

DB 5304

玉溪市地方标准

DB 5304/T XXXX—2022

动物疫病监测采样技术规范

2022 - 11 - 01 发布

2023 - 02 - 01 实施

玉溪市市场监督管理局 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。

本文件由玉溪市动物疫病预防控制中心提出。

本文件由玉溪市农业农村局归口。

本文件起草单位：玉溪市动物疫病预防控制中心

本文件主要起草人：杨耀兰、吕嵘、宋诗雅、罗晓燕、杨秋楠、李晶、徐聪、张晓舟、赵明丽、吴明伟、茆洪涛、杨曦、魏建宏。

动物疫病监测采样技术规范

1 范围

本文件规定了动物疫病监测样品的采样原则、采样准备、样品采集与处理、样品记录、样品保存、样品运送与包装、废弃物无害化处理等技术内容。

本文件适用于兽医诊断、疫情监测、畜禽疫病防控和免疫效果评价等动物疫病实验室检测所需样品（病料）的采集、保存和运送。

2 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。

GB/T 16550 新城疫诊断技术
GB/T 16551 猪瘟诊断技术
GB/T 18090 猪繁殖与呼吸综合征诊断方法
GB/T 18639 狂犬病诊断技术
GB/T 18648 非洲猪瘟诊断技术
GB/T 18935 口蹄疫诊断技术
GB/T 18936 高致病性禽流感诊断技术
GB/T 27982 小反刍兽疫诊断技术
GB/T 39602 牛结节性皮肤病诊断技术
NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范
NY/T 561 动物炭疽诊断技术

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

动物疫病监测

调查动物群体中某种疫病或病原的存在情况。

3.2

样品

取自动物或环境，拟通过检测反映动物个体、群体或环境有关状况的材料或物品。

3.3

采样

按照规定的程序和要求，从动物或环境取得一定量的样本，并经过适当的处理，留做待检样品的过程。

4 采样原则

急性死亡的患畜，怀疑患有炭疽时，先排除炭疽后，再进行解剖取样。

——诊断或被动监测时，根据不同疫病或检测目的，采集 1~3 头（只）病死或濒死动物相应样品，病料必须具有代表性（见附录 A）；

——用于流行病学调查、抗体监测、动物群体健康评估等样品，数量、种类、分布等要满足流行病学调查和生物统计学的要求；

——采集死亡动物病料，应于动物死亡后 2 小时内采集；无法完成时，夏天不得超过 6 小时，冬天不得超过 24 小时；

——采样过程应注意无菌操作，所需器具均应事先严格灭菌；

——活体动物采样时，应避免过度刺激或损害动物；

——做好个人防护、环境消毒和病害肉尸的无害化处理。

5 采样准备

5.1 人员准备

采样人员应熟练掌握采样工作程序和采样操作技术，做好个人防护。

5.2 器械和物品

5.2.1 保定器械

保定器（绳）、牛鼻钳、口笼等。

5.2.2 工具物品

采样箱（或冷藏箱）、解剖刀、手术剪、镊子、钢锯、骨剪、探杯、酒精灯、酒精棉、注射器、一次性采血针、离心管、试管、试管架、平皿、样品袋、玻片、无菌棉拭子、冰袋、封条、废弃物袋等。

5.2.3 防护用品

防护服、防护帽、口罩、手套、胶鞋、护目镜、消毒药、喷壶等。

5.2.4 记录用品

采样单、记号笔、签字笔、不干胶标签、记录本等。

5.3 保存液

25%~50%甘油生理盐水（加双抗）、阿氏液、PBS液等（附录C）。

6 样品采集与处理

6.1 血液样品

6.1.1 采血部位

- 猪：前腔静脉、耳缘静脉、股静脉、前肢隐静脉等采血方式；
- 禽类：翅静脉、心脏、颈静脉等采血方式；
- 牛、羊、马：颈静脉、尾静脉、耳缘静脉、乳房静脉等采血方式；
- 犬、猫：前臂头静脉、颈静脉等采血方式；
- 兔：耳背静脉、颈静脉或心脏采血等采血方式；
- 啮齿类动物：尾尖采血，也可从眼窝内的血管丛采血。

6.1.2 血样处理

6.1.2.1 血清样品

分离血清的样品不加抗凝剂，采集的血液应在室温下静置，待血液凝固，血清自然析出或进行离心分离，收集备用。若需长时间保存，应将血清置-20℃以下保存，且应避免反复冻融。

6.1.2.2 全血样品

样品容器中加入抗凝剂，充分摇匀，低温备用。抗凝剂可用乙二胺四乙酸（EDTA，PCR检测血样首选抗凝剂）、0.1%肝素钠、阿氏液（见附录C.1，2份阿氏液可抗1份血液）、3.8%~4%枸橼酸钠溶液（0.1ml可抗1ml血液）等。

6.1.2.3 血浆样品

样品容器内先加入抗凝剂（同全血样品），采血后摇匀，然后静置，待红细胞自然下沉或离心沉淀后，取上清液即为血浆。

6.2 组织样品

6.2.1 病原分离样品

以无菌技术采集淋巴结、肝脏、肾、脾、胰腺、心、肺等组织样品（大约2cm³~5cm³），分别放入灭菌容器或样品袋内。

6.2.2 组织病理学样品

选取典型、明显的病变部位，连同健康组织一同切下，立即放入不低于10倍于组织块的10%福尔马林溶液（见附录C.7）中固定。固定器具避免使用金属材质，组织块厚度不超过0.5cm，面积在2cm²~3cm²之间（检查狂犬病则需较大的组织块）。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，尽快送往实验室。

6.2.3 猪扁桃体样品

用开口器打开猪口腔，将采样枪的采样钩紧靠扁桃体，扣动扳机取出扁桃体组织。

6.2.4 皮肤组织及其附属物样品

6.2.4.1 上皮组织或水泡皮

无菌采集2g病变的上皮组织或水泡皮（坏死组织、痂皮、丘疹、结节、脓包等）置于25%~50%甘油生理盐水缓冲液（加双抗）（见附录C.6）。未破裂的水泡，可用灭菌注射器或其他器具抽取水泡液，装入灭菌容器中送检。若水泡皮表面有污物，可用清水清洗，切忌使用酒精、碘酒等消毒剂消毒、擦拭。

6.2.4.2 毛发和绒毛样品

拔取毛发或绒毛样品，可用于检查体表的螨虫、跳蚤和真菌感染。用解剖刀片沿边缘刮取的表层皮屑用于检查皮肤真菌，深层皮屑（刮至皮肤轻微出血）可用于检查疥螨。

6.2.5 脑、脊髓样品

较小动物，取整个头部，无菌纱布包裹并密封待用；较大动物，可采取开颅无菌取样、用采样勺从延脑腹侧插入枕骨大孔取样（疯牛病和羊痒病样品）、用内径0.5cm塑料吸管插入枕骨大孔取样（犬脑组织样品）等方法，脑、脊髓样品应浸入30%甘油盐水缓冲液（见附录C.2）保存。

6.2.6 骨、骨髓样品

- a) 骨：将附着的肌肉和韧带等全部除去，表面撒上食盐，然后用浸过5%石炭酸溶液的纱布包裹，装入不渗漏的容器送检；
- b) 采集骨髓一般选择胸骨、肋骨、髌骨、胫骨和股骨等造血功能活跃的骨组织。大动物的骨髓采集用活体穿刺取骨髓的方法；小动物骨头小难穿刺，只能剖杀后采胸骨、股骨等的骨髓。

6.3 体液样品

6.3.1 脑脊液样品

6.3.1.1 颈椎穿刺法

采样前，常规消毒术部和用具，使用特制的专用穿刺针，穿刺点为环枢孔。将动物站立或横卧保定，使其头部向前下方屈曲，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，脑脊液自动流出或点滴状流出，盛入消毒容器内。大型动物颈部穿刺一次采集量约35mL~70mL。

6.3.1.2 腰椎穿刺法

穿刺部位为腰荐孔。动物站立保定，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，即有脑脊液滴状滴出或用消毒注射器抽取，盛入消毒容器内。大型动物腰椎穿刺一次采集量约1mL~30mL。

6.3.2 牛、羊 O-P 液（食道-咽分泌物）

被检动物在采样前禁食（可饮水）12h，采样探杯在使用前经0.2%柠檬酸或2%氢氧化钠浸泡5min，再用自来水冲洗，每采完一头动物，探杯要重复进行消毒和清洗。采样时动物站立保定，将探杯随吞咽动作送入食道上部10cm~15cm处，轻轻来回移动2次~3次，然后将探杯拉出。如采集的O-P液被反刍内容物严重污染，用生理盐水或自来水冲洗口腔后重新采样。采集8mL~10mL O-P液，倒入含有等渗磷酸盐缓冲液（见附录C.4）的灭菌容器中，加盖密封后充分摇匀，标记后放入冷藏箱及时送检，若不能及时送检应置-60℃冰箱冷冻保存。

6.3.3 精液

精液样品最好用假阴道挤压阴茎或人工刺激的方法采集。精液样品精子含量要多，不加防腐剂，而且要避免抗菌冲洗剂污染。

6.3.4 乳汁

先用消毒水清洗和消毒乳房、乳头及采样者的手，然后将最初挤出的3~4把乳汁弃去，再采集适量乳汁于灭菌容器内，加塞密封，编号后冷藏运送。进行血清学检验的乳汁避免冻结、加热或强烈震动。

6.3.5 胆汁、脓、粘液、关节液等

对采样部位消毒后，用采血器插入吸取内部液体放入容器中备用，也可以将病料直接接种到培养基或涂到载玻片上备镜检。

6.3.6 生殖道分泌物

用灭菌棉拭子从阴道深部或子宫颈采集分泌物，立即置于无菌肉汤（见附录C.3）或PBS等溶液内。

6.4 拭子样品及镜检样品

6.4.1 眼、鼻、咽喉、泄殖腔拭子

取无菌棉签，伸入畜禽口腔（咽喉）、鼻腔、泄殖腔（肛门）沾取分泌物，或在眼结膜表面或眼角周边用拭子轻轻擦拭采集分泌物，立即将拭子浸入保存液低温保存，常用的保存液有25%~50%甘油生理盐水（加双抗）、30%甘油盐水缓冲液、肉汤、等渗磷酸盐缓冲液（PBS）、抗生素PBS样品保存液等。

6.4.2 环境拭子

在对养殖场（户）、屠宰加工场所、交易市场等场所采集环境样品时，可用拭子在圈舍、饲料槽、排污沟、生产加工环节、交通运输工具等采样，浸入保存液中，密封低温保存送检。

6.4.3 培养样品

用灭菌接种环经消毒部位插入，提取病料接种在培养基上。

6.4.4 直接镜检样品

采集病变组织、体液等，置载玻片上，火焰或试剂固定，密封保存送检。

6.5 内容物

6.5.1 肠内容物

选择病变明显的肠管，用线结扎两端，自结扎线以外剪下放入容器内。也可用吸管扎穿肠壁，从肠腔内吸取内容物，放入盛有灭菌的30%甘油盐水缓冲保存液中送检。

6.5.2 胃内容物

反刍动物在反刍时，当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。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。

6.6 排泄物

6.6.1 尿液

在动物排尿时，选择中段尿液，用洁净的容器直接接取，也可用导管导尿或膀胱穿刺；死亡动物可直接从膀胱抽取尿液。采集尿液，宜早晨进行。

6.6.2 粪便

体外采集应选新鲜粪便，样品不少于10g；体内采集粪便，小动物可用拭子伸入直肠深处蘸取粪便，放入无菌保存液中；大动物可戴上手套人工伸入直肠深部掏取少量粪便。采好的粪样须立即冷藏，及时转送到实验室检验。

6.7 其他样品

6.7.1 胚胎和胎儿样品

选取无腐败的胚胎、胎儿或胎儿的实质器官装入适宜容器立即送检。

6.7.2 虫媒样品

将整个虫体放入容器密封送检。

7 样品记录

采样时应清晰标识每份样品，同时在采样登记表上填写相关信息，见附录B。

8 样品保存

- 采集的样品在无法于 12h 内送检的情况下，应根据不同的检验要求，将样品按所需温度分类保存于冰箱、冰柜中；
- 血清应放于-20℃冻存，全血应放于 4℃冰箱中保存；
- 供细菌检验的样品应于 4℃保存，或用灭菌后浓度为 30%~50%的甘油生理盐水 4℃保存；
- 供病毒检验的样品应在 0℃以下低温保存，也可用灭菌后浓度为 30%~50%的甘油生理盐水 0℃以下低温保存。

9 样品运送与包装

- 样品采集后应在 24h 内尽快送往实验室，不能在 24h 内送检的应将样品冷冻保存（有特殊保存要求的样品除外）；
- 样品的包装要防水、防漏、密封性良好；
- 样品与容器间应填充防震材料，以防玻璃容器破裂；
- 容器外包装要加贴生物安全警示标识，提示用语等；
- 同时提供采样登记表等。

10 废弃物无害化处理

采样完成后，及时分类收集病死动物及采集样品过程中产生的废弃物，运用深埋、焚化炉焚烧、移交无害化处理机构等方法，进行废弃物无害化处理。

附 录 A

(规范性)

主要动物疫病病原学监测样品采集重点

动物种类	疫病名称	采集重点
猪	口蹄疫	水泡皮、水泡液、淋巴结、扁桃体、脊髓、肌肉
	非洲猪瘟	口鼻拭子、全血、血清、脾脏、淋巴结、肝、肾、肺
	猪瘟	扁桃体、肺脏、脾脏
	高致病性猪蓝耳病	扁桃体、脾脏、肺脏
	猪细小病毒病	流产胎儿、阴道分泌物、肾脏
	猪伪狂犬	大脑、三叉神经节、扁桃体、肝脏、脾脏、肺脏
	猪圆环病毒病	肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、血清（未免）
	猪囊尾蚴病	咬肌、舌肌、内腰肌、膈肌、肋间肌、脑、心、肝脏、肺脏
牛	口蹄疫	水泡皮、水泡液、O-P 液（食道-咽部分泌物）、淋巴结、脊髓
	牛肺疫	肺、胸、腹腔积液
	牛结节性皮肤病	皮肤结痂、口鼻拭子、全血
	牛传染性鼻气管炎	全血、眼、鼻、气管分泌物、气管黏膜、流产胎儿
	牛病毒性腹泻	全血、粪便、肠粘膜、淋巴结、精液、流产胎儿
	牛流行热	全血、脾、肝、肺
	牛结核病	淋巴结、结节病灶组织、痰、乳、精液、子宫内分泌物
羊	口蹄疫	水泡皮、水泡液、O-P 液（食道-咽部分泌物）、淋巴结、脊髓
	小反刍兽疫	眼鼻拭子、肺脏、脾脏
	羊痘	全血、新鲜病变组织及结痂、淋巴结
	蓝舌病	全血、脾、肝
禽	禽流感	鼻、咽、气管分泌物、喉头气管、肝、脾、肾、脑、肠管及内容物、粪便、泄殖腔拭子
	新城疫	鼻、咽、气管分泌物、喉头气管、肝、脾、肾、脑、肠管及内容物、粪便、泄殖腔拭子
	禽白血病	全血、血清、病变组织、泄殖腔拭子、脾、气管黏膜、脑、蛋清
	禽毒支原体	鼻、咽、气管分泌物、肺、气管黏膜
	鸡病毒性关节炎	水肿的腱鞘、脾、胫股关节滑液
	鸡传染性喉气管炎	鼻、气管分泌物、气管黏膜
	鸡传染性支气管炎	气管黏膜
	鸡传染性法氏囊	法氏囊、肾、脾
	禽痘	水疱皮、结痂
	马立克氏病	全血、皮肤、皮屑、羽毛尖、脾
	鸡白痢	全血、粪便、肝、脾
	鸭病毒性肝炎	全血、肝
其他	狂犬病	脑组织、唾液
	支原体	咽喉拭子、肺脏

动物种类	疫病名称	采集重点
	动物球虫病	新鲜粪便
	流行性乙型脑炎	脑、脑脊髓液、全血
	血吸虫病	粪便、血清

附 录 B
(资料性)
采样登记表

养殖场户名称				地址	(含经度和纬度)		
联系人				电话			
饲养动物种类			存栏数		饲养批次		日龄
免疫 信息	疫苗种类	末次免疫时间		免疫剂量		疫苗生产厂家及批号	
发病 情况	临床发病情况	(首发病例日期、临床症状、分布、发病数、死亡数、死亡时间等)					
	解剖病变情况						
	治疗情况						
样品 信息	样品种类	样品数量		样品编号		备注	
采样目的:							
被采样单位(畜主)签名(盖章):				采样单位盖章:			
				采样人签名:			
年 月 日				年 月 日			

附 录 C
(规范性)
常用保存液、固定液的配制

C.1 阿氏液 (Alsever): 葡萄糖 2.05g, 柠檬酸钠 ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.80g, 柠檬酸 0.055g, 氯化钠 (NaCl) 0.42g, 加蒸馏水至 100mL, 溶解后调 pH 至 6.1 后分装, 70kPa 15min 灭菌, 冷却后 4℃ 冰箱中保存备用。

C.2 30% 甘油 盐水缓冲液: 甘油 30.00mL, 氯化钠 (NaCl) 4.20g, 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 1.00g, 磷酸氢二钾 (K_2HPO_4) 3.10g, 0.02% 酚红 1.50mL, 蒸馏水 (或无离子水) 加至 100mL 加热溶化, 校正 pH 值为 7.6, 100kPa 15min 灭菌, 冷却后 4℃ 冰箱中保存备用。

C.3 肉汤: 牛肉膏 3.50g, 蛋白胨 10.00g, 氯化钠 (NaCl) 5.00g, 充分混合后, 加热溶解, 校正 pH 值为 7.2~7.4, 用流通蒸汽加热 3min, 滤纸过滤, 获黄色透明液体, 分装于试管或烧瓶中, 以 100kPa 20min 灭菌, 冷却后 4℃ 冰箱中保存备用。

C.4 0.01mol/L pH7.4 的等渗磷酸盐缓冲液 (PBS): 氯化钠 (NaCl) 8.00g, 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 0.27g, 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) /12 水磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 1.42g/3.58g, 氯化钾 (KCl) 0.20g, 将上列试剂按次序加入定量容器中, 加适量蒸馏水溶解后, 用 HCL 溶液或 NaOH 溶液调 pH 值至 7.4, 再定容至 1000mL, 高压消毒灭菌 112Kpa 20min, 冷却后, 保存于 4℃ 冰箱中备用。

C.5 抗生素 PBS 样品保存液: 取上述 PBS 液, 按要求加入下列抗生素: 喉气管拭子用 PBS 液中加入青霉素 (2 000IU/mL)、链霉素 (2mg/mL)、丁胺卡那霉素 (1 000IU/mL)、制霉菌素 (1 000IU/mL)。粪便和泄殖腔拭子所用 PBS 中抗生素浓度应提高 5 倍。加入抗生素后应调 pH 值至 7.4。采样前分装小塑料离心管。

C.6 25%~50% 甘油生理盐水缓冲液 (加双抗) 的配制: 以配制 100mL 30% 甘油生理盐水为例, 将 30.00mL 甘油加入 70.00mL 的双蒸水中, 再加入 0.85g 的氯化钠 (NaCl), 高压灭菌。用前按 5 000~10 000IU/mL 加入青霉素、链霉素, 分装于小塑料离心管中。

C.7 10% 福尔马林溶液: 加蒸馏水约 800mL, 充分搅拌, 溶解无水磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4) 6.50g 和一水磷酸二氢钠 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 4.00g, 将溶解液加入到 100mL 40% 的甲醛溶液中, 定容到 1000mL。