

## 3302 禽白血病病毒检验法

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 毒种和疫苗样品的处理 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 10 000~12 000 g 离心 10~15 分钟, 取上清备用。

2.1.1 含鸡新城疫病毒(低毒力弱毒株)的制品 取 1.00.8 ml (含 200 羽份) 疫苗, 加入等体积的鸡新城疫病毒特异性抗血清置 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制品 取 1000 (或以上) 羽份制品, 加无菌注射用水, 使每 4.0 ml 溶液中含 500 羽份制品; 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℃, 5 000 g 离心 10 分钟, 取上清液经 0.22 μm 滤器过滤 1 次, 取滤液 4.0 ml 接种 CEF 单层。如果含有鸡马立克氏病火鸡疱疹病毒时, 取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, 全部接种于 CEF 单层。

2.1.3 含鸡马立克氏病火鸡疱疹病毒的制品 取 1 000 (或以上) 羽份制品, 用 4.0 ml (或适量) 不含血清的 M-199 培养液溶解, 使最终为 500 羽份/2.0 ml; 2~8℃, 10 000 g 离心 15 分钟; 上清液经 0.45 μm 滤器过滤 1 次, 0.22 μm 滤器过滤 2 次, 取滤液 2.0 ml 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, 全部接种于 CEF 单层。

2.1.4 含鸡痘病毒的制品 取 1 000 (或以上) 羽份制品, 用 4.0 ml (或适量) 不含血清的 M-199 培养液溶解, 使最终为 500 羽份/2.0 ml; 2~8℃, 12 000 g 离心 15 分钟; 上清液经 0.8 μm、0.45 μm、0.22 μm 和 0.1 μm 滤器各过滤 1 次, 取滤液 2.0 ml 接种于 CEF 单层。

2.1.5 含鸡传染性法氏囊病病毒的制品 取 1 000 (或以上) 羽份制品, 用 4.0 ml (或适量) 不含血清的 M-199 培养液溶解, 使最终为 500 羽份/2.0 ml; 2~8℃, 10 000 g 离心 10 分钟; 取上清液 2.0 ml 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, 全部接种于 CEF 单层。

2.1.6 含禽脑脊髓炎病毒的制品 取稀释的疫苗 2.0 ml (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制品进行滤过处理), 接种于 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制品 不中和, 直接取稀释后的制品 2.0 ml (含 500 羽份) 接种于 CEF 单层。

2.1.8 含呼肠孤病毒的制品 取 1 000 (或以上) 羽份制品, 用 4.0 ml (或适量) 不含血清的 M-199 培养液溶解, 使最终为 500 羽份/2.0 ml; 2~8℃, 10 000 g 离心 10 分钟; 取上清液经 0.45 μm 滤器过滤, 取 2.0 ml 滤液与等体积的鸡呼肠孤病毒特异性抗血清混匀, 置 37℃ 作用 60 分钟, 全部接种于 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。



注: NC, 代表正常细胞对照。P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>, 分别代表第 1 代、第 2 代、第 3 代。S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>、S<sub>3</sub>, 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 2.8% 绵羊红细胞悬液。

5.1.2.2 致敏红细胞悬液的制备 在 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℃ 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 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 2.8% 绵羊红细胞悬液 1.0 ml, 加无菌纯化水 7.0 ml, 再加 5× 缓冲液 2.0 ml, 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 1.0 ml。

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 0.125 ml。

5.1.2.4 其余各孔内加入致敏红细胞悬液 0.025 ml, 并用胶带密封好, 置 37℃ 水浴 30 分钟, 再以 1500 r/min 离心 5 分钟, 或置 2~8℃ 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 每孔加 100 μl 被检样品, 每个样品加两孔。设阳性、阴性对照孔, 每个样品加各两孔, 用封口膜封板后, 放置 37℃ 作用 1 小时。

5.2.2 洗涤 弃去样品, 每孔加 300 μl 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 100 μl, 用封口膜封板后, 放置 37℃ 作用 60 分钟。

5.2.4 洗涤 同 5.2.2。

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

5.2.6 加终止液 每孔加 100 μl。

5.2.7 读数 置酶联读数仪读取各孔 OD<sub>650nm</sub> 值。

5.2.8 结果判断

5.2.8.1 当阴性对照 OD<sub>650nm</sub> 值小于 0.2, 阳性对照 OD<sub>650nm</sub> 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<sub>650nm</sub> 值均小于 0.3, RAV<sub>1</sub> 和 RAV<sub>2</sub> 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。