

第十三章 T/CALAS 13—2017《实验动物 树鼩病理学诊断规范》实施指南

第一节 工 作 简 况

编制任务来自国家科技部资助的以下三个国家科技支撑项目：

- (1) 野生动物人工种群的生物净化及相关疾病动物模型的建立与评价(2009BAI83B02)；
- (2) 实验动物新品种的种群建立与质量标准化研究(2011BAI15B01)；
- (3) 实验用树鼩的标准化研究和人类重大疾病树鼩模型创建与应用集成示范(2014BAI101B01)。

本部分的编制为这些课题的研究成果之一。

本标准起草单位：中国医学科学院医学生物学研究所、中国人民解放军总医院、昆明理工大学。

本标准主要起草人：匡德宣、代解杰、陈华、孙晓梅、赵玉琼、王文广、罕园园、李娜、陆彩霞、全品芬、夏雪山。

第二节 工 作 过 程

本标准前后在3个国家科技支撑计划资助下逐步形成的。

2009年，为完成“野生动物人工种群的生物净化及相关疾病动物模型的建立与评价(2009BAI83B02)”中的任务内容，在收集、整理相关文献和大量研究的基础上，开始编制树鼩微生物感染谱的调查和质量控制标准及检测方法标准(研究稿)。

2011年，“实验动物新品种的种群建立与质量标准化研究(2011BAI15B01)”项目的实施，进一步开展树鼩质量标准和技术规范研究，制定树鼩微生物学质量标准和相关条件控制标准。

2014年，在“实验用树鼩的标准化研究和人类重大疾病树鼩模型创建与应用集成示范(2014BAI101B01)”项目中得到了持续研究和完善，形成了本标准研究稿，即标准雏形。

2015年6月10日，起草单位向全国实验动物标准化委员会提交了“国家标准制修订计划项目提案表”，6月17日，在全国实验动物标准化技术委员会举办的工作会议上获得通过，进行了备案。

2015年11月11日，起草单位在项目中期检查会上将本标准申报稿通过会议和通讯方式，向来自国内实验动物领域的18位知名专家征求了意见，起草小组对照反馈意见进

行修改、补充和完善。

2016年上半年,起草小组又反复进行了多次修改和完善,形成了目前的本标准征求意见稿。

2017年1月,起草小组整理汇总专家对本标准征求意见稿提出的问题,去除重复意见共收到意见23条,经过起草小组讨论,采纳19条,不采纳4条。同时对标准格式进行了规范,最终形成标准送审稿。

2017年2月21日,中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会邀请全国的31名知名专家,组织召开了“全国实验动物标准化委员会年会暨标准审查会议”,起草单位在审查会上详细汇报了本标准(送审稿),现场专家们肯定了本标准的重要性和必要性,同时提出了一些意见或建议,起草小组对照征求意见稿进行了修改说明、补充和完善,形成本标准的报批稿。

2017年5月,本标准经中国实验动物学会第六届理事会常务理事会第八次会议审议通过,批准发布,于2017年5月19日起正式实施。

第三节 编写背景

树鼩(Tree shrew, *Tupaia belangeri*)作为我国正在开发的具有自主知识产权的实验动物新品种,由于其亲缘关系与灵长类最接近,在生理解剖、生化代谢、神经发育、病毒感染特性、心理应激模式等方面,与灵长类甚至人类之间都存在高度的相似性,同时,由于其具有体型小、繁殖周期短、易于实验操作、饲养成本低,比高等灵长类动物更适合大规模应用等独特优势,作为非人灵长类动物模型的补充(彭燕章等,1991; Fan et al., 2013; 许凌等, 2013)。目前已经被用于若干重要疾病如乙型肝炎(HBV)、丙型肝炎(HCV)、手足口等病毒感染,以及自发性肿瘤、代谢性疾病、抑郁症等动物模型的创建(郑永唐等, 2014)。

随着树鼩相关研究的深入及其作为非人灵长类动物模型的替代作用得到越来越广泛的认可,树鼩必将在未来作为实验动物模型被用于越来越多的人类重大疾病研究中,各研究单位目前都急需行业标准和国家标准的技术支撑。同时,实验树鼩作为我国具有自主知识产权的新品种,其标准的制定将在很大程度上提高国内实验动物新资源开发和动物模型的研究水平,从而提升我国在实验动物领域的国际地位。

实验动物的健康状况直接影响其生产和应用,而实验动物病理监测是实验动物质量监督检验不可缺少的重要环节,其目的首先是对传染性动物疫情进行监控,保证实验动物的健康,为实验动物的饲养繁殖、生长发育及疾病的预防和治疗提供可靠的依据;其次为研究疾病的病因、转归和比较医学提供依据;影响动物健康的因素众多,除了病原微生物和寄生虫外,动物生存环境中的化学物质,饲料、垫料和空气中的有害物质,甚至噪声和光照都可能引发动物健康问题。

病理学检查是判断动物健康状况的重要手段,病理学研究以肉眼和光学显微镜为观察基础,能结合全身所见症状及各项检测指标进行综合分析和判断,是目前对实验动物质量进行综合评估的最好方法。近年来,人们发现实验动物的病理变化至关重要,尤其是病

理形态学的改变,对实验动物的应用产生重要影响。由于病理学诊断的复杂性和难于标准化,至今实验动物的国家标准还没有病理学诊断标准。以往实验动物国家标准主要关注传染性疾病对动物质量的影响,建立《实验动物 树鼩病理学诊断规范》,可以更加全面地判断动物的健康状态,完善树鼩的质量控制标准体系。

目前,国内提出的树鼩标准仅有由云南省技术监督局颁布的云南地方标准 DB53/T 328.1~5—2010 和 DB53/T 328.6~10—2012,这两者均不包括该标准,因此,目前除 DB11/T 828.6—2011《实验用小型猪》第4部分:病理学诊断规范标准外,尚无树鼩病理学诊断规范的相关标准。

第四节 编制原则

本标准的制定原则是基于我们实验结果的总结、提炼,充分参考了国内外有关树鼩研究成果,广泛采纳有关专家合理建议,立足各项指标既符合树鼩实际情况,又具有科学性和可操作性。在确定本标准的各项指标时,严格遵循国家科委颁发的《实验动物管理条例》和国家科委与国家技术监督局联合颁发的《实验动物质量管理办法》。本标准的编制遵循“科学性、实用性、统一性、规范性”的原则,有利于云南省树鼩资源的有效利用,提升我国实验动物标准化水平,拓展使用范围。

第五节 内容解读

一、定义

(一) 普通级树鼩 (conventional tree shrew)

经人工培育,遗传背景明确或者来源清楚,对其携带的微生物和寄生虫实行控制,不携带所规定的人兽共患病病原和烈性传染病病原,用于科学研究、教学、生产和检定以及其他科学实验的树鼩。简称普通树鼩。

(二) 无特定病原体级树鼩 (specific pathogen free tree shrew)

除普通树鼩应排除的病原外,不携带所规定的潜在感染或条件致病和对科学实验干扰大的病原的树鼩。简称无特定病原体树鼩或 SPF 树鼩。

(三) 临床病理学 (clinical pathology)

用化学、微生物学、血液学和分子生物学的方法对体液(血液和尿液)和组织等进行实验室分析,从而对疾病进行诊断的医学学科。

(四) 解剖病理学 (anatomical pathology)

通过肉眼、显微镜、化学的、免疫学的和分子的方法对整体、器官和组织的形态进行检查而对疾病做出诊断的医学学科。

二、血液常规指标缩略语

RBC: 红细胞, PLT: 血小板, WBC: 白细胞, LYM: 淋巴细胞, MON: 单核细胞,

GRAN：中性粒细胞，PCT：血小板比积，HCT：红细胞比积，MCHC：平均红细胞血红蛋白浓度，MCH：平均红细胞血红蛋白含量，MPV：平均血小板体积，HGB：血红蛋白。

三、血液生化指标缩略语

TP：总蛋白，ALB：白蛋白，T-BIL：总胆红素，ALT：丙氨酸氨基转移酶，AST：天门冬氨酸氨基转移酶，GLU：血糖，BUN：尿素氮，CRE：肌酐，T-CHO：总胆固醇，TG：三酰甘油。

四、检测指标的确定

外观检查：考虑到监督检查工作的可行性，外观检查内容的设定以尽可能简捷为原则，检测指标主要为目测项目。

血常规检查和血液生化指标检查：主要参考了药物安全性评价的国际规范，由于检测项目的多少所需检测经费差别较大，考虑到监督检查工作中标准的可行性和经济性，选择对健康状况最有代表性的12项血常规指标和11项血清生化指标。

大体解剖：由于采取尽可能不处死动物的原则，因而需要解剖的动物数量较少，因此，确定大体解剖检查内容尽可能全面，这样有利于全面了解动物的健康状态。

组织病理学：考虑到检查成本和时间限制，依据树鼯病理学研究的实践经验，组织病理学检查项目选择了最主要的脏器和大体解剖发现异常的器官和组织。

五、血液化验指标正常值范围的设定

生理指标正常值范围的设定采取大样本的检查结果并与临床情况相结合。本课题所选择研究的动物数量200只，滇西亚种，雌雄各半，体重为103~160g，应用全自动血细胞仪和生化分析仪测定，用SPSS软件包分析，各项数据以“平均值±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示，参考值范围的计算方法则根据数据是否正态分布决定，若正态以“平均值±1.96×标准差”($\bar{x} \pm 1.96s$)，非正态以P95法计算，用 t 检验分析，求出 P 值，比较不同性别的各指标差异。结果雌性与雄性比较，各项指标的差异不具显著性($P > 0.05$)，部分指标与恒河猴、大鼠及人的相应指标存在一定的差异。建立了健康树鼯的血液学及生化指标的正常值参考范围，可为应用该动物进行科学研究时提供参考。

六、对病理学专业人员的要求

在病理诊断标准的执行过程中，病理学专业人员对诊断结果的判定至关重要，因此，本标准要求由具有病理学专业资质的人员来签署报告，同时，增加了同行复核的要求。此外，随着实验动物病理诊断标准的不断建立和完善，需要加强有关病理学专业人员的交流与培训，逐步开展认证工作，不断提高实验动物的病理学诊断水平，增强诊断的准确性和可靠性。

七、确定本标准内容的主要论据

本标准是在收集和整理国内外相关组织、地方及行业有关树鼯质量控制标准，以及

迄今为止国内外研究机构所有发表的以树鼩作为实验材料开展组织病理学研究基础上制定的。确定本标准的主要论据是以下论文：

(1) 匡德宣, 孙晓梅, 江勤芳, 仝品芬, 陆彩霞, 高家红, 代解杰. 树鼩的动物福利措施探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23 (4): 76-81.

(2) 匡德宣, 王文广, 孙晓梅, 黄晓云, 陆彩霞, 罕园园, 仝品芬, 代解杰. 驯养繁殖树鼩主要消化腺的组织学观察 [J]. 实验动物与比较医学, 2016, 36 (1): 13-18.

(3) 江勤芳, 匡德宣, 仝品芬, 等. 树鼩规模化繁殖及繁殖群的建立 [J]. 实验动物科学, 2011, 28 (6): 35-38.

(4) 匡德宣, 孙晓梅, 王文广, 陆彩霞, 罕园园, 仝品芬, 代解杰. 树鼩乳腺导管内乳头状瘤一例 [J]. 亚洲兽医病例研究, 2015, 4: 26-29.

(5) 匡德宣, 孙晓梅, 陆彩霞, 王文广, 仝品芬, 殷安国, 李晓飞, 代解杰. 实验树鼩主要内分泌器官的组织学观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24 (6): 35-39.

(6) 白继丽, 孙晓梅, 王欣, 代解杰. 人工饲养树血液学及生化指标正常值测定及分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19 (7): 38-41.

第六节 分析报告

一、病变诊断依靠病理学专业人员

病理学是一门经验医学, 树鼩可能出现的病理改变多种多样, 给出一个统一的病变判定标准难以实现, 病理标准的制定主要规范可能影响病变判定的技术方法, 同时明确判定规则, 对病变的诊断仍然依赖于病理学专业人员的经验和判断。

二、尽可能不处死动物

由于树鼩是珍贵资源, 而且培育成本也远高于啮齿类动物, 因此, 本标准参考了北京市地方标准 DB11/T 828.4—2011《实验用小型猪》第4部分: 病理学诊断规范, 设立临床病理学和解剖病理学两阶段结果判定, 其目的在于通过外观和血液化验结果就能够明确判定动物是否符合标准时, 就不再处死动物进行解剖病理学检查, 这样既节约了检测成本, 也使合格的动物还能够继续用于实验研究。

三、注重标准执行的可行性

实验动物的健康状况受多种因素影响, 判断动物健康与否的检测内容也多种多样, 例如, 目前人类健康体检的手段就包括: 血液化验、尿液化验、粪便化验、各种影像学检查 (X 射线透视或照相、B 超、CT、MRI、PET 等)、功能学手段 (心电图、动态心电图、肌电图、脑电图等), 甚至心理咨询等。树鼩健康状况的检查充分考虑到标准执行的可行性, 同时作为实验动物质量控制标准还应考虑到标准的执行成本。因此, 本标准内容仅设定了外观检查、血液化验检查和解剖病理学检查, 指标的设定充分考虑了对动物健康状况的代表性和经济性。

第七节 国内外同类标准分析

树鼩作为具有我国自主知识产权的实验动物新品种,目前还没有相关病理学诊断标准报道,无国际或国外先进标准参照和借鉴。在制订本标准时本着立足国内、面向国际的原则,尽可能采用国际上认可的原则和方法,同时又符合目前国情,注重可操作性。

第八节 与法律法规、标准关系

目前,在树鼩病理学诊断方面迄今无国家层面的相关标准,本标准的制定以符合《实验动物管理条例》(国家科委,1988年)为前提,在编制体例上尽可能与现行实验动物国家标准(GB14922.2—2011、GB14922.1—2011)相一致。

第九节 重大分歧意见的处理和依据

从标准结构框架和制定原则的确定、标准的引用、有关技术指标和参数的试验验证、主要条款的确定直到标准草稿征求专家意见(通过函寄和会议形式多次咨询和研讨),均未出现重大意见分歧的情况。

第十节 作为推荐性标准的建议

树鼩病理学诊断规范为首次制定,需要在实践过程中不断改进和完善,例如,血常规指标的红细胞指数,随着人工培育代数的进展,红细胞指数呈下降的趋势,正常参考值的设定存在时效性。因此,建议作为推荐性标准。

第十一节 标准实施要求和措施

由于树鼩是珍贵资源,而且培育成本也远高于啮齿类动物,因此,本标准结合树鼩的生物学特性,设立相应的技术参数指标,同时还考虑到我国目前实验用树鼩现有水平和发展趋势,最终设立相应的技术指标,基本上代表了我国树鼩的环境和设施控制要求和水平。建议本标准由全国实验动物标准化技术委员会组织宣传和培训,贯彻实施。

第十二节 其他应予说明的事项

本标准在编写格式上符合 GB/T 1.1—2009 的规定。

本标准的制定引用了以下文件。

DB53/T 293.1—2009《实验动物病理学检测 第1部分:实验动物处死方法》

DB53/T 293.2—2009《实验动物病理学检测 第2部分:病理剖检方法》

DB53/T 293.4—2009《实验动物病理学检测 第4部分：病理检测技术规程》

DB11/T 828.6—2011《实验用小型猪 第4部分：病理学诊断规范》

参 考 文 献

彭燕章, 叶智彰, 邹如金, 等. 1991. 树鼩生物学. 昆明: 云南科技出版社, 1-7.

许凌, 范宇, 蒋学龙, 等. 2013. 树鼩进化分类地位的分子证据. 动物学研究, 34(2): 70-76.

郑永唐, 姚永刚, 徐林. 2014. 树鼩基础生物学与疾病模型. 昆明: 云南科技出版社.

Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. 2013. Genome of the Chinese tree shrew. Nat Commun, 4: 1426-1434.