

---

## 第六章

# 科学采样与诊断检测

---

在非洲猪瘟的防控过程中，准确、快速、及时地诊断对尽早发现疫情，及时处理极其重要。为确保能够从实验室检测中获得准确的诊断结果，在临床取样时应重点考虑动物发病的时间、治疗史、发病状态来选择最佳时机和最具代表性的动物进行采样。其次，有效的样本采集后，如何使用正确的运输方式提交到实验室进行检测也会影响诊断结果的准确性。临床兽医对诊断结果最大的贡献就是以最可靠的采集和运输方式向诊断实验室提供最合适的临床样本。同时，实验室选择正确有效的检测方法对送检样品进行规范准确的检测是非洲猪瘟疫情确诊和阳性动物筛查的重中之重。

### 第一节 样品的采集、运送与储存

我国要求对非洲猪瘟的诊断、报告与防控必须严格遵照《中

## ◆ 生猪养殖与非洲猪瘟生物安全防控技术

《中华人民共和国动物防疫法》《突发重大动物疫情应急预案》《非洲猪瘟防治技术规范》《非洲猪瘟防控应急预案》的要求执行。疑似样品的采集、运送与保存必须符合《病原微生物实验室生物安全管理条例》的规定，样品的采集，运送和存储单位必须具备相应资格。

样品的采集、运送与存储关乎诊断结果的可靠性、准确性。实验室检验能否得出准确结果，与病料取材是否得当、保存是否得法和送检是否及时等有密切关系。当有关单位或者个人怀疑发生非洲猪瘟疫情时，应及时向当地动物疫病预防控制机构报告。

病猪和病死猪的全血、组织、分泌物和排泄物中均可能含有病毒。内脏器官弥漫性出血症状明显，故在采集组织病料时需首先通过剖检观察器官组织的病理变化，结合生前各项临床症状进行初步诊断，采集的脏器应尽可能全面，如疫点周边有野猪分布，应联合林业部门同时采集野猪样品。

### 一、样品的采集

#### 1. 全血和血清

采样前提前准备好采血所需器材，如注射器、真空采血针和管、1.5mL离心管、记号笔、样品袋、泡沫箱、冰袋、白纸和笔。

抗凝血采集，从耳静脉



图 6-1 前腔静脉采血示范

或前腔静脉采集血液（图 6-1）。用注射器吸取 EDTA 抗凝剂（不可用肝素抗凝，易抑制后续 PCR 反应），静脉采集血液 5mL，颠倒混匀后，注入无菌容器。如条件允许，最好每份血液样品采集 2 管，以便留存充足的备份样品。也可以用已经含有抗凝剂的真空采血器抽取血液。

血清分离，对非洲猪瘟进行血清学样品采集时，需对病猪，健康猪以及处于不同发病阶段的猪分别采集血清。注射器（或真空采血针和管）采集全血 3~5mL，室温放置 12~24h，收集自然析出血清或离心分离血清，置于无菌容器中，封口，标识后放入加入冰袋的泡沫箱送检，见图 6-2。

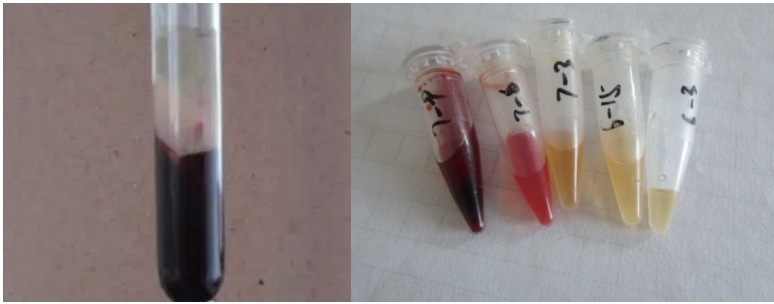


图 6-2 血清分离

### 2. 口腔 / 鼻 / 血液拭子

采样前提前准备好无菌棉签、离心管、生理盐水、手套、记号笔。离心管内加生理盐水或者 PBS 适量，以没过棉签头为宜。

口腔拭子采集，将无菌棉拭子插入猪口腔中，5~10cm 深，

转动棉拭子顺时针和逆时针擦拭口腔数次，拿出棉拭子放到加有 2~3mL 生理盐水的离心管中，挤压几次，并折断木棒，盖上离心管管盖。

鼻拭子采集，将无菌棉拭子斜 45° 角插入猪鼻腔中线附近，5~10cm 深，把鼻拭子贴着猪鼻腔周壁顺时针擦两到三圈，然后逆时针擦拭，然后换一个鼻孔重复这套动作，保证拭子看起来湿润。拿出棉拭子放到加有 2~3mL 生理盐水的试管中，挤压几次，并折断木棒，盖上离心管管盖。

血拭子采集，用一次性注射器在猪只耳朵处扎一下，用无菌棉拭子反复擦拭流出来的血液，将棉拭子放到加有 2~3mL 生理盐水的试管中，挤压几次，并折断木棒，盖上离心管管盖。

应该注意，采样前，务必保证采样管、无菌棉拭子、自封袋等物品处于干净清洁、未被污染的状态。采集的每头猪的口腔液、鼻拭子、血液拭子，要分开装入采样管内；装有猪口腔液、鼻拭子、肛门拭子、全血的采样管，要分开装入自封袋内；自封袋密封严实后，标注相应信息，置于加冰袋的无菌容器内，标明动物编号。

### 3. 口腔液样本

根据猪群日龄不同，选不同直径全棉绳进行采集，保育猪可用直径 1.3cm 绳索，而生长育肥猪和生产母猪则选用直径 1.6cm 的绳索进行口腔腔液采集，悬挂处应远离饲槽和猪排便区。棉绳上端固定，下垂高度与猪只的肩关节齐平，任猪咀嚼，30min 后收取棉绳，刮取和挤压口腔液至自封袋（图 6-3），然后装入 EP 管或其他容器。一般认为  $\geq 1\text{mL}$  为有效采集量。



图 6-3 猪群口腔液的采集 (Prickett et al., 2008)

采集完毕应立即取走绳索，避免猪群失去对绳索兴趣，不利于下次采集。

#### 4. 粪便

以清洁玻棒或棉棒挑取新鲜粪便少许（约 1g），置于无菌容器内，也可用棉拭子自直肠内直接蘸取或掏取。

#### 5. 脾脏、淋巴结、肝脏、肺脏等实质器官

检测 ASFV 时，脾脏为首选器官，其次为淋巴结。肉眼所见有病理变化或没有病理变化的脾脏、淋巴结都应在采集样品范围之内。淋巴结可连同周围脂肪整个采取，其他器官可选病变明显部位与健康部位交界处，以无菌操作剪取直径 1cm 左右的组织样品，加入含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  青霉素和链霉素的 PBS 溶

## 生猪养殖与非洲猪瘟生物安全防控技术

液中，4℃保存运输。或保存于含 50% 甘油的 PBS 溶液中，4℃保存运输。为保持病毒的感染性，样品到达实验室后，立即放入 -80℃低温冰箱内冷冻保存。若条件允许，可另取少许制触片数张，一并送检。

注意事项：在舍外采集死猪脾脏、淋巴结时，必须着一一次性防护服、一次性手套，每采集一头死猪的脾脏、淋巴结，更换一次手套、刀片。每头死猪的脾脏、淋巴结，要分开装入自封袋内，确认密封严实后，标注相应信息，放入泡沫箱加冰袋送检。采集死猪样品时，必须在远离猪舍的环保区进行，并且要注意采样时的生物安全，以及采样后的生物安全工作，及时对死猪进行无害化处理，对采样场地进行有效的消毒处置，以确保不污染环境。

### 6. 水样

可用矿泉水瓶作为水样采样工具。采样点一般为蓄水池、生产区各栋舍出水口、洗车用水等，使用新矿泉水瓶采集采样点水样，每次采样时务必做好生物安全防护和注意生物安全操作，防止将水池内水体进行二次污染和所采集的水样被污染。

### 7. 环境样品

提前准备纱布 / 棉拭子、采样管、自封袋、生理盐水、一次性手套。纱布裁剪成面积 2cm × 5cm 或 10cm 长度的纱布，或者直接购买纱布块。

采集方法，第一步戴好手套，用裁剪好的纱布 / 棉拭子，蘸取生理盐水；第二步擦拭采样点（面积越大越好）；第三步放入采样管（或样品袋）内，在采样管或样品袋中加入生理盐水，

浸湿纱布；第四步做好标记。

应用场景，猪舍内外环境样品，如猪舍内（地面、料槽、水槽、刮粪板、墙面、栏杆等），猪舍外（储粪池、水、地面、道路等），生活区和办公区（地面、桌面、电脑等）。



图 6-4 车辆采样部位示意

车辆样品，采样部位包括车头、驾驶室、车轮（前）、车轮（后）、车体外表面（左）、车体外表面（右）、车顶、底盘、车厢内表面、车厢外表面、车厢内部升降（第一、二、三层等），见图 6-4。

注意事项：采样前，务必保证采样管、纱布、自封袋等物品处于干净整洁、未被污染的状态。一个采样点换一个手套。每个采样点或或者一个单元的样品要单独放于一个自封袋内，标记好采样地点。附上送检单，冷藏保存或运输。

### 8. 人员样品

可用蘸取生理盐水的棉拭子，擦拭相关人员的头发、鼻腔、口腔、耳朵、脸部、手及指甲缝、衣服、鞋底、手机等部位或物品，拿出棉拭子放到加有 2~3mL 生理盐水的离心管中，挤压几次，并折断木棒，盖上离心管管盖。

### 9. 软蜱

在非洲和欧洲的很多国家，软蜱可以通过叮咬猪或野猪传播 ASFV，成为非洲猪瘟非常重要的生物虫媒，并可以作为

ASFV 的自然宿主。

一般来说，可以采用手工方式捉软蜱。通过手工移除裂缝和猪舍墙壁孔洞中的尘土，清理木质或瓦屋的屋顶缝隙，从猪舍道路上或路边挖掘均可进行软蜱的收集。也可以在野猪出没的地方查找软蜱的存在。但这种方法费时、费力，由于软蜱的寄居环境潮湿，黑暗，发现难度大，且难以找到更小的幼虫阶段的虫体。因此，手工方法不适合进行大规模软蜱的采集。在非洲、欧洲的一些国家，二氧化碳诱捕法、真空抽吸法广泛应用于田间软蜱样品的采集。

### 10. 病理组织学检测样品

若需采集病料进行病理组织学检测，应选取剖检有典型病变的部位，连同邻近的健康组织一并采取。如果某种组织器官具有不同病变时应各采一块，将标本切成  $1\sim 2\text{cm}^3$  大小，用清水冲去血污，立即浸入固定液中。

常用的固定液为 10% 福尔马林，固定液的用量应为标本体积的 10 倍以上。脑、脊髓组织最好用 10% 中性福尔马林溶液（即在 10% 福尔马林溶液中加入 5%~10% 碳酸镁）固定。初次固定时，应于 24h 后更换新鲜溶液一次。

一头病死猪的标本可装在一个瓶内，如同时采集几头病猪的标本，可分别用纱布包好，每包附一纸片，纸片上用记号笔标明病猪的号码。

### 11. 样品选取和采集过程中的注意事项

（1）合理取材。不同疫病要求采取的病料不同。怀疑非洲猪瘟时，应按照《非洲猪瘟防治技术规范》的要求采





集病料，确保送检样品合格、规范，方便后续的实验室检测工作。如果怀疑除非洲猪瘟外还有多种疫病同时感染，应综合考虑，全面取材，或根据临床和病理变化有侧重地取材。

(2) 剖检取材之前，应先对病情，病史加以了解，并详细进行临床检查。取材时，应选择临床症状明显，病变变化典型，有代表性的病猪。最好能选送未经抗菌药物治疗的病例和发病猪生前活体样品送检。

(3) 病死猪要及时取材，夏季不超过 4h，若死亡时间过长，则组织变性、腐败，影响检测结果。

(4) 除病理组织学检验病料及胃肠内容物外，其他病料应无菌采取，器械及盛病料的容器须事先灭菌。①刀、剪子、镊子、针头等金属制品需高压灭菌，尽可能采用一次性无菌注射器；②试管、平皿、棉拭子等可高压灭菌或干热灭菌；③载玻片事先洗擦干净并灭菌。

(5) 为了减少污染机会，一般应先采取微生物学检验材料，再取病理组织学检验材料。

(6) 牢记生物安全原则。①样品采集人员做好个人防护，防止感染人兽共患病；②防止污染环境，避免人为散播疫病；③做好环境消毒和动物尸体的处理。

## 二、待检样品的保存

待检的组织病料、血液、血清、体液、分泌物等待检样品必须保持新鲜，避免交叉污染和腐败变质。采样后如不能立即

## 生猪养殖与非洲猪瘟生物安全防控技术

送检，应根据样品类别以及检测目的不同分类保存，以免影响检测结果的质量。一般情况下，所有拟送检样品均应低温，冷藏保存和运输。

血清或抗凝全血送检前可放置于 4℃ 保存，之后冷藏运送至检测实验室。实验室收到样品后如果不能立即检测，应置于 -20℃ 保存，或 -80℃ 长期保存。用于病毒分离或攻毒试验诊断的抗凝全血样品，应尽可能低温冷藏运送至检测实验室，到达实验室后立即存放于 -70℃ 以下，以确保病毒不丧失感染性。ASFV 抗体和提取的 DNA 在 4℃ 条件下保存数月不影响检测结果。但口腔液或口鼻拭子样品在 4~6h 内检测，其影响不大，若运输时间过长，应添加唾液保护剂或干冰运输以保护核酸不被核酸酶破坏降解。

组织样品，如脾脏、淋巴结可于 50% 中性甘油溶液或含 100 μg/mL 青霉素和链霉素的 PBS 溶液中 4℃ 冷藏运送。到达实验室后立即存放于 -80℃ 以下。以上保存液均需充分灭菌后应用。

盛装送检材料的容器须确实密封，固定，置于装有冷却用品的容器中迅速送检。夏天运输耗时较长时，需更换冷却剂一次或数次。

活蝇样品在采集后应放于带螺纹塞、且有空气出入口的瓶或管中，样品瓶或管中放入潮湿的土或滤纸片。长期保存时，应放置于 20~25℃ 阴凉、潮湿环境下。为保持蝇体内 ASFV 的感染性，可以将带毒蝇存放于 -70℃ 以下。无水乙醇也可以用于带毒蝇的保存，但是此种样品仅能用于 PCR 检测病毒核酸。



### 三、样品的送检和运输

ASFV 是高致病性动物病原微生物，疑似样品的包装应按照国际通用 A 类物质包装。样品的运输必须符合《病原微生物实验室生物安全管理条例》《高致病性动物病原微生物实验室生物安全管理审批办法》《高致病性动物病原微生物菌（毒）种或者样品运输包装规范》以及航空、铁路，公路等交通管理的相关规定。

此外，待检材料包装好后还应注意以下问题：①在容器和样品管上编号，并详加记录。送检时应复写送检单一式三份，一份存查，两份寄住检验单位，检验完毕后退回一份；②事先与检验单位联系；③检验用病料尽可能指派专人送检。

送检时除注意病料冷藏运输外，还必须避免包装破损带来的散毒风险。用冰瓶送检时，装病料的瓶子不宜过大，需在其外包一层填充物，途中避免振动，冲撞，以免冰瓶破裂。如路途遥远，可将冰瓶航空托运，并将单号电传检验单位，以便其被及时提取。

## 第二节 病原学诊断

从流行病学调查、临床症状、病理变化等指标怀疑非洲猪瘟疫情后，应对采集的样品进行实验室检测。通过病原学或免疫学手段检测 ASFV 或特异抗体是疑似疫情实验室确诊的必要前提。但非洲猪瘟多表现为最急性或急性病型，往往在特异抗体出现前已经死亡。因此，病毒的病原学检测在非洲猪瘟疫情

确诊中非常重要。

非洲猪瘟病原学诊断技术主要有病毒分离、血细胞吸附试验、核酸检测以及荧光抗体法、免疫过氧化物酶染色法检测 ASFV 抗原等方法,在此主要介绍最常用的病毒核酸检测方法。

### 一、病毒核酸检测

常用的检测 ASFV 核酸的方法有普通聚合酶链式反应 (PCR) 和实时聚合酶链式反应 (real-time PCR) 两种方法,不仅可以用于病毒核酸的扩增,还可用于毒株的分型,特别是无红细胞吸附能力毒株和低毒力毒株的检测。

ASFV 基因组中含有高度特异、保守的基因序列,这些序列可以通过 PCR 进行扩增。PCR 是指体外合成特定 DNA 片段的一种分子生物学技术,由高温变性、低温退火和适温延伸三个步骤反复循环构成,使位于两段已知序列之间的 DNA 片段呈几何倍数扩增。PCR 首先需要从待检样品中提取 DNA 样品,用作扩增的模板。普通 PCR 扩增结束后,扩增产物采用琼脂糖电泳技术进行检测。实时 PCR 中的扩增产物可以实时监测,在反应混合物中加入荧光染色,随着扩增产物的增加,荧光信号会成比例变化。实时 PCR 较为先进,可对扩增产物进行自动检测,规避了核酸电泳等后续操作所带来的污染风险,而且多数情况下检测敏感性高于普通 PCR。PCR 方法适用于任何临床样本,如全血、血清,组织匀浆和细胞培养上清液等,尤其适合检测那些不适用于病毒分离的样品,如已腐败变质的样品或怀疑病毒可能失活的样品。PCR 方法能够在几小时内完成,特异性

强，敏感性高，在感染动物还未出现临床症状前即可检测到病毒核酸，已成为应用最为广泛的非洲猪瘟病原学诊断方法。

P72 蛋白是由 B646L 基因编码的主要结构蛋白，B646L 基因高度保守，B646L 基因序列常被用作 PCR 扩增的对象。此外，B646L 基因序列常用于不同 ASFV 分离株的系统进化树分析和不同 ASFV 毒株的基因型鉴别，所用序列多为 B646L 基因 C- 末端约 478bp 大小的片段，目前，OIE 推荐的以及众多研究开发的 PCR 方法，大多是基于 B646L 基因的高度保守序列，确保能够检测出 24 种 ASFV 基因型。例如，OIE 推荐的实时 PCR 方法，扩增的 DNA 片段大小为 250bp，针对参考株 BA7IV 的整个 VP72 序列第 2041-2290 位核苷酸，使用 TaqMan 探针对扩增产物进行检测。

下面以国家非洲猪瘟参考实验室研发的 ASFV 荧光 PCR 检测试剂盒为例，简述核心试剂和试验流程。

### 1. 分组与用法（表 6-1）

表 6-1 ASFV 荧光 PCR 检测试剂盒核心试剂及用法

序号	名称	装量	用法	保存条件
1	反应阳性对照品	20 $\mu$ L/ 管 $\times$ 1 管	直接使用	-20 $^{\circ}$ C 保存
2	PCR 反应液	875 $\mu$ L/ 管 $\times$ 1 管	直接使用	-20 $^{\circ}$ C 保存
3	荧光探针	25 $\mu$ L/ 管 $\times$ 1 管	直接使用	-20 $^{\circ}$ C 保存

### 2. 作用与用途

用于检测多种临床样本（如全血、淋巴结、脾、扁桃腺、肾、肺等）中是否含 ASFV 核酸。

### 3. 实验室自备试剂和耗材

（1）无 RNA 酶污染的纯水，购买或自己制备。

(2) PCR 反应管, Tip 头和 1.5mL 离心管等(要求为无 RNase & DNase 级别)。

#### 4. 用法与判定

(1) 样本处理。可采用 Roche, QIAGEN 等公司生产的 DNA 纯化试剂盒提取各类样本中的 DNA, 或用自动化核酸提取仪器提取各类样本中的病毒核酸。如在 2h 内检测则提取的 DNA 置于冰上保存, 否则置于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

(2) 扩增试剂准备。每个反应的体积为  $20\ \mu\text{L}$ , 其中 PCR 反应液  $17.5\ \mu\text{L}$ , 荧光探针  $0.5\ \mu\text{L}$  (反应液配制请在冰上进行)。

上述反应体系充分混匀后, 将  $18\ \mu\text{L}$  反应预混液分装到每个反应管内, 最后加  $2\ \mu\text{L}$  的 DNA 模板到 PCR 反应管中。

每次检测还应包括反应阳性对照(以  $2\ \mu\text{L}$  反应阳性对照品作为模板)和反应阴性对照(以  $2\ \mu\text{L}$  灭菌水作为模板)。

(3) PCR 反应。加样后, 将 PCR 管置于荧光 PCR 仪内, 按下列程序进行反应(表 6-2)。

表 6-2 PCR 反应步骤

PCR 步骤	温度	时间	循环次数
UNG 孵育	$50^{\circ}\text{C}$	2min	1
激活 Taq 酶	$95^{\circ}\text{C}$	10min	1
DNA 变性	$95^{\circ}\text{C}$	15S	45
引物退火 / 延伸	$58^{\circ}\text{C}$	60S	45
每循环 $58^{\circ}\text{C}$ 时采集 FAM 同道中的荧光信号			

(4) 结果判定。结果的有效性: 阳性对照的 Ct 值应该小于 35。反应阴性对照应没有扩增曲线, 没有 Ct 值或 Ct 值



大于等于 37。

当样品的扩增结果有典型的扩增曲线且 Ct 值小于等于 35 时，可判定为阳性；当样品的扩增结果在背景信号之下或 Ct 值大于等于 37 时，判定为阴性结果。

当样品的 Ct 值大于 35 小于 37 并且扩增曲线呈指数时被判定为可疑，当扩增曲线呈线性时判为阴性。可疑样品应当重新提取病毒核酸检测，如仍为可疑，可判为阳性。

### 5. 注意事项

由于 PCR 是极其灵敏的技术，所有操作程序中的关键问题就是防止交叉污染，防止出现假阳性结果。污染可能来自 ASFV 阳性样本或 DNA 提取程序中的阳性对照；此外，还可能来自于过去 PCR 扩增的 ASFV DNA 产物。因此强烈要求所有负责 PCR 工作的人员全面严格遵守规章制度，将 PCR 技术相关的污染风险降到最低。

(1) PCR 样品分析的每一步都应在专门区域或地点进行，这些区域可以分为：样本制备区，DNA 提取区，PCR 混合液制备区和 PCR 产物处理区。

(2) PCR 实验室工作人员必须一直戴硅胶或丁腈手套。

(3) 人员进入不同的 PCR 区域时，应脱下现有手套，换上新手套。

(4) 各区域物品均为专用，不得交叉使用，以免污染。

(5) PCR 专用的材料需要合理放置并标记。

(6) 带有扩增产物的试管不得在其他实验室打开或操作，应当统一销毁。

(7) 酶混合物容易失活，因此使用时应置于冰上，使用后应放回冰箱冻存。

### 二、直接免疫荧光检测 ASFV 抗原

用荧光素标记抗 ASFV 特异性多抗或者单克隆抗体，然后将荧光素标记抗体与组织压片，触片以及冷冻切片上抗原直接进行反应。如果样品中含有 ASFV 抗原，不管是否具有生物学活性，都可以与荧光素标记抗体发生反应，形成免疫复合物，荧光素在紫外线激发下产生相应的荧光，借助荧光显微镜观察结果。直接免疫荧光抗原检测 (Direct Fluorescent Antigen Test, FAT) 特异性强，敏感性较高，适用于 ASFV 抗原的检测。该方法已经应用于目前非洲猪瘟疫情发生国家的证实性检测。但由于该方法对实验室的生物安全防护条件、操作者的实验技能以及仪器设备要求较高，因此应用受到了一定限制。

FAT 可检测野外可疑猪或实验室接种猪脾脏、扁桃体、肾脏、淋巴结组织中的抗原。此外，还可以用于检测无血细胞吸附现象的白细胞培养中的 ASFV 抗原，即能够鉴别没有红细胞吸附能力的病毒株。FAT 还可用于病毒培养物的检测，用于区分细胞病变是 ASFV 产生还是其他病毒产生的。但对亚急性或慢性非洲猪瘟病例，FAT 检出敏感性明显降低，可能与感染猪体内抗原-抗体复合物的形成有关。这种抗原-抗体复合物能干扰甚至阻断 ASFV 抗原与结合物之间的结合。

荧光抗体试验时，为保证荧光素标记抗体的浓度，稀释度一般不应超过 1:20，抗体浓度过低会导致产生的荧光过弱，





影响结果的观察。染色的温度和时间需要根据不同的标本及抗原进行合理选择，染色时间可以从 10min 至数小时，一般 30min，染色温度多采用室温（25℃左右），整个反应过程最好在湿盒内进行。

### 第 三 节 血清学诊断技术

目前对非洲猪瘟尚无疫苗可用于预防，血清学检测阳性通常可做出确诊。

感染后康复猪的抗体可维持很长时间，有时可终生携带抗体。可用于非洲猪瘟抗体检测的方法很多，但只有少数可用作实验室常规诊断。非洲猪瘟血清学检测方法主要有酶联免疫吸附试验（ELISA），间接荧光抗体试验（IFA），免疫印迹试验（IB）和对流免疫电泳（CIE）试验等。其中，最常用的是 ELISA 法，此方法既可以检测血清也可检测组织液。在某些疫情的诊断中，对 ELISA 法检测为阳性的样品，一般应再用其他方法，如 IFA、免疫过氧化物酶染色或免疫印迹等方法进行确证。通常感染了 ASFV 强度株的猪在急性死亡前尚未产生抗体；而感染了中等毒力、低毒力或无致病力毒株的猪，往往病程长并有可能临床康复，通常能产生高水平的抗体。这些抗体虽然不具备病毒中和能力，但可以用于诊断检测。

在非洲猪瘟呈地方性流行的区域，最好用标准的血清学试验（ELISA）方法，再结合另一种血清学试验（IFA）或抗原检测试验（FAT）进行可疑病例的确诊。目前，很多实验室对

## 生猪养殖与非洲猪瘟生物安全防控技术

95% 以上的阳性病例都要在 PCR 等病原学检测基础上，结合 IFA、FAT 等血清学检测方法进一步鉴定和确诊。而在猪感染无致病力或低致病力毒株时，感染后期或者临床康复后病毒血症消失，血清学试验也许是检测感染动物的首选。对流免疫电泳和 ELISA 均可用于大规模血清普查，但 ELISA 对检测单个阳性血清的敏感性更高。

根据《非洲猪瘟防治技术规范》的要求，从流行病学调查、临床症状等指标临床怀疑非洲猪瘟疫情的，应采集血清样品进行实验室检测，以便做出疑似诊断。

### 一、用于血清学试验的样品

对于发生疫情的畜群，血清学样品采集工作要与病原学样品采集工作同步进行。无菌操作采集动物血液，分离血清，用于血清学诊断、监测或流行病学调查。将血清装入灭菌小瓶中，如有需要可加适量抗生素，加盖密封后冷藏保存。

### 二、酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附试验（ELISA）是一种国际贸易指定试验，用于检测猪的 ASFV 特异性抗体。目前有多种市售 ELISA 试剂盒，分为间接 ELISA 和阻断 ELISA 两种方法，所用包被抗原也不尽相同。

如同其他病原体的 ELISA 方法，使用灭活的全病毒或表达的抗原包被固定在固相载体上（聚苯乙烯板）。间接 ELISA 中，当血清样品中含有 ASFV 特异性抗体时，会与吸附在板上



的抗原结合；如果血清样品中不含特异性抗体，则不能与包被抗原结合。加入酶标第二抗体结合 ASFV 抗体和包被抗原复合物，加入底物呈现颜色反应。阻断 ELISA 中，待检血清与包被抗原反应后，再加入针对包被抗原的特异性酶标单抗进行反应。如果血清中含有一定滴度的非洲猪瘟病毒特异性抗体，酶标单抗就不能或者减少与包被的抗原结合。反之，如果血清中不含 ASFV 特异性抗体，酶标单抗就与抗原结合，最后加入底物呈现颜色反应。ELISA 方法既可以检测血清，也可检测组织液，此外还可用于大规模的血清学普查。

ELISA 方法敏感性强，但样品保存不好，出现腐败，变质等情况下，敏感性会明显降低，为解决样品质量带来的影响，Gallardo 等利用重组蛋白作为包被抗原建立了新的 ELISA 方法。在用 ELISA 方法检测不合格血清样品出现阳性或可疑结果时，需用间接荧光抗体试验、免投印迹试验等确证方法做进一步检测。

### 三、间接免疫荧光试验（IFA）

IFA 是一种敏感性高，特异性强的快速检测方法，既可用于血清又可用于组织液的检测，通常用于无非洲猪瘟流行地区 ELISA 检测阳性的血清，以及来自地方性流行地区经 ELISA 检测结果可疑血清的确诊试验。

将感染 ASFV 的原代细胞或者传代细胞固定于细胞板或者载玻片上，加入待检血清作用，如果被检血清中含有 ASFV 特异性抗体，就会与细胞中的 ASFV 抗原结合，再加入荧光素标

## 生猪养殖与非洲猪瘟生物安全防控技术

记的第二抗体与抗原-抗体复合物结合，在荧光显微镜下观察结果，阳性血清会在感染细胞的细胞核附近呈现特异性荧光。操作时，应同时使用标准阳性和阴性血清作为对照，避免非特异荧光信号引起的误判。

### 第④节 我国批准使用的非洲猪瘟现场快速检测试剂

为做好非洲猪瘟疫情的发现、报告和处置工作，农业农村部对非洲猪瘟的实验室检测提出了明确要求，各检测实验室要按照有关要求，遵守实验室生物安全操作规范，严格开展实验室活动。发生疑似非洲猪瘟疫情的，由省级动物疫病预防控制机构进行确诊；各受委托实验室发现疑似阳性结果，要将疑似阳性样品送省级动物疫病预防控制机构进行确诊。确诊后要将病料样品送中国动物卫生与流行病学中心备份。

为降低非洲猪瘟病毒扩散风险，农业农村部已部署开展了2批非洲猪瘟现场快速检测试剂评价工作，并要求各地在动物检疫中对生猪及其产品开展非洲猪瘟病毒检测时，应当使用经过比对符合要求的检测方法 & 检测试剂盒（试纸条），确保检测结果准确。