

附件 3. 附录 3309 禽腺病毒 I 群抗原/抗体间接免疫荧光检测法（标准草案）

3309 禽腺病毒 I 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 将已长成良好单层的鸡肝癌细胞系（LMH 细胞）用含 8%胎牛血清的 DMEM 培养液稀释为 100~140 万个细胞/ml, 接种于 96 孔细胞培养板, 每孔 0.1ml, 置 37℃、含 5%CO₂ 培养箱培养 24 小时。

1.2 样品接种 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 I 群（FAdV-I）4 型适宜毒株用无血清 DMEM 培养液稀释为 10~100TCID₅₀/0.1ml, 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 DMEM 培养液 0.1ml, 置 37℃、含 5%CO₂ 培养箱培养 72~120 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（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 用 PBS 轻洗细胞表面 1 次; 每孔加入 0.1ml 用 PBS 适当稀释的抗 FAdV-I 单克隆抗体, 置 37℃作用 1 小时。

1.3.3 洗涤 弃去抗体, 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 标记的抗鼠 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（波长为 490nm）观察。FAdV-I 感染的 LMH 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 当阳性对照孔出现典型的特异性绿色荧光, 正常细胞对照孔未出现特异性绿色荧光时, 试验成立。

1.5.2 被检样品接种的 4 个孔中, 只要有 1 个孔出现特异性绿色荧光, 则该样品判为 FAdV-I 阳性。否则, 判为 FAdV-I 阴性。

2 抗体检测

2.1 病毒培养 将 FAdV-I 适宜毒株用含 4%胎牛血清的 DMEM 培养液稀释为 100TCID₅₀/0.1ml, 接种到已长成良好 LMH 单层的 96 孔细胞板（细胞制备同 1.1）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 DMEM 培养液 0.1ml。置 37℃、含 5%CO₂ 培养箱培养 72 小时, 按 1.3.1 固定干燥后。

2.2 荧光染色

2.2.1 加待检样品 将待检血清、FAdV-I 阴性血清对照和 FAdV-I 阳性血清对照分别用 PBS 作 1:100 稀释, 分别加入到病毒接种孔和正常细胞对照孔各 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（波长为 490nm）观察。当待检血清 FAdV-I 抗体阳性时，病毒感染孔呈现绿色荧光，而正常细胞孔无绿色荧光；当待检血清 FAdV-I 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 加入被检血清处理的 4 个病毒感染孔，只要有 1 孔出现特异性绿色荧光，则该样品判为 FAdV-I 抗体阳性。否则，判为 FAdV-I 抗体阴性。

修订说明：

1. 关于 FAdV-I 抗原免疫荧光检测法 FAdV-I 可在 LMH 细胞、CEL 细胞等中复制，典型的细胞病变特征包括细胞圆缩、破碎等。验证了采用 FAdV-I 单克隆抗体作为一抗、以 FITC 标记的抗鼠 IgG 作为二抗建立了 IFA 方法，参考《外源病毒检验法（公示稿）》进行外源病毒检测，显示对 FAdV-I 外源病毒污染的最低检出限为 1.25TCID₅₀，且可以特异性识别 12 个血清型 FAdV-I 病毒，而不与其他禽病毒反应，证明了抗原免疫荧光检测法的可行性。

2. 关于 FAdV-I 抗体免疫荧光检测法 采用 FAdV-I 群 1 群毒株（CELO 株）制备细胞板，证实可与中监所保存的 12 个血清型病毒的阳性血清均可反应。同时验证了 7 日、28 日、2 月、3 月和 5 月龄的 SPF 鸡血清作为 IFA 一抗的适宜稀释倍数，结果显示：不同日龄的 SPF 鸡在同等稀释比例下日龄越小的 SPF 鸡血清非特异性反应越小，100 倍稀释时可完全避免非特异性反应。参考《中华人民共和国农业农村部公告第 717 号》对抗体检测为阴性（AGP 效价小于 1:1）的 4 份样品和 4 份阳性样品（AGP 效价分别为 1:2、1:2、1:1、1:4）稀释 100 倍后进行方法验证，结果显示：4 份阴性样品和阴性血清对照均无特异荧光反应；4 份阳性样品和阳性血清对照均出现特异性荧光，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，即该样品判为 FAdV-I 抗体阳性。

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

4. FAdV-I 抗体检测方法建立报告（略）。