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 $2\sim8$ °C1 小时,冻融 3 次;按 10%体积加 10 倍浓度的 M-199 浓缩培养液; $2\sim8$ °C,5 000 g 离心 10 分钟,取上清液经 0.22 μ m 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°C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; $2\sim8\%$, $10\,000$ g 离心 15 分钟;上清液经 0.45 μ m 滤器过滤 1 次,0.22 μ m 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; $2\sim8$ °C,12 000 g 离心 15 分钟;上清液经 0.8 μ m、0.45 μ m、0.22 μ m 和 0.1 μ m 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; $2\sim8$ °C,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°C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; $2\sim 8^\circ$ C,10 000 g 离心 10 分钟;取上清液经 0.45 μ m 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 \circ C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。

- 2.1.10 细胞液 取最后的细胞悬液 5.0 ml,反复冻融 3 次; 2 \sim 8 $^{\circ}$ 0, 5 000 g 离心 10 分钟,取上清液用于接种 CEF。
- **2.2 接种与培养** 处理好的样品接种 2 个 25 cm² 左右的 CEF 单层,置 37℃吸附 45~ 60 分钟,弃去接种液,加入细胞生长液,次日换成维持液。同时设立正常细胞作对照。

3 细胞培养的传代与处理

- 3.1 待细胞培养 $5\sim7$ 日后,按常规方法消化、收获细胞,将其中 1/2 细胞,置 -60° C 以下作检验用 (P_1) ,其余细胞分散到 2 个瓶中。培养 $5\sim7$ 日后,按同样方法收获细胞,留样 (P_2) 。如此继续传第 3 代,收获 (P_3) 。所有对照组按相同方法处理。
- 3.2 处理 将 P_1 、 P_2 和 P_3 的细胞培养物(包括样品和所有对照组)冻融 3 次,5 000 g 离心 3 分钟,待用。
- **4 病毒对照** 去掉细胞生长液,分别加入 RAV_1 和 RAV_2 0.5 ml,置 37℃下吸附 45~60分钟,直接加入培养液,同样品连传 3 代,传代时病毒对照应在最后进行。
 - 5 样品检测 所有样品用 COFAL 试验或 ELISA 试验进行禽白血病病毒检测

5.1 COFAL 试验 (两日试验)

- 5.1.1 第一日试验
- 5.1.1.1 在 96 孔微量板中, 按下表所示加入缓冲液 0.025 ml, 对照孔 A、B 各 0.025 ml, C、D、E 各 0.05 ml, F 加 0.1 ml。
- 5.1.1.2 样品的加入与稀释 在 A、D、E 和 H 各孔中分别加入 0.025 ml 样品,并用微量吸管从 A \rightarrow B \rightarrow C 和 E \rightarrow F \rightarrow G 进行连续稀释,最后 C 孔和 G 孔中弃去 0.025 ml,D 和 H 孔中混合后弃去 0.025 ml;其他对照孔中 B、G 各加病毒对照 0.025 ml。
 - 5.1.1.3 在 D 和 H 排各孔中加入缓冲液 0.025 ml。
- 5.1.1.4 在 A、B、C 和 E、F、G 排各孔中加入灭活抗血清 0.025 ml, 其他对照孔中 A、G 各加入 0.025 ml, 混匀包板后,置室温下作用 30~45 分钟(其间配制补体)。
- 5.1.1.5 所有孔中均加入适当浓度的补体(全量) 0.05 ml,对照孔中 A、B、C、G 各加入 0.05 ml(全量)补体,D 孔加 0.05 ml(1/2 浓度)的补体,E 孔加入 0.05 ml(1/4 浓度)的补体,轻摇平板,混匀密封后,置 $2\sim8$ C 过夜。

4 5 8 9 1 2 6 10 11 12 A 1: 2 NCP₁ NCP₂ NCP₃ S_1P_1 S_1P_2 S_1P_3 S_2P_1 S_2P_2 S_2P_3 B 1: 4 标 C 1: 8 其 准 D 1: 2 他 比 $RAV_1 \quad RAV_1 \quad RAV_1 \quad RAV_2 \quad RAV_2$ RAV₂ 对 E 1: 2 S_3P_1 S_3P_2 S_3P_3 色 照 \mathbf{P}_1 P_2 P_3 \mathbf{P}_1 P_2 P_3 板 孔 F 1: 4 孔 G 1: 8

表 1 第一日试验 (96 孔板) 反应术式

注: NC, 代表正常细胞对照。 P_1 、 P_2 、 P_3 ,分别代表第 1 代、第 2 代、第 3 代。 S_1 、 S_2 、 S_3 ,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。

	ā	表 2 第二日试验反应术式					单位: 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 $A\rightarrow H$ 和 10 列的 $H\rightarrow F$ 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 μ l 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_{650nm}值。
 - 5.2.8 结果判断
- 5.2.8.1 当阴性对照 OD_{650nm} 值小于 0.2,阳性对照 OD_{650nm} 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_{650nm} 值均小于 0.3, RAV_1 和 RAV_2 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。