

新增附录 鸡传染性贫血病毒检验法（标准草案）

1 细胞制备 准备 6 个含 15ml MDCC-MSB1 细胞悬液（细胞浓度约 $5.0 \times 10^5 \sim 6.0 \times 10^5$ 个细胞/ml）的 25cm² 细胞瓶。

2 样品的处理及接种

2.1 毒种与疫苗样品的处理 除另有规定外，禽腺病毒 III 群、禽网状内皮组织增生症病毒及其活疫苗需用特异性阳性血清中和，其它样品无需处理。

2.2 接种与培养 将处理好的样品（至少含 200 羽份）接种 2 个规格为 25cm² 的 MDCC-MSB1 细胞单层，每瓶接种 1.0ml；同时设立 2 瓶细胞对照，置 37℃ 培养。同时将鸡传染性贫血病毒（CIAV）稀释至 2.5 TCID₅₀/ml ~ 10 TCID₅₀/ml，分别取 1.0ml 接种 2 瓶 MDCC-MSB1 单层，作为阳性对照。

3 细胞培养与传代 所有细胞培养至少 21 日（待检样品出现 CPE 时间早于 21 日时可适当减少培养时间），间隔 2~3 日传代 1 次。传代时，将同一样品的培养物混合，以 1000r/min 离心 7~10 分钟收获细胞，按 1:2 比例进行传代。最后一代细胞培养物混合后以 1000r/min 离心 7~10 分钟收获细胞，用 PBS 洗涤细胞 3 次，重悬至细胞浓度达到 1.0×10^6 细胞/ml。

4 细胞病变的观察 在传代培养过程中，通过观察培养基颜色的变化来监测鸡传染性贫血病毒的存在，并在显微镜下观察细胞病变。

5 荧光染色

5.1 细胞板制备 取 96 孔细胞培养板，加入 0.05mg/ml 的多聚 L 赖氨酸进行预处理。每孔 100μl，室温孵育 1 小时，弃去多聚 L 赖氨酸，然后用 PBS（0.01mol/l，pH 值 7.2，下同）洗涤 1 次，风干备用。收获的细胞悬液，分别接种多聚 L 赖氨酸预处理的 96 孔细胞培养板 10 孔，200μl/孔。加样后，室温孵育 1.5 小时待细胞沉降。

5.2 固定 小心弃去上清，每孔加入 150μl 甲醇，2~8℃ 固定 45~60 分钟。弃去甲醇，风干备用。

5.3 加一抗（CIAV 阳性血清或单克隆抗体） 用 PBS 轻洗细胞表面 1 次。每孔加入 0.05ml 用 PBS 适当稀释的 CIAV 阳性血清或单克隆抗体，置 37℃ 作用 1 小时，弃去一抗。用 PBS 洗涤 3 次。

5.4 荧光二抗染色 每孔加入用 PBS 适当稀释的 FITC 荧光标记的抗小鼠或鸡 IgG，置 37℃ 作用 1 小时，弃去二抗。用 PBS 洗涤 3 次。

5.5 伊文氏兰复染（可选步骤） 每孔加入 0.01% 伊文氏兰 100μl，37℃ 作用 30 分钟，弃去伊文氏兰。用 PBS 洗涤 3 次。

6 观察 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光（波长 490nm）观察。被 CIAV 感染的 MDCC-MSB1 细胞呈现绿色荧光；未被感染的细胞不着色，视野发暗。

7 结果判定

7.1 若病毒对照未检测到 CIAV 或细胞对照中检测到 CIAV，则试验无效。

7.2 当病毒对照所有孔中均出现特异性绿色荧光，细胞对照所有孔中均未出现特异性绿色荧光时，试验成立。

7.3 被检样品接种的 10 个孔中，只要有 1 个孔出现特异性绿色荧光，即判该样品为 CIAV 阳性。

起草说明：

1. 本标准系在参考了 2023~2024 年对企业生产禽用活疫苗和灭活疫苗监测其中 CIAV 的污染情况大数据（检测方法按照《农业行业标准 NY/T 1187-2019 鸡传染性贫血诊断技术》

进行检测的数据), 结合对兽用生物制品生产和检验用细胞、种毒、动物源材料、半成品、成品的外源病毒检验结果实际, 完成了 CIAV 外源病毒检测方法的起草。本标准属于首次起草。

2. 基于《中国兽药典》惯例, 借鉴《欧洲药典》和美国 9CFR 等经验, 对禽源细胞、种毒、动物源性材料及制品制定了特定 CIAV 外源病毒检验的具体附录方法, 今后可结合新版《中国兽药典》三部宣贯及外源病毒检验技术培训来进一步强化企业对相应方法的掌握。

3. 关于 IFA 方法检测 CIAV 《欧洲药典》等收录有 CIAV 接种 MDCC-MSB1 细胞进行 IFA 检测的方法, 借鉴其方法建立了 CIAV 的 IFA 检测方法。对常见其他禽源抗原[NDV、AIV(H9)、IBDV、MDV、IBV、ALV、REV、FAdv]和细胞对照未均未出现特异性荧光, 证实 IFA 方法特异性良好。将 CIAV 阳性病毒稀释至每 0.1ml 含有 10 TCID₅₀、5 TCID₅₀、2.5 TCID₅₀、1 TCID₅₀、0.1 TCID₅₀, 进行 IFA 检测, 结果显示可检出 1 TCID₅₀/0.1ml 的 CIAV, 证实敏感性良好。

4. 关于禽外源病毒检验样品处理 细胞检查法接种剂量采用至少 200 羽份, 鉴于 EDSV、REV 可在 MSB1 细胞上出现细胞病变, 因此规定“除另有规定外, 除禽腺病毒 III 群 (EDS)、禽网状内皮组织增生症病毒及其活疫苗需用特异性阳性血清中和外, 其它样品无需处理。”

5. 关于阳性对照传代 将 CIAV 病毒对照 (AV1550 毒株) 稀释至 50 TCID₅₀、10 TCID₅₀、5 TCID₅₀、2.5 TCID₅₀、1 TCID₅₀/0.1ml, 接种 MDCC-MSB1 细胞, 结果显示接种 10 TCID₅₀、5 TCID₅₀、2.5 TCID₅₀、1 TCID₅₀ 的阳性病毒, 可连续传代至 21 日。接种 50 TCID₅₀ 的阳性病毒对照, 在第 5 代开始出现少量细胞病变。因此阳性病毒接种量 10~2.5 TCID₅₀ 均可连续传代 21 日, 最后收集细胞进行 IFA 染色, 均阳性。

6. 关于 IFA 方法的适应性 选择 CIAV AV1550 株、MSD 株、Cux-1 株、Gif 株及实验室分离毒株 CE、QD、DZ、JN 等 8 个国内毒株, 稀释至 10 TCID₅₀/0.1ml, 接种 MSB1, 培养后进行 IFA 染色, 结果显示病毒感染细胞均染色阳性, 对照细胞无染色。证实 IFA 方法具有普遍性。