

ICS 11.220
B 41



中华人民共和国国家标准

GB/T 16551—2008
代替 GB 16551—1996

GB/T 16551—2008

猪 瘟 诊 断 技 术

Diagnostic techniques for classical swine fever (hog cholera)

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
猪 瘟 诊 断 技 术
GB/T 16551—2008

*
中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn
电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*
开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字
2009年4月第一版 2009年4月第一次印刷

*
书号: 155066·1-36673 定价 14.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



GB/T 16551—2008

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

箱作用 1 h,同时设置标准的阴、阳性血清中和对照,没有血清中和的病毒对照和正常细胞对照。

4.1.3.2 在 Leighton 管、培养瓶或微量细胞培养板中加入细胞维持液,并将细胞培养物继续置于 37 ℃温箱培养 2 d 以上。

4.1.4 荧光抗体染色

4.1.4.1 从 Leighton 管、培养瓶或微量细胞培养板中取出带有细胞的盖玻片,用 pH7.2 的磷酸缓冲盐水洗涤细胞单层 2 次,每次 5 min,后用无水丙酮固定 10 min,再将工作浓度的猪瘟荧光抗体结合物滴加在带有细胞的盖玻片上,放置湿盒中,于 37 ℃染色 30 min,并用 pH7.2 的磷酸缓冲盐水冲洗 3 次。

4.1.4.2 用 pH 值 9.0~9.3 的 90%碳酸盐-甘油缓冲液将盖玻片封固在无油渍的显微镜载玻片上,并在荧光显微镜下作荧光检查。

4.1.5 镜检

将染色、封固后的样品片置于激发光为蓝紫光或紫外光的荧光显微镜下观察。

4.1.6 判定标准

4.1.6.1 当在荧光显微镜下,正常细胞对照和标准阳性血清中和对照的细胞胞浆中无黄绿色荧光,标准的阴性血清中和对照和没有血清中和的病毒对照的细胞胞浆中有黄绿色荧光时,试验成立,可判定被检样品的结果。

4.1.6.2 荧光显微镜下,被检样品的细胞胞浆内未见黄绿色荧光时,判为猪瘟抗体阳性;被检样品的细胞胞浆内有明亮的黄绿色荧光时,判为猪瘟抗体阴性。

4.2 猪瘟单抗酶联免疫吸附试验

4.2.1 材料准备

猪瘟弱毒单抗纯化酶联抗原,猪瘟强毒单抗纯化酶联抗原,酶标结合物,标准阴、阳性血清,酶联板及其他必要的试验溶液。

4.2.2 操作方法

4.2.2.1 抗原包被

用包被液将猪瘟弱毒单抗纯化酶联抗原、猪瘟强毒单抗纯化酶联抗原分别作 100 倍稀释,以每孔 100 μL 分别加入做好标记的酶联板孔中,置于湿盒放 4 ℃过夜。

4.2.2.2 洗涤

甩掉酶联板孔内的液体,加入洗涤液,室温下浸泡 3 min,甩去洗涤液,再重新加入洗涤液,连续洗涤三次,最后一次甩掉洗涤液后,拍干酶联板。

4.2.2.3 加入被检血清

用稀释液将被检血清作 400 倍稀释,每孔加 100 μL。同时,将猪瘟标准阴、阳性血清以 100 倍稀释作对照,置湿盒于 37 ℃作用 1.5 h~2 h,甩掉酶联板中稀释的血清,用洗涤液冲洗三次,洗涤方法同 4.2.2.2。

4.2.2.4 加入酶标抗体结合物

用稀释液将酶标抗体结合物作 100 倍稀释,每孔加入 100 μL,置湿盒于 37 ℃孵育 1.5 h~2.0 h。甩掉酶标抗体结合物,用洗涤液冲洗三次,洗涤方法同 4.2.2.2。

4.2.2.5 加底物

每孔加入新配制的底物溶液(每块 96 孔酶联板所需底物溶液按邻苯二胺 10 mg 加底物缓冲液 10 mL 加 30%过氧化氢 37.50 μL 配制)100 μL,室温下观察显色反应,一旦阴性对照孔略显微黄色,立即终止反应。

4.2.2.6 终止反应

每孔加入终止液 50 μL 后,迅速用酶联读数仪以 490 nm 波长测定每孔的光吸收值(OD),并以阴性血清孔作为空白对照调零孔。

前 言

本标准对应于 OIE 最新公布的《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2004 版)第二部分第二节 2.1.13 猪瘟(CSF)有关内容,且与该章节标准的一致性程度为非等效。

本标准代替 GB 16551—1996《猪瘟检疫技术规范》。

本标准与 GB 16551—1996 相比主要变化如下:

——本标准修订了 GB 16551—1996 中第 3 章“群体检疫”和第 4 章“个体检疫”的有关内容,删除了其中有关疫苗免疫、产地检疫和查验检疫证明等《中华人民共和国动物防疫法》等法律法规已有明确规定且不宜作为本标准条款的相关内容,保留和合并了群体和个体 CSF 临床症状和病理变化的有关章节,单独增写了临床和病理学诊断内容;

——本标准将 GB 16551—1996 中第 5 章“实验室检验”的内容进行了较大的修订,删除了 5.1,将 5.2 中涉及的兔体交叉免疫试验、免疫酶染色试验、病毒分离与增毒试验、直接免疫荧光抗体试验由原标准中附录 A(补充件)和附录 C(补充件)的编排格式转为本标准中的正文内容,并补充和修订了上述方法,增加了能鉴别诊断 CSF 自然感染和疫苗免疫抗体的单抗酶联免疫吸附试验,同时,还直接引用了《陆生动物诊断试验和疫苗手册》(2004 版)中的诊断 CSF 抗体的荧光抗体病毒中和试验,新增了有自主知识产权的诊断 CSF 病毒的反转录聚合酶链式反应;

——本标准改变了 GB 16551—1996 的编写格式,正文采取了对 CSF 诊断技术分临床和病理学诊断,病原学诊断及血清学诊断三个层次诊断技术的分类编写方式,并根据所列诊断方法的性质,进行划分和归类编写;

——本标准修订了 GB 16551—1996 中第 6 章“综合判定”的相关内容,并将容易引起歧义的“综合判定”一词改为“最终结论判定”,增加了与之相吻合的判定标准,使其“综合判定”与诊断结果的分析相一致,删除了现行法律法规已涵盖且不宜于本标准的第 7 章“检疫后处理”的有关内容。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人:王在时、王琴、丘惠深、赵耘。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——GB 16551—1996。

3.5.2 RNA 提取

3.5.2.1 移取 750 μL Trizol 至 1.5 mL Eppendorf 管,加入 200 μL 血液(培养液或组织处理上清),漩涡振荡 20 s,室温下作用 5 min。加入 200 μL 三氯甲烷,漩涡振荡 15 s,室温下作用 10 min。

3.5.2.2 以 12 000 r/min(11 750g),4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min。

3.5.2.3 轻轻吸取上清转至新的 1.5 mL Eppendorf 管(注意不要吸到中间蛋白层),约 550 μL ~600 μL ,加入等量预冷的异丙醇,颠倒数次混匀,-20 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置至少 10 min。

3.5.2.4 以 12 000 r/min(11 750g),4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min。

3.5.2.5 轻轻倒掉上清,顺势将管口残液在吸水纸上蘸干(注意各管不要用吸水纸同一点),向管中轻轻加入 1 mL 预冷的 75%乙醇。轻轻颠倒数次,将乙醇倒掉,将管口残液在吸水纸上蘸干(注意各管不要用吸水纸同一点),盖上盖后,以 5 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 2 min。

3.5.2.6 用洁净无酶吸头将管底乙醇吸干,注意不要吸走沉淀(RNA 少的情况下可能看不见沉淀)。在安全柜或超净台中将残留的乙醇吹干,约 5 min,直至无乙醇味为止。时间不要过长,以免 RNA 溶解困难。

3.5.2.7 用下列比例配制溶液溶解 RNA:

4 μL 0.1 mol/L MDTT

1 μL RNA 酶抑制剂(RNase inhibitor)

15 μL 无酶水

共计 20 μL ,按此比例一次性配好,混匀。按每个样品 20 μL ~50 μL 配制。

吸取 20 μL ~50 μL RNA 溶解液溶液加至 Eppendorf 管底,55 $^{\circ}\text{C}$ ~65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴助溶 10 min。RNA 溶液在-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。短期也可在-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

3.5.3 cDNA 合成

3.5.3.1 吸取 5 μL 上述 RNA 溶液至 PCR 管中。

3.5.3.2 加入 1 μL 50 pmol/L 的下游引物,68 $^{\circ}\text{C}$ 作用 5 min,冰水浴中降温(或在 PCR 仪中采用程序:68 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 结束反应)。

3.5.3.3 加入下列试剂:

2 μL 5 \times 第一链缓冲液(first strand buffer)

0.5 μL 0.1 mol/L DTT

0.5 μL dNTP(10 mmol/L)

0.25 μL RNA 酶抑制剂(RNase inhibitor)

0.5 μL 反转录酶(superscript III)

PCR 仪中 50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min,75 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 结束反应。

3.5.4 PCR

3.5.4.1 吸取上述 cDNA 模板 3 μL ,无酶水 34.5 μL 。

3.5.4.2 加入下列试剂:

5 μL 10 \times PCR 缓冲液

3 μL dNTP(10m mol/L)

1 μL 上游引物

1 μL 下游引物

2.5 μL Taq DNA 聚合酶

将混合物吹打均匀后,至 PCR 仪中扩增,条件如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 预热 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 链延伸 1 min 40 s,30 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min。置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 结束反应。

3.5.5 nest-PCR

3.5.5.1 吸取上述 PCR 模板 1.5 μL ,无酶水 36 μL 。

猪 瘟 诊 断 技 术

1 范围

本标准规定了猪瘟(CSF)临床诊断、病理学诊断及实验室诊断方法的技术要求。实验室诊断方法主要包括:兔体交互免疫试验、免疫酶染色试验、病毒分离与鉴定试验、直接免疫荧光抗体试验、荧光抗体病毒中和试验、猪瘟单抗酶联免疫吸附试验和反转录聚合酶链式反应等诊断技术。

本标准适用于猪瘟的诊断。兔体交互免疫试验,免疫酶染色试验,直接免疫荧光抗体试验,反转录聚合酶链式反应和病毒分离与鉴定试验等五种方法主要用于猪瘟病毒和抗原的诊断,以发现带毒猪和自然感染猪;猪瘟单抗酶联免疫吸附试验和荧光抗体病毒中和试验主要用于猪瘟抗体的监测和免疫效果评估,其中,单抗酶联免疫吸附试验主要用于猪瘟抗体的鉴别诊断,可区别诊断猪瘟自然感染猪,免疫猪,强、弱毒抗体阳性猪及猪瘟抗体阴性猪。

2 临床及病理学诊断

2.1 临床及病理学诊断的作用

感染 CSF 的猪临床症状和解剖后肉眼所见的病理变化,因病毒株致病力、感染时间和宿主等因素不同而有很大差异,同时田间还存在着无临床症状的猪瘟病毒持续性感染和多种病原混合感染的现象,因此,猪瘟的临床诊断和病理学诊断只能作为综合诊断定性的依据之一,不能作为确诊的根据,特别是那些隐性感染的带毒猪,一般不表现临床症状及肉眼可见的病理变化,所以,猪瘟的确诊应依赖于对 CSF 病毒及抗原的实验室诊断,才能形成最终的结论。

2.2 临床诊断

猪群中被检猪出现下列临床症状时,可作为综合诊断定性的依据之一:

- 体温在 40.5 $^{\circ}\text{C}$ 以上或间歇性的发热;
- 精神萎靡、倦怠,畏寒,食欲不振、厌食、甚至废食,呕吐,步态不稳;
- 交替便秘与腹泻,产生带粘液和血丝的粪球,结膜充血、出血或有不正常分泌物;
- 鼻盘、嘴唇、耳尖、下颌、四肢、腹下及腹股沟等处出现紫红色斑点或斑块;
- 公猪包皮积尿或其他疑似 CSF 的症状;
- 怀孕母猪有流产、死胎、木乃伊等现象或所产仔猪有衰弱、震颤、痉挛、发育不良等现象。

出现上述症状时,猪群作为可疑 CSF 对待,应全群隔离饲养,并作进一步诊断。

2.3 病理学诊断

对临床检出的可疑患猪可抽样进行病理学诊断,下述肉眼可见的病变可作为综合诊断定性的依据之一:

- 肾皮质色泽变淡,有不同大小的点状出血;
- 淋巴结外观充血、切面周边出血,呈红白相间的“大理石样”;
- 脾脏不肿大,表面有点状出血或边缘出现突起的楔状梗死区;
- 心脏、喉头、大肠、小肠、胆囊及膀胱有点状出血;
- 全身出血性变化、多呈片状或点状;
- 回盲瓣、回肠、结肠形成“钮扣状”溃疡(慢性猪瘟)。