

ICS 11.220
B 41



中华人民共和国国家标准

GB/T 18935—2003

口蹄疫诊断技术

Diagnostic techniques for foot-and-mouth disease

2003-01-10 发布

2003-05-01 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

口蹄疫(food-and-mouth disease,简称 FMD)是哺乳动物的一种接触烈性传染病,可引起易感偶蹄兽潜在的严重经济损失。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,我国列为一类动物疫病。FMD 病毒有 7 个血清型,分别为 O、A、C、SAT1、SAT2、SAT3 和 Asial。本病临床上表现为口、舌、唇、鼻、蹄、乳房等部位发生水泡、破溃形成烂斑。FMD 在临床上不易与其他水泡性疾病(猪水泡病、水泡性疹和水泡性口炎)区别。

本标准的诊断方法参考 OIE《诊断试验和疫苗标准手册》(2000 版)的推荐方法,并结合我国有关动物防疫法,以及相关政策和法规制定的。在技术上与国际先进技术保持一致。其中病毒中和试验、液相阻断-酶联免疫吸附试验是国际贸易指定试验。

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 是规范性附录。

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:朱彩珠、卢永干。

口蹄疫诊断技术

1 范围

本标准规定了口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)的微量补体结合试验、食道探杯查毒试验、反转录-聚合酶链反应(RT-PCR),病毒中和试验、液相阻断-酶联免疫吸附试验、病毒感染相关抗原(VIA)琼脂凝胶免疫扩散(AGID)试验的技术要求。

本标准所规定的试验技术适用于检测各种不同样品中的口蹄疫病毒抗原或抗体。

2 微量补体结合试验

2.1 材料

2.1.1 样品采集和抗原制备

2.1.1.1 样品的采集、保存和运送的方法和要求见附录 A。

2.1.1.2 抗原制备:在无菌室内将水泡皮或乳鼠胴体用磷酸盐缓冲液(PBS)洗净,用灭菌滤纸吸干后称重。放在灭菌研钵中先剪碎,后加灭菌石英砂研磨。加磷酸盐缓冲液(PBS)(pH7.4)制成1:4悬液。水泡液也以PBS作1:4稀释,可与组织悬液合并。室温浸毒2h以上,或4℃冰箱过夜。3000 r/min离心10 min。分离出上清液;58℃水浴灭活40 min。再3000 r/min离心10 min。取上清液为待检抗原。

2.1.2 抗体

口蹄疫病毒O、A和亚洲-1型,及猪水泡病病毒(SVDV)豚鼠高免血清。

2.1.3 补体

健康成年公豚鼠新鲜血清。加保存液(Richardson'液)后,可4℃保存6个月。使用前滴定效价。

2.1.4 溶血素

兔抗绵羊红细胞抗血清,使用前滴定效价。

2.1.5 红细胞

成年健康绵羊红血球。试验当天制备2.8%工作液和敏化红细胞。

2.1.6 主要仪器和器材

“U”形底96孔微量滴定板,微量可调移液器及配套尖头,转头经改装可插入微量板的离心机,光电比色计。

2.1.7 缓冲液配制方法(见附录B)

2.2 预备试验

2.2.1 2.8%红细胞悬液的制备

将脱纤的(绵羊)红细胞用VBD洗涤3次。每次加5倍于红细胞体积的VBD轻摇混匀,1500 r/min离心10 min。吸去上清液后再加入VBD,反复3次。最后吸取2.8 mL红细胞泥加入盛有97.2 mL VBD的三角瓶中,充分混匀。取0.5 mL红细胞悬液,加4.5 mL蒸馏水。对照管加5 mL蒸馏水。用波长625 nm滤光片的光电比色计测定该初配制的红细胞悬液的OD值。按标准2.8%红细胞悬液的标准OD值=42,用式(1)校正该初配红细胞悬液的浓度。

$$\text{应加缓冲液的总数(mL)} = \frac{\text{初配红细胞悬液用VBD量(mL)} \times \text{OD值}}{\text{标准OD值(42)}} \times (1)$$