

中华人民共和国农业农村部公告

第 717 号

根据《兽药管理条例》，农业农村部组织制定了鸡传染性支气管炎活疫苗非法添加/改变制苗用毒种检测方法等 4 项检测方法，现予发布，自发布之日起执行。

农业农村部将加强对鸡传染性支气管炎活疫苗等 4 种兽用疫苗产品监督抽检力度，对发现的非法添加或改变制苗用毒种行为，按照兽药严重违法行为从重处罚情形严厉查处。

- 附件：1. 鸡传染性支气管炎活疫苗中非法添加/改变制苗用毒种检测方法
2. 鸡传染性法氏囊病活疫苗中非法添加/改变制苗用毒种检测方法
3. 鸡新城疫活疫苗中非法添加/改变制苗用毒种检测方法

4. 禽用灭活疫苗中非法添加禽腺病毒 I 群全病毒抗原 检测方法

农业农村部

2023 年 10 月 23 日

附件 1

鸡传染性支气管炎活疫苗中非法添加/ 改变制苗用毒种检测方法

1. 适用范围

1.1 本方法适用于鸡传染性支气管炎活疫苗中非法添加/改变制苗用毒种的检测。

1.2 非法添加/改变制苗用毒种的检测范围为 GI-1 谱系 (Mass-like)、GI-13 谱系 (4/91-like)、GI-19 谱系 (QX-like) 和 GI-22 谱系 (LDT3-A-like) 的鸡传染性支气管炎病毒核酸。

2. 试验材料

2.1 引物

针对鸡传染性支气管炎病毒 (Infectious Bronchitis Virus, IBV) 不同毒株基因序列差异区,分别设计针对 IBV 的一对通用型引物和检测 GI-1 谱系 (Mass-like)、GI-13 谱系 (4/91-like)、GI-19 谱系 (QX-like) 和 GI-22 谱系 (LDT3A-like) 的 4 对特异性引物,详见表 1。

表 1 检测 IBV 的通用型引物 and 不同谱系毒株的特异性引物

引物名称	序列(5'-3')	扩增长度	用途
IBV-F	ATGTCTATCGCCAGGGAAATGTC	266bp	IBV 通用型 鉴定引物
IBV-R	GCTCTAACTCTATACTAGCCTA		
Mass-F	AGTTTCAATTGCTTACGGTCCT	360bp	GI-1 谱系(Mass-like) 鉴定引物
Mass-R	AATAGCCAAACCTGCGTCT		
4/91-F	AGTAGTTTTGTGTATAAACCA	328bp	GI-13 谱系(4/91-like) 鉴定引物
4/91-R	GAGTTAACACCAGTGTTCACTT		
QX-F	TGTATAAGGCAAGTGATTWTATG	340bp	GI-19 谱系(QX-like) 鉴定引物
QX-R	ACTAAGGGCTCYGTTCTAGT		
LDT3-A-F	TGCGCCACAGCAGGAAGAAT	787bp	GI-22 谱系(LDT3A-like) 鉴定引物
LDT3-A-R	CGTAGTTGGAATGAAGAGA		

2.2 阳性对照和阴性对照

阳性对照：

GI-1 谱系 (Mass-like) 代表毒株为鸡传染性支气管炎病毒 (H120 株), 毒种编号为 CVCC AV1514;

GI-13 谱系 (4/91-like) 代表毒株为鸡传染性支气管炎病毒 (IBV/CK/49101 株), 毒种编号为 CVCC AV1567;

GI-19 谱系 (QX-like) 代表毒株为鸡传染性支气管炎病毒 (IBV/CK/QX01 株), 毒种编号为 CVCC AV1568;

GI-22 谱系 (LDT3A-like) 代表毒株为鸡传染性支气管炎病毒 (IBV/CK/ldt3a01 株), 毒种编号为 CVCC AV1569。

以上代表毒株均来源于国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心。

阴性对照:生理盐水或无菌水。

2.3 试剂

RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂、琼脂糖、50xTAE、DNA marker、无核酸酶水、生理盐水。

3. 检测方法

3.1 样品稀释

取疫苗按瓶签标示,用生理盐水稀释至每毫升至少含 250 羽份;阳性对照按瓶签标示原倍或 10 倍稀释后使用。

3.2 RNA 提取

将稀释后的疫苗和阴、阳性对照按商品化核酸提取试剂盒进行 RNA 核酸提取。

3.3 RT-PCR 反应

将 3.2 步骤提取的 RNA 进行反转录操作,按商品化的一步法 RT-PCR 试剂盒说明书进行 RT-PCR 反应。RT-PCR 反应程序如下:第一阶段,反转录 50℃ 30min;第二阶段,预变性 92℃ 2min;第三阶段,PCR 扩增 94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 1min,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5min。RT-PCR 反应体系见表 2:

表 2 RT-PCR 反应体系(50 μ L)

试剂	体积(μ L)
PrimeScript 1 Step Enzyme Mix	2
2 \times 1 Step Buffer (Dye Plus)	25
上游 Primer(20 μ M)	0.5
下游 Primer(20 μ M)	0.5
RNA 模板	4
RNase-Free ddH ₂ O	18

3.4 电泳

配制 1% 琼脂糖凝胶, 取 10 μ L RT-PCR 产物进行电泳, 120V, 30min。

4. 结果判定

4.1 试验成立条件: 阴性对照应无条带, 各谱系代表毒株应扩增出相应大小条带, 分别为:

鸡传染性支气管炎病毒通用引物应扩增出大小约为 266bp 的条带;

GI-1 谱系 (Mass-like) 代表毒株鸡传染性支气管炎病毒 (H120 株) 应扩增出大小约为 360bp 的条带;

GI-13 谱系 (4/91-like) 代表毒株鸡传染性支气管炎病毒 (IBV/CK/49101 株) 应扩增出大小约为 328bp 的条带;

GI-19 谱系 (QX-like) 代表毒株鸡传染性支气管炎病毒 (IBV/CK/QX01 株) 应扩增出大小约为 340bp 的条带;

GI-22 谱系 (LDT3A-like) 代表毒株鸡传染性支气管炎病毒 (IBV/CK/ldt3a01 株) 应扩增出大小约为 787bp 的条带。

4.2 检测样品如不出现大小约为 266bp 的条带, 则判定样品中不含 IBV 核酸; 检测样品如出现大小约为 360bp 的条带, 则判定样品中检出 GI-1 谱系 (Mass-like) 的 IBV 核酸; 如出现大小约为 328bp 的条带, 则判定样品中检出 GI-13 谱系 (4/91-like) 的 IBV 核酸; 如出现大小约为 340bp 的条带, 则判定样品中检出 GI-19 谱

系(QX-like)的 IBV 核酸;如出现大小约为 787bp 的条带,则判定样品中检出 GI-22 谱系(LDT3A-like)的 IBV 核酸。

附件 2

鸡传染性法氏囊病活疫苗中非法添加/ 改变制苗用毒种检测方法

1. 适用范围

1.1 本方法适用于鸡传染性法氏囊病活疫苗中非法添加/改变制苗用毒种的检测。

1.2 非法添加/改变制苗用毒种的检测范围为鸡传染性法氏囊病病毒超强毒株、中等毒力及中等偏强毒力毒株、弱毒力毒株、变异株的鸡传染性法氏囊病病毒核酸。

2. 试验材料

2.1 引物

针对鸡传染性法氏囊病病毒 (Infectious Bursal Disease Virus, IBDV) 不同毒力毒株基因序列差异区, 参考 WOH《陆生动物诊断试验与疫苗手册》第 3.3.12 鸡传染性法氏囊病, 设计 VP2 高变区的一对通用引物。

Upper U3: 5' -GCATGCGGTATGTGAGGCTTGGTGAC-3',

Lower L3: 5' -GAATTCGATCCTGTTGCCACTCTTTC-3'

2.2 阳性对照

鸡传染性法氏囊病病毒阳性对照分别为:

超强毒株代表毒株鸡传染性法氏囊病病毒 (SD1205E5 株), 毒

种编号为 CVCC AV358, 来源于国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心;

中等毒力及中等偏强毒力代表毒株鸡传染性法氏囊病病毒(CF株), 毒种编号为 CVCC AV164, 来源于国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心; 鸡传染性法氏囊病病毒(NF8株), 来源于乾元浩生物股份有限公司南京生物药厂;

弱毒力毒株代表毒株鸡传染性法氏囊病病毒(B87株), 毒种编号为 CVCC AV140, 来源于国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心;

变异株代表毒株鸡传染性法氏囊病病毒(LN2023株), 毒种编号为 CVCC AV1570, 来源于国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心。

2.3 试剂

RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂、DNA 片段回收试剂盒、限制性内切酶 *EagI*-HF 和 *StuI*、琼脂糖、50xTAE、DNA marker、无核酸酶水、生理盐水。

3. 检测方法

3.1 样品稀释

取疫苗按瓶签标示, 用生理盐水稀释至每毫升至少含 10 羽份。

阳性对照病毒含量至少应为 100ELD₅₀/0.1ml。

阴性对照: 生理盐水或无菌水。

3.2 RNA 提取

将稀释后的疫苗和阴、阳性对照按商品化核酸提取试剂盒进

行 RNA 核酸提取。

3.3 RT-PCR 反应

将 3.2 步骤提取的 RNA 进行反转录操作。RT-PCR 反应程序如下:第一阶段,反转录,用六聚体随机引物作为反转录引物获得 cDNA,在 0.2ml PCR 管中加入:RNA 8 μ L, random hexamers (50 μ g/ μ L) 1 μ L, 10mM dNTP mix 1 μ L, 沸水浴 5min, 冰浴 2min; 再加入 10 μ L cDNA 合成预混液,反应体系见表 1。

表 1 cDNA 合成预混液成分 (10 μ L)

试剂	体积 (μ L)
10xRT buffer	2
25mM Mgcl ₂	4
0.1M DTT	2
RNaseOUT(40U/ μ L)	1
SuperScript III	1

反转录反应条件:25 $^{\circ}$ C 10min;50 $^{\circ}$ C 50min;85 $^{\circ}$ C 5min。

第二阶段,95 $^{\circ}$ C 3min;95 $^{\circ}$ C 40s,60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 40s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。反应体系见表 2:

表 2 PCR 反应体系 (50 μ L)

试剂	体积 (μ L)
Premix	25
U3 (10 μ M)	1
L3 (10 μ M)	1
cDNA 模板	6
ddH ₂ O	17

3.4 PCR 产物回收、酶切

利用片段回收试剂盒对 PCR 产物进行回收,最终用 32 μ L 无核酸酶水进行洗脱。将回收产物利用 EagI-HF 和 StuI 进行酶切,酶切体系 (50 μ L): 10x Cutsmart Buffer 5 μ L, DNA 30 μ L, EagI-HF 1 μ L, StuI 1 μ L, ddH₂O 13 μ L, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 水浴 4h。

3.5 电泳

配置 2% 琼脂糖凝胶,取 10 μ l 酶切产物进行电泳,130V,40min。

4. 结果判定

4.1 试验成立条件,阴性对照应无条带,不同毒力代表毒株应出现相应大小条带,分别为:

超强毒株代表毒株鸡传染性法氏囊病病毒 (SD1205E5 株)、中等毒力及中等偏强毒力代表毒株鸡传染性法氏囊病病毒 (CF 株) 应出现大小约为 234bp、233bp 和 89bp 条带,实际检测中仅可见 234bp 左右的一个条带,原因为 233bp 条带和 234bp 条带差异过小,会出现重叠。89bp 条带片段过小,电泳不可见。

弱毒力代表毒株鸡传染性法氏囊病病毒 (B87 株) 应出现大小约为 556bp 条带。

变异株代表毒株鸡传染性法氏囊病病毒 (LN2023 株) 和中等毒力及中等偏强毒力代表毒株鸡传染性法氏囊病病毒 (NF8 株) 应出现大小约为 322bp 和 234bp 条带。

4.2 检测样品如出现大小约为 556bp 的条带,则判定样品中检出 B87 株类似 IBDV 核酸;如出现大小约为 234bp 的条带,则判定样品中检出 CF 株类似或者 SD1205E5 株类似 IBDV 核酸;如出现大小约为 322bp 和 234bp 的条带,则判定样品中检出 LN2023 株类似株或者 NF8 株类似 IBDV 核酸。

4.3 如需明确具体的鸡传染性法氏囊病病毒种类,可将酶切片段回收后进行测序和 blast 比对。

鸡新城疫活疫苗中非法添加/改变制苗用毒种检测方法

1. 适用范围

1.1 本方法适用于鸡新城疫活疫苗中非法添加/改变制苗用毒种的检测。

1.2 非法添加/改变制苗用毒种的检测范围为基因 VII 型新城疫病毒核酸。

1.3 检测对象为鸡新城疫活疫苗 La Sota 株、Clone30 株、F 株、HB1 株、N79 株、CS2 株、V4/HB92 株、ZM10 株、VG/GA 株等疫苗株。

2. 试验材料

2.1 引物

针对鸡新城疫病毒 (Newcastle Disease Virus, NDV) F 基因保守区域设计一对通用型引物。

NDV-F(Universas 型) -F:5' -ACAGGRTCAATCATAGT-3'

NDV-F(Universas 型) -R:5' -CAGTAWGAGGTGTCAAG -3'

针对基因 VII 型新城疫病毒 F 基因差异序列,设计一对基因 VII 型特异性引物。

NDV-F(Ⅶ型)-F:5'-AGTTTAATAATACGGCGCGA-3'

NDV-F(Ⅶ型)-R:5'-GCAATAACTGAGCCYYTAAG-3'

2.2 阳性对照和阴性对照

阳性对照:

鸡新城疫病毒 La Sota 株,毒种编号为 CVCC AV1615,来源于国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心。

基因Ⅶ型新城疫病毒核酸标准品,编号为 CVCC Z333,来源于国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心。

阴性对照:生理盐水或无菌水。

2.3 试剂

RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂、琼脂糖、50xTAE、DNA marker、无核酸酶水、生理盐水。

3. 检测方法

3.1 样品稀释

取疫苗按瓶签标示,用生理盐水稀释至每毫升至少含 100 羽份;阳性对照按瓶签标示原倍或 10 倍稀释后使用。

3.2 RNA 提取

将稀释后的疫苗和阴、阳性对照按商品化核酸提取试剂盒进行 RNA 核酸提取。

3.3 RT-PCR 反应

将 3.2 步骤提取的 RNA 进行一步法 RT-PCR 反应,一步法 RT

-PCR 反应程序如下:50°C 30min、92°C 2min、94°C 30s、55°C 30s、72°C 1min,共 30 个循环,最后 72°C 延伸 10min。一步法 RT-PCR 反应体系见表 1:

表 1 一步法 RT-PCR 反应体系(25 μ L)

试剂	体积(μ L)
PrimeScript 1 Step Enzyme Mix	1
2 \times 1 Step Buffer (Dye Plus)	12.5
上游 Primer(10 μ M)	1
下游 Primer(10 μ M)	1
RNA 模板	1
RNase-Free ddH ₂ O	8.5

3.4 电泳

配置 1% 琼脂糖凝胶,取 10 μ l RT-PCR 产物进行电泳,120V,30min。

4. 结果判定

4.1 试验成立条件,新城疫病毒(La Sota 株)通用型引物应扩增出大小约为 842bp 条带,基因 VII 型新城疫病毒特异性引物应无条带;基因 VII 型新城疫病毒核酸标准品通用型引物应扩增出大小约为 842bp 条带,基因 VII 型新城疫病毒特异性引物应扩增出大小约为 609bp 特异性条带;阴性对照均无条带,则试验成立。

4.2 样品用新城疫病毒通用型引物应扩增出大小约为 842bp 条带。若用基因 VII 型新城疫病毒特异性引物扩增出大小约为 609bp 条带,则判定样品中检出基因 VII 型新城疫病毒核酸。

禽用灭活疫苗中非法添加禽腺病毒 I 群 全病毒抗原检测方法

1. 适用范围

1.1 本方法适用于禽用灭活疫苗中非法添加制苗用毒种的检测。

1.2 非法添加制苗用毒种的检测范围为禽腺病毒 I 群全病毒抗原。

2. 试验材料

2.1 实验动物

SPF 鸡, 4 ~ 6 周龄。

2.2 试剂

禽腺病毒 I 群琼脂扩散试验抗原, 阴性对照为 SPF 鸡血清, 阳性对照为禽腺病毒 I 群琼脂扩散试验阳性血清, 均来源于中国兽医药品监察所; 琼脂粉或琼脂糖、氯化钠、PBS(0.01M、pH7.2)。

3. 检测方法

3.1 免疫

用 4 ~ 6 周龄 SPF 鸡 15 只, 其中 10 只鸡按制品推荐的免疫途径和剂量进行免疫。首次免疫后 14 天, 按照相同途径(不同部位)

和剂量进行第二次免疫。另取 5 只作为不免疫对照组。第二次免疫后 21 日每只鸡分别采血,分离血清,用禽腺病毒 I 群琼脂扩散试验抗原进行抗体效价测定。

3.2 抗体效价测定

3.2.1 琼脂板制备

称取优质琼脂粉或琼脂糖 1g、氯化钠 8g,加入 PBS(0.01M、pH7.2)溶液 100ml 中,置沸水中水浴加热融化,室温冷却至 60 ~ 65℃后,倒入无菌平皿内(琼脂厚度约为 5mm),冷凝后加盖倒置平皿,防止水分蒸发,隔日使用应在 2 ~ 8℃保存。

3.2.2 打孔

用六角形打孔器在琼脂上打孔,孔径 3 ~ 4mm,孔间间距 3mm。

3.2.3 封底

挑出孔中琼脂后,将平皿底部至酒精灯上微微加热,使孔底琼脂稍微融化封底。

3.2.4 加样

中央孔滴加琼扩抗原 50 μ l,第 2、4 孔滴加阳性对照各 50 μ l,第 6 孔滴加阴性对照 50 μ l,第 1、3、5 孔滴加待检血清,每孔 50 μ l。

3.2.5 反应

将琼脂板放入湿盒中,置 37℃温箱内 2 小时后倒置琼脂板,继续作用至 24 小时,然后移至室温再放置 48 ~ 72 小时,观察沉淀线。

3.2.6 琼脂扩散试验(AGP)抗体检测结果判定

3.2.6.1 试验成立条件,抗原孔与阳性对照之间出现沉淀线,与阴性对照之间无沉淀线出现,抗体检测试验成立。

3.2.6.2 当待检血清与抗原孔之间形成沉淀线,并与阳性对照的沉淀线末端吻合,则待检血清判为阳性;当待检血清与抗原孔之间未形成沉淀线,但阳性对照的沉淀线末端向待检血清孔内侧偏弯,则判为弱阳性。弱阳性样品应重检一次,仍为弱阳性时可判为阳性;当待检血清与抗原孔之间未形成沉淀线,或阳性对照与抗原孔间的沉淀线末端向毗邻的待检血清孔直伸或向外侧偏弯时,则判该待检血清为阴性。

4. 结果判定

4.1 试验成立条件,对照组鸡 AGP 抗体应全部为阴性,试验成立。

4.2 若待检样品免疫鸡血清 1 份及以上出现 AGP 抗体阳性,则判定该疫苗中添加了禽腺病毒 I 群全病毒抗原;若待检样品免疫鸡血清均未出现 AGP 抗体阳性,则判定该疫苗中未添加禽腺病毒 I 群全病毒抗原。