

附件 2

托芬那酸片等 4 种兽药产品质量标准、说明书和标签

一、托芬那酸片质量标准、说明书和内包装标签

(一) 托芬那酸片质量标准

托芬那酸片

Tuofennasuan Pian

Tolfenamic acid Tablets

本品含托芬那酸($C_{17}H_{15}ClNO_2$)应为标示量的 95.0%~105.0%。

【性状】 本品为白色片。

【鉴别】 在含量测定项下记录的色谱图中，供试品溶液主峰的保留时间应与对照品溶液主峰的保留时间一致。

【检查】 含量均匀度 取本品(6mg 规格)1 片，置 100ml 量瓶中，加无水乙醇适量，超声使托芬那酸溶解，用无水乙醇稀释至刻度，照含量测定项下的方法测定含量，应符合规定(附录 118 页)。

溶出度 取本品，照溶出度测定法(附录 114 页，第二法)，以人 T 肠液(pH7.4，取 0.2mol/L KH_2PO_4 溶液 250ml，加 1mol/L NaOH 溶液 42.5ml，用水稀释至 1000ml)1000ml 为溶出介质，转速为每分钟 100 转，依法操作，经 45 分钟时，取溶液，滤过，取续滤液作为供试品溶液(6mg 规格)或取续滤液用溶出介质 3 倍稀释后作为供试品溶液(60mg 规格)。另取托芬那酸对照品适量，精密称定，用溶出介质溶解并定量稀释成每 1ml 中约含 6 μ g 的溶液(6mg 规格)或 20 μ g 的溶液(60mg 规格)，作为对照品溶液。照紫外-可见分光光度法(附录 26 页)，在 290nm 的波长处测定吸光度，计算每片的溶出量。限度为标示量的 70%，应符合规定。

其他 应符合片剂项下有关的各项规定(附录 5 页)。

【含量测定】 照高效液相色谱法(附录 36 页)测定。

色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以甲醇-水-醋酸(75:24:1)为流动相；检测波长为 285nm；流速为每分钟 1.5ml。理论板数以托芬那酸峰计算不低于 2000。

测定法 取本品 20 片，精密称定，研细，精密称取适量(约相当于托芬那酸 60mg)，置 100ml 量瓶中，加无水乙醇适量，超声处理 15 分钟，用无水乙醇稀释至刻度，滤过，精密量取续滤液 10ml，置 100ml 量瓶中，用无水乙醇稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 10 μ l，注入液相色谱仪，记录色谱图。另取托芬那酸对照品适量，精

密称定，用无水乙醇溶解并定量稀释制成每 1ml 中含 60 μg 的溶液，作为对照品溶液，同法测定。按外标法以峰面积计算，即得。

【作用与用途】 甾体类抗炎药。用于治疗猫发热综合症；用于治疗犬炎症的急性期以及慢性运动系统疾病的疼痛。

【用法与用量】 以托芬那酸计。内服：每 1kg 体重，犬、猫 4mg，一日 1 次，连用 3 日。犬可以长期给药（连续 3 日给药，停药 4 日，持续 13 周）。

【不良反应】 在治疗过程中会有少数动物出现腹泻和呕吐。此外，会出现短暂的多饮和/或多尿。大多数的这种病例在停药后症状会自动消失。

【注意事项】 1. 对于心脏、肝脏、肾脏功能不全的犬不可服用此药，这些犬服用后可能会引起胃肠道溃疡或出血，也有证据表明此药物可能引起血液恶质或过敏反应。

2. 服药不可超过处方剂量或疗程，亦不可同时或在 24 小时内再给以甾体类药物。某些甾体类药物可能与血浆蛋白的结合能力过高，与其他高结合力的药物相拮抗，这些会导致药物的毒副作用。不可与糖皮质激素类药物联合用药。

3. 甾体类药物可引起吞噬抑制作用，因此在治疗细菌感染的并发症时，应与适当的抗生素类药物联合用药。

4. 犬服用此药时，如治疗超过 3 个月，应遵从兽医医嘱。肝功能不全的犬应对其进行密切监测。

5. 对小于 6 周龄或老年动物使用该药物时，应考虑额外的风险。如必须使用该药物时，应考虑酌情减量并仔细地进行临床观察。

6. 对患有脱水、低血容或低血压的动物避免使用该药物，因为使用该药物会增加潜在的肾脏毒性风险。

7. 避免与具有潜在肾脏毒性作用的药物联合用药。

8. 最好在麻醉动物完全苏醒后再给以此药物。

9. 对患有慢性肾功能不全且必须接受抗炎治疗的动物，使用托芬那酸治疗时无需调整用药剂量。但该产品忌用于肾功能不全的急性期。

【休药期】 无。

【规格】 (1) 6mg (2) 60mg

【贮藏】 密封，25℃以下干燥保存。

【有效期】 3 年

【生产企业】 法国威隆制药股份有限公司 (VETOQUINOL France)

VETOQUINOL, MAGNY VERNOIS, 70200 LURE

（二）托芬那酸片说明书

曾用

【兽药名称】

通用名：托芬那酸片

商品名：痛立定

英文名：Tolfenamic acid Tablets

汉语拼音：Tuofennasuan pian

【主要成分】 托芬那酸

【性状】 本品为白色片。

【药理作用】 甾体类抗炎药。托芬那酸具有甾体结构，能够发挥抗炎、特别是抗渗出和止痛的效果，同时具有抗高热效果。主要作用方式和其他甾体药物一样，通过抑制环氧化酶，来阻断重要的炎性介质类花生酸类物质的合成，如前列腺素。已有研究证明，犬体内血小板对凝血脂素合成的抑制也是由基于上述机理。托芬那酸也可能有其他的作用方式，有研究显示，无论在体内或体外，在临床相关浓度条件下，托芬那酸都可以抑制由多核白细胞（PMNs）到白三烯（LT）B₄ 的形成，而托芬那酸还有可能对前列腺素受体有直接对抗性反应。

【适应证】 用于治疗猫发热综合症；用于治疗犬炎症的急性期以及慢性运动系统疾病的疼痛。

【用法与用量】 以托芬那酸计。内服：每 1kg 体重，犬、猫 4mg，-11 1 次，连用 3 日。犬可以长期给药（连续 3 日给药，停药 4 日，持续 13 周）。

【不良反应】 在治疗过程中会有少数动物出现腹泻和呕吐。此外，会出现短暂的多饮和/或多尿。大多数的这种病例在停药后症状会自动消失。

【注意事项】 1. 对于心脏、肝脏、肾功能不全的犬不可服用此药，这些犬服用后可能会引起胃肠道溃疡或出血，也有证据表明此药物可能引起血液恶质或超敏反应。

2. 服药不可超过处方剂量或疗程，亦不可同时或在 24 小时内再给以甾体类药物。某些甾体类药物可能与血浆蛋白的结合能力过高，与其他高结合力的药物相拮抗，这些会导致药物的毒副作用。不可与糖皮质激素类药物联合用药。

3. 甾体类药物可引起吞噬抑制作用，因此在治疗细菌感染的并发炎症时，应与适当的抗生素类药物联合用药。

4. 犬服用此药时，如治疗超过 3 个月，应遵从兽医医嘱。肝功能不全的犬应对其进行密切监测。

5. 对小于 6 周龄或老年动物使用该药物时，应考虑额外的风险。如必须使用该药物时，应考虑酌情减量并仔细地进行临床观察。

6. 对患有脱水、低血容或低血压的动物避免使用该药物，因为使用该药物会增加潜在

的肾脏毒性风险。

7. 避免与具有潜在肾脏毒性作用的药物联合用药。

8. 最好在麻醉动物完全苏醒后再给以此药物。

9. 对患有慢性肾功能不全且必须接受抗炎治疗的动物，使用托芬那酸治疗时无需调整用药剂量。但该产品忌用于肾功能不全的急性期。

【休药期】 无。

【规格】 (1)6mg (2)60mg

【包装】

【贮藏】 密封，25℃以下干燥保存。

【有效期】 3 年

【进口兽药注册证号】

【生产企业】 法国威降制药股份有限公司 (VETOQUINOL France)

VETOQUINOL, MAGNY VERNON, 70200 LURE

(三) 托芬那酸片包装标签

兽用

【主要成分】 托芬那酸

【适应证】 用于治疗猫发热综合症；用于治疗犬炎症的急性期以及慢性运动系统疾病的疼痛。

【用法与用量】 以托芬那酸计。内服：每 1kg 体重，犬、猫 4mg，一日 1 次，连用 3 日。犬可以长期给药（连续 3 日给药，停药 4 日，持续 13 周）。

【不良反应】 在治疗过程中会有少数动物出现腹泻和呕吐。此外，会出现短暂的多饮和/或多尿。大多数的这种病例在停药后症状会自动消失。

【注意事项】 1. 对于心脏、肝脏、肾脏功能不全的犬不可服用此药，这些犬服用后可能会引起胃肠道溃疡或出血，也有证据表明此药物可能引起血液恶质或超敏反应。

2. 服药不可超过处方剂量或疗程，亦不可同时或在 24 小时内再给以 NSAID 类药物。某些 NSAID 类药物可能与血浆蛋白的结合能力过高，与其他高结合力的药物相拮抗，这些会导致药物的毒作用。不可与糖皮质激素类药物联合用药。

3. NSAID 类药物可引起吞噬抑制作用，因此在治疗细菌感染并发的炎症时，应与适当的抗生素类药物联合用药。

4. 给犬服用此药时，如需长期治疗超过 3 个月，应遵从兽医医嘱。特别是肝功能不全的犬应对其进行密切监测。

5. 对小于 6 周龄或老年动物使用该药物时，应考虑额外的风险。如必须使用该药物时，

应考虑酌情减量并仔细的进行临床观察。

6. 对患有脱水、低血容或低血压的动物避免使用此药物，因为使用该药物会增加潜在的肾脏毒性的风险。

7. 避免与具有潜在肾脏毒性作用的药物联合用药。

8. 最好在接受麻醉动物完全苏醒后再给以此药物。

9. 对于患有慢性肾功能不全且必须接受抗炎治疗的动物，使用托灭酸治疗时无需调整用药剂量。但是，该产品忌用于肾功能不全的急性期。

【休药期】 无。

【规格】 (1) 6mg (2) 60mg

【包装】

【贮藏】 密封，25℃以下干燥保存。

【生产日期】

【生产批号】

【有效期至】

【进口兽药注册证号】

【生产企业】 法国威隆制药股份有限公司 (VETOQUINOL France)

VETOQUINOL, MAGNY VERNOIS, 70200 LURE

二、鸡传染性鼻炎三价灭活疫苗质量标准、说明书和内包装标签

（一）鸡传染性鼻炎三价灭活疫苗质量标准

鸡传染性鼻炎三价灭活疫苗

Ji Chuanranxingbiyan Sanjia Miehuoyimiao

Avian Coryza Trivalent Vaccine, Inactivated

本品系用副鸡禽杆菌 A 型 083 株、B 型 Spross 株和 C 型 H-18 株分别接种适宜的培养基，收获培养物，经硫柳汞和 EDTA 灭活，加矿物油佐剂混合乳化制成。用于预防鸡传染性鼻炎。

【性状】 外观 乳白色乳剂。

剂型 油包水型。

稳定性 37℃ 放置 21 日，应不破乳。

黏度 使用旋转黏度计在 25℃ 进行黏度检测，应不超过 200cP。

【装量检查】 按现行《中国兽药典》附录进行检查，应符合规定。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录或《欧洲药典》进行检验，应无菌生长。

【安全检验】 用 2~4 周龄 SPF 鸡 10 只，每只颈部皮下接种疫苗 1ml（含 2 羽份）。观察 21 日，应不出现由疫苗引起的局部和全身不良反应。

【效力检验】 用 3~5 周龄 SPF 鸡 30 只，每只腿部肌肉接种疫苗 0.5 ml（含 1 羽份），另 30 只 SPF 鸡不接种作为对照。接种 28 日后，分别用 A 型（083 株），B 型（Spross 株）和 C 型（H-18 株）三个血清型的副鸡禽杆菌攻击 10 只免疫鸡和 10 只对照鸡，每组鸡同侧眶下窦和鼻腔各接种 0.2 ml 卵黄培养物，观察 5 日。每个血清型对照鸡应至少 7 只发病（流鼻涕），免疫鸡应至少 7 只保护。

【汞类防腐剂残留量测定】 按现行《中国兽药典》附录进行测定，应不超过 0.01%。

【规格】 （1）500 羽份（250 ml）/ 瓶 （2）1000 羽份（500 ml）/ 瓶

【贮藏与有效期】 2~8℃ 保存，有效期为 24 个月。

【生产企业】 英特威国际有限公司

（二）鸡传染性鼻炎三价灭活疫苗说明书

兽用

【兽药名称】

通用名 鸡传染性鼻炎三价灭活疫苗

商品名 禽必威®考威克

英文名 Avian Coryza Trivalent Vaccine, Inactivated

汉语拼音 Ji Chuanranxingbiyan Sanjia Miehuoyimiao

【主要成分与含量】 含灭活的副鸡禽杆菌（A、B、C 三种血清型），每个菌株灭活前的含量至少为 3×10^8 CFU/羽份。

【性状】 乳白色乳剂。

【作用与用途】 用于预防鸡传染性鼻炎。

【用法与用量】 皮下注射。适用于免疫5周龄以上鸡只，每只0.5ml。

建议蛋鸡和种鸡免疫两次。5~10周龄时进行首免，产蛋前数周进行加强免疫，两次免疫的时间间隔应至少6周。

【不良反应】 健康鸡免疫后临床上一般不会见到不良反应。个别鸡在注射部位可见轻微肿块。

【注意事项】 （1）切忌冻结。

（2）仅用于接种健康鸡。

（3）使用前应将疫苗恢复至室温，并充分摇匀。

（4）接种时，应执行常规无菌操作。

（5）疫苗瓶开启后限3小时内用完。

（6）本疫苗不得与其它疫苗混合使用。

（7）用过的疫苗瓶、器具和未用完的疫苗等应进行无害化处理。

（8）如误将疫苗注入人体，应立即就医，并告诉医生本疫苗含有矿物油乳剂。

（9）接种的最佳时间和方法在很大程度上取决于当地的具体情况。因此，接种前应征求当地兽医的意见。

【规格】 （1）500 羽份（250ml）/瓶 （2）1000 羽份（500ml）/瓶

【包装】 12 瓶/盒

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为24个月。

【《进口兽药注册证书》证号】

【生产企业】 英特威国际有限公司 (INTERVET INTERNATIONAL B.V.)

地址: P.O.Box31, 5830 AA Boxmeer, The Netherlands

电话: +31 (0) 485587600

仅在兽医指导下使用

(三) 鸡传染性鼻炎三价灭活疫苗内包装标签

兽用

禽必威®考威克

鸡传染性鼻炎三价灭活疫苗

500 (1000) 羽份/瓶

《进口兽药注册证书》证号:

批 号:

有效期至:

详见说明书。

【作用与用途】 用于预防鸡传染性鼻炎。

【贮藏与有效期】 2~8℃保存, 有效期为24个月。

【生产企业】 英特威国际有限公司

仅在兽医指导下使用

三、犬瘟热、腺病毒病、细小病毒病、副流感病毒 2 型呼吸道感染症 四联活疫苗-犬钩端螺旋体病、黄疸出血钩端螺旋体病二联灭活疫苗 质量标准、说明书和内包装标签

(一) 犬瘟热、腺病毒病、细小病毒病、副流感病毒 2 型呼吸道感染症四联活疫苗-犬钩端螺旋体病、黄疸出血钩端螺旋体病二联灭活疫苗质量标准

犬瘟热、腺病毒病、细小病毒病、副流感病毒 2 型呼吸道感染症四联活疫苗-犬
钩端螺旋体病、黄疸出血钩端螺旋体病二联灭活疫苗

Quanwenre Xianbingdubing Xixiaobingdubing Fuliugan Bingdu 2 xing Huxidaoganranzheng
Silian Huoyimiao Quangouduanluoxuantibing Huangdanchuxuegouduanluoxuantibing Erlian
Miehuoyimiao

Canine Distemper, Adenovirose, Parvovirose and Parainfluenza Type 2 Respiratory Infections Vaccine,
Live –Leptospira Canicola And Leptospira Icterohaemorrhagiae Leptospirose Vaccine, Inactivated

本品活疫苗部分系用犬瘟热病毒 BA5-Vero 150 株接种非洲绿猴肾细胞 (Vero) 培养, 用犬腺病毒 2 型 20RCVF8 株接种犬肾细胞 (MDCK) 培养, 用犬细小病毒 115-780916 株接种猫肾细胞 (CrFK) 培养以及用犬副流感病毒 2 型 CGF2004/75 株接种犬肾细胞 (MDCK) 培养, 分别收获培养物混合加适宜稳定剂, 经冷冻真空干燥制成; 灭活疫苗部分系用犬钩端螺旋体, 黄疸出血型钩端螺旋体分别接种适宜培养基培养, 收获培养物经硫柳汞灭活后制成。用于预防犬瘟热, 犬腺病毒病, 犬细小病毒病和犬副流感病毒感染, 及犬钩端螺旋体病和黄疸出血钩端螺旋体病。

【性状】 外观 活疫苗部分呈浅褐色海绵状疏松团块, 易与瓶壁脱离, 加稀释液后迅速溶解; 灭活疫苗部分呈乳白色均匀悬液。

【装量检查】 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应不少于标识量。

【无菌检验】 按现行《中国兽药典》附录或《欧洲药典》进行检验, 应无菌生长。

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

【外源病毒检验】 按现行《中国兽药典》附录进行检验, 应无外源病毒污染。

【鉴别检验】 活疫苗部分的检验按附注 1 进行, 其各组分病毒的中和指数 (NI) 均应不小于 $2.0 \log_{10}$ 。

犬钩端螺旋体和黄疸出血型钩端螺旋体血清学检验按附注 2 进行, 免疫豚鼠的血清滴度应呈阳性反应。

【安全检验】 用 8~14 周龄健康比格犬 2 只, 每只犬皮下或肌肉接种以 2 头份灭活疫苗部分稀释的 10 头份活疫苗部分的待检样品。连续观察 21 日, 应不出现局部或全身性的异常反应。

【效力检验】 各组分按以下方法进行检验:

犬瘟热病毒 按附注 3 进行检验, 每头份病毒含量应 $\geq 10^{4.0} \text{CCID}_{50}$ 。

犬腺病毒 2 型 按附注 4 进行检验，每头份病毒含量应 $\geq 10^{2.5}$ CCID₅₀。

犬细小病毒 按附注 5 进行检验，每头份病毒含量应 $\geq 10^{4.9}$ CCID₅₀。

犬副流感病毒 2 型 按附注 6 进行检验，每头份病毒含量应 $\geq 10^{4.7}$ CCID₅₀。

犬钩端螺旋体和黄疽出血型钩端螺旋体 按附注 7 进行检验，含犬钩端螺旋体应至少为 40 个效检剂量（即 80%以上的免疫仓鼠可存活），黄疽出血钩端螺旋体应至少为 40 个效检剂量（即 80%以上的免疫仓鼠可存活）

【灭活检验】 取 10ml 待检灭活苗部分，3000g 离心 30 分钟去除残留的灭活剂。弃上清液，用 10ml EMJH 液体培养基重悬沉淀物。取 10ml 重悬沉淀物溶液接入 100ml EMJH 液体培养基，29℃±1℃培养 14 天后，用新鲜培养基于同等条件下进行一次继代培养。用暗视野显微镜检查培养物。同时，取 10⁶ 倍稀释的两种血清型的钩端螺旋体，分别接入同批制备的适量 EMJH 培养基作为阳性对照，相等条件下同法培养。钩端螺旋体对照培养物应观察到生长；而待检灭活苗部分，两次培养均应无钩端螺旋体生长。

【相容性检验】 各取 2 瓶活疫苗部分，分别用钩端螺旋体灭活疫苗部分（待检稀释液）和参考稀释液（无菌注射用水），按使用说明复原。20±3℃放置 2 小时，依照附注 3~6 各病毒组分的滴定方法检验。通过与参考稀释液比较，评估待检稀释液对病毒活性组分的影响。各病毒组分的滴定结果的差值应不超过 0.7log10。

【汞类防腐剂残留量测定】 按现行《中国兽药典》附录对灭活疫苗部分进行测定，应不超过 0.01%。

【剩余水分测定】 按现行《中国兽药典》附录对活疫苗部分进行测定，应不超过 3.5%。

【pH 值测定】 按现行《中国兽药典》附录进行检验，活疫苗部分用无菌蒸馏水稀释后应为 7.0~8.0；灭活疫苗部分应为 6.8~7.8。

【规格】 活疫苗部分：1 头份/瓶；灭活疫苗部分：1 头份（1ml）/瓶。

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为 24 个月。

【生产企业】 梅里亚有限公司法国生产厂（MERIAL SAS, FRANCE）

附注：1 疫苗病毒组分的鉴别检验——中和指数测定

1.1 材料

1.1.1 待检疫苗各病毒组分的滴定所需设备和试剂，参见附注 3~6。

1.1.2 犬瘟热病毒（CDV）单特异抗体

1.1.3 犬腺病毒 2 型（CAV2）单特异抗体

- 1.1.4 犬细小病毒（CPV）单特异抗体
- 1.1.5 犬副流感病毒 2 型（CPI2）单特异抗体

1.2 方法

1.2.1 微量板的准备

- 1.2.1.1 每块微量板等分成两个部分。
- 1.2.1.2 半块板（第 1~6 列）用于常规的疫苗测定，另半块板（第 7~12 列）用于加入抗体中和后的疫苗测定。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
对照细胞													A
													B
													C
													D
													E
													F
													G
对照细胞													H
	疫苗测定						加入抗体中和后的疫苗测定						

1.2.2 单特异抗体的稀释

按照待鉴别检验的病毒株类型，将相应组分的单特异抗体按照其使用说明及试验要求，作适当稀释（如 1:500，1:1000），并摇匀。

1.2.3 待检疫苗（病毒组分）稀释

待检疫苗的稀释，是按照相应的病毒组分测定的要求进行（参见附注 3~6，分别为 CDV，CAV2，CPV，CPI2 的病毒含量测定方法）。

1.2.4 待检疫苗（病毒组分）加样

1.2.4.1 CDV

1.2.4.1.1 取每个稀释度（共 6 个稀释度）的待检疫苗，分别加入 B1~G1 孔，B2~G2 孔，…，B6~G6 孔，每孔 50μl，即每个稀释度重复 6 个孔；每孔再分别加入 CPI2 单特异抗体 50μl。

1.2.4.1.2 另取每个稀释度（共 6 个稀释度）的待检疫苗，分别加入 B7~G7 孔，B8~G8 孔，…，B12~G12 孔，每孔 50μl，即每个稀释度重复 6 个孔；每孔再分别加入 CPI2 单特异抗体和 CDV 单特异抗体的混合溶液（两者按 1:1 混合，抗体滴度分别为工作浓度的两倍）50μl。

1.2.4.1.3 微量板振荡混匀，置 20~22℃中和反应 1 小时。

1.2.4.2 CPV

1.2.4.2.1 取每个稀释度（共 6 个稀释度）的待检疫苗，分别加入 B1~G1 孔，B2~G2 孔，…，B6~G6 孔，每孔 50μl，即每个稀释度重复 6 个孔；每孔再分别加入 CPI2 单特异抗体 50μl。

1.2.4.2.2 另取每个稀释度（共 6 个稀释度）的待检疫苗，分别加入 B7~G7 孔，B8~G8 孔，…，B12~G12 孔，每孔 50μl，即每个稀释度重复 6 个孔；每孔再分别加入 CPV 单特异抗体和 CPI2 单特异抗体的混合溶液（两者按 1:1 混合，抗体滴度分别为工作浓度的两倍）50μl。

1.2.4.2.3 微量板振荡混匀，置 20~22℃中和反应 1 小时。

1.2.4.3 CAV2

1.2.4.3.1 取每个稀释度（共 6 个稀释度）的待检疫苗，分别加入 B1~G1 孔，B2~G2 孔，…，B6~G6 孔，每孔 50μl，即每个稀释度重复 6 个孔；每孔再分别加 50μl CPI2 单特异抗体。

1.2.4.3.2 另取每个稀释度（共 6 个稀释度）的待检疫苗，分别加入 B7~G7 孔，B8~G8 孔，…，B12~G12 孔，每孔 50μl，即每个稀释度重复 6 个孔；每孔再分别加 50μl CPI2 单特异抗体和 CAV2 单特异抗体的混合液（两者按 1:1 混合，抗体滴度分别为工作浓度的两倍）。

1.2.4.3.3 微量板振荡混匀，置 36~38℃中和反应 1 小时。

1.2.4.4 CPI2

1.2.4.4.1 取每个稀释度（共 6 个稀释度）的待检疫苗，分别加入 B1~G1 孔，B2~G2 孔，…，B6~G6 孔，每孔 50μl，即每个稀释度重复 6 个孔；每孔再分别加入 CAV2 单特异抗体 50μl。

1.2.4.4.2 另取每个稀释度（共 6 个稀释度）的待检疫苗，分别加入 B7~G7 孔，B8~G8 孔，…，

B12~G12 孔，每孔 50 μ l，即每个稀释度重复 6 个孔；每孔再分别加入 CPI2 单特异抗体和 CAV2 单特异抗体的混合液（两者按 1:1 混合，抗体滴度分别为工作浓度的两倍）50 μ l。

1.2.4.4.3 微量板振荡混匀，置 36~38℃ 中和反应 1 小时。

1.2.5 各疫苗组分的滴定方法

按照附注 3~6 中分别描述的方法，加入相应的细胞进行培养后，进行各组分的滴定。

其中 A

和 H 行作为细胞培养的空白对照。

1.3 结果判定

1.3.1 中和指数计算，即常规测定的疫苗滴度与抗体中和后测定的疫苗滴度之比值。

1.3.2 CDV，CAV2，CPV，CPI2 的中和指数，均应不小于 2.0 log10。

2 钩端螺旋体的鉴别检验

2.1 材料

2.1.1 仪器设备

2.1.1.1 生物安全橱

2.1.1.2 漩涡振荡器

2.1.1.3 水槽

2.1.1.4 稀释用试管

2.1.1.5 自动加样器

2.1.1.6 暗视野显微镜

2.1.1.7 30℃ 培养箱

2.1.1.8 250ml 锥形烧瓶

2.1.1.9 移液管

2.1.2 试剂

2.1.2.1 用作阳性对照的黄疸出血钩端螺旋体（LI）和犬钩端螺旋体（LC）

2.1.2.2 EMJH 培养基

2.1.2.3 生理盐水，pH 值 7.15

2.1.2.4 LI 阳性参考血清

2.1.2.5 LC 阳性参考血清

2.1.2.6 阴性参考血清

2.1.2.7 待检血清

2.1.2.8 健康易感豚鼠 2 只，250~350g/只

2.2 方法

2.2.1 豚鼠免疫

2.2.1.1 用 2 只健康豚鼠，分别腹腔接种钩端螺旋体灭活疫苗部分，每只 2 头份（2ml）。

2.2.1.2 第 7 日时，按上述方法第二次接种相同剂量的钩端螺旋体灭活疫苗部分。

2.2.1.3 第 14 日时，采集血样。

2.2.2 钩端螺旋体培养

2.2.2.1 在生物安全橱里，分别白液氮取出装黄斑出血钩端螺旋体和犬钩端螺旋体的冻存管解冻，取 0.5ml 菌液接入装有 50ml EMJH 培养基的 250ml 烧瓶。

2.2.2.2 30℃培养 1 周。

2.2.2.3 培养期末，于系列稀释前检查钩端螺旋体的生长。经显微镜检查和外观检验，评估其生长情况（对数生长期）。若未达到足够的浓度，可继续培养。

2.2.3 系列稀释

2.2.3.1 待检血清在 56℃灭活 30 分钟。用生理盐水按下列方式（示例）进行系列稀释：

表 1 阳性参考血清的系列稀释（一组为 LI 阳性血清，另一组为 LC 阳性血清）

试管号	1	2	3	4	5	6	7……
稀释倍数	0	1:10	1:40	1:160	1:640	1:2560	……
以 log ₁₀ 表示的稀释倍数	-	1.0	1.6	2.2	2.8	3.4	……
自前一稀释度所取血清量（μl）	阳性血清	60	150	150	150	150	150
	1\	1\	1\	1\	1\	1\	1\ 并 150μl
稀释液（μl）	-	540	450	450	450	450	450

表 2 阴性参考血清的系列稀释（LI 和 LC 的阴性对照血清）

试管号	1	2	3	4	5
稀释倍数	0	1:5	1:10	1:40	1:160
以 log ₁₀ 表示的稀释倍数	-	0.7	1.0	1.6	2.2
自前一稀释度所取血清	阴性血清	300	600	300	300

量 (μl)

	}\	}\	}\	}\	}\	弃 300μl
稀释液 (μl)	-	1200	600	900	900	

表 3 待检血清的系列稀释 (LI 和 LC 的待检血清)

试管号	1	2	3	4	5	6	7...
稀释倍数	0	1:10	1:40	1:160	1:640	1:2560	...
以 log ₁₀ 表示的稀 释倍数	-	1.0	1.6	2.2	2.8	3.4	...
自前一稀释度所 取血清量 (μl)	待检血清	300	600	300	300	300	
	}\	}\	}\	}\	}\	}\	弃 300μl
稀释液 (μl)	-	1200	600	900	900	900	

抗原对照：检验时设立抗原对照

2.2.3.2 从阴性参考血清和待检血清的各稀释试管中，分别移取 450μl 至另一组空的试管，分成相同的两组：一组用于 LI 培养，另一组用于 LC 培养。

2.2.3.3 向上述 (2.2.3.2) 的每支试管中，加入等量 (450 μl) 的不稀释的钩端螺旋体培养物 (2.2.2 中制备)，即一组检测 LI 血清样品，一组检测 LC 血清样品。

2.2.3.4 充分混匀。

2.2.3.5 30℃ 孵育 1 小时。

2.2.4 结果读取

2.2.4.1 孵育后，每管取 1 滴在显微镜下检查。

2.2.4.2 用暗视野显微镜，检查至少 10 个视野 (×20 镜头)。

2.2.4.3 检查钩端螺旋体凝集 (“球体”) 情况，有凝集表明存在特异抗体。

2.2.4.4 当至少有一个圆的纺纱形 “球体”，围绕着游走的活钩端螺旋体，则试验呈阳性。

2.2.4.5 当游走的钩端螺旋体中无 “球体” 形成，则试验呈阴性。

2.2.4.6 记录结果

无凝集的钩端螺旋体

- + 仅一个“球体”
- ++ 超过一个“球体”

2.3 结果判定

2.3.1 结果表述

2.3.1.1 如果最末一支阳性试管中仅观察到一个“球体”，待检血清的滴度即为该试管稀释

度倒数的对数。

2.3.1.2 如果最末一支阳性试管中观察到多个“球体”，血清滴度按下列公式计算：

血清滴度 = (最后阳性稀释度的反对数+最后阳性稀释度后一个稀释度的反对数) / 2

2.3.2 检验成立的条件：

2.3.2.1 测定的阳性和阴性参考血清滴度与其预期（通常测定）的值一致。

2.3.2.2 阳性参考血清和阴性参考血清的滴度差值至少为 $1 \log 10$ 。

2.3.2.3 阴性参考血清的滴度不超过 $1 \log 10$ 。

3 犬瘟热病毒的病毒含量测定

3.1 材料

3.1.1 仪器设备

3.1.1.1 细胞培养用 96 孔带盖微量板

3.1.1.2 自动加样器及吸头

3.1.1.3 水槽

3.1.1.4 稀释用试管

3.1.1.5 旋涡振荡器

3.1.1.6 自动微量板振荡器

3.1.1.7 37℃-二氧化碳（5%CO₂）培养箱

3.1.1.8 5℃冰箱

3.1.1.9 倒置显微镜

3.1.1.10 垂直层流橱

3.1.2 试剂

3.1.2.1 待检冻干苗部分

3.1.2.2 犬副流感病毒 2 型（CPI2）单特异抗体（按使用说明稀释至工作浓度）

3.1.2.3 非洲绿猴肾细胞（VERO）

- 3.1.2.4 胎牛血清（FCS）
- 3.1.2.5 待检疫苗稀释用培养基：F15-A-DCQ + 2% FCS + 1%谷氨酰胺（临用添加）
- 3.1.2.6 细胞悬液稀释用培养基：MEM-A-DCQ + 2% FCS + 2%谷氨酰胺（临用添加）
- 3.1.2.7 注射用无菌水（SRL）

3.2 方法

3.2.1 用 1ml SRL 复原待检冻干苗部分。按下表的方式用试管进行稀释。

试管号	1	2	3	4	5	6	7……
稀释倍数	0	1:10	1:40	1:160	1:640	1:2560	……
以 log ₁₀ 表示的稀释倍数	-	1.0	1.6	2.2	2.8	3.4	……
待检样品（ml）	1	0.2	1	1	1	1	1
	}\	}\	}\	}\	}\	}\	}\
稀释用培养基（ml）	-	1.8	3	3	3	3	3

- 3.2.2 每步操作时，试管用旋涡振荡混匀。每个稀释度之间更换吸头。
- 3.2.3 选取 6 个稀释度（覆盖待检冻干苗部分的犬瘟热病毒组分的滴度），用加样器将每个稀释度的待检样品加入 6 个孔，每孔 50μl。
- 3.2.4 每孔加入 50μl 的 CPI2 抗体，微量板加盖。置于 20~22℃、5%CO₂ 培养箱感作 1 小时。
- 3.2.5 细胞悬液制备期间，培养板置于 5℃ 保存（至多数小时）。
- 3.2.6 细胞悬液制备和加样：用 MEM-A-DCQ 培养基+2%FCS+2%新鲜谷氨酰胺制备 VERO 细胞悬液，120000 细胞/ml。将细胞悬液用自动加样器加入含待检样品的孔，每孔 150 μl。
- 3.2.7 微量板上留 6 个空白孔，每孔加入细胞悬液 150μl，并加入细胞用稀释培养基 100μl，作为细胞对照。
- 3.2.8 叠加细胞板（最多 10 块），置于 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 7 日。
- 3.2.9 第 7 日时读取结果 用倒置显微镜检查细胞单层外观（细胞病变），尤其是对照细胞。

从最高稀释度开始读数，至少须读取 2 个没有细胞病变的稀释度。出现细胞病变的孔记为“+”，而没有细胞病变的孔记为“-”。

3.3 结果判定

通过 Kärber 法计算 CDV 成分的病毒含量，其表示为引起 50%细胞病变的病毒稀释度倒数的对数值。每头份病毒含量应 $\geq 10^{4.0}$ CCID₅₀。

4 犬腺病毒 2 型的病毒含量测定

4.1 材料

4.1.1 仪器设备

4.1.1.1 细胞培养用 96 孔带盖微量板

4.1.1.2 自动加样器及吸头

4.1.1.3 水槽

4.1.1.4 稀释用试管

4.1.1.5 旋涡振荡器

4.1.1.6 自动微量板振荡器

4.1.1.7 37℃二氧化碳（5%CO₂）培养箱

4.1.1.8 5℃冰箱

4.1.1.9 倒置显微镜

4.1.1.10 垂直层流橱

4.1.2 试剂

4.1.2.1 待检冻干苗部分

4.1.2.2 犬副流感病毒 2 型（CPI2）单特异抗体（按使用说明稀释至工作浓度）

4.1.2.3 犬肾细胞（MDCK）

4.1.2.4 胎牛血清（FCS）

4.1.2.5 待检疫苗稀释用培养基：F15-A-DCQ + 2% FCS

4.1.2.6 细胞悬液稀释用培养基：F15-A-DCQ + 2% FCS

4.1.2.7 注射用无菌水（SRL）

4.2 方法

4.2.1 用 1ml SRL 复原待检冻干苗部分。按下表的方式用试管进行稀释。

试管号	1	2	3	4	5	6	7……
稀释倍数	0	1:10	1:40	1:160	1:640	1:2560	……

以 $\log_{10}$ 表示的稀释倍数	-	1.0	1.6	2.2	2.8	3.4	……
待检样品 (ml)	1	0.2	1	1	1	1	1
	}\	}\	}\	}\	}\	}\	}\
稀释用培养基 (ml)	-	1.8	3	3	3	3	3

4.2.2 每步操作时，试管用旋涡振荡混匀。每个稀释度之间更换吸头。

4.2.3 选取 6 个稀释度（覆盖待检冻干苗部分的犬腺病毒 2 型组分的滴度），用加样器将每个稀释度的待检疫苗加入 6 个孔，每孔 50 μ l。

4.2.4 每孔加入 CPI2 抗体 50 μ l，微量板加盖。置于 37℃、5%CO₂ 培养箱感作 1 小时。

4.2.5 细胞悬液制备期间，培养板置于 5℃ 保存（至多数小时）。

4.2.6 细胞悬液制备和加样：用 F15-A-DCQ 培养基+2%FCS 制备 MDCK 细胞悬液，100,000 细胞/ml。

4.2.7 将细胞悬液用自动加样器加入含待检样品的孔，每孔 150 μ l。

4.2.8 微量板上留 6 个空白孔，每孔加入细胞悬液 150 μ l，并加入细胞用稀释培养基 100 μ l，作为细胞对照。

4.2.9 孵育：叠加细胞板（最多 10 块），置于 37℃、5%CO₂ 培养箱培养 10 日。

4.2.10 第 10 日时读取结果 用倒置显微镜检查细胞单层外观（细胞病变），尤其是对照细胞。从最高稀释度开始读数，至少须读取 2 个没有细胞病变的稀释度。出现细胞病变的孔记为“+”，而没有细胞病变的孔记为“-”。

4.3 结果判定

通过 Kärber 法计算 CAV2 成分的病毒含量，其表示为引起 50%细胞病变的病毒稀释度倒数的对数值。每头份病毒含量应 $\geq 10^{2.5}$ CCID₅₀。

5 犬细小病毒的病毒含量测定

5.1 材料

5.1.1 仪器设备

5.1.1.1 细胞培养用 96 孔带盖微量板

5.1.1.2 血凝试验用 96 孔锥形底微量板

5.1.1.3 自动加样器及吸头

5.1.1.4 水槽

5.1.1.5 稀释用试管

- 5.1.1.6 旋涡振荡器
- 5.1.1.7 自动微量板振荡器
- 5.1.1.8 37℃二氧化碳（5%CO₂）培养箱
- 5.1.1.9 5℃冰箱
- 5.1.1.10 倒置显微镜
- 5.1.1.11 垂直空气层流橱
- 5.1.1.12 放大镜
- 5.1.2 试剂
- 5.1.2.1 待检冻干苗部分
- 5.1.2.2 猫肾细胞（CrFK）
- 5.1.2.3 胎牛血清（FCS）
- 5.1.2.4 待检疫苗稀释用培养基：F15-A-DCQ + 2% FCS+1%谷氨酰胺（临用添加）
- 5.1.2.5 细胞悬液稀释用培养基：MEM-D-DCQ +5% FCS+1%谷氨酰胺（临用添加）
- 5.1.2.6 猪红细胞
- 5.1.2.7 血凝试验用稀释液：PBS（pH 值 6.4）
- 5.1.2.8 牛血清白蛋白硼酸盐溶液（4%BABS，pH7.2）
- 5.1.2.9 注射用无菌水（SRL）

5.2 方法

5.2.1 用 1ml SRL 复原待检冻干苗部分。按下表的方式用试管进行稀释。

试管号	1	2	3	4	5	6	7……
稀释倍数	0	1:10	1:40	1:160	1:640	1:2560	……
以 log ₁₀ 表示的稀释倍数	-	1.0	1.6	2.2	2.8	3.4	……
待检样品（ml）	1	0.2	1	1	1	1	1
	}\	}\	}\	}\	}\	}\	}\
稀释用培养基（ml）	-	1.8		3	3	3	3

- 5.2.2 每步操作时，试管用旋涡振荡混匀。每个稀释度之间更换吸头。
- 5.2.3 选取 6 个稀释度（覆盖冻干苗部分的犬细小病毒组分的滴度），用加样器将每个稀释度的待检疫苗加入 6 个孔，每孔 50μl，微量板加盖。
- 5.2.4 细胞悬液制备期间，培养板置于 5℃保存（至多数小时）。

5.2.5 细胞悬液制备和加样 用 MEM-D-DCQ 培养基+5%FCS 制备 CrFK 细胞悬液，60,000 细胞/ml。

5.2.6 将细胞悬液用加样器加入含待检样品的孔，每孔 150 μ l。

5.2.7 微量板上留 6 个空白孔，每孔加入细胞悬液 150 μ l，并加入细胞用稀释培养基 100 μ l，
作为细胞对照。

5.2.8 叠加细胞板（最多 10 块），置于 37℃、5% CO₂ 培养箱孵育 6 h。

5.2.9 第 6 h 时进行血凝试验读取结果。

5.2.10 制备猪红细胞悬液，用 PBS(pH 值 6.4)+1%BABS(V/V)混合溶液稀释至 20×10^6 细胞/ml。

5.2.11 按细胞滴定时微量板的次序，标识好血凝试验用微量板。

5.2.12 用加样器将血凝试验用稀释溶液加至锥形底微量板，每孔 50 μ l。

5.2.13 用加样器白细胞培养微量板上，依次地垂直移取上清液至血凝试验微量板，每孔 25 μ l。

5.2.14 每孔加入猪红细胞悬液 50 μ l。

5.2.15 微量板置于 5℃孵育。

5.2.16 当红细胞沉积时（5℃，约 2~3 小时），使用放大镜读取血凝结果。红细胞沉积时
间应不超过 4 小时。

5.2.17 从最大稀释度开始读数，至少须读取 2 个没有血凝的稀释度。

5.2.18 勿同时从冰箱取出 10 块以上的微量板。

5.2.19 出现血凝的孔记为“+”，而没有血凝的孔记为“-”。

5.3 结果判定

按照 Kärber 法计算 CPV 组分的病毒含量，其表示为引起 50%孔发生血凝的最高稀释度倒数的对数。每头份病毒含量应 $\geq 10^{4.9}$ CCID₅₀。

6 犬副流感病毒 2 型的病毒含量测定

6.1 材料

6.1.1 仪器设备

6.1.1.1 细胞培养用 96 孔带盖微量板

6.1.1.2 血凝试验用 96 孔锥形底微量板

- 6.1.1.3 自动加样器及吸头
- 6.1.1.4 水槽
- 6.1.1.5 稀释用试管
- 6.1.1.6 漩涡振荡器
- 6.1.1.7 自动微量板振荡器
- 6.1.1.8 37℃二氧化碳（5%CO₂）培养箱
- 6.1.1.9 5℃冰箱
- 6.1.1.10 倒置显微镜
- 6.1.1.11 垂直层流橱
- 6.1.1.12 放入镜
- 6.1.2 试剂
 - 6.1.2.1 待检冻干苗部分
 - 6.1.2.2 犬腺病毒 2 型（CAV2）单特异抗体（按使用说明稀释至工作浓度）
 - 6.1.2.3 犬肾细胞（MDCK）
 - 6.1.2.4 胎牛血清（FCS）
 - 6.1.2.5 待检疫苗稀释用培养基：F15-A-DCQ + 2% FCS+1%谷氨酰胺（临用添加）
 - 6.1.2.6 细胞悬液稀释用培养基：F15-A-DCQ + 2% FCS+1%谷氨酰胺（临用添加）
 - 6.1.2.7 豚鼠红细胞
 - 6.1.2.8 血凝试验用稀释液：生理盐水+1%BABS
 - 6.1.2.9 牛血清白蛋白硼酸盐溶液（4%BABS，pH 值 7.2）
 - 6.1.2.10 冻干样品注射用无菌水（SRL）

6.2 方法

6.2.1 用 1ml SRL 复原待检冻干苗部分。按下表的方式用试管进行稀释。

试管号	1	2	3	4	5	6	7……
稀释倍数	0	1:10	1:40	1:160	1:640	1:2560	……
以 log ₁₀ 表示的稀 释倍数	-	1.0	1.6	2.2	2.8	3.4	……
待检样品（ml）	1	0.2	1	1	1	1	1
	1\	1\	1\	1\	1\	1\	1\

稀释用培养基(ml)	-	1.8	3	3	3	3	3
------------	---	-----	---	---	---	---	---

6.2.2 每步操作时，试管用旋涡振荡混匀。每个稀释度之间更换吸头。

6.2.3 选取 6 个稀释度（覆盖待检冻干苗部分的犬副流感病毒 2 型组分的滴度），用加样器将每个稀释度的待检疫苗加入 6 个孔，每孔 50 μ l。

6.2.4 每孔加入 CAV2 抗体 50 μ l，微量板加盖。置于 37℃、5%CO₂ 培养箱感作 1 小时。

6.2.5 细胞悬液制备期间，培养板置于 5℃ 保存（至多数小时）。

6.2.6 细胞悬液制备和加样：用 F15-A-DCQ 培养基+2%FCS+1%谷氨酰胺制备 MDCK 细胞悬液，100,000 细胞/ml。将细胞悬液加至含待检样品的孔，每孔 150 μ l。

6.2.7 微量板上留 6 个空白孔，每孔加入细胞悬液 150 μ l，并加入细胞用稀释培养基 100 μ l，作为细胞对照。

6.2.8 叠加细胞板（最多 10 块），置于 37℃、5%CO₂ 培养箱孵育 7 日。

6.2.9 第 7 日时经血凝试验读取结果。

6.2.10 制备豚鼠红细胞悬液，用生理盐水+1%BABS（V/V）混合溶液稀释至 25×10^6 细胞/ml。

6.2.11 按细胞滴定时微量板的次序，标识好血凝试验用微量板。

6.2.12 用加样器将血凝试验用稀释溶液加至锥形底微量板，每孔 50 μ l。

6.2.13 用加样器自细胞培养微量板上，依次地垂直移取上清液至血凝试验微量板，每孔 25 μ l。

6.2.14 每孔加入豚鼠红细胞悬液 50 μ l。

6.2.15 微量板置于 5℃ 孵育。

6.2.16 当红细胞沉积时（5℃，约 2~3 小时），使用放大镜读取血凝结果。红细胞沉积时间应不超过 4 小时。

6.2.17 从最大稀释度开始读数，至少须读取 2 个没有血凝的稀释度。

6.2.18 勿同时从冰箱取出 5 块以上的微量板读取结果。

6.2.19 出现血凝的孔记为“+”，而无血凝的孔记为“-”。

6.3 结果判定

按照 Kärber 法计算 CPI2 成分的病毒含量，其表示为引起 50%孔发生血凝的最高稀释度倒数的对数。每头份病毒含量应 $\geq 10^{4.7}$ CCID₅₀。

7 钩端螺旋体的效检方法

7.1 材料

7.1.1 仪器设备

7.1.1.1 一次性注射器 (5ml)

7.1.1.2 带盖试管 (15ml)

7.1.1.3 旋涡振荡器

7.1.1.4 37℃ 二氧化碳 (5%CO₂) 培养箱

7.1.1.5 5℃冰箱

7.1.1.6 倒置显微镜

7.1.1.7 垂直层流橱

7.1.2 试剂

7.1.2.1 待检灭活疫苗部分

7.1.2.2 疫苗稀释用缓冲液 生理盐水, pH 值 7.5。

7.1.2.3 SPF 金黄色仓鼠 雌性, 用于试验时约 3~4 周龄。

7.2 方法

7.2.1 待检灭活苗部分的稀释

7.2.1.1 在垂直层流罩下, 取两瓶灭活疫苗部分混合, 用生理盐水 (pH 值 7.5) 将其按 1:40 稀释。

7.2.1.2 疫苗的稀释与攻毒菌株的稀释不可在同一层流罩下完成。

7.2.2 试验动物

7.2.2.1 仓鼠必须在其运抵实验场所后 8 日内使用 (若超过 8 日, 则勿用于此类检验)。

7.2.2.2 一次检验用的仓鼠总数:

7.2.2.2.1 免疫组: 5 只仓鼠/组分/攻毒菌液稀释度/疫苗批次

7.2.2.2.2 对照组: 5 只仓鼠/组分/攻毒菌液稀释度

7.2.2.3 仓鼠饲养于合适笼具, 并置于常规金属架上。

7.2.3 免疫接种 (第 0 日, 依此类推)

7.2.3.1 用 5ml 的一次性注射器抽取 5ml 稀释好的待检灭活疫苗 (见 7.2.1)。

7.2.3.2 免疫组的仓鼠, 逐只经颈背部皮下注射 1ml 待检灭活疫苗。

7.2.3.3 免疫后的仓鼠置于无菌笼具, 按分组标识 (如 A、B、C、D)。

7.2.3.4 需免疫的仓鼠全部接种完后, 盖好笼具放回架上。

7.2.3.5 对照的仓鼠饲养于架上的单独笼具内, 不作免疫。

7.2.3.6 免疫组的笼具的标记方法示例:

犬钩端螺旋体 (LC) 组分		疫苗稀释
		1:40
攻毒菌株稀释	1:10	A
	1:100	B
黄疸出血钩端螺旋体 (LI) 组分		疫苗稀释
		1:40
攻毒菌株稀释	1:1	C
	1:10	D

7.2.3.7 清洁疫苗接种区域。

7.2.4 疫苗接种后的观察

此阶段对试验仓鼠不进行特别的观察。

7.2.5 攻毒用菌液的制备

7.2.5.1 攻毒用菌液可于攻毒前 7~15 日开始复壮传代，或使用复壮后 45 日内的贮存菌液。

7.2.5.1.1 自液氮中取出一支钩端螺旋体菌株的冻存管，室温解冻。

7.2.5.1.2 密切注意观察，解冻至冻存管内仅剩一小块晶体。

7.2.5.1.3 取 5 支装有半固体 EMJH 培养基 (9ml) 的带盖试管，在 $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ 的干燥培养箱放置 30 分钟。

7.2.5.1.4 在层流罩下，用无菌移液管混匀解冻的菌液，每支试管中各加 0.2ml 菌液。

7.2.5.1.5 菌液积于培养基表面。试管加盖。

7.2.5.1.6 将试管垂直放置于 $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ 干燥培养箱内，避光，培养 7~15 日。

7.2.5.1.7 7~15 日后，不打开试管，肉眼检查。培养基表面下应出现一个 1~2mm 深的乳白色环状物。

7.2.5.1.8 根据试验需要，可继续下列操作：

7.2.5.1.8.1 收获乳白色环状物，进行增殖传代。

7.2.5.1.8.2 将符合要求的培养物 (试管)，避光保存于恒温密闭容器，但至多保存 45 日。此后，经增殖传代后使用，或毁掉。

7.2.5.2 第 11 日时，开始增殖攻毒菌液；第 15 日时，若攻毒菌液未达到合适的浓度，可继续培养，攻毒因此最多可推迟至第 20 日。

7.2.5.2.1 每支试管内的培养物仅可用于一次增殖传代。不允许多次传代。

7.2.5.2.2 在层流罩下，开启试管，用一支 2ml 无菌移液管收集乳白色环状物。将其加入一个装有 50ml EMJH 液体培养基和一个磁力搅拌子的 250ml 锥形烧瓶中。

7.2.5.2.3 锥形烧瓶密封后，置于 $29\pm 1^{\circ}\text{C}$ 干燥培养箱内，振荡培养（约 50~60 转/分钟）。

7.2.5.2.4 3~5 日后，培养基应呈均匀乳白色。

7.2.5.2.5 培养过程中，锥形烧瓶应保持密闭。

7.2.5.2.6 增殖传代结束时，在层流罩下取样。用分光光度计在 460nm 波长处测定光吸收值。

7.2.5.2.6.1 测定无菌 EMJH 液体培养基的光吸收值，作为基线值。

7.2.5.2.6.2 测定钩端螺旋体的增殖菌液的光吸收值，其应至少大于基线值 0.05 时，增殖的菌液浓度符合要求。

7.2.6 第 15 日：攻毒

7.2.6.1 当有多个血清型的菌株用于同一批效力检验时，攻毒当日进行的不同血清型菌株的接种和仓鼠的操作，须完全独立开来。

7.2.6.2 接种攻毒菌液后，仓鼠须饲养于架上的通风笼具内（低压区域）。

7.2.6.3 该步操作原则如下：

第 1 种血清型： 最高稀释度的攻毒菌液：

- 先接种相应的对照仓鼠
- 再接种相应的免疫仓鼠

较低稀释度的攻毒菌液：

- 先接种相应的对照仓鼠
- 再接种相应的免疫仓鼠

清洁工作台

第 2 种血清型： 最高稀释度的攻毒菌液：

- 先接种相应的对照仓鼠
- 再接种相应的免疫仓鼠

较低稀释度的攻毒菌液：

- 先接种相应的对照仓鼠
- 再接种相应的免疫仓鼠

7.2.6.4 具体操作如下:

7.2.6.4.1 在层流橱里, 放一个取自架上的带通风装置的笼具。

7.2.6.4.2 将装仓鼠的笼具, 靠近层流橱放置。

7.2.6.4.3 从相同血清型的攻毒菌液的对照仓鼠开始接种。

7.2.6.4.4 取 1 支 5ml 的一次性注射器。

7.2.6.4.5 缓和地摇匀攻毒菌液, 用注射器抽取 5ml 菌液, 随即盖紧锥形烧瓶。

7.2.6.4.6 在层流罩下, 对照仓鼠逐只腹腔接种 1ml 菌液, 然后放入洁净笼具。

7.2.6.4.7 接种完第 5 只对照仓鼠后, 盖好笼具, 标识好后立即放于通风架上。

7.2.6.4.8 接种相应稀释度和血清型攻毒菌液的免疫仓鼠 (如 7.2.6.3), 重复步骤 7.2.6.4.1~7.2.6.4.7。

7.2.6.4.9 更换注射器, 接种其他稀释度的相同血清型攻毒菌液, 重复步骤 7.2.6.4.1~7.2.6.4.8。

7.2.6.4.10 最后 1 只仓鼠攻毒后, 消毒层流罩内的工作区域。关闭前窗, 加速换气 10 分钟。

7.2.6.4.11 检验第 2 种血清型组分时, 重复步骤 7.2.6.4.1~7.2.6.4.10。

7.2.7 第 16 日~第 43 日: 攻毒后阶段

7.2.7.1 第 16~29 日, 对照仓鼠逐日观察。

7.2.7.2 若第 29 日时仍有超过 1 只的对照仓鼠存活, 则停止观察, 攻毒试验不成立。

7.2.7.3 当仅剩 1 只对照仓鼠存活时 (第 16~29 日期间), 观察即可停止。免疫仓鼠则从第 4 只对照仓鼠死亡开始, 连续观察 14 日。

7.2.7.4 每种组分的检验中:

7.2.7.4.1 当使用较低稀释倍数的强毒菌液 (即 LI 按 1:1 稀释, LC 按 1:10 稀释) 攻毒后, 检验结果若符合要求, 则整个检验即可停止。最高稀释倍数的强毒菌液的攻毒结果不作统计。

7.2.7.4.2 当使用较低稀释倍数的强毒菌液攻毒后, 若超过 80% 的对照仓鼠 (≥ 4 只) 死亡, 且少于 80% 的免疫仓鼠 (≤ 4 只) 存活, 则依据最高稀释倍数的强毒菌液 (即 LI 按 1:10 稀释, LC 按 1:100 稀释) 的攻毒检验结果, 来判定疫苗是否合格。

7.2.8 第 16~43 日期间进行的操作

7.2.8.1 逐日记录各笼存活仓鼠的数量。从架上取下笼具，勿打开滤盖，检查死亡仓鼠。

如果发现死亡：

7.2.8.1.1 将该笼具置层流橱中，打开滤盖，

7.2.8.1.2 取出死亡仓鼠，并立即放入塑料袋中，

7.2.8.1.3 将笼具盖好滤盖，并放回架上，

7.2.8.1.4 记录各笼存活仓鼠的数量，及观察日期等信息。

7.2.8.2 每日观察结束时，将盛有死亡仓鼠的塑料袋放在净化走道里。没有死亡时，则将笼具放回原架，并记录观察结果。

7.2.9 检验结束

7.2.9.1 检验结束时，存活仓鼠观察并记录后，用 CO₂ 安乐死。

7.2.9.2 将盛放仓鼠的笼具放入净化走道，不打开盖，作净化处理。

7.3 结果判定

7.3.1 试验成立的要求

7.3.1.1 仓鼠运抵试验场所与免疫接种的日程之间不超过 8 日，

7.3.1.2 攻毒菌株解冻与攻毒的日程之间不超过 60 日，

7.3.1.3 攻毒菌株增殖与攻毒的日程不超过 5 日，

7.3.1.4 新鲜培养的攻毒菌液中钩端螺旋体形态应相似，

7.3.1.5 至第 29 日（若攻毒日程推迟，则该日程亦顺延），5 只对照仓鼠应至少有 4 只死亡。

7.3.2 疫苗合格的判定

满足下列两个条件时，该批次中待检血清型的钩端螺旋体组分判为合格：

7.3.2.1 试验符合 7.3.1 中的要求，

7.3.2.2 5 只免疫的仓鼠（1/40 头份疫苗），用与该组分相同血清型的强毒菌株攻毒后，应至少有 4 只存活。

（二）犬瘟热、腺病毒病、细小病毒病、副流感病毒 2 型呼吸道感染症四联活疫苗-犬钩端螺旋体病、黄疸出血钩端螺旋体病二联灭活疫苗说明书

兽用

【兽药名称】

通用名 犬瘟热、腺病毒病、细小病毒病、副流感病毒 2 型呼吸道感染症四联活疫苗-

犬钩端螺旋体病、黄疽出血钩端螺旋体病二联灭活疫苗

商品名 优乐康

英文名 Canine Distemper, Adenovirose, Parvovirus and Parainfluenza Type 2
Respiratory Infections Vaccine, Live – Leptospira Canicola and Leptospira Icterohaemorrhagiae
Leptospirose Vaccine, Inactivated

汉语拼音 Quanwenre Xianbingdubing Xixiaobingdubing Fuliugan Bingdu 2 xing
Huxidaoganranzheng Silian Huoyimiao Quangouduanluoxuantibing Huangdanchuxuegouduanluoxuantibing
Erlian Miehuoyimiao

【主要成分与含量】 每头份疫苗含犬瘟热病毒至少 $10^{4.0}$ CCID₅₀，犬腺病毒 2 型至少 $10^{2.5}$ CCID₅₀，犬细小病毒至少 $10^{4.9}$ CCID₅₀，犬副流感病毒 2 型至少 $10^{4.7}$ CCID₅₀；含犬钩端螺旋体至少 40 个效检剂量（即 80% 以上的免疫仓鼠存活），黄疽出血钩端螺旋体至少 40 个效检剂量（即 80% 以上的免疫仓鼠存活）。

【性状】 活疫苗部分呈浅褐色海绵状疏松状，易与瓶壁脱离，加稀释液后迅速溶解；灭活疫苗部分呈乳白色均匀悬液。

【作用与用途】 用于预防犬瘟热、犬腺病毒病、犬细小病毒病和犬副流感病毒感染，及犬钩端螺旋体病和黄疽出血钩端螺旋体病。

【用法与用量】 用灭活疫苗部分稀释活疫苗部分，皮下注射，每只犬 1 头份。首次免疫可从 7 周龄开始，3~5 周后进行第二次免疫。每年加强免疫一次。若钩端螺旋体病发病情况严重，则每半年加强免疫一次。

【不良反应】 个别免疫犬可能出现过敏反应，可用肾上腺素皮下注射缓解，并由兽医作进一步对症处理。

【注意事项】 （1）仅用于接种健康犬。

（2）疫苗稀释后立即使用。

（3）使用无菌和消毒或灭菌处理的设备用于接种，执行常规无菌操作。

（4）如疫苗接种前，进行常规驱虫，则至少提前 10 日进行。

（5）免疫后不宜立即进行剧烈运动。

（6）用过的疫苗瓶、器具和稀释后未用完的疫苗等应进行无害化处理。

【规格】 活疫苗部分：1 头份/瓶；灭活疫苗部分：1 头份（1ml）/瓶。

【包装】 （1）10 瓶活疫苗+10 瓶灭活疫苗/盒 （2）50 瓶活疫苗+50 瓶灭活疫苗/盒

【贮藏与有效期】 2~8℃ 保存，有效期为 24 个月。

【《进口兽药注册证书》证号】

【生产企业】 梅里亚有限公司法国生产厂（MERIAL S.A.S, France）

地址 17, rue Bourgelat 69007 Lyon- France

仅在兽医指导下使用

（三）犬瘟热、腺病毒病、细小病毒病、副流感病毒2型呼吸道感染症四联活疫苗-犬钩端螺旋体病、黄疸出血钩端螺旋体病二联灭活疫苗内包装标签

兽用

优乐康

犬瘟热、腺病毒病、细小病毒病、副流感病毒2型呼吸道感染症四联活疫苗 - 犬钩端螺旋体病、黄疸出血钩端螺旋体病二联灭活疫苗

（活疫苗部分）

1 头份/瓶

《进口兽药注册证书》证号：

批 号：

有效期至：

【作用与用途】 用于预防犬瘟热，腺病毒病，犬细小病毒病，犬副流感病毒感染，以及犬钩端螺旋体病和黄疸出血钩端螺旋体病。

【用法与用量】 详见说明书。

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为24个月。

【生产企业】 梅里亚有限公司法国生产厂（MERIAL S.A.S）

仅在兽医指导下使用

兽用

优乐康

犬瘟热、腺病毒病、细小病毒病、副流感病毒2型呼吸道感染症四联活疫苗 - 犬钩端螺旋体病、黄疸出血钩端螺旋体病二联灭活疫苗

（灭活疫苗部分）

1 头份（1ml）/瓶

《进口兽药注册证书》证号：

批 号：

有效期至：

【作用与用途】 用于预防犬瘟热，腺病毒病，犬细小病毒病，犬副流感病毒感染，以及犬钩端螺旋体病和黄疸出血钩端螺旋体病。

【用法与用量】 详见说明书。

【贮藏与有效期】 2~8℃保存，有效期为 24 个月。

【生产企业】 梅里亚有限公司法国生产厂家（MERIAL S.A.S）

仅在兽医指导下使用

四、硝碘酚腈注射液质量标准、说明书和内包装标签

（一）硝碘酚腈注射液质量标准

硝碘酚腈注射液

Xiaodianfenjing zhushuye

Nitroxinil Injection

本品为硝碘酚腈与 N-乙基葡萄糖胺的灭菌水溶液。含硝碘酚腈（ $C_7H_9IN_2O_4$ ）应为标示量的 95.0%~105.0%。

【性状】 本品为桔红色澄明液体。

【鉴别】 （1）在含量测定项下记录的色谱图中，供试品溶液主峰的保留时间应与对照品溶液主峰的保留时间一致。

（2）取本品 1ml，用水稀释至 10ml，作为供试品溶液；另取 N-乙基葡萄糖胺对照品 0.18g，用水溶解并稀释至 10ml，作为对照品溶液。照薄层色谱法（附录 33 页）试验，吸取上述两种溶液各 10 μ l，分别点于同一硅胶 GF₂₅₄ 薄层板上，以丁醇-冰醋酸-水（30:10:10）为展开剂，展开后，晾干，供试品溶液所显主斑点的位置和颜色应与对照品溶液的主斑点相同。

【检查】 pH 值 应为 6.0~7.0（附录 56 页）。

碘化物 取本品 1.6ml，用水稀释至 10ml，加稀硫酸 4ml，用氯仿萃取 3 次（10ml，10ml，10ml）。取水相，加浓过氧化氢溶液和氯仿各 1ml，振摇 2 分钟，静置分层。若氯仿层出现

紫色，与同法制成的对照溶液（取 0.013% 碘化钾溶液 2ml，加入稀硫酸 4ml 和水 8ml 混合液后，再加氯仿 10ml 萃取 1 次，以下操作同供试品溶液）比较，不得更深（0.05%）。

其他 应符合注射剂项下的有关各项规定（附录 6 页）。

【含量测定】 照高效液相色谱法（附录 36 页）测定。

色谱条件与系统适用性试验 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；以乙腈-水（60:40）为流动相（用磷酸将流动相 pH 值调至 2.4）；流速为每分钟 1.2ml；检测波长为 240nm。硝碘酚腈峰与相邻峰的分离度应不小于 1.0，峰面积测量值的相对标准偏差应不大于 2.0%。

测定法 精密量取本品 1ml，置 25ml 量瓶中，用水稀释至刻度。精密量取上述溶液 1ml，置 10ml 量瓶中，用水稀释至刻度，精密量取 1ml，置 100ml 量瓶中，用流动相稀释至刻度。精密量取 10 μ l，注入液相色谱仪，记录色谱图；另取硝碘酚腈对照品适量，同法测定。按外标法以峰面积计算，即得。

【作用与用途】 驱虫药。用于驱除羊的肝片吸虫、胃肠道线虫。

【用法与用量】 皮下注射：一次量，每 1kg 体重，羊 10mg；急性感染：每 1kg 体重，羊 13mg。

【注意事项】 （1）药液能使羊毛染成黄色。

（2）重复用药应间隔 4 周以上。泌乳动物禁用。

（3）不能与其他药液混合。不可冰冻或加热。

【不良反应】 按推荐剂量使用未见不良反应，高剂量（>20 mg/kg）时，可见体温过高，呼吸深快，甚至死亡。

【休药期】 休药期 30 日；产奶期 5 日。

【规格】 （1）50 ml:12.5 g （2）250ml: 62.5 g

【贮藏】 遮光，密闭保存。

【有效期】 3 年

【生产企业】 梅里亚有限公司法国生产厂（Merial SAS, France）

4 chemin du Calquet, 31000 Toulouse, France

（二）硝碘酚腈注射液说明书

硝碘酚腈注射液

兽用

【兽药名称】

通用名：硝碘酚腈注射液

商品名：

汉语拼音: Xiaodianfenjing Zhusheye

英文名: Nitroxinil Injection

【主要成分】 硝碘酚腈

【性状】 本品为桔红色澄明液体。

【药理作用】 本品对小、羊肝片吸虫成虫有驱杀效果,但对未成熟虫体效果较差。本品驱虫作用的机理是阻断虫体的氧化磷酸化作用,降低 ATP 浓度,减少细胞分裂所需能量而导致虫体死亡。药物吸收后排泄缓慢,经尿、粪排泄长达 31 日。

【适应症】 用于驱除羊的肝片吸虫、胃肠道线虫。

【用法与用量】 皮下注射:一次量,每 1kg 体重,羊 10mg;急性感染:每 1kg 体重,羊 13mg。

【不良反应】 按推荐剂量使用未见不良反应,高剂量(>20mg/kg)时,可见体温过高,呼吸深快,甚至死亡。

【注意事项】 1. 药液能使羊毛染成黄色。

2. 重复用药应间隔 4 周以上;泌乳动物禁用。

3. 不能与其他药液混合。不可冰冻或加热。

【休药期】 30 日,产奶期 5 日。

【规格】 (1) 50ml:12.5g (2) 250ml:62.5g

【包装】

【贮藏】 遮光,密闭保存。

【有效期】 3 年

【进口兽药注册证号】

【生产企业】 梅里亚有限公司法国生产厂家 (Meril SAS, France)

4 chemin du Calquet, 31000 Toulouse, France

(三) 硝碘酚腈注射液内包装标签

硝碘酚腈注射液

Xiaodianfenjing Zhusheye

Nitroxinil Injection

兽用

【主要成分】 硝碘酚腈

【性状】 本品为桔红色澄明液体。

【适应症】 用于驱除羊的肝片吸虫、胃肠道线虫。

【用法与用量】 皮下注射：一次量，每 1kg 体重，羊 10mg；急性感染：每 1kg 体重，羊 13mg。

【不良反应】 按推荐剂量使用未见不良反应，高剂量（>20mg/kg）时，可见体温过高，呼吸深快，甚至死亡。

【注意事项】 1. 药液能使羊毛染成黄色。
2. 重复用药应间隔 4 周以上；泌乳动物禁用。
3. 不能与其他药液混合。不可冰冻或加热。

【休药期】 30 日，产奶期 5 日。

【规格】 （1）50ml:12.5g （2）250ml:62.5g

【包装】

【贮藏】 遮光，密闭保存。

【生产日期】

【生产批号】

【有效期至】

【进口兽药注册证号】

【生产企业】 梅里亚有限公司法国生产厂（Merial SAS, France）

4 chemin du Calquet, 31000 Toulouse, France