

DB41

河南省地方标准

DB41/T 1702—2018

猪血样与组织样品采集技能操作规范

2018 - 09 - 29 发布

2018 - 12 - 29 实施

河南省质量技术监督局 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

本标准由河南省畜牧局提出并归口。

本标准起草单位：驻马店市动物疫病预防控制中心、西平县动物卫生监督所、遂平县动物疫病预防控制中心、泌阳县动物疫病预防控制中心、正阳县动物疫病预防控制中心、确山县动物卫生监督所。

本标准主要起草人：朱凤霞、杨晴、付显东、陈奎、薛双、董宏伟、张煜、陶顺启、许瑞、张三军、刘明莉、罗志忠、王五臣、李春芳、韩宇、宋亚举、李清莲。

猪血样与组织样品采集技能操作规范

1 范围

本标准规定了猪前腔静脉采血、耳静脉采血、扁桃体活体采样、鼻腔拭子采样、水泡液和水泡皮采样、脏器及脑组织样品采集技术与操作规范。

本标准适用于猪病诊断、流行病学调查、疫情监测、疫苗免疫效果评估、生猪调运、评估认证等猪血样和组织样品的采集。

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。

NY/T 541 兽医诊断样品采集、保存与运输技术规范

3 术语和定义

该标准界定的下列术语和定义适用于本文件。为了便于使用，以下重复列出了NY/T 541 中的某些术语和定义。

3.1

样品

取自动物或环境，拟通过检验反映动物个体、群体或环境有关状况的材料或物品。

3.2

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，留作待检样品的过程。

4 个人防护

采样人员应做好个人安全防护，佩戴口罩、工作帽、防护服、防护靴、双层手套，必要时戴防护眼镜、面罩。

5 采样原则

5.1 先排除后采样

凡发现急性死亡的动物，怀疑患有炭疽时，不得解剖。应先采集血样，进行血液抹片镜检，确定不是炭疽后，方可解剖采样。

5.2 合理选择采样方法

5.2.1 应根据采样的目的，内容和要求合理选择样品采集的种类、数量、部位与抽样方法。样品数量应满足流行病学调查和生物统计学的要求。

5.2.2 诊断或被动监测时，应选择症状典型或病变明显或有患病征兆的畜禽，疑似污染物；在无法确定病因时，采样种类应尽量全面。

5.2.3 主动监测时，应根据畜禽日龄，季节、周边疫情情况估计其流行率，确定抽样单元。在抽样单元内，应遵循随机取样原则。

5.3 采样时限

采集亡动物的病料，应于动物死亡后2 h内采集，无法完成时，夏天不得超过6 h，冬天不得超过24 h。

5.4 无菌操作

采样过程应注意无菌操作，刀、剪、镊子，器皿，注射器，针头等采样用具应事先严格灭菌，每种样品应单独采集。

5.5 尽量减少应激和损害

活体动物采样时，应避免过度刺激或害动物；也应避免对采样者造成危害。

5.6 生物安全防护

采样人员应加强个人防护，严格遵守生物安全操作的相关规定，严防人兽共患病感染；同时，应做好环境消毒以及动物或组织的无害化处理，而免污染环境，防止疫病传播。

6 耳静脉采血

6.1 采样准备

保定器、采样箱、保温箱或保温瓶、酒精棉、碘伏、镊子、采血器及针头、离心管及自封袋、签字笔、记号笔、采样单、采样登记表、垃圾袋和防护用品等。

6.2 保定及消毒

站立或侧卧保定，或用保定器具保定，耳静脉局部用碘伏棉球由里向外做点状螺旋式消毒。

6.3 采样

6.3.1 用手指捏压耳根部静脉血管处，使静脉充盈、怒张(或用酒精棉反复局部涂擦以引起其充血)；

6.3.2 左手把持耳朵，将其托平使采血部位稍高；

6.3.3 右手持采血器，沿静脉管使针头与皮肤呈 $30^{\circ} \sim 45^{\circ}$ 角，刺入皮肤及血管内，轻轻回抽针芯，如有回血即证明已刺入血管，再将针管放平并沿血管稍向前伸入，把针芯向外缓慢拉，使血液流入采血器；

6.3.4 拔出针头后用干棉球压迫止血；

6.3.5 采血后，将采血器活塞外拉预留血清析出空间。将采血器套上护针帽，去除推杆；

6.3.6 对所采样品进行编号并放入保温箱或保温瓶；

6.3.7 填写样品采集登记表（见附录A）。

7 前腔静脉采血

7.1 采样准备

保定器、采样箱、保温箱或保温瓶、酒精棉、碘伏、镊子、采血器及针头、离心管及自封袋、签字笔、记号笔、采样单、采样登记表、垃圾袋和防护用品等。

7.2 保定消毒

7.2.1 站立保定：用保定器保定猪，使猪的头颈与背线呈 30° 以上角度，并稍偏向一侧。选择颈部最低凹处，用镊子夹取碘伏棉球由里向外做点状螺旋式消毒。

7.2.2 仰卧保定：将猪仰卧保定，其中一助手抓握两后肢，尽量向后牵引，另一助手用手将下颌骨下压，使头部贴地，并使两前肢与体中线基本垂直。选取胸骨端与耳基部的连线上胸骨端旁 2 cm 的凹陷处，用镊子夹取碘伏棉球由里向外做点状螺旋式消毒。

7.3 采样

7.3.1 站立保定时，使针头偏向气管约 15° 方向进针，回抽见有回血时，即把针芯向外拉，使血液流入采血器；

7.3.2 仰卧保定时，使针头与地面呈 60° 方向进针，当进入约 2 cm 时，回抽见有回血时，即把针芯向外拉，使血液流入采血器；

7.3.3 拔出针头后用干棉球压迫止血；

7.3.4 采血后，将采血器活塞外拉预留血清析出空间。将采血器套上护针帽，去除推杆；

7.3.5 对所采样品进行编号并放入保温箱或保温瓶；

7.3.6 填写样品采集登记表（见附录 A）。

8 扁桃体活体采样

8.1 采样准备

保定器、猪活体扁桃体采样器、牙签、一次性离心管、自封袋、消毒液盆、3%的烧碱或1%聚维酮碘、保温箱或保温瓶、采样单、记号笔、签字笔。

8.2 保定消毒

站立保定，将采样枪放入3%的烧碱或说明浓度的聚维酮碘消毒液中浸泡消毒，取出后放入无菌清水中洗算；采样结束后再将采样器放入用3%的烧碱或说明浓度的聚维酮碘消毒液中浸泡消毒。

8.3 采样

8.3.1 安装照明灯、校准和固定枪头；

8.3.2 用开口器打开口腔，可以看到突起的扁桃体，把采样钩放在扁桃体上；

8.3.3 快速扣动扳机采取扁桃体，样品应如绿豆般大小；

8.3.4 用灭菌牙签将样品挑至 1.5 mL 灭菌离心管中，密闭离心管；

8.3.5 对所采样品进行编号并放入保温箱或保温瓶；

8.3.6 填写样品采集登记表（见附录 A）。

9 鼻腔拭子采样

9.1 采样准备

保定器、棉拭子、一次性离心管、自封袋、30%甘油磷酸盐缓冲液（见附录B）、保温箱或保温瓶、采样单、记号笔、签字笔和垃圾袋等。

9.2 采样

9.2.1 采样人蹲于猪的左侧，左手抓紧猪的上下颌，使猪嘴紧闭，右臂肘部与右腿将猪颈部夹住，对其进行固定；

9.2.2 右手持棉拭子，将棉拭子与猪鼻中隔成45度角轻轻插入，遇到鼻中隔后，稍作拐弯，绕过骨状瓣膜，与鼻中隔平行方向插入约2 cm；

9.2.3 轻轻转动棉签，刺激猪的喷嚏反射，当打2~3个喷嚏后，轻轻拔出棉签；

9.2.4 将棉签放入含有甘油磷酸盐缓冲液的1.5 mL塑料离心管中，断多余部的棉棒，密闭离心管；

9.2.5 对所采样品进行编号并放入保温箱或保温瓶；

9.2.6 填写样品采集登记表（见附录A）。

10 水泡液和水泡皮采样

10.1 采样准备

酒精棉球、干棉球、生理盐水、镊子、手术剪刀、注射器、1.5 mL离心管、抗生素、自封袋、签字笔、记号笔、保温箱或保温瓶和垃圾袋等。

10.2 消毒

用75%酒精消毒水泡皮表面，尽量去除污物，再用灭菌生理盐水擦去酒精。

10.3 采样

10.3.1 用无菌注射器穿刺水泡吸取水泡液。置于灭菌离心管中，加入抗生素；

10.3.2 采取水泡液后，用无菌手术剪将水泡皮剪下，放入PH7.4PBS配制的30%甘油缓冲液、加入抗生素、如果水泡已经破溃，用生理盐水洗掉水泡皮上的污物，然后将水泡皮放入上述甘油缓冲液中，加入抗生素；

10.3.3 对所采样品进行编号并放入保温箱或保温瓶；

10.3.4 填写样品采集登记表（见附录A）。

11 脏器及脑组织样品采集

11.1 采样准备

手术刀、手术剪、骨刀、骨锯、骨锤、酒精棉球、酒精灯、火柴、镊子、自封袋、样品采集登记表、签字笔、记号笔、保温箱或保温瓶、消毒液桶和垃圾袋等。

11.2 消毒

每剪开一个部位或采集完一种组织均应用酒精棉球擦拭、火焰消毒剪刀两面和镊子/手术刀等解剖器具。

11.3 采样

- 11.3.1 仰卧动物尸体，从腹股沟、腋窝处切开皮肤、肌肉，使关节脱臼，四肢平摊于台面，固定好，采集腹股沟淋巴结；
- 11.3.2 以胸骨前缘切开皮肤至骨盆处剥开皮肤切开胸腔摘除网膜和脾脏，左手拇指和食指固定肾脏右手用刀沿着肾脏凸面轻轻切开包膜并剥离，采集肾脏；
- 11.3.3 切开两侧肋软骨，依次采集心脏，肝脏、肺脏；
- 11.3.4 沿下颌正切开至胸骨柄，采集颌下淋巴结，舌根扁桃体、腭扁桃体；
- 11.3.5 必要时打开脑盖，无菌采集大脑小脑及延髓；
- 11.3.6 每种样品要求无菌采集大小为 1 cm~2 cm 见方的切块，采集后立即放入无菌的封口袋中；
- 11.3.7 对所采样品进行编号并保存至冰盒；
- 11.3.8 填写样品采集登记表（见附录 A）。

附 录 A
(规范性附录)
样品采集登记表

样品采集登记表见表A.1。

表A.1 样品采集登记表

被采样单位名称							
采样地点							
联系人		联系电话			邮编		
动物类别		样品类型		采样日期			
动物种类	日龄	存栏量	样品数量		样品编号		
动物临床情况							
动物免疫情况	免疫病种	疫苗类型	疫苗厂家	疫苗批号	免疫次数	末次免疫剂量	末次免疫至采样的间隔天数
检测目的							
被采样单位盖章或签名			采样单位盖章		采样人签名		
年 月 日			年 月 日		年 月 日		
备注							
<p>注1：样品类型指全血、扁桃体、鼻腔拭子、淋巴结等。</p> <p>注2：动物种类指种公猪、种母猪、后备母猪等。</p> <p>注3：此单一式三份，第一联由采样单位保存、第二联随样品、第三联由被采样单位留存。</p>							

附录 B
(规范性附录)
样品保存液的配置

B.1 PH 7.2、0.01mol/L PBS的配制

- (1) 配制25×PBS: 称量2.74 g磷酸氢二钠和0.79 g磷酸二氢钠加蒸馏水至100 mL。
- (2) 配制1×PBS: 称量40 mL25×PBS, 加入8.5 g氯化钠, 加蒸馏水至1000 mL。
- (3) 用氢氧化钠或盐酸调PH至7.2。
- (4) 灭菌或过滤。
- (5) PBS一经使用, 于4 °C保存不超过3周。

B.1 30%甘油磷酸盐缓冲液 (PH 7.6)

甘油	30 mL
氯化钠 (NaCl)	4.20 g
磷酸二氢钾 KH_2PO_4	1.00 g
磷酸氢二钾 K_2HPO_4	3.10 g
0.02%酚红	1.5 mL
蒸馏水	加至100 mL

调配方法: 加热融化, 校正PH为7.6, , 以100 kPa, 15 min灭菌。保存于冰箱中备用。