

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1981—2010

猪链球菌病监测技术规范

The surveillance guideline of swine streptococcosis

2010-12-23 发布

2011-02-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本规范遵照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本规范由中华人民共和国农业部提出。

本规范由全国动物防疫标准化技术委员会(SAC/TC 181)归口。

本规范起草单位:中国动物卫生与流行病学中心、广西壮族自治区动物疫病预防与控制中心。

本规范主要起草人:范伟兴、王楷成、张喜悦、王幼明、康京丽、黄保续、刘棋、熊毅。

猪链球菌病监测技术规范

1 范围

本规范制定了在全国范围内开展猪链球菌病监测和暴发疫情处理的技术规范,主要适用于散养户的调查、监测。

各地可参考本规范,按实际情况开展有针对性的猪链球菌病监测工作。

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 4789.28 食品卫生微生物学检验染色法、培养基和试剂

GB/T 19915.1 猪链球菌 2 型平板和试管凝集试验操作规程

GB/T 19915.2 猪链球菌 2 型分离鉴定操作规程

GB/T 19915.3 猪链球菌 2 型 PCR 定型检测技术

GB/T 19915.4 猪链球菌 2 型三重 PCR 检测方法

3 术语和定义

下列术语和文件适用于本文件。

3.1

猪链球菌病 swine streptococcosis

由多种链球菌感染引起的猪传染病。其中,由猪链球菌 2 型感染所引起的猪链球菌病是一种人畜共患传染病,该病能引致猪急性败血死亡,并能使人致死。

3.2

监测 surveillance

对某种疫病的发生、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发展趋势。

3.3

暴发 outbreak

在一定地区或某一单位动物短时期内突然发生某种疫病很多病例。

4 常规监测

4.1 目的

了解病例的流行形式、感染率、发病率和病死率以及该病畜间、空间和时间的分布情况。

4.2 监测点的选择

4.2.1 非疫区监测抽样

4.2.1.1 养猪场(户)的活体监测

按照每个乡镇至少抽检一个行政村的抽样比例,从该县(市、区)所有行政村中随机抽样确定待抽样村、在待抽样村随机抽样采集该村饲养猪只的扁桃体拭子。每年 3 月、6 月和 10 月各采集一批。以行政村为单位,每村采样 20 头。在对被抽样猪只的选择上,原则上只对 100 日龄以上的存栏育肥猪进行

采样。对不足 20 头的村,按实际饲养头数采样。填写采样登记表(见附录 A)。

4.2.1.2 屠宰场(点)散养屠宰猪的监测

屠宰检疫应将猪链球菌作为重要检查项目,并详细记录检疫结果,对辖区内的屠宰场(点)的屠宰猪只,随机采集扁桃体样品 20 份,每年 3 月、6 月和 10 月各采集一次,并对采样猪只的原场(户)来源做好详细记录,填写采样登记表(见附录 A)。

4.2.2 曾为疫区的监测抽样

近三年有人、猪链球菌病发病或死亡的疫区,需进行以下监测:

——每年 6 月在疫点及周围 5 km 范围内,从所饲养的猪只中随机采集 30 头猪的扁桃体拭子,进行病原学检测;

——若此地区实行猪链球菌疫苗免疫,每年 6 月和 8 月分别在疫点周围 5 km 范围内,从所饲养的猪只中随机采集 30 头猪血清样品,进行抗体监测。填写采样登记表(见附录 A)。

4.3 样品采集

当地动物疫病预防控制机构的兽医技术人员,按照“猪链球菌病样品采集方法”(见附录 B),对病死猪、活猪以及慢性和局部感染病例,分别采集相应样品。

4.4 实验室检测

待检样品送至实验室后,按猪链球菌病实验室检测流程(见附录 C),选用适当的方法进行分离鉴定和血清抗体检测。若本实验室不具备实验条件或能力,可送国家指定的猪链球菌病诊断实验室进行鉴定。

4.5 结果汇总与分析

样品检测结果填报猪链球菌病病原检测结果汇总表(附录 D),计算猪群的猪链球菌感染率、发病率和病死率,分析疫情发生的可能性与风险因素。

5 暴发疫情监测

5.1 目的

确定引起疫情的病原,明确疫情发生范围,详细调查疫点的饲养方式、饲养密度、发病情况、自然地理条件、气象资料等流行病学因素。了解疫点所在地的既往疫情和免疫情况。

5.2 病例发现与疫情报告

从事动物疫情监测、检验检疫、疫病研究与诊疗以及动物饲养、屠宰、经营、隔离、运输等活动的单位和个人,发现患有猪链球菌病或疑似猪链球菌病暴发疫情时,要立即向当地兽医主管部门、动物卫生监督机构或者动物疫病预防控制机构报告。发现疑似猪链球菌病疫情时,当地动物疫病预防控制机构应及时派员到现场进行突发病例调查(见附录 E),同时采集病料进行检测或送检。动物疫病预防控制机构防疫、检疫人员在辖区内的猪只进行防疫、检疫和诊疗的过程中,加强对猪链球菌病的诊断工作,发现疑似病例按规定进行剖检,采集病料送检,填写病例调查与采样送检单(见附录 E),并做好无害化处理。

5.3 样品采集

当地动物疫病预防控制机构的兽医技术人员,按照“猪链球菌病样品采集方法”(见附录 D),对病死猪、活猪以及慢性和局部感染病例分别采集相应样品。样品种类依附录 D,样品采集数量依当地估计流行率查询暴发疫情采样数量表(见附录 F)。

5.4 实验室检测

同 4.4。

5.5 结果汇总与分析

样品检测结果填报猪链球菌病病原检测结果汇总表(见附录 F),确定引起疫情的病原是否为链球菌,明确病原的血清群和种型。必要时,分析流行菌株的毒力因子与基因背景,推测疫情发生原因等。

附 录 B
(规范性附录)
猪链球菌样品采集、包装、运送

猪链球菌样品采集、包装、运送应由经过培训的兽医技术人员进行操作。

B.1 采样器材准备

- B.1.1 防护服、无粉乳胶手套和防护口罩,如活体采样各开口器、长 30 cm 左右的棉拭子等。
- B.1.2 灭菌的剪刀、镊子手术刀、注射器和针头等。可以清楚标记且标记不易脱落的记号笔、标签纸和胶布等。
- B.1.3 用来采集器官、组织的带螺口盖塑料管等灭菌容器。
- B.1.4 血平板和增菌培养液。
- B.1.5 带有冰袋或干冰的冷藏容器。
- B.1.6 样品采集登记表。

B.2 样品的采集

B.2.1 养殖场(户)活猪的样品采集

用开口器给猪开口,用灭菌的棉拭子(长约 30 cm)采集活猪的扁桃体拭子,并随即置于选择增菌培养液(含 15 μg /mL 多黏菌素 B,30 μg /mL 萘啶酮酸的脑心浸液)中,带回实验室进行增菌培养;如需进行抗体效价检测,同时采集对应猪的血液 5 mL;如遇急性菌血症或败血症病例,可无菌采集抗凝全血 5 mL。

B.2.2 养殖场(户)剖检病死猪的样品采集

无菌采集死亡猪的肝、脾、肺、肾、心血和淋巴结等组织及心血样品,脑膜炎病例还可采集脑脊液、脑组织等样品。

B.2.3 屠宰场健康猪的样品采集

无菌采集屠宰猪的腭扁桃体。

B.2.4 屠宰场肺部急性病变猪的样品采集

无菌采集屠宰猪的肺脏。

B.3 样品运输保存与运输

- B.3.1 装病料的容器要做好标记,并根据所采样品的种类详细填写样品采集登记表。
- B.3.2 冷藏容器应包装完好,防止运输过程中破损。
- B.3.3 采集的样品如不能马上进行检测,则应立即置于安全密闭的保温容器中冷藏运输。
- B.3.4 用来检测的标本可在 4 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱暂放,剩余样品应放置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。用于病原检测的样品不可放置时间太长,尽可能在 1 周内送实验室进行检测,切勿反复冻融。

B.4 注意事项

- B.4.1 采样过程应严格无菌操作,采取一头猪的病料,使用一套器械和容器,避免混用,防止样品交叉

污染。

B. 4. 2 应尽可能在解剖现场接种绵羊血平板和增菌培养液。如无法在解剖现场接种,样品应尽快送实验室,并立即检测。

B. 4. 3 在标本采集过程中,应穿戴防护用具,注意安全防护,谨防剪、刀、针头等锐器刺伤。

附录 C
(规范性附录)
参考方法

C.1 病料的触片镜检

用灭菌刀片或剪刀将病料组织做一新切面,然后在载玻片上做组织触片,姬姆萨染色(按 GB/T 4789.28 规定的方法进行染色)后镜检,检查视野中是否有蓝紫色链状球菌。

C.2 链球菌分离鉴定

C.2.1 病料或扁桃体的培养

C.2.1.1 直接分离

用火焰灭菌并冷却的接种环蘸取样品内部组织后,划线接种于绵羊血琼脂平板,于 37℃ 培养 16 h~20 h。如菌落生长缓慢,可延长至 46 h~50 h 后观察。

C.2.1.2 增菌培养

无菌采集样品置于脑心肉汤中,37℃ 增菌培养 18 h~48 h,接种新鲜绵羊血平板,置 37℃ 培养 16 h~20 h。如菌落生长缓慢,可延长至 46 h~50 h 后观察。对污染样品接种选择性增菌培养液(15 μg/mL 多黏菌素 B,30 μg/mL 萘啶酮酸的脑心浸液)增菌约 15 h 后接种绵羊血平板,或直接划线接种含两种抗生素(15 μg/mL 多黏菌素 B,30 μg/mL 萘啶酮酸)的绵羊血琼脂平板,37℃ 培养 22 h~26 h 后观察。

C.2.2 扁桃体拭子或抗凝全血的培养

扁桃体拭子或抗凝全血 1 mL 加入到含有 5 mL 灭菌的选择性增菌培养液试管中,于 37℃ 培养 16 h~20 h 后,划线接种于选择性绵羊血琼脂平板,37℃ 培养 22 h~26 h 后观察。

C.2.3 分离纯培养

参照 GB/T 19915.2 的规定执行。

C.2.4 鉴定

C.2.4.1 猪链球菌种的鉴定

采用纯化后的单菌落或液体纯培养或提取的细菌基因组,利用猪链球菌种的特异性引物(推荐使用 *gdh* 基因)进行检测,若为阳性者判为猪链球菌(也可先用增菌培养液进行猪链球菌种的鉴定,再进行细菌分离,最终以分离到细菌判为阳性)。

C.2.4.2 猪链球菌 2 型的 PCR 鉴定

按照 GB/T 19915.2 的规定执行。

C.2.4.3 其他血清型的鉴定

若属猪链球菌种,但不属猪链球菌 2 型的病原菌,可送到有资质的实验室进行鉴定。

C.2.4.4 猪链球菌的毒力因子 PCR 检测

必要时,进行猪链球菌毒力因子的 PCR 检测。可检测的主要毒力基因包括溶菌酶释放蛋白基因(*mrip*)、细胞外蛋白因子基因(*epf*)、溶血素(*slx*)和 *orf 2* 等。

C.3 结果报告

样品检测结果汇总后,填报猪链球菌病原检测结果汇总表(见附录 D)。

C.4 猪链球菌病实验室检测流程见图 C.1

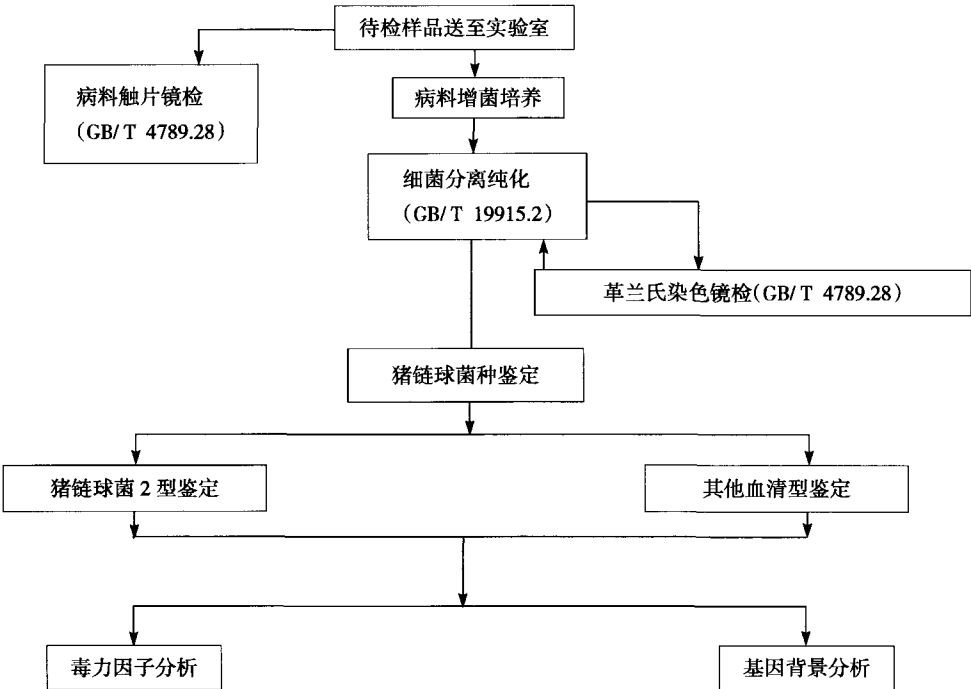


图 C.1 猪链球菌病实验室检测流程

附录 D
(规范性附录)
猪链球菌病原检测结果汇总表

样品编号	猪只来源	样品类型	分离培养	猪链球菌 2 型 (是: +; 否: -)	若非猪链球菌 2 型, 说明病原鉴定情况	猪链球菌的毒力因子				结果判定	
						mrp	epf	sly	orf 2		

____省____年____月____日
 填报单位: _____ 填报人: _____
 填报时间: _____年____月____日

附录 E
(规范性附录)
病例调查与采样送检单

采样单位	样品编号		检验单位	
联系电话	采样地点	样品收到日期	检验人	
发病日期	年 月 日 时	死亡时间	年 月 日 时	结果通知日期
送检日期	年 月 日 时	取材时间	年 月 日 时	联系电话
病例有关情况	猪的品种	猪舍卫生状况	<input type="checkbox"/> 良好 <input type="checkbox"/> 一般 <input type="checkbox"/> 较差 <input type="checkbox"/> 很差	<input type="checkbox"/> 是猪链球菌 2 型 <input type="checkbox"/> 不是猪链球菌 2 型，而是_____
	猪舍面积	猪舍通风情况	<input type="checkbox"/> 良好 <input type="checkbox"/> 一般 <input type="checkbox"/> 较差 <input type="checkbox"/> 很差	
	同舍猪数	猪舍潮湿情况	<input type="checkbox"/> 干燥 <input type="checkbox"/> 较干燥 <input type="checkbox"/> 潮湿 <input type="checkbox"/> 很潮湿	
疫苗免疫状况	菌苗全称	免疫次数	免疫日期	实验室病原检测结果
疫点既往疫情、自然地理和气候状况	诊断结论			
病例的流行形式、发病率、畜间、空间和时间分布				
主要临床症状	处理意见			
主要剖检病变				
疫点人群感染、发病情况	<input type="checkbox"/> 疑似诊断 <input type="checkbox"/> 临床诊断	送检人		
初步诊断结果				

附录 F
(规范性附录)
暴发疫情采样数量表

群体大小	估算流行率					
	0.1%	1%	2%	5%	10%	20%
10	10	10	10	10	10	8
50	50	50	48	35	22	12
100	100	98	78	45	25	13
500	500	225	129	56	28	14
1 000	950	258	138	57	29	14
10 000	2 588	294	148	59	29	14
无穷大	2 995	299	148	59	29	14

根据《OIE 陆生动物诊断试剂与疫苗手册》中,试验敏感性和特异性为 100%时,要 95%至少检出一例感染的样品数的公式计算。