



中华人民共和国国家标准

GB/T 18648—2020
代替 GB/T 18648—2002

非洲猪瘟诊断技术

Diagnostic techniques for African swine fever

2020-12-14 发布

2020-12-14 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	V
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 缩略语	1
4 生物安全措施	1
5 临床诊断	1
5.1 易感动物和宿主	1
5.2 临床表现	2
5.3 病理变化	2
5.4 临床诊断结果判定	2
6 实验室诊断样品采集及处理	2
6.1 试剂	2
6.2 采样用具	2
6.3 样品采集	2
6.4 样品处理	3
7 普通 PCR方法	3
7.1 试剂	3
7.2 仪器设备	3
7.3 引物序列	4
7.4 试验程序	4
7.5 试验成立条件	4
7.6 普通 PCR结果判定	5
8 荧光 PCR方法	5
8.1 试剂	5
8.2 仪器设备	5

8.3	引物和探针	5
8.4	试验程序	5
8.5	试验成立条件	6
8.6	荧光 PCR结果判定	6
9	荧光 RAA方法	6
9.1	试剂	6
9.2	仪器设备	6
9.3	引物	6

9.4	试验程序	6
9.5	试验成立条件	7
9.6	荧光 RAA结果判定	7
10	高敏荧光免疫分析法	7
10.1	试剂	7
10.2	仪器设备	7
10.3	试验程序	8
10.4	高敏荧光免疫分析结果判定	8
11	夹心 ELISA抗原检测方法	9
11.1	试剂	9
11.2	仪器设备	9
11.3	试验程序	9
11.4	试验成立条件	10
11.5	夹心 ELISA抗原检测结果判定	10
12	间接 ELISA抗体检测方法	10
12.1	试剂	10
12.2	仪器设备	10
12.3	试验程序	10
12.4	试验成立条件	11
12.5	间接 ELISA抗体检测结果判定	11
13	阻断 ELISA抗体检测方法	12
13.1	试剂	12
13.2	仪器设备	12
13.3	试验程序	12
13.4	阻断率计算方法	13
13.5	试验成立条件	13
13.6	阻断 ELISA抗体检测结果判定	13
14	夹心 ELISA抗体检测方法	13
14.1	试剂	13
14.2	仪器设备	14
14.3	试验程序	14

14.4	试验成立条件	15
14.5	夹心 ELISA抗体检测结果判定	15
15	间接免疫荧光方法	15
15.1	试剂	15
15.2	仪器设备	16
15.3	试验程序	16

15.4	试验成立条件	16
15.5	间接免疫荧光结果判定	17
16	综合判定	17
附录 A (规范性附录)	样品保存液的配制方法	18
附录 B (规范性附录)	聚合酶链式反应溶液的配制方法	19
附录 C (规范性附录)	酶联免疫吸附试验溶液的配制方法	20

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 GB/T 18648—2002《非洲猪瘟诊断技术》，与 GB/T 18648—2002 相比，除编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 增加了缩略语（见第 3 章）；
- 增加了生物安全措施（见第 4 章）；
- 增加了临床诊断（见第 5 章）；
- 增加了实验室诊断样品采集及处理（见第 6 章）；
- 增加了荧光 PCR 方法（见第 8 章）、荧光 RAA 方法（见第 9 章）、高敏荧光免疫分析法（见第 10 章）、夹心 ELISA 抗原检测方法（见第 11 章）、阻断 ELISA 抗体检测方法（见第 13 章）、夹心 ELISA 抗体检测方法（见第 14 章）、间接免疫荧光方法（见第 15 章）等实验室诊断方法；
- 增加了综合判定（见第 16 章）；
- 增加了样品保存液的配制方法（见附录 A）、聚合酶链式反应溶液的配制方法（见附录 B）；
- 修改了酶联免疫吸附试验溶液的配制方法（见附录 C，2002 年版的附录 C）。

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这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业农村部提出。

本标准由全国动物卫生标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本标准起草单位：中国动物卫生与流行病学中心。

非洲猪瘟诊断技术

1 范围

本标准规定了 ASF 的临床诊断，实验室诊断样品采集及处理，以及普通 PCR 方法、荧光 PCR 方法、荧光 RAA 方法、高敏荧光免疫分析法、夹心 ELISA 抗原检测方法、间接 ELISA 抗体检测方法、阻断 ELISA 抗体检测方法、夹心 ELISA 抗体检测方法、间接免疫荧光方法等实验室诊断方法。

本标准适用于家猪和野猪 ASF 的诊断与监测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 19489 实验室 生物安全通用要求

3 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

ASF：非洲猪瘟 (African Swine Fever)

ASFV：非洲猪瘟病毒 (African Swine Fever Virus)

DEPC：焦碳酸二乙酯 (Diethyl Pyrocarbonate)

EDTA：乙二胺四乙酸 (Ethylenediaminetetraacetic Acid)

ELISA：酶联免疫吸附试验 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

FAM：6-羧基荧光素 (6-Carboxy-Fluorescein)

OD：光密度 (Optical Density)

PBS：磷酸盐缓冲液 (Phosphate Buffered Saline)

PCR：聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction)

RAA：重组酶介导的等温核酸扩增技术 (Recombinase Aided Amplification)

SPF：无特定病原体 (Specific Pathogen Free)

TMB: 四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-Tetramethyl-Benzidine)

4 生物安全措施

进行 ASF 实验室诊断时，如样品处理、核酸提取等，应按照 GB 19489 执行。

5 临床诊断

5.1 易感动物和宿主

猪科动物是 ASFV 的易感动物。家猪和欧亚野猪对 ASFV 高度易感，且表现出相似的临床症状和死亡率；而非洲野猪，例如疣猪、丛林猪、红河猪和巨林猪，感染 ASFV 后很少或者不出现临床症状，是

病毒的储存宿主。

5.2 临床表现

5.2.1 最急性：无明显临床症状突然死亡。

5.2.2 急性：体温可高达 42 °C,沉郁,厌食,耳、四肢、腹部皮肤有出血点,可视黏膜潮红、发绀。眼、鼻有黏液脓性分泌物;呕吐;便秘,粪便表面有血液和黏液覆盖;或腹泻,粪便带血。共济失调或步态僵直,呼吸困难,病程延长则出现瘫痪、抽搐等其他神经症状。妊娠母猪流产。病死率可达 100%。病程 4 d~10 d。

5.2.3 亚急性：临床症状与急性相同,但病情较轻,病死率较低。体温波动无规律,一般高于 40.5 °C。仔猪病死率较高。病程 5 d~30 d。

5.2.4 慢性：波状热,呼吸困难,湿咳。消瘦或发育迟缓,体弱,毛色暗淡。关节肿胀,皮肤溃疡,跛足。死亡率低。病程 2 个月到 15 个月。

5.3 病理变化

典型的病理变化包括浆膜表面充血、出血,肾脏、肺脏表面有出血点,心内膜和心外膜有大量出血点,胃、肠道黏膜弥漫性出血;胆囊、膀胱出血;肺脏肿大,切面流出泡沫性液体,气管内有血性泡沫样黏液;脾脏肿大,易碎,呈暗红色至黑色,表面有出血点,边缘钝圆,有时出现边缘梗死;颌下淋巴结、腹腔淋巴结肿大,严重出血。最急性型的个体可能不出现明显的病理变化。

5.4 临床诊断结果判定

易感动物出现上述临床症状和病理变化,可初步判定为疑似 ASF 病例。

6 实验室诊断样品采集及处理

6.1 试剂

6.1.1 0.1 mol/L PBS(pH 7.4),配制方法见附录 A 的 A.1。

6.1.2 0.04 mol/L PBS(pH 7.4),配制方法见 A.2。

6.1.3 50%甘油-PBS 保存液,配制方法见 A.3。

6.1.4 青霉素,浓度为 10 000 IU/mL。

6.1.5 链霉素,浓度为 10 000 µg/mL。

6.2 采样用具

6.2.1 器械：解剖刀、剪刀、镊子、骨锯、注射器及针头、组织匀浆器等。

6.2.2 容器：真空采血管(含 EDTA 抗凝剂)、离心管(2 mL、10 mL)、样品保存管等。

6.2.3 个人防护用具：防护服、防护镜、防护帽、防护靴、口罩、一次性手套等。

6.2.4 采样记录用品：采样单、记号笔、防水标签等。

6.2.5 其他：医用棉签、医用纱布、封口膜、冰袋等。

6.3 样品采集

6.3.1 口鼻拭子采集

采集病死猪或发病猪、同群猪的口鼻拭子样品。用医用棉签在口腔或鼻腔转动至少 3 圈，采集口腔、鼻腔的分泌物；蘸取分泌物后，立即将拭子浸入 1 mL 50%甘油-PBS保存液中，剪去露出部分，盖紧

离心管盖，密封后冷藏或冷冻保存。

6.3.2 全血样品采集

在发病猪群中，使用真空采血管（含 EDTA 抗凝剂）采集一定数量发病猪、同群猪全血各 5 mL，密封后冷藏或冷冻保存。

6.3.3 血清样品采集

在每一发病猪群中，采集发病猪、同群猪全血各 5 mL，室温放置 12 h~24 h，分离血清，装入离心管中，密封后冷藏或冷冻保存。

6.3.4 组织样品采集

采集病死猪或扑杀发病猪的组织样品。首选脾脏，其次为扁桃体、淋巴结、肾脏、骨髓等。脾脏、肾脏采集约 3 cm×3 cm 大小，扁桃体整体采集，淋巴结选取出血严重的整体采集，骨髓采集长度约 3 cm。将所采集样品放入 50% 甘油-PBS 保存液中。

6.4 样品处理

6.4.1 口、鼻拭子样品处理

口、鼻拭子标记样品编号，立即进行 ASF 病原检测或冷冻储存备用。

6.4.2 全血样品处理

全血标记样品编号，立即进行 ASF 病原检测或冷冻储存备用。

6.4.3 血清样品处理

血清标记样品编号，立即进行 ASFV 抗体检测或冷冻储存备用。

6.4.4 组织样品处理

取适量采集的组织样品置于组织匀浆器中充分研磨，加入终浓度为 1 000 IU/mL 的青霉素、1 000 µg/mL 的链霉素，灭菌的 0.1 mol/L PBS(pH 7.4) 制备 10% 组织匀浆液。2 000 r/min 离心处理 10 min。取上清液，标记编号，立即进行 ASF 病原检测或冷冻储存备用。

7 普通 PCR 方法

7.1 试剂

7.1.1 DNA 提取试剂盒。

7.1.2 PCR 预混液 (2×): Taq DNA 聚合酶 (0.05 U/µL)，反应缓冲液，4 mmol/L MgCl₂ 以及 0.4 mmol/L 的 dNTP。

7.1.3 无核酸酶水，配制方法见附录 B 的 B.1。

7.1.4 TAE 缓冲液，配制方法见 B.2 和 B.3。

7.1.5 2% 的琼脂糖凝胶，配制方法见 B.4。

7.1.6 6×上样缓冲液。

7.2 仪器设备

7.2.1 自动化核酸提取仪。

7.2.2 PCR扩增仪。

7.2.3 台式低温高速离心机(最大离心力 12 000 g 以上)。

7.2.4 稳压稳流电泳仪和水平电泳槽。

7.2.5 凝胶成像仪(或紫外透射仪)。

7.2.6 微量可调移液器(2.5 μL, 10 μL, 100 μL, 200 μL, 1 000 μL等不同规格)。

7.2.7 无核酸酶离心管与吸头。

7.2.8 PCR扩增管。

7.3 引物序列

引物针对 ASFV B646L 基因的保守区域设计。上游引物 PPA-1: 5'-AGTTATGGGAAAC-CCGACCC-3', 下游引物 PPA-2: 5'-CCCTGAATCGGAGCATCCT-3'。扩增产物大小为 257 bp。

7.4 试验程序

7.4.1 核酸提取

采用 DNA提取试剂盒提取各类样本中的病毒核酸, 或用自动化核酸提取仪提取各类样本中的病毒核酸。如在 2 h 内检测可将提取的核酸置于冰上保存, 否则应置于 -20 °C 冰箱保存。

每次抽提核酸, 应至少包括一个阳性对照和一个阴性对照。阳性对照样品应为 ASFV 核酸阳性样本(血清、全血、10%组织匀浆或细胞培养上清液); 阴性对照样品应为无核酸酶水或者 ASFV 核酸阴性样本(血清、全血、10%组织匀浆或细胞培养上清液)。

7.4.2 核酸扩增

7.4.2.1 扩增体系

每个样品配制 22 μL PCR反应混合液, 组成如下:

无核酸酶水	7.5 μL
PCR 预混液(2×)	125 μL
PPA-1(10 μmol/L)	1 μL
PPA-2(10 μmol/L)	1 μL

将 22 μL PCR反应混合液加入每个 0.2 mL PCR扩增管; 将 3 μL DNA模板加入 PCR 扩增管中。

每次进行普通 PCR扩增时均应设立阳性、阴性及空白对照。阳性对照应用阳性对照样品所提取核酸作为模板, 阴性对照应用阴性对照样品所提取核酸作为模板, 空白对照应用无核酸酶水作为模板。加入模板后, 密封反应管, 瞬时离心。将所有 PCR扩增管放在 PCR仪中。按 7.4.2.2 条件运行扩增程序。

7.4.2.2 扩增条件

95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s; 62 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 30 s; 40 个循环; 72 °C 终延伸 7 min。

7.4.2.3 PCR扩增产物电泳

将 5 μL 的 6 \times 上样缓冲液加入 PCR 产物中，混匀后取 8 μL 加入到使用 1 \times TAE 缓冲液配制的 2%琼脂糖凝胶中，电泳 30 min~40 min。电泳结束后，将琼脂糖凝胶置于凝胶成像仪中观察结果。

7.5 试验成立条件

阳性对照应有大小为 257 bp 的特异性扩增条带，且阴性对照和空白对照应无任何扩增条带。

7.6 普通 PCR结果判定

符合 7.5 的条件，被检样品有大小为 257 bp 的特异性扩增条带，且与阳性对照条带分子量大小相符，则该样品判为 ASFV核酸阳性；被检样品无特异性的扩增条带，则判为 ASFV核酸阴性。

8 荧光 PCR方法

8.1 试剂

8.1.1 DNA提取试剂盒。

8.1.2 无核酸酶水，配制方法见 B.1。

8.1.3 荧光 PCR 预混液(2×)。

8.2 仪器设备

8.2.1 荧光 PCR扩增仪。

8.2.2 台式低温高速离心机(最大离心力 12 000 g 以上)。

8.2.3 微量可调移液器(2.5 μL, 10 μL, 100 μL, 200 μL, 1000 μL等不同规格)。

8.2.4 无核酸酶离心管与吸头。

8.2.5 PCR扩增管。

8.3 引物和探针

引物和探针针对 ASFV B646L 基因的保守序列设计。上游引物 VP72-F1: 5'-GCTTTCAGGAT-AGAGATACAGCTCT-3'; 下游引物 VP72-R1: 5'-CCGTAGTGGAAGGGTATGTAAGAG-3'; TaqMan 探针 VP72-T1: FAM-CCGTAAGTGGCTCATGGTATCAATCTTATCG-BHQ1。

8.4 试验程序

8.4.1 核酸提取

方法同 7.4.1。

8.4.2 核酸扩增

8.4.2.1 扩增体系

每个样品配制 18 μL 荧光 PCR反应混合液，组成如下：

无核酸酶水	5.9 μL
荧光 PCR 预混液(2×)	10 μL
VP72-F1(10 μmol/L)	0.8 μL

VP72-R1(10 $\mu\text{mol/L}$)
VP72-T1(10 $\mu\text{mol/L}$)

0.8 μL
0.5 μL

将 18 μL 荧光 PCR 反应混合液加入 PCR 扩增管；将 2 μL DNA 模板加入每个 PCR 扩增管中。每次进行荧光 PCR 扩增时均应设阳性、阴性及空白对照。阳性对照应用阳性对照样品所提取核酸作为模板，阴性对照应用阴性对照样品所提取核酸作为模板，空白对照应用无核酸酶水作为模板。加入模板后，密封 PCR 扩增管，瞬时离心。将所有 PCR 扩增管放入荧光 PCR 仪中。按 8.4.2.2 运行扩增程序。

8.4.2.2 扩增条件

50 °C 孵育 2 min; 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 15 s; 58 °C 退火延伸 1 min, 45 个循环, 在每一循环的 58 °C 时收集 FAM 荧光信号。

8.5 试验成立条件

阳性对照的 Ct 值 < 30 且出现特异性扩增曲线, 阴性对照无 Ct 值或阴性对照 Ct 值 ≥ 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。

8.6 荧光 PCR 结果判定

符合 8.5 的条件, 被检样品 Ct 值 ≤ 38 且出现特异性扩增曲线, 则判为 ASFV 核酸阳性; 当无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 40, 则判为 ASFV 核酸阴性; 当 38 < Ct 值 < 40 且出现特异性扩增曲线, 则判为疑似。对疑似样品, 模板量加倍 (4 μL DNA 模板) 进行 1 次复检, 做 3 个重复; 有 2 个重复 Ct 值 < 40 且出现特异性扩增曲线即判为 ASFV 核酸阳性, 否则判为 ASFV 核酸阴性。

9 荧光 RAA 方法

9.1 试剂

9.1.1 DNA 提取试剂盒。

9.1.2 无核酸酶水, 配制方法见 B.1。

9.1.3 RAA 反应预混液。

9.1.4 RAA 荧光基础反应单元: 包含重组酶, 单链结合蛋白, DNA 聚合酶的冻干粉。

9.1.5 280 mmol/L 乙酸镁。

9.2 仪器设备

9.2.1 恒温荧光基因检测仪。

9.2.2 台式低温高速离心机 (最大离心力 12 000 g 以上)。

9.2.3 微量可调移液器 (2.5 μL, 10 μL, 100 μL, 200 μL, 1 000 μL 等不同规格)。

9.2.4 无核酸酶离心管与吸头。

9.3 引物

引物和探针针对 ASFV B646L 基因的保守序列设计。上游引物 VP72-F2: 5'-TAGTGATAGAC-CCCACGTAATCCGTGTCCCAAC-3'; 下游引物 VP72-R2: 5'-CGATGATCCGGGTGCGATGAT-GATTACCTT-3'; 探针 VP72-T2: GATACGTTAATATGACCACTGGGTTGGTAT (FAM-dT) C (THF)(BHQ1-dT) CCCGTGGCTTCAAAG。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：

<https://d.book118.com/007024140134006135>