

DB14

山 西 省 地 方 标 准

DB 14/T 1940—2019

实验动物 中国地鼠微生物等级及监测

Laboratory animal Microbiological standards and monitoring in Chinese hamster

2019 – 12 – 01 发布

2020 – 02 – 01 实施

山西省市场监督管理局

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 检测要求 2

5 检测程序 4

6 检测规则 4

7 检测方法 5

8 结果判定 6

9 报告 6

附录 A（规范附录） 实验中国地鼠白喉棒状杆菌的分离鉴定方法 7

附录 B（规范附录） 实验中国地鼠流感病毒的实时荧光 PCR 检测方法 8

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则编写。

本标准由山西省技术科技厅提出、归口并监督实施。

本标准起草单位：山西医科大学。

本标准主要起草人：宋国华、轩瑞晶、陈朝阳、高继萍、卫兵艳、庞文彪、卫佳宁。

实验动物 中国地鼠微生物等级及监测

1 范围

本标准规定了实验动物 中国地鼠（以下简称实验中国地鼠）的微生物学术语和定义、细菌和病毒的检测项目、检测程序、检测规则、检测方法、结果判定和报告。

本标准适用于实验中国地鼠微生物学等级及监测。

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 14926.1-2001 实验动物 沙门菌检测方法
- GB/T 14926.3-2001 实验动物 耶尔森菌检测方法
- GB/T 14926.4-2001 实验动物 皮肤病原真菌检测方法
- GB/T 14926.5-2001 实验动物 多杀巴斯德杆菌检测方法
- GB/T 14926.6-2001 实验动物 支气管鲍特杆菌检测方法
- GB/T 14926.10-2008 实验动物 泰泽病原体检测方法
- GB/T 14926.12-2001 实验动物 嗜肺巴斯德杆菌检测方法
- GB/T 14926.13-2001 实验动物 肺炎克雷伯杆菌检测方法
- GB/T 14926.14-2001 实验动物 金黄色葡萄球菌检测方法
- GB/T 14926.15-2001 实验动物 肺炎链球菌检测方法
- GB/T 14926.16-2001 实验动物 乙型溶血性链球菌检测方法
- GB/T 14926.17-2001 实验动物 绿脓杆菌检测方法
- GB/T 14926.18-2001 实验动物 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒检测方法
- GB/T 14926.23-2001 实验动物 仙台病毒检测方法
- GB/T 14926.24-2001 实验动物 小鼠肺炎病毒检测方法
- GB/T 14926.25-2001 实验动物 呼肠孤病毒 III 型检测方法
- GB/T 14926.41-2001 实验动物 无菌动物生活环境及粪便标本的检测
- GB/T 14926.44-2001 实验动物 念珠状链杆菌检测方法
- GB/T 14926.48-2001 实验动物 结核分枝杆菌检测方法
- GB/T 14926.56-2008 实验动物 狂犬病病毒检测方法
- NY/T 541-2002 动物疫病实验室检验采样方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实验中国地鼠 laboratory Chinese hamster

指经人工饲育，对其携带的微生物和寄生虫实行控制，遗传背景明确或者来源清楚，用于科学研究、教学、生产和检定以及其它科学实验的中国地鼠 (*Cricetulus griseus*)。

3.2

普通级中国地鼠 conventional (CV) Chinese hamster

指不携带所规定的人兽共患病病原和烈性传染病病原的中国地鼠。

3.3

无特定病原体级中国地鼠 specific pathogen free (SPF) Chinese hamster

指除普通级中国地鼠应排除的病原外，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中国地鼠。

3.4

无菌级中国地鼠 germ freedom (GF) Chinese hamster

指利用现有的生物学技术，体内外无可检出一切其它种类生命体的实验用中国地鼠。

4 检测要求

4.1 临床观察

外观健康、无异常。

4.2 病原菌检测项目

各等级实验中国地鼠病原菌检测项目见表 1。

4.3 病毒检测项目

各等级实验中国地鼠病毒检测项目见表 2。

表1 各等级实验动物中国地鼠病原菌检测项目

动物等级			病原菌检测项目	检测要求
无菌级	无特定病原体级	普通级	沙门菌 <i>Salmonella</i> spp. 结核分枝杆菌 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> 皮肤病原真菌 <i>Pathogenic dermal fungi</i> 假结核耶尔森菌 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> 小肠结肠炎耶尔森菌 <i>Yersinia enterocolitica</i> 念珠状链杆菌 <i>Streptobacillus moniliformis</i>	● ● ○ ○ ○ ○
			多杀巴斯德杆菌 <i>Pasteurella multocida</i> 支气管鲍特杆菌 <i>Bordetella bronchiseptica</i> 泰泽病原体 Tyzzer's organism 白喉棒状杆菌 <i>C.diphtheriae</i> 嗜肺巴斯德杆菌 <i>Pasteurella pneumotropica</i> 肺炎克雷伯杆菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> 绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i> 乙型溶血性链球菌 β -hemolytic streptococcus	● ● ● ● ● ● ● ● ○ ○
			用现有的生物技术，无任何可查到的细菌	●
			注：●必须检测项目，要求阴性；○必要时检查项目，要求阴性。	

表2 各等级实验动物中国地鼠病毒检测项目

动物等级			病毒检测项目	检测要求
无菌级	无特定病原体级	普通级	淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) 狂犬病病毒 Rabies Virus (RV)	● ●
			仙台病毒 Sendai Virus (SV) 小鼠肺炎病毒 Pneumonia Virus of Mice (PVM) 呼肠孤病毒 III 型 Reovirus type III (Reo-3) 流感病毒 (influenza virus)	● ● ● ○
			用现有的生物技术，无任何可查到的病毒	●
			注：●必须检测项目，要求阴性；○必要时检查项目，要求阴性。	

4.4 检测项目分类

寄生虫检测项目分为必须检测项目和必要时检查项目。必须检测项目是在进行中国地鼠微生物学质量评价时必须检测的项目，必须检测项目用“●”表示。在申请生产许可证、引进种源和疑有本病流行时除必须检测项目外，需增加必要时检查项目。必要时检查项目用“○”表示。

5 检测程序

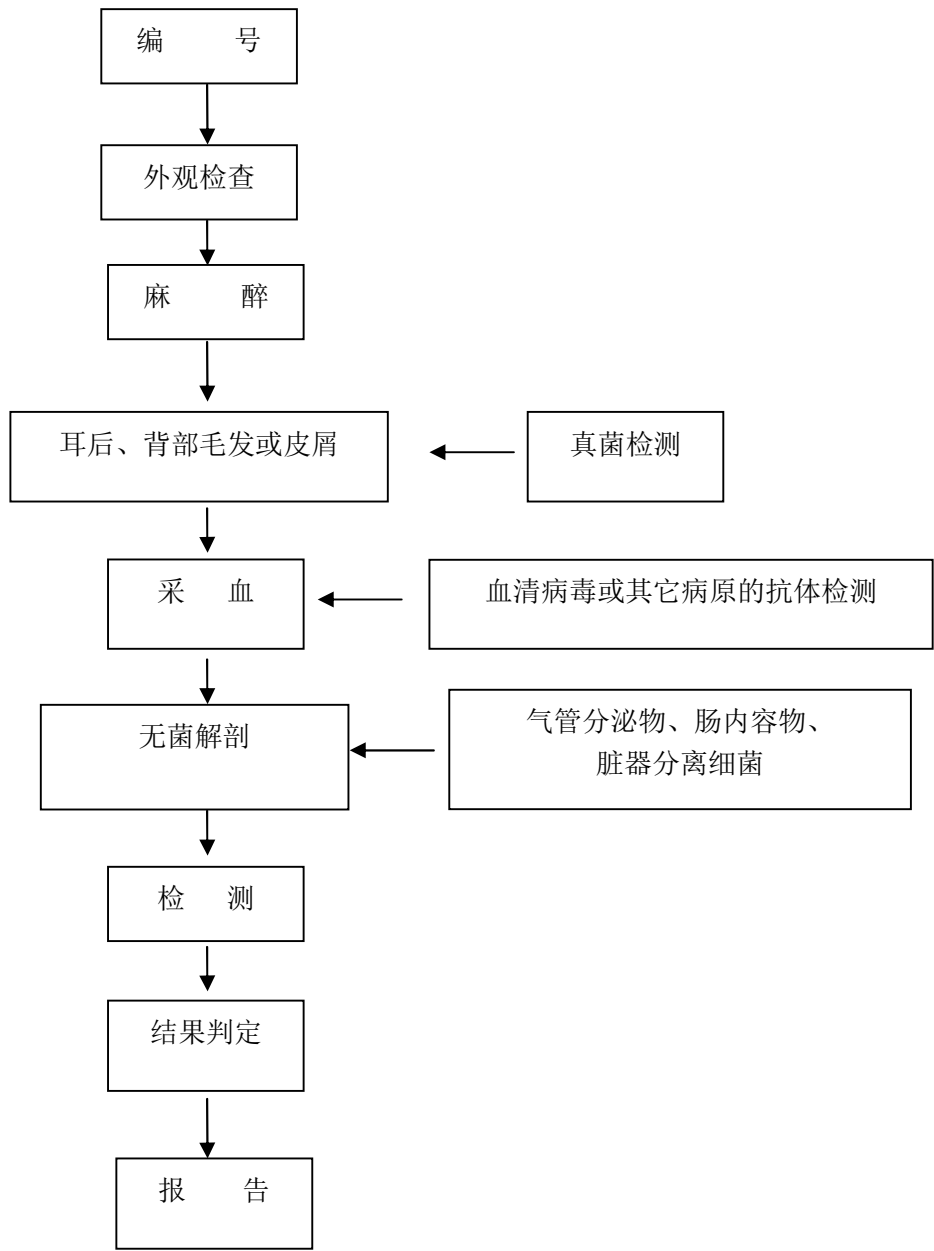


图1 检测程序

6 检测规则

6.1 检测频率

每年检测一次。

6.2 采样

6.2.1 方式

选择 8 周龄以上中国地鼠用于检测，随机取样。新鲜粪便样本应在饲养单元中选取至少 4 个点随机取样。

对同一只中国地鼠，按寄生虫、微生物要求联合采样。

6.2.2 方法

采样方法详见 NY/T 541-2002 第 3 章样品的采集。

6.2.3 数量

根据中国地鼠群体大小，采样数量见表 3。

表3 中国地鼠微生物学采样数量

群体数量（只）	采样数量 ^a （只）
<100	≥5
100~500	≥10
>500	≥15
^a 血清≥0.5 mL/只；每个隔离器至少检测 2 只。	

6.3 送检要求

样本要求有明显标识，安全送达实验室，送检单应写明检品名称、品系、等级、数量及检测项目等内容。

7 检测方法

检测方法见表 4。

表4 中国地鼠微生物检测方法

微生物检测项目	方法
沙门氏菌	GB/T 14926.1-2001
耶尔森菌	GB/T 14926.3-2001
皮肤病原真菌	GB/T 14926.4-2001
多杀巴斯德杆菌	GB/T 14926.5-2001
支气管鲍特杆菌	GB/T 14926.6-2001
泰泽病原体	GB/T 14926.10-2008
嗜肺巴斯德杆菌	GB/T 14926.12-2001
肺炎雷克伯杆菌	GB/T 14926.13-2001
金黄色葡萄球菌	GB/T 14926.14-2001
绿脓杆菌	GB/T 14926.17-2001
肺炎链球菌	GB/T 14926.15-2001
乙型溶血性链球菌	GB/T 14926.16-2001

淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒	GB/T 14926.18-2001
仙台病毒	GB/T 14926.23-2001
小鼠肺炎病毒	GB/T 14926.24-2001
呼肠孤病毒Ⅲ型	GB/T 14926.25-2001
无菌动物生活环境及粪便标本的检测	GB/T 14926.41-2001
念珠状链杆菌	GB/T 14926.44-2001
结核分枝杆菌	GB/T 14926.48-2001
狂犬病病毒	GB/T 14926.56-2008
白喉棒状杆菌	详见附录A
人流感病毒	详见附录B

8 结果判定

在检测的各等级动物中，如有一项指标不符合该等级标准指标要求，则判为不符合该等级标准。

9 报告

报告应包括检测结果、检验结论等内容。

附 录 A
(规范性附录)
实验中国地鼠白喉棒状杆菌的分离鉴定方法

A.1 材料

A.1.1 主要试剂

咽拭子、普通琼脂培养基、血平板、麦康凯平板、各种糖(醇)等发酵管、普通琼脂斜面培养基、尿素琼脂斜面培养基、明胶培养基、3% H₂O₂ 溶液。

A.1.2 主要仪器

普通恒温培养箱、光学显微镜。

A.2 方法

A.2.1 动物的取材

用无菌棉签采取中国地鼠咽拭子。

A.2.2 操作步骤

A.2.2.1 氧化酶试验

将滤纸片浸泡于 1% 盐酸四甲基对苯二胺试剂中制成试剂纸片，取菌涂于试剂纸上，细菌在与试剂接触 10 秒内呈深紫色，则为阳性。

A.2.2.2 鉴定

A.2.2.2.1 形态与染色

革兰氏阳性棒状杆菌；易染颗粒染色发现黄褐色的菌体，菌体一端粗大，易染颗粒呈黑色，排列不规则。

A.2.2.2.2 培养特性

经 37℃ 培养 24 小时后，在麦康凯平板不生长，血平板生长菌落为灰白色，圆形、光滑，并有狭窄溶血环。

A.2.2.2.3 生化反应

氧化酶阴性、触媒阳性、发酵葡萄糖、半乳糖、麦芽糖、果糖产酸不产气，不发酵乳糖、甘露醇，蔗糖不分解，不产生吡啶，能还原硝酸盐，明胶不液化，不分解尿素。

附 录 B

（规范性附录）

实验中国地鼠流感病毒的实时荧光 PCR 检测方法

B.1 材料

B.1.1 主要试剂

总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒；根据流感病毒的基质蛋白（M）基因保守区域设计与合成的 PCR 通用型引物和探针：

上游引物：CTTCTAACCGAGGTCGAAACG；

下游引物：GATTGGTCTTGTCTTTAGCCA；

探针序列：TCAGGCCCCCTCAAAGCCGAGAT，

荧光报告集团 5'-HEX，3'-BHQ1

B.1.2 主要仪器

Real-time PCR 仪、冷冻离心机、恒温水浴箱、电泳仪、酶标仪、凝胶成像系统。

B.2 方法

B.2.1 样品取材

采取中国地鼠鼻咽分泌物，液氮速冻后-80℃保存备用。

B.2.2 标本总RNA提取和cDNA第一链的合成

用 RNA 提取试剂盒提取中国地鼠鼻咽分泌物总 RNA，具体操作按说明书进行。经酶标仪测定浓度，通过 OD_{260}/OD_{280} 比值判定 RNA 质量和浓度。反转录体系和步骤按照试剂盒说明书进行。

B.2.3 Real-time PCR检测流感病毒

反应总体积：25 μ l，反应体系为：Premix Ex Taq TM (1 $\times$)、荧光探针 0.8 μ mol/L、上下游引物各 0.4 μ mol/L、标本 cDNA，反应管内加入的质粒拷贝数分别为 5×10^8 、 5×10^7 、 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、 5×10^1 、 5×10^0 ，进行扩增反应。反应程序采用两步法：95℃ 预变性 1 min；95℃ 10 s，60℃ 30 s，共 40 个循环。通过收集的荧光曲线和 CT 值计算机自动绘制标准曲线，并对流感病毒进行定量。

B.3 结果判定

收集到典型的 S 型扩增曲线判为阳性。对阳性检测结果，选用同一种或另一种方法重试，如仍为阳性则判为阳性。