

# SN

## 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 1247—2007  
代替 SN/T 1247.1~1247.2—2003

SN/T 1247—2007

### 猪繁殖和呼吸综合征检疫规范

Quarantine protocol for porcine reproductive and respiratory syndrome

中华人民共和国出入境检验检疫  
行业标准  
猪繁殖和呼吸综合征检疫规范  
SN/T 1247—2007

\*

中国标准出版社出版  
北京复兴门外三里河北街16号  
邮政编码:100045

网址 [www.spc.net.cn](http://www.spc.net.cn)  
电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

\*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 26 千字  
2007年11月第一版 2007年11月第一次印刷  
印数 1—2 000

\*

书号: 155066·2-18215 定价 12.00 元



SN/T 1247-2007

2007-08-06 发布

2008-03-01 实施

中华人民共和国  
国家质量监督检验检疫总局 发布

**附录 D**  
(资料性附录)

**猪繁殖和呼吸综合征病毒 TCID<sub>50</sub> 测定**

**D.1 材料准备**

**D.1.1 器材:**48孔细胞培养板2块、微量移液器、恒温箱、倒置显微镜等。

**D.1.2 病毒:**美洲型标准株 ATCC VR-2332 或欧洲型标准株 LV,向农业部指定单位索取。

**D.1.3 细胞:**MARC-145 或 HS2H 传代细胞,向农业部指定单位索取。使用时,细胞经细胞分散液消化分散后计数,用 EMEM 营养液(含犊牛血清 10%、青霉素 100IU/mL、链霉素 100 μg/mL,pH7.2)稀释至  $1 \times 10^6$  个/mL。

**D.2 操作方法**

**D.2.1 稀释病毒:**取洁净无菌的 48 孔细胞培养板,于第 1 孔加 EMEM 营养液 200 μL,其余各孔加 225 μL;换吸头,再于排头第 1 孔添加病毒液 50 μL,将混合液充分混匀。换吸头,吸取 25 μL 移于第 2 孔,混合。更换吸头,再吸取 25 μL 加入第 3 孔。连续如此操作至第 10 列,制成 10 个连续 10 倍的稀释液,使病毒稀释度依次为  $5 \times 10^0$ 、 $5 \times 10^1$ 、 $5 \times 10^2$ 、 $5 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^9$ 。改用多头微量取样器吸取每一稀释度的病毒液 50 μL 移入另一块 48 孔(或 96 孔)细胞培养板,每个稀释度的病毒液接种 4 孔。剩下的各孔加 50 μL EMEM 营养液,留作细胞对照。

**D.2.2 添加细胞:**于细胞培养板各孔内添加 50 μL 工作浓度的细胞悬液。此时,病毒稀释度依次变为  $10^1$ 、 $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 、 $10^{10}$ 。

**D.2.3 培养:**封板后,放 37℃ 5%二氧化碳保湿恒温箱内培养。

**D.3 观察与 TCID<sub>50</sub> 计算**

在倒置显微镜下逐孔观察致细胞病变作用(CPE)。每天观察一次,并将观察结果记入专用登记表内。观察天数为直至出现 CPE 终点,即看到能够引起病毒增殖的病毒最高稀释度。对照细胞应始终保持良好形态和特征。

用 Reed-Muench 法、内插法或 Karber 法计算该病毒培养物的 TCID<sub>50</sub>/0.05 mL。

## 前 言

本标准代替 SN/T 1247.1—2003《猪繁殖和呼吸综合征间接免疫荧光试验》和 SN/T 1247.2—2003《猪繁殖和呼吸综合征免疫过氧化物酶单层试验》。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 和附录 D 是资料性附录。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位:中华人民共和国福建出入境检验检疫局、中华人民共和国辽宁出入境检验检疫局、中华人民共和国天津出入境检验检疫局。

本标准主要起草人:孙颖杰、张伯强、白泉阳、苏永生、简中友、袁文泽、赵祥平、董志珍。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

——SN/T 1247.1—2003;

——SN/T 1247.2—2003。

## 附录 C (资料性附录)

### 猪肺泡巨噬细胞(PAM)制备、鉴定、保存与复苏

#### C.1 试剂准备

##### C.1.1 磷酸盐缓冲盐水(PBS)

氯化钠(NaCl)8.00 g,氯化钾(KCl)0.20 g,磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )1.15 g,磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )0.20 g,加三蒸水至 800 mL,56 kPa 20 min 灭菌备用。

##### C.1.2 细胞生长液

含 10% 犊牛血清的 RPMI 1640 营养液(含青霉素 100IU/mL、链霉素 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、庆大霉素 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

##### C.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砷(DMSO)2.0 mL,混合均匀。不加制霉菌素。

#### C.2 巨噬细胞(PAM)的制备

取 4 周龄~8 周龄的 SPF 猪或被证实无 PRRS 病毒感染的健康猪,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 液从气管灌入肺,挤压灌洗 3 次~4 次,收集灌洗液,1 000 $\times g$ 离心 10 min,得到的巨噬细胞泥用 PBS 液再悬浮和离心洗涤 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  $4\times 10^7/1.5$  mL。所得新鲜巨噬细胞立即应用或定量分装后冻存。

#### C.3 PAM 的冻存

取细胞浓度为  $8\times 10^7/1.5$  mL 的细胞悬液,加入等量细胞冻存液,缓慢滴加,边加边振摇。加毕,立即用聚苯乙烯管分装,每管 1.5 mL,放  $-70^\circ\text{C}$  过夜,转入液氮中保存。液氮保存各批巨噬细胞,不可混合。

#### C.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的标准病毒良好生长的巨噬细胞,方可用于试验。

#### C.5 PAM 的复苏

从液氮中取出冷冻细胞管,立即投入温水( $38^\circ\text{C}$ 左右)中迅速解冻。将细胞移入 10 倍量的 RPMI 1640 营养液(pH7.2)中,1 000 $\times g$ 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。

#### C.6 IPMA 诊断板的制备

用细胞分散液消化 Marc-145 或 HS2H,用营养液稀释成  $5\times 10^4$  个/mL,加入 PRRS 美洲或欧洲标准毒,使其最终浓度为 100TCID<sub>50</sub>/25  $\mu\text{L}$ ,混合后接种 96 孔细胞培养板 1、2、4、5、7、8、10、11 列的各孔内,每孔加 100  $\mu\text{L}$ 。在 3、6、9、12 列的各孔内加 100  $\mu\text{L}$  未感染病毒细胞悬液。把细胞培养板放在  $37^\circ\text{C}$  5%二氧化碳恒温箱中培养,当细胞出现 20% CPE 时,弃去培养液,用 PBS 液(100  $\mu\text{L}/$ 孔)洗一次,每孔

## 猪繁殖和呼吸综合征检疫规范

### 1 范围

本标准规定了猪繁殖和呼吸综合征(PRRS)的检疫规范。

本标准适用于猪繁殖和呼吸综合征的病毒分离鉴定、病毒抗原监测、病毒抗体检测,可用于该病的检疫、诊断和流行病学调查。

### 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 18090—2000 猪繁殖和呼吸综合症诊断方法

### 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

#### 3.1

##### 免疫过氧化物酶单层试验 immunoperoxidase monolayer assay(IPMA)

培养的单层细胞,接种 PRRS 病毒或处理过的被检样品,让 30%~50% 细胞感染,经组织固定和内源酶处理,加被检血清或阳性抗体处理,再加酶标抗抗体,经过显色反应检测抗原或抗体的存在。在 PRRS 诊断上最早用于检测其抗体。

#### 3.2

##### 间接免疫荧光试验 indirect fluorescent antibody test(IFA)

成切片或涂片的标本经过固定后,加抗血清处理,再加荧光标记的抗抗体染色,漂洗,滴加缓冲甘油后用盖玻片封载,用荧光显微镜进行检测。检测抗体,可用于早期诊断。

### 4 疾病概述

猪繁殖和呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS),也称为蓝耳病(Blue-eared Disease),是由猪繁殖和呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus, PRRSV)引起的以母猪繁殖障碍和仔猪及育成猪呼吸困难为特征的接触性传染病。繁殖障碍的特征是流产、死胎和产弱仔,弱仔由于呼吸道疫病和继发感染常常很快死亡;呼吸道特征是仔猪及育成猪呼吸困难,年龄较大的猪可能出现温和性呼吸道症状,有时因继发感染而使病情复杂。其病原、流行病学、诊断以及检疫与诊断参见附录 A。

### 5 检疫方法

#### 5.1 病毒的分离与鉴定(见 GB/T 18090—2000)

##### 5.1.1 设备、材料和试剂

5.1.1.1 器材:96 孔或 48 孔细胞培养板、微量移液器、恒温水浴箱、二氧化碳恒温箱、普通冰箱及低温冰箱、离心机及离心管、组织研磨器、孔径 0.2  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜、普通光学显微镜。

5.1.1.2 试剂:RPMI 1640 培养液、犊牛血清、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。