



中华人民共和国国家标准

GB/T 16551—2020
代替 GB/T 16551—2008

猪 瘟 诊 断 技 术

Diagnostic techniques for classical swine fever

2020-12-14 发布

2020-12-14 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 缩略语	1
4 临床症状与病理变化	2
4.1 临床症状	2
4.2 病理变化	2
4.3 结果判定	2
5 样本的采集、保存、运输和处理	2
5.1 器材	2
5.2 试剂	2
5.3 样品采集	3
5.4 保存与运输	3
5.5 样本处理	3
6 实验室病原学诊断方法	3
6.1 免疫荧光抗体试验 (FAT)	3
6.2 免疫过氧化物酶试验 (IPT)	4
6.3 猪痘病毒分离与鉴定	5
6.4 猪痘病毒 RT-nPCR 检测方法	6
6.5 猪痘病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法	6
7 实验室抗体检测方法	6
7.1 猪痘病毒中和试验	6
7.2 猪痘病毒阻断 ELISA 抗体检测方法	9
7.3 猪痘抗体间接 ELISA 检测方法	9

7.4 猪瘟病毒化学发光抗体检测方法	9
8 综合判定.....	10
附录 A(规范性附录) 试剂配制	11
附录 B(规范性附录) 猪瘟病毒 TCID50测定	14
附录 C(规范性附录) 校准品的制备	15

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 16551—2008《猪瘟诊断技术》。与 GB 16551—2008 相比，主要技术变化如下：

- 修改了“范围”（见第 1 章，2008 年版的第 1 章）；
- 增加了“规范性引用文件”（见第 2 章）；
- 增加了“缩略语”（见第 3 章）；
- 修改了“临床及病理学诊断”部分，并更名为“临床症状与病理变化”（见第 4 章，2008 年版的第 2 章）；
- 增加了“样本的采集、保存、运输和处理”部分（见第 5 章）；
- 修改了“病原学诊断”部分，并更名为“实验室病原学诊断方法”（见第 6 章，2008 年版的第 3 章）；
- 删除了“兔体交互免疫试验”部分（见 2008 年版的 3.1）；
- 修改了“免疫酶染色试验”和“直接免疫荧光抗体试验”部分，更名为“免疫荧光抗体试验（FAT）”和“免疫过氧化物酶试验（IPT）”（见 6.1、6.2，2008 年版的 3.2 3.4）；
- 修改了“病毒分离与鉴定试验”部分，更名为“猪瘟病毒分离与鉴定”（见 6.3，2008 年版的 3.3）；
- 删除了“猪瘟病毒反转录聚合酶链式反应（RT-PCR）”（见 2008 年版的 3.5）；
- 增加了“猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法”和“猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法”（见 6.4 6.5）；
- 修改了“血清学诊断”部分，并更名为“实验室抗体检测方法”（见第 7 章，2008 年版的第 4 章）；
- 修改了“荧光抗体病毒中和试验”部分，并更名为“猪瘟病毒中和试验”（见 7.1，2008 年版的 4.1）；
- 删除了“猪瘟单抗酶联免疫吸附试验”（见 2008 年版的 4.2）；
- 增加了“猪瘟病毒阻断 ELISA 抗体检测方法”“猪瘟抗体间接 ELISA 检测方法”和“猪瘟病毒化学发光抗体检测方法”（见 7.2 7.3 7.4）。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

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。

引 言

猪瘟(Classical swine fever,CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus,CSFV)感染猪引起的一种高度接触性致死性传染性疾病,可造成巨大的经济损失和社会影响。被世界动物卫生组织(OIE)列为必须报告的疫病,我国规定 CSF为一类动物疫病。

猪包括野猪是本病唯一的自然宿主,发病猪和带毒猪是本病的传染源,不同年龄、性别、品种的猪均易感,一年四季均可发生。感染猪在发病前能通过分泌物和排泄物排毒,并持续整个病程。与感染猪直接接触是本病传播的主要方式,病毒也可通过精液、胚胎、猪肉和泔水等方式间接传播,人、其他动物如鼠类和昆虫、器具等均可成为重要传播媒介。

CSFV是黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pestivirus)的成员之一,只有1个血清型,3个基因型,10个基因亚型,不同基因型间有很好的抗原交叉反应。近年来,由于临床上出现了CSFV持续性感染所致的无典型临床症状和病理变化的慢性和隐性感染形式,以及多种疫病混合感染的现象,CSF的临床诊断和病理学诊断只能作为初步诊断的依据,对CSF病原的实验室检测是确定病毒感染的主要方法,要求诊断技术和标准更加特异和敏感。由于诊断的需求和诊断技术的发展,GB/T 16551—2008已经不适应要求。针对CSF感染普遍存在病毒载量低、病毒血症时间短等特点,最适用于活体动物的检测样本首先是扁桃体,其次为抗凝全血;若为病死动物,可采集扁桃体、脾脏、肾脏、胰脏、回肠、回盲瓣、肠系膜淋巴结和颌下淋巴结等含毒量较高的脏器进行检测。采用CSFV抗原免疫检测法[免疫荧光抗体试验(Fluorescent antibody test,FAT)/免疫过氧化物酶试验(Immunoperoxidase test,IPT)]可检测感染组织和细胞中的病毒抗原,用于确诊;如果结果可疑或者样本不足,可以通过核酸检测技术确认。如果样本量大,可采用猪瘟病毒实时荧光RT-PCR检测方法进行初筛,阳性者采用猪瘟病毒RT-nPCR检测方法和序列测定进行确诊和基因分型;上述都不能确诊的样本,采用经典的CSFV分离技术确诊,分离的病毒可用于进一步研究。上述三类方法均为OIE推荐的方法。

目前,实施CSF疫苗全面免疫是我国防控CSF的重要手段,CSFV抗体检测主要用于CSF疫苗的免疫效果评价,而对于一些不实施免疫CSF疫苗的国家 and 地区来说,CSF抗体检测可以作为未免疫猪瘟疫疫苗猪群感染CSF的诊断依据。而在我国,ELISA方法已成为监测免疫后CSFV抗体保护水平、评价猪群免疫效果的最主要手段,根据检测目的不同,可选择不同的方法。对于我国CSF疫苗采取的全面免疫后而开展的大规模普查,间接ELISA抗体检测方法能够更加真实地反映中和抗体水平,为免疫程序制定和抗体水平监测提供可靠的数据支持;阻断ELISA抗体检测方法因其特异性强,可用于引种的种猪检测;化学发光抗体检测方法是近年来发展起来的一种新的酶联免疫检测方法,利用化学发光底物提高检测的灵敏度,同时增加检测的线性范围。本标准中的CSFV化学发光抗体检测方法中采用了CSFV抗体的校准品,并在检测中绘制校准曲线,可以使抗体检测结果相对定量。另外,采用该方法进行检测,能够大大缩短检测时间,适应于田间推广使用。最终的抗体确认可采用“金标准”方法病毒中和试验(Virus neutralization test,VNT)。ELISA方法和VNT两类方法均为OIE推荐的方法,也是国际

贸易指定试验。

本标准中涉及了 5 种 CSF 病原和 4 种 CSFV 抗体的实验室检测方法，均可用于 CSF 病原和抗体的定性检测。使用者可根据自身的实验条件、能力水平以及待检样本的实际情况选择合适的方法。

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及 7.2 和 7.3 与 CSFV E2 蛋白表达及纯化相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证，他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，

就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：中国兽医药品监察所。

地址：北京中关村南大街 8 号。

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

猪 瘟 诊 断 技 术

1 范围

本标准规定了猪瘟的临床症状与病理变化，样本的采集、保存、运输和处理，实验室病原学诊断方法以及实验室抗体检测方法等。

本标准适用于猪（家猪、野猪）的猪瘟诊断。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27540 猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR检测方法

GB/T 34729—2017 猪瘟病毒阻断 ELISA抗体检测方法

GB/T 35906 猪瘟抗体间接 ELISA检测方法

GB/T 36875 猪瘟病毒 RT-nPCR检测方法

NY/T 541 兽医诊断样本采集、保存与运输技术规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CSF: 猪瘟 (Classical swine fever)

CSFV: 猪瘟病毒 (Classical swine fever virus)

EDTA: 乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic acid)

ELISA: 酶联免疫吸附试验 (Enzyme linked immunosorbent assay)

FAT: 免疫荧光抗体试验 (Fluorescent antibody test)

IFC: 异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate)

HRP: 辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase)

PT: 免疫过氧化物酶试验 (Immunoperoxidase test)

MEM: 基础 Eagle 培养基 (Minimum eagle's medium)
NCU: 国家临床单位 (National clinical unit)

NF: 免疫荧光中和试验 (Neutralization-immunofluorescence)

NPLA: 过氧化物酶联中和试验 (Neutralization peroxidase-linked antibody)

PBS: 磷酸盐缓冲溶液 (Phosphate buffered saline)

PK-15: 猪肾传代细胞系 (Pig kidney-15 cell line)

RT-nPCR: 巢式 PCR 技术 (Reverse transcription nest polymerase chain reaction)

RT-PCR: 反转录聚合酶链式反应 (Reverse transcription polymerase chain reaction)

TCID₅₀: 组织半数感染剂量 (50% tissue culture infective dose)

4 临床症状与病理变化

4.1 临床症状

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：

- a) 发病急、病死率高；
- b) 体温 ≥ 40.5 °C 或间歇性发热；
- c) 精神萎靡、畏寒、厌食甚至废食，呕吐、步态不稳或跛行；
- d) 先便秘后腹泻，或便秘和腹泻交替出现；
- e) 腹部皮下、鼻镜、耳尖、四肢内侧均可出现紫色出血斑点，指压不褪色，结膜炎；
- f) 怀孕母猪有流产、死胎、“木乃伊”胎或所产仔猪有衰弱、震颤、痉挛、发育不良等现象。

4.2 病理变化

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

- a) 淋巴结水肿、出血，呈现红白相间“大理石样变”；
- b) 肾脏呈土黄色，表面可见出血点，部分病例可见雀斑肾；
- c) 全身浆膜、黏膜和心脏、膀胱、胆囊、扁桃体均可见出血点和出血斑；
- d) 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；
- e) 慢性 CSF 在回肠末端、盲肠和结肠常见“纽扣状”溃疡。

4.3 结果判定

易感猪出现 4.1 或 4.2 的情况，可判定为疑似 CSF。

确诊应采集有临床症状或病理变化的猪的扁桃体、脾脏、肾脏、胰脏、回肠、回盲瓣、肠系膜淋巴结和颌下淋巴结等组织（若无法采集组织，也可采集抗凝全血，但会大大降低检测的敏感性）按实验室病原学诊断方法进行确诊。

5 样本的采集、保存、运输和处理

5.1 器材

- 5.1.1 扁桃体活体采样箱（包括鼻捻子、开口器和采样枪）。
- 5.1.2 无菌剪刀。
- 5.1.3 无菌镊子。

5.1.4 无菌离心管。

5.1.5 无菌注射器。

5.1.6 医用 EDTA抗凝采血管。

5.1.7 一次性密封袋。

5.1.8 组织匀浆器或研磨器。

5.1.9 冷冻离心机。

5.2 试剂

5.2.1 MEM培养液。

5.2.2 双抗储液,见 A.1。

5.2.3 75%酒精,见 A.2。

5.3 样品采集

5.3.1 活体动物扁桃体的采集

采集活体猪扁桃体时,用鼻捻子固定猪上唇,用开口器打开口腔,用采样枪采集扁桃体样本,放入离心管中并编号。

5.3.2 活体动物抗凝全血的采集

采用 75%酒精对待采血动物颈部前腔静脉表面皮肤进行擦拭消毒。用无菌注射器于前腔静脉采血,立即注入医用 EDTA抗凝采血管,充分混匀后编号备用。

5.3.3 组织样品采集

病死猪可采集扁桃体、淋巴结、胰脏、脾脏、回肠、肝脏和肾脏等含毒量较高的组织脏器。若组织或脏器出现了典型的病理变化,宜采集病健交界处的组织,不宜采集病变严重且出现继发感染(如细菌感染)的组织。采样时用无菌的剪刀和镊子剪切至少 1 g,装入一次性自封袋或离心管,编号。

5.4 保存与运输

采集的样本应放入主容器密封后,采用保温容器加冰袋或干冰密封,应在 8 h之内运送到实验室。样本相关生物安全标识和运送流程应按照 NY/T 541 的相关规定执行。

样本到达实验室后,在 2 °C ~ 8 °C条件下保存应 ≤24 h。若需长期保存,应放置于超低温冰箱(≤-70 °C),避免反复冻融。

5.5 样本处理

5.5.1 生物安全措施

样本处理的生物安全措施按 GB 19489 规定的相关操作进行。

5.5.2 组织样本的处理

将病料用无菌眼科剪和眼科镊进行修剪(病灶与健康组织的交界处),处理不同组织病料应更换手套并消毒操作器械。取 1 g 大小的病料组织,置于无菌离心管中,再向其中加入无菌 MEM 培养液(含 2%双抗)1 mL。在 2 °C ~ 8 °C温度下置于匀浆机中匀浆,将匀浆液于 4 °C温度下 8 000 r/min 离心 5 min,取上清,置于另一个无菌离心管中,待检。

5.5.3 抗凝全血的处理

将抗凝全血样本直接分装于无菌离心管中,在 4 °C下 8 000 r/min离心 5 min,取上清,置于另一个无菌离心管中,待检。

6 实验室病原学诊断方法

6.1 免疫荧光抗体试验 (FAT)

6.1.1 概述

本方法快速、特异,可用于检测扁桃体、淋巴结、脾脏、胰脏、肾脏和回肠远端等组织样品的冰冻切片

或触片以及细胞培养物中的病毒抗原。样本需在无防腐剂的冷藏条件下运送，但样本不能冻结。根据 FITC 标记的抗体不同，可分为直接法和间接法。

6.1.2 器材

6.1.2.1 倒置荧光显微镜。

6.1.2.2 恒温培养箱。

6.1.2.3 湿盒（带盖子的长方形容容器，底部铺一层湿纱布）。

6.1.2.4 盖玻片。

6.1.25 微量移液器 (200 μL , 1 000 μL)。

6.1.3 试剂

6.1.3.1 PBS 缓冲液，见 A.3。

6.1.32 丙酮， $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷。

6.1.3.3 固定液，见 A.9。

6.1.3.4 缓冲甘油，见 A.4。

6.1.3.5 抗体：直接法采用 FITC 标记的抗 CSFV 的单克隆或多克隆抗体；间接法采用抗 CSFV 的单克隆或多克隆抗体及相应的 FITC 标记二抗。

6.1.4 操作步骤

6.1.4.1 将待检的组织样本制成冰冻切片或触片，将液体吸干后用预冷的丙酮固定 5 min~10 min，自然干燥；细胞培养物弃去孔中液体，用 PBS 缓冲液漂洗 3 次后，自然干燥，每孔加入适量固定液固定 30 min。每个样本应做 3 个重复切片或触片。固定后用 PBS 缓冲液漂洗 3 次，自然干燥。同时采用阳性组织和阴性组织进行相同处理，分别作为阳性对照和阴性对照。

6.1.4.2 染色方法，以下两种可任选其一：

a) 直接法：滴加工作浓度的 FITC 标记的抗 CSFV 的单克隆或多克隆抗体，覆盖于样本表面，置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒避光作用 30 min~40 min，用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。

b) 间接法：滴加工作浓度的抗 CSFV 的单克隆或多克隆抗体，覆盖于样本表面，置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒作用 1 h 后，用 PBS 缓冲液洗涤 3 次，再加入工作浓度的 FITC 标记二抗，置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒避光作用 30 min~40 min，用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。

6.1.4.3 将组织切片放置室温干燥 5 min，于组织样本表面滴加适量缓冲甘油，用盖玻片覆盖样本；细胞培养物表面滴加适量 PBS 缓冲液。将样本直接置于倒置荧光显微镜下观察结果。

6.1.4.4 实验成立条件和结果判定：当细胞胞浆中出现亮绿色荧光着染时，判为染色阳性；细胞胞浆无着染，判为染色阴性。当阳性对照为染色阳性，阴性对照为染色阴性时，实验结果成立。待检样本的 3 个重复切片或触片中至少一个出现染色阳性时，即判该样本为 CSFV 阳性；否则，判为阴性。

6.2 免疫过氧化物酶试验 (IPT)

6.2.1 概述

本方法原理与 FAT相似，但抗体标记物为 HRP,根据标记的抗体不同，可分为直接法和间接法。在普通光学显微镜下可观察结果，且细胞板或组织切片能长期保存、反复观察。

6.2.2 器材

器材包括倒置光学显微镜和其他器材（按 6.1.2.2~6.1.2.5 执行）。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/167011102134006135>