

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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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

物，经浓缩、 β -丙内酯灭活、纯化后，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防犬的狂犬病。

【性状】 白色团块，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。

【灭活检验】 (1) 小鼠检验法 取疫苗，用疫苗稀释液（附注 1）稀释至 1 头份/ml、0.1 头份/ml，分别脑内接种体重 11~13g 小鼠 10 只，每只 0.03ml，观察 21 日，前 3 日死亡小鼠不计，其余小鼠应全部健活。第 4 日后若有死亡小鼠，应进行狂犬病病毒的检测（附注 2），若检测结果为阴性，则判灭活检验合格。

(2) 细胞检测法 取 3 瓶疫苗，分别用 PBS (0.04mol/L, pH 值 7.6) 稀释至 1 头份/ml，混合均匀，按细胞维持液量的 0.5%~1.0% 接种已长成单层的 BHK21 细胞，37℃ 吸附 1 小时，加入维持液，置 33~34℃ 培养 96 小时，收获，冻融 1 次。如此连续传代 3 次，收获第 3 代培养物，接种 96 孔细胞培养板，每孔 100 μ l，作 4 孔重复。同步加入 BHK21 细胞悬液，每孔 50 μ l (含 2×10^4 个细胞)，各孔补加 50 μ l 细胞维持液，置 37℃ 培养 48 小时，弃去培养液，进行直接荧光抗体染色。同时设病毒对照和正常细胞对照。如正常细胞组无狂犬病病毒特异性荧光，病毒对照组出现狂犬病病毒特异性荧光，则试验成立。如接种待检疫苗样品的细胞上无狂犬病病毒特异性荧光，则判灭活检验合格。

【安全检验】 用 10~14 周龄狂犬病抗体阴性（附注 3）的健康比格犬 2 只，各皮下或肌肉注射疫苗 2.0ml (含 2 头份)；用体重 18~22g 小鼠 5 只，各皮下注射疫苗 0.5ml (含 1 头份)；用体重 250~350g 豚鼠 2 只，各皮下注射疫苗 2.0ml (含 2 头份)。观察 21 日，应全部健活。

【效力检验】 效力检验 采用 NIH 法（附注 4）。用疫苗稀释液将待检疫苗稀释至 1 头份/ml，将待检疫苗和参考疫苗用 PBS (0.04mol/L, pH 值 7.6) 分别作 5 倍系列稀释，取 1:25、1:125、1:625、1:3125 4 个稀释度，每个稀释度腹腔接种体重 11~13g 小鼠 10 只，每只 0.5ml；留同批小鼠 20 只作攻毒回归对照。疫苗接种后 14 日，每只小鼠脑内注射检验用强毒 CVS-24 株病毒液 0.03ml (含 50LD₅₀)。同时将检验用强毒用 PBS (0.04mol/L, pH 值 7.6) 稀释成 1、5、25、125 LD₅₀/0.03ml，每个稀释度各脑内注射体重 11~13g 小鼠 5 只，每只 0.03ml。攻毒后，3 日内每个稀释度最多可允许死亡 2 只，记录攻毒后 4~14 日各稀释度（组）呈现狂犬病症状的小鼠数量，如病毒回归试验结果证明攻毒剂量为 5~100 LD₅₀，则试验成立。计算待检疫苗和参考疫苗的半数保护量。二者倒数之比乘以参考疫苗所含国际单位数即为每头份待检疫苗所含国际单位数。每头份疫苗至少应含 2.5 个国际单位 (2.5 IU)。

【剩余水分测定】 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

【真空度测定】 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

【作用与用途】 用于预防犬的狂犬病。免疫期为 12 个月。

【用法与用量】 皮下或肌肉接种。用配套稀释液稀释，3 月龄以上犬，每只 1.0ml (含 1 头份)。建议在 3 月龄时进行首次接种，首免后 30~60 日加强接种 1 次，以后每 12 个月接种 1 次。

【不良反应】 无可见的不良反应。

【注意事项】 (1) 仅用于接种健康犬，在接种前 10 日进行驱虫。

- (2) 使用配套的稀释液稀释疫苗。
- (3) 使用前应将疫苗放至室温(15~25℃),经稀释后充分摇匀,一次用完。
- (4) 应使用无菌注射器进行接种。
- (5) 如疫苗瓶有裂纹、标签不清或有异物,均不可使用。
- (6) 接种前后犬不要剧烈运动。
- (7) 怀孕犬限用,如需接种,则应采取相应防护措施。
- (8) 使用过的疫苗瓶、器具和稀释后剩余的疫苗应作消毒处理。

【规格】 疫苗:(1) 1头份/瓶 (2) 2头份/瓶 (3) 5头份/瓶 (4) 10头份/瓶
稀释液:(1) 1ml/瓶 (2) 2ml/瓶 (3) 5ml/瓶 (4) 10ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存,有效期为24个月。

附注

1 疫苗稀释液 [PBS (0.04mol/L, pH 值 7.6)] 质量标准

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验,应无菌生长。

【pH 值】 按现行《中国兽药典》附录进行检验,pH 值应为7.6±0.2。

2 狂犬病病毒检测方法 免疫荧光法检测 将发病鼠脑组织制成印片或冷冻切片,用丙酮固定,用抗狂犬病病毒特异性荧光抗体染色,同时设正常鼠脑组织对照和已知狂犬病阳性鼠脑组织对照。如正常鼠脑组织对照不出现特异性荧光,已知狂犬病阳性鼠脑组织对照出现特异性荧光,则试验成立。待检鼠脑组织出现特异性荧光则判为狂犬病病毒阳性,否则判为阴性。

3 狂犬病阴性犬标准 未接种过狂犬病疫苗,狂犬病 FAVN 法检测,抗体滴度 < 0.09IU/ml。

3.1 细胞培养与准备 取 BHK21 细胞单层,用胰酶消化后,以含 5% 小牛血清的 MEM 按 1:3 分散传代,在 37℃、含 5%CO₂ 条件下培养 24 小时,使其长成单层。

3.2 血清的预处理 取出标准阳性血清,加 500μl 灭菌水,充分溶解后,取 50~100μl,移入 1.5ml 离心管,与待测血清一起,置 56℃ 水浴 30 分钟灭活补体,12000r/min,离心 1 分钟后,置 2~8℃ 待用。

3.3 标准阳性血清的稀释 将标准阳性血清用 PBS (0.01mol/L, pH 值 7.6) 稀释至 0.5IU/ml。

3.4 加样 将细胞培养板按检测样品序号、标准阳性血清、标准阴性血清、细胞对照、MEM 对照分区标记,每个稀释度样品作 4 孔重复。各细胞孔分别加入含 2% 小牛血清的 MEM 营养液 100μl 后,向各标准血清对照区和每个样品检测区第 1 列的 4 个孔内分别加 0.5IU/ml 的标准阳性血清和待检血清各 50μl,以多道移液器充分混合各区第 1 列各孔内容物(150μl)后,吸取 50μl 转入第 2 列各孔,以此类推,直至第 6 列,充分混合后,吸 50μl 弃去。此时,1 至 6 列血清稀释倍数分别为 3、9、27、81、243、729。

3.5 中和用病毒的稀释与加入 取狂犬病病毒 CVS-24 株,融化后,以无血清的 MEM 培养基在灭菌平皿内进行稀释,使病毒的最终滴度为 100TCID₅₀/100μl。充分混合后,以多道移液器向样品检测区各孔、标准血清对照区各孔及病毒滴度检测区第 1 列各孔内加入

100 μ l 上述病毒稀释液。

3.6 中和用病毒的复测 将狂犬病病毒 CVS-24 株作 10 倍系列稀释至 10^{-6} ，每个稀释度分别取 100 μ l，接种 4 孔细胞。

3.7 中和 将细胞培养板置 37 $^{\circ}$ C、含 5%CO₂ 培养箱内中和 60 分钟。

3.8 细胞的消化与加入 将长成单层的 BHK21 细胞，用胰酶消化后，以含 5% 小牛血清的 MEM 培养液悬浮，以多道移液器向除培养基对照区的各检测孔内加入细胞悬液 100 μ l（约含 2×10^4 个细胞）。

3.9 将细胞培养板置 37 $^{\circ}$ C、含 5%CO₂ 培养箱内培养 48 小时。

3.10 取出细胞培养板，将培养基倒掉。将细胞培养板浸入盛有 80% 丙酮溶液的玻璃缸中，固定 20 分钟。

3.11 用 PBS (0.01mol/L, pH 值 7.6) 按工作浓度稀释 FITC 标记的抗狂犬病病毒纯化单克隆抗体，并加入 1% (V/V) 的伊文斯蓝溶液，混合均匀后，以多道移液器向每孔各加入 50 μ l 该抗体，置 37 $^{\circ}$ C 湿盒内温育 1 小时。

3.12 弃去荧光抗体，以 PBS (0.01mol/L, pH 值 7.6) 洗板 2 次，每次 3 分钟。

3.13 荧光显微镜下观察。

3.14 判定 凡有不少于 1 个荧光细胞的孔，即记为“+”，否则记为“-”。

$$\text{距离比} = \frac{50\% - \text{低于}50\% \text{的感染率}}{\text{高于}50\% \text{的感染率} - \text{低于}50\% \text{的感染率}}$$

Log 半数保护量 (ED₅₀) = 感染率低于 50% 的稀释度的对数 + 距离比 \times 稀释倍数的对数

$$\text{待检血清效价 (IU/ml)} = \frac{\text{待检血清ED}_{50} \text{的倒数}}{\text{参考血清ED}_{50} \text{的倒数}} \times \text{参考血清效价}$$

4 效力检验 NIH 法

4.1 将待检疫苗复原，并进行 5 倍系列稀释，取 1:25、1:125、1:625、1:3125 4 个稀释度备用。

4.2 将参考疫苗用 PBS (0.04mol/L, pH 值 7.6) 以相同方式稀释。

4.3 每个稀释度的待检疫苗和参考疫苗分别腹腔注射体重 11~13g 小鼠 10 只，每只 0.5ml。

4.4 设未接种的对照小鼠 20 只。

4.5 待检疫苗和参考疫苗接种后 14 日，每只小鼠脑内注射检验用强毒 CVS-24 株病毒液 0.03ml (含 50LD₅₀)。

4.6 将检验用强毒用 PBS (0.04mol/L, pH 值 7.6) 稀释成 1、5、25、125 LD₅₀/0.03ml，每个稀释度分别接种体重 11~13g 小鼠 5 只，每只 0.03ml，作为攻毒回归对照。

4.7 记录攻毒后 4~14 日各稀释度 (组) 呈现狂犬病症状的小鼠数量 (3 日内每稀释度最多可允许死亡 2 只)。如病毒回归试验结果证明攻毒剂量为 5~100 LD₅₀，则试验成立。

4.8 计算待检疫苗和参考疫苗的半数保护量 (PD₅₀)。二者倒数之比乘以参考疫苗所含国际单位数即为每头份待检疫苗所含国际单位数。

计算公式：

$$\text{距离比} = \frac{50\% - \text{低于}50\% \text{的死亡率}}{\text{高于}50\% \text{的死亡率} - \text{低于}50\% \text{的死亡率}}$$

Log 半数保护量 (PD₅₀) = 死亡率低于 50% 的稀释度的对数 + 距离比 × 稀释倍数的对数

$$\text{待检疫苗效价 (IU/ml)} = \frac{\text{待检疫苗PD}_{50} \text{的倒数}}{\text{参考疫苗PD}_{50} \text{的倒数}} \times \text{参考疫苗效价}$$

附加说明:

1. 本标准由中国兽医药品监察所、北京海淀中海动物保健科技公司、吉林正业生物制品有限责任公司、齐鲁动物保健品有限公司、北京信得威特科技有限公司、瑞普(保定)生物药业有限公司、乾元浩生物股份有限公司提出。

2. 本标准于 2010 年 02 月 01 日经农业部公告第 1338 号发布。

犬瘟热活疫苗 (CDV-11 株)

Quanwenre Huoyimiao (CDV-11 Zhu)

Canine Distemper Vaccine, Live (Strain CDV-11)

本品系用犬瘟热病毒 CDV-11 株接种 Vero 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。用于预防狐狸犬瘟热。

【性状】 微黄白色海绵状疏松团块, 易与瓶壁脱离, 加稀释液后迅速溶解。

【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》附录方法, 接种 Vero、MDCK、CRFK (或 F81)、BT 细胞进行狂犬病病毒、犬腺病毒、犬副流感病毒、犬细小病毒和牛病毒性腹泻病毒等外源病毒检验, 应无外源病毒污染。

【鉴别检验】 将疫苗稀释至 1 头份/ml 后再作 100 倍稀释, 与等量 10 倍稀释的犬瘟热病毒特异性抗血清混合, 经 37℃ 中和 30 分钟后, 接种已长成单层的 Vero 细胞 24 孔细胞培养板, 共接种 12 孔, 每孔 0.5ml。同时设不中和对照组 (将疫苗稀释成 1 头份/ml 后再作 100 倍稀释, 与等量 MEM 混合) 和正常细胞对照组, 各接种 6 孔, 每孔 0.5ml。将细胞培养板置 37℃、含 5% 二氧化碳培养箱中培养、观察 96~120 小时。中和组和细胞对照组应不出现 CPE, 不中和对照组应全部出现 CPE。

【安全检验】 下列方法任择其一。

(1) 用犬检验 用 2~3 月龄健康易感犬 (犬瘟热病毒 SN 抗体效价 ≤ 1:4) 5 只, 各肌肉注射用生理盐水稀释的疫苗 10 头份。观察 21 日, 应全部健活。

(2) 用狐狸检验 用 2~3 月龄健康易感狐狸 (犬瘟热病毒 SN 抗体效价 ≤ 1:4) 5 只, 各肌肉注射用生理盐水稀释的疫苗 10 头份。观察 21 日, 应全部健活。

【效力检验】 用含 2% 新生牛血清的维持液将疫苗稀释至 1 头份/ml, 再作 10 倍系列稀释。取 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 4 个稀释度, 分别接种已长成单层的 Vero 细胞 96 孔微量细胞培养板, 每个稀释度接种 8 孔, 每孔 100μl, 同时设不接毒对照组。将细胞培养板置 37℃、含 5% 二氧化碳培养箱中培养、观察 96~120 小时, 记录出现 CPE 的孔数。按 Reed-Muench

法计算 TCID₅₀，每头份疫苗病毒含量应 $\geq 10^{4.5}$ TCID₅₀。

【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】 用于预防狐狸犬瘟热，免疫期为6个月。

【用法与用量】 按瓶签注明头份，用注射用生理盐水稀释，每只肌肉注射1ml（含1头份）。新生狐狸初免1个月后，加强免疫1次。

【注意事项】 （1）本品仅用于接种健康狐狸。使用过免疫血清的动物，需隔1~2周后，再使用本疫苗，否则将影响免疫效果。

（2）稀释后充分摇匀，接种过程中也应随时摇匀疫苗，已稀释的疫苗须在2小时内用完。

（3）注射部位应做消毒处理，使用过的器具和疫苗瓶需作消毒处理。

（4）注射疫苗期间动物应避免调动、运输和饲养条件突然改变等，以免引起应激反应，导致免疫失败；并严格防止与发病动物接触。

（5）接种疫苗后可能有极个别的动物会发生过敏反应。接种前备好盐酸肾上腺素注射液，发生过敏反应时及时进行解救。

【规格】 （1）1头份/瓶 （2）2头份/瓶 （3）10头份/瓶

【贮藏与有效期】 -15℃以下保存，有效期为18个月。

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02月08日经农业部公告第1341号发布。

新城疫病毒抗血清

Xinchengyibingdu Kangxueqing

Antisera Against Newcastle Disease Virus

本品系用鸡新城疫中等毒力活疫苗经穴位接种猪后，再用鸡新城疫灭活疫苗经穴位加强免疫，采血，分离血清，加适宜防腐剂制成。用于预防鸡新城疫。

【性状】 淡红黄色透明液体，久置后有白色絮状沉淀。

【装量检查】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【支原体检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无支原体生长。

【外源病毒检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无禽源和非禽源外源病毒污染。

【安全检验】 用30~60日龄SPF鸡10只，各肌肉或颈部皮下分点注射本品4ml。观察10日，应全部健活。

【效力检验】 下列方法任择其一。

（1）血清学方法 用血凝抑制试验（HI）测定血清抗体效价。按现行《中国兽药典》

附录进行测定，HI抗体效价应不低于1:512。

(2) 免疫攻毒法 用30~60日龄SPF鸡15只，其中10只各肌肉注射本品1ml，另5只各注射生理盐水1ml作对照。24小时后，所有鸡各肌肉注射鸡新城疫病毒北京株强毒（CVCC AV1611株）1ml（含 $10^{4.0}$ ELD₅₀）。观察10日，对照组应全部死亡，接种本品的10只鸡中应至少保护8只。

【苯酚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。

【用法与用量】 肌肉注射。每只鸡1ml。每日1次，可连用3次。

【不良反应】 无。

【注意事项】 (1) 本品每次注射后的被动免疫期为10日。

(2) 本品口服无效。

(3) 本品可以与抗生素同时使用。

(4) 本品含有抗新城疫病毒抗体，用后10日内不宜接种鸡新城疫活疫苗。

(5) 久置后有少量白色絮状沉淀，对药效无影响，摇匀后可使用。

【规格】 (1) 100ml/瓶 (2) 200ml/瓶 (3) 500ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为24个月。

附加说明：

1. 本标准由辽宁天禾生物技术有限公司提出。
2. 本标准于2010年02月08日经农业部公告第1341号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

禽流感病毒检测试纸条

Qinliuganbingdu Jiance Shizhitiao

Immunochromatographic Assay Strips for Avian Influenza Virus

本品由禽流感病毒（AIV）检测试纸条、样本处理液、塑料吸头和棉拭子组成。其中的试纸条系用PVC胶板、样品垫、吸水垫、金标垫和硝酸纤维素膜组合制成，检测线为兔抗H9亚型AIV抗体，质控线为羊抗鼠IgG，样本处理液为Tirs缓冲液。用于检测禽流感病毒。

【性状】 试纸条 包装袋应封闭良好，塑料外壳应无破损。每盒3袋，每袋10条，包装袋内附1包干燥剂。

样本处理液 无色透明液体。每盒30管，每管1ml。

塑料吸头 应无破损。每盒3袋，每袋10个。

棉拭子 每盒1袋，每袋30个。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，样本处理液应无菌生长。

【敏感性检验】 将AIV H5亚型HI抗原、H9亚型HI抗原（HA价不低于1:256），分别进行2倍系列稀释至1:32，用本品对各稀释度进行检测，均应为阳性。

【特异性检验】 用本品对 SPF 鸡心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏组织和泄殖腔拭子样品、新城疫病毒 (NDV)、传染性法氏囊病病毒 (IBDV)、传染性支气管炎病毒 (IBV)、传染性喉气管炎病毒 (ILT)、减蛋综合症病毒 (EDSV) 和正常鸡胚尿囊液各 1 份进行检测, 均应为阴性。

【作用与用途】 用于检测禽流感病毒。

【用法与判断】 1 样本处理

1.1 泄殖腔拭子样本的处理 将收集的泄殖腔棉拭子插入到含有处理液的样品管中, 充分混合, 使其溶解, 以 12000r/min 离心 10 分钟, 取上清待检。

1.2 内脏组织样本的处理 称取内脏组织块 0.5g, 置于匀浆器中, 加生理盐水 1ml, 充分研磨后, 取组织浸出液, 在 2~8℃ 下, 以 12000r/min 离心 10 分钟, 取上清待检。

1.3 鸡胚尿囊液样本的处理 取鸡胚尿囊液样本, 以 12000r/min 离心 2 分钟, 取上清待检。

1.4 细胞培养液样本的处理 细胞培养液可直接用于检测或者冻融一次后检测。

2 操作步骤 取适量的检测样品 (80~120 μ l, 用滴管取样时约为 3~4 滴), 缓慢滴加到样品孔中, 当看到红色液体在试纸条上移动时, 放慢加样速度。整个加样过程控制在 1 分钟内完成。加样完成后将试纸条平放在桌面上, 5~30 分钟内观察结果。

3 结果判定

3.1 阳性结果 在试纸条上出现两条红色条带 (检测带和对照带) (见图 1)。

3.2 阴性结果 在试纸条上仅出现一条红色条带 (对照带) (见图 2)。

3.3 无效结果 在对照带处不出现红色条带 (见图 3)。



图 1



图 2



【注意事项】 (1) 如果试纸条的密封袋 (图 3) 请勿使用。

(2) 试验时, 请勿饮食和吸烟。

(3) 处理样品时, 请戴保护手套。试验完毕, 充分洗手。

(4) 试验完毕后, 请将试纸条充分消毒或焚烧处理。

【规格】 30 份/盒

【贮藏与有效期】 2~8℃ 避光保存, 有效期为 12 个月。

附加说明:

1. 本标准由华中农业大学、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所、武汉科前动物生物制品有限责任公司提出。

2. 本标准于 2010 年 02 月 08 日经农业部公告第 1341 号发布。

鸭瘟灭活疫苗

Yawen Miehuoyimiao

Duck Plague Vaccine, Inactivated

本品系用鸭瘟病毒接种易感鸭胚培养，收集感染鸭胚液，经甲醛溶液灭活后，与矿物油佐剂混合乳化制成。用于预防鸭瘟。

【性状】 外观 白色均匀乳剂。

剂型 油包水型 (W/O)。用一清洁吸管，吸取少量疫苗滴于冷水中，除第 1 滴外，均应呈油滴状，不扩散。

稳定性 在 37℃ 下放置 21 日，应无破乳、分层现象；吸取疫苗 10ml 加入离心管中，以 3000r/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 10~14 日龄健康易感鸭（中和抗体效价不高于 1:4，见附注）10 只，各皮下注射疫苗 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】 用 2~12 月龄健康易感鸭（中和抗体效价不高于 1:4，见附注）5 只，各颈背部皮下注射疫苗 0.5ml，21~28 日后，连同对照鸭 5 只，各肌肉注射鸭瘟病毒强毒 1.0ml（含 10^3 MLD），观察 14 日。对照鸭应全部发病死亡，免疫鸭应至少 4 只健活。

【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】 用于预防鸭瘟。免疫期暂定为：雏鸭 2 个月，成鸭 5 个月。

【用法与用量】 皮下或肌肉注射。2 月龄以上成鸭，每只 0.5ml；10 日龄~2 月龄雏鸭，每只 0.5ml，2 周后加强免疫一次。

【不良反应】 无不良反应。

【注意事项】 （1）鸭瘟病毒感染鸭或健康状况异常的鸭禁用。

（2）疫苗恢复到室温并摇匀后使用。

（3）发现疫苗严重分层、有结块或絮状物，以及瓶盖松脱、瓶身有裂纹等异常现象，切勿使用。

（4）接种时应执行常规无菌操作，应及时更换针头，最好 1 只鸭 1 个针头。

（5）本品严禁冻结。

（6）疫苗启封后，限当日用完。

（7）屠宰前 28 日内禁止使用。

【规格】 （1）20ml/瓶 （2）100ml/瓶 （3）250ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃ 避光保存，有效期为 12 个月。

附注：鸭瘟病毒中和抗体效价测定法 用灭菌生理盐水将待检血清做 2 倍系列稀释，

取适当稀释度与等量鸭瘟病毒 AV1222 株（含 200 ELD₅₀/0.2ml）混合，同时设病毒对照（病毒液与等量生理盐水混合）和生理盐水对照，37℃下作用 1 小时。各中和组和对照组经绒毛尿囊膜接种 9~10 日龄 SPF 鸡胚 5 枚，每胚 0.2ml；接种后，37℃下培养 144 小时，记录鸡胚死亡情况。病毒对照胚应全部死亡，生理盐水对照胚应全部健活。根据鸡胚死亡情况计算半数保护量（PD₅₀），能使 50% 鸡胚保护（健活）的血清最高稀释度即为该血清的中和抗体效价。

附加说明：

1. 本标准由中国兽医药品监察所、广东永顺生物制药有限公司、洛阳普莱柯生物工程有限公司、乾元浩生物股份有限公司、哈药集团生物疫苗有限公司提出。
2. 本标准于 2010 年 05 月 31 日经农业部公告第 1398 号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》要求改变黏度测定方法，为黏度计法。
4. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

猪萎缩性鼻炎灭活疫苗（波氏杆菌 JB5 株）

Zhu Weisuoxingbiyan Miehuoyimiao（Boshiganjun JB5 Zhu）

Swine Atrophic Rhinitis Vaccine, Inactivated（Strain JB5）

本品系用 I 相支气管败血波氏杆菌 JB₅ 株接种胰大豆蛋白肉汤（TSB）液体培养基，收获培养物，经灭活后，与油佐剂混合乳化制成。用于预防由支气管败血波氏杆菌引起的猪萎缩性鼻炎。

【性状】 外观 乳白色乳剂。

剂型 油包水型。取一清洁吸管，吸取少量疫苗滴于冷水中，除第 1 滴外，均不应扩散。

稳定性 吸取 10ml 疫苗加入离心管中，以 3000r/min 离心 15 分钟，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 28~35 日龄健康易感仔猪（波氏杆菌 K 凝集抗体效价应不高于 1:8）5 头，各颈部肌肉注射疫苗 4ml，观察 14 日，应无不良反应，且全部健活。

【效力检验】 用 28~35 日龄健康易感仔猪（波氏杆菌 K 凝集抗体效价应不高于 1:8）10 头，分成免疫组和对照组各 5 头。免疫组每头肌肉注射疫苗 2ml。免疫后 28 日，连同对照猪 5 头，各气管注射 JB₅ 菌株菌液 2ml（含活菌 2.0×10⁹~1.0×10¹⁰CFU），每日测定体温，并观察记录临床症状，14 日后，扑杀所有仔猪，并检查鼻部和肺部病变。免疫猪应至少保护 4 头，对照仔猪应至少发病 4 头（发病判定标准见附注）。

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

【作用与用途】 用于预防由支气管败血波氏杆菌引起的猪萎缩性鼻炎。免疫期为 3 个月。

【用法与用量】 颈部肌肉注射。不论猪只大小，每次 2ml。推荐免疫程序为：妊娠母猪在分娩前 6 周和 2 周各免疫 1 次；仔猪在 4 周龄左右免疫。

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

【注意事项】 （1）仅用于健康猪。

（2）疫苗贮藏及运输过程中切勿冻结，长时间暴露在高温下会影响疫苗效力，使用前应使疫苗平衡至室温并充分摇匀。

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

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

（5）禁止与其他疫苗合用，接种后不影响抗病毒类、抗生素类药物的使用。

（6）启封后限在 8 小时内用完。

（7）屠宰前 1 个月内禁止使用。

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

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为 12 个月。

附注：1 发病判定标准 符合以下任意 2 项者判为发病。

1.1 体温连续 2~3 日升高至 40℃以上。

1.2 食欲减退，有喷嚏、鼻塞及不同程度的卡他性鼻症状。

1.3 剖检后观察到不同程度的粘液或脓性鼻分泌物，肺叶或心叶呈红褐色。

附加说明：

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

2. 本标准于 2010 年 06 月 01 日经农业部公告第 1401 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。

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（AV33 株+C51-2 株+C57-1 株）

Tu Bingduxingchuxuezheng Duoshaxingbashiganjunbing Chanqijiamosuojunbing (A xing)

Sanlian Miehuoyimiao (AV33 Zhu + C51-2 Zhu + C57-1 Zhu)

Viral Hemorrhagic Disease, Pasteurella Multocida and Clostridium Perfringens (Type A) Vaccine
for Rabbits, Inactivated (Strain AV33+ Strain C51-2+ Strain 57-1)

本品系用兔病毒性出血症病毒 AV33 株接种家兔、多杀性巴氏杆菌 C51-2 株、产气荚膜梭菌 A 型 C57-1 株分别接种适宜培养基，分别收获感染兔的含毒组织（制成乳剂）和培养物，经甲醛溶液灭活后，再向兔多杀性巴氏杆菌和产气荚膜梭菌灭活菌液中加入氢氧化铝胶，经适当浓缩，三者按适当比例配制而成。用于预防兔病毒性出血症（兔瘟）、多杀性巴氏杆菌病和产气荚膜梭菌病（A 型）。

【性状】 静置后，上层为灰褐色澄明液体，下层为灰褐色沉淀，振荡后呈灰褐色均匀混悬液。

【装量检查】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，将疫苗接种马丁琼脂、肉肝胃酶消化汤培养，应无菌生长。

【安全检验】 用 45~60 日龄（体重 1.5~2.0kg）健康易感家兔 5 只，各皮下注射疫苗 4.0ml，观察 10 日，均应健活。

【效力检验】 用 45~60 日龄（体重 1.5~2.0kg）健康易感家兔 15 只，各皮下注射疫苗 2.0ml，21 日后连同对照兔 15 只，按下述方法进行攻毒。

(1) 兔病毒性出血症部分 用免疫兔和对照兔各 5 只，分别皮下注射 1:10 稀释的兔病毒性出血症病毒 AV33 株（肝、脾毒）1.0ml，观察 7 日，对照兔应至少死亡 4 只，免疫兔应全部健活。

(2) 兔多杀性巴氏杆菌部分 用免疫兔和对照兔各 5 只，分别皮下注射 1 个致死量兔多杀性巴氏杆菌 C51-2 株活菌，观察 7 日，对照兔应全部死亡，免疫兔应至少保护 4 只。

(3) 兔产气荚膜梭菌部分 用免疫兔 5 只和对照兔 5 只，分别静脉注射致死量的 A 型产气荚膜梭菌 C57-1 株毒素，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病（兔瘟）、多杀性巴氏杆菌病和产气荚膜梭菌病（A 型）。免疫期为 6 个月。

【用法与用量】 皮下注射。45 日龄以上家兔，每只 2.0ml。

【不良反应】 注射本品后可能在注射部位形成约 0.5cm 大小硬结，3~4 周后会自然消失。

【注意事项】 (1) 仅用于接种 45 日龄以上健康兔。

(2) 使用前应将疫苗恢复至常温，并振荡均匀。

(3) 接种疫苗时，应执行常规的无菌操作，及时更换针头。

(4) 疫苗瓶开启后，限当日用完。

(5) 本品严禁冻结，避免阳光直射与高温。

(6) 使用前应仔细检查，如发现破瓶、无标签或标签不清楚、疫苗中混有杂质等，均不能使用。

【规格】 (1) 10ml/瓶 (2) 20ml/瓶 (3) 100ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存, 有效期为12个月。

附加说明:

1. 本标准由哈药集团生物疫苗有限公司提出。
2. 本标准于2010年06月01日经农业部公告第1401号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》要求增加**【装量检查】**项。

鸚鵡热衣原体抗体胶体金检测试纸条

Yingwureiyuanti Kangti Jiaotijin Jianceshizhitiao

Antibody Diagnostic Strip for *Chlamydia psittaci* by Colloidal Gold

本品系用鸚鵡热衣原体重组主要外膜蛋白(MOMP)抗原和兔IgG分别包被在硝酸纤维素(NC)膜上,与金黄色葡萄球菌蛋白A(SPA)标记的免疫胶体金、样品垫、吸水垫、双面胶层和塑料底衬组装而成。用于羊鸚鵡热衣原体抗体检测。

【性状】 试纸条应平整,材料附着应牢固。膜条宽度应不小于2.5mm、长度应不大于80mm,样品移行速度应不低于10mm/min。

【检测线和对照线检验】 用试纸条检测鸚鵡热衣原体阳性质控血清(见附注1),应在2~15分钟内出现清晰可见的检测线和对照线;检测生理盐水时,应只出现对照线。

【特异性检验】 用试纸条分别对炭疽杆菌、布氏杆菌、鼠疫耶尔森菌、大肠杆菌阳性血清以及鸚鵡热衣原体阴性质控血清(见附注2)和生理盐水进行检测,在2~15分钟内均应只出现对照线。

【敏感性检验】 用试纸条分别对5份鸚鵡热衣原体阳性质控血清(见附注1)进行检测,在2~15分钟内均应出现清晰可见的检测线和对照线。

【作用与用途】 用于羊鸚鵡热衣原体抗体检测。

【用法与判定】 (1)用法 取待检羊血清样本,用生理盐水作1:40稀释,取约150μl(3~4滴)滴加于试纸条圆孔中,2分钟后开始观察结果,15分钟后终止观察。

(2)判定 在试纸条“C”(对照线)和“T”(检测线)处均出现沉淀线,判为阳性,即有鸚鵡热衣原体抗体;只在试纸条“C”处出现1条沉淀线,判为阴性,即无鸚鵡热衣原体抗体;在试纸条“C”处不出现沉淀线,该试验不成立。

【注意事项】 (1)本品仅供体外检测用。

(2)如需检测待检标本的最高血清滴度,可将阳性血清作2倍系列稀释,重复上述操作步骤,直至检测结果呈阴性。

(3)试纸条取出后应立即使用。试纸条在空气中暴露时间过长后会受潮失效。

(4)试纸条用过后放入包装袋中,集中消毒后再处理,以防污染环境。

(5)应对废弃样品进行高压灭菌处理。

【规格】 (1) 1头份/袋 (2) 10头份/袋

【贮藏与有效期】 20℃以下避光保存,有效期为20个月。

附注：阳性质控血清和阴性质控血清质量标准

1 阳性质控血清质量标准

1.1 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 效价测定 用琼脂双向免疫扩散试验测定血清抗体效价，抗体效价应不低于 1：32。

2 阴性质控血清质量标准

2.1 无菌检验 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

2.2 效价测定 用琼脂双向免疫扩散试验测定血清抗体效价，应为阴性。

附加说明：

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

2. 本标准于 2010 年 06 月 01 日经农业部公告第 1401 号发布。

鸡新城疫、病毒性关节炎二联灭活疫苗（La Sota 株+AV2311 株）

Jixinchengyi Bingduxingguanjieyan Erlian Miehuoyimiao (La Sota Zhu+AV2311 Zhu)

Newcastle Disease and Viral Arthritis Vaccine, Inactivated (Strain La Sota+Strain AV2311)

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株、病毒性关节炎病毒 AV2311 株分别接种易感鸡胚培养、收集感染胚液，经超滤浓缩，甲醛溶液灭活后，加入矿物油佐剂，混合乳化制成。用于预防鸡新城疫和病毒性关节炎。

【性状】 外观 乳白色乳剂。

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

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

黏度 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

【装置检查】 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，应不出现因注射疫苗而出现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 μ l，另 5 只作对照。免疫后 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），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 20 μ l，另 5 只作对照。免疫后 21~28 日，每只鸡分别肌肉注射鸡新城疫病毒北京株强毒（CVCC

AV1611株) $10^{5.0}$ ELD₅₀, 观察 14 日。对照组应全部死亡, 免疫组应保护至少 7 只。

2 病毒性关节炎部分 用 21~28 日龄 SPF 鸡 15 只, 10 只各肌肉注射疫苗 0.2ml, 另 5 只作对照。免疫后 28 日, 每只鸡分别采血, 分离血清, 进行 AGP 抗体效价测定, 免疫组 AGP 抗体应全部阳性, 对照组应全部阴性; 或经脚垫注射 10 倍稀释的鸡病毒性关节炎病毒 AV2311 株, 每只 0.2ml (约 $10^{4.0}$ BID₅₀), 观察 168 小时, 检查趾关节、跗关节病变。对照组应全部有趾关节、跗关节红肿等特异性病变, 免疫组应全部保护。

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

【作用与用途】 用于预防鸡新城疫和病毒性关节炎。

【用法与用量】 肌肉或颈部皮下注射。28 日龄内雏鸡每只 0.2ml, 免疫期为 3 个月; 28 日龄以上的鸡每只 0.5ml, 免疫期为 6 个月; 种鸡开产前 1 个月左右免疫, 每只 0.5ml, 免后 4 个月内的子代在 2 周内可获保护。

【不良反应】 无。

【注意事项】 (1) 本品不能冻结。

(2) 体质瘦弱、患有其他疾病的禽, 禁止使用。

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

(4) 注射前应将疫苗恢复至室温, 并充分摇匀。

(5) 疫苗启封后, 限当日使用。

(6) 注射器具, 用前需经消毒, 注射部位应涂擦 5% 碘酒消毒。

(7) 宰杀前 28 日内禁止使用。

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

【贮藏与有效期】 2~8℃保存, 有效期为 12 个月。

附注: 1 鸡病毒性关节炎琼脂扩散试验 (AGP) 抗原质量标准

本品系由鸡病毒性关节炎病毒 AV2311 株接种 SPF 鸡胚制成, 用于检测鸡病毒性关节炎琼扩抗体。

【性状】 微黄色疏松团块, 加灭菌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】 将抗原复原, 与阳性血清各作 2 倍系列稀释, 做方阵试验, 抗原与阳性血清的加量以孔满为度。然后将琼脂平皿置湿盒中, 在 37℃ 下作用 12~24 小时, 观察结果。能与 8 倍稀释的标准阳性血清产生明显沉淀线的最高稀释度, 即为该抗原的效价。抗原按 1:4 稀释出现沉淀线者判为效价合格。

【特异性检验】 抗原与病毒性关节炎标准阳性血清出现明显沉淀线, 与阴性血清及 ND、IBD、MD、REV 等抗血清孔之间均不出现沉淀线, 判该抗原特异性检验合格。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存, 有效期为 12 个月。

2 鸡病毒性关节炎琼脂扩散试验 (AGP) 操作方法

2.1 待检血清的分离 通过翅静脉采血, 置室温下, 待血清析出后, 吸出血清。

2.2 方法

2.2.1 琼脂平板的制备 取巴比妥盐酸缓冲液（0.06mol/L, pH 值 8.1）100ml, 加入优质琼脂糖 1g, 水浴中加热融化, 制成平板, 并在其上按六角形打孔, 孔径、孔距均为 3mm, 注意封底。

2.2.2 加样 中间孔加抗原, 1#、2#、3#、4#孔分别加 2 倍系列稀释的待检血清, 5#、6#孔分别加阴性血清和标准阳性血清, 抗原与血清的加量以孔满为度, 然后置湿盒中, 在 37℃下作用 12~24 小时, 观察结果。

2.3 结果判定

2.3.1 抗原与阴性血清间无沉淀线, 与标准阳性血清间有明显沉淀线, 判为试验成立。

2.3.2 被检血清原液与抗原间出现明显沉淀线, 且与标准阳性血清沉淀线完全融合者判为阳性。

2.3.3 出现阳性反应的血清最高稀释倍数作为被检血清的 AGP 抗体效价。

附加说明:

1. 本标准由中国动物卫生与流行病学中心（原农业部动物检疫所）提出。
2. 本标准于 2005 年 01 月 20 日经农业部公告第 456 号发布。
3. 本标准于 2010 年 07 月 14 日经农业部公告第 1420 号批准变更注册。变更内容：变更制品中新城疫部分的效力检验标准。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。

山羊支原体肺炎灭活疫苗（MoGH3-3 株+M87-1 株）

Shanyang Zhiyuanti Feiyan Miehuoyimiao（MoGH3-3 Zhu+M87-1 Zhu）

Caprine Mycoplasmal Pneumonia Vaccine, Inactivated（Strain MoGH3-3 + Strain M87-1）

本品系用绵羊肺炎支原体 MoGH3-3 株和丝状支原体山羊亚种 M87-1 株菌种分别接种于适宜培养基培养, 收集培养物并进行浓缩, 经甲醛溶液灭活后, 按一定比例混合加 206 油佐剂制成。用于预防由绵羊肺炎支原体和丝状支原体山羊亚种引起的山羊支原体肺炎。

【性状】 外观 乳白色乳剂。

剂型 水包油包水（w/o/w）型。取一清洁吸管, 吸取少量疫苗, 滴于冷水中, 应呈云雾状扩散。

稳定性 吸取疫苗 10ml 加入离心管装, 以 3000r/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】 用体重 1.5~2.0kg 兔 4 只, 各皮下或肌肉注射疫苗 4ml, 观察 10 日, 全部健活为合格。用 12 月龄左右健康易感山羊（附注 1）5 只, 各颈部皮下注射疫苗 6ml,

观察 30 日，应无减食、精神沉郁、体温反应、注射局部炎症等不良反应。

【效力检验】 用 12 月龄左右健康易感山羊（附注 1）10 只，均分为免疫 I 组和 II 组，各颈部皮下注射疫苗 3ml，另以条件相同的山羊 10 只，均分为对照 I 组和 II 组。接种后 30 日，免疫 I 组和对照 I 组山羊各气管内接种绵羊肺炎支原体 MoGH3-3 株培养物 10ml (5×10^8 ccu/ml)，观察 30 日，对照羊应全部发病（附注 2），免疫羊应至少保护 4 只，或对照羊 4 只发病（附注 2），免疫羊应全部保护。免疫 II 组和对照 II 组山羊各气管内接种丝状支原体山羊亚种 M87-2 株培养物 10ml (5×10^8 ccu/ml)，观察 30 日，对照羊应全部发病（附注 2），免疫羊应至少保护 4 只，或对照羊 4 只发病（附注 2），免疫羊应全部保护。

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

【作用与用途】 用于预防由绵羊肺炎支原体和丝状支原体山羊亚种引起的山羊支原体肺炎。免疫期为 10 个月。

【用法与用量】 颈部皮下注射。每只山羊 3ml。

【不良反应】 无。

【注意事项】 （1）疫苗中混有异物、疫苗瓶破裂或无标签时，禁止使用。

（2）切忌冻结。

（3）疫苗在运送和使用中应避免高温和曝晒。

（4）开封后应即当日用完。

（5）接种过程中应采用常规无菌操作。

（6）屠宰前 21 日内禁止使用。

（7）使用过的器具、疫苗瓶及剩余的疫苗均应消毒处理，以防污染环境。

（8）孕期内接种过本疫苗的母羊，所产羔羊 1 月龄以内可无需接种。

【规格】 （1）50ml/瓶 （2）100ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃ 保存，有效期为 12 个月。

附注：1 健康易感山羊标准

健康山羊，无布氏杆菌病、皮肤真菌和体外寄生虫。绵羊肺炎支原体间接血凝（IHA）抗体效价不高于 1：4，丝状支原体山羊亚种间接血凝（IHA）抗体效价不高于 1：4。

2 山羊支原体肺炎发病判定标准 符合下列情形之一者判为发病：

2.1 出现肺炎症状如咳嗽、呼吸急促、喘气，体温升高至 40.5℃ 以上，呈稽留热，喷嚏、流清亮或浆液性鼻液，判为发病。

2.2 剖检见以下几种情况之一，均判为发病。①肺部一侧或两侧形成纤维素性肺炎，肺小叶间组织增宽，小叶界限明显，支气管扩张；②局部（尤其尖叶、心叶、中间叶和膈叶前沿）形成明显肝变区，颜色由红至灰色不等，切面呈大理石样；③胸腔中有淡黄色胸腔渗出液（胸水），遇空气后出现纤维蛋白凝块；④胸膜变厚而粗糙，上有纤维素层附着，甚至与肺和心包发生粘连。

2.3 从肺组织中进行支原体分离，若能分离到攻毒支原体，判为发病。

附加说明：

1. 本标准由中国农业科学院兰州兽医研究所提出。
2. 本标准于 2010 年 07 月 30 日经农业部公告第 1433 号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》要求改变黏度测定方法，为黏度计法。
4. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

猪圆环病毒 2 型灭活疫苗（SH 株）

Zhu Yuanhuanbingdu Erxing Miehuoyimiao （SH Zhu）

Porcine Circovirus Type 2 Vaccine, Inactivated （Strain SH）

本品系用猪圆环病毒 2 型（PCV2）SH 株接种 PK15-B1 克隆细胞培养，收获细胞培养物，经甲醛溶液灭活，与矿物油佐剂混合乳化制成。用于预防由 PCV2 感染引起的疾病。

【性状】 外观 乳白色或淡粉红色均匀乳状液。

剂型 呈双相油乳剂（W/O/W）。取一清洁吸管，吸取少量疫苗滴于清洁冷水表面，应呈云雾状扩散。

稳定性 吸取疫苗 10ml 加入离心管中，以 3000r/min 离心 15 分钟，应不出现分层现象，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 14~21 日龄 PCV2 ELISA 抗体阴性（附注 1）和 PCV2 抗原阴性（附注 2）健康易感仔猪 3 头，每头肌肉注射疫苗 4ml，连续观察 14 日，应无异常临床反应。

【效力检验】 下列方法任择其一。

（1）仔猪免疫攻毒法 用 14~21 日龄 PRRSV ELISA 抗体阴性（IDEXX ELISA 试剂盒检测）、PCV2 ELISA 抗体阴性（附注 1）和 PCV2 抗原阴性（附注 2）健康易感仔猪 15 头，分成 3 组，每组 5 头，第 1 组每头颈部肌肉注射疫苗 1ml，两周后按相同途径和剂量进行第 2 次接种，第 2 组作非免疫攻毒对照，第 3 组作空白对照（非免疫、非攻毒），均隔离饲养观察。首免后 5 周对所有猪称重，第 1、2 组各用 PCV2 SH 株（含 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml）滴鼻 1ml、肌肉注射 2ml，隔离饲养。攻毒后第 4、7 日，分别在每头猪的两侧腋下及两侧臀部共 4 个点对所有猪接种用弗氏不完全佐剂乳化的钥匙孔血蓝蛋白（KLH/ICFA，0.5mg/ml），每个点接种 1ml（4ml/头），同时腹腔接种巯基乙酸培养基，10ml/头；攻毒后第 11、19 日再次腹腔接种巯基乙酸培养基，10ml/头。攻毒后连续观察 25 日，于第 25 日称重后扑杀，剖检。根据体温、相对日增重和病毒抗原检测（附注 3）结果进行判定。攻毒对照组应至少 4 头发病（附注 4），免疫组应至少 4 头保护。

（2）小鼠免疫试验法 用 5~6 周龄 PCV2 ELISA 抗体阴性（附注 1）、健康雌性清洁级 Balb/c 小鼠（PCV2 ELISA 抗体效价不高于 1：50）15 只，分成 3 组，每组 5 只。第 1 组和第 2 组分别皮下接种参考疫苗（参考疫苗标准见附注 5）和待检疫苗，每只 0.2ml，两周后按相同途径和剂量进行第 2 次接种；第 3 组不接种，作空白对照。各组小鼠均隔离饲养观

察。首免后 5 周采血，分离血清，测定血清中 PCV2 ELISA 抗体效价（附注 1）。对照组应全部为阴性，待检疫苗免疫组平均抗体效价应不低于参考疫苗免疫组平均抗体效价，参考疫苗免疫组平均抗体效价应不低于 1：800。

【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】 用于预防由猪圆环病毒 2 型感染引起的疾病。免疫期为 3 个月。

【用法与用量】 颈部皮下或肌肉注射。仔猪 14~21 日龄首免，1ml/头，间隔两周后以同样剂量加强免疫 1 次。

【不良反应】 一般无不良反应。个别猪接种疫苗后，于注射部位可能出现轻度肿胀，体温轻度升高，1~3 日后恢复正常。

【注意事项】 （1）使用前和使用中应充分摇匀。

（2）使用前应使疫苗升至室温。

（3）一经开瓶启用，应尽快用完。

（4）本品严禁冻结，破乳后切勿使用。

（5）仅供健康猪只预防接种。

（6）接种工作完毕，应立即洗净双手并消毒，疫苗瓶及剩余的疫苗，应以燃烧或煮沸等方法做无害化处理。

【规格】 （1）20ml/瓶 （2）40ml/瓶 （3）50ml/瓶 （4）100ml/瓶 （5）250ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为 12 个月。

附注：1 PCV2 ELISA 抗体检测法 用大肠杆菌表达的 PCV2 重组 Cap 蛋白或纯化的 PCV2 作为抗原，用 pH 值 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至终浓度为 5μg/ml，包被酶标板，每孔 100μl，置 37℃下作用 2 小时，置 2~8℃下过夜；洗涤 3 次，每次 3~5 分钟；每孔加入 200μl 含 0.15%BSA 的封闭液封闭，置 37℃下作用 2 小时；洗涤 3 次，每次 3~5 分钟；将待检血清用 PBS 做 1：50 稀释，然后再做 2 倍系列稀释，每个样品一行，每孔 100μl，置 37℃下作用 1 小时；洗涤 3 次，每次 3~5 分钟；加入 HRP 标记的 SPA（1：10000 稀释）或 HRP 标记的羊抗鼠 IgG（1：5000 倍稀释）（前者用于检测猪血清，后者用于检测小鼠血清），每孔 100μl，置 37℃下作用 1 小时；洗涤 3 次，每次 3~5 分钟；加底物液 TMB 显色，每孔 100μl，室温下避光显色 10~15 分钟；加终止液（2mol/L H₂SO₄ 溶液），每孔 100μl，10 分钟内于酶标仪上读取 450nm 波长处的 OD 值。结果判定：同稀释度待检血清 OD₄₅₀ 值/阴性血清 OD₄₅₀ 值（P/N 值）不低于 2.1 时判为阳性。以 P/N 值不低于 2.1 时的血清最大稀释度作为该血清的 ELISA 抗体效价。

2 PCV2 抗原 PCR 检测法

2.1 引物 根据 PCV2 SH 分离株基因序列设计并合成如下 PCR 引物：PCV2-P1：5'-TTC GGT ACC AGC TAT GAC GTA TCC AAG-3'；PCV2-P2：5'-GCC AAG CTT TCA CTT CGT AAT GGT TTT-3'。

2.2 病毒 DNA 提取 用 DNAzol 试剂盒提取病毒 DNA，按产品说明书进行操作。基本步骤为：向 200μl 淋巴结组织悬液或血清中加入 400μl DNAzol，以 12000r/min 离心 15 分钟；取上清，加入 2 倍体积的无水乙醇沉淀，以 12000r/min 离心 15 分钟；弃去上清液，

用 75% 乙醇洗涤 DNA, 以 12000r/min 离心 5 分钟; 最后用 8mmol/L NaOH 溶液溶解 DNA。

2.3 PCR 总反应体系 25 μ l, 其中含上游引物 PCV2-P1 1 μ l, 下游引物 PCV2-P2 1 μ l, 25mmol/L Mg²⁺ 1.5 μ l, 2.5mmol/L dNTPs 2.0 μ l, 10 \times 无 Mg²⁺ 缓冲液 2.5 μ l, Taq 酶 0.2 μ l, ddH₂O 11.8 μ l, 模板 DNA 5 μ l。循环反应参数: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 分钟; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 秒, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 秒, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶上电泳观察。

2.4 结果判定 当阳性对照产物出现约 751bp 的扩增带、阴性对照产物未出现目的条带时, 实验结果成立。被检样品出现约 751bp 的扩增带时判为 PCV2 抗原阳性, 否则判为 PCV2 抗原阴性。

3 淋巴结中 PCV2 抗原免疫组化检测法

3.1 样品固定 取新鲜支气管淋巴结或腹股沟淋巴结样品, 浸泡于 4% 甲醛溶液 [用 PBS (pH 值 7.2~7.4) 配制 (NaCl 37mmol/L、KCl 2.7mmol/L、Na₂HPO₄ 4.3mmol/L、KH₂PO₄ 1.4mmol/L)], 固定 8~12 小时后, 将组织取出, 修整为合适大小 (一般厚度不超过 5mm), 重新将组织固定于 4% 的多聚甲醛中, 继续固定 8~12 小时。

3.2 组织脱水、透明、包埋 将固定好的组织取出, 可稍作修整后, 置于脱水筐中, 用梯度酒精脱水, 75% 乙醇 45~60 分钟, 75% 乙醇 45~60 分钟, 85% 乙醇 45~60 分钟, 85% 乙醇 45~60 分钟, 95% 乙醇 1~2 小时, 95% 乙醇 1~2 小时, 无水乙醇 1~2 小时, 无水乙醇 1~2 小时, 将脱水完全的组织浸泡于二甲苯中 3 分钟左右, 取出后, 置 60 $^{\circ}$ C 石蜡中透蜡 2 次, 1~1.5 小时/次。透蜡后, 将组织包埋于旧石蜡中。

3.3 载玻片及盖玻片处理 将新的载玻片和盖玻片泡酸过夜, 用自来水充分冲洗后, 去离子水中清洗干净, 并在温箱中烘干备用。

3.4 切片、贴片、烤片 制备组织切片时, 厚度不超过 5 μ m。将切好的组织在 42 $^{\circ}$ C 水浴中充分展平后, 贴于载玻片上。贴片后平放一段时间, 防止组织滑落, 然后置于染色架上 60 $^{\circ}$ C 烤片过夜。处理好的组织切片可置 2~8 $^{\circ}$ C 保存。

3.5 脱蜡和水化 将组织芯片置于二甲苯中浸泡 10 分钟, 更换二甲苯后再浸泡 10 分钟; 然后于无水乙醇中浸泡 5 分钟, 更换无水乙醇再浸泡 5 分钟; 于 95% 乙醇中浸泡 5 分钟, 更换 95% 乙醇再浸泡 5 分钟; 置于 85% 乙醇中浸泡 5 分钟, 更换 85% 乙醇再浸泡 5 分钟; 于 75% 乙醇中浸泡 5 分钟, 更换 75% 乙醇再浸泡 5 分钟。用 PBS (pH 值 7.2~7.4) 冲洗 2~3 次, 每次 5 分钟。

3.6 抗原修复 在微波炉中将 0.01mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH 值 6.0, 每 1000ml 含柠檬酸三钠 3g、柠檬酸 0.4g) 加热至 97 $^{\circ}$ C, 将组织切片放入缓冲液, 继续在微波炉中 97 $^{\circ}$ C 维持 10~20 分钟, 取出后自然冷却至室温, 然后用 PBS 清洗 2~3 次, 每次 5 分钟。

3.7 封闭内源性过氧化物酶 将清洗好的组织切片擦干或自然干燥后, 滴加含 3% H₂O₂ 的甲醇溶液 100 μ l, 于室温中孵育 15~20 分钟。

3.8 封闭 将含 1.5% BSA 的封闭液滴加在组织上, 50 μ l/块, 于室温下封闭 15~20 分钟。

3.9 PCV2 抗体孵育 将猪圆环病毒 2 型抗血清作 1:50 稀释后, 每片组织上滴加 50 μ l, 置湿盒内, 在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时, 用 PBS 清洗 3~5 次, 每次 5 分钟。

3.10 HRP-SPA (或 HRP-羊抗鼠 IgG) 孵育 将 HRP-SPA (或 HRP-羊抗鼠 IgG) 用 PBS 作 1:100 稀释, 每片组织上滴加 50 μ l, 置 37 $^{\circ}$ C 下孵育 1 小时, 用 PBS 清洗 3~5 次, 每次 5 分钟。

3.11 DAB 显色 将组织片用干净吸水纸干燥后, 滴加 DAB 显色液 50 μ l, 于室温下显色 3 分钟, 具体显色时间可在显微镜下掌握。显色结束后, 用自来水冲洗 10 分钟左右或在 PBS 中浸泡 10 分钟, 防止背景着色较深。

3.12 苏木精复染、脱水、透明、封片 将显色后的组织用苏木精复染 30 秒, 然后用自来水充分清洗, 再用梯度酒精脱水, 即 75% 乙醇 3~5 分钟, 85% 乙醇 3~5 分钟, 95% 乙醇 3~5 分钟, 95% 乙醇 3~5 分钟, 无水乙醇 3~5 分钟, 无水乙醇 3~5 分钟, 然后于二甲苯中充分透明 3 分钟左右, 取出后在二甲苯未挥发完全时封片。

3.13 镜检观察 在高倍显微镜下观察, 淋巴滤泡中出现棕黄色着色巨噬细胞时判为 PCV2 阳性。

4 仔猪发病的判定标准

4.1 体温标准 体温升高 ($\geq 40^{\circ}$ C) (每日上午 10 点左右测定仔猪体温一次), 至少持续 3 日。

4.2 相对日增重标准 根据每头猪的个体相对日增重计算每组猪的平均相对日增重, 并将各组的平均相对日增重与空白对照组的平均相对日增重进行比较。当平均相对日增重显著低于空白对照组 ($P < 0.05$) 时, 判定该组所有猪有临床症状。

个体相对日增重 = (攻毒后第 25 日体重 - 攻毒当日体重) \div 25 \div 攻毒当日体重。

P 值计算, 采用相关生物统计软件 (如 SPSS17.0) 进行。

4.3 病毒抗原检测 用免疫组化方法检测淋巴结组织, 应检测到 PCV2 抗原。

符合 4.1、4.2 和 4.3 项中的任何 2 项, 即可判为发病。

5 参考疫苗质量标准

本品系用猪圆环病毒 2 型 (PCV2) SH 株接种 PK15-B1 克隆细胞培养, 收获细胞培养物, 经甲醛溶液灭活, 与矿物油佐剂混合乳化制成。用于猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (SH 株) 成品效力检验。灭活前的病毒含量不低于 $2.0 \times 10^{5.0}$ TCID₅₀/ml。

【性状】 外观 乳白色或淡粉红色均匀乳状液。

剂型 呈双相油乳剂 (W/O/W)。取一清洁吸管, 吸取少量疫苗滴于清洁冷水表面, 应呈云雾状扩散。

稳定性 吸取疫苗 10ml 加入 15mm \times 100mm 离心管中, 以 3000r/min 离心 15 分钟, 应不出现分层现象, 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 14~21 日龄 PCV2 ELISA 抗体阴性 (附注 1) 和 PCV2 抗原阴性 (附注 2) 阴性健康仔猪 3 头, 每头肌肉注射疫苗 4ml, 连续观察 14 日, 应无异常临床反应。

【效力检验】 (1) 仔猪免疫攻毒法 用 14~21 日龄 PRRSV ELISA 抗体阴性 (IDEXX 试剂盒)、PCV2-ELISA 抗体阴性 (附注 1) 和 PCV2 抗原阴性 (附注 2) 阴性健康易感仔猪

15 头，分成 3 组，每组 5 头，第 1 组每头颈部肌肉注射疫苗 1ml，两周后按相同的途径和剂量进行第 2 次接种，第 2 组作非免疫攻毒对照，第 3 组作空白对照（非免疫、非攻毒），均隔离饲养观察。首免后 5 周对所有猪称重。第 1、2 组用 PCV2 SH 株（含 $10^{6.0}$ TCID₅₀/ml）攻击，每头猪滴鼻 1ml、肌肉注射 2ml，隔离饲养。攻毒后第 4、7 日三组所有猪分别在猪的两腋下及两臀部位的 4 个点接种用弗氏不完全佐剂乳化的钥匙孔血蓝蛋白（KLH/ICFA，0.5mg/ml），每个点接种 1ml（4ml/头），同时腹腔接种巯基乙酸培养基，10ml/头；攻毒后第 11 日、第 19 日再次腹腔接种巯基乙酸培养基，10ml/头。攻毒后连续观察 25 日，于第 25 日称重后扑杀，剖检。根据体温、相对日增重和病毒抗原检测（附注 3）结果进行判定。攻毒对照组应至少 4 头发病（附注 4），免疫组应至少 4 头保护。

（2）小鼠免疫试验法 用 5~6 周龄 PCV2 ELISA 抗体阴性（附注 1）、健康雌性清洁级 Balb/c 小鼠（PCV2 ELISA 抗体效价不高于 1：50）10 只，分成 2 组，每组 5 只。第 1 组皮下接种疫苗，每只 0.2ml，两周后按相同途径和剂量进行第 2 次接种；第 2 组不接种，作空白对照。各组小鼠均隔离饲养观察。首免后 5 周采血，分离血清，测定血清中 PCV2 ELISA 抗体效价（附注 1）。对照组应全部为阴性，疫苗免疫组抗体平均效价应不低于 1：800。

【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。

【规格】 20ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为 12 个月。

附加说明：

1. 本标准由南京农业大学、洛阳普莱柯生物工程有限公司、江苏南农高科技股份有限公司提出。
2. 本标准于 2010 年 08 月 27 日经农业部公告第 1448 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+ NJ02 株）

Ji Xinchengyi Chuanranxingzhiqiguanyan Qinliugan (H9 Yaxing)

Sanlian Miehuoyimiao (La Sota Zhu + M41 Zhu + NJ02 Zhu)

Newcastle Disease, Infectious Bronchitis and Avian Influenza (H9 Subtype)

Vaccine, Inactivated (Strain La Sota+Strain M41+Strain NJ02)

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、禽流感病毒 A/Chicken/NanJing/02/2001 (H9N2) 株（简称 NJ02 株）分别接种易感鸡胚培养，收获感染胚液，浓缩后经甲醛溶液灭活，与油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡新城疫、传染性支气管炎及 H9 亚型禽流感病毒引起的禽流感。

【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，除第一滴外，均应不扩散。

稳定性 吸取疫苗 10ml，装于离心管中，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 7~9 日龄 SPF 鸡 10 只，每只颈背部皮下注射疫苗 0.6ml，观察 14 日，应不出现因注射疫苗而出现的局部或全身反应。

【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，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，其中 10 只各颈部皮下注射疫苗 12 μ l (1/25 羽份)，另 5 只作不免疫作为对照。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，未免疫对照鸡 HI 抗体效价均应不高于 1:4。

免疫攻毒法 用 30~60 日龄 SPF 鸡 15 只，其中 10 只各颈部皮下注射疫苗 12 μ l (1/25 羽份)，另 5 只不免疫作为对照。接种后 21~28 日，每只鸡各肌肉注射鸡新城疫病毒北京株 (CVCC AV1611 株) $10^{5.0}$ ELD₅₀，观察 14 日，对照鸡应全部死亡，免疫组应至少保护 7 只。

(2) 鸡传染性支气管炎部分 用 3~4 周龄 SPF 鸡 15 只，其中 10 只各滴鼻接种鸡传染性支气管炎活疫苗 (H120) 1 羽份，另 5 只不接种作为对照。21 日后，分别采血，免疫鸡再接种灭活疫苗 0.3ml (1 羽份)，二免后 28 日，分别采血。将两次血清分别进行 HI 抗体效价测定 (见附注)。免疫鸡二免血清的 HI 抗体效价几何平均值应不低于首免血清的 3 倍，对照鸡血清 HI 抗体效价均应不高于 1:8。

(3) 禽流感 (H9 亚型) 部分 下列方法任择其一。

血清学方法 用 3~4 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，分别采血，分离血清，用 H9 亚型抗原测定 HI 抗体效价。免疫鸡血清 HI 抗体的几何平均值应不低于 1:64，对照鸡血清均不应高于 1:4。

免疫攻毒法 用 3~4 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，用 H9 亚型禽流感病毒 NJ02 株病毒液进行静脉注射，每只 0.2ml (含 $10^{7.0}$ EID₅₀)，攻毒后第 4~6 日，采集喉拭子进行分离病毒。将每只鸡的拭子样品经尿囊腔接种 10~11 日龄 SPF 鸡胚 5 枚，每胚 0.2 ml，孵育观察 5 日，无论死胚、活胚均应测定鸡胚液血凝价，5 枚鸡胚中只要有 1 枚鸡胚的鸡胚液的 HA 价不低于 1:16 则判为感染。对病毒感染为阴性的鸡胚，应盲传一次，免疫组应至少有 9 只鸡病毒分离阴性，对照鸡应至少 4 只病毒分离阳性。

【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】 用于预防鸡新城疫、传染性支气管炎及 H9 亚型禽流感病毒引起的禽流感。免疫期为 4 个月。

【用法与用量】 颈部皮下注射。7 日龄以上鸡，每只 0.3ml。

【不良反应】 一般无可见的不良反应。

【注意事项】 (1) 仅用于接种健康鸡群。

(2) 严防冻结与高温。

(3) 使用前应将疫苗温度升至室温，并将疫苗摇匀。

(4) 遇有破乳、分层、变质时，不得使用。

(5) 疫苗开启后，限当日用完。

(6) 接种时，应执行常规无菌操作。

【规格】 (1) 100ml/瓶 (2) 250ml/瓶 (3) 300ml/瓶 (4) 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质量标准及血凝抑制试验操作术式

1 鸡传染性支气管炎血凝抑制(HI)试验抗原质量标准

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

【性状】 无色疏松团块，加稀释液后迅速溶解。

【效价测定】 按标识体积稀释后，HA 效价应不低于 1:128。

【特异性检验】 抗原与阴性血清、鸡新城疫、禽流感 H9 亚型、减蛋综合征阳性血清的 HI 效价均应不高于 1:8。

【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 HI 试验操作术式

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 型微量板 1 块，每孔加入 25μl 生理盐水，第一排加 25μl 抗原，并作 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 生理盐水，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 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 4 HA 单位抗原的配制 根据测定的 HI 抗原 HA 效价，用生理盐水配制 4 HA 单位抗原。将配制好的 4 HA 单位抗原用生理盐水稀释，使其稀释度为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6 和 1:7。在每一个稀释度的 25μl 抗原中加入 25μl 生理盐水，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 100% 红细胞凝集终点，表明配制的是 4 HA 单位工作抗原，如果 100% 红细胞凝集终点是 1:5 或 1:6，表明配制的 4 HA 单位抗原实际上是高于 4 个单位；如果 100% 红细胞凝集终点是 1:2 或 1:3，表明配制的 4 HA 单位抗原实际上是低于 4 个单位。应根据检验结果作适当调整，使工作抗原为 4 HA 单位。

2.2 HI 试验

2.2.1 取 96 孔 V 型微量反应板，每孔加入 25μl 生理盐水。

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，然后作 2 倍系列稀释。

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

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

2.2.5 结果判定 将反应板倾斜, 凡血清反应孔与红细胞对照孔中红细胞以同样速度从孔底流淌者判为血凝抑制。当阴性血清 HI 效价不高于 1:8、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。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. 本标准由国家兽用生物制品工程技术研究中心、南京天邦生物科技有限公司、江苏省农业科学院兽医研究所提出。

2. 本标准于 2010 年 08 月 27 日经农业部公告第 1448 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。

猪细小病毒病灭活疫苗 (L 株)

Zhu Xixiaobingdubing Miehuoyimiao (L Zhu)

Swine Parvovirus Vaccine, Inactivated (Strain L)

本品系用猪细小病毒 L 株接种 ST 传代细胞培养, 收获病毒液, 经 BEI 灭活后, 浓缩, 加矿物油佐剂混合乳化制成。用于预防猪细小病毒病。

【性状】 外观 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, 应不出现破乳现象, 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】 用体重 10~20kg 仔猪 (猪瘟中和抗体阴性、PPV HI 抗体价应不高于 8, 见附注) 2 头, 各深部肌肉注射疫苗 5ml。逐日观察 21 日, 应无不良反应。

【效力检验】 效力检验 用体重 350~400g 成年豚鼠 (PPV HI 抗体价应不高于 8, 见附注) 5 只, 各肌肉注射疫苗 0.5ml。28 日后, 连同条件相同的对照豚鼠 3 只, 采血分离血清, 测定 PPV HI 抗体效价。对照豚鼠的血清 HI 抗体效价应不高于 8, 免疫豚鼠至少应有 4 只出现抗体反应, 且 HI 抗体效价应不低于 64。

【汞类防腐剂残留量测定】 按现行《中国兽药典》附录进行测定, 应符合规定。

【作用与用途】 用于预防猪细小病毒病。免疫期为 6 个月。

【用法与用量】 颈部肌肉注射，每头 2ml。推荐免疫程序：初产母猪 5~6 月龄时接种 1 次。经产母猪于每次配种前 3~4 周接种 1 次，种公猪每年接种 2 次。

【不良反应】 无不良反应。

【注意事项】 (1) 使用前应使疫苗恢复到室温，并充分摇匀。

(2) 应防止疫苗受高温、消毒剂的作用，并避免阳光照射。

(3) 使用前应认真检查疫苗，如出现破乳、变质等均不可使用。

(4) 在标明的有效期内使用疫苗，疫苗瓶开封后，应予当日用完。

(5) 切忌疫苗冻结。

(6) 怀孕母猪不宜使用。

【规格】 (1) 4ml/瓶 (2) 20ml/瓶 (3) 100ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃ 保存，有效期为 12 个月。

附注：1 猪细小病毒血凝抑制试验 (HI) 抗原质量标准

本品系用猪细小病毒 L 株接种 ST 传代细胞，收获感染细胞液，经测定血凝价后制备而成。

1.1 性状 橙红色液体。

1.2 效价测定 HA 效价应不低于 256。

1.3 特异性 将抗原用 PBS 稀释为 200TCID₅₀，与等量抗猪细小病毒特异性血清混合，置 37℃ 水浴中和 1 小时后，接种 ST 传代细胞，培养 5 日，应不产生 CPE。

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

2 猪细小病毒血凝抑制试验 (HI) 抗体测定操作术式

2.1 猪细小病毒血凝试验 (HA) 取 96 孔 U 型微量反应板，每孔加 25μl PBS (0.01mol/L, pH 值 7.0~7.4)，第一列各孔中加 25μl 抗原，然后将抗原进行 2 倍系列稀释，直至第 11 孔，弃去 25μl。每孔加入 25μl PBS，再加入 0.6% 豚鼠红细胞悬液 25μl，用微量振荡器混合混匀，置室温下作用 1 小时。判定结果时，以使 50% 红细胞凝集的抗原最高稀释倍数作为判定终点。

2.2 猪细小病毒血凝抑制试验 (HI)

2.2.1 抗原工作液配制 根据测定的抗原 HA 效价，用 PBS 配制成 4HA 单位抗原。

2.2.2 待检血清的处理 取 100μl 待检血清，56℃ 水浴灭活 30 分钟后，加入 300μl 25% 白陶土悬液，混匀，置室温下作用 30 分钟，以 4000r/min 离心 10 分钟，吸取上清，加入 100μl 20% 的豚鼠红细胞泥，振荡混匀后 37℃ 作用 1 小时，以 4000 r/min 离心 10 分钟，收集上清，即为 1:4 稀释的血清样品。

2.2.3 试验操作 向 96 孔 U 型微量反应板各孔中加入 25μl PBS，红细胞对照孔中加 50μl。第 1 孔中加入经处理的待检血清 25μl，混匀，取出 25μl 加至第 2 孔，依次类推，直到第 10 孔，弃去 25μl，此时待检血清的稀释度分别为 1:8、1:16、...1:4096。除红细胞对照孔外，每孔中再加入抗原工作液 25μl，此时第 11 孔即为病毒对照孔，振荡混匀，置 37℃ 作用 1 小时，每孔中加入 0.6% 豚鼠红细胞悬液 25μl，振荡混匀，置室温下作用 2 小时，观

察结果。

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

附加说明：

1. 本标准由哈药集团生物疫苗有限公司提出。
2. 本标准于 2010 年 09 月 09 日经农业部公告第 1457 号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》要求改变黏度测定方法，为黏度计法。
4. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

猪圆环病毒 2 型灭活疫苗（LG 株）

Zhu Yuanhuanbingdu Erxing Miehuoyimiao (LG Zhu)

Porcine Circovirus Type 2 Vaccine, Inactivated (Strain LG)

本品系用猪圆环病毒 2 型 LG 株接种猪肾传代细胞 (PK15) 培养，收获病毒液，经甲醛灭活后，加矿物油佐剂混合乳化制成。用于预防猪圆环病毒 2 型感染引起的相关疾病。

【性状】 外观 粉白色乳状液。

剂型 水包油型，取一清洁吸管，吸取少量疫苗滴于冷水表面，应呈云雾状扩散。

稳定性 吸取疫苗 10ml 加入离心管中，以 3000r/min 离心 30 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 30~40 日龄健康易感仔猪（用 IPMA 法检测 PCV2 抗体效价，应低于 50，见附注 1）5 头，各颈部肌肉接种疫苗 2ml，连续观察 14 日。接种前 1 日及接种后逐日测定体温，每日上、下午各测定 1 次。应不出现体温升高，或仅于接种次日体温升高不超过 1℃，在观察期内应不出现由疫苗注射引起的任何局部或全身不良反应。

【效力检验】 下列方法任择其一。

(1) 抗体检测 用 30~40 日龄健康易感仔猪（IPMA 法检测 PCV2 抗体效价，应低于 50，见附注 1）10 头，随机等分成 2 组。其中一组分别经颈部肌肉注射途径接种疫苗 1ml，21 日后，以相同剂量和途径加强免疫 1 次；另一组不接种疫苗，作为对照组。二免后 14 日采血，分离血清，用 IPMA 法（见附注 1）检测血清抗体效价。免疫猪应至少 4 头抗体效价不低于 800，对照猪抗体效价均应低于 50。

(2) 免疫攻毒 二免后 14 日，取上述免疫猪和对照猪，用 PCV2 LG 株强毒攻击，通过滴鼻和肌肉注射途径各接种 1ml ($10^{5.0}$ TCID₅₀)。称取攻毒当日体重。攻毒后 28 日，将所有猪称重后扑杀，取腹股沟淋巴结样品，采用荧光定量 PCR 法（见附注 2）检测病毒核酸载量。相对增重率（见附注 3）应不低于 5%；免疫猪应至少 4 头病毒核酸载量不高于 3.5×10^7 拷贝/g 组织，对照猪应至少 4 头病毒核酸载量不低于 1.45×10^9 拷贝/g 组织。

【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】 用于预防猪圆环病毒 2 型感染引起的相关疾病，适用于 3 周龄以上仔猪和成年猪。

【用法与用量】 颈部肌肉注射。新生仔猪：3~4 周龄首免，间隔 3 周加强免疫 1 次，1ml/头；后备母猪：配种前作基础免疫 2 次，间隔 3 周，产前 1 个月加强免疫 1 次，2ml/头；经产母猪跟胎免疫，产前 1 个月接种 1 次，2ml/头；其他成年猪实施普免，每半年 1 次，2ml/头。

【不良反应】 一般无可见的不良反应。

【注意事项】 (1) 本品仅用于接种健康猪群。

(2) 瘦弱、体温或食欲不正常的猪只不宜注射疫苗。

(3) 疫苗应冷藏运输和保存，切勿冻结，发生破乳、变色现象者应废弃。

(4) 疫苗使用前应放至室温，充分振摇，严格消毒，开封后应当日用完。

(5) 注苗后猪只可能出现一过性体温升高、减食现象，一般可在 2 日内自行恢复。

(6) 如有个别猪只发生过敏反应，可用肾上腺素救治。

(7) 剩余的疫苗及空瓶不得任意丢弃，须经加热或消毒灭菌后方可废弃。

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

【贮藏与有效期】 2~8℃避光保存，有效期为 18 个月。

附注：1 IPMA 法

1.1 溶液配制

1.1.1 PBS (0.01mol/L, pH 值 7.4) 称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, KH_2PO_4 0.2g, KCl 0.2g, NaCl 8g, 加蒸馏水定容至 1L, 12 磅高压灭菌 30 分钟，置室温下保存。

1.1.2 AEC 底物储液 称取 AEC (9-amianoethyl carbazole) 200mg, 溶解于 50 ml 二甲基甲酰胺中，置 2~8℃下避光保存。

1.1.3 0.1mol/L 乙酸盐缓冲液 称取无水乙酸钠 8.2g, 加蒸馏水至 1L, 溶解后，用冰醋酸调至 pH 值 5。

1.1.4 底物显色液 取 0.1 mol/L 乙酸盐缓冲液 5 ml, 加蒸馏水 5ml, 滴加 AEC 底物储存液 500 μl 和 30% H_2O_2 13 μl 。

1.2 血清样品 新采集或置 -20℃ 保存的血清样品。无需补体灭活。

1.3 IPMA 反应板的准备 将 PCV2 LG 株稀释成 $10^{4.0}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$, 加入新消化的 PK15 细胞悬液 ($2 \times 10^5/\text{ml}$)，按 100 μl /孔分别加入 96 孔细胞培养板奇数列各孔。偶数列各孔加不含病毒的细胞悬液，作为对照。置 37℃、5% CO_2 培养箱中培养至单层，弃去细胞孔内液体，用 PBS 洗板 1 次，置通风厨内室温下干燥细胞 30 分钟，每孔加入 100 μl 33% 丙酮-PBS 液，室温下固定 20 分钟，弃去固定液，置通风厨内、室温下干燥 30 分钟，密封于塑料袋内，置 -20℃ 以下保存。

1.4 操作 取 IPMA 反应板，置室温下，用 PBS 洗涤 1 次。用 PBS 将待检血清样品从 50 倍起进行 2 倍系列稀释，同时设 PCV2 阴、阳性血清对照，每个稀释度各加入 1 个抗原孔和 1 个对照孔，100 μl /孔，置 37℃ 下湿盒中作用 1 小时，用 PBS 洗涤 3 次，加入 3000 倍稀释的 HRP-SPA 液，100 μl /孔，置 37℃ 下湿盒中作用 1 小时，用 PBS 洗涤 3 次，

每孔加 50 μ l 底物显色液，置室温下显色 30 分钟。弃去底物显色液，蒸馏水洗涤 1 次，干燥后在普通显微镜下观察判定结果。

1.5 判定 PCV2 阳性血清与病毒感染孔应呈棕红色反应，与细胞对照孔无着色反应；阴性血清与细胞对照孔和病毒感染细胞均无着色反应。上述试验对照成立的前提下，判定待检血清的检测结果。以出现阳性反应的待检血清最高稀释倍数的倒数作为其抗体效价。

2 荧光定量 PCR 法

2.1 引物设计 上游引物为PCV2-F: 5-TAGGTTAGGGCTGTGGCCTT-3; PCV2-R: 5-CCGCACCTTCGGATATACTg-3, 特异性扩增PCV2片段大小约263bp。

2.2 标准DNA模板 含PCV2全长基因组重组质粒 (pUC-PCV2) 由哈尔滨兽医研究所构建。经鉴定的重组质粒用于制备荧光定量PCR标准品，用紫外法测定质粒DNA浓度，小量分装，置-20 $^{\circ}$ C以下保存备用。

2.3 荧光定量PCR操作程序 采用SYBR Premix Ex Taq试剂盒进行荧光定量PCR试验。以重组质粒标准品为模板，在Rotor Gene 3000 PCR仪 (Corbett公司) 上应用矩阵法对实时定量PCR的循环参数、引物浓度等条件进行优化。反应体系为25 μ l，配制如下：2 \times SYBR Premix Ex Taq预混液12.5 μ l，DNA模板2 μ l，上下游引物 (20pmol/L) 各0.25 μ l，加灭菌双蒸水至终体积25 μ l。反应条件为：94 $^{\circ}$ C预变性5分钟；94 $^{\circ}$ C变性15秒、55 $^{\circ}$ C退火30秒、72 $^{\circ}$ C延伸45秒，共40个循环；每一循环延伸时采集荧光信号进行荧光定量PCR检测。

2.4 标准曲线确定 将重组质粒标准品经10倍系列稀释，设定质粒浓度范围为 $10^7 \sim 10^1$ 拷贝/ μ l，每个稀释度设3个重复，按照荧光定量PCR操作程序进行试验，确定标准曲线。

2.5 试验猪样品采集及检测 取试验猪腹股沟淋巴结样品，经称重后研磨制成 10 倍稀释的乳剂，按下述方法提取病毒 DNA 样品，然后进行荧光定量 PCR 操作。

2.6 病毒 DNA 提取 取 472 μ l 乳剂样品，加入 25 μ l 10%SDS 和 2.5 μ l 蛋白酶 K (25mg/ml)，置 50 $^{\circ}$ C 水浴作用 2 小时，加入等量饱和酚，涡旋 20 秒，以 15000r/min 离心 5 分钟，取上清液移入新管。于上清液中加 500 μ l 的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1) 抽提一次，同上离心取上清。按 1/10 体积加入 3mol/L 醋酸钠 (pH 值 5.3)；加 2 倍体积的无水异醇，置冰浴 15 分钟；以 15000r/min 离心 10 分钟沉淀 DNA。加入 70%乙醇 1ml，离心洗涤 DNA，以 15000r/min 离心 5 分钟，弃上清，取沉淀，真空干燥。加入 20 μ l 双蒸馏水溶解，置-20 $^{\circ}$ C以下保存备用。

3 增重率计算公式

$$\text{相对增重率 (\%)} = \frac{\text{免疫组猪平均日增重} - \text{攻毒对照组猪平均日增重}}{\text{攻毒对照组猪平均日增重}}$$

附加说明：

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

2. 本标准于 2010 年 09 月 19 日经农业部公告第 1464 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。

犬细小病毒免疫球蛋白注射液

Quan Xixiaobingdu Mianyiqiudanbai Zhusheye

Immunoglobulin G Injection against Canine Parvovirus

本品系用犬细小病毒(CPV)细胞培养弱毒抗原免疫接种健康关中驴制成的犬细小病毒免疫球蛋白注射液。用于治疗犬细小病毒引起的犬急性出血性肠炎。

【性状】 微带乳白色的清明液体,在冷暗处久置后,瓶底可能有微量白色沉淀,轻摇即可溶解。

【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。

【鉴别检验】 将 CPV 病毒液稀释至 200TCID₅₀/0.2ml,与本品等量混合,置 37℃中和 1 小时后,接种生长良好的 F81 单层细胞(40 孔培养板)6 孔,每孔 0.2ml,同时设病毒对照孔,每孔接种 CPV 病毒液 0.2ml,置 37℃培养 96 小时,观察 CPE。病毒对照组细胞孔应全部出现 CPE,中和组细胞孔应无 CPE。

【安全检验】 用 50~60 日龄、体重为 2.0~3.0kg 的健康犬(CPV 中和抗体效价不高于 1:4)3 只,每只肌肉注射本品 2.5ml/kg,共注射 6 次,每次间隔 12 小时,末次注射后隔离观察 14 日,均应健活,精神、食欲、体温与粪便均应无异常。

【F(ab)₂(分子量 23000)含量测定】 按附注 1 进行,CPV-IgG F(ab)₂含量应≥60%。

【热原检查】 按附注 2 进行检验,应符合规定。

【效力检验】 下列方法任择其一。

(1)疗效检验 用 50~60 日龄、体重 2.0~3.0kg 的健康犬(CPV 中和抗体不高于 1:4)10 只,各口服 CPV 肠血毒液 1ml(含 200ID₅₀),从中选 CPV 临床症状典型病犬 7 只,分成两组:第一组 4 只犬为治疗组,按每千克体重肌肉注射 0.5ml,每日注射两次(间隔 12 小时),连用 3~5 日,第二组 3 只犬为对照组,仅口服肠血毒液 1ml。

对照犬应于口服肠血毒液后的 3~5 日内全部出现典型 CPV 症状:食欲废绝,精神沉郁,频频呕吐,大便带血,间或附有粘液或肠粘膜,取腹泻样品用 1%猪红血球测定、HA 效价应不低于 1:64,7 日内应至少有 2 只犬死亡。治疗组的 4 只犬,观察 7 日,应至少 3 只健活。

(2) VN 效价 按附注 3 进行, VN 效价应≥1:80。

(3) HI 效价 按附件 4 进行, HI 效价应≥1:128。

【作用与用途】 用于治疗犬细小病毒引起的犬急性出血性肠炎。

【用法与用量】 肌内或皮下注射,也可静脉滴注。每次 0.5ml/kg,每日 2 次,每次间隔 12 小时,根据症状轻重可连用 3~5 日,必要时可配合输液或静脉给药。

【不良反应】 注射该制剂时,应在兽医指导下使用,个别犬偶有过敏,应及时注射脱敏药物。

【注意事项】 瓶内出现摇不散的团块、瓶裂、外观混浊以及过期失效者严禁使用。

【规格】 2ml/支

【贮存与有效期】 2~8℃保存，有效期为12个月。

附注：1 CPV-IgG F(ab)₂ (分子量23000) 片段含量测定 用SDS-PAGE法测定。

1.1 试剂

1.1.1 丙烯酰胺溶液 取丙烯酰胺14g，双丙烯酰胺0.367g，加纯化水至50ml。

1.1.2 缓冲液 PBS (0.2mol/L, pH值7.2) - 0.2%十二烷基磺酸钠(SDS) 取磷酸二氢钠(含2个结晶水)17.8g，磷酸氢二钠(含12个结晶水)103g，SDS4g，加纯化水至2000ml。

1.1.3 样品结合液 取10%SDS溶液4ml, PBS(0.2mol/L, pH值7.2)0.2ml, 甘油10ml, 加蒸馏水至20ml。

1.1.4 电极缓冲液 取上述1.1.2项缓冲液稀释3倍。

1.1.5 固定液 取甲醇400ml, 冰醋酸70ml, 加纯化水至1000ml。

1.1.6 染色液 取考马斯亮蓝2.5g, 溶于500ml甲醇中, 加冰醋酸70ml, 再加纯化水至1000ml。

1.1.7 脱色液 取冰醋酸70ml, 甲醇50ml, 加纯化水至1000ml。

1.1.8 干燥液 取甘油30ml, 甲醇200ml, 加纯化水至1000ml。

1.2 操作

1.2.1 样品处理 取待检样品0.1ml, 加样品结合液0.1ml, 100℃煮沸1~2分钟(或37℃2小时)后, 冷却。

1.2.2 凝胶板制备 按下列比例制备所需量凝胶溶液 PBS (0.2mol/L, pH值7.2) : 丙烯酰胺溶液:水:1.5%过硫酸铵=2:1:0.8:0.25。最后加1~2滴四甲基乙二胺(TEMED), 混匀后立即将胶液加入电泳槽的玻璃板间, 要避免产生气泡。

1.2.3 加样 于每个样品孔内加入已经处理过的样品蛋白25μg。

1.2.4 电泳 电泳条件为每个样品孔的电流恒定为2~3mA。当溴酚蓝电泳至底部时停止电泳。

1.2.5 固定 将电泳后的胶板放入固定液中, 过夜。

1.2.6 染色及脱色 于染色液中染色1~2小时, 然后置脱色液中进行脱色, 直至底色成为无色为止。

1.2.7 干燥保存

1.3 结果计算 将干燥后的胶板用扫描仪于520nm处对每一样品进行扫描, 根据F(ab)₂ (分子量23000) 片段占有区带总面积的百分比计算F(ab)₂ (分子量23000) 的百分含量。

计算公式为: 含量=反应面积/总面积。

2 热原检查

2.1 方法 选用体重1.7~3.0kg、体温为38.0~39.6℃、最高与最低体温相差不超过0.4℃的健康家兔3只, 按0.5ml/kg剂量静脉注射已温热至38℃的待检样品, 每隔30分钟测量其体温, 共测6次, 取最高体温减去正常体温的值作为该兔的升高体温。如3只中有1只体温

升高 0.6℃或以上，或者 3 只家兔体温升高均低于 0.6℃，但体温升高总和达到 1.4℃或 1.4℃以上，应另取 5 只家兔复试，检测方法同上。

2.2 判定

2.2.1 初试的 3 只家兔中，体温升高均低于 0.6℃，并且 3 只家兔体温升高总和低于 1.4℃；或在复试的 5 只兔子中，体温升高 0.6℃或 0.6℃以上的家兔不超过 1 只，并且初试和复试的 8 只家兔的体温升高总和为 3.5℃或 3.5℃以下，判为热原检查合格。

2.2.2 在初试的 3 只家兔中，体温升高 0.6℃或 0.6℃以上的家兔超过 1 只；或在复试的 5 只家兔中，体温升高 0.6℃或 0.6℃以上家兔超过 1 只；或初试和复试的 8 只家兔的体温升高总和超过 3.5℃，判为热原检查不合格。

3 中和抗体测定法 用 E-MEM 培养液将待检样品作 2 倍系列稀释，取 1:16、1:32、1:64、1:128、1:256、1:512 6 个稀释度，每个稀释度与 CPV 抗原（含 200TCID₅₀）等量混合，于 37℃感作 1 小时。取各稀释度，分别接种生长良好的 F81 细胞单层 96 孔培养板 5 孔，每孔 0.1ml，35℃培养 3~4 日。观察各细胞孔 CPE，记录每个稀释度中无 CPE 的细胞孔数，计算其半数保护量。按 Reed-Muench 法计算，能使 50%细胞孔保护的最高稀释度为其中和效价。

4 HI 抗体效价测定法

4.1 血凝素凝集价测定 在 96 孔 V 型微量板上测定。用 PBS (0.015mol/L, pH 值 6.4) 将血凝素稀释成不同倍数，加入 1%猪红细胞悬液，再加入 0.25ml PBS (0.015mol/L, pH 值 6.4)。将 96 孔微量板在振荡器上摇匀，置 25℃作用 2 小时或置 2~8℃作用 8 小时，当对照孔中的红细胞呈显著钮扣状时判定结果。以使红细胞完全凝集的最高稀释度作为判定终点。

4.2 4HAU 血凝素的配制 如果血凝素凝集价测定结果为 1:256 (举例)，4 个血凝单位 (即 4HAU) = 256/4 = 64 (即 1:64)。取 1.0ml HA 效价为 1:256 的病毒液加入到 63ml PBS (0.015mol/L, pH 值 6.4) 中，使最终浓度为 1:64。

4.3 HI 试验术式

4.3.1 按表 1 所示顺序将待检样品作 2 倍系列稀释，将第 1 孔的 2 倍稀释样品 25μl 移至第 2 孔中，依此类推。将最后一孔弃掉 25μl。

4.3.2 向各孔中加入 4HAU CPV 抗原各 25μl。

4.3.3 向各孔加入 1%猪红细胞悬液各 50μl。

4.3.4 在微量振荡器上震荡 3 分钟，在 4~8℃下感作 8 小时或 25℃反应 2 小时，判定结果。

表 1 96 孔微量血凝抑制试验

孔号	1	2	3	4	5	6	7. . .	病毒对照	单位 ml
								红细 胞对 照	

稀释倍数	2	4	8	16	32	64	128		
PBS	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.05
	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	}↘	弃	0.025
待检样品	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025		
4HAU 抗原	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	
1%猪红细胞悬液	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05

4.4 结果判定 以完全抑制红细胞凝集的血清最高稀释度的倒数作为该样品的血凝抑制效价。

附加说明:

1. 本标准由杨凌凯娜英多克隆动物药业有限公司提出。
2. 本标准于 2010 年 11 月 26 日经农业部公告第 1489 号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

绵羊支原体肺炎间接血凝试验抗原与阴、阳性血清

Miayang Zhiyuanti Feiyan Jianjixuening Shiyuan Kangyuan Yu Yinyangxing Xueqing
Ovine Mycoplasmal Pneumonia Indirect Haemagglutination Assay Antigen and Negative,
Positive Sera

本抗原系用绵羊肺炎支原体 Y₉₈ 株, 接种适宜培养基培养, 收获培养物, 浓缩、超声裂解、致敏戊二醛化-鞣酸化绵羊红细胞后, 经冷冻真空干燥制成。用于间接血凝试验检测绵羊肺炎支原体抗体。

阳性血清系用绵羊肺炎支原体 Y₉₈ 株接种健康家兔, 采血, 分离血清制成。阴性血清系用健康绵羊, 采血, 分离血清制成。用于间接血凝试验阴、阳性血清对照。

抗 原

【性状】 褐色疏松团块。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无菌生长。

【效价测定】 每批抽样 3 瓶, 分别用含 1% 健康兔血清的 PBS (0.15mol/L, pH 值 7.2) 稀释至 10ml, 混合, 与阴性、阳性对照血清进行间接血凝试验。阳性对照血清效价应 $\geq 1:128$, 阴性对照血清效价应 $\leq 1:2$, 抗原加等量稀释液后应无自凝现象。

【特异性检验】 用含 1% 健康兔血清的 PBS (0.15mol/L, pH 值 7.2) 将每瓶抗原稀释至 10ml, 分别与阴性对照血清、丝状支原体山羊亚种抗血清和山羊支原体山羊肺炎亚种抗血清进行间接血凝试验, 均应为阴性。

【作用与用途】 用于间接血凝试验检测绵羊肺炎支原体抗体。

【用法与判定】 1 用法

1.1 抗原稀释 用稀释液 (含 1% 健康兔血清的 PBS (0.15mol/L, pH 值 7.2), 下同) 将每瓶抗原稀释至 10ml。

1.2 阴、阳性血清稀释 用稀释液将阴、阳性血清分别稀释至 1ml。

1.3 加样和稀释 取 96 孔 V 型微量反应板，每孔加稀释液 25 μ l。取待检血清 25 μ l，加入第 1 孔中，与稀释液混匀后，吸取 25 μ l，加入第 2 孔中，依次作 2 倍系列稀释至所需稀释度。每个反应板上均设立阳性血清、阴性血清及抗原对照，阳性血清、阴性血清（各 25 μ l）均作 2 倍系列稀释至第 8 孔，抗原对照稀释至第 4 孔。

1.4 加抗原 每孔加入抗原 25 μ l，将反应板置微型振荡器上振荡 1~2 分钟，直至红细胞分布均匀。加盖后，置 37 $^{\circ}$ C 作用 2~3 小时，观察结果。

2 判定 以呈现“++”血凝反应的血清最高稀释度作为间接血凝抗体效价。血凝反应强度表示如下：

“++++” 红细胞全部凝集，形成一层均匀膜，布满整个孔底。

“+++” 红细胞在孔底形成一层薄膜，面积比前者略小。

“++” 红细胞在孔底形成薄膜凝集，边缘松散或呈锯齿状。

“+” 红细胞在孔底呈稀薄、散在、少量凝集，孔底有小圆点。

“±” 红细胞沉于孔底，但周围不光滑或中心有空斑。

“-” 红细胞完全沉于孔底，呈光滑的圆点。

当阳性血清抗体效价 $\geq 1:128$ 、阴性血清抗体效价 $\leq 1:2$ 、抗原对照无自凝现象时，试验成立。待检血清抗体效价 $\geq 1:8$ 时，判为阳性；抗体效价 $\leq 1:2$ 时，判为阴性；介于二者之间时，判为可疑。对可疑血清应复检，仍为可疑时，判为阳性。

【剩余水分测定】 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

【注意事项】 稀释后的抗原，不得在冻结保存后再使用。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 18 个月；-25 $^{\circ}$ C 以下保存，有效期为 36 个月。

阳性血清

【性状】 乳白色疏松团块，加稀释液后迅速溶解。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【效价测定】 与绵羊支原体肺炎间接血凝试验抗原进行间接血凝试验，抗体效价应 $\geq 1:128$ 。

【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】 用作间接血凝试验阳性对照。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8 $^{\circ}$ C 保存，有效期为 18 个月；-25 $^{\circ}$ C 以下保存，有效期为 36 个月。

阴性血清

【性状】 乳白色疏松团块，加稀释液后迅速溶解。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【效价测定】 与绵羊支原体肺炎间接血凝试验抗原进行间接血凝试验，抗体效价应 $\leq 1:2$ 。

【剩余水分测定】 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

【作用与用途】 用作间接血凝试验阴性对照。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为18个月；-25℃以下保存，有效期为36个月。

附加说明：

1. 本标准由中国农业科学院兰州兽医研究所提出。
2. 本标准于2010年11月26日经农业部公告第1489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+HN106株）

Ji Xinchengyi Chuanranxingzhiqiguanyan Qinliugan (H9 Yaxing) Sanlian Miehuoyimiao
(La Sota Zhu+M41 Zhu+HN106 Zhu)

Newcastle Disease, Infectious Bronchitis and Avian Influenza (H9 Subtype) Vaccine,
Inactivated (Strain La Sota+ Strain M41+ Strain HN106)

本品系用鸡新城疫病毒La Sota株、鸡传染性支气管炎病毒M41株和禽流感病毒A/Chicken/Henan/01/2006 (H9N2)株（简称HN106株）分别接种易感鸡胚培养，收获感染鸡胚液，浓缩，经甲醛溶液灭活后，按一定比例混合，加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14~28日龄SPF鸡10只，每只肌肉或皮下注射疫苗1ml，观察21日，应不出现因注射疫苗而引起的任何局部和全身不良反应。

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

血清学方法 用30~60日龄SPF鸡15只，其中10只各皮下或肌肉注射疫苗20μl（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。免疫鸡HI抗体效价的几何平均值应不低于1:16，对照鸡HI抗体效价均应不高于1:4。

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20μl（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10^{5.0}ELD₅₀，观察14日。对照鸡应全部死亡，免疫鸡应至少保护7只。

（2）传染性支气管炎部分 用3~4周龄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日，分别采血，分离血清。再各肌肉或皮下注射三联灭活

疫苗0.5ml。接种后28日，分别采血，分离血清。分别测定两次所采血清HI抗体效价（见附注1~3）。二免血清HI抗体效价的几何平均值应不低于首免血清HI抗体效价几何平均值的3倍。

（3）禽流感部分 下列方法任择其一。

血清学方法 用4~5周龄SPF鸡15只，其中10只各颈部皮下注射疫苗0.3ml，另5只作对照。接种后21日，对试验鸡采血，分离血清，用禽流感病毒H9亚型抗原测定HI抗体效价（见附注4~6）。免疫鸡HI抗体效价的几何平均值应不低于1:90，对照鸡HI抗体效价均应不高于1:4。

免疫攻毒法 上述免疫鸡及对照鸡，各静脉注射禽流感病毒HN106株病毒液0.2ml（含 $2 \times 10^{6.0}$ EID₅₀）。攻毒后第5日，采集每只鸡喉头和泄殖腔拭子，并将两者混合后经尿囊腔接种9~11日龄SPF鸡胚5枚，每胚0.2ml，孵育观察4日，测定所有鸡胚液HA效价。每份混合拭子样品接种的鸡胚中只要有1枚鸡胚的鸡胚液HA效价不低于1:16（微量法），即判为病毒分离阳性。对病毒分离阴性的样品，应盲传1代后，再进行判定。免疫鸡应至少有9只病毒分离阴性，对照鸡应至少有4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、传染性支气管炎和H9亚型禽流感病毒引起的禽流感。免疫期为4个月。

【用法与用量】 颈部皮下或肌肉注射。1~5周龄的鸡，每只0.3ml；5周龄以上鸡，每只0.5ml。

【不良反应】 一般无可见的不良反应。

【注意事项】 （1）仅用于接种健康鸡。体质瘦弱、患有其他疾病者，禁止使用。

（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至常温并充分摇匀。

（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。

【规格】 （1）100ml/瓶 （2）250ml/瓶 （3）500ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为12个月。

附注：1 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验抗原质量标准

本品系用鸡传染性支气管炎病毒 M41 株制备的血凝抑制抗原。用于鸡传染性支气管炎（Massachusetts 血清型）血凝抑制抗体检测。所用 IB-HI 抗原应达到如下标准：

【性状】 微黄色疏松团块，加稀释液后迅速溶解。

【效价测定】 按标识体积稀释后，对 1% 鸡红细胞凝集价应不低于 1:256。

【特异性检验】 抗原与禽流感（H9 亚型）阳性血清、鸡新城疫阳性血清、减蛋综合征阳性血清、SPF 鸡血清的 HI 效价均应不高于 1:8。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为120个月。

2 鸡传染性支气管炎阳性血清质量标准

本品系用鸡传染性支气管炎（Massachusetts血清型）疫苗接种SPF鸡，采血、分离血清，经冷冻真空干燥制成。用于鸡传染性支气管炎的红细胞凝集抑制试验对照。

【性状】 微黄色或淡红色疏松团块，加稀释液后迅速溶解。

【效价测定】 按标识体积稀释后，HI效价应不低于1:256。

【特异性检验】 阳性血清与禽流感（H9亚型）、鸡新城疫、减蛋综合征抗原HI效价应不高于1:4。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为60个月。

3 鸡传染性支气管炎血凝抑制试验操作方法

3.1 鸡传染性支气管炎HI抗原工作液配制

3.1.1 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，每孔加入PBS(0.01mol/L, pH值7.0~7.4)25 μ l。然后在第1列的2~4个孔中加入抗原，每孔25 μ l，将抗原进行2倍系列稀释，稀释后每孔再加入PBS 25 μ l，最后再加入1%鸡红细胞悬液25 μ l，用微量振荡器混匀，2~8℃静置40分钟判定结果，以使100%红细胞凝集的抗原最高稀释倍数作为判定终点。

3.1.2 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。取每一稀释度的抗原25 μ l，加入微量板的相应孔中，每孔中再加入PBS 25 μ l，最后加入1%鸡红细胞悬液25 μ l，混匀，2~8℃静置40分钟，判定结果。如果1:4稀释为100%红细胞凝集终点，表明配制的是4HA单位抗原；如果100%红细胞凝集终点是1:5或1:6，表明配制的4HA单位抗原实际上高于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。应根据检验结果适当调整，使抗原工作液为4HA单位。

3.2 血凝抑制试验（HI）

3.2.1 取96孔V型微量反应板，每孔加入PBS 25 μ l。

3.2.2 分别吸取待检血清25 μ l，加至每块板的第1列各相应孔内，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。

3.2.3 分别向各孔中加入含4HA单位的抗原25 μ l，轻轻混匀，2~8℃静置30分钟。

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

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效价不超过1:8、阳性血清HI效价与规定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。

4 禽流感（H9亚型）血凝抑制试验抗原质量标准

本品系用禽流感（H9亚型）病毒接种SPF鸡胚，收获感染鸡胚液，经灭活后，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于检测禽流感（H9亚型）HI抗体的红细胞凝集抑制试验。

【性状】 微黄色疏松团块，加稀释液后迅速溶解。

【效价测定】 按标识体积稀释后，对 1% 鸡红细胞凝集价应不低于 1:256。

【特异性检验】 抗原与鸡传染性支气管炎阳性血清、鸡新城疫阳性血清、减蛋综合征阳性血清、SPF 鸡血清的 HI 效价均应不高于 1:4。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 -20℃ 保存，有效期为 24 个月。

5 禽流感（H9 亚型）阳性血清标准

本品系用禽流感（H9 亚型）灭活疫苗接种 SPF 鸡，采血、分离血清，经冷冻真空干燥制成。用于禽流感（H9 亚型）红细胞凝集抑制试验对照。

【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。

【特异性检验】 阳性血清与鸡传染性支气管炎抗原 HI 效价应不高于 1:8，与鸡新城疫、减蛋综合征抗原 HI 效价应不高于 1:4。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 -20℃ 保存，有效期为 24 个月。

6 禽流感（H9 亚型）血凝抑制试验操作方法

6.1 禽流感（H9 亚型）HI 抗原工作液配制

6.1.1 禽流感（H9 亚型）HI 抗原血凝价测定 取 96 孔 V 型微量反应板 1 块，每孔加入 PBS（0.01mol/L，pH 值为 7.0~7.4）25 μ l，然后在第 1 列的 2~4 个孔中加入抗原，每孔 25 μ l，将抗原进行 2 倍系列稀释，稀释后每孔再加入 PBS 25 μ l，最后再加入 1% 鸡红细胞悬液 25 μ l，用微量振荡器混匀，20~30℃ 静置 15~30 分钟判定结果，以使 100% 红细胞凝集的抗原最高稀释倍数作为判定终点。

6.1.2 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 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。取每一稀释度的抗原 25 μ l，加入微量板的相应孔中，每孔中再加入 PBS 25 μ l，最后加入 1% 鸡红细胞悬液 25 μ l，混匀，20~30℃ 静置 15~30 分钟判定结果。如果 1:4 稀释为 100% 红细胞凝集终点，表明配制的是 4HA 单位抗原；如果 100% 红细胞凝集终点是 1:5 或 1:6，表明配制的 4HA 单位抗原实际上高于 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。应根据检验结果适当调整，使抗原工作液为 4HA 单位。

6.2 血凝抑制试验（HI）

6.2.1 取 96 孔 V 型微量反应板，每孔加入 PBS 25 μ l。

6.2.2 分别吸取待检血清 25 μ l，加入每块板的第 1 列各相应孔内，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。

6.2.3 分别向各孔中加入含 4HA 单位的抗原 25 μ l，轻轻混匀，37℃ 静置 15 分钟。

6.2.4 每孔中加入 1%（V/V）鸡红细胞悬液 25 μ l，轻轻混匀，20~30℃ 静置 15~30 分钟，判定结果。

6.2.5 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 效价不超过 1:4、阳性血清 HI 效价与规定效价相比误差不得超过 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. 本标准由河南农业大学、北京市兽医生物药厂、山西海森生物药品有限公司、青岛宝依特生物制药有限公司提出。

2. 本标准于 2010 年 11 月 26 日经农业部公告第 1489 号发布。

3. 根据现行《中国兽药典》要求改变黏度测定方法，为黏度计法。

4. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

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

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

Ji Xinchengyi Chuanranxingzhiqiguanyan Qinliugan (H9 Yaxing) Sanlian Miehuoyimiao (La Sota Zhu+M41 Zhu+WD Zhu)

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

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、A 型禽流感病毒（AIV）A/Chicken/Hebei/WD/98（H9N2）株（简称 WD 株）分别接种鸡胚培养，收获感染胚液，超滤浓缩，经甲醛溶液灭活后，按一定比例混合，加油佐剂乳化制成。用于预防鸡新城疫、传染性支气管炎和 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 用长度约为 100mm、直径约为 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。

（1）血清学方法 用 3~5 周龄 SPF 鸡 15 只，其中 10 只各皮下或肌肉注射疫苗 20μl（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。免疫组鸡 HI 抗体效价的几何平均值应不低于 1:16，

未免疫对照组鸡 HI 抗体效价均应不高于 1:4。

(2) 免疫攻毒法 用 3~5 周龄 SPF 鸡 15 只, 其中 10 只各皮下或肌肉注射疫苗 20 μ l (1/25 羽份), 另 5 只作对照。接种后 21~28 日, 每只鸡各肌肉注射鸡新城疫病毒北京株 (CVCC AV1611 株) 10^5 ELD₅₀, 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 (0.3ml), 21~28 日后, 再分别采血。将两次血清分别进行 HI 抗体效价测定 (附注 1 和附注 2)。二免血清的 HI 抗体效价几何平均值应不低于首免血清的 4 倍。

3 禽流感部分 下列方法任择其一。

(1) 血清学方法 用 3~5 周龄 SPF 鸡 15 只, 其中 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, 每只鸡分别采血, 分离血清, 用禽流感病毒 H9 亚型抗原测定 HI 抗体 (见附注 3 和附注 4)。免疫组鸡 HI 抗体效价的几何平均值应不低于 1:90, 未免疫对照组鸡 HI 抗体效价均应不高于 1:4。

(2) 免疫攻毒法 用 3~5 周龄 SPF 鸡 15 只, 其中 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 H9 亚型 AIV WD 株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 枚鸡胚的鸡胚液 HA 效价不低于 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、传染性支气管炎和 H9 亚型禽流感。免疫接种后 14~21 日产生免疫力。免疫期雏鸡为 3 个月, 成鸡为 6 个月。

【用法与用量】 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) 只能对健康鸡群进行免疫接种。

(2) 用鸡新城疫活疫苗及鸡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鸡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) 疫苗开启后限当日用完。

【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 A 型魏氏梭菌滤液处理制成。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 (H9 亚型)、EDS、IBD 阳性血清及 SPF 鸡血清按附注 2.3.1 项处理后，与本抗原进行血凝抑制试验。IB 阳性血清 HI 抗体效价应不低于 1:128，ND、AI (H9 亚型)、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】 按 2.2.1 项测定 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 鸡传染性支气管炎 HI 试验操作术式

2.1 试验材料

2.1.1 IB HI 抗原 系用 IBV M41 株病毒液经 100 倍浓缩后加入 A 型魏氏梭菌滤液处理制成。

2.1.2 试剂

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

2.1.2.2 生理盐水 取 9g 氯化钠溶解纯化水中至 1000ml。

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

2.1.2.4 25%高岭土悬液 取高岭土 25g，加纯化水至 100ml，再加入 0.1mol/L 盐酸溶液 250ml，摇匀，静置 60 分钟，弃上清，用注射用水反复洗涤至中性，置 37℃，直至水份完全蒸发，用 PBS (0.01mol/L, pH 值 7.2) 配成 25%悬液，置 2~8℃保存备用。

2.2 IB HI 工作抗原的制备

2.2.1 IB HI 抗原效价测定

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

2.2.1.2 取 25μl 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 25μl。

2.2.1.3 每孔加入 25μl HA 缓冲液。

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

2.2.1.5 将微量板置振荡器上振荡 30 秒，置 2~8℃作用 45 分钟，判定结果。判定时，将微量板倾斜 45 度。对照孔的红细胞完全沉淀到孔底中心，呈泪珠样流淌，HA 阳性孔的红细胞则均匀分布于孔底或呈锯齿样凝集。使红细胞完全凝集的最大稀释倍数为该抗原的 HA 效价。

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

2.3 HI 试验操作方法

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

2.3.2 HI 试验操作方法

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

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

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

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

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

2.3.3 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。

2.3.4 结果判定 判定时将反应板倾斜 45 度。只有当阴性对照血清 HI 效价不高于 1:8、阳性对照血清 HI 效价与已知结果相比误差不高于 1 个滴度时、抗原对照孔 (第 11 孔) 中红细胞完全凝集、血清对照孔 (第 12 孔) 中的红细胞完全沉淀时, 试验结果方为有效。若红细胞沉淀呈泪珠样流淌, 判为 HI 阳性; 若红细胞在孔底均匀分布或呈锯齿状凝集, 判为 HI 阴性。以完全抑制红细胞凝集的最高血清稀释倍数作为待检血清的 HI 抗体效价。

3 H9 亚型禽流感血凝抑制 (HI) 试验抗原质量标准

【性状】 白色或淡黄色液体。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无菌生长。

【效价测定】 按瓶签标明的量用灭菌生理盐水进行稀释, 用微量法测定 HA 效价, 应不低于 1:128。

【特异性检验】 分别与 ND、EDS₇₆、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 等其他阳性血清及 SPF 鸡血清应为阴性。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃ 保存, 有效期为 6 个月。

4 H9 亚型禽流感 HI 试验操作术式

4.1 取微量反应板, 分别向 1~11 孔中加入 25μl 生理盐水, 第 12 孔中加入 50μl 生理盐水。

4.2 吸取 25μl 血清, 加至第 1 孔内, 充分混匀后, 吸取 25μl 至第 2 孔, 依次 2 倍稀释至第 10 孔, 从第 10 孔吸取 25μl, 弃去。

4.3 分别向 1~11 孔中加入含 4HA 单位的抗原 25μl, 室温下静置 30~40 分钟。

4.4 每孔中加入 25μl 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。

4.5 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 效价与已知结果相比,误差不超过 1 个滴度时,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、北京信得威特科技有限公司、乾元浩股份有限公司、四川省华派生物制药有限公司、上海海利生物制品有限公司、江苏南农高科技股份有限公司提出。

2. 本标准于 2010 年 11 月 26 日经农业部公告第 1489 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+LG1 株)

Ji Xinchengyi Chuanranxingzhiqiguanyan Qinliugan (H9 Yaxing) Sanlian Miehuoyimiao
(La Sota Zhu +M41 Zhu+LG1 Zhu)

Newcastle Disease, Infectious Bronchitis and Avian Influenza (Subtype H9) Vaccine,
Inactivated (Strain La Sota+Strain M41+ Strain LG1)

本品系用鸡新城疫病毒 (NDV) La Sota 株、鸡传染性支气管炎病毒 (IBV) M41 株、A 型禽流感病毒 (AIV) 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,超滤浓缩,经甲醛溶液灭活后,按一定比例混合,加油佐剂乳化制成。用于预防鸡新城疫、传染性支气管炎和 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,除第 1 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 3~4 周龄 SPF 鸡 10 只,每只颈背部皮下或胸部肌肉注射疫苗 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 μ 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。免疫鸡 HI 抗体效价的几何平均值应不低于 1:16 (微量法),未免疫对照鸡 HI 抗体效价均应不高于 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 μ 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}ELD₅₀, 观察 14 日。对照组应全部死亡, 免疫组应至少保护 7 只。

2 鸡传染性支气管炎部分 用 3~4 周龄 SPF 鸡 10 只, 各滴鼻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 0.3ml, 21~28 日后, 再分别采血。将两次血清分别进行 HI 抗体效价测定 (见附注 1)。二免血清的 HI 抗体效价几何平均值应不低于首免血清的 3 倍。

3 禽流感部分 下列方法任择其一。

(1) 血清学方法 用 3~4 周龄 SPF 鸡 15 只, 其中 10 只各皮下或肌肉注射疫苗 0.3ml, 另 5 只作对照。接种后 21 日, 每只鸡分别采血, 分离血清, 用禽流感病毒 H9 亚型抗原测定 HI 抗体 (见附注 2)。免疫鸡 HI 抗体效价的几何平均值应不低于 1:90, 对照鸡 HI 抗体效价均不应不高于 1:4。

(2) 免疫攻毒法 用 3~4 周龄 SPF 鸡 20 只, 其中 10 只各皮下或肌肉注射疫苗 0.3ml, 另 10 只作对照。接种后 21 日, 用 1:10 稀释的 H9 亚型 AIV LG1 株毒种进行翅静脉注射, 每只鸡 0.2ml。攻毒后第 5 日, 分别采集每只鸡的泄殖腔棉拭子, 经处理后, 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 枚鸡胚的鸡胚液 HA 效价不低于 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 只鸡病毒分离阴性, 对照组应至少 9 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、传染性支气管炎和 H9 亚型禽流感。

【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) 用前摇匀, 并使疫苗恢复至室温。疫苗一旦开启, 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) 用过的疫苗瓶、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 鸡传染性支气管炎血凝抑制 (HI) 试验抗原质量标准及 HI 试验操作术式

1.1 鸡传染性支气管炎血凝抑制 (HI) 试验抗原质量标准

本品系用鸡传染性支气管炎病毒 M41 株接种 SPF 鸡胚，收获鸡胚液，经灭活浓缩后，用 A 型产气荚膜梭菌滤液处理，冷冻真空干燥制成。用于鸡传染性支气管炎 HI 抗体效价的测定。

【性状】 黄白色或微黄色疏松团块，加稀释液后迅速溶解。

【效价测定】 按标识体积稀释后，HA 效价应不低于 1:128。

【特异性检验】 对鸡阴性血清，鸡新城疫、H9 亚型禽流感、减蛋综合征等病毒阳性血清 HI 抗体效价应不高于 1:8；对鸡传染性支气管炎病毒阳性血清 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 HI 抗体效价测定。

【规格】 1ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期暂定为 36 个月。

1.2 鸡传染性支气管炎 HI 试验操作术式

1.2.1 鸡传染性支气管炎 HI 抗原工作液配制

1.2.1.1 鸡传染性支气管炎 HI 抗原血凝价测定 取 96 孔 V 型微量反应板 1 块，每孔加 25μl 注射用生理盐水，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 注射用生理盐水，最后再加入 0.5% 鸡红细胞悬液 25μl，用微量振荡器混匀，置 2~8℃，40 分钟后判定结果，以使 100% 红细胞凝集的抗原最高稀释倍数作为判定终点。

1.2.1.2 4HA 单位抗原的配制 根据测定的 HI 抗原 HA 效价，用注射用生理盐水配制 4HA 单位抗原。将配制好的 4HA 单位抗原用注射用生理盐水稀释，使其稀释度为 1:2、1:4、1:8、1:16。在每稀释度的 25μl 抗原中加 25μl 注射用生理盐水，再加入 0.5% 鸡红细胞悬液 25μl，混匀，置 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 1:8 或 1:16，表明配制的 4HA 单位抗原实际上高于 4 个单位；如果 100% 红细胞凝集终点是 1:2，表明配制的 4HA 单位抗原实际上低于 4 个单位。应根据检验结果适当调整，使抗原工作液确为 4HA 单位。

1.2.2 HI 试验

1.2.2.1 25% 酸性高岭土配制

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

1.2.2.1.2 弃上清，加入 1mol/L 的盐酸溶液洗 3 次，以 2500r/min 离心 10 分钟，弃上清。

1.2.2.1.3 将沉淀的白陶土用 pH 值 7.2 的 PBS 稀释成 25% 悬液，用 5mol/L 的氢氧化钠溶液调 pH 值为 7.2。116℃ 高压灭菌 30 分钟，2~8℃ 保存备用。

1.2.2.2 血清处理

1.2.2.2.1 将血清样品置 56℃ 水浴作用 30 分钟。

1.2.2.2.2 取 100μl 灭活血清，加入 300μl 25% 酸性高岭土溶液，混匀，室温下作用 30 分钟。以 2000r/min 离心 10 分钟，取上清。加新鲜红细胞泥一滴，混匀，室温下作用 30 分钟。以 2000r/min 离心 10 分钟，取上清待检。

1.2.2.3 HI 试验操作方法

1.2.2.3.1 取 96 孔 V 型微量反应板，每孔中加入 25 μ l 注射用生理盐水。

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

1.2.2.3.3 分别向各孔中加入含 4HA 的单位抗原 25 μ l，2~8 $^{\circ}$ C 静置 30 分钟。

1.2.2.3.4 每孔中加入 25 μ l 0.5% (V/V) 鸡红细胞悬液，轻轻混匀，2~8 $^{\circ}$ C 静置 40 分钟。

1.2.2.3.5 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、阳性血清 HI 效价与规定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。

2 H9 亚型禽流感血凝抑制 (HI) 试验抗原质量标准及 HI 试验操作术式

2.1 H9 亚型禽流感 HI 试验抗原质量标准

【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】 按标识体积用灭菌生理盐水稀释后，HA 效价应不低于 1:256。

【特异性检验】 分别与 ND、EDS₇₆、H5 亚型禽流感、H7 亚型禽流感、H9 亚型禽流感阳性血清及 SPF 鸡血清作 HI 试验，抗原对 H9 亚型禽流感阳性血清应为阳性，对 NDV 等其他阳性血清应为阴性。

【剩余水分测定】 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

【真空度测定】 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应符合规定。

【规格】 1ml/瓶

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

2.2 H9 亚型禽流感 HI 试验操作术式

2.2.1 取微量反应板，分别向 1~11 孔中加入 25 μ l 注射用生理盐水，第 12 孔中加入 50 μ l 注射用生理盐水。

2.2.2 吸取 25 μ l 血清，加至第 1 孔内，充分混匀后，吸取 25 μ 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 μ l，弃去。

2.2.3 分别向 1~11 孔中加入含 4HA 单位的抗原 25 μ l，室温静置 30~40 分钟。

2.2.4 每孔加入 25 μ l 1% (V/V) 鸡红细胞悬液，轻轻混匀，室温静置 30~40 分钟。对照红细胞将呈显著钮扣状。

2.2.5 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、山东农业大学提出。

2. 本标准于 2010 年 11 月 30 日经农业部公告第 1507 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+JY 株）

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

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

本品系用鸡新城疫病毒 La Sota 株和 A 型禽流感病毒 A/Chicken/Jiangsu/JY/99(H9N2) 株（简称 JY 株）分别接种易感鸡胚，收获感染胚液，超滤浓缩，经甲醛溶液灭活后，按一定比例混合，加油佐剂乳化制成。用于预防鸡新城疫和 H9 亚型病毒引起的禽流感。

【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 10~14 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。

(1) 血清学方法 用 21~28 日龄 SPF 鸡 15 只，其中 10 只各皮下或肌肉注射疫苗 20 μ l，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。免疫组鸡 HI 抗体效价几何平均值应不低于 1:16，未免疫对照组鸡 HI 抗体效价均应不高于 1:4。

(2) 免疫攻毒法 用 21~28 日龄 SPF 鸡 15 只，其中 10 只各皮下或肌肉注射疫苗 20 μ 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（CVCC AV1611 株） 10^5 ELD₅₀，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 21~28 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 只作对照。接种后 21~28 日，每只鸡分别采血，分离血清，用禽流感病毒 H9 亚型抗原（见附注 1）测定 HI 抗体效价（见附注 2）。免疫组鸡 HI 抗体效价几何平均值应不低于 1:90，未免疫对照组鸡 HI 抗体效价均应不高于 1:4。

(2) 免疫攻毒法 用 21~28 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 只作对照。接种后 21~28 日，用 1:10 稀释的 H9 亚型 AIV JY 株病毒液进行翅静脉注射，每只 0.2ml。攻毒后第 5 日，分别采集每只鸡的泄殖腔拭子，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 效价不低于 1:16, 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 亚型病毒引起的禽流感。

【用法与用量】 颈部皮下或肌肉注射。2 周龄以内鸡, 每只 0.2ml, 免疫期为 2 个月; 2 周龄以上鸡, 每只 0.5ml, 免疫期为 4 个月。

【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) 使用前须检查, 如出现变色、破乳、破漏、混有异物等, 均不得使用。

(3) 疫苗使用前, 应恢复至室温并充分摇匀。

(4) 接种器具应无菌, 注射部位应消毒。

(5) 疫苗开启后, 限当日用完。

(6) 剩余疫苗、疫苗瓶及注射器, 应做无害化处理。

(7) 疫苗运输及保存中, 切勿冻结或接触高温。

【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) 血凝抑制试验抗原质量标准

本抗原系用 A 型禽流感病毒 A/Chicken/Jiangsu/JY/99 (H9N2) 株 (简称 JY 株) 接种 SPF 鸡胚培养, 收获感染鸡胚液, 经甲醛溶液灭活后制成。

【性状】 淡黄色液体。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无菌生长。

【效价测定】 按现行《中国兽药典》附录测定 HA 效价, 应不低于 1:128。

【特异性检验】 分别与 ND、EDS76、H5 亚型禽流感、H7 亚型禽流感阳性血清和 SPF 鸡血清作 HI 试验, 均应不高于 1:4。

【规格】 2ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存, 有效期为 3 个月。

2 禽流感 (H9 亚型) 血凝抑制试验操作术式

2.1 取微量反应板, 分别向 1~11 孔中加入 25μl 生理盐水, 第 12 孔中加入 50μl 生理盐水。

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

2.3 分别向 1~11 孔中加入含 4HA 单位的抗原 25μl, 室温静置 30~40 分钟。

2.4 每孔中加入 25μl 1% (V/V) 鸡红细胞悬液, 轻轻混匀, 室温静置 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 效价不高于 1:4、阳性

对照血清 HI 效价与已知结果相比误差不超过 1 个滴度时, 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. 本标准由扬州优邦生物制药有限公司、中国农业科学院家禽研究所、扬州威克生物工程技术有限公司、哈药集团生物疫苗有限公司提出。
2. 本标准于 2010 年 11 月 30 日经农业部公告第 1507 号发布。
3. 根据现行《中国兽药典》要求改变黏度测定方法, 为黏度计法。
4. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

猪胸膜肺炎放线杆菌 ApxIV-ELISA 抗体检测试剂盒

Zhu Xiongmo feiyanfangxianganjun ApxIV-ELISA Kangtijiance Shijihe

ELISA Kit to Detect the Antibody against ApxIV of *Actinobacillus pleuropneumoniae*

本试剂盒系用重组大肠杆菌表达的胸膜肺炎放线杆菌 ApxIV A5 蛋白包被的酶联反应板、阳性对照血清、阴性对照血清、羊抗猪酶标二抗、样品稀释液、20 倍浓缩洗涤液、底物液 A、底物液 B、终止液和血清稀释板等组成。用于检测猪血清中抗胸膜肺炎放线杆菌 ApxIV 的抗体。

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

- (1) 抗原包被板 (96 孔板) 包装膜封闭良好, 孔底清洁透明, 无异物, 装量为 2 块。
- (2) 阳性对照血清 淡黄色液体, 无臭、无味, 有少量悬浮物, 装量为 1ml/管×1 管。
- (3) 阴性对照血清 淡黄色液体, 无臭、无味, 有少量悬浮物, 装量为 1ml/管×1 管。
- (4) 羊抗猪酶标二抗 无色澄清溶液, 无臭、无味, 无沉淀物, 装量为 20ml/瓶×1 瓶。
- (5) 样品稀释液 无色溶液, 无臭、无味, 无沉淀物, 装量为 50ml/瓶×1 瓶。
- (6) 底物液 A 无色澄清溶液, 无臭、无味, 无沉淀物, 装量为 10ml/瓶×1 瓶。
- (7) 底物液 B 无色澄清溶液, 无臭、无味, 无沉淀物, 装量为 10ml/瓶×1 瓶。
- (8) 终止液 无色澄清溶液, 无臭、无味, 无沉淀物, 装量为 10ml/瓶×1 瓶。
- (9) 20 倍浓缩洗涤液 无色澄清溶液, 无臭、无味, 无沉淀物, 装量为 30ml/瓶×1 瓶。
- (10) 血清稀释板 (96 孔板) 孔底清洁透明, 无异物, 装量为 2 块。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录对阳性血清、阴性血清和羊抗猪酶标二抗进行检验, 均应无菌生长。

【敏感性检验】 敏感性检验 将阳性质控血清作 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640 稀释, 按“用法与判定”进行检测和判定。应符合下列标准。

阳性质控血清稀释倍数	OD _{630nm} 值 (P: 阳性对照孔平均 OD _{630nm} 值)
1:5	≥P×0.25+1.1
1:10	≥P×0.25+0.9
1:20	≥P×0.25+0.7
1:40	≥P×0.25+0.5

1:80	$\geq P \times 0.25 + 0.3$
1:160	$\geq P \times 0.25 + 0.2$
1:320	$\geq P \times 0.25 + 0.1$
1:640	$\geq P \times 0.25$

【特异性检验】 按“用法与判定”对 10 份猪胸膜肺炎阴性血清和 20 份猪胸膜肺炎灭活疫苗免疫血清进行检测和判定。均应为阴性。

【作用与用途】 用于检测猪血清中抗胸膜肺炎放线杆菌 ApxIV 的抗体。

【用法与判定】 1 用法

1.1 样品准备 取动物全血，待血液凝固后，以 4000 r/min 离心 10 分钟，收集上清。也可采集血液，待凝固后自然析出血清。血清应清亮，无溶血。

1.2 洗涤液配制 使用前，将浓缩的洗涤液恢复至室温（20~25℃），并摇动，使沉淀溶解（最好在 37℃ 水浴中加热 5~10 分钟），然后用去离子水作 20 倍稀释，混匀，置 2~8℃，可保存 7 日。

1.3 待检血清和对照血清的稀释 在血清稀释板中将待检血清作 1:40 稀释，对照血清按 1:4 稀释。

1.4 操作步骤

1.4.1 取抗原包被板（根据样品多少，可拆开分次使用），将稀释好的待检血清、阴性对照血清和阳性对照血清各取 100μl 加至抗原包被板中，待检血清设 1 孔，阴、阳性对照各设 2 孔。轻轻振匀孔中样品，置 37℃ 下温育 30 分钟。

1.4.2 甩掉反应孔中的溶液，每孔用约 200μl 洗涤液洗涤 5 次，每次静置 3 分钟后倒掉洗涤液，并在干净的吸水纸上拍干。

1.4.3 每个反应孔中加入羊抗猪酶标二抗 100μl，置 37℃ 下温育 30 分钟。

1.4.4 重复步骤 1.4.2。

1.4.5 每个反应孔中加入底物液 A、底物液 B 各 1 滴（约 50μl），混匀，置室温下（20~25℃）避光显色 10 分钟。

1.4.6 每个反应孔中加入终止液 1 滴（约 50μl），10 分钟内测定结果。

2 判定 在酶联读数仪上测定各孔 OD_{630nm} 值。试验成立的条件是：阳性对照孔 OD_{630nm} 值均应 ≥ 0.6 ，且 < 1.6 ；阴性对照孔 OD_{630nm} 值均应 < 0.3 。

如果 S （样品孔 OD_{630nm} 值） $\geq P$ （阳性对照孔平均 OD_{630nm} 值） $\times 0.25$ ，判为阳性；如果 $S < P \times 0.25$ ，判为阴性。

【注意事项】 （1）试剂盒使用前各试剂应平衡至室温，使用后放回 2~8℃ 保存。

（2）不同批号的试剂盒组份不得混用，不同试剂使用时应防止交叉污染。

（3）底物液和终止液不能暴露于强光或接触氧化剂。

（4）待检血清数量较多时，应先稀释完所有待检血清，再加入到抗原包被板上，使反应时间一致。

（5）稀释 20 倍浓缩洗涤液时，如发现有结晶，应加热使其溶解后再使用。

（6）移液时，应尽量准确，防止产生气泡。

（7）应严格遵守各操作步骤规定的时间和温度。

【规格】 96孔/块，2块/盒

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为6个月。

附注：阳性质控血清质量标准

【性状】 橙黄或淡黄色透明液体。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【效价检验】 作 1:5、1:10、1:20...1:1280 稀释，进行 ApxIV-ELISA 抗体效价测定，应 \geq 1:640。

【规格】 1ml/管

附加说明：

1. 本标准由华中农业大学、武汉科前动物生物制品有限责任公司、中华人民共和国上海出入境检验检疫局提出。

2. 本标准于 2010 年 11 月 30 日经农业部公告第 1507 号发布。

鸡马立克氏病 I、III型二价活疫苗（CVI988 株+FC126 株）

Ji Malikeshibing I, III Xing Erjia Huoyimiao (CVI988 Zhu+FC126 Zhu)

Chicken Marek's Disease Bivalent Vaccine, Live (Strain CVI988+Strain FC126)

本品系用鸡马立克氏病病毒 I 型 CVI988/Rispens 株和 III 型火鸡包疹病毒 FC126 株分别接种鸡胚成纤维细胞（CEF）培养后，经消化、收获离心沉淀细胞，按一定比例混合，加入适宜冷冻保护液制成。用于预防鸡马立克氏病（MD）。

【性状】 融化后为淡黄色或淡粉红色细胞悬液。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【支原体检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无支原体生长。

【外源病毒检验】 除增加鸡传染性贫血病毒检验项外，其他按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

鸡传染性贫血病毒检验法 用 1 日龄 SPF 鸡 20 只，点眼、滴鼻接种 10 羽份疫苗，肌肉注射 100 羽份疫苗，21 日后，按上述方法和剂量重复接种 1 次。第 1 次接种后 42 日采血，按附注 2 进行鸡传染性贫血病毒的血清抗体检测，应为阴性。

【鉴别检验】（1）I 型鉴别检验 将疫苗稀释成 100~200PFU/0.2ml，接种 CEF 单层，另用 MDV CVI988 株和 FC126 株（各 50~100PFU/0.2ml）分别接种 CEF 单层，置含 5% 二氧化碳的培养箱中、37~38℃ 下培养 2~3 日，弃去细胞培养液，用 PBS 洗 2~3 次，用 -30℃ 冷甲醇固定 10 分钟，弃去甲醇，用 PBS 洗 3 次，用 MDV I 型特异单抗（见附注 1）对 3 种培养物进行荧光染色，疫苗培养物和 CVI988 株培养物均应为阳性，FC126 株培养物应为阴性。

（2）III 型鉴别检验 将疫苗稀释成 100~200PFU/0.2ml，接种 CEF 单层，另用 MDV CVI988 株和 FC126 株（各 50~100PFU/0.2ml）分别接种 CEF 单层，置含 5% 二氧化碳的培

养箱中、37~38℃下培养 2~3 日，弃去细胞培养液，用 PBS 洗 2~3 次，用 -30℃冷甲醇固定 10 分钟，弃去甲醇，用 PBS 洗 3 次，用 MDV III 型特异单抗（见附注 1）对 3 种培养物进行荧光染色，疫苗培养物和 FC126 株培养物均应为阳性，CVI988 株培养物应为阴性。

【安全检验】 用 1 日龄 SPF 雏鸡 20 只，其中 10 只各肌肉或皮下注射疫苗 10 羽份（0.2ml），另 10 只不接种作为对照，观察 14 日，对照组应至少存活 8 只，免疫组非特异死亡数应不超过对照组。

【病毒含量测定】 每批疫苗抽样 3 瓶，分别用维持液将疫苗稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 或其他适宜稀释度，接种 2 块 24 孔板 CEF 单层，1 块用于检测 I 型，另 1 块用于检测 III 型，每块板接种 3 个样品，每个样品每个稀释度重复 4 孔，每孔 0.2ml。吸附 1 小时后，每孔加入维持液 2ml。同时设 1 块正常细胞对照。置含 5% 二氧化碳的培养箱中、37~38℃下培养 4~5 日，弃去细胞培养液，用 PBS 洗 2~3 次，每孔加冷甲醇（-30℃）0.5ml 固定 10 分钟，弃去甲醇，用 PBS 洗 3 次，分别用 I、III 型特异单抗（见附注 1）进行荧光染色，在荧光显微镜下观察并分别计 MDV CVI988/Rispens 株和 FC126 株的蚀斑数。以 3 个样品中最低的蚀斑数，确定每批二价苗的使用羽份。每羽份疫苗中的 MDV CVI988 株应不低于 2000PFU，FC126 株应不低于 1000PFU。对照细胞上应无蚀斑。

【作用与用途】 用于预防鸡马立克氏病。各种品种 1 日龄雏鸡均可使用。

【用法与用量】 按瓶签注明的羽份，用稀释液稀释，肌肉或皮下注射 0.2ml。

【不良反应】 一般无可见的不良反应。

【注意事项】 （1）必须在液氮中保存及运输。

（2）从液氮中取出后应迅速放于 38℃温水中，待完全融化后再取出，加稀释液稀释，否则影响疫苗效力。

（3）稀释好的疫苗必须在 1 小时内用完。注射期间应经常摇动疫苗使其均匀。

【规格】 （1）1000 羽份/瓶 （2）2000 羽份/瓶

【贮藏与有效期】 液氮中保存，有效期为 18 个月。

附注：1 检验用单抗质量标准

1.1 MDV I 型特异单抗 H34 株质量标准

1.1.1 Ig 同种型 应为 IgG2a。

1.1.2 IFA 抗体效价 上清单抗 IFA 效价应不低于 1:100，小鼠腹水单抗 IFA 效价应不低于 $1:10^5$ 。

1.1.3 VN 抗体效价 VN 抗体效价应 <2 ，即无中和能力。

1.1.4 特异性 仅与 MDV I 型病毒呈 IFA 阳性反应，与 MDV II 型或 III 型病毒及其他禽类病毒均不反应。

1.2 MDV III 型特异单抗 L78 株质量标准

1.2.1 Ig 同种型 应为 IgG1。

1.2.2 IFA 抗体效价 上清单抗 IFA 效价应不低于 1:100，小鼠腹水单抗 IFA 效价应不低于 $1:10^5$ 。

1.2.3 VN 抗体效价 VN 抗体效价，上清效价应不低于 10，小鼠腹水效价应不低于

10000。

1.2.4 特异性 仅与 MDV III型病毒呈 IFA 阳性反应，与 MDV II型或 I 型病毒及其他禽类病毒均呈 IFA 阴性反应。

2 鸡传染性贫血病毒抗体检测法（间接 ELISA）

2.1 检测

2.1.1 在使用前，所有试剂应达到室温，并混匀。

2.1.2 在鸡传染性贫血病毒抗原包被板上作标记，并在操作记录纸上标上样品的位置。

2.1.3 在 A1 和 A2 孔中各加入 100 μ l 阴性血清对照原液。

2.1.4 在 A3 和 A4 孔中各加入 100 μ l 阳性血清对照原液。

2.1.5 用样品稀释液将所有待检血清样品作 10 倍稀释后，分别加入与操作记录纸上标记的各相应的位置。每份样品加 2 个孔。

2.1.6 室温下吸附 60 分钟。

2.1.7 每孔加入约 350 μ l 洗涤液洗 3~5 次。

2.1.8 每孔加入抗鸡传染性贫血病毒抗体辣根过氧化物酶结合物 100 μ l。

2.1.9 室温下吸附 30 分钟。

2.1.10 重复 2.1.7。

2.1.11 每孔加入 100 μ l TMB 底物溶液。

2.1.12 室温下吸附 15 分钟。

2.1.13 每孔加入 100 μ l 终止液，终止反应。

2.1.14 用空气做空白对照，在 650nm 读 OD 值并记录。

2.2 判定 所有样品和对照的结果以两孔平均值计算，S/N 值等于样品孔 OD 值除以阳性对照孔 OD 值。

2.2.1 阴性对照孔 OD 值应不低于 0.60，阳性对照孔 OD 值应不高于 0.50。否则应重检。

2.2.2 S/N 值高于 0.60 的样品判为阴性。

2.2.3 S/N 值不高于 0.60 的样品判为阳性。

3 疫苗稀释液的检验

【性状】 橘红色透明液体，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。

【pH 值】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应为 6.7~7.1。

【稳定性检验】 用 23~27 $^{\circ}$ C 的稀释液稀释疫苗后：（1）立即测定疫苗的蚀斑总数；（2）23~27 $^{\circ}$ C 置 1 小时后测定疫苗的蚀斑总数。放置 1 小时后的疫苗蚀斑总数应不低于疫苗稀释后立即测定的 70%。

【规格】 （1）200ml /瓶 （2）400 ml /瓶

【贮藏与有效期】 室温保存，有效期为 24 个月。

附加说明：

1. 本标准由乾元浩生物股份有限公司南京生物药厂、扬州大学农业部畜禽传染病学重

点开放实验室提出。

2. 本标准于 2006 年 04 月 25 日经农业部第 644 号发布。

3. 本标准于 2010 年 11 月 30 日经农业部公告第 1507 号批准变更注册。**变更内容：**鉴别检验方法由中和试验变更为单抗免疫荧光试验法。重新发布标准。

猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白 ELISA 抗体检测试剂盒

Zhu Weikuanguanbingdu gE Danbai ELISA Kangtijiianceshijihe

ELISA Kit for Antibody Detection Against Pseudorabies Virus gE Glycoprotein

本品系用基因工程大肠杆菌表达的猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白包被酶联反应板后，与阳性对照血清、阴性对照血清、羊抗猪酶标二抗、样品稀释液、20 倍浓缩洗涤液、底物液 A、底物液 B 及终止液等组份组装制成。用于猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的检测。

【性状】 应密封完好、无破损、无裂痕、无渗漏，品名、批号、保存条件、有效期等应清晰。其中：

(1) 抗原包被板 封口膜封闭良好，包被板孔底清洁透明，无异物。96 孔/板，2 块/盒。

(2) 阳性对照血清 橙黄或淡黄色透明液体，无臭、无味。装量 1ml/管，1 管/盒。

(3) 阴性对照血清 橙黄或淡黄色透明液体，无臭、无味。装量 1ml/管，1 管/盒。

(4) 羊抗猪酶标二抗 无色透明液体，无臭、无味。装量 20ml/瓶，1 瓶/盒。

(5) 样品稀释液 无色液体，无臭、无味，无沉淀物。装量 50ml/瓶，1 瓶/盒。

(6) 底物液 A 无色透明液体，无臭、无味，无沉淀物。装量 10ml/瓶，1 瓶/盒。

(7) 底物液 B 无色透明液体，无臭、无味，无沉淀物。装量 10ml/瓶，1 瓶/盒。

(8) 终止液 无色透明液体，无臭、无味，无沉淀物。装量 10ml/瓶，1 瓶/盒。

(9) 20 倍浓缩洗涤液 无色透明液体，无臭、无味，无沉淀物。装量 30ml/瓶，1 瓶/盒。

(10) 血清稀释板 透明塑料板，孔底应清洁透明，无异物。96 孔/块，装量 2 块/盒。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录对试剂盒中阳性血清、阴性血清和羊抗猪酶标二抗进行检验，均应无菌生长。

【敏感性检验】 敏感性检验 将阳性质控血清作 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640 稀释，按试剂盒“用法与判定”进行检测和判定，应符合下列标准：

阳性质控血清稀释度	OD _{630nm} 值
1:5	≥1.40
1:10	≥1.20
1:20	≥1.00
1:40	≥0.80
1:80	≥0.70
1:160	≥0.60
1:320	≥0.50

1:640

≥ 0.40

以阳性质控血清的 OD_{630nm} 值高于阳性判定标准时的最高稀释倍数作为阳性质控血清的 ELISA 抗体效价，应不低于 1:640。

【特异性检验】 取阴性质控血清，按试剂盒“用法与判定”进行检测和判定，均应为阴性。

【作用与用途】 用于猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白抗体的检测。

【用法与判定】 1 用法

1.1 样品准备 取动物全血，待血液凝固后，以 4000r/min 离心 10 分钟，收集上清。待检血清应清亮，无溶血。

1.2 洗涤液配制 使用前，将 20 倍浓缩洗涤液恢复至室温（20~25℃），并摇动使沉淀溶解（最好在 37℃ 水浴中加热 5~10 分钟），然后用蒸馏水作 20 倍稀释（如：每两块板用 50ml 的 20 倍浓缩洗涤液加上 950ml 蒸馏水），混匀，稀释好的洗涤液在 2~8℃ 可存放 7 日。

1.3 样品和对照稀释 将待检血清在血清稀释板中按 1:40 稀释（如 195μl 样品稀释液中加 5μl 待检血清），对照血清在血清稀释板中按 1:4 稀释（如：180μl 样品稀释液中加 60μl 对照血清）。

1.4 操作步骤

1.4.1 取抗原包被板，分别将稀释好的待检血清和对照血清各 100μl 加入到抗原包被板孔中。阴性对照和阳性对照各设 2 孔，轻轻振匀孔中样品（勿溢出），置 37℃ 下孵育 30 分钟。

1.4.2 弃去孔中液体，每孔加入 200μl 洗涤液，每次静置 3 分钟后，弃去洗涤液，并在吸水纸上拍干，重复洗板 5 次。

1.4.3 每孔加入羊抗猪酶标二抗 100μl，置 37℃ 下孵育 30 分钟。

1.4.4 洗涤 5 次，方法同 1.4.2。

1.4.5 每孔加底物液 A、底物液 B 各 1 滴（约 50μl），混匀，室温（20~25℃）下避光显色 10 分钟。

1.4.6 每孔加入终止液 1 滴（约 50μl），10 分钟内测定结果。

2 判定 在酶标仪上测定各孔 OD_{630nm} 值。试验成立的条件为：阳性对照孔 OD_{630nm} 值均 ≥ 0.8 ，且 < 2.0 ；阴性对照孔 OD_{630nm} 值均 < 0.3 。

如果样品孔 OD_{630nm} 值 (S) \geq 阳性对照孔平均 OD_{630nm} 值 (P) $\times 0.27$ ，判为 gE 抗体阳性；如果 $S < P \times 0.27$ ，判为 gE 抗体阴性。

【注意事项】 （1）试剂盒使用前，各试剂应平衡至室温，使用后放回 2~8℃ 保存。

（2）不同批号的试剂盒组份不得混用，不同试剂使用时应防止交叉污染。

（3）底物液和终止液不能暴露于强光或接触氧化剂。

（4）待检血清数量较多时，应先稀释完所有待检血清，再加入到抗原包被板上，使反应时间一致。

（5）稀释 20 倍浓缩洗涤液时，如发现有结晶，应加热使其溶解后再使用。

（6）移液时，应尽量准确，防止产生气泡。

(7) 应严格遵守各操作步骤规定的时间和温度。

【规格】 192 孔/盒

【贮藏与有效期】 2~8℃ 保存，有效期为 6 个月。

附注：1 阳性质控血清标准

【性状】 橙黄或棕黄色液体，无臭、无味，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】 将阳性质控血清作 1:5、1:10、1:20、...、1:1280 稀释，进行 ELISA 试验。ELISA 抗体效价应不低于 1:640。

【规格】 1ml/管

【贮藏与有效期】 -70℃ 以下保存，有效期为 24 个月。

2 阴性质控血清质量标准 本品含有 20 份猪伪狂犬病阴性血清和 10 份猪伪狂犬病病毒 gE 缺失株疫苗免疫血清。

2.1 猪伪狂犬病阴性血清标准

【性状】 橙黄或淡黄色液体，无臭、无味，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】 用猪伪狂犬病病毒鄂 A 株，在 PK15 细胞上测定血清中和抗体效价和用猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白 ELISA 抗体检测试剂盒检测，均应为阴性。

【规格】 1ml/管

【贮藏与有效期】 -70℃ 以下保存，有效期为 24 个月。

2.2 猪伪狂犬病病毒 gE 缺失株疫苗免疫血清标准

【性状】 橙黄或淡黄色液体，无臭、无味，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】 用猪伪狂犬病病毒 gB 蛋白 ELISA 抗体检测试剂盒检测，应为阳性；用猪伪狂犬病病毒鄂 A 株，在 PK15 细胞上测定血清中和抗体效价，应不低于 1:8；用猪伪狂犬病病毒 gE 蛋白 ELISA 抗体检测试剂盒检测，应为阴性。

【规格】 1ml/管

【贮藏与有效期】 -70℃ 以下保存，有效期为 24 个月。

附加说明：

1. 本标准由华中农业大学、武汉科前动物生物制品有限责任公司提出。
2. 本标准于 2010 年 12 月 15 日经农业部公告第 1508 号发布。

水貂病毒性肠炎灭活疫苗（MEV-RC1 株）

Shuidiaobingduxingchangyan Miehuoyimiao（MEV-RC1 Zhu）

Mink Viral Enteritis Vaccine, Inactivated（Strain MEV-RC1）

本品系用水貂肠炎病毒 MEV-RC1 株接种 F81 细胞培养，收获细胞培养物，经甲醛溶液

灭活后，加氢氧化铝胶制成。用于预防水貂病毒性肠炎。

【性状】 静置后，上层为粉红色液体，下层为淡粉红色沉淀，振摇后呈均匀混悬液。

【装量检查】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应符合规定。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，应无菌生长。

【安全检验】 用 2~10 月龄健康易感水貂（MEV HI 抗体效价不高于 1:4）5 只，各皮下注射疫苗 3ml，观察 10 日，应全部健活。

【效力检验】 下列方法任择其一。

（1）血清学方法 取 2~10 月龄健康易感水貂（MEV HI 抗体效价不高于 1:4）5 只，各皮下注射疫苗 1ml，同时设不接种对照水貂 5 只。免疫后 14 日，采血，分离血清，分别测定 HI 抗体效价，免疫水貂 HI 抗体效价均应不低于 1:32，对照水貂 HI 抗体效价均不应高于 1:4。

（2）免疫攻毒法 取 2~10 月龄健康易感水貂（MEV HI 抗体效价不高于 1:4）5 只，各皮下注射疫苗 1ml，同时设不接种对照水貂 5 只。免疫后 14 日，对所有水貂分别通过口服途径攻击水貂肠炎病毒 MEV-RC1 株病毒液 15ml（含 $15 \times 10^{7.0}$ TCID₅₀），观察 10 日。对照水貂应全部发病（附注 2），免疫水貂应全部健活。

【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】 用于预防水貂病毒性肠炎。免疫期为 6 个月。

【用法与用量】 皮下注射。分窝后 2~3 周每只水貂注射 1ml；种貂可在配种前 3 周加强免疫 1 次，每只 1ml。

【注意事项】 （1）本品仅用于健康水貂。

（2）本品应防止冻结，注射前摇匀。

（3）注射疫苗时，接种部位应严格消毒。

（4）疫苗一经开瓶，限当日用完。

（5）用过的疫苗瓶、器具应消毒处理。

【规格】 （1）20ml/瓶 （2）30ml/瓶 （3）90ml/瓶 （4）250ml/瓶 （5）500ml/瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为 9 个月。

附注：1 水貂肠炎病毒血凝（HA）试验和血凝抑制（HI）试验操作方法

1.1 1%猪红细胞悬液的制备 采集健康青年猪血液，与等量阿氏液混合，用生理盐水反复洗涤 3 次，每次以 1500r/min 离心 10 分钟，将沉积的红细胞用 PBS（0.015mol/L，pH 值为 6.4，下同）配制成 1%红细胞悬液（每次现用现配）。

1.2 HA 试验

1.2.1 在微量板上，从第 1 孔至第 12 孔，每孔用移液器加入 0.025ml PBS，用移液器吸取抗原液 0.025ml 加入第 1 孔，依次作 2 倍系列稀释，至最后 1 个孔，弃去移液器内 0.025ml 液体。

1.2.2 每孔加入 1%猪红细胞悬液 0.025ml，并设不加抗原液的红细胞对照孔，立即将

微量板在振荡器上摇匀，在 2~8℃下，静置 30 分钟后，判定结果。

1.2.3 以使 50%红细胞凝集的最高稀释度作为判定终点。

1.3 HI 试验

1.3.1 8 单位抗原的配制 举例：如果抗原凝集价测定结果为 1:1024，8 个血凝单位（即 8HA）=1024/8=128（即 1:128）。取生理盐水 12.7ml，加抗原 0.1ml，使抗原终浓度为 1:128。

1.3.2 HI 试验

1.3.2.1 将血清在 56℃下灭活 30 分钟后，取 0.1ml，加入 0.2ml PBS 和 0.1ml 25%白陶土溶液，在室温下作用 20 分钟后，以 3000r/min 离心 15 分钟，除去沉积的白陶土，取 0.05ml 猪红细胞泥，加至处理过的血清中，轻轻摇动，室温下吸附 1 小时，以 3000r/min 离心 15 分钟，收集上清液，作为原始血清样品的 1:4 稀释液。

1.3.2.2 血凝抑制试验 取 V 型 96 孔微量血凝板 1 块，用移液器向第 1 排的 1~12 孔内各加稀释液 0.025ml，用移液器将待检血清 0.025ml 加入第 1 孔，混匀后移至第 2 孔，如此逐孔稀释到第 10 孔。第 11 孔不加待检血清，作为病毒对照，第 12 孔不加待检血清，作为红细胞对照。除第 12 孔外，再向每孔加 8 单位血凝抗原 0.025ml，振荡混匀后于 37℃感作 1 小时，再加 1%猪红细胞悬液 0.025ml，经振荡混匀，在 2~8℃下，静置 30 分钟后，判定结果。以 100%抑制红细胞凝集的最高血清稀释度作为该血清的血凝抑制效价。

2 水貂病毒性肠炎发病标准

2.1 腹泻，粪便稀软、呈黄色、灰白或粉红色甚至煤焦油状。

2.2 体温升高至 40℃以上，并持续 2 日以上。

2.3 精神沉郁，食欲减退或废绝。

2.4 粪便对猪红细胞血凝（HA）效价应不低于 1:128。

具备第 2.1 项和 2.2~2.4 项中任何两项时，判为发病。

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 12 月 31 日经农业部公告第 1525 号发布。

3. 本标准于 2012 年 12 月 3 日经农业部公告第 1865 号批准变更注册。变更内容：增加规格 30ml/瓶、250ml/瓶、500ml/瓶；增加包装规格 40 瓶/箱、20 瓶/箱。未重新发布标准。

4. 根据现行《中国兽药典》要求增加【装量检查】项。

草鱼出血病活疫苗（GCHV-892 株）

Caoyu Chuxuebing Huoyimiao（GCHV-892 Zhu）

Grass Carp Haemorrhage Vaccine, Live（Strain GCHV-892）

本品系用草鱼出血病病毒 GCHV-892 株接种草鱼吻端成纤维细胞（PSF），经 28℃培养，收集细胞培养物，加适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成。用于预防草鱼出血病。

【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】 按附注方法进行检验，应无外源病毒污染。

【鉴别检验】 将冻干疫苗用 MEM 细胞维持液稀释成 $200\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 后，与等量抗草鱼出血病特异性血清混合，同时设病毒对照（病毒液与稀释液等量混合）和稀释液对照。37℃ 水浴中和 1 小时后，各接种草鱼肾细胞（CIK）6 瓶，每瓶 1ml。置 28℃ 培养 14 日，对照组应产生细胞病变，而中和组应不出现细胞病变。

【安全检验】 按瓶签标明的尾份数，用灭菌生理盐水将疫苗稀释成每 0.2ml 含 10 个使用剂量，经腹腔注射 4 月龄（体长 10~12cm）健康易感草鱼 50 尾，每尾 0.2ml。在 28℃ 左右水体中饲养 21 日，每日观察 2 次。应不出现由疫苗引起的任何症状或死亡。

【效力检验】 下列方法任择其一。

（1）病毒含量测定 按瓶签标明尾份数，用灭菌生理盐水将疫苗稀释成每 ml 含 1 尾份。再用灭菌生理盐水作 10 倍系列稀释，取 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 稀释度，每个稀释度接种草鱼肾细胞（CIK）6 瓶（约 $3\times 6\text{cm}^2$ ），每瓶 1ml，吸附 1 小时后，倒掉病毒液，加入维持液，置 28℃ 下培养观察 6~8 日，记录细胞病变。根据 Reed-Muench 法计算 TCID_{50} 。每尾份病毒含量应 $\geq 10^{4.2}\text{TCID}_{50}$ 。

（2）免疫攻毒 按瓶签标明尾份数，用灭菌生理盐水将疫苗稀释成每 0.2ml 含 1 尾份。经腹腔注射 4 月龄（体长 10cm~12cm）健康易感草鱼 50 尾，每尾 0.2ml。在 28℃ 左右水体中饲养 15 日后，连同条件相同的对照非免疫草鱼 50 尾，分别用检验用毒种（草鱼出血病病毒 GCHV-901 株）腹腔注射，每尾 $10^{3.2}\text{LD}_{50}/0.2\text{ml}$ ，在 28℃ 水体中观察 15 日，每日观察并记录各组的死亡鱼数。对照组应全部发病（出现草鱼出血病症状），且应至少死亡 45 尾，免疫组应至少保护（健活）46 尾。

【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】 用于预防草鱼出血病。免疫期为 15 个月。

【用法与用量】 按瓶签注明尾份，用灭菌生理盐水（0.65%）稀释成每 0.2ml 含 1 尾份，腹腔或肌肉注射体重 12~250g 的草鱼，每尾注射 0.2ml；体重 250~750g 的草鱼，每尾注射 0.3ml。

【不良反应】 一般无可见的不良反应。

【注意事项】 （1）本品仅用于预防，鱼体发病时不能使用本疫苗。

（2）疫苗应随配随用，稀释后的疫苗应放冷暗处，2 小时内用完。

（3）疫苗注射后养殖水体应用消毒剂全池泼洒 1 次，预防由于操作不慎使鱼体受伤而造成的细菌感染。

（4）使用后的疫苗瓶、器具和剩余的疫苗应消毒后妥善处理。

【规格】 （1）500 尾份/瓶 （2）1000 尾份/瓶

【贮藏与有效期】 -10℃ 以下保存，有效期 18 个月；2~8℃ 保存，有效期 6 个月。

附注：外源病毒检验

1 材料

1.1 样品处理 取待检细胞、毒种或疫苗样品 2~3 瓶。细胞经 3 次冻融后，混合，作为检品；毒种或疫苗，混合后，与等量抗草鱼出血病特异性抗血清混合，37℃水浴中和 1 小时后，作为检品。

1.2 检验用细胞 黑头软口鲮尾柄细胞（FHM）和草鱼肾细胞（CK）。

1.3 细胞培养液 MEM。细胞生长液中含 10%犊牛血清，pH 值 7.0~7.2；细胞维持液中含 2%犊牛血清，pH 值 7.5 左右。

1.4 细胞消化液 0.25%胰蛋白酶和 0.02%乙二胺四乙酸二钠混合液。

1.5 病毒 草鱼呼肠孤病毒（GCRV）和鲤春病毒血症病毒（SVCV）。

2 检验方法

2.1 取已培养 24 小时左右的 FHM 细胞和 CK 细胞各 2 瓶（约 3×6cm²），接种检品各 1ml，分别置 25℃和 28℃的恒温培养箱中培养 14 日，每日观察 CPE。第 14 日，继续盲传一代。

2.2 另取上述 2 种病毒，接种相应细胞，作为阳性对照；同时设不接种的细胞，作为空白对照。

2.3 收集各培养物，进行 RT-PCR 检测，并设立阳性对照和阴性对照。

2.3.1 鲤春病毒血症病毒

RT 引物：5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR-RTC-3'或随机引物。

PCR 一扩引物：

SV F1：5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR-RTC-3'，

SV R2：5'-AGA-TGG-TAT-GGA-CCC-CAA-TAC-ATH-ACN-CAY-3'，（扩增产物片段大小 714bp）。

PCR 二扩引物：

SV F1：5'-TCT-TGG-AGC-CAA-ATA-GCT-CAR-RTC-3'，

SVR3：5'-CTG-GGG-TTT-CCN-CCT-CAA-AGY-TGY-3'（扩增产物片段大小 606bp）。

2.3.2 草鱼呼肠孤病毒（只用作检测疫苗病毒以外的呼肠孤病毒）

RT 引物：5'-GCGGCAGGA ACTACAGCGTC-3'或随机引物。

PCR 引物：GCRV-T-F：5'-GCGGCAGGA ACTACAGCGTC-3'，

GCRV-T-R：5'-CCGCACTAAGTGGTTTAGCCGTC-3'，（扩增产物片段大小约为 450 bp）。

3 判定 阳性对照出现特异性 DNA 条带（鲤春病毒血症病毒 606bp，草鱼呼肠孤病毒 450bp），样品组和阴性对照均无条带出现，判为合格。

附加说明：

1. 本标准由中国水产科学院研究院珠江水产研究所提出。

2. 本标准于 2010 年 12 月 31 日经农业部公告第 1525 号发布。

羊传染性脓疱皮炎活疫苗

Yang Chuanranxingnongbaopiyan Huoyimiao

Ovine Contagious Pustular Dermatitis Vaccine, Living

本品系用羊传染性脓疱皮炎 HCE 或 GO-BT 弱毒毒株接种牛睾丸细胞，收获细胞培养物，加入适宜稳定剂，经冷冻真空干燥制成，用于预防羊传染性脓疱皮炎。

【性状】 为乳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。

【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 6 月龄左右健康易感羔羊 2 只，于口粘膜划痕接种相当于 5 个免疫量的疫苗，10 日内接种部位不出现水泡和脓疱者为合格。

【效力检验】 (1) 疫苗按冻干前分装量稀释混合，用犊牛睾丸单层细胞测定半数感染量 (TCID₅₀)。要求 HCE 冻干苗病毒含量应≥10⁵TCID₅₀/0.1ml; GO-BT 冻干苗病毒含量应≥10⁷TCID₅₀/0.1ml。

(2) 每批苗用半岁左右的健康易感羔羊 4 只，于口腔下唇粘膜划痕接种 (GO-BT 苗于口唇粘膜内注射) 疫苗 0.2ml，另用同条件的 4 只健康羔羊作对照，经 21~25 日，用强毒攻击 (HCE 毒株用 100ID₅₀/0.2ml 强毒; GO-BT 毒株用 2~4 个 ID/0.1ml 强毒)。观察 10~15 日，对照羊全部发病，免疫羊至少保护 3 只 (无水泡、脓疱)，或对照羊发病 3 只，免疫羊全部保护为合格。

【剩余水份测定】 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】 预防绵羊、山羊的传染性脓疱皮炎。GO-BT 冻干苗免疫期为 5 个月; HCE 冻干苗为 3 个月。

【用法与用量】 HCE 冻干苗在下唇粘膜划痕免疫; GO-BT 冻干苗在口唇粘膜内注射。适用于各种年龄的绵羊、山羊。免疫剂量均为 0.2ml。对于有本病流行的羊群，均可用本苗股内划痕免疫，剂量为 0.2ml。

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

【贮藏与有效期】 在-10~-15℃保存，有效期为 10 个月; 在 0~4℃，为 5 个月。

附加说明:

1. 本标准由青海省畜牧科学院、甘肃省畜牧兽医研究所提出。
2. 本标准经农业部 (1989) 农 (牧) 字第 48 号发布，经 1992 年版《质量标准》修订。