破坏，并做无害化处理。

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

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为 12 个月。

#### 附注：1 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验抗原质量标准

本品系用鸡传染性支气管炎病毒 M41 株制备的血凝抑制抗原。所用 IB-HI 抗原应达到如下标准：

**【性状】** 无色疏松团块，加稀释液后迅速溶解。

**【效价测定】** 按标识体积稀释后，HA 效价应 $\geq 1:128$ 。

**【特异性检验】** 抗原与阴性血清、鸡新城疫、禽流感、减蛋综合征等病毒阳性血清的 HI 效价应 $\leq 3\log_2$ 。

**【作用和用途】** 用于鸡传染性支气管炎血凝抑制抗体的检测。

**【规格】** 1ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为 180 个月。

#### 2 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验操作方法

##### 2.1 鸡传染性支气管炎 HI 抗原工作液配制

2.1.1 鸡传染性支气管炎 HI 抗原血凝价测定 取 96 孔 V 型微量反应板 1 块，每孔加 25 $\mu$ l PBS (0.01mol/L, pH 值为 7.0~7.4)，第一排加 25 $\mu$ l 抗原，并做 2~4 个重复孔，然后将抗原进行 2 倍系列稀释，稀释后每孔再加入 25 $\mu$ l PBS，最后再加入 1% 鸡红细胞悬液 25 $\mu$ l，用微量振荡器混匀，2~8℃静置 40 分钟判定结果，以使 100% 红细胞凝集的抗原最高稀释倍数作为判定终点。

2.1.2 4HA 单位抗原的配制 根据测定的 HI 抗原 HA 效价，用 PBS 配制 4HA 单位抗原。将配制好的 4HA 单位抗原用 PBS 稀释，使其稀释度为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7。在每一稀释度的 25 $\mu$ l 抗原中加 25 $\mu$ l PBS，再加入 1% 鸡红细胞悬液 25 $\mu$ l，混匀，2~

8℃静置 40 分钟，判定结果。如果 1：4 稀释为 100%红细胞凝集终点，表明配制的是 4HA 单位抗原；如果 100%红细胞凝集终点是 1：5 或 1：6，表明配制的 4HA 单位抗原实际上是高于 4 个单位；如果 100%红细胞凝集终点是 1：2 或 1：3，表明配制的 4HA 单位抗原实际上是低于 4 个单位。应根据检验结果适当调整，使抗原工作液为 4HA 单位。

## 2.2 血凝抑制试验（HI）

2.2.1 取 96 孔 V 型微量反应板，每孔加 25μlPBS。

2.2.2 分别吸取 25μl 待检血清，加至每块板的第一排各相应孔内，并在每块板上设标准阳性血清和阴性血清对照，然后 2 倍系列稀释。

2.2.3 分别向各孔中加入含 4HA 单位的抗原 25μl，2~8℃静置 30 分钟。

2.2.4 每孔中加入 1%（V/V）鸡红细胞悬液 25μl，轻轻混匀，2~8℃静置 40 分钟。

2.2.5 结果判定 将反应板倾斜，凡血清反应孔与红细胞对照孔中红细胞以同样速度从孔底流淌者判为血凝抑制。当阴性血清 HI 效价 $\leq 3\log_2$ 、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差 $\leq 1\log_2$ 时，试验方可成立。以完全抑制 4HA 单位抗原的血清最高稀释度作为 HI 效价。

### 附加说明：

1. 本标准由洛阳普莱柯生物工程有限公司等 3 家提出。
2. 本标准于 2008 年 1 月 20 日经农业部公告第 976 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。
5. 删除附注 1 帽子中的“因目前国内暂无商品化的 IB-HI 抗原，暂采用国际通用的进口的 IB-HI 抗原”——已经规定了 IB-HI 抗原标准，凡符合该标准的抗原，均可使用。

## 鸡新城疫低毒力耐热保护剂活疫苗（La Sota 株）

Ji Xinchengyididuli 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低毒力 La Sota 株接种 SPF 鸡胚培养，收获感染胚液，加入适宜的耐热冻干保护剂，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。

**【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。

**【鉴别检验】** 将疫苗稀释至含  $10^5\text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ ，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 10 日龄 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，应不引起特异性死亡，且至少存活 8 枚，鸡胚液作红细胞凝集试验，应为阴性。

**【安全检验】** 用2~7日龄SPF雏鸡20只，分成2组，第1组10只，每只滴鼻接种0.05ml（含10个使用剂量）；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，免疫组和对照组均应不超过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3个适宜的稀释度，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小时内死亡的鸡胚弃去不计，在48~120小时内死亡的鸡胚，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 $\geq 1:160$ （微量法1:128）者判为感染，计算半数感染量，每羽份 $\geq 10^6 \text{EID}_{50}$ ，判为合格。

(2) 用鸡检验 用30~60日龄的SPF鸡10只，每只滴鼻接种0.01羽份，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 $10^4 \text{ELD}_{50}$ ），观察14日。对照鸡应全部发病死亡，免疫鸡至少保护9只，判为合格。

**【耐老化试验】** 取疫苗5瓶，置37℃温箱中10日后，取其中3瓶，测定病毒含量，每羽份病毒含量下降不超过1个滴度，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，用灭菌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。

**【注意事项】** (1) 有鸡支原体感染的鸡群，禁用喷雾免疫。

(2) 点眼、滴鼻效果更佳；饮水免疫在水中加2~5%脱脂奶效果更佳。

(3) 饮水免疫忌用金属容器，所用水不得含有氯及其它消毒剂。饮水免疫前停水4小时，保证每只鸡都能充分饮服。

(4) 疫苗应随配随用，稀释后的疫苗应放冷暗处，必须在4小时内用完。

(5) 本品包装箱和包装盒为一次性使用品，用完后须销毁，使用后的疫苗瓶、器具及剩余的疫苗必须灭菌或消毒后妥善处理。

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

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为24个月。

**附加说明：**

1. 本标准由南京天邦生物科技有限公司提出。

2. 本标准于2008年2月25日经农业部公告第987号发布。

## 鸡新城疫、传染性支气管炎二联灭活疫苗（La Sota株+M41株）

Ji Xinchengyi Chuanranxingzhiqiguanyan Erlian Miehuoyimiao (La Sota Zhu +M41 Zhu)

Newcastle Disease and Infectious Bronchitis Vaccine, Inactivated (La Sota Strain+M41 Strain)

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株和鸡传染性支气管炎病毒 M41 株分别接种易感鸡胚培养, 收获感染胚液, 经甲醛灭活、浓缩后加油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡新城疫和传染性支气管炎。

**【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, 除第 1 滴外, 均不应扩散。

稳定性 吸取疫苗 10ml 加入离心管中, 以 3000r/min 离心 15 分钟, 管底析出的水相应  $\leq 0.5\text{ml}$ 。

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 3~4 周龄 SPF 鸡 10 只, 各胸部肌肉注射疫苗 1ml, 观察 14 日, 应不出现由疫苗注射引起的任何局部和全身不良反应。

**【效力检验】** (1) 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 $\mu\text{l}$  (1/25 羽份), 另 5 只作对照。接种后 21~28 日, 每只鸡分别采血, 分离血清, 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 $\mu\text{l}$  (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强毒 (CVCC AV1611 株)  $10^{5.0}\text{ELD}_{50}$ , 观察 14 日。对照组应全部死亡, 免疫组应至少保护 7 只。

(2) 传染性支气管炎部分 用 2~4 周龄 SPF 鸡 10 只, 各滴鼻接种鸡传染性支气管炎活疫苗 1 羽份。21 日后, 分别采血, 分离血清。再接种二联灭活疫苗 1 羽份, 21 日后再分别采血, 分离血清。将 2 次血清分别做 HI 试验。若二免血清的 HI 抗体效价几何平均滴度 (GMT) 较首免血清 HI 抗体效价几何平均滴度高 3 倍以上判合格。

**【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】** 用于预防鸡新城疫和传染性支气管炎。

**【用法与用量】** 颈部皮下或肌肉注射。3 周龄以内的雏鸡, 每只 0.3ml, 成鸡每只 0.5ml。

**【不良反应】** 无明显不良反应。

**【注意事项】** (1) 仅用于接种健康鸡。

(2) 本品严禁冻结。如出现破损、异物或破乳分层等异常现象, 切勿使用。

(3) 接种时, 注射器具需经高压或煮沸消毒, 注射部位应用碘酊消毒。

(4) 用时摇匀, 并使疫苗恢复至室温。疫苗瓶一旦开启, 限当日用完。

(5) 屠宰前 21 日内禁止使用。

(6) 一旦误将疫苗注射到人体内, 应立即就医, 并告知医生本品含有矿物油佐剂。

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

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为18个月。

### 附注：1 鸡传染性支气管炎的抗原标准及操作方法

1.1 鸡传染性支气管炎抗原标准 本品系用鸡传染性支气管炎病毒 M41 株接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚，选取 36~48 小时死亡或感染的鸡胚，收获鸡胚液，装于灭菌容器内。将无菌检验合格、病毒含量 $\geq 10^{6.0} \text{EID}_{50}/0.1\text{ml}$ 、且对 1% 鸡红细胞凝集试验为阴性的鸡胚液混合，经灭活浓缩后，用 A 型产气荚膜梭菌滤液处理，冷冻真空干燥制成。用于鸡传染性支气管炎 HI 抗体效价的测定。

【性状】 黄白色或微黄色疏松团块，加稀释液后迅速溶解。

【效价测定】 按标识体积稀释后，HA 效价应 $\geq 1:128$ 。

【非特异性检验】 对鸡阴性血清，鸡新城疫、禽流感、减蛋综合征等病毒阳性血清 HI 效价应 $\leq 3 \log_2$ 。

【作用和用途】 用于鸡传染性支气管炎 HI 抗体效价测定。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃，有效期暂为 6 个月。

### 1.2 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验操作方法

#### 1.2.1 鸡传染性支气管炎 HI 抗原工作液配制

1.2.1.1 鸡传染性支气管炎 HI 抗原血凝价测定 取 96 孔 V 型微量反应板 1 块，每孔加 25 $\mu\text{l}$  注射用生理盐水，第 1 排加 25 $\mu\text{l}$  抗原，并做 2~4 个重复孔，然后将抗原进行 2 倍系列稀释，稀释后每孔再加入 25 $\mu\text{l}$  注射用生理盐水，最后再加入 0.5% 鸡红细胞悬液 25 $\mu\text{l}$ ，用微量振荡器混匀，置于 2~8℃，40 分钟后判定结果，以使 100% 红细胞凝集的抗原最高稀释倍数作为判定终点。

#### 1.2.1.2 鸡传染性支气管炎 HI 抗原工作液配制

1.2.1.2.1 4HA 单位抗原的配制 根据测定的 HI 抗原 HA 效价，用注射用生理盐水配制 4HA 单位抗原。将配制好的 4HA 单位抗原用注射用生理盐水稀释，使其稀释度 1:2、1:4、1:8、1:16。在每稀释度的 25 $\mu\text{l}$  抗原中加 25 $\mu\text{l}$  注射用生理盐水，再加入 0.5% 的鸡红细胞悬液 25 $\mu\text{l}$ ，混匀，置于 2~8℃，40 分钟判定结果。如果 1:4 稀释为 100% 红细胞凝集终点，表明配制的是 4HA 单位抗原；如果 100% 红细胞凝集终点是 1:8 或 1:16，表明配制的 4HA 单位抗原实际上高于 4 个单位；如果 100% 红细胞凝集终点是 1:2，表明配制的 4HA 单位抗原实际上低于 4 个单位。应根据检验结果适当调整，使抗原工作液确为 4HA 单位。

#### 1.2.2 血凝抑制试验 (HI)

1.2.2.1 取 96 孔 V 型微量反应板，每孔中加入 25 $\mu\text{l}$  注射用生理盐水。

1.2.2.2 分别吸取 25 $\mu\text{l}$  待检血清，加至每块板的第 1 排各相应孔内，并在每块板上设标准阳性血清和阴性血清对照，然后 2 倍系列稀释。

1.2.2.3 分别向各孔中加入含 4HA 单位的抗原 25 $\mu\text{l}$ ，2~8℃静置 30 分钟。

1.2.2.4 每孔中加入 25 $\mu\text{l}$  0.5% (V/V) 鸡红细胞悬液，轻轻混匀，2~8℃静置 40 分钟。

1.2.2.5 结果判定 将反应板倾斜，凡血清反应孔与红细胞对照孔中红细胞以同样速度

从孔底流淌者判为血凝抑制。当阴性血清 HI 效价 $\leq 3 \log_2$ 、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差 $\leq 1 \log_2$ 时，试验方可成立。以完全抑制 4HA 单位抗原的血清最高稀释度作为 HI 效价。

### 2 高岭土处理血清方法

2.1 将血清样品 56℃水浴作用 30 分钟灭活。

2.2 取 100 $\mu$ l 灭活血清加入 300 $\mu$ l 25%酸性高岭土溶液混匀，室温作用 30 分钟。2000r/min 离心 10 分钟，取上清。加新鲜红细胞泥一滴，混匀，室温作用 30 分钟。2000r/min 离心 10 分钟，取上清待检。

### 3 25%酸性高岭土配制方法

3.1 取白陶土 25g 置离心管中，加入 1mol/L 的盐酸溶液，搅拌摇匀，2500r/min 离心 10 分钟；

3.2 弃上清，加入 1mol/L 的盐酸溶液洗 3 次，2500r/min 离心 10 分钟弃上清；

3.3 将沉淀的白陶土用 pH7.2 的 PBS 溶液稀释成 25%悬液，用 5mol/L 的氢氧化钠溶液调 pH 值为 7.2；

3.4 116℃高压灭菌 30 分钟，4℃保存备用。

#### 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 2008 年 2 月 25 日经农业部公告第 987 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、传染性支气管炎、减蛋综合征三联灭活疫苗（La Sota 株 +M41 株+京 911 株）

Ji Xinchengyi Chuanranxingzhiqiguanyan Jiandanzonghezheng Sanlian Miehuoyimiao (La Sota Zhu +M41 Zhu +Jing 911 Zhu)

Newcastle Disease Infectious Bronchitis and Egg Drop Syndrome Vaccine, Inactivated (La Sota Strain+M41 Strain+Beijing 911 Strain)

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株、鸡传染性支气管炎病毒 M41 株和减蛋综合征病毒京 911 株分别接种易感鸡胚或鸭胚培养，收获感染胚液，经甲醛灭活、浓缩后加油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡新城疫、传染性支气管炎和减蛋综合征。

**【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，除第 1 滴外，均不应扩散。

稳定性 吸取疫苗 10ml 加入离心管中，以 3000r/min 离心 15 分钟，管底析出的水相应 $\leq 0.5$ 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 3~4 周龄 SPF 鸡 10 只，各胸部肌肉注射疫苗 1ml，观察 14 日，应不出现由疫苗注射引起的任何局部和全身不良反应。

**【效力检验】** (1) 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，每只鸡分别采血，分离血清，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强毒 (CVCC AV1611 株)  $10^{5.0}$ 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) 传染性支气管炎部分 用 2~4 周龄 SPF 鸡 10 只，各滴鼻接种鸡传染性支气管炎活疫苗 1 羽份。21 日后，分别采血，分离血清。再接种三联灭活疫苗 1 羽份，21 日后再分别采血，分离血清。将 2 次血清分别做 HI 试验。若二免血清的 HI 抗体效价几何平均滴度 (GMT) 较首免血清 HI 抗体效价几何平均滴度高 3 倍以上判合格。

(3) 减蛋综合征部分 用 3~5 周龄 SPF 鸡 10 只，各肌肉或皮下注射疫苗 0.5ml，观察 21~28 日，连同对照鸡 5 只，分别采血，分离血清，测定 HI 抗体。对照鸡 HI 抗体效价应 $\leq 1:2$ ，免疫鸡 HI 抗体效价几何平均滴度应 $\geq 1:128$ 。

**【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、传染性支气管炎和减蛋综合征。

**【用法与用量】** 颈部皮下或肌肉注射。主要用于开产前期蛋鸡和种鸡的免疫，在鸡群开产前 14~28 日进行免疫，每只 0.5ml。

**【不良反应】** 无明显不良反应。

**【注意事项】** (1) 仅用于接种健康鸡。

(2) 本品严禁冻结。如出现破损、异物或破乳分层等异常现象，切勿使用。

(3) 接种时，注射器具需经高压或煮沸消毒，注射部位应用碘酊消毒。

(4) 用时摇匀，并使疫苗恢复至室温。疫苗瓶一旦开启，限当日用完。

(5) 屠宰前 21 日内禁止使用。

(6) 一旦误将疫苗注射到人体内，应立即就医，并告知医生本品含有矿物油佐剂。

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

**【贮藏与有效期】** 2~8 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 18 个月。

## 附注：1 鸡传染性支气管炎的抗原标准及操作方法

### 1.1 鸡传染性支气管炎抗原标准

本品系用鸡传染性支气管炎病毒 M41 株接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚，选取 36~48 小时死亡或感染的鸡胚，收获鸡胚液，装于灭菌容器内。将无菌检验合格、病毒含量 $\geq 10^{6.0}$ EID<sub>50</sub>/0.1ml、

且对 1% 鸡红细胞凝集试验为阴性的鸡胚液混合，经灭活浓缩后，用 A 型产气荚膜梭菌滤液处理，冷冻真空干燥制成。用于鸡传染性支气管炎 HI 抗体效价的测定。

【性状】 黄白色或微黄色疏松团块，加稀释液后迅速溶解。

【效价测定】 按标识体积稀释后，HA 效价应 $\geq 1:128$ 。

【非特异性检验】 对鸡阴性血清，鸡新城疫、禽流感、减蛋综合征等病毒阳性血清 HI 效价应 $\leq 3 \log_2$ 。

【作用与用途】 用于鸡传染性支气管炎 HI 抗体效价测定。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃，有效期暂为 6 个月。

## 1.2 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验操作方法

### 1.2.1 鸡传染性支气管炎 HI 抗原工作液配制

1.2.1.1 鸡传染性支气管炎 HI 抗原血凝价测定 取 96 孔 V 型微量反应板 1 块，每孔加 25 $\mu$ l 注射用生理盐水，第 1 排加 25 $\mu$ l 抗原，并做 2~4 个重复孔，然后将抗原进行 2 倍系列稀释，稀释后每孔再加入 25 $\mu$ l 注射用生理盐水，最后再加入 0.5% 鸡红细胞悬液 25 $\mu$ l，用微量振荡器混匀，置于 2~8℃，40 分钟后判定结果，以使 100% 红细胞凝集的抗原最高稀释倍数作为判定终点。

### 1.2.1.2 鸡传染性支气管炎 HI 抗原工作液配制

1.2.1.2.1 4HA 单位抗原的配制 根据测定的 HI 抗原 HA 效价，用注射用生理盐水配制 4HA 单位抗原。将配制好的 4HA 单位抗原用注射用生理盐水稀释，使其稀释度 1:2、1:4、1:8、1:16。在每稀释度的 25 $\mu$ l 抗原中加 25 $\mu$ l 注射用生理盐水，再加入 0.5% 的鸡红细胞悬液 25 $\mu$ l，混匀，置于 2~8℃，40 分钟判定结果。如果 1:4 稀释为 100% 红细胞凝集终点，表明配制的是 4HA 单位抗原；如果 100% 红细胞凝集终点是 1:8 或 1:16，表明配制的 4HA 单位抗原实际上高于 4 个单位；如果 100% 红细胞凝集终点是 1:2，表明配制的 4HA 单位抗原实际上低于 4 个单位。应根据检验结果适当调整，使抗原工作液确为 4HA 单位。

### 1.2.2 血凝抑制试验 (HI)

1.2.2.1 取 96 孔 V 型微量反应板，每孔中加入 25 $\mu$ l 注射用生理盐水。

1.2.2.2 分别吸取 25 $\mu$ l 待检血清，加至每块板的第 1 排各相应孔内，并在每块板上设标准阳性血清和阴性血清对照，然后 2 倍系列稀释。

1.2.2.3 分别向各孔中加入含 4HA 单位的抗原 25 $\mu$ l，2~8℃ 静置 30 分钟。

1.2.2.4 每孔中加入 25 $\mu$ l 0.5% (V/V) 鸡红细胞悬液，轻轻混匀，2~8℃ 静置 40 分钟。

1.2.2.5 结果判定 将反应板倾斜，凡血清反应孔与红细胞对照孔中红细胞以同样速度从孔底流淌者判为血凝抑制。当阴性血清 HI 效价 $\leq 3 \log_2$ 、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差 $\leq 1 \log_2$  时，试验方可成立。以完全抑制 4HA 单位抗原的血清最高稀释度作为 HI 效价。

## 2 高岭土处理血清方法

2.1 将血清样品 56℃ 水浴作用 30 分钟灭活。

2.2 取 100 $\mu$ l 灭活血清加入 300 $\mu$ l 25% 酸性高岭土溶液混匀，室温作用 30 分钟。2000r/min 离心 10 分钟，取上清。加新鲜红细胞泥一滴，混匀，室温作用 30 分钟。2000r/min

离心 10 分钟，取上清待检。

### 3 25%酸性高岭土配制方法

3.1 取白陶土 25g 置离心管中，加入 1mol/L 的盐酸溶液，搅拌摇匀，2500r/min 离心 10 分钟；

3.2 弃上清，加入 1mol/L 的盐酸溶液洗 3 次，2500r/min 离心 10 分钟弃上清；

3.3 将沉淀的白陶土用 pH7.2 的 PBS 溶液稀释成 25%悬液，用 5mol/L 的氢氧化钠溶液调 pH 值为 7.2；

3.4 116℃高压灭菌 30 分钟，4℃保存备用。

#### 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 2008 年 2 月 25 日经农业部公告第 987 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、传染性支气管炎二联灭活疫苗（La Sota 株+M41 株）

Ji Xinchengyi Chuanranxingzhiqiguanyan Erlian Miehuoyimiao (La Sota Zhu +M41 Zhu)

Newcastle Disease and Infectious Bronchitis Vaccine, Inactivated (La Sota Strain+M41 Strain)

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株、传染性支气管炎病毒 M41 株分别接种易感鸡胚、收获感染胚液、超滤浓缩后经甲醛溶液灭活，加油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡新城疫、传染性支气管炎。

**【性状】** 外观 乳白色乳剂。

剂型 油包水型。取一清洁吸管，吸取少量疫苗滴入冷水中，除第 1 滴外，均应不扩散。

稳定性 吸取疫苗 10ml 加入离心管中，以 3000r/min 离心 15 分钟，管底析出的水相应 ≤0.5ml。

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 30~60 日龄 SPF 鸡 10 只，每只肌肉或颈部皮下注射疫苗 1ml，观察 14 日，应不出现由疫苗引起的任何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 20μl，另 5 只不免疫作对照。免疫后 21~28 日，每只鸡分别采血，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 ≥4log<sub>2</sub>，未免疫对照组 HI 抗体效价的几何平均值应 ≤2log<sub>2</sub>。

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 20μl，另 5 只

不免疫作对照。免疫后 21~28 日，每只鸡分别肌肉注射鸡新城疫病毒北京株强毒（CVCC AV1611 株） $10^{5.0}$ ELD<sub>50</sub>，观察 14 日。对照组应全部死亡，免疫组应保护至少 7 只。

（2）鸡传染性支气管炎部分 用 14~42 日龄 SPF 鸡 20 只，各点眼免疫 H120 弱毒活疫苗 1 羽份。免疫后 21~28 日分别采血，分离血清，同时免疫二联灭活疫苗，每只 0.3ml，二免后 21~28 日再分别采血，分离血清。将两次血清分别测 HI 效价。二免血清的 HI 效价几何平均值应比首免血清 HI 效价几何平均值高 3 倍以上。

**【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传染性支气管炎。接种后 21 日产生免疫力。

**【用法与用量】** 肌肉或颈部皮下注射。雏鸡每只 0.3ml，免疫期为 4 个月；肉鸡每只 0.3ml，免疫期为 2 个月；成鸡每只 0.5ml，免疫期为 6 个月。

**【不良反应】** 无。

**【注意事项】** （1）该疫苗免疫前或免疫同时应用新城疫、传染性支气管炎弱毒疫苗作基础免疫。

（2）体质瘦弱、患有其它疾病的鸡，禁止使用。

（3）应仔细检查疫苗，如发现破乳、疫苗中混有异物等情况时，不能使用。

（4）使用前应先使疫苗恢复到常温并充分摇匀。

（5）疫苗启封后，限当日使用。

（6）本品不能冻结。

（7）注射器具，用前需经消毒，注射部位应涂擦 5% 碘酒消毒。

（8）剩余的疫苗及用具，应经无害化处理后废弃。

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

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 12 个月。

### 附注：1 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验抗原质量标准

本品系用鸡传染性支气管炎病毒 M<sub>41</sub> 株制备的血凝抑制抗原。所用 IB-HI 抗原应达到如下标准：

**【性状】** 微黄色疏松团块。

**【效价测定】** 按标识体积稀释后，对 1% 鸡红细胞凝集价应  $\geq 8\log_2$ 。

**【特异性检验】** 抗原与传染性支气管炎 M<sub>41</sub> 株阳性血清呈阳性反应 ( $\geq 8\log_2$ )，与禽流感阳性血清、鸡新城疫阳性血清、减蛋综合征阳性血清、SPF 鸡血清均为阴性反应 ( $\leq 3\log_2$ )。

**【作用与用途】** 用于检测传染性支气管炎（Massachusetts 血清型）HI 抗体的红细胞凝集抑制试验。

**【规格】** 1ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 120 个月。

### 2 鸡传染性支气管炎血阳性血清标准

**【性状】** 微黄色或淡红色疏松团块。

【效价测定】 按标识体积稀释后，HI 抗体效价应 $\geq 8\log_2$ 。

【特异性检验】 阳性血清与传染性支气管炎 M<sub>41</sub> 株抗原应呈阳性反应 ( $\geq 8\log_2$ )，与禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征抗原应为阴性反应 ( $\leq 3\log_2$ )。

【作用与用途】 用于传染性支气管炎的红细胞凝集抑制试验对照。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为 60 个月。

### 3 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验操作方法

#### 3.2.1 鸡传染性支气管炎 HI 抗原工作液配制

3.2.1.1 鸡传染性支气管炎 HI 抗原血凝价测定 取 96 孔 V 型微量反应板 1 块，每孔加 25 $\mu$ l PBS (0.01mol/L, pH 值为 7.0~7.4)，第一排加 25 $\mu$ l 抗原，并做 2~4 个重复孔，然后将抗原进行 2 倍系列稀释，稀释后每孔再加入 25 $\mu$ l PBS，最后再加入 1%鸡红细胞悬液 25 $\mu$ l，用微量振荡器混匀，2~8℃静置 40 分钟判定结果，以使 100%红细胞凝集的抗原最高稀释倍数作为判定终点。

3.2.1.2 鸡传染性支气管炎 HI 抗原工作液配制 (4HA 单位抗原的配制) 根据测定的 HI 抗原 HA 效价，用 PBS 溶液配制 4HA 单位抗原。将配制好的 4HA 单位抗原用 PBS 稀释，使其稀释度为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7。在每一稀释度的 25 $\mu$ l 抗原中加 25 $\mu$ l PBS，再加入 1%鸡红细胞悬液 25 $\mu$ l，混匀，2~8℃静置 40 分钟，判定结果。如果 1:4 稀释为 100%红细胞凝集终点，表明配制的是 4HA 单位抗原；如果 100%红细胞凝集终点是 1:5 或 1:6，表明配制的 4HA 单位抗原实际上是高于 4 个单位；如果 100%红细胞凝集终点是 1:2 或 1:3，表明配制的 4HA 单位抗原实际上是低于 4 个单位。应根据检验结果适当调整，使抗原工作液为 4HA 单位。

#### 3.2.2 血凝抑制试验 (HI)

3.2.2.1 取 96 孔 V 型微量反应板，每孔加 25 $\mu$ l PBS。

3.2.2.2 分别吸取 25 $\mu$ l 待检血清，加至每块板的第一排各相应孔内，并在每块板上设标准阳性血清和阴性血清对照，然后 2 倍系列稀释。

3.2.2.3 分别向各孔中加入含 4HA 单位的抗原 25 $\mu$ l，2~8℃静置 30 分钟。

3.2.2.4 每孔中加入 1% (V/V) 鸡红细胞悬液 25 $\mu$ l，轻轻混匀，2~8℃静置 40 分钟。

3.2.2.5 结果判定 将反应板倾斜，凡血清反应孔与红细胞对照孔中红细胞以同样速度从孔底流淌者判为血凝抑制。当阴性血清 HI 效价 $\leq 3\log_2$ 、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差 $\leq 1\log_2$ 时，试验方可成立。以完全抑制 4HA 单位抗原的血清最高稀释度作为 HI 效价。

#### 附加说明:

1. 本标准由青岛易邦生物工程有限公司提出。

2. 本标准于 2008 年 4 月 24 日经农业部公告第 1023 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。

5. 删除附注 1 帽子中的“因目前国内暂无商品化的 IB-HI 抗原，暂采用国际通用的进口的 IB-HI 抗原”——已经规定了 IB-HI 抗原标准，凡符合该标准的抗原，均可使用。

## 猪瘟活疫苗（传代细胞源）

Zhuwen Huoyimiao (Chuandai Xibao Yuan)

Classical Swine Fever Vaccine, Live (Cell Line Origin)

本品系用猪瘟兔化弱毒株接种易感传代细胞培养，收获细胞培养物，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防猪瘟。

**【性状】** 本品为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。

**【鉴别检验】** 将疫苗用灭菌生理盐水稀释成为每毫升含有 100 个兔的最小感染量的病毒悬液，与等量的抗猪瘟病毒特异性血清充分混合，置 10~15℃中和 1 小时，其间振摇 2~3 次。同时设立阳性对照组（病毒对照）和阴性对照组（灭菌生理盐水）。中和结束后，分别接种家兔 2 只，每兔耳静脉注射 1ml，测温方法及体温反应标准同效力检验项。除阳性对照组应出现热反应外，其余 2 组在接种后 120 小时内不引起热反应。

**【安全检验】** 选用符合国家实验动物标准的饲养场或定点猪场供应，并经中和试验方法（见附注）检测无猪瘟抗体的健康易感断奶猪（注苗前观察 5~7 日，每日上下午各测体温 1 次。挑选体温、精神、食欲正常者使用）。每批冻干疫苗样品或同批各亚批样品等量混合，按瓶签注明的头份用灭菌生理盐水稀释成每毫升含 6 头份疫苗，肌肉注射猪 4 头，每头 5ml（含 30 个使用剂量）。注苗后，每日上、下午各观察并测体温 1 次，观察 21 日。体温、精神、食欲与注苗前相比没有明显变化；或体温升高超过 0.5℃，但不超过 1℃，稽留不超过 2 日（4 个温次）；或减食不超过 1 日，疫苗可判为合格。如有 1 头猪体温超过常温 1℃ 以上，但不超过 1.5℃，稽留不超过 2 个温次，疫苗也可判为合格。如有 1 头猪的反应超过上述标准；或出现可疑的其它体温反应和其它异常现象时，可用 4 头猪重检 1 次。重检的猪仍出现同样反应，疫苗应判为不合格。也可在猪高温期采血复归猪 2 头，每头肌肉注射可疑猪原血 5ml，测温观察 16 日。如均无反应，疫苗可判合格。如第 1 次检验结果已经确证疫苗不安全，则不应进行重检。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

(1) 用家兔效检 按瓶签注明头份用无菌生理盐水将每头份疫苗稀释 7500 倍，耳静脉注射体重为 1.5~3kg 家兔 2 只，每只 1ml。家兔接种后，上下午各测体温 1 次，48 小时后，每隔 6 小时测体温 1 次，根据体温反应和攻毒结果进行综合判定。

①家兔接种疫苗后，体温反应标准如下：

定型热反应(++) 潜伏期 48~96 小时，体温上升呈明显曲线，至少有 3 个温次超过常温 1℃ 以上，并稽留 18~36 小时。如稽留 42 小时以上，必须攻毒，攻毒后无反应可判为定型热。

轻热反应(+) 潜伏期 48~96 小时，体温上升呈明显曲线，至少有 2 个温次超过常温 0.5℃ 以上，并稽留 12~36 小时。

可疑反应(±) 潜伏期 48~96 小时, 体温曲线起伏不定, 稽留不到 12 小时; 或潜伏期在 24 小时以上, 不足 48 小时及超过 96 小时至 120 小时出现热反应。

体温反应呈二次高峰, 有一次高峰符合定型热反应(++) 或轻热反应(+) 标准者, 均须攻毒。攻毒后无反应时, 该兔热反应可判为定型热或轻热反应。

无反应(-) 体温正常。

#### ②结果判定:

注苗后, 当 2 只家兔均呈定型热反应(++), 或 1 只兔呈定型热反应(++)、另 1 只兔呈轻热反应(+) 时, 疫苗判为合格。

注苗后, 当 1 只家兔呈定型热反应(++) 或轻热反应(+), 另 1 只兔呈可疑反应(±); 或 2 只兔均呈轻热反应(+) 时, 可在注苗后 7~10 日攻毒(接种新鲜脾淋毒或冻干毒)。攻毒时, 加对照兔 2 只, 攻毒剂量为 50~100 倍乳剂。每兔耳静脉注射 1ml。

攻毒后的体温反应标准如下:

热反应(+) 潜伏期 24~72 小时, 体温上升呈明显曲线, 超过常温 1℃以上, 稽留 12~36 小时。

可疑反应(±) 潜伏期不到 24 小时或 72 小时以上, 体温曲线起伏不定, 稽留不到 12 小时或超过 36 小时而不上升。

无反应(-) 体温正常。

攻毒后, 当 2 只对照兔均呈定型热反应(++), 或 1 只兔呈定型热反应(++), 另 1 只兔呈轻热反应(+), 而 2 只注苗兔均无反应(-), 疫苗判合格。

注苗后, 如有 1 只兔呈定型热(++), 或轻热反应(+), 另 1 只兔呈可疑反应(±) 或无热反应(-), 可对可疑反应兔或无反应兔采用剖杀或采心血分离病毒的方法, 判明是否隐性感染; 或注苗后, 2 只兔均呈轻热反应, 亦可对其中 1 只兔分离病毒。方法是: 接种疫苗后 96~120 小时之间, 将兔剖杀, 采取脾脏, 用生理盐水制成 50 倍稀释乳剂(脾乳剂应无菌), 或采取心血(全血), 接种 2 只家兔, 每只兔耳静脉注射 1ml。凡有 1 只兔潜伏期 24~72 小时出现定型热反应(++), 疫苗可判为合格。

注苗后, 出现其它反应情况无法判定时, 可重检。用家兔做效检, 不应超过 3 次。

(2) 用猪效检 按瓶签注明头份, 用灭菌生理盐水将每头份稀释 3000 倍, 肌肉注射无猪瘟中和抗体的健康易感猪 2 头, 每头 1ml。10~14 日后, 连同对照猪 3 头, 注射猪瘟石门系血毒 1ml ( $10^5$  最小致死量), 观察 16 日。对照猪全部发病, 且至少死亡 2 头, 免疫猪全部健活或稍有体温反应, 但无猪瘟临床症状为合格。如对照猪死亡不到 2 头, 可重检, 重检后应符合规定。

**【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】** 用于预防猪瘟, 注射 4 日后, 即可产生免疫力。断奶后无母源抗体仔猪的免疫期为 12 个月。

**【用法与用量】** 肌肉或皮下注射。按瓶签注明头份, 用灭菌生理盐水稀释成 1 头份/ml, 每头 1.0ml; 在没有猪瘟流行的地区, 断奶后无母源抗体的仔猪, 注射 1 次即可。有疫情威胁时, 仔猪可在 21~30 日龄和 65 日龄左右各注射 1 次。

- 【注意事项】** (1) 注苗后应注意观察, 如出现过敏反应, 应及时注射抗过敏药物。
- (2) 疫苗仅用于健康猪只。
- (3) 疫苗应在 8℃ 以下的冷藏条件下运输。
- (4) 使用单位收到冷藏包装的疫苗后, 如保存环境超过 8℃ 而在 25℃ 以下时, 从接到疫苗时算起, 应在 10 日内用完。
- (5) 使用单位所在地区的气温在 25℃ 以上时, 如无冷藏条件, 应采用冰瓶领取疫苗, 随领随用。
- (6) 疫苗稀释后, 如气温在 15℃ 以下, 应在 6 小时内用完; 如气温在 15~27℃, 则应在 3 小时内用完。
- (7) 注射时, 应执行常规无菌操作, 每注射 1 头猪更换 1 支针头。
- (8) 使用过的疫苗瓶、器具和稀释后剩余的疫苗等应消毒处理。
- 【规格】** (1) 10 头份/瓶 (2) 20 头份/瓶 (3) 40 头份/瓶 (4) 50 头份/瓶 (5) 100 头份/瓶
- 【贮藏与有效期】** -15℃ 以下保存, 有效期为 18 个月。

#### 附注: 1 猪瘟中和试验方法

1.1 先测定猪瘟兔化弱毒(抗原)对家兔的最小感染量。试验时, 将被检抗原用生理盐水稀释, 使每毫升含有 100 个兔的最小感染量, 作为工作抗原(如抗原对兔的最小感染量为  $10^{-5}$ /ml, 则将抗原稀释成 1000 倍使用)。

1.2 将被检猪血清分别用生理盐水作 2 倍稀释, 与含有 100 个兔的最小感染量工作抗原等量混合, 摇匀后, 置 10~15℃ 中和 2 小时, 其间振摇 2~3 次。同时设有相同工作抗原量加等量生理盐水(不加血清)的对照组, 与被检组在同样条件下处理。

1.3 中和完毕, 被检组各注射家兔 1~2 只, 对照组注射家兔 2 只, 每只耳静脉注射 1ml, 观察体温反应, 并判定结果。

1.4 结果判定 体温反应标准同效力检验项。当对照组 2 只家兔均呈定型热反应(++), 或 1 只兔呈定型热反应(++), 另一只兔呈轻热反应(+) 时, 方能判定结果。被检组如用 1 只家兔, 须呈定型热反应; 如用 2 只家兔, 每只家兔应呈定型热或轻热反应, 被检血清判为阴性。

1.5 注意 如被检组用 2 只家兔, 其中 1 只家兔无反应或呈可疑反应时, 可采血复归或对 2 只家兔进行攻毒。如被检血清出现阳性反应或复归的家兔仍为可疑反应时, 则该头被检猪不得用于猪瘟疫苗的安全(或效力)检验。被检组用 1 只家兔, 不得复归或攻毒。用中和试验方法选择易感猪, 无论是否同窝猪, 均须逐头检测。

#### 附加说明:

1. 本标准由农业部组织拟定。
2. 本标准于 2008 年 6 月 4 日经农业部公告 1041 号发布。

## 鸡传染性支气管炎耐热保护剂活疫苗（H120 株）

Ji Chuanranxingzhiqiguanyan Nairebaohuji Huoyimiao (H120 Zhu)

Avian Infectious Bronchitis Thermo-stable Vaccine, Live (H120 Strain)

本品系用鸡传染性支气管炎病毒弱毒 H120 株接种 SPF 鸡胚培养，收获感染胚液，加入适量耐热保护剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防鸡传染性支气管炎。

**【性状】** 为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，应无细菌生长。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。每羽份疫苗非病原菌数应不超过 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。

**【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。

**【鉴别检验】** 将疫苗用灭菌生理盐水稀释至每 ml 含 1 羽份，与等量抗鸡传染性支气管炎特异性血清混合，置 20~25℃ 中和 1 小时，尿囊腔内接种 10 日龄 SPF 鸡胚 10 枚，每胚 0.2ml。置 37℃ 孵育 24~144 小时，应不出现特异死亡及鸡胚病变，并应至少有 8 枚鸡胚健活。

**【安全检验】** 用 4~7 日龄 SPF 雏鸡 20 只，10 只各滴鼻接种疫苗 10 羽份，另 10 只作对照。观察 10 日，应全部健活，应无呼吸异常及神经症状，任何一组非特异死亡鸡不超过 1 只，否则可重检 1 次。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

(1) 用鸡胚检验 按瓶签注明羽份，将疫苗用灭菌生理盐水稀释成每 0.1ml 含 1 羽份，再继续作 10 倍系列稀释，取 3 个适宜稀释度，各尿囊腔内接种 10 日龄 SPF 鸡胚 5 枚，每胚 0.1ml，置 37℃ 继续孵育 144 小时，24 小时以内死亡的鸡胚弃去不计，根据接种后 24~144 小时死胚及 144 小时活胚中具有失水、蜷缩、发育小等特异性病痕的鸡胚总和计算 EID<sub>50</sub>，每羽份应不低于 10<sup>3.5</sup>EID<sub>50</sub>。

(2) 用鸡检验 用 1~3 日龄 SPF 雏鸡 10 只，每只滴鼻接种疫苗 1 羽份，接种后 10 日，连同对照鸡 10 只，用 10 倍稀释的鸡传染性支气管炎病毒强毒 M41 株（CVCC AV1511 株）滴鼻，每只 1~2 滴，观察 10 日。对照鸡应至少发病 8 只，免疫鸡应至少保护 8 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】** 用于预防鸡传染性支气管炎。免疫后 5~8 日产生免疫力，免疫期为 2 个月。

**【用法与用量】** (1) 本品用于初生雏鸡，不同品种鸡均可使用，雏鸡用本品免疫后，至 1~2 月龄时，须用鸡传染性支气管炎活疫苗（H52 株）加强免疫。

(2) 按瓶签注明羽份，用生理盐水、蒸馏水或水质良好的冷开水稀释后，经滴鼻、饮水免疫。

(3) 滴鼻免疫 按瓶签注明羽份做适当稀释，用滴管吸取疫苗，每鸡滴鼻 1 滴（约

0.05ml)。

(4) 饮水免疫 剂量加倍, 饮水量根据鸡龄大小而定, 一般 5~10 日龄鸡, 每只 5~10ml, 20~30 日龄鸡, 每只 10~20ml, 成鸡每只 20~30ml。

**【不良反应】** 当接种已被支原体感染的鸡群时, 可能会引起不同程度的疫苗反应, 应于接种前以适宜的抗生素预防, 并且不得使用喷雾免疫途径。

**【注意事项】** (1) 疫苗稀释后, 应放冷暗处, 限当日用完。

(2) 饮水免疫时忌用金属容器, 饮水前至少停水 4 小时。

(3) 本品应在 8℃ 以下冷藏条件下运输。

(4) 用过的疫苗瓶、接种器具和未用完的疫苗等应进行消毒处理。

**【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 2008 年 6 月 18 日经农业部公告第 1049 号发布。

## 犬狂犬病、犬瘟热、副流感、腺病毒和细小病毒病五联活疫苗

Quan Kuangquanbing, Quanwenre, Fuliugan, Xianbingdu he Xixiaobingdubing  
Wulian Huoyimiao

Rabies, Canine Distemper, Parainfluenza, Adenovirus and Parvovirus Vaccine, Live

本品系用狂犬病病毒 ERA 株、犬瘟热病毒 XN112 株、犬副流感病毒 XN4 株、犬腺病毒 2 型 XN3 株和犬细小病毒 XN1 株, 分别接种易感细胞, 收获细胞培养物, 浓缩后, 按比例混合, 加入适宜稳定剂, 经冷冻真空干燥制成。用于预防犬狂犬病、犬瘟热、副流感、腺病毒和细小病毒病。

**【性状】** 微黄白色海绵状疏松团块, 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》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】** 任取冻干疫苗 1 瓶, 加入不含牛血清的细胞维持液 1ml, 溶解后, 加入狂犬病病毒抗血清、犬瘟热病毒抗血清、犬副流感病毒抗血清、犬腺病毒抗血清、犬细小病毒抗血清各 0.2ml, 37℃ 作用 1 小时后, 分别接种 BHK21、MA-104、Vero、MDCK、F81 和牛睾丸细胞各 3 瓶, 每瓶 0.2ml, 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无细胞病变和红细胞吸附。

**【鉴别检验】** 任取冻干疫苗 1 瓶, 加入不含牛血清的细胞维持液 1ml, 溶解后, 进行以下检验。

(1) 狂犬病病毒 取 0.2ml 疫苗液与狂犬病病毒抗血清、犬瘟热病毒抗血清各 0.2ml 等量混合, 37℃ 作用 1 小时, 脑内接种体重 11~13g (20~21 日龄) 小鼠 5 只, 每只 0.03ml,

观察 14 日，均应健活。

(2) 犬瘟热病毒 取 0.5ml 疫苗液与犬瘟热病毒抗血清、犬副流感病毒抗血清各 0.5ml 混合，置 37℃作用 1 小时，接种 MA-104 单层细胞瓶（25cm<sup>2</sup>）3 瓶，每瓶 0.2ml，接种后 37℃吸附 1 小时，然后每瓶加入维持液 10ml，在 5%二氧化碳、37℃条件下培养观察 5 日，均应无 CPE。

(3) 犬副流感病毒 取 0.5ml 疫苗液与犬瘟热病毒抗血清、犬副流感病毒抗血清各 0.5ml 混合，置 37℃作用 30 分钟，接种 Vero 细胞单层细胞瓶（25cm<sup>2</sup>）3 瓶，每瓶 0.2ml，接种后 37℃吸附 1 小时，然后每瓶加入维持液 10ml，在 5%二氧化碳、37℃条件下培养观察 5 日，均应无 CPE。

(4) 犬腺病毒 2 型 取 0.5ml 疫苗液与犬腺病毒抗血清、犬副流感病毒抗血清各 0.5ml 混合，置 37℃作用 1 小时，接种 MDCK 细胞单层细胞瓶（25cm<sup>2</sup>）3 瓶，每瓶 0.2ml，接种后 37℃吸附 1 小时，然后每瓶加入维持液 10ml，在 5%二氧化碳、37℃条件下培养观察 4 日，均应无 CPE。

(5) 犬细小病毒 取 0.5ml 疫苗液与犬细小病毒抗血清等量混合，置 37℃作用 1 小时后，同步接种于传代的 F81 细胞培养瓶（25cm<sup>2</sup>）3 瓶，每瓶 0.2ml，在 5%二氧化碳、37℃条件下培养观察 5 日，均应无 CPE。

**【安全检验】** 取 2~3 月龄易感犬（狂犬病病毒、犬瘟热病毒、犬副流感病毒、犬腺病毒和犬细小病毒中和抗体效价均≤1:2）3 只，每只肌肉注射疫苗 10 头份，隔离观察 28 日，犬的精神、食欲、体温与粪便均应正常。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

#### 1 病毒含量测定

1.1 狂犬病毒部分 取疫苗样品 1 瓶（1 头份），用生理盐水进行 1:50 稀释，与犬瘟热病毒抗血清等量混合，置 37℃中和 1 小时后，再作 10 倍系列稀释，取 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup> 个稀释度，各脑内接种 11~13g（20~21 日龄）小鼠 4 只，每只 0.03ml，观察 14 日。记录注射 3 日以后的死亡小鼠情况，按 Reed-Muench 法计算 LD<sub>50</sub>，每头份疫苗病毒含量应 ≥104.8LD<sub>50</sub>。

1.2 犬瘟热病毒部分 取疫苗样品 1 瓶（1 头份），用不含牛血清的细胞维持液进行 1:50 稀释，与犬副流感病毒抗血清等量混合，置 37℃中和 30 分钟后，再作 10 倍系列稀释，取 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 个稀释度，各接种 MA-104 细胞 5 孔（24 孔板），每孔 0.1ml，在 5%二氧化碳、37℃条件下培养 5 日，观察 CPE。按 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>，每头份疫苗病毒含量应 ≥104.0TCID<sub>50</sub>。

1.3 副流感病毒部分 取疫苗样品 1 瓶（1 头份），用不含牛血清的细胞维持液进行 1:50 稀释，与犬瘟热病毒单特异性抗血清等量混合，置 37℃中和 30 分钟，再作 10 倍系列稀释，取 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup> 个稀释度，各接种 Vero 细胞 5 孔（24 孔板），每孔 0.1ml，在 5%二氧化碳、37℃条件下培养 5 日，观察 CPE。按 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>，每头份疫苗病毒含量应 ≥105.5TCID<sub>50</sub>。

1.4 犬腺病毒部分 取疫苗样品 1 瓶（1 头份），用不含牛血清的细胞维持液进行 1:50 稀释，与犬副流感病毒抗血清等量混合，置 37℃中和 30 分钟，再作 10 倍系列稀释后，取

10-3、10-4、10-5、10-6 4 个稀释度，各接种 MDCK 细胞 8 孔（96 孔板），每孔 0.1ml，在 5%二氧化碳、37℃条件下培养 4 日，观察 CPE。按 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>，每头份疫苗病毒含量应≥104.0TCID<sub>50</sub>。

1.5 犬细小病毒部分 取疫苗样品 1 瓶（1 头份），用不含牛血清的细胞维持液作 10 倍系列稀释，取 10-5、10-6、10-7、10-8 4 个稀释度，各接种 F81 单层细胞 5 孔（24 孔板），每孔加入疫苗液 0.1ml，在 5%二氧化碳、37℃条件下培养 5 日，观察 CPE。按 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>，每头份疫苗病毒含量应≥106.5TCID<sub>50</sub>。

2 中和抗体效价测定 取 2~3 月龄易感犬（狂犬病病毒、犬瘟热病毒、犬副流感病毒、犬腺病毒和犬细小病毒中和抗体效价均≤1:2）5 只，每只肌肉注射疫苗 1 头份。注苗后 21~28 日，连同对照犬 2 只，分别采血，分离血清，按现行《中国兽药典》附录中和抗体效价测定法分别测定血清中和抗体效价。

2.1 狂犬病病毒血清中和抗体 将血清用生理盐水作倍比稀释至 1:32，取 1:4、1:8、1:16、1:32 4 个稀释度，分别与 100LD<sub>50</sub>/0.03ml 的狂犬病毒巴黎株混合，另取 100LD<sub>50</sub>/0.03ml 病毒液加入等体积生理盐水作为病毒对照，37℃作用 1.5 小时后，各脑内接种 16~18g（20~21 日龄）小鼠 4 只，每只 0.03ml，观察 21 日，记录注射 3 日后的死亡小鼠情况，病毒对照组小鼠应全部发病死亡，按 Reed-Muench 氏法计算血清中和抗体效价，每只犬血清抗狂犬病病毒中和抗体效价应≥1:16；对照犬中和抗体效价≤1:2。

2.2 犬瘟热病毒血清中和抗体 将血清用不含牛血清的细胞维持液作倍比稀释至 1:128，取 1:16、1:32、1:64、1:128 4 个稀释度，分别与 200TCID<sub>50</sub>/0.1ml 的犬瘟热病毒液等量混合，另取 200TCID<sub>50</sub>/0.1ml 的病毒液加入等体积细胞维持液作为病毒对照，置 37℃作用 1 小时，接种 MA-104 细胞单层 96 孔培养板，每个稀释度 8 孔，每孔 0.1ml，同时设对照细胞 8 孔（只加维持液）。接种后，置 5%二氧化碳、37℃条件下培养 5 日，观察 CPE，病毒对照细胞孔均应出现 CPE，细胞对照组无 CPE，按 Reed-Muench 法计算血清中和抗体效价，每只犬血清抗犬瘟热病毒中和抗体效价应≥1:64；对照犬中和抗体效价≤1:2。

2.3 犬副流感病毒血清中和抗体 将血清用不含牛血清的细胞维持液作倍比稀释至 1:16，取 1:2、1:4、1:8、1:16 4 个稀释度，分别与 200TCID<sub>50</sub>/0.1ml 的犬副流感病毒等量混合，另取 200TCID<sub>50</sub>/0.1ml 的病毒液加入等体积细胞维持液作为病毒对照，置 37℃作用 30 分钟，分别接种 Vero 细胞单层 96 孔培养板，每个稀释度接种 8 孔，每孔 0.1ml，同时设对照细胞 8 孔（只加维持液），置 5%二氧化碳、37℃条件下培养 5 日，观察 CPE，病毒对照细胞孔均应出现 CPE，细胞对照组无 CPE，按 Reed-Muench 法计算血清中和抗体效价，每只犬血清抗副流感病毒中和抗体效价应≥1:8；对照犬中和抗体效价≤1:2。

2.4 犬腺病毒 2 型血清中和抗体 将血清用不含牛血清的细胞维持液作倍比稀释至 1:32，取 1:4、1:8、1:16、1:32 4 个稀释度，分别与 200TCID<sub>50</sub>/0.1ml 的犬腺病毒 2 型病毒等量混合，另取 200TCID<sub>50</sub>/0.1ml 的病毒液加入等体积细胞维持液作为病毒对照，置 37℃作用 1 小时，分别接种 MDCK 细胞单层 96 孔培养板，每个稀释度接种 8 孔，每孔 0.1ml，同时设对照细胞 8 孔（只加维持液），置 5%二氧化碳、37℃条件下培养 4 日，观察 CPE，病毒对照细胞孔均应出现 CPE，细胞对照组无 CPE，按 Reed-Muench 法计算血清中和抗体效价，每只犬血清抗犬腺病毒 2 型中和抗体效价应≥1:16；对照犬中和抗体效价≤1:2。

2.5 犬细小病毒血清中和抗体 将血清用不含牛血清的细胞维持液作倍比稀释至 1:64, 取 1:8、1:16、1:32、1:64 4 个稀释度, 分别与 200TCID<sub>50</sub> 的犬细小病毒等量混合, 另取 200TCID<sub>50</sub>/0.1ml 的病毒液加入等体积细胞维持液作为病毒对照, 置 37℃作用 1 小时后, 同步接种于传代的 F81 细胞 (96 孔板), 每个稀释度 8 孔, 每孔 0.2ml, 同时设 8 孔细胞对照, 在 5%二氧化碳、37℃条件下培养 5 日, 观察 CPE, 病毒对照细胞孔均应出现 CPE, 细胞对照组无 CPE, 按 Reed-Muench 法计算血清抗犬细小病毒中和抗体效价, 每只犬血清中和抗体效价应≥1:32; 对照犬中和抗体效价≤1:2。

**【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】** 用于预防犬狂犬病、犬瘟热、副流感、腺病毒和细小病毒病。免疫期为 12 个月。

**【用法与用量】** 每瓶疫苗加注射用水 2ml (含 1 头份), 肌肉注射。断奶幼犬以 21 日的间隔, 连续注射 3 次, 每次 1 头份; 成年犬以 21 日的间隔, 连续注射 2 次, 每次 1 头份。

**【注意事项】** (1) 本品仅用于非食用犬的预防注射, 不能用于紧急预防和治疗。

(2) 使用过免疫血清的犬, 需隔 7~14 日后再使用本疫苗。

(3) 注射器具需经煮沸消毒。本品溶解后, 应及时注射。

(4) 注苗期间 (前后各 1 周) 应避免调动、运输和饲养管理条件的骤变, 并禁止与病犬的接触。

(5) 注射苗后如发生过敏反应, 应立即注射盐酸肾上腺素注射液 0.5~1ml。

**【规格】** 1 头份/瓶

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

#### 附注: 1 病毒致靶细胞的 CPE 特征

1.1 犬瘟热病毒 接种 MA104 细胞后 72 小时左右细胞单层开始出现 CPE, 局部细胞单层皱缩、细胞脱落, 96 小时细胞单层破坏, 120 小时左右细胞呈网状、完全脱落。

1.2 副流感病毒 接种 Vero 细胞后 96~120 小时出现明显病变, 细胞融合, 此后融合细胞从瓶壁上脱落。

1.3 犬腺病毒 2 型 接种 MDCK 细胞单层后 36 小时即出现 CPE, 72~96 小时 80%~85% 的细胞 CPE 明显, 特征为细胞肿大变圆, 聚集或出现葡萄串样, 也可产生蚀斑。

1.4 犬细小病毒 接种 F81 细胞 48 小时后少量细胞圆缩破碎, 72~96 小时 80~90% 的细胞圆缩、脱落、破碎。

1.5 狂犬病病毒 细胞单层接毒后 5 日不出现 CPE, 细胞培养液脑内注射体重 11~13g (20~21 日龄) 小鼠, 每只 0.03ml, 接种 11~14 日内可见兴奋、不安、麻痹和死亡。

#### 附加说明:

1. 本标准由杨凌绿方生物工程有限公司、中国人民解放军第四军医大学提出。

2. 本标准于 2008 年 6 月 18 日经农业部公告第 1049 号发布。

## 羊胎盘转移因子注射液

Yangtaipan Zhuanyiyinzi Zhusheye

Sheep Placental Transfer Factor Injection

本品系用怀孕 100 日以上的健康绵(山)羊新鲜或冷藏胎盘经低温高压超声波蛋白裂解法制备的转移因子溶液。以多肽含量作为有效标示成分,每毫升含量 $\geq 1.5\text{mg}$ 。具有增强猪、禽机体免疫力和抗病力的作用;有助于提高猪、禽生产性能。

**【性状】** 灰白色或微黄色乳液,半透明,无沉淀,无絮状物,具轻度肉腥气味。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验,应无菌生长。

**【pH 值检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验,应为 4.0~6.0。

**【装量检查】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验,应符合规定。

**【热原检验】** 按现行《中国兽药典》附录提供的方法进行检验,以 0.5ml/只剂量静注家兔进行检验,应符合要求。

**【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。

**【羊痒病病原检验】** 按免疫印渍法(见附注 1)进行检测,应不得检出。

**【安全性检验】** 按以下各项进行,应符合要求。

(1) 豚鼠检验 用体重 350~400g 的健康豚鼠 3 只,各腹侧皮下注射羊胎盘转移因子注射液 1ml,观察 10 日,应全部健活。

(2) 鸡检验 用 1 日龄 SPF 鸡 30 只,按 1.0ml/只剂量口服羊胎盘转移因子注射液,24 小时重复给药,剂量相同。观察 5 日,应全部健活。

(3) 猪检验 用经中和试验方法(见附注 2)检测无猪瘟母源抗体的健康易感断乳仔猪 4~5 头(注射前观察 5~7 日,每日上、下午各测体温 1 次,体温、精神、食欲异常者不能用作检验)。每头肌肉注射羊胎盘转移因子注射液 2ml,注射后每日上、下午各测体温 1 次,观察 21 日。体温、精神、食欲与注射前相比没有明显变化,或体温升高不超过  $1^{\circ}\text{C}$ ,稽留不超过 2 日;或减食不超过 1 日,判定为合格。如有 1 头猪的反应超过上述标准;或出现可疑的其它体温反应和其它异常现象时,可另用 4~5 头猪重检 1 次。仍出现同样反应,则判为不合格。

(4) 动物过敏检验 用体重 350~400g 的健康豚鼠 6 只,隔日腹腔注射羊胎盘转移因子注射液 1ml,连续 3 次。然后分成 2 组,每组 3 只,分别在第一次注射后第 14 日及第 21 日经静脉或肌肉注射羊胎盘转移因子注射液 1ml。

静脉注射后 15 分钟或肌肉注射后 2 小时内均不得出现过敏反应,如有竖毛、呼吸困难、喷嚏、干呕或咳嗽等现象中的两种以上者;或罗音、抽搐、虚脱或死亡现象之一者判为阳性。

**【效力检验】** 按以下各项进行,应符合要求。

(1) 淋巴细胞活性测定法-脱 E 受体法 按附注 3 进行检验,羊胎盘转移因子注射液测定管 E 玫瑰花结百分率-对照管 E 玫瑰花结百分率,应不小于 10%。

(2) 巨噬细胞吞噬试验 按附注 4 进行检验,比较对照组( $K_1$  值)和试验组( $K_2$  值),应有显著性差异( $P < 0.05$ )。

**【含量测定】** 福林酚法，按附注 5 进行检验，每毫升多肽含量应 $\geq 1.5\text{mg}$ 。

**【作用与用途】** 具有增强猪、禽机体免疫力和抗病力的作用；有助于提高猪、禽生产性能。

**【用法与用量】** 猪皮下注射，大剂量（20ml 以上）时皮下分点注射。每次 10ml，24~48 小时后再次用药，仔猪每次 1ml，24 小时后重复。家禽经口给药。成鸡每次 2ml、雏鸡每次 1ml，24 小时后重复。

严禁在牛、羊、骆驼和鹿等反刍动物中使用。

**【不良反应】** 无肉眼可见不良反应。

**【注意事项】** （1）使用前应恢复至室温。

（2）凡包装瓶破裂、瓶塞松动、脱落及内含异物者禁用。

（3）贮藏时避免冷冻。

**【规格】** （1）10ml/瓶 （2）30ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为 24 个月。

### 附注：1 免疫印渍法

1.1 主要试剂 预染蛋白 Marker（分子量范围为 14-97，Biolab 公司）；CDP—Star<sup>TM</sup> 发光底物（Boehringer Maninheim 公司）；吐温-20（Bio-Rad 公司）；Nonidet P-40 和 N-N-甲叉双丙烯酰胺（Fluka 公司）；Tris 碱（Promega 公司）；甘氨酸、溴酚兰、十二烷基硫酸钠（SDS）、脱氧胆酸钠、苯甲基黄酰氟（PMSF）（Sigma 公司）；8H4 抗体（英国 TSE Resource Center）；碱性磷酸酶标记的马抗鼠二抗（北京中杉公司进口分装）；PVDF 膜（German 公司）；蛋白酶 k（美国 Merck）；BSA v、DTT（德国 Roche）；X 光片（Kodak 公司）。

1.2 主要试验仪器 Mini Trans-Blot<sup>®</sup>转印电泳道、Mini-PROTEAN<sup>®</sup>电泳仪、PowerPac<sup>TM</sup> HC 电源（Bio-Rad 公司）、X-OMAT1000 型洗片机（Kodak 公司）、TS-1 脱色摇床（江苏海门麒麟医用仪器厂）。

#### 1.3 试剂的配制

消化缓冲液 0.1%氯化钙，20mmol/L Tris.Cl，4℃保存。

蛋白酶 K 先配制 50mmol/L 的 Tris-HCl pH 值 8.0，1.5mmol/L 的乙酸钙溶液高压灭菌，然后取 5mg 蛋白酶 K 溶于 10ml 基础溶液中（基础溶液 Tris 碱 0.605g、乙酸钙 0.0264g 溶于 100ml 纯水），4℃保存。

消化终止液 0.174g 的苯甲基黄酰氟 PMSF 溶于 50ml 的乙醇中，4℃保存。

2×SDS 加样缓冲液 100mmol/L Tris-HCl pH 值 6.8，200mmol/L 二硫苏糖醇 DTT，4% SDS，0.2% 溴酚蓝，20% 甘油。

Tris-甘氨酸电泳缓冲液 pH 值 8.3，0.025mol/L Tris 碱，0.25mol/L 甘氨酸，0.1% SDS，4℃保存。

转印缓冲液 Tris 碱 5.8g，甘氨酸 2.9g，SDS 0.375g，甲醇 200ml 加蒸馏水溶解并定容至 1000ml。

封闭液 5g 脱脂奶粉溶于 100ml TBS-Tween 溶液中，4℃保存。

TBS 缓冲液 pH 值 7.4，Tris 碱 3g、NaCl 3g、KCl 0.2g，加水溶解定容至 1L，调 pH

值至 7.4, 高压后室温保存。

**TBST** Tris 碱 3 g, NaCl 8g, KCL 0.2g, 加水定容至 1L, 调 pH 值至 7.4, 高压后加 0.5ml Tween-20。

**A 液** 30% 丙烯酰胺溶液 (W/V), 丙烯酰胺 29.2g, N-N-甲叉双丙烯酰胺 0.8g, 加去离子水定容至 100ml, pH 值不超过 7.0, 过滤后于棕色瓶中 4℃ 保存。

**B 液** 1.5mol/L Tris-HCl, pH 值 8.8, Tris 碱 18.17g 溶于 80ml 去离子水中, 加入约 3ml 的浓 HCl 调 pH 值至 8.8, 定容至 100ml, 4℃ 保存。

**C 液** 1.0mol/L Tris-HCl, pH 值 6.8, Tris 碱 12.1g 溶于 80ml 去离子水中, 加入约 7ml 的浓 HCl 调 pH 值至 6.8, 定容至 100ml, 4℃ 保存。

**D 液** 10% SDS, SDS 10g 溶于去离子水中, 加热至 68℃ 助溶, 定容至 100ml。

**E 液** 10% 过硫酸铵, 过硫酸铵 5 g 溶于 50 ml 去离子水中, 现配现用。

**F 液** TEMED 原液, 室温保存。

**分离胶** 纯水 3.4ml, A 液 4ml, B 液 2.5ml, D 液 0.1ml, E 液 50 $\mu$ l, F 液 5 $\mu$ l。

**浓缩胶** 纯水 2.85ml, A 液 0.85ml, C 液 1.25ml, D 液 50 $\mu$ l, E 液 25 $\mu$ l, F 液 5 $\mu$ l。

**CDP-Star 发光底物缓冲液** 0.1mol/L 的 Tris 碱, 0.1mol/L 的氯化钠用盐酸调 pH 值至 9.5, 高压后室温保存。

**染色液** 0.25g 考马斯亮蓝 R250 溶于 45ml 甲醇、45 ml ddH<sub>2</sub>O 以及 10ml 冰醋酸的混合液中, 用 Whatman 滤纸过滤, 以除去颗粒状物质, 室温保存。

**脱色液** 按甲醇:冰醋酸:水=3:1:6 的体积进行配制, 室温保存。

#### 1.4 方法

**1.4.1 样品处理** 取 100 $\mu$ l 羊胎盘转移因子注射液供试品, 加入消化缓冲液和 500 $\mu$ g/ml 蛋白酶 K 各 10 $\mu$ l, 48℃ 消化 30 分钟, 加 10 $\mu$ l 消化终止液终止消化。

**1.4.2 样品变性** 取 100 $\mu$ l 2 $\times$  SDS 加样缓冲液加入处理后的样品中, 混匀, 100℃ 变性 5 分钟, 5000g 离心 3 分钟。

**1.4.3 电泳** 常规灌制 12% 分离胶、5% 浓缩胶的聚丙烯酰胺凝胶。每孔加 10 $\mu$ L 上清样品, 再用电泳缓冲液加满电泳泳道, 设预染标准蛋白 Marker 孔, 160V, 40~50 分钟; 时间以溴酚蓝距离凝胶的底部 0.5~1cm 为宜。

**1.4.4 转印** 按 Bio-Rad 的使用说明安装转印装置, 取出凝胶, 在转印缓冲液中泡 10 分钟, 将裁剪好的 PVDF 膜置于甲醇浸泡 5 分钟后放于转印缓冲液中平衡, 将浸泡过的与凝胶同样大小的滤纸和 PVDF 膜, 按纤维垫-滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸-纤维垫的结构装入转印夹。转印时凝胶侧接负极, PVDF 膜接正极, 4℃ 恒定电压 100V 转印 1.5~2 小时。

**1.4.5 封闭** 转印结束后取下 PVDF 膜, 加适量封闭液封闭 60 分钟, TBST 洗 5 次, 每次 5 分钟。

**1.4.6 温育** 洗毕, 加入 5ml 用 TBST 稀释的 8H4 抗体 (1:4000), 摇床上室温孵育 2 小时 (或者在 4℃ 条件下孵育 12~18 小时)。用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 分钟。之后, 加入 5ml 用 TBST 稀释 (1:2000) 的二抗-AP (马抗鼠 IgG), 室温下孵育 30 分钟。用 TBST 洗膜 5 次, 每次 5 分钟。

**1.4.7 显色** 将 PVDF 膜置于发光底物缓冲液中, 平衡 5 分钟。随后用发光底物缓冲

液稀释的 CDP-Star 溶液均匀地涂到膜上，在室温下温育 5 分钟。将膜置于杂交袋中，用封口机封好四周，最后将封闭好的膜与 X 光片进感光 1~20 分钟，冲洗光片。

1.4.8 结果判定 被检样品出现 27~30kDa 蛋白带可判为阳性，否则判为阴性。

## 2 中和试验法

2.1 先测定猪瘟兔化弱毒（抗原）对家兔的最小感染量。试验时，将抗原用生理盐水稀释，使每 1ml 含有 100 个兔的最小感染量，作为工作抗原（如抗原对兔的最小感染量为  $10^5$ /ml，则将抗原稀释成 1000 倍使用）。

2.2 将被检猪血清分别用生理盐水作 2 倍稀释，与含有 100 个兔的最小感染量工作抗原等量混合，摇匀后，置 10~15℃ 中和 2 小时，期间振摇 2~3 次。同时设含有相同工作抗原量加等量生理盐水（不加血清）的对照组，与被检组在同样条件下处理。

2.3 中和完毕，被检组各注射家兔 1~2 只，对照组注射家兔 2 只，每只耳静脉注射 1ml，观察体温反应，并判定结果。

2.4 结果判定

2.4.1 家兔体温反应标准

定型热反应（++） 潜伏期 48~96 小时，体温上升呈明显曲线，至少有 3 个温次超过常温 1℃，并稽留 18~36 小时。如稽留 42 小时以上，必须攻毒，攻毒后无反应可判为定型热。

轻热反应（+） 潜伏期 48~96 小时，体温上升呈明显曲线，至少有 2 个温次超过常温 0.5℃，并稽留 12~36 小时。

可疑反应（±） 潜伏期 48~96 小时，体温曲线起伏不定，稽留不到 12 小时；或潜伏期在 24 小时以上，不足 48 小时及超过 96 小时至 120 小时出现热反应。

体温反应呈二次高峰，有一次高峰符合定型热反应（++）或轻热反应（+）标准者，均须攻毒。攻毒后无反应时，该兔的热反应可判为定型热或轻热反应。

无反应（-） 体温正常。

2.4.2 结果判定 当对照组 2 只家兔均呈定型热反应（++），或 1 只家兔呈定型热反应（++），另 1 只兔呈轻热反应（+）时，方能判定结果。被检组如用 1 只家兔，须呈定型热反应；如用 2 只家兔，每只家兔应呈定型热或轻热反应，被检血清判为阴性。

## 3 淋巴细胞活性测定法-脱 E 受体法

3.1 试剂

3.1.1 Hank's 液 将 0.3% 磷酸二氢钾溶液，0.76% 磷酸氢二钠溶液，2% 氯化钾溶液及 20% 氯化钠溶液依次按 20:20:20:40 比例混合，加葡萄糖 1g，溶解后混匀，用水稀释至 1000ml，并用 4% 碳酸氢钠溶液调节 pH 值为 7.2~7.3（临用时配制）。

3.1.2 阿氏液 取氯化钠 0.420g，枸橼酸 0.055g，枸橼酸钠 0.766g，葡萄糖 2.05g，加水溶解并稀释至 100ml，灭菌。

3.1.3 分离液 为淋巴细胞分离液。

3.1.4 羊血 取绵羊静脉血 5ml，加入 5ml 阿氏液中，冰箱保存。

3.1.5 固定液 取 25% 戊二醛溶液，3.5% 碳酸氢钠溶液及 Hank's 液依次按 1:1:38 比例混合。

3.1.6 姬姆萨染色液原液 取姬姆萨染料 0.5g, 加甘油 33ml, 55~60℃加热至姬姆萨染料溶解, 冷至室温, 加入 33ml 甲醇, 室温放置 24 小时后, 用滤纸过滤, 滤液即为原液, 密封室温保存。

3.1.7 染色液 取姬姆萨染色液原液 2ml, 加 Hank's 液 6ml, 摇匀, 以 1500 转/分离心 10 分钟, 取上清液待用。

## 3.2 操作方法

3.2.1 脱 E 受体胸腺 T 细胞悬液的制备 取新鲜猪胸腺, 去脂肪并剪碎, 加适量 Hank's 液使成细胞悬液, 经 100 目筛过滤, 1500 转/分离心 3~5 分钟, 弃去上清液, 加入少量 Hank's 液混匀, 将此溶液加入已具有 1/3 滤液量的分离液的离心管中, 以 2000 转/分离心 20 分钟, 小心吸出中间层的胸腺细胞, 放入另一离心管中, 加适量 Hank's 液洗涤, 摇匀, 1500 转/分离心 3~5 分钟, 弃去上清液, 洗涤 1 次后, 在沉淀物中加入适量的 Hank's 液, 混匀, 45℃恒温水保温 30 分钟 (每隔 5 分钟振摇 1 次)。以 1500 转/分离心 3~5 分钟, 弃去上清液。用 Hank's 液洗涤 3 次 (操作同前), 最后用 Hank's 液适当稀释并计数, 使最终浓度为每 1ml 中  $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  个细胞。

3.2.2 绵羊红血球悬液的制备 取适量羊血, 用适量 Hank's 液洗 3 次, (同前)。弃去上清液, 加适量 Hank's 液稀释并计数, 使最终浓度为脱 E 受体胸腺 T 细胞悬液浓度的 8~10 倍。

3.2.3 羊胎盘转移因子注射液溶液的制备 取注射羊胎盘转移因子注射液, 用 Hank's 液配成每 1ml 中含 1mg 的溶液。

3.2.4 取小试管 6 支, 其中 3 支各加 Hank's 液 0.1ml 作为对照管, 另 3 支各加羊胎盘转移因子注射液溶液 0.1ml 作测定管, 每管中各加脱 E 受体胸腺 T 细胞悬液 0.2ml, 37℃保温 1 小后, 加入绵羊红血球悬液 0.2ml, 摇匀, 以 500 转/分钟离心 3 分钟, 放入 4℃冰箱过夜, 次日取出, 弃去上清液, 每管中各加入固定液 1 滴, 轻轻摇匀, 静置 10 分钟, 加入染色液 2 滴, 摇匀, 静置 15 分钟后开始计数, 显微镜视野中淡蓝色的较大的细胞为淋巴细胞, 共计数 16 个大方格上所有淋巴细胞的个数 (不少于 200 个), 统计其中的 E 玫瑰花结形成的细胞数 (结合 3 个以上绵羊红血球的淋巴细胞), 求得结花百分率, 取平均值, 即为羊胎盘转移因子注射液测定管或对照管的平均值。

3.3 效力评定 羊胎盘转移因子注射液测定管 E 玫瑰花结百分率-对照管 E 玫瑰花结百分率, 应不小于 10%。

## 4 巨噬细胞吞噬试验

4.1 试验动物 用体重为 18~22g 健康清洁级昆系小白鼠 24 只, 随机分成 2 组。

4.2 试验方法 试验组小白鼠腹腔内注射 5% 淀粉溶液 1ml/只, 48 小时后, 腹腔注射羊胎盘转移因子注射液 0.5ml/只, 24 小时后再腹腔注射 1% 鸡红细胞 1ml/只, 轻揉小白鼠腹部。注射血球悬液后 30 分钟, 杀死小白鼠, 剖腹收集腹腔内液, 加入肝素抗凝。

4.3 计数方法 腹腔液离心 (1000 转/分×5 分钟) 后弃去上清液, 用沉淀物涂片, 自然干燥, 瑞氏法染色。计数 100 个巨噬细胞中吞有 3 个以上 (包括 3 个) 鸡血红细胞, 并按下式计算吞噬指数 K 值,

$$K = A/100$$

其中，A = 100 个巨噬细胞吞噬鸡红细胞总和

4.4 比较对照组 ( $K_1$  值) 和试验组 ( $K_2$  值)，应有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

## 5 福林酚法

5.1 试剂 碱性铜试液 取氢氧化钠 10g，碳酸钠 50g，加水 400ml 使溶解，作为甲液；取酒石酸钾 0.5g，加水 50ml 使溶解，另取硫酸铜 0.25g，加水 30ml 使溶解，将两液混合，作为乙液。临用前合并两液，并加水至 500ml。

### 5.2 操作法

5.2.1 对照品溶液的配制 取牛血清白蛋白对照品，加水制成每 1ml 中含 0.3mg 的溶液。

5.2.2 羊胎盘转移因子注射液溶液的制备 照各药品项下的方法制备。

5.2.2.1 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0.0、0.1、0.3、0.5、0.7、0.9ml，分别置具塞刻度试管中，各加水至 1ml，再分别加入碱性铜溶液 1ml，摇匀，各加入福林酚试液 4ml，立即混匀，置 55℃ 水浴中 10 分钟，在 650nm 的波长处测定吸收度；同时以 0 号管作为空白对照，以吸收度为纵坐标，对照品溶液浓度为横坐标绘制标准曲线。

5.2.2.2 测定法 精密量取羊胎盘转移因子注射液溶液 1ml，照标准曲线的制备项下的方法，自“加入碱性铜试液”起，依法测定，自标准曲线上查得羊胎盘转移因子注射液溶液的浓度，并乘以稀释倍数。

### 附加说明：

1. 本标准由内蒙古神元生物工程股份有限公司提出。
2. 本标准于 2008 年 8 月 1 日经农业部公告 1064 号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。
4. 根据现行《中国兽药典》要求，将检验用鸡均改为 SPF 鸡。

## 酪酸菌活菌制剂

Laosuanjun Huojunzhi

Live Clostridium Butyricum Preparation

本品系用酪酸菌 RH-2 株接种适宜培养基培养，收获培养物，加入保护剂，经真空冷冻干燥后，混合辅料制成粉剂。用于预防猪、鸡由大肠杆菌引起的腹泻，并能促进猪、鸡的生长。

【性状】 灰黄色的干燥粉剂，能通过 60 目筛。

【杂菌检验】 取本品 1 克，加无菌生理盐水 9ml 溶解，取 10 倍稀释菌悬液滴于 3 个麦康凯琼脂平板上，每皿 0.1ml，置 37℃ 培养 24~48 小时，计算杂菌数，再换算出每克样品所含的杂菌数，并作病原性鉴定。每克制剂含杂菌数应不超过 1000 个。

【病原性鉴定】 挑取杂菌菌落若干个，混合接种于营养肉汤，置 37℃ 培养 24 小时，用无菌生理盐水作 10 倍稀释，皮下或肌肉注射体重 18~22 克小鼠 5 只，每只 0.2ml，观察 7 日，应无死亡和注射局部化脓等症状。

**【活菌计数】** 每批随机抽样 3 个，各取 1 克，用无菌 TPY 稀释液（见附注 1）作 10 倍系列稀释至  $10^{-5}$ ，取  $10^{-5}$  菌悬液 5ml 加入 5ml 无菌 TPY 稀释液中，混匀后各取菌悬液 0.1ml 接种 TPY 固体培养基（见附注 2）平板 3 个，厌氧培养 48 小时，计算菌落数。以 3 个样品中最低菌数为该批制剂的活菌数。每克制剂中含活菌数应  $\geq 2.0 \times 10^8$  个。

**【安全检验】** （1）用雏鸡检验 用 5~10 日龄的 SPF 雏鸡 10 只，抽取 3 个样品，混合后，用无菌生理盐水溶解后灌服，每只灌服制剂 2 克，每日 1 次，连服 3 日，同时设对照 SPF 雏鸡 10 只，继续饲养、观察至第 10 日。两组试验鸡均应健活；或两组试验鸡合计死亡数不超过 3 只，且试验组死亡数不超过对照组。

（2）用小鼠检验 用体重 18~22 克的小鼠 10 只，抽取 3 个样品，混合后，用无菌生理盐水溶解后灌服，每只灌服制剂 0.1 克，每日 1 次，连服 3 日，继续饲养、观察至第 10 日，应全部健活。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，剩余水分应不超过 10.0%。

**【重量差异限度】** 取样品 10 份，除去包装，分别称定重量，每份重量与标示重量相比较，差异限度不得超过  $\pm 5\%$ ，超出重量差异限度的不得多于 2 份，并不得有 1 份超出重量差异限度 1 倍。

**【作用与用途】** 用于预防猪、鸡由大肠杆菌引起的腹泻，并能促进猪、鸡的生长。

**【用法与用量】** 内服。与饲料混合后口服。用于预防由大肠杆菌引起的腹泻时，猪：每 1000kg 饲料添加：0.5~1kg，鸡：每 1000kg 饲料添加：1~2kg；用于促进猪、鸡生长时，每 1000kg 饲料添加：0.5~1kg。

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】** （1）本品不得与抗菌类药物和抗菌药物添加剂同时服用。

（2）本品口服时严禁用 40℃ 以上热水溶解。

**【规格】** （1）50g/袋 （2）500g/袋

**【贮藏与有效期】** 室温、干燥、避光保存，有效期暂定为 12 个月。

**附注：**

**1 TPY 稀释液**

酵母粉 0.5 克

5%L-半胱氨酸盐酸盐 0.5ml

吐温 80 1 克

蒸馏水加至 1000ml

上述成分混合后加热溶解，调 pH 值为 6.5，116℃ 高压灭菌 20 分钟。

**2 TPY 固体培养基**

胰蛋白胨 10 克

植物胨（大豆胨）5 克

酵母粉 3 克

月示蛋白胨 10 克

葡萄糖 10 克

L-半胱氨酸盐酸盐 0.3 克

磷酸氢二钾 2.5 克

氯化钠 3 克

硫代乙醇酸钠 0.3 克

琼脂 20 克

蒸馏水加至 1000ml

上述成分混合后加热溶解，调 pH 值为 6.5，116℃ 高压灭菌 20 分钟。