

第九章 T/CALAS 9—2017《实验动物 树鼩寄生虫学等级及监测》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、中国食品药品检定研究院、昆明理工大学。

本标准主要起草人：孙晓梅、代解杰、贺争鸣、王文广、岳秉飞、罕园园、李娜、巩薇、夏雪山、冯育芳、陆彩霞、匡德宣、全品芬、冯悦。

第二节 工 作 过 程

本标准先后在3个国家科技支撑计划项目资助下逐步形成。

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，开始进行树鼩寄生虫感染谱的调查和编制寄生虫控制及检测方法标准(研究稿)。

2011年，随着“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，进一步开展了树鼩质量标准和技术规范研究，制定了树鼩寄生虫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。

2014年4月14~16日，在北京召开的课题中期检查会上，以及2015年3月28日在昆明召开的第四次课题研讨和专家咨询会上，起草单位就树鼩的质量控制的主要标准包括微生物、寄生虫、饲料、环境等及其技术规范的讨论稿进行了汇报和讨论，分别得到了与会专家的指导意见，并做了修改。

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的方式,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《实验动物 树鼩寄生虫学等级及监测》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,共收到了6个单位的回函,征得12条意见,采纳意见10条,未采纳2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。

第三节 编写背景

树鼩(Tree shrew, *Tupaia belangeri chinensis*)是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,目前已经被用于更多重要疾病如乙型肝炎、丙型肝炎、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。随着相关研究的不断深入,树鼩得到越来越广泛的关注,树鼩的标准化也就显得迫切而重要,而实验树鼩质量标准的制定将在很大程度上保证科研数据的可靠性、一致性和可重复性,对提升我国实验动物科学自主创新的研究水平,进而提高我国在实验动物领域的国际地位亦具有重要的科学意义。

寄生虫等级及监测是实验动物标准化(质量控制)的重要组成部分。自20世纪80年代以来,国内外已有关于树鼩寄生虫学的研究报道,但至今仍然缺乏一个国家层面的、指导性强的标准,难以保证所用动物的质量,很大程度上制约了实验树鼩这一新品种资源的建设、标准化和产业化发展。需要说明的是虽然在2010年颁布了云南省《实验树鼩 寄生虫学等级及监测》标准,但随着研究的深入,发现此标准存在一些缺陷。因此,在前期大量研究基础上,本标准的制定旨在按照我国实验动物质量控制等级要求,基于排除引起人兽共患病、树鼩烈性传染病以及对科学研究干扰大的各类寄生虫病病原的实际情况进行等级分类,规范检测标准、检测方法和检测程序等,制定树鼩寄生虫学等级及检测的国家团体标准。只有实现树鼩的标准化,才能为树鼩生产和使用机构申请许可证认证时提供检测依据,才能保证实验结果的科学性和可靠性。

第四节 编制原则

本标准的编制应遵循以下基本原则：

- (1) 本标准编写格式应符合 GB/T 1.1—2000 的规定；
- (2) 本标准规定的技术内容及要求应科学、合理，具有适用性和可操作性；
- (3) 本标准的水平应达到国内领先水平。

本标准编写的依据为国家标准《实验动物 寄生虫学等级及监测》、云南省地方标准《实验树鼩 寄生虫学等级及监测》，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的寄生虫学质量控制研究成果。

第五节 内容解读

本标准由范围、规范性引用文件、术语和定义、实验树鼩等级分类、缩略语、检测要求、检测程序、检测规则、检测方法、结果判定、判定结论共十一章构成。从标准研究稿到标准报批稿经过了多次修改。现将《实验动物 树鼩寄生虫学等级及监测》报批稿主要技术内容的确定说明如下。

一、等级设定

参考实验动物有关标准，结合目前树鼩的生产水平和使用情况，本标准将实验树鼩按寄生虫学控制标准分为2个等级，即普通级和无特定病原体级（即SPF级）。

基于两个方面因素，其一，我国实验动物现行国家标准已颁布的啮齿类实验动物寄生虫学控制标准分为清洁级、SPF级和无菌动物；颁布的灵长类实验动物寄生虫学控制标准分为普通级和SPF级。树鼩虽然在体型上属于小型实验动物，但在分类上隶属于攀鼯目，经核基因组学分析，在进化上与灵长类处于同一分支，是灵长类的近缘物种；前期研究发现树鼩在解剖结构、生理生化等方面与灵长类动物接近。其二，前期的研究已经能够在实验室培育得到清洁级的树鼩，但目前国内大多数树鼩饲养机构处于起步阶段，仅仅具备普通级饲养设施。因此，在制定本标准时综合考虑将树鼩的寄生虫学等级设定为普通级和SPF级2个等级。

二、检测项目分类

本标准将检测项目分为必须检测和必要时检测两类。必须检测项目是在进行树鼩质量评价时必须检测的项目；必要时检测项目是在引种、疑有本病感染或开展相关研究时需要检测的项目。这种分类既可以突出重点，确保树鼩的质量，又在一定程度上简化了检测工作量，更具可操作性。

三、不同等级要求排除的寄生虫

普通级树鼩应排除人兽共患病和烈性传染的寄生虫病原。体外寄生虫（主要指节肢动

物)是寄生于动物体外并暂时性吸取营养,能造成动物皮肤损害并传播多种疾病,危害性很大的寄生虫病病原。弓形虫为一种原虫,也是常见的人兽共患病原,寄生于终宿主猫和猫科动物的小肠上皮细胞内,完成有性生殖,形成卵囊随粪便排出,很多哺乳动物误食后可造成全身感染,该病原感染范围广、传播性强、危害性大。因此本标准中把这两种寄生虫列入普通级树鼩必须检测和排除的项目。

蠕虫是多细胞动物,自然界中广泛存在,部分寄生于动物体内,主要有扁形动物门中的吸虫纲和绦虫纲,还有线形动物门中的线虫纲,危害较大。经大量的文献收集、总结,以及大样本树鼩感染谱的调查分析鉴定,发现树鼩体内携带人类常见的蠕虫,包括线虫、绦虫、吸虫及旋毛虫,其中线虫的携带率较高,通过药物可以清除。因此将全部蠕虫列入 SPF 级树鼩必须检测和排除的项目。

肉孢子虫对动物机体有一定危害,轻度感染可导致恶心、腹胀、腹痛、腹泻等消化道疾病,重度感染危害较大,前期研究发现树鼩自然携带肉孢子虫。在树鼩体内携带鞭毛虫,据报道尤以鞭毛虫中的毛滴虫最为普遍,导致消化道疾病。本标准将肉孢子虫列入 SPF 级树鼩必须检测和排除的项目;将鞭毛虫列为 SPF 级树鼩必要时检测项目。

四、检测程序和检测规则

本标准提出的检测程序和检测规则,与颁布的 GB14922.1—2001《实验动物 寄生虫学等级和监测》一致。

五、检测方法

针对体外寄生虫、弓形虫、蠕虫、肉孢子虫、鞭毛虫和纤毛虫的检测方法均可按照国标进行检测。

六、结果判定

根据所采取的检测方法的结果判定标准进行相应判定。

第六节 分析报告

树鼩属于小型哺乳类,全身被毛,加上其食性和生态环境与人类活动范围密切,容易感染各类人兽共患寄生虫。

一、树鼩体外寄生虫携带状况调查

自 20 世纪 80 年代以来,关于树鼩携带的体外寄生虫就有多篇报道。经统计大约有 40 余种,尤以螨、蜱、蚤、虱种类居多,其中螨的种类就高达 20 多种(彭燕章等,1991)。这些节肢动物不仅造成动物皮炎、贫血和过敏反应,还是很多重大传染病的传染源,因此把它列为普通级必须排除的项目。

二、树鼩肠道蠕虫携带状况的系统调查

由中国医学科学院医学生物学研究所, 完成了野生树鼩肠道蠕虫感染情况的调查及分析。采用经典的粪便直接图片法, 对 203 只野生树鼩肠道蠕虫携带率、蠕虫种类鉴定等进行了分析, 发现野生树鼩常见携带的蠕虫有长膜壳绦虫、奇口线虫、粪类圆线虫和鞭虫等, 其中长膜壳绦虫、奇口线虫和粪类圆线虫感染率较高, 分别为 27.67%、30.06% 和 61.52% (孙晓梅等, 2015); 此结果与其他研究结果相吻合; 还有报道称树鼩能自然感染多种线虫, 包括树鼩圆线虫、血管圆线虫等。由于树鼩食性广泛, 喜食昆虫, 生活在村落附近, 基本上能感染人类所有的蠕虫。因此把全部蠕虫列为 SPF 级必须排除的项目。

三、树鼩原虫携带状况的调查

有树鼩感染肉孢子虫的研究报道, 该肉孢子虫为一新种, 对机体有一定危害, 但感染率低 (Xiang et al., 2010)。研究发现树鼩携带大量的鞭毛虫, 经形态和核酸测序鉴定属三毛滴虫属的胎儿三毛滴虫 (陈玲霞, 2015), 感染率高但为条件性致病。因此把这两个原虫列为 SPF 级树鼩必须和需要排除的项目。

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, 目前没有国外标准可借鉴。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。在等级设定和检测项目设定方面均从国内的整体水平考虑; 标准中列举的检测方法是目前国内外通常采用的检测方法。

第八节 与法律法规、标准关系

本标准是在收集、整理国内外相关组织、地方和行业有关树鼩质量控制标准, 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寄生虫学质量控制研究基础上制定的。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》, 同时参考国家标准 GB14922.1—2001《实验动物寄生虫学等级及监测》。

在实验动物微生物学等级及监测方面迄今无国家层面的树鼩的相关标准, 但有地方标准。2010 年由云南省技术监督局颁布了云南省地方标准 DB53/T 328.2—2010《实验树鼩 寄生虫学等级及监测》。虽然有标准, 但由于颁发时间较早, 存在前期研究数据不足、内容有缺陷, 甚至缺乏科学性等问题; 如地方标准中, 无特定病原体检测指标把各类线虫分别罗列, 缺乏科学性, 而本标准则是把全部蠕虫 (其中包含了全部线虫) 列为 SPF 级应检测的指标, 更加全面。总之, 本标准的制定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。

第九节 重大分歧的处理和依据

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

考虑到本标准为首次制定，还需要经过广泛实践的检验逐步完善，建议作为推荐性团体标准。

第十一节 标准实施要求和措施

标准如果颁布，建议由中国实验动物学会对有关人员进行宣贯和培训。

第十二节 其他说明事项

本部分的编写格式是按照 GB/T1.1—2000《标准化工作导则》第一部分：标准的结构和编写规则执行的。

本部分的制定引用了以下文件：

NY/T 541 《动物疫病实验室检验采样方法》

GB 14922.1—2001 《实验动物 寄生虫学等级及监测》

GB/T 18448.1—2001 《实验动物 体外寄生虫检测方法》

GB/T 18448.2—2008 《实验动物 弓形虫检测方法》

GB/T 18448.6—2001 《实验动物 蠕虫检测方法》

GB/T 18448.10—2001 《实验动物 肠道鞭毛虫和纤毛虫检测方法》

参考文献

- 陈玲霞, 尹博文, 李振宇, 等. 2015. 树鼩鞭毛虫的形态学观察及其 18S rRNA 基因分析. 中国比较医学杂志, 25 (11): 5-8.
- 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: 162-163.
- 孙晓梅, 全品芬, 匡德宣, 等. 2015. 野生树鼩肠道蠕虫感染调查及分析. 中国比较医学杂志, 25 (2): 15-17.
- Xiang Z, Rosenthal BM, He YS, et al. 2010. *Sarcocystis tupaia*, sp. nov., a new parasite species employing tree shrews (*Tupaia* spp.) as natural intermediate hosts. Parasitol Int, 59, 128-132.