

ICS 11.220

B 41

# 团 体 标 准

T/ CVMA 1—2018

全国团体标准信息平台

## 禽白血病净化技术规范

Technical specifications for eradication of Avian Leukosis



全国团体标准信息平台

2018- 10-24 发布

2018 - 10 -24 实施

中 国 兽 医 协 会 发 布

## 前 言

本标准按GB/T 1.1-2009给出的规则起草。

本标准由中国兽医协会提出并归口。

本标准起草单位：中国动物疫病预防控制中心、山东农业大学、扬州大学、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人：王传彬、赵鹏、翟新验、杨林、王笑梅、秦爱建、蒋菲、刘林青、宋晓晖、高玉龙、钱琨、顾小雪、刘玉良、叶建强、刘洋、曲萍、王睿男、毕一鸣、徐琦。

# 禽白血病净化技术规范

## 1 范围

本标准规定了种鸡群禽白血病净化检测和净化状态维持相关的技术规范。

本标准所列种鸡各生长阶段净化检测技术主要适用于有禽白血病净化需求的原种鸡群（或称核心群），其他类型鸡群也可参照执行。所列禽白血病净化状态维持技术适用于已实现禽白血病净化的鸡群。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 18635 动物防疫 基本术语

GB/T 26436 禽白血病诊断技术

NY/T 680 禽白血病病毒p27抗原酶联免疫吸附试验方法  
《中国兽药典》

## 3 术语和定义

GB/T 18635 确定的及下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**种鸡** breeding chicken

经过不断选种、选育，按育种组织制订的标准鉴定承认的鸡品种，按经济用途分为蛋用型、肉用型、肉蛋兼用型和观赏型。

### 3.2

**原种鸡群** pedigree breeder flock

按照四系配套原则，鸡的遗传谱系分为曾祖代、祖代、父母代、商品代，只有曾祖代的鸡可以自繁留种，其他后代都不能留做和它同级的种，通常将曾祖代称为原种鸡群或者核心群。

### 3.3

**动物疫病净化** animal disease eradication

有计划地在特定区域或场所对特定动物传染病通过监测、检验检疫、隔离、扑杀、销毁等一系列技术和管理措施最终达到在该范围内动物个体不发病和无感染状态的根除消灭疫病病原的过程，目的是清

除可传染的病原因子，从而达到并维持动物个体和群体健康。这个特定区域或场所是人为确定的一个固定范围，可以是一个养殖场、一个自然区域、一个行政区，也可以是一个国家。本标准所指净化主要指在种鸡群中（通常为一个种鸡场），通过雏鸡胎粪检测、不同日龄鸡血液病毒分离、公鸡精液中病毒分离等方法，发现并淘汰鸡群中感染禽白血病的鸡只，最终达到鸡群消除该病的过程。

## 4 净化检测程序

### 4.1 出壳雏鸡胎粪检测与淘汰

4.1.1 将种蛋置于出壳纸袋（纸盒）中隔离孵化，每只（羽）种鸡所产种蛋单独使用一个出壳纸袋（纸盒），以免出雏时发生横向传播。

4.1.2 出壳后将雏鸡胎粪挤压于灭菌的 1.5 mL 离心管中，离心管中预先加入 0.5 mL 样品稀释液（含体积分数 10% 新生牛血清的 PBST 溶液或商品化试剂盒中专用稀释液），充分震荡混匀。对一只（羽）母鸡的雏鸡采集完胎粪后，更换一次性手套或对双手信息消毒后，方可采集下一只（羽）母鸡的雏鸡胎粪。

4.1.3 将雏鸡胎粪样品置入液氮中快速冷冻后取出，放入 37 °C 水浴锅中融化，反复冻融三次，使禽白血病毒 p27 抗原充分释放，离心取上清液用于检测胎粪中禽白血病毒 p27 抗原。

4.1.4 禽白血病毒 p27 抗原检测，可按照 NY/T 680 标准或采用等效的商品化酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒进行，也可采用针对禽白血病毒 p27 抗原的单克隆抗体建立的胶体金试纸条等快速检测方法。

4.1.5 同一只（羽）母鸡所产的雏鸡中，若有一只（羽）雏鸡胎粪检测为禽白血病毒 p27 抗原阳性，则该纸袋（纸盒）中所有雏鸡视为阳性，相应雏鸡及其对应母鸡应全部淘汰。

4.1.6 阴性鸡作为育种选留进行隔离饲养，同一母鸡的阴性雏鸡放于同一笼中。在育雏期间每个笼具之间应采取阻隔措施以避免水平传播，避免笼间直接接触和直接气流的对流。可在每个笼具之间用纸板阻隔，在不影响通风情况下纸板高度应尽量高。

### 4.2 育雏后期的检测与淘汰

4.2.1 在育雏结束即将转入育成鸡舍前，对每只鸡无菌采集抗凝血，按照 GB/T 26436 规定程序接种 DF-1 细胞进行病毒分离，培养 9 天（d）后取细胞培养上清，按 4.1.4 规定方法检测禽白血病毒 p27 抗原。

4.2.2 检测为阳性的鸡应淘汰，不再作为育种选育个体。对检测为阴性的选留后备种鸡，应维持小群隔离饲养。

### 4.3 开产初期的检测与淘汰

4.3.1 每只（羽）母鸡取开产后的初产蛋 2~3 枚采集蛋清，蛋清反复冻融三次，按照 4.1.4 规定方法逐个检测禽白血病毒 p27 抗原。也可无菌采集母鸡抗凝血，按照 4.2.1 规定方法进行禽白血病毒分离鉴定。

4.3.2 公鸡分别采集抗凝血和精液同时接种 DF-1 细胞，按照 4.2.1 规定方法进行禽白血病毒分离鉴定。精液病毒分离鉴定具体操作见附录 A。

4.3.3 检测为阳性的鸡应淘汰，不再作为育种选育个体。对检测为阴性的选留后备种鸡，继续维持小群隔离饲养。

#### 4.4 留种前的检测与淘汰

4.4.1 取每只（羽）母鸡所产种蛋2~3枚采集蛋清，检测方法同4.3.1。

4.4.2 公鸡检测方法同4.3.2。

4.4.3 检测为阳性的鸡应淘汰，不再作为育种选育个体。对检测为阴性的选留后备种鸡，继续维持小群隔离饲养。

#### 4.5 种蛋的选留和孵化

按照本标准4.1~4.4规定程序淘汰所有阳性鸡后，每只母鸡仅选用1只检测为阴性公鸡的精液进行人工授精。按育种规定时间留足种蛋，每只母鸡的种蛋均标号。将每只母鸡的种蛋置于写有该母鸡标号的专用孵化纸袋（纸盒）中，防止不同母鸡的种蛋直接接触，置于出雏箱中出雏。

#### 4.6 不同世代的持续检测

经检测合格的种蛋孵出的雏鸡作为净化后第二世代鸡，继续按照本标准4.1~4.5规定的程序实施第二世代的检测和净化。后续世代按此程序继续循环进行，直至评估达到附录B所列禽白血病净化评估标准。

### 5 净化周期与终止

#### 5.1 净化周期确定

净化时可根据种鸡所处育种时期，对照本标准4.1~4.5的任何一个时间节点启动净化程序。不同种鸡场可根据其技术条件分别选择本标准4.1~4.5的任何一时间节点进行检测，但按照本标准4.1~4.5从出壳开始至留种过程中所有时间节点全部进行检测是实现净化的最短周期。

#### 5.2 净化效果评估

净化效果评估应按照国家农业行业行政主管部门制定的禽白血病净化评估程序和净化评估标准进行。净化评估标准见附录B。

#### 5.3 达到净化鸡群的检测比例调整

对按照5.2评估达到净化标准的原种场无需再按照本标准4.1~4.5要求进行普遍性检测，可按照5.2或不低于10%的比例进行抽样监测。检测结果不符合5.2所要求标准，则按照本标准4.1~4.5所列检测规程重新进入检测净化程序。

### 6 已净化鸡群的净化状态维持措施

#### 6.1 种源的选择

对饲养进口祖代及其以下代次的鸡场，应从无外源性禽白血病病毒感染的育种公司购入苗鸡。应要求供应商提供初产种蛋（100~200枚），检测蛋清中p27抗原为阴性。同时，可要求供应商提供相关种鸡群在相应年龄（23周龄后）的禽白血病病毒血清抗体检测报告和留种孵化前所产种蛋的蛋清p27抗原检测报告。禽白血病病毒血清抗体检测，可采用针对禽白血病病毒p27蛋白抗体的ELISA检测方法，同时也

可采用针对禽白血病A/B亚群和J亚群抗体的商品化ELISA试剂盒检测。禽白血病病毒p27蛋白抗体的ELISA检测操作程序见附录C

## 6.2 鸡群禽白血病病毒感染状态监测

种鸡群在饲养过程中应进行禽白血病定期监测，以了解鸡群禽白血病病毒的感染状态。可在种鸡群开产后、留种蛋前，采集500份左右血清样品，用ELISA方法检测禽白血病病毒A/B亚群及J亚群抗体或p27蛋白抗体。同时，采集种蛋用ELISA方法检测蛋清中的禽白血病p27抗原。如果血清抗体阳性率或蛋清p27抗原阳性率超过1%时，应对鸡群采集抗凝血接种DF-1细胞进行病毒分离鉴定。

## 6.3 鸡群之间水平传播的预防

种鸡场应执行全进全出制度。饲养已经净化的品系时，应避免不同来源的种鸡在同一鸡场饲养而发生交叉感染。一个鸡场在同一时期只能饲养一批来源的种鸡。不同来源的种蛋在孵化和出雏之时应分开，避免与其他鸡群（特别是非净化鸡群）同时孵化和出壳，以减少禽白血病水平传播风险。

## 6.4 生物安全措施的建立

种鸡场地理位置应相对隔离，远离其他鸡场。运送物品车辆以及人员出入，均应执行消毒制度，同时应尽可能降低种鸡场所需物品与外界的交流。接触核心群的工作人员应固定化，避免其他鸡群的饲养员进入实施净化的鸡群中工作。种鸡场应在鸡舍安装防鸟网或其他防鸟设施，并定期检查维护。

## 6.5 疫苗的管理和使用

净化鸡群使用的针对各种鸡病的弱毒疫苗，应是经过《中国兽药典》规定程序检测合格的疫苗，确保无外源性禽白血病毒污染。用鸡胚或鸡胚来源的细胞作为原材料生产的疫苗，以及对1日龄雏鸡通过注射法（包括皮肤刺种）使用的疫苗，使用前应进行检测。鸡用弱毒活疫苗中禽白血病毒污染检测操作程序可参考附录D。

附 录 A  
(规范性附录)  
公鸡精液中病毒分离鉴定操作程序

A.1 使用 75%乙醇将泄殖腔周围擦拭干净,将公鸡精液采集到 1.5 mL已灭菌的离心管中,一只公鸡的精液对应一个离心管,编号后放入冰盒中暂存。采集的精液,用含有青链霉素(青霉素 100 U/mL,链霉素 0.1 mg/mL)的细胞维持液,按照最终稀释度为 1:28~1:56 充分混匀后接种DF-1 细胞,在 37℃,5% CO<sub>2</sub>条件下培养 2 小时(h)后换为正常细胞维持液。

A.2 上述细胞在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 7 d~9 d,取出冻融一次,然后分别取 0.1 mL细胞培养上清按照NY/T 680 或等效商品化试剂检测禽白血病病毒p27 抗原,如检测结果阳性,则判定所检测公鸡精液中存在外源性禽白血病病毒。

中国兽医协会  
CVMA

全国团体标准信息平台

**附 录 B**  
(资料性附录)

《动物疫病净化示范场评估标准（试行）》（2017 版）中有关禽白血病净化评估标准

### B.1 净化评估标准

同时满足以下要求，视为达到净化标准：

- 种鸡群抽检，禽白血病病原学检测均为阴性；
- 连续两年以上无临床病例；
- 现场综合审查通过。

### B.2 抽检要求

**表B.1 净化评估抽样检测方法**

检测项目	检测方法	抽样种群	抽样数量	样本类型
病原学检测	p27 抗原 ELISA	产蛋鸡群	500 枚种蛋（随机抽样，覆盖不同栋鸡群）	种蛋
	病毒分离（DF-1 细胞）	种鸡群	单系 50 份（随机抽样，覆盖不同栋鸡群）	血样
注：p27 抗原检测全部为阴性，实验室检测通过；p27 抗原检测阳性率高于 1%，实验室检测不通过。检出 p27 抗原阳性且阳性率 1%以内，采用病毒分离进行复测，病毒分离全部为阴性，实验室检测通过；病毒分离出现阳性，实验室检测不通过。				

## 附录 C (资料性附录)

### 禽白血病病毒 p27 蛋白抗体 ELISA 检测操作程序

#### C.1 仪器设备

酶标仪(含450 nm波长滤光片)、50  $\mu\text{L}$ 和100  $\mu\text{L}$ 的精确微量移液器、200  $\mu\text{L}$ 八或十二通道可调移液器、一次性移液器吸头、稀释用96孔板、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育箱、1 000 mL量筒(配制洗涤液用)、蒸馏水或去离子水、自动或手动洗板系统等。

#### C.2 材料

禽白血病p27抗体ELISA检测试剂盒。

#### C.3 操作

##### C.3.1 样品采集

经翅静脉采血,分离血清,要求血清清亮、无溶血。短期内使用可置于4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,否则应置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 以下冻存。

##### C.3.2 试剂盒检测

###### C.3.2.1 检测原理

本试剂盒使用纯化的p27蛋白包被微量反应板,利用间接ELISA原理进行检测。如果待测样品中含有针对ALV-p27的抗体,则与包被抗原结合,加入可与鸡抗体结合的酶标二抗(酶结合物)后,形成抗体-抗原-酶标抗体复合物,再加入TMB底物液作用显色,在酶标仪450 nm波长测定各孔吸光度值,判定结果。

###### C.3.2.2 洗涤液的配制

使用前,浓缩的10 $\times$ 洗涤液应恢复至室温(25 $^{\circ}\text{C}$ 左右),并摇动使沉淀的盐溶解,然后用蒸馏水或去离子水作10倍稀释(例如:每板用40 mL浓缩液加360 mL水),即1 $\times$ 洗涤液。

###### C.3.2.3 样品准备

用样品稀释液将阴阳对照样品和被检样品进行500倍稀释(如:1  $\mu\text{L}$ 样品稀释到500  $\mu\text{L}$ )。

###### C.3.2.4 检测步骤

使用前所有试剂应恢复至室温(25 $^{\circ}\text{C}$ 左右),试剂应轻轻旋转或振荡混匀。

1) 取出反应板,在记录表上记录阳性对照、阴性对照和样品的位置;

2) 分别在相应孔中加入稀释好的阳性对照(2孔)、阴性对照(2孔)和待检样品各100  $\mu\text{L}$ 。充分混匀后,贴上封板膜,置37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育60 min;

3) 小心揭掉封板膜, 弃去各孔中液体、拍净。每孔加满洗涤液, 静置约30 s, 重复洗涤3次, 最后在吸水纸上拍净;

4) 每孔加入酶结合物溶液100  $\mu\text{L}$ , 贴上封板膜, 置37  $^{\circ}\text{C}$  孵育60 min;

5) 重复步骤3);

6) 每孔加入底物液A 50  $\mu\text{L}$ 和底物液B 50  $\mu\text{L}$ , 轻轻振荡混匀, 置室温避光显色15 min;

7) 每孔加入终止液50  $\mu\text{L}$ , 轻轻振荡混匀, 立即置酶标仪450 nm波长处测定各孔OD值。

### C.3.2.5 结果判定

C.3.2.5.1 试验结果同时符合下列条件, 方为有效:

① 阳性对照平均值-阴性对照平均值 $>0.20$ ;

② 阴性对照平均值 $\leq 0.2$ ;

C.3.2.5.2 计算公式:

$$S/P = (\text{样品平均值} - \text{阴性对照平均值}) / (\text{阳性对照平均值} - \text{阴性对照平均值})$$

C.3.2.5.3 按以下方法判定结果:

阳性:  $S/P > 0.2$ , 即禽白血病p27抗体阳性。

阴性:  $S/P \leq 0.2$ , 即禽白血病p27抗体阴性。

## 附录 D

### (资料性附录)

#### 弱毒活疫苗中禽白血病病毒污染检测操作程序

##### D.1 细胞培养检查法

###### D.1.1 细胞培养检查法操作方法

按照《中国兽药典》规定对疫苗中禽白血病病毒污染主要采用细胞培养检查法进行检测，即将疫苗样品接种鸡胚成纤维细胞（CEF）盲传三代，取三个代次的细胞培养物反复冻融3次，5 000 g离心3分钟，测定细胞培养上清中禽白血病病毒p27抗原，用以确定所检测疫苗中是否存在禽白血病病毒污染。鉴于鸡马立克氏病毒活疫苗、鸡新城疫病毒活疫苗、鸡痘病毒活疫苗、鸡传染性法氏囊病毒活疫苗等接种CEF后均可造成细胞病变（CPE），导致禽白血病病毒在细胞上复制受到干扰，为此对不同的疫苗需要进行一定的预处理。

###### D.1.2 不同样品的处理与接种

###### D.1.2.1 样品的处理

D.1.2.1.1 含鸡新城疫病毒（低毒力弱毒株）的制品通常按照如下程序进行：取0.8 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。

D.1.2.1.2 含鸡马立克氏病细胞结毒的制品通常按照如下程序进行：取1 000（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15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。

D.1.2.1.3 含鸡马立克氏病火鸡疱疹病毒的制品通常按照如下程序进行：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上清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。

D.1.2.1.4 含鸡痘病毒的制品通常按照如下程序进行检测：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。

D.1.2.1.5 含鸡传染性法氏囊病病毒的制品通常按照如下程序进行：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；取滤液2.0 mL上清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。

D.1.2.1.6 含禽脑脊髓炎病毒的制品通常按照如下程序进行：取稀释的疫苗2.0 mL，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。

D.1.2.1.7 鸡传染性支气管炎病毒和传染性喉气管炎病毒的制品通常按照如下程序进行：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。

D.1.2.1.8 含呼肠孤病毒的制品通常按照如下程序进行：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；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。

D.1.2.1.9 含重组病毒的活疫苗按疫苗载体病毒方法进行处理。

D.1.2.1.10 细胞液样品通常按照如下程序进行：取最后的细胞悬液5.0 mL，反复冻融3次；5 000 *g*离心10分钟，取上清液用于接种CEF

#### D.1.2.2 接种与培养

处理好的样品接种2个25cm<sup>2</sup>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。同时设立接种RAV<sub>1</sub>和RAV<sub>2</sub> 0.5mL的病毒对照组，以及正常细胞对照组。

#### D.1.3 细胞培养的传代与处理

待细胞培养5~7日后，按常规方法消化、收获细胞，将其中1/2细胞，置-60℃以下作检验用（P<sub>1</sub>），其余细胞分散到2个瓶中。培养5~7日后，按同样方法收获细胞，留样（P<sub>2</sub>）。如此继续传第3代，收获（P<sub>3</sub>）。所有对照组按相同方法处理。

将P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、P<sub>3</sub>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，取上清液用于禽白血病病毒检测。

#### D.2 接种SPF鸡检查法

按照疫苗说明书，将待检测疫苗接种规定日龄的SPF鸡一定时间后（通常为42 d），使用禽白血病A/B亚群和J亚群的ELISA抗体检测试剂盒，分别检测血清中相应抗体，据此判断待检测疫苗是否存在外源性禽白血病病毒污染。使用该方法检测弱毒疫苗中禽白血病病毒污染需要注意：一是避免免疫耐受性感染，慎用低日龄SPF鸡；二是要确保试剂盒质量可靠，排除抗体检测ELISA试剂盒假阳性结果的影响；三是每个疫苗应接种10只以上SPF鸡，用以消除鸡对禽白血病病毒易感性的个体差异影响。