

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。

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 禽白血病病毒检验 采用 COFAL 试验或 ELISA 试验进行，具体方法见附录 3302。

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

1.4 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/IFA

禽腺病毒III群 (EDS)	HI
禽 A 型流感病毒	AGP/HI/ELISA
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 1: 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。

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

~~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、混合, 以 2000~3000 g 离心 10 分钟, 取上清液, 用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。

~~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, 2000~3000 g 离心 10 分钟, 取上清液, 用相应的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。

~~细胞~~—经 3 次冻融后, 2000~3000 g 离心 10 分钟, 取上清液作为检品, 无需进行中和。

取样品至少 2 瓶。除另有规定外, 对毒种取至少 1.0ml 原液 (冻干制品恢复至冻干前装量), 对活疫苗按瓶签注明头份稀释至每 1.0 ml 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殖, 可不进行中和。对细胞样品进行检验时, 待检细胞应至少培养 14 天 (期间至少继代 1 次, 每代培养面积不低于 75cm²), 经 3 次冻融后离心, 取上清液作为检品。

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、红细胞吸附及血凝性检查用细胞: 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、红细胞吸附及血凝性检查用细胞: 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、红细胞吸附及血凝性检查用细胞: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、红细胞吸附及血凝性检查用细胞: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、红细胞吸附及血凝性检查用细胞: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 当待检样品为毒种时,应增加使用毒种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、红细胞吸附及血凝性外源病毒检测和荧光抗体检查。

2.2.2 样品的接种与培养

取处理好的样品2.0ml(除另有规定外,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。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。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检查的要求。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细胞病变,而正常细胞未出现病变,则判为不符合规定。当被检样品判为不符合规定时,可不再进行其他项目检验。如无细胞病变,培养结束时,细胞单层应按2.3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34~57日,显微镜下观察细胞病变情况,至少观察6cm²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 红细胞吸附及血凝性外源病毒检测 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，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 的方法进行血凝性检测。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 6cm² 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，当正常对照细胞不出现血凝和红细胞吸附现象，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。

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 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。