

《非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法》编制

说明

一、工作简况

(一) 任务来源

非洲猪瘟 (African swine fever, ASF) 是由非洲猪瘟病毒 (African swine fever virus, ASFV) 引起的猪的一种急性、热性、高度接触性传染病, 死亡率高达 100%, 该病毒也是目前唯一已知的 DNA 虫媒病毒。1921 年, 非洲东部的肯尼亚首次确诊 ASF 疫情, 此后其传播范围长期局限于非洲。直到 1957 年, 该病从西非传入葡萄牙, 并于 1971 年首次登陆古巴, 随后在美洲的多米尼加共和国和海地相继暴发。2007 年, 东欧的格鲁吉亚发现基因 I 型 ASFV, 此后该毒株在东欧地区造成难以控制的传播。2018 年 8 月, 我国确认首例 ASF 疫情, 仅 2019 年就给我国造成约 1110 亿美元的经济损失。自那之后, ASF 持续在亚太地区蔓延, 截至 2023 年 5 月, 已影响中国、蒙古国、越南、柬埔寨和韩国等 18 个国家。近年来, 我国又发现了基因缺失毒、减毒弱毒株和基因 I 型毒等病毒株, 复杂的毒株生态给该病的诊断与防控带来了新的困难和挑战。目前, ASF 仍在全球多个地区流行, 严重威胁全球生猪养殖业安全, 对世界粮食安全产生巨大影响。世界动物卫生组织(WOAH)将非洲猪瘟列为法定报告的动物疫病, 我国农业农村部将其列为一类动物疫病。

迄今为止, 尚未开发出安全有效的 ASF 疫苗, 也无商品化抗病毒药物。根据我国农业农村部印发的《非洲猪瘟疫情应急实施方案(第五版)》, 当发现生猪、野猪出现疑似 ASF 症状或异常死亡等情况时, 需按照“可疑疫情—疑似疫情—确诊疫情”的程序完成疫情认定与报告。因此, 准确、及时的实验室诊断对于 ASF 疫情的科学认定与有效控制至关重要。现有抗体检测方法包括酶联免疫吸附试验(ELISA)、免疫层析实验等, 普遍存在检测周期较长、灵敏度有限、易发生交叉反应等问题, 并且对检测设备与操作人员的技术水平有较高要求, 检测成本相对较高, 同时还容易因污染而产生假阳性结果, 在实际应用中存在一定的局

限性。因此，建立科学快速有效的检测方法才能正确诊断和有效遏制非洲猪瘟的流行。

（二）起草单位

本文件起草单位为河北省动物疫病预防控制中心、石家庄市动物疫病预防控制中心、石家庄市兽用生物制品供应站、张家口市动物疫病预防控制中心、涿州市动物疫病预防控制中心、天津测易生物科技有限公司。

本文件主要起草人为马宏伟、李永娟、苏晓梅、倪志广、仇国明、武革利、侯桂芳、王世超、葛辉、张倩、魏泽华、殷克勇、张斌、叶航、董晓坤、张承礼、彭科、丁子涵、王耀国、吴志国、李健坤、李晓琳、刘泽霖、严博悦、赵研、刘志昌、霍宏宇、陈锡俊，孙伟珊，赵秀英，曹琪，董建伟。

陈锡俊、孙伟珊（天津测易生物科技有限公司）：主持和制订定标准全面工作、任务分工及联系标准意见征求和技术复核专家与单位。赵秀英、曹琪和董建伟（天津测易生物科技有限公司）：负责实验设计方案与验证方案制订、标准初稿的起草与征求意见后的修订；马宏伟、倪志广、仇国明、侯桂芳、王世超、张倩、魏泽华、殷克勇（河北省动物疫病预防控制中心）：负责实验材料的准备，参与技术标准化、标准初稿修订、征集意见的组织安排工作和负责征求意见后的修改等工作；武革利（石家庄市动物疫病预防控制中心）：负责标准背景资料收集、试验结果统计分析；张斌、叶航（石家庄市兽用生物制品供应站）：负责实验方法的建立以及优化；李永娟、彭科、丁子涵、王耀国（张家口市动物疫病预防控制中心）：负责特异性、敏感性、重复性试验等实验室操作；苏晓梅、张承礼、吴志国、李健坤（沧州市动物疫病预防控制中心）：负责临床样品采集、筛选与处理；葛辉（涿州市动物疫病预防控制中心）：负责验证实验的组织汇总。

（三）主要工作过程

1. 预研阶段

在天津测易生物科技有限公司发起的非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测试剂盒研发项目的资助下，开展非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法标准的起草工作。

首先成立了标准起草技术专家组，研讨标准框架、内容以及涉及的技术方法；其次根据项目任务书的要求，按照技术专家组研究确定的标准起草内容，组织相关技术领域专家，成立标准起草编制工作组，编制工作组根据要求和制定的方案，开展本标准制定工作并按照制订的时间进度表组织实施。

2. 起草阶段

标准起草编制工作组对现有的文献和标准技术库的相关材料进行了查阅和梳理，明确了现有非洲猪瘟病毒检测方法技术，这些技术资料主要有两类：（1）国内相关诊断技术标准、规范、法律、法规等，包括《非洲猪瘟诊断技术》（GB/T 18648-2020）等；（2）诊断技术研发资料，如酶联免疫吸附试验（ELISA）、间接免疫荧光试验等中、外文文章、专利等资料；

标准起草编制工作组成员结合自身实验室前期研究成果根据上述技术资料并按照标准撰写资料，如 GB/T1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第4部分：试验方法标准》的要求完成《非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法》初稿的撰写。

3. 征求意见阶段

4. 审查阶段（未经审查的不写本部分）

5. 报批阶段（未报批的不写本部分）

二、标准编制原则和确定标准主要内容的依据

（一）标准的编写原则

1. 政策性原则：本标准编写过程遵循国家相关法律、法规和国家标准。
2. 先进性原则：以国内外相关文献资料为参考，力求反映该领域最新的科技成果。以国内同类标准制订编写方法为基础，对本标准进行规范、充实和创新，使之具有先进性。
3. 经济性原则：在本标准编制过程，从获取信息、起草、实验室及试验验证到形成征求意见稿的各个环节，在确保质量的前提下力行节约，利用有限的经费圆满完成各阶段工作。
4. 适用性原则：标准借鉴国内外非洲猪瘟诊断技术和磁微粒化学发光方法，

并经实验室与应用验证，且完全按照国家标准的要求编写，内容全面，形式规范，可操作和实用性强。

5. 协调统一性原则：本标准参照国内相关标准的编写形式和表达方法，力求与国内相关标准的协调统一。
6. 规范化原则：本标准是严格按照 GB/T 1.1-2020 和 GB/T 20001.4-2015 的要求来编写。

（二）提出本标准的依据

本标准依据起草单位科研成果、参考有关文献资料，同时通过实验室研究验证并参考其他资料后经验证提出。

本文件规定了非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法的试剂、仪器设备、耗材、操作步骤、结果判定。

本文件适用于磁微粒化学发光法检测猪血清中非洲猪瘟病毒抗体。

（三）制定本标准的基础

本项目起草人员为中国动物疫病预防控制岗位专家，本项目起草负责人所在实验室从事猪疫病研究已达 20 余年，完成了多项省部级科研项目。系统开展了非洲猪瘟的病原学与流行病学、诊断、防控技术等研究，发表多篇相关研究论文，因此在非洲猪瘟病原检测与防控技术方面有雄厚的研究工作基础。同时本项目起草工作组依托河北省动物疫病预防控制中心检测实验室，联合石家庄市动物疫病预防控制中心、石家庄市兽用生物制品供应站、张家口市动物疫病预防控制中心、涿州市动物疫病预防控制中心等多家省市级动物疫病预防控制中心共同研究。具有良好的实验设备，具备制定本标准的技术水平与实力。

（四）实验内容

本标准根据现有非洲猪瘟病毒检测方法的国内标准并结合相关文献等技术资料，提出了一种利用磁微粒化学发光技术结合免疫法检测非洲猪瘟病毒抗体的方法。

（五）实际应用效果

采用本标准磁微粒化学发光抗体检测方法，检测实验室采集到的不同地区的 276 份临床样品进行试验，与国标检测方法对比，两个方法的 Kappa 值为 0.98，说明两种方法的符合率较高。

三、主要试验或验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果

（一）主要试验或验证的分析

本标准中非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法，主要内容是通过对猪血清中非洲猪瘟病毒抗体效价的检测，以达到监测猪群体免疫水平的目的。

1 材料

1.1 试剂和材料

1.1.1 反应杯。

1.1.2 猪瘟病毒(CSFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)、猪圆环病毒(PCV)、伪狂犬病病毒(PRV)、猪肺炎支原体(Mhp)标准阳性血清与非洲猪瘟的血清阳性样品、非洲猪瘟的血清阴性样品。

1.1.3 预激发液和激发液。

1.1.4 非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测配套试剂盒（天津测易生物科技有限公司）

1.1.5 非洲猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒，北京金诺百泰生物技术有限公司，兽药生字 010678902。

1.1.6 20×清洗液

1.2 仪器和设备

1.2.1 全自动化学发光免疫分析仪 CY-198

1.2.2 生物安全柜

1.2.3 离心机（8000 rpm）

1.2.4 电子天平

1.2.5 可调单道移液器 (0.1 μL ~ 2.5 μL , 2 μL ~ 20 μL , 20 μL ~ 200 μL , 100 μL ~ 1000 μL)

1.2.6 冰箱

2 方法

2.1 样品的采集及运输

样品采集按照 NY/T 541 进行。采集静脉血后, 将血样室温下倾斜 30° 静置 2 h ~ 4h, 待血液凝固有血清析出时, 无菌剥离凝血块, 然后置 2℃ 冰箱过夜, 待大部分血清析出后即可取出血清, 必要时可低速离心 (1000 g 离心 10 min ~ 15 min) 分离出血清。采集的血清样品在无法于 12h 内送检的情况下, 应放于 -20℃ 冻存。

血清样本运输时应注意 2℃ ~ 8℃ 冷藏。

样品检测前 8000 rpm 离心 2 min, 取上清放于 1.5 mL 尖底离心管中, 体积应大于 300 μL , 待检; 若样品中存在沉淀或絮状物等杂质, 应离心去除杂质, 轻柔操作, 避免出现泡沫。

2.2 溶液配制

洗涤液: 将 20 \times 浓缩洗液用无离子水或蒸馏水 1:20 倍稀释, 装入洗涤液桶。

去离子水或蒸馏水均应符合 GB/T 6682 的要求。

2.3 ROC 曲线拟合

用本研究建立的非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法检测 96 份病毒抗体阳性血清样品, 83 份病毒抗体阴性血清 (北京金诺百泰生物技术有限公司非洲猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒检测确定), 检测结果按照 $PI \text{ 值} = (\text{样本发光值} / \text{阴性对照发光值}) \times 100\%$ 进行计算。用 SPSS 26.0 软件绘制 ROC 曲线, 以 Youden 指数最大时对应的 PI 值作为临界值。

2.4 重复性测试

选取 3 份猪血清样品 (由北京金诺百泰生物技术有限公司非洲猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒检测确定的 2 份 ASFV 抗体阳性血清样品和 1 份 ASFV 抗体阴性血清样品), 进行重复 20 次检测, 根据血清样品的发光值分析计算变异系数。

2.5 敏感性试验

分别采用本标准的非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法和北京金诺百泰生物技术有限公司非洲猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒，对已知背景的 30 份临床血清样品进行检测，统计本方法对临床血清样品的检出率，并与北京金诺百泰生物技术有限公司非洲猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒检测结果进行对比。

2.6 特异性试验

按照本标准的非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法检测已知非洲猪瘟病毒抗体阴性的 CSFV 阳性血清 5 份、PRRSV 阳性血清 5 份、PCV 阳性血清 5 份、PRV 阳性血清 5 份、Mhp 阳性血清 5 份，共 25 份特异性血清临床样本。

2.7 临床样品检测

分别采用本标准的非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法和北京金诺百泰生物技术有限公司非洲猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒同时检测 276 份临床采集的样品，统计结果，比较二者的检测结果，并计算两种方法的符合率。

3 结果

3.1 阴阳性判定标准的建立

用本标准的非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法检测 96 份病毒抗体阳性血清样品，83 份病毒抗体阴性血清（北京金诺百泰生物技术有限公司非洲猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒检测确定），检测结果按照 $PI \text{ 值} = (\text{样本发光值} / \text{阴性对照发光值}) \times 100\%$ 进行计算。用 SPSS 26.0 软件绘制 ROC 曲线，以 Youden 指数最大时对应的 PI 值作为临界值。当 PI 值为 19.90% 时，Youden 指数最大时为 0.926，ROC 曲线下面积（AUC）为 0.993，显著性水平（面积 = 0.5） $P = 0.004$ 。结果如图 1 显示。即定义：PI 值 $\leq 20\%$ 时，判为 ASFV 抗体阳性；PI 值 $> 20\%$ 时，判为 ASFV 抗体阴性。

图 1.ASFV 抗体 ROC 曲线

3.2 重复性实验结果

选取 3 份猪血清样品(由北京金诺百泰生物技术有限公司非洲猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒检测确定的 2 份 ASFV 抗体阳性血清样品和 1 份 ASFV 抗体阴性血清样品), 进行重复 20 次检测, 结果表明非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法稳定性符合预期, CV 值均小于 5%。如表 1 所示。

表 1. 重复性检测结果

样品名称	重复次数	发光值	PI 值	平均值	标准差	变异系数
阳性样品 1	1	148772	8.13%	7.76%	0.26%	3.38%
	2	135407	7.40%			
	3	146630	8.01%			
	4	150218	8.21%			
	5	138991	7.60%			
	6	145798	7.97%			
	7	140045	7.65%			
	8	135722	7.42%			
	9	144847	7.92%			
	10	146507	8.01%			
	11	140833	7.70%			
	12	134003	7.32%			
	13	149909	8.19%			
	14	140887	7.70%			
	15	138531	7.57%			
	16	137473	7.51%			
	17	143230	7.83%			
	18	142483	7.79%			
	19	137325	7.51%			
	20	140873	7.70%			
阳性样品 2	1	90885	4.97%	5.08%	0.18%	3.60%
	2	95641	5.23%			
	3	98172	5.37%			

样品名称	重复次数	发光值	PI 值	平均值	标准差	变异系数
	4	89346	4.88%			
	5	91543	5.00%			
	6	96789	5.29%			
	7	88762	4.85%			
	8	93451	5.11%			
	9	97654	5.34%			
	10	87923	4.81%			
	11	94567	5.17%			
	12	92876	5.08%			
	13	89123	4.87%			
	14	95432	5.22%			
	15	90123	4.93%			
	16	96123	5.25%			
	17	88456	4.83%			
	18	93987	5.14%			
	19	97123	5.31%			
	20	89876	4.91%			
	1	735489	40.20%			
	2	768912	42.03%			
	3	712345	38.94%			
	4	756789	41.36%			
	5	778901	42.57%			
	6	723456	39.54%			
阴性样品	7	745678	40.76%			
	8	789012	43.13%			
	9	701234	38.33%			
	10	765432	41.84%	40.78%	1.37%	3.37%
	11	734567	40.15%			
	12	754321	41.23%			
	13	718901	39.29%			
	14	776543	42.44%			
	15	729876	39.89%			
	16	741234	40.51%			
	17	781234	42.70%			
	18	709876	38.80%			
	19	759876	41.53%			
	20	738901	40.39%			
	阳性对照发光值均值			36397		
	阴性对照发光值均值			1829542		

3.3 敏感性试验结果

分别采用本标准的非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法和北京金诺百泰生物技术有限公司非洲猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒，对已知背景的 30 份临床血清样品进行检测。结果显示非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法

对临床样品的阳性检出率为 100%，与北京金诺百泰生物技术有限公司非洲猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒检测结果一致。结果如表 2 所示。

表 2. 敏感性试验结果

样品编号	非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测			ELISA		
	发光值	PI 值	结果	OD _{450nm}	S/N	结果
1	1235499	66.40%	-	0.05	-0.02	-
2	523480	28.13%	-	0.06	-0.02	-
3	236546	12.71%	+	0.83	0.34	+
4	532080	28.60%	-	0.70	0.28	-
5	797276	42.85%	+	1.07	0.45	+
6	261487	14.05%	+	0.99	0.41	+
7	261405	14.05%	+	1.08	0.45	+
8	131956	7.09%	+	1.12	0.47	+
9	196487	10.56%	+	2.59	1.16	+
10	323987	17.41%	+	2.01	0.89	+
11	315463	16.95%	+	1.70	0.74	+
12	253911	13.65%	+	0.91	0.38	+
13	362028	19.46%	+	1.62	0.71	+
14	252949	13.59%	+	1.96	0.86	+
15	102432	5.51%	+	1.86	0.82	+
16	469242	25.22%	-	0.09	-0.01	-
17	610703	32.82%	-	0.71	0.28	-
18	827098	44.45%	-	0.63	0.24	-
19	1195752	64.27%	-	0.20	0.04	-
20	228441	12.28%	+	1.91	0.84	+
21	1017942	54.71%	-	0.24	0.06	-
22	1832503	98.49%	-	0.43	0.15	-
23	885942	47.61%	-	0.66	0.26	-
24	158620	8.52%	+	0.96	0.40	+
25	106244	5.71%	+	1.32	0.57	+
26	151680	8.15%	+	1.67	0.73	+
27	366831	19.72%	+	1.73	0.76	+
28	67787	3.64%	+	1.86	0.81	+
29	904071	48.59%	-	0.13	0.01	-
30	1051292	56.50%	-	0.36	0.12	-
	阳性对照发光值均值	36425	阳性对照	OD _{450nm} 均值	2.26	
	阴性对照发光值均值	1860648	阴性对照	OD _{450nm} 均值	0.10	

3.4 特异性试验结果

通过本标准的非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法对非洲猪瘟阴性的 CSFV 阳性血清 5 份、PRRSV 阳性血清 5 份、PCV 阳性血清 5 份、PRV 阳性血清 5 份、Mhp 阳性血清 5 份，共 25 份特异性血清临床样本进行检测，检测结

果均为阴性，表明该方法具有良好的特异性，特异性符合率 100%。结果如表 3 所示。

表 3. 25 份血清临床样品特异性试验结果

样品类型	样品编号	发光值	PI 值	结果
CSFV 阳性血清	1	1180908	63.67%	-
	2	1250920	67.44%	-
	3	1398021	75.37%	-
	4	1394893	75.20%	-
	5	1279359	68.98%	-
PRRSV 阳性血清	1	1212435	65.37%	-
	2	1547674	83.44%	-
	3	1145208	61.74%	-
	4	910372	49.08%	-
	5	1061284	57.22%	-
PCV 阳性血清	1	1327683	71.58%	-
	2	1556646	83.93%	-
	3	1004388	54.15%	-
	4	1373789	74.07%	-
	5	1423802	76.76%	-
PRV 阳性血清	1	1275509	68.77%	-
	2	1502576	81.01%	-
	3	573710	30.93%	-
	4	1394860	75.20%	-
	5	1458698	78.64%	-
Mhp 阳性血清	1	1243849	67.06%	-
	2	1431892	77.20%	-
	3	1234516	66.56%	-
	4	1144325	61.70%	-
	5	1219325	65.74%	-
阳性对照发光值均值		35731		
阴性对照发光值均值		1854790		

3.5 临床样品检测结果

用本标准的非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法和北京金诺百泰生物技术有限公司非洲猪瘟病毒 ELISA 抗体检测试剂盒同时检测 276 份临床采集的样品，统计结果，比较二者的检测结果，并计算两种方法的符合率。结果发现两个方法的 Kappa 值为 0.98，说明两种方法的符合率较高。结果如表 4 所示。

表 4. 276 份血清临床样品比对试验结果

非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测		
阳性	阴性	合计

	阳性	136	1	137
ELISA	阴性	2	137	139
	合计	138	138	276
	Kappa 值		0.98	

注:0<Kappa≤0.40,一致性较差;0.40<Kappa<0.75,中度一致性;Kappa≥0.75,高度一致性

(二) 预期的经济效果

非洲猪瘟可导致猪大量死亡，造成养殖业巨大经济损失。本标准制定的非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测方法单样本检测成本仅 10-20 元，全流程自动化检测仅需 15 分钟，较传统 ELISA（2 小时）效率提升 8-16 倍。能通过早期精准识别疫情，降低猪大规模染病死亡风险，减少养殖户经济损失，降低防控成本，从整体上提升养猪业经济效益。

(三) 真实性验证

送审前，将本检测方法送至三家有资质实验室进行验证。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度

通过联网检索，未发现非洲猪瘟病毒磁微粒化学发光抗体检测的标准。国内现行的关于非洲猪瘟病原诊断的国家标准、地方标准、行业标准以及团体标准的制定采用的检测方法是 ELISA 抗体检测法、间接免疫荧光方法、RT-PCR 方法和实时荧光 RT-PCR 方法方法，均不包含本标准制定的磁微粒化学发光抗体检测方法，所以本标准与国内相关标准无关。

本标准在制定过程中，充分考虑了畜牧业健康发展的市场需求，标准的技术指标合理、先进。

五、与现行的法律、法规和强制性国家标准的关系

该项目遵循国内现行法律法规，与国家标准、行业标准无冲突和交叉。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

无

七、标准性质（强制性，推荐性）的建议，特别是对建议批为强制性标准的理由应充分说明

建议将本标准批为推荐性标准。

八、贯彻标准的要求和建议措施（组织实施、技术措施、过渡办法等）

（一）组织实施

标准发布后,为了有效贯彻实施,建议中国兽医协会有关部门确定培训对象,对有关技术人员进行相关技术强化操作培训。

（二）技术措施

标准发布后,为了有效贯彻实施,建议以培训班的形式在不同层次、不同水平的应用单位推广本标准。

（三）实施办法

（1）本标准的实施,可由起草单位负责指导、培训,确保相关防治技术得到预期效果。

（2）标准起草单位,应注意搜集、跟踪、整理标准实施过程的反馈信息,以利于标准的完善和提高。

九、废止现行有关标准的建议;

无

十、其他应予说明的事项。

无

十一、标准中涉及专利的情况说明

无