

农业农村部办公厅文件

农办牧〔2020〕39号

农业农村部办公厅关于进一步严厉打击 违法研制生产经营使用非洲猪瘟 疫苗行为的通知

各省、自治区、直辖市农业农村(农牧、畜牧兽医)厅(局、委),新疆生产建设兵团农业农村局:

截至目前,包括中国在内的世界各国均未批准生产经营使用非洲猪瘟商品化疫苗,但非法使用非洲猪瘟疫苗问题时有发生。为切实推动非洲猪瘟防控工作有序开展,保持生猪生产恢复向好势头,现就严厉打击违法研制生产经营使用非洲猪瘟疫苗行为有关事项通知如下。

一、严厉打击违法研制非洲猪瘟疫苗行为

各省级畜牧兽医主管部门要组织对辖区内科研教学单位、企业等所有兽医实验室开展排查活动,重点检查是否违法从事非洲猪瘟疫苗研制活动;对实验室冰箱保存的无标签疫苗、病料或成份不明的试剂,要开展检查检测确认;对实验活动记录等要进行仔细核查。如发现有非洲猪瘟疫苗制苗用种毒或试制疫苗,要进一步核实种毒和试制疫苗的使用和去向情况。如发现涉嫌违法制售非洲猪瘟疫苗线索,要立即立案查处,依照《兽药管理条例》《病原微生物实验室生物安全管理条例》从严从快从重处理;涉嫌犯罪的,依法移送公安机关追究刑事责任。要加强对非洲猪瘟疫苗实验室研究、临床试验单位和中试生产企业监督检查,重点检查开展非洲猪瘟疫苗研究的实验室条件是否符合要求,实验活动、临床试验等是否经过审批,临床试验范围等是否与批准的试验方案一致,中试条件和生物安全防范措施是否符合要求,是否存在非法转移中试产品及其种毒行为等。发现未经批准、擅自开展非洲猪瘟疫苗相关实验室研究活动、临床试验或非法转移中试产品及其种毒的,要立案查处,并依照《兽药管理条例》《病原微生物实验室生物安全管理条例》从严从快从重处罚。

二、严厉打击违法生产非洲猪瘟疫苗行为

各省级畜牧兽医主管部门要组织对辖区内兽用生物制品生产企业开展全面检查,排查是否存在违法制售非洲猪瘟疫苗行为。重点检查生产企业的隐蔽场所、原材料出入库情况、试验动物购买

和使用情况、资金往来情况等,全面查找非法制售假疫苗线索。如发现违法制售非洲猪瘟疫苗行为,要进一步核查疫苗生产销售数量和销售对象、生产种毒来源等信息,并依照《兽药管理条例》第五十六条规定和《兽药严重违法行为从重处罚情形》从严从快从重处理,吊销《兽药生产许可证》,兽药生产企业主要负责人和直接负责的主管人员终身不得从事兽药生产活动。涉嫌犯罪的,及时依法移送公安机关追究刑事责任。

三、严厉打击违法经营非洲猪瘟疫苗行为

各省级畜牧兽医主管部门要组织对辖区内兽药经营企业开展全面检查,排查是否存在经营所谓“非洲猪瘟中试苗、自家苗、进口苗”等非法疫苗行为。重点检查无标签疫苗、出入库记录、资金往来等情况,全面查找违法经营假疫苗线索。如发现违法经营非洲猪瘟疫苗行为,要进一步核查假疫苗来源、销售对象和数量等信息,并依照《兽药管理条例》第五十六条规定和《兽药严重违法行为从重处罚情形》从严从快从重处理,吊销《兽药经营许可证》,兽药经营企业主要负责人和直接负责的主管人员终身不得从事兽药经营活动。涉嫌犯罪的,及时依法移送公安机关追究刑事责任。

四、严厉打击违法使用非洲猪瘟疫苗行为

各省级畜牧兽医主管部门要组织对辖区内生猪养殖企业(场、户)开展检查,排查是否存在违法使用非洲猪瘟疫苗行为。重点检查冰箱冰柜是否保存有可疑疫苗、疫苗购买记录、免疫接种记录、检测记录、资金往来等信息,全面查找违法使用假疫苗线索。如发

现违法使用非洲猪瘟疫苗行为,要进一步核查假疫苗来源和数量等信息,并依据《兽药管理条例》第六十二条和《兽药严重违法行为从重处罚情形》从严从快从重处罚。必要时商请公安机关联合办案,一查到底。对养殖企业(场、户)使用非洲猪瘟非法疫苗免疫接种的猪只,一经检测为阳性的,视为非洲猪瘟感染猪,予以扑杀,并不得给予补助。

五、组织开展非洲猪瘟疫苗毒鉴别检测

各省级畜牧兽医主管部门在按照《2020年全国非洲猪瘟监测方案》组织做好辖区内非洲猪瘟监测基础上,要组织开展鉴别检测,对来自养殖场、采用实时荧光 PCR 方法检测结果为阳性的组织、血液或口鼻拭子等样品,可按照“非洲猪瘟病毒流行株与基因缺失株鉴别检测规范”(见附件)进行鉴别检测。鉴别检测结果显示为基因缺失病毒的,各检测单位要第一时间将检测结果及样品来源信息报省级畜牧兽医主管部门。对涉嫌违法单位,省级畜牧兽医主管部门要立即组织立案查处。

中国动物疫病预防控制中心和中国动物卫生流行病学中心在开展非洲猪瘟病毒监测的同时,要对来自养殖场、采用实时荧光 PCR 方法检测结果为阳性的组织、血液或口鼻拭子等样品进行鉴别检测。鉴别检测结果显示为基因缺失病毒的,第一时间将检测结果及样品来源信息报我部畜牧兽医局。

六、严格执行非洲猪瘟疫苗“五禁止”监管措施

非洲猪瘟疫苗监管工作对非洲猪瘟疫情防控和生猪生产恢复

影响深远,采取强力措施、坚决遏制非法研制生产经营使用非洲猪瘟疫苗行为是目前各地畜牧兽医主管部门面临的紧迫任务。为保证非洲猪瘟疫苗监管职责落实到位,各地畜牧兽医主管部门和相关从业人员要严格执行非洲猪瘟疫苗“五禁止”监管措施,即:禁止未经批准开展实验活动,禁止未经审批开展临床试验,禁止生产非法疫苗,禁止经营非法疫苗,禁止使用非法疫苗。对存在违法研制生产经营非洲猪瘟疫苗行为的单位及其主要负责人、直接负责的主管人员,一经查实,全部列入失信惩戒名单,列为重点监管对象,从严审核行政许可审批事项。

各省级畜牧兽医主管部门要及时总结打击违法研制生产经营使用非洲猪瘟疫苗行为进展情况,并于11月30日前将相关工作情况报送我部畜牧兽医局。

附件:非洲猪瘟病毒流行株与基因缺失株鉴别检测规范

农业农村部办公厅

2020年8月24日

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。

1. 主要试剂

1.1 核酸提取试剂盒。

1.2 无核酸酶水。

1.3 荧光 PCR 预混液(2×)。

1.4 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 μ L、10 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L 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 $^{\circ}$ C 最长保存 2 天;如需长时间保存,应置于-20 $^{\circ}$ C 以下。

4. 样品处理

4.1 组织样品

取 0.1g~0.2g 样品,加入 1mL~2mL 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 10min,取 200 μ L 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 μ L 进行核酸提取。

5. 病毒核酸的提取和纯化

取已进行前处理的样品 200 μ L,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 $20\mu\text{L}$ PCR 反应混合液,组成如下: $7.5\mu\text{L}$ 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)、 $12.5\mu\text{L}$ $2\times$ 探针法荧光 PCR 预混液。

分别取 $20\mu\text{L}$ PCR 反应混合液加至每个 PCR 扩增管中;再分别取 $5\mu\text{L}$ 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、CD2_v、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、CD2_v、MGF 360-505R 基因无 Ct 值或阴性对照 P72、CD2_v、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、CD2_v、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; $38 < \text{Ct 值} < 40$ 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 CD2_v 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 CD2_v 基因检测阳性;无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 40 ,判为 ASFV CD2_v 基因检测阴性; $38 < \text{Ct 值} < 40$ 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 CD2_v 基因检测阳性,否则判为 ASFV

CD2_v 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、CD2_v、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	CD2 _v -VIC	MGF-Cy5
ASFV 流行株阳性	+	+	+
ASFV CD2 _v 基因缺失株阳性	+	-	+
ASFV MGF 基因缺失株阳性	+	+	-
ASFV CD2 _v 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

抄送：中国动物疫病预防控制中心、中国兽医药品监察所、中国动物卫生与流行病学中心。

农业农村部办公厅

2020年8月25日印发
