ICS 11.220
B 41

团　　体　　标　　准

T/CVMA 36-2020

猪繁殖与呼吸综合征病毒免疫酶组织化学法检测方法

Immunohistochemistry assay for detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus

中国兽医协会 CVMA

2020-12-22 发布　　2020-12-22 实施

中 国 兽 医 协 会　发 布

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。

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。

本文件由中国兽医协会提出并归口。

本文件起草单位：中国动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：李晓霞、王睿男、王传彬、亢文华、徐琦、宋晓晖、顾小雪、毕一鸣、刘颖昳、张硕、周智、原霖、杨林。

中国兽医协会
CVMA

猪繁殖与呼吸综合征病毒免疫酶组织化学法检测方法

1 范围

本文件规定了猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原的免疫酶组织化学检测方法的材料、操作步骤、结果判定和注意事项等内容。

本文件适用于猪肺脏、扁桃体、淋巴结、脾脏等组织中猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原的免疫酶组织化学检测。

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。

NY/T 541 兽医诊断样品采集、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 仪器与耗材

切片机、恒温培养箱、显微镜、微量移液器及配套吸头、保湿盒、可调移液器（2 μL、20 μL、200 μL、1 000 μL）、稀释槽、免疫组化用载玻片、盖玻片、1.5 mL 离心管、免疫组化用染色缸。

5 试剂

5.1 10 %~20 %中性福尔马林固定液，10 mL~20 mL 的中性福尔马林溶液加水至 100 mL

5.2 无水乙醇

5.3 二甲苯

5.4 1% 盐酸酒精，1 mL 盐酸溶液加 75 %的酒精至 100 mL

5.5 3 % H_2O_2 溶液

5.6 pH7.2 PBS 溶液，参见附录 A.1

5.7 pH7.3 PBS 溶液，参见附录 A.2

5.8 0.25 %胰酶

5.9 5 %健康马血清，5 mL 健康马血清加 pH7.3 PBS 至 100 mL

5.10 PRRSV 单抗，使用前用已知 PRRSV 阳性的组织片测定工作浓度

5.11 PRRSV 阴性组织片、PRRSV 阳性组织片

5.12 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗

5.13　苏木素染色液
5.14　水溶性封片剂（GVA）
5.15　AEC 显色剂
5.16　DAB 显色剂

6　操作步骤

6.1　样品采集和运输

样品采集、保存及运输按照NY/T 541的规定执行。采集猪的肺脏、扁桃体、淋巴结、脾脏等有病变的组织脏器，采集正常和病变交界的部位，被检组织采集好后立即加入10 %~20 %的甲醛溶液中固定，组织应新鲜无自溶，样品应在常温条件下尽快运输至实验室。

6.2　石蜡切片制作

将固定好的组织修成2 mm左右的块，所取样品要包括正常组织和病变组织交界部位，如所取样品块内有多种形态，则需取多个切面，必要时可将不同部位修整成不同形状，将修好的组织块放入包埋盒中，经75 %酒精7 h（可延长5 h~10 h），85 %酒精3 h，95 %酒精3 h，无水乙醇2.5 h，二甲苯40 min，石蜡2 h 30 min，经包埋制成石蜡块，将制作好的石蜡块切成2 μm~3 μm的切片，贴在组化专用载玻片上，37 ℃ 温箱过夜，-20 ℃ 保存，备用。

6.3　脱蜡

组织切片常规脱蜡至 1 % 盐酸酒精 20 min。

6.4　洗涤

将切片放入免疫组化用染色缸中，用蒸馏水洗 3 次，每次 3 min。

6.5　抑制内源酶

组织切片浸入 3 % H_2O_2 溶液中 20 min。

6.6　洗涤

将切片放入免疫组化用染色缸中，用蒸馏水洗 3 次，每次 3 min。

6.7　孵育

切片加 0.25 % 胰酶消化，放入保湿盒 37 ℃ 温箱孵育 3 min。

6.8　洗涤

将切片放入免疫组化用染色缸中，用 pH7.2 PBS 洗 3 次，每次 3 min。

6.9　封闭

切片加 5 %健康马血清，放入保湿盒 37 ℃ 温箱中孵育 20 min。

6.10　单抗孵育

中国兽医协会 CVMA

切片加上用 pH 7.3 PBS 适当稀释的 PRRSV 单抗，阴性、阳性 PRRSV 猪组织切片作为阴性对照和阳性对照，放入保湿盒于 37 ℃ 温箱中孵育 60 min，或采用 37 ℃温箱孵育 40 min 后，放 4 ℃冰箱过夜。

6.11 洗涤

将切片放入免疫组化用染色缸中，用 pH7.2 PBS 洗 3 次，每次 3 min。

6.12 二抗孵育

切片加上用 pH 7.3 PBS 1:100 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗，放入保湿盒于 37 ℃ 温箱中孵育 60 min。

6.13 洗涤

将切片放入染色缸中用 pH 7.2 PBS 洗 3 次，每次 3 min。

6.14 显色

将切片置于保湿盒中，加配制好的 AEC 或 DAB 显色剂显色，时间 3 min~7 min，以显微镜下观察染色效果，控制染色终止时间，如果已经明显着色可终止显色。

6.15 洗涤

将切片放入组化专用染色缸中，用蒸馏水洗 3 次，每次 3 min。

6.16 衬染

切片加 1：10 稀释的苏木素染色液染色 10 s~30 s，也可显微镜下控制染色效果。

6.17 洗涤

将切片放入组化专用染色缸中用自来水冲洗 3 min。

6.18 封片

使用 AEC 染色剂显色的切片待切片自然干燥后用水溶性封片剂（GVA）进行封片。

使用 DAB 染色的切片衬染结束后用无水乙醇脱水 10 min，二甲苯浸泡 10 min（可以适当延长时间），用中性树胶进行封片。

7 结果判定

用显微镜观察，阴性对照片本底清晰，背景无非特异着染，阳性对照片胞浆或胞核呈红色或棕褐色（AEC 染色结果呈红色，DAB 染色显色结果呈棕褐色）着染，通常阳性反应见于变性、坏死的细胞胞浆或胞膜上，偶见胞核呈红色或棕褐色着染，即可判为猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原阳性。

8 注意事项

8.1 组织切片及所有试剂均应按组织切片和试剂保存要求进行保存，使用前恢复至室温。
8.2 单抗反应结束后可 4 ℃ 过夜。

中国兽医协会 CVMA

8.3　在操作过程中动作要快，避免组织片变干。

8.4　显色时应保持切片处于避光的环境。

8.5　衬染时环境温度高衬染时间短一点，温度低时衬染时间适当延长。

8.6　H_2O_2、显色液对眼睛、皮肤及呼吸道有刺激性作用，使用过程应注意防护，防止直接接触和吸入。H_2O_2 应避光保存。

8.7　观察时先用低倍镜 5 x 或 10 x 进行观察，找到疑似阳性部位换高倍镜进行观察。

中国兽医协会
CVMA

附　录　A
（规范性）
猪繁殖与呼吸综合征病毒免疫酶组织化学法检测方法试剂的配制

A.1　pH值7.2 PBS

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	5.8 g
$NaH_2PO4 \cdot 2H_2O$	0.6 g
NaCl	17.0 g

加入蒸馏水至2000 mL，用盐酸或氢氧化钠调pH至7.2。

A.2　pH值7.3PBS

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	2.89 g
KH_2PO_4	0.2 g
NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g

加入蒸馏水至1000 mL，用盐酸或氢氧化钠调pH至7.3。

中国兽医协会 CVMA