

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。

**附加说明:**

1. 本标准由江苏省微生物研究所责任有限公司、无锡大江中盛生物科技有限公司提出。
2. 本标准于 2008 年 11 月 7 日经农业部公告第 1115 号发布。

## 兔病毒性出血症、多杀性巴氏杆菌病、产气荚膜梭菌病（A 型）三联灭活疫苗（皖阜株+ C51-17 株+苏 84-A 株）

Tu bingduxingchuxuezheng Duoshaxingbashi杆菌bing Chanqijiamosuojunbing  
(A xing) Sanlian Miehuoyimiao (Wanfu Zhu+ C51-17 Zhu +Su 84-A Zhu)

Rabbit haemorrhagic disease, *Pasteurella multocida* and *Clostridium perfringens* type A  
Vaccine, Inactivated (Strain Wanfu + Strain C51-17+ Strain Su 84-A)

本品系用兔病毒性出血症病毒皖阜株接种家兔、荚膜 A 群多杀性巴氏杆菌 C51-17 株和产气荚膜梭菌（A 型）苏 84-A 株分别接种适宜培养基培养，分别收获感染兔的实质脏器和培养物，经甲醛溶液灭活后，多杀性巴氏杆菌菌液中加入氢氧化铝胶，产气荚膜梭菌（A 型）菌液经适当浓缩，然后三者按适当比例混合制成。用于预防兔病毒性出血症（兔瘟）、兔多杀性巴氏杆菌病和兔产气荚膜梭菌病（A 型）。

**【性状】** 灰褐色均匀混悬液，静置后上层为棕色的澄明液体，下层有少量沉淀。

**【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。

**【安全检验】** 皮下注射 2~3 月龄（体重 1.5~2.0kg）易感家兔 4 只，每只 4ml，观察 10 日，应全部健活。

**【效力检验】** （1）用 2~3 月龄（体重 1.5~2.0kg）易感家兔 5 只，每只皮下注射疫苗 2ml，14 日后，连同对照兔 5 只，各皮下注射 1:9 稀释的兔病毒性出血症病毒皖阜株（肝、脾毒）1ml，观察 7 日，对照兔应至少死亡 4 只，免疫兔应全部健活。

（2）用 2~3 月龄（体重 1.5~2.0kg）易感家兔 5 只，各皮下注射疫苗 2ml，21 日后，连同对照兔 5 只，各皮下注射多杀性巴氏杆菌 C51-17 株菌液 1 个致死量，观察 10 日，对照兔应全部死亡，免疫兔应保护至少 4 只。

（3）用 2~3 月龄（体重 1.5~2.0kg）易感家兔 5 只，各皮下注射疫苗 2ml，21 日后，连同对照兔 5 只，各静脉注射 1 个致死量的 A 型产气荚膜梭菌毒素，观察 7 日，对照兔应全部死亡，免疫兔应至少保护 4 只。

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

**【作用与用途】** 用于预防兔病毒性出血症（兔瘟）、兔多杀性巴氏杆菌病和兔产气荚膜梭菌病（A 型）。免疫期为 6 个月。

**【用法与用量】** 皮下注射。2 月龄以上兔，每只 2ml。

**【不良反应】** 部分兔注射后可能出现一过性食欲减退的现象，疫苗注射后，注射部位有蚕豆大小硬结，数月后自行吸收。

**【注意事项】** (1) 仅用于接种健康兔，且不能接种怀孕后期母兔。

(2) 本品不得冻结。

(3) 注射器械及接种部位必须严格消毒，以免造成感染。

(4) 在兽医指导下进行接种。在已发病地区，应按紧急防疫处理。

**【规格】** (1) 20ml/瓶 (2) 40ml/瓶 (3) 100ml/瓶 (4) 250ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为12个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由江苏省农业科学院兽医研究所、南京天邦生物技术有限公司提出。

2. 本标准于2008年11月17日经农业部公告第1115号发布。

3. 根据现行《中国兽药典》要求增加**【装量检查】**项。

## 猪伪狂犬病毒荧光抗体

Zhu Weikuanguan Bingdu Yingguang Kangti

Porcine Pseudorabies Virus Fluorescence Antibody

本品系采用猪伪狂犬病毒（PRV）免疫 SPF 猪，制备高免血清，用硫酸铵盐析法提纯抗体，与异硫氰酸荧光素（FITC）结合，制成伪狂犬荧光抗体，用于伪狂犬病毒抗原的检测。

**【性状】** 蓝绿色澄明液体。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【敏感性检验】** 用细胞维持液将 Batha K-61 株 PRV 液稀释为  $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$  TCID<sub>50</sub> 三个稀释度，每个稀释度病毒液接种长满 PK-15 细胞的林氏管 10 支，每支 1.5ml，同时，接种不加病毒的对照 3 支，37℃ 培养 48~72 小时，取出细胞玻片，荧光抗体染色，洗涤，镜检。3 支病毒阴性对照细胞玻片，均不应检测到特异性荧光，每个稀释度的接毒细胞玻片，至少有 8 个细胞玻片可以检测到特异性荧光（参照质控样本细胞玻片）。

**【特异性检验】** 用细胞维持液将 Theveral 株 HCV 稀释为 1000 FA-TCID<sub>50</sub>/ml 接种长满单层 PK-15 细胞的玻片林氏管 10 支，每支接种 1.5ml，37℃ 培养 48~72 小时；用 PK-15 细胞悬液将 NADL-2 株 PPV 稀释为 1000TCID<sub>50</sub>/ml 接种林氏管 10 支，每支接种 1.5ml，37℃ 培养 48~96 小时；用细胞维持液将 VR-2332 株 PRRSV 稀释为 1000 TCID<sub>50</sub>/ml，接种长满单层 Marc-145 细胞的玻片林氏管 10 支，每支接种 1.5ml，37℃ 培养 48~96 小时。分别取出细胞玻片，荧光抗体染色，洗涤，镜检，30 支细胞玻片，均不应检测到特异性荧光（参照质控样本细胞玻片）。

**【作用与用途】** 用于猪伪狂犬病毒抗原检测。

**【用法与判定】** 1 用法 将待检材料接种相应的细胞培养玻片，经适当培养后，取出细胞玻片，或用新鲜的病理组织制备冰冻切片或触片，室温下丙酮固定待检材料的相应样本片（细胞培养玻片、组织切片、组织触片）5~10 分钟，滴加荧光抗体并覆盖整个细胞玻片，置 37℃ 作用 60 分钟；用 pH 值为 7.2 0.01mol/L 的 PBS 洗涤 3 次，再用 pH 值为 9.0~9.5

0.5mol/L 的碳酸盐缓冲甘油封片，置荧光显微镜下观察。

2 判定 已感染 PRV 的细胞胞内呈现明亮的翠绿色荧光，病毒细胞培养样本中，细胞呈局灶性感染，感染细胞呈片状分布于视野中。该特异性荧光可被伪狂犬病毒抗体抑制。未感染 PRV 的阴性样本片不应出现特异性荧光。

**【注意事项】** (1) 本品仅供体外诊断使用。

(2) 诊断试剂要避免反复冻融。

(3) 试剂盒要在规定的有效期内使用。

**【规格】** 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -20℃以下保存，切勿反复冻融，有效期为 24 个月。

#### 附加说明：

1. 本标准由中国兽医药品监察所提出。
2. 本标准于 2008 年 11 月 17 日经农业部公告 1115 号发布。

## 猪繁殖与呼吸综合征病毒荧光抗体

Zhu Fanzhiyuhuxi Zonghezheng Bingdu Yingguang Kangti

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Fluorescence Antibody

本品系采用猪繁殖与呼吸综合征病毒免疫 SPF 猪，制备高免血清，用硫酸铵盐析法提纯抗体，与异硫氰酸荧光素（FITC）结合，制成猪繁殖与呼吸综合征病毒荧光抗体。用于猪繁殖与呼吸综合征病毒的抗原检测。

**【性状】** 蓝绿色澄明液体。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【敏感性检验】** 用细胞维持液将 VR-2332 株 PRRSV 稀释为  $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$  TCID<sub>50</sub> 三个稀释度，每个稀释度病毒液接种长满单层 Marc-145 细胞的林氏管 10 支，每支 1.5ml，同时，接种不加病毒的对照 3 支，37℃培养 48~72 小时，取出细胞玻片，荧光抗体染色，洗涤，镜检。3 支病毒阴性对照细胞玻片，均不应检测到特异性荧光，每个稀释度的接毒细胞玻片，应至少有 8 个细胞玻片可以检测到特异性荧光（参照质控样本细胞玻片）。

**【特异性检验】** 用细胞维持液将 Theveral 株 HCV 稀释为 1000 FA-TCID<sub>50</sub>/ml 接种长满单层 PK-15 细胞的玻片林氏管 10 支，每支接种 1.5ml，37℃培养 48~72 小时；用 PK-15 细胞悬液将 NADL-2 株 PPV 稀释为 1000 TCID<sub>50</sub>/ml，接种玻片林氏管 10 支，每支接种 1.5ml，37℃培养 24~72 小时；用细胞维持液将 Fa 株 PRV 稀释为 1000TCID<sub>50</sub>/ml 接种长满单层 PK-15 细胞的玻片林氏管 10 支，每支接种 1.5ml，37℃培养 24~48 小时。分别取出细胞玻片，猪繁殖与呼吸综合征荧光抗体染色，洗涤，镜检，30 支细胞玻片，均不应检测到特异性荧光（参照质控样本细胞玻片）。

**【作用与用途】** 用于猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原检测。

**【用法与判定】** 1 用法 将待检材料接种相应的细胞培养玻片，经适当培养后，取出细胞玻片，或用新鲜的病理组织制备冰冻切片或触片，室温下丙酮固定待检材料的相应样本

片(细胞培养玻片、组织切片、组织触片)5~10分钟,滴加荧光抗体并覆盖整个细胞玻片,置37℃作用60分钟;用pH值为7.2,0.01mol/L的PBS洗涤3次,再用pH值为9.0~9.5 0.5mol/L的碳酸盐缓冲甘油封片,置荧光显微镜下观察。

2 判定 已感染PRRSV的细胞胞内呈现明亮的翠绿色荧光,病毒细胞培养样本中,细胞呈散在性感染,感染细胞散见于视野中。该特异性荧光可被繁殖与呼吸综合征病毒抗体抑制。未感染PRRSV的阴性样本片不应出现特异性荧光。

**【注意事项】** (1) 本品仅供体外诊断使用。

(2) 诊断试剂要避免反复冻融。

(3) 试剂盒要在规定的有效期内使用。

**【规格】** 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -20℃以下保存,切勿反复冻融,有效期为24个月。

#### 附加说明:

1. 本标准由中国兽医药品监察所提出。

2. 本标准于2008年11月17日经农业部公告1115号发布。

## 猪细小病毒荧光抗体

Zhu Xixiaobingdu Yingguangkangti

Porcine Parvovirus Fluorescence Antibody

本品系采用猪细小病毒(PPV)免疫SPF猪,制备高免血清,用硫酸铵盐析法提纯抗体,与异硫氰酸荧光素(FITC)结合,制成猪细小病毒荧光抗体诊断试剂。用于猪细小病毒的抗原检测。

**【性状】** 蓝绿色澄明液体。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验,应无菌生长。

**【敏感性检验】** 用PK-15细胞悬液将NADL-2株PPV稀释为 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$ TCID<sub>50</sub>3个稀释度,每个稀释度细胞悬液接种玻片林氏管10支,每支1.5ml,同时,接种不加病毒的对照3支,37℃培养48~72小时,取出细胞玻片,荧光抗体染色,洗涤,镜检。3支病毒阴性对照细胞玻片,均不应检测到特异性荧光,每个稀释度的接毒细胞玻片,至少有8个细胞玻片可以检测到特异性荧光。

**【特异性检验】** 用细胞维持液将Thiverval株HCV稀释为1000FA-TCID<sub>50</sub>/ml接种长满单层PK-15细胞的玻片林氏管10支,每支接种1.5ml,37℃培养48~72小时;用细胞维持液将Fa株PRV稀释为1000TCID<sub>50</sub>/ml接种长满单层PK-15细胞的玻片林氏管10支,每支接种1.5ml,37℃培养24~48小时。用细胞维持液将VR-2332株PRRSV稀释为1000TCID<sub>50</sub>/ml,接种长满单层Marc-145细胞的玻片林氏管10支,每支接种1.5ml,37℃培养48~96小时。分别取出细胞玻片,荧光抗体染色,洗涤,镜检,30支细胞玻片,均不应检测到特异性荧光。

**【作用与用途】** 用于猪细小病毒抗原检测。

**【用法与判定】** 1 用法 将待检材料接种相应的细胞培养玻片，经适当培养后，取出细胞玻片，或用新鲜的病理组织制备冰冻切片或触片，室温下丙酮固定待检材料的相应样本片（细胞培养玻片、组织切片、组织触片）5~10 分钟，滴加荧光抗体并覆盖整个细胞玻片，置 37℃ 作用 60 分钟；用 pH 值为 7.2 0.01mol/L 的 PBS 溶液洗涤 3 次，再用 pH 值为 9.0~9.5 0.5mol/L 的碳酸盐缓冲甘油封片，置荧光显微镜下观察。

2 判定 已感染 PPV 的细胞胞核内呈现明亮的翠绿色荧光，病毒细胞培养样本中，细胞呈散在性感染，亮核细胞散见于视野中。该特异性荧光可被细小病毒抗体抑制。未感染 PPV 的阴性样本片不应出现特异性荧光。

**【注意事项】** （1）本品仅供体外诊断使用。

（2）诊断试剂要避免反复冻融。

（3）试剂盒要在规定的有效期内使用。

**【规格】** 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -20℃ 以下保存，切勿反复冻融，有效期为 24 个月。

#### 附注说明：

1. 本标准由中国兽医药品监察所提出。
2. 本标准于 2008 年 11 月 17 日经农业部公告 1115 号发布。

## 犬瘟热病毒单克隆抗体注射液

Quanwenre Bingdu Dankelong Kangti Zhusheye

Canine Distemper Monoclonal Antibody Injection

犬瘟热病毒（Canine Distemper Virus, CDV）单克隆抗体注射液系将杂交瘤细胞株 1C4 接种生物反应器，采用连续罐注培养法收获培养液，经滤器过滤、超滤浓缩和过滤除菌制成。主要用于治疗犬瘟热。

**【性状】** 微带乳光浅红色透明液体。

**【pH 检验】** 按现行《中国兽药典》附录测定产品的 pH 值应为 7.0±0.2。

**【装量检查】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【支原体检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无支原体生长。

**【外源病毒检验】** 按附注 1 采用动物抗体产生实验检测流行性出血热病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、3 型呼肠孤病毒，均应为阴性。

**【安全性检验】**（1）用体重 350~450g 豚鼠 2 只，各皮下注射本品 2ml（分两侧注射）。观察 10 日，均应健活。

（2）用体重 18~22g 清洁级昆明小鼠 5 只，各皮下注射本品 0.5ml。观察 10 日，均应健活。

（3）用 2 月龄断奶比格犬 3 只，每只均按 2.5ml/kg（含 5 个使用剂量）肌肉注射本品。观察 10 日，均应健活。

**【特异性检验】** 取本品分别与犬瘟热病毒 98017 株、犬细小病毒 AMS-1 株、犬传染性肝炎病毒 BJ-1 株、呼肠病毒 3 型 AMMS 株的细胞培养飞片，进行免疫酶试验（见附注 2）。犬瘟热病毒单克隆抗体与犬瘟热病毒细胞培养飞片应为阳性反应，与其它病毒飞片应为阴性反应。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

(1) 效价测定 按附注 3 进行中和试验，单克隆抗体对 CDV MD-77 株的中和效价应 $\geq 1024$ 。

(2) 疗效试验 取 8 周龄断奶犬（CDV 抗原、抗体检测均为阴性）25 只，每只腹腔注射病毒液 5ml（每 ml 含  $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>）、滴鼻 0.5ml（每 ml 含  $10^{6.0}$ TCID<sub>50</sub>），接种后连续观察。取 3~9 日发病犬（发病判定标准见附注 4）15 只，随机分为两组。第 1 组 10 只，在发病后 1 日内，按使用剂量（0.5ml/kg）肌肉注射本品，每日 1 次，连用 3 日；第 2 组 5 只不予治疗作为对照。观察 10 日，治疗组应至少有 6 只犬康复（犬的精神、食欲、体温恢复正常为康复），对照组应至少有 4 只犬未康复。

**【作用与用途】** 用于治疗犬瘟热。

**【用法与用量】** 肌肉注射，每 kg 体重注射 0.5ml，每日 1 次，连用 3 日。

**【不良反应】** 本品为异种球蛋白，个别犬偶有过敏反应，过敏反应犬应立即停用，必要时使用抗过敏药物进行救治。

**【注意事项】** 本品仅限于肌肉注射，用前恢复至室温。

**【规格】** (1) 5ml/瓶 (2) 10ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 在-20℃以下保存，有效期为 12 个月。

**附注：1 动物抗体产生实验（参照中国药典，2005 版三部，附录 XII 鼠源性病毒检测法）**

本法用于杂交瘤细胞株及鼠源性单抗制品的鼠源性病毒检测，通过动物抗体产生试验，检测活病毒抗原及病毒抗体。

1.1 供试品的制备

1.1.1 试剂

1.1.1.1 0.01mol/L pH7.4 PBS 称取磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）2.9g，磷酸二氢钠 0.2g，氯化钠 8.0g，氯化钾 0.2g 加水溶解并稀释至 1000ml。

1.1.1.2 pH9.6 包被缓冲液 称取碳酸钠 1.59g，碳酸氢钠 2.93g，叠氮钠 0.20g，加水溶解并稀释至 1000ml。

1.1.1.3 0.01mol/L pH7.4 PBS 洗液 称取磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）2.9g，磷酸二氢钠 0.295g，氯化钠 8.5g，聚山梨酯 80.5 ml，加水溶解并稀释至 1000ml。

1.1.1.4 底物缓冲液称取磷酸氢二钠（ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ）12.9g，枸橼酸 3.26g，加水溶解并稀释至 700ml。

1.1.1.5 底物溶液 称取邻苯二胺 4mg，溶于底物缓冲液 10ml 中，再加入 30%过氧化氢 4 $\mu\text{l}$ 。

1.1.1.6 终止液 1mol/L 硫酸溶液。

1.1.2 动物抗体产生试验用的供试品 供试品包括杂交瘤细胞株,腹水和单抗半成品或成品。单抗腹水、半成品或成品不需处理, -20℃保存。而杂交瘤细胞按下述步骤进行处理后使用:取 7 瓶生长良好的杂交瘤细胞,弃去培养液,用 PBS 轻轻将细胞吹打下来,移入小管,再用 PBS 冲洗细胞瓶,收集残余的细胞。于小管中洗涤,每分钟 1000 转离心 10 分钟,弃去上清液,用 PBS 重新悬浮细胞,以上步骤重复 2 次。细胞集中后,悬浮于 4mlPBS 中。冻融 3 次,超声波处理。每分钟 10 000 转离心 30 分,吸取上清液,每分钟 40 000 转离心 4 小时,弃上清液,将沉淀溶于适量的 PBS 中,即为动物抗体产生试验用抗原。-40℃保存。

1.2 接种动物 每批受试品按下表参数注射无特定病原体小鼠 (BALB/CA 或 KM) 共 50 只。

动物	动物数 (只)		注射途径	注射剂量 (ml/只)	备注
	试验组	对照组			
乳鼠	10		肌内	0.03	观察 4 周, 应至少存活 8 只
3~4 周龄小鼠	10	10	腹腔	0.03	观察 4 周, 应至少存活 8 只
6~8 周龄小鼠	10	10	肌内和腹腔	第 1 次 0.1 第 2 次 0.2	间隔 10 日后注射 1 次, 对照组注射 PBS; 第 2 次注射后 14 日后采血。

1.3 血清学检查 对经肌内注射和腹腔注射的供试品组和对照组小鼠分别采血, 分离血清后用 ELISA 法检测抗体。在 ELISA 板上包被病毒抗原和正常细胞抗原, 每孔 0.1ml, 置 37℃1 小时后, 放 4℃过夜, 用洗液充分洗涤, 拍干。每份试品分别加入病毒抗原和正常细胞抗原孔各 1 个, 37℃培养 1 小时, 用洗液充分洗涤, 拍干。加酶结合物, 37℃培养 1 小时, 用洗液充分洗涤, 拍干。每孔加底物溶液 0.1ml, 37℃培养 10~20 分钟, 当阳性血清对照孔出现颜色, 阴性对照孔无颜色时, 每孔加入 1mol/L 硫酸液 0.1ml 终止反应, 测吸光度。

1.4 结果判定 P/N 值不小于 2.0 为阳性;

1.4.1 P/N 值在 1.5~2.0 为可疑

1.4.2 P/N 值小于 1.5 为阴性。

P 为供试品免疫小鼠血清与病毒抗原的吸光度减去供试品免疫小鼠血清与正常细胞抗原的吸光度; N 为对照组动物血清与病毒抗原的吸光度减去对照组动物血清与正常细胞抗原的吸光度。

## 附注 2 免疫酶试验 (GB14926.51-2001 中华人民共和国实验动物国家标准)

### 2.1 范围

本标准规定了免疫酶试验 (IEA) 所用试剂、器材和操作步骤等。

本标准适用于实验动物病毒抗体的检测。

2.2 原理 含有病毒抗原的细胞固定于玻片上, 遇相应抗体形成抗原抗体复合物。此抗原抗体复合物仍保持其抗原活性, 可与相应的第二抗体酶结合物结合, 遇酶底物产生颜色反应。在普通显微镜下, 根据颜色的反应。判定结果。

## 2.3 主要试剂与器材

### 2.3.1 试剂

#### 2.3.1.1 抗原片

2.3.1.1.1 抗原片的制备 将病毒接种敏感细胞（表 1），待细胞出现病变或确知细胞内含有丰富的病毒抗原后，用胰酶消化分散细胞，PBS 洗涤三次，最后用适量 PBS 悬浮细胞。将细胞悬浮液滴于玻片孔内。同时消化不感染病毒的同批同种细胞，滴加同一玻片另一孔内，作为正常细胞对照。孔内滴加的细胞以细胞铺开，不重叠为宜。室温干燥后，冷丙酮（4℃）固定 10min。用蒸馏水漂洗后充分干燥，置于-20℃备用。

2.3.1.1.2 抗原片的鉴定 每批抗原片在使用前，用相应的阳性血清和阴性血清进行鉴定。鉴定方法可用 IEA 或免疫荧光试验。在阴性血清与正常细胞和病毒感染细胞反应无色；阳性血清与正常细胞反应无色，而与病毒感染细胞呈棕褐色，且阳性细胞数达 30%~50%时，此抗原片可以使用。

2.3.1.2 酶结合物 抗小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔、犬或猴 IgG 抗体辣根过氧化物酶结合物用于检查相应动物的血清抗体。葡萄球菌蛋白 A（SPA）辣根过氧化物酶结合物可代替抗小鼠、豚鼠、兔、犬和猴 IgG 抗体辣根过氧化物酶结合物使用。

2.3.1.3 阳性血清 用病毒抗原免疫清洁或 SPF 级小鼠、大鼠、豚鼠或普通级兔、犬和猴所获得的抗血清；或自然感染恢复后的犬、猴血清。

2.3.1.4 阴性血清 清洁级或 SPF 级小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠血清；或确认无相关病毒感染的兔、犬、猴血清。

#### 2.3.1.5 PBS（0.01 mol/L，pH 7.4）

氯化钠	8g
氯化钾	0.2g
磷酸二氢钾	0.2g
磷酸氢二钠（Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O）	2.83g
蒸馏水	加至 1000ml

#### 2.3.1.6 底物溶液（现用现配）

3, 3-二氨基联苯胺盐酸盐（DAB）	40mg
PBS（0.01 mol/L，pH7.4）	100ml
丙酮	5 ml
33%过氧化氢	0.1ml

### 2.3.2 器材

2.3.2.1 普通显微镜。

2.3.2.2 印有 10~40 个小孔的玻片。

2.3.2.3 微量加样器，容量 5~50μL。

2.3.2.4 恒温水浴箱。

## 2.4 操作步骤

2.4.1 取出抗原片，室温干燥后，滴加适当稀释的待检血清和阴性、阳性血清，每份血清加两个病毒细胞孔和一个正常细胞孔，置湿盒内，37℃ 30min。

2.4.2 PBS 洗三次，每次 5min，室温干燥。

2.4.3 滴加适当稀释的酶结合物，置湿盒内，37℃ 30min。

2.4.4 PBS 洗三次，每次 5min。

2.4.5 将玻片放入底物溶液中，在室温下显色 5~10min。PBS 漂洗 2 次，再用蒸馏水漂洗 1 次。

2.4.6 吹干后，在光镜下判定结果。

2.5 结果判定 在阴性、阳性对照血清成立的情况下：即阴性血清与正常细胞和病毒感染细胞反应无色；阳性血清与正常细胞反应无色，与病毒感染细胞呈棕褐色，即可判定结果。

2.5.1 待检血清与正常细胞和病毒感染细胞反应呈无色，判为阴性。

2.5.2 待检血清与正常细胞反应呈无色，而与病毒感染细胞反应呈棕褐色，判为阳性。根据颜色深浅可判为+~++++。

表 1 IEA 细胞抗原片的制备

病毒	敏感细胞	收获时间(天)	病变	涂片制备
HV	E6	7~10	-	分散细胞涂片， 固定鉴定，保存。
LCMV	Vero	7~10	++	
Ect.	BHK21	2~3	++~++++	
MHV	DBT, L929	1~2	++~++++	
Sendai	BHK21	2~4	++~++++	
PVM	BHK21	5~7	++	
Reo3	BHK21	3~4	++~++++	
TMEV	BHK21	4~5	++~++++	
MAd	MK	2~4	++~++++	
MVM	RE, ME	7~12	++~++++	
Polyoma	ME	10~12	++~++++	
RCV	RK	2~3	++~++++	
KRV	RE	7~12	++~++++	
H-1	RE	7~12	++~++++	
SA11	MA-104	2~3	++~++++	
CDV	Vero	5~7	++~++++	
BVirus	Vero	1~2	+++	
SPV	BHK21	1~2	++~++++	

注：MK-小鼠肾细胞；ME-小鼠胚细胞；RK-大鼠肾细胞；RE-大鼠胚细胞。

### 附注 3 犬瘟热病毒单克隆抗体中和试验

本试验采用固定病毒—稀释血清法中和试验，用于犬瘟热病毒单克隆抗体中和效价的检测。

#### 3.1 材料和方法

##### 3.1.1 新生牛血清

### 3.1.2 DMEM

3.1.2.1 DMEM 母液 取 13.5g DMEM 粉末溶于 100ml 高压灭菌无离子水中，G6 滤器过滤，置 4℃ 保存。

#### 3.1.2.2 无血清 DMEM 液

DMEM 母液	20ml
高压灭菌无离子水	180ml
卡那霉素（1 万单位/ml）	5ml
7.5%NaHCO <sub>3</sub>	3ml

3.1.2.3 Vero 细胞营养液 含 10% 牛血清的无血清 DMEM 液；

3.1.2.4 Vero 细胞维持液 含 2% 牛血清的无血清 DMEM 液；

3.1.3 犬瘟热病毒 CDV MD-77 株；

3.1.4 Vero 细胞；

3.1.5 细胞培养板。

### 3.2 试验方法

3.2.1 将 Vero 细胞培养于 25cm<sup>2</sup> 细胞瓶中，待细胞长成单层后按每瓶 0.1ml 量接种 CDV，33℃ 培养 5 天后，将对照细胞和接毒细胞分别用胰酶消化，收毒和细胞悬液，测定 TCID<sub>50</sub>；

3.2.2 稀释病毒 将病毒悬液稀释至 100TCID<sub>50</sub> 0.1ml；

3.2.3 稀释单克隆抗体 将待测单克隆抗体作 2 倍倍比稀释；

3.2.4 体外中和 0.25ml 各稀释度 CDV 单克隆抗体与 0.25ml 病毒液混合，37℃ 作用 1 小时；

3.2.5 在 96 孔细胞培养板上每孔加 40μl Vero 细胞悬液；

3.2.6 每孔加入 100μl 单抗-病毒混合液，每个稀释度加 4 孔。5%CO<sub>2</sub> 培养箱，37℃ 培养；

3.2.7 试验同时设 0.1、1、100TCID<sub>50</sub> 病毒对照、Vero 细胞对照、单克隆抗体原液对照，各 4 孔；

3.2.8 待细胞长成单层，换无血清 DMEM 培养液，每日观察细胞病变，按 Reed 和 Muench 氏法计算结果。

#### 附注 4 犬瘟热发病判定标准

4.1 间歇性或持续性发热，体温达 39.5℃ 以上。

4.2 精神不振，食欲减退，眼鼻有浆液性或脓性分泌物，咳嗽、喘等呼吸道症状。

4.3 抽搐、震颤、麻痹等神经症状。

符合 4.1、4.2、4.3 或符合 4.1、4.2 均可判为发病。

#### 附加说明：

1. 本标准由农业部组织拟定。

2. 本标准于 2009 年 01 月 04 日经农业部公告第 1139 号发布。

3. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

## 犬细小病毒单克隆抗体注射液

Quanxiaobingdu Dankelong Kangti Zhusheye

Canine Parvovirus Monoclonal Antibody Injection

犬细小病毒（Canine Parvovirus, CPV）单克隆抗体注射液系将杂交瘤细胞株 1D3 接种于生物反应器中，采用连续罐注培养法收获培养液，经滤器过滤、超滤浓缩和过滤除菌制成。用于治疗犬细小病毒性肠炎。

**【性状】** 微带乳光浅红色透明液体。

**【pH 检验】** 按现行《中国兽药典》附录测定产品的 pH 值，应为 7.0±0.2。

**【装量检查】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【支原体检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无支原体生长。

**【外源病毒检验】** 按附注 1 采用动物抗体产生实验检测流行性出血热病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、3 型呼肠孤病毒，均应为阴性。

**【安全性检验】** （1）用体重 350~450g 豚鼠 2 只，各皮下注射本品 2ml（分两侧注射）。观察 10 日，均应健活。

（2）用体重 18~22g 清洁级昆明小鼠 5 只，各皮下注射本品 0.5ml。观察 10 日，均应健活。

（3）用 2 月龄断奶比格犬 3 只，每只均按 2.5ml/kg（含 5 个使用剂量）肌肉注射本品。观察 10 日，均应健活。

**【特异性检验】** 取本品进行血凝抑制（HI）试验（见附注 2），测定其对猫泛白细胞减少症病毒 philips-Roxane 株、水貂肠炎病毒 S11 株的效价。本品对猫泛白细胞减少症病毒 philips-Roxane 株、水貂肠炎病毒 S11 株 HI 效价均应≤8。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

（1）效价测定 按附注 1 进行血凝抑制（HI）试验，单克隆抗体对犬细小病毒的血凝抑制（HI）抗体效价应≥1280。

（2）疗效试验 取 8 周龄断奶的幼犬 25 只，每只口服病毒液 1ml（每 ml 含  $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>）、静脉注射病毒液 1ml（每 ml 含  $10^{7.0}$ TCID<sub>50</sub>），接种后连续观察。取 3~6 日发病犬（发病判定标准见附注 3）15 只，随机分为两组。第 1 组 10 只，在发病后 1 日内，按使用剂量（0.5ml/kg）肌肉注射本品，每日 1 次，连用 3 日；第 2 组 5 只不予治疗作为对照。观察 5 日，治疗组应至少有 8 只犬康复（见附注 3），对照组应至少有 3 只犬未康复。

**【作用与用途】** 用于治疗犬细小病毒性肠炎。

**【用法与用量】** 肌肉注射，每 kg 体重注射 0.5ml，每日 1 次，连用 3 日。

**【不良反应】** 本品为异种球蛋白，个别犬偶有过敏反应，过敏反应犬应立即停用，必要时使用抗过敏药物进行救治。

**【注意事项】** 本品仅限于肌肉注射，用前恢复至室温。

**【规格】** （1）5ml/瓶 （2）10ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 在-20℃以下保存，有效期为 12 个月。

**附注：1 动物抗体产生实验（参照中国药典，2005 版三部，附录 XII 鼠源性病毒检测法）**

本法用于杂交瘤细胞株及鼠源性单抗制品的鼠源性病毒检测，通过动物抗体产生试验，检测活病毒抗原及病毒抗体。

1.1 供试品的制备

1.1.1 试剂

1.1.1.1 0.01mol/L pH7.4 PBS 称取磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 2.9g，磷酸二氢钠 0.2g，氯化钠 8.0g，氯化钾 0.2g 加水溶解并稀释至 1000ml。

1.1.1.2 pH9.6 包被缓冲液 称取碳酸钠 1.59g，碳酸氢钠 2.93g，叠氮钠 0.20g，加水溶解并稀释至 1000ml。

1.1.1.3 0.01mol/L pH7.4 PBS 洗液 称取磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 2.9g，磷酸二氢钠 0.295g，氯化钠 8.5g，聚山梨酯 80.5 ml，加水溶解并稀释至 1000ml。

1.1.1.4 底物缓冲液称取磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 12.9g，枸橼酸 3.26g，加水溶解并稀释至 700ml。

1.1.1.5 底物溶液 称取邻苯二胺 4mg，溶于底物缓冲液 10ml 中，再加入 30%过氧化氢 4 $\mu$ l。

1.1.1.6 终止液 1mol/L 硫酸溶液。

1.1.2 动物抗体产生试验用的供试品 供试品包括杂交瘤细胞株，腹水和单抗半成品或成品。单抗腹水、半成品或成品不需处理，-20℃保存。而杂交瘤细胞按下述步骤进行处理后使用：取 7 瓶生长良好的杂交瘤细胞，弃去培养液，用 PBS 轻轻将细胞吹打下来，移入小管，再用 PBS 冲洗细胞瓶，收集残余的细胞。于小管中洗涤，每分钟 1000 转离心 10 分钟，弃去上清液，用 PBS 重新悬浮细胞，以上步骤重复 2 次。细胞集中后，悬浮于 4ml PBS 中。冻融 3 次，超声波处理。每分钟 10 000 转离心 30 分，吸取上清液，每分钟 40 000 转离心 4 小时，弃上清液，将沉淀溶于适量的 PBS 中，即为动物抗体产生试验用抗原。-40℃保存。

1.2 接种动物 每批受试品按下表参数注射无特定病原体小鼠 (BALB/CA 或 KM) 共 50 只。

动物	动物数 (只)		注射途径	注射剂量 (ml/只)	备注
	试验组	对照组			
乳鼠	10		肌内	0.03	观察 4 周，应至少存活 8 只
3~4 周龄小鼠	10	10	腹腔	0.03	观察 4 周，应至少存活 8 只
6~8 周龄小鼠	10	10	肌内和腹腔	第 1 次 0.1 第 2 次 0.2	间隔 10 日后注射 1 次，对照组注射 PBS；第 2 次注射后 14 日后采血。

1.3 血清学检查 对经肌内注射和腹腔注射的供试品组和对对照组小鼠分别采血，分离血清后用 ELISA 法检测抗体。在 ELISA 板上包被病毒抗原和正常细胞抗原，每孔 0.1ml，

置 37℃1 小时后，放 4℃过夜，用洗液充分洗涤，拍干。每份试品分别加入病毒抗原和正常细胞抗原孔各 1 个，37℃培养 1 小时，用洗液充分洗涤，拍干。加酶结合物，37℃培养 1 小时，用洗液充分洗涤，拍干。每孔加底物溶液 0.1ml，37℃培养 10~20 分钟，当阳性血清对照孔出现颜色，阴性对照孔无颜色时，每孔加入 1mol/L 硫酸液 0.1ml 终止反应，测吸光度。

1.4 结果判定 P/N 值不小于 2.0 为阳性；

1.4.1 P/N 值在 1.5~2.0 为可疑

1.4.2 P/N 值小于 1.5 为阴性。

P 为供试品免疫小鼠血清与病毒抗原的吸光度减去供试品免疫小鼠血清与正常细胞抗原的吸光度；N 为对照组动物血清与病毒抗原的吸光度减去对照组动物血清与正常细胞抗原的吸光度。

#### 附注 2 血凝和血凝抑制试验

本试验用于测定 CPV 等病毒的血凝活性、CPV 单克隆抗体的血凝抑制效价。

2.1 试剂 1%新鲜猪红细胞；0.015mol/L, pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS)；CPV 血凝素抗原用 CPV AMS-1 种毒制备，由北京世纪元亨公司提供。

2.2 器材 恒温培养箱；微量震荡器；微量血凝反应板 (V 型，110°)；微量加样器 (容量 5~50μl)；普通冰箱。

2.3 血凝试验

2.3.1 用 PBS 将血凝素抗原作连续倍比稀释，每稀释度留 25μl 于微量血凝板孔内。

2.3.2 每孔加入 25μlPBS 与 50μl 红细胞悬液，摇匀。同时设红细胞对照。

2.3.3 置 4℃冰箱作用 2h，观察结果。

2.3.4 出现 50%血凝 (计为“++”)的最高稀释度定为 CPV 的血凝效价。

2.4 血凝抑制试验

2.4.1 用 PBS 将待检单克隆抗体从 1 : 10 稀释至 1 : 5120，血凝板每孔中加入 25μl。

2.4.2 每孔加入 8 单位的 CPV 血凝素 25μl，摇匀后，37℃作用 30min。

2.4.3 每孔加入红细胞悬液 50μl，摇匀后置 4℃2h 判定结果。以红细胞凝集完全抑制的单抗最高稀释度为其 HI 效价。

2.4.4 CPV 血凝素校对 加入 8 单位 CPV 血凝素时，同时另将其稀释成 4、2、1、1/2、1/4、1/8 单位，各加入板孔 25μl，然后加入 25μlPBS，50μl 1%红细胞悬液，校对血凝素单位是否准确。

#### 附注 3 实验犬发病与康复标准

3.1 发病犬标准：发病犬表现为精神不振、食欲减退、不同程度腹泻，PCR 检测粪便 CPV 为阳性。

3.2 康复犬标准：实验犬精神、食欲恢复正常，停止腹泻。

#### 附加说明：

1. 本标准由农业部组织拟定。

2. 本标准于 2009 年 01 月 04 日经农业部公告第 1139 号发布。

3. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

## 鸡传染性喉气管炎耐热保护剂活疫苗

Ji Chuanranxing Houqiguanyan Nairebaohuji Huoyimiao

Avian Infectious Laryngotracheitis Thermo-stable Vaccine, Live

本品系用鸡传染性喉气管炎病毒 K317 株接种 SPF 鸡胚，收获感染的鸡胚绒毛尿囊膜混合研磨，加入适量耐热保护剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防鸡传染性喉气管炎。

**【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，进行作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】** 将疫苗稀释至含 100EID<sub>50</sub>/0.1ml，分为两组，一组与等量抗鸡传染性喉气管炎血清（血清中和抗体效价应≥1:10）混合，另一组与等量生理盐水混合，置室温和 1 小时后，接种 11 日龄鸡胚绒毛尿囊膜，中和组和病毒对照组各接种 5 枚，37℃培养 120 小时后，病毒对照组绒毛尿囊膜应有明显病斑。中和组鸡胚全部存活，绒毛尿囊膜无任何病斑。

**【安全检验】** 用 21~35 日龄 SPF 鸡 5 只，每只点眼或滴鼻接种 0.1ml（含 10 个使用剂量）的疫苗，观察 14 日，应无异常反应或在接种后 3~5 日有轻度眼炎或轻微咳嗽，而 2~3 日后恢复正常，判为合格。

**【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成 1 羽份/0.2ml，再继续作 10 倍系列稀释，取 10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup> 3 个稀释度，各绒毛尿囊膜接种 10~11 日龄 SPF 鸡胚 5 个，每胚 0.2ml，接种后培养 5 日，解剖观察病变，鸡胚绒毛尿囊膜呈明显增厚，有灰白色病斑，判为感染，计算 EID<sub>50</sub>，每羽份应≥10<sup>2.7</sup>EID<sub>50</sub>。

(2) 用鸡检验 按瓶签注明的羽份，用灭菌生理盐水稀释疫苗，点眼或滴鼻 35~42 日龄 SPF 鸡 5 只，每只 2 滴（约 0.06ml，相当于 1/5 使用剂量），21 日后，连同对照鸡 4 只，各喉气管内注射鸡传染性喉气管炎病毒 VL.B.V582 株 0.2ml（含 10<sup>4</sup>EID<sub>50</sub>），观察 10 日，对照鸡至少 3 只出现眼炎和呼吸道症状，免疫鸡全部无症状，判为合格。

**【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，每羽份疫苗病毒含量下降应不超过 0.5 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】** 用于预防鸡传染性喉气管炎。

**【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。

**【用法与用量】** 点眼。按瓶签注明羽份用生理盐水稀释，每羽 1 滴（0.03ml）。蛋鸡

在 35 日龄第 1 次接种后，在产蛋前再接种 1 次。

**【注意事项】** (1) 稀释后应放冷暗处，限 3 小时内用完。

(2) 对 35 日龄以下的鸡接种时，应先作小群试验，无重反应时，再扩大使用。35 日龄以下的鸡用苗后效果较差，21 日后需作第 2 次接种。

(3) 接种前、后要作好鸡舍环境卫生管理和消毒工作，降低空气中细菌密度，可减轻眼部感染。

(4) 本品只限于疫区使用。鸡群中发生严重呼吸道病如传染性鼻炎、鸡支原体感染等时，不宜使用本疫苗。

(5) 用过的疫苗瓶、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 (3) 2000 羽份/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为 12 个月。

**附加说明：**

1. 本标准由瑞普（保定）生物药业有限公司提出。

2. 本标准于 2009 年 01 月 29 日经农业部公告第 1148 号发布。

## 鸡新城疫、禽流感（H9 亚型）二联灭活疫苗（La Sota 株+WD 株）

Ji Xinchengyi Qinliugan (H9 Yaxing) Erlian Miehuoyimiao (La Sota Zhu+WD Zhu)

Newcastle Disease and Avian Influenza (H9 Subtype) Vaccine, Inactivated (Strain La Sota + Strain WD)

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株和 A 型禽流感病毒 A/Chicken/Hebei/WD/98 (H9N2) 株（简称 WD 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 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 吸取疫苗 10ml 加入离心管中，以 3500r/min 离心 15 分钟，管底析出水相应不超过 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 21~35 日龄 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 21~35 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>。

**免疫攻毒法** 用 21~35 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, 免疫组应至少保护 7 只。

(2) 禽流感部分 以下方法任择其一。

**血清学方法** 用 21~35 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 21~28 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 (见附注 1 和附注 2)。免疫组 HI 抗体效价的几何平均值应不小于 6.0log<sub>2</sub>, 对照组 HI 抗体效价的几何平均值应不大于 2log<sub>2</sub>。

**免疫攻毒法** 用 21~35 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 21~28 日, 用 1:10 稀释的 AIV WD 毒种进行翅静脉注射, 每只鸡 0.5ml。攻毒后第 5 日, 分别采集每只鸡的泄殖腔及气管拭子, 将同一只鸡的泄殖腔及气管拭子混合后作为 1 个样品, 每个样品经尿囊腔接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚 5 枚, 每胚 0.2ml, 孵育观察 5 日, 逐胚测定鸡胚液的 HA 效价。每个样品接种的 5 枚鸡胚中只要有 1 枚鸡胚胚液的 HA 效价≥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 H9 亚型禽流感。

**【用法与用量】** 可用于任何品种及不同日龄的鸡。颈部皮下或肌肉注射, 4 周龄以内的鸡, 每只 0.3ml, 4 周龄以上的鸡, 每只 0.5ml。

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】** (1) 仅对健康鸡群进行免疫接种。

(2) 使用前应充分摇匀, 并使疫苗升到室温。

(3) 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 禽流感 (H9 亚型) 血凝抑制试验抗原制造及检验标准

### 1.1 抗原制造

1.1.1 病毒繁殖 取 A 型禽流感病毒 A/Chicken/Hebei/WD/98 (H9N2) 株生产用毒种, 用 SPF 鸡胚繁殖病毒, 收获鸡胚液。

1.1.2 灭活 取含毒鸡胚液, 加入 10% 甲醛溶液, 使其终浓度均为 0.2%, 37℃ 灭活 24 小时。

1.1.3 配制 灭活后的鸡胚液, 加入灭菌甘油 25%, 充分混匀, 定量分装, 保存于 2~8℃。

### 1.2 检验

1.2.1 性状 白色或淡黄色液体。

1.2.2 无菌检验 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

1.2.3 效价测定 按瓶签标明的用量用灭菌生理盐水进行稀释，用微量法测定 HA 效价，应 $\geq 7\log_2$ 。

1.2.4 特异性检验 分别与 ND、EDS<sub>76</sub>、H5 亚型禽流感、H7 亚型禽流感阳性血清，SPF 鸡血清和 H9 亚型禽流感阳性血清作 HI 试验，抗原对 H9 亚型禽流感阳性血清应为阳性，对 ND 等其它阳性血清及 SPF 鸡血清应为阴性。

#### 附注 2 禽流感（H9 亚型）血凝抑制（HI）试验操作术式

2.1 取微量反应板，分别向 1~11 孔中加入 0.025ml 生理盐水，第 12 孔中加入 0.05ml 生理盐水。

2.2 吸取 0.025ml 血清，加至第 1 孔内，充分混匀后，吸取 0.025ml 至第 2 孔，依次 2 倍稀释至第 10 孔，从第 10 孔吸取 0.025ml，弃去。

2.3 分别向 1~11 孔中加入含 4HA 单位的抗原 0.025ml，室温下静置 30~40 分钟。

2.4 每孔中加入 0.025ml 1% (V/V) 鸡红细胞悬液，轻轻混匀，室温下静置 30~40 分钟。对照红细胞将呈显著纽扣状。

2.5 结果判定 将反应板倾斜后判定结果。当阴性对照血清 HI 效价 $\leq 2\log_2$ 、阳性对照血清 HI 效价与已知结果相比，误差 $\leq 1\log_2$ 时，试验方可成立。以完全抑制 4 HA 单位抗原的血清最高稀释度作为 HI 效价。

#### 附加说明：

1. 本标准由北京市农林科学院提出。
2. 本标准于 2009 年 03 月 06 日经农业部公告第 1176 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（H9N2 亚型，HP 株）二联灭活疫苗

Ji Xinchengyibingdu (La Sota Zhu) Qinliuguanbingdu (H9N2 Yaxing, HP zhu) Erlian  
Miehuoyimiao

Newcastle Disease Virus (La Sota Strain) and Avian Influenza Virus (H9N2, HP Strain) Disease  
Vaccine, Inactivated

本品系用鸡新城疫病毒 LaSota 株、禽流感 H9N2 亚型 HP 株分别接种鸡胚培养，分别收集胚液，超滤浓缩，经甲醛溶液灭活后，加入矿物油佐剂乳化，混合制成。用于预防鸡新城疫、禽流感 H9N2 亚型。

【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 取疫苗 10ml，装于离心管中，以 3000r/min 离心 15 分钟或在 37℃左右保存 21 日，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3~4周龄的SPF雏鸡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引发的局部或全身不良反应。

**【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。

(1) 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 $\leq 2\log_2$ 。

(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，免疫组应至少保护7只。

2 禽流感H9N2亚型部分 下列方法任择其一。

(1) 用4~5周龄SPF鸡15只，其中10只各颈部皮下注射疫苗0.3ml，另5只不接种，作为对照，21日后采血，分离血清，用HP株作为H9N2亚型抗原测定HI抗体效价。免疫鸡HI抗体几何平均滴度应 $\geq 6\log_2$ ，对照鸡应为阴性。

(2) 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，采集泄殖腔棉拭子进行病毒分离。将每只鸡的样品经尿囊腔接种9~11日龄SPF鸡胚5枚。孵育观察5日，无论死胚、活胚均应测定鸡胚液血凝价，以5枚鸡胚中至少有1枚鸡胚液的血凝价 $\geq 1:16$ （微量法）判为感染。对病毒感染为阴性的鸡胚，应盲传一次。免疫组应至少有9只鸡为病毒分离阴性，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H9N2亚型禽流感，免疫期4周龄内雏鸡为2个月、4周龄以上的青年鸡为3个月、成年鸡为4个月。

**【用法与用量】** 颈部皮下或肌肉注射，2周龄内雏鸡每只0.2ml，2~4周龄雏鸡每只0.3ml，4周龄以上的青年鸡和成年鸡每只0.5ml。

**【不良反应】** 无。

**【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。

(4) 疫苗启封后，限当日用完。

(5) 本品不能冻结。

(6) 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。

**【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. 本标准由河南农业大学禽病研究所提出。
2. 本标准于 2009 年 03 月 06 日经农业部公告第 1176 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。

## 狐狸脑炎活疫苗（CAV-2C 株）

Huli Naoyan Huoyimiao（CAV-2C Zhu）

Fox Encephalitis Vaccine, Live（CAV-2C strain）

本品系用免疫原性良好的犬腺病毒-II 型弱毒 CAV-2C 株，接种于犬肾传代细胞(MDCK) 培养，收获感染细胞培养液加保护剂真空冷冻干燥制成。用于预防狐狸脑炎。

**【性状】** 微黄白色海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离，稀释后为粉红色液体。

**【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】** 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】** 每批疫苗随机取 1 瓶，加灭菌注射用水 5 ml，再作 1:100 稀释，用此稀释液与 1:10 倍稀释的狐狸脑炎病毒阳性血清等量混合后，37℃中和 1 小时，接种 MDCK 细胞 4 瓶，每瓶 1ml，同时设对照组，培养观察 5 日，试验组应不出现 CPE，对照组应全部出现 CPE。

**【安全检验】** 每批疫苗随机取 5 瓶，分别加灭菌注射用水 5ml，混合后皮下接种中和抗体效价 $\leq 1:4$  的 2~10 月龄健康狐狸 5 只，每只 5 ml（5 个免疫剂量），分 4 点注射，观察 14 日，精神、食欲、体温、粪便应无异常变化。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

(1) 病毒含量测定 每批疫苗随机取 1 瓶，加灭菌注射用水 5 ml，水化后做 10 倍系列稀释，取  $10^{-3}$ ~ $10^{-6}$  4 个稀释度，每个稀释度接种 4 孔，每孔 0.1 ml，每孔加入 MDCK 细胞悬液 0.9 ml，置 37℃培养并观察 5 日，记录细胞病变，按 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>，每头份病毒含量应 $\geq 10^{4.50}$ TCID<sub>50</sub>。

(2) 中和抗体效价（GMT）测定 每批疫苗随机取 1 瓶，加灭菌注射用水 5ml 稀释，皮下注射中和抗体效价 $\leq 1:4$  的 2~10 月龄健康狐狸 5 只，每只注射疫苗 1 头份（1ml），同时设立 5 只不接种狐为对照，免疫后 21 日分别采血，分离血清，测定狐狸脑炎血清中和抗体。对照狐狸血清抗体 GMT 应 $\leq 1:4$ ，免疫组的血清抗体 GMT 应 $\geq 1:27$ 。

**【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】** 用于预防狐狸脑炎，免疫期为 6 个月。

**【用法与用量】** 仔狐在断乳 21 日后或种狐配种前 30~60 日接种疫苗。按标签注明头份，用灭菌注射用水稀释后，皮下接种狐狸，每只 1 头份。

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】** (1) 疫苗在运输时应避光，在冷冻条件下运输。

(2) 疫苗不能与防腐消毒成分接触。

(3) 疫苗稀释后限当日内用完，注射前须将本品摇匀后使用。

(4) 疫苗瓶和未用完的疫苗应作消毒处理。

**【规格】** 5 头份/瓶

**【贮藏与有效期】** 在-20℃条件下保存，有效期为 12 个月。

#### 附注 狐狸脑炎发病判定标准

1 体温升高至 40℃以上，并稽留 1~2 日；

2 精神沉郁、食欲废绝、呕吐、腹泻；

3 流水样鼻液、眼球震颤、高度兴奋、感觉过敏、共济失调；

4 发生阵发性痉挛、麻痹等神经症状乃至昏迷死亡。

具备任何 3 项临床症状，判为发病。

#### 附加说明：

1. 本标准由中国农业科学院特产研究所提出。

2. 本标准于 2009 年 04 月 02 日经农业部公告第 1184 号发布。

## 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+Z16 株+HP 株）

Ji Xinchengyi, Chuanranxingzhiqiguanyan, Jiandanzonghezheng, Qinliugan (H9 Yaxing)

Silian Miehuoyimiao (La Sota zhu+M41 zhu +Z16 zhu +HP zhu)

Newcastle Disease, Infectious Bronchitis, Egg Drop Syndrome and Avian Influenza (H9 Subtype) Vaccine, Inactivated (strain La Sota+strain M41+strain Z16+strain HP)

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株、传染性支气管炎病毒 M41 株、禽流感 H9N2 亚型 A/chicken/Henan Puyang/2/98 (H9N2) 株（即 HP 株）分别接种鸡胚培养，减蛋综合征病毒 Z16 株接种鸭胚培养，收集胚液，超滤浓缩，经甲醛溶液灭活后，加入矿物油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征、H9 亚型禽流感。

**【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 取疫苗 10ml，装于离心管中，以 3000r/min 离心 15min，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 1~2 月龄 SPF 鸡 10 只，每只肌肉或皮下注射疫苗 1ml，观察 14 日，

应不出现由疫苗引起的任何局部或全身反应。

**【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。

(1) 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不低于 1:16，对照组 HI 抗体效价的几何平均值应不高于 1:4。

(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 (CVCCAV1611 株) 10<sup>5.0</sup>ELD<sub>50</sub>，观察 14 日。对照组应全部死亡，免疫组应至少保护 7 只。

2 鸡传染性支气管炎部分 用 14~42 日龄 SPF 鸡 20 只，各点眼接种鸡传染性支气管炎活疫苗 (H120 株) 1 羽份，接种后 21~28 日分别采血，分离血清，同时再各接种本疫苗 0.5ml，二次接种后 21~28 日再分别采血，分离血清。将两次血清分别作 HI 抗体效价测定 (见附注)。二免血清 HI 抗体效价的几何平均值 (GMT) 应较首免血清 HI 抗体效价的几何平均值高 3 倍以上。

3 鸡减蛋综合征部分 用 21~42 日龄 SPF 鸡 10 只，每只肌肉或皮下注射疫苗 0.5ml，另取 SPF 鸡 10 只作对照。21~35 日后，分别采血，分离血清，测定 HI 抗体效价。免疫鸡 HI 抗体效价几何平均滴度应不低于 1:128，对照鸡 HI 抗体效价应不高于 1:4。

4 H9 亚型禽流感部分 下列方法任择其一。

(1) 取 28 日龄 SPF 鸡 15 只，其中 10 只各颈部皮下注射疫苗 0.3ml，另 5 只不接种，作为对照，21 日后，分别采血，分离血清，用 H9 亚型 HP 株禽流感抗原测定 HI 抗体效价。免疫鸡 HI 抗体几何平均滴度应不低于 1:64，对照鸡 HI 抗体效价应不高于 1:4。

(2) 上述免疫鸡和对照鸡，用 1:10 稀释的 HP 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进行病毒分离。将每只鸡的样品经尿囊腔内接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚 5 枚。孵育观察 5 日，无论死胚、活胚均应测定鸡胚液血凝价，以 5 枚鸡胚中至少有 1 个鸡胚的鸡胚液血凝价不低于 1:16 (微量法) 判为病毒分离阳性。对病毒分离为阴性的样品，应盲传 1 次，再次测定 HA 价。免疫组应至少有 9 只鸡为病毒分离阴性，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、传染性支气管炎、减蛋综合征和 H9 亚型禽流感。开产前成鸡免疫期为 4 个月。

**【用法与用量】** 颈部皮下或肌肉注射。开前一个月左右种鸡、蛋鸡，每只 0.5ml。

**【不良反应】** 无。

**【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。

(4) 疫苗启封后，限当日用完。

(5) 本品不能冻结。

(6) 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。

**【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：鸡传染性支气管炎血凝抑制试验抗原、阳性血清质量标准及血凝抑制试验操作程序

##### 1 鸡传染性支气管炎血凝抑制 (HI) 试验抗原质量标准

本品系从荷兰 Gezondheidsdienst voor Dieren BV Animal Health Service Ltd 公司购入，系由鸡传染性支气管炎病毒 M41 株制成，用于检测鸡传染性支气管炎 M41 血清型血凝抑制 (HI) 抗体。

**【性状】** 黄色结晶状粉末。

**【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】** 对鸡红细胞凝集价应不低于 1:256。

**【特异性检验】** 与阴性血清、NDV、AIV、EDSV 阳性血清呈阴性反应 (HI 抗体效价应不高于 1:8)，与鸡传染性支气管炎 M41 株阳性血清呈阳性反应 (HI 抗体效价应不低于 1:256)。

**【规格】** 1ml/瓶

**【贮存与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 24 个月。

##### 2 抗鸡传染性支气管炎病毒 (M41 株) 阳性血清质量标准

本品系从荷兰 Gezondheidsdienst voor Dieren BV Animal Health Service Ltd 公司购入，专用于鸡传染性支气管炎 M41 血清型血凝抑制 (HI) 抗体检测时作阳性对照。

**【性状】** 黄色结晶状粉末。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** HI 效价应不低于 1:256。

**【特异性检验】** 对 NDV、AIV、EDSV 抗原呈阴性反应 (HI 抗体效价应不高于 1:8)。

**【规格】** 1ml/瓶

**【贮存与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 24 个月。

##### 3 鸡传染性支气管炎血凝抑制 (HI) 试验操作术式

3.1 仪器设备 V 型 96 孔微量血凝板；微型震荡器；聚乙烯塑料采血管；多道移液器等。

##### 3.2 试剂

3.2.1 缓冲液 0.1 mol/L PBS 缓冲液 (pH 值为 7.0~7.2)，置 2~8℃ 保存备用。

3.2.2 0.5% 红细胞悬液 采集成年鸡血液，用 20 倍量 PBS 缓冲液洗涤 3~4 次，每次 3~4 分钟，最后一次 5 分钟，用 PBS 缓冲液配成 0.5% 悬液。

3.2.3 鸡传染性支气管炎血凝抑制 (HI) 试验抗原和阳性血清见附注 1 和附注 2

3.3 被检血清 采血，分离血清，-20℃ 以下保存备用。使用前以 56℃ 灭活 30 分钟。

##### 3.4 HI 试验操作方法

##### 3.4.1 微量血凝 (HA) 试验

3.4.1.1 向微量血凝板每孔中加入 PBS 缓冲液 25μl，共做 4 行平行重复。

3.4.1.2 吸取 1:5 稀释的抗原加入到第 1 列各孔, 每孔 25 $\mu$ l, 然后自左至右顺序倍比稀释至第 11 列孔, 从第 11 列各孔吸取 25 $\mu$ l 混合液, 弃去。第 12 列各孔不加抗原作为对照孔。

3.4.1.3 向每孔中加入 0.5% 红细胞悬液 25 $\mu$ l。

3.4.1.4 将微量血凝板置微型震荡器上震荡 1 分钟。

3.4.1.5 将微量血凝板置 4 $^{\circ}$ C 条件下作用 50 分钟。根据血凝图像判定结果。以使红细胞完全凝集的最高稀释度作为该抗原的 HA 效价。每次做 4 行平行重复, 以几何平均值表示结果。

3.4.1.6 4HA 单位工作抗原的配制

3.4.1.6.1 配制 4HA 单位工作抗原稀释倍数的计算 按照下列公式计算配制 4HA 单位工作抗原稀释倍数, 即抗原稀释倍数=抗原血凝滴度 $\div$ 4。如抗原 HA 效价为 1:1024, 则配制 4HA 单位工作抗原液时应用 PBS 缓冲液稀释 256 倍 (1024 $\div$ 4=256)。

3.4.1.6.2 4HA 单位工作抗原的验证 向 96 孔微量板第 1 孔加入 4HA 单位工作抗原液 50 $\mu$ l, 向第 2、3、4 孔各加入 PBS 缓冲液 25 $\mu$ l。从第 1 孔中吸取 25 $\mu$ l 4HA 单位工作抗原液加入到第 2 孔, 依次倍比稀释至第 4 孔, 弃去 25 $\mu$ l 混合液, 即第 1 孔至第 4 孔的抗原 HA 单位依次为 4、2、1、0.5 HA 单位。每孔加入 0.5% 红细胞悬液 25 $\mu$ l, 置微型震荡器上震荡 1 分钟, 然后置 4 $^{\circ}$ C 条件下作用 50 分钟, 根据血凝图像判定结果。如果 4HA 单位工作抗原配制正确, 第 3 孔应完全凝集, 第 4 孔应凝集 50% 以上。

3.4.2 微量血凝抑制 (HI) 试验

3.4.2.1 在 96 孔微量板上, 第 1 孔至第 12 孔, 每孔加入 25 $\mu$ l PBS 缓冲液。

3.4.2.2 向第 1 孔中加入被检血清 25 $\mu$ l, 依次倍比稀释至第 12 孔, 最后从第 12 孔弃去 25 $\mu$ l 混合液。

3.4.2.3 向每孔中加入 25 $\mu$ l 4HA 单位工作抗原液, 置微型震荡器上震荡 1 分钟。

3.4.2.4 置 4 $^{\circ}$ C 条件下作用 10 分钟。

3.4.2.5 向每孔加入 0.5% 红细胞悬液 25 $\mu$ l, 置微型震荡器上震荡 1 分钟。

3.4.2.6 置 4 $^{\circ}$ C 条件下作用 50 分钟。根据血凝图像判定结果。

3.4.2.7 每次测定时应设阴性血清对照和已知 HI 抗体效价的阳性血清对照 (阳性血清先做 10 倍稀释后, 其 HI 抗体效价应为 1:32 左右)。

3.5 结果判定 判定时将微量板倾斜 45 度。当阴性血清 HI 效价不高于 1:8 (微量法)、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差不高于 1 个滴度时, 方可成立。若红细胞沉淀呈泪珠状流淌, 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 4HA 单位抗原的血清最高稀释度作为待检血清的 HI 抗体效价。

#### 附加说明:

1. 本标准由河南农业大学禽病研究所、辽宁益康生物制品有限公司、上海海利生物药品有限公司提出。

2. 本标准于 2009 年 04 月 02 日经农业部公告第 1184 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（N79 株 +M41 株+NE4 株）

Jixinchengyi、Chuanranxingzhiqiguanyan、Jiandanronghezheng Sanlian Miehuoyimiao (N79 Zhu+M41 Zhu+NE4 Zhu)

Newcastle Disease, Infectious Bronchitis and Egg Drop Syndrome Vaccine, Inactivated  
(Strain N79+Strain M41+Strain NE4)

本品系用鸡新城疫病毒 N79 株和鸡传染性支气管炎病毒 M41 株分别接种易感鸡胚培养，收获感染鸡胚液；鸡减蛋综合征病毒 NE4 株接种易感鸭胚培养，收获感染鸭胚液，分别经超滤浓缩、甲醛溶液灭活后，按一定比例混合，加油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡新城疫、鸡传染性支气管炎和鸡减蛋综合征。

**【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）鸡新城疫部分效力检验 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，每只鸡分别采血，分离血清，按现行《中国兽药典》附录进行 HI 效价测定。免疫组 HI 效价几何平均值应不低于 1:16（微量法），对照组 HI 效价几何平均值应不高于 1:4（微量法）。

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 只作对照。接种后 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，免疫组应至少保护 7 只。

（2）鸡传染性支气管炎部分 用 14~42 日龄 SPF 鸡 25 只，20 只各点眼接种传染性支气管炎活疫苗（H120 株）1 羽份（0.05ml），另 5 只作对照。接种后 21~28 日，每只鸡分别采血，分离血清，同时免疫鸡再分别接种本疫苗 0.3ml，二次接种后 21~28 日，将免疫鸡和对照鸡再分别采血，分离血清。将两次血清按“附注”方法分别进行 HI 效价测定。免疫组二免血清 HI 效价几何平均值应比首免血清 HI 效价几何平均值高 4 倍以上，对照组血清 HI 效价几何平均值应不高于 1:8（微量法）。

（3）鸡减蛋综合征部分 用 21~42 日龄 SPF 鸡 20 只，10 只各皮下或肌肉注射疫苗

0.5ml, 另 10 只作对照。接种后 21~35 日, 每只鸡分别采血, 分离血清, 进行 HI 效价测定。免疫组 HI 效价几何平均值应不低于 1:128 (微量法), 对照组 HI 效价几何平均值应不高于 1:4 (微量法)。

**【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。接种后 21 日产生免疫力。

**【用法与用量】** 开产前 14~28 日免疫, 颈部皮下或肌肉注射, 每只 0.5ml。

**【不良反应】** 无。

**【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 鸡传染性支气管炎血凝抑制 (HI) 试验抗原及阳性血清质量标准

#### 1.1 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验抗原质量标准

1.1.1 抗原来源 购于荷兰, VLDIA035-HAG-M41。

1.1.2 抗原标准

**【性状】** 微黄色疏松团块。

**【效价测定】** 对 1% 鸡红细胞凝集价应不低于 1:256 (微量法)。

**【特异性】** 抗原与传染性支气管炎 M41 株阳性血清呈阳性反应, 不低于 1:256 (微量法); 抗原与阴性血清、禽流感阳性血清、鸡新城疫阳性血清、鸡减蛋综合征阳性血清均为阴性反应, 不高于 1:8 (微量法)。

**【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。

#### 1.2 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验阳性血清质量标准

**【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 抗体效价应不低于 1:256 (微量法)。

**【特异性检验】** 阳性血清与传染性支气管炎 M41 株抗原应呈阳性反应, 不低于 1:256 (微量法); 阳性血清与禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征抗原应为阴性反应, 不高于 1:

8 (微量法)。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存, 有效期为 60 个月。

## 2 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验 (HI) 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, 以使红细胞 100%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 (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 稀释为红细胞 100%凝集终点, 表明配制的是 4HA 单位抗原; 如果红细胞 100%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; 如果红细胞 100%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, 然后作 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℃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℃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 效价不高于 1:8 (微量法)、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差不高于 1 个滴度时, 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. 本标准由农业部动物检疫所 (现名: 中国动物卫生与流行病学中心) 提出。
2. 本标准于 2003 年 02 月 09 日经农业部公告第 246 号发布。
3. 本标准于 2009 年 04 月 02 日经农业部公告第 1184 号批准变更注册。变更内容: 变更产品质量标准, 其中传染性支气管炎部分效力检验方法变更为血清学方法; 新城疫部分效力检验方法变更为同现行《中国兽药典》方法。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。

## 高致病性猪繁殖与呼吸综合征活疫苗（JXA1-R 株）

Gaozhibingxing Zhufanzhiyuhuxizonghezheng huoyimiao (JXA1-R Zhu)

Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Vaccine, Live (JXA1-R Strain)

本品系用高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒NVDC-JXA1株经传代致弱的JXA1-R株接种Marc-145细胞，经培养后，收获感染细胞培养液，加入适量蔗糖脱脂乳保护剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防高致病性猪繁殖与呼吸综合征（俗称：高致病性猪蓝耳病）。

**【性状】** 淡黄色海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离，加稀释液后迅速溶解。

**【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】** （1）中和试验 将疫苗用无血清培养基稀释成 $10^3$ TCID<sub>50</sub>/ml，取0.1ml与等量猪繁殖与呼吸综合征病毒特异性阳性血清混合，同时设病毒对照组和正常细胞对照组，37℃作用1小时后，接种Marc-145细胞培养板，观察5日。应不产生细胞病变（CPE）。

（2）病毒基因鉴定 应用下列引物进行RT-PCR检测，疫苗可扩增出581bp的特异性条带，以NVDC-JXA1株为代表的高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒以及其他猪繁殖与呼吸综合征病毒核酸均为阴性。（猪繁殖与呼吸综合征病毒JXA1-R株RT-PCR检测方法见附注3）

U1 ATTTGAATGTTTCGCACGGTCTC D2 CGGAACCATCAAGCACAACCTCT。

**【安全检验】** 用3~4周龄繁殖与呼吸综合征病毒抗原、抗体阴性仔猪（阴性猪标准见附注1）5头，各肌肉注射疫苗10头份，逐日测量体温，观察21日，应均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）病毒含量测定 将疫苗用无血清培养基稀释为1头份/0.1ml，再做10倍系列稀释，取 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 3个稀释度，分别接种于96孔细胞板，每个稀释度接种6孔，每孔0.1ml，在含5%CO<sub>2</sub>、37℃培养箱培养观察3~5日，根据Reed-Muench法计算TCID<sub>50</sub>。每头份病毒含量应 $\geq 10^{5.0}$ TCID<sub>50</sub>。

（2）免疫攻毒 用4~6周龄猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原、抗体阴性猪（阴性猪标准见附注1）10头，其中5头肌肉注射疫苗1头份，另5头作为对照，同等条件下隔离饲养。28日后，所有猪肌肉注射检验用强毒NVDC-JXA1株的病毒培养液（ $\geq 10^{4.5}$ TCID<sub>50</sub>/ml）3ml，每日测温并观察21日。对照猪5头均应发病，且至少2头死亡，免疫猪5头应至少4头保护（发病猪判定标准见附注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】** 用于预防高致病性猪繁殖与呼吸综合征（俗称：高致病性猪蓝耳病）。接种后21~28日产生免疫力。免疫期为4个月。

**【用法与用量】** 耳根后部肌肉注射。按瓶签注明头份，用生理盐水稀释。仔猪断奶前

后首免，1头份/头，4个月后加强1次；母猪配种前免疫1次，1头份/次。

**【不良反应】** 接种后，个别猪可能出现过敏反应，可使用抗组胺药（肾上腺素等）治疗。

**【注意事项】** （1）初次应用本品的猪场，应先做小群试验。

（2）本品仅用于接种健康猪。

（3）本品不应用于紧急免疫接种。

（4）阴性猪群、种公猪和妊娠母猪禁用。

（5）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。

（6）接种用器具应无菌，注射部位应严格消毒。

（7）疫苗稀释后应避免高温，限1小时内用完。

（8）剩余的疫苗及用具，应经消毒处理后废弃。

（9）屠宰前30日不应进行接种。

**【规格】** （1）10头份/瓶 （2）20头份/瓶 （3）50头份/瓶

**【贮藏与有效期】** -15℃以下保存，有效期暂定为18个月。

#### 附注：1 阴性猪标准

1.1 经猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原为阴性、LSI ELISA检测猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体为阴性的猪。

##### 1.2 猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR检测方法

1.2.1 试剂 北京世纪元亨动物防疫技术有限公司生产的猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR检测试剂盒。

1.2.2 方法 按照试剂盒说明书要求进行以下操作

##### 1.2.2.1 样品制备

1.2.2.1.1 样品采集 病死或扑杀猪，取肺、扁桃体和脑等组织；待检活猪，用注射器取血5ml，4℃保存，送实验室检测（要求送检病料新鲜，严禁反复冻融）。

1.2.2.2 样品处理 每份样品分别处理。

1.2.2.2.1 组织样品处理 称取猪组织0.5g于研磨器中研磨，加入1.5ml生理盐水继续研磨，待匀浆后转至1.5ml灭菌离心管中，8000r/m离心2分钟，取上清液100μl于1.5ml灭菌离心管中。

1.2.2.2.2 全血样品处理 待血凝后取血清100μl，置1.5ml灭菌离心管中。

1.2.2.2.3 阳性对照处理 取阳性对照100μl，置1.5ml灭菌离心管中。

1.2.2.2.4 阴性对照处理 取阴性对照100μl，置1.5ml灭菌离心管中。

##### 1.2.2.3 病毒RNA的提取

1.2.2.3.1 取已处理的样品、阴性对照和阳性对照，分别加入裂解液600μl，充分颠倒混匀，室温静置3~5分钟。

1.2.2.3.2 将全部液体加入吸附柱中，吸附柱要套上收集管，13000r/m离心30秒，弃去收集管中液体，套上收集管。

1.2.2.3.3 向吸附柱中加入600μl洗液，13000r/m离心30秒，弃去收集管中液体，套上收

集管。

1.2.2.3.4 重复步骤1.2.2.3.3,再13000r/m离心2分钟。将吸附柱移入新的1.5ml离心管中,在膜中央加入洗脱液25 $\mu$ l,室温静置1min,13000r/m离心30秒,获得总RNA。

1.2.2.4 反转录(RT)操作程序 每份总体积20 $\mu$ l。取16 $\mu$ l反转录反应液(用前混匀)、1 $\mu$ lRNA酶抑制剂、1 $\mu$ l反转录酶,2 $\mu$ l 1.2.2.3.4中已溶解的病毒RNA。混匀并作好标记,在PCR扩增仪上进行以下循环:42 $^{\circ}$ C反转录60分钟,98 $^{\circ}$ C预变性5分钟。

1.2.2.5 PCR操作程序 每份总体积20 $\mu$ l。取16 $\mu$ lPCR反应液(用前混匀)、2 $\mu$ lTaq DNA聚合酶、2 $\mu$ l 1.2.2.4中的反转录产物。混匀,作好标记并加入20 $\mu$ l矿物油覆盖(有热盖的PCR扩增仪不用加矿物油),放于PCR扩增仪上,扩增条件为94 $^{\circ}$ C变性30秒,55 $^{\circ}$ C退火30秒,72 $^{\circ}$ C延伸30秒,35个循环后,72 $^{\circ}$ C延伸10分钟。

1.2.2.6 电泳 称3g琼脂糖放于500ml锥形瓶中,加入50倍稀释的TAE电泳缓冲液200ml(取4ml 50 $\times$ TAE电泳缓冲液,用双蒸水稀释至200ml),于微波炉中溶解,再加入10 $\mu$ l染色液混匀。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,点样于琼脂糖凝胶孔中,以5 V/cm电压于50倍稀释的TAE电泳缓冲液中电泳,紫外灯下观察结果。

1.2.2.7 结果判定 当阳性对照出现660bp扩增带、阴性对照无扩增带出现(引物带除外),实验结果成立。被检样品出现660bp扩增带为猪繁殖与呼吸综合征病毒核酸阳性,未出现相应扩增带的样品判为阴性。

## 2 发病猪判定标准

2.1 至少3日体温在41 $^{\circ}$ C以上;或精神不振,食欲下降,眼结膜炎,咳嗽、喘等呼吸道症状;

2.2 大体剖检,肺部出现片状实变。

符合以上2条,即可判为发病。

## 3 猪繁殖与呼吸综合征病毒JXA1-R株RT-PCR检测方法

3.1 试剂 北京世纪元亨动物防疫技术有限公司生产的猪繁殖与呼吸综合征病毒JXA1-R株RT-PCR试剂盒。

3.2 方法 按照试剂盒说明书要求进行以下操作

### 3.2.1 样品制备

3.2.1.1 样品采集 病死或扑杀猪,取肺、扁桃体和脑等组织;待检活猪,用注射器取血5ml,4 $^{\circ}$ C保存,送实验室检测(要求送检病料新鲜,严禁反复冻融)。

3.2.2 样品处理 每份样品分别处理。

3.2.2.1 组织样品处理 称取猪组织0.5g于研磨器中研磨,加入生理盐水继续研磨,待匀浆后转至1.5ml灭菌离心管中,8000r/m离心2分钟,取上清液100 $\mu$ l于1.5ml灭菌离心管中。

3.2.2.2 全血样品处理 待血凝后取血清100 $\mu$ l,置1.5ml灭菌离心管中。

3.2.2.3 弱毒疫苗样品处理 取稀释好的样品100 $\mu$ l,置1.5ml灭菌离心管中。

3.2.2.4 阳性对照处理 取阳性对照100 $\mu$ l,置1.5ml灭菌离心管中。

3.2.2.5 阴性对照处理 取灭菌去离子水100 $\mu$ l,置1.5ml灭菌离心管中。

### 3.2.3 病毒RNA的提取

3.2.3.1 取已处理的样品、阴性对照和阳性对照，分别加入裂解液600 $\mu$ l，充分颠倒混匀，室温静置3~5分钟。

3.2.3.2 将全部液体加入吸附柱中，吸附柱要套上收集管，13000r/m离心30秒，弃去收集管中液体，套上收集管。

3.2.3.3 向吸附柱中加入600 $\mu$ l洗液，13000r/m离心30秒，弃去收集管中液体，套上收集管。

3.2.3.4 重复步骤3.2.3.3，再13000r/m离心2分钟。将吸附柱移入新的1.5ml离心管中，在膜中央加入洗脱液25 $\mu$ l，室温静置1min，13000r/m离心30秒，获得总RNA。

3.2.4 RT-PCR操作程序 每份总体积20 $\mu$ l。取16.8 $\mu$ l RT-PCR反应液（用前混匀）、1.2 $\mu$ l 酶混合液，2 $\mu$ l样品RNA。混匀并作好标记，加入矿物油20 $\mu$ l覆盖（有热盖的PCR扩增仪不用加矿物油），在PCR扩增仪上进行以下循环 42 $^{\circ}$ C反转录45分钟；95 $^{\circ}$ C预变性3分钟；扩增条件为95 $^{\circ}$ C变性30秒；55 $^{\circ}$ C退火30秒，72 $^{\circ}$ C延伸1分钟；35个循环后，72 $^{\circ}$ C延伸7分钟。

3.2.5 电泳 称3g琼脂糖放于500ml锥形瓶中，加入50倍稀释的TAE电泳缓冲液200ml（取4ml 50 $\times$ TAE电泳缓冲液，用双蒸水稀释至200ml），于微波炉中熔解，再加入10 $\mu$ l染色液混匀。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，点样于琼脂糖凝胶孔中，以5 V/cm电压于50倍稀释的TAE电泳缓冲液中电泳，紫外灯下观察结果。

3.2.6 结果判定 当阳性对照出现581bp扩增带、阴性对照无扩增带出现（引物带除外），实验结果成立。被检样品出现581bp扩增带为PRRSV JXA1-R株核酸阳性，未出现相应扩增带的样品判为阴性。

#### 附加说明：

1. 本标准由农业部组织拟定。
2. 本标准于2009年04月20日经农业部公告第1191号发布。

## 鸡传染性法氏囊病冻干蛋黄抗体

Ji Chuanranxingfashinangbing Donggan Danhuang Kangti

Infectious Bursal Disease Antibodies

本品系用鸡传染性法氏囊病病毒中等毒力 B87 株接种 SPF 鸡胚，收获感染胚，加适宜佐剂制成灭活疫苗，接种健康产蛋鸡。从蛋黄中提取抗体，灭活、沉淀、萃取后加入适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于鸡传染性法氏囊病早、中期感染的治疗和紧急预防。

**【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。

**【支原体检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无支原体生长。

**【外源病毒检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【安全检验】** 用7日龄 SPF 鸡 10 只，每只胸部肌肉两侧（每侧 0.5ml）注射 1.0ml（含 10 羽份）；用体重 18~22g 小白鼠 5 只，皮下注射 0.5ml（含 4 羽份）。观察 10 日。雏

鸡应健活（允许非特异性死亡 1 只），小白鼠应全部健活。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

(1) 抗体效价测定 按瓶签注明羽份，将抗体用生理盐水稀释至 1 羽份/ml。在 8.0% 氯化钠溶液 100ml 中加入 1g 优质琼脂粉，加热融化后，加入终浓度为 0.01% 硫柳汞防腐，浇制凝胶板。在其上按六角形打孔，孔径为 5mm，孔距为 3mm。将抗体作 2 倍系列稀释后进行试验，抗原及抗体加量以孔满为度（约 25ul）。然后将琼脂平板置湿盒中，37℃ 孵育 24~48 小时。当阴、阳性血清对照成立时，与标准抗原形成白色沉淀线的抗体最大稀释倍数即为蛋黄抗体的效价，应不低于 1:128。

(2) 用鸡效检 用 4~6 周龄 SPF 鸡 30 只，随机分成 3 组，每组 10 只。第 1 组为空白对照组，不注射任何药品，单独隔离饲养。第 2、3 组，每只鸡经点眼途径接种 IBDV LX 株囊毒 0.2ml。24 小时后，第 2 组胸部两侧（每侧 0.5ml）肌肉注射 1.0ml（含 1 羽份），第 3 组各胸部两侧（每侧 0.5ml）肌肉注射生理盐水 1.0ml。观察 10 日。空白对照组鸡应全部健活。攻毒对照组鸡，应于攻毒后 24~48 小时发病，48 小时后开始死亡，72 小时全部发病，10 日内至少死亡 8 只。治疗组鸡，应至少存活 9 只。

**【甲醛残留量测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【辛酸残留量测定】** 按附注进行测定，辛酸残留量应不高于 0.1%。

**【剩余水分测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 用于鸡传染性法氏囊病早、中期感染的治疗和紧急预防。

**【用法与用量】** 肌肉注射。

治疗用量 35 日龄以下鸡，每只 1.0ml（含 1 羽份）；35 日龄以上鸡，每只 1.0ml（含 2 羽份）。可根据发病情况重复注射 2~3 次。

预防用量 每只鸡均 1.0ml（含 1 羽份）。可根据发病情况重复注射 2~3 次。保护期可达 7 日。

**【不良反应】** 无可见不良反应。

**【注意事项】** (1) 注射后的被动免疫保护期为 7 日。

(2) 可连续应用 2~3 次。

(3) 口服无效。可与抗生素混合 1 次注射。

(4) 应用后 7 日内不宜接种鸡传染性法氏囊病活疫苗。

(5) 用过的器具和瓶子应消毒处理。

**【规格】** (1) 250 羽份/瓶 (2) 500 羽份/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 36 个月。

#### 附注：辛酸含量检测方法（一次提取比色法）

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

2 设备仪器 721 型分光光度计、振荡器、普通离心机。

3 试剂

3.1 氯仿（AR）

### 3.2 pH 值 6.4 磷酸盐缓冲液 (1/30mol/L)

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

3.2.2 1/30mol/L 磷酸氢二钠溶液 取磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) 11.94g, 加蒸馏水至 1L。

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

3.2.4 显色剂 称取二乙基二硫代氨基甲酸钠 [ $\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CS}_2\text{Na}$ ] 100mg, 加正丁醇至 100ml。置 2~8°C 可保存 7~14 日。

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

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

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

## 4 操作

### 4.1 标准曲线制定

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

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

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

4.1.4 加塞, 振摇 15 分钟, 静置 10 分钟后, 以 3500 转/分钟离心 5 分钟。

4.1.5 仔细吸去上清液体及蛋白凝块, 弃之。

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

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

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

### 4.2 待测样品测定

4.2.1 抽样 按 0.05% 抽样。超滤浓缩也在采样前应充分搅拌均匀。

#### 4.2.2 检测

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

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

- 4.2.2.3 加塞，振摇 15 分，静置 10 分钟后离心 5 分钟。
- 4.2.2.4 仔细吸去上层液体及蛋白凝块，弃之。
- 4.2.2.5 各管吸氯仿层 4ml 于另 1 组洁净试管中，加入显色剂 0.5ml，充分混合后放置 5 分钟。

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

## 5 结果判定

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

## 6 注意事项

6.1 用氯仿提取游离脂肪酸时，加入 pH 值 6.4 磷酸盐缓冲液可以消除磷脂的干扰。但此 pH 值不是脂肪酸铜皂形成的最适条件，经实验证明以 pH 值 8.0 左右为最好。因此本法测定结果较实际值率偏低。

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

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

6.4 显色后色泽稳定，5 分钟到 3 小时吸光度值不变。

6.5 全部容器应为玻璃器皿，不能沾污胶塞，否则结果混乱。

## 附加说明：

1. 本标准由北京海淀中海动物保健科技公司提出。

2. 本标准于 2009 年 05 月 08 日经农业部公告第 1204 号发布。

3. 删除【白血病病毒检验】项——现版《中国兽药典》附录“外源病毒检验”中已含有“白血病病毒检验”的内容。

## 转移因子口服溶液

Zhuanyiyinzi Koufurongye

Transfer Factor Oral Solution

本品系用健康猪脾脏为原料，经去脂肪、细胞破碎、超滤制备的转移因子口服溶液。本品为非特异性免疫调节剂，用于增强鸡机体免疫功能。

【性状】 无色或微黄色液体。

【pH 值】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，在  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  时，pH 值应为 6.0~7.5。

【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 7~14 日龄 SPF 鸡 10 只，各口服 2.5ml (含 10 个使用剂量)，连服 3 日，观察 14 日，应全部健活。

**【含量测定】** 多肽 按福林酚法（见附注 1）进行，每 1ml 应不少于 1mg。

核糖 按核糖含量测定法（见附注 2）进行，每 1ml 应不少于 30 $\mu$ g。

**【鉴别检验】** （1）取本品 1ml，加茛三酮试液数滴，加热，溶液应显蓝紫色。

（2）取本品，根据含量测定结果加水制成每 1ml 中含多肽 20 $\mu$ g 的溶液，按现行《中国兽药典》附录分光光度法进行测定，在（251 $\pm$ 2）nm 的波长处有最大吸收。在 251nm 与 280nm 波长处吸收度的比值不得低于 1.9。

**【游离氨基酸】** 采用高效液相色谱法，按现行《中国兽药典》附录进行测定。每 1ml 中游离氨基酸的量不得少于 1.3mg（见附注 3）。

**【活力测定】** 取本品适量，按 T 细胞活性测定法---脱 E 受体法（见附注 4）测定，供试品管的 E 玫瑰花结百分率与对照管的 E 玫瑰花结百分率之差应不低于 10.0%。

**【甲醛残留量测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

**【作用与用途】** 非特异性免疫调节剂，用于增强鸡机体免疫功能。

**【用法与用量】** 饮水，鸡 0.25~0.5ml/只/日，连用 3 日。

**【不良反应】** 按推荐剂量使用，未发现不良反应。

**【注意事项】** （1）混浊或变色勿用。

（2）仅在兽医指导下使用。

**【规格】** （1）100ml/瓶 （2）200ml/瓶

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

### 附注：1 福林酚测定法

1.1 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。

#### 1.2 操作法

1.2.1 对照品溶液的制备 取牛血清白蛋白对照品，加水制成每 1ml 中含 0.3mg 的溶液。

1.2.2 供试品溶液的制备 取本品适量，加水制成每 1ml 中含 0.15mg 多肽的溶液，作为供试品溶液。

1.2.3 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液 0ml、0.1ml、0.3ml、0.5ml、0.7ml、0.9ml，分别置具塞试管中，各加水至 1.0ml，再分别加碱性铜试液 1.0ml，摇匀，各加福林酚试液（取福林酚储备液 1 $\rightarrow$ 16）4.0ml，立即混匀，置 55 $^{\circ}$ C 水浴中准确反应 5 分钟，置冷水浴中 10 分钟，在 650nm 的波长处测定吸收度；同时以 0 号管作为空白，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。

1.2.4 测定法 精密量取供试品溶液 1.0ml，按标准曲线的制备项下的方法，自“加碱性铜试液”起，依法测定，自标准曲线上查得供试品溶液的浓度，并乘以稀释倍数。

### 2 核糖含量测定法

2.1 对照品溶液的制备 精密称取 D-核糖对照品适量，用 5%三氯醋酸制成每 1ml 含核糖 20 $\mu$ g 的溶液，摇匀。

2.2 供试品溶液的制备 取本品适量,用 5%三氯醋酸制成每 1ml 含核糖 5 $\mu$ g 的溶液,作为供试品溶液。

2.3 标准曲线的制备 精密量取对照品溶液至 0ml、0.2ml、0.4ml、0.6ml、0.8ml、1.0ml 分别置具塞试管中,各加 5%三氯醋酸溶液适量至 2.0ml,各加 1% 3, 5-二羟基甲苯溶液[取 3, 5-二羟基甲苯 1g,加 0.1%三氯化铁-盐酸溶液(取三氯化铁 0.5g,加盐酸溶解使成 500ml,可长期使用) 100ml 中使溶解,临用新配]2.0ml,摇匀,置沸水浴中准确加热 30min,迅速冷却至室温,以 0 号管为空白,按现行《中国兽药典》附录分光光度法进行测定,在 650nm 的波长处测定吸收度,以浓度为横坐标,吸收度为纵坐标绘制标准曲线并进行线性回归,其相关系数应大于 0.995。

2.4 测定法 精密量取供试品溶液 2.0ml,按标准曲线的制备方法,自“各加 1%3, 5-二羟基甲苯溶液 2.0ml”起,依法测定。从回归方程中求出核糖含量。

### 3 游离氨基酸测定方法

3.1 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱为 ODS 氨基酸分析柱(250mm $\times$ 4.6mm, 5 $\mu$ m);流动相 A 为乙腈-水(1:1);流动相 B 为含 1%N,N-二甲基甲酰胺 0.05mol/L 醋酸钠溶液,流动相洗脱程序见流动相梯度洗脱程序表(见 3.5),流速为 1.2ml/min;检测波长为 360nm,柱温为 27 $^{\circ}$ C,相邻氨基酸峰分离度应大于 1.0。

3.2 对照品溶液的制备 精密称取亮氨酸、胱氨酸、丝氨酸、赖氨酸、丙氨酸、缬氨酸、谷氨酸、脯氨酸、甘氨酸、天门冬氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、组氨酸、苏氨酸、色氨酸、异亮氨酸、精氨酸对照品各 50mg,酪氨酸 10mg,置 1000ml 量瓶中,加水溶解后稀释至刻度,摇匀。

3.3 供试品溶液的制备 精密量取本品 5ml,置 50ml 量瓶中,加水稀释至刻度。

3.4 测定法 精密量取对照品溶液 5ml,置 50ml 棕色量瓶中,加 0.5mol/L 碳酸氢钠溶液 5.0ml,混匀;加 1%的 2, 4-二硝基氟苯的乙腈溶液 5.0ml,摇匀,密闭,放入 60 $^{\circ}$ C 水浴中,暗处反应 60min,取出,冷却至室温,加磷酸缓冲液(pH7.0)稀释至刻度,摇匀,静置 15min,用 0.45 $\mu$ m 的膜滤过,取 20 $\mu$ l 注入液相色谱仪,记录色谱图。另精密量取供试品溶液 5ml,置 50ml 棕色量瓶中,同法测定,按外标法以峰面积计算,即得。有关试液的配制见 3.6。

3.5 流动相梯度洗脱程序表:

序号	时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)	备注
1	0	16	84	
2	0.3	16	84	
3	4	31	69	
4	9.5	36	64	
5	17	55	45	
6	28	65	35	
7	34	100	0	
8	36	100	0	
9	38	16	84	系统开始重新平

衡，恢复到初始状态

### 3.6 游离氨基酸检测中有关试液配制方法

3.6.1 流动相 B 取无水醋酸钠 2.05g，置 500ml 量瓶中，加水约 450ml 溶解后，用醋酸精密调 pH 值为 6.40，加 N，N-二甲基甲酰胺 5ml，用水稀释至刻度，摇匀后静置片刻，用 0.45 $\mu$ m 膜滤过。

3.6.2 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 取磷酸二氢钾 0.68g，置 100ml 量瓶中，加 0.1mol/L 氢氧化钠溶液 29.1ml，用水稀释至刻度，摇匀，即得。

3.6.3 0.5mol/L 碳酸氢钠溶液 称取碳酸氢钠 4.2g，置 100ml 量瓶中，加水至刻度，摇匀。

**4 T 细胞活性测定法---脱 E 受体法** 本法系根据转移因子可使脱 E 受体后的胸腺 T 细胞恢复其受体功能，从而反映转移因子的生物活性。

#### 4.1 试剂

4.1.1 Hank's 液 将 0.3% 磷酸二氢钾溶液，0.76% 磷酸二氢钠溶液，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，溶解混匀，用水稀释至 1000ml，并用 4% 碳酸氢钠溶液调节 pH 值至 7.2~7.3 (临用时配制)。

4.1.2 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。

4.1.3 分离液 为淋巴细胞分离液。

4.1.4 羊血 取绵羊静脉血 5ml，加 5ml 阿氏液中，冰箱保存。

4.1.5 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。

4.1.6 姬姆萨染色液原液 取姬姆萨染料 0.5g，加甘油 33ml，55~60 $^{\circ}$ C 加热至姬姆萨染料溶解，冷至室温，加 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。

4.1.7 染色液 取姬姆萨染色液原液 2ml，加 Hank's 液 6ml，摇匀，以 1500r/min 离心 10 分钟，取上清液待用。

#### 4.2 操作法

4.2.1 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，每分钟 1500 转离心 3~5 分钟，弃去上清液，加少量 Hank's 液打匀，将此溶液加已具有 1/3 滤液量的分离液的离心管中，以每分钟 2000 转离心 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，以每分钟 1500 转离心 3~5 分钟，弃去上清液，洗涤一次后，在沉淀物中加适量 Hank's 液，混匀，45 $^{\circ}$ C 恒温水浴保温 30 分钟(每隔 5 分钟振摇一次)。以每分钟 1500 转离心 3~5 分钟，弃去上清液，再加适量 Hank's 液，混匀后，置 45 $^{\circ}$ C 恒温水浴保温 30 分钟，取出后以每分钟 1500 转离心 3~5 分钟，弃去上清液。用 Hank's 液洗涤三次(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 ( $3 \times 10^6$ ) ~ ( $5 \times 10^6$ ) 个细胞。

4.2.2 绵羊红血球悬液的制备 取适量羊血，用适量 Hank's 液洗三次(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。

4.2.3 供试品溶液的配制 取供试品，用 Hank's 液配制成每 1ml 中含 1mg 的溶液。

4.2.4 测定 取小试管 6 支，其中 3 支各加 Hank's 液 0.1ml 作对照管，另 3 支各加供试品溶液 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 小时后，加绵羊红血球悬液 0.2ml，摇匀，以每分钟 500 转离心 3 分钟，放入 4℃ 冰箱过夜，次日取出，弃去上清液，每管中各加固定液一滴，轻轻摇匀，静置 10 分钟，加染色液 2 滴并摇匀，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，共数计数板 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 个以上绵羊红细胞的淋巴细胞），求得结花百分率，取平均值。即为供试品管或对照管的平均数。

样品活力=供试品测定管 E 玫瑰花结百分率-对照管 E 玫瑰花结百分率。

#### 附加说明：

1. 本标准由山东信得科技股份有限公司、天津瑞普高科生物药业有限公司提出。
2. 本标准于 2009 年 06 月 09 日经农业部公告第 1220 号发布。

## 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+K-11 株）

Ji Xinchengyi、Chuanranxingzhiqiguanyan、Jiandanzonghezheng Sanlian Miehuoyimiao  
(La Sota zhu+M41 zhu+K-11 zhu)

Newcastle Disease, Infectious Bronchitis and Egg Drop Syndrome Vaccine, Inactivated  
(Strain La Sota + Strain M41 + Strain K-11)

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，鸡减蛋综合征病毒 K-11 株接种易感鸭胚培养，分别收获感染胚液，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、传染性支气管炎和减蛋综合征。

**【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，均不应不散。

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 21~42 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不低于 1:16, 未免疫对照组 HI 抗体效价的几何平均值应不高于 1:4。

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</sup>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) 鸡传染性支气管炎部分 取 21~28 日龄 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, 再加强免疫接种 (肌肉注射) 灭活疫苗 0.5ml, 28 日后, 分别采血。将两次血清分别做 HI 试验 (见附注)。二免血清的 HI 抗体效价几何平均滴度应比首免血清 HI 抗体效价几何平均滴度高 4 倍以上。

(3) 鸡减蛋综合征部分 用 21~42 日龄 SPF 鸡 15 只, 其中 10 只各肌肉或皮下注射疫苗 0.5ml, 另 5 只不接种作为对照。接种后 21~35 日, 采血, 分离血清, 用减蛋综合征抗原测定 HI 抗体效价。免疫鸡 HI 抗体效价的几何平均滴度应不低于 1:128, 对照鸡 HI 抗体效价的几何平均滴度应不高于 1:4。

**【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。免疫期为 4 个月。

**【用法与用量】** 颈部皮下或胸部肌肉注射。开产前 1 个月左右的产蛋鸡, 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) 体质瘦弱、患有其他疾病的鸡, 禁止使用。

(5) 疫苗开启后限当日用完, 残留的疫苗要报废。

(6) 接种时, 应作局部消毒处理, 且接种器具必须灭菌。

(7) 接种本疫苗的种鸡的子代鸡具有较高的抗体水平, 因此, 应对子代鸡的有关免疫程序进行适当调整。建议免疫期内的种鸡的子代鸡于 10~14 日龄时初次进行鸡新城疫、鸡传染性支气管炎活疫苗接种。

**【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 (HI) 抗原质量标准**

本品系用鸡传染性支气管炎病毒 M41 株接种 SPF 鸡胚, 收获感染鸡胚液, 经灭活浓缩后, 冷冻真空干燥制成。用于检验鸡传染性支气管炎抗体的血凝抑制试验。**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 效价应不低于 1：128（微量法）。

【非特异性检验】 用抗原检测鸡传染性支气管炎阴性血清、鸡新城疫阳性血清、禽流感阳性血清和减蛋综合征阳性血清，HI 效价均应不高于 1：8（微量法）。

【作用和用途】 用于检验鸡传染性支气管炎抗体的血凝抑制试验。

【规格】 （1）1ml/瓶 （2）5ml/瓶

【贮藏与有效期】 在 2~8℃，有效期为 15 年。

## 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 25μl PBS（1/15 mol/L，pH 值 7.2~7.4），第 1 排加 25μl 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 25μl PBS，最后再加入 1% 鸡红细胞悬液 25μl，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。

### 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。

2.1.2.2 检验 将配置好的 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 和 1：7。在每一稀释度的 25μl 抗原中加 25μl PBS，再加入 1% 鸡红细胞悬液 25μl，混匀，置于 2~8℃，40 分钟后判定结果。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 单位抗原实际上低于 4 个单位。应根据检验结果作适当调整，使抗原工作液确为 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，每孔中加入 25μl PBS。

2.2.2 分别吸取 25μl 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。

2.2.3 分别向各孔中加入含 4HA 单位的抗原 25μl，2~8℃ 静置 40 分钟。

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

2.2.5 结果判定 判定时将微量板倾斜 45 度，红细胞沉淀呈泪珠状流淌，判为阳性，红细胞在孔底均匀分布或呈锯齿状凝集判为阴性。当阴性血清 HI 效价不高于 1：8（微量法）、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差不高于 1 个滴度时，试验方可成立。完全抑制红细胞凝集的最大稀释度为该血清的血凝抑制滴度。

### 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 2009 年 06 月 09 日经农业部公告第 1220 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。

## 猪圆环病毒 2-dCap-ELISA 抗体检测试剂盒

Zhuyuanhuanbingdu 2-dCap-ELISA Kangtijiianceshijihe

Porcine Circovirus 2-dCap Antibody ELISA Kit

本品系用大肠杆菌基因工程菌 *BL21-dCap* 表达的猪圆环病毒 2 去核定位信号衣壳蛋白（简称 dCap）为抗原的抗原包被板、待检样品稀释板、封板膜、强阳性对照血清、弱阳性对照血清、阴性对照血清、山羊抗猪 IgG 酶标二抗工作液、样品稀释液及洗涤液、显色 A 液、显色 B 液及终止液组装而成。用于猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白抗体检测。

**【性状】** 试剂盒应密封完好、组分齐全、无破损、无渗漏。其中：

抗原包被板（96 孔） 表面光洁、无裂纹、孔底透明、无异物，装量 2 块。

待检样品稀释板（96 孔） 表面光洁、无裂纹、孔底透明、无异物，装量 1 块。

封板膜 表面光洁、无裂纹、无异物，装量 1 块。装量 1 块。

强阳性对照血清 无臭味淡黄色液体，装量为 1ml/管×1 管。

弱阳性对照血清 无臭味淡黄色液体，装量为 1ml/管×1 管。

阴性对照血清 无臭味淡黄色液体，装量为 1ml/管×1 管。

山羊抗猪 IgG 酶标二抗工作液 无臭味、无沉淀物的桔黄色澄清溶液，装量为 24ml/瓶×1 瓶。

20×洗涤浓缩液（血清稀释液） 无色、无臭味、无沉淀物的透明溶液，装量为 50ml/瓶×1 瓶。

显色 A 液 无色、无臭味、无沉淀物的透明溶液，装量为 12ml/瓶×1 瓶。

显色 B 液 无色、无臭味、无沉淀物的透明溶液，装量为 12ml/瓶×1 瓶。

终止液 无色、无臭味、无沉淀物的透明溶液，装量为 12ml/瓶×1 瓶。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，强阳性对照血清、弱阳性对照血清、阴性对照血清、山羊抗猪 IgG 酶标二抗工作液、20×洗涤浓缩液（血清稀释液）、显色 A 液、显色 B 液和终止液均应无菌生长。

**【敏感性检验】** 用不稀释的强阳性对照血清、弱阳性对照血清按附注 3 作 ELISA 检测，与强阳性对照血清反应的  $OD_{450}$  值应 $\geq 0.8$ ；与弱阳性对照血清反应的  $OD_{450}$  值应 $\geq 0.5$ 。

**【特异性检验】** 用不稀释的阴性对照血清按附注 3 作 ELISA 检测， $OD_{450}$  值应 $\leq 0.25$ 。

**【作用与用途】** 用于猪圆环病毒 2 型的抗体检测。

**【用法与判定】** 1 用法

1.1 取 20×洗涤浓缩液（血清稀释液），用蒸馏水稀释 20 倍。

1.2 用血清稀释液在稀释板内将待检血清样本稀释 400 倍，振荡混匀。

1.3 取抗原包被板，每孔加入 100 $\mu$ l 已稀释的待检样品；同时设不稀释的强阳性对照血清孔、弱阳性对照血清孔、阴性对照血清孔，各 2 孔。

1.4 轻轻振匀孔中样品，置 37℃ 孵育 30 分钟。

1.5 甩掉抗原包被板孔中的溶液，每孔加入 200~300 $\mu$ l 洗涤液、静置 1 分钟，倒掉洗涤液。重复洗板 5 次。吸水纸干燥抗原包被板。

1.6 每孔加入山羊抗猪 IgG 酶标二抗工作液 100 $\mu$ l，置 37℃ 孵育 30 分钟。

1.7 洗涤液洗板 5 次，方法同 5。

1.8 蒸馏水洗板 2 次，甩干。

1.9 等体积混合显色 A 液、显色 B 液，混匀，每孔 100 $\mu$ l，室温避光显色 10 分钟。

1.10 每孔加终止液 50 $\mu$ l，30 分钟内测定结果。

1.11 在酶标仪上读取样品 OD<sub>450nm</sub> 的光密度值。

## 2 判定

2.1 试验成立条件 两孔阴性对照 OD<sub>450nm</sub> 平均值应 $\leq$ 0.25，两孔强阳性对照 OD<sub>450nm</sub> 平均值应 $\geq$ 0.8，两孔弱阳性对照 OD<sub>450nm</sub> 平均值应 $\geq$ 0.5。

2.2 S/P 值的计算

S/P 值 = (待检样本 OD<sub>450nm</sub> 均值 - 阴性对照 OD<sub>450nm</sub> 均值) / (阳性对照孔 OD<sub>450nm</sub> 均值 - 阴性对照 OD<sub>450nm</sub> 均值)。

2.3 结果判定

阳性 S/P 值 $\geq$ 0.25；可疑 0.16 $<$ S/P 值 $<$ 0.25；阴性 S/P 值 $\leq$ 0.16。

(注：可疑区间的样品重复检测一次，如样品 S/P 值仍在可疑区间内，判定为 PCV-2 抗体阴性。)

**【注意事项】** (1) 试剂盒严禁冻结。

(2) 试剂盒的洗液出现絮状沉淀不能使用。

(3) 96 孔抗原包被板受潮或沾水后不能使用。

(4) 显色 A 液、显色 B 液切勿交叉污染。

(5) 试剂盒从冷藏环境中取出后，应置室温下平衡 30 分钟后再使用。

(6) 每个血清样品 1 个吸头，避免样品交叉污染。

(7) 待检血清样品数量较多时，应尽量缩短加样时间。

(8) 洗涤时各孔均需加满洗涤液，防止因洗涤不充分造成非特异性显色；

(9) 终止反应后应立即用酶标仪读数，应在 15 分钟内完成。

(10) 所有样品、洗涤液和各种废弃物都应灭活处理。

(11) 所有试剂均含有防腐剂，不得入口。

(12) 显色液 B 对强光和氧化剂敏感，应尽量避光；取 A、B 液时必须更换枪头，防止试剂交叉污染。

(13) 终止液为 2mol/L 硫酸，应避免与眼、皮肤接触。

(14) 严格按照实验操作步骤操作。

**【规格】** 192 孔/盒，90 头份。

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 6 个月。

**附加说明：**

1. 本标准由浙江大学提出。
2. 本标准于 2009 年 06 月 09 日经农业部公告第 1220 号发布。

## 猪繁殖与呼吸综合征活疫苗（R98 株）

Zhu Fanzhiyuhuxizonghezheng Huoyimiao (R98 Zhu)

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Vaccine, Live (R98 Strain)

本品系用猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）弱毒 R98 株接种 Marc145 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。用于预防猪繁殖与呼吸综合征（猪蓝耳病）。

**【性状】** 微黄色海绵状疏松团块，易于瓶壁脱离，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。

**【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】** 按瓶签注明头份，将疫苗用生理盐水稀释为每毫升含 1 头份，接种于 96 孔细胞板 Marc145 细胞，2 孔/样品，100 $\mu$ l/孔，37 $^{\circ}$ C 吸附 1 小时，加入含 4% 犊牛血清的 DMEM 细胞维持液，同时设定空白细胞对照，在 5%CO<sub>2</sub> 温箱 37 $^{\circ}$ C 培养 24 小时；弃去营养液，用 PBS 缓冲液（0.01mol/L pH 值为 7.0）洗涤细胞 3 次；加入冷丙酮（80% 丙酮，20% 双蒸水），200 $\mu$ l/孔，4 $^{\circ}$ C 30 分钟；弃丙酮，在室温下干燥，用 PBS 缓冲液洗涤 1 次；加入 1:500 稀释的美洲型 PRRSV 单克隆抗体，50 $\mu$ l/孔，37 $^{\circ}$ C 1 小时；移去孔内液体，用 PBS 缓冲液洗涤 5 次；加入 1:100 稀释的 FITC 标记羊抗鼠 IgG，50 $\mu$ l/孔，37 $^{\circ}$ C 1 小时；移去孔内液体，用 PBS 缓冲液洗涤 5 次，于荧光显微镜下观察。细胞对照孔细胞浆内应无荧光物质着染，而病毒接种细胞孔细胞浆内应有大量绿色荧光物质着染。

**【安全检验】** 按瓶签注明头份，将疫苗用生理盐水稀释为每毫升含 10 头份，肌肉注射 7 日龄 PRRSV 抗体阴性健康仔猪（见附注 1）3 头，每头 1ml，观察 14 日，应无异常临床反应。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

(1) 病毒含量测定 将 Marc145 细胞培养于细胞瓶中，每隔 2 日用含 8%~10% DMEM 营养液按 1:2 扩大培养；测定疫苗病毒含量前 48 小时，将该细胞传代接种于 96 孔培养板，置于 5%CO<sub>2</sub> 温箱 37 $^{\circ}$ C 培养 2 日，形成细胞单层；按瓶签注明头份，将疫苗用生理盐水稀释为每毫升含 1 头份，用细胞维持液作 10 倍系列稀释，取 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 3 个稀释度病毒液接种于 96 孔培养板 Marc145 细胞单层，每个稀释度重复 4 孔，0.2ml/孔；然后将细胞板放置于 5%CO<sub>2</sub> 温箱 37 $^{\circ}$ C 培养 5 日，观察细胞病变(CPE)，根据 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>。每头份病毒含量应 $\geq$ 10<sup>5.0</sup>TCID<sub>50</sub>。

(2) 免疫攻毒 用 28~30 日龄 PRRSV 抗体阴性健康仔猪（见附注 1）5 头，每头颈部肌肉注射或滴鼻疫苗 1 头份，同时设同龄 PRRSV 抗体阴性健康仔猪 3 头作为对照，接种后 30 日，用 PRRSV-S1 株（10<sup>5.0</sup>TCID<sub>50</sub>/ml）攻击，滴鼻 2ml/头，连续观察 4 周，根据临床

症状和病毒血症检测结果进行判定（见附注 3、4）。对照猪至少应有 2 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（猪蓝耳病），适用于 7 日龄以上健康猪。接种后 7~14 日产生免疫力，免疫期为 4 个月。

**【用法与用量】** 按瓶签注明头份，用灭菌生理盐水将疫苗稀释为每头份 1ml，7 日龄以上仔猪肌肉注射或滴鼻，1ml/头，后备母猪和配种前母猪肌肉注射，2ml/头。

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】** （1）本品不宜用于 PRRS 阴性猪场及怀孕 30 日内母猪和种公猪；发生本病时可进行紧急预防注射；对体质瘦弱和患有其它疾病的猪不应使用。

（2）目前尚未进行该疫苗对高致病性猪蓝耳病的免疫效力试验，故尚不能确定该疫苗对高致病性猪蓝耳病的免疫效果。

（3）本品稀释后应放置于冷暗处，限 1 小时内用完。

（4）用过的疫苗瓶、器具和未用完的疫苗等应进行消毒处理。

（5）本品应在 8℃ 以下的冷藏条件下运输。

**【规格】** （1）20 头份/瓶 （2）50 头份/瓶

**【贮藏与有效期】** -20℃ 以下保存，有效期为 15 个月。

**附注：1 猪 PRRSV 抗体阴性标准** 用 IDEXX 公司生产 PRRSV-ELISA 抗体检测试剂盒，按其操作说明，检测猪抗 PRRSV 血清抗体。S/P 值 $\geq$ 0.4 为 PRRSV 抗体阳性，S/P 值 $<$ 0.3 为 PRRSV 抗体阴性。

**2 中和抗体效价测定方法** 根据 PRRSV-R98 株毒价，用细胞维持液将病毒稀释成 200TCID<sub>50</sub>。将被检血清 56℃ 处理 30 分钟，用细胞维持液将血清做 2 倍梯度稀释至 2<sup>-8</sup>。取倍比稀释的血清 0.5ml 与等体积 200TCID<sub>50</sub> 病毒液混合，37℃ 作用 1 小时，分别接种于生长良好的 Marc145 细胞单层的 96 孔细胞培养板上（接种前弃去生长液），每个血清稀释度接种 4 个孔，200ul/孔，同时设正常细胞对照、病毒对照和阴、阳性血清对照。置 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 5 日，观察细胞病变（CPE）。以能够完全抑制 CPE 的血清最大稀释度作为该血清的中和抗体效价。

### 3 仔猪发病标准

3.1 临床症状 仔猪体温升高（ $\geq$ 40℃），持续 2~3 日；食欲减退，精神沉郁。

3.2 病毒血症 攻毒后用 RT-PCR 检测仔猪血清，PRRSV 病毒血症至少持续 28 日。

符合 3.1 和 3.2 中的任 1 项，即可判为发病。

### 4 RT-PCR 检测 PRRSV

4.1 引物 上游引物 5'-ACGTTGAAAGTGCCGCACGG-3'，下游引物 5'-TCTTTCCCGGTCCTTGCCT-3'，由南京农业大学农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室设计并由上海生物工程有限公司合成。

4.2 病毒 RNA 提取 取血清样品，用 TRIZOL 试剂（Invitrogen 公司）提取 RNA，按

试剂盒说明书进行。即取血清 200 $\mu$ l, 加入 1ml TRIZOL 试剂, 室温孵育 5 分钟; 加入 0.2ml 氯仿, 充分晃动离心管约 15 秒, 室温孵育 2~3 分钟; 4 $^{\circ}$ C 12000g 离心 15 分钟; 取上清液, 加入 0.5ml 异丙醇, 充分晃动, 室温放置 10 分钟; 4 $^{\circ}$ C 12000g 离心 10 分钟; 弃上清液, 加入 75%酒精 1ml, 震荡; 4 $^{\circ}$ C 8000g 离心 5 分钟; 弃上清液, 干燥沉淀物; 加入 40 $\mu$ l DEPC 水溶解沉淀。

4.3 反转录 按 cDNA 合成试剂盒 (Promega 公司) 说明书进行。反应总体积 20 $\mu$ l: 25mmol/L Oligo (dT)<sub>12-18</sub> 1.0 $\mu$ l、10mmol/L dNTPs 0.5 $\mu$ l、5 $\times$ 反转录缓冲液 4.0 $\mu$ l、RNA 7.0 $\mu$ l、双蒸水 6.5 $\mu$ l。将上述反应物混合均匀后, 65 $^{\circ}$ C 10 分钟, 然后加入 M-MLV 反转录酶 (50U/ $\mu$ l) 1.0 $\mu$ l, 42 $^{\circ}$ C 60 分钟, 再于 95 $^{\circ}$ C 5 分钟。制备的 cDNA 于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

4.4 PCR 反应体系 25 $\mu$ l, 含 cDNA 2.0 $\mu$ l、25pmol/L 上下游引物各 0.5 $\mu$ l、10mmol/L dNTPs 1.0 $\mu$ l、10 $\times$ PCR 缓冲液 (无 Mg<sup>2+</sup>) 2.5 $\mu$ l、25mmol/L Mg<sup>2+</sup> 3.0 $\mu$ l、Taq DNA 聚合酶 (5U/ $\mu$ l) 1.0 $\mu$ l 和双蒸水 14.5 $\mu$ l, 同时设定阴性和阳性对照。将上述反应物混合均匀后, 放置于 PCR 仪, 设置为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 分钟; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒, 63 $^{\circ}$ C 退火 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 秒, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。

4.5 电泳与观察 取 5~10 $\mu$ l PCR 产物, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。凝胶用溴化乙锭染色, 紫外线透射观察, 扩增产物长度为 300bp。

## 5 怀孕母猪发病判定标准

5.1 临床症状 母猪出现体温升高 ( $\geq 40^{\circ}$ C), 持续 2~3 日, 食欲减退; 临产前 1~2 周发生早产, 或出现死胎和弱仔 ( $\geq 20\%$ )。

5.2 病理变化 死胎和新生弱仔脐带部分和全部出血, 肺组织呈间质性肺炎, 部分猪的脾脏和淋巴结肿大; 组织学病变为局部坏死性脐动脉炎, 动脉血管壁和血管周围出血。

5.3 病毒检测 用 RT-PCR 检测肺脏和淋巴结组织, 应检测到 PRRSV。

符合 5.1、5.2 和 5.3 项中的任何 2 项, 即可判为发病。

## 6 Marc145 细胞质控标准

6.1 无菌检验 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无菌生长。

6.2 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。

6.3 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。

6.4 生长活性 将 Marc145 细胞培养于细胞瓶中, 每隔 2 日用含 10% DMEM 营养液按 1:2 扩大培养, 37 $^{\circ}$ C 培养 2 日, 形成细胞单层。细胞形态一致, 细胞膜清晰。细胞传代次数暂定为 50 次。

6.5 病毒适应性 取 Marc145 细胞单层, 接种 10<sup>3</sup>TCID<sub>50</sub> PRRSV-R98 株种毒液, 37 $^{\circ}$ C 培养 2~3 日出现明显 CPE; 培养 3 日收获病毒, 病毒含量为 10<sup>6.0</sup>TCID<sub>50</sub>/ml 以上。

6.6 裸鼠成瘤试验 取 Marc145 细胞及 C6 细胞的对数生长期的细胞, 分别经 0.25% 胰酶消化、计数, 用 PBS 缓冲液 (0.01mol/L pH 值为 7.0) 洗涤后稀释成 5 $\times 10^6$ /ml 浓度, 分别背部皮下注射裸鼠 3 只, 200 $\mu$ l/只, 另取裸鼠 3 只背部皮下注射 DMEM 细胞营养液作为对照, 隔离饲养观察 21 日, 接种 C6 细胞组裸鼠颈背应形成肿瘤, 而接种 Marc145 细胞组和 DMEM 细胞营养液的裸鼠应不形成肿瘤。

7 40%蔗糖明胶稳定剂配制 用蒸馏水配制 40%蔗糖和 8%明胶, 充分溶解后于 116 $^{\circ}$ C

高压蒸汽灭菌 30~40 分钟，冷却后进行无菌检验，合格者 2~8℃ 保存备用。

**附加说明：**

1. 本标准由南京农业大学、瑞普（保定）生物药业有限公司提出。
2. 本标准于 2009 年 06 月 12 日经农业部公告第 1222 号发布。

**鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感（H9 亚型）三联灭活疫苗（La Sota 株+M41 株+YBF003 株）**

Jixinchengyi Chuanranxingzhiqiguanyan Qinliugan (H9 yaxing)

Sanlianmiehuoyimiao (La Sota zhu+M41 zhu+YBF003 zhu)

Newcastle Disease, Infectious Bronchitis and Avian Influenza (H9 subtype) Vaccine, Inactivated (Strain La Sota+Strain M41+Strain YBF003)

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 H9N2 亚型禽流感病毒 A/Chicken/Shandong/11/05 株（简称 YBF003 株），分别接种易感鸡胚培养、收获感染胚液、经超滤浓缩、甲醛溶液灭活后，加油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡新城疫、鸡传染性支气管炎和 H9 亚型禽流感病毒引起的禽流感。

**【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≤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 7~14 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。

(1) 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低于 1:16（微量法），未免疫对照组 HI 抗体效价的几何平均值应不高于 1:4（微量法）。

(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 20μl，另 5 只作对照。接种后 21~28 日，每只鸡分别肌肉注射鸡新城疫病毒强毒北京株（CVCC AV1611 株） $10^{5.0}$ ELD<sub>50</sub>，观察 14 日。未免疫对照组应全部死亡，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 25 只，20 只各点眼接种传染性支气管炎活疫苗（H120 株）1 羽份（0.05ml），另 5 只作对照。接种后 21~28 日，每只鸡分别采

血，分离血清，同时免疫鸡再分别接种本疫苗 0.3ml，二次接种后 21~28 日，将免疫鸡和对照鸡再分别采血，分离血清。将两次血清按“附注一”方法进行 HI 抗体效价测定。免疫组二免血清 HI 抗体效价的几何平均值应比首免血清 HI 抗体效价的几何平均值高 4 倍以上，未免疫对照组血清 HI 抗体效价的几何平均值应不高于 1:8（微量法）。

3 H9 亚型禽流感部分 下列方法任择其一。

(1) 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 0.2ml，另 5 只作对照。接种后 21~28 日，每只鸡分别采血，分离血清，按“附注二”方法进行 HI 抗体效价测定。免疫组 HI 抗体效价的几何平均值应不低于 1:180（微量法），未免疫对照组 HI 抗体效价的几何平均值应不高于 1:4（微量法）。

(2) 免疫攻毒法 将上述免疫鸡及对照鸡，分别翅静脉注射 10 倍稀释的 YBF003 株病毒液，每只鸡 0.2ml，于攻毒后 3~5 日，采集泄殖腔拭子，经处理后，尿囊腔接种 10~11 日龄 SPF 鸡胚 5 个，孵育观察 5 日，无论死胚、活胚均应测定鸡胚液红细胞凝集价，每个拭子样品接种的 5 枚鸡胚中只要有 1 枚鸡胚液的凝集价不低于 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 9 只鸡病毒分离为阴性；对照组应至少 4 只鸡病毒分离为阳性。

**【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、鸡传染性支气管炎和 H9 亚型禽流感病毒引起的禽流感，接种后 21 日产生免疫力，免疫期为 6 个月。

**【用法与用量】** 肌肉或颈部皮下注射。雏鸡 7~14 日龄接种，每只 0.3ml；成鸡开产前 7~14 日接种，每只 0.5ml。

**【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、鸡传染性支气管炎弱毒活疫苗作基础免疫。

(2) 体质瘦弱、患有其他疾病的鸡，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（HI）试验抗原及阳性血清质量标准及血凝抑制试验操作程序**

1.1 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验抗原质量标准

1.1.1 抗原来源 购于荷兰，VLDIA035-HAG-M41。

### 1.1.2 抗原标准

【性状】 微黄色疏松团块。

【效价测定】 对 1% 鸡红细胞凝集价应不低于 1 : 256 (微量法)。

【特异性】 抗原与传染性支气管炎 M41 株阳性血清呈阳性反应, 不低于 1 : 256 (微量法); 抗原与阴性血清、禽流感阳性血清、鸡新城疫阳性血清、鸡减蛋综合征阳性血清均为阴性反应, 不高于 1 : 8 (微量法)。

【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。

### 1.2 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验阳性血清质量标准

【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 抗体效价应不低于 1 : 256 (微量法)。

【特异性检验】 阳性血清与传染性支气管炎 M41 株抗原应呈阳性反应, 不低于 1 : 256 (微量法); 阳性血清与禽流感、鸡新城疫、减蛋综合征抗原应为阴性反应, 不高于 1 : 8 (微量法)。

【作用与用途】 用于传染性支气管炎血凝抑制试验阳性对照。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃ 保存, 有效期为 60 个月。

### 1.3 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验 (HI) 操作方法

#### 1.3.1 鸡传染性支气管炎 HI 抗原工作液配制

1.3.1.1 鸡传染性支气管炎 HI 抗原红细胞凝集价测定 取 96 孔 V 型微量反应板 1 块, 每孔加 25μl PBS (0.01mol/L, pH 值为 7.0~7.4), 第一排加 25μl 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 25μl PBS, 最后再加入 1% 鸡红细胞悬液 25μl, 用微量振荡器混匀, 2~8℃ 静置 40 分钟判定结果, 以使红细胞 100% 凝集的抗原最高稀释倍数作为判定终点。

1.3.1.2 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 抗原红细胞凝集价, 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 25μl 抗原中加 25μl PBS, 再加入 1% 鸡红细胞悬液 25μl, 混匀, 2~8℃ 静置 40 分钟, 判定结果。如果 1 : 4 稀释为红细胞 100% 凝集终点, 表明配制的是 4HA 单位抗原; 如果红细胞 100% 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; 如果红细胞 100% 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。

#### 1.3.2 血凝抑制试验 (HI)

1.3.2.1 取 96 孔 V 型微量反应板, 每孔加 25μl PBS。

1.3.2.2 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, 然后作 2 倍系列稀释。

1.3.2.3 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。

1.3.2.4 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。

1.3.2.5 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 效价不高于 1:8 (微量法)、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差不高于 1 个滴度时, 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 禽流感 (H9 亚型) 血凝抑制试验抗原、阳性血清质量标准及血凝抑制试验操作程序

### 2.1 禽流感 (H9 亚型) 血凝抑制试验抗原质量标准

本品系用 H9 亚型禽流感病毒 A/Chicken/Shandong/11/05 株 (H9N2) (简称 YBF003 株) 制备的血凝抑制抗原。抗原应达到如下标准。

【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】 按标识体积稀释后, 对 1% 鸡红细胞凝集价应不低于 1:1024 (微量法)。

【特异性】 抗原与禽流感 (H9 亚型) 阳性血清呈阳性反应, 不低于 1:256 (微量法), 抗原与鸡新城疫 (ND) 阳性血清、禽流感 (H5、H7 亚型) 阳性血清、鸡减蛋综合征 (EDS) 阳性血清、SPF 鸡血清均为阴性反应, 不高于 1:4 (微量法)。

【作用与用途】 用于 H9 亚型禽流感 HI 抗体的红细胞凝集抑制试验。

【规格】 (1) 1ml/瓶 (2) 2ml/瓶

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

### 2.2 禽流感 (H9 亚型) 血凝抑制试验阳性血清质量标准

【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】 按标识体积稀释后, HI 抗体效价应不低于 1:256 (微量法)。

【特异性检验】 阳性血清与禽流感 (H9 亚型) 抗原应呈阳性反应, 不低于 1:256 (微量法), 阳性血清与禽流感 (H5、H7 亚型)、鸡新城疫、鸡减蛋综合征抗原应呈阴性反应, 不高于 1:4 (微量法)。

【作用与用途】 用于 H9 亚型禽流感血凝抑制试验阳性对照。

【规格】 (1) 1ml/瓶 (2) 2ml/瓶

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

### 2.3 禽流感 (H9 亚型) 血凝抑制试验操作方法

#### 2.3.1 禽流感 (H9 亚型) HI 抗原工作液配制

2.3.1.1 禽流感 (H9 亚型) HI 抗原红细胞凝集价测定 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, 室温 (约 20 $^{\circ}$ C) 静置 20~40 分钟或 2~8 $^{\circ}$ C 静置 40~60 分钟判定结果, 以使红细胞 100% 凝集的抗原最高稀释倍数作为判定终点。

2.3.1.2 禽流感 (H9 亚型) HI 抗原工作液配制 (4HA 单位抗原的配制) 根据测定的

HI 抗原红细胞凝集价,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 稀释为红细胞 100%凝集终点,表明配制的是 4HA 单位抗原;如果红细胞 100%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;如果红细胞 100%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。

### 2.3.2 血凝抑制试验 (HI)

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

2.3.2.2 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,然后作 2 倍系列稀释。

2.3.2.3 分别向各孔中加入含 4HA 单位的抗原 25 $\mu$ l,室温(约 20 $^{\circ}$ C)静置 40 分钟或 2~8 $^{\circ}$ C 静置 60 分钟。

2.3.2.4 每孔中加入 1% (V/V) 鸡红细胞悬液 25 $\mu$ l,轻轻混匀,室温(约 20 $^{\circ}$ C)静置 20~40 分钟或 2~8 $^{\circ}$ C 静置 40~60 分钟。

2.3.2.5 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 效价不高于 1:4 (微量法)、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差不高于 1 个滴度时,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 2009 年 07 月 21 日经农业部公告第 1240 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+Z16 株)

JiXinchengyi Chuanranxingzhiqiguanyan Jiandanzonghezheng Sanlian  
Miehuoyimiao (La Sota zhu+M41 zhu+Z16 zhu)

Newcastle Disease, Infectious Bronchitis and Egg Drop Syndrome Vaccine, Inactivated  
(Strain La Sota+Strain M41+Strain Z16)

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株、传染性支气管炎病毒 M41 株分别接种鸡胚培养,减蛋综合征病毒 Z16 株接种鸭胚培养,收集胚液,超滤浓缩,经甲醛溶液灭活后,加入矿物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 油包水型。取一清洁吸管,吸取少量疫苗滴于冷水中,应呈油滴状不扩散。

稳定性 取疫苗 10ml 加入离心管中，以 3000r/min 离心 15min，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 30~60 日龄 SPF 鸡 10 只，每只肌肉或皮下注射疫苗 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】 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不低于 1:16，对照组 HI 抗体效价的几何平均值应不高于 1:4。

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，免疫组应至少保护 7 只。

2 鸡传染性支气管炎部分 用 14~42 日龄 SPF 鸡 25 只，20 只各点眼接种鸡传染性支气管炎活疫苗（H120 株）1 羽份，另 5 只不免疫作对照。接种后 21~28 日分别采血，分离血清，同时免疫鸡再分别接种本疫苗 0.5ml。二次接种后 21~28 日将免疫鸡和对照鸡再分别采血，分离血清。将两次血清按“附注”方法分别作 HI 抗体效价测定。免疫组二免血清 HI 抗体效价几何平均值应较首免血清 HI 抗体效价几何平均值高 3 倍以上，对照组血清 HI 抗体效价几何平均值应不高于 1:8。

3 鸡减蛋综合征部分 用 21~42 日龄 SPF 鸡 10 只，每只肌肉或皮下注射疫苗 0.5ml，另取 SPF 鸡 10 只作对照。21~35 日后，分别采血，分离血清，测定 HI 抗体效价。免疫鸡 HI 抗体效价几何平均滴度应不低于 1:128，对照鸡 HI 抗体效价应不高于 1:4。

【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、传染性支气管炎和减蛋综合征。开产前成鸡免疫期为 6 个月。

【用法与用量】 颈部皮下或肌肉注射。开产前一个月左右种鸡、蛋鸡，每只 0.5ml。

【不良反应】 无。

【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。

（4）疫苗启封后，限当日用完。

（5）本品不能冻结。

（6）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。

【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 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验抗原、阳性血清质量标准及血凝抑制试验操作程序

### 1 鸡传染性支气管炎血凝抑制（HI）试验抗原质量标准

本品系从荷兰 Gezondheidsdienst voor Dieren BV Animal Health Service Ltd 公司购入，系由鸡传染性支气管炎病毒 M41 株制成，用于检测鸡传染性支气管炎血凝抑制（HI）抗体。

【性状】 黄色结晶状粉末。

【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】 对鸡红细胞凝集价应不低于 1：256。

【特异性检验】 与阴性血清、NDV、AIV、EDSV 阳性血清呈阴性反应（HI 抗体效价应不高于 1：8），与鸡传染性支气管炎 M41 株阳性血清呈阳性反应（与标准阳性血清反应，HI 抗体效价应不低于 1：256）。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃ 保存，有效期为 24 个月。

### 2 抗鸡传染性支气管炎病毒（M41 株）阳性血清质量标准

本品系从荷兰 Gezondheidsdienst voor Dieren BV Animal Health Service Ltd 公司购入，用于鸡传染性支气管炎血凝抑制（HI）抗体检测时作阳性对照。

【性状】 黄色结晶状粉末。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【效价测定】 HI 效价应不低于 1：256。

【特异性检验】 对 NDV、AIV、EDSV 抗原呈阴性反应（HI 抗体效价应不高于 1：8）。

【规格】 1ml/瓶

【贮存与有效期】 2~8℃ 保存，有效期为 24 个月。

### 3 鸡传染性支气管炎血凝抑制（HI）试验操作术式

3.1 仪器设备 V 型 96 孔微量血凝板；微型震荡器；聚乙烯塑料采血管；多道移液器等。

#### 3.2 试剂

3.2.1 缓冲液 0.1 mol/L PBS 缓冲液（pH 值为 7.0~7.2），置 2~8℃ 保存备用。

3.2.2 0.5% 红细胞悬液 采集成年鸡血液，用 20 倍量 PBS 缓冲液洗涤 3~4 次，每次 3~4 分钟，最后一次 5 分钟，用 PBS 缓冲液配成 0.5% 悬液。

3.2.3 鸡传染性支气管炎血凝抑制（HI）试验抗原和阳性血清 见附注 1 和附注 2。

3.3 被检血清 采血，分离血清，-20℃ 保存备用。使用前以 56℃ 灭活 30 分钟。

#### 3.4 HI 试验操作方法

##### 3.4.1 微量血凝（HA）试验

3.4.1.1 向微量血凝板每孔中加入 PBS 缓冲液 25μl，共做 4 行平行重复。

3.4.1.2 吸取 1：5 稀释的抗原加入到第 1 列各孔，每孔 25μl，然后自左至右顺序倍比稀释至第 11 列孔，从第 11 列各孔吸取 25μl 混合液，弃去。第 12 列各孔不加抗原作为对照孔。

3.4.1.3 向每孔中加入 0.5% 红细胞悬液 25μl。

3.4.1.4 将微量血凝板置微型震荡器上震荡 1 分钟。

3.4.1.5 将微量血凝板置 2~8℃ 条件下作用 50 分钟。根据血凝图像判定结果。以使红细胞完全凝集的最高稀释度作为该抗原的 HA 效价。每次做 4 行平行重复，以几何平均值表示结果。

3.4.1.6 4HA 单位工作抗原的配制

3.4.1.6.1 配制 4HA 单位工作抗原稀释倍数的计算 按照下列公式计算配制 4HA 单位工作抗原稀释倍数，即抗原稀释倍数=抗原血凝滴度÷4。如抗原 HA 效价为 1：1024，则配制 4HA 单位工作抗原液时应用 PBS 缓冲液稀释 256 倍（1024÷4=256）。

3.4.1.6.2 4HA 单位工作抗原的验证 向 96 孔微量板第 1 孔加入 4HA 单位工作抗原液 50μl，向第 2、3、4 孔各加入 PBS 缓冲液 25μl。从第 1 孔中吸取 25μl 4HA 单位工作抗原液加入到第 2 孔，依次倍比稀释至第 4 孔，弃去 25μl 混合液，即第 1 孔至第 4 孔的抗原 HA 单位依次为 4、2、1、0.5 HA 单位。每孔加入 0.5% 红细胞悬液 25μl，置微型震荡器上震荡 1 分钟，然后置 2~8℃ 条件下作用 50 分钟，根据血凝图像判定结果。如果 4HA 单位工作抗原配制正确，第 3 孔应完全凝集，第 4 孔应凝集 50% 以上。

3.4.2 微量血凝抑制（HI）试验

3.4.2.1 在 96 孔微量板上，第 1 孔至第 12 孔，每孔加入 25μl PBS 缓冲液。

3.4.2.2 向第 1 孔中加入被检血清 25μl，依次倍比稀释至第 12 孔，最后从第 12 孔弃去 25μl 混合液。

3.4.2.3 向每孔中加入 25μl 4HA 单位工作抗原液，置微型震荡器上震荡 1 分钟。

3.4.2.4 置 2~8℃ 条件下作用 10 分钟。

3.4.2.5 向每孔加入 0.5% 红细胞悬液 25μl，置微型震荡器上震荡 1 分钟。

3.4.2.6 置 2~8℃ 条件下作用 50 分钟。根据血凝图像判定结果。

3.4.2.7 每次测定时应设阴性血清对照和已知 HI 抗体效价的阳性血清对照（标准阳性血清先做 10 倍稀释后，其 HI 抗体效价应为 1：32 左右）。

3.5 结果判定 判定时将微量板倾斜 45 度。当阴性血清 HI 效价不高于 1：8（微量法）、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差不高于 1 个滴度时，方可成立。若红细胞沉淀呈泪珠状流淌，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 4HA 单位抗原的血清最高稀释度作为待检血清的 HI 抗体效价。

#### 附加说明：

1. 本标准由河南农业大学提出。
2. 本标准于 2003 年 02 月 09 日经农业部公告第 246 号发布。
3. 本标准于 2009 年 08 月 25 日经农业部公告第 1252 号批准变更注册。变更内容：变更制品中传染性支气管炎部分效力检验方法和标准。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。

## 禽流感 H5 亚型血凝抑制试验抗原与阴、阳性血清

Qinliugan H5 Yaxing Xueningyizhishiyuan Kangyuan Yu Yin, Yangxing Xueqing

Avian Influenza (H5 Sub-type) HI Antigen and Negative, Positive Sera

本抗原系用禽流感 H5N1 亚型病毒 AIV-GBL 株接种 SPF 鸡胚培养, 收获鸡胚尿囊液, 经甲醛溶液灭活后, 加适宜稳定剂制成。用于血凝抑制试验检测禽流感 H5 亚型抗体。

### 抗 原

**【性状】** 无色透明或半透明液体。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无菌生长。

**【安全检验】** 取 3~4 周龄 SPF 鸡 6 只, 各肌肉注射抗原 0.5ml, 观察 14 日, 应不出现全身和局部不良反应。

**【效价测定】** 按现行《中国兽药典》附录进行测定, 对 1% 鸡红细胞的 HA 价应  $\geq 1:256$ 。

**【特异性检验】** 用微量法进行 HI 试验。抗原对禽流感病毒 H5 亚型抗血清应为阳性反应, 对禽流感病毒 H7、H9 亚型、鸡新城疫病毒和减蛋综合征病毒单特异性抗血清均应为阴性反应。

**【作用与用途】** 用于血凝抑制试验检测禽流感 H5 亚型抗体。

**【注意事项】** (1) 红细胞凝集和红细胞凝集抑制试验虽简单快速, 但影响因素甚多, 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 或灭菌生理盐水作稀释液。

(3) 抗原和血清若有污染, 应废弃。

(4) 工作浓度的抗原应现用现配。

### 【用法与判定】

#### 1 凝集试验

1.1 凝集试验的详细操作方法 (见表 1)。

表 1 HA 效价测定操作术式

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
稀释倍数	$2^{-1}$	$2^{-2}$	$2^{-3}$	$2^{-4}$	$2^{-5}$	$2^{-6}$	$2^{-7}$	$2^{-8}$	$2^{-9}$	$2^{-10}$	$2^{-11}$	$2^{-12}$
稀释液 ( $\mu\text{l}$ )	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
抗原 ( $\mu\text{l}$ )	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25 (弃去)
生理盐水	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
1% 红血球*	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25

轻轻混匀 在室温条件下静置 40 分钟, 观察凝集反应

\* 1% 鸡红细胞悬液的制备

用 20ml 的注射器先吸取约 6ml 阿氏液 (Alsever's Solution), 然后从鸡翅下静脉采集 3 只不含有禽流感和新城疫抗体的成年公鸡血液, 每只鸡约 2ml。将采集的血液轻轻混匀后, 用生理盐水洗涤 3 次, 头两次 1500rpm 离心 5 分钟, 最后一次相同转速离心 10 分钟, 弃上清后配制成 1% 红细胞 (V/V) 悬液置 4℃ 备用。

1.2 结果判定 判定血凝时, 可将血凝板倾斜。

大于 75% 的红细胞被病毒所凝集判为“++++”；

50%~75% 的红细胞被病毒所凝集判为“+++”；

25%~50% 的红细胞被病毒所凝集判为“++”；

5%~25% 的红细胞被病毒所凝集判为“+”；

100% 的红细胞没有被病毒所凝集判为阴性“-”。

以出现“++++”完全血凝（不流淌）的最高稀释度作为判定终点。

## 2 凝集抑制试验

### 2.1 4 个 HA 单位工作抗原液的制备

根据凝集试验的测定结果，用灭菌的生理盐水或 PBS 配制 4 个工作单位的抗原。如果稳

定抗原的 HA 效价为 256，配制方法为  $256/4=64$  倍，即 1ml 的抗原液加入到 63ml 的稀释液里进行稀释，必要时要对 4 个 HA 单位进行重新标定。

2.2 凝集抑制试验的操作方法 H5 亚型禽流感血清抗体效价测定方法 HI 试验操作术式见表 2

表 2 HI 试验操作术式

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
稀释倍数	$2^{-1}$	$2^{-2}$	$2^{-3}$	$2^{-4}$	$2^{-5}$	$2^{-6}$	$2^{-7}$	$2^{-8}$	$2^{-9}$	$2^{-10}$	$2^{-11}$	$2^{-12}$
稀释液 (μl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
被检血清 (μl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
4 个 HA 抗原 (μl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
	震荡器震荡 1 分钟，置室温作用 30 分钟											
1% 红血球 (μl)	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
	22±4℃ 条件下作用 20~40 分钟，观察凝集抑制反应											

2.3 结果判定 以阳性对照血清出现明显的血凝抑制现象开始判定。

当阴、阳性血清的 HI 效价与已知效价相差不超过 1 个滴度时，试验结果成立。以出现 4 个单位工作抗原的血凝活性完全被抑制的血清最高稀释度作为判定终点。

待检血清的 HI 抗体效价  $\geq 1:16$  判为阳性。

【规格】 1ml/安瓿

【贮藏与有效期】 2~8℃ 保存，有效期为 12 个月。

### 阳性血清

【性状】 淡黄色透明液体。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【HI 效价测定】 按现行《中国兽药典》附录进行测定，HI 效价应  $\geq 1:256$ 。

【特异性检验】 用微量法进行 HI 试验。血清对禽流感 H5 亚型抗原应为阳性反应，对禽流感 H7、H9 亚型、鸡新城疫和减蛋综合征抗原均应为阴性反应。

【规格】 1ml/安瓿

【贮藏与有效期】 -20℃ 以下保存，有效期为 24 个月。

## 阴性血清

【性状】 淡黄色透明液体。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【HI 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。

【规格】 1ml/安瓿

【贮藏与有效期】  $-20^{\circ}\text{C}$  以下保存，有效期为 24 个月。

### 附加说明：

1. 本标准由北京市农林科学院提出。
2. 本标准于 2009 年 09 月 07 日经农业部公告第 1259 号发布。

## 鸭病毒性肝炎精制蛋黄抗体

Ya Bingduxingganyan Jingzhi Danhuang Kangti

Duck Virus Hepatitis Antibodies

本品系用鸭肝炎病毒（DHV）LY-20 株接种鸡胚，收获死亡鸡胚液，经甲醛溶液灭活后与矿物油佐剂混合制成免疫原，接种健康产蛋鸡，从蛋黄中提取抗体精制而成。用于预防 I 型鸭肝炎病毒引起的鸭病毒性肝炎。

【性状】 本品为略带棕色或淡黄色的透明液体，放置 48 小时后瓶底有少许微细的白色沉淀。pH 值为 6.9~7.2。

【装量检查】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【支原体检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无支原体生长。

【外源病毒检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无外源病毒污染。

【安全检验】 用 1 日龄健康雏鸭 10 只，各皮下注射 2ml；用 18~22g 清洁级小鼠 10 只，各皮下注射 0.5ml。连续观察 14 日，雏鸭和小鼠均应全部健活。

【效力检验】 下列方法任择其一。

中和试验 按附注 1 方法进行检验，中和抗体效价应 $\geq$ 1:256。

雏鸭效检 用 4~7 日龄健康易感雏鸭 30 只，随机分为 A、B、C 三个组，每组 10 只。A 组为蛋黄抗体组，B 组为攻毒对照组，C 组为空白对照组。三组雏鸭严格分开饲养。A 组每只皮下或肌肉注射 0.5ml 稀释至中和抗体效价 1:256 的鸭病毒性肝炎精制蛋黄抗体，C 组每只皮下或肌肉注射灭菌生理盐水 0.5ml。24 小时后，A、B 组雏鸭各用鸭肝炎病毒 LY 株病毒液皮下或肌肉注射 0.1ml（含 100 LD<sub>50</sub>），观察 10 日。A 组雏鸭应至少 8 只保护，B 组雏鸭应至少 8 只死亡，C 组雏鸭应全部健活。

【甲醛残留量测定】 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

【辛酸残留量测定】 按附注 2 方法进行测定，辛酸残留量应 $\leq$ 0.1%。

**【作用与用途】** 用于预防 I 型鸭肝炎病毒引起的鸭病毒性肝炎。

**【用法和用量】** 皮下或肌肉注射。1~4 日龄雏鸭，每只 0.5ml；5 日龄以上雏鸭，每只 1.0ml。

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】** (1) 本品 1 次注射的被动免疫保护期为 6 日。

(2) 本品口服无效。

(3) 本品可连续应用 2~3 次。

(4) 本品可与抗菌素混合 1 次注射。

(5) 本品久置后瓶底有微量白色沉淀，对疗效无影响。

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

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期暂定为 12 个月。

### 附注：1 中和试验

1.1 将 DHV LY-20 株稀释成每 0.1ml 含 200 ELD<sub>50</sub>，与等量系列稀释的待检抗体混合，病毒对照为病毒液与灭菌生理盐水等量混合物，37℃中和 1 小时。

1.2 每个稀释度接种 5 枚 9 日龄 SPF 鸡胚，每胚 0.2ml，同时设病毒对照组和空白对照组（接种 0.2ml 灭菌生理盐水）各 5 枚，置 37℃培养 168 小时，记录 48~168 小时的鸡胚死亡数，判定结果。

1.3 空白对照组应全部健活，病毒对照组应全部死亡，能使 50% 鸡胚不发生死亡的最高抗体稀释倍数即为该抗体的中和效价。

### 2 辛酸残留量检测方法（一次提取比色法）

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

2.2 器材 721 分光光度计；振荡器；普通离心机。

2.3 试剂

2.3.1 氯仿（AR）

2.3.2 磷酸盐缓冲液（1/30mol/L，pH 值为 6.4）

2.3.2.1 1/30mol/L 磷酸二氢钾溶液 取磷酸二氢钾 4.54g，加水至 1L。

2.3.2.2 1/30mol/L 磷酸氢二钠溶液 取磷酸氢二钠（含 12 个结晶水）11.94g，加水至 1L。

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

2.3.3 显色剂 称取二乙基二硫代氨基甲酸钠[N(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CS<sub>2</sub>Na]100mg，加正丁醇至 100ml。置 2~8℃可保存 7~14 日。

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

2.3.5 辛酸标准液[0.1%（V/V）] 精确吸取辛酸（BR）10μl 与 9.99ml 氯仿充分混匀

即成。

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

## 2.4 操作

### 2.4.1 标准曲线制定

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

2.4.1.2 另取洁净干燥的具塞试管5支,编为1~5。1~4管分别从4.1.1对应号数的试管中吸取0.3ml辛酸溶液,5号试管中加入水0.3ml。

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

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

2.4.1.5 仔细吸去上层液体及蛋白凝块,弃之。

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

2.4.1.7 在440nm波长下比色,以空白管调整光度计零点,读取各管吸收值(A)。

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

### 2.4.2 待测样品测定

2.4.2.1 抽样 按0.05%抽样。取样前应充分搅拌均匀。

#### 2.4.2.2 检测

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

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

2.4.2.2.3 加塞,振摇15分钟,静置10分钟后离心5分钟。

2.4.2.2.4 仔细吸去上层液体及蛋白凝块弃之。

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

2.4.2.2.6 在440nm波长下比色,以空白管调整光度计零点,读取各管吸收值(A)。

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

## 2.6 注意事项

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

2.6.2 显色前吸氯仿层时要注意不要触及管壁上粘着的铜试剂。氯仿层必须清澈,否则会使结果偏高。

2.6.3 对照管可不加显色剂，而用正丁醇代替，在测定管吸收值读数中减去此对照管的吸收值。

2.6.4 显色后色泽稳定，5 分钟到 3 小时吸收值不变。

2.6.5 全部容器应为玻璃器皿，不能沾污胶塞，否则结果混乱。

**附加说明：**

1. 本标准由洛阳普莱柯生物工程有限公司提出。

2. 本标准于 2009 年 09 月 29 日经农业部公告第 1268 号发布。

3. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

4. 删除【白血病病毒检验】项——现版《中国兽药典》附录“外源病毒检验”中已含有“白血病病毒检验”的内容。

## 鸭传染性浆膜炎灭活疫苗

Ya Chuanranxingjiangmoyan Miehuoyimiao

Duck Riemerella Anatipestifer Vaccine, Inactivated

本品系用免疫原性良好的血清 I 型鸭疫里默氏杆菌 I/Duck/Sichuan/CH/04 株（简称 RA-CH- I 株）接种于适宜培养基培养，将培养物经甲醛溶液灭活后，加油佐剂乳化而成。用于预防血清 I 型鸭疫里默氏杆菌引起的鸭传染性浆膜炎。

**【性状】** 外观 白色或淡黄色乳剂。

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

稳定性 疫苗在 37℃左右条件下放置 21 日，或取疫苗 10ml 装于离心管中以 3000rpm/min 离心 15 分钟，应不出现分层。

黏度 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【装量检查】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【安全检验】** 用 3~7 日龄健康易感鸭（血清中 I 型鸭疫里默氏杆菌抗体凝集效价应不高于 1:2）10 只，各颈部皮下注射疫苗 0.5ml，观察 7 日，应全部健活。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

(1) 血清学方法 用 3~7 日龄健康易感鸭（血清中 I 型鸭疫里默氏杆菌抗体凝集效价应不高于 1:2）10 只，各颈部皮下注射疫苗 0.25ml，14 日后，连同对照鸭 10 只，采血测定血清抗体凝集效价。对照鸭抗体效价均应不高于 1:2，免疫鸭抗体效价均应不低于 1:8。

(2) 免疫攻毒法 用 3~7 日龄健康易感鸭（血清中 I 型鸭疫里默氏杆菌抗体凝集效价应不高于 1:2）10 只，各颈部皮下注射疫苗 0.25ml，14 日后，连同对照鸭 10 只，各颈部皮下注射约  $5.20 \times 10^9$  CFU RA-CH- I 株活菌，观察 7 日。对照组鸭应至少 8 只发病（发病判定标准见附注 1），免疫组鸭应至少 9 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

合规定。

**【作用与用途】** 用于预防血清 I 型鸭疫里默氏杆菌引起的鸭传染性浆膜炎。免疫期为 3 个月。

**【用法与用量】** 颈部皮下注射。3~7 日龄鸭, 每只 0.25ml; 8~30 日龄鸭, 每只 0.5ml。

**【不良反应】** 一般无明显的不良反应。

**【注意事项】** (1) 仅用于接种健康鸭。

(2) 疫苗使用前应认真检查, 如出现破乳、变色、瓶有裂纹等均不可使用。

(3) 疫苗应在标明的有效期内使用。使用前必须摇匀, 疫苗一旦开启应当时用完。

(4) 切忌冻结和高温。

(5) 本疫苗在疫区或非疫区均可使用, 不受季节限制。

(6) 注射疫苗用的器具应消毒处理。

**【规格】** (1) 100ml/瓶 (2) 250ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存, 有效期为 12 个月。

**附注: 1 发病判定标准** (符合下列条件之一, 判为发病)

1.1 精神不振、行动蹒跚、眼鼻有分泌物流出、排绿色或黄绿色稀薄粪便或死亡。

1.2 对无临床症状的鸭剖检观察病变, 出现心包膜炎或肝周炎或浆膜炎病变。

1.3 对无病变的鸭进行细菌分离 (细菌分离用培养基见附注 2), 心血或肝脏或脾脏分离细菌呈阳性。

**2 10% 鲜血营养琼脂平板 (或斜面)**

2.1 成分

牛肉汤	900ml	蛋白胨	10g
氯化钠	5g	琼脂粉	12g
鲜血	100ml		

2.2 配制 称取除鲜血外各种成分混合后加热溶解, 待琼脂完全溶化后, 用氢氧化钠溶液调整 pH 值为 7.4~7.6, 分装于中性容器中, 116℃灭菌 30~40 分钟, 冷却至 40~50℃时, 按 10%量加入无菌鲜血, 摇匀, 制成平板或斜面备用。

**3 鸭疫里默氏杆菌抗体试管凝集试验抗原制备与检验**

3.1 材料

3.1.1 菌种 血清 I 型鸭疫里默氏杆菌 (RA-CH- I 株)。

3.1.2 培养基 含 1%裂解血球全血的 N-J 合成培养基。

3.1.3 阳性血清 凝集效价应不低于 1:32。

3.2 抗原制备

3.2.1 菌液培养 将 RA-CH- I 菌株接种于含 1%裂解血球全血的 N-J 合成培养基中, 置 37℃培养 24 小时。

3.2.2 活菌计数 取样进行活菌计数。

3.2.3 灭活 按菌液总量的 0.5%加入 10%甲醛溶液, 置 37℃灭活 24 小时。

3.2.4 抗原配制 用 0.5%石碳酸生理盐水离心洗涤 3 次, 每次 3000~5000rpm/min 离

心 30 分钟。用 0.5% 石碳酸生理盐水将抗原浓度配成  $2.0 \times 10^8$  CFU/ml。

3.3 检验 采用玻片凝集试验进行测定。取抗原 0.1ml 滴于玻片上，加入等量已稀释 4 倍的阳性血清，摇匀，置 37℃ 作用 3~5 分钟，观察结果。50% 凝集判为合格。同时设生理盐水作对照。

#### 4 鸭疫里默氏杆菌试管凝集试验操作程序

##### 4.1 操作方法

4.1.1 用生理盐水将待检血清作 2 倍系列稀释至 1:512，每管 0.5ml。

4.1.2 每管分别加入抗原 0.5ml。

4.1.3 阳性血清对照 取 1:2 稀释的阳性血清 0.5ml，加入抗原 0.5ml。

4.1.4 生理盐水对照 取生理盐水 0.5ml，加入抗原 0.5ml。

4.1.5 充分混匀后，置 37℃ 作用 16~24 小时，观察结果。

##### 4.2 结果判定

当阳性血清对照出现 ++ 以上，生理盐水对照无凝集沉淀时，试验方可成立。以出现 ++ 的血清最高稀释度的下一倍比稀释度为待检血清效价。

##### 判定标准

++++ 管底形成伞状沉淀，或沉淀物呈片状、块状或颗粒状，直径不小于 0.25cm，即 100% 凝集；

+++ 菌体大部分凝集呈片状、块状或颗粒状，直径 0.20cm~0.24cm，即 75% 凝集；

++ 管底有明显的凝集沉淀，呈块状或小片絮状，直径 0.10cm~0.19cm，为 50% 凝集；

+ 有不明显的凝集沉淀或仅有凝集沉淀的痕迹，直径 0.01cm~0.09cm，即 25% 凝集；

- 液体浑浊、不透明，无凝集沉淀或凝集沉淀的痕迹。

##### 附加说明：

1. 本标准由四川农业大学实验动物工程技术中心、成都天邦生物制品有限公司提出。

2. 本标准于 2009 年 12 月 11 日经农业部公告第 1306 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。

### 水貂细小病毒性肠炎灭活疫苗（MEVB 株）

Mink Parvoviral Enteritis Vaccine, Inactivated (Strain MEVB)

Shuidiao Xixiaobingduxingchangyan Miehuoyimiao (MEVB Zhu)

本品系用免疫原性良好的水貂细小病毒 MEVB 株，接种于猫肾传代细胞（CRFK 株）培养，收获细胞培养液，经甲醛溶液灭活后，加氢氧化铝胶制成。用于预防水貂细小病毒性肠炎。

**【性状】** 粉红色均匀混悬液，静置后，上层为粉红色澄清液体，下层为淡粉红色沉淀，摇匀后呈均匀混悬液。

**【装量检查】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【安全检验】** 用 2~10 月龄健康易感水貂 5 只（水貂细小病毒 HI 抗体效价 $\leq$ 1:4），各肌肉接种疫苗 5 ml（5 个免疫剂量），分 4 点注射，观察 10 日，精神、食欲、体温与粪便应无异常变化。

**【效力检验】** 下列方法任择其一。

（1）血清抗体测定 用 2~10 月龄健康易感水貂 5 只（水貂细小病毒 HI 抗体效价 $\leq$ 1:4），各肌肉接种疫苗 1ml，21 日后，连同对照水貂 5 只，分别采血，测定 HI 抗体效价。免疫组水貂抗体效价均 $\geq$ 1:32，对照组水貂抗体效价均 $\leq$ 1:4。

（2）免疫攻毒 用 2~10 月龄健康易感水貂 5 只（水貂细小病毒 HI 抗体效价 $\leq$ 1:4），各肌肉接种疫苗 1ml，21 日后，连同对照水貂 5 只，各口服水貂细小病毒 SMPV-11 株肠道毒（含 100 个 ID<sub>50</sub>），观察 9 日，对照组水貂应全部发病（见附注），免疫组水貂应全部健活。

**【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】** 用于预防水貂细小病毒性肠炎，免疫期为 6 个月。

**【用法与用量】** 肌肉注射。出生后 50~70 日龄的仔貂与母貂同时接种，种貂配种前 30~60 日接种，每只 1ml。

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】** （1）疫苗注射前应恢复至室温并摇匀后使用，疫苗启封后限当日用完。

（2）注射部位和注射器具应严格消毒，每注射一只水貂，应更换一个针头。

（3）疫苗应冷藏运输和保存（但防止冻结），运输和使用过程中避免日光直射

（4）疫苗中若有其他异物、瓶体有裂纹或变质者不得使用。

**【规格】** （1）30ml/瓶 （2）90ml/瓶 （3）250 ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃保存，有效期为 10 个月。

#### 附注 水貂细小病毒性肠炎发病判定标准

1 腹泻，排出混有血液、黏液的水样便或带有肠粘膜的稀便，或管型便、绿色便；

2 体温升高至 40℃以上并持续 1~2 日；

3 精神沉郁，呕吐，食欲减退或废绝，渴欲增加；

4 粪便对猪红血球血凝（HA）效价应 $\geq$ 1:128。

具备第 1 项和其中任何 2 项或 2 项以上判为发病。

#### 附加说明：

1. 本标准由中国农业科学院特产研究所、吉林特研生物技术有限责任公司提出。

2. 本标准于 2009 年 12 月 11 日经农业部公告第 1306 号发布。

3. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

## 鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征三联灭活疫苗（La Sota 株 +M41 株+HSH23 株）

Ji Xinchengyi Chuanranxingzhiqiguanyan Jiandanzonghezheng Sanlian Miehuoyimiao  
(La Sota Zhu+M41 Zhu +HSH23 Zhu)

Newcastle Disease, Infectious Bronchitis and Egg Drop Syndrome Vaccine, Inactivated  
(Strain La Sota+Strain M41+Strain HSH23)

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（EDSV）HSH23 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，按一定比例混合，加油佐剂乳化制成。用于预防鸡新城疫、传染性支气管炎和减蛋综合征。

**【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，除第 1 滴外，均不应不散。

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 分钟，管底析出的水相应不超过 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 3~5 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 14 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低于 1:16，未免疫对照组 HI 抗体效价的几何平均值应不高于 1:4。

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 3~6 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，各皮下或肌肉注射灭活疫苗 1 羽份（0.5ml），21~28 日后，再分别采血。将两次血清分别做 HI 试验（见附注）。二免血清的 HI 抗体效价几何平均滴度应较首免血清 HI 抗体效价几何平均滴度高 4 倍以上。

（3）减蛋综合征部分 用 3~6 周龄 SPF 鸡 10 只，每只皮下或肌肉注射疫苗 1 羽份（0.5ml），21 日后，连同对照鸡 5 只，分别采血，分离血清，测定 HI 抗体效价，免疫鸡 HI 抗体效价几何平均滴度应不低于 1:128，对照鸡 HI 抗体效价几何平均滴度应不高于 1:4。

**【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。免疫接种后 14~21 日产生免疫力。免疫期为 6 个月。

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

**【不良反应】** 一般无可见的不良反应。

**【注意事项】** （1）仅对健康鸡群进行免疫接种。

（2）用鸡新城疫及传染性支气管炎活疫苗进行基础免疫后，再接种本疫苗，可提高对鸡新城疫及传染性支气管炎的免疫预防效果。

（3）疫苗使用前应充分摇匀，并使疫苗升到室温。

（4）疫苗开启后应在 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 18 个月。

### 附注：1 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验（HI）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，经磷酸脂酶 C 处理制成。用于检测鸡传染性支气管炎病毒抗体。

**【性状】** 白色混浊液体，底部有少量沉淀。

**【特异性检验】** 将 IB、ND、AI、EDS、IBD 阳性血清及 SPF 鸡血清按附注 3.3.1 项处理后，与本抗原进行血凝抑制试验。IB 阳性血清 HI 抗体效价应不低于 1:128，ND、AI、EDS、IBD 阳性血清及 SPF 鸡血清 HI 抗体效价均应不高于 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 效价应不低于 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试验（HI）阳性血清质量标准

本品系用 H120 活疫苗免疫 SPF 鸡后，再用 IB 灭活疫苗（M41 株）加强免疫，免疫后采集鸡血，分离血清制备而成。用于鸡传染性支气管炎 HI 试验阳性对照。

**【性状】** 微黄色或淡红色澄清液体。

**【特异性检验】** 按附注 3.3 项进行，阳性血清与鸡传染性支气管炎病毒 M41 株抗原呈阳性反应，HI 抗体效价应不低于 1:128；与禽流感（H9 亚型）、鸡新城疫、减蛋综合征病毒抗原应为阴性反应，HI 抗体效价应不高于 1:4。

**【效价测定】** 按附注 3.3 项进行，阳性血清 HI 抗体效价应不低于 1:128。

**【作用与用途】** 用于鸡传染性支气管炎血凝抑制试验阳性对照。

**【规格】** 1ml/瓶

**【贮藏与有效期】** -20℃以下保存，有效期为 24 个月。

### 3 鸡传染性支气管炎 HI 试验操作方法

### 3.1 试验材料

3.1.1 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。

#### 3.1.2 试剂

3.1.2.1 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 0.2 $\mu$ m 微孔滤器滤过, 分装, 置 2~8 $^{\circ}$ C 保存备用。

3.1.2.2 生理盐水 取 9g 氯化钠溶解于 1000ml 蒸馏水中, 即成。

3.1.2.3 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)。

3.1.2.4 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 分钟, 弃上清, 用去离子水反复洗涤至中性, 置 37 $^{\circ}$ C 直至水份完全蒸发, 用 PBS (pH 值 7.2) 配成 25%悬液, 置 2~8 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 3.2 IB HI 工作抗原的制备

#### 3.2.1 IB HI 抗原效价测定

3.2.1.1 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 25 $\mu$ l。

3.2.1.2 取 25 $\mu$ l HI 抗原, 从第 1 孔起, 依次作 2 倍系列稀释至第 12 孔, 混合, 弃去 25 $\mu$ l。

3.2.1.3 每孔加入 25 $\mu$ l HA 缓冲液。

3.2.1.4 每孔加入 25 $\mu$ l 1%鸡红细胞悬液, 每块板上设稀释液和红细胞悬液对照孔。

3.2.1.5 将微量板置振荡器上振荡 30 秒, 置 2~8 $^{\circ}$ C 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。

3.2.2 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。

#### 3.3 HI 试验操作方法

3.3.1 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 $^{\circ}$ C 下 60 分, 以 6000r/min 离心 15 分钟, 取上清, 即为 1:4 稀释的待检血清。

#### 3.3.2 HI 试验操作方法

3.3.2.1 在 96 孔微量板上, 第 1 孔至第 12 孔, 每孔加入 25 $\mu$ l HA 缓冲液。

3.3.2.2 向第 1 孔中加入被检血清 25 $\mu$ l, 依次 2 倍系列稀释至第 12 孔, 最后从第 12 孔弃去 25 $\mu$ l 混合液。

3.3.2.3 向每孔中加入 25 $\mu$ l 4 HA 单位工作抗原液, 置微型振荡器上振荡 30 秒。

3.3.2.4 置室温条件下作用 30 分钟。

3.3.2.5 向每孔加入 1%红细胞悬液 25 $\mu$ l, 置微型振荡器上振荡 30 秒。

3.3.2.6 置 2~8 $^{\circ}$ C 作用 30~45 分钟。根据血凝图像判定结果。

3.3.2.7 每次测定时应设阴性血清对照和已知 HI 抗体效价的阳性血清对照。

3.3.3 结果判定 判定时将微量板倾斜 45 度。当阴性血清 HI 抗体效价不高于 1:8（微量法）、阳性血清 HI 效价与已知效价相比误差不高于 1 个滴度时，试验方可成立。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 4HA 单位抗原的血清最高稀释度作为待检血清的 HI 抗体效价。

#### 附加说明：

1. 本标准由北京市农林科学院、乾元浩生物股份有限公司、北京市兽医生物制品厂提出。
2. 本标准于 2010 年 01 月 11 日经农业部公告第 1322 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、禽流感（H9 亚型）二联灭活疫苗（La Sota 株+LG1 株）

Ji Xinchengyi Qinliugan (H9 Yaxing) Erlian Miehuoyimiao (La Sota Zhu+LG1 Zhu)  
Newcastle Disease and Avian Influenza (Subtype H9) Vaccine, Inactivated (Strain La Sota+Strain LG1)

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株、A 型禽流感病毒（H9 亚型）A/Chicken/Shandong/LG1/2000（H9N2）株（简称 LG1 株）分别接种易感鸡胚培养，收获感染胚液，经甲醛溶液灭活、浓缩后加油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡新城疫和由 H9 亚型禽流感病毒引起的禽流感。

**【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 吸取疫苗 10ml 加入离心管中，以 3000r/min 离心 15 分钟，管底析出的水相应不多于 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 30 日龄左右 SPF 鸡 10 只，各皮下或肌肉注射疫苗 1.0ml，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。

(1) 血清学方法 用 30~60 日龄 SPF 鸡 15 只，其中 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不低于 1:16（微量法），未免疫对照组 HI 抗体效价的几何平均值应不高于 1:4（微量法）。

(2) 免疫攻毒法 用 30~60 日龄 SPF 鸡 15 只，其中 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 禽流感部分 下列方法任择其一。

(1) 血清学方法 用 7~10 日龄 SPF 鸡 15 只, 其中 10 只各颈部皮下或肌肉注射疫苗 0.2ml, 另 5 只不接种作为对照。21 日后, 每只鸡分别采血, 分离血清, 进行 HI 抗体效价测定 (见附注)。免疫鸡 HI 抗体效价的几何平均值应不低于 1:90, 对照鸡 HI 抗体效价的几何平均值应不高于 1:4。

(2) 免疫攻毒法 用 7~10 日龄 SPF 鸡 20 只, 其中 10 只各颈部皮下或肌肉注射疫苗 0.2ml, 另 10 只不接种作为对照。21 日后, 连同条件相同的对照鸡 10 只, 各静脉注射 1:10 稀释的禽流感病毒 LG1 株毒种 0.2ml, 攻毒后 5 日, 采集每只鸡的泄殖腔棉拭子, 经处理后, 分别经尿囊腔接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚 5 枚, 每胚 0.2ml, 孵育观察 5 日, 无论死胚、活胚均应测定红细胞凝集价, 每个拭子样品接种的 5 枚鸡胚中只要有 1 枚鸡胚液的红细胞凝集价不低于 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, 应盲传一代后再进行判定。免疫鸡应至少 9 只病毒分离阴性, 对照鸡应至少 9 只病毒分离阳性。

**【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。

**【用法与用量】** 颈部皮下或肌肉注射。2 月龄以下鸡, 每只 0.3ml; 2 月龄以上鸡, 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。

(3) 如出现破损、异物或破乳分层等异常现象, 切勿使用。

(4) 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。

(5) 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。

(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。

(7) 用过的苗瓶、器具应消毒处理。

**【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 18 个月。

#### 附注: 1 禽流感 (H9 亚型) 血凝抑制试验 (HI) 抗原质量标准

**【性状】** 白色或淡黄色疏松团块, 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。

**【效价测定】** 按标识体积稀释后, HA 效价应不低于 1:256。

**【特异性检验】** 抗原与禽流感病毒 (H9 亚型) 特异性抗血清应为阳性反应, 与禽流感病毒 (H7、H5 亚型) 阳性血清、NDV 阳性血清和 EDSV 阳性血清均应为阴性反应。

**【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。

## 2 禽流感（H9 亚型）血凝抑制试验（HI）操作方法

2.1 取微量反应板，分别向 1~11 孔加入 25 $\mu$ l 注射用生理盐水，第 12 孔中加入 50 $\mu$ l 注射用生理盐水。

2.2 吸取 25 $\mu$ l 血清，加至第 1 孔内，充分混匀后，吸取 25 $\mu$ l 加至第 2 孔，依次 2 倍系列稀释至第 10 孔，从第 10 孔吸取 25 $\mu$ l，弃去。

2.3 分别向 1~11 孔加入含 4HA 单位的抗原 25 $\mu$ l，室温下静置 30~40 分钟。

2.4 每孔加入 25 $\mu$ l 1%（V/V）鸡红细胞悬液，轻轻混匀，室温下静置 30~40 分钟。

对照红细胞将呈显著钮扣状。

2.5 结果判定 将反应板倾斜后判定结果。当阴性对照血清 HI 效价不高于 1:4、阳性对照血清 HI 效价与已知效价相比误差不超过 1 个滴度时，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. 本标准由齐鲁动物保健品有限公司提出。
2. 本标准于 2010 年 01 月 11 日经农业部公告第 1322 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、禽流感（H9 亚型）三联灭活疫苗（La Sota 株+ M41 株+HP 株）

Ji Xinchengyi Chuanranxingzhiqiguanyan Qinliugan（H9 Yaxing）

Sanlian Miehuoyimiao（La Sota Zhu + M41 Zhu + HP Zhu）

Newcastle Disease, Infectious Bronchitis, and Avian Influenza（H9 Subtype）Vaccine,  
Inactivated（Strain La Sota+Strain M41+Strain HP）

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株、传染性支气管炎病毒 M41 株、禽流感病毒（H9 亚型）A/chicken/Henan Puyang/2/98（H9N2）株（简称 HP 株）分别接种易感鸡胚培养，收获感染胚液，超滤浓缩，经甲醛溶液灭活后，加入矿物油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡新城疫、传染性支气管炎和由 H9 亚型禽流感病毒引起的禽流感。

【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 吸取疫苗 10ml 加入离心管中，以 3000r/min 离心 15 分钟，管底析出的水相应不大于 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 21~28 日龄 SPF 鸡 10 只, 每只肌肉或皮下注射疫苗 1.0ml, 观察 14 日, 应不出现由疫苗引起的任何局部或全身反应。

**【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。

(1) 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不低于 1:16, 对照组 HI 抗体效价的几何平均值应不高于 1:4。

(2) 免疫攻毒法 用 30~60 日龄 SPF 鸡 15 只, 其中 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, 每只鸡分别肌肉注射鸡新城疫病毒北京株强毒 (CVCC AV1611 株) 10<sup>5.0</sup>ELD<sub>50</sub>, 观察 14 日。对照组应全部死亡, 免疫组应至少保护 7 只。

2 鸡传染性支气管炎部分 用 14~42 日龄 SPF 鸡 20 只, 各点眼接种鸡传染性支气管炎活疫苗 (H120 株) 1 羽份, 接种后 21~28 日, 分别采血, 分离血清, 同时再各接种本疫苗 0.5ml, 二次接种后 21~28 日, 再分别采血, 分离血清。将两次血清分别作 HI 抗体效价测定 (见附注)。二免血清 HI 抗体效价的几何平均值 (GMT) 应较首免血清 HI 抗体效价的几何平均值高 3 倍以上

3 H9 亚型禽流感部分 下列方法任择其一。

(1) 用 28 日龄 SPF 鸡 15 只, 其中 10 只各颈部皮下注射疫苗 0.3ml, 另 5 只不接种, 作为对照, 21 日后, 分别采血, 分离血清, 用禽流感病毒 H9 亚型 HP 株抗原测定 HI 抗体效价。免疫鸡 HI 抗体几何平均滴度应不低于 1:64, 对照鸡 HI 抗体效价均应不高于 1:4。

(2) 上述免疫鸡和对照鸡, 用 1:10 稀释的 HP 株毒种进行静脉注射, 每只鸡 0.2ml。攻毒后第 5 日, 采集每只鸡的泄殖腔拭子进行病毒分离。将每只鸡的样品经尿囊腔内接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚 5 枚。孵育观察 5 日, 无论死胚、活胚均应测定鸡胚液血凝价, 以 5 枚鸡胚中至少有 1 个鸡胚的鸡胚液血凝价不低于 1:16 判为病毒分离阳性。对病毒分离为阴性的样品, 应盲传 1 次。免疫组应至少有 9 只鸡为病毒分离阴性, 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、传染性支气管炎和由 H9 亚型禽流感病毒引起的禽流感。4 周龄内雏鸡免疫期为 2 个月, 4 周龄以上青年鸡免疫期为 3 个月, 成年鸡免疫期为 4 个月。

**【用法与用量】** 颈部皮下或肌肉注射。2 周龄内雏鸡每只 0.2ml; 2~4 周龄雏鸡每只 0.3ml; 4 周龄以上的青年鸡和成年鸡每只 0.5ml。

**【不良反应】** 无。

**【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。

(4) 疫苗启封后, 限当日用完。

(5) 本品不能冻结。

(6) 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。

**【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 (HI) 抗原质量标准

本品购于荷兰，系由鸡传染性支气管炎病毒 M41 株制成，用于检测鸡传染性支气管炎 M41 血清型 HI 抗体。

**【性状】** 黄色结晶状粉末。

**【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】** 对鸡红细胞凝集价应不低于 1:256。

**【特异性检验】** 与阴性血清、NDV、AIV (H9 亚型)、EDSV 阳性血清进行 HI 试验，应呈阴性反应 (HI 抗体效价应不高于 1:8)，与鸡传染性支气管炎病毒 M41 株阳性血清进行 HI 试验，应呈阳性反应 (HI 抗体效价应不低于 1:256)。

**【规格】** 1ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 24 个月。

### 2 抗鸡传染性支气管炎病毒 (M41 株) 阳性血清质量标准

本品购于荷兰，专用于鸡传染性支气管炎 Massachusetts 型 HI 抗体检测时作阳性对照。

**【性状】** 黄色结晶状粉末。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** HI 效价应不低于 1:256。

**【特异性检验】** 对 NDV、AIV (H9 亚型)、EDSV 抗原进行 HI 试验，应呈阴性反应 (HI 抗体效价应不高于 1:8)。

**【规格】** 1ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 2~8℃ 保存，有效期为 24 个月。

### 3 鸡传染性支气管炎 HI 操作方法

3.1 仪器设备 96 孔 V 型微量血凝板；微型震荡器；聚乙烯塑料采血管；多道移液器等。

#### 3.2 试剂

3.2.1 缓冲液 PBS (0.1mol/L, pH 值 7.0~7.2)，置 2~8℃ 保存备用。

3.2.2 0.5% 红细胞悬液 采集成年鸡血液，用 20 倍量 PBS 洗涤 3~4 次，每次 3~4 分钟，最后一次 5 分钟，用 PBS 配成 0.5% 悬液。

3.2.3 鸡传染性支气管炎 HI 抗原和阳性血清 见附注 1 和附注 2。

3.3 被检血清 采血，分离血清，-20℃ 保存备用。使用前以 56℃ 灭活 30 分钟。

#### 3.4 HI 操作方法

##### 3.4.1 微量血凝试验

3.4.1.1 向微量血凝板每孔中加入 PBS 25μl，共做 4 行平行重复。

3.4.1.2 吸取 1:5 稀释的抗原加入到第 1 列各孔中，每孔 25μl，然后自左至右进行 2 倍系列稀释至第 11 列孔，从第 11 列各孔中吸取 25μl 混合液，弃去。第 12 列各孔中不加抗

原，作为对照孔。

3.4.1.3 向每孔中加入 0.5% 红细胞悬液 25 $\mu$ l。

3.4.1.4 将微量血凝板置微型震荡器上震荡 1 分钟。

3.4.1.5 将微量血凝板置 2~8 $^{\circ}$ C 下作用 50 分钟。根据血凝图像判定结果。以使红细胞完全凝集的最高稀释度作为该抗原的 HA 效价。每次做 4 行平行重复，以几何平均值表示结果。

3.4.1.6 4HA 单位工作抗原的配制

3.4.1.6.1 配制 4HA 单位工作抗原稀释倍数的计算 按照下列公式计算配制 4HA 单位工作抗原稀释倍数，即抗原稀释倍数=抗原血凝滴度 $\div$ 4。如抗原 HA 效价为 1:1024，则配制 4HA 单位工作抗原液时应用 PBS 稀释 256 倍（1024 $\div$ 4=256）。

3.4.1.6.2 4HA 单位工作抗原的验证 向 96 孔微量板第 1 孔中加入 4HA 单位工作抗原液 50 $\mu$ l，向第 2、3、4 孔中各加入 PBS 25 $\mu$ l。从第 1 孔中吸取 25 $\mu$ l 4HA 单位工作抗原液加入到第 2 孔中，依次 2 倍系列稀释至第 4 孔，弃去 25 $\mu$ l 混合液，即第 1 孔至第 4 孔的抗原 HA 单位依次为 4、2、1、0.5 HA 单位。每孔中加入 0.5% 红细胞悬液 25 $\mu$ l，置微型震荡器上震荡 1 分钟，然后置 2~8 $^{\circ}$ C 下作用 50 分钟，根据血凝图像判定结果。如果 4HA 单位工作抗原配制正确，第 3 孔应完全凝集，第 4 孔应凝集 50% 以上。

3.4.2 微量血凝抑制试验

3.4.2.1 在 96 孔微量血凝板上，第 1 孔至第 12 孔，每孔中加入 25 $\mu$ l PBS。

3.4.2.2 向第 1 孔中加入被检血清 25 $\mu$ l，依次 2 倍系列稀释至第 12 孔，最后从第 12 孔中弃去 25 $\mu$ l 混合液。

3.4.2.3 向每孔中加入 25 $\mu$ l 4HA 单位工作抗原液，置微型震荡器上震荡 1 分钟。

3.4.2.4 置 2~8 $^{\circ}$ C 下作用 10 分钟。

3.4.2.5 向每孔中加入 0.5% 红细胞悬液 25 $\mu$ l，置微型震荡器上震荡 1 分钟。

3.4.2.6 置 2~8 $^{\circ}$ C 下作用 50 分钟。根据血凝图像判定结果。

3.4.2.7 每次测定时应设阴性血清对照和已知 HI 抗体效价的阳性血清对照（阳性血清先做 10 倍稀释后，其 HI 抗体效价应为 1:32 左右）。

3.5 结果判定 判定时将微量板倾斜 45 度。当阴性血清 HI 效价不高于 1:8（微量法）、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差不高于 1 个滴度时，方可成立。若红细胞沉淀呈泪珠状流淌，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 4HA 单位抗原的血清最高稀释度作为待检血清的 HI 抗体效价。

#### 附加说明：

1. 本标准由河南农业大学禽病研究所、瑞普（保定）生物药业有限公司、广东永顺生物药业有限公司、扬州威克生物工程有限公司、辽宁益康生物制品有限公司提出。

2. 本标准于 2010 年 02 月 01 日经农业部公告第 1335 号发布。

3. 根据现行《中国兽药典》要求改变黏度测定方法，为黏度计法。

4. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

## 口蹄疫、猪水疱病反向间接血凝试验致敏红细胞诊断液

Koutiyi Zhushuipaobing Fanxiangjianjiexueningshiyan Zhiminhongxibao Zhenduanye

Foot and Mouth Disease and Swine Vesicular Disease RIHA Diagnostic Preparation

本品系用口蹄疫病毒 A、O、C、Asia I 型毒种和猪水疱病病毒毒种分别高度免疫豚鼠或猪，分离血清，提取免疫球蛋白，致敏红细胞制成。用于口蹄疫和水疱病的鉴别诊断。

**【性状】** 静置后，致敏红细胞沉于瓶底，上层为淡黄色透明液体。振摇后，致敏红细胞均匀分散于溶液中。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** 用稀释液将标准抗原作 2 倍系列稀释，与待检红细胞诊断液在血凝滴定板上进行反向间接血凝试验。血凝效价，口蹄疫 A、O、C、Asia I 型 $\geq 1:480$ 、猪水疱病 $\geq 1:240$ 为合格。

**【特异性检验】** 按照反向间接血凝试验法，将待检红细胞诊断液与不同稀释度的 A、O、C、Asia I 型口蹄疫、猪水疱病 5 种标准抗原进行反应。对同型抗原反应效价，A、O、C、Asia I 型口蹄疫 $\geq 1:480$ ，猪水疱病 $\geq 1:240$ ；对异型抗原反应效价均 $\leq 1:30$ 为合格。

**【作用与用途】** 用于鉴别诊断口蹄疫和水疱病的反向间接血凝试验。

**【用法与判定】** 1 使用标准阳性血清对 O 型口蹄疫和猪水疱病进行鉴别诊断时，按以下方法操作。

1.1 在 96 孔血凝滴定板上，每份被检样品做 4 排孔，每孔先各加 25 $\mu$ l 稀释液。

1.2 每排第 1 孔各加被检样品 25 $\mu$ l，然后分别由左至右进行 2 倍系列稀释至第 7 孔（竖板）或第 11 孔（横板）。每排最后孔留作空白对照。

1.3 加标准阳性血清 在第 1 排和第 3 排，每孔加稀释液 25 $\mu$ l。

在第 2 排，每孔加入 1:20 稀释的 O 型口蹄疫标准阳性血清 25 $\mu$ l。

在第 4 排，每孔加入 1:100 稀释的猪水疱病标准阳性血清 25 $\mu$ l。

放微型混合器上振荡 1~2 分钟，加盖，置 37 $^{\circ}$ C 作用 30 分钟。

1.4 加致敏红细胞诊断液 在第 1 排和第 2 排，每孔加入 1% O 型口蹄疫抗体致敏红细胞悬液 25 $\mu$ l。

在第 3 排和第 4 排孔，每孔加入 1% 猪水疱病抗体致敏红细胞悬液 25 $\mu$ l。

将血凝滴定板置微型混合器上振荡 1~2 分钟，加盖，放室温 2 小时后观察结果。

1.5 结果判定 若第 1 排出现 2 孔以上的凝集（50% 以上凝集），且第 2 排相对应孔出现 2 个孔以上的凝集抑制；第 3、4 排不出现凝集，判为口蹄疫 O 型阳性。若第 3 排出现 2 个孔以上的凝集（50% 以上凝集），并且第 4 排对应孔出现 2 个孔以上的凝集抑制，第 1、2 排不出现凝集，则判为猪水疱病阳性。

以能引起 50% 红细胞凝集的被检样品最大稀释度为被检样品的血凝效价。

2 使用标准抗原对口蹄疫各型和猪水疱病进行鉴别诊断时，按下列方法操作。

2.1 被检样品的稀释 取试管 8 支，自第 1 管开始由左至右用稀释液进行 2 倍系列稀释（即 1:6、1:12、1:24……1:768），每管 0.5ml。

2.2 滴加被检样品 在血凝滴定板上的第 1 至第 5 排，每排的第 8 孔滴加第 8 管稀释被检样品 2 滴，每排的第 7 孔滴加第 7 管稀释被检样品 2 滴，以此类推至第 1 孔。每排的第

9 孔滴加稀释液 2 滴，作为稀释液对照，每排的第 10 孔按顺序分别滴加 A、O、C、Asia I 型口蹄疫和猪水泡病标准抗原（1:30 稀释）各 2 滴，作为阳性对照（注意每型换滴管 1 支）。

2.3 滴加致敏红细胞诊断液 先将红细胞诊断液摇匀，于滴定板第 1 至第 5 排孔分别滴加 A、O、C、Asia I 口蹄疫型及猪水泡病致敏红细胞诊断液，每孔 1 滴，置振荡器上振荡 1~2 分钟，放置 20~25℃ 1.5~2 小时后判定结果。

如果被检样品来自牛、羊等偶蹄兽，仅用口蹄疫 4 个型的致敏红细胞诊断液；如果被检材料来自猪，除用上述 4 种诊断液外，还用猪水泡病红细胞诊断液。

#### 2.4 结果判定

2.4.1 观察血凝板上各排孔的凝集图形，如果只有第 1 排孔凝集，且稀释液对照孔不凝集，阳性对照孔凝集，则证明此种凝集是与 A 型红细胞诊断液同型病毒所致的特异性凝集，被检样品即判为 A 型。若只有第 2 排孔凝集，其余 4 排孔不凝集，则待检抗原为 O 型，以此类推。

2.4.2 致敏红细胞 50%凝集的被检样品最高稀释度为其凝集效价。

2.4.3 出现 2 排孔以上的凝集时，如某排孔的凝集效价高于其余各排孔的凝集效价至少 4 倍，即可判为阳性，其余判为阴性。

**【注意事项】** 保存与使用中，勿冻结，勿倒置。

**【规格】** 5ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 在 2~8℃ 保存，有效期为 6 个月。

**附注：** 凝集反应强度标准

- ++++ 100% 凝集。红细胞均匀地分布于孔底周围。
- +++ 75% 凝集。红细胞均匀地分布于孔底周围，但孔底中心有红细胞形成的针尖大的小点。
- ++ 50% 凝集。孔底周围有不均匀的红细胞分布，孔底有一红细胞沉下的小点。
- + 25% 凝集。孔底周围有不均匀的红细胞分布，但大部分红细胞已沉积于孔底。
- 不凝集。红细胞完全沉积于孔底成一圆点。

**附加说明：**

1. 本标准由中国农业科学院兰州兽医研究所、江苏省农业科学院畜牧兽医研究所提出。
2. 本标准于 1998 年 12 月 7 日（1998）农（牧）字第 92 号批准。
3. 本标准于 2010 年 1 月经农业部公告第 1337 号重新发布。

## 水貂阿留申病对流免疫电泳抗原与阳性血清

Shuidiao Aliushenbing Duiliumianyidanyong Kangyuan Yu yangxingxueqing

Aleutian Mink Disease Counter Immunoelectrophoresis Antigen and Positive Sera

本抗原系用水貂阿留申病病毒接种水貂或猫肾传代细胞系培养，收获感染动物的脏器进行匀浆或收获细胞培养液进行提取和浓缩制成。用于诊断水貂阿留申病。

阳性血清系用水貂阿留申病病毒免疫接种健康易感水貂，采血，分离血清制成。用于对流免疫电泳对照。

**【性状】** 组织抗原为淡棕黄色透明液体；细胞抗原为稍带乳白色透明液体。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【特异性检验】** 1 将组织抗原分别与阴、阳性血清进行对流免疫电泳。与 1:100 稀释的阳性血清呈阳性反应，与阴性血清无反应，为合格。

2 将细胞抗原作 2 倍系列稀释，分别与阴、阳性血清进行对流免疫电泳。与 1:10 稀释的阳性血清呈阳性反应，与阴性血清无反应，为合格。

3 将用组织抗原或细胞抗原分别与水貂犬瘟热抗血清和病毒性肠炎抗血清进行对流免疫电泳，均应呈阴性反应。

**【作用与用途】** 用于诊断水貂阿留申病的对流免疫电泳。

**【用法与判定】** 方法

1.1 取 3mm 厚普通玻璃板，大板约 100×90mm（可检 50 头份），小板约 100×45mm（检 24 头份）。将温度降至 70℃ 左右时的琼脂糖溶液浇注在水平放置、洁净无污物的玻璃板上，厚度约为 3mm，冷却凝固后，放入湿盒内，置 2~8℃ 保存备用（当日用完为宜）。

1.2 打孔 把已凝固好的琼脂糖凝胶板放在孔径 3mm、孔距 4mm 的打孔模型图案（见图）上打孔，然后除去孔内的琼脂块。

1.3 加样 首先将被检血清按编号顺序逐份加到血清孔内（左侧），以充满且不外溢为度。抗原加到另一排抗原孔内（右侧），每块板均应设立已知标准阳性和阴性血清对照。

1.4 电泳 电泳槽两侧应加满（以标线为准）相应的缓冲液。把加样后的凝胶板平放于电泳槽架上，血清孔置阳极端，以双层滤纸或单层纱布（宽度以 11cm 为宜，长度以能连接凝胶板和电泳缓冲液为准）搭桥。核对电极与样品孔间的正确关系后接通电源，开启电泳仪，调整电压至 90~100V，电泳 30~60 分钟，出现沉淀线时，关闭电源，取出琼脂板，判定反应结果。

2 结果判定

2.1 在标准阳性血清对照孔与抗原孔之间有明显的灰白色沉淀线，在标准阴性血清对照孔与抗原孔之间无沉淀线时，则该板被检血清样品检测结果有效，否则无效。

2.2 在抗原与被检血清孔之间，稍偏向血清孔一侧，形成一条直或稍弯曲、十分清晰可见的灰白色沉淀线为阳性；如沉淀线短而纤细，但呈明显灰白色，可判为弱阳性。

2.3 在抗原与被检血清孔之间无沉淀线为阴性。

**【注意事项】** （1）电泳时，电压不得超过 100V。

（2）抗原应尽量避免反复冻融，注意核对抗原的有效期限。

（3）电泳后，若只看到在靠近被检血清孔一边出现较宽的、多呈云雾状的弧形沉淀带，此为某些貂血清含脂蛋白等之故，不能判为阳性。

（4）被检血清孔往往出现拖尾现象，此乃轻微溶血所致，不影响结果判定。

（5）如在抗原与血清孔之间出现模糊不清的沉淀线而难以判定时，可用 2% 盐水浸泡琼脂板 15 分钟至 18 小时，或放电泳槽内或置 2~8℃ 湿盒内，隔夜后再判定。

【规格】 5ml/瓶

【贮藏与有效期】 组织抗原：在-10℃以下保存，有效期为1年；在2~8℃为30日。

细胞抗原：在-20℃保存，有效期为1年；在2~8℃为5个月。

附图 小板（100mm×45mm）打孔模型图案



### 阳性血清

【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】 将标准抗原分别与阳性血清、阴性血清进行对流免疫电泳。用组织抗原制备的阳性血清100倍、用细胞抗原制备的阳性血清10倍稀释与标准抗原呈阳性反应，而标准抗原与阴性血清无反应为合格。

【规格】 5ml/瓶

【贮藏与有效期】 在2~8℃，有效期为1年。

### 附加说明：

1. 本标准由中国农业科学院特产所、吉林农业大学、农业部动物检疫所提出。
2. 本标准于1998年12月7日（1998）农（牧）字第92号批准。
3. 本标准于2010年1月经农业部公告第1337号重新发布。

## 马传染性贫血病毒单克隆抗体-酶结合物

Ma Chuanranxingpinxuebingdu Dankelong Kangti-mei Jiehewu

Enzyme-Labelled - McAb against Equine Infectious Anemia Virus

本品系用A4杂交瘤细胞系接种BALB/C小鼠，采集腹水或进行细胞培养，收集培养物，纯化后，与辣根过氧化物酶结合，经冷冻真空干燥制成。用于检测马传染性贫血马白细胞弱毒株抗体。

【性状】 为乳白略带黄褐色海绵状疏松团块。加稀释液后立即溶解，液体显微黄色。

【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】 取冻干McAb-酶标结合物2支，先用稀释液做2倍稀释，混合后再做20倍和30倍稀释。随后对已知马传染性贫血疫苗免疫马阳性血清和阴性血清按[用法与判定]项中斑点试验（DB）程序进行试验并判定，血清阴、阳性反应结果与已知相符，判为合格。

【株系特异性检验】 DB试验中，马传染性贫血疫苗免疫马阳性血清呈红褐色斑点。

【非株系特异性检验】 DB试验中，马传染性贫血病马血清无斑点，颜色同纤维素膜背景。

**【作用与用途】** 用于鉴别诊断马传染性贫血病马与马传染性贫血驴白细胞弱毒株免疫接种马用。

**【用法与判定】** 马传染性贫血病马与疫苗免疫马鉴别诊断操作方法如下。

1 斑点试验 (DB)

应用硝酸纤维素膜或混合纤维素酯膜作固相载体。

1.1 点样 将阳性、阴性对照及被检血清用微量进样器或玻璃棒蘸取约 2.5 $\mu$ l, 点在膜的指定位置上, 室温干燥 15 分钟。

1.2 用含 0.05%吐温-20 的 PBS(0.02mol/L, pH7.2)漂洗 3 次, 每次 3~5 分钟。

1.3 用 1.2 项溶液稀释抗原-抗体复合物, 将点样膜浸入抗原-酶联 McAb 试剂溶液中, 室温作用 1 小时。

1.4 重复 1.2 项。

1.5 将膜浸入底物溶液(pH7.6, 0.05mol/L Tris-HCl 液 20ml, DAB 3mg, 30% $H_2O_2$  60 $\mu$ l) 作用 30 分钟。

1.6 用蒸馏水漂洗终止反应, 判定结果。显示红棕色斑点为阳性, 即为疫苗免疫马。显示结果同纤维素膜背景为阴性, 即为未接种疫苗马。

2 琼脂扩散试验 (AGP)

对斑点试验阴性血清, 再用农业部规定的马传染性贫血琼脂扩散试验法进行检验, 判为 AGP 阳性即为马传染性贫血病马。

**【规格】** 0.5ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 在-20 $^{\circ}$ C, 有效期为 12 个月; 在 2~8 $^{\circ}$ C 为 6 个月。

**附加说明:**

1. 本标准由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提出。
2. 本标准于 1991 年 4 月 23 日 (1991) 农 (牧) 字第 14 号批准。
3. 本标准于 2010 年 1 月经农业部公告第 1337 号重新发布。

## 猪旋毛虫病酶联免疫吸附试验试剂盒

Zhu Xuanmaochongbing Meilianmianyixifushiyan Shijihe

Swine Trichinella Spiralis ELISA Diagnostic Kit

本品系用旋毛虫标准虫株, 通过人工感染猪体的肌幼虫制成排泄-分泌抗原, 再用旋毛虫单克隆抗体通过亲和层析法制成纯化抗原, 包被于聚苯乙烯微量反应板, 并配以 1、2、3、4 号试液和阴、阳性血清组装而成。用于诊断猪旋毛虫病。

**【性状】** 抗原包被板无色, 透明, 干燥, 无杂质吸附。

1 号试液为淡黄色澄明液体。

2 号试液为淡乳白色液体。

3 号、4 号试液为无色透明液体。

阴、阳性血清为淡黄色透明液体。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，1号试液及阴、阳性血清，均应无菌生长。

**【灵敏度检验】** 对每克膈肌含0.1~0.5条肌幼虫的猪，用本试剂盒检测其血清或全血，应为阳性反应。

**【特异性检验】** 与感染猪囊虫、猪蛔虫、猪弓形体或猪细颈囊尾蚴的猪血清，应不产生交叉反应。

**【作用与用途】** 用于诊断猪旋毛虫病的酶联免疫吸附试验。

**【用法与判定】**

- 1 样品准备 被检血清作1:100稀释，血片作1:10稀释，阴、阳性血清作1:200稀释。
- 2 加样 反应板的每孔加检样2滴（约100 $\mu$ l），并设阴、阳性血清对照，25 $^{\circ}$ C静置2~3分钟。
- 3 反应 倒掉被检液，每孔加1号试液1滴（约40 $\mu$ l），室温静置2~3分钟。
- 4 洗涤 甩掉1号试液，每孔加2号试液1滴，立即用自来水或蒸馏水反复冲洗5次。
- 5 显色 拍干残液，每孔先加3号试液1滴，再加4号试液1滴，轻轻混匀，静置2~5分钟。
- 6 判定 在白色背景下，按下列标准判定：吸收度 $\leq$ 0.3、蓝色为阳性；吸收度 $\leq$ 0.08、无色为阴性。

	肉眼观察	吸收度（450nm）
++++	蓝色，明显深于阳性参考血清	$>0.8$
+++	蓝色，深于阳性参考血清	$\leq 0.8$
++	蓝色，近于阳性参考血清	$\leq 0.5$
+	蓝色，浅于阳性参考血清	$\leq 0.3$
-	无色或颜色浅于或接近阴性参考血清	$\leq 0.08$

**【注意事项】** （1）每孔加入的1、2、3、4号试液的量要均等，最好加到孔中央，并严禁冻存。

（2）每孔加入2号试液后，必须用水充分冲洗，洗涤不彻底会影响结果。

（3）第1号试液要密封保存，污染后不宜使用。第2、4号试液比较粘稠，要注意加足量。

（4）室温低于25 $^{\circ}$ C时，可适当延长每次反应时间，但最终判定结果，应在5分钟内完成。

（5）运输途中应避光、避高温和避碰撞。

**【规格】** 200头份/盒（含40孔包被板5块、1号试液8ml/瓶、2号试液8ml/瓶、3号试液8ml/瓶、4号试液8ml/瓶、阴、阳性血清各2ml）、400头份/盒（以上各种试剂加倍量）。

**【贮藏与有效期】** 在2~8 $^{\circ}$ C，有效期为10个月。

**附加说明：**

1. 本标准由河南省农业科学院畜牧兽医研究所提出。
2. 本标准于1991年12月4日（1991）农（牧）字第38号批准。

3. 本标准于 2010 年 1 月经农业部公告第 1337 号重新发布。

## 大肠埃希氏菌病酶联免疫吸附试验试剂盒

Dachangaixishijunbing Meilianmianyixifushiyuan Shijihe

Escherichia Coli ELISA Diagnostic Kit

本品系用大肠埃希氏菌 K88、K99、987P 抗原分别免疫接种豚鼠和兔，采血，分离血清，提取抗体，适当稀释后进行冷冻真空干燥，与冻干阳性对照抗原、酶标记羊抗兔 IgG 组装而成。用于诊断由 K88、K99、987P 菌株引起的仔猪大肠埃希氏菌病。

**【性状】** 本品为乳白色或淡黄色海绵状疏松团块或粉末，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】** 在酶联免疫吸附试验中，3 个系统的阳性对照  $P/N \geq 40$  ( $P \geq 2.00$ ,  $N \leq 0.050$ ) 为合格。

**【特异性检验】** 在酶联免疫吸附试验中，3 个系统之间相互交叉的  $P/N < 1.5$  (其中单孔的  $P/N < 3.0$ )，阴性对照的 OD 值  $\leq 0.05$  (单孔的 OD 值  $< 0.1$ ) 为合格。

**【作用与用途】** 用于诊断由 K88、K99、987P 菌株引起的仔猪大肠埃希氏菌病。

### 【用法与判定】

1 包被 将 40 孔 TC 型聚苯乙烯微量反应板用无水乙醇或 95% 酒精浸泡至少 4 小时，蒸馏水漂洗 3 次，37℃ 烘干。用碳酸盐缓冲液 (pH9.6, 0.05mol/L) 分别将豚鼠 K88、K99、987P 抗体作 100 倍稀释，按图设计，每孔加 0.1ml，37℃ 作用 1.5 小时后，置 2~8℃ 过夜。用洗液加满反应孔，室温漂洗 (不断晃动) 4 次，每次 3 分钟，洗完后晾干。

2 加样 每份样品 (用洗液稀释的仔猪直肠粪便) 加 1 列的 A、B、C 排各 1 孔，每孔 0.1ml。每块反应板检 10 份样品。D 排的 1、2、3 孔分别加 K88、K99、987P 阳性对照抗原 (用洗液作 10 倍稀释) 0.1ml，4~10 孔加洗液 0.1ml，37℃ 作用 30 分钟，按前述方法洗板。

3 加兔抗体 将兔抗 K88、K99、987P 抗体用洗液作 100 倍稀释，如图设计 (与豚鼠抗体对应)，每孔加 0.1ml，37℃ 作用 30 分钟。按前述方法洗板。

4 加酶结合物 用洗液将酶标羊抗兔 IgG (酶结合物) 作 200 倍稀释，加至反应板各孔 (D10 孔用洗液代替)，每孔 0.1ml，37℃ 作用 30 分钟，按前述方法洗板。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

— A 排孔检 K88 抗原、加 K88 抗体

— B 排孔检 K99 抗原、加 K99 抗体

— C 排孔检 987P 抗原、加 987P 抗体

D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

D 排孔作阳、阴性对照

1、4、5 孔加 K88 抗体                      2、6、7 孔加 K99 抗体  
3、8、9 孔加 987P 抗体                    10 孔空白（用于调零）

5 显色与终止 每孔加底物 0.1ml，室温暗盒显色 15 分钟。每孔用硫酸溶液（2mol/L）终止反应。

6 结果判定 终止后 5 分钟内用肉眼判定或用酶标读数仪测定。

6.1 肉眼判定 阳性对照孔应为黄褐色，阴性对照孔应无色。出现黄色至黄褐色反应的样品孔为阳性。如果某样品在板的 A 排孔中出现阳性，而在 B、C 排孔中为阴性，则该样品为 K88 阳性，其余类推。

6.2 酶标读数仪测定 在波长 490nm 处，用 D10 孔调零，测定各孔的 OD 值（P），各系统（如 K88 系统）阴性对照孔平均 OD 值为阴性值（N），计算 P/N。P/N≥4.8，为阳性；P/N<3，为阴性；P/N 在 3~4.7 之间，为可疑，重检一次，仍为可疑时判为阳性。

7 缓冲液配方

7.1 碳酸盐缓冲液 碳酸钠 0.19g，碳酸氢钠 0.25g，蒸馏水加至 100ml，2~8℃ 保存，14 日内用完。

7.2 洗液 磷酸氢二钠（2 个结晶水）1.44g，磷酸氢二钠（含 1 个结晶水）0.26g，氯化钠 8.5g，吐温-80 1ml，蒸馏水加至 1000ml。

7.3 底物 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液（0.1mol/L 柠檬酸溶液 24.3ml，0.2mol/L 磷酸氢二钠溶液 25.7ml，蒸馏水 50ml）10ml，邻苯二胺 4mg，完全溶解后加 30%过氧化氢 0.015ml，使用时新鲜配制。

【规格】 0.5ml/瓶

【贮藏与有效期】 在 2~8℃，有效期为 2 年。

附加说明：

1. 本标准由新疆农业科学院兽医研究所、中国兽医药品监察所提出。
2. 本标准于 1993 年 5 月 17 日 [1993] 农（牧）函字第 22 号批准。
3. 本标准于 2010 年 1 月经农业部公告第 1337 号重新发布。

## 大肠埃希氏菌 K88、K99、987P 定型血清

Dachangaixishijun K88, K99, 987P Dingxingxueqing

Escherichia Coli Serotyping Antisera against K88, K99 and 987P Antigens

本品系用大肠埃希氏菌（含 K88、K99、987P 抗原）标准菌株，接种适宜培养基通气培养，收获抗原表达良好的菌液，经离心、匀浆、盐析、纯化，得到 K88、K99、987P 纤毛抗原，分别免疫接种家兔和豚鼠，采血，分离血清，经冷冻真空干燥制成。用于大肠埃希氏菌病原菌检查及菌株的分型鉴定。

【性状】 本品为淡红色海绵状疏松团块，易与瓶壁脱离。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【效价测定】 用纯化抗原（1.5mg/ml）与本品进行琼脂扩散试验，血清效价 >1:64 为合格。

### 【特异性检验】

1 K88、K99、987P 3种菌，各用至少2株不同O、K型菌株及1株F41菌，分别与10倍稀释的血清进行玻板凝集试验。每种血清应只凝集具有同种纤毛的不同血清型菌株，而不凝集具有异种纤毛的菌株。

2 3种抗原菌株的菌液（浓度约 $5 \times 10^{10}$ 个菌/ml）经超声波处理后作抗原，血清做10倍稀释，按常规法进行免疫电泳，每种血清与相应抗原间应只出现单一沉淀线。

【作用与用途】 用于大肠埃希氏菌病原菌检查及菌株的分型鉴定。

### 【用法与判定】

#### 1 玻板凝集试验

1.1 应在20℃以上环境中进行。

1.2 试验前，将阳、阴性血清分别用含0.5%苯酚生理盐水5ml和2.5ml溶解，阳性对照抗原充分混匀。

1.3 用滴管吸取阳性抗原，垂直滴2滴于清洁玻璃板上，每滴约0.05ml；在2滴抗原中，分别加入等量（约0.05ml）阳性血清和阴性血清，随即搅拌均匀，并使散开至直径约2cm。在2分钟内，阳性血清出现“+++”（75%）以上凝集，阴性血清不出现凝集时，可进行正式试验。

1.4 用滴管吸取待检菌液（约 $10^{10}$ 个菌/ml），垂直滴3滴于清洁玻璃板上，每滴约0.05ml。菌液无自凝颗粒时，分别加入1滴K88、K99、987P阳性血清，随即搅拌均匀，并使散开至直径约2cm。

1.5 判定结果 阳性血清与菌液混合后，在2分钟内，发生不低于50%(++)絮状凝集，为阳性反应；不发生凝集，为阴性反应(-)；介于上述二者之间，为可疑反应(±)。

#### 2 琼脂扩散试验

2.1 用生理盐水配制1%琼脂凝胶，浇成3mm厚的胶板，按六角形打孔。孔径3mm，孔距4mm。

2.2 将冻干阳性血清用0.5%苯酚生理盐水溶解，并作4倍或8倍稀释，加满中央孔。

2.3 外周孔加满阳性对照抗原、苯酚生理盐水和待检样品。

2.4 置37℃湿盒24小时，判定结果。血清与阳性抗原之间应出现沉淀线；与苯酚盐水之间应不出现沉淀线。待检抗原与血清孔之间出现沉淀线为阳性；不出现沉淀线为阴性。

【规格】 0.5ml/瓶

【贮藏与有效期】 在-25℃以下，有效期为2年。

### 附加说明：

1. 本标准由新疆农业科学院兽医研究所、中国兽医药品监察所提出。
2. 本标准于1993年5月17日[1993]农（牧）函字第22号批准。
3. 本标准于2010年1月经农业部公告第1337号重新发布。

## 猪传染性胸膜肺炎酶联免疫吸附试验抗原与阴、阳性血清

Zhu Chuanranxingxiongmoifeiyan Meilianmianyixifushiyang Kangyuan Yu Yin, Yangxingxueqing Swine Hemophilus Pleuropneumoniae ELISA Antigen and Negative, Positive Sera

本抗原系用胸膜肺炎嗜血杆菌（HP）1~10型国际标准株，接种适宜培养基培养，收获培养物，经热处理、浓度标定等制成。用于诊断猪嗜血杆菌胸膜肺炎。

阳性血清系用胸膜肺炎嗜血杆菌培养物免疫接种猪，采血，分离血清制成。用于酶联免

疫吸附试验对照。

## 抗 原

**【性状】** 为无色澄明液体。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** 用 1/10 光吸收单位的 HP-ELISA 多价混合抗原与特定的标准阴、阳性血清进行 HP-ELISA 测定，P/N 值应为  $4.5 \pm 0.4$ 。

**【特异性检验】**

1 以 HP-ELISA 方法检测，对标准 HP 阳性猪血清、各型高免兔血清、人工接种猪血清，均应呈阳性反应。

2 对健康猪血清应呈阴性反应。

3 对猪瘟、猪喘气病、猪肺疫、猪流感、猪萎缩性鼻炎等阳性血清应无反应。

4 HP-ELISA 操作中，所有对照如抗原、血清、OPD、HRP-SPA，均应呈阴性反应，光吸收值应在 0.05 以下。

**【作用与用途】** 用于检测猪嗜血杆菌胸膜肺炎抗体的酶联免疫吸附试验。

**【用法与判定】** 按瓶签注明效价使用。以碳酸盐缓冲液 (pH9.6, 0.05mol/L) 将 1 个光吸收单位的 HP-ELISA 1~10 型多价混合抗原作 10 倍稀释后，加入到酶标板孔内进行包被，每孔 50 $\mu$ l，在 37 $^{\circ}$ C 作用 4 小时，再转入 2~8 $^{\circ}$ C 过夜 (18~20 小时)，取出，按照 HP-ELISA 操作程序，先后加入血清、HRP-SPA 结合物、底物，最后加硫酸溶液 (0.2mol/L) 终止反应，立即进行目测，再用酶联读数仪测定光吸收值并进行判定。

每份血清 1:200 稀释时，P/N 值  $\geq 4$ ，判为阳性；P/N  $\leq 3.5$ ，判为阴性； $3.5 < P/N < 4$ ，判为可疑。

**【注意事项】** 本抗原应为无色透明液体，如出现混浊或沉淀，应停止使用。

**【规格】** 1ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 在 2~8 $^{\circ}$ C，有效期为 5 个月；加等量中性甘油在 -30 $^{\circ}$ C 以下，有效期为 10 个月。

## 阳 性 血 清

**【性状】** 为橙黄或淡棕黄色液体。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** 按照 HP-ELISA 操作程序进行方阵滴定。1:200 稀释的血清与 1/10 光吸收单位的 1~10 型多价混合抗原反应，强阳性血清 P/N 值应  $> 10$ ，弱阳性血清 P/N 值应  $> 4$ 。

**【作用与用途】** 用于猪嗜血杆菌胸膜肺炎酶联免疫吸附试验对照。

**【规格】** 1ml/瓶

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

## 阴 性 血 清

**【性状】、【无菌检验】、【作用与用途】、【贮藏与有效期】** 同阳性血清。

**【效价测定】** 对猪嗜血杆菌胸膜肺炎酶联免疫吸附试验抗原应为阴性反应。

**【规格】** 0.5ml/瓶

**附加说明：**

1. 本标准由农业部动物检疫所提出。
2. 本标准于 1993 年 5 月 17 日 [1993] 农 (牧) 函字第 22 号批准。
3. 本标准于 2010 年 1 月经农业部公告第 1337 号重新发布。

## 蓝舌病酶联免疫吸附试验抗原与阳性血清

Lanshebing Meilianmianyixifushiyang Kangyuan Yu Yangxingxueqing  
Bluetongue ELISA Antigen and Positive Sera

本抗原系用蓝舌病病毒（BTV）国际标准毒株，接种 BHK-21 单层细胞培养，收获培养物，经冻融、裂解、氟里昂 113 提取，再经超速离心、解聚处理后制成。用于诊断蓝舌病。

阳性血清系用蓝舌病病毒国际标准毒株纯化的抗原，免疫接种健康牛、羊，采血，分离血清制成。用于酶联免疫吸附试验对照。

### 抗 原

**【性状】** 本品为淡乳白色、均匀一致、稍粘稠的液体，无絮状悬浮物或沉淀。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【特异性检验】** 用本抗原进行 ELISA 试验，每份血清的试验数应不少于 4 孔。标准弱阳性血清的  $A_{490}$  平均值应约为 0.3， $P/N$  应  $\geq 3.0$  或 2 次重复试验均  $\geq 2.5$ 。

**【效价测定】** 采用琼扩抗原平行试验法。将待检抗原从 1:25 作 2 倍系列稀释，每一稀释度包被 8 个孔，其中 4 孔与阳性血清反应，另 4 孔与阴性血清反应；在同一反应板上用 1:20 稀释的琼扩抗原包被 8 个孔，与上述阴阳性血清各反应 4 孔，进行 ELISA 测定，以琼扩抗原对阴、阳性血清反应值（ $A_{490}$ ）和  $P/N$  值为标准，找出与其相当（相差  $< 10\%$ ）的抗原稀释度。效价（或工作稀释度） $\geq 1:50$  为合格。

**【作用与用途】** 用于检测蓝舌病群特异性抗体的酶联免疫吸附试验。

**【用法与判定】** 见附注。

**【注意事项】** 抗原运输途中，温度应不高于  $10^{\circ}\text{C}$ 。

**【规格】** (1) 0.2ml/管 (2) 1.2ml 管

**【贮藏与有效期】** 在  $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ ，有效期为 6 个月。阳性血清

**【性状】** 为淡黄色澄明液体。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** 加甘油后按工作稀释度要求操作，ELISA  $P/N$  值应  $> 3.0$ 。

**【作用与用途】** 用于蓝舌病酶联免疫吸附试验对照。

**【用法与判定】** 见附注。

**【贮藏与有效期】** 在  $-70^{\circ}\text{C}$ ，有效期为 1 年；在  $2\sim 8^{\circ}\text{C}$  为 6 个月。

### 附注：

#### 1 操作程序

##### 1.1 HRP-SPA-ELISA 间接法

1.1.1 抗原包被 标化 BTV 单体抗原和正常 BHK 细胞（C）抗原均用包被液稀释到工作浓度。按表 1 或表 2 所示，两种抗原平行排列，同时包被，每孔加 50 $\mu\text{l}$ 。轻轻振摇，使抗原分布均匀，置  $37^{\circ}\text{C}$  2 小时后置  $2\sim 8^{\circ}\text{C}$  18 小时，备用。

1.1.2 覆盖（封闭）处理 甩干孔内包被液，每孔加入含 5% 新鲜鸡或犊牛血清的包被液 200 $\mu\text{l}$ ，置  $37^{\circ}\text{C}$  30 分钟，甩干后用冲洗液冲洗 2 次，甩干。

1.1.3 加被检血清 用稀释液将牛、绵羊、山羊血清作 1:50 稀释，每份血清加 4 个反应孔，每孔 50 $\mu\text{l}$ ，置  $37^{\circ}\text{C}$  30 分钟，甩干后用冲洗液冲洗 4 次，甩干。

1.1.4 加 HRP-SPA 用稀释液将 HRP-SPA 稀释到工作浓度，每孔加入 50 $\mu\text{l}$ ，置  $37^{\circ}\text{C}$  30 分钟，甩干，冲洗 4 次，甩干。

1.1.5 加底物 OPD 或 TMB 溶液 每孔加入底物溶液 100 $\mu\text{l}$ ，置  $37^{\circ}\text{C}$  5~7 分钟。以标准阳性血清显淡黄（OPD）或蓝绿色（TMB）作为参考。

1.1.6 加终止液 每孔加入硫酸液 (2mol/L) 50 $\mu$ l, 终止反应。

1.1.7 测定各孔光吸收值  $A_{490}$  用酶标仪以波长 490nm (使用底物 TMB 时, 波长为 450nm), 测定各孔光吸收值  $A_{490(450)}$ 。

## 1.2 HRP-二抗间接法

1.2.1、1.2.2、1.2.3 抗原包被、覆盖(封闭)处理、加被检血清 分别同程序 1.1.1、1.1.2、1.1.3。

1.2.4 加酶标抗抗体结合物(酶标二抗) 用稀释液将酶标二抗稀释到工作浓度, 每孔加入 50 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 置 30 分钟, 甩干后, 用冲洗液冲洗 4 次, 甩干。

1.2.5、1.2.6、1.2.7 分别同程序 1.1.5、1.1.6、1.1.7。

## 2 判定标准

计算检测结果时, 从 BTV 抗原孔测定值中减去正常细胞抗原 (C) 孔测定值, 得出“净”值后, 除以同板阴性血清“净”值得 S/N 值, 而 N 值可用特定阳性血清  $G A_{490}$  的 1/3 代替, 其计算式为:

$$S/N = \frac{(SB_1 + SB_2) - (SC_1 + SC_2)}{[(GB_1 + GB_2) - (GC_1 + GC_2)]/3} \text{ 或 } = \frac{\text{被检血清净值}}{\text{特定阳性血清净值}} \times 3$$

其中: S 为样品 Sample 或血清 Serum 的缩写。

N 为阴性 Negative 的缩写。

$S_{B_1、2}$  为某被检血清在 BTV 抗原孔 1、2 中的测定值。

$S_{C_1、2}$  为某被检血清在正常细胞对照抗原 (C) 孔中的测定值。

$G_{B_1、2}$  为特定阳性血清在 BTV 抗原孔 1、2 中的测定值。

$G_{C_1、2}$  为特定阳性血清在正常细胞对照抗原 (C) 孔中的测定值。

## 3 判定

3.1  $S/N \geq 3$  为阳性;  $\leq 2$  为阴性;  $> 2$  而  $< 3$  为可疑, 应重检, 重检后  $\geq 2.5$  为阳性,  $< 2.5$  为阴性。

3.2 待检血清 A 值  $\geq$  特定阳性血清的 A 值时, 为阳性 (+)。

待检血清 A 值  $\leq$  特定阳性血清 A 值的 80% 时, 为阴性 (-)。

待检血清 A 值介于 (+) ~ (-) 之间时, 为可疑 ( $\pm$ )。

3.3 目测判定 在无酶标检测仪和测定新鲜血清时可考虑采用目测判定。被检样品的反应颜色与特定标准阳性血清颜色相当或更强时为阳性。无色或弱于特定标准阳性血清时为阴性。判定时酶标反应板下衬以白色背景。判定中可能有感官的误差, 应由具有一定判定经验的人员进行判定。

## 4 ELISA 试液

4.1 包被液为碳酸盐缓冲液 (0.05mol/L, pH9.6) 或 Tris 缓冲液 (0.02mol/L, pH9.0)。

4.2 冲洗液为含氯化钠 (0.5mol/L) 及 0.5% 吐温-20 的磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.01mol/L, pH7.2~7.4)。

4.3 稀释液为含 5% 正常鸡或犊牛血清的冲洗液。

4.4 底物溶液

4.4.1 OPD 溶液 为含 0.04% 邻苯二胺 (OPD) 和 0.05% 过氧化氢的柠檬酸-磷酸盐缓冲液 (pH5.0)。

4.4.2 TMB 溶液 为 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺溶液。

4.5 终止液 为硫酸溶液 (2mol/L)。

**表 1 两种抗原在 96 孔板上的排列**

血清 抗原		×	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>7</sub>	S <sub>8</sub>	S <sub>9</sub>	S <sub>10</sub>	×
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
BHK(C)	A	×											×
BHK(C)	B	×											×
BTV	C	×											×
BTV	D	×											×
BTV	E	×										抗原	×
BTV	F	×										对照	×
BHK(C)	G	×											×
BHK(C)	H	×											×
抗原 血清		×	S <sub>11</sub>	S <sub>12</sub>	S <sub>13</sub>	S <sub>14</sub>	S <sub>15</sub>	S <sub>16</sub>	S <sub>17</sub>	S <sub>+</sub>	S <sub>-</sub>		×

**表 2 两种抗原在 40 孔板上的排列**

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BTV 抗原	A	×									×
	B	×									×
BHK 抗原	C	×									抗原对照
	D	×									
血清			S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>5</sub>	S <sub>6</sub>	S <sub>+</sub>	S <sub>-</sub>	

其中：

- ① S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>、S<sub>3</sub> 分别为被检血清，S<sub>+</sub>为阳性血清，S<sub>-</sub>为阴性血清。
- ② BTV 为蓝舌病抗原，C 为正常 BHK 细胞对照抗原。包被时，BTV 和 C 抗原平行排列，同时包被，A、B、G、H 排加 BHK，C、D、E、F 排加 BTV。每份血清加 4 孔（BTV 2 孔，C 抗原加 2 孔）。
- ③ 每板应设标准阳性血清（S<sub>+</sub>）、阴性血清（S<sub>-</sub>）及抗原对照。
- ④ ×为空白孔，不作正式试验用。

**附加说明：**

1. 本标准由农业部动物检疫所提出。
2. 本标准于 1993 年 5 月 17 日 [1993] 农（牧）函字第 22 号批准。
3. 本标准于 2010 年 1 月经农业部公告第 1337 号重新发布。

**牛传染性胸膜肺炎微量凝集试验抗原与阳性血清**

**Niu Chuanranxingxiongmo-feiyan Weiliangningjishiyuan Kangyuan Yu Yangxingxueqing  
Bovine Contagious Pleuropneumonia Micro-Agglutination Test Antigen and Positive Sera**

本抗原系用牛传染性胸膜肺炎丝状支原体丝状亚种菌株，接种含血清马丁肉汤培养，收获培养物，经离心浓缩并洗涤后，按一定浓度悬浮于苯酚生理盐水中制成。用于诊断牛传染性胸膜肺炎（牛肺疫）。

阳性血清系用丝状支原体 RF400 菌株的培养液为抗原免疫接种健康牛，采血，分离血

清，标化，经冷冻真空干燥制成。用于凝集试验对照。

### 抗 原

【性状】 本抗原为淡乳白色菌体混悬液，静置后出现沉淀。

【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】 将抗原和标准阳性血清用生理盐水稀释成 1:2、1:4、1:8……1:64 共 6 个稀释度，标准阴性血清稀释成 1:2、1:4、1:8。稀释后的血清置 56~58℃ 水浴 30 分钟后，分别用 25μl 移液器将各种稀释度的阳性血清和抗原按 25μl 量加至聚乙烯微量滴定板进行方阵滴定，同时设标准阴性血清及生理盐水对照。操作结束后轻轻振动滴定板，置室温暗处或 2~8℃，5~15 小时后判定结果。如 1:16 和 1:32 稀释的抗原与 1:8 稀释的阳性血清能出现 100% 和 50% 凝集，对照组不出现凝集，则抗原效价为 1:8，抗原效价合格。

抗原效价测定表

抗原	阳性血清						阴性血清			生理盐水
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:2	1:4	1:8	
1:2	#	#	#	—	—	—	—	—	—	—
1:4	#	#	#	++	—	—	—	—	—	—
1:8	#	#	#	++	—	—	—	—	—	—
1:16	#	#	#	++	—	—	—	—	—	—
1:32	++	++	++	++	—	—	—	—	—	—
1:64	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—

【特异性检验】 将抗原用生理盐水稀释成工作量抗原 (1:8)，分别与 1:2、1:4、1:8 稀释的阴性血清进行微量凝集试验，各稀释度均应不出现凝集。

【作用与用途】 用于诊断牛肺疫的微量凝集试验。

【用法与判定】 1 用法 按已知效价，将抗原用生理盐水稀释成工作量抗原，标准阴、阳性血清及被检血清分别用生理盐水稀释成 1:5。血清在 56~58℃ 水浴 30 分钟，用 25μl 微量移液器吸取血清滴 1 滴于微量滴定板的 1 个孔内，然后再滴 1 滴工作量抗原于同一孔内，即每份被检血清用 1 个孔。同时每板设一组阴、阳性血清和生理盐水对照。操作结束时轻轻振动滴定板，使充分混合。然后置室温暗处或 2~8℃，5~20 小时后取出，轻轻振动滴定板，静置约 10 分钟后判定结果。

2 判定 判定时用 8w 日光灯照明，手持反应板，借助侧光在黑色背景上判定或用凝集反应箱观察。

判定标准 “#”、“+++”、“++”为阳性反应；“+”或“-”为阴性反应。

反应符号 “#”为 100%凝集，“+++”为 75%凝集，“++”为 50%凝集，“+”为 25%凝集，“-”为不凝集。

【注意事项】 (1) 每次试验前应将抗原充分摇匀，经肉眼观察，应不出现颗粒、凝块。

(2) 冻结过的抗原不能使用。

(3) 被检血清经肉眼观察，不应有沉淀、絮状物，否则需经离心处理后取上清。

【规格】 1.8ml (500 头份) /瓶

【贮藏与有效期】 在 2~8℃，有效期为 2 年。期满后测定效价，如合格，可继续使用。

### 阳性血清

【性状】 为淡黄色疏松团块，加稀释液后迅速溶解。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【效价测定】** 用参照抗原按抗原（效价测定）项进行方阵滴定。测定结果应符合抗原效价测定标准。

**【作用与用途】** 用于抗原效价测定和牛肺疫微量凝集试验对照。

**【规格】** 0.1ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 在 2~8℃，有效期为 3 年。

**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 1993 年 5 月 17 日 [1993] 农（牧）函字第 22 号批准。
3. 本标准于 2010 年 1 月经农业部公告第 1337 号重新发布。

## 猪瘟单克隆抗体纯化酶联免疫吸附试验抗原

Zhuwen Dankelongkangti Chunhuameilianmianyixifushiyuan Kangyuan

Swine Fever ELISA Antigen Purified with McAb

本抗原系分别用猪瘟病毒兔化弱毒株和猪瘟病毒强毒株，分别接种细胞培养，收获培养物，通过亲和层析法，利用猪瘟病毒兔化弱毒株特异性单克隆抗体和猪瘟病毒强毒株特异性单克隆抗体纯化制成。用于检测猪瘟兔化弱毒疫苗免疫抗体和猪瘟病毒强毒抗体。

**【性状】** 本抗原为微乳白色、无异物的透明液体。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

**【安全检验】** 用免疫荧光抗体试验法检查猪瘟强毒及猪瘟弱毒单抗纯化酶联抗原，应为阴性，而同批未经超声波裂解及亲和层析法提纯的病毒应为阳性。

**【蛋白质含量测定】** 以分光光度计测定抗原在 280nm 波长时的光吸收值(OD)，并计算其蛋白质含量。弱毒抗原含量应 $\geq 1.88\text{mg/ml}$ ，强毒抗原含量应 $\geq 1.38\text{mg/ml}$ 。

**【特异性检验】** 用猪瘟弱毒、强毒单抗纯化酶联抗原分别作为抗原，标准抗猪瘟弱毒猪血清、强毒猪血清、强弱毒混合猪血清和阴性猪血清作为第一抗体，兔抗猪 IgG 过氧化物酶结合物作为第二抗体，以间接 ELISA 方法进行试验。猪瘟弱毒单抗纯化酶联抗原应只识别弱毒血清，强毒单抗纯化酶联抗原应只识别强毒血清，两种抗原均应能识别混合血清中各自相应的抗体，两种抗原均应不能识别猪瘟阴性血清。

**【作用与用途】** 用于检测猪瘟兔化弱毒疫苗免疫抗体和猪瘟病毒强毒抗体的酶联免疫吸附试验。

**【用法与判定】** 1 用法

1.1 用包被液将猪瘟弱毒、强毒单抗纯化酶联抗原分别作 100 倍稀释，以 100 $\mu\text{l}$  分别加到做好标记的酶联板各孔中，置湿盒于 2~8℃ 过夜。

1.2 倒去孔内液体，用洗涤液洗板 3 次，每次间隔 3~5 分钟，拍干。

1.3 用稀释液将待检血清作 400 倍稀释后，每孔加入 100 $\mu\text{l}$ 。同时，将猪瘟阳性、阴性血清以 100 倍稀释作对照，置 37℃ 1.5~2 小时。

1.4 重复 1.2。

1.5 用稀释液将兔抗猪 IgG-辣根过氧化物酶结合物作 100 倍稀释，每孔加入 100 $\mu\text{l}$ ，置 37℃ 1.5~2 小时。

1.6 重复 1.2。

1.7 每孔加入底物溶液(邻苯二胺 5mg+底物缓冲液 5ml+30%过氧化氢 18.75 $\mu$ l) 100 $\mu$ l, 室温中约 10~30 分钟后, 观察显色反应。

1.8 每孔加入终止液 50 $\mu$ l, 于酶联读数仪上测定在 490nm 波长处的光密度(OD)。

## 2 判定

在弱毒酶联板上: OD $\geq$ 0.2, 为猪瘟弱毒抗体阳性; OD $<$ 0.2, 为猪瘟弱毒抗体阴性。

在强毒酶联板上: OD $\geq$ 0.5, 为猪瘟强毒抗体阳性; OD $<$ 0.5, 为猪瘟强毒抗体阴性。

在弱毒与强毒酶联板上, 阳性对照血清应为阳性; 阴性对照血清应为阴性。

**【规格】** 100 头份/盒

**【贮藏与有效期】** 在-15 $^{\circ}$ C, 有效期为 1 年; 在 2~8 $^{\circ}$ C 为 6 个月。

### 附加说明:

1. 本标准由中国兽医药品监察所提出。
2. 本标准于 1994 年 3 月 22 日农牧函(1994)第 6 号批准。
3. 本标准于 2010 年 1 月经农业部公告第 1337 号重新发布。
4. 按现行《中国兽药典》要求增加【无菌检验】项。

## 猪旋毛虫病皮试变应原

Zhu Xuanmaochong Pishibianyingyuan

Swine Trichinella Spiralis Intradermal Allergen

本品系用从旋毛虫组织中提取的酸溶性蛋白抗原制成。用于诊断猪旋毛虫病。

**【性状】** 本品为无色澄明液体。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无菌生长。

**【安全检验】** 取体重 300g 左右的豚鼠 2 只, 腹腔注射旋毛虫皮试变应原各 1ml, 观察 10 日, 应全部健活。

**【敏感性和特异性检验】** 用人工感染旋毛虫的阳性兔和阴性对照兔各 2 只, 于试验前 1 日在背部直径约 3~4mm 大小的区域去毛, 然后用含量为 3.0 $\mu$ g/ml 的变应原 0.1ml, 对每只兔作皮内试验。2 只阳性兔应呈明显阳性反应, 阴性兔应呈阴性反应。

**【作用与用途】** 用于诊断猪旋毛虫病的皮内变态反应。

### 【用法与判定】

1 用法 取本品 0.2ml, 对白皮肤的被检猪作耳后颈部皮内注射, 注射正确时会在注射部位形成一个豆粒大小的水泡, 然后观察皮肤反应。

2 判定 于注射后 10~20 分钟内判定结果。注射局部的水泡变红、变暗, 形成直径 1cm 以上的暗紫红色斑点, 并保持 30 分钟以上为阳性反应。注射局部的水泡无变化, 在 10 分钟左右消失, 或仅出现淡红色斑点, 但在 30 分钟内消失为阴性反应。

**【注意事项】** 本品适用于白毛白皮肤猪。但对黑白花杂种猪或棕毛猪, 也可选择白皮肤或淡色皮肤部位进行皮内试验。注射前应剪毛消毒, 拭净注射部位。

**【规格】** (1) 0.5ml/瓶 (2) 2ml/瓶

【贮藏与有效期】 在2~8℃，有效期为1年；在室温下为3个月。

**附加说明：**

1. 本标准由河南农业大学提出。
2. 本标准于1994年3月22日农牧函（1994）第6号批准。
3. 本标准于2010年1月经农业部公告第1337号重新发布。

## 家兔支气管败血博代氏菌感染琼脂扩散试验抗原与阴、阳性血清

Jiutu Zhiqiguanbaixuebodaishijunganran Qiongzhuikuosanshiyan Kangyuan Yu Yin,  
Yangxingxueqing

Rabbit Bordetella Bronchiseptica Agar Gel Precipitation Antigen and Negative, Positive Sera

本抗原系用家兔博代氏菌 I 相菌株，接种适宜培养基培养，收获培养物，经甲醛溶液灭活后，离心浓缩制成。用于诊断家兔支气管败血博代氏菌病。

阳性血清系用灭活抗原免疫接种兔，采血，分离血清制成。阴性血清系用健康家兔采血，分离血清制成。用于琼脂扩散试验对照。

### 抗 原

【性状】 本品为乳白色混悬液。

【无菌检验】 制成的抗原用普通琼脂斜面、绵羊血鲍姜氏琼脂斜面、蛋白胨琼脂平板和肉汤进行检验，应无菌生长。

【效价测定】 将沉淀抗体滴度为8的抗血清，按10%的比例加入到1%琼脂糖 Tris 缓冲液中（加血清时温度应控制在50~60℃），混合均匀，倒入平皿中或载玻片上，制成反应板，厚度为2-3mm。用模具打孔，孔径4mm。向反应孔中加入被检抗原20μl。将辐射琼脂扩散试验板置室温湿盒中24~72小时，观察判定结果。出现10±1mm明显沉淀环为合格。

【特异性检验】 将抗原分别与10份标准阴、阳性血清进行琼脂双扩散试验。抗原孔与阳性血清孔间出现明显沉淀线，与标准阴性血清间不出现沉淀线，为合格。

【作用与用途】 用于检测家兔支气管败血博代氏菌抗体的琼脂扩散试验。

【用法与判定】 1 琼脂板的制备

1.1 取0.7~1.0g琼脂糖放入含有0.01%硫柳汞的0.01mol/L pH8.6 Tris 缓冲液(氯化钠5.84g, 三羟甲基氨基甲烷1.21g, 乙二胺四乙酸0.29g, 加蒸馏水至1000ml)100ml中, 在热水浴中彻底融化并混匀。

1.2 将直径约90mm的平板放在水平台上, 每板倒入经加热融化的琼脂糖 Tris 液15ml, 厚度为2~3mm。注意不要产生气泡。凝固后加盖, 将平板倒置, 放2~8℃备用。

2 打孔与加样 中央孔径为4mm, 周围6孔的孔径为3mm, 孔距为4mm。中央孔加抗原, 周围孔加被检血清。将扩散板置湿盒中, 放室温进行反应, 逐日观察记录结果, 3日后最后判定。

3 判定 抗原孔与被检血清孔之间形成一条致密的沉淀线及其末端向毗邻的被检血清之抗原孔方向偏弯时, 均判为阳性。

【规格】 (1) 2ml/瓶 (2) 3ml/瓶

【贮藏与有效期】 在-15℃以下，有效期为3年；在2~8℃为1个月。

#### 阳性血清

【性状】 本品为淡黄色透明液体，无沉淀。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【效价测定】 用琼脂扩散试验测定抗体滴度。应≥1:8。

【规格】 2ml/瓶

【贮藏与有效期】 在-15℃以下，有效期为3年；在2~8℃为14日。

#### 阴性血清

【性状】 本品为淡黄色透明液体，无沉淀。

【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】 对家兔支气管败血博代氏菌病琼脂扩散试验抗原应为阴性反应。

【规格】 (1) 1ml/瓶 (2) 2ml/瓶

【贮藏与有效期】 在-15℃以下，有效期为3年。

#### 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1994年3月22日农牧函(1994)第6号批准。
3. 本标准于2010年1月经农业部公告第1337号重新发布。

## 牛无浆体病快速凝集试验抗原和阴、阳性血清

### Niu Wujiangtibing Kuaisuningjishiyan Kangyuan Yu Yin, Yangxingxueqing

### Bovine Anaplasmosis Rapid Agglutination Test Antigen and Negative, Positive Sera

本抗原系用牛边缘无浆体经牛体快速继代培养，收获高感染率牛的红细胞，经离心洗涤、低溶溶解、超声处理、加固绿染色后制成。用于诊断牛无浆体病。

阳性血清系用牛边缘无浆体为抗原，免疫接种健康牛，采血，分离血清，加防腐剂制成。用于快速凝集试验阳性对照。

阴性血清系从健康牛采集制成。除用于快速凝集试验阴性对照外，还用作阴性协同血清，在快速凝集试验中具有协同凝集作用。

#### 抗 原

【性状】 本品为浅绿色混悬液。静置后分层，上层为清亮浅绿色液体，下层为微带绿色的白色沉淀。有醋酸挥发味。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【特异性检验】 用标准弱阳性血清(+)2份、强阳性血清(++)1份、阴性血清2份和PBS(pH7.2)1份，分别与抗原作快速凝集试验。与弱阳性血清产生(+)凝集、与强阳性血清产生(++)凝集、与阴性血清无任何凝集(-)、在PBS(pH7.2)中无自凝为合格。

【作用与用途】 用于诊断牛无浆体病的快速凝集试验。

**【用法与判定】** 1 试验前,将抗原和弱阳性对照血清(+)、强阳性对照血清(++)、阴性对照血清(-)、阴性协同血清、被检血清置20~28℃约20~30分钟。

2 在划有直径为18mm油漆圈的洁净玻璃板上,依次将阴性协同血清10μl、抗原5μl和被检血清10μl加在同一圈内。每板的左上方设阳性对照血清(+和++两种)、阴性对照血清共3个对照。3种反应物互不接触,分别将各圈内反应物混匀并摊成直径约12mm的液面。

3 在20~28℃作用5~8分钟,26℃恒温作用6分钟,用手晃动玻璃板进行反应,在微量振荡器上加盖振荡,反应效果更佳。当弱阳性对照血清(+)出现特征性凝集反应时,立即在有深色背景的光源前判读试验结果。

4 凝集强度判定标准:

+++ 强阳性反应。抗原凝集呈絮片或团块状,液体清亮(即75%以上颗粒抗原凝集)。

++ 强阳性反应。抗原凝集呈较大颗粒,液体中等混浊(即约50%颗粒抗原凝集)。

+ 弱阳性反应。抗原凝集呈针头状颗粒,积聚于液面边缘或散在,液体混浊(即颗粒抗原出现可分辨的特征性凝集)。

- 阴性反应。液体完全混浊,无任何凝集颗粒。

凡出现可分辨特征性凝集的反应,均判为阳性结果。

**【注意事项】** (1) 抗原不能冻结。

(2) 避免抗原的保存温度频繁变化和受到抗原污染。

(3) 使用时按需要量吸取抗原,剩余的抗原限7日内用完。

**【规格】** 1ml/支

**【贮藏与有效期】** 在2~8℃,有效期为3年。

### 阳性血清

**【性状】** 为橙黄色透明液体。

**【无菌放验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验,应无菌生长。

**【特异性检验】** 按抗原【特异性检验】项进行,应符合规定。

**【作用与用途】** 用于抗原鉴定和牛无浆体病快速凝集试验对照。

**【规格】** 1ml/支

**【贮藏与有效期】** 在-20℃以下,有效期为2年。期满后重检,如符合要求,可继续使用6个月。

### 阴性血清

**【性状】** 为橙黄色透明液体。

**【无菌检验】** 按现行《中国兽药典》附录进行检验,应无菌生长。

**【效价测定】** 1 阴性协同血清在保存前和使用时测定。应能使弱阳性血清(+)和抗原的快速凝集试验呈弱阳性反应(+),使强阳性血清(++)和抗原的快速凝集试验呈强阳性反应(++)。2 倍量阴性协同血清不能与抗原发生任何凝集反应。

2 阴性对照血清与抗原和阴性协同血清进行快速凝集试验,应为阴性反应。

**【作用与用途】** 用于牛无浆体病快速凝集试验对照。

**【规格】** 1ml/支

**【贮藏与有效期】** 在-20℃以下,有效期为2年。

#### 附加说明：

1. 本标准由农业部动物检疫所提出。
2. 本标准于 1994 年 11 月 7 日农牧发（1994）37 号批准。
3. 本标准于 2010 年 1 月经农业部公告第 1337 号重新发布。

## 鸡滑液支原体血清平板凝集试验抗原与阳性血清

### Ji Huayezhiyuanti Xueqingpingbanningjishiyan Kangyuan Yu Yangxingxueqing Mycoplasma Synoviae Sera Plate Agglutination Test Antigen and Negative, Positive Sera

本抗原系用抗原性良好的滑液支原体菌株，接种适宜培养基培养，收获培养物，经浓缩、洗涤、裂解、着色后，用参考血清标化制成。用于诊断鸡滑液支原体感染。

阳性血清系用滑液支原体免疫接种健康成年鸡，采血，分离血清，加适当防腐剂制成。用于血清平板凝集试验对照。

#### 抗 原

**【性状】** 本品为红色均匀混悬液。久置后，菌体下沉，上部澄清，振摇后，又恢复混悬状态，应不出现凝集块。将抗原滴在检测板上，应为均质，无肉眼可见凝集颗粒，无自凝现象。

**【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】** 取参考血清 0.025ml 与等量抗原混合作平板凝集试验，摇动反应板，在 2 分钟终了时，应出现阳性反应。

**【非特异性检验】** 取阴性血清与抗原作血清平板凝集试验，应不出现凝集。

**【作用与用途】** 用于诊断鸡滑液支原体感染的血清平板凝集试验。

**【用法与用量】** 用 7 号针头在洁净检测板上滴加抗原 2 滴（约 0.025ml），然后滴加等量被检血清，充分混合，涂成直径约 2cm 大小的液面，摇动检测板，在 2 分钟终了时判定结果。出现明显凝集颗粒或凝集块，为阳性；不出现凝集，为阴性；介于二者之间，为可疑。

**【注意事项】** （1）试验必须在 22℃ 以上条件下进行。使用前 1 小时将抗原从冰箱取出，使其温度在试验时接近室温。

（2）抗原使用前必须摇匀，用无菌方法吸出抗原，剩余的抗原应立即放回 2~8℃ 冷暗处保存。血清应无污染，抗原和待检血清不能冻结。

**【规格】** （1）2ml/瓶 （2）5ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 在 2~8℃，有效期为 3 年。

#### 阳 性 血 清

**【性状】** 为橙黄色或略带橙红色液体。久置后，有少量沉淀。

**【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】** 取 0.025ml 血清与等量抗原进行血清平板凝集试验，于 2 分钟内出现明显凝集，为合格。

**【作用与用途】** 用于鸡滑液支原体血清平板凝集试验抗原效价测定和滑液支原体血清平板凝集试验对照。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 冻干血清在-30℃以下，有效期为10年。

**附加说明：**

1. 本标准由中国兽医药品监察所提出。
2. 本标准于1995年10月20日农牧函（1995）第27号批准。
3. 本标准于2010年1月经农业部公告第1337号重新发布。

## 牛副结核酶联免疫吸附试验抗原与阳性血清

### Niu Fujiehe Meilianmianyixifushiyang Kangyuan Yu Yangxingxueqing Bovine Paratuberculosis ELISA Antigen and Positive Sera

本抗原系用抗原性良好的副结核菌株，接种适宜培养基培养，收获菌体，经超声波粉碎、离心、过 Sephadex G200 凝胶柱，取第一蛋白峰再经亲和层析后，经冷冻真空干燥制成。用于诊断牛副结核。

阳性血清系用自然感染的副结核病牛，采血，分离血清制成。用于抗原效价测定和酶联免疫吸附试验对照。

#### 抗 原

【性状】 本品为白色海绵状疏松团块，加稀释液后迅速溶解。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【效价测定】 以50μg/ml 抗原包被，用副结核阳性血清进行 ELISA 试验，OD<sub>490nm</sub> 应 ≥0.50。

【特异性检验】 以副结核阴性血清进行 ELISA 试验，OD<sub>490nm</sub> 应 <0.23。

【作用与用途】 用于诊断牛副结核的酶联免疫吸附试验。

【用法与判定】 按副结核 ELISA 试验方法，被检血清经草分枝杆菌吸收抗原吸收后，进行1:100 稀释，判定标准如下：

目测法：与标准阳性血清呈一致的棕黄色判为阳性。

酶标仪测定法（490nm）：OD ≥0.50 判为阳性；OD <0.50 判为阴性。

【规格】 （1）0.25 mg/瓶 （2）0.5mg/瓶

【贮藏与有效期】 在2~8℃，有效期为2年。期满后，如效价不低于原效价，可继续使用。

#### 草分枝杆菌吸收抗原

【性状】 为黄色疏松团块，加稀释液后，呈均匀混浊液，放置后有沉淀，用时摇匀即可。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【吸收特性】 取0.1ml 草分枝杆菌吸收抗原与等量兔抗草分枝杆菌抗体（试管凝集价为1:1600）混合，进行草分枝杆菌抗体 ELISA 检测，其 OD 值应 <0.50。

【作用与用途】 用于牛副结核酶联免疫吸附试验中待检血清的非特异性吸收。

【规格】 (1) 0.1g/瓶 (2) 0.2g/瓶

【贮藏与有效期】 在2~8℃, 有效期为2年。

#### 酶标兔抗牛抗体

【性状】 为白色疏松团块, 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。

【效价测定】 以牛 IgG 包被, 将兔抗牛酶标抗体做 1:100、1:200……1:12800 稀释, 进行 ELISA 测定, 以  $OD_{490nm}=1.0$  相对应的稀释度为该酶标抗体的效价。酶标抗体效价应  $\geq 1:800$ 。

【作用与用途】 用于牛副结核酶联免疫吸附试验。

【注意事项】 每次测定前, 先用标准阳性血清测定酶标抗体效价, 如偏低, 可适当降低其稀释倍数, 使标准阳性血清 OD 值达到可校正范围之内。如酶标抗体效价  $< 1:100$ , 则不能使用。

【规格】 (1) 0.1 ml/瓶 (2) 0.2ml/瓶

【贮藏与有效期】 在2~8℃, 有效期为2年。

#### 阳性血清

【性状】 为浅黄色疏松团块, 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。

【效价测定】 经草分枝杆菌吸收抗原吸收后进行 ELISA,  $OD_{490nm} \geq 0.50$  为合格。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 在2~8℃, 有效期为2年。期满后测定效价, 如  $OD_{490nm} \geq 0.50$ , 可继续使用。

#### 附加说明:

1. 本标准由吉林农业大学提出。
2. 本标准于1998年3月2日农牧函(1998)第1号批准。
3. 本标准于2010年1月经农业部公告第1337号重新发布。

### 狐阴道加德纳氏菌病虎红平板凝集试验抗原

Hu Yindaojiadenashijunbing Huhongpingbanningjishiyan Kangyuan

Fog Gardnerella Vaginalis Disease Rose-Bengal Plate Agglutination Test Antigen

本品系用抗原性良好的狐阴道加德纳氏菌株, 接种适宜培养基培养, 将培养物加热灭活, 离心沉淀后, 用虎红染色, 悬浮于缓冲液中制成。用于诊断狐阴道加德纳氏菌病。

【性状】 本品为玫瑰红色均匀混悬液, 静置后, 菌体下沉, 上清呈微红色。

【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】 将抗原与最终稀释度为 1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000 的标准阳性血清进行平板凝集试验, 反应结果应分别为“++++”、“+++”、“++”、“+”、“-”; 与阴性血清反应结果应为“-”。

**【特异性检验】** 取待检抗原和标准抗原（或前批合格抗原）分别与 5~10 份阴性血清及生理盐水作平板凝集试验，应无任何凝集现象。

**【作用与用途】** 用于诊断狐阴道加德纳氏菌病的虎红平板凝集试验。

**【用法与判定】** 取被检血清 30 $\mu$ l 与抗原 30 $\mu$ l 等量混匀，于 3 分钟内判定结果。“++”以上判为阳性；“+”为可疑，重复 2 次，仍为“+”判为阳性；“-”为阴性。

反应强度判定标准：

++++ 100%凝集，凝集快，颗粒大，液体完全透明。

++++ 75%凝集，凝集较快，液体半透明。

++ 50%凝集，颗粒状，液体相对混浊。

+ 25%凝集，液体混浊。

- 无凝集，液体均匀混浊。

**【注意事项】** （1）抗原使用前要充分摇匀。

（2）抗原贮藏过程中应避免冻结和温度过高。

（3）抗原中出现摇不散的絮状凝集块时，应予废弃。

**【规格】** （1）5ml/瓶 （2）10ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 在 2~8 $^{\circ}$ C，有效期为 1 年。

**附加说明：**

1. 本标准由中国农业科学院特产研究所提出。
2. 本标准于 1998 年 11 月 2 日农牧函（1998）第 35 号批准。
3. 本标准于 2010 年 1 月经农业部公告第 1337 号重新发布。

## 日本血吸虫病单克隆抗体斑点酶联免疫吸附试验试剂盒

**Ribenuexichongbing Dankelongkangti Bandianmeilianmianyixifushiyuan Shijihe**  
**Schistosoma Japonica McAb-based ELISA Diagnostic Kit**

本品系用抗日本血吸虫单克隆抗体经过氧化物酶标记后，与 A、B、C 3 种试剂、显色物、封闭剂、硝酸纤维素膜（N.C 膜）、玻璃毛细管和阴、阳性参考抗原组装制成。用于诊断家畜日本血吸虫病。

**【性状】** 应密封好、组份齐全、无破损、无渗漏、无污染。其中：酶标单抗为蓬松的淡棕色片状或块状物；阳性参考抗原为淡红色或微黄色蓬松干粉；阴性参考抗原为淡红色蓬松干粉；玻璃毛细管应清洁无破损，长度整齐，粗细均匀。装有封闭剂的离心管应密封完好，无结块、无霉变；装有试剂 A 的袋应无漏气和吸潮现象；装有试剂 B 的离心管应密封完好，内容物为琥珀色油状液体，无浑浊现象；装有试剂 C 的管应不产生气泡和渗漏。

从装有 N.C 膜的袋中随机抽 2 张，用玻璃毛细管蘸取 PBS 后，轻轻点在 N.C 膜的小方格中，水化直径应小于 3mm。

将显色物溶于 20ml PBS 中，加 8 $\mu$ l 过氧化氢（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>），配成底物溶液，将点有辣根过氧化物酶的 N.C 膜浸入，应产生棕色斑点。

将封闭剂加入到 20ml PBS 中，应能均匀分散。

**【无菌检验】** 将盒中的酶标单抗用灭菌 PBS 溶解，加入液体培养基（RPMI 1640 培养基，内含 10% 雏鸡血清）中，置培养箱中培养 7 日。应无菌生长。

**【效价测定】** 1 酶标单抗的效价测定 将酶标单抗作 2 倍系列稀释，进行 McAb-Dot-ELISA，测定其工作浓度，应 $\geq 1:800$ 。

2 阳性参考抗原的效价测定 将阳性参考抗原用 10 $\mu$ l PBS 溶解，作 2 倍系列稀释后进行 McAb-Dot-ELISA，以阳性参考抗原稀释度 $\geq 1:128$  能产生显色反应为合格。

**【特异性检验】** 将 20 头（只）健康牛、羊、兔血清和实验感染日本血吸虫的牛、羊、兔血清分别等量混合，各取 5 份分别作 1:10 稀释，进行 McAb-Dot-ELISA。健康牛、羊、兔血清均应呈阴性反应，实验感染牛、羊、兔血清均应呈阳性反应。

**【非特异性检验】** 选用锥虫病牛血清、棘球蚴和绦虫病羊血清，同时设实验感染血吸虫病牛、羊血清对照和健康牛、羊血清对照，进行 McAb-Dot-ELISA。非血吸虫病被检血清应呈阴性反应；血吸虫病牛、羊血清应呈阳性反应。

**【作用与用途】** 用于检测家畜血清中日本血吸虫循环抗原的斑点酶联免疫吸附试验。

**【用法与用量】** 在使用本试剂盒时，按下列方法配制试剂后，即可进行实验操作。

A 液的配制 取试剂 A 1 袋溶于 400ml 生理盐水中。

B 液的配制 取试剂 B 1 管加至 350ml A 液中。

C 液的配制 取显色物 1 包加至 20ml A 液中，避光温育，临用时加入试剂 C 1 管。

D 液的配制 取封闭剂 1 管溶于 20ml B 液中。

E 液的配制 临用前，取酶标单抗 1 支加至 10ml B 液中。

操作步骤：

- 1 阴、阳性参考抗原和被检血清分别用 A 液作 1:10 稀释。
- 2 用玻璃毛细管吸取稀释过的血清点样于 N.C 膜上，60 $^{\circ}$ C 烘干 1 小时。
- 3 用 D 液封闭 30 分钟后，用 B 液洗 3 次，每次 5 分钟。
- 4 用 E 液作用 2 小时后，用 B 液洗 3 次，每次 5 分钟。
- 5 用 C 液避光作用 10~15 分钟。
- 6 取出 N.C 膜，用自来水冲洗，阴干后判定结果。

判定：对照成立时，有棕色斑点，判为阳性；无色，判为阴性。

**【注意事项】** 试剂盒一旦启封，必须一次性用完。应避光保存，防止潮湿。

**【规格】** 100 头份/盒

**【贮藏与有效期】** 在 2~8 $^{\circ}$ C，有效期为 1 年 6 个月。

附加说明：

1. 本标准由中国农业科学院上海家禽寄生虫病研究所提出。
2. 本标准于 2000 年 8 月 3 日农牧发 [2000] 12 号批准。
3. 本标准于 2010 年 1 月经农业部公告第 1337 号重新发布。

# 雏番鸭细小病毒病胶乳凝集和凝集抑制试验抗原、单抗致敏胶乳与阴、阳性血清

Chufanya Xixiaobingdubing Jiaoruningji He Ningjiyizhishiyan Kangyuan,

Dankangzhiminjiaoru Yu Yin, Yangxingxueqing

## Muscovy Duckling Parvovirus Latex Agglutination and Latex Agglutination Inhibition Test Antigen, Monoclonal Antibody Sensitized Latex and Negative, Positive Sera

本抗原系用番鸭细小病毒接种番鸭胚培养，收获感染胚液，经甲醛灭活制成。用于检测番鸭细小病毒抗体。

单抗致敏胶乳系用番鸭细小病毒特异性单克隆抗体致敏聚苯乙烯胶乳制成。用于检测雏番鸭细小病毒病抗原。

阳性血清系用番鸭细小病毒经甲醛灭活加油佐剂乳化后制成抗原，免疫接种健康家兔，采血，分离血清制成。阴性血清系用健康家兔采血，分离血清制成。用于胶乳凝集抑制试验对照。

### 抗 原

【性状】 本品为淡乳白色透明液体，滴于洁净玻璃板上，应不出现自凝现象。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【灭活检验】 每批次任取1瓶，尿囊腔接种13日龄番鸭胚4只，每只0.1ml，37℃培养，观察10日。应全部健活。

【效价测定】 按附注1进行，LA效价应 $\geq 1:16$ 。

【特异性检验】 分别与MPV阳性血清、抗MPV单克隆抗体和阴性血清等量混合，按附注2进行胶乳凝集抑制试验。抗原与致敏胶乳的凝集反应应能被MPV阳性血清和抗MPV单克隆抗体抑制，而不被阴性血清抑制。

【作用与用途】 用于雏番鸭细小病毒胶乳凝集和胶乳凝集抑制试验。

【规格】 2ml/瓶

【贮藏与有效期】 在2~8℃，有效期为6个月。

### 单抗致敏胶乳

【性状】 为乳白色悬浮液。滴在洁净玻璃板上，应不出现自凝现象。

【活性检验】 抗原对致敏胶乳的凝集价应 $\geq 1:16$ 。

【特异性检验】 1 与小鹅瘟病毒、鸭肝炎病毒和鸭瘟病毒均应不发生凝集反应。

2 与MPV的凝集反应应能被MPV抗血清和致敏用单抗抑制。

【作用与用途】 用于检测雏番鸭细小病毒抗原的胶乳凝集试验和检测抗体的胶乳凝集抑制试验。

【用法与判定】 1 检测雏番鸭细小病毒抗原 取濒死病鸭肝、脾、心和肾等组织，用稀释液研磨成1:1匀浆，加入等体积氯仿，振荡3~5分钟，以5000r/min离心5分钟，取水相，即为待检标本。

操作方法与结果判定，见附注1。

2 检测雏番鸭细小病毒抗体 按常规方法采血，分离血清，-20℃保存备用。

操作方法与结果判定，见附注 2。

**【注意事项】** (1) 室温若超过 28℃，其反应需加盖，以防水份过快蒸发，造成干枯。

(2) 用时轻轻摇动，应为均匀悬浮液，如有凝集块出现，不宜使用。

(3) 致敏胶乳冻结后不能使用。

**【规格】** 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 在 2~8℃，有效期为 5 个月。

#### 阳性血清

**【性状】** 为淡黄色透明液体。

**【无菌检验】** 按《中国兽药典》现行版进行，应无菌生长

**【效价测定】** 按附注 2 进行，LAI 效价应为 1:256。

**【规格】** 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 在-20℃，有效期为 1 年；在 2~8℃为 4 个月。

#### 阴性血清

**【性状】** 为淡黄色透明液体。

**【无菌检验】** 按《中国兽药典》现行版进行，应无菌生长

**【效价测定】** 按附注 2 进行，LAI 效价应<1:2。

**【规格】** 2ml/瓶

**【贮藏与有效期】** 在-20℃，有效期为 1 年；在 2~8℃为 4 个月。

#### 附注:

##### 1 胶乳凝集试验

##### 1.1 操作方法

按表 1 用稀释液 (pH7.2 PBS 或生理盐水) 将待测样品作 2 倍系列稀释后，取不同稀释度各 10μl 分别与等量单抗致敏胶乳在洁净的玻片或细胞培养板盖上混匀，室温 (22±4℃) 或 37℃ 水浴中静置 5~15 分钟，观察凝集反应。同时设致敏胶乳对照、抗原对照和抗原加稀释液对照。

表 1 病毒抗原稀释方法

孔号	1	2	3	4	5	6	...	致敏胶乳对照	抗原对照	抗原加稀释液对照
稀释度	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	...	/	/	/
稀释液 (μl)	50	50	50	50	50	50	...	50	0	50
待测样品 (μl)	50	50	50	50	50	50	...	0	0	/
标准抗原	/	/	/	/	/	/	...	/	50	50

##### 1.2 结果判定

1.2.1 对照试验 出现如下结果，试验方成立，否则应重试：致敏胶乳对照呈“-”；抗原加稀释液对照呈“-”；抗原加致敏胶乳呈“++++”。

##### 1.2.2 判定标准

++++ 1~3 分钟内出现粗大凝集块，液体澄清。

+++ 形成较大的凝集块，液体澄清。

++ 50%胶乳凝集，颗粒明显，液体较澄清。

+ 少量乳胶凝集，液体较混浊。

- 无凝集颗粒，液体呈均匀乳状。

出现“++”以上凝集为阳性；“+”为可疑；“-”为阴性。以出现“++”以上凝集反应的最高稀释度作为判定终点。

## 2 胶乳凝集抑制试验

### 2.1 抗原凝集工作液制备

#### 2.1.1 抗原凝集价测定

用稀释液将病毒抗原液作 2 倍系列稀释后，取不同稀释度的病毒液各 10ul 分别与等量单抗致敏胶乳在洁净的玻片或细胞培养板盖上混匀，室温（22±4℃）或 37℃水浴中静置 5~15 分钟，按附注 1 进行结果判定。

#### 2.1.2 抗原凝集价工作液配制及检验

如果抗原凝集价测定结果为 1:64（举例），4 个凝集单位 =  $\frac{64}{4} = 16$ （即 1:16 稀释）。

##### 2.1.2.1 配制

稀释液 15ml，加病毒抗原 1ml，混匀，使最终浓度为 1:16（即 4 个凝集单位）。将 1:16 稀释的抗原液加等量稀释液，即成 2 个凝集单位的病毒抗原。

##### 2.1.2.2 抗原凝集价滴定

检查 4 个凝集单位抗原的凝集价是否准确时，应将抗原分别以 0.1ml 的量加至稀释液 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5ml 中，使抗原最终稀释度为 1:2、1:3、1:4、1:5 和 1:6，取不同稀释度抗原 10μl 分别与等量致敏胶乳混匀，室温（22±4℃）或 37℃水浴中静置 15 分钟。如果配制的抗原液为 4 单位，则 1:4 稀释度出现终点；如果高于 4 单位，可能 1:5 或 1:6 出现终点；如果低于 4 单位，可能 1:3 或 1:2 出现终点。应根据检验结果做适当调整，使工作液确为 4 个凝集单位。可根据相同方法检查 2 个凝集单位的凝集价是否准确。

## 2.2 胶乳凝集抑制试验

### 2.2.1 操作方法

按表 2 取被检血清 50μl 加入第 1 孔（4 单位抗原孔）中，混匀后，取 50μl 加入第 2 孔，以此类推，以 2 单位抗原液作 2 倍比系列稀释，并设阳性血清对照、阴性血清对照、致敏胶乳对照、2 单位抗原对照和抗原加稀释液对照，置 37℃水浴 60 分钟；取上述混合液 10μl 分别与等量单抗致敏胶乳混匀，室温（22±4℃）或 37℃水浴箱中静置 5~15 分钟，判定结果。

### 2.2.2 结果判定

2.2.2.1 对照试验 出现如下结果，试验方成立，否则应重试：致敏胶乳对照呈“-”；抗原加致敏胶乳对照呈“++++”；抗原加稀释液对照呈“-”；阳性血清对照呈“-”；阴性血清对照呈“++++”；阳性血清加致敏胶乳呈“-”；阴性血清加致敏胶乳呈“-”。

表 2 胶乳凝集抑制试验

孔号	1	2	3	4	5	6	...
稀释度	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	...
4 单位抗原	50	0	0	0	0	0	...
2 单位抗原	0	50	50	50	50	50	...

被检血清	50	50	50	50	50	50	...
置 37℃ 60 分钟后, 各取 10ul 上述混合液分别与等量致敏胶乳混匀, 室温(22±4℃)或 37℃水浴中静置 5~15 分钟, 观察结果							
结果	-	-	-	++	+++	++++	

#### 2.2.2.2 判定标准

++++ 1~3 分钟内出现粗大凝集块, 液体澄清;

+++ 形成较大的凝集块, 液体澄清;

++ 50%胶乳凝集, 颗粒明显, 液体较澄清;

+ 少量乳胶凝集, 液体较混浊;

- 无凝集颗粒, 液体呈均匀乳状。

“++”以上凝集为阴性; 出现“-”为阳性。以出现“-”的最高血清稀释度为判定终点。从表 2 结果看, 该被检血清的 LAI 效价为 1:8。

#### 附加说明:

1. 本标准由福建省农业科学院畜牧兽医研究所提出。
2. 本标准于 2001 年 11 月 21 日农牧发 [2000] 19 号批准。
3. 本标准于 2010 年 1 月经农业部公告第 1337 号重新发布。

## 伪狂犬病胶乳凝集试验试剂盒

### Weikuanguanbing Jiaoruningjishiyan Shijihe

### Pseudorabies Latex Agglutination Test Diagnostic Kit

本品由伪狂犬病胶乳凝集试验抗原、阳性血清、阴性血清、稀释液及其它配套材料等组成。用于胶乳凝集试验检测伪狂犬病抗体。

**【性状】** 胶乳抗原为乳白色均匀混悬液; 阳性血清和阴性血清为橙黄或淡棕黄色液体; 稀释液为透明无色液体。

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

**【效价测定】** 胶乳抗原 将中和效价为 1:64 的标准血清进行 2 倍系列稀释后, 各取 20μl 与抗原混合。与 1:128 稀释的阳性血清呈现“++”凝集反应为合格。

阳性血清 按《中国兽药典》现行版进行中和试验, 伪狂犬病中和抗体效价应 $\geq$ 1:64; 按本标准规定的方法进行检验, 血清 1:64 稀释的凝集反应程度应达“++”以上。

阴性血清 按《中国兽药典》现行版进行中和试验, 应为伪狂犬病中和抗体阴性。

**【特异性检验】** 取 0.01ml、0.02ml、0.04ml、0.08ml 阴性血清分别与 0.02ml 胶乳抗原作胶乳凝集试验, 应不出现凝集反应。

取 0.02ml 阳性血清与 0.02ml 抗原作胶乳凝集试验, 应出现凝集反应, 且凝集反应强度应为“++++”。

将 20μl 抗原分别与生理盐水、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、猪瘟阳性血清、衣原体

阳性血清进行胶乳凝集试验，应不出现凝集反应。

**【作用与用途】** 胶乳抗原 用于检测伪狂犬病病毒抗体的胶乳凝集试验。

阳性血清 用于伪狂犬病胶乳凝集试验抗原效价测定和胶乳凝集试验对照。

阴性血清 用于伪狂犬病胶乳凝集试验对照。

稀释液 用于待检血清的稀释。

**【用法与判定】** 对照试验应出现如下结果。

阳性对照 将阳性血清进行 2 倍系列稀释，取 20 $\mu$ l 与等量胶乳抗原进行胶乳凝集试验。

胶乳抗原与 1:64 稀释的阳性血清应出现“++”凝集反应。

阴性对照 阴性血清加抗原，应不发生凝集反应。

稀释液对照 抗原加稀释液混合后，应不发生凝集反应。

定性试验 取被测样品（血清或全血）、阳性血清、阴性血清、稀释液各 1 滴（约 20 $\mu$ l），分别置于玻片上，各加等量胶乳抗原 1 滴，混匀，搅拌并摇动 1~2 分钟，在 3~5 分钟内观察，判定结果。

定量试验 先将被测样品在微量反应板或 EP 管内用稀释液作 2 倍系列稀释，各取 1 滴（约 20 $\mu$ l）依次滴加于玻片上，同时设阳性血清和阴性血清对照，随后各加胶乳抗原 1 滴，如上搅拌并摇动，判定。达到阳性凝集反应的血清最高稀释度，即为血清的抗体效价。

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。

出现“++”以上凝集判为阳性。

**【规格】** 胶乳抗原、阳性血清和阴性血清 1 瓶（2ml）/盒。

稀释液 4ml x 4 瓶/盒。

其它材料 橡皮乳头 5 个/盒；200 $\mu$ l 微量吸头 5 个/盒；载玻片 2 块/盒。

**【贮藏与有效期】** 在 2~8 $^{\circ}$ C，有效期为 1 年。

**附加说明：**

1. 本标准由华中农业大学畜牧兽医学院提出。
2. 本标准于 2000 年 11 月 21 日农牧发 [2000] 19 号批准。
3. 本标准于 2010 年 1 月经农业部公告第 1337 号重新发布。

## 狂犬病灭活疫苗（Flury LEP 株）

Kuangquanbing Miehuo Yimiao（Flury LEP Zhu）

Rabies Vaccine, Inactivated（Strain Flury LEP）

本品系用狂犬病病毒 Flury LEP 株接种仓鼠肾细胞（BHK21）培养，收获感染细胞培养