



中华人民共和国国家标准

GB/T 28940—2012

病媒生物感染病原体采样规程 鼠类

Sampling procedure of vector infected by pathogens—Rodent

2012-11-20 发布

2013-05-01 实施



中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准主要起草单位：北京出入境检验检疫局、中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所、中国疾病预防控制中心传染病预防控制所。

本标准主要起草人：郭天宇、刘艳华、任彤、董言德、鲁亮、夏连续。

病媒生物感染病原体采样规程 鼠类

1 范围

本标准规定了鼠及鼠血样和脏器取样方法、样本的保存方法以及整个过程的安全防护。
本标准适用于感染或可能感染病原体的鼠类现场采样和保存。

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 19489 实验室生物安全通用要求

WS 233 微生物和生物医学实验室生物安全通用准则

3 试剂及材料

3.1 消毒剂

2%碘酊、75%酒精。

3.2 抗凝剂

乙二胺四乙酸(EDTA)、草酸盐合剂、肝素、枸橼酸钠、氟化钠、草酸钾。制备及用量参见附录 A。

3.3 组织、脏器保存液

20%中性甘油盐水、50%甘油磷酸盐缓冲液、组织保存液、RNAlater 保存液。制备及用量参见附录 B。

3.4 麻醉剂

乙醚、氯仿。

3.5 其他

液氮、干冰。

4 实验用品

4.1 实验用仪器设备

生物安全柜、-80℃低温冰箱、高压灭菌器、液氮罐、离心机、移液器、带盖搪瓷盘、3号~5号一次性针头注射器、直头眼科镊、眼科剪刀、大号镊子、吸管、平皿、冻存管、针线、鼠袋、鼠固定板、鼠固定盒、焚尸炉。

4.2 个人防护用具

白(浅)色防护服(连体服)、白色长筒袜、长筒雨靴、无粉手套、口罩、眼罩、杀虫气雾剂。

5 鼠样本采集

5.1 采集要求

捕获鼠单体装鼠袋。登记捕获方法、时间、地点、状态(活体、死亡、是否腐败等)、鼠样本基本信息(重量、性别、体长、尾长、右后足长、耳高等)。采血和脏器组织样本前,用麻醉剂麻醉鼠和鼠体寄生虫,梳检寄生虫后,再进行血液和脏器组织的采集。

5.2 鼠样本采集方法

5.2.1 鼠笼法

将鼠笼放置在鼠洞口或鼠道等有鼠活动的地方采集鼠类,诱饵为生花生米、油条、瓜子、红薯块等。

5.2.2 鼠夹法

将鼠夹放置在鼠洞口或鼠道等有鼠活动的地方采集鼠类,诱饵为生花生米。

5.2.3 粘鼠板法

将粘鼠板放置在鼠洞口或鼠道等有鼠活动且雨水淋不到的地方采集鼠类,无需诱饵。

5.2.4 毒饵毒杀法

选择有鼠活动的场所采用毒饵灭鼠,采集毒毙鼠。

5.2.5 熏蒸法

选择有鼠活动的密闭场所采用熏蒸灭鼠药灭鼠,采集毒毙鼠。

5.2.6 其他方法

选择有鼠活动的场所采用翻草堆或掘灌等人工捕捉方法采集鼠类。

5.3 鼠血样采集方法

5.3.1 左前肢腋窝下采血

将鼠仰卧固定于鼠固定板上,消毒后将左胸皮肤剪开,并将皮肤与肌肉剥离,向左前肢展开而成一袋状,以消毒剪刀将左前肢腋下静脉剪开,用吸管或注射器吸取流出的血液。

5.3.2 尾静脉采血

将鼠装入固定盒内,盖上盒盖,露出鼠尾,用手揉擦或用温水(45℃~50℃)加温鼠尾,也可用二甲苯等化学药物涂擦鼠尾,使鼠尾静脉充分充血后,用剪刀剪去尾尖,尾静脉血即可流出。用手轻轻从尾根部向尾尖部挤几下,可以采到数滴血。

5.3.3 心脏采血

将鼠仰卧固定于鼠固定板上,剪去心区部位的被毛,用碘酊、酒精消毒皮肤。在左侧底3肋~4肋

间,用左手食指摸到心搏,右手取连有3号~5号针头的注射器,选择心搏最强处穿刺。当针头正确刺到心脏时,鼠血由于心搏自然进入注射器,即可进行取血。

5.3.4 眼眶动脉和静脉采血

用左手抓住鼠,拇指和食指尽量将鼠头皮肤捏紧,使鼠眼球突出。右手取直头眼科镊,在鼠右侧眼球根部将眼球摘去,并将鼠倒置,头朝下,此时眼眶内很快流血,将血滴入预先加有抗凝剂的平皿内,直到无血液流出为止。

5.3.5 后眼眶静脉丛连续穿刺采血

取血时,手从背部捉住鼠,拇指和食指握住颈部,利用对颈部所加的压力,使头部静脉淤血,在突出的眼球旁分辨出后眼眶静脉。将消毒的吸管用抗凝剂湿润其内壁,从内侧眼角将吸管转向前,并轻压刺入 Tenon 氏筋膜,然后由鼻侧眼眶壁平行地对喉头方向推进,深约 4.5 mm 就达到后眼眶静脉丛,血液自然进入吸管内。

5.3.6 断头采血

实验者右手握住鼠头部,左手握住背部,露出颈部,助手用剪刀在鼠颈部将鼠头剪掉。立即将鼠颈向下,对准已准备好的平皿(内放凝血剂),鼠血即可从颈部很快滴入容器内。

5.3.7 颈静脉采血

将鼠仰卧固定于鼠固定板上,将一侧颈部外侧的被毛剪去,用消毒液消毒皮肤,作一般外颈静脉分离手术,颈静脉暴露清楚后,用注射器针头沿静脉平行方向刺入,抽取所需血量。

5.3.8 股静脉或股动脉采血

大鼠可进行股静脉或股动脉采血。将鼠麻醉后,剪开腹股沟处皮肤,即可看到股静脉,把此静脉剪断或用注射器采血即可,股动脉较深需剥离出,再采血。

5.4 鼠脏器及脑组织采集步骤

5.4.1 所用解剖用具应煮沸或高压消毒灭菌,将应用器械以剖解顺序分次排列在灭菌有盖的搪瓷盘内。整个过程在生物安全柜中进行。

5.4.2 鼠尸固定于解剖盘上,腹部向上,用消毒液消毒腹部皮肤。

5.4.3 以镊子提起耻骨缝前面的皮肤,用剪刀剪开。并沿正中线直剪到下颌部。然后用钝头剪刀或刀柄剥离皮肤,再把皮肤向四肢剪开,翻转皮肤。剪开腹壁前先用碘酊或酒精消毒。

5.4.4 用无菌剪刀沿正中线自阴部至膈肌为止剪开再行横切开,并切取肝、脾、肾等脏器放入冻存管中,保存在低温冰箱或加保存液保存。

5.4.5 另换灭菌剪刀,切开膈肌,剪断胸骨两侧软肋骨(呈倒V型),翻起胸骨,再切取心脏和肺脏放入冻存管,保存在低温冰箱中或加保存液保存。

5.4.6 取脑组织时,固定头部,用碘酊消毒,剪开头皮露出头骨。再以碘酊消毒,更换一套无菌剪、镊,沿脑部边缘剪开头骨用剪使脑与骨剥离,取出整个鼠脑放入冻存管,保存在低温冰箱中或加保存液保存。

5.4.7 剖解完毕,高压后按实验室垃圾处理,或将鼠尸投入焚尸炉焚化,或在75%酒精中消毒后深埋。用75%酒精处理生物安全柜台面,紫外消毒30 min。所用的器械都要高压消毒。

6 样本保存

6.1 鼠样本的保存

6.1.1 活鼠

将捕获的活鼠连同鼠笼(夹)装入鼠袋,扎紧袋口,严防跳蚤逃逸。

6.1.2 死鼠

将捕获的死鼠从鼠夹上取下,单只装入鼠袋,扎紧袋口,严防跳蚤逃逸。

6.2 用于病原体检测鼠脏器样本的保存

6.2.1 冷冻保存

用于细菌、病毒分离和检测的样本可直接冷冻保存(−80℃冰箱),也可用化学制冷剂(如干冰)或在液氮罐中保存。

6.2.2 保存液保存

含鼠疫耶尔森菌的组织或脏器的样本可用20%中性甘油盐水保存。用于病毒检测的组织样本可放在50%甘油磷酸盐缓冲液中,在5℃条件下保存数周;也可用组织保存液保存;或保存于RNAlater保存液(用于核酸检测的样本方可用这种方法,无法再进行病原分离检测),样品储存液中保存的新鲜样品37℃下稳定保存1d,18℃~25℃保存7d,2℃~8℃稳定4周,−20℃永久保存。

6.3 血液样本保存

根据不同检测目的选取冷藏保存或加相应的抗凝剂保存,详见资料性附录A。

7 安全防护要求

7.1 现场采集的防护要求

7.1.1 工作人员应穿白(浅)色防护服(连体服)、防蚤袜。放(收)夹时戴白色线手套,2人1组,可以相互检查身体是否有蚤或蜱,发现后及时清除。身体暴露部位也可使用驱避剂防护。

7.1.2 收夹时,不要用手直接接触鼠。装鼠袋时,动作要快,随即扎紧袋口。对死(自毙)鼠或捕获口鼻出血的鼠,需用大号镊子,装入鼠袋后,外套1个塑料袋。鼠笼捕获的鼠,需连同鼠笼一起装入大号鼠袋。

7.2 实验室安全防护要求

7.2.1 在鼠传疾病疫区采集鼠类样本时,工作人员应经过严格生物安全防护培训,合格后方可进行工作。

7.2.2 鼠类样本采集、解剖时工作人员应做好个人防护,防止被病原体感染或鼠体外寄生虫叮咬。采血及解剖过程应按相应病原体生物安全级别在相应的实验室中进行,做好相应防护。

7.2.3 开展病原体检测的实验室属专用实验室,其结构、防护水平、工作制度、工作人员着装(个人防护)、实验操作规程以及污物处理和意外事故的处理都符合相应的规定,详细参照GB 19489、WS 233。

7.3 预防接种

工作人员应提前接种相关疫苗。

附 录 A
(资料性附录)
常用抗凝剂的制备及用量

A.1 乙二胺四乙酸(EDTA)

EDTA 的钠盐或钾盐常在实验中作为抗凝剂,每毫升血样加 1.5 mg~2.2 mg。加 EDTA 抗凝剂的新鲜冰冻血浆在-20℃以下可保存 1 a。

A.2 草酸盐合剂

草酸铵 1.2 g、草酸钾 0.8 g、福尔马林 1.0 mL、蒸馏水加至 100 mL。每毫升血样加 0.1 mL。

A.3 肝素

20 U 肝素可抗凝 1 mL 血液。1%肝素溶液 0.1 mL 于试管内,旋转试管,使溶液均匀浸湿试管内壁,放入 80℃~100℃烘箱烤干,每管能使 5 mL~10 mL 血液不凝。急性血压实验时可在充满生理盐水的动脉套管内注入肝素 20 mg~25 mg。体内抗凝:500 U/kg~1 000 U/kg。

A.4 枸橼酸钠

配成 3%~5%水溶液,每毫升血样加 0.1 mL;也可直接加粉剂,每毫升血样加 3 mg~5 mg。

A.5 氟化钠

每毫升血样加 6 mg 氟化钠。

A.6 草酸钾

每毫升血样加 1 mg~2 mg 草酸钾。或配置成 10%水溶液,每毫升血样加 0.01 mL~0.02 mL。

在试管内加饱和草酸钾溶液 2 滴(或 10%溶液 0.2 mL),轻轻敲击试管,使溶液分散到管壁四周,置 80℃以下的烘箱中烤干(烘烤温度过高,可使草酸钾分解为碳酸钾而失效),每管能使 3 mL~5 mL 血液不凝。供钾、钙含量测定的血样不能用草酸钾抗凝。

附录 B

(资料性附录)

常用组织、脏器保存液的制备及用量

B.1 20%中性甘油盐水

中性甘油(化学纯)20 mL、氯化钠 0.85 g、蒸馏水 80 mL 混匀后分装,高压灭菌。

B.2 50%甘油磷酸盐缓冲液

取等体积的甘油与等体积的 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)混合,调节 pH 即可。

100 mL 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)具体配方为:0.2 mol/L Na_2HPO_4 81 mL 和 0.3 mol/L NaH_2PO_4 19 mL 混合。

B.3 组织保存液

0.5%水解乳蛋白、2%小牛血清、青霉素 500 U/mL、链霉素 50 U/mL、制霉菌素 50 U/mL 组成的溶液。

B.4 RNAlater 保存液

10 μL /1 mg 组织,采样后立即将新鲜样品浸入此试剂,RNAlater 可以迅速渗透到组织中,保护 RNA 完整不被降解,确保下游分析得到的数据真实反应样品的表达信息。

中华人民共和国
国家标准
病媒生物感染病原体采样规程 鼠类
GB/T 28940—2012

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100013)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)64275323 发行中心:(010)51780235
读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

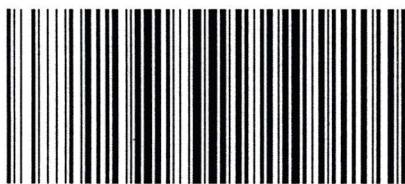
*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 13 千字
2013年4月第一版 2013年4月第一次印刷

*

书号: 155066·1-46303 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 28940-2012