

ICS 65.020.30
B 44
备案号:40366-2014

DB11

北京市地方标准

DB11/T 1053.1—2013

实验用鱼 第1部分：微生物学等级及监测

Laboratory fish

Part 1: Microbiological standards and monitoring

2013-12-20 发布

2014-04-01 实施

北京市质量技术监督局 发布

目次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 微生物学等级分类	1
5 检测项目	2
6 检测程序	2
7 检测要求	3
8 检测方法	4
9 结果判定	6

前 言

DB11/T 1053 的本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

DB11/T 1053 《实验用鱼》分为六个部分：

- 第 1 部分：微生物学等级及监测；
- 第 2 部分：寄生虫学等级及监测；
- 第 3 部分：遗传质量控制；
- 第 4 部分：病理学诊断规范；
- 第 5 部分：配合饲料技术要求；
- 第 6 部分：环境条件。

本部分为 DB11/T 1053 的第 1 部分。

本部分由北京市科学技术委员会提出。

本部分由北京市科学技术委员会归口。

本部分由北京市科学技术委员会组织实施。

本部分起草单位：国家人口计生委科学技术研究所、中国科学院水生生物研究所、中国食品药品检定研究院。

本部分主要起草人：李爱华、崔宗斌、孙德明、岳秉飞、王天奇。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实验用鱼 laboratory fish

经人工饲养、繁育，对其携带的病原体滋生情况及寄生虫实行控制，进行背景明确或未知病原检测，用于科学研究、教学、生产、检定以及其他科学实验的鱼类。

4 微生物学等级分类

实验用鱼

第1部分：微生物学等级及监测

1 范围

DB11/T 1053 的本部分规定了实验用鱼（斑马鱼和剑尾鱼）微生物学等级及监测，包括普通级(CV)和无特定病原体级(SPF)实验用鱼的微生物等级分类、检测要求、检测程序、检测方案、检测方法、结果判定和报告等。

本部分适于实验用鱼（斑马鱼和剑尾鱼）的微生物学等级划分和质量监测。

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，仅所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/T 4789.7 食品卫生微生物学检验 副溶血性弧菌检验
- GB 4789.15 食品安全国家标准 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数
- GB/T 14926.15 实验动物 肺炎链球菌检测方法
- GB/T 14926.16 实验动物 乙型溶血性链球菌检测方法
- GB/T 18652 致病性嗜水气单胞菌检验方法
- SC/T 7201.2 鱼类细菌病检疫技术规程 第2部分：柱状嗜纤维菌烂鳃病诊断方法
- SC/T 7201.3 鱼类细菌病检疫技术规程 第3部分：嗜水气单胞菌及豚鼠气单胞菌肠炎病诊断方法
- SC/T 7201.4 鱼类细菌病检疫技术规程 第4部分：荧光假单胞菌赤皮病诊断方法
- SN/T 1869 食品中多种致病细菌快速检测方法 PCR法
- SN/T 2439 鱼鳃霉病检疫技术规范
- 《斑马鱼疾病健康手册》2012年4月24日国际斑马鱼资源中心 (ZIRC Health Services Zebrafish Disease Manual, M. L. Kent, J. M. Spitsbergen, J. M. Matthews, J. W. Fournie, K. N. Murray and M. Westerfield)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实验用鱼 laboratory fish

经人工饲养、繁育，对其携带的病原微生物及寄生虫实行控制，遗传背景明确或者来源清楚，用于科学研究、教学、生产、检定以及其他科学实验的鱼类。

4 微生物学等级分类

4.1 普通级实验用鱼 conventional (CV) laboratory fish

不携带所规定的鱼的烈性传染病病原和与人共患病的病原。

4.2 无特定病原体级实验用鱼 specific pathogen free (SPF) laboratory fish

除了普通级应排除的病原体外，不携带所规定的对实验用鱼危害大、重要潜在感染或条件致病和对科学实验干扰大的病原体。

5 检测项目

5.1 外观检查

外观健康、无异常。

5.2 微生物学检测项目

普通级(CV)和无特定病原体级(SPF)实验用鱼病原微生物检测项目见表 1。

表1 CV 和 SPF 实验用鱼病原微生物检测项目

等级		应排除的病原微生物	检测要求
无特定病原体级	普通级	海分枝杆菌 <i>Mycobacterium marinum</i>	●
		龟分枝杆菌 <i>Mycobacterium chelonae</i>	●
		脓肿分枝杆菌 <i>Mycobacterium abscessus</i>	●
		嗜血分枝杆菌 <i>Mycobacterium haemophilum</i>	●
		霍乱弧菌 <i>Vibrio cholerae</i>	●
		嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	●
		海豚链球菌 <i>Streptococcus iniae</i>	○
		柱状黄杆菌 <i>Flavobacterium columnare</i>	●
		维隆气单胞菌 <i>Aeromonas veronii</i>	●
		简氏气单胞菌 <i>Aeromonas jandaei</i>	●
		偶发分枝杆菌 <i>Mycobacterium fortuitum</i>	●
		水霉菌 <i>Saprolegnia</i> spp.	●
		鳃霉菌 <i>Branchiomyces</i> spp.	●
		嗜鳃黄杆菌 <i>Flavobacterium branchiophilum</i>	○
		嗜冷黄杆菌 <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	○
		荧光假单胞菌 <i>Pseudomonas</i> spp.	○
		温和气单胞菌 <i>Aeromonas sobri</i>	○
		链球菌 <i>Streptococcus</i> spp*	○
	注1: ● 必须检测项目: 指在进行实验用鱼质量评价时必须检测的项目。		
	○ 必要时检测项目: 指引进实验用鱼时或怀疑本病流行等必要时要求检测的项目。		
	注2: * 指海豚链球菌之外的链球菌		

6 检测程序

检测程序见图1。

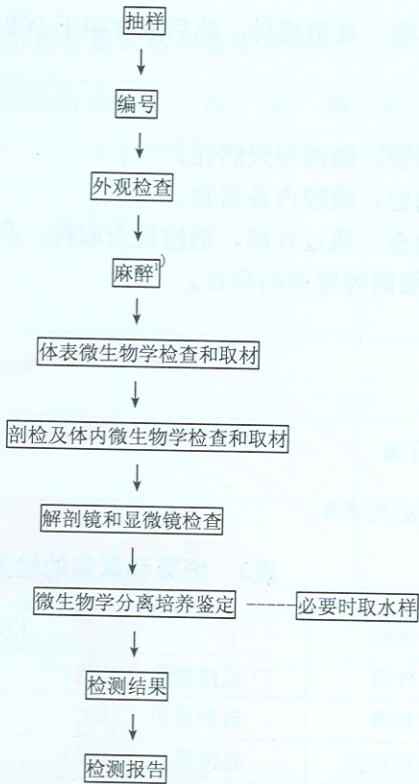


图1 微生物学检测程序

7 检测要求

7.1 检测频率

每3个月至少检测1次。

7.2 样品要求

- 7.2.1 样品应为 3 月龄以上成鱼，必要时同时取饲养环境水样作为样品。
- 7.2.2 应在不同的水环境内随机抽样。
- 7.2.3 抽样采集样品数量，见表 2。

表2 抽样采集样品数量

同一水环境实验用鱼数量	抽样数量
100尾以下	5尾
100尾以上	5%，最大取样量为30尾

- 7.2.4 采集的样品应新鲜，避免冰冻，避免人为污染和采样误差。每一样品要附有编号和标志并附送检单，写明样品的来源、品种品系、级别、数量、检测项目和采样时间。
- 7.2.5 样品采集：按照细菌、真菌的取样要求，与寄生虫学、病理学或遗传学等检测联合取样。

1) 活体实验用鱼的麻醉，应方便于检查、采样和满足动物福利伦理的要求。

7.2.6 取样顺序：先做细菌、真菌接种，然后取样用于 PCR 检测，最后进行固定，用于组织学检查。

7.3 检测内容

- 7.3.1 外观检查：检查体表、鳃部和天然孔。
- 7.3.2 剖检检查：检查胸腔、腹腔内各器官。
- 7.3.3 解剖镜和显微镜检查：通过外部、剖检检查取样，利用组织印迹或组织涂片，采用适当方法染色后，观察是否有真菌、细菌等感染的存在。

8 检测方法

8.1 细菌和真菌的检测方法

细菌和真菌的检测方法见表3。

表3 细菌和真菌的检测方法

微生物	检测方法
海分枝杆菌	抗酸染色 (ZIRC) ²⁾
龟分枝杆菌	抗酸染色 (ZIRC)
脓肿分枝杆菌	抗酸染色 (ZIRC)
霍乱弧菌	微生物分离培养 (GB/T 4789.7)
海豚链球菌	微生物分离培养 (GB/T 14926.15)
链球菌	微生物分离培养 (GB/T 14926.15及GB/T 14926.16)
嗜水气单胞菌	微生物分离培养 (SC/T 7201.3)
柱状黄杆菌	微生物分离培养 (SC/T 7201.2)
嗜鳃黄杆菌	微生物分离培养 (SC/T 7201.2)
嗜冷黄杆菌	微生物分离培养 (SC/T 7201.2)
荧光假单胞菌	微生物分离培养 (SC/T 7201.4)
维隆气单胞菌	微生物分离培养 (GB/T 18652)
简氏气单胞菌	微生物分离培养 (GB/T 18652)
偶发分枝杆菌	抗酸染色 (ZIRC) ⁽²⁾
嗜血分枝杆菌	抗酸染色 (ZIRC) ⁽²⁾
水霉菌	微生物分离培养 (GB 4789.15)
鳃霉菌	微生物分离培养 (SN/T 2439)
温和气单胞菌	微生物分离培养 (GB/T 18652)

8.2 分枝杆菌的区分鉴定方法

4种分枝杆菌的区分鉴定方法见表4。

2) 《斑马鱼疾病健康手册》2012年4月24日国际斑马鱼资源中心 (ZIRC Health Services Zebrafish Disease Manual, M.L. Kent, J.M. Spitsbergen, J.M. Matthews, J.W. Fournie, K.N. Murray and M. Westerfield)

表4 4种分枝杆菌的区别鉴定方法*

	色素产生	硝酸盐还原	Tween-80水解	50g/LNaCl生长	耐热触酶 (68℃20min)	芳香硫酸酯酶	尿素酶	铁吸收	生长速度
偶发分枝杆菌	-		±	+	+	+	+	+	速生
龟分枝杆菌	-		-	-	+	+	+	-	速生
脓肿分枝杆菌	-		-	+	+	+	+	-	速生
海分枝杆菌	光照后可产生色素		+	-	±	±			缓生

注1: +: 84%以上菌株阳性; -: 少于16%阳性; ±: 50%~84%阳性。
注2: * 嗜血分枝杆菌采用种特异性引物进行PCR快速检测。

8.3 PCR 检测方法

按照SN/T 1869进行细菌DNA提取、PCR扩增、电泳和结果分析。本部分中有关细菌的属或种特异性PCR扩增引物见表5。对扩增产物进行常规的分子克隆和测序比对。

表5 特异性 PCR 扩增引物序列和产物大小

菌种或菌株	引物名称和序列	扩增产物大小
<i>Flavobacterium</i> spp. *	AGRGTTTGATCMTGGCTCAG GGACCCTTTAAACCCAAG	561bp
<i>Flavobacterium Columnare</i>	GCCCAGAGAAATTGGAT TGCGATTACTAGCGAATCC	1193bp
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	AGAGTTTGATCATGGCTCAG GGTTACCTTGTTACGACTT	1498bp
<i>F. psychrophilum</i> 巢式PCR引物	GTTGGCATCAACACT CGATCCTACTTGCGTAG	1089bp
<i>Mycobacterium</i> spp. *	GCGAACGGGTGAGTAACACG TGCACACAGGCCACAAGGGA。	924bp
<i>Mycobacterium</i> 巢式PCR引物	AATGGGCGCAAGCCTGATG ACCGCTACACCAGGAAT	300bp
<i>Mycobacterium haemophilum</i>	GACGAAGTCGTAACAAGG TGAACACGCCACCATTAC	220bp
<i>Vibrio</i> spp. *	AAATCAGGCTCGGGCCCT GCAATTTT (A/G) TC (A/G/T) AC (C/T) GG	241bp
<i>Vibrio cholerae</i>	CACCAAGAAGGTGACTTTATTGT GAAGTTATAACCAACCCGCG	588bp

表 5 特异性 PCR 扩增引物序列和产物大小 (续)

菌种或菌株	引物名称和序列	扩增产物大小
<i>Streptococcus</i> spp. *	GTACAGTTGCTTCAGGACGTATC ACGTTTCGATTTCATCACGTTG	197bp
<i>Streptococcus iniae</i>	AAGGGGAAATCGCAAGTGCC ATATCTGATTGGGCCGTCTAA	850bp
<i>Aeromonas</i> spp. *	CTACTTTTGCCGGCGAGCGG TGATTCCCGAAGGCACTCCC	953bp

注: * 为相应细菌的属特异性引物。

9 结果判定

9.1 合格判定

所有检测样品的微生物学指标都符合该等级标准要求,则判定该水环境内的鱼群为符合该等级微生物学标准。

9.2 不合格判定

在检测的样品中,如有一个样品的微生物学指标不符合该等级标准要求,则判定该水环境内的鱼群为不符合该等级微生物学标准。