

非洲猪瘟病毒超快速荧光 PCR 检测技术规范

编制说明

一、任务来源（包括目的意义）

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的一种猪的急性、烈性、高度接触性传染病，急性型非洲猪瘟发病急、病程短，死亡率接近 100%。该病在非洲、欧洲、亚洲、南美洲及大洋洲均有流行传播。世界动物卫生组织(World Organization for Animal Health, WOAH)将该病列为需报告的动物疫病，我国将其归为一类动物疫病。2018 年 8 月非洲猪瘟传入我国，随后迅速蔓延至全国大部分地区，给我国养猪业造成了巨大损失。据统计，2018-2020 年中国 31 个省份累计发生非洲猪瘟疫情 181 起，扑杀生猪超 120 万头，直接经济损失高达 3391~8166 亿元，猪肉价格则从 2018 年 8 月的 22.15 元 / 公斤飙升到 2020 年 2 月的 57.97 元 / 公斤。因此非洲猪瘟的防控工作，对保障生猪养殖业健康可持续发展具有重要的现实意义。

由于尚未有能够有效防治非洲猪瘟的疫苗和药物，它的防控主要依赖于早期诊断、扑杀患病动物和严格的生物安全措施，由此可见，一个可靠的检测方法关乎非洲猪瘟防控工作的成败。在此基础上，东莞市动物疫病预防控制中心提出《非洲猪瘟病毒超快速荧光 PCR 检测技术规范》的团体标准立项申请。目前，经专家研讨，立项标准符合国家政策，申报的团体标准满足立项条件，同意该标准立项。

二、起草工作简要过程（含主要参加单位及工作组成员）

1 标准起草阶段

为制定本标准，本项目组织有关技术人员参阅技术专著、国家、地方标准等大量文献，并进行了预讨论工作。本项目主要开展非洲猪瘟病毒超快速荧光 PCR 试验方法各项参数的验证，包括了方法的特异性、敏感性、稳定性和临床样品的验证。本研究使用的试剂均为同批次制品或者产品，尽可能确保了各要素效价的稳定性和一致性，保证了试验体系的稳定。2025 年 7 月，我们初步完成了标准的修订并送交同行专家审定。

2 标准参与单位和参与人员

文件起草单位包括东莞市动物疫病预防控制中心、超快生物技术（广州）有限公司、广州国家实验室、广东省动物疫病预防控制中心、深圳市动植物疫病预防控制中心、深圳海关动植物检验检疫技术中心、海南省动物疫病预防控制中心、广西壮族自治区动物疫病预防控制中心、广州市疾病预防控制中心、肇庆市动物疫病预防控制中心、东莞市横沥镇农业技术服务中心、东莞市东坑镇农业技术服务中心、华润五丰肉类食品（河南）有限公司深圳分公司、东莞市洪梅镇农业技术服务中心等多家单位联合起草。

本文件起草人为张险朋、管知深、卢受昇、徐强、卢受昇、徐振娜、李秋剑、阮周曦、迟庆安、韦正吉、刘雪怡、李漪舟、曹 兰、周美芳、赖笑娴、周柱辉、卢伟昌、谢柱彬、洪伟彬、王婉君、林仰孝、李小军、张远龙、李 敏、叶毅飞、钟群芳、谭铭光、林梦哲等。

文件起草的具体分工如下：

张险朋：项目负责人，负责标准的立项、整体方案确立及宣贯，负责标准的审阅、项目申报建议及相关技术文件的校订。

管知深、徐 强：负责标准中方法建立、实验数据分析起草，负责各版本标准稿的讨论和修订工作及征求意见后的修改工作；

徐振娜、刘雪怡、洪伟彬、赖笑娴、叶毅飞、钟群芳：负责标准中部分实验室方法的建立、优化及验证；

谭铭光、林梦哲：负责仪器设备的验证、负责耗材的选择；

李秋剑、阮周曦、迟庆安、韦正吉、李漪舟、曹 兰、周美芳、赖笑娴、周柱辉、卢伟昌、谢柱彬、王婉君、林仰孝：负责部分标准方法的验证及检测方法的推广应用；

李小军、张远龙、卢受昇：负责标准文本质量的整体把握。

三、编写原则和确定标准主要内容的依据

（一）框架的确定

根据非洲猪瘟病毒超快速荧光 PCR 检测技术规范的要求，结合标准撰写格式确定标准的框架为适用范围、规范性引用文件、术语和定义、缩略语、试剂和耗材、仪器设备、样品采集与处理、操作方法、结果判定。

（二）标准的编写原则

1 标准引用

检测样品的采集和用水方面引用了已经发布的国家标准 GB 19489-2008 《实验室 生物安全通用要求》、GB/T 18088 《出入境动物检疫采样》、GB/T 6682 《分析实验室用水规格和试验方法》和行业标准 NY/T 541-2016 《兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范》

2 实际科研和检测工作经验

标准编写人员为张险朋、管知深、卢受昇、徐 强、卢受昇、徐振娜、李秋剑、阮周曦、迟庆安、韦正吉、刘雪怡、李漪舟、曹 兰、周美芳、赖笑娴、周柱辉、卢伟昌、谢柱彬、洪伟彬、王婉君、林仰孝、李小军、张远龙、李 敏、叶毅飞、钟群芳、谭铭光、林梦哲等，多年来一直从事重大动物疫病防控工作，在本标准的编写过程中，结合实验室的实际工作经验，对试验操作的具体细节进行编写。

项目组在动物疫病检测方面具有丰富的经验，东莞市动物疫病预防控制中心实验室（以下简称中心实验室）每年平均检测动物样品近 10 万份，监测项目 70 多个。在非洲猪瘟诊断方面开展了大量的研究工作，并于 2019 年第一批获得广东省非洲猪瘟病毒检测资格。中心实验室于 2003 年通过了中国合格评定国家认可委员会（CNAS）认可，2023 年被认定为“东莞市人兽共患病重点实验室”。项目组在动物疫病超快速荧光 PCR 检测方面积累的大量的经验，目前已建立了布鲁氏菌超快速荧光 PCR 检测方法、非洲猪瘟病毒超快速荧光 PCR 检测方法、鸚鵡热衣原体超快速荧光 PCR 检测方法等多种重要动物疫病的超快速荧光 PCR 检测方法，并应用于临床样品的检测，在重大动物疫病的快速诊断方面发挥了重要作用。

（三）主要内容及其确定依据

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器设备

核酸提取仪（广州达安基因股份有限公司）；超快速荧光 PCR 仪（超快生物技术（广州）有限公司）；生物安全柜（ESCO，广州合众生物科技股份有限公司）。

1.1.2 试剂材料与菌株

5×PCR Buffer、快速启动酶、dNTP、购自超快生物技术（广州）有限公司；核酸提取试剂购自广州达安基因股份有限公司，非洲猪瘟荧光 PCR 检测试剂盒购自深圳市莱孚生物科技有限公司；口蹄疫病毒灭活抗原购自兰州兽医研究所，猪戊型肝炎阳性样品为能力验证样品、

猪瘟病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性样品均由本实验室保存；80份非洲猪瘟临床样品由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 引物、探针设计

参考非洲猪瘟病毒多个基因型参考毒株的 *B646L* 基因组序列，筛选保守区段，设计特异性引物及 TaqMan 探针。此外针对猪的管家基因 *GAPDH* 保守区域设计特异性上下游引物及 TaqMan 探针，引物探针序列见表 1。所有引物、探针均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

表 1 设计的引物和探针

引物、探针名称	序列（5'-3'）
ASFV-F	GGCAATGCRATTAACCC
ASFV-R	CGTGGCTCAAAGCAAAGGT
ASFV-P	FAM-TCCGGGTGCGATGATGATTACCTT-MGB
GAPDH-F	GTTTGTGATGGGCGTGAACC
GAPDH-R	CACCAAGCTCACCTGACGAT
GAPDH-P	ROX-AAGTATGACAACCTCCCTCAAG-BHQ2

1.2.2 重组质粒的构建

根据非洲猪瘟病毒 *B646L* 基因和猪的 *GAPDH* 基因序列，分别构建重组质粒，由生工生物工程（上海）股份有限公司构建、纯化。质粒浓度约为 7.85×10^9 copies/ μL 、 9.50×10^9 copies/ μL 。

1.2.3 核酸提取

使用全自动核酸提取仪提取核酸。

1.2.4 反应体系的优化

对非洲猪瘟超快速荧光 PCR 反应体系的引物探针浓度和退火温度进行优化。引物与探针初始浓度均为 $10 \mu\text{mol/L}$ ，总反应体系为 $50 \mu\text{L}$ ，非洲猪瘟病毒引物探针使用体积分别为 5/2.5、4/2、3/1.5、2/1 μL ，内参引物探针浓度使用体积为 3/1.5、2/1 μL 。退火温度设置为 53°C ， 55°C ， 56°C ， 58°C ， 60°C 。

1.2.5 灵敏度试验和标准曲线绘制

将稀释后浓度约为 3×10^6 copies/ μL 的非洲猪瘟重组质粒进行 10 倍比稀释，稀释 7 个梯度，每个梯度重复检测 3 次，以 100% 检出作为最低检出限，并绘制标准曲线。

1.2.6 特异性试验

提取口蹄疫病毒、猪戊型肝炎、猪瘟病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒核酸，使用建立的非洲猪瘟病毒超快速荧光 PCR 方法进行扩增，评价其特异性。

1.2.7 重复性试验

将非洲猪瘟重组质粒（浓度 3×10^6 copies/ μL ）分别稀释 10 倍， 10^3 倍， 10^5 倍进行检测，每个梯度重复检测 5 次，根据 Ct 值计算变异系数，评价重复性。

1.2.8 临床样本检测

80 份临床样品，包括 30 份全血、50 份环境拭子，其中有 15 粪样品为非洲猪瘟阳性样品。进行核酸提取后，分别用超快速荧光 PCR 方法检测，比较与荧光 PCR 方法的符合率。

2 结果

2.1 反应体系的优化

经过优化，最终确定了非洲猪瘟病毒超快速荧光 PCR 的反应体系和反应条件，结果见表 2 和表 3。

表 2 反应体系

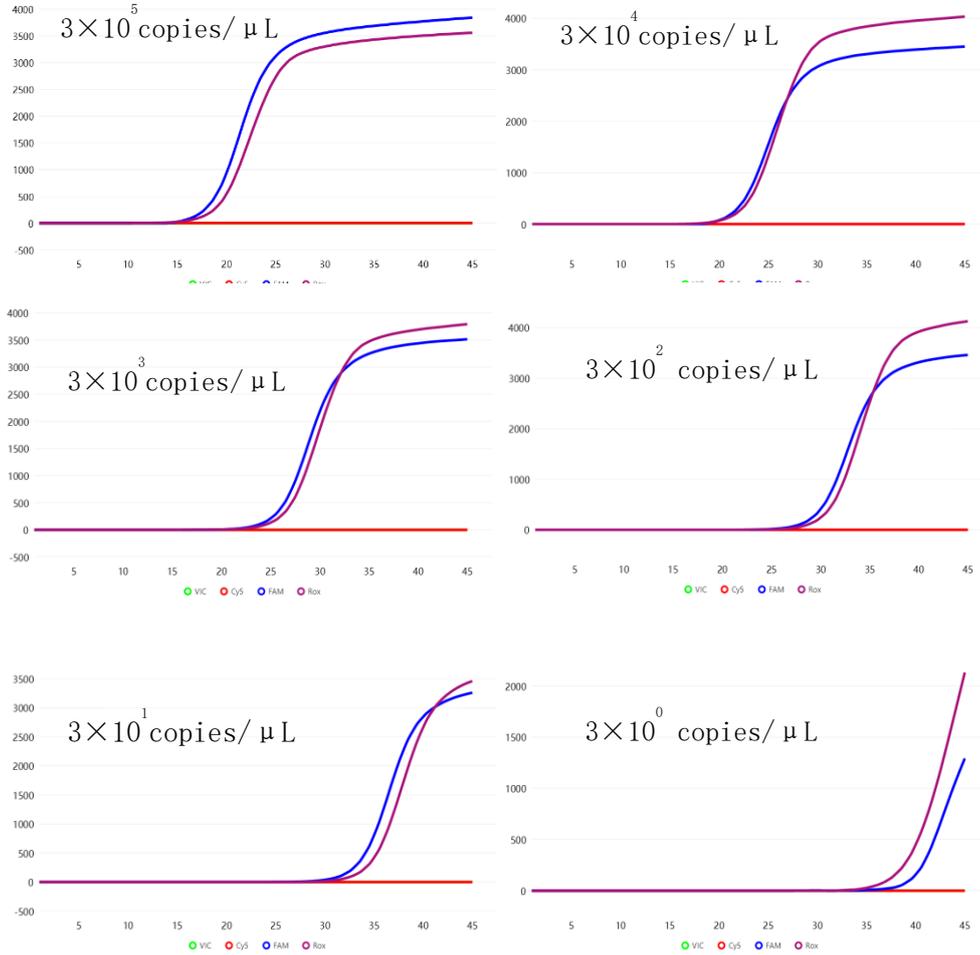
组分	体积 (μL)
5×PCR Buffer	10
dNTP	0.8
快速启动酶	4
ASFV-F (10μmol)	5
ASFV P (10μmol)	2.5
GAPDH -F (10μmol)	2
GAPDH -R (10μmol)	2
GAPDH -P (10μmol)	1
ASFV 重组质粒	5
GAPDH 重组质粒	5
DEPC H ₂ O	7.7
合计	50

表 3 反应条件

步骤	温度 (°C)	时间 (s)	循环
预变性	95	60	1
变性	95	1	45
退火延伸	60	6	

2.3 灵敏度试验结果和标准曲线绘制

对 7 个稀释梯度的质粒进行检测，结果显示：能够 100%检出的最低浓度为 3copies/μL (图 1)，因此，确定该方法的最低检出限为 3copies/μL。并据此绘制标准曲线 (图 2)，结果显示，该方法的定量线性表达式 $y=0.2596x+9.5909$ ， $R^2=0.9996$ 。



注：蓝色曲线（FAM）为非洲猪瘟重组质粒的扩增曲线，红色曲线（ROX）为内参重组质粒的扩增曲线。

图 1 灵敏度评价

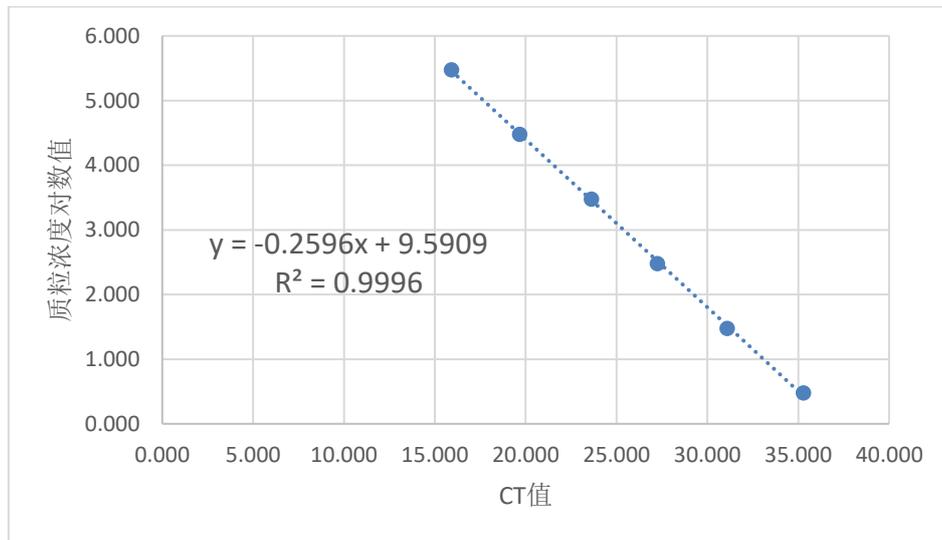


图 2 非洲猪瘟病毒超快速荧光 PCR 标准曲线图

2.4 特异性试验结果

对提取的口蹄疫病毒、猪戊型肝炎、猪瘟病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒核酸进行扩增，以无核酸酶水为阴性对照。仅有非洲猪瘟重组质粒有扩增曲线，其余病原核酸样品和无核酸酶水均未检出（内参有曲线），说明该方法对非洲猪瘟病毒具有较好的特异性。

2.5 重复性试验结果

分别计算非洲猪瘟重组质粒稀释 10 倍、 10^3 倍、 10^5 倍检测结果的 CV 值，CV 值分别为 1.36%、2.4%、0.87%，内参的 CV 值分别为 0.39%、0.14%、0.63%。所有 CV 值均在 3% 以内，说明该方法具有较好的重复性。

2.6 临床样品检测结果

用建立的非洲猪瘟病毒超快速荧光 PCR 方法检测 80 份临床样品，两者检测结果完全一致，符合率 100%。说明建立的检测方法适用于临床样品检测。

四、技术经济分析论证和预期的经济效益

本项目建立的非洲猪瘟超快速荧光 PCR 方法，可以在 15min 内完成非洲猪瘟病毒核酸检测，为诊断、消灭非洲猪瘟提供了新的技术手段。文本的发布将对生猪养殖产业健康可持续发展起到重大作用，能够减少从业人员的损失，平抑猪价，减轻消费者负担。

五、采用国际标准和国外先进标准情况及水平对比

本文本所建立的非洲猪瘟病毒超快速荧光 PCR 方法为国内、外首创，未采用国际标准。

六、与现行法律、法规、政策及相关标准的协调性

与现行法律法规、强制性标准等上位标准关系没有冲突。非洲猪瘟病毒检测方法被列入 WOA 动物卫生法典、WOAH 诊断手册（CHAPTER-3.9.1）；国内标准 1 项，非洲猪瘟诊断技术（GB/T 18648-2020）；国内行业标准 2 项，非洲猪瘟检疫技术规范（SN/T 1559—2024）、非洲猪瘟实验室快速检测方法（SN/T 5479-2022）；地方标准 4 项，分别为非洲猪瘟病毒 LAMP 目视检测方法（DB21/T 3787-2023）、非洲猪瘟病毒检测免核酸提取荧光 PCR 法（DB43/T 1670-2019）、非洲猪瘟恒温扩增检测技术规范（DB37/T 4032—2020）。这些标准推荐的非洲猪瘟病原学检测方法主要有普通 PCR、荧光 PCR、ELISA、恒温扩增等，其中普通 PCR 方法耗时长、所用试剂对人体有害，ELISA 方法耗时更长、操作繁琐，恒温扩增敏感性低，这些方法都不能满足目前临床检测的需求。荧光 PCR 方法虽然具有快速、敏感性高和特异性好的特点，但它的检测时间和用户的需求已经成为该方法的主要矛盾。

本标准所建立的非洲猪瘟病毒超快速荧光 PCR 方法，具有较高的敏感性、重复性和特异性的同时，扩增时间却大幅缩短。从样品送达到结果报告，仅需 30 分钟，更加适合非洲猪瘟的临床诊断。

七、贯彻实施标准的措施和建议

为确保团体标准的有效落地，提出以下措施：

1. 强化宣贯培训

编制标准解读手册及操作指南，面向成员单位开展专题培训，重点解读技术条款、实施要点和检测方法，提升从业人员对标准的理解，使其认识到标准施行的必要性和紧迫性。

2. 建立配套支持体系

设立技术咨询小组，提供标准应用指导。对于各单位在应用过程中出现的问题及时收集整理，并及时解答。

3. 持续迭代优化

建立标准动态维护机制，每 2-3 年开展适用性评估，及时启动修订程序，确保标准与产业发展同步更新。

八、其它应予说明的事项

无。