

ICS 65.020.30
CCS B 41

DB 46

海南 地方 标准

DB XX/T XXXX—2025

代替 DB XX/T

文昌鸡禽白血病净化规程

Code of practice for eliminate of Avian leukosis in Wenchang chicken

(征求意见稿)

(本草案完成时间: 2025-11-03)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

海南省市场监督管理局 发布

目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	5
2 规范性引用文件	5
3 术语和定义	5
4 文昌鸡核心群禽白血病净化程序	5
5 核心群禽白血病检测及阳性鸡淘汰	6
5.1 1 日龄雏鸡	6
5.2 20 周龄~22 周龄开产初期种鸡	6
5.3 28 周龄~30 周龄扩繁留种前种鸡	7
5.4 各阶段检测结果判定	7
6 净化鸡场生物安全措施	7
6.1 种源控制	7
6.2 孵化管理	7
6.3 饲养管理	8
6.4 无害化处理	8
6.5 档案管理	8
7 净化维持	9
7.1 净化效果评估	9
7.2 净化效果判定	9
附录 A (规范性) 样品采集处理方法	10
A.1 采样前准备	10
A.2 各阶段样本采集	10
A.3 样品处理	10
附录 B (规范性) ALV p27 抗原 ELISA 检测操作流程	12
B.1 加样	12
B.2 第一次洗板	12
B.3 加酶标抗体	12
B.4 第二次洗板	12
B.5 加底物溶液	12
B.6 加终止液	12
B.7 计算	12
B.8 结果判定	12
附录 C (规范性) 甲醛熏蒸消毒操作	14
C.1 消毒原理	14

C. 2 操作方法	14
C. 3 注意事项	14
附录 D (资料性) 净化档案记录表	15
D. 1 检测试剂使用一览表	15
D. 2 禽白血病检测报告表	16
D. 3 禽白血病检测原始数据表	17
D. 4 禽白血病检测阳性淘汰鸡编号表	18

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由海南省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：崖州湾国家实验室、海南（潭牛）文昌鸡股份有限公司、海南省农业科学院畜牧兽医研究所、中国农业科学院南繁研究院、海南省动物疫病预防控制中心、河南农业大学。

本文件主要起草人：王笑梅、王秀萍、朱琼乐、袁靖丽、陈香凝、李庆霞、付朝阳、郭影、滑珂鑫、李世军、李凯、顾酰渊、樊灵芝、韩瑞丽。

引　　言

禽白血病（Avian leukosis, AL）是由禽白血病病毒（Avian leukosis virus, ALV）感染引起的鸡的肿瘤病，导致鸡生长缓慢、产蛋下降和免疫抑制，主要传播途径为垂直传播。ALV分为外源性ALV和内源性ALV两大类。外源性ALV指不通过宿主细胞染色体传递给下一代的ALV，包括A、B、C、D、J和K亚群，致病性强的ALV都属于外源性病毒。它们来自被感染细胞的细胞外，既可以像其他病毒一样在细胞与细胞间以完整的病毒粒子形式传播，或在个体与群体间通过直接接触或污染物发生横向传播，也能以游离的完整病毒粒子形式从种鸡垂直传播给后代。内源性ALV包括E、F、G、H和I亚群，是指整合进宿主细胞染色体基因组通过染色体垂直传播的ALV，其中ALV囊膜蛋白内源性基因与群特异性抗原基因往往呈现连锁遗传。几乎所有鸡个体的体细胞和生殖细胞的基因组中都带有完整的或缺陷性的ALV的前病毒遗传系列，即内源性ALV。不同亚群的致病性和传染性存在差异，其中J亚群白血病病毒流行较广，对鸡致病力和致瘤性较强。

禽白血病会导致鸡只死亡或继发多种疾病，缺少有效疫苗和药物，具有分布广泛、亚临床症状普遍等特点。禽白血病防控措施是检测和淘汰禽白血病阳性鸡、建立白血病阴性种鸡群，同时采取生物安全管理措施有效控制并彻底清除鸡群中的禽白血病病毒，保持种群安全与健康。我国《国家中长期动物疫病防治规划（2012—2020年）》和《全国畜禽遗传改良计划2030（2021—2035）》明确规定祖代以上鸡群必须进行禽白血病净化。

文昌鸡禽白血病净化规程

1 范围

本文件确立了文昌鸡核心群禽白血病净化程序，规定了核心群禽白血病检测及阳性鸡淘汰、净化鸡场生物安全措施等阶段的操作指示，描述了净化效果评估和净化效果判定的方法。

本文件适用于文昌鸡禽白血病的净化。

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 32148 家禽健康养殖规范

GB/T 36873 原种鸡群禽白血病净化检测规程

GB/T 39915 动物饲养场防疫准则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

文昌鸡 Wenchang chicken

被列入《国家畜禽遗传资源品种名录》原产于海南省文昌市的地方鸡品种。

3.2

种鸡 breeding chicken

具有优良遗传性状、专门用于繁殖后代的公鸡和母鸡，其后代可作为商品代家禽或下一代种用家禽。

3.3

种鸡核心群 core group of breeding chicken

指一个家禽（鸡）育种体系中，经过严格、科学的选择和遗传改良，拥有高遗传水平和优良基因组合的纯系群体。

4 文昌鸡核心群禽白血病净化程序

文昌鸡核心群禽白血病净化程序包括3个阶段，其中第一个阶段为核心群禽白血病检测及阳性鸡淘汰，第二阶段为净化鸡场生物安全措施，第三个阶段为净化维持。程序流程如图1所示。

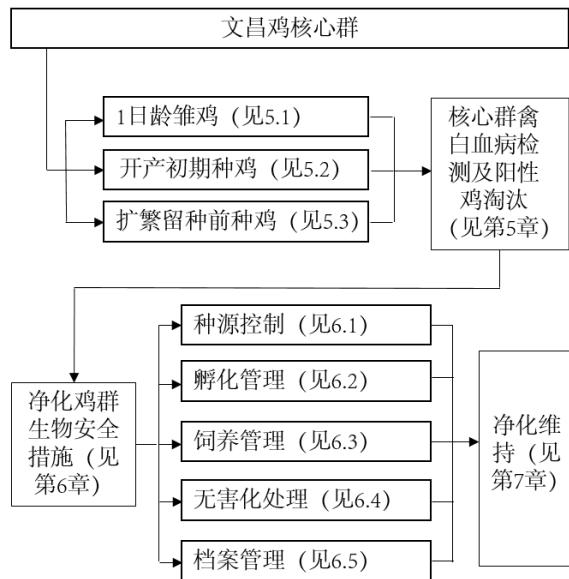


图1 核心群禽白血病净化程序流程图

5 核心群禽白血病检测及阳性鸡淘汰

5.1 1日龄雏鸡

5.1.1 样品采集

对核心群1日龄雏鸡全群进行胎粪采集。样品采集处理按照附录A操作。

5.1.2 检测方法

按照附录B进行ALV p27抗原ELISA检测。

5.1.3 检测后处理

对检测结果为阳性的雏鸡进行淘汰和无害化处理，对检测阳性雏鸡的其它同胞雏鸡及其对应的母鸡均应淘汰和无害化处理；只准许检测为阴性的雏鸡按照第6章生物安全措施进行饲养。

5.2 20周龄~22周龄开产初期种鸡

5.2.1 样品采集

对核心群20周龄~22周龄种鸡全群进行母鸡初产蛋采集和公鸡翅静脉采血。样品采集处理按照附录A操作。

5.2.2 检测方法

采集的蛋清按照附录B进行ALV p27抗原ELISA检测，全血样品处理后接种细胞，培养7 d~14 d，进行ALV p27抗原ELISA检测。

5.2.3 检测后处理

只要有一枚初产蛋的蛋清检测结果为阳性，则淘汰对应产蛋母鸡并进行无害化处理；对检测结果为阳性公鸡进行淘汰和无害化处理；只准许检测为阴性的鸡按照第6章生物安全措施进行饲养。

5.3 28周龄～30周龄扩繁留种前种鸡

5.3.1 样品采集

对核心群28周龄～30周龄全部扩繁留种前种鸡翅静脉进行全血采样。样品采集处理按照附录A操作。

5.3.2 检测方法

采集的全血处理后接种细胞，培养7 d～9d，按照附录B进行ALV p27抗原ELISA检测。

5.3.3 检测后处理

对检测结果为阳性鸡进行淘汰和无害化处理；只准许检测为阴性的鸡按照第6章生物安全措施进行饲养。

5.4 各阶段检测结果判定

各阶段采样检测结果判定按照表1。

表1 检测结果判定

采样阶段	样本类型	采集方法	检测方法	判定标准
1日龄雏鸡	胎粪	出壳24 h内，挤压腹部收集胎粪至含PBS的离心管，冻融1次后离心取上清为待测液	ALV p27抗原ELISA检测	阳性：S/P值 ≥ 0.1 阴性：S/P值 < 0.1
20周龄～22周龄开产初期种鸡	母鸡：蛋清 公鸡：抗凝血	母鸡：取2枚初产蛋，取蛋清冻融2次后做为待测液；公鸡：翅静脉采集抗凝血，离心取血浆接种DF-1细胞培养7 d～9 d后，取细胞培养上清液为待测液	母鸡：蛋清p27抗原ELISA检测； 公鸡：细胞培养上清P27抗原ELISA检测	阳性：S/P值 ≥ 0.1 阴性：S/P值 < 0.1
20周龄～22周龄扩繁留种前种鸡	抗凝血	翅静脉采集抗凝血，离心取血浆接种DF-1细胞培养7 d～9 d后，取细胞培养上清液为待测液	细胞培养上清p27抗原ELISA检测	阳性：S/P值 ≥ 0.1 阴性：S/P值 < 0.1

6 净化鸡场生物安全措施

6.1 种源控制

应从ALV阴性场引种，引种时需供方提供3个月内ALV阴性检测报告，引进鸡群须隔离观察4周。

6.2 孵化管理

6.2.1 种蛋入孵

每日收集种蛋，在蛋壳上用记号笔注明母鸡编号，同一母鸡产的蛋均放入同一蛋盘里。种蛋入孵前须按照附录C消毒。落盘采用专用出雏盒，按照1只母鸡的全同胞后代装袋，每袋5枚~6枚，并写上母鸡编号。

6.2.2 出雏

出雏室内的温度维持在26 °C~27 °C。孵化出雏要建立隔离设施，孵化出雏环节管理按照GB/T 36873操作。

6.2.3 公母鉴别

1日龄雏鸡进行泄殖腔公母鉴别又称“翻肛”。操作时须戴一次性乳胶手套，每翻肛一个出雏袋后，需对双手进行消毒，再继续翻肛；每个家系翻肛结束后，更换乳胶手套，再继续翻肛。

6.3 饲养管理

6.3.1 人工输精

每只公鸡的精液供给固定的母鸡群体，输精过程中每只母鸡更换一个输精枪头。

6.3.2 预防水平感染

同一个鸡舍内，须将相对高阳性率的鸡群放置在鸡笼的底层，或放置在下风口的笼内。

6.3.3 分区饲养

核心群应有相对隔离的地理位置，与其他群饲养区域的间距≥500 m。核心群由专职人员管理，避免其他鸡群的饲养人员进入正在实施净化的核心群中工作。

6.3.4 环境控制

按照GB/T 32148的要求操作。

6.4 无害化处理

6.4.1 淘汰鸡处理

淘汰的阳性鸡无害化处理按照GB 39915执行。

6.4.2 污染物处理

检测呈阳性的胎粪、蛋清、血浆等样本应密封于生物安全袋中，由实验室废弃物管理人员转移至医疗废弃间暂存，并委托具备资质的第三方机构进行无害化处理。

6.5 档案管理

6.5.1 净化建档

按批次对净化鸡群进行建档管理，批次号依出雏日期编制。须按世代详细记录每阶段净化数据，包括净化世代、批次号、采样时间、样品类型、采样数量、检测方法、检测结果及处理措施等。进入净化维持阶段后，仍沿用此档案管理制度。

6.5.2 档案记录

6.5.2.1 检测试剂管理

根据核心群净化计划中的检测数量，完善检测试剂采购和使用记录，相应表格见附录D中D.1。

6.5.2.2 检测报告管理

在检测结束1天内出具检测报告，相应表格见D.2，并归档管理。

6.5.2.3 淘汰净化记录

依据检测报告编制淘汰鸡编号表，相关表格见D.3。核心育种场应在收到检测报告及淘汰表后，及时完成相应编号鸡的淘汰工作，避免漏淘、少淘或不淘。

7 净化维持

7.1 净化效果评估

文昌鸡核心群禽白血病净化效果评估按照GB/T 36873执行。

7.2 净化效果判定

7.2.1 核心群连续三个世代所有检测时间点的ALV阳性率为0，进入净化维持期。

7.2.2 维持期实施定期抽检，第一世代按照净化检测时间点及检测方法抽样50%检测（或免检胎粪），第二世代抽样50%（免检胎粪），第三世代及往后抽样30%（免检胎粪）。

7.2.3 一旦检出ALV阳性，立即启动净化程序，重新进入核心群禽白血病检测及阳性鸡淘汰程序。

附录 A
(规范性)
样品采集处理方法

A. 1 采样前准备

A. 1. 1 PBS试剂配制

在800 mL蒸馏水中分别加入氯化钠8 g, 氯化钾0.2 g, 无水磷酸二氢钾0.27 g, 无水磷酸氢二钠1.42 g, 搅拌使其充分溶解。用盐酸调节溶液的PH值至7.4, 加蒸馏水定容至1 L, 高压蒸汽灭菌后室温保存。

A. 1. 2 耗材准备

采样前需提前准备规格为8×12的96孔离心管盒、1.5 mL～2 mL离心管, 加入1 ml PBS。

A. 1. 3 样品标记

标记信息包含个体编号、代次、采样日期和母源信息。电子登记表按照离心管盒号登记相对应鸡的翅号。

A. 2 各阶段样本采集

A. 2. 1 胎粪采集

使用75%酒精棉球对泄殖腔部位消毒后, 手动按压肛门周围促使排便或将无菌棉签插入泄殖腔3 cm左右, 轻柔沿泄殖腔内壁顺、逆时针各转3圈后取出, 将采集的粪便样本棉签, 置于事先标记好的加有PBS缓冲液的离心管中, 盖上管盖, 置于离心管盒中备用。

A. 2. 2 蛋清采集

每只鸡收集2枚～3枚鸡蛋, 使用酒精棉球对鸡蛋气室端(大头端)进行消毒, 使用镊子敲一小孔, 用移液枪吸取1 mL蛋清于2 mL离心管内, 置于-20 ℃冰箱冻融1次后进行p27抗原检测。

A. 2. 3 抗凝血采集

采用禽类翼下静脉采血法, 采血者用左手拇指压迫翼下静脉的近心端, 使血管怒张, 手持一次性采血针, 由翼根的肌肉处进针, 向翅膀方向斜向刺入翼下静脉, 缓慢采集1.5 mL左右血量。采血完毕, 拔出采血针, 上下轻轻颠倒肝素钠管, 使血液与抗凝剂充分混合, 防止凝血。

A. 3 样品处理

A. 3. 1 胎粪样品处理

将挤出的胎粪样品放入装有0.5 mL PBS (0.01 mol/L, pH值7.4) 的2 mL离心管中, 置于液氮冻融1次, 待样品完全融化; 震荡后以12000 r/min离心1 min, 离心后将样品摆放在96孔板内进行下一步ALV p27抗原ELISA检测。

A. 3. 2 蛋清样品处理

种鸡种鸡开产后每只母鸡连续收集2枚种蛋，每枚种蛋取1 mL蛋清到2 mL离心管中，放置-20 ℃冰箱冻融1次后，将样品摆放在96孔板内进行下一步ALV p27抗原ELISA检测。

A. 3.3 抗凝血样品处理

按照以下步骤进行：

- 以 2000 r/min 离心 2 min，离心后，血液分层从上至下依次为血浆层、淋巴细胞层、细胞层，取靠近淋巴细胞层的血浆 100 μ L 至 96 孔细胞培养板备用，样品数量较多时，取好血浆后可放 4 ℃冰箱暂时冷藏；
- 从二氧化碳培养箱中取出提前铺好 DF-1 细胞的细胞板，调整移液枪至 125 μ L 弃培养液，加 1×PBS 洗涤一遍，调整移液枪至 150 μ L 弃洗涤液，弃液弃干净；
- 取血浆接种至洗涤好的 96 孔细胞板中，每孔加 60 μ L，然后放至 37°C 、5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h~3 h；
- 孵育结束后，调整移液枪至 125 μ L 弃上清液，加 1×PBS 洗涤两遍，洗涤第二遍时调整移液枪至 150 μ L 弃洗涤液，弃液弃干净后加 200 μ L 1%DMEM 细胞维持液放至 37 °C 、5% CO₂ 培养箱中继续培养；
- 培养 7 d~9 d，冻融两次后，进行下一步 ALV p27 抗原 ELISA 检测。

附录 B (规范性)

B. 1 加样

吸取样品上清液150 μ L加入稀释板（每个样品更换枪头），待所有加样人员将本次样品全部加入到稀释板后（血浆病毒培养无需此操作），指定负责人核对本次样品号段（确保本次所有样品都有人检测无遗漏）。负责人统一口令进行转板（将样品加入酶标板内），待所有加样人员全部转板后，负责人统一口令加阴性对照。全部完成后，负责人进行收板，统一放入恒温培养箱37 $^{\circ}$ C孵育1 h。

B. 2 第一次洗板

甩去孔内液体，用稀释好的洗涤液洗涤包被板，300 μ L/孔，洗涤4次，每次拍干。

B. 3 加酶标抗体

加酶标抗体100 μ L/孔（使用移液器吸取酶标抗体时不要有气泡产生，注意吸头里的液体是否都在同一水平线，确保液体量一致）同一试剂无需更换吸头，如有气泡必须更换；待本次循环全部加完酶标抗体后，统一放置37 $^{\circ}$ C恒温培养箱孵育1 h。

B. 4 第二次洗板

方式同步骤B. 2。

B. 5 加底物溶液

加入底物溶液A (50 μ L/孔) 后立即加入底物溶液B (50 μ L/孔)，振荡混匀后 (手轻敲侧壁)，室温避光孵育15 min，因各地温度差异，建议放在25 °C 恒温培养箱中进行孵育。(底物溶液B需避光，如把底物溶液B倒入加样槽内，需及时使用遮光板盖住)。

B. 6 加终止液

加入终止液50 μ L/孔，轻微震荡混合均匀后（手轻敲侧壁），置酶联检测仪于波长630 nm测定各孔光密度值（OD值）；加入终止液后10 min内完成读数，统计结果，保存。

B. 7 计算

读取OD值，计算S/P值，按式（1）计算：

$$S/P = (OD_{630-S} - OD_{630-NC}) / (OD_{630-PC} - OD_{630-NC}) \dots \dots \dots \quad (1)$$

式中：

S/P ——样品数值；

OD_{630-s} ——待检样品在波长630 nm处的OD值；

OD_{630-PC} ——阳性对照样品在波长630 nm处的平均OD值；

OD_{630-NC} —— 阴性对照样品在波长630 nm处的平均OD值。

B. 8 结果判定

$OD_{630-PC} - OD_{630-NC} \geq 0.20$ 且 $OD_{630-NC} \leq 0.15$ ，试验结果有效，否则，应重新进行实验。当 $S/P \geq 0.10$ 时，判为 p27 抗原阳性；当 $S/P < 0.10$ ，判为 p27 抗原阴性。

附录 C
(规范性)
甲醛熏蒸消毒操作

C. 1 消毒原理

甲醛能破坏微生物的活性成分从而达到消毒的作用，高锰酸钾遇到甲醛后释放大量的热使甲醛蒸发弥漫到空气当中，可对蛋库的种蛋进行熏蒸消毒。当湿度在65%左右，温度在 24 ℃~40 ℃甲醛的消毒效果是最好的。

C. 2 操作方法

按照以下操作步骤进行：

- 计算蛋库空间体积:每立方米用 42 mL 的福尔马林 (40%的甲醛溶液) 加入 21 g 的高锰酸钾；
- 消毒前准备，关闭空调机或门窗，在设定的地点放置装有定量高锰酸钾的容器（通常可以不锈钢盆或桶），双层纱布盖住容器口，旁边配有定量的福尔马林。（根据消毒空间的大小，依据 a) 计算消毒剂的用量）；
- 消毒，将福尔马林溶液倒入装有高锰酸钾的容器中，迅速离开房间，密闭熏蒸 30 min；
- 熏蒸后，打开门窗，充分通风、换气，直至残留甲醛与高锰酸钾彻底释放，可使用空气质量检测仪检测消毒空间内空气中甲醛的含量，含量低于 0.08 mg/m³为甲醛含量合格。

C. 3 注意事项

操作过程中应注意以下几点：

- 种蛋在孵化器里用福尔马林消毒时，应避开 24 h~96 h 胚龄的时间；
- 福尔马林与高锰酸钾的化学反应很剧烈，所以先加少量温水，再加高锰酸钾，最后加福尔马林，注意不要伤及皮肤和眼睛。

附录 D
(资料性)
净化档案记录表

D. 1 检测试剂使用一览表

记录检测试剂使用情况使用表D. 1。

表D.1 检测试剂使用一览表

D. 2 禽白血病检测报告表

《禽白血病检测报告表》见表D. 2.

表 D. 2 禽白血病检测报告表

鸡场名称			
品类			
批次			
采样日期			
检测方法			
依据标准			
阳性数量		阳性率	
分析说明			
备注	详细结果见附件《禽白血病原始数据表》		
主检: _____ 审核: _____ 日期: _____			

D.3 禽白血病检测原始数据表

《禽白血病检测原始数据表见表》见表D.3, 记录样品检测登记、检测结果及板号。

表 D.3 禽白血病原始数据表

序号	样品编号登记表												板号:	送样日期:
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	阴性对照													
B	阴性对照													
C	阳性对照													
D	阳性对照													
E														
F														
G														
H														

序号	样品检测结果登记表												日期:
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A													
B													
C													
D													
E													
F													
G													
H													

D. 4 禽白血病检测阳性淘汰鸡编号表

《禽白血病检测阳性淘汰鸡编号表》见表D. 4。

表 D. 4 禽白血病检测阳性淘汰鸡编号表

鸡场			舍号			品系/类别		
周齡			批次					
检测员			数量			检测日期		
序号	阳性编号	阳性编号	阳性编号	阳性编号	阳性编号	阳性编号	阳性编号	阳性编号
1								
2								
3								
4								
5								
6								
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								