

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〔2025〕87号

中国动物疫病预防控制中心关于印发 《主要动物疫病诊断检测方法验证技术说明》的通知

各省、自治区、直辖市、计划单列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机构：

为加强兽医实验室检测能力建设，提升主要动物疫病诊断检测质量和标准化水平，根据《2025年国家动物疫病监测实施意见》（疫控监〔2025〕23号）和《中国动物疫病预防控制中心关于做好动物疫病监测诊断试剂采购配制等工作的通知》（疫控监〔2025〕72号），我中心组织制定了《主要动物疫病诊断检测方法验证技术说明》。现印发你们，请参照执行。

附件：主要动物疫病诊断检测方法验证技术说明

中国动物疫病预防控制中心
(农业农村部屠宰技术中心)

2025年5月23日



附件

主要动物疫病诊断检测方法验证技术说明

为指导做好动物疫病诊断检测方法验证工作，按照《2025年国家动物疫病监测实施意见》（疫控监〔2025〕23号）和《中国动物疫病预防控制中心关于做好动物疫病监测诊断试剂采购配制等工作的通知》（疫控监〔2025〕72号）要求，特制定本技术说明。

一、分子生物学检测方法验证

（一）基本情况

对于非洲猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征、禽流感（H5/H7亚型）、口蹄疫等疫病病原已有合法合规的商品化分子生物学检测试剂（盒）产品（以下简称“商品化试剂（盒）”）；猪瘟、禽流感（通检/H9亚型）、新城疫、小反刍兽疫、布鲁氏菌病、炭疽等疫病病原暂无合法合规的商品化试剂（盒），可参考国家标准、行业标准和 WOAHP 标准等（详见表1）自行配制体系（以下简称“标准方法体系”）。

表 1.猪瘟、禽流感等疫病病原分子生物学方法参考标准

疫病名称	国家/行业标准	国际标准
猪瘟	GB/T 16551-2020 猪瘟诊断技术	WOAH 陆生动物诊断试验和疫苗手册 3.9.2 章（2022 版）
禽流感 (通检/H9 亚型)	GB/T18936-2020 高致病性禽流感诊断技术（现行） GB/T 18936-2025 禽流感诊断技术（2025.8.1.实施）	WOAH 陆生动物诊断试验和疫苗手册 3.3.4 章（2021 版）
新城疫	GB/T 16550-2020 新城疫诊断技术	WOAH 陆生动物诊断试验和疫苗手册 3.3.14 章（2021 版）
小反刍兽疫	GB/T 27982-2011 小反刍兽疫诊断技术	WOAH 陆生动物诊断试验和疫苗手册 3.8.9 章（2022 版）
布鲁氏菌病	GB/T 18646-2018 动物布鲁氏病诊断技术	WOAH 陆生动物诊断试验和疫苗手册 3.1.4 章（2022 版）
炭疽	NY/T 561-2015 动物炭疽诊断技术（普通 PCR） GB/T 45101-2024 动物炭疽诊断技术（2025.7.1 实施）	WOAH 陆生动物诊断试验和疫苗手册 3.1.1 章（2023 版）

（二）验证程序

1.样品盘制备

(1) 样品类型

样品盘中的样品，可使用灭活的病毒培养物、疫苗、全血/血浆/血清、组织研磨液、重组阳性质粒等多种样品类型，应结合具体使用场景选择合适的样品类型。

(2) 样品盘组成

包括分析敏感性（灵敏度）、分析特异性（交叉反应性）、诊断敏感性、诊断特异性、批内重复性、批间重复性等需要的样品盘。针对不同评价指标的样品盘组成见表 2。

表 2.分子生物学样品盘组成

评价指标	样品类型	样品数量 (份)	备注
分析敏感性	强阳性标准物质/标准样品/质控品（以下统称为质控品）	15~25	用基质或者 0.01M pH 7.2 PBS 缓冲液进行 10 倍梯度稀释，使终浓度范围包括 $10^4 \sim 10^0$ copies/ μ L，每个稀释度设 3~5 个重复。
分析特异性	同物种常感染的其他疫病病原的高浓度培养物/质控品	≥ 3	应选择至少 3 种同物种其他疫病病原核酸阳性样品，可增加不同基质的阴性样品，如全血、血浆、血清、组织研磨液、环境拭子等。
诊断敏感性	临床阳性样品	20~50	1. 包括强阳性、中等阳性、弱阳性样品，样品量建议为 20~50 份，其中弱

			阳性样品的比例不少于 1/3。 2. 临床样品应背景清晰，并且通过标准方法或者多种方法综合判定。 3. 用于筛查目的时应增加敏感性样品比例。 4. 建议包括不同样品基质。
诊断特异性	临床阴性样品	20~50	样品量建议为 20~50 份，用于确诊目的时应增加特异性样品比例。
批内重复性	强阳性、中等阳性、	4~8	同批次 ≥ 3 个商品化试剂（盒）/标准方法体系。
批间重复性	弱阳性、阴性		≥ 3 个不同批次商品化试剂（盒）/标准方法体系。

（3）样品盘测定

样品盘制备后，应使用标准方法或荧光 PCR、数字 PCR 等多种方法对样品进行评价测试，不合格的样品应重新制备。

2. 验证试验和结果分析

严格按照商品化试剂（盒）说明书或依据标准对样品盘进行检测，并对所取得的结果进行分析。

（1）分析特性

A.分析敏感性：以所有重复检测结果均为阳性的最高稀释倍数作为商品化试剂（盒）/标准方法体系的检测灵敏度。

B.分析特异性：与同物种其他动物疫病病原有无交叉反应。

（2）诊断特性：每个样品检测1次，根据判定标准判定阴、阳性，并按照附表1、附表2中的公式分别计算方法的诊断敏感性（DSe）、诊断特异性（DSp）、Kappa值和总符合率。

（3）重复性：对重复性样品进行至少3次检测，并按照附表3、附表4中的公式分别计算符合度和Ct值的变异系数（CV%）。如需验证普通PCR/RT-PCR方法，只计算其符合度。

A.批内重复：使用随机选取的同批次3个商品化试剂（盒）/标准方法体系对重复性样品进行检测，计算批内符合度和批内变异系数。

B.批间重复：选取3个不同批次的商品化试剂（盒）/标准方法体系对重复性样品进行检测，计算批间符合度和批间变异系数。

二、血清学检测方法验证

（一）基本情况

对于非洲猪瘟、伪狂犬病、口蹄疫、猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征、禽白血病、禽流感（H5/H7亚型）、新城疫、布鲁氏

菌病、小反刍兽疫等疫病抗体均有合法合规的商品化血清学检测试剂（盒）产品。

（二）验证程序

1. 样品盘制备

（1）样品类型

样品盘中的样品，可使用灭活的动物血清（经 56℃ 水浴灭活 30min，其中布鲁氏菌病、炭疽的动物血清经 70℃ 灭活 30min）。

（2）样品盘组成

包括分析敏感性、分析特异性、诊断敏感性、诊断特异性、批内重复性、批间重复性、板内重复性等需要的样品盘。针对不同评价指标的样品盘组成见表 3。

表 3. 血清学样品盘组成

评价指标	样品类型	样品数量 (份)	备注
分析敏感性	强阳性质控品	27	用 SPF 动物血清或者 0.01M pH7.2 PBS 缓冲液进行 2 倍倍比稀释至 $2^0 \sim 2^{-8}$ ，每个稀释度设 3 个重复。
分析特异性	同物种常感染的其他疫病的阳性血清标准	≥ 3	应选择至少 3 种同物种其他疫病病原抗体的阳性血清。

物质/样品/质控品

诊断敏感性	临床阳性样品	20~50	1. 包括感染不同时期的实验/临床感染动物血清，应包含强阳性、中等阳性和弱阳性样品，样品量建议为 20~50 份，其中弱阳性样品的比例不少于 1/3。 2. 临床样品阳性、阴性应背景清晰，并且通过标准方法或者多种方法综合判定。 3. 用于筛查目的时应增加敏感性样品比例。
诊断特异性	临床阴性样品	20~50	样品量建议为 20~50 份，用于确诊目的时应增加特异性样品比例。
批内重复性	强阳性、中等阳性、 弱阳性、阴性	4~8	同批次 ≥ 3 个试剂（盒）。
批间重复性			≥ 3 个不同批次试剂（盒）。
板内重复性*			同块反应板， ≥ 3 个板条。

注：板内重复性*适用于评价 ELISA 试剂盒时使用。

（2）样品盘血清用量

每个样品盘中，每份样品总量不少于 1 mL，重复性样品不少于 3mL。如需进行多次试验，应进行分装，避免反复冻融。

(3) 样品盘测定

样品盘制备后，应使用标准方法或多种方法对样品进行评价测试，不合格的样品应重新制备。

2. 验证试验和结果分析

严格按照商品化试剂（盒）说明书对样品盘进行检测，并对所取得的结果进行分析。

(1) 分析特性

A. 分析敏感性：以所有重复检测结果均为阳性的最高稀释倍数作为试剂（盒）的检测灵敏度。

B. 分析特异性：与同物种其他动物疫病病原抗体的阳性血清有无交叉反应。

(2) 诊断特性：每个样品检测 1 次，根据判定标准判定阴、阳性，并按照附表 1、附表 2 中的公式分别计算试剂（盒）的诊断敏感性、诊断特异性、Kappa 值和总符合率。

(3) 重复性：对重复性样品进行至少 3 次检测，按照附表 3 中的公式计算试剂（盒）的符合度；按照附表 4 中的公式计算试剂（盒）的变异系数；验证凝集试验方法时，只计算其符合度。

A.批内重复：使用随机选取的同批次 3 个商品化试剂（盒）对重复性样品进行检测，计算批内符合度和批内变异系数。

B.批间重复：选取 3 个不同批次的商品化试剂（盒）对重复性样品进行检测，计算批间符合度和批间变异系数。

C.板内重复：对于 ELISA 试剂盒，使用随机选取同一反应板的 3 个板条对重复性样品进行检测，计算板内符合度和板内变异系数。

三、有关说明

1. 实验室在选用标准方法体系时，应参照上述验证程序，至少验证体系的分析敏感性、分析特异性和重复性；选用商品化试剂（盒）时，可参照上述验证程序开展评价。

2. 无法获得临床样品的实验室，可考虑使用稳定的标准物质/标准样品/质控品进行模拟。

3. 对于分析敏感性、分析特异性、诊断敏感性、诊断特异性、符合率、Kappa 值、重复性等参数，各实验室应根据监测目的选择适合的指标值。

（1）分子生物学方法（以荧光 PCR 和荧光 RT-PCR 方法为例）可参考参数值：分析敏感性为 1~10 copies/ μ L，分析特异性为 100%，诊断敏感性和诊断特异性为 90%~100%，Kappa 值>0.8，重复性测定样品 Ct 值的 CV% $\leq$ 5%，符合度为 100%。

(2) 血清学方法 (以 ELISA 为例) 可参考参数值: 分析特异性为 100%, 诊断敏感性和诊断特异性为 85%~100%, Kappa 值 >0.8 , 重复性测定样品计算值的 CV% $\leq 10\%$, 符合度为 100%; 各病种 ELISA 方法的分析敏感性差异较大, 建议各实验室择优使用。

4. 商品化试剂 (盒) 工艺、检测所需时间、操作复杂性等, 也应当作为验证的综合评判指标。

附表: 1. 诊断敏感性和诊断特异性数据统计公式

2. Kappa 值计算数据统计公式

3. 符合度计算数据统计公式

4. 变异系数计算数据统计公式

附表 1

诊断敏感性和诊断特异性数据统计公式

	阳性样品	阴性样品	DSe	DSp
诊断阳性	TP	FP		
诊断阴性	FN	TN		
诊断敏感性 $DSe=TP/（TP+FN）\times100\%$				
诊断特异性 $DSp=TN/（TN+FP）\times100\%$				
总符合率= $（TP+TN）/（TP+FN+FP+TN）\times100\%$				

附表 2

Kappa 值计算数据统计公式

		样品盘		
		阳性	阴性	总计
待评价试剂（盒）	诊断阳性	N ₁₁	N ₁₂	N _{1.}
	诊断阴性	N ₂₁	N ₂₂	N _{2.}
	总计	N _{.1}	N _{.2}	N
$Kappa = [N(N_{11} + N_{22}) - (N_{1.} \times N_{.1} + N_{2.} \times N_{.2})] / [N^2 - (N_{1.} \times N_{.1} + N_{2.} \times N_{.2})]$ Kappa 值在 0.81-1，说明完全符合；如果 Kappa 值在 0.61-0.8 时，高度符合； Kappa 值在 0.41-0.6，中度符合；0.21-0.4，比较符合；0.2 以下轻度符合；0 以下不符合				

附表 3

符合度计算数据统计公式

	重复性样品 1	重复性样品 2	重复性样品 3	符合度
阴阳性判断				
符合度=判定阳性的重复性样品/3 ×100%				

附表 4

变异系数计算数据统计公式

	重复性 样品 1	重复性 样品 2	重复性 样品 3	重复性样品 Ct 值或计算 值均值	重复性样品 Ct 值或计算 值标准偏差	变异系数 (CV%)
Ct 值/ 计算值*						
变异系数 CV%=重复性样品 Ct 值或计 算值标准偏差/重复性样品 Ct 值或计算 值均值×100%						

*计算值是指按照试剂（盒）说明书中的公式计算后获得的数值，如 S/P 值、S/N 值、阻断率等。

中国动物疫病预防控制中心（农业农村部屠宰技术中心）办公室

2025 年 5 月 23 日印发
