



中华人民共和国国家标准

GB/T 16551—2020
代替 GB/T 16551—2008

猪 瘟 诊 断 技 术

Diagnostic techniques for classical swine fever

2020-12-14 发布

2020-12-14 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言 III

引言 IV

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 缩略语 1

4 临床症状与病理变化 2

 4.1 临床症状 2

 4.2 病理变化 2

 4.3 结果判定 2

5 样本的采集、保存、运输和处理 2

 5.1 器材 2

 5.2 试剂 2

 5.3 样品采集 3

 5.4 保存与运输 3

 5.5 样本处理 3

6 实验室病原学诊断方法 3

 6.1 免疫荧光抗体试验(FAT) 3

 6.2 免疫过氧化物酶试验(IPT)..... 4

 6.3 猪瘟病毒分离与鉴定 5

 6.4 猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法 6

 6.5 猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法 6

7 实验室抗体检测方法 6

 7.1 猪瘟病毒中和试验 6

 7.2 猪瘟病毒阻断 ELISA 抗体检测方法 9

 7.3 猪瘟抗体间接 ELISA 检测方法 9

 7.4 猪瘟病毒化学发光抗体检测方法 9

8 综合判定..... 10

附录 A (规范性附录) 试剂配制 11

附录 B (规范性附录) 猪瘟病毒 TCID₅₀测定 14

附录 C (规范性附录) 校准品的制备 15



前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 16551—2008《猪瘟诊断技术》。与 GB 16551—2008 相比,主要技术变化如下:

- 修改了“范围”(见第 1 章,2008 年版的第 1 章);
- 增加了“规范性引用文件”(见第 2 章);
- 增加了“缩略语”(见第 3 章);
- 修改了“临床及病理学诊断”部分,并更名为“临床症状与病理变化”(见第 4 章,2008 年版的第 2 章);
- 增加了“样本的采集、保存、运输和处理”部分(见第 5 章);
- 修改了“病原学诊断”部分,并更名为“实验室病原学诊断方法”(见第 6 章,2008 年版的第 3 章);
- 删除了“兔体交互免疫试验”部分(见 2008 年版的 3.1);
- 修改了“免疫酶染色试验”和“直接免疫荧光抗体试验”部分,更名为“免疫荧光抗体试验(FAT)”和“免疫过氧化物酶试验(IPT)”(见 6.1、6.2,2008 年版的 3.2、3.4);
- 修改了“病毒分离与鉴定试验”部分,更名为“猪瘟病毒分离与鉴定”(见 6.3,2008 年版的 3.3);
- 删除了“猪瘟病毒反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)”(见 2008 年版的 3.5);
- 增加了“猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法”和“猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法”(见 6.4、6.5);
- 修改了“血清学诊断”部分,并更名为“实验室抗体检测方法”(见第 7 章,2008 年版的第 4 章);
- 修改了“荧光抗体病毒中和试验”部分,并更名为“猪瘟病毒中和试验”(见 7.1,2008 年版的 4.1);
- 删除了“猪瘟单抗酶联免疫吸附试验”(见 2008 年版的 4.2);
- 增加了“猪瘟病毒阻断 ELISA 抗体检测方法”“猪瘟抗体间接 ELISA 检测方法”和“猪瘟病毒化学发光抗体检测方法”(见 7.2、7.3、7.4)。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位:中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人:王琴、赵启祖、徐璐、王在时、张乾义、夏应菊、范学政、邹兴启、朱元源、李翠、丘惠深、赵耘、徐嫒。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 16551—2008。



引 言

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)感染猪引起的一种高度接触性致死性传染性疾病,可造成巨大的经济损失和社会影响。被世界动物卫生组织(OIE)列为必须报告的疫病,我国规定 CSF 为一类动物疫病。

猪包括野猪是本病唯一的自然宿主,发病猪和带毒猪是本病的传染源,不同年龄、性别、品种的猪均易感,一年四季均可发生。感染猪在发病前能通过分泌物和排泄物排毒,并持续整个病程。与感染猪直接接触是本病传播的主要方式,病毒也可通过精液、胚胎、猪肉和泔水等方式间接传播,人、其他动物如鼠类和昆虫、器具等均可成为重要传播媒介。

CSFV 是黄病毒科(Flaviviridae)瘟病毒属(Pestivirus)的成员之一,只有 1 个血清型,3 个基因型,10 个基因亚型,不同基因型间有很好的抗原交叉反应。近年来,由于临床上出现了 CSFV 持续性感染所致的无典型临床症状和病理变化的慢性和隐性感染形式,以及多种疫病混合感染的现象,CSF 的临床诊断和病理学诊断只能作为初步诊断的依据,对 CSF 病原的实验室检测是确定病毒感染的主要方法,要求诊断技术和标准更加特异和敏感。由于诊断的需求和诊断技术的发展,GB/T 16551—2008 已经不适应要求。针对 CSF 感染普遍存在病毒载量低、病毒血症时间短等特点,最适用于活体动物的检测样本首先是扁桃体,其次为抗凝全血;若为病死动物,可采集扁桃体、脾脏、肾脏、胰脏、回肠、回盲瓣、肠系膜淋巴结和颌下淋巴结等含毒量较高的脏器进行检测。采用 CSFV 抗原免疫检测法[免疫荧光抗体试验(Fluorescent antibody test, FAT)/免疫过氧化物酶试验(Immunoperoxidase test, IPT)]可检测感染组织和细胞中的病毒抗原,用于确诊;如果结果可疑或者样本不足,可以通过核酸检测技术确认。如果样本量大,可采用猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法进行初筛,阳性者采用猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法和序列测定进行确诊和基因分型;上述都不能确诊的样本,采用经典的 CSFV 分离技术确诊,分离的病毒可用于进一步研究。上述三类方法均为 OIE 推荐的方法。

目前,实施 CSF 疫苗全面免疫是我国防控 CSF 的重要手段,CSFV 抗体检测主要用于 CSF 疫苗的免疫效果评价,而对于一些不实施免疫 CSF 疫苗的国家 and 地区来说,CSF 抗体检测可以作为未免疫猪瘟疫疫苗猪群感染 CSF 的诊断依据。而在我国,ELISA 方法已成为监测免疫后 CSFV 抗体保护水平、评价猪群免疫效果的最主要手段,根据检测目的不同,可选择不同的方法。对于我国 CSF 疫苗采取的全面免疫后而开展的大规模普查,间接 ELISA 抗体检测方法能够更加真实地反映中和抗体水平,为免疫程序制定和抗体水平监测提供可靠的数据支持;阻断 ELISA 抗体检测方法因其特异性强,可用于引种的种猪检测;化学发光抗体检测方法是近年来发展起来的一种新的酶联免疫检测方法,利用化学发光底物提高检测的灵敏度,同时增加检测的线性范围。本标准中的 CSFV 化学发光抗体检测方法中采用了 CSFV 抗体的校准品,并在检测中绘制校准曲线,可以使抗体检测结果相对定量。另外,采用该方法进行检测,能够大大缩短检测时间,适应于田间推广使用。最终的抗体确认可采用“金标准”方法病毒中和试验(Virus neutralization test, VNT)。ELISA 方法和 VNT 两类方法均为 OIE 推荐的方法,也是国际贸易指定试验。

本标准中涉及了 5 种 CSF 病原和 4 种 CSFV 抗体的实验室检测方法,均可用于 CSF 病原和抗体的定性检测。使用者可根据自身的实验条件、能力水平以及待检样本的实际情况选择合适的方法。

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及 7.2 和 7.3 与 CSFV E2 蛋白表达及纯化相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构保证,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,

就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：中国兽医药品监察所。

地址：北京中关村南大街 8 号。

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

猪 瘟 诊 断 技 术

1 范围

本标准规定了猪瘟的临床症状与病理变化,样本的采集、保存、运输和处理,实验室病原学诊断方法以及实验室抗体检测方法等。

本标准适用于猪(家猪、野猪)的猪瘟诊断。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 27540 猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

GB/T 34729—2017 猪瘟病毒阻断 ELISA 抗体检测方法

GB/T 35906 猪瘟抗体间接 ELISA 检测方法

GB/T 36875 猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法

NY/T 541 兽医诊断样本采集、保存与运输技术规范

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CSF:猪瘟(Classical swine fever)

CSFV:猪瘟病毒(Classical swine fever virus)

EDTA:乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic acid)

ELISA:酶联免疫吸附试验(Enzyme linked immunosorbent assay)

FAT:免疫荧光抗体试验(Fluorescent antibody test)

FITC:异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate)

HRP:辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase)

IPT:免疫过氧化物酶试验(Immunoperoxidase test)

MEM:基础 Eagle 培养基(Minimum eagle's medium)

NCU:国家临床单位(National clinical unit)

NIF:免疫荧光中和试验(Neutralization-immunofluorescence)

NPLA:过氧化物酶联中和试验(Neutralization peroxidase-linked antibody)

PBS:磷酸盐缓冲溶液(Phosphate buffered saline)

PK-15:猪肾传代细胞系(Pig kidney-15 cell line)

RT-nPCR:巢式 PCR 技术(Reverse transcription nest polymerase chain reaction)

RT-PCR:反转录聚合酶链式反应(Reverse transcription polymerase chain reaction)

TCID₅₀:组织半数感染剂量(50% tissue culture infective dose)

4 临床症状与病理变化

4.1 临床症状

猪群中被检猪出现下列临床症状时,可作为综合诊断定性的依据之一:

- a) 发病急、病死率高;
- b) 体温 $\geq 40.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或间歇性发热;
- c) 精神萎靡、畏寒、厌食甚至废食,呕吐、步态不稳或跛行;
- d) 先便秘后腹泻,或便秘和腹泻交替出现;
- e) 腹部皮下、鼻镜、耳尖、四肢内侧均可出现紫色出血斑点,指压不褪色,结膜炎;
- f) 怀孕母猪有流产、死胎、“木乃伊”胎或所产仔猪有衰弱、震颤、痉挛、发育不良等现象。

4.2 病理变化

对临床检出的可疑患猪可进行病理学诊断,下述肉眼可见的病理变化可作为综合诊断定性的依据之一:

- a) 淋巴结水肿、出血,呈现红白相间“大理石样变”;
- b) 肾脏呈土黄色,表面可见出血点,部分病例可见雀斑肾;
- c) 全身浆膜、黏膜和心脏、膀胱、胆囊、扁桃体均可见出血点和出血斑;
- d) 脾脏不肿大,表面有点状出血或边缘出现突起的楔状梗死区;
- e) 慢性 CSF 在回肠末端、盲肠和结肠常见“纽扣状”溃疡。

4.3 结果判定

易感猪出现 4.1 或 4.2 的情况,可判定为疑似 CSF。

确诊应采集有临床症状或病理变化的猪的扁桃体、脾脏、肾脏、胰脏、回肠、回盲瓣、肠系膜淋巴结和颌下淋巴结等组织(若无法采集组织,也可采集抗凝全血,但会大大降低检测的敏感性)按实验室病原学诊断方法进行确诊。

5 样本的采集、保存、运输和处理

5.1 器材

- 5.1.1 扁桃体活体采样箱(包括鼻捻子、开口器和采样枪)。
- 5.1.2 无菌剪刀。
- 5.1.3 无菌镊子。
- 5.1.4 无菌离心管。
- 5.1.5 无菌注射器。
- 5.1.6 医用 EDTA 抗凝采血管。
- 5.1.7 一次性密封袋。
- 5.1.8 组织匀浆器或研磨器。
- 5.1.9 冷冻离心机。

5.2 试剂

- 5.2.1 MEM 培养液。



5.2.2 双抗储液,见 A.1。

5.2.3 75%酒精,见 A.2。

5.3 样品采集

5.3.1 活体动物扁桃体的采集

采集活体猪扁桃体时,用鼻捻子固定猪上唇,用开口器打开口腔,用采样枪采集扁桃体样本,放入离心管中并编号。

5.3.2 活体动物抗凝全血的采集

采用 75%酒精对待采血动物颈部前腔静脉表面皮肤进行擦拭消毒。用无菌注射器于前腔静脉采血,立即注入医用 EDTA 抗凝采血管,充分混匀后编号备用。

5.3.3 组织样品采集

病死猪可采集扁桃体、淋巴结、胰脏、脾脏、回肠、肝脏和肾脏等含毒量较高的组织脏器。若组织或脏器出现了典型的病理变化,宜采集病健交界处的组织,不宜采集病变严重且出现继发感染(如细菌感染)的组织。采样时用无菌的剪刀和镊子剪切至少 1 g,装入一次性自封袋或离心管,编号。

5.4 保存与运输

采集的样本应放入主容器密封后,采用保温容器加冰袋或干冰密封,应在 8 h 之内运送到实验室。

样本相关生物安全标识和运送流程应按照 NY/T 541 的相关规定执行。

样本到达实验室后,在 2℃~8℃ 条件下保存应≤24 h。若需长期保存,应放置于超低温冰箱(≤-70℃),避免反复冻融。

5.5 样本处理

5.5.1 生物安全措施

样本处理的生物安全措施按 GB 19489 规定的相关操作进行。

5.5.2 组织样本的处理

将病料用无菌眼科剪和眼科镊进行修剪(病灶与健康组织的交界处),处理不同组织病料应更换手套并消毒操作器械。取 1 g 大小的病料组织,置于无菌离心管中,再向其中加入无菌 MEM 培养液(含 2%双抗)1 mL。在 2℃~8℃ 温度下置于匀浆机中匀浆,将匀浆液于 4℃ 温度下 8 000 r/min 离心 5 min,取上清,置于另一个无菌离心管中,待检。

5.5.3 抗凝全血的处理

将抗凝全血样本直接分装于无菌离心管中,在 4℃ 下 8 000 r/min 离心 5 min,取上清,置于另一个无菌离心管中,待检。

6 实验室病原学诊断方法

6.1 免疫荧光抗体试验(FAT)

6.1.1 概述

本方法快速、特异,可用于检测扁桃体、淋巴结、脾脏、胰脏、肾脏和回肠远端等组织样品的冰冻切片

或触片以及细胞培养物中的病毒抗原。样本需在无防腐剂的冷藏条件下运送,但样本不能冻结。根据 FITC 标记的抗体不同,可分为直接法和间接法。

6.1.2 器材

- 6.1.2.1 倒置荧光显微镜。
- 6.1.2.2 恒温培养箱。
- 6.1.2.3 湿盒(带盖子的长方形容容器,底部铺一层湿纱布)。
- 6.1.2.4 盖玻片。
- 6.1.2.5 微量移液器(200 μL 、1 000 μL)。

6.1.3 试剂

- 6.1.3.1 PBS 缓冲液,见 A.3。
- 6.1.3.2 丙酮, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷。
- 6.1.3.3 固定液,见 A.9。
- 6.1.3.4 缓冲甘油,见 A.4。
- 6.1.3.5 抗体:直接法采用 FITC 标记的抗 CSFV 的单克隆或多克隆抗体;间接法采用抗 CSFV 的单克隆或多克隆抗体及相应的 FITC 标记二抗。

6.1.4 操作步骤

6.1.4.1 将待检的组织样本制成冰冻切片或触片,将液体吸干后用预冷的丙酮固定 5 min~10 min,自然干燥;细胞培养物弃去孔中液体,用 PBS 缓冲液漂洗 3 次后,自然干燥,每孔加入适量固定液固定 30 min。每个样本应做 3 个重复切片或触片。固定后用 PBS 缓冲液漂洗 3 次,自然干燥。同时采用阳性组织和阴性组织进行相同处理,分别作为阳性对照和阴性对照。

6.1.4.2 染色方法,以下两种可任选其一:

- a) 直接法:滴加工作浓度的 FITC 标记的抗 CSFV 的单克隆或多克隆抗体,覆盖于样本表面,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒避光作用 30 min~40 min,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。
- b) 间接法:滴加工作浓度的抗 CSFV 的单克隆或多克隆抗体,覆盖于样本表面,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒作用 1 h 后,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,再加入工作浓度的 FITC 标记二抗,置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 湿盒避光作用 30 min~40 min,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。

6.1.4.3 将组织切片放置室温干燥 5 min,于组织样本表面滴加适量缓冲甘油,用盖玻片覆盖样本;细胞培养物表面滴加适量 PBS 缓冲液。将样本直接置于倒置荧光显微镜下观察结果。

6.1.4.4 实验成立条件和结果判定:当细胞胞浆中出现亮绿色荧光着染时,判为染色阳性;细胞胞浆无着染,判为染色阴性。当阳性对照为染色阳性,阴性对照为染色阴性时,实验结果成立。待检样本的 3 个重复切片或触片中至少一个出现染色阳性时,即判该样本为 CSFV 阳性;否则,判为阴性。

6.2 免疫过氧化物酶试验(IPT)

6.2.1 概述

本方法原理与 FAT 相似,但抗体标记物为 HRP,根据标记的抗体不同,可分为直接法和间接法。在普通光学显微镜下可观察结果,且细胞板或组织切片能长期保存、反复观察。

6.2.2 器材

器材包括倒置光学显微镜和其他器材(按 6.1.2.2~6.1.2.5 执行)。

6.2.3 试剂

抗体:直接法采用 HRP 标记的抗 CSFV 的单克隆或多克隆抗体,间接法采用抗 CSFV 的单克隆或多克隆抗体及相应的 HRP 标记二抗。

底物显色液见 A.5。

其他试剂按照 6.1.3.1~6.1.3.4 执行。

6.2.4 操作步骤

6.2.4.1 操作步骤按照 6.1.4.1 执行。

6.2.4.2 染色方法,以下两种可任选其一:

- a) 直接法:滴加工作浓度的 HRP 标记的抗 CSFV 的单克隆或多克隆抗体,覆盖于样本表面,置 37 °C 湿盒避光作用 30 min~40 min,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。
- b) 间接法:滴加工作浓度的抗 CSFV 的单克隆或多克隆抗体,覆盖于样本表面,置 37 °C 湿盒作用 1 h 后,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次,再加入工作浓度的 HRP 标记二抗,置 37 °C 湿盒避光作用 30 min~40 min,用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。

6.2.4.3 组织样本表面滴加适量底物显色液,室温反应,待出现红褐色显色时,弃去底物显色液,用蒸馏水漂洗,终止显色反应。

6.2.4.4 将组织切片放置室温干燥 5 min,于组织样本表面滴加适量缓冲甘油,用盖玻片覆盖样本;细胞培养物表面滴加适量 PBS 缓冲液。样本直接置于普通光学显微镜下观察。

6.2.4.5 实验成立条件和结果判定:当细胞浆中出现红褐色着色时,判为染色阳性;细胞胞浆无着色,判为染色阴性。当阳性对照为染色阳性,阴性对照为染色阴性时,实验结果成立。待检样本的 3 个重复中至少一个出现染色阳性时,即判该样本为 CSFV 阳性;否则,判为阴性。

6.3 猪瘟病毒分离与鉴定

6.3.1 器材

6.3.1.1 25 cm² 细胞培养瓶。

6.3.1.2 24 孔细胞培养板。

6.3.1.3 细胞计数器。

6.3.1.4 微量移液器(200 μ L,1 000 μ L)。

6.3.1.5 一次性针式滤器(0.45 μ m、0.22 μ m)。

6.3.1.6 二氧化碳温箱。

6.3.1.7 倒置荧光显微镜(FAT 染色)或普通光学显微镜(IPT 染色)。

6.3.2 试剂

6.3.2.1 胰酶,见 A.6。

6.3.2.2 PBS 缓冲液,见 A.3。

6.3.2.3 MEM 培养液。

6.3.2.4 双抗储液(100 倍),见 A.1。

6.3.2.5 细胞生长液,见 A.7。

6.3.2.6 病毒维持液,见 A.8。

6.3.2.7 固定液,见 A.9。

6.3.2.8 抗体稀释液,见 A.10。

6.3.2.9 阳性对照:猪瘟兔化弱毒疫苗 C 株细胞毒,病毒滴度为 $10^{5.0}$ TCID₅₀/0.1 mL。

6.3.2.10 阴性对照:PK-15 细胞培养上清。

6.3.2.11 PK-15 细胞,或对病毒敏感性不低于 PK-15 细胞的猪肾和猪睾丸传代细胞系。

6.3.2.12 2% NaOH 消毒液,见 A.11。

6.3.3 操作步骤

6.3.3.1 细胞的制备:分离病毒前 24 h~36 h 制备细胞。用胰酶消化处于对数生长期的 PK-15 细胞单层,将所得细胞悬液以 1 500 r/min 离心 5 min,并用细胞生长液将细胞重悬,细胞计数器计数,调整细胞浓度至 2×10^6 个/mL,备用;也可取适量细胞悬液加入细胞培养瓶或 24 孔细胞培养板制备细胞单层,待细胞长至 60%~70%铺满孔底时备用。

6.3.3.2 待检样本的准备:取 5.5.2 和 5.5.3 中制备的组织悬液或全血,用 0.45 μ m 一次性针式滤器过滤,收集滤出液备用。

6.3.3.3 病毒接种和培养。以下 2 种接种方式可选其一:

- a) 同步接种:取 9 份细胞悬液(见 6.3.3.1)和 1 份待检样本(见 6.3.3.2)进行混合,取 5 mL 混合液加入细胞培养瓶中,同时接种 24 孔细胞培养板 2 孔,每孔 0.5 mL;24 孔细胞培养板上同时接种猪瘟兔化弱毒疫苗 C 株细胞毒作为阳性对照(9 份细胞悬液和 1 份细胞毒)2 孔和阴性对照(9 份细胞悬液和 1 份 PK-15 细胞培养上清)2 孔,每孔 0.5 mL。操作时一定要避免交叉污染。当接种完待检样本后,做好标记,置于 37 °C 含 5%二氧化碳温箱中培养 72 h。
- b) 单层细胞接种:待 6.3.3.1 中的细胞长至 60%~70%细胞单层后,弃去细胞培养上清,按细胞培养液 1/10 体积加入处理后的待检样本(见 6.3.3.2)于细胞培养瓶和 24 孔细胞培养板中,24 孔细胞培养板中同时接种 0.2 mL 阳性对照和阴性对照各 2 孔。置于 37 °C 含 5%二氧化碳温箱中吸附 1 h,期间每隔 15 min 晃动一次细胞瓶/板,使液体全部浸润细胞,防止细胞过分干燥死亡。吸出孔中液体,弃于 2%NaOH 溶液中进行灭活,用无血清 MEM 培养液漂洗瓶/板中细胞 3 次。加入适量细胞维持液于细胞培养瓶或细胞培养板中(例如:25 cm² 细胞培养瓶加入 5 mL 维持液,24 孔细胞培养板加入维持液 0.5 mL~1 mL);37 °C 含 5%二氧化碳温箱中放置 72 h。

6.3.3.4 检测和结果判定。病毒接种后 72 h,取出细胞培养板,吸出孔中液体于 2%NaOH 溶液中灭活。用 PBS 漂洗 3 次,置通风橱下干燥 5 min,用-20 °C 预冷的固定液固定 30 min 以上。弃去孔中固定液,PBS 缓冲液漂洗 3 次。可采用 6.1 或 6.2 的方法进行检验和结果判定。

6.3.3.5 病毒传代及扩大培养。如需对病毒阳性样本进行扩大培养,取出接种样本的细胞瓶反复冻融 3 次后收集瓶中液体,5 000g 离心 5 min,收集上清,即为 F1 代病毒细胞培养物;重复 6.3.3.3~6.3.3.5 共 2 次,进行扩大培养,获得第 3 代阳性培养物,冻存备用。根据需要对获得的阳性培养物进行病毒滴度测定(见附录 B)或基因分型等研究。如对检测结果有疑问可按上述方法盲传 2 代并进行检测。

6.4 猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法

猪瘟病毒 RT-nPCR 检测方法按照 GB/T 36875 执行。

6.5 猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法按照 GB/T 27540 执行。

7 实验室抗体检测方法

7.1 猪瘟病毒中和试验

根据抗体标记物的不同,猪瘟病毒中和实验可分为 NIF 和 NPLA。

7.1.1 免疫荧光中和试验(NIF)

7.1.1.1 器材

- 7.1.1.1.1 单道微量移液器(20 μ L、200 μ L)。
- 7.1.1.1.2 多道移液器(200 μ L)。
- 7.1.1.1.3 96 孔细胞培养板。
- 7.1.1.1.4 无菌移液器吸头(200 μ L)。
- 7.1.1.1.5 无菌离心管。
- 7.1.1.1.6 生物安全柜。
- 7.1.1.1.7 水浴锅。
- 7.1.1.1.8 二氧化碳温箱。
- 7.1.1.1.9 倒置荧光显微镜。

7.1.1.2 试剂

- 7.1.1.2.1 MEM 培养液。
- 7.1.1.2.2 病毒维持液,见 A.8。
- 7.1.1.2.3 CSFV 抗体阳性血清。
- 7.1.1.2.4 CSFV 抗体阴性血清。
- 7.1.1.2.5 PK-15 细胞。
- 7.1.1.2.6 猪瘟兔化弱毒疫苗 C 株细胞毒。
- 7.1.1.2.7 固定液,见 A.9。
- 7.1.1.2.8 PBS 缓冲液,见 A.3。
- 7.1.1.2.9 抗体稀释液,见 A.10。
- 7.1.1.2.10 抗体,见 6.1.3.5。

7.1.1.3 检验步骤

- 7.1.1.3.1 细胞的准备:用 96 孔细胞培养板培养 PK-15 细胞,待细胞铺满孔底 60%~70%时,备用。
- 7.1.1.3.2 血清的灭活:用移液器吸取 100 μ L 待检血清、CSFV 抗体阳性和阴性对照血清,分装于无菌离心管中,一份血清换一个移液器吸头。将分装后的待检血清和对照血清置于 56 $^{\circ}$ C 水浴锅中灭活 30 min。
- 7.1.1.3.3 病毒的稀释:在血清灭活期间,取适量已知毒价的猪瘟兔化弱毒疫苗细胞毒(猪瘟病毒 TCID₅₀测定见附录 B),用含 1%双抗的无血清 MEM 培养液将病毒稀释至 200 TCID₅₀/0.1 mL。
- 7.1.1.3.4 血清与病毒的中和:取 1 块 96 孔细胞培养板(记为板 I),每孔加入含 1%双抗的无血清 MEM 培养液 80 μ L。将 7.1.1.3.2 灭活后的待检血清和对照血清按顺序加入上述培养液中,每孔 20 μ L,每份血清做 2 个重复。此时,待检/对照血清均被稀释 5 倍。血清稀释后,向板 I 中每孔加入 100 μ L 7.1.1.3.3 中的病毒液,此时血清的最终稀释倍数为 10 倍。将板 I 置于 37 $^{\circ}$ C 含 5%二氧化碳温箱中孵育 1 h。
- 7.1.1.3.5 孵育结束后,将 7.1.1.3.1 中制备的 PK-15 细胞板(记为板 II),用多道移液器吸净上清,然后迅速加入板 I 中对应孔中的血清-病毒混合液,每孔 100 μ L。

注:进行此步骤操作时,以两列为单位进行操作,例如:先用多道移液器吸净板 II 中 1 列、2 列细胞培养液,然后迅速从板 I 中吸取 1 列、2 列孔中液体加入板 II 的对应孔中。

- 7.1.1.3.6 将板 II 置于 37 $^{\circ}$ C 含 5%二氧化碳温箱中孵育 1 h。
- 7.1.1.3.7 取出板 II,每孔加入维持液 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 含 5%二氧化碳温箱中孵育 72 h。

7.1.1.3.8 取出板Ⅱ,弃去孔中液体,用 PBS 缓冲液漂洗三次,在吸水滤纸上轻拍后,置于通风橱下干燥 5 min。每孔加入 -20°C 预冷的固定液 $100\ \mu\text{L}$, -20°C 放置 30 min 以上。

7.1.1.3.9 细胞染色。弃去孔中固定液,PBS 缓冲液漂洗 3 次。可采用直接法或间接法进行细胞染色:

- a) 直接法:用抗体稀释液将 FITC 标记的 CSFV 单克隆/多克隆抗体稀释至工作浓度,每孔加入 $50\ \mu\text{L}$, 37°C 避光反应 1 h,直接进入 7.1.1.3.10。
- b) 间接法:将 CSFV 多克隆/单克隆抗体用稀释液稀释至工作浓度。向板Ⅱ中加入稀释后的抗体,每孔加入 $50\ \mu\text{L}$, 37°C 反应 1 h。取出板Ⅱ,弃去孔中液体。用 PBS 缓冲液漂洗 3 次。将 FITC 标记的二抗用抗体稀释液稀释至工作浓度,加入到板Ⅱ各孔中,每孔 $50\ \mu\text{L}$, 37°C 避光反应 30 min~45 min。

7.1.1.3.10 取出板Ⅱ,弃去孔中液体。用 PBS 缓冲液漂洗 3 次。

7.1.1.3.11 将板Ⅱ置于荧光倒置显微镜下观察。

7.1.1.4 实验成立条件和结果判定

当细胞胞浆中出现亮绿色荧光时,判为染色阳性;细胞胞浆无着染,判为染色阴性。CSFV 抗体阳性对照血清均为染色阴性,阴性对照血清均为染色阳性时,实验成立。

血清的 2 个重复孔中,2 孔均为染色阳性,则该血清判为 CSFV 抗体阴性;若 2 孔均为染色阴性,则该血清判为 CSFV 抗体阳性;若 2 孔中 1 孔为染色阳性、1 孔为染色阴性,则该血清判为可疑,应重复检测,若仍为疑似结果,则判为 CSFV 抗体阴性。

7.1.2 过氧化物酶联中和试验(NPLA)

7.1.2.1 器材

器材包括倒置光学显微镜、其他器材。

其他器材按照 7.1.1.1.1~7.1.1.1.8 执行。

7.1.2.2 试剂

抗体按 6.2.3 执行。

底物显色液,见 A.5。

其他试剂按照 7.1.1.2.1~7.1.1.2.9 执行。

7.1.2.3 检验步骤

7.1.2.3.1 检验步骤按 7.1.1.3.1~7.1.1.3.8 执行。

7.1.2.3.2 细胞染色。可采用直接法或间接法进行细胞染色:

- a) 直接法:用抗体稀释液将 HRP 标记的 CSFV 单克隆/多克隆抗体稀释至工作浓度,每孔加入 $50\ \mu\text{L}$, 37°C 避光反应 1 h。
- b) 间接法:将 CSFV 多克隆/单克隆抗体用稀释液稀释至工作浓度。向板Ⅱ中加入稀释后的抗体,每孔加入 $50\ \mu\text{L}$, 37°C 反应 1 h。取出板Ⅱ,弃去孔中液体。用 PBS 缓冲液漂洗 3 次。将 HRP 标记的二抗用抗体稀释液稀释至工作浓度,加入到板Ⅱ各孔中,每孔 $50\ \mu\text{L}$, 37°C 避光反应 30 min~45 min。

7.1.2.3.3 取出板Ⅱ,弃去孔中液体。用 PBS 缓冲液漂洗 3 次。

7.1.2.3.4 向各孔中滴加底物显色液 $50\ \mu\text{L}$,待阴性血清对照孔细胞出现红褐色显色时,弃去孔中液体,加入蒸馏水漂洗两次,终止反应。

7.1.2.3.5 将板Ⅱ置于倒置光学显微镜下观察。

7.1.2.4 实验成立条件及结果判定

当细胞胞浆中出现红褐色着染时,判为染色阳性;细胞胞浆无着染,判为染色阴性。CSFV 抗体阳性对照血清均为染色阴性,抗体阴性对照血清均为染色阳性时,实验成立。

血清的 2 个重复孔中,2 孔均为染色阳性,则该血清判为 CSFV 抗体阴性;若 2 孔均为染色阴性,则该血清判为 CSFV 抗体阳性;若 2 孔中 1 孔为染色阳性、1 孔为染色阴性,则该血清判为可疑,应重复检测,若仍为疑似结果,则判为 CSFV 抗体阴性。

7.2 猪瘟病毒阻断 ELISA 抗体检测方法

猪瘟病毒阻断 ELISA 抗体检测方法按照 GB/T 34729—2017 执行。

7.3 猪瘟抗体间接 ELISA 检测方法

猪瘟抗体间接 ELISA 检测方法按照 GB/T 35906 执行。

7.4 猪瘟病毒化学发光抗体检测方法

7.4.1 器材和设备

7.4.1.1 37 °C 温箱。

7.4.1.2 化学发光仪。

7.4.1.3 微量移液器(200 μ L、1 000 μ L)。

7.4.1.4 多道移液器(200 μ L)。

7.4.1.5 移液器吸头。

7.4.1.6 化学发光板。

7.4.1.7 血清稀释板。

7.4.2 试剂

7.4.2.1 CSFV E2 蛋白:见 GB/T 34729—2017 中附录 A,或采用等效抗原。

7.4.2.2 酶结合物:见 GB/T 34729—2017 的附录 B。

7.4.2.3 校准品:见附录 C。

7.4.2.4 包被液:见 A.12。

7.4.2.5 封闭液:见 A.13。

7.4.2.6 洗涤液:见 A.14。

7.4.2.7 发光底物 A:见 A.15。

7.4.2.8 发光底物 B:见 A.16。

7.4.2.9 商品化试剂盒:可选择商品化试剂盒。

7.4.3 检测步骤

7.4.3.1 包被:将 CSFV E2 蛋白用包被液稀释至 0.1 μ g/mL,按 100 μ L 每孔加入到化学发光板中,37 °C 包被 3 h。包被结束后,弃去孔中液体,每孔加入洗涤液 300 μ L,洗涤 2 次。

7.4.3.2 封闭:每孔加入新鲜配制的封闭液 300 μ L,37 °C 封闭 2 h。封闭结束后,弃去孔中液体,37 °C、湿度 \leq 40%环境下干燥 3 h。放入干燥剂,密封包装,置 2 °C~8 °C 保存。

7.4.3.3 样本稀释和加样:每次实验需设置系列校准品 6 孔。首先在血清稀释板上依次加入校准品 1~校样品 6(见附录 C)各 60 μ L,其余各孔依次加入待检样本各 60 μ L,再向以上各孔均加入 60 μ L 酶结合

物,震荡混匀;每孔吸取 100 μL 转移至包被 E2 蛋白的化学发光板对应孔内。37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中反应 30 min。吸取不同血清时需要更换吸头。

7.4.3.4 洗涤:弃去孔中液体,每孔加入 300 μL 洗涤液,室温放置 3 min,洗涤 5 次,甩干洗涤液。或用自动洗板机洗板 5 次。

7.4.3.5 加底物和显色:每孔加入 50 μL 化学发光底物 A 和 50 μL 的化学发光底物 B,振荡混匀。也可将化学发光底物 A、B 等比例混匀后取 100 μL 加入到各孔。在 18 $^{\circ}\text{C}$ ~26 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光静置 5 min。

7.4.3.6 化学发光仪读取发光值。

7.4.3.7 绘制校准曲线:以校准品发光值为纵坐标,对应的 NCU 为横坐标,绘制校准品的四参数拟合曲线,将样本的发光值代入校准曲线计算,即可得出样本中 CSFV 抗体的含量(NCU/mL)。

7.4.3.8 结果判定:如果样本中抗体含量 ≤ 20 NCU/mL,样本应判定为阴性;如果样本中抗体含量 ≥ 20 NCU/mL,则判定为阳性。

8 综合判定

8.1 临床症状与病理变化判定为典型的疑似猪病料,按 6.1 或 6.2 检测为 CSFV 抗原阳性,或按 6.3 分离出 CSFV,或按 6.4 和 6.5 检测出 CSFV 核酸,同时与流行病学史相符合,均可判定为 CSF 阳性。

8.2 临床症状与病理变化无明显特征的疑似猪的病料,按 6.1 或 6.2 检测为 CSFV 抗原阳性,或按 6.3 分离出 CSFV(一般需盲传培养),或按 6.4 和 6.5 检测出 CSFV 核酸,同时与流行病学史相符合,均可判定为 CSF 阳性。

8.3 若临床症状与病理变化的诊断结果与 6.1 或 6.2,或与 6.4 和 6.5 不符合,按 6.3 分离出 CSFV,可判定为 CSF 阳性。

8.4 从未暴发过 CSF 的场(地区),临床症状与病理变化判定为典型的疑似猪的病料,至少需要 6.1~6.3 中两种方法诊断为阳性,或 6.4 或 6.5 诊断为阳性,才可判定为 CSF 阳性。

8.5 若待检病料按第 6 章检测为 CSFV 抗原阳性,需判断是否为 CSFV 野毒感染或疫苗免疫所致。如待检病料采自 50 d 内未免疫过猪瘟疫苗的动物,可判定为野毒感染;若 50 d 内免疫过猪瘟疫苗,应采用 6.4 方法对阳性病料进行核酸扩增,并对目的片段进行测序,与猪瘟病毒免化弱毒疫苗株进行序列比对,确定基因亚型,最终鉴别诊断。

8.6 临床症状与病理变化无明显特征的未免疫且无母源猪瘟抗体的动物,按 7.1、7.2、7.3 或 7.4 任一项检测出 CSF 抗体的,可判定该动物曾经或正在感染 CSFV。

8.7 进行免疫效果评估时,可在免疫后约 21 d 进行抗体检测。可采用 7.1、7.2、7.3 或 7.4 任一项进行 CSF 抗体检测,检测结果为阳性的,判定为疫苗免疫合格。

附 录 A
(规范性附录)
试 剂 配 制

A.1 双抗储液(100 倍)

青霉素	10 ⁸ IU
链霉素	1 g
无菌蒸馏水	100 mL
无菌定量分装,于-20 ℃保存。	

A.2 75%酒精

无水乙醇(分析纯)	75 mL
无菌蒸馏水	25 mL
室温保存。	



A.3 PBS 缓冲液

氯化钠	8 g
氯化钾	0.2 g
磷酸氢二钠	1.42 g
磷酸二氢钾	0.27 g

加去离子水 800 mL,充分溶解后,用浓盐酸将 pH 值调节至 7.4,去离子水定容至 1 000 mL。高压灭菌 15 min(121 ℃±2 ℃),室温保存。

A.4 缓冲甘油

无水碳酸钠	0.6 g
碳酸氢钠	3.7 g

加 100 mL 蒸馏水或去离子水,充分溶解,调节 pH 值至 9.0~9.3,与等量甘油(分析纯)充分混合即可。

A.5 底物显色液

3,3-二氨基苯联胺	50 mg
Tris-HCl 缓冲液(0.01 mol/L,pH 值 7.6)	100 mL
充分溶解,加入 30%双氧水 10 μL~30 μL,现用现配。	
也可采用等效的商品化显色试剂盒。	

A.6 胰酶

胰酶(胰蛋白酶, Trypsin)	0.25 g
无菌 PBS 缓冲液	100 mL

将胰酶加于 PBS 缓冲液中, 4 ℃ 低温、低速过夜搅拌溶解, 用 0.22 μm 一次性滤器过滤分装, -20 ℃ 保存。也可采用等效的商品化试剂。

A.7 细胞生长液

MEM	475 mL
FBS	25 mL
双抗储液	1 mL

于 2 ℃~8 ℃ 保存。

A.8 病毒维持液

MEM	490 mL
FBS	10 mL
双抗储液	1 mL

于 2 ℃~8 ℃ 保存。

A.9 固定液

甲醇(分析纯)	50 mL
丙酮(分析纯)	50 mL

于 -20 ℃ 保存。

A.10 抗体稀释液

马血清	2 mL
PBS 缓冲液	98 mL

A.11 2%NaOH

NaOH	20 g
水	1 000 mL

充分溶解, 室温保存。



A.12 包被液

碳酸钠	1.59 g
碳酸氢钠	2.93 g

蒸馏水 800 mL
搅拌溶解,调节 pH 值至 9.6,再加蒸馏水定容至 1 000 mL。

A.13 封闭液

酪蛋白 10 g
蔗糖 50 g
PROCLIN-300 500 μ L
吐温-20 0.5 mL
蒸馏水定容至 1 000 mL

A.14 洗涤液

十二水合磷酸氢二钠 5.0 g
二水合磷酸二氢钠 70.0 g
氯化钠 170.0 g
吐温-20 16.0 mL

加去离子水至 800 mL,调 pH 值至 7.4~7.6,定容至 1 000 mL。高压灭菌 15 min(121 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C),室温保存。使用时,将 20 \times 浓缩洗液用蒸馏水或去离子水按 1 : 19 的比例混合即可。

A.15 发光底物 A

过氧化脲 1.0 g
碳酸盐缓冲液(0.05 mol/L,pH 值 9.6) 1 000 mL

A.16 发光底物 B

溶液 A: 
鲁米诺 0.1 g
0.1 mol/L 氢氧化钠 10 mL

溶液 B:
碘苯酚 3.0 g
无水乙醇 1 mL
溶液 A 和溶液 B 混合,用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液稀释至 1 000 mL。

附 录 B
(规范性附录)
猪瘟病毒 TCID₅₀ 测定

B.1 细胞的准备

预先 24 h~36 h 制备细胞,分散于 96 孔细胞培养板中进行培养,待细胞长至 60%~70%铺满孔底时,进行下列操作。

B.2 病毒的稀释

待检病毒液的稀释:取 8 个 1.5 mL 无菌离心管(分别标记为 1#~8#,对应的稀释度为 10^{-1} ~ 10^{-8}),向无菌离心管中加入 MEM 培养液,每管 900 μL 。吸取待测病毒原液 100 μL ,加入 1#管中,小心地反复吹打混匀,换吸头,从 1#管中吸取 100 μL 液体,加入 2#管中,小心地反复吹打混匀,换吸头,从 2#管中吸取 100 μL 液体,加到 3#管中,依次类推,至 8#管。

阳性对照的稀释:取已知病毒滴度的猪瘟病毒 C 株细胞毒,取适量体积的病毒原液,用 MEM 培养液将病毒液稀释至 200 TCID₅₀/100 μL 。

B.3 病毒的接种

将 B.2 中稀释后的病毒接种到 B.1 中的细胞板中。每个稀释度的病毒液接种 8 孔细胞。取出细胞板,用多道微量移液器吸第 1 列孔中液体,用 200 μL 微量移液器立即加入 1#管中病毒稀释液,每孔 100 μL ;用多道微量移液器吸净第 2 列孔中液体,更换吸头,用 200 μL 微量移液器立即加入 2#管中病毒稀释液,每孔 100 μL ;依次类推,至第 8 列。阳性对照加至第 9 列,第 10 列为无病毒的空白对照。37 $^{\circ}\text{C}$ 含 5%二氧化碳温箱放置 1 h。取出细胞板,弃去孔中液体,用 PBS 缓冲液漂洗 3 次,置通风橱下干燥 5 min,用 -20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的固定液固定 30 min 以上。

B.4 结果判定

采用 FAT(见 6.1)或 IPT(见 6.2)进行染色和判定。

B.5 病毒含量计算

记录不同稀释度阳性细胞孔数与阴性细胞孔数,按照 Reed-Muench 氏法计算病毒 TCID₅₀。

附 录 C
(规范性附录)
校准品的制备

C.1 材料

标准阳性血清:CSF 抗体阳性血清,CSFV 中和抗体效价为 1 : 10 000。

标准阴性血清:CSF 抗体阴性血清,CSF 中和抗体效价为阴性。

校准品稀释液:磷酸氢二钠 2.9 g、磷酸二氢钾 0.2 g、氯化钠 8 g、氯化钾 0.2 g,加入 800 mL 双蒸水搅拌溶解,再称取牛血清白蛋白 10 g 加入,量取 PROCLIN-300 500 μ L、吐温-20 1 mL 加入,而后加双蒸水定容至 1 000 mL,过滤除菌,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 保存。

C.2 校准品的制备

C.2.1 标准阳性血清

采用标准阳性血清,因此将该血清赋值为 10 000 NCU/mL。(1 NCU/mL 含义是:以建立相应标准品时期的有代表性的国内外特定试剂检测的 Cut-off 均值为 1 NCU/mL,换句话说就是使用国际上公认的一流公司的试剂盒检出原血清中某物质的最低含量称为 1 NCU/mL。)

C.2.2 校准品的制备

校准品 1 的制备:用校准品稀释液将标准阴性血清按 1 : 20 比例进行稀释,无菌定量分装,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 保存。

校准品 2~校准品 6 的制备:用校准品稀释液将标准阳性血清稀释到 10 NCU/mL、20 NCU/mL、40 NCU/mL、100 NCU/mL 和 200 NCU/mL,分别无菌定量分装,2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 保存。

