ICS 11.220
B 41

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 541—2002

动物疫病实验室检验采样方法

Sampling methods for laboratory investigation of animal diseases

2002-08-27 发布　　2002-12-01 实施

中华人民共和国农业部　发布

前　言

动物病料样品的采集是动物疾病诊断、流行病学调查或免疫监测所不可缺少的重要步骤，在各国的兽医学标准中都把这一部分纳入第一重要内容，广泛应用于动物疾病流行病学调查、动物检疫和科研教学。世界动物卫生组织〔World Organization for Animal Health(英)，Office Intentional des Epizootic(法)，OIE〕推荐的诊断方法中，也将该部分内容列为第一部分内容。

本标准是依据世界动物卫生组织(OIE)《诊断试验和疫苗标准手册》(2000 版)(Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines，2000)第 1.1.1 章“Sampling Methods”的技术要求编写的。本标准与该章的非原则性差异在于：

——本标准结合本国实践经验对操作程序和条件作了更具体的陈述和规定；

——本标准根据 GB/T 1.1—2000 的规定和汉语习惯将该章的陈述性文本改为规范性标准文件。

本标准的附录 A 为规范性附录。

本标准由农业部畜牧兽医局提出。

本标准由全国动物检疫标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：农业部动物检疫所。

本标准主要起草人：吴延功、杜元钊、朱万光、刘佩兰、仰惠芬。

动物疫病实验室检验采样方法

1 范围

本标准规定了动物疫病诊断实验室的样品采集方法。

本标准适用于病因(原)学、病理组织学、血清学、免疫学等实验室检验所需样品的采集。

2 样品[1]采集的一般原则和采集前的准备

2.1 样品采集所遵循的一般原则

2.1.1 凡发现患畜(包括马、牛、羊及猪等)有急性死亡时,如怀疑是炭疽,则不可随意解剖,应采取患畜的血液,万不得已时局部解剖作脾脏触片的显微镜检查。只有在确定不是炭疽后,方可进行剖检。

2.1.2 采取病料的种类,根据不同的疾病或检验目的,采其相应的脏器、内容物、分泌物、排泄物或其他材料;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。采样时应小心谨慎,以免对动物产生不必要的刺激或损害和对采样者构成威胁。在无法估计病因时,可进行全面的采集。检查病变与采集病料应统筹考虑。

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 6 h。

2.1.4 血液样品在采集前一般禁食 8 h。

2.1.5 应做好人身防护,严防人畜共患病感染。

2.1.6 应防止污染环境,防止疫病传播,做好环境消毒和病害肉尸的处理。

2.2 使用器械的消毒

刀、剪、镊子等用具煮沸消毒 30 min,使用前用酒精擦拭,用时进行火焰消毒。器皿(玻制、陶制等)经 103 kPa 高压 30 min,或经 160 C干烤 2 h 灭菌;或放于 0.5%～1%的碳酸氢钠($NaHCO_3$)水中煮沸 10 min～15 min,水洗后,再用清洁纱布擦干,保存于酒精、乙醚等溶液中备用。注射器和针头放于清洁水中煮沸 30 min。一般要求使用"一次性"针头和注射器。采取一种病料,使用一套器械与容器,不可用其再采其他病料或容纳其他脏器材料。采过病料的用具应先消毒后清洗。检查过传染性海绵状脑病的器械要放在 2 mol/L 的氢氧化钠(NaOH)溶液中浸泡 2 h 以上,才可再使用。

3 样品的采集

3.1 血液

3.1.1 采血部位

大的哺乳动物可选用颈静脉或尾静脉采血,也可采胫外静脉和乳房静脉血。毛皮动物小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 0.5 cm 深或剪断尾尖部采血。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。禽类通常选择翅静脉采血,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%的酒精消毒,待干燥后采血,采血可用针管、针头、真空管或用三棱针穿刺,将血液滴到开口的试管内。禽类等的少量血清样品的采集,可用塑料管采集。用针

1) 本标准所称的"样品",系待进行实验室检验的材料,在多数情况下,与"病料"具有同一含义。

头刺破消毒过的翅静脉，将血液滴到直径为 3 mm～4 mm 的塑料管内，将一端封口。

3.1.3 采血种类

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（见第 A.1 章）（阿氏液为红细胞保存液，使用时，以 1 份血液加 2 份阿氏液），或枸橼酸钠（3.8%～4%的枸橼酸钠 0.1 mL，可抗 1 mL 血液）。采血时应直接将血液滴入抗凝剂中，并立即连续摇动，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。

3.1.3.2 血清样品

进行血清学试验通常用血清样品。用作血清样品的血液中不加抗凝剂，血液在室温下静置 2 h～4 h（防止曝晒），待血液凝固，有血清析出时，用无菌剥离针剥离血凝块，然后置 4℃冰箱过夜，待大部分血清析出后取出血清，必要时经低速离心分离出血清。在不影响检验要求原则下可因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（如硼酸、硫柳汞等）。若需长时间保存，则将血清置 20℃以下保存，但要尽量防止或减少反复冻融。样品容器上贴详细标签。

3.1.3.3 血浆的采集

采血试管内先加上抗凝剂（每 10 mL 血加柠檬酸钠 0.04 g～0.05 g），血液采完后，将试管颠倒几次，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死亡动物的皮肤，体腔用消毒的器械剥开，所需病料按无菌操作方法从新鲜尸体中采集。剖开腹腔后，注意不要损坏肠道。

作病原分离用：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，容器壁上注明日期、组织或动物名称。注意防止组织间相互污染。

3.2.2 采样种类

3.2.2.1 病原分离样品的采集

用于微生物学检验的病料应新鲜，尽可能的减少污染。用于细菌分离的样品的采集，首先以烧红的刀片烫烙脏器表面，在烧烙部位刺一孔，用灭菌后的铂耳伸入孔内，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 0.5 cm，切成 1 cm^2～2 cm^2（检查狂犬病则需要较大的组织块）。组织块切忌挤压、刮摸和用水洗。如作冷冻切片用，则将组织块放在 0℃～4℃容器中，尽快送实验室检验。

3.3 肠内容物或粪便

肠道只需选择病变最明显的部分，将其中的内容物弃去，用灭菌生理盐水轻轻冲洗；也可烧烙肠壁表面，用吸管扎穿肠壁，从肠腔内吸取内容物，将肠内容物放入盛有灭菌的 30%甘油盐水缓冲保存液（见第 A.2 章）中送检。或者，将带有粪便的肠管两端结扎，从两端剪断送检。

从体外采集粪便，应力求新鲜。或者，用拭子小心地插到直肠粘膜表面采集粪便，然后将拭子放入盛有灭菌的 30%甘油盐水缓冲保存液中送检。

3.4 胃液及瘤胃内容物

3.4.1 胃液采集

胃液可用多孔的胃管抽取。将胃管送入胃内，其外露端接在吸引器的负压瓶上，加负压后，胃液即可自动流出。

3.4.2 瘤胃内容物采集

反刍动物在反刍时，与食团从食道逆入口腔时，立即开口拉住舌头，另一只手深入口腔即可取出少量的瘤胃内容物。

3.5 呼吸道

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pH7.2～7.4的灭菌肉汤(见第A.3章)或磷酸盐缓冲盐水，如准备将待检标本接种组织培养，则保存于含0.5%乳蛋白水解物的汉克氏(Hanks)液中。一般每支拭子需保存液5 mL。

3.6 生殖道

可采集阴道或包皮冲洗液，或者采用合适的拭子，有时也可用尿道拭子采集。

3.7 眼睛

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。

3.8 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。

3.9 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，装入木箱内，立即送往实验室。

3.10 小家畜及家禽

将整个尸体包入不透水塑料薄膜、油纸或油布中，装入木箱内，送往实验室。

3.11 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，装入不漏水的容器内送往实验室。

3.12 脑、脊髓

3.12.1 全脑、脊髓的采集

如采取脑、脊髓做病毒检查，可将脑、脊髓浸入30%甘油盐水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。

3.12.2 脑、脊髓液的采集

3.12.2.1 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。

3.12.2.2 采样方法

3.12.2.2.1 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。

3.12.2.2.2 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，即有脑脊髓液滴状滴出或用消毒注射器抽取，盛入消毒容器内。

3.12.2.3 采样数量

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

3.13 液体病料

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的试管中，塞好棉塞送检。也可用接种环经消毒的部位插入，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：先将材料置玻片上，再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。

3.14 乳汁

乳房先用消毒药水洗净（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，然后再采集10 mL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。

3.15 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。

3.16 尿液的采集

在动物排尿时，用洁净的容器直接接取。也可使用塑料袋，固定在雌畜外阴部或雄畜的阴茎下接取尿液。采取尿液，宜早晨进行。

3.17 环境

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

4 送检样品的记录

送往实验室的样品应有一式三份的送检报告，一份随样品送实验室，一份随后寄去，另一份备案。样品记录至少应包括以下内容：

a） 畜主的姓名和畜禽场的地址；

b） 畜（农）场里饲养的动物品种及其数量；

c） 被感染的动物种类；

d） 首发病例和继发病例的日期及造成的损失；

e） 感染动物在畜群中的分布情况；

f） 死亡动物数、出现临床症状的动物数量及其年龄；

g） 临床症状及其持续时间，包括口腔、眼睛和腿部的情况，产奶或产蛋的记录，死亡情况和时间，免疫和用药情况等；

h） 饲养类型和标准，包括饲料种类；

i） 送检样品清单和说明，包括病料的种类、保存方法等；

j） 动物治疗史；

k） 要求做何种试验；

l） 送检者的姓名、地址、邮编和电话；

m） 送检日期。

5 样品的运送

所采集的样品以最快最直接的途径送往实验室。如果样品能在采集后24 h内送抵实验室，则可放在4℃左右的容器中运送。只有在24 h内不能将样品送往实验室并不致影响检验结果的情况下，才可把样品冷冻，并以此状态运送。根据试验需要决定送往实验室的样品是否放在保存液中运送。

要避免样品泄漏。装在试管或广口瓶中的病料密封后装在冰瓶中运送，防止试管和容器倾倒。如需寄送，则用带螺口的瓶子装样品，并用胶带或石蜡封口。将装样品的并有识别标志的瓶子放到更大的具有坚实外壳的容器内，并垫上足够的缓冲材料。空运时，将其放到飞机的加压舱内。

制成的涂片、触片、玻片上注名号码，并另附说明。玻片两端用细木条分隔开，层层叠加，底层和最上一片，涂面向内，用细线包扎，再用纸包好，在保证不被压碎的条件下运送。

所有样品都要贴上详细标签。

附 录 A
（规范性附录）
待检样品保存液的配制

A.1 阿(Alserer)氏液

葡萄糖	2.05 g
柠檬酸钠($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)	0.80 g
氯化钠(NaCl)	0.42 g
蒸馏水(或无离子水)	加至 100 mL

溶解后，以 10%柠檬酸调至 pH 为 6.1 分装后，70 kPa 10 min 灭菌，冷却后 4℃保存备用。

A.2 30 %甘油盐水缓冲液

甘油	30 mL
氯化钠	4.2 g
磷酸二氢钾	1.0 g
磷酸氢二钾	3.1 g
0.02%酚红	1.5 mL
蒸馏水	加至 100 mL

加热溶化，校正 pH 值为 7.6，100 kPa 15 min 灭菌，冰箱保存备用。

A.3 肉汤(broth)

牛肉膏	3.5 g
蛋白胨	10 g
氯化钠	5 g

充分混合后，加热溶解，校正 pH 为 7.2～7.4，再用流通蒸气加热 30 min，用滤纸过滤，获蒿黄色透明液体，分装于试管或烧瓶中，以 100 kPa 20 min 灭菌。保存于冰箱中备用。