

DB41

河南省地方标准

DB 41/T 708—2011

规模牛场口蹄疫监测技术规范

地方标准信息服务平台

2011 - 12 - 20 发布

2011 - 12 - 20 实施

河南省质量技术监督局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由河南省畜牧局提出并归口。

本标准由河南省动物疫病预防控制中心负责起草，中国动物疫病预防控制中心参加起草。

本标准主要起草人：张志凌、王功民、吴志明、张健、闫若潜、方先珍、谢彩华。

地方标准信息服务平台

规模牛场口蹄疫监测技术规范

1 范围

本标准规定了规模牛场口蹄疫监测样品的采集和保存、监测方法和方式、监测结果的处理。
本标准适用于规模牛场口蹄疫监测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 18935—2003 口蹄疫诊断技术

中华人民共和国农业部 《口蹄疫防治技术规范》

中华人民共和国农业部公告第503号 《高致病性动物病原微生物菌(毒)种或者样本运输包装规范》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

酶联免疫吸附试验（ELISA）

一种酶联免疫技术。用于检测包被于固相板孔中的待测抗原(或抗体)。即用酶标记抗体，并将已知的抗原或抗体吸附在固相载体表面，使抗原抗体反应在固相载体表面进行，用洗涤法将液相中的游离成分洗除，最后通过酶作用于底物后显色来判断结果。

4 样品的采集和保存要求

4.1 样品的采集和保存

4.1.1 组织样品

4.1.1.1 样品的选择

用于病毒分离、鉴定的样品应选择牛未破裂的舌面或蹄部、鼻镜、乳头等部位的水疱皮和水疱液。对临床健康但怀疑带毒的牛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。

4.1.1.2 样品的采集和保存

4.1.1.2.1 水疱样品采集部位可用清水清洗，不应使用酒精、碘酒等消毒剂消毒、擦拭。

- 4.1.1.2.2 未破裂水疱中的水疱液用灭菌注射器采集不少于 1mL，装入灭菌小瓶中，加抗菌素（青霉素终浓度为 10 000 IU mL⁻¹，链霉素终浓度为 10 mg mL⁻¹），加盖密封并用胶带封口，及时冷冻保存。
- 4.1.1.2.3 剪取新鲜水疱皮 3g~5g 放入灭菌小瓶中，加 2 倍体积的 50%甘油/磷酸盐缓冲液(pH7.4)，加盖密封并用胶带封口，冷冻保存。
- 4.1.1.2.4 在无法采集水疱液和水疱皮时，应采集淋巴结、脊髓、肌肉等组织样品 3g~5g 装入灭菌的小瓶内，加盖密封并用胶带封口，冷冻保存。
- 4.1.1.2.5 每份样品的包装瓶上均要贴上防水标签，并写明采集地点、样品编号、动物种类、时间等。

4.1.2 牛食道-咽部分泌物(O-P 液)样品

4.1.2.1 样品的采集

- 4.1.2.1.1 被检动物应在采样前禁食(可饮水)12h，以免反刍胃内容物严重污染 O-P 液。
- 4.1.2.1.2 采样探杯在使用前经 0.2%柠檬酸或 2%氢氧化钠溶液浸泡 5 min，再用蒸馏水反复冲洗 3 次以上。每采完一头牛，探杯应重复进行消毒和清洗。
- 4.1.2.1.3 采样时动物站立保定，将探杯随动物吞咽动作送入其食道上部 10cm~15cm 处，轻轻来回移动 2~3 次，然后将探杯拉出。如采集的 O-P 液被反刍胃内容物严重污染，应用生理盐水或自来水冲洗口腔后重新采样。

4.1.2.2 样品的保存

将采集到的 8 mL~10 mL O-P 液倒入大于 25 mL 的灭菌玻璃容器中，容器中应事先加有 8mL~10mL 细胞培养液或磷酸盐缓冲液（0.04 mol L⁻¹、pH7.4），加盖密封后充分摇匀，贴上防水标签，并写明采集地点、样品编号、动物种类、时间等，及时放入冷藏箱内，12 h 内转往-15℃以下冰箱冻存。

4.1.3 血清采集

牛群发生疑似疫情而错过组织样品采集时机时，应无菌操作采集动物血液，每头不少于 10mL。自然凝固后无菌分离血清装入灭菌小瓶中，加适量抗菌素（青霉素终浓度为 10 000 IU mL⁻¹，链霉素终浓度为 10 mg mL⁻¹），加盖密封后 2℃~8℃冷藏保存。每份样品的包装瓶上应贴上防水标签，并写明采集地点、样品编号、动物种类、时间等。通过抗体检测，做出追溯性诊断。

4.2 样品登记

采集样品后应及时填写样品采集登记表，一式 3 份（参见附录 A）。

4.3 样品的运送

- 4.3.1 将采集好的样品装入金属套筒中，套筒应填充防震材料，加盖密封，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。
- 4.3.2 外包装上应加贴生物危险警示标识及警告语，并符合《高致病性动物病原微生物菌(毒)种或者样本运输包装规范》要求。样品应于 24h 内运送到检测单位。
- 4.3.3 送检材料应附有符合 4.2 样品采集登记表。

5 监测方法与方式

5.1 血清学监测

O型口蹄疫抗体检测用正向间接血凝试验（IHA）或液相阻断酶联免疫吸附试验（ELISA），O型合成肽疫苗免疫后抗体检测用相应的口蹄疫病毒 VP1 结构蛋白抗体间接 ELISA；亚洲 I 型和 A 型口蹄疫抗体检测用液相阻断 ELISA。具体试验方法按照《口蹄疫防治技术规范》操作。

5.2 病原学监测

采用 RT-PCR 方法直接检测病原。具体按照 GB/T 18935—2003 操作。

5.3 疫情监视与报告

县级以上动物防疫监督机构应每月按5.1、5.2的方法开展一次口蹄疫疫情普查。牛场怀疑发生口蹄疫时，应立即报告当地动物防疫监督机构，并采集样品送省级动物防疫监督机构检测，必要时送国家口蹄疫参考实验室确诊。

5.4 免疫效果监测结果判定

5.4.1 O型正向间接血凝抑制试验的抗体效价 $\geq 2^5$ 为合格。

5.4.2 亚洲 I 型、A 型液相阻断 ELISA 的抗体效价 $\geq 2^6$ 为合格。

5.4.3 存栏牛群免疫抗体合格率 $\geq 70\%$ 判定合格。

5.5 监测要求

5.5.1 监测对象

包括不同年龄/品种的牛。

5.5.2 样品采集及检测

5.5.2.1 免疫效果监测采集牛的血清，检测方法参照 5.1。

5.5.2.2 病原学监测采集牛的血清、O-P 液和组织样品等，检测方法参照 5.2。

5.5.3 抽样方法及数量

5.5.3.1 抽样方法：依照牛存栏数量采取层次分类随机选样法抽样。

5.5.3.2 抽样数量：被检牛群的 10%。

6 监测结果处理

6.1 存栏牛群免疫抗体合格率 $\leq 70\%$ ，牛群应立即加强免疫一次。

6.2 病原学监测有疑似阳性样品存在，应立即报告当地动物疫病预防控制机构，并送样至国家口蹄疫参考实验室确诊。

6.3 免疫效果监测和病原学监测结果每月应向当地动物疫病预防控制机构报告一次,规模牛场对监测结果应存档或备案。

地方标准信息服务平台

附 录 A
(资料性附录)
样品采集登记

A.1 样品采集登记表

样品采集登记表参见表 A.1。

表A.1 样品采集登记表

采样日期:		编号:			
场/户/养殖小区名称					
采样地点	省(市) 市(地、州) 县(市、区) 镇(乡) 场/村				
联系人	联系电话				
被采样牛类别	日龄	存栏量	样品名称	样品数量	样品编号
被采样牛 临床健康状况					

表 A.1 (续)

被采样牛 免疫情况	免疫 病种	疫苗类型	疫苗厂家	疫苗批号	免疫 次数	免疫 剂量	末次免疫时间/末次免疫 至采样的间隔天数
被采样单位盖章(签名)				采样单位盖章(采样人签名)			
年 月 日				年 月 日			
备注							

A.2 说明

A.2.1 样品名称指全血、血清、抗凝血、棉拭子、心脏、肺脏、气管、脑等脏器组织。

A.2.2 疫苗类型中应注明所用疫苗的具体型(O型、A型、亚洲 I 型)、疫苗种类(单联疫苗或多联疫苗, 灭活疫苗或合成肽疫苗)等信息。

A.2.3 此单一式三份, 第一联由采样单位保存、第二联随样品、第三联由被采样单位保存。