

ICS 11.220
B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 544—2002

猪流行性腹泻诊断技术

Diagnostic techniques for porcine epidemic diarrhoea

2002-08-27 发布

2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

猪流行性腹泻是猪的严重传染病之一，症状与猪传染性胃肠炎相似，病毒形态上也基本相同，但两者的抗原性不一样。本标准是根据国内研究成果和参考国外同类研究成果编写的。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 均为规范性附录。

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、中国人民解放军军需大学。

本标准主要起草人：马思奇、王明、宣华、冯力、佟有恩。

猪流行性腹泻诊断技术

1 范围

本标准规定了猪流行性腹泻(PED)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),检测抗体的血清中和试验、间接 ELISA 试验技术。

本标准适用于对猪流行性腹泻的诊断、产地检疫及流行病学调查等。

2 病毒分离与鉴定

2.1 材料准备

2.1.1 器材

倒置显微镜,冷冻离心机,微孔滤器,细胞培养瓶,盖玻片,温箱等。

2.1.2 培养基及溶液的配制

磷酸盐缓冲液(PBS)、细胞培养液、病毒培养液及 N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸(HEPES)液(配制方法见附录 A)。

2.1.3 细胞

Vero 细胞系。

2.2 病毒分离

2.2.1 病料采集

采病仔猪空肠内容物及小肠内容物用于分离病毒,样品冷冻保存。

2.2.2 病料处理

将采集的小段空肠连同肠内容物用含 1 000 IU/mL 青霉素、1 000 μ g/mL 链霉素、PBS 液制成 5 倍悬液,在 4℃ 条件下 3 000 r/min 离心 30 min,取上清液,经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,分装,-20℃ 保存备用。

2.2.3 接种及观察

将过滤液(病毒培养液的 10%)接种于 Vero 细胞单层上,同时加过滤液量 50% 的病毒培养液,37℃ 吸附 1 h,根据组织培养瓶大小添加病毒培养液至病毒培养总量,置 37℃ 培养,逐日观察 3 d~4 d,按致细胞病变作用(CPE)变化情况,可盲传 2 代~3 代。

2.3 结果判定

CPE 变化的特点是:细胞面粗糙,颗粒增多,有多核细胞(7 个~8 个甚至几十个),并可见空斑样小区,细胞逐渐脱落,这是特征性的 CPE,可与(猪)传染性胃肠炎(TGE)病毒的 CPE 相区别。同时在细胞培养瓶加盖玻片,收毒后用直接荧光做鉴定试验。有条件时可进行电镜观察,用负染法在阳性样品中电镜观察可见到冠状病毒粒子。

3 直接荧光抗体法

3.1 材料准备

3.1.1 器材:荧光显微镜、冷冻切片机、载玻片、盖玻片、温箱、滴管等。

3.1.2 荧光抗体(FA)。

3.1.3 溶液配制:磷酸盐缓冲液(PBS)、0.1%伊文思蓝原液、磷酸盐缓冲甘油(配制方法见附录 B)。