ICS 11.220

CCS B 41

|  |
| --- |
|  |

DB1308

承德市地方标准

DB 1308/T \*\*\*—2024

|  |
| --- |
|  |

绵羊痘和山羊痘防控技术规程

（征求意见稿）

|  |
| --- |
|  |
|  |

2024-\*\*-\*\* 发布

2024-\*\*-\*\* 实施

承德市市场监督管理局   发布

前  言

本文件按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由承德市农业农村局提出并归口。

本文件起草单位：承德市兽药管理站、河北农业大学、丰宁正原牧业有限公司。

本标准主要起草人：张会文、袁万哲、刘广鑫、李秀丽、许立阳、马长龙、苏玉菲、赵春芳、蒋铁宇、李伯森、陈伟、邱晓东、王丽娟、张相君、赵俊国、庄建立、王学东、罗妤、姚丽、张志刚。

绵羊痘和山羊痘防控技术规程

1. 范围

本文件规定了绵羊痘和山羊痘的诊断、疫情报告、疫情处理和预防措施。

本文件适用于从事羊的饲养、经营及其产品生产、经营的单位和个人，以及从事动物防疫活动的单位和个人。

1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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。

NY/T 388 畜禽场环境质量标准

NY/T 576 绵羊痘和山羊痘诊断技术

NY 5027 无公害食品 畜禽饮用水水质

NY 5149 无公害食品 肉羊饲养兽医防疫准则

NY/T 5151 无公害食品 肉羊饲养管理准则

1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

绵羊痘和山羊痘 sheeppox and goatpox

由痘病毒科羊痘病毒属的绵羊痘病毒、山羊痘病毒引起的绵羊和山羊的急性热性接触性传染病。世界动物卫生组织（OIE）将其列为必须报告的动物疫病，我国将其列为一类动物疫病。

1. 诊断
   1. 流行病学
      1. 流行特点

一年四季均可发生，多发于冬春季节，传播快、发病率高。

* + 1. 易感动物

在自然条件下，绵羊痘病毒只能使绵羊发病，山羊痘病毒只能使山羊发病。不同品种、性别和年龄的羊都有易感性，以细毛羊最为易感，羔羊比成年羊易感。

* + 1. 传染源

病羊是主要的传染源。

* + 1. 传播途径

主要通过呼吸道感染，也可通过损伤的皮肤或黏膜侵入机体。饲养和管理人员，以及被污染的饲料、垫草、用具、皮毛产品和体外寄生虫等均可成为传播媒介。

* 1. 临床症状

潜伏期6～8 d。但可短至2～3 d，天冷时可以长达15～20 d。临床表现上绵羊和山羊基本相同。

* + 1. 绵羊痘

病初体温升高至41～42℃，精神萎顿，食欲不振，脉搏及呼吸加快，结膜潮红，有浆液性、黏液或脓性分泌物从鼻孔流出。

持续l～2 d后在无毛或少毛部位，如眼周围、鼻翼、口唇、口角、四肢的内侧、乳房及尾内侧出现痘疹，初期为红色圆形斑点，斑点很快形成结节，即圆锥形的丘疹。

数日之后，丘疹内部逐渐变成充满浆液的水泡，水泡通常扁平，中间凹下，其内液体在2～3 d后变为脓性，即由水泡期转为脓疱期。

脓疱逐渐破裂，变为褐色的痂，称为结痂期；痂经过4～6 d而脱落，遗留红色瘢痕，称为落痂期。

可引起妊娠母羊流产。

* + 1. 山羊痘

在病程上和绵羊痘相似，但痘的病变常局限在皮肤和黏膜形成痘疹，少数病羊可蔓延到嘴唇或齿龈。

* 1. 病理学诊断
     1. 剖检变化

皮肤及黏膜（呼吸道、消化道、肺和皱胃）出现痘疹，后期易形成糜烂或溃疡。

淋巴结水肿。

肝脏常有脂肪变性。

* + 1. 组织学变化

真皮充血，浆液性水肿和炎性浸润。

炎性细胞增多，主要是嗜中性白细胞和淋巴细胞。

表皮的棘细胞肿大、变性、胞浆空泡化。

* 1. 病原学诊断

无菌采集水疱液、痘斑等病料，选择羔羊睾丸细胞等易感细胞，参照NY／T 576进行病原分离鉴定。

* 1. 血清学诊断
     1. 间接免疫荧光试验（IFA方法）

按附录B规定的方法执行。

* + 1. 中和试验

参照NY/T 576规定的方法执行。

* 1. 核酸检测方法
     1. 聚合酶链式反应（PCR方法）

按附录C规定的方法执行。

* + 1. 实时荧光定量PCR检测方法

按附录D规定的方法执行。

1. 疫情报告

任何单位和个人发现患有本病或者疑似本病的病羊，都应当立即向当地动物防疫监督机构报告。

动物防疫监督机构接到疫情报告后，按国家动物疫情报告的有关规定执行。

1. 疫情处理
   1. 调查

发现或接到疑似疫情报告后，动物防疫监督机构应及时派员到现场进行临床诊断、流行病学调查、采样送检。对疑似病羊及同群羊应立即按NY 5149的规定采取隔离、限制移动等防控措施，并做好消毒工作。对病死、剖检羊尸体进行无害化处理。

* 1. 确诊
     1. 划定疫点、疫区、受威胁区

疫点：指病羊所在的地点，一般是指患病羊所在的养殖场（户）或其它有关屠宰、经营单位。如为农村散养，应将自然村划为疫点。  
   疫区：由疫点边缘外延3公里范围内的区域。在实际划分疫区时，应考虑当地饲养环境和自然屏障（如河流、山脉等）等因素，科学确定疫区范围。  
   受威胁区：指疫区边缘外延5公里范围内的区域。

* + 1. 封锁

县级以上人民政府在接到封锁报告后，应立即发布封锁令，对疫区进行封锁。

* + 1. 扑杀

在动物防疫监督机构的监督下，对疫点内的病羊及其同群羊彻底扑杀。

* + 1. 无害化处理

对病死羊、扑杀羊及其产品均需通过深埋、焚烧等方法进行无害化处理；对病羊排泄物和被污染或可能被污染的饲料、垫料、污水等均需通过焚烧、密封堆积发酵等方法进行无害化处理。 病死羊、扑杀羊尸体需要运送时，应使用防漏容器，须有明显标志，并在动物防疫监督机构的监督下实施。

* + 1. 紧急免疫

对疫区和受威胁区内的所有易感羊进行紧急免疫接种，建立免疫档案。 紧急免疫接种时，应遵循从受威胁区到疫区的顺序进行免疫。

* + 1. 疫源分析与追踪调查

根据流行病学调查结果，分析疫源及其可能扩散、流行的情况。对可能存在的传染源以及在疫情潜伏期和发病期间售/运出的羊只及其产品、可疑污染物（包括粪便、垫料、饲料等）等应当立即开展追踪调查，一经查明进行无害化处理。

* + 1. 封锁令的解除

疫区内没有新的病例发生，疫点内所有病死羊、被扑杀的同群羊及其产品按规定处理21 d后，对有关场所和物品进行彻底消毒，经动物防疫监督机构审验合格后，由当地兽医主管部门提出申请，由原发布封锁令的人民政府发布解除封锁令。

* + 1. 处理记录

对处理疫情的全过程应做好详细的记录（包括文字、图片和影像等），并完整建档。

1. 预防

以免疫为主，采取“扑杀与免疫相结合”的综合性防治措施。

* 1. 加强羊群饲养管理

加强饲养管理，增强羊群的抵抗力。饮水要求按照NY 5027的规定执行；饲养管理按照NY/T 5151的规定执行；环境控制应符合NY/T 388的规定。

* 1. 严格羊群检疫

建立基础母羊群，自繁自养。品种调整或补充种源，应加强检疫，证明无病后方可混入大群饲养。

* 1. 消毒

各饲养场、屠宰厂（场）、动物防疫监督检查站等要建立严格的卫生（消毒）管理制度。羊舍、羊场环境、用具、饮水等应定期进行严格消毒；饲养场出入口处应设置消毒池，内置有效消毒剂。

* 1. 免疫

按操作规程和免疫程序进行免疫接种，建立免疫档案。所用疫苗必须是经国务院兽医主管部门批准使用的疫苗。目前，我国可批准使用的疫苗有：山羊痘活疫苗，该疫苗可用于预防山羊痘及绵羊痘，免疫期为12个月。另外也有绵羊痘活疫苗，只能用于预防绵羊痘。羔羊一般在30～35日龄免疫；母羊与种公羊可在每年3～4月份免疫。疫苗尾根内侧或股内侧皮内注射均可，但尾根内侧皮内注射较常用。

* 1. 监测
     1. 监测机构

县级以上动物防疫监督机构按规定实施。

* + 1. 监测方法

非免疫区域以流行病学调查、血清学监测为主，结合病原鉴定；免疫区域以病原监测为主，结合流行病学调查、血清学监测。

* + 1. 监测结果处理

监测结果要及时汇总，由省级动物防疫监督机构定期上报中国动物疫病预防控制中心。

（规范性）

相关试剂的配制

* 1. 1.0%琼脂糖凝胶

称取琼脂糖1.0 g，放入100 mL 1×TAE电泳缓冲液中，加热融化，温度降至60℃时，加入5 μL核酸染料，均匀铺板，厚度为3 mm～5 mm。

* 1. 50×TAE电泳缓冲液
     1. 0.5 mol/L EDTA溶液（pH 8.0）

称取EDTA 18.61 g，加灭菌双蒸水至100 mL，后用氢氧化钠调pH至8.0。

* + 1. TAE电泳缓冲液（50×）

Tris 242 g，冰乙酸57.1 mL，0.5 mol/L EDTA 100 mL，加灭菌双蒸水至1000 mL。

* 1. 溴化乙锭（EB）溶液

溴化乙锭20 mg，加灭菌双蒸水至20 mL。 。

* 1. DEPC水

焦碳酸二乙酯（DEPC）50 μL，加灭菌双蒸水至100 mL，室温放置6 h～8 h，121℃±2℃高压灭菌20 min，分装到1.5 mL DEPC处理过的离心管。 。

* 1. PBS缓冲液

A液（0.2 mol/L磷酸二氢钠水溶液）：NaH2PO4·H2O 27.6 g先用适量蒸馏水溶解，最后用蒸馏水稀释至1000 mL。

B液（0.2 mol/L 磷酸氢二钠水溶液）：Na2HPO4·7H2O 53.6 g（或Na2HPO4·12H2O 71.6 g或Na2HPO4·2H2O 35.6 g）先用适量蒸馏水溶解，最后用蒸馏水稀释至1000 mL。

0.01 mol/L pH 7.2磷酸盐缓冲液的配制：A液14 mL，B液36 mL，加NaCl 8.5 g，最后用蒸馏水稀释至1000 mL。

* 1. 细胞培养用溶液

2×104 U/mL青霉素链霉素液（双抗）：青霉素、链霉素各2×106 U溶于100 mL三蒸水中，过滤除菌，分装后，-20℃冻存备用。

500 mmol/L Hepes贮存液：1.2 g Hepes溶于10 mL三蒸水中，经121℃高压灭菌15 min，置-20℃冻存备用。

7.5%NaHCO3：7.5 g NaHCO3溶于100 mL三蒸水中，115℃高压灭菌20 min，4℃保存备用。

5×DMEM浓缩液：将DMEM粉剂按厂家说明书配制，过滤除菌，4℃保存，使用时进行5倍稀释。

含10％胎牛血清 DMEM培养基（生长液）：于264 mL三蒸水中加入80 mL 5×DMEM溶液，40 mL FBS（胎牛血清），2 mL 2×104 U/mL青链霉素液，4 mL 500 mmol/L Hepes贮存液，用7.5% NaHCO3溶液调节pH值至7.2～7.4，4℃保存备用。

含2％胎牛血清DMEM培养基（维持液）：于296 mL三蒸水中加入80 mL 5×DMEM溶液，8 mL FBS，2 mL 2×104 U/mL青链霉素液，4 mL 500 mmol/L Hepes贮存液，用7.5% NaHCO3溶液调节pH值至7.2～7.4，4℃保存备用。

10×Na2EDTA-胰酶溶液（2.5%）：Na2EDTA 0.2 g，NaCl 8.0 g，KCl 0.2 g，Na2HPO4·12H2O 2.89 g，KH2PO4 0.2 g，溶于90 mL三蒸水中，再加入2.5 g胰酶（1：250），完全溶解后，加三蒸水补足至100 mL，NaHCO3调节pH至7.2～7.4，过滤除菌，分装，-20℃保存备用，使用时1：10稀释。

（规范性）

间接免疫荧光试验

* 1. 材料

MDBK细胞、生长液、维持液、0.25%胰酶溶液、绵羊痘或山羊痘鼠源单克隆抗体、荧光标记兔抗鼠IgG、丙酮。

* 1. 仪器设备

倒置荧光显微镜、CO2培养箱。

* 1. 操作步骤

复苏MDBK细胞，于37℃ CO2培养箱中培养，待细胞长成良好的细胞单层后，用0.25%胰酶溶液进行消化。

将MDBK细胞消化后，以约106个/mL的细胞密度转入96孔细胞培养板，于37℃ CO2培养箱中培养，待细胞长成良好的细胞单层后，接种待检病毒，同时设立阴阳性对照，于37℃吸附1 h后，加入100 μL维持液继续培养。

接毒一定时间后，倒去上层液体，用-20℃预冷的丙酮室温固定15 min，自然干燥。

滴加一定浓度绵羊痘或山羊痘鼠源单克隆抗体，37℃湿盒作用45 min；PBS漂洗3次，每次5 min；滴加1:40稀释的含0.01％伊文斯兰的荧光标记（FITC）兔抗鼠IgG，37℃湿盒作用45 min；PBS漂洗3次，每次5 min；吸干液体后立即于荧光显微镜下观察。

* 1. 结果判定

阳性对照进行IFA后细胞浆中可见特异性绿色荧光，阴性对照进行IFA后细胞浆中未见特异性绿色荧光，阴阳性同时成立表明试验有效，否则试验无效。阴阳性同时成立的情况下，若待检样品进行IFA后细胞浆中可见特异性绿色荧光，则判定为待检样品绵羊痘或山羊痘病毒阳性。

(规范性)

聚合酶链式反应

* 1. 材料

表C.1 引物信息

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 引物名称 | 引物浓度 | 序列（5'- 3'） |
| CPV-decF | 10 μmol/L | CTC ATT GGT GTT CGG ATT |
| CPV-decR | 10 μmol/L | ATG GCA GAT ATC CCA TTA |

* 1. 仪器设备

PCR仪、凝胶成像系统、台式低温高速离心机、电泳仪、电泳槽、冰箱、微量可调移液器（10 μL、100 μL、1000 μL）、水浴锅。

* 1. 样品的采集与处理
     1. 样品的采集

采集痘斑、水疱液等，将采集好的样品放入1.5 mL离心管，加盖，编号，放入塑料袋内密封（一个采集点的样品放一个塑料袋内），于保温箱中加冰，密封24 h内送至实验室。

* + 1. 样品的处理

将所采集的痘斑于洁净、灭菌并烘干的搪瓷盘中，称取组织按照质量体积比（1:5）加入PBS缓冲液进行充分研磨，4℃ 3000 r/min离心15 min，取上清转入无菌1.5 mL离心管，编号备用；将水疱液4℃ 3000 r/min离心15 min，取上清转入无菌1.5 mL离心管，编号备用。

* 1. 操作步骤
     1. 核酸提取

采用商品化核酸提取试剂，按照说明书进行操作。同时进行阴阳对照样品的核酸提取。

* + 1. PCR反应

在反应管中依次加入无核酸酶水8 μL、[2×Taq MasterMix](http://www.cwbiotech.com/index.php/product-1380.html" \t "blank) 10 μL、所提取的DNA溶液1 μL、10 µmol/L的上游引物各0.5 μL，反应体系共计20 μL。经充分混匀后瞬时离心使液体全部聚集于管底。

PCR扩增条件：94℃预变性3 min，94℃变性10 s，56℃退火30 s，延伸30 s，循环30次；72℃延伸5 min。扩增反应结束后立即进行电泳或置于4℃条件下备用。

* + 1. 扩增产物电泳检测

制备1.0%琼脂糖凝胶板。在电泳槽内加入1×TAE电泳缓冲液，使液面刚刚没过凝胶。取3 μL～5 μL扩增产物加到凝胶孔，加入DNA分子量标准（100 bp）。恒压（110V）电泳30 min～40 min，在凝胶成像系统上观察结果。

* 1. 结果判定

阳性对照扩增产物经电泳检测，在预期大小的条带位置均出现特异性的条带；阴性对照扩增产物没有预期目的条带。阴阳性同时成立表明试验有效，否则试验无效。在试验结果成立的前提下，如果样品的PCR产物电泳后在969 bp位置出现特异性条带，则判定为绵羊痘病毒核酸检测阳性；如果样品的PCR产物电泳后在1006 bp位置出现特异性条带，则判定为山羊痘病毒核酸检测阳性。必要时对扩增产物进行序列测定。

(规范性)

实时荧光定量PCR检测方法

* 1. 材料

表D.1 引物/探针信息

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 引物/探针名称 | 引物/探针浓度 | 序列（5'- 3'） |
| CPV-F  （上游引物） | 10 μmol/L | AAA ACG GTA TAT GGA ATA GAG TTG GAA |
| CPV-R  （下游引物） | 10 μmol/L | AAA TGA AAC CAA TGG ATG GGA TA |
| CPV-P  （探针） | 10 μmol/L | FAM-TGG CTC ATA GAT TTC CT-MGB |

* 1. 仪器设备

实时荧光定量PCR仪、台式低温高速离心机、冰箱、微量可调移液器（10 μL、100 μL、1000 μL）。

* 1. 样品的采集与处理
     1. 样品的采集

采集痘斑、水疱液等，将采集好的样品放入1.5 mL离心管，加盖，编号，放入塑料袋内密封（一个采集点的样品放一个塑料袋内），于保温箱中加冰，密封24 h内送至实验室。

* + 1. 样品的处理

将所采集的痘斑于洁净、灭菌并烘干的搪瓷盘中，称取组织按照质量体积比（1:5）加入PBS缓冲液进行充分研磨，4℃ 3000 r/min离心15 min，取上清转入无菌1.5 mL离心管，编号备用；将水疱液4℃ 3000 r/min离心15 min，取上清转入无菌1.5 mL离心管，编号备用。

* 1. 操作步骤
     1. 核酸提取

采用商品化核酸提取试剂，按照说明书进行操作。同时进行阴阳对照样品的核酸提取。

* + 1. 实时荧光定量PCR反应

在反应管中依次加入6.5 μL无核酸酶水、12.5 μL Premix Ex Taq、3 μL上述DNA溶液、0.5 μL 10 µmol/L两种探针、1 μL 10 µmol/L的上游引物、1 μL 10 µmol/L的下游引物，最终至总体积为25 μL。经充分混匀后瞬时离心使液体全部聚集于管底。

实时荧光定量PCR扩增条件：95℃预变性30 sec，95℃变性5 sec，60℃退火60 sec，循环45次。在60℃退火延伸阶段收集荧光信号。

* 1. 结果判定

点击分析界面，取3～10或3～15个循环的荧光信号确定基线（baseline）。阈值(threshold)设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品及阴性样本的扩增曲线（无规则的噪音线）的最高点，不出现Ct值并且与阳性对照的指数期相交为准。阴性对照应没有Ct值显示或显示Ct值为40；阳性对照的Ct值应小于30.0。否则实验视为无效。检测样本Ct值小于等于30.0，且曲线有明显的指数增长期，测定结果有效，可直接报告样本阳性；检测样本Ct值大于30.0且小于40时，重复一次，如果Ct值仍小于40，且曲线有明显的指数增长期，可报告样本阳性，否则报告样本阴性。检测不到样本Ct值或Ct值为40，报告样本阴性。

———————————