

# 《禽白血病病毒抗原磁微粒化学发光检测方法》编制

## 说明

### 一、工作简况

#### (一) 任务来源

禽白血病(Avian Leukosis, AL)是由禽白血病病毒(Avian Leukosis Virus, ALV)感染鸡群引起的一种瘤性传染性疾病。先天性感染 ALV 的耐受鸡是危害最大的传染源。感染 ALV 的病鸡表现为多发性肿瘤、体重增长缓慢、产蛋下降、蛋畸形以及孵化率低等临床症状,对我国养禽业造成严重危害,被列为我国三类动物疫病。ALV 目前尚无商品化疫苗,其防治主要以净化为主,经过多年的检测和净化,ALV 的流行在我国白羽肉鸡和蛋鸡中已获有效控制,但在黄羽肉鸡与地方品种鸡中仍持续蔓延。ALV 的净化主要依赖血清学方法检测,建立检测 ALV 准确高效的血清学方法对于 ALV 的监测和净化具有重要的意义。

现有抗体检测方法包括酶联免疫吸附试验(ELISA)、抗原免疫胶体金试纸卡检测、IFA 检测等,普遍存在检测周期较长、灵敏度有限、易发生交叉反应等问题,并且对检测设备与操作人员的技术水平有较高要求,检测成本相对较高,同时还容易因污染而产生假阳性结果,在实际应用中存在一定的局限性。因此,建立科学快速有效的检测方法才能正确诊断和有效遏制禽白血病的流行。

#### (二) 起草单位

本文件起草单位为河北省动物疫病预防控制中心、天津测易生物科技有限公司、秦皇岛市动物疫病预防控制中心、沧州市动物疫病预防控制中心、衡水市动物疫病预防控制中心、唐山市动物疫病预防控制中心、保定市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人为马宏伟、张承礼、王振来、赵梦琳、刘亚伟、梁稼焯、顾文源、倪志广、杨卫军、麻润雯、刘博、常丽、岳家宝、王童、曹源、袁方、王小月、孙月川、陈彦丽、苏晓梅、许玲涵、杨海娟、吴志国、陈锡俊、孙伟珊、

赵秀英、曹琪、董建伟。

陈锡俊、孙伟珊（天津测易生物科技有限公司）：主持和制订定标准全面工作、任务分工及联系标准意见征求和技术复核专家与单位。赵秀英、曹琪和董建伟（天津测易生物科技有限公司）：负责实验设计方案与验证方案制订、标准初稿的起草与征求意见后的修订；马宏伟、王振来、赵梦琳、刘亚伟、梁稼焯、顾文源、倪志广、麻润雯（河北省动物疫病预防控制中心）：负责实验材料的准备，参与技术标准化、标准初稿修订和负责征求意见后的修改等工作；杨卫军、常丽、岳家宝、王童、许玲涵、杨海娟（秦皇岛市动物疫病预防控制中心）：负责标准背景资料收集、试验结果统计分析；张承礼、苏晓梅、吴志国（沧州市动物疫病预防控制中心）：负责实验方法的建立以及优化；刘博、曹源、袁方（衡水市动物疫病预防控制中心）：负责特异性、敏感性、重复性试验等实验室操作；王小月、孙月川、陈彦丽（唐山市动物疫病预防控制中心）：负责临床样品采集、筛选与处理；刘泽霖、严博悦、赵研、刘志昌、霍宏宇、李晓琳（保定市动物疫病预防控制中心）：负责验证实验的组织汇总和征集意见的组织安排工作。

### （三）主要工作过程

#### 1. 预研阶段

在天津测易生物科技有限公司发起的禽白血病毒抗体磁微粒化学发光检测试剂盒研发项目的资助下，开展禽白血病毒抗原磁微粒化学发光检测方法标准的起草工作。

首先成立了标准起草技术专家组，研讨标准框架、内容以及涉及的技术方法；其次根据项目任务书的要求，按照技术专家组研究确定的标准起草内容，组织相关技术领域专家，成立标准起草编制工作组，编制工作组根据要求和制定的方案，开展本标准制定工作并按照制订的时间进度表组织实施。

#### 2. 起草阶段

标准起草编制工作组对现有的文献和标准技术库的相关材料进行了查阅和梳理，明确了现有禽白血病毒检测方法技术，这些技术资料主要有两类：（1）国内相关诊断技术标准、规范、法律、法规等，包括《禽白血病毒诊断技术》（GB/T 26436-2025）等；（2）诊断技术研发资料，如酶联免疫吸附试验（ELISA）、

抗原免疫胶体金试纸卡检测、IFA 检测等中、外文文章、专利等资料；

标准起草编制工作组成员结合自身实验室前期研究成果根据上述技术资料并按照标准撰写资料，如 GB/T1.1-2020《标准化工作导则第 1 部分：标准的结构和编写》和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》的要求完成《禽白血病病毒抗原磁微粒化学发光检测方法》初稿的撰写。

3. 征求意见阶段
4. 审查阶段（未经审查的不写本部分）
5. 报批阶段（未报批的不写本部分）

## 二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

### （一）标准的编写原则

1. 政策性原则：本标准编写过程遵循国家相关法律、法规和国家标准。
2. 先进性原则：以国内外相关文献资料为参考，力求反映该领域最新的科技成果。以国内同类标准制订编写方法为基础，对本标准进行规范、充实和创新，使之具有先进性。
3. 经济性原则：在本标准编制过程，从获取信息、起草、实验室及试验验证到形成征求意见稿的各个环节，在确保质量的前提下力行节约，利用有限的经费圆满完成各阶段工作。
4. 适用性原则：标准借鉴国内外禽白血病诊断技术和磁微粒化学发光方法，并经实验室与应用验证，且完全按照国家标准的要求编写，内容全面，形式规范，可操作和实用性强。
5. 协调统一性原则：本标准参照国内相关标准的编写形式和表达方法，力求与国内相关标准的协调统一。
6. 规范化原则：本标准是严格按照 GB/T 1.1-2020 和 GB/T 20001.4-2015 的要求来编写。

### （二）提出本标准的依据

本标准依据起草单位科研成果、参考有关文献资料，同时通过实验室研究验证并参考其他资料后经验证提出。

本文件规定了禽白血病病毒抗原磁微粒化学发光检测方法的试剂、仪器设备、耗材、操作步骤、结果判定。

本文件适用于磁微粒化学发光法检测血清、蛋清、泄殖腔拭子、胎粪等样品中禽白血病病毒抗原。

### **（三）制定本标准的基础**

本项目起草人员为中国动物疫病预防控制岗位专家，本项目起草负责人所在实验室从事禽类疫病研究已达 20 余年，完成了多项省部级科研项目。系统开展了禽白血病的病原学与流行病学、诊断、防控技术等研究，发表多篇相关研究论文，因此在禽白血病病原检测与防控技术方面有雄厚的研究工作基础。同时本项目起草工作组依托河北省动物疫病预防控制中心检测实验室，联合秦皇岛市动物疫病预防控制中心、沧州市动物疫病预防控制中心、衡水市动物疫病预防控制中心、唐山市动物疫病预防控制中心等多家省市级动物疫病预防控制中心共同研究。具有良好的实验设备，具备制定本标准的技术水平与实力。

### **（四）实验内容**

本标准根据现有禽白血病病毒检测方法的国内标准并结合相关文献等技术资料，提出了一种利用磁微粒化学发光技术结合免疫法检测禽白血病病毒抗原的方法。

### **（五）实际应用效果**

采用本标准磁微粒化学发光抗体检测方法，检测实验室采集到的不同地区的 184 份临床样品进行试验，与国标 ELISA 检测方法对比，两个方法的 Kappa 值为 0.96，说明两种方法的符合率较高。

**三、主要试验或验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果**

## （一）主要试验或验证的分析

本标准中禽白血病病毒抗原磁微粒化学发光检测方法，主要内容是通过对禽类血清、蛋清、泄殖腔拭子、胎粪等样品中禽白血病病毒抗原效价的检测，以达到监测禽类群体免疫水平的目的。

### 1 材料

#### 1.1 试剂和材料

##### 1.1.1 反应杯。

1.1.2 新城疫病毒（NDV）阳性血清样品、禽流感病毒（AIV）阳性血清样品、鸡传染性法氏囊病毒（IBDV）阳性血清样品、禽腺病毒（FAV）阳性血清样品、鸡病毒性肝炎（DHV）阳性血清样品与禽白血病病毒阳性血清样品、禽白血病病毒阴性血清样品。

##### 1.1.3 预激发液和激发液。

1.1.4 禽白血病病毒抗原磁微粒化学发光检测配套试剂盒（天津测易生物科技有限公司）

##### 1.1.5 IDEXX 禽白血病抗原检测试剂盒。

##### 1.1.6 20×清洗液

#### 1.2 仪器和设备

##### 1.2.1 全自动化学发光免疫分析仪 CY-198

##### 1.2.2 生物安全柜

##### 1.2.3 离心机（8000 rpm）

##### 1.2.4 电子天平

1.2.5 可调单道移液器（0.1 μL ~ 2.5 μL, 2 μL ~ 20 μL, 20 μL ~ 200 μL, 100 μL ~ 1000 μL）

##### 1.2.6 冰箱

### 2 方法

#### 2.1 样品的采集及运输

样品采集按照 NY/T 541 进行。采集静脉血后，将血样室温下倾斜 30° 静置 2 h ~ 4 h，待血液凝固有血清析出时，无菌剥离凝血块，然后置 2℃ 冰箱过夜，待大部分血清析出后即可取出血清，必要时可低速离心（1000 g 离心 10 min ~ 15

min) 分离出血清。采集的血清样品在无法于 12h 内送检的情况下, 应放于-20℃ 冻存。

血清样本运输时应注意 2℃ ~ 8℃ 冷藏。

样品检测前 8000 rpm 离心 2 min, 取上清放于 1.5 mL 尖底离心管中, 体积应大于 300 μL, 待检; 若样品中存在沉淀或絮状物等杂质, 应离心去除杂质, 轻柔操作, 避免出现泡沫。

## 2.2 溶液配制

洗涤液: 将 20×浓缩洗液用无离子水或蒸馏水 1:20 倍稀释, 装入洗涤液桶。

去离子水或蒸馏水均应符合 GB/T 6682 的要求。

## 2.3 ROC 曲线拟合

用本研究建立的禽白血病病毒抗原磁微粒化学发光检测方法检测 199 份病毒抗体阳性血清样品, 50 份病毒抗体阴性血清 (IDEXX 禽白血病抗原检测试剂盒检测确定), 检测结果按照  $PI \text{ 值} = (\text{样本发光值} / \text{阴性对照发光值}) \times 100\%$  进行计算。用 SPSS 26.0 软件绘制 ROC 曲线, 以 Youden 指数最大时对应的 PI 值作为临界值。

## 2.4 重复性测试

选取 3 份禽类血清样品(由 IDEXX 禽白血病抗原检测试剂盒检测确定的 2 份 ALV 抗体阳性血清样品和 1 份 ALV 抗体阴性血清样品), 进行重复 20 次检测, 根据血清样品的发光值分析计算变异系数。

## 2.5 敏感性试验

分别采用 IDEXX 禽白血病抗原检测试剂盒和禽白血病病毒抗原磁微粒化学发光检测方法, 对已知背景的 30 份临床血清样品进行检测, 统计本方法对临床血清样品的检出率, 并与 IDEXX 禽白血病抗原检测试剂盒检测结果进行对比。

## 2.6 特异性试验

按照本方法检测已知禽白血病病毒抗原阴性的新城疫病毒（NDV）阳性血清样品 5 份、禽流感病毒(AIV)阳性血清样品 5 份、鸡传染性法氏囊病毒(IBDV)阳性血清样品 5 份、禽腺病毒(FAdV)阳性血清样品 5 份、鸡病毒性肝炎(DHV) 5 份，共 25 份特异性血清临床样本。

## 2.7 临床样品检测

分别采用 IDEXX 禽白血病抗原检测试剂盒和禽白血病病毒抗原磁微粒化学发光检测方法同时检测 249 份临床采集的样品，统计结果，比较二者的检测结果，并计算两种方法的符合率。

## 3 结果

### 3.1 阴阳性判定标准的建立

用本研究建立的禽白血病病毒抗原磁微粒化学发光检测方法检测 199 份病毒抗体阳性血清样品，50 份病毒抗体阴性血清（IDEXX 禽白血病抗原检测试剂盒检测确定），检测结果按照  $PI \text{ 值} = (\text{样本发光值} / \text{阴性对照发光值}) \times 100\%$  进行计算。用 SPSS 26.0 软件绘制 ROC 曲线，以 Youden 指数最大时对应的 PI 值作为临界值。当 PI 值为 20.09%时，Youden 指数最大时为 0.99，ROC 曲线下面积（AUC）为 0.999，显著性水平（面积=0.5） $P = 0.001$ 。结果如图 1 显示。即定义 PI 值  $\geq 20\%$  时，判为 ALV 抗体阳性；PI 值  $< 20\%$  时，判为 ALV 抗体阴性。

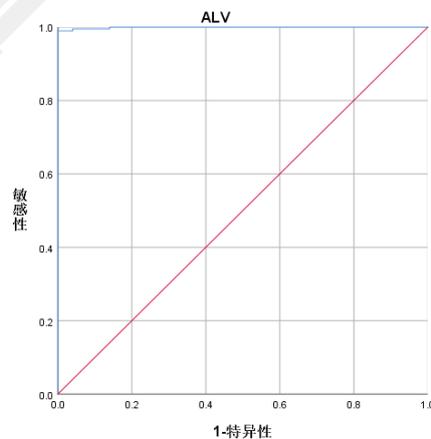


图 1. ALV 抗原检测 ROC 曲线

### 3.2 重复性实验结果

选取 3 份禽类血清样品(由 IDEXX 禽白血病抗原检测试剂盒检测确定的 2 份 ALV 抗体阳性血清样品和 1 份 ALV 抗体阴性血清样品), 进行重复 20 次检测, 结果表明禽白血病病毒抗原磁微粒化学发光检测方法稳定性符合预期, CV 值均小于 5%。如表 1 所示。

表 1. 重复性检测结果

样品名称	重复次数	发光值	PI 值	平均值	标准差	变异系数
阳性样品 1	1	241357	26.45%	27.40%	0.85%	3.11%
	2	259842	28.47%			
	3	248763	27.26%			
	4	257918	28.26%			
	5	238469	26.13%			
	6	255621	28.01%			
	7	260934	28.59%			
	8	239875	26.29%			
	9	253149	27.74%			
	10	243682	26.70%			
	11	249215	27.31%			
	12	258746	28.35%			
	13	240718	26.38%			
	14	261359	28.64%			
	15	245937	26.95%			
	16	248951	27.28%			
	17	237642	26.04%			
	18	256893	28.15%			
	19	247219	27.09%			
	20	254386	27.88%			
阳性样品 2	1	556328	60.96%	63.87%	2.84%	4.44%
	2	615497	67.45%			
	3	587219	64.35%			
	4	608934	66.73%			
	5	542716	59.47%			
	6	599348	65.68%			
	7	618253	67.75%			
	8	547962	60.05%			
	9	593175	65.00%			
	10	562843	61.68%			
	11	579861	63.54%			
	12	612789	67.15%			
	13	551483	60.43%			
	14	619507	67.89%			
	15	568924	62.34%			
	16	577359	63.27%			
	17	540138	59.19%			

样品名称	重复次数	发光值	PI 值	平均值	标准差	变异系数
	18	605427	66.34%			
	19	573216	62.81%			
	20	596841	65.40%			
阴性样品	1	48923	5.36%	5.51%	0.16%	2.86%
	2	51876	5.68%			
	3	49651	5.44%			
	4	52349	5.74%			
	5	47892	5.25%			
	6	50987	5.59%			
	7	52103	5.71%			
	8	48356	5.30%			
	9	51429	5.64%			
	10	49178	5.39%			
	11	50564	5.54%			
	12	51732	5.67%			
	13	48765	5.34%			
	14	52501	5.75%			
	15	49327	5.41%			
	16	50219	5.50%			
	17	48105	5.27%			
	18	51284	5.62%			
	19	49876	5.47%			
	20	50831	5.57%			
阳性对照发光值均值				912568		
阴性对照发光值均值				71843		

### 3.3 敏感性试验结果

分别采用 IDEXX 禽白血病抗原检测试剂盒和禽白血病病毒抗原磁微粒化学发光检测方法，对已知背景的 30 份临床血清样品进行检测。结果显示禽白血病病毒抗原磁微粒化学发光检测方法对临床样品的阳性检出率为 100%，与 IDEXX 禽白血病抗原检测试剂盒检测结果一致。结果如表 2 所示。

表 2. 敏感性试验结果

样品编号	ELISA	禽白血病病毒抗体磁微粒化学发光检测		
	结果	发光值	PI 值	结果
1	-	128494	13.13%	-
2	-	57273	5.85%	-
3	+	241985	24.73%	+
4	-	103366	10.57%	-
5	+	487634	49.84%	+
6	-	94067	9.61%	-
7	+	483167	49.39%	+
8	-	145324	14.85%	-

样品编号	ELISA	禽白血病毒抗体磁微粒化学发光检测		
	结果	发光值	PI 值	结果
9	-	150905	15.42%	-
10	+	208836	21.35%	+
11	+	255217	26.09%	+
12	+	219298	22.42%	+
13	+	239831	24.51%	+
14	+	208598	21.32%	+
15	+	335253	34.27%	+
16	-	150176	15.35%	-
17	-	162010	16.56%	-
18	-	70820	7.24%	-
19	+	250740	25.63%	+
20	-	78620	8.04%	-
21	-	130230	13.31%	-
22	-	152366	15.57%	-
23	-	152040	15.54%	-
24	-	75756	7.74%	-
25	-	170207	17.40%	-
26	-	113812	11.63%	-
27	+	263889	26.97%	+
28	+	246870	25.23%	+
29	-	69512	7.11%	-
30	-	27977	2.86%	-
		阳性对照发光值均值	978342	
		阴性对照发光值均值	68572	

### 3.4 特异性试验结果

通过本方法对新城疫病毒（NDV）阳性血清样品 5 份、禽流感病毒（AIV）阳性血清样品 5 份、鸡传染性法氏囊病毒（IBDV）阳性血清样品 5 份、禽腺病毒（FAvV）阳性血清样品 5 份、鸡病毒性肝炎（DHV）5 份，共 25 份特异性血清临床样本进行检测，检测结果均为阴性，表明该方法具有良好的特异性，特异性符合率 100%。结果如表 3 所示。

表 3. 25 份血清临床样品特异性试验结果

样品类型	样品编号	发光值	PI 值	结果
NDV 阳性血清	1	509807	54.52%	-
	2	467893	50.04%	-
	3	401250	42.91%	-
	4	522415	55.87%	-
	5	419070	44.81%	-
AIV 阳性血清	1	620457	66.35%	-
	2	590863	63.19%	-
	3	697864	74.63%	-

样品类型	样品编号	发光值	PI 值	结果	
IBDV 阳性血清	4	719563	76.95%	-	
	5	705138	75.41%	-	
	1	827283	88.47%	-	
	2	894490	95.65%	-	
	3	904518	96.73%	-	
	4	908343	97.14%	-	
	5	836837	89.49%	-	
	FAdV 阳性血清	1	617771	66.06%	-
		2	826142	88.35%	-
		3	700810	74.94%	-
4		788162	84.28%	-	
5		748963	80.09%	-	
DHV 阳性血清	1	772439	82.60%	-	
	2	596246	63.76%	-	
	3	672648	71.93%	-	
	4	885730	94.72%	-	
	5	928082	99.25%	-	
阳性对照发光值均值		935127			
阴性对照发光值均值		72936			

### 3.5 临床样品检测结果

用 IDEXX 禽白血病抗原检测试剂盒和禽白血病病毒抗原磁微粒化学发光检测方法同时检测 249 份临床采集的样品，统计结果，比较二者的检测结果，并计算两种方法的符合率。结果发现两个方法的 Kappa 值为 0.96，说明两种方法的符合率较高。结果如表 4 所示。

表 4. 249 份血清临床样品比对试验结果

		禽白血病病毒抗体磁微粒化学发光检测		
		阳性	阴性	合计
ELISA	阳性	117	2	119
	阴性	3	127	130
	合计	120	129	249
Kappa 值		0.96		

注:0<Kappa≤0.40,一致性较差;0.40<Kappa<0.75,中度一致性;Kappa≥0.75,高度一致性

## （二）预期的经济效果

禽白血病对我国养殖业造成巨大经济损失。本标准制定的禽白血病病毒抗原磁微粒化学发光检测方法单样本检测成本仅 10-20 元，全流程自动化检测仅需 15 分钟，较传统 ELISA（2 小时）效率提升 8-16 倍。能通过早期精准识别疫情，降低禽类大规模染病死亡风险，减少养殖户经济损失，降低防控成本，从整体上提升养禽类业经济效益。

## （三）真实性验证

送审前，将本检测方法送至三家有资质实验室进行验证。

## 四、采用国际标准和国外先进标准的程度

通过联网检索，未发现禽白血病病毒抗体磁微粒化学发光检测的标准。国内现行的关于禽白血病病原诊断的国家标准、地方标准、行业标准以及团体标准的制定采用的检测方法是 ELISA 抗体检测法、病毒细胞培养分离检测、RT-PCR 方法、实时荧光 RT-PCR 方法和 LAMP 检测方法，均不包含本标准制定的磁微粒化学发光抗体检测方法，所以本标准与国内相关标准无关。

本标准在制定过程中，充分考虑了畜牧业健康发展的市场需求，标准的技术指标合理、先进。

## 五、与现行的法律、法规和强制性国家标准的关系

该项目遵循国内现行法律法规，与国家标准、行业标准无冲突和交叉。

## 六、重大分歧意见的处理经过和依据

无

七、标准性质（强制性，推荐性）的建议，特别是对建议批为强制性标准的理由应充分说明

建议将本标准批为推荐性标准。

八、贯彻标准的要求和建议措施（组织实施、技术措施、过渡办法等）

## （一）组织实施

标准发布后,为了有效贯彻实施,建议中国兽医协会有关部门确定培训对象,对有关技术人员进行相关技术强化操作培训。

## **(二) 技术措施**

标准发布后,为了有效贯彻实施,建议以培训班的形式在不同层次、不同水平的应用单位推广本标准。

## **(三) 实施办法**

(1) 本标准的实施,可由起草单位负责指导、培训,确保相关防治技术得到预期效果。

(2) 标准起草单位,应注意搜集、跟踪、整理标准实施过程的反馈信息,以利于标准的完善和提高。

### **九、废止现行有关标准的建议:**

无

### **十、其他应予说明的事项。**

无

### **十一、标准中涉及专利的情况说明**

无