

世界动物卫生组织（OIE） 非洲猪瘟（ASF）参考实验室网络 对非洲猪瘟现场应用诊断 检测方法概述



世界卫生组织 (OIE) 非洲猪瘟 (ASF)

参考实验室网络对非洲猪瘟现场

应用诊断检测方法概述

主要作者:

Ken Inui⁽¹⁾, Carmina Gallardo⁽²⁾, Raquel Portugal⁽³⁾, Linda Dixon⁽³⁾, Carrie Baton⁽³⁾ & David Williams⁽⁴⁾

参与者:

Zhiliang Wang⁽⁵⁾, Livio Heath⁽⁶⁾ & Jose Manuel Sanchez-Vizcaino⁽⁷⁾

⁽¹⁾ 联合国粮食及农业组织 (FAO)、越南动物卫生部 (DAH)、越南农业和农村发展部 (MARD), 河内, 越南

⁽²⁾ 动物健康研究中心 (CISA)、西班牙国家农业研究与技术研究所 (INIA-CSIC)、国家研究理事会 欧盟非洲猪瘟参考实验室 (EURL), 巴尔德奥尔莫斯, 马德里, 西班牙

⁽³⁾ OIE ASF参考实验室、Pirbright研究所、Ash Road, Pirbright, 沃金, 萨里, 英国

⁽⁴⁾ OIE ASF参考实验室、联邦科学与工业研究组织 (CSIRO)、澳大利亚疾病预防中心, 吉朗, 维多利亚州, 澳大利亚

⁽⁵⁾ OIE ASF参考实验室、国家外来动物疫病研究中心、中国动物卫生与流行病学中心, 青岛, 中国

⁽⁶⁾ OIE ASF参考实验室、Onderstepoort兽医研究所、农业研究委员会, Onderstepoort, 南非

⁽⁷⁾ OIE ASF参考实验室、兽医卫生监督中心 (VISAVET)、马德里康普顿斯大学, 马德里, 西班牙

© 世界动物卫生组织, 2022年2月

封面照:

在越南现场检测病原体/Ken Inui

国家农业检疫检验局 (NAQIA) 的Pius Clement在巴布亚新几内亚进行检查/大卫·威廉姆斯



免责声明:

本文概述了目前OIE ASF参考实验室网络在商用护理点 (PoC) 检测方面的最新认知。本文提及的特定公司或厂商的产品, 无论这些产品是否已获得专利, 并不意味着这些公司或产品已优先于未提及的其他类似性质的产品而获得OIE的认可或推荐。所有商业化试剂盒均应根据 OIE 国际标准进行验证。OIE登记簿中包含的所有商业试剂盒均由OIE认证为经过验证且适合其用途。本文中不包含的PoC检测不在OIE登记簿中, 也未在OIE陆生动物诊断试验与疫苗手册中描述。

OIE登记簿可在以下网址查阅: <https://www.oie.int/en/what-we-offer/veterinary-products/#ui-id-5>

简介



在越南使用便携式PCR进行现场检测 / Ken Inui

我们无法通过临床或尸检将非洲猪瘟（ASF）与猪的其他发热性出血综合征或细菌性败血症区分开来。因此，实验室检测对诊断ASF至关重要，也是ASF监测活动成功的关键。

OIE陆生动物诊断试验与疫苗手册（陆生手册）的第3.9.1章中描述了国际公认的ASF诊断标准。然而，在某些情况下，使用陆生手册中描述的诊断检测方法无法及时提交、处理和检测样本。

拥有在疾病爆发点检测ASF的能力使我们能够对疾病的爆发迅速做出反应，并有效控制疾病广泛传播。

尽管没有被列入经OIE认证的诊断试剂盒登记簿，但有几个被称为笔旁或现场检测（PoC检测）的诊断平台，仍可出于商业目的用于现场检测。其中包括基本的快速检测试剂盒，使用横向流动装置检测抗原或抗体。这种试剂盒简单易用，只需极少培训便能操作，并能在大约20分钟内提供结果。



ASF检测结果呈阳性

快速抗体检测通常具有与实验室酶联免疫吸附试验（ELISA检测法）相当的灵敏度和特异性，但与免疫过氧化物酶单层试验等参考试验相比，灵敏度较低。这些试验可用于检测在感染后存活下来的或存活时间足以进行血清转化的猪体内抗体。

抗原快速检测方法的灵敏度通常逊于病毒分子检测技术，但有些抗原检测具有水平相当的特异性。建议将抗原检测用于病毒血症水平高、有症状和疾病末期的猪，而不是用于处于临床感染早期阶段的猪，这些猪的病毒血症可能尚不足以检测。建议对多头病猪的样本进行检测，以增加检测到感染的机会。

此外，现在有多个分子平台，可以在受感染的猪只内进行灵敏度极高的ASF病毒DNA检测，甚至在疾病的早期阶段也可以。这些试验还可在需求点（例如屠宰场、机场或山猪/野猪栖息地）用于检测受污染的尸体、猪肉和环境样本。然而，这些平台在技术层面上比快速抗体或抗原检测更复杂，需要更高水平的培训和能力才能准确检测。在许多情况下，现场分子检测还需要昂贵的设备扩增和提取病毒DNA。



ASF检测结果呈阴性

使用方法的选择受到多种因素影响，包括成本、易用性和培训要求。简单的快速检测可能仅适用于如资源匮乏的环境等某些情况。如果成本不是主要影响因素，且操作员可以自信地接受高水平的能力培训时，应首选更先进的分子平台。对于某些国家来说，可以根据检测的具体环境（例如农场、屠宰场、肉类市场、入境口岸）和可用资源采用各种检测组合。

本文旨在总结 OIE ASF 参考实验室网络目前对商用PoC检测的认知，包括一系列技术细节、成本以及每种检测的优缺点。这些检测的选择是基于对检测或平台进行评价的同行评议出版物或作者在实验室进行的独立评估。需要注意的是，在ASF疾病控制计划中，PoC检测是实验室检测的一个非常有用的辅助手段，但它不能替代实验室检测。使用本文所述的PoC检测得到的结果需要由实验室使用陆地手册第3.9.1章中描述的诊断检测来确认。



表1. 四个主要的ASF病毒检测平台对比

	抗原检测	DNA检测		
	护理点 (PoC) 检测			实验室
检测	快速检测 (横向流动装置)	等温 (LAMP、Pockit 等)	移动实时荧光定量PCR	实验室的 实时荧光定量 PCR
预期用途	筛查检测	具有高灵敏度和特异性的PoC检测		确诊试验
标本类型	全血、血清、血浆*	全血、血清、血浆、组织、拭子*	全血、血清、血浆、组织、拭子*	全血、血清、血浆、组织、拭子、猪肉、环境样本
灵敏度	低到中	高	高	高
特异性	高	高	高	高
培训要求	无 (低)	有	有	有
检测时间	15至30分钟	40至120分钟	60至120分钟	60至120分钟, 外加样品运输时间
每次检测费用 (US\$)	2.50至14.00	4.00至23.00 包括DNA提取	5.00 至 15.00 包括DNA提取	6.00至15.00 包括DNA提取
设备成本 (US\$)	无	1,000至15,000	7,000至15,000	30,000+
优点	快速 (PoC早期检测)	高灵敏度和特异性	高灵敏度和特异性	高灵敏度和特异性
	简单易用 (任何人都可以操作)	PoC检测	PoC检测	官方确认的检测
	便宜			高通量
				经过验证的检测方法和商业化试剂盒
缺点	灵敏度低到中等, 但对于重症和垂死的动物来说已足够	设备成本相对较高	设备成本相对较高	设备成本高
				专业的实验室要求
				训练有素的操作人员
用途	爆发调查	爆发调查	爆发调查	爆发调查
	对病猪进行常规检测	对病猪和死猪的常规检测	对病猪和死猪的常规检测	对病猪和死猪的常规检测
		检疫	检疫	检疫
		生物安全检查	生物安全检查	生物安全检查
				调运控制
				监测
注释	对新产品进行需求评估	许多产品即将推出。未来的主要工具?		金标准
		适用于小型实验室。有自动化系统。		

* 部分检测是为特定类型的样本设计的; 据报告, 对某些平台的样本类型的评估有限。

表2. 四种主要的用于ASF病毒抗原快速检测的PoC检测方法对比

检测	Ingenasa	Bionote	PenCheck™	深圳绿诗源生物技术有限公司
目录编号	INgezim ASF CROM Ag (11.ASFV.K.42)	Anigen ASFV Ag Rapid Test (RG1407DD)	Rapid Screening Test for ASFV (PC-888)	SLB ASF Antigen Detection RDT
网址	ingenasa.eurofins-technologies.com/home/	www.bionote.co.kr	www.penchecktest.com/	lsybt.com/En
样本类型	全血	全血、血清、血浆	全血	全血
形式	横向流动测定	横向流动测定	试纸	横向流动测定
评估水平	同行评议的已发表期刊文章			同行评议的已发表期刊文章
	参考实验室的独立评估	参考实验室的独立评估	参考实验室的独立评估	独立实验室评估
灵敏度	低到中 (~68%)	低到中*	低*	低到中 (~65%)
特异性	高 (98%)	中*	中到高*	中度 (~76%)
培训要求	低	低	低	低
检测时间	15分钟	20 min	25至30分钟	15至20分钟
每次检测费用 (US\$)	5.80至10.45 (取决于包装大小)	13.90	2.50	3.50
设备成本	无	无	无	无

表2 续. 四种主要的用于ASF病毒抗原快速检测的PoC检测方法对比

检测	Ingenasa	Bionote	PenCheck™	深圳绿诗源生物技术有限公司
优点	快速 (PoC早期检测)	快速 (PoC早期检测)	快速 (PoC早期检测)	快速 (PoC早期检测)
	简单易用 (任何人都可以操作)	简单易用 (任何人都可以操作)	培训要求最低 (例如移液器的使用)	简单易用 (任何人都可以操作)
	便宜	便宜	便宜	便宜
	没有设备成本	没有设备成本	所需设备最少 (用于等分检测试剂的移液器和吸头)	没有设备成本
	高特异性		中到高特异性	
缺点	灵敏度低到中等, 但对于重症和垂死的动物来说已足够	灵敏度低到中等, 但对于检测病重和垂死的动物来说已足够; 特异性中等 (→假阳性)	灵敏度低	灵敏度低到中等, 但对于检测病重和垂死的动物来说已足够; 特异性中等 (→假阳性)
注释	在CISA-INIA, ACDP-, NVLD和Pirbright进行了评估。分析灵敏度在6-7 log ₁₀ TCID ₅₀ ASFV (加标血液) 和 7.75 log ₁₀ TCID ₅₀ (实验性感染的猪的血液) 之间 (Pirbright)。	在 ACDP 使用实验性感染的猪的血液进行评估: 68% 的 PCR* 阳性样本为阳性; 90% 的 PCR阴性样本为阴性	在 ACDP 使用实验性感染的猪的血液进行评估: 27% 的 PCR* 阳性样本为阳性; 92% 的 PCR阴性样本为阴性	同行评审已发表期刊文章
参考	Sastre等人 (2016a)	尚未有同行评议的出版物	尚未有同行评议的出版物	Matsumoto等人 (2020)

*ACDP用Zsak 等人(2005)描述的内部 ASF PCR进行评估

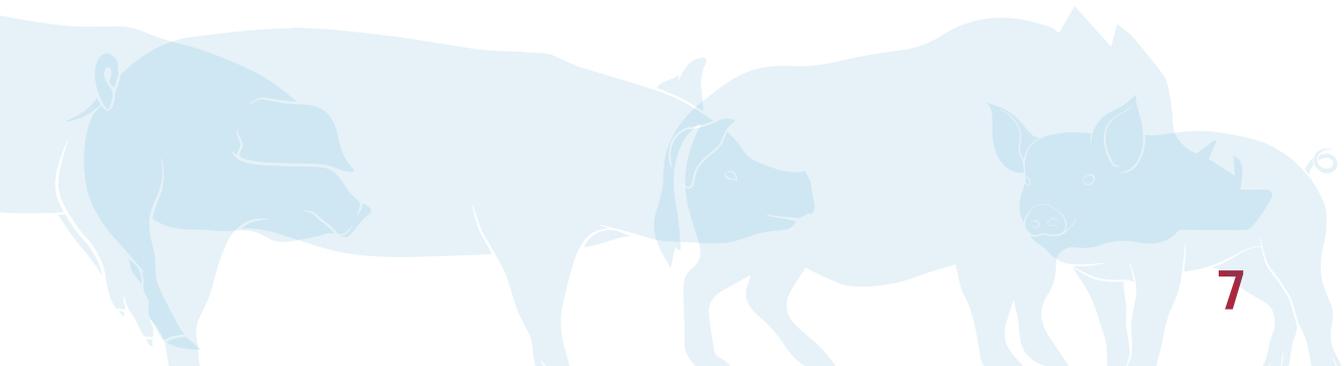


表3. 三种主要的用于ASF病毒抗体快速检测的PoC检测方法对比

检测	Ingenasa (ASFV/CSFV双重)	Ingenasa (ASFV)	Global Dx
目录编号	INGEZIM ASFV-CSFV CROM Ab (11.SFV.K41)	INGEZIM PPA CROM (11.PPA. K41/25)	GDX70-2 Herdscreen® ASF Antibody
网址	ingenasa.eurofins-technologies.com/home	ingenasa.eurofins-technologies.com/home	globaldx.com
样本类型	全血、血清	全血、血清、血浆	全血、血清、血浆
形式	横向流动测定	横向流动测定	横向流动测定
评估水平	同行评议的已发表期刊文章	同行评议的已发表期刊文章	
	参考实验室的独立评估	参考实验室的独立评估	参考实验室的独立评估
敏感性	中到高 (CSFV-92%/ ASFV-87%)	中到高 (与免疫过氧化物酶单分子层测定[IPMA]灵敏度相比为82%，与ELISA的相似性为99%；IPMA数据由野猪样品获得)	中到高的分析敏感性。(与IPMA的相似性为86.2%。相当于或高于商业化ELISA的灵敏度)
特异性	高 (98.4%-CSFV/ASFV-100%)	高 (与ELISA的相似度为99.9%。与IPMA的特异性相比96%[IPMA数据由野猪样品获得])。	高 (与参考技术IPMA的相似度为100%)
培训要求	低	低	低
检测时间	15至30分钟	15至30分钟	15至30分钟
每次检测费用 (US\$)	16.38	5.43 至 (取决于包装尺寸)	4.80
设备成本	无	无	无

表3 续. 三种主要的用于ASF病毒抗体快速检测的PoC检测方法对比

检测	Ingenasa (ASFV/CSFV双重)	Ingenasa (ASFV)	Global Dx
优点	快速 (PoC早期检测) 简单易用 (任何人都可以操作) 便宜 没有设备成本 CSFV-ASFV的鉴别诊断	快速 (PoC早期检测) 简单易用 (任何人都可以操作) 便宜 没有设备成本	快速 (PoC早期检测) 简单易用 (任何人都可以操作) 便宜 没有设备成本
缺点	对ASFV抗体检测的诊断灵敏度为中度。 建议与Ag LFA并行使用。	对ASFV抗体检测的诊断灵敏度为中度。 建议与Ag LFA并行使用。	需要进一步的现场验证
注释	在CISA-INIA和NRL对ASFV进行评估和验证。	在CISA-INIA和NRL对ASFV进行了评估和验证。 在Pirbright检测的17个IgM或IgG阳性样本中, 15个经LFD检测为阳性 (8个弱阳性)。	在CISA-INIA和Pirbright进行评估和验证。
参考	Sastre等人 (2016b)	Cappai等人 (2017)	尚未有同行评议的出版物



菲律宾一散养猪场的工人在抽取样本进行检测/菲律宾动物产业局 (BAI)

表4. 用于快速ASF病毒DNA检测的现场PCR系统对比

系统 iiPCR		检测方法					
		iiPCR+DNA 提取(全自动)	LAMP	qPCR	qPCR	qPCR	
厂商		GeneReach	GeneReach	OptiGene	Tetracore	Indical	Genesig
网址		www.genereach.com	www.genereach.com	www.optigene.co.uk	tetracore.com	www.indical.com	www.genesig.com/home
PoC仪器	仪器	POCKIT Micro Duo 核酸分析仪	POCKIT Central	Genie III	T-CORE8	Indifield 便携式PCR系统	Genesig q16 qPCR仪
	目录编号	apmd	apcc	Gen3-01	T-CORE8	IF-IN6010093	Z-gene-sig-q16
	孔位数量	4	8	8	8 (独立)	9	16
	检测时间	45分钟	45分钟	30分钟	60分钟	30-60分钟	60分钟
	电源	电池	100-240 V	电池 /100-240 V	电池 /100-240 V	电池 /100-240 V	100-240 V
	检测颜色	2	2	2	最多6个	2	2
	PCR管	包含在试剂盒中	包含在试剂盒中	标准 200ul	厂商提供	标准 200ul	厂商提供
	重量 (kg) 费用 (US\$)	0.43 3,000	21 30,000	1.75 18,000	4.5 20,000	1.2 9,000	2 9,000
核酸检测试剂	厂商的ASF试剂盒	POCKIT ASFV 试剂组; 冻干	ASFV预混料筒; 冻干	否	ASF w/IC (96次反应) 湿法测定	Virotype ASFV PCR 试剂盒/IndiField ASFV PCR; 冻干	Z-Path-ASFV
	内部*	否	否	是	是	是	否
	商业化试剂盒**	否	否	是	是	是	否
	每次检测费用 (US\$)	8	15 (包括DNA提取)	4至23	5至15	5至15	5至15
DNA提取	仪器	taco Mini (8孔); 电池供电; US\$6000	包含在PCR中	否	否	否	否
	厂商的试剂盒	预装 taco 核酸提取试剂盒 (atc-pd/rna)	包含在PCR中	否	(Mag-MAX-96 总RNA 分离试剂盒)	M1样本预处理筒试剂盒	Genesig 简易DNA/RNA 提取试剂盒
	样本类型	全血、血清、组织	全血、血清、组织	血清、拭子***	全血、组织	全血、血清、血浆、组织、拭子	各种样本类型
	时间	30分钟	40分钟	95°C 2分钟	30分钟	2分钟	60分钟
	每次检测费用 (US\$)	5.00	0.00	0.00	5.00至10.00	5.00至10.00	5.00至10.00

表4续. 用于快速ASF病毒DNA检测的护理点PCR系统对比

系统 iiPCR		检测方法					
		iiPCR+DNA提取(全自动)	LAMP	qPCR	qPCR	qPCR	qPCR
厂商		GeneReach	GeneReach	OptiGene	Tetracore	Indical	Genesig
性能	灵敏度	高	高	中	高	高	高(LOD<100)
	特异性	高	高	高	高	高	高
	培训要求	中	低	高	高	高	高
	评估水平	由FAO评估	同行评审的期刊文章	同行评审的期刊文章	同行评审的期刊文章	同行评审的期刊文章	同行评审的期刊文章
参考	尚未有同行评议的出版物	Tran等人 (2021)	Mee等人 (2020)	Liu等人 (2019)	Daigle等人 (2020); Elnagar等人 (2021)	尚未有同行评议的出版物	
优点	设备成本低	全自动, 只需装入样本即可	无需提取DNA	与基于实验室的qPCR相同	与基于实验室的qPCR相同	与基于实验室的qPCR相同	
	电池供电自动提取DNA	无需培训					
缺点		设备: 成本高					

*OIE推荐的经过验证的内部实时PCR检测是King等人 (2003) 和Fernandez-Pinero等人 (2013)。

**目前已验证的PCR商业化试剂盒: INgene q PPA, INGENASA. 11.PPA.K.5TX/Q; Tetracore TC-9017-064; Virotype ASFV PCR Kit, INDICAL BIOSCIENCE; LSI VetMAX™ Thermo Fisher Scientific; IDEXX RealPCR ASFV Mix, IDEXX; ID Gene® African Swine Fever Duplex – IDVet; ADIAVET ASFV REAL TIME 100R, BIO-X DIAGNOSTICS.

Commercial LAMP kit available from Geneworks (<https://geneworks.com.au/>; KIT-ASFV-96P).

可从 Geneworks (<https://geneworks.com.au/>; KIT-ASFV-96P) 获得商业化 LAMP 试剂盒。

***如果在LAMP检测之前提取DNA, 则可以检测其他类型的样本, 例如全血和组织 (James等人., 2010)。

Thermo Fisher Scientific LSI S.A.S.制造的 VetMAX™ 非洲猪瘟病毒检测试剂盒 (Taqman® 实时 PCR) 包含在 OIE 诊断试剂盒登记簿中, www.oie.int/en/what-we-offer/veterinary-products/diagnostic-kits/the-register-of-diagnostic-kits/

致谢

该项计划是日本国民通过日本农林水产省提供的资金支持来完成的, 谨此深表谢意。

参考文献

- Cappai S., Loi F., Coccollone A., Cocco M., Falconi C., Dettori G., Feliziani F., Sanna M.L., Oggiano A. & Rolesu S. (2017). – Evaluation of a Commercial Field Test to Detect African Swine Fever. *Journal of Wildlife Diseases*, **53** (3), 602–606. <https://doi.org/10.7589/2016-05-112>
- Daigle J., Onyilagha C., Truong T., Le V.P., Nga B., Nguyen T.L., Clavijo A. & Ambagala, A. (2021). – Rapid and highly sensitive portable detection of African swine fever virus. *Transboundary and Emerging Diseases*, **68** (2), 952–959. <https://doi.org/10.1111/tbed.13770>
- Elnagar A., Pikalo J., Beer M., Blome S. & Hoffmann B. (2021). – Swift and Reliable 'Easy Lab' Methods for the Sensitive Molecular Detection of African Swine Fever Virus. *International Journal of Molecular Sciences*, **22** (5), 2307. <https://doi.org/10.3390/ijms22052307>
- Fernández-Pinero J., Gallardo C., Elizalde M., Robles A., Gómez C., Bishop R., Heath L., Couacy-Hymann E., Fasina F.O., Pelayo V., Soler A. & Arias M. (2013). – Molecular diagnosis of African Swine Fever by a new real-time PCR using universal probe library. *Transboundary and Emerging diseases*, **60** (1), 48–58. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01317.x>
- James H.E., Ebert K., McGonigle R., Reid S.M., Boonham N., Tomlinson J.A., Hutchings G.H., Denyer M., Oura C.A., Dukes J.P. & King D.P. (2010). – Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods*, **164** (1–2), 68–74. Epub 2009 Dec 4. PMID: 19963011. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.11.034>
- King D.P., Reid S.M., Hutchings G.H., Grierson S.S., Wilkinson P.J., Dixon L.K., Bastos A.D. & Drew T.W. (2003). – Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus. *Journal of Virological Methods*, **107** (1), 53–61. [https://doi.org/10.1016/s0166-0934\(02\)00189-1](https://doi.org/10.1016/s0166-0934(02)00189-1)
- Liu L., Atim S., LeBlanc N., Rauh R., Esau M., Chenais E., Mwebe R., Nelson W.M., Masembe C., Nantima N., Ayebazibwe C. & Ståhl K. (2019). – Overcoming the challenges of pen-side molecular diagnosis of African swine fever to support outbreak investigations under field conditions. *Transboundary and Emerging Diseases*, **66** (2), 908–914. <https://doi.org/10.1111/tbed.13103>
- Matsumoto N., Siengsan-an-Lamont J., Gleeson L.J., Douangneun B., Theppangna W., Khounsy S., Phommachanh P., Halasa T., Bush R.D. & Blacksel S.D. (2020). – Evaluation of the diagnostic accuracy of an affordable rapid diagnostic test for African swine fever antigen detection in Lao People's Democratic Republic. *Journal of Virological Methods*, **286**, 113975. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113975>
- Mee P.T., Wong S., O'Riley K.J., da Conceição F., Bendita da Costa Jong J., Phillips, D.E., Rodoni B.C., Rawlin G.T. & Lynch S.E. (2020). – Field Verification of an African swine fever Virus Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay During an Outbreak in Timor-Leste. *Viruses*, **12** (12), 1444. <https://doi.org/10.3390/v12121444>
- Sastre P., Gallardo C., Monedero A., Ruiz T., Arias M., Sanz A., & Rueda P. (2016a). – Development of a novel lateral flow assay for detection of African swine fever in blood. *BMC Veterinary Research*, **12**, 206. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0831-4>
- Sastre P., Pérez T., Costa S., Yang X., Råber A., Blome S., Goller K.V., Gallardo C., Tapia I., García J., Sanz A. & Rueda P. (2016b). – Development of a duplex lateral flow assay for simultaneous detection of antibodies against African and Classical swine fever viruses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **28** (5), 543–549. <https://doi.org/10.1177/1040638716654942>
- Tran H., Le N.T., Pham B.P., Luu V.Q. & Nguyen V.L. (2021). – Evaluation of an automated insulated isothermal polymerase chain reaction system for rapid and reliable, on-site detection of African swine fever virus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **259** (6), 662–668. <https://doi.org/10.2460/javma.259.6.662>



12, rue de Prony - 75017 Paris, France

电话: +33(0)1 44 15 18 88 | 传真: +33 (0)1 42 67 09 87 | www.oie.int