



非洲猪瘟快速诊断及疫苗研究进展

Research progress in the Rapid Diagnosis and Vaccine of African Swine Fever

吴晓东

Wu Xiaodong

国家非洲猪瘟参考实验室

National reference laboratory for ASF

中国动物卫生与流行病学中心

China Animal Health and Epidemiology Center

报告提纲

Outline

- 非洲猪瘟快速诊断技术研究进展 Research progress in rapid diagnosis of African Swine Fever
 - 1. 诊断技术综述 A review of diagnostic techniques
 - 1.1 非洲猪瘟诊断技术 ASF diagnostic techniques
 - 1.2 快速诊断技术定义及应用范围 Definition(in China) and application scope of rapid diagnostic techniques
 - 2. 病原检测技术 Pathogen detection technology
 - 2.1 分子生物学技术 Molecular Biology Technology
 - 2.2 免疫学技术 Immunological Technology
 - 1.3 抗体检测技术 Antibody Detection Technology
- 非洲猪瘟疫苗研究进展 Research progress of African Swine Fever vaccine
 - 1. 非洲猪瘟病毒分离 Isolation of African Swine Fever Virus
 - 2. 基因缺失毒株构建 Development of Gene Deletion Vaccine
 - 3. 细胞系筛选 Screening of cell line

1.1 非洲猪瘟诊断技术概况

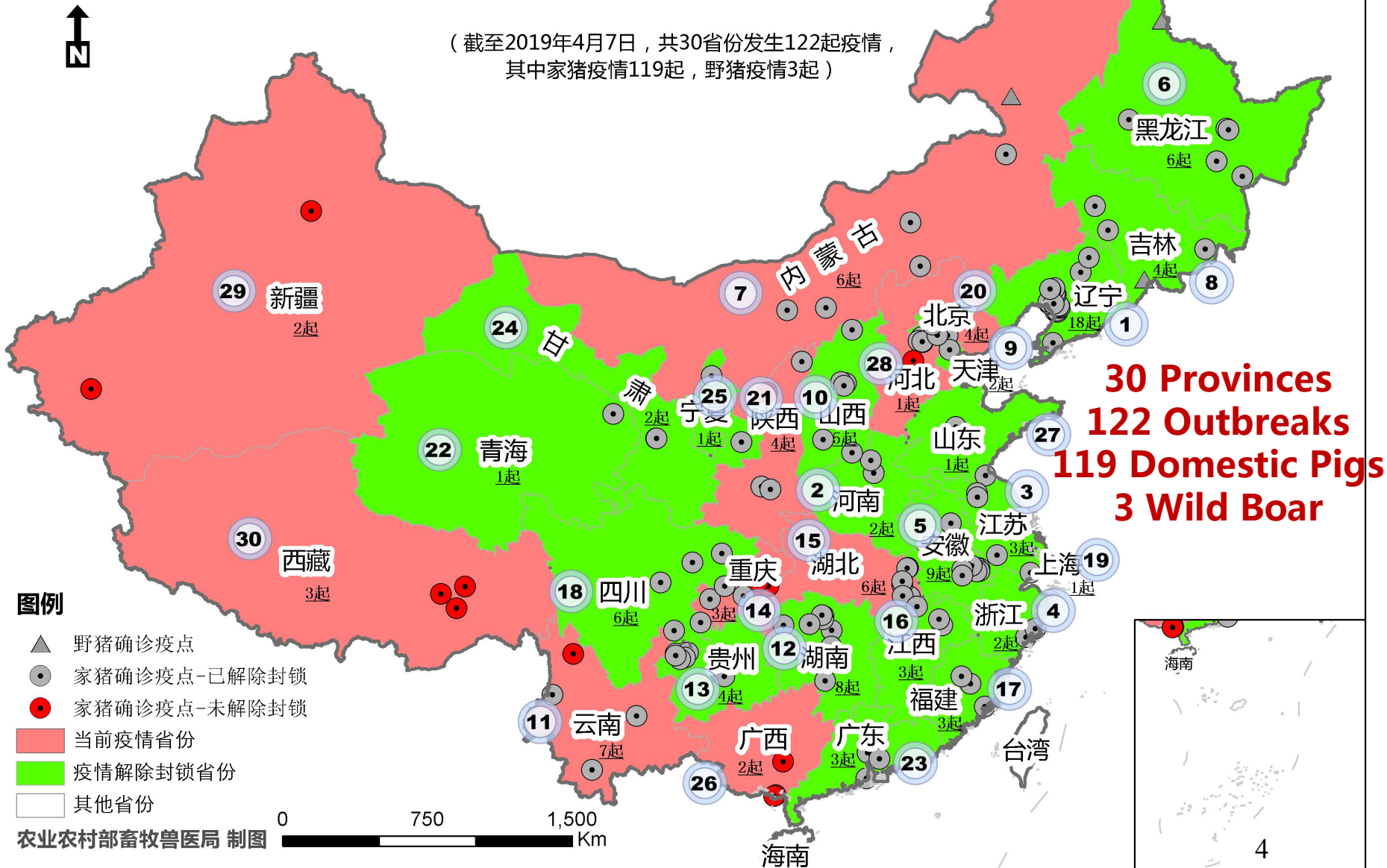
1.1 ASF diagnostic techniques



The Situation of ASF in China

我国非洲猪瘟疫情形势示意图

(截至2019年4月7日, 共30省份发生122起疫情,
其中家猪疫情119起, 野猪疫情3起)



检测政策的变迁过程

The Change Process of Detection Policy

农业农村部办公厅关于进一步加强动物病原微生物实验室生物安全管理工作的紧急通知

2018年8月9日

《农业农村部办公厅关于开展非洲猪瘟专项监测的通知》
(农办医〔2018〕43号)

2018年9月5日

农业农村部办公厅关于做好非洲猪瘟实验室检测工作的通知(授权)

2018年10月25日

农业农村部办公厅关于进一步做好非洲猪瘟实验室检测工作的通知

2018年12月18日

中华人民共和国农业农村部公告 第119号

2019年01月02日

国家层面
National
level

省级层面
Provincial
level

地市级层面
Municipal level

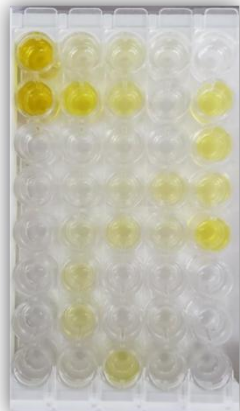
确诊权下放
Outbreaks confirmed
by provincial CADC

屠宰企业主体责任
Detection in slaughter
Enterprises

1.2 快速诊断技术定义及应用范围

1.2 Definition(in China) and application scope of rapid diagnostic techniques

- Definition(in China) of rapid diagnostic techniques
 - 检测时间应不超过1h
 - Detection time should not exceed 1h
 - 试剂种类 Reagent type
 - 核酸检测试剂盒
 - Nucleic acid detection kit
 - 抗原ELISA检测试剂盒
 - ELSA Kit for Antigen Detection
 - 抗原快速检测试纸条
 - Antigen rapid test strip
- Application scope of rapid diagnostic techniques
 - 1. 屠宰场检测，特别是场外现场快速检测
 - 1. Detection of ASFV in slaughterhouses
 - 2. 养殖场快速排查
 - 2. Rapid detection of African swine fever in pig herds
 - 3. 现地排查监测
 - 3. On-site Rapid Detection



2018年底，农业农村部组织第一批非洲猪瘟现场快速检测试剂评价，共通过11个产品，其中荧光PCR试剂盒8个，等温扩增试剂盒1个，检测试纸条2个。

At the end of 2018, the MARA organized the evaluation of the first batch of rapid detection reagents for African swine fever. A total of 11 products were passed, including 8 Real-time PCR kits, 1 isothermal amplification kit and 2 test strips.

- Detection limit
- Specificity
- Sensitivity
- Repeatability
- Detection time
- Simplicity
- Practicability

中国动物疫病预防控制中心 (农业农村部屠宰技术中心) 文件

疫控(诊)[2019]3号

关于公布第一批非洲猪瘟现场 快速检测试剂评价结果的通知

各省、自治区、直辖市动物疫病预防控制机构,新疆生产建设兵团动物疫病预防控制中心,各有关单位:

按照农业农村部畜牧兽医局要求,我中心与中国动物卫生与流行病学中心、中国兽医药品监察所、中国农业科学院哈尔滨兽医研究所等单位共同组成评价专家组,于11月26日至12月19日开展了非洲猪瘟现场快速检测试剂评价工作,现将通过了专家评审的第一批非洲猪瘟现场快速检测试剂评价结果印发,请根据农业农村部有关检测工作要求选择使用。

本次评价仅对各单位送检的试剂盒中试产品进行了盲样测试和盲评,试剂盒敏感性 & 特异性结果仅限于此次对样品盘的检测结果,检测样品类型仅限于样品盘的类型,包括血液样品和脾脏、淋巴结、肾脏组织样品。

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%	仅用于病(死)猪现场快速初步检测,具体按试剂盒说明书。
试纸条类	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%	
	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%	

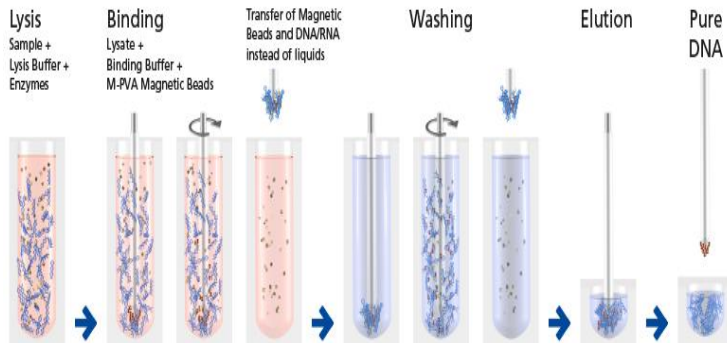
2.1 分子生物学技术

2.1 Molecular Biology Technology

- 实时荧光聚合酶链式反应
- Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR)
- 聚合酶链式反应
- Polymerase Chain Reaction (PCR)
- 等温扩增
- Isothermal Amplification

实时荧光聚合酶链式反应 Real-time PCR

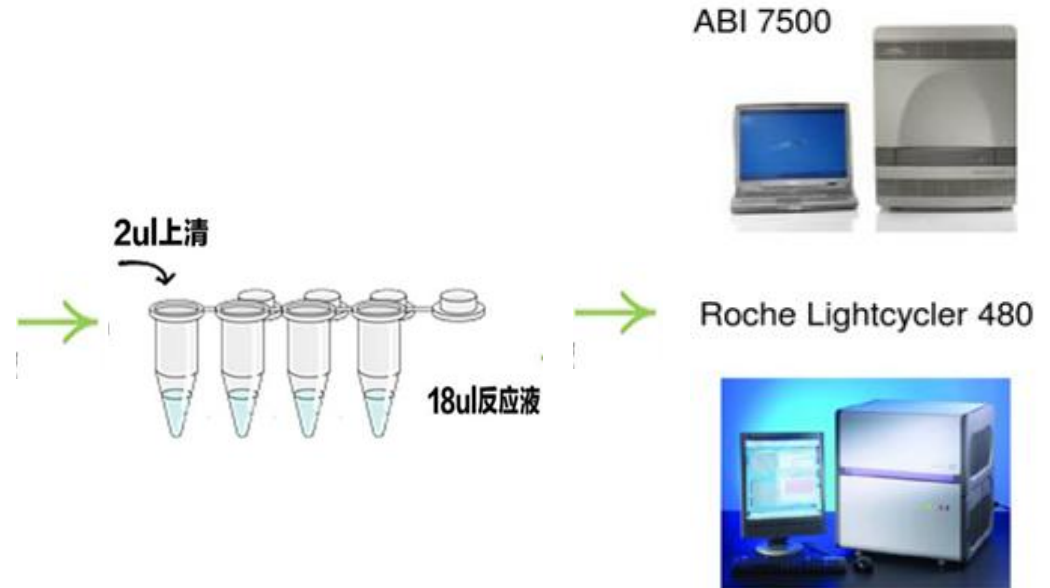
25 min



1. 核酸提取

1. DNA extraction

60 min



2. 加样

2. Adding sample

3. 荧光PCR仪普通扩增

3. Ordinary amplification

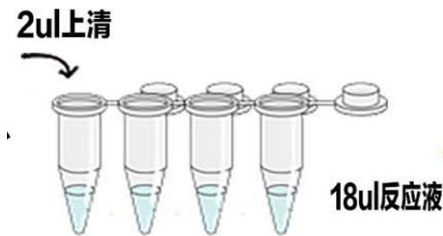
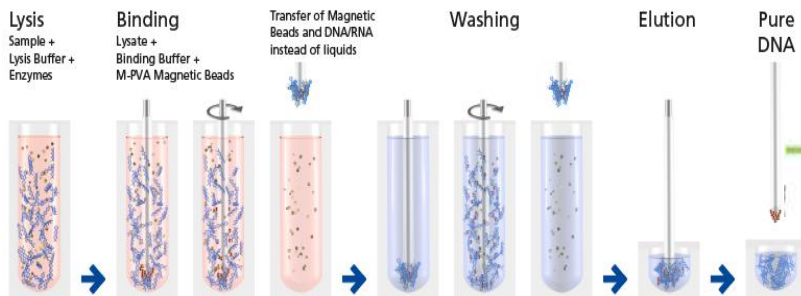
快速实时荧光定量聚合酶链式反应

Rapidly Real-time PCR (with extraction)

三步完成PCR反应 Complete PCR in four steps

25 min

30 min



放入荧光定量PCR仪运行



1. 核酸提取

1. DNA extraction

2. 加样

2. Adding sample

3. 荧光PCR仪快速扩增

3. Quickly amplification

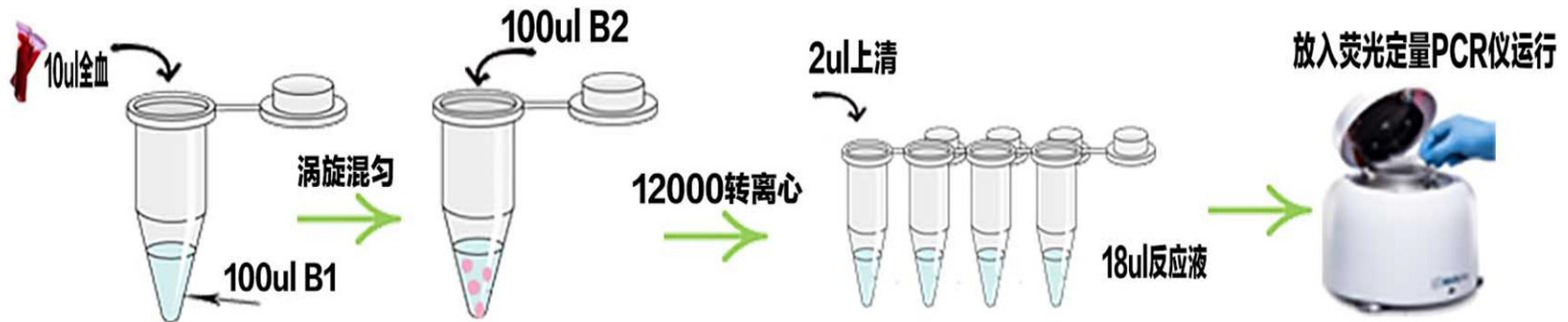
快速实时荧光定量聚合酶链式反应

Rapidly Real-time PCR (without extraction)

四步完成PCR反应 Complete PCR in four steps

5 min

30min



1. 样品裂解

2. 平衡

3. 加样

4. 荧光PCR仪快速扩增

1. Sample pyrolysis

2. Balance

3. Adding sample

4. Quick amplification

基于重组酶的非洲猪瘟病毒等温扩增检测

Recombinase-based isothermal amplification on the detection of ASFV

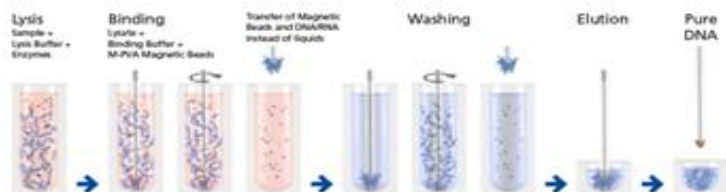
重组酶聚合酶扩增

Recombinase polymerase amplification (RPA)

重组酶辅助扩增

Recombinase aided amplification (RAA)

25 min



1. 磁珠法提取

1. Magnetic bead DNA extraction



2. 加样

2. Adding sample

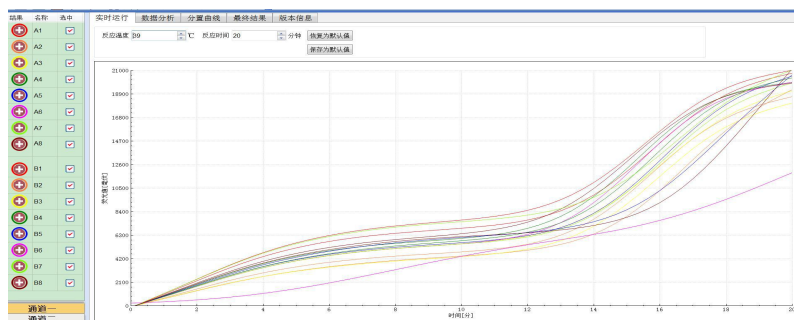
15 min



3. 恒温荧光扩增

3. Recombinase-based isothermal amplification

结果
Result



与实时荧光PCR比较

Comparison with Real-time PCR

RPA Coincident rate=93.8%

RAA Coincident rate=96.9%

常用核酸检测方法

Nucleic acid detection methods

方法 Methods	核酸提取 Nucleic acid extraction	扩增 Amplification	结果观察 Observation	耗时 Total time	特异性 Specificity	敏感性 Sensitivity
Conventional PCR	≈ 25min	≈ 60min	≈ 30min	≈ 115min	★★★	★★
Real-time PCR	≈ 25min	≈ 60min	/	≈ 85min	★★★★	★★★★
Rapidly Real-time PCR (without extration)	≈ 5min	≈ 30min	/	≈ 35min	★★★★	★★
Rapidly Real-time PCR (with extration)	≈ 25min	≈ 30min	/	≈ 55min	★★★★	★★★★
RPA/RAA	≈ 25min	≈ 15min	/	≈ 40min	★★	★★★★
LAMP	≈ 25min	≈ 20min	/	≈ 45min	★★	★★★★
Conventional PCR + Nucleic acid capture colloidal gold technology	≈ 25min	≈ 35min	≈ 5min	≈ 60min	★★	★★

非洲猪瘟病毒荧光PCR快速检测试剂盒

Rapid Detection Kit of ASFV by Fluorescent PCR

敏感性 Sensitivity : 100%

特异性 Specificity : 100%

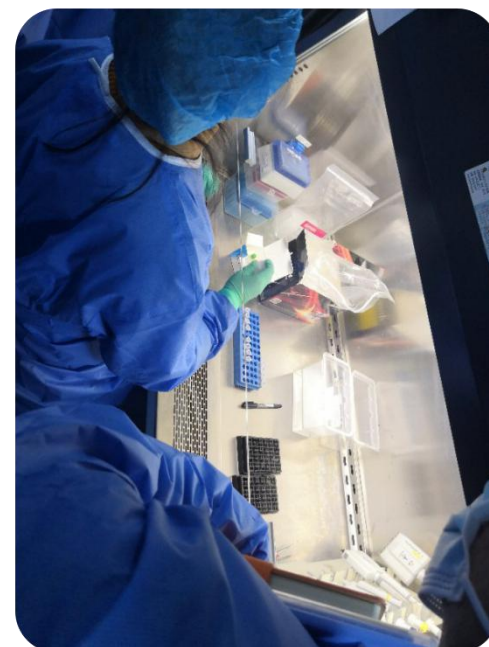
重复性 Repeatability : CV值<2%

检测时间 Time consuming :

≈35min

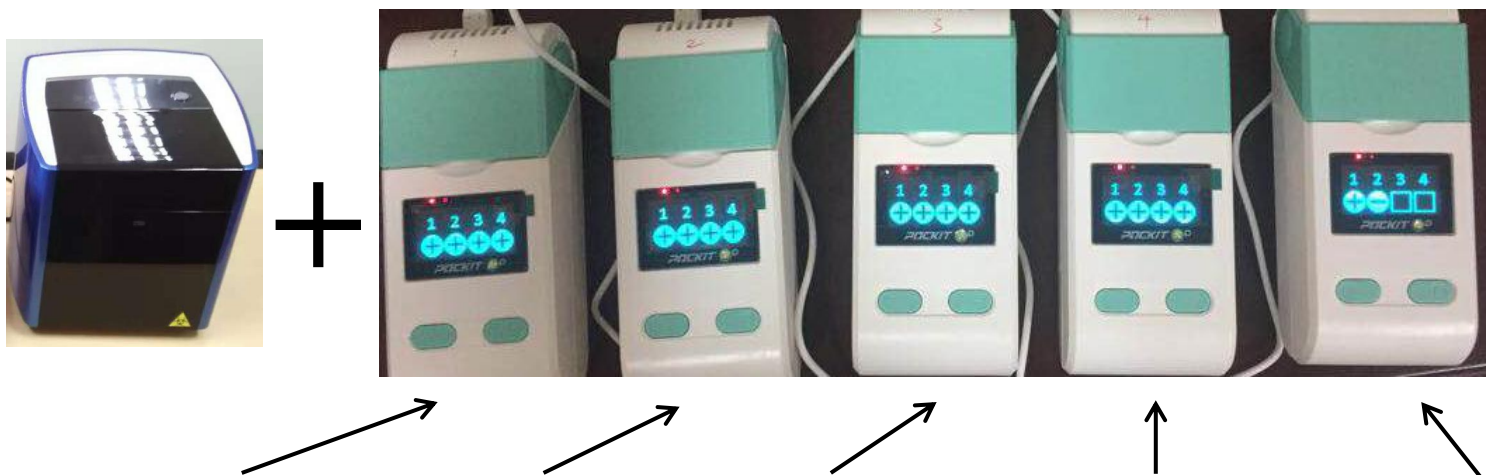
便携性 Portability : 适用于现场检测, 操作简单。可搭配各种便携式荧光定量PCR仪

It is suitable for on-site testing and easy to operate. It can be matched with various portable fluorescent quantitative PCR instruments



农业农村部-FAO合作评估移动PCR技术

Evaluate Pen-side PCR by CAHEC under the framework of cooperation between MARA and FAO

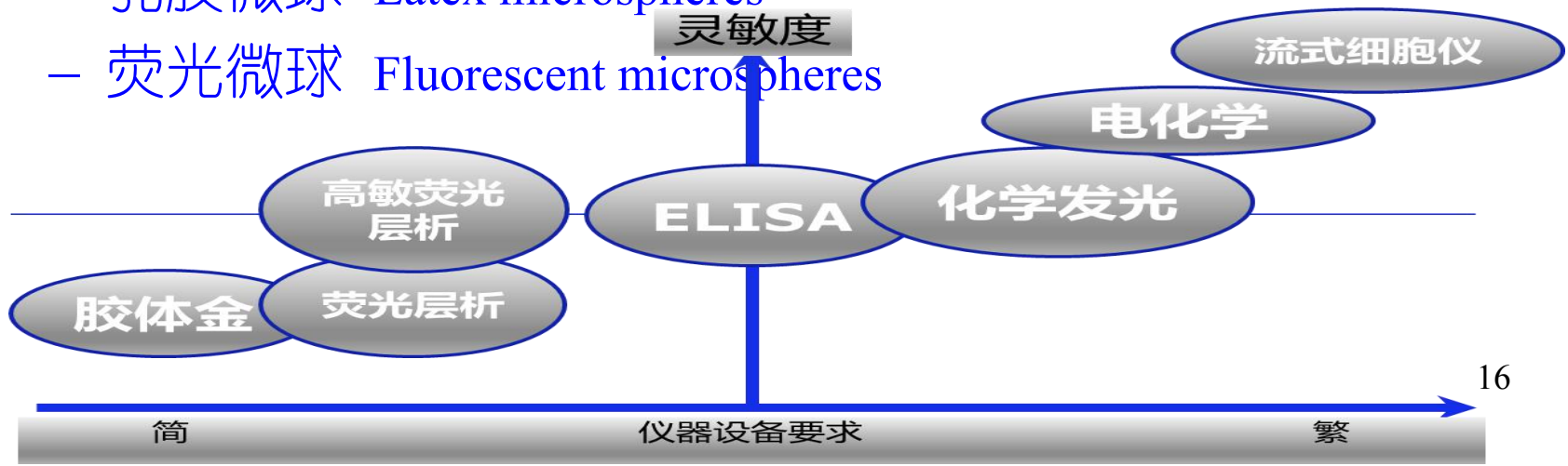


No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Type	Blood					Envi ronm ent	Blood		Tissue			Blood	Faeces				PC	NC
CT value	23.42	17.37	15.22	17.55	22.62	21.38	16.26	19.71	19.59	16.22	21.03	15.45	26.28	29.27	23.43	34.16	/	/

2.2 免疫学技术

2.2 Immunological Technology

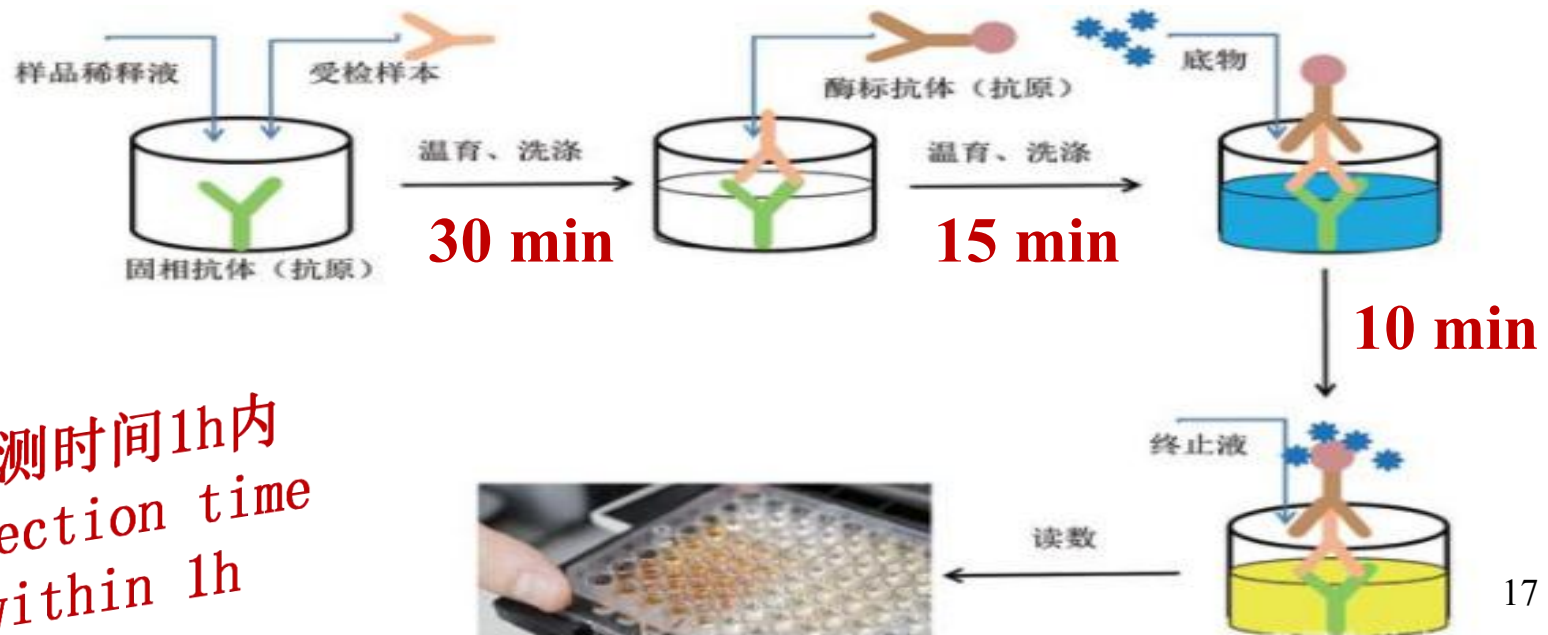
- 酶联免疫吸附试验 enzyme-linked immunosorbent assay
 - 酶促显色 Enzymatic coloration
 - 酶促发光 Enzymatic luminescence
- 试纸条 Test strips
 - 胶体金 Colloidal gold
 - 乳胶微球 Latex microspheres
 - 荧光微球 Fluorescent microspheres



酶联免疫吸附试验

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

- 操作简单，设备需求低 Simple operation and low equipment requirements
- 适用于多种场景 Suitable for multiple scenarios
- 敏感性从低到中不等 Low to medium sensitivity
- 价格相对便宜 Low prices
- 一般不会污染 No cross-contamination



检测时间1h内
Detection time
within 1h

	PCR			
CLIA		Negative	Positive	Total
	Tests Negative	True Negative 182	FALSE Negative 4	186
	Tests Positive	FALSE Negative 2	True Positive 25	27
	Total	184	29	213



敏感性

$$\text{Sensitivity} = 25/29 = 86.2\%$$

特异性

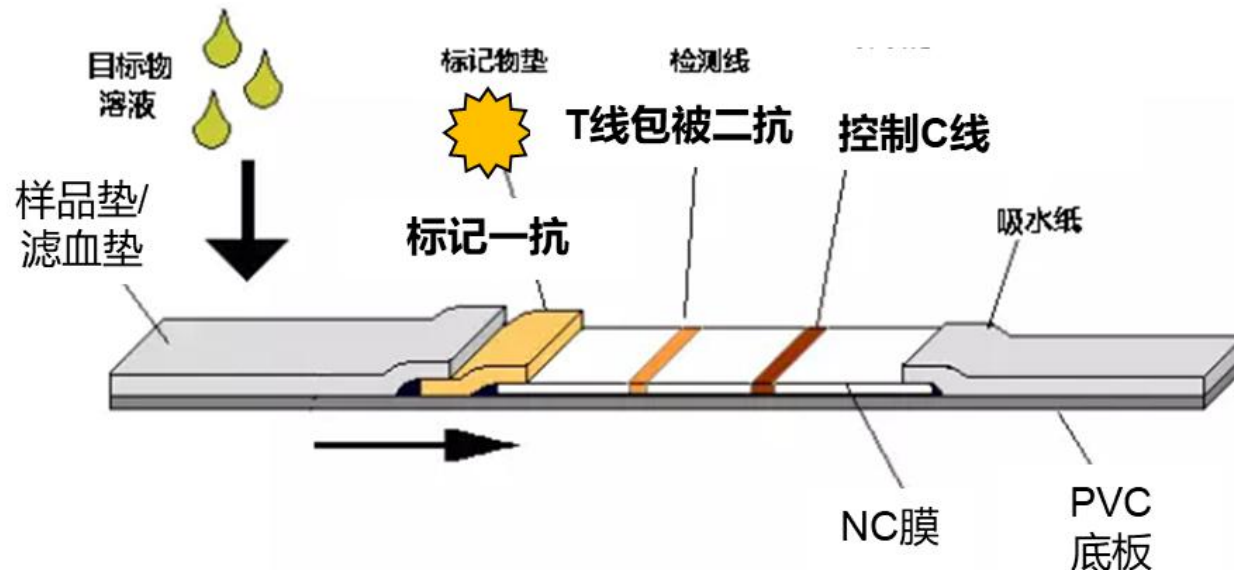
$$\text{Specificity} = 182/184 = 98.9\%$$

符合率

$$\text{Accordance Rate} = (25 + 182) / 213 = 97.2\%$$

试纸条 Test strips

- 检测时间短，20分钟内可完成 The detection time is short and can be completed in 20 minutes.
- 不需专门仪器，适合现场运用 Not need special instruments, suitable for current use.
- 敏感性较低 Low sensitivity
- 价格较高 Higher prices
- 不会污染 No cross-contamination



1.3 抗体检测技术

1.3 Antibody Detection Technology

- **Antibody Screening Method**

1. **OIE-ELISA indirect ELISA**

- Semi-purified viral antigen

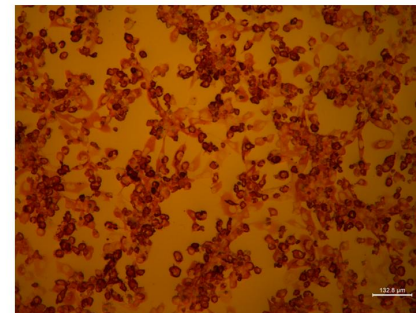
2. **Commercial ELISA method**

- INGEZIM PPA COMPAC K3 (INGENASA) Blocking ELISA using VP73-specific monoclonal antibody
- ID Screen indirect ELISA (coated p32, p62 and p72 proteins)
- **Domestic blocking and indirect ELISA** are being compared in verification

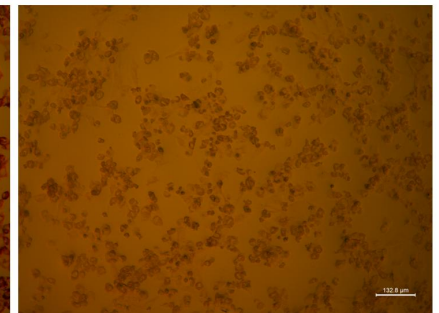
3. **Test strip**

- **Antibody Diagnosis Method**

- Immunoblotting: semi-purified viral antigen
- Indirect immunofluorescence (IFI): passage cells infected with ASFV strain
- Immunoperoxidase assay (IPT): virus-infected cells



ASFV Positive serum (1:100)



ASFV Negative serum (1:100)

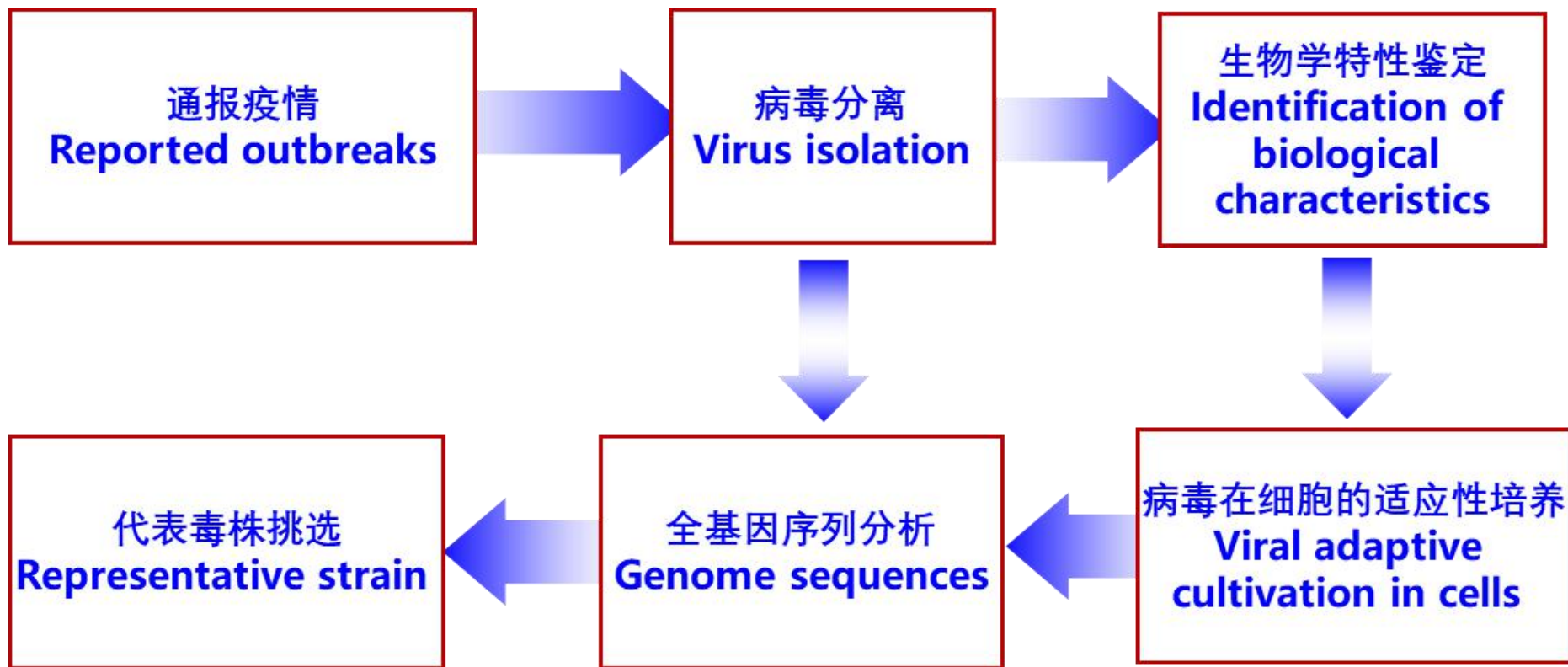
2.1 非洲猪瘟病毒分离

2.1 Isolation of African Swine Fever virus



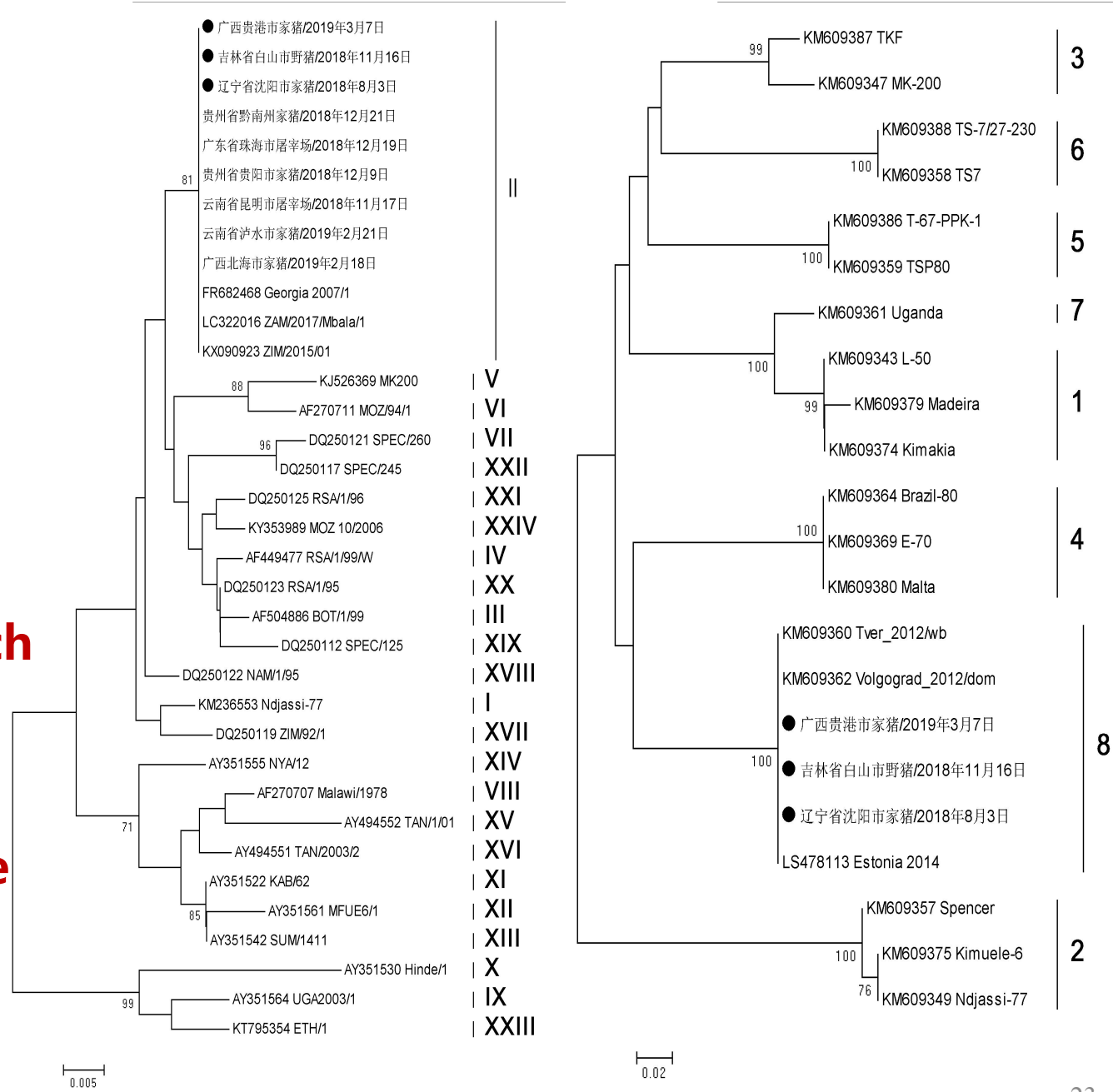
中国非洲猪瘟病毒特性研究

Characterization of African swine fever virus in China



Chinese strains belong to gene type II and serum 8 group

The same branch as the strains prevalent in Russia and Eastern Europe



- Strain of Baishan wild boar belongs to IGR I
- Strains of most domestic pig belong to IGR II
- Strain of Guangxi domestic pig belongs to IGR III

区域/国家	毒株	IGR/TRS序列(I73R-I329L)
中国	广西家猪/2019 年	GGAATATATAGGAATATATAGGAATATATAGAAA'
	云南省泸水市家猪/2019 年 2 月 21 日	GGAATATATAGGAATATATA-----GAAA
	广西北海市家猪/2019 年 2 月 18 日	GGAATATATAGGAATATATA-----GAAA
	贵州省黔南州家猪/2018 年 12 月 21 日	GGAATATATAGGAATATATA-----GAAA
	广东省珠海市屠宰场/2018 年 12 月 19 日	GGAATATATAGGAATATATA-----GAAA
	贵州省贵阳市家猪/2018 年 12 月 9 日	GGAATATATAGGAATATATA-----GAAA
	云南省昆明市屠宰场/2018 年 11 月 17 日	GGAATATATAGGAATATATA-----GAAA
	辽宁省沈阳市家猪/2018 年 8 月 3 日	GGAATATATAGGAATATATA-----GAAA
	吉林省白山市野猪/2018 年 11 月 16 日	GGAATATATA-----GAAA
格鲁吉亚	Georgia 2007/1	GGAATATATA-----GAAA
俄罗斯	Irkutsk 2017	GGAATATATA-----GAAA
	Rostov09	GGAATATATA-----GAAA
	Lipetsk2016	GGAATATATAGGAATATATA-----GAAA
	Voronezh 2016	GGAATATATAGGAATATATA-----GAAA
欧洲	Estonia 2014	GGAATATATAGGAATATATA-----GAAA
	Bel13/Grodno	GGAATATATAGGAATATATA-----GAAA
	Ukr12/Zapo	GGAATATATAGGAATATATA-----GAAA
	LT14/1490	GGAATATATAGGAATATATA-----GAAA
	Pol14/Sz	GGAATATATAGGAATATATA-----GAAA
非洲	ZAM/2017/Mbala/1	无序列信息
	ZAM/13/Mbala	

注：----- 代表基因缺失

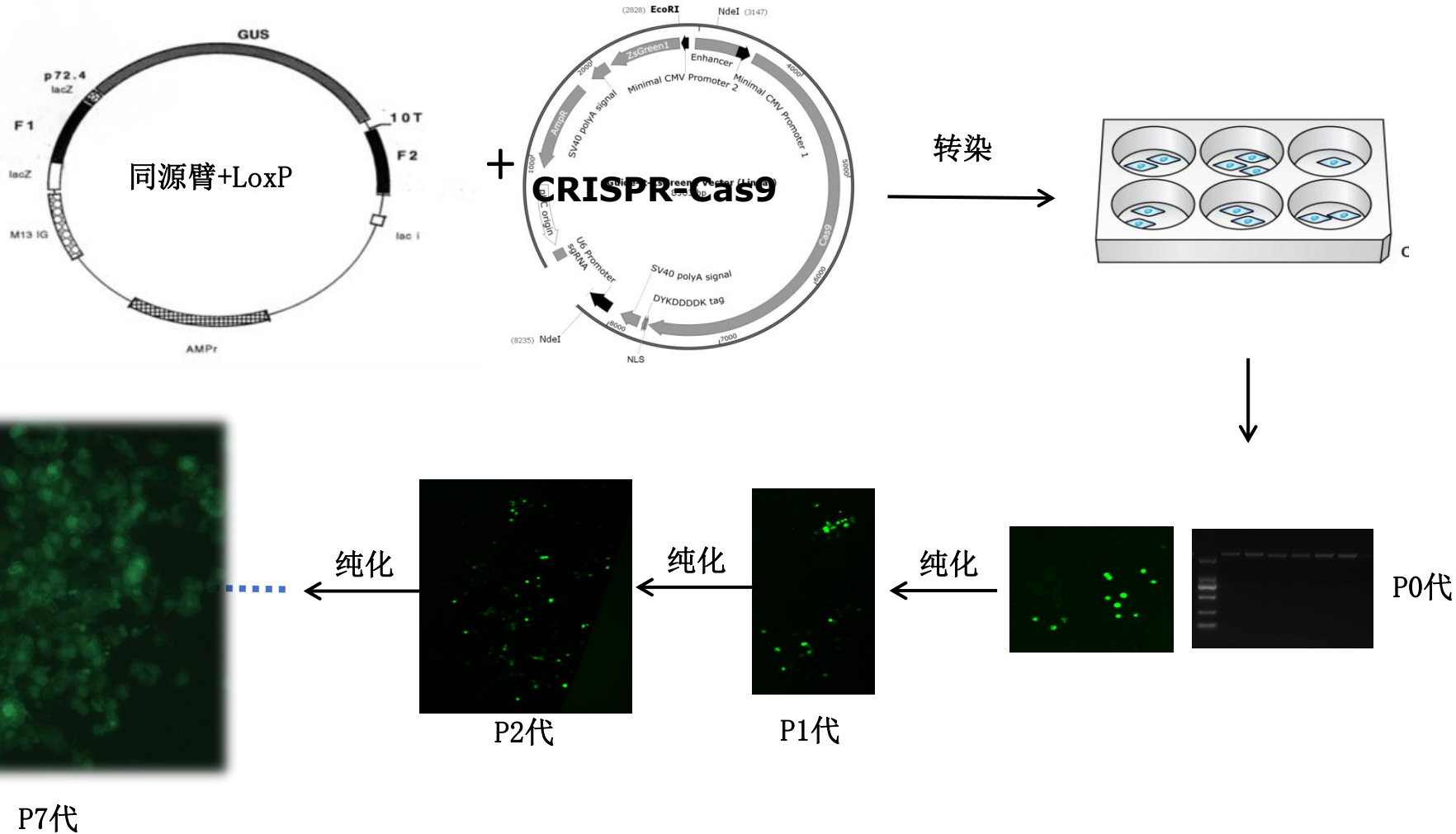
2.2 基因缺失毒株构建

2.2 Development of Gene Deletion candidate vaccine



缺失基因	原始毒株	基因型	致弱/免疫保护情况
CD2V	BA71	I	致弱、保护
MGF	Pretoriuskop/96/4	I	致弱, 未攻毒
	Benin 97/1	I	致弱、保护
	Georgia 2007	II	致弱、保护
9GL	Georgia 2007	II	致弱、高免疫剂量保护
	Malawi Lil-20/1	I	致弱、保护
DP148R	Benin 97/1	I	致弱、部分保护
A238L	NH/P68	I	致弱、部分保护
A224L	NH/P68	I	致弱、部分保护
UK/D96R	E70	I	致弱
9GL+UK	Georgia 2007	II	致弱、保护
9GL + MGF	Georgia 2007	II	致弱、不保护

CRISPR-Cas9 + Cre/LoxP + 同源重组

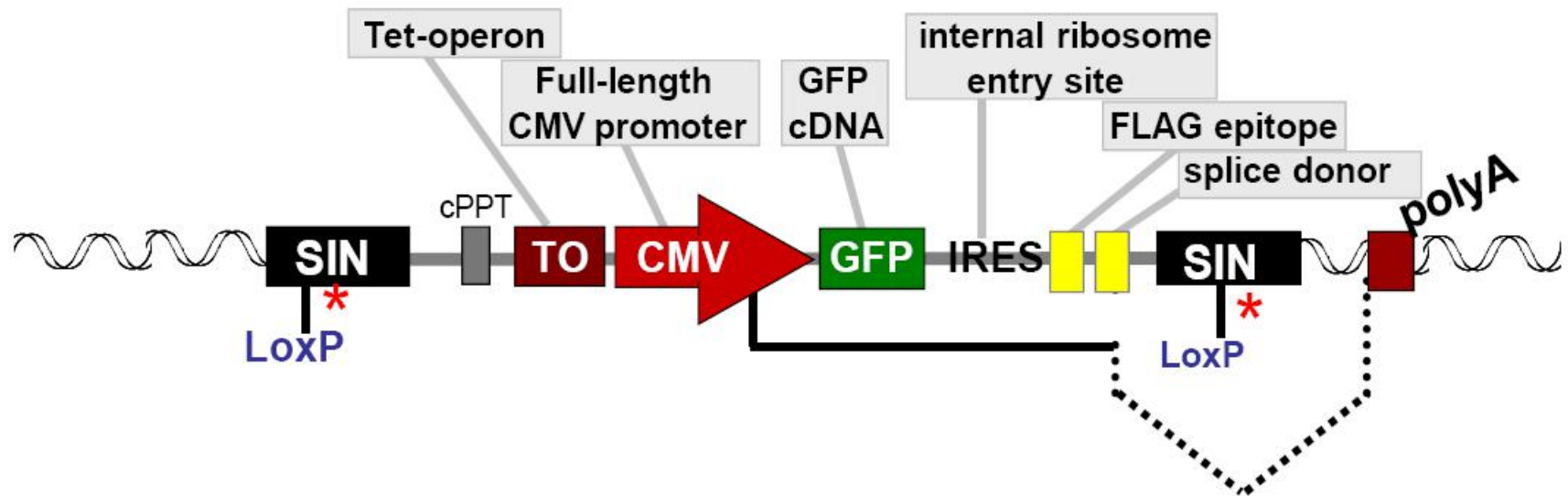


2.3 细胞系筛选

2.3 Screening of cell line

筛选/改造可繁殖非洲猪瘟病毒的传代细胞系

Screening/Modification of immortalized cell line for propagating of African Swine Fever Virus



Thanks!

