



# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 679—2003

---

## 猪繁殖与呼吸综合症免疫酶试验方法

Enzyme immunoassay for porcine reproductive and respiratory syndrome

2003-07-30 发布

2003-10-01 实施

---

中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由农业部畜牧兽医局提出并归口。

本标准起草单位：农业部兽医诊断中心。

本标准主要起草人：王宏伟、王传彬、陈西钊、田克恭。

## 猪繁殖与呼吸综合症免疫酶试验方法

### 1 范围

本标准规定了猪繁殖与呼吸综合症(PRRS)免疫酶试验和免疫酶组织化学方法。

本标准适用于检测猪血清中的猪繁殖与呼吸综合症病毒(PRRSV)抗体和组织中的 PRRSV 抗原。

### 2 免疫酶试验

#### 2.1 材料准备

##### 2.1.1 试剂

2.1.1.1 磷酸盐缓冲液(PBS):配制见第 A.1 章。

2.1.1.2 抗原涂片的制备:PRRSV 接种于生长至 70%~80%单层的 Marc-145 细胞。接种后 3 d~4 d,病变达 50%~75%时,用胰蛋白酶消化分散感染的细胞单层,PBS 洗涤三次后,稀释至  $1 \times 10^6$  个细胞/mL。取印有 10 个~40 个小孔的室玻片,每孔滴加 10  $\mu$ L。室温自然干燥后,冷丙酮(4℃)固定 10 min。密封包装,置-20℃备用。

2.1.1.3 标准阳性血清:PRRSV 试验感染猪制备的血清。

2.1.1.4 标准阴性血清:无 PRRSV 感染、未经免疫的猪血清。

2.1.1.5 酶结合物:辣根过氧化物酶(HRP)标记的葡萄球菌 A 蛋白(SPA)。

2.1.1.6 底物溶液:配制见第 A.2 章。

##### 2.1.2 器材

- a) 普通光学显微镜;
- b) 印有 10 个~40 个小孔的室玻片;
- c) 微量加样器,容量 5  $\mu$ L~50  $\mu$ L;
- d) 37℃恒温培养箱或水浴箱。

##### 2.1.3 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-30℃保存或立即送检。试验前将被检血清统一编号,并用 PBS 作 10 倍稀释。

#### 2.2 操作方法

2.2.1 取出抗原涂片,室温干燥后,滴加 10 倍稀释的待检血清和标准阴性血清、标准阳性血清,每份血清加两个病毒细胞孔和一个正常细胞孔,置湿盒内,37℃ 30 min。

2.2.2 PBS 漂洗三次,每次 5 min,室温干燥。

2.2.3 滴加适当稀释的酶结合物,置湿盒内,37℃ 30 min。

2.2.4 PBS 漂洗三次,每次 5 min。

2.2.5 将室玻片放入底物溶液中,室温下显色 5 min~10 min。PBS 漂洗两次,再用蒸馏水漂洗一次。

2.2.6 吹干后,在普通光学显微镜下观察,判定结果。

#### 2.3 结果判定

2.3.1 在阴性血清对照、阳性血清对照成立的情况下:即阴性血清与正常细胞和病毒感染细胞反应均无色;阳性血清与正常细胞反应无色,与病毒感染细胞反应呈棕黄色至棕褐色,即可判定结果;否则应重试。

2.3.2 待检血清与正常细胞和病毒感染细胞反应均呈无色,即可判为 PRRSV 抗体阴性。

2.3.3 待检血清与正常细胞反应呈无色,而与病毒感染细胞反应呈棕黄色至棕褐色,即可判为