

第八章 T/CALAS 8—2017《实验动物 树鼩微生物学等级及监测》实施指南

第一节 工作简况

《实验动物 树鼩微生物学等级及监测》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，分别为：

(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。本标准主要起草人：孙晓梅、代解杰、贺争鸣、岳秉飞、罕园园、王文广、李娜、巩薇、王淑菁、邢进、付瑞、匡德宣、陆彩霞、全品芬

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)”任务内容，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，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)”项目中得到持续研究和完善，形成本标准研究稿，即标准雏形。

2014年4月14~16日，在北京召开课题中期检查会，2015年3月28日在昆明召开第四次课题研讨和专家咨询会，起草单位就树鼩质量控制的主要标准包括微生物、寄生虫、饲料、环境设施等及其技术规范的讨论稿进行了汇报和讨论，分别得到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“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工作会议上获得通过，进行备案。

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位知名专家征求意见，起草小组对照反馈意见进行了修改、补充和完善。

2016年上半年，起草小组反复进行多次修改和完善，形成《实验动物 树鼩微生物学等级及监测》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8个单位的回函，征得25条意见，采纳意见23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。

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 shrews, *Tupaia belangeri*）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为接近，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，实验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。

微生物等级监测是实验动物标准化（质量控制）中的重要组成部分。近年来，国内外已有部分关于树鼩微生物学的相关研究报道，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 第1部分 微生物学等级及监测》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细菌、真菌和病毒等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，制定树鼩微生物学等

级及检测的团体标准。只有实现树鼩的标准化,才能在树鼩生产和使用机构申请许可证认证时提供检测依据,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 GB 14922.2—2011《实验动物 微生物学等级及监测》、云南省地方标准 DB53/T 328.1—2010《实验树鼩 第1部分 微生物学等级及监测》,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微生物学质量控制的研究成果。

第五节 内容解读

本标准由适用范围、规范性引用文件、术语和定义、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、结果判定和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 树鼩微生物学等级及监测》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,本标准将树鼩按微生物学控制标准分为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微生物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微生物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尚处于起步阶段,仅仅具备普通级饲养设施。同时,很多实验研究中又需要排除其自身易感的病原,因此,在制定本标准时综合考虑将树鼩的微生物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病原微生物

普通级实验动物应排除人兽共患病和树鼩烈性传染病病原。沙门菌是一种常见的人兽共患病病原，人和动物通过进食污染的食物引起沙门菌性肠胃炎，甚至败血症。在一项大样本的树鼩肠道细菌检测报道中提示树鼩携带沙门菌。皮肤病原真菌能引起人兽共患的皮肤病，主要侵害人和动物的皮肤、毛发和爪甲等部位，各种动物均可感染。志贺菌是肠道传染病中最为常见的病原菌，可引起细菌性痢疾及急性胃肠炎。在一项树鼩肠道细菌检测报道中提示树鼩能够感染志贺菌，以福氏志贺菌和宋氏志贺菌为主。因此，本标准中把这三种病原列入普通级树鼩必须检测和排除的项目。

疱疹病毒是一类较为常见的病毒，宿主范围广，感染率高，当机体抵抗力下降时，体内潜伏的病毒被激活而发病，危害性大，少数感染者可发生病情严重的中枢神经系统和多器官弥漫性感染，预后不良。有研究报道显示疱疹病毒可实验性感染树鼩，建立动物模型。轮状病毒是引起婴幼儿腹泻的主要病原体之一，其主要感染小肠上皮细胞而引起腹泻。有报道称轮状病毒能实验性感染树鼩，同时，也能够从树鼩肠道分离出轮状病毒。呼肠孤病毒能引起树鼩肠道、呼吸道及神经系统感染，前期研究发现树鼩对呼肠孤病毒易感，并多次从体内分离得到该病毒。腺病毒在树鼩群体内常常携带，其40和41型病毒能引起腹泻。本标准把疱疹病毒、轮状病毒、呼肠孤病毒和腺病毒列入SPF级树鼩必须检测和排除项目。树鼩被认为是良好的肝炎病毒模型，由此被大量用于肝炎病毒感染机制及药物研发当中，但是，能诱导树鼩肝炎模型的病毒种类很多，原先在讨论稿和征求意见稿中分别都罗列了一些必要时检测的肝炎病毒项目，如HBV、HCV、小鼠肝炎病毒，最后经查阅大量文献证实除了实验性感染以外，树鼩不携带人肝炎病毒和小鼠肝炎病毒，起草小组认为列举肝炎病毒不恰当，决定删除该项目。当用于肝炎病毒感染研究时再行排除。

肺炎链球菌、变形杆菌、金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌都是树鼩易感病菌。本标准将肺炎链球菌和变形杆菌列入SPF级树鼩必须检测和排除项目；将金黄色葡萄球菌和空肠弯曲菌列为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《实验动物 微生物学等级和监测》基本一致。

五、检测方法

针对沙门菌、皮肤病原真菌、志贺菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、轮状病毒、空肠弯曲菌、疱疹病毒的检测方法均可分别按照实验动物国家标准进行检测。本标准在附录中提供了呼肠孤病毒、腺病毒两种病毒核酸的PCR检测方法，以及变形杆菌的培养鉴定方法。呼肠孤病毒、腺病毒均为树鼩源病毒，将分离得到病毒经形态学、血清学和核酸测序鉴定后设计了特异性引物，建立了相应的PCR检测方法。方法的特异性强、灵敏度高，经验证适合于树鼩呼肠孤病毒和腺病毒的检测。

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

一、树鼩微生物携带状况的系统调查

2012年,由中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所与中国医学科学院医学生物学研究所共同合作,完成了野生树鼩可培养细菌和真菌携带情况的调查,研究者采用经典方法,对61只野生树鼩呼吸道、肠道和体表毛发样本进行分离培养,形态学、生化和分子生物学多种方法鉴定,结果显示可培养的16个科32个属56种细菌及11种真菌。以肠杆菌属、葡萄球菌属、链球菌属携带率最高,其中常见病原菌有甲型副伤寒沙门氏菌携带率3.3%、金黄色葡萄球菌携带率93.6%、肺炎链球菌携带率52.5%、空肠弯曲菌携带率8.2%、鲍氏志贺菌携带率6.6%、变形杆菌携带率9.8%等(邢进等,2012)。多项研究也证实树鼩携带沙门菌、志贺菌等人兽共患病致病菌(刘丽君等,2015),仅仅是携带率有差异。因此,可以得出这样的结论:树鼩作为小型的哺乳类动物,携带多种病菌,其中沙门菌、志贺菌和皮肤病原真菌是重要的人兽共患病致病菌,沙门菌和志贺菌还是树鼩的烈性传染病病原,作为基本的普通级实验动物必须排除;其他病原菌虽然携带率高,但多为条件致病,所以把它们列为SPF级树鼩必须或必要控制的项目。

二、树鼩病毒携带状况的调查

(一) 抗体调查

在一份研究报道中,作者就60只野生树鼩的单纯疱疹病毒、流感病毒、柯萨奇病毒、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、丁肝病毒、登革热病毒、出血热病毒和麻疹病毒进行血清抗体筛查。结果仅检测到单纯疱疹病毒血清抗体阳性率为36.7%,说明树鼩能够自然感染(王新兴等,2011)。考虑到单纯疱疹病毒危害较大、动物易感,因此把它列入SPF级树鼩必须排除项目。国内外研究报道也显示树鼩能实验性感染单纯疱疹病毒和轮状病毒,成为这些病毒病研究的动物模型。

(二) 抗原检测

研究人员曾从树鼩粪便中分离到树鼩呼肠孤病毒,通过建立相应的PCR方法进行检测,阳性率为27%(李晓飞等,2014);在一项检测报告中报道了树鼩的腺病毒核酸检出率为73%;粪便中ELISA法检测到轮状病毒阳性率为6.7%。虽然这几种病毒的检出率较高,但对于树鼩而言为条件致病病原,将其列为SPF级树鼩排除的病原。

以上这些基础研究结果为我们制定团体标准提供许多重要依据。

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;对树鼩来源的特异性强的病原采用附录提供的核酸 PCR 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、地方和行业有关实验树鼩质量控制标准,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微生物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《实验动物 微生物学等级及监测》。

在实验动物微生物学等级及监测方面迄今无国家层面的相关标准,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 328.1—2010《实验树鼩 第1部分:微生物学等级及监测》,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,在地方标准检测项目中将结核杆菌列入是缺乏科学根据的,因为从未查阅到树鼩感染结核杆菌的实验证据。而本标准的制定原则是尽量做到各项指标既不遗漏又符合实验树鼩实际情况,实现科学性和可操作性。

第九节 重大意见分歧的处理和依据

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 作为推进性标准的建议

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 14922.2—2011 《实验动物 微生物学等级及监测》

GB/T 14926.50~14926.55 《实验动物 微生物学检测方法》

GB/T 14926.1 《实验动物 沙门菌检测方法》

GB/T 14926.4 《实验动物 皮肤病原真菌检测方法》

GB/T 14926.47 《实验动物 志贺菌检测方法》

GB/T 14926.14 《实验动物 金黄色葡萄球菌检测方法》

GB/T 14926.15 《实验动物 肺炎链球菌检测方法》

GB/T 14926.30 《实验动物 兔轮状病毒检测方法》

GB/T 14926.49 《实验动物 空肠弯曲杆菌检测方法》

GB/T 14926.60 《实验动物 猕猴疱疹病毒 I 型（B 病毒）检测方法》

GB/T 14926.50 《实验动物 酶联免疫吸附实验》

GB/T 14926.52 《实验动物 免疫荧光试验》

参考文献

- 李晓飞, 殷安国, 张媛, 等. 2014. 树鼩呼肠孤病毒 RT-nPCR 检测方法的建立及初步应用. 中国比较医学杂志, 24 (6): 63-68.
- 刘丽君, 余柄廷, 胡凝珠, 等. 2015. 树鼩粪便细菌分离培养与鉴定. 中国比较医学杂志, 25 (10): 64-68.
- 王新兴, 李靖潇, 王文广, 等. 2011. 野生中缅树鼩病毒携带情况的初步调查. 动物学研究, 32 (1): 66-69.
- 邢进, 冯育芳, 付瑞, 等. 2012. 野生树鼩可培养细菌和真菌携带情况的调查. 实验动物科学, 29 (3): 34-38.