



中华人民共和国国家标准

GB/T 18090—2023

代替 GB/T 18090—2008

猪繁殖与呼吸综合征诊断方法

Diagnostic techniques for porcine reproductive and respiratory syndrome

2023-03-17 发布

2023-10-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 1

5 生物安全措施 2

6 临床诊断 2

 6.1 易感动物 2

 6.2 临床症状 2

 6.3 病理变化 2

 6.4 结果判定 2

7 实验室检测样本采集与保存 3

 7.1 采样器材 3

 7.2 样本采集 3

 7.3 样本保存 3

8 病毒的分离与鉴定 3

 8.1 主要器材、试剂与细胞 3

 8.2 样本制备 4

 8.3 试验方法 4

 8.4 结果判定 5

9 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 5

 9.1 主要器材 5

 9.2 主要试剂 5

 9.3 样本制备 6

 9.4 试验方法 6

 9.5 结果判定 8

10 实时反转录-聚合酶链反应(实时 RT-PCR) 8

 10.1 主要器材 8

 10.2 主要试剂 8

 10.3 样本制备 8

 10.4 试验方法 8

 10.5 结果判定 9

11 免疫过氧化物酶单层试验(IPMA) 9

11.1 主要器材 9

11.2 主要试剂 10

11.3 试验方法 10

11.4 结果判定 10

12 间接免疫荧光试验(IFA) 10

12.1 主要器材 10

12.2 主要试剂 10

12.3 试验方法 10

12.4 结果判定 11

13 间接酶联免疫吸附试验(间接 ELISA) 11

13.1 主要器材 11

13.2 主要试剂 11

13.3 试验方法 11

13.4 结果判定 12

14 综合判定 12

附录 A (规范性) 猪肺泡巨噬细胞(PAMs)制备、鉴定、保存 14

附录 B (规范性) 试剂的配制 16

附录 C (资料性) RT-PCR、定量 RT-PCR 引物探针和特异性扩增片段序列 18

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 18090—2008《猪繁殖与呼吸综合征诊断方法》，与 GB/T 18090—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了临床诊断（见第 6 章，2008 年版的第 4 章）；
- 增加了实时反转录聚合酶链反应（见第 10 章）。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国动物卫生标准化技术委员会（SAC/TC 181）归口。

本文件起草单位：中华人民共和国大连海关、中国农业大学、中华人民共和国郑州海关。

本文件主要起草人：胡传伟、杨汉春、肇慧君、周磊、张雪、刘钊、苗丽、贾赟、李叶。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2000 年首次发布为 GB/T 18090—2000，2008 年第一次修订；
- 本次为第二次修订。



猪繁殖与呼吸综合征诊断方法

1 范围

本文件描述了猪繁殖与呼吸综合征(PRRS)的临床诊断和实验室诊断的方法。

本文件适用于猪繁殖与呼吸综合征的诊断和监测。临床诊断方法适用于 PRRS 临床疑似病例的诊断,病毒分离与鉴定、反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和实时反转录-聚合酶链反应(Real-time RT-PCR)适用于猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)的检测,免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)、间接免疫荧光试验(IFA)和间接酶联免疫吸附试验(ELISA)适用于 PRRSV 抗体的检测以及感染状况的监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室生物安全通用要求

NY/T 541 兽医诊断样本采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

AEC:氨乙基咔唑(3-amino-9-ethyl-carbazole)

bp:碱基对(base pair)

CPE:致细胞病变作用(cytopathic effect)

DEPC:焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate)

dNTP:脱氧核糖核苷三磷酸(deoxyribonucleoside triphosphate)

EB:溴化乙锭(ethidium bromide)

EDTA:乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid)

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

FITC:异硫氢酸荧光素(fluorescein isothiocyanate)

HRP:辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase)

IFA:间接免疫荧光试验(indirect immunofluorescent assay)

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

OD:光密度(optical density)

PBS:磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline)

PRRS:猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiratory syndrome)

PRRSV:猪繁殖与呼吸综合征病毒(porcine reproductive and respiratory syndrome virus)

Real time RT-PCR:实时反转录聚合酶链反应(Real time reverse transcription-polymerase chain reaction)

RNA:核糖核酸(ribonucleic acid)

RT-PCR:反转录聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reaction)

SDS:十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate)

Taq 酶:*Taq* DNA 聚合酶(*Taq* DNA polymerase)

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

5 生物安全措施

PRRSV 的分离与鉴定应在生物安全二级(BSL-2)实验室进行,按照 GB 19489 执行。

6 临床诊断

6.1 易感动物

家猪是 PRRSV 的易感动物,各种年龄和品种的猪均易感,主要危害妊娠母猪和仔猪。PRRSV 也可感染野猪。

6.2 临床症状

6.2.1 急性型:妊娠母猪以繁殖障碍为主,表现为晚期流产、早产、产死胎、木乃伊胎和弱仔,死亡率一般为 1%~4%。哺乳仔猪表现为体温升高、精神萎靡、食欲废绝、嗜睡、扎堆、消瘦、呼吸困难和结膜水肿等,断奶前的死亡率可达 60%。保育猪、生长育肥猪食欲下降、精神沉郁、耳发绀、呼吸困难、咳嗽、被毛粗乱、平均日增重降低,死亡率可达 12%~20%。如果继发或并发其他疾病,可致死亡率升高。公猪表现出食欲下降、精神沉郁、呼吸道症状、精液质量下降等。

6.2.2 慢性型:妊娠母猪散发性流产、胎儿异常、不规律返情、空怀等,产活仔率下降。仔猪和生长育肥猪有不同程度的呼吸系统症状,猪只生长迟缓,如有细菌性继发感染,生长猪的死淘率可达 5%~20%。持续性感染和亚临床感染猪无明显临床表现。

6.2.3 非典型:以高热、高发病率和死亡率为特征。妊娠母猪的流产率为 40%~100%,死亡率可达 10%以上,哺乳仔猪的死亡率可高达 100%,保育猪的死亡率可达 50%以上。

6.3 病理变化

6.3.1 剖检病理变化:感染猪肺脏轻度或中度水肿,呈橡胶样,大部分淋巴结肿大。高致病性 PRRSV 毒株感染猪的皮肤出血,肺脏严重水肿和实变。继发细菌感染的病例可出现胸膜炎、心包炎、腹膜炎、关节炎等。

6.3.2 组织病理学变化:肺脏呈典型的间质性肺炎,肺泡间隔增厚、单核细胞与淋巴细胞浸润以及Ⅱ型肺泡上皮细胞增生,具有诊断意义。淋巴结生发中心变大、增生、坏死,淋巴窦内有多核巨细胞浸润。

6.4 结果判定

6.4.1 出现上述临床症状和病理变化,可初步判定为疑似 PRRS。

6.4.2 确诊应按照 NY/T 541 规定的要求采集猪的全血、血清及肺脏、脾脏、淋巴结等组织样本,进行实验室检测。

7 实验室检测样本采集与保存

7.1 采样器材

解剖刀、剪刀、镊子、注射器(5 mL、10 mL)及针头、扁桃体采样器、真空采血管(含 EDTA 抗凝剂)、棉绳、离心机、离心管(2 mL、10 mL)、样本保存管、工作服、一次性手套、采样记录单、记号笔、防水标签、封口膜、冰袋等。

7.2 样本采集

7.2.1 血液样本

用注射器无菌采集发病猪或感染猪血液,凝固后分离血清,或采集抗凝血,经离心分离出血浆。血清、抗凝血或血浆可用于 PRRSV 的分离与鉴定、RT-PCR 和 Real time RT-PCR 检测。血清可用于 PRRSV 抗体检测,猪群 PRRSV 抗体的监测应采集至少 30 头猪的血清样本。

7.2.2 组织样本

无菌采集病死猪或扑杀猪的肺脏、脾脏、淋巴结、扁桃体等组织,用于 PRRSV 的分离与鉴定、RT-PCR 和 Real time RT-PCR 检测。



7.2.3 其他样本

公猪的精液可用于 PRRSV 的 RT-PCR 和 Real time RT-PCR 检测。将绵绳悬挂于猪栏,让猪咬绵绳,挤压绵绳收集口腔液,可用于 PRRSV 的 RT-PCR 和 Real time RT-PCR 检测以及抗体检测。

7.3 样本保存

采集的样本应保存于 4 ℃,用于病毒分离的样本应在 24 h~48 h 内运送至实验室。不能立即进行检测的样本应保存于-20 ℃冰箱,长期保存应置于-70 ℃冰箱。

8 病毒的分离与鉴定

8.1 主要器材、试剂与细胞

8.1.1 主要器材

- 8.1.1.1 二氧化碳培养箱(37 ℃)。
- 8.1.1.2 冰箱(4 ℃、-20 ℃、-70 ℃)。
- 8.1.1.3 倒置生物显微镜。
- 8.1.1.4 恒温水浴箱(37 ℃)。
- 8.1.1.5 离心机及离心管(规格 10 mL)。
- 8.1.1.6 96 孔微量细胞培养板。
- 8.1.1.7 微量可调移液器(规格 100 μL~1 000 μL、20 μL~200 μL、1 μL~20 μL)。
- 8.1.1.8 组织研磨器。
- 8.1.1.9 微孔滤器(滤膜孔径 0.22 μm)。

8.1.2 主要试剂

8.1.2.1 细胞生长液与维持液,按照附录 A 中 A.1.1 配制。

8.1.2.2 PRRSV 阳性血清或单克隆抗体。

8.1.3 细胞

猪原代肺泡巨噬细胞(PAMs)或 MARC-145 细胞。PAMs 按照附录 A 进行制备、保存与复苏。应首选 PAMs 进行 PRRSV 分离。

8.2 样本制备

血清、全血或血浆样本可直接用于病毒分离。组织样本经剪碎后经组织研磨器研磨,按照 1:9 的比例加入 RPMI1640 培养基制成 10%的组织悬液,经 3 000 r/min 离心 15 min 后,吸取上清液,加入青霉素(500 IU/mL)、链霉素(500 μ g/mL)、庆大霉素(500 μ g/mL)和两性霉素 B(200 μ g/mL)。有细菌污染的样本应用微孔滤器进行过滤处理。

8.3 试验方法

8.3.1 单层细胞制备

用 RPMI1640 细胞生长液稀释复苏的 PAMs,细胞终浓度为每毫升 1×10^6 个/mL 细胞,或用 DMEM 细胞生长液稀释 MARC-145 细胞,细胞终浓度为每毫升 5×10^4 个细胞。然后,将稀释的细胞加入 96 孔细胞培养板中,100 μ L/孔,置于 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳培养箱中培养长成单层。

8.3.2 样本稀释

在空白的 96 孔细胞培养板中加入细胞培养液 RPMI1640,90 μ L/孔,在 A 排和 E 排各孔内分别加入 7.2.1 制备的样本,10 μ L/孔(样本 1:10 稀释,重复 2 孔),摇动培养板后,从 A 排和 E 排孔各取 10 μ L 分别移入 B 排和 F 排孔内(样本 1:100 稀释)。摇动培养板后,再从 B 排和 F 排孔各取 10 μ L 分别移入 C 排和 G 排孔内(样本 1:1 000 稀释)。同样,再从 C 排和 G 排孔各取 10 μ L 分别移入 D 排和 H 排孔内(样本 1:10 000 稀释)。每个培养板应设置不接种样本的细胞空白对照。一般而言,对用于 PRRSV 分离的样本进行 1:10 和 1:100 稀释即可。

8.3.3 样本接种

吸取按 8.3.2 方法稀释的样本 50 μ L 接种于 8.3.1 中对应的细胞孔(第 1 代)中,吸附 1 h 后,加入细胞维持液,100 μ L/孔,置于 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳培养箱中培养,每天观察细胞病变,连续观察 2 d~5 d。

8.3.4 培养物盲传

样本初次接种细胞培养 2 d 后,不论有无 CPE,应将每孔内细胞液取 25 μ L,移入按照 8.3.1 制备的新细胞板对应的孔内(第 2 代),置于 37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳培养箱中培养 2 d~5 d,每天观察 CPE。样本的细胞培养物应盲传 2 代~3 代。

8.3.5 病毒鉴定

用 PRRSV 阳性血清或单克隆抗体,采用本文件的免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)或间接免疫荧光试验(IFA),对出现细胞病变的培养物进行 PRRSV 的鉴定。

8.4 结果判定

8.4.1 PRRSV 感染细胞的 CPE 主要表现为细胞圆缩、聚集、固缩,最后崩解脱落。初次接种样本和盲传后均出现 CPE,或盲传后出现 CPE,并经 IPMA 或 IFA 检测为阳性,判定为 PRRSV 分离阳性。

8.4.2 初次接种样本和盲传后均无 CPE,或出现 CPE 但经 IPMA 或 IFA 检测为阴性,判为 PRRSV 分离阴性。

9 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

9.1 主要器材

9.1.1 PCR 仪。

9.1.2 高速台式冷冻离心机(4℃,离心速度 12 000 r/min 以上)。

9.1.3 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。

9.1.4 凝胶成像系统。

9.1.5 混匀器。

9.1.6 冰箱(2℃~8℃、-20℃和-70℃)。

9.1.7 微量可调移液器(规格 100 μL~1 000 μL、20 μL~200 μL、1 μL~20 μL)以及无 RNase 污染带滤芯吸头。

9.1.8 组织研磨器。

9.2 主要试剂

9.2.1 除特别说明以外,本文件所用试剂均为分析纯,所用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格,所有试剂均用无 RNase 污染的容器分装。

9.2.2 PBS 液,按照附录 B 中 B.1 配制。

9.2.3 商品化的 RNA 提取裂解液。

9.2.4 三氯甲烷。

9.2.5 异丙醇(-20℃预冷)。

9.2.6 DEPC 水:在 100 mL 三蒸水中加入 100 μL DEPC,18℃~22℃室温下过夜,121℃灭菌 15 min。也可用商品化的产品。

9.2.7 75%乙醇:75 mL 无水乙醇加 25 mL DEPC 水,配制成 75%乙醇溶液,-20℃预冷备用。

9.2.8 M-MLV 反转录酶(10 U/μL)。

9.2.9 5×RT 缓冲液。

9.2.10 RNA 酶抑制剂(40 U/μL)。

9.2.11 *Taq* 酶(10 U/μL)。

9.2.12 10×PCR 缓冲液。

9.2.13 dNTPs(含 dATP、dTTP、dCTP、dGTP,各 10 mmol/L)。

9.2.14 10×MgCl₂(25 mmol/L)。

9.2.15 甘油或矿物油。

9.2.16 引物,检测 PRRSV 的引物对序列见附录 C,加 DEPC 水配制成 100 μmol/L 的储存浓度和 20 μmol/L 的工作浓度。

9.2.17 5×TBE 电泳缓冲液,按照 B.2 配制。

9.2.18 EB 溶液。

9.2.19 电泳上样缓冲液:100 mL 溶液中含 0.25 g 溴酚蓝及 40 g 蔗糖。

9.3 样本制备

9.3.1 组织样本

取待检组织样本 2.0 g 于灭菌的组织研磨器中充分研磨,加 10 mL PBS 混匀,4 °C 3 000 r/min 离心 15 min,取上清液转入无菌的 1.5 mL 离心管中,对样本进行编号。

9.3.2 精液

取精液 0.5 mL,经冻融 2 次或进行超声波裂解,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液。

9.3.3 血清、全血或血浆、口腔液

直接使用。

9.4 试验方法

9.4.1 样本总 RNA 的提取

9.4.1.1 取灭菌的 1.5 mL 离心管,基于样本数量进行编号。每管加入 600 μ L 细胞裂解液,然后分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照、空白对照(无核酸酶水)各 200 μ L,每加一份样本换用一个吸头,再各加入 200 μ L 三氯甲烷,在混匀器上振荡混匀 5 s。于 4 °C 经 12 000 r/min 离心 15 min。

9.4.1.2 取与 9.4.1.1 相同数量灭菌的 1.5 mL 离心管,加入 500 μ L 异丙醇。吸取 9.4.1.1 各管中的上清液(至少 500 μ L)转移至相应的管中,并颠倒混匀。

9.4.1.3 于 4 °C 经 12 000 r/min 离心 15 min,小心倒去上清液,倒置于吸水纸上吸干液体,然后加入 600 μ L 75%乙醇进行洗涤。

9.4.1.4 于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,小心倒去上清液,倒置于吸水纸上吸干液体。

9.4.1.5 4 000 r/min 离心 10 s,将管壁上的残余液体甩至管底部,用微量移液器吸干液体,室温干燥 3 min。

9.4.1.6 加入 11 μ L DEPC 水,轻轻混匀,以溶解管壁上的 RNA,2 000 r/min 离心 5 s,置于冰上备用。提取的 RNA 应在 2 h 内进行 RT-PCR 扩增,否则应置于-70 °C 冰箱保存。

9.4.2 反转录(RT)

反应液总量 20 μ L。依次在 RT 反应管中加入 RNA 模板和试剂:

- a) RNA 模板:提取样本的总 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 dNTPs,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。经 4 000 r/min 离心 20 s 后进行反转录。RT 的反应条件:50 °C,30 min。

9.4.3 PCR 扩增

9.4.3.1 PCR 扩增体系

用于检测 PRRSV 的通用引物序列见附录 C,PCR 反应体系见表 1。

表 1 PCR 反应体系(总体积为 50 μL)

加样次序	试剂成分	体积/μL
1	反转录产物	10.0
2	10×PCR 缓冲液	5.0
3	10 mmol/L dNTPs	1.0
4	10×MgCl ₂ (25 mmol/L)	3.0
5	上游引物 P1(20 μmol/L)	1.0
6	下游引物 P2(20 μmol/L)	1.0
7	Taq 酶(5 U/μL)	0.5
8	加 DEPC 水至	50

9.4.3.2 PCR 扩增条件

将表 1 中的试剂充分混匀,4 000 r/min 离心 30 s。PCR 的反应条件:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 50 s,35 个循环;72 ℃终延伸 10 min。扩增反应结束后,进行扩增产物的琼脂糖凝胶电泳。

若采用一步法 RT-PCR,则省略 9.4.2,用提取的 RNA 直接进行反应。一步法 RT-PCR 反应体系见表 2,用于检测 PRRSV 的通用引物序列见附录 C。

表 2 RT-PCR 反应体系(总体积为 50 μL)

加样次序	试剂成分	体积/μL
1	RNA 模板	10.0
2	10×PCR 缓冲液	5.0
3	10 mmol/L dNTPs	1.0
4	10×MgCl ₂ (25 mmol/L)	3.0
5	上游引物 P1(20 μmol/L)	1.0
6	下游引物 P2(20 μmol/L)	1.0
7	反转录酶	1.0
8	Taq 酶 (5 U/μL)	0.5
9	加 DEPC 水至	50.0

一步法 RT-PCR 的反应条件:50 ℃反转录 30 min;94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 50 s,35 个循环;72 ℃终延伸 10 min。

9.4.3.3 琼脂糖凝胶电泳

用 TBE 电泳缓冲液配制 1.5%的琼脂糖(含 0.5 μg/mL EB)凝胶。将凝胶放入水平电泳槽,使电泳缓冲液刚好淹没胶面,将 6 μL PCR 扩增产物和 2 μL 电泳上样缓冲液混匀后加入样本孔。电泳时应设立 DNA Marker 对照。按 5 V/cm 进行电泳 20 min~30min。电泳结束后,将琼脂糖凝胶置于凝胶成像系统中观察结果。

9.5 结果判定

9.5.1 试验成立条件:PRRSV-1(欧洲型)阳性对照有大小为 398 bp 的特异性扩增条带;PRRSV-2(美洲型)阳性对照有大小为 433 bp 的特异性扩增条带;阴性对照和空白对照无任何扩增条带。

9.5.2 被检样本有大小为 398 bp 的特异性扩增条带,且与阳性对照条带大小相符,则判为 PRRSV-1 核酸阳性。

9.5.3 被检样本有大小为 433 bp 的特异性扩增条带,且与阳性对照条带大小相符,则判为 PRRSV-2 核酸阳性。

9.5.4 被检样本同时有大小为 398 bp 和 433 bp 的特异性扩增条带,且与阳性对照条带大小相符,则判为 PRRSV-1 和 PRRSV-2 核酸阳性。

9.5.5 被检样本无大小为 398 bp 或 433 bp 特异性的扩增条带,则样本判为 PRRSV 核酸阴性。

必要时,可取 RT-PCR 扩增产物进行序列测定,并与已公开发表的 PRRSV 特异性片段序列进行同源性比对分析,以确证检测结果。

10 实时反转录-聚合酶链反应(实时 RT-PCR)

10.1 主要器材

10.1.1 荧光 PCR 仪。

10.1.2 高速台式冷冻离心机(4℃,离心速度 12 000 r/min 以上)。

10.1.3 混匀器。

10.1.4 冰箱(2℃~8℃和-20℃)。

10.1.5 微量可调移液器(规格 100 μL~1 000 μL、20 μL~200 μL 和 1 μL~20 μL)以及无 RNase 污染带滤芯吸头。

10.2 主要试剂

10.2.1 商品化的 RNA 提取裂解液。

10.2.2 三氯甲烷。

10.2.3 异丙醇(-20℃预冷)。

10.2.4 75%乙醇。

10.2.5 DEPC 水。

10.2.6 RT-PCR 反转录系统:AMV 或 M-MLV 反转录酶、*Taq* 酶。

10.2.7 dNTPs:含 dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 10 mmol/L。

10.2.8 引物和探针:序列见附录 C,加 DEPC 水配制成 100 μmol/L 的储存浓度和 10 μmol/L 工作浓度。

10.3 样本制备

同 9.3。

10.4 试验方法

10.4.1 样本总 RNA 的提取

同 9.4.1。

10.4.2 实时 RT-PCR 反应体系

分别使用 C.4 和 C.5 中的引物和探针,检测 PRRSV-1 和 PRRSV-2。实时 RT-PCR 反应体系见表 3。各种试剂充分混匀,2 000 r/min 离心 2 min。将 15 μ L 实时 RT-PCR 反应混合液加入 PCR 反应管,然后加入 10 μ L 样本 RNA 模板,密封反应管,500 r/min 离心 30 s。将所有检测样本的 PCR 管放入荧光 PCR 仪中。每次进行实时 RT-PCR 检测均应设阳性对照、阴性对照及空白对照。

表 3 实时 RT-PCR 反应体系

试剂成分	储存液浓度	终浓度	体积/ μ L
RT-PCR 缓冲液	5 $\times$	1 $\times$	5
MgCl ₂	25 mmol/L	2.5 mmol/L	2.5
dNTPs	10 mmol/L	0.2 mmol/L	0.5
上游引物	10 μ mol/L	0.2 μ mol/L	0.5
下游引物	10 μ mol/L	0.2 μ mol/L	0.5
探针	10 μ mol/L	0.1 μ mol/L	0.25
AMV 或 M-MLV 反转录酶	5 U/ μ L	0.1 U/ μ L	0.5
Taq 酶	5 U/ μ L	0.1 U/ μ L	0.5
DEPC 水	—	—	4.75

10.4.3 实时 RT-PCR 反应条件

反转录,42 $^{\circ}$ C (AMV)或 50 $^{\circ}$ C (M-MLV)30 min;预变性,92 $^{\circ}$ C 3 min;预扩增,92 $^{\circ}$ C 变性 10 s,45 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,5 个循环;扩增,92 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s,40 个循环。在扩增阶段每次循环的 60 $^{\circ}$ C 退火延伸时收集荧光信号。

10.5 结果判定

10.5.1 试验成立条件:阳性对照的 Ct 值应 $\leq$ 28 且出现特异性扩增曲线,阴性对照应无 Ct 值或 Ct 值 $\geq$ 40 且无特异性扩增曲线,试验结果有效;否则,应重新进行试验。

10.5.2 被检样本 Ct 值 $\leq$ 30 且出现特异性扩增曲线,判为阳性;当无 Ct 值或 Ct 值 $\geq$ 40,判为阴性;当 30<Ct 值<40 且出现特异性扩增曲线,判为疑似。对疑似样本,应进行重复检测,Ct 值<40 且出现特异性扩增曲线即判为阳性,否则判为阴性。

11 免疫过氧化物酶单层试验(IPMA)

11.1 主要器材

11.1.1 微量移液器(规格 20 μ L~200 μ L、1 μ L~20 μ L)。

11.1.2 倒置生物显微镜。

11.2 主要试剂

11.2.1 IPMA 诊断板:按照 A.6 制备。

11.2.2 PRRSV 阳性血清、阴性血清和 HRP-兔抗猪 IgG 结合物。使用前用血清稀释液稀释至工作浓度。

11.2.3 洗涤液、血清稀释液和显色/底物溶液:分别按照 B.3、B.4.1、B.5 配制。

11.3 试验方法

11.3.1 稀释血清样本: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(1:10 稀释),摇动混匀;从 A 排和 E 排各孔内取 40 μL 分别加入 B 排和 F 排孔,依次做 1:40、1:160、1:640 稀释。

11.3.2 取上述板中稀释血清样本各 50 μL 加入 IPMA 诊断板的相应孔内,封板后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,弃去液体,用 0.15 mol/mL NaCl(含 0.5%吐温-80)洗板 3 次。

11.3.3 用 0.15 mol/L NaCl(含 0.5%吐温-80)稀释 HRP-兔抗猪 IgG 结合物为工作浓度,加入 50 μL 结合物稀释液于板的孔中,封板后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,洗涤 3 次。

11.3.4 在各孔中加入显色剂/底物溶液(AEC- H_2O_2)(按照 B.5.1 配制)50 μL ,在 18 $^{\circ}\text{C}$ ~22 $^{\circ}\text{C}$ 室温下作用至少 30 min,弃去液体,加入 50 μL 0.05 mol/L 醋酸钠溶液。

11.4 结果判定

11.4.1 试验成立条件:将 IPMA 诊断板置于倒置生物显微镜下观察。阳性血清对照孔细胞质呈现深红色的特异性染色,阴性血清对照孔细胞质不被染色。

11.4.2 被检血清样本孔 30%~50% 的细胞质呈现深红色,判定为免疫过氧化物酶单层试验阳性(IPMA+);细胞质未被染色,判定为免疫过氧化物酶单层试验阴性(IPMA-)。与阳性血清对照相比,若整孔细胞被染色,则视为血清样本的非特异性反应。血清滴度以 50%以上的孔染色的最高稀释度的倒数表示。血清样本的滴度 ≤ 10 判定为阴性;血清样本的滴度为 10 或 40 判定为弱阳性,非特异性染色常在此范围内;血清样本的滴度 ≥ 160 判定为阳性。

12 间接免疫荧光试验(IFA)

12.1 主要器材

12.1.1 微量移液器(规格 20 μL ~200 μL 、1 μL ~20 μL)。

12.1.2 倒置荧光显微镜。

12.1.3 恒温箱(37 $^{\circ}\text{C}$)。

12.1.4 96 孔板。

12.2 主要试剂

12.2.1 IFA 诊断板:按照 A.7 制备。

12.2.2 PRRSV 阳性血清、阴性血清和 FITC-兔抗猪 IgG 结合物。

12.3 试验方法

12.3.1 在 96 孔板中每孔加入 PBS 液 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)。

12.3.2 取出 IFA 诊断板。加入 150 μL PBS, 室温浸润 5 min, 弃去板中液体, 在吸水纸上轻轻拍干。

12.3.3 在 IFA 诊断板的感染和非感染细胞孔内分别加入 50 μL 11.3.1 中稀释的血清, 封板, 置湿盒中 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min。

12.3.4 弃去板中血清, 在吸水纸上轻轻拍干。每孔加入 PBS 液 200 μL , 弃去孔内液体, 重复洗板 6 次。

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

12.3.6 弃去板中结合物, 用 PBS 洗涤 4 次后, 最后在吸水纸上轻轻拍干。

12.3.7 将 IFA 诊断板置于倒置荧光显微镜下观察。

12.3.8 血清滴度的测定: 将血清样本进行 4 倍倍比稀释 (1 : 20、1 : 80、1 : 160、1 : 320 等), 按上述方法进行 IFA 检测。

12.4 结果判定

12.4.1 试验成立条件: 阳性血清对照中感染细胞孔细胞质出现典型的黄绿色特异性荧光, 而未感染细胞孔无荧光; 阴性血清对照中感染细胞孔和未感染细胞孔细胞质均不出现荧光。

12.4.2 被检血清的感染细胞孔细胞质出现特异性黄绿色荧光, 而未感染细胞孔不出现荧光, 判定为阳性; 被检血清的未感染细胞和感染细胞孔细胞质均无特异性黄绿色荧光, 判定为阴性。若血清样本在 1 : 20 稀释时出现可疑结果, 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, 应综合考虑其他检测方法结果进行判定。血清样本感染细胞孔呈现特异性荧光的最高稀释度的倒数表示为血清效价。

13 间接酶联免疫吸附试验(间接 ELISA)

13.1 主要器材

13.1.1 96 孔平底聚苯乙烯酶标反应板。

13.1.2 微量移液器(规格 20 μL ~200 μL 、1 μL ~20 μL)。

13.1.3 酶联免疫测定仪。

13.1.4 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱。

13.2 主要试剂

13.2.1 PRRSV 抗原: 提纯的 PRRSV 重组 N 蛋白抗原 (PRRSV-1 或 PRRSV-2, 或其混合抗原)。

13.2.2 PRRSV 阳性血清、阴性血清、HRP-兔抗猪 IgG 结合物。使用前用稀释液稀释至工作浓度。

13.2.3 洗涤液、血清稀释液、显色/底物溶液 (TMB- H_2O_2)、抗原稀释液、封闭液等, 按照 B.3、B.4、B.5、B.6、B.7 配制。

也可使用商品化的检测 PRRSV N 蛋白抗体的试剂盒。

13.3 试验方法

13.3.1 用抗原稀释液将 PRRSV 抗原稀释成工作浓度, 加入 96 孔反应板中, 每孔 100 μL , 封板后置湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中感作 60 min, 然后置 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内过夜。

13.3.2 弃去板中稀释液, 加洗涤液洗板, 300 μL /孔, 洗涤 3 次, 每次 1 min。在吸水纸上轻轻拍干。

13.3.3 加入封闭液, 200 μL /孔, 封板后置湿盒内 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中反应 60 min。

13.3.4 同 13.3.2 进行洗涤。

若使用商品化的 ELISA 试剂盒,无上述操作步骤。

13.3.5 取 5 μL 血清样本,加入 195 μL 血清稀释液,进行 1 : 40 稀释。在 PRRSV 抗原包被反应板中加入稀释的被检血清、阳性血清对照和阴性血清对照,每孔 100 μL 。阳性血清对照和阴性血清对照各加入相邻的 2 个孔,每份血清样本加 1 孔。封板后置湿盒内于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中反应 30 min。

13.3.6 同 13.3.2 进行洗涤。

13.3.7 加入工作浓度的 HRP-兔抗猪 IgG 结合物,100 μL /孔,封板后置湿盒内于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中反应 30 min。

13.3.8 同 13.3.2 洗涤。

13.3.9 加入新配制的显色/底物溶液(TMB- H_2O_2),100 μL /孔,封板后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中避光反应 15 min。

13.3.10 加入反应终止液(1 mol/L 氢氟酸溶液或 10%SDS 溶液),100 μL /孔,终止反应。

13.3.11 光密度(OD)值测定:在酶联免疫测定仪上读取反应板各孔波长 450 nm(氢氟酸终止)或 650 nm(SDS 终止)的 OD 值。

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
P	P	S13									
N	N	S14									
S1	S7	S15									
S2	S8	S16									
S3	S9	S17									
S4	S10	S18									
S5	S11	S19									
S6	S12	S20									

注: P——阳性血清对照孔;N——阴性血清对照孔;S1、S2、S3、S4、S5 等——被检血清样本孔。

图 1 酶标反应板对照和样本分布图

13.4 结果判定

13.4.1 试验成立条件:阳性血清对照平均 OD 值与阴性血清对照平均 OD 值的差值 ≥ 0.15 时,试验成立。否则,应重新进行试验。

13.4.2 计算血清样本的 S/P 比值。若被检血清样本的 S/P 比值 ≥ 0.4 ,判定为 PRRSV 抗体阳性。被检血清样本的 S/P 比值 < 0.3 ,判定为 PRRSV 抗体阴性。 $0.3 \leq$ 被检血清样本的 S/P 比值 < 0.4 ,判定为可疑;对可疑样本重复检测一次,若仍为可疑,则可判定为阳性。

血清样本 S/P 比值的计算公式: $S/P = (\text{样本 OD 值} - \text{阴性血清对照平均 OD 值}) / (\text{阳性血清对照平均 OD 值} - \text{阴性血清对照平均 OD 值})$ 。

14 综合判定

14.1 PRRS 的诊断方法有多种,当在临床上怀疑 PRRS 或 PRRSV 感染时,可根据实际情况选用上述方法中的一种或两种进行确诊。对于未接种过 PRRS 活疫苗的猪,当病毒分离与鉴定试验为阳性时,可判定为 PRRSV 感染阳性;对于接种过 PRRS 活疫苗的猪,当病毒分离与鉴定试验为阳性时,如果

猪有临床症状,可判定为 PRRSV 感染;如果猪无临床症状,应进一步采用 RT-PCR 检测并对扩增片段进行序列测定,以区分疫苗毒株或野毒株感染。RT-PCR 和实时 RT-PCR 方法适用于 PRRSV 感染的快速诊断,当检测结果用于 PRRS 新疫区的确定时,应对样本进行病毒分离与鉴定。IPMA、IFA 和间接 ELISA 适用于发病猪的群体诊断,但不能区分疫苗免疫猪和野毒感染猪。

14.2 依据临床症状和病理变化可做出初步诊断,符合 6.2、6.3 的任何一项,可判为疑似 PRRS。

14.3 符合 6.2、6.3 的任何一项,并且第 8 章~第 13 章的六种诊断方法中任何一项为阳性,可诊断为 PRRS。

14.4 对于未接种过 PRRS 疫苗的猪,第 8 章~第 13 章的六种诊断方法中任何一项为阳性,均可判定为 PRRSV 感染;对于接种过 PRRS 灭活疫苗的猪,第 8 章~第 10 章的三种诊断方法中任何一项为阳性,均可判定为 PRRSV 感染。



附 录 A

(规范性)

猪肺泡巨噬细胞(PAMs)制备、鉴定、保存

A.1 试剂

A.1.1 细胞生长液与维持液

细胞生长液:加入 10% 犊牛血清的 RPMI1640 培养基或 DMEM 培养基(含 1% 谷氨酰胺、青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 $\mu\text{g/mL}$ 、庆大霉素 50 $\mu\text{g/mL}$ 、两性霉素 B 10 $\mu\text{g/mL}$, pH7.2)。

细胞维持液:加入 5% 犊牛血清的 RPMI1640 培养基或 DMEM 培养基(含 1% 谷氨酰胺、青霉素 100 IU/mL、链霉素 100 $\mu\text{g/mL}$ 、庆大霉素 50 $\mu\text{g/mL}$ 、两性霉素 B 10 $\mu\text{g/mL}$, pH7.2)。

A.1.2 细胞冻存液

细胞生长液与二甲基亚砜(DMSO)按照 8:2 的比例混匀。

A.2 PAMs 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,立即无菌操作取肺脏,切勿划破被膜。约 200 mL PBS 液从气管灌入肺脏,挤压灌洗 3 次~4 次,收集灌洗液,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,沉淀物用 50 mL 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。所得新鲜巨噬细胞应立即使用或分装后冻存。

A.3 PAMs 的冻存

取细胞浓度为 $6 \times 10^7 / 1.5 \text{ mL}$ 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。液氮保存不同批次的巨噬细胞,不可混用。

A.4 PAMs 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(pH7.2)中,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,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.5 PAMs 的批次试验

每批巨噬细胞应检验合格后再使用。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.6 IPMA 诊断板的制备

IPMA 诊断板的制备步骤如下。

- a) 将长满单层的 PAMs 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 1×10^5 个/mL,在 96 孔细胞培养板中每孔分别加入 100 μL ,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。

- b) 用细胞营养液稀释 PRRSV 为 1×10^5 TCID₅₀/mL, 每孔 50 μ L, 剩余 2 孔不加 PRRSV 作为对照孔。放入 37 $^{\circ}$ C、5% 二氧化碳培养箱中, 培养 18 h~24 h;
- c) 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 $^{\circ}$ C 干燥 45 min, 密封后储存于 -20 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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

在 96 孔细胞培养板的 2、4、6、8、10、12 列分别加入 50 μ 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 10^5 个/mL, 加入上述 96 孔细胞培养板中, 每孔 150 μ L; 37 $^{\circ}$ 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 TCID₅₀/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 μ L。置 37 $^{\circ}$ 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 μ L, 置 4 $^{\circ}$ C 作用 30 min, 弃去丙酮, 室温干燥, 密封于塑料袋内, -70 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。



附 录 B
(规范性)
试剂的配制

B.1 PBS 液(0.01 mol/L PBS,pH7.2)

配制 pH7.2PBS 液所需试剂如下:

- 8 g 氯化钠(NaCl);
- 0.2 g 氯化钾(KCl);
- 1.15 g 碳酸氢钠(NaHCO_3);
- 0.2 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。

试剂加三蒸水至 1 000 mL,调节 pH 至 7.2,高压灭菌,4 °C 保存备用。

B.2 5×TBE 电泳缓冲液

配制 5×TBE 电泳缓冲液所需试剂如下:

- 54.0 g Tris;
- 27.5 g 硼酸;
- 2.9 g EDTA。

试剂加三蒸水至 1 000 mL,用 5 mol/L 的盐酸(HCl)调节 pH 至 pH8.0。使用前用三蒸水 5 倍稀释成工作浓度的 TBE 电泳缓冲液。

B.3 洗涤液(0.01 mol/L PBS-0.05%吐温-20,pH7.4)

配制洗涤液(0.01 mol/L PBS-0.05%吐温-20,pH7.4)所需试剂如下:

- 0.2 g 磷酸二氢钾(KH_2PO_4);
- 2.9 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$);
- 8.0 g 氯化钠 (NaCl);
- 0.2 g 氯化钾 (KCl);
- 0.5 mL 吐温-20。

试剂加三蒸水至 1 000 mL,现用现配。

B.4 血清稀释液

B.4.1 称取 2.922 g 氯化钠,加入约 80 mL 的三蒸水,高温高压灭菌后冷却至室温,加入 4 mL 马血清,500 μL 吐温-80,用灭菌水定容到 100 mL,调节 pH 至 7.2,4 °C 保存备用。用于 IPMA。

B.4.2 含 1%犍牛血清白蛋白或 10%马血清的 PBS 液,4 °C 保存备用。用于间接 ELISA。

B.5 显色/底物溶液

B.5.1 AEC- H_2O_2

B.5.1.1 AEC 贮存液。配制 AEC 贮存液所需试剂如下:

- 4 mg 氨乙基咔唑(3-amino-9-ethyl-carbazole,AEC);
- 4 mL 二甲基甲酰胺(*N,N*-dimethyl-formamide)。

充分溶解后置 4°C 避光保存备用。

B.5.1.2 0.05M pH 5.0 乙酸钠缓冲液:称取 4.15 g 乙酸钠(CH_3COONa),加三蒸水至 1 000 mL,充分溶解后,用冰乙酸调整至 pH 5.0。

B.5.1.3 乙酸盐缓冲液:量取 14.8 mL 冰乙酸(CH_3COOH),加入 35.2 mL、0.05 mol/L、pH 5.0 乙酸钠缓冲液,加三蒸水至 50 mL,用冰乙酸调节至 pH 5.0。

B.5.1.4 AEC- H_2O_2 的配制:量取 19 mL 乙酸盐缓冲液,加 1 mL AEC 贮存液及 10 μL 30%过氧化氢(H_2O_2),充分混合后,用 5 μm 滤纸过滤,现用现配。

B.5.2 TMB- H_2O_2

B.5.2.1 0.1 mol/L 柠檬酸溶液:称取 1.92 g 柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$),加三蒸水至 100 mL,充分溶解。

B.5.2.2 0.1 mol/L 磷酸氢二钠溶液:称取 3.58 g 磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$),加三蒸水至 100 mL,充分溶解。

B.5.2.3 TMB- H_2O_2 配制底物溶液所需试剂如下:

- 33.0 mL 柠檬酸溶液;
- 66.0 mL 磷酸氢二钠溶液;
- 1.5 mL 30%过氧化氢(H_2O_2);
- 40.0 mg 四甲基联苯胺($\text{C}_{16}\text{H}_2\text{ON}_2$)。

充分混合后装于褐色玻璃瓶避光存放。现用现配。

B.6 抗原稀释液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6)

配制抗原稀释液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6)所需试剂如下:

- 1.59 g 碳酸钠(Na_2CO_3);
- 2.93 g 碳酸氢钠(NaHCO_3)。

加三蒸水至 1 000 mL,充分溶解后,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

B.7 封闭液

含 1% 犊牛血清白蛋白或 10% 马血清的 PBS 液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

附 录 C

(资料性)

RT-PCR、定量 RT-PCR 引物探针和特异性扩增片段序列

C.1 PRRSV RT-PCR 引物序列

PRRSV RT-PCR 的引物序列位于 PRRSV-2/美洲株和 PRRSV-1/欧洲株毒株 RNA 中高度保守的 ORF7/3'UTR 区域(OIE 推荐),引物的序列为:

上游引物 P1:5'-ATGGCCAGCCAGTCAATCA-3';

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

C.2 PRRSV-1 特异性扩增片段序列(398 bp)

ATGGCCAGCCAGTCAATCAACTGTGCCAGTTGCTGGGTGCAATGATAAAGTCCCAGCG
CCAGCAACCTAGGGGAGGACAGGCCAAAAAGAAAAAGCCTGAGAAGCCACATTTTCCC
CTGGCTGCTGAAGATGACATCCGGCACCACCTCACCCAGACTGAACGCTCCCTCTGCTT
GCAATCGATCCAGACGGCTTTCAATCAAGGCGCAGGAAGTGGCTCGCTTTCATCCAGC
GGGAAGGTCAGTTTTTCAGGTTGAGTTTATGCTGCCGTTGCTCATACAGTGCGCCTGA
TTCGCGTGACTTCTACATCCGCCAGTCAGGGTGCAAGTTAATTTGACAGTCAGGTGAA
TGGCCGCGATTGGCGTGTGGCCTCTGAGTCACCTATTCAATTAGGGCGA

C.3 PRRSV-2 特异性扩增片段序列(433 bp)

ATGGCCAGCCAGTCAATCAGCTGTGCCAGATGCTGGGTAAGATCATCGCTCAGCAAAA
CCAGTCCAGAGGCAAGGGACCGGGAAGAAAAATAAGAAGAAAAACCCGGAGAAGCC
CCATTTTCTCTAGCGACTGAAGATGATGTCAGACATCACTTTACCCCTAGTGAGCGG
CAATTGTGTCTGTCGTCAATCCAGACCGCCTTTAATCAAGGCGCTGGGACTTGCACCC
TGTCAGATTCAGGGAGGATAAGTTACACTGTGGAGTTTAGTTTGCCTACGCATCATAC
TGTGCGCCTGATCCGCGTCACAGCATCACCTCAGCATGATGGGCTGGCATTCTTGAGG
CATCTCAGTGTTTGAATTGGAAGAATGTGTGGTGAATGGCACTGATTGACATTGTGC
CTCTAAGTCACCTATTCAATTAGGGCGA

C.4 PRRSV-1 实时 RT-PCR 引物与探针序列

引物与探针序列根据 GenBank 中欧洲株 ORF6/ORF7 保守区域序列设计,引物的序列为:

上游引物 P1:5'-CAGATGCAGAYTGTGTTGCCT-3';

下游引物 P2:5'-TGGAGDCCTGCAGCACTTTC-3';

探针序列 P3:5'-(FAM)ATACATTCTGGCCCCTGCCAYCACGT(TAMRA)-3'。

C.5 PRRSV-2 实时 RT-PCR 引物与探针序列

引物与探针序列根据 GenBank 内美洲株 ORF7/3'UTR 保守区域序列设计,引物的序列为:

上游引物 P1:5'-GCACTGATTGACAYTGTGCC-3';

下游引物 P2:5'-CGCATGGTTCTCGCCAAT-3';

探针序列 P3:5'-(FAM)AGTCACCTATTCAATTAGGGCGACCG(TAMRA)-3'。