

3304 禽网状内皮组织增生症病毒检验法（标准草案）

1 细胞制备 按附录 3504 制备鸡胚成纤维细胞。

2 样品的处理及接种

2.1 样品的处理 同附录 3302 禽白血病病毒检验法。

2.2 接种与培养 处理好的样品接种 1 个 25cm² 左右的 CEF 单层，置 37℃ 吸附 60 分钟，弃去接种液，用含 3% 牛血清的 M-199 培养液洗 CEF 单层 2 次，2.0ml/次，每瓶细胞加含 3% 牛血清的 M-199 培养液 7.0~8.0ml，置 37℃ 培养 5~7 日。同时设立正常细胞对照 1 瓶，将禽网状内皮组织增生症病毒（REV）稀释至 10TCID₅₀/ml，取 1.0ml 接种至 1 个 CEF 单层作为病毒对照。

3 细胞培养的传代 细胞培养 5~7 日后，按常规方法消化、收获细胞，将其中 1/10 的细胞用 2.0ml 含 3% 牛血清的 M-199 细胞培养液悬浮，接种 4 孔 48 孔板，每孔接种 0.5ml，同时设置阴性对照孔和阳性对照孔各 4 孔。将接种细胞的 48 孔板置 37℃、含 5% CO₂ 培养 5~7 日，然后进行荧光染色。

4 荧光染色

4.1 固定 弃去 48 孔板的细胞培养液，每孔约加 0.5ml PBS（pH 值 7.2~7.4，下同）轻洗细胞表面 1 次，尽量弃尽 PBS，然后每孔加入 0.3ml 冷甲醇，置室温固定 10~15 分钟，弃去甲醇，自然晾干 2~5 分钟。

4.2 加一抗 自然晾干后，用 PBS 洗细胞面 1 次，然后每孔加入工作浓度的一抗，置 37℃ 作用 1 小时。

4.3 洗涤 弃去一抗，先用含 0.05% 吐温-20 的 PBS 洗 3 次，每次每孔加入洗液 0.5ml，轻微振荡洗涤 1 分钟。然后用 PBS 以同样的方法洗 2 次。

4.4 荧光二抗染色 尽量弃尽洗液，每孔加入工作浓度的二抗，置 37℃ 作用 1 小时。

4.5 洗涤 方法同 4.3 项。

5 观察 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光（波长 490nm）观察。被感染的 CEF 细胞呈现绿色荧光，有完整的细胞形态，周围未被感染的细胞不着色，视野发暗。

6 结果判定

6.1 当阳性对照接种的 4 个孔中全部出现特异性绿色荧光，阴性对照接种孔均未出现特异性绿色荧光时，检验结果成立。

6.2 被检样品接种的 4 个孔中，只要有 1 孔出现特异性绿色荧光，即判定该样品中 REV 阳性。

修订说明：

1. 本标准是在 2020 年版《中国兽药典》三部附录 3304 的基础上修订而成。

2. 关于 2.2 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 5~7 日相比，REV 最低检出限（5TCID₅₀）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该问题。

3. 依据 2024 年度第 2 次会议审查意见，“4 细胞培养传代”项内容中增加了“同时设置阴性对照孔和阳性对照孔各 4 孔。”的描述。正文中“鸡网状内皮组织增生症病毒”统一修改为“禽网状内皮组织增生症病毒”。

4. 依据 11 月 18 日预备会意见，将“3 病毒对照”合并到“2.2 接种与培养”中。

5. 依据 2024 年度第 13 次会议审查意见，删除了一抗、二抗的名称，将用 PBS 适当稀释的一抗或二抗，改为工作浓度的一抗或二抗。

6. 对文字进行了规范性修改。

工作浓度