

ICS 11.220
B 41



中华人民共和国国家标准

GB/T 19200—2003

猪水泡病诊断技术

Diagnostic techniques for swine vesicular disease

2003-06-17 发布

2003-12-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

猪水泡病(Swine Vesicular Disease,简称 SVD)是猪的一种烈性传染病,被世界动物卫生组织[World Organization for Animal Health(英),Office International des Epizooties(法),OIE]列为 A 类疾病,我国将其列为一类动物疫病。本病主要在猪的蹄踵、蹄冠、唇、舌、鼻及乳头部引起水泡,临床症状与猪口蹄疫(Foot and Mouth Disease,简称 FMD)相似。

本标准提出的实验室方法主要是以世界动物卫生组织(OIE)《哺乳动物、禽、蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册》为依据,并结合我国实际情况制定,其中“猪水泡病反向间接血凝试验”是我国建立的方法。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E 均为规范性附录。附录 F 为资料性附录。

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:中国农业科学院兰州兽医研究所。

本标准主要起草人:张永光、牟克斌、王永录、刘西兰、方玉珍。

猪水泡病诊断技术

1 范围

本标准规定了猪水泡病病毒分离及鉴定,反向间接血凝试验(RIHA)、琼脂凝胶免疫扩散试验(AGID)和病毒中和试验(VN)的技术要求。

本标准适用于猪水泡病的诊断。反向间接血凝试验和琼脂凝胶免疫扩散试验适用于大批样品筛选试验,包括产地检疫、疫情监测、流行病学调查和无本病健康猪群的建立;病毒中和试验(VN)适用于诊断和进出口猪检疫及抗体水平的评估。

2 病毒分离及鉴定

2.1 材料准备

2.1.1 灭菌注射器,研钵。

2.1.2 pH 7.6、0.05 mol/L 的磷酸缓冲液(PB),pH7.6、50%的丙三醇磷酸缓冲液(GPB),pH7.2、0.11 mol/L的磷酸缓冲液(PB),配制方法见附录 A。

2.1.3 仔猪肾传代细胞(IB-RS-2),乳鼠。

2.1.4 细胞培养液,见附录 B。

2.2 样品的采集及处理

2.2.1 水泡液:将水泡表面用 75%酒精棉球消毒,用注射器抽取水泡液,直接放入灭菌小瓶中,加盖封口,避光送至实验室,不做处理直接用于检测。

2.2.2 水泡皮:采集鼻镜、蹄部新鲜水泡皮,采集量为 0.5 g 以上,放入预先加有 pH7.6、50%的 GPB 的灭菌瓶中,加盖封口,送至实验室。

2.3 细胞分离

2.3.1 新鲜水泡液不做任何处理,可直接使用。当 IB-RS-2 长满单层细胞后,弃去培养液,加入水泡液,以能淹没细胞单层为宜,于 37℃感作 30 min,然后补加 4 倍于水泡液的细胞培养液,置 37℃培养。每天在倒置显微镜下观察 2 次,48 h 终判,若细胞培养液对照孔成立,分离病毒的细胞孔细胞出现变圆乃至脱落,则视为细胞病变(CPE)判为阳性,若 48 h 不出现 CPE,则应冻融 2 次,再传 3 代,不出现 CPE,判为阴性,出现 CPE,则需做进一步鉴定。

2.3.2 水泡皮的分离,将水泡皮用 pH7.2、0.11 mol/L PB 洗 2 次~3 次,用灭菌滤纸吸去水分,称其质量后置于加少量石英砂或玻璃砂的研钵中,按质量体积比(1:2)~(1:5)加入 pH7.2、0.11 mol/L PB 研磨,制成悬液,室温浸毒 1 h 或 4℃ 12 h,以 3 000 r/min 离心 20 min~30 min,取上清液用于病毒分离。

2.4 乳鼠分离

2.4.1 乳鼠为 2~3 日龄小鼠,每份材料接种 4 只小鼠,每只颈背部皮下接种 0.1 mL~0.2 mL,在母鼠哺乳下观察 5 天。

2.4.2 若 5 天内出现神经症状乃至死亡,剥皮去头及内脏,将肌肉及骨骼一起称量,按质量体积比加 9 倍的细胞培养液,加玻璃砂研磨制成悬液,置 4℃浸毒过夜,以 1 000 r/min 离心 10 min,取上清液用于进一步鉴定。

2.5 反向间接血凝试验(RIHA)鉴定分离物