

ICS 65.020.30

CCS B41

DB3204

常州市农业地方标准

DB3204/T093—2021

黄羽肉种鸡核心群禽白血病净化技术规程

Technical regulation for eradication of Avian Leukosis in yellow broiler nucleus breeding chicken in China.

2021-06-24 发布

2021-07-24 实施

常州市市场监督管理局 发布

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 操作规程	1
4.1 流行病学调查	1
4.2 净化方案制定	1
4.3 生产管理	1
4.4 检测与处理	2
4.5 活疫苗的外源病毒检测	3
4.6 引种	3
4.7 禽白血病净化标准	3
附录 A（规范性）AL 净化采样送检标准化流程	4
A.1 采样前的准备	4
A.2 采样	4
A.3 送检信息登记表	5
A.4 注意事项	5
附录 B（规范性）0 日龄胎粪 ALV 检测操作规程	6
B.1 准备工作	6
B.2 出苗	6
B.3 采样与登记	6
B.4 胎粪样品冻融	6
B.5 胶体金检测试剂条检测	6
附录 C（规范性）ALV 衣壳蛋白 P27 的 ELISA 检测规程	8
C.1 待检样品的准备	8
C.2 检测步骤	8
C.3 判定标准	8
C.4 结果登记	8
C.5 注意事项	8
附录 D（规范性）血淋巴细胞中 ALV 的分离检测规程	9
D.1 DF-1 细胞的培养	9
D.2 ALV 的分离	9

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由江苏立华牧业股份有限公司提出。

本文件由常州市农业农村局归口。

本文件起草单位：江苏立华牧业股份有限公司、扬州大学、江苏兴牧农业科技有限公司、常州市动物疫病预防控制中心、江苏省畜牧总站。

本文件主要起草人：刘岳龙、尹丽萍、杨铜、张凯云、秦爱建、金松、王姣、路璐、周敏、张进。
本文件为首次发布。

引 言

禽白血病 (Avian leukosis, AL) 是由禽白血病病毒 (Avian leukosis virus, ALV) 引起的禽类多种肿瘤性疾病的总称, 是《国家中长期动物疫病防治规划 (2012-2020年)》中在祖代以上鸡群必须净化的疾病。ALV可诱发肿瘤, 造成鸡的直接死亡; 也可以产生非肿瘤综合征, 表现为生长发育不良、生产性能下降; 同时可引起免疫抑制, 导致疫苗免疫失败, 继发多种疾病。传播途径包括垂直传播和水平传播。禽白血病病毒分为外源性病毒 (包括A、B、C、D、J和新发现的K亚群) 和内源性病毒 (包括E、F、G、H和I亚群)。该病是危害我国养禽业的重要疫病之一。

作为家禽业的重要组成部分, 黄羽肉鸡目前已经占据我国肉鸡市场40%以上的份额, 具有自主知识产权, 产业外延性和发展韧性较强。由于黄羽肉鸡ALV感染率普遍较高, 净化进展缓慢, 而且品系多, 育种企业不断引入新血统进行培育等因素, 导致黄羽肉种鸡禽白血病净化工作比白羽肉鸡、蛋鸡复杂。黄羽肉鸡核心群禽白血病净化目前尚无统一的技术规程。

本单位经多年禽白血病净化技术研发和推广, 已形成一整套适合黄羽肉种鸡的AL净化体系, 在此基础上编写此技术规程, 用于黄羽肉种鸡核心群的禽白血病净化。

黄羽肉种鸡核心群禽白血病净化技术规程

1 范围

本标准规定了黄羽肉种鸡禽白血病净化操作规程。
本标准适用于黄羽肉种鸡禽白血病的净化。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 1620-2008 种鸡场孵化厂动物卫生规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 操作规程

黄羽肉鸡以育种场为单位开展净化工作。

4.1 流行病学调查

对黄羽种鸡育种场内所有的品系种鸡群进行AL流行病学调查。采集鸡群各个年龄段（0d、6w、12w、18w、20w、36w、40w、45w）的样本（血清、泄殖腔拭子、胎粪或蛋清）（采集方法与要求参照附录A和B），检测P27抗原和A/B、J亚群抗体，监测ALV的感染和传播规律。

4.2 净化方案制定

根据4.1结果，综合考虑净化代次、饲养管理、引种情况、选留计划、带毒水平等因素制定具体方案。

4.3 生产管理

4.3.1 孵化出雏

建立严格的隔离设施，孵化出雏环节管理按照NY/T 1620-2008执行。

4.3.1.1 种蛋入孵

采用专用育雏袋，按照1只母鸡的全同胞后代装袋，每袋5-6枚。
孵化前不同家系种蛋分区域放置。不同ALV感染风险的种蛋放在不同孵化机中孵化。

4.3.1.2 出雏

不同感染率鸡群后代分区域放置。

4.3.1.3 公母鉴别

0日龄胎粪检测阴性的雏鸡通过翻肛进行公母鉴别。

操作时须戴塑胶手套，每翻肛不超过20羽后须消毒手套再继续翻肛。

4.3.2 育雏

- a) 不同感染率的鸡群后代放置在不同育雏舍内；
- b) 粪盘须每周至少清洗一次，并进行消毒。

4.3.3 人工输精

每只公鸡的精液供给固定的母鸡群体，每只母鸡单独使用一支输精管。

4.3.4 转群

检测淘汰所有阳性鸡后，将阴性鸡群再转群。鸡群在感染程度有差异场舍之间发生转群时，禁止从感染率高的鸡舍转到感染率低的鸡舍。

4.3.5 鸡群安置

同一鸡舍内，若需饲养不同品种不同感染率的鸡群，须将高阳性率的鸡群放置在鸡笼的底层。前后分布时，须将高阳性率的鸡群放置在下风口。

4.4 检测与处理

0日龄采集胎粪检测；育成期（12W）、开产前（18W）、纯繁（留种前1W）采集血液，分离病毒和泄殖腔拭子检测；公鸡采集精液分离病毒；初生蛋取蛋清进行检测。

4.4.1 0日龄胎粪检测及处理

- a) 检测：胎粪 ALV 检测详细操作见附录 B；
- b) 处理：发现阳性苗鸡，淘汰同一出雏袋内的所有全同胞苗鸡，同时淘汰对应种鸡。

4.4.2 育成鸡检测及处理

12W种鸡群全群检测，对同一只鸡同时采集泄殖腔拭子和抗凝血。

- a) 检测：泄殖腔拭子样品采集与检测详细操作过程见附录 A 和 B；血液样品采集与检测详细操作过程见附录 A、C 和 D；
- b) 处理：淘汰所有阳性鸡和血液检测可疑鸡。

4.4.3 开产前鸡群检测及处理

- a) 检测：18W 种鸡群，泄殖腔拭子样品和血液样品采集与检测与 4.4.2 中所述操作相同；
- b) 处理：淘汰所有阳性鸡和血液检测可疑鸡。

4.4.4 初生蛋检测及处理

- a) 检测：收集第 1-3 枚初生蛋的蛋清样品，检测详细操作过程见附录 B 和附录 C；
- b) 处理：淘汰所有阳性种鸡。

4.4.5 种公鸡检测及处理

- a) 检测：种公鸡检测参照种母鸡检测程序进行，同时增加精液分离病毒，每月检测 1 次。按照 1:4 比例将精液原液与 1×PBS（含青链霉素）混匀，离心取上清，无菌接种 DF-1 细胞，其余操作见附录 D；
- b) 处理：淘汰所有阳性鸡及血液、精液病毒分离可疑鸡。

4.4.6 纯繁留种的种鸡检测及处理

- a) 检测：对 40-42W 纯繁留种前种鸡，采集泄殖腔拭子、血液、蛋清及公鸡精液进行检测，方法与 4.4.3 中所述操作相同，淘汰所有阳性及可疑鸡。
- b) 处理：同 4.4.3、4.4.4 和 4.4.5。

4.4.7 下一世代鸡检测及处理

按照 4.4.1-4.4.6 步骤检测与处理。

4.5 活疫苗的外源病毒检测

对所有活毒疫苗进行 ALV 检测，检测方法按照 GB/T 26436-2010 执行。

4.6 引种

4.6.1 引种前的准备

引种前须详细了解供种单位的鸡群感染情况，血液、泄殖腔拭子及蛋清检测为阴性方可引种。

4.6.2 引种后的检测与处理

- a) 所有引进种鸡须在隔离区饲养；
- b) 种鸡在引入后 1W 内进行第一次 ALV 血液和泄殖腔拭子检测，淘汰所有阳性和可疑鸡；
- c) 种鸡在第一次检测后间隔 4W 或者在计划转群到场前 2W 内进行第二次 ALV 血液和泄殖腔拭子检测，淘汰所有阳性和可疑鸡，直到符合入场指标。

4.7 禽白血病净化标准

核心群 ALV 连续两个世代以上所有检测时间点的血液和蛋清 ALV 阳性率为 0，该鸡群为 AL 净化鸡群。

附录 A

(规范性)

AL 净化采样送检标准化流程

A.1 采样前的准备

A.1.1 缓冲液的制备

10× PBS (1L) 配方:	NaCl	80g
	KCl	2g
	Na ₂ HPO ₄	14.2g
	KH ₂ PO ₄	2.7g

用蒸馏水700mL溶解后定容至1L后备用;

采样缓冲液(PBST): 将配好的10×PBS用蒸馏水稀释10倍(1×PBS), 再加入0.05% Tween-20, 混匀高压灭菌即可。

A.1.2 离心管盒准备

- 离心管盒每次使用之前应进行浸泡消毒处理;
- 离心管盒侧面用记号笔标注盒号。

A.1.3 离心管的准备

- 每个 1.5mL/2.0mL 离心管中加 1mL PBST 缓冲液;
- 每个离心管盒内不得超过 92 个加缓冲液的离心管, 每个离心管盖上标号按顺序标记 1-92, 纸质版和电子版登记相对应的鸡只翅号;

A.2 采样

A.2.1 泄殖腔拭子

- 准备物品: 木柄棉签、100 孔离心管盒、1.5mL/2mL 离心管、保温箱、登记表、记号笔、油性笔、手套、防护服、口罩、酒精棉等;
- 采样人员分组 (“2+1+2” 模式): 5 人 (A/B/C/D/E), 2 人一组 (A+B) +2 人一组 (C+D)+1 人 (E) 编号登记, 两组同时进行。A 负责抓鸡保定、读翅号 (笼号或脚号); B 将棉签插入泄殖腔 3cm 左右, 稍用力沿泄殖腔内壁顺、逆时针各三转后取出, 尽量不带鸡粪, 放入有 PBST 缓冲液的离心管中, 折断, 以能盖上离心管盖为宜。C、D 分工同 A、B。E 负责放样、编号、登记, 每 20 个样品核对编号是否吻合;
- 装箱密封后尽快送至实验室, 如有特殊情况, 也可将所采样品放入 -20℃ 冰箱中暂时冷冻;
- 放入离心管内的棉签不宜过长, 须保证离心管的盖子盖实。

A.2.2 静脉采血

- 准备物品: 2mL (或 2.5mL) 一次性注射器、100 孔离心管盒、1.5mL/2mL 离心管 (加无菌抗凝剂)、保温箱、登记表、记号笔、油性笔、手套、防护服、口罩、酒精棉等;
- 采样人员分组与泄殖腔拭子分组相同: A 负责抓鸡保定、读翅号 (笼号或脚号); B 使用注射器静脉采血 0.5mL, 采血后用棉球压住采血静脉。卸下针头, 将血液沿着内壁缓慢注入离心管后盖好, 将离心管放入离心管盒 (如使用可直接离心的采血器, 可省略此步骤)。C、D 分工同 A、B。E 负责放样、编号、登记, 每 20 个样品核对编号是否吻合。

A.2.3 蛋清样品

- a) 准备物品：蛋托、记录表、笔、手套等；
- b) 对刚开产的鸡群，每天收集其初生蛋，每只鸡收集 2-3 枚，并在蛋壳上用记号笔注明母鸡信息（母鸡编号+蛋的编号），收集好后集中检测蛋清。

A.3 送检信息登记表

- a) 登记表上应包含：公司及场名、盒号、每盒样品个数、品种（分公母）、群号、舍号、周龄（具体）、采样日期、样品类型（肛拭子、血液、蛋清）、备注说明等；
- b) 采样送检信息登记表应及时发送给实验室负责人。

A.4 注意事项

- a) 每个鸡场净化负责人应在每月固定时间将下个月各种鸡场的检测计划发送至实验室负责人，检测计划应包括品种和检测量；
- b) 若检测地点不在本场内，或需要长途运输时，须冷链送样；冬季应注意防止血液结冰；
- c) 用充填物填充多余缝隙，避免样品在运输中散落；
- d) 3h 内完成送样，24h 内完成检测。

附录 B

(规范性)

0 日龄胎粪 ALV 检测操作规程

B.1 准备工作

离心管盒和离心管（参照附录A）、记录表、检测用具、大液氮罐（装满液氮）、泡沫盒（冻样品）、检测操作台、凳子、塑胶桶（解冻）、水管、洗手消毒盆、毛巾、消毒药等，夏天防暑降温措施（风扇、饮用水、冰袋等），冬天防寒保暖措施等。

B.2 出苗

- a) 同一孵化器内的鸡，ALV 低阳性率和高阳性率分开；
- b) 在出壳前，将全同胞家系的种蛋（6 枚）置于同一出雏袋中；
- c) 从出苗机推出蛋车，并把鸡苗连同出雏袋一起放入苗鸡筐（苗鸡筐需提前做好编号，从 1 开始自然数字编号），每只母鸡的后代放置在同一格内，每筐 4 只母鸡后代。

B.3 采样与登记

- a) 分组：在出雏室对 0 日龄雏鸡逐只采集胎粪。每组 4 人，1 人负责记录、解袋口，核对管号与鸡只是否吻合；1 人发离心管并把采好样的离心管按序号放回离心管盒；2 人采样。采好样的苗鸡放回原位置；
- b) 具体流程：1 人从出雏袋倒出雏鸡，清点鸡只数量，报与第 2 人记录，同时记录父系号和母系号及编写对应的管号，第 3 人打开对应装有稀释液的离心管（在 2mL 容积的离心管内预先加入 1mL 样品裂解液），第 4 人挤胎粪，并将 2 只鸡的胎粪挤到一个离心管中。（具体分工可根据现场情况调整）；
- c) 将全同胞每 2 只鸡的胎粪挤入同一离心管中，可以降低一半的检测成本，并显著提高效率。如检测量不大，可每只雏鸡的胎粪挤入一个指型管中；在对同一个同胞系的雏鸡采集完胎粪后，必须彻底洗手消毒。

B.4 胎粪样品冻融

B.4.1 冻融样品

收到样品后将离心管盒底部壳去掉，样品连同离心管盒剩余部分一起放入泡沫盒中，倒入液氮覆盖 3-5min，取出样品放入 37℃ 水浴锅中融化 3-5min，共冻融 2 次，并在 20min 内完成。

B.4.2 注意事项

- a) 确保样品完全冻住；
- b) 水浴锅融化过程中，不能久放，防止病毒高温降解；
- c) 样品盒号标记在内层边缘，防止冻融过程中混淆；
- d) 操作人员要求戴防护眼罩和防冻手套。

B.5 胶体金检测试剂条检测

B.5.1 检测步骤

- a) 试纸平放在平板上，滴加 3-4 滴样品（上清），在反应 5-10min 内判断结果，如果操作时间过长（>15-20min），会产生非特异反应。

- b) 安排专人进行结果判定，前 50 个样本在加样结束后即可判定（已加样结束后约 5min），同时记录此刻时间点（在记录纸上），剩余样本需放置 2-5min 再判定（加样结束后 5min）。

B.5.2 注意事项

- a) 每批试纸，用自己配制的 PBST（5 条试纸条）和纯水（5 条试纸条）进行验证，正常情况下在 15-20min 内两种试剂均为阴性。此方法同样可以验证试纸和 PBST；
- b) 加样时不要吸取有杂质的部分，防止太黏不能走线；
- c) 不同家系鸡群，更换滴管，避免交叉污染；
- d) 样本加完后放回原处，等结果判定无误后丢弃；
- e) 判定时须强光照。

B.5.3 阳性鸡群标记及处理

同一只母鸡种蛋孵出的苗鸡，只要出现一只胎粪检测阳性，该母鸡所产的所有苗鸡全部淘汰。

附录 C (规范性)

ALV 衣壳蛋白 P27 的 ELISA 检测规程

C.1 待检样品的准备

- a) 泄殖腔拭子——将泄殖腔棉拭子挤压液加到 600 μ L 稀释液 (PBST) 中, 反复冻融两次。检测前, 将样品恢复至 18-26 $^{\circ}$ C, 吸取 100 μ L 上清, 加到 ELISA 板中;
- b) 细胞培养病毒分离上清——将抗凝血用 DF-1 细胞 (鸡胚成纤维细胞系) 培养后, 将培养物冻融两次, 轻轻摇匀, 吸取 100 μ L 加到 ELISA 板中;
- c) 蛋清——收集蛋清 (取鸡蛋小头处, 靠近蛋壳壁, 较稀薄, 易吸取), 用稀释液按 1: 1 比例稀释, 冻融两次, 吸取 100 μ L, 加到 ELISA 板中;
- d) 精液——收集精液, 反复冻融 2 次, 吸取 100 μ L, 加到 ELISA 板中。

C.2 检测步骤

按照试剂盒要求加样检测。

C.3 判定标准

- a) 阳性对照的平均值减去阴性对照的平均值 ($PCx-NCx$) 必须大于 0.20, 阴性对照平均吸收值必须小于或等于 0.15, 试验方能有效;
- b) 阴性对照平均值的计算 (NCx):

$$NCx = [A1孔A(650) + A2孔A(650)] / 2$$
- c) 阳性对照平均值的计算 (PCx):

$$PCx = [A3孔A(650) + A4孔A(650)] / 2$$
- d) S/P 的计算:

$$S/P = (\text{样本平均值} - \text{阴性对照平均值}) / (\text{阳性对照平均值} - \text{阴性对照平均值})$$
 如果 S/P 小于等于 0.2, 样品为阴性;
 如果 S/P 大于 0.2, 样品为阳性。
- e) P27 抗原检测操作过程详见试剂盒说明书。

C.4 结果登记

将对应的检测数据准确反馈到净化现场。

结果反馈时间要求: 血液和精液, 自收到样品之日起, 不超过 9 天; 泄殖腔拭子样品, 不超过 3 天; 胎粪, 当日反馈。

C.5 注意事项

- a) 试剂盒在使用之前须室温 (25 $^{\circ}$ C) 平衡至所有析出的物质溶解;
- b) 避免重复使用手中的吸头和封板膜;
- c) 不同批次的试剂不能混用;
- d) TMB 显色液避免长时间暴露于光下。

附录 D
(规范性)
血淋巴细胞中 ALV 的分离检测规程

D.1 DF-1 细胞的培养**D.1.1 材料的准备**

DF-1细胞（对内源性ALV-E有抵抗力的O系CEF的传代细胞系，可排除内源性ALV-E的干扰）、PBS、7%生长液、胰酶、离心管管架、细胞培养瓶、96孔培养板、巴氏吸管、超净台（均要求无菌）、二氧化碳培养箱。

D.1.2 试剂的配置

a) 灭菌 1× PBS (1L) 配方：

NaCl	8g
KCl	0.2g
Na ₂ HPO ₄	1.42g
KH ₂ PO ₄	0.27g

用蒸馏水700mL溶解后定容至1L，置于高压锅内，121℃，灭菌20min。

b) 7%生长液配方：每100mLDMEM添加7mL胎牛血清。

D.1.3 细胞处理前的准备

将PBS、7%生长液，放入超净台紫外照射15min（2.5%胰酶置于离心管管架上，放于超净台外）。

D.1.4 细胞的处理

- a) 以培养箱中取出 DF-1，进行消化，无菌操作，将细胞瓶内的培养液倒掉。
- b) 各瓶加 10mLPBS 洗涤，倒掉，重复 2 次。
- c) 加 3mL 浓度为 0.05%的胰酶消化，拧紧培养瓶瓶盖，在显微镜下观察消化情况，待 70%-80%的细胞变圆时去除消化液静置 20s，加 5mL 的 7%生长液终止消化。
- d) 用巴氏吸管吹打各瓶（须充分吹打），根据实验需要分瓶或上细胞板。

D.2 ALV 的分离**D.2.1 材料的准备**

超净台、滤芯枪头、12道移液器（酒精擦拭）、1×PBS、平皿、双抗、1%维持液、酒精棉球、垃圾盒（内铺卫生纸）。

D.2.2 试剂的配置

1%维持液配方：每100mLDMEM添加7mL胎牛血清，各加200IU/mL青链霉素。

D.2.3 分离步骤

- a) 新洁尔灭洗手，超净台内酒精擦拭。
- b) 开始加样前，在 96 孔板盖板上标记出 A1、A2、A3、A4，把孔内培养基去掉，从 A5 孔开始加样，盖上盖板。

- c) 抗凝血样品肉眼可见分层（从上到下依次为血浆层、淋巴细胞层、细胞层）后才能开始加样。采用滤芯的移液器吸头无菌吸取 60 μ L 的淋巴细胞层。
- d) 加完后标记好离心管盒号、姓名、日期、洗板时间。
- e) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5h 后，用 12 道移液器（调至 125 μ L）将血样吸出，用 125 μ L PBS 洗涤两次，加 1% 维持液（含青霉素和链霉素各 200IU/mL）。
- f) 放置实验室细胞培养箱 7 天后，取出冻融 2 次再进行 ELISA 检测。完成检测的所有样本全部灭菌后再处理。ELISA 详细检测步骤见附录 C。