

ICS 11.220
B 41



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
国家标准化管理委员会 发布

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 猪瘟病毒分离与鉴定	5
6.4 猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法	6
6.5 猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法	6
7 实验室抗体检测方法	6
7.1 猪瘟病毒中和试验	6
7.2 猪瘟病毒阻断 ELISA 抗体检测方法	9
7.3 猪瘟抗体间接 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 TCID ₅₀ 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。

本标准主要起草人:王琴、赵启祖、徐璐、王在时、张乾义、夏应菊、范学政、邹兴启、朱元源、李翠、丘惠深、赵耘、徐媛。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 16551—2008。

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)
 FITC:异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate)
 HRP:辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase)
 IPT: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)
 NIF: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)