

## 3305 外源病毒检验法（标准草案）

### 1 禽源外源病毒检验

1.1 样品处理 取样品至少 2 瓶，对毒种按所生产疫苗推荐使用羽份进行稀释，对活疫苗按瓶签注明羽份稀释后，用相应的特异性血清中和后作为检品（除另有规定外），如待检疫苗毒在检验用细胞上不增值，可不进行中和；对细胞进行检验时，经 3 次冻融后混合作为检品；用鸡检查法检验时，样品不处理。

#### 1.2 鸡胚检查法

1.2.1 鸡胚接种 尿囊腔和绒毛尿囊膜接种 用 9~11 日龄 SPF 鸡胚 20 枚，分成 2 组，第 1 组鸡胚 10 枚，各经尿囊腔内接种 0.1~0.2ml（除另有规定外，至少含 10 羽份），第 2 组鸡胚 10 枚，各经绒毛尿囊膜接种 0.1~0.2ml（除另有规定外，至少含 10 羽份），置 37°C 培养 7 日。每日照胚，弃去接种后 24 小时内死亡的鸡胚。每组鸡胚应至少存活 8 枚，试验方可成立。

1.2.2 卵黄囊接种 用 5~6 日龄 SPF 鸡胚 10 枚，各经卵黄囊接种 0.1~0.2ml（除另有规定外，至少含 10 羽份），置 37°C 培养 12 日。每日照胚，弃去接种后 24 小时内死亡的鸡胚。每组鸡胚应至少存活 8 枚，试验方可成立。

1.2.3 判定 胎儿应发育正常，绒毛尿囊膜应无病变。取鸡胚液作红细胞血凝试验，应为阴性。必要时，为确定胚异常死亡原因，可将存在异常的活胚和死亡胚分别收取绒毛尿囊膜（研磨后用灭菌生理盐水 1:1 混匀）、尿囊液、胚体（研磨后用灭菌生理盐水 1:1 混匀），将每个混样分别接种 10 枚胚，绒毛尿囊膜样品经绒毛尿囊膜接种，尿囊液样品经尿囊腔接种，胚体样品经卵黄囊接种。按照上述方法进行观察、检查与判定，应符合规定。

#### 1.3 细胞检查法

1.3.1 细胞的制备 鸡胚成纤维细胞、鸡胚肾细胞、鸡胚肝细胞的制备，按附录 3504 进行。

1.3.2 样品的接种与培养 分别取上述已长成良好细胞单层的（培养 24 小时左右）细胞培养瓶（面积不小于 25cm<sup>2</sup>）各 2 个，接种处理过的样品 0.1~0.2ml（除另有规定外，至少含 10 羽份），培养 10~14 日，期间应至少继代 1 次，另分别设正常细胞对照 2 瓶。最后一次继代的细胞单层数量和培养面积应符合检查的要求。

#### 1.3.3 检查方法

1.3.3.1 致细胞病变检查 样品培养期间，任何一代培养细胞出现 CPE，而正常细胞未出现 CPE，则判为不符合规定。

1.3.3.2 红细胞凝集及红细胞吸附性外源病毒检查 培养结束，取培养液采用 1% 鸡红细胞按照附录 3403 的方法进行红细胞凝集检测。弃去培养液，用 PBS 洗涤细胞面，加入 0.1%（v/v）鸡红细胞悬液覆盖细胞面，置 2~8°C 60 分钟后，用 PBS 轻轻洗涤细胞，在显微镜下检查红细胞吸附情况。当正常对照细胞不出现红细胞凝集和红细胞吸附现象，而被检样品出现外源病毒所致的红细胞凝集或红细胞吸附现象时，则判为不符合规定。

1.3.3.3 禽淋巴白血病毒病病毒检验 按附录 3302 进行。

1.3.3.4 禽网状内皮增生症病毒检验 按附录 3304 进行。

1.3.3.5 鸡传染性贫血病毒检验 按附录 XX 进行。

1.4 鸡检查法 除另有规定外，用适于接种本疫苗日龄的 SPF 鸡 20 只，每只同时点眼、滴鼻、皮肤刺种各接种 10 羽份疫苗（毒种检验时应不少于 0.1ml），肌肉注射 100 羽份疫苗（毒种检验时应不少于 1.0ml）。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，进行有关病原（见下表 1，水禽源外源病毒检查应同时增加表 2 中病原）的血清

抗体检测。在 42 日内，应不发生由疫苗引起的局部或全身症状或死亡。如果有死亡，应进行病理学检查，以证明是否由疫苗所致。进行血清抗体检测时，除本疫苗所产生的特异性抗体外，不应有其他病原的抗体存在。

**表 1 用鸡检查法检验外源病毒时检查的病原及其检验方法**

病原	检验方法
鸡传染性支气管炎病毒	HI/ELISA
鸡新城疫病毒	HI/ELISA
禽腺病毒 I 群	AGP/ELISA
禽腺病毒 III 群 (EDS)	IFA/HI
禽 A 型流感病毒	AGP/HI
鸡传染性喉气管炎病毒	SN/ELISA
禽呼肠孤病毒	AGP/ELISA
鸡传染性法氏囊病病毒	AGP/ELISA
禽网状内皮组织增生症病毒	IFA/ELISA
鸡马立克氏病病毒	AGP
禽淋巴白血病毒	ELISA
禽脑脊髓炎病毒	AGP/ELISA
鸡传染性贫血病毒	IFA/ELISA
B 亚型禽偏肺病毒	IFA/ELISA
鸡痘病毒	AGP/临床观察

注：HI，血凝抑制试验；ELISA，酶联免疫吸附试验；SN，血清中和试验；AGP，琼脂扩散试验；IFA，间接免疫荧光试验。

**表 2 水禽源样品鸡检查法检验外源病毒时应增加的病原及其检验方法**

病原	检验方法
鸭和鹅细小病毒	SN
鸭瘟病毒	ELISA/SN
鸭肝炎病毒 I 型	SN
鸭肝炎病毒 III 型	SN
鸭坦布苏病毒	HI/SN
小鹅瘟病毒	AGP/SN

注：HI，血凝抑制试验；ELISA，酶联免疫吸附试验；SN，血清中和试验；AGP，琼脂扩散试验。

## 2 非禽源外源病毒检验

2.1 样品处理 取样品至少 2 瓶。除另有规定外，毒种取原液（冻干制品恢复至冻干前装量）；活疫苗按瓶签注明头份稀释至每 1.0ml 至少含 10 头份。混匀，离心，取上清液，用等体积的特异性抗血清中和后作为检品；如待检疫苗毒在检验用细胞上不增值，可进行不中和。对细胞样品进行检验时，待检细胞应至少培养 14 日（期间至少继代 1 次，每代培养面积不低于 75cm<sup>2</sup>），经 3 次冻融后离心，取上清液作为检品。

2.2 样品的接种与培养 取处理好的样品 2.0ml（除另有规定外，成品应不低于 10 头份），接种到已长成良好单层（或同步接种）的所选细胞上，另至少设一瓶正常细胞对照，每一种细胞培养时间应不低于 14 日，培养期间应至少继代 2 次。最后一次继代的细胞单层数量和培养面积应符合 2.3 项的要求。在对毒种或活疫苗进行检验时，如特异性血清不能完全中和待检样品，可在培养过程中加入特异性抗血清（一般不超过细胞维持液体积的 10%）。如样品传代培养期间，任何一代培养细胞出现 CPE，而正常细胞未出现 CPE，则判为不符合规定。如无 CPE，培养结束时，细胞单层应按 2.3 项进行检验。

### 2.3 检查方法

2.3.1 致细胞病变检查法 将最后一次继代（至少为第 3 代）的培养物培养 4~7 日，

显微镜下观察 CPE 情况，至少观察 6.0cm<sup>2</sup> 的细胞面积。若未观察到明显的 CPE，再用适宜染色液对细胞单层进行染色。观察细胞单层，检查包涵体、巨细胞或其他由外源病毒引起的 CPE 的出现情况。当正常对照细胞未出现 CPE，而被检样品出现外源病毒所致的 CPE，则判为不符合规定。

2.3.2 红细胞凝集和红细胞吸附性外源病毒检查法 将最后一次继代（至少为第 3 代）的培养物培养 4~7 日，取上清分别采用 0.5% 的豚鼠红细胞和 0.5% 鸡红细胞按照附录 3403 的方法进行红细胞凝集检测。再用 PBS 洗涤细胞单层 2~3 次，加入适量 0.2% 的豚鼠红细胞和鸡红细胞的等量混合悬液，以覆盖整个单层表面为准。选 2 个细胞单层，分别在 2~8℃ 和 20~25℃ 放置 30 分钟，用 PBS 洗涤，检查红细胞吸附情况，至少观察 6.0cm<sup>2</sup> 的细胞面积。当正常对照细胞不出现红细胞凝集和红细胞吸附现象，而被检样品出现外源病毒所致的血凝或红细胞吸附现象时，则判为不符合规定。

2.3.3 荧光抗体检查法 将最后一次继代（至少为第 3 代）的培养物冻融 3 次，以 3000g 离心 10 分钟，取适量培养物的上清液（一般取培养量的 10%）接种已长成良好单层（或同步接种）的所选细胞，培养 4~7 日后用于荧光抗体检查。对每一种特定外源病毒的检测应至少包含 3 组细胞单层：（1）被检样品细胞培养物；（2）接种适量（一般为 100~300 FA-TCID<sub>50</sub>）特定病毒的阳性对照；（3）正常细胞对照。每组细胞单层检查面积应不小于 6.0cm<sup>2</sup>。

细胞单层样品经 80% 丙酮（或其他适宜固定液）固定后，用适宜的荧光抗体进行染色，检查每一组单层是否存在特定外源病毒的荧光。当阳性对照出现特异性荧光，正常细胞无荧光，而被检样品出现外源性病毒特异性荧光，则判为不符合规定。如果阳性对照未出现特异性荧光，或者正常细胞出现特异性荧光，则判为无结果，应重检。

#### 修订说明：

1. 本标准是在 2020 年版《中国兽药典》三部附录 3305 的基础上修订而成。

2. 禽源外源病毒检验

（1）名称改为“禽源外源病毒检验”，不再强调制品和细胞。

（2）删除检验方法选择的一般要求，在新增附录外源病毒检验一般要求中体现方法的选择；

（3）鸡胚检查法增加了卵黄囊接种；根据近年来我国新发禽病的流行情况以及近年来对 SPF 胚、毒种的风险监测结果，鸡传染性贫血病毒、禽偏肺病毒、禽呼肠孤病毒等污染风险持续存在，上述病毒采用卵黄囊途径接种鸡胚时，分离成功率更高。此外，上述病毒采用细胞分离时难度较大，因此有必要在鸡胚检查法里增加卵黄囊途径，对该途径敏感病毒见下表。关于卵黄囊接种鸡胚的日龄和观察时间等具体方法，主要参考了欧洲药典方法。适宜卵黄囊接种的主要禽病毒及其特点见下表：

病毒名称	适宜细胞或细胞系	鸡胚接种方式
禽副黏病毒	/	9~11 日龄鸡胚尿囊腔、卵黄囊 APMV-5 采用羊膜腔、番鸭胚
禽偏肺病毒（禽鼻 气管炎病毒）	鸡胚或者火鸡胚肾细胞、鸡胚肝或 成纤维细胞、VERO、BS-C-1、 MA104、QT-35	6~7 日龄鸡胚或火鸡胚卵黄囊或尿囊腔 接种（病毒经 3-5 次传代后可引起胚胎发 育受阻、胚体表面出血，甚至死亡。病 毒滴度低）A 型 B 型可接种气管环培养 物

鸡传染性贫血病毒	鸡 T 淋巴细胞系 (MSB-1、MDCC-JP2)、B 淋巴细胞系 LSCC-1104B1、MSB-1	1 日龄雏鸡、1 日龄鸡胚卵黄囊接种 (可能看不到 CPE, 部分可引起死亡)、肝脏中可复制分离病毒
禽腺病毒 1 群	CK、鸡胚肝细胞、CEF(敏感性较差)、雄性来航鸡肝癌 LMH 细胞系	鸡胚卵黄囊 (初次培养不敏感)
鹌鹑支气管炎病毒	鸡肾细胞、鸡肝细胞	鸡胚(尿囊腔、卵黄囊)
禽呼肠孤病毒	鸡胚细胞、肝、肺、肾、巨噬细胞、睾丸培养细胞、CEF、VERO、BHE21/13、TTT、CRFK、GBK、RK、PK、QT35、鸡淋巴母细胞	鸡胚卵黄囊 (更敏感, 可在接种后 3~5 日出现死亡)、绒毛尿囊腔 (可在接种后 7~8 日出现死亡)

(4) 禽源外源的细胞检查法增加了继代 1 次的要求, 并增加了细胞种类 (如鸡胚肾细胞、鸡胚肝细胞等, 见外源病毒检验一般要求) 并将培养时间由原来的“5~7 日”修订为“10~14 日”。该修订主要参考欧洲药典及非禽源外源病毒检验方法, 增加培养时间, 提高外源检出率。

据统计, 对鸡胚肾细胞敏感或可以作为分离系统的主要禽病病毒有鸡传染性支气管炎病毒、禽疱疹病毒 1 型、传染性法氏囊病病毒、产蛋下降综合征病毒、鹌鹑支气管炎病毒、鸡痘病毒、禽呼肠孤病毒、禽轮状病毒、鸡星状病毒、禽脑脊髓炎病毒、鸡喉气管炎病毒、鸡马立克氏病病毒肠道病毒样病毒等 13 种常见病毒, 对于外源病毒检验而言具有较广的适宜性。从欧洲药典来看, 鸡胚肾细胞也作为细胞培养法的推荐细胞。常见的对鸡胚肝细胞敏感的病毒至少有禽偏肺病毒 (禽鼻气管炎病毒)、禽腺病毒 I 群、鹌鹑支气管炎病毒、禽呼肠孤病毒、鸡产蛋下降综合症病毒、禽轮状病毒、肠道病毒样病毒等 7 种, 特别是对近年来筛查到污染风险较高或新发疫病 (如鸡产蛋下降综合症病毒以及禽腺病毒 1 群、B 亚型禽偏肺病毒) 可产生 CPE。通过增加鸡胚肝细胞作为细胞检查法细胞, 可增加可能存在的外源病毒的检出率, 特别是对与基础种毒和传代细胞而言尤为重要。对于水禽种毒和细胞增加鸭胚成纤维细胞, 也是基于疱疹病毒血清 1 型、鹅/番鸭细小病毒、鸭肝炎病毒 1 型/3 型、鸭肠炎病毒对于鸭胚成纤维细胞分离较为敏感。

(5) 关于鸡检查法的修订, 主要是三个方面: 一是接种途径上新增加了“皮肤刺种”, 主要是考虑到鸡痘污染时目前的接种途径并非最敏感途径, 以改进该方法的敏感性。二是增加了水禽源外源鸡检查法检验时需检查的病原及其检验方法。结合我国已批准水禽用诊断试剂 (盒) 及技术储备, 并参考欧洲药典、我国国标《鸭源生物制品外源病毒检测方法》, 在原检查病原基础上另外增加了鸭瘟病毒、鸭肝炎病毒 I 型、鸭肝炎病毒 III 型、鸭和鹅细小病毒、鸭坦布苏病毒、小鹅瘟病毒等 6 种主要水禽病毒的检测, 以提升我国水禽用生物制品质量。三是拟增加禽偏肺病毒 IFA/ELISA 检测, 以适应目前我国该病的流行趋势及防控现实风险。腺病毒 III 群、禽脑脊髓炎病毒和鸡传染性贫血病毒的检测分别增加了 IFA 和 AGP 的方法, 以解决国内目前尚无商品化 ELISA 试剂的问题。

### 3. 非禽源外源病毒检验 (基本无变化)

(1) 名称改为“非禽源外源病毒检验”, 不再强调制品和细胞。

(2) 删除了原标准中 2.2.1.6 对毒种的特别规定, 毒种检验的原则已体现在新增外源病毒检验一般要求中。

(3) 删去了 2.2.1 细胞选择, 因与新增附录外源病毒检验一般要求重复。

4. 对文字进行了规范性修改。

学位论文