

## 附件 2. 新增附录 禽腺病毒 III 群抗原/抗体间接免疫荧光检测法（标准草案）

### 禽腺病毒 III 群抗原/抗体间接免疫荧光检测法

#### 1 抗原检测

1.1 细胞培养 按附录 3504 制备鸡胚肝细胞（CEL），用含 10%胎牛血清的 M-199 培养液将细胞悬液稀释为 100~140 万个细胞/ml，接种 96 孔细胞培养板，每孔 0.1ml，置 37℃、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 24 小时。

1.2 样品接种与培养 当细胞板细胞长成良好单层，弃去 96 孔细胞板的细胞培养液，将待检样品作适宜稀释后接种到细胞孔，每个样品接种 4 孔，每孔 0.1ml。同时，将禽腺病毒 III 群适宜毒株用无血清 M-199 培养液稀释为 10~100TCID<sub>50</sub>/0.1ml，接种 4 孔，每孔 0.1ml，另设正常细胞对照 4 孔。接种后每孔补加含 4%胎牛血清的 M-199 培养液 0.1ml，置 37℃、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 96~144 小时。

#### 1.3 荧光染色

1.3.1 固定 弃去 96 孔板的细胞培养液，每孔加入 0.2ml PBS（0.1mol/L，pH 值 7.2~7.4，下同），轻洗细胞表面 1 次，尽量弃尽 PBS，每孔加入 0.2ml 冷甲醇，置室温固定 15~30 分钟，弃去甲醇，室温自然晾干 3~5 分钟。

1.3.2 加抗体 自然晾干后，用 PBS 轻洗细胞表面 1 次，然后每孔加入 0.1ml 用 PBS 适当稀释的禽腺病毒 III 群阳性血清，置 37℃作用 1 小时。

1.3.3 洗涤 弃去孔中液体，每孔加入 0.2ml 含 0.05%吐温-20 的 PBS，轻微振荡洗涤 1 分钟，弃去洗液，如此洗涤 3 次。

1.3.4 加荧光抗体 尽量弃尽洗液，每孔加入 0.1ml 用 PBS 适当稀释的 FITC 标记的抗鸡 IgG，置 37℃作用 1 小时。

1.3.5 洗涤 方法同 1.3.3。

1.4 观察 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光（波长 490nm）观察。禽腺病毒 III 群感染的 CEL 细胞呈现绿色荧光；未被感染的细胞不着色。

#### 1.5 结果判定

1.5.1 当阳性对照孔均出现特异性绿色荧光，正常细胞对照孔无绿色荧光时，试验成立。

1.5.2 被检样品接种的 4 个孔中，只要有 1 孔出现特异性绿色荧光，则判该样品为禽腺病毒 III 群病毒阳性。否则，判为禽腺病毒 III 群病毒阴性

#### 2 抗体检测

2.1 病毒培养 将禽腺病毒 III 群适宜毒株用含 4%胎牛血清的 M-199 培养液稀释为 100TCID<sub>50</sub>/0.1ml，接种已长成良好 CEL 单层的 96 孔细胞板（按附录 3504 制备 CEL）48 孔，每孔 0.1ml。同时，设正常细胞对照孔 48 孔，每孔加入含 4%胎牛血清的 M-199 培养液 0.1ml。置 37℃、含 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养 96 小时，按 1.3.1 固定干燥。

#### 2.2 荧光染色

2.2.1 加待检样品 将待检血清、禽腺病毒 III 群阴性血清对照和阳性血清对照分别用 PBS 作 1:100 稀释，分别加入病毒感染孔和细胞对照板各 4 孔，0.1ml/孔，置 37℃作用 1 小时。

2.2.2 洗涤 方法同 1.3.3。

2.2.3 加荧光抗体 尽量弃尽洗液，每孔加入 0.1ml 用 PBS 适当稀释的 FITC 标记的抗鸡 IgG，置 37℃作用 1 小时。

2.2.4 洗涤 方法同 1.3.3。

2.3 观察 在倒置荧光显微镜下用蓝色激发光（波长 490 nm）观察。但待检血清中禽腺病毒 III 群抗体阳性时，病毒感染细胞孔呈现绿色荧光，而正常细胞孔无绿色荧光；当待检血清中禽腺病毒 III 群抗体阴性时，病毒感染孔和正常细胞孔均无绿色荧光出现。

2.4 结果判定

2.4.1 当加入阳性血清处理的病毒感染孔均出现典型的特异性绿色荧光，而加入阳性血清处理的正常细胞孔、加入阴性血清的病毒感染孔和正常细胞孔均不出现特异性绿色荧光时，试验成立。

2.4.2 被检样品接种的 4 个孔中，只要有 1 孔出现特异性绿色荧光，则判该样品为禽腺病毒 III 群抗体阳性。否则，判为禽腺病毒 III 群抗体阴性。

### 起草说明：

1. 制定依据 通过对近百批禽用活疫苗、SPF 胚、种毒、细胞等外源病毒污染风险监测，发现部分活疫苗（如鸡痘鹌鹑化弱毒活疫苗、鸡马立克氏病火鸡疱疹活疫苗、IBD 耐热保护剂活疫苗）以及种毒等检测出了 EDSV 污染，而 2020 年版《中国兽药典》附录方法中缺少特定的检测方法。为便于开展对禽源动物源性材料（如 SPF 鸡胚、禽源细胞、毒种等）及制品中是否存在 EDSV 以及鸡群中 EDSV 抗体的检测，特制定该检测方法。本附录标准属于首次起草。

2. 关于禽腺病毒 III 群抗原间接免疫荧光检测法 EDSV 可在 CEL 细胞中复制，但其 CPE 较轻微。验证了采用 EDSV 阳性血清和 EDSV-Hexon 纯化蛋白免疫小鼠制备的单克隆抗体作为一抗建立的两种 IFA 方法，参考《外源病毒检验法（公示稿）》进行外源病毒检测，显示可检出 5~10 TCID<sub>50</sub>/ml 的外源 EDSV 污染，证明了抗原免疫荧光检测法的可行性。

3. 关于禽腺病毒 III 群抗体间接免疫荧光检测法 验证了 7 日、28 日、2 月、3 月和 5 月龄等不同日龄 SPF 阴性血清作为 IFA 一抗的适宜稀释倍数，结果显示：不同日龄的 SPF 鸡在 100 倍稀释时即可最大限度避免非特异性反应，同等稀释比例下日龄越小的 SPF 鸡血清非特异性反应越小。对 HI 抗体效价检测为阴性（HI 抗体效价不高于 1:4）的 5 份样品以及 5 份阳性样品（HI 效价分别为 1:4、1:8、1:8、1:16、1:32）稀释 100 倍进行检测，结果显示：5 份阴性样品均无特异性荧光，5 份阳性血清 IFA 效价均不低于 1:100，说明样品稀释 100 倍进行检测是适宜的。因此将判定标准确定为：在阳性血清对照、阴性血清对照和正常细胞对照均成立的条件下，被检血清 100 倍稀释后作为一抗进行 IFA 检测，只要有 1 孔出现特异性绿色荧光，则该样品判为禽腺病毒 III 群抗体阳性。

4. 依据 2025 年度第 7 次会议审查意见，将名称改为：禽腺病毒 III 群抗原/抗体间接免疫荧光检测法。

5. 禽腺病毒 III 群抗体间接免疫荧光检验法研究报告（略）。