

3305 外源病毒检验法

1 禽源制品及其细胞的检验

除另有规定外，禽源制品及其细胞的检验按照下列方法进行。通常情况下，可采用鸡胚检查法和细胞检查法进行，如果检验无结果或结果可疑时，用鸡检查法进行检验。也可直接用鸡检查法进行检验。

1.1 样品处理

取样品至少 2 瓶，对种毒按所生产疫苗推荐羽份稀释，对活疫苗按瓶签注明羽份稀释后，混合，用相应的特异性抗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殖，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** 选 9~11 日龄 SPF 鸡胚 20 个，分成 2 组，第 1 组 10 枚个鸡胚，经尿囊腔内接种 0.1~0.2 ml（除另有规定外，至少含 10 羽份），第 2 组 10 枚个鸡胚，经绒毛尿囊膜接种 0.1~0.2 ml（除另有规定外，至少含 10 羽份），置 37℃ 下培养 7 日。弃去接种后 24 小时内死亡的鸡胚，但每组鸡胚应至少存活 8 只个，试验方可成立。

1.2.2 **判定** 胎儿应发育正常，绒毛尿囊膜应无病变。取鸡胚液作血凝试验，应为阴性。

如各组 24 小时后死亡鸡胚均不超过 2 个，且尿囊液无血凝性，绒毛尿囊膜无病变，可按相同方式盲传一代。盲传时，尿囊腔接种组应分别收集各个死亡鸡胚的尿囊液，等比例混合，混合物与相应的特异性血清中和，经尿囊腔接种 5 个鸡胚；绒毛尿囊膜接种组应分别收集各个死亡鸡胚的尿囊膜，混合后经研磨制成 1: 5~1: 10 (V/W) 组织悬液，反复冻融 3 次，2~8℃，5000 g 离心 10 分钟，取上清液与相应的特异性血清中和，经尿囊膜接种 5 个鸡胚。弃去接种后 24 小时内死亡的鸡胚，但每组鸡胚应至少存活 4 个，试验方可成立；盲传后，如胎儿发育正常，绒毛尿囊膜无病变，鸡胚液血凝阴性，则判为合格；如接种 24 小时后鸡胚仍出现死亡，可重检一次。

1.3 细胞检查法

1.3.1 **细胞观察** 取 2 个已长成良好鸡胚成纤维细胞单层的（培养 24 小时左右）细胞培养瓶（面积不小于 25 cm²），接种处理过的样品 0.1~0.2 ml（~~2~20~~羽份除另有规定外，至少含 10 羽份），培养 5~7 日，观察细胞，应不出现 CPE。

1.3.2 **红细胞吸附试验** 取上述培养的细胞，弃去培养液，用 PBS 洗涤细胞面 3 次，加入 0.1% (v/v) 鸡红细胞悬液覆盖细胞面，置 2~8℃ 60 分钟后，用 PBS 轻轻洗涤细胞 1~2 次，在显微镜下检查红细胞吸附情况。应不出现由外源病毒所致的红细胞吸附现象。

1.3.3 **禽淋巴白血病毒检验** 采用 COFAL 试验或 ELISA 试验进行，具体方法见附录 3302。

1.3.4 **禽网状内皮增生症病毒检验** 采用间接免疫荧光试验 (IFA) 进行，具体方法见附录 3304。

1.3.5 **禽腺病毒 (I 群) 检验** 一般情况可不进行本项检验，需要时可采用间接免疫

荧光试验（IFA）进行。

1.3.6 鸡传染性贫血病毒检验 一般情况下可不进行该项检验，需要时可采用间接免疫荧光试验（IFA）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、滴鼻接种各10羽份疫苗，肌肉注射100羽份疫苗，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）的血清抗体检测。在42日内，不应有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 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 有血凝性）	HI
禽 A 型流感病毒	AGP/HI
鸡传染性喉气管炎病毒	中和抗体-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
禽淋巴白血病病毒	ELISA
禽脑脊髓炎病毒	ELISA
鸡传染性贫血病毒	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。

1.5 水禽用制品外源病毒检验

除另有规定外，水禽制品的外源病毒检验按照以下方法进行。

1.5.1 用鸡胚或鸡胚成纤维细胞生产的制品和毒种的检验 通常情况下，按照 1.2、1.3 进行检验，如果检验无结果或结果可疑时，用鸡检查法进行检验。也可直接用鸡检查法进行检验。用鸡检查法检验时，应另外增加水禽相关病原（见下表）血清抗体的检测。在免疫期内，不应有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 用鸡检查法检验水禽制品外源病毒时需补充检测的病原及其检验方法

病原	检验方法
----	------

鸭和鹅细小病毒	SN/乳胶凝集试验
鸭瘟病毒	AGP
鸭肝炎病毒 I 型	SN
鸭肝炎病毒 III 型	SN
鸭坦布苏病毒	HI
鸭呼肠孤病毒（是否增加，待定）	SN

注：HI，血凝抑制试验；SN，血清中和试验；AGP，琼脂扩散试验。

1.5.2 用鸭胚或鸭胚成纤维细胞生产的制品和毒种的检验 除另有规定外，按照 1.5.1 中鸡检查法进行检验。

2 非禽源制品及其细胞的检验

除另有规定外，非禽源制品及其细胞的检验按照下列方法进行。

2.1 样品处理

2.1.1 活疫苗 除另有规定外，取至少 2 瓶样品，按瓶签注明头份稀释至每 1.0 ml 至少含 10 头份（如 10 头份不能被完全中和，应至少取 1 头份进行检验），混合匀，以 2000~3000g 离心 10 分钟，取上清液，用等体积的相应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殖，可不进行中和。

2.1.2 毒种 除另有规定外，取至少 2 支（瓶）毒种原液（冻干制品恢复至冻干前装量即为原液）按所生产疫苗推荐头份稀释后，混合匀，2000~3000g 离心 10 分钟，取上清液，用等体积的相应特异性抗血清中和后作为检品。如待检病毒在检验用细胞上不增殖，可不进行中和。

2.1.3 细胞 待检细胞至少培养 14 天（期间至少继代 1 次，每代培养面积不低于 75cm²），经 3 次冻融后，2000~3000g 离心 10 分钟，取上清液作为检品，无需进行中和。

2.2 细胞的选择与样品的培养

2.2.1 细胞的选择（应至少包括下列细胞）

2.2.1.1 猪用活疫苗、毒种和细胞检查用细胞

2.2.1.1.1 致细胞病变检查~~和~~、红细胞吸附性检查~~和~~血凝性外源病毒检查用细胞：Vero 细胞、PK-15（或 ST）细胞。

2.2.1.1.2 荧光抗体检查用细胞：检查牛病毒性腹泻/黏膜病病毒（BVDV/MDV）用 MDBK（或牛睾丸）细胞；检查猪瘟病毒（CSFV）用 PK-15（或 ST）细胞；检查猪圆环病毒 2 型（PCV2）用 PK-15 细胞。

2.2.1.2 牛用活疫苗、毒种和细胞检查用细胞

2.2.1.2.1 致细胞病变检查~~和~~、红细胞吸附性检查~~和~~血凝性外源病毒检查用细胞：Vero 细胞、MDBK（或牛睾丸）细胞。

2.2.1.2.2 荧光抗体检查牛病毒性腹泻/黏膜病病毒（BVDV/MDV）用 MDBK（或牛睾丸）细胞。

2.2.1.3 绵羊和山羊用活疫苗、毒种和细胞检查用细胞

2.2.1.3.1 致细胞病变检查~~和~~、红细胞吸附性检查~~和~~血凝性外源病毒检查用细胞：Vero

细胞、羊睾丸（或羊肾）细胞。

2.2.1.3.2 荧光抗体检查牛病毒性腹泻/黏膜病病毒（BVDV/MDV）用 MDBK（或牛睾丸）细胞。

2.2.1.4 犬科、猫科或鼬科动物用活疫苗、毒种和细胞检查用细胞

2.2.1.4.1 致细胞病变检查~~和~~、红细胞吸附性检查~~和~~血凝性外源病毒检查用细胞：Vero 细胞、MDCK 细胞、CRFK（或 F81）细胞。

2.2.1.4.2 荧光抗体检查用细胞：检查牛病毒性腹泻/黏膜病病毒（BVDV/MDV）用 MDBK（或牛睾丸）细胞；检查狂犬病病毒（RV）用 Vero（或 BHK21）细胞；检查犬细小病毒（CPV）用 CRFK（或 F81）细胞。

2.2.1.5 马用活疫苗、毒种和细胞检查用细胞

2.2.1.5.1 致细胞病变检查~~和~~、红细胞吸附性检查~~和~~血凝性外源病毒检查用细胞：Vero 细胞。

2.2.1.5.2 荧光抗体检查用细胞：检查牛病毒性腹泻/黏膜病病毒（BVDV/MDV）用 MDBK（或牛睾丸）细胞。

2.2.1.6 在对毒种进行外源病毒检验时，应增加使用种毒繁殖所用细胞来源动物的胚胎细胞、新生动物细胞或一种细胞系（如与前述细胞不同时）进行致细胞病变检查、红细胞吸附性检查和血凝性外源病毒检查。

2.2.2 样品的接种与培养

取处理好的样品 2.0 ml（除另有规定外，至少含 10 头份。~~如 10 头份不能被完全中和，应至少含 1 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，培养 3~5 日，继代至少 2 代~~每一种细胞培养时间应不低于 14 日，培养期间至少继代 2 次~~。最后一次继代（至少为第 3 代）的培养物作为外源病毒检验的被检材料的细胞单层数量和培养面积应符合 2.3 检查的要求。在对活疫苗或毒种样品进行检验时，可在培养过程中加入 2%~10% 相应的特异性抗血清。

如样品传代培养期间，任何一代培养细胞出现细胞病变，而正常细胞未出现病变，则判为不符合规定。~~如无细胞病变，培养结束时，细胞单层应按 2.3 进行检验。当被检样品判为不符合规定时，可不再进行其他项目检验。~~

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 34~57 日，显微镜下观察细胞病变情况，至少观察 6 cm² 的细胞面积。若未观察到明显的细胞病变，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。

~~——当致细胞病变检查法检查结果判为不符合规定时，可不再进行其他项目的检验。~~

2.3.2 红细胞吸附性外源病毒检测 将最后一次继代（至少为第 3 代）的培养物培养 34~57 日后直接进行检验。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 cm² 的细胞面积。当正常对照细胞不出现红细胞吸附现象，而被检样品出现外源病毒所致的红细胞吸附现象，则判为不符合规定。

~~当红细胞吸附性检查结果判为不符合规定时，可不再进行其他项目的检验。~~

2.3.3 血凝性外源病毒检查法 将 2.3.2 最后一次继代的培养物培养 4~7 日后取上清直接进行检验。分别采用 0.5% 的豚鼠红细胞和 0.5% 鸡红细胞按照附录 3403 的方法进行血凝性检测。当正常对照细胞不出现血凝现象（血凝效价 < 1 : 2），而被检样品出现外源病毒所致的血凝现象（血凝效价 ≥ 1 : 2），则判为不符合规定。

2.3.34 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，3000 g 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 34~57 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-TCID₅₀）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 6.0 cm²。

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。

~~当荧光抗体法检查结果判为不符合规定时，可不再进行其他项目的检验。~~