附件

非洲猪瘟病毒流行株与基因缺失株鉴别检测规范

 本规范适用于非洲猪瘟病毒流行毒株与非洲猪瘟病毒CD2v和MGF 360-505R基因缺失株的荧光PCR方法鉴别检测。

#  **主要试剂**

* 1. 核酸提取试剂盒。
	2. 无核酸酶水。
	3. 荧光PCR预混液（2×）。
	4. 引物和探针：P72、CD2v、MGF360-505R基因扩增引物和探针由国家非洲猪瘟参考实验室设计并提供（联系人：李林，电话：0532-87839188）。

1.5 阳性和阴性对照：阳性对照样品为ASFV基因组DNA标准物质（用无核酸酶水稀释1000倍后使用），由国家非洲猪瘟参考实验室提供；阴性对照样品为无核酸酶水。

**2. 主要仪器设备**

2.1 荧光PCR扩增仪。

2.2 台式低温高速离心机。

2.3 组织匀浆机。

2.4 微量可调移液器（2.5 μL、10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL等不同规格）。

2.5 无核酸酶离心管与吸头。

2.6 PCR扩增管。

**3. 样品采集和运输保存**

 对活猪，可采集抗凝全血（EDTA抗凝）、口鼻拭子或血清等；对病死猪或已屠宰猪，可采集脾脏、淋巴结、扁桃体、肝脏等组织。尽快送至实验室进行病毒核酸检测。

 样品的运送与保存应满足NY/T 541《兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范》相关要求。上述样品可在4°C最长保存2天；如需长时间保存，应置于-20°C以下。

#  **样品处理**

**4.1 组织样品**

 取0.1 g～0.2 g样品，加入1 mL～2 mL预冷的PBS（pH 7.4），用组织匀浆机高速匀浆，制成10%组织匀浆液，以5000 r/min离心10 min，取200 μL上清液进行核酸提取。

**4.2 液体样品**

抗凝全血、血清等液体样品不需进行特殊处理，直接取200 μL进行核酸提取。

#  **病毒核酸的提取和纯化**

 取已进行前处理的样品200 μL，可按传统方法提取病毒核酸，也可采用病毒核酸提取试剂盒、自动化核酸提取仪提取病毒核酸。提取后的病毒核酸应立即使用或置于-20°C以下冷冻保存。每次抽提核酸，应包括一个阳性对照样品和一个阴性对照样品。

# **6. 荧光PCR检测**

**6.1 荧光PCR反应液制备**

 在灭菌的离心管中制备符合检测样品数量（包括阳性、阴性对照）要求的荧光PCR反应混合液，至少额外制备两个样品的量。每个样品配制20 µL PCR反应混合液，组成如下：7.5 μL P72、CD2v、MGF360-505R基因引物、探针预混液（P72、CD2v、MGF360-505R基因探针分别用FAM、VIC和Cy5进行标记）、12.5 μL 2×探针法荧光PCR预混液。

 分别取20 µL PCR反应混合液加至每个PCR扩增管中；再分别取5 µL DNA模板加入到PCR扩增管中。每次进行荧光PCR扩增时均应设立阳性、阴性对照。阳性对照应用阳性对照样品所提取核酸作为模板，阴性对照应用阴性对照样品所提取核酸作为模板。加入模板后，密封PCR扩增管，瞬时离心。将所有PCR扩增管放在荧光PCR仪中。按下述条件运行扩增程序。

**6.2 荧光PCR扩增条件**

50°C孵育2min；95°C预变性5min；95°C变性15s，60°C退火延伸1min，45个循环，在每一循环的60°C时收集FAM、VIC和Cy5通道中的荧光信号。

**6.3 结果分析**

 Ct值由荧光PCR仪的软件自动确定。

**6.3.1 试验成立条件**

 阳性对照P72、CD2v、MGF 360-505R基因的Ct值均＜35且出现特异性扩增曲线，阴性对照P72、CD2v、MGF 360-505R基因无Ct值或阴性对照P72、CD2v、MGF 360-505R基因Ct值≥40且无特异性扩增曲线，判为试验有效。试验无效时应重新进行试验。

**6.3.2**  **P72、CD2v、MGF 360-505R基因检测结果判定**

**6.3.2.1 P72基因检测结果判定（FAM通道）**

 被检样品Ct值≤38且出现特异性扩增曲线，判为ASFV P72基因检测阳性；无Ct值或Ct值≥40，判为ASFV P72基因检测阴性；38＜Ct值＜40且出现特异性扩增曲线，判为疑似。对疑似样品，再进行1次复检，做3个重复；至少2个重复Ct值＜40且出现特异性扩增曲线即判为ASFV P72基因检测阳性，否则判为ASFV P72基因检测阴性。

**6.3.2.2 CD2v基因检测结果判定（VIC通道）**

 被检样品Ct值≤38且出现特异性扩增曲线，判为ASFV CD2v基因检测阳性；无Ct值或Ct值≥40，判为ASFV CD2v基因检测阴性；38＜Ct值＜40且出现特异性扩增曲线，判为疑似。对疑似样品，再进行1次复检，做3个重复；至少2个重复Ct值＜40且出现特异性扩增曲线即判为ASFV CD2v基因检测阳性，否则判为ASFV CD2v基因检测阴性。

**6.3.2.3 MGF 360-505R基因检测结果判定（Cy5通道）**

 被检样品Ct值≤38且出现特异性扩增曲线，判为ASFV MGF 360-505R基因检测阳性；无Ct值或Ct值≥40，判为ASFV MGF 360-505R基因检测阴性；当38＜Ct值＜40且出现特异性扩增曲线，判为疑似。对疑似样品，再进行1次复检，做3个重复；至少2个重复Ct值＜40且出现特异性扩增曲线即判为ASFV MGF 360-505R基因检测阳性，否则判为ASFV MGF 360-505R基因检测阴性。

**6.3.3 综合判定**

结合P72、CD2v、MGF 360-505R等3个基因的检测结果进行综合判定。具体判定标准见附表。

附表 综合判定标准

|  |  |
| --- | --- |
| **综合判定结果** | **检测结果** |
| P72-FAM | CD2v-VIC | MGF-Cy5 |
| ASFV流行株阳性 | + | + | + |
| ASFV CD2v基因缺失株阳性 | + | - | + |
| ASFV MGF基因缺失株阳性 | + | + | - |
| ASFV CD2v与MGF基因双缺失株阳性 | + | - | - |
| ASFV阴性 | - | - | - |

注：“+”代表检测阳性；“-”代表检测阴性