

ICS 11.220
B 41



中华人民共和国国家标准

GB/T 18641—2002

伪狂犬病诊断技术

Diagnostic techniques for Aujeszki's disease

2002-02-19 发布

2002-05-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
伪 狂 犬 病 诊 断 技 术
GB/T 18641—2002

*

中国标准出版社出版发行
北京西城区复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

<http://www.bzcbs.com>

电话:63787337、63787447

2002年7月第一版 2004年11月电子版制作

*

书号: 155066·1-18545

版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533

前 言

伪狂犬病(pseudorabies, PR; Aujeszky's disease, AD)是危害猪、牛、羊、狗、猫、家兔等多种家畜和野生动物的一种急性传染病。除猪以外的动物感染伪狂犬病病毒后,主要是以发热、奇痒和脑脊髓炎症状为特征,以死亡为结局,并呈散发形式。本病对养猪业危害最大,猪感染后可引起妊娠母猪流产、产死胎和木乃伊胎;仔猪大量死亡,15日龄内死亡率为100%,断奶仔猪死亡率10%~20%,种猪不育,母猪返情,空怀,公猪睾丸发炎肿胀、萎缩、失去种用能力;育肥猪增重缓慢、饲料报酬降低。本病呈世界性分布。

本标准规定的病原学诊断方法主要用于死亡动物的病料检测和活体动物的鼻拭子样品检测,其中聚合酶链反应具有快速、灵敏的特点,可用于大批样品的检测。血清学诊断主要用于非免疫动物的诊断、血清流行病学调查和免疫动物的抗体水平监测。中和试验特异性强,是国际通用的法定方法,可用于口岸进出口检疫;胶乳凝集试验,简便快速、敏感性高、特异性强,适用于基层现场检测;酶联免疫吸附试验适用于实验室大批样品检查、产地检疫、流行病学调查和无本病健康猪群的建立。

本标准的附录A、附录B、附录C、附录D都是标准的附录,附录E是提示的附录。

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。

本标准由华中农业大学畜牧兽医学院负责起草,农业部动物检疫所参加起草。

本标准主要起草人:陈焕春、何启盖、李晓成、吴斌、方六荣、金梅林、邱德新、吴美州。

中华人民共和国国家标准

GB/T 18641—2002

伪狂犬病诊断技术

Diagnostic techniques for Aujeszki's disease

1 范围

本标准规定了伪狂犬病的诊断方法。

本标准适用于猪、羊、犬、猫等及其他易感动物伪狂犬病的诊断。其中病毒分离鉴定、聚合酶链式反应、家兔接种试验适用于伪狂犬病病毒的检测；中和试验、酶联免疫吸附试验适用于非免疫动物伪狂犬病抗体的检测以及免疫后抗体水平的监测；胶乳凝集试验适用于实验室和现场对伪狂犬病抗体的早期检测。

2 病毒分离鉴定

2.1 试验材料

改良最低要素营养液(DMEM)培养基配方见附录 A(标准的附录),仓鼠肾细胞(BHK₂₁)或猪肾细胞系(PK-15)细胞,新生犊牛血清,青霉素,链霉素,0.22 μm 微孔滤膜,细胞培养瓶。

2.2 操作步骤

2.2.1 病料的采集:对死亡病畜或活体送检并处死的动物,以无菌手术采集大脑、三叉神经节、扁桃体、肺等组织,冷藏送实验室检测。

2.2.2 样品处理:待检组织在灭菌乳钵内剪碎,加入灭菌玻璃砂研磨,用灭菌生理盐水或 DMEM 培养液(见附录 A)制成 1:5 乳剂,反复冻融三次,经 3 000 r/min 离心 30 min 后,取上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,加入青霉素溶液至最终浓度为 300 IU/mL、链霉素为 100 μg/mL, -70℃ 保存作为接种材料。

2.2.3 病料接种:将病料滤液接种已长成单层的 BHK₂₁ 细胞(或 PK-15 细胞),接种量为培养液量的 10%,37℃ 恒温箱中吸附 1 h,加入含 10% 新生犊牛血清(已经过 56℃ 水浴灭活 30 min,过滤除菌,无支原体)的 DMEM 培养液,置 37℃ 温箱中培养。

2.2.4 观察结果:接种后 36 h~72 h,细胞应出现典型的细胞病变效应(CPE),表现为细胞变圆,拉网、脱落。如第一次接种不出现细胞病变,应将细胞培养物冻融后盲传三代,如仍无细胞病变,则判为伪狂犬病病毒检测阴性。

2.2.5 病毒的鉴定:将出现细胞病变的细胞培养物,用聚合酶链反应或家兔接种试验,或作进一步鉴定。

3 聚合酶链反应

3.1 试验材料

蛋白酶 K,十二烷基硫酸钠(SDS),苯酚,三氯甲烷,异戊醇(分析纯),溴化乙锭(EB),TEN 缓冲液〔见附录 B(标准的附录)〕。

引物:扩增伪狂犬病毒基因中 434~651 碱基对(bp)之间 217 bp 基因片段,序列为:上游引物 P1: