生猪屠宰企业非洲猪瘟检测实验室建设及

生物安全技术要求

一、检测实验室建设要求

**（一）实验室布局**

远离生产区，处于相对封闭区域。实验室面积需满足工作需要，原则上不低于30平方米，至少包括独立的前处理室和检测室。前处理室面积原则上不低于20平方米，检测室原则上不低于10平方米。前处理室应分为样品处理区、配液区等，严格分区操作。

**（二）主要仪器设备及耗材配置**

1、前处理室主要仪器设备：配置离心机、高压灭菌锅、涡旋振荡器、水浴锅（金属浴）、移液器及其配套吸头（样品处理区和配液区各一套移液器，不能混用）、移动紫外灯，配备冷藏冷冻冰箱（存放检测试剂、检测样品、灭菌后废弃物）、储物柜（存放EP管、PCR管、枪头等耗材）、垃圾桶2个（1个配黑色垃圾袋，用于盛放普通垃圾；1个配黄色废弃物专用垃圾袋，用于盛放废弃物）。

2、检测室仪器设备：荧光定量PCR仪或其他检测设备。

3、实验耗材：采血器（或注射器）、真空采血管（EDTA抗凝剂）、1.5mLEP管及其管架、PCR八联管（与荧光PCR仪配套）及其管架、剪刀、镊子、搪瓷托盘、酒精灯等。

4、其他器材：实验台、操作椅、试剂架、器皿橱等。

5、个人防护用品：实验服、一次性乳胶手套、一次性口罩、一次性鞋套。

**（三）实验室检测人员**

屠宰企业应配备专职检测技术人员，检测人员应接受实验室分子生物学检测技术及生物安全相关知识培训，熟悉非洲猪瘟检测要求。

二、检测实验室操作规范

**（一）样品采集**

生猪屠宰企业应安排专人负责样品采集，并填好采样记录表（见附表1）。样品为生猪抗凝血（5mL，0.5%EDTA抗凝，不能使用肝素钠作为抗凝剂）或全血样品。

**（二）样品保存**

样品采集后，按要求进行混血，混血待检样品需在60℃下进行30min的灭活处理，在12h内检测的待检样品应在冰箱冷藏（4℃）保存，超过12h不能检测的样品和留样需冷冻保存。留样应至少保存3个月，以备复查。

样品需转运的，应按农业农村部《高致病性动物病原微生物菌（毒）或者样本运输包装规范》要求进行包装，并由专人将样品送至实验室，禁止使用公共交通工具运送。

**（三）样品检测**

1. 严格按照试剂说明书的操作步骤进行检测。
2. 采集的血液样品，可按照生猪批准次（车次）或一定的生猪数量进行混样，具体混样数量根据所使用的检测试剂盒的技术指标科学确定。
3. 待检血样必须充分混匀，使用经农业农村部批准或中国动物疫病预防控制中心对比符合要求的检测试剂盒进行检测。
4. 熟悉操作，缩短检测过程，以减少各种有害因素对核酸的破坏。
5. 所有试剂开盖前都应先瞬时离心，避免液体飞溅；若液体不小心溅到手套或桌面上，应立刻更换手套并清洁桌面。
6. 样品处理、配液、扩增严格分区操作，仪器、耗材等严禁交叉混用。
7. 加样时严禁反复吹吸。
8. 荧光探针应避光保存，反应液现配现用，加入核酸后应尽快上机。
9. 不要在荧光定量PCR管盖的采光部位做任何标记。

**（四）原始记录**

检测完成后应填写并保存相关检测原始记录（见附表2），检测原始记录、PCR图至少保存2年。

**（五）检测报告**

根据《关于全面开展生猪屠宰环节非洲猪瘟检测工作有关具体要求的通知》（川动监[2019]5号）要求，屠宰企业检测结果应规范出具《检测报告》（见附表3），载明对应的检疫合格证明编号、检测方法、检测日期、检测结果。检测报告必须经由报告编制人、驻场官方兽医和批准人（场点负责人）签字确认，加盖屠宰企业公章方为有效。检测报告一式两份，一份交驻场官方兽医存档，一份为屠宰企业自行留存，保存期至少2年。

**（六）结果处理**

1、检测结果为阴性，同批生猪产品上市销售。

2、检测结果为阳性，应立即停止生产，将检测结果报告驻场官方兽医，并及时将阳性样品送所在县级动物疫病预防控制中心，待复核后再做处理。复核为阳性的按照《非洲猪瘟疫情应急实施方案（2020年版）》的规定采取应急处置措施处理。

**三、检测实验室生物安全要求**

**（一）采样生物安全**

1、正确穿戴好口罩、手套、鞋套、实验服等个人防护用品。

2、尽可能使用物理设备保定动物，既保证人的安全，又保证样品质量。

3、一头猪一个注射器或一个真空采血管，避免样品交叉污染。

4、采样结束，采样人员脱去个人防护用品，并对采样环境清洁消毒。

**（二）检测过程中的生物安全**

1、检查样品外包装有无损坏，并对外包装进行消毒。

2、注射器使用完后必须放置于专用废弃盒中待高压灭菌处理，高压灭菌前不得拆卸针头和注射器。

3、尽量使用带滤芯的移液器吸头，不用移液器混匀液体。

4、对于管壁上沾有悬液的离心管，应短暂离心后再打开管盖。

5、核酸提取完成后应在更换手套后再进行配液。

6、配液区和核酸提取区严格分开，仪器、耗材等严禁交叉混用。

**（三）检测后实验室消毒**

1、实验室台面、桌椅、橱柜、门把手、水龙头等物品的表面可用有效氯浓度为0.1%-0.5%的消毒剂喷洒，作用30min后用清水擦拭。

2、实验室地面可用有效氯浓度为0.1%-0.5%的消毒剂喷雾或拖地，各实验室拖把应专用，不得混用。

3、废液缸、剪刀、镊子等可回收物，用消毒液浸泡30min后用清水清洗，可高温灭菌的用牛皮纸等包好后高压（121℃，20min）灭菌备用。

4、实验服等可重复利用的棉织制品，可经121℃、20min高压灭菌、清洗后使用，也可用氯化物、酚化物等消毒剂浸泡30min，清水清洗后晾干备用。

5、仪器设备：离心机、PCR仪等设备的金属部件使用75%乙醇擦拭消毒，非金属部件可使用含2.3%有效氯的次氯酸盐消毒30min，然后清水洗净或擦拭。

**（四）废弃物处理**

1、以下废弃物需进行高压灭菌处理：（1）超过留存期的所有样品；（2）使用后的枪头、EP管、采血管等；（3）一次性个人防护用品，如口罩、手套、鞋套等；（4）注射器针头等锐器使用后应直接弃置于耐高压、防穿透的容器内。将上述废弃物放入医疗废物袋，并在废物袋的中心位置放置高压指示带或化学指示卡，袋口应稍微扎口（不能太紧），袋口和外表面喷洒消毒剂，121℃高压灭菌处理20分钟，然后将灭菌后的废弃物存放在指定冰柜中，定期交由有资质的无害化处理企业进行无害化处理。

2、使用后的PCR反应管（内含反应产物）直接弃置于医疗废物袋中，禁止开盖（以免造成气溶胶污染），交由有资质的无害化处理企业进行无害化处理。

附表1

XXXX企业采样记录表

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 采样时间 | 采样人 | 样品名称及份数 | 样品编号 | 货主 | 联系电话 | 生猪来源 | 运猪车辆车牌号 | 承运人 | 检验合格证明编号 | 该车生猪总数 | 进场时间 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

附表2

XXXX企业

检测原始记录表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 样品编号： | 样品名称及份数： | |
| 检测项目： 非洲猪瘟病毒核酸 | 检测方法： 荧光PCR | |
| 诊断试剂名称： | 诊断试剂公司： | |
| 试剂批号： | 执行标准： | |
| 检测日期： | 环境温度： ℃ | 湿度： % |
| 主要仪器： | | |

|  |
| --- |
| 主要步骤： |

试验结果

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品编号 | Ct值 | 结果判定 | 样品编号 | Ct值 | 结果判定 |
| 阳性对照 |  |  |  |  |  |
| 阴性对照 |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
| 结  论 |  | | | | |

备 注：

检测人： 审核人：

日 期： 日 期：

第 页，共 页

附表3

**XXXXXXX 企业 第 页 共 页**

**报告编号**

**检 测 报 告**

**样品名称：**

**检测类别：** 自行检测

**XXXXXX 企 业**

**XXXXXX企业 第 页 共 页**

**注 意 事 项**

1. 报告书无检测单位公章无效。
2. 复制本报告书未重新加盖检测单位专用章无效。
3. 报告书无编制人、企业负责人、驻场官方兽医签章（名）无效。
4. 报告书涂改无效。
5. 报告书不能作为商业广告用。
6. 本报告一式两份，一份交驻场官方兽医存档，一份屠宰企业自行留存，保存期至少2年。

地 址：

通讯地址：

邮政编码：

电话号码：

**XXXXXX企业 第 页 共 页**

**检 测 报 告**

**报告编号：**

**样 品 信 息**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 采样场点 |  | | 采样日期 |  |
| 采样地址 |  | | 检测日期 |  |
| 采样人单位 |  | | 采样人 |  |
| 样品名称及数量 |  | | | |
| 样品编号 |  | 检疫合格证明编号 | |  |
| 样品特性和状态 |  | 试验环境条件 | |  |

**检 测 结 果**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **检测项目** | **方法及执行标准** | **结 果** |
| 非洲猪瘟病毒核酸 |  | 共检测XXX份，其中阳性XXX份，阴性XXX份（详细结果见附表）。 |
| 备注 |  | |
| 以下无正文 | | |

编制人： 企业负责人： 驻场官方兽医：

XXXXX企业

年 月 日

**XXXXX企业 第 页 共 页**

附表

**（XXXXX企业）样品非洲猪瘟检测结果**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样品编号 | 样品类型 | 样品来源 | 检疫合格证明编号 | 检测结果 | 备注 |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |
| 以下无正文 | | | | | |