



中华人民共和国国家标准

GB/T 18090—2008
代替 GB/T 18090—2000

猪繁殖与呼吸综合征诊断方法

Diagnostic methods of porcine reproductive and respiratory syndrome

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdreger.com

2008-12-31 发布

2009-05-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布



猪繁殖与呼吸综合征诊断方法

1 范围

本标准规定了猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)的诊断方法。

本标准适用于猪繁殖与呼吸综合征的诊断。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

3 符号和缩略语

下列符号和缩略语适用于本标准。

- bp——碱基对;
- CPE——致细胞病变作用;
- DEPC——焦碳酸二乙酯;
- dNTP——脱氧核苷三磷酸;
- EB——溴化乙锭;
- HRP——辣根过氧化物酶;
- IFA——间接免疫荧光试验;
- IPMA——免疫过氧化物酶单层试验;
- PBS——磷酸盐缓冲盐水;
- PRRS——猪繁殖与呼吸综合征;
- RNA——核糖核酸;
- RT-PCR——反转录-聚合酶链反应;
- Taq 酶——Taq DNA 聚合酶。

4 临床诊断

急性感染初期,猪群表现为食欲低下、发热、昏睡和精神不振等症状,个别猪可出现双耳、外阴、腹部、口部青紫发绀,一般持续1周~3周;发病高峰的主要特征是母猪早产、流产以及木乃伊胎和弱仔增多;仔猪断奶前死亡率增加,高峰期一般持续8周~12周;发病末期,母猪繁殖功能逐渐恢复,达到或接近病前水平。仔猪和育肥猪存在不同程度的呼吸系统症状,痊愈猪一般生长缓慢,体重较轻。若没有继发感染,除发病仔猪可见间质性肺炎等特征病变外,一般不表现肉眼可见病变。

有以上临床症状者,可以怀疑猪群有猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)感染,确诊需要实验室检验。

5 病毒的分离与鉴定

5.1 材料准备

5.1.1 器材

二氧化碳培养箱、普通冰箱及低温冰箱、倒置生物显微镜、恒温水浴箱、离心机及离心管、96孔细胞培养板、微量移液器、组织研磨器、孔径 0.2 μm 的微孔滤器及滤膜。

5.1.2 试剂

RPMI 1640 细胞培养液、MEM 细胞培养液、犍牛血清、青霉素(10^4 IU/mL)与链霉素(10^4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)溶液、7.5%碳酸氢钠溶液等。

5.1.3 细胞

猪原代肺泡巨噬细胞培养物(PAM)、MARC-145。PAM 由未感染过 PRRS 猪群中 6 周龄~8 周龄的猪获取,并经批次检验合格,制备和检验方法见附录 A。

5.1.4 样品

5.1.4.1 采样

无菌采取扁桃体、肺、淋巴结和脾等组织,血清或腹水置低温保存盒内立即送检。不能立即检测者,应放 -20°C 冰箱中,长期保存应置于 -70°C 冰箱中。

5.1.4.2 制备

血清和腹水可直接检测。肺、脾和扁桃体等组织可单独检测,也可混合后检测。各组织剪碎后研磨成糊状,加入 RPMI1640,制成 10%的组织悬液,以 3 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液,加入青霉素 500 IU/mL、链霉素 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、庆大霉素 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和两性霉素 B 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。怀疑有细菌污染的样品,也可用 0.2- μm 微孔滤膜过滤处理。

5.2 操作方法

5.2.1 制备细胞板

已建立的某些猴肾细胞系不能支持所有分离株特别是欧洲型病毒株的生长,因此病毒分离应首选 PAM 细胞,先将 PAM 细胞用 RPMI1640 稀释(含犍牛血清 5%,青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、庆大霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、两性霉素 B 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pH7.2),稀释细胞终浓度为每毫升 1×10^6 个细胞。或将 MARC-145 用 MEM 稀释,使细胞终浓度为每毫升 5×10^4 个细胞。然后,每孔 100 μL 加入到 96 孔细胞培养板中。

5.2.2 稀释样品

在空白 96 孔细胞培养板中加入细胞培养液 RPMI1640,每孔 90 μL ,在 A 排和 E 排各孔内分别加入样品,每孔 10 μL (样品 1:10 稀释),将板轻轻摇动后,从 A 排和 E 排孔各取 10 μL 分别移入 B 排和 F 排孔内(样品 1:100 稀释)。将板轻轻摇动后,从 B 排和 F 排孔各取 10 μL 分别移入 C 排和 G 排孔内(样品 1:1 000 稀释),将板轻轻摇动后,从 C 排和 G 排孔各取 10 μL 分别移入 D 排和 H 排孔内(样品 1:10 000 稀释)。每个培养板应设置空白对照。振动稀释板后加盖,置 4°C 冰箱内保存备用。

5.2.3 接种样品

分别吸取上述稀释样品 50 μL 接种于 5.2.1 中对应的细胞孔(第一代)中,放入 37°C 、5%二氧化碳培养箱中培养,每天观察 CPE,连续观察 2 d~5 d。

5.2.4 培养物盲传

一般在第一代培养 2 d 后,不论有无细胞病变,一律将每孔内细胞液取 25 μL ,整板移入按照 5.2.1 方法制备的新细胞板对应的孔内。放入 37°C 、5%二氧化碳培养箱中培养 2 d~5 d,每天观察 CPE。

5.3 结果判定

通常在接种 1 d~2 d 后可出现 CPE,主要呈现细胞圆缩、聚集、固缩,最后溶解脱落。初次接种样品和盲传后都出现 CPE,或盲传后出现 CPE 均认为阳性。仅仅初次接种样品出现 CPE,认为是由于病

料毒性引起的假阳性。

在细胞培养物盲传结束后,不论是否出现 CPE,对所有的孔应采用免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)或间接免疫荧光试验(IFA)进行终判;只要对 PRRSV 标准阳性血清呈现阳性反应,则被认定为 PRRSV 分离阳性。

6 免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)

6.1 材料准备

6.1.1 器材

微量移液器、倒置显微镜等。

6.1.2 试剂

6.1.2.1 IPMA 诊断板的制备:见第 A.6 章。

6.1.2.2 标准阳性血清、标准阴性血清和兔抗猪 IgG HRP 结合物使用前按说明书规定用血清稀释液稀释至工作浓度。

6.1.2.3 洗涤液、血清稀释液和显色/底物溶液按照附录 B 配制。

6.1.3 样品

采集被检猪血液,分离血清,血清应新鲜、透明、不溶血、无污染,密装于灭菌小瓶内,4℃或-20℃冰箱保存或立即送检。试验前将被检血清统一编号。

6.2 操作方法

6.2.1 稀释血清样品:在空板的 A 排和 E 排各孔分别加入 180 μL 的血清稀释液,其余各孔加 120 μL。将 20 μL 被检血清和对照血清分别加入 A 排和 E 排各孔,缓慢摇动,从 A 排和 E 排各孔内取 40 μL 分别加入 B 排和 F 排,依次作 1:40、1:160、1:640 稀释。

6.2.2 取上述板中稀释血清样品各 50 μL 加入 IPMA 诊断板的相应孔内,封板,37℃孵育 1 h,弃去液体,用 0.15 mol/mL 氯化钠(NaCl) + 0.5%吐温-80 洗板三次。

6.2.3 用 0.15 mol/L NaCl 和 0.5%吐温-80 稀释兔抗猪 IgG HRP 结合物至工作浓度,加入 50 μL 结合物稀释液于板中,封板后 37℃孵育 1 h,洗涤一次。

6.2.4 各孔中加入显色剂/底物(AEC)溶液 50 μL,在 18℃~22℃室温下作用至少 30 min,弃去液体,加入 50 μL 0.05 mol/L 乙酸钠溶液。

6.3 结果判定

将 IPMA 诊断板置于倒置显微镜下判读。在对照样品成立的前提下,被检血清标本板内各孔约 30%~50%的细胞质呈现深红色,判读为免疫过氧化物酶单层试验阳性,记作 IPMA(+);细胞质未被染色,判读为免疫过氧化物酶单层试验阴性,记作 IPMA(-)。血清非特异性反应使整孔细胞染色(与阳性对照比较)。血清滴度以 50%以上的孔染色的最高稀释度的倒数表示。血清滴度 < 10 为阴性,10 或 40 为弱阳性,非特异性染色常在此范围内,血清滴度 ≥ 160 为阳性。

7 间接免疫荧光试验(IFA)

7.1 材料准备

7.1.1 器材

荧光显微镜、二氧化碳培养箱、恒温箱、保湿盒、微量移液器等。

7.1.2 试剂

7.1.2.1 IFA 诊断板的制备:见第 A.7 章。

7.1.2.2 兔抗猪 IgG 异硫氰酸荧光素(FITC)结合物、标准阳性血清和标准阴性血清。

7.1.3 样品

被检血清应新鲜、透明、不溶血、无污染,试验前用 PBS 作 20 倍稀释。

7.2 操作方法

7.2.1 在 96 孔板中每孔加入 PBS 190 μL ,再分别加入待检血清、阳性血清、阴性血清 10 μL (1:20 稀释)。

7.2.2 96 孔板 IFA 操作步骤

7.2.2.1 取 96 孔 IFA 诊断板,加入 150 μL PBS,室温浸润 5 min,弃去板中液体,并在吸水纸上轻轻拍干。

7.2.2.2 在 96 孔 IFA 诊断板的感染和非感染细胞孔内分别加入 50 μL 7.2.1 中稀释的血清,封板后,湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min,弃去板中血清,在吸水纸上轻轻拍干。每孔加入 PBS 200 μL ,洗板六次,弃去液体。

7.2.2.3 每孔加入工作浓度的兔抗猪 IgG FITC 结合物 50 μL ,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒中作用 30 min。

7.2.2.4 弃去板中结合物,用 PBS 洗涤四次后,最后在吸水纸上轻轻拍干。用荧光显微镜观察。

7.3 结果判定

在对照血清成立的前提下进行,即标准阳性血清对照中感染细胞孔应出现典型的特异性荧光,而未感染细胞孔不出现荧光;标准阴性血清对照感染细胞孔和未感染细胞孔均不出现荧光。被检血清中未感染细胞孔不出现荧光,感染细胞孔出现绿色荧光,判为阳性;未感染细胞和感染细胞中都没有特异性绿色荧光,判为阴性。任何血清在 1:20 稀释条件下出现可疑结果时应重新检测,或 2 周~3 周后重新采样进行检测,重复检测仍为可疑,判为阳性。

8 间接酶联免疫吸附试验(间接 ELISA)

8.1 材料准备

8.1.1 器材

96 孔平底微量反应板、微量移液器、酶标测定仪、恒温箱、保湿盒等。

8.1.2 试剂

8.1.2.1 PRRSV 抗原和正常细胞对照抗原、兔抗猪 IgG HRP 结合物(简称酶标抗体)、标准阳性血清和标准阴性血清。使用前按说明书规定用抗原稀释液稀释至工作浓度。

8.1.2.2 抗原稀释液、血清稀释液、洗涤液、封闭液、底物溶液、终止液等的配制,见附录 B。

8.1.3 样品

被检血清应新鲜、透明、不溶血、无污染,试验前用血清稀释液作 1:20 稀释。

8.2 操作方法

8.2.1 取 96 孔微量反应板,于奇数列加工作浓度的病毒抗原,偶数列加工作浓度的对照抗原,每孔 100 μL ,封板,置湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中感作 60 min,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内过夜。

8.2.2 弃去板中包被液,加洗涤液洗板,每孔 300 μL ,洗涤三次,每次 1 min。在吸水纸上轻轻拍干。

8.2.3 每孔加入封闭液 100 μL ,封板后置湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中感作 60 min。

8.2.4 洗涤,方法同 8.2.2。

8.2.5 反应板编号后,对号加入已作稀释的被检血清、标准阳性血清和标准阴性血清。每份血清各加 2 个病毒抗原孔和 2 个对照抗原孔,孔位相邻。每孔加样量均为 100 μL 。封板,置保湿盒内于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中感作 30 min。

8.2.6 洗板,方法同 8.2.2。

8.2.7 每孔加工作浓度的酶标抗体 100 μL ,封板,放保湿盒内置 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中感作 30 min。

8.2.8 洗板,方法同 8.2.2。

8.2.9 每孔加入新配制的底物溶液 100 μL ,封板,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中避光感作 15 min。

8.2.10 每孔加终止液 100 μL 终止反应。

8.3 光密度(OD)值测定

在酶标测定仪上读取反应板各孔溶液的 OD 值,记入专用表格。

8.4 结果判定

8.4.1 有效性判定

阳性对照 OD 值与阴性对照 OD 值的差值应大于或等于 0.15 时,才可进行结果判定。否则,本次试验无效。

8.4.2 判定标准与解释

- a) S/P 比值小于 0.3,判定为 PRRSV 抗体阴性,记作间接 ELISA(-);
- b) S/P 比值大于或等于 0.3,小于 0.4,判定为可疑,记作间接 ELISA(\pm);
- c) S/P 比值大于或等于 0.4,判定为 PRRSV 抗体阳性,记作间接 ELISA(+).

判定为可疑样品,可重复检测一次,如果检测结果仍为可疑,可判作阳性;也可以采用其他血清学检测方法进行检测。

注:间接 ELISA 试验也可采用经过验证的商品化检测试剂盒。

9 反转录-聚合酶链反应试验(RT-PCR)

9.1 仪器与器材

PCR 检测仪,高速台式冷冻离心机(离心速度 12 000 r/min 以上),台式离心机(离心速度 2 000 r/min),稳压稳流电泳仪和水平电泳槽,电泳凝胶成像系统(或紫外分析仪),混匀器,冰箱(2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 和-20 $^{\circ}\text{C}$ 两种),微量可调移液器(10 μL 、100 μL 、1 000 μL)及配套无 RNA 酶污染带滤芯吸头,Eppendorf 管。

9.2 试剂

除特别说明以外,本标准所用试剂均为分析纯,一级水、二级水符合 GB/T 6682 规定的要求;本标准所有试剂均用无 RNA 酶污染的容器(用 DEPC 水处理后高压灭菌)分装。

- a) PBS:见 A.1.1;
- b) 裂解液:Tri-reagent 或其他等效裂解液;
- c) 三氯甲烷;
- d) 异丙醇:-20 $^{\circ}\text{C}$ 预冷;
- e) 75%乙醇:见 B.9.2;
- f) DEPC 水:见 B.9.1;
- g) M-MLV 反转录酶:10 U/ μL ;
- h) 5 \times RT 缓冲液;
- i) RNA 酶抑制剂:40 U/ μL ;
- j) Taq 酶:10 U/ μL ;
- k) 10 \times PCR 缓冲液(Mg²⁺ full);
- l) dNTPs:含有 dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 10 mmol/L;
- m) 甘油或矿物油;
- n) 引物:检测 PRRSV 的引物对,参见附录 C,加 DEPC 水配制成 100 $\mu\text{mol/L}$ 的储存液和 20 $\mu\text{mol/L}$ 工作液;
- o) 电泳缓冲液:0.5 \times TBE 缓冲液,见第 B.11 章;
- p) 电泳加样缓冲液:见第 B.13 章。

9.3 采样

9.3.1 器械

下列采样工具应经(121 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$,15 min 高压灭菌并烘干:

棉拭子、剪刀、镊子、1.5 mL Eppendorf 管、研钵。

9.3.2 样品

肺、扁桃体、淋巴结和脾等组织样品；新鲜精液或冷冻精液；血清、血浆、全血或细胞培养物。

9.4 样品制备

9.4.1 组织

取待检样品 2.0 g 在研钵中充分研磨，加 PBS 混匀，冻融两次，4 ℃，以 3 000 r/min 离心 15 min，取上清液备用。

9.4.2 精液

冻融两次或超声波裂解，以 10 000 r/min 离心 10 min，取上清备用。

9.5 操作方法

9.5.1 样品总 RNA 的提取

9.5.1.1 取 n 个灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，其中 n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和，编号。每管加入 600 μ L 细胞裂解液，分别加入被检样品、阴性对照、阳性对照各 200 μ L，每加一份样品换用一个吸头，再各加入 200 μ L 三氯甲烷，在混匀器上振荡混匀 5 s。于 4 ℃、以 12 000 r/min 离心 15 min。

9.5.1.2 取与 9.5.1.1 相同数量灭菌的 1.5 mL Eppendorf 管，加入 500 μ L 异丙醇（-20 ℃预冷），做标记。吸取 9.5.1.1 各管中的上清液转移至相应的管中，上清液应至少吸取 500 μ L（不能吸出中间层），颠倒混匀。

9.5.1.3 于 4 ℃、以 12 000 r/min 离心 15 min（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），小心倒去上清，倒置于吸水纸上，沾干液体（不同样品应在吸水纸不同地方沾干）；加入 600 μ L 75% 乙醇，颠倒洗涤。

9.5.1.4 于 4 ℃、以 12 000 r/min 离心 10 min（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），小心倒去上清，倒置于吸水纸上，尽量沾干液体（不同样品应在吸水纸不同地方沾干）。

9.5.1.5 以 4 000 r/min 离心 10 s（Eppendorf 管开口保持朝离心机转轴方向放置），将管壁上的残余液体甩到管底部，小心倒去上清，用微量加样器将其吸干，一份样品换用一个吸头，吸头不要碰到有沉淀一面，室温干燥 3 min，不能过于干燥，以免 RNA 不溶。

9.5.1.6 加入 11 μ L DEPC 水，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，以 2 000 r/min 离心 5 s，冰上保存备用。提取的 RNA 应在 2 h 内进行 PCR 扩增；若需长期保存应放置于 -70 ℃ 冰箱内。

9.5.2 RT-PCR 操作程序

9.5.2.1 反转录

反应液总量 20 μ L。依次在 RT 反应管中加入以下反应物：

- a) 模板，提取样品的总 RNA 5 μ L；
- b) 下游引物 P2：1 μ L；
- c) 5 \times RT 缓冲液：4 μ L；
- d) 10 mmol/L dNTP：2 μ L；
- e) RNA 酶抑制剂：1 μ L；
- f) M-MLV 反转录酶：1 μ L；
- g) DEPC 水：6 μ L。

以 4 000 r/min 离心 20 s，放入 PCR 仪中，RT 条件：42 ℃、60 min，95 ℃、5 min。

9.5.2.2 PCR 扩增

PCR 反应体系见表 1。

表 1 检测 PRRSV 基因的 PCR 反应体系

次 序	组 分	50 μL 反应体系/ μL
1	反转录产物	10.0
2	10 \times PCR 缓冲液	5.0
3	10 mmol/L dNTPs	1.0
4	10 \times 氯化镁(25 mmol/L)	3.0
5	上游引物 P1(20 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
6	下游引物 P2(20 $\mu\text{mol/L}$)	1.0
7	<i>Taq</i> 酶 (5 U/ μL)	0.5
8	加 DEPC 水至	50

注：反应体系中各种试剂的量可根据具体情况进行适当的调整；没有热盖的 PCR 仪器需加入矿物油 40 μL 。

9.5.2.3 PCR 反应条件设置

各种试剂充分混合均匀后，以 4 000 r/min 离心 30 s，放入 PCR 仪中，设定 PCR 程序。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 min，95 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min，51 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min，72 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min，35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min。试验检测结束后，根据琼脂糖凝胶电泳来判断试验结果。

9.6 结果分析和判定

9.6.1 1%琼脂糖凝胶的制备

称取 1 g 琼脂糖，加入到 100 mL 0.5 \times TBE 缓冲液中。加热融化后稍冷却到 40 $^{\circ}\text{C}$ 左右加 5 μL (10 mg/mL) 溴化乙锭，混匀后倒入放置在水平台面上的凝胶盘中，胶板厚 5 mm 左右。依据样品数量选用合适型号的梳子。待凝胶冷却凝固后拔出梳子(胶中已形成加样孔)，放入水平电泳槽中，加 1 \times TBE 缓冲液淹没胶面。

9.6.2 加样

取 8 μL ~10 μL PCR 扩增产物和 2 μL 加样缓冲液混匀后加入一个加样孔。每次电泳应加阳性对照和阴性对照的扩增产物。并且设立 DNA 标准分子质量 Marker 作分子质量大小对照。

9.6.3 电泳条件

电压 80 V~100 V，或电流 40 mA~50 mA，电泳时间 30 min~40 min。

9.6.4 结果观察和判定

- 在紫外灯下观察核酸条带并判断结果；
- PCR 后阳性对照孔会出现一条 372 bp 的 DNA 片段，阴性对照和空白对照没有核酸条带；
- 待测样品电泳后在相应 372 bp DNA 位置上有条带者为 PRRSV 核酸检测结果阳性；
- 无条带或条带的大小不是 372 bp 的为 PRRSV 核酸检测结果阴性。

必要时，可取 PCR 扩增产物进行序列测定，序列结果与已公开发表的 PRRSV 特异性片段序列(参见附录 C)进行比对，序列同源性在 95% 以上，可判定待测样品 PRRSV 核酸检测结果阳性。

10 综合判定

PRRS 的诊断方法有多种。依据临床症状和病理变化只可作出初步诊断，确诊应依靠实验室检查。病毒的分离与鉴定多用于急性病例的确诊和新疫区的确定，RT-PCR 适用于该病病原的快速诊断。血清学方法主要用于检测 PRRSV 抗体。IPMA、IFA 和间接 ELISA 群体水平上进行血清学诊断较易操作、特异性强、敏感性高，但是对个体检测比较困难，有时出现非特异性反应，但是在 2 周~4 周后采血检测能够解决此问题。

当在临床上怀疑有 PRRSV 感染时,可根据实际情况,由上述几种方法中选用一种或两种方法进行确诊,对于未接种过 PRRS 疫苗,经任何一种方法检测呈现阳性结果时,都可最终判定为 PRRSV 感染猪。对接种过 PRRS 灭活疫苗并在疫苗免疫期内的猪或已超越疫苗免疫期的猪,当病毒分离鉴定试验为阳性结果时,可终判为 PRRSV 感染猪;当仅血清学试验呈阳性结果时,应结合病史和疫苗接种史进行综合判定,不可一律视为 PRRSV 感染猪。

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdregen.com

附录 A

(规范性附录)

猪肺泡巨噬细胞(PAM)制备、鉴定、保存以及 IPMA、IFA 诊断板的制备

A.1 试剂

A.1.1 磷酸盐缓冲盐水(PBS)

a) 原液甲

氯化钠(NaCl)	8.00 g
氯化钾(KCl)	0.20 g
磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)	1.15 g
磷酸二氢钾(KH_2PO_4)	0.20 g

溶于 500 mL 一级水中,再加入 5 mL 0.4% 酚红液,加一级水至 800 mL,56 kPa,20 min 灭菌备用。

b) 原液乙

氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.1 g
一级水加至	100 mL

56 kPa,20 min 灭菌备用。

c) 原液丙

氯化钙(CaCl_2)	0.1 g
------------------------	-------

溶于 100 mL 一级水中,56 kPa,20 min 灭菌备用。

d) 工作液

原液甲	8 份
原液乙	1 份
原液丙	1 份

充分混合后备用。必要时,可适量加入抗生素(青霉素 10^3 IU/mL、链霉素 10^3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、庆大霉素 10^3 $\mu\text{g}/\text{mL}$),不加制霉菌素。

A.1.2 细胞生长液

a) 含 10% 犊牛血清的 RPMI1640 液(含青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、庆大霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$);

b) 含 10% 犊牛血清的 MEM 液(含青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、庆大霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

A.1.3 细胞冻存液

取细胞生长液 8.0 mL,加入分析纯二甲基亚砜(DMSO)2.0 mL,混合均匀,不加制霉菌素。

A.2 PAM 的制备

取 6 周龄~8 周龄的 SPF 猪或被证实无 PRRSV 感染的健康猪,动脉放血致死,立即无菌操作取出肺,切勿划破被膜。每次用约 200 mL PBS 从气管灌入肺,挤压灌洗 3 次~4 次,收集灌洗液,以 1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,沉淀物用 50 mL PBS 再悬浮和离心洗涤 2 次~3 次。最后的细胞泥用 50 mL 细胞生长液悬浮,进行细胞计数,用细胞生长液稀释使细胞浓度达 4×10^7 个/1.5 mL。所得新鲜巨噬细胞立即使用或定量分装后冻存。

A.3 PAM 的冻存

取细胞浓度为 6×10^7 个/1.5 mL 的细胞悬液,加入等量细胞冻存液,缓慢滴加,边加边振摇。用细胞冻存管分装,每管 1.5 mL,放 -70°C 过夜,转入液氮中保存。液氮保存各批巨噬细胞,不可混合。

A.4 PAM 的批次试验

每批巨噬细胞应检验合格后再使用。方法是:在 96 孔细胞培养板上用已知滴度的标准病毒感染巨噬细胞,并用标准的阳性血清和阴性血清进行 IPMA 或 IFA 测定。只有能支持特定滴度(TCID_{50})的标准病毒良好生长的巨噬细胞,方可用于试验。

A.5 PAM 的复苏

从液氮中取出冷冻细胞管,立即投入温水(37°C 左右)中迅速解冻。将细胞移入 10 倍量的 RPMI1640 液($\text{pH}7.2$)中,以 $1\,000\text{ r/min}$ 离心 10 min,弃去上清液,沉淀的细胞用细胞生长液悬浮,计数,稀释至要求的细胞浓度后,即可使用。

A.6 IPMA 诊断板的制备

- 将长满单层的 PAM 细胞用消化液消化后,用 RPMI 1640 细胞生长液悬浮细胞,使细胞浓度达 10^5 个细胞每 $100\ \mu\text{L}$,在 96 孔细胞培养板中每孔分别加入 $100\ \mu\text{L}$,将细胞培养板放入 37°C 、5%二氧化碳培养箱中,培养 18 h~24 h;
- 用细胞营养液稀释 PRRSV 为 $10^5\ \text{TCID}_{50}/\text{mL}$,每孔 $50\ \mu\text{L}$,剩余 2 孔不加 PRRSV 作为对照孔。放入 37°C 、5%二氧化碳培养箱中,培养 18 h~24 h;
- 弃去培养液,用生理盐水洗涤细胞培养板,弃去液体,在吸水纸上轻轻拍干, 37°C 干燥 45 min,密封后储存于 -20°C 备用。加入冷的 4%多聚甲醛 PBS,室温固定 10 min。或用冰冷的无水乙醇 4°C 固定 45 min,或冰冷的 80%丙酮固定 45 min。弃去上述固定液,用生理盐水洗涤一次。

A.7 IFA 诊断板的制备

96 孔 IFA 诊断板:在 96 孔细胞培养板的 2、4、6、8、10、12 列分别加入 $50\ \mu\text{L}$ 无血清的 MEM 细胞培养基;用细胞分散液消化 MARC-145,用含 8% FBS 的 MEM 液稀释成每毫升 10^5 个,加入到上述 96 孔细胞培养板中,每孔 $150\ \mu\text{L}$; 37°C 、5%二氧化碳培养箱中培养至单层细胞备用;无血清的 MEM 培养基稀释 PRRS 标准毒,终浓度为 $10^5\ \text{TCID}_{50}/\text{mL}$,分别加到上述 96 孔细胞培养板的 1、3、5、7、9、11 列各孔内,每孔 $50\ \mu\text{L}$ 。置 37°C 、5%二氧化碳培养箱中培养 48 h~72 h。弃去培养液,用 PBS 洗一次细胞,弃去 PBS 后,每孔加入丙酮 $150\ \mu\text{L}$,置 4°C 作用 30 min,弃去丙酮,室温干燥,密封于塑料袋内, -70°C 冰箱中备用。

8 孔 IFA 诊断板:细胞分散液消化 MARC-145,用含 8% FBS 的 MEM 液稀释成每毫升 10^5 个,在 8 孔细胞培养板各孔中分别加入 $500\ \mu\text{L}$ 细胞悬液,置 37°C 、5%二氧化碳培养箱中培养至单层;用不含血清的 MEM 培养基稀释 PRRS 标准毒,终浓度为 $10^5\ \text{TCID}_{50}/\text{mL}$,取 $50\ \mu\text{L}$ 分别加到上述 8 孔细胞培养板中。置 37°C 、5%二氧化碳培养箱中培养 18 h。弃去培养液,用 PBS 洗一次细胞,弃去 PBS 后,每孔加入丙酮 $150\ \mu\text{L}$,室温固定 10 min~15 min,弃去丙酮,室温干燥。密封, -70°C 冰箱中保存。

附录 B
(规范性附录)
试剂的配制

B.1 PBS液(0.01 mol/L PBS, pH7.2)(用于 IFA)

氯化钠(NaCl)	8 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
碳酸氢钠(NaHCO ₃)	1.15 g
磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.2 g
二级水加至	1 000 mL
保存于 4 °C 备用。	

B.2 洗涤液(0.01 mol/L PBS-0.05%吐温-20, pH7.4)(用于间接 ELISA)

磷酸二氢钾(KH ₂ PO ₄)	0.2 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	2.9 g
氯化钠(NaCl)	8.0 g
氯化钾(KCl)	0.2 g
吐温-20	0.5 mL
二级水加至	1 000 mL
现用现配。	

B.3 抗原稀释液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6)(用于间接 ELISA)

碳酸钠(Na ₂ CO ₃)	1.59 g
碳酸氢钠(NaHCO ₃)	2.93 g
二级水加至	1 000 mL
4 °C 保存, 一周内用完。	

B.4 血清稀释液(用于 IPMA 和 ELISA)

B.4.1 称取 2.922 g NaCl 置于 100 mL 瓶中, 加入约 80 mL 的二级水, 高温高压灭菌后冷却至室温, 加入 4 mL 马血清, 500 μL 吐温-80, 用灭菌水补到 100 mL, 调节 pH 值至 7.2, 4 °C 保存。用于 IPMA。

B.4.2 含 1% 犍牛血清白蛋白或 10% 马血清的“A1”液。用于间接 ELISA。

B.5 封闭液(用于间接 ELISA)

含 1% 犍牛血清白蛋白或 10% 马血清的“A1”液。

B.6 显色/底物溶液(用于 IPMA)**B.6.1 AEC 贮存液**

称取 4 mg 氨基苊唑(3-amino-9-ethyl-carbazole, AEC)溶于 4 mL 二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide)中, 充分溶解后置 4 °C 避光保存。

B.6.2 0.05 mol/L pH 5.0 乙酸钠缓冲液

乙酸钠(CH ₃ COONa)	4.15 g
----------------------------	--------

二级水加至 1 000 mL
用冰乙酸调整至 pH 5.0。

B.6.3 乙酸盐缓冲液

冰乙酸(CH₃COOH) 14.8 mL
乙酸钠溶液 35.2 mL
二级水 50 mL
用冰乙酸调整至 pH 5.0。

B.6.4 显色/底物溶液(AEC-H₂O₂)

乙酸盐缓冲液 19 mL
AEC 贮存液 1 mL
30%过氧化氢(H₂O₂) 10 μL
充分混合后,用 5 μm 滤纸过滤,现用现配。

B.7 底物溶液(用于间接 ELISA)**B.7.1 0.1 mol/L 柠檬酸溶液**

柠檬酸(C₆H₈O₇) 1.92 g
二级水加至 100 mL

B.7.2 0.1 mol/L 磷酸氢二钠溶液

磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O) 3.58 g
二级水加至 100 mL

B.7.3 底物溶液(TMB-H₂O₂)

0.1 mol/L 柠檬酸溶液 33.0 mL
0.1 mol/L 磷酸氢二钠溶液 66.0 mL
四甲基联苯胺(TMB) 40.0 mg
30%过氧化氢(H₂O₂) 1.5 mL
充分混合后装于褐色玻璃瓶避光存放。现用现配。

B.8 终止液(用于间接 ELISA)

1 mol/L 氢氟酸(HF)溶液。

B.9 无 RNA 酶溶液的配制

配制溶液所用的三氯甲烷、无水乙醇、异丙醇等应采用未开封的新品,配置溶液所使用的一级水、容器、移液器吸嘴等应无 RNA 酶污染,操作过程中应戴一次性的塑料或乳胶手套,避免人体的 RNA 酶污染。

B.9.1 DEPC 水

一级水 100 mL
DEPC 100 μL

18 ℃~22 ℃室温下过夜,121 ℃、15 min 灭菌,或直接购买商品化的产品。

B.9.2 75%乙醇

DEPC 水 25 mL
无水乙醇 75 mL

用无水乙醇和 DEPC 水配制,-20 ℃预冷。

B.10 引物配制

根据附录 C 的序列合成引物,加 DEPC 水配制成 25 $\mu\text{mol/L}$ 。

B.11 TBE 电泳缓冲液(5 \times 浓缩液)

Tris	54.0 g
硼酸	27.5 g
EDTA	2.9 g
一级水加至	1 000 mL

用 5 mol/L 的盐酸(HCl)调到 pH8.0,正式试验时用一级水稀释成工作浓度的 0.5 \times TBE 缓冲液。

B.12 EB(核酸染色剂)

用一级水配制成 10 mg/mL 的浓缩液,用时每 10 mL 琼脂溶液中加入 1 μL 。

B.13 加样缓冲液

每 100 mL 溶液中含:溴酚蓝 0.25 g,蔗糖 40 g。

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdregen.com

附录 C
(资料性附录)

猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 方法引物序列、PRRSV 特异性片段的序列

C.1 猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 方法引物序列

猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 方法的引物序列根据基因数据库(Genbank)中美洲株和欧洲株的病毒 RNA 中高度保守的开放阅读框 ORF7(N 基因)设计。引物的序列为:

上游引物 P1:5'-GCGGATCCATGCCAAATAACAAC-3';

下游引物 P2:5'-AGCTCGAGTCATGCTGAGGGTGA-3'。

C.2 PRRSV 特异性片段的序列

```
1 atgccaata acaacggcaa gcagaaaag aaaaagaagg ggaatggcca gcctgtcaat
61 cagetgtgcc aatgetggg taagatcadc gcccaacaaa accagtccag aggcaaggga
121 ccggggaaga aaaataggaa gaaaaccgg gagaagcccc atttccctet agcgactgaa
181 gatgacgtca ggcacactt taccctagt gagcggcaat tgtgtctgtc gtcgatccag
241 actgccttca atcagggcgc tggaacttgt accctgtcag attcagggag gataagttac
301 actgtggagt ttagtttgc gacgcaacat actgtgcgtc tgatccgcgc cacagcatca
361 ccctcagcat ga
```

前 言

本标准的修订参照了世界动物卫生组织(OIE)编写的《陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽与蜜蜂)》(第五版,2004)。其技术内容与OIE所推荐的基本一致。

本标准代替GB/T 18090—2000《猪繁殖和呼吸综合症诊断方法》。

本标准与GB/T 18090—2000相比主要变化如下:

- 增加了临床诊断;
- 免疫过氧化物酶单层试验作连续4倍稀释,结果的判定按照OIE编写的《陆生动物诊断试验和疫苗手册(哺乳动物、禽与蜜蜂)》(第五版,2004)的内容作了相应的修改;
- 增加了反转录聚合酶链反应试验。

本标准的附录A、附录B是规范性附录,附录C是资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国动物防疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:孙颖杰、苏永生、胡传伟、吴斌、李叶、贾赞、肇惠君。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- GB/T 18090—2000。

青岛立见诊断技术发展中心
提供下载 www.qdregen.com