



马传染性贫血防治技术规范 农医发(2007)12号

来源: 信息管理科 时间: 2012-10-16 作者: 点击率: 3920

马传染性贫血防治技术规范 农医发(2007)12号

马传染性贫血(Equine Infectious Anemia, EIA, 简称马传贫),是由反转录病毒科慢病毒属马传贫病毒引起的马属动物传染病。我国将其列为二类动物疫病。

为预防、控制和消灭马传贫,依据《中华人民共和国动物防疫法》及有关的法律法规,制定本规范。

1 适用范围

本规范规定了马传贫的诊断、疫情报告、疫情处理、防治措施、控制和消灭标准。

本规范适用于中华人民共和国境内从事马属动物饲养、经营,马属动物产品加工、经营,及从事动物防疫活动的单位和个人。

2 诊断

2.1 流行特点

本病只感染马属动物,其中,马最易感,骡、驴次之,且无品种、性别、年龄的差异。病马和带毒马是主要的传染源。主要通过蚊、蝇、刺蝇及蠓等吸血昆虫的叮咬而传染,也可通过病毒污染的器械等传播。多呈地方性流行或散发,以7~9月份发生较多。在流行初期多呈急性型经过,致死率较高,以后呈亚急性或慢性经过。

2.2 临床特征

本病潜伏期长短不一,一般为20~40天,最长可达90天。

根据临床特征,常分为急性、亚急性、慢性和隐性四种类型。

急性型 高热稽留。发热初期,可视黏膜潮红,轻度黄染;随病程发展逐渐变为黄白至苍白;在舌底、口腔、鼻腔、阴道黏膜及眼结膜等处,常见鲜红色至暗红色出血点(斑)等。

亚急性型 呈间歇热。一般发热39℃以上,持续3~5天退热至常温,经3~15天间歇期又复发。有的患病马属动物出现温差倒转现象。

慢性型 不规则发热,但发热时间短。病程可达数月或数年。

隐性型 无可见临床症状,体内长期带毒。

2.3 病理变化

2.3.1 剖检变化

急性型 主要表现为败血性变化,可视黏膜、浆膜出现出血点(斑),尤其以舌下、齿龈、鼻腔、阴道黏膜、眼结膜、回肠、盲肠和大结肠的浆膜、黏膜以及心内外膜尤为明显。肝、脾肿大,肝切面呈现特征性槟榔状花纹。肾显著增大,实质肿胀,呈灰黄色,皮质有出血点。

心肌脆弱,呈灰白色煮肉样,并有出血点。全身淋巴结肿大,切面多汁,并常有出血。

亚急性和慢性型 主要表现为贫血、黄染和细胞增生性反应。脾中(轻)度肿大,坚实,表面粗糙不平,呈淡红色;有的脾萎缩,切面小梁及滤泡明显;淋巴小结增生,切面有灰白色粟粒状突起。不同程度的肝肿大,呈土黄或棕红色,质地较硬,切面呈豆蔻状花纹(豆蔻肝);管状骨有明显的红髓增生灶。

2.3.2 病理组织学变化

主要表现为肝、脾、淋巴结和骨髓等组织器官内的网状内皮细胞明显肿胀和增生。急性病例主要为组织细胞增生，亚急性及慢性病例则为淋巴细胞增生，在增生的组织细胞内，常有吞噬的铁血黄素。

2.4 实验室诊断

2.4.1 马传贫琼脂扩散试验(AGID) (见附件)。

2.4.2 马传贫酶联免疫吸附试验(ELISA)(见附件)。

2.4.3 马传贫病原分离鉴定 (见附件)。

2.4.4 结果判定

具备马传贫流行特点、临床症状、病理变化，可做出初步诊断； 2.4.1或2.4.2或2.4.3结果阳性，即可确诊。

3 疫情报告

3.1 任何单位和个人发现疑似疫情，应当及时向当地动物防疫监督机构报告。

3.2 动物防疫监督机构接到疫情报告并确认后，按《动物疫情报告管理办法》及有关规定及时上报。

4 疫情处理

4.1 发现疑似马传贫病马属动物后，畜主应立即隔离疑似患病马属动物，限制其移动，并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报告后，应及时派员到现场诊断，包括流行病学调查、临床症状检查、病理解剖检查、采集病料、实验室诊断等，并根据诊断结果采取相应防治措施。

4.2 在马属动物饲养地，确诊为马传贫病畜后，当地县级以上人民政府畜牧兽医行政管理部门应当划定疫点、疫区、受威胁区；县级以上地方人民政府根据需要组织有关部门和单位采取隔离、扑杀、销毁、消毒、限制易感动物和动物产品及有关物品出入等控制、扑灭措施。

若呈暴发流行时，由当地畜牧兽医行政管理部门，及时报请同级人民政府决定对疫区实行封锁，逐级上报国务院畜牧兽医行政管理部门。县级以上人民政府根据需要组织有关部门和单位采取隔离、扑杀等强制性控制和扑灭措施，并迅速通报毗邻地区。

4.2.1 划定疫点、疫区、受威胁区

疫点 指患病马属动物所在的地点，一般是指患病马属动物所在的养殖场（户）；散养时，是指患病马属动物所在的自然村（屯）；或其它有关屠宰、经营单位。

疫区 疫点外延3公里范围内的区域，包括病畜发病前3个月经常活动，可能污染的地区。疫区划分时注意考虑疫区的饲养环境和天然屏障（如河流、山脉等）。

受威胁区 是指疫区外延5公里范围内的区域。

4.2.2 封锁

疫区封锁期间，禁止染疫和疑似染疫的马属动物及其产品出售、转让和调群；繁殖马属动物要用人工授精方法进行配种；种用马属动物不得对疫区外马属动物配种；对可疑马属动物要严格隔离检疫；关闭马属动物交易市场。禁止非疫区的马属动物进入疫区，并根据扑灭疫情的需要对出入封锁区的人员、运输工具及有关物品采取消毒和其它限制性措施。

4.2.3 隔离

当发生马传贫时，要及时应用临床检查、血清学试验等方法对可疑感染马属动物进行检测，根据检测结果，将马属动物群分为患病群、疑似感染群和假定健康群三类。立即扑杀患病群，隔离疑似感染群、假定健康群，经过3个月观察，不再发病后，方可解除隔离。

4.2.4 监测

疫区内应对同群马属动物隔离饲养，所有马属动物每隔1个月进行一次血清学监测；受威胁地区每3个月进行一次血清学监测。

4.2.5 扑杀

患病马属动物、阳性马属动物在不放血条件下进行扑杀。

4.2.6 无害化处理

病畜和阳性畜及其胎儿、胎衣、排泄物等按照GB16548《畜禽病害肉尸及其产品无害化处理规程》进行。

4.2.7 消毒

对患病和疑似患病的马属动物污染的场所、用具、物品严格进行消毒；受污染的粪便、垫料等必须采用堆积密封发酵1个月等方法处理。

4.2.8 封锁的解除

封锁的疫区内最后一匹阳性马属动物扑杀处理后，并经彻底消毒等处理后，对疫区监测90天，未见新病例；且经血清学检查3次（每次间隔30天），未检出阳性马属动物的，对所污染场所、设施设备和受污染的其他物品彻底消毒，经当地动物防疫监督机构检查合格后，方可由原发布封锁令机关解除封锁。

5 预防与控制

5.1 检疫

异地调入的马属动物，必须来自非疫区。

调出马属动物的单位和个人，应按规定报检，经当地动物防疫监督机构进行检疫(应包括血清学检查)，合格后方可调出。

马属动物需凭当地动物防疫监督机构出具的检疫证明运输。运输途中发现疑似马传贫病畜时，货主及运输部门应及时向就近的动物防疫监督机构报告，确诊后，由动物防疫监督机构就地监督畜主实施扑杀等处理措施。

调入后必须隔离观察30天以上，并经当地动物防疫监督机构两次临床综合诊断和血清学检查，确认健康无病，方可混群饲养。

5.2 监测和净化

5.2.1 马传贫控制区、稳定控制区 采取“监测、扑杀、消毒、净化”的综合防治措施。每年对全县6~12月龄的幼驹，用血清学方法监测一次。如果检出阳性马属动物，除按规定扑杀处理外，应对疫区内的所有马属动物进行临床检查和血清学检查，每隔3个月检查一次，直至连续2次血清学检查全部阴性为止。

5.2.2 马传贫消灭区 采取“以疫情监测为主”的综合性防治措施，每县每年抽查存栏马属动物的1%（存栏不足10000匹的，抽检数不少于100匹，存栏不足100匹的全检），做血清学检查，进行疫情监测，及时掌握疫情动态。

6 控制和消灭标准

6.1 稳定控制标准

6.1.1 县级稳定控制标准

A、全县（市、区或旗）范围内连续5年没有马传贫临床病例；

B、全县（市、区或旗）停止注苗一年后，连续两年每年抽检300匹份马属动物血清（不满300匹全检），经血清学检查，全部阴性。

6.1.2 市级稳定控制标准

全市（地、盟、州）所有县（市、区、旗）均达到稳定控制标准。

6.1.3 省级稳定控制标准

全省所有市（地、盟、州）均达到稳定控制标准。

6.1.4 全国稳定控制标准

全国所有省（市、自治区）均达到稳定控制标准。

6.2 马传贫消灭标准

6.2.1 县级达到消灭标准，在达到稳定控制标准的基础上，还应符合以下条件：

全县（市、区或旗）范围内在达到稳定控制标准后，连续两年每年抽检200匹份马属动物血清（不满200匹者全检），血清学检查全部为阴性。

6.2.2 市级马传贫消灭标准

全市（地、盟、州）所有县（市、区、旗）均达到消灭标准。

6.2.3 省级马传贫消灭标准

全省所有市（地、盟、州）均达到消灭标准。

6.2.4 全国马传贫消灭标准

全国所有省（市、自治区）均达到消灭标准。

附件1

马传染性贫血琼脂扩散反应试行操作方法

1 检验用琼脂板的制备

1.1 取高级琼脂糖1克或普通琼脂1.2克直接放入加有500mL蒸馏水的三角瓶中，配成2%的琼脂溶液，在沸水浴中煮沸，全融化后再冷凝，切成1~1.5cm3小块，装入干净砂布袋中，用10倍量自来水冲漂两天，每天换水两次，然后改用无离子水冲漂1~2天，每天换水两次。将冲漂完毕的琼脂小块装入1000mL三角烧瓶中，同时加入500mL无离子水再加入相当于配制1000mL磷酸缓冲液（PBS液）或硼酸缓冲液（BBS液）的各种盐类用量，再加入1%硫柳汞溶液10mL，在沸水浴中使之全融化并混匀。

若是取优质琼脂1克时，可直接放入含有万分之一硫柳汞的100mL的PBS或BBS液中，用热水浴融化混匀。

1.2 融化后以两层纱布夹薄层脱脂棉过滤，除去不溶性杂质。

1.3 将直径90mm的平皿放在水平台上，每平皿倒入热融化琼脂液15~18mL，厚度约2.5mm左右，注意不要产生气泡，冷凝后加盖，把平皿倒置，防止水分蒸发，放在普通冰箱中可保存两周左右。根据受检血清样品多少亦可采用大、中、小三种不同规格的玻璃板。10×16cm的玻璃板加注热琼脂液40mL；6×7cm的加注11mL；32×7.6cm的加注6mL。

琼脂经处理后配成的琼脂液，可装瓶中用胶塞盖好，以防水分蒸发，待使用琼脂板时，现融化现倒。

1.4 打孔

反应孔现用现打。打孔器为外径5mm直径的薄壁型金属打孔器。在坐标纸上画好七孔型图案。把坐标纸放在带有琼脂板的平皿或玻璃板下面，照图案在固定位置上用金属管打孔，将切下的琼脂板取出，勿使琼脂膜与玻璃面离动。外周孔径为5mm，中央孔径为5mm，孔间距3mm，如图1所示。

图1 7孔型

(1) (2)

(3) G (4)

(5) (6)

当受检血清数量多时，可用如图2所示的检测40份血清的图案。

图2 40孔型

```

01 02 03 04 05 06
+ G + G + G +
07 08 09 10 11 12
13 14 15 16 17 18 19 20
+ G + G + G + G +
21 22 23 24 25 26 27 28
29 30 31 32 33 34
+ G + G + G +
35 36 37 38 39 40

```

注解：图1、图2中的“G”字周围应有圆圈。

2 抗原

检验用抗原按马传贫琼扩抗原生产制造及检验规程进行生产。

3 血清

3.1 检验用标准阳性血清：能与合格抗原在12小时内产生明显致密的沉淀线的马传贫血清，做8倍以上的稀释仍保持阳性反应者为宜，小量分装，冻结保存，使用时要注意防止散毒。

3.2 受检血清：来自受检马的不腐败的血清，勿加防腐剂和抗凝剂。

4 抗原及血清的添加

打孔完毕，在琼脂板上端写上日期及编号等。在图1(7孔型)的中央孔加抗原，2、5孔加检验用标准阳性血清，其余1、3、4、6孔加入受检血清。在图2(40份血清)的孔型所有①②③……数字号孔分别加入受检马血清，G为加抗原孔，+为加检验用包被阳性血清孔，加至孔满为止。平皿加盖，待孔中液体吸干后，将平皿倒置，以防水分蒸发；琼脂板则放入铺有数层湿纱布的带盖搪瓷盘中。置15~30℃条件下进行反应，逐日观察3天并记录结果。

5 判定

阳性：当检验用标准阳性血清孔与抗原孔之间只有一条明显致密的沉淀线时，受检血清孔与抗原孔之间形成一条沉淀线；或者阳性血清的沉淀线末端向毗邻的受检血清的抗原侧偏弯者，此种受检血清判定为阳性。

阴性：受检血清与抗原孔之间不形成沉淀线，或者标准阳性血清孔与抗原孔之间的沉淀线向毗邻的受检血清孔直伸或向受检血清孔侧偏弯者，此种受检血清为阴性。

疑似：标准阳性血清孔与抗原孔之间的沉淀线末端，似乎向毗邻受检血清孔内侧偏弯，但不易判断时，可将抗原稀释2倍、4倍、6倍、8倍进行复试，最后判定结果。观察时间可延至5天。

判定结果时，应从不同折光角度仔细观察平皿上抗原孔与受检血清孔之间有无沉淀线。

判断时要注意非特异性沉淀线。例如当受检马匹近期注射过组织培养疫苗，如乙型脑炎疫苗等，可见与检验用标准阳性血清的沉淀线末端不是融合而为交叉状，两个血清间产生的自家免疫沉淀线等。

6 溶液的配制

6.1 pH7.4的0.01mol/L磷酸缓冲生理盐水（PBS液）□

6.2 12水磷酸氢二钠（Na₂HPO₄·12H₂O） 2.9克

磷酸二氢钾 0.3克

氯化钠 8.0克

无离子水或蒸馏水加至 1000mL

6.3 pH8.6硼酸缓冲液（BBS液）

四硼酸钠 8.8克

硼酸 4.65克

无离子水或蒸馏水加至 1000mL

6.4 硫柳汞溶液

硫柳汞 1.0克

无离子水或蒸馏水 1000mL

附件2

马传染性贫血酶联免疫吸附试验（间接法）

1 总则

本规程所规定的酶联免疫吸附试验（ELISA）适用于马传染性贫血（以下简称马传贫）的检疫，也可以用于马传贫弱毒疫苗免疫马的抗体监测。

2 材料准备

- 2.1 器材
- 2.1.1 聚苯乙烯微量反应板
- 2.1.2 酶标仪
- 2.2 抗原、酶标记抗体和阴、阳性标准血清
- 2.3 试验溶液（配置方法见附录）

- 2.3.1 抗原稀释液
- 2.3.2 冲洗液
- 2.3.3 酶标记抗体及血清稀释液
- 2.3.4 底物溶液
- 2.3.5 反应终止液

3 操作方法

3.1 包被抗原

用抗原稀释液将马传贫ELISA抗原作20倍稀释，用微量移液器将稀释抗原加到各孔内，每孔100 μ l。盖好盖，置4 $^{\circ}$ C冰箱放置24小时。

3.2 冲洗

甩掉孔内的包被液，注入冲洗液浸泡3分钟，甩干，再重新注入冲洗液，按此方法洗3次。

3.3 被检血清

每份被检血清及阳性对照血清、阴性对照血清均以血清稀释液作20倍稀释，每份被检血清依次加两孔，每孔加100 μ l。每块反应板均需设阳性及阴性对照血清各两孔，盖好盖，置37 $^{\circ}$ C水浴作用1小时。

3.4 冲洗

方法同“3.2”。

3.5 加酶标记抗体

将酶标记抗体用稀释液作1000倍稀释。每孔加100 μ l，盖好盖，置37 $^{\circ}$ C水浴作用1小时。

3.6 冲洗

方法同“3.2”。

3.7 加底物溶液

每孔加新配制的底物溶液100 μ l，于25 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C避光反应10分钟。

3.8 终止反应

每孔滴加终止剂25 μ l。

3.9 比色

用酶标测试仪在波长492nm下，测各孔降解产物的吸收值。

4 结果判定

被检血清两孔的平均吸收值与同块板阴性对照血清两个孔的平均吸收值之比 ≥ 2 ，且被检血清吸收值 ≥ 0.2 者，为马传贫阳性。

5 附录

5.1 聚苯乙烯微量板的处理

- 5.1.1 将聚苯乙烯微量板用温水反复冲洗，彻底冲掉灰尘。
- 5.1.2 用无离子水冲洗3~4遍，室温或37 $^{\circ}$ C温箱晾干，置无尘干燥处保存备用。

5.2 试液的配制

5.2.1 抗原稀释液：0.1mol/L pH9.5碳酸盐缓冲液。

甲液：0.1mol/L pH9.5 碳酸钠溶液，称取无水Na₂CO₃10.6克，以无离子水溶液溶解至1000mL。

乙液：0.1mol/L pH9.5碳酸氢钠溶液，称取NaHCO₃ 8.4克，以无离子水溶液溶解至1000mL。

取甲液200mL、乙液700mL混合即成。

5.3 冲洗液：0.02mol/L pH7.2 PBS-0.05%吐温-20。

5.3.1 0.02mol/L pH7.2 PBS液

甲液：0.2mol/L 磷酸氢二钠溶液 称取Na₂HPO₄·12H₂O 71.64克，以无离子水溶液溶解至1000mL。

乙液：0.2mol/L 磷酸二氢钠溶液 称取NaH₂PO₄·2H₂O 31.21克，以无离子水溶液溶解至1000mL。

取甲液360mL，乙液140mL，NaCl 38克，无离子水溶解至5000mL。

5.3.2 0.02mol/L pH7.2 PBS液1000mL，加吐温-20液0.5mL混匀即成。

5.3.3 酶标记抗体和血清稀释液：

0.02mol/L pH7.2PBS-0.05%吐温-20，加0.1%明胶，加10%健康牛血清。

5.3.4 底物溶液：pH5.0磷酸盐-柠檬酸缓冲液，内含0.04%邻苯二胺和0.045%过氧化氢。

5.3.4.1 pH5.0磷酸盐-柠檬酸缓冲液：

甲液0.1mol/L柠檬酸溶液，称取柠檬酸（C₆H₈O₇·H₂O）21.01克以无离子水溶液溶解至1000mL。

乙液0.2mol/L磷酸氢二钠溶液。

取甲液243mL，乙液257mL混合即成。

5.3.4.2 称取邻苯二胺40mg溶于pH5.0磷酸盐-柠檬酸缓冲液100mL中。临用前加30%过氧化氢150μL即成。根据试验需要可按此比例增减。

5.3.5 反应终止剂：

2mol/L硫酸：取浓H₂SO₄（纯度95~98%）4mL加入32mL无离子水中混匀即成。

附件3

马传染性贫血病毒分离鉴定

通常是将病料接种于健康马驹或接种于马白细胞培养物，其中以接种马驹法更为敏感。

1 马匹接种试验

1.1 试验驹：选自非马传染性贫血（以下简称马传贫）疫区，1~2岁，经3周以上系统检查，确认健康者。

1.2 接种材料：无菌采取可疑马传贫马（最好是可疑性较大或高热期病马）的血液。如怀疑混合感染时，须用细菌滤器过滤血清，接种材料应尽可能低温保存，保存期不宜过长。接种前进行无菌和安全检查。

1.3 接种方法：常用2~3匹马的材料等量混合，接种2匹以上的试验驹，皮下接种0.2~0.3mL左右。

1.4 观察期3个月。每日早、晚定期测温两次，定期进行临床、血液学及抗体检查。当马驹发生典型马传贫的症状和病理变化，或血清中出现马传贫特异性抗体时，即证明被检材料中含有马传贫病毒。

2 用白细胞培养物分离病毒

培养驹白细胞1~2天后，细胞已贴壁并伸出突起，换入新鲜营养液，并在营养液中加入被检材料，接入被检材料的量应不大于营养液量的10%，否则可能使培养物发生非特异性病变。

也可在倾弃旧营养液后，直接接种被检材料，37℃吸附1~2小时后吸弃接种物，换入新鲜营养液。初代分离培养通常难以出现细胞病变，一般需盲传2~3代，甚至更多的代次（每代7~8天）。如果被检材料中有马传贫病毒存在，培养物将最终出现以细胞变圆、破碎、脱落为特征的细胞病变。为了证明细胞病变是由马传贫病毒而不是由其它原因引起的，应该以马传染性贫血酶联免疫吸附试验（间接法）等检查培养物的抗原性。如果引起白细胞出现细胞病变并具有明显的马传贫抗原性，则说明被检材料中含有马传贫病毒。

[【返回】](#) [【打印本页】](#)

友情链接

[更多>>](#)



版权所有 吉林省动物卫生监督网 地址：吉林省长春市西安大路4510号 联系电话：0431-89343349

网站律师声明：本站内容未经同意不得转载，一经发现将追究法律责任！吉ICP备08101550号

网站标识码：220000041

