

国生——ASF试纸条快检方案

中国农业科学院哈尔滨兽医研究所
动物用生物制品国家工程研究中心
哈尔滨国生生物科技股份有限公司
樊智博 13304510649

2019.05



非洲猪瘟防控的难点

非洲猪瘟：养猪业的头号杀手

- 严重危害养猪业的烈性传染病
- 死亡率可**高达 100%**
- OIE法定报告动物疫病
- 无商品化疫苗，依靠**检测+扑杀**
- **重大**的经济、政治和社会影响



非洲猪瘟防控的难点

ASFV的超强抵抗力

不怕冷、不怕脏、不怕咸

- ❑ 耐低温：4°C/1年以上
- ❑ 耐pH值范围广：pH 3.9-11.5
- ❑ 不同介质中存活力：在血液、粪便和组织中可长期存活，冻肉中存活数年-数十年，未熟肉品、腌肉、泔水中可长时间存活。

Resilience of ASFV across a variety of environmental conditions

Item	ASFV survival time
Meat with and without bone and ground meat	105 days
Salted meat	182 days
Cooked meat (minimum of 30 minutes at 70 °C)	0
Dried meat	300 days
Smoked and deboned meat	30 days
Frozen meat	1 000 days
Chilled meat	110 days
Offal	105 days
Skin/fat (seven dried)	300 days
Blood stored at 4 °C	18 months
Faeces at room temperature	11 days
Putrefied blood	15 weeks
Contaminated pig pens	1 month

Source: adapted from Nisbet, Opinion on African swine fever, *EPJ Special Topics*, 2010, 193: 1534.

Resistance to physical and chemical action

Temperature:	Highly resistant to low temperatures. Heat inactivated by 56°C/70 minutes; 60°C/20 minutes.
pH:	Inactivated by pH <3.9 or >11.5 in serum-free medium. Serum increases the resistance of the virus, e.g. at pH 13.4 – resistance lasts up to 21 hours without serum, and 7 days with serum.

非洲猪瘟防控的难点

流行病学

易感宿主	家猪、野猪（非洲、欧亚）、钝缘蜱
传染源	感染ASFV的家猪、野猪、软蜱、猪肉制品、精液、受污染的饲料、泔水、饮水、车辆、人员、靴子、注射器等
传播途径	直接或者间接接触、软蜱叮咬等多种方式



非洲猪瘟防控的难点

ASF全球流行情况



非洲猪瘟的诊断方法

临床诊断

- 类似**猪瘟**的症状（高热、皮肤发绀、便秘/腹泻、后驱无力）
- 脾脏异常肿大、内脏广泛出血

最急性型（强毒株）

- 无症状突然死亡，死亡率100%

急性型（强毒株）

- 死亡率100%
- 高热，耳、四肢、腹背部出血点、发绀
- 脾脏显著肿大、出血
- 淋巴结出血，肾脏斑点状出血

亚急性型和慢性型

- 局部皮肤红斑、溃疡或坏死，易继发感染，如肺炎和关节炎
- 死亡率低



非洲猪瘟的诊断方法

实验室诊断

类型	技术
病原学方法	红细胞吸附试验
	荧光抗体试验
	PCR: 国际贸易中OIE指定
	荧光定量PCR
	等温扩增技术 (CPA、RPA、LAMP)
	夹心ELISA、胶体金试纸条
血清学方法	ELISA (间接、阻断) : 国际贸易中OIE指定
	免疫荧光试验 (IFA)
	免疫过氧化物酶单层试验 (IPMA)

非洲猪瘟的诊断方法

基于PCR原理的诊断制品

检测
目标是病毒
的DNA

荧光PCR

核酸等温扩增
(LAMP)

附件

第一批非洲猪瘟现场快速检测试剂评价结果
(按生产企业名称首字母顺序排列, 不分先后)

类型	生产企业	试剂名称	诊断敏感性	诊断特异性	应用范围
PCR 类	北京明日达科技发展有限公司	非洲猪瘟病毒实时荧光 PCR 快速检测试剂盒	96.67%	100%	猪血液、脾脏、淋巴结、肾脏组织样品快速检测, 具体按试剂盒说明书。
	北京亿森宝生物科技有限公司	非洲猪瘟病毒实时荧光 PCR 快速检测试剂盒	100%	100%	
	哈尔滨元亨生物药业有限公司	非洲猪瘟病毒实时荧光 PCR 快速检测试剂盒	93.33%	100%	
	洛阳莱普生信息科技有限公司	非洲猪瘟病毒荧光 PCR 快速检测试剂盒	96.67%	100%	
	青岛立见诊断技术发展中心	非洲猪瘟病毒荧光定量 PCR 快速检测试剂盒	100%	100%	
	深圳真瑞生物科技有限公司	非洲猪瘟病毒微流控荧光 PCR 快速检测试剂盒	93.33%	100%	
	唐山怡安生物工程有限公司	非洲猪瘟病毒荧光 PCR 快速检测试剂盒	93.33%	100%	
	郑州中道生物技术有限公司	非洲猪瘟病毒荧光定量 PCR 快速检测试剂盒	100%	100%	
核酸等温扩增类	北京森康生物技术开发有限公司	非洲猪瘟病毒 LAMP 检测试剂盒	100%	100%	

非洲猪瘟的诊断方法

基于抗原抗体特异结合反应的诊断制品

免疫层析

.....

.....

	北京森康生物技术开发有限公司	非洲猪瘟病毒抗原检测试纸条	66.67%	100%	仅用于病(死)猪现场快速初步检测,具体按试纸条说明书。
试纸条类	哈尔滨国生生物科技股份有限公司	非洲猪瘟病毒抗原检测试纸条	70%	100%	仅用于病(死)猪现场快速初步检测,具体按试纸条说明书。

检测目标是病毒

非洲猪瘟的诊断方法

两种不同原理诊断方法的优缺点

	荧光PCR	免疫层析
优点	敏感性高	特异性好
	特异性好	敏感性较好
	研发简单	操作简单、快捷、便利和检测时间短
	检测谱广，对样品要求低	不需要设备、对操作环境要求低
		基本不用考虑样品的污染问题
缺点	操作复杂，检测时间长	敏感性较PCR方法低10倍，甚至以上
	需要设备，有时设备会影响实验结果	检测谱窄，对样品要求要高于PCR
	要有较好条件的实验室	研发有较高的难度，甚至十几年时间
	对检测人员的素质要求较高	
	很难实现高通量	
	容易污染	

非洲猪瘟抗原检测试纸条的应用方案

- 快检试纸条主要应用于发病诊断上，对疑似发病的猪群进行筛查，**十几分钟出结果，马上采取措施；精准快速实施拔牙战术！（动物疫控中心、监督所和养殖场）**
- **也应用于屠宰场的宰前初筛上，运猪车进场前先初筛一下，减小宰后检测阳性的风险。**

论文作者赵东明、刘任强等人利用2018年9月3日黑龙江省佳木斯疫情发病猪样品，接种猪原代肺泡巨噬细胞，成功分离出我国第一个ASFV毒株（Pig/HILJ/18）。分别采用红细胞吸附试验、免疫印迹试验、间接免疫荧光及电镜观察等试验系统鉴定了分离病毒株；Pig/HILJ/18在猪原代巨噬细胞显示良好复制能力，病毒滴度可达 10^8 HAU₅₀/ml以上。SPF猪肌注接种不同剂量Pig/HILJ/18后，2-3天血液病毒核酸检测阳性，3-4天出现发热等症状，4-5天口腔及肛拭子样品病毒核酸检测阳性，6-10天内接种猪全部发病死亡；病死猪剖检一般表现为急性出血性变化，部分脾脏极度

非洲猪瘟抗原检测试纸条的应用方案

方法：

将单克隆抗体和乳胶微球交联并应用免疫层析技术研制而成。

组成：

- 1、抗ASFV单克隆抗体-乳胶微球（黑色）：捕获抗体；
- 2、实验对照蛋白-乳胶微球（蓝色）：对照；
- 3、抗ASFV单克隆抗体：检测线（T线）；
- 4、抗对照蛋白单克隆抗体：质控线（C线）。

原理：

如果是阳性血液样品，则样品中的AFSV病毒与抗ASFV单克隆抗体-乳胶微球（黑色）结合形成ASFV-单抗-乳胶微球（黑色）复合物。该复合物通过毛细管作用在膜上继续向前迁移，并被吸附在检测线（T线）上的抗ASFV单克隆抗体再次捕获，呈现黑色线条。

质控线（C线）是验证本次检验是否有效的标准，呈现蓝色线条。

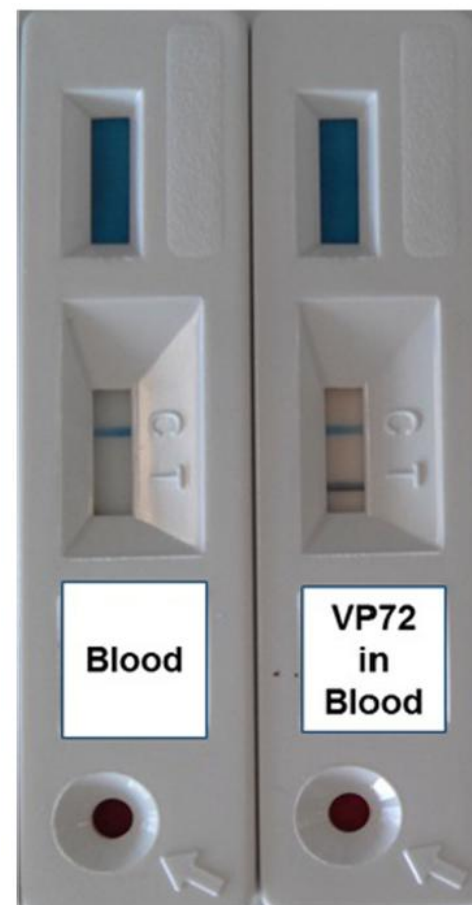


Fig. 1 Picture of the lateral flow device for ASFV detection. The left device shows a negative result using a blood sample from a healthy donor pig; where only the blue control line is detected. The right test shows a positive result by spiking the semi-purified VP72 protein in blood; in this scenario, the two lines, control line (blue) and test line (black) will appear

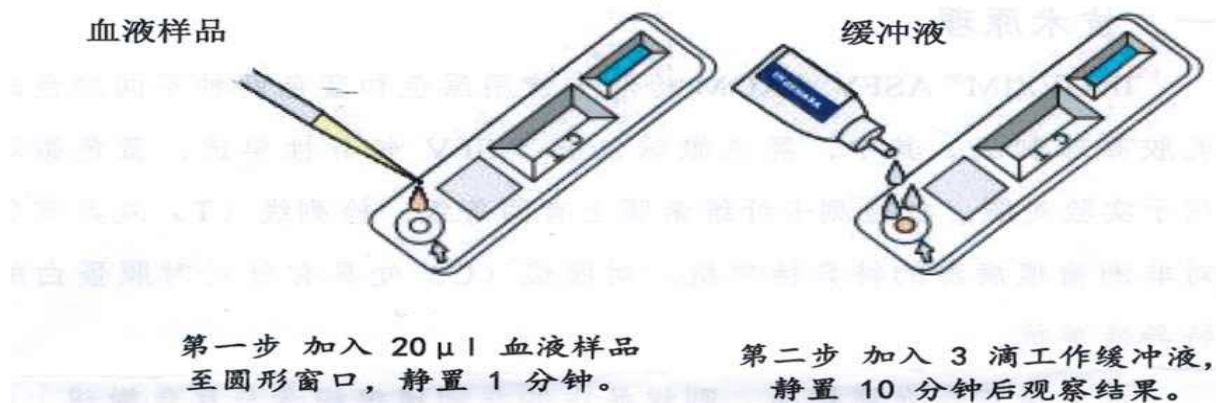
非洲猪瘟抗原检测试纸条的应用方案

三、样品

检测样品为：血液。血液样品应是新鲜采集或在 2~8℃ 保存不超过 4 天的全血样品。样品采集时，使用抗凝剂（EDTA）抗凝。不使用抗凝剂的血液样品中，可能含有凝血块，使样品在纤维素膜上迁移时受阻，影响检测结果。

非洲猪瘟抗原检测试纸条的应用方案

1. 使用前，将所有检测卡组分和样品放置在室温下恢复至室温。
2. 打开铝箔包装，取出检测卡，并将干燥剂丢弃。
3. 在检测卡圆形窗口处滴加 20 μ l 抗凝全血（图 1），静置 1 分钟。
4. 在该窗口处再次滴入 3~4 滴缓冲液，10 分钟后读取结果。

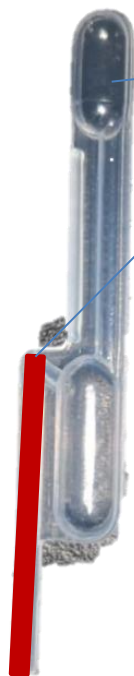




非洲猪瘟抗原检测试纸条的应用方案

国生ASF试纸条 实操加样说明

加样管 实物

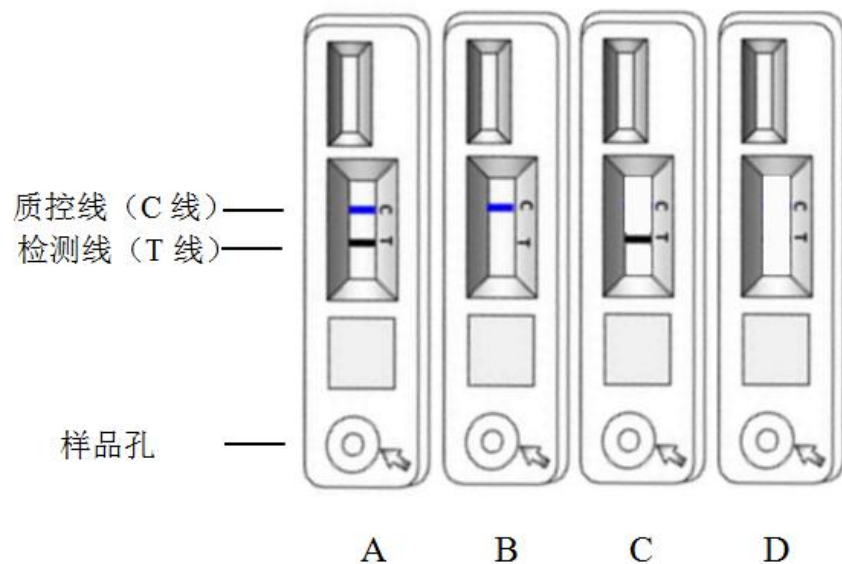


捏放吸球，吸取抗凝血。
吸取样品至下部球腔顶部水平高度，即为20微升，加入试纸条加样孔即可。

非洲猪瘟抗原检测试纸条的应用方案

2 判定

- 2.1 在试纸条上出现两条带（T 线为黑色和 C 线为蓝色），判为阳性（见示意图 A）。
- 2.2 在试纸条上仅出现一条蓝色条带（C 线），判为阴性（见示意图 B）。
- 2.3 在试纸条上 C 线处不出现蓝色条带，判为无效（见示意图 C 和 D）。



非洲猪瘟抗原检测试纸条检测结果判定示意图

非洲猪瘟抗原检测试纸条的应用方案

敏感性检测

Semi-purified VP72 viral protein

Inactivated tissue culture virus

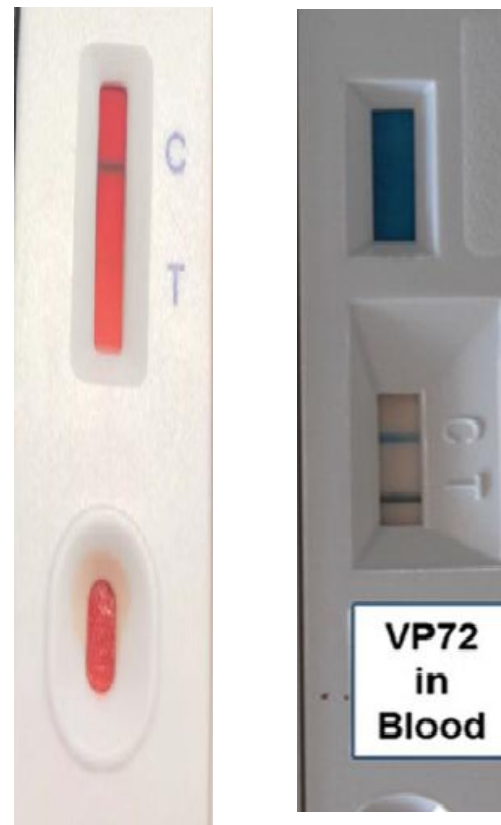
3ng/test

10^4 PFU/ml

目前发病猪的检测，95%以上。

特异性检测 100%

- 全血检测：95%以上的ASFV具有红细胞吸附性，红细胞上附着大量的病毒，更利于ASFV检测。
- 特制样品垫：采用特殊材料制备的样品垫，可最大程度吸附红细胞，避免检测框底色变红而影响判断。（尤其是弱阳性）。
- 特制缓冲液：含有特殊成份的缓冲液，可以将病毒粒子从红细胞上洗脱下来，在虹吸作用下向检测框快速迁移。
- 彩色乳胶微球：结果清晰易判。



质优价廉的新产品

- 一、哈尔滨国生生物科技股份有限公司非洲猪瘟国产原料的免疫层析技术胶体金抗原检测试纸条，正在申报新兽药证书，即将面世，将大幅度的降低终端用户的使用成本。敏感性、特异性均十分优异！





非洲猪瘟抗原检测试纸条的应用方案

质优价廉的新产品

- 二、哈尔滨国生生物科技股份有限公司全系列的非洲猪瘟诊断试剂盒即将面世，包括非洲猪瘟病毒ELISA抗原检测试剂盒、非洲猪瘟病毒荧光PCR检测试剂盒等。依托非洲猪瘟国家专业实验室哈尔滨兽医研究所的强大科研力量，将形成国内品种最全，证书最多，质量最好的非洲猪瘟诊断试剂拳头产品。

- 非洲猪瘟是目前危害养猪业最重要的病，没有之一！
- 生猪产业链的5000万从业人员，都应当站出来，一起防控非洲猪瘟！
- 相信国家的力量、相信科研的力量、相信我们中国人的智慧，我们能战胜非洲猪瘟！





谢谢大家！
欢迎批评指正！
樊智博13304510649