

3302 禽白血病毒检验法（标准草案）

1 细胞制备 鸡胚成纤维细胞制备，按附录 3504 进行。

2 样品的处理及接种

2.1 样品的处理 除另有规定外，每批毒种或病毒性活疫苗均用无血清 M-199 培养基复原，2~8℃、以 10000~12000g 离心 10~15 分钟，取上清备用。

2.1.1 含鸡新城疫病毒的样品 取 1000（或以上）羽份样品，用适量不含血清的 M-199 培养液溶解，使最终为 200 羽份/1.0ml；2~8℃、以 10000g 离心 10 分钟；取上清液 1.0ml，加入等体积的鸡新城疫病毒特异性抗血清 37℃左右中和 60 分钟，全部接种到 CEF 单层。

2.1.2 含鸡马立克氏病细胞结合毒的样品 取 1000（或以上）羽份样品，加无菌注射用水，使每 4.0ml 溶液中含 500 羽份样品；置 2~8℃ 1 小时，冻融 3 次；按 10% 体积加 10 倍浓度的 M-199 浓缩培养液；2~8℃、以 5000g 离心 10 分钟，取上清液经 0.22μm 滤器过滤 1~3 次，取滤液 4.0ml 接种 CEF 单层。如果含有鸡马立克氏病火鸡疱疹病毒，取上述滤液与等体积的鸡马立克氏病火鸡疱疹病毒特异性抗血清混匀，置 37℃作用 60 分钟，全部接种 CEF 单层。

2.1.3 含鸡马立克氏病火鸡疱疹病毒的样品 取 1000（或以上）羽份样品，用 4.0ml（或适量）不含血清的 M-199 培养液溶解，使最终为 500 羽份/2.0ml；2~8℃、以 10000g 离心 15 分钟；上清液经 0.45μm 滤器过滤 1 次，用 0.22μm 滤器过滤 2 次，取滤液 2.0ml 与等体积的鸡马立克氏病火鸡疱疹病毒特异性抗血清混匀，置 37℃作用 60 分钟，全部接种 CEF 单层。

2.1.4 含鸡痘病毒的样品 取 1000（或以上）羽份样品，用 4.0ml（或适量）不含血清的 M-199 培养液溶解，使最终为 500 羽份/2.0ml；2~8℃、以 12000g 离心 15 分钟；上清液经 0.8μm、0.45μm、0.22μm 和 0.1μm 滤器各逐级过滤 1 次，取滤液 2.0ml 接种 CEF 单层。含鸡痘病毒的二联疫苗应先进行上述过滤处理。

2.1.5 含鸡传染性法氏囊病病毒的样品 取 1000（或以上）羽份样品，用 4.0ml（或适量）不含血清的 M-199 培养液溶解，使最终为 500 羽份/2.0ml；2~8℃、以 10000g 离心 10 分钟；取上清液 2.0ml 与等体积的鸡传染性法氏囊病病毒特异性抗血清混匀，置 37℃作用 60 分钟，全部接种 CEF 单层。

2.1.6 含禽脑脊髓炎病毒的样品 取稀释的疫苗 2.0ml（含 500 羽份），加入等体积的禽脑脊髓炎病毒特异性抗血清进行中和（禽脑脊髓炎病毒-鸡痘病毒二联苗，则先按含鸡痘病毒的样品进行滤过处理），接种 CEF 单层。

2.1.7 鸡传染性支气管炎病毒和传染性喉气管炎病毒的样品 不中和（不在鸡胚成纤维细胞上增殖），直接取稀释后的样品 2.0ml（含 500 羽份）接种 CEF 单层。

2.1.8 含呼肠孤病毒的样品（包括鸭呼肠孤病毒） 取 1000（或以上）羽份样品，用 4.0ml（或适量）不含血清的 M-199 培养液溶解，使最终为 500 羽份/2.0ml；2~8℃、以 10000g 离心 10 分钟；取上清液经 0.45μm 滤器过滤，取 2.0ml 滤液与等体积的相应特异性抗血清混匀，置 37℃作用 60 分钟，全部接种 CEF 单层。

2.1.9 含重组病毒的活疫苗 按疫苗载体病毒方法进行处理。

2.1.10 细胞 取至少 75cm² 细胞培养物，反复冻融 3 次；2~8℃、以 5000g 离心 10 分钟，取上清液 5ml 用于接种 CEF。

2.2 接种与培养 处理好的样品接种 2 个 25cm² 左右的 CEF 单层，置 37℃吸附 45~60 分钟，弃去接种液，加入细胞持液。同时设立正常细胞作对照。

3 细胞培养的传代与处理

3.1 待细胞培养 5~7 日后, 按常规方法消化、收获细胞, 将其中 1/2 细胞, 置 -60°C 以下保存, 作检验用 (P₁), 其余细胞分散到 2 个细胞培养瓶中。培养 5~7 日后, 按同样方法收获细胞, 留样 (P₂)。如此继续传第 3 代, 收获 (P₃)。所有对照组按相同方法处理。

3.2 处理 将 P₁、P₂、P₃ 的细胞培养物 (包括样品和所有对照组) 冻融 3 次, 以 5000g 离心 3 分钟, 待用。

4 病毒对照 去掉细胞生长液, 分别加入 RAV-1 和 RAV-2 0.5ml, 置 37°C 下吸附 45~60 分钟, 直接加入培养液, 同样品连传至第 3 代, 传代时病毒对照应在最后进行。

5 样品检测 所有样品用 COFAL 试验或 ELISA 试验进行禽白血病毒检测。

5.1 COFAL 试验 (两日试验)

5.1.1 第一日试验

5.1.1.1 在 96 孔微量板中, 按下表所示加入缓冲液 0.025ml, 对照孔 A、B 各 0.025ml, C、D、E 各 0.05ml, F 加 0.1ml。

5.1.1.2 样品的加入与稀释 在 A、D、E 和 H 各孔中分别加入 0.025ml 样品, 并用微量吸管从 A→B→C 和 E→F→G 进行连续稀释, 最后 C 孔和 G 孔中弃去 0.025ml, D 和 H 孔中混合后弃去 0.025ml; 其他对照孔中 B、G 各加病毒对照 0.025ml。

5.1.1.3 在 D 和 H 排各孔中加入缓冲液 0.025ml。

5.1.1.4 在 A、B、C 和 E、F、G 排各孔中加入灭活抗血清 0.025ml, 其他对照孔中 A、G 各加入 0.025ml, 混匀包板后, 置室温下作用 30~45 分钟 (其间配制补体)。

5.1.1.5 所有孔中均加入适当浓度的补体 (全量) 0.05ml, 对照孔中 A、B、C、G 各加入 0.05ml (全量) 补体, D 孔加 0.05ml (1/2 浓度) 的补体, E 孔加入 0.05ml (1/4 浓度) 的补体, 轻摇平板, 混匀密封后, 置 2~8°C 过夜。

表 1 第一日试验 (96 孔板) 反应术式

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1:2	NCP ₁	NCP ₂	NCP ₃	S ₁ P ₁	S ₁ P ₂	S ₁ P ₃	S ₂ P ₁	S ₂ P ₂	S ₂ P ₃		
B	1:4	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
C	1:8	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓		
D	1:2	—			—			—			标准	其他
E	1:2	S ₃ P ₁	S ₃ P ₂	S ₃ P ₃	RAV ₁ P ₁	RAV ₁ P ₂	RAV ₁ P ₃	RAV ₂ P ₁	RAV ₂ P ₂	RAV ₂ P ₃	比	对
F	1:4	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	色	照
G	1:8	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	板	孔
H	1:2	—			—			—				

注: NC, 代表正常细胞对照。P₁、P₂、P₃, 分别代表第 1 代、第 2 代、第 3 代。S₁、S₂、S₃, 分别代表样品 1、样品 2、样品 3。

5.1.2 第二日试验

5.1.2.1 配制含 2.8% 绵羊红细胞悬液。

5.1.2.2 致敏红细胞悬液的制备 在含 2.8% 的绵羊红细胞悬液中缓缓加入等量经适当稀释 (如 1:2000) 的溶血素, 磁力搅拌混合 10 分钟后, 置 37°C 水浴 30 分钟, 其间搅动 2~3 次。

5.1.2.3 制备标准比色板

5.1.2.3.1 将含 2.8% 绵羊红细胞悬液用缓冲液稀释成 0.28% 绵羊红细胞悬液。

5.1.2.3.2 取含 2.8% 绵羊红细胞悬液 1.0ml, 加无菌纯化水 7.0ml, 再加 5×缓冲液 2.0ml, 即为溶解红细胞液。

5.1.2.3.3 按表 2 术式的顺序加入下列试剂，第 12 管只加缓冲液 1.0ml。

试管号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
溶血率（%）	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	—
溶解红细胞液	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	—
0.28%绵羊红细胞悬液	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	—
缓冲液	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1.0

5.1.2.3.4 在标准比色板中，从 0 溶血率开始，在 11 列的 A→H 和 10 列的 H→F 相应孔内加入上述红细胞悬液 0.125ml。

5.1.2.4 其余各孔内加入致敏红细胞悬液 0.025ml，并用胶带密封好，置 37℃水浴 30 分钟，再以 1500r/min 离心 5 分钟，或置 2~8℃放置 3~6 小时。

5.1.2.5 判定 以 50%为反应终点，任何孔溶血率高于 50%时判为阴性，低于 50%时判为阳性。

5.2 ELISA 试验

5.2.1 加样 每个被检样品加 2 孔，100μl/孔。设阳性、阴性对照孔各 2 孔，用封口膜封板后，放置 37℃作用 60 分钟。

5.2.2 洗涤 弃去样品，每孔加 300μl 洗涤液，放置 1 分钟，弃去洗涤液，同法洗涤 4~5 次。

5.2.3 加酶标抗体 每孔 100μl，用封口膜封板后，放置 37℃作用 60 分钟。

5.2.4 洗涤 同 5.2.2 项。

5.2.5 加显色液 每孔加 100μl 显色液，室温避光作用 10 分钟。

5.2.6 加终止液 每孔加 100μl。

5.2.7 读数 置酶联读数仪读取各孔 OD_{650nm} 值。

5.2.8 结果判断

5.2.8.1 当阴性对照 OD_{650nm} 值小于 0.2，阳性对照 OD_{650nm} 值大于 0.4 时，ELISA 试验结果成立。

5.2.8.2 当正常细胞对照每个代次各孔 OD_{650nm} 值均小于 0.3，RAV-1 和 RAV-2 病毒对照三个代次中均应至少有一个代次 OD_{650nm} 值高于 0.5 时，检验结果成立。

5.2.8.3 被检样品任一代次任一孔 OD_{650nm} 值大于或等于 0.3 即判为阳性，每代次每孔 OD_{650nm} 值均小于 0.3 判为阴性。

修订说明：

1. 本标准是在 2020 年版《中国兽药典》三部附录 3302 的基础上修订而成。
2. 依据 2024 年度第 2 次审查意见，2.1 项中去掉“毒种”二字；2.1.1 项中明确稀释度和离心步骤；2.1.4 项中的“各”改为“逐级”；对文字进一步规范化修改，如在离心转数前增加“以”字。
3. 依据 2024 年度第 13 次会议审查意见，删除了 2.1.1 项中“(低毒力弱毒株)”。
4. 在 2.1.7 项中增“不中和（不在鸡胚成纤维细胞上增殖）”的描述。
5. 在 2.1.8 项中增加了其他禽类呼肠孤病毒的处理，如鸭呼肠孤病毒，使用的特异性抗血清为每种病毒所对应的，因此将“鸡呼肠孤病毒特异性抗血清”改为“相应特异性抗血清”。
6. 关于 3.1 项中的细胞培养时间，2024 年第 2 次会议上有委员提出：建议缩短细胞培养时间，培养 5~7 日进行传代，细胞会出现脱落现象。经试验验证，培养 3~4 日与培养 5

日相比，阳性对照和阴性对照各代次 OD 值没有差异，缩短培养时间并不能提高病毒的增殖效率，还增加了工作量，因此起草小组未采纳修改建议，推荐通过提高人员技术水平解决问题。

7. 参照新版《禽病学》，将第 4 项和 5.2.8.2 项中“RAV₁ 和 RAV₂”修改为“RAV-1 和 RAV-2”。
8. 将标准中“制品”修改为“样品”，主要是为了涵盖毒种样品。
9. 对文字进行了规范性修改。