

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 548—2002

猪传染性胃肠炎诊断技术

Diagnostic techniques for transmissible gastroenteritis

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

猪传染性胃肠炎(transmissible gastroenteritis,简称 TGE)是由冠状病毒属中的猪传染性胃肠炎病毒导致的高度传染性猪胃肠道病。以呕吐、水样腹泻为临床特征,不同年龄的猪都易感,但一周龄以内的仔猪死亡率可达 100%,随着年龄的增大,死亡率逐渐下降。大多数养猪国家都有本病发生,给养猪业造成巨大的经济损失。世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health (英),Office International des Epizootic (法),OIE]将 TGE 定为 B 类传染病,是我国法定检疫的疫病。

本标准主要参考了世界动物卫生组织《诊断试验和疫苗标准手册》(2000)及国内外发表的同类研究试验报告。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由农业部畜牧兽医局提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。

本标准主要起草人:马思奇、王明、冯力、佟有恩。

猪传染性胃肠炎诊断技术

1 范围

本标准规定了猪传染性胃肠炎的病毒分离鉴定与检测病毒抗原的直接免疫荧光法、双抗体夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)及检测血清抗体的中和试验、间接 ELISA 试验技术。

本标准适用于对猪传染性胃肠炎的临床诊断、产地检疫及流行病学调查等。

2 材料准备

2.1 器材

倒置显微镜、冷冻离心机、微孔滤膜、滤器、细胞培养瓶、盖玻片、温箱、荧光显微镜、冰冻切片机、载玻片、滴管、定量加液器、微量吸液器及配套吸头、96孔或40孔聚乙烯微量反应板、单通道、8通道微量吸液器及配套吸头、二氧化碳培养箱、微量振荡器及小培养瓶、酶标测试仪等。

2.2 溶液的配制

0.02 mol/L pH7.2 磷酸盐缓冲液、细胞培养液、病毒培养液、HEPES 液、0.1%伊文斯蓝原液、磷酸盐缓冲甘油、洗液、包被稀释液、样品稀释液、酶标抗体稀释液、底物溶液、终止液,配制方法见附录 A。

2.3 试剂

荧光抗体(FA),猪抗 TGE-IgG 及猪抗 TGE-IgG-HRP,病毒抗原和标准阴、阳性血清,抗原和酶标抗体。

2.4 细胞

仔猪肾原代细胞或 PK₁₅、ST 细胞系。细胞培养液,配制方法见附录 A。

3 病毒分离鉴定

3.1 病毒分离

3.1.1 病料采集

采病仔猪空肠两端扎住,取其内容物及小肠用于分离病毒,样品冷冻保存。

3.1.2 病料处理

将采集的小段空肠剪碎及肠内容物用含青霉素 10000IU、链霉素 10 000 μg/mL 的磷酸盐缓冲液(PBS)液(见第 A.1 章)制成 5 倍悬液,在 4℃条件下 3 000 r/min 离心 30 min,取上清液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,分装, -20℃保存备用。

3.1.3 接种及观察

将过滤液(病毒培养液的 10%)(见第 A.3 章)接种细胞单层上,在 37℃吸附 1 h 后补加病毒培养液,逐日观察细胞病变(CPE),连续 3 d~4 d,按 CPE 变化情况可盲传 2 代~3 代。

3.2 病毒鉴定

CPE 变化的特点:细胞颗粒增多,圆缩,呈小堆状或葡萄串样均匀分布,细胞破损,脱落。对不同细胞培养物,CPE 可能有些差异。分离病毒用细胞瓶中加盖玻片培养,收毒时取出盖玻片(包括接毒与不接毒对照片)用直接荧光法做鉴定。鉴定方法和结果判定见第 4 章。

4 直接免疫荧光法

4.1 样品

组织标本:从急性病例采取空肠(中段)、扁桃体、肠系膜淋巴结任选一种组织;慢性、隐性感染病例