



中华人民共和国国家标准

GB/T 18935—2018
代替 GB/T 18935—2003

口蹄疫诊断技术

Diagnostic techniques for foot and mouth disease

2018-09-17 发布

2019-04-01 实施

国家市场监督管理总局
中国国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	V
引言	VI
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 缩略语	1
4 临床诊断	1
4.1 易感动物	1
4.2 临床症状	2
4.3 病理变化	2
4.4 结果判定	2
5 实验室诊断样品采集	2
5.1 器材	2
5.2 试剂	2
5.3 样品采集	2
5.4 样品处理	3
6 病毒分离	3
6.1 器材	3
6.2 试剂	4
6.3 试验动物与细胞	4
6.4 试验程序	4
6.5 病毒鉴定	5
6.6 结果判定	5
7 定型酶联免疫吸附试验(定型 ELISA)	5
7.1 器材	5
7.2 试剂	5
7.3 试验程序	6
7.4 试验成立条件	6
7.5 结果判定	6
8 多重反转录-聚合酶链式反应(多重 RT-PCR)	6
8.1 器材	6
8.2 引物	7
8.3 试剂	7
8.4 样品准备	8
8.5 试验程序	8
8.6 试验成立条件	9
8.7 结果判定	9

9	定型反转录-聚合酶链式反应(定型 RT-PCR)	9
9.1	器材	9
9.2	引物	9
9.3	试剂	9
9.4	样品准备	9
9.5	试验程序	9
9.6	试验成立条件	10
9.7	结果判定	10
10	病毒 VP1 基因序列分析	10
10.1	器材	10
10.2	引物	10
10.3	试剂	10
10.4	样品准备	10
10.5	试验程序	10
10.6	试验成立条件	11
10.7	结果判定与分析	11
11	荧光定量反转录聚合酶链式反应(荧光定量 RT-PCR)	11
11.1	器材	11
11.2	引物和探针	11
11.3	试剂	11
11.4	样品准备	12
11.5	试验程序	12
11.6	试验成立条件	12
11.7	结果判定	12
12	病毒中和试验(VN)	12
12.1	器材	12
12.2	试剂	12
12.3	试验程序	13
12.4	试验成立条件	13
12.5	结果判定	13
13	液相阻断酶联免疫吸附试验(LPB-ELISA)	14
13.1	器材	14
13.2	试剂	14
13.3	对照血清	14
13.4	试验程序	14
13.5	试验成立条件	14
13.6	结果判定	14
14	固相竞争酶联免疫吸附试验(SPC-ELISA)	15
14.1	器材	15
14.2	试剂	15
14.3	试验程序	15

14.4	试验成立条件	15
14.5	结果判定	15
15	非结构蛋白 3ABC 抗体间接酶联免疫吸附试验(3ABC-I-ELISA)	15
15.1	器材	15
15.2	试剂	16
15.3	试验程序	16
15.4	试验成立条件	16
15.5	结果计算与判定	16
16	非结构蛋白 3ABC 抗体阻断酶联免疫吸附试验(3ABC-B-ELISA)	16
16.1	器材	16
16.2	试剂	16
16.3	试验程序	17
16.4	试验结果有效性判定	17
16.5	结果判定	17
17	综合判定	17
附录 A (规范性附录)	样品保存液和细胞培养液	18
附录 B (规范性附录)	酶联免疫吸附试验用溶液的配制	20
附录 C (规范性附录)	核酸检测用液体配制	22

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 18935—2003《口蹄疫诊断技术》。本标准与 GB/T 18935—2003 相比,除编辑性修改外,主要技术变化如下:

- 增加了临床诊断;
- 删除了微量补体结合试验;
- 取消了查毒试验部分,其相关内容在其他部分规定;
- 删除了病毒感染相关(VIA)抗原琼脂凝胶免疫扩散试验(VIA-AGID),增加了非结构蛋白 3ABC 抗体间接酶联免疫吸附试验(3ABC-I-ELISA)和非结构蛋白 3ABC 抗体阻断酶联免疫吸附试验(3ABC-B-ELISA)以替代 VIA-AGID;
- 增加了定型反转录-聚合酶链式反应;
- 增加了病毒 VP1 基因序列分析;
- 增加了荧光定量反转录-聚合酶链式反应。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)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:刘湘涛、张强、郭建宏、何继军、刘在新、卢曾军、包慧芳、常惠芸、田宏、郑海学、尚佑军、马军武、吴国华、靳野、林密、马维民、卢永干、朱彩珠。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 18935—2003。

引 言

口蹄疫(Foot and mouth disease,FMD)是由口蹄疫病毒(Foot and mouth disease virus,FMDV)感染引起偶蹄动物的一种急性、烈性、接触性传染病。口蹄疫可造成巨大经济损失和社会影响,世界动物卫生组织(OIE)将口蹄疫列为必须报告的动物传染病,我国规定口蹄疫为一类动物疫病。

口蹄疫的传染源主要为潜伏期感染及临床发病动物。易感动物可通过呼吸道、消化道、生殖道和伤口感染病毒,通常以直接或间接接触(飞沫等)方式传播,或通过人或犬、蝇、蜚、鸟等动物媒介,或经车辆、器具等被污染物传播。如果环境气候适宜,病毒可随风远距离传播。感染动物呼出物、唾液、粪便、尿液、乳、精液及肉和副产品均可带毒。牛羊等反刍动物感染后,病毒可在食道-咽喉部持续带毒。

口蹄疫病毒在分类上属小 RNA 病毒科(*Picornaviridae*),口蹄疫病毒属,有 7 个血清型,即 O、A、Asia 1、C、SAT 1、SAT 2 和 SAT 3 型,各血清型间无交叉免疫保护反应,免疫防控时相当于面临 7 种不同的疫病,血清型鉴定是免疫防控首先要解决的问题。适于口蹄疫诊断的样品是未破裂或刚破裂的水泡皮和水泡液。在不能获得水泡皮和水泡液的情况下,可采集血液和(或)用食道探杯采集反刍动物食道-咽部分泌物样品,这些样品中也存在病毒。未有组织样品的情况下,检测特异性抗体也用于诊断。对组织或液体样品进行病毒分离,检测是否存在口蹄疫病毒抗原或核酸可以作出阳性诊断。如果样品不足或检测结果不确定,可通过反转录聚合酶链反应(RT-PCR),和(或)用敏感细胞培养或吮乳小白鼠对样品中可能存在的核酸或活病毒进行增殖后再用酶联免疫吸附试验(ELISA)或 RT-PCR 进行检测。血清学诊断中,若未接种疫苗的动物体内检出特异性抗体,即可作出阳性诊断,这种方法对温和型病例和不易采到水泡性上皮样品的病例十分有用。检测口蹄疫病毒的某些非结构蛋白抗体可做为曾经或目前病毒感染的证据。用于口蹄疫病毒型别鉴定的方法有定型酶联免疫吸附试验(定型 ELISA)、定型反转录-聚合酶链式反应(定型 RT-PCR),用于口蹄疫病毒抗原和核酸诊断的方法有多重反转录-聚合酶链式反应(多重 RT-PCR)、病毒 VP1 基因序列分析和荧光定量反转录-聚合酶链式反应(荧光定量 RT-PCR),用于口蹄疫病毒结构蛋白抗体检测的方法有病毒中和试验(VN)、液相阻断酶联免疫吸附试验(LPB-ELISA)和固相竞争酶联免疫吸附试验(SPC-ELISA),用于检测口蹄疫病毒非结构蛋白抗体诊断的方法有非结构蛋白(NSP)3ABC 抗体间接酶联免疫吸附试验(3ABC-I-ELISA)和非结构蛋白(NSP)3ABC 抗体阻断酶联免疫吸附试验(3ABC-B-ELISA)。

本标准的修订参考了 OIE《陆生动物诊断试验和疫苗标准手册》(2017 版),并结合我国相关技术研究新成果制定,在技术上与国际先进技术保持一致。

口蹄疫诊断技术

1 范围

本标准规定了口蹄疫(Foot and mouth disease, FMD)临床诊断和实验室诊断的技术要求。
本标准适用于猪、牛、羊等偶蹄动物及其他易感动物口蹄疫的诊断。

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

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

CPE:致细胞病变(Cytopathic effect)

DNA:脱氧核糖核酸(Deoxyribonucleic acid)

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

FMD:口蹄疫(Foot and mouth disease)

FMDV:口蹄疫病毒(Foot and mouth disease virus)

HRP:辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase)

ID₅₀:半数感染剂量(Median infective dose)

LPB:液相阻断(Liquid phase block)

MEM:最低必需培养基(Minimum essential medium)

NSP:非结构蛋白(Non structural protein)

O-P液:食道-咽喉分泌物(Oesophageal-pharyngeal fluids)

OPD:邻苯二胺(O-Phenylenediamine)

PBS:磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline buffer)

RNA:核糖核酸(Ribonucleic acid)

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

SPC:固相竞争(Solid phase competition)

TCID₅₀:半数细胞感染量(Median tissue culture infective dose)

TMB:四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethyl-benzidine)

VN:病毒中和试验(Virus neutralisation test)

4 临床诊断

4.1 易感动物

偶蹄目动物,包括牛科动物(牛、瘤牛、水牛、牦牛)、绵羊、山羊及所有野生反刍动物和猪科动物对口蹄疫病毒均易感,驼科动物易感性较低。马属动物不感染口蹄疫。