

ICS 11.220
B 41



中华人民共和国国家标准

GB/T 18090—2008
代替 GB/T 18090—2000

GB/T 18090—2008

猪繁殖与呼吸综合征诊断方法

Diagnostic methods of porcine reproductive and respiratory syndrome

中华人民共和国
国家标准
猪繁殖与呼吸综合征诊断方法
GB/T 18090—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 1.25 字数 26 千字
2009年4月第一版 2009年4月第一次印刷

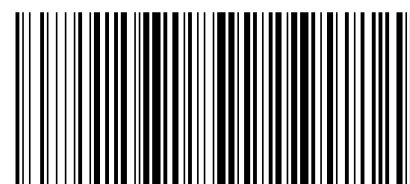
*

书号: 155066·1-36676 定价 18.00 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 18090-2008

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

附录 C
(资料性附录)

猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 方法引物序列、PRRSV 特异性片段的序列

C.1 猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 方法引物序列

猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 方法的引物序列根据基因数据库(Genbank)中美洲株和欧洲株的病毒 RNA 中高度保守的开放阅读框 ORF7(N 基因)设计。引物的序列为:

上游引物 P1:5'-GCGGATCCATGCCAAATAACAAC-3';

下游引物 P2:5'-AGCTCGAGTCATGCTGAGGGTGA-3'。

C.2 PRRSV 特异性片段的序列

```

1 atgcaaata acaacggcaa gcagcaaaag aaaaagaagg ggaatggcca gcctgtcaat
61 cagctgtgcc aatgctggg taagatcgc gcccaacaaa accagtccag aggcaaggga
121 ccggggaaga aaaataggaa gaaaaccgc gagaagcccc atttcctct agcgactgaa
181 gatgacgtca ggcacactt taccctagt gagcggcaat tgtgtctgtc gtcgatccag
241 actgccttca atcagggcgc tggaacttgt acctgtcag attcagggag gataagttac
301 actgtggagt ttagtttggc gagcaacat actgtgcgtc tgatccgcgc cacagcatca
361 ccctcagcat ga

```

前 言

本标准的修订参照了世界动物卫生组织(OIE)编写的《陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽与蜜蜂)》(第五版,2004)。其技术内容与 OIE 所推荐的基本一致。

本标准代替 GB/T 18090—2000《猪繁殖和呼吸综合症诊断方法》。

本标准与 GB/T 18090—2000 相比主要变化如下:

——增加了临床诊断;

——免疫过氧化物酶单层试验作连续 4 倍稀释,结果的判定按照 OIE 编写的《陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽与蜜蜂)》(第五版,2004)的内容作了相应的修改;

——增加了反转录聚合酶链反应试验。

本标准的附录 A、附录 B 是规范性附录,附录 C 是资料性附录。

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归口。

本标准起草单位:中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:孙颖杰、苏永生、胡传伟、吴斌、李叶、贾赞、肇惠君。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——GB/T 18090—2000。

猪繁殖与呼吸综合征诊断方法

二级水加至 1 000 mL
用冰乙酸调整至 pH 5.0。

B.6.3 乙酸盐缓冲液

冰乙酸(CH₃COOH) 14.8 mL
乙酸钠溶液 35.2 mL
二级水 50 mL
用冰乙酸调整至 pH 5.0。

B.6.4 显色/底物溶液(AEC-H₂O₂)

乙酸盐缓冲液 19 mL
AEC 贮存液 1 mL
30%过氧化氢(H₂O₂) 10 μL
充分混合后,用 5 μm 滤纸过滤,现用现配。

B.7 底物溶液(用于间接 ELISA)

B.7.1 0.1 mol/L 柠檬酸溶液

柠檬酸(C₆H₈O₇) 1.92 g
二级水加至 100 mL

B.7.2 0.1 mol/L 磷酸氢二钠溶液

磷酸氢二钠(Na₂HPO₄ · 12H₂O) 3.58 g
二级水加至 100 mL

B.7.3 底物溶液(TMB-H₂O₂)

0.1 mol/L 柠檬酸溶液 33.0 mL
0.1 mol/L 磷酸氢二钠溶液 66.0 mL
四甲基联苯胺(TMB) 40.0 mg
30%过氧化氢(H₂O₂) 1.5 mL
充分混合后装于褐色玻璃瓶避光存放。现用现配。

B.8 终止液(用于间接 ELISA)

1 mol/L 氢氟酸(HF)溶液。

B.9 无 RNA 酶溶液的配制

配制溶液所用的三氯甲烷、无水乙醇、异丙醇等应采用未开封的新品,配置溶液所使用的一级水、容器、移液器吸嘴等应无 RNA 酶污染,操作过程中应戴一次性的塑料或乳胶手套,避免人体的 RNA 酶污染。

B.9.1 DEPC 水

一级水 100 mL
DEPC 100 μL
18 ℃~22 ℃室温下过夜,121 ℃、15 min 灭菌,或直接购买商品化的产品。

B.9.2 75%乙醇

DEPC 水 25 mL
无水乙醇 75 mL
用无水乙醇和 DEPC 水配制,-20 ℃预冷。

1 范围

本标准规定了猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)的诊断方法。
本标准适用于猪繁殖与呼吸综合征的诊断。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

3 符号和缩略语

下列符号和缩略语适用于本标准。

bp——碱基对;
CPE——致细胞病变作用;
DEPC——焦碳酸二乙酯;
dNTP——脱氧核苷三磷酸;
EB——溴化乙锭;
HRP——辣根过氧化物酶;
IFA——间接免疫荧光试验;
IPMA——免疫过氧化物酶单层试验;
PBS——磷酸盐缓冲盐水;
PRRS——猪繁殖与呼吸综合征;
RNA——核糖核酸;
RT-PCR——反转录-聚合酶链反应;
Taq 酶——*Taq* DNA 聚合酶。

4 临床诊断

急性感染初期,猪群表现为食欲低下、发热、昏睡和精神不振等症状,个别猪可出现双耳、外阴、腹部、口部青紫发绀,一般持续 1 周~3 周;发病高峰的主要特征是母猪早产、流产以及木乃伊胎和弱仔增多;仔猪断奶前死亡率增加,高峰期一般持续 8 周~12 周;发病末期,母猪繁殖功能逐渐恢复,达到或接近病前水平。仔猪和育肥猪存在不同程度的呼吸系统症状,痊愈猪一般生长缓慢,体重较轻。若没有继发感染,除发病仔猪可见间质性肺炎等特征病变外,一般不表现肉眼可见病变。

有以上临床症状者,可以怀疑猪群有猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)感染,确诊需要实验室检验。