

# 农 业 部 文 件

农医发[2007]3 号

---

## 农业部关于印发《无规定动物疫病区 管理技术规范（试行）》的通知

各省、自治区、直辖市及计划单列市农业（农牧、畜牧兽医）厅（局、委、办），新疆生产建设兵团农业局：

为实施动物疫病区域化管理，规范无规定动物疫病区评估活动，有效控制和扑灭重大动物疫病，提高动物卫生及动物产品安全水平，促进对外贸易，根据《无规定动物疫病区评估管理办法》（农业部令第1号）有关规定，我部制定了《无规定动物疫病区管理技术规范（试行）》。现印发给你们，请遵照执行。

二〇〇七年一月二十五日

# 无规定动物疫病区管理技术规范

## (试行)

# 目 录

第一部分 无规定动物疫病区建设步骤.....	5
通则.....	6
口蹄疫控制计划.....	8
高致病性禽流感控制计划.....	9
新城疫控制计划.....	10
猪瘟控制计划.....	11
第二部分 无疫区标准.....	12
通则.....	13
无口蹄疫区标准.....	16
无高致病性禽流感区标准.....	17
无新城疫区标准.....	18
无猪瘟区标准.....	19
第三部分 基础与体系.....	21
动物防疫机构兽医实验室建设标准.....	22
兽医实验室工作程序.....	25
检测工作质量保证制度.....	26
检测工作质量保证制度.....	27
剧毒药品管理制度.....	28
实验室安全卫生制度.....	29
实验室废弃物处理制度.....	30
样品管理制度.....	31
兽医实验室档案管理制度.....	32
药品试剂管理制度.....	33
仪器设备使用管理制度.....	35
动物防疫档案管理规范.....	36
畜牧业基本情况报告制度.....	38
第四部分 预防与监测.....	46
口蹄疫免疫技术规范.....	47
高致病性禽流感免疫技术规范.....	49
新城疫免疫技术规范.....	51
猪瘟免疫技术规范.....	53
样品采集、保存及运输技术规范.....	55
口蹄疫诊断技术规范.....	60
高致病性禽流感诊断技术规范.....	79
新城疫诊断技术规范.....	96

猪瘟诊断技术规范 .....	101
口蹄疫监测技术规范 .....	105
高致病性禽流感监测技术规范 .....	106
新城疫监测技术规范 .....	107
猪瘟监测技术规范 .....	108
<b>第五部分 检疫与监管</b> .....	<b>109</b>
动物隔离场管理规范 .....	110
动物及动物产品流通控制规范 .....	112
动物及动物产品追溯规范 .....	114
饲养场动物防疫条件 .....	116
家禽饲养场防疫管理规范 .....	117
养猪场防疫管理规范 .....	118
奶牛饲养场防疫管理规范 .....	119
屠宰场动物防疫条件 .....	121
家禽屠宰检疫规范 .....	123
牛羊屠宰检疫规范 .....	125
猪屠宰检疫规范 .....	127
动物无害化处理场管理规范 .....	129
消毒技术规范 .....	131
<b>第六部分 应急与恢复</b> .....	<b>133</b>
口蹄疫疫情报告和确认规范 .....	134
高致病性禽流感疫情报告和确认规范 .....	139
新城疫疫情报告和确认规范 .....	140
猪瘟疫情报告和确认规范 .....	141
口蹄疫应急处置原则 .....	142
新城疫应急处置原则 .....	143
猪瘟应急处置原则 .....	144
口蹄疫疫情扑灭技术规范 .....	145
高致病性禽流感疫情扑灭技术规范 .....	147
新城疫疫情扑灭技术规范 .....	149
猪瘟疫情扑灭技术规范 .....	151
口蹄疫流行病学调查技术规范 .....	153
高致病性禽流感流行病学调查技术规范 .....	161
新城疫流行病学调查技术规范 .....	169
猪瘟流行病学调查技术规范 .....	177

# 第一部分 无规定动物疫病区建设步骤

- 1 通则
- 2 口蹄疫控制计划
- 3 禽流感控制计划
- 4 新城疫控制计划
- 5 猪瘟控制计划

# 通则

为有计划、有步骤地推进重大动物疫病的无规定动物疫病区（以下简称“无疫区”）建设和评估工作，根据 OIE《陆生动物卫生法典》的要求，借鉴先进国家净化消灭重大动物疫病的成功经验，结合我国国情，制定本实施计划。

## 1 基础建设

1.1 机构队伍 建立职能明确的政府兽医行政管理部门，具有统一、稳定的省、市、县三级动物防疫监督机构和技术支撑机构，具有与动物防疫工作相适应的动物防疫队伍。建设区域内，县以上地方人民政府应成立无疫区建设和疫病防治领导指挥机构和专家委员会。

1.2 法规规章 根据有关法律、法规，结合建设区域的自然、地理、生产和社会经济发展状况，制定完善该区域实施无疫区工作的各项法规、规章、规范、标准和制度。

1.3 财政支持 建立稳定的投入机制，保证基础设施、设备建设和日常运转维护的经费投入，各级动物防疫监督机构及技术支撑机构的人员及工作经费应当全额纳入财政预算。

1.4 防疫屏障 无疫区与相邻地区间具备地理屏障或人工屏障；无疫区周边须建立缓冲区；进入无疫区的主要交通道口及口岸设立动物防疫监督检查站，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。

1.5 测报预警 规范疫情确认程序，健全疫情报告制度，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不间断疫情档案资料，具有对动物疫情准确及时报告及预警能力，并按照《动物疫情报告管理办法》的要求，及时、准确报告疫情。

1.6 流通监管 完善动物及动物产品流通监管制度。无规定动物疫病区引进动物及其产品来源于规定疾病的无疫区，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防疫监督机构或其指定的动物防疫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；引入的易感动物须在动物检疫隔离场按规定隔离，检疫合格后经指定通道进入无疫区。

1.7 检疫监管 强化检疫监管，规范实施动物及其产品生产、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，检疫证明和标志、防疫记录等须按规定制作、管理和使用，确保动物及其产品能够追踪溯源。

1.8 规划制定 根据畜牧业生产现状，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、净化规划及实施步骤。

## 2 免疫控制

2.1 目标：规定时期内无临床病例。

2.2 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。

2.2.1 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。

2.2.2 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%。

2.2.3 对可疑病例及时诊断并采取控制疫病扩散措施；一经确诊，扑杀全部发病动物和同群动物，做好无害化处理。按监测技术规范要求实施疫病监测。

2.2.4 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。

## 3 监测净化（免疫无疫）

3.1 目标：规定期限内无感染。

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

3.2.1 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%。

3.2.2 按监测技术规范重点开展病原监测，发现野毒携带动物按疫点处置办法处置；同时强化周边 3 公里的易感动物抽样监测，发现阳性感染动物同样按疫点处置办法处理。

3.2.3 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。

#### **4 无疫监测（非免疫无疫）**

4.1 目标：规定期限内非免疫无感染。

4.2 主要措施：停止免疫；强化监测；处置感染动物。

4.2.1 区域内全部停止免疫。

4.2.2 强化监测和检疫，发现发病动物和感染动物，按疫情处理。

4.2.3 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，应先在缓冲区按规定实施监控，确定符合非免疫无疫区动物卫生要求后，加永久性标识后方可进入。

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。

#### **5 评估**

农业部兽医局按《无规定动物疫病区评估管理办法》的规定，对符合免疫无疫或非免疫无疫规定的无疫区进行评估。评估合格后，农业部兽医局按国际惯例向有关国际组织申请国际认证。

# 口蹄疫控制计划

## 1 基础建设

制定《重大动物疫病应急预案》及相关规定，建立各级领导指挥机构及专家委员会，具有能落实免疫接种、对疑似病例采样送检的基层动物防疫组织，有鉴别诊断、病原监测、血清学监测及疫苗运输存储的设施设备条件及相应的技术力量；具有落实强制免疫接种及相关措施保障机制，即明确实施强制免疫接种的劳务报酬、疫苗成本、病畜扑杀补助、诊断监测、疫苗接种反应补偿和防治工作运行等费用的投入政策和负担办法；具有检疫与流通控制，疫情确认报告程序，疫源追溯和防疫条件考核制度，畜禽养殖档案及畜禽标识管理，产地及屠宰检疫等管理措施，并严格按照规定实施落实。

## 2 免疫控制

2.1 目标：临床无病，连续 24 个月无临床病例。

2.2 主要措施：强制扑杀发病动物及同群动物；区域内易感动物实施 100% 免疫接种，开展有效的免疫效果监测；同时用非结构蛋白抗体检测法进行病原监测，阳性畜及同群畜按临床病例处置；对发病畜、非结构蛋白抗体阳性畜周边 10 公里范围内的易感动物按口蹄疫监测技术规范进行监测，检出的阳性畜同样按临床病例处置。

## 3 监测净化（免疫无疫）

3.1 目标：临床无疫，且持续 12 个月无感染（2 和 3 时间段可以重叠）。

3.2 主要措施：根据病原监测结果，经风险评估，可逐步缩小免疫接种的区域，免疫区域的免疫密度应达到 100%，进行免疫效果监测和病原监测；未免疫区域进行病原监测；对监测发现的感染动物按疫点处置，同时对周边 10km 的易感动物进行抽样监测，发现阳性动物，按疫点处理。

## 4 无疫监测（非免疫无疫）

4.1 目标：停止免疫接种后 12 个月无病例，且连续 12 个月监测不到病毒。

4.2 主要措施：停止免疫接种；按口蹄疫监测技术规范进行监测，监测到感染畜，扑杀感染畜和同群畜；不得引进免疫接种过的动物。

## 5 评估（对 3 或 4 阶段进行评估）

农业部兽医局按《无规定动物疫病区评估管理办法》对符合 3 或 4 规定的无疫区进行评估。评估合格后，农业部兽医局按国际惯例向有关国际组织申请国际认证。

# 高致病性禽流感控制计划

## 1 基础建设

制定《重大动物疫病应急预案》及相关规定，建立各级领导指挥机构及其专家委员会，省级建立现场诊断防治专家组，有能落实免疫接种、对怀疑病例采样送样的基层防疫组织，具有鉴别诊断、病原监测、血清学监测及疫苗运输存储的设施设备条件及相应的技术力量。具有落实强制免疫接种及相关措施保障机制，即明确的劳务报酬、疫苗成本、扑杀补助、诊断监测、疫苗接种反应补偿和防治工作运行等费用的投入政策和负担办法；重点对规模饲养、屠宰加工条件实行有效监督，加强检疫与流通控制，疫情确认报告程序，疫源追溯和防疫条件考核制度，产地及屠宰检疫等管理措施。

## 2 免疫控制

2.1 目标：连续 6 个月无临床病例。

2.2 主要措施：区域内易感禽种禽场、蛋禽场和曾受威胁规模场实施 100% 免疫接种，实施免疫效果监测和病原监测，病原阳性禽及同群禽按临床病例处置，强制扑杀疫点、疫区内全部禽；对疫区周边 5km 范围内的易感禽类进行病原监测，检出的阳性禽按临床病例处置。

## 3 监测净化（免疫无疫）

3.1 目标：临床无疫，且持续 12 个月无感染（2 和 3 时间段可以重叠）。

3.2 主要措施：继续按 2.2 规定进行免疫接种，免疫效果监测，对未免疫区域内的未免疫禽（含野禽类）进行病原监测，对监测发现的感染禽、带毒禽按疫情处置办法处置。对疫区养猪场采集鼻腔拭子，受威胁区所有禽群采集气管拭子和泄殖腔拭子，在野生禽类活动或栖息地采集新鲜粪便或水样；每个采样点采集 20 份样品，按标准进行病原检测，发现疑似感染样品，送国家禽流感参考实验室确诊。

## 4 无疫监测（非免疫无疫）

4.1 目标：停止免疫接种 12 个月后无病例，且连续 12 个月监测不到病毒。

4.2 主要措施：停止免疫接种，监测 12 个月，监测到感染禽扑杀同群禽，12 个月未发现感染；不得引进免疫接种过易感禽类。

## 5 评估（对 3 或 4 阶段进行评估）

农业部兽医局按《无规定动物疫病区评估管理办法》对符合 3 或 4 规定的无疫区进行评估。评估合格后，农业部兽医局按国际惯例向有关国际组织申请国际认证。

# 新城疫控制计划

## 1 基础建设

制定《重大动物疫病应急预案》及相关规定，具有鉴别诊断、病原监测、血清学监测及疫苗运输存储的设施设备条件及相应的技术力量。具有落实强制免疫接种及相关措施保障机制，即明确的劳务报酬、疫苗成本、扑杀补助、诊断监测、疫苗接种反应补偿和防治工作运行等费用的投入政策和负担办法；具有检疫与流通控制，疫情确认报告程序，疫源追溯和防疫条件考核制度，产地及屠宰检疫等管理措施。

## 2 免疫控制

2.1 目标：连续 3 个月无临床病例。

2.2 主要措施：对区域内易感家禽实施 100% 免疫接种，实施免疫效果监测；强制扑杀疫点、疫区内全部禽；受威胁区所有禽群采集气管拭子和泄殖腔拭子，在野生禽类活动或栖息地采集新鲜粪便或水样，每个采样点采集 20 份样品进行病原监测，病原阳性禽及同群禽按临床病例处置。

## 3 监测净化（免疫无疫）

3.1 目标：临床无疫，且持续 12 个月无感染（2 和 3 时间段可以重叠）。

3.2 主要措施：根据病原监测结果，经风险评估，可逐步缩小免疫接种的区域，免疫区域的免疫密度应达到 100%，实施免疫效果监测和病原监测；对未免疫区域内的未免疫禽（含野禽类）进行病原监测。对监测发现的感染禽、带毒禽按疫点处置办法处置。受威胁区所有禽群采集气管拭子和泄殖腔拭子，在野生禽类活动或栖息地采集新鲜粪便或水样，每个采样点采集 20 份样品，进行病原检测，发现疑似感染样品，送国家指定参考实验室确诊，监测发现阳性，扑杀处理。

## 4 无疫监测（非免疫无疫）

4.1 目标：无临床病例、无感染病例；停止免疫接种 3 个月无临床病例，且连续 12 个月监测不到病毒。

4.2 主要措施：停止免疫接种 3 个月；监测 12 个月，监测到感染禽扑杀感染禽和同群禽，受威胁区所有禽群采集气管拭子和泄殖腔拭子，在野生禽类活动或栖息地采集新鲜粪便或水样，每个采样点采集 20 份样品；按标准进行病原检测，发现疑似感染样品，送国家参考实验室确诊；对监测发现的感染禽、带毒禽按疫情处置办法处置；不得引进免疫接种过的易感禽类。

## 5 评估（对 3 或 4 阶段进行评估）

农业部兽医局按《无规定动物疫病区评估管理办法》对符合 3 或 4 规定的无疫区进行评估。评估合格后，农业部兽医局按国际惯例向有关国际组织申请国际认证。

# 猪瘟控制计划

## 1 基础建设

制定《重大动物疫病应急预案》及相关规定，具有鉴别诊断、病原监测、血清学监测及疫苗运输存储的设施设备条件及相应的技术力量。具有落实强制免疫接种及相关措施保障机制，即明确的劳务报酬、疫苗成本、扑杀补助、诊断监测和防治工作运行等费用的投入政策和负担办法；具有检疫与流通控制，疫情确认报告程序，疫源追溯和防疫条件考核制度，标识管理，产地及屠宰检疫等管理措施。

## 2 免疫控制

2.1 目标：连续 12 个月无临床病例。

2.2 主要措施：区域内易感动物 5 年内实施 100% 免疫接种，并开展免疫效果监测；实施病原监测，病原阳性畜及同群畜按临床病例处置；强制扑杀发病动物及同群动物，对发病畜及病原阳性畜周边 3km 范围内的易感动物进行监测，进行猪群临床和实验室监测，检出的病原阳性按临床病例处置；加强科学饲养管理，禁止饲喂泔水；实施有效的动物卫生措施，阻止该病从野猪向家猪的传播。

## 3 监测净化（免疫无疫）

3.1 目标：持续 6 个月无感染（2 和 3 时间段可以重叠）。

3.2 主要措施：免疫区域的免疫接种率达到 100%，对免疫效果继续进行监测，实施病原监测，根据病原监测结果逐步缩小免疫范围，对带毒者周边 3km 的易感动物进行抽样监测，对监测发现的感染畜、带毒畜按疫点处置办法处置。加强科学饲养管理，禁止饲喂泔水；实施有效的动物卫生措施，阻止该病从野猪向家猪的传播。

## 4 监测无疫（非免疫无疫）

4.1 目标：停止免疫接种后连续 12 个月无病例，且监测不到病毒。

4.2 主要措施：停止免疫接种，实施病原监测 12 个月；如发现感染畜，扑杀感染畜和同群畜，不得引进免疫接种过的动物，加强科学饲养管理，禁止饲喂泔水；实施有效的动物卫生措施，阻止疫病从野猪向家猪的传播。

## 5 评估（对 3 或 4 阶段进行评估）

农业部兽医局按《无规定动物疫病区评估管理办法》对符合 3 或 4 规定的无疫区进行评估。评估合格后，农业部兽医局按国际惯例向有关国际组织申请国际认证。

## 第二部分 无疫区标准

- 1 通则
- 2 无口蹄疫区标准
- 3 无高致病性禽流感区标准
- 4 无新城疫区标准
- 5 无猪瘟区标准

# 通则

## 1 范围

本标准规定了无规定动物疫病区的相关定义和基本条件。

本标准适用于无规定动物疫病区标准的执行和解释。

## 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》 农业部 1999 年第 96 号公告

《陆生动物卫生法典》2004 版

《哺乳动物、禽和蜜蜂 A 和 B 类疾病诊断试验和疫苗标准手册》

GB/T 18635-2002 《动物防疫基本术语》

《动物及动物产品流通控制规范》

## 3 术语和定义

本标准采用下列定义：

### 3.1 动物疫病

指《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(地区)

区是指动物卫生状况和界限清楚的地区。

### 3.4 无规定动物疫病区

指在某一确定区域，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、动物源性饲料、动物遗传材料、动物病料、兽药（包括生物制品）的流通实施官方有效控制并经国家评估合格的特定地域。无规定疫病区包括免疫无规定动物疫病区和非免疫无规定动物疫病区两种。

### 3.5 免疫无规定动物疫病区

在规定期限内，某一划定的区域没有发生过某种或某几种动物疫病，对该区域及其周围一定范围采取免疫措施，对动物和动物产品及其流通实施官方有效控制。

### 3.6 非免疫无规定动物疫病区

在规定期限内，某一划定的区域没有发生过某种或某几种动物疫病，且未实施免疫接种，并在其边界及周围一定范围规定期限内未实施免疫接种，对动物和动物产品及其流通实施官方有效控制。

### 3.7 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。

### 3.8 人工屏障

指为防止规定动物疫病病原进入无规定动物疫病区，由省级人民政府批准的，在无规定动物疫病区周边建立的动物防疫监督检查站、隔离设施、封锁设施等。

### 3.9 缓冲区

指为防止规定的动物疫病进入无规定动物疫病区，根据自然、地理或行政区域等条件，在无规定动物疫病区边界外围设立的防疫缓冲区域，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。

### 3.10 监测区

指在无疫区内，沿无疫区边界设立的，应采取强化监测措施的区域。

#### 3.11 潜伏期

指病原侵入动物到首次出现疫病临床症状的最长时间。

#### 3.12 感染期

感染动物作为传染源的最长持续时间。

### 4 建立无规定动物疫病区的基本条件

#### 4.1 组织机构及基础设施条件

有职能明确的兽医行政管理部门，有统一、稳定的省、市、县三级动物防疫监督机构和技术支撑机构，有与动物防疫工作相适应的动物防疫队伍。

有完善的法律法规体系和稳定的财政保障机制，在保证基础设施、设备投入和更新的同时，人员及工作经费应纳入财政预算。

兽医机构应具有供其支配的必要资源，有实施监督检查、流行病学调查、疫情监测和疫病报告、控制、扑灭等能力，并有效运作。

#### 4.2 区域规模

具有一定规模，尽可能与行政区域（如地级市或地区）一致；无规定动物疫病区的区域应集中连片，有足够的缓冲区和监测区，具备一定地理或人工屏障的区域。

#### 4.3 社会经济状况

无规定动物疫病区的建立能为当地带来显著的经济和社会生态效益；经济发展水平和公用经费能支持和保证无规定动物疫病区的建立和维持；行政管理和社会管理对该项工作给予有效的支持。

#### 4.4 动物疫病防控基础

区域内的技术支撑体系应具备相应疫病的诊断、监测、免疫质量监控和分析能力，以及与所承担工作任务相适应的设施设备。

动物防疫监督机构具备与检疫、监督、消毒工作相适应的仪器设备，并有能力实施对动物及其产品的检疫监控、防疫条件审核和防疫追溯。

有相应的无害化处理设施设备，具备及时有效地处理病害动物和动物产品以及其他污染物的能力。

省、市、县有健全的应急体系，完备的疫情信息传递和档案资料管理设备，具有对动物疫情应急处理和对疫情准确、迅速报告的能力，并按《动物疫情报告管理办法》的要求，及时、准确报告疫情。

工作人员的技术水平必须符合行政主管部门的规定和工作需要。

#### 4.5 保护屏障

无规定动物疫病区与相邻地区间必须有足以阻止疫病传播的地理屏障或人工屏障。在运输动物及其产品的主要交通路口设立的动物防疫监督检查站，须配备检疫、消毒、交通和信息传递的设施设备。

### 5 各类地区应具备的基本条件

#### 5.1 免疫无规定动物疫病区

5.1.1 在规定时限内没有发现感染规定动物疫病的临床和监测证据。

5.1.2 怀疑暴发疫病必须立即调查，并对周围边界地区进行系统持续监测。

5.1.3 免疫无规定疫病区按规定实施免疫，并执行畜禽标识制度。

5.1.4 从无规定动物疫病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。

5.1.5 必要时，无规定动物疫病区边界（外）应设立缓冲区，与国内其它地区及邻国相隔离。

#### 5.2 非免疫无规定动物疫病区

5.2.1 当地动物防疫监督机构应能够了解当地动物饲养和分布情况。

5.2.2 怀疑疫病暴发时，动物防疫监督机构必须立即进行调查，并及时按《动物疫情报告管理办法》上报疫情，采取必要措施。

5.2.3 必要时，无规定动物疫病区边界（外）应设立缓冲区，与国内其它地区及邻国相隔离。

5.2.4 从无规定动物疫病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 监测区

5.3.1 根据地理和气候条件及疫病性质，监测区应具有足够的面积和宽度，原则上以县级行政区域为单位。

5.3.2 应实施科学的疫病监控计划。

5.3.3 怀疑疫病暴发时，动物防疫监督机构必须立即进行调查，并及时按《动物疫情报告管理办法》上报疫情，采取必要措施。

5.3.4 从无规定动物疫病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。

### 5.4 缓冲区

5.4.1 根据地理和气候条件及疫病性质，缓冲区应具有足够的面积和宽度，原则上以县级行政区域为单位。

5.4.2 实施科学的疫病监控计划。

5.4.3 按规定实施免疫，并实行标识制度。

5.4.4 动物及动物产品流通应遵循相关规范。

5.4.5 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。

# 无口蹄疫区标准

## 1 范围

本标准规定了无口蹄疫（FMD）区的条件。

本标准适用于无口蹄疫区的建立和评估。

## 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。

无规定动物疫病区标准 通则

## 3 缩略语和定义

通则规定的缩略语和定义适用于本标准。

## 4 潜伏期

FMD 的潜伏期为 14d。

## 5 免疫无 FMD 区

除遵守通则的相关规定外，还应符合下列条件：

5.1 与国内其它地区或毗邻 FMD 感染国家间设有缓冲区，或具有人工屏障或地理屏障，以有效防止病毒入侵。

5.2 过去 24 个月内没有发生过 FMD，12 个月内的疫病监测中未检出 FMD 病原或无 FMD 病毒感染的任何证据。

5.3 设有有效的监测体系，并按规定的频率和密度实施了 FMD 监测；执行预防和控制 FMD 的常规措施。

5.4 无 FMD 区及缓冲区均实施免疫接种，所用 FMD 疫苗符合国家规定。

## 6 非免疫无 FMD 区

除遵守通则的相关规定外，还应符合下列条件：

6.1 在无疫区内，沿无疫区周边与国内其它地区或毗邻 FMD 感染地区间设有监测区，或具有人工或地理屏障，以有效防止病毒入侵。

6.2 过去 12 个月内，没有进行 FMD 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 设有有效的监测体系，过去 12 个月没有发生过 FMD，并且过去 12 个月内的疫病监测中未检出 FMD 病原或无 FMD 病毒感染的任何证据。

6.4 所有预防和控制 FMD 的规定措施都得以执行，并得到有效监督。

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 FMD 区的恢复

8.1 免疫无 FMD 区发生 FMD 后，恢复免疫无 FMD 区的条件

采取扑杀、血清学监测、紧急免疫等措施，并采用检测 FMD 病毒非结构蛋白抗体的方法进行血清学监测来证明没有 FMD 病毒感染，在最后一例病例扑杀后 6 个月。

8.2 非免疫无 FMD 区发生 FMD 后，恢复非免疫无 FMD 区的条件

8.2.1 采取扑杀及血清学监测，但不采取紧急免疫措施，最后一个病例扑杀后 3 个月；

8.2.2 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宰杀，最后一头免疫动物宰杀后 3 个月；

8.2.3 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 FMD 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 FMD 病毒时，须在最后一例病例或最后一次免疫后等待 6 个月。

# 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(HPAI)区的条件。

本标准适用于无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。

无规定动物疫病区标准 通则

## 3 缩略语和定义

通则规定的缩略语和定义适用于本标准。

## 4 潜伏期

HPAI 的潜伏期为 21d。

## 5 无 HPAI 区

具有有效的监测体系，按 HPAI 监测技术规范进行监测，符合通则的相关规定，并符合下列条件之一：

5.1 有证据证明在过去至少 12 个月内未发生过 HPAI。

5.2 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 HPAI 疫苗接种，最后一例感染动物扑杀后，6 个月没有再发生疫情。

## 6 无 HPAI 区的恢复

采取扑杀政策时，无论是否实施 HPAI 疫苗接种，在最后一例感染病例扑杀后 6 个月，并采取相应的消毒措施，未再出现新的疫情，就可以申请恢复无 HPAI 区。

# 无新城疫区标准

## 1 范围

本标准规定了无新城疫(ND)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。

无规定动物疫病区标准 通则

## 3 缩略语和定义

通则规定的缩略语和定义适用于本标准。

## 4 潜伏期

ND 的潜伏期为 21d。

## 5 无 ND 区

具有有效的监测体系，按 ND 监测技术规范进行监测，符合通则的相关规定，并符合下列条件之一：

5.1 有证据证明至少在过去 12 个月内未发生过 ND。

5.2 发生过疫情的地区，按国家规定实施扑杀政策，不论是否实施 ND 疫苗接种，最后一例感染动物扑杀后，6 个月再没有疫情发生。

## 6 无 ND 区的恢复

发生 ND 后，实施扑杀政策，不论是否实施 ND 疫苗接种，最后一例感染动物扑杀后，6 个月再没有疫情发生，就可申请恢复无 ND 区。

# 无猪瘟区标准

## 1 范围

本标准规定了无猪瘟(CSF)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。

无规定动物疫病区标准 通则

## 3 缩略语和定义

通则规定的缩略语和定义适用于本标准。

## 4 潜伏期

猪在胎儿期一旦接触到 CSF 病毒就可能终身感染，通常在几个月的潜伏期后才出现临床症状。猪出生后接触病毒后潜伏期为 7~10d，通常在感染后 5~14d 具有感染性，但慢性感染时，在 3 个月后才具有感染性。

本规范规定猪瘟的潜伏期为 40d。

## 5 基本条件：

- 5.1 符合《无规定动物疫病区标准 通则》的相关规定；
- 5.2 实施有效的动物卫生措施，阻止疫病从野猪向家猪的传播；
- 5.3 按照猪瘟监测技术规范，进行猪群临床和实验室监测，结果呈阴性；
- 5.4 禁止饲喂泔水。

## 6 免疫无 CSF 区

符合 5 的规定，并符合以下条件：

- 6.1 该区内在过去 12 个月内没有发生猪瘟疫情；
- 6.2 5 年内实施 CSF 疫苗接种；
- 6.3 对 6 月龄到 1 岁的猪病原学和血清学监测，至少连续 6 个月证明没有感染。

## 7 非免疫无 CSF 区

符合 5 的规定，并符合以下条件之一：

- 7.1 实施扑杀政策而不进行接种疫苗的地区，至少 6 个月没有发生疫情。
- 7.2 实施扑杀政策结合疫苗接种的地区，疫苗停止使用至少 12 个月，且没有疫情发生。

## 8 无疫区的恢复

8.1 免疫无 CSF 区：若免疫无 CSF 区内发生猪瘟时，实施扑杀政策，最后一个病例扑杀后 12 个月，经实施有效的疫情监测，确认后方可重新申请免疫无 CSF 区。

8.2 非免疫无 CSF 区：

8.2.1 非免疫无 CSF 区如发生 CSF 病例，实施扑杀政策，不采取紧急免疫接种的情况下，采取以下措施，在 40d 以上未发生 CSF 病例，可申请恢复非免疫无 CSF 区。

8.2.1.1 在疫点周围划定 CSF 家养猪控制区（包括至少半径为 3km 的内保护区和外围半径至少 10km 的监测区）；

8.2.1.2 扑杀饲养场内所有猪，销毁尸体并进行彻底消毒；

8.2.1.3 CSF 疫点周围保护区：

对临近饲养场感染 CSF 的可能性进行风险分析，如分析结果表明存在明显风险时，则扑杀半径 0.5km 内所有家养猪；

对保护区所有饲养场的猪只立即进行临床检查；

8.2.1.4 在疫点周围监测区内所有病猪应送实验室作 CSF 诊断；

8.2.1.5 对控制区内与感染猪场有直接或间接接触的所有养猪场均需进行包括临床检查或血清学或病毒学检查在内的流行病学调查，证明这些饲养场没有被感染；

8.2.1.6 实施防止病毒通过活猪、猪精液和猪胚胎、污染物、交通工具等进行传播的控制措施。

如在控制区内实施紧急疫苗接种，则在接种疫苗的猪被全部屠宰前不能恢复无疫状态，除非有区分疫苗接种猪和自然感染猪的有效方法。

8.2.2 非免疫无 CSF 区发生 CSF 病例，实施扑杀政策同时实施免疫接种，经实施有效的疫情监测和血清学检测确认后，此后至少 12 个月不再实施免疫接种并未发生 CSF 病例，可申请恢复非免疫无 CSF 区。

## 第三部分 基础与体系

- 1 动物防疫机构兽医实验室建设标准
- 2 兽医实验室工作程序
- 3 检测工作质量保证制度
- 4 剧毒药品管理制度
- 5 实验室安全卫生制度
- 6 实验室废弃物处理制度
- 7 样品管理制度
- 8 兽医实验室档案资料管理制度
- 9 药品试剂管理制度
- 10 仪器设备使用管理制度
- 11 动物防疫档案管理规范
- 12 畜牧业基本情况报告制度

# 动物防疫机构兽医实验室建设标准

## 1 范围

本标准规定了无规定动物疫病区动物防疫机构兽医实验室建设要求。

本标准适用于无规定动物疫病区动物防疫机构兽医实验室的建设,其它兽医实验室的建设可参照本标准执行。

## 2 实验室建设

### 2.1 省级兽医实验室

#### 2.1.1 工作能力

2.1.1.1 能对重大动物疫病进行病原学定性诊断。

2.1.1.2 能组织并指导全省开展动物疫病监测工作,并制定监测方案及规程。

2.1.1.3 能研究开发新技术,推广重大动物疫病的防治、诊断技术。

2.1.1.4 能完成培训各市(县、区)化验员的任务。

#### 2.1.2 人员要求

总人数不得少于 12 人。

2.1.2.1 实验室主任:具备与兽医专业相关大学本科以上学历,有 3 年以上实验室工作经验,高级职称;熟悉各种实验及实验仪器的使用性能及特点,能对实验数据进行分析、判定,并对实验结果进行审核。能分析解决实验过程中出现的疑难问题。

2.1.2.2 各检验室负责人:主管检验室工作,具备大学本科以上学历,有 2 年以上实验室工作经验,中级以上职称;熟悉分管检验室的各种实验及所用实验仪器的使用性能及特点,能对实验数据进行分析、判定,并对实验结果进行审核。能分析解决实验过程中出现的疑难问题。

2.1.2.3 实验员:具备大专以上学历,熟悉所在实验室各种实验的操作及所用实验仪器的使用性能,能对实验数据进行分析、判定。上岗前必须进行技术培训,考核合格的方可上岗。

#### 2.1.3 仪器设备

2.1.3.1 常规仪器:高速冷冻离心机、普通离心机、冷冻自动切片机、石蜡切片机、普通显微镜、荧光显微镜、体视显微镜、酶标仪、电泳仪、超声波清洗器、超声波细胞破碎仪、组织捣碎机、二氧化碳培养箱、普通生化培养箱、干燥箱、倒置显微镜、超净工作台、生物安全柜、隔离器、分光光度计、超低温冰箱、低温冰柜、普通冰箱、恒温冷藏柜、酸度计、真空泵、液氮罐、多(单)道微量移液器、电子天平(感量分别为 0.01mg 和 0.1mg)、水浴锅、水浴箱、微波炉、小型台式冻干机、高压灭菌器、自动磨刀机、(超)纯水器、蒸馏水器、高温炉、电脑、照相机、投影仪、摄像机等。

2.1.3.2 精密仪器:研究型显微镜、血液分析仪、PCR 仪、细菌快速鉴定测试仪、血细胞分析仪、全自动生化分析仪、超速离心机等。

#### 2.1.4 实验室设置

2.1.4.1 兽医实验室处于一个相对独立或封闭的区域,并与其它区域之间建有屏障或缓冲区。实验室布局应合理、结构安全、防护设施齐备,达到生物安全三级水平。

2.1.4.2 具有通风换气、恒温恒湿、双电源、防火等设施设。

2.1.4.3 实验室应分设病毒室(包括重大动物疫病实验室、病毒繁殖及毒力测定实验室等)、细菌室、病理室、寄生虫实验室、中毒代谢病实验室,以及实验动物舍、剖检室、洗涤室、试剂室、无害化处理间、污水处理间、留样室、档案室等。

2.1.4.4 总面积不应低于 800 平方米。

#### 2.1.5 质量保证体系

省级实验室应建立完善可行的实验室质量保证体系。

#### 2.1.6 记录、报告、档案

2.1.6.1 对实验结果及数据实行电脑管理,统一实验室记录、统一出具实验报告。

2.1.6.2 建立实验室档案,档案规范、齐全,有专人管理。

2.1.6.3 重要仪器及设备要建立使用记录,规范使用程序。

### 2.2 市级兽医实验室

#### 2.2.1 工作能力

- 2.2.1.1 能对常发动物病毒病、细菌病、寄生虫病、中毒代谢病等进行快速诊断。
- 2.2.1.2 能组织并指导全市开展动物疫病监测工作，完成本市的动物疫病监测任务。
- 2.2.1.3 能完成重大动物疫病的初步诊断。
- 2.2.1.4 能完成培训各县区化验员的任务。

#### 2.2.2 人员要求

总人数不得少于 5 人，具备大专以上学历。

2.2.2.1 实验室主任：主管实验室全面工作，有丰富的实验室工作经验，副高级以上职称；掌握各种实验及实验仪器的使用性能及特点，能对实验数据进行分析、判定；能对实验过程中出现的问题进行分析，解决疑难问题。

2.2.2.2 实验员：有实验室工作经验；熟悉所在实验室的各种实验操作，并掌握所用实验仪器的使用方法，能对实验数据进行分析、判定。

#### 2.2.3 仪器设备

普通离心机、冷冻自动切片机、石蜡切片机、普通显微镜、荧光显微镜、体视显微镜、超声波清洗器、超声波细胞破碎仪、组织捣碎机、酶标仪、电泳仪、普通生化培养箱、干燥箱、倒置显微镜、超净工作台、分光光度计、低温冰柜、普通冰箱、恒温冷藏柜、酸度计、真空泵、液氮罐、多（单）道微量移液器、电子天平（感量 0.1mg）、水浴锅、水浴箱、微波炉、高压灭菌器、自动磨刀机、纯水器、蒸馏水器、电脑、照相机等。

#### 2.2.4 实验室设置

2.2.4.1 兽医实验室处于一个相对独立或封闭的区域，并与其它区域之间建有屏障或缓冲区。实验室布局合理、结构安全、防护设施齐备，达到生物安全二级水平。

2.2.4.2 具有通风换气、恒温恒湿、双电源、防火等设施。

2.2.4.3 实验室应分设病毒室、细菌室、病理剖检室、寄生虫实验室，以及洗涤室、无害化处理、污水处理间等。

2.2.4.4 总面积不应低于 200 平方米。

#### 2.2.5 计量认证

市级实验室应通过实验室计量认证。

#### 2.2.6 记录、报告、档案

2.2.6.1 对实验结果及数据实行电脑管理，统一实验室记录、统一出具实验报告。

2.2.6.2 建立实验室档案，档案规范、齐全，有专人管理。

2.2.6.3 重要仪器及设备要建立使用记录，规范使用程序。

### 2.3 县级兽医实验室

#### 2.3.1 工作能力

2.3.1.1 能对常发的动物病毒病、细菌病、寄生虫病等进行快速诊断。

2.3.1.2 能完成本县和上级下达的动物疫病监测任务。

2.3.1.3 能完成重大动物疫病的初步诊断。

2.3.1.4 能够培训、指导基层动物防疫组织开展疫病检测工作。

#### 2.3.2 人员要求

总人数不得少于 3 人，具备大学专科以上学历。

2.3.2.1 实验室主任：主管实验室全面工作，有丰富的实验室工作经验，中级以上职称；掌握各种实验及实验仪器的使用性能及特点，能对实验数据进行分析、判定；能对实验过程中出现的问题进行分析，解决疑难问题。

2.3.2.2 实验员：有实验室工作经验；熟悉所在实验室的各种实验的操作并掌握所用实验仪器的使用方法，能对实验数据进行分析、判定。

#### 2.3.3 仪器设备

普通离心机、石蜡切片机、普通显微镜、荧光显微镜、体视显微镜、超声波清洗器、酶标仪、电泳仪、普通生化培养箱、干燥箱、超净工作台、分光光度计、普通冰箱、恒温冷藏柜、酸度计、液氮罐、多（单）道微量移液器、电子天平（感量 0.1mg）、水浴锅、水浴箱、微波炉、高压灭菌器、自动磨刀机、纯水器、蒸馏水器、电脑、照相机等。

#### 2.3.4 实验室设置

2.3.4.1 兽医实验室处于一个相对独立或封闭的区域，并与其它区域之间建有屏障或缓冲区。实验室布局合理、结构安全、防护设施齐备，达到生物安全一级以上水平。

2.3.4.2 具有通风换气、恒温恒湿、双电源、防火等设施设备。

2.3.4.3 实验室应分设血清学室、细菌及寄生虫室、病理剖检室和准备室等，并具有污水处理等设施。

2.3.4.4 总面积不应低于 200 平方米，其中实验室面积不应少于 160 平方米。

2.3.5 计量认证

县级实验室应通过实验室计量认证。

2.3.6 记录、报告、档案

2.3.6.1 对实验结果及数据实行电脑管理，统一实验室记录、统一出具实验报告。

2.3.6.2 建立实验室档案，档案规范、齐全，有专人管理。

2.3.6.3 重要仪器及设备要建立使用记录，规范使用程序。

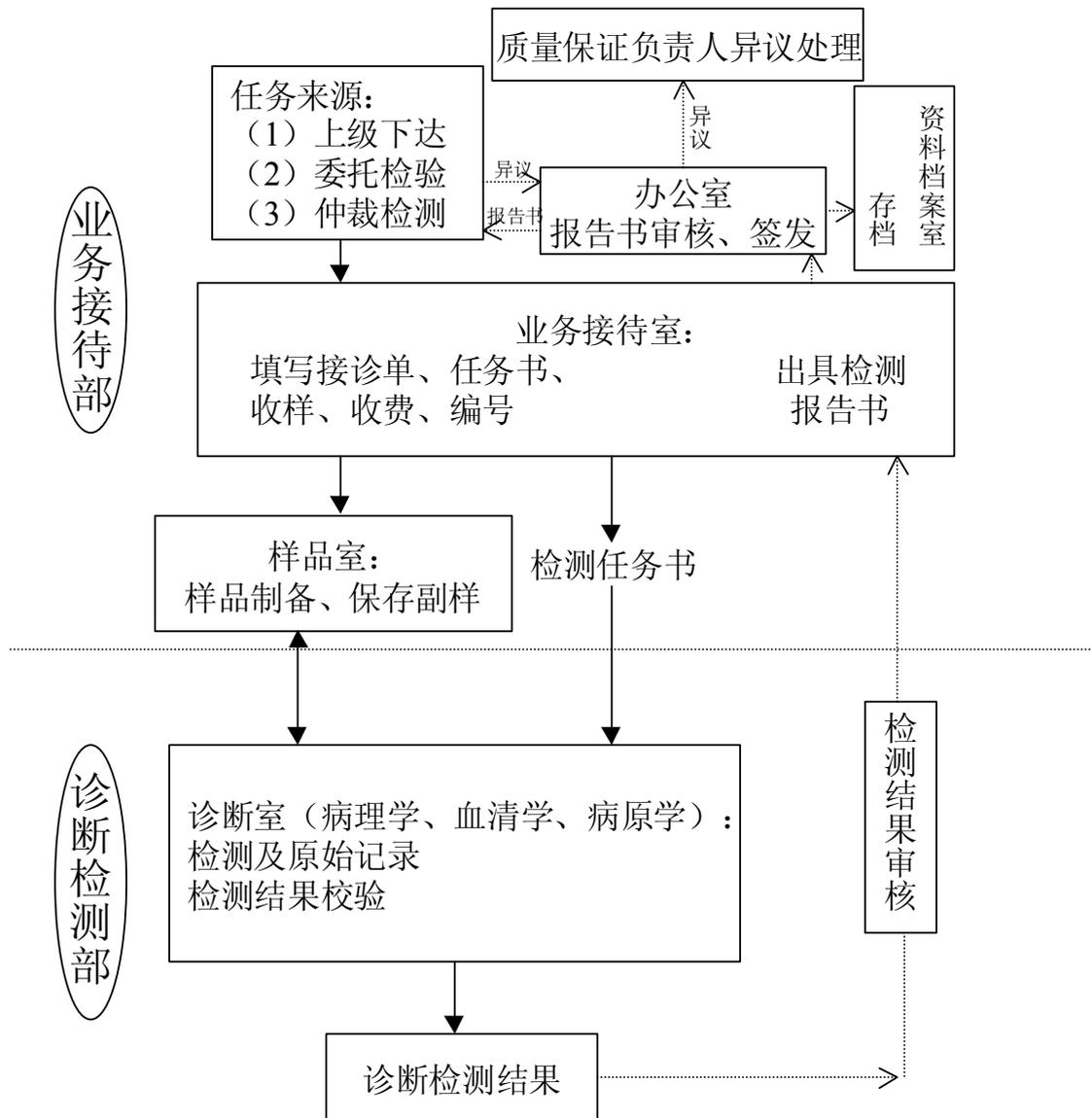
## 兽医实验室工作程序

### 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。

## 2、工作流程图

诊断工作流程图



## 检测工作质量保证制度

为了确保实验室检测工作的质量，保证检测结果的准确性、可靠性，特制定本制度。

1、实验室负责人负责监督检查检测人员的工作质量，所有检测人员对所做的工作负相应的责任。

2、按规定程序对待检样品进行制样。制样、分样过程中不得污染样品或影响样品的检测。

3、实验员必须熟练掌握所使用的各类仪器设备的性能和操作方法、计量知识。每一个检测项目应有能够独立承担检测任务的两名以上实验员共同完成。

4、检测应依据公布的标准化方法，并严格按操作步骤实施检验。对没有技术标准的检测项目，则编制检测实施细则。编制的检测实施细则须广泛征求意见，反复试验后经实验室负责人批准或向上级主管部门备案后方可使用。

5、检测过程中所使用的仪器设备、计量器具必须检定合格。

6、检测所用的化学试剂纯度，实验用水均应符合检验标准的要求，不得降级使用。

7、检测工作开始前和结束后，检测人员要对检测仪器设备的连结方式、工作状态等进行检查，并做好记录。检测过程中，检测人员亦应对仪器设备的运转使用情况、环境条件进行检查，并做好记录。

8、出具的检验数据必须在规定的允许误差范围内；若超出允许误差，必须查找原因，进行复检。

9、对批量样品的测试应设置空白和标准样品对照，并按一定比例做平行分析，以消除系统误差，减少偶然误差。

10、检测结果必须经审核和实验室主任签字后方能出据《检测报告》。

11、实验室每年应对检测的有效性进行监控，确保检测结果的准确性。实验室负责人应定期或不定期对检测人员的工作质量进行抽查，对检测质量实施监控，可采用下列方法：

(1) 定期使用核查标准或有证标准物质进行质量控制。

(2) 参加实验室间比对或能力验证。

(3) 用相同或不同方法进行重复检测。

(4) 对留样进行再检测。

## 剧毒品管理制度

为加强剧毒品管理，防止毒害事故发生，保卫人民生命财产安全，特制定本制度，具体规定如下：

### 1、采购

按工作需要，做出购买剧毒品品种、数量计划，由使用单位负责人批准，并由专人（2人）在指定商店负责购入、登记、建账入库，购买剧毒品需经当地公安部门批准、备案。剧毒品入库时要标记清楚。

### 2、保管

剧毒品应存放于双门、双锁保险柜内，存放剧毒品的保险柜应存于远离人群、干燥通风的房间中，由2人负责保管，实行双人双锁管理，每人携带一把保险柜钥匙。

### 3、领取和使用

剧毒品使用单位应制定严格的剧毒品领用审批制度，使用部门要提交书面申请，由实验室主任签字批准，保管人员根据批准意见，由两人同时开锁，并监督进行称量出库，领取人和保管人应在剧毒品使用登记本中签字。

使用剧毒品时必须2人以上在场，出现问题及时上报。剩余药品立即送交保管人员入库，并履行相关手续。

### 4、剧毒品废弃物处理

剧毒品残液或废弃物应由使用单位指定专门机构会同使用部门经无害化处理后倒入废液缸，集中处理。

5、使用过程中应严格遵守相关制度，并采取必要的安全保护措施，一旦发生险情，应立即排除。

6、定期进行安全检查，及时清理库存，做到账物相符，定期上报有关部门。

7、如保管不当，工作中流失等人为因素，造成环境污染及危及人、畜安全，根据情节轻重，依法追究责任。

## 实验室安全卫生制度

为保证检测工作安全、有效的进行，特制定本制度。本制度适用于实验室所有检测室的安全和卫生管理。

1、实验室负责人是实验室生物安全第一负责人，对实验室安全负责，应当经常进行安全教育，定期开展安全检查，及时消除事故隐患。

2、各检测室负责人对本室安全负责，应当经常检查检测室安全措施落实情况，负责对本室人员进行安全监督和检查。各检测室根据本室的工作情况建立安全程序，明确安全责任人，实行安全清洁卫生轮流值日制度。

3、检测人员工作中应严格遵守安全操作规程。仪器设备应由专人负责管理维护和保养，并定期检查和校正，保证仪器设备安全正常运转。

4、检测室是检测场所，应保持实验台面、地面、各种仪器设备的干净、整洁。室内严禁吸烟、进餐、会客，不得放置任何与工作无关物品；仪器设备应当摆放在固定位置，不得随意挪动或带出实验室。

5、进入检测室必须换鞋并穿上工作服，检测室内用鞋和工作服应当定期清洗消毒、保持整洁，不得在检测室外穿用。

6、每日上班后应检查温箱、冰箱的工作情况，并建档记录温度情况。下班前应当检查水、电、气、门窗，确保安全。发现隐患，及时报告主管领导。

7、检测室内药品试剂应有规范标签，数量适当，陈列整齐；挥发性试剂应按规定在通风橱存放。易燃、易爆、剧毒物品的管理，应严格按《药品试剂管理制度》和《剧毒药品管理制度》的各项要求执行。

8、无菌室、无菌罩、超净工作台应保持清洁，定期做好安全检查和消毒处理。每次使用前用紫外灯照射 30 分钟，使用后 70% 的酒精消毒台面，对实验废弃物进行无害化处理。

9、检测人畜共患病、外来病或新发疫病时，应做好个人防护和工作记录。用过的工作衣、帽须高压灭菌后方可再次使用。

10、常规实验用过的培养基、试剂、试管、平皿、吸管等实验用品须经有效消毒处理后方可丢弃或清洗。

11、应当在存放、操作毒种、菌种、病料的设备上和可能对工作人员健康造成危害的地方张贴危害标记和安全提示语。

12、检测室的电、水、火由使用者负责。使用冷却水之前，应先检查供水系统接头是否安全可靠，使用火源应做到火在人在。停水、停电时应立即关闭水龙头和电源开关。连续使用的仪器要认真检查，确保使用安全。高压气瓶的使用、搬运应严格遵守操作规程。

13、检测室操作需遵守分析和化验安全守则。排放有毒、有害气体的项目，应该在通风橱里操作。废液、废渣等的排放遵守环保要求、妥善处理。

14、各检测室组织培训，熟悉和掌握有关消防器材的使用方法，掌握触电、烧伤、有害气体中毒等急救方法。

15、实验室应配备灭火器，所有实验室人员都应熟知灭火器的使用方法，发现火灾采取必要措施并及时报警。掌握触电、烧伤、有害气体中毒等急救方法。

## 实验室废弃物处理制度

为防止实验室废弃物污染环境和对实验室工作人员的健康造成危害，制定本制度。

1、实验室产生的废气、废水、废渣不得乱排、乱倒。

2、工作人员不得将检验过程中产生的废弃物（包括废液、废渣、检验完毕的样品等）带出实验区。

3、废弃的病料和实验动物应根据其危害性不同而采取销毁、高压消毒、添加消毒剂等措施进行无害化处理。

4、实验过程中采取病料、玻片染色等相关程序所产生的污水，应该经消毒后再排入专用容器或专门排污道内进行无害化处理。

5、盛放过病原微生物的器皿及废弃的培养物应先行消毒，再洗涤。用过的污物和废物必须投入容器集中焚毁，禁止乱放。

6、接触过病原微生物的样品、物品等应严格高温消毒，以防扩散病原。当发生病原微生物污染桌面、地面、衣服和器械等时，应立即采取消毒措施。

7、应确保实验室排污处理系统工作运转正常，处理后排放的污水符合国家标准。

8、剧毒药液或危险药品废弃物应统一回收，并经适当方法破坏后方可倒入废液缸，集中深埋于地下。

## 样品管理制度

为了对待检样品的收发、保管和处理进行有效管理，制定本制度。

1、实验室接收检验样品后认真填写样品登记卡。登记卡上应详细记录样品的来源、时间、地点、畜主、送检单位等情况。保存、发放无误。

2、所有送检样品均应制备副样。副样以原始状态密封保存，并由专人负责保管，启用副样需经相关负责人批准。

3、样品的保存时间：根据样品性质不同，制定不同的样品保存期限。

4、样品的保管须分类、分标、按序、按格有序存放。

5、样品的保管要做到按相应的温度要求存放。

6、样品室要做到器具整洁，定期清理消毒。

7、超过保存（质）期的样品，要及时报批，并由专人进行无害化处理。

8、样品的处理要做好登记。

### 样品登记卡（副样）

送检单位			报告编号	
样品名称	数量		送检日期	
运输方式				
样品状况				
采样人	收样人			
保存条件				
制样日期	制样人			
检测项目				
检验方法				

## 兽医实验室档案管理制度

为加强兽医实验室技术档案、仪器设备、文件资料等文件的管理，特制定本制度。

- 1、认真贯彻执行档案工作的各项法律法规和规章制度，确保档案的完整和安全。
- 2、兽医实验室设有专门的档案室，指定专人负责，按规定做好档案材料的收集、整理、保存、借阅和日常管理工作，对所有档案资料实行统一管理。
- 3、检验工作中的采样单、原始记录、检验报告、统计分析结果等材料，仪器设备管理档案资料，文件图书资料，科学研究和课题等技术资料等均属归档范围。
- 4、建立和执行档案查阅、借阅登记制度，并做好详细查/借阅记录。
- 5、各种档案资料不准作为个人资料擅自处理、私自保存和据为己有，更不准私自外借（传）。
- 6、根据档案的涉及范围进行分类建档，分为检验报告及相关资料类，仪器设备类，文件及会议类，书刊及标准类，科技课题资料类，兽医实验室工作计划、总结及培训类，人事档案资料类等。
- 7、档案材料文件的制作要符合管理规范，统一用纸，用钢笔（或签字笔）书写或打印，字迹要工整清晰，便于长久保存和查阅。
- 8、档案资料由管理人员按时间顺序进行立档和编号。各种档案的标题都应该用文件或资料的全称。
- 9、在检验报告等资料的档案中，采样单和送检单及检验通知单要填写认真，内容详细，不漏项。
- 10、检验员应如实填写原始记录。填写要做到内容详细、项目齐全、格式规范，要有检验人员、校对人员的签字，并经检验室主任审核签字。
- 11、检验工作结束后，工作人员要以原始记录为依据进行汇总并形成实验室检验报告。检验报告要有制表人、审核人和批准人签字。
- 12、仪器设备档案按相关的管理制度进行，其它相关档案的建立、保管及借阅也按档案规范要求进行。
- 13、按照材料归档范围，将办理完毕的全部文字材料收集齐全，分类进行立卷归档。
- 14、归档案卷质量要求：组卷遵循文字材料的形成规律和特点、保持文件之间的有机联系、区别不同价值，案卷题名表达简明确切，案卷封面、卷内文件目录书写规范，案卷装订整齐、牢固、不压字、不漏页，便于保管和利用。
- 15、立卷归档时间：档案立卷按年度归档，应在每年三月底以前将上一年的文件材料立卷归档完毕。
- 16、档案的保管期限分为永久、长期、短期三种。技术档案和科研课题档案资料一般列为长期。其它的档案资料按相关要求进行保管和销毁。

## 药品试剂管理制度

为加强药品试剂管理，保证药品试剂质量满足检测等工作需要，防止易燃、易爆、腐蚀性试剂药品引起安全事故，保护环境，特制定本制度。

1、实验室使用的药品试剂应为国家批准生产和使用的产品。

2、药品试剂登记造册，其内容包括：名称（商品名、化学名、英文名及分子式）、规格、数（重）量、质量等级、有效期、购买/领取人、存放地点、供货单位相关信息等。

3、药品试剂保管条件应符合不同试剂的理化要求

(1) 化学试剂应保存于干燥、避光、阴凉处并远离火源。存放挥发性药品试剂的房间应有通风条件。

(2) 易燃易爆药品试剂应存放于铁皮柜等不易燃烧的专用柜中，禁止存放于木质柜中。

(3) 氧化剂、腐蚀性药品须分别存放，并存放于抗腐蚀性柜中。

(4) 生物制剂按其特定要求存放。

(5) 危险物品必须贴有完整清晰的警示标志，严防误用。

(6) 剧毒药品按《剧毒药品管理制度》有关规定进行保管。

(7) 存放药品试剂的房间应配备必要的防护用品及灭火器。

4、化学试剂的领取、使用及管理

(1) 药品试剂须由专人保管，易燃、易爆、腐蚀性、放射性药（物）及剧毒药品等危险物品，必须由专人专库专账保管。

(2) 剧毒药品按《剧毒药品管理制度》进行管理。

(3) 应制定严格的易燃、易爆、腐蚀性药品试剂、放射性药（物）等危险性物品领用程序，保证安全使用。

(4) 危险物品的领取、使用应进行登记，领取后未用或用后剩余的未经污染的危险物品应注明数量，及时退回库房，使用后的有毒残液应进行无害化处理。

(5) 保管人员要定期核查，对过期、潮解、变质的药品试剂应及时清理并进行无害化处理。

(6) 对贴有毒有害标记的化学和生物试剂，在搬运和使用过程中要配备防护用品，做好个人防护。



## 仪器设备使用管理制度

为加强对仪器设备的管理，降低仪器设备成本和使用费用，保证仪器设备的正常运行，特制定本制度。

- 1、本制度适用于兽医实验室仪器设备的管理。
- 2、仪器设备的购置、验收、调试、使用、管理、维修、降级和报废处理等应由兽医实验室和各检测室统一协调管理，指定专人负责，定期维护和保养。
- 3、实验室根据检验职能购买和匹配仪器设备，建立健全验收制度。
- 4、兽医实验室应建立仪器设备档案，填写《仪器设备保养登记卡》，其内容包括：设备名称、制造商、型号、产地、售价、购买日期、保修截止日期。一物一卡，长期保存。
- 5、每年或定期进行仪器设备指定校验或自检，校证书或自检证书放入仪器档案。
- 6、仪器设备的使用和保管要实行“三定制度”，即定位（放置位置）、定人（管理人员）、定规（操作规程），操作规程应放置仪器上方或显著位置。
- 7、使用、保管有关仪器设备的人员，必须熟练掌握有关仪器的操作程序和保养要求，按照规定的操作程序进行操作。
- 8、设立仪器设备的使用登记簿。每次用毕，使用人员须登记仪器使用情况。
- 9、各种仪器设备须定期维护、校正，不能超负荷运行，有封印或标记的不可调部分不得擅自调动。
- 10、仪器设备出现故障时应立即组织维修，并填写《设备维修单》，所有维修情况均应有记录。凡属影响仪器性能的故障，在修复后应重新校正或检定仪器。
- 11、凡精度达不到要求的仪器设备应降级使用，并有降级使用的相关手续，放入仪器设备档案中备查。
- 12、由于各种事故而无法使用的仪器设备或因年久失修而无维修价值的仪器设备要报废，由实验室主任和相关检测室负责人报请上级主管部门，并有相关的报废手续，放入仪器设备档案，报废的仪器设备档案按档案管理制度执行。

# 动物防疫档案管理规范

## 1 范围

为规范无规定动物疫病动物防疫档案管理，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，结合无规定动物疫病建设要求，制定本规范。

本规范适用于各级动物防疫监督机构、乡镇动物防疫组织动物防疫档案的归档、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

指动物防疫活动中形成的全部档案。包括项目建设、免疫、监测、疫情报告（报表）、疫情处理、实验室检验、检疫、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 动物防疫档案的管理单位

4.1 动物防疫档案应是以县级以上人民政府动物防疫监督机构和乡镇动物防疫组织为基本管理单位，所形成的动物防疫档案统一由县级以上动物防疫监督机构和乡镇防疫组织存档管理。

4.2 省、市、县动物防疫监督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）防疫组织应配备专用的档案橱柜。

4.3 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。县级以上档案管理人员应具有档案管理的初级以上技术职称。

## 5 动物防疫档案的形成和归档

### 5.1 立卷

动物防疫监督机构业务部门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。

#### 5.1.1 立卷资料要求

5.1.1.1 保持成套性和完整性。

5.1.1.2 准确的反映本单位各项动物防疫活动的真实内容。

5.1.1.3 符合文件格式和书写标准。

5.1.1.4 经有关负责人签名或行文机关盖章。

5.1.1.5 资料的制成材料质量符合 DA/T22-2000 要求。

### 5.2 组卷

5.2.1 按事件组卷。如疫苗台帐、免疫登记、疫情报表、疫情处理记录、疫病监测资料、检验记录、检疫记录、检疫证明存根、各种动物防疫监督记录、案卷、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。

5.2.2 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。

5.2.3 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。

### 5.3 归档

### 5.3.1 归档时间

5.3.1.1 文书档案、声像档案、实物档案在下一年第一季度归档。

5.3.1.2 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。

### 5.3.2 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。

## 6 档案管理

### 6.1 分类编号

档案按年度、事件、保管期限分类编号。

### 6.2 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。

### 6.3 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。

### 6.4 销毁

6.4.1 根据《文书档案保管期限表》确定其保管期限。

6.4.2 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。

### 6.5 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。

### 6.6 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。

### 6.7 借阅

6.7.1 借阅档案应填写借阅登记，经批准方可借阅。

6.7.2 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。

6.7.3 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。

## 7 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制度

为及时掌握无疫区畜牧业基本情况，制定本制度。

### 1 报告主体和方式

畜牧业基本情况实行书面逐级报告制度。乡镇人民政府报县级人民政府，县级人民政府报市级人民政府，市级人民政府报省级人民政府，省级人民政府抄报农业部。

### 2 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日前县级报市级，15日前市级报省级，20日前省级报农业部兽医局。

### 3 报告内容

3.1 各种动物饲养量、存栏量、出栏量等，详见附表1。

3.2 规模饲养场情况统计，详见附表2、附表3。

3.3 口蹄疫、猪瘟、高致病性禽流感、新城疫免疫情况统计，详见附表4。

3.4 口蹄疫、猪瘟、高致病性禽流感、新城疫监测情况统计，详见附表5。

3.5 畜禽及其产品流通与贸易情况统计，详见附表6、附表7。

附表 1

畜禽生产情况统计表

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	种 鸡				
	蛋 鸡				
	肉 鸡				
	合 计				
鸭	种 鸭				
	蛋 鸭				
	肉 鸭				
	合 计				
其它					





附表 4

口蹄疫、猪瘟、高致病性禽流感、新城疫免疫情况统计表

单位：

填表日期：

疫病种类	畜种	存栏数	应免疫数	免疫数	免疫密度
口蹄疫	猪				
	牛				
	羊				
	其他				
猪 瘟	猪				
高致病性 禽流感	鸡				
	鸭				
	鹅				
	其他				
新城疫	鸡				
	其他				

附表 5

口蹄疫、猪瘟、高致病性禽流感、新城疫监测情况统计表

单位：

填表日期：

疫病种类	畜禽种类	样品种类	监测方法	监测群数	样品数量	阳性数	阳性率	免疫情况	备注
口蹄疫	牛								
	羊								
	猪								
	其他								
猪瘟	猪								
	其他								
高致病性 禽流感	鸡								
	鸭								
	鹅								
	其他								
新城疫	鸡								
	其他								



附表 7

动物产品流通贸易情况统计表

单位：吨

填表日期：

目 单位	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在内。

## 第四部分 预防与监测

- 1 口蹄疫免疫技术规范
- 2 高致病性禽流感免疫技术规范
- 3 鸡新城疫免疫技术规范
- 4 猪瘟免疫技术规范
- 5 样品采集、保存及运输技术规范
- 6 口蹄疫诊断技术规范
- 7 高致病性禽流感诊断技术规范
- 8 鸡新城疫诊断技术规范
- 9 猪瘟诊断技术规范
- 10 口蹄疫监测技术规范
- 11 高致病性禽流感监测技术规范
- 12 鸡新城疫监测技术规范
- 13 猪瘟监测技术规范

# 口蹄疫免疫技术规范

## 1 范围

本规范规定了牲畜口蹄疫灭活疫苗的运输、贮存、使用、免疫程序和免疫效果评价的技术要求。

本规范适用于牲畜口蹄疫的免疫接种。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本规范。

### 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 选择与流行毒株相同血清型的口蹄疫疫苗用于牲畜的预防接种。

3.2 根据饲养牲畜的数量，准备足够完成一次免疫接种所需要的指定厂家生产的同一批次的疫苗。

### 3.3 疫苗的运输和贮存

3.3.1 疫苗应包装良好，2~8℃冷藏运输，冬季运输要注意防冻。

3.3.2 疫苗应在2~8℃避光保存。

3.3.3 疫苗的运输和保存应有完善的管理制度。

3.3.4 疫苗的入库和发放必须做好记录。

3.3.5 每批次疫苗应留样。

## 4 疫苗使用要求

### 4.1 牲畜要求

待接种的牲畜经临床观察应未见异常。凡有病、体弱的牲畜不应接种。患病牲畜待康复后再按规定接种。怀孕牲畜、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

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、发霉的疫苗，不得使用。

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

### 4.3 接种器械

4.3.1 仔猪使用12~16号（2.5cm）针头，育成猪和成年猪使用16~18号（4.0cm）针头，牛使用16~20号（4.0cm）针头，绵羊和山羊使用12~18号（2.5~4.0cm）。

4.3.2 注射器和针头应洁净无菌。

### 4.4 接种安全

4.4.1 首次使用疫苗的地区，建议应选择一定数量牲畜进行小范围试用，观察7~10d，临床无不良反应后，方可扩大接种面。

4.4.2 注射疫苗人员应携带肾上腺素，用于疫苗过敏反应时急救。

4.4.3 发生疫情时，免疫接种应先从安全区域到受威胁区、最后到疫区。

### 4.5 接种操作

4.5.1 注射部位剪毛后用碘酊或75%酒精棉擦拭消毒，再用挤干的酒精棉擦干消毒部位。

4.5.2 用于接种的疫苗从冰箱取出后，应先预温至室温再进行注射，瓶塞上应固定一只消毒过的针头，其上覆盖酒精棉球。

4.5.3 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。

- 4.5.4 疫苗要注入深层肌肉内，牛、羊注射部位在颈侧中部上 1/3 处；猪选择耳根后，注射时避开耳道。注射时针头与皮肤表面呈 45 度，避免疫苗的流出。
- 4.5.5 一支注射器只能用于一种疫苗的接种，接种时针头要逐头/只更换。
- 4.5.6 注射剂量按疫苗使用说明书规定的剂量。
- 4.5.7 疫苗在免疫过程中暂停接种时，应低温保存并避免日光直射。
- 4.5.8 每瓶疫苗启用后，瓶内剩余疫苗用蜡封闭针孔，于 2~8℃ 贮存，超过 24h 不可再用。

## 5 推荐免疫程序

### 5.1 猪的免疫程序

#### 5.1.1 规模化猪场免疫程序

种公猪：每年接种 2 次。

怀孕母猪：分娩前 1 个月接种。

仔猪及育成猪：非免疫母猪所产仔猪 20 日龄首免，30 日龄后加强免疫一次，100 日龄再接种一次（外调猪可适当顺延）；免疫母猪所产仔猪 25-35 日龄首免，60 日龄二免。

#### 5.1.2 散养猪只免疫程序

种公猪：每年接种 2 次。

母猪：每年接种 2 次。

仔猪及育成猪：仔猪断奶时首免，30 日龄后加强免疫一次，100 日龄再接种一次。

外运猪：出场前 30 天接种。

### 5.2 牛、羊的免疫程序

母牛：分娩前 2 个月接种一次。

犊牛：4 月龄首免（30 天后加强免疫一次），6 个月后二免，以后每 6 个月免疫一次。

母羊：分娩前 4 周接种一次。

羔羊：4 月龄首免（30 天后加强免疫一次），6 个月后二免，以后每 6 个月免疫一次。

母羊的秋季免疫应注意选择在配种前 4 周进行。

## 6 免疫效果监测

- 6.1 免疫接种后，应进行免疫抗体水平监测，掌握免疫动态，及时加强免疫。
- 6.2 各级动物防疫监督机构应对牲畜免疫效果进行监测，并指导免疫工作。
- 6.3 免疫效果监测应建立记录档案。

# 高致病性禽流感免疫技术规范

## 1 范围

本规范规定了高致病性禽流感油乳剂灭活疫苗运输、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 H5 或其他亚型高致病性禽流感的免疫。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本规范。

### 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，每只禽一次接种的疫苗使用量。

### 2.3 效力

使用生物制品所产生的特异的免疫保护能力。

## 3 疫苗选用和贮运

3.1 根据流行的禽流感病毒血凝素（HA）亚型，选择相同亚型的禽流感疫苗用于家禽的预防接种。

3.2 根据饲养家禽的数量，准备足够完成一次免疫接种所需要的指定厂家生产的同一批次的疫苗。

### 3.3 疫苗的运输和贮存

3.3.1 疫苗应包装良好，2~8℃冷藏运输，冬季运输要注意防冻。

3.3.2 疫苗应在 2~8℃避光保存。

3.3.3 疫苗的运输和保存应有完善的管理制度。

3.3.4 疫苗的入库和发放必须做好记录。

3.3.5 每批次疫苗应留样。

## 4 疫苗使用要求

### 4.1 家禽要求

待接种的家禽必须临床表现健康。

### 4.2 疫苗检查

疫苗使用前要仔细核对疫苗的抗原亚型，详细记录生产厂家、生产批号和失效日期。出现包装破损、破乳分层、颜色改变、异物、发霉等现象的疫苗不得使用。

### 4.3 疫苗预温

疫苗使用前应提至室温，使用时应充分摇匀。疫苗启封后，应于 24h 内用完。

### 4.4 接种器械

注射器具应无菌，针头以 9~12 号为宜，使用过程中应注意消毒，勤换针头。

### 4.5 接种部位

颈部背侧下三分之一处进行皮下注射，针头向下与皮肤呈 45 度角，确保注入颈部皮下；种禽、产蛋禽可选用胸部肌肉注射。

### 4.6 疫苗接种过程的质量监控

4.6.1 专人负责监督接种过程，确保每只家禽都被接种，发现漏种的家禽要及时补种。

4.6.2 做好免疫记录，记录内容包括：畜主、家禽的品种、数量、日龄、疫苗生产厂家、类型、批次，接种的时间和剂量等。

## 5 推荐的免疫程序

### 5.1 生产蛋鸡和种鸡

雏鸡在 2 周龄首次免疫，接种剂量 0.3mL；5 周龄时加强免疫，接种剂量 0.5mL；120 日龄左右再加强免疫，接种剂量 0.5mL；以后间隔 5 个月加强免疫一次，接种剂量 0.5mL；种鸡 24 周龄加强免疫一次，接种剂量 0.5mL。

### 5.2 肉仔鸡

雏鸡在 5~10 日龄免疫，接种剂量 0.3mL。

### 5.3 100 日龄左右出栏的肉鸡

雏鸡在 2 周龄首次免疫，接种剂量为 0.3mL；5 周龄时加强免疫，接种剂量 0.5mL。

#### 5.4 鸭和鹅

在 1~2 周龄首免，接种剂量为 0.5mL；4~5 周龄时加强免疫，接种剂量 1.0mL；以后间隔 4 个月加强免疫一次，鸭接种剂量 1.0mL，鹅接种剂量 1.5mL。

#### 5.5 紧急免疫接种

发生疫情时，免疫接种应先从安全区域到受威胁区、最后到疫区。

### 6 免疫效果监测

6.1 在疫苗免疫后 4 周，每群禽抽样 30 只，静脉采血，分离血清，按 GB/T 18936 血凝抑制试验（HI）检测禽血清 HI 的抗体水平。70%被免疫鸡只的 HI 抗体水平大于或者等于  $4\log^2$  时，判定为合格。

6.2 各级动物防疫监督机构应对家禽免疫效果进行监测，并指导免疫工作。

6.3 免疫效果监测应建立记录档案。

# 新城疫免疫技术规范

## 1 范围

本规范规定了新城疫疫苗运输、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 II 系、IV 系等新城疫活疫苗、新城疫低毒力灭活疫苗的免疫。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本规范。

### 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，每羽一次接种的疫苗使用量。

### 2.3 效力

使用生物制品所产生的特异免疫保护能力。

## 3 疫苗的选用和贮运

3.1 根据预防新城疫需要，选择低毒力灭活疫苗和/或 ICPI $\leq$ 0.4 的弱毒疫苗用于禽的预防接种。

### 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 疫苗的入库和发放必须做好记录。

3.2.3 每批次疫苗应留样。

## 4 疫苗使用要求

### 4.1 对接种禽的要求

待接种的禽必须临床表现健康。

### 4.2 疫苗检查

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、有效期、生产厂家等。

4.2.2 瓶盖松动、疫苗瓶裂损、失真空、色泽与说明不相符、瓶内有异物、发霉或超过有效期等疫苗不得使用。

### 4.3 疫苗稀释

活疫苗按瓶签注明的羽份，用生理盐水稀释，必须在 2h 内用完。

### 4.4 接种方法要求

4.4.1 冻干疫苗可采用滴鼻、点眼、喷雾或饮水免疫，其稀释液及免疫剂量按疫苗使用说明进行。

油乳剂灭活疫苗接种途径和剂量按疫苗使用说明进行。

4.4.2 滴管、针头等接种用具，使用前须严格消毒；接种后剩余的疫苗、空瓶、稀释液及敷料等应做消毒或无害化处理。

4.4.3 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。

4.4.4 油乳剂灭活疫苗使用前先升至室温并充分摇匀，启封后当日用完。

### 4.5 疫苗接种过程的质量监控

4.5.1 专人负责监督接种过程，确保每只家禽按要求接种，漏免的要及时补免。

4.5.2 做好记录，内容包括：畜主，家禽的品种、数量、日龄，疫苗生产厂家、批次，接种方法、剂量和时间等。

## 5 推荐的免疫程序

5.1 种鸡 7~10 日龄弱毒苗滴鼻、点眼，同时用油乳剂灭活苗免疫一次；6~7 周龄弱毒苗喷雾或饮水免疫；120 日龄左右油乳剂灭活苗免疫；280~300 日龄油乳剂灭活苗或弱毒疫苗再免疫一次。

5.2 商品蛋鸡 7~10 日龄弱毒苗滴鼻、点眼，同时用油乳剂灭活苗免疫一次；6~7 周龄弱毒苗喷雾或饮水免疫，同时用油乳剂灭活苗免疫；120 日龄左右油乳剂灭活苗免疫。

5.3 商品肉鸡 7~10 日龄弱毒苗滴鼻、点眼，同时用油乳剂灭活苗免疫；18~20 日龄弱毒苗饮水免疫。

## **6 免疫效果监测**

6.1 免疫接种后 2~3 周，每群鸡抽样 30 只按新城疫诊断技术规范中的血凝抑制（HI）进行抗体监测，70%被免疫鸡只的抗体水平大于等于  $4\log^2$  时，判定为免疫合格。

6.2 各级动物防疫监督机构应对鸡免疫效果进行监测，并指导免疫工作。

6.3 免疫效果监测应建立记录档案。

# 猪瘟免疫技术规范

## 1 范围

本规范规定了猪瘟弱毒疫苗的运输、贮存、使用、免疫程序和免疫效果评价的技术要求。  
本规范适用于猪瘟弱毒疫苗的免疫。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本规范。

### 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，每头猪一次接种的疫苗量。

### 2.3 效力

使用生物制品所产生的特异的免疫保护能力。

## 3 疫苗的选择和贮运

3.1 选择猪瘟弱毒疫苗用于预防接种。

3.2 疫苗的运输和贮存

3.2.1 疫苗应采用 8℃ 以下冷藏条件运输。

3.2.2 疫苗应按要求保存。

3.2.3 做好疫苗的入库和发放记录。

3.2.4 每批次疫苗应留样。

## 4 疫苗使用要求

4.1 对猪的要求

4.1.1 待接种的猪临床观察健康，凡有病、体弱的猪不宜接种，患病猪待康复后再按规定接种，怀孕猪的免疫应严格按说明书要求进行。

4.2 疫苗检查

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、有效期、生产厂家等。

4.2.2 瓶盖松动、疫苗瓶裂损、失真空、超过有效期、疫苗色泽与说明不相符，或瓶内有异物等疫苗不能使用。

4.3 接种器具要求

4.3.1 建议使用 9~12 号针头。

4.3.2 注射器和针头应洁净无菌。

4.4 接种安全

4.4.1 发生疫情时，免疫接种应先从安全区域到受威胁区、最后到疫区。

4.4.2 首次使用本疫苗的地区，建议应选择一定数量家畜进行小范围试用，观察 7~10d，临床无不良反应后，方可扩大接种面。

4.5 接种操作

4.5.1 注射部位用 75% 酒精棉或碘酊擦拭消毒，再用挤干的酒精棉擦干消毒部位。

4.5.2 瓶塞上应固定一只消毒过的针头，其上面覆盖酒精棉球。

4.5.3 选择在耳根后肌肉注射，注射时要保持针头指向后方，以保证避开耳道，针头与皮肤表面呈 45 度角，避免疫苗流出。吸出的疫苗液不可回注于瓶内，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、碘酊棉放置入专用瓶内，与疫苗瓶一同进行无害化处理。

4.5.4 疫苗稀释后，应放在冷藏容器内，严禁冻结。如环境温度在 15℃ 以下，应 6h 内用完。如环境温度在 15~27℃，应 3h 内用完。

4.5.5 疫苗使用的稀释液及注射剂量按疫苗使用说明进行。

4.5.6 一支注射器在使用中只能用于一种疫苗的接种，接种时针头要逐头更换。

## 5 推荐免疫程序

仔猪 20~30 日龄接种猪瘟疫苗，60 日龄左右再接种 1 次；或采取超前免疫，即出生时立即接种 1 次疫苗，2h 后再喂初乳，35 日龄左右接种第 2 次，70 日龄左右接种第 3 次；种

母猪配种前 10~15d 接种 1 次，种公猪春秋各接种 1 次疫苗。

## **6 免疫效果监测**

6.1 免疫接种后，按猪瘟诊断技术规范的规定进行免疫抗体监测，当抗体保护水平低下时，应当进行疫苗接种。

6.2 各级动物防疫监督机构应对猪免疫效果进行监测，并指导免疫工作。

6.3 免疫效果监测应建立记录档案。

# 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、保存和运送的技术要求。

本规范适用于动物疫病诊断、监测样品的采集、保存和运送。

## 2 样品采集所遵循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 凡发现怀疑炭疽等不宜解剖的患畜，严禁剖检。

2.1.2 采取病料的种类，根据不同的疫病或检验目的，采其相应的血样、活体组织、脏器、肠内容物、分泌物、排泄物或其它材料；进行流行病学调查、抗体检测、动物群体健康评估或环境卫生检测时，样品的数量应满足统计学的要求。在无法确认病因时，应系统采集病料。

2.1.3 内脏病料的采取，如患畜已死亡，应尽快采集，最迟不超过 6h。

2.1.4 采样时应考虑动物福利，并作好人身防护，严防人畜共患病感染。

### 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 动物检疫器械箱，保温箱或保温瓶，解剖刀，剪刀，镊子，酒精灯，酒精棉，碘酒棉，注射器及针头等。

2.2.2.2 样品容器（小瓶、平皿、离心管及易封口样品袋、塑料包装袋等）。

2.2.2.3 试管架，铝盒，瓶塞，无菌棉拭子，胶布，封口膜，封条，冰袋等。

#### 2.2.2.4 记录和防护材料

不干胶标签、签字笔、圆珠笔、记号笔、采样单、记录本等；口罩、一次性手套、乳胶手套、防护服、防护帽、胶靴等。

2.2.2.5 采样刀剪等器具和样品容器须无菌。

#### 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，将血液滴到或抽入试管内。禽类等少量血清样品的采集，可用塑料管采集。

#### 3.1.3 血样种类

##### 3.1.3.1 全血样品

进行血液学分析，细菌、病毒或原虫培养，通常用全血样品。样品中加抗凝剂。抗凝剂可用 0.1%肝素、阿氏液（阿氏液为红血球保存液，使用时 1 份血液加 2 份阿氏液）或 2%柠檬酸钠。采血时应直接将血液滴入抗凝剂中，并立即连续、缓慢摇动，充分混合。也可将血液放入装有玻璃珠的灭菌瓶内，震荡，脱纤维蛋白抗凝。

##### 3.1.3.2 血清样品

用作血清样品的血液不加抗凝剂，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。在不影响检测结果的原则下，可根据需要加入适宜的防腐剂。做病毒中和试验的血清避免使用化学防腐剂。如需长时间保存，则将血清置-20℃以下保存，但要尽量避免反复冻融。

##### 3.1.3.3 血浆样品

采血试管内先加上抗凝剂，加入血液后，使血液与抗凝剂充分混合，然后静止，待细胞

下沉后，上层即为血浆。

## 3.2 一般组织

### 3.2.1 采样方法

用常规解剖器械剥离样本动物的皮肤，体腔用消毒的器械剥开，所需病料按无菌操作方法采集病料。剖开腹腔时，注意不要损坏肠道。

进行细菌、病毒、原虫等病原分离所用组织块的采集，可用一套新消毒的器械切取所需器官的组织块，每个组织块应单独放在已消毒的容器内。

### 3.2.2 组织样品种类

#### 4.2.2.1 病原分离样品的采集

用于微生物学检验的病料应新鲜，尽可能减少污染。用于细菌分离样品的采集，首先以烧红的刀片烫烙脏器表面，在烫烙部位刺一孔，用灭菌后的铂金耳伸入孔内，取少量组织或液体，作涂片镜检或划线接种于适宜的培养基上。

#### 3.2.2.2 组织病理学检查样品的采集

采集包括病灶及临近正常组织的组织块，立即放入 10 倍于组织块的 10%福尔马林溶液中固定。组织块厚度不超过 0.5cm，切成 1~2cm<sup>2</sup>（检查狂犬病则需要较大的组织块）。组织块切忌挤压、刮摸和水洗。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

选择病变最明显的肠道部分，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中送检。有时也采取病变组织碎屑，置载玻片上，供显微镜检查。

## 3.6 皮肤

病料直接采自病变部位，如病变皮肤的碎屑、未破裂水泡的水泡液、水泡皮等。

## 3.7 胎儿

将流产后的整个胎儿，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。

## 3.8 家畜及家禽

将整个尸体包入不透水塑料薄膜、或油布中，装入容器内，送往实验室。

## 3.9 骨

需要完整的骨标本时，应将附着的肌肉和韧带等全部除去，表面撒上食盐，然后包入浸过 5%石炭酸溶液的纱布中，装入不漏水的容器中送往实验室。

### 3.10 脑、脊髓

#### 3.10.1 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。

#### 3.10.2 脑、脊髓液的采集

##### 3.10.2.1 采样前的准备

采样使用特制的专用穿刺针，或用长的封闭针头（将针头稍磨钝，并配以合适的针芯）；采样前，术部及用具均按常规消毒。

##### 3.10.2.2 采样方法

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。

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。

##### 3.10.2.3 采样数量

大型动物颈部穿刺一次采集量 35~70mL，腰椎穿刺一次采集量 15~30mL。

### 3.11 液体样本

#### 3.11.1 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。

供显微镜检查的脓、血液及粘液抹片的制备方法：将材料置玻片上，用一灭菌玻棒均匀涂抹或另用一玻片推抹。组织块、致密结节及脓汁等亦可放在两张玻片中间，然后沿水平面向两端推移。用组织块作触片时，持小镊将组织块的游离面在玻片上轻轻涂抹即可。

#### 3.11.2 乳汁

用消毒药水洗净乳房（取乳者的手亦应事先消毒），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。

#### 3.11.3 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。

#### 3.11.4 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 环境

为监测环境卫生或调查疾病，可从废弃物、通风管、下水道、孵化场或屠宰场采集有代表性样品。

## 4 送检样品的记录和包装

### 4.1 采样单及标签等的填写

采样单应用钢笔或签字笔逐项填写（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。样品信息至少应包括以下内容：

- (1) 畜主姓名和畜禽场地址；
- (2) 畜禽（农）场里饲养动物品种及数量；
- (3) 被感染动物或易感动物种类；
- (4) 首发病例和继发病例的日期及造成的损失；
- (5) 感染动物在畜禽群中的分布情况；
- (6) 死亡动物数、出现临床症状的动物数量及年龄；
- (7) 临床症状及其持续时间，包括口腔、眼睛和腿部情况，产奶或产蛋记录，死亡情况和时间，免疫和用药情况等；

- (8) 饲养类型和标准, 包括饲料种类;
- (9) 送检样品清单和说明, 包括病料种类、保存方法等;
- (10) 动物治疗史;
- (11) 要求做何种试验;
- (12) 送检者的姓名、地址、邮编和电话;
- (14) 送检日期;
- (15) 采样人和被采样单位签章。

#### 4.2 包装要求

4.2.1 每个组织样品应仔细分别包装, 在样品袋或平皿外贴上标签, 标签注明样品名、样品编号、采样日期等。再将各个样品放到塑料包装袋中。

4.2.2 拭子样品小塑料离心管应放在特定塑料盒内。

4.2.3 血清样品装于小瓶时应用铝盒盛放, 盒内加填塞物避免小瓶晃动, 若装于小塑料离心管中, 则应置于塑料盒内。

4.2.4 包装袋外、塑料盒及铝盒应贴封条, 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。一般使用保温箱或保温瓶, 保温容器外贴封条, 封条有贴封人(单位)签字(盖章), 并注明贴封日期。

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 各种样品到达实验室后, 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 阿氏液 (Alsevers)**

葡萄糖	2.05g
柠檬酸钠 ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.80g
柠檬酸	0.055g
氯化钠	0.42g

加蒸馏水至 100mL,溶解后调 pH 至 6.1 后分装, 70kPa 15min 灭菌, 冷却后 4℃冰箱中保存备用。

**A.2 30%甘油盐水缓冲液**

甘油	30mL
氯化钠 (NaCl)	4.2g
磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.0g
磷酸氢二钾 ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	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.3 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.4 pH7.4 的等渗磷酸盐缓冲液 (PBS)**

氯化钠 (NaCl)	8.0g
磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.2g
磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	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.5 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 (2 000IU/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, 采粪便时在西林瓶中加 PBS 1.0~1.5mL, 采样前冷冻保存。

# 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(牛、羊或猪)未破裂或刚破裂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淋巴结、脊髓、肌肉等组织样品作为检测材料。

##### 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），剪取病畜的新鲜水泡皮 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;也可采用无菌器具采集水泡液,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,可采集淋巴结、脊髓、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、羊食道-咽分泌物(O-P 液)样品

##### 2.1.2.1 样品采集

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。

##### 2.1.2.2 样品的保存

将采集到的 8~10mLO-P 液倒入灭菌容器中,容器中应事先加有 8~10mL 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,内装适当冷冻剂和防震材料。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

牛、羊、猪在临床上具有诊断意义的特异性症状为口、鼻、蹄、乳头等部位出现水泡。

#### 3.1.2 病原学检测指标

采集的新鲜水泡皮、水泡液或其它组织样品,经双抗体夹心酶联免疫吸附试验(见 4.1)、反向间接血凝试验(见 4.2)、反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) (见 4.3)、乳鼠中和试验(见 4.4)或微量补体结合试验(见 4.5)进行病原检测。检测结果为阴性时,需将样品接种 3~5 日龄乳鼠或细胞盲传 2 代进行病毒增殖,用乳鼠组织或细胞培养物再进行上述检测。

O-P 液可直接用反转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 方法进行检测,或经乳鼠或敏感细胞增殖后用上述方法进行病原检测。

#### 3.1.3 血清检测

将采集的血清样品,用非结构蛋白抗体酶联免疫吸附试验(见 4.6)检测野毒感染抗体,或用液相阻断-酶联免疫吸附试验(见 4.7)、病毒感染相关抗原 (VIA) 检测试验(见 4.8)进行抗体检测。

## 3.2 结果判定

### 3.2.1 疑似口蹄疫

符合临床典型症状指标。

### 3.2.2 确诊口蹄疫

3.2.2.1 经实验室病原检测呈阳性的；

3.2.2.2 非结构蛋白抗体阳性,或未免疫畜群病毒抗体阳性。

## 4 实验室诊断方法

### 4.1 双抗体夹心酶联免疫吸附试验

#### 4.1.1 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。样品量不足的，可将几个样品合并成一个样品检测。

#### 4.1.2 主要试剂

##### 4.1.2.1 抗体

包被抗体：兔抗 FMDV-“O”、“A”、“Asia-I”型 146S 血清；兔抗 SVDV-160S 血清

检测抗体：豚鼠抗 FMDV-“O”、“A”、“Asia-I”型 146S 血清；豚鼠抗 SVDV-160S 血清。

##### 4.1.2.2 酶结合物

兔抗豚鼠 Ig 抗体(Ig)-辣根过氧化物酶(HRP)结合物。

##### 4.1.2.3 对照抗原

灭活的 FMDV-“O”“A”“Asia-I”各型及 SVDV 细胞病毒液。

##### 4.1.2.4 底物溶液 (底物/显色剂)

3%过氧化氢/3.3mmol/L 邻苯二胺(OPD)。

##### 4.1.2.5 终止液

1.25mol/L 硫酸。

##### 4.1.2.6 缓冲液

包被缓冲液 0.05mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>, pH9.6

稀释液 A 0.01mol/L PBS - 0.05% (v/v) Tween-20, pH7.2~7.4

稀释液 B 5%脱脂奶粉 (w/v) - 稀释液 A

洗涤缓冲液 0.002mol/L PBS - 0.01% (v/v) Tween-20

#### 4.1.3 主要器材设备

##### 4.1.3.1 固相

96 孔平底聚苯乙烯 ELISA 专用板。

##### 4.1.3.2 移液器、吸头及贮液槽

微量可调移液器一套，可调范围 0.5~5000μL(5~6 支)；多 (4、8、12) 孔道微量可调移液器 (25~250μL)；微量可调连续加样移液器 (10~100μL)；与各移液器匹配的各种吸头，及配套使用的贮液槽。

##### 4.1.3.3 振荡器

与 96 孔微量板配套的旋转振荡器。

##### 4.1.3.4 酶标仪,492nm 波长滤光片。

##### 4.1.3.5 洗板机或洗涤瓶,吸水纸巾。

##### 4.1.3.6 37℃恒温温室或温箱。

#### 4.1.4 实验方法

##### 4.1.4.1 包被固相

FMDV 各血清型及 SVDV 兔抗血清分别用包被缓冲液稀释至工作浓度，然后按表 1< I > 所示布局加入微量板各行,每孔 50μL,加盖后 37℃振荡 2h,或室温 (20℃左右) 振荡 30min,然后置湿盒中 4℃过夜 (可以保存 1 周左右)。

表 1 定型 ELISA 微量板包被血清布局< I >、对照和被检样品布局< II >

< I >	< II >	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	FMDV “O”	C++	C++	C+	C+	C-	C-	S1	1	S3	3	S5	5
B	“A”	C++	C++	C+	C+	C-	C-	S1	1	S3	3	S5	5
C	“Asia-I”	C++	C++	C+	C+	C-	C-	S1	1	S3	3	S5	5
D	SVDV	C++	C++	C+	C+	C-	C-	S1	1	S3	3	S5	5
E	FMDV “O”	C++	C++	C+	C+	C-	C-	S2	2	S4	4	S6	6
F	“A”	C++	C++	C+	C+	C-	C-	S2	2	S4	4	S6	6
G	“Asia-I”	C++	C++	C+	C+	C-	C-	S2	2	S4	4	S6	6
H	SVDV	C++	C++	C+	C+	C-	C-	S2	2	S4	4	S6	6

牛病料需要进行“O”、“A”和“Asia-I”型的鉴定；猪病料还要进行猪水泡病病原（SVDV）鉴别鉴定。

试验开始，依据当天检测样品的数量包被，或取出包被好的板子；如用可拆卸微量板，则根据需要取出几条。在试验台上放置 20min，再洗涤 5 次，扣干。

#### 4.1.4.2 加对照抗原和待检样品

(1)布局：空白和各阳性对照、待检样品在 ELISA 板上的分布位置如表 1< II >所示。

(2)加样：①第 5 和第 6 列为空白对照（C-），每孔加 50μL 稀释液 A。②先将各型阳性对照抗原分别以稀释液 A 适当稀释，然后加入与包被抗体同型的各行孔中，C++为强阳性，C+为阳性，可以用同一对照抗原的不同稀释度。每一对照 2 孔，每孔 50μL。③按待检样品的序号（S1、S2 ...）逐个加入，每份样品每个血清型加 2 孔，每孔 50μL。37℃振荡 1h，洗涤 5 次，扣干。

4.1.4.3 加检测抗体 各血清型豚鼠抗血清以稀释液 A 稀释至工作浓度，然后加入与包被抗体同型各行孔中，每孔 50μL。37℃振荡 1h。洗涤 5 次，扣干。

4.1.4.4 加酶结合物 酶结合物以稀释液 B 稀释至工作浓度，每孔 50μL。37℃振荡 40min。洗涤 5 次，扣干。

4.1.4.5 加底物溶液 试验开始时，按当天需要量从冰箱暗盒中取出 OPD，放在温箱中融化并使之升温至 37℃。临加样前，按每 6mL OPD 加 3%双氧水 30μL（一块微量板用量），混匀后每孔加 50μL。37℃振荡 15min。

4.1.4.6 加终止液 显色反应 15min，每孔加 50μL 终止液 1.25mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

#### 4.1.4.7 观察和判读结果

终止反应后，先用肉眼观察全部反应孔。如空白对照和阳性对照孔的显色基本正常，再用酶标仪(492nm)判读 OD 值。

#### 4.1.5 结果判定

##### 4.1.5.1 数据计算

为了便于说明，假设表 3 所列数据为检测结果（OD 值）。利用表 2 所列数据，计算平均 OD 值和平均修正 OD 值（表 3）

- (1) 各行 2 孔空白对照（C-）平均 OD 值；
- (2) 各行（各血清型）抗原对照（C++、C+）平均 OD 值；
- (3) 各待检样品各血清型（2 孔）平均 OD 值；
- (4) 计算出各平均修正 OD 值（=[每个(2)或(3)值]-[同一行的(1)值]）。

表2 定型 ELISA 结果(OD 值)

	C++	C+	C-	S1	S2	S3
A FMDV“O”	1.84 1.74	0.56 0.46	0.06 0.04	1.62 1.54	0.68 0.72	0.10 0.08
B “A”	1.25 1.45	0.40 0.42	0.07 0.05	0.09 0.07	1.22 1.32	0.09 0.09
C “Asia-1”	1.32 1.12	0.52 0.50	0.04 0.08	0.05 0.09	0.12 0.06	0.07 0.09
D SVDV	1.08 1.10	0.22 0.24	0.08 0.08	0.09 0.10	0.08 0.12	0.28 0.34
	C++	C+	C-	S4	S5	S6
E FMDV“O”	0.94 0.84	0.24 0.22	0.06 0.06	1.22 1.12	0.09 0.10	0.13 0.17
F “A”	1.10 1.02	0.11 0.13	0.06 0.04	0.10 0.10	0.28 0.26	0.20 0.28
G “Asia-1”	0.39 0.41	0.29 0.21	0.09 0.09	0.10 0.09	0.10 0.10	0.35 0.33
H SVDV	0.88 0.78	0.15 0.11	0.05 0.05	0.11 0.07	0.09 0.09	0.10 0.12

表3 平均 OD 值/平均修正 OD 值

	C++	C+	C-	S1	S2	S3
A FMDV“O”	1.79/1.75	0.51/0.46	0.05	1.58/1.53	0.70/0.65	0.09/0.04
B “A”	1.35/1.29	0.41/0.35	0.06	0.08/0.02	1.27/1.21	0.09/0.03
C “Asia-1”	1.22/1.16	0.51/0.45	0.06	0.07/0.03	0.09/0.03	0.08/0.02
D SVDV	1.09/1.01	0.23/0.15	0.08	0.10/0.02	0.10/0.02	0.31/0.23
	C++	C+	C-	S4	S5	S6
E FMDV“O”	0.89/0.83	0.23/0.17	0.06	1.17/1.11	0.10/0.04	0.15/0.09
F “A”	1.06/1.01	0.12/0.07	0.05	0.10/0.05	0.27/0.22	0.24/0.19
G “Asia-1”	0.40/0.31	0.25/0.16	0.09	0.10/0.01	0.10/0.01	0.34/0.25
H SVDV	0.83/0.78	0.13/0.08	0.05	0.09/0.05	0.09/0.04	0.11/0.06

#### 4.1.5.2 结果判定

##### (1) 试验不成立

如果空白对照(C-)平均 OD 值 $>0.10$ , 则试验不成立, 本试验结果无效。

##### (2) 试验基本成立

如果空白对照(C-)平均 OD 值 $\leq 0.10$ , 则试验基本成立。

##### (3) 试验成立

如果空白对照(C-)平均 OD 值 $\leq 0.10$ , C+ 平均修正 OD 值 $>0.10$ , C++ 平均修正 OD 值 $>1.00$ , 试验成立。如表 2 中 A、B、C、D 行所列数据。

① 如果某一待检样品某一型的平均修正 OD 值 $\leq 0.10$ , 则该血清型为阴性。如 S1 的“A”、“Asia-1”型和“SVDV”;

② 如果某一待检样品某一型的平均修正 OD 值 $>0.10$ , 而且比其它型的平均修正 OD 值大 2 倍或 2 倍以上, 则该样品为该最高平均修正 OD 值所在的血清型。如 S1 为“O”型; S3 为“Asia-1”型;

③ 虽然某一待检样品某一型的平均修正 OD 值 $>0.10$ , 但不大于其它型的平均修正 OD 值的 2 倍, 则该样品只能判定为可疑。该样品应接种乳鼠或细胞, 并盲传数代增毒后再作检测。如 S2 “A”型。

##### (4) 试验部分成立

如果空白对照(C-)平均 OD 值 $\leq 0.10$ , C+ 平均修正 OD 值 $\leq 0.10$ , C++ 平均修正 OD 值 $\leq 1.00$ , 试验部分成立。如表 2 中 E、F、G、H 行所列数据。

① 如果某一待检样品某一型的平均修正 OD 值 $\geq 0.10$ , 而且比其他型的平均修正 OD 值大 2 倍或以上, 则该样品为该最高平均修正 OD 值所在的血清型。例如 S4 判定为“O”型。

② 如果某一待检样品某一型的平均修正 OD 值介于 0.10~1.00 之间, 而且比其它型的平均修正 OD 值大 2 倍或以上, 该样品可以判定为该最高 OD 值所在血清型。例如 S5 判定为“A”型。

③ 如果某一待检样品某一型的平均修正 OD 值介于 0.10~1.00 之间, 但不比其它型的平均修正 OD 值大 2 倍, 该样品应增毒后重检。如 S6 “Asia-I”型。

## 4.2 反向间接血凝试验 (RIHA)

### 4.2.1 材料准备

4.2.1.1 96 孔微型聚乙烯血凝滴定板 (110 度), 微量振荡器或微型混合器, 25 $\mu$ L、50 $\mu$ L 稀释用滴管、乳胶吸头或 25 $\mu$ L、50 $\mu$ L 移液加样器。

4.2.1.2 pH7.6、0.05mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.6、0.05mol/L PB), pH7.6、50%丙三醇磷酸缓冲液 (GPB), pH7.2、0.11mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.2、0.11mol/L PB), 配制方法见 GB/T 19200-2003《猪水泡病诊断技术》附录 A (规范性附录)。

4.2.1.3 稀释液 I、稀释液 II, 配制方法见 GB/T 19200-2003《猪水泡病诊断技术》附录 B (规范性附录)。

4.2.1.4 标准抗原、阳性血清, 由指定单位提供, 按说明书使用和保存。

4.2.1.5 敏化红细胞诊断液: 由指定单位提供, 效价滴定见 GB/T 19200-2003《猪水泡病诊断技术》附录 C (规范性附录)。

4.2.1.6 被检材料处理方法见 GB/T 19200-2003《猪水泡病诊断技术》附录 E (规范性附录)。

### 4.2.2 操作方法

4.2.2.1 使用标准抗原进行口蹄疫 A、O、C、Asia-I 型及与猪水泡病鉴别诊断。

(1) 被检样品的稀释: 将 8 只试管排列于试管架上, 自第 1 管开始由左至右用稀释液 I 作二倍连续稀释 (即 1:6、1:12、1:24……1:768), 每管容积 0.5mL。

(2) 按下述滴加被检样品和对照

a) 在血凝滴定板上的第 1~5 排, 每排的第 8 孔滴加第 8 管稀释被检样品 0.05mL, 每排的第 7 孔滴加第 7 管稀释被检样品 0.05mL, 以此类推至第 1 孔;

b) 每排的第 9 孔滴加稀释液 I 0.05mL, 作为稀释液对照。

c) 每排的第 10 孔按顺序分别滴加口蹄疫 A、O、C、Asia-I 型和猪水泡病标准抗原 (1:30 稀释) 各 0.05mL, 作为阳性对照。

(3) 滴加敏化红细胞诊断液: 先将敏化红细胞诊断液摇匀, 于滴定板第 1~5 排的第 1-10 孔分别滴加口蹄疫 A、O、C、Asia-I 型和猪水泡病敏化红细胞诊断液, 每孔 0.025mL, 置微量振荡器上振荡 1~2min, 20~35 $^{\circ}$ C 放置 1.5~2h 后判定结果。

4.2.2.2 使用标准阳性血清进行口蹄疫 O 型及与猪水泡病鉴别诊断。

(1) 每份被检样品作四排、每孔先各加入 25 $\mu$ L 稀释液 II。

(2) 每排第 1 孔各加被检样品 25 $\mu$ L, 然后分别由左至右作二倍连续稀释至第 7 孔 (竖板) 或第 11 孔 (横板)。每排最后孔留作稀释液对照。

(3) 滴加标准阳性血清: 在第 1、3 排每孔加入 25 $\mu$ L 稀释液 II; 第 2 排每孔加入 25 $\mu$ L 稀释至 1:20 的口蹄疫 O 型标准阳性血清; 第 4 排每孔加入 25 $\mu$ L 稀释至 1:100 的猪水泡病标准阳性血清; 置微型混合器上振荡 1~2min, 加盖置 37 $^{\circ}$ C 作用 30min。

(4) 滴加敏化红细胞诊断液: 在第 1 排和第 2 排每孔加入口蹄疫 O 型敏化红细胞诊断液 25 $\mu$ L; 第 3 排和第 4 排每孔加入猪水泡病敏化红细胞诊断液 25 $\mu$ L; 置微型混合器上振荡 1~2min, 加盖 20~35 $^{\circ}$ C 放置 2h 后判定结果。

### 4.2.3 结果判定

4.2.3.1 按以下标准判定红细胞凝集程度: +++++ 100%完全凝集, 红细胞均匀的分布于孔底周围; +++ 75%凝集, 红细胞均匀的分布于孔底周围, 但孔底中心有红细胞形成的针尖大的小点; ++ 50%凝集, 孔底周围有不均匀的红细胞分布, 孔底有一红细胞沉下的小点; + 25%凝集, 孔底周围有不均匀的红细胞分布, 但大部分红细胞已沉积于孔底; - 不凝集, 红细胞完全沉积于孔底成一圆点。

4.2.3.2 4.2.2.1 的结果判定：稀释液 I 对照孔不凝集、标准抗原阳性孔凝集试验方成立。

(1) 若只第 1 排孔凝集，其余四排孔不凝集，则被检样品为口蹄疫 A 型；若只第 2 排孔凝集，其余四排孔不凝集，则被检样品为口蹄疫 O 型；以此类推。若只第 5 排孔凝集，其余四排孔不凝集，则被检样品为猪水泡病。

(2) 致红细胞 50%凝集的被检样品最高稀释度为其凝集效价。

(3) 如出现 2 排以上孔的凝集，以某排孔的凝集效价高于其余排孔的凝集效价 2 个对数（以 2 为底）浓度以上者即可判为阳性，其余判为阴性。

4.2.3.3 4.2.2.2 的结果判定：稀释液 II 对照孔不凝集试验方可成立。

(1) 若第 1 排出现 2 孔以上的凝集（++以上），且第 2 排相对应孔出现 2 个孔以上的凝集抑制，第 3、4 排不出现凝集判为口蹄疫 O 型阳性。若第 3 排出现 2 孔以上的凝集（++以上），且第 4 排相对应孔出现 2 个孔以上的凝集抑制，第 1、2 排不出现凝集则判为猪水泡病阳性。

(2) 致红细胞 50%凝集的被检样品最高稀释度为其凝集效价。

### 4.3 反转录-聚合酶链式反应（RT-PCR）

#### 4.3.1 样品处理

样品的采集、保存和运送方法见《口蹄疫诊断技术》（GB/T18935-2003）附录 A。

样品的处理:在无菌环境中，将采集的动物机体组织（如舌、鼻、蹄水泡皮）置乳钵中，剪碎，加灭菌石英砂研磨。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，置乳钵中，剪碎，加灭菌石英砂研磨。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 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。

#### 4.3.2 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 dH<sub>2</sub>O: 每 100mL 水中加入 DEPC（焦碳酸二乙酯）原液 0.1mL，于室温下作用数小时，然后高压灭菌使 DEPC 失活。

溶液 E（One Step RNA PCR 混合液）:

10 X One Step RNA PCR Buffer	50 μ L
MgCl <sub>2</sub>	100 μ L
dNTP	50 μ L
正链引物	30 μ L
负链引物	30 μ L
无 RNase dH <sub>2</sub> O	110 μ L

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

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

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

溶液 I（阳性对照）: 200μL

50×TAE 缓冲液:

三羟甲基氨基甲烷（Tris）	242.0 g
冰乙酸	57.1mL
0.5mol/L 乙二胺四乙酸（EDTA）（pH8.0）	100.0mL
加双蒸水至	1000mL

1×TAE 缓冲液:

使用前将 50×TAE 作 50 倍稀释即可。

电泳加样缓冲液:

溴酚兰	0.25g
甘油	30.0mL
双蒸水	70.0mL

#### 4.3.3 操作程序

#### 4.3.3.1 总 RNA 萃取

(1) 取 500 $\mu$ L 组织样品研磨上清液置 1.5mL 离心管中, 加等量 (500 $\mu$ L) 溶液 B, 快速振荡数秒, 8000r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 5min。细胞毒、水泡液、阳性样品不经此步处理。

(2) 取上清液 200 $\mu$ L 置 1.5mL 离心管中, 加入 1000 $\mu$ L 溶液 A, 反复混匀, 冰上放置 5min。取阳性对照样品 (50-200 $\mu$ L 均可), 同时提 RNA。

(3) 加 200 $\mu$ L 溶液 B, 小心盖上帽盖, 用力摇动离心管 15 秒, 室温放置 5min。

(4) 11000r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 15min, 可见分为三层, 上层水相含 RNA。

(5) 转移水相至一新离心管, 加入等量溶液 C (约 500 $\mu$ L), 混匀, 室温放置 15min。

(6) 11000r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 离心后在离心管边和底部可见有胶样 RNA 沉淀。

(7) 洗 RNA: 弃上清, 加 1000 $\mu$ L 75%乙醇 (使用前用溶液 D 加无水乙醇配置而成) 漂洗沉淀, 漂洗二次, 10000r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 5min。

(8) 室温充分干燥 RNA 沉淀。加 10 $\mu$ L 溶液 D, 即可用于 PCR 扩增。可以-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

(9) 阳性对照样品: 将阳性对照与检验样品同时提取 RNA, 同样条件下扩增。

#### 4.3.3.2 一步法 RT-PCR

(1) 反应总体积 25 $\mu$ L。向 RNA 管中加入下列反应物:

RNA PCR 混合液: 18.5 $\mu$ L

AMV 反转录酶 (溶液 F): 0.5 $\mu$ L

RNase 抑制剂 (溶液 G): 0.5 $\mu$ L

AMV-Optimized Taq (溶液 H): 0.5 $\mu$ L

RNA: 5 $\mu$ L

空白对照: 以 RNase Free dH<sub>2</sub>O 代替模板, 同样条件下扩增。

(2) 高速离心 10s 后, 将反应管放入扩增仪中, 指令设定程序开始工作。

(3) 反应条件: ① 50 $^{\circ}$ C, 30 min。

② 94 $^{\circ}$ C, 2 min。

③ 94 $^{\circ}$ C, 50s; 58 $^{\circ}$ C, 50s; 72 $^{\circ}$ C, 60s; 35 个循环。

④ 72 $^{\circ}$ C, 8 min。

#### 4.3.4 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 $\times$ TAE (见附一) 缓冲液中。加热融化后加 5 $\mu$ L (10mg/mL) 溴化乙锭, 混匀后倒入放置在水平面上的凝胶盘中, 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 $\times$ TAE 缓冲液淹没胶面。

(2) 加样 取 6~8 $\mu$ L PCR 扩增产物和 2 $\mu$ L 加样缓冲液 (见附二) 混匀后加入一个加样孔。每次电泳同时加标准 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。

(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。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。

### 4.4 乳鼠中和试验

#### 4.4.1 材料

##### 4.4.1.1 口蹄疫病毒标准血清

用口蹄疫病毒 A、O、C、Asia-I 型标准毒株经多次免疫制备的特异性豚鼠抗血清, 于 56 $^{\circ}$ C 水浴灭活 30min, 呈透明的浅黄色液体。

##### 4.4.1.2 待检样品

送检样品主要为猪、牛、羊等病畜唇部、舌面、蹄部、乳房等部位的新鲜水泡皮 3~5g 或水泡液 0.5g 以上。送检样品经接种乳鼠传代增殖病毒。

##### 4.4.1.3 乳鼠 2~3 日龄乳鼠。

##### 4.4.1.4 主要仪器和器材

冰箱、温箱、离心机、注射器、乳钵、吸管、试管等。

#### 4.4.2 操作程序

#### 4.4.2.1 待检病毒液的制备

将送检样品用 pH7.5、0.04mol/L PBS 液洗 2~3 次，至病料表面污物彻底被冲洗干净后，用消毒滤纸吸去水分，称重，取 3~5g，剪碎，加适量无菌石英砂和适量双抗充分研磨，再用 PBS 液配制成 1:5 悬液（水泡液可加双抗后直接用于接种乳鼠），室温浸毒 1h 或 4℃ 冰箱过夜，以 2000~3000rpm 离心 10min，取上清液接种 2~3 日龄乳鼠连续传 2~3 代，用发病死亡的乳鼠胴体组织按上述方法制成 1:10 悬液，于 -30℃ 冰箱冻融一次，离心后取上清液。

#### 4.4.2.2 待检病毒液毒价的测定

##### (1) 稀释病毒

用 pH7.5、0.04 mol/L PBS 液将病毒作 10 倍连续稀释（例如  $10^1$ - $10^8$ ）。

##### (2) 接种动物

接种时应从最大的稀释度（ $10^{-8}$ ）开始，依次向低稀释度进行，每个稀释度接种 2~3 日龄乳鼠 4 只，每只乳鼠颈部皮下注射 0.2mL。每天观察 2 次，连续 7 天记录每个稀释度乳鼠的死亡及存活情况。

##### (3) 半数致死量的计算

按 Reed—Muench 氏法计算，详见表 4。

由表 4 可知该病毒的  $LD_{50}$  在  $10^{-5}$  与  $10^{-6}$  之间，计算公式如下：

$LD_{50}$  = 高于 50% 死亡率稀释度倒数的对数 + 距离比例 × 稀释倍数的对数

高于 50% 死亡率稀释度倒数的对数 = 5

距离比例 = (高于 50% 死亡率 - 50) ÷ (高于 50% 死亡率 - 低于 50% 死亡率)

= (80 - 50) ÷ (80 - 20) = 0.5

稀释倍数 (10) 的对数 = 1

则  $LD_{50} = 5 + 0.5 \times 1 = 5.5$

查 5.5 的反对数等于 316200，即当病毒稀释成 1:316200 时，注射乳鼠，能使 50% 乳鼠发生死亡。

表 4 半数致死量计算表

病毒 稀释度	接种 只数	存活数	死亡数	积累总计		死亡比例	死亡率(%)
				活	死		
10-2	4	0	4	0	16	16/16	100
10-3	4	0	4	0	12	12/12	100
10-4	4	0	4	0	8	8/8	100
10-5	4	1	3	1	4	4/5	80
10-6	4	3	1	4	1	1/5	20
10-7	4	4	0	8	0	0/8	0
10-8	4	4	0	12	0	0/12	0

#### 4.4.2.3 待检病毒液的稀释

待检病毒液按 200  $LD_{50}$  进行稀释。

#### 4.4.2.4 标准血清的稀释

口蹄疫病毒 O、A、C、AsiaI 型豚鼠高免血清，用 pH7.5、0.04 mol/L PB 液作 1:5 稀释。

#### 4.4.2.5 病毒液和血清中和

取被检病毒液 1mL 分别与等量稀释的 A、O、C、Asia-I 型高免血清于试管中混合，37℃ 温箱孵育 1h。

#### 4.4.2.6 接种动物

选 2~3 日龄乳鼠，分为 A、O、C、Asia-I 型四组，每组一窝鼠，颈背部皮下注射 0.2mL/只，接种 4 只。同时设病毒液、健康乳鼠、PB 液和血清对照组各 2 只（见表 5）。每窝以 1 只母鼠哺乳。

#### 4.4.2.7 观察

接种后观察 5~7d，每天记录 2 次。

表 5: 试验设计及分组

组别	血清型	试验组乳鼠 (只)	血清对照乳鼠 (只)	病毒液对照乳鼠 (只)	PB液对照乳鼠 (只)	健康对照乳鼠 (只)
1	O	4	2	2	2	2
2	A	4	2	2	2	2
3	C	4	2	2	2	2
4	Asia-I	4	2	2	2	2

#### 4.4.3 结果判定

检查对照组：病毒液对照乳鼠发病死亡，健康对照、血清对照和 PB 液对照乳鼠健康。如 O 型血清试验组乳鼠被保护（健康），其它各型组乳鼠发病死亡，则被检病料为口蹄疫病毒 O 型。依次类推，判定其它病毒型。

#### 4.5 微量补体结合试验

##### 4.5.1 材料（主要试剂和仪器）

##### 4.5.1.1 样品采集和抗原制备：

###### (1) 样品采集

疑似 FMDV 感染动物的水泡皮和水泡液可直接作为定型材料。如病料量少或不新鲜，研磨加 0.04mol/L PBS(pH7.2~7.4)制成 1:5 或 1:10 的悬液，先接种 3~4 日龄乳鼠，并视乳鼠发病情况连续传 1~3 代，待乳鼠出现 FMDV 所致典型症状濒死或死亡后，剖解病死或濒死乳鼠（去皮、头、爪及内脏）后的胴体（主要是骨骼肌）作为检测样品。胴体加甘油/PBS 后置-30℃或-70℃可长期保存。也可用病料悬液或乳鼠组织 1:10 悬液接种细胞培养物，以呈现典型 FMDV 致细胞病变（CPE）的细胞培养液作为检测样品。

###### (2) 抗原制备

在无菌室内将水泡皮或乳鼠胴体用 PBS 洗净，用灭菌滤纸吸干后称重。放在灭菌研钵中先剪碎，后加灭菌石英砂研磨。加 PBS (pH7.4) 制成 1:4 悬液。水泡液也以 PBS 液 1:4 稀释，可与组织悬液合并。室温浸毒 2h 以上，或 4℃冰箱过夜。3000r/min 离心 10min。分离出上清液，58℃水浴灭能 40min。再 3000r/min 离心 10min，取上清液为待检抗原。

##### 4.5.1.2 抗体

口蹄疫病毒 O、A、和 Asia-I 型，及猪水泡病病毒（SVDV）豚鼠高免血清，由农业部指定单位提供，按说明书使用。

##### 4.5.1.3 补体

健康成年公豚鼠新鲜血清。加保存液（Richardson'液）后，可 4℃保存 6 个月。使用前滴定效价。

##### 4.5.1.4 溶血素

兔抗绵羊红细胞抗血清，由农业部指定单位提供。使用前滴定效价。

##### 4.5.1.5 红细胞

成年健康绵羊红血球。试验当天制备 2.8%工作液和敏化红细胞。

##### 4.5.1.6 主要仪器和器材

“U”形底 96 孔微量滴定板，微量可调移液器及配套吸头，可插入微量板的离心机，光电比色计。

实验室常规器皿：如试管和管架，吸管，离心管，三角烧瓶，各种大小的玻璃或塑料瓶（管）等。

##### 4.5.1.7 缓冲液

###### (1) 5 倍巴比妥缓冲液（VB）

巴比妥酸	5.75g
巴比妥钠	3.75g
NaCl	85.0g
CaCl <sub>2</sub>	0.28g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1.68g
蒸馏水	2000mL

先将巴比妥酸溶于 500mL 加热至沸的蒸馏水中。冷却后加入其它成分，加蒸馏水至

2000mL，充分混匀。分装入带塞的瓶中，103kpa 蒸汽灭菌 15min。塞紧瓶塞，4℃保存。

(2)微量补体结合试验缓冲液 (VBD)

5 倍巴比妥缓冲液 100mL  
蒸馏水 400mL

用 NaHCO<sub>3</sub> 调整 pH 至 7.4。试验当天现配现用。

(3)补体保存液 (Richardson' 液)

A 液: H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (硼酸) 0.93g  
Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O (硼砂) 2.29g  
山梨醇 11.47g  
饱和 NaCl 溶液 加至 100 mL 混匀, 室温保存。

B 液: Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O (硼砂) 0.75g  
NaN<sub>3</sub> (叠氮钠) 0.81g  
饱和 NaCl 溶液 加至 100mL 混匀。室温保存。

使用方法: 8 份豚鼠血清加 1 份 A 液、1 份 B 液, 混匀后置 4℃可保存 6 个月。

用补体时, 取 1 份保存补体加 7 份蒸馏水, 即 1:10 稀释补体。

4.5.2 预备试验

4.5.2.1 2.8%红细胞悬液的制备

将脱纤的(绵羊)红细胞用 VBD 洗涤 3 次。每次加 5 倍于红细胞体积的 VBD 轻摇混匀, 1500r/min 离心 10min, 吸去上清液后再加入 VBD, 反复 3 次, 最后吸取 2.8mL 红细胞泥加入盛有 97.2mL VBD 的三角瓶中, 充分混匀。取 0.5mL 红细胞悬液, 加 4.5mL 蒸馏水, 对照管加 5mL 蒸馏水, 用波长 625nm 滤光片的光电比色计测定该初配制的红细胞悬液的 OD 值。按照标准化 2.8%红细胞悬液的 OD 值=42, 用下列公式校正 (标准化) 该初配红细胞悬液的浓度。

计算公式: [初配红细胞悬液用 VBD 量(mL)×OD 值]÷标准 OD 值(42)  
=应加缓冲液的总数(mL)

例如: 初配红细胞悬液 100mL 测定 OD 值=45 (大于标准值 42)

按公式计算 [97.2×45]÷42=104, 104-97.2=7.8, 即应补加 7.8mL 缓冲液于红细胞悬液中, 再测 OD 值将符合标准值 42。

若初配红细胞悬液的 OD 值小于 42, 可将该红细胞悬液离心, 根据公式计算, 取出多余的缓冲液, 再测 OD 值。

4.5.2.2 0-100%溶血标准孔的制备

(1) 血红素: 取 1mL 2.8%红细胞悬液, 加 7mL 蒸馏水, 充分摇动直到红细胞全部溶解。再加 2mL VB, 混匀。

(2) 0.28%红细胞: 取 1mL 2.8%红细胞悬液, 加 9mL VBD, 混匀。

表 6 标准溶血百分比 单位:μL

孔 位	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11
血红素	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
0.28%红细胞	200	180	160	140	120	100	80	60	40	20	0
溶血百分比	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

(3)溶血标准孔的制备: 按表 6 所列剂量将血红素和红细胞悬液加入微量板 A1-A11 各孔。1000r/min 离心 10min。A6 孔为 50%溶血孔, 其红细胞沉淀图形的大小和溶血颜色深浅(OD 值)作为微量补体结合试验判定的比标准。

4.5.2.3 棋盘式滴定溶血素/补体

(1)稀释溶血素

① 1:100 稀释液: 0.1mL 溶血素加 9.9mL VBD。

② 按表 7 所示方法, 制备 8 个溶血素稀释液。

表7 溶血素稀释液制备

单位: mL

管号	溶血素浓度	溶血素量	VBD量	溶血素稀释度	溶血素最终浓度
A	1:100	1.0	1.5	1:250	1/500
B	1:100	0.5	2.0	1:500	1/1000
C	1:100	1.0	9.0	1:1000	1/2000
D	1:1000	2.0	1.0	1:1500	1/3000
E	1:1000	1.5	1.5	1:2000	1/4000
F	1:1000	1.0	1.5	1:2500	1/5000
G	1:1000	0.5	1.0	1:3000	1/6000
H	1:1000	0.5	1.5	1:4000	1/8000

## (2)制备敏化红细胞

①取8支试管, 写明标签A-H。将上述8个溶血素稀释液分别取1mL移入相应编号的试管中。

②各管再加入1mL标准化的2.8%红细胞悬液。混匀。溶血素最终浓度如表7所列。

③25℃孵育20分钟。

表8 补体稀释液制备

单位: mL

管号	稀释用补体浓度	补体加入量	VBD量	补体最终浓度
1	1:10	2.0	3.0	1:25
2	1:10	1.0	4.0	1:50
3	1:25	1.0	2.0	1:75
4	1:50	1.5	1.5	1:100
5	1:25	0.5	2.0	1:125
6	1:50	1.0	2.0	1:150
7	1:25	0.5	3.0	1:175
8	1:100	1.0	1.0	1:200
9	1:50	0.5	2.0	1:250
10	1:150	1.0	1.0	1:300
11	1:175	1.0	1.0	1:350
12	1:100	0.5	1.5	1:400

## (3)稀释补体

① 1:10稀释补体: 0.5mL新鲜补体(豚鼠血清)加4.5mL VBD。或0.5mL保存补体加3.5mL蒸馏水, 就是1:10稀释补体。

②按表8所示, 制备12个补体稀释液

## (4)棋盘式滴定

①用“U”形底微量板。首先每孔(全部96孔)加50 $\mu$ L VBD缓冲液。

②将12个补体稀释液移加入微量板1~12列。即将管1(1/25稀释)补体加入第1列(A1~H1)8孔, 每孔50 $\mu$ L; 将管2(1:50稀释)补体加入第2列(A2~H2)8孔, 每孔50 $\mu$ L; 依此类推, 将12管补体分别加入12列各孔中。

③将8管以8个不同浓度溶血素敏化的红细胞悬液依次加入微量板A~H行。即将A管(溶血素1:500稀释)敏化红细胞加入A行(A1~A12)12孔, 每孔25 $\mu$ L; 将B管(溶血素1:1000稀释)敏化红细胞加入B行(B1~B12)12孔, 每孔25 $\mu$ L; 依此类推, 直至8管敏化红细胞分别加入8行各孔中。

④37℃振荡40min, 1000r/min离心10min。

⑤结果判定: 确定补体最高稀释度时, 引起50%溶血的溶血素最高稀释度。该补体最高稀释度(如1:200)即为补体效价, 4倍效价为补体工作液(1:50)。该溶血素最高稀释度

(如 1:2000) 即为溶血素效价, 2 倍效价为溶血素工作液 (1:1000)。

#### 4.5.3 定型补体结合试验

##### 4.5.3.1 布局:

牛病料鉴定“O”、“A”和“Asia-I”型。“Asia-I”型的定型按相关技术规范执行。

定型布局如表 2-4 所列。A1~A4 为“O”型, B1~B4 为“A 型”。A5、A6 为“O”“A”型血清对照, B7 为抗原对照, A8 为补体对照, A9 为空白对照。

表 9. 定型补体结合试验布局

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
A	○	○	○	○	◇	◆		△	※
B	●	●	●	●			◎		

##### 4.5.3.2 主要操作步骤: 补体结合试验各试剂加入量和次序列于表 9。

(1) 加 VBD 稀释液: A2~A4、B2~B4 每孔各加 25μL;

对照 A5、A6、B7 孔各加 25μL; A8 孔加 50μL; A9 孔加 100μL。

(2) 加高免抗血清

① 稀释血清: 将“O”、“A”两型血清分别以 VBD 作 1: 8 稀释。

② A1、A5 孔加 1: 8 “O”型血清 25μL/孔, A2 孔加 50μL/孔;

B1、B5 孔加 1: 8 “A”型血清 25μL/孔, B2 孔加 50μL/孔。

③ 从 A2 到 A4 孔作 1: 1.5 连续稀释: 用微量移液器先将 A2 孔中的 25μL VBD 和 50μL 血清混匀, 然后吸出 50μL 移入 A3 孔; 混匀后再吸出 50μL 移入 A4 孔; 混匀后吸出 50μL 弃去。A1 到 A4 孔的血清稀释度分别为 1: 8、1: 12、1: 18、1: 27。

B2 到 B4 孔作同样连续稀释。

表 10 FMDV 微量补体结合试验

单位为微升

血清型	O				A				对照				
孔号	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	A5	A6	B7	A8	A9
血清稀释度	1:8	1:12	1:18	1:27	1:8	1:12	1:18	1:27	1:8	1:8	—	—	—
缓冲液	0	25	25	25	0	25	25	25	25	25	25	50	100
高免血清量	25	50	50	50	50	50	50	50	25	25	—	—	—
				弃 50				弃 50					
被检抗原	25	25	25	25	25	25	25	25	—	—	25	—	—
补体量	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	—
37°C 振荡 60min													
敏化红细胞	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
37°C 振荡 30min													
结果	+	—	—	—	++++	++++	++	+	—	—	—	—	++++
注: “—”完全溶血; “++++”完全不溶血, “++”50%溶血, “+”75%溶血。													

(3) 加抗原: 除对照 A5、A6、A8、A9 孔外, 各孔加待检样品 25μL。

(4) 加补体: 除空白对照 A9 孔外, 各孔加补体工作液 50μL。

(5) 37°C 振荡 60min。

(6) 制备敏化红细胞和加样: 2.8% 红细胞悬液与溶血素工作液等体积混合, 25°C 敏化 20min。各反应孔加 25μL/孔。

(7)37℃振荡 30min, 1000r/min 离心 30min。

#### 4.5.4 结果判定

##### 4.5.4.1 试验成立的条件:

当空白对照孔(A9)完全不溶血(++++);

补体对照孔(A8)完全溶血(-);

血清对照孔(A5和A6)和抗原对照孔(B7)完全溶血(-), 试验才成立。

##### 4.5.4.2 判定血清型:

(1) 若某血清型4孔完全溶血(-),或仅含最高浓度血清的第1孔,被阻止溶血不足 50%, 如表10所示A1~A4孔, 则判定为“阴性”, 即不是“O”型。

(2) 若某血清型4孔中3孔或4孔50%以上被阻止溶血(++、+++或++++), 如表10所示B1-B4孔, 则判定为阳性, 即该病料为FMDV“A”型。

#### 4.6 非结构蛋白抗体 ELISA

##### 4.6.1 仪器和材料准备

4.6.1.1 酶标板、微量移液器, 孵育箱, 样品稀释板, 量筒, 酶标仪, 吸水纸等。

4.6.1.2 使用溶液的配制: 方法见附录A。

4.6.1.3 间接ELISA 抗原, 酶标抗体。

4.6.1.4 抗原包被板制备: 方法见附录B。

##### 4.6.2 操作步骤

4.6.2.1 在稀释板上按1:20的体积比稀释待检血清(6 $\mu$ L待检血清+120 $\mu$ L样品稀释液)。设阴性和阳性对照。

4.6.2.2 分别在诊断板的相应孔中加入阳性对照(2孔)和阴性对照(2孔)原液(不用稀释)、预稀释的待检动物血清各100 $\mu$ L。充分混匀后, 贴上封口胶片, 置37℃孵育30min。

4.6.2.3 小心揭掉封口胶片, 弃去各孔中液体、拍净。每孔加满洗涤液, 静置约30s, 重复洗涤5次, 最后在吸水纸上拍净。

4.6.2.4 每孔加入酶结合物液100 $\mu$ L, 贴上封口胶片, 置37℃孵育30min。

4.6.2.5 重复操作步骤4.6.2.3。

4.6.2.6 每孔加入底物溶液(见附录A.6), 轻振混匀, 置37℃避光显色15min。

4.6.2.7 每孔加入终止液(见附录A.8), 每孔50 $\mu$ L, 轻轻振荡, 置酶标仪450nm波长处测定各孔OD<sub>450</sub>值。

##### 4.6.3 结果判定

4.6.3.1 试验结果同时符合下列条件, 方为有效:

(1) 两孔的阴性对照OD平均值应 $\leq$ 0.15;

(2) 每孔阳性对照OD值均 $\geq$ 0.60;

计算临界值=(阳性对照孔OD<sub>450</sub>均值-阴性对照孔OD<sub>450</sub>均值) $\times$ 0.2+阳性对照孔OD<sub>450</sub>均值, 判定检测结果。

4.6.3.2 被检样品OD<sub>450</sub>值 $<$ 临界值, 为FMDV-NS抗体阴性;

4.6.3.3 样品OD<sub>450</sub>值 $\geq$ 临界值, 为初试FMDV-NS抗体阳性;

4.6.3.4 初试阳性的样品应再进行双孔复试, 若任意一孔或两孔均为阳性, 则视为FMDV-NS抗体阳性; 若两孔均为阴性则视为FMDV-NS抗体阴性。

4.6.3.5 FMDV-NS抗体阴性, 说明该动物未感染口蹄疫病毒(急性发病期除外); FMDV-NS抗体阳性, 说明该动物曾感染和携带口蹄疫病毒。

#### 4.7 液相阻断-酶联免疫吸附试验(LpB-ELISA)

##### 4.7.1 材料

###### 4.7.1.1 样品采集

动物血清样品的采集、保存和运送方法和要求详见附录A。

###### 4.7.1.2 试剂和仪器

(1) U形底板

96孔U形底聚丙稀微量板, 抗原/血清液相阻断反应专用。

(2) 对照血清

含有某型FMDV抗体的牛或猪血清。预先测定其抗体滴度, 作适当稀释后, 其阻断定量抗原的程度分别为45~90%(阳性对照)和0~45%(阴性对照)。

## 4.7.2 试验方法

### 4.7.2.1 包被固相

用包被缓冲液稀释兔抗血清至工作浓度，ELISA 板每孔加 50 $\mu$ L。室温振荡 30min，然后置湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜，或 37 $^{\circ}$ C 振荡 2h（当天试验）。

### 4.7.2.2 抗原/抗体(对照和待检血清)的预先结合(液相阻断)

(1) 布局 各对照和待检血清在 LpB-ELISA 中的布局如表 11 所示。

表 11.LpB-ELISA 布局

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C++	C++	S1	1	S9	9	S17	17	S25	25	S27	27
B	C++	C++	S2	2								
C	C+	C+	S3	3								
D	C+	C+	S4	4								
E	C-	C-	S5	5					S26	26	S28	28
F	C-	C-	S6	6								
G	Ag	Ag	S7	7								
H	Ag	Ag	S8	8	S16	16	S24	24				

(2) C++空白对照孔 (A1、A2、B1、B2) 加 80 $\mu$ L/孔稀释液 A。

Ag 抗原对照孔 (G1、G2、H1、H2) 加 40 $\mu$ L/孔稀释液 A。

(3) 阳性对照血清用稀释液 A 适当稀释后分别作为 C+和 C-对照。

例如：1:50 稀释加入 C+对照孔 (C1、C2、D1、D2)；

1:200 稀释加入 C-对照孔 (E1、E2、F1、F2)。

(4) 检测(筛选)试验时待检血清的稀释和加样

待检血清样品先以稀释液 A 作 1:16 稀释，混匀后按表 11(第 3~8 列)所示逐个加入，每份样品加 2 孔，每孔 40 $\mu$ L。

(5) 滴定试验时待检血清的稀释和加样

① 首先每孔加 40 $\mu$ L 稀释液 A，如表 11 中第 9~12 列各孔。

② 待检血清先作 1:8 稀释，混匀后加入 A 行 (A9、A10 或 A11、A12) 或 E 行 (E9、E10 或 E11、E12) 2 孔，每孔 40 $\mu$ L。

③ 从 A→D、或 E→H 行作 2 倍连续稀释，最后弃去 40 $\mu$ L。待检血清形成 1:16→1:128 系列稀释。

(6) 抗原稀释和加样

以稀释液 A 将抗原稀释至 2 倍工作浓度，混匀后加入除 C++对照 4 孔外的所有各孔，40 $\mu$ L/孔。

(7) 加盖后室温振荡 30min,然后置湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜。或 37 $^{\circ}$ C 振荡 2h（当天试验）。

### 4.7.3 转移抗原/血清混合液

4.7.3.1 将包被的 ELISA 板和抗原/血清混合液 (U 形底) 板从 4 $^{\circ}$ C 湿盒中取出，放在试验台上 (室温) 20~30min；洗涤 ELISA 板 5 次,扣干。

4.7.3.2 将抗原/血清混合液转移到 ELISA 板相应各孔中，每孔 50 $\mu$ L。

4.7.3.3 37 $^{\circ}$ C 振荡 60min。洗涤 5 次，扣干。

### 4.7.3.4 加检测抗体

以稀释液 B 将豚鼠抗血清稀释至工作浓度。

混匀后每孔加 50 $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C 振荡 60min，洗涤 5 次，扣干。

### 4.7.3.5 加酶结合物

以稀释液 B 将酶结合物稀释至工作浓度，混匀后每孔加 50 $\mu$ L。

37 $^{\circ}$ C 振荡 40min，洗涤 5 次，扣干酶标板。

### 4.7.3.6 加底物溶液

临加样前，按每 6mL (每块板用量) 3.3mmol/L OPD 加 30 $\mu$ L 30% 双氧水，混匀后每孔加 50 $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C 振荡 15min。

#### 4.7.3.7 加终止液

每孔加 50 $\mu$ L 1.25mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 轻轻振荡混匀。

#### 4.7.3.8 判读结果

先用肉眼观察全板的显色状况, 如各对照组反应液的颜色与设计大体相符, 初步判定试验成立后再用酶标仪测定 OD 值。

#### 4.7.4 数据分析和结果判定

为了便于说明, 假设 28 份血清样品的检测结果列于表 12。第 1-2 列是对照, 第 3-8 列是 24 份血清的检测结果, 第 9-12 列是 4 份血清的滴定结果。

##### 4.7.4.1 试验初步成立的条件

试验成立的首要条件是: 4 个抗原对照 OD 值中, 有 3 个在设定范围内 (1.50 $\pm$ 0.49), 或其中 2 个很接近。

##### 4.7.4.2 试验完全成立的条件

计算抗原对照平均 OD 值: 以居中的 2 个 OD 值求平均值。

如表 12 所示 (1.59+1.63)  $\div$  2=1.61

按公式计算对照各孔的阻断百分率(PI 值)

PI=100-[某孔 OD 值 $\div$ 抗原对照平均 OD 值 $\times$ 100]

如 C++ 4 个 PI 值中的 3 个 >90; C+ 4 个 PI 值中的 3 个介于 45~90;

C- 4 个 PI 值中的 3 个介于 0~45, 则试验完全成立。

表 12 LpB-ELISA 血清抗体 OD 值

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.10	0.07	0.78	0.73	1.09	1.12	1.11	1.19	0.31	0.34	0.47	0.53
B	0.09	0.12	0.67	0.70	0.60	0.55	0.40	0.32	0.48	0.53	0.78	0.88
C	0.43	0.46	0.90	0.98	1.21	1.28	0.77	0.68	0.87	0.94	0.99	1.10
D	0.54	0.60	0.88	0.81	1.56	1.51	1.09	0.99	1.33	1.38	1.45	1.34
E	1.02	1.12	0.23	0.31	0.89	0.79	0.39	0.48	0.12	0.11	0.09	0.09
F	0.95	0.99	0.43	0.49	0.27	0.36	0.55	0.59	0.28	0.25	0.21	0.22
G	1.85	1.59	0.89	0.97	0.12	0.14	0.65	0.82	0.42	0.49	0.36	0.31
H	1.38	1.63	0.34	0.41	0.22	0.19	0.51	0.70	0.77	0.84	0.79	0.73

表 13 相应表 12.OD 值的 PI 值(Ag 为平均 OD 值)

	1	2	3	4	5	6	7	8
C++	93.8	95.6	S1	51.5	54.7	S9	32.3	30.4
C++	94.4	92.5	S2	58.4	57.5	S10	62.7	65.8
C+	73.3	71.4	S3	44.1	39.1	S11	24.8	20.5
C+	67.5	62.7	S4	45.3	50.3	S12	3.1	7.2
C-	37.6	30.4	S5	85.7	80.7	S13	44.7	50.9
C-	41.0	38.5	S6	73.3	69.5	S14	83.2	77.6
Ag			S7	45.9	38.5	S15	92.5	91.3
Ag	1.61		S8	78.9	74.5	S16	87.3	88.2

血清稀释度	9	10	11	12
1/32	S25	80.7	78.9	S27
1/64		70.2	67.1	51.5
1/128		45.9	41.6	-
1/256		-	-	-
1/32	S26	-	-	S28
1/64		-	-	-
1/128		73.0	69.6	-
1/256		52.2	47.8	50.9

#### 4.7.4.3 判定检测(筛选)试验结果

本试验的判定界限设定为：50%阻断,即 PI 值 $\geq 50$  为“+”。

抗体滴度 $\geq 1:45$  的血清判定为 (FMDV 某型抗体) 阳性。

(1) 如某一待检血清的 2 个 PI 值都 $< 50$ , 则该样品判定为阴性, 血清抗体滴度 $< 1/32$ 。如表 13 中 S3、S9、S11 等。

(2) 如某一待检血清的 2 个 PI 值, 1 个 $\geq 50$ , 另 1 个 $< 50$ , 则该样品判定为阴性, 血清抗体滴度为 1:32。如表 13 中 S4、S13 等。

(3) 如某一待检血清的 2 个 PI 值都 $\geq 50$ , 则该样品判定为阳性, 血清抗体滴度 $\geq 1:45$ , 或再进一步滴定。如表 13 中 S1、S5、S8、S15 等。

#### 4.7.4.4 判定滴定试验结果

(1) 如某一待检血清的 4 个稀释度 (1/32~1/256) 8 个孔的 PI 值都 $< 50$ , 则该样品判定为阴性, 血清抗体滴度 $< 1/32$ 。同 4.7.4.3 (1)。

(2) 如第 1 个血清稀释度 (1/32) 的 2 个 PI 值, 1 个 $\geq 50$ , 另 1 个和其余 6 个都 $< 50$ , 则该样品判定为阴性, 血清抗体滴度为 1/32。同 4.7.4.3 (2)。

(3) 如 1/32 稀释血清的 2 个 PI 值都 $\geq 50$ , 其余 6 个都 $< 50$ , 判定该待检血清为阳性, 血清抗体滴度为 1/45。

(4) 若高于 1:32 稀释血清的 PI 值 $\geq 50$ , 该样品肯定为阳性, 其血清抗体滴度的判定可参考表 13。

如表 13 所示 S25-S28 的抗体滴度分别为:

S25: 1/90; S26: 1/256; S27: 1/64; S28: 1/360。

表 14 血清抗体滴度

血清 稀释度	滴定试验 8 个孔中, 1~8 孔 PI 值 $\geq 50(+)$ 对应的抗体滴度							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1: 32	+ -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
1: 64	- -	- -	+ -	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
1:128	- -	- -	- -	- -	+ -	+ +	+ +	+ +
1:256	- -	- -	- -	- -	- -	- -	+ -	+ +
抗体滴度	1:32	1:45	1:64	1:90	1:128	1:180	1:256	1:360

#### 4.8 病毒感染相关 (VIA) 抗原琼脂凝胶免疫扩散试验(VIA-AGID)

##### 4.8.1 材料

4.8.1.1 血清样品的采集和处理见附录 A。

4.8.1.2 VIA 抗原。

4.8.1.3 VIA 抗体阳性(对照)血清

4.8.1.4 缓冲液

0.02mol/L Tris-0.15mol/L 氯化钠(pH7.6)

Tris	2.42g
氯化钠 (NaCl)	3.80g
蒸馏水	1000mL

用浓盐酸调整 pH 为 7.6。

4.8.1.5 模板: 用有机玻璃板制作。本试验设计了两种不同孔数的模板 (图 1 和图 2 所示)。

I 型模板由 1 个中央孔和 6 个均匀分布的周边孔组成, 孔径和孔间距均为 4mm。II 型模板为适应大批量检测需要设计的, 由 4 组 I 型模板组成。

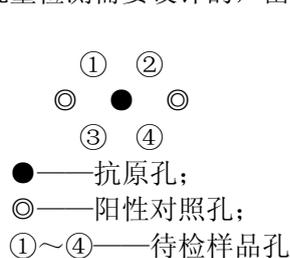


图 1 I 型模板

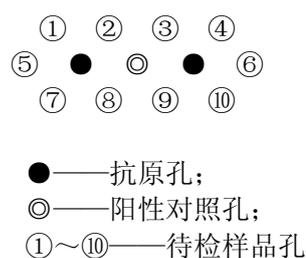


图 2 II 型模板

4.8.1.6 打孔器：与模板配套制作的，外径为 4mm 的不锈钢管。

4.8.1.7 平皿：常用直径 6cm 的平皿，要求底面平整光滑。

#### 4.8.2 试验操作

##### 4.8.2.1 琼脂糖凝胶板的制备

称取 1.0g 琼脂糖(电泳用)，置于 150mL 容量的三角烧瓶中，再加入 100mL 缓冲液。将三角烧瓶置于磁力搅拌器上，边搅拌边加热至沸腾使琼脂糖完全融化。将熔化的琼脂糖溶液注入平皿中，每个平皿加 8mL，凝胶板厚约 3mm。待自然冷却凝固后，盖好平皿后倒置放在湿盒中，4℃冰箱保存。

##### 4.8.2.2 打孔

按检测样品的数量选用模板。揭开平皿，将模板放在凝胶板上方，打孔器垂直插入模板孔中并穿透凝胶直至底面。打完孔后拿开模板，用细针头轻轻挑出孔中的凝胶块，将平皿底部在酒精灯上略烤封底。

##### 4.8.2.3 加样

用微量移液器每孔加样 20 $\mu$ L。抗原孔(中央孔)加 VIA 抗原；对照孔(I 型中央孔左、右侧的 2 个周边孔，II 型 2 个中央孔之间的孔)加 VIA 阳性对照血清；其余各孔(I 型 4 孔/板，II 型 10 孔/板)加待检血清样品。

##### 4.8.2.4 扩散

加完样后盖上平皿，放入湿盒中。置于室温 20~25℃任其扩散。

#### 4.8.3 结果判定

4.8.3.1 加样后 24h 开始观察，每天观察并记录，至 120h 时判定结果。当阳性对照与抗原孔之间出现清晰沉淀线时，本试验成立。

4.8.3.2 待检血清与抗原孔之间出现沉淀线，并与阳性对照沉淀线末端相融，该血清判定为“阳性”。

4.8.3.3 待检血清与抗原孔之间虽然未出现沉淀线，但阳性对照沉淀线的末端弯向待检血清孔，该血清判定为弱阳性。

4.8.3.4 待检血清与抗原孔之间未出现沉淀线，该血清判定为阴性。

4.8.3.5 血清孔之间出现的沉淀线，为非特异性反应。

**附录 A**  
(规范性附录)

**口蹄疫非结构蛋白抗体的酶联免疫吸附试验使用溶液的配制**

- A.1 碳酸盐缓冲液 (0.05mol/L、pH9.6, CBS)
- |      |       |
|------|-------|
| 碳酸钠  | 1.59g |
| 碳酸氢钠 | 2.93g |
- 用双蒸水溶解至 1000mL, 于 4℃ 保存, 不超过 1 个月。
- A.2 磷酸盐冲液 (0.01mol/L、pH7.4, PBS)
- |  |        |
|--|--------|
| 氯化钠  | 8g     |
| 磷酸二氢钠  | 0.2g   |
| 磷酸氢二钠 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O) | 2.9g   |
| 氯化钾  | 0.2g   |
| 加蒸馏水至  | 1000mL |
- A.3 洗液 (含 0.05%Tween-20 的 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS, 即 PBST)
- |                           |        |
|---------------------------|--------|
| Tween-20                  | 0.5mL  |
| 加 0.01mol/L、pH7.4 的 PBS 至 | 1000mL |
- A.4 封闭液 (含 0.5%BSA 的 PBST)
- |              |       |
|--------------|-------|
| 牛血清白蛋白 (BSA) | 0.5g  |
| 加洗液至         | 100mL |
- 4℃ 存放, 避光。
- A.5 稀释液 (含 0.1%BSA 的 PBST)
- |              |       |
|--------------|-------|
| 牛血清白蛋白 (BSA) | 0.1g  |
| 加洗液至         | 100mL |
- 4℃ 存放, 避光。
- A.6 间接 ELISA 底物缓冲液 (磷酸氢二钠-柠檬酸, pH5.4)
- |   |        |
|---|--------|
| 0.2mol/L 磷酸氢二钠 (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O) | 26.7mL |
| 0.1mol/L 磷酸钠  | 24.3mL |
| 双蒸水   | 49mL   |
- 准确称量 40mg 邻苯二胺(OPD), 溶解后置暗处保存, 临用前加入 30%过氧化氢 150μL。  
用时现配, 避光。
- A.7 三羟甲基氨基甲烷-盐酸 (Tris-HCl) 缓冲液 (0.05mol/L pH7.6)
- |               |         |
|---------------|---------|
| 0.1mol/L Tris | 250mL   |
| 0.1mol/L 盐酸   | 192.5mL |
| 双蒸水           | 57.5mL  |
- A.8 间接 ELISA 终止液
- |     |        |
|-----|--------|
| 浓硫酸 | 11.1mL |
| 蒸馏水 | 88.9mL |

**附录 B**  
**(规范性附录)**

**口蹄疫非结构蛋白抗体酶联免疫吸附试验抗原包被板制备**

抗原包被板也称诊断板，将基因工程表达口蹄疫非结构蛋白抗原用 0.05mol/L，pH9.6 碳酸盐缓冲液（见附录第 A.1 章）稀释成 3 $\mu$ g/mL 包被 96 孔聚苯乙烯微量板，每孔 100 $\mu$ L，置 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜，用洗液洗涤（见附录第 A.3 章）3 次，用封闭液（见附录第 A.4 章）于 37 $^{\circ}$ C 湿盒内封闭 60min，用洗涤液洗涤 3 次，干燥后即为诊断板，置 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

# 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采样、临床及病理学诊断和实验室检验方法和技术要求。

本规范适用于高致病性禽流感的诊断与监测。

## 2 术语和定义

### 2.1 高致病性禽流感

6 周龄鸡的静脉接种致病指数 (IVPI) 大于 1.2 的 A 型禽流感病毒, 或核苷酸测序证明其血凝素基因裂解位点上有多碱性氨基酸的 H5 及 H7 亚型的 A 型禽流感病毒。

## 3 样品采集与处理

3.1 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; 死禽采集气管、脾、肺、肝、肾和脑等组织样品。

3.2 病料应放在含有抗生素的 pH 值 7.0~7.4 的等渗 PBS 内 (无 PBS 可用 25%~50% 的甘油盐水)。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。

3.3 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)。

3.4 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 1 000r/min 离心 10min, 取上清液作为接种材料。

## 4 诊断指标

### 4.1 临床诊断指标

4.1.1 急性发病死亡;

4.1.2 脚鳞出血;

4.1.3 鸡冠出血或发绀、头部和脸部水肿;

4.1.4 鸭、鹅等水禽可见神经和腹泻症状, 有时可见角膜炎, 甚至失明。

### 4.2 病理诊断指标

4.2.1 肌肉和其他组织器官广泛性严重出血;

4.2.2 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;

4.2.3 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”;

4.2.4 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。

### 4.3 血清学诊断指标

4.3.1 H5 或 H7 的血凝抑制 (HI) 效价达到  $2^4$  及以上;

4.3.2 禽流感琼脂免疫扩散试验 (AGID) 阳性 (水禽除外);

4.3.3 禽流感酶联免疫吸附试验 (ELISA) 阳性。

### 4.4 病原学诊断指标

4.4.1 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;

4.4.2 特异性高致病性禽流感分子生物学方法试验诊断阳性;

4.4.3 静脉内接种致病指数 (IVPI) 大于 1.2。

### 4.5 结果判定

#### 4.5.1 临床怀疑为高致病性禽流感

符合临床诊断指标 4.1.1, 且至少有临床诊断指标 4.1.2、4.1.3、4.1.4 之一的, 或至少有病理诊断指标 4.2.1、4.2.2、4.2.3、4.2.4 之一的。

#### 4.5.2 疑似高致病性禽流感

非免疫禽符合结果判定 4.5.1, 且符合血清学诊断指标 4.3.1、4.3.2 或/和 4.3.3 之一的; 免疫禽符合结果判定 4.5.1, 且能排除鸡新城疫和中毒性疾病的。

#### 4.5.3 确诊

符合结果判定 4.5.2, 且至少符合病原学诊断指标 4.4.1、4.4.2、4.4.3 之一的; 或符合结果判定 4.5.1, 且符合 4.4.1、4.4.2、4.4.3 之一的。

### 5 实验室诊断方法

#### 5.1 病原鉴定方法

5.1.1 通过鸡胚接种进行病原分离 粪便和组织悬液经 1000r/min 离心 10min, 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 4~5d。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 5.4)。阳性反应说明可能有正粘病毒科的流感病毒, 阴性反应的尿囊液至少应再传 2 代。

5.1.2 用 AGID 试验 (见 5.3) 检测, 可证明是否存在 A 型流感病毒属所有成员共同存在的核衣壳和基质抗原。

#### 5.1.3 抗原制备方法

5.1.3.1 用含毒鸡胚尿囊液制备。将含毒尿囊液超速离心或者在酸性条件下进行沉淀以浓缩病毒。

酸性沉淀法是将 1.0mol/L HCl 加入到含毒尿囊液中, 调 pH 值到 4.0, 将混合物置于冰浴中作用 1h, 经 1000r/min, 4℃ 离心 10min, 弃去上清液。病毒沉淀物悬于甘氨酸-肌氨酸缓冲液中 (含 1% 十二烷基肌氨酸缓冲液, 用 0.5 mol/L 甘氨酸调 pH 值至 9.0)。沉淀物中含有核衣壳和基质多肽。

5.1.3.2 用鸡胚绒毛尿囊膜制备。从尿囊液呈 HA 阳性的感染鸡胚中取绒毛尿囊膜, 将其匀浆或研碎, 然后反复冻融三次, 经 1000r/min 离心 10min, 弃沉淀, 取上清液用 0.1% 福尔马林灭活 24h, 制备抗原。

#### 5.2 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  $lg2^4$ ), 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 24 小时检查鸡群一次, 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)。

#### 5.3 琼脂凝胶免疫扩散试验 (AGID)

因为 A 型流感病毒都有抗原性相似的核衣壳和基质抗原, 可以利用免疫扩散试验检测 A 型流感病毒的存在与否。琼脂免疫扩散试验已作为常规试验方法来检测鸡与火鸡的特异性抗体, 并可作为鸡群感染证据。

#### 5.3.1 琼脂板制备

该试验常用 1 克优质琼脂粉或 0.8~1g 琼脂糖加入 100mL 0.01mol/L pH 值 7.2 的 8% 氯化钠-磷酸缓冲液中, 水浴加热融化, 稍凉 (60~65℃), 倒入琼脂板内 (厚度为 3mm), 待琼脂凝固后, 4℃ 冰箱保存备用。用打孔器在琼脂板上按 7 孔梅花图案打孔, 孔径约 3mm~4mm, 孔距为 3mm。

#### 5.3.2 加样

用移液器滴加抗原于中间孔, 周围 1、4 孔加阳性对照血清, 其余孔加被检血清, 每孔均以加满不溢出为度, 每加一个样品应换一个滴头, 并设阴性对照血清。

#### 5.3.3 孵育

将琼脂板加盖保湿, 倒置于 37℃ 温箱, 24~48h 后, 判定结果。

### 5.3.4 结果判定

当标准阳性血清与标准抗原孔之间有明显沉淀线时，试验成立。

5.3.4.1 阳性：被检血清与抗原孔之间形成沉淀线，并与阳性对照血清的沉淀线末端吻合。

5.3.4.2 弱阳性：被检血清与抗原孔之间没有沉淀线，但阳性血清的沉淀线末端向被检血清孔偏弯（需重复试验）。

5.3.4.3 阴性：被检血清与抗原孔之间不形成沉淀线，且阳性血清沉淀线指向被检血清孔。

## 5.4 血凝抑制（HI）试验

### 5.4.1 操作程序

#### 5.4.1.1 抗原血凝效价测定

(1) 10%和 1% 鸡红细胞液的制备

① 采血：用注射器吸取阿氏液约 1mL，取 SPF 鸡（最少 2 只），采血约 2~4mL，与阿氏液混合，放入装 10mL 阿氏液的离心管中混匀。

② 洗涤鸡红细胞：将离心管中的血液经 1500~1800 r/min 离心 5min，弃上清液，沉淀物加入阿氏液，轻轻混合，再经 1500~1800 r/min 离心 5min，用吸管移去上清液及沉淀红细胞上层的白细胞薄膜，再多次重复以上过程后，加入阿氏液 5~10 mL，轻轻混合成红细胞悬液，4℃ 保存备用，不超过 5d。

③ 10%鸡红细胞悬液：取阿氏液保存不超过 5d 的红细胞，在锥形刻度离心管中离心 1500~1800 r/min 5min，弃去上清液，准确观察刻度离心管中红细胞体积(mL)，加入 9 倍体积(mL)的生理盐水，用吸管反复吹吸使生理盐水与红细胞混合均匀。

④ 1%鸡红细胞液：取混合均匀的 10%鸡红细胞悬液 1 mL，加入 9 mL 生理盐水，混合均匀即可。

(2) 抗原血凝效价测定（HA 试验，微量法）

① 在微量反应板的 1 孔~12 孔均加入 0.025mL PBS，换滴头。

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。

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。

④ 每孔再加入 0.025mL PBS。

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）见附录 B。

⑥ 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。

⑦ 结果判定：将板倾斜，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）。

#### 5.4.1.2 血凝抑制（HI）试验（微量法）

(1) 根据 5.4.1.1 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）。

(2) 在微量反应板的 1 孔~11 孔加入 0.025mL PBS，第 12 孔加入 0.05mL PBS。

(3) 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。

(4) 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。

(5) 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。

(6) 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  $2^2$  或  $2\log_2$ ），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（ $2^4$  或  $4\log_2$ ）能抑制 4HAU 抗原，可判为抗体阳性，使用 8HAU 抗原时，阳性滴度为大于等于 1/8（ $2^3$  或  $3\log_2$ ）

## 5.5 禽流感 RT-PCR 试验

### 5.5.1 试剂/引物

5.5.1.1 变性液：见附录 A.1

5.5.1.2 2M 醋酸钠溶液(pH4.0)：见附录 A.2

5.5.1.3 水饱和酚 (pH 4.0)

5.5.1.4 氯仿/异戊醇混合液：见附录 A.3

5.5.1.5 M-MLV 反转录酶 (200u/μL)

5.5.1.6 RNA 酶抑制剂(40u/μL)

5.5.1.7 Taq DNA 聚合酶(5u/μL)

5.5.1.8 1.0% 琼脂糖凝胶：见附录 A.4

5.5.1.9 50×TAE 缓冲液：见附录 A.5

5.5.1.10 溴化乙锭(10 μg/μL)：见附录 A.6

5.5.1.11 加样缓冲液：见附录 A.7

5.5.1.12 焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的灭菌双蒸水：见附录 A.8

5.5.1.13 5×反转录反应缓冲液 (附录 A.9)

5.5.1.14 2.5mmol dNTPs (附录 A.10)

5.5.1.15 10×PCR Buffer (附录 A.11)

5.5.1.16 DNA 分子量标准

5.5.1.17 引物：见附录 B

### 5.5.2 操作程序

5.5.2.1 样品的采集和处理：按照 GB/T 18936 中提供方法进行。

#### 5.5.2.2 RNA 的提取

(1) 设立阳性、阴性样品对照。

(2) 异硫氰酸胍一步法

① 将组织或细胞中加入适量的变性液，匀浆。

② 将混合物移至一管中，按每毫升变性液中立即加入 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。

③ 将匀浆剧烈振荡 10s。冰浴 15min 使核蛋白质复合体彻底裂解。

④ 12000r/min，4℃离心 20min，将上层含 RNA 的水相移入一新管中。为了降低被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。

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。

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。

(3) 也可选择市售商品化 RNA 提取试剂盒，完成 RNA 的提取。

#### 5.5.2.3 反转录

(1) 取 5μL RNA，加 1μL 反转录引物，70℃作用 5min。

(2) 冰浴 2min。

(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。

#### 5.5.2.4 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；H5-380U/H5-380L、H7-501U/H7-501L、H9-732U/H9-732L 分别特异性扩增 H5、H7、H9 亚型血凝素基因片段；N1-358U/N1-358L、N2-377U/N2-377L 分别特异性扩增 N1、N2 亚型神经氨酸酶基因片段。

PCR 为 50 $\mu$ L 体系, 包括:

双蒸灭菌水	37.5 $\mu$ L
反转录产物	4 $\mu$ L
上游引物	0.5 $\mu$ L
下游引物	0.5 $\mu$ L
10 $\times$ PCR Buffer	5 $\mu$ L
2.5mmol dNTPs	2 $\mu$ L
Taq 酶	0.5 $\mu$ L

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。在每个 PCR 管中加入 1 滴液体石蜡(约 20 $\mu$ L)。循环参数为 95 $^{\circ}$ C 5min, 94 $^{\circ}$ C 45s, 52 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 循环 30 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 6min 结束。设立阳性对照和阴性对照。

#### 5.5.2.5 电泳

- (1)制备 1.0%琼脂糖凝胶板, 见附录 A.4。
- (2)取 5  $\mu$ L PCR 产物与 0.5 $\mu$ L 加样缓冲液混合, 加入琼脂糖凝胶板的加样孔中。
- (3)加入分子量标准。
- (4)盖好电泳仪, 插好电极, 5V/cm 电压电泳, 30~40min。
- (5)用紫外凝胶成像仪观察、扫描图片存档, 打印。
- (6)用分子量标准比较判断 PCR 片段大小。

#### 5.5.3 结果判定

5.5.3.1 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。

5.5.3.2 用 M-229U/M-229L 检测, 出现大小为 229bp 扩增片段时, 判定为禽流感病毒阳性, 否则判定为阴性。

5.5.3.3 用 H5-380U/H5-380L 检测, 出现大小为 380bp 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。

5.5.3.4 用 H7-501U/H7-501L 检测, 出现大小为 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。

5.5.3.5 用 H9-732U/H9-732L 检测, 出现大小为 732bp 扩增片段时, 判定为 H9 血凝素亚型禽流感病毒阳性, 否则判定为阴性。

5.5.3.6 用 N1-358U/N1-358L 检测, 出现大小为 358bp 扩增片段时, 判定为 N1 神经氨酸酶亚型禽流感病毒阳性, 否则判定为阴性。

5.5.3.7 用 N2-377U/N2-377L 检测, 出现大小为 377bp 扩增片段时, 判定为 N2 神经氨酸酶亚型禽流感病毒阳性, 否则判定为阴性。

#### 5.6 禽流感病毒(NASBA)检测

##### 5.6.1 材料准备

##### 5.6.1.1 试验环境

洁净分区环境, 分为核酸提取、核酸扩增和核酸检测三个区。

##### 5.6.1.2 器材

采用常规的分子生物学器材, 包括: 一次性手套、移液器(量程5 $\mu$ L 到200 $\mu$ L)、滴头、无RNA酶的1.5mL塑料离心管、1.5mL离心管架、5mL试管架、旋涡振荡器、计时器、高速台式离心机、温度计(精度 $\pm 2^{\circ}$  C)、加热器、水浴锅、5mL 聚丙烯试管(VWR)、封口膜。

如果采用ECL方法, 需要NucliSens阅读器或者其它等同仪器。

如果采用ELISA方法, 需要酶标仪。

##### 5.6.1.3 引物

上游引物 AAT TCT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GAG AAG G A(A/G)G GCA  
TT(C/T) TGG ACA AA(G/T) CGT CTA

下游引物 GAT GCA AGG TCG CAT ATG AGG AGA GAA GAA GAA AAA AGA GAG  
GAC

5.6.1.4 检测试剂:所有检测试剂在使用前, 使其达到室温。

- (1)裂解缓冲液(5mol/L异硫氰酸胍, 10%Triton X-100, 10mmol/LTris/HCl);

- (2) 冲洗缓冲液 (5mol/L 异硫氰酸胍, 10mmol/L Tris/HCl) ;
- (3) 500mg/mL 硅土 (500mg/mL 盐酸活化的二氧化硅)。
- (4) 洗脱缓冲液 (10mmol/L Tris/HCl) ;
- (5) 酶溶液 (见附录C) ;
- (6) H5 捕捉探针 (10mmol/L 生物素化寡聚核苷酸) ;

探针序列为 Biotin-CCG TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA

- (7) 电化学发光法属别检测探针 (钆标记的DNA 寡聚核苷酸) ;

ECL 序列为 GAT GCA AGG TCG CAT ATG AG CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG

TA

- (8) 仪器调试参照液;
- (9) 检测稀释液 (15mmol/L Tris-HCl) ;
- (10) 分析缓冲液; (50mmol/L Tris-HCl) ;
- (11) 清洗液 (100mmol/L KOH, 10% SDS, 10% Triton X-100) ;
- (12) 无水乙醇。

5.6.1.5 样品采集、保存、处理按GB/T 18936—2003 中2.1款进行。

## 5.6.2 操作方法

### 5.6.2.1 核酸释放和提取

- (1) 将0.1mL 样品加入盛有0.9mL 裂解缓冲液的管中并振荡混合;
  - (2) 振荡混合硅土悬浮液并向每个管中加入50 $\mu$ L;
  - (3) 振荡混合均匀;
  - (4) 室温下温育10min (每2min 振荡混合一次, 防止硅土沉淀) ;
  - (5) 在12,000r/min 下离心裂解缓冲液管30s;
  - (6) 小心移除上清液 (不要搅动沉淀) 后, 向每个管中加入1mL 冲洗缓冲液;
  - (7) 振荡混合直至管中沉淀重新完全悬浮为止;
  - (8) 在12000r/min 下离心30s, 然后移除上清液;
  - (9) 重复第(6)到第(8)的步骤。第一次使用冲洗缓冲液; 第二次使用70%乙醇; 最后一次使用无水乙醇;
  - (10) 最后一次洗涤步骤后, 用移液器小心移除残余乙醇;
  - (11) 使用加热器在56 $^{\circ}$ C 敞口干燥硅土10min (用薄纸覆盖每个管避免污染) ;
  - (12) 干燥后向每个管加入50 $\mu$ L 洗脱缓冲液;
  - (13) 振荡试管直至沉淀物再次重新完全悬浮;
  - (14) 56 $^{\circ}$ C 温育硅土悬浮液10min 以洗脱核酸 (5min 后开始振荡试管) ;
  - (15) 在12000r/min 下离心2min;
  - (16) 将5 $\mu$ L 核酸上清液转移至新试管, 在1h 内开始扩增反应。
- 以上步骤也可采用Qiagen 试剂盒或者其它等同试剂盒进行。

### 5.6.2.2 核酸扩增

- (1) 在向上述5 $\mu$ L核酸 (5.1 p) 中加入10 $\mu$ L扩增试剂;
- (2) 65 $^{\circ}$ C 温育5min;
- (3) 41 $^{\circ}$ C 温育5min;
- (4) 加入5 $\mu$ L酶溶液, 并用手指轻轻扣击试管促使混合均匀;
- (5) 放回试管, 并继续在41 $^{\circ}$ C 温育5min;
- (6) 将试管稍作离心后, 在41 $^{\circ}$ C 温育90min;
- (7) 检测扩增产物;
- (8) 在-70 $^{\circ}$ C 下保存扩增产物不超过30d。

### 5.6.2.3 核酸检测

按照以下步骤或用ELISA方法进行检测。

- (1) 将 (N\*+2) 个5mL聚丙烯试管进行编号, 试管1作为空白对照;
- (2) 振荡混合, 除了试管1外, 其余试管各加入20 $\mu$ L杂交溶液 (见附录D) ;
- (3) 试管2中加入5 $\mu$ L检测稀释液作为空白对照;
- (4) 其余试管各加5 $\mu$ L RNA 扩增产物;
- (5) 封口膜封住所有试管, 振荡混合;

- (6) 所有试管41℃温育30min。每10min混合一次；
- (7) 除了试管1外，其余试管各加入0.3mL分析缓冲液；
- (8) 振荡仪器调试参照液直至不透明，然后加0.25mL IRS到试管1。
- (9) 把试管放在转盘式传送盘的适当位置上。
- (10) 运行NucliSens阅读器，对数据进行分析和解释（见附录E）。

\*注：N为样品数。

### 5.6.3 结果判定

通过大量分析已知阴性对照样品后，确定NASBA/ECL的临界值为0.15X仪器参照溶液的数值。样品的读数超过临界值时，判为禽流感病毒阳性，低于临界值时，判为禽流感病毒阴性。

## 5.7 禽流感病毒通用荧光RT-PCR检测

### 5.7.1 材料与试剂

#### 5.7.1.1 仪器与器材

荧光RT-PCR检测仪

高速台式冷冻离心机（离心速度12000r/min以上）

台式离心机（离心速度3000r/min）

混匀器

冰箱（2~8℃和-20℃两种）

微量可调移液器（10μL、100μL、1000μL）及配套带滤芯吸头离心管（1.5mL）。

#### 5.7.1.2 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附录B

### 5.7.2 抽样

#### 5.7.2.1 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。

#### 5.7.2.2 样品采集

##### (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。

##### (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。

##### (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。

#### 5.7.2.3 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。

#### 5.7.2.4 样品制备

##### (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。

##### (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。

#### 5.7.2.5 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)。

#### 5.7.3 操作方法

##### 5.7.3.1 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。

##### 5.7.3.2 样本的处理

在样本制备区进行。

(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。

(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。

(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。

(4) 于4℃、12000r/min离心15min(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600μL 75%乙醇, 颠倒洗涤。

(5) 于4℃、12000r/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)。

(6) 4000r/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, 一份样本换一个吸头, 吸头不要碰到有沉淀一面, 室温干燥3min, 不能过于干燥, 以免RNA不溶。

(7) 加入11μL DEPC水, 轻轻混匀, 溶解管壁上的RNA, 2000r/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。

##### 5.7.3.3 检测

###### (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。

###### (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。

###### (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。

#### 5.7.4 结果判定

##### 5.7.4.1 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。

##### 5.7.4.2 质控标准

(1) 阴性对照无Ct值并且无扩增曲线。

(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。

#### 5.7.4.3 结果描述及判定

(1) 阴性

无Ct值并且无扩增曲线，表示样品中无禽流感病毒。

(2) 阳性

Ct值 $\leq$ 30.0，且出现典型的扩增曲线，表示样品中存在禽流感病毒。

(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。

**附录 A**  
**(规范性附录)**  
**相关试剂的配制**

A.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  $\beta$ -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  $\beta$ -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。

A.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

A.3 氯仿/异戊醇混合液

氯仿	49mL
异戊醇	1mL

A.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 $\mu$ L，摇匀，倒入电泳板上，凝固后取下梳子，备用。

A.5 50×TAE 电泳缓冲液

A.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

A.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。

A.6 溴化乙锭 (EB) 溶液

溴化乙锭	20mg
灭菌双蒸水	加至 20mL

A.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

A.8 DEPC 水

超纯水	100mL
焦碳酸二乙酯(DEPC)	50μL

室温过夜，121℃高压 15min，分装到 1.5 mL DEPC 处理过的微量管中。

A.9 M-MLV 反转录酶5×反应缓冲液

1mol Tris-HCl (pH 8.3)	5mL
KCl	0.559g
MgCl <sub>2</sub>	0.029g
DTT	0.154g
灭菌双蒸水	加至 100mL

A.10 2.5mmol/LdNTP

DATP(10mmol/L)	20μL
DTTP(10mmol/L)	20μL
DGTP(10mmol/L)	20μL
DCTP(10mmol/L)	20 μL

A.11 10×PCR 缓冲液

1M Tris-HCl (pH8.8)	10mL
1M KCl	50mL
Nonidet P40	0.8mL
1.5mol MgCl <sub>2</sub>	1mL
灭菌双蒸水	加至 100mL

**附录 B**  
**(规范性附录)**  
**禽流感病毒 RT-PCR 试验用引物**

**B.1 反转录引物**

Uni12: 5' -AGCAAAAGCAGG-3' , 引物浓度为 20pmol。

**B.2 PCR 引物**

见下表, 引物浓度均为 20pmol。

**B.2 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'		
H5-380U	5' -AGTGAATTGGAATATGGTAACTG-3'	380	H5
H5-380L	5' -AACTGAGTGTTTCATTTTGTCAAT-3'		
H7-501U	5' -AATGCACARGGAGGAGGAACT-3'	501	H7
H7-501L	5' -TGAYGCCCCGAAGCTAAACCA-3'		
H9-732U	5' -TCAACAACTCCACCGAAACTGT-3'	732	H9
H9-732L	5' -TCCCGTAAGAACATGTCCATACCA-3'		
N1-358U	5' -ATTRAATACAAYGGYATAATAAC-3'	358	N1
N1-358L	5' -GTCWCCGAAAACYCCACTGCA-3'		
N2-377U	5' -GTGTGYATAGCATGGTCCAGCTCAAG-3'	377	N2
N2-377L	5' -GAGCCYTTCCARTTGTCTCTGCA-3'		

W = (AT); Y = (CT); R = (AG)。

**附录C**  
**(规范性附录)**  
**酶溶液的配制**

C.1 配制材料

C.1.1 酶球（单个酶球（6.5mg）含1.3U/ $\mu$ L AMV-RT，0.51.3U/ $\mu$ L RNaseH，151.3U/ $\mu$ L T7 RNA 聚合酶,100mmol/LTris /HCl,10%BSA）；

C.1.2 酶球稀释剂（0.42  $\mu$ g/ $\mu$ L BSA）；

C.1.3 球状骨针（单个球状骨针为10mg，4mmol/LNTP,15mDTT, 40mmol/LMgCl<sub>2</sub>）。

C.1.4 球状骨针稀释剂（100mmol/LTris/HCl pH8.3, 2mmol/LdNTP）；

C.1.5 氯化钾溶液(100mmol/LKCl solution)；

C.1.6 引物混合物(10mmol/L Primer Mixture)；

C.1.7 阳性对照RNA（positive control RNA）；

C.1.8 DEPC 水。

C.2 配制过程

C.2.1 酶稀释液的制备

C.2.1.1 单个球状骨针中加入80 $\mu$ L 球状骨针稀释剂，并迅速振荡均匀；

C.2.1.2 稀释的球状骨针中加入16 $\mu$ L KCl 溶液和14 $\mu$ L DEPC 水，振荡均匀；

C.2.1.3 加入10 $\mu$ L 引物混合物，振荡混合；

C.2.1.4 不能离心；

C.2.1.5 在30min 内使用。

C.2.2 酶溶液的制备

C.2.2.1 单个酶球中加入55 $\mu$ L 酶稀释液，将此溶液放置室温至少20min；

C.2.2.2 用手指轻轻扣击试管让酶球充分溶解；

C.2.2.3 不能剧烈振荡任何含酶的溶液；

C.2.2.4 使用前，稍作离心；

C.2.2.5 在60min 内使用。

**附录D**  
**(规范性附录)**  
**杂交溶液的配制**

杂交溶液制备

- D.1 振荡通用型捕捉探针和ECL 探针直到形成不透明溶液。
- D.2 对于N 次特异性检测反应，在新试管中混合  $(N+2) \times 10\mu\text{L}$  捕捉探针和  $(N+2) \times 10\mu\text{L}$  ECL 探针。
- D.3 使用前稍作振荡。
- D.4 在60min 内使用。

**附录E**  
**(资料性附录)**  
**NucliSens 阅读器的操作运行**

- E.1 建立一个新的运行程序。
  - E.1.1 打开NucliSens 阅读器的个人电脑。
  - E.1.2 在开始界面点击“Prime”来执行系统校准。
  - E.1.3 机器准备好后，点击“Start”。校准步骤大约持续3min。
  - E.1.4 在登入(log-in)界面的用户名(user name)上选择“service engineer”并且点击“login”。不需要输入密码。
  - E.1.5 在屏幕左上方选择“Routine”菜单然后点击“New Run”。
  - E.1.6 在弹出的工作表界面点击“yes”。
  - E.1.7 输入文件名(不超过8个字符)并且点击“ok”。
  - E.1.8 一个工作表单会打开，在分析选择栏(selected assay)选择“Free tube”。
  - E.1.9 输入样品号并且点击“Add to list”。
  - E.1.10 重复上述步骤直到输入所有样品ID。
  - E.1.11 输入所有样品号后，点击“close”键。
  - E.1.12 屏幕出现了一张列有所有样品号的工作表。检查工作表，检查无误后点击“OK”。
- E.2 确定样品放在转盘式传送盘(instrument carousel)上，并且按照计算机中输入的样品ID顺序摆放。
- E.3 在屏幕上方选择“Routine”菜单然后点击“Run Worklist”。
- E.4 出现一个检查弹出窗口，点击“Proceed”。
- E.5 检测开始(每个试管用时大约1.5min)。
- E.6 检测停止后，在屏幕左上方选择“Routine”菜单然后点击“Sample results”或者“Assay result”显示结果。

**附录 F**  
**(规范性附录)**  
**磷酸盐缓冲盐水配方**

以下所用试剂均为分析纯。

**F.1 A液**

0.2 mol/L磷酸二氢钠水溶液

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  27.6 g, 溶于蒸馏水中, 最后稀释至1000 mL。

**F.2 B液**

0.2 mol/L磷酸氢二钠水溶液

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  53.6 g, (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  71.6 g或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  35.6 g) 加蒸馏水溶解, 最后稀释至1000 mL。

**F.3 0.01 mol/L、pH7.2 磷酸盐缓冲盐水的配制**

0.2 mol/L A液14 mL

0.2 mol/L B液36 mL

加NaCl 8.5 g

用蒸馏水稀释至1 000 mL

**附录 G**  
**(资料性附录)**  
**试剂盒的组成**

**G.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

**G.2 说明**

G.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。

G.2.2 DEPC水，用1%DEPC处理后的去离子水，用于溶解RNA。

G.2.3 RT-PCR反应液中含有特异性引物、探针及各种离子。

**G.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。

**G.4 使用时的注意事项**

G.4.1 在检测过程中，必须严防不同样品间的交叉污染。

G.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采样、临床及病理学诊断、实验室检验的方法和技术要求。

本规范适用于鸡和其他禽新城疫（ND）的诊断。

## 2 临床与病理学诊断

### 2.1 典型临床症状

发病鸡精神沉郁或无任何症状而死亡；体温升高、食欲减退、精神萎顿、产蛋减少或停止；口腔和鼻腔分泌物增多，嗉囊胀满；鸡冠及髯发绀，呼吸困难、喉部发出“咯咯”声；下痢，粪便稀薄，呈黄绿色或黄白色；部分病鸡还出现神经症状，如偏头转颈，作转圈运动或共济失调。

### 2.2 典型病理变化

主要病变是全身粘膜和浆膜出血；腺胃粘膜水肿，乳头或乳头间有出血点、溃疡或坏死，小肠、盲肠和直肠粘膜有出血、坏死病变；盲肠扁桃体常见肿大、出血和坏死；气管出血，周围组织水肿；肺瘀血、出血或水肿；心冠脂肪有细小如针尖大的出血点；产蛋母鸡的卵泡和输卵管显著充血、出血；淋巴结肿胀、出血和坏死；脑膜充血或出血。

## 3 样品采集与处理

无菌采取疑似 ND 病死鸡的大脑组织、气管、肺、肝、脾，装入灭菌小瓶中，盖好瓶盖并记录清楚（编号、采样时间、鸡群编号及发病的情况），样品立即送实验室处理或于 $-20^{\circ}\text{C}$ 以下冷冻保存。活禽可采其气管和泄殖腔拭子，将其放入盛有抗生素 PBS（抗生素的浓度是青霉素 2000 单位/mL，链霉素 2mg/mL，庆大霉素 0.05mg/mL，制菌霉素 1000 单位/mL；粪便样品要求抗生素浓度提高 5 倍）的离心管中，样品应尽快处理或于 $4^{\circ}\text{C}$ 保存，但不超过 4 天。

取采集样品约 1g 放入研磨器中磨碎，加入 5mL 抗生素 PBS 制成 1:5(W/V)悬液，并在室温下静置 1~2h，然后移入小离心管中，在不超过 $25^{\circ}\text{C}$ 的室温下，以 2000r/min 离心 15min。上清液用于接种鸡胚。或以灭菌离心管盛装磨碎稀释的检样，置台式离心机中 5000r/min 离心 10min，将上清液移入另一只灭菌离心管中 8000r/min 离心 10min，取上清液进行下一项试验。

## 4 病原分离与鉴定

4.1 鸡胚接种 用 1mL 注射器吸取无菌样品上清液接种 9~10 日龄 SPF 鸡胚的尿囊腔或绒毛尿囊膜，每份样至少接种 5 枚鸡胚，每胚 0.2mL。接种后在 $35\sim 37^{\circ}\text{C}$ 继续孵化 4~5d，弃去 24h 内死亡的鸡胚。24h 以后死亡的和濒死的以及结束孵化时存活的鸡胚置 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱，4~24h 收集其尿囊液。以澄清无菌尿囊液作血凝试验（HA），测定 HA 效价，方法同 5.2。HA 阴性者，至少用 SPF 鸡胚再传代两次。

### 4.2 HA 试验

确定尿囊液是否有血凝性，方法同 5.2。

### 4.3 血凝抑制试验（HI）

确定尿囊液中病毒的血凝性是否能被新城疫病毒特异性抗血清所抑制，即确定尿囊液中的病毒是否为新城疫病毒，方法同 7.2。

### 4.4 1 日龄雏鸡脑内接种致病指数（ICPI）测定

取血凝滴度为 $2^4$ 以上的新鲜感染鸡胚尿囊液，用灭菌生理盐水稀释 10 倍，脑内注射出壳后 24~40h 之内的 SPF 雏鸡，每份样品接种 10 只，每只接种 0.05mL。并设生理盐水和标准毒株阳性对照。接种鸡隔离饲养，每 24h 观察一次，连续观察 8d，每天观察即应给鸡打分，正常鸡记作 0，病鸡记作 1，死亡鸡记作 2（死亡鸡在死后每天观察都记作 2），ICPI 是指每只鸡 8d 内所有观察计分总数的平均数。

$$\text{ICPI} = \frac{8 \text{ 天累计发病数} \times 1 + 8 \text{ 天累计死亡数} \times 2}{8 \text{ 天累计观察鸡的总数}}$$

结果举例见表 1。

表 1 ICPI 测定结果判定

临床症状	1	2	3	4	5	6	7	8	8 天累计鸡只数	分 值
正常	10	4	0	0	0	0	0	0	14	14×0=0
发病	0	6	10	4	0	0	0	0	20	20×1=20
死亡	0	0	0	6	10	10	10	10	46	46×2=92
总值									80	112

$$\text{ICPI} = 112/80 = 1.4$$

#### 4.5 6 周龄鸡静脉接种致病指数 (IVPI) 测定

取 HA 滴度为 2<sup>4</sup> 以上的新鲜感染尿囊液，用灭菌生理盐水稀释 10 倍，翅静脉接种 6 周龄 SPF 小鸡，每只 0.1mL。每份样品接种 10 只，并设生理盐水和标准毒株阳性对照，隔离饲养。每 24h 观察一次，连续观察 10d，每天观察应给鸡打分，正常鸡记作 0，病鸡记作 1，瘫痪鸡或有其他神经症状的记作 2，死亡鸡记作 3（死亡鸡在死后的每天观察都记作 3）。IVPI 是 10d 内每次观察每只鸡的记录总数的平均数。

$$\text{IVPI} = \frac{10 \text{ 天累计发病数} \times 1 + 10 \text{ 天累计瘫痪数} \times 2 + 10 \text{ 天累计死亡数} \times 3}{10 \text{ 天累计观察鸡只总数}}$$

结果判定举例见表 2。

表 2 IVPI 测定结果判定

临床症状	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	10 天累计鸡只数	分 值
正常	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0	12	12×0=0
发病	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0	6	6×1=6
瘫痪	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	6	6×2=12
死亡	0	2	6	8	10	10	10	10	10	10	76	76×3=228
总值											100	246

$$\text{IVPI} = 246/100 = 2.46$$

#### 4.6 鸡胚平均致死时间 (MDT) 测定

将新鲜感染尿囊液，用灭菌生理盐水稀释成 10<sup>-6</sup>-10<sup>-9</sup> 五个不同稀释度，每个稀释度分别接种 9~10 日龄 SPF 鸡胚 5 只，每只尿囊腔接种 0.1mL。已接种的鸡胚置于 37℃ 孵育，剩余的稀释病毒液置于 4℃，8h 后每个稀释度分别接种另外 5 只鸡胚，每只 0.1mL，于 37℃ 继续孵化，每天早晚观察 2 次，间隔 12h，连续观察 7d，每次观察都应记录鸡胚死亡的时间。MDT 是指最小致死量引起鸡胚死亡的平均时间。

$$\text{MDT} = \frac{(X \text{ 小时死亡胚数} \times X \text{ 小时} + Y \text{ 小时死亡胚数} \times Y \text{ 小时} + \dots)}{\text{死亡胚总数}}$$

#### 4.7 结果判定

4.7.1 ICPI 值越大, NDV 致病性越强。最强毒力病毒的 ICPI 接近 2.0, 而弱毒株毒力的 ICPI 值为 0。

4.7.2 IVPI 值越大, NDV 致病性越强。最强毒力的病毒的 IVPI 值可达 3.0, 弱毒株的 IVPI 值为 0。

4.7.3 MDT 低于 60h 为强毒型 NDV; MDT 值在 60~90h 为中等毒力型 NDV; MDT 大于 90h 为低毒力 NDV。

### 5 NDV 的 HA 试验

#### 5.1 材料与试剂

5.1.1 器材:普通天平、分析天平、普通离心机、微型振荡器、煮沸消毒器、冰箱、高压灭菌器、微量移液器、吸头、96 孔 V 型血凝反应板。

5.1.2 磷酸缓冲盐水 (PBS), 配制方法见附录 A。

5.1.3 1%鸡红细胞悬液, 配制方法见附录 A。

5.1.4 标准 NDV 抗原。

#### 5.2 HA 试验

5.2.1 在 96 孔 V 型微量血凝反应板上, 自第 1 孔至第 11 孔每孔加入 25 $\mu$ l PBS。

5.2.2 在第一孔中加入被检病毒液 (感染尿囊液) 25 $\mu$ l; 充分混和后移出 25 $\mu$ l 至第二孔, 依次类推作等量倍比稀释至第 10 孔, 第 10 孔弃去 25 $\mu$ l。

5.2.3 设 11 孔为红细胞对照 (阴性对照), 不加病毒液, 只加入 25 $\mu$ l PBS; 12 孔为标准 NDV 对照。

5.2.4 上述每孔各加入 25 $\mu$ l 1%鸡红细胞悬液, 立即放在微型振荡器上摇匀, 室温 (约 20 $^{\circ}$ C) 静置 40min, 或 4 $^{\circ}$ C 60min, 待阴性对照孔红细胞全部沉淀后, 判定结果。血凝效价高于 2<sup>10</sup>时可继续增加稀释孔数。方法示意图表 3。

表 3 NDV 的 HA 试验程式 (单位  $\mu$ l)

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
稀释倍数	2 <sup>1</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>7</sup>	2 <sup>8</sup>	2 <sup>9</sup>	2 <sup>10</sup>		
PBS	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	—
病毒液	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
1%鸡红细胞	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
感作	20 $^{\circ}$ C左右		40min, 或 4 $^{\circ}$ C 60min									
结果举例	#	#	#	#	#	#	#	#	+++	++	+	—
	#											
注: 1) 11 孔为红细胞对照; 12 孔为 4 单位标准 (HAU) NDV 抗原对照。 2) # 为完全凝集, +++ ++ + 为不完全凝集, — 为不凝集。												

能使鸡红细胞完全凝集的病毒最高稀释倍数为该病毒的 HA 效价。例如, 表 3 所示, 病毒 HA 效价为 2<sup>7</sup>, 即 1:128。

#### 5.2.5 判定

将血凝板倾斜, 从背侧观察, 看红细胞是否呈泪珠状流下。滴度是指产生完全凝集 (无红细胞流下) 的最高稀释度。仅当对照成立时, 判定结果方为有效。

### 6 NDV 的 HI 试验 (病毒鉴定试验)

#### 6.1 材料与试剂

6.1.1 器材同 5.1.1。

6.1.2 试剂同 5.1.2。

6.1.3 标准抗 NDV 血凝抑制抗体（阳性血清）。

6.1.4 4 个血凝单位的病毒液制备：

根据 6.2 测定的病毒的血凝效价，判定 4 个血凝单位的稀释倍数。方法举例为：如病毒 HA 效价为  $2^9$ ，其 4 个血凝单位为  $2^7$ ，则将病毒稀释 128 倍即可。

6.2 HI 试验

6.2.1 在 96 孔 V 型血凝反应板上，1-11 孔各加入 25 $\mu$ l PBS。12 孔加入 50 $\mu$ l PBS。

6.2.2 在第一孔加入 25 $\mu$ l 标准抗 NDV 血清，充分混匀后移出 25 $\mu$ l 至第 2 孔，依次类推，倍比稀释至第 10 孔，第 10 孔稀释混匀后弃去 25 $\mu$ l，11 孔加入 4 倍稀释的标准阳性血清 25 $\mu$ l，第 11 孔为 4 倍稀释的标准阳性血清对照；12 孔加入 4 倍稀释的标准阳性血清 25 $\mu$ l，12 孔为 4HAU 标准 NDV 抗原与 4 倍稀释的标准阳性血清的血凝抑制对照。

6.2.3 在 1-10 孔每孔加入 25 $\mu$ l 4 个血凝单位的待检病毒液，12 孔加入 4HAU 标准 NDV 抗原，立即在微型振荡器上摇匀，室温（约 20 $^{\circ}$ C）静置不少于 30min，或 4 $^{\circ}$ C 不少于 60min。

6.2.4 每孔各加入 25 $\mu$ l 1%鸡红细胞悬液，置微型振荡器上摇匀后，室温（约 20 $^{\circ}$ C）静置 40min，或 4 $^{\circ}$ C 60min，这时 4 倍稀释的标准阳性血清对照孔应呈明显的纽扣状，方法示意图表 4

6.2.5 结果判定

将血凝板倾斜，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。仅当该滴度与已知标准血清滴度相差在一个稀释度范围内且所有对照成立时，判定结果方为有效。

表 4 HI 试验程式 (单位  $\mu$ l)

孔号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
稀释倍数	$2^1$	$2^2$	$2^3$	$2^4$	$2^5$	$2^6$	$2^7$	$2^8$	$2^9$	$2^{10}$		
PBS	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	—
被检血清	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
4 个血凝单位病毒	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	—	25
感 作	20 $^{\circ}$ C 左右						40min, 或 4 $^{\circ}$ C 60min					
1%鸡红细胞	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25
感 作	20 $^{\circ}$ C 左右						40min, 或 4 $^{\circ}$ C 60min					
结果举例	—	—	—	—	—	—	—	++	+++	#	#	—
注：1) 11 孔为 4 被稀释的标准阳性血清对照；12 孔为 4HAU 标准 NDV 抗原与 4 倍稀释的标准阳性血清的血凝抑制对照。 2) +++++ 为完全凝集，即凝集未被抑制；+++ ++ + 为不完全凝集，即凝集被部分抑制； — 为不凝集，即凝集被完全抑制。												

## 7 结果判定

7.1 疑似新城疫

有典型症状或典型病变。

7.2 确诊新城疫

从疑似病例的样品中分离到 HA 滴度大于等于  $2^4$  的病毒，这种血凝性能被新城疫标准阳性血清有效抑制，分离毒的 ICPI 大于或等于 0.7 可判断为中等或强毒新城疫感染。

**附录 A**  
(规范性附录)

**A.1 磷酸缓冲盐水 (PBS) 配制**

氯化钠 NaCl	8.0g
氯化钾 KCl	0.2g
磷酸氢二钠 Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44g
磷酸二氢钠 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24g

溶于 800mL 纯水中，用 HCl 调 pH 至 7.0~7.4，加纯水至 1000mL，分装，121℃ (15 磅) 20min 高压灭菌。

**A.2 1%鸡红细胞悬液配制**

采集 2~3 只健康公鸡加抗凝剂的血液，放入离心管中，加入 3~4 倍量生理盐水，以 2000r/min 离心 5min，去掉血浆和白细胞层，再加生理盐水，混匀、离心，反复洗涤 3 次，最后吸取压积红细胞用生理盐水配成 1% (V/V) 悬液。

# 猪瘟诊断技术规范

## 1 范围

本规范规定了猪瘟（CSF）临床、病理和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 临床及病理学诊断

### 2.1 临床诊断

如猪群中被检猪只体温在 40.5℃ 以上，精神萎靡、倦怠，食欲不振、厌食、呕吐、便秘腹泻交替，可视粘膜充血、出血或有不正常分泌物，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，做可疑猪瘟对待，全群隔离饲养，作进一步诊断。

带毒母猪大都表现繁殖障碍、病毒可水平和垂直传播，产下仔猪有衰弱、震颤、痉挛、发育不良等现象，通常表现为先天性感染和免疫耐受，应进行实验室确诊。

### 2.2 病理学诊断

对检出的可疑患病猪可抽样进行病理学诊断，下述病变作为综合诊断定性的依据之一：

2.2.1 肾皮质色泽变淡，有出血点。

2.2.2 淋巴结外观充血、切面周边出血，呈红白相间的“大理石”样。

2.2.3 脾脏表面有点状出血或边缘楔状梗死区。

2.2.4 心脏、喉头、膀胱有小出血点。

2.2.5 全身出血性变化、多呈小片或点状。

2.2.6 回盲瓣、回肠、结肠形成“钮扣状”溃疡。

## 3 实验室诊断方法

### 3.1 病原学检测方法

#### 3.1.1 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% 扁挑体、肾脏、脾脏或淋巴结等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。程序如下：

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

3.1.1.2 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。

3.1.1.3 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 EMEM 生长液[含 5% 胎牛血清(无 BVDV 抗体，并经 56℃ 灭活 30min)、0.3% 谷氨酰胺、青霉素 100IU/mL、链霉素 0.1mg/mL]悬浮，使细胞浓度为  $2 \times 10^6$ /mL。

3.1.1.4 将细胞悬液与上清液按 9: 1 混合，接种 25cm<sup>2</sup> 细胞瓶，每瓶 1mL；接种含细胞玻片的莱顿氏管(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 25cm<sup>2</sup> 细胞瓶中加入 5mL EMEM 维持液[含 2% 胎牛血清(无 BVDV 抗体，并经 56℃ 热灭活 30min)、0.3% 谷氨酰胺、青霉素 100IU/mL、链霉素 0.1mg/mL]，莱顿氏管中加入 1mL EMEM 维持液。置细胞培养箱中 37℃ 培养。

3.1.1.5 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，取出细胞玻片，以磷酸缓冲盐水（PBS 液，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。

3.1.1.6 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 3.1.1.4 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。

### 3.1.2 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。操作程序如下：

#### 3.1.2.1 样品的采集和选择

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。

其它样品：尸体解剖时采取的病死猪脏器等，如扁桃体、肾脏、脾脏、淋巴结、肝脏和肺脏等脏器等，或病毒分离时待检的细胞玻片。

样品采集、包装与运输见样品采集、保存及运输技术规范。

#### 3.1.2.2 检测方法与判定

##### (1) 方法

将上述组织制成冰冻切片，或待检的细胞培养片，将液体吸干后经冷丙酮固定 5~10min，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 液洗涤，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。

##### (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，并由抑制试验证明为特异的荧光，判猪瘟阳性；无荧光判为阴性。

##### (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鹅黄绿色荧光。

### 3.1.3 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。

#### 3.1.3.1 实验动物:1.5~2kg 家兔，在试验前 1d 测基础体温。

3.1.3.2 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 的猪瘟兔化病毒（淋巴脾脏毒），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。

#### 3.1.4 其他方法

抗原捕获-ELISA 试验和反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 也可用于猪瘟诊断和检测。

### 3.2 抗体检测

#### 3.2.1 猪瘟单克隆抗体酶联免疫吸附试验 (ELISA)

##### 3.2.1.1 用途

本方法用于检测猪瘟弱毒疫苗免疫产生的抗体和猪瘟野毒感染产生的抗体。

##### 3.2.1.2 试验操作方法

(1) 用包被液将猪瘟弱毒单抗纯化的酶联抗原、猪瘟强毒单抗纯化的酶联抗原各作 100 倍稀释，以 100μL 分别加入做好标记的酶联板孔中，置湿盒于 4℃ 过夜。

- (2) 弃去孔内液体。用洗涤液洗板 3 次，每次间隔 3~5min，拍干。
- (3) 用稀释液将待检血清作 400 倍稀释，每孔加 100 $\mu$ L。同时，将猪瘟阳性、阴性血清以 100 倍稀释作对照，37 $^{\circ}$ C 温育 1.5h~2h。
- (4) 重复(2)。
- (5) 用稀释液将兔抗猪 IgG-辣根过氧化物酶结合物作 100 倍稀释，每孔加入 100 $\mu$ L，37 $^{\circ}$ C 培育 1.5h~2h。
- (6) 重复(2)。
- (7) 每孔加入底物液 100 $\mu$ L，室温下观察显色反应（当阴性对照孔略微显色，立即终止反应，并以阴性孔作空白调零）。
- (8) 每孔加终止液 50 $\mu$ L，于酶标检测仪测定 490nm 波长的光密度（OD）。

### 3.2.1.3 判定标准

在猪瘟弱毒酶联板上：

OD $\geq$ 0.2,为猪瘟弱毒抗体阳性

OD $<$ 0.2,为猪瘟弱毒抗体阴性

在猪瘟野毒酶联板上：

OD $\geq$ 0.5,为猪瘟强毒抗体阳性

OD $<$ 0.5,为猪瘟强毒抗体阴性

### 3.2.1.4 注意事项

- (1) 运输单抗纯化酶联抗原时，必须使用冰盒低温运输。
- (2) 配置洗涤液时，应使用新鲜蒸馏水或无离子水，每次洗板后，尽量不要在孔中留有残余液体，以免影响结果；
- (3) 底物溶液应临用前配置，待邻苯二胺完全溶解于底物缓冲液后再加过氧化氢，混匀后立即使用；
- (4) 终止反应后，应立即读数。

### 3.2.1.5 试剂配制

#### (1) 包被液

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.59g
NaHCO <sub>3</sub>	2.93g
双蒸水	1000mL

调 pH 至 9.6。

#### (2) 磷酸缓冲盐水(PBS)

NaCl	8.0g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (无水)	2.13g
KCl	0.2g

加双蒸水 1000mL,完全溶解后用 3mol/L NaOH 调 PH 为 7.4。

#### (3) 磷酸缓冲盐水-吐温（PBS-T）洗涤液

PBS	1000mL
吐温-20（Tween-20）	0.5mL

充分摇匀

#### (4) 稀释液(PBS-T-BS)

PBS-T	100mL
小牛血清	5mL

充分摇匀

#### (5) 邻苯二胺底物液(OPD)

##### ① 0.1mol/L 柠檬酸液

称取柠檬酸(C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O)21g,加双蒸水溶解至 1000mL;

##### ② 0.2mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 溶液;

称取 71.6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 加双蒸水溶解至 1000mL;

##### ③ 取①液 24.3mL, ②液 25.7mL,混匀, pH5.0;

##### ④ 取邻苯二胺 20mg 溶于 20mL(3)液中,临用前加 30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.075mL(75 $\mu$ L);

##### ⑤ 终止液(2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

于 500mL 蒸馏水中缓慢加入 76mL 浓硫酸 (98%), 混匀即成。

### 3.2.2 荧光抗体病毒中和试验

本方法是国际贸易指定的猪瘟抗体检测方法。该试验采用固定病毒稀释血清的方法, 测定的结果表示待检血清中抗体的中和效价。具体操作如下:

将浓度为  $2 \times 10^5$  细胞/mL 的 PK-15 细胞悬液接种到带有细胞玻片的 5cm 平皿或莱顿氏管 (Leighton's), 也可接种到平底微量培养板中。

细胞培养箱中 37°C 培养至 70%~80% 的细胞单层 (1~2d)。

将待检血清 56°C 灭活 30min, 用无血清 EMEM 培养液作 2 倍系列稀释。

将稀释的待检血清与含 200TCID<sub>50</sub>/0.1mL 的猪瘟病毒悬液等体积混合, 置 37°C 孵育 1~2h。

用无血清 EMEM 培养液漂洗细胞单层。加入血清-病毒混合物, 每个稀释度加 2 个莱顿氏管或培养板上的 2 个孔, 37°C 孵育 1h。

吸出感作物, 加入 EMEM 维持液 [含 2% 胎牛血清 (无 BVDV 抗体, 并经 56°C 灭活 30min)、0.3% 谷氨酰胺、青霉素 100U/mL、链霉素 0.1mg/mL], 37°C 继续培养 48h~72h; 最终用荧光抗体染色法进行检测 (见附件 2), 计算中和效价。

### 3.2.3 猪瘟中和试验方法

3.2.3.1 测定猪瘟兔化弱毒 (抗原) 对家兔的最小感染量。生理盐水稀释抗原, 使每 1mL 含有 100 个兔的最小感染量, 为工作浓度抗原 (如抗原对兔的最小感染量为  $10^{-5}$ /mL, 则将抗原稀释成 1000 倍使用)。

3.2.3.2 将被检猪血清分别用生理盐水作 2 倍稀释, 与含有 100 个兔的最小感染量工作抗原等量混合, 摇匀后, 置 10~15°C 中和 2h, 其间振摇 2~3 次。同时设含有相同工作抗原量加等量生理盐水 (不加血清) 的对照组, 与被检组在同样条件下处理。

3.2.3.3 中和完毕, 被检组各注射家兔 1~2 只, 对照组注射家兔 2 只, 每只耳静脉注射 1mL, 观察体温反应, 并判定结果。

3.2.3.4 结果判定 当对照组 2 只家兔均呈定型热反应 (++), 或 1 只兔呈定型热反应 (++), 另一只兔呈轻热反应时, 方能判定结果。被检组如用 1 只家兔, 须呈定型热反应; 如用 2 只家兔, 每只家兔应呈定型热反应或轻热反应, 被检血清判为阴性。

3.2.3.5 兔体体温反应标准如下:

热反应 (+) 潜伏期 24~72h, 体温上升呈明显曲线, 超过常温 1°C 以上, 稽留 12~36h。

可疑反应 (±) 潜伏期不到 24h 或 72h 以上, 体温曲线起伏不定, 稽留不到 12h 或超过 36h 而不下降。

无反应 (-) 体温正常。

## 4 结果判定

### 4.1 疑似猪瘟

有典型症状或典型病变。

### 4.2 确诊猪瘟

病原学检测结合动物试验证明存在猪瘟野毒感染; 或猪瘟单抗荧光抗体、猪瘟单克隆抗体 ELISA 等试验检测呈野毒抗原或抗体阳性。

# 口蹄疫监测技术规范

## 1 范围

本规范规定了口蹄疫常规监测，疫病发生后对疫点、疫区和受威胁区的监测技术要求。  
本规范适用于饲养和流通环节的猪、牛、羊以及其他易感动物及其产品的口蹄疫监测。

## 2 术语和定义

### 2.1 监测

对口蹄疫的发生、流行、分布及相关因素进行系统的长时间的观察与检测，以把握该疫病的发生情况和发展趋势。

### 2.2 岗哨动物

临床健康、无口蹄疫病原和抗体的易感动物，在疫病监测过程中，将其饲养于某一特定地点，用来指示该地点是否存在所监测的特定疫病。

## 3 样品采集和储运要求

按照《样品采集、保存及运输技术规范》执行。

## 4 监测方法

临床检查、血清学检测与病原学检测方法见口蹄疫诊断技术规范。

## 5 监测方式

### 5.1 疫情监视与报告

饲养、生产、经营、屠宰、加工、运输牲畜及其产品的单位和个人，怀疑发生疫情时，必须立即报告当地动物防疫监督机构。

动物防疫监督机构应定期开展疫情普查。

### 5.2 免疫效果监测

见口蹄疫免疫技术规范。

### 5.3 常规监测

#### 5.3.1 监测对象

包括不同年龄/品种的猪、牛、羊以及其他易感动物。

#### 5.3.2 样品采集及检测

采集血清、O-P 液和组织样品等，检测血清抗体用非结构蛋白（NSPs）间接 ELISA，检测 O-P 液和组织样品用相应的病原检测方法。检测发现疑似样品，送国家口蹄疫参考实验室确诊。

#### 5.3.3 监测频度及抽样数量

依照动物种类、动物数量、饲养方式和地理分布采取层次分类随机选样法抽样。

100 头以上的猪、牛、羊以及其他易感动物群每半年随机抽样 30 头；农村散养动物，原则上每个自然村每半年随机抽样 30 头（易感动物合计），不足 30 头的全部采集。

必要时，可适当增加监测频度和抽样数量。

### 5.4 疫点、疫区和受威胁区的监测

5.4.1 按照口蹄疫流行病学的调查范围，对疫区和受威胁区的畜群每周 1 次，连续 1 个月临床观察，如出现临床症状，采样送省级动物防疫监督机构实验室进行检测，或送国家口蹄疫参考实验室进行病毒分离和鉴定。

5.4.2 解除封锁前，对疫区和受威胁区所有猪、牛和羊规模场及自然村采集血样，或 O-P 液等样品进行感染抗体或病原学检测，样品数量见 5.3.3。

#### 5.4.3 岗哨动物

必要时，设岗哨动物。原疫点内畜舍在清洗消毒 30d 后放养岗哨动物，岗哨动物的数量为牛 2 头和/或猪 2~4 头，并由兽医技术人员定期检查，至少饲养 30d，经血清学或病原学检测阴性，方可允许重新饲养动物。

## 6 监测结果处理

6.1 监测结果由动物防疫监督机构进行分析、汇总和报告，并作为采取防疫措施、解除封锁和疫情评估的依据。

6.2 监测结果由动物防疫监督机构存档或备案。

# 高致病性禽流感监测技术规范

## 1 范围

本规范规定了高致病性禽流感常规监测和疫病发生后对疫点、疫区和受威胁区的监测技术要求。

本规范适用于饲养和流通环节禽类的高致病性禽流感监测。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本规范。

### 2.1 监测

对高致病性禽流感的发生、流行、分布及相关因素进行系统的长时间的观察与检测，以把握该疫病的发生情况和发展趋势。

### 2.2 岗哨动物

临床健康、无高致病性禽流感病原和抗体的易感动物，在疫病监测过程中，将其饲养于某一特定地点，用来指示该地是否存在所监测的疫病。

## 3 样品采集和储运要求

按照《样品采集、保存及运输技术规范》执行。

## 4 监测方法

流行病学调查见高致病性禽流感流行病学调查技术规范，临床症状检查、血清学检测、病原学检测见高致病性禽流感诊断技术规范。

## 5 监测方式

### 5.1 疫情监视与报告

饲养、生产、经营、屠宰、加工、运输禽类及其产品的单位和个人，怀疑发生疫情时，必须立即报告当地动物防疫监督机构。

动物防疫监督机构应定期开展疫情普查。

### 5.2 免疫效果监测

见高致病性禽流感免疫技术规范。

### 5.3 常规监测

#### 5.3.1 监测对象 鸡、鸭、鹅以及其他易感禽类。

#### 5.3.2 监测频度及抽样数量

1000羽以上的禽群每6个月随机采样30只进行检测；散养禽每个自然村每6个月随机采样30只，不足30只的全部采集。必要时，可适当增加监测频度和抽样数量。

#### 5.3.3 样品采集与检测

采集的易感禽类的气管拭子、泄殖腔拭子和/或血清，采用病毒检测或血清学方法进行检测。检测发现疑似样品，送国家禽流感参考实验室确诊。

### 5.4 疫点、疫区和受威胁区的监测

5.4.1 按照高致病性禽流感流行病学的调查范围，对疫区和受威胁区的禽群每周1次连续进行1个月临床观察，病死禽送省级动物防疫监督机构实验室进行诊断，疑似样品送国家禽流感参考实验室进行病毒分离和鉴定。

5.4.2 对疫区养猪场采集鼻腔拭子，受威胁区所有禽群采集气管拭子和泄殖腔拭子，在野生禽类活动或栖息地采集新鲜粪便或水样，每个采样点采集20份样品，用RT-PCR方法进行病原检测，发现疑似感染样品，送国家禽流感参考实验室确诊。

解除封锁前采样检测1次，解除封锁后采样检测2次，间隔3个月。

5.4.3 必要时，恢复饲养前在原疫点内禽舍饲养适龄岗哨鸡30只，临床观察21d。岗哨鸡应每周采集血清检测抗体。如有发病或死亡，按规定采集样品进行实验室检测。

## 6 监测结果处理

6.1 监测结果由动物防疫监督机构进行分析、汇总和报告，并作为采取防疫措施、解除封锁和疫情评估的依据。

6.2 监测结果由动物防疫监督机构存档或备案。

# 新城疫监测技术规范

## 1 范围

本规范规定了新城疫常规监测和疫病发生后对疫点、疫区和受威胁区的监测技术要求。本规范适用于饲养和流通环节禽类的新城疫监测。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本规范。

### 2.1 监测

对新城疫的发生、流行、分布及相关因素进行系统的长时间的观察与检测，以把握该疫病的发生情况和发展趋势。

### 2.2 岗哨动物

临床健康、无新城疫病原和抗体的易感动物，在疫病监测过程中，将其饲养于某一特定地点，用来指示是否存在所监测的疫病。

## 3 样品采集和储运要求

按照《样品采集、保存和运输技术规范》执行。

## 4 监测方法

流行病学调查、临床症状检查、血清学检测、病原学检测分别见新城疫流行病学调查技术规范和新城疫诊断技术规范。

## 5 监测方式

### 5.1 疫情监视与报告

饲养、生产、经营、屠宰、加工、运输禽类及其产品的单位和个人，怀疑发生疫情时，必须立即报告当地动物防疫监督机构。

动物防疫监督机构应定期开展疫情普查。

### 5.2 免疫效果监测

见新城疫免疫技术规范。

### 5.3 常规监测

#### 5.3.1 监测对象

鸡及其他易感禽类。

#### 5.3.2 监测频度及抽样数量

1000羽以上的禽群每6个月随机采样30只进行检测；散养禽每个自然村每6个月随机采样30只，不足30只的全部采集。必要时，可适当增加监测频度和抽样数量。

#### 5.3.3 样品采集与检测

按规定采集易感禽类的气管拭子、泄殖腔拭子和/或血清。采用血清学方法、病毒检测或病毒分离进行检测。检测发现疑似样品，送国家新城疫参考实验室确诊。

### 5.4 疫点、疫区和受威胁区的监测

5.4.1 按照新城疫流行病学的调查范围，对疫区和受威胁区的禽群每周1次连续进行1个月临床观察，病死禽送省级动物防疫监督机构实验室进行诊断，疑似样品送国家新城疫参考实验室进行病毒分离和鉴定。

5.4.2 对疫区、受威胁区所有禽群采集气管拭子和泄殖腔拭子，在野生禽类活动或栖息地采集新鲜粪便或水样，每个采样点采集20份样品，进行病原检测。

解除封锁前采样1次，解除封锁后采样2次，间隔3个月。

5.4.3 必要时，恢复饲养前在原疫点内禽舍饲养适龄岗哨鸡30只，临床观察21d。岗哨鸡应每周采集血清检测抗体。如有发病或死亡，按规定采集样品进行实验室检测。

## 6 监测结果处理

6.1 监测结果由动物防疫监督机构进行分析、汇总和报告，并作为采取防疫措施、解除封锁和疫情评估的依据。

6.2 监测结果由动物防疫监督机构存档或备案。

# 猪瘟监测技术规范

## 1 范围

本规范规定了猪瘟常规监测和疫病发生后对疫点、疫区和受威胁区的监测技术要求。  
本规范适用于饲养和流通环节猪瘟的监测。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本规范。

### 2.1 监测

对猪瘟的发生、流行、分布及相关因素进行系统的长时间的观察与检测，以把握该疫病的发生情况和发展趋势。

### 2.2 岗哨动物

临床健康、无猪瘟病原和抗体的易感动物，在疫病监测过程中，将其饲养于某一特定地点，用来指示该地是否存在所监测的疫病。

## 3 样品采集和储运要求

按照《样品采集、保存及运输技术规范》执行。

## 4 监测方法

流行病学调查、临床症状检查、血清学检测、病原学检测分别见猪瘟流行病学调查技术规范 and 猪瘟诊断技术规范。

## 5 监测方式

### 5.1 疫情监视与报告

饲养、生产、经营、屠宰、加工、运输牲畜及其产品的单位和个人，怀疑发生疫情时，必须立即报告当地动物防疫监督机构。

动物防疫监督机构应定期开展疫情普查。

### 5.2 免疫效果监测

见猪瘟免疫技术规范。

### 5.3 常规监测

#### 5.3.1 监测对象

包括不同年龄/品种的猪及其他易感动物。

#### 5.3.2 监测频度及抽样数量

依照动物数量、饲养方式和地理分布采取层次分类随机选样法抽样。100 头以上的猪群及其他易感动物群每半年随机抽样 30 头；农村散养动物，原则上每个自然村每半年随机抽样 30 头，不足 30 头的全部采集。

#### 5.3.3 样品采集及检测

采集血清、活体组织等样品，用 ELISA 检测猪瘟强毒感染抗体或荧光抗体法检测病原。

### 5.4 疫点、疫区和受威胁区的监测

5.4.1 按照猪瘟流行病学的调查范围，对疫区和受威胁区的猪群每周 1 次连续进行 1 个月临床观察，对病死猪采样送省级动物防疫监督机构实验室或国家猪瘟参考实验室诊断。

5.4.2 对疫区和受威胁区所有规模养猪场及自然村散养猪户抽样采集血样。每个规模场采集 30 头猪的血样，每个自然村采集 30 头，不足 30 头的全部采集。

对采集的样品进行感染抗体检测。如果发现野毒感染抗体阳性，则按照疫情处置有关规定处理。

#### 5.4.3 岗哨动物

必要时在原疫点内畜舍清洗消毒 40d 后放养 4~5 周龄岗哨猪 5 头，临床观察 40d，应无临床症状，血清学和病原学检测阴性。

## 6 监测结果处理

6.1 监测结果由动物防疫监督机构进行分析、汇总和报告，并作为采取防疫措施、解除封锁和疫情评估的依据。

6.2 监测结果由动物防疫监督机构存档或备案。

## 第五部分 检疫与监管

- 1 动物隔离场管理规范
- 2 动物及动物产品流通控制规范
- 3 动物及动物产品防疫追溯规范
- 4 饲养场动物防疫条件
- 5 家禽饲养场防疫管理规范
- 6 猪饲养场防疫管理规范
- 7 奶牛饲养场防疫管理规范
- 8 屠宰厂动物防疫条件
- 9 家禽屠宰检疫规范
- 10 牛羊屠宰检疫规范
- 11 猪屠宰检疫规范
- 12 动物无害化处理场管理规范
- 13 消毒技术规范

# 动物隔离场管理规范

## 1 范围

本规范规定了无规定动物疫病区动物隔离场的建设条件和管理要求，动物隔离的实施、记录和报告等。

本规范适用于无规定动物疫病区种用、乳用、役用动物隔离场的建设和管理。

## 2 选址、布局

### 2.1 选址

动物隔离场应设在无规定动物疫病区缓冲区。

动物隔离场应选择交通便利、无有害气体和其它污染物的区域，并距干线公路、铁路、居民区、工厂、学校、动物饲养场、动物屠宰场、动物交易市场、垃圾和污水处理场所等1000米以上。

### 2.2 布局

动物隔离场周围有符合防疫要求的围墙和绿化缓冲带，在动物隔离场入口处设警示标志。动物隔离场设办公区和隔离区，办公区和隔离区之间严格分开。

## 3 设施设备

3.1 动物隔离场内应具备防鼠、防风、防盗、供水、供电设施以及存放饲草、饲料的场所。

3.2 动物隔离场及隔离舍的出、入口处设消毒池、消毒通道、更衣室。更衣室内应有紫外灯，有专用衣、帽、鞋。

3.3 有对动物采样和处理的场地，必要的安全保定设施以及对患病动物隔离饲养的场地。

3.4 有对动物排泄物、垫草、污水及其它废弃物无害化进行处理的设施。

3.5 有供动物隔离场运行及隔离观察的必要设备，包括消毒设备，熏蒸设备，样品采集、保存设备，温度调节设备，信息处理设备，封闭运输车辆等。

## 4 管理要求

4.1 动物隔离场应有完善的隔离、消毒、检疫、值班等工作制度，管理人员无人兽共患传染病。

4.2 动物隔离场由省级动物防疫监督机构统一安排使用。凡需使用动物隔离场的单位，提前30天办理预定手续。

4.3 动物隔离场禁止参观，人员、车辆及物品等未经许可不得出入。严禁非工作人员进入隔离区。

4.4 工作人员、饲养人员进出隔离区，应更衣、换鞋，经消毒池、消毒通道出入。

4.5 使用单位应在动物入场前，派人到动物隔离场在管理人员指导监督下彻底清洗、消毒隔离舍、场地及有关设备、用具等。

4.6 动物入场运输所使用的车辆、饲料、垫料、排泄物及其它被污染物料等，应在动物运抵隔离场后，在动物隔离场管理人员指导监督下进行清洗、消毒和无害化处理。

4.7 使用单位应当选派畜牧兽医专业人员驻场，负责动物隔离期间的饲养管理等相关工作。驻场人员入场前应做健康检查，无人兽共患传染病。

### 4.8 隔离期间的要求

4.8.1 隔离动物应在管理人员指定分配的隔离舍饲养，未经许可不得擅自调换。

4.8.2 驻场人员应在管理人员指导监督下负责隔离动物的饲养管理，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，并协助采样及其它有关检疫、监测工作。

4.8.3 驻场人员不得擅自离开动物隔离场，不得任意出入其它隔离舍，未经管理人员批准不得中途换人。

4.8.4 隔离动物所需饲料、牧草、垫料、药物、疫苗及器物等及驻场人员所使用的日常生活用品，不得来自其它饲养场。严禁将肉类、骨、皮、毛等动物产品带入动物隔离场内，未经动物隔离场管理人员同意不得携进（出）任何物品。

4.8.5 隔离动物的排泄物、垫料及污水须经无害化处理后方可排出动物隔离场外。

4.8.6 发现疑似患病或死亡的动物，应及时报告当地动物防疫监督机构，将患病动物与其他动物进行隔离观察。对患病动物停留过的地方和污染的用具、物品进行消毒。

4.9 动物隔离结束后，使用单位应在动物隔离场管理人员指导监督下清洗消毒使用过的隔离

舍、场地、用具等。

4.10 动物隔离场应当保持隔离舍及场内环境清洁卫生，做好灭鼠、防蚊、防蝇、防火、防盗等工作。

4.11 动物隔离场使用前后，应彻底消毒三次，每次间隔三天，并做好消毒效果的检测；同一隔离舍内，不得同时隔离两批（含）以上的动物；隔离舍两次使用间隔时间至少 15 天。

## **5 隔离检疫**

5.1 动物隔离期限：根据不同动物疫病的潜伏期，实施一定时间的隔离。

5.2 隔离期满，经检疫合格的隔离动物登记其畜禽标识，凭动物防疫监督机构签发的检疫证明放行。检疫不合格的动物按照国家有关规定处理。

## **6 隔离记录和报告**

### **6.1 记录**

检疫人员在动物隔离期间做好隔离观察记录，建立完整的隔离观察记录档案。隔离观察记录包括进场时间、货主姓名、动物种类及数量、畜禽标识编码、持证情况、隔离观察情况、处理、采样检测情况等。

### **6.2 报告**

动物隔离场应定期将工作情况及统计报表上报当地和省级动物防疫监督机构。

# 动物及动物产品流通控制规范

## 1 范围

本规范规定了动物及动物产品在无规定动物疫病区内流通、进出无规定动物疫病区、通过无规定动物疫病区的各项要求，以及对动物及动物产品进入无规定动物疫病区后实施的流通监管。

本规范适用于对无规定动物疫病区特定动物疫病的易感动物和动物产品的流通实施官方有效控制。缓冲区采用与无规定动物疫病区同样的措施对动物、动物产品实施流通控制。

## 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。

无规定动物疫病区标准 通则

GB 16548 畜禽病害肉尸及其产品无害化处理规程

## 3 定义

### 3.1 指定通道

指由省、自治区、直辖市人民政府指定并公告的允许无规定动物疫病区外动物及动物产品进入无规定动物疫病区的通道，指定通道应设有动物防疫监督检查站。

## 4 输入

4.1 免疫无规定疫病区输入的易感动物及其产品只能来自于相应的免疫无规定动物疫病区或非免疫无规定动物疫病区。非免疫无规定动物疫病区输入的易感动物及其产品只能来自于相应的非免疫无规定动物疫病区。

4.2 确需从其它地区输入易感动物及动物产品的，必须到输入地省级动物防疫监督机构或其指定的动物防疫监督机构办理准引手续。输入的动物产品，从指定通道进入无规定动物疫病区；输入的易感动物经动物隔离场隔离，从指定通道进入无规定动物疫病区。

4.3 动物及动物产品经指定通道进入无规定动物疫病区

4.3.1 经公路运输进入无规定动物疫病区的动物及动物产品，必须经指定通道进入。动物及动物产品的货主或承运人应主动到动物防疫监督检查站报验，检查人员严格查验验物。

4.3.1.1 对不符合本规范 4.1 和 4.2 规定的动物及动物产品，一律作退回处理，不得进入无规定动物疫病区。

4.3.1.2 对检疫证明、准引手续齐全、有效，证物相符，畜禽标识佩带符合国家有关规定的，在检疫证明上加盖查验印章后放行。

4.3.1.3 对无检疫证明、准引手续或畜禽标识，证物不符和检疫证明过期、涂改、伪造、失效的，不得进入无规定动物疫病区。

4.3.1.4 发现染疫的动物及动物产品按照 GB 16548 进行处理。

4.3.1.5 对疑似染疫的动物和动物产品，应采取隔离、封存、留验等措施，经确认无疫并经严格消毒后方可放行。

4.3.2 对经火车、飞机、轮船等运载工具进入无规定动物疫病区的，参照 4.3.1 的规定执行。

## 5 区内流通及输出

实行畜禽标识的动物凭畜禽标识和检疫证明在无规定动物疫病区内流通或运出无规定动物疫病区；其它动物凭检疫证明在无规定动物疫病区内流通或运出无规定动物疫病区。动物产品凭检疫证明、验讫标志在无规定动物疫病区内流通或运出无规定动物疫病区。

## 6 过境运输

6.1 途经无规定动物疫病区运输动物及动物产品，必须经指定通道进入。货主或承运人应持有效的检疫证明向经过的动物防疫监督检查站报验，并在规定日期内经动物防疫监督机构指定的路线过境。

6.2 动物防疫监督检查站检查人员对经过无规定动物疫病区的动物及动物产品必须严格查验验物。如发现运载工具、包装物和容器有可能中途撒漏的，应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。

6.3 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，必须在动物防疫监督机构指定的地点卸放，并在当地动物防疫监督机构监督下进行无害化处理。

## **7 输入后的监管**

7.1 对进入无规定动物疫病区的动物及动物产品实施全程监控，进行疫情监测和预警。

7.2 对生产、加工、存放进入无规定动物疫病区的动物及动物产品的场所和卸后运输工具进行严格消毒，对排泄物、垫草等进行无害化处理。

7.3 发现染疫动物或动物产品，应立即采取有效措施进行处理，及时追踪溯源。

7.4 对未经允许进入无规定动物疫病区的动物和动物产品，由发现地动物防疫监督机构视其情况，作退回、销毁等处理，并对有关情况进行评估，适时采取有关措施。

# 动物及动物产品追溯规范

## 1 范围

本规范规定了通过查验畜禽标识、检疫证明和记录,实施动物及动物产品可追溯的要求。

本规范适用于在产地、到达地或流通环节中发现染疫或疑似染疫,畜禽标识和检疫证明不符合规定的动物及动物产品时,对这些动物及动物产品实施追踪溯源。

## 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。

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

## 3 定义

### 3.1 追溯

指在产地、到达地或流通环节中发现动物及动物产品存在《畜禽标识和养殖档案管理办法》第三十条规定的情形时,通过查验畜禽标识、检疫证明和记录,对相关动物及动物产品实施追踪溯源的活动。

### 3.2 防疫记录

指各级动物防疫监督机构在实施动物免疫、检疫、监督工作中建立的,记载各类防疫信息的记录。包括养殖档案、防疫档案、产地检疫记录、屠宰检疫记录、监督检查记录、监测检验记录、检查站检查记录、隔离记录、无害化处理记录等。

## 4 追溯的依据

畜禽标识、检疫证明和防疫记录是对动物及动物产品实施追溯的重要依据,必须对畜禽标识、检疫证明的领发和防疫记录的建立实施有效管理。

### 4.1 畜禽标识、检疫证明领发管理

畜禽标识、检疫证明由省级动物疫病预防控制机构和省级动物防疫监督机构统一订制、发放,逐级领发,不得超越辖区、级别发放。健全畜禽标识、检疫证明保管、领发制度,做好记载记录。

### 4.2 防疫记录的建立

各级动物防疫监督机构在实施动物免疫、检疫、监督过程中要建立统一、完整的防疫记录。各类防疫记录项目、格式等由省级动物防疫监督机构统一制定,填写要规范。养殖档案和防疫档案应符合《畜禽标识和养殖档案管理办法》的规定。

## 5 追溯查验的内容

### 5.1 查验畜禽标识、检疫证明

5.1.1 畜禽标识: 畜禽标识编码等。

5.1.2 检疫证明: 编号、起运地、到达地、动物防疫监督机构、检查站及检疫人员签章等。

5.1.3 检疫验讫印章: 签章单位、印章编号等。

5.1.4 检疫验讫标志: 签章单位、标志编号等。

5.2 查验防疫记录。

5.3 查验养殖档案和防疫档案。

5.4 查验畜禽标识、检疫证明领发记录。

5.5 查验生产企业动物及动物产品进出货登记,包装上相关信息等。

## 6 追溯的实施及处理

### 6.1 对产地发现的染疫或疑似染疫动物及动物产品实施追溯

6.1.1 在产地发现染疫或疑似染疫动物及动物产品时,对该动物疫病潜伏期内已调出的、可能染疫的其它动物及动物产品进行追溯。

6.1.2 及时向上级动物防疫监督机构报告,核查已调出动物及动物产品使用的畜禽标识、检疫证明和各类记录,通知到达地和途经滞留地动物防疫监督机构。

6.1.3 到达地和途经滞留地动物防疫监督机构在接到通知后立即对该批动物及动物产品和其滞留的场所实施监控,发现疫情及时处置,并向始发地动物防疫监督机构反馈相关信息。

## 6.2 对到达地或流通环节发现的染疫或疑似染疫动物及动物产品实施追溯

6.2.1 在到达地或流通环节发现染疫或疑似染疫的动物及动物产品时，对动物及动物产品的产地进行追溯。

6.2.2 及时向上级动物防疫监督机构报告，核查动物及动物产品的标识、证明和各类记录，通知始发地动物防疫监督机构。

6.2.3 始发地动物防疫监督机构在接到通知后立即对始发地相关的动物及动物产品实施监控，开展疫情调查和监测，发现疫情及时处置，并向到达地或流通环节的动物防疫监督机构反馈相关信息。

## 6.3 对畜禽标识、检疫证明不符合规定的动物及动物产品实施追溯

对在流通环节发现的畜禽标识、检疫证明不符合规定的动物及动物产品，要根据查实的畜禽标识、检疫证明和记录实施追溯。

# 饲养场动物防疫条件

## 1 范围

本规范规定了规模饲养场的动物防疫条件，包括选址、布局、设施设备、人员要求、防疫制度、记录和报告等。

本规范适用于年饲养量为 500 头以上的猪、100 头以上的牛、500 只以上的羊、10000 羽以上的禽及其它相当规模的畜禽饲养场，其它饲养场可参照执行。省级兽医行政管理部门也可根据实际情况做出相应的规定。

## 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。

NY/T 388 畜禽场环境质量标准

畜禽标识和养殖档案管理办法 中华人民共和国农业部令第 67 号

## 3 选址、布局

### 3.1 选址

应选择在交通便利、水质良好、无有害气体和其他污染物，并距干线公路、铁路、居民区、工厂、学校、动物屠宰场、动物交易市场、垃圾和污水处理场所等 1000 米以上。

### 3.2 布局

场内建筑布局合理，应分为生活区、生产区、生产辅助区，各区之间应当建有围墙或相当围墙功能的隔离设施，界限分明。

3.2.1 生产区布置在上风向，兽医室、隔离病畜禽舍、贮粪场和污水处理池应布置在下风向。

3.2.2 人员、动物和物资运转应采取单一流向，道路分为污道、净道，不重叠，不交叉。

3.2.3 根据功能不同，生产区划分为若干个单元或小区，其间要有防疫隔离设施。

3.3.4 充分考虑动物福利问题。

## 4 设施设备

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 生产区进出处应设置出入人员更衣消毒室。

4.3 饲养场场区和生产区入口处应分别设置消毒池或配备消毒设备。

4.4 根据饲养动物的不同，可在每栋饲养舍门口设置消毒池。

4.5 有符合环保要求的排泄物、污水、污物处理设施，场区环境达到 NY/T 388 要求。

4.6 场内应当设有防蝇、防蚊、防鼠等设施。

4.7 场内设有与饲养规模相适应的兽医室，配备必须的检验仪器、设备和防治、化验、消毒等药品。

4.8 场内建有病死动物及废弃物无害化处理设施设备。

## 5 人员要求

5.1 饲养场应当配备与其生产规模相适应的兽医人员。

5.2 饲养、兽医人员应定期进行健康检查，取得《健康证》后方可上岗。

## 6 防疫制度

建立各种防疫制度，包括：消毒制度，免疫接种制度，出入人员、车辆、物品和参观管理制度，动物疫病登记和疫情报告制度，无害化处理制度等。

## 7 记录

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。

# 家禽饲养场防疫管理规范

## 1 范围

本规范规定了家禽饲养场在疫病预防、监测、控制、扑灭和饲养管理等方面的防疫要求，以及兽药、饲料的使用要求。

本规范适用于规模家禽饲养场。其它家禽饲养场（户）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（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。

GB 16548 畜禽病害肉尸及其产品无害化处理规程

消毒技术规范

饲养场动物防疫条件

## 3 定义

**家禽** 指人工养殖的鸡、鸭、鹅等禽类。

## 4 防疫条件

选址、布局和设施设备等应达到饲养场动物防疫条件的要求，并取得《动物防疫合格证》。

## 5 饲养管理

5.1 同一家禽饲养场内只能饲养同种家禽。同舍家禽坚持“全进全出”的原则。每批家禽出栏后应当清洗、消毒并空舍一定时间。

5.2 家禽饲养场要有严格的人员进出制度，外来人员不得随意进出。

5.3 家禽饲养场应制定消毒制度，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。

5.4 病死家禽的无害化处理按照 GB 16548 执行。

5.5 兽药、饲料和饲料添加剂的使用应当符合国家有关规定。

## 6 疫病预防

6.1 家禽饲养场根据有关规定，结合当地实际情况，进行疫病的预防接种工作，并选择适合的疫苗、免疫程序和免疫方法。

6.2 实施强制免疫的疫病，免疫密度达 100%。

6.3 制定家禽常见寄生虫的驱虫方案和驱虫程序，并定期驱虫。

## 7 疫病的监测

7.1 家禽饲养场应按照有关规定的要求，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。

7.2 家禽饲养场应当向当地动物防疫监督机构提供连续性的疫情监测信息，接受当地动物防疫监督机构的监督。

7.3 怀疑发生疫病，应依法报告当地动物防疫监督机构。

## 8 疫病的控制和扑灭

8.1 家禽饲养场发生疫病或怀疑发生疫病时，应及时向当地动物防疫监督机构报告。

8.2 根据不同的疫病对禽群采取相应的处理措施。

8.3 发生疫病时，对全场进行彻底清洗消毒，消毒按消毒技术规范执行。病死或淘汰禽按 GB 16548 进行无害化处理。

## 9 记录

9.1 做好用药、用料等日常生产记录，同时做好禽进出场、免疫、监测、疫病诊治等记录，接受动物防疫监督机构检查。

9.2 记录至少保存 2 年。

# 养猪场防疫管理规范

## 1 范围

本规范规定了养猪场在防疫条件、饲养管理、兽药和饲料及饲料添加剂的使用、疫病预防、疫病监测、疫病控制和扑灭、记录方面的要求。

本规范适用于规模猪场。其它猪饲养场（户）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规范。

GB 16567 种畜禽调运检疫技术规范

GB 16548 畜禽病害肉尸及其产品无害化处理规程

饲养场动物防疫条件

消毒技术规范

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

## 3 防疫条件

选址、布局和设施设备等应达到饲养场动物防疫条件的要求，并取得《动物防疫合格证》。

## 4 饲养管理

4.1 实行单元式或“全进全出”的饲养方式。

4.2 猪场内不得饲养其它动物。

4.3 需要引进种猪时，应从具有种猪生产经营许可的种猪场引进，并按照 GB 16567 规定进行检疫、隔离。

4.4 猪场应制定环境消毒、人员消毒、猪舍消毒、用具消毒、带猪消毒等消毒制度，并能有效实施。消毒药物的选择和使用应符合消毒技术规范的要求。

4.5 按《畜禽标识和养殖档案管理办法》的要求，建立养殖档案。

4.6 禁止饲喂泔水。

4.7 兽药、饲料和饲料添加剂的使用应符合国家有关规定。

4.8 猪场应谢绝参观。

## 5 疫病预防

### 5.1 免疫接种

养猪场应根据法律法规的要求，结合当地实际情况，进行疫病的预防接种。

5.2 实施强制免疫的疫病，免疫密度达 100%。

5.3 制定猪常见寄生虫的驱虫方案和驱虫程序，并定期驱虫。

## 6 疫病监测

6.1 养猪场应依照规定，结合当地实际情况，制定疫病监测方案，并对口蹄疫和猪瘟进行定期监测。

6.2 养猪场应当向当地动物防疫监督机构提供连续性的疫情监测信息，接受当地动物防疫监督机构的监督。

## 7 疫病的控制和扑灭

7.1 养猪场发生疫病或怀疑发生疫病时，应依法向当地动物防疫监督机构报告。

7.2 根据不同的疫病采取相应的处理措施。

7.3 发生疫病时，对全场进行彻底清洗消毒，消毒按消毒技术规范执行。病死或淘汰猪按 GB 16548 进行无害化处理。

## 8 记录

8.1 做好用药、用料等日常生产记录，同时做好猪进出场、免疫、监测、疫病诊治等记录，接受动物防疫监督机构检查。

8.2 记录至少保存 2 年。

# 奶牛饲养场防疫管理规范

## 1 范围

本规范规定了奶牛饲养场的设施布局与饲养管理、兽药、饲料及饲料添加剂的使用、免疫接种、疫病监测和净化、疫病控制和扑灭、记录的要求。

本规范适用于规模奶牛场。其它奶牛饲养户（点）参照执行。

## 2 规范性应用文件

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 5749 生活饮用水卫生标准

GB 7959 粪便无害化卫生标准

GB 8978 污水综合排放标准

GB 13078 饲料卫生标准

GB 16548 畜禽病害肉尸及其产品无害化处理规程

GB 16567 种畜禽调运检疫技术规范

GB 16568 奶牛场卫生及检疫规范

GB 16569 畜禽产品消毒技术规范

GB 18407 农产品安全质量无公害畜禽肉产地环境要求

NY 388 畜禽场环境质量标准

NY 5046 无公害食品 奶牛饲养兽药使用准则

NY 5048 无公害食品 奶牛饲养饲料使用准则

NY 5049 无公害食品 奶牛饲养管理准则

饲养场动物防疫条件

消毒技术规范

畜禽标识和养殖档案管理办法 中华人民共和国农业部令第 67 号

## 3 设施布局与饲养管理

### 3.1 场址要求

3.1.1 场址应符合 GB 18407、GB 16568 的规定。

3.1.2 符合饲养场动物防疫条件，取得《动物防疫合格证》。

### 3.2 场区的布局与设施要求

3.2.1 场内分区应符合 GB 16568 的要求。运送饲料和生奶的道路与装运排泄物、废弃物等的道路应分设。

3.2.2 场区地形要开阔整齐，以便于生产作业和卫生防疫；场区内的道路应坚硬、平坦、无积水。牛舍、运动场、道路以外地带应绿化；奶牛场和运动场地面要平坦而稍有坡度，坡度以 1%~3%为宜。

3.2.3 牛舍建筑、消毒设施设备及场区内其它设备设施应执行 GB 16568 规定。

3.2.4 牛舍内的温度、湿度、气流（风速）和光照应满足奶牛不同饲养阶段的需求，以降低牛群发生疫病的机会。

3.2.5 牛舍应具备良好的清粪排尿系统，处理后应符合 GB 7959 的规定，排放出场的污水必须符合 GB 8978 的有关规定。牛场排污应遵循减量化、无害化和资源化的原则。

3.2.6 场区内应有供、排水系统，应符合 GB 16568 规定，水质应符合 GB 5749 的规定。如需配备贮水设施，应有防污染措施，并定期清洗、消毒。

3.2.7 场内应设置牛奶专用存放室。

### 3.3 饲养管理要求

3.3.1 日常饲养、管理应充分利用当地现有的饲料资源，结合当地实际，因地制宜，并应符合 GB 16568 规定。

3.3.2 奶牛场的卫生、工作人员健康卫生、生奶存放及运输卫生等应执行 GB 16568、GB 16567 及 NY 5049 规定，环境卫生质量应执行 NY 388 规定。

3.3.3 引进的乳牛、奶牛冻精、奶牛胚胎，应符合 GB 16568 规定，并按照 GB 16567 进行检疫；外来的奶牛应隔离观察合格后，方可并群饲养。

3.3.4 按《畜禽标识和养殖档案管理办法》的要求，建立养殖档案。

3.3.5 应建立规范的消毒制度，包括环境消毒、人员消毒、牛舍消毒、用具消毒、带牛消毒等，并能有效实施。消毒药物的选择和使用应符合消毒技术规范的要求。

3.3.6 生产区应谢绝参观。

#### **4 兽药、饲料及饲料添加剂的使用**

##### **4.1 兽药使用要求**

4.1.1 预防、治疗和诊断疫病所用兽药应符合国家有关法律法规的相关规定，禁止使用违禁药物。治疗患病奶牛执行 NY 5046 的规定。

4.1.2 泌乳牛在正常情况下禁止使用任何药物。必须用药时，在药物残留期间的牛乳不应作为商品牛乳出售，牛乳在上市前应按规定停药，应准确计算停药时间和弃乳期。

##### **4.2 饲料及饲料添加剂使用要求**

4.2.1 饲料及添加剂使用应执行 NY 5048 的规定，禁止使用骨粉、肉骨粉等动物性饲料。

4.2.2 奶牛饲料和饲料添加剂中有害物质及微生物允许量必须符合 GB 13078 的要求。

#### **5 免疫接种**

5.1 奶牛场应根据本地区疫病发生种类、特点及动物防疫监督机构制订的防疫规划，结合本场实际情况，确定免疫接种内容、方法和程序。

5.2 实施强制免疫的疫病，免疫密度达 100%。

#### **6 疫病监测和净化**

6.1 奶牛场应依照有关规定的要求，结合当地实际情况，制定监测方案，定期或不定期进行疫病监测，接受动物防疫机构的监督检查。

6.2 对口蹄疫、蓝舌病、牛白血病、结核病、布鲁氏菌病等疫病应当定期进行临床检查，并定期进行实验室检验。

6.3 牛群要做好全群乳牛的结核病和布氏杆菌病检测。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。可疑反应的牛在隔离期间所产乳不得销售。

6.4 母牛在干乳前 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。

#### **7 疫病控制和扑灭**

7.1 奶牛场发生疫病或怀疑发生疫病时，应立即向当地动物防疫监督机构报告，采取紧急防控措施。

7.2 确诊发生口蹄疫等疫病时，要按相关规定处置。

#### **8 记录**

8.1 做好用药、用料等日常生产记录，同时做好奶牛进出场、免疫、监测、疫病诊治、净化等记录，接受动物防疫监督机构检查。

8.2 记录等资料应长期保存。

# 屠宰场动物防疫条件

## 1 范围

本规范规定了规模屠宰场的标准和动物防疫条件，包括选址、布局、设施设备、人员要求、工作制度、记录和报告等方面的要求。

本规范适用于日屠宰量设计规模在宰杀 500 头猪、100 头牛、500 只羊、10000 只禽以上的屠宰场，其它屠宰场可参照执行。省级兽医行政管理部门根据当地实际情况做出相应的规定。

## 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。

GB 12694 肉类加工厂卫生规范

## 3 选址、布局

### 3.1 选址

3.1.1 屠宰场应建在水源充足、交通方便、无有害气体、灰砂及其它污染物、便于污水排放的地区。

3.1.2 屠宰场应远离学校、村庄、居民区、饮用水取水口、养殖场等相关场所 1000 米以上。

### 3.2 布局

3.2.1 生产作业区应与生活区分开设置，各区之间应当建有围墙或相当围墙功能的隔离设施，界限分明。

3.2.2 动物与动物产品进出场不得共用一个大门，在场内不得共用一个通道。

3.2.3 为防止交叉感染，原料、辅料、生肉、熟肉和成品存放场所（库）应当分开设置。

3.2.4 生产车间的设置、位置以及工艺流程应当符合卫生和动物防疫要求，屠宰场的生产车间一般应按待宰、屠宰、分割、加工、冷藏的顺序设置。

3.2.5 隔离圈、急宰间、无害化处理间、锅炉房、污水和污物处理设施应与分割车间和肉制品车间间隔一定距离，并位于下风向。

3.2.6 生产冷库应与分割肉和肉制品车间直接相连。

3.2.7 屠宰场应在适当位置建立与其规模相适应的检疫室、化验室。

3.2.8 充分考虑动物福利问题。

## 4 场区和道路

4.1 场区主要道路和进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，场区应有符合环保要求的给水、排水系统。

4.2 场区内不得有积水沟、垃圾堆及其他有碍卫生的场所。

## 5 厂房和设施

5.1 厂房与设施应当结构合理、坚固，便于清洗和消毒。

5.2 厂房、设施应与生产能力相适应。厂房高度应能满足生产作业、设备安装、维修、采光与通风的需要。

5.3 厂房应当设有防蝇、防蚊、防鼠、防尘等设施。

5.4 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。

5.5 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。

5.6 厂房天花板：表面涂层应光滑、不易脱落、防止污物积聚。

5.7 厂房门窗：应装配严密，使用不变形的材料制作。

5.8 屠宰生产线应当有固定的检疫位置和足够的检疫空间，屠宰车间须有兽医检疫设施，包括同步检验、对号检验、旋毛虫检验、内脏检验设施及化验室等。

5.9 屠宰场设待宰圈、隔离圈和急宰间。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。

5.10 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。

5.11 设有生产冷库的，应当符合预冷、冻结和冷藏的温度。冷库应安装温度自动记录仪器或设备。

## **6 设备和器具**

6.1 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。

6.2 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。

6.3 固定设备的安装位置应当便于清洗、消毒。

6.4 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。

## **7 人员要求**

生产人员及其他有关工作人员应当符合 GB 12694 的标准，定期进行健康检查，取得《健康证》后方可上岗。

## **8 照明**

车间内应有充足的自然光或人工照明。照明灯具的光不应改变被加工物的本色，亮度应能满足动物检疫员和生产操作人员的工作需要，吊挂在肉品上方的灯具，应当装有安全防护罩。

## **9 通风和温控装置**

9.1 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。

9.2 分割肉和肉制品加工车间及其成品冷却间、成品库应有降温和调节温度的设施。

## **10 记录**

屠宰场应建立屠宰生产记录、消毒记录等，并由专人登记和保管。

# 家禽屠宰检疫规范

## 1 范围

本规范规定了家禽屠宰检疫的对象、程序和要求。

本规范适用于家禽的屠宰检疫。

## 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。

GB 16548 畜禽病害肉尸及其产品无害化处理规程

GB 16549 畜禽产地检疫规范

消毒技术规范

## 3 检疫对象

检疫对象包括传染病、寄生虫病等疾病。

## 4 宰前检疫

### 4.1 查证验物

4.1.1 检查进入屠宰场（厂、点）家禽的检疫证明，核对证物是否相符，并按规定回收和保存。

4.1.2 对无检疫证明、证物不符或疑似染疫的，不准入场，并按有关规定处理。

4.1.3 经临床健康检查合格后，方可卸载。

### 4.2 群体检查

依照 GB 16549 中规定的群体检查方法，检查禽群的动态、静态、粪便及生长发育状况，挑出可疑病禽。

### 4.3 个体检查

个体检查包括群体检查时挑出的异常个体或抽样检查（5%~20%）的个体。检查：羽毛及精神状态；神经症状；体温、呼吸指标；可视粘膜；嗉囊以及排泄物和病理性产物。必要时采集病料进行实验室检验。

### 4.4 检疫后的处理

4.4.1 准宰：经检查，对合格的家禽送屠宰车间屠宰。

4.4.2 急宰：确定为无碍于肉食品安全的濒死家禽，送急宰间急宰。

4.4.3 无害化处理：染疫或疑似染疫的家禽按 GB 16548 进行处理，做好记录并按规定上报。

4.4.4 消毒：对运载车辆和场地按消毒技术规范进行消毒。

## 5 宰后检疫

### 5.1 不净膛屠宰检疫

#### 5.1.1 肉尸检查

5.1.1.1 体表检查：检查皮肤色泽和皮下血管充盈度，判定放血程度；检查体表的完整性和清洁度，即有无损伤、出血、痘痂、结节、肿瘤等；检查腿部、脚关节、头颈有无肿胀、畸形，冠、髯有无异常。

5.1.1.2 天然孔（腔）及可视粘膜检查：检查眼睛、鼻腔有无炎症、肿胀、病理性分泌物；检查口腔、咽喉、有无充血、出血、溃疡等；检查肛门有无充血、出血或下痢等变化。

#### 5.1.2 内脏检查或实验室检验

必要时取出内脏进行检查或进行实验室检验。

#### 5.1.3 检疫后的处理

5.1.3.1 合格：出具检疫证明，加施检疫验讫标志，准予出厂。

5.1.3.2 不合格：按 GB 16548 进行无害化处理，并按规定上报。

5.1.3.3 消毒：对屠宰场地、用具等按消毒技术规范进行消毒。

### 5.2 全净膛屠宰检疫

#### 5.2.1 肉尸检查

执行本规程 5.1.1（肉尸检查）中规定的程序及要求。

## 5.2.2 内脏检查

5.2.2.1 将内脏与肉尸编记同一号码。

5.2.2.2 心脏：检查有无心包炎变化，心冠脂肪、心外膜有无出血点、坏死、结节及观察心脏的肥厚程度。

5.2.2.3 肝脏：检查色泽、大小、硬度、胆囊充盈度有无异常，有无出血点、坏死灶等变化。

5.2.2.4 脾脏：检查有无肿大、瘀血、结节等变化。

5.2.2.5 肺脏：检查有无炎症、瘀血、结节等变化。

5.2.2.6 胃肠：检查胃粘膜、乳头、腺胃与肌胃交界处有无充血、出血、溃疡；检查肠浆膜、肠系膜有无出血、瘀血、结节，肠粘膜有无出血、瘀血、肿胀、坏死、溃疡、内容物异常变化。

5.2.2.7 气管、食道、嗦囊：检查气管有无充血、出血或干酪性分泌物；检查食道、嗦囊有无出血、溃疡、糜烂或肿胀。

## 5.2.3 体腔检查

5.2.3.1 体腔壁：检查有无充血、出血、化脓、结节、纤维素性炎等病变。

5.2.3.2 肾脏：检查有无肿大、充血、出血、尿酸盐沉积等。

## 5.2.4 实验室检验

必要时采集病料进行实验室检验。

## 5.2.5 检疫后的处理

执行本规范 5.1.3 的程序及要求。

## 6 记录

记录被检家禽种类、检疫时间、数量、检疫结果及处理情况等，检疫记录应保存 2 年以上。

# 牛羊屠宰检疫规范

## 1 范围

本规范规定了牛羊屠宰检疫的对象、程序和要求。

本规范适用于牛羊的屠宰检疫。

## 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。

GB 16548 畜禽病害肉尸及其产品无害化处理规程

GB 16549 畜禽产地检疫规范

消毒技术规范

## 3 检疫对象

包括传染病、寄生虫病等疾病。

## 4 宰前检疫

### 4.1 查证验物

4.1.1 检查进入屠宰场（厂、点）牛羊的检疫证明和畜禽标识，核对证物是否相符，并按规定回收和保存。

4.1.2 对无检疫证明、证物不符或疑似染疫的，不准入场，并按有关规定处理。

4.1.3 经临床健康检查合格后，方可卸载。

### 4.2 临床检查

4.2.1 对进入屠宰场的牛羊依照 GB 16549 中规定的检查方法进行临床检查。对疑似染疫的，送入隔离圈，并进行实验室检验。

4.2.2 临宰时要逐头对待宰牛羊进行复查。

### 4.3 检疫后的处理

4.3.1 准宰：检疫合格的牛羊，送屠宰车间屠宰。

4.3.2 急宰：确定为无碍于肉食品安全的濒死牛羊，送急宰间急宰。

4.3.3 禁宰：染疫或疑似染疫的牛羊，禁止屠宰。疑似染疫的送隔离圈，做进一步检查；染疫的，按 GB 16548 进行处理，并按规定上报。

4.3.4 消毒：对运载车辆和场地按消毒技术规范进行消毒。

## 5 宰后检疫

### 5.1 头部检查

5.1.1 检查眼睑、唇、鼻镜、口腔粘膜、舌面、齿龈。

5.1.2 牛剖检两侧颌下淋巴结、咬肌、舌根部，检查咽喉、扁桃体，摘除病变淋巴结。

### 5.2 胴体检查

5.2.1 检查皮肤、脂肪、肌肉、胸腔、腹腔等。

5.2.2 剖检股前、肩前淋巴结。

5.2.3 剖检腰肌、膈肌，必要时剖检肩胛外侧肌、股内侧肌等。

5.2.4 摘除病变淋巴结。

### 5.3 内脏检查

5.3.1 将内脏与胴体编记同一号码。

5.3.2 心脏：检查心包及心外膜，有无心包炎，剖开心室，检查心肌、心内膜及血凝状态。

5.3.3 肺脏：检查外表、色泽及大小，必要时剖检支气管淋巴结、纵膈淋巴结和肺实质。

5.3.4 食道：检查住肉孢子虫。

5.3.5 胃肠：检查胃肠浆膜，剖检肠系膜淋巴结，必要时检查胃肠粘膜。

5.3.6 肝脏：检查外表、色泽及大小，剖检肝门淋巴结，必要时剖检肝实质和胆囊。

5.3.7 脾脏：检查外表、色泽及大小，必要时剖检其实质。

5.3.8 肾脏：剥离肾包膜，检查外表、色泽及大小，必要时剖检其实质。

5.3.9 乳房：检查弹性，剖检乳房淋巴结，必要时剖检其实质。

5.3.10 必要时剖检子宫、睾丸及膀胱。

5.3.11 摘除病变淋巴结。

5.4 检疫后的处理

5.4.1 合格：在胴体上加盖检疫验讫印章，并在检疫验讫印章中注明畜禽标识编码，出具检疫证明，准予出场。

5.4.2 不合格：按 GB 16548 进行无害化处理，并按规定上报。

5.4.3 消毒：对屠宰场地、用具等按消毒技术规范进行消毒。

## 6 记录

记录被检牛羊检疫时间、数量、检疫结果及处理情况等，检疫记录应至少保存 2 年。

# 猪屠宰检疫规范

## 1 范围

本规范规定了猪屠宰检疫的对象、程序和要求。

本规范适用于猪的屠宰检疫。

## 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。

GB 16548 畜禽病害肉尸及其产品无害化处理规程

GB 16549 畜禽产地检疫规范

消毒技术规范

## 3 检疫对象

包括传染病、寄生虫病等疾病。

## 4 宰前检疫

### 4.1 查证验物

4.1.1 检查进入屠宰场（点、厂）猪的检疫证明和畜禽标识，核对证物是否相符，并按规定回收和保存。

4.1.2 对无检疫证明、证物不符或疑似染疫的，不准入场，并按有关规定处理。

4.1.3 经临床健康检查合格后，方可卸载。

### 4.2 临床检查

4.2.1 对进入屠宰场的猪依照 GB 16549 中规定的检查方法进行临床检查。对疑似染疫的，送入隔离圈，并进行实验室检验。

4.2.2 临宰时要逐头对待宰猪进行复查。

### 4.3 检疫后的处理

4.3.1 准宰：检疫合格的猪，送屠宰车间屠宰。

4.3.2 急宰：确定为无碍于肉食品安全的濒死猪，送急宰间急宰。

4.3.3 禁宰：染疫或疑似染疫的猪，禁止屠宰。疑似染疫的送隔离圈，做进一步检查；染疫的，按 GB 16548 进行处理，并按规定上报。

4.3.4 消毒：对运载车辆和场地按消毒技术规范进行消毒。

## 5 宰后检疫

### 5.1 头部检查

5.1.1 检查鼻镜、唇、齿龈、皮肤、咽喉粘膜和扁桃体。

5.1.2 剖检两侧颌下淋巴结和咬肌。

5.1.3 摘除病变淋巴结。

### 5.2 胴体检查

5.2.1 检查皮肤、脂肪、肌肉、胸腔、腹腔等。

5.2.2 剖检腹股沟浅淋巴结、腹股沟深淋巴结，必要时剖检颈浅背淋巴结、膈淋巴结。

5.2.3 剖检腰肌、膈肌，必要时剖检股内侧肌、肩胛外侧肌。

5.2.4 采膈肌脚制片镜检。

5.2.5 摘除病变淋巴结。

### 5.3 内脏检查

5.3.1 将内脏与胴体编记同一号码。

5.3.2 心脏：检查心包及心外膜，并确定肌僵程度，切开心室，检查心肌、心内膜及血液凝固状态，检查心内、外膜有无出血斑、点、心包炎、二尖瓣赘生物等病变。

5.3.3 肝脏：检查外表、色泽、大小，被膜和实质弹性；剖检肝门淋巴结，必要时剖检肝实质和胆囊。

5.3.4 脾脏：检查外表、色泽、大小，被膜和实质弹性；必要时剖检脾髓。

5.3.5 肺脏：检查外表、色泽、大小、弹性；必要时剖检肺实质。

5.3.6 肾脏：剥离肾包膜，检查外表、色泽、大小、弹性；必要时剖检肾实质。

5.3.7 胃肠：检查胃肠浆膜，剖检肠系膜淋巴结，必要时剖检胃肠粘膜。

5.3.8 膀胱：检查出血斑、点。

5.3.9 摘除病变淋巴结。

5.4 检疫后的处理

5.4.1 合格：在胴体上加盖检疫验讫印章，并在检疫验讫印章中注明畜禽标识编码，出具检疫证明，准予出场。

5.4.2 不合格：按 GB 16548 进行无害化处理，并按规定上报。

5.4.3 消毒：对屠宰场地、用具等按消毒技术规范进行消毒。

## 6 记录

记录被检猪检疫时间、数量、检疫结果及处理情况等，检疫记录应至少保存 2 年。

# 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条件和管理要求。

本规范适用于动物无害化处理场的建设和管理。

## 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。

消毒技术规范

## 3 建设条件

### 3.1 选址

3.1.1 无害化处理场应距干线公路、铁路、居民区、工厂、学校、动物饲养场、动物屠宰场、动物交易市场、风景旅游区、水源等 1000 米以上，在城镇的下风口。

3.1.2 无害化处理场的选址由省级动物防疫监督机构统一规划，并符合动物防疫条件的要求。

3.1.3 符合环保要求。

### 3.2 布局

3.2.1 无害化处理场周围必须筑有围墙，并建有绿化带。场区分为生活区和生产区两部分，生产区应包括厂房、锅炉房、冷库、污水处理设施、消毒设施、辅助用房等。

3.2.2 生活区和生产区之间要有严格的隔离设施分开。

### 3.3 处理能力

无害化处理场应具备日处理 5 吨以上动物及动物产品的能力。

### 3.4 生产工艺

具备彻底消灭病害动物及其产品所携带的病原体的生产工艺。

### 3.5 其他

3.5.1 无害化处理场入口处应设有警示标志，场区出、入口处均应分别设有车辆和人员进出的消毒池或消毒通道。

3.5.2 场内应具有防鼠、防风、防盗、供水、供电等附属设施。

3.5.3 场内具备对染疫动物进行无血扑杀的设施。

## 4 管理要求

4.1 场内禁止参观，人员、车辆及物品等未经许可不得入内。

### 4.2 人员安全防护

4.2.1 场内工作人员每年进行两次以上的健康检查，取得健康证明。

4.2.2 工作人员在进入生产区时应穿戴工作服、帽、胶鞋和口罩；离开生产区时应淋浴、更衣、换鞋，并经紫外消毒后方可离开。

4.2.3 外来人员及非生产区工作人员不得随意进入生产区。

### 4.3 运输

病害动物及其产品应由封闭运输车运送到处理场。

### 4.4 消毒

场内要建立严格的消毒制度，并有效实施。消毒方法及用药按照消毒技术规范进行。

4.4.1 人员和车辆进出时，应经消毒池或消毒通道进出。

4.4.2 运送病害动物及其产品的车辆在离场前，应在指定区域经严格的清洗消毒后方可离场。

4.4.3 每处理一批病害动物及其产品或冻库在清空后，应对地面、墙壁、用具等进行严格的消毒。

4.4.4 对生产区、生活区要定期进行消毒。

### 4.5 记录

对处理的每一批动物及动物产品的来源、数量、疫病情况和处理情况等均应做详细记录，并建立档案。

### 4.6 环保要求

无害化处理场产生的废水、废气、废渣、噪声等应符合国家环保标准。

4.7 无害化处理的动物尸体及动物产品不得用作动物饲料。

# 消毒技术规范

## 1 范围

本规范规定了动物、动物产品及其运载工具、相关场所的消毒技术。

本规范适用于动物、动物产品及其运载工具、相关场所的消毒。

## 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。

GB / T 16569 畜禽产品消毒规范

## 3 消毒药物使用原则

3.1 选择符合规定的有效消毒药品。

3.2 采用适当的消毒方法。

3.3 掌握准确的浓度和剂量。

3.4 注意个人防护。

## 4 消毒的实施

### 4.1 饲养场的消毒

4.1.1 饲养舍的消毒可在空舍和有饲养动物的情况下实施。在有饲养动物的情况下，应选择低刺激性的消毒药物，一般使用喷雾方法，在喷雾时注意舍内各处的均匀度和药液的用量。

4.1.2 场内环境一般用喷洒消毒，也可用火焰消毒。

4.1.3 进出口消毒池应有足量的、保持有效浓度的消毒液，并根据浓度定期更换。

4.1.4 场内动物的排泄物采用堆积发酵方法消毒。

### 4.2 屠宰场（厂）的消毒

4.2.1 屠宰场进出口处的车辆消毒池应有足量的、保持有效浓度的消毒液，并根据浓度定期更换。

4.2.2 待宰圈：每天清洗消毒 1 次，消毒方法同 4.1.1。

4.2.3 隔离圈：每天清洗消毒 2 次，消毒方法同 4.1.1。

4.2.4 车间：每日屠宰结束，地面用去油的物品清洗后再消毒，屠宰用具采用浸泡消毒或高温消毒。

4.2.5 场内环境一般用喷洒消毒。

4.2.6 每进行 1（批）次染疫动物、动物产品无害化处理，对场地、工具（包括运输工具）、盛装器皿等设备应进行消毒。

### 4.3 动物及动物产品交易场所的消毒

4.3.1 动物交易场所每日清理动物排泄物、废弃物等，并喷洒消毒 1 次。

4.3.2 动物产品交易场所每日清洗消毒 1 次。

### 4.4 动物及动物产品运载工具的消毒

4.4.1 运输动物、动物产品的交通工具在装前、卸后按规定进行清洗消毒。

4.4.2 经铁路运输动物、动物产品的车辆，在铁路部门指定的车辆洗刷消毒站进行清洗消毒。

4.4.3 经公路运输动物、动物产品的车辆通过消毒通道或用电动喷雾器进行喷雾消毒。

4.4.4 经水路、航空运输动物、动物产品的船舶、飞机及其它运载工具采用喷雾方法进行消毒。

### 4.5 冷库的消毒

可采用喷雾、熏蒸等方法消毒。

### 4.6 动物产品的消毒

可疑污染畜禽病原微生物的动物产品及其包装物的消毒按 GB 16569 执行。

## 5 消毒效果监测

### 5.1 熏蒸消毒监测

5.1.1 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，并检查袋壁有无破损或裂缝，然后封口。

5.1.2 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。

## 5.2 喷雾消毒效果监测

### 5.2.1 染菌样片（枯草杆菌芽胞或大肠杆菌）测定法

5.2.1.1 将染菌样片置于具有代表性的各点。

5.2.1.2 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。

5.2.1.3 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。

## 5.3 浸泡消毒效果监测

5.3.1 将染菌样片放入布袋内，置于消毒容器（池）内。

5.3.2 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。

## 第六部分 应急与恢复

- 1 口蹄疫疫情报告和确认规范
- 2 高致病性禽流感疫情报告和确认规范
- 3 新城疫疫情报告和确认规范
- 4 猪瘟疫情报告和确认规范
- 5 口蹄疫应急处置原则
- 6 新城疫应急处置原则
- 7 猪瘟应急处置原则
- 8 口蹄疫疫情控制扑灭技术规范
- 9 高致病性禽流感疫情控制扑灭技术规范
- 10 新城疫疫情控制扑灭技术规范
- 11 猪瘟疫情控制扑灭技术规范
- 12 口蹄疫流行病学调查技术规范
- 13 高致病性禽流感流行病学调查技术规范
- 14 新城疫流行病学调查技术规范
- 15 猪瘟流行病学调查技术规范

# 口蹄疫疫情报告和确认规范

## 1 范围

本规范规定了牲畜口蹄疫疫情报告和疫情确认的基本程序。

本规范适用于牲畜口蹄疫疫情的报告和确认。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本规范。

### 2.1 动物疫情

动物疫情是指动物疫病的发生、发展及相关情况。

### 2.2 疫情报告

按照法律法规规定，兽医和有关人员及时向动物防疫监督机构所作的有关疫病发生、流行情况的报告。

### 2.3 疫情确认

接到疫情报告以后，授权机构对疫情进行确认的程序，包括疫情的通报和发布。

## 3 疫情报告

### 3.1 疑似疫情的报告

县、市（地）级动物防疫监督机构确认为疑似口蹄疫疫情的，应当在 2h 内报告当地防治牲畜口蹄疫指挥部办公室。当地防治牲畜口蹄疫指挥部办公室应当于 24h 内经省级上报至全国防治牲畜口蹄疫总指挥部办公室（报告内容及格式见附表 1）。

### 3.2 确认疫情的报告

省级动物防疫监督机构认定为确诊病例的应立即报告省级防治牲畜口蹄疫指挥部办公室，省级防治牲畜口蹄疫指挥部办公室应立即报至全国防治牲畜口蹄疫总指挥部办公室；国家口蹄疫参考实验室认定为确诊病例的，应立即上报全国防治牲畜口蹄疫总指挥部办公室，并通知疫情发生地省级防治牲畜口蹄疫指挥部办公室（报告内容及格式见附表 2）。

### 3.3 疫情处理的报告

疫情发生后，省级防治牲畜口蹄疫指挥部办公室要将扑杀、封锁、消毒、监测、免疫等疫情处理情况每周一次报至全国防治牲畜口蹄疫总指挥部办公室（报告内容及格式见附表 3）。必要时，实行每日报告。

### 3.4 解除封锁的报告

解除封锁后，省级防治牲畜口蹄疫指挥部办公室要及时将疫情处理工作总结、解除封锁时间、解除封锁审查报告等情况报至全国防治牲畜口蹄疫总指挥部办公室。

### 3.5 疫情的汇总和月报。

省级防治牲畜口蹄疫指挥部办公室应于每月 2 日前将本省上月牲畜口蹄疫疫情汇总报至全国防治牲畜口蹄疫总指挥部办公室。

## 4 疫情报告管理

### 4.1 专人管理疫情报告

各级防治牲畜口蹄疫指挥部办公室应设专人负责疫情报告工作，并对每起疫情建立完整档案。

### 4.2 设置专门疫情报告联系电话

各级防治牲畜口蹄疫指挥部办公室应设专门疫情报告联系电话，并将电话号码报上一级防治牲畜口蹄疫指挥部办公室。

## 5 疫情确认程序

牲畜口蹄疫疫情按以下程序确认：

### 5.1 现场临床诊断

动物防疫监督机构接到疫情报告后，应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，符合口蹄疫典型症状的可确认为疑似病例。

### 5.2 省级实验室或国家口蹄疫参考实验室确诊

对于疑似病例或症状不够典型的病例，当地动物防疫监督机构要及时采集病料送省级动物防疫监督机构实验室进行检测，检测结果为阳性的，可认定为确诊病例。

省级动物防疫监督机构实验室对难以确诊的病例，必须派专人将病料送国家口蹄疫参考

实验室检测，进行确诊。

### 5.3 国家确认

农业部兽医局根据省级动物防疫监督机构实验室或国家口蹄疫参考实验室认定的最终确诊结果，确认口蹄疫疫情。

附表 1

疑似牲畜口蹄疫快报表

序号:

报 告 单 位				
发 生 地 点				
联 系 电 话				
报 告 日 期				
始现症状日期				
最初感染日期				
临床诊断情况				
诊断人及日期				
发 病 情 况	动物种类	存栏数	发病数	死亡数
流行病学调查				
传 染 来 源				
传 播 途 径				
追 踪				
控 制 措 施				
备 注				

填表人(报告人):

审核人:

单位公章

附表 2

## 确诊牲畜口蹄疫快报表

序号：

报 告 单 位	
发 生 地 点	
联 系 电 话	
报 告 日 期	
疑似报告序号	
送检样品及日期	
确 诊 日 期	
诊 断 方 法	
诊 断 人	
诊 断 结 果	
诊断实验室名称	
备 注	

填表人（报告人）：

审核人：

单位公章

附表 3

牲畜口蹄疫周报表

序号:

报 告 单 位						
上次报告日期						
本次报告日期						
始现症状日期						
最初感染日期						
病 毒 型 别						
确 诊 单 位						
确 诊 日 期						
发 病 情 况	畜种	存栏数	发病数	死亡数	扑杀数	紧急免疫数
传 染 来 源						
传 播 途 径						
追 踪						
控 制 措 施						
备 注						

填表人(报告人):

审核人:

单位公章

# 高致病性禽流感疫情报告和确认规范

## 1 范围

本规范规定了高致病性禽流感疫情报告和疫情确认的基本程序。

本规范适用于高致病性禽流感疫情的报告和确认。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本规范。

### 2.1 动物疫情

动物疫情是指动物疫病的发生、发展及相关情况。

### 2.2 疫情报告

按照法律法规规定，兽医和有关人员及时向动物防疫监督机构所作的有关疫病发生、流行情况的报告。

### 2.3 疫情确认

接到疫情报告以后，授权机构对疫情进行确认的程序，包括疫情的通报和发布。

## 3 疫情报告

任何单位和个人发现禽类出现发病急、传播迅速、死亡率高等异常情况，应及时向当地动物防疫监督机构报告。

动物防疫监督机构在接到报告后，立即派员到现场进行调查核实，怀疑是高致病性禽流感的，应在 2h 内将情况逐级报至省级兽医行政管理部门。确认疑似病例后，应立即上报同级人民政府和农业部兽医局，农业部兽医局应立即向国务院报告。

## 4 疫情确认程序

4.1 动物防疫监督机构接到疫情报告后，立即派出 2 名以上具备相关资格的兽医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防疫监督机构进行实验室检测，检测结果为阳性的，并经综合判定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进行病毒分离与鉴定，作最终确诊；

4.4 农业部兽医局根据最终确诊结果，确认高致病性禽流感疫情。

# 新城疫疫情报告和确认规范

## 1 范围

本规范规定了新城疫疫情报告和疫情确认的基本程序。

本规范适用于新城疫疫情的报告和确认。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本规范。

### 2.1 动物疫情

动物疫情是指动物疫病的发生、发展及相关情况。

### 2.2 疫情报告

按照法律法规规定，兽医和有关人员及时向动物防疫监督机构所作的有关疫病发生、流行情况的报告。

### 2.3 疫情确认

接到疫情报告以后，授权机构对疫情进行确认的程序，包括疫情的通报和发布。

## 3 疫情报告

任何单位和个人怀疑禽类发生新城疫疫情，应及时向当地动物防疫监督机构报告。

动物防疫监督机构在接到报告或了解上述情况后，立即派员到现场进行调查核实，怀疑是新城疫的，应在 2h 内将情况逐级报至省级兽医行政管理部门。经确认后，应立即上报同级人民政府和农业部兽医局。

## 4 疫情确认程序

4.1 动物防疫监督机构接到疫情报告后，立即派出 2 名以上具备相关资格的兽医人员到现场进行临床诊断，提出初步诊断意见。

4.2 对怀疑为新城疫疫情的，及时采集病料送省级动物防疫监督机构实验室或国家新城疫参考实验室进行病毒分离与鉴定，作最终确诊；经省级动物防疫监督机构实验室确诊的，应将分离株及时送国家新城疫参考实验室复核并保存。

4.3 农业部兽医局根据最终确诊结果，确认新城疫疫情。

# 猪瘟疫情报告和确认规范

## 1 范围

本规范规定了猪瘟疫情报告和疫情确认的基本程序。

本规范适用于猪瘟疫情的报告和确认。

## 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本规范。

### 2.1 动物疫情

动物疫情是指动物疫病的发生、发展及相关情况。

### 2.2 疫情报告

按照法律法规规定，兽医和有关人员及时向动物防疫监督机构所作的有关疫病发生、流行情况的报告。

### 2.3 疫情确认

接到疫情报告以后，授权机构对疫情进行确认的程序，包括疫情的通报和发布。

## 3 疫情报告

任何单位和个人怀疑发生猪瘟疫情时，应及时向当地动物防疫监督机构报告。

动物防疫监督机构在接到报告或了解上述情况后，立即派员到现场进行调查核实，怀疑是猪瘟疫的，应在 2h 内将情况逐级报至省级兽医行政管理部门。经确认后，应立即上报同级人民政府和农业部兽医局。

## 4 疫情确认程序

4.1 动物防疫监督机构接到疫情报告后，立即派出 2 名以上具备相关资格的兽医人员到现场进行临床诊断，提出初步诊断意见。

4.2 对怀疑为猪瘟疫情的，及时采集病料送省级动物防疫监督机构实验室，病原学检测为阳性的，经综合判定，可确诊为猪瘟疫病例；结果可疑的，必须派专人将病料送国家猪瘟疫参考实验室进行最终确诊。

4.3 农业部兽医局根据最终确诊结果，确认猪瘟疫情。

# 口蹄疫应急处置原则

为及时、有效地预防、控制和扑灭牲畜口蹄疫，确保养殖业持续发展和人民身体健康，依据《中华人民共和国动物防疫法》，制定本原则。

## 1 疫情报告与确认

按照《口蹄疫疫情报告和确认规范》的要求执行。

## 2 疫情控制措施

一旦发现疫情，要按照“早、快、严”的原则立即扑杀，彻底消毒，严格隔离，强制免疫，防止疫情扩散。

### 2.1 分析疫源

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，对仍可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售出的动物及其产品、可疑污染物(包括粪便、垫料、饲料)等应立即开展追踪调查，并按《口蹄疫疫情扑灭技术规范》的相关技术要求进行无害化处理。

### 2.2 划定疫点、疫区、受威胁区

2.2.1 将病畜所在养殖场(户)、屠宰和经营场所划为疫点；散养的，将病畜所在自然村划为疫点。

2.2.2 以疫点为中心，至少半径 3km 内的区域划为疫区。

2.2.3 将距疫区周边至少 10km 内的区域划为受威胁区。

### 2.3 疫点内应采取的措施

2.3.1 封锁疫点。

2.3.2 扑杀所有易感动物，并对所有病死畜、被扑杀畜及其产品按国家有关标准或规范的要求进行无害化处理。

2.3.3 对动物排泄物、被污染饲料、垫料、污水等进行无害化处理；对被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行彻底消毒。

### 2.4 疫区内应采取的措施

2.4.1 由县级以上人民政府决定对疫区实行封锁。在疫区周围设置警示标志，在出入疫区的交通路口设置动物防疫消毒站，对出入的人员、车辆和有关物品进行消毒。必要时，经省级人民政府批准，可设立临时动物防疫监督检查站，执行监督检查任务。

2.4.2 对易感动物进行紧急强制免疫，建立完整的档案，并加强监测。

2.4.3 对动物排泄物、被污染饲料、垫料、污水等按国家标准规定进行无害化处理。

2.4.4 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。

2.4.5 关闭活畜及畜产品交易市场，禁止易感动物及产品移动。

### 2.5 受威胁区应采取的措施

2.5.1 对所有易感动物进行紧急强制免疫，并建立完整的档案。

2.5.2 实行疫情监测，掌握疫情动态。

2.5.3 监控易感动物及产品的移动。

2.5.4 必要时，关闭活畜及畜产品交易市场。

### 2.6 非疫区应采取的措施

要做好各项防疫工作，完善疫情应急预案，加强疫情监测，防止疫情传入。

### 2.7 解除封锁

疫区内所有易感动物及其产品按规定处理后，经过 14d 以上的监测，未出现新发病例，经审核合格后，由原发布封锁令的人民政府解除封锁。

2.8 2.3、2.4、2.5 所列措施必须在当地动物防疫监督机构的监督和指导下实施。

## 3 疫情档案

各级兽医行政管理部门必须完整详细地记录疫情应急处理过程，做好相关资料归档工作。

# 新城疫应急处置原则

为及时、有效地预防、控制和扑灭新城疫，确保养殖业持续发展和人民身体健康，依据《中华人民共和国动物防疫法》，制定本原则。

## 1 疫情报告与确认

按照《新城疫疫情报告和确认规范》的要求执行。

## 2 控制措施

一旦发现疫情，要按照“早、快、严”的原则立即扑杀，彻底消毒，严格隔离，强制免疫，防止疫情扩散。

### 2.1 分析疫源

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。对仍可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售出的动物及其产品、可疑污染物(包括粪便、垫料、饲料)等应立即开展追踪调查，并按《新城疫疫情扑灭技术规范》的相关技术要求进行无害化处理。

### 2.2 划定疫点、疫区、受威胁区

2.2.1 将病禽所在养殖场(户)、屠宰和经营场所划为疫点；散养的，将病禽所在自然村划为疫点。

2.2.2 以疫点为中心，至少半径 3km 内的区域划为疫区。

2.2.3 将距疫区周边至少 5km 内的区域划为受威胁区。

### 2.3 疫点内应采取的措施

2.3.1 扑杀所有易感禽只，并对所有病死禽、被扑杀禽及其产品按国家有关标准或规范的要求进行无害化处理。

2.3.2 对禽类排泄物、被污染饲料、垫料、污水等进行无害化处理。

2.3.3 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。

### 2.4 疫区内应采取的措施

2.4.1 由县级以上人民政府决定对疫区实行封锁。在疫区周围设置警示标志，在出入疫区的交通路口设置动物防疫消毒站，对出入的人员、车辆和有关物品进行消毒。必要时，经省级人民政府批准，可设立临时动物防疫监督检查站，执行监督检查任务。

2.4.2 对所有易感禽类进行紧急强制免疫接种，并建立完整的档案。

2.4.3 对禽类排泄物、被污染饲料、垫料、污水等按国家标准规定进行无害化处理。

2.4.4 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。

2.4.5 关闭活禽及禽产品交易市场，禁止易感禽只及其产品移动。

### 2.5 受威胁区应采取的措施

2.5.1 对所有易感禽类进行紧急强制免疫接种，并建立完整的档案。

2.5.2 实行疫情监测，掌握疫情动态。

2.5.3 监控易感禽类及禽产品的移动。

2.5.4 必要时，关闭易感禽类及禽产品交易市场。

### 2.6 非疫区应采取的措施

要做好各项防疫工作，完善疫情应急预案，加强疫情监测，防止疫情传入。

2.7 2.3、2.4、2.5 所列措施必须在当地动物防疫监督机构的监督指导下实施。

### 2.8 解除封锁

疫区内所有禽类及禽产品按规定处理后，经过 21d 以上的监测，未出现新发病例，经审查合格后，由原发布封锁令的人民政府解除封锁。

## 3 疫情档案

各级兽医行政管理部门必须完整详细地记录疫情应急处理过程，做好相关资料归档工作。

# 猪瘟应急处置原则

为及时、有效地预防、控制和扑灭猪瘟，确保养殖业持续发展和人民身体健康，依据《中华人民共和国动物防疫法》，制定本原则。

## 1 疫情报告与确认

按照《猪瘟疫情报告和确认规范》的要求执行。

## 2 控制措施

一旦发现疫情，要按照“早、快、严”的原则扑杀，彻底消毒，严格隔离，强制免疫，防止疫情扩散。

### 2.1 分析疫源

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。对仍可能存在的传染源，以及在疫情潜伏期和发病期间售出的动物及其产品、可疑污染物(包括粪便、垫料、饲料)等应立即开展追踪调查，并按《猪瘟疫情扑灭技术规范》中的相关技术要求进行无害化处理。

### 2.2 划定疫点、疫区、受威胁区

2.2.1 将病畜所在养殖场(户)、屠宰和经营场所划为疫点；散养的，将病畜所在自然村划为疫点。

2.2.2 以疫点为中心，至少半径 3km 内的区域划为疫区。

2.2.3 将距疫区周边至少 10km 内的区域划为受威胁区。

### 2.3 疫点内应采取的措施

2.3.1 封锁疫点。

2.3.2 扑杀所有易感动物，并对所有病死畜、被扑杀畜及其产品按国家有关标准或规范的要求进行无害化处理。

2.3.3 对动物排泄物、被污染饲料、垫料、污水等进行无害化处理；对被污染的物品、交通工具、用具、圈舍、场地进行彻底消毒。

### 2.4 疫区内应采取的措施

2.4.1 由县级以上人民政府决定对疫区实行封锁。在疫区周围设置警示标志，在出入疫区的交通路口设置动物防疫消毒站，对出入的人员、车辆和有关物品进行消毒。必要时，经省级人民政府批准，可设立临时动物防疫监督检查站，执行监督检查任务。

2.4.2 对易感动物进行紧急强制免疫，建立完整的档案，并加强监测。

2.4.3 对动物排泄物、被污染饲料、垫料、污水等按国家标准规定进行无害化处理。

2.4.4 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。

2.4.5 关闭活畜及畜产品交易市场，禁止易感动物及产品的移动。

### 2.5 受威胁区应采取的措施

2.5.1 对所有易感动物进行紧急强制免疫，并建立完整的档案。

2.5.2 实行疫情监测，掌握疫情动态。

2.5.3 监控易感动物及产品的移动。

2.5.4 必要时，关闭活畜及畜产品交易市场。

### 2.6 非疫区应采取的措施

要做好各项防疫工作，完善疫情应急预案，加强疫情监测，防止疫情传入。

2.7 2.3、2.4、2.5 所列措施必须在当地动物防疫监督机构的监督指导下实施。

### 2.8 解除封锁

疫区内所有动物及其产品按规定处理后，经过 40d 以上的监测，未出现新发病例，经审核合格后，由原发布封锁令的人民政府解除封锁。

## 3 疫情档案

各级兽医行政管理部门必须完整详细地记录疫情应急处理过程，做好相关资料归档工作。

# 口蹄疫疫情扑灭技术规范

## 1 范围

本规范规定了口蹄疫疫情扑灭中的易感动物扑杀、无害化处理及消毒技术要求。

本规范适用于口蹄疫疫情扑灭工作。

## 2 牲畜扑杀

### 2.1 扑杀方法

2.1.1 电击：使用分体电击棍击杀致死。

2.1.2 药物注射：静脉注射来苏尔溶液，使用量以致死为准。

2.1.3 其它符合动物福利要求的无流血致死方法。

### 2.2 工作人员防护要求

#### 2.2.1 穿戴防护衣物

穿防护服，或者穿长袖手术衣加防水围裙；

穿可消毒的绝缘胶靴；

戴可消毒的绝缘橡胶手套；

戴 N95 口罩或标准手术用口罩；

戴护目镜。

#### 2.2.2 消毒

工作后用无腐蚀性消毒液浸泡手后，再用肥皂清洗 2 次以上。

防护服、手套、口罩、目镜、胶鞋、鞋套等使用后在指定地点消毒或销毁。非一次性防护用品须经消毒、晾晒后使用。

## 3 无害化处理

所有病死牲畜、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、饲料和其它物品应当进行无害化处理。清洗所产生的污水、污物进行无害化处理。

可以选择深埋、焚烧等方法，饲料、粪便可以堆积发酵处理。

### 3.1 深埋

#### 3.1.1 选址

应当避开公共视线，选择地表水位低，远离学校、公共场所、居民住宅区、牲畜饲养场、屠宰场和交易市场、村庄、饮用水源地、河流等的地域。选址应当有利于防洪。

#### 3.1.2 深度

坑的深度应保证动物尸体、产品、饲料、污染物等被掩埋物的上层距地表 1.5m 以上。

#### 3.1.3 焚烧

掩埋前，应对需掩埋的动物尸体、产品、饲料、污染物等实施焚烧处理。

#### 3.1.4 消毒

掩埋坑底铺 2cm 厚生石灰；焚烧后的动物尸体、产品、饲料、污染物等表面，以及掩埋后的地表环境应使用有效消毒药品喷洒消毒。

#### 3.1.5 填土

用土掩埋后，应当保持与周围持平。填土不要太实，以免尸腐产气造成气泡冒出和液体渗漏。

3.1.6 掩埋后应设立明显标志。

### 3.2 工厂化处理

将所有病死牲畜、扑杀牲畜及其产品密封运输至无害化处理厂，统一实施无害化处理。

### 3.3 发酵

饲料、粪便可在指定地点堆积，彻底密封发酵，表面应当进行消毒。

3.4 无害化处理应符合环保要求，所涉及到的运输、装卸等环节应避免洒漏，运输装卸工具使用后应彻底消毒。

## 4 消毒

### 4.1 设备和用品

4.1.1 清洗工具：扫帚、叉子、铲子、锹和冲洗用水管等。

4.1.2 消毒工具：喷雾器、火焰喷射枪、消毒车、消毒容器等。

4.1.3 消毒剂：酸性物质、碱性物质，福尔马林液体或气体等适合的消毒剂。

4.1.4 防护装备：防护服、口罩、胶靴、手套、护目镜等。

4.2 疫点圈舍、场地和各种用具的消毒

4.2.1 对圈舍及场地内外采用喷洒消毒液的方式进行消毒，消毒后对污物、粪便、饲料等进行清理；清理完毕再用消毒液以喷洒方式进行彻底消毒，消毒完毕后再进行清洗；不易冲洗的圈舍铲除废弃物和表土，进行堆积发酵处理。

4.2.2 对金属设施设备，可采取火焰、薰蒸等方式消毒；木质工具及塑料用具采取用消毒液浸泡消毒；工作服等采取浸泡或高温高压消毒。

4.3 疫区内怀疑污染的场所及道路应进行喷洒消毒。

4.4 运载工具的清洗消毒

4.4.1 在出入疫点、疫区的交通路口设立消毒站点，对所有可能被污染的运载工具应当严格消毒。

4.4.2 从车辆上清理下来的废弃物按 3.3 进行无害化处理。

4.5 封锁期间，疫点每天至少消毒 1 次，连续 1 周；1 周以后每两天消毒 1 次；疫区内其他重点区域每两天消毒 1 次。

# 高致病性禽流感疫情扑灭技术规范

## 1 范围

本规范规定了高致病性禽流感疫情扑灭中易感禽类扑杀、无害化处理、消毒的技术要求。

本规范适用于高致病性禽流感疫情扑灭工作。

## 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标准。

NY/T 768《高致病性禽流感 人员防护技术规范》

## 3 扑杀方法

### 3.1 窒息

先将待扑杀禽装入袋中，置入密封车或其它密封容器，通入二氧化碳窒息致死；或将禽装入密封袋中，通入二氧化碳窒息致死。

### 3.2 扭颈

扑杀量较小时采用。根据禽只大小，一手握住头部，另一手握住体部，朝相反方向扭转拉伸。

### 3.3 电击

使用分体电击棍击杀致死。

### 3.4 其它

可根据本地情况，采用其它能避免病原扩散的致死方法。

3.5 人员防护应符合 NY/T 768《高致病性禽流感 人员防护技术规范》的要求。

## 4 无害化处理

所有病死禽、被扑杀禽及其产品、排泄物以及被污染或可能被污染的垫料、饲料和其它物品应当进行无害化处理。清洗所产生的污水、污物进行无害化处理。

无害化处理可以选择深埋、焚烧等方法，饲料、粪便可以堆积发酵处理。

### 4.1 深埋

#### 4.1.1 选址

应当避开公共视线，选择地表水位低，远离学校、公共场所、居民住宅区、动物饲养场、屠宰场及交易市场、村庄、饮用水源地、河流等的地域。选址应当有利于防洪。

4.1.2 坑的覆盖土层厚度应大于 1.5m，坑底铺垫 2cm 生石灰，覆盖土以前再撒一层生石灰。

4.1.3 禽类尸体置于坑中后，浇油焚烧，然后用土覆盖，与周围持平。填土不要太实，以免尸腐产气造成气泡冒出和液体渗漏。

4.1.4 饲料、污染物等置于坑中，喷洒消毒剂后掩埋。

4.1.5 掩埋后应设明显标志。

### 4.2 工厂化处理

将所有病死牲畜、扑杀牲畜及其产品密封运输至无害化处理厂，统一实施无害化处理。

### 4.3 发酵

饲料、粪便可在指定地点堆积，彻底密封发酵，表面应进行消毒。

4.4 无害化处理应符合环保要求，所涉及到的运输、装卸等环节应避免洒漏，运输装卸工具使用后应彻底消毒。

## 5 消毒

### 5.1 设备和必需品

5.1.1 清洗工具：扫帚、叉子、铲子、锹和冲洗水管。

5.1.2 消毒工具：喷雾器、火焰喷射枪、消毒车辆、消毒容器等。

5.1.3 消毒剂：清洁剂、醛类、强碱类、氯制剂类等合适的消毒剂。

5.1.4 防护装备：防护服、口罩、胶靴、手套、护目镜等。

### 5.2 圈舍、场地和各种用具的消毒

5.2.1 对圈舍及场地内外采用喷洒消毒液的方式进行消毒，消毒后对污物、粪便、饲料等进行清理；清理完毕再用消毒液以喷洒方式进行彻底消毒，消毒完毕后再进行清洗；不易冲洗的圈舍清除废弃物和表土，进行堆积发酵处理。

5.2.2 对金属设施设备，可采取火焰、薰蒸等方式消毒；木质工具及塑料用具采取用消毒液浸泡消毒；工作服等采取浸泡或高温高压消毒。

5.3 疫区内可能被污染的场所应进行喷洒消毒。

5.4 污水沟、水塘可投放生石灰或漂白粉。

5.5 运载工具清洗消毒

5.5.1 在出入疫点、疫区的交通路口设立消毒站点，对所有可能被污染的运载工具应当严格消毒。

5.5.2 从车辆上清理下来的废弃物按 4.3 进行无害化处理。

5.6 疫点每天至少消毒 1 次，连续 1 周；1 周以后每两天消毒 1 次。疫区内疫点以外的区域每两天消毒 1 次。

# 新城疫疫情扑灭技术规范

## 1 范围

本规范规定了新城疫疫情扑灭中易感禽类扑杀、无害化处理、消毒的技术要求。  
本规范适用于新城疫疫情扑灭工作。

## 2 扑杀方法

### 2.1 窒息

先将待扑杀禽装入袋中，置入密封车或其它密封容器，通入二氧化碳窒息致死；或将禽装入密封袋中，通入二氧化碳窒息致死。

### 2.2 扭颈

扑杀量较小时采用。根据禽只大小，一只手握住头部，另一只手握住体部，朝相反方向扭转拉伸。

### 2.3 电击

使用分体电击棍击杀致死。

### 2.4 其它

可根据本地情况，采用其它能避免病原扩散的致死方法。

### 2.5 人员的防护要求

穿防护服，或者穿长袖手术衣加防水围裙；

穿可消毒的胶靴；

戴可消毒的橡胶手套；

戴 N95 口罩或标准手术用口罩；

戴护目镜。

### 2.6 工作后用无腐蚀性消毒液浸泡洗手

防护服、手套、口罩、目镜、胶鞋、鞋套等使用后在指定地点消毒或销毁。非一次性防护用品须经消毒、晾晒后使用。

## 3 无害化处理

所有病死禽、被扑杀禽及其产品、排泄物以及被污染或可能被污染的垫料、饲料和其他物品应当进行无害化处理。清洗所产生的污水、污物进行作无害化处理。

无害化处理可以选择深埋、焚烧等方法，饲料、粪便可以堆积发酵处理。

### 3.1 深埋

#### 3.1.1 选址

应当避开公共视线，选择地表水位低、远离学校、公共场所、居民住宅区、禽饲养场、屠宰场所、禽类交易场所、村庄、饮用水源地、河流等的地域。选址应当有利于防洪。

3.1.2 坑的覆盖土层厚度应大于 1.5m，坑底铺垫 2cm 生石灰，覆土以前再撒一层生石灰。

3.1.3 禽类尸体置于坑中后，浇油焚烧，然后用土覆盖，与周围持平。填土不要太实，以免尸腐产气造成气泡冒出和液体渗漏。

3.1.4 饲料、污染物等置于坑中，喷洒消毒剂后掩埋。

3.1.5 掩埋后应设明显标志。

### 3.2 工厂化处理

将所有病死牲畜、扑杀牲畜及其产品密封运输至无害化处理厂，统一实施无害化处理。

### 3.3 发酵

饲料、粪便可在指定地点堆积，彻底密封发酵，表面应进行消毒。

3.4 无害化处理应符合环保要求，所涉及到的运输、装卸等环节要避免洒漏，运输装卸工具使用后应彻底消毒。

## 4 消毒

### 4.1 设备和必需品

4.1.1 清洗工具：扫帚、叉子、铲子、锹和冲洗水管。

4.1.2 消毒工具：喷雾器、火焰喷射枪、消毒车辆、消毒容器等。

4.1.3 消毒剂：强碱类、醛类、氯素类、酚复合物等合适的消毒剂。

4.1.4 防护装备：防护服、口罩、胶靴、手套、护目镜等。

#### 4.2 圈舍、场地和各种用具的消毒

4.2.1 对圈舍及场地内外采用喷洒消毒液的方式进行消毒，消毒后对污物、粪便、饲料等进行清理；清理完毕再用消毒液以喷洒方式进行彻底消毒，消毒完毕后再进行清洗；不易冲洗的圈舍铲除废弃物和表土，进行堆积发酵处理。

4.2.2 对金属设施设备，可采取火焰、薰蒸等方式消毒；木质工具及塑料用具采取用消毒液浸泡消毒；工作服等采取浸泡或高温高压消毒。

4.3 疫区内怀疑污染场所及道路应进行喷洒消毒。

#### 4.4 运载工具清洗消毒

4.4.1 在出入疫点、疫区的交通路口设立消毒站点，对所有可能污染的运载工具应当严格消毒。

4.4.2 从车辆上清理下来的废弃物按 3.3 进行无害化处理。

4.5 疫点每天至少消毒 1 次，连续 1 周；1 周以后每两天消毒 1 次。疫区内疫点以外的区域每两天消毒 1 次。

# 猪瘟疫情扑灭技术规范

## 1 范围

本规范规定了猪瘟疫情扑灭中易感动物扑杀、无害化处理及消毒的技术要求。

本规范适用于猪瘟疫情扑灭工作。

## 2 牲畜扑杀

### 2.1 扑杀方法

2.1.1 电击：使用分体电击棍击杀致死。

2.1.2 药物注射：静脉注射来苏尔溶液，使用量以致死为准。

2.1.3 其它符合动物福利要求的无流血致死方法。

### 2.2 人员的防护要求

#### 2.2.1 穿戴防护衣物

穿防护服，或者穿长袖手术衣加防水围裙；

穿可消毒的绝缘胶靴；

戴可消毒的绝缘橡胶手套；

戴 N95 口罩或标准手术用口罩；

戴护目镜。

#### 2.2.2 消毒

工作后用无腐蚀性消毒液浸泡手后，用肥皂清洗 2 次以上。

防护服、手套、口罩、目镜、胶鞋、鞋套等使用后在指定地点消毒或销毁。非一次性防护用品须经消毒、晾晒后使用。

## 3 无害化处理

所有病死牲畜（猪）、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、饲料和其它物品应当进行无害化处理。清洗所产生的污水、污物应做无害化处理。

无害化处理可以选择深埋、焚烧等方法，饲料、粪便可以堆积发酵处理。

### 3.1 深埋

#### 3.1.1 选址

应当避开公共视线，选择地表水位低，远离学校、公共场所、居民住宅区、牲畜饲养场、屠宰场及交易市场、村庄、饮用水源地、河流等的地域。选址应当有利于防洪。

#### 3.1.2 深度

坑的深度应保证动物尸体、产品、饲料、污染物等被掩埋物的上层距地表 1.5 米以上。

#### 3.1.3 焚烧

掩埋前，应对需掩埋的动物尸体、产品、污染物等实施浇油焚烧处理。

#### 3.1.4 消毒

掩埋坑底铺 2cm 厚生石灰；焚烧后的动物尸体、产品、饲料、污染物等表面，以及掩埋后的地表环境应使用有效消毒药品喷洒消毒。

#### 3.1.5 填土

用土掩埋后，应当保持与周围持平。填土不太实，以免尸腐产气造成气泡冒出和液体渗漏。

#### 3.1.6 掩埋后应设立明显标志。

### 3.2 工厂化处理

将所有病死牲畜、扑杀牲畜及其产品密封运输至无害化处理厂，统一实施无害化处理。

### 3.3 发酵

饲料、粪便可在指定地点堆积，彻底密封发酵，表面应当进行消毒。

3.4 无害化处理应符合环保要求，所涉及到的运输、装卸等环节应避免洒漏，运输装卸工具使用后应彻底消毒。

## 4 消毒

### 4.1 设备和用品

- 4.1.1 清洗工具：扫帚、叉子、铲子、锹和冲洗用水管等。
- 4.1.2 消毒工具：喷雾器、火焰喷射枪、消毒车、消毒容器等。
- 4.1.3 消毒剂：次氯酸盐类、碱液、来苏尔等。
- 4.1.4 防护装备：防护服、口罩、胶靴、手套、护目镜等。
- 4.2 牲畜圈舍的消毒
  - 4.2.1 对圈舍及场地内外采用喷洒消毒液的方式进行消毒，消毒后对污物、粪便、饲料等进行清理；清理完毕再用消毒液以喷洒方式进行彻底消毒，消毒完毕后再进行清洗；不易冲洗的圈舍铲除废弃物和表土，进行堆积发酵处理。
  - 4.2.2 对金属设施设备，可采取火焰、薰蒸等方式消毒；木质工具及塑料用具采取用消毒液浸泡消毒；工作服等采取浸泡或高温高压消毒。
- 4.3 疫区内怀疑被污染场所及道路应进行喷洒消毒
- 4.4 运载工具的清洗消毒
  - 4.4.1 在出入疫点、疫区的交通路口设立消毒站点，对所有可能被污染的运载工具应当严格消毒。
  - 4.4.2 从车辆上清理下来的废弃物按 3.3 进行无害化处理。
- 4.5 封锁期间，疫点每天消毒 1 次连续 1 周，1 周以后每两天消毒 1 次；疫区内其他重点区域每两天消毒 1 次。

# 口蹄疫流行病学调查技术规范

## 1 范围

本规范规定了发生口蹄疫疫情后开展的流行病学调查技术要求。

本规范适用于发生口蹄疫疫情后的最初调查、现场调查和跟踪调查。

## 2 术语与定义

### 2.1 最初调查

当地动物防疫监督机构在接到养殖场/户怀疑发生口蹄疫的报告后，由兽医技术人员对所报告的养殖场/户进行的实地考察和对发病情况的初步核实。

### 2.2 现场调查

省级、国家级动物流行病学专家对所报告的口蹄疫发病场/户的场区状况、传染来源、传播途径、发病牲畜品种与日龄、发病时间与病程、近期牲畜、畜产品和人员流动等情况进行的调查。

### 2.3 跟踪调查

兽医技术人员或动物流行病学专家在接到怀疑发生口蹄疫的报告后所进行的追溯最原始病畜、跟踪疫点牲畜去向情况、检测自然宿主带毒状况、病原变异情况等调查。

## 3 最初调查

### 3.1 组织与要求

3.1.1 当地动物防疫监督机构接到养殖场/户怀疑发病的报告后，应立即指派至少 2 名具备兽医师以上职称的技术人员，携带必要的器械、用品和采样器具，在 24 h 内赶赴现场，核实发病情况。

3.1.2 被派人员至少 3d 内没有接触过口蹄疫病畜及其污染物，并做好个人防护。

### 3.2 内容

3.2.1 调查发病畜场的基本情况、病史、临床症状、免疫接种情况及环境状况等，完成最初调查表（见附录 A）。

3.2.2 认真检查发病畜群状况，根据临床症状和病理变化，做出是否发生口蹄疫的初步判断。

3.2.3 若不能排除口蹄疫，调查人员应立即报告当地动物防疫监督机构，并提请省级或国家级动物流行病学专家作进一步诊断和调查，同时按照《样品采集、保存、运输技术规范》的要求完成样品采集工作，并将样品送到省级实验室确诊。

3.2.4 提出对怀疑发病点实施的初步控制措施建议。

3.2.5 画图标出怀疑发病畜场/户周围 13km 以内分布的牲畜养殖场、道路、河流、山岭、树林、人工屏障等，连同最初调查表一同报告当地动物防疫监督机构。

## 4 现场调查

### 4.1 组织与要求

4.1.1 省级动物防疫监督机构接到怀疑发病报告后，应立即派遣动物流行病学专家携带必要的器械和用品尽快赶赴现场，做进一步诊断和调查。

4.1.2 被派动物流行病学专家应符合 3.1.2 的要求。

### 4.2 内容与方法

4.2.1 在当地动物防疫监督机构技术人员最初调查的基础上，对发病养殖场/户的发病情况、周边地理地貌、近期牲畜、畜产品、人员流动情况等开展全面的调查，分析传染源、传播途径以及影响疫情控制和消灭的环境和生态因素。

4.2.2 尽快完成流行病学现场调查表（见附录 B），报告省级动物防疫监督机构。

4.2.3 按照《样品采集、保存、运输规范》的要求，采样送国家口蹄疫参考实验室进行确诊。

## 5 跟踪调查

### 5.1 组织

5.1.1 当地流行病学调查人员在省级或国家级动物流行病学专家指导下对有关人员、可疑感染畜（场）、可疑污染物品和带毒宿主等进行跟踪调查。

5.1.2 被派人员应符合 3.1.2 的要求。

### 5.2 内容

5.2.1 追踪出入发病养殖场/户的有关工作人员和所有牲畜、畜产品及有关物品的流动情况。

5.2.2 对疫区的猪、牛、羊、野猪等重要易感动物进行发病情况调查，追踪疫病传播和扩散情况。

5.2.3 完成跟踪调查表（见附录 C），并提交跟踪调查报告。

## **6 总结分析报告**

根据调查结果，汇总分析形成报告，报省级动物防疫监督机构和动物卫生与流行病学中心。

**附录 A**  
**(规范性附录)**  
**口蹄疫流行病学最初调查表**

任务编号:	
调查者姓名:	电话:
场/户主姓名:	电话:
场/户名称	邮编:
场/户地址	
饲养品种	
饲养数量	
免疫接种	
场址地形环境描述	
发病时 天气状况	温度
	干旱/下雨
	主风向
场区条件	<input type="checkbox"/> 进场要洗澡更衣 <input type="checkbox"/> 进生产区要换胶靴 <input type="checkbox"/> 场舍门口有消毒池 <input type="checkbox"/> 净道与污道分开 <input type="checkbox"/> 无防疫设施 <input type="checkbox"/> 是否饲喂泔水
污水排向	<input type="checkbox"/> 附近河流 <input type="checkbox"/> 农田沟渠 <input type="checkbox"/> 附近村庄 <input type="checkbox"/> 野外湖区 <input type="checkbox"/> 野外水塘 <input type="checkbox"/> 野外荒郊 <input type="checkbox"/> 其他
过去一年曾发生的疫病	<input type="checkbox"/> 口蹄疫 <input type="checkbox"/> 猪水疱病 <input type="checkbox"/> 牛粘膜病 <input type="checkbox"/> 蓝舌病 <input type="checkbox"/> 牛丘疹性口炎 <input type="checkbox"/> 牛恶性卡他热 <input type="checkbox"/> 小反刍兽疫 <input type="checkbox"/> 牛传染性鼻气管炎 <input type="checkbox"/> 牛溃疡性乳房炎 <input type="checkbox"/> 其它:
本次典型发病情况	<input type="checkbox"/> 大批动物出现急性跛行 <input type="checkbox"/> 发烧 <input type="checkbox"/> 口、蹄和/或乳头有水泡 <input type="checkbox"/> 泌乳奶牛产奶量显著下降 <input type="checkbox"/> 流涎 <input type="checkbox"/> 其他 (请填写):
疫情核实结论	<input type="checkbox"/> 疑似口蹄疫 <input type="checkbox"/> 排除口蹄疫

**附录 B**  
**(规范性附录)**  
**口蹄疫现场调查表**

**B1 疫点易感牲畜与发病牲畜现场调查**

B1.1 最早发病时间:\_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日\_\_\_\_时,  
发病数: \_\_头, 死亡数: \_\_头, 圈舍(户)编号:\_\_\_\_\_。

B1.2 畜群发病情况:

圈舍(户)编号	牲畜品种	存栏数	日龄	发病日期	发病数	开始死亡日期	死亡数

**B2 可能的传染源调查**

B2.1 发病前 15d 内, 发病畜舍是否新引进了牲畜?

(1) 否 (2) 是, 请回答:

引进牲畜种类	引进数量	引进时间	来源	健康状况	最初混群时间	混群情况※

注: ※混群情况 (1) 同舍(户)饲养 (2) 邻舍(户)饲养 (3) 饲养于本场(村)隔离场, 隔离场(舍)人员单独隔离

B2.2 发病前 15d 内发病畜场/户是否有野猪、啮齿动物等出没?

(1) 否 (2) 是, 请回答:

野生动物种类	数量	来源	与牲畜接触地点※	野生动物数量	与牲畜接触频率#

注: ※与牲畜接触地点包括进入场/户场内、畜栏舍四周、存料处及料槽等;

# 接触频率指野生动物与牲畜接触地点的接触情况, 分为每天、数次、仅一次。

B2.3 发病前 15d 内是否运入可疑的被污染物品(药品)?

(1) 否 (2) 是, 请回答:

物品名称	数量	经过或存放地	运入后使用情况

B2.4 最近 15d 内的是否有场外有关业务人员来场? (1) 无 (2) 有, 请写出访问者姓名、单位、访问日期和注明是否来自疫区。

来访人	来访日期	来访人职业/电话	是否来自疫区

B2.5 发病场/户是否靠近其他养殖场及动物集散地?

(1) 否 (2) 是, 请回答:

B2.5.1 与发病场的相对地理位置\_\_\_\_\_

B2.5.2 与发病场的距离\_\_\_\_\_

B2.5.3 其大致情况\_\_\_\_\_

B2.6 发病场周围 10km 以内是否有下列动物群？

B2.6.1 猪，\_\_\_\_\_

B2.6.2 野猪，\_\_\_\_\_

B2.6.3 牛群，\_\_\_\_\_

B2.6.4 羊群，\_\_\_\_\_

B2.6.5 田鼠、家鼠，\_\_\_\_\_

B2.6.6 其它易感动物，\_\_\_\_\_

B2.7 在最近 30d 内本场周围 10km 有无畜群发病？（1）无 （2）有，请回答：

B2.7.1 发病日期：\_\_\_\_\_

B2.7.2 病畜数量和品种：\_\_\_\_\_

B2.7.3 确诊/疑似诊断疾病：\_\_\_\_\_

B2.7.4 场主姓名：\_\_\_\_\_

B2.7.5 发病地点与本场相对位置、距离：\_\_\_\_\_

B2.7.6 发病期间，本场与发病场在风向上的关系为：①本场处于发病场下风向 ②本场处于发病场上风向 ③这期间上下风向有变换 ④两场风向关系不能确定 ⑤这期间风很小，不能作出通过风传播的判断。

B2.7.7 发病畜群疫苗接种情况：\_\_\_\_\_

B2.8 场内是否有职员住在其他养殖场/养畜村？（1）无 （2）有，请回答：

B2.8.1 该场所处的位置：\_\_\_\_\_

B2.8.2 该场牲畜的数量和品种：\_\_\_\_\_

B2.8.3 该场牲畜的来源及去向：\_\_\_\_\_

B2.8.4 职员拜访和接触他人地点：\_\_\_\_\_

**B3 在发病前 15d 是否有更换饲料来源等饲养方式/管理的改变？**

（1）无 （2）有，\_\_\_\_\_

**B4 发病场（户）周围环境情况**

B4.1 静止水源——沼泽、池塘或湖泊：（1）是 （2）否

B4.2 流动水源——灌溉用水、运河水、河水：（1）是 （2）否

B4.3 断续灌溉区——方圆 3 公里内无水面：（1）是 （2）否

B4.4 最近发生过洪水：（1）是 （2）否

B4.5 靠近公路干线：（1）是 （2）否

B4.6 靠近山溪或森（树）林：（1）是 （2）否

**B5 该养殖场/户地势类型属于：**

（1）盆地 （2）山谷 （3）高原 （4）丘陵 （5）平原 （6）山区

（7）其他（请注明）\_\_\_\_\_

**B6 饮用水及冲洗用水情况**

B6.1 饮水类型：

（1）自来水 （2）浅井水 （3）深井水 （4）河水 （5）塘水 （6）其他

B6.2 冲洗水类型：

（1）自来水 （2）浅井水 （3）深井水 （4）河水 （5）塘水 （6）其他

B7 发病养殖场/户口蹄疫疫苗免疫情况：

（1）不免疫 （2）免疫

B7.1 疫苗生产厂家\_\_\_\_\_

B7.2 疫苗品种、批号\_\_\_\_\_

B7.3 免疫畜种及数量\_\_\_\_\_

B7.4 免疫抗体监测\_\_\_\_\_

**B8 受威胁区免疫畜群情况**

B8.1 免疫接种一个月内畜群发病情况：

(1) 未见发病 (2) 发病, 发病率\_\_\_\_\_

**B8.2 血清学检测和病原学检测**

样品	采样时间	检测项目	检测方法	病毒亚型

注: 样品包括水泡液、水泡皮、脾脏、心脏、血清及咽腭分泌物等。

**B9 解除封锁后 30d 是否使用了岗哨动物**

(1) 否 (2) 是, 简述岗哨动物名称、数量及结果\_\_\_\_\_

**B10 最后诊断情况:**

B10.1 确诊口蹄疫, 确诊单位\_\_\_\_\_, 病毒亚型\_\_\_\_\_

B10.2 排除, 其他疫病名称\_\_\_\_\_

**B11 疫情处理情况**

B11.1 发病畜及其同群畜全部扑杀:

(1) 否 (2) 是, 扑杀范围: \_\_\_\_\_

B11.2 受威胁区内的所有易感畜全部接种疫苗

(1) 否 (2) 是

所用疫苗的病毒亚型: \_\_\_\_\_; 厂家\_\_\_\_\_

**附录 C**  
**(规范性附录)**  
**口蹄疫跟踪调查表**

**C1 在发病养殖场/户出现第 1 个病例前 15 天至该场被控制期间出场的:**

(A) 有关人员, (B) 动物/产品/排泄废弃物, (C) 运输工具/物品/饲料/原料, (d) 其他(请标出)\_\_\_\_\_ , 养殖场被控制日期\_\_\_\_\_。

出场日期	出场人员/物 (A/B/C/D)	运输工具 (车号)	目的地	通讯地址/电话

**C2 在发病养殖场/户出现第 1 个病例前 15d 至该场被控制期间, 是否有家畜、车辆和人员进出家畜集散地? (1) 无 (2) 有, 请填写下表, 追踪可能污染物, 做限制或消毒处理。**

集散地名称	出入日期	出场人/物	运输工具	通讯地址/电话	相对方位/距离

注: 家畜集散地包括展览场所、交易市场、动物园等。

**C3 列举在发病养殖场/户出现第 1 个病例前 15d 至该场被控制期间出场的工作人员 (如送料员、销售人员、兽医等) 3d 内接触过的所有养殖场/户, 通知被访场家进行防范。**

姓名	出场人员	出场日期	访问日期	目的地/电话

**C4 疫区家畜**

C4.1 在发病后一个月发病情况

(1) 未见发病 (2) 发病, 发病率\_\_\_\_\_

C4.2 血清学检测和病原学检测

样品	采样时间	检测项目	检测方法	结果

**C5 疫区野生动物**

C5.1 在发病后一个月发病情况

(1) 未见发病 (2) 发病, 发病率\_\_\_\_\_

C5.2 血清学检测和病原学检测

样 品	采样时间	检测项目	检测方法	结 果

C6 在该疫点疫病传染期内密切接触人员的发病情况\_\_\_\_\_

(1) 未见发病

(2) 发病，简述情况：

接触人员 姓名	性别	年龄	接触方式※	住址或 工作单位	电话号码	是否发病 及死亡

注：※接触方式：(1) 本舍（户）饲养员 (2) 非本舍饲养员 (3) 本场兽医 (4) 收购与运输 (5) 屠宰加工 (6) 处理疫情的场外兽医 (7) 其他接触

# 高致病性禽流感流行病学调查技术规范

## 1 范围

本规范规定了发生高致病性禽流感疫情后开展的流行病学调查技术要求。

本规范适用于发生高致病性禽流感疫情后的最初调查、现场调查和跟踪调查。

## 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。

NY 764-2004 高致病性禽流感 疫情判定及扑灭技术规范

NY/T 768-2004 高致病性禽流感 人员防护技术规范

## 3 术语与定义

### 3.1 最初调查

当地动物防疫监督机构在接到养禽场/户怀疑发生高致病性禽流感的报告后，由兽医技术人员对所报告的养禽场/户进行的实地考察和对发病情况的初步核实。

### 3.2 现场调查

省级、国家级动物流行病学专家对所报告的高致病性禽流感发病场/户的场区状况、传染来源、应急条件、免疫状况、发病禽品种与日龄、发病时间与病程、发病率与病死率、发病禽舍分布情况等进行的调查。

### 3.3 跟踪调查

在高致病性禽流感暴发及扑灭前后，对疫点的可疑带毒人员、用具、车辆、病死禽及其产品和其它传播媒介的扩散和流向趋势、自然宿主发病和带毒情况的调查。

## 4 最初调查

### 4.1 组织与要求

4.1.1 当地动物防疫监督机构接到养禽场/户怀疑发病的报告后，应立即指派 2 名具备兽医师以上职称的技术人员，携带必要的器械、用品和采样器具，在 24 h 内赶赴现场，核实发病情况。

4.1.2 被派兽医技术人员至少在 3d 内没有接触过高致病性禽流感病禽及其污染物，按 NY/T 768-2004 要求做好个人防护。

### 4.2 内容

4.2.1 调查发病禽场的基本状况、病史、临床症状及环境状况等，完成最初调查表（见附录 A）。

4.2.2 认真检查发病禽群状况，根据 NY 764-2004 做出是否发生高致病性禽流感的初步判断。

4.2.3 若不能排除高致病性禽流感，调查人员应立即报告当地动物防疫监督机构，并建议提请省级或国家级动物流行病学专家作进一步调查和诊断，同时按《样品采集、包装、运输技术规范》的要求完成样品采集工作，并将样品送到指定实验室确诊。

4.2.4 提出对怀疑发病点实施的初步控制措施建议。

4.2.5 画图标出怀疑发病禽场/户周围 8km 以内分布的养禽场、道路、河流、山岭、树林、人工屏障等，连同最初调查表一同报告当地动物防疫监督机构。

## 5 现场调查

### 5.1 组织与要求

5.1.1 省级动物防疫监督机构接到怀疑发病报告后，应立即派遣动物流行病学专家携带必要的器械和用品尽快赶赴现场，作进一步诊断和调查。

5.1.2 被派动物流行病学专家应符合 4.1.2 的要求。

### 5.2 内容

5.2.1 在当地动物防疫监督机构兽医技术人员最初调查的基础上，对发病养禽场/户的发病情况、周边地理地貌、野生动物分布、近期家禽、禽产品、人员流动情况等开展全面的调查，分析传染来源、传播途径以及影响疫情控制和消灭的环境和生态因素。

5.2.2 尽快完成流行病学现场调查表（见附录 B），报告省级动物防疫监督机构。

5.2.3 按照《样品采集、保存、运输规范》的要求，采样送国家禽流感参考实验室确诊。

## **6 跟踪调查**

### **6.1 组织**

6.1.1 当地流行病学调查人员在省级或国家级动物流行病学专家指导下对有关人员、可疑感染禽（场）、可疑污染物品和带毒宿主进行跟踪调查。

6.1.2 被派人员应符合 4.1.2 的要求。

### **6.2 内容**

6.2.1 追踪出入发病养禽场/户的有关工作人员和所有家禽、禽产品及有关物品的流动情况。

6.2.2 对疫区的家禽、水禽、猪、留鸟、候鸟等重要易感动物进行发病情况调查，追踪疫病传播和扩散情况。

6.2.3 完成跟踪调查表（见附录 C），并提交跟踪调查报告。

## **7 总结分析报告**

根据调查结果，汇总分析形成报告，报省级动物防疫监督机构和动物卫生与流行病学中心。

**附录 A**  
**(规范性附录)**  
**高致病性禽流感流行病学最初调查表**

任务来源		任务编号	
调查者姓名		电 话	
场/户主姓名		电 话	
场/户名称		传 真	
场/户地址		邮 编	
饲养品种		发病日龄	
饲养数量		发病数量	
场址地形 环境描述			
发病时 天气状况	温度变化		
	干旱/下雨/下雪		
	风力/主风向		
场区条件	<input type="checkbox"/> 进场要洗澡更衣 <input type="checkbox"/> 进生产区要换胶靴 <input type="checkbox"/> 场舍门口有消毒池 <input type="checkbox"/> 净道与污道分开		
污水排向	<input type="checkbox"/> 附近河流 <input type="checkbox"/> 农田沟渠 <input type="checkbox"/> 附近村庄 <input type="checkbox"/> 野外湖区 <input type="checkbox"/> 野外水塘 <input type="checkbox"/> 野外荒郊 <input type="checkbox"/> 其他		
过去一年曾 发生的疫病	<input type="checkbox"/> 低致病性禽流感 <input type="checkbox"/> 新城疫 <input type="checkbox"/> 马立克氏病 <input type="checkbox"/> 禽白血病 <input type="checkbox"/> 鸡传染性喉气管炎 <input type="checkbox"/> 鸡传染性贫血 <input type="checkbox"/> 鸡传染性支气管炎 <input type="checkbox"/> 鸡传染性法氏囊病		
本次典型 发病情况	<input type="checkbox"/> 急性发病死亡 <input type="checkbox"/> 脚鳞出血 <input type="checkbox"/> 鸡冠出血或发绀、头部水肿 <input type="checkbox"/> 肌肉和其他组织器官广泛性严重出血 <input type="checkbox"/> 神经症状 <input type="checkbox"/> 绿色稀便 <input type="checkbox"/> 其他（请填写）：		
疫情核实 结论	<input type="checkbox"/> 不能排除高致病性禽流感 <input type="checkbox"/> 排除高致病性禽流感		
调查人员签字：			时间：

**附录 B**  
**(规范性附录)**  
**高致病性禽流感现场调查表**

疫情类型 (1) 确诊 (2) 疑似 (3) 可疑

**B1 现场调查**

B1.1 最早出现发病时间:\_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日\_\_\_\_时,  
发病数:\_\_\_只, 死亡数:\_\_\_只, 圈舍(户)编号:\_\_\_\_\_。

B1.2 禽群发病情况:

圈舍(户)编号	家禽种类	发病日龄	发病日期	发病数	开始死亡日期	死亡数

B1.3 袭击率: \_\_\_\_\_

计算公式: 袭击率=(疫情暴发以来发病禽数÷疫情暴发开始时易感禽数)×100%

**B2 可能的传染来源调查**

B2.1 发病前 30d 内, 发病禽舍是否新引进了家禽?

(1) 是 (2) 否

引进禽品种	引进数量	混群情况	最初混群时间	健康状况	引进时间	来源

注: 混群情况为: (1) 同舍(户)饲养 (2) 邻舍(户)饲养 (3) 饲养于本场(村)隔离场

B2.2 发病前 30d 内发病禽场/户是否有野鸟栖息、捕获鸟或购入观赏鸟?

(1) 是 (2) 否

鸟名	数量	来源	鸟停留地点	鸟病死数量	与禽只接触频率

注: a 停留地点: 包括禽场(户)内建筑物上、畜禽舍内、树上、存料处及料槽等;  
b 接触频率: 指鸟与停留地点的接触情况, 分为每天、数次、仅一次。

B2.3 发病前 30d 内是否运入可疑的被污染物品(药品)?

(1) 是 (2) 否

物品名称	数量	经过或存放地	运入后使用情况

B2.4 最近 30d 内的是否有场外有关业务人员来场? (1) 无 (2) 有, 请写出访问者姓名、单位、访问日期, 并注明是否来自疫区。

来访人	来访日期	来访人职业/电话	是否来自疫区

B2.5 发病场(户)是否靠近其他养禽场及动物集散地?

(1) 是 (2) 否

- B2.5.1 与发病场的相对地理位置\_\_\_\_\_
- B2.5.2 与发病场的距离\_\_\_\_\_
- B2.5.3 其大致情况\_\_\_\_\_
- B2.6 发病场周围 10km 以内是否有下列动物群？
- B2.6.1 猪，\_\_\_\_\_
- B2.6.2 野禽，具体禽种：\_\_\_\_\_
- B2.6.3 野水禽，具体禽种：\_\_\_\_\_
- B2.6.4 田鼠、家鼠：\_\_\_\_\_
- B2.6.5 其它：\_\_\_\_\_
- B2.7 在最近 25~30d 内本场周围 10 公里有无禽发病？（1）无 （2）有，请回答：
- B2.7.1 发病日期：\_\_\_\_\_
- B2.7.2 病禽数量和品种：\_\_\_\_\_
- B2.7.3 确诊/疑似诊断疾病：\_\_\_\_\_
- B2.7.4 场主姓名：\_\_\_\_\_
- B2.7.5 发病地点与本场相对位置、距离：\_\_\_\_\_
- B2.7.6 投药情况：\_\_\_\_\_
- B2.7.7 疫苗接种情况：\_\_\_\_\_
- B2.8 场内是否有职员住在其他养殖场/养禽村？（1）无 （2）有，请回答：
- B2.8.1 该农场所处的位置：\_\_\_\_\_
- B2.8.2 该场禽只的数量和品种：\_\_\_\_\_
- B2.8.3 该场禽只的来源及去向：\_\_\_\_\_
- B2.8.4 职员拜访和接触他人地点：\_\_\_\_\_
- B3 在发病前 30d 是否有饲养方式/管理的改变？**
- （1）无 （2）有，\_\_\_\_\_
- B4 发病场（户）周围环境情况**
- B4.1 静止水源——沼泽、池塘或湖泊：（1）是 （2）否
- B4.2 流动水源——灌溉用水、运河水、河水：（1）是 （2）否
- B4.3 断续灌溉区——方圆三公里内无水面：（1）是 （2）否
- B4.4 最近发生过洪水：（1）是 （2）否
- B4.5 靠近公路干线：（1）是 （2）否
- B4.6 靠近山溪或森（树）林：（1）是 （2）否
- B5 该养禽场/户地势类型属于：**
- （1）盆地（2）山谷（3）高原（4）丘陵（5）平原（6）山区  
（7）其他（请注明）\_\_\_\_\_
- B6 饮用水及冲洗用水情况**
- B6.1 饮水类型：
- （1）自来水（2）浅井水（3）深井水（4）河水（5）塘水  
（6）其他
- B6.2 冲洗水类型：
- （1）自来水（2）浅井水（3）深井水（4）河水（5）塘水  
（6）其他
- B7 发病养禽场/户高致病性禽流感疫苗免疫情况：**
- （1）免疫 （2）不免疫
- B7.1 疫苗生产厂家\_\_\_\_\_
- B7.2 疫苗品种、批号\_\_\_\_\_
- B7.3 被免疫禽数量\_\_\_\_\_
- B8 受威胁区免疫禽群情况**
- B8.1 免疫接种 30 d 内禽只发病情况：
- （1）未见发病  
（2）发病，发病率\_\_\_\_\_
- B8.2 异源亚型血清学检测和病原学检测

样品类型	采样时间	检测项目	检测方法	结果
注：样品类型包括气管拭子、泄殖腔拭子、脾、淋巴结、血清及粪便等。				

**B9 解除封锁后是否使用了岗哨动物**

(1) 否 (2) 是, 简述结果\_\_\_\_\_

**B10 最后诊断情况:**

B10.1 确诊高致病性禽流感, 确诊单位\_\_\_\_\_

B10.2 排除, 其他疫病名称\_\_\_\_\_

**B11 疫情处理情况**

B11.1 疫区以内所有家禽全部扑杀:

(1) 是 (2) 否, 扑杀范围: \_\_\_\_\_

B11.2 受威胁区所有家禽全部接种疫苗

(1) 是 (2) 否

所用疫苗的病毒亚型: \_\_\_\_\_; 厂家\_\_\_\_\_

**附录 C**  
**(规范性附录)**  
**高致病性禽流感跟踪调查表**

**C1 在发病养禽场/户出现第 1 个病例前 21 天至该场被控制期间出场的:**

(A) 有关人员, (B) 动物/产品/排泄废弃物, (C) 运输工具/物品/饲料/原料, (天) 其他(请标出)\_\_\_\_\_ , 养禽场被隔离控制日期\_\_\_\_\_。

出场日期	出场人/物 (A/B/C/天)	运输工具	出场人/承运人姓名/电话	目的地/电话

**C2 在发病养禽场/户出现第 1 个病例前 21d 至该场被隔离控制期间, 是否有家禽、车辆和人员进出家禽集散地?** (家禽集散地包括展屠宰场、览场所、农贸市场、动物产品仓库、动物园等。)(1) 无 (2) 有, 请填写下表, 追踪可能污染物, 做限制或消毒处理。

出入日期	出入人/物	运输工具	出入人/承运人姓名/电话	相对方位/距离

**C3 列举在发病养禽场/户出现第 1 个病例前 21d 至该场被隔离控制期间出场的工作人员** (如送料、雌雄鉴别、销售、兽医人员等), 3 天内接触过的所有养禽场/户, 通知进行防范。

姓名	出场人员	出场日期	访问日期	目的地/电话

**C4 疫点或疫区水禽**

C4.1 在发病后一个月发病情况

(1) 未见发病 (2) 发病, 发病率\_\_\_\_\_

C4.2 血清学异源亚型检测和病原学检测

样品类型	采样时间	检测项目	检测方法	结果

**C5 疫点或疫区留鸟**

C5.1 在发病后一个月发病情况

(1) 未见发病 (2) 发病, 发病率\_\_\_\_\_

C5.2 血清学检测和病原学检测

样品类型	采样时间	检测项目	检测方法	结果

**C6 受威胁区猪密切接触的猪只**

C6.1 在发病后一个月发病情况

(1) 未见发病 (2) 发病, 发病率\_\_\_\_\_

C6.2 异源亚型血清学检测和病原学检测

样品类型	采样时间	检测项目	检测方法	结果

C7 疫点或疫区候鸟

C7.1 在发病后一个月发病情况

(1) 未见发病 (2) 发病, 发病率\_\_\_\_\_

C7.2 血清学检测和病原学检测

样品类型	采样时间	检测项目	检测方法	结果

C8 在该疫点疫病传染期内与禽群密切接触人员的发病情况\_\_\_\_\_

(1) 未见发病

(2) 发病, 简述情况:

接触人员姓名	性别	年龄	接触方式	住址或工作单位	电话号码	是否发病及死亡

注: 接触方式: (1) 本舍(户)饲养员 (2) 非本舍饲养员 (3) 本场兽医 (4) 收购与运输 (5) 屠宰加工 (6) 处理疫情的场外兽医 (7) 其他接触

# 新城疫流行病学调查技术规范

## 1 范围

本规范规定了发生新城疫疫情后开展流行病学调查的技术要求。

本规范适用于发生新城疫疫情后的最初调查、现场调查和跟踪调查。

## 2 术语与定义

### 2.1 最初调查

当地动物防疫监督机构在接到养禽场/户怀疑发生新城疫的报告后，由兽医技术人员对所报告的养禽场/户进行的实地考察和对发病情况的初步核实。

### 2.2 现场调查

省级、国家级动物流行病学专家对所报告的新城疫发病场/户的场区状况、传染来源、应急条件、免疫状况、发病禽品种与日龄、发病时间与病程、发病率与病死率、发病禽舍分布情况等进行的调查。

### 2.3 跟踪调查

在新城疫暴发及扑灭前后，对疫点的可疑带毒人员、用具、车辆、病死禽及其产品和其它传播媒介的扩散和流向趋势、自然宿主发病和带毒情况的调查。

## 3 最初调查

### 3.1 组织与要求

3.1.1 当地动物防疫监督机构接到养禽场/户怀疑发病的报告后，应立即指派 2 名具备兽医师以上职称的技术人员，携带必要的器械、用品和采样器具，在 24 h 内赶赴现场，核实发病情况。

3.1.2 被派兽医技术人员至少 3d 内没有接触过新城疫病禽及其污染物，并做好个人防护。

### 3.2 内容

3.2.1 调查发病禽场的基本状况、病史、临床症状、免疫接种情况及环境状况等，完成最初调查表（见附录 A）。

3.2.2 认真检查发病禽群状况，根据临床症状和病理变化，做出是否发生新城疫的初步判断。

3.2.3 若不能排除新城疫，调查人员应立即报告当地动物防疫监督机构并建议提请省级/国家级动物流行病学专家作进一步调查和诊断，同时按《样品采集、包装、运输技术规范》的要求完成样品采集工作，并将样品送到指定实验室确诊。

3.2.4 提出对怀疑发病点实施的初步控制措施建议。

3.2.5 画图标出怀疑发病禽场/户周围 8km 以内分布的养禽场、道路、河流、山岭、树林、人工屏障等，连同最初调查表一同报告当地动物防疫监督机构。

## 4 现场调查

### 4.1 组织与要求

4.1.1 省级动物防疫监督机构接到怀疑发病报告后，应立即派遣动物流行病学专家携带必要的器械和用品尽快赶赴现场，作进一步诊断和调查。

4.1.2 被派动物流行病学专家应符合 3.1.2 的要求。

### 4.2 内容

4.2.1 在当地动物防疫监督机构兽医技术人员最初调查的基础上，对发病养禽场/户的发病情况、周边地理地貌、野生动物分布、近期家禽、禽产品、人员流动情况等开展全面的调查，分析传染来源、传播途径以及影响疫情控制和消灭的环境和生态因素。

4.2.2 尽快完成流行病学现场调查表（见附录 B），报告省级动物防疫监督机构。

4.2.3 按照《样品采集、保存、运输规范》的要求，采样送指定新城疫参考实验室确诊。

## 5 跟踪调查

### 5.1 组织

5.1.1 当地流行病学调查人员在省级或国家级动物流行病学专家指导下对有关人员、可疑感染禽（场）、可疑污染物品和带毒宿主等进行跟踪调查。

5.1.2 被派人员应符合 3.1.2 的要求。

### 5.2 内容

5.2.1 追踪出入发病养禽场/户的有关工作人员和所有家禽、禽产品及有关物品的流动情况。

5.2.2 对疫区的家禽、水禽、留鸟、候鸟等重要易感动物进行发病情况调查，追踪疫病传播和扩散情况。

5.2.3 完成跟踪调查表（见附录 C），并提交跟踪调查报告。

## **6 总结分析报告**

根据调查结果，汇总分析形成报告，报省级动物防疫监督机构和动物卫生与流行病学中心。



**附录 B**  
**(规范性附录)**  
**新城疫流行病学现场调查表**

疫情类型 (1) 确诊 (2) 疑似 (3) 可疑

**B1 疫点现场调查**

B1.1 最早出现发病时间:\_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日\_\_\_\_时,  
发病数:\_\_\_只, 死亡数:\_\_\_只, 圈舍(户)编号:\_\_\_\_\_。

B1.2 禽群发病情况:

圈舍(户)编号	家禽品种	发病日龄	发病日期	发病数	开始死亡日期	死亡数

B1.3 袭击率: \_\_\_\_\_

计算公式:袭击率=(疫情暴发以来发病禽数÷疫情暴发开始时易感禽数)×100%

B1.4 最近 30d 内该场有无禽只发病? (有或无) 如有, 请回答:

- (1) 发病日期:
- (2) 病禽数量和品种:
- (3) 用药情况:
- (4) 疫苗接种情况:

**B2 可能的传染来源调查**

B2.1 发病前 30d 内, 发病场/户是否新引进了家禽? (1) 是 (2) 否

引进禽品种	引进数量	混群情况	最初混群时间	健康状况	引进时间	来源

注: 混群情况为: (1) 同舍(户)饲养 (2) 邻舍(户)饲养 (3) 饲养于本场(村)隔离场

B2.2 发病前 30d 内发病禽场/户是否有野鸟栖息、是否捕获野鸟或购入观赏鸟?

(1) 是 (2) 否

鸟名	数量	来源	鸟停留地点	鸟有无发病	病死数量	与家禽接触频率

注: 停留地点: 包括禽场(户)内建筑物上、禽舍内、树上、存料处及料槽等;  
接触频率: 指鸟与停留地点家禽的接触情况。

B2.3 最近 30d 内的是否有场外有关业务人员(兽医、销售人员等)来场?

(1) 无 (2) 有, 请写出访问者姓名、单位、访问日期, 并注明是否来自疫区。

来访人	来访日期	来访人职业/电话	事由	是否来自疫区

B2.4 发病前 30d 内是否有外地车辆(运蛋、运禽、运粪便)来过本场, 如有是何时、何单位、是否来自疫区, 详细登记。

B2.5 近期发病场有否从外面收购过禽粪或其他动物组织? (1) 无 (2) 有  
如有, 指出来源, 用途和运输方式?

B2.6 最近 30d 内有无禽只和禽产品调出养禽场? (有或无) 如有, 请回答:

- (1) 调出理由:
- (2) 调出日期:
- (3) 调出的数量和品种:
- (4) 运输方法:
- (5) 运往目的地:

B2.7 发病场(户)是否靠近其他养禽场及动物集散地?

- (1) 是 (2) 否

B2.7.1 与发病场的相对地理位置\_\_\_\_\_

B2.7.2 与发病场的距离\_\_\_\_\_

B2.7.3 其大致情况\_\_\_\_\_

B2.8 在最近 25~30 天内本场周围 10km 有无禽类发病? (1) 无 (2) 有, 请回答:

B2.8.1 发病日期: \_\_\_\_\_

B2.8.2 病禽数量和品种: \_\_\_\_\_

B2.8.3 确诊/疑似诊断疾病: \_\_\_\_\_

B2.8.4 场主姓名: \_\_\_\_\_

B2.8.5 发病地点与本场相对位置、距离: \_\_\_\_\_

B2.8.6 投药情况: \_\_\_\_\_

B2.8.7 疫苗接种情况: \_\_\_\_\_

B2.9 场内是否有职员住在其他养殖场/养禽场? (1) 无 (2) 有, 请回答:

B2.9.1 该场所处的位置: \_\_\_\_\_

B2.9.2 该场禽只的数量和品种: \_\_\_\_\_

B2.9.3 该场禽只的来源及去向: \_\_\_\_\_

B2.9.4 职员拜访和接触他人地点: \_\_\_\_\_

**B3 在发病前 30d 是否有饲料贮存/饲养方式/管理方式的改变?**

- (1) 无 (2) 有, \_\_\_\_\_

**B4 发病场(户)周围环境情况**

B4.1 静止水源——沼泽、池塘或湖泊: (1) 是 (2) 否

B4.2 流动水源——灌溉用水、运河水、河水: (1) 是 (2) 否

B4.3 断续灌溉区——方圆 3 公里内无水面: (1) 是 (2) 否

B4.4 最近发生过洪水: (1) 是 (2) 否

B4.5 靠近公路干线: (1) 是 (2) 否

B4.6 靠近山溪或森(树)林: (1) 是 (2) 否

**B5 该养禽场/户地势类型属于:**

- (1) 盆地 (2) 山谷 (3) 高原 (4) 丘陵 (5) 平原 (6) 山区
- (7) 其他(请注明) \_\_\_\_\_

**B6 饮用水及冲洗用水情况**

B6.1 饮水类型:

- (1) 自来水 (2) 浅井水 (3) 深井水 (4) 河水 (5) 塘水 (6) 其他

B6.2 冲洗水类型:

- (1) 自来水 (2) 浅井水 (3) 深井水 (4) 河水 (5) 塘水 (6) 其他

**B7 发病养禽场/户新城疫疫苗免疫情况**

- (1) 不免疫 (2) 免疫, 若免疫请说明

B7.1 疫苗生产厂家\_\_\_\_\_

B7.2 疫苗品种、批号、剂量、应用途径\_\_\_\_\_

B7.3 被免疫禽数量\_\_\_\_\_

**B8 场内职员是否饲养观赏鸟?**

**B9 场内职员是否出席或参加过斗鸡、赛鸽会、禽展或观赏鸟表演? 如参加了, 是在何时何地?**

**B10 受威胁区免疫禽群情况**

B10.1 免疫接种一个月内禽只发病情况:

- (1) 未见发病 (2) 发病, 发病率\_\_\_\_\_

**B10.2 病原学检测和血清学检测**

样品类型	采样时间	检测项目	检测方法	结果

注：样品类型包括泄殖腔拭子、气管拭子、血清及粪便等。

**B11 解除封锁后是否使用了岗哨动物**

(1) 否 (2) 是，简述结果\_\_\_\_\_

**B12 最后诊断情况**

B12.1 确诊新城疫，确诊单位\_\_\_\_\_

B12.2 排除，其他疫病名称\_\_\_\_\_

**B13 疫情处理情况**

B13.1 疫区内有家禽全部扑杀：

(1) 是 (2) 否，扑杀范围：\_\_\_\_\_

B13.2 受威胁区所有家禽全部接种疫苗

(1) 是 (2) 否

所用疫苗：\_\_\_\_\_；厂家\_\_\_\_\_

**附录 C**  
**(规范性附录)**  
**新城疫流行病学跟踪调查表**

**C1 在发病养禽场/户出现第 1 个病例前 21d 至该场被控制期间出场的**

(A) 有关人员, (B) 动物/产品/排泄废弃物, (C) 运输工具/物品/饲料/原料, (天) 其他(请标出)\_\_\_\_\_ , 养禽场被隔离控制日期\_\_\_\_\_。

出场日期	出场人/物 (A/B/C/天)	运输工具	出场人/承运人姓名/电话	目的地/电话

**C2 在发病养禽场/户出现第 1 个病例前 21d 至该场被隔离控制期间, 是否有家禽、车辆和人员进出家禽集散地?** (家禽集散地包括展览场所、农贸市场、动物产品仓库、动物园等。)(1) 无 (2) 有, 请填写下表, 追踪可能污染物, 进行流通限制或无害化处理。

出入日期	出入人/物	运输工具	出入人/承运人姓名/电话	相对方位/距离

**C3 列举在发病养禽场/户出现第 1 个病例前 21d 至该场被隔离控制期间出场的工作人员** (如送料、雌雄鉴别、销售、兽医人员等), 3d 内接触过的所有养禽场/户, 通知他们进行适当的防范。

姓名	出场人员	出场日期	访问养禽场日期	目的地/电话

**C4 疫点或疫区水禽**

C4.1 在发病后一个月发病情况

(1) 未见发病 (2) 发病, 发病率\_\_\_\_\_

C4.2 病原学检测和血清学检测

样品类型	采样时间	检测项目	检测方法	结果

注: 样品类型包括泄殖腔拭子、气管拭子、血清及粪便等。

**C5 疫点或疫区留鸟**

C5.1 在发病后一个月发病情况

(1) 未见发病 (2) 发病, 发病率\_\_\_\_\_

C5.2 病原学检测和血清学检测

样品类型	采样时间	检测项目	检测方法	结果

注: 样品类型包括泄殖腔拭子、气管拭子、血清及粪便等。

**C6 疫点或疫区候鸟**

C6.1 在发病后一个月发病情况

(1) 未见发病 (2) 发病, 发病率\_\_\_\_\_

C6.2 病原学检测和血清学检测

样品类型	采样时间	检测项目	检测方法	结果

注: 样品类型包括泄殖腔拭子、气管拭子、血清及粪便等。

# 猪瘟流行病学调查技术规范

## 1 范围

本规范规定了发生猪瘟疫情后开展的流行病学调查技术要求。

本规范适用于发生猪瘟疫情后的最初调查、现场调查和跟踪调查。

## 2 术语与定义

### 2.1 最初调查

当地动物防疫监督机构在接到养猪场/户怀疑发生猪瘟的报告后，由兽医技术人员对所报告的养猪场/户进行的实地考察和对发病情况的初步核实。

### 2.2 现场调查

省级、国家级动物流行病学专家对所报告的猪瘟发病场/户的场区状况、传染来源、传播途径、免疫状况、发病猪品种与日龄、发病时间与病程、近期猪、猪产品、人员流动等情况进行的调查。

### 2.3 跟踪调查

兽医技术人员或动物流行病学专家在接到怀疑发生猪瘟的报告后所进行的追溯最原始病猪、跟踪疫点猪只去向情况、检测自然宿主带毒状况、病原变异情况等调查。

## 3 最初调查

### 3.1 组织与要求

3.1.1 当地动物防疫监督机构接到养猪场/户怀疑发病的报告后，应立即指派 2 名具备兽医师以上职称的技术人员，携带必要的器械、用品和采样器具，在 24 h 内赶赴现场，核实发病情况。

3.1.2 被派兽医技术人员至少 3d 内没有接触过猪瘟病猪及其污染物，并做好个人防护。

### 3.2 内容

3.2.1 调查发病猪场的基本状况、病史、临床症状及环境状况等，完成最初调查表（见附录 A）。

3.2.2 认真检查发病猪群状况，根据临床症状和病理变化，做出是否发生猪瘟的初步判断。

3.2.3 若不能排除猪瘟，调查人员应立即报告当地动物防疫监督机构，并建议提请省级或国家级动物流行病学专家作进一步调查，同时按《样品采集、包装、运输技术规范》的要求完成样品采集工作，并将样品送到指定实验室确诊。

3.2.4 提出对怀疑发病点实施的初步控制措施建议。

3.2.5 画图标出疑似发病猪场/户周围 13km 以内分布的养猪场、道路、河流、山岭、树林、人工屏障等，连同最初调查表一同报告当地动物防疫监督机构。

## 4 现场调查

### 4.1 组织与要求

4.1.1 省级动物防疫监督机构接到怀疑发病报告后，应立即派遣动物流行病学专家携带必要的器械和用品尽快赶赴现场，作进一步诊断和调查。

4.1.2 被派动物流行病学专家应符合 3.1.2 的要求。

### 4.2 内容

4.2.1 在当地动物防疫监督机构兽医技术人员最初调查的基础上，对发病养猪场/户的发病情况、周边地理地貌、近期猪、猪产品、人员流动情况等开展全面的调查，分析传染源、传播途径以及影响疫情控制和消灭的环境和生态因素。

4.2.2 尽快完成流行病学现场调查表（见附录 B），报告省级动物防疫监督机构。

4.2.3 按照《样品采集、保存、运输规范》的要求，采样送指定猪瘟参考实验室确诊。

## 5 跟踪调查

### 5.1 组织

5.1.1 当地流行病学调查人员在省级或国家级动物流行病学专家指导下对有关人员、可疑感染猪（场）、可疑污染物品和带毒宿主等进行跟踪调查。

5.1.2 被派人员应符合 3.1.2 的要求。

## 5.2 内容

5.2.1 追踪出入发病养猪场/户的有关工作人员和所有猪、猪产品及有关物品的流动情况。

5.2.2 对疫区的猪进行发病情况调查，追踪疫病传播和扩散情况。

5.2.3 完成跟踪调查表（见附录 C），并提交跟踪调查报告。

## 6 总结分析报告

根据调查结果，汇总分析形成报告，报省级动物防疫监督机构和动物卫生与流行病学中心。

**附录 A**  
**(规范性附录)**  
**猪瘟流行病学最初调查表**

任务编号:	
调查者姓名:	电话:
场/户主姓名:	电话:
场/户名称	邮编:
场/户地址	
饲养品种	
饲养数量	
场址地形环境描述	
发病时天气状况	温度
	干旱/下雨
	主风向
场区条件	<input type="checkbox"/> 进场要洗澡更衣 <input type="checkbox"/> 进生产区要换胶靴 <input type="checkbox"/> 场舍门口有消毒池 <input type="checkbox"/> 供料道与出粪道分开
污水排向	<input type="checkbox"/> 附近河流 <input type="checkbox"/> 农田沟渠 <input type="checkbox"/> 附近村庄 <input type="checkbox"/> 野外湖区 <input type="checkbox"/> 野外水塘 <input type="checkbox"/> 野外荒郊 <input type="checkbox"/> 其他
过去一年曾发生的疫病	<input type="checkbox"/> 猪流感 <input type="checkbox"/> 传染性胃肠炎 <input type="checkbox"/> 猪流行性腹泻 <input type="checkbox"/> 猪细小病毒病 <input type="checkbox"/> 猪呼吸与繁殖障碍综合症 <input type="checkbox"/> 猪轮状病毒病 <input type="checkbox"/> 猪伪狂犬病 <input type="checkbox"/> 其它:
本次典型发病情况	<input type="checkbox"/> 体温升高 <input type="checkbox"/> 精神萎顿、倦怠、食欲不振 <input type="checkbox"/> 可视粘膜充血、出血或有分泌物 <input type="checkbox"/> 便秘腹泻交替 <input type="checkbox"/> 仔猪有衰弱、震颤或发育不良现象 <input type="checkbox"/> 其它(请填写):
疫情核实结论	<input type="checkbox"/> 不能排除猪瘟 <input type="checkbox"/> 排除猪瘟
调查人员签字:	时间:

**附录 B**  
**(规范性附录)**  
**猪瘟现场调查表**

**B1 疫点易感猪与发病猪现场调查**

B1.1 最早出现发病时间:\_\_\_\_\_年\_\_\_\_月\_\_\_\_日\_\_\_\_\_时,

发病数: \_\_头, 死亡数: \_\_头, 圈舍(户)编号:\_\_\_\_\_。

B1.2 猪群发病情况:

圈舍(户)编号	猪品种	日龄	发病日期	发病数	开始死亡日期	死亡数

B1.3 袭击率: \_\_\_\_\_

计算公式:袭击率=(疫情暴发以来发病猪数÷疫情暴发开始时易感猪数)×100%

**B2 可能的传染源调查**

B2.1 发病前 30d 内, 发病猪舍是否新引进了猪?

(1) 否                      (2) 是, 请回答:

引进猪品种	引进数量	混群情况	最初混群时间	健康状况	引进时间	来源

注: 混群情况为: (1) 同舍(户)饲养 (2) 邻舍(户)饲养 (3) 饲养于本场(村)隔离场, 隔离场(舍)人员应单独隔离

B2.2 发病前 30d 内是否运入可疑的被污染物品(药品)?

(1) 否                      (2) 是, 请回答:

物品名称	数量	经过或存放地	运入后使用情况

B2.3 最近 30d 内的是否有场外有关业务人员来场? (1) 无 (2) 有, 请写出访问者姓名、单位、访问日期, 并注明是否来自疫区。

来访人	来访日期	来访人职业/电话	是否来自疫区

B2.4 发病场(户)是否靠近其他养猪场及动物集散地?

(1) 否                      (2) 是, 请回答:

B2.4.1 与发病场的相对地理位置\_\_\_\_\_

B2.4.2 与发病场的距离\_\_\_\_\_

B2.4.3 其大致情况\_\_\_\_\_

B2.5 在最近 30d 内本场周围 10km 有无猪发病? (1) 无 (2) 有, 请回答:

B2.5.1 发病日期: \_\_\_\_\_

B2.5.2 病猪数量: \_\_\_\_\_

B2.5.3 确诊/疑似诊断疾病: \_\_\_\_\_

- B2.5.4 场主姓名: \_\_\_\_\_  
 B2.5.5 发病地点与本场相对位置、距离: \_\_\_\_\_  
 B2.5.6 投药情况: \_\_\_\_\_  
 B2.5.7 疫苗接种情况: \_\_\_\_\_  
 B2.6 场内是否有职员住在其他养殖场/养猪村? (1) 无 (2) 有, 请回答:  
 B2.6.1 该农场所处的位置: \_\_\_\_\_  
 B2.6.2 该场猪只的数量: \_\_\_\_\_  
 B2.6.3 该场猪只的来源及去向: \_\_\_\_\_  
 B2.6.4 职员拜访和接触他人地点: \_\_\_\_\_

**B3 在发病前 30d 是否有饲养方式/管理的改变?**

- (1) 无 (2) 有, \_\_\_\_\_

**B4 发病场(户)周围环境情况**

- B4.1 静止水源——沼泽、池塘或湖泊: (1) 是 (2) 否  
 B4.2 流动水源——灌溉用水、运河水、河水: (1) 是 (2) 否  
 B4.3 断续灌溉区——方圆三公里内无水面: (1) 是 (2) 否  
 B4.4 最近发生过洪水: (1) 是 (2) 否  
 B4.5 靠近公路干线: (1) 是 (2) 否  
 B4.6 靠近山溪或森(树)林: (1) 是 (2) 否

**B5 该养猪场/户地势类型属于:**

- (1) 盆地 (2) 山谷 (3) 高原 (4) 丘陵 (5) 平原 (6) 山区  
 (7) 其他(请注明) \_\_\_\_\_

**B6 饮用水及冲洗用水情况**

- B6.1 饮水类型:  
 (1) 自来水 (2) 浅井水 (3) 深井水 (4) 河水 (5) 塘水 (6) 其他  
 B6.2 冲洗水类型:  
 (1) 自来水 (2) 浅井水 (3) 深井水 (4) 河水 (5) 塘水 (6) 其他

**B7 发病养猪场/户猪瘟疫苗免疫情况:**

- (1) 免疫 (2) 不免疫  
 B7.1 疫苗生产厂家 \_\_\_\_\_  
 B7.2 疫苗品种、批号 \_\_\_\_\_  
 B7.3 被免疫猪数量 \_\_\_\_\_

**B8 受威胁区免疫猪群情况**

- B8.1 免疫接种一个月内猪只发病情况:  
 (1) 未见发病 (2) 发病, 发病率 \_\_\_\_\_  
 B8.2 异源血清学检测和病原学检测

标本类型	采样时间	检测项目	检测方法	结果

注: 标本类型包括扁桃腺、脾脏、肾脏、淋巴结、回肠和血清等。

**B9 解除封锁后是否使用了岗哨动物**

- (1) 否 (2) 是, 简述结果 \_\_\_\_\_

**B10 最后诊断情况:**

- B10.1 确诊猪瘟, 确诊单位 \_\_\_\_\_  
 B10.2 排除, 其他疫病名称 \_\_\_\_\_

**B11 疫情处理情况**

- B11.1 疫区内所有猪全部扑杀:  
 (1) 是 (2) 否, 扑杀范围: \_\_\_\_\_  
 B11.2 受威胁区所有猪全部接种疫苗:

(1) 是 (2) 否  
所用疫苗：\_\_\_\_\_； 厂家\_\_\_\_\_

**附录 C**  
**(规范性附录)**  
**猪瘟跟踪调查表**

**C1 在发病养猪场/户出现第 1 个病例前 30d 至该场被控制期间离开养猪场的:**

(A) 有关人员, (B) 动物/产品/排泄废弃物, (C) 运输工具/物品/饲料/原料, (天) 其他(请标出)\_\_\_\_\_ , 养猪场被隔离控制日期\_\_\_\_\_。

出场日期	出场人/物 (A/B/C/天)	运输工具	出场人/承运人姓名/电话	目的地/电话

**C2 在发病养猪场/户出现第 1 个病例前 30d 至该场被隔离控制期间, 是否有猪、车辆和人员进出猪集散地?** (猪集散地包括展览场所、农贸市场、动物产品仓库、拍卖市场、动物园等。)(1) 无 (2) 有, 请填写下表, 追踪可能污染物, 做限制或消毒处理。

出入日期	出入人/物	运输工具	出入人/承运人姓名/电话	相对方位/距离

**C3 疫区猪**

C3.1 在发病后一个月发病情况

(1) 未见发病 (2) 发病, 发病率\_\_\_\_\_

C3.2 血清学检测和病原学检测

样品	采样时间	检测项目	检测方法	结果

**C4 列举在发病养猪场/户出现第 1 个病例前 30d 至该场被隔离控制期间出场的工作人员 (如送料员、销售人员、兽医等) 3d 内接触过的所有养猪场/户, 通知被访场家进行防范。**

姓名	出场人员	出场日期	访问日期	目的地/电话