

农业部办公厅

农办医函〔2014〕64号

农业部办公厅关于征求《无规定动物疫病区 管理技术规范(征求意见稿)》意见的函

各省、自治区、直辖市及计划单列市畜牧兽医(农牧、农业)厅(局、委、办),新疆生产建设兵团畜牧兽医局,国家兽医参考实验室和专业实验室,部属有关事业单位:

为进一步加强动物疫病区域化管理工作,我们对《无规定动物疫病区管理技术规范》(农医发〔2007〕3号)进行了修订,形成了《无规定动物疫病区管理技术规范(征求意见稿)》,相关材料已发邮箱 syjfyc202@163.com。现征求你单位意见,请于12月15日前将修改意见书面反馈我部兽医局。

联系人:赵浩军 陈国胜

联系电话:010-59193394 59191403

传 真:010-59192861

附件：无规定动物疫病区管理技术规范(征求意见稿)

农业部办公厅

2014年12月3日

附件

无规定动物疫病区管理技术规范

目 录

第一部分 无疫区标准	9
通则	10
无口蹄疫区标准	14
无猪瘟区标准	16
无小反刍兽疫区标准	17
无高致病性禽流感区标准	19
无新城疫区标准	20
无马流感区标准	21
无亨德拉病区标准	22
无西尼罗河热区标准	23
无伊氏锥虫病(苏拉病)区标准	24
无马梨形虫病区标准	25
无日本脑炎区标准	26
无马脑脊髓炎(东方和西方)区标准	27
无马病毒性动脉炎区标准	28
无尼帕病毒病区标准	30
无水泡性口炎区标准	31
无非洲马瘟区标准	33

无马鼻疽区标准	34
无马传染性贫血病区标准	35
无马媾疫区标准	36
第二部分 无规定动物疫病生物安全隔离区规范	37
通则	38
无口蹄疫生物安全隔离区标准	43
无猪瘟生物安全隔离区标准	44
无高致病性禽流感生物安全隔离区标准	45
无新城疫生物安全隔离区标准	46
无布鲁氏菌病生物安全隔离区标准	47
第三部分 基础体系	48
兽医机构建设规范	49
兽医实验室建设管理规范	51
动物防疫档案管理规范	59
畜牧业基本情况报告规范	62
第四部分 预防与监测	71
样品采集、保存及运输技术规范	72
畜禽免疫技术规范	76
规定动物疫病监测准则	78
口蹄疫诊断技术规范	83
猪瘟诊断技术规范	99
小反刍兽疫诊断技术规范	111

高致病性禽流感诊断技术规范	117
新城疫诊断技术规范	127
马流感诊断技术规范	134
亨德拉病诊断技术规范	140
西尼罗河热诊断技术规范	147
伊氏锥虫病(苏拉病)诊断技术规范	157
马梨形虫诊断技术规范	162
日本脑炎诊断技术规范	168
马脑脊髓炎(东方和西方)诊断技术规范	178
马病毒性动脉炎诊断技术规范	185
尼帕病诊断技术规范	192
水泡性口炎诊断技术规范	198
非洲马瘟诊断技术规范	207
马鼻疽诊断技术规范	216
马传染性贫血诊断技术规范	225
马媾疫诊断技术规范	231
第五部分 检疫与监管	235
动物隔离场管理规范	236
动物无害化处理场管理规范	238
消毒技术规范	240
活畜禽交易市场动物卫生管理规范	245
公路动物卫生监督检查站建设管理规范	246

动物及动物产品流通控制规范	248
动物及动物产品追溯规范	249
饲养场动物卫生管理通用规范	251
家禽饲养场动物卫生管理规范	253
养猪场动物卫生管理规范	256
奶畜养殖场动物卫生管理规范	259
肉牛养殖场动物卫生管理规范	262
马养殖场动物卫生管理规范	265
屠宰厂(场)动物卫生管理规范	268
家禽屠宰检疫规范	270
牛屠宰检疫规范	272
羊屠宰检疫规范	274
猪屠宰检疫规范	276
规定动物疫病风险评估准则	279
第六部分 应急与处置	284
口蹄疫应急处置技术规范	285
猪瘟应急处置技术规范	288
小反刍兽疫应急处置技术规范	290
高致病性禽流感应急处置技术规范	293
新城疫应急处置技术规范	296
马流感应急处置技术规范	298
亨德拉病应急处置技术规范	301

西尼罗河热应急处置技术规范	304
伊氏锥虫病应急处置技术规范	307
马梨形虫病应急处置技术规范	310
日本脑炎应急处置技术规范	313
马脑脊髓炎(东方和西方)应急处置技术规范	316
马病毒性动脉炎处置技术规范	319
尼帕病应急处置技术规范	322
水泡性口炎处置技术规范	325
非洲马瘟应急处置技术规范	328
马鼻疽应急处置技术规范	331
马传染性贫血应急处置技术规范	334
马媾疫处置技术规范	337
紧急流行病学调查技术规范	340

农办医函〔2014〕64号

农业部办公厅关于征求《无规定动物疫病区 管理技术规范(征求意见稿)》意见的函

各省、自治区、直辖市及计划单列市畜牧兽医(农牧、农业)厅(局、委、办),新疆生产建设兵团畜牧兽医局,国家兽医参考实验室和专业实验室,部属有关事业单位:

为进一步加强动物疫病区域化管理工作,我们对《无规定动物疫病区管理技术规范》(农医发〔2007〕3号)进行了修订,形成了《无规定动物疫病区管理技术规范(征求意见稿)》,相关材料已发邮箱 syjfyc202@163.com。现征求你单位意见,请于12月15日前将修改意见书面反馈我部兽医局。

联系人:赵浩军 陈国胜

联系电话:010-59193394 59191403

传 真:010-59192861

附件：无规定动物疫病区管理技术规范(征求意见稿)

农业部办公厅

2014年12月3日

附件

无规定动物疫病区管理技术规范

目 录

第一部分 无疫区标准	9
通则	10
无口蹄疫区标准	14
无猪瘟区标准	16
无小反刍兽疫区标准	17
无高致病性禽流感区标准	19
无新城疫区标准	20
无马流感区标准	21
无亨德拉病区标准	22
无西尼罗河热区标准	23
无伊氏锥虫病(苏拉病)区标准	24
无马梨形虫病区标准	25
无日本脑炎区标准	26
无马脑脊髓炎(东方和西方)区标准	27
无马病毒性动脉炎区标准	28
无尼帕病毒病区标准	30
无水泡性口炎区标准	31
无非洲马瘟区标准	33

无马鼻疽区标准	34
无马传染性贫血病区标准	35
无马媾疫区标准	36
第二部分 无规定动物疫病生物安全隔离区规范	37
通则	38
无口蹄疫生物安全隔离区标准	43
无猪瘟生物安全隔离区标准	44
无高致病性禽流感生物安全隔离区标准	45
无新城疫生物安全隔离区标准	46
无布鲁氏菌病生物安全隔离区标准	47
第三部分 基础体系	48
兽医机构建设规范	49
兽医实验室建设管理规范	51
动物防疫档案管理规范	59
畜牧业基本情况报告规范	62
第四部分 预防与监测	71
样品采集、保存及运输技术规范	72
畜禽免疫技术规范	76
规定动物疫病监测准则	78
口蹄疫诊断技术规范	83
猪瘟诊断技术规范	99
小反刍兽疫诊断技术规范	111

高致病性禽流感诊断技术规范	117
新城疫诊断技术规范	127
马流感诊断技术规范	134
亨德拉病诊断技术规范	140
西尼罗河热诊断技术规范	147
伊氏锥虫病(苏拉病)诊断技术规范	157
马梨形虫诊断技术规范	162
日本脑炎诊断技术规范	168
马脑脊髓炎(东方和西方)诊断技术规范	178
马病毒性动脉炎诊断技术规范	185
尼帕病诊断技术规范	192
水泡性口炎诊断技术规范	198
非洲马瘟诊断技术规范	207
马鼻疽诊断技术规范	216
马传染性贫血诊断技术规范	225
马媾疫诊断技术规范	231
第五部分 检疫与监管	235
动物隔离场管理规范	236
动物无害化处理场管理规范	238
消毒技术规范	240
活畜禽交易市场动物卫生管理规范	245
公路动物卫生监督检查站建设管理规范	246

动物及动物产品流通控制规范	248
动物及动物产品追溯规范	249
饲养场动物卫生管理通用规范	251
家禽饲养场动物卫生管理规范	253
养猪场动物卫生管理规范	256
奶畜养殖场动物卫生管理规范	259
肉牛养殖场动物卫生管理规范	262
马养殖场动物卫生管理规范	265
屠宰厂(场)动物卫生管理规范	268
家禽屠宰检疫规范	270
牛屠宰检疫规范	272
羊屠宰检疫规范	274
猪屠宰检疫规范	276
规定动物疫病风险评估准则	279
第六部分 应急与处置	284
口蹄疫应急处置技术规范	285
猪瘟应急处置技术规范	288
小反刍兽疫应急处置技术规范	290
高致病性禽流感应急处置技术规范	293
新城疫应急处置技术规范	296
马流感应急处置技术规范	298
亨德拉病应急处置技术规范	301

西尼罗河热应急处置技术规范	304
伊氏锥虫病应急处置技术规范	307
马梨形虫病应急处置技术规范	310
日本脑炎应急处置技术规范	313
马脑脊髓炎(东方和西方)应急处置技术规范	316
马病毒性动脉炎处置技术规范	319
尼帕病应急处置技术规范	322
水泡性口炎处置技术规范	325
非洲马瘟应急处置技术规范	328
马鼻疽应急处置技术规范	331
马传染性贫血应急处置技术规范	334
马媾疫处置技术规范	337
紧急流行病学调查技术规范	340

第一部分 无疫区标准

通则

无口蹄疫区标准

无猪瘟区标准

无小反刍兽疫区标准

无高致病性禽流感区标准

无新城疫区标准

无马流感区标准

无亨德拉病区标准

无西尼罗河热区标准

无伊氏锥虫病（苏拉病）区标准

无马梨形虫病区标准

无日本脑炎区标准

无马脑脊髓炎（东方和西方）区标准

无马病毒性动脉炎区标准

无尼帕病毒病区标准

无水泡性口炎区标准

无非洲马瘟区标准

无马鼻疽区标准

无马传染性贫血病区标准

无马媾疫区标准

通 则

1 范围

本规范规定了建立无规定动物疫病区的基本条件、各类区域建设的条件以及无规定动物疫病区建设的一般步骤。

本标准适用于无规定动物疫病区的建设、管理和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本部分，然而，鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

- 《中华人民共和国动物防疫法》
- 《动物疫情报告管理办法》
- 《一、二、三类动物疫病病种名录》
- 《畜禽标识与养殖档案管理办法》
- 《无规定动物疫病区评估管理办法》

3 术语和定义

本标准采用下列定义：

3.1 动物疫病

《中华人民共和国动物防疫法》及《一、二、三类动物疫病病种名录》规定的一、二、三类动物疫病。

3.2 规定动物疫病

根据国家或某一区域需要，列为国家或某一区域重点控制或消灭的疫病。

3.3 区（区域）

动物卫生状况和地理或行政界限清楚的地理区域。

3.4 无规定动物疫病区

在某一确定区域，在规定期限内没有发生过某种或某几种动物疫病，且在该区域及其边界和外围一定范围内，对动物和动物产品的流通实施官方有效控制并经国家验收合格的区域（以下简称“无疫区”）。根据是否在区域内采取免疫措施，分为免疫无疫区和非免疫无疫区。

3.5 动物亚群

指动物群体中可根据某些共同动物卫生特征而识别的部分。动物亚群可通过自然（地理）、人工屏障或生物安全措施同其他动物亚群进行流行病学隔离，且该动物亚群的特定动物卫生状况清楚。

3.6 地理屏障

亦称自然屏障，是指自然存在的足以阻断某种疫病传播、人和动物自然流动的地貌或地理阻隔，如山峦、河流、沙漠、海洋、沼泽地等。

3.7 人工屏障

指为防止规定动物疫病侵入无疫区，由省级人民政府批准的，在无疫区周边建立的动物卫生监督检查站、隔离设施、封锁设施等。

3.8 保护区

为防止规定的动物疫病侵入无疫区，根据自然、地理或行政区域等条件，沿无疫区边界设立的保护区域，在区域内采取了防止致病病原进入无疫区的相关措施，这些措施可包括但不限于免疫接种、强化监测和易感动物的移动控制等。

3.9 控制区

指根据动物疫病的流行病学因素及调查结果，在可疑或已确认感染的养殖场及其周围划定实施控制措施以防止感染蔓延的区域。

3.10 潜伏期

病原侵入动物到首次出现疫病临床症状的最长时间。

4 建立无疫区的基本条件

4.1 区域区划

对动物疫病实施区域化管理的区域应当由兽医主管部门依据地理、法律或人工屏障划分，并通过官方渠道公布。区域应集中连片，具有一定规模和范围，可以是省、自治区、直辖市的部分或全部区域，也可以是毗邻省的连片区域，原则上，至少与地级行政区域一致。

4.2 社会经济状况

区域所在地应具有一定畜牧业基础或经济贸易需求，且当地的经济发展水平、财政经费等能保障和支持无疫区的建立和维持；行政管理和社会管理对该项工作给予有效的支持。

4.3 机构队伍

4.3.1 县级以上地方人民政府成立无疫区建设与管理指挥协调机构和专家组织。

4.3.2 具有健全的省、市、县三级兽医主管部门。

4.3.3 具有统一、稳定的省、市、县三级动物卫生监督机构和依法开展动物卫生监督执法的工作队伍。

4.3.4 具有统一、稳定的省、市、县三级动物疫病预防控制机构和开展动物疫病监测、诊断、流行病学调查等技术支持的工作队伍。

4.3.5 具有稳定的基层动物防疫机构和相应的队伍。

4.4 法规制度

根据有关法律、法规，结合建设区域的自然、地理、畜牧业生产和社会经济发展状况，制定完善该区域实施区域化管理工作的各项法规、规章、规范、标准和制度。

4.5 财政支持

建立稳定的财政投入机制，保证基础设施设备建设和日常运转维护的经费投入，各级动物卫生监督机构、动物疫病预防控制机构、基层动物防疫机构的人员及工作经费应当全额纳入财政预算，保证村级防疫员补贴落实到位。

4.6 防疫屏障

无疫区与相邻地区间具备地理屏障、人工屏障或保护区。确定并公布动物及动物产品进入无疫区的指定通道，并在进入无疫区的主要交通道口及口岸设立动物卫生监督检查站，配备检疫、消毒、交通和信息传输的设施设备，完善运行机制，对动物及其产品实施严格的监督检查。设立动物隔离场及相应设施。设立警示标志。

4.7 测报预警

规定动物疫病必须是《动物防疫法》等法律法规及有关文件规定报告的动物疫病。健全疫情报告制度，规范疫情确认程序，完善疫情测报预警体系；有针对性地开展区域内流行病学监测与调查，掌握相关基础情况。无疫区所在省、市、县有完备的疫情信息传递、档案资料管理设备和疫情档案资料，具有对动物疫情准确及时报告和预警能力，并按照《动物疫情报告管理办法》的要求，及时、准确报告疫情。

4.8 流通监管

完善动物及动物产品流通监管制度。无疫区引进动物及其产品应来源于规定的无疫区，确需从非无疫区引入易感动物及其产品的，必须到输入地省级动物卫生监督机构或其指定的动物卫生监督机构办理准引手续；引入的动物产品，从指定通道进入无疫区；引入的易感动物在动物隔离场按规定隔离，检疫合格后经指定通道进入无疫区。

4.9 检疫监管

强化检疫监管，规范实施动物及其产品饲养、生产、加工、流通等环节的动物防疫条件审核；按照《畜禽标识及养殖档案管理办法》的规定，严格实施动物养殖档案及畜禽标识制度；严格实施检疫，按规定制作、管理和使用检疫证明和标志，确保动物及其产品能够追溯溯源。

4.10 规划制定

当地兽医主管部门在准确把握动物繁育、饲养、流通、进出口、屠宰、加工和疫情信息等基本情况的基础上，客观评价动物卫生状况，制定疫病扑灭、净化规划或计划及无疫区建设实施方案。

5 各类区域建设的条件

5.1 免疫无疫区

5.1.1 在规定时限内没有规定动物疫病的临床病例和感染。

5.1.2 免疫无疫区按规定实施免疫，并执行畜禽标识制度。

5.1.3 从无疫区以外的地区和国家引进动物及动物产品，按动物及动物产品流通控制规范执

行。

5.1.4 必要时，沿无疫区边界应设立保护区，与国内其它地区及邻国相隔离。

5.1.5 具备有效的、符合规定的监测系统和记录，所有相关报告和记录等材料准确、详细和齐全。

5.2 非免疫无疫区

5.2.1 在规定时限内没有规定动物疫病的临床病例和感染。

5.2.2 在一定时间范围内区域内所有的易感动物不实施免疫。

5.2.3 必要时，非免疫无疫区沿边界应设立保护区，与国内其它地区及邻国相隔离。

5.2.4 从非免疫无疫区以外的地区和国家引入动物及动物产品，按动物及动物产品流通控制规范执行。

5.2.5 具备有效的、符合规定的监测系统和记录，所有相关报告和记录等材料准确、详细和齐全。

5.3 保护区

根据地理、人工条件及规定动物疫病流行病学特点，设置保护区。保护区可以设在无疫区内，也可以设在无疫区外，原则上，保护区区域范围至少与县级行政区域一致。

5.3.1 实施科学的疫病监控计划，包括对易感野生动物物种及虫媒的监测。

5.3.2 根据需要实施免疫，并实行标识制度。

5.3.3 动物及动物产品流通应遵循相关规范。

5.3.4 怀疑暴发疫病时必须立即调查，并采取必要措施，若确诊应立即组织扑灭。

5.3.5 采取强化的生物安全措施，包括对运输物及规定运输路线的清洁、消毒等。

5.3.6 对公众或者特定人群（饲养者、贸易相关人员、猎人和兽医工作人员等）进行知情教育。

5.4 控制区

在无疫区（包括保护区）内暴发局域性某规定动物疫病时，应在发生规定动物疫病的区域设立感染控制区，该区域应包含所有的规定动物疫病病例。

5.4.1 确定疫情是局域性的

一旦发现疑似规定动物疫病疫情，立即做出快速反应并向兽医主管部门通报。通过流行病学调查（追踪和溯源）证实动物疫病局限在该区域内，并已确定了最先发生地，完成了可能传染源的调查、确认了所有病例间的流行病学关联。

5.4.2 明确界定控制区内的易感动物群，禁止动物移动，有效控制有关动物产品的流通。

5.4.3 实施了扑杀政策，控制区内最后一个病例扑杀后，在规定动物疫病的2个潜伏期内没有新病例发生。

5.4.4 通过实施有效的动物卫生措施，建立物理屏障或借助地理屏障，有效防止规定动物疫病扩散到控制区以外的其他区域。

5.4.5 在控制区内开展持续监测，并强化控制区以外区域的被动和目标监测，没有发现任何感染证据。

5.4.6 在建立控制区之前，控制区外的无疫状况暂时停止。一旦控制区清楚地建立，控制区外的无疫状况随即恢复。

6 无疫区的建设步骤

6.1 免疫控制

6.1.1 目标：规定期限内无临床病例。

6.1.2 主要措施：制定科学的免疫计划，实施免疫接种，开展流行病学和免疫效果监测；加强流通控制。

6.1.2.1 按规定对区域内的易感动物实施免疫接种，进行免疫抗体和免疫带毒监测；及时分析调整免疫程序，适时补免和加强免疫。

6.1.2.2 加强对易感动物及动物产品的流通控制，严格实施产地检疫和屠宰检疫，检疫率达到100%。

6.1.2.3 对可疑病例及时诊断并采取控制疫病扩散措施；一经确诊，按规定扑杀易感动物，做好无害化处理。按监测技术规范要求实施疫病监测。

6.1.2.4 规定期限内未发现临床病例，视为达到免疫控制标准，转入监测净化阶段。

6.2 免疫无疫

6.2.1 目标：规定期限内无感染。

6.2.2 主要措施：加强病原和免疫效果监测，强制扑杀感染动物及同群动物，逐步缩小免疫接种区域。

6.2.2.1 根据病原监测结果，经风险评估，逐步缩小免疫接种的区域，免疫区域的免疫密度应达到 100%。

6.2.2.2 按监测技术规范要求，重点开展病原监测，发现野毒携带动物按疫点处置办法处置；同时强化对周边 3 公里范围内的易感动物进行抽样监测，发现阳性动物同样按疫点处置办法处理。

6.2.2.3 对区域内的动物及其产品实施检疫，对检疫中发现的可疑染疫动物进行追踪溯源；对进入区域内的动物及其动物产品实施准引审批和隔离检疫。

连续实施监测净化一定时期，在监测检疫中均未发现可疑感染动物，可转入无疫监测阶段，未发现感染动物即可申报免疫无疫区评估。

6.3 非免疫无疫

6.3.1 目标：规定期限内非免疫无感染。

6.3.2 主要措施：停止免疫；强化监测；扑杀并无害化处理感染动物。

6.3.2.1 区域内全部停止免疫。

6.3.2.2 强化监测和检疫，发现发病动物和感染动物，按疫情处理。

6.3.2.3 强化流通控制，非免疫无疫区引进易感动物及其产品，应当来自相应的其他非免疫无疫区，对确需进入非免疫无疫区的易感动物，应先在保护区内按规定实施监控，确定符合非免疫无疫区动物卫生要求后方可进入。

上述措施实施一定时期后，未发现感染动物和患病动物即可申报非免疫无疫区评估。

6.4 评估

对符合 6.2 和 6.3 规定的区域，可向农业部申请国家评估验收。全国动物卫生风险评估专家委员会按照《无规定动物疫病区评估管理办法》的规定及相关标准进行评估。评估合格后，由农业部进行公布，并根据需要向有关国际组织申请国际认证或宣布。

无口蹄疫区标准

1 范围

本标准规定了无口蹄疫区的条件。

本标准适用于无口蹄疫区的建设和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本部分，然而，鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

《无疫区标准 通则》

《口蹄疫诊断技术规范》

《规定动物疫病监测准则》

《口蹄疫防治技术规范》

3 术语和定义

除《无疫区标准 通则》规定的术语和定义适用于本文件外，下列术语和定义适用于本文件。

3.1 口蹄疫病毒感染

出现以下任一情况可定义为发生了口蹄疫病毒感染：

(1) 从易感动物及其产品中分离鉴定出口蹄疫病毒；

(2) 从易感动物中检测出口蹄疫病毒核酸或抗原；

(3) 从出现口蹄疫的临床症状、或具有与证实发生了口蹄疫或疑似暴发口蹄疫的流行病学相关性以及与口蹄疫病毒接触或相关的易感动物中检测出不是由疫苗免疫产生的结构蛋白抗体或非结构蛋白抗体。

3.2 口蹄疫病毒循环

在免疫动物群体中，通过口蹄疫的临床症状、病毒分离或血清学证据，证明口蹄疫病毒在易感动物群中发生了传播。

4 潜伏期

口蹄疫的潜伏期为 14d。

5 免疫无口蹄疫区

除遵守《无疫区标准 通则》的相关规定外，还应符合下列条件：

5.1 与国内其它地区或毗邻口蹄疫感染国家间设有保护区，或具有人工屏障或地理屏障，以有效防止口蹄疫病毒入侵。

5.2 无口蹄疫区及保护区均实施免疫接种，且免疫合格率达到 80%以上。所用口蹄疫疫苗符合国家规定。

5.3 具有疫情报告体系且有效运行。

5.4 区域及其外围一定范围内，防控口蹄疫的各项措施有效实施。

5.5 具有监测体系，按照《规定动物疫病监测准则》科学开展了口蹄疫监测。经监测证明在过去 24 个月内没有发生过口蹄疫，过去 12 个月内没有发生口蹄疫病毒循环。

6 非免疫无口蹄疫区

除遵守《无疫区标准 通则》的相关规定外，还应符合下列条件：

6.1 与国内其它地区或毗邻口蹄疫感染国家间设有保护区，或具有人工屏障或地理屏障，以有效防止口蹄疫病毒入侵。

6.2 过去 12 个月内，没有进行口蹄疫免疫接种，该地区在停止免疫接种后，没有引进过免疫接种动物。

6.3 具有疫情报告体系且有效运行。

6.4 区域及其外围一定范围内，防控口蹄疫的各项措施有效实施。

6.5 具有监测体系，按照《规定动物疫病监测准则》科学开展了口蹄疫监测。经监测证明在过去 12 个月没有发生过口蹄疫，过去 12 个月内没有发生口蹄疫病毒感染。

7 免疫无 FMD 区转变为非免疫无 FMD 区时，应在免疫接种停止后等待 12 个月，并能提供在这

段时间内没有FMD病毒感染的证据。

8 无疫区内发生局域性疫情或感染时，建立控制区的条件：

8.1 发生疫情或感染时，按照国家《口蹄疫防治技术规范》的要求划定疫点、疫区和受威胁区，并采取相应的管理技术措施。该无疫区的状态暂时中止。

8.2 开展口蹄疫流行病学调查，查明疫源，确认该起疫情仅为局域性疫情。

8.3 建立控制区。根据流行病学调查结果，结合地理特点，对具有流行病学关联的易感动物的区域建立控制区，并确认发病动物和其他周围的易感动物具有流行病学关联性。控制区应不小于受威胁区的范围，原则上以该疫点所在县级行政区域划定控制区范围。

8.4 对整个无口蹄疫区进行排查，对控制区内疫区周围的受威胁区强化主动监测。

8.5 对控制区内具有流行病学关联的易感动物进行隔离，对发病动物和同群动物进行扑杀，对其他有流行病学关联的动物及动物产品采取限制措施，不能流出控制区。

8.6 最后一例病畜处置完毕后 28 天，可宣布控制区建成。

9 无口蹄疫区的恢复

9.1 免疫无口蹄疫区发生口蹄疫时，恢复为免疫无疫区的条件：

9.1.1 符合 8 的要求，控制区建成后，除控制区外的其余区域可恢复为免疫无口蹄疫区。

9.1.2 不符合 8 的要求，但能采取扑杀、血清学监测、紧急免疫等措施，并经监测证明没有口蹄疫病毒感染，在最后一例感染畜扑杀后 6 个月。

9.2 非免疫无口蹄疫区发生口蹄疫时，恢复为非免疫无疫区的条件：

9.2.1 符合 8 的要求，控制区建成后，除控制区外的其余区域可恢复为非免疫无口蹄疫区。

9.2.2 不符合 8 的要求，但能采取扑杀、紧急免疫接种及血清学监测措施，紧急免疫的动物全部屠宰后 3 个月；

9.2.3 采取扑杀、紧急免疫及血清学监测措施、但紧急免疫后并不屠宰所有的免疫动物，而用检测口蹄疫病毒非结构蛋白抗体的方法进行血清学监测来证明免疫动物没有感染口蹄疫病毒时，须在最后一例感染畜扑杀和最后一次免疫后 6 个月以上。

9.3 控制区恢复无口蹄疫区的条件

9.3.1 免疫无口蹄疫区内建立的控制区，恢复无疫区的条件按照 9.1.2 规定的内容恢复为免疫无疫状态。

9.3.2 非免疫无口蹄疫区内建立的控制区，恢复无疫区的条件按照 9.2.2 规定的内容恢复为非免疫无疫状态。

无猪瘟区标准

1 范围

本标准规定了无猪瘟区的条件。

本标准适用于无猪瘟区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本部分，然而，鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

《无疫区标准 通则》

3 术语和定义

《无疫区标准 通则》规定的术语和定义适用于本标准，下列术语和定义适用于本文件。

3.1 猪瘟病毒感染：存在以下任一情况时，均定义为猪瘟病毒感染。

- (1) 分离到猪瘟病毒（疫苗株除外）；
- (2) 鉴定出猪瘟病毒抗原（疫苗株除外）或特异性病毒核糖核酸（RNA）；
- (3) 鉴定出非免疫所致的猪瘟病毒特异性抗体。

4 潜伏期

猪瘟的潜伏期为 40d。

5 无猪瘟区

除遵守《无疫区标准 通则》的相关规定外，还应符合下列条件：

5.1 与国内其它地区或毗邻猪瘟感染国家间设有保护区，或具有人工屏障或地理屏障，以有效防止猪瘟病毒入侵。

5.2 具有疫情报告体系且有效运行。

5.3 区域及其外围一定范围内，防控猪瘟的各项措施有效实施。

5.4 具有监测体系，按照《规定动物疫病监测准则》科学开展了猪瘟监测。经监测证明在过去 12 个月内没有发生过猪瘟临床症状，过去 12 个月内没有猪瘟感染的证据。

5.5 在过去 12 个月内停止猪瘟疫苗免疫，除非能够区分抗猪瘟抗体是由感染引起还是由于注射疫苗产生的抗体；

5.6 过去 12 个月内引进的家养猪没有注射过猪瘟疫苗，除非能够区分抗猪瘟抗体是由感染引起还是由于注射疫苗产生的抗体。

6 无猪瘟区的恢复

6.1 不实施免疫，对发病猪采取扑杀政策后 3 个月，经监测，区域内易感动物没有猪瘟病毒感染；

6.2 实施紧急免疫，对最后一头免疫猪屠宰后 3 个月；或对紧急免疫的猪不进行扑杀 3 个月后，除非能够区分抗猪瘟抗体是由感染引起还是由于注射疫苗产生的抗体；经监测，区域内易感动物没有猪瘟病毒感染；

6.3 对发病猪没有进行扑杀，在最后一头病畜死亡后，12 个月内没有发生猪瘟疫情；且在过去 12 个月内没有猪瘟感染的证据；在过去 12 个月内停止猪瘟疫苗免疫和停止引进免疫过猪瘟疫苗的生猪，除非能够区分抗猪瘟抗体是由感染引起还是由于注射疫苗产生的抗体。

无小反刍兽疫区标准

1 范围

本标准规定了无小反刍兽疫区的条件。

本标准适用于无小反刍兽疫区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

《无疫区标准 通则》

《动物及动物产品流通控制规范》

《小反刍兽疫防治技术规范》

《跨省调运乳用种用动物产地检疫规程》

3 缩略语和定义

3.1 通则规定的缩略语和定义适用于本标准。

3.2 小反刍兽疫病毒感染出现以下任一情况可定义为发生了小反刍兽疫病毒感染：

从易感动物或其产品中分离鉴定出小反刍兽疫病毒（疫苗株除外）；

从出现小反刍兽疫临床症状，或与小反刍兽疫确诊或疑似疫情有流行病学相关性的易感动物样品中检测出小反刍兽疫病毒的病毒抗原或核酸（疫苗株除外）；

从出现小反刍兽疫临床症状，与小反刍兽疫确诊或疑似疫情有流行病学相关性的未经小反刍兽疫疫苗接种过的易感动物样品中检测到小反刍兽疫病毒抗体。

4 潜伏期

小反刍兽疫的潜伏期为 21 天。

5 免疫无小反刍兽疫区

除遵守《无疫区标准 通则》的相关规定外，还应符合下列条件：

5.1 与国内其它地区或毗邻小反刍兽疫感染国家间设有保护区，或具有人工屏障或地理屏障，以有效防止小反刍兽疫病毒入侵。

5.2 所用小反刍兽疫疫苗、免疫程序和免疫合格率符合国家规定。

5.3 具有疫情报告体系且有效运行。

5.4 区域及其外围一定范围内，防控小反刍兽疫的各项措施有效实施。

5.5 具有监测体系，按照《规定动物疫病监测准则》科学开展了小反刍兽疫的监测。经监测证明，过去 24 个月内没有发现小反刍兽疫临床病例。

6 非免疫无小反刍兽疫区

除遵守《无疫区标准 通则》的相关规定以及本标准 5.1、5.3、5.4、5.5 条款要求外，还应符合下列条件：

6.1 经监测证明，过去 24 个月内没有发现小反刍兽疫病毒感染。

6.2 过去 24 个月内，没有进行小反刍兽疫疫苗免疫。

6.3 停止免疫后，未调入免疫动物。

7 无疫区内发生局域性疫情或感染时，建立控制区的条件：

7.1 发生疫情或感染时，按照国家《小反刍兽疫防治技术规范》的要求划定疫点、疫区和受威胁区，并采取相应的管理技术措施。该无疫区的状态暂时中止。

7.2 开展小反刍兽疫流行病学调查，查明疫源，确认该起疫情为局域性疫情。

7.3 建立控制区。根据流行病学调查结果，结合地理特点，对具有流行病学关联的易感动物的区域建立控制区，并确认发病动物和其他周围的易感动物具有流行病学关联性。控制区应不小于受威胁区的范围，原则上以该疫点所在县级行政区域划定控制区范围。

7.4 对整个无小反刍兽疫区进行排查，对控制区内疫区周围的受威胁区强化主动监测。

7.5 对控制区内具有流行病学关联的易感动物进行隔离，对发病动物和同群动物进行扑杀，对其他有流行病学关联的动物及动物产品采取限制措施，不能流出控制区。

7.6 最后一例病畜处置完毕后 42 天，可宣布控制区建成。

8 无小反刍兽疫区的恢复

8.1 发生小反刍兽疫疫情后，符合 7 的要求，控制区建成后，除控制区外的其余区域可恢复为无小反刍兽疫区；控制区内如 6 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物没有小反刍兽疫病毒感染，控制区可申请恢复无小反刍兽疫区。

8.2 发生小反刍兽疫疫情后，不符合 7 的要求，但最后一例感染动物扑杀后，6 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物没有小反刍兽疫病毒感染，可申请恢复无小反刍兽疫区。

无高致病性禽流感区标准

1 范围

本标准规定了无高致病性禽流感区的条件。

本标准适用于高致病性禽流感区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本部分，然而，鼓励根据本部分达成协议各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

《无疫区标准 通则》

《规定动物疫病监测准则》

3 术语和定义

《无疫区标准 通则》规定的术语和定义适用于本标准。

高致病性禽流感：对6周龄易感鸡的静脉接种致病指数（IVPI）大于1.2，或对4—8周龄易感鸡静脉接种感染死亡率不低于75%的H5、H7亚型或其他A型流感病毒；对不具备上述两个特征的H5和H7亚型流感病毒，经测序，如血凝素裂解位点存在多个碱性氨基酸，且与高致病性禽流感分离毒株的氨基酸序列相似，则为高致病性禽流感。

4 潜伏期

高致病性禽流感的潜伏期为21d。

5 无高致病性禽流感区

除遵守《无疫区标准 通则》的相关规定外，还应符合下列条件：

5.1 与国内其他地区或毗邻高致病性禽流感感染国家间设有保护区，或具有人工屏障或地理屏障，以有效防止病毒入侵。

5.2 具有疫情报告体系且有效运行。

5.3 区域及其外围一定范围内，防控高致病性禽流感的各项措施有效实施。

5.4 具有有效的监测体系，按照《规定动物疫病监测准则》进行监测，并证明在过去至少12个月内未发生过高致病性禽流感。

5.5 按国家规定实施扑杀政策，发生过疫情的地区，不论是否实施高致病性禽流感疫苗接种，最后一例感染动物扑杀后3个月没有再发现感染。

6 无高致病性禽流感区的恢复

采取扑杀政策时，无论是否实施高致病性禽流感疫苗接种，在最后一例感染病例扑杀后3个月，并采取相应的监测等措施，未再出现新的感染，可以申请恢复无高致病性禽流感区。

无新城疫区标准

1 范围

本标准规定了无新城疫区的条件。

本标准适用于无新城疫区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本部分，然而，鼓励根据本部分达成协议各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

《无疫区标准 通则》

《规定动物疫病监测准则》

3 术语和定义

《无疫区标准 通则》规定的术语和定义适用于本标准。

新城疫：新城疫是由新城疫病毒（NDV）强毒引起的禽类感染，其毒株的毒力应符合以下标准之一：（1）毒株 1 日龄雏鸡脑内接种致病指数（ICPI）大于或等于 0.7；（2）毒株 F2 蛋白 C 端（第 113-116 位）至少包括 3 个碱性氨基酸残基，F1 蛋白 N 端，即第 117 位氨基酸残基为苯丙氨酸（F），如果毒株没有上述氨基酸特征序列，则需要通过 ICPI 鉴定。

4 潜伏期

新城疫的潜伏期为 21d。

5 无新城疫区

除遵守《无疫区标准 通则》的相关规定外，还应符合下列条件：

- 5.1 与国内其它地区或毗邻新城疫感染国家间设有保护区，或具有人工屏障或地理屏障，以有效防止病毒入侵。
- 5.2 具有疫情报告体系且有效运行。
- 5.3 区域及其外围一定范围内，防控新城疫的各项措施有效实施。
- 5.4 具有有效的监测体系，按《规定动物疫病监测准则》的有关原则制定监测方案，并开展监测。经监测证明至少在过去 12 个月内未发生过新城疫强毒感染。

6 无新城疫区的恢复

发生新城疫后，实施扑杀政策，不论是否实施新城疫疫苗接种，最后一例感染动物扑杀后，按《规定动物疫病监测准则》开展监测后 3 个月，有证据证明不存在新城疫强毒感染，可申请恢复无新城疫区。

无马流感区标准

1 范围

本标准规定了马属动物无马流感区的条件。

本标准适用于马属动物无马流感区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

《无疫区标准 通则》

《动物及动物产品流通控制规范》

3 术语和定义

《无疫区标准 通则》规定的术语和定义适用于本标准。

4 感染期

马流感的感染期为 21d。

5 免疫无马流感区

5.1 建立免疫无马流感区的基本条件符合《无疫区标准 通则》的要求；

5.2 过去 12 个月内没有发生过马流感临床病例；

5.3 过去 12 个月内，对马属动物进行监测，没有发现马流感病毒感染；

5.4 无马流感区内易感动物均实施免疫接种，开展有效的免疫效果监测；

5.5 引入马属动物符合《动物及动物产品流通控制规范》要求，并满足以下条件：

5.5.1 装运之日无马流感临床症状；

5.5.2 装运前 21d，在官方报告无马流感的养殖场隔离饲养，饲养期间无马流感病例报告，在装运前 15~90d 按免疫程序进行了马流感免疫。

6 非免疫无马流感区

6.1 符合 5.1 和 5.2 要求；

6.2 过去 12 个月内，没有进行马流感免疫接种，该地区在停止免疫接种后，没有引进过免疫接种动物；

6.3 过去 12 个月，对马属动物进行监测，没有监测出马流感抗体或马流感病毒感染；

6.4 引入的马属动物需按照《动物及动物产品流通控制规范》要求，并满足以下条件：

6.4.1 装运之日无马流感临床症状；

6.4.2 装运前 21d，在官方报告无马流感的养殖场隔离饲养，且饲养期间无马流感病例报告；

6.4.3 马属动物来源于非免疫无马流感区。

7 免疫无马流感区转变为非免疫无马流感区时，应在最后一匹马停止免疫接种后 12 个月，并能提供在这段时间内没有马流感病毒感染的证据。

8 无马流感区的恢复

8.1 免疫无马流感区发生马流感后，恢复免疫无马流感区的条件

对发病马属动物采取隔离、治疗措施，对同群动物强化免疫接种，最后一例病例康复后，12 个月再没有疫情发生，易感动物没有病原感染，可申请恢复免疫无马流感区。

8.2 非免疫无马流感区发生马流感后，恢复非免疫无马流感区的条件

对发病马属动物采取隔离、治疗措施，最后一例病例康复后，12 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物没有病原感染，可申请恢复非免疫无马流感区。

无亨德拉病区标准

1 范围

本标准规定了马属动物无亨德拉病区的条件。

本标准适用于马属动物无亨德拉病区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

《无疫区标准 通则》

《动物及动物产品流通控制规范》

3 术语和定义

《无疫区标准 通则》规定的术语和定义适用于本标准。

4 潜伏期

亨德拉病的潜伏期为 16d。

5 无亨德拉病区

5.1 建立无亨德拉病区的基本条件符合《无疫区标准 通则》的要求；

5.2 过去 12 个月内，没有发现亨德拉病临床病例；

5.3 过去 12 个月内，对马属动物、猪以及果蝠等野生动物进行监测，没有发现亨德拉病病毒感染；

5.4 采取了有效措施防止果蝠与马属动物、猪等接触；

5.5 引入动物符合《动物及动物产品流通控制规范》要求，并满足以下条件：

5.5.1 装运之日，无亨德拉病临床症状；

5.5.2 装运前 16d，在官方报告无亨德拉病的养殖场饲养，饲养期间无亨德拉病报告。

6 无亨德拉病区的恢复

发生亨德拉病后，实施扑杀政策，对最后一例病例扑杀后，6 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物没有病原感染，可申请恢复无亨德拉病区。

无西尼罗河热区标准

1 范围

本标准规定了马属动物无西尼罗河热区的条件。

本标准适用于马属动物无西尼罗河热区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

《无疫区标准 通则》

《动物及动物产品流通控制规范》

3 术语和定义

《无疫区标准 通则》规定的术语和定义适用于本标准。

4 潜伏期

西尼罗河热的潜伏期为 15d。

5 无西尼罗河热区

5.1 建立无西尼罗河热区的基本条件符合《无疫区标准 通则》的要求；

5.2 过去 12 个月内，没有发现西尼罗河热的临床病例；

5.3 过去 12 个月内，对马属动物进行监测，没有发现马属动物的西尼罗河热病毒感染；

5.4 过去的 12 个月内，对鸟类、蚊等传播媒介进行监测，没有发现西尼罗河热病毒感染；

5.5 采取有效措施防止传播媒介与马属动物直接接触；

5.6 引入马属动物符合《动物及动物产品流通控制规范》要求，并满足以下条件：

5.6.1 装运之日，无西尼罗河热临床症状；

5.6.2 装运前 15d，在官方报告无西尼罗河热的养殖场隔离饲养，饲养期间无西尼罗河热病例报告。

6 无西尼罗河热区的恢复

发生西尼罗河热后，实施扑杀政策，对最后一例病例扑杀后，6 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物没有病原感染，可申请恢复无西尼罗河热区。

无伊氏锥虫病（苏拉病）区标准

1 范围

本标准规定了马属动物无伊氏锥虫病（苏拉病）区的条件。

本标准适用于马属动物无伊氏锥虫病区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

《无疫区标准 通则》

《动物及动物产品流通控制规范》

3 潜伏期

伊氏锥虫病的潜伏期为 60d。

4 无伊氏锥虫病（苏拉病）区

4.1 建立无伊氏锥虫病区的基本条件符合《无疫区标准 通则》的要求；

4.2 在过去 12 个月内，没有发现马属动物和相关易感动物（包括骆驼、猪、牛、羊等）伊氏锥虫病的临床病例；

4.3 在过去 12 个月内，对马属动物开展监测，没有发现伊氏锥虫感染；

4.4 对相关易感动物（包括骆驼、猪、牛、羊等）和虻等传播媒介进行监测；

4.4.1 在过去的 12 个月内，没有发现伊氏锥虫病原；

4.4.2 采取有效措施防止传播媒介与易感动物直接接触。

4.5 引入易感动物符合《动物及动物产品流通控制规范》要求，并满足以下条件：

4.5.1 装运之日，无伊氏锥虫病临床症状；

4.5.2 装运前 60d，在官方报告无伊氏锥虫病的养殖场隔离饲养，且饲养期间无伊氏锥虫病的病例报告，经实验室诊断，血液中应不含伊氏锥虫。

5 无伊氏锥虫病（苏拉病）区的恢复

发生伊氏锥虫病后，实施扑杀政策，对最后一例病例扑杀后，6 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物血液不含伊氏锥虫病原，可申请恢复无伊氏锥虫病区。

无马梨形虫病区标准

1 范围

本标准规定了马属动物无梨形虫病区的条件。

本标准适用于马属动物无梨形虫病区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

《无疫区标准 通则》

《动物及动物产品流通控制规范》

3 术语和定义

《无疫区标准 通则》规定的术语和定义适用于本标准。

4 潜伏期

梨形虫的潜伏期为 30d。

5 无马梨形虫病区

5.1 建立无梨形虫病区的基本条件符合《无疫区标准 通则》的要求；

5.2 采取了有效的措施防止蜱与马属动物接触；

5.3 在过去 12 个月内，没有发现马梨形虫的临床病例；

5.4 在过去 12 个月内，对马属动物进行监测，没有发现梨形虫感染；

5.5 采取有效措施防止传播媒介与马属动物直接接触；

5.6 引入马属动物符合《动物及动物产品流通控制规范》要求，并满足以下条件：

5.6.1 装运之日及装运前 30d，无梨形虫病临床症状；

5.6.2 装运前 30d，在官方报告无梨形虫病的养殖场隔离饲养，饲养期间无梨形虫病病例报告，并经马梨形虫病诊断试验，结果为阴性；

5.6.3 装运前 30d，对动物进行驱蜱处理。

6 无马梨形虫病区的恢复

发生马梨形虫病后，实施扑杀政策，对最后一例病例扑杀后，6 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物血液中不含梨形虫病原，可申请恢复无马梨形虫病区。

无日本脑炎区标准

1 范围

本标准规定了马属动物无日本脑炎区的条件。

本标准适用于马属动物无日本脑炎区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

《无疫区标准 通则》

《动物及动物产品流通控制规范》

3 术语和定义

《无疫区标准 通则》规定的术语和定义适用于本标准。

4 潜伏期

日本脑炎的潜伏期为 21d。

5 免疫无日本脑炎区

5.1 建立免疫无日本脑炎区的基本条件符合《无疫区标准 通则》的要求；

5.2 在过去 12 个月内，没有发现日本脑炎临床病例；

5.3 在过去 12 个月内，对易感动物进行监测，没有发现日本脑炎病毒感染；

5.4 采取有效措施防止蚊等传播媒介、野生易感动物和其他易感动物与马属动物直接接触；

5.5 对易感马属动物实施免疫接种；并根据风险评估结果，对其它易感动物可实施免疫，开展有效的免疫效果监测；

5.6 引入易感动物符合《动物及动物产品流通控制规范》要求，并满足以下条件：

5.6.1 装运之日无日本脑炎临床症状；

5.6.2 在隔离饲养期间和运输期间，具备有避免被昆虫叮咬的措施；

5.6.3 装运前 21d，在官方报告无日本脑炎的养殖场隔离饲养，饲养期间无日本脑炎病例报告；
或

5.6.4 装运前 7d 与装运前 12 个月之间进行过日本脑炎免疫接种。

6 非免疫无日本脑炎区

6.1 符合 5.1、5.2、5.3 和 5.4 条的要求；

6.2 在过去 12 个月内没有对易感动物进行日本脑炎免疫接种；

6.3 该地区在停止免疫接种后，没有引进过日本脑炎免疫接种动物；

6.4 引入的易感动物需按照《动物及动物产品流通控制规范》要求，并满足以下条件：

6.4.1 装运之日无日本脑炎临床症状；

6.4.2 装运前 21d，在官方报告无日本脑炎的养殖场隔离饲养，饲养期间无日本脑炎病例报告；

6.4.3 在隔离饲养期间和运输期间，具备有避免被昆虫叮咬的措施；

6.4.4 装运前 12 个月没有进行过日本脑炎免疫接种。

7 免疫无日本脑炎区转变为非免疫无日本脑炎区时，应在最后一头易感动物停止免疫接种后 12 个月，并能提供在这段时间内没有日本脑炎病毒感染的证据。

8 无日本脑炎区的恢复

8.1 免疫无日本脑炎区发生日本脑炎后，恢复免疫无日本脑炎区的条件：

对发病马属动物采取隔离、治疗措施，对同群动物强化免疫接种，最后一例病例康复后，6 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物没有病原感染，可申请恢复免疫无日本脑炎区。

8.2 非免疫无日本脑炎区发生日本脑炎后，恢复非免疫无日本脑炎区的条件：

对发病易感动物进行扑杀，最后一例病例死亡或扑杀后，6 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物没有病原感染，可申请恢复非免疫无日本脑炎区。

无马脑脊髓炎（东方和西方）区标准

1 范围

本标准规定了马属动物无马脑脊髓炎（东方和西方）区的条件。

本标准适用于马属动物无马脑脊髓炎（东方和西方）区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

《无疫区标准 通则》

《动物及动物产品流通控制规范》

3 术语和定义

《无疫区标准 通则》规定的术语和定义适用于本标准。

4 感染期

马脑脊髓炎（东方和西方）的感染期为 14d。

5 无马脑脊髓炎（东方和西方）区

5.1 建立无马脑脊髓炎（东方和西方）区的基本条件符合《无疫区标准 通则》的要求；

5.2 过去 24 个月内，没有发现马脑脊髓炎（东方和西方）的临床病例；

5.3 对马属动物进行监测，过去 12 个月没有监测出马脑脊髓炎（东方和西方）病毒感染；

5.4 对昆虫等传播媒介进行监测，在过去的 12 个月内，通过监测未发现马脑脊髓炎（东方和西方）病原；

5.5 采取有效措施防止传播媒介与马属动物的接触；

5.6 引入马属动物符合《动物及动物产品流通控制规范》要求，在装运之日及装运前 3 个月，无马脑脊髓炎（东方和西方）临床症状；并满足以下条件之一：

5.6.1 装运前 3 个月，在官方报告无马脑脊髓炎（东方和西方）的养殖场饲养，饲养期间无马脑脊髓炎（东方和西方）病例报告；

5.6.2 装运前隔离观察 21d，隔离期间及运往装运地过程中，有防止媒介昆虫叮咬措施；

5.6.3 装运前 15d 至 12 个月内进行过免疫接种。

6 无马脑脊髓炎（东方和西方）区的恢复

发生马脑脊髓炎（东方和西方）后，实施扑杀政策，对最后一例病例扑杀后，6 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物没有病原感染，可申请恢复无马脑脊髓炎（东方和西方）区。

无马病毒性动脉炎区标准

1 范围

本标准规定了马属动物无马病毒性动脉炎区的条件。

本标准适用于马属动物无马病毒性动脉炎区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

《无疫区标准 通则》

《动物及动物产品流通控制规范》

3 术语和定义

《无疫区标准 通则》规定的术语和定义适用于本标准。

4 感染期

种公马感染后可终生带毒，其它马的马病毒性动脉炎感染期为 28d。

5 无马病毒性动脉炎区

5.1 建立无马病毒性动脉炎区的基本条件符合《无疫区标准 通则》的要求；

5.2 过去 12 个月没有发生过马病毒性动脉炎临床病例；

5.3 过去 12 个月内，对马属动物进行监测，没有发现马病毒性动脉炎病毒感染；

5.4 引入马属动物符合《动物及动物产品流通控制规范》要求；

5.4.1 引入未去势种公马，除必须在装运之日及装运前 28d，无马病毒性动脉炎临床症状外，并满足以下条件之一：

5.4.1.1 在装运前 28d 进行隔离，在装运前 21d 采集血清样品进行马病毒性动脉炎检测，检测结果为阴性；

5.4.1.2 在装运前 28d 内，间隔至少 14d，进行两次血清样品的马病毒性动脉炎抗体检测，结果表明抗体滴度稳定或下降；

5.4.1.3 对 6~9 月龄的马在装运前 28d 的隔离期间内至少间隔 14d 采集血清样品进行马病毒性动脉炎抗体检测，结果表明抗体滴度稳定或下降，而后进行马病毒性动脉炎免疫接种，并定期免疫；

5.4.1.4 在装运前的 28d 进行隔离期间，进行马病毒性动脉炎抗体检测，如果结果阴性，应立即进行马病毒性动脉炎免疫接种，接种后 21d 内与其他马匹保持隔离，并定期免疫；

5.4.1.5 马病毒性动脉炎抗体检测结果呈阳性者：采取下列两种措施之一：

(1) 在装运前 6 个月，分别选择两匹母马与两匹公马进行试验性交配，并在交配之日及此后的 28d 内两次采集母马血清样品，进行马病毒性动脉炎抗体检测，结果阴性；

(2) 在装运前 6 个月，采集精液进行病毒检测，结果阴性。

5.4.2 引入未去势雄性马属动物以外的马属动物，应满足以下条件之一：

5.4.2.1 在装运前 28d 内，在无马病毒性动脉炎临床症状的饲养场饲养，且在装运之日无马病毒性动脉炎临床症状以外，在装运前 28d，采集血液样品进行抗体检测，结果阴性；

5.4.2.2 在装运前 28d 进行隔离，无马病毒性动脉炎临床症状，采集血清样品进行检测，结果阴性；或在装运前 28d，间隔至少 14d 进行两次血清样品检测，结果表明抗体滴度稳定或下降；

5.4.2.3 对 6~9 月龄马属动物，在装运前 28d 进行隔离，间隔至少 14d 采集两份血清样品进行 EVA 抗体检测，结果表明抗体滴度稳定或下降，而后进行马病毒性动脉炎免疫接种，并定期免疫。

5.4.3 引入精液时，其供精马应满足下列 5.4.3.1 和 5.4.3.2 以及 5.4.3.3 至 5.4.3.6 之中的任一条件：

5.4.3.1 采精前 28d，在无马病毒性动脉炎临床症状饲养场饲养；

5.4.3.2 采精之日无马病毒性动脉炎临床症状；

5.4.3.3 对 6~9 月龄马采集两份血清样品进行马病毒性动脉炎检测，结果表明抗体滴度稳定或下降，而后进行马病毒性动脉炎免疫接种，并定期重复免疫；

5.4.3.4 采集血清样品进行马病毒性动脉炎检测，结果阴性，而后立即进行马病毒性动脉炎免疫接种，免疫后与其他马属动物隔离饲养 21d，加强免疫；

5.4.3.5 采精前 14d，采集血清样品进行马病毒性动脉炎检测，并在采血之日起至采血结束后的 14d 内与其他马属动物进行隔离饲养；

5.4.3.6 采集血清样品进行马病毒性动脉炎检测，马病毒性动脉炎检测阳性结果者，满足下列条件之一：

（1）采精前 12 月内，选择两匹母马进行试验性交配，并在交配之日及此后 28d 时两次采集母马血清样品，进行马病毒性动脉炎检测，结果阴性；

（2）在精液采集前 12 月内，精液中不含病毒。

6 无马病毒性动脉炎区的恢复

对发病马属动物采取隔离、治疗措施，最后一例病例康复后，6 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物没有病原感染，可申请恢复无马病毒性动脉炎区。

无尼帕病毒病区标准

1 范围

本标准规定了马属动物无尼帕病毒病区的条件。

本标准适用于马属动物无尼帕病毒病区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

《无疫区标准 通则》

《动物及动物产品流通控制规范》

3 术语和定义

《无疫区标准 通则》规定的术语和定义适用于本标准。

4 潜伏期

尼帕病毒病的潜伏期为 14d。

5 无尼帕病毒病区

5.1 建立无尼帕病毒病区的基本条件符合《无疫区标准 通则》的要求；

5.2 在过去至少 12 个月内，没有发现马、猪、犬等易感动物尼帕病毒病临床病例；

5.3 在过去至少 6 个月内，对马属动物和猪等易感动物进行监测，未监测到尼帕病毒或特异性抗体。

5.4 在过去的 6 个月内，对蚊、果蝠等传播媒介进行监测，没有发现尼帕病毒感染；

5.5 采取有效措施防止传播媒介与易感动物直接接触；

5.6 引入动物符合《动物及动物产品流通控制规范》要求，并满足以下条件：

5.6.1 装运之日无尼帕病毒病临床症状；

5.6.2 装运前 14d，在官方报告无尼帕病毒病的养殖场饲养，饲养期间无尼帕病毒病的病例报告；或

5.6.3 装运前隔离观察 14d，隔离期间及运往装运地过程中，防止接触野猪和果蝠。

6 无尼帕病毒病区的恢复

发生尼帕病毒病后，实施扑杀政策，对最后一例病例扑杀后，6 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物没有病原感染，可申请恢复无尼帕病毒病区。

无水疱性口炎区标准

1 范围

本标准规定了马属动物无水疱性口炎区的条件。

本标准适用于马属动物无水疱性口炎的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

《无疫区标准 通则》

《动物及动物产品流通控制规范》

3 术语和定义

《无疫区标准 通则》规定的术语和定义适用于本标准。

4 潜伏期

水疱性口炎的潜伏期为 21d。

5 无水疱性口炎区

5.1 建立无水疱性口炎区的基本条件符合《无疫区标准 通则》的要求；

5.2 过去 24 个月内，没有发现水疱性口炎的临床病例；

5.3 过去 12 个月内，对马、猪、牛、羊等易感动物进行水疱性口炎病毒监测，没有发现水疱性口炎病毒感染；

5.4 过去的 12 个月内，对易感野生动物进行监测，没有发现水疱性口炎病毒病原；

5.5 采取有效措施防止易感野生动物与其他易感动物接触；

5.6 引入动物符合《动物及动物产品流通控制规范》要求，并满足以下条件：

5.6.1 从无水疱性口炎国家或地区引入易感动物：

5.6.1.1 装运之日无水疱性口炎临床症状；

5.6.1.2 自出生或至少过去 21d 内在无水疱性口炎国家或地区饲养。

5.6.2 从无水疱性口炎国家或地区引入野生易感动物：

5.6.2.1 装运之日无水疱性口炎临床症状；

5.6.2.2 如果无水疱性口炎国家或地区与水疱性口炎感染国家或地区具有共同边界，则：

(1) 装运前隔离观察 30d，并在隔离开始至少 21d 后经水疱性口炎诊断试验，没有发生水疱性口炎病毒感染；

(2) 在隔离期间及运往装运地的过程中，避免媒介昆虫叮咬。

5.6.3 从水疱性口炎感染国家（地区）或水疱性口炎状况不清楚的国家（地区）引入家养易感动物：

5.6.3.1 装运之日无水疱性口炎临床症状；

5.6.3.2 自出生或至少过去 21d 内一直在官方报告无水疱性口炎病例的饲养场饲养，且饲养期间无水疱性口炎病例报告；或

5.6.3.3 装运前隔离观察 30d，并在隔离开始至少 21d 后经水疱性口炎诊断试验，没有发生水疱性口炎病毒感染；

5.6.3.4 在隔离期间及运往装运地的过程中，避免媒介昆虫叮咬。

5.6.4 从水疱性口炎感染国家（地区）或水疱性口炎状况不清楚的国家（地区）引入易感野生动物：

5.6.4.1 装运之日无水疱性口炎临床症状；

5.6.4.2 装运在隔离检疫场隔离观察 30d，并在隔离开始至少 21d 后经水疱性口炎诊断试验，没有发生水疱性口炎病毒感染；

5.6.4.3 在隔离期间及运往装运地的过程中，避免媒介昆虫叮咬。

5.6.5 从无水泡性口炎国家或地区引入反刍动物、猪和马的体内胚胎时，应满足下列条件：

5.6.5.1 采集胚胎时供体母畜在无水泡性口炎国家或地区饲养场饲养；

5.6.5.2 胚胎采集、加工和存贮符合 OIE 法典关于胚胎采集、加工和存贮的要求。

5.6.6 从水泡性口炎感染国家（地区）或水泡性口炎状况不清楚的国家（地区）引进反刍动物、猪和马的体内胚胎时，应满足下列条件：

5.6.6.1 供体母畜：

（1）至少在采集前的 21d 及采集过程中，饲养场没有水泡性口炎病例的报告；

（2）在胚胎采集前的 21d 进行水泡性口炎诊断，没有发生水泡性口炎病毒感染；

5.6.6.2 胚胎的采集、加工和存贮符合 OIE 法典关于胚胎采集、加工和存贮的要求。

6 无水泡性口炎区的恢复

发生水泡性口炎后，实施扑杀政策，对最后一例病例扑杀后，6 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物没有病原感染，可申请恢复无水泡性口炎区。

无非洲马瘟区标准

1 范围

本标准规定了马属动物无非洲马瘟区的条件。

本标准适用于马属动物无非洲马瘟区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

《无疫区标准 通则》

《动物及动物产品流通控制规范》

3 术语和定义

《无疫区标准 通则》规定的术语和定义适用于本标准。

4 感染期

非洲马瘟的感染期为 40d。

5 无非洲马瘟区

5.1 建立无非洲马瘟区的基本条件符合《无疫区标准 通则》的要求；

5.2 过去 24 个月内，没有发现非洲马瘟的临床病例；

5.3 过去 24 个月内，接壤的周边国家或地区为无非洲马瘟区；

5.4 过去 12 个月内，未对家养马属动物和其他马属动物实施非洲马瘟免疫接种；

5.5 过去 12 个月内，对马属动物进行监测，没有发现非洲马瘟病毒感染；

5.6 引入马属动物符合《动物及动物产品流通控制规范》要求，并满足以下条件：

5.6.1 来源于无非洲马瘟国家；

5.6.2 装运之日无非洲马瘟临床症状；

5.6.3 过去 40d 没进行过免疫；

5.6.4 出生之日起或装运前至少 40d 在无非洲马瘟国家饲养；

5.6.5 不经过感染国家（地区）转运；或

5.6.6 如经过感染国家（地区）转运时有防止与库蠓接触的措施。

5.6.7 引入马属动物精液或胚胎（卵）时，供精（卵）动物除满足 5.6 条款要求以外，采精或胚胎（卵）之日以及此前的 60d，马属动物没有进行过免疫。

6 无非洲马瘟区的恢复

发生非洲马瘟后，实施扑杀政策，对最后一例病例扑杀后，6 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物没有病原感染，可申请恢复无非洲马瘟区。

无马鼻疽区标准

1 范围

本标准规定了无马鼻疽区的条件。

本标准适用于无马鼻疽区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

《无疫区标准 通则》

《动物及动物产品流通控制规范》

3 潜伏期

马鼻疽的潜伏期为 6 个月。

4 无马鼻疽区

4.1 建立无马鼻疽区的基本条件符合《无疫区标准 通则》的要求；

4.2 过去 36 个月内，没有发现马鼻疽临床病例。

4.3 对马属动物进行监测，过去 6 个月内，没有发现病原感染；

4.4 采取有效措施防止骆驼、犬、猫等其他易感动物与马属动物直接接触；

4.5 引入马属动物应符合《动物及动物产品流通控制规范》要求，并满足以下条件：

4.5.1 装运之日无马鼻疽临床症状；

4.5.2 装运前 6 个月，一直在官方报告无马鼻疽的饲养场饲养，饲养期间无马鼻疽病例报告；

4.5.3 装运前 30d，经马鼻疽实验室病原学、血清学检测或变态反应，结果阴性。

5 无马鼻疽区的恢复

发生马鼻疽后，实施扑杀政策，对最后一例病例扑杀后，6 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物没有病原感染，可申请恢复无马鼻疽区。

无马传染性贫血病区标准

1 范围

本标准规定了马属动物无马传染性贫血病区的条件。

本标准适用于马属动物无马传染性贫血病区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

《无疫区标准 通则》

《动物及动物产品流通控制规范》

3 术语和定义

《无疫区标准 通则》规定的术语和定义适用于本标准。

4 潜伏期

EIA 的潜伏期为 3 个月。

5 无马传染性贫血病区

5.1 建立无马传染性贫血病的基本条件符合《无疫区标准 通则》的要求；

5.2 过去 24 个月内，没有发现马属动物的马传染性贫血病临床病例；

5.3 过去 12 个月内，对马属动物进行监测，没有发现马传染性贫血病病毒感染；

5.4 对吸血马蝇等传播媒介进行监测：

5.4.1 在过去的 12 个月内，通过监测未发现马传染性贫血病病毒感染；或

5.4.2 采取有效措施防止传播媒介与马属动物直接接触；

5.5 引入马属动物符合《动物及动物产品流通控制规范》要求，并满足以下条件：

5.5.1 装运前 48h 无马传染性贫血病临床症状；

5.5.2 装运前 3 个月，在官方报告无马传染性贫血病的饲养场饲养，饲养期间无马传染性贫血病病例报告；

5.5.3 长期进口时，装运前 30d 期间采集的血清样品，经病原学或血清学检测，结果阴性；临时进口时，装运前 90d 期间采集的血清样品，经病原学或血清学检测，结果阴性。

6 无马传染性贫血病区的恢复

发生马传染性贫血病后，实施扑杀政策，对最后一例病例扑杀后，6 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物没有病原感染，可申请恢复无马传染性贫血病区。

无马媾疫区标准

1 范围

本标准规定了马属动物无马媾疫区的条件。

本标准适用于马属动物无马媾疫区的建立和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

《无疫区标准 通则》

《动物及动物产品流通控制规范》

3 潜伏期

马媾疫的潜伏期为 6 个月。

4 无马媾疫区

4.1 建立无马媾疫区的基本条件符合《无疫区标准 通则》的要求；

4.2 过去 24 个月内，没有发现马媾疫临床病例；

4.3 过去 12 个月内，对马属动物进行监测，没有发现马媾疫锥虫感染；

4.4 引入马属动物符合《动物及动物产品流通控制规范》要求，并满足以下条件：

4.4.1 装运之日无马媾疫临床症状；

4.4.2 装运前 6 个月，一直在官方报告无马媾疫的饲养场饲养，饲养期间无马媾疫病例报告；

4.4.3 装运前 15d，经马媾疫病原学或血清学诊断，结果阴性。

4.5 引入马属动物精液应符合《动物及动物产品流通控制规范》要求，并满足以下条件：

4.5.1 供精马属动物无马媾疫临床症状；

4.5.2 供精马属动物在官方报告无马媾疫的饲养场饲养，饲养期间无马媾疫病例报告；

4.5.3 供精马属动物经马媾疫病原学或血清学诊断，结果阴性。

5 无马媾疫区的恢复

对采取隔离、治疗措施，最后一例病例康复后，6 个月再没有疫情发生，经监测，易感动物没有病原感染，可申请恢复无马媾疫区。

第二部分 无规定动物疫病生物安全隔离区规范

通则

无口蹄疫生物安全隔离区标准

无猪瘟生物安全隔离区标准

无高致病性禽流感生物安全隔离区标准

无新城疫生物安全隔离区标准

无布鲁氏菌病生物安全隔离区标准

通则

1 范围

本规范规定了无规定动物疫病生物安全隔离区的基本条件和建设要求。

本规范适用于无规定动物疫病生物安全隔离区的建设和评估。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

《饲料和饲料添加剂管理条例》 中华人民共和国国务院令 第645号

《畜禽标识和养殖档案管理办法》 中华人民共和国农业部令 2006年第67号

《动物检疫管理办法》 中华人民共和国农业部令 2010年第6号

《无公害食品 畜禽饮用水水质》 NY 5027-2008

《重大动物疫情应急条例》 中华人民共和国国务院令 第450号

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本规范：

3.1 规定动物疫病

国家或县级以上地方人民政府列入控制或消灭计划的动物疫病。

3.2 生物安全隔离区

指处于同一个生物安全管理体系下的一个或多个动物养殖屠宰加工场所，该场所包含一种或多种规定动物疫病状况清楚的特定动物群体，并对该动物群体采取系统性监测、控制和生物安全措施。

3.3 无规定动物疫病生物安全隔离区

实施了官方有效监管，能够对影响规定动物疫病的风险因素实施有效控制，且在规定期限内没有发生过某种或某几种规定动物疫病，并经验收合格的生物安全隔离区。

3.4 生物安全计划

分析规定动物疫病传入以及在生物安全隔离区内传播、扩散的可能途径，并采取相应控制措施降低动物疫病发生风险的计划。

3.5 流行病学单元

具有明确的流行病学关联，且暴露某一病原的可能性大体相同的动物群体。通常是指处于相同环境或处于共同管理措施下的一个畜禽群。

4 基本条件

4.1 建立生物安全隔离区的企业应是独立的法人实体。

4.2 生物安全隔离区建设可以选择以下模式：

4.2.1 全产业链模式，其主要生产单元应覆盖种畜禽、商品畜禽养殖，屠宰加工，饲料加工等生产环节；

4.2.2 种畜禽模式，单独以种畜禽养殖和繁育为核心，主要生产单元应包括种畜禽场和饲料厂，种禽生物安全隔离区还应包括孵化厂；

4.2.3 商品畜禽模式，单独以商品畜禽饲养为核心，主要生产单元至少为单独的种畜禽场、商品畜禽养殖场和饲料厂。

4.3 企业应明确构成生物安全隔离区的所有生产单元，生产单元的地理位置应相对集中，原则上处于同一县级行政区域内或处于半径50公里的地理区域内；在实施良好生物安全管理措施及有效的风险管理基础上，区域范围可适当扩大。

4.4 种畜禽场、商品畜禽养殖场、屠宰加工厂应取得《动物防疫条件合格证》；种畜禽场还应取得《种畜禽生产经营许可证》，种畜禽达到种用动物健康标准。饲料厂应符合《饲料和饲料添加剂管理条例》的有关规定。

4.5 生物安全隔离区内建立的畜禽标识和追溯系统，应对所有生产环节中的畜禽及其产品、主要生产资料实施可追溯管理。

按照《畜禽标识和养殖档案管理办法》的要求对猪、牛、羊加施畜禽标识；对家禽至少应建立批次或禽群水平的标识。

4.6 规定动物疫病的诊断、监测由所在地兽医部门实验室或由兽医部门指定的实验室承担。承担检测和诊断工作的实验室应具备相应资质，实验室人员应经过培训，具有规定动物疫病检测和诊断能力。

4.7 生物安全隔离区应具有病害动物无害化处理设施条件，病害动物无害化处理、污染物排放及废弃物处理应符合生物安全和相应的环保要求。

5 企业生物安全管理体系建设

5.1 遵循全过程风险管理和关键点控制的原则，建立统一的生物安全管理体系。

5.2 组织体系

5.2.1 企业负责生物安全隔离区生物安全管理工作，应制定生物安全计划，任命并授权一名有资质和经验的生物安全负责人，每个生产单元应有生物安全管理员。

5.2.2 生物安全负责人负责生物安全计划的运行和维护，生物安全管理员应具备相应的能力，并有权阻止不安全的活动。

5.2.3 所有生产人员上岗前应进行相应的生物安全培训。

5.3 屏障设施

5.3.1 每个生产单元应有围墙或其他能够与外界进行物理隔离的屏障。

5.3.2 畜禽养殖场养殖区（生产区）与生活区之间应建立有效的隔离设施，严禁非饲养人员和无关物品进入养殖区。

5.3.3 必要时，沿养殖场物理屏障向外设立3公里的环形缓冲区。

5.4 生物安全计划

5.4.1 生物安全计划应根据规定动物疫病的流行病学特征并结合生物安全隔离区实际情况制定。

5.4.2 生物安全计划应考虑以下因素：

5.4.2.1 毗邻地区以及流行病学关联地区的规定动物疫病状况；

5.4.2.2 生物安全隔离区生产单元相邻的其他养殖生产加工场所相关情况，包括：

- (1) 其他畜禽群的位置、规定动物疫病状况和生物安全情况；
- (2) 野生动物及其迁徙路线；
- (3) 屠宰厂、无害化处理场和饲料厂分布情况；
- (4) 畜禽及其产品交易市场、动物园等其他动物集散地分布情况；
- (5) 其它。

5.4.2.3 基础设施设备对规定动物疫病的影响，主要包括：

- (1) 栅栏或者其它物理隔离；
- (2) 人员进入，包括门禁、更衣区和淋浴区；
- (3) 车辆进入，包括冲洗和消毒；
- (4) 装卸、动物隔离、物流和设备进入等；
- (5) 饲料供应及贮存；
- (6) 动物尸体、粪便和污物的处理；
- (7) 兽医药械的来源及贮存；
- (8) 防止昆虫、啮齿类动物和野禽等机械性传播与生物性传播规定动物疫病的措施；
- (9) 通风、供排水。

5.4.2.4 规定动物疫病传播的生物学因素，如气溶胶、环境中病原的存活能力等。

5.4.3 生物安全计划的制定：

5.4.3.1 分析规定动物疫病传入传播的各类风险因素及可能途径；

5.4.3.2 对每个可能因素，设立相应的关键控制点，分别制定相应的生物安全措施；

5.4.3.3 建立标准操作程序（SOPs），内容主要包括：

- （1）生物安全措施的实施、维持和监督程序；
- （2）纠错程序；
- （3）纠错过程确认程序；
- （4）记录保存。

5.4.3.4 制定应急实施方案；

5.4.3.5 向兽医主管部门的报告程序；

5.4.3.6 工作人员的教育和培训计划。

5.5 生物安全措施

5.5.1 养殖场

5.5.1.1 商品代养殖场引进畜禽应来自同一生物安全管理体系的养殖场（种畜禽场）或同类生物安全隔离区。

从其他养殖场引入种畜禽或种蛋、精液、胚胎时，应按《动物检疫管理办法》等有关规定，经隔离检疫合格后，方可引入。

5.5.1.2 养殖区设有能防止野生动物（含野鸟）或其他易感动物进入或接触畜禽群的控制设施，不得同时饲养其他易感动物。

5.5.1.3 应使用来自同一生物安全管理体系的饲料厂提供的饲料，且饲料符合国家规定；饲料储藏室应保持清洁、干燥，并采取防鸟、防啮齿类动物、防蚊蝇等措施；

5.5.1.4 畜禽饮用水应符合NY 5027畜禽饮用水水质的要求。

5.5.1.5 装运畜禽和饲料的车辆在进入养殖区时，应进行彻底的清洗和消毒。

5.5.1.6 所有生产人员应有健康证明，患有相关人畜共患病的人员不得上岗；生产人员应经淋浴、消毒、更换衣帽和鞋子后，方可进入养殖区。

5.5.1.7 外来人员不得随意进入养殖区；确需进入的，需经淋浴、消毒、更换衣帽和鞋后，方可入内。

5.5.1.8 配备与其养殖规模相适应的执业兽医，并定期参加相关培训，不得从事场外诊疗等有关活动。

5.5.1.9 养殖场应设置空舍期，在引进下一批畜禽前，应进行彻底的清理、冲洗和消毒。

5.5.1.10 对所有出现异常临床症状或出现异常死亡的畜禽应进行诊断检测，并按照规定上报当地兽医部门。

5.5.1.11 养殖场净道和污道分设，粪便和垫料应进行无害化处理。

5.5.1.12 制定生物安全管理措施及标准操作程序，至少包括：

- （1）环境风险管理程序；
- （2）易感动物、人员、车辆移动控制程序；
- （3）场区、畜禽舍清洁卫生与消毒程序；
- （4）人员、车辆、物品进场、进舍消毒程序；
- （5）进、出场动物的装运卸载程序；
- （6）免疫程序；
- （7）用药规定和程序；
- （8）畜禽群健康状况日常观察与记录；
- （9）怀疑发病畜禽群的诊断与控制程序；
- （10）灭鼠、杀虫、防鸟、灭蚊蝇措施；
- （11）粪便、污水、污染物、死淘畜禽等无害化处理程序等。

5.5.2 孵化厂（孵化车间）

5.5.2.1 种蛋应来自同一生物安全管理体系的种禽场或同类生物安全隔离区的种禽场。

5.5.2.2 应配备种蛋熏蒸消毒设施，孵化车间人流和物流为单向流程，不得交叉或回流。

5.5.2.3 应制定疫情报告、消毒、免疫、无害化处理等制度，并能有效实施。

5.5.2.4 应有对无精蛋、死胚、终止胚、淘汰雏、蛋壳、绒毛等废弃物的处理设施设备，制定

有标准操作处理程序。

5.5.3 饲料厂

应有饲料质量保证措施，保证饲料原料和饲料添加剂符合《饲料和饲料添加剂管理条例》的有关规定。

5.5.4 屠宰加工厂

5.5.4.1 应获得以HACCP原理为基础的质量控制体系认证，确保其有效运行。

5.5.4.2 屠宰厂屠宰生物安全隔离区内的畜禽时，不得在同一生产车间同时屠宰其他养殖场的畜禽；有条件的企业可建立屠宰生物安全隔离区畜禽的专用屠宰生产线。

5.5.4.3 对经检疫检验合格的畜禽产品施加统一的生物安全隔离区畜禽产品标识。

5.5.4.4 屠宰厂应建立与屠宰规模相适应的冷藏储藏设施。

5.5.5 流通运输

5.5.5.1 企业应对种畜禽场、商品畜禽养殖场、屠宰加工厂、饲料厂、孵化厂等不同生产单元间的流通运输实施有效的生物安全控制。

5.5.5.2 根据有关风险评估结果提前确定运输路线，按指定路线进行运输。

5.5.5.3 饲料、畜禽使用专用运输工具。饲料运输采用封闭式专用运输车辆。畜禽运输车辆应采取适当措施，确保畜禽在运输过程中的生物安全和动物福利。

动物及其产品运输工具应在运输前后实施有效清洗、消毒。

5.6 监测

5.6.1 应建立生物安全隔离区监测体系，在地方兽医主管部门指导下，建立生物安全隔离区及缓冲区监测方案，按照监测方案的分工，由地方兽医机构和企业共同实施监测。

5.6.2 应根据当地规定动物疫病的流行病学特点制定监测方案，按照主动监测和被动监测相结合、临床观察和实验室监测相结合的方式，确定监测方法、监测频次和抽样数量等。

5.6.3 抽样、检测、报告和检测结果分析等记录齐全，及时归档。

5.7 疫情报告和应急响应

5.7.1 建立有效的动物疫情报告体系，一旦发生重大动物疫情，立即按《重大动物疫情应急条例》及国家有关规定执行。

5.7.2 在当地兽医主管部门指导下建立生物安全隔离区规定动物疫病应急预案，企业应按照应急预案的要求，做好人员、物质、资金等应急储备，并开展应急演练。

5.7.3 缓冲区或毗邻地区发生规定动物疫病疫情时，生物安全隔离区应按照应急响应实施方案的要求，采取强化的生物安全措施。

5.8 记录

5.8.1 记录应能清楚证明生物安全隔离区的各项生物安全管理措施得到持续有效实施。

5.8.2 养殖环节应按照农业部养殖档案管理的有关要求做好各项记录。

5.8.3 孵化厂（孵化车间）应做好孵化、出雏、免疫、运输、无害化处理等记录。

5.8.4 饲料厂应做好原料来源、质量检验、生产和产品流向等记录。

5.8.5 屠宰加工环节应做好畜禽来源、屠宰日期、数量、批次、活畜禽运输车辆牌照、储存场所、产品去向等记录。

5.8.6 所有记录应妥善保存，便于查阅。疫情报告、监测等记录保存期不少于5年，其他记录保存期不少于2年。

5.9 内部审核与改进

企业应成立生物安全管理小组，定期对生物安全隔离区的生物安全计划、生物安全措施、标准操作程序、规定动物疫病状况、养殖档案、记录等进行检查和评估，并根据检查结果改进。

6 兽医机构监管

6.1 基本要求

6.1.1 兽医机构健全，职能明确，有充足的财政支持，基础设施完善，能够满足工作需要。

6.1.2 兽医机构监管人员应熟悉国家有关畜牧兽医法律法规，具有相应的专业技术知识和技能，以及良好的职业道德和工作责任心。

6.1.3 遵循全程监管、风险管理的基本原则，制定完善的监管制度和程序，对企业的生物安全管理体系的建立及运行情况进行有效监管。

6.1.4 当地兽医主管部门应建立生物安全隔离区规定动物疫病应急预案。

6.1.5 兽医部门应做好产地检疫、屠宰检疫、监督检查等记录。

6.2 监管内容

6.2.1 对缓冲区及周边区域的监管

6.2.1.1 兽医机构应掌握当地动物饲养、屠宰加工、交易等场所分布情况，以及相关动物种类、数量、分布等情况。

6.2.1.2 兽医机构应了解辖区内野生易感动物的分布及栖息地情况。

6.2.1.3 兽医机构应对生物安全隔离区缓冲区及其周边区域易感野生动物的规定动物疫病实施有效监测。

6.2.1.4 兽医机构应对缓冲区的易感动物免疫、规定动物疫病监测、诊疗、疫情报告、动物及其产品运输、无害化处理等进行监管。

6.2.1.5 兽医机构应定期对生物安全隔离区及其缓冲区和周边区域的规定动物疫病发生风险开展调查和风险评估，根据风险评估结果指导企业完善生物安全管理体系。

6.2.2 对生物安全隔离区从业人员的监管

6.2.2.1 生物安全负责人和生物安全管理人员的设置和资质情况；

6.2.2.2 从业人员健康证明持证情况和相关生物安全知识培训情况；

6.2.2.3 执业兽医配备及其资格情况。

6.2.3 对生产活动的监管

6.2.3.1 对养殖场的监管，包括动物防疫条件、养殖档案、可追溯管理、饲料和兽药使用、免疫、监测、诊疗、疫情报告、消毒、无害化处理和检疫申报等内容。

6.2.3.2 对屠宰加工厂的监管，包括动物防疫条件、消毒、无害化处理、可追溯管理等内容。

6.2.3.3 对流通运输的监管，包括运输路线、运输工具清洗消毒、检疫证明持有情况等内容。

无口蹄疫生物安全隔离区标准

1 范围

本标准规定了无口蹄疫生物安全隔离区的条件及中止、撤销和恢复要求。
本标准适用于无口蹄疫生物安全隔离区的建设和评估。

2 术语和定义

口蹄疫病毒感染：存在以下任一情况时，均定义为口蹄疫病毒感染。

- (1) 分离并鉴定出口蹄疫病毒；
- (2) 鉴定出一个或多个血清型口蹄疫病毒的特异性病毒抗原或病毒核糖核酸（RNA）；
- (3) 鉴定出非免疫所致的口蹄疫病毒结构蛋白或非结构蛋白抗体。

3 无口蹄疫生物安全隔离区

无口蹄疫生物安全隔离区应符合下列所有条件：

- 3.1 符合《通则》的要求；
- 3.2 在过去12个月内没有发生口蹄疫疫情；
- 3.3 在过去12个月内没有发现口蹄疫感染的证据；
- 3.4 禁止进行口蹄疫疫苗免疫，且在过去12个月不存在免疫过口蹄疫疫苗的动物；
- 3.5 生物安全隔离区所在县级行政区域在最近3个月内没有发生口蹄疫疫情。

4 资格中止与撤销

- 4.1 生物安全管理体系不能正常运行，不再符合《通则》有关要求的，应立即中止无口蹄疫生物安全隔离区的资格。
- 4.2 发生口蹄疫疫情，或者出现口蹄疫病毒感染的，应立即撤销无口蹄疫生物安全隔离区资格。

5 资格恢复

- 5.1 已经中止无口蹄疫生物安全隔离区资格的，应在中止之日起30天内采取纠正措施，且后续控制措施得到有效实施后，方可恢复资格。
- 5.2 已发生口蹄疫疫情，或者出现口蹄疫病毒感染被撤销无口蹄疫生物安全隔离区资格的，要重新恢复无疫资格，需满足本标准3的条件。

无猪瘟生物安全隔离区标准

1 范围

本标准规定了无猪瘟生物安全隔离区的条件及中止、撤销和恢复要求。

本标准适用于无猪瘟生物安全隔离区的建设和评估。

2 术语和定义

猪瘟病毒感染：存在以下任一情况时，均定义为猪瘟病毒感染。

- (1) 分离到猪瘟病毒（疫苗株除外）；
- (2) 鉴定出猪瘟病毒抗原（疫苗株除外）或特异性病毒核糖核酸（RNA）；
- (3) 鉴定出非免疫所致的猪瘟病毒特异性抗体。

3 无猪瘟生物安全隔离区

无猪瘟生物安全隔离区应符合下列所有条件：

- 3.1 符合《通则》的规定；
- 3.2 建有有效的监测体系，对生物安全隔离区进行了12个月的持续监测；
- 3.3 在过去12个月内未发生猪瘟疫情；
- 3.4 在过去12个月内未发现猪瘟病毒感染的证据；
- 3.5 在过去12个月内没有接种过猪瘟疫苗，或接种过疫苗，但能有效区分疫苗抗体和自然感染抗体。

4 资格中止与撤销

- 4.1 生物安全管理体系不能正常运行，不再符合《通则》有关要求的，应立即中止无猪瘟生物安全隔离区的资格。
- 4.2 发生猪瘟疫情，或者出现猪瘟病毒感染的，应立即撤销无猪瘟生物安全隔离区的资格。

5 资格恢复

- 5.1 已经中止无猪瘟生物安全隔离区资格的，应在中止之日起30天内采取纠正措施，且后续控制措施得到有效实施后，方可恢复。
- 5.2 撤销无猪瘟生物安全隔离区资格的，通过持续监测，有监测证据表明没有发现猪瘟感染，并满足下列条件之一者，可申请恢复无猪瘟生物安全隔离区资格：
 - 5.2.1 采取了扑杀政策，未进行猪瘟免疫，在最后一例感染病例扑杀至少3个月后；
 - 5.2.2 采取了扑杀政策，同时又进行了紧急免疫时，满足以下任一条件的：
 - 5.2.2.1 在最后一例感染病例扑杀、所有免疫动物屠宰至少3个月后；
 - 5.2.2.2 如果有区分免疫和感染的有效方法，可以不用屠宰免疫动物，但应在最后一例感染病例扑杀至少3个月后。
 - 5.2.3 未执行扑杀政策，应满足本标准3的条件。

无高致病性禽流感生物安全隔离区标准

1 范围

本标准规定了无高致病性禽流感生物安全隔离区的条件及中止、撤销和恢复要求。
本标准适用于无高致病性禽流感生物安全隔离区的建设和评估。

2 术语和定义

2.1 禽流感病毒感染

存在以下任一情况时，均定义为禽流感病毒感染。

- (1) 分离并鉴定出禽流感病毒；
- (2) 在家禽或家禽产品中检测到禽流感病毒特异性核糖核酸（RNA）。

2.2 禽流感

为任何 H5 或 H7 亚型的 A 型流感病毒感染，或任何一种静脉接种致病指数(IVPI)大于 1.2（或造成至少 75%死亡率作为代替指标）的其他 A 型流感病毒感染，可分为高致病性禽流感和低致病性禽流感。

2.3 高致病性禽流感

由以下禽流感病毒引起的家禽感染，定义为高致病性禽流感：

(1) 对 6 周龄易感鸡的静脉接种致病指数（IVPI）大于 1.2，或对 4—8 周龄易感鸡静脉接种感染死亡率不低于 75%的 H5、H7 亚型或其他 A 型流感病毒；

(2) 对不具备上述两个特征的 H5 和 H7 亚型流感病毒，需要进行测序，如果血凝素裂解位点存在多个碱性氨基酸，且与高致病性禽流感分离毒株的氨基酸序列相似，则认为是高致病性禽流感。

3 无高致病性禽流感生物安全隔离区

无高致病性禽流感生物安全隔离区应符合下列所有条件：

- 3.1 符合《通则》的规定；
- 3.2 商品禽未进行高致病性禽流感疫苗免疫；
- 3.3 监测证明至少在过去12个月内没有发现高致病性禽流感病毒感染；

4 资格中止及撤销

4.1 生物安全管理体系不能正常运行，不符合《通则》有关要求的，应立即中止无高致病性禽流感生物安全隔离区的资格。

4.2 不管低致病性禽流感状态如何，只要发生高致病性禽流感疫情，或者出现高致病性禽流感病毒感染的，应立即撤销无高致病性禽流感生物安全隔离区资格。

5 资格恢复

5.1 已经中止无高致病性禽流感生物安全隔离区资格的，应在中止之日起30天内采取纠正措施，且后续控制措施得到有效实施后，方可恢复资格。

5.2 无高致病性禽流感生物安全隔离区的恢复

发生高致病性禽流感感染的，采取扑杀政策（包括对所有感染养殖场进行彻底消毒）后，有监测证据表明在最后一例病例被扑杀后连续3个月内没有发现禽流感感染。

无新城疫生物安全隔离区标准

1 范围

本标准规定了无新城疫生物安全隔离区的条件及中止、撤销和恢复要求。

本标准适用于无新城疫生物安全隔离区的建设和评估。

2 定义

2.1 新城疫强毒感染

分离并鉴定出新城疫强毒，或检测到新城疫强毒特异的病毒核糖核酸（RNA）。

2.2 新城疫

由新城疫强毒引起的禽类感染。

2.3 新城疫强毒

新城疫强毒的毒力应符合以下任一标准：

（1）毒株对1日龄雏鸡脑内接种致病指数（ICPI）大于或等于0.7；

（2）毒株F2蛋白C端（第113-116位）至少包括3个碱性氨基酸残基，F1蛋白N端，即第117位氨基酸残基为苯丙氨酸（F）。

3 无新城疫生物安全隔离区

无新城疫生物安全隔离区应满足下列所有条件：

3.1 符合《通则》的规定；

3.2 有监测证据表明在过去至少12个月内没有发现新城疫强毒感染。

4 资格中止与撤销

4.1 生物安全管理体系不能正常运行，不再符合《通则》有关要求的，应立即中止无新城疫生物安全隔离区的资格。

4.2 发生新城疫疫情或出现新城疫强毒感染的，应立即撤销无新城疫生物安全隔离区资格。

5 资格恢复

5.1 已经中止新城疫生物安全隔离区资格的，应在中止之日起30天内采取纠正措施，且后续控制措施得到有效实施后，方可恢复资格。

5.2 生物安全隔离区内发生新城疫疫情或出现新城疫强毒感染后，采取了扑杀政策和相应的消毒措施，在最后一例感染病例扑杀后，有监测证据表明在过去至少3个月内没有发现新城疫强毒感染，可申请恢复无新城疫生物安全隔离区资格。

无布鲁氏菌病生物安全隔离区标准

1 范围

本标准规定了牛、羊、鹿无布鲁氏菌病生物安全隔离区的条件及中止、撤销和恢复要求。
本标准适用于牛、羊、鹿无布鲁氏菌病生物安全隔离区的建设和评估。

2 术语和定义

布鲁氏菌感染：存在以下任一情况时，均定义为布鲁氏菌感染。

- (1) 从动物样品中分离鉴定出布鲁氏菌；
- (2) 诊断检测结果为阳性，且与某病例有流行病学关联。

3 牛、羊、鹿非免疫无布鲁氏菌病生物安全隔离区

3.1 牛、羊、鹿非免疫无布鲁氏菌病生物安全隔离区标准

牛、羊、鹿非免疫无布鲁氏菌病生物安全隔离区除符合《通则》的要求外，还应符合下列条件：

- 3.1.1 过去3年内未进行过疫苗免疫；
- 3.1.2 至少过去1年内未监测到布鲁氏菌感染病例和感染的证据；
- 3.1.3 对出现流产等布鲁氏菌感染临床症状的病例，需要进行相关的检测，结果为阴性；
- 3.1.4 对所有性成熟动物要每年至少间隔6个月进行两次检测，结果应为阴性。

4 牛、羊、鹿免疫无布鲁氏菌病生物安全隔离区

4.1 牛、羊、鹿免疫无布鲁氏菌病生物安全隔离区标准

牛、羊、鹿免疫无布鲁氏菌病生物安全隔离区除符合《通则》的要求外，还应符合下列任一条件：

- 4.1.1 应有区分免疫和非免疫动物的措施；
- 4.1.2 过去1年内未出现过布鲁氏菌感染病例或感染的证据；
- 4.1.3 对出现流产等布鲁氏菌感染临床症状的病例，需要进行相关的检测，结果为阴性；
- 4.1.4 对所有性成熟的动物要进行两次诊断检测，结果必须为阴性。

5 资格中止与撤销

5.1 生物安全管理体系不能正常运行，不再符合《通则》有关要求的，应立即中止相应无布鲁氏菌病生物安全隔离区的资格。

5.2 发生布鲁氏菌病疫情，或者出现布鲁氏菌感染的，应立即撤销相应无布鲁氏菌病生物安全隔离区资格。

6 资格恢复

6.1 已经中止无布鲁氏菌病生物安全隔离区资格的，应在中止之日起30天内采取纠正措施，且后续控制措施得到有效实施后，方可恢复资格。

6.2 撤销无布鲁氏菌病生物安全隔离区资格的，要重新恢复，应满足相应无布鲁氏菌病生物安全隔离区标准条款的规定。

第三部分 基础体系

兽医机构建设规范

兽医实验室建设管理规范

动物防疫档案管理规范

畜牧业基本情况报告规范

兽医机构建设规范

1 范围

本规范规定了省、地（市）、县兽医主管部门、动物疫病预防控制机构和动物卫生监督机构，以及基层动物防疫机构的建设要求。

本规范适用于省、地（市）、县兽医主管部门、动物疫病预防控制机构和动物卫生监督机构，以及基层动物防疫机构的建设。

2 兽医主管部门

2.1 省、市、县三级兽医主管部门应涵盖动物防疫、检疫监督、药政、医政等内设机构和职能。

2.2 兽医主管部门的各个内设机构人员应当具有兽医及相关专业本科以上学历。

3 动物疫病预防控制机构

3.1 省、市、县三级设立动物疫病预防控制机构，其称谓统一为 XX 省（市、县）动物疫病预防控制中心，具有独立法人资格。

3.2 各级动物疫病预防控制机构归口同级兽医主管部门管理。

3.3 各级动物疫病预防控制机构的职责为：负责实施动物疫病的监测、预警、预报、实验室诊断、流行病学调查、疫情报告；提出重大动物疫病防控技术方案；动物疫病预防的技术指导、技术培训、科普宣传。

3.4 各级动物疫病预防控制机构实行分级业务指导，上级动物疫病预防控制机构指导下级动物疫病预防控制机构的业务工作。

3.5 各级动物疫病预防控制机构编制应当根据辖区工作量、职责范围和经济水平等因素科学合理制定，应具有与工作需要相匹配的兽医及相关专业技术人员。

3.5.1 省级：专业技术人员比例不低于 80%；专业技术人员中，大专以上学历人员比例不低于 90%

3.5.2 市级：专业技术人员比例不低于 75%；专业技术人员中，大专以上学历人员比例不低于 80%。

3.5.3 县级：专业技术人员比例不低于 70%；专业技术人员中，大专以上学历人员比例不低于 70%。

3.6 地方各级动物疫病预防控制机构应具有与工作需要相匹配的工作用房及配套的设施、设备。工作用房包括业务办公、实验、培训、档案管理、信息化管理、防疫物资储备及后勤保障用房等，其中兽医诊断实验室用房面积：省级不少于 1500 平方米、地市级不少于 300 平方米、县级不少于 200 平方米。

3.7 各级动物疫病预防控制机构应具有与工作需要相匹配的畜禽养殖、强制免疫、疫病监测、流行病学调查、防疫人员和物资管理等内容的信息网络系统及相关配套设施、设备，并运转正常。

3.8 各级动物疫病预防控制机构人员实行定期培训和考核制度。

4 动物卫生监督机构

4.1 省、市、县应设立动物卫生监督机构，称谓统一为 XX 省（市、县）动物卫生监督所，具有独立执法主体资格。

4.2 各级动物卫生监督机构归口同级兽医主管部门管理。

4.3 动物卫生监督机构依法负责动物卫生监督管理和执法工作。其主要职责有：依法实施辖区内的动物及动物产品检疫；对辖区内有关单位和个人执行动物防疫法及有关动物卫生法律法规、规章和技术规范的情况进行监督、检查；纠正和处理违反动物卫生法律、法规和规章的行为，决定动物卫生行政处罚、处罚等。

4.4 各级动物卫生监督机构实行分级业务指导，上级动物卫生监督机构指导下级动物卫生监督机构的业务工作。下级动物卫生监督机构按规定向上级动物卫生监督机构定期报告工作，重大事件要及时报告。

4.5 各级动物卫生监督机构的人员编制应当根据辖区工作量、职责范围和经济水平等因素科学合理制定，应具有与工作需要相匹配的专业人员，兽医专业人员比例不低于 70%。

4.6 动物卫生监督机构实行官方兽医制度。

4.7 各级动物卫生监督机构应具有与工作需要相匹配的工作用房及配套的设施、装备。设施设

备应包括：通讯工具、工作用车（执法和快速检测用车）、执法办案设备、证据保全设备、培训设备、现场快速检测设备、防护设备、取证工具等。

4.8 各级动物卫生监督机构应具有与工作需要相匹配的涵盖动物及动物产品检疫、养殖和流通监管、官方兽医管理、执法办案等内容的信息网络系统及配套设施、设备，并运转正常。

4.9 各级动物卫生监督机构人员实行定期培训和考核制度。

5 乡镇或区域兽医机构

县级人民政府兽医主管部门应当向乡镇或特定区域派驻兽医机构，承担乡镇或区域内的动物强制免疫、免疫效果评估以及相关场所（动物饲养场、屠宰场、交易市场、水网地带、候鸟栖息地、动物产品仓储场所等）消毒灭原的组织实施和监督管理，承担动物产地检疫、动物屠宰检疫、动物疫病监测、动物疫情普查和流行病学调查、动物疫情报告和其他有关动物卫生监督管理及执法工作。乡镇或特定区域派驻兽医机构工作应具有稳定的工作用房和与业务工作相配套的设施设备。

6 村级动物防疫员

6.1 在有畜禽养殖的行政村设置村级动物防疫员，负责所在村动物养殖数量及养殖方式情况的调查统计，具体实施动物强制免疫、相关场所的消毒灭原以及动物疫情普查和报告，协助、配合乡镇（街道）或者区域兽医机构开展动物疫病监测、动物疫病流行病学调查、动物产地检疫、动物养殖场防疫监管、动物免疫效果评估等工作。

6.2 村级动物防疫员实行每月工作绩效考评制度和定期培训制度。由乡镇或者区域兽医机构根据其每月工作数量和质量核发工作补助经费，奖优罚劣；对在每月工作绩效考评中有两次以上不合格，予以辞退。每年应当组织村级动物防疫员进行动物疫病防治、动物免疫和消毒、动物疫情普查和报告等技术规范以及免疫注射、采（送）样等技能的培训两次以上。

6.3 村级动物防疫员应当配备与业务工作相配套的装备和器械，包括冷藏包、消毒喷雾器、免疫注射器械、测温仪、防护用具、畜禽标识打挂和识读设备等。

兽医实验室建设管理规范

1 范围

本规范规定了无疫区兽医实验室建设和管理要求。

本规范适用于无疫区兽医实验室的建设和管理。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本部分，然而，鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

检测和校准实验室能力的通用要求

《无疫区标准 通则》

实验室生物安全通用要求

兽医实验室生物安全要求通则

兽医实验室管理技术规范

《陆生动物诊断试验和疫苗手册》世界动物卫生组织

《病原微生物实验室生物安全管理条例》

《动物病原微生物分类名录》

3 术语和定义

3.1 通则规定的术语和定义适用于本标准。

3.2 兽医实验室

指隶属于各级兽医机构，承担动物疫病监测、检测和诊断等任务的实验室，包括省级、地（市）级和县级兽医实验室。

4 工作能力

4.1 省级兽医实验室

4.1.1 能对重大动物疫病和其他常发动物疫病进行诊断。能够开展一、二、三类动物病原微生物所致动物疫病的血清学和分子生物学检测，二、三类动物病原微生物所致动物疫病的组织病理学诊断，三类动物病原微生物的病原学检测。

4.1.2 能完成农业部和本省主管部门下达的动物疫病监测任务。

4.1.3 能指导全省各级实验室开展动物疫病检测工作。

4.1.4 能承担对全省各级实验室检测人员的培训工作。

4.1.5 能开展动物疫病检测和诊断技术研究和推广工作。

4.2 地（市）级兽医实验室

4.2.1 能对重大动物疫病进行初步诊断，对其他常发动物疫病进行诊断。能够开展一、二、三类动物病原微生物所致动物疫病的血清学和分子生物学检测，动物常见致病菌分离培养及药物敏感性试验。

4.2.2 能完成本市和上级主管部门下达的动物疫病监测任务。

4.2.3 能指导辖区内县（区）级实验室开展动物疫病检测工作。

4.2.4 能承担对辖区内县（区）级实验室检测人员的培训工作。

4.3 县级兽医实验室

4.3.1 能对重大动物疫病进行临床初步诊断，对其他常发动物疫病进行初步诊断。能够开展一、二、三类动物病原微生物所致动物疫病的血清学检测，动物常见致病菌分离培养及药物敏感性试验。

4.3.2 能完成本县和上级主管部门下达的动物疫病监测任务。

4.3.3 能够培训和指导基层动物防疫人员按规范开展采样工作。

5 组织

5.1 兽医实验室应建立与业务工作相适应的组织结构，按附录 A 要求设置各功能室，其人员配

备和岗位设置应满足从样品接收到实验报告发出的整个检测过程的需要。

5.2 兽医实验室应设置实验室主任、技术负责人、质量负责人、生物安全负责人、各检测室负责人、检测人员、档案管理员、仪器设备管理员、样品保管员等岗位。技术负责人和质量负责人不能是同一人，其他岗位可以兼任。

6 人员

6.1 省级兽医实验室总人数不少于 12 人，地（市）级兽医实验室总人数不少于 6 人，县级兽医实验室总人数不少于 4 人。

6.2 兽医实验室工作人员的资质应符合附录 B 要求规定。专业技术人员比例应为 80%以上。所有人员应持证上岗。

6.3 兽医实验室主任、技术负责人、质量负责人和生物安全负责人应由主管部门任命。

6.4 兽医实验室应制订并实施人员年度培训计划，培训计划应与实验室当前和预期的任务相适应，并对培训的有效性进行评价。

6.5 兽医实验室应建立完整的人员技术档案，内容至少包括：学历、学位、技术职称、工作业绩、培训考核、技术成果等材料。

7 设置及布局

7.1 兽医实验室应处于一个相对独立或封闭的区域，其设施和环境等条件要满足工作需要，并符合环保和生物安全的规定。

7.2 兽医实验室应做到布局科学、流程合理、功能完整、设施齐备，符合附录 A 规定的要求。

7.3 兽医实验室防火、防盗、防爆、防泄漏等设施应符合《兽医实验室管理技术规范》要求，病原微生物、化学试剂、压力容器、易燃易爆物品、剧毒及其他危险物品的存放应有专门的安全防护设施。

8 管理

8.1 管理体系

8.1.1 兽医实验室应建立与工作相适应的质量管理体系，并持续有效运行。质量管理体系应覆盖实验室工作的全过程。

8.1.2 兽医实验室应按照《实验室生物安全通用要求》的规定，建立完善的生物安全管理体系，明确管理责任。

8.1.3 兽医实验室应通过实验室资质认定和省级以上兽医主管部门考核。

8.2 管理文件

省级和地（市）级兽医实验室应制定完整的质量管理文件和生物安全管理文件，包括“质量管理手册”、“程序文件”、“管理制度”、“作业指导书”。

所有文件均应由授权人员审查并批准实施。

8.2.1 质量管理手册

8.2.1.1 质量管理手册的范围

包括实验室职责与能力、机构与人员、设施与环境、管理体系、仪器设备、检测工作、记录与报告、档案管理等方面。

8.2.1.2 质量管理手册的内容

包括简介、公正性声明；质量方针与质量目标；术语和缩略语；管理要求：组织、管理体系、文件控制、检验、服务和供应品采购、申诉和投诉、纠正措施与预防措施及改进、记录、内部审核、管理评审；人员要求、设施和环境条件、检测和校准方法、设备和标准物质、量值溯源、抽样和样品处置、结果质量控制、结果报告；附录：人员一览表、程序文件目录、仪器设备一览表；授权签字人确认表。

8.2.2 程序文件

包括文件的控制和维护、管理体系运行和维持、仪器设备、设施和环境、人员培训与考核、样品管理、检测方法选择与确认、检测过程、检测结果质量（含能力验证）、检测记录、结果报告、供应品采购、安全作业、剧毒危险物品管理、内务管理、检测事故处理等方面的控制及管理程序。

8.2.3 管理制度

包括实验室管理规定（含卫生、安保要求）、岗位责任制、人员培训与考核制度、仪器设备管理制度、试剂和耗材管理制度、样品采集、处理、运输和保存制度、检测记录与报告审核管理制度、档案管理制度、生物安全管理制度、废弃物处理制度、菌（毒）种管理制度、危险品、剧毒品管理制度等。

8.2.4 作业指导书

包括《检测操作规程》、《仪器设备操作规程》和《记录格式》。

9 仪器设备

9.1 仪器设备的种类、数量、参数等应满足所承担工作任务的需要，符合附录 C 规定的要求。

9.2 计量器具应按有关规定定期检定或校验，对检测结果有影响的其他仪器也应定期检定或校验，保证正常运行。仪器设备应有专人负责管理，明确检定和维护计划，有使用、维护和校验记录。

9.3 高温、高速、贵重和精密仪器应有醒目的警示性标识。有故障或停用的仪器设备应有明显的标识，防止误用。

9.4 兽医实验室应建立仪器设备档案，内容包括名称、型号、规格、制造商名称、购置日期、验收记录、放置地点、管理人、操作维修说明书、使用记录、维护和维修记录、检定或校准记录（如适用）、附件情况等，进口仪器设备应备有中文说明书。

10 检测工作

10.1 兽医实验室应按照附录 D 规定的要求建立科学、合理的诊断工作流程，制定相应的工作程序。

10.2 样品的采集、处理、运输和保存要符合有关规定，建立样品的唯一性标识，保证样品在检测和保存期间不发生混淆。样品流转过程中应检查样品状况，避免发生损坏、变质或丢失。

10.3 实验室应优先使用国家标准、行业标准及农业部规定的检测方法。兽医实验室应定期对技术标准和规范等进行收集和查新，对其有效性进行确认。

10.4 实验室在采用新方法（包括标准方法）时应当进行内部评估、优化和/或验证。

10.5 实验室应定期参加比对试验或能力验证计划，保证检测工作质量。

10.6 实验室应建立实验试剂和实验材料购买、保存、领用和使用记录。

11 记录与报告

11.1 实验室应建立和维持记录控制程序，规定记录的识别、收集、索引、存档、维护和清理等。并规定保存期限。

11.2 检测原始记录应有统一、固定的格式，数据真实，填写规范，信息完整。检测原始记录应有检测、复核和审核人员三级签字。

11.3 检测原始记录必须用不褪色笔（蓝黑墨水或碳素笔）书写。对记录的修改应规范，原字迹应仍清晰可辨，并有修改人的签章。

11.4 利用计算机或自动设备对检测数据、信息资料进行采集、处理、记录、报告或存贮时，应及时备份，有保障其安全性的措施，避免原始信息或数据的泄密、丢失或随意改动。

11.5 实验室应准确、清晰、明确、客观地报告每一项检测结果。检测报告应至少包括标题、检测实验室名称和地址、样品信息、送检日期、检测日期、检测项目、检测依据、检测方法、检测结果及结果仅与被检样品有关的声明等信息。

11.6 检测报告实施批准、审核和制表人三级签字制度。

11.7 当对已发出的检测报告有实质性修改时，明确规定应收回、更改和重新签发的检测报告和责任人，以及补救措施和事故处理措施。

12 档案管理

12.1 实验室应设立档案室，集中统一管理档案；应配置必要的设施，确保档案安全。

12.2 实验室应按照《动物防疫档案管理规范》的有关规定建立档案管理制度。

12.3 技术资料、检测报告及相应原始记录的保存期限应不少于 10 年；高致病性动物病原微生物相关实验活动的检测报告及记录，保存期限应不少于 20 年。

附录 A
(规范性附录)
各级兽医实验室设施与环境要求

A.1 省级实验室

A.1.1 选址、布局、内部设施和内部环境等应符合 BSL-2 实验室的要求。

A.1.2 总建筑面积不低于 1500 平方米。

A.1.3 应分别设置有：解剖室、接样室、样品处理室、样品保存室、档案室、仪器室、试剂室、病理学检测室、血清学检测室、分子生物学检测室、病毒学检测室、细菌学检测室、寄生虫学检测室、洗涤消毒室、实验器材准备室、标准物质室、菌（毒）种及样本保藏室、实验动物室等。

A.2 地（市）级实验室

A.2.1 选址、布局、内部设施和内部环境等应符合 BSL-2 实验室的要求。

A.2.2 总建筑面积不低于 300 平方米。

A.2.3 应分别设置有：解剖室、接样室、样品保存室、仪器室、分子生物学检测室、血清学检测室、病原学检测室、洗涤消毒室和档案室等。

A.3 县（市）级实验室

A.3.1 选址、布局、内部设施和内部环境等应符合 BSL-1 实验室的要求，局部达到 BSL-2 实验室要求。

A.3.2 总建筑面积不低于 200 平方米。

A.3.3 实验室应当分别设置有：解剖室、接样室、样品保存室、血清学检测室、病原学检测室、洗涤消毒室和档案室等。

附录 B
(规范性附录)
各级兽医实验室人员资质要求

B.1 省级实验室

B.1.1 实验室主任：从事本专业工作 5 年以上，熟悉检测技术、质量管理、生物安全管理和相关法律法规，具有兽医专业高级技术职称。

B.1.2 技术负责人：具有 5 年以上的实验室管理及工作经验，具有兽医专业高级技术职称。了解动物疫病检测技术发展动态，熟悉本实验室相关检测标准及操作，能对实验数据进行分析，得出正确结论。

B.1.3 质量负责人：具有 5 年以上的实验室管理及工作经验，具有兽医专业高级技术职称。掌握实验室质量管理体系的建立和运行、内审及管理评审，熟悉本实验室相关检测标准及操作，能对实验数据进行分析，得出正确结论。

B.1.4 生物安全负责人：从事本专业工作 5 年以上，具有兽医专业高级技术职称。掌握病原微生物实验室生物安全相关法律法规，熟悉实验室检测流程、生物安全风险点、质量管理等知识。

B.1.5 各检测室负责人：具有分管实验室的管理及工作经验，具有相关专业中级以上技术职称。熟悉分管实验室的检测标准及操作，能对实验数据进行分析，得出正确结论，能对实验过程中出现的问题进行分析，找出解决办法。

B.1.6 检测人员：所有的检测人员均应达到兽医专业或相关专业专科以上学历，能掌握所在实验室的各种实验操作，并能熟练使用本室的实验仪器设备，能对实验数据进行分析，得出正确结论，各检测室实验员应达到 2 人以上(可兼职)，经过相关部门的培训和考核合格。

B.2 地（市）级实验室

B.2.1 实验室主任：从事本专业工作 5 年以上，熟悉检测技术、质量管理、生物安全管理和相关法律法规，具有兽医相关专业中级及以上技术职称。

B.2.2 技术负责人：具有 3 年以上的实验室管理及工作经验，具有相关专业中级以上技术职称。熟悉本实验室相关检测标准及操作，能对实验数据进行分析，得出正确结论。

B.2.3 质量负责人：具有 3 年以上的实验室管理及工作经验，具有兽医相关专业中级技术职称。了解质量管理体系的相关政策和规定，能推动实验室质量管理体系的建立、运行和持续改进。

B.2.4 生物安全负责人：从事本专业工作 3 年以上，具有兽医相关专业中级以上技术职称。掌握病原微生物实验室生物安全相关法律法规，熟悉实验室检测流程、生物安全风险点、质量管理等知识。

B.2.5 检测人员：所有检测人员均达到兽医专业或相关专业专科以上学历，掌握所在实验室的各种实验操作，并能熟练使用本室的实验仪器设备，能对实验数据进行分析，得出正确结论，经过相关部门的培训和考核合格。

B.3 县级实验室

B.3.1 实验室主任：从事本专业工作 3 年以上，熟悉检测技术、质量管理、生物安全和相关法律法规，具有兽医相关专业中级（含中级）以上技术职称。

B.3.2 检测人员：所有检测人员均应达到兽医专业或相关专业专科以上学历，掌握所在实验室开展的各种实验操作，并能熟练使用本室的实验仪器设备，能对实验数据进行分析，得出正确结论。应经过相关部门的培训和考核合格。

附录 C
(规范性附录)
各级兽医实验室仪器设备配置要求

C.1 省级实验室

C.1.1 具有开展检测工作的基本仪器设备,并在数量上满足工作需要,包括:酶标仪、自动洗板机、微量震荡器、普通离心机、磁力搅拌器、生物显微镜、恒温培养箱、生化培养箱、超声波清洗器、酸度计、超纯水仪、医用冰箱、自动高压灭菌器、冰柜、恒温水浴锅、干热灭菌器、通风橱、电动移液器、多道移液器、单道移液器、PCR 仪、II 级生物安全柜、组织匀浆机、电子天平、涡旋混匀器、超声波裂解器、梯度 PCR 仪、荧光 PCR 仪、液氮罐、多功能电泳仪、恒温振荡摇床、细菌过滤器、小型冻干机、小型孵化器、细菌鉴定仪、倒置显微镜、多功能显微镜、二氧化碳培养箱、全自动高压灭菌器、制冰机、超低温冰箱(-86℃)、台式高速冷冻离心机、凝胶成像与分析系统。

C.1.2 应具有开展 BSL-2 级实验室工作和生物安全需要的其他设备。

C.1.3 应具有一定的科学研究设备,并不断更新。推荐的设备包括:石蜡切片机、自动组织脱水机、石蜡包埋机、自动染色机、大容量冷冻离心机、冷冻切片机、显微数字成像系统、真菌培养箱、厌氧培养箱、转瓶培养箱、荧光显微镜、显微照相系统、病毒超滤提纯系统、体视显微镜、酶标检测工作站、分子生物学工作站、核酸蛋白提取仪、核酸蛋白测定仪、超速冷冻离心机、高速冷冻离心机、电动吸液器。

C.2 地(市)级实验室

C.2.1 具有开展检测工作的基本仪器设备,并在数量上满足工作需要包括:酶标仪、自动洗板机、微量震荡器、生物安全柜、普通离心机、磁力搅拌器、生物显微镜、恒温培养箱、生化培养箱、超声波清洗器、酸度计、纯水仪、医用冰箱、高压灭菌器、冰柜、恒温水浴锅、干热灭菌器、通风橱、多道移液器、单道移液器、电子天平、PCR 仪、液氮罐、电泳仪、凝胶成像与分析系统、台式高速冷冻离心机、II 级生物安全柜、组织匀浆机、涡旋混匀器、自动高压灭菌器。

C.2.2 应具有开展 BSL-2 级实验室工作和生物安全需要的其他设备。

C.3 县级实验室

C.3.1 具有开展检测工作的基本仪器设备,并在数量上满足工作需要,包括:酶标仪、微量震荡器、生物安全柜、普通离心机、磁力搅拌器、生物显微镜、恒温培养箱、生化培养箱、超声波清洗器、酸度计、纯水仪、医用冰箱、高压灭菌器、冰柜、恒温水浴锅、干热灭菌器、通风橱、多道移液器、单道移液器、电子天平。

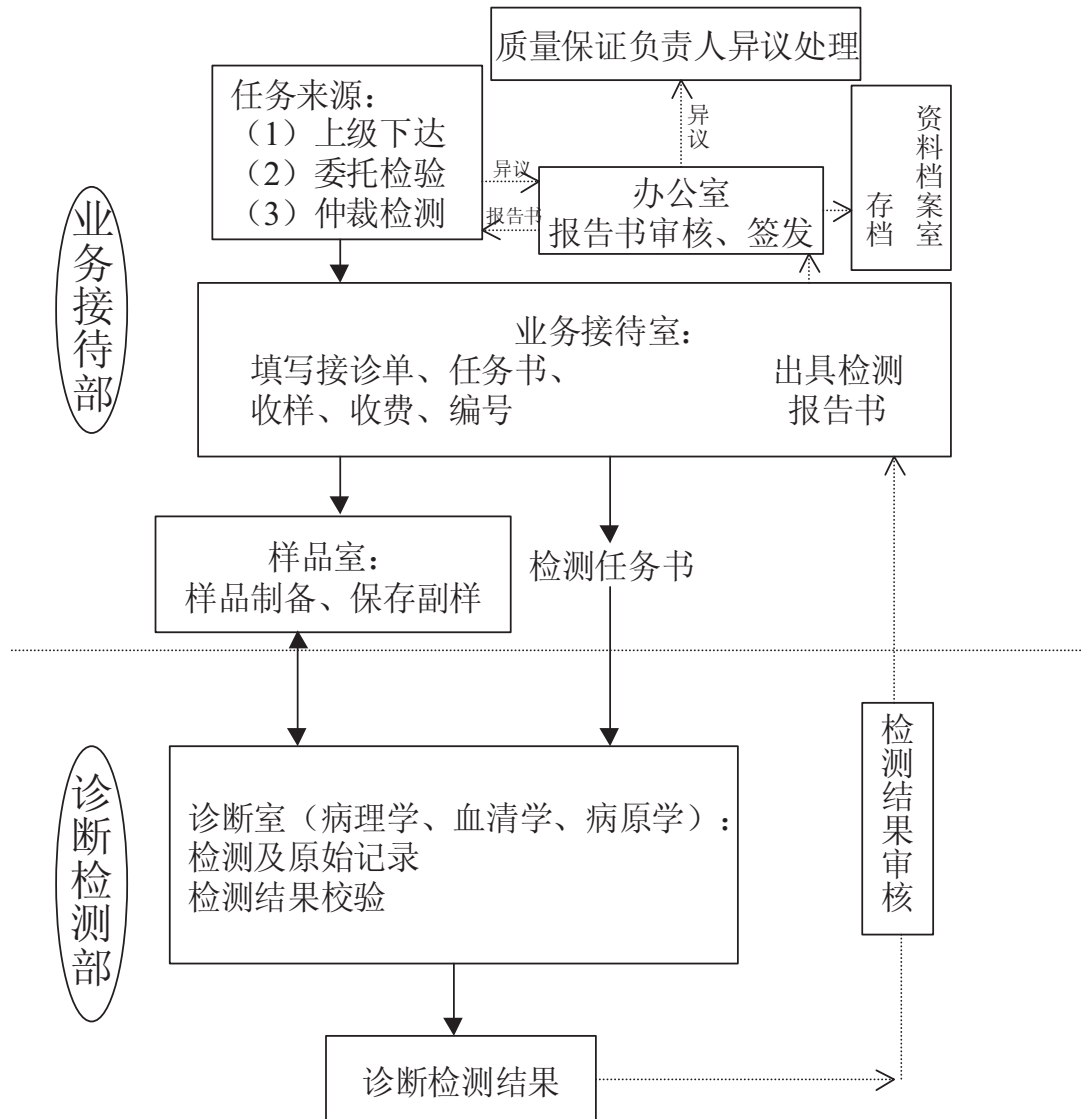
C.3.2 应具有开展 BSL-2 级实验室工作和生物安全需要的其他设备。

附录 D
(规范性附录)
兽医实验室工作程序

D.1 工作程序

部门	工作程序
业务接待室	1. 样品接收。 2. 填写接样单。 3. 制定检测方案，填写检测任务书。 4. 任务书发送至各检测室。
样品室	5. 样品制备。 6. 保存副样，副样封条。
检测室	7. 检测，填写原始数据。 8. 检测结果的审校。 9. 检测室主任审核原始记录。
业务接待室	10. 编制检测报告书。 11. 检测报告书审核。
主任室	12. 报告终审签发。
业务办公室	13. 检测报告书盖章。 14. 发送检测报告书。
资料档案室	15. 检测报告归档。

D.2 诊断工作流程图



动物防疫档案管理规范

1 范围

为规范无疫区动物防疫档案管理，依据《中华人民共和国动物防疫法》和《中华人民共和国档案法》等有关规定，结合无疫区建设要求，制定本规范。

本规范适用于各级动物卫生监督机构、动物疫病预防控制机构、乡镇或区域兽医机构的动物防疫档案的归档、管理。

各级兽医主管部门在动物防疫活动中形成的档案可以参照本规范管理。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可以使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

DA/T22-2000 《归档文件整理规则》

《文书档案保管期限表》国家档案局

3 定义

3.1 动物防疫档案

指各级兽医主管部门、动物卫生监督机构、动物疫病预防控制机构和乡镇或区域兽医机构及工作人员在动物防疫活动中形成的档案，包括动物强制免疫和消毒灭原、动物疫病监测、动物疫情普查及报告、动物疫情处理、动物检疫、动物卫生监督、组织机构与人员组成等文件、声像、实物资料。

3.2 归档资料

立档单位在其职能活动中形成的、办理完毕、应作为文书档案保存的各种防疫档案。

3.3 立卷

将零散的防疫档案根据其相互联系、特征和保存价值分类组成案卷的整理过程。

4 动物防疫档案的种类及主要内容

4.1 动物防疫档案至少包括以下种类：防疫物资管理档案、免疫档案、消毒档案、疫病监测档案、产地检疫记录档案、屠宰检疫记录档案、动物疫病普查及流行病学调查档案、疫情报告及处理档案、动物卫生监督档案、动物隔离检疫档案、动物卫生执法办案档案、动物及动物产品无害化处理档案、机构和人员档案、官方兽医培训考核档案和村级防疫员培训考核档案等。

4.2 动物防疫档案的内容

4.2.1 防疫物资管理档案：包括疫苗、消毒剂、耳标、防护服、靴子、护目镜、手套、消毒器械等各类防疫物资的数量、生产厂家、生产日期、有效期以及入库、出库、领用、发放、回收核销信息和数据，档案上必须有相关工作人员、管理人员和有关负责人的签字等。

4.2.2 免疫档案：包括养殖场（户）名称、地址、畜禽种类、数量、免疫时间、疫苗名称、畜禽养殖代码、畜禽标识号、疫苗瓶回收时间及数量、养殖场免疫实施人员或者村防疫员签字、免疫效果监测（时间、样品数量、采样人、监测结果）、畜主签字等。

4.2.3 消毒档案：包括消毒药名称、生产厂家、生产批号、用量、稀释比例、消毒地点（带畜禽、养殖场内、周边环境、水网地带、候鸟栖息地）、消毒时间、消毒面积、消毒实施人或者村防疫员签字、畜主签字。

4.2.4 疫病监测档案：包括动物疫病监测方案、种类、监测时间、监测地点（村、场、户）、监测点畜禽基本情况（种类、数量、年龄、饲养方式等）、采样数量、采样人签字、畜主签字、检测方法、检测结果。

4.2.5 产地检疫记录档案：包括动物饲养场（户）名称、地址、动物种类、数量、年龄、免疫情况、畜禽标识、临床健康检查情况、动物疫病抽样检测情况、违禁药物及化合物抽样和快速检测情况、调往地或者买主、出证编号及时间、畜主签字、官方兽医签字等

4.2.6 屠宰检疫记录档案：包括动物来源、数量、产地检疫证号、畜禽标识、宰前健康检查情

况（静态、动态）、宰后检疫部位及结果（头、蹄、内脏、胴体、膈肌等）、违禁药物及化合物抽样比例及数量、违禁物质检测结果、销往地或者买主、出证编号及时间、屠宰企业负责人签字、官方兽医签字等。

4.2.7 动物疫情普查和流行病学调查档案：分常规、紧急、专项动物疫病普查和流调档案。具体内容主要包括：调查范围、调查方式、调查时间及频率、调查地动物养殖、免疫、流通（动物调入调出数量、价格等）、屠宰情况，动物产品调入调出情况、相关风险因素变化情况、动物疫病的血清学和病原学监测情况、动物疫病发生和发展形势分析等、调查人签字。

4.2.8 动物疫情报告及处理档案：包括疫情发生的时间、地点、涉及养殖场（户）数量及养殖规模、感染畜禽数量、畜禽免疫情况、死亡情况、报告时间、报告人等；疫情处理的地点、处理方式、每批处理的数量、处理时间、处理过程相关参数（温度、压力、维持时间）、相关影像资料、动物运输人员签字、交接人员签字、处理人员签字、官方兽医签字。

4.2.9 动物卫生监督档案：包括监督检查时间、地点、相关场所基本情况（养殖、屠宰加工、经营、仓储等）、监督检查内容、存在的问题、处理处罚情况、相关场所负责人签字、官方兽医签字等。

4.2.10 动物隔离检疫档案：包括货（畜）主姓名、身份证号、手机号码、运载工具牌号、入场时间、动物种类、数量、年龄、隔离时间、抽样情况、实验室检测项目及结果、隔离期间动物发病情况（若有）、死亡情况、无害化处理情况、离场时间、隔离场负责人签字、监管兽医签字。

4.2.11 动物卫生执法办案档案：包括案源、案由、立案决定书、暂扣通知书、调查笔录、取证影像资料、处理处罚决定书、送达通知书、违法动物及动物产品处理书面报告、处理影像资料等。

4.2.12 动物及动物产品无害化处理档案：包括处理动物的货主（畜主）姓名、身份证号、手机号码、动物来源、数量（头只数量和总重量）、处理时间、方式（焚烧、高温高压、碱降解等）、处理参数（温度、压力、持续时间）、处理后车间消毒情况（药品、方式、时间）、处理人（各环节）签字、处理后产品去向等。

4.2.13 机构和人员档案：包括机构名称、详细地址、单位性质、人员编制、在岗人数、官方兽医人数、实验室检测人员数量、检测及执法设施设备情况、工作人员情况（姓名、性别、年龄、编制性质、所学专业、最终学历、毕业学校、职称、参加工作时间）等。

4.2.14 官方兽医培训考核档案：包括培训通知、培训时间、地点、形式、内容、学时、教材、培训考核情况、培训人员签到表、相关音像资料等。

4.2.15 村级防疫员培训考核档案：包括培训通知、培训时间、地点、形式、内容、学时、培训教材、培训考核情况、相关音像资料等。

5 动物防疫档案的管理主体

5.1 动物防疫档案应是以县级动物卫生监督机构、动物疫病预防控制机构和乡镇或区域兽医机构为基本管理单位，所形成的动物防疫档案统一由各自单位存档管理。

5.2 省、市、县动物卫生监督机构、动物疫病预防控制机构应建立专用的档案室，配备专用档案存放、借阅设施等。乡镇或区域兽医机构应配备专用的档案柜。

5.3 各单位档案管理工作应由主要领导负责，指定专人负责档案工作。

6 动物防疫档案的形成和归档

6.1 立卷

各级动物卫生监督机构、动物疫病预防控制机构指定专人将动物防疫活动资料立卷，立卷后送交档案室归档。

6.1.1 立卷资料要求

6.1.1.1 保持成套性和完整性。

6.1.1.2 准确的反映本单位各项动物防疫活动的真实内容。

6.1.1.3 符合文件格式和书写标准。

6.1.1.4 经有关负责人签名或行文机关盖章。

6.1.1.5 资料的制成材料质量符合 DA/T22-2000 要求。

6.2 组卷

6.2.1 按事件组卷。如防疫物资台帐、免疫登记、疫情报表、疫情处理、疫病监测、检疫、动物卫生监督、证章标志管理、组织机构与人员组成等分类组卷，在组卷过程中要保持所有资料的种类、份数、页数的齐全完整和文件资料的历史联系。

6.2.2 按年度组卷。跨年度的请示与批复要放在批复年组卷。跨年度的规划、总结放在针对年的最后一年组卷。跨年度的会议文件放在会议开幕年组卷。不同保管期限的档案要分别组卷。

6.2.3 案卷的排列要按同一性质的文件资料形成时间排列，不同性质的文件资料要区别不同情况进行排列。

6.3 归档

6.3.1 归档时间

6.3.1.1 文书档案、声像档案、实物档案在下一年第一季度归档。

6.3.1.2 科研、基建、设备档案在项目完成、竣工验收、投入使用后及时归档。

6.3.2 归档份数

一般性资料归档一份，重要的和特殊的资料归档两份。

7 档案管理

7.1 分类编号

档案按年度、事件、保管期限分类编号。

7.2 目录和检索

各单位档案案卷目录均采用簿式目录。要编写科技档案分类目录。还可根据各类档案查询的实际需要编写档案专题检索目录。

7.3 保管

接收档案时，必须按各类档案移交手续办理。档案库房应当有防盗、防火、防光、防潮、防干、防尘、防有害生物和防污染的措施。

7.4 销毁

7.4.1 根据《文书档案保管期限表》确定其保管期限。

7.4.2 确定销毁的档案要填写销毁登记表，由主管领导签字后进行销毁，销毁时应有 2 人以上在场，并将销毁清单永久保存。

7.5 统计

按档案管理要求统计年报内容，建立统计台帐，每年统计一次。

7.6 安全保密

档案密级的划分、变更、解密要按国家有关保密法律和行政法规执行。档案人员要认真做好档案的安全保密工作，对玩忽职守，造成档案损坏、泄密、丢失或擅自提供抄录档案内容的，根据情节依法追究责任。

7.7 借阅

7.7.1 借阅档案应填写借阅登记，经批准方可借阅。

7.7.2 应在档案室阅览，必要时经主管领导批准可带出档案室，一般不超过 3 天。

7.7.3 档案资料不得拆卷、涂改、乱划。借阅密级档案，应遵守相关规定。

8 档案整理

档案管理人员应对档案进行整理，编制查询档案的专题目录和示意图，编写有关档案简介、汇编等。

畜牧业基本情况报告规范

1 范围

本规范规定了畜牧业基本情况的报告主体、报告时间和报告内容。

本规范适用于各级畜牧兽医机构的畜牧业基本情况的报告。

2 报告主体

乡镇或区域畜牧兽医机构逐级向省级畜牧兽医主管部门报告畜牧业基本情况。

3 报告时间

报告时间按半年报告制度，每年1月、7月的5日前乡镇报到县级，10日前县级报到市级，15日前市级报到省级。

4 报告内容

4.1 易感动物（包括易感野生动物）数量。以乡镇为单位按照表1要求进行统计各种易感动物的饲养量、存栏量、出栏量。

4.2 易感动物（包括易感野生动物）分布。以乡镇为单位进行统计易感动物（含易感野生动物）的养殖数量和分布，并分别以县、市、省为单位绘制相应的易感动物养殖分布图。

4.3 易感动物养殖方式。按照本省动物规模化标准，以乡镇为单位按照表2、表3、表4、表5、表6要求统计规模家禽场、规模化猪场、规模化养牛场、规模化养羊场、动物散养户的数量情况，并逐级进行上报。

4.4 动物流通情况。以县为单位按照表7要求统计报告区域内动物调出和调入情况，并逐级进行上报动物产品流通情况。以县为单位按照表8要求统计报告区域内动物产品调出和调入情况，并逐级进行上报。

表 1 动物养殖情况统计表

单位： 报表日期：

动物类别		饲养量	存栏量	出栏量	备注
牛	种牛				
	奶牛				
	肉牛				
	其他				
	合计				
羊	种羊				
	山羊				
	绵羊				
	合计				
猪	种猪				
	商品猪				
	合计				
鸡	蛋种鸡				
	肉种鸡				
	商品蛋鸡				
	商品肉鸡				
	合计				
鸭	蛋种鸭				
	肉种鸭				
	蛋鸭				
	肉鸭				
	合计				
易感 野生 动物				
	合计				

表3 规模化猪场统计表

单位：填表日期：

场名	猪场数		不同规模场数					存栏数量	养殖代码	防疫合格证编号
	种猪	商品猪	100至499头	500至999头	1000至4999头	5000至9999头	10000头以上			
注：填报单位为乡镇或区域兽医机构以及县级畜牧兽医主管部门。										

表 4 规模化养牛场统计表

单位： 填表日期：

场名	养殖场数量		不同规模场数					存栏数量	养殖代码	防疫合格证编号
	肉牛	奶牛	20至49头	50至199头	200至499头	500至999头	1000头以上			
注： 填报单位为乡镇或区域兽医机构以及县级畜牧兽医主管部门。										

表 5 规模化养羊场统计表

单位： 填表日期：

场名	养殖场数量		不同规模场数					存栏数量	养殖代码	防疫合格证号
	绵羊	山羊	50至99只	100至199只	200至499只	500至999只	1000只以上			

注：填报单位为乡镇或区域兽医机构以及县级畜牧兽医主管部门。

表 6 动物散养户统计表

填表单位：填表时间：

序号	畜主姓名	详细地址	电话	动物种类及数量					年龄				
				猪	牛	羊	鸡	鸭	猪	牛	羊	鸡	鸭

注：填报单位为乡镇或区域兽医机构以及县级畜牧兽医主管部门。

表 7 动物流通情况统计表

单位：头（只） 填表日期：

县名	调入数量								调出数量							
	种畜禽				商品畜禽				种畜禽				商品畜禽			
	猪	牛	羊	禽	猪	牛	羊	禽	猪	牛	羊	禽	猪	牛	羊	禽

注：调入、调出数量指进出无疫区的数量，本无疫区区域内流通数量不计在内。

表 8 动物产品流通贸易情况统计表

单位：吨填表日期：

县名	调入数量					调出数量					调出中用于出口数量				
	禽肉	禽蛋	猪肉	牛羊肉	其他	禽肉	禽蛋	猪肉	牛羊肉	其他	禽肉	禽蛋	猪肉	牛羊肉	其他

注：调入、调出数量指进出无疫区的数量，本无疫区区域内流通数量不计。

第四部分 预防与监测

样品采集、保存及运输技术规范

畜禽免疫技术规范

规定动物疫病监测准则

口蹄疫诊断技术规范

猪瘟诊断技术规范

小反刍兽疫诊断技术规范

高致病性禽流感诊断技术规范

新城疫诊断技术规范

马流感诊断技术规范

亨德拉病诊断技术规范

西尼罗河热诊断技术规范

伊氏锥虫病（苏拉病）诊断技术规范

马梨形虫病诊断技术规范

日本脑炎诊断技术规范

马脑脊髓炎（东方和西方）诊断技术规范

马病毒性动脉炎诊断技术规范

尼帕病毒病诊断技术规范

水泡性口炎诊断技术规范

非洲马瘟诊断技术规范

马鼻疽诊断技术规范

马传染性贫血病诊断技术规范

马媾疫诊断技术规范

样品采集、保存及运输技术规范

1 范围

本规范规定了动物疫病诊断、监测样品的采集、保存和运输的技术要求。

本规范适用于动物疫病诊断、监测样品的采集、保存和运输。

2 样品采集的一般原则及采样前的准备

2.1 样品采集的一般原则

2.1.1 采样时应符合生物安全相关要求，做好个人防护，严防人畜共患病感染。凡发现怀疑炭疽等不宜解剖的患畜，严禁剖检。

2.1.2 采样时应遵守动物福利相关规定。

2.1.3 根据病种或检测目的的不同，选择采集相应的血样、活体组织、脏器、肠内容物、分泌物、排泄物或其它材料。

2.1.4 样品的数量应满足统计学的要求。

2.1.5 内脏病料的采取，如患畜已死亡，应尽快采集，最迟不宜超过 6h。

2.1.6 采样结束后应做好消毒和无害化处理工作。

2.2 采样前的准备

2.2.1 采样人员必须是兽医技术人员，熟悉采样器具的使用，掌握正确采样方法。

2.2.2 器具

2.2.2.1 采样器具包括：采样箱，解剖刀，剪刀，镊子，穿刺针、注射器及针头等。

2.2.2.2 采样容器应选择抗压防漏密闭容器，非密闭容器应易于密封，包括小瓶、平皿、离心管及易封口样品袋、塑料包装袋等。

2.2.2.3 采样刀剪等器具和样品容器须无菌。

2.2.2.4 其他辅助器材包括酒精灯，酒精棉，碘酒棉，试管架，铝盒，瓶塞，无菌棉拭子，胶布，封口膜，封条等。

2.2.2.5 记录和防护材料包括不干胶标签、签字笔、圆珠笔、记号笔、采样单、记录本等；眼罩、口罩、一次性手套、乳胶手套、防护服、防护帽、胶靴等。

2.2.3 试剂

配制方法见附录 A。

3 样品采集

3.1 血液

3.1.1 采血部位

大哺乳动物可选用颈静脉或尾静脉采血，也可采胫外静脉或乳房静脉血液。毛皮动物少量采血可穿刺耳尖或耳壳外侧静脉，多量采血可在隐静脉采集，也可用尖刀划破趾垫至一定深度或剪断尾尖部采血。啮齿类动物可从尾尖采血，也可由眼窝内的血管丛采血；兔可从耳背静脉、颈静脉或心脏采血。禽类通常选用翅或腿静脉采血，也可通过心脏采血。

3.1.2 采血方法

对动物采血部位的皮肤先剃毛（拔毛），75%酒精消毒，待干燥后采血，采血可用针管、针头、真空管或用三棱针穿刺，将血液抽入或滴到采集装置内试管内。

3.1.3 血样种类

3.1.3.1 全血样品

用抗凝管采集全血，采血时直接将血液滴入抗凝管中，并立即连续、缓慢摇动，充分混合。

3.1.3.2 血清样品

用于分离血清的血液不加抗凝剂。血液在室温下静置至血液凝固，收集析出的血清。必要时，经低速离心分离血清。需长时间保存的，置-20℃以下保存，避免反复冻融。

3.1.3.3 血浆样品

应采取抗凝血，通过静置或离心方法，将血细胞与血浆分离。

3.2 一般组织样品

根据病种选择相应的病原嗜性组织，用于病原学检测的样品应新鲜，尽可能减少污染，用于组织病理学检查的样品，立即放入 10 倍于组织块的 10%福尔马林溶液中固定。冷冻切

片样品，应将组织块放在 0~4℃ 容器中，尽快送实验室检验。

3.3 肠道组织、内容物或粪便

病变与正常组织交界处的肠道部分，通过灭菌生理盐水冲洗弃去其中的内容物，取肠道组织；取肠内容物时，烧烙肠壁表面，用吸管扎穿肠壁，从肠腔内吸取内容物放入盛有灭菌的 30%甘油磷酸缓冲盐水保存液中送检，或将带有粪便的肠管两端结扎，从两端剪断送检。根据需要，粪便样品也可直接从饲养场所采集。

3.4 胃液及瘤胃内容物

3.4.1 胃液采集

胃液可用多孔胃管抽取，将胃管送入胃内，其外露端接在吸引器的负压瓶上，加压后，胃液即可自动流出。

3.4.2 瘤胃内容物采集

反刍动物反刍时，当食团从食道逆入口腔，立即打开口腔，用一只手拉住舌头，另一只手伸入口腔即可取出少量瘤胃内容物。

3.5 拭子样品

3.5.1 呼吸道拭子

应用灭菌的棉拭子采集鼻腔、咽喉或气管内的分泌物，蘸取分泌物后立即将拭子浸入保存液中，密封，低温保存。常用的保存液有 pH7.4 的含抗生素的 PBS 保存液、pH7.2~7.4 的灭菌肉汤或 30%甘油盐水缓冲液，如准备将待检标本接种组织培养，则保存于含 0.5%乳蛋白水解液中。一般每支拭子需保存液 1mL。

3.5.2 肛门或泄殖腔拭子

将灭菌的棉拭子插入肛门或泄殖腔内采集其内容物和分泌物后，立即将拭子浸入保存液中，密封低温保存。一般每支拭子需保存液 1mL。

3.5.3 生殖道拭子

用灭菌的棉拭子采集生殖道分泌物或采集阴道或包皮冲洗液。

3.5.4 眼睛拭子

眼结膜表面用拭子轻轻擦拭后放在灭菌的 30%甘油盐水缓冲保存液。

3.6 皮肤

样品直接采自病变部位，如病变皮肤的碎屑、未破裂水泡的水泡液、水泡皮等。

3.7 脑、脊髓

3.7.1 脑、脊髓的采集

如采集脑、脊髓做病毒检查，可将脑、脊髓浸入 30%甘油盐水缓冲液中或将整个头部割下，包入浸过消毒液的纱布中，置于不漏水的容器内送往实验室。

3.7.2 脑、脊髓液的采集

3.7.2.1 颈椎穿刺法：穿刺点为环枢孔。将动物实施站立或横卧保定，使其头部向前下方屈曲，术部经剪毛消毒，穿刺针与皮肤面呈垂直缓慢刺入。将针体刺入蛛网膜下腔，立即拔出针芯，脑脊髓液自动流出或点滴状流出，盛入消毒容器内。大型动物颈部穿刺一次采集量 35~70mL。

3.7.2.2 腰椎穿刺法：穿刺部位为腰荐孔。实施站立保定，术部剪毛消毒后，用专用的穿刺针刺入，当刺入蛛网膜下腔时，即有脑脊髓液滴出或用消毒注射器抽取，盛入消毒容器内。大型动物腰椎穿刺一次采集量 15~30mL。

3.8 胆汁、脓、粘液或关节液

采集胆汁、脓、粘液或关节液等样品时，用烫烙法消毒采样部位，用灭菌吸管、毛细吸管或注射器经烫烙部位插入，吸取内部液体材料，然后将材料注入灭菌试管中，塞好棉塞送检。也可用接种环经消毒部位插入，提取病料直接接种在培养基上。

3.9 乳汁

用消毒药水洗净乳房，并把乳房附近的毛刷湿，最初所挤的 3~4 把乳汁弃去，然后采集 10mL 左右乳汁于灭菌试管中。进行血清学检验的乳汁不应冻结、加热或强烈震动。

3.10 精液

精液样品用人工方法采集，所采样品应包括“富精”部分，并避免加入防腐剂。

3.11 尿液

动物排尿时，用洁净的容器直接接取。也可用塑料袋固定在雌畜外阴部或雄畜的阴茎下

接取尿液。尿液采取宜早晨进行。

3.12 尸体或流产胎儿

将尸体或流产胎儿，用塑料薄膜、油布或数层不透水的油纸包紧，装入容器内，立即送往实验室。

3.13 环境样品

使用适合容器采集污水、排泄物、空气等环境样品进行检测。

4 送检样品的记录和包装

4.1 采样单及标签等的填写

采样单用签字笔逐项填写（一式三份），样品标签和封条应用圆珠笔填写，保温容器外封条应用钢笔或签字笔填写，小塑料离心管上可用记号笔作标记。应将采样单和病史资料装在塑料包装袋中，随样品一起送到实验室。

采样单应包括畜主姓名和畜禽场地址；饲养动物品种、数量及饲养方式；动物健康状况；免疫和用药情况；送检者的姓名、地址、邮编和电话；送检日期；采样人和被采样单位签章等信息。发生疑似规定动物疫病时，按照《紧急流行病学调查技术规范》收集采样信息。

4.2 包装要求

4.2.1 包装应符合生物安全要求。

4.2.2 样品应分别标记包装，标注样品名、样品编号、采样日期等信息。

4.2.3 样品用小瓶（管）包装时，应选用抗压外包装容器盛放，内外包装之间加填塞物避免样品晃动。

4.2.4 外包装容器外应贴封条，封条上应有采样人签章，并注明贴封日期，标注放置方向。

5 保存和运输

5.1 样品应置于保温容器中运输，保温容器应密封，防止渗漏。

5.2 样品应在特定的温度下运输，拭子样品和组织样品可以暂时冷藏处理，然后立即运送实验室。

5.3 样品应按有关规定冷藏或冷冻保存。长期保存的样品应超低温冷冻（以-70℃或以下为宜）保存，尽量避免反复冻融。

附录 A
(规范性附录)
待检样品保存液的配制

A.1 30%甘油盐水缓冲液

甘油 30mL

氯化钠 (NaCl) 4.2g

磷酸二氢钾 (KH₂PO₄) 1.0g

磷酸氢二钾 (K₂HPO₄) 3.1g

0.02%酚红 1.5mL

蒸馏水 (或无离子水) 加至 100mL

加热溶化, 校正 pH 值为 7.6, 100kPa 15min 灭菌, 冷却后 4℃冰箱中保存备用。

A.2 肉汤

牛肉膏 3.5g

蛋白胨 10g

氯化钠 5g

充分混合后, 加热溶解, 校正 pH 值为 7.2~7.4, 用流通蒸气加热 30min, 滤纸过滤, 分装于试管或烧瓶中, 以 100kPa 20min 灭菌, 冷却后 4℃冰箱中保存备用。

A.3 pH7.4 的等渗磷酸盐缓冲液 (PBS)

氯化钠 (NaCl) 8.0g

磷酸二氢钾 (KH₂PO₄) 0.2g

磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄·12H₂O) 2.9g

氯化钾 (KCl) 0.2g

将上列试剂按次序加入定量容器中, 加适量蒸馏水溶解后, 再定容至 1000mL, 调 pH 值至 7.4, 高压消毒灭菌 112Kpa 20min, 冷却后, 保存于 4℃冰箱中备用。

A.4 棉拭子用抗生素 PBS (病毒保存液) 的配制

取上述 PBS 液, 按要求加入下列抗生素: 喉气管拭子用 PBS 液中加入青霉素 (2000IU/mL)、链霉素 (2mg/mL)、丁胺卡那霉素 (1 000IU/mL)、制霉菌素 (1 000IU/mL)。

粪便和泄殖腔拭子所用 PBS 中抗生素浓度应提高 5 倍。加入抗生素后应调 pH 值至 7.4。采样前分装小塑料离心管, 每管中加 PBS 1.0~1.3mL, 采粪便时在西林瓶加 PBS 1.0~1.5mL, 采样前冷冻保存。

畜禽免疫技术规范

1 范围

本规范规定了规定动物疫病免疫的基本要求及疫苗的选择、运输、贮存、使用、免疫程序和免疫效果评价的技术要求。

本规范适用于无疫区内畜禽的免疫接种。

2 术语与定义

2.1 批次

具有相同代码、组成均一的全部疫苗。

2.2 剂量

标签上标定的特定年龄动物，经特定免疫途径，一次接种疫苗的使用剂量。

2.3 效力

使用疫苗所产生的特异的免疫保护能力。

3 疫苗选用和贮运

3.1 疫苗选用

疫苗选用应符合国家相关规定，应对规定动物疫病流行毒株具有免疫效力。

3.2 疫苗运输和贮存

3.2.1 冻干疫苗在运输过程中，必须放在冷藏容器内，严禁阳光照射和接触高温，按疫苗保存要求进行贮存。油乳剂灭活疫苗在 2~8℃ 下运输和保存，切勿冻结。

3.2.2 应有完善的疫苗运输和保存管理制度。

3.2.3 疫苗的入库和发放必须做好记录。

4 免疫接种要求

4.1 畜禽要求

待接种的畜禽表现健康；有病、体弱的应在康复后再按规定接种；怀孕畜、仔畜的免疫应严格按疫苗使用说明书要求进行。

4.2 疫苗检查与准备

4.2.1 疫苗使用前要仔细检查外包装是否完好，标签是否完整，包括疫苗名称、生产批号、批准文号、保存期或失效日期、生产厂家等。

4.2.2 出现瓶盖松动、疫苗瓶裂损、破乳、超过保存期、色泽与说明不符、瓶内有异物、疫苗发霉等问题时，不得使用。

4.2.3 接种前将疫苗恢复至室温，充分混合均匀，但要防止气泡影响免疫剂量的准确性。

4.2.4 疫苗稀释、免疫接种方法和剂量按疫苗使用说明书进行。

4.3 疫苗接种

4.3.1 首次使用疫苗的地区，应选择一定数量畜禽进行小范围试用，观察 7~10d，临床无不良反应后，方可扩大接种范围。

4.3.2 免疫大动物时，疫苗注射人员应携带肾上腺素，用于疫苗过敏反应时急救。

4.3.3 发生疫情时，应按照从安全区到受威胁区、最后到疫区的顺序进行紧急免疫接种。

4.3.4 注射部位用碘酊或 75% 酒精棉擦拭消毒，再用挤干的酒精棉擦干消毒部位。

4.3.5 吸出的疫苗液不可再回注于瓶内，针筒排气溢出的疫苗液应吸积于酒精棉球上，并将其收集于专用瓶内；用过的酒精棉球、碘酊棉球应收集到指定容器内，与疫苗瓶一同进行无害化处理。

4.3.6 一支注射器只能用于一种疫苗的接种，使用过的疫苗瓶或未用完的疫苗应无害化处理

4.3.7 疫苗启封后，应于 24h 内用完。疫苗使用过程中应低温保存并避免日光直射。

4.3.8 饮水免疫前要控制断水时间，忌用金属容器，所用的水不得含有游离氯或其他消毒剂，水量适中，保证禽群在 2h 内饮完。

4.4 免疫接种档案

做好免疫档案，记录内容应至少包括畜主，家禽的品种、数量、日龄，疫苗生产厂家、批次，接种方法、剂量和接种时间、接种人等。

免疫档案保存 12 个月以上。

5 免疫程序制定及免疫效果监测

- 5.1 应根据免疫疫病种类科学制定并实施疫苗免疫程序。
- 5.2 免疫接种后，应进行免疫抗体水平监测，掌握免疫动态，并及时调整免疫程序，必要时应加强免疫。
- 5.3 区域内动物疫病预防控制机构应根据疫病监测结果及时指导免疫工作。

规定动物疫病监测准则

1 范围

本标准规定了无疫区规定动物疫病监测的一般要求、方式、抽样方法、证明无疫及恢复无疫的要求等内容。

本标准适用于无疫区建设、评估和恢复的监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

《无疫区标准 通则》

《样品采集、保存及运输技术规范》

《陆生动物卫生法典》世界动物卫生组织

《陆生动物诊断试验和疫苗手册》世界动物卫生组织

3 术语和定义

除《无疫区标准 通则》规定的缩略语和定义适用于本标准外，下列缩略语和定义适用于本标准。

3.1 监测

通过系统持续地收集、整理和分析动物卫生相关数据和信息，了解规定动物疫病状况、发展趋势，并为相关部门采取动物卫生措施提供依据。

3.2 被动监测

兽医机构被动接收动物卫生相关数据和信息的监测活动。

3.3 主动监测

兽医机构主动收集动物卫生相关数据和信息的监测活动。

3.4 置信水平

所实施的监测能够从某一假定存在感染的群体中检出感染的概率。

3.5 预定流行率

预计某个特定时间、某特定区域规定动物疫病病例数或发病数与动物群体的平均值之比。预定流行率可分为群间预定流行率和群内预定流行率。

3.6 流行病学单元

具有明确的流行病学关联，且暴露某一病原的可能性大体相同的动物群。通常情况下是指处于相同环境下或处于共同管理措施下的一个畜禽群，如同一个圈舍里的动物、同一个村庄的动物群、或使用同一饲养设施的动物群等。

3.7 一步法抽样

区域内具有共同的动物疫病状况，区域面积不大且样本清单清楚的规定动物疫病抽样调查时采用的抽样技术，不需要抽取流行病学单元，直接抽取易感动物。

3.8 两步法抽样

对区域面积大且样本清单复杂或不清楚的规定动物疫病抽样调查时采用的抽样技术，第一步抽取流行病学单元，第二步从流行病学单元内抽取易感动物。

3.9 岗哨动物

动物疫病监测过程中，饲养于某一特定地点、用来指示该地区是否存在所监测疫病的临床健康、无规定动物疫病病原和抗体的易感动物。

4 一般要求

4.1 区域所在的省级兽医主管部门负责规定动物疫病监测工作和制定监测方案，监测方案应明确监测范围、监测方式、抽样方法以及对无疫状况的监测要求等。

4.2 区域所在县级以上动物疫病预防控制机构实施监测工作，从事动物饲养、屠宰、经营、隔离、运输以及动物产品生产、经营、加工、贮藏等活动的单位和个人应配合开展监测工作。

4.3 区域所在兽医主管部门应掌握区域内易感动物（包括易感野生动物）的分布情况及易

感动物的养殖方式、种类和数量等。

4.4 监测范围应包括无规定动物疫病疫区和保护区内的种畜禽场、商品畜禽场、自然村的散养户、活畜禽交易市场、野生易感动物密集活动区和隔离、屠宰加工、运输等环节的易感动物（包括野生动物）及其相关传播媒介。强化无疫区边界及高风险区的监测。

4.5 承担规定动物疫病监测的实验室应建立保证检测工作规范、准确、公正运行的质量保证体系。实验室必须拥有为保证其质量管理体系的运行、检测所需的专业技术人员和管理人员，并应定期对抽样人员和实验室工作人员进行培训。检测实验室必须符合相应的生物安全要求。

4.6 检测应采用国家标准和行业标准规定的检测方法、农业部指定的检测方法或 OIE《陆生动物卫生法典》和《陆生动物诊断试验和疫苗手册》的相关检测方法；没有检测方法时，可采用其他国际标准或诊断试剂提供的方法进行检测，但需对检测方法进行验证。

4.7 样品采集、保存及运输应遵循《样品采集、保存及运输技术规范》。

5 监测方式

5.1 被动监测

5.1.1 从事动物饲养、隔离、屠宰加工、运输、经营等活动的有关单位和个人，发现临床疑似病例或怀疑发生疫情时应立即报告当地兽医机构。

5.1.2 从事动物疫病科研、诊疗、检验检疫、检测的相关机构或实验室发现阳性或可疑结果时应立即报告当地兽医机构。

5.1.3 兽医机构在接到疑似疫情报告或疫情举报后，应立即开展现场核查、流行病学调查、抽样和实验室检测等工作。

5.2 主动监测

5.2.1 流行病学调查

区域所在县级以上级兽医主管部门每年至少组织一次流行病学调查，系统获取流行病学信息和监测数据，分析动物疫病状况。

5.2.2 疫情监视

当地兽医机构应对动物饲养、屠宰加工、运输、经营、隔离检疫等环节进行定期或不定期的调查、巡查或普查等。

5.2.3 实验室监测

5.2.3.1 监测频率和监测时间

综合考虑动物疫病流行病学特点、易感动物生产周期和国家对监测频率的相关规定，确定监测频率和监测时间。

虫媒性动物疫病的监测时间应主要集中在虫媒活动高峰期和繁殖高峰期。

5.2.3.2 抽样

5.2.3.2.1 通过调查动物疫病流行病学特点、历史状况和日常监测情况等信息，确定流行病学单元和预定流行率，计算抽样数量。

5.2.3.2.2 抽样方法的选择和抽样数量的确定可参照附录 A 中的推荐方法。

(1) 当区域面积小，样本清单清楚时，证明无疫时可采取简单随机抽样计算或按照附录 A 中的表一推荐的方法抽样技术进行样品采集。

(2) 当区域面积大，样本清单不清楚时，证明无疫时可按照附录 A 采用两步法抽样技术进行样品采集。第一步抽取流行病学单元，第二步从流行病学单元内抽取易感动物。样品总量等于抽取的流行病学单元数量乘以抽取的易感动物数量。

5.2.3.2.3 抽样原则

(1) 抽样点包括区域内的全部县（市区），抽样时应覆盖到每个县（市区）中饲养、屠宰加工、运输、经营、隔离检疫等所有环节，根据各环节的风险权重大小确定抽样比例和抽样数量。

(2) 抽取的样品应涵盖区域内的所有易感动物，根据不同易感动物的数量确定抽样比例和抽样数量。

(3) 对于虫媒性动物疫病的监测，应根据传播媒介生活和繁殖特性设置监测点，在虫媒活动高峰期和繁殖高峰期采集虫媒进行监测。

(4) 抽样工作必须在监测方案下达后的规定时间内完成。

(5) 群间预定流行率的确定应考虑动物疫病的流行病学特征、区域内每个流行病学单

元之间的距离、历史状况和日常监测情况等因素；群内预定流行率的确定应重点考虑动物疫病流行病学特征等因素。

5.2.3.3 检测

按照无规定动物疫病区相关动物疫病诊断技术规范开展血清学和病原学检测。

6 监测结果处理

6.1 监测结果由动物疫病预防控制机构进行分析、汇总和报告，并作为采取防控净化措施和评估无疫状况的依据。

6.2 动物疫病预防控制机构要对监测结果及数据实行计算机管理，统一记录，出具报告，并建立规范、齐全的档案，设专人管理。监测结果应由动物疫病预防控制机构存档或备案。

7 证明无疫状况的监测要求

7.1 具有有效的监测系统，按照 4、5、6 开展监测；

7.2 监测结果证明在规定时间内无疫情和无感染/无循环存在。

7.3 必要时，对岗哨动物进行监测。

8 恢复无疫状况的监测要求

通过开展持续性的监测，证明在规定时间内没有监测出临床病例和无感染/无循环，符合规定动物疫病无疫区标准要求，可按相关程序恢复规定动物疫病的无疫状态。

附录 A
(资料性附录)
抽样数量的计算方法

1 公式法计算抽样数量

1.1 清楚掌握区域内流行病学单元或易感动物的数量，可采用以下两个公式中的任意一个计算区域内证明无疫的抽样数量：

1.1.1 公式： $n=[1-(1-CL)^{1/d}][(N-d/2)+1/2]$

其中，CL：置信水平，一般情况下，设定置信水平为 95%

d：感染规定动物疫病的流行病学单元或易感动物的数量（预定流行率*总体数量）

N：总体数量（流行病学单元总量或易感动物总量）

1.1.2 公式： $n=\frac{\ln(\alpha)}{\ln(1-p \cdot Se)}$

其中， α ：显著性水平，一般情况下，设定为 0.05，置信水平为 $1-\alpha$

p：预定流行率

Se：检测方法的敏感度

1.2 区域内流行病学单元或易感动物的数量不清或数量过大难以计算时，可采用以下公式计算区域内证明无疫的抽样数量：

公式： $n=\frac{\ln(\alpha)}{\ln(1-p \cdot Se)}$

其中， α ：显著性水平，一般情况下，设定为 0.05，置信水平为 $1-\alpha$

p：预定流行率

Se：检测方法的敏感度

2 表格法计算抽样数量

在 95%置信水平，假定的预定流行率下还可参照 Cannon 和 Roe 二氏，1982（见表 1）计算区域内证明无疫的抽样数量。

3 抽样软件法计算抽样数量

使用 Survey toolbox 和 Win Episcople 等软件计算区域内证明无疫的抽样数量。

表1 检出动物疫病所需样本数量 (Cannon 和 Roe 二氏, 1982)

群体大小	预定流行率 (群间预定流行率或群内预定流行率)											
	50%	40%	30%	25%	20%	15%	10%	5%	2%	1%	0.5%	0.1%
10	4	5	6	7	8	10	10	10	10	10	10	10
20	4	6	7	9	10	12	16	19	20	20	20	20
30	4	6	8	9	11	14	19	26	30	30	30	30
40	5	6	8	10	12	15	21	31	40	40	40	40
50	5	6	8	10	12	16	22	35	48	50	50	50
60	5	6	8	10	12	16	23	38	52	60	60	60
70	5	6	8	10	13	17	24	40	62	70	70	70
80	5	6	8	10	13	17	24	42	68	79	80	80
90	5	6	8	10	13	17	25	43	73	87	90	90
100	5	6	9	10	13	17	25	45	78	96	100	100
120	5	6	9	10	13	18	26	47	86	111	120	120
140	5	6	9	11	13	18	26	48	92	124	139	140
160	5	6	9	11	13	18	27	49	97	136	157	160
180	5	6	9	11	13	18	27	50	101	146	174	180
200	5	6	9	11	13	18	27	51	105	155	190	200
250	5	6	9	11	14	18	27	53	112	175	228	250
300	5	6	9	11	14	18	28	54	117	189	260	300
350	5	6	9	11	14	18	28	54	121	201	287	350
400	5	6	9	11	14	19	28	55	124	211	311	400
450	5	6	9	11	14	19	28	55	127	218	331	450
500	5	6	9	11	14	19	28	56	129	225	349	500
600	5	6	9	11	14	19	28	56	132	235	379	597
700	5	6	9	11	14	19	28	57	134	243	402	691
800	5	6	9	11	14	19	28	57	136	249	421	782
900	5	6	9	11	14	19	28	57	137	254	437	868
1000	5	6	9	11	14	19	29	57	138	258	450	950
1200	5	6	9	11	14	19	29	57	140	264	471	1102
1400	5	6	9	11	14	19	29	58	141	269	487	1236
1600	5	6	9	11	14	19	29	58	142	272	499	1354
1800	5	6	9	11	14	19	29	58	143	275	509	1459
2000	5	6	9	11	14	19	29	58	143	277	517	1553
3000	5	6	9	11	14	19	29	58	145	284	542	1895
4000	5	6	9	11	14	19	29	58	146	288	556	2108
5000	5	6	9	11	14	19	29	59	147	290	564	2253
6000	5	6	9	11	14	19	29	59	147	291	569	2358
7000	5	6	9	11	14	19	29	59	147	292	573	2437
8000	5	6	9	11	14	19	29	59	147	293	576	2498
9000	5	6	9	11	14	19	29	59	148	294	579	2548
10000	5	6	9	11	14	19	29	59	148	294	571	2588
∞	5	6	9	11	14	19	29	59	149	299	598	2995

口蹄疫诊断技术规范

1 范围

本规范规定了口蹄疫（FMD）采样、临床诊断和实验室诊断的方法和技术要求。

本规范适用于口蹄疫的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

2.1 样品的采集和保存

2.1.1 组织样品

2.1.1.1 样品的选择

用于病毒分离、鉴定的样品以发病动物未破裂或刚破裂的舌面或蹄部、鼻镜、乳头等部位的水泡皮和水泡液为宜。对临床健康但怀疑带毒的动物可在扑杀后采集颌下淋巴结、扁桃体、脊髓、心肌肌肉等组织样品以及O-P液（牛、羊等反刍动物咽喉/食道分泌物）、会厌扁桃体拭子样品（猪）做为检测材料。

2.1.1.2 样品的采集和保存

样品采集部位可用清水清洗（切忌使用酒精、碘酒等消毒剂消毒、擦拭），剪取新鲜水泡皮3~5g放入灭菌小瓶中，加适量50%甘油磷酸盐缓冲液(pH7.4)，加盖密封，冷冻保存；未破裂水泡中的水泡液用灭菌注射器吸出后装入灭菌小瓶中(可加适量抗菌素)，加盖密封，冷冻保存。

2.1.1.3 在无法采集水泡皮和水泡液时，可采集颌下淋巴结、扁桃体、脊髓、心肌肌肉等组织样品，装入洁净的小瓶内，加盖密封，冷冻保存。

2.1.2 牛、羊等反刍动物咽喉/食道分泌物(O-P液)样品

2.1.2.1 样品采集

被检动物在采样前禁食（可饮水）12h，以免反刍胃内容物严重污染O-P液。采样探杯在使用前经0.2%柠檬酸或2%氢氧化钠浸泡5min，再用洁净水冲洗。每采完一头动物，探杯要进行消毒并充分清洗。采样时动物站立保定，将探杯随吞咽动作送入食道上部10~15cm处，轻轻来回移动2~3次，然后将探杯拉出。如采集的O-P液被反刍胃内容物严重污染，要用生理盐水或自来水冲洗口腔后重新采样。

2.1.2.2 样品的保存

将采集到的4~5mL O-P液倒入15mL灭菌容器中，容器中应事先加有4~5mL细胞培养液或磷酸盐缓冲液（0.04mol/L、pH7.4），密封后充分摇匀，冷冻保存。

2.1.3 血清

采集动物血液，每头不少于5mL。无菌分离血清装入灭菌小瓶中，加盖密封后冷藏或冷冻保存。

2.2 采样记录及标签

样品的包装瓶上均要贴上标签，标明编号，并填写采样单。

2.3 样品运送

运输时样品容器与采样记录一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标识。

3 诊断标准

3.1 诊断指标

3.1.1 临床指标

牛、羊、猪等易感动物在口、鼻、蹄、乳头等部位出现水泡、破溃形成烂斑。

3.1.2 病原学检测指标

采集的组织样品，用口蹄疫病毒定型ELISA检测口蹄疫病毒抗原，并用反转录-聚合酶链式反应（多重RT-PCR）或实时荧光定量RT-PCR方法或分型RT-PCR方法核酸检测。核酸检测阳性时，利用基因测序技术测定VP1基因进行毒株分析。核酸检测为阴性时，需将样品接种3~5日龄乳鼠或细胞盲传3代进行病毒增殖，当出现致乳鼠发病死亡或致细胞病变效应（CPE）时，用发病死亡乳鼠组织或细胞培养物再进行上述抗原和核酸检测。

3.1.3 血清学诊断指标

血清样品用非结构蛋白抗体ELISA检测感染抗体，采用口蹄疫病毒五种非结构蛋白抗

体斑点印迹 (Dot-blot) 检测方法或酶联免疫电转印迹试验 (EITB) 进行验证, 用液相阻断-酶联免疫吸附试验或中和试验检测结构蛋白抗体。

3.2 结果判定

3.2.1 疑似口蹄疫

符合临床指标。

3.2.2 确诊口蹄疫感染

3.2.2.1 病原或核酸检测呈阳性的。

3.2.2.2 未免疫畜群病毒抗体阳性的。

3.2.3 免疫动物确诊口蹄疫病毒循环

3.2.3.1 出现疑似口蹄疫, 非结构蛋白抗体 ELISA 检测感染抗体阳性, 经 Dot-blot 方法或 EITB 方法验证仍为阳性的。

3.2.3.2 从临床健康动物群中, 检测出非结构蛋白抗体阳性, 经 Dot-blot 方法或 EITB 方法验证仍为阳性, 在 14 天后再采样检测, 经 Dot-blot 方法或 EITB 方法验证仍为阳性的。

3.2.3.3 非结构蛋白抗体阳性时, 病原或核酸检测呈阳性的。

4 实验室诊断方法

4.1 病原诊断方法

口蹄疫病毒定型 ELISA, 见附录 A。

口蹄疫病毒多重 RT-PCR, 见附录 B。

口蹄疫实时荧光定量 RT-PCR, 见附录 C。

口蹄疫病毒分型 RT-PCR, 见附录 D。

4.2 血清诊断方法

口蹄疫病毒非结构蛋白抗体间接 ELISA, 见附录 E。

口蹄疫病毒五种非结构蛋白抗体斑点印迹 (Dot-blot), 见附录 F。

口蹄疫病毒液相阻断 ELISA, 见附录 G。

口蹄疫病毒中和试验, 见附录 H。

附录 A
(规范性附录)
口蹄疫病毒定型 ELISA

A.1 样品的选择

用于鉴定的样品以发病动物(牛、羊或猪)未破裂或刚破裂的舌面或蹄部、鼻镜、乳头等部位的水泡皮和水泡液为宜。对不能采到上皮组织的反刍动物,如感染前期或康复期的病例,或无临床症状的疑似病例,可采集血液或用食道探杯采集咽喉/食道分泌物(O-P 液)样品,送实验室作病毒分离。

A.2 样品处理

将采集的水泡皮等动物组织样品,剪碎研磨,加 0.04mol/L PBS (pH7.4) 制成 1:5 的悬液。置室温(20℃左右) 2h 以上,或 4℃冰箱过夜。3000r/min 离心 10min,取上清液作为检测材料。水泡液样品可直接用作检测材料。对于血液和咽喉/食道分泌物(O-P 液)样品,可在传代细胞系(BHK-21)或原代牛甲状腺细胞作病毒分离,出现细胞病变效应后,培养液 6000 r/min 离心 10min,上清即可作为检测材料。

A.3 包被酶标板

用包被缓冲液稀释抗 FMDV O、A、Asia-I 型及抗 SVDV 兔血清至工作浓度,参照表 1 分别包被 ELISA 板第 1 列到第 12 列(也可根据待检样品数量调整包被列数),每孔 50μL,用封板膜封板,置于 4℃过夜(或 38±0.5℃以 100-200 转/min 在旋转振荡器中孵育 2h)。

表 1: 定型 ELISA 兔抗血清包被布局示意图

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	O	A	Asia-I	SVDV	O	A	Asia-I	SVDV	O	A	Asia-I	SVDV
B	O	A	Asia-I	SVDV	O	A	Asia-I	SVDV	O	A	Asia-I	SVDV
C	O	A	Asia-I	SVDV	O	A	Asia-I	SVDV	O	A	Asia-I	SVDV
D	O	A	Asia-I	SVDV	O	A	Asia-I	SVDV	O	A	Asia-I	SVDV
E	O	A	Asia-I	SVDV	O	A	Asia-I	SVDV	O	A	Asia-I	SVDV
F	O	A	Asia-I	SVDV	O	A	Asia-I	SVDV	O	A	Asia-I	SVDV
G	O	A	Asia-I	SVDV	O	A	Asia-I	SVDV	O	A	Asia-I	SVDV
H	O	A	Asia-I	SVDV	O	A	Asia-I	SVDV	O	A	Asia-I	SVDV

A.4 洗涤

倾去孔中液体,往孔中加满 PBS 洗涤液,放置 30s 后倒去,重复洗涤 6 次后在纸巾上拍干。

A.5 加对照和样品

参照表 2, ELISA 板第 1 列的 A、B 两孔加 O 型抗原,第 2 列 A、B 两孔加 A 型抗原,第 3 列 A、B 两孔加 Asia-I 型抗原,第 4 列的 A、B 两孔加 SVDV 抗原,其余孔加被检样品,每份样品每个血清型加 2 孔,每孔 50μL。用封板膜封板,置于 38±0.5℃旋转振荡器中振荡 60min。

附表 2 定型 ELISA 阴性对照、阳性对照和被检样品的布局示意图

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PO	PA	PAsiaI	PSVDV	S3	S3	S3	S3	S7	S7	S7	S7
B	PO	PA	PAsiaI	PSVDV	S3	S3	S3	S3	S7	S7	S7	S7
C	S1	S1	S1	S1	S4	S4	S4	S4	S8	S8	S8	S8
D	S1	S1	S1	S1	S4	S4	S4	S4	S8	S8	S8	S8
E	S2	S2	S2	S2	S5	S5	S5	S5	S9	S9	S9	S9
F	S2	S2	S2	S2	S5	S5	S5	S5	S9	S9	S9	S9
G	N	N	N	N	S6	S6	S6	S6	S10	S10	S10	S10
H	N	N	N	N	S6	S6	S6	S6	S10	S10	S10	S10

注: 1. 阴性对照 (N) 每孔加 50 μ L 的稀释液 A;

2. 阳性对照 (P) 每孔加 50 μ L 阳性对照样品 (其中 PO: O 型抗原; PA: A 型抗原, PAsiaI: Asia-I 型抗原, PSVDV: SVDV 抗原)。

3. 检测样品 (S) 每孔加 50 μ L 检测样品。

A.6 洗涤

同 A.4。

A.7 加豚鼠抗血清

用稀释缓冲液 B 将 FMDV O、A、Asia-I 型及 SVDV 各豚鼠抗血清稀释至工作浓度, 然后逐个加入与包被兔抗血清同型的各孔, 即包被 O 型兔抗血清的孔则加 O 型豚鼠抗血清, 包被 A 型兔抗血清的孔则加 A 型豚鼠抗血清, 以此类推。每孔 50 μ L, 封板后置于 38 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 旋转振荡器中振荡 60min。

A.8 洗涤

同 A.4。

A.9 加酶标抗体

用稀释缓冲液 B 将酶标抗体稀释至工作浓度, 每孔 50 μ L, 封板后 38 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 振荡孵育 45min。

A.10 洗涤

同 A.4。

A.11 OPD 溶液

将分装冻存的 OPD 于 38 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 水浴锅中预热, 将 3% 的 H₂O₂ 加入 OPD 中混匀, 每孔加 50 μ L, 封板, 避光 38 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 振荡孵育 15min。

A.12 加终止液, 观察和判读结果

加 50 μ L 终止液, 混匀后在分光光度计 492nm 下判读结果。

A.13 判定

A.13.1 数据计算

(1) 各型阴性对照 (N) 平均 OD 值。

(2) 被检样品各血清型平均 OD 值。

(3) 相对 OD 值 = 被检样品各血清型平均 OD 值 - 同型阴性对照 (N) 平均 OD 值。

(4) 阳性相对 OD 值 = 阳性对照 (P) 平均 OD 值 - 同型阴性对照 (N) 平均 OD 值。

A.13.2 结果判定

如果某型阴性对照 (N) 平均 OD 值 > 0.20, 试验不成立。

如果阳性对照 OD 值 \geq 0.6, 阴性对照 \leq 0.20, 试验成立。

在试验成立的前提下:

如果样品各型的相对 OD 值 \leq 0.20, 则该样品为阴性。

如果样品某型的相对 OD 值 \geq 0.3, 则判定该样品此血清型阳性。

如果样品某型的相对 OD 值 > 0.2, 但 < 0.3, 则判为可疑。

附录 B
(规范性附录)
口蹄疫病毒多重 RT-PCR 检测方法

B.1 样品处理

在无菌环境中,将采集的动物机体组织(如舌、鼻、蹄水泡皮)剪碎研磨。其它机体组织(如淋巴结、扁桃体等)除去包膜和其它结缔组织,选取内部实质部分,剪碎研磨。加 0.01mol/L PBS (pH7.6~7.8) 或 MEM (pH7.6~7.8) 制成 1: 5 的悬液。-20℃~30℃冻融 2 次, 3000r/min 离心 10min, 取上清液提取总 RNA。

液体样品, 如水泡液和 OP 液直接用于提取总 RNA。

B.2 试剂

溶液 A: Trizol, 从组织或细胞中提 RNA 试剂。

溶液 B: 三氯甲烷, 分析纯。

溶液 C: 异丙醇, 分析纯。

溶液 D: 无 RNase dH₂O: 每 100mL 水中加入 DEPC (焦碳酸二乙酯) 原液 0.1mL, 于室温下作用数 h, 然后高压灭菌使 DEPC 失活。

溶液 E (One Step RNA PCR 混合液)。

溶液 F (AMV Reverse Transcriptase XL, 5u/μL): 反转录酶。

溶液 G (RNase Inhibitor, 40u/μL): RNA 酶抑制剂。

溶液 H (AMV-Optimized Taq, 5u/μL) Taq DNA 聚合酶。

溶液 I (阳性对照)

B.3 操作程序

B.3.1 总 RNA 萃取

B.3.1.1 传统酚/氯仿抽提法提取核酸

(1) 取 500μL 组织样品研磨上清液置 1.5 mL eppendorf 管中, 加等量 (500μL) 溶液 B, 快速振荡数秒, 8000r/min, 4℃, 离心 5min。细胞毒、水泡液、阳性样品不经此步处理。

(2) 取上清液 200μL 置 1.5 mL eppendorf 管中, 加入 1000μL 溶液 A, 反复混匀, 冰上放置 5min。取阳性对照样品 (100~200μL 均可), 同时提 RNA。

(3) 加 200μL 溶液 B, 小心盖上帽盖, 用力摇动 eppendorf 管 15s, 室温放置 5min。

(4) 12000r/min, 4℃, 离心 15min, 可见分为三层, 上层水相含 RNA。

(5) 转移水相至一新 eppendorf 管, 加入等量溶液 C (约 500μL), 混匀, 室温放置 15min。

(6) 12000r/min, 4℃, 离心 10min, 离心后在 eppendorf 管边和底部可见有胶样 RNA 沉淀。

(7) 洗 RNA: 弃上清, 加 1000μL 75%乙醇 (使用前用溶液 D 加无水乙醇配置而成, -20℃预冷) 漂洗沉淀, 漂洗二次, 10000r/min, 4℃, 离心 5min。

(8) 室温充分干燥 RNA 沉淀。加 10μL 溶液 D, 即可用于 PCR 扩增。可以 -20℃保存备用。

B.3.1.2 核酸提取等效方法

口蹄疫病毒核酸提取也可以采用等效的 RNA 提取试剂盒及其方法: 如采用 RNA 提取试剂盒, 自动化核酸抽提仪和配套核酸抽提试剂进行病毒核酸抽提。

B.3.2 一步法 RT-PCR

反应总体积 25μL。向 0.2 mL 扩增管中加入下列反应物:

(1) One Step RNA PCR 混合液: 18.5μL

(2) AMV Reverse Transcriptase XL (溶液 F): 0.5μL

(3) RNase Inhibitor (溶液 G): 0.5μL

(4) AMV-Optimized Taq (溶液 H): 0.5μL

(5) RNA: 5μL

空白对照: 以 RNase Free dH₂O 代替模板, 同样条件下扩增。

高速离心 10sec 后, 将反应管放入扩增仪中, 指令设定程序开始工作。

反应条件:

- (1) 50℃, 30 min。
- (2) 94℃, 2 min
- (3) 94℃, 50sec; 58℃, 50sec; 72℃, 60sec; 35 个循环。
- (4) 72℃, 8 min。

B.3.3 结果分析和判定

(1) 1.5%琼脂糖凝胶板的制备称取 1.5g 琼脂糖, 加入 100mL 1×TAE 缓冲液中。加热融化后加 5μL (10mg/mL) 溴乙锭, 混匀后倒入放置在水平台上的凝胶盘中, 胶板厚 5mm 左右。依据样品数选用适宜的梳子。待凝胶冷却凝固后拔出梳子 (胶中形成加样孔), 放入电泳槽中, 加 1×TAE 缓冲液淹没胶面。

(2) 加样取 6μL~8μL PCR 扩增产物和 2μL 加样缓冲液混匀后加入一个加样孔。每次电泳同时上样标准 DNA Marker 和空白对照。

(3) 电泳电压 80 V~100 V, 或电流 40mA~50mA。电泳 30 min~40 min。

结果观察和判定电泳结束后, 取出凝胶板置于紫外透射仪上打开紫外灯观察。强阳性样品电泳结果应为三条大小不一的条带, 分别为 634bp、483bp 和 278bp。如某一待检样品扩增产物的 DNA 带至少有一条与以上条带大小相符, 同时空白对照无扩增条带, 则该样品判定为阳性。

附录 C
(规范性附录)
口蹄疫病毒定型 RT-PCR 方法

C.1 主要试剂

C.1.1 总 RNA 提取试剂

- (1) 变性液: 6 mol/L 异硫氰酸胍或 Trizol Reagent
- (2) 2 mol/L 乙酸钠 (pH 4.0)
- (3) 酚氯仿抽提液: 苯酚-三氯甲烷-异戊醇 (25:24:1) 混合液
- (4) 异丙醇: 分析纯
- (5) 75%乙醇: 无水乙醇 (分析纯) 与 DEPC 水按 3:1 配制而成。
- (6) DEPC 水: 将 DEPC (焦碳酸二乙酯) 按 0.1%含量加入双蒸馏水 (ddH₂O) 配制而成。可用于浸泡试验所用的移液器吸头、离心管等可能带有 RNA 酶的试验耗材、器具。

C.1.2 RT-PCR 试剂

- (1) 10×One Step RNA PCR Buffer
- (2) 逆转录酶 (AMV): 5U/μL
- (3) RNase inhibitor: 40U/μL
- (4) AMV-Optimized Taq: 5U/μL
- (5) dNTP Mixture: 包括 dATP、dTTP、dCTP、dGTP, 各 10mM
- (6) MgCl₂: 25mM
- (7) 引物: PAGE 纯度, 在 PCR 反应体系中的终浓度各 50pM

C.1.3 电泳试剂

- (1) 电泳缓冲液: 50×TAE 贮存液, 临用时加蒸馏水配成 1×TAE 缓冲液。
- (2) 琼脂糖: 制胶时用 1×TAE 缓冲液配成 1.2%浓度, 加热融化后加 5 μL (10 mg/mL) 溴化乙锭, 混匀后倒入凝胶盘中, 胶板厚约 5mm。
- (3) 电泳加样缓冲液: 含溴酚蓝 0.25 g、甘油 30 mL、双蒸水 70 mL。
- (4) DNA Marker: 分子大小范围 100~1000 bp, 100bp 梯度。

C.2 样品准备

在生物安全柜中, 将采集到的病料组织 (如舌、鼻、蹄部水泡皮) 剪碎研磨; 然后加 0.04 mol/L PBS (pH7.4~7.6) 制成 1:5 的悬液; 置室温 3~5 h 或 4℃冰箱过夜, 再-20℃至-30℃冻融 2 次, 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液作为检测材料。

液体样品 (如水泡液、病毒细胞培养物) 可直接用于提取总 RNA, 而组织研磨浸毒液 (若混有脂肪) 在提取总 RNA 之前, 需用等量酚氯仿抽提。

阳性对照样品: 以已知病毒材料, 如 FMDV 感染乳鼠或细胞的培养物为阳性对照。与待检病料同时提取总 RNA, 再进行定型 RT-PCR, 其扩增产物可作为电泳对照样品。

C.3 操作程序

C.3.1 总 RNA 提取

可采取酚/氯仿抽提法提取核酸, 也可以采用商品化 RNA 提取试剂盒。

C.3.2 一步法 RT-PCR

扩增体系的配制: 采用 25 μL 反应体系

10 × One step RNA PCR buffer	2.5μL
MgCl ₂ (25 mM) 5μL	
dNTPs (10 mM)	2.5μL
RNase inhibitor (40 unit/μL) 0.5μL	
AMV (5 unit/μL) 0.5μL	
AMV-Optimized Taq (5 unit/μL) 0.5μL	
下游通用引物 (50 pmol/μL)	0.5μL
上游型特异性引物混合 (各 50 pmol/μL)	0.5μL
总 RNA 水溶液	12.5μL

扩增程序: (1) 50℃, 30min
(2) 94℃, 4min

(3) 94℃, 50sec; 58~60℃, 40sec; 72℃, 40sec; 30 次循环

(4) 72℃, 8 min

C.3.3 扩增产物电泳检测

琼脂糖凝胶板的制备：称取 1g 琼脂糖，加入 100mL，1 × TAE 缓冲液中。加热融化后加 5 μL (10 mg/mL) 溴化乙锭，混匀后倒入放置在水平台上的凝胶盘中，胶板厚 5mm 左右。依据样品数选用适宜的梳子。待凝胶冷却凝固后拔出梳子(胶中形成加样孔)，放入电泳槽中，加 1 X TAE 缓冲液淹没胶面。

加样：取 6~8 μL PCR 扩增产物和 2~3 μL 加样缓冲液混匀后加入一个加样孔。每次电泳至少加 1 孔阳性样品的扩增产物作为对照。同时加 DNA Marker 作分子量大小对照

电泳：在电压 80~100V 或电流 25~40 mA 条件下电泳 10min。

C.3.4 结果观察和判定

电泳结束后，取出凝胶板置于紫外透射仪上打开紫外灯观察。如阳性样品扩增产物的 DNA 条带与预期大小一致，说明本次试验操作正确无误。

根据 PCR 产物条带的大小，判断被检样品的血清型：O 型样品为 400bp，A 型样品为 730bp，C 型样品为 600bp，Asia1 型样品为 300bp。

附录 D
(规范性附录)
口蹄疫病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法

D.1 荧光定量 RT-PCR

D.1.1 样品处理

水泡皮、淋巴结、肌肉等组织样品，无菌条件下破碎组织，用 0.04mol/L PBS (pH7.4) 制成 1:5~1:10 的悬液。置室温 2h 以上或 4℃ 冰箱过夜浸毒。3000r/min 离心 10min，取上清液待检。

水泡液、反刍动物 O/P 液、全血等液体样品：可直接用于核酸提取。

D.1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂 (盒)：各组分按照规定保存。

DEPC 水

荧光定量 RT-PCR 试剂：各组分按照规定保存。

引物和探针：

Forward Primer/3DF: 5'-ACT GGG TTT TAC AAA CCT GTG A-3'

Reverse Primer/3DR: 5'-GCG AGT CCT GCC ACG GA-3'

Taqman Probe/3DP: 5'-FAM-TCC TTT GCA CGC CGT GGG AC-TAMRA-3'

阳性对照：灭活的 FMDV 细胞病毒液。

阴性对照：核酸提取洗脱用水。

D.1.3 实验方法

核酸提取：按常规方法提取被检材料 RNA，同时以阳性对照和阴性对照作被检材料提核酸作为质控。

扩增体系配制：按照下列组份和体积配置反应体系。

组份	每反应体系加入量
RT-PCR缓冲液	12.5μL
反转录酶	0.5μL
Taq酶	0.5μL
3DF (10pm)	0.5μL
3DR (10pm)	0.5μL
3DP (5pm)	1μL
DEPC水	7.5μL
总RNA	2μL
合计	25μL

扩增条件：

42℃ 15min

95℃ 10sec

55℃ 30sec

72℃ 30sec

40个循环

在72℃ 30sec步骤时收集荧光信号。

结果判定：

(1) 阳性对照扩增曲线呈标准的S形曲线，且Ct值≤30；

(2) 阴性对照扩增曲线应为基线下的水平线；

(3) 若样本曲线Ct值小于35为阳性，Ct值大于40为阴性，Ct值介于35和40之间为可疑，重新测定或换用其它方法复核检测。

附录 E
(规范性附录)

口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体的间接 ELISA 检测方法 (3ABC-ELISA)

E.1 主要试剂

- E.1.1 阴性对照血清, 无口蹄疫病毒非结构蛋白抗体的阴性标准牛、羊与猪血清。
- E.1.2 阳性对照血清, 口蹄疫病毒非结构蛋白 3ABC 抗体阳性的标准牛、羊与猪血清。
- E.1.3 25 倍浓缩 PBS 缓冲液。
- E.1.4 25 倍浓缩 PBST 洗涤液。
- E.1.5 100 倍工作浓度的兔抗牛、羊或猪 IgG-HRP 酶结合物。
- E.1.6 血清稀释液。
- E.1.7 ELISA 用 TMB 底物溶液。
- E.1.8 终止液。
- E.1.9 3ABC 蛋白包被酶标板

E.2 检测程序

E.2.1 血清准备

来自疫区或可疑畜群的血清需要在 56℃ 下灭活 30min。血清样品需放在恒温水浴箱内, 水面要高于血清液面, 但不要没过试管。

血清样本处理好后对血清样本进行编号登记, 在不立即使用时, 应置于-20℃ 冰箱内保存, 长期保存应置于-70℃ 冰箱保存。样品采集细节情况需记录清楚。

试验前将血清样本按顺序排列于有数字标记的试管架, 按顺序在样品检测记录表格上登记对应的样品号与检测板号。检测时, 用笔迹持久的记号笔在血清稀释板与酶标板上标记清楚检测板号, 在 96 孔血清稀释板上进行血清稀释。

低温冰箱冻存的血清样本应置于室温充分融化后使用, 使用前应将血清混匀。

E.2.2 试剂准备

用双蒸水或超纯水将 25 倍浓度的 PBST 贮存液配成工作浓度的 PBST 洗涤液。

使用前将 100 倍浓缩的酶标抗体按 1:100 比例稀释于血清稀释液中, 混匀, 工作浓度的酶标抗体不可贮存, 现配现用。可参照下表进行工作浓度酶标抗体的配制。

测试孔数	100×酶标抗体用量 (μL)	血清稀释液用量 (mL)
16	20	2.0
24	30	3.0
32	40	4.0
40	50	5.0
48	60	6.0
56	70	7.0
64	80	8.0
72	90	9.0
80	100	10.0
88	110	11.0
96	120	12.0

E.2.3 操作程序

(1) 在检测记录表格中登记清楚血清稀释板每孔对应的样品号; 首先于血清稀释板每孔加入血清稀释液 120 μL, 然后依次加入阳性对照血清、阴性对照血清和待检血清, 每孔 6 μL (1:21 倍稀释); 标准阴、阳性对照血清平行加两孔, 待测血清加 1 孔, 留两孔不加血清作为空白对照, 轻振混匀; 然后, 将稀释好的血清按对应的位置转移至包被 3ABC 抗原的 ELISA 板上, 每孔 100 μL, 用封口膜封口, 37℃ 结合 30 min。

(2) 取掉封口膜, 每孔加满洗涤液, 洗涤 5 次, 最后一次拍干。

(3) 用血清稀释液按 1:100 比例稀释酶标二抗, 每孔加入 100 μL, 用封口膜封口, 37℃ 结合 30 min。

(4) 取掉封口膜, 每孔加满洗涤液, 洗涤 5 次, 最后一次拍干。

(5) 每孔加入 100 μL TMB 底物, 封口膜封口, 37℃ 避光作用 10~15 min。显色过程中监测 OD630 值接近 0.7 时终止反应。

- (6) 每孔加入 100 μL 终止液 (终止后测定阳性对照孔 OD450 值最好应小于 2.1)。
- (7) 轻轻摇振混匀, 测定波长 450 nm 吸光值 (OD450 值)。
- (8) 试验成立条件: 阳性对照平均 OD450 值应 >0.6 ; 阴性对照平均 OD450 值应 <0.2 。
- (9) 结果计算: 样品效价 = $(\text{OD450 样品} - \text{OD450 阴性}) \div (\text{OD450 阳性} - \text{OD450 阴性})$ 。
- (10) 结果判定: 效价 < 0.2 , 为阴性; 效价 ≥ 0.2 为阳性。检测 3ABC 抗体阳性说明动物可能感染过 FMDV 病毒; 对阳性血清样本可采用检测五种 NSP 抗体的 Dot-blot 方法进行确认诊断。

附录 F
(规范性附录)

口蹄疫病毒五种非结构蛋白(NSP)抗体的斑点印迹 (Dot-blot) 检测方法

F.1 主要试剂

- F.1.1 阴性对照血清, 无口蹄疫病毒非结构蛋白抗体的阴性标准牛、羊与猪血清。
- F.1.2 阳性对照血清, 口蹄疫病毒非结构蛋白抗体阳性的标准牛、羊与猪血清。
- F.1.3 25 倍浓缩 PBS 缓冲液。
- F.1.4 25 倍浓缩 PBST 洗涤液。
- F.1.5 100 倍工作浓度的兔抗牛、羊或猪 IgG-HRP 酶结合物
- F.1.6 血清稀释液,
- F.1.7 膜显色专用 TMB 底物溶液,
- F.1.8 口蹄疫病毒 5 种 NSP 包被硝酸纤维素膜条

F.2 检测程序

F.2.1 血清准备

来自疫区或可疑畜群的血清需要在 56℃ 下灭活 30min。血清样品需放在恒温水浴箱内, 水面要高于血清液面, 但不要没过试管。

血清样本处理好后对血清样本进行编号登记, 在不立即使用时, 应置于-20℃ 冰箱内保存, 长期保存应置于-70℃ 冰箱保存。样品采集细节情况需记录清楚。

试验前将血清样本按顺序排列于有数字标记的试管架, 按顺序在样品检测记录表格上登记对应的样品号与检测号。检测时, 用油性记号笔在血清稀释板与印迹膜条上标记清楚检测号, 在 10 孔血清稀释板上进行血清稀释。

低温冰箱冻存的血清样本应置于室温充分融化后使用, 使用前应将血清混匀。

F.2.2 试剂准备

用双蒸水或超纯水将 25 倍浓度的 PBST 贮存液配成工作浓度的 PBST 洗涤液。

使用前将 100 倍浓缩的酶标抗体按 1:100 比例稀释于血清稀释液中, 混匀, 工作浓度的酶标抗体不可贮存, 现配现用。

F.2.3 操作程序

(1) 与待检血清作用: 用油性防水记号笔在检测线上方将印迹膜标记检测号, 用血清稀释液将待检血清及阴、阳性对照血清 1:50 稀释于 10 孔血清稀释板中, 将单个膜浸入对应的反应孔中, 37 °C 作用 60 min。然后用 1×PBST 洗涤液洗膜 3 次, 每次浸泡约 1 min。

(2) 与酶标抗体作用: 用血清稀释液配制工作浓度的酶标抗体溶液于平皿中, 放入膜条, 使膜条完全浸入液面, 37 °C 作用 60 min, 同前洗涤 3 次。

(3) 加底物显色: 更换新的平皿, 加入适量膜显色底物溶液, 将印迹膜浸入底物溶液中, 37 °C 避光显色 5~10 min, 待阳性对照血清出现明显条带后, 用去离子水或蒸馏水漂洗 2 次终止反应, 取出膜自然干燥, 观察并记录结果, 膜条还可避光保存。

(4) 试验成立的条件: 凡在包被抗原点出现明显规则蓝黑色条带者判为条带显色阳性 (+), 不出现明显可见斑点者判为条带显色阴性 (-)。阳性对照应出现 5 个条带, 阴性对照无条带; 若阳性对照出现 5 个以下条带或不出现条带者, 判为无效。

(5) 结果判定: 有 4 或 5 点显色的血清为非结构蛋白抗体阳性, 没有斑点显色或有 1~3 点显色者判为非结构蛋白抗体阴性。五种 NSP 抗体 Dot-blot 检测阳性, 说明该动物曾经感染过 FMDV, 对于反刍类动物还应筛查是否有带毒或有隐性感染的情况。

附录 G
(规范性附录)

口蹄疫抗体液相阻断 ELISA (LB-ELISA) 检测口蹄疫病毒抗体

G.1 主要试剂

- G.1.1 1×PBST 洗涤液
- G.1.2 碳酸盐/碳酸氢盐包被缓冲液
- G.1.3 底物溶液
- G.1.4 终止液

G.2 血清样品准备

采集动物血液不少于 2mL, 血液置室温或 4℃ 自然凝固后析出上清液, 移液管吸出血清, 4℃ 或 -20℃ 保存待用。

G.3 LB-ELISA 抗原与抗体

G.3.1 FMDV 灭活抗原

口蹄疫病毒于单层 BHK-21 细胞上繁殖, 经二乙烯亚胺灭活后离心除去细胞碎片的上清液作为试验抗原。在不加血清的情况下将抗原作 2 倍系列稀释, 加入等量稀释液 (PBST) 后, 将滴定曲线线性区的上端光密度值 (光密度值约 1.5) 所对应的稀释度作为确定的最终稀释度。

G.3.2 捕获抗体 (兔抗血清)

由提纯的型特异 FMDV 146S 完整病毒粒子免疫兔子制备, 用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液将兔抗血清按预先滴定的最佳使用浓度稀释。

G.3.3 检测抗体 (豚鼠抗血清)

用与制备兔抗血清同源的 FMD 抗原纯化的 146S 病毒粒子免疫豚鼠, 在豚鼠血清中加入等量的正常牛血清预先阻断。用含有 10% 正常牛血清和 5% 健康兔血清的 PBST 缓冲液稀释至预先滴定的最佳浓度。

G.3.4 HRP 标记兔抗豚鼠 IgG

兔抗豚鼠 IgG 酶结合物用正常兔血清阻断, 将其用 PBST 稀释至最适浓度。

G.3.5 阳性对照血清

用与兔抗血清制备抗原同源的 FMDV 灭活疫苗免疫正常牛制备的高免血清, 测定其抗体效价后作为试验中的阳性对照血清, 同待检血清一起作同样稀释。

G.3.6 阴性对照血清

阴性对照血清来自健康牛, 各型口蹄疫 LB-ELISA 抗体效价均小于 1:4。

G.4 试剂准备

包被缓冲液: 将碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液胶囊 1 粒小心打开, 将胶囊内粉末倒入 100 mL 无离子水中即可, pH 值 9.6, 4℃ 存放。

底物溶液: 取 1 片柠檬酸-磷酸盐片剂溶于 100 mL 无离子水中, 溶化后取 50 mL 溶液, 再加 1 片 OPD 片剂, 充分溶解后分装分装 (5 mL/瓶或 10 mL/瓶), 避光 -20℃ 保存。用前避光溶化, 临用时每 10 mL 上述溶液加 100 μL 的 1.5% H₂O₂ (W/V)。

G.5 试验程序

G.5.1 ELISA 板每孔用 50 μL pH 值 9.6 碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液稀释的兔抗血清包被, 封板膜封板, 置室温过夜。

G.5.2 用 PBST 连续洗板 5 次。

G.5.3 在“U”型 96 孔载体板内, 按 50 μL/孔量用 PBST 工作液将待检血清从 1:4 开始做 2 倍连续稀释, 每份待检血清都做 2 个重复, 然后向每孔内加入相应的 50 μL 同型病毒抗原, 封板混合后置 4℃ 过夜或 37℃ 孵育 1 h。加入病毒抗原后血清的实际稀释度变为从 1:8 开始的 2 倍连续稀释度。

G.5.4 用 PBST 洗 ELISA 板 5 次, 将各孔血清/抗原混合物从载体板转移至兔抗血清包被的 ELISA 板中, 每孔 50 μL, 封板, 37℃ 孵育 1 h。

G.5.5 用 PBST 洗 ELISA 板 5 次, 将与试验抗原同源的豚鼠抗血清用含有 10% 新生牛血清和 5% 健康兔血清 PBST 缓冲液稀释至预定的最佳工作浓度, 每孔 50 μL, 封板, 37℃ 孵育 1 h。

G.5.6 用 PBST 洗 ELISA 板 5 次，每孔加 50 μ L 用 PBST 稀释的兔抗豚鼠免疫球蛋白辣根过氧化物酶结合物，封板，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。

G.5.7 用 PBST 洗 ELISA 板 5 次，每孔加 50 μ L 含 0.05% H_2O_2 (30%W/V) 的邻苯二胺底物显色溶液。37 $^{\circ}$ C 温育 15 min 后每孔再加 50 μ L 1.25 mol/L H_2SO_4 终止反应，将 ELISA 板置于联有计算机的酶标仪上，在 492nm 波长条件下读取光吸收值 (OD₄₉₂)。

G.5.8 对照：8 孔连续 2 倍稀释的阳性对照血清、2 孔连续 2 倍稀释的阴性对照血清，以及不加血清稀释液的 4 孔抗原对照。

G.5.9 试验认可标准：每次试验，每块板必须设病毒抗原对照和阴阳性血清对照。病毒抗原对照至少两个孔的 OD_{492nm} 值为 1.0 以上，最好在 1.0~2.0 范围内；阳性对照抗体滴度应是 1:1024 \pm 1 滴度；阴性对照抗体滴度应小于 1:4。

G.5.10 结果判定：抗体滴度是以 50% 终点滴度表示，以病毒抗原对照 50% 平均值为临界值，被检血清稀释孔 OD_{492nm} 值大于临界值的孔为阴性孔，小于或等于临界值的孔为阳性孔，阳性孔的 OD_{492nm} 值等于临界值时所对应的稀释度为该份血清的抗体滴度。例如病毒抗原对照平均 OD_{492nm} 值为 1.2，则其 50% 为 0.6；若某一待检血清在 1:128 时 OD_{492nm} 值为 0.6，则该份待检血清的抗体滴度为 1:128；若临界值处于两个滴度之间，如处于 1:64 与 1:128 之间，则抗体滴度取中间值为 1:90 (karber 法)。抗体滴度大于或等于 1:128 判为阳性，小于 1:64 判为阴性。大于或等于 1:64 并小于 1:128 判为可疑，可疑样品经再次测定后，如果有一个滴度为 1:64 或更高可判为阳性。

附录 H
(规范性附录)
口蹄疫病毒中和试验方法

H.1 试剂

H.1.1 对照血清

口蹄疫中和抗体阳性血清和阴性血清。

H.1.2 待检血清

动物血清样品经 56℃ 水浴灭活 30 min。

H.1.3 病毒

FMDV 适应于 BHK-21 或 IB-RS-2 单层细胞。收获的病毒液，测定病毒滴度 (TCID₅₀/0.1mL) 后，分装于小管，-70℃ 保存备用。

H.1.4 细胞

新复苏的 BHK-21 或 IB-RS-2 传代细胞，传代培养细胞形态良好。

H.1.5 细胞维持液和营养液

细胞维持液：Eagle's MEM 与含 5% 水解乳蛋白的 Earle's 液等量混合配成，pH7.6~7.8，在中和试验中作稀释液用。

细胞营养液：细胞维持液加 10% 犊牛血清 (pH 7.4)，培养细胞用。

H.2 操作步骤

H.2.1 FMDV 滴度测定

将 FMDV 在 96 孔培养板上作 10 倍连续稀释，即 10⁻¹，10⁻²，10⁻³……10⁻¹¹，每孔 50 μL 病毒液，100 μL 细胞悬液 (细胞悬液的浓度以在 24 h 内长满单层为度)，每个稀释度 8 孔。每块板的最后一列设 8 孔细胞对照，每孔补加 50 μL 稀释液 (不加病毒)。置 37℃ 5% CO₂ 温箱培养。适时观察 CPE，72 h 后将板固定，并作常规染色 (先用 10% 福尔马林固定 30 min，然后再置于用 10% 福尔马林配制的 0.05% 亚甲基兰溶液中浸泡染色 30 min，然后将培养板用水冲洗)。未病变细胞呈蓝色，病变细胞脱落或不着色。依据每个稀释度下 8 孔 CPE 情况，按 Reed-Muench 法计算病毒滴度。

H.2.2 血清稀释

用细胞维持液将待检血清在培养板上从 1:4 开始作 2 倍连续稀释，每份血清至少平行稀释 2 排孔，每孔 50 μL。

H.2.3 中和反应

在上述每孔中加入 50 μL 滴度为 200 TCID₅₀/0.1mL 的病毒液，与等量血清混合，封闭培养板，37℃ 温箱孵育 1 h。

H.2.4 对照设立

每次试验每块培养板都必须设立下列对照：

阳性和阴性血清对照：阳性和阴性血清对照各设 2~4 孔，每孔 50 μL。

正常细胞对照：为避免培养板本身引起的试验误差，在每块培养板上均设立 2~4 孔不接种病毒和血清的正常细胞对照，该对照应在整个试验中保持良好的生长特征。每孔 50 μL。

病毒对照：中和试验用病毒滴度为 200 TCID₅₀/0.1mL 病毒液，每孔 50 μL。

H.2.5 加入细胞

血清与病毒中和 1 h 后，取出，每孔加入 50 μL 细胞悬液 (以 24 h 内长满单层为度，一般每 mL 100~150 万个细胞)，置 37℃ 5% CO₂ 温箱培养。对照孔体积不足 150 μL 时，用稀释液补全体积。培养 48 h 后，显微镜下作适当判断，72 h 后固定染色，染色方法同 7.3.1。

H.2.6 试验成立条件

当正常细胞对照在整个试验中一直保持良好的生长形态，染色呈蓝色；阳性对照孔 (病毒被中和) 无 CPE 出现染色呈蓝色；阴性对照孔 (病毒未被中和) 出现 CPE，染色不着色；病毒对照无细胞生长 (或可见少量病变细胞留存) 等 4 个对照都成立时，试验有效。否则，重新试验。

H.2.7 结果判定

被检血清孔出现 100% CPE 判阴性，50% 以上细胞出现保护者为阳性。

用 Reed-Muench 法计算出能保护 50% 细胞孔不产生细胞病变的血清稀释度，该稀释度

为该份血清的中和抗体效价

当被检血清（在血清/病毒混合物中）最终滴度为 1:45 或更高者为阳性；最终滴度滴度在 1:16~1:32 之间为可疑，需要重复试验，再次试验结果为 1:16 或更高时为阳性；滴度为 1:16 或更低为阴性。

猪瘟诊断技术规范

1 范围

本规范规定了猪瘟（CSF）临床、病理、实验室诊断方法和技术要求。

本规范适用于猪瘟的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

2.1 样品的采集和保存

2.1.1 组织样品

2.1.1.1 样品的选择

用于病毒分离、鉴定的样品，以发病或死亡动物扁桃体、肾脏、脾脏或淋巴结等组织为宜。对临床健康但怀疑带毒的动物可采集扁桃体样品作为检测材料。

2.1.1.2 样品的采集和保存

活体采样：利用扁桃体采样器（鼻捻子、开口器和采样枪）。采样器使用前均须用 5% 氢氧化钠溶液消毒后经清水冲洗。首先固定猪上唇，用开口器打开口腔，用采样枪采取扁桃体样品，用灭菌牙签挑至灭菌离心管并作标记，冷冻保存

尸体解剖时采取的病死猪脏器，如扁桃体、肾脏、脾脏、淋巴结、肝脏和肺脏等脏器，装入灭菌小瓶内，加盖密封，并作标记，冷冻保存。

2.1.2 血清样品

采集动物血液，每头不少于 5mL。无菌分离血清装入灭菌小瓶中，加盖密封并作标记后冷藏或冷冻保存。

2.2 采样记录及标签

样品的包装瓶上均要贴上标签，标明编号，并填写采样单。

2.3 样品运送

运输时样品容器与采样记录一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标志。

3 诊断标准

3.1 诊断指标

3.1.1 临床指标

临床上猪只体温在 41.0℃ 以上，精神萎靡、倦怠，厌食、呕吐、便秘腹泻交替，可视粘膜充血、出血或有结膜炎，在鼻盘、嘴唇、下颌、耳尖、四肢、腹下及腹股沟处出现紫红色斑点或斑块，公猪包皮积尿等症状。

带毒母猪大都表现繁殖障碍，产下仔猪有死胎、木乃伊、存活的仔猪常表现为衰弱、震颤、痉挛、发育不良以致死亡。

3.1.2 病理学指标

肾皮质色泽变淡，有出血点。淋巴结外观充血、切面周边出血，呈红白相间的“大理石”样。脾脏表面有点状出血或边缘楔状梗死区。心脏、喉头、膀胱有小出血点。全身出血性变化、多呈小片或点状。回盲瓣、回肠、结肠形成“钮扣状”溃疡。

3.1.3 病原学检测指标

采集的扁桃体、肾脏、脾脏、淋巴结、肝脏和肺脏等组织样品，用病毒分离鉴定、猪瘟荧光抗体染色法、兔体交互试验或猪瘟抗原双抗体夹心 ELISA 检测方法检测猪瘟抗原，并用反转录聚合酶链式反应（RT-PCR）或猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR 检测核酸，猪瘟病毒抗原或核酸检测有一项指标为阳性时，即判定为阳性

3.1.4 血清检测

血清样品用猪瘟酶联免疫吸附试验（ELISA）检测抗体。

3.2 结果判定

3.2.1 疑似猪瘟

符合临床典型症状指标或病理学指标。

3.2.2 确诊猪瘟

经实验室病原检测呈阳性的。

4 实验室诊断方法

- 4.1 病原诊断方法
 - 病毒分离鉴定（附录 A）
 - 猪瘟荧光抗体染色法（附录 B）
 - 兔体交互试验（附录 C）
 - 猪瘟抗原双抗体夹心 ELISA 检测方法（附录 D）
 - 反转录聚合酶链式反应（RT-PCR）（附录 E）
 - 猪瘟病毒实时荧光 RT-PCR（附录 F）
- 4.2 血清诊断方法
 - 猪瘟酶联免疫吸附试验（ELISA）（附录 G）

附录 A
(规范性附录)
猪瘟病毒分离鉴定

采用细胞培养法分离病毒是诊断猪瘟的一种灵敏方法。通常使用对猪瘟病毒敏感的细胞系如 PK-15 细胞等,加入 2%扁桃体、肾脏、脾脏或淋巴结等无菌过滤除菌待检组织悬液于培养液中。37℃培养 48~72h 后用荧光抗体染色法检测细胞培养物中的猪瘟病毒。

A.1 制备抗生素浓缩液(青霉素 10 000IU/mL、链霉素 10 000IU/mL、卡那霉素和制霉菌素各 5 000IU/mL),小瓶分装,-20℃保存。

A.2 取 1~2g 待检病料组织放入灭菌研钵中,剪刀剪碎,加入少量无菌生理盐水,将其研磨匀浆;再加入 Hanks 平衡盐溶液或细胞培养液,制成 20%(w/v)组织悬液;最后按 1/10 的比例加入抗生素浓缩液,混匀后室温作用 1h;以 1000g 离心 15min,取上清液备用。

A.3 用胰酶消化处于对数生长期的 PK-15 单层细胞,将所得细胞悬液以 1000g 离心 10min,再用一定量的 DMEM 生长液[含 5%胎牛血清(无 BVDV 抗原、抗体,并经 56℃灭活 30min)、0.3%谷氨酰胺、青霉素 100IU/mL、链霉素 100IU/mL]悬浮,使细胞浓度为 2×10^6 /mL。

A.4 将细胞悬液与上清液按 9:1 混合,接种 25cm² 细胞瓶,每瓶 1mL;接种含细胞玻片的莱顿氏管 6 支(Leighton's)(或其它适宜的细胞培养瓶),每管 0.2mL;3 支莱顿氏管接种细胞悬液作阴性对照;3 支莱顿氏管接种猪瘟病毒作阳性对照。37℃吸附 2h,倒掉细胞瓶和莱顿氏管中液体,于 25cm² 细胞瓶中加入 5mL EMEM 维持液[含 2%胎牛血清(无 BVDV 抗原、抗体,并经 56℃热灭活 30min)、0.3%谷氨酰胺、青霉素 100IU/mL、链霉素 100IU/mL],莱顿氏管中加入 1mL EMEM 维持液。置细胞培养箱中 37℃培养。

A.5 经培养 24h、48h、72h,分别取 2 管组织上清培养物及 1 管阴性对照培养物、1 管阳性对照培养物,取出培养好的细胞玻片,以磷酸缓冲盐水(PBS, pH7.2, 0.01mol/L)或生理盐水洗涤 2 次,每次 5min,用冷丙酮(分析纯)固定 10min,晾干,采用猪瘟病毒荧光抗体染色法进行检测。

A.6 根据细胞玻片猪瘟荧光抗体染色强度,判定病毒在细胞中的增殖情况,若荧光较弱或为阴性,应按 A.4 将组织上清细胞培养物进行增毒传代。

采自临床发病猪或疑似猪的抗凝血是一种适宜的猪瘟早期诊断样品。接种细胞时操作程序如下:取-20℃冻存的全血样品置 37℃水浴融化;向 24 孔板每孔加 300μL 血样以覆盖对数生长期的 PK-15 单层细胞;37℃吸附 2h。弃去接种液,用细胞培养液洗涤细胞二次,然后加入 EMEM 维持液,37℃培养 24~48h 后,采用猪瘟病毒荧光抗体染色法检测。

附录 B
（规范性附录）
猪瘟荧光抗体染色法

荧光抗体染色法可用于检测扁桃体等组织样品以及细胞培养中的病毒抗原。

B.1 方法

将组织样品制成冰冻切片，或待检的细胞培养片，将液体吸干后经冷丙酮固定 10min，晾干。滴加猪瘟荧光抗体覆盖于切片或细胞片表面，置湿盒中 37℃作用 30min。然后用 PBS 洗涤，自然干燥。用碳酸缓冲甘油（pH9.0~9.5，0.5mol/L）封片，置荧光显微镜下观察。必要时设立抑制试验染色片，以鉴定荧光的特异性。

B.2 判定

在荧光显微镜下，见切片或细胞培养物（细胞盖片）中有胞浆荧光，并由猪瘟阳性血清抑制试验证明为特异的荧光，判猪瘟病毒阳性；无荧光判为阴性。

B.3 荧光抑制试验

取两组猪瘟感染猪的扁桃体冰冻切片，分别滴加猪瘟高免血清和健康猪血清（猪瘟中和抗体阴性），在湿盒中 37℃作用 30min，用生理盐水或 PBS（pH7.2）漂洗 2 次，然后进行荧光抗体染色。经用猪瘟高免血清处理的扁桃体切片，隐窝上皮细胞不应出现荧光，或荧光显著减弱；而用阴性血清处理的切片，隐窝上皮细胞仍出现明亮的黄绿色荧光。

附录 C
(规范性附录)
兔体交互试验

本方法用于检测疑似猪瘟病料中的猪瘟病毒。

C.1 实验动物:1.5~2kg 家兔, 在试验前 1d 测基础体温。

C.2 取病猪的淋巴结和脾脏, 磨碎后用生理盐水作 1:10 稀释, 肌肉注射 3 只健康家兔, 5mL/只, 另设 3 只不注射病料的对照兔, 间隔 5d 对所有家兔静脉注射 1:20 接种的猪瘟兔化病毒(淋巴结、脾脏或细胞毒), 1mL/只, 24h 后, 每隔 6h 测体温一次, 连续测 96h, 对照组 2/3 出现定型热或轻型热, 试验成立。试验组的试验结果判定见表 1。

表 1 兔体交叉免疫试验结果判定

接种病料后体温反应	接种猪瘟兔化弱毒后体温反应	结果判定
-	-	含猪瘟病毒
-	+	不含猪瘟病毒
+	-	含猪瘟兔化病毒
+	+	含非猪瘟病毒热原性物质

注：“+”表示多于或等于三分之二的动物有反应。

附录 D
(规范性附录)
猪瘟抗原双抗体夹心 ELISA 试验

本方法通过形成的多克隆抗体-样品-单克隆抗体夹心，并采用辣根过氧化物酶标记物检测，对外周血白细胞、全血、细胞培养物以及组织样本中的猪瘟病毒抗原进行检测的一种双抗体夹心 ELISA 方法。

D.1 试剂盒组成

D.1.1 多克隆羊抗血清包被板条	8 孔×12 条 (96 孔)
D.1.2 CSFV 阳性对照, 含有防腐剂	1.5mL
D.1.3 CSFV 阴性对照, 含有防腐剂	1.5mL
D.1.4 100 倍浓缩辣根过氧化物酶标记物 (100×) 辣根过氧化物酶标记抗鼠 IgG, 含防腐剂 200uL	
D.1.5 10 倍浓缩样品稀释液 (10×) 55mL	
D.1.6 底物液, TMB/H ₂ O ₂ 溶液	12mL
D.1.7 终止液, 1M HCL (小心, 强酸)	12mL
D.1.8 倍浓缩洗涤液 (10×) 125mL	
D.1.9 CSFV 单克隆抗体, 含防腐剂 4mL	
D.1.10 酶标抗体稀释液	15 mL

D.2 样品制备

注意: 制备好的样品或组织可以在 2~7℃ 保存 7 天, 或-20℃ 冷冻保存 6 个月以上。但这些样品在应用前应该再次以 1500×g 离心 10min 或 10000×g 离心 2~5min。

D.2.1 外周血白细胞

D.2.1.1 取 10mL 肝素或 EDTA 抗凝血样品, 1500×g 离心 15—20min。

D.2.1.2 再用移液器小心吸出血沉棕黄层, 加入 500uL 样品稀释液 (1×), 在旋涡振荡器上混匀, 室温下放置 1h, 期间不时旋涡混合。然后直接进行步骤 6 操作。

D.2.1.3 假如样品的棕黄层压积细胞体积非常少, 那么就用整个细胞团 (包括红细胞)。将细胞加进 10mL 的离心管, 并加入 5mL 预冷 (2~7℃, 下同) 的 0.17M NH₄Cl。混匀, 静置 10min。

D.2.1.4 用冷 (2~7℃) 超纯水或双蒸水加满离心管, 轻轻上下颠倒混匀, 1500×g 离心 5min。

D.2.1.5 弃去上清, 向细胞团中加入 500uL 样品稀释液 (1×), 用洁净的吸头悬起细胞, 在旋涡振荡器上混匀, 室温放置 1h。期间不时旋涡混合。

D.2.1.6 1500×g 离心 5min, 取上清液按操作步骤进行检测。

注意: 处理好的样品可以在 2~7℃ 保存 7 天, 或-20℃ 冷冻保存 6 个月以上。但这些样品在使用前必须再次离心。

D.2.2 外周血白细胞 (简化方法)

D.2.2.1 取 0.5~2mL 肝素或 EDTA 抗凝血与等体积冷 0.17 M NH₄Cl 加入离心管混合。室温放置 10min。

D.2.2.2 1500×g 离心 10min (或 10000×g 离心 2~3min), 弃上清。

D.2.2.3 用冷 (2~7℃) 超纯水或双蒸水加满离心管, 轻轻上下颠倒混匀, 1500×g 离心 5min。

D.2.2.4 弃去上清, 向细胞团加入 500uL 样本稀释液 (1×)。旋涡振荡充分混匀, 室温放置 1h。期间不时旋涡混匀。取 75uL 按照 “D.3 操作步骤” 进行检测。

D.2.3 全血 (肝素或 EDTA 抗凝)

D.2.3.1 取 25uL 10 倍浓缩样品稀释液 (10×) 和 475uL 全血加入微量离心管, 在旋涡振荡器上混匀。

D.2.3.2 室温下孵育 1h, 期间不时旋涡混合。此样品可以直接按照 “D.3 操作步骤” 进行检测。

或: 直接将 75uL 全血加入酶标板孔中, 再加入 10uL 5 倍浓缩样品稀释液 (5×)。晃动酶标板 / 板条, 使样品混合均匀。再按照 “D.3 操作步骤” 进行检测。

D.2.4 细胞培养物

D.2.4.1 移去细胞培养液, 收集培养瓶中的细胞加入离心管中。

D.2.4.2 2500×g 离心 5min, 弃上清。

D.2.4.3 向细胞团中加入 500uL 样品稀释液 (1×)。旋涡振荡充分混匀, 室温孵育 1h。期间不时旋涡混合。取此样品 75uL 按照“D.3 操作步骤”进行检测。

D.2.5 组织

最好用新鲜的组织。如果有必要, 组织可以在处理前于-15 度以下冷冻保存 1 个月。每只动物检测 1~2 种组织, 最好选取扁桃体、脾、肠、肠系膜淋巴结或肺。

D.2.5.1 取 1~2g 组织用剪刀剪成小碎块 (2~5mm 大小)。

D.2.5.2 将组织碎块加入 10mL 离心管, 加入 5mL 样品稀释液 (1×), 旋涡振荡混匀, 室温下孵育 1~2h, 期间不时旋涡混合。

D.2.5.3 1500×g 离心 5min, 取 75uL 上清液按照“操作步骤”进行检测。

D.3 操作步骤

注意: 所有试剂在使用前应该恢复至室温 18~22℃; 使用前试剂应在室温条件下至少放置 1h。

D.3.1 每孔加入 25uLCSFV 特异性单克隆抗体。此步骤可以用多道加样器操作。

D.3.2 在相应孔中分别加入 75uL 阳性对照、阴性对照, 各加 2 孔。注意更换吸头。

D.3.3 在其余孔中分别加入 75uL 制备好的样品, 注意更换吸头。轻轻拍打酶标板, 使样品混合均匀。

D.3.4 置湿盒中或用胶条密封后室温 (18~22℃) 孵育过夜。也可以孵育 4 个 h, 但是这样会降低检测灵敏度。

D.3.5 甩掉孔中液体, 用洗涤液 (1×) 洗涤 5 次, 每次洗涤都要将孔中的所有液体倒空, 用力拍打酶标板, 以使所有液体拍出。或者, 每孔加入洗涤液 250~300uL 用自动洗板机洗涤 5 次。注意, 洗涤酶标板要仔细。

D.3.6 每孔加入 100uL 稀释好的辣根过氧化物酶标记物, 在湿盒或密封后置室温孵育 1h。

D.3.7 重复操作步骤 3.5; 每孔加入 100uL 底物液, 在暗处室温孵育 10min。第 1 孔加入底物液开始计时。

D.3.8 每孔加入 100uL 终止液终止反应。加入终止液的顺序与上述加入底物液的顺序一致。

D.3.9 在酶标仪上测量样品与对照孔在 450nm 处的吸光值, 或测量在 450nm 和 620nm 双波长的吸光值 (空气调零)。

D.3.10 计算每个样品和阳性对照孔的矫正 OD 值的平均值 (参见“计算方法”)。

D.4 计算方法

首先计算样品和对照孔的 OD 平均值, 在判定结果之前, 所有样品和阳性对照孔的 OD 平均值必须进行矫正, 矫正的 OD 值等于样本或阳性对照值减去阴性对照值。

矫正 OD 值 = 样本 OD 值 - 阴性对照 OD 值

D.4.1 试验有效性判定

阳性对照 OD 平均值应该大于 0.500, 阴性对照 OD 平均值应小于阳性对照平均值的 20%, 试验结果方能有效。否则, 应仔细检查实验操作并进行重测。如果阴性对照的 OD 值始终很高, 将阴性对照在微量离心机中 10000×g 离心 3~5min, 重新检测。

D.4.2 结果判定

被检样品的矫正 OD 值大于或等于 0.300, 则为阳性;

被检样品的矫正 OD 值小于 0.200, 则为阴性;

被检样品的矫正 OD 值大于 0.200, 小于 0.300, 则为可疑。

附录 E
(规范性附录)
猪瘟病毒反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 试验

本方法用于检测病毒核酸。

E.1 材料与样品准备

E.1.1 材料准备本试验所用试剂需用无 RNA 酶污染的容器分装；各种离心管和带滤芯吸头需无 RNA 酶污染；剪刀、镊子和研钵器须经干烤灭菌。

E.1.2 样品制备按 1: 5 (W/V) 比例，取待检组织和 PBS 液于研钵中充分研磨，4℃，1000g 离心 15min，取上清液转入无 RNA 酶污染的离心管中，备用；全血采用脱纤抗凝备用；细胞培养物冻融 3 次备用；其他样品酌情处理。制备的样品在 2-8℃ 保存不应超过 24h，长期保存应小分装后置 -70℃ 以下，避免反复冻融。

E.2 RNA 提取

E.2.1 取 1.5mL 离心管，每管加入 800μL RNA 提取液（通用 Trizol）和被检样品 200μL，充分混匀，静置 5min。同时设阳性和阴性对照管，每份样品换一个吸头。

E.2.2 加入 200μL 氯仿，充分混匀，静置 5min，4℃、12000g 离心 15min。

E.2.3 取上清约 500μL（注意不要吸出中间层）移至新离心管中，加等量异丙醇，颠倒混匀，室温静置 10min，4℃、12000g 离心 10min。

E.2.4 小心弃上清，倒置于吸水纸上，沾干液体；加入 1000μL 75%乙醇，颠倒洗涤，4℃、12000g 离心 10min。

E.2.5 小心弃上清，倒置于吸水纸上，沾干液体；4000g 离心 10s，将管壁上残余液体甩到管底部，小心吸干上清，吸头不要碰到有沉淀的一面，每份样品换一个吸头，室温干燥。

E.2.6 加入 10μL DEPC 水和 10U RNasin，轻轻混匀，溶解管壁上的 RNA，4000 g 离心 10s，尽快进行试验。长期保存应置 -70℃ 以下。

E.3 cDNA 合成

取 200μL PCR 专用管，连同阳性对照管和阴性对照管，每管加 10μL RNA 和 50 pM 下游引物(P25'-CACAG (CT) CC (AG) AA (TC) CC (AG) AAGTCATC -3')，按反转录试剂盒说明书进行。

E.4 PCR

E.4.1 取 200μL PCR 专用管，连同阳性对照管和阴性对照管，每管加上述 10μL cDNA 和适量水，95℃ 预变性 5min。

E.4.2 每管加入 10 倍稀释缓冲液 5μL，上游引物 P1 (5'-TC (GA) (AT) CAACCAA (TC) GAGATAGGG-3') 和下游引物 P2 各 50pM，10 mol/L dNTP 2μL，Taq 酶 2.5U，补水至 50μL。

E.4.3 置 PCR 仪，循环条件为 95℃ 50sec，58℃ 60sec，72℃ 35sec，共 40 个循环，72℃ 延伸 5min。

E.5 结果判定

取 RT-PCR 产物 5 μL，于 1%琼脂糖凝胶中电泳，凝胶中含 0.5μg/mL 溴化乙锭，电泳缓冲液为 0.5×TBE，80V 30min，电泳完后于长波紫外灯下观察拍照。阳性对照管和样品检测管出现 251nt 的特异条带判为阳性；阴性管和样品检测管未出现特异条带判为阴性。

附录 F
(规范性附录)
猪瘟疫病毒实时荧光 RT-PCR 试验

适用于猪活体及其脏器、血液、排泄物和细胞培养物中 CSFV 核酸的检测。

F.1 核酸提取

F.1.1 取 n 个灭菌的 1.5 mL 离心管，其中 n 为待检样品数×重复数 3+阳性管数+弱阳性管数+阴性管数，对每个离心管进行编号。

F.1.2 每管加入 500 μL Trizol，分别加入被检样品、阳性对照、弱阳性对照和阴性对照各 200 μL（由于阳性和弱阳性样品中模板浓度相对较高，检测过程中不得交叉污染），颠倒 10 次混匀，静置 5min；再加入 200 μL 氯仿，混匀器上振荡混匀 5 s（也可以用手反复颠倒混匀）。于 4℃、12 000g 离心 15 min。

F.1.3 取与 F.1.1 中相同数量灭菌的 1.5 mL 离心管，加入 500 μL 异丙醇（4℃预冷），对每个管进行编号。取 F.1.2 中离心后的上清液约 500 μL（注意不要吸出中间层）转移至相应的管中，颠倒混匀，4℃静置 20 min。

F.1.4 于 4℃、12 000g 离心 15 min（离心管开口保持朝离心机转轴方向放置），弃上清，倒置于吸水纸上，沾干液体，加入 600μL 75%乙醇，颠倒洗涤。

F.1.5 于 4℃、12 000 g 离心 10min（离心管开口保持朝离心机转轴方向放置），弃上清，倒置于吸水纸上，沾干液体（不同样品应在吸水纸不同地方沾干）。

F.1.6 4 000 g 离心 10 s（离心管开口保持朝离心机转轴方向放置），用微量加样器小心将残余液体吸干，室温干燥 3~10min。

F.1.7 加入 38 μL 经 DEPC 处理的水和 2μL RNA 酶抑制剂，轻柔混匀，溶解管壁上的 RNA，冰上保存备用。提取的 RNA 应在 2 h 内进行荧光 RT-PCR 扩增；若需长期保存应放置-70 °C 冰箱。

F.2 荧光 RT-PCR 扩增体系的配制

设 PCR 反应数为 n，其中 n 为待检样品数×重复数 3+阳性管数+弱阳性管数+阴性管数，每个样本测试反应体系配制见表 1。配制完毕的反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。

表 2 每个样品反应体系配制表

体系组分		用量	终浓度
猪瘟疫病毒 RT-PCR 反应液	10×PCR Buffer	5.0μL	1×
	dNTPs	1.5μL	0.075 uM
	上游引物 F	3.0μL	0.6uM
	下游引物 R	3.0μL	0.6uM
探针溶液	探针 P	1.5μL	0.15uM
反应酶	Superscript III 反转录酶	0.3μL	2U/μL
	HS Taq DNA 聚合酶	0.5μL	0.05U/μL
总量		14.8μL	

F.3 加样

在各设定的荧光 RT-PCR 管中分别加入 F.1.7 中制备的 35.2 μL RNA 溶液，盖紧管盖后，500 r/min 离心 30 s。放入荧光 PCR 检测仪内。

F.4 荧光 RT-PCR 扩增

将离心后的 PCR 管放入荧光 RT-PCR 检测仪内，记录样品摆放顺序。

循环条件设置：反转录50 °C，20 min；
预变性94 °C，4 min；
88 °C，8 s；60 °C，35 s。40个循环。荧光收集设置在此阶段每次循环的退火延伸时进行。

F.5 结果判定

F.5.1 阈值设定

试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和Ct值直接读取检测结果，Ct值为每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

F.5.2 质控标准

阴性对照无Ct 值，且无典型扩增曲线。

强阳性对照的Ct 值应<27.0并出现典型的扩增曲线；弱阳性对照的Ct 值应在34.0左右并出现典型的扩增曲线。否则，此次试验视为无效。

F.5.3 结果描述及判定

阴性:无Ct值并且无典型的扩增曲线，表示样品中无CSFV核酸。

阳性: Ct值 \leq 34.0，且出现典型的扩增曲线，表示样品中存在CSFV核酸。

可疑: Ct值>34.0，且出现典型扩增曲线的样本建议重复试验，重复试验结果出现Ct值 \leq 34.0和典型扩增曲线者为阳性，否则为阴性。

附录 G
(规范性附录)
猪瘟酶联免疫吸附试验 (ELISA)

用于检测猪血清或血浆中的特异性猪瘟病毒抗体。

G.1 试剂盒组成

G.1.1	用猪瘟病毒抗原包被的 ELISA 反应板	5 块
G.1.2	阳性对照	1mL
G.1.3	阴性对照	1mL
G.1.4	辣根过氧化物酶标记(HRPO)的抗猪瘟病毒的酶标抗体	60mL
G.1.5	样品稀释液	45mL
G.1.5.1	洗涤液 (10×)	480mL
G.1.5.2	TMB 底物	60mL
G.1.5.3	终止液	60mL

G.2 试剂准备

包被的微量反应板、样品稀释液、阳性对照、阴性对照、酶标抗体、底物溶液和终止液都是即用试剂。

G.3 洗涤液

(10×) 浓缩的洗涤液应在恢复至室温并充分的混合确保结晶的盐溶解。在使用前用纯化水(去离子水或双蒸水)进行 10 倍稀释。无菌条件下制备的洗涤液在 2-8℃可保存 1 周。

例如: 300mL 的洗涤液需用 30mL 的浓缩洗涤液和 270mL 的纯化水充分混合配制而成。

G.4 样品准备

新鲜的、冷藏(4℃少于 8 天)的、冰冻的血清或血浆都可以用于检测。

G.5 操作步骤

在使用前,所有的试剂盒组分都必须恢复到室温 18-25℃。试剂应通过轻轻涡旋、旋转混合均匀。

G.5.1 分别将 50μL 样品稀释液加入每个检测孔和对照孔中。

G.5.2 分别将 50μL 的阳性对照和阴性对照加入到相应的对照孔中,注意不同对照的吸头需要更换。

G.5.3 分别将 50μL 的被检样品加入到剩下的检测孔中,注意每个样本都使用不同吸头。

G.5.4 轻弹微量反应板或用振荡器振荡,将反应板中的溶液混匀。

G.5.5 将微量反应板用封条封闭或于湿箱中(18~25℃)孵育 2h,也可以将微量反应板用封条封闭或于湿箱中室温孵育过夜(12-18h)。

G.5.6 用 300μL 左右的洗涤液洗涤每个板孔 3 次。在每一次洗涤后,甩去每个板孔中的液体,在最后一次甩掉后,在吸水材料上用力扣板,吸去剩余的液体。在加入下一个试剂前,避免孔壁变干。

G.5.7 加入 100μL 辣根过氧化物酶标记(HRPO)的抗猪瘟病毒的酶标抗体(即取即用)加入反应孔中,用封条封闭反应板或湿盒中室温下孵育 30min。

G.5.8 重复步骤 6。

G.5.9 每个反应孔中加入 100μL 的底物溶液到反应孔中,并于避光、室温条件下放置 10min。加完第一孔后即可计时。

G.5.10 在每个反应孔中加入 100μL 的终止液终止反应。加终止液的顺序同步骤 9,与底物的加入顺序相同。

G.5.11 在 450nm 处测定样本以及对照的吸光度值,也可用双波长(450nm 和 650nm)测定样本以及对照的吸光度值,空气调零。

G.5.12 计算样本和对照的平均吸光度值(见 G.7 计算方法)。

G.6 结果

只有阴性对照的平均 OD₄₅₀ 大于 0.50,阳性对照的阻断率大于 50%,该检测结果才能有效。

G.7 计算方法

阴性对照平均值/阳性对照平均值/样本的计算

$$\overline{NCX} = \frac{NC1A450+NC2A450}{2} \quad \overline{PCX} = \frac{PC1A450+PC2A450}{2} \quad \overline{NCX}\text{-sample A450 Blocking\%} = \frac{\overline{NCX}-\overline{NCX}}{\overline{NCX}}$$

例如：例如：例如：样品结果为 1.219

$$\frac{1.28+1.30}{2} = 1.290 \quad \frac{0.120+0.140}{2} = 0.130 \quad \frac{1.290-1.219}{1.290} = 5.5\%$$

G.8 结果判定

如果被检样本的阻断率大于或等于 40%，该样本就可以被判为阳性（有 CSFV 抗体存在）。

如果被检样本的阻断率小于或等于 30%，该样本就可以被判为阴性（无抗 CSFV 抗体存在）。如果被检样本的阻断率在 30-40%之间，判为可疑，应在数日后再对该动物进行重测。

如果重测结果仍为可疑，就应用血清中和实验方法鉴定。

小反刍兽疫诊断技术规范

1 范围

本规范规定了小反刍兽疫采样、临床及病理学诊断和实验室检验的方法和技术要求。
本规范适用于小反刍兽疫的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

2.1 样品的采集和保存

2.1.1 棉拭子样品

选择处于发热期，出现眼鼻分泌物、口腔溃疡、腹泻等症状的活畜采集棉拭子样品。采集眼结膜棉拭子 2 个、鼻粘膜棉拭子 2 个，分别置于 2mL 离心管中，加 300 μ L 灭菌磷酸盐缓冲液 (pH7.4)，盖紧密封。

2.1.2 组织样品

选择刚被扑杀或者死亡的病畜采集组织样品。无菌采集肠系膜和支气管淋巴结各 3 个~4 个，脾脏、胸腺、肠粘膜和肺等组织各 25 g~50 g，分别置于 50 mL 离心管中，盖紧密封。

2.1.3 血清

采集动物血清，每头不少于 2mL。无菌分装血清装入 1.5mL 离心管中，盖紧密封。

2.2 采样记录及标签

样品的容器上均要贴上标签，表明编号，并填写采样单。

2.3 样品运送

样品置于密封袋中，与采样单一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标志。

3 诊断标准

3.1 诊断指标

3.1.1 临床指标

3.1.1.1 突然发热，第 2 天至第 3 天体温达 40°C ~42°C 高峰。发热持续 3 天左右，病羊死亡多集中在发热后期。

3.1.1.2 病初有水样鼻液，此后大量的粘脓性卡他样鼻液，阻塞鼻孔造成呼吸困难。鼻内膜发生坏死。眼流分泌物，遮住眼睑，出现眼结膜炎。

3.1.1.3 发热症状出现后，病羊口腔内膜轻度充血，继而出现糜烂。初期多在下齿龈周围出现小面积坏死，严重病例迅速扩展到齿垫、硬腭、颊和颊乳头以及舌，坏死组织脱落形成不规则的浅糜烂斑。部分病羊口腔病变温和，并可在 48 小时内愈合，这类病羊可很快康复。

3.1.1.4 多数病羊发生严重腹泻或下痢，造成迅速脱水和体重下降。怀孕母羊可发生流产。

3.1.2 病理指标

3.1.2.1 口腔和鼻腔黏膜糜烂坏死。

3.1.2.2 支气管肺炎，肺尖肺炎。

3.1.2.3 可见坏死性或出血性肠炎，盲肠、结肠近端和直肠出现特征性条状充血、出血，呈斑马状条纹。

3.1.2.4 可见淋巴结特别是肠系膜淋巴结水肿，脾脏肿大并可出现坏死病变。

3.1.3 病原学检测指标

采集的棉拭子或组织样品用反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 或实时定量 RT-PCR 方法检测核酸。核酸检测阳性时，利用基因测序技术进行毒株序列分析。

3.1.4 血清学诊断指标

血清样品用竞争 ELISA 或阻断 ELISA 检测感染抗体。

3.2 结果判定

3.2.1 疑似小反刍兽疫病毒感染

符合临床指标和病理指标。

3.2.2 确诊小反刍兽疫病毒感染

3.2.2.1 未免疫小反刍兽疫疫苗的山羊或绵羊出现疑似病例，且病原学和血清学任一项方法检测阳性，可判定为确诊小反刍兽疫病毒感染。

3.2.2.2 免疫小反刍兽疫疫苗的山羊或绵羊出现疑似病例，且病原学任一项方法检测阳性，可判定为确诊小反刍兽疫病毒感染。

4 实验室诊断

4.1 病原学诊断方法

小反刍兽疫病毒 RT-PCR，见附录 A。

小反刍兽疫病毒荧光定量 RT-PCR，见附录 B。

4.2 血清学诊断方法

小反刍兽疫病毒竞争 ELISA，见附录 C。

小反刍兽疫病毒阻断 ELISA，见附录 D。

附录 A
(规范性附录)
小反刍兽疫病毒 RT-PCR 方法

A.1 试剂与材料

除另有规定外，试剂为分析纯或生化试剂。实验用水符合 GB/T 6682 的要求。

Trizol 试剂，三氯甲烷，异丙醇，无水乙醇，DEPC 处理过的水，反转录/Taq DNA 聚合酶混合液，2×一步法 RT-PCR 反应缓冲液，1.5%的琼脂糖凝胶，0.5×TBE 缓冲液，溴化乙锭。

可以采用引物 NP3/NP4 用于小反刍兽疫病毒核酸的检测，引物的靶基因、位置、序列和扩增产物的大小见表 1。

表 1 用于小反刍兽疫病毒 RT-PCR 检测的引物

引物	目的	靶基因	位置	序列(5'-3')	产物
NP3	正向引物	N 基因	1181-1204	TCTCGGAAATCGCCTCACAGACTG	351 bp
NP4	反向引物	N 基因	1531-1508	CCTCCTCCTGGTCTCCAGAATCT	

A.2 样品处理

将棉拭子充分捻动、挤干后弃去拭子，取 100μL 样品液至一新的离心管中，加入 1mL TRIzol 试剂，振荡混匀，进行 RNA 提取。

取大约 100mg 组织样品，剪碎后，加入 1mL TRIzol 试剂充分匀浆后转移至 1.5mL 离心管中，进行 RNA 提取。

A.3 RNA 提取

经 TRIzol 处理的样品液 12000 r/min，4℃ 离心 10 min，取上清，静置 5 min。加 200 μL 三氯甲烷，振荡混匀，15 s，静置 2 min ~ 3 min。12000 r/min，4℃ 离心 15 min，取 400 μL 上层水相到新的离心管中，加 400 μL 的异丙醇，混匀，静置 10 min。12000 r/min，4℃ 离心 10 min，去上清。加入 75%乙醇 1 ml，混匀，12000 r/min，4℃ 离心 5 min，去上清。再加入 75%乙醇 1 ml，混匀，12000 r/min，4℃ 离心 5 min，去上清。干燥 RNA 沉淀后加入 100 μL DEPC 处理过的水溶解。立即进行 RT-PCR 反应或 -70℃ 保存。

也可以采用其他商品化 RNA 提取试剂盒或核酸纯化仪提取病毒核酸。

A.4 RT-PCR 反应

反应体系为 25μL，依次加入以下成分：12.5 μL 2×一步法 RT-PCR 反应缓冲液，1 μL 正向引物 NP3(10 μmol/L)，1 μL 反向引物 NP4(10 μmol/L)，1 μL 反转录酶/Taq DNA 聚合酶混合液，4.5 μL DEPC 处理过的水，5 μL RNA 模板。

每次进行 RT-PCR 反应时均设立标准阳性、阴性及空白对照。标准阳性用阳性对照 RNA 作为模板，标准阴性用 Vero 细胞 RNA 作为模板，空白对照用 DEPC 处理过的水作为模板。

RT-PCR 反应条件为：50℃ 反转录 30 min；94℃，2 min 进行 Taq 酶的激活；94℃，30 sec，55℃，30 sec，72℃，30 sec，共 35 次循环；72℃ 延伸 7 min。

A.5 PCR 产物的电泳

取 PCR 产物 5 μL 在 1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳，凝胶成像系统中观察结果。

A.6 质控标准

小反刍兽疫病毒 RT-PCR 标准阳性对照有大小为 351bp 的特异性阳性扩增条带，标准阴性对照和空白对照无任何扩增条带，说明质控合格。

A.7 结果判定

样品有大小为 351bp 的特异性阳性扩增条带判为 RT-PCR 结果阳性，表述为检出小反刍兽疫病毒核酸。

样品无特异性的阳性扩增条带判为 RT-PCR 结果阴性，表述为未检出小反刍兽疫病毒核酸。

附录 B
(规范性附录)

小反刍兽疫病毒荧光定量 RT-PCR 方法

B.1 试验材料

Trizol 试剂, 三氯甲烷, 异丙醇, 无水乙醇, DEPC 处理过的水, 2×一步法荧光 RT-PCR 反应缓冲液, 反转录/Taq DNA 聚合酶混合液, 参比荧光 ROX II。

引物和探针: 引物和探针针对小反刍兽疫病毒 N 基因保守序列区段设计, 引物和探针的位置和序列见表 2。

表 2 用于小反刍兽疫病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测的引物和探针

引物	目的	位置	序列(5'-3')
PPRN8a	正向	1213-1233	CACAGCAGAGGAAGCCAAACT
PPRN9b	反向	1327-1307	TGTTTTGTGCTGGAGGAAGGA
PPRN10P	探针	1237-1258	FAM-5'-CTCGGAAATCGCCTCGCAGGCT-3'-TAMRA

B.2 样品处理和 RNA 提取

同附录 A.2 和 A.3

B.3 荧光定量 RT-PCR 反应

反应体系为 25 μL , 依次加入以下成分: 12.5 μL 2×1 step buffer, 1 μL 正向引物 PPRN8a (10 $\mu\text{mol/L}$), 1 μL 反向引物 PPRN9b (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.5 μL 探针 PPRN10p (10 $\mu\text{mol/L}$), 0.5 μL Taq DNA 聚合酶, 0.5 μL 反转录酶, 0.5 μL 参比荧光 ROX II, 3.5 μL DEPC 处理过的水, 5 μL RNA 模板。每次进行荧光定量 RT-PCR 时均设标准阳性、阴性及空白对照。标准阳性用阳性对照 RNA 作为模板, 标准阴性用 Vero 细胞 RNA 作为模板, 空白对照用 DEPC 处理过的水作为模板。

荧光定量 RT-PCR 反应条件为: 42°C 反转录 30 min; 95°C, 10 min 进行 Taq 酶的激活; 95°C, 15 sec, 60°C, 1 min, 共 50 次循环; 每个循环在 60°C, 1 min 时收集荧光信号。

B.4 质控标准

读取每个样品的 Ct 值。

标准阳性对照样品有特异性扩增曲线而且 Ct 值 \leq 30, 标准阴性对照和空白对照无特异性扩增曲线, 说明质控合格。

B.5 结果判定

样品有特异性扩增曲线而且 Ct 值 \leq 40 判为实时荧光 RT-PCR 扩增阳性, 表述为检出小反刍兽疫病毒核酸。

样品 Ct 值 $>$ 40 或者无特异性扩增曲线判为实时荧光 RT-PCR 扩增阴性, 表述为未检出小反刍兽疫病毒核酸。

附录 C
(规范性附录)
小反刍兽疫病毒抗体竞争 ELISA 方法

C.1 试验材料与试剂

包被用抗原：PPRV 疫苗株重组 N 蛋白。对照血清：强阳性血清、弱阳性血清、阴性血清。单克隆抗体：小反刍兽疫病毒 N 蛋白的单克隆抗体。酶结合物：辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠血清。封闭缓冲液、洗涤缓冲液、底物溶液及终止液。

C.2 检测程序

C.2.1 抗原包被

PPRV 重组 N 蛋白用包被缓冲液 1:3500 倍稀释后，每孔 50μL 包被 96 孔酶标板，37°C 置湿盒吸附 1h，用洗涤缓冲液洗板 4 次。

C.2.2 血清加样步骤

每孔加入 45μL 封闭缓冲液。每份待检血清做 2 孔，每孔加入 5μL 待检血清。设强阳性血清对照孔 (C++) 4 个，每孔加入 5μL 强阳性血清，设弱阳性血清对照孔 (C+) 4 个，每孔加入 5 μL 弱阳性血清，设阴性血清对照孔 (C-) 2 个，每孔加入 5μL 阴性血清，设单抗对照孔 (Cm) 4 个，每孔加入 5μL 封闭缓冲液，设酶结合物对照孔 (Cc) 2 个，每孔加入 55μL 封闭缓冲液。

C.2.3 单克隆抗体的加入

除酶结合物对照孔外，每孔加入 50μL 工作浓度的单抗，37°C 置湿盒作用 1h，用洗涤缓冲液洗板 4 次。

C.2.4 酶结合物的加入

每孔加入 50μL 工作浓度的酶结合物，37°C 置湿盒作用 1h，洗涤缓冲液洗板 4 次。

C.2.5 显色与终止

每孔加入 50μL 底物溶液，37°C 避光反应 10min，每孔加入 50μL 终止液。

C.2.6 读值

酶标仪预热 15min，读取每孔 492nm 波长的吸光度值 (OD 值)。

C.2.7 计算抑制率

按照式 (1) 计算每孔 (包括对照孔) 的抑制率，并计算每份样品的平均抑制率。

$$PI = 100 - (OD_T \div OD_C) \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

PI — 抑制率

OD_T — 试验孔或对照孔 OD 值；

OD_C — 单抗对照孔 OD 平均值。

C.2.8 质控标准

结果在质控标准 (见表 3) 范围内，则试验成立。

表 3 小反刍兽疫竞争 ELISA 检测方法质控标准

	最大值	最小值
Cm 孔的 OD 值	1.500	0.500
Cc 孔抑制率	+105	+95
Cm 孔抑制率	+20	-19
C++ 孔抑制率	90	81
C+ 孔抑制率	80	51
C- 孔抑制率	30	5

C.2.9 结果判定

平均抑制率 (PI) >80，判为强阳性，50<平均抑制率 (PI) ≤80；判为弱阳性，表述为小反刍兽疫血清学阳性。平均抑制率 (PI) ≤50，判为阴性，表述为小反刍兽疫抗体血清学阴性。

附录 D
(规范性附录)
小反刍兽疫病毒抗体阻断 ELISA 方法

D.1 试验材料

抗原包被的酶标板、阳性对照血清、阴性对照血清、稀释液、酶标单抗，洗涤缓冲液、底物溶液及终止液。

D.2 操作步骤

- (1) 在 A1 和 B1 抗原包被孔加入阳性血清，50 μ L/孔。
- (2) 在 C1 和 D1 抗原包被孔中加入阴性血清，50 μ L/孔。
- (3) 在 E1 和 F1 抗原包被孔中加入稀释液，50 μ L/孔。
- (4) 在样品孔中加入稀释液，25 μ L/孔。
- (5) 在样品孔中再加入待检血清，25 μ L/孔。
- (6) 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min。
- (7) 弃去反应孔中的液体。
- (8) 每孔用洗涤液清洗 4 次，洗涤液 (1 \times) 300 μ L/孔。
- (9) 每次除去洗涤液后，在吸水纸上拍打，除去残留的液体。
- (10) 每孔加入酶标单抗 (1 \times)，50 μ L/孔。
- (11) 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。
- (12) 重复步骤 7 至 9。
- (13) 每孔加入底物溶液，50 μ L/孔。
- (14) 室温避光作用 10-15min。
- (15) 每孔中加入 50 μ L 终止液，终止所有的反应。
- (16) 用酶标仪在 450nm 的波长下测定各孔 OD_{450nm} 值，计算阻断率。

D.3 计算阻断率

按照式 (1) 计算每孔 (包括对照孔) 的抑制率，并计算每份样品的平均阻断率。

$$PB = 100 - [\text{待检血清 OD}_{450\text{nm}}(\text{或对照 OD}_{450\text{nm}} \text{平均值}) \times 100] / C_m \text{ 的 OD}_{450\text{nm}} \text{ 平均值} \dots (1)$$

式中：

PB — 阻断率

C_m — 酶标单抗对照孔

D.4 结果判定

阳性对照阻断率 (PB) >60，阴性对照阻断率 (PB) <40，试验结果有效；否则，应重新进行试验。

待检样品阻断率 (PB) >50，判为阳性。

待检样品阻断率 (PB) \leq 50，判为阴性。

高致病性禽流感诊断技术规范

1 范围

本规范规定了高致病性禽流感的样品采集与处理、诊断指标和实验室诊断方法的技术要求。

本规范适用于高致病性禽流感的诊断与监测。

2 样品采集与处理

2.1 活禽采集血清、气管和泄殖腔拭子等样品；小珍禽采集新鲜粪便；死禽采集咽喉、脾、肺、肾和脑等组织样品。

2.2 病料应放在含有抗生素的 pH 值 7.0~7.4 的等渗 PBS（或盐水）内。抗生素的选择视当地情况而定，组织和气管拭子悬液中应含有青霉素（2 000IU/mL）、链霉素（2mg/mL）、丁胺卡那霉素（1 000 IU/mL）和制霉菌素（1 000IU/mL），但粪便和泄殖腔拭子所有的抗生素浓度应提高 5 倍，加入抗生素后 pH 值应调至 7.0~7.4。

2.3 在室温放置 1~2h 后样品应尽快处理，可在 4℃ 存放几天，也可于低温条件下保存（-70℃ 贮存最好）。

2.4 处理时将棉拭子充分捻动、拧干后弃去拭子；粪便、研碎的组织用含抗生素的 pH 值 7.0~7.4 的等渗 PBS 溶液配成 10%~20%（W/V）的悬液。样品液经 5 000r/min 离心 5min，取上清液作为接种材料。

3 诊断指标

3.1 临床诊断指标

3.1.1 急性发病死亡；

3.1.2 脚鳞出血；

3.1.3 鸡冠出血或发绀、头部和脸部水肿；

3.1.4 鸭、鹅等水禽可见神经和腹泻症状，有时可见角膜炎症，甚至失明。

3.2 病理诊断指标

3.2.1 肌肉和其他组织器官广泛性严重出血；

3.2.2 消化道、呼吸道粘膜广泛充血、出血；腺胃粘液增多，可见腺胃乳头出血、腺胃和肌胃之间交界处粘膜可见带状出血；

3.2.3 输卵管的中部可见乳白色分泌物或凝块；卵泡充血、出血、萎缩、破裂，有的可见“卵黄性腹膜炎”；

3.2.4 脑部出现坏死灶、血管周围淋巴细胞管套、神经胶质灶、血管增生等病变；胰腺和心肌组织局灶性坏死。

3.3 血清学诊断指标

3.3.1 H5 或 H7 的血凝抑制(HI)效价达到 2^4 及以上；

3.3.2 禽流感酶联免疫吸附试验（ELISA）阳性。

3.4 病原学诊断指标

3.4.1 H5 或 H7 亚型病毒分离阳性，病毒在缺乏胰蛋白酶的敏感细胞上能够生长，并产生明显的细胞病变（CPE），对血凝素基因裂解位点的氨基酸序列测定结果与高致病性禽流感分离株基因序列相符；

3.4.2 特异性高致病性禽流感分子生物学方法试验诊断阳性；

3.4.3 静脉内接种致病指数（IVPI）大于 1.2。

3.5 结果判定

3.5.1 临床怀疑为高致病性禽流感

符合 3.1 临床诊断指标和 3.2 病理诊断指标之一的。

3.5.2 疑似高致病性禽流感

非免疫禽符合结果判定 3.5.1，且符合血清学诊断指标之一的；免疫禽符合结果判定

3.5.1，且能排除新城疫和中毒性疾病的。

3.5.3 确诊

符合结果判定 3.5.2，且符合 3.4 之一的；或符合结果判定 3.5.1，且符合符合病原学诊断指标之一的。

4 实验室诊断方法

4.1 病原分离与鉴定

通过鸡胚接种进行病原分离粪便和组织悬液经 5000r/min 离心 5min, 上清液以 0.2mL/胚的剂量经尿囊腔途径接种 9~11 日龄 SPF 鸡胚, 每个样品接种 5 个胚, 于 37℃ 孵化箱内孵育 3-4d。接种 18h 后每 8h 观察鸡胚死亡情况, 死亡鸡胚或者濒死鸡胚以及孵育末期所有的鸡胚放在 4℃ 冷却, 检测尿囊液的 HA 活力 (见 4.3), 阴性反应的尿囊液至少应再传 2 代。阳性反应继续进行 4.3 和 4.4 或 4.5 鉴定。

4.2 静脉致病指数 (IVPI) 试验方法

收获接种病毒的 SPF 鸡胚的感染性尿囊液, 测定其血凝价大于 1:16 (2^4 或 $4\log_2$), 将含毒尿囊液用灭菌生理盐水稀释 10 倍 (切忌使用抗生素), 将此稀释病毒液以 0.1mL/羽静脉接种 10 只 6 周龄 SPF 鸡, 2 只同样鸡只接种 0.1mL 稀释液作对照 (对照鸡不应发病, 也不计入试验鸡)。每隔 24h 检查鸡群一次, 共观察 10 天。根据每只鸡的症状用数字方法每天进行记录: 正常鸡记为 0, 病鸡记为 1, 重病鸡记为 2, 死鸡记为 3 (病鸡和重病鸡的判断主要依据临床症状表现。一般而言, “病鸡”表现有下述一种症状, 而“重病鸡”则表现下述多个症状, 如呼吸症状、沉郁、腹泻、鸡冠和/或肉髯发绀、脸和/或头部肿胀、神经症状。死亡鸡在其死后的每次观察都记为 3)。

IVPI 值 = 每只鸡在 10d 内所有数字之和 / (10 只鸡 × 10d), 如指数为 3.00, 说明所有鸡 24h 内死亡; 指数为 0.00, 说明 10d 观察期内没有鸡表现临床症状。

当 IVPI 值大于 1.2 时, 判定分离株为高致病力禽流感病毒 (HPAIV)。

4.3 血凝抑制 (HI) 试验

见附录 A。

4.4 禽流感 RT-PCR 试验

见附录 B。

4.5 禽流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测

见附录 C。

附录 A
(规范性附录)
禽流感血凝抑制 (HI) 试验

A.1 1%鸡红细胞的制备

采集至少 3 只 SPF 鸡或无禽流感和新城疫等抗体的健康公鸡的血液与等体积阿氏液混合, 用 pH7.2、0.01mol/L/PBS 液洗涤 3 次, 每次均以 1000r/min 离心 10min, 洗涤后用 PBS 配成体积分数为 1%红细胞悬液, 4℃保存备用。

A.2 抗原血凝效价测定 (HA 试验, 微量法)

A.2.1 在微量反应板的 1 孔~12 孔均加入 0.025mL PBS, 换滴头。

A.2.2 吸取 0.025mL 病毒悬液 (如感染性鸡胚尿囊液) 加入第 1 孔, 混匀。

A.2.3 从第 1 孔吸取 0.025mL 病毒液加入第 2 孔, 混匀后吸取 0.025mL 加入第 3 孔, 如此进行对倍稀释至第 11 孔, 从第 11 孔吸取 0.025mL 弃之, 换滴头。

A.2.4 每孔再加入 0.025mL PBS。

A.2.5 每孔均加入 0.025mL 体积分数为 1%鸡红细胞悬液 (将鸡红细胞悬液充分摇匀后加入)。

A.2.6 轻微振荡混匀, 在室温 (20~25℃) 下静置 40min 后观察结果 (如果环境温度太高, 可置 4℃环境下反应 1h)。对照孔红细胞将成明显的钮扣状沉到孔底。

A.2.7 结果判定: 将微量反应板倾斜, 观察红细胞有无呈泪滴状流淌。完全血凝 (不流淌) 的抗原或病毒最高稀释倍数代表一个血凝单位 (HAU)。

A.3 血凝抑制 (HI) 试验 (微量法)

A.3.1 根据抗原血凝效价测定试验结果配制 4HAU 的病毒抗原。以完全血凝的病毒最高稀释倍数作为终点, 终点稀释倍数除以 4 即为含 4HAU 的抗原的稀释倍数。例如, 如果血凝的终点滴度为 1:256, 则 4HAU 抗原的稀释倍数应是 1:64 (256 除以 4)。

A.3.2 稀释好的 4HAU 根据根据抗原血凝效价测定方法作回归滴定。

A.3.3 在微量反应板的 1 孔~11 孔加入 0.025mL PBS, 第 12 孔加入 0.05mL PBS。

A.3.4 吸取 0.025mL 血清加入第 1 孔内, 充分混匀后吸 0.025mL 于第 2 孔, 依次对倍稀释至第 10 孔, 从第 10 孔吸取 0.025mL 弃去。

A.3.5 1 孔~11 孔均加入含 4HAU 混匀的病毒抗原液 0.025mL, 室温 (约 20℃) 静置至少 30min。

A.3.6 每孔加入 0.025mL 体积分数为 1%的鸡红细胞悬液混匀, 轻轻混匀, 静置约 40min (室温约 20℃, 若环境温度太高, 可置 4℃条件下进行), 对照红细胞将呈显钮扣状沉于孔底。

A.3.7 结果判定

以完全抑制 4 个 HAU 抗原的血清最高稀释度作为 HI 滴度。

只有阴性对照血清滴度不大于 1/4 (以倒数标识大于 2² 或 2log2), 阳性对照误差不超过 1 个滴度, 试验才有效。

血清稀释度大于或等于 1/16 (2⁴ 或 4log2) 能抑制 4HAU 抗原, 可判为抗体阳性。

附录 B
(规范性附录)
禽流感 RT-PCR 试验

B.1 试剂/引物

- B.1.1 变性液：见 B.4.1。
 B.1.2 2M 醋酸钠溶液(pH4.0)：见 B.4.2
 B.1.3 水饱和酚 (pH 4.0)
 B.1.4 氯仿/异戊醇混合液：见 B.4.3
 B.1.5 M-MLV 反转录酶 (200u/μL)
 B.1.6 RNA 酶抑制剂(40u/μL)
 B.1.7 Taq DNA 聚合酶(5u/μL)
 B.1.8 1.0% 琼脂糖凝胶：见 B.4.4
 B.1.9 50×TAE 缓冲液：见 B.4.5
 B.1.10 溴化乙锭(10μg/μL)：见 B.4.6
 B.1.11 加样缓冲液：见 B.4.7
 B.1.12 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的灭菌双蒸水：见 B.4.8
 B.1.13 5×反转录反应缓冲液：见 B.4.9
 B.1.14 2.5mmol dNTPs：见 B.4.10
 B.1.15 10×PCR Buffer：见 B.4.11
 B.1.16 DNA 分子量标准
 B.1.17 引物：
 B.1.17.1 反转录引物
 Uni12: 5' -AGCAAAGCAGG-3' ，引物浓度为 20pmol。
 B.1.17.2 PCR 引物
 见下表，引物浓度均为 20pmol。

PCR 过程中选择的引物

引物名称	引物序列	长度 (bp)	扩增目的
M-229U	5' -TTCTAACCGAGGTCGAAAC-3'	229	通用引物
M-229L	5' -AAGCGTCTACGCTGCAGTCC-3'		
H5-372U	5' -GGAATATGGTAACTGCAACACCA -3'	372	H5
H5-372L	5' -AACTGAGTGTTTCATTTTGCAATG-3'		
H7-501U	5' -AATGCACARGGAGGAGGAACT-3'	501	H7
H7-501L	5' -TGAYGCCCCGAAGCTAAACCA-3'		

W = (AT); Y = (CT); R = (AG)。

B.2 操作程序

- B.2.1 样品的采集和处理：按照 GB/T 18936 中提供方法进行。
 B.2.2 RNA 的提取
 B.2.2.1 设立阳性、阴性样品对照。
 B.2.2.2 异硫氰酸胍一步法
 B.2.2.2.1 将组织或细胞中加入适量的变性液，匀浆。
 B.2.2.2.2 将混合物移至一管中，按每毫升变性液后立即加入 0.1mL 乙酸钠，1mL 酚，0.2mL 氯仿-异戊醇。加入每种组分后，盖上管盖，倒置混匀。
 B.2.2.2.3 将匀浆剧烈振荡 10s。冰浴 15min 使核蛋白质复合体彻底裂解。
 B.2.2.2.4 12000r/min，4℃离心 20min，将上层含 RNA 的水相移入一新管中。为了降低处于水相和有机相分界处的 DNA 污染的可能性，不要吸取水相的最下层。

B.2.2.2.5 加入等体积的异丙醇，充分混匀液体，并在-20℃沉淀 RNA 1h 或更长时间。
B.2.2.2.6 4℃ 12000 r/min 离心 10 min，弃上清，用 75%的乙醇洗涤沉淀，离心，用吸头彻底吸弃上清，自然条件下干燥沉淀，溶于适量 DEPC 处理的水中。-20℃贮存，备用。

B.2.2.3 选择市售商品化 RNA 提取试剂盒，完成 RNA 的提取。

B.2.3 反转录

B.2.3.1 取 5μL RNA，加 1μL 反转录引物，70℃作用 5min。

B.2.3.2 冰浴 2min。

B.2.3.3 继续加入：

5×反转录反应缓冲液	4μL
0.1M DTT	2μL
2.5mmol dNTPs	2μL
M-MLV 反转录酶	0.5μL
RNA 酶抑制剂	0.5μL
DEPC 水	11μL

37℃水浴 1h，合成 cDNA 链。取出后可直接进行 PCR，或者放于-20℃保存备用。试验中同时设立阳性和阴性对照。

B.2.4 PCR

根据扩增目的不同，选择不同的上/下游引物，M-229U/M-229L 是型特异性引物，用于扩增禽流感病毒的 M 基因片段；H5-372U/H5-372L、H7-501U/H7-501L 分别特异性扩增 H5、H7 亚型血凝素基因片段。

PCR 为 50μL 体系，包括：

双蒸灭菌水	37.5μL
反转录产物	4μL
上游引物	0.5μL
下游引物	0.5μL
10×PCR Buffer	5μL
2.5mmol dNTPs	2μL
Taq 酶	0.5μL

首先加入双蒸灭菌水，然后按顺序逐一加入上述成分，每次要加入到液面下。全部加完后，混悬，瞬时离心，使液体都沉降到 PCR 管底。循环参数为 95℃ 5min，94℃ 45s，52℃ 45s，72℃ 45s，循环 30 次，72℃ 延伸 6min 结束。设立阳性对照和阴性对照。

B.2.5 电泳

B.2.5.1 制备 1.0%琼脂糖凝胶板，见附录 B.4.4。

B.2.5.2 取 5 μL PCR 产物与 0.5μL 加样缓冲液混合，加入琼脂糖凝胶板的加样孔中。

B.2.5.3 加入分子量标准。

B.2.5.4 盖好电泳仪，插好电极，5V/cm 电压电泳，30~40min。

B.2.5.5 用紫外凝胶成像仪观察、扫描图片存档，打印。

B.2.5.6 用分子量标准比较判断 PCR 片段大小。

B.3 结果判定

B.3.1 在阳性对照出现相应扩增带、阴性对照无此扩增带时判定结果。

B.3.2 用 M-229U/M-229L 检测，出现大小约为 229bp 扩增片段时，判定为禽流感病毒阳性，否则判定为阴性。

B.3.3 用 H5-372/H5-372L 检测，出现大小约为 372bp 扩增片段时，判定为 H5 血凝素亚型禽流感病毒阳性，否则判定为阴性。

B.3.4 用 H7-501U/H7-501L 检测，出现大小约为 501bp 扩增片段时，判定为 H7 血凝素亚型禽流感病毒阳性，否则判定为阴性。

B.4 相关试剂的配制 B.4.1 变性液

4M 异硫氰酸胍
25mM 柠檬酸钠
0.5% (m/V) 十二烷基肌酸钠
0.1M β-巯基乙醇

具体配制：将 250g 异硫氰酸胍、0.75mol/L (pH7.0) 柠檬酸钠 17.6mL 和 26.4mL 10% (m/V) 十二烷基肌酸钠溶于 293mL 水中。65℃条件下搅拌、混匀，直至完全溶解。室温条件下保存，每次临用前按每 50mL 变性液加入 14.4 mol/L 的 β -巯基乙醇 0.36mL 的剂量加入。变性液可在室温下避光保存数月。

B.4.2 2mol/L 醋酸钠溶液(pH4.0)

乙酸钠	16.4g
冰乙酸	调 pH 至 4.0
灭菌双蒸水	加至 100mL

B.4.3 氯仿/异戊醇混合液

氯仿	49mL
异戊醇	1mL

B.4.4 1.0%琼脂糖凝胶的配制

琼脂糖	1.0g
0.5×TAE 电泳缓冲液	加至 100mL

微波炉中完全融化，待冷至 50-60℃时，加溴化乙锭 (EB) 溶液 5 μ L，摇匀，倒入电泳板上，凝固后取下梳子，备用。

B.4.5 50×TAE 电泳缓冲液

B.4.5.1 0.5mol/L 乙二铵四乙酸二钠 (EDTA) 溶液 (pH8.0)

二水乙二铵四乙酸二钠	18.61g
灭菌双蒸水	80mL
氢氧化钠	调 pH 至 8.0
灭菌双蒸水	加至 100mL

B.4.5.2 TAE 电泳缓冲液(50×)配制

羟基甲基氨基甲烷(Tris)	242g
冰乙酸	57.1mL
0.5mol/L 乙二铵四乙酸二钠溶液(pH8.0)	100mL
灭菌双蒸水	加至 1 000mL

用时用灭菌双蒸水稀释使用。

B.4.6 溴化乙锭 (EB) 溶液

溴化乙锭	20mg
灭菌双蒸水	加至 20mL

B.4.7 10×加样缓冲液

聚蔗糖	25g
灭菌双蒸水	100mL
溴酚蓝	0.1g
二甲苯青	0.1g

B.4.8 DEPC 水

超纯水	100mL
焦碳酸二乙酯(DEPC)	50 μ L

室温过夜，121℃高压 15min，分装到 1.5 mL DEPC 处理过的微量管中。

B.4.9 M-MLV 反转录酶5×反应缓冲液

1mol Tris-HCl (pH 8.3)	5mL
KCl	0.559g
MgCl ₂	0.029g
DTT	0.154g
灭菌双蒸水	加至 100mL
B.4.10 2.5mmol/LdNTP	
DATP(10mmol/L)	20μL
DTTP(10mmol/L)	20μL
DGTP(10mmol/L)	20μL
DCTP(10mmol/L)	20 μL
B.4.11 10×PCR 缓冲液	
1M Tris-HCl (pH8.8)	10mL
1M KCl	50mL
Nonidet P40	0.8mL
1.5moL MgCl ₂	1mL
灭菌双蒸水	加至 100mL

附录 C
(规范性附录)
禽流感病毒通用荧光 RT-PCR 检测

C.1 试剂

除特别说明以外,本标准所用试剂均为分析纯,所有试剂均用无RNA酶污染的容器(用DEPC水处理后高压灭菌)分装。

氯仿;

异丙醇: -20℃预冷;

PBS: 121±2℃, 15min高压灭菌冷却后,无菌条件下加入青霉素、链霉素各10000 U/mL;

75%乙醇: 用新开启的无水乙醇和DEPC水(符合GB 6682 要求)配制, -20℃预冷;

禽流感病毒通用型荧光RT-PCR检测试剂盒: 组成、功能及使用注意事项见5

C.2 抽样

C.2.1 采样工具

下列采样工具必须经(121±2)℃, 15min高压灭菌并烘干:

棉拭子、剪刀、镊子、注射器、1.5mL 离心管、研钵。

C.2.2 样品采集

C.2.2.1 活禽

取咽喉拭子和泄殖腔拭子,采集方法如下:

取咽喉拭子时将拭子深入喉头口及上颚裂来回刮3-5次取咽喉分泌液;

取泄殖腔拭子时将拭子深入泄殖腔转一圈并沾取少量粪便;

将拭子一并放入盛有1.0mL PBS的1.5mL 离心管中,加盖、编号。

C.2.2.2 肌肉或组织脏器

待检样品装入一次性塑料袋或其它灭菌容器,编号,送实验室。

C.2.2.3 血清、血浆

用无菌注射器直接吸取至无菌采样管中,编号备用。

C.2.3 样品贮运

样品采集后,放入密闭的塑料袋内(一个采样点的样品,放一个塑料袋),于保温箱中加冰、密封,送实验室。

C.2.4 样品制备

C.2.4.1 咽喉、泄殖腔拭子

样品在混合器上充分混合后,用高压灭菌镊子将拭子中的液体挤出,室温放置30 min,取上清液转入无菌的1.5 mL 离心管中,编号备用。

C.2.4.2 肌肉或组织脏器

取待检样品2.0 g于洁净、灭菌并烘干的研钵中充分研磨,加10mL PBS混匀,4℃, 3000r/min离心15min,取上清液转入无菌的1.5mL 离心管中,编号备用。

C.2.5 样本存放

制备的样本在2~8℃条件下保存应不超过24h,若需长期保存应置-70℃以下,但应避免反复冻融(冻融不超过3次)。

C.3 操作方法

C.3.1 实验室标准化设置与管理

禽流感病毒通用荧光RT-PCR检测的实验室规范。

C.3.2 样本的处理

在样本制备区进行。

C.3.2.1 取n 个灭菌的1.5mL 离心管,其中n 为被检样品、阳性对照与阴性对照的和(阳性对照、阴性对照在试剂盒中已标出),编号。

C.3.2.2 每管加入600μL裂解液,分别加入被检样本、阴性对照、阳性对照各200μL,一份样本换用一个吸头,再加入200μL氯仿,混匀器上振荡混匀5s(不能过于强烈,以免产生乳化层,也可以用手颠倒混匀)。于4℃、12000r/min离心15min。

C.3.2.3 取与(1)相同数量灭菌的1.5mL 离心管,加入500μL异丙醇(-20℃预冷),做标记。吸取本标准(2)各管中的上清液转移至相应的管中,上清液应至少吸取500μL,不能吸出中间

层，颠倒混匀。

C.3.2.4 于4℃、12 000r/min离心15 min（离心管开口保持朝离心机转轴方向放置），小心倒去上清，倒置于吸水纸上，沾干液体(不同样品须在吸水纸不同地方沾干)；加入600 μL 75%乙醇，颠倒洗涤。

C.3.2.5 于4℃、12 000 r/min离心10min（离心管开口保持朝离心机转轴方向放置），小心倒去上清，倒置于吸水纸上，尽量沾干液体（不同样品须在吸水纸不同地方沾干）。

C.3.2.6 4000 r/min 离心10s（离心管开口保持朝离心机转轴方向放置），将管壁上的残余液体甩到管底部，小心倒去上清，用微量加样器将其吸干，一份样本换用一个吸头，吸头不要碰到有沉淀一面，室温干燥3 min，不能过于干燥，以免RNA 不溶。

C.3.2.7 加入11 μL DEPC水，轻轻混匀，溶解管壁上的RNA，2 000r/min离心5s，冰上保存备用。提取的RNA须在2h内进行PC扩增；若需长期保存须放置-70℃冰箱。

C.3.3 检测

C.3.3.1 扩增试剂准备

在反应混合物配制区进行。从试剂盒中取出相应的荧光RT-PCR反应液、Taq酶，在室温下融化后，2000r/min离心5s。设所需荧光RT-PCR检测总数为n，其中n为被检样品、阳性对照与阴性对照的和，每个样品测试反应体系配制如下：RT-PCR反应液15μL，Taq酶0.25μL。根据测试样品的数量计算好各试剂的使用量，加入到适当体积中，向其中加入0.25×n颗RT-PCR反转录酶颗粒，充分混合均匀，向每个荧光RT-PCR管中各分装15μL，转移至样本处理区。

C.3.3.2 加样

在样本处理区进行。在各设定的荧光RT-PCR管中分别加入上述样本处理中制备的RNA溶液各10μL，盖紧管盖，500r/min离心30s。

C.3.3.3 荧光RT-PCR检测

在检测区进行。将本标准中离心后的PCR管放入荧光RT-PCR检测仪内，记录样本摆放顺序。

循环条件设置：第一阶段，反转录42℃/30min；第二阶段，预变性92℃/3min；第三阶段，92℃/10s，45℃/30s，72℃/1min，5个循环；第四阶段，92℃/10s，60℃/30s，40个循环，在第四阶段每个循环的退火延伸时收集荧光。

试验检测结束后，根据收集的荧光曲线和Ct值判定结果。

C.4 结果判定

C.4.1 结果分析条件设定

直接读取检测结果。阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整，以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

C.4.2 质控标准

C.4.2.1 阴性对照无Ct值并且无扩增曲线。

C.4.2.2 阳性对照的Ct值应<28.0，并出现典型的扩增曲线。否则，此次实验视为无效。

C.4.3 结果描述及判定

C.4.3.1 阴性

无Ct值并且无扩增曲线，表示样品中无禽流感病毒。

C.4.3.2 阳性

Ct值≤30.0，且出现典型的扩增曲线，表示样品中存在禽流感病毒。

C.4.3.3 有效原则

Ct值>30.0的样本建议重做。重做结果无Ct值者为阴性，否则为阳性。

C.5 试剂盒的组成

C.5.1 试剂盒组成

每个试剂盒可做48个检测，包括以下成分：

裂解液 30 mL×1盒

DEPC水 1 mL×1管

RT-PCR反应液（内含禽流感病毒的引物、探针） 750 μL×1管

RT-PCR酶 1颗/管×12管

Taq酶 12 μL×1管

阴性对照 1 mL×1管

阳性对照（非感染性体外转录RNA） 1 mL×1管

C.5.2 说明

C.5.2.1 裂解液的主要成分为异硫氰酸胍和酚，为RNA提取试剂，外观为红色液体，于4℃保存。

C.5.2.2 DEPC水，用1%DEPC处理后的去离子水，用于溶解RNA。

C.5.2.3 RT-PCR反应液中含有特异性引物、探针及各种离子。

C.5.3 功能

试剂盒可用于禽类相关样品（包括肌肉组织、脏器、咽喉拭子、泄殖腔拭子、血清或血浆等）中禽流感病毒的检测。

C.5.4 使用时的注意事项

C.5.4.1 在检测过程中，必须严防不同样品间的交叉污染。

C.5.4.2 反应液分装时应避免产生气泡，上机前检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。RT-PCR酶颗粒极易吸潮失活，必须在室温条件下置于干燥器内保存，使用时取出所需数量，剩余部分立即放回干燥器中。

新城疫诊断技术规范

1 范围

本规范规定了新城疫（ND）样品采集与处理、临床诊断和实验室诊断的方法和技术要求。

本规范适用于新城疫的诊断与监测。

2 样品采集和处理

2.1 棉拭子样品：主要用于活禽的病原学诊断和监测，应包括咽喉和泄殖腔双拭子。在采集气管拭子时应带有可见的粘液，在采集泄殖腔拭子时应带有少许粪便。棉拭子应置于含有适当抗生素的等渗缓冲液（PBS 或生理盐水）中。处理时将棉拭子在缓冲液中充分混匀挤压后弃之，5000r/min 离心 5min 取上清作为处理好的样品尽快进行相关检测。

2.2 组织样品：主要用于病死禽的病原学监测，采集的病料以脑、肺脏、脾脏为主，也可采集其它病变组织。将病料与适量含抗生素的等渗缓冲液混合，充分研磨后制成 10-20% 的悬液，5000r/min 离心 5min 取上清作为处理好的样品尽快进行相关检测。

2.3 血清样品：主要用于免疫效果评估，从发病禽或健康禽采集全血，用常规方法分离血清进行抗体效价测定。

3 诊断标准

3.1 临床诊断指标

当禽出现以下部分或全部临床症状时，可作为初步诊断的依据之一：

- (1) 发病急、死亡率高；
- (2) 体温升高、精神沉郁、呼吸困难、食欲下降、嗦囊积液；
- (3) 粪便稀薄，呈黄绿色或黄白色；
- (4) 出现扭颈、翅膀麻痹等神经症状；
- (5) 免疫禽群出现产蛋下降。

3.2 病理诊断指标

当禽出现下列肉眼可见的病变时，可作为初步诊断的依据之一：

- (1) 全身黏膜和浆膜出血，以呼吸道和消化道最为严重；
- (2) 腺胃黏膜水肿，乳头和乳头间有出血点；
- (3) 盲肠扁桃体肿大、出血、坏死；
- (4) 十二指肠和直肠黏膜出血，有的可见纤维素性坏死病变；
- (5) 脑膜充血和出血；鼻道、喉、气管黏膜充血，偶有出血，肺可见淤血和水肿。

3.3 血清学诊断指标

血清样品中新城疫抗体效价达到 $4\log_2$ 及以上确定为抗体阳性。

3.4 病原学诊断指标

3.4.1 新城疫病毒分离呈阳性

3.4.2 分离到的新城疫病毒脑内接种致病指数（ICPI）大于或等于 0.7；

3.4.3 新城疫病毒 F2 蛋白 C 端（第 113-116 位）至少包括 3 个碱性氨基酸残基，F1 蛋白 N 端，即第 117 位氨基酸残基为苯丙氨酸（F）。

4 实验室诊断方法

4.1 病原学诊断

4.1.1 病毒分离与鉴定（附录 A）。

4.1.2 RT-PCR（见附录 B）

4.2 血清学诊断

血凝和血凝抑制试验（见附录 C）。

5 结果判定

5.1 可疑病例

出现 3.1 和 3.2 中所列举的部分或全部临床症状和病理变化。

5.2 疑似病例

符合 5.1，且检测到新城疫病毒特异性核酸。

5.3 确诊病例

符合 5.2, 分离到新城疫病毒且病毒 ICPI 不小于 0.7 或病毒 F2 蛋白 C 端 (第 113-116 位) 至少包括 3 个碱性氨基酸残基, F1 蛋白 N 端, 即第 117 位氨基酸残基为苯丙氨酸 (F)。

附录 A
(规范性附录)
新城疫病毒分离与鉴定

A.1 样品的选择和处理

A.1.1 用于病毒分离的样品包括新鲜采集的组织样品或棉拭子样品;

A.1.2 样品置于含抗生素的等渗磷酸盐缓冲液 (PBS) (pH7.0~pH 7.4), 抗生素视条件而定, 但组织和气管拭子保存液中应含青霉素(2000U/mL), 链霉素(2mg/mL); 卡那霉素(50μg/mL) 和制菌霉素(1000U/mL), 而粪便和泄殖腔拭子保存液抗生素浓度应提高五倍。加入抗生素后调 pH 值到 7.0~7.4。粪便和搅碎的组织, 应用含抗生素的 PBS 溶液制成 10%~20% (w/v) 的悬浮液, 在室温下静置 1~2h。将粪便或组织的悬浮液 4℃、3000g 离心 5min, 取上清液进行鸡胚接种。

A.2 鸡胚接种

用 1mL 注射器吸取上清液按每枚 0.2mL, 经尿囊腔接种至少 3 枚 (9~11) 日龄的 SPF 鸡胚, 接种后, 35℃~37℃ 孵育 3d~4d。18h 后每 8h 观察鸡胚死亡情况。

A.3 病毒收获

18h 以后死亡的和濒死的以及结束孵化时存活的鸡胚置 4℃ 冰箱 4h~24h 无菌采集尿囊液。

A.4 病毒鉴定

A.4.1 血凝试验(HA)

对于血凝试验呈阳性的样品采用新城疫标准阳性血清进一步进行血凝抑制试验。如果没有血凝活性或血凝效价很低, 则采用 SPF 鸡胚用初代分离的尿囊液继续传两代, 若仍为阴性, 则认为新城疫病毒分离阴性。血凝试验方法见附录 C。

A.4.2 血凝抑制试验 (HI)

采用新城疫标准阳性血清进行血凝抑制试验, 确认是否有新城疫病毒繁殖。血凝抑制试验方法见附录 C。

A.4.3 脑内接种致病指数 (ICPI) 测定

A.4.3.1 选择血凝效价高于 4log₂ 以上的新鲜感染尿囊液 (不超过 24h~48h, 细菌检验为阴性), 用无菌等渗缓冲液作 10 倍稀释;

A.4.3.2 脑内接种出壳 24h~40h 之间的 SPF 雏鸡, 共接种 10 只, 每只接种 0.05mL;

A.4.3.3 每 24h 观察一次, 共观察 8d;

A.4.3.4 每天观察并给鸡打分, 正常鸡记作 0, 病鸡记作 1, 死鸡记作 2 (每只死鸡在其死后的每日观察中仍记 2);

A.4.3.5 ICPI 是每只鸡 8d 内所有每次观察数值的平均数, 计算方法见公式 1。

$$ICPI = \frac{\Sigma_s \times 1 + \Sigma_d \times 2}{T} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

Σ_s ——8d 累计发病数;

Σ_d ——8d 累计死亡数;

T ——8d 累计观察鸡的总数。

附录 B
(规范性附录)
反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 试验

B.1 试剂

- (1) RNA 提取试剂 Trizol;
- (2) 氯仿;
- (3) 异丙醇;
- (4) 75%乙醇: 用 DEPC 水配制, -20 °C 预冷。

B.2 操作程序

B.2.1 样品的采集和处理

取 200 μ L 离心后的上清提取 RNA。也可选择含病毒的鸡胚尿囊液进行 RT-PCR 检测。

B.2.2 病毒核酸 RNA 的提取

RNA 提取应在样品制备区。应保证无细菌及核酸污染, 实验材料和容器应经过消毒处理并一次性使用。提取 RNA 时应避免 RNA 酶污染。同时设立阳性对照和阴性对照。可用 Trizol 提取核酸 RNA, 也可用其他商品化 RNA 提取试剂盒。采用 Trizol 提取 RNA 的操作步骤如下:

B.2.2.1 在无 RNA 酶的 1.5 mL 离心管中加入 200 μ L 待检样品, 后加入 1 mL Trizol, 震荡 20s, 室温静置 10min;

B.2.2.2 加入 200 μ L 氯仿, 颠倒混匀, 室温静置 10min, 12000r/min 离心 15 min;

B.2.2.3 管内液体分为三层, 取 500 μ L 上清液于离心管中, 加入 500 μ L 预冷 (-20°C) 的异丙醇, 颠倒混匀, 静置 10 min。12000r/min 离心 15 min 沉淀 RNA, 弃去所有液体 (离心管在吸水纸上控干);

B.2.2.4 加入 700 μ L 预冷 (-20°C) 的 75%乙醇洗涤, 颠倒 2~3 次混匀。12000r/min 离心 10min;

B.2.2.5 室温下干燥 10 min;

B.2.2.6 加入 40 μ L DEPC 水充分融解 RNA, -70°C 保存或立即使用。

B.2.3 配置 RT-PCR 反应体系

在样品处理区内由专人按下表给出的程序分步进行。注意只能在试剂准备区打开和配制试剂, 配制完毕后应及时将剩余试剂放回贮存区域。将适量的核酸样品小心加入装有反应液体的反应管内, 盖紧盖子并做好标记。参照表 1 中反应体系配置 RT-PCR 扩增。

表 1 RT-PCR 反应体系配置表

试剂	体积 (μ L)
无 RNA 酶灭菌超纯水	13.6
10 \times Buffer	2.5
dNTPs	2
RNase 抑制剂	0.5
AMV 反转录酶	0.7
Taq 酶	0.7
上游引物 P1	1
下游引物 P2	1
模板 RNA	3
总计	25

注: 上游引物 P1 的序列为 5'-ATGGGCYCCAGAYCTTCTAC-3', 下游引物 P2 的序列为 5'-CTGCCACTGCTAGTTGTGATAATCC-3'。

B.2.4 RT-PCR

按照表 1 中的加样顺序全部加完后, 充分混匀, 瞬时离心, 使液体都沉降到 PCR 管底。在每个 PCR 管中加入一滴液体石蜡 (约 20 μ L)。同时设立阳性对照和阴性对照。循环条件为:

第一阶段, 反转录 42°C/45min;

第二阶段, 预变性 95°C/3 min;

第三阶段, 94°C/30s, 55°C/30s, 72°C/45s, 30 个循环;

第四阶段, 72°C/7 min。

最后的 RT-PCR 产物置 4℃ 保存。

B.2.5 电泳

B.2.5.1 制备 1.5% 琼脂糖凝胶板；

B.2.5.2 取 5 μ L PCR 产物与 0.5 μ L 加样缓冲液混合，加入琼脂糖凝胶板的加样孔中；

B.2.5.3 加入 DNA 分子量标准；

B.2.5.4 盖好电泳仪，插好电极，5V/cm 电压电泳，30 min~40min；

B.2.5.5 紫外线灯下观察结果，凝胶成像仪扫描图片存档；

B.2.5.6 用分子量标准比较判断 PCR 片段大小。

B.3 结果判定

B.3.1 出现 0.5 Kb 大小左右的目的片段（与阳性对照大小相符，参见附录 C），而阴性对照无目的片段出现方可判为新城疫病毒阳性；

B.3.2 对于扩增到的目的片段，需进一步进行序列测定，从分子水平确定其致病性强弱。根据序列测定结果，对毒株 F 基因编码的氨基酸序列进行分析，如果毒株 F2 蛋白的 C 端有“多个碱性氨基酸残基”，F1 蛋白的 N 端即 117 位为苯丙氨酸，可确定为新城疫强毒感染。“多个碱性氨基酸”指在 113 位到 116 位残基之间至少有三个精氨酸或赖氨酸。

附录 C
(规范性附录)
血凝和血凝抑制试验

C.1 试剂

pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS)

1%鸡红细胞悬液

新城疫标准抗原

新城疫标准阳性血清

C.2 血凝试验

C.2.1 操作程序

C.2.1.1 取 96 孔 V 型微量反应板, 用微量移液器在 (1~12) 孔每孔加 0.025mL PBS;

C.2.1.2 吸取 0.025mL 病毒悬液加入第 1 孔中, 吹打 (3~5) 次充分混匀;

C.2.1.3 从第 1 孔中吸取 0.025mL 混匀后的病毒液加到第 2 孔, 混匀后吸取 0.025mL 加入到第 3 孔, 依次进行系列倍比稀释到第 11 孔, 最后从第 11 孔吸取 0.025mL 弃之, 设第 12 孔为 PBS 对照;

C.2.1.4 每孔再加 0.025mL PBS;

C.2.1.5 每孔加入 0.025mL 体积分数为 1%的鸡红细胞悬液;

C.2.1.6 振荡混匀反应混合液, 室温 20℃~25℃下静置 40min 后观察结果, 若环境温度太高, 放 4℃静置 60min。PBS 对照孔的红细胞成明显的钮扣状沉到孔底时判定结果。

C.2.2 结果判定

C.2.2.1 在 PBS 对照孔出现正确结果的情况下, 将反应板倾斜, 观察红细胞是否完全凝集。以完全凝集的病毒最大稀释度为其血凝效价;

C.2.2.2 如果没有血凝活性或血凝效价很低, 则采用 SPF 鸡胚用初代分离的尿囊液继续传两代, 若仍为阴性, 则认为新城疫病毒分离阴性;

C.2.2.3 对于血凝试验呈阳性的待检样品应采用新城疫标准阳性血清进一步进行血凝抑制试验。

C.3 血凝抑制试验

C.3.1 操作程序

C.3.1.1 根据血凝试验结果配制 4 单位抗原 (4HAU): 以能引起 100%血凝的病毒最高稀释倍数代表 1 个血凝单位, 4HAU 的配制方法如下: 假设抗原的血凝滴度为 1: 256, 则 4 HAU 抗原的稀释倍数应是 1:64(256 除以 4), 稀释时, 将 1mL 抗原加入到 63mL PBS 中即为 4HAU 抗原;

C.3.1.2 取 96 孔 V 型微量反应板, 用移液器在第 (1~11) 孔各入 0.025mL PBS, 第 12 孔加入 0.05mL PBS;

C.3.1.3 在第 1 孔加入 0.025mL 新城疫标准阳性血清, 充分混匀后移出 0.025mL 至第 2 孔, 依次类推, 倍比稀释至第 10 孔, 第 10 孔弃去 0.025mL, 第 11 孔为抗原对照, 第 12 孔为 PBS 对照;

C.3.1.4 在第 (1~11) 孔各加入 0.025mL 含 4 HAU 抗原, 轻叩反应板, 使反应物混合均匀, 室温下 (约 20℃~25℃) 静置不少于 30min, 4℃不少于 60min;

C.3.1.5 每孔加入 0.025mL 体积分数为 1%的红细胞悬液, 轻晃混匀后, 室温 (约 20℃~25℃) 静置约 40min, 若环境温度太高, 放 4℃静置 60min。当 PBS 对照孔红细胞呈明显钮扣状沉到孔底时判定结果。

C.3.2 结果判定

C.3.2.1 在 PBS 对照孔出现正确结果的情况下, 将反应板倾斜, 从背侧观察, 看红细胞是否呈泪珠状流下。滴度是指产生完全不凝集 (红细胞完全流下) 的最高稀释度。只有当阴性血清与标准抗原对照的 HI 滴度不大于 $2\log_2$, 阳性血清与标准抗原对照的 HI 滴度与已知滴度相差在 1 个稀释度范围内, 并且所用阴阳性血清都不发生自凝的情况下, HI 试验结果方判定有效;

C.3.2.2 在采用血凝抑制试验进行抗体效价测定时, 当 HI 抗体效价大于或等于 $4\log_2$ 时判定为新城疫抗体阳性;

C.3.2.3 采用血凝抑制试验对病毒进行鉴定时，病毒分离株尿囊液的 HA 效价应大于等于 $4\log_2$ ，且标准新城疫阳性血清对其 HI 效价大于等于 $4\log_2$ ，方可判为新城疫病毒阳性。对确定存在新城疫病毒繁殖的尿囊液应采用 ICPI 进一步测定其毒力。

马流感诊断技术规范

1 范围

本规范规定了马流感（EI）样品采集、临床症状和实验室诊断的方法和技术要求。

本规范适用于马流感的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

2.1 鼻拭子的采集和保存

将拭子伸入鼻部，采取深部鼻液，然后立即放入盛有 1-3mLPBS 的小瓶中。

2.2 血清样品

采集血液，每头不少于 5mL，无菌分离血清装入灭菌小瓶中，加盖密封后冷藏或冷冻保存。

2.3 采样记录及标签

样品的包装瓶上均要贴上标签，标明编号，并填写采样单。

2.4 样品运送

运输时样品容器与采样记录一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标志。

3 诊断

3.1 临床症状

3.1.1 病畜发热，体温上升至 39.5℃ 以上，稽留 1~5d，发病最初呈现频繁干咳，后期变为湿咳；

3.1.2 初期可流水样鼻液，后期可发展成脓性鼻液；

3.1.3 呼吸急促、脉搏频数，食欲降低，精神萎顿；

3.1.4 眼结膜充血水肿，流泪；

3.1.5 发热中常表现肌肉震颤，病畜因肌肉酸痛而不愿活动。

3.2 病原学指标

3.2.1 病毒分离试验阳性；

3.2.2 反转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）阳性；

3.2.3 实时荧光定量 RT-PCR 反应阳性。

3.3 血清学指标

3.3.1 血凝抑制试验（HI），康复期血清比发病初期 HI 抗体明显升高；

3.3.2 单向辐射溶血扩散试验（SRH）阳性，康复期血清比发病初期抗体明显升高。

3.4 结果判定

3.4.1 疑似马流感病例

符合 3.1。

3.4.2 确诊马流感病例

3.4.2.1 疑似病例，且至少符合 3.2 指标之一的；

3.4.2.2 疑似病例，且至少符合 3.3 指标之一的。

4 实验室诊断方法

4.1 病原学诊断方法

4.1.1 马流感病毒分离试验，见附录 A。

4.1.2 马流感病毒 RT-PCR，见附录 B。

4.1.3 马流感病毒实时荧光定量 RT-PCR，见附录 C。

4.2 血清学诊断方法

4.2.1 马流感血凝/血凝抑制试验，见附录 D。

4.2.2 马流感单向辐射扩散试验，见附录 E。

附录 A
(规范性附录)
马流感病毒分离试验

A.1 样品的选择

采集马匹的鼻拭子。

A.2 样品的处理

用青链霉素处理鼻拭子，低速离心，用 0.22mm 滤膜过滤，去除杂质和细菌。

A.3 样品接种

将滤液接种鸡胚或敏感细胞，如犬肾细胞 (MDCK)。

A.3.1 鸡胚接种

每份样品接种 3 个 10~11 日龄鸡胚，每胚经尿囊腔内注射 0.2 mL，34°C~35°C 孵化 2~3 天，收获尿囊液。

A.3.2 细胞培养

A.3.2.1 将 MDCK 细胞在细胞培养瓶或六孔板内长成单层。

A.3.2.2 每份接种 3 管，每管 0.25~0.5mL。

A.3.2.3 细胞培养物用含 0.5~2 μ g/mL 胰蛋白酶 (的无血清培养基维持，每天检查细胞病变 (CPE)。

A.4 血凝试验

A.4.1 在 U 型或 V 型血凝板孔中将尿囊液与等体积的 1% 鸡红细胞 PBS 悬液或 0.4% 豚鼠红细胞 PBS 悬液混合，检测血凝活性。

A.4.2 如果用鸡的红细胞，红细胞未被凝集时，将试管或反应板倾斜 70° 后，可见沉淀的红细胞在管底形成“流线”。

A.4.3 非凝集的豚鼠红细胞在管底形成钮扣状，需要较长的时间形成“流线”。

A.4.4 若无血凝价时，将各样品收获液收集在一起，再经鸡胚盲传。

A.4.5 将所有 HA 阳性的样品作小量等份分装在小玻璃瓶内，-70°C 冰箱内保存，并立即取其一份测定 HA 滴度。

A.4.6 滴度为 1:16 或更高，则分离物用亚型抗血清作进一步定型，滴度低，则要继续传代。

A.4.7 盲传至多 5 代。

A.4.8 选择最高稀释度呈 HA 阳性的样品作为种毒贮存。

附录 B
(规范性附录)
马流感病毒 RT-PCR 试验

B.1 引物

NP 基因的套式 PCR 引物:

NPF: 5'-AGCAAAAGCAGGGTAGATAA-3';

NPR: 5'-TCCTTGCATCAGAGAGCACA-3';

NPFI: 5'-GCAGGGTAGATAATCACTCA-3';

NPRI: 5'-AGTACCATCCTTTCTATTGT-3'。

M 基因的引物:

M52C: 5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACG-3';

M253R : 5'-AGGGCATTGTTGGACAAAG/TCGTCTA-3'。

B.2 病毒 RNA 的提取

使用商品化的试剂盒提取病毒 RNA。

B.3 反转录 (RT)

在离心管中加入 9 μ L 的病毒 RNA 提取物和 1 μ L 的 9x 随机引物或用于 PCR 试验的病毒特异性下游引物 1 μ L; 然后在 70 度变性 5min, 取出后置于冰上保存。离心后加入 5xFirst Strand buffer 4 μ L、0.1mol/L DTT 2 μ L、10mmol/L dNTP 1 μ L、RNA 酶抑制剂 1 μ L、Superscript II 反转录酶 1 μ L、无 RNA 酶的去离子水 1 μ L, 42 $^{\circ}$ C 反转录 1h, 最后 70 $^{\circ}$ C 灭活 10min, 将反转录产物取出后, 立即用于 PCR 试验或置于 -20 $^{\circ}$ 保存备用。

B.4 聚合酶链式反应 (PCR)

反应体系: 10xPCR buffer 2 μ L、2.5mmol/L dNTP 1 μ L、病毒特异性的上/下游引物各 1 μ L、反转录的 PCR 模板 2 μ L、Taq 酶 1U、去离子水 12.8 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 总延伸 10min。

针对 NP 的套式 PCR 反应, 外围 PCR 结束后, 取 2-4 μ L PCR 产物做模板, 用内侧引物对 (NPFI 和 NPFR) 进行 PCR 反应。

B.5 结果检测

将 PCR 产物取出之后, 取 9 μ L PCR 样品与 1 μ L 10xPCR 上样液混匀, 然后加入到已经配制号的 1% 的琼脂糖凝胶中, 用 1xTAE 作为凝胶电泳缓冲液, 电压设为 150v, 电流设为 100mA, 时间设为 20min。最后在紫外凝胶成像系统中观察成像结果。

B.6 结果判定

如果待检样品中含有 EIV, 则能够检测到病毒特异性的条带, 反之则没有。

B.6.1 针对 EIV NP 基因外侧的引物对 PCR 产物大小为 552bp;

B.6.2 针对 NP 基因内侧的引物对 PCR 产物大小为 241bp;

B.6.3 针对 M 基因的 PCR 产物大小为 244bp。

附录 C

(规范性附录)

马流感病毒实时荧光定量 RT-PCR 试验

C.1 引物

IVA-D161M: 5'-AGATGAGYCTTCTAACCGAGGTCG-3';

IVA-D162M: 5'-TGCAAANACATCYTCAAGTCTCTG-3';

probe IVA-MA: 5'-FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-TAMRA-3';

N (A, C, G 或 T) 或 Y (C 或 T)。

C.2 病毒 RNA 的提取

使用商品化的试剂盒提取病毒 RNA。

C.3 荧光定量 PCR 反应

一步法 RT-PCR 荧光定量试剂盒反应体系为: 2xqRT-PCR buffer 15 μ L、正向引物 (25pmol/ μ L)0.5-1 μ L、反向引物(25pmol/ μ L)0.5-1 μ L、荧光探针(25pmol/ μ L)0.2-0.5 μ L、RT-PCR MIX 2 μ L、RNA 样品或对照 2-4 μ L、DEPC 水加至终体积为 30 μ L。将反应管置于荧光 PCR 仪器上, 48 $^{\circ}$ C 反应 30min, 95 $^{\circ}$ C 10min; 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 60s, 共 45 个循环。

C.4 结果判定

- (1) 阳性对照扩增曲线呈标准的S形曲线, 且Ct值 \leq 35;
- (2) 阴性对照扩增曲线应为基线下的水平线, 且Ct值大于40;
- (3) Ct值35和40之间为可疑, 重新测定或换用其它方法复核检测。

附录 D
(规范性附录)
马流感血凝/血凝抑制试验

D.1 材料准备

D.1.1 1%鸡红细胞 (RBC) 悬液

D.1.2 血清的处理

马的血清中含有非特异性血凝抑制因子, 常用过碘酸盐的方法处理, 具体方法如下:

D.1.2.1 在 1 个体积 (50 μ L) 血清中加入 2 个体积 (100 μ L) 新配制的 0.016M 过碘酸钾 (0.38g/100mLPBS), 22 $^{\circ}$ C 作用 15min。

D.1.2.2 再加 1 个体积 (50 μ L) 的 3%甘油 PBS 中和过剩的高碘酸溶液, 22 $^{\circ}$ C 作用 15min。56 $^{\circ}$ C 水浴中灭活 30min。

D.1.3 病毒的处理

用做 HA-HI 试验的抗原应先用吐温 80、乙醚处理, 以破坏病毒的感染性和减少交叉污染的危险性, 尤其是对 H3N8 亚型马流感病毒, 如此处理还能提高其 HA 的活性。

D.1.3.1 40mL 病毒尿囊液中加入 0.5mL 10%的吐温-80 PBS, 使吐温-80 的终浓度为 0.125%。

D.1.3.2 室温条件下轻轻混合 5min 后, 加入 20mL 乙醚使终浓度为 33.3%, 充分混合后, 4 $^{\circ}$ C 静置 15min。

D.1.3.3 静置分层后, 将含已裂解的病毒粒子的液相移入一新的玻璃瓶中, 过夜挥发残留的乙醚。

D.1.4 单位抗原的配制

D.1.4.1 在微量血凝板第一排的各孔中加入 50 μ L PBS。

D.1.4.2 在第一孔中加入 50 μ L 病毒抗原, 按 1:2 逐级稀释, 一直到第 11 个孔, 弃掉 50 μ L, 最后 1 个孔做空白对照。

D.1.4.3 每孔加 50 μ L 1%RBC 悬液, 室温静置 30min。

D.1.4.4 结果判读: 病毒血凝单位 (HAU) 为 50%红细胞出现凝集的最高稀释倍数 (可将板倾斜至 70 度, 非凝集的红细胞向下“流淌”, 似泪流状)。将抗原稀释成含 4 个 HAU, 即只有前两个孔出现凝集。稀释倍数为血凝效价除以 4, 如滴定的 HAU 为 1: 256, 则稀释倍数为 $256 \div 4 = 64$, 即将病毒稀释 64 倍。

D.2 实验步骤

D.2.1 加 25 μ L PBS 于微量板各孔中。

D.2.2 分别加入处理好的阳性血清、阴性血清及待检样品于第一排 12 个孔中, 倍比稀释, 最后一孔不加血清做对照。

D.2.3 每孔中加 25 μ L 刚稀释好的 4 HAU 抗原, 室温作用 30min。

D.2.4 每孔加 50 μ L 1%鸡红细胞悬液, 室温作用 30min。

D.3 结果判定

将滴定板倾斜 70 度判读结果, 无凝集反应记录为阳性。HI 抗体滴度为微量板滴定的滴度乘以 4。

附录 E
(规范性附录)
马流感单向辐射扩散试验 (SRH)

E.1 试剂的制备

HEPES 缓冲液: 0.85% NaCl (4.25 g/500 mL); 0.05M HEPES(N-2-hydroxyethylpiperazine, N-2-ethanesulphonic acid; 5.95 g/500 mL); 0.02% sodium azide. 用 NaOH 调节成 pH 6.5。

HEPES/BSA 缓冲液:加入 0.2% (w/v) 牛血清白蛋白 (BSA)的 HEPES 缓冲液。

三氯化铬母液(2.25 M): 6 g/10 mL。用 0.85% NaCl 做 1/400 稀释使用。

PBS/PBS “A”: NaCl (10.00 g)、KCl (0.25 g)、Na₂PO₄ (1.45 g)、KH₂PO₄ (0.25 g)、叠氮钠(0.20 g), 用无离子水定容至 1L。

1%琼脂糖: 按比例用 PBS “A” 稀释琼脂糖, 高压煮沸后冷却至室温 22°C (± 2°C)储存。

病毒抗原: 含有病毒的尿囊液储存于-70°C。

绵羊血: 用等体积阿氏液稀释绵羊血, 4°C 保存两天后使用, 使用期可达 3 周。

补体: 可以用豚鼠制备或购买。

灭活血清: 未稀释的血清要经 56°C 灭活 30min。

E.2 试验程序

E.2.1 用盐水/HEPES 洗涤绵羊 RBC, 至少 3 次。

E.2.2 用盐水/HEPES 制备适当体积的 8%的 RBC, 可根据要用平板的个数计算, 每板大致 1 mL, 留出余额 1~2 mL。

E.2.3 加预定体积的病毒抗原到 8%RBC 溶液中, 混合物在 4°C 静置 10min, 此时可能会看到凝集现象。

E.2.4 取病毒/RBC 液总体积 1/2 量的三氯化铬工作液缓慢地加入病毒/RBC 混悬液中, 在 22°C 静置 5min, 偶尔摇动混合。

E.2.5 1500g 离心 5min, 沉积致敏的 RBC。

E.2.6 轻轻的再混悬于盐水/HEPES/BSA 中, 1500g 离心 5min。

E.2.7 用 PBS“ A”重悬浮 RBC 成 8%悬液。

在致敏过程中, 在压力消毒锅内溶化琼脂糖。临用前用吸管吸取 7.8mL 置于玻璃瓶内, 42°C 保温。用前检查琼脂糖是否冷至 42°C。

E.3 平板制备

E.3.1 加 0.9 mL 病毒致敏的绵羊 RBC 于 7.8 mL 42°C 的琼脂糖内, 快速轻轻的混合。

E.3.2 加 0.3mL 未稀释的豚鼠血清, 再次混合后加到放在水平桌面上的免疫反应板上。待凝固, 不加盖, 自然风干 5min。

E.3.3 风干后加盖, 并放在湿盒内置于 4°C 冰箱中保存备用。

E.3.4 用未致敏的红细胞, 或者用无关的流感病毒致敏的红细胞制备对照板, 以检查有无非特异性溶血现象。

E.3.5 将琼脂板放在打孔图上, 打 3mm 直径的孔, 打孔数以够 16 份被检血清和 1 份阳性对照血清用为准。在抗原对照板上准备 5 排, 每排打 8 个孔。

E.3.6 吸取 10 μ L 经加热灭活的被检血清和阳性对照血清加入相应的孔内, 在湿盒内于 34°C 孵育 20h。

E.3.7 测量溶血环直径, 扣除孔面积计算溶血环面积。

E.4 判定标准

测定溶血环直径, 试验结果可用 mm² 表示。

亨德拉病诊断技术规范

1 范围

本规范规定了马属动物亨德拉病毒（Henipavirus, HeV）病样品采集、临床症状、实验室诊断方法和技术要求。

本规范适用于马属动物亨德拉病毒病的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

HeV 属于生物安全四级病毒，可疑样品的采集需由专业实验室人员完成。处理和运输可能带有此类病毒的样品必须采取严格的生物安全防护措施。

2.1 样品采集

可采集淋巴结、脑、肺、肾、脾、肝及血清，在低温和密封状态下保存送检。

2.2 采样记录及标签

样品的包装瓶上均要贴上标签，标明编号，并填写采样单。

2.3 样品运送

运输时样品容器与采样记录一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标志。

3 诊断

3.1 临床症状

HeV 感染潜伏期为 7~14d。

3.1.1 病畜表现发热、萎靡不振、厌食、头颈部肿胀；

3.1.2 鼻内流出大量带泡沫的液体，有时带有少量血液；

3.1.3 出现严重的呼吸窘迫和共济失调。

3.2 病理变化

3.2.1 最常见淋巴结肿大；

3.2.2 严重的肺水肿和充血；

3.2.3 气管和支气管充满大量带泡沫的液体，有时呈淡红色。

3.3 血清学指标

3.3.1 酶联免疫吸附试验（ELISA）阳性；

3.4.2 血清中和试验（SNT）阳性。

3.4 病原学指标

3.4.1 病毒分离试验或动物接种试验阳性；

3.4.2 反转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）阳性。

3.5 结果判定

3.5.1 临床怀疑病例

符合 3.1、3.2 可判定为临床怀疑病例。

3.5.2 疑似病例

符合 3.5.1，且酶联免疫吸附试验（ELISA）、血清中和试验（SNT）任意一项检测阳性，可判定为疑似病例。

3.5.3 确诊病例

符合 3.5.1 或 3.5.2，RT-PCR 检测阳性，且扩增产物进行序列测定证实为亨德拉病毒 N 基因序列，可判定为确诊病例。

4 实验室诊断方法

4.1 病原学诊断方法

病毒分离试验，见附录 A。

荧光 RT-PCR 反应，见附录 B。

4.2 血清学诊断方法

4.2.1 酶联免疫吸附试验 (ELISA)，见附录 C。

4.2.2 血清中和试验 (SNT)，见附录 D。

附录 A
(规范性附录)
病毒分离试验

病毒分离必须在 BSL-4 实验室进行。

- A.1 用密闭的匀浆器处理含 10% (w/v) 组织样品的悬浮液，如在密闭的金属筒中用可以高压灭菌的金属球进行研磨，或者在罩/袋式匀浆器中用塑料袋进行研磨。
- A.2 样品磨碎后，300g 离心。
- A.3 将收取上清加入到培养的细胞单层中。非洲绿猴肾细胞 (Vero 细胞) 和兔肾细胞 (RK-13) 对亨德拉病毒敏感。
- A.4 细胞培养如在第 3 天出现细胞病变 (CPE)，判为阳性。
- A.5 如没有出现细胞病变，应该再盲传 2 次，每次培养 5 天，仍未出现 CPE，判为阴性。
- A.6 在低感染情况下，亨德拉病毒特征性 CPE 是细胞融合，经过 24—48h 培养，有些融合细胞可含有 60 个以上细胞核。

附录 B
(规范性附录)
反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR)

B.1 样品处理

在无菌环境中, 将采集的动物机体组织 (如脑、肺、肾、脾、肝) 置乳钵中, 剪碎, 用灭菌研磨器研磨。其它机体组织 (如淋巴结、扁桃体等) 除去包膜和结缔组织, 选取内部实质部分, 置研钵中, 剪碎进行研磨。再加 0.01mol/L PBS (pH7.6-7.8) 或 MEM (pH7.6-7.8) 制成 1: 5 的悬液。-20℃至-30℃冻融 3 次, 3000r/min 离心 10min, 取上清液提取总 RNA。

液体样品, 如血清和全血直接用于提取总 RNA。提取的 RNA 如果在 2h 内检测则于冰上保存, 否则置于-70℃冰箱保存。

B.2 试剂

商品化 RT-PCR 试剂盒。

B.3 引物和阳性对照

引物: N1433F: 5'-ATC-TCA-GAT-CCA-GAT-TAG-CTG-CAA-3'

N1572R: 5'-ATC-ATT-TTG-GGC-AGG-TTT-GG-3'

阳性对照:

阳性对照是体外转录的稳定 RNA, 含有 N1433F 和 N1572R 的对应的序列, 其序列为:

```
atctcagatccagattagctgcaaaggctatcaaagagagtactgcacagagctcatcggaaagaaacccacctaataaccgcctcaggca  
gactcaggaaggaagatgaccaggaacccaaacctgcccaaatgatttgactttgttagag
```

B.4 操作步骤

B.4.1 总 RNA 提取

用商品化 RNA 提取试剂盒, 方法步骤见试剂盒说明书。

B.4.2 一步法 RT-PCR

反应总体积 25μL。向 0.2 mL 扩增管中加入下列反应物:

- | | |
|---------------------------------|--------|
| (1) 2×1 Step Buffer | 12.5μL |
| (2) PrimeScript 1 Step Enzyme | 0.5μL |
| (3) 上游引物 (10pM) | 1μL |
| 下游引物 (10pM) | 1μL |
| (4) RNA | 2μL |
| (5) RNase FreedH ₂ O | 8μL |

每次检测设置标准阳性对照和标准阴性对照。标准阳性对照用阳性对照 RNA 作为模板, 而标准阴性对照用 DEPC 水作为模板。

B.4.3 扩增反应条件

50℃, 30 min; 95℃, 5 min; 94℃, 30sec; 56℃, 30sec; 72℃, 30sec; 35 个循环。72℃, 7 min 延伸。

B.4.4 1.5%的琼脂糖凝胶进行核酸电泳

B.4.5 结果判定

如果阳性对照的扩增产物大小约为 154bp, 阴性对照检测无任何扩增条带, 说明检测合格。受检样品电泳结果出现 139bp 的条带, 扩增产物进行序列测定, 如果样品序列为特异的亨德拉病毒 N 基因序列, 判定受检样品检测结果为亨德拉病毒核酸阳性。

附录 C
(规范性附录)
酶联免疫吸附试验 (ELISA)

C.1 试剂

C.1.1 包被抗原: HeV 全病毒

C.1.2 包被液: 0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液 (0.5mol/L Na₂CO₃ 10mL、0.5mol/L NaHCO₃ 90mL, pH9.6)

C.1.4 洗涤液 (PBST): 含 0.05%吐温-20 的 0.01mol/LPBS (pH7.4)

C.1.5 封闭液: 含 5%鸡血清和 5%脱脂奶粉的 0.01mol/L PBS (pH7.4)

C.1.6 底物: 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB, Sigma 公司, 目录号 T 3405)。

C.1.7 终止液: 1mol/L H₂SO₄

C.1.8 HeV 抗原制备

C.1.8.1 用含 10% (v/v) 胎牛血清 (FCS) 的 EMEM 培养 Vero 细胞直至长满, 倒掉培养液, 无菌 PBS 冲洗 3 次。

C.1.8.2 在 BSL4 实验室, 按照每个细胞 0.1 TCID₅₀ 的感染复数加入低代次、蚀斑纯化的 HeV, 使病毒液刚好覆盖瓶底。

C.1.8.3 33°C, 进行病毒吸附 30min。加入适量含 10% FCS 的 EMEM, 33°C 继续培养 48h。

C.1.8.4 用冷的 0.01M 的 PBS 冲洗细胞单层一次, 将细胞刮到 5-10mL 冷的 PBS 中。

C.1.8.5 4°C, 300g 离心 5min, 弃掉 PBS, 加入约 0.5mL 冰浴的 TNM (10mM Tris, 10mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, pH 7.2) 重悬细胞。

C.1.8.6 加入 10% (v/v) NP40 (乙基苯基聚乙二醇) 至其终浓度 1%。匀浆 5-10 次, 裂解细胞。

C.1.8.7 4°C, 600g 离心 10min 沉淀细胞核。

C.1.8.8 将上清液小心吸入干净试管, 加入 EDTA 使终浓度为 1.5 mM, 再加 TNE (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA/L, pH 7.2) 至 10mL。

C.1.8.9 用伽马射线照射 (6 千戈瑞), 小量分装, -80°C 保存。

C.1.9 对照抗原制备

用含 10%FCS 的 EMEM 培养 Vero 细胞, 至细胞长满。用冷的 PBS 冲洗一次, 将细胞刮到 5-10mL 冷的 PBS 中, 其余步骤同 HeV 抗原制备 C.1.8.5- C.1.8.9。

C.2 待检血清处理

此操作需在配有适当人员防护设备的 2 级或 3 级生物安全柜中进行。

C.2.1 在 96 孔板中, 用含 0.5%(v/v) Triton X-100 和 0.5%(v/v)吐温 20 的 PBS, 按 1:5 比例稀释待检血清, 密封 96 孔板。

C.2.2 实验人员穿戴防护服和手套, 用 1%卫康 (virkon) 冲洗的双手和密封的板, 取出该密封板, 56°C 加热 30min。

C.2.3 每份取 22.5μL, 与对照抗原 (对照抗原用 PBS 做 100 倍稀释) 等体积彻底混合, 18~22°C 作用 30min。

C.2.4 每份上述样品加入 405μL 封闭液, 使血清最终稀释至 100 倍, 18~22°C 作用 30min。

C.3 操作步骤

C.3.1 用包被液稀释对照抗原和 HeV 抗原。每一批抗原, 都应确定其合适的稀释度。按照下面方法向 96 孔板中加入 50μL 对照抗原或 HeV 抗原: 第 1、3、5、7、9、11 列加入 HeV 抗原, 第 2、4、6、8、10、12 列加入对照抗原。

C.3.2 37°C 震荡孵育 1h, 或 4°C 过夜。

C.3.3 用洗涤液 (250μL/孔) 洗板三次, 加入封闭液 (100μL/孔), 37°C 震荡 30min。

C.3.4 用洗涤液洗板三次,将处理好的待检样品加入 HeV 抗原包被孔和对照抗原包被孔,100 μ L/孔,每份样品各加两孔。在结合物孔和底物对照孔中加入 100 μ L 封闭液。37 $^{\circ}$ C 静置 1h,洗板三次。

C.3.5 用含 1%(w/v)脱脂奶粉的 PBST 稀释辣根过氧化物酶标记的 A/G 蛋白(Progen Biosciences, 目录号 32490),做 1: 50000 稀释。

C.3.6 每孔(底物对照孔除外)加 100 μ L 上述稀释液。底物对照孔加 100 μ L 含 1%脱脂奶粉的 PBST。37 $^{\circ}$ C 静置 1h,洗板四次。

C.3.8 以底物对照孔为空白对照,测定 450nmOD 值,计算每一份样品的 HeV 抗原包被孔 OD 值 (OD_{HeV}) 和对照抗原包被孔的 OD 值 (OD_{CON}) 之比 (OD_{HeV}/OD_{CON})。

C.3.9 结果判定

C.3.9.1 $OD_{HeV}/OD_{CON} > 2.0$, 并且 $OD_{HeV} > 0.2$, 判为阳性。

C.3.9.2 $OD_{HeV}/OD_{CON} > 2.0$, 并且 $OD_{HeV} < 0.2$, 判为阴性;

C.3.9.3 OD_{HeV}/OD_{CON} 在 2.0 和 2.2 之间,判为可疑。

C.3.9.4 可疑用 VNT 进一步检测。

附录 D
(规范性附录)
血清中和试验

D.1 材料准备

D.1.1 对照血清

亨德拉病毒中和抗体阴、阳性血清。

D.1.2 待检血清

待检血清经 56℃ 灭活 30 min。

D.1.3 病毒

亨德拉病毒适应于 Vero 细胞 PK-13 细胞。收获的病毒液测定滴度后，分装于小管，-70℃ 保存备用。

D.1.4 细胞

Vero 细胞或 PK-13 细胞，传代培养细胞形态良好。

D.1.5 细胞维持液和营养液

细胞维持液：Eagle's MEM 与含 5% 水解乳蛋白的 Earle's 液等量混合配成，pH7.6~7.8，在中和试验中作稀释液用。

细胞营养液：细胞维持液加 10% 犊牛血清，培养细胞用。

D.2 操作步骤

D.2.1 设置 4 种对照

每块培养板都必须设立下列对照：

- ✓ 阳性和阴性血清对照；
- ✓ 正常细胞对照：不接种病毒和血清的正常细胞对照；
- ✓ 病毒对照：接种病毒滴度 100 TCID₅₀。

每种对照至少设两个重复。细胞对照孔细胞生长良好，且病毒对照孔和阴性血清对照孔细胞产生病变，一定稀释度的阳性血清对照孔细胞生长良好，判为试验符合质量控制标准。

D.2.2 在培养板上，用细胞维持液将待检血清从 1:2 做系列倍比稀释，每份血清至少平行稀释 2 排孔，每孔 50 μL。在上述每孔中加入 50 μL 200 TCID₅₀ 的病毒液，封闭培养板，37℃ 温箱中和 1h。取出，每孔加入 50 μL 细胞悬液（100~150 万个细胞/mL），置 37℃ 5% CO₂ 温箱培养。对照孔体积不足 150 μL 时，用稀释液补全体积。

D.2.3 37℃ 培养 3d，观察细胞病变。

D.3 结果判定

被检血清孔 > 50% 细胞出现 CPE 判为阴性，≤ 50% 细胞出现 CPE 判为阳性。

用 Reed-Muench 法计算出能保护 50% 细胞不产生病变的血清最大稀释度，该稀释度即为该血清的中和抗体效价。

西尼罗河热诊断技术规范

1 范围

本规范规定了马属动物西尼罗河热（WNF）样品采集、临床症状和实验室诊断的方法和
技术要求。

本规范适用于马属动物西尼罗河热的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

2.1 组织样品

采取病畜脑、脊髓或鸟的脑、心、肝等组织样品，装入洁净的小瓶内，加盖密封，冷冻
保存。

2.2 血清样品

病畜血液，每头不少于 5mL，无菌分离血清装入灭菌小瓶中，加盖密封后冷冻保存。

2.2 采样记录及标签

样品的包装瓶上均要贴上标签，标明编号，并填写采样单。

2.3 样品运送

运输时样品容器与采样记录一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装
适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标志。

3 诊断

3.1 临床症状

3.1.1 鸟类感染后一般不出现临床症状，是病毒携带者。但北美毒株可引起大量乌鸦和蓝鸦
死亡。

3.1.2 绝大多数感染马匹不表现临床症状，发病马匹特别是患西尼罗河病毒性脑炎的马匹，
往往表现出共济失调、转圈等神经症状，此外还可见后肢软弱无力、不能站立、多肢麻痹、
肌无力、瞎眼、嘴唇垂落或者麻痹、磨牙以及急性死亡。有的病例出现发热。

3.2 病理变化

3.2.1 鸟类主要为心肌炎和脑炎病变。

3.2.2 马主要为脑炎及中枢神经系统出血、充血和水肿，脑脊髓液增多，单核细胞浸润，形
成胶质细胞结节。神经元变性坏死，形成软化灶，周围有淋巴细胞浸润和胶质细胞增生，形
成血管套。脑干和脊髓部病变最为严重。

3.3 血清学指标

3.3.1 竞争酶联免疫吸附法（cELISA）；

3.3.2 IgM-ELISA；

3.3.3 蚀斑减少中和试验阳性（PRNT）。

3.4 病原学指标

3.4.1 病毒分离试验阳性；

3.4.2 反转录套式聚合酶链反应阳性（RT-nPCR）；

3.4.3 实时荧光定量反转录-聚合酶链式反应（real-time RT-PCR）。

4 结果判定

4.1 临床怀疑病例

符合 3.1 和 3.2 之一的可判定为临床怀疑病例。

4.2 疑似病例

符合 4.1，且 3.3 检测阳性的可判定为疑似病例。

4.3 确诊病例

符合 4.2，且 3.4 检测阳性的可判定为确诊病例。

5 实验室诊断方法

5.1 病原学诊断方法

5.1.1 病毒分离，见附录 A；

5.1.2 反转录-复合套式聚合酶链式反应(RT-nPCR)，见附录 B；

5.1.3 实时荧光定量反转录-聚合酶链式反应 (real-time RT-PCR)，见附录 C。

5.2 血清学诊断方法

5.2.1 竞争酶联免疫吸附试验 (cELISA)，见附录 D；

5.2.2 IgM 捕获 ELISA，见附录 E；

5.2.3 空斑减少中和试验 (PRN)，附录 F。

附录 A
(规范性附录)
病毒分离试验

A.1 操作步骤

A.1.1 在无菌情况下，生物安全柜内研磨或匀浆处理受检样品。

A.1.2 样品磨碎后，3000g 离心，将上清抽滤后接种培养的 Vero 细胞或兔肾细胞 (RK-13)。

A.2 结果判定

A.2.1 WNV 感染细胞后，引起的细胞病变 (CPE) 特征是出现细胞融合现象。经过 24~48h，有些融合的细胞可含有 60 个以上的细胞核，并且融合细胞的细胞核分布在融合细胞的周围。如果没有出现 CPE，应该再盲传 2 次，每次培养 5d。

A.2.2 对病毒分离物的鉴定可以通过如下三种方法进行：一是使用病毒特异的单克隆抗体进行间接免疫荧光实验；二是进行病毒的核酸检测；三是进行病毒中和试验。

附录 B
(规范性附录)

反转录-套式聚合酶链式反应(RT-nPCR)

B.1 病毒 RNA 的提取

取 50-100mg 组织, 按照制作规程, 用 Trizol®试剂提取总 RNA。用每 100 μ L 含 10-100 组织培养感染量 (TCID₅₀) 的 WNV 对照种毒, 也提取总 RNA。

B.2 反转录和第一步 PCR

第一步引物

1401: 5'-ACC-AAC-TAC-TGT-GGA-GTC-3'

1845: 5'-TTC-CAT-CTT-CAC-TCT-ACA-CT-3'

B.2.1 将提取的 RNA 样品悬浮于 12 μ L 无核糖核酸酶水中;

B.2.2 70 $^{\circ}$ C 变性 10min;

B.2.3 将 2 μ L 每个变性 RNA 样品加到 48 μ L 含有的下成份的 RT-PCR 混合物中:

10mM Tris/HCl, pH8.3

50mM KCl

2.0mM MgCl₂

0.8mM dNTPs

25U M-MLV 反转录酶

1.25U RNA 酶抑制剂

1.25U Taq 酶

37.5 pmol 第一步 PCR 引物

用 2 μ L 无核糖核酸酶水作为模板设置空白对照。

B.2.4 反应管 45 $^{\circ}$ C 孵育 45min;

B.2.5 反应管 95 $^{\circ}$ C 孵育 11min;

B.2.6 经过 35 个循环进行 PCR 扩增;

95 $^{\circ}$ C 变性 30s,

55 $^{\circ}$ C 引物退火 45s,

72 $^{\circ}$ C 引物延伸 60s (第 35 循环, 引物在 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min)

B.2.7 将 PCR 产物置于 4 $^{\circ}$ C, 直到做第二步 PCR。

B.3 第二步 (巢式) PCR

第二步引物:

1485: 5'-GCC-TTC-ATA-CAC-ACT-AAA-G-3'

1732: 5'-CCA-ATG-CTA-TCA-CAG-ACT-3'

B.3.1 每份样品和对照, 将 1.5 μ L 的第一步扩增的产物加到 48.5 μ L 的 PCR 混合物中, PCR 混合物的成份为:

10mM Tris/HCl, pH8.3

50mM KCl

2.0mM MgCl₂

0.8mM dNTPs

1.25U Taq 酶

37.5 pmol 第二步 PCR 引物

B.3.2 反应管于 95 $^{\circ}$ C 孵育 11min,

B.3.3 经过 35 个循环进行 PCR 扩增:

95℃变性 30s,

55℃引物退火 45s,

72℃引物延伸 60s (第 35 循环, 引物在 72℃延伸 5min),

B.3.4 将第二步 PCR 产物置于 4℃或-20℃, 直到做电泳。

B.4 用凝胶电泳分析 PCR 产物

B.4.1 用 TAE 缓冲液 (见附录 B) 制备的 1.5% 的琼脂糖 (见附录) 溶液, 在热盘上或微波炉中煮, 直到琼脂糖完全融解, 将溶液冷却到 45℃~60℃, 每 100mL 温琼脂糖溶液加入 5.0μL 溴化乙锭溶液 (10mg/mL), 按上梳子, 倾倒琼脂糖凝胶, 待凝固后, 取出梳子。

B.4.2 将凝胶放于仪器中, 1×TAE 缓冲液 (见附录 B) 充满缓冲槽。

B.4.3 每个样品取 15μL 与 2μL 10×加样缓冲液 (见附录 B) 混匀, 并至少在 1 个孔中加上 DNA Marker。在 65~75 伏下电泳, 直到凝胶负载染料运行到大约为凝胶长度的 2/3 为止。

B.4.4 在紫外光照射下观察并照相。

B.5 结果判定

阳性对照出现 248bp 大小条带, 空白对照相应位置无条带出现, 该实验成立。如果样品检测到一条与阳性对照相同大小的带, 则样品被认为是阳性; 双份样品, 二者应出现相同的反应, 如果不一致, 应该用从原始的样品中提取 RNA 重做。如果需要进一步验证, 可对最后的嵌套 PCR 产物作序列分析, 并与来自 GenBank 中公布的 WNV 序列作比较。

附录 C
(规范性附录)

实时荧光定量反转录-聚合酶链式反应 (real-time RT-PCR)

C.1 RNA 提取

用商品化试剂盒进行RNA提取。

C.2 实时荧光定量 RT-PCR

C.2.1 试剂

C.2.1.1 无核酸酶灭菌水

C.2.1.2 荧光定量PCRmix (基础混合物)。

C.2.1.3 RNA酶抑制剂。

C.2.1.4 引物浓度为20pmol/μL:

引物 1

(上游引物) 1160-1180

5'-TCAGCGATCTCTCCACCAAAG-3'

引物 2

(下游引物) 1209-1229

5'-GGGTCAGCACGTTTGTTCATTG-3'

C.2.1.5 TaqMan探针浓度为10pmol/μL:

5'-(FAM)-TGCCCGACCCATGGGAGAAGCTC(TAMRA)-3'

C.2.2 扩增方法

C.2.2.1 最优反应条件为25μL体系, 各反应成分为:

10×PCR buffer	2.5μL
25mM MgCl ₂	2.0μL
25mM dNTPs	0.25μL
TaqDNA 聚合酶 5U/μL	0.25μL
10pM W II 上游引物 Ws2	1.0μL
10pM W II 下游引物 Wa2	1.0μL
10pM Wp	0.25μL
AMV	0.75μL
RNA 酶抑制剂	0.75μL
DEPC H ₂ O	14.25μL
RNA	2.0μL

C.2.2.2 将所有PCR管置于荧光定量PCR仪中, 按下列反应程序进行操作:

42°C 35:00min

95°C 02:00min

94°C 00:15min

58°C 00:45min



40 个循环

58°C时收集荧光信号，最后由软件自动生成荧光动力学曲线图。

C.3 结果判定

Ct>30.0 为阴性；Ct≤30.0 为阳性。

附录 D
(规范性附录)
竞争 ELISA

- D.1 WNV EII 抗原用 0.5M pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至 0.53 μ g/mL，每孔 100 μ L 加入 96 孔 ELISA 板。
- D.2 抗原包被的 ELISA 板 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。
- D.3 使用前，用含有 0.05%吐温 20 的 0.01M pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBST) 洗板 3 次，拍干。
- D.4 用 1%的明胶封板，每孔 200 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 2h，移去封闭液，并用 PBST 洗板 3 次，拍干。
- D.5 被检血清和对照血清用 PBST 作 1:10 稀释，每孔 50 μ L。D.6 每孔加入工作浓度的 WNV 特异性单克隆抗体 50 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。
- D.7 移去血清，并用 PBST 洗板 3 次，拍干。
- D.8 每孔加入工作浓度的兔抗鼠酶标二抗 100 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。
- D.9 每孔加入 TMB 显色液 100 μ L，室温避光孵育 15min。
- D.10 使用 2M 的 H₂SO₄ 终止反应。
- D.11 于 450nm 波长下读取酶标板的光吸收值 (OD 值)。
- D.12 结果判定

按照说明书计算阻断率。样品的阻断率小于 25%，则该样品为西尼罗河热抗体阴性；样品的阻断率大于 30%，则该样品为西尼罗河热抗体阳性；介于二者之间，为西尼罗河热抗体可疑，需重新进行检测，如果结果还是一样，建议两个周后再进行重检。

附录 E
(规范性附录)
IgM 捕获 ELISA 试验

E.1 试剂

西尼罗河热 IgM 捕获 ELISA 试剂盒 (商品化)。

E.2 操作步骤

E.2.1 待检血清和阴阳性对照使用样品稀释液 20 倍稀释, 分别加入酶标板的各反应孔中, 200 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。

E.2.2 使用洗液洗板 3 次, 将酶标板在吸附材料上轻拍, 除去剩余的洗涤液。

E.2.3 西尼罗河热抗原使用样品稀释液 1:1 稀释, 每孔加入 100 μ L, 并在室温孵育过夜 (16-20h)。

E.2.4 使用洗液洗板 3 次, 将酶标板在吸附材料上轻拍, 除去剩余的洗涤液。

E.2.5 酶标抗体用酶标抗体稀释液稀释 10 倍, 每孔加入 50 μ L, 室温孵育 30min。

E.2.6 使用洗液洗板 3 次, 将酶标板在吸附材料上轻拍, 除去剩余的洗涤液。

E.2.7 每孔加 100 μ L 底物溶液, 室温避光 15min。

E.2.8 每孔加入 100 μ L 终止液, 终止反应。

E.2.9 于 450nm 波长下读取酶标板的光吸收值 (OD 值)。

E.3 结果判定

阳性对照 OD 值 > 0.350, 阳性对照 OD 值/阴性对照 OD 值 > 3, 该检测结果成立。按照说明书计算 S/P。如样品 S/P \leq 35%, 则为西尼罗河热阴性; 如样品 S/P \geq 45%, 则为西尼罗河热阳性; 介于二者之间, 为西尼罗河热抗体可疑, 需重新进行检测或者使用其他方法进行检测。

附录 F
(规范性附录)
蚀斑减少中和试验 (PRN)

F.1 操作步骤

F.1.1 在试验前,血清在 56℃加热灭活 30min,并用培养基稀释,用含有 10%豚鼠补体的培养基制备病毒(每 0.1mL 含 200PFU)的工作稀释度。

F.1.2 病毒和血清等体积混合,在 37℃孵育 75min 后取 0.1mL 接种到融合的单层细胞培养物上。

F.1.3 接种物于 37℃吸附 1h,随后加 4mL 初次覆盖培养基。

初次覆盖培养基由分别制备的两种溶液组成。

溶液 I 含有无酚红的 2 倍 Earle's 基础盐溶液,4%胎牛血清,100μg/mL 庆大霉素和 0.45% 碳酸氢钠。由 2% Noble 琼脂组成的溶液 II 灭菌后保持在 47℃,将等体积的溶液 I 和 II 调整到 47℃,并在使用前混合到一起。

F.1.4 37℃培养 72h。

F.1.5 将 4.0mL 上所述制备的初次覆盖培养基加 0.003%中性红的第二次覆盖培养基加到每一个扁瓶中

F.1.6 37℃培养过夜,然后确定每个扁瓶的病毒空斑数。终点滴度是依据与出现大约 100 个空斑的病毒对照瓶比较减少 90%。

F.2 结果判定

双份血清样品(急性期和康复期)的中和效价有 4 倍或更大的差异。

伊氏锥虫病（苏拉病）诊断技术规范

1 范围

本规范规定了马属动物伊氏锥虫病（苏拉病）样品采样、临床症状和实验室诊断的方法和技术要求。

本规范适用于马属动物伊氏锥虫病（苏拉病）的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

2.1 从耳静脉或尾静脉采取外周血，从颈静脉或其他大静脉采取深部血液。

2.2 毛细管集虫检查，从动物耳静脉或尾静脉穿刺获得血液。先用酒精棉擦净拟采血处皮肤，风干后用针头穿刺血管，血流出时用毛细管吸入40mm（即70 μ l血），封闭未沾染血的另一端（可用塑泥或火焰加热封闭）。

2.3 血清样品

采集病畜血液，每头份至少 5mL，无菌分离血清装入灭菌小瓶中，加盖密封后冷藏或冷冻保存。

2.4 采样记录及标签

样品的包装瓶上均要贴上标签，标明编号，并填写采样单。

2.5 样品运送

2.5.1 在 24h 内送抵实验室，样品放在 4℃左右的容器中运送，否则冷冻运送。

2.5.2 运输时样品容器与采样记录一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标志。

3 诊断

3.1 临床症状

3.1.1 潜伏期 5~11d；

3.1.2 体温升高到 40℃以上，稽留数天，然后经短时间的简写，再度发热；

3.1.3 呼吸急促，脉搏加速，尿量减少，尿色深黄而黏稠；

3.1.4 精神沉郁，食欲减退，逐渐消瘦；

3.1.5 被毛干枯，粪便干燥。

3.2 病原学指标

血涂片发现锥虫。

3.3 血清学指标

3.3.1 卡片凝集试验阳性

3.3.2 酶联免疫吸附试验阳性。

3.4 结果判定

3.4.1 疑似伊氏锥虫病。

符合 3.1。

3.4.2 确诊伊氏锥虫病

3.4.2.1 疑似病例，且符合 3.2；

3.4.2.2 疑似病例，且至少符合 3.3 指标之一的。

4 实验室诊断方法

4.1 血清诊断

4.1.1 伊氏锥虫病卡片凝集试验（CATT），见附录 A。

4.1.2 酶联免疫吸附试验（ELISA），见附录 B。

4.2 病原诊断

伊氏锥虫涂片镜检，见附录 C。

附录 A
(规范性附录)
伊氏锥虫卡片凝集试验 (CATT)

A.1 CATT 抗原的前处理

A.1.1 将 2.5mL CATT 缓冲液加入到一瓶冻干的 CATT 抗原中;

A.1.2 立即迅速地将上述液体和抗原混匀;

A.1.3 于上述瓶上安上一个漏斗待用。

A.2 对照试剂的前处理

A.2.1 将 0.5mL CATT 缓冲液分别加到阳性对照和阴性对照的瓶中, 并立即迅速地混匀;

A.2.2 于上述瓶上安上一个漏斗待用。

A.3 样品准备

A.3.1 用 CATT 缓冲液将待检血清进行 1:4 或者 1:8 稀释。

A.4 试验方法

A.4.1 用移液枪将 25ul 稀释完毕的血清加到卡上测试圈内;

A.4.2 将一滴混匀了的 CATT 抗原加入到每个测试圈内。

A.4.3 用一个塑料搅拌棒将测试圈内的被检血清和抗原混匀并涂抹成圆形, 这个圆的外围里测试圈大约 1mm 左右。每次搅拌完后将搅拌棒擦拭干净。

A.4.4 将卡片放在漩涡仪上, 以 70rpm 转 5min 左右, 直接在漩涡仪上进行读取卡片上的结果。

注意: 为了防止卡上的液体蒸发, 需要在漩涡仪上盖上盖子。

A.5 结果判定

5min 内出现肉眼可见凝集现象的判为阳性, 无凝集现象的判定为阴性。阳性判定标准为:

++++ 乳胶全部凝集, 呈絮状团块, 漂浮于清亮的液滴中;

+++ 大部分乳胶凝集成小颗粒, 液滴微见混浊;

++ 约半量乳胶凝集成细小颗粒, 液滴混浊;

+ 仅少量乳胶凝集成肉眼微细小颗粒, 液滴混浊;

- 全部乳胶呈均匀的乳状。

附录 B
(规范性附录)
酶联免疫吸附试验 (ELISA)

- B.1 试验前, 将冰冻或冻干抗原用新鲜配制的 0.01mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.6), 稀释或恢复原体积, 在酶标板上每孔内加入 100 μ L, 放 4 $^{\circ}$ C 下过夜或 37 $^{\circ}$ C 下 1d。
- B.2 将孔内过多的抗原弃掉, 将板用 PBST 冲洗, 风干后加入 PBST 稀释的血清 100 μ L。
- B.3 将反应板在 37 $^{\circ}$ C 下孵育 30min, PBST 冲洗 3 次。
- B.4 加入用 PBST 适当稀释的特异性结合的抗球蛋白。
- B.5 将板 37 $^{\circ}$ C 温育 30min, PBST 冲洗 3 次。
- B.6 用于过氧化物酶结合物的显色底物溶液很多如 TMB、ABTS 和 OPD。
- B.7 将底物显色液 100 μ L 加进反应板, 室温孵育 15~20min。
- B.8 加 1M 硫酸 50 μ L, 中止反应, 对 TMB 底物来说, 应在 450nm 处读取吸光值。其它色原则需要不同波长。所有试验必须包括已知强和中度阳性、阴性血清对照和缓冲液对照。

附录 C
(规范性附录)
伊氏锥虫涂片镜检

C.1 常用现场试验方法

C.1.1 采样

C.1.1.1 必须同时采自外周血管和深部血管中的血液用于检验。

C.1.1.2 外周血可通过耳静脉或尾静脉穿刺获得，深部血则可用注射器从较大的静脉抽取。

C.1.2 新鲜血片检查

在干净载玻片上滴一小滴鲜血，盖上盖玻片，使血液扩散成为细胞单层，再用光学显微镜观察活动的锥虫。

C.1.3 厚血膜染色检查

在载玻片中央滴一大滴血，用牙签或另一载玻片角旋转摊开，使直径达 1~1.25cm。晾干 1h 以上，直接用姬姆萨液染色 25min，冲洗后，用光学显微镜高倍观察。

C.1.4 薄血膜染色检查

将一小滴血放在清洁载玻片一端约 20mm 处，按常用方法推成薄血膜，迅速风干，用甲醇固定 2min，干燥后，再加姬姆萨液染色 25min，倾去染色液，自来水冲洗，干燥待检。另一双染色方法为：该血膜先加梅一格鲁沃尔德染液色 2min，然后加等量 PBS，3min 后倾去，再用姬姆萨液染色 25min，然后倾去染液，自来水冲洗，凉干。两种血片用高倍显微镜检查。

C.1.5 淋巴结活组织检查

从肩胛骨前或股前淋巴结取样，通过触摸选定适当的淋巴结后，用酒精清洗术部，用适当型号的针头刺入淋巴结内，将淋巴结内容物抽进注射器，然后滴到载玻片上，加上盖玻片，像新鲜血片一样进行检查。

C.2 浓缩法

伊氏锥虫使大多数宿主表现为轻微临床症状或亚临床带虫感染状态，呈低虫血症而不易发现虫体。因此，需要采用浓缩法。

C.2.1 血细胞压积离心法

C.2.1.1 用肝素处理过的毛细管采血 70 μ L，将未沾染血液的一端封闭，封闭端朝下，3000g 离心 10min。

C.2.1.2 将两片玻璃粘贴在一载玻片上，毛细管放在其间，将一盖玻片压在锥虫浓集的棕黄层边界，并在这部分毛细管周围充满水或显微镜油，然后用显微镜检查棕黄层。

C.2.2 暗视野/相差技术

毛细管采取血样，离心同上。将毛细管在棕黄层下 1mm 处用砂轮划痕切断，将其部分内容物加到载玻片上，盖上盖玻片，在暗视野、相差或普通光源下检查。

C.2.3 溶血技术

C.2.3.1 新鲜血膜澄清法

C.2.3.1.1 取 10 μ L 血滴于载玻片上。

C.2.3.1.2 再用接种环加入 10 μ L SDS 溶液，轻轻混合，覆以盖玻片。

C.2.3.1.3 立即用低倍镜下观察。

C.2.3.2 溶血离心法

C.2.3.2.1 用吸管或注射器取 SDS 液 9 份放入普通试管中，然后用吸管吸取 1 份血样，准确放在 SDS 溶液表面，快速完全混合，尽量防止泡沫出现，以免破坏虫体。静置 10min，使血球充分溶解。

C.2.3.2.2 将以上混合液体倒入锥形离心管，500g 离心 10min。用洁净的吸管尽可能将上清液吸去，注意不要搅动沉淀物。再换用较细尖的吸管将上清液尽量吸净，留下 10~20 μ L 沉淀物于管底，小心地将其全部收集放在载玻片上，加盖玻片，立即在低倍镜下检查整个制片。

马梨形虫诊断技术规范

1 范围

本规范规定了马梨形虫病样品采集、临床症状和实验室诊断的方法和技术要求。
本规范适用于马梨形虫病的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

2.1 样品的采集

2.1.1 涂片

马匹病畜表皮毛细血管或急性发病期的器官抹片。

2.1.2 血清

采集血液，每头不少于 5mL，无菌分离血清装入灭菌小瓶中，加盖密封后冷藏或冷冻保存。

2.2 采样记录及标签

样品的包装瓶上均要贴上标签，标明编号，并填写采样单。

2.3 样品运送

如样品在 24h 内送抵实验室，则可放在 4℃左右的容器中运送，或将样品冷冻运送。运输时样品容器与采样记录一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标志。

3 诊断

3.1 临床症状

3.1.1 病畜体温升高，精神不振，食欲减退，结膜充血或稍黄染；

3.1.2 随后体温逐渐升高，呈稽留热，呼吸、心跳加快，精神沉郁，低头耷耳，皮温不整，躯体末梢发凉；

3.1.3 食欲大减，饮水量少，口腔干燥发臭；

3.1.4 突出症状是黄热；

3.1.5 有时四肢末端轻度水肿。

3.2 病原学指标

血液抹片染色发现虫体。

3.3 血清学指标

3.3.1 补体结合试验（CF）阳性；

3.3.2 间接免疫荧光试验（IFA）阳性；

3.3.3 酶联免疫吸附试验（ELISA）阳性；

3.3.4 间接荧光抗体（IFA）试验阳性；

3.3.5 竞争酶联免疫吸附试验（C-ELISA）阳性。

3.4 结果判定

3.4.1 疑似马梨形虫病

符合 3.1。

3.4.2 确诊马梨形虫病

3.4.2.1 疑似病例，且符合 3.2；

3.4.2.2 疑似病例，且至少符合 3.3 指标之一的。

4 实验室诊断方法

4.1 病原学诊断方法

马梨形虫病原检测方法，见附录 A。

4.2 血清诊断方法

4.2.1 马梨形虫病间接免疫荧光试验 (IFA), 见附录 B。

4.2.2 马梨形虫病酶联免疫吸附试验 (ELISA), 见附录 C。

4.2.3 马梨形虫病补体结合试验 (CF), 见附录 D。

附录 A
(规范性附录)
马梨形虫病原检测方法

A.1 薄血膜的制作

在洁净玻片近左端滴 1 滴血液，用推片沾取少量血液，从载片近右端处涂一薄的血膜，空气干燥后，用甲醇固定 1min，再用 10%姬姆萨染液染色 20min~30min，刚涂好的血片应尽快染色，以确保良好的染色质量。

A.2 厚血膜的制作

于洁净的载玻片上滴 1 小滴血液（约 50 μ L），风干后 80 $^{\circ}$ C 加热固定 5min，然后用 5%姬姆萨染液染色 20min~30min。

A.3 脏器涂片的制作

用 1 块洁净的玻片轻触脏器的新鲜切面，或者以 2 块洁净的玻片轻轻夹住 1 小块组织，纵向推压玻片使两玻片都留下 1 层组织。待涂片风干后，用甲醇固定 5min，再用 10%姬姆萨染液染色 20min~30min。

A.4 淋巴液涂片的制作

将抽取的淋巴液推至载玻片上，再用针头抹开，制成涂片。待涂片风干后，用甲醇固定 5min，再用 10%姬姆萨染液染色 20min~30min。

A.5 血液浓集检查

取一离心管，加入抗凝血 6mL~7mL，充分混合，500r/min 离心 5 min。用吸管吸取接近红细胞层的黄色血浆 2mL~3mL 到另一个离心管中，以 2000r/min 的速度离心 40min，弃去上层液体，用沉淀制备涂片，风干后 80 $^{\circ}$ C 加热固定 5min，然后用 5%姬姆萨染液染色 20min~30min。

A.6 涂片虫体大小的显微测量

使用目镜测微计和镜台测微计进行虫体大小的显微测量。

A.7 染色涂片虫体的镜检

用 8 倍以上目镜和 60 倍以上物镜，在油浸下检查染色涂片，先用低倍镜对血膜整体观察一下，梨形虫具有明晰而纤细的轮廓，有淡蓝色的浆和红紫色的染色质。镜检时，观察一个红细胞内的虫数，虫体在红细胞内的位置，虫体的大小、形态、染色质块的数目，同时观察红细胞染虫率的高低。至少观察 100 个视野。

A.8 结果判定

A.8.1 马巴贝斯虫：裂殖子相对较小长度小于 2mm~3mm，一般不超过红细胞的半径，呈圆形或阿米巴样，通常 4 个裂殖子在起，形成四联体或“马尔他十字”排列。

A.8.2 弩巴贝斯虫：红细胞内的裂殖子呈梨状，长 2mm~5mm，一般大于红细胞半径，直径 1.3mm~3mm。其特征是成对裂殖子的后端相连。

附录 B
(规范性附录)
马梨形虫病间接免疫荧光试验 (IFA)

B.1 抗原制备

- B.1.1 采集自高虫血症马匹的血液，收集于 235mL 磷酸盐缓冲液 (pH7.2) 中。
- B.1.2 用预冷 PBS 洗涤红细胞 3 次，每次离心后弃去上清液和白细胞层。
- B.1.3 最后一次洗涤结束之后，沉积红细胞用 PBS 配置的 4% 牛血清白蛋白 V 片段重悬至初始体积，即初始沉积红细胞体积为 30%，则红细胞占 1/3。如果初始红细胞体积为 15mL，那么 5mL 沉积红细胞加 10mL 4% 牛血清白蛋白 PBS 液组成抗原。
- B.1.4 充分混匀之后，用加样器或注射器取该抗原加入玻璃板备用孔内，或者让细胞液在载玻片上均匀扩散，厚度适宜地覆盖整个载玻片。
- B.1.5 自然干燥，用软纸包裹并密封于所料袋内或铝箔包裹，-20℃ 贮存可长达一年时间。

B.2 试验程序

- B.2.1 每一血清样品用弩巴贝斯虫和马泰勒虫两种抗原检测。
- B.2.2 从-20℃ 取出冷冻保存的抗原玻片，37℃ 孵育 10min。
- B.2.3 打开包装取出抗原抹片，用冷的丙酮固定 1min。预固定的抗原玻片已经商品化。
- B.2.4 如果整个玻片表面已准备好抹片，用指甲油或快速干燥封固剂将抗原抹片分成小方格。
- B.2.5 试验时，阳性和阴性对照血清用 PBS 液从 1:80 至 1:1 280 依次稀释，每次试验设阴性和阳性对照。
- B.2.6 向孔中或抗原抹片玻片不同方块中滴加适宜稀释度的血清，37℃ 孵育 30min，用 PBS 液洗涤数次，最后水洗 1 次。
- B.2.7 异硫氰酸荧光素标记的兔抗马免疫球蛋白用 PBS 稀释并加到抹片上，孵育和洗涤条件同前。
- B.2.8 最后一次洗涤后，滴加两滴 50% 甘油 PBS 液于每一个抹片上，加盖玻片封固。

B.3 结果判定

镜检玻片，查发荧光的虫体。1:80 或以上稀释的血清出现强荧光时，判为阳性。同时，也应该注意阴性和阳性对照的荧光形式。

附录 C

（规范性附录）

马梨形虫病酶联免疫吸附试验（ELISA）

C.1 试验程序

C.1.1 用抗原包被缓冲液稀释的马泰勒虫抗原或弩巴贝斯虫抗原包被微量滴定板，每孔 50 μ L。标准血清学滴定技术确定使用稀释度。反应板用密封胶带密封，4 $^{\circ}$ C 放置过夜，尔后冻存于-70 $^{\circ}$ C。反应板可以在-70 $^{\circ}$ C 存放达 6 个月。

C.1.2 抗马泰勒虫或抗弩巴贝斯虫的第一抗体和过氧化物标记的第二抗体在应用 C-ELISA 时按照制造商说明用稀释抗体的缓冲液进行稀释。

C.1.3 室温下解冻反应板，倾掉包被液，用 C-ELISA 洗涤液洗涤反应板两次。

C.1.4 在 50 μ L 血清加入到反应孔之前，对照血清和试验用血清样品用等体积血清稀释液稀释。每一个未知血清样品单孔或重复孔测定。阳性对照血清和空白反应孔重复孔测定而阴性对照则在反应板的不同部位设三个重复。反应板在室温下在湿盒中加盖孵育 30min，用 C-ELISA 洗涤液洗涤三次。

C.1.5 所有反应孔中每孔加入 50 μ L 稀释的抗马泰勒虫或抗弩巴贝斯虫单抗的第一抗体。反应板在室温下在湿盒中加盖孵育 30min，用 C-ELISA 洗涤液洗涤三次。

C.1.6 每孔中加入稀释的鼠抗 IgG 过氧化物酶结合物第二抗体。反应板在室温下在湿盒中加盖孵育 30min，用 C-ELISA 洗涤液洗涤三次。

每孔中加入 50 μ L 发色底物，在颜色产生过程中反应板室温孵育 15min。

C.1.7 所有孔中加入 50 μ L 终止液终止反应，立即在读板器上读数。

C.1.8 在 620, 630 或 650nm 波长下读板。所有阳性对照和空白孔的重复孔计算平均 OD 值。对于有效检测，阴性对照的平均值产生的 OD 值必须为 >0.300 和 <2.000。阳性对照血清平均值须产生 $\geq 40\%$ 的抑制。

C.1.9 抑制率（% |）按照下面公式计算： $\% | = 100 - [(样品 OD \times 100) \div (阴性对照平均 OD)]$ 。

C.2 结果判定

检测样品得到 $\geq 40\%$ 的抑制率判为阳性，检测样品得到 <40% 的抑制率判为阴性。

附录 D
(规范性附录)
马梨形虫病补体结合试验

D.1 材料与试剂

D.1.1 溶液

D.1.1.1 阿氏液;

D.1.1.2 巴比妥缓冲液。

D.1.2 抗原制备

D.1.2.1 虫血症高峰期时采血。当红细胞沉到瓶底时移去上层的血浆/阿氏液和血沉棕黄层,收集下层的红细胞。用冷的巴比妥缓冲液洗涤红细胞几次,然后破碎红细胞。将血细胞裂解物经过 30 000g 离心 30min 后,收集抗原。

D.1.2.2 收集的抗原用冷巴比妥缓冲液 20 000g 离心 15min 洗涤几次。加入聚乙烯吡咯烷酮 40000 作为稳定剂,在磁力搅拌器上混合 30min,经两层厚的无菌纱布过滤,分装成 2mL 并冷冻干燥。

D.2 试验程序

D.2.1 每批抗原的特异性和效价应该用已知特异性和效价的标准抗血清进行检测。最适抗原稀释度也用初步棋盘滴定法测定。

D.2.2 待检血清 58℃ 灭活 30min (驴和骡血清 62.5℃ 灭活 35min),作 1:5~1:5120 稀释后进行检测。稀释液为巴比妥缓冲液。所有稀释均用巴比妥缓冲液。

D.2.3 制备补体并用分光光度计测定滴度确定 50%溶血剂量,以 5 倍的量用于试验。溶血体系组成由等量的 2%绵羊红细胞悬浮液和巴比妥钠缓冲液稀释的 5 个最小溶血剂量的溶血素。有些实验室采用 2 个 100%溶血剂量,具有同样的敏感性。

D.2.4 该试验适合于微量滴定板。试验的总体积是 0.125mL,由等量抗原,补体和稀释的血清。37℃ 孵育 1h。

D.2.5 加入双份溶血体系,反应板震荡 20min 之后在 37℃ 进一步孵育 45min。镜面阅读之前,反应板 200g 离心 1min。

D.3 结果判定

50%红细胞溶解判为阳性反应,引起 50%红细胞溶解的血清最高稀释度为血清效价。血清效价达 1:5 的定为阳性。每次检测必须包括一套对照以及正常马红细胞制备的对照抗原。

日本脑炎诊断技术规范

1 范围

本规范规定了马属动物日本脑炎样品采集、临床症状和实验室诊断的方法和技术要求。
本规范适用于马属动物日本脑炎的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

2.1 组织样品

一般取脑纹状体、脑皮质或丘脑，或取脊髓和血液，于4℃保存或送检。

2.2 血清样品

采集血液，每头不少于 5mL，无菌分离血清装入灭菌小瓶中，加盖密封后冷藏或冷冻保存。

2.3 采样记录及标签

样品的包装瓶上均要贴上标签，标明编号，并填写采样单。

2.4 样品运送

运输时样品容器与采样记录一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标志。

3 诊断

3.1 临床症状

3.1.1 病初体温短期升高，可视粘膜潮红或轻度黄染，精神不振，头下垂，驻立于暗处，常打呵欠，食欲减退，肠音稀少，粪球干小；

3.1.2 视力和听力减退或消失，针刺反应减弱，常有阵发性抽搐；

3.1.3 有的病马以沉郁为主，表现呆立不动，低头垂耳，眼半开半闭，常出现异常姿势，后期卧地昏迷；

3.1.4 有的病马以兴奋为主，表现狂暴不安，乱冲乱撞，攀登饲槽，后期衰弱倒地，四肢划动；

3.1.5 有的病马沉郁与兴奋症状交替出现；

3.1.6 还有的病马主要表现后躯的不全麻痹症状，步行摇摆，容易跌倒，甚至不能站立。

3.2 病原学指标

3.2.1 病毒分离阳性；

3.2.2 实时荧光定量 RT-PCR 试验阳性；

3.3 血清学指标

3.3.1 间接酶联免疫吸附试验阳性；

3.3.2 病毒中和试验阳性；

3.3.3 血凝抑制试验阳性。

3.4 结果判定

3.4.1 疑似日本脑炎

符合 3.1。

3.4.2 确诊日本脑炎

3.4.2.1 疑似病例，且至少符合 3.2 指标之一的；

3.4.2.2 疑似病例，且至少符合 3.3 指标之一的。

4 实验室诊断方法

4.1 病原学诊断方法

4.1.1 日本脑炎病毒分离方法，见附录 A；

- 4.1.2 日本脑炎实时荧光定量 RT-PCR 方法，见附录 B。
- 4.2 血清学诊断方法
 - 4.2.1 日本脑炎病毒抗体酶联免疫吸附试验，见附录 C；
 - 4.2.2 日本脑炎病毒中和试验，见附录 D；
 - 4.2.3 日本脑炎血凝抑制试验，见附录 E；
 - 4.2.4 日本脑炎补体结合试验（CF），见附录 F。

附录 A
(规范性附录)
日本脑炎病毒分离方法

A.1 材料与试剂

缓冲盐水。

细胞：原代鸡胚或仓鼠肾细胞以及白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) C6/36 克隆细胞系。

A.2 试验方法

A.2.1 采集脑组织和脊髓样品，用缓冲盐水制成 10% 悬液。

A.2.2 上述悬液以 1500 g 离心 15min，取上清，按照 0.02mL/只剂量，给 2~4 日龄乳鼠作脑内接种，观察 14d。

A.2.3 小鼠可能无明显临床症状，但食欲明显减退，腹部白色乳斑消失，继而皮肤从粉红色变成暗红色，出现痉挛后小鼠马上死亡。采集濒死鼠或死亡鼠的脑组织，于 -80℃ 保存，以作进一步传代。

A.2.4 取自可疑感染动物的脑组织或血液等样品和鼠脑悬液均可接种于细胞培养物。再利用黄病毒及日本脑炎病毒的特异性单克隆抗体，通过间接荧光试验来鉴定细胞培养物中的病毒。

附录 B
(规范性附录)

日本脑炎实时荧光定量 RT-PCR 试验

B.1 RNA 提取

组织样品和血清样品均可使用商品化的试剂盒提取病毒 RNA。

B.2 扩增

B.2.1 取出 JEV qPCR MIX、Taq 酶系、逆转录酶系室温融化并振荡混匀后，10,000rpm 离心 10s。

B.2.2 设所需要的 PCR 反应管数为 N (N=样本数+1 管阴性对照+1 管阳性对照)，每个测试反应体系配制如下表：

试剂	JEV qPCR MIX	逆转录酶系	Taq 酶系
用量	20 μ L	1 μ L	1 μ L

计算好各试剂的使用量，加入一适当体积洁净离心管中，充分混匀，10,000rpm 离心 10s。

B.2.3 向设定的 n 个 PCR 反应管中分别加入 22 μ L，向每管中加入处理后样品或 JEV 阳性质控品和阴性质控品 3 μ L，10,000rpm 瞬时离心 30s。

B.2.4 将各反应管放入定量 PCR 仪器的反应槽内，按对应顺序设置阴性质控品，阳性质控品以及待检标本，并设置样品名称、标记荧光基团种类(报告基团为 FAM，淬灭基团为 TAMRA)和循环条件：42 $^{\circ}$ C，20min； 94 $^{\circ}$ C，2min； 94 $^{\circ}$ C 30s，55 $^{\circ}$ C，45s，40 个循环。

B.3 结果判定

Ct 值小于 35 为阳性；Ct 值在 35-40 之间为可疑。在重复试验之后，仍在 35-40 之间，则为阳性，没有 Ct 值为阴性。

附录 C
(规范性附录)
日本脑炎酶联免疫吸附试验

C.1 试剂

磷酸盐缓冲液 (PBS)、吐温-20、兔抗马酶标二抗、TMB 显色液、浓硫酸、标准阴、阳性血清、待测血清。

C.2 试验方法

C.2.1 包被

采用原核表达的 E 蛋白作为包被抗原，抗原包被量为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

C.2.2 将稀释好的样品及阴阳性对照血清加入到 ELISA 板中，每孔 100 μL ，每块检测板都需要设立阴阳性对照及空白对照。

C.2.3 将 ELISA 板置于湿盒内，在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱孵育 1h。

C.2.4 取出 ELISA 板，甩干，加入 300 μL PBST，甩出，再加入 200 μL PBST，放在震荡器上震荡 3min，甩出 PBST，在滤纸上将 ELISA 板拍干，重复此步骤 3 次。

C.2.5 加入稀释后的酶标二抗，每孔 100 μL 。

C.2.6 放入湿盒内，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 40min。

C.2.7 按照步骤 C.2.4 洗板三次。

C.2.8 加入配制好的 TMB 显色液，每孔 100 μL ，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 10min。

C.2.9 取出 ELISA 板，每孔加入 50 μL 终止液。

C.2.10 将 ELISA 板放在酶标仪上，450nm 读值。

C.3 结果判定

按照试剂盒说明书判定标准进行结果判定。

附录 D
(规范性附录)
日本脑炎病毒中和试验

D.1 材料

采集濒死鼠或死亡鼠，将其脑用含 10%犊牛血清 pH7.2 的 PBS 缓冲液制成 10%悬液。将悬液在 4℃下 5 000g 离心 20min，上清液分装后-80℃保存。此外，收获的病毒感染细胞上清也可用中和试验。

D.2 试验程序

D.2.1 血清 56℃水浴灭活 30min。

D.2.2 在 24 孔平底微量板上用细胞培养液从 1:10 开始，作倍比稀释血清。

D.2.3 用细胞培养液将种毒稀释为 100 PFU/0.2 ml。

D.2.4 每个稀释度的血清与等体积的稀释病毒混合。每板设稀释液对照、阴性血清对照和阳性血清对照。

D.2.5 37℃孵育 90min。

D.2.6 将上述 200μL 病毒/血清混合物分别接种至长满单层的 BHK-21 细胞中。

D.2.7 置 CO₂ 环境中，37℃孵育 90min。

D.2.8 移去接种物，加入 1 mL 覆盖液。

D.2.9 置 CO₂ 环境中，37℃孵育 4d。

D.2.10 移去培养液，将培养板放在含 2.5%重铬酸钾、5%冰醋酸和 5%福尔马林的溶液中，室温下固定 30min。

D.2.11 室温下，0.1%结晶紫溶液中染色 30min。

D.2.12 倒去染液，用水轻轻冲洗细胞。

D.2.13 风干细胞，计数蚀斑数。

D.2.14 被检血清孔出现 50%以上细胞保护者为阳性。

附录 E
(规范性附录)
日本脑炎血凝/血凝抑制试验

E.1 血凝试验 (HA)

E.1.1 病毒抗原制备

E.1.1.1 用蔗糖-丙酮法由感染的乳鼠脑组织 (SMB) 抽提抗原

E.1.1.1.1 加 4 体积 8.5%蔗糖溶液匀浆感染性乳鼠脑组织。

E.1.1.1.2 向匀浆内逐滴加入匀浆量 20 倍体积的冷丙酮。

E.1.1.1.3 500g 离心 5min 后, 弃上清液。

E.1.1.1.4 沉淀物用与上述相同量的冷丙酮悬浮, 冰浴 1h。

E.1.1.1.5 500g 离心 5min 后, 弃上清液。

E.1.1.1.6 将沉淀物 (稍带点丙酮) 集中到一支试管内。

E.1.1.1.7 500g 离心 5min 后, 弃上清液。

E.1.1.1.8 分散沉淀物于试管内壁, 真空干燥 1~2h。

E.1.1.1.9 用生理盐水溶解干燥的沉淀物, 至匀浆原量的 0.4 倍。

E.1.1.1.10 4℃下 8000g 离心 1h, 取上清液备用。

E.1.1.2 C6/36 细胞感染液

E.1.1.2.1 收获经 28℃培养 1 周的感染培养液。

E.1.1.2.2 1000g 离心 15min, 取上清液备用。

E.1.2 鹅红细胞的制备

E.1.2.1 溶液

枸橼酸葡萄糖溶液 (ACD)、葡萄糖明胶巴比妥溶液(DGV)。

E.1.2.2 采血: 1.5mLACD 加 8.5mL 血液。

E.1.2.3 洗血

E.1.2.3.1 1 倍体积上述血液加 2.5 倍体积的 DGV, 500g 离心 15min, 弃上清液。

E.1.2.3.2 用 3 倍于上述血液量的 DGV 重新悬浮沉淀的红细胞。

E.1.2.3.3 500g 离心 15min, 弃上清液。重复洗涤 4 次。

E.1.2.3.4 将红细胞悬液移入带铝盖的玻璃瓶内。

E.1.2.4 校正红细胞浓度

E.1.2.4.1 取 0.2mL 红细胞悬液加 7.8mL 0.9%生理盐水。

E.1.2.4.2 移取部分稀释的红细胞悬液至测定管内, 用分光光度计读取光密度值。

E.1.2.4.3 调节红细胞母液, 使其 1:40 稀释的 OD490 光密度值至 0.450, 即成红细胞母液。

E.1.2.4.4 该红细胞母液置冷藏室内保存, 可用 3 周。

E.1.2.4.5 使用前, 将母液轻轻摇匀, 再用 VAD 作 1:24 稀释。

E.1.3 抗原稀释

E.1.3.1 母液:

1.5M 氯化钠溶液、0.5M 硼酸溶液、1N 氢氧化钠溶液、pH9.0 硼酸氯化钠溶液、4%牛血清白蛋白溶液。

E.1.3.2 抗原稀释液: 。

E.1.3.3 在 U 型微量滴定板上用 BABS 将抗原作连续 2 倍稀释。

E.1.4 添加鹅红细胞

E.1.4.1 母液:

1.5M NaCl、0.5M 磷酸氢二钠溶液、1.0M 磷酸二氢钠溶液。

E.1.4.2 工作液：病毒校正稀释液。

E.1.4.3 试验程序

E.1.4.3.1 1 体积鹅红细胞母液加 23 倍量 VAD。

E.1.4.3.2 微量滴定板上每孔加稀释的抗原 25 μ L，再加 25 μ L 稀释的红细胞液。

E.1.4.3.3 37 $^{\circ}$ C 感作 1h 后判读结果：

++ 完全凝集（红细胞呈薄膜状均匀地分散于孔底）

+ 部分凝集（红细胞呈环状沉于管底，略带薄膜状）

± 极少凝集（红细胞呈小钮扣状沉于管底，周边有一些散在的薄膜状红细胞）

- 凝集阴性（红细胞全部沉于管底中央呈钮扣状）

终点为呈现++或+凝集强度的最高稀释度。

效价为终点稀释度的倒数。

E.2 血凝抑制试验（HI）

E.2.1 被检血清的准备

E.2.1.1 采血和血清分离

E.2.1.1.1 将采集的血样置 37 $^{\circ}$ C 1h，再置 4 $^{\circ}$ C 过夜。如果该实验非要立即进行，可将血清在 37 $^{\circ}$ C 温育 2~3h，代替 4 $^{\circ}$ C 过夜的处理。

E.2.1.1.2 2000g 离心 15min，从血凝块中分离血清。

E.2.1.1.3 置 56 $^{\circ}$ C 灭活 30min。

E.2.1.1.4 立即使用，则置于-20 $^{\circ}$ C 保存。

E.2.1.2 2-巯基乙醇处理、

E.2.1.2.1 取 2 支小试管，每管加入 50 μ L 血清。

E.2.1.2.2 一试管内加 0.13M 2-巯基乙醇 PBS 150 μ L，另一管内加 PBS 15 μ L。

E.2.1.2.3 37 $^{\circ}$ C 感作 1h，然后置冰浴中冷却。

E.2.1.3 丙酮抽提

E.2.1.3.1 上述两试管内，各加冷丙酮 2.5mL，塞紧橡皮塞，置冰浴中抽提 5min。

E.2.1.3.2 1500g 离心 5min 后，弃上清液。

E.2.1.3.3 重复上述步骤一次。

E.2.1.3.4 分散沉淀物于管壁，在室温下真空抽干 1h。

E.2.1.3.5 于各管加 pH9.0 硼酸氯化钠溶液 0.5mL，塞紧橡皮塞，置 4 $^{\circ}$ C 溶解沉淀物过夜。至此，血清已作了 1:10 稀释。

E.2.1.4 高岭土抽提

E.2.1.4.1 经酸洗过的高岭土用 pH9.0 硼酸氯化钠溶液配制成 25% 浓度。

E.2.1.4.2 1 份血清加 4 份 pH9.0 硼酸氯化钠溶液，再加 5 份 25% 高岭土溶液。

E.2.1.4.3 室温下抽提 5min，其间晃动几次。

E.2.1.4.4 1000g 离心 30min 上清即是 1:10 稀释的血清。

E.2.1.5 鹅红细胞吸收

E.2.1.5.1 于处理过的各血清中加入 1/50 体积量的鹅红细胞泥。

E.2.1.5.2 置冰浴中吸收 20min。

E.2.1.5.3 800g 离心 10min，取上清即可用于 HI 试验。

E.2.2 血凝抑制试验

E.2.2.1 抗原凝集效价初滴定。

稀释抗原至 4~8 单位/0.05mL。

E.2.2.2 在微量滴定板上将被检血清作连续 2 倍稀释。

血清稀释完毕后，于每孔滴加 25 μ L 稀释的抗原，将剩余的抗原加到空孔中，一起置 4 $^{\circ}$ C

过夜。

E.2.2.3 抗原凝集效价再滴定。

E.2.2.3.1 将各“空孔”中的抗原收集起来，并以 25 μ L 的体系将其作连续 2 倍稀释后进行 HA 试验。

E.2.2.3.2 每孔加 BABS 25 μ L，此时各孔液体量为 50 μ L。

E.2.2.4 添加鹅红细胞。

E.2.2.4.1 用 VAD 将红细胞母液作 1:24 稀释。

E.2.2.4.2 于加有 50 μ L 血清抗原混合物的以及再滴定抗原的各孔内各加 50 μ L 稀释的红细胞液。

E.2.2.4.3 37 $^{\circ}$ C 感作 1h 后判读结果。

被完全抑制的血清最高稀释倍数的倒数为该被检血清的 HI 效价。

E.3 结果判定

急性期和康复期血清 HI 效价相差 4 倍，才被认为有明显的上升或下降；上升 4 倍以上，则认为发生了与试验中所用的、在抗原性上相关的病毒的安装。

附录 F
(规范性附录)
日本脑炎补体结合试验 (CF)

F.1 抗原的制备

- F.1.1 采集和称重感染死鼠的脑组织。
- F.1.2 加入 20 倍体积的冷丙酮搅匀, -20°C 下匀浆。
- F.1.3 将混悬液在 4°C 下, 5000g 离心 5min , 弃上清液。
- F.1.4 向沉淀物中加入上述步骤中使用的等体积冷丙酮, 充分混匀。
- F.1.5 在 -20°C 放置 20min 后, 按上述 F.1.3 的方法离心。
- F.1.6 重复第 F.1.3、 F.1.4。
- F.1.7 用冷丙酮/乙醚代替冷丙酮, 然后重复第 F.1.3、 F.1.4 步骤。
- F.1.8 用冷乙醚重复第 F.1.3、 F.1.4 步骤两次。
- F.1.9 用吸液器移去上清液, 将沉淀物分散到离心管壁上。
- F.1.10 真空干燥 $1\sim 2\text{h}$ 。
- F.1.11 将干燥沉淀物溶解在冷氯化钠溶液中, 4°C 过夜。
- F.1.12 5000g 离心 1h , 上清液即是抗原。

F.2 试验程序

- F.2.1 用明胶-巴比妥缓冲液将被检血清作 1:4 稀释后加热灭活。
- F.2.2 于 96 孔微量板上, 将被检血清作连续 2 倍稀释。
- F.2.3 加 $25\mu\text{L}$ 4 单位抗原, 振荡混匀。
- F.2.4 加 $50\mu\text{L}$ 2 单位补体。
- F.2.5 振荡混匀, 4°C 孵育 18h 。
- F.2.6 将该微量板室温放置 15min 。
- F.2.7 每孔加入 $25\mu\text{L}$ 致敏绵羊红细胞。
- F.2.8 振荡混匀, 37°C 孵育 30min , 然后判读结果。

F.3 结果判定

无溶血的血清最高稀释度是该被检血清的 CF 效价。血清效价上升或下降 4 倍以上确实是感染的有效证据。

马脑脊髓炎（东方和西方）诊断技术规范

1 范围

本规范规定了马脑脊髓炎（东方和西方）样品采样、临床症状和实验室诊断的方法和技术要求。

本规范适用于马脑脊髓炎（东方和西方）的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

2.1 组织样品

首选脑组织，其次为肝、脾，每种组织或脏器采集两份，一份用作病毒分离，另一份浸泡在福尔马林中作病理组织学检查。

2.2 血清样品

每个病畜血液不少于 5mL，无菌分离血清装入灭菌小瓶中，加盖密封后冷藏或冷冻保存。

2.3 样品保存

样品在48h内能抵达实验室，应冷藏运送；如超过48h，则冷冻后用干冰运送。

2.4 采样记录及标签

样品的包装瓶上均要贴上标签，标明编号，并填写采样单。

2.5 样品运送

运输时样品容器与采样记录一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标志。

3 诊断

3.1 临床症状

3.1.1 嗜睡等神经症状；

3.1.2 轻度沉郁，意识障碍，不安和轻度兴奋，作圆圈运动或无目的冲撞障碍物，易于惊慌，以后出现嗜眠；

3.1.3 两前肢交叉站立、或呈其他异常姿势；

3.1.4 唇、舌发生麻痹，以后站立不起；

3.1.5 神经症状出现后约 1-2d 死亡。

3.2 病原学指标

病毒分离呈阳性。

3.3 血清学指标

3.3.1 间接酶联吸附试验（ELISA）阳性；

3.3.2 蚀斑减数中和试验（PRN）阳性；

3.3.3 补体结合试验（CF）阳性；

3.3.4 血凝抑制试验（HI）阳性。

3.4 结果判定

疑似马脑脊髓炎符合 3.1

3.4.1 确诊马脑脊髓炎

3.4.1.1 疑似病例，且至少符合 3.2 指标之一的；

3.4.1.2 疑似病例，且至少符合 3.3 指标之一的。

4 实验室诊断方法

4.1 病原学诊断方法

病毒分离鉴定方法，见附录 A。

4.2 血清学诊断方法

4.2.1 补体结合试验 (CF), 见附录 B。

4.2.2 血凝抑制试验 (HI), 见附录 C。

4.2.3 酶联免疫吸附试验 (ELISA), 见附录 D。

4.2.4 蚀斑减数中和试验 (PRN), 见附录 E。

附录 A
(规范性附录)
马脑脊髓炎(东方和西方)病原分离鉴定

A.1 材料与试剂

A.1.1 磷酸盐缓冲盐水。

A.1.2 细胞：原代鸡胚和鸭胚成纤维细胞、非洲绿猴传代肾细胞系(Vero)、兔肾 RK-13 或幼仓鼠肾细胞(BHK-21)。

A.2 试验方法

A.2.1 将样品用磷酸盐缓冲盐水制成 10%悬液，1500g 离心 30min。

A.2.2 在已长成细胞单层的培养瓶内接种 1.0mL 组织悬液。吸附 1~2h 后，添加维持液，培养 6~8 天，并盲传一代。收集反复冻融的培养物作病毒鉴定。

A.2.3 取 1~4 日龄乳鼠颅内接种 0.02mL 接种物，观察 10 天。弃去接种后 24h 内死亡的小鼠，在接种后第 2~10 天，每天收集死亡鼠，-70℃ 保存。然后收获脑组织进行病毒鉴定。如果从接种后死亡鼠未检测到病毒，则应作第二次传代。

A.2.4 用鸡胚初次分离 WEE 和 EEE 时，组织悬液经卵黄囊接种 6~8 日龄鸡胚，接种后观察 7 天，通常在接种后 2~4 天出现死亡。通常只传一代，如果出现鸡胚死亡但又未发现病毒，则应作第二次传代。

A.2.5 采用 CF 鉴定感染小鼠或鸡雏脑组织、细胞培养液、羊膜尿囊液中的 EEE 或 WEE 病毒。脑组织用巴比妥缓冲液制成 10%悬液，鸡胚和细胞培养液既可直接使用也可用巴比妥缓冲液作 1:10 稀释后使用。组织悬液或培养液以 9000g 离心 30min，然后按标准 CF 程序将上清液与抗 EEE 和 WEE 病毒的高免血清或鼠腹水作 CF 检测。CF 检测需要用 7 单位补体与血清和抗原在 4℃ 下孵育过夜。细胞培养物中的病毒也可通过直接免疫荧光染色来鉴定。

附录 B
(规范性附录)

马脑脊髓炎(东方和西方)补体结合试验(CF)

B.1 材料与试剂

B.1.1 抗原: 采用感染鼠脑的蔗糖/丙酮抽提液, 要经 1%β-丙内酯灭活处理。

B.1.2 血清: 用含 1%明胶的巴比妥缓冲盐水(VBSG) 1:4 稀释, 56℃灭活 30min。阳性血清可再作 2 倍稀释。

B.1.3 对照抗原: 正常鼠脑组织。

B.2 试验方法

B.2.1 按照滴定阳性血清所确定的抗原量, 用 VBSG 稀释 CF 抗原和对照抗原, 豚鼠补体用 VBSG 稀释至含 5 个 50%补体溶血单位(CH₅₀)。

B.2.2 血清、抗原和补体加入 96 孔圆底微量滴定板, 4℃反应 18h。绵羊红细胞(SRBC)浓度标定为 2.8%。

B.2.3 滴定溶血素, 确定所用的这批补体的最佳稀释度。用溶血素致敏 2.8% SRBC, 并加入反应板的每个孔中。37℃孵育 30min。

B.2.4 将反应板离心(200g), 记录溶血的孔数。

B.2.5 对照设置

B.2.5.1 血清和对照血清: 各加 5 个 CH₅₀ 和 2.5 个 CH₅₀ 补体。

B.2.5.2 CF 抗原和对照抗原: 各加 5 个 CH₅₀ 和 2.5 个 CH₅₀ 补体。

B.2.5.3 补体对照: 5 个 CH₅₀、2.5 个 CH₅₀ 和 1.25 个 CH₅₀ 补体。

B.2.5.4 细胞对照: 仅加 SRBC 和 VBSG 稀释剂。

附录 C

(规范性附录)

马脑脊髓炎(东方和西方)血凝抑制试验(HI)

C.1 材料与试剂

C.1.1 抗原: HI 试验的抗原与上述的 CF 试验中的抗原相同。稀释抗原,使其每个血凝单位(HAU)中的含量为使试验体系中 50%RBC 凝集的抗原量的 4~8 倍。每批抗原的凝集价和最佳 pH 值,通过用 pH 值范围 5.8~6.6,间隔为 0.2 的 pH 溶液稀释的鹅红细胞来测定。

C.1.2 红细胞悬液:从健康白色公鹅采集 RBC,用葡萄糖-明胶-巴比妥液(DGV)洗涤 3 次,再用 DGV 配成 7.0%红细胞悬液。

C.2 试验方法

C.2.1 用 pH9.0 的硼酸生理盐水将血清作 1:10 稀释,然后 56℃灭活 30min,用白陶土处理以除去非特异血清抑制物。此外,用丙酮处理 PBS1:10 稀释的血清后重悬于硼酸盐溶液可除去非特异性抑制因素。用前再用 0.05mL 鹅红细胞泥于 4℃孵育 20min 将血清吸附处理一次。

C.2.2 将经过热灭活、高岭土处理和红细胞吸附过的血清,用 pH9.0 的含 0.4%牛白蛋白的硼酸生理盐水作倍比稀释。

C.2.3 在 96 孔圆底反应板上用 pH9.0 的含 0.4%牛白蛋白的硼酸生理盐水将血清作倍比稀释(0.025mL/孔)。

C.2.4 在有血清的孔内加入抗原 0.025mL。将反应板放在 4℃作用过夜。

C.2.5 将 7.0%红细胞悬液用相应的 pH 溶液作 1:24 稀释,并立即于反应板每孔加入 0.05mL。

C.2.6 将反应板 37℃孵育 30min。

C.3 结果判定

滴度 1:10~1:20 为可疑; 1:40 或以上为阳性。

附录 D
(规范性附录)
马脑脊髓炎(东方和西方)酶联免疫吸附试验(ELISA)

D.1 材料与试剂

抗体: 用 0.5M pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释。

D.2 试验方法

D.2.1 平底酶标板用抗马 IgM 捕获抗体包被。使用前, 包被过的反应板用 200 μ L 含 0.05% 吐温-20 的 0.01M PBS 洗液冲洗 2 次, 再加入 200 μ L 含有 5% 脱脂乳的 PBS/吐温溶液, 室温孵育 1h, 用 PBS/吐温洗液再洗涤 3 次。

D.2.2 每孔加入 50 μ L 抗体。将反应板 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 再放置 4 $^{\circ}$ C 过夜。

D.2.3 被检血清和对照血清用 0.01M pH7.2 含 0.05% 吐温-20 的 PBS 作 1:400 稀释, 每孔加入 50 μ L。

D.2.4 反应板 37 $^{\circ}$ C 孵育 90min, 然后洗涤 3 次。

D.2.5 每孔加入 50 μ L 病毒抗原。反应板 4 $^{\circ}$ C 过夜, 然后洗涤 6 次。

D.2.6 加入 50 μ L 辣根过氧化物酶标记的脑脊髓炎病毒单克隆抗体。将反应板放置 37 $^{\circ}$ C 孵育 90min, 然后冲洗 6 次。

D.2.7 加入 50 μ L 新配制的 ABTS 底物和过氧化氢, 然后将反应板放置室温 15~40min。

D.3 判定结果

波长 405nm 处测定被检血清的吸收值。如果被检血清孔的吸收值是阴性对照血清孔和对照抗原孔平均吸收值的 2 倍或以上, 则判为阳性。

附录 E
(规范性附录)

马脑脊髓炎(东方和西方)蚀斑减数中和试验(PRN)

E.1 材料与试剂

E.1.1 细胞: 鸭胚成纤维细胞、VERO 或 BHK-21 细胞

E.1.2 细胞培养液

E.2 试验方法

E.2.1 用鸭胚成纤维细胞、VERO 或 BHK-21 细胞在 25cm^2 细胞瓶或 6 孔细胞培养板上进行。

E.2.2 血清作 1:10 和 1:100 稀释, 用 PRN 或 HI 试验确定血清终点滴度。

E.2.3 血清与 100 个蚀斑形成单位(PFU)的病毒反应, 病毒与血清混合物置 37°C 下中和 75min 后, 接种到单层细胞培养物上, 吸附 1h, 再加入 6mL 培养基覆盖。

E.2.4 继续孵育 48~72h, 再判读结果。被检血清的终点滴度按蚀斑数比病毒对照瓶减少 90% 的那一瓶计算。

马病毒性动脉炎诊断技术规范

1 范围

本规范规定了马病毒性动脉炎（EVA）样品采样、临床症状和实验室诊断的方法和技术要求。

本规范适用于马病毒性动脉炎的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

2.1 样品的采集和保存

2.1.1 组织样品

当怀疑为本病，可采集鼻咽和结膜拭子、抗凝血、种马精液。怀疑死于 EVA 的病畜应采取与消化道有关的淋巴腺和相关器官、肺、肝和脾、胎盘和胎儿的体液与组织。除抗凝血于 4℃ 保存或送检外，其他样品均冷冻或送检。

2.1.2 血清样品

采集病畜血液，每头不少于 5mL，无菌分离血清装入灭菌小瓶中，加盖密封后冷藏或冷冻保存并送检。

2.2 采样记录及标签

样品的包装瓶上均要贴上标签，标明编号，并填写采样单。

2.3 样品运送

运输时样品容器与采样记录一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标志。

3 诊断

3.1 临床症状

3.1.1 典型病例的病程为 7~14d；

3.1.2 病马发热（39.5~41.5℃），精神沉郁，白细胞减少，流泪，流鼻涕，有结膜炎；

3.1.3 眼睑、四肢、腹下等部位水肿；

3.1.4 腹痛，腹泻，脱水；

3.1.5 孕马有 40%~80% 发生流产。

3.2 病原学指标

3.2.1 病毒分离试验阳性；

3.2.2 反转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）阳性；

3.2.3 实时荧光定量 RT-PCR 试验阳性。

3.3 血清学指标

3.3.1 结构蛋白 N 蛋白抗体 ELISA 试验阳性；

3.3.2 中和试验阳性。

3.4 结果判定

3.4.1 疑似马病毒性动脉炎

符合 3.1。

3.4.2 确诊马病毒性动脉炎

3.4.2.1 疑似病例，且至少符合 3.2 指标之一的；

3.4.2.2 疑似病例，且至少符合 3.3 指标之一的。

4 实验室诊断方法

4.1 病原学方法

4.1.1 马病毒性动脉炎病毒分离试验，见附录 A；

- 4.1.2 马病毒性动脉炎病毒 RT-PCR，见附录 B；
- 4.1.3 马病毒性动脉炎病毒实时荧光定量 RT-PCR，见附录 C。
- 4.2 血清学方法
 - 4.2.1 马病毒性动脉炎病毒结构蛋白 N 蛋白抗体间接 ELISA，见附录 D。
 - 4.2.2 马病毒性动脉炎病毒中和试验，见附录 E。

附录 A
(规范性附录)
马病毒性动脉炎病毒分离

- A.1 无菌采集发病动物病料组织，或对病料组织进行无菌处理；
- A.2 培养 RK-13 细胞，可以用六孔板培养，也可以用 25cm² 的细胞瓶进行培养；
- A.3 待细胞快长成单层，弃掉培养液，用 PBS 涮洗细胞 1~2 次；
- A.4 将处理好的样品做一定体积的稀释，添加于六孔板或 25cm² 中，37℃感作 1h；
- A.5 不需除去接种物，也不用洗涤细胞单层，直接添加含 0.75% 羧甲基纤维素的培养液；
- A.6 37℃下继续培养，逐日观察细胞病变；
- A.7 结果判定：如果待检样品中含有 EAV，通常在接种的 2~6 天出现明显的细胞病变；若 5~7 天后，仍无 CPE 时，则将上清液移种到新铺满的 RK-13 单层细胞，盲传 2~3 代。

附录 B
(规范性附录)
马动脉炎病毒 RT-PCR 试验

B.1 引物

ORF 1b 的引物:

正向: 5'-GATGTCTATGCTCCATCATT-3'

反向: 5'-GGCGTAGGCTCCAATTGA A-3';

ORF6 的引物:

正向: 5'-CTGAGGTATGGGAGCCATAG-3'

反向: 5'-GCAGCCAAAAGCACAAAAG C-3'。

ORF7 基因的引物:

正向: 5'-ATGGCGTCAAGACGATCACG-3'

反向: 5'-AGAATATCCACGTCTTACGG C-3'。

B.2 病毒 RNA 的提取

用商品化试剂盒提取病毒 RNA。

B.3 反转录 (RT)

在离心管中加入 9 μ l 的病毒 RNA 提取物和 1 μ L 的 9x 随机引物或用于 PCR 试验的病毒特异性下游引物 1 μ L; 然后在 70 度变性 5min, 取出后置于冰上保存。离心后加入 5xFirst Strand buffer 4 μ L、0.1mol/L DTT 2 μ L、10mmol/L dNTP 1 μ L、RNA 酶抑制剂 1 μ L、Superscript II 反转录酶 1 μ L、无 RNA 酶的去离子水 1 μ L, 42 $^{\circ}$ C 反转录 1h, 最后 70 $^{\circ}$ C 灭活 10min, 将反转录产物取出后, 立即用于 PCR 试验或置于 -20 $^{\circ}$ 保存备用。

B.4 聚合酶链式反应 (PCR)

反应体系: 10xPCR buffer 2 μ L、2.5mmol/L dNTP 1 μ L、病毒特异性的上/下游引物各 1 μ L、反转录的 PCR 模板 2 μ L、Taq 酶 1U、去离子水 12.8 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30sec, 56 $^{\circ}$ C 退火 30sec, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30sec, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 总延伸 10min。

B.5 结果判定

如果待检样品中含有 EAV, 则能够检测到病毒特异性的条带, 针对 ORF1b、ORF6 基因和 ORF7 基因的 PCR 产物长度分别是 279bp、231bp 和 525bp; 否则判为阴性。

附录 C
(规范性附录)

马病毒性动脉炎病毒实时荧光定量 RT-PCR

C.1 引物及探针

正向引物: 5'-GGCGACAGCCTACAAGCTACA-3';

反向引物: 5'-CGGCATCTGCAGTGAGTGA-3';

探针: 5'-FAM-TTGCGGACCCGCATCTGACCAA-TAMRA-3'。

C.2 病毒 RNA 的提取

用商品化试剂盒提取病毒 RNA。

C.3 荧光定量 PCR 反应

一步法 RT-PCR 荧光定量试剂盒反应体系为: 2xqRT-PCR buffer 15 μ L、正向引物 (25pmol/ μ L) 0.5~1 μ L、反向引物 (25pmol/ μ L) 0.5~1 μ L、荧光探针 (25pmol/ μ L) 0.2~0.5 μ L、RT-PCR MIX 2 μ L、RNA 样品或对照 2~4 μ L、DEPC 水加至终体积为 30 μ L。将反应管置于荧光 PCR 仪器上, 48 $^{\circ}$ C 反应 35min, 90 $^{\circ}$ C 10min, 然后再按 95 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 1min, 共 40 个循环。

C.4 结果判定

- (1) 阳性对照扩增曲线呈标准的S形曲线, 且Ct值 \leq 30;
- (2) 阴性对照扩增曲线应为基线下的水平线, 且Ct值 $>$ 40;
- (3) Ct值介于35和40之间为可疑, 建议重新测定或换用其它方法复核检测。

附录 D
(规范性附录)

马病毒性动脉炎病毒结构蛋白 N 蛋白抗体间接 ELISA

D.1 材料准备

D.1.1 EAV 重组 N 蛋白的制备

原核表达并纯化的 EAV 重组 N 蛋白。

D.1.2 EAV 标准阳性血清

由国家有关主管部门认可的或指定的供应商提供。

D.1.3 被检血清采集及前处理

马静脉采血 10mL, 分离血清并处理后用于检测, 若需较长时间检测, 可置于 4℃ 或 -20℃。

D.2 操作方法

D.2.1 将纯化好的 EAV 重组 N 蛋白用碳酸盐缓冲液(CBS)稀释成 1.0~3.0mg/L, 取干净的 96 孔酶标板一块, 然后每孔加 100 μ L 包被抗原, 4℃ 孵育过夜。

D.2.2 将包被液倒掉, 然后每孔添加 300 μ L 洗涤液, 然后弃掉洗涤液, 然后添加 200 μ L 洗涤液, 在振荡器上振荡 3min, 然后弃掉洗涤液, 在吸水纸上拍干, 反复洗涤 3 次。

D.2.3 每孔添加 100 μ L 封闭液, 37℃ 封闭 2h。

D.2.4 按照步骤 2.2 方法洗涤。

D.2.5 将阳性血清、阴性血清、待检血清作 1:100 稀释。

D.2.6 取 100 μ L 稀释好的待检血清、阳性血清和阴性血清添加到 96 孔板里, 37℃ 孵育 1h。

D.2.7 按照步骤 D.2.2 方法洗涤。

D.2.8 取 100 μ L 1:5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的抗马 IgG 加到 96 孔板里, 37℃ 孵育 1h。

D.2.9 按照步骤 D.2.2 方法洗涤。

D.2.10 每孔加入 100 μ L TMB 显色液, 室温避光显色 10min。

D.2.11 每孔加 50 μ L 终止液。

D.2.12 即可读值, 波长选择 450nm。

D.3 判定标准

D.3.1 阳性对照 OD 值大于 1.0, 阴性对照 OD 值小于或等于 0.2, 试验成立。

D.3.2 EAV 抗体阳性判定标准: 被检血清的 OD 值与阴性对照血清的 OD 值之比, 大于或等于 2, 且 OD 值在 0.2 以上。

D.3.3 EAV 抗体阴性判定标准: 被检血清的 OD 值与阴性对照血清的 OD 值之比, 小于 0.2, 且 OD 值在 0.2 以下。

附录 E
(规范性附录)
马病毒性动脉炎病毒中和试验

- E.1 56℃水浴 30min 灭活血清；
- E.2 在 96 孔平底微量滴定板上倍比稀释待检血清；
- E.3 用细胞培养液配制每 25 μ L 含 100~300 个 TCID₅₀ 的病毒稀释液。
- E.4 在加有 25 μ L 稀释血清的各孔内加入稀释的病毒液 25 μ L，被检血清对照孔除外。
- E.5 对工作滴度的病毒作病毒回归滴定，10 倍系列稀释后，每个稀释度做 4 孔，以确定实验结果是否有效。
- E.6 将培养板盖上，轻轻摇匀以使血清和病毒混匀。
- E.7 置含 5% CO₂ 的保湿培养箱中 37℃ 孵育 1h。
- E.8 配制 3~5 日龄的 RK-13 细胞悬液，其浓度应保证接种 18~24h 后能在微量滴定板上长成细胞单层。
- E.9 每孔加入 100 μ L 细胞悬液，将板盖好或用胶带封好，轻轻摇匀。
- E.10 含 5%CO₂ 的保湿培养箱中 37℃ 继续培养。
- E.11 接种后 48~72h，用显微镜观察 CPE。
- E.12 结果判定

工作滴度的病毒液含有 30~300 个 TCID₅₀ 和阳性血清对照的效价在其预测滴度的 0.3 log₁₀ 之内，试验结果有效。与最低稀释度病毒对照孔相比，如果血清试验孔中病毒 CPE 的数量减少 75% 以上，那么该孔的血清稀释度应被视为阳性，然后通过 Spearman-Kärber 氏方法计算终点滴度。

尼帕病诊断技术规范

1 范围

本规范规定了马属动物尼帕病毒病采样、临床症状、实验室检测技术要求。

本规范适用于马属动物尼帕病的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

2.1 样品的采集和保存

NiV 属于生物安全四级病毒，处理和运输可能带有此类病毒的样品必须采取严格的生物安全防护措施，并遵守国际准则。

按照生物安全要求，采集可疑动物的淋巴结、脑、肺、肾、脾、肝及血清，在低温和密封状态下，运输到指定的具备生物安全条件的实验室检测。

2.2 血清

采集动物血液，每头不少于 5mL。无菌分离血清装入灭菌小瓶中，加盖密封后冷藏或冷冻保存。

2.3 采样记录及标签

样品的包装瓶上均要贴上标签，标明编号，并填写采样单。

2.4 样品运送

运输时样品容器与采样记录一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标志。

3 诊断

3.1 临床症状

马一般不表现典型临床症状。猪感染后仅少数出现临床症状，感染 NiV 的猪场临床发病的猪可能只占少数，大部分的猪可不表现任何临床症状。该病的潜伏期为 7~14d，NiV 可以感染各个月龄的猪，都可表现出急性发热症状，并伴有呼吸困难和（或）神经症状，但不同类别的猪可表现不同的临床症状。

3.2 血清学指标

3.2.1 酶联免疫吸附试验（ELISA）阳性；

3.2.2 血清中和试验（SNT）阳性。

3.3 病原学指标

3.3.1 病毒分离试验或动物接种试验阳性；

3.3.2 反转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）阳性。

3.4 结果判定

3.5.1 临床怀疑病例

符合 3.1 可判定为临床怀疑病例。

3.5.2 疑似病例

符合 3.5.1，且酶联免疫吸附试验（ELISA）、血清中和试验（SNT）任意一项检测阳性，可判定为疑似病例。

3.5.3 确诊病例

符合 3.5.1 或 3.5.2，RT-PCR 检测阳性，且 RT-PCR 阳性检测结果得到核酸序列测定的证实，可判定为确诊病例。

4 实验室诊断方法

4.1 病原诊断方法

病毒分离试验，见附录 A。

反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR), 见附录 B。

4.2 血清诊断方法

酶联免疫吸附试验 (ELISA), 见附录 C。

血清中和试验 (SNT), 见附录 D。

附录 A
(规范性附录)
病毒分离试验

病毒分离必须在 BSL-3 级或 BSL-3 级以上实验室进行。

- A.1 用密闭的匀浆器处理含 10% (w/v) 组织样品的悬浮液，如在密闭的金属筒中用可以高压灭菌的金属球进行研磨，或者在罩/袋式匀浆器中用塑料袋进行研磨。
- A.2 样品磨碎后，300g 离心。
- A.3 将收取上清加入到培养的细胞单层中。非洲绿猴肾细胞 (Vero 细胞) 和兔肾细胞 (RK-13) 对亨尼病毒敏感。
- A.4 细胞培养约在第 3 天出现细胞病变 (CPE)，为阳性。
- A.5 如没有出现细胞病变，应该再盲传 2 次，每次培养 5 天，仍未出 CPE，判为阴性。
- A.6 感染情况下，尼帕病毒特征性 CPE 是出现细胞融合现象，经过 24—48h，有些融合的细胞可含有 60 个以上的细胞核。

附录 B
(规范性附录)
反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR)

B.1 样品处理

在无菌环境中, 将采集的动物机体组织 (如脑、肺、肾、脾、肝) 置乳钵中, 剪碎, 用灭菌研磨器研磨。其它机体组织 (如淋巴结、扁桃体等) 除去包膜和结缔组织, 选取内部实质部分, 置研钵中, 剪碎进行研磨。再加 0.01mol/L PBS (pH7.6~7.8) 或 MEM (pH7.6~7.8) 制成 1:5 的悬液。-20℃至-30℃冻融 3 次, 3000r/min 离心 10min, 取上清液提取总 RNA。

液体样品, 如血清和全血直接用于提取总 RNA。提取的 RNA 如果在 2h 内检测则于冰上保存, 否则置于-70℃冰箱保存。

B.2 试剂

商品化 RNA 提取试剂盒、商品化 RT-PCR 试剂盒。

B.3 引物和阳性对照

引物序列: NiV01:5-TAGAAATAATCTCAGACATCGGAAA-3

NiV02:5-CCCATAGACCTGTCAATAGTAGAGC-3

阳性对照: 阳性对照是体外转录的稳定的 RNA, 含有 NiV01 和 NiV02 对应的序列, 其序列为:

UAGAAAUAUUCUCAGACAUCGGAACUAUGUCGGCUGCUGCAGUUCAGGAAACAU
CAGCUACUCUACAGAGAAAUUGGCCCAAGAGCCCCUUAUAUGGUGCUUCUUGAAGAA
UCAAUUCAGACUAAAUUUGCCCCUGGAGGUUACCAUUCAGUUCUGUGAGCACAUCCG
GUUGGCUACUACUAUUGACAGGUCUAUGGG。

B.4 操作步骤

B.4.1 总 RNA 提取

用商品化 RNA 提取试剂盒, 方法步骤见试剂盒说明书。

B.4.2 一步法 RT-PCR

反应总体积 25μL。向 0.2 mL 扩增管中加入下列反应物:

- (1) 2×1 Step Buffer 12.5μL
- (2) PrimeScript 1 Step Enzyme 0.5μL
- (3) 上游引物 (10pM) 1μL
- 下游引物 (10pM) 1μL
- (4) RNA 2μL
- (5) RNase Free H₂O 8μL

每次检测设置标准阳性对照和标准阴性对照。标准阳性对照用阳性对照 RNA 作为模板, 而标准阴性对照用 DEPC 水作为模板。

B.4.3 扩增反应条件

50℃, 30 min; 95℃, 5 min; 94℃, 1 min; 56℃, 1 min; 72℃, 1 min; 35 个循环。72℃, 7 min 延伸。

B.4.4 1.5%的琼脂糖凝胶进行核酸电泳

B.4.5 结果判定

如果阳性对照的扩增产物大小约为 200bp, 阴性对照检测无任何扩增条带, 说明检测合格。受检样品电泳结果出现 300bp 的条带, 扩增产物进行序列测定, 如果样品序列为特异的尼帕病毒 N 基因序列, 判定受检样品检测结果为尼帕病毒核酸阳性。

附录 C
(规范性附录)
酶联免疫吸附试验 (ELISA)

C.1 主要试剂

C.1.1 包被抗原: 纯化的重组 N 蛋白

C.1.2 包被液: 0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液 (0.5mol/l Na₂CO₃ 10ml、0.5mol/l NaHCO₃ 90ml, pH9.6)。

C.1.3 血清稀释液: 0.01mol/L PBS (8.0g NaCl, 0.2g KCl, 0.2g KH₂PO₄, 2.9g Na₂HPO₄•12H₂O/L pH7.4)

C.1.4 洗涤液 (PBST): 含 0.05%吐温-20 的 0.01mol/LPBS

C.1.5 封闭液: 含 5%脱脂奶粉的 0.01mol/L PBS

C.1.6 底物: 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB, Sigma 公司, 目录号 T 3405)。

C.1.7 终止液: 1mol/L H₂SO₄

C.1.8 标准血清: 标准阳性血清为重组 N 蛋白兔高免血清; 标准阴性血清为健康兔血清。

C.1.9 N 蛋白抗原的制备

原核表达并纯化 HiV 重组 N 蛋白。

C.2 操作步骤

C.2.1 包被: 以 5 μg/mL 的 N 蛋白包被 ELISA 板, 50μL/孔, 4℃包被过夜。

C.2.2 封闭: 200μL/孔, 加入封闭液, 37℃2h 或 4℃封闭过夜。

C.2.3 加样

用洗涤液洗涤封闭好的 ELISA 板, 洗涤 5 次, 再加入用 0.01mol/LPBS 稀释的标准阴性血清、标准阳性血清以及待测血清, 每份血清 2 孔, 每孔 50μL, 37℃ 孵育 2h, 空白对照孔不加血清。

标准血清、待检血清均稀释 100 倍。

C.2.4 加酶标结合物

用洗涤液洗 ELISA 板 5 次, 然后加入用含 1% (w/v) 脱脂奶粉的 PBST 稀释的辣根过氧化物酶标记的 A/G 蛋白 (Progen Biosciences, 目录号 32490), 50μL/孔。

C.2.5 显色

PBST 洗板 5 次后, 加底物显色 10min 后, 用 1M 硫酸终止反应, 50μL/孔。测定 450nm 的 OD 值。

C.2.6 结果判定

标准阴性血清的 OD 值<0.15, 标准阳性血清的 OD 值>1.50, 空白对照孔 OD 值<0.1, 则试验成立。

计算检测样品 OD 平均值 ($\overline{OD}_{\text{sample}}$) 和标准阳性血清 OD 平均值 ($\overline{OD}_{\text{positive}}$) 的比值。 $\overline{OD}_{\text{sample}} / \overline{OD}_{\text{positive}}$ 值 ≥ 0.3 , 判为阳性; $\overline{OD}_{\text{sample}} / \overline{OD}_{\text{positive}}$ 值 < 0.3 , 判为阴性。

附录 D
(规范性附录)
血清中和试验

D.1 材料准备

D.1.1 对照血清

尼帕病毒中和抗体阴阳性血清。

D.1.2 待检血清

待检血清经 56℃ 灭活 30 min。

D.1.3 病毒

尼帕病毒适应于 Vero 细胞或 RK-13 细胞。收获的病毒液测定滴度后,分装于小管,-70℃ 保存备用。

D.1.4 细胞

复苏的 Vero 细胞或 RK-13 细胞,传代培养细胞形态良好。

D.1.5 细胞培养基

EMEM。

D.2 操作步骤

D.2.1 设置 4 种对照

每块培养板都必须设立下列对照:

- ✓ 阳性和阴性血清对照;
- ✓ 正常细胞对照: 不接种病毒和血清的正常细胞对照;
- ✓ 病毒对照: 接种病毒滴度 100 TCID₅₀。

每种对照至少设两个重复。细胞对照孔细胞生长良好,且病毒对照孔和阴性血清对照孔细胞产生病变,一定稀释度的阳性血清对照孔细胞生长良好,判为试验符合质量控制标准。

D.2.2 在培养板上,用细胞维持液将待检血清从 1:2 做系列倍比稀释,每份血清至少平行稀释 2 排孔,每孔 50 μL。在上述每孔中加入 50 μL 200 TCID₅₀ 的病毒液,封闭培养板,37℃ 温箱中和 1h。取出,每孔加入 50 μL 细胞悬液(100~150 万个细胞/mL),置 37℃ 5% CO₂ 温箱培养。对照孔体积不足 150 μL 时,用稀释液补全体积。

D.2.3 37℃ 培养 3d,观察细胞病变。

D.3 结果判定

被检血清孔 >50% 细胞出现 CPE 判为阴性, ≤50% 细胞出现 CPE 判为阳性。

用 Reed-Muench 法计算出能保护 50% 细胞不产生病变的血清最大稀释度,该稀释度即为该血清的中和抗体效价。

水泡性口炎诊断技术规范

1 范围

本规范规定了马属动物水泡性口炎（VS）样品采集、临床症状和实验室诊断的方法和技术要求。

本规范适用于马属动物水泡性口炎的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

2.1 组织样品

水泡液、未破裂的水泡上皮、新破裂的水泡上皮碎片及破裂的水泡液拭子置于含有酚红的 pH7.6 Tris 缓冲胰蛋白肉汤中，如用 CF 试验检测抗原，必须保存在 pH7.2~7.6 的甘油/磷酸盐缓冲液中，若 48h 内能抵达实验室，样品应冷藏保存与运输。

2.2 血清样品

采集病畜血液，每头不少于 5mL，无菌分离血清装入灭菌小瓶中，加盖密封后冷藏或冷冻保存。

2.2 采样记录及标签

样品的包装瓶上均要贴上标签，标明编号，并填写采样单。

2.3 样品运送

运输时样品容器与采样记录一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标志。

3 诊断

3.1 临床症状

马感染本病发生损伤主要在唇和舌面。

3.1.1 黏膜变白或有微量的渗出液，进而破溃、糜烂；

3.1.2 当水疱出现时，频繁流涎，随后又发热反应，表现为精神沉郁、厌食、但饮水正常；

3.1.3 病马虚嚼、磨牙，从口中流出黏稠液体；

3.1.4 病畜经常在食槽沿或其他物体上摩擦其唇部，表现痒感，有时波及口咽和鼻骨，导致吞咽困难，轻度鼻流血或呼吸困难；

3.1.5 蹄冠充血和溃疡，导致跛行。

3.2 病原学指标

3.2.1 病毒分离试验阳性；

3.2.2 反转录-聚合酶链式反应阳性（RT-PCR）；

3.2.3 实时荧光定量 RT-PCR 方法阳性；

3.2.4 间接夹心 ELISA 试验阳性；

3.2.5 补体结合试验阳性。

3.3 血清学指标

3.3.1 液相阻断 ELISA 试验阳性；

3.3.2 竞争酶联免疫吸附试验阳性；

3.3.3 中和试验阳性。

3.4 结果判定

3.4.1 疑似病例

符合 3.1。

3.4.2 确诊病例

疑似病例，且至少符合 3.2 或 3.3 指标之一。

4 实验室诊断方法

4.1 病原学诊断方法

- 4.1.1 水泡性口炎病毒分离试验，见附录 A。
- 4.1.2 水泡性口炎病毒 RT-PCR，见附录 B。
- 4.1.3 水泡性口炎病毒实时荧光定量 RT-PCR，见附录 C。
- 4.1.4 水泡性口炎病毒间接夹心 ELISA，见附录 D。

4.2 血清学诊断方法

- 4.2.1 水泡性口炎液相阻断 ELISA，见附录 E。
- 4.2.2 水泡性口炎竞争酶联免疫吸附试验，见附录 F。
- 4.2.3 水泡性口炎中和试验，见附录 G。

附录 A
(规范性附录)
水泡性口炎病毒分离试验

- A.1 将澄清组织悬液或水泡液接种于 Leighton 培养管及用 25cm² 细胞瓶的培养细胞上;
- A.2 37℃ 孵育 1h;
- A.3 弃去接种物, 用细胞培养液洗涤细胞三次, 然后用含有 2.5% 胎牛血清 (FBS) 的细胞培养液继续培养;
- A.4 将接种的 Leighton 管细胞培养物置于 33~35℃ 并观察 CPE;
- A.5 接种后 18~24h, 从接种每一样品的 Leighton 管中取出培养的盖片, 用新泽西型 (NJ) 和印第安型 (IND) VSV 特异性荧光抗体 (FA) 结合物染色;
- A.6 将其余的接种的 Leighton 管和 25cm² 细胞瓶在 35~37℃ 培养 6 天以上, 并每天观察 CPE;
- A.7 接种后第 7 天, 用 FA 结合物将 Leighton 管中剩余的培养盖片染色。如果未观察到荧光而且细胞瓶也无观察到 CPE, 即可报告样品为 VS 病毒分离阴性;
- A.8 如果观察到 CPE, 而 FA 染色阴性, 则按照如上程序, 用 25cm² 细胞瓶中的细胞进行传代培养。
- A.9 结果判定

应用附录 B、C、D 或 E 中的病原学检测方法来进行病毒鉴定, 当病原学鉴定是阳性, 则表明病毒分离阳性。

附录 B
(规范性附录)
水泡性口炎病毒 RT-PCR 试验

B.1 引物

选用水泡性口炎病毒 L 蛋白基因保守序列,采用半套式 RT-PCR 方法进行扩增。半套式引物分别根据新泽西型和印第安那型标准病毒株扩增区的碱基差别设计。

外侧引物 I (P1): 5'-AAGGCTCTCTGTTTCCGGATCTGG-3';

外侧引物 II (P2): 5'-TGATTCAATATAATTATTTTGGGAC-3';

NJ 半套式引物 (P3): 5'-TGTTCTGGTGTGCAAACCAGGTATC-3';

IND 半套式引物 (P4): 5'-AGTAGAACTGTGCAAGCCCGGTATC-3'。

B.2 病毒 RNA 提取

用商品化试剂盒提取病毒 RNA。

B.3 反转录 (RT)

B.3.1 在离心管中加入 9 μ L 的病毒 RNA 提取物和 1 μ L 的 9x 随机引物或用于 PCR 试验的病毒特异性下游引物 1 μ L;

B.3.2 70 $^{\circ}$ C 变性 5min, 取出后置于冰上;

B.3.3 瞬时离心后加入 5xFirst Strand buffer 4 μ L、0.1mol/L DTT 2 μ L、10mmol/L dNTP 1 μ L、RNA 酶抑制剂 1 μ L、Superscript II 反转录酶 1 μ L、无 RNA 酶的去离子水 1 μ L;

B.3.4 42 $^{\circ}$ C 反转录 1h, 最后 70 $^{\circ}$ C 灭活 10min;

B.3.5 将反转录产物取出后, 立即用于 PCR 试验或置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

B.4 聚合酶链式反应 (PCR)

反应体系: 10xPCR buffer 2 μ L、2.5mmol/L dNTP 1 μ L、病毒特异性的 P1 和 P2 引物各 1 μ L、反转录的 PCR 模板 2 μ L、Taq 酶 1U、去离子水 12.8 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 总延伸 10 min。

B.5 结果检测

1%琼脂糖平板电泳检测。

B.6 半套式定型 PCR

B.6.1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后, 如果看不到 227bp 的 DNA 条带, 取 2 μ L 产物做模板; 如果电泳后能看到 227bp 的 DNA 带, 则需将产物按 1:1000 稀释后, 取 2 μ L 做模板。

B.6.2 取两只离心管, 分别做新泽西型和印第安那型的定型 PCR: 新泽西型定型的 PCR 反应采用引物 P2 和 P3, 印第安那型定型的 PCR 反应采用引物 P2 和 P4, PCR 反应体系和反应条件同步骤 4。

B.6.3 1%琼脂糖平板电泳检测。

B.7 结果判定

B.7.1 普通 RT-PCR 中如果待检样品中含有 VSV, 则能够检测到病毒特异性 227bp 的条带。

B.7.2 半套式 RT-PCR 中, 如果待检样品中能够检测到病毒特异性 119bp 的条带, 则能够定型为新泽西型或印第安那型 VSV。

附录 C
(规范性附录)
水泡性口炎病毒实时荧光定量 RT-PCR 试验

C.1 引物及探针

正向引物: 5'-ATGGCTCCTACAGTTAAGAGAATCA-3';

反向引物: 5'-TGAAGTAATCAGCCGGGTATTC-3';

荧光双标记探针: 5'-FAM-CGAAATTACCGGCCAACGAGGATC-TAMAR-3'。

C.2 病毒 RNA 的提取

用商品化试剂盒提取病毒 RNA。

C.3 荧光定量 PCR 反应

一步法 RT-PCR 荧光定量试剂盒反应体系为: 2xqRT-PCR buffer 15 μ L、正向引物 0.5-1moL、反向引物 0.5-1moL、荧光探针 0.2-0.5 μ L、RT-PCR MIX 2 μ L、RNA 样品或对照 2-4 μ L、DEPC 水加至终体积为 30 μ L。将反应管置于荧光 PCR 仪上, 42 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 94 $^{\circ}$ C 3 min, 然后再按 94 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。

C.4 结果分析

C.4.1 条件设定

直接读取检测结果。基线和阈值设定原则根据仪器噪声情况进行调整, 以阈值线刚好超过正常阴性样品扩增曲线的最高点为准。

C.4.2 质控标准

C.4.2.1 阴性对照无 Ct 值, 并且无扩增曲线, 一直为水平线。

C.4.2.2 阳性对照的 Ct 值应小于 28.0, 并出现典型的扩增曲线, 两个阳性对照扩增曲线基本重合。否则, 此次实验视为无效。

C.5 结果判定

根据荧光定量 RT-PCR 反应的 Ct 值来判断阴阳性。

C.5.1 阴性: 无 Ct 值并且无扩增曲线, 表示样品中无水泡性口炎病毒。

C.5.2 阳性: Ct 值小于等于 30.0, 且出现典型的扩增曲线, 表示样品中存在水泡性口炎病毒。

C.5.3 可疑: Ct 值在 30.0~35.0 的样本建议重做。重做结果无 Ct 值或者大于等于 30.0 为阴性, 否则为阳性。

附录 D
(规范性附录)
水泡性口炎病毒间接夹心 ELISA 试验

D.1 包被捕获抗体

用 pH9.6 的碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液将兔抗血清或正常兔血清作适当稀释后包被 ELISA 板, 37℃ 孵育 1 h 或 4℃ 过夜。之后, 用磷酸缓冲盐水洗板 1 次和 1% 的卵白蛋白室温下封闭 1 h。该板可直接使用或洗 3 次以后保存在 -20℃ 备用。

D.2 加样

将待检样品的 50μL 抗原悬液加到相应孔内, 旋转振荡器上振荡孵育 30 min。

D.3 与特异性抗体反应

用含 0.05% 吐温 20、1% 卵白蛋白、2% 正常兔血清及 2% 正常牛血清将抗 VS 病毒 NJ 和 IND 血清型的单价或多价豚鼠抗血清作适当稀释, 分别加 50μL 到相应的包被兔血清孔内, 置旋转振荡器上 37℃ 反应 30 min。

D.4 加入酶结合物

将过氧化物酶/兔或山羊抗豚鼠 IgG 结合物用 PBST 作适当稀释后, 每孔各加入 50μL, 置旋转振荡器上 37℃ 反应 30 min。

D.5 加入底物

每孔加 50μL H₂O₂ 活化的底物, 在室温下反应 15min, 随后加入硫酸终止反应, 用酶标仪测光吸收值。

D.6 洗板

每步之间反应板均用含 0.05% 吐温 20 的 200μL PBS 洗 5 次。所使用的试剂均做对照。

D.7 结果判定

某个抗血清的吸光值高于其他抗血清、阳性血清以及对照吸光值 20% 以上时, 认为该血清为某个病毒亚型阳性。

附录 E
(规范性附录)
水泡性口炎液相阻断 ELISA 试验

E.1 包被捕获抗体

用 pH9.6 的碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液将兔抗血清或正常兔血清作适当稀释后包被 ELISA 板, 37℃ 孵育 1 h 或 4℃ 过夜。之后, 用磷酸缓冲盐水洗板 1 次和 1% 的卵白蛋白室温下封闭 1 h。该板可直接使用或洗 3 次以后保存在 -20℃ 备用。

E.2 液相阻断

从 1: 4 开始, 将每份待检血清在 U 型微量滴定板中 2 倍连续稀释, 每个稀释度作双份, 将等体积的 VS 病毒 NJ 或 IND 糖蛋白稀释液加到每个孔中, 37℃ 孵育 1 h, 然后将 50μL 混合物转移到包被的 ELISA 板中, 置旋转振荡器上 37℃ 反应 30 min。

E.3 特异性抗体、酶结合物和底物

使用的试剂和方法与在间接竞争 ELISA 中所使用的相同。

E.4 结果判定

按照 Spearman-Kärber 方法, 以阴性血清对照降到 50% 时的 \log_{10} 表示 50% 终点滴度, 滴度大于 1.3 (1/20) 时判为阳性。

附录 F
(规范性附录)
水泡性口炎竞争酶联免疫吸附试验

F.1 固相包被

用 pH9.6 的碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液稀释抗原，并以每孔 50 μ L 稀释抗原量加到 96 孔 ELISA 板的每个孔中，4 $^{\circ}$ C 过夜；包被板能在 -70 $^{\circ}$ C 下冻存 60 天。将板解冻后弃去抗原，加 100 μ L 封闭液。然后，将板置 25 $^{\circ}$ C 孵育 30min，弃去封闭液。用含 0.05%吐温 20 的 PBS 洗 3 次。

F.2 液相

用 1%脱脂乳按 1:8 稀释血清，并将稀释血清以每孔 50 μ L 加到每份样品的两个孔内，每块酶标板应设每种血清型的阴阳性对照；将板置 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min，不洗板，再按每孔 50 μ L 将多克隆腹水加到每个孔内，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。

F.3 酶结合物

洗板 3 次，每孔加入用 1%脱脂乳稀释的山羊抗小鼠的辣根过氧化物酶结合物 50 μ L。将板置 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min，洗板 3 次，每孔加四乙基联苯胺底物溶液 50 μ L，25 $^{\circ}$ C 孵育 5~10min，然后，每孔加 0.05M 硫酸 50 μ L 终止反应，将板置 450nm 波长下测吸光值；稀释液对照孔的光吸收值必须大于 1.0。

F.4 结果判定

如果光吸收值小于或等于稀释液对照光吸收值的 50%时，样品即为阳性。

附录 G
(规范性附录)
水泡性口炎病毒中和试验

G.1 病毒

NJ 或 IND 型 VS 病毒于 IB-RS-2 细胞单层上生长，并于液氮或-70℃保存；

G.2 被检样品

在试验前，血清于 56℃灭活 30min，包括阳性和阴性标准对照血清；

G.3 病毒中和

从 1:4 开始，将血清在平板上以 2 倍横向连续稀释，每份血清用两排孔，每孔加入相同体积的大约含 1000TCID₅₀NJ/ 25μL 的 NJ 或 IND 型 VS 病毒悬液；

G.4 37℃孵育 60min；

G.5 在长成单层的微量培养板上每孔加进 50μL 混合物，或将含有血清/病毒混合物和 150μL 的含 3×10^5 个 IB-RS-2 或 Vero 细胞悬液同时加到各孔内。

G.6 5%CO₂ 37℃培养 48~72h。

G.7 结果判定

没有出现 CPE 的孔认为是被保护。当 1000 TCID₅₀ 的值在 750~1330TCID₅₀ 之间，而阳性和阴性标准血清的滴度在其平均值的 2 倍之内时，用 Spearman-Kärber 方法计算终点滴度。

每份血清 100%的中和滴度以 log₁₀ 表示。血清滴度值等于或大于 1:32 时，即判为 VS 阳性。

非洲马瘟诊断技术规范

1 范围

本规范规定了非洲马瘟样品采集、临床症状、病理变化和实验室诊断的方法和技术要求。
本规范适用于非洲马瘟的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

2.1 组织样品

采集发热期病畜全血，用 OPG（50%甘油+0.5%草酸钠+0.5%石炭酸）或肝素抗凝，于 4℃ 下保存或送检；采集刚死亡动物的脾、肺和淋巴结（2~4g），置 10%甘油缓冲液，于 4℃ 下保存或送检。

2.2 血清样品

病畜血液，每头不少于 5mL，无菌分离血清装入灭菌小瓶中，加盖密封后冷藏或冷冻保存。

2.3 采样记录及标签

样品的包装瓶上均要贴上标签，标明编号，并填写采样单。

2.4 样品运送

运输时，样品容器与采样记录一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标志。

3 诊断

3.1 临床症状

3.1.1 最急性型或肺型：潜伏期较短（3~5d）。通常有明显的精神沉郁和发热（39~41℃），随后出现呼吸窘迫和严重的呼吸困难，痉挛性咳嗽，大量出汗，从鼻孔流出大量泡沫状液体，致死率 95%以上，有的没有任何症状突然死亡。

3.1.2 急性型或混合型：它是心肺混合型的疾病，潜伏期为 5~7d。临床上多见，病畜头部和颈部出现明显的水肿，最后死于心力衰竭，致死率 80%以上，死亡通常发生在发热开始后的 3~6d 内。

3.1.3 亚急性型或心型：潜伏期 7~14d。以发热并持续几个星期为特征。主要临床表现为皮下水肿，尤其是头部、颈部和胸部以及眶上窝。结膜充血，舌的腹侧面有出血斑。常见腹痛，致死率 50%以上。

3.1.4 温和型：潜伏期 5~14d，后期表现弛张型发热（39~40℃），清晨体温较低，下午体温升高，持续 5~8d。其他临床症状不明显。

3.2 病理变化

3.2.1 最急性型病例中，很少见到肉眼病变。

3.2.2 自然感染病例，死后剖检常见皮下和肌肉间组织胶样浸润，咽、气管、支气管内充满黄色浆液和泡沫，心内膜和心包膜有出血点和出血淤斑，心肌变性。

3.2.3 胸膜腔积水明显，肺水肿严重。主动脉和气管周围常出现水肿性浸润和纵膈结节水肿。腹腔内有腹水，大小肠浆膜面发绀。胃底小腺充血、增大，肠系膜淋巴结水肿。

3.2.4 心包积水是本病亚急性型病例的特征变化。心包内有时可见 2 升左右淡黄色液体，在心内、外膜，沿冠状脉管和心瓣膜，常有斑点状和瘀斑状出血。

3.3 血清学指标

3.3.1 间接酶联免疫吸附试验(ELISA)。

3.3.2 阻断ELISA。

3.4 病原学指标

3.4.1 病毒分离试验；

- 3.4.2 反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR);
- 3.4.3 实时反转录-聚合酶链反应 (reaL-time RT-PCR);
- 3.4.4 病毒中和试验 (VNT);
- 3.4.5 夹心 ELISA。

3.5 结果判定

3.5.1 临床怀疑病例

符合临床症状 3.1 和病理变化 3.2 之一的。

3.5.2 疑似病例

临床怀疑病例，且 3.3 血清学检测阳性。

3.5.3 确诊病例

疑似病例，且 3.4 病原学检测阳性。

4 实验室诊断

4.1 病原学方法

4.1.1 病毒分离，见附录 A。

4.1.2 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR)，见附录 B。

4.1.3 实时反转录-聚合酶链反应 (reaL-time RT-PCR)，见附录 C。

4.1.4 病毒中和试验(VNT)，见附录 D。

4.1.5 夹心 ELISA，见附录 E。

4.2 血清学方法

4.2.1 间接酶联免疫吸附试验(IELISA)，见附录 F。

4.2.2 阻断酶联免疫吸附试验(cELISA)，见附录 G。

附录 A
(规范性附录)
病毒分离试验

A.1 样品处理

A.1.1 抗凝血样品无需稀释。

A.1.2 脾、肺等组织病料，则需磨碎，用以含有青霉素、链霉素的磷酸盐缓冲液制成 10% 的组织悬浮液。

A.2 接种细胞

接种仓鼠肾细胞 (BHK-21)、猴稳定细胞 (MS) 和绿猴肾细胞 (VERO) 细胞系，吸附后，加入 MEM 维持液。

A.3 结果判定

接种后 12~18d 可出现细胞病变 (CPE)，可判为阳性，如盲传三代仍无 CPE，则判成阴性。

附录 B
(规范性附录)
反转录聚合酶链式反应

B.1 引物

S7P1: 5'-GTT AAA ATT CGG TTA GGA TG-3',

S7P2: 5'-GTA AGT GTA TTC ATT G-3'。

B.2 操作方法

B.2.1 RNA 提取

用商品化试剂盒提取病毒 RNA。

B.2.2 RT-PCR 体系

每管 RT-PCR 扩增混合液体系的总体积为 25 μ L, 其中含有 12.5 μ L 2 倍反应混合液、1 μ L 正向引物 S7P1 (10 μ L/L)、1 μ L 反向引物 S7P2 (10 μ L/L)、2 μ L 反转录酶和 Taq 酶混合物、3 μ L 从被检样品中提取的 RNA 和 6.5 μ L DEPC 水。每份待检样品重复一次, 每次检测设置标准样品对照和标准阴性对照。标准阳性对照用阳性对照 RNA 作为模板, 而标准阴性对照用 DEPC 水作为模板。

B.2.3 RT-PCR

置于 PCR 扩增仪进行 RT-PCR 扩增反应。RT-PCR 扩增反应的条件如下: 50 $^{\circ}$ C, 30min 进行反转录; 94 $^{\circ}$ C, 2min 进行 Taq 酶的激活; 40 个循环的 PCR (94 $^{\circ}$ C, 1min, 55 $^{\circ}$ C, 1min, 72 $^{\circ}$ C, 2.5min); 72 $^{\circ}$ C, 7min 延伸。

B.2.4 电泳

1%的琼脂糖凝胶进行核酸电泳。

B.3 结果判定

如果阳性对照出现 1179bp 大小的特异扩增条带, 阴性对照无任何扩增条带, 试验成立。当被检样品出现 1179bp 大小的特异扩增条带, 为 RT-PCR 检测阳性。如检测样品为特异的非洲马瘟病毒 VP7 基因序列, 则表明为非洲马瘟病毒阳性。

B.4 序列测定和分析

RT-PCR 检测阳性的扩增产物进行序列测定, 如果样品序列为特异的非洲马瘟病毒 VP7 基因序列, 则说明受检样品检测结果为非洲马瘟病毒病原核酸阳性。

附录 C
(规范性附录)
实时反转录-聚合酶链反应

C.1 引物与探针

引物1: 5'-GGCTCCAACACTCACAAGATGT-3'

引物2: 5'-GGCGGATTAATAGGCTGCATA-3'

TaqMan-MGB®探针

5'- (FAM) TGGCACGCCTTACGCGC- (MGB) -3'。

C.2 RNA 提取

用商品化试剂盒提取病毒 RNA。

C.3 扩增

混合下列试剂: 20 pmol/μL引物1 (0.75 μL)、20pmol/μL引物2 (0.75μL)、6.5μL的无RNA灭菌水及2μL样品提取模版RNA, 同时设阳性对照 (2 μL AHSV RNA) 和阴性对照 (2μL灭菌水)。将试管置于热循环仪或加热板上 (95℃孵育5min); 瞬离并立刻将其置于冰上。

在1.5mL灭菌离心管中, 依次加入下列试剂制备RT-PCR反应混合物: 无核酸酶灭菌水 (1.375μL), 10pmol/μL TaqMan-MGB探针 (0.625μL), 2×基础混合物 (12.5μL), 20U/μL RNA抑制剂 (0.25μL), RT混合物 (0.25μL)。配好反应液后, 在每个加有变性RNA模板的PCR管中加入15μL。

将所有PCR管置于荧光定量PCR仪中, 按下列反应程序进行操作:

- 55℃, 30min, 循环一次。
- 95℃, 15min, 循环一次。
- 94℃, 15s; 60℃, 1min; 循环扩增45次; 用适当的通道在每个循环的末端进行荧光的检测。

C.4 结果判定

Ct>45.0为阴性; Ct≤45.0为阳性。

附录 D
(规范性附录)
病毒中和试验

D.1 稀释病毒，每 25 μ L 含 30-100TCID₅₀ (50%组织培养感染剂量)。分别取 25 μ L 稀释病毒加入 4 个含有 25 μ L 稀释血清的微量滴定孔中。抗体监测时，血清做 10 倍稀释；抗体效价测定时，血清依次做倍比稀释；

D.2 将血清病毒混合物于 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min，然后每孔加入 0.1mL VERO 细胞悬浮液(200,000 细胞/mL)；

D.3 每个试验均应做原病毒回归滴定，即将 10 倍稀释的原病毒加入 4 个孔，每孔 25 μ L，于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 和 95%湿度下培养 4~5d，直到回归滴度显示原病毒含 30~100TCID₅₀；

D.4 平板在 2% (v/v) 戊二醛溶解的 0.15% (w/v) 结晶紫中固定和染色后，轻洗；平板也可用 70%乙醇固定后，再用 1%碱性品红染色；

D.5 结果判定

细胞层蓝染是阳性，不着色为阴性。计算蚀斑数比无血清对照孔减少 50%或以上的血清稀释度，为该血清的中和效价。

附录 E
(规范性附录)
夹心 ELISA

E.1 固相

Mab 5G5和3D2用pH7.2的PBS稀释至浓度10 μ g/mL包被酶标板, 4 $^{\circ}$ C过夜。

E.2 以含 0.05%吐温-20 的蒸馏水(洗液)将板洗 5 次, 将酶标板在吸附材料上轻拍, 以除去剩余液体。

E.3 以含 1%牛血清白蛋白(BSA)的 pH7.2 的 PBS 封闭酶标板, 200 μ L/孔, 于 37 $^{\circ}$ C作用 1h。

E.4 弃去封闭液, 将酶标板在吸附材料上轻拍。

E.5 加待检样品

加入用含 1%BSA 的 pH7.2 的 PBS 稀释的待检样品(脾脏匀浆物的 2 倍稀释液, 或 AHSV 的细胞培养上清液)。100 μ L/孔, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。[脾脏匀浆: 取约 2cm³ (1g) 脾脏, 加入 3mL MEM (基础培养基), 匀浆后, 以 600g 离心 10min, 取上清]。

E.6 按步骤 E.2 洗涤酶标板。

E.7 加结合物

将生物素标记的 5G5 MAbs 用含 1%BSA 的 pH7.2 的 PBS 作 1/500 稀释, 每孔加入 100 μ L。室温下孵育 45min。

E.8 按步骤 E.2 洗涤酶标板。

E.9 加底物

加 200 μ L/孔底物溶液[10mL 80.6mM DMAB (二甲氨基苯甲醛)+10mL 1.56mM MBTH (3-甲基-2-苯基-噻吡唑啉盐酸脞)+5 μ LH₂O₂], 约 5~10min 后(阴性对照显色之前), 加入 50 μ L 3M 的 H₂SO₄ 终止显色反应。

E.10 读值

于 600nm (620nm) 波长下读取酶标板的光吸收值(OD 值)

E.11 结果判定

按以下公式计算临界值: 临界值=C+0.06 (C 为阴性对照的 OD 值)。如样品 OD 值<临界值, 则判为非洲马瘟抗原阴性; 如样品 OD 值>临界值+0.20, 则判为非洲马瘟抗原阳性; 如样品 OD 值介于两个值之间, 则判为可疑, 需用其它方法证实。

附录 F
(规范性附录)
间接 ELISA

F.1 试剂

- F.1.1 包被抗原：重组 VP7 蛋白
- F.1.2 包被液：0.05mol/L PH9.6 碳酸盐缓冲液
- F.1.3 洗涤液：含 0.05%吐温-20PH7.4 PBS
- F.1.4 封闭液及稀释液：含 3%BSAPH7.4 PBS
- F.1.5 辣根过氧化物酶-抗马 γ 球蛋白结合物
- F.1.6 底物
- F.1.7 终止液：1mol/L H₂SO₄

F.2 操作方法

F.2.1 抗原包被

将重组 AHSV-4 VP7 以包被液稀释，包被酶标板，4℃孵育过夜。

F.2.2 洗板

以洗涤液洗板 5 次，将酶标板在吸附材料上轻拍，除去剩余的洗涤液。

F.2.3 封闭

每孔加入 200 μ L 封闭液，于 37℃孵育 1h。弃去封闭液，洗板 2 次，拍干。

F.2.4 加样

将待检血清、阳性对照血清和阴性对照血清用稀释液按 1:40 倍稀释，每孔加入 100 μ L，37℃孵育 1h。如测量抗体效价，将待检血清自 1:40 稀释开始，进行 2 倍连续稀释后，加入酶标板中（100 μ L/孔），每排孔加一份血清，阴阳性对照做法相同。37℃孵育 1h。

F.2.5 洗板

同 F.2.2。

F.2.6 加酶标结合物

将辣根过氧化物酶-抗马 γ 球蛋白结合物以稀释液稀释，加入到各孔中，100 μ L/孔，37℃孵育 1h。

F.2.7 洗板

同 F.2.2。

F.2.8 加底物溶液

将新配制好的底物溶液加入酶标板各孔中，100 μ L/孔。室温下避光孵育 5~10min（阴性对照开始显色之前）。

F.2.9 终止反应

每孔加入 100 μ L 终止液。

F.2.10 读值

于 450nm 波长下读取酶标板的光吸收值（OD 值）

F.3 结果判定

临界值=阴性对照的 OD 值+0.6。如待检血清的 OD 值<临界值，判为非洲马瘟抗体阴性；如待检血清的 OD 值>临界值+0.15，判为非洲马瘟抗体阳性；如待检血清的 OD 值介于二者之间，则判为可疑，重新检测或者采用其它方法验证。

附录 G
(规范性附录)
阻断 ELISA

G.1 试剂

非洲马瘟阻断 ELISA 抗体检测试剂盒 (商品化)。

G.2 操作步骤

G.2.1 待检血清和阴阳性对照使用样品稀释液 5 倍稀释, 分别加入包被 AHSV-4 VP7 的酶标板的各反应孔中, 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。

G.2.2 使用洗液洗板 5 次, 将酶标板在吸附材料上轻拍, 除去剩余的洗涤液。

G.2.3 每孔加入辣根过氧化物酶-抗 VP7 的单抗 100 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。

G.2.4 使用洗液洗板 5 次, 将酶标板在吸附材料上轻拍, 除去剩余的洗涤液。

G.2.5 ABTS 底物使用底物缓冲液 10 倍稀释后, 加入到酶标板各孔中, 100 μ L/孔, 室温避光孵育 10min。

G.2.6 每孔加入 100 μ L 终止液, 终止反应。

G.2.7 于 405nm 波长下读取酶标板的光吸收值 (OD 值)

G.3 结果判定

按照说明书计算阻断率。样品的阻断率小于 45%, 则该样品为非洲马瘟抗体阴性; 样品的阻断率大于 50%, 则该样品为非洲马瘟抗体阳性; 介于二者之间, 为非洲马瘟抗体可疑, 需重新进行检测, 如果结果还是一样, 两周后再次采样重新检测。

马鼻疽诊断技术规范

1 范围

本规范规定了马鼻疽样品采集、临床诊断和实验室诊断的方法和技术要求。

本规范适用于马鼻疽的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

2.1 组织样品

应采集病畜发病部位的病料，肺鼻疽应无菌采集肺组织、鼻腔鼻疽可采集鼻拭子、皮肤型鼻疽可无菌采集病变肿大的淋巴结组织、慢性型鼻疽可采集鼻腔分泌物。采集的病料应冷藏或冷冻保存。

2.2 血清样品

采集病畜血液，每头不少于 5mL，无菌分离血清装入灭菌小瓶中，加盖密封后冷藏或冷冻保存。

2.3 采样记录及标签

样品的包装瓶上均要贴上标签，标明编号，并填写采样单。

2.4 样品运送

运输时样品容器与采样记录一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标志。

3 诊断

3.1 临床症状

本病临床上分为急性型和慢性型。

3.1.1 急性型：多见于骡和驴。根据临床症状分为肺鼻疽、鼻腔鼻疽和皮肤鼻疽。

3.1.1.1 肺鼻疽主要以肺部患病为特点常可发生鼻衄血，或咳出带血黏液，同时呼吸困难等症状；

3.1.1.2 鼻腔鼻疽可见一侧或两侧鼻孔流出浆液、黏液性脓性鼻汁，鼻腔黏膜上有结节突出黏膜表面，周围绕以红晕，结节坏死后可形成溃疡，边缘不整，隆起如堤状，底面凹陷呈灰白色或黄色；

3.1.1.3 皮肤鼻疽常于四肢、胸侧和腹下等处发生局限性有热有痛的炎性肿胀并形成硬固的结节。结节破溃排出脓汁，形成边缘不整、喷火口状的溃疡，底部呈油脂样，难以愈合。结节常沿淋巴管径路向附近组织蔓延，形成念珠状的索肿。后肢皮肤发生鼻疽时可见明显肿胀变粗。

3.1.2 慢性型：最为常见，但临床症状不明显。由开放性鼻疽转来的病畜常在一侧或两侧鼻孔流出灰黄色脓性鼻汁，在鼻腔黏膜常见有糜烂性溃疡，有的在鼻中膈形成放射状斑痕。

3.2 病原学指标

3.2.1 细菌分离试验阳性；

3.2.2 聚合酶链式反应（PCR）阳性；

3.2.3 实时荧光定 PCR 试验阳性。

3.3 鼻疽菌素试验和血清学指标

3.3.1 鼻疽菌素点眼试验阳性；

3.3.2 皮下注射试验阳性；

3.3.3 眼睑皮内注射试验阳性；

3.3.4 血清补体结合试验阳性。

3.4 结果判定

3.4.1 疑似马鼻疽

符合 3.1

3.4.2 确诊马病鼻疽

疑似马鼻疽，且至少符合 3.2 或 3.3 指标之一的。

4 实验室诊断

4.1 病原学诊断方法

4.1.1 马鼻疽细菌分离试验，见附录 A；

4.1.2 马鼻疽 PCR，见附录 B；

4.1.3 马鼻疽实时荧光定量 PCR，见附录 C。

4.2 鼻疽菌素试验

4.2.1 鼻疽菌素点眼试验，见附录 D；

4.2.2 鼻疽菌素皮下注射，见附录 E；

4.2.3 鼻疽菌素眼睑皮内注射试验，见附录 F。

4.3 血清学诊断方法

马鼻疽补体结合试验，见附录 G。

附录 A
(规范性附录)
马鼻疽细菌分离试验

A.1 细菌分离培养

A.1.1 无菌采集发病组织。

A.1.2 接种甘油琼脂培养基，放置 37℃温箱中观察。

A.1.3 结果观察：该菌生长经过一段时间会融合成片，稍带奶油色，光滑，湿润，粘稠。继续培养时，生长物增厚且变成暗棕色。

A.2 试验动物接种

A.2.1 无菌采集发病组织。

A.2.2 将可以病料经腹腔接种雄性豚鼠，逐日观察动物反应。

A.2.3 结果观察：阳性反应可引起严重的局部腹膜炎和睾丸炎。

附录 B
(规范性附录)
马鼻疽 PCR

B.1 引物

正向引物: 5'-TCAGGTTTGTATGTCGCTCGG-3'

反向引物: 5'-CTAGGTGAAGCTCTGCGCGAG-3'

B.2 样品 DNA 提取

B.2.1 菌落 DNA 的提取

B.2.1.1 将平板上的一个菌落转移至 200 μ L 溶菌缓冲液中;

B.2.1.2 56 $^{\circ}$ C 孵育 1h 后;

B.2.1.3 95 $^{\circ}$ C 灭活 10min;

B.2.1.4 在 PCR 和实时 PCR 中分别加入 2 μ L 和 4 μ L 澄清裂解液作为模板。

B.2.2 马组织样品中 DNA 的提取

B.2.2.1 将马的组织样品在福尔马林溶液中灭活保存;

B.2.2.2 用手术刀将样品切成 0.5 \times 0.5 cm 小片;

B.2.2.3 将样品在去离子水中洗涤两次, 在 4 $^{\circ}$ C 无菌盐水孵育过夜;

B.2.2.4 使用液氮、研钵, 研棒将组织样绞碎;

B.2.2.5 用商品化试剂盒制备 DNA。DNA 用 80 μ L dH₂O 洗脱, 取 4 μ L 作为模板。

B.3 聚合酶链式反应 (PCR)

反应体系: 10xPCR buffer 2 μ L、2.5mmol/L dNTP 1 μ L、病毒特异性的上/下游引物各 1 μ L、反转录的 PCR 模板 2 μ L、Taq 酶 1U、去离子水 12.8 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 65 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 总延伸 10min。

B.4 结果判定

如果待检样品中含有鼻疽, 则能够检测到细菌特异性 989bp 的条带。

附录 C
(规范性附录)
马鼻疽实时荧光定量 PCR

C.1 引物

正向引物: 5'-CCCATTGGCCCTATCGAAG-3';

反向引物: 5'-GCCCGACGAGCACCTGATT-3';

探针: 5'-FAM-CAGGTCAACGAGCTTCACGCGGATC-BHQ1-3'。

C.2 样品 DNA 的提取

用商品化试剂盒提取样品 DNA。

C.3 荧光定量 PCR 反应

荧光定量 PCR 反应体系如下: 2xPremix Ex Taq 12.5 μ L、正向引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L、反向引物 (10 μ mol/L) 0.5 μ L、探针 (10 μ mol/L) 0.2 μ L、DNA 模板 2-4 μ L, 加灭菌蒸馏水至 25 μ L。应用荧光定量 PCR 扩增仪进行操作, PCR 程序如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5s, 60 $^{\circ}$ C 变性 30s, 共计 40 个循环。

C.4 结果判定

C.4.1 阴性无 Ct 值并且无扩增曲线, 表示样品中无鼻疽核酸。

C.4.2 阳性 Ct 值小于等于 30.0, 且出现典型的扩增曲线, 表示样品中存在鼻疽核酸。

C.4.3 疑似 Ct 值在 30.0~35.0 的样本建议重做。重做结果无 Ct 值或者大于等于 30.0 为阴性, 否则为阳性。

附录 D
(规范性附录)
鼻疽菌素点眼操作方法

- D.1 点眼前必须检查两眼结膜和单、双眼瞎等情况，并记录。眼结膜正常者可进行点眼，点眼后检查颌下淋巴结，体表状况及有无鼻漏等。
- D.2 规定间隔 5~6d 做两次点眼为一次检疫。每次点眼用鼻疽菌素原液 3~4 滴(0.2~0.3mL)，两次点眼必须点于同一眼中，一般应点于左眼，左眼生病可点于右眼，
- D.3 点眼应在早晨进行，第 9h 判定须在白天进行。
- D.4 固定马匹，用食指插入上眼睑窝内使瞬膜露出，用拇指拨开下眼睑构成凹兜，右手持点眼器保持水平方向，手掌下缘支撑额骨眶部，点眼器尖端距凹兜约 1cm，拇指按胶皮乳头滴入鼻疽菌素 3~4 滴。
- D.5 点眼后注意，防止风沙侵入、阳光直射眼睛及动物自行磨擦眼部。
- D.6 判定反应：在点眼后 3、6、9h，分别检查 1 次，尽可能于注射 24h 再检查一次。先由马头正面两眼对照观察，在第 6h 要翻眼检查，其余观察必要时须翻眼。细查结膜状况，有无眼眵等
- D.7 每次检查点眼反应时，应以连续两次点眼之中最高一次反应为准。
- D.8 结果判定
- D.8.1 阴性反应：点眼后无反应或结膜轻微充血及流泪，为阴性。记录为“—”。
- D.8.2 疑似反应：结膜潮红，轻微肿胀，有灰白色浆液性及黏液性分泌物的，为疑似阳性。记录为“±”。
- D.8.3 阳性反应：结膜发炎，肿胀明显，有数量不等脓性分泌物的为阳性。记录为“+”。

附录 E
(规范性附录)
鼻疽菌素皮下注射试验

- E.1 一般临床检查, 早、午、晚分别测量体温, 体温正常的方可做皮下注射。
- E.2 皮下注射前所测 3 次体温, 如其中有一次超过 39℃, 或 3 次体温平均数超过 38.5℃, 或在前一次皮下注射后尚未经过一个半月以上的, 均不得作皮下注射。
- E.3 注射部位通常在左颈侧或胸部肩胛前, 术部剪毛消毒后注射鼻疽菌素原液 1mL。
- E.4 牲畜在注射后 24h 内不得使役, 不得饮冷水。
- E.5 注射通常在零点进行。注射后 6h 测温, 每隔 2h 测一次, 连续测温 10 次后, 再于 36h 测温一次, 详细记录并划出体温曲线, 同时记录局部肿胀程度, 以备判定。局部肿胀以手掌大为明显反应。
- E.6 皮下注射鼻疽菌素的病畜可发生体温反应及局部或全身反应。
- E.6.1 体温反应: 一般在皮下注射鼻疽菌素后 6~8h 体温开始上升, 12~16h 体温上升到最高, 此后逐渐降低, 有的在注射 30~36h 后, 体温再度轻微上升。
- E.6.2 局部反应: 注射部位发热, 肿胀疼痛, 以注射后 24~36h 最为显著, 直径可达 10~20cm, 并逐渐消散, 有时肿胀可存在 2~3d。
- E.6.3 全身反应: 精神不振, 食欲减少, 呼吸短促, 脉搏加快, 步态踉跄、战栗, 大小便次数增加, 颌下淋巴结肿大。
- E.7 结果判定
- E.7.1 阴性反应: 体温升至摄氏 39℃ 以下并无局部或全身反应。
- E.7.2 疑似反应: 体温升至 39℃ (不超过 39.6℃), 有轻微全身反应及局部反应者, 或体温升至 40℃ 以上稽留并无局部反应时, 也可认为疑似反应。
- E.7.3 阳性反应: 体温升至 40℃ 以上稽留及有轻微局部反应, 或体温在 39℃ 以上稽留并有显著的局部反应 (肿胀直径 10cm 以上) 或有全身反应。

附录 F
(规范性附录)
鼻疽菌素眼睑皮内注射试验

- F.1 注射前检查眼结膜及眼睛是否单、双眼瞎等情况。注射后检查颌下淋巴结及有无鼻漏，并详细记录检查情况。
- F.2 注射部位通常在左下眼睑边缘 1~2cm 内侧眼角三分之一处皮肤实质内，注射前用硼酸棉消毒注射部位。
- F.3 保定马匹，用食指、拇指捏住下眼睑，右手持注射器，手掌支撑头部对左手捏起的眼睑皱襞术部斜向刺入下眼睑皮内，注入 0.1mL 鼻疽菌素，食指感觉注射液推进迟滞，局部呈现小包，即为药液已进入皮内。
- F.4 一般在早晨进行检测，注射后第 24、36、48h 分别进行检查，详细记录结果。
- F.5 结果判定
- F.5.1 阴性反应：无反应或下眼睑有极轻微肿胀、流泪的，为阴性反应。记录为“—”。
- F.5.2 疑似反应：下眼睑稍肿胀，有轻微疼痛及发热，结膜潮红，无分泌物或仅有浆黏液性分泌物的，为疑似阳性，记录为“±”。
- F.5.3 阳性反应：下眼睑肿胀明显，有显著的疼痛及灼热，结膜发炎畏光，有脓性分泌物的，为阳性。记录为“+”。

附录 G
(规范性附录)
鼻疽补体结合试验

G.1 预备试验

G.1.1 材料准备

G.1.1.1 标准血清：鼻疽阴、阳性马血清。

G.1.1.2 鼻疽抗原。

G.1.1.3 溶血素。

G.1.1.4 补体。

G.1.1.5 绵羊红细胞。

G.1.1.6 生理盐水。

G.1.2 溶血素效价测定，每一月左右测价一次。

G.1.3 补体效价测定，每次进行补体结合反应试验，应于当日测定补体效价。

G.1.4 抗原效价，最少每半年滴定一次。

G.2 正式试验

G.2.1 在预备试验完成的基础上，进行正式试验。

G.2.1.1 排列试管加入 1:10 稀释被检血清，总量为 0.5mL，此管准备加抗原。另一管总量为 1mL，不加抗原作为对照。

G.2.1.2 马血清在 58~59℃加温 30min，骡、驴血清在 63~64℃加温 30min。

G.2.1.3 加入鼻疽抗原（工作量）0.5mL。

G.2.1.4 加入补体（工作量）0.5mL。

G.2.1.5 加温后各试管中再加入 2.5%红细胞稀释液 0.5mL 及 2 单位溶血素 0.5mL。

G.2.1.6 再置 37~38℃水浴箱中 20min。

G.2.2 为证实上述操作过程中是否正确，应同时设置对照试验。

G.2.2.1 健康马血清。

G.2.2.2 阳性马血清。

G.2.2.3 抗原（工作量）。

G.2.2.4 溶血素（工作量）。

G.2.3 加温完毕后，立即做第一次观察。阳性血清对照管须完全抑制溶血，其它对照管完全溶血，证明试验正确。静置室温 12h 后，再做第二次观察，详细记录两次观察结果。

G.2.4 为正确判定反应结果，按下述办法制成标准比色管，以判定溶血程度。

G.2.4.1 置 2.5%红细胞稀释液，于不同试管中，另一管不加。

G.2.4.2 选择完全溶血者数管混合，按份量顺次加入前项各不同量的红细胞稀释液中。

G.2.4.3 再补充生理盐水，使每管之总量为 2.5mL。

G.3 结果判定

G.3.1 阳性反应

红细胞溶血 0~10%者为#；

红细胞溶血 10~40%者为+++；

红细胞溶血 40~50%者为++；

G.3.2 疑似反应

红细胞溶血 50~70%者为+；

红细胞溶血 70~90%者为±；

G.3.3 阴性反应

红细胞溶血 90~100%者为一。

马传染性贫血诊断技术规范

1 范围

本规范规定了马传染性贫血（EIA）样品采集、临床症状、病理变化和实验室诊断方法和技术要求。

本规范适用于马传染性贫血的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

2.1 抗凝血

病畜血液，每匹不少于 5mL，将抗凝血置于 4℃ 冷藏保存。

2.2 血清样品

采集病畜血液，每匹不少于 5mL，无菌分离血清装入灭菌小瓶中，加盖密封后冷藏或冷冻保存。

2.3 采样记录及标签

样品的包装瓶上均要贴上标签，标明编号，并填写采样单。

2.4 样品运送

运输时样品容器与采样记录一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标志。

3 诊断标准

3.1 临床症状

一般常将马传染性贫血患畜分为急性、亚急性、慢性及隐性四个类型。

3.1.1 急性型：病程通常为 2~4 周，死亡率 70%~80%。病畜体温突然升高到 39~41℃ 以上，一般稽留 8~15d，有的出现短时间的降温，然后骤升到 40~41℃ 以上，抑制稽留至死亡。临床症状及血液学变化明显。

3.1.2 亚急性型：病程较长，约 1~2 个月。主要呈现反复发作的间歇热，温差倒转现象较多。通常是反复发作 4~5 次，体温上升到 39.5~40.5℃，一般持续 4~6d，而后多经 5~18d 复发临床症状及血液学随体温的变化而变化规律。

3.1.3 慢性型：病程更长，可达数月或数年。呈现反复发作的间歇热或不规则热，但发热程度不高，发热时间段，一般为 2~3d，无热期常，可持续数周、数月或更长，温差倒转现象更为多见。有热期的临床症状及血液学变化都比亚急性病畜轻，尤其无热期常的病畜，临床症状更不明显。

3.1.4 隐性型：本性无任何临床症状，而体内却长期带毒。

3.2 病理变化

3.2.1 急性型：在浆膜、黏膜上有较多的新鲜出血点或出血斑，有的甚至呈密发状的或喷洒状；皮下组织，疏松结缔组织常见不同的胶样水肿；脾脏显著肿大，脾滤泡境界不清，柔软脆弱；肝脏肿大，肝小叶纹理不清，混浊脆弱；全身淋巴结肿大、出血；肾脏表面有散在出血点，混浊，固有结构纹理不清等变化。

3.2.2 亚急性型：可视粘膜，肠浆、黏膜，各器官被摸下等可见密发的鲜红和紫红色的出血点和出血斑；脾脏显著肿大，质地较硬，滤泡周围组织肿胀特别明显，呈粗糙的颗粒状隆起；肝脏显著肿大，呈明显肉豆蔻样外观；淋巴结充血肿胀，常伴有出血。

3.2.3 慢性型：尸体消瘦，有明显的贫血现象，血液稀薄，出血性素质表现轻微，通常只有少数器官见有出血点或出血斑的痕迹。

3.3 病原学指标

3.3.1 病毒分离试验阳性。

3.3.2 实时荧光定量 RT-PCR 试验阳性。

3.4 血清学指标

3.4.1 马传染性贫血琼脂扩散试验。

3.4.2 马传染性贫血间接 ELISA 试验检测呈阳性。

3.5 结果判定

3.5.1 疑似马传染性贫血

符合 3.1 和 3.2。

3.5.2 确诊马传染性贫血

疑似马传染性贫血，且至少符合 3.3 或 3.4 指标之一。

4 实验室诊断方法

4.1 病原学方法

4.1.1 马传染性贫血病毒分离试验，见附录 A。

4.1.2 马传染性贫血病毒荧光定量 RT-PCR 试验，见附录 B。

4.2 血清学方法

4.2.1 马传染性贫血琼脂扩散试验，见附录 C。

4.2.2 马传染性贫血间接 ELISA，见附录 D。

附录 A
（规范性附录）
马传染性贫血病毒分离

将病料接种于健康马驹或接种于马白细胞培养物，其中以接种马驹法更为敏感。

A.1 马匹接种试验

A.1.1 试验驹：选自非马传染性贫血疫区，1~2 岁，经 3 周以上系统检查，确认健康者。

A.1.2 接种材料：无菌采取可疑马传贫病马的血液。如怀疑混合感染时，须用细菌滤器过滤血清，接种材料应尽可能低温保存，保存期不宜过长。接种前进行无菌和安全检查。

A.1.3 接种方法：常用 2~3 匹马的材料等量混合，接种 2 匹以上的试验驹，皮下接种 0.2~0.3mL 左右。

A.1.4 观察期 3 个月。每日早、晚定期测温两次，定期进行临床、血液学及抗体检查。当马驹发生典型马传贫的症状和病理变化，或血清中出现马传贫特异性抗体时，即证明被检材料中含有马传贫病毒。

A.2 白细胞培养物分离病毒

A.2.1 无菌采集健康驴抗凝血，制备驴白细胞。

A.2.2 待驴白细胞培养 1~2d 后，倾弃原培养液，接种一定体积的被检材料。

A.2.3 于 37 °C 吸附 1~2h 后，吸弃接种物，更换新鲜培养液，逐日观察细胞病变。

A.2.4 结果观察：初代分离培养物通常难以出现细胞病变，一般需要盲传 2~3 代，如果被检中有马传贫病毒，则细胞培养物出现细胞变圆、破碎和脱落；必要时，可以借助病原学检测方法进行鉴定。

附录 B
(规范性附录)
马传染性贫血荧光定量 RT-PCR

B.1 引物

正向引物: 5'-CAGATTGCTGTCTCAGATAAAA-3'

反向引物: 5'-GTGTCTGTCAGGAATTTAGTT-3'

探针: 5'-FAM-TCAGCCGGATGTCCCTCACT-BHQ1-3'。

B.2 样品 RNA 的提取

用商品化试剂盒提取病毒 RNA。

B.3 荧光定量 RT-PCR 反应

一步法 RT-PCR 荧光定量试剂盒反应体系为: 2xqRT-PCR buffer 15 μ L、正向引物 (25pmol/ μ L) 0.5~1 μ L、反向引物 (25pmol/ μ L) 0.5~1 μ L、荧光探针 (25pmol/ μ L) 0.2~0.5 μ L、RT-PCR MIX 2 μ L、RNA 样品或对照 2~4 μ L、DEPC 水加至终体积为 30 μ L。将反应管置于荧光 PCR 仪器上, 48 $^{\circ}$ C 反应 20min, 94 $^{\circ}$ C 2min, 然后再按 94 $^{\circ}$ C 5s, 60 $^{\circ}$ C 20s, 共 40 个循环。

B.4 结果判定

- (1) Ct值 \leq 30且扩增曲线呈标准的S形曲线, 判定为阳性;
- (2) Ct值 $>$ 35且没有出现标准的S形曲线, 判定为阴性;
- (3) Ct值介于30和35之间判为可疑, 重新测定或用其它方法复核。

附录 C
(规范性附录)
马传染性贫血琼脂扩散试验

C.1 检验用琼脂板的制备

- C.1.1 配制 1%的琼脂溶液。
- C.1.2 融化后以两层纱布夹薄层脱脂棉过滤，除去不溶性杂质。
- C.1.3 制作马传染性贫血琼脂扩散试验用平板。
- C.1.4 打孔，反应孔用现打。

C.2 抗原

检验用抗原按马传贫琼扩抗原生产制造及检验规程进行生产。

C.3 血清

- C.3.1 标准阳性血清：能与合格抗原在 12h 内产生明显致密的沉淀线的马传贫血清，做 8 倍以上的稀释仍保持阳性反应者为宜，小量分装，冻结保存，使用时要注意防止散毒。
- C.3.2 待检血清：来自受检马的不腐败的血清，勿加防腐剂和抗凝剂。

C.4 抗原及血清的添加

打孔完毕，在琼脂板上端写上日期及编号等。在中央孔加抗原，周围孔加检验用标准阳性血清和受检血清。

平皿加盖，待孔中液体吸干后，将平皿倒置，以防水分蒸发；琼脂板则放入铺有数层湿纱布的带盖搪瓷盘中。置 15~30℃条件下进行反应，逐日观察 3 天并记录结果。

C.5 判定

阳性：当检验用标准阳性血清孔与抗原孔之间只有一条明显致密的沉淀线时，受检血清孔与抗原孔之间形成一条沉淀线；或者阳性血清的沉淀线末端向毗邻的受检血清的抗原侧偏弯者，此种受检血清判定为阳性。

阴性：受检血清与抗原孔之间不形成沉淀线，或者标准阳性血清孔与抗原孔之间的沉淀线向毗邻的受检血清孔直伸或向受检血清孔侧偏弯者，此种受检血清为阴性。

疑似：标准阳性血清孔与抗原孔之间的沉淀线末端，似乎向毗邻受检血清孔内侧偏弯，但不易判断时，可将抗原稀释 2 倍、4 倍、6 倍、8 倍进行复试，最后判定结果。观察时间可延至 5 天。

判定结果时，应从不同折光角度仔细观察平皿上抗原孔与受检血清孔之间有无沉淀线。

判断时要注意非特异性沉淀线。例如当受检马匹近期注射过组织培养疫苗，如乙型脑炎疫苗等，可见与检验用标准阳性血清的沉淀线末端不是融合而为交叉状，两个血清间产生的自家免疫沉淀线等。

附录 D
(规范性附录)
马传染性贫血间接 ELISA

D.1 试剂

商品化兔抗马IgG辣根过氧化物酶结合物、马传贫病毒抗原包被板、马传贫病毒标准阳性血清和标准阴性血清、磷酸盐缓冲液、洗涤缓冲液、血清及酶标记抗体稀释液、底物缓冲液、终止液。

D.2 操作方法

D.2.1 洗板：向各孔注入洗涤缓冲液，浸泡3 min，甩干，再注入洗涤缓冲液，重复3次。甩干孔内残液，在滤纸上吸干。

D.2.2 加被检血清及对照血清：将每份被检血清样品各取50 μ L加入到血清稀释板的各孔内，再将稀释液0.95 mL依次加入各孔内，作1:20倍稀释。混匀后分别取100 μ L依次加入抗原包被反应孔中，每份血清加两个孔。每块反应板设阴性血清和阳性血清对照各两孔，每孔100 μ L。盖好包被板置37 $^{\circ}$ C湿盒内1 h，洗板。

D.2.3 加酶标记抗体：用酶标抗体稀释液将冻干酶标记抗体稀释至工作浓度，每孔加100 μ L，置37 $^{\circ}$ C湿盒内1 h，洗板。

D.2.4 加底物缓冲液：每孔加新配制的底物溶液100 μ L，在室温下避光反应5 min~10 min。

D.2.5 终止反应：每孔加终止液 20 μ L~30 μ L。

D.3 结果判断

D.3.1 目测法

阳性对照血清孔呈鲜明的桔黄色，阴性对照血清孔无色或基本无色，被检血清孔凡显色者即判为马传贫病毒抗体阳性。如遇颜色反应较弱，但与阴性对照血清孔还有差异者，用目测法难以判定时，则以比色法测定为最终结果。

D.3.2 比色法

用酶标测试仪，在波长492 nm下，测定各孔OD值，阳性对照血清两孔平均OD值大于1.0，阴性对照血清两孔平均OD值小于等于0.2为正常反应。

按以下标准判定结果：被检血清的两孔平均OD值与阴性对照血清的两孔平均OD值之比，大于或等于2，且被检血清的两孔平均OD值在0.2以上者，判为马传贫病毒抗体阳性，否则为阴性。

马媾疫诊断技术规范

1 范围

本规范规定了马媾疫样品采集、临床症状和实验室诊断方法和技术要求。

本规范适用于马媾疫的诊断与监测。

2 样品采集、保存和运送

2.1 血清样品采集病畜血液，每头不少于 5mL，无菌分离血清装入灭菌小瓶中，加盖密封后冷藏或冷冻保存。

2.2 采样记录及标签

样品的包装瓶上均要贴上标签，标明编号，并填写采样单。

2.3 样品运送

运输时样品容器与采样记录一同装入专用运输容器中。专用运输容器应隔热坚固，内装适当冷冻剂和填充材料。外包装上要加贴生物安全警示标志。

3 诊断

3.1 临床症状

3.1.1 贫血和消瘦、共济失调；

3.1.2 眼损害、面神经麻痹；

3.1.3 生殖器官和乳腺局部水肿、水肿性皮肤丘疹；

3.1.4 关节肿胀；

3.1.5 特征性变化是由皮肤隆起的损伤形成的水肿性斑块。

3.2 血清学指标

3.2.1 补体结合试验（CF）阳性

3.2.2 间接荧光抗体试验（IFA）阳性

3.2.3 酶联免疫吸附试验（ELISA）阳性

3.3 结果判定

3.3.1 疑似病例

符合 3.1。

3.3.2 确诊病例

疑似病例，且至少符合 3.2 指标之一。

4 实验室诊断方法

4.1 补体结合试验（CF），见附录 A。

4.2 间接荧光抗体试验（IFA），见附录 B。

4.3 酶联免疫吸附试验（ELISA），见附录 C。

附录 A
(规范性附录)
马媯疫补体结合试验 (CF)

A.1 材料与试剂

豚鼠血清, 绵羊红细胞 (SRBCs), 兔溶血素血清, 阴性和阳性对照。

A.2 预稀释与灭活

A.2.1 在 100 μ L 被检血清中加入 400 μ L 巴比妥缓冲液。

A.2.2 分别在 100 μ L 阳性对照血清和阴性对照血清中加入 400 μ L 缓冲液。

A.2.3 58 $^{\circ}$ C 水浴 30min, 灭活补体和消除抗补体因素。

A.3 试验程序

A.3.1 一组 3 孔各加 25 μ L 灭活的被检血清。

A.3.2 每组 3 孔均加灭活对照血清 25 μ L。

A.3.3 每份血清的第 1 孔加 25 μ L 2 单位马媯疫锥虫抗原。

A.3.4 每份血清的前 2 孔加 25 μ L 2 单位补体。

A.3.5 每份血清的第 2 孔加 25 μ L 巴比妥缓冲液 (pH7.4)。

A.3.6 每份血清的第 3 孔加入 50 μ L 巴比妥缓冲液 (pH7.4)。

A.3.7 准备补体对照孔。

A.3.8 在微量振荡器上振摇反应板, 充分混匀试剂。

A.3.9 37 $^{\circ}$ C 水浴 1h。

A.3.10 溶血系统的准备: 在上步水浴 50min 后, 通过将稀释到每 50 μ l 含有 2 单位的兔溶血素血清与等体积的洗涤过的 3% SRBC 混合致敏 SRBC。将二者混匀后, 37 $^{\circ}$ C 孵育 10min。

A.3.11 孵育后, 每孔加 50 μ L 溶血系统。

A.3.12 在微量振荡器上振荡充分混合试剂。

A.3.13 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。

A.4 结果判定

将平板置于光源上面俯视观察。通过估算未溶解细胞的比例评价每孔补体结合程度, 表达为 0、1+、2+、3+、4+。按如下判定结果: 4+、3+、2+均判为阳性, 1+判为可疑, 微量和完全溶解判为阴性。

附录 B
（规范性附录）
马媾疫间接荧光抗体试验（IFA）

B.1 材料与试剂

B.1.1 抗原制备：制备含有虫体抗原的抹片，将抹片置于-20℃以下保存。

B.1.2 枸橼酸葡萄糖溶液。

B.1.3 结合物：用荧光素标记的羊抗马免疫球蛋白。

B.2 试验程序

B.2.1 将抗原片置于干燥器内，使其达到室温。

B.2.2 将抗原片画上标记。

B.2.3 将 PBS 稀释的被检血清定位加样在抗原片上。

B.2.4 将抗原片置于湿盒内，37℃孵育 30min。

B.2.5 用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min，然后自然干燥。

B.2.6 加入工作浓度的荧光素标记结合物。将玻片置于湿盒内，37℃水浴 30min。

B.2.7 以 PBS 冲洗 3 次，每次 5min，自然干燥。

B.2.8 以甘油/PBS 混合液封片。

B.3 结果判定

紫外光下检查，80 倍或 80 倍以上稀释的血清使虫体呈强荧光时，判为阳性；否则为阴性。

附录 C
(规范性附录)
马媯疫酶联免疫吸附试验 (ELISA)

C.1 材料与试剂

- C.1.1 包被缓冲液: pH9.6 碳酸盐缓冲液。
- C.1.2 封闭缓冲液: 碳酸盐缓冲液加 3%胎牛血清。
- C.1.3 洗涤缓冲液: PBS-T。
- C.1.4 样品和结合物缓冲液: PBS-T 加 6%FCS。
- C.1.5 枸橼酸磷酸盐缓冲液。
- C.1.6 底物指示系统: ABTS。
- C.1.7 结合物: 兔抗马 IgG (H+L) PO 或 IgY 抗马 Ig-PO。
- C.1.8 抗原: 马媯疫锥虫冻干抗原。

C.2 试验程序

- C.2.1 第 2、4、6 等列加 50 μ L 抗原; 第 1、3、5 等列加同体积碳酸盐缓冲液。湿盒中于 37 $^{\circ}$ C 孵育 40min。常水洗涤后, 每孔加 50 μ L 封闭缓冲液, 放置 20min 后, 常水洗涤, 再用 PBS-T 洗三遍, 每遍浸泡 3min。
- C.2.2 加 50 μ L 试验血清和对照血清, 两者均先用样品/结合物缓冲液作 100 倍稀释, 这些血清分别加入平行的有抗原或没有抗原孔中。温育 30min。常水洗涤, 再用 PBS-T 洗三遍。
- C.2.3 每孔加 50 μ L 用样品/结合物缓冲液适当稀释的结合物。温育 30min, 如前洗涤。
- C.2.4 所有孔加 100 μ L 底物指示系统。
- C.2.5 室温作用 15min 后, 每孔加 25 μ L 37mM NaCN 终止反应。于 405nm 波长的分光光度计判读试验结果。

第五部分 检疫与监管

动物隔离场管理规范

动物无害化处理场管理规范

消毒技术规范

动物和动物产品交易市场建设管理规范

公路动物卫生监督检查站建设管理规范

动物及动物产品流通控制规范

动物及动物产品追溯规范

饲养场动物卫生管理规范

家禽饲养场动物卫生管理规范

养猪场动物卫生管理规范

奶畜养殖场动物卫生管理规范

肉牛养殖场动物卫生管理规范

马养殖场动物卫生管理规范

屠宰场动物卫生管理规范

家禽屠宰检疫规范

牛屠宰检疫规范

羊屠宰检疫规范

猪屠宰检疫规范

规定动物疫病风险评估准则

动物隔离场管理规范

1 范围

本规范规定了动物隔离场的资质条件、建设条件和管理要求，以及动物隔离的实施、工作记录和工作报告等。

本规范适用于按规定对引进需要继续饲养动物进行隔离检疫的专门场所。

2 资质要求

取得《动物防疫条件合格证》。

3 建设要求

3.1 应由省级兽医主管部门统一规划。

3.2 原则上设在保护区内。

3.3 应符合环保要求。

3.4 入口处设明显警示标志。

3.5 饲养区应按照动物种类分区域建设，相互间有围墙等物理隔离带。

4 条件和能力要求

4.1 应当具有防风、防火、防盗、防野生动物设施设备；具有供水、供电设施设备。

4.2 应当具有消毒和熏蒸设备、样品采集和保存设备、温度调节设备等。

4.3 隔离区应具有视频监控设备。

4.4 饲养区入口、动物隔离舍入口设有更衣消毒室、消毒通道并配有紫外灯，有专用衣、帽、鞋。

4.5 应当具有单独存放饲草、饲料的场所(间)。

4.6 有对动物采样和处理的场地，必要的安全保定设施以及对动物隔离饲养的病患舍。

4.7 有与建设规模相适应的病死动物无害化处理设施。

4.8 有与建设规模相适应的粪污无害化处理设施。

5 管理要求

5.1 制度

5.1.1 应由省级动物卫生监督机构统筹安排使用、监管。

5.1.2 凡需引入继续饲养动物的单位和个人，提前 30 天向输入地省级动物卫生监督机构申请办理使用手续。

5.1.3 应有完善的观察、免疫、检疫、消毒、疫情报告、值班等工作制度。

5.1.4 外来人员、车辆及物品等未经许可不得出入，非隔离场工作人员、非驻场人员不得进入饲养区。

5.2 人员要求和安全防护

5.2.1 场方工作人员、使用单位驻场人员应无结核病、布鲁氏菌病等人畜共患病。

5.2.2 所有人员进出饲养区应更衣、换鞋、消毒。

5.2.3 隔离期间场方工作人员应实行 24 小时值班，保证设施设备有效运转。

5.3 饲养

5.3.1 同一隔离舍，实行全进全出饲养模式，不得同时隔离两批（含）以上的动物。

5.3.2 隔离舍两次使用间隔时间至少 15 天。

5.3.3 使用单位应在使用前后，派人对隔离舍及相关场地、有关设备和用具等按照有关规定进行清洗、消毒。

5.3.4 运输动物、饲料、垫料、排泄物等的车辆和笼具，应在装前卸后，按规定进行清洗、消毒和无害化处理。

5.3.5 使用单位驻场人员负责动物隔离期间的饲养管理等相关工作，定期清扫、清洗、消毒，保持动物、隔离舍内外和周边环境清洁卫生。

5.3.6 使用单位驻场人员不得擅自离开动物隔离场，不得随意出入其它隔离舍，未经隔离场工作人员批准不得中途换人。

5.3.7 场方和使用单位应协助官方兽医机构进行检疫、监测等相关工作。

5.3.8 使用单位在隔离动物进入隔离场时，应提交隔离动物的相关资料。

5.3.9 隔离动物应在指定的隔离舍饲养，不得擅自调换。

- 5.3.10 动物隔离期间所需饲料、垫料、药物及器物等原则上应使用隔离场的，如需外出购置，应按规定执行。
- 5.3.11 外出购置饲料、垫料、药物等物品来源应清楚，符合国家相关要求；进入场内，应查验、登记。
- 5.3.12 严禁将其它相关易感动物和动物产品带入场区。
- 5.3.13 动物隔离期间的排泄物、垫料及污水须经无害化处理并符合环保要求后方可运出。
- 5.3.14 使用单位驻场人员发现疑似患病或死亡的动物，应及时报告相关兽医机构。
- 5.3.15 官方兽医机构应定期巡查，查看隔离动物群体、个体情况；如接到疫情报告或发现患病或疑似患病或不明原因死亡的动物，应按规定报告。
- 5.3.16 使用单位对污染和疑似污染的场地、用具、饲料、垫料、排泄物等进行彻底消毒、无害化处理。
- 5.3.17 按照隔离期限进行隔离，大中型动物隔离期为 45 天，小型动物隔离期为 30 天。
- 5.3.18 隔离期满，官方兽医对隔离动物进行检疫，经检疫合格的出具《动物检疫合格证明》。检疫不合格的，按规定进行处理。
- 5.3.19 使用单位对饲养区、生活区定期进行有效消毒。

5.4 设施设备的维护

场内所有设施设备及辅助动力设备要定期进行维修和保养。

6 应急

6.1 应建立突发情况处理方案。

6.2 应有应急物资储备。

7 工作记录和工作报告

7.1 工作记录

7.1.1 隔离场应建立相应纸质和电子工作记录。

7.1.1.1 被隔离动物出入场记录。包括进场时间、货主姓名、动物种类及数量、畜禽标识编码、持证情况、输出和引入养殖场基本情况等。

7.1.1.2 被隔离动物隔离观察记录。包括隔离期内临床观察情况，以及免疫、治疗、用药（含饲料用药、添加剂）、无害化处理、采样检测等情况。

7.1.1.3 动物检疫情况记录。包括被隔离动物畜禽标识编码、入场出场所持动物检疫合格证明基本情况。

7.1.2 视频监控记录应至少保存 3 个月，其他工作记录应至少保存 24 个月。

7.2 工作报告

7.2.1 每批动物隔离结束后，动物隔离场应将本批动物隔离有关情况报省级和所在地动物卫生监督机构。

7.2.2 动物隔离场每 6 个月将隔离场运行情况、工作情况及统计报表及时上报省级动物卫生监督机构，通报所在地县级动物卫生监督机构。

7.2.3 场内发生动物疫情、疑似动物疫情、突发安全事件，动物隔离场应按规定及时上报。

动物无害化处理场管理规范

1 范围

本规范规定了动物无害化处理场的建设要求、条件和能力要求、管理要求、应急，以及工作记录和工作报告。

本规范适用于动物无害化处理的专门场所。

2 资质要求

取得《动物防疫条件合格证》。

3 建设要求

3.1 应由省级兽医主管部门统一规划。

3.2 应符合环保要求。

3.4 无害化处理区与生活办公区分开，并有物理隔离设施；人流与物流分离，净污分离。

3.5 无害化处理区入口、出口应分别设置人员更衣消毒室、消毒通道。

3.6 无害化处理区内设置无害化处理间、冷库，配有污水处理设施、动物扑杀器、消毒设施及消毒药品储备间、仓库、辅助用房等。

3.7 应配备与无害化处理方式相适应的消毒设施和消毒药品。

4 条件和能力要求

4.1 应当具有防火、防爆、防盗、防野生动物设施设备；具有供水、供电设施设备。

4.2 无害化处理区出入口更衣消毒室、消毒通道应有紫外灯，有专用衣、帽、鞋。

4.3 有机动消毒设备、冷藏设备、空气过滤净化处理设施，辅助动力设备，视频监控，封闭运输车辆，个人防护设备等。

4.4 场方工作人员应具有相应的岗位资质，具备动物疫病防控、无害化处理、个人防护等相关法律法规常识，熟练掌握无害化处理设施设备操作。

5 管理要求

5.1 制度要求

5.1.1 应有完善的病害动物和动物产品入场登记、设施设备操作与维护制度，有消毒、应急处置、人员防护、无害化处理后的物品流向登记、档案管理、值班等制度。

5.1.2 场内禁止参观，人员、车辆及物品等未经许可不得入场区；无关人员不得随意进入无害化处理区。

5.1.3 仓库或储备间的库存物资和器材，要按要求堆放和管理；对易燃、易爆有害物品，要严格妥善管理。

5.2 人员要求和个人防护

5.2.1 场内工作人员每年进行健康检查，取得健康证明。

5.2.2 人员防护用品包括：普通工作服和工作帽、防护服、防护口罩、防护眼镜、乳胶手套、鞋套、长筒胶鞋。

5.2.3 工作人员在进入无害化处理区时应穿戴防护服和防护口罩，佩戴防护目镜、乳胶手套、鞋套或长筒胶鞋；离开无害化处理区时应淋浴、更衣、换鞋，并经消毒后方可离开。

5.2.4 现场所有用过的一次性防护用品应作销毁处理，对循环使用的防护用品消毒处理。

5.3 生物安全及环保要求

5.3.1 根据需处理的病害动物、动物产品感染病原微生物的等级，采取相应的生物安全措施和人员防护措施。

5.3.2 病害动物及其产品应由封闭专用运输车运送到处理场，沿途不得有液体滴漏。

5.3.3 无害化处理场产生的废水、废气、废渣、噪声等应符合环保标准。

5.4 消毒

5.4.1 所有消毒池内置满消毒药，人员和车辆进出时，需经消毒池或消毒通道进出。

5.4.2 运送病害动物及其产品的车辆和笼具在离场前，应在指定区域经严格的清洗消毒后方可离场。

5.4.3 每处理一批病害动物及其产品或冷库

清空后，应对处理车间、冷库地面、墙壁、用具、设备等进行严格的清洗、消毒。

5.4.4 对无害化处理区、生活区定期进行有效消毒。

5.5 设施设备的维护

场内所有设施设备及辅助动力设备要定期进行维修/保养。

6 应急

6.1 应建立突发情况处理方案。

6.2 应有应急物资储备。

6.3 至少每两年进行一次应急演练。

7 工作记录和工作报告

7.1 工作记录

7.1.1 接收台帐和记录应包括病死动物及相关动物产品来源、种类、数量、动物标识号、运输人员、联系方式、车牌号、接收时间及经手人员等。

7.1.2 处理台帐和记录应包括处理时间、处理方式、处理数量及操作人员及官方兽医签字等。

7.1.3 消毒记录应包括消毒频次、药品、浓度、方法、时间。

7.1.4 设施设备保养维护记录。

7.2 工作报告

7.2.1 无害化处理场每 6 个月将场内运行情况、工作情况及统计报表报送所在地动物卫生监督机构。

7.2.2 场内发生人员感染事件、突发安全事件，应按规定及时上报。

消毒技术规范

1 范围

本规范规定了消毒方法和消毒剂选用原则、消毒方法、常用消毒剂的种类和使用范围，消毒程序以及消毒效果监测。

本规范适用于动物、动物产品及其运载工具、相关场所、相关物品的消毒。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件，其随后的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本部分，然而，鼓励根据本部分协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB / T 16569 畜禽产品消毒规范

3 消毒方法和消毒剂选用原则

3.1 根据不同目的选择适当的消毒方法和消毒剂。

3.2 根据需要选择广谱或对某种病原敏感的消毒剂。

3.3 根据消毒剂的消毒作用，选用两种或两种以上的消毒剂交替使用，但更换频率不宜太高，以防相互间产生化学反应，影响消毒效果。

3.4 选择符合规定的有效消毒剂。

3.5 选择环境友好型消毒剂，要注意避免消毒药物伤害消毒操作人员和动物。

4 消毒方法

4.1 物理消毒法

4.1.1 日光消毒法。

利用日光紫外线、灼热和干燥作用杀灭病原微生物，达到消毒目的。适用于圈舍垫草、用具消毒，对被污染的土壤、牧场、场地表层消毒有一定作用。

4.1.2 干燥消毒法

利用干燥抑制病原微生物的生长。用于保存草料、谷类、肉、鱼及皮张等。

4.1.3 火焰喷射

消毒火焰喷射消毒器中喷射的火焰具有很高温度，瞬间就能有效杀死物体表面的病原。常用于砖混或水泥墙壁、地面、金属笼具、金属或水泥饲槽等非易燃物品的表面消毒。

4.1.4 热空气灭菌

一般在干热灭菌箱内进行，加热 120℃~130℃维持 2h，能杀死所有微生物的繁殖体及芽孢，适用于干燥的玻璃器皿等耐高温物品的消毒。

4.1.5 煮沸消毒

用于耐煮的金属器械、木质和玻璃器具、工作服等的消毒。

4.1.6 高压蒸汽消毒

利用高压蒸汽灭菌器在 103.4kpa、121.3℃下维持 20~30min，可以杀死全部细菌及其芽孢。适用于耐高温和耐水物品的消毒。

4.1.7 流通蒸汽消毒

利用流通蒸汽灭菌器发出的 100℃左右的水蒸汽进行消毒的方法。一般维持 15~30min，可杀灭所有微生物的繁殖体。适用于耐高温和耐水物品的消毒。

4.1.8 巴氏消毒法

在 61~63℃加热 30min（低温长时间巴氏消毒法），或 71~72℃加热 15min（高温短时间巴氏消毒法），然后迅速冷却至 10℃左右。适用于不耐高温的物品的消毒，多用于牛奶灭菌。

4.2 化学消毒法

4.2.1 喷雾法

将化学消毒剂配制成一定浓度的溶液后，装入喷雾器内，用喷雾器向被消毒的对象喷雾，对其进行消毒。

4.2.2 喷洒法

将化学消毒剂配制成一定浓度的溶液后，直接喷洒到待消毒的对象表面，对其进行消毒。

4.2.3 擦拭法

用布块等浸沾配制好的消毒药液，擦拭被消毒的物品，对其进行消毒。

4.2.4 浸泡法

将被消毒的物品浸泡于配制好的消毒药液内，对其进行消毒。

4.2.5 熏蒸法

将消毒剂加热或加入氧化剂，使其气化，气态的消毒剂会弥散到密闭空间内的每一个角落，在一定时间内，达到消毒目的。

4.3 生物热消毒法

将被污染的粪便、染疫动物尸体埋在一定深度的发酵坑或堆积一定的高度，通过粪便生物热和尸体的腐败，杀灭各种病毒、细菌（芽胞除外）、寄生虫虫卵等病原体。对粪便常用的生物热消毒法有堆粪法与发酵池法。

5 常用消毒剂种类及使用范围

5.1 酸类

5.1.1 盐酸：常用来消毒炭疽芽胞污染的皮张。常用 2% 盐酸中加 15% 食盐，浸泡皮张，消毒后需用碱液中和。

5.1.2 柠檬酸：0.2% 的柠檬酸水溶液加入适量清洁剂后，可以改善其效力，适用于被污染畜舍、场地、器具、运输工具、粪便、泔水、其它被污染物品等的喷洒消毒和被污染耐酸器具、物品等的浸泡消毒。

5.1.3 乳酸、醋酸：适用于空气消毒。按 6~12ml/100m³ 的用量，加水稀释成 20% 浓度进行乳酸蒸汽消毒。乳酸蒸汽亦可用来消毒仓库霉菌，按 100ml/1000m³ 的用量，加水 100~200ml 加热。

5.2 碱类

5.2.1 氢氧化钠（又名苛性钠或烧碱）：使用时需配成 2%~5% 的水溶液，将其喷洒到待消毒的对象上，维持 6~12h 后用清水冲干净。适用于被污染畜舍、屠宰加工厂、运动场、饲槽、器具、装置、运输车船、粪便、尸体、泔水、其它被污染物品等的喷洒消毒和被污染耐碱器具、装置、物品等的浸泡消毒。炭疽芽胞污染物和场所的消毒使用 20% 溶液。

5.2.2 氧化钙（生石灰）：常用于畜禽舍墙壁、畜栏、地面、阴湿地面、粪池周围及污水沟等消毒。畜禽圈舍墙壁、畜栏、地面消毒使用 20% 石灰乳。直接将生石灰加入水中，撒在阴湿地面、粪池周围及污水沟等处进行消毒；消毒粪便可加等量的 2% 石灰乳，使接触至少 2h；畜禽场、屠宰场等门口放置浸透 20% 石灰乳的湿草包用于消毒鞋底。

5.2.3 草木灰：适用于被污染的畜舍、禽舍、饲槽和场地的消毒。多使用 30% 热草木灰水喷洒。

5.3 酚类

5.3.1 苯酚（又叫酚、石炭酸）：用于处理污物、用具和器械，以及用于消毒车辆、墙壁、畜禽运动场及畜禽圈舍。通常使用 2%~5% 的水溶液。不适用于肉、蛋的运输车辆及贮藏肉蛋的仓库消毒。

5.3.2 煤酚（又叫甲酚）：主要用于畜舍、用具和排泄物的消毒，以及手术前洗手和皮肤的消毒。通常手术前洗手及皮肤消毒使用 2% 水溶液，器械、物品消毒 3%~5% 水溶液，畜禽舍、畜禽排泄物等的消毒使用 5%~10% 水溶液。不适用于蛋品和肉品的消毒。

5.3.3 复合酚：主要用于畜禽圈舍、栏、笼具、饲养场地、排泄物等喷洒消毒。常用浓度为 0.35%~1%。

5.4 醇类

主要是乙醇。常用 75% 水溶液，又称为酒精，用于皮肤及器械消毒。

5.5 醛类

主要是甲醛。常用 40% 水溶液，又称为福尔马林，用于圈舍、用具、皮毛、仓库、实验室、衣物、器械、房舍等的消毒，也可用于畜禽排泄物消毒。2% 福尔马林用于器械消毒，置于药液中浸泡 1~2h；10% 甲醛溶液可以处理排泄物，以及圈舍、皮毛、仓库、实验室、衣物、器械等消毒；房舍消毒常用熏蒸消毒法。

5.6 氯制剂

5.6.1 漂白粉（氯化石灰）：主要用于畜禽圈舍、畜栏、笼架、饲槽及车辆等的消毒；屠宰加工厂操作前或日常消毒中设备、工作台面等消毒。水溶液常用作水源和食品加工厂的器皿

消毒。可采用 5%~10%混悬液喷洒消毒，亦可用于粉末撒布；5%溶液 1h 可杀死芽胞；10%~20%乳剂可用于消毒被污染的圈舍、畜栏、粪池、排泄物、运输畜禽车辆和污染了炭疽芽胞的场所。干粉按 1:5 比例可用于粪便的消毒。每 1L 水中加 0.3~1.5 g，用于自来水消毒，但若河水或井水则需每升水加入 6~10g，30min 后可饮用。

5.6.2 二氯异氰尿酸钠：可用于水、圈舍、畜禽粪便等消毒，可采用喷洒、浸泡、擦拭等方法。消毒圈舍每平方米用 10~20mg，作用 2~4h；冬季在 0℃以下 50 mg / m²，作用 16~24 h 以上。饮水消毒 4g/L，作用 30 min。

5.6.3 三氯异氰尿酸钠：常用作环境消毒、饮水消毒、带鸡消毒或带猪消毒。饮水消毒 4~6mg/L，喷洒消毒 200~400mg/L，熏蒸消毒 5g/m³。

5.7 氧化剂

主要是过氧乙酸，可用于实验室、无菌室、圈舍、仓库、屠宰加工车间、运载工具等的空气消毒和室内熏蒸消毒。0.5%溶液可用于畜禽圈舍、饲槽、车辆等的喷雾消毒；0.04%~0.296%溶液用于浸泡消毒耐酸塑料、玻璃搪瓷和橡胶制品等；5%溶液按 2.5 ml / m³对密闭的实验室、无菌室、圈舍、仓库、屠宰加工车间等的空气消毒；0.396%溶液按 30ml / m³用于带群消毒。

5.8 表面活性剂

5.8.1 新洁尔灭：用于养殖场用具和种蛋消毒。0.1%水溶液喷雾消毒蛋壳、孵化器及用具等；0.15%~0.2%水溶液鸡舍内喷雾消毒。

5.8.2 杜灭芬：用于器械、奶牛场用具、设备的消毒。0.05%水溶液（须加 0.05%的亚硝酸钠）用于器械消毒。

5.8.3 络合碘（碘伏）：可用于新城疫、鸡传染性法氏囊病的预防和紧急消毒，可带鸡喷雾；也可用于圈舍的环境和用具的喷雾消毒。80~100mg / kg 的水溶液可用于圈舍的环境、用具的喷雾消毒；40mg / kg 水溶液用于种蛋的浸洗消毒（10min）；80mg / kg 水溶液用于孵化器的洗刷消毒，200~500mg / kg 水溶液可用于预防和紧急消毒，也可带鸡喷雾消毒。

5.8.4 洗必泰：多用于洗手消毒、皮肤消毒、创伤冲洗、也可用于圈舍、器具设备的消毒等。200mg/L 洗手消毒，500mg/L 皮肤消毒。

5.9 挥发性烷化剂

主要有环氧乙烷。适用于精密仪器、手术器械、生物制品、皮革、裘皮、羊毛、橡胶、塑料制品、饲料等物品的消毒，也可用于仓库、实验室、无菌室等的空间消毒。杀灭细菌使用浓度 300~400g/m³；消毒霉菌污染使用浓度 700~950g/m³；消毒芽孢污染的物品使用浓度 800~1700g/m³。要求严格密闭，温度不低于 18℃，相对湿度 30%~50%，时间 6~24h。

6 消毒程序

6.1 预防性消毒

6.1.1 环境消毒

- (1) 养殖场周围及场内污水池、粪收集池、下水道出口等设施每月消毒 1-2 次；
- (2) 养殖场大门口消毒池每周更换消毒液 2-3 次；
- (3) 畜舍周围环境每周消毒 1-2 次；
- (4) 动物舍入口处设长度为 1.5m 以上、深度为 20cm 以上的消毒槽，每周至少更换 2 次消毒液；
- (5) 动物舍内每天消毒 1 次。

6.1.2 人员消毒

- (1) 应定期清洗、更换工作服和鞋、帽，清洗后的工作服晒干后应用消毒剂熏蒸消毒 20min。
- (2) 工作人员的手用肥皂洗净后，浸于消毒液如 0.2%柠檬酸、洗必泰或新洁尔灭等溶液内 3-5min，清水冲洗后抹干。然后穿上生产区的水鞋或其他专用鞋，通过脚踏消毒池后，进入生产区。

6.1.3 圈舍消毒

- (1) 圈舍的全面消毒，按畜舍排空、清扫、洗净、干燥、消毒、干燥、再消毒顺序进行。
- (2) 在畜群出栏后，圈舍要先用 3%-5%氢氧化钠溶液或常规消毒液进行 1 次喷洒消毒，可加用杀虫剂，以杀灭寄生虫和蚊蝇等。

(2) 对排风扇、通风口、天花板、横梁、吊架、墙壁等部位的积垢进行清扫, 然后清除所有垫料、粪肥, 清除的污物集中处理。

(3) 经过清扫后, 用喷雾器或高压水枪由上到下、由内向外冲洗干净。对较脏的地方, 可先进行人工刮除。

(4) 圈舍经彻底洗净干燥, 再经过必要的检修维护后即可进行消毒。首先用 2% 氢氧化钠溶液或 5% 甲醛溶液喷洒消毒。24h 后用高压水枪冲洗, 干燥后再喷雾消毒 1 次。为了提高消毒效果, 一般要求使用 2 种以上不同类型的消毒药进行至少 3 次的消毒 (建议消毒顺序: 甲醛→氯制剂→复合碘制剂→熏蒸)。喷雾消毒要使消毒对象表面至湿润挂水珠。对易于封闭的圈舍, 最后一次把所有用具放入圈舍再进行密闭熏蒸消毒。熏蒸消毒门窗密闭 24h 后, 打开门窗通风换气 2d 以上, 散尽余气后方可使用。

(5) 在完成所有清洁和消毒步骤后, 保持不少于 2 周的空舍时间。进动物前 5-6d 对圈舍的地面、墙壁用 2% 氢氧化钠溶液彻底喷洒。24h 后用清水冲刷干净再用常规消毒液进行喷雾消毒。

6.1.4 用具及运载工具消毒

出入畜舍的车辆、工具定期进行严格消毒, 可采用紫外线照射或消毒药喷洒消毒, 然后放入密闭室内用福尔马林熏蒸消毒 30min 以上。

6.1.5 带群消毒

选用杀菌 (毒) 作用强而对畜体无害, 对塑料、金属器具腐蚀性小的消毒药。用高压动力喷雾器或背负式手摇喷雾器, 将喷头高举空中, 喷嘴向上以画圆圈方式先内后外, 逐步喷洒, 使药液如雾一样缓慢下落。要喷到墙壁、屋顶、地面, 以均匀湿润和动物的体表稍湿为宜, 不得直喷畜, 雾粒直径应控制在 80-120 微米之间, 同时与通风换气措施配合起来。

6.2 紧急消毒

(1) 对圈舍内外消毒后再行清理和清洗。

(2) 清理污物。将畜舍内的污物、粪便、垫料、剩料等各种污物清理干净, 并作无害化处理。所有病死牲畜、被扑杀牲畜及其产品、排泄物以及被污染或可能被污染的垫料、饲料等物品进行无害化处理。

(3) 器具消毒。对所有可能被污染的运输车辆、工具, 对畜舍墙壁、地面、笼具, 特别是屋顶木架等, 用消毒液进行地面和墙壁喷雾或喷洒消毒。对金属笼具等设备采取火焰消毒。

(4) 人员消毒。参加疫病防控的各类工作人员, 包括穿戴的工作服、鞋、帽及器械等都应进行严格的消毒, 消毒方法可采用消毒液浸泡、喷洒、洗涤等。

(5) 以上所产生的污水和工作服等废弃物均作无害化处理。

7 消毒效果监测

消毒的效果决定于许多因素, 如病原体抵抗力的特点、所处环境的情况和性质、消毒时的温度、药剂的浓度、作用时间长短等。

7.1 熏蒸消毒监测

7.1.1 将装于布袋内的枯草杆菌芽孢染菌片 (每片含菌 1000 万个) 或化学指示袋 (溴酚蓝指示剂) 放入熏蒸室 (器) 内, 同时安放入输药管道, 并检查包装袋的壁有无破损或裂缝, 然后封口。

7.1.2 熏蒸 48h 后, 取出染菌片, 放入灭菌营养肉汤, 37℃ 下培养 24h, 观察有无细菌生长; 或观察化学指示袋是否由无色变为紫色。若无细菌生长或指示袋变为紫色, 证明消毒效果良好。

7.2 喷雾消毒效果监测

7.2.1 染菌样片 (枯草杆菌芽孢或大肠杆菌) 测定法

7.2.1.1 将染菌样片置于具有代表性的各点。

7.2.1.2 消毒后无菌操作将染菌样片置入含有中和剂的营养肉汤中, 充分振荡, 经适当稀释, 取适量稀释液, 浇注平板, 置于 37℃ 温箱中培养 24~48h, 进行菌落计数, 同时作对照样片, 计算杀灭率。

7.2.1.3 杀灭率 (%) = (对照样片回收菌落数 - 消毒后样片回收菌落数) × 100% / 对照样片回收菌落数。

7.3 浸泡消毒效果监测

7.3.1 将染菌样片放入布袋内, 置于消毒容器 (池) 内。

7.3.2 消毒后，取出染菌样片，放入灭菌营养肉汤，37℃下培养 24h，观察有无细菌生长，若无细菌生长，证明消毒效果良好。

活畜禽交易市场动物卫生管理规范

1 范围

本规范规定了专门经营活畜禽交易市场的动物卫生管理要求。

本规范适用于无疫区内专营活畜禽交易市场的动物卫生监督管理。动物交易会、动物拍卖会和动物展览会的经营场所监督管理可参照本规范执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

《动物防疫条件审查办法》

3 选址、布局要求

3.1 与文化教育科研等人口集中区域、生活饮用水源地、动物饲养场和养殖小区、动物屠宰加工场所，种畜禽场、动物隔离场所、无害化处理场所，动物诊疗场所之间的距离符合动物防疫条件要求。

3.2 市场周围应有围墙。

3.3 场内设管理区、交易区、留验观察区、废弃物处理区，各区相对独立并有明显的标志。

3.4 交易区内不同种类动物交易场所相对独立。

3.5 活禽交易市场中，水禽与其它家禽交易区应适当分开。

3.6 设有专门的兽医工作室。

4 设施设备要求

4.1 出入口处设置与门同宽、长 4m、深 0.3m 以上的消毒池，置满消毒药。

4.2 有清洗消毒设备，并应保持正常运行。

4.3 有符合环保要求的，并与经营规模相适应的粪便、污水、污物处理设施。

4.4 具备与经营规模相适应的病害动物无害化处理设备，或委托具备无害化处理资质和能力的单位承担无害化处理。

4.5 场内应当设有防蝇、防蚊、防鼠等设施。

4.6 场内交易区应设有视频监控设备。

5 人员要求

5.1 场方工作人员应取得健康证明，佩戴身份标识。

5.2 场方工作人员应熟悉动物疫病防控相关法律法规，了解应急处置和个人防护知识。

6 制度要求

6.1 场方应建立、执行畜禽进场检查核实制度，审验进场交易畜禽的检疫合格证明和标识，建立进场交易畜禽台账，如实记录交易品种、数量、交易人及联系方式、交易时间、畜禽流向等。

6.2 场方应建有动物和运载车辆出入登记、疫情报告、定期休市、消毒、无害化处理、疑似染病动物隔离观察制度、应急处置等制度并有效实施。

7 记录要求

7.1 场方应建立货主、畜禽和运载车辆出入、疫情报告、定期休市、消毒、无害化处理、疑似染病动物隔离观察等情况的详细记录。

7.2 当地动物卫生监督机构应建有检疫、监督检查、疑似染疫动物隔离观察、应急处置等工作记录。

7.3 各项记录要建立电子记录并由专人负责登记保管。

7.4 档案应保存 24 个月以上。

公路动物卫生监督检查站建设管理规范

1 范围

本规范规定了公路动物卫生监督检查站建设和管理的相关要求。

本规范适用于公路动物卫生监督检查站的建设和管理，设立在主要港口、铁路、航空港的动物卫生监督检查站的建设、管理参照本规范执行。

2 建设要求

2.1 设立的程序

2.1.1 根据无疫区建设需要，由省级人民政府批准设立，为动物卫生监督机构的派出机构，同时报农业部备案。

2.1.2 动物卫生监督检查站设置情况向公众公布。

2.2 建设条件

2.2.1 公路动物卫生监督检查站应设立在无疫区和保护区的交界处。

2.2.2 公路动物卫生监督检查站名称统一为“××省（自治区、直辖市）××公路动物卫生监督检查站”，标牌统一为竖牌，长 180 厘米，宽 30 厘米，厚 4 厘米，白底黑字，大宋字体。

2.2.3 有固定的独立办公场所，面积不少于 60 平方米。

2.2.4 有与开展工作相适应的检查场地和设施。

2.2.5 建有车辆消毒通道。

2.2.6 按规定悬挂动物卫生监督执法标志。

2.2.7 距公路动物卫生监督检查站适当位置设立用反光材料制作的提示牌和停车检查提示牌。

2.2.8 配有反光背心、口罩、皮手套、胶鞋、防护服等人员防护设备。

2.2.9 配有与开展工作相适应的照明设施。

2.2.10 配有与开展工作相适应的仪器设备，包括视频监控设备、冰柜（冰箱）、数码摄像机、数码照相机、执法记录仪、对讲机、录音笔、显微镜、机动消毒喷雾器、冷藏包、采样检疫箱、执法车、应急灯等。

2.2.11 配有与开展工作相适应的办公设备，包括台式计算机（能够保持随时与互联网连接）、打印机、传真机、电话机、文件柜、储藏柜、办公桌椅（每人 1 套）等。

3 管理要求

3.1 公示

在明显位置设置公示牌。公示内容包括：主管机关、设站依据、执法依据及职责、执法程序和内容、收费标准和处罚依据、上岗人员情况，以及省、市、县动物卫生监督机构的监督电话。

3.2 人员要求和管理

3.2.1 动物卫生监督检查站执法人员应当符合下列条件：

3.2.1.1 遵纪守法，作风正派，公正廉洁。

3.2.1.2 持证上岗，着装整齐，具备官方兽医资格。

3.2.1.3 熟悉动物防疫法律法规及相关规定。

3.2.2 执法人员每年参加培训不少于一次。

3.2.3 遵守畜牧兽医综合执法“六条禁令”，杜绝公路“三乱”。

3.3 执法程序

执法人员在检查时，使用指示牌，引导运输动物和动物产品车辆进入检查场地。

3.3.1 进出无疫区的易感动物和动物产品，按照下列程序实施检疫。

3.3.1.1 执法人员向货主出示执法证件，由两名执法人员实施检查。

3.3.1.2 查验是否具有《动物检疫合格证明》、检疫标志和畜禽标识，并核对所载信息与实际情况是否相符。

3.3.1.3 是否具有输入地省级动物卫生监督所审批的进入无疫区手续。

3.3.1.4 跨省引进乳用动物、种用动物及其精液、胚胎、种蛋的，还应查验《跨省引进乳用动物种用动物检疫审批表》。

3.3.1.5 查验动物是否临床健康，了解和观察动物在运输途中有无死亡和其它异常现象。

3.3.1.6 查验动物产品是否腐败变质。

3.3.1.7 引入用于饲养、经营的易感动物，按指定路线到指定隔离场进行隔离检疫。输入的用于展览、演出和比赛等相关易感动物，参照执行。

3.3.1.8 引入易感动物产品，按指定路线到指定地点由官方兽医实施检疫。

- 3.3.1.9 对运载动物及动物产品的车辆实施消毒。
- 3.3.2 进出无疫区的非易感动物和动物产品，按照下列程序进行监督检查：
- 3.3.2.1 执法人员向货主出示执法证件，由两名执法人员实施检查。
- 3.3.2.2 查验是否具有《动物检疫合格证明》、检疫标志和畜禽标识，并核对所载信息与实际情况是否相符。跨省引进乳用动物、种用动物及其精液、胚胎、种蛋的，还应查验《跨省引进乳用动物种用动物检疫审批表》。
- 3.3.2.3 查验动物是否临床健康；查验动物产品是否腐败变质。
- 3.3.2.4 对运载动物及动物产品的车辆实施消毒。
- 3.3.3 过境无疫区的易感动物和动物产品执法程序同 3.3.1，但易感动物不需要进行隔离检疫。
- 3.3.3.1 动物卫生监督检查站对过境无疫区的易感动物及动物产品指定过境路线及时限，并在《动物检疫合格证明》上进行标注。
- 3.3.4 结果处理
- 3.3.4.1 易感动物和动物产品检查：
输入无疫区的易感动物和动物产品，经检疫合格的，由输入地官方兽医出具《动物检疫合格证明》，准予进入；不合格的，出具检疫处理通知单，不准进入，并按照相关规定处理。
过境无疫区的易感动物和动物产品，经检查符合要求的，准许过境，在《动物检疫合格证明》上加盖动物卫生监督检查站专用章，并通报指定出境的无疫区动物卫生监督检查站；不符合要求的，按相关规定处理。
- 3.3.4.2 非易感动物和动物产品：
检查符合要求的，在《动物检疫合格证明》上加盖动物卫生监督检查站专用章放行。
检查不符合要求的，按照相关规定处理。
- 3.3.5 执法人员发现运载工具、包装物和容器有洒漏隐患的，应责令货主或承运人采取有效控制措施，无法做到的不准入境、过境。

4 工作记录

- 4.1 检查站应建立相应纸质和电子工作记录。
- 4.1.1 监督检查记录。动物卫生监督检查站应完整、规范填写监督检查登记表、监督检查日志，并建立完整的监督检查档案。
- 4.1.2 检疫记录。动物卫生监督检查站须完整、规范填写检疫工作记录，详细登记货主姓名、地址、回收的进入无疫区相关审批材料、检疫时间、检疫地点、检疫动物种类、数量及用途、对发现异常情况的处理、原附检疫证明编号等，并由货主签名。
- 4.2 视频监控记录应至少保存 3 个月，其他工作记录应至少保存 24 个月。

动物及动物产品流通控制规范

1 范围

本规范规定了易感动物及动物产品进入无疫区及过境无疫区的检疫监管要求。

本规范适用于易感动物及动物产品进入或过境无疫区的流通控制活动。

2 定义

指定通道

指由无疫区建设省份省级人民政府指定并公告的允许无疫区外动物及动物产品进入无疫区的通道，指定通道应设有动物卫生监督检查站。

3 进入

3.1 所有进入无疫区的动物和动物产品应由指定通道进入。

3.2 引进易感动物和动物产品

3.2.1 免疫无疫区引进的相关易感动物及其产品应来自于同种动物疫病免疫无疫区或非免疫无疫区。

3.2.2 非免疫无疫区引进的相关易感动物及其产品应来自于同种动物疫病的非免疫无疫区。

3.2.3 从其他同类型的动物疫病无疫区直接引进易感动物，落地前向输入地县级动物卫生监督机构申报检疫，经输入地官方兽医检疫合格后，出具《动物检疫合格证明》。

3.2.4 跨省引进乳用动物、种用动物及其精液、胚胎、种蛋的，应当取得输入地所在的省级动物卫生监督机构签署的有效《跨省引进乳用动物种用动物检疫审批表》。

3.2.5 确需从非无疫区引进相关易感动物继续饲养的，应取得输入地所在的省级动物卫生监督机构准引手续和输出地动物卫生监督机构出具的《动物检疫合格证明》。经指定通道进入后，应当在指定的隔离场，按照规定进行隔离检疫。隔离检疫合格的，由输入地官方兽医出具《动物检疫合格证明》。输入用于展览、演出和比赛等相关易感动物，参照执行。

3.2.6 无疫区外的易感动物原则上不得进入无疫区内屠宰场进行屠宰。确需从无疫区外的非无疫区引进易感动物进行屠宰的，应满足相应规定动物疫病的无疫区标准要求。

3.2.7 来自非无疫区的相关易感动物产品，应当在指定的地点，按照规定进行检疫。检疫合格的，由输入地官方兽医出具《动物检疫合格证明》；不合格的，不准进入，并依法处理。

3.3 输入后监管

3.3.1 继续饲养的易感动物到达目的地后，货主或者承运人应当在 24 小时内向所在地县级动物卫生监督机构报告，并接受监督检查。

3.3.2 对于继续饲养的易感动物，要定期进行监督检查和疫情监测。

3.3.3 应详细掌握所有引进易感动物和动物产品的生产、去向和结果，并建立相关档案。

3.3.4 对未按规定进入无疫区的易感动物和动物产品，由发现地动物卫生监督机构依法进行处理处罚，并对有关情况进行风险评估，采取控制措施。

3.3.5 发现染疫动物或动物产品，应立即按照有关规定处理，并及时追踪溯源。

4 过境

原则上不允许非无疫区的动物及动物产品过境无疫区，确需过境无疫区的，应满足以下要求：

4.1 货主或承运人持有有效的检疫证明，向经过的公路动物卫生监督检查站报验，由公路动物卫生监督检查站人员对动物及动物产品的检疫证明、检疫验讫标志和畜禽标识、起运地、到达地等进行认真核对，并查验动物及动物产品是否符合检疫合格条件要求。对不符合过境要求的动物及动物产品予以劝返，不准过境。

4.2 对运载车辆进行消毒，并监督过境无疫区的易感动物和动物产品经指定通道进入，在规定时间内经动物卫生监督检查站指定的路线过境，通过指定道口离开无疫区。

4.3 运输途中，患病、死亡的动物及其排泄物、垫草等污物不得随意抛弃，必须在当地动物卫生监督所指定的地点卸放，并在当地动物卫生监督所的监督下进行无害化处理。

4.4 发现运载工具、包装物和容器有可能中途撒漏的，责令货主或承运人采取控制措施，对无法采取控制措施的不准过境。

5 记录

建立易感动物及动物产品引进、过境记录和监管记录，记录保存期为 24 个月以上。

动物及动物产品追溯规范

1 范围

本规范规定了通过动物卫生证章标志、养殖档案或防疫档案、官方记录和非官方记录，实施动物及动物产品可追溯的要求。

本规范适用于在饲养、屠宰、运输、经营等环节中对动物及动物产品实施的追踪溯源

2 定义

2.1 官方记录

指各级兽医机构在实施动物防疫、检疫、监督工作中记载各类工作信息的记录，以及食药监、工商、质监等部门按照有关规定，对动物产品生产、经营、加工、贮藏等活动实施监管的工作记录。

2.2 非官方记录

指从事动物饲养、屠宰、经营、隔离、运输以及动物产品生产、经营、加工、贮藏等活动的单位和个人，在从事动物饲养、屠宰、经营、隔离、运输以及动物产品生产、经营、加工、贮藏等活动中建立记载动物及动物产品相关信息的记录，包括养殖档案、进出货物的台账、法定凭据、包装标识等。

3 追溯凭据及查验内容

官方记录和非官方记录是对动物及动物产品实施追溯的重要凭据。

3.1 各级兽医机构在实施动物及动物产品全程监管的过程中，要建立统一、完整、规范的工作记录。各类工作记录的填写项目、填写格式、填写时间、工作要求等由省级兽医机构按照农业部相关规定统一制定。从事饲养、屠宰、经营、生产、加工、贮藏等活动的单位和个人按照兽医机构的要求建立完整、准确的工作记录。

3.2 记录包括养殖档案、防疫档案、免疫记录、监测记录、流行病调查记录、检疫记录、各环节监督检查记录、无害化处理记录、动物卫生证章标志管理记录、疫情处置记录等。

3.3 追溯查验的内容

3.3.1 动物卫生证章标志

3.3.1.1 畜禽标识：查验畜禽标识编码、佩戴时间等。

3.3.1.2 检疫证明：查验检疫证编号、货主基本情况、启运地、目的地、动物和动物产品基本情况、牲畜耳标号、通过的公路动物卫生监督检查站签章、出证动物卫生监督机构和官方兽医签章、出证时间等。

3.3.1.3 检疫标志：包括检疫滚筒印章、检疫粘贴标志，查验区域代码、签章单位。

3.3.1.4 动物卫生证章标志管理记录。

3.3.2 养殖档案

3.3.2.1 养殖场养殖档案：畜禽的品种、数量、繁殖记录、标识情况、来源和进出场日期；饲料、饲料添加剂等投入品和兽药来源、名称、使用对象、时间和用量等有关情况；检疫、免疫、监测、消毒情况；畜禽发病、诊疗、死亡和无害化处理情况；畜禽养殖代码；农业部规定的其他内容。

3.3.2.2 动物疫病预防控制机构畜禽防疫档案

3.3.2.2.1 养殖场：名称、地址、联系电话、动物种类、数量、免疫日期、疫苗名称、动物养殖代码、畜禽标识顺序号、免疫人员以及用药记录等。

3.3.2.2.2 散养户：户主姓名、地址、联系电话、畜禽种类、数量、免疫日期、疫苗名称、畜禽标识顺序号、免疫人员以及用药记录等。

3.3.3 相关工作记录

3.3.3.1 免疫记录、监测记录（血清学监测、病原学监测）、流行病调查记录。

3.3.3.2 检疫记录：检疫申报记录、产地检疫记录、屠宰检疫记录、进入和经过无疫区审批记录、隔离检疫记录等。

3.3.3.3 各环节监督检查记录：养殖环节、屠宰环节、仓储和经营环节、运输和公路动物卫生监督检查站、其它环节。

3.3.3.4 无害化处理记录。

3.3.3.5 疫情处置记录等。

4 追溯的实施

4.1 养殖环节的追溯

4.1.1 对动物的追溯

4.1.1.1 通过养殖档案查询动物的来源、引进或出生日期、年龄、免疫情况、监测情况以及执业兽医工作记录、官方兽医工作记录。

4.1.1.2 引进继续饲养动物的，从随附的检疫证明查询原饲养地、出证动物卫生监督机构和官方兽医、沿途经过的动物卫生监督检查站以及隔离检疫、引进审批等情况。

4.1.1.3 通过监测记录查询抽样饲养场、抽样时间和数量、免疫等情况。

4.1.1.4 通过产地检疫记录查询饲养、免疫、监测等情况。

4.1.1.5 通过上述情况，查询动物来源及流向。

4.1.2 对动物产品的追溯

通过动物检疫合格证明和企业生产记录查询产品来源和去向。

4.2 屠宰环节的追溯

4.2.1 对动物的追溯

4.2.1.1 通过入场记录、回收的检疫证明、生产记录查询货主、产地、出证的动物卫生监督机构和官方兽医、动物从产地到屠宰场经过路径等信息。

4.2.1.2 通过动物佩戴的耳标编号查询动物原产地、耳标领用使用人员。

4.2.2 对动物产品的追溯

4.2.2.1 通过随附检疫证明、检疫标志查询屠宰场。

4.2.2.2 通过屠宰检疫工作记录查询货主、屠宰动物、待宰、同步检疫、出证、动物产品流向等情况。

4.3 运输环节的追溯

4.3.1 对动物的追溯

4.3.1.1 通过随附的检疫证明查询产地、货主、动物运输经过路径、出具证明的动物卫生监督机构和官方兽医以及检疫证明出具时间。

4.3.1.2 通过动物佩戴耳标编号查询动物原产地、货主、耳标领用使用人员、动物移动、检疫证明开具情况。

4.3.2 对动物产品的追溯

通过随附的检疫证明、检疫标志，查询屠宰场。

4.3.3 通过动物卫生监督检查站工作记录，查询货主、动物产品经过时间、动物产品种类和数量、运载工具号码、启运地和目的地、查证验物的结果、监督人员等。

4.4 经营环节的追溯

4.4.1 对动物的追溯

4.4.1.1 通过随附的检疫证明查询产地、动物运输经过路径、出具证明的动物卫生监督机构和官方兽医、检疫证明出具时间、动物流向。

4.4.1.2 通过动物佩戴耳标编号查询原产地、耳标领用使用人员。

4.4.2 对动物产品的追溯

通过随附的检疫证明、检疫标志，查询屠宰场、动物产品流向、动物入场回收的检疫证明。

4.4.3 通过检疫工作记录查询原货主、原检疫证明记载相关情况。

4.5 仓储环节的追溯

通过出入库记录或监管工作记录，查询货物来源、入库时间、货主、流向。

饲养场动物卫生管理通用规范

1 范围

本规范规定了饲养场的建设、条件和能力、人员、制度、管理和记录要求等。

本规范适用于饲养场的建设和管理，养殖小区参照本规范执行。

2 资质条件

2.1 应符合动物防疫条件

2.1.1 兴办饲养场要按要求向当地兽医主管部门申请，取得《动物防疫条件合格证》。按要求向当地畜牧主管部门备案，取得畜禽养殖代码。

2.1.2 在取得《动物防疫条件合格证》后，变更场址或经营范围的，应当重新申请办理《动物防疫条件合格证》，同时交回原《动物防疫条件合格证》。

2.1.3 在取得《动物防疫条件合格证》后，变更布局、设施设备和制度，可能引起动物防疫条件发生变化的，应当提前 30 日向原发证机关报告。

2.1.4 在取得《动物防疫条件合格证》后，变更单位名称或其负责人的，应当在变更后 15 日内持有效申请变更《动物防疫合格证》。

2.1.5 在每年 1 月底前将上一年的动物防疫条件情况和防疫制度执行情况向发证机关报告。

2.2 应符合环保、消防要求

3 选址和布局

除具备动物防疫条件审查管理办法规定的条件外，还应符合下列要求：

3.1 应当具有单独存放饲草、饲料的场所。

3.2 生产区布置在上风向，兽医室、隔离舍、贮粪场和污水处理池应布置在下风向。

3.3 人员、动物和物资运转应采取单一流向，生产区内清洁道、污染道分设，不重叠，不交叉。

3.4 禽类饲养场、养殖小区内的孵化间与养殖区之间应当设置隔离设施，并配备种蛋熏蒸消毒设施，孵化间的流程应当单向，不得交叉或者回流。

3.5 种畜禽场应当根据需要设置单独的动物精液、卵、胚胎采集等区域。

3.6 充分考虑动物福利问题。

4 条件和能力

4.1 生产区内道路及相关场地坚硬、无积水，便于清扫、消毒。

4.2 圈舍地面和墙壁选用适宜材料，以便清洗消毒。生产区进出处应设置出入人员更衣消毒室。

4.3 饲养场的场区和生产区入口处应分别设置消毒池，配备机动高效消毒机或消毒通道。

4.4 在每栋饲养舍门口设置消毒池。

4.5 有符合环保要求的处理排泄物、污水、污物设施。

4.6 生产区有良好的采光、通风设施设备。场内应当设有防蝇、防蚊、防鼠、防鸟、防虫设施或者具有相应措施。具有供水、供电设施设备。

4.7 每栋饲养舍配备饲喂、饮水、消毒、清扫等器具。

4.8 建立兽医室，配备疫苗冷冻（冷藏）设备、消毒和诊疗等防疫与治疗设备；或者聘有兽医机构为其提供相应服务。

4.9 配备与饲养规模相适应的无害化处理设施设备或者处理机制。

4.10 场内所有设施设备及辅助动力设备要定期进行维修/保养。

5 人员要求

5.1 饲养场应当配备与其生产规模相适应的执业兽医或者聘用乡村兽医。

5.2 场方工作人员应无结核病、布鲁氏菌病等人畜共患病，应定期进行健康检查，取得《健康证》后方可上岗。

6 制度要求

6.1 建立免疫、投入品使用、检疫申报、疫病检测、疫情报告、消毒、畜禽标识等制度及完整养殖档案，并有效实施。

6.2 建立粪污、病死动物的无害化处理制度，并有效实施。

6.3 有国家规定的动物疫病的净化制度，并有效实施。

7 管理要求

- 7.1 同一饲养舍，实行全进全出饲养模式。
- 7.2 同一饲养舍两次使用间隔时间不少于 15 天。
- 7.3 运输动物、饲料、垫料、排泄物等的车辆，应在装前卸后进行清洗、消毒。
- 7.4 饲养人员、工作人员不得任意出入饲养舍、隔离舍。
- 7.5 使用饲料、垫料、药物、生物制品、疫苗等物品来源应清楚，符合国家相关要求。
- 7.6 发现疑似患病或死亡的动物，应及时报告官方兽医。
- 7.7 对污染和疑似污染的场地、用具、饲料、垫料、排泄物等进行彻底消毒、无害化处理。
- 7.8 对生产区、生活区要定期进行有效消毒。

8 记录

- 8.1 按《畜禽标识和养殖档案管理办法》的要求，建立养殖档案，并由专人登记保管。
- 8.2 对场内建立各项制度的执行情况建立完整记录。

家禽饲养场动物卫生管理规范

1 范围

本规范规定了家禽饲养场的建场资质条件、疫病预防、检疫、疫情报告与处置、无害化处理、防疫制度、饲养管理、记录与档案、配合主管部门工作等方面的具体要求，以及应需杜绝的禁止性行为进行了规定。

本规范适用于达到发放《动物防疫条件合格证》规模标准的家禽饲养场的动物卫生管理，养殖小区参照本规范执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 资质条件

3.1 兴办按要求向当地兽医主管部门申请，取得有效《动物防疫合格证》，申请前置审查。

3.2 兴办后，按要求向当地畜牧主管部门备案，取得畜禽养殖代码。

3.3 在取得《动物防疫条件合格证》后，变更场址或经营范围的，应当重新申请办理《动物防疫条件合格证》，同时交回原《动物防疫条件合格证》。

3.4 在取得《动物防疫条件合格证》后，变更布局、设施设备和制度，可能引起动物防疫条件发生变化的，应当提前 30 日向原发证机关报告。

3.5 在取得《动物防疫条件合格证》后，变更单位名称或其负责人的，应当在变更后 15 日内持有效申请变更《动物防疫条件合格证》。

3.6 在每年 1 月底前将上一年的动物防疫条件情况和防疫制度执行情况向发证机关报告。

4 疫病防控

4.1 免疫和监测

4.1.1 按照农业部和当地兽医主管部门相关规定，制定适合本场的免疫程序。

4.1.2 完成重大疫病强制免疫，免疫密度达到应免疫动物的 100%。

4.1.3 完成其它疫病的免疫预防工作。

4.1.4 应按照国家规定的要求，结合当地实际情况制定疫病监测方案，对禽流感和新城疫定期监测。要按照国家规定进行免疫抗体监测，强制免疫疫病免疫抗体合格率要达到 80%以上；并定期委托有资质实验室进行病原学监测。

4.1.5 应当向当地兽医机构提供连续性的疫情监测信息，接受当地兽医机构的监督。

4.2 消毒

4.2.1 有与饲养规模相适应的污水、污物的清洗消毒设施设备。

4.2.2 运输饲料、雏禽、蛋等运载工具在装载前和卸载后应当及时清洗、消毒。

4.2.3 场内消毒要全面，包括环境消毒、人员消毒、禽舍消毒、用具消毒、带禽消毒等。消毒药物的选择和使用方面应符合消毒技术规范的要求。使用的洗涤剂、消毒剂应当对人体安全、无害。

4.3 隔离

4.3.1 发现染疫和疑似染疫的禽只，应立即移入隔离舍，进行观察；及时将异常情况向当地兽医机构报告。

4.3.2 新购入的雏禽和跨省引进的种禽到达饲养场后，应先放入隔离舍观察；应当向当地动物卫生监督机构报告新购入禽只的基本情况。

4.4 制定家禽常见寄生虫的驱虫方案和驱虫程序，并定期驱虫。

4.5 种禽场还应制定并执行高致病性禽流感、新城疫、沙门氏菌病、禽白血病等疫病的净化方案。

5 检疫

5.1 禽只出售或运输前，饲养场应当向当地动物卫生监督机构申报检疫。

5.2 取得《动物检疫合格证明》后，方可运输和经营。

5.3 跨省引进种禽、种蛋时，应按规定向输入地省级动物卫生监督机构提出申请，办理相关审批手续，并取得输出地《动物检疫合格证明》。

6 疫情报告与处置

6.1 发现场内禽只染疫或者疑似染疫的，应当立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或者动物疫病预防控制机构报告，并采取隔离等控制措施，防止动物疫情扩散。

6.2 根据不同的疫病对禽群采取相应的处理措施。

6.3 发生高致病性禽流感等重大动物疫情时，应当遵守有关疫情控制、扑灭的规定。不得藏匿、转移、盗掘已被依法隔离、封存、处理的动物和动物产品

6.4 应遵守国家有关动物疫情管理规定，不得擅自以个人名义发布动物疫情信息。

6.5 应遵守国家有关动物疫情管理规定，不得瞒报、谎报、迟报、漏报动物疫情，不得授意他人瞒报、谎报、迟报动物疫情，不得阻碍他人报告动物疫情。

6.6 发生疫病时，对全场进行彻底清洗消毒。病死禽、扑杀禽或淘汰禽按 GB 16548 进行无害化处理。

6.7 如发现生产的产品存在安全隐患，可能对人体健康和生命安全造成损害的，应当立即停止销售，并向当地动物卫生监督机构报告。

7 无害化处理

7.1 建有与饲养规模相适应的污水、污物、病死禽的无害化处理设施设备。

7.2 饲养种禽应当接受动物疫病预防控制机构的定期检测；检测不合格的，应当按照国务院兽医主管部门的规定予以处理。

7.3 染疫禽只及其排泄物、染疫禽产品，病死或者死因不明的禽只尸体，运载工具中的禽排泄物以及垫料、包装物、容器等污染物，应当按照国务院兽医主管部门的规定进行处理，不得随意处置。

7.4 经检疫不合格的禽只、种蛋，应当在动物卫生监督机构监督下按照国务院兽医主管部门的规定处理。

7.5 家禽养殖场、养殖小区的粪便、污水、污物等处理符合环保要求，达到排放标准。需要做无害化处理的，要按照 GB 16548 的处理要求进行无害化处理。

7.6 未使用完的疫苗及使用过的疫苗瓶、注射器和针头、检测试剂等需按规定进行无害化处理。

8 制度要求

8.1 建立免疫、用药、检疫申报、疫情报告、消毒、无害化处理、隔离观察等制度，并有效实施。

8.2 有国家规定的动物疫病的净化制度，并有效实施。

8.3 建立自觉接受官方监测、监督检查、疫情处理制度，并有效实施。

9 饲养管理

养殖场应当为所饲养的家禽提供适当的繁殖条件和生存、生长环境。

9.1 同一家禽饲养场内只能饲养同种家禽。

9.2 同一饲养舍，实行全进全出饲养模式。

9.3 每批家禽出栏后应当清洗、消毒，同一饲养舍两次使用间隔时间不少于 15 天。

9.4 饲养场要有严格的人员进出管理制度，外来人员不得随意进出。

9.5 饲养人员、工作人员不得任意出入饲养舍、隔离舍。

9.6 运输禽只、饲料、垫料、排泄物等的车辆，应在装前卸后进行清洗、消毒和无害化处理。

9.7 发现疑似患病或死亡的动物，应及时报告官方兽医；对污染和疑似污染的场地、用具、饲料、垫料、排泄物等进行彻底消毒、无害化处理。

9.8 病死禽只的无害化处理按照 GB 16548 执行。

9.9 使用饲料、垫料、药物、生物制品、疫苗等物品来源应清楚，符合国家相关要求。

9.10 对生产区、生活区要定期进行有效消毒。

9.11 需要引进种禽时，应从具有种畜禽生产经营许可证的种禽场引入。

10 档案

10.1 养殖档案应载明以下内容：

10.2 饲养家禽的品种、代次、数量、繁殖记录、来源和进出场日期。

- 10.3 饲料、饲料添加剂等投入品和兽药的来源、名称、使用对象、时间和用量等有关情况。
 - 10.4 检疫、免疫、监测、消毒情况。
 - 10.5 禽只发病、诊疗、死亡和无害化处理情况。
 - 10.6 畜禽养殖代码。
 - 10.7 防疫制度执行情况。
 - 10.8 商品代禽养殖档案应保存 2 年，种禽档案应长期保存。
- 11 配合管理部门工作**
- 应自觉接受动物疫病预防控制机构和动物卫生监督机构等机构进行监测、流行病学调查、动物防疫监督检查等工作。

养猪场动物卫生管理规范

1 范围

本规范规定了无疫区内养猪场在建场资质条件、疫病预防、检疫、疫情报告与处置、无害化处理、防疫制度、饲养管理、记录与档案、配合主管部门工作等方面的具体要求，以及应需杜绝的禁止性行为进行了规定。

本规范适用于达到发放《动物防疫条件合格证》规模标准的养猪场的动物卫生管理，养殖小区参照本规范执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 资质条件

3.1 养猪场兴办前，按要求向当地兽医主管部门申请，取得有效《动物防疫条件合格证》。

3.2 养猪场兴办后，按要求向当地畜牧主管部门备案，取得畜禽养殖代码。

3.3 在取得《动物防疫条件合格证》后，变更场址或经营范围的，应当重新申请办理《动物防疫条件合格证》，同时交回原《动物防疫条件合格证》。

3.4 在取得《动物防疫条件合格证》后，变更布局、设施设备和制度，可能引起动物防疫条件发生变化的，应当提前 30 日向原发证机关报告。

3.5 在取得《动物防疫条件合格证》后，变更单位名称或其负责人的，应当在变更后 15 日内持有效申请变更《动物防疫条件合格证》。

3.6 在每年 1 月底前将上一年的动物防疫条件情况和防疫制度执行情况向发证机关报告。

4 疫病预防

4.1 免疫和监测

4.1.1 按照农业部和当地兽医主管部门相关规定，制定适合本场的免疫程序。

4.1.2 完成猪口蹄疫等重大疫病强制免疫，免疫密度达到应免疫动物的 100%。

4.1.3 按照国家规定，加施畜禽标识；畜禽标识不得重复使用。

4.1.4 完成其它疫病的免疫预防工作。

4.1.5 应按照国家规定的要求，结合当地实际情况制定疫病监测方案，对猪口蹄疫、猪瘟、高致病性猪蓝耳病定期监测。要按照国家规定进行免疫抗体监测，强制免疫疫病群体保护率要达到 70% 以上；并进行病原学监测。

4.1.6 制定猪常见寄生虫的驱虫方案和驱虫程序，并定期驱虫。

4.1.7 如为种猪场，还应制定并执行高致病性猪蓝耳病、猪瘟、猪伪狂犬病、猪繁殖与呼吸综合征等疫病的净化方案。

应当向当地兽医机构提供连续性的疫情监测信息，接受当地兽医机构的监督。

4.2 消毒

4.2.1 有与饲养规模相适应的污水、污物的清洗消毒设施设备。

4.2.2 运输饲料、垫料、生猪、粪便等运载工具在装载前和卸载后应当及时清洗、消毒。

4.2.3 场内使用的洗涤剂、消毒剂应当对人体安全、无害。

4.3 隔离

4.3.1 发现染疫和疑似染疫的生猪，应立即移入隔离舍，进行观察；及时将异常情况向当地兽医机构报告。

4.3.2 新购入的猪和跨省引进的种猪到达饲养场后，应先放入隔离舍观察；24 小时内，应当向当地动物卫生监督机构报告新购入生猪基本情况。

5 检疫

5.1 猪出售或运输前，饲养场应当向当地动物卫生监督机构申报检疫。

5.2 取得《动物检疫合格证明》后，方可运输和经营。

5.3 跨省引进种猪、精液时，应按规定向输入地省级动物卫生监督机构提出申请，办理相

关审批手续，并取得输出地动物卫生监督机构所出具的《动物检疫合格证明》。

5.4 从无疫区外引进的继续饲养的生猪，如为相关易感动物，应当在输入地省级动物卫生监督机构指定的隔离场所，按照农业部规定的无疫区有关检疫要求隔离检疫；隔离检疫期为45天。

6 疫情报告与处置

6.1 发现场内猪染疫或者疑似染疫的，应当立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或者动物疫病预防控制机构报告，并采取隔离等控制措施，防止动物疫情扩散。

6.2 根据不同的疫病对场内存栏生猪采取相应的处理措施。

6.3 发生牲畜口蹄疫等重大动物疫情时，应当遵守有关疫情控制、扑灭的规定。不得藏匿、转移、盗掘已被依法隔离、封存、处理的动物和动物产品

6.4 应遵守国家有关动物疫情管理规定，不得发布动物疫情信息。

6.5 应遵守国家有关动物疫情管理规定，不得瞒报、谎报、迟报、漏报动物疫情，不得授意他人瞒报、谎报、迟报动物疫情，不得阻碍他人报告动物疫情。

6.6 发生疫病时，对全场进行彻底清洗消毒。病死猪、扑杀猪或淘汰猪按 GB 16548 进行无害化处理。

6.7 如发现生产的产品存在安全隐患，可能对人体健康和生命安全造成损害的，应当立即停止销售，并向当地动物卫生监督机构报告进行追溯。

7 无害化处理

7.1 建有与饲养规模相适应的污水、污物、病死猪的无害化处理设施设备。

7.2 饲养种猪应当接受动物疫病预防控制机构的定期检测；检测不合格的，应当按照国务院兽医主管部门的规定予以处理。

7.3 染疫猪及其排泄物、染疫猪产品，病死或者死因不明的猪尸体，运载工具中的排泄物以及垫料、包装物、容器等污染物，应当按照国务院兽医主管部门的规定处理，不得随意处置。

7.4 经检疫不合格的猪，应当在动物卫生监督机构监督下按照国务院兽医主管部门的规定处理，处理费用由货主承担。

7.5 应当保证粪便、废水及其他固体废弃物综合利用或者无害化处理设施的正常运转，保证污染物达标排放，防止污染环境，符合环保要求。

7.6 违法排放粪便、废水及其他固体废弃物，造成环境污染危害的，应当排除危害，依法赔偿损失。

7.7 未使用完的疫苗，使用过的疫苗瓶、注射器和针头、检测试剂等需按规定进行无害化处理。

8 应建立完善的防疫制度

8.1 建立免疫、用药、检疫申报、疫情报告、无害化处理、隔离观察、畜禽标识等制度，并有效实施。

8.2 建立消毒制度并有效实施，包括环境消毒、人员消毒、猪舍消毒、用具消毒、带猪消毒等。消毒药物的选择和使用方面应符合消毒技术规范的要求。

8.3 有国家规定的动物疫病的净化制度，并有效实施。

8.4 建立自觉接受官方监测、监督检查、疫情处理制度，并有效实施。

9 饲养管理

养殖场应当为所饲养的猪提供适当的繁殖条件和生存、生长环境。

9.1 猪场内不得饲养其它动物。

9.2 实行单元式或“全进全出”的饲养方式。

9.3 每批猪出栏后应当清洗、消毒，同一饲养舍两次使用间隔时间至少15天。

9.4 饲养场要有严格的人员进出管理制度，养猪场应谢绝参观，外来人员不得随意进出。

9.5 饲养人员、工作人员不得任意出入饲养舍、隔离舍。

9.6 运输猪、饲料、垫料、排泄物等的车辆，应在装前卸后进行清洗、消毒和无害化处理。

9.7 发现疑似患病或死亡的动物，应及时报告官方兽医；对污染和疑似污染的场地、用具、饲料、垫料、排泄物等进行彻底消毒、无害化处理。

9.8 病死猪的无害化处理按照 GB 16548 执行。

9.9 使用饲料、垫料、药物、生物制品、疫苗等物品来源应清楚，符合国家相关要求。

9.10 对生产区、生活区要定期进行有效消毒。

9.11 需要引进种猪时，应从同等无疫区或高于本地区的具有《种畜禽生产经营许可证》的种猪场引进。

10 建立档案

10.1 养殖档案应载明以下内容：

10.1.1 饲养猪的品种、数量、繁殖记录、来源和进出场日期。

10.1.2 饲料、饲料添加剂等投入品和兽药来源、名称、使用对象、时间和用量等有关情况。

10.1.3 检疫、免疫、监测、消毒情况。

10.1.4 发病、诊疗、死亡和无害化处理情况。

10.1.5 畜禽养殖代码。

10.1.6 防疫制度执行情况。

10.2 饲养种猪应当建立个体养殖档案，注明性别、出生日期、父系和母系品种类型、来源等信息。

10.3 种猪调运时应当在个体养殖档案上注明调出和调入地，个体养殖档案应当随同调运。

10.4 商品代生猪档案应保存2年，种猪档案应长期保存。

11 应配合管理部门工作

11.1 应自觉接受动物疫病预防控制机构和动物卫生监督机构进行监测、流行病学调查工作；

11.2 种猪场应接受动物疫病预防控制机构的定期检测。

11.3 应自觉接受动物卫生监督机构依法执行监督检查任务。

奶畜养殖场动物卫生管理规范

1 范围

本规范规定了无疫区内奶畜养殖场在建场资质条件、疫病预防、检疫、疫情报告与处置、无害化处理、防疫制度、饲养管理、记录与档案、配合主管部门工作等方面的具体要求，以及应需杜绝的禁止性行为进行了规定。

本规范适用于达到发放《动物防疫条件合格证》规模标准的奶畜饲养场的动物卫生管理，养殖小区参照本规范执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 定义

本规范所指奶畜，指奶牛、奶山羊。

4 资质条件

4.1 奶畜养殖场兴办前，按要求向当地兽医主管部门申请，取得有效《动物防疫条件合格证》。

4.2 奶畜养殖场兴办后，按要求向当地畜牧主管部门备案，取得畜禽养殖代码。

4.3 取得《动物防疫条件合格证》后，如果场址或经营范围发生变化的，需要重新申请办理《动物防疫条件合格证》，同时交回原《动物防疫条件合格证》。

4.4 取得《动物防疫条件合格证》后，如果布局、设施设备和制度等发生变化，有可能引起动物防疫条件发生变化的，应当提前 30 日向当地兽医主管部门报告。

4.5 取得《动物防疫条件合格证》后，如果养殖场名称或负责人发生变化的，应当在变化发生 15 日内持有效申请变更《动物防疫合格证》。

4.6 在每年 1 月底前将上一年养殖场内动物防疫条件情况和防疫制度执行情况向发证机关报告。

5 建设条件

5.1 分为生活区、生产区、生产辅助区，生产区包括泌乳牛（羊）舍、育成牛（羊）舍、犊牛（羊羔）舍、人工授精舍、隔离舍等；生产辅助区包括生鲜乳专用存放室、青贮存放区、饲料库、兽医室、治疗舍等。

5.2 每栋牛（羊）舍应配有运动场，运动场地面要平坦而稍有坡度，应为硬化土地。

5.3 牛（羊）舍应具备良好的清粪排污系统。

5.4 应有生鲜乳冷藏设施设备；超过 2 小时未冷藏的生鲜乳，不得销售。

5.6 对挤奶设施、生鲜乳贮存设施等应当及时清洗、消毒。

6 疫病预防

奶畜养殖者应当确保场内奶畜符合国务院畜牧兽医主管部门规定的健康标准。

6.1 免疫和监测

6.1.1 按照农业部和当地兽医主管部门相关规定，制定适合本场的免疫程序。

6.1.2 完成牲畜口蹄疫等重大疫病强制免疫，免疫密度达到应免疫动物的 100%。

6.1.3 按照国家规定，加施畜禽标识；畜禽标识不得重复使用。

6.1.5 按照国家动物疫病监测计划对口蹄疫、牛瘟、牛肺疫、布鲁氏菌病、结核病、炭疽、山羊痘、小反刍兽疫进行定期监测，监测结果符合规定要求。

6.1.6 场内所有奶畜布鲁氏菌病、结核病监测结果符合要求：进行布鲁氏菌病免疫的，免疫抗体检测合格；不进行布鲁氏菌病免疫的，血清学检测结果应为阴性；结核病经变态反应检测为阴性。阳性牛应按国家有关规定进行无害化处理；出现可疑反应的奶畜应予隔离复检，连续两次可疑者按阳性反应处理。可疑反应的奶畜在隔离期间所产鲜乳不得销售。

- 6.1.7 应当向当地兽医机构提供连续性的疫情监测信息，接受当地兽医机构的监督。
6.1.8 奶畜在干乳前 15 天作隐性乳腺炎检验，在干乳时用有效的抗菌制剂封闭治疗。

6.2 消毒

- 6.2.1 有与饲养规模相适应的清洗消毒设施设备。
6.2.2 运载工具在装载前和卸载后应当及时清洗、消毒。
6.2.3 场内使用的洗涤剂、消毒剂应当对人体安全、无害。
6.2.4 开展定期消毒、灭鼠杀虫工作。

6.3 隔离

- 6.3.1 发现染疫和疑似染疫的奶畜，应立即移入隔离舍，进行观察；及时将异常情况向当地兽医机构报告。
6.3.2 新购入的奶畜到达饲养场后，应先放入隔离舍观察；且 24 小时内，应当向当地动物卫生监督机构报告新购入奶畜基本情况。

7 检疫

- 7.1 奶畜出售或运输前，饲养场应当向当地动物卫生监督机构申报检疫。
7.2 取得《动物检疫合格证明》后，方可运输和经营。
7.3 跨省引进奶畜、精液、胚胎时，应按规定向输入地省级动物卫生监督机构提出申请，办理相关审批手续，并取得《动物检疫合格证明》。
7.4 从无疫区外引进的奶畜，如无相关易感动物，应当在输入地省级动物卫生监督机构指定的隔离场所，按照农业部规定的无疫区有关检疫要求隔离检疫；隔离检疫期为 45 天。

8 疫情报告与处置

- 8.1 发现场内奶畜染疫或者疑似染疫的，应当立即向当地兽医机构报告，并采取隔离等控制措施，防止动物疫情扩散。
8.2 根据不同的疫病对场内存栏奶畜采取相应的处理措施。
8.3 发生牲畜口蹄疫等重大动物疫情时，应当遵守有关疫情控制、扑灭的规定。不得藏匿、转移、盗掘已被依法隔离、封存、处理的动物和动物产品
8.4 应遵守国家有关动物疫情管理规定，不得发布动物疫情信息。
8.5 应遵守国家有关动物疫情管理规定，不得瞒报、谎报、迟报、漏报动物疫情，不得授意他人瞒报、谎报、迟报动物疫情，不得阻碍他人报告动物疫情。
8.6 发生疫病时，对全场进行彻底清洗消毒。病死奶畜、扑杀奶畜或淘汰奶畜，以及所有生鲜乳、精液、胚胎、饲料、垫料等，均需进行无害化处理。

9 无害化处理

- 9.1 建有与饲养规模相适应的污水、污物、病死奶畜、生鲜乳的无害化处理设施设备。
9.2 对于检测不合格的奶畜及其产品，应当按照国务院畜牧兽医主管部门的规定予以处理。
9.3 染疫奶畜及其排泄物、染疫奶畜产品，病死或者死因不明的奶畜尸体，运载工具中的排泄物以及垫料、包装物、容器等污染物，按照 GB16548 进行处理。
9.4 经检疫不合格的奶畜，应当在动物卫生监督机构监督下按照国务院兽医主管部门的规定处理。
9.5 应当保证粪便、废水及其他固体废弃物综合利用或者无害化处理设施的正常运转，保证污染物达标排放，防止污染环境。
9.6 未使用完的疫苗，使用过的疫苗瓶、注射器和针头、检测试剂等需按规定进行无害化处理。

10 制度建设

- 10.1 建立免疫、监测、用药、检疫申报、疫情报告、无害化处理、隔离观察、畜禽标识等制度，并有效实施。
10.2 建立消毒制度并有效实施，包括环境消毒、人员消毒、动物舍消毒、用具消毒、带禽消毒等。消毒药物的选择和使用方面应符合消毒技术规范的要求。
10.3 有国家规定的奶牛疫病的净化制度，并有效实施。
10.4 建立自觉接受官方监测、监督检查、疫情处理制度，并有效实施。
10.5 有生鲜乳生产、销售、运输管理制度，并有效实施。

11 饲养管理

养殖场应当为所饲养的奶畜提供适当的繁殖条件和生存、生长环境。

- 11.1 奶畜场内不得饲养其它动物。
- 11.2 饲养人员、工作人员不得任意出入饲养舍、隔离舍。
- 11.3 饲养场要有严格的人员进出管理制度，应谢绝参观，外来人员不得随意进出。
- 11.4 发现疑似患病或死亡的动物，应及时报告官方兽医；对污染和疑似污染的场地、用具、饲料、垫料、排泄物等进行彻底消毒、无害化处理。
- 11.5 使用饲料、垫料、药物、生物制品、疫苗等物品来源应清楚，符合国家相关要求。
- 11.6 对生产区、生活区要定期进行有效消毒。
- 11.7 需要跨省引进奶畜时，需从规模奶畜养殖场引进。

12 档案

- 12.1 奶畜个体养殖档案应载明性别、出生日期、父系和母系品种类型、来源等信息。
- 12.2 养殖档案主要内容：
 - 12.2.1 饲养奶畜的品种、数量、繁殖记录、来源和进出场日期。
 - 12.2.2 饲料、饲料添加剂等投入品和兽药来源、名称、使用对象、时间和用量等有关情况。
 - 12.2.3 检疫、免疫、监测、净化、消毒情况。
 - 12.2.4 发病、诊疗、死亡和无害化处理情况。
 - 12.2.5 畜禽养殖代码。
 - 12.2.6 生鲜乳生产、检测、销售情况。
 - 12.2.7 防疫制度执行情况。
- 12.3 奶畜调运时应当在个体养殖档案上注明调出和调入地，个体养殖档案应当随同调运。
- 12.4 奶畜需跨省调运的，应按照农业部规定，进行实验室检测，检测结果合格的，提出调运申请。
- 12.5 各类档案应长期保存。

13 配合管理部门工作

- 13.1 应自觉接受动物疫病预防控制机构和动物卫生监督机构进行监测、流行病学调查工作；
- 13.2 奶畜养殖场应接受动物疫病预防控制机构的定期检测。
- 13.3 应自觉接受动物卫生监督机构依法执行监督检查任务。

肉牛养殖场动物卫生管理规范

1 范围

本规范规定了无疫区内肉牛养殖场在建场资质条件、疫病预防、检疫、疫情报告与处置、无害化处理、防疫制度、饲养管理、记录与档案、配合主管部门工作等方面的具体要求，以及应需杜绝的禁止行为进行了规定。

本规范适用于达到发放《动物防疫条件合格证》规模标准的肉牛饲养场的动物卫生管理，养殖小区参照本规范执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 资质条件

3.1 肉牛场兴办前，按要求向当地兽医主管部门申请，取得有效《动物防疫条件合格证》。

3.2 肉牛场兴办后，按要求向当地畜牧主管部门备案，取得畜禽养殖代码。

3.3 在取得《动物防疫条件合格证》后，变更场址或经营范围的，应当重新申请办理《动物防疫条件合格证》，同时交回原《动物防疫条件合格证》。

3.4 在取得《动物防疫条件合格证》后，变更布局、设施设备和制度，可能引起动物防疫条件发生变化的，应当提前 30 日向原发证机关报告。

3.5 在取得《动物防疫条件合格证》后，变更单位名称或其负责人的，应当在变更后 15 日内持有效申请变更《动物防疫条件合格证》。

3.6 在每年 1 月底前将上一年的动物防疫条件情况和防疫制度执行情况向发证机关报告。

4 建设条件

4.1 分为生活区、生产区、生产辅助区，生产区包括育成牛舍、犊牛舍、隔离舍等；生产辅助区包括青贮存放区、饲料库、兽医室、治疗舍等。

4.2 每栋牛舍应配有运动场，运动场地面要平坦而稍有坡度，应为硬化土地。

4.3 牛舍应具备良好的清粪排污系统。

5 疫病预防

5.1 免疫和监测

5.1.1 按照农业部和当地兽医主管部门相关规定，制定适合本场的免疫程序。

5.1.2 完成牲畜口蹄疫等重大疫病强制免疫，免疫密度达到应免疫动物的 100%。

5.1.3 按照国家规定，加施畜禽标识；畜禽标识不得重复使用。

5.1.4 场内牛没有牲畜口蹄疫、布鲁氏菌病、结核病、包虫病、炭疽、牛瘟、牛肺疫和牛海绵状脑病等疫病；临床表现健康。

5.1.5 按照国家动物疫病监测计划对口蹄疫、牛瘟、牛肺疫、布鲁氏菌病、结核病、炭疽进行定期监测，监测结果符合规定要求。

5.1.6 场内所有牛布鲁氏菌病和结核病监测符合要求：进行布鲁氏菌病免疫的，免疫抗体检测合格；不进行布鲁氏菌病免疫的，血清学检测结果应为阴性；结核病经变态反应检测为阴性。阳性牛应按国家有关规定进行无害化处理；出现可疑反应的牛应予隔离复检，连续两次可疑者按阳性反应处理。

5.1.7 应当向当地兽医机构提供连续性的疫情监测信息，接受当地兽医机构的监督。

5.2 消毒

5.2.1 有与饲养规模相适应的污水、污物的清洗消毒设施设备。

5.2.2 运输饲料、垫料、牛只、粪便等运载工具在装载前和卸载后应当及时清洗、消毒。

5.2.3 场内使用的洗涤剂、消毒剂应当对人体安全、无害。

5.2.4 开展定期消毒、灭鼠杀虫工作。

5.3 隔离

5.3.1 发现染疫和疑似染疫的牛只，应立即移入隔离舍，进行观察；及时将异常情况向当地

兽医机构报告。

5.3.2 新购入的牛到达饲养场后，应先放入隔离舍观察；且 24 小时内，应当向当地动物卫生监督机构报告新购入奶牛基本情况。

5.4 制定肉牛常见寄生虫的驱虫方案和驱虫程序，并定期驱虫。

5.5 如为种牛场，还应制定并执行疫病的净化方案。

6 检疫

6.1 肉牛出售或运输前，饲养场应当向当地动物卫生监督机构申报检疫。

6.2 取得《动物检疫合格证明》后，方可运输和经营。

6.3 跨省引进肉牛、精液、胚胎时，应按规定向输入地省级动物卫生监督机构提出申请，办理相关审批手续，并取得《动物检疫合格证明》。

6.4 从无疫区外引进的肉牛，如为相关易感动物，应当在输入地省级动物卫生监督机构指定的隔离场所，按照有关规定要求隔离检疫；隔离检疫期为 45 天。

7 疫情报告与处置

7.1 发现场内肉牛染疫或者疑似染疫的，应当立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或者动物疫病预防控制机构报告，并采取隔离等控制措施，防止动物疫情扩散。

7.2 根据不同的疫病对场内存栏肉牛采取相应的处理措施。

7.3 发生牲畜口蹄疫等重大动物疫情时，应当遵守有关疫情控制、扑灭的规定。不得藏匿、转移、盗掘已被依法隔离、封存、处理的动物和动物产品

7.4 应遵守国家有关动物疫情管理规定，不得发布动物疫情信息。

7.5 应遵守国家有关动物疫情管理规定，不得瞒报、谎报、迟报、漏报动物疫情，不得授意他人瞒报、谎报、迟报动物疫情，不得阻碍他人报告动物疫情。

7.6 发生疫病时，对全场进行彻底清洗消毒。病死牛、扑杀牛或淘汰牛按 GB 16548 进行无害化处理。

7.7 如发现生产的产品存在安全隐患，可能对人体健康和生命安全造成损害的，应当立即停止销售，并向当地动物卫生监督机构报告。

8 无害化处理

8.1 建有与饲养规模相适应的污水、污物、病死牛的无害化处理设施设备。

8.2 饲养种牛应当接受动物疫病预防控制机构的定期检测；检测不合格的，应当按照国务院兽医主管部门的规定予以处理。

8.3 染疫肉牛及其排泄物、染疫肉牛产品，病死或者死因不明的肉牛尸体，运载工具中的排泄物以及垫料、包装物、容器等污染物，按照 GB16548 进行处置。

8.4 经检疫不合格的肉牛，应当在动物卫生监督机构监督下按照国务院兽医主管部门的规定处理，处理费用由货主承担。

8.5 应当保证粪便、废水及其他固体废弃物综合利用或者无害化处理设施的正常运转，保证污染物达标排放，防止污染环境。

8.6 违法排放粪便、废水及其他固体废弃物，造成环境污染危害的，应当排除危害，依法赔偿损失。

8.7 未使用完的疫苗，使用过的疫苗瓶、注射器和针头、检测试剂等需按规定进行无害化处理。

9 应建立完善的防疫制度

9.1 建立免疫、用药、检疫申报、疫情报告、无害化处理、隔离观察、畜禽标识等制度，并有效实施。

9.2 建立消毒制度并有效实施，包括环境消毒、人员消毒、牛舍消毒、用具消毒、带牛消毒等。消毒药物的选择和使用方面应符合消毒技术规范的要求。

9.3 有国家规定的动物疫病的净化制度，并有效实施。

9.4 建立自觉接受官方监测、监督检查、疫情处理制度，并有效实施。

10 饲养管理

养殖场应当为所饲养的肉牛提供适当的繁殖条件和生存、生长环境。

10.1 场内不得饲养其它动物。

10.2 每批肉牛出栏后应当清洗、消毒，同一饲养舍两次使用间隔时间至少 15 天。

10.3 饲养场要有严格的人员进出管理制度。

- 10.4 饲养人员、工作人员不得任意出入饲养舍、隔离舍。
- 10.5 运输肉牛、饲料、垫料、排泄物等的车辆，应在装前卸后进行清洗、消毒和无害化处理。
- 10.6 发现疑似患病或死亡的动物，应及时报告官方兽医；对污染和疑似污染的场地、用具、饲料、垫料、排泄物等进行彻底消毒、无害化处理。
- 10.7 使用饲料、垫料、药物、生物制品、疫苗等物品来源应清楚，符合国家相关要求。
- 10.8 对生产区、生活区要定期进行有效消毒。

11 建立档案

- 11.1 养殖档案应载明以下内容：
 - 11.1.1 饲养肉牛的品种、数量、繁殖记录、来源和进出场日期。
 - 11.1.2 饲料、饲料添加剂等投入品和兽药来源、名称、使用对象、时间和用量等有关情况。
 - 11.1.3 检疫、免疫、监测、消毒情况。
 - 11.1.4 发病、诊疗、死亡和无害化处理情况。
 - 11.1.5 畜禽养殖代码。
 - 11.1.6 防疫制度执行情况。
- 11.2 饲养肉牛应当建立个体养殖档案，注明性别、出生日期、来源等信息。
- 11.3 商品代肉牛档案应保存 20 年。

12 应配合管理部门工作

- 12.1 应自觉接受动物疫病预防控制机构和动物卫生监督机构进行监测、流行病学调查工作；
- 12.2 种牛场应接受动物疫病预防控制机构的定期检测。
- 12.3 应自觉接受动物卫生监督机构依法执行监督检查任务。

马养殖场动物卫生管理规范

1 范围

本规范规定了无疫区内马养殖场在建场资质条件、疫病预防、检疫、疫情报告与处置、无害化处理、防疫制度、饲养管理、记录与档案、配合主管部门工作等方面的具体要求，以及应需杜绝的禁止性行为进行了规定。

本规范适用于达到发放《动物防疫条件合格证》规模标准的马养殖场的动物卫生管理，马散养户及驴、骡养殖场（户）可参照本规范执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 资质条件

3.1 养殖场兴办前，按要求向当地兽医主管部门申请，取得《动物防疫条件合格证》。种马场还应取得《种畜禽生产经营许可证》。

3.2 养殖场兴办后，按要求向当地畜牧主管部门备案，取得畜禽养殖代码。

3.3 马养殖场间距离尽量达3公里及以上。

3.4 在取得《动物防疫条件合格证》后，变更场址或经营范围的，应当重新申请办理《动物防疫条件合格证》，同时交回原《动物防疫条件合格证》。

3.5 在取得《动物防疫条件合格证》后，变更布局、设施设备和制度，可能引起动物防疫条件发生变化的，应当提前30日向原发证机关报告。

3.6 在取得《动物防疫条件合格证》后，变更单位名称或其负责人的，应当在变更后15日内持有效申请变更《动物防疫条件合格证》。

3.7 在每年1月底前将上一年的动物防疫条件情况和防疫制度执行情况向发证机关报告。

4 疫病预防

4.1 免疫和监测

4.1.1 养殖场应根据法律法规和无疫区建设要求，结合当地实际情况，进行疫病的预防接种。

4.1.2 对于无疫区建设规定实施免疫的疫病，按免疫程序应免尽免。

4.1.3 养殖场应依照规定，配合当地动物疫病预防控制机构做好有关疫病的检疫净化、监测工作。

4.2 消毒

4.2.1 有与饲养规模相适应的污水、污物的清洗消毒设施设备。

4.2.2 运输饲料、垫料、马匹、粪便等运载工具在装载前和卸载后应当及时清洗、消毒。

4.2.3 场内使用的洗涤剂、消毒剂应当对人体安全、无害。

5 检疫

5.1 马匹出售或运输前，饲养场应当向当地动物卫生监督机构申报检疫。

5.2 取得《动物检疫合格证明》后，方可离开产地。

5.3 从无疫区外及非同等动物卫生水平引入马匹，应当在输入地省级动物卫生监督机构指定的隔离场所，按照农业部规定的无疫区有关检疫要求隔离检疫；隔离检疫期为45天。

5.4 引入种马及其精液的，还应当符合国家有关要求。

6 疫情报告与处置

6.1 发现场内马匹染疫或者疑似染疫的，应当采取隔离等控制措施，防止动物疫情扩散，并立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或者动物疫病预防控制机构报告。

6.2 根据不同的疫病对场内马匹采取相应的处理措施。

6.3 发生疫情时，应当遵守有关疫情控制、扑灭的规定。不得藏匿、转移、盗掘已被依法隔离、封存、处理的动物和动物产品。

6.4 应遵守国家有关动物疫情管理规定，不得发布动物疫情信息。

6.5 应遵守国家有关动物疫情管理规定，不得瞒报、谎报、迟报、漏报动物疫情，不得授

意他人瞒报、谎报、迟报动物疫情，不得阻碍他人报告动物疫情。

6.6 发生疫病时，对全场进行彻底清洗消毒。病害动物和病害动物产品应按 GB 16548 进行无害化处理。

7 无害化处理

7.1 具备与饲养规模相适应的污水、污物、粪便、病死马匹的无害化处理条件。

7.2 饲养种马应当接受动物疫病预防控制机构的定期检测；检测不合格的，应当按照国务院兽医主管部门的规定予以处理。

7.3 染疫马匹及其排泄物、染疫马产品，病死或者死因不明的马尸体，运载工具中的排泄物以及垫料、包装物、容器等污染物，应当按照国务院兽医主管部门的规定处理，不得随意处置。

7.4 经检疫不合格的马匹，应当在动物卫生监督机构监督下按照国务院兽医主管部门的规定处理。

7.5 应当保证粪便、废水及其他固体废弃物综合利用或者无害化处理设施的正常运转，保证污染物达标排放，防止污染环境。

7.6 违法排放粪便、废水及其他固体废弃物，造成环境污染危害的，应当排除危害，依法赔偿损失。

7.7 未使用完的疫苗，使用过的疫苗瓶、注射器和针头、检测试剂等需按规定进行无害化处理。

8 防疫制度

8.1 建立免疫、临床健康检查、诊疗、检疫申报、疫情报告、无害化处理、隔离观察、传播媒介消灭与防范、配种、繁育等制度，并有效实施。

8.2 建立消毒制度并有效实施，包括环境消毒、人员消毒、厩舍消毒、用具消毒、带马消毒等。消毒药物的选择和使用方面应符合消毒技术规范的要求。

8.3 有国家规定的动物疫病的净化制度，并有效实施。

8.4 建立自觉接受官方监测、监督检查、疫情处理制度，并有效实施。

9 饲养管理

养殖场应当为所饲养的马匹提供适当的繁殖条件和生存、生长环境。

9.1 种马、孕马和赛马应实行单元式饲养方式，一马一厩，并设立与生产规模相适应的运动场。

9.2 马场内不得饲养其它动物。

9.3 养殖场应当结合自身实际，定期开展临床健康检查工作。

9.4 制定马常见寄生虫(体表和体外)的驱虫方案和驱虫程序，并定期驱虫。

9.5 制定并落实蚊、虻、蝇、蝇、野猪、野鸟、蝙蝠等可能传播马属动物疫病的传播媒介的消杀、治理和防范措施，避免马与其接触。

9.6 粪便和垫草、垫料应及时清理并在指定地点做堆积发酵处理。

9.7 人工受精的要设立配种室，并配备专职配种员。

9.8 配备与养殖规模相适应的执业兽医或签约兽医。

9.9 在马匹的驯养和调教过程中充分考虑动物福利问题。

9.10 饲养场要有严格的人员进出管理制度，外来人员不得随意进出。

9.11 饲养人员、工作人员不得任意出入饲养舍、隔离舍。

9.12 发现疑似患病或死亡的动物，应及时向当地兽医部门报告；对污染的场地、用具、饲料、垫料、排泄物等进行彻底消毒、无害化处理。

9.13 使用的饲料、垫料、药物、生物制品、疫苗等物品来源应清楚，采购和使用符合国家相关要求。

9.14 对生产区、生活区要定期进行有效消毒。

9.15 需要引进种马时，应从具有《种畜禽生产经营许可证》的种马场引进。

10 建立档案

10.1 养殖档案应载明以下内容：

10.1.1 饲养马的品种、数量、繁殖记录、来源和进出场日期。

10.1.2 饲料、饲料添加剂、兽药等投入品的来源、名称、使用对象、时间和用量等有关情况。

- 10.1.3 检疫、免疫、监测、消毒情况。
- 10.1.4 发病、诊疗、死亡和无害化处理情况。
- 10.1.5 畜禽养殖代码。
- 10.1.6 防疫制度执行情况。
- 10.2 建立马匹个体养殖档案，包括编号、品种、性别、年龄、毛色、特征等内容。
- 10.3 马匹调运时应当在个体养殖档案上注明调出和调入地，个体养殖档案应当随同调运。
- 10.4 马匹档案应长期保存。
- 11 应配合管理部门工作
- 11.1 应自觉接受动物疫病预防控制机构进行监测、流行病学调查工作；
- 11.2 种马场应接受动物疫病预防控制机构的定期检测。
- 11.3 应自觉接受动物卫生监督机构依法执行监督检查任务。

屠宰厂（场）动物卫生管理规范

1 范围

本规范规定了无疫区内屠宰厂（场）的动物卫生管理要求，包括建设要求、条件和能力要求、人员要求、检疫、疫情报告和处理、制度要求、无害化处理、记录等方面的要求。

本规范适用于无疫区内的屠宰厂（场）。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可以使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

3 资质要求

3.1 应符合动物防疫条件

3.2 应符合环保要求

4 条件和能力

4.1 采光与照明

4.1.1 生产区有良好的采光设备。

4.1.2 动物装卸台配备照度不小于 300Lx 的照明设备。

4.1.3 屠宰间配备检疫操作台和照度不小于 500Lx 的照明设备。

4.2 清洗消毒

4.2.1 厂房与设施应当坚固，便于清洗和消毒。

地面、操作台、墙壁、天棚应当耐腐蚀、不吸潮、易清洗。

4.2.2 场区主要道路和入场区的主要道路铺设便于车辆通行的坚硬路面。路面应平坦、无积水，便于清洗消毒。

4.2.3 有与生产规模相适应的无害化处理、污水污物处理设施设备。

4.2.4 厂房应当设有防蝇、防蚊、防鼠、防尘等设施。

4.2.5 厂房地面应使用防水、防滑、不吸潮、可冲洗、耐腐蚀、无毒的材料，表面无裂缝、无局部积水、易于清洗和消毒，明地沟应呈弧形，排水口应设网罩。

4.2.6 厂房墙壁与墙柱应使用防水、不吸潮、可冲洗、无毒、淡色的材料，顶角、墙角、地脚呈弧形，便于冲洗。

4.2.7 厂房天花板表面涂层应光滑、不易脱落、防止污物积聚；厂房门窗应装配严密，使用不变形的材料制作。

4.2.8 待宰圈设动物装卸台和车辆清洗、消毒等设施，并设污水排放系统。

4.2.9 屠宰生产线应当按照国家规定，设置固定的检疫位置和足够的检疫空间。

4.2.10 待宰圈舍容量应为日屠宰量的一倍以上，圈舍内应防寒、隔热、通风，并设有宰前淋浴等设施。隔离圈应与待宰圈有一定的距离，圈舍不得为开放式，待宰圈有饮水设施。

4.2.11 车间内应有良好的通风、排气装置，及时排除污染的空气和水蒸气。空气流动的方向应当从净化区流向污染区。

4.2.12 工厂应有足够的供水设备，如须配备贮水设施，应有防污染措施，并定期清洗、消毒。使用循环水时需经处理达到环保标准。

4.2.13 接触肉品的设备、器具，应使用无毒、无气味、不吸水、耐腐蚀、耐用材料制作，其表面应平滑、无裂缝。

4.2.14 固定设备的安装位置应当便于清洗、消毒。

4.2.15 盛装废弃物的容器选用不渗水的材料制作，并有明显的标志。

4.3 在待宰区、屠宰区安装视频监控设备。

5 人员要求

5.1 生产人员及其他有关工作人员不得患有人畜共患病和皮肤病，应当定期进行健康检查，取得《健康证》后方可上岗。

5.2 当地动物卫生监督机构派驻与屠宰规模相一致的官方兽医。

5.3 屠宰场应按照规定配备相应的检验检疫人员。

6 检疫

6.1 需从非无疫区引入供屠宰的易感动物，应满足相应条件，经过审批后，方可进入无疫区内进行屠宰。

6.2 屠宰前，场方应当按照国务院兽医主管部门的规定向当地动物卫生监督机构申报检疫。

6.3 屠宰的动物应当附有检疫证明。

7 制度建设

7.1 厂（场）方应有完善的动物卫生管理制度；包括隔离间、待宰间制度及动物入场和动物产品出场登记、检疫申报、疫情报告、消毒、无害化处理、应急处置等制度，并有效实施。

7.2 厂（场）方应建立品质检验、有毒有害物质检测和产品召回制度，并有效实施。

7.3 厂（场）方应建立动物福利制度。

8 无害化处理

8.1 配备与屠宰规模相适应的无害化处理设施设备或者处理机制。

8.2 染疫动物及其排泄物、染疫动物产品，病死或者死因不明的动物尸体，运载工具中的动物排泄物以及垫料、包装物、容器等污染物，按照有关规定处理。

9 记录

9.1 应建立屠宰生产记录、各项制度执行记录等，并由专人登记和保管。

9.2 各项记录保存期 24 个月以上。

家禽屠宰检疫规范

1 范围

本规范规定了无疫区内家禽屠宰加工场，屠宰检疫申报、进入屠宰场（厂、点）监督检查、宰前检查、同步检疫、检疫结果处理以及检疫记录等操作程序。

本规范适用于无疫区内的日屠宰量5万只以上屠宰加工厂的鸡、鸭、鹅的屠宰检疫。鹌鹑、鸽子等禽类的屠宰检疫，以及其它规模的家禽屠宰场的屠宰检疫可参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可以使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》
《家禽产地检疫规程》

3 检疫对象

包括高致病性禽流感、新城疫、禽白血病、鸭瘟、禽痘、小鹅瘟、马立克氏病、鸡球虫病、禽结核病。

4 检疫合格标准

4.1 入场（厂、点）时，具备有效的《动物检疫合格证明》，如为外省调入的规定疫病相关的易感动物，应具备无疫区建设省省级动物卫生监督机构签署的《动物检疫合格证明》。

4.2 无规定的传染病和寄生虫病。

4.3 需要进行实验室疫病检测的，检测结果合格。

4.4 履行本规程规定的检疫程序，检疫结果符合规定。

5 检疫申报

货主应在屠宰前6小时申报检疫，现场填写检疫申报单。官方兽医接到检疫申报后，根据相关情况决定是否予以受理。受理的，应当及时实施宰前检查；不予受理的，应说明理由。

6 入场（厂、点）监督检查和宰前检查

6.1 查验入场（厂、点）家禽的《动物检疫合格证明》。

6.2 了解家禽运输途中有关情况。

6.3 官方兽医应按照《家禽产地检疫规程》农医发〔2010〕27号中“临床检查”部分实施临床检查。其中，个体检查的对象包括群体检查时发现的异常禽只和随机抽取的禽只（每车抽60-100只）。

6.4 结果处理

6.4.1 合格的，准予屠宰，并回收《动物检疫合格证明》。

6.4.2 不合格的，按以下规定处理。

6.4.2.1 发现有高致病性禽流感、新城疫等疫病症状的，限制移动，并按照《动物防疫法》、《重大动物疫情应急条例》、《动物疫情报告管理办法》和GB16548等要求进行处理。

6.4.2.2 发现有鸭瘟、小鹅瘟、禽白血病、禽痘、马立克氏病、禽结核病等患病家禽或运输过程中死亡的家禽按照GB16548处理。

6.4.2.3 怀疑患有本规程规定疫病及临床检查发现其他异常情况的，按相应疫病防治技术规范进行实验室检测，并出具检测报告。实验室检测须由省级动物卫生监督机构指定的具有资质的实验室承担。

6.4.2.4 发现患有本规程规定以外疫病的，隔离观察，确认无异常的，准予屠宰；隔离期间出现异常的，按GB16548要求处理。

6.5 消毒 监督货主在卸载后对运输工具及相关物品等进行消毒。监督场（厂、点）方对患病家禽的处理场所等进行消毒。

7 同步检疫

7.1 屠体检查

7.1.1 体表 检查色泽、气味、光洁度、完整性及有无水肿、痘疮、化脓、外伤、溃疡、坏死灶、肿物等。

7.1.2 冠和髯 检查有无出血、水肿、结痂、溃疡及形态有无异常等。

- 7.1.3 眼 检查眼睑有无出血、水肿、结痂，眼球是否下陷等。
- 7.1.4 爪 检查有无出血、淤血、增生、肿物、溃疡及结痂等。
- 7.1.5 肛门 检查有无紧缩、淤血、出血等。
- 7.2 抽检按照 1%的比例抽样检查。
- 7.2.1 皮下 检查有无出血点、炎性渗出物等。
- 7.2.2 肌肉 检查颜色是否正常，有无出血、淤血、结节等。
- 7.2.3 鼻腔 检查有无淤血、肿胀和异常分泌物等。
- 7.2.4 口腔 检查有无淤血、出血、溃疡及炎性渗出物等。
- 7.2.5 喉头和气管 检查有无水肿、淤血、出血、糜烂、溃疡和异常分泌物等。
- 7.2.6 气囊 检查囊壁有无增厚浑浊、纤维素性渗出物、结节等。
- 7.2.7 肺脏 检查有无颜色异常、结节等。
- 7.2.8 肾脏 检查有无肿大、出血、苍白、尿酸盐沉积、结节等。
- 7.2.9 腺胃和肌胃 检查浆膜面有无异常。剖开腺胃，检查腺胃黏膜和乳头有无肿大、淤血、出血、坏死灶和溃疡等；切开肌胃，剥离角质膜，检查肌层内表面有无出血、溃疡等。
- 7.2.10 肠道 检查浆膜有无异常。剖开肠道，检查小肠黏膜有无淤血、出血等，检查盲肠黏膜有无枣核状坏死灶、溃疡等。
- 7.2.11 肝脏和胆囊 检查肝脏形状、大小、色泽及有无出血、坏死灶、结节、肿物等。检查胆囊有无肿大等。
- 7.2.12 脾脏 检查形状、大小、色泽及有无出血和坏死灶、灰白色或灰黄色结节等。
- 7.2.13 心脏 检查心包和心外膜有无炎症变化等，心冠状沟脂肪、心外膜有无出血点、坏死灶、结节等。
- 7.2.14 法氏囊（腔上囊） 检查有无出血、肿大等。剖检有无出血、干酪样坏死等。
- 7.2.15 体腔 检查内部清洁程度和完整度，有无赘生物、寄生虫等。检查体腔内壁有无凝血块、粪便和胆汁污染和其他异常等。
- 7.3 复检 官方兽医对上述检疫情况进行复查，综合判定检疫结果。
- 7.4 结果处理
- 7.4.1 合格的，由官方兽医出具《动物检疫合格证明》，加施检疫标志。
- 7.4.2 不合格的，由官方兽医出具《动物检疫处理通知单》，并按以下规定处理。
- 7.4.2.1 发现患有本规程规定疫病的，按 6.4.2.1、6.4.2.2 和有关规定处理。
- 7.4.2.2 发现患有本规程规定以外其他疫病的，患病家禽屠体及副产品按《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》（GB16548）的规定处理，污染的场所、器具等按规定实施消毒，并做好《生物安全处理记录》。
- 7.4.3 监督场（厂、点）方做好检疫病害动物及废弃物无害化处理。
- 7.5 官方兽医在同步检疫过程中应做好卫生安全防护。
- 8 检疫记录
- 8.1 官方兽医应监督指导屠宰场方做好入场监督查验等相关记录。
- 8.2 官方兽医应做好检疫申报、宰前检查、同步检疫等环节记录。
- 8.3 检疫记录应保存 24 个月以上。

牛屠宰检疫规范

1 范围

本规范规定了无疫区内牛屠宰加工场屠宰检疫申报、进入屠宰场（厂、点）监督检查、宰前检查、同步检疫、检疫结果处理以及检疫记录等操作程序。

本规范适用于无疫区内的日屠宰量 100 头牛以上屠宰加工厂的屠宰检疫。其它规模的牛屠宰场的屠宰检疫可参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可以使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 检疫对象

包括口蹄疫、牛传染性胸膜肺炎、牛海绵状脑病、布鲁氏菌病、牛结核病、炭疽、牛传染性鼻气管炎、日本血吸虫病。

4 检疫合格标准

4.1 入场（厂、点）时，具备有效的《动物检疫合格证明》，畜禽标识符合国家规定；如为外省调入的规定疫病相关的易感动物，应具备无疫区建设省省级动物卫生监督机构签署的《动物检疫合格证明》。

4.2 无规定的传染病和寄生虫病。

4.3 需要进行实验室疫病检测的，检测结果合格。

4.4 履行本规程规定的检疫程序，检疫结果符合规定。

5 入场（厂、点）监督检查

5.1 查验验物 查验入场（厂、点）牛的《动物检疫合格证明》和佩戴的畜禽标识。

5.2 了解牛运输途中有关情况。

5.3 临床检查牛群的精神状况、外貌、呼吸状态及排泄物状态等情况。

5.4 结果处理

5.4.1 合格 《动物检疫合格证明》有效、证物相符、畜禽标识符合要求、临床检查健康，方可入场，并回收《动物检疫合格证明》。场（厂、点）方须按产地分类将牛只送入待宰圈，不同货主、不同批次的牛只不得混群。

5.4.2 不合格 不符合条件的，按国家有关规定处理。

5.5 消毒 监督货主在卸载后对运输工具及相关物品等进行消毒。

6 检疫申报

屠宰加工场场方应在屠宰前 6 小时申报检疫，现场填写检疫申报单。官方兽医接到检疫申报后，根据相关情况决定是否予以受理。受理的，应当及时实施宰前检查；不予受理的，应说明理由。

7 宰前检查

7.1 屠宰前 2 小时内，官方兽医应按照《反刍动物产地检疫规程》中“临床检查”部分实施检查。

7.2 结果处理

7.2.1 合格的，准予屠宰。

7.2.2 不合格的，按以下规定处理。

7.2.2.1 发现有口蹄疫、牛传染性胸膜肺炎、牛海绵状脑病及炭疽等疫病症状的，限制移动，并按照《动物防疫法》、《重大动物疫情应急条例》、《动物疫情报告管理办法》和 GB16548 等规定处理。

7.2.2.2 发现有布鲁氏菌病、牛结核病、牛传染性鼻气管炎等疫病症状的，病牛按相应疫病的防治技术规范处理，同群牛隔离观察，确认无异常的，准予屠宰。7.2.2.3 怀疑患有本规程规定疫病及临床检查发现其他异常情况的，按相应疫病防治技术规范进行实验室检测，并出具检测报告。实验室检测须由省级动物卫生监督机构指定的具有资质的实验室承担。

7.2.2.4 发现患有本规程规定以外疫病的，隔离观察，确认无异常的，准予屠宰；隔离期间出现病死动物的，按照 GB16548 要求处理。

7.2.2.5 确认为无碍于肉食安全且濒临死亡的牛只，视情况进行急宰。

7.3 监督场（厂、点）方对处理病牛的待宰圈、急宰间以及隔离圈等进行消毒。

8 同步检疫

与屠宰操作相对应，对同一头牛的头、蹄、内脏、胴体等统一编号进行检疫。

8.1 头蹄部检查

8.1.1 头部检查 检查鼻唇镜、齿龈及舌面有无水疱、溃疡、烂斑等；剖检一侧咽后内侧淋巴结和两侧下颌淋巴结，同时检查咽喉黏膜和扁桃体有无病变。

8.1.2 蹄部检查 检查蹄冠、蹄叉皮肤有无水疱、溃疡、烂斑、结痂等。

8.2 内脏检查 取出内脏前，观察胸腔、腹腔有无积液、粘连、纤维素性渗出物。检查心脏、肺脏、肝脏、胃肠、脾脏、肾脏，剖检肠系膜淋巴结、支气管淋巴结、肝门淋巴结，检查有无病变和其他异常。

8.2.1 心脏 检查心脏的形状、大小、色泽及有无淤血、出血等。必要时剖开心包，检查心包膜、心包液和心肌有无异常。

8.2.2 肺脏 检查两侧肺叶实质、色泽、形状、大小及有无淤血、出血、水肿、化脓、实变、结节、粘连、寄生虫等。剖检一侧支气管淋巴结，检查切面有无淤血、出血、水肿等。必要时剖开气管、结节部位。

8.2.3 肝脏 检查肝脏大小、色泽，触检其弹性和硬度，剖开肝门淋巴结，检查有无出血、淤血、肿大、坏死灶等。必要时剖开肝实质、胆囊和胆管，检查有无硬化、萎缩、日本血吸虫等。

8.2.4 肾脏 检查其弹性和硬度及有无出血、淤血等。必要时剖开肾实质，检查皮质、髓质和肾盂有无出血、肿大等。

8.2.5 脾脏 检查弹性、颜色、大小等。必要时剖检脾实质。

8.2.6 胃和肠 检查肠袢、肠浆膜，剖开肠系膜淋巴结，检查形状、色泽及有无肿胀、淤血、出血、粘连、结节等。必要时剖开胃肠，检查内容物、黏膜及有无出血、结节、寄生虫等。

8.2.7 子宫和睾丸 检查母牛子宫浆膜有无出血、黏膜有无黄白色或干酪样结节。检查公牛睾丸有无肿大，睾丸、附睾有无化脓、坏死灶等。

8.3 胴体检查

8.3.1 整体检查 检查皮下组织、脂肪、肌肉、淋巴结以及胸腔、腹腔浆膜有无淤血、出血、疹块、脓肿和其他异常等。

8.3.2 淋巴结检查

8.3.2.1 颈浅淋巴结（肩前淋巴结） 在肩关节前稍上方剖开臂头肌、肩胛横突肌下的一侧颈浅淋巴结，检查切面形状、色泽及有无肿胀、淤血、出血、坏死灶等。

8.3.2.2 髂下淋巴结（股前淋巴结、膝上淋巴结） 剖开一侧淋巴结，检查切面形状、色泽、大小及有无肿胀、淤血、出血、坏死灶等。

8.3.2.3 必要时剖检腹股沟深淋巴结。

8.4 复检 官方兽医对上述检疫情况进行复查，综合判定检疫结果。

8.5 结果处理

8.5.1 合格的，由官方兽医出具《动物检疫合格证明》，加盖检疫验讫印章，对分割包装的肉品加施检疫标志。

8.5.2 不合格的，由官方兽医出具《动物检疫处理通知单》，并按以下规定处理。

8.5.2.1 发现患有本规程规定疫病的，按 7.2.2.1、7.2.2.2 和有关规定处理。

8.5.2.2 发现患有本规程规定以外疫病的，监督场（厂、点）方对病牛胴体及副产品按 GB16548 处理，对污染的场所、器具等按规定实施消毒，并做好《生物安全处理记录》。

8.5.3 监督场（厂、点）方做好检疫病害动物及废弃物无害化处理。

8.6 官方兽医在同步检疫过程中应做好卫生安全防护。

9 检疫记录

9.1 官方兽医应监督指导屠宰场（厂、点）方做好入场监督检查、待宰、急宰、生物安全处理等环节各项记录。

9.2 官方兽医应做好检疫申报、宰前检查、同步检疫等环节记录。

9.3 检疫记录应保存 24 个月以上。

羊屠宰检疫规范

1 范围

本规范规定了无疫区内牛屠宰加工场屠宰检疫申报、进入屠宰场（厂、点）监督检查、宰前检查、同步检疫、检疫结果处理以及检疫记录等操作程序。

本规范适用于无疫区内的日屠宰羊 500 只以上屠宰加工厂的屠宰检疫。其它规模的羊屠宰场的屠宰检疫可参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可以使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 检疫对象

包括口蹄疫、痒病、小反刍兽疫、绵羊痘和山羊痘、炭疽、布鲁氏菌病、肝片吸虫病、棘球蚴病。

4 检疫合格标准

4.1 入场（厂、点）时，具备有效的《动物检疫合格证明》，畜禽标识符合国家规定；如为外省调入的规定疫病相关的易感动物，应具备无疫区建设省省级动物卫生监督机构签署的《动物检疫合格证明》。

4.2 无规定的传染病和寄生虫病。

4.3 需要进行实验室疫病检测的，检测结果合格。

4.4 履行本规程规定的检疫程序，检疫结果符合规定。

5 入场（厂、点）监督检查

5.1 查验验物查验入场（厂、点）羊的《动物检疫合格证明》和佩戴的畜禽标识。

5.2 询问了解羊只运输途中有关情况。

5.3 临床检查检查羊群的精神状况、外貌、呼吸状态及排泄物状态等情况。

5.4 结果处理

5.4.1 合格 《动物检疫合格证明》有效、证物相符、畜禽标识符合要求、临床检查健康，方可入场，并回收《动物检疫合格证明》。场（厂、点）方须按产地分类将羊只送入待宰圈，不同货主、不同批次的羊只不得混群。

5.4.2 不合格 不符合条件的，按国家有关规定处理。

5.5 消毒 监督货主在卸载后对运输工具及相关物品等进行清洗消毒。

6 检疫申报

屠宰加工场场方应在屠宰前 6 小时申报检疫，现场填写检疫申报单。官方兽医接到检疫申报后，根据相关情况决定是否予以受理。受理的，应当及时实施宰前检查；不予受理的，应说明理由。

7 宰前检查

7.1 屠宰前 2 小时内，官方兽医应按照《反刍动物产地检疫规程》中“临床检查”部分实施检查。

7.2 结果处理

7.2.1 合格的，准予屠宰。

7.2.2 不合格的，按以下规定处理。

7.2.2.1 发现有口蹄疫、痒病、小反刍兽疫、绵羊痘和山羊痘、炭疽等疫病症状的，限制移动，并按照《动物防疫法》、《重大动物疫情应急条例》、《动物疫情报告管理办法》和《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》（GB16548）等有关规定处理。

7.2.2.2 发现有布鲁氏菌病症状的，病羊按布鲁氏菌病防治技术规范处理，同群羊隔离观察，确认无异常的，准予屠宰。

7.2.2.3 怀疑患有本规程规定疫病及临床检查发现其他异常情况的，按相应疫病防治技术规范进行实验室检测，并出具检测报告。实验室检测须由省级动物卫生监督机构指定的具有资

质的实验室承担。

7.2.2.4 发现患有本规程规定以外疫病的，隔离观察，确认无异常的，准予屠宰；隔离期间出现病死动物的，GB16548 要求处理。

7.2.2.5 确认为无碍于肉食安全且濒临死亡的羊只，视情况进行急宰。

7.3 监督场（厂、点）方对处理病羊的待宰圈、急宰间以及隔离圈等进行消毒。

8 同步检疫

与屠宰操作相对应，对同一头羊的头、蹄、内脏、胴体等统一编号进行检疫。

8.1 头蹄部检查

8.1.1 头部检查 检查鼻镜、齿龈、口腔黏膜、舌及舌面有无水疱、溃疡、烂斑等。必要时剖开下颌淋巴结，检查形状、色泽及有无肿胀、淤血、出血、坏死灶等。

8.1.2 蹄部检查 检查蹄冠、蹄叉皮肤有无水疱、溃疡、烂斑、结痂等。

8.2 内脏检查 取出内脏前，观察胸腔、腹腔有无积液、粘连、纤维素性渗出物。检查心脏、肺脏、肝脏、胃肠、脾脏、肾脏，剖检支气管淋巴结、肝门淋巴结、肠系膜淋巴结等，检查有无病变和其他异常。

8.2.1 心脏 检查心脏的形状、大小、色泽及有无淤血、出血等。必要时剖开心包，检查心包膜、心包液和心肌有无异常。

8.2.2 肺脏 检查两侧肺叶实质、色泽、形状、大小及有无淤血、出血、水肿、化脓、实变、粘连、包裹砂、寄生虫等。剖开一侧支气管淋巴结，检查切面有无淤血、出血、水肿等。

8.2.3 肝脏 检查肝脏大小、色泽、弹性、硬度及有无大小不一的突起。剖开肝门淋巴结，切开胆管，检查有无寄生虫（肝片吸虫病）等。必要时剖开肝实质，检查有无肿大、出血、淤血、坏死灶、硬化、萎缩等。

8.2.4 肾脏 剥离两侧肾被膜（两刀），检查弹性、硬度及有无贫血、出血、淤血等。必要时剖检肾脏。

8.2.5 脾脏 检查弹性、颜色、大小等。必要时剖检脾实质。

8.2.6 胃和肠 检查浆膜面及肠系膜有无淤血、出血、粘连等。剖开肠系膜淋巴结，检查有无肿胀、淤血、出血、坏死等。必要时剖开胃肠，检查有无淤血、出血、胶样浸润、糜烂、溃疡、化脓、结节、寄生虫等，检查瘤胃肉柱表面有无水疱、糜烂或溃疡等。

8.3 胴体检查

8.3.1 整体检查 检查皮下组织、脂肪、肌肉、淋巴结以及胸腔、腹腔浆膜有无淤血、出血以及疹块、脓肿和其他异常等。

8.3.2 淋巴结检查

8.3.2.1 颈浅淋巴结（肩前淋巴结）在肩关节前稍上方剖开臂头肌、肩胛横突肌下的一侧颈浅淋巴结，检查切面形状、色泽及有无肿胀、淤血、出血、坏死灶等。

8.3.2.2 髂下淋巴结（股前淋巴结、膝上淋巴结）剖开一侧淋巴结，检查切面形状、色泽、大小及有无肿胀、淤血、出血、坏死灶等。

8.3.2.3 必要时检查腹股沟深淋巴结。

8.4 复检 官方兽医对上述检疫情况进行复查，综合判定检疫结果。

8.5 结果处理

8.5.1 合格的，由官方兽医出具《动物检疫合格证明》，加盖检疫验讫印章，对分割包装肉品加施检疫标志。

8.5.2 不合格的，由官方兽医出具《动物检疫处理通知单》，并按以下规定处理。

8.5.2.1 发现患有本规程规定疫病的，按 7.2.2.1、7.2.2.2 和有关规定处理。

8.5.2.2 发现患有本规程规定以外疫病的，监督场（厂、点）方对病羊胴体及副产品按 GB16548 处理，对污染的场所、器具等按规定实施消毒，并做好《生物安全处理记录》。

8.5.3 监督场（厂、点）方做好检疫病害动物及废弃物无害化处理。

8.6 官方兽医在同步检疫过程中应做好卫生安全防护。

9 检疫记录

9.1 官方兽医应监督指导屠宰场（厂、点）方做好入场监督检查、待宰、急宰、生物安全处理等环节各项记录。

9.2 官方兽医应做好检疫申报、宰前检查、同步检疫等环节记录。

9.3 检疫记录应保存 24 个月以上。

猪屠宰检疫规范

1 范围

本规范规定了无疫区内猪屠宰加工场屠宰检疫申报、进入屠宰场（厂、点）监督检查、宰前检查、同步检疫、检疫结果处理以及检疫记录等操作程序。

本规范适用于无疫区内的日屠宰猪 500 只以上屠宰加工厂的屠宰检疫。其它规模的猪屠宰场的屠宰检疫可参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可以使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 检疫对象

包括口蹄疫、猪瘟、高致病性猪蓝耳病、炭疽、猪丹毒、猪肺疫、猪副伤寒、猪Ⅱ型链球菌病、猪支原体肺炎、副猪嗜血杆菌病、丝虫病、猪囊尾蚴病、旋毛虫病。

4 检疫合格标准

4.1 入场（厂、点）时，具备有效的《动物检疫合格证明》，畜禽标识符合国家规定；如为外省调入的规定疫病相关的易感动物，应具备无疫区建设省省级动物卫生监督机构签署的《动物检疫合格证明》。

4.2 无规定的传染病和寄生虫病。

4.3 需要进行实验室疫病检测的，检测结果合格。

4.4 履行本规程规定的检疫程序，检疫结果符合规定。

5 入场（厂、点）监督检查

5.1 查验验物查验入场（厂、点）生猪的《动物检疫合格证明》和佩戴的畜禽标识。

5.2 询问了解生猪运输途中有关情况。

5.3 临床检查检查生猪群体的精神状况、外貌、呼吸状态及排泄物状态等情况。

5.4 结果处理

5.4.1 合格《动物检疫合格证明》有效、证物相符、畜禽标识符合要求、临床检查健康，方可入场，并回收《动物检疫合格证明》。场（厂、点）方须按产地分类将生猪送入待宰圈，不同货主、不同批次的生猪不得混群。

5.4.2 不合格不符合条件的，按国家有关规定处理。

5.5 消毒监督货主在卸载后对运输工具及相关物品等进行消毒。

6 检疫申报

屠宰加工场场方应在屠宰前 6 小时申报检疫，现场填写检疫申报单。官方兽医接到检疫申报后，根据相关情况决定是否予以受理。受理的，应当及时实施宰前检查；不予受理的，应说明理由。

7 宰前检查

7.1 屠宰前 2 小时内，官方兽医应按照《生猪产地检疫规程》中“临床检查”部分实施检查。

7.2 结果处理

7.2.1 合格的，准予屠宰。

7.2.2 不合格的，按以下规定处理。

7.2.2.1 发现有口蹄疫、猪瘟、高致病性猪蓝耳病、炭疽等疫病症状的，限制移动，并按照《中华人民共和国动物防疫法》、《重大动物疫情应急条例》、《动物疫情报告管理办法》和《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》（GB16548）等有关规定处理。

7.2.2.2 发现有猪丹毒、猪肺疫、猪Ⅱ型链球菌病、猪支原体肺炎、副猪嗜血杆菌病、猪副伤寒等疫病症状的，患病猪按国家有关规定处理，同群猪隔离观察，确认无异样的，准予屠宰；隔离期间出现病死的，按 GB16548 要求处理。

7.2.2.3 怀疑患有本规程规定疫病及临床检查发现其他异常情况的，按相应疫病防治技术规范进行实验室检测，并出具检测报告。实验室检测须由省级动物卫生监督机构指定的具有资

质的实验室承担。

7.2.2.4 发现患有本规程规定以外疫病的，隔离观察，确认无异常的，准予屠宰；隔离期间出现异常的，按《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》（GB16548）等有关规定处理。

7.2.2.5 确认为无碍于肉食安全且濒临死亡的生猪，视情况进行急宰。

7.3 监督场（厂、点）方对处理患病生猪的待宰圈、急宰间以及隔离圈等进行消毒。

8 同步检疫

与屠宰操作相对应，对同一头猪的头、蹄、内脏、胴体等统一编号进行检疫。

8.1 头蹄及体表检查

8.1.1 视检体表的完整性、颜色，检查有无本规程规定疫病引起的皮肤病变、关节肿大等。

8.1.2 观察吻突、齿龈和蹄部有无水疱、溃疡、烂斑等。

8.1.3 放血后退毛前，沿放血孔纵向切开下颌区，直到颌骨高峰区，剖开两侧下颌淋巴结，视检有无肿大、坏死灶（紫、黑、灰、黄），切面是否呈砖红色，周围有无水肿、胶样浸润等。

8.1.4 剖检两侧咬肌，充分暴露剖面，检查有无猪囊尾蚴。

8.2 内脏检查 取出内脏前，观察胸腔、腹腔有无积液、粘连、纤维素性渗出物。检查脾脏、肠系膜淋巴结有无肠炭疽。取出内脏后，检查心脏、肺脏、肝脏、脾脏、胃肠、支气管淋巴结、肝门淋巴结等。

8.2.1 心脏 视检心包，切开心包膜，检查有无变性、心包积液、渗出、淤血、出血、坏死等症状。在与左纵沟平行的心脏后缘房室分界处纵剖心脏，检查心内膜、心肌、血液凝固状态、二尖瓣及有无虎斑心、菜花样赘生物、寄生虫等。

8.2.2 肺脏 视检肺脏形状、大小、色泽，触检弹性，检查肺实质有无坏死、萎陷、气肿、水肿、淤血、脓肿、实变、结节、纤维素性渗出物等。剖开一侧支气管淋巴结，检查有无出血、淤血、肿胀、坏死等。必要时剖检气管、支气管。

8.2.3 肝脏 视检肝脏形状、大小、色泽，触检弹性，观察有无淤血、肿胀、变性、黄染、坏死、硬化、肿物、结节、纤维素性渗出物、寄生虫等病变。剖开肝门淋巴结，检查有无出血、淤血、肿胀、坏死等。必要时剖检胆管。

8.2.4 脾脏 视检形状、大小、色泽，触检弹性，检查有无肿胀、淤血、坏死灶、边缘出血性梗死、被膜隆起及粘连等。必要时剖检脾实质。

8.2.5 胃和肠 视检胃肠浆膜，观察大小、色泽、质地，检查有无淤血、出血、坏死、胶冻样渗出物和粘连。对肠系膜淋巴结做长度不少于 20 厘米的弧形切口，检查有无淤血、出血、坏死、溃疡等病变。必要时剖检胃肠，检查黏膜有无淤血、出血、水肿、坏死、溃疡。

8.3 胴体检查

8.3.1 整体检查 检查皮肤、皮下组织、脂肪、肌肉、淋巴结、骨骼以及胸腔、腹腔浆膜有无淤血、出血、疹块、黄染、脓肿和其他异常等。

8.3.2 淋巴结检查 剖开腹部底壁皮下、后肢内侧、腹股沟皮下环附近的两侧腹股沟浅淋巴结，检查有无淤血、水肿、出血、坏死、增生等病变。必要时剖检腹股沟深淋巴结、髂下淋巴结及髂内淋巴结。

8.3.3 腰肌 沿荐椎与腰椎结合部两侧肌纤维方向切开 10 厘米左右切口，检查有无猪囊尾蚴。

8.3.4 肾脏 剥离两侧肾被膜，视检肾脏形状、大小、色泽，触检质地，观察有无贫血、出血、淤血、肿胀等病变。必要时纵向剖检肾脏，检查切面皮质部有无颜色变化、出血及隆起等。

8.4 旋毛虫检查 取左右膈脚各 30 克左右，与胴体编号一致，撕去肌膜，感官检查后镜检。

8.5 复检 官方兽医对上述检疫情况进行复查，综合判定检疫结果。

8.6 结果处理

8.6.1 合格的，由官方兽医出具《动物检疫合格证明》，加盖检疫验讫印章，对分割包装的肉品加施检疫标志。

8.6.2 不合格的，由官方兽医出具《动物检疫处理通知单》，并按以下规定处理。

8.6.2.1 发现患有本规程规定疫病的，按 7.2.2.1、7.2.2.2 和有关规定处理。

8.6.2.2 发现患有本规程规定以外疫病的，监督场（厂、点）方对病猪胴体及副产品按

GB16548 处理，对污染的场所、器具等按规定实施消毒，并做好《生物安全处理记录》。

8.6.3 监督场（厂、点）方做好检疫病害动物及废弃物无害化处理。

8.7 官方兽医在同步检疫过程中应做好卫生安全防护。

9 检疫记录

9.1 官方兽医应监督指导屠宰场（厂、点）方做好入场监督查验、待宰、急宰、生物安全处理等环节各项记录。

9.2 官方兽医应做好检疫申报、宰前检查、同步检疫等环节记录。

9.3 检疫记录应保存 24 个月以上。

规定动物疫病风险评估准则

1 范围

本准则规定了无疫区在动物疫病风险评估过程中开展危害确认、释放评估、暴露评估、后果评估、风险估算、风险交流、风险管理及起草评估报告等工作的要求。

本准则适用于规定动物疫病的风险评估活动。

2 引用文件

本标准内容引用了下列文件中的条款。凡是不注明日期的引用文件，其有效版本适用于本标准。

《风险管理原则与实施指南》（GB/T 24535-2009）

《风险管理风险评估技术》（GB/T 27921-2011）

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1 危害

动物或动物产品所携带可能引起不利后果的特定致病因子。

3.2 危害确认

识别与进入无疫区的动物及动物产品有关的可能产生潜在危害的致病因子。

3.3 释放评估（传入评估）

阐明每种潜在危害在特定条件下向无疫区内特定环境“释放”病原体的生物学途径和可能性。

3.4 暴露评估

阐明无疫区内的动物或动物产品暴露于特定危害因子（病原体）的生物途径，并定性或定量评估此种暴露发生的概率。

3.5 后果评估

阐明无疫区内的动物或动物产品接触病原体的潜在后果并计算其可能发生的概率。

3.6 风险

一定时期内，危害在无疫区或无疫区内特定环境中发生的可能性及导致生物、经济方面不利后果的严重程度。

3.7 风险评估

对无疫区传入、流行或扩散危害因子的可能性及生物学和社会经济后果的评价。

3.8 风险交流

在风险评估中，风险管理者及利益相关方之间交流风险信息的过程。

3.9 风险计算

综合考虑从危害确认到产生不良后果的全部风险路径，包括释放评估、暴露评估和后果评估的结果，生成针对既定危害因子的总体风险量。

3.10 风险管理

在风险评估的基础上，确定、选择和实施能够降低风险水平的措施及对措施开展评价的过程。

3.11 不确定性

由于统计数据不准确及信息缺乏等因素而产生的评估结果的不精确。

3.12 定性风险评估

用高、中、低、可忽略等定性词汇表示风险评估结果的可能性及程度的评估活动。

3.13 定量风险评估

用数值表示风险评估结果的评估活动。

4 基本要求

4.1 无疫区建设及维持过程中，应针对从无疫区外引进动物及动物产品的特点以及无疫区周边地区和无疫区内规定动物疫病的状态定期开展风险评估活动，无疫区风险评估可根据需要适时启动，每年应不少于一次。

4.2 无疫区风险评估由无疫区所在省组织实施。

4.3 无疫区所在省应成立动物卫生风险评估专家委员会或相应专家组织，制订相关动物卫

生风险评估规划和计划，提出动物卫生风险评估的方针、政策及技术措施建议，组织开展规定动物疫病风险评估工作。

4.4 无疫区风险评估应成立专家组承担无疫区规定动物疫病风险评估工作，专家组成员包括动物卫生管理、兽医流行病学、风险分析、统计学、兽医实验室等相关领域的专家。

5 风险评估原则

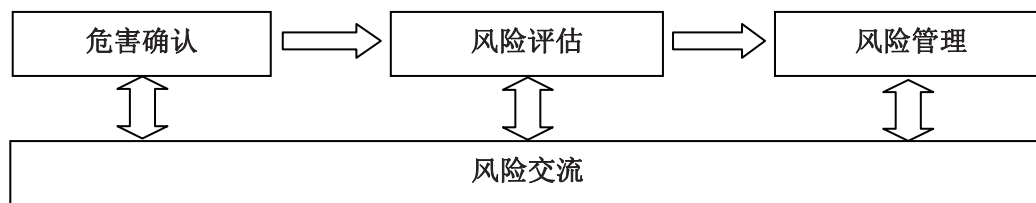
5.1 开展风险评估过程中，要认真审查风险评估相关信息的合理性、准确性、时效性和可追溯性，与各相关方及时交流意见，并向各相关方适时通报风险评估结果或风险管理措施意见。

5.2 风险评估可以是定性评估，也可以是定量评估。由于定性评估不需要精确的建模，在数据难以准确收集或相关数据不完善的情况下，建议采用定性评估。

5.3 风险评估专家组在风险评估过程中应根据实际情况灵活处理各种复杂问题，并参照《风险管理-风险评估技术》(GB/T 27921-2011)中推荐的评估技术及国家或国际通用的风险评估方法开展具体评估工作。

6 评估程序

根据世界动物卫生组织(OIE)风险分析框架，动物卫生风险分析通常包含危害确认、风险评估、风险管理和风险交流四个组成部分。



图一：世界动物卫生组织风险评估框架

本准则参照该风险分析框架，将规定动物疫病风险评估分为四个阶段：第一阶段进行评估前的准备；第二阶段开展危害确认；第三阶段分步骤开展风险评估，分析发生规定动物疫病的可能性及潜在危害程度；第四阶段提出风险管理建议并评价风险管理效果。此外，风险分析从开始到最终形成评估报告全过程都需要各利益相关方开展有效的风险交流，以便评估人员取得利益相关方对风险分析的意见及相关信息。

6.1 评估前的准备

专家组应在风险评估开展前明确拟评估的动物疫病种类及评估区域范围。

6.2 危害确认

危害确认必须在风险评估之前开展，主要考虑以下几方面内容：

- 6.2.1 引入或过境动物及动物产品的原产地是否存在规定动物疫病感染；
- 6.2.2 无疫区内及其周边地区是否存在规定动物疫病感染；
- 6.2.3 无疫区内及其周边地区的野生动物是否存在规定动物疫病感染；
- 6.2.4 其他风险因素。

如存在上述任一可能性，则应启动释放评估。

6.3 风险评估

6.3.1 释放评估

释放评估需考虑以下风险因素：

6.3.1.1 引入或过境动物及动物产品的原产地存在规定动物疫病感染的释放评估

(1) 动物及动物产品原产地规定动物疫病的流行率、防疫措施、流行病学调查情况、监测情况及是否实施区域化管理；

(2) 进入或过境无疫区的动物及动物产品是否通过指定的通道，并有完整记录；

(3) 进入或过境无疫区的动物及动物产品的检疫监管及隔离情况；

(4) 进入或过境动物及动物产品的数量和去向；

(5) 引入动物的饲养过程是否存在病原扩散的可能；

(6) 动物及动物产品加工过程是否存在病原扩散的可能。

6.3.1.2 无疫区内及其周边地区存在规定动物疫病感染的释放评估

(1) 无疫区内规定动物疫病的流行率、防疫措施、流行病学调查情况、监测情况及监

督管理情况；

(2) 无疫区周边地区规定动物疫病的流行率、防疫措施、流行病学调查情况、监测情况及监督管理情况；

(3) 自然环境（如虫媒、河流）存在病原体的可能性及监测情况。

6.3.1.3 无疫区内及其周边地区的野生动物存在规定动物疫病感染的释放评估

(1) 野生动物规定动物疫病的监测情况、流行病学调查情况及流行率；

(2) 野生动物与家养动物的隔离情况或接触情况。

6.3.1.4 其他风险因素的释放评估

综合考虑其他可能影响无疫区规定动物疫病状态的相关风险因素，确定是否存在危害释放的风险。

经释放评估后证明不存在风险，即可在这一步作出风险评估结论；如存在释放风险，则启动暴露评估。

6.3.2 暴露评估

暴露评估需考虑以下风险因素：

6.3.2.1 疫病特性

(1) 病原的生物学特性；

(2) 病原的理化特性。

6.3.2.2 暴露因素

(1) 进入无疫区的动物或动物产品数量、用途及管理措施等；

(2) 无疫区内可能接触危害因子的动物的饲养量、饲养模式、年龄结构及地理分布等；

(3) 潜在的传播媒介或方式；

(4) 影响疫病传播的地理和环境特征；

(5) 影响疫病传播的消费习惯和文化风俗。

6.3.2.3 政策及管理因素

(1) 与无疫区管理和运行相关的法律法规、规范、标准、计划的制订情况及执行情况（包括动物疫病报告制度、应急处置能力、管理和运行机制等）；

(2) 特定地区动物疫病管理机构和人员的设置及运行情况；

(3) 规定动物疫病预防管理措施（包括各类免疫、监测、流行病学调查等）的设置情况及执行情况；

(4) 识别规定动物疫病的能力（实验室管理及诊断能力）；

(5) 无疫区内动物及动物产品运输环节管理是否符合相关规定；

(6) 特定地区饲养场管理及防疫制度是否符合相关规定；

(7) 活动物交易市场管理及防疫情况；

(8) 屠宰场管理及检疫措施的实施情况；

(9) 无害化处理场的种类及管理措施；

(10) 动物产品生产加工处理情况；

(11) 针对违法违规行为的处理及改正措施的执行情况；

(12) 其他政策及管理因素。

如果暴露评估证明不存在风险，可在这一步作出风险评估结论；如存在暴露风险，则启动后果评估。

6.3.3 后果评估

6.3.3.1 直接后果

(1) 动物感染、发病及生产损失；

(2) 公共卫生后果。

6.3.3.2 间接后果

(1) 监测、控制成本；

(2) 损失赔偿成本；

(3) 潜在贸易损失；

(4) 对环境的不良后果；

(5) 社会经济后果。

6.3.4 风险估算（风险评价）

风险估算是综合释放评估、暴露评估和后果评估的结果，制定应对危害引起风险的总体措施。因此，风险估算要考虑从危害确认到产生不良后果的全部风险途径。

6.3.4.1 定性风险评估结果

6.3.4.1.1 风险等级

通过确定风险等级来确认危害因子的影响程度，进而为风险管理措施提供依据。本准则将风险等级分为四级，分别为：可忽略、低、中等和高（表一），通常描述为：

表一：风险等级表

风险等级	定义
可忽略	危害几乎不发生，并且后果不严重或可忽略
低	危害极少发生，但有一定后果
中等	危害有发生的可能性，且后果较严重
高	危害极有可能发生，且后果严重

6.3.4.1.2 不确定性分析

在风险评估过程中，应明确注明各个评估项目存在的不确定性，不确定性等级将直接影响最终结论的可靠性。不确定性通常分为四级，分别为：低、中、高和未知。通常描述为：

表二：不确定性等级

低	开展有效的风险交流，数据详实系统，信息来源可信且文件齐全，对风险交流中的不同意见进行了合理处理，所有评估专家给出相似的评估结论。
中	开展了风险交流，数据较详实、全面，信息来源较可靠且文件齐全，对风险交流中的不同意见进行了处理，不同评估专家给出的评估结论存在差异。
高	没有开展风险交流，数据详实性较差，信息来源不太可靠，文件不齐全，评估专家仅凭借未发布的资料和现场考察或交流获取相关信息，不同评估专家给出的评估结论存在较大差异。
未知	信息和数据来源不可靠、没有充分有效的收集信息，风险评估时间仓促。

评估过程中，专家组可依据现场评审或书面评审结果，依据对应的评判指标，确定各风险因素所处的风险等级；并依据所掌握的信息，确定不确定性等级，最后按下表格式填写评估结论（见表三）。

表三：评估结论表

序号	被评估风险因素	风险等级	不确定性等级
1.			
2.			
3.			
...			

6.3.4.2 定量风险评估结果

(1) 计算一定时期内健康状况可能受到不同程度影响的畜群、禽群、其它动物或人类的数量。

(2) 概率分布、置信区间及其它表示不确定性的方式。

(3) 计算所有模型输入值的方差。

(4) 灵敏度分析, 根据各输入值导致风险计算结果的变异程度, 确定其等级。

(5) 模型输入值之间的依赖性及相关性分析。

6.3.5 风险评估结论

评估活动结束后, 经与各利益相关方充分风险交流, 参照评估结论表(表三), 在对各个风险因素的风险水平、不确定性水平及可能造成的后果分别进行描述的基础上, 判定无疫区规定动物疫病的整体风险水平, 为下一阶段风险管理措施的开展提供参考依据。

7 风险管理措施

风险评估委员会可在获得风险评估结论后, 以书面形式向所在省份兽医主管部门提交风险管理措施建议。风险管理措施应包括以下几个组成部分:

(1) 确定风险管理目标;

(2) 开展风险评价, 将风险评估中确定的风险水平与无疫区的可接受风险水平相比较;

(3) 拟定风险处理方案;

(4) 选择风险处理最佳方案;

(5) 风险处理方案的评价;

(6) 方案的实施;

(7) 监督及评审, 对风险管理措施的不间断评估, 以确保取得预期的效果。

8 风险评估报告

风险评估结束后, 风险评估专家组应向所属的省级风险评估专家委员会递交风险评估报告。评估报告通常都包括以下几部分:

8.1 题目

题目应能概括全篇, 反映所要评估的对象、范围、病种等问题。

8.2 前言

简短扼要地说明评估的目的、意义、任务、时间、地点、对象、范围等。要将评估的目的性、针对性和必要性交待清楚, 使读者初步掌握报告主旨, 并相信评估的科学性和真实性, 体现评估报告的价值, 前言中应明确表述的信息包括: 针对哪些动物疫病开展风险评估; 被评估的动物种类(包括野生动物); 评估涉及的相关产品(如饲料、肥料、兽药等); 评估涉及的人员及设施、设备等; 评估涉及的自然资源(如虫媒、河流、湖泊等); 评估区域的范围及保护区范围等; 采用何种调查方法及采样方法(重点调查、典型调查、抽样调查, 是随机取样还是分层取样, 调查方式是开调查会, 还是访问或问卷)。

8.3 报告主体

将调研得来材料进行陈述, 并依据风险评估的步骤对需评估的项目逐条开展评估, 数据也可用图示来表示。评估报告正文的写作在安排上要先后有序详略得当。大致有如下几种写法: ①按评估顺序逐点来写; ②按被评估单位的人和事的产生、发展和变化的过程来写, 以体现其规律性; ③按评估对象的特点分门别类逐一叙述。

8.4 评估结论

利用逻辑推理等方式, 科学归纳出结论。

8.5 风险管理建议

依据正文的科学分析, 可以对评估结果作理论上的进一步阐述, 明确观点, 提出风险管理意见。风险管理措施应严格遵守国家及地方相关法律法规, 并具有可操作性。

8.6 附录和参考资料

附录包括原始数据、研究记录、统计结果等内容。参考文献包括参考和引用别人的材料和论述。

第六部分 应急与处置

口蹄疫应急处置技术规范

猪瘟应急处置技术规范

小反刍兽疫应急处置技术规范

高致病性禽流感应急处置技术规范

新城疫应急处置技术规范

马流感应急处置技术规范

亨德拉病应急处置技术规范

伊氏锥虫病应急处置技术规范

西尼罗河热应急处置技术规范

马梨形虫病应急处置技术规范

日本脑炎应急处置技术规范

马脑脊髓炎（东方和西方）应急处置技术规范

马病毒性动脉炎处置技术规范

尼帕病应急处置技术规范

水泡性口炎处置技术规范

非洲马瘟应急处置技术规范

马鼻疽应急处置技术规范

马传染性贫血应急处置技术规范

马媾疫处置技术规范

紧急流行病学调查技术规范

口蹄疫应急处置技术规范

1 范围

本规范规定了口蹄疫的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国无疫区口蹄疫疫情的应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注明日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

任何单位和个人发现疑似口蹄疫疫情时，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应在 2 小时内将疫情逐级报省级动物疫病预防控制机构，并同时报所在地兽医主管部门。

省级动物疫病预防控制机构确认为疫情的，应立即向省级兽医主管部门报告。省级兽医主管部门应当在接到报告后 2 小时内报省级人民政府和国务院兽医主管部门。

疫情涉及跨省（区）的，发生地省级兽医主管部门要在确认疫情后 2 小时内通报相关省（区）的省级兽医主管部门。

4 疫情确认

4.1 疑似确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，认定为疑似疫情的，当地动物疫病预防控制机构应及时采集样品，送省级动物疫病预防控制机构进行诊断。

4.2 疫情确认

省级动物疫病预防控制机构进行实验室诊断，确认为疫情的，及时派专人将采集的样品送国家口蹄疫参考实验室进行分型鉴定。

4.3 农业部根据国家口蹄疫参考实验室的最终确诊结果，确认口蹄疫疫情。

5 疫情应急处置

5.1 临时处置

发生疑似疫情时，对发病场（户）实施隔离、监控，禁止家畜及畜产品、饲料及有关物品移动，进行严格消毒等临时处置措施。在疑似疫情报告同时，对可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售出的动物及其产品、对被污染或可疑污染物的物品（包括粪便、垫料、饲料），立即开展追踪调查，并按规定进行彻底消毒和无害化处理。必要时采取封锁、扑杀等措施。

5.2 确诊疫情处置

5.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫情确诊后，当地兽医主管部门应当在 2 小时内，确定疫情级别，划定疫点、疫区和受威胁区，报请同级人民政府对疫区实行封锁。

疫点为发病动物或野生动物所在的地点。相对独立的规模化养殖场/户，以病畜所在的养殖场/户为疫点；散养畜以病畜所在的自然村为疫点；放牧畜以病畜所在的牧场、野生动物驯养场及其活动场地为疫点；病畜在运输过程中发生疫情，以运载病畜的车、船、飞机等为疫点；在市场发生疫情，以病畜所在市场为疫点；在屠宰加工过程中发生疫情，以屠宰加工工厂（场）为疫点。

疫区为由疫点边缘向外延伸 3 公里内的区域。新的口蹄疫亚型病毒引发疫情时，疫区范围为疫点边缘向外延伸 5 公里的区域。

受威胁区为由疫区边缘向外延伸 10 公里的区域。新的口蹄疫亚型病毒引发疫情时，受威胁区范围为疫区边缘向外延伸 30 公里的区域。

在划定疫区、受威胁区时，应考虑当地饲养环境、天然屏障（如河流、山脉等）、人工屏障（道路、围栏等）、野生动物栖息情况，以及疫情溯源和分析评估结果。

5.2.2 封锁

疫情发生所在地县级以上兽医主管部门报请同级人民政府对疫区进行封锁，人民政府在接到报告后，应在 24 小时内发布封锁令。跨行政区域发生疫情时，由共同上一级兽医行政主管部门报请同级人民政府对疫区实行封锁，或者由各有关行政区域的上一级人民政府共同对疫区实行封锁。必要时，上级人民政府可以责成下级人民政府对疫区实行封锁。

5.2.3 对疫点采取的措施

5.2.3.1 扑杀并销毁疫点内所有病畜及同群畜，并对病死畜、被扑杀畜及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.3.2 对被污染或可疑污染的粪便、垫料、饲料、污水等按规定进行无害化处理。

5.2.3.3 对被污染或可疑污染的交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.3.4 对发病前 14 天内售出的家畜及其产品进行追踪，并作扑杀和无害化处理。

5.2.4 对疫区采取的措施

5.2.4.1 在疫区周围设立警示标志，在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站，执行监督检查任务，对出入人员和车辆及有关物品进行消毒。

5.2.4.2 对疫区内的易感动物进行隔离饲养，开展疫情监测、流行病学调查及风险评估，并根据易感动物的免疫健康状况开展紧急免疫。一旦发现有临床症状、监测阳性的家畜，立即实施扑杀并作无害化处理。

5.2.4.3 对排泄物或可疑受污染的饲料和垫料、污水等按规定进行无害化处理；可疑被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4.4 关闭疫区内所有生猪、牛、羊等牲畜交易市场，禁止易感动物及其产品出入疫区。

5.2.5 对受威胁区采取的措施

加强对牲畜养殖场、屠宰场、交易市场的监测，及时掌握疫情动态，并根据易感动物的免疫状况开展紧急免疫。

5.2.6 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况，做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强动物卫生监督，禁止从疫区、受威胁区调入猪、牛、羊等易感动物及其产品。加强牲畜养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警，及时掌握疫情发生风险，开展风险评估并作出疫情预警，根据辖区内动物健康状况，切实做好紧急免疫、消毒、检疫等各项综合防控措施的落实，防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传，提高养殖者防控意识。

5.2.7 疫情跟踪

对疫情发生前 14 天内，从疫点输出的易感动物及其产品、被污染饲料垫料和粪便、运输车辆及密切接触人员的去向等，按照流行病学调查技术规范进行跟踪调查，分析疫情扩散风险。必要时，对接触的易感动物进行隔离观察，对相关动物及其产品进行消毒或无害化处理。

5.2.8 疫情溯源

对疫情发生前 14 天内，所有引入疫点的易感动物、相关产品来源及运输工具等，按照流行病学调查技术规范进行追溯性调查，分析疫情来源。必要时，对其它来自原产地猪、牛、羊等畜群或与其接触的易感动物进行隔离观察，对相关动物及其产品进行消毒或无害化处理。

5.2.9 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感野生动物分布状况和发病情况，根据流行病学调查和监测结果，采取相应措施，避免野猪、黄羊等野生偶蹄兽与人工饲养牲畜接触。当地兽医主管部门要定期与林业部门进行沟通，交流通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 疫区解除封锁条件

要求疫点内最后一头病畜死亡或扑杀后，经过 14 天以上连续观察，未发现新的病例。根据疫区、受威胁区内易感动物免疫状况进行紧急免疫，易感动物免疫抗体水平达到有效保护且疫情监测为阴性，对疫点完成终末消毒。

6.2 疫区解除封锁的评估验收

疫区解除封锁时，由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。跨省区的，由所涉及省份省级兽医主管部门共同报请农业部组织评估验收。评估验收内容包括：

- (1) 疫情基本情况；
- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论；
- (3) 现场调查和实验室检测结果；
- (4) 已采取的应急措施及其效果；
- (5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后，由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

7 档案管理

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

猪瘟应急处置技术规范

1 范围

本规范规定了猪瘟的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。
本规范适用于我国无疫区猪瘟疫情应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

- 3.1 任何单位和个人发现患有猪瘟或疑似猪瘟的病例，应及时向当地兽医机构报告。
- 3.2 接到疫情报告后，当地动物疫病预防控制机构按国家动物疫情报告管理的有关规定执行。

4 疫情确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，认定为临床怀疑疫情后，当地动物疫病预防控制机构应及时采集样品，送有资质的兽医实验室进行诊断。

确诊后，由省级动物疫病预防控制机构进行复核。

5 疫情应急处置

5.1 当地县级以上动物疫病预防控制机构接到可疑猪瘟疫情报告后，应及时派员到现场诊断，根据流行病学调查、临床症状和病理变化等初步诊断为疑似猪瘟时，应立即对病猪及同群猪采取隔离、消毒、限制移动等临时性措施。

5.2 确诊为猪瘟疫情后，当地县级以上人民政府兽医主管部门应当立即划定疫点、疫区、受威胁区，并采取相应措施；同时，及时报请同级人民政府对疫区实行封锁，逐级上报至国务院兽医主管部门，并通报毗邻地区。

5.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫点：为病猪和带毒猪所在的地点。一般指病猪或带毒猪所在的猪场、屠宰厂或经营单位，如为农村散养，应将自然村划为疫点。

疫区：疫区划分时，应注意考虑当地的饲养环境和天然屏障（如河流、山脉等）等因素，原则上由疫点边缘外延 3 公里范围内区域。

受威胁区：是指疫区外延 5 公里范围内的区域。

5.2.2 封锁

由县级以上兽医主管部门向本级人民政府提出启动重大动物疫情应急指挥系统、应急预案和对疫区实行封锁的建议，有关人民政府应当立即做出决定。

5.2.3 对疫点、疫区、受威胁区采取的措施

疫点：扑杀所有的病猪和同群猪，并对所有病死猪、被扑杀猪及其产品按 GB16548 规定进行无害化处理；对排泄物、被污染或可能污染饲料和垫料、污水等均需进行无害化处理；对被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒；严禁猪只及其产品及可能污染的物品运出。

疫区：对疫区进行封锁，在疫区周围设置警示标志，在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站，对出入的人员和车辆进行消毒；根据易感动物的免疫健康状况开展紧急免疫；停止疫区内猪及其产品的交易活动，禁止易感猪只及其产品运出；对猪只排泄物、被污染饲料、垫料、污水等按国家规定标准进行无害化处理；对被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

受威胁区：加强对牲畜养殖场、屠宰场、交易市场的监测，及时掌握疫情动态，并根据易感动物的免疫状况开展紧急免疫。

5.2.4 疫源分析与追踪调查

根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。对可能存在的传染源，

以及在发病期间售(/ 运)出的猪只及其产品、可疑污染物(包括粪便、垫料、饲料等)等应当立即开展追踪调查, 一经查明立即按规定进行无害化处理。

5.2.5 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况, 做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管, 禁止从疫区、受威胁区调入易感动物及其产品。加强猪养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警, 及时掌握疫情发生风险, 及时开展风险评估并作出疫情预警, 根据辖区内动物健康状况, 切实做好紧急免疫、消毒、检疫等各项综合防控措施的落实, 防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传, 提高养殖者防控意识。

5.2.6 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况, 根据流行病学调查和监测结果, 采取相应措施。当地兽医主管部门与林业部门定期进行沟通, 交流通报有关信息。

6 封锁解除

疫点内所有病死猪、被扑杀的猪按规定进行处理, 疫区内没有新的病例发生, 彻底消毒10天后, 经当地兽医主管部门组织评估合格后提出申请, 由原封锁令发布机关解除封锁。

7 疫情档案

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录, 包括: 疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理, 各项档案记录应长期保存。

小反刍兽疫应急处置技术规范

1 范围

本规范规定了小反刍兽疫的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国小反刍兽疫疫情的应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》。

3 疫情报告

任何单位和个人发现疑似小反刍兽疫疫情时，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应在 2 小时内将疫情逐级报省级动物疫病预防控制机构，并同时报所在地兽医主管部门。

省级动物疫病预防控制机构确认为疑似疫情的，应立即向省级兽医主管部门报告。省级兽医主管部门应当在接到报告后 2 小时内报省级人民政府和国务院兽医主管部门。

疫情涉及跨省（区）的，发生地省级兽医主管部门要在认定为临床疑似疫情后 2 小时内通报相关省（区）的省级兽医主管部门。

4 疫情确认

4.1 疑似确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，认定为疑似疫情的，当地动物疫病预防控制机构应及时采集样品，送省级动物疫病预防控制机构进行诊断。

4.2 疫情确认

省级动物疫病预防控制机构进行实验室诊断，确认为疑似疫情的，及时派专人将采集的样品送国家外来动物疫病研究中心进行确诊。农业部根据国家外来动物疫病研究中心的最终确诊结果，确认小反刍兽疫疫情。

5 疫情应急处置

5.1 临时处置

发生疑似疫情时，对发病场（户）实施隔离、监控，禁止家畜及畜产品、饲料及有关物品移动，进行严格消毒等临时处置措施。在疑似疫情报告同时，对可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售出的动物及其产品、对被污染或可疑污染物的物品（包括粪便、垫料、饲料），立即开展溯源、追踪调查，并按规定进行彻底消毒和无害化处理。必要时采取封锁、扑杀等措施。

5.2 确诊疫情处置

5.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫情确诊后，当地兽医主管部门应当在 2 小时内，确定疫情级别，划定疫点、疫区和受威胁区，报请同级人民政府对疫区实行封锁。

疫点为发病动物或野生动物所在的地点。相对独立的规模化养殖场/户，以病畜所在的养殖场/户为疫点；散养畜以病畜所在的自然村为疫点；放牧畜以病畜所在的牧场、野生动物驯养场及其活动场地为疫点；病畜在运输过程中发生疫情，以运载病畜的车、船、飞机等为疫点；在市场发生疫情，以病畜所在市场为疫点；在屠宰加工过程中发生疫情，以屠宰加工厂（场）为疫点。

疫区为由疫点边缘向外延伸 3 公里内的区域。

受威胁区为由疫区边缘向外延伸 10 公里的区域。

在划定疫区、受威胁区时，应考虑当地饲养环境、天然屏障（如河流、山脉等）、人工屏障（道路、围栏等）、野生动物栖息情况，以及疫情溯源和分析评估结果。

5.2.2 封锁

疫情发生所在地县级以上兽医主管部门报请同级人民政府对疫区进行封锁, 人民政府在接到报告后, 应在 24 小时内发布封锁令。跨行政区域发生疫情时, 由共同上一级兽医行政主管部门报请同级人民政府对疫区实行封锁, 或者由各有关行政区域的上一级人民政府共同对疫区实行封锁。必要时, 上级人民政府可以责成下级人民政府对疫区实行封锁。

5.2.3 对疫点采取的措施

5.2.3.1 扑杀并销毁疫点内所有病畜及同群畜, 并对病死畜、被扑杀畜及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.3.2 对被污染或可疑污染的粪便、垫料、饲料、污水等按规定进行无害化处理。

5.2.3.3 对被污染或可疑污染的交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4 对疫区采取的措施

5.2.4.1 在疫区周围设立警示标志, 在出入疫区的交通路口设置动物卫生监督检查站, 执行监督检查任务, 对出入人员和车辆及有关物品进行消毒。

5.2.4.2 对于免疫省份和地区, 根据免疫状况, 对疫区和受威胁区易感动物实施紧急免疫。对于非免疫或退出免疫的省份和地区, 应对疫区易感动物实施紧急免疫, 建立免疫隔离带, 疫区解除封锁后, 所有免疫羊只就近集中屠宰; 或者对疫区易感动物实施就近急宰。

5.2.4.3 对排泄物或可疑受污染的饲料和垫料、污水等按规定进行无害化处理; 可疑被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4.4 关闭疫区内所有羊、骆驼等牲畜交易市场, 禁止易感动物及其产品出入疫区。

5.2.5 对受威胁区采取的措施

加强对牲畜养殖场、屠宰场、交易市场的监测, 及时掌握疫情动态, 并根据易感动物的免疫状况开展紧急免疫。

5.2.6 对周边其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况, 做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强动物卫生监督, 禁止从疫区、受威胁区调入羊、骆驼等易感动物及其产品。加强牲畜养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警, 及时掌握疫情发生风险, 开展风险评估并作出疫情预警, 根据辖区内动物健康状况, 切实做好紧急免疫、消毒、检疫等各项综合防控措施的落实, 防止疫情传入。做好疫情防控知识宣传, 提高养殖者防控意识。

5.2.7 疫情跟踪

对疫情发生前 21 天内, 从疫点输出的易感动物及其产品、被污染饲料垫料和粪便、运输车辆及密切接触人员的去向等, 按照流行病学调查技术规范进行跟踪调查, 分析疫情扩散风险。必要时, 对接触的易感动物进行隔离观察, 对相关动物及其产品进行消毒或无害化处理。

5.2.8 疫情溯源

对疫情发生前 21 天内, 所有引入疫点的易感动物、相关产品来源及运输工具等, 按照流行病学调查技术规范进行追溯性调查, 分析疫情来源。必要时, 对其它来自原产地羊、骆驼等畜群或与其接触的易感动物进行隔离观察, 对相关动物及其产品进行消毒或无害化处理。

5.2.9 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及周边其他地区易感野生动物分布状况和发病情况, 根据流行病学调查和监测结果, 采取相应措施, 避免黄羊等野生偶蹄兽与人工饲养牲畜接触。当地兽医主管部门要定期与林业部门进行沟通, 交流通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 疫区解除封锁条件

疫点内最后一头病畜死亡或扑杀后, 经过 21 天以上连续观察, 未发现新的病例。

6.2 疫区解除封锁的评估验收

疫区解除封锁时, 由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。跨省区的, 由所涉及省份省级兽医主管部门共同报请农业部组织评估验收。评估验收内容包括:

- (1) 疫情基本情况;
- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论;
- (3) 现场调查和实验室检测结果;

(4) 已采取的应急措施及其效果；

(5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后，由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

7 档案管理

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

高致病性禽流感应急处置技术规范

1 范围

本规范规定了高致病性禽流感的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于无疫区高致病性禽流感疫情应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

3.1 任何单位和个人发现禽类发病急、传播迅速、死亡高等异常情况，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应在2个小时内将情况逐级报到省级动物疫病预防控制机构和同级兽医主管部门。

3.2 省级动物疫病预防控制机构确认为疑似疫情的，应立即向省级兽医主管部门报告。省级兽医主管部门应当在接到报告后2小时内报省级人民政府和国务院兽医主管部门。

3.3 省级动物疫病预防控制机构确认为疑似疫情的，必须派专人将病料送国家禽流感参考实验室做病毒分离与鉴定，进行最终确诊；经确认后，应立即上报同级人民政府和国务院兽医主管部门。

3.4 疫情涉及跨省（区）的，发生地省级兽医主管部门要在确认疫情后2小时内通报相关省（区）的省级兽医主管部门。

4 疫情确认

4.1 疑似确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，认定为临床怀疑疫情后，当地动物疫病预防控制机构应及时采集样品，送省级动物疫病预防控制机构进行疑似诊断，符合疑似高致病性禽流感诊断要求的，可确认为疑似病例。

4.2 疫情确认

4.1 动物疫病预防控制机构在接到疫情报告后，立即派出2名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，提出初步诊断意见；

4.2 对怀疑为高致病性禽流感疫情的，及时采集病料送省级动物疫病预防控制机构实验室进行检测，诊断结果为阳性的，可确认为高致病性禽流感疑似病例；

4.3 对疑似病例必须派专人将病料送国家禽流感参考实验室做病毒分离与鉴定，进行最终确诊；

4.4 国务院兽医主管部门根据最终确诊结果，确认高致病性禽流感疫情。

5 应急处置

5.1 临床怀疑疫情的处置

对发病场（户）实施隔离、监控，禁止禽类、禽类产品及有关物品移动，并对其内、外环境实施严格的消毒措施。

5.2 疑似疫情的处置

当确认为疑似疫情时，扑杀疑似禽群，对扑杀禽、病死禽及其产品进行无害化处理，对其内、外环境实施严格的消毒措施，对污染物或可疑污染物进行无害化处理，对污染的场所和设施进行彻底消毒，限制发病场（户）周边3公里的家禽及其产品移动。

5.3 确诊疫情的处置

疫情确诊后立即启动相应级别的应急预案。

5.3.1 划定疫点、疫区、受威胁区

由所在地县级以上兽医主管部门划定疫点、疫区、受威胁区。

疫点：患病动物所在的地点。一般是指患病禽类所在的禽场（户）或其它有关屠宰、经营单位；如为农村散养，应将自然村划为疫点。

疫区：疫区划分时，应注意考虑当地的饲养环境和天然屏障（如河流、山脉等），原则上由疫点边缘向外延伸 3 公里的区域划为疫区。

受威胁区：由疫区边缘向外延伸 5 公里的区域划为受威胁区。

5.3.2 封锁

由县级以上兽医主管部门报请同级人民政府决定对疫区实行封锁；人民政府在接到封锁报告后，应在 24 小时内发布封锁令，对疫区进行封锁；在疫区周围设置警示标志，在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站，对出入的车辆和有关物品进行消毒和监督检査。

跨行政区域发生疫情的，由共同上一级兽医主管部门报请同级人民政府对疫区发布封锁令，对疫区进行封锁。

5.3.3 疫点内应采取的措施

5.3.3.1 扑杀所有的禽只，销毁所有病死禽、被扑杀禽及其禽类产品；

5.3.3.2 对禽类排泄物、被污染饲料、垫料、污水等进行无害化处理；

5.3.3.3 对被污染的物品、交通工具、用具、禽舍、场地进行彻底消毒。

5.3.4 疫区内应采取的措施

5.3.4.1 扑杀疫区内所有家禽，并按 GB16548 进行无害化处理，同时销毁相应的禽类产品；

5.3.4.2 禁止禽类进出疫区及禽类产品运出疫区；

5.3.4.3 对禽类排泄物、被污染饲料、垫料、污水等进行无害化处理；

5.3.4.4 对所有与禽类接触过的物品、交通工具、用具、禽舍、场地进行彻底消毒。5.3.5 受威胁区内应采取的措施加强对牲畜养殖场、屠宰场、交易市场的监测，及时掌握疫情动态，并根据易感动物的免疫健康状况开展紧急免疫。

5.3.5 关闭疫点及周边 13 公里内所有家禽及其产品交易市场。

5.3.6 流行病学调查、疫源分析与追踪调查

追踪疫点内在发病期间及发病前 21 天内售出的所有家禽及其产品，并销毁处理。开展流行病学调查，对疫情进行溯源和扩散风险分析。

5.3.7 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况，做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管，禁止从疫区、受威胁区调入鸡、鸭、鹅等易感动物及其产品。加强禽类养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警，及时掌握疫情发生风险，开展风险评估并作出疫情预警，根据辖区内动物健康状况，切实做好紧急免疫、消毒、检疫等各项综合防控措施，防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传，提高养殖者防控意识。

5.3.8 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况，根据流行病学调查和监测结果，采取相应措施。当地兽医主管部门要定期与林业部门进行沟通，交流通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 解除封锁的条件

疫点、疫区内所有禽类及其产品按规定处理完毕 21 天以上，监测未出现新的传染源；在当地动物卫生监督机构的监督指导下，完成相关场所和物品终末消毒；受威胁区按规定完成免疫。

6.2 解除封锁的程序

疫区解除封锁时，由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。跨省区的，由所涉及省份省级兽医主管部门共同报请农业部组织评估验收。评估验收内容包括：

- (1) 疫情基本情况；
- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论；
- (3) 现场调查和实验室检测结果；

(4) 已采取的应急措施及其效果；

(5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后，由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

6.3 疫区解除封锁后，要继续对该区域进行疫情监测，6个月后如未发现新病例，方可重新养禽。

7 疫情档案

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

新城疫应急处置技术规范

1 范围

本规范规定了新城疫的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国无疫区新城疫疫情应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

3.1 任何单位和个人发现患有新城疫或疑似新城疫的禽类，应及时向当地兽医机构报告。

3.2 接到疫情报告后，当地动物疫病预防控制机构按国家动物疫情报告管理的有关规定执行。

4 疫情确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，认定为临床怀疑疫情后，当地动物疫病预防控制机构应及时采集样品，送有资质的兽医实验室进行诊断。

确诊后，由省级动物疫病预防控制机构或国家指定实验室进行复核。

5 应急处置

5.1 发现可疑新城疫疫情时，畜主应立即将病禽（场）隔离，并限制其移动。动物疫病预防控制机构要及时派员到现场进行调查核实，诊断为疑似新城疫时，立即采取隔离、消毒、限制移动等临时性措施。同时要及时将病料送省级动物疫病预防控制机构实验室确诊。

5.2 当确诊新城疫疫情后，当地县级以上人民政府兽医主管部门应当立即划定疫点、疫区、受威胁区，并采取相应措施；同时，及时报请同级人民政府对疫区实行封锁，逐级上报至国务院兽医主管部门，并通报毗邻地区。

5.2.1 划定疫点、疫区、受威胁区

由所在地县级以上（含县级）兽医主管部门划定疫点、疫区、受威胁区。

疫点：指患病禽类所在的地点。一般是指患病禽类所在的禽场（户）或其它有关屠宰、经营单位；如为农村散养，应将自然村划为疫点。

疫区：疫区划分时，应注意考虑当地的饲养环境和天然屏障（如河流、山脉等），原则上由疫点边缘向外延伸 3 公里的区域划为疫区。

受威胁区：指疫区边缘外延 5 公里范围内的区域。

5.2.2 封锁

由县级以上兽医主管部门报请同级人民政府决定对疫区实行封锁；人民政府在接到封锁报告后，应立即做出决定，发布封锁令。

5.2.3 疫点、疫区、受威胁区采取的措施

疫点：扑杀所有的病禽和同群禽只，并对所有病死禽、被扑杀禽及其禽类产品按照 GB16548 规定进行无害化处理；对禽类排泄物、被污染或可能污染饲料和垫料、污水等均需进行无害化处理；对被污染的物品、交通工具、用具、禽舍、场地进行严格彻底消毒；严禁禽、禽类产品及可能污染的物品运出。

疫区：对疫区进行封锁，在疫区周围设置警示标志，在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站，对出入的人员和车辆进行消毒；对易感禽只实施紧急强制免疫，确保达到免疫保护水平；关闭活禽及禽类产品交易市场，禁止易感活禽进出和易感禽类产品运出；对禽类排泄物、被污染饲料、垫料、污水等按国家规定标准进行无害化处理；对被污染的物品、交通工具、用具、禽舍、场地进行严格彻底消毒。

受威胁区：加强对禽养殖场、屠宰场、交易市场的监测，及时掌握疫情动态，并根据易感动物的免疫状况开展紧急免疫。

5.2.4 流行病学调查、疫源分析与追踪调查

追踪疫点内在发病期间及发病前 21 天内售出的所有家禽及其产品，并销毁处理。按照新城疫流行病学调查规范，对疫情进行溯源和扩散风险分析。

5.2.5 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况，做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管，禁止从疫区、受威胁区调入鸡、火鸡等易感动物及其产品。加强禽养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警，及时掌握疫情发生风险，及时开展风险评估并作出疫情预警，根据辖区内动物健康状况，切实做好紧急免疫、消毒、检疫等各项综合防控措施的落实，防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传，提高养殖者防控意识。

5.2.6 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况，根据流行病学调查和监测结果，采取相应措施。当地林业部门应定期向兽医主管部门通报有关信息。

6 封锁解除

疫区内没有新的病例发生，疫点内所有病死禽、被扑杀的同群禽及其禽类产品按规定处理 21 天后，对有关场所和物品进行彻底消毒。经当地兽医主管部门组织评估合格后提出申请，由原封锁令发布机关解除封锁。

7 疫情档案

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

马流感应急处置技术规范

1 范围

本规范规定了马流感的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国无疫区马流感疫情的应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

任何单位和个人发现疑似马流感疫情时，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应迅速将疫情逐级报省级动物疫病预防控制机构，并同时报所在地兽医主管部门。疫情确诊后，按动物疫情管理办法上报。

4 疫情确认

4.1 现场临床诊断

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，符合疑似马流感典型症状的可确认为疑似病例。

4.2 省级实验室或国家马流感参考实验室确诊

确认为疑似病例后，当地动物疫病预防控制机构应采集样品送省级动物疫病预防控制机构或有资质的兽医实验室进行检测。检测结果为阳性的，可认定为确诊病例，同时将病料送国家马流感参考实验室复核。

5 疫情应急处置

5.1 临时处置

发生疑似疫情时，根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。在疑似疫情报告同时，对发病场（户）实施隔离、监控，限制易感动物及其产品、饲料及有关物品移动，进行严格消毒等临时处置措施。对可能存在的传染源，以及在发病前 21 天内售出的动物及其产品、对被污染或可疑污染物的物品(包括粪便、垫料、饲料)，立即开展追踪调查，并按规定进行彻底消毒和无害化处理。必要时采取封锁等措施。

5.2 确诊疫情处置

5.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫情确诊后，当地兽医主管部门应根据疫病发生情况，划定疫点、疫区和受威胁区，报请同级人民政府对疫区实行封锁。

疫点为发病动物或野生动物所在的地点。相对独立的规模化养殖场/户，以病畜所在的养殖场/户为疫点；散养畜以病畜所在的自然村为疫点；放牧畜以病畜所在的牧场、野生动物驯养场及其活动场地为疫点；病畜在运输过程中发生疫情，以运载病畜的车、船、飞机等为疫点；在市场发生疫情，以病畜所在市场为疫点；在屠宰加工过程中发生疫情，以屠宰加工厂（场）为疫点；在竞技比赛过程中发生疫情的，以赛场为疫点。

疫区为由疫点边缘向外延伸 3 公里内的区域。

受威胁区为由疫区边缘向外延伸 5 公里的区域。

在划定疫区、受威胁区时，应考虑当地饲养环境、天然屏障（如河流、山脉等）、人工屏障（道路、围栏等）、野生动物栖息情况，以及疫情溯源和分析评估结果。

5.2.2 封锁

疫情发生所在地县级以上兽医主管部门报请同级人民政府对疫区进行封锁，人民政府在接到报告后，应在 24 小时内发布封锁令。跨行政区域发生疫情时，由共同上一级兽医行政主管部门报请同级人民政府对疫区实行封锁，或者由各有关行政区域的上一级人民政府共同对疫区实行封锁。必要时，上级人民政府可以责成下级人民政府对疫区实行封锁。

5.2.3 对疫点采取的措施

5.2.3.1 对发病动物隔离治疗；其它动物隔离饲养，加强饲养、防疫管理和监测；必要时扑杀疫点的所有马属动物并做无害化处理。

5.2.3.2 对被污染或可疑污染的粪便、垫料、饲料、污水等按 GB16548 规定进行无害化处理。

5.2.3.3 对被污染或可疑污染的交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.3.4 对发病前 21 天内售出的马属动物等易感动物及其产品进行追踪，对售出的马属动物进行隔离和监测。

5.2.3.5 禁止马属动物出入。

5.2.3.6 必要时对马属动物实施紧急免疫，建立完整的免疫档案。

5.2.4 对疫区采取的措施

5.2.4.1 在疫区周围设立警示标志，在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站，执行监督检查任务，对出入人员和车辆及有关物品进行消毒。

5.2.4.2 对疫区内的马属动物进行隔离饲养，加强疫情持续监测和流行病学调查，积极开展风险评估。一旦发现有临床症状的马属动物，马上采取隔离治疗等措施。

5.2.4.3 对排泄物或可疑受污染的饲料和垫料、污水等按规定进行无害化处理；可疑被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4.4 关闭疫区内马属动物交易市场和屠宰场，停止赛马等活动，禁止马属动物及其产品出入疫区。

5.2.4.5 必要时对马属动物实施紧急免疫，建立完整的免疫档案。

5.2.5 对受威胁区采取的措施

加强对马属动物养殖场、屠宰场、交易市场的监测，及时掌握疫情动态。加强检疫监督，禁止从疫区调入马属动物及其产品。

5.2.6 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生状况，做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管，禁止从疫区、受威胁区调入马属动物及其产品。加强马属动物养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警，及时掌握疫情发生风险，开展风险评估并进行疫情预警，根据辖区内动物健康状况，切实做好消毒、检疫等各项综合防控措施的落实，防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传，提高养殖者防控意识。

5.2.7 疫情跟踪

对疫情发生前 21 天内，从疫点输出的马属动物及其产品、被污染饲料垫料和粪便、运输车辆及密切接触人员的去向等，按照流行病学调查技术规范进行跟踪调查，分析疫情扩散风险。必要时，对接触的马属动物进行隔离观察，对相关动物及其产品进行消毒处理。

5.2.8 疫情溯源

对疫情发生前 21 天内，所有引入疫点的马属动物、相关产品来源及运输工具等，按照流行病学调查技术规范进行追溯性调查，分析疫情来源。必要时，对其它来自原产地马属动物或与其接触的马属动物进行隔离观察，对动物产品进行消毒处理。

5.2.9 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况，根据流行病学调查和监测结果，采取相应措施，避免野生易感动物与人工饲养易感动物接触。当地兽医主管部门定期与林业部门进行沟通，交流通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 疫区解除封锁条件

疫点患病马属动物经隔离治疗康复后，经 15 天以上的观察，未发现新的病例，对疫点完成终末消毒。

6.2 疫区解除封锁的评估验收

疫区解除封锁时，由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。跨省区的，由所涉及省份省级兽医主管部门共同报请农业部组织评估验收。评估验收内容包括：

- (1) 疫情基本情况；
- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论；
- (3) 现场调查和实验室检测结果；

(4) 已采取的应急措施及其效果；

(5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后，由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

7 档案管理

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

亨德拉病应急处置技术规范

1 范围

本规范规定了亨德拉病的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国无疫区亨德拉病疫情的应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

任何单位和个人发现疑似亨德拉病疫情时，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应在 2 小时内将疫情逐级报省级动物疫病预防控制机构，并同时报所在地兽医主管部门。

省级动物疫病预防控制机构确认为疑似疫情的，应在 1 小时内向省级兽医主管部门报告。省级兽医主管部门应当在接到报告后 1 小时内报省级人民政府和国务院兽医主管部门。

疫情涉及跨省（区）的，发生地省级兽医主管部门要在接到报告后 1 小时内通报相关省（区）的省级兽医主管部门。

4 疫情确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，认定为临床怀疑疫情后，由省级动物疫病预防控制机构采集样品，送农业部指定的诊断实验室进行诊断。

农业部根据实验室的最终确诊结果，确认亨德拉病疫情。

5 疫情应急处置

5.1 临时处置

发生疑似疫情时，根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。在疑似疫情报告同时，对发病场（户）实施隔离、监控，易感动物及其产品、饲料及有关物品移动，进行严格消毒等临时处置措施。对可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售出的动物及其产品、对被污染或可疑污染物的物品（包括粪便、垫料、饲料），立即开展追踪调查，并按规定进行彻底消毒和无害化处理。必要时采取封锁、扑杀等措施。

5.2 确诊疫情处置

5.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫情确诊后，当地兽医主管部门应当在 2 小时内，确定疫情级别，划定疫点、疫区和受威胁区，报请同级人民政府对疫区实行封锁。

疫点为发病动物或野生动物所在的地点。相对独立的规模化养殖场/户，以病畜所在的养殖场/户为疫点；散养畜以病畜所在的自然村为疫点；放牧畜以病畜所在的牧场、野生动物驯养场及其活动场地为疫点；病畜在运输过程中发生疫情，以运载病畜的车、船、飞机等为疫点；在市场发生疫情，以病畜所在市场为疫点；在屠宰加工过程中发生疫情，以屠宰加工厂（场）为疫点；在竞技比赛过程中发生疫情的，以赛场为疫点。

疫区为由疫点边缘向外延伸 3 公里内的区域。

受威胁区为由疫区边缘向外延伸 5 公里的区域。

在划定疫区、受威胁区时，应考虑当地饲养环境、天然屏障（如河流、山脉等）、人工屏障（道路、围栏等）、野生动物栖息情况，以及疫情溯源和分析评估结果。

5.2.2 封锁

疫情发生所在地县级以上兽医主管部门报请同级人民政府对疫区进行封锁，人民政府在接到报告后，应在 24 小时内发布封锁令。跨行政区域发生疫情时，由共同上一级兽医行政

主管部门报请同级人民政府对疫区实行封锁,或者由各有关行政区域的上一级人民政府共同对疫区实行封锁。必要时,上级人民政府可以责成下级人民政府对疫区实行封锁。

5.2.3 对疫点采取的措施

5.2.3.1 扑杀所有易感动物,并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.3.2 对被污染或可疑污染的粪便、垫料、饲料、污水等按规定进行无害化处理。

5.2.3.3 对被污染或可疑污染的交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.3.4 对发病前 16 天内售出的马属动物及其产品进行追踪,对售出的马属动物进行隔离和监测。

5.2.3.5 禁止马属动物出入。

5.2.3.6 加强对狐蝠的治理和防范。

5.2.4 对疫区采取的措施

5.2.4.1 在疫区周围设立警示标志,在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站,执行监督检查任务,对出入人员和车辆及有关物品进行消毒。

5.2.4.2 扑杀所有易感动物,并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.4.3 对排泄物或可疑受污染的饲料和垫料、污水等按规定进行无害化处理;可疑被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4.4 对交通工具、圈舍、用具及场地进行彻底消毒。

5.2.4.5 关闭疫区内马属动物交易市场和屠宰场,停止赛马等活动,禁止易感动物及其产品出入疫区。

5.2.4.6 加强对狐蝠的治理和防范。

5.2.5 对受威胁区采取的措施

加强对马属动物养殖场、屠宰场、交易市场的监测,及时掌握疫情动态。加强检疫监督,禁止从疫区调入马属动物及其产品。

5.2.6 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况,做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管,禁止从疫区、受威胁区调入马属动物及其产品。加强马属动物养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警,及时掌握疫情发生风险,开展风险评估并作出疫情预警,根据辖区内动物健康状况,做好消毒、检疫、野生动物防范等各项综合防控措施落实,防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传,提高养殖者防控意识。

5.2.7 疫情跟踪

对疫情发生前 16 天内,从疫点输出的马属动物及其产品、被污染饲料垫料和粪便、运输车辆及密切接触人员的去向等,按照流行病学调查技术规范进行跟踪调查,分析疫情扩散风险。必要时,对接触的马属动物进行隔离观察,对马属动物产品进行消毒处理。

5.2.8 疫情溯源

对疫情发生前 16 天内,所有引入疫点的马属动物、相关产品来源及运输工具等,按照流行病学调查技术规范进行追溯性调查,分析疫情来源。必要时,对其它来自原产地马属动物或与其接触的马属动物进行隔离观察,对动物产品进行消毒处理。

5.2.9 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况,根据流行病学调查和监测结果,采取相应措施,避免野生易感动物与人工饲养易感动物接触。当地林业部门应定期向兽医主管部门通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 疫区解除封锁条件

要求疫点内最后一头发病动物死亡或扑杀后,经过 16 天以上连续观察,未发现新的病例,对疫点完成终末消毒。

6.2 疫区解除封锁的评估验收

疫区解除封锁时,由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。跨省区的,由所涉及省份省级兽医主管部门共同报请农业部组织评估验收。评估验收内容包括:

- (1) 疫情基本情况;
- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论;
- (3) 现场调查和实验室检测结果;

(4) 已采取的应急措施及其效果；

(5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后，由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

7 档案管理

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

西尼罗河热应急处置技术规范

1 范围

本规范规定了西尼罗河热的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国无疫区西尼罗河热疫情的应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

任何单位和个人发现疑似西尼罗河热疫情时，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应在 2 小时内将疫情逐级报省级动物疫病预防控制机构，并同时报所在地兽医主管部门。

省级动物疫病预防控制机构确认为疑似疫情的，应在 1 小时内向省级兽医主管部门报告。省级兽医主管部门应当在接到报告后 1 小时内报省级人民政府和国务院兽医主管部门。

疫情涉及跨省（区）的，发生地省级兽医主管部门要在接到报告后 1 小时内通报相关省（区）的省级兽医主管部门。

4 疫情确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，认定为临床怀疑疫情后，由省级动物疫病预防控制机构采集样品，送农业部指定的诊断实验室进行诊断。

农业部根据实验室的最终确诊结果，确认西尼罗河热疫情。

5 疫情应急处置

5.1 临时处置

发生疑似疫情时，根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。在疑似疫情报告同时，对发病场（户）实施隔离、监控，易感动物及其产品、饲料及有关物品移动，进行严格消毒等临时处置措施。对可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售出的动物及其产品、对被污染或可疑污染物的物品（包括粪便、垫料、饲料），立即开展追踪调查，并按规定进行彻底消毒和无害化处理。必要时采取封锁、扑杀等措施。

5.2 确诊疫情处置

5.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫情确诊后，当地兽医主管部门应当在 2 小时内，确定疫情级别，划定疫点、疫区和受威胁区，报请同级人民政府对疫区实行封锁。

疫点为发病动物或野生动物所在的地点。相对独立的规模化养殖场/户，以病畜所在的养殖场/户为疫点；散养畜以病畜所在的自然村为疫点；放牧畜以病畜所在的牧场、野生动物驯养场及其活动场地为疫点；病畜在运输过程中发生疫情，以运载病畜的车、船、飞机等为疫点；在市场发生疫情，以病畜所在市场为疫点；在屠宰加工过程中发生疫情，以屠宰加工厂（场）为疫点；在竞技比赛过程中发生疫情的，以赛场为疫点。

疫区为由疫点边缘向外延伸 3 公里内的区域。

受威胁区为由疫区边缘向外延伸 5 公里的区域。

在划定疫区、受威胁区时，应考虑当地饲养环境、天然屏障（如河流、山脉等）、人工屏障（道路、围栏等）、野生动物栖息情况，以及疫情溯源和分析评估结果。

5.2.2 封锁

疫情发生所在地县级以上兽医主管部门报请同级人民政府对疫区进行封锁，人民政府在接到报告后，应在 24 小时内发布封锁令。跨行政区域发生疫情时，由共同上一级兽医行政

主管部门报请同级人民政府对疫区实行封锁,或者由各有关行政区域的上一级人民政府共同对疫区实行封锁。必要时,上级人民政府可以责成下级人民政府对疫区实行封锁。

5.2.3 对疫点采取的措施

5.2.3.1 扑杀所有易感动物,并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.3.2 对被污染或可疑污染的粪便、垫料、饲料、污水等按规定进行无害化处理。

5.2.3.3 对被污染或可疑污染的交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.3.4 对发病前 15 天内售出的马属动物等易感动物及其产品进行追踪,对售出的易感动物进行隔离和监测。

5.2.3.5 禁止马属动物出入。

5.2.3.6 加强对蚊等虫媒的消杀和对野鸟等野生动物的治理和防范,采取有效措施防止传播媒介与马属动物直接接触。

5.2.4 对疫区采取的措施

5.2.4.1 在疫区周围设立警示标志,在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站,执行监督检查任务,对出入人员和车辆及有关物品进行消毒。

5.2.4.2 扑杀所有易感动物,并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.4.3 对排泄物或可疑受污染的饲料和垫料、污水等按规定进行无害化处理;可疑被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4.4 对交通工具、圈舍、用具及场地进行彻底消毒。

5.2.4.5 关闭疫区内马属动物交易市场和屠宰场,停止赛马等活动,禁止易感动物及其产品出入疫区。

5.2.4.6 加强对蚊等虫媒的消杀和对野鸟等野生动物的治理和防范,采取有效措施防止传播媒介与马属动物直接接触。

5.2.5 对受威胁区采取的措施

加强对马属动物养殖场、屠宰场、交易市场的监测,及时掌握疫情动态。加强检疫监督,禁止从疫区调入马属动物及其产品。

5.2.6 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况,做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管,禁止从疫区、受威胁区调入马属动物及其产品。加强马属动物养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警,及时掌握疫情发生风险,开展风险评估并进行疫情预警,根据辖区内动物健康状况,切实做好消毒、检疫、虫媒消杀和野生动物防范等各项综合防控措施的落实,防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传,提高养殖者防控意识。

5.2.7 疫情跟踪

对疫情发生前 15 天内,从疫点输出的马属动物及其产品、被污染饲料垫料和粪便、运输车辆及密切接触人员的去向等,按照流行病学调查技术规范进行跟踪调查,分析疫情扩散风险。必要时,对接触的马属动物进行隔离观察,对马属动物产品进行消毒处理。

5.2.8 疫情溯源

对疫情发生前 15 天内,所有引入疫点的马属动物、相关产品来源及运输工具等,按照流行病学调查技术规范进行追溯性调查,分析疫情来源。必要时,对其它来自原产地马属动物或与其接触的马属动物进行隔离观察,对动物产品进行消毒处理。

5.2.9 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况,根据流行病学调查和监测结果,采取相应措施,避免野生易感动物与人工饲养易感动物接触。当地兽医主管部门定期与林业部门进行沟通,交流通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 疫区解除封锁条件

要求疫点内最后一头发病动物死亡或扑杀后,经过 15 天以上连续观察,未发现新的病例,对疫点完成终末消毒。

6.2 疫区解除封锁的评估验收

疫区解除封锁时,由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。跨省区的,由所涉及省份省级兽医主管部门共同报请农业部组织评估验收。评估验收内容包括:

(1) 疫情基本情况;

- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论；
- (3) 现场调查和实验室检测结果；
- (4) 已采取的应急措施及其效果；
- (5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后，由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

7 档案管理

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

伊氏锥虫病应急处置技术规范

1 范围

本规范规定了伊氏锥虫病的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国无疫区伊氏锥虫病疫情的应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

任何单位和个人发现疑似伊氏锥虫病疫情时，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应在 2 小时内将疫情逐级报省级动物疫病预防控制机构，并同时报所在地兽医主管部门。

省级动物疫病预防控制机构确认为疑似疫情的，应在 1 小时内向省级兽医主管部门报告。省级兽医主管部门应当在接到报告后 24 小时内报省级人民政府和国务院兽医主管部门。

疫情涉及跨省（区）的，发生地省级兽医主管部门要在接到报告后 24 小时内通报相关省（区）的省级兽医主管部门。

4 疫情确认

4.1 疑似确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，符合疑似伊氏锥虫病典型症状的可确认为疑似病例。

4.2 疫情确认

对疑似病例或症状不够典型的病例，当地动物疫病预防控制机构应当采集样品进行实验室诊断。检测结果为阳性的，送省级动物疫病预防控制机构实验室进行复核。

5 疫情应急处置

5.1 临时处置

发生疑似疫情时，根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。在疑似疫情报告同时，对发病场（户）实施隔离、监控，易感动物及其产品、饲料及有关物品移动，进行严格消毒等临时处置措施。对可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售出的动物及其产品、对被污染或可疑污染物的物品（包括粪便、垫料、饲料），立即开展追踪调查，并按规定进行彻底消毒和无害化处理。必要时采取封锁、扑杀等措施。

5.2 确诊疫情处置

5.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫情确诊后，当地兽医主管部门应当在 2 小时内，确定疫情级别，划定疫点、疫区和受威胁区，必要时报请同级人民政府对疫区实行封锁。

疫点为发病动物或野生动物所在的地点。相对独立的规模化养殖场/户，以病畜所在的养殖场/户为疫点；散养畜以病畜所在的自然村为疫点；放牧畜以病畜所在的牧场、野生动物驯养场及其活动场地为疫点；病畜在运输过程中发生疫情，以运载病畜的车、船、飞机等为疫点；在市场发生疫情，以病畜所在市场为疫点；在屠宰加工过程中发生疫情，以屠宰加工厂（场）为疫点；在竞技比赛过程中发生疫情的，以赛场为疫点。

疫区为由疫点边缘向外延伸 3 公里内的区域。

受威胁区为由疫区边缘向外延伸 5 公里的区域。

在划定疫区、受威胁区时，应考虑当地饲养环境、天然屏障（如河流、山脉等）、人工屏障（道路、围栏等）、野生动物栖息情况，以及疫情溯源和分析评估结果。

5.2.2 封锁

疫情发生所在地县级以上兽医主管部门报请同级人民政府对疫点进行封锁, 人民政府在接到报告后, 应在 24 小时内发布封锁令。

5.2.3 对疫点采取的措施

5.2.3.1 对发病动物进行扑杀, 对没有发病但病原学阳性动物进行隔离治疗; 其它动物隔离饲养, 加强防疫管理和监测。

5.2.3.2 对被污染或可疑污染的粪便、垫料、饲料、污水等按规定进行无害化处理。

5.2.3.3 对被污染或可疑污染的工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.3.4 对发病前 60 天内售出的马属动物、猪、牛、羊等易感动物及其产品进行追踪, 对售出的易感动物进行隔离和监测。

5.2.3.5 禁止马属动物、猪、牛、羊等易感动物出入。

5.2.3.6 对吸血蝇类等传播媒介进行消杀, 采取有效措施防止传播媒介与易感动物直接接触。

5.2.4 对疫区采取的措施

5.2.4.1 在疫区周围设立警示标志, 在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站, 执行监督检查任务, 对出入人员和车辆及有关物品进行消毒。

5.2.4.2 对疫区内的易感动物进行隔离饲养, 加强疫情持续监测和流行病学调查, 积极开展风险评估。一旦发现具有临床症状的易感动物, 立即按 GB16548 规定标准实施扑杀并作无害化处理。

5.2.4.3 对排泄物或可疑受污染的饲料和垫料、污水等按规定进行无害化处理; 可疑被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4.4 对交通工具、圈舍、用具及场地进行彻底消毒。

5.2.4.5 必要时关闭疫区内马属动物、猪、牛、羊交易市场, 停止赛马等活动, 禁止易感动物及其产品出入疫区。

5.2.4.6 对吸血蝇类等传播媒介进行消杀, 采取有效措施防止传播媒介与易感动物直接接触。

5.2.5 对受威胁区采取的措施

加强对易感动物养殖场、屠宰场、交易市场的监测, 及时掌握疫情动态。加强检疫监督, 禁止从疫区调入易感动物及其产品。

5.2.6 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况, 做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管, 禁止从疫区、受威胁区调入易感动物及其产品。加强易感动物养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警, 及时掌握疫情发生风险, 开展风险评估并进行疫情预警, 根据辖区内动物健康状况, 切实做好消毒、检疫、虫媒消杀等各项综合防控措施的落实, 防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传, 提高养殖者防控意识。

5.2.7 疫情跟踪

对疫情发生前 60 天内, 从疫点输出的易感动物及其产品、被污染饲料垫料和粪便、运输车辆及密切接触人员的去向等, 按照流行病学调查技术规范进行跟踪调查, 分析疫情扩散风险。必要时, 对接触的易感动物进行隔离观察, 对相关动物及其产品进行消毒处理。

5.2.8 疫情溯源

对疫情发生前 60 天内, 所有引入疫点的易感动物、相关产品来源及运输工具等, 按照流行病学调查技术规范进行追溯性调查, 分析疫情来源。必要时, 对其它来自原产地易感动物或与其接触的易感动物进行隔离观察, 对动物产品进行消毒处理。

5.2.9 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况, 根据流行病学调查和监测结果, 采取相应措施, 避免野生易感动物与人工饲养易感动物接触。当地林业部门应定期向兽医主管部门通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 解除封锁条件

疫点最后一例患病动物死亡或扑杀后, 经过 60 天连续观察, 未发现新的病例, 对疫点完成终末消毒。

6.2 解除封锁的评估验收

疫点解除封锁时，由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。评估验收内容包括：

- (1) 疫情基本情况；
- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论；
- (3) 现场调查和实验室检测结果；
- (4) 已采取的应急措施及其效果；
- (5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后，由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

7 档案管理

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

马梨形虫病应急处置技术规范

1 范围

本规范规定了马梨形虫病的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国无疫区马梨形虫病疫情的应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

任何单位和个人发现疑似马梨形虫病疫情时，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应在 2 小时内将疫情逐级报省级动物疫病预防控制机构，并同时报所在地兽医主管部门。

省级动物疫病预防控制机构确认为疑似疫情的，应在 1 小时内向省级兽医主管部门报告。省级兽医主管部门应当在接到报告后 24 小时内报省级人民政府和国务院兽医主管部门。

疫情涉及跨省（区）的，发生地省级兽医主管部门要在接到报告后 24 小时内通报相关省（区）的省级兽医主管部门。

4 疫情确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，符合疑似马梨形虫病典型症状的可确认为疑似病例。

对疑似病例或症状不够典型的病例，当地动物疫病预防控制机构应当采集样品进行实验室诊断。检测结果为阳性的，送省级动物疫病预防控制机构实验室进行复核。

5 疫情应急处置

5.1 临时处置

发生疑似疫情时，根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。在疑似疫情报告同时，对发病场（户）实施隔离、监控，易感动物及其产品、饲料及有关物品移动，进行严格消毒等临时处置措施。对可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售出的动物及其产品、对被污染或可疑污染物的物品(包括粪便、垫料、饲料)，立即开展追踪调查，并按规定进行彻底消毒和无害化处理。必要时采取封锁等措施。

5.2 确诊疫情处置

5.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫情确诊后，当地兽医主管部门应当在 2 小时内，确定疫情级别，划定疫点、疫区和受威胁区，报请同级人民政府对疫区实行封锁。

疫点为发病动物或野生动物所在的地点。相对独立的规模化养殖场/户，以病畜所在的养殖场/户为疫点；散养畜以病畜所在的自然村为疫点；放牧畜以病畜所在的牧场、野生动物驯养场及其活动场地为疫点；病畜在运输过程中发生疫情，以运载病畜的车、船、飞机等为疫点；在市场发生疫情，以病畜所在市场为疫点；在屠宰加工过程中发生疫情，以屠宰加工厂（场）为疫点；在竞技比赛过程中发生疫情的，以赛场为疫点。

疫区为由疫点边缘向外延伸 3 公里内的区域。

受威胁区为由疫区边缘向外延伸 5 公里的区域。

在划定疫区、受威胁区时，应考虑当地饲养环境、天然屏障（如河流、山脉等）、人工屏障（道路、围栏等）、野生动物栖息情况，以及疫情溯源和分析评估结果。

5.2.2 封锁

疫情发生所在地县级以上兽医主管部门报请同级人民政府对疫点进行封锁，人民政府在接到报告后，应在 24 小时内发布封锁令。

5.2.3 对疫点采取的措施

5.2.3.1 对发病及病原学阳性动物扑杀；其它动物隔离饲养并加强防疫管理和监测；对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.3.2 对被污染或可疑污染的粪便、垫料、饲料、污水等按规定进行无害化处理。

5.2.3.3 对被污染或可疑污染的交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.3.4 对发病前 30 天内售出的马属动物等易感动物及其产品进行追踪，对售出的马属动物进行隔离和监测。

5.2.3.5 禁止马属动物出入。

5.2.3.6 对蜚等传播媒介进行消杀，采取有效措施防止传播媒介与马属动物直接接触。

5.2.4 对疫区采取的措施

5.2.4.1 在疫区周围设立警示标志，在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站，执行监督检查任务，对出入人员和车辆及有关物品进行消毒。

5.2.4.2 对疫区内的马属动物进行隔离饲养，加强疫情持续监测和流行病学调查，积极开展风险评估。一旦发现有临床症状的马属动物，立即按国家规定标准实施扑杀并作无害化处理。

5.2.4.3 对排泄物或可疑受污染的饲料和垫料、污水等按规定进行无害化处理；可疑被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4.4 对交通工具、圈舍、用具及场地进行彻底消毒。

5.2.4.5 必要时关闭疫区内马属动物交易市场，停止赛马等活动，禁止马属动物及其产品出入疫区。

5.2.4.6 对蜚等传播媒介进行消杀，采取有效措施防止传播媒介与马属动物直接接触。

5.2.5 对受威胁区采取的措施

加强对马属动物养殖场、屠宰场、交易市场的监测，及时掌握疫情动态。加强检疫监督，禁止从疫区调入马属动物及其产品。

5.2.6 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况，做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管，禁止从疫区、受威胁区调入马属动物及其产品。加强马属动物养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警，及时掌握疫情发生风险，开展风险评估并进行疫情预警，根据辖区内动物健康状况，切实做好消毒、检疫、虫媒消杀等各项综合防控措施，防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传，提高养殖者防控意识。

5.2.7 疫情跟踪

对疫情发生前 30 天内，从疫点输出的马属动物及其产品、被污染饲料垫料和粪便、运输车辆及密切接触人员的去向等，按照流行病学调查技术规范进行跟踪调查，分析疫情扩散风险。必要时，对接触的马属动物进行隔离观察，对相关动物及其产品进行消毒处理。

5.2.8 疫情溯源

对疫情发生前 30 天内，所有引入疫点的马属动物、相关产品来源及运输工具等，按照流行病学调查技术规范进行追溯性调查，分析疫情来源。必要时，对其它来自原产地马属动物或与其接触的马属动物进行隔离观察，对动物产品进行消毒处理。

5.2.9 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况，根据流行病学调查和监测结果，采取相应措施，避免野生易感动物与人工饲养易感动物接触。当地林业部门应定期向兽医主管部门通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 解除封锁条件

疫点最后一例患病动物死亡或扑杀后/对发病马属动物采取隔离、治疗措施，最后一例病例康复后，经过 30 天以上连续观察，未发现新的病例，对疫点完成终末消毒。

6.2 解除封锁的评估验收

疫点解除封锁时，由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。评估验收内容包括：

- (1) 疫情基本情况；
- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论；
- (3) 现场调查和实验室检测结果；
- (4) 已采取的应急措施及其效果；

(5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后，由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

7 档案管理

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

日本脑炎应急处置技术规范

1 范围

本规范规定了日本脑炎的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国无疫区日本脑炎疫情的应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

任何单位和个人发现疑似日本脑炎疫情时，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应在 2 小时内将疫情逐级报省级动物疫病预防控制机构，并同时报所在地兽医主管部门。

省级动物疫病预防控制机构确认为疑似疫情的，应在 1 小时内向省级兽医主管部门报告。省级兽医主管部门应当在接到报告后 24 小时内报省级人民政府和国务院兽医主管部门。

疫情涉及跨省（区）的，发生地省级兽医主管部门要在接到报告后 24 小时内通报相关省（区）的省级兽医主管部门。

4 疫情确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，符合疑似日本脑炎典型症状的可确认为疑似病例。

对疑似病例或症状不够典型的病例，当地动物疫病预防控制机构应当采集样品进行实验室诊断。检测结果为阳性的，送省级动物疫病预防控制机构实验室进行复核。

5 疫情应急处置

5.1 临时处置

发生疑似疫情时，根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。在疑似疫情报告同时，对发病场（户）实施隔离、监控，易感动物及其产品、饲料及有关物品移动，进行严格消毒等临时处置措施。对可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售出的动物及其产品、对被污染或可疑污染物的物品（包括粪便、垫料、饲料），立即开展追踪调查，并按规定进行彻底消毒和无害化处理。必要时采取封锁、扑杀等措施。

5.2 确诊疫情处置

5.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫情确诊后，当地兽医主管部门应根据疫病发生情况，划定疫点、疫区和受威胁区，报请同级人民政府对疫区实行封锁。

疫点为发病动物或野生动物所在的地点。相对独立的规模化养殖场/户，以病畜所在的养殖场/户为疫点；散养畜以病畜所在的自然村为疫点；放牧畜以病畜所在的牧场、野生动物驯养场及其活动场地为疫点；病畜在运输过程中发生疫情，以运载病畜的车、船、飞机等为疫点；在市场发生疫情，以病畜所在市场为疫点；在屠宰加工过程中发生疫情，以屠宰加工厂（场）为疫点；在竞技比赛过程中发生疫情的，以赛场为疫点。

疫区为由疫点边缘向外延伸 3 公里内的区域。

受威胁区为由疫区边缘向外延伸 5 公里的区域。

在划定疫区、受威胁区时，应考虑当地饲养环境、天然屏障（如河流、山脉等）、人工屏障（道路、围栏等）、野生动物栖息情况，以及疫情溯源和分析评估结果。

5.2.2 封锁

疫情发生所在地县级以上兽医主管部门报请同级人民政府对疫点进行封锁，人民政府在接到报告后，应在 24 小时内发布封锁令。

5.2.3 对疫点采取的措施

5.2.3.1 对发病动物进行扑杀，同群动物就地隔离，加强防疫管理和监测；并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.3.2 对被污染或可疑污染的粪便、垫料、饲料、污水等按规定进行无害化处理。

5.2.3.3 对被污染或可疑污染的交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.3.4 对发病前 21 天内售出的马属动物、猪等易感动物及其产品进行追踪，对售出的易感动物进行隔离和监测。

5.2.3.5 禁止马属动物、猪等易感动物出入。

5.2.3.6 对蚊等传播媒介进行消杀，采取有效措施防止易感野生动物与易感动物直接接触。

5.2.3.7 必要时对易感动物实施紧急免疫，建立完整的免疫档案。

5.2.4 对疫区采取的措施

5.2.4.1 在疫区周围设立警示标志，在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站，执行监督检查任务，对出入人员和车辆及有关物品进行消毒。

5.2.4.2 对疫区内的易感动物进行隔离饲养，加强疫情持续监测和流行病学调查，积极开展风险评估。一旦发现有临床症状的易感动物，立即实施扑杀并按 GB16548 规定进行无害化处理。

5.2.4.3 对排泄物或可疑受污染的饲料和垫料、污水等按规定进行无害化处理；可疑被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4.4 对交通工具、圈舍、用具及场地进行彻底消毒。

5.2.4.5 关闭疫区内马属动物、猪交易市场和屠宰场，停止赛马等活动，禁止易感动物及其产品出入疫区。

5.2.4.6 必要时对易感动物实施紧急免疫，建立完整的免疫档案。

5.2.4.7 采取有效措施防止蚊等传播媒介、野生动物与易感动物直接接触。

5.2.5 对受威胁区采取的措施

加强对易感动物养殖场、屠宰场、交易市场的监测，及时掌握疫情动态。加强检疫监督，禁止从疫区调入易感动物及其产品。

5.2.6 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况，做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管，禁止从疫区、受威胁区调入马属动物及其产品。加强马属动物养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警，及时掌握疫情发生风险，开展风险评估并进行疫情预警，根据辖区内动物健康状况，切实做好消毒、检疫、虫媒消杀、野生动物防范等各项综合防控措施的落实，防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传，提高养殖者防控意识。

5.2.7 疫情跟踪

对疫情发生前 21 天内，从疫点输出的易感动物及其产品、被污染饲料垫料和粪便、运输车辆及密切接触人员的去向等，按照流行病学调查技术规范进行跟踪调查，分析疫情扩散风险。必要时，对接触的易感动物进行隔离观察，对相关动物及其产品进行消毒处理。

5.2.8 疫情溯源

对疫情发生前 21 天内，所有引入疫点的易感动物、相关产品来源及运输工具等，按照流行病学调查技术规范进行追溯性调查，分析疫情来源。必要时，对其它来自原产地易感动物或与其接触的易感动物进行隔离观察，对动物产品进行消毒处理。

5.2.9 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况，根据流行病学调查和监测结果，采取相应措施，避免野生易感动物与人工饲养易感动物接触。当地兽医主管部门定期与林业部门进行沟通，交流通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 解除封锁条件

要求疫点内最后一头发病动物死亡或扑杀后，经过 21 天以上连续观察，未发现新的病例，对疫点完成终末消毒。

6.2 解除封锁的评估验收

疫点解除封锁时，由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。评估验收内容包括：

- (1) 疫情基本情况；
- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论；
- (3) 现场调查和实验室检测结果；
- (4) 已采取的应急措施及其效果；
- (5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后，由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

7 档案管理

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

马脑脊髓炎（东方和西方）应急处置技术规范

1 范围

本规范规定了马脑脊髓炎（东方和西方）的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国无疫区马脑脊髓炎（东方和西方）疫情的应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

任何单位和个人发现疑似马脑脊髓炎（东方和西方）疫情时，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应在 2 小时内将疫情逐级报省级动物疫病预防控制机构，并同时报所在地兽医主管部门。

省级动物疫病预防控制机构确认为疑似疫情的，应在 1 小时内向省级兽医主管部门报告。省级兽医主管部门应当在接到报告后 24 小时内报省级人民政府和国务院兽医主管部门。

疫情涉及跨省（区）的，发生地省级兽医主管部门要在接到报告后 24 小时内通报相关省（区）的省级兽医主管部门。

4 疫情确认

4.1 疑似确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，认定为临床怀疑疫情后，当地动物疫病预防控制机构应及时按照《样品采集、保存及运输技术规范》要求采集样品，送省级动物疫病预防控制机构进行疑似诊断，符合疑似马脑脊髓炎（东方和西方）诊断要求的，可确认为疑似病例。

4.2 疫情确认

确认为疑似病例后，省级动物疫病预防控制机构应采集样品送省级动物疫病预防控制机构或有资质的兽医实验室进行检测。检测结果为阳性的，可认定为确诊病例，同时将病料送农业部指定的实验室复核。

5 疫情应急处置

5.1 临时处置

发生疑似疫情时，根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。在疑似疫情报告同时，对发病场（户）实施隔离、监控，马属动物及其产品、饲料及有关物品移动，进行严格消毒等临时处置措施。对可能存在的传染源，以及在发病前 21 天内售出的动物及其产品、对被污染或可疑污染物的物品(包括粪便、垫料、饲料)，立即开展追踪调查，并按规定进行彻底消毒和无害化处理。必要时采取封锁、扑杀等措施。

5.2 确诊疫情处置

5.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫情确诊后，当地兽医主管部门应根据疫病发生情况，划定疫点、疫区和受威胁区，报请同级人民政府对疫区实行封锁。

疫点为发病动物或野生动物所在的地点。相对独立的规模化养殖场/户，以病畜所在的养殖场/户为疫点；散养畜以病畜所在的自然村为疫点；放牧畜以病畜所在的牧场、野生动物驯养场及其活动场地为疫点；病畜在运输过程中发生疫情，以运载病畜的车、船、飞机等为疫点；在市场发生疫情，以病畜所在市场为疫点；在屠宰加工过程中发生疫情，以屠宰加工厂（场）为疫点；在竞技比赛过程中发生疫情的，以赛场为疫点。

疫区为由疫点边缘向外延伸 3 公里内的区域。

受威胁区为由疫区边缘向外延伸 5 公里的区域。

在划定疫区、受威胁区时，应考虑当地饲养环境、天然屏障（如河流、山脉等）、人工屏障（道路、围栏等）、野生动物栖息情况，以及疫情溯源和分析评估结果。

5.2.2 封锁

疫情发生所在地县级以上兽医主管部门报请同级人民政府对疫点进行封锁，人民政府在接到报告后，应在 24 小时内发布封锁令。

5.2.3 对疫点采取的措施

5.2.3.1 扑杀所有易感动物，并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.3.2 对被污染或可疑污染的粪便、垫料、饲料、污水等按规定进行无害化处理。

5.2.3.3 对被污染或可疑污染的工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.3.4 对发病前 14 天内售出的易感动物及其产品进行追踪，对售出的马属动物进行隔离和监测。

5.2.3.5 禁止马属动物出入。

5.2.3.6 对吸血昆虫和蜱进行消杀，采取有效措施防止传播媒介与马属动物直接接触。

5.2.4 对疫区采取的措施

5.2.4.1 在疫区周围设立警示标志，在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站，执行监督检查任务，对出入人员和车辆及有关物品进行消毒。

5.2.4.2 扑杀所有易感动物，并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.4.3 对排泄物或可疑受污染的饲料和垫料、污水等按规定进行无害化处理；可疑被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4.4 关闭疫区内马属动物交易市场和屠宰场，停止赛马等活动，禁止易感动物及其产品出入疫区。

5.2.4.5 加强对吸血昆虫和蜱的消杀，采取有效措施防止传播媒介与马属动物直接接触。

5.2.5 对受威胁区采取的措施

加强对马属动物养殖场、屠宰场、交易市场的监测，及时掌握疫情动态。加强检疫监督，禁止从疫区调入马属动物及其产品。

5.2.6 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况，做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管，禁止从疫区、受威胁区调入马属动物及其产品。加强马属动物养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警，及时掌握疫情发生风险，开展风险评估并进行疫情预警，根据辖区内动物健康状况，切实做好消毒、检疫及虫媒消杀等各项综合防控措施，防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传，提高养殖者防控意识。

5.2.7 疫情跟踪

对疫情发生前 14 天内，从疫点输出的马属动物及其产品、被污染饲料垫料和粪便、运输车辆及密切接触人员的去向等，按照流行病学调查技术规范进行跟踪调查，分析疫情扩散风险。必要时，对接触的易感动物进行隔离观察，对相关动物及其产品进行消毒处理。

5.2.8 疫情溯源

对疫情发生前 14 天内，所有引入疫点的易感动物、相关产品来源及运输工具等，按照流行病学调查技术规范进行追溯性调查，分析疫情来源。必要时，对其它来自原产地马属动物或与其接触的易感动物进行隔离观察，对动物产品进行消毒处理。

5.2.9 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况，根据流行病学调查和监测结果，采取相应措施，避免野生马属动物与人工饲养马属动物接触。当地兽医主管部门定期与林业部门进行沟通，交流通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 解除封锁条件

要求疫点内最后一头发病动物死亡或扑杀后，经过 14 天以上连续观察，未发现新的病例，对疫点完成终末消毒。

6.2 解除封锁的评估验收

疫点解除封锁时，由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。跨省区的，由所涉及省份省级兽医主管部门共同报请农业部组织评估验收。评估验收内容包括：

(1) 疫情基本情况；

- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论；
- (3) 现场调查和实验室检测结果；
- (4) 已采取的应急措施及其效果；
- (5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后，由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

7 档案管理

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

马病毒性动脉炎处置技术规范

1 范围

本规范规定了马病毒性动脉炎的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国无疫区马病毒性动脉炎疫情的应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

任何单位和个人发现疑似马病毒性动脉炎疫情时，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应在 2 小时内将疫情逐级报省级动物疫病预防控制机构，并同时报所在地兽医主管部门。

省级动物疫病预防控制机构确认为疑似疫情的，应在 1 小时内向省级兽医主管部门报告。省级兽医主管部门应当在接到报告后 24 小时内报省级人民政府和国务院兽医主管部门。

疫情涉及跨省（区）的，发生地省级兽医主管部门要在接到报告后 24 小时内通报相关省（区）的省级兽医主管部门。

4 疫情确认

4.1 疑似确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，符合疑似马病毒性动脉炎典型症状的可确认为疑似病例。

4.2 疫情确认

对疑似病例或症状不够典型的病例，当地动物疫病预防控制机构应采集样品送省级动物疫病预防控制机构或有资质的兽医实验室进行检测。检测结果为阳性的，可认定为确诊病例，同时将病料送农业部指定的实验室复核。

5 疫情应急处置

5.1 临时处置

发生疑似疫情时，根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。在疑似疫情报告同时，对发病场（户）实施隔离、监控，易感动物及其产品、饲料及有关物品移动，进行严格消毒等临时处置措施。对可能存在的传染源，以及在发病前 28 天售出的动物及其产品、对被污染或可疑污染物的物品（包括粪便、垫料、饲料），立即开展追踪调查，并按规定进行彻底消毒和无害化处理。必要时采取封锁等措施。

5.2 确诊疫情处置

5.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫情确诊后，当地兽医主管部门应根据疫病发生情况，划定疫点、疫区和受威胁区，报请同级人民政府对疫区实行封锁。

疫点为发病动物或野生动物所在的地点。相对独立的规模化养殖场/户，以病畜所在的养殖场/户为疫点；散养畜以病畜所在的自然村为疫点；放牧畜以病畜所在的牧场、野生动物驯养场及其活动场地为疫点；病畜在运输过程中发生疫情，以运载病畜的车、船、飞机等为疫点；在市场发生疫情，以病畜所在市场为疫点；在屠宰加工过程中发生疫情，以屠宰加工工厂（场）为疫点；在竞技比赛过程中发生疫情的，以赛场为疫点。

疫区为由疫点边缘向外延伸 3 公里内的区域。

受威胁区为由疫区边缘向外延伸 5 公里的区域。

在划定疫区、受威胁区时，应考虑当地饲养环境、天然屏障（如河流、山脉等）、人工屏障（道路、围栏等）、野生动物栖息情况，以及疫情溯源和分析评估结果。

5.2.2 封锁

疫情发生所在地县级以上兽医主管部门报请同级人民政府对疫点进行封锁, 人民政府在接到报告后, 应在 24 小时内发布封锁令。

5.2.3 对疫点采取的措施

5.2.3.1 对发病及病原学阳性动物进行扑杀; 对其它动物尤其种公马隔离饲养, 加强防疫管理和监测; 并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.3.2 对被污染或可疑污染的粪便、垫料、饲料、污水等按规定进行无害化处理。

5.2.3.3 对被污染或可疑污染的交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.3.4 对发病前 28 天内售出的马属动物等易感动物及其产品进行追踪, 对售出的马属动物进行隔离和监测。

5.2.3.5 禁止马属动物出入。

5.2.4 对疫区采取的措施

5.2.4.1 在疫区周围设立警示标志, 在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站, 执行监督检查任务, 对出入人员和车辆及有关物品进行消毒。

5.2.4.2 对疫区内的马属动物进行隔离饲养, 加强疫情持续监测和流行病学调查, 积极开展风险评估。一旦发现有临床症状的马属动物, 立即按国家规定标准实施扑杀并作无害化处理。

5.2.4.3 对排泄物或可疑受污染的饲料和垫料、污水等按规定进行无害化处理; 可疑被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4.5 必要时停止赛马活动; 禁止马属动物及其产品出入疫区。

5.2.5 对受威胁区采取的措施

加强对马属动物养殖场、屠宰场、交易市场的监测, 及时掌握疫情动态。加强检疫监督, 禁止从疫区调入马属动物及其产品。

5.2.6 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况, 做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管, 禁止从疫区、受威胁区调入易感动物及其产品。加强易感动物养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警, 及时掌握疫情发生风险, 开展风险评估并作出疫情预警, 根据辖区内动物健康状况, 切实做好消毒、检疫等各项综合防控措施的落实, 防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传, 提高养殖者防控意识。

5.2.7 疫情跟踪

对疫情发生前 28 天内, 从疫点输出的马属动物及其产品、被污染饲料垫料和粪便、运输车辆及密切接触人员的去向等, 按照流行病学调查技术规范进行跟踪调查, 分析疫情扩散风险。必要时, 对接触的马属动物进行隔离观察, 对马属动物产品进行消毒处理。

5.2.8 疫情溯源

对疫情发生前 28 天内, 所有引入疫点的马属动物、相关产品来源及运输工具等, 按照流行病学调查技术规范进行追溯性调查, 分析疫情来源。必要时, 对其它来自原产地马属动物或与其接触的马属动物进行隔离观察, 对动物产品进行消毒处理。

5.2.9 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况, 根据流行病学调查和监测结果, 采取相应措施, 避免野生易感动物与人工饲养易感动物接触。当地兽医主管部门定期与林业部门进行沟通, 交流通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 解除封锁条件

对发病马属动物采取隔离、治疗措施, 最后一例病例康复后, 或采取扑杀措施的, 疫点最后一例发病动物死亡或扑杀后, 经过 28 天以上连续观察, 未发现新的病例, 对疫点完成终末消毒。

6.2 解除封锁的评估验收

疫点解除封锁时, 由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。跨省区的, 由所涉及省份省级兽医主管部门共同报请农业部组织评估验收。评估验收内容包括:

- (1) 疫情基本情况;
- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论;
- (3) 现场调查和实验室检测结果;
- (4) 已采取的应急措施及其效果;

(5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后，由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

7 档案管理

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

尼帕病应急处置技术规范

1 范围

本规范规定了尼帕病的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国无疫区尼帕病疫情的应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

任何单位和个人发现疑似尼帕病疫情时，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应在 2 小时内将疫情逐级报省级动物疫病预防控制机构，并同时报所在地兽医主管部门。

省级动物疫病预防控制机构确认为疑似疫情的，应在 1 小时内向省级兽医主管部门报告。省级兽医主管部门应当在接到报告后 1 小时内报省级人民政府和国务院兽医主管部门。

疫情涉及跨省（区）的，发生地省级兽医主管部门要在接到报告后 1 小时内通报相关省（区）的省级兽医主管部门。

4 疫情确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，认定为临床怀疑疫情后，由省级动物疫病预防控制机构采集样品，送农业部指定的诊断实验室进行诊断。

农业部根据实验室的最终确诊结果，确认尼帕病疫情。

5 疫情应急处置

5.1 临时处置

发生疑似疫情时，根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。在疑似疫情报告同时，对发病场（户）实施隔离、监控，易感动物及其产品、饲料及有关物品移动，进行严格消毒等临时处置措施。对可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售出的动物及其产品、对被污染或可疑污染物的物品（包括粪便、垫料、饲料），立即开展追踪调查，并按规定进行彻底消毒和无害化处理。必要时采取封锁、扑杀等措施。

5.2 确诊疫情处置

5.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫情确诊后，当地兽医主管部门应当在 2 小时内，确定疫情级别，划定疫点、疫区和受威胁区，报请同级人民政府对疫区实行封锁。

疫点为发病动物或野生动物所在的地点。相对独立的规模化养殖场/户，以病畜所在的养殖场/户为疫点；散养畜以病畜所在的自然村为疫点；放牧畜以病畜所在的牧场、野生动物驯养场及其活动场地为疫点；病畜在运输过程中发生疫情，以运载病畜的车、船、飞机等为疫点；在市场发生疫情，以病畜所在市场为疫点；在屠宰加工过程中发生疫情，以屠宰加工厂（场）为疫点；在竞技比赛过程中发生疫情的，以赛场为疫点。

疫区为由疫点边缘向外延伸 3 公里内的区域。

受威胁区为由疫区边缘向外延伸 5 公里的区域。

在划定疫区、受威胁区时，应考虑当地饲养环境、天然屏障（如河流、山脉等）、人工屏障（道路、围栏等）、野生动物栖息情况，以及疫情溯源和分析评估结果。

5.2.2 封锁

疫情发生所在地县级以上兽医主管部门报请同级人民政府对疫区进行封锁，人民政府在接到报告后，应在 24 小时内发布封锁令。跨行政区域发生疫情时，由共同上一级兽医行政

主管部门报请同级人民政府对疫区实行封锁,或者由各有关行政区域的上一级人民政府共同对疫区实行封锁。必要时,上级人民政府可以责成下级人民政府对疫区实行封锁。

5.2.3 对疫点采取的措施

5.2.3.1 扑杀所有易感动物,并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.3.2 对被污染或可疑污染的粪便、垫料、饲料、污水等按规定进行无害化处理。

5.2.3.3 对被污染或可疑污染的交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.3.4 对发病前 14 天内售出的马属动物、猪等易感动物及其产品进行追踪,对售出的易感动物进行隔离和监测。

5.2.3.5 禁止马属动物、猪等易感动物出入。

5.2.3.6 加强对蚊等虫媒的消杀和对果蝠、野猪和野鸟等野生动物的治理和防范,采取有效措施防止传播媒介与马属动物直接接触。

5.2.4 对疫区采取的措施

5.2.4.1 在疫区周围设立警示标志,在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站,执行监督检查任务,对出入人员和车辆及有关物品进行消毒。

5.2.4.2 扑杀所有易感动物,并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.4.3 对排泄物或可疑受污染的饲料和垫料、污水等按规定进行无害化处理;可疑被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4.4 对交通工具、圈舍、用具及场地进行彻底消毒。

5.2.4.5 关闭疫区内马属动物交易市场和屠宰场,停止赛马等活动,禁止易感动物及其产品出入疫区。

5.2.4.6 加强对蚊等虫媒的消杀和对果蝠、野猪和野鸟等野生动物的治理和防范,采取有效措施防止传播媒介与马属动物直接接触。

5.2.5 对受威胁区采取的措施

加强对马属动物养殖场、屠宰场、交易市场的监测,及时掌握疫情动态。加强检疫监督,禁止从疫区调入马属动物及其产品。

5.2.6 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况,做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管,禁止从疫区、受威胁区调入易感动物及其产品。加强易感动物动物养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警,及时掌握疫情发生风险,开展风险评估并作出疫情预警,根据辖区内动物健康状况,切实做好消毒、检疫、虫媒消杀和野生动物防范等各项综合防控措施的落实,防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传,提高养殖者防控意识。

5.2.7 疫情跟踪

对疫情发生前 14 天内,从疫点输出的马属动物及其产品、被污染饲料垫料和粪便、运输车辆及密切接触人员的去向等,按照流行病学调查技术规范进行跟踪调查,分析疫情扩散风险。必要时,对接触的马属动物进行隔离观察,对马属动物产品进行消毒处理。

5.2.8 疫情溯源

对疫情发生前 14 天内,所有引入疫点的易感动物、相关产品来源及运输工具等,按照流行病学调查技术规范进行追溯性调查,分析疫情来源。必要时,对其它来自原产地易感动物或与其接触的易感动物进行隔离观察,对动物产品进行消毒处理。

5.2.9 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况,根据流行病学调查和监测结果,采取相应措施,避免野生易感动物与人工饲养易感动物接触。当地林业部门应定期向兽医主管部门通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 解除封锁条件

要求疫点内最后一头发病动物死亡或扑杀后,经过 14 天以上连续观察,未发现新的病例,对疫点完成终末消毒。

6.2 解除封锁的评估验收

疫区解除封锁时,由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。跨省区的,由所涉及省份省级兽医主管部门共同报请农业部组织评估验收。评估验收内容包括:

(1) 疫情基本情况;

- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论；
- (3) 现场调查和实验室检测结果；
- (4) 已采取的应急措施及其效果；
- (5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后，由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

7 档案管理

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

水泡性口炎处置技术规范

1 范围

本规范规定了水泡性口炎的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国无疫区水泡性口炎疫情的应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

任何单位和个人发现疑似水泡性口炎疫情时，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应在 2 小时内将疫情逐级报省级动物疫病预防控制机构，并同时报所在地兽医主管部门。

省级动物疫病预防控制机构确认为疑似疫情的，应在 1 小时内向省级兽医主管部门报告。省级兽医主管部门应当在接到报告后 1 小时内报省级人民政府和国务院兽医主管部门。

疫情涉及跨省（区）的，发生地省级兽医主管部门要在接到报告后 1 小时内通报相关省（区）的省级兽医主管部门。

4 疫情确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的防疫人员到现场进行临床诊断，认定为临床怀疑疫情后，由省级动物疫病预防控制机构采集样品，送农业部指定的诊断实验室进行诊断。

农业部根据实验室的最终确诊结果，确认水泡性口炎疫情。

5 疫情应急处置

5.1 临时处置

发生疑似疫情时，根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。在疑似疫情报告同时，对发病场（户）实施隔离、监控，易感动物及其产品、饲料及有关物品移动，进行严格消毒等临时处置措施。对可能存在的传染源，以及在发病前 21 天内售出的动物及其产品、对被污染或可疑污染物的物品（包括粪便、垫料、饲料），立即开展追踪调查，并按规定进行彻底消毒和无害化处理。必要时采取封锁、扑杀等措施。

5.2 确诊疫情处置

5.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫情确诊后，当地兽医主管部门应根据疫病发生情况，划定疫点、疫区和受威胁区，报请同级人民政府对疫区实行封锁。

疫点为发病动物或野生动物所在的地点。相对独立的规模化养殖场/户，以病畜所在的养殖场/户为疫点；散养畜以病畜所在的自然村为疫点；放牧畜以病畜所在的牧场、野生动物驯养场及其活动场地为疫点；病畜在运输过程中发生疫情，以运载病畜的车、船、飞机等为疫点；在市场发生疫情，以病畜所在市场为疫点；在屠宰加工过程中发生疫情，以屠宰加工厂（场）为疫点；在竞技比赛过程中发生疫情的，以赛场为疫点。

疫区为由疫点边缘向外延伸 3 公里内的区域。

受威胁区为由疫区边缘向外延伸 5 公里的区域。

在划定疫区、受威胁区时，应考虑当地饲养环境、天然屏障（如河流、山脉等）、人工屏障（道路、围栏等）、野生动物栖息情况，以及疫情溯源和分析评估结果。

5.2.2 封锁

疫情发生所在地县级以上兽医主管部门报请同级人民政府对疫区进行封锁，人民政府在接到报告后，应在 24 小时内发布封锁令。跨行政区域发生疫情时，由共同上一级兽医行政

主管部门报请同级人民政府对疫区实行封锁,或者由各有关行政区域的上一级人民政府共同对疫区实行封锁。必要时,上级人民政府可以责成下级人民政府对疫区实行封锁。

5.2.3 对疫点采取的措施

5.2.3.1 扑杀所有易感动物,并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.3.2 对被污染或可疑污染的粪便、垫料、饲料、污水等按规定进行无害化处理。

5.2.3.3 对被污染或可疑污染的交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.3.4 对发病前 21 天内售出的马属动物、猪、牛、羊等易感动物及其产品进行追踪,对售出的易感动物进行隔离和监测。

5.2.3.5 禁止易感动物出入;

5.2.3.6 加强对对双翅目昆虫的消杀,采取有效措施防止传播媒介与易感动物直接接触。

5.2.4 对疫区采取的措施

5.2.4.1 在疫区周围设立警示标志,在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站,执行监督检查任务,对出入人员和车辆及有关物品进行消毒。

5.2.4.2 扑杀所有易感动物,并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.4.3 对排泄物或可疑受污染的饲料和垫料、污水等按规定进行无害化处理;可疑被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4.4 关闭疫区内马属动物交易市场和屠宰场,停止赛马等活动,禁止易感动物及其产品出入疫区。

5.2.4.6 加强对双翅目昆虫的消杀,采取有效措施防止传播媒介与易感动物直接接触。

5.2.5 对受威胁区采取的措施

加强对易感动物养殖场、屠宰场、交易市场的监测,及时掌握疫情动态。加强检疫监督,禁止从疫区调入易感动物及其产品。

5.2.6 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况,做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管,禁止从疫区、受威胁区调入易感动物及其产品。加强易感动物养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警,及时掌握疫情发生风险,开展风险评估并作出疫情预警,根据辖区内动物健康状况,切实做好消毒、检疫、虫媒消杀等各项综合防控措施,防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传,提高养殖户防控意识。

5.2.7 疫情跟踪

对疫情发生前 21 天内,从疫点输出的易感动物及其产品、被污染饲料垫料和粪便、运输车辆及密切接触人员的去向等,按照流行病学调查技术规范进行跟踪调查,分析疫情扩散风险。必要时,对接触的易感动物进行隔离观察,对易感动物产品进行消毒处理。

5.2.8 疫情溯源

对疫情发生前 21 天内,所有引入疫点的易感动物、相关产品来源及运输工具等,按照流行病学调查技术规范进行追溯性调查,分析疫情来源。必要时,对其它来自原产地易感动物或与其接触的易感动物进行隔离观察,对动物产品进行消毒处理。

5.2.9 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况,根据流行病学调查和监测结果,采取相应措施,避免野生易感动物与人工饲养易感动物接触。当地兽医主管部门定期与林业部门进行沟通,交流通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 解除封锁条件

要求疫点内最后一头发病动物死亡或扑杀后,经过 21 天以上连续观察,未发现新的病例,对疫点完成终末消毒。

6.2 解除封锁的评估验收

疫区解除封锁时,由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。跨省区的,由所涉及省份省级兽医主管部门共同报请农业部组织评估验收。评估验收内容包括:

- (1) 疫情基本情况;
- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论;
- (3) 现场调查和实验室检测结果;
- (4) 已采取的应急措施及其效果;

(5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后，由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

7 档案管理

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

非洲马瘟应急处置技术规范

1 范围

本规范规定了非洲马瘟的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国无疫区非洲马瘟疫情的应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

任何单位和个人发现疑似非洲马瘟疫情时，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应在 2 小时内将疫情逐级报省级动物疫病预防控制机构，并同时报所在地兽医主管部门。

省级动物疫病预防控制机构确认为疑似疫情的，应在 1 小时内向省级兽医主管部门报告。省级兽医主管部门应当在接到报告后 1 小时内报省级人民政府和国务院兽医主管部门。

疫情涉及跨省（区）的，发生地省级兽医主管部门要在接到报告后 1 小时内通报相关省（区）的省级兽医主管部门。

4 疫情确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，认定为临床怀疑疫情后，由省级动物疫病预防控制机构采集样品，送农业部指定的诊断实验室进行诊断。

农业部根据实验室的最终确诊结果，确认非洲马瘟疫情。

5 疫情应急处置

5.1 临时处置

发生疑似疫情时，根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。在疑似疫情报告同时，对发病场（户）实施隔离、监控，易感动物及其产品、饲料及有关物品移动，进行严格消毒等临时处置措施。对可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售出的动物及其产品、对被污染或可疑污染物的物品（包括粪便、垫料、饲料），立即开展追踪调查，并按规定进行彻底消毒和无害化处理。必要时采取封锁、扑杀等措施。

5.2 确诊疫情处置

5.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫情确诊后，当地兽医主管部门应当在 2 小时内，确定疫情级别，划定疫点、疫区和受威胁区，报请同级人民政府对疫区实行封锁。

疫点为发病动物或野生动物所在的地点。相对独立的规模化养殖场/户，以病畜所在的养殖场/户为疫点；散养畜以病畜所在的自然村为疫点；放牧畜以病畜所在的牧场、野生动物驯养场及其活动场地为疫点；病畜在运输过程中发生疫情，以运载病畜的车、船、飞机等为疫点；在市场发生疫情，以病畜所在市场为疫点；在屠宰加工过程中发生疫情，以屠宰加工厂（场）为疫点；在竞技比赛过程中发生疫情的，以赛场为疫点。

疫区为由疫点边缘向外延伸 3 公里内的区域。

受威胁区为由疫区边缘向外延伸 5 公里的区域。

在划定疫区、受威胁区时，应考虑当地饲养环境、天然屏障（如河流、山脉等）、人工屏障（道路、围栏等）、野生动物栖息情况，以及疫情溯源和分析评估结果。

5.2.2 封锁

疫情发生所在地县级以上兽医主管部门报请同级人民政府对疫区进行封锁，人民政府在接到报告后，应在 24 小时内发布封锁令。跨行政区域发生疫情时，由共同上一级兽医行政

主管部门报请同级人民政府对疫区实行封锁,或者由各有关行政区域的上一级人民政府共同对疫区实行封锁。必要时,上级人民政府可以责成下级人民政府对疫区实行封锁。

5.2.3 对疫点采取的措施

5.2.3.1 扑杀所有易感动物,并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.3.2 对被污染或可疑污染的粪便、垫料、饲料、污水等按规定进行无害化处理。

5.2.3.3 对被污染或可疑污染的交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.3.4 对发病前 40 天内售出的马属动物及其产品进行追踪,对售出的马属动物进行隔离和监测。

5.2.3.5 禁止马属动物出入。

5.2.3.6 对库蠓等吸血昆虫进行消杀,采取有效措施防止传播媒介与马属动物直接接触。。

5.2.4 对疫区采取的措施

5.2.4.1 在疫区周围设立警示标志,在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站,执行监督检查任务,对出入人员和车辆及有关物品进行消毒。

5.2.4.2 扑杀所有易感动物,并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.4.3 对排泄物或可疑受污染的饲料和垫料、污水等按规定进行无害化处理;可疑被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4.4 对交通工具、圈舍、用具及场地进行彻底消毒。

5.2.4.5 关闭疫区内马属动物交易市场和屠宰场,停止赛马等活动,禁止易感动物及其产品出入疫区。

5.2.4.6 加强对库蠓等吸血昆虫的消杀,采取有效措施防止传播媒介与马属动物直接接触。

5.2.5 对受威胁区采取的措施

加强对马属动物养殖场、屠宰场、交易市场的监测,及时掌握疫情动态。加强检疫监督,禁止从疫区调入马属动物及其产品。

5.2.6 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况,做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管,禁止从疫区、受威胁区调入马属动物及其产品。加强马属动物养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警,及时掌握疫情发生风险,开展风险评估并作出疫情预警,根据辖区内动物健康状况,切实做好消毒、检疫、虫媒消杀等各项综合防控措施,防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传,提高养殖者防控意识。

5.2.7 疫情跟踪

对疫情发生前 40 天内,从疫点输出的马属动物及其产品、被污染饲料垫料和粪便、运输车辆及密切接触人员的去向等,按照流行病学调查技术规范进行跟踪调查,分析疫情扩散风险。必要时,对接触的马属动物进行隔离观察,对马属动物产品进行消毒处理。

5.2.8 疫情溯源

对疫情发生前 40 天内,所有引入疫点的马属动物、相关产品来源及运输工具等,按照流行病学调查技术规范进行追溯性调查,分析疫情来源。必要时,对其它来自原产地马属动物或与其接触的马属动物进行隔离观察,对动物产品进行消毒处理。

5.2.9 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况,根据流行病学调查和监测结果,采取相应措施,避免野生易感动物与人工饲养易感动物接触。当地林业部门应定期向兽医主管部门通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 解除封锁条件

要求疫点内最后一头发病动物死亡或扑杀后,经过 40 天以上连续观察,未发现新的病例,对疫点完成终末消毒。

6.2 解除封锁的评估验收

疫区解除封锁时,由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。跨省区的,由所涉及省份省级兽医主管部门共同报请农业部组织评估验收。评估验收内容包括:

- (1) 疫情基本情况;
- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论;
- (3) 现场调查和实验室检测结果;

(4) 已采取的应急措施及其效果；

(5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后，由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

7 档案管理

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

马鼻疽应急处置技术规范

1 范围

本规范规定了马鼻疽的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国无疫区马鼻疽疫情的应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

任何单位和个人发现疑似马鼻疽疫情时，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应在 2 小时内将疫情逐级报省级动物疫病预防控制机构，并同时报所在地兽医主管部门。

省级动物疫病预防控制机构确认为疑似疫情的，应在 1 小时内向省级兽医主管部门报告。省级兽医主管部门应当在接到报告后 1 小时内报省级人民政府和国务院兽医主管部门。

疫情涉及跨省（区）的，发生地省级兽医主管部门要在接到报告后 1 小时内通报相关省（区）的省级兽医主管部门。

4 疫情确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，认定为临床怀疑疫情后，由省级动物疫病预防控制机构采集样品，送农业部指定的诊断实验室进行诊断。

农业部根据实验室的最终确诊结果，确认马鼻疽疫情。

5 疫情应急处置

5.1 临时处置

发生疑似疫情时，根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。在疑似疫情报告同时，对发病场（户）实施隔离、监控，易感动物及其产品、饲料及有关物品移动，进行严格消毒等临时处置措施。对可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售出的动物及其产品、对被污染或可疑污染物的物品（包括粪便、垫料、饲料），立即开展追踪调查，并按规定进行彻底消毒和无害化处理。必要时采取封锁等措施。

5.2 确诊疫情处置

5.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫情确诊后，当地兽医主管部门应当在 2 小时内，确定疫情级别，划定疫点、疫区和受威胁区，报请同级人民政府对疫区实行封锁。

疫点为发病动物或野生动物所在的地点。相对独立的规模化养殖场/户，以病畜所在的养殖场/户为疫点；散养畜以病畜所在的自然村为疫点；放牧畜以病畜所在的牧场、野生动物驯养场及其活动场地为疫点；病畜在运输过程中发生疫情，以运载病畜的车、船、飞机等为疫点；在市场发生疫情，以病畜所在市场为疫点；在屠宰加工过程中发生疫情，以屠宰加工厂（场）为疫点；在竞技比赛过程中发生疫情的，以赛场为疫点。

疫区为由疫点边缘向外延伸 3 公里内的区域。

受威胁区为由疫区边缘向外延伸 5 公里的区域。

在划定疫区、受威胁区时，应考虑当地饲养环境、天然屏障（如河流、山脉等）、人工屏障（道路、围栏等）、野生动物栖息情况，以及疫情溯源和分析评估结果。

5.2.2 封锁

疫情发生所在地县级以上兽医主管部门报请同级人民政府对疫区进行封锁，人民政府在接到报告后，应在 24 小时内发布封锁令。跨行政区域发生疫情时，由共同上一级兽医行政

主管部门报请同级人民政府对疫区实行封锁,或者由各有关行政区域的上一级人民政府共同对疫区实行封锁。必要时,上级人民政府可以责成下级人民政府对疫区实行封锁。

5.2.3 对疫点采取的措施

5.2.3.1 患病马属动物、阳性马属动物在不放血条件下进行扑杀;其它动物隔离饲养,加强饲养、防疫管理和监测;并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.3.2 对被污染或可疑污染的粪便、垫料、饲料、污水等按规定进行无害化处理。

5.2.3.3 对被污染或可疑污染的交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.3.4 对发病前 6 个月内售出的马属动物等易感动物及其产品进行追踪,对售出的马属动物进行隔离和监测。

5.2.3.5 禁止马属动物出入。

5.2.4 对疫区采取的措施

5.2.4.1 在疫区周围设立警示标志,在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站,执行监督检查任务,对出入人员和车辆及有关物品进行消毒。

5.2.4.2 对疫区内的马属动物进行隔离饲养,加强疫情持续监测和流行病学调查,每隔 6 个月开展一次血清学监测,积极开展风险评估。一旦发现有临床症状的马属动物,立即按国家规定标准实施扑杀并作无害化处理。

5.2.4.3 对排泄物或可疑受污染的饲料和垫料、污水等按规定进行无害化处理;可疑被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4.4 对交通工具、圈舍、用具及场地进行彻底消毒。

5.2.4.5 关闭疫区内马属动物交易市场,必要时停止赛马等活动,禁止马属动物及其产品出入疫区;繁殖马属动物要用人工授精方法进行配种;种用马属动物不得对疫区外马属动物配种。

5.2.5 对受威胁区采取的措施

加强对马属动物养殖场、屠宰场、交易市场的监测,及时掌握疫情动态。加强检疫监督,禁止从疫区调入马属动物及其产品。

5.2.6 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况,做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管,禁止从疫区、受威胁区调入马属动物及其产品。加强马属动物养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警,及时掌握疫情发生风险,开展风险评估并作出疫情预警,根据辖区内动物健康状况,切实做好消毒、检疫等各项综合防控措施的落实,防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传,提高养殖者防控意识。

5.2.7 疫情跟踪

对疫情发生前 6 个月内,从疫点输出的马属动物及其产品、被污染饲料垫料和粪便、运输车辆及密切接触人员的去向等,按照流行病学调查技术规范进行跟踪调查,分析疫情扩散风险。必要时,对接触的马属动物进行隔离观察,对相关动物及其产品进行消毒处理。

5.2.8 疫情溯源

对疫情发生前 6 个月内,所有引入疫点的马属动物、相关产品来源及运输工具等,按照流行病学调查技术规范进行追溯性调查,分析疫情来源。必要时,对其它来自原产地马属动物或与其接触的马属动物进行隔离观察,对动物产品进行消毒处理。

5.2.9 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况,根据流行病学调查和监测结果,采取相应措施,避免野生易感动物与人工饲养易感动物接触。当地林业部门应定期向兽医主管部门通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 疫区解除封锁条件

疫点最后一例患病(阳性)动物扑杀后,经过 6 个月以上连续观察,未发现新的病例,且经过半年时间采用鼻疽菌素试验逐匹检查,未检出鼻疽菌素试验阳性马属动物的,对疫点完成终末消毒。

6.2 疫区解除封锁的评估验收

疫区解除封锁时,由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。跨省区的,由所涉及省份省级兽医主管部门共同报请农业部组织评估验收。评估验收内容包括:

- (1) 疫情基本情况；
- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论；
- (3) 现场调查和实验室检测结果；
- (4) 已采取的应急措施及其效果；
- (5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后，由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

7 档案管理

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

马传染性贫血应急处置技术规范

1 范围

本规范规定了马传贫的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国无疫区马传贫疫情的应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

任何单位和个人发现疑似马传贫疫情时，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应在 2 小时内将疫情逐级报省级动物疫病预防控制机构，并同时报所在地兽医主管部门。

省级动物疫病预防控制机构确认为疑似疫情的，应在 1 小时内向省级兽医主管部门报告。省级兽医主管部门应当在接到报告后 1 小时内报省级人民政府和国务院兽医主管部门。

疫情涉及跨省（区）的，发生地省级兽医主管部门要在接到报告后 1 小时内通报相关省（区）的省级兽医主管部门。

4 疫情确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，认定为临床怀疑疫情后，由省级动物疫病预防控制机构采集样品，送农业部指定的诊断实验室进行诊断。

农业部根据实验室的最终确诊结果，确认马传贫疫情。

5 疫情应急处置

5.1 临时处置

发生疑似疫情时，根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。在疑似疫情报告同时，对发病场（户）实施隔离、监控，易感动物及其产品、饲料及有关物品移动，进行严格消毒等临时处置措施。对可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售出的动物及其产品、对被污染或可疑污染物的物品（包括粪便、垫料、饲料），立即开展追踪调查，并按规定进行彻底消毒和无害化处理。必要时采取封锁等措施。

5.2 确诊疫情处置

5.2.1 划定疫点、疫区和受威胁区

疫情确诊后，当地兽医主管部门应当在 2 小时内，确定疫情级别，划定疫点、疫区和受威胁区，报请同级人民政府对疫区实行封锁。

疫点为发病动物或野生动物所在的地点。相对独立的规模化养殖场/户，以病畜所在的养殖场/户为疫点；散养畜以病畜所在的自然村为疫点；放牧畜以病畜所在的牧场、野生动物驯养场及其活动场地为疫点；病畜在运输过程中发生疫情，以运载病畜的车、船、飞机等为疫点；在市场发生疫情，以病畜所在市场为疫点；在屠宰加工过程中发生疫情，以屠宰加工厂（场）为疫点；在竞技比赛过程中发生疫情的，以赛场为疫点。

疫区为由疫点边缘向外延伸 3 公里内的区域，包括病畜发病前 3 个月经常活动，可能污染的地区。

受威胁区为由疫区边缘向外延伸 5 公里的区域。

在划定疫区、受威胁区时，应考虑当地饲养环境、天然屏障（如河流、山脉等）、人工屏障（道路、围栏等）、野生动物栖息情况，以及疫情溯源和分析评估结果。

5.2.2 封锁

疫情发生所在地县级以上兽医主管部门报请同级人民政府对疫区进行封锁，人民政府在接到报告后，应在 24 小时内发布封锁令。跨行政区域发生疫情时，由共同上一级兽医行政

主管部门报请同级人民政府对疫区实行封锁,或者由各有关行政区域的上一级人民政府共同对疫区实行封锁。必要时,上级人民政府可以责成下级人民政府对疫区实行封锁。

5.2.3 对疫点采取的措施

5.2.3.1 患病马属动物、阳性马属动物在不放血条件下进行扑杀;其它动物隔离饲养,加强饲养、防疫管理和监测;并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.3.2 对被污染或可疑污染的粪便、垫料、饲料、污水等按规定进行无害化处理。

5.2.3.3 对被污染或可疑污染的工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.3.4 对发病前 3 个月内售出的马属动物等易感动物及其产品进行追踪,对售出的马属动物进行隔离和监测。

5.2.3.5 禁止马属动物出入。

5.2.3.6 对吸血马蝇等传播媒介进行消杀,采取有效措施防止传播媒介与马属动物直接接触。

5.2.4 对疫区采取的措施

5.2.4.1 在疫区周围设立警示标志,在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查站,执行监督检查任务,对出入人员和车辆及有关物品进行消毒。

5.2.4.2 对疫区内的马属动物进行隔离饲养,加强疫情持续监测和流行病学调查,每隔一个月开展一次血清学监测,积极开展风险评估。一旦发现具有临床症状的马属动物,立即按国家规定标准实施扑杀并作无害化处理。

5.2.4.3 对排泄物或可疑受污染的饲料和垫料、污水等按规定进行无害化处理;可疑被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4.4 对交通工具、圈舍、用具及场地进行彻底消毒。

5.2.4.5 关闭疫区内马属动物交易市场,必要时停止赛马等活动,禁止马属动物及其产品出入疫区;繁殖马属动物要用人工授精方法进行配种;种用马属动物不得对疫区外马属动物配种。

5.2.4.6 对吸血马蝇等传播媒介进行消杀,采取有效措施防止传播媒介与马属动物直接接触。

5.2.5 对受威胁区采取的措施

加强对马属动物养殖场、屠宰场、交易市场的监测,每 3 个月开展一次血清学监测,及时掌握疫情动态。加强检疫监督,禁止从疫区调入马属动物及其产品。

5.2.6 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况,做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管,禁止从疫区、受威胁区调入马属动物及其产品。加强马属动物养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警,及时掌握疫情发生风险,开展风险评估并作出疫情预警,根据辖区内动物健康状况,切实做好消毒、检疫、虫媒消杀等各项综合防控措施,防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传,提高养殖户防控意识。

5.2.7 疫情跟踪

对疫情发生前 3 个月内,从疫点输出的马属动物及其产品、被污染饲料垫料和粪便、运输车辆及密切接触人员的去向等,按照流行病学调查技术规范进行跟踪调查,分析疫情扩散风险。必要时,对接触的马属动物进行隔离观察,对相关动物及其产品进行消毒处理。

5.2.8 疫情溯源

对疫情发生前 3 个月内,所有引入疫点的马属动物、相关产品来源及运输工具等,按照流行病学调查技术规范进行追溯性调查,分析疫情来源。必要时,对其它来自原产地马属动物或与其接触的马属动物进行隔离观察,对动物产品进行消毒处理。

5.2.9 野生动物控制

了解疫区、受威胁区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况,根据流行病学调查和监测结果,采取相应措施,避免野生易感动物与人工饲养易感动物接触。当地林业部门应定期向兽医主管部门通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 解除封锁条件

疫点最后一例患病(阳性)动物扑杀后,经过 3 个月以上连续观察,未发现新的病例,且经血清学检查 3 次(每次间隔 30 天),未检出阳性马属动物的,对疫点完成终末消毒。

6.2 解除封锁的评估验收

疫区解除封锁时，由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。跨省区的，由所涉及省份省级兽医主管部门共同报请农业部组织评估验收。评估验收内容包括：

- (1) 疫情基本情况；
- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论；
- (3) 现场调查和实验室检测结果；
- (4) 已采取的应急措施及其效果；
- (5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后，由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

7 档案管理

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

马媾疫处置技术规范

1 范围

本规范规定了马媾疫的疫情报告、疫情确认、应急处置、封锁解除、档案管理的相关内容。

本规范适用于我国无疫区马媾疫疫情的应急处置工作。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本规范的引用而成为本规范的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本规范，然而，鼓励根据本规范达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注明日期的引用文件，其最新版本适用于本规范。

GB16548 《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》

3 疫情报告

任何单位和个人发现疑似马媾疫疫情时，要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或动物疫病预防控制机构报告。当地动物疫病预防控制机构接到报告后，认定为临床怀疑疫情的，应在2小时内将疫情逐级报省级动物疫病预防控制机构，并同时报所在地兽医主管部门。

省级动物疫病预防控制机构确认为疑似疫情的，应在1小时内向省级兽医主管部门报告。省级兽医主管部门应当在接到报告后1小时内报省级人民政府和国务院兽医主管部门。

疫情涉及跨省（区）的，发生地省级兽医主管部门要在接到报告后1小时内通报相关省（区）的省级兽医主管部门。

4 疫情确认

4.1 疑似确认

动物疫病预防控制机构接到疫情报告后，立即派出两名以上具备相关资格的兽医技术人员到现场进行临床诊断，符合疑似马媾疫典型症状的可确认为疑似病例。

4.2 疫情确认

对疑似病例或症状不够典型的病例，当地动物疫病预防控制机构应当采集样品进行实验室诊断。检测结果为阳性的，送省级动物疫病预防控制机构实验室进行复核。

5 疫情应急处置

5.1 临时处置

发生疑似疫情时，根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。在疑似疫情报告同时，对发病场（户）实施隔离、监控，易感动物及其产品、饲料及有关物品移动，进行严格消毒等临时处置措施。对可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售出的动物及其产品、对被污染或可疑污染物的物品（包括粪便、垫料、饲料），立即开展追踪调查，并按规定进行彻底消毒和无害化处理。必要时采取封锁、扑杀等措施。

5.2 确诊疫情处置

5.2.1 划定疫点、疫区

疫情确诊后，当地兽医主管部门应当在2小时内，确定疫情级别，划定疫点、疫区，报请同级人民政府对疫区实行封锁。

疫点为发病动物所在栏舍。

疫区为发病动物所在养殖场所。相对独立的规模化养殖场/户，以病畜所在的养殖场/户为疫区；散养畜以病畜所在的自然村为疫区；放牧畜以病畜所在的牧场、野生动物驯养场及其活动场地为疫区；病畜在运输过程中发生疫情，以运载病畜的车、船、飞机等为疫区；在市场发生疫情，以病畜所在市场为疫区；在屠宰加工过程中发生疫情，以屠宰加工厂（场）为疫区；在竞技比赛过程中发生疫情的，以赛场为疫区。

在划定疫区时，应考虑当地饲养环境、天然屏障（如河流、山脉等）、人工屏障（道路、围栏等）、野生动物栖息情况，以及疫情溯源和分析评估结果。

5.2.2 封锁

疫情发生所在地县级以上兽医主管部门报请同级人民政府对疫点进行封锁, 人民政府在接到报告后, 应在 24 小时内发布封锁令。

5.2.3 对疫点采取的措施

5.2.3.1 对发病及病原学阳性动物扑杀, 其它马属动物尤其种马隔离饲养, 加强饲养、防疫管理和监测; 并对扑杀动物及其产品按 GB16548 进行无害化处理。

5.2.3.2 对被污染或可疑污染的粪便、垫料、饲料、污水等按规定进行无害化处理。

5.2.3.3 对被污染或可疑污染的工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.3.4 对发病前 6 个月内售出的有与发病动物交配或人工授精马属动物等易感动物及其产品进行追踪, 对售出的马属动物进行隔离和监测。

5.2.3.5 马属动物隔离饲养至少 28 天。

5.2.4 对疫区采取的措施

5.2.4.1 在疫区周围设立警示标志, 在出入疫区的交通路口设置临时动物卫生监督检查点, 执行监督检查任务, 对出入人员和车辆及有关物品进行消毒。

5.2.4.2 对疫区内的马属动物进行隔离饲养至少 28 天, 停止交配或人工授精, 加强疫情持续监测和流行病学调查, 积极开展风险评估。一旦发现有临床症状的马属动物, 立即按国家规定标准实施扑杀并作无害化处理。

5.2.4.3 对排泄物或可疑受污染的饲料和垫料、污水等按规定进行无害化处理; 可疑被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行严格彻底消毒。

5.2.4.4 对交通工具、圈舍、用具及场地进行彻底消毒。

5.2.4.5 必要时停止赛马活动; 禁止马属动物及其产品出入疫区。

5.2.5 对本无疫区内其他地区采取的措施

无疫区内其他地区要根据疫区疫情发生发展状况, 做好启动突发重大动物疫情应急预案的准备。加强检疫监管, 禁止从疫区入马属动物及其产品。加强马属动物养殖场、屠宰场、交易市场疫情监测与预警, 及时掌握疫情发生风险, 开展风险评估并作出疫情预警, 根据辖区内动物健康状况, 切实做好消毒、检疫等各项综合防控措施的落实, 防止疫情发生。做好疫情防控知识宣传, 提高养殖者防控意识。

5.2.6 疫情跟踪

对疫情发生前 6 个月内, 从疫点输出的可能与发病动物有交配或人工授精史的马属动物的去向等, 按照流行病学调查技术规范进行跟踪调查, 分析疫情扩散风险。

5.2.7 疫情溯源

对疫情发生前 6 个月内, 所有引入疫点的马属动物、相关产品来源及运输工具等, 按照流行病学调查技术规范进行追溯性调查, 分析疫情来源。必要时, 对其它来自原产地马属动物或与其接触的马属动物进行隔离观察, 对动物产品进行消毒处理。

5.2.8 野生动物控制

了解疫区及本无疫区内其他地区易感动物分布状况和发病情况, 根据流行病学调查和监测结果, 采取相应措施, 避免野生易感动物与人工饲养易感动物接触。当地林业部门应定期向兽医主管部门通报有关信息。

6 封锁解除

6.1 疫区解除封锁条件

疫点最后一例发病动物死亡或扑杀后, 经过 6 个月以上连续观察, 未发现新的病例, 对疫点完成终末消毒。

6.2 疫区解除封锁的评估验收

疫区解除封锁时, 由疫情发生地省级兽医主管部门负责组织评估验收。跨省区的, 由所涉及省份省级兽医主管部门共同报请农业部组织评估验收。评估验收内容包括:

- (1) 疫情基本情况;
- (2) 疫情发生的主要原因、疫源追踪结论;
- (3) 现场调查和实验室检测结果;
- (4) 已采取的应急措施及其效果;
- (5) 是否应当解除封锁的结论。

经验收合格后, 由当地兽医主管部门向发布封锁令的人民政府申请解除封锁。

7 档案管理

各级人民政府兽医主管部门必须对处理疫情的全过程做好完整详实的文字和影像记录，包括：疫情报告、疫情封锁、疫情扑灭、实验室诊断、流行病学调查、紧急免疫、消毒灭源以及相关会议、通知等记录和资料。实施专人专档管理，各项档案记录应长期保存。

紧急流行病学调查技术规范

1 范围

本规范规定了无疫区内发生疑似或确诊发生规定动物疫病时,开展紧急流行病学调查的程序和工作要求。

本标准适用于怀疑或确认发生规定动物疫病时,兽医主管部门组织动物疫病预防控制机构开展紧急流行病学调查工作。

2 术语与定义

2.1 现场调查。接到确诊或怀疑发生规定动物疫情报告后,对相关养殖场/户、交易市场、屠宰场等区域实施的现场检测、调查和勘测等活动。

2.2 溯源调查。接到确诊或怀疑发生规定动物疫情报告后,所进行的追溯最原始病畜禽或风险动物产品来源情况、检测自然宿主带毒状况、病原变异情况等等的调查。

2.3 跟踪调查。接到确诊或怀疑发生规定动物疫情报告后,所进行的追踪病畜禽及风险动物产品去向情况的调查。

3 程序

3.1 接到确诊或疑似疫情报告后,县级或县级以上动物疫病预防控制机构应立即核实信息,进行初步调查并按规定报告疫情,开展现场流行病学调查。

3.2 现场调查人员进一步核实情况后,按照相应紧急流行病学调查表(附表 1~6)的要求,详细、全面、准确收集相关信息,填写调查表。

3.3 现场调查人员应根据调查情况,描述动物疫情现状(空间、时间和群间分布等),分析疫病来源,判断疫情发展趋势,提出控制措施建议,形成调查评估报告。怀疑疫情扩散时,应开展追踪调查。

3.4 流行病学调查专家组要对现场调查人员形成的调查评估报告及其结论进行审核。

4 要求

4.1 流行病学调查专家组要对现场调查人员形成的调查评估报告及其结论进行审核,审核意见作为规定动物疫情解除封锁的重要依据。

4.2 疫情解除封锁前,动物疫病预防控制机构要将流行病学调查表、现场调查评估报告及流行病学调查专家组的审核意见报同级兽医主管部门,由兽医主管部门逐级报农业部备案。

4.3 动物疫病预防控制机构要对紧急疫情应急处置措施和扩散风险进行及时评估,汇总分析流行规律,定期逐级报告农业部兽医局。

4.4 各级动物疫病预防控制机构要明确专人负责动物流行病学调查表填报工作。

4.5 根据调查结果,汇总分析形成报告,逐级报兽医主管部门。

表1 反刍动物（牛、羊、骆驼、鹿）_____（病）紧急流行病学调查表

说明：

1. 本表由县级动物疫病预防控制机构在接到疫情报告后，开展流行病学调查时填写。
2. 为多种动物共患病的，需填写猪等易感动物的相关数据。
3. 本表述及的单元（流行病学单元）是指处在同一环境、感染某种病原可能性相同的一群动物。如处在同一个封闭圈舍内的动物，或同一个场内（开放式圈舍）的动物，或某个村内饲养的所有易感动动物，或者是使用同一个公共设施的一群动物（如水源、公共挤奶站等），均可称其为一个流行病学单元。

序号：填表日期：____年__月__日

一、基础信息

1. 疫点所在场/养殖小区/村概况

名称		地理坐标	经度：纬度：
地址	省（自治区、直辖市）县（市、区）乡（镇）村（场）		
联系电话		启用时间	
易感动物种类	养殖单元（户/舍）数	存栏数（头/只）	

2. 调查简要信息

调查原因				
调查人员姓名		单位		
发现首个病例日期		接到报告日期		调查日期

二、现况调查

1. 发病单元（户/舍）概况

户名或畜舍编号	动物种类 ^①	存栏数 ^② (头/只)	最后一次该病疫苗免疫情况							病死情况	
			应免数量	实免数量	免疫时间	疫苗种类	生产厂家	批号	来源	发病数 ^③ (头/只)	死亡数 (头/只)

注：①动物种类：同一单元存在多种动物的，分行填写；
 ②存栏数：是指发病前的存栏数；
 ③发病数：是指出现该病临床症状或实验室检测为阳性的动物数。

2. 疫点发病过程（用于计算袭击率）

自发现之日起	新发病数	新病死数
第1日		
第2日		
第3日		
第4日		
第5日		
第6日		
第7日		
第8日		
第9日		
第10日		

3. 诊断情况

初步诊断	临床症状：						
	病理变化：						
实验室诊断	初步诊断结果： 诊断人员：						
	诊断日期：						
	样品类型	数量	采样时间	送样单位	检测单位	检测方法	检测结果
诊断结果	疑似诊断				确诊结果		

4. 疫情传播情况

村/场名	最初发病时间	存栏数	发病数	死亡数	传播途径

5. 疫点所在地及周边地理特征

请在县级行政区域图上标出疫点所在地位置；注明周边地理环境特点，如靠近山脉、河流、公路等。

--

6. 疫点所在县易感动物生产信息（为判断暴露风险及做好应急准备等提供信息支持）

易感动物种类	疫区		受威胁区		全县	
	养殖场/户数	存栏量 (万头/只)	养殖场/户数	存栏量 (万头/只)	养殖场/户数	存栏量 (万头/只)

7. 当地疫病史

--

三、疫病可能来源调查（追溯）

对疫点第一例病例发现前 1 个潜伏期内的可能传染来源途径进行调查。

可能来源途径	详细信息
家畜引进情况（种类、年龄、数量、用途和相关时间、地点等）	
易感动物产品购进情况	
饲料调入情况	
水源	
本场/户人员到过其他养殖场/户或活畜交易市场情况	
配种情况	
放牧情况	
公共奶站挤奶情况	
营销人员、兽医及其他相关人员到过本场/户情况	
外来车辆进入或本场车辆外出情况	
与野生动物接触过情况	
其他	
初步结论	

四、疫病可能扩散范围调查（追踪）

疫点发现第一例病例前 1 个潜伏期至封锁之日内，对以下事件进行调查。

可能事件	详细信息
家畜调出情况（数量、用途及相关时间、地点等）	
配种	
参展情况	
公共牧场放牧情况	
公共奶站挤奶情况	
与野生动物接触过情况	
兽医巡诊情况	
相关人员外出与易感动物接触情况	
其他	
初步结论	

五、疫情处置情况（根据防控技术规范规定的内容填写）

疫点处置	扑杀动物数	
	无害化处理动物数	
	消毒情况（频次、药名、面积等）	
	隔离封锁措施（时间、范围等）	
	其他	
疫区防控	封锁时间、范围等	
	扑杀易感动物数	
	无害化处理数	
	消毒情况	
	紧急免疫数	
	监测情况	
	其他	
受威胁区防控	免疫数	
	消毒情况	
	监测情况	
	其他	
其他（如市场关闭等）		

填表人姓名：联系电话：

填表单位（签章） 省级动物疫病预防控制机构复核（签章）

表 2 猪____(病) 紧急流行病学调查表

说明:

1. 本表由县级动物疫病预防控制机构在接到疫情报告后, 开展流行病学调查时填写。
2. 猪是单一易感动物的, 无需填写牛羊等动物的相关数据。
3. 本表述及的单元(流行病学单元)是指处在同一环境、感染某种病原可能性相同的一群动物。如处在同一个封闭圈舍内的动物, 或同一个场内(开放式圈舍)的动物, 或某个村内饲养的所有易感动物的, 或者是使用同一个公共设施的一群动物(如水源等), 均可称为一个流行病学单元。

序号: 填表日期: ____年 ____月 ____日

一、基础信息

1. 疫点所在场/养殖小区/村概况

名称		地理坐标	经度: 纬度:
地址	省(自治区、直辖市)县(市、区)乡(镇)村(场)		
联系电话		启用时间	
易感动物种类	养殖单元(户/舍)数	存栏数(头/只)	
猪			
牛			
羊			
其他()			

2. 调查简要信息

调查原因					
调查人员姓名		单位			
发现首个病例日期		接到报告日期		调查日期	

二、现况调查

1. 发病单元(户/舍)概况

户名或猪舍编号	母猪/育肥猪/仔猪 ^①	存栏数 ^② (头)	最后一次该病疫苗免疫情况							病死情况	
			应免数量	实免数量	免疫时间	疫苗种类	生产厂家	批号	来源	发病数 ^③ (头)	死亡数(头)

- 注: ①母猪/育肥猪/仔猪: 同一单元同时存在母猪、育肥猪、仔猪的, 分行填写;
 ②存栏数: 是指发病前的存栏数;
 ③发病数: 是指出现该病临床症状或实验室检测为阳性的动物数。

2. 疫点发病过程（用于计算袭击率）

自发现之日起	新发病数	新病死数
第1日		
第2日		
第3日		
第4日		
第5日		
第6日		
第7日		
第8日		
第9日		
第10日		

3. 诊断情况

初步诊断	临床症状：						
	病理变化：						
	初步诊断结果： 诊断人员：						诊断日期：
实验室诊断	样品类型	数量	采样时间	送样单位	检测单位	检测方法	检测结果
诊断结果	疑似诊断				确诊结果		

4. 疫情传播情况

村/场名	最初发病时间	存栏数	发病数	死亡数	传播途径

5. 周边野生易感动物分布及发病情况

野生易感动物种类	病死情况

6. 疫点所在地及周边地理特征

请在县级行政区域图上标出疫点所在地位置；注明周边地理环境特点，如靠近山脉、河流、公路等。

--

7. 疫点所在县易感动物生产信息（为判断暴露风险及做好应急准备等提供信息支持）

易感动物名称	疫区		受威胁区		全县	
	养殖场/户数	存栏量 (万头/万只)	养殖场/户数	存栏量 (万头/万只)	养殖场/户数	存栏量 (万头/万只)
猪						
牛						
羊						
其他						

8. 当地疫病史

--

三、疫病可能来源调查（追溯）

对疫点第一例病例发现前 1 个潜伏期内的可能传染来源途径进行调查。

可能来源途径	详细信息
易感动物购买或引进（数量、用途和相关时间、地点等）	
易感动物产品购入情况	
饲料调入情况	
水源	
本场/户人员到过其他养殖场/户或活畜交易市场情况	
配种情况	
是否放养	
泔水饲喂情况	
营销人员、兽医及其他相关人员是否到过本场/户	
外来车辆进入或本场车辆外出情况	
与野生动物接触过情况	
其他	

四、疫病可能扩散传播范围调查（追踪）

疫点发现第一例病例前 1 个潜伏期至封锁之日内，对以下事件进行调查。

可能事件	详细信息
易感动物出售/赠送情况	
配种情况	
参展情况	
放养	
与野生动物接触情况	
诊疗兽医巡诊情况	
相关人员外出与易感动物接触情况	
其他	

五、疫情处置情况（根据防控技术规范规定的内容填写）

疫点处置	扑杀动物数	
	无害化处理动物数	
	消毒情况（频次、面积、药名等）	
	隔离封锁措施（时间、范围等）	
	其他	
疫区防控	封锁时间、范围等	
	扑杀易感动物数	
	无害化处理数	
	消毒情况	
	紧急免疫数	
	监测情况	
	其他	
受威胁区防控	免疫数	
	消毒情况	
	监测情况	
	其他	
其他（如市场关闭等）		

填表人姓名：联系电话：

填表单位（签章） 省级动物疫病预防控制机构复核（签章）

表3 禽（鸡、鸭、鹅、）____（病）紧急流行病学调查表

说明：

1. 本表由县级动物疫病预防控制机构在接到疫情报告后，开展流行病学调查时填写。
2. 本表述及的单元（流行病学单元）是指处在同一环境、感染某种病原可能性相同的一群动物。如处在同一个圈舍内的动物，或某个村内饲养的所有易感动物，均可称其为一个流行病学单元。

序号：填表日期：__年__月__日

一、基础信息

1. 疫点所在场/养殖小区/村养殖概况

名称		地理坐标	经度：纬度：	
地址	省（自治区、直辖市）县（市、区）乡（镇）村（场）			
联系电话		启用时间		
易感动物种类	养殖单元（户/舍）数	存栏数（羽）		
蛋鸡				
肉鸡				
鸭				
鹅				
其他（）				

2. 调查简要信息

调查原因				
调查人员姓名		单位		
发现首个病例日期		接到报告日期	调查日期	

二、现况调查

1. 发病单元（户/舍）概况

户名或禽舍编号	家禽种类 ^①	存栏数 ^② （羽）	日龄	最后一次该病疫苗免疫情况						病死情况		
				应免数量	实免数量	免疫时间	疫苗种类	生产厂家	批号	来源	发病数 ^③ （羽）	死亡数（羽）

注：①家禽种类：同一单元存栏多种家禽的，分行填写；
 ②存栏数：是指发病前的存栏数；
 ③发病数：是指出现该病临床症状或实验室检测为阳性的动物数。

2. 疫点发病过程（用于计算袭击率）

自发现之日起	新发病数	新病死数
第1日		
第2日		
第3日		
第4日		
第5日		
第6日		
第7日		
第8日		
第9日		
第10日		

3. 诊断情况

初步诊断	临床症状：						
	病理变化：						
实验室诊断	初步诊断结果： 诊断人员：						
	诊断日期：						
实验室诊断	样品类型	数量	采样时间	送样单位	检测单位	检测方法	检测结果
诊断结果	疑似诊断				确诊结果		

4. 疫情传播情况

村/场名	最初发病时间	存栏数	发病数	死亡数	传播途径

5. 疫点所在地及周边地理特征

请在县级行政区域图上标出疫点所在地位置；注明周边地理环境特点，如靠近山脉、河流、公路等。

6. 疫点所在县家禽生产情况（为判断暴露风险及做好应急准备等提供信息支持）

易感动物种类	疫区		受威胁区		疫区所在县	
	养殖场/户数	存栏量（万羽）	养殖场/户数	存栏量（万羽）	养殖场/户数	存栏量（万羽）
蛋鸡						
肉鸡						
鸭						
鹅						
其他（）						

7. 当地疫病史

--

三、疫病可能来源调查（追溯）

对疫点发现第一例病例前 1 个潜伏期内的可能传染来源途径进行调查。

可能来源途径	详细信息
家禽引进情况（种类、数量、用途和相关时间、地点等）	
禽产品购入情况	
饲料调入情况	
水源	
本场/户人员到过其他养殖场/户情况	
本场/户人员到过活禽交易市场情况	
营销人员、兽医及其他相关人员进出本场/户情况	
外来车辆进入或本场车辆外出情况	
与野禽接触情况	
其他	
初步调查结论	

四、疫病可能扩散传播范围调查（追踪）

疫点发现第一例病例前 1 个潜伏期至封锁之日内，对以下事件进行调查。

可能事件调查	详细信息
家禽调出情况（数量、用途及相关时间、地点等）	
禽产品调出情况	
粪便、垫料运出情况	
兽医人员诊疗情况	
饲养人员探亲/串门情况	

参加展览/竞技活动	
其他事件	
初步结论	

五、疫情处置情况（根据防控技术规范规定的内容填写）

疫点处置	扑杀动物数	
	无害化处理动物数	
	消毒情况（频次、药名、面积等）	
	隔离封锁措施（时间、范围等）	
	其他	
疫区防控	封锁时间、范围等	
	扑杀易感动物数	
	无害化处理数	
	消毒情况	
	紧急免疫数	
	监测情况	
	其他	
受威胁区防控	免疫数	
	消毒情况	
	监测情况	
	其他	
其他（如市场关闭等）		

填表人姓名：联系电话：

填表单位（签章） 省级动物疫病预防控制机构复核（签章）

表 4 农贸市场/畜禽批发市场____(病) 紧急流行病学调查表

说明：1. 本表由县级动物疫病预防控制机构在接到疫情报告后，开展流行病学调查时填写。
2. 本表中畜禽包括猪、禽、牛、羊等多种动物。

序号：填表日期：__年__月__日

一、基础信息

1. 农贸市场、畜禽批发市场概况

名称		地理坐标	经度：纬度：	
地址	省（自治区、直辖市）县（市、区）乡（镇）村（场）			
联系电话		启用时间		

2. 调查简要信息

调查原因				
调查人员姓名		单位		
发现首个病例日期		接到报告日期	调查日期	

3. 农贸市场、畜禽批发市场经营概况

所经营动物及其产品种类	经营/批发户数	日均销售/批发数量	主要来源地

二、现况调查

1. 发病情况（头/羽/只）

动物种类	同群数*	发病数**	死亡数

*同群数是指与发病动物有过直接或间接接触的动物数。

**发病数是指出现该病临床症状的动物数。

2. 诊断情况

初步诊断	临床症状：						
	病理变化：						
实验室诊断	初步诊断结果： 诊断人员：						
	诊断日期：						
	样品类型	数量	采样时间	送样单位	检测单位	检测方法	检测结果
诊断结果	疑似诊断				确诊结果		

3. 疫点地理特征

请提供当地行政区划图，并在地图上标出疫点位置，注明疫点所在地的地理环境特点，如靠近山脉、河流、公路等。

--

4. 其他信息

如您觉得有其他上表未标出的可用信息，如当地的风俗习惯等，请在以下写出。

--

三、发病动物来源地追溯

经营户姓名	动物种类	数量（头/只/羽）	检疫证书号	来源地 ^{***}

***对于农贸市场发生的疫情，要追溯到批发市场，进而追溯到来源地。

四、风险动物及其产品追踪

发病动物运抵该市场至封锁之日起，对所有从疫点出售的动物（可能时，包括产品）进行跟踪调查。

出售/调运情况	日期	详细信息

五、控制措施

市场控制措施	
疫区防控措施	
受威胁区防控措施	
其他	

填表人姓名：联系电话：

填表单位（签章） 省级动物疫病预防控制机构复核（签章）

表 5 运输途中 ____ (病) 紧急流行病学调查表

说明：1. 本表由县级动物疫病预防控制机构在接到疫情报告后，开展流行病学调查时填写。
2. 本表适用猪、禽、牛、羊等多种动物。

序号：填表日期：__年__月__日

一、基础信息

1. 疫点概况

疫点所在地址	省（自治区、直辖市）县（市、区）乡（镇）
地理坐标	经度： 纬度：

2. 货主及运输工具基本情况

货主姓名		从业时间		电话	
联系地址	省（自治区、直辖市）县（市、区）乡（镇）				
运输工具		车牌号			

3. 调查简要信息

调查原因					
调查人员姓名		单位			
发现首个病例日期		接到报告日期		调查日期	

二、现况调查

1. 发病动物情况（头/羽/只）

动物种类	猪	牛	羊	鸡	鸭	鹅		
来源地								
启运地								
检疫证书号								
启运时间								
启运时数量								
截至调查时发病数（含途中）								
截至调查时死亡数（含途中）								

2. 诊断情况

初步诊断	临床症状：						
	病理变化：						
实验室诊断	初步诊断结果： 诊断人员：						
	诊断日期：						
	样品类型	数量	采样时间	送样单位	检测单位	检测方法	检测结果
诊断结果	疑似诊断				确诊结果		

3. 疫点所在县畜牧业生产信息（为判断暴露风险及做好应急准备等提供信息支持）

易感动物名称	疫区		受威胁区		全县	
	养殖场/户数	存栏量 (万头/万只)	养殖场/户数	存栏量 (万头/万只)	养殖场/户数	存栏量 (万头/万只)

4. 疫点所在地及周边地理特征

请在县级行政区域图上标出疫点所在地位置；注明周边地理环境特点，如靠近山脉、河流、公路等。

--

三、疫病可能扩散传播范围调查（追踪）

可能事件	详细信息
途中经停地点	
途中病死动物处理情况	
初步结论	

四、应急处置措施

疫点处置情况	
疫区防控措施	
受威胁区防控措施	
其他措施（如向经停地点所在县通报疫情情况等）	

填表人姓名：联系电话：

填表单位（签章） 省级动物疫病预防控制机构复核（签章）

表 6 屠宰场/点__（病）紧急流行病学调查表

说明：1. 本表由县级动物疫病预防控制机构在接到疫情报告后，开展流行病学调查时填写。
2. 本表适用猪、禽、牛、羊等多种动物。

序号：填表日期：__年__月__日

一、基础信息

1. 屠宰场/点概况

名称		地理坐标	经度：纬度：	
地址	省（自治区、直辖市）县（市、区）乡（镇）村（场）			
联系电话		启用时间		
屠宰动物种类		日均屠宰量（头/羽/只）		

2. 调查简要信息

调查原因				
调查人员姓名		单位		
发现首个病例日期		接到报告日期		调查日期

二、现况调查

1. 动物发病死亡情况（头/羽/只）

动物种类	同群数*	发病数**	死亡数

* 同群数是指与发病动物直接或间接接触的易感动物数。

** 发病数是指出现该病临床症状的动物数。

2. 诊断情况

初步诊断	临床症状：						
	病理变化：						
实验室诊断	初步诊断结果： 诊断人员：						
	诊断日期：						
	样品类型	数量	采样时间	送样单位	检测单位	检测方法	检测结果
诊断结果	疑似诊断				确诊结果		

3. 疫点及周边地理特征

请提供当地行政区划图，并在地图上标出疫点位置；注明疫点所在地的地理环境特点，如山脉、河流、公路等分布情况。

--

4. 疫点所在县畜牧业生产信息（为判断暴露风险及做好应急准备等提供信息支持）

易感动物名称	疫区		受威胁区		全县	
	养殖场/户数	存栏量 (万头/万只)	养殖场/户数	存栏量 (万头/万只)	养殖场/户数	存栏量 (万头/万只)

5. 其他信息

如您觉得有其他未标出的可用信息，如当地的风俗习惯等，请在以下表中写出。

--

三、发病动物来源追溯

发病动物种类	运输车辆牌照号	检疫证书号	来源地	途经地

四、疫病可能扩散传播范围调查（追踪）

可能事件	详细信息
发病动物运载车辆去向	
发病及同群动物处置情况	
发病及同群动物产品流出情况	
其他（如污水排放等其他环节）	
初步结论	

五、疫情处置情况（根据防控技术规范规定的内容填写）

疫点处置	扑杀动物数	
	无害化处理动物数	
	消毒情况（频次、药名、面积等）	
	隔离封锁措施（时间、范围等）	
	其他	
疫区防控	封锁时间、范围等	
	扑杀易感动物数	
	无害化处理数	
	消毒情况	
	紧急免疫数	
	监测情况	
	其他	
受威胁区防控	免疫数	
	消毒情况	
	监测情况	
	其他	
其他（如市场关闭等）		

填表人姓名：联系电话：

填表单位（签章） 省级动物疫病预防控制机构复核（签章）

