

ICS 65.020.30
B 41



中华人民共和国国家标准

GB/T 18090—2000

猪繁殖和呼吸综合症诊断方法

Diagnostic methods of porcine reproductive
and respiratory syndrome

2000-04-26 发布

2000-10-01 实施

国家质量技术监督局 发布

目 次

前言	I
1 范围	1
2 诊断方法的种类和选用	1
3 病毒的分离与鉴定	1
4 免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)	2
5 间接免疫荧光试验(IFA)	3
6 间接酶联免疫吸附试验(间接 ELISA)	4
7 血清中和试验(SN)	5
8 综合判定	7
附录 A(标准的附录) 血清学试验中试剂的配制	8
附录 B(标准的附录) 猪肺泡巨噬细胞(PAM)制备、鉴定、保存与复苏	9
附录 C(标准的附录) 猪繁殖和呼吸综合症病毒 TCID ₅₀ 测定	11

前 言

猪繁殖和呼吸综合症(简称 PRRS)是由 PRRS 病毒引起的一种接触传染性疾病。各种年龄的猪均易感染。妊娠母猪感染后可引起流产、死胎、木乃伊胎及弱胎,仔猪可发生呼吸障碍和高病死率,其他猪常呈隐性感染或仅出现轻度的呼吸道症状。PRRS 病毒有欧洲型和美洲型两种主要抗原型,分别以 LV 和 VR-2332 为代表株,型间具有明显的抗原交叉反应性。据现有资料,我国流行的毒株为美洲型。本病几乎发生于世界各养猪国家,并于九十年代中期传入我国。由于其对养猪业的严重威胁性,国际兽疫局(1996)已将本病列为 B 类传染病。

大连动植物检疫局在国内率先开展了 PRRS 的研究工作,建立了具有与国际同等水平的病毒分离鉴定、间接免疫荧光试验和血清中和试验等诊断方法。其他单位也相继建立了多种酶联免疫吸附试验等。

本标准是在综合我国科研成果的基础上,参照国际兽疫局(OIE)编写的《哺乳动物、禽和蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册》(第三版,1996)编写的。其技术内容与 OIE 所推荐的基本一致。

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 都是标准的附录。

本标准由农业部提出。

本标准起草单位:中华人民共和国大连动植物检疫局。

本标准起草人:孙颖杰、苏永生、潘凤城、孙延峰、简中友。

中华人民共和国国家标准

猪繁殖和呼吸综合症诊断方法

GB/T 18090—2000

Diagnostic methods of porcine reproductive and respiratory syndrome

1 范围

本标准规定了猪繁殖和呼吸综合症(PRRS)的诊断方法。

本标准适用于猪繁殖和呼吸综合症的诊断。

2 诊断方法的种类和选用

PRRS 的诊断方法有多种。依据临床症状和病理变化只可作出初步诊断,确诊必须依靠实验室检查。目前已建立和应用的实验室诊断技术有病毒的分离与鉴定、免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)、间接免疫荧光试验(IFA)、间接酶联免疫吸附试验(间接 ELISA)和血清中和试验(SN)等。病毒的分离与鉴定多用于急性病例的确诊和新疫区的确定。其余 4 种方法主要用于检测 PRRS 病毒抗体。IPMA、IFA 和间接 ELISA 三者特异性相似,但以间接 ELISA 的敏感性最高。应用这三种方法一般不易区别病毒的抗原类型,故多适用于确定病性。SN 反应具有明显的抗原型别差异,因此,它既适用于确定病性,也适用于鉴定病毒的抗原类型。中和抗体出现最晚,不适合于早期诊断。

本标准指定上述五种实验室诊断技术为我国进出境和国内生猪 PRRS 的诊断方法,保证了我国对 PRRS 的诊断与国外的一致性。在实际应用时,可根据需要和条件,从中选用 1~2 种方法即可。

3 病毒的分离与鉴定

3.1 材料准备

3.1.1 器材:96 孔细胞培养板、微量移液器、恒温水浴箱、二氧化碳(CO₂)恒温箱、普通冰箱及低温冰箱、离心机及离心管、组织研磨器、孔径 0.2 μm 的微孔滤膜、普通光学显微镜。

3.1.2 试剂:RPMI1640 营养液、犊牛血清、青霉素(10⁴ IU/mL)与链霉素(10⁴ μg/mL)溶液、7.5%碳酸氢钠溶液等。

3.1.3 细胞培养物:猪原代肺泡巨噬细胞培养物(PAM)或 MARC-145 或 HS₂H 细胞。PAM 由无 PRRS 猪获取,并经批次检验合格,制备和检验方法见附录 B。MARC-145 或 HS₂H 细胞由国家指定单位提供。

3.1.4 样品

3.1.4.1 样品的采取和送检:在发病早期,无菌地采取病猪的血清或腹水。对病死猪(如流产的死胎)和扑杀猪(如弱胎猪),应立即采取肺、扁桃体和脾等组织数小块,置冰瓶内立即送检。不能立即检查者,应放-25℃~-30℃冰箱中,或加 50%甘油生理盐水,4℃保存送检。

3.1.4.2 样品的处理:血清和腹水可直接使用。肺、脾和扁桃体等组织可单独使用,也可混合后使用。各组织剪碎后研磨成糊状,加入 RPMI1640 营养液,制成 10%悬液,3 000×g 离心 15 min,吸取上清液,加入青霉素 500 IU/mL、链霉素 500 μg/mL、庆大霉素 500 μg/mL 和两性霉素 B 200 μg/mL。怀疑有细菌