



中华人民共和国国家标准

GB/T 36873—2018

原种鸡群禽白血病净化检测规程

Code of practice for detection of avian leukosis infection in chicken pedigree
breeder flock

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:山东农业大学、中国动物卫生与流行病学中心、安徽科技学院、扬州大学、华南农业大学。

本标准主要起草人:赵鹏、崔治中、李卫华、张训海、秦爱建、叶建强、曹伟胜。

原种鸡群禽白血病净化检测规程

1 范围

本标准规定了原种鸡群禽白血病净化检测规程。
本标准适用于原种鸡群实施针对禽白血病的净化。

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 26436—2010 禽白血病诊断技术
NY/T 680—2003 禽白血病病毒 p27 抗原酶联免疫吸附试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

原种鸡群 pedigree breeder flock
进行选育种的原始禽群。

3.2

动物疫病净化 animal disease eradication
在一个养殖场或指定区域内,通过持续检测和监测发现患病动物或带毒动物,并通过淘汰带毒动物以实现根除某种动物疫病的过程。

4 检测规程

4.1 出壳雏鸡胎粪的检测与淘汰

4.1.1 样品的收集

在灭菌的 1.5 mL 离心管中每管预先放入 0.5 mL 灭菌的磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4)(PBS 配制操作规范见附录 A),或采用符合 NY/T 680—2003 的商品化试剂盒专用稀释液,将离心管对准鸡肛门处轻轻按压雏鸡腹部将胎粪挤入 1.5 mL 离心管中。

4.1.2 样品的处理与检测

将装有胎粪的 1.5 mL 离心管在涡旋震荡仪上充分震荡混匀,然后放于液氮中迅速冷冻,冷冻 2 min 后取出置于 37 ℃ 水浴锅中融化,然后将离心管在涡旋震荡仪上再次充分震荡混匀。如此反复冻融两次后将离心管置于台式离心机中,12 000 g 离心 1 min,离心后取上清,应按照 NY/T 680—2003 或采用符合 NY/T 680—2003 的商品化试剂盒检测胎粪中禽白血病病毒 p27 抗原。

4.1.3 检测后的处理

同一只(羽)母鸡所产的雏鸡中,只要有一只雏鸡胎粪检测为禽白血病病毒 p27 抗原阳性则该纸袋中所有同胞雏鸡及其对应母鸡均视为禽白血病病毒阳性,阳性鸡不再列为育种选育个体,应淘汰做无害化处理。阴性鸡立即运送至育雏舍中饲养。

4.1.4 出壳期间注意事项

出壳期间操作注意事项参见附录 B。

4.2 育雏后期的检测与淘汰

4.2.1 鸡群全血病毒分离

在育雏结束前 10 d 左右,对按照育种标准选定的雏鸡逐一无菌采集抗凝血,应按照 GB/T 26436—2010 接种 DF-1 细胞进行病毒分离,培养 7 d~9 d 后取细胞上清,应按照 NY/T 680—2003 或采用符合 NY/T 680—2003 的商品化试剂盒检测细胞上清中禽白血病病毒 p27 抗原,若禽白血病病毒 p27 抗原为阳性则判定该雏鸡为禽白血病病毒阳性鸡(全血病毒分离操作规范见附录 C)。

4.2.2 检测后的处理

经病毒分离为阳性的雏鸡不再列为育种选育个体,应淘汰做无害化处理。对检测为阴性的选留后备种鸡应维持小群饲养或单笼饲养。

4.2.3 育雏期间注意事项

育雏期间操作注意事项参见附录 D。

4.3 开产初期的检测与淘汰

4.3.1 母鸡的检测

每只(羽)母鸡逐一无菌采集抗凝血,应按照 GB/T 26436—2010 接种 DF-1 细胞进行病毒分离,培养 7 d~9 d 后取细胞上清,应按照 NY/T 680—2003 或采用符合 NY/T 680—2003 的商品化试剂盒检测细胞上清中禽白血病病毒 p27 抗原,若禽白血病病毒 p27 抗原为阳性则判定该母鸡为禽白血病病毒阳性鸡(全血病毒分离操作规范见附录 C)。

4.3.2 公鸡的检测

每只(羽)公鸡逐一无菌采集抗凝血,应按照 GB/T 26436—2010 接种 DF-1 细胞进行病毒分离,培养 7 d~9 d 后取细胞上清,应按照 NY/T 680—2003 或采用符合 NY/T 680—2003 的商品化试剂盒检测细胞上清中禽白血病病毒 p27 抗原,若禽白血病病毒 p27 抗原为阳性则判定该公鸡为禽白血病病毒阳性鸡(全血病毒分离操作规范见附录 C)。同时对每只(羽)公鸡逐一采集新鲜精液接种 DF-1 细胞进行病毒分离(公鸡精液病毒分离操作规范见附录 E),公鸡的血浆和精液任何一方检测结果为阳性即判定该公鸡为禽白血病病毒阳性鸡。

4.3.3 检测后的处理

经病毒分离为禽白血病病毒阳性种鸡不再列为育种选育个体,应淘汰做无害化处理。对检测为阴性的选留后备种鸡维持单笼饲养。

4.4 留种前的检测与淘汰

4.4.1 母鸡的检测

每只(羽)母鸡逐一无菌采集抗凝血,应按照 GB/T 26436—2010 接种 DF-1 细胞进行病毒分离,培养 7 d~9 d 后取细胞上清,应按照 NY/T 680—2003 或采用符合 NY/T 680—2003 的商品化试剂盒检测细胞上清中禽白血病病毒 p27 抗原,若禽白血病病毒 p27 抗原为阳性则判定该母鸡为禽白血病病毒阳性鸡(全血病毒分离操作规范见附录 C)。

4.4.2 公鸡的检测

每只(羽)公鸡逐一无菌采集抗凝血,应按照 GB/T 26436—2010 接种 DF-1 细胞进行病毒分离,培养 7 d~9 d 后取细胞上清,应按照 NY/T 680—2003 或采用符合 NY/T 680—2003 的商品化试剂盒检测细胞上清中禽白血病病毒 p27 抗原,若禽白血病病毒 p27 抗原为阳性则判定该公鸡为禽白血病病毒阳性鸡(全血病毒分离操作规范见附录 C)。同时对每只(羽)公鸡逐一采集新鲜精液接种 DF-1 细胞进行病毒分离(公鸡精液病毒分离操作规范见附录 E),公鸡的血浆和精液任何一方检测结果为阳性即判定该公鸡为禽白血病病毒阳性鸡。

4.4.3 检测后的处理

经病毒分离为禽白血病病毒阳性种鸡不再列为育种选育个体,应淘汰做无害化处理。对检测为阴性的选留后备种鸡维持单笼饲养。

4.5 种蛋的选留和孵化

按照 4.1~4.4 所列检测规程淘汰阳性鸡后,每只阴性母鸡仅选用来源于 1 只阴性公鸡的精液进行人工授精。母鸡所产种蛋均一一标号并与母鸡编号对应,将来自于同一只母鸡的种蛋置于带有母鸡编号的孵化纸袋或纸盒中,放入已消毒的孵化器中孵化(孵化期间操作注意事项参见附录 F)。

4.6 不同世代的持续检测与净化

按照 4.1~4.5 检测规程净化后孵出的雏鸡作为净化后第二世代鸡,继续按照 4.1~4.5 检测规程实施第二世代的检测和净化,后续世代按此检测规程继续循环进行。

5 净化周期启动与终止

5.1 检测节点的选择

可根据原种鸡群所处时期对照 4.1~4.5 任何一个时间节点启动净化程序,不同原种鸡场可根据其技术条件选择 4.1~4.5 的部分检测程序进行检测,但按照 4.1~4.5 所有检测程序进行全面检测可有效缩短净化周期。

5.2 净化效果评估

首先随机选取 500 枚种蛋取蛋清,应按照 NY/T 680—2003 或采用符合 NY/T 680—2003 的商品化试剂盒检测蛋清中禽白血病病毒 p27 抗原,若禽白血病病毒 p27 抗原全部为阴性则判定为达到禽白血病净化状态,若阳性率高于 1% 则判定为未达到净化状态,若阳性率介于 0~1% 则需要对原种鸡群单系随机选取 50 只(羽)鸡开展病毒分离进行复核检测,若病毒分离全部为阴性则判定为达到禽白血病净化状态,若病毒分离出现阳性则判定为未达到禽白血病净化状态。

5.3 实现净化后检测比例的调整

按照 5.2 所列要求判定达到禽白血病净化状态的原种鸡群建议无需再按照 4.1~4.5 全部检测程序进行普遍性检测,转为按照不低于 10%的比例进行抽样检测,如抽样检测结果不符合 5.2 所列要求,则按照 4.1~4.5 推荐的净化检测规程重新实施净化。

6 净化过程中注意事项

6.1 种禽场生物安全

- 6.1.1 原种鸡群应有相对隔离的地理位置,要远离其他鸡群。
- 6.1.2 应执行全进全出制度,原种鸡群需要物品和人员与外界的交流程度越低越好。
- 6.1.3 原种鸡群工作人员应固定化,避免其他鸡群的饲养员进入正在实施净化的原种鸡群中工作。
- 6.1.4 运送物品的车辆进出时以及人员出入均应执行消毒制度。
- 6.1.5 原种鸡群应在鸡舍设立严密而有效的防鸟网或其他防鸟措施,并定期检查防鸟网或其他防鸟措施的维护状况和应用效果。

6.2 弱毒疫苗的使用

正在实施和已经实现禽白血病净化的原种鸡群应确保所有使用的弱毒疫苗无外源性禽白血病毒等外源病毒污染,原种鸡群饲养企业需购买检测合格的市售商品化弱毒疫苗,购买疫苗时向生物制品企业索取该批次产品的检测报告并保留疫苗样品备查。

附 录 A
(规范性附录)

磷酸缓冲盐溶液(PBS,pH 7.4)配制操作规范

A.1 在 800 mL 蒸馏水中分别加入无水 NaCl 8 g,无水 KCl 0.2 g,无水 KH_2PO_4 0.27 g,无水 Na_2HPO_4 1.42 g,搅拌使其充分溶解。

A.2 用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4,加蒸馏水定容至 1 L,高压蒸汽灭菌后置于室温保存。

附 录 B
(资料性附录)
出壳期间操作注意事项

- B.1** 为避免交叉污染,对一只(羽)母鸡所产雏鸡采集完胎粪后,要进行彻底洗手消毒或更换一次性手套后方可采集下一只(羽)母鸡所产雏鸡的胎粪。
- B.2** 检测为阴性的雏鸡需在最短时间内运送至育雏舍中,同一母鸡所产雏鸡在运送过程中仍在同一运输箱内运输。
- B.3** 出壳后 1 日龄注射的鸡马立克氏病弱毒疫苗等应为经过检测的不含有外源病毒污染的合格商品化疫苗。



附 录 C
(规范性附录)
全血病毒分离操作规范

C.1 DF-1 细胞的培养

C.1.1 DF-1 细胞的生长液为含有 10% 胎牛血清的改良 Eagle 培养基(DMEM,pH 7.2),维持液为含有 1%胎牛血清的 DMEM。

C.1.2 为确保 DF-1 细胞保持良好生长状态,将 DF-1 细胞传代控制在 50 代以内。

C.1.3 应定期检测 DF-1 细胞的纯净性特别是其中是否含有禽白血病病毒污染,每次传代时以及接种样品前取细胞培养上清,应按照 NY/T 680—2003 或采用符合 NY/T 680—2003 的商品化试剂盒检测细胞上清中禽白血病病毒 p27 抗原。

C.1.4 经浓度为 0.25% 的胰酶消化后,将 DF-1 细胞接种至一次性 24 孔细胞培养板中,每培养板接种 DF-1 细胞量约 10^6 个,接种后将细胞培养板置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,待细胞贴壁并铺满细胞孔约 80%~90%时接种样品。

C.2 抗凝血的采集与接种

C.2.1 配置浓度为 5 mg/mL 的肝素钠溶液并以一次性滤器过滤除菌,作为抗凝剂备用。

C.2.2 将一次性注射器在超净工作台或生物安全柜内吸取抗凝剂,抗凝剂在全血中比例为 20%。也可采用一次性抗凝采血管。

C.2.3 采集抗凝血后在超净工作台或生物安全柜内将全血注入 1.5 mL 灭菌离心管中,5 000 g 离心 3 min。

C.2.4 取出 24 孔细胞培养板,每孔取 80 μ L 血浆接种至 DF-1 细胞,每个细胞培养板中应保留一个孔不接种样品作为空白细胞对照。

C.3 细胞培养的维持与检测

C.3.1 将细胞培养板放入 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,样品吸附 2 h 后弃去所有上清并以灭菌的 PBS(0.01 mol/L,pH 7.4)洗涤细胞,然后每孔更换 500 μ L 细胞维持液,继续在 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

C.3.2 每天观察 DF-1 细胞状态,待培养 7 d~9 d 后取细胞上清,应按照 NY/T 680—2003 或采用符合 NY/T 680—2003 的商品化试剂盒检测细胞上清中禽白血病病毒 p27 抗原。

C.4 注意事项

C.4.1 抗凝剂浓度和用量应按照要求比例添加,避免因凝集导致 DF-1 细胞脱落。

C.4.2 采集抗凝血时应注意无菌操作,以免导致 DF-1 细胞污染。

C.4.3 样品接种时 DF-1 细胞密度过大容易导致细胞过早老化脱落,造成培养时间不够。

C.4.4 在确保 DF-1 细胞不脱落的前提下延长培养时间有助于提高病毒分离率。

C.4.5 将 DF-1 细胞和上清同时冻融后再检测上清中禽白血病病毒 p27 抗原有助于提高病毒分离率。

附 录 D
(资料性附录)
育雏期间操作注意事项

- D.1** 将同一母鸡所产雏鸡置于同一笼中饲养,避免将不同母鸡所产雏鸡置于同一笼中。
- D.2** 不同笼之间以一次性纸板进行隔离以降低禽白血病水平传播概率,为便于清洗和消毒建议使用不锈钢板。
- D.3** 一次性纸板或不锈钢板的高度应超过该鸡群育雏结束时鸡的高度,确保育雏期间不同母鸡所产雏鸡之间不会发生直接接触。
- D.4** 群体规模较小的原种鸡群可使用实验动物专用隔离器进行单家系育雏。
- D.5** 为降低在疫苗免疫和采血过程中由注射器针头带来的水平传播,建议使用一次性注射器以避免不同鸡之间出现交叉感染。
- D.6** 育雏期间为禽白血病病毒易感期,所有使用的弱毒疫苗应为经过检测的不含有外源病毒污染的合格商品化疫苗。



附 录 E
(规范性附录)
公鸡精液病毒分离操作规范

E.1 DF-1 细胞的培养

同 C.1 操作。

E.2 精液的采集与接种

E.2.1 在每个 1.5 mL 灭菌离心管中加入含有青霉素和链霉素各 500 U/mL 的灭菌 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)溶液 150 μ L。

E.2.2 以 75%酒精棉对公鸡肛门进行清洗消毒,采集公鸡精液至已灭菌的采精杯中,以灭菌吸头吸取 50 μ L 精液至已装有稀释液的 1.5 mL 离心管中,将装有精液的 1.5 mL 离心管置于冰袋上运送至实验室。

E.2.3 将装有精液的 1.5 mL 离心管置于低温离心机中离心,于 4 $^{\circ}$ C 5 000 g 离心 3 min,取 80 μ L~100 μ L 上清接种至 DF-1 细胞。

E.3 细胞培养的维持与检测

E.3.1 将细胞培养板放入 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养,样品吸附 2 h 后弃去所有上清并以灭菌的 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)洗涤细胞,然后每孔更换 500 μ L 细胞维持液,继续在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

E.3.2 每天观察 DF-1 细胞状态,待培养 7 d~9 d 后取细胞上清,应按照 NY/T 680—2003 或采用符合 NY/T 680—2003 的商品化试剂盒检测细胞上清中禽白血病病毒 p27 抗原。

E.4 注意事项

E.4.1 精液采集时间点建议为早上公鸡喂料前或空料 2 h 后,以最大程度减少粪便的污染。

E.4.2 采集精液应用广口容器,让精液流至容器内,避免容器口与公鸡接触以减少污染。

E.4.3 采集精液时所用器皿应需灭菌并注意消毒,以最大程度减少对 DF-1 细胞的污染。

E.4.4 每采集一只公鸡的精液后应进行手部消毒方可采集下一只公鸡的精液。

E.4.5 精液应保持新鲜,如采集后无法马上接种 DF-1 细胞可冻存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

E.4.6 样品接种时 DF-1 细胞密度过大容易导致细胞过早老化脱落,造成培养时间不够。

E.4.7 在确保 DF-1 细胞不脱落的前提下延长培养时间有助于提高病毒分离率。

E.4.8 将 DF-1 细胞和上清同时冻融后再检测上清中禽白血病病毒 p27 抗原有助于提高病毒分离率。

附 录 F
(资料性附录)

孵化期间操作注意事项

- F.1 待孵种蛋应做到专人专车运输,避免与其他种蛋发生交叉,种蛋进入孵化厅前应进行消毒。
- F.2 对实施净化的原种鸡群应使用独立的孵化厅、孵化机和出雏机,确保单品系入孵和单家系出雏。
- F.3 孵化过程中所有设备和工具用前应彻底冲洗消毒。
- F.4 为降低孵化期间的水平传播,将每只母鸡所产种蛋置于同一个出壳纸袋或纸盒中孵化。纸袋或纸盒体积按照不同品系雏鸡个体大小自行设计,以每个纸袋或纸盒容纳 7 只~10 只出壳雏鸡为佳;纸袋或纸盒上应设有一定数量通气孔,一般在 12 个左右。为避免纸袋或纸盒底部光滑导致雏鸡瘫痪,应在纸袋或纸盒底部加一层防滑纸垫。
- F.5 为防止由于通风不畅造成雏鸡窒息死亡,应加大通风。
-