

重组新城疫病毒灭活疫苗（A-VII株）

Chongzu Xinchengyi bingdu Miehuoyimiao (A-VII Zhu)

Recombinant Newcastle Disease Virus Vaccine, Inactivated (Strain A-VII)

本品系用重组新城疫病毒 A-VII株接种鸡胚培养，收获感染鸡胚液，经甲醛溶液灭活后，加矿物油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡、鹅新城疫。

【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，管底析出的水相应不大于 0.5ml。或在 37℃ 放置 21 日，应不出现破乳现象。

黏度 按现行《中国兽药典》附录 3102 进行检验，应符合规定。

【装量检查】 按现行《中国兽药典》附录 3104 进行检查，应符合规定。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录 3306 进行检验，应无菌生长。

【安全检验】 用 7~10 日龄 SPF 鸡 10 只，每只肌肉或颈背部皮下注射疫苗 1.0 ml，连续观察 14 日，应不出现由疫苗引起的局部和全身不良反应。

【效力检验】 下列方法任择其一。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 21~35 日龄 SPF 鸡 15 只，10 只各颈部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，用新城疫病毒 A-VII 抗原测定 HI 抗体。对照鸡 HI 抗体效价均不应高于 1:4，免疫鸡 HI 抗体效价几何平均值应不低于 1:64。

(2) 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 20 μ l (1/25 羽份)，另 5 只作对照。接种后 21~28 日，每只鸡各肌肉注射新城疫病毒 JS02/06 株强毒 0.5 ml (含 $10^{5.0}$ ELD₅₀)，连续观察 14 日。对照组应全部发病或死亡，免疫组应至少 9 只不出现新城疫的临床症状。攻毒后 5 日采集泄殖腔拭子进行病毒分离，对病毒分离阴性的样品，应盲传一次后再进行判定，免疫组应至少有 7 只病毒分离为阴性。

【甲醛残留量测定】 按现行《中国兽药典》附录 3203 进行，应符合规定。

【作用与用途】 用于预防鸡、鹅的新城疫。3 周龄以内的鸡免疫期为 4 个月；3 周龄以上的鸡免疫期为 6 个月。鹅免疫期为 3 个月。

【用法与用量】 颈部皮下或肌肉注射。3 周龄以内鸡，每只 0.2ml；3 周龄以上的鸡，每只 0.5ml。4 周龄以下鹅，每只 0.5ml；4 周龄以上鹅，每只 1.5ml。

【注意事项】 (1) 本品仅在兽医指导下用于健康鸡、鹅的免疫接种。

(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) 使用前，疫苗应恢复至室温，并充分摇匀。

(4) 接种器具应无菌，注射部位应消毒。

(5) 疫苗开启后限当日使用。

(6) 剩余疫苗、疫苗瓶及注射器等，应进行无害化处理。

(7) 疫苗运输及保存切勿冻结和高温。

(8) 屠宰前 28 日内禁止使用。

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

【贮藏与有效期】 2~8℃保存, 有效期为 18 个月。

附注: 1-重组新城疫病毒(A-VII株)血凝抑制试验(HI)抗原质量标准

本品系用重组新城疫病毒(A-VII株)接种 SPF 鸡胚培养, 收获感染鸡胚液, 经甲醛溶液灭活后加入灭菌甘油制成。

1.1 性状 淡黄色液体。

1.2 特异性检验 分别与新城疫(ND)、减蛋综合征(EDS72)、H5 亚型禽流感阳性血清、H9 亚型禽流感阳性血清及 SPF 鸡血清作 HI 试验, 抗原对 DN 阳性血清应为阳性, 对 EDS76 等其他阳性血清及 SPF 鸡血清应为阴性。

1.3 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。

1.4 无菌检验 按现行《中国兽药典》进行检验, 应无菌生长。

1.5 作用与用途 用于检测新城疫病毒抗体的血凝抑制试验。

1.6 规格 (1) 2ml/瓶 (2) 5ml/瓶

2-重组新城疫病毒血凝抑制(HI)试验操作术式

2.1 血凝素工作液配制

2.1.1 血凝素凝集价测定 用 PBS 将血凝素稀释成不同倍数, 加入与抑制试验中血清量等量的 PBS, 再加入 1%鸡红细胞悬液。将 96 孔微量板在振荡器上摇匀, 25℃静置 25 分钟判定结果, 以使红细胞完全凝集的样品最高稀释度作为判定终点(即凝集价)。

2.1.2 血凝素工作液配制及检验

2.1.2.1 4 个血凝单位(即 4HAU)血凝素的配制 如果血凝素凝集价测定结果为 1:1024(举例), 4HAU=1024/4=256(即 1:256)。取 PBS 9 ml, 加血凝素 1 ml 使成稀释 1:10, 取 1:10 血凝素稀释液 1 ml 加入到 24.6 ml PBS 中最终浓度为 1:256。

2.1.2.2 4HAU 血凝素检验

检查 4HAU 的血凝价是否准确, 应将配制的 1:256 血凝素稀释液分别以 1 ml 的量加入到 1.0 ml、2.0 ml、3.0 ml、4.0 ml、5.0 ml、6.0 ml PBS 中, 使其最终浓度为 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7, 然后, 将每一稀释度的液体取 0.025 ml 加入 0.025 ml 的 1%鸡红细胞悬液、0.025 ml PBS 混匀。将血凝板在 25℃静置 25 分钟, 如果配制的血凝素稀释液为 4HAU, 则 1:4 稀释度将产生完全凝集终点。如果 4HAU 高于 4 个单位, 可能 1:5 或 1:6 为终点, 如果较低, 可能 1:2 或 1:3 为终点, 应根据检验结果将血凝素稀释度做合适调整, 使工作液确为 4HAU。

2.2 血凝抑制试验步骤

2.2.1 取微量反应板, 分别向 1-11 孔中加入 0.025 ml PBS, 第 12 孔中加入 0.05 ml PBS。

2.2.2 吸取 0.025 ml 血清, 加至第 1 孔内, 充分混合后, 吸取 0.025 ml 至第 2 孔, 一次 2 倍稀释至第 10 孔, 从第 10 孔吸取 0.025 ml, 弃去。

~~2.2.3 分别向 1-11 孔中加入含 4HA 单位的抗原 0.025 ml，室温下静置 30~40 分钟。~~

~~2.2.4 每孔中加入 0.025 ml 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。~~

~~2.2.5 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 4HA 单位抗原的血清最高稀释度作为 HI 效价。~~

3.1 鸡感染新城疫基因 VII 型强毒株发病判定标准

3.1.1 食欲废绝，呼吸困难、嗜睡；

3.1.2 拉白绿色或黄绿色稀粪；

3.1.3 气囊炎、肺、肾充血；

3.1.4 腺胃黏膜、肠管集合淋巴结、心脏等组织点状出血。

以上 4 项出现任意 2 项判为发病。

4.2 感染鸡新城疫病毒分离操作程序

采集的棉拭子样品经 -70℃ 至 37℃ 冻融 2 次后，用旋涡混合器涡旋棉拭子，经 5000 r/min 离心 10 分钟，取上清经尿囊腔接种 10 日龄 SPF 鸡胚 5 枚，每胚 0.2 ml。鸡胚接种后置 37℃ 孵育 120 小时，期间每日照胚两次，弃去 24 小时内死亡胚，收集 24 小时后死亡胚及 120 小时内未死亡胚的尿囊液(120 小时内未死亡鸡胚于 4℃ 放置 24 小时后收集尿囊液)，检测尿囊液的 HA 效价，每个拭子样品接种的 5 枚鸡胚中只要有 1 枚鸡胚液的 HA 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，盲传一次后再进行判定，盲传后仍为阴性者，方判为病毒分离阴性。

备注：本标准替代农业部公告第 2169 号中扬州大学、中崇信诺生物科技泰州有限公司、青岛易邦生物工程有限公司、扬州优邦生物制药有限公司、江苏南农高科技股份有限公司、哈药集团生物疫苗有限公司、天津瑞普生物技术股份有限公司、乾元浩生物股份有限公司、广东大华农动物保健品股份有限公司注册的同品种标准。