




实验室生物安全系列丛书

生物安全实验室 兽医病原微生物操作 技术规范

王君玮 王志亮 主编



 中国农业出版社



实验室生物安全系列丛书

生物安全实验室

□□□□□□□□□□□□□□□□

兽医病原微生物操作技术规范

王君玮 王志亮 主编

中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

兽医病原微生物操作技术规范/王君玮, 王志亮主编.
北京: 中国农业出版社, 2009.10
ISBN 978-7-109-13597-0

I. 兽… II. ①王…②王… III. 兽医学—病原微生物—
技术操作规程 IV. S852.6—65

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 180844 号

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)
(邮政编码 100125)
责任编辑 颜景辰

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行
2009 年 11 月第 1 版 2009 年 11 月北京第 1 次印刷

开本: 850mm×1168mm 1/32 印张: 16.5
字数: 417 千字 印数: 1~3 000 册
定价: 48.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

编 委 会

主 编	王君玮	王志亮		
副主编	吕 京			
编 者	王君玮	王志亮	刘华雷	张 维
	张永强	刘雨田	邵卫星	辛九庆
	王晓亮	王 华	王清华	包静月
	徐天刚	吕 京	李 林	李金明
	吴晓东	吴延功	郑东霞	张 玲
	杨咏梅	赵金山	刘培言	林瑞华

前 言

人畜共患病、重大动物动物疫病、外来动物动物疫病是当前我国动物疫病防控的重点对象。这些疫病在特定条件下可通过动物及其产品的国际、国内贸易，边境互市，野生动物迁徙和媒介昆虫等途径传播，从而对国内动物和公共卫生安全、生态安全产生威胁，造成难以估量的经济损失，甚至对政治、经济、社会和国家安全产生重大影响。因此，对人畜共患病、重大动物动物疫病、外来动物动物疫病的及时诊断和识别，不仅关乎我国畜牧业发展，而且关系到公众的安全、环境安全和社会稳定。但是，由于我国在生物安全领域起步晚，尤其是在高生物安全级别的兽医诊断实验室管理和规范操作方面仍存在滞后现象，因此，给高致病性病原体的传播提供了可乘之机，也给实验室工作人员和环境带来了极大的安全隐患。

目前，有些兽医诊断实验室工作人员还存在重研究、轻质量、轻安全的思想，认为自己操作的是动物病原体，不会对人类健康、环境造成危害，对实验室生物安全缺乏足够的认识和重视。但随着我国加入 OIE，对兽医诊断实验室检测的质量和生物安全都提出了更高的要求，迫切需要针对系列动物病原体的诊断技术规范，尤其对外来动物病原体，我国多数诊断实验室尚缺乏足够的知识和防范意识，而这些病原体一旦传入，将给我国畜牧业带来灾难性后果。

为进一步加强我国兽医诊断实验室的诊断能力，提高兽医实验室生物安全管理意识和水平，中国动物卫生与流行病学中心国

家外来动物疫病诊断中心结合数十年来从事突发动物疫病、重大动物疫病和外来动物疫病研究、检测的经验，组织国内部分专家编写了《兽医病原微生物操作技术规范》。全书分总论和各论两部分，系统介绍了疯牛病、非洲猪瘟、禽流感、口蹄疫等 32 种重大动物疫病、外来动物疫病样品采集、实验室检测工作的基本操作技术规范。总论部分重点介绍了兽医诊断实验室的质量管理、生物安全管理规范，在高级别生物安全防护条件下从事高危病原检测的质量和安全管理要求，高危病原疑似样品的采集、包装、运送原则，以及三级生物安全实验室（BSL - 3/ABSL - 3）从事高危病原检测前的风险评估技术。各论部分分人畜共患病原体、重大动物疫病病原体、重要外来动物疫病病原体和高致病性不明原因病原体等四个篇章详细介绍了 5 种人畜共患病、12 种重大动物疫病、15 种重要外来动物疫病的风险识别技术、样品采集运输和实验室检测技术规范，指出了在疫情不明条件下样品处理、实验室检测应遵循的规则。附录部分给出了兽医生物安全实验室溢洒处理指南、常见意外伤害指南、安全操作规范等实验室常用技术。内容简洁、实用、新颖。

本书编写中不仅参考了世界动物卫生组织（OIE）《陆生动物诊断试验和疫苗手册》（2008 版）和《陆生动物卫生法典》（2008 版）的内容、世界卫生组织（WHO）和我国有关机构近年制订的各类标准，而且参考了美国、加拿大、日本等国家诊断实验室研究检测的最新成果。这些成果和诊断实验室管理经验对刚刚起步的我国兽医实验室规范管理将很有借鉴意义。

本书由多位从事人畜共患病、重大动物疫病和外来动物疫病研究、诊断、检测的专家多方收集资料，经反复论证、修改完成。但限于学识水平，书中难免有不妥和错漏之处，恳请广大读者及时反馈信息，以期修订和完善。

本书的策划、编写和出版得到了农业部兽医局、中国动物卫

生与流行病学中心等单位领导和有关专家的大力支持，在此谨表谢意。同时，对参与本书编写的工作人员致以真诚的感谢！

编 者

2009年8月

目 录

前言

◎总论

第一章 兽医诊断实验室的质量管理	2
第一节 实验室质量管理计划的总体设计	2
第二节 检测方法的选择与验证	3
第三节 兽医实验室的能力认可	5
第二章 兽医诊断实验室的安全管理	11
第一节 实验室安全计划的总体设计	11
第二节 实验活动的风险评估	13
第三节 兽医实验室的生物安全认可和资格认定	19
第三章 病原体操作的安全要求和质量要求	25
第一节 安全要求	25
第二节 质量要求	31
第四章 兽医诊断样品的包装和运送原则	38
第一节 感染性物质的分类与包装	38
第二节 兽医诊断样品送检运输程序的办理	42
附 兽医诊断样品通过航空运输程序实例	46
第三节 运输中意外泄漏事件的安全处置	50
第五章 兽医病原微生物危害风险评估技术	51
第一节 风险评估概论	51
第二节 兽医病原微生物危害风险评估的作用	52
第三节 兽医病原微生物危害风险评估要素	53

第四节 兽医实验室运行中危害风险评估	56
附 评估实例(提纲)	57

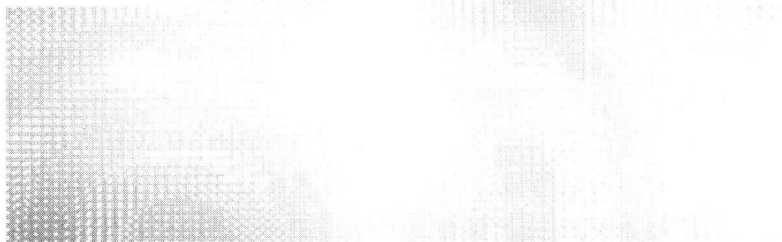
◎各论

第一篇 人畜共患病原体安全操作技术规范	62
第六章 炭疽	62
第七章 布鲁氏菌病	71
第八章 牛结核病	87
第九章 副结核病	99
第十章 猪链球菌 2 型感染	109
第二篇 重大动物病病原体安全操作技术规范	121
第十一章 禽流感	121
第十二章 新城疫	138
第十三章 口蹄疫	154
第十四章 高致病性猪蓝耳病	171
第十五章 猪瘟	188
第十六章 猪流行性感冒	203
第十七章 小反刍兽疫	216
第十八章 蓝舌病	226
第十九章 牛瘟	244
第二十章 牛传染性胸膜肺炎	257
第二十一章 马传染性贫血	274
第二十二章 马流感	282
第三篇 重要外来病病原体安全操作技术规范	289
第二十三章 疯牛病	289
第二十四章 痒病	302
第二十五章 西尼罗河热	308
第二十六章 尼帕病	320
第二十七章 亨爪病	332
第二十八章 非洲猪瘟	344

第二十九章 猪水疱病	361
第三十章 水疱性口炎	373
第三十一章 非洲马瘟	391
第三十二章 马脑脊髓炎	400
第三十三章 裂谷热	418
第三十四章 结节性皮肤病	427
第三十五章 绵羊和山羊痘	435
第三十六章 边界病	449
第三十七章 埃博拉和马尔堡出血热	458
第四篇 高致病性不明原因病原体安全操作指南	468
第三十八章 不明原因的群体性疾病	468
附录	478
附录一 一、二、三类动物疫病病种名录	478
附录二 采样工具包	481
附录三 兽医诊断实验室良好操作规范指南	483
附录四 兽医实验室常用消毒剂及其配制、 有效浓度监测和使用方法	489
附录五 兽医实验室常用溶液及其配制	495
附录六 兽医实验室生物危险材料溢洒处理指南	503
附录七 兽医实验室常见意外伤害处理指南	508

总 论

□□□□□□□□



第一章 兽医诊断实验室的质量管理

第一节 实验室质量管理计划的总体设计

有效的实验结果对实验室诊断、疫病监测和动物及动物性产品贸易是非常重要的。只有应用良好的管理规范、有效的检测和校准方法、适宜的检测技术、良好的质量控制和质量保证才能获得理想的实验结果。将这些保证结果的要素有机结合，便构成实验室质量管理体系，其在检测过程中以及检测结果解释中发挥着重要作用。实验室质量管理体系可以分为管理性、操作性和技术性要素三部分。实验室建立并运行了良好的质量管理体系，就能证实实验室具备实施可靠的质量体系的能力，能出具技术上有效的检测结果。另外，质量管理体系能证明实验室有能力满足顾客和客户需求。在国际贸易中以及不同实验室间检测结果的互认也需要实验室建立和运行良好的质量管理体系。因此，近年来建立实验室管理体系并通过国家或国际有关机构认可已成为诊断和/或检测实验室的重点工作之一。兽医诊断实验室在实验室质量管理体系建立方面也取得了长足的进展。

为保证质量管理体系的适用和有效，兽医类实验室在设计管理体系时应应对实验室质量管理计划进行全面考虑，重点考虑实验室的工作内容、职责和目标，采用的标准、指南和参考文献，实验室质量管理程序的范围，检测方法的选择，以及实现质量控制计划应采取的策略等内容。此外，要综合质量和生物安全通盘考虑。

第二节 检测方法的选择与验证

ISO/IEC 17025 要求检测实验室在检测活动中要使用适当的检测方法,同时对方法的选择、方法的建立以及方法的验证提出了要求。OIE 也提出了方法的选择和验证的要求。OIE 手册推荐了部分疾病在贸易和疾病诊断检测上可供选择的方法。此外,OIE 陆生动物卫生法典也列出了在国际贸易中疾病检测的方法。这些实验方法在用于动物国际贸易时,被认为是能有效地给出可靠的结果的方法。许多兽医实验室在实际运行中自己建立或修订了实验方法,其中多数实验室还使用非标准方法,或者非标准方法与标准方法混合的检测程序。在兽医诊断实验室,尤其为社会提供数据和报告的检测类实验室,即使使用标准方法,为保证检测结果有效,也需要对检测方法进行评估、优化和/或验证。客户和实验室工作人员应充分了解检测方法的性能,如果实验室采用非标准方法检测,应事先通知客户,与客户充分交流并得到客户的许可。因此,许多兽医检测实验室需要证明其具备研制、使用和验证检测方法的能力。

一、方法的选择

选择的检测方法首先应满足实验室客户进行动物疾病诊断或病原体检测的需要。选择检测方法时,通常要考虑以下几个要素:

- 国际上能否接受并认可;
- 技术上是否可行;
- 检测方法是否过时;
- 方法的性能特点,如敏感性、特异性、重复性、分离率、检出限、不确定度等;
- 拟分析物是抗原还是抗体;

- 操作时间；
- 实验室的资源、技术要求；
- 所需要的检测样品，是血清、组织，还是培养物；
- 检测结果的应用，如：进口/出口动物或其产品检测、流行病学监测、疫病筛查、疾病确诊、个体动物疾病诊断还是群体动物疾病诊断；
- 客户的期望值；
- 安全因素；
- 拟检测的数量；
- 每个样品检测的费用；
- 参考标准，包括参考物质；
- 检测试剂来源；
- 所能检测项目的有效性。

二、实验方法的标准化

实验室一旦确定了检测方法，就要立即建立并标准化。无论此种方法是实验室自己研制的还是从外部引进的，一般都需要先进行优化。检测方法优化是指进行一系列实验，随后进行数据分析，确定最佳实验程式。检测方法优化时应考虑以下因素：

- 仪器设备操作说明；
- 试剂说明，包括化学的、生物学的试剂；
- 严格的参考标准、参考物质和内部质量控制；
- 技术能力。

三、方法的验证

方法验证是进一步评价试验方法的适用性并确定方法的操作性能（如敏感性、特异性、分离率等）的过程。验证工作通常包括：与其他方法比较，最好是标准方法；与参照标准比较；用相同的方法与其他实验室开展合作研究，包括交换样品，尤其是未

知成分组成或滴度的样品；试验感染研究；内部质量控制分析等。

第三节 兽医实验室的能力认可

兽医实验室的能力认可是正式表明获准认可实验室具备实施动物疫病诊断、检测的能力的第三方证明。从事向社会出具具有证明作用的数据和结果的兽医检测实验室尚需要接受并通过由国家认证认可监督管理机构或省、自治区、直辖市人民政府质量技术监督部门组织的资质认定的评审。

兽医实验室要想获得认可资格、取得相应资质，需要进行许多准备工作，首先要建立质量管理体系，包括编制体系文件、试运行质量体系并进一步修改完善质量体系等内部准备工作，其次要做好评审准备，包括选择实验室认可机构、提出申请、接受评审等外部认可活动。目前，ILAC 已经出版了关于实验室认可的要求和指南，即 ISO/IEC 17025《检测和校准实验室能力的通用要求》，国家实验室认可机构根据国际通用要求制定了认可准则以及认可准则在微生物领域、在动物检疫领域的应用说明。国家计量管理机构也根据行业职责制定了实验室资质认定评审准则，对实验室的能力资质进一步提出了认可、认证要求。兽医实验室具备了 ISO/IEC 17025 要求的检测能力，满足了资质认定准则要求，也就意味着实验室具备了与“准则”要求一致的技术上有效的检测方法、检测程序，同时实验室的基本条件和能力能符合法律、行政法规规定以及相关技术规范或者标准，检测结果才能有效。实验室认可总是与实验室的能力密切相关，获得了认可意味着具备了以下能力：

- 按照选定标准和/或指南要求确认的技术上有效的并经验证的检测方法、检测步骤和操作说明；
- 具备资格并经适当培训的熟知操作程序及技术背景的工

作人员；

- 有经校正且数量足够的仪器设备；
- 具有良好的设施和环境控制措施；
- 有保证结果准确可靠的操作程序和操作说明；
- 能预测技术需求和可能存在的问题，并能实施持续的改进措施；

改进措施；

- 能处理和防止可能出现的技术问题；
- 能准确地评估和控制检测过程中的不确定因素；
- 能证实具备实施所用检测方法的能力；
- 有证实其能获得技术上有效结果的能力。

本节的目的在于帮助兽医实验室有的放矢地做好实验室认可和资质认定前的各项准备工作，为获得实验室认可奠定基础。

一、建立质量管理体系

1. 编制体系文件 实验室在确定要建立质量体系后，首先要组织有关培训，包括 ISO/IEC 17025 培训、体系文件编写要求培训、实验室内审员培训、资质认定内审员培训等。确定了认可机构或资质认定机构后，还要进行相应认可机构的认可要求的培训。经过大量、有效地培训后，实验室就可以组织人员进行质量体系文件的编写了。

2. 体系试运行 体系文件编制完后，需要试运行管理体系。体系试运行期间，一方面可以广泛征求实验室全体人员的意见，进一步查找体系文件中不符合认可标准或不合理之处，以便修改、完善体系文件；另一方面，可以形成体系运行的有关记录，如内部审核、管理评审、培训、结果质量保证等记录，在以后的认可或资质认定时作为体系运行状况的证据。实验室认可机构通常要求实验室体系的试运行时间不少于 6 个月，方可申请认可。

3. 修改完善管理体系文件 体系文件试运行后，在编写时考虑不周或没有考虑到的问题就会一一暴露出来。可以结合实验

室检测工作的实际情况进行补充、完善，经过多次循环往复地修改、运行、再修改、再运行，使质量管理体系不断地趋于完善。

二、实验室认可和资质认定评审准备

1. 选择认可机构或资质认定机构 目前，我国的兽医实验室认可机构一般选择中国合格评定国家认可委员会（CNAS）。CNAS是由中国国家认证认可监督管理委员会根据《中华人民共和国认证认可条例》的规定批准设立并授权，统一负责对认证机构、实验室和检查机构等相关机构的认可工作。CNAS国际认可论坛（IAF）、国际实验室认可合作组织（ILAC）、太平洋认可合作组织（PAC）、亚太实验室认可合作组织（APLAC）等国际认可组织或区域性认可组织的全权成员，在质量和环境管理体系认证、检测与校准实验室、医学实验室、检查机构、标准物质和标准样品生产者等多个认可领域签署了国际多边互认协议。中国认可的相关证书或报告在签署多边互认协议的数十个国家和经济体具有证明效力。

实验室资质认定是指国家认证认可监督管理委员会和各省、自治区、直辖市人民政府质量技术监督部门对实验室和检查机构的基本条件和能力是否符合法律、行政法规规定以及相关技术规范或标准实施的评价和承认活动。国家级实验室和检查机构的资质认定由国家认证认可监督管理委员会负责实施，地方级实验室和检查机构的资质认定由地方质检部门负责实施。CNAS认可与国家级资质认定一般由CNAS委派的一个评审组即可完成，而与省级资质认定合并进行时常需要分别委派专家组。实验室可以根据自身需求和所处区域选择，或CNAS认可与国家级资质认定合并进行，或CNAS认可与省级资质认定合并进行。

2. 实验室认可或资质认定申请

(1) 确定认可或资质认定范围 实验室拟提出申请时，首先必须明确认可或资质认定范围，通常包括申请认可或资质认定的