



标准规程

猪瘟疫防治技术规范 农医发〔2007〕12号

来源：信息管理科 时间：2012-10-16 作者： 点击率：10477

猪瘟疫（Classical swine fever, CSF）是由黄病毒科瘟病毒属猪瘟疫病毒引起的一种高度接触性、出血性和致死性传染病。世界动物卫生组织（OIE）将其列为必须报告的动物疫病，我国将其列为一类动物疫病。为及时、有效地预防、控制和扑灭猪瘟疫，依据《中华人民共和国动物防疫法》、《重大动物疫情应急条例》和《国家突发重大动物疫情应急预案》及有关法律法规，制定本规范。

1 适用范围

本规范规定了猪瘟疫的诊断、疫情报告、疫情处置、疫情监测、预防措施、控制和消灭标准等。

本规范适用于中华人民共和国境内一切从事猪（含驯养的野猪）的饲养、经营及其产品生产、经营，以及从事动物防疫活动的单位和个人。

2 诊断

依据本病流行病学特点、临床症状、病理变化可作出初步诊断，确诊需做病原分离与鉴定。

2.1 流行特点

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。感染猪在发病前即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、猪肉和泔水等传播，人、其它动物如鼠类和昆虫、器具等均可成为重要传播媒介。感染和带毒母猪在怀孕期可通过胎盘将病毒传播给胎儿，导致新生仔猪发病或产生免疫耐受。

2.2 临床症状

2.2.1 本规范规定本病潜伏期为3-10天，隐性感染可长期带毒。

根据临床症状可将本病分为急性、亚急性、慢性和隐性感染四种类型。

2.2.2 典型症状

2.2.2.1 发病急、死亡率高；

2.2.2.2 体温通常升至41℃以上、厌食、畏寒；

2.2.2.3 先便秘后腹泻，或便秘和腹泻交替出现；

2.2.2.4 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，眼结膜和口腔黏膜可见出血点。

2.3 病理变化

2.3.1 淋巴结水肿、出血，呈现大理石样变；

2.3.2 肾脏呈土黄色，表面可见针尖状出血点；

2.3.3 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，脾脏边缘出现梗死灶；

2.3.4 脾不肿大，边缘有暗紫色突出表面的出血性梗死；

2.3.5 慢性猪瘟疫在回肠末端、盲肠和结肠常见“纽扣状”溃疡。

2.4 实验室诊断

实验室病原学诊断必须在相应级别的生物安全实验室进行。

2.4.1 病原分离与鉴定

2.4.1.1 病原分离、鉴定可用细胞培养法（见附件1）；

2.4.1.2 病原鉴定也可采用猪瘟荧光抗体染色法，细胞浆出现特异性的荧光（见附件2）；

2.4.1.3 兔体交互免疫试验（附件3）；

2.4.1.4 猪瘟病毒反转录聚合酶链式反应（RT-PCR）：主要用于临床诊断与病原监测（见附件4）。

2.4.1.5 猪瘟抗原双抗体夹心ELISA检测法：主要用于临床诊断与病原监测（见附件5）。

2.4.2 血清学检测

2.4.2.1 猪瘟病毒抗体阻断ELISA检测法（见附件6）；

2.4.2.2 猪瘟荧光抗体病毒中和试验（见附件7）；

2.4.2.3 猪瘟中和试验方法（见附件8）。

2.5 结果判定

2.5.1 疑似猪瘟

符合猪瘟流行病学特点、临床症状和病理变化。

2.5.2 确诊

非免疫猪符合结果判定2.5.1，且符合血清学诊断2.4.2.1、2.4.2.2、2.4.2.3之一，或符合病原学诊断2.4.1.1、2.4.1.2、2.4.1.3、2.4.1.4、2.4.1.5之一的；

免疫猪符合结果2.5.1，且符合病原学诊断2.4.1.1、2.4.1.2、2.4.1.3、2.4.1.4、2.4.1.5之一的。

3 疫情报告

3.1 任何单位和个人发现患有本病或疑似本病的猪，都应当立即向当地动物防疫监督机构报告。

3.2 当地动物防疫监督机构接到报告后，按国家动物疫情报告管理的有关规定执行。

4 疫情处理

根据流行病学、临床症状、剖检病变，结合血清学检测做出的临床诊断结果可作为疫情处理的依据。

4.1 当地县级以上动物防疫监督机构接到可疑猪瘟疫情报告后，应及时派员到现场诊断，根据流行病学调查、临床症状和病理变化等初步诊断为疑似猪瘟时，应立即对病猪及同群猪采取隔离、消毒、限制移动等临时性措施。同时采集病料送省级动物防疫监督机构实验室确诊，必要时将样品送国家猪瘟参考实验室确诊。

4.2 确诊为猪瘟后，当地县级以上人民政府兽医主管部门应当立即划定疫点、疫区、受威胁区，并采取相应措施；同时，及时报请同级人民政府对疫区实行封锁，逐级上报至国务院兽医主管部门，并通报毗邻地区。国务院兽医行政管理部门根据确诊结果，确认猪瘟疫情。

4.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫点：为病猪和带毒猪所在的地点。一般指病猪或带毒猪所在的猪场、屠宰厂或经营单位，如为农村散养，应将自然村划为疫点。

疫区：是指疫点边缘外延3公里范围内区域。疫区划分时，应注意考虑当地的饲养环境和天然屏障（如河流、山脉等）等因素。

受威胁区：是指疫区外延5公里范围内的区域。

4.2.2 封锁

由县级以上兽医行政管理部门向本级人民政府提出启动重大动物疫情应急指挥系统、应急预案和对疫区实行封锁的建议，有关人民政府应当立即做出决定。

4.2.3 对疫点、疫区、受威胁区采取的措施

疫点：扑杀所有的病猪和带毒猪，并对所有病死猪、被扑杀猪及其产品按照GB16548规定进行无害化处理；对排泄物、被污染或可能污染饲料和垫料、污水等均需进行无害化处理；对被污染的物品、交通工具、用具、禽舍、场地进行严格彻底消毒（见附件9）；限制人员出入，严禁车辆进出，严禁猪只及其产品及可能污染的物品运出。

疫区：对疫区进行封锁，在疫区周围设置警示标志，在出入疫区的交通路口设置动物检疫消毒站（临时动物防疫监督检查站），对出入的人员和车辆进行消毒；对易感猪只实施紧急强制免疫，确保达到免疫保护水平；停止疫区内猪及其产品的交易活动，禁止易感猪只及其产品运出；对猪只排泄物、被污染饲料、垫料、污水等按国家规定标准进行无害化处理；对被污染的物品、交通工具、用具、禽舍、场地进行严格彻底消毒。

受威胁区：对易感猪只（未免或免疫未达到免疫保护水平）实施紧急强制免疫，确保达到免疫保护水平；对猪只实行疫情监测和免疫效果监测。

4.2.4 紧急监测

对疫区、受威胁区内的猪群必须进行临床检查和病原学监测。

4.2.5 疫源分析与追踪调查

根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。对可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售（/运）出的猪只及其产品、可疑污染物（包括粪便、垫料、饲料等）等应当立即开展追踪调查，一经查明立即按照GB16548规定进行无害化处理。

4.2.6 封锁令的解除

疫点内所有病死猪、被扑杀的猪按规定进行处理，疫区内没有新的病例发生，彻底消毒10天后，经当地动物防疫监督机构审验合格，当地兽医主管部门提出申请，由原封锁令发布机关解除封锁。

4.2.7 疫情处理记录

对处理疫情的全过程必须做好详细的记录（包括文字、图片和影像等），并归档。

5 预防与控制

以免疫为主，采取“扑杀和免疫相结合”的综合性防治措施。

5.1 饲养管理与环境控制

饲养、生产、经营等场所必须符合《动物防疫条件审核管理办法》（农业部[2002]15号令）规定的动物防疫条件，并加强种猪调运检疫管理。

5.2 消毒

各饲养场、屠宰厂（场）、动物防疫监督检查站等要建立严格的卫生（消毒）管理制度，做好杀虫、灭鼠工作（见附件9）。

5.3 免疫和净化

5.3.1 免疫

国家对猪瘟实行全面免疫政策。

预防免疫按农业部制定的免疫方案规定的免疫程序进行。

所用疫苗必须是经国务院兽医主管部门批准使用的猪瘟疫苗。

5.3.2 净化

对种猪场和规模养殖场的种猪定期采样进行病原学检测，对检测阳性猪及时进行扑杀和无害化处理，以逐步净化猪瘟。

5.4 监测和预警

5.4.1 监测方法

非免疫区域：以流行病学调查、血清学监测为主，结合病原鉴定。

免疫区域：以病原监测为主，结合流行病学调查、血清学监测。

5.4.2 监测范围、数量和时间

对于各类种猪场每年要逐头监测两次；商品猪场每年监测两次，抽查比例不低于0.1%，最低不少于20头；散养猪不定期抽查。或按照农业部年度监测计划执行。

5.4.3 监测报告

监测结果要及时汇总，由省级动物防疫监督机构定期上报中国动物疫病预防控制中心。

5.4.4 预警

各级动物防疫监督机构对监测结果及相关信息进行风险分析，做好预警预报。

5.5 消毒

饲养场、屠宰厂（场）、交易市场、运输工具等要建立并实施严格的消毒制度。

5.6 检疫

5.6.1 产地检疫

生猪在离开饲养地之前，养殖场/户必须向当地动物防疫监督机构报检。动物防疫监督机构接到报检后必须及时派员到场/户实施检疫。检疫合格后，出具合格证明；对运载工具进行消毒，出具消毒证明，对检疫不合格的按照有关规定处理。

5.6.2 屠宰检疫

动物防疫监督机构的检疫人员对生猪进行验证查物，合格后方可入厂/场屠宰。检疫合格并加盖（封）检疫标志后方可出厂/场，不合格的按有关规定处理。

5.6.3 种猪异地调运检疫

跨省调运种猪时，应先到调入地省级动物防疫监督机构办理检疫审批手续，调出地进行检疫，检疫合格方可调运。到达后须隔离饲养10天以上，由当地动物防疫监督机构检疫合格后方可投入使用。

6 控制和消灭标准

6.1 免疫无猪瘟区

6.1.1 该区域首先要达到国家无规定疫病区基本条件。

6.1.2 有定期、快速的动物疫情报告记录。

6.1.3 该区域在过去3年内未发生过猪瘟。

6.1.4 该区域和缓冲带实施强制免疫，免疫密度100%，所用疫苗必须符合国家兽医主管部门规定。

6.1.5 该区域和缓冲带须具有运行有效的监测体系，过去2年内实施疫病和免疫效果监测，未检出病原，免疫效果确实。

6.1.6 所有的报告，免疫、监测记录等有关材料详实、准确、齐全。

若免疫无猪瘟区内发生猪瘟时，最后一例病猪扑杀后12个月，经实施有效的疫情监测，确认后方可重新申请免疫无猪瘟区。

6.2 非免疫无猪瘟区

6.2.1 该区域首先要达到国家无规定疫病区基本条件。

6.2.2 有定期、快速的动物疫情报告记录。

6.2.3 在过去2年内没有发生过猪瘟，并且在过去12个月内，没有进行过免疫接种；另外，该地区在停止免疫接种后，没有引进免疫接种过的猪。

6.2.4 在该区具有有效的监测体系和监测区，过去2年内实施疫病监测，未检出病原。

6.2.5 所有的报告、监测记录等有关材料详实、准确、齐全。

若非免疫无猪瘟区发生猪瘟后，在采取扑杀措施及血清学监测的情况下，最后一例病猪扑杀后6个月；或在采取扑杀措施、血清学监测及紧急免疫的情况下，最后一例免疫猪被屠宰后6个月，经实施有效的疫情监测和血清学检测确认后，方可重新申请非免疫无猪瘟区。

附件1

病毒分离鉴定

采用细胞培养法分离病毒是诊断猪瘟的一种灵敏方法。通常使用对猪瘟病毒敏感的细胞系如PK-15细胞等，加入2%扁桃体、肾脏、脾脏或淋巴结等待检组织悬液于培养液中。37℃培养48~72小时后用荧光抗体染色法检测细胞培养物中的猪瘟病毒。

步骤如下：

1. 制备抗生素浓缩液（青霉素10000IU/mL、链霉素10000IU/mL、卡那霉素和制霉菌素5000IU/mL），小瓶分装，-20℃保存。用时融化。
2. 取1~2g待检病料组织放入灭菌研钵中，剪刀剪碎，加入少量无菌生理盐水，将其研磨匀浆；再加入Hank's平衡盐溶液或细胞培养液，制成20%(w/v)组织悬液；最后按1/10的比例加入抗生素浓缩液，混匀后室温作用1小时；以1000g离心15分钟，取上清液备用。
3. 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1000g离心10分钟，再用一定量EMEM生长液[含5%胎牛血清(无BVDV抗体)，56℃灭活30分钟]、0.3%谷氨酰胺、青霉素100IU/mL、链霉素100IU/mL悬浮，使细胞浓度为 2×10^6 /mL。
4. 9份细胞悬液与1份上清液混合，接种6~8支含细胞玻片的莱顿氏管(Leighton's)(或其它适宜的细胞培养瓶)，每管0.2mL；同时设3支莱顿氏管接种细胞悬液作阴性对照；另设3支莱顿氏管接种猪瘟病毒作阳性对照。
5. 经培养24、48、72小时，分别取2管组织上清培养物及1管阴性对照培养物、1管阳性对照培养物，取出细胞玻片，以磷酸缓冲盐水(PBS液，pH7.2，0.01M)或生理盐水洗涤2次，每次5分钟，用冷丙酮(分析纯)固定10分钟，晾干，采用猪瘟病毒荧光抗体染色法进行检测（见附件2）。
6. 根据细胞玻片猪瘟荧光抗体染色强度，判定病毒在细胞中的增殖情况，若荧光较弱或为阴性，应按步骤4将组织上清细胞培养物进行病毒盲传。

临床发病猪或疑似病猪的全血样是猪瘟早期诊断样品。接种细胞时操作程序如下：取-20℃冻存全血样品置37℃水浴融化；向24孔板每孔加300微升血样以覆盖对数生长期的PK-15单层细胞；37℃吸附2小时。弃去接种液，用细胞培养液洗涤细胞二次，然后加入EMEM维持液，37℃培养24至48小时后，采用猪瘟病毒荧光抗体染色法检测（见附件2）。

附件2

猪瘟荧光抗体染色法

荧光抗体染色法快速、特异，可用于检测扁桃体等组织样品以及细胞培养中的病毒抗原。操作程序如下：

1 样品的采集和选择

1.1 活体采样：利用扁桃体采样器（鼻捻子、开口器和采样枪）。采样器使用前均须用3%氢氧化钠溶液消毒后经清水冲洗。首先固定活猪的上唇，用开口器打开口腔，用采样枪采取扁桃体样品，用灭菌牙签挑至灭菌离心管并作标记。

1.2 其它样品：剖检时采取的病死猪脏器，如扁桃体、肾脏、脾脏、淋巴结、肝脏和肺等，或病毒分离时待检的细胞玻片。

1.3 样品采集、包装与运输按农业部相关要求执行。

2 检测方法与判定

2.1 方法：将上述组织制成冰冻切片，或待检的细胞培养片（见附件1），将液体吸干后经冷丙酮固定5~10分钟，晾干。滴加猪瘟荧光抗体覆盖于切片或细胞片表面，置湿盒中37℃作用30分钟。然后用PBS液洗涤，自然干燥。用碳酸缓冲甘油（pH9.0~9.5，0.5 M）封片，置荧光显微镜下观察。必要时设立抑制试验染色片，以鉴定荧光的特异性。

2.2 判定：在荧光显微镜下，见切片或细胞培养物（细胞盖片）中有胞浆荧光，并由抑制试验证明为特异的荧光，判猪瘟阳性；无荧光判为阴性。

2.3 荧光抑制试验：将两组猪瘟病毒感染猪的扁桃体冰冻切片，分别滴加猪瘟高免血清和健康猪血清（猪瘟中和抗体阴性），在湿盒中37℃作用30分钟，用生理盐水或PBS(pH7.2)漂洗2次，然后进行荧光抗体染色。经用猪瘟高免血清处理的扁桃体切片，隐窝上皮细胞不应出现荧光，或荧光显著减弱；而用阴性血清处理的切片，隐窝上皮细胞仍出现明亮的黄绿色

荧光。
附件3

兔体交互免疫试验

本方法用于检测疑似猪瘟疫料中的猪瘟疫病毒。

- 1 试验动物
- 家兔 1.5~2kg、体温波动不大的大耳白兔，并在试验前1天测基础体温。
- 2 试验操作方法
- 将病猪的淋巴结和脾脏，磨碎后用生理盐水作1：10稀释，对3只健康家兔作肌肉注射，5mL/只，另设3只不注射病料的对照兔，间隔5天对所有家兔静脉注射1:20的猪瘟疫化病毒（淋巴脾脏毒），1mL/只，24h后，每隔6小时测体温一次，连续测96小时，对照组2/3出现定型热或轻型热，试验成立。
- 3 兔体交互免疫试验结果判定
- | 接种病料后体温反应 | 接种猪瘟疫化弱毒后体温反应 | 结果判定 |
|-----------|---------------|--------------|
| - | - | 含猪瘟疫病毒 |
| - | + | 不含猪瘟疫病毒 |
| + | - | 含猪瘟疫化病毒 |
| + | + | 含非猪瘟疫病毒热原性物质 |

注：“+”表示多于或等于三分之二的动物有反应。

附件4

猪瘟疫病毒反转录聚合酶链式反应（RT-PCR）

- RT-PCR方法通过检测病毒核酸而确定病毒存在，是一种特异、敏感、快速的方法。在RT-PCR扩增的特定基因片段的基础上，进行基因序列测定，将获得的基因信息与我国猪瘟疫分子流行病学数据库进行比较分析，可进一步鉴定流行毒株的基因型，从而追踪流行毒株的传播来源或预测预报新的流行毒株。
- 1 材料与样品准备
- 1.1 材料准备：本试验所用试剂需用无RNA酶污染的容器分装；各种离心管和带滤芯吸头需无RNA酶污染；剪刀、镊子和研钵器须经干烤灭菌。
- 1.2 样品制备：按1：5（W/V）比例，取待检组织和PBS液于研钵中充分研磨，4℃，1000g离心15分钟，取上清液转入无RNA酶污染的离心管中，备用；全血采用脱纤抗凝备用；细胞培养物冻融3次备用；其它样品酌情处理。制备的样品在2~8℃保存不应超过24小时，长期保存应小分装后置-70℃以下，避免反复冻融。
- 2 RNA提取
- 2.1 取1.5mL离心管，每管加入800μL RNA提取液（通用Trizol）和被检样品200μL，充分混匀，静置5分钟。同时设阳性和阴性对照管，每份样品换一个吸头。
- 2.2 加入200μL氯仿，充分混匀，静置5分钟，4℃、12000g离心15分钟。
- 2.3 取上清约500μL（注意不要吸出中间层）移至新离心管中，加等量异丙醇，颠倒混匀，室温静置10分钟，4℃、12000g离心10分钟。
- 2.4 小心弃上清，倒置于吸水纸上，沾干液体；加入1000μL 75%乙醇，颠倒洗涤，4℃、12000g离心10分钟。
- 2.5 小心弃上清，倒置于吸水纸上，沾干液体；4000 g离心10分钟，将管壁上残余液体甩到管底部，小心吸干上清，吸头不要碰到有沉淀的一面，每份样品换一个吸头，室温干燥。
- 2.6 加入10μL DEPC水和10U RNasin,轻轻混匀，溶解管壁上的RNA，4000 g离心10分钟，尽快进行试验。长期保存应置-70℃以下。
- 3 cDNA合成
- 取200μL PCR专用管，连同阳性对照管和阴性对照管，每管加10μL RNA和50 pM下游引物P2 (5'-CACAG (CT) CC (AG) AA (TC) CC (AG) AAGTCATC -3')，按反转录试剂盒说明书进行。
- 4 PCR
- 4.1 取200μLPCR专用管，连同阳性对照管和阴性对照管，每管加上述10μL cDNA和适量水，95℃预变性5分钟。
- 4.2 每管加入10倍稀释缓冲液5μL，上游引物P1 (5'-TC (GA) (AT) CAACCAA (TC) GAGATAGGG-3')和下游引物P2各50pM，10 mol/L dNTP 2μL，Taq酶2.5U，补水至50μL。
- 4.3 置PCR仪，循环条件为95℃ 50sec，58℃ 60sec，72℃ 35sec，共40个循环，72℃延伸5分钟。

5 结果判定

取RT-PCR产物5 μ L, 于1%琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶中含0.5 μ L/mL溴化乙锭, 电泳缓冲液为0.5 \times TBE, 80V 30分钟, 电泳完后于长波紫外灯下观察拍照。阳性对照管和样品检测管出现251nt的特异条带判为阳性; 阴性管和样品检测管未出现特异条带判为阴性。

附件5

猪瘟抗原双抗体夹心ELISA检测方法

本方法通过形成的多克隆抗体-样品-单克隆抗体夹心, 并采用辣根过氧化物酶标记物检测, 对外周血白细胞、全血、细胞培养物以及组织样本中的猪瘟病毒抗原进行检测的一种双抗体夹心ELISA方法。具体如下:

1 试剂盒组成

- | | |
|---|-----------------------|
| 1.1 多克隆羊抗血清包被板条 | 8孔 \times 12条 (96孔) |
| 1.2 CSFV阳性对照, 含有防腐剂 | 1.5mL |
| 1.3 CSFV阴性对照, 含有防腐剂 | 1.5mL |
| 1.4 100倍浓缩辣根过氧化物酶标记物 (100 \times) | |
| 辣根过氧化物酶标记抗鼠IgG, 含防腐剂 | 200uL |
| 1.5 10倍浓缩样品稀释液 (10 \times) | 55mL |
| 1.6 底物液, TMB/H ₂ O ₂ 溶液 | 12mL |
| 1.7 终止液, 1M HCL (小心, 强酸) | 12mL |
| 1.8 10倍浓缩洗涤液 (10 \times) | 125mL |
| 1.9 CSFV单克隆抗体, 含防腐剂 | 4mL |
| 1.10 酶标抗体稀释液 | 15 mL |

2 样品制备

注意: 制备好的样品或组织可以在2~7 $^{\circ}$ C保存7天, 或-20 $^{\circ}$ C冷冻保存6个月以上。但这些样品在应用前应该再次以1500g离心10分钟或10000g离心2~5分钟。

2.1 外周血白细胞

2.1.1 取10mL肝素或EDTA抗凝血样品, 1500g离心15~20分钟。

2.1.2 再用移液器小心吸出血沉棕黄层, 加入500uL样品稀释液 (1 \times), 在旋涡振荡器上混匀, 室温下放置1小时, 期间不时旋涡混合。然后直接进行步骤2.1.6操作。

2.1.3 假如样品的棕黄层压积细胞体积非常少, 那么就用整个细胞团 (包括红细胞)。将细胞加进10mL的离心管, 并加入5mL预冷 (2~7 $^{\circ}$ C, 下同) 的0.17M NH₄Cl。混匀, 静置10分钟。

2.1.4 用冷 (2~7 $^{\circ}$ C) 超纯水或双蒸水加满离心管, 轻轻上下颠倒混匀, 1500g离心5分钟。

2.1.5 弃去上清, 向细胞团中加入500uL样品稀释液 (1 \times), 用洁净的吸头悬起细胞, 在旋涡振荡器上混匀, 室温放置1小时。期间不时旋涡混合。

2.1.6 1500g离心5分钟, 取上清液按操作步骤进行检测。

注意: 处理好的样品可以在2~7 $^{\circ}$ C保存7天, 或-20 $^{\circ}$ C冷冻保存6个月以上。但这些样品在使用前必须再次离心。

2.2 外周血白细胞 (简化方法)

2.2.1 取0.5~2mL肝素或EDTA抗凝血与等体积冷0.17 M NH₄Cl加入离心管混合。室温放置10分钟。

2.2.2 1500g离心10分钟 (或10000g离心2~3分钟), 弃上清。

2.2.3 用冷 (2~7 $^{\circ}$ C) 超纯水或双蒸水加满离心管, 轻轻上下颠倒混匀, 1500g离心5分钟。

2.2.4 弃去上清, 向细胞团加入500uL样本稀释液 (1 \times)。旋涡振荡充分混匀, 室温放置1小时。期间不时旋涡混匀。取75uL按照“操作步骤”进行检测。

2.3 全血 (肝素或EDTA抗凝)

2.3.1 取25uL 10倍浓缩样品稀释液 (10 \times) 和475uL全血加入微量离心管, 在旋涡振荡器上混匀。

2.3.2 室温下孵育1小时, 期间不时旋涡混合。此样品可以直接按照“操作步骤”进行检测。

或: 直接将75uL全血加入酶标板孔中, 再加入10uL 5倍浓缩样品稀释液 (5 \times)。晃动酶标板 / 板条, 使样品混合均匀。再按照“操作步骤”进行检测。

2.4 细胞培养物

2.4.1 移去细胞培养液, 收集培养瓶中的细胞加入离心管中。

2.4.2 2500g离心5分钟, 弃上清。

2.4.3 向细胞团中加入500uL样品稀释液 (1 \times)。旋涡振荡充分混匀, 室温孵育1小时。期间不时旋涡混合。取此样品75uL按照“操作步骤”进行检测。

2.5 组织

最好用新鲜的组织。如果有必要,组织可以在处理前于2~7℃冷藏保存1个月。每只动物检测1~2种组织,最好选取扁桃体、脾、肠、肠系膜淋巴结或肺。

2.5.1 取1~2g组织用剪刀剪成小碎块(2~5mm大小)。

2.5.2 将组织碎块加入10mL离心管,加入5mL样品稀释液(1×),旋涡振荡混匀,室温下孵育1~21小时,期间不时旋涡混合。

2.5.3 1500g离心5分钟,取75uL上清液按照“操作步骤”进行检测。

3 操作步骤

注意:所有试剂在使用前应该恢复至室温18~22℃;使用前试剂应在室温条件下至少放置1小时。

3.1 每孔加入25uLCSFV特异性单克隆抗体。此步骤可以用多道加样器操作。

3.2 在相应孔中分别加入75uL阳性对照、阴性对照,各加2孔。注意更换吸头。

3.3 在其余孔中分别加入75uL制备好的样品,注意更换吸头。轻轻拍打酶标板,使样品混合均匀。

3.4 置湿盒中或用胶条密封后室温(18~22℃)孵育过夜。也可以孵育4个小时,但是这样会降低检测灵敏度。

3.5 甩掉孔中液体,用洗涤液(1×)洗涤5次,每次洗涤都要将孔中的所有液体倒空,用力拍打酶标板,以使所有液体拍出。或者,每孔加入洗涤液250~300uL用自动洗板机洗涤5次。注意:洗涤酶标板要仔细。

3.6 每孔加入100uL稀释好的辣根过氧化物酶标记物,在湿盒或密封后置室温孵育1小时。

3.7 重复操作步骤3.5;每孔加入100uL底物液,在暗处室温孵育10分钟。第1孔加入底物液开始计时。

3.8 每孔加入100uL终止液终止反应。加入终止液的顺序与上述加入底物液的顺序一致。

3.9 在酶标仪上测量样品与对照孔在450nm处的吸光值,或测量在450nm和620nm双波长的吸光值(空气调零)。

3.10 计算每个样品和阳性对照孔的矫正OD值的平均值(参见“计算方法”)。

4 计算方法

首先计算样品和对照孔的OD平均值,在判定结果之前,所有样品和阳性对照孔的OD平均值必须进行矫正,矫正的OD值等于样本或阳性对照值减去阴性对照值。

矫正OD值=样本OD值-阴性对照OD值

5 试验有效性判定

阳性对照OD平均值应该大于0.500,阴性对照OD平均值应小于阳性对照平均值的20%,试验结果方能有效。否则,应仔细检查实验操作并进行重测。如果阴性对照的OD值始终很高,将阴性对照在微量离心机中10000g离心3~5分钟,重新检测。

6 结果判定

被检样品的矫正OD值大于或等于0.300,则为阳性;

被检样品的矫正OD值小于0.200,则为阴性;

被检样品的矫正OD值大于0.200,小于0.300,则为可疑。

附件6

猪瘟病毒抗体阻断ELISA检测方法

本方法是用于检测猪血清或血浆中猪瘟病毒抗体的一种阻断ELISA方法,通过待测抗体和单克隆抗体与猪瘟病毒抗原的竞争结合,采用辣根过氧化物酶与底物的显色程度来进行判定。

1 操作步骤

在使用时,所有的试剂盒组分都必须恢复到室温18~25℃。使用前应将各组分放置于室温至少1小时。

1.1 分别将50uL样品稀释液加入每个检测孔和对照孔中。

1.2 分别将50uL的阳性对照和阴性对照加入相应的对照孔中,注意不同对照的吸头要更换,以防污染。

1.3 分别将50uL的被检样品加入剩下的检测孔中,注意不同检样的吸头要分开,以防污染。

1.4 轻弹微量反应板或用振荡器振荡,使反应板中的溶液混匀。

1.5 将微量反应板用封条封闭置于湿箱中(18~25℃)孵育2小时,也可以将微量反应板用封条置于湿箱中孵育过夜。

1.6 吸出反应孔中的液体,并用稀释好的洗涤液洗涤3次,注意每次洗涤时都要将洗涤液加满反应孔。

1.7 分别将100uL的抗CSFV酶标二抗(即取即用)加入反应孔中,用封条封闭反应板并于室温下或湿箱中孵育30分钟。

1.8 洗板(见1.6)后,分别将100uL的底物溶液加入反应孔中,于避光、室温条件下放置10分钟。加完第一孔后即可计时。

1.9 在每个反应孔中加入100uL终止液终止反应。注意要按加酶标二抗的顺序加终止液。

1.10 在450nm处测定样本以及对照的吸光值,也可用双波长(450nm和620nm)测定样本以及对照的吸光度值,空气调零。

1.11 计算样本和对照的平均吸光度值。计算方法如下:

计算被检样本的平均值OD₄₅₀(=OD_{TEST})、阳性对照的平均值(=OD_{POS})、阴性对照的平均值(=OD_{NEG})。

根据以下公式计算被检样本和阳性对照的阻断率:

$$\frac{OD_{NEG} - OD_{TEST}}{OD_{POS} - OD_{NEG}}$$

阻断率=—————×100%
ODNEG

2 试验有效性

阴性对照的平均OD450应大于0.50。阳性对照的阻断率应大于50%。

3 结果判定

如果被检样本的阻断率大于或等于40%，该样本被判定为阳性（有CSFV抗体存在）。如果被检样本的阻断率小于或等于30%，该样本被判定为阴性（无CSFV抗体存在）。如果被检样本阻断率在30～40%之间，应在数日后再对该动物进行重测。

附件7

荧光抗体病毒中和试验

本方法是国际贸易指定的猪瘟抗体检测方法。该试验是采用固定病毒稀释血清的方法。测定的结果表示待检血清中抗体的中和效价。具体操作如下：

将浓度为2×10⁵细胞/mL的PK-15细胞悬液接种到带有细胞玻片的5cm平皿或莱顿氏管（leighton's），也可接种到平底微量培养板中；

细胞培养箱中37℃培养至汇合率为70%～80%的细胞单层（1～2天）。

将待检血清56℃灭活30分钟，用无血清EMEM培养液作2倍系列稀释；

将稀释的待检血清与含200TCID₅₀/0.1mL的猪瘟病毒悬液等体积混合，置37℃孵育1～2小时；

用无血清EMEM培养液漂洗细胞单层。然后，加入血清病毒混合物，每个稀释度加2个莱顿氏管或培养板上的2个孔，37℃孵育1小时；

吸出反应物，加入EMEM维持液[含2%胎牛血清(无BVDV抗体)，56℃灭活30分钟]、0.3%谷氨酰胺、青霉素100IU/mL、链霉素100IU/mL)，37℃继续培养48～72小时；最终用荧光抗体染色法进行检测（见附件2）。

根据特异荧光的有无来计算中和效价。

(中和效价值达到多少表示抗体阳性或抗体达到保护)

附件8

猪瘟中和试验方法

本试验采用固定抗原稀释血清的方法，利用家兔来检测猪体的抗体。

1 操作程序

1.1 先测定猪瘟兔化弱毒（抗原）对家兔的最小感染量。试验时，将抗原用生理盐水稀释，使每1mL含有100个兔的最小感染量，为工作抗原（如抗原对兔的最小感染量为10-5/mL，则将抗原稀释成1000倍使用）。

1.2 将被检猪血清分别用生理盐水作2倍稀释，与含有100个兔的最小感染量工作抗原等量混合，摇匀后，置10～15℃中和2小时，其间振摇2～3次。同时设含有相同工作抗原量加等量生理盐水（不加血清）的对照组，与被检组在同样条件下处理。

1.3 中和完毕，被检组各注射家兔1～2只，对照组注射家兔2只，每只耳静脉注射1mL，观察体温反应，并判定结果。

2 结果判定

2.1 当对照组2只家兔均呈定型热反应（++），或1只兔呈定型热反应（++），另一只兔呈轻热反应时，方能判定结果。被检组如用1只家兔，须呈定型热反应；如用2只家兔，每只家兔应呈定型热反应或轻热反应，被检血清判为阴性。

2.2 兔体体温反应标准如下：

2.2.1 热反应（+）：潜伏期24～72小时，体温上升呈明显曲线，超过常温1℃以上，稽留12～36小时。

2.2.2 可疑反应（±）：潜伏期不到24小时或72小时以上，体温曲线起伏不定，稽留不到12小时或超过36小时而不上升。

2.2.3 无反应（—）：体温正常。

附件9

消毒

1 药品种类

消毒药品必须选用对猪瘟病毒有效的，如烧碱、醛类、氧化剂类、氯制剂类、双季胺盐类等。

2 消毒范围

猪舍地面及内外墙壁，舍外环境，饲养、饮水等用具，运输等设施设备以及其它一切可能被污染的场所和设施设备。

3 消毒前的准备

- 3.1 消毒前必须清除有机物、污物、粪便、饲料、垫料等；
- 3.2 消毒药品必须选用对猪瘟病毒有效的；
- 3.3 备有喷雾器、火焰喷射枪、消毒车辆、消毒防护用具（如口罩、手套、防护靴等）、消毒容器等。

4 消毒方法

- 4.1 金属设施设备的消毒，可采取火焰、熏蒸等方式消毒；
- 4.2 猪舍、场地、车辆等，可采用消毒液清洗、喷洒等方式消毒；
- 4.3 养猪场的饲料、垫料等，可采取堆积发酵或焚烧等方式处理；
- 4.4 粪便等可采取堆积密封发酵或焚烧等方式处理；
- 4.5 饲养、管理等人员可采取淋浴消毒；
- 4.6 衣、帽、鞋等可能被污染的物品，可采取消毒液浸泡、高压灭菌等方式消毒；
- 4.7 疫区范围内办公、饲养人员的宿舍、公共食堂等场所，可采用喷洒的方式消毒；
- 4.8 屠宰加工、贮藏等场所以及区域内池塘等水域的消毒可采取相应的方式进行，避免造成污染。

[【返回】](#) [【打印本页】](#)

友情链接

[更多>>](#)



版权所有 吉林省动物卫生监督网 地址：吉林省长春市西安大路4510号 联系电话：0431-89343349

网站律师声明：本站内容未经同意不得转载，一经发现将追究法律责任！吉ICP备08101550号

网站标识码：2200000041

