

第六章 T/CALAS 32—2017《实验动物 爪蟾生产和使用指南》实施指南

第一节 工作简况

2017年3月,广东省实验动物监测所提出立项申请,经全国实验动物标准化技术委员会审查同意,由中国实验动物学会下达《实验动物 爪蟾生产和使用指南》团体标准编制任务,承担单位为广东省实验动物监测所。

为明确国内实验爪蟾的生产和使用现状,以及对标准的需求,确保《实验动物 爪蟾生产和使用指南》的科学性和适用性,标准工作组对我国爪蟾生产和使用单位进行了调研,包括暨南大学、南方科技大学等。同时,工作组对爪蟾质量控制相关的文献资料进行了全面检索,检索数据库包括NCBI、Xenbase、CNKI等,系统整理总结了国内外实验爪蟾的质量控制研究进展。

标准工作组引进非洲爪蟾和热带爪蟾,并在实验室开展繁育和质量控制技术研究。对非洲爪蟾和热带爪蟾的形态进行对比,并结合形态学分类知识和分子生物学分类验证,筛选非洲爪蟾和热带爪蟾简单、可行的形态学鉴别指标。参考*The Laboratory Xenopus sp.*等指南关键技术点,对爪蟾健康检查方法进行了整理和提炼,并定期开展检查和监测验证,包括病原分离、水质检测和水环境微生物检测等;根据国内外文献研究结果,对爪蟾危害严重的病原进行了归类,并开展了检测方法验证,包括嗜水气单胞菌、脑膜炎败血伊丽莎白菌等,筛选确定了病原微生物检测指标和检测方法。饲料和养殖环境方面,采纳国外爪蟾养殖指南的经验数据,并在实验室养殖过程中进行了连续的监测和数据积累。

综合调研和技术研究结果,并广泛征求意见,形成本标准稿。

第二节 工作过程

2017年3~4月,广东省实验动物监测所成立工作组,系统启动文献检索和资料调研工作,召开工作组会议,讨论并确定了标准编制的原则和指导思想;制订了编制大纲和工作计划,编制该标准的征求意见稿和编制说明初稿。

2017年6~7月,中国实验动物标准化技术委员会发出《关于第二批中国实验动物学会团体标准征求意见的通知》,向各省(自治区)实验动物管理委员会、学会、各有关单位及专家征求意见,发送《征求意见稿》的单位12个,提出意见单位4个,提出意见数量24条。

2017年8~9月,全国实验动物标准化技术委员会于北京举行全国实验动物标准化技术委员会年会暨标准审查会,会议对标准进行审查,共提出10条意见。工作组整理汇总专家对本标准征求意见稿提出的问题,同时对标准格式进行了规范,最终形成标准送审稿和编制说明。

2017年10月10日,编写组就8月30日的专家意见进行了讨论修改,形成了报批稿。

2017年12月29日,中国实验动物学会第七届理事会常务理事会第一次会议批准发布包括本标准在内的《实验动物 教学用动物使用指南》等23项团体标准,并于2018年1月1日起正式实施。

第三节 编写背景

爪蟾作为两栖类的代表动物,已有超过150年的研究历史,因具有产卵量大、体外受精、胚胎体外发育、卵径大、养殖成本低、比果蝇和线虫更高等的优点,自20世纪50年代以来,以非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)和热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)为代表的爪蟾属动物已成为胚胎学、发育生物学、生理学、生态学、毒理学、遗传学、分子生物学等研究的重要模式动物。

在疾病模型研究和应用领域,因实验爪蟾具有体外受精发育,可全程观察胚胎发育,现已建立众多人类疾病动物模型,如恶性肿瘤、心血管疾病、遗传疾病等。在药物筛选和评价方面,利用爪蟾受精卵评价激素、中药提取物、小分子化合物、微生物、细胞色素c、重组蛋白等对胚胎发育的影响。在发育生物学和基因功能研究领域,利用器官分割技术及转基因技术研究爪蟾胚胎早期发育过程,包括背腹极性建立、原肠胚形成、中胚层形成、神经胚形成等,同时由于爪蟾在蝌蚪开始喂食前的早期阶段心脏功能不完全,是研究心脏不对称发育机制的重要材料。在生态毒理学研究领域,Kloas等于1999年最早报道酚类物质对非洲爪蟾内分泌的干扰作用,并明确提出非洲爪蟾可作为内分泌干扰的模型;Hayes等研究发现阿特拉津可诱导非洲爪蟾出现双性;美国Fort环境实验室多年来致力于FETAX的开发和利用,利用非洲爪蟾胚胎对多种环境污染物和环境样品的发育毒性进行评价。随着非洲爪蟾和热带爪蟾全基因组序列的解析,爪蟾的研究和使用将会进一步增加。目前我国研究和使用爪蟾的单位超过40家,并呈逐年上升趋势。

实验动物质量是关系动物实验结果科学性和可靠性的一个至关重要的因素。作为生物学研究模型动物的爪蟾虽被使用多年,但是它还没能像其他模型动物那样做到真正的实验动物化,目前国际上仅制定了一些指引,如*Guidance on the housing and care of African clawed frog Xenopus laevis*、*Guidelines for Egg and Oocyte Harvesting in Xenopus laevis*、*Aquatic Frog Housing Density Guidelines-Animal Care and Use Program*、*Husbandry of Xenopus tropicalis*、*The Laboratory Xenopus sp.*等,没有有关爪蟾作为实验动物的严格的饲养管理及使用的标准。随着爪蟾应用领域和规模的日益拓展,迫切需要制定《实验动物 爪蟾生产和使用指南》,对爪蟾的生产和使用加以规范,确保爪蟾生产及其实验结果的质量。

第四节 编制原则

(1) 科学性。本标准充分借鉴了国外实验爪蟾质量控制的技术内容和指导原则,在 *Guidance on the housing and care of African clawed frog *Xenopus laevis**、*Guidelines for Egg and Oocyte Harvesting in *Xenopus laevis**、*Aquatic Frog Housing Density Guidelines-Animal Care and Use Program*、*Husbandry of *Xenopus tropicalis**、*The Laboratory *Xenopus* sp.*等指南基础上总结和提炼,对标准内容仔细推敲、验证,并广泛征求意见,确保标准内容的科学性。

(2) 可操作性。对我国爪蟾生产和使用单位开展了实地调研,并对标准内容的可操作性进行充分探讨,对标准指标参数和检验方法等进行了系统验证、监测,确保标准的可操作性。

(3) 充分考虑我国国情,符合我国技术发展水平。本标准在采纳国外实验爪蟾质量控制技术要点的基础上,充分考虑了我国实验爪蟾的养殖和应用现状,并广泛征求了意见,符合我国实验爪蟾技术发展水平。

第五节 内容解读

一、范围

规定了标准的基本内容和适用范围。

本标准是实验爪蟾质量控制的基本要求,包括爪蟾的种质鉴定、病害预防、饲料、设施与环境及其检测方法。

本标准适用于实验爪蟾,包含非洲爪蟾和热带爪蟾。此两种爪蟾为用于发育生物学、细胞生物学等科学研究及教学、生产、检测等的两栖类代表性模式动物。

本标准的目的是通过借鉴国内外实验爪蟾管理经验和研究成果,指导、规范我国实验动物爪蟾的生产和使用,保障实验爪蟾和爪蟾实验的质量,促进我国实验动物学科的发展。

二、术语和定义

1. 标准条款:“3.1 实验爪蟾 *experimental clawed frog*: 经人工繁育,用于发育生物学、细胞生物学、毒理学、神经学、人类疾病和生殖缺陷模型等科学研究及教学、生产、检测等的两栖类动物,包括非洲爪蟾和热带爪蟾。”

按指南培育、饲养的旨在用于各种科学目的的科学研究、教学、检测等的爪蟾,包括非洲爪蟾和热带爪蟾,为两栖类代表性模式动物。本定义的理解需要注意以下几点:①实验爪蟾是按指南要求来培育的,区分于野生爪蟾和粗放式养殖的爪蟾;②以教学、检测或科学实验为目的而培育的爪蟾;③为两栖类模式动物的代表,仅包括应用较多的非洲爪蟾和热带爪蟾两种。

2. 标准条款: “3.2 养殖单元 breeding unit: 用于爪蟾繁育、由同一水体及相关设施设备组成的一个单位。”

养殖单元是一个养殖群体的养殖空间度量单位。由于爪蟾终生生活在水中, 水是其病原传播的重要媒介, 因此同一水体内的所有养殖个体视为一个养殖群体, 即同一水体及相关设施设备等组成一个养殖单元。同一个水循环系统内(可能包含多个养殖箱)视为一个养殖单元, 而独立进排水的养殖箱则视为不同的养殖单元。

3. 标准条款: “3.4 蝌蚪 tadpole: 受精卵孵出至尾完全被吸收的爪蟾。”

爪蟾蝌蚪经历了孵化后各器官的发育完善、四肢的出现到最后尾逐渐被吸收等一系列的变化过程, 我们选取了受精卵孵出作为蝌蚪的起始点, 尾被完全吸收作为终点, 通过两个典型特征定义“蝌蚪”。

4. 标准条款: “3.5 幼蟾 froglet: 从蝌蚪变态发育完全到接近达到性成熟的爪蟾。”

幼蟾一般是指蝌蚪变态发育完全, 也就是尾完全吸收后, 从形态上讲已与成蟾无差异, 逐渐发育到接近性成熟的爪蟾。接近达到性成熟是一个比较难量化的概念, 如果从性腺发育来定义操作上较为麻烦, 我们根据日常的养殖经验及相关文献进行归纳总结, 认为非洲爪蟾在 20℃ 下养殖约 500 天可以达到接近性成熟, 热带爪蟾在 26℃ 下养殖约 150 天可以达到接近性成熟。

5. 标准条款: “3.6 成蟾 adult frog: 性腺已发育成熟的爪蟾。”

同幼蟾定义的问题一样, 性腺是否发育成熟通过解剖来观察较为麻烦, 对于有些繁殖实验也不现实。我们对日常的养殖经验及相关文献进行了归纳总结, 认为非洲爪蟾在 20℃ 下养殖超过 500 天性腺已发育成熟, 热带爪蟾在 26℃ 下养殖超过 150 天性腺已发育成熟。不同养殖情况下爪蟾性腺发育存在差异, 如需进行繁殖实验, 可将养殖时间适当延长。

三、标准正文

(一) 遗传

1. 标准条款: “4.1 分类地位非洲爪蟾和热带爪蟾隶属于两栖纲 (Amphibia)、无尾目 (Anura)、负子蟾科 (Pipidae)、爪蟾属 (*Xenopus*)。”

非洲爪蟾和热带爪蟾为同属物种。

2. 标准条款: “4.2.1 习性: 爪蟾终生水栖, 自然状态下喜栖息于温暖、泥质底的淡水水体中, 早春至早秋期间繁殖, 温度低于 8℃ 或干旱时进入休眠状态; 适宜温度下, 可常年繁殖。非洲爪蟾可存活 25~30 年, 热带爪蟾可存活 5~20 年。”

非洲爪蟾和热带爪蟾虽为两栖类, 但在习性上有别于传统两栖类, 为终生水栖, 不能离水生活。在自然环境中, 从早春至晚秋期间繁殖, 温度低于 8℃ 或干旱时会进入休眠状态, 待环境条件转好后复苏。在人工养殖条件下, 通过控制温度等环境条件, 爪蟾可常年繁殖。

3. 标准条款: “4.2.2 分布: 原产于非洲, 非洲爪蟾分布范围南至南非南部、北至苏丹东北、西至尼日利亚西部, 肯尼亚、喀麦隆、刚果共和国也有分布; 热带爪蟾主要分布于塞内加尔至喀麦隆西北部和萨纳加河西部”。

非洲爪蟾和热带爪蟾均原产于非洲, 爪蟾分布是指其原产地分布范围, 随着爪蟾作为模式动物的广泛应用, 现已传播到全球多个国家和地区。

4. 标准条款：“4.3 形态特征”

我国用于科学研究的爪蟾属实验动物仅见非洲爪蟾和热带爪蟾，因两种爪蟾传统形态学分类特征均已较为清楚，为方便各使用和生产单位快速鉴别两种爪蟾，标准中仅列出两种爪蟾最典型的两个特征，分别为成体个体大小和角质爪数量，在实际生产和使用过程中非洲爪蟾与热带爪蟾成体体型差异较大，热带爪蟾一般只有非洲爪蟾的 1/3，通常较易分辨，且热带爪蟾的内趾突角化成爪，是区分二者另一重要特征；在蝌蚪期二者从形态上较难分辨，可采取后续染色体方法进行鉴别。

5. 标准条款：“4.4 染色体数目”

非洲爪蟾为四倍体，染色体数目为 72；热带爪蟾为二倍体，也是爪蟾属唯一的二倍体生物，染色体数目为 20。

6. 标准条款：“4.6 检测方法”

为方便快速区分和鉴别两种爪蟾，标准给出了形态鉴定为主、染色体鉴定为辅的方法；用于种质检测的取样数量理论上是越多越准确，但数量过多会增大工作量，造成浪费，综合考虑我国实验爪蟾养殖现状和可操作性，建议取样数量按引进爪蟾数量的 6% 抽样，每次不少于 5 只，最多不超过 30 只。优先抽取可疑样品，可最大限度地排除混杂可能；形态测量按照传统方法测量，染色体检测可参照标准 GB/T 18654.12《养殖鱼类种质检验 第 12 部分：染色体组型分析》。

7. 标准条款：“4.7 判定方法如下：a) 形态符合规定，判定为合格；b) 形态存在差异或不可检测时，补充染色体检测，染色体数目符合规定，判定为合格。”

如形态检测符合特征，则判定为合格；如形态检测存在差异或蝌蚪期较难从形态上进行判定时，增加染色体检测方法，染色体数目符合规定，则判定为合格。染色体检测通常为较简单粗放的方法，因国内用于实验动物的爪蟾属物种只有非洲爪蟾和热带爪蟾，二者染色体差别较大，可利用此方法进行区别。

8. 标准条款：“附录 A 饲养管理”

国内外爪蟾研究机构制定了较多关于爪蟾饲养管理的文献、书籍、指南、标准及实验室 SOP (Animal Care and Use Program: AQUATIC FROG HOUSING 和 Amphibian Care & Handling 等)。本标准在综合上述资料的基础上，结合国内爪蟾饲养管理现状，制定了爪蟾的饲养管理指南。

爪蟾饲养管理包含了繁殖、孵化、饲养、养殖密度、日常管理和运输。亲蟾性腺发育质量是能否获得高质量受精卵的关键，在繁殖时亲蟾的选择尤为重要，标准中给出了雌雄亲蟾选择的参考规范；在“繁殖”章节，实际生产和使用过程中通过人工催产获取卵子和精子的方式较为常见，包括注射 HCG 激素人工催产、人工取卵和取精、人工授精，也可通过自然交配方式产卵；孵化时孵化密度尤为重要，初始时可保持约 100 粒/90mm 培养皿的密度，随着受精卵的分裂，需及时调整孵化密度。此外，保持卵的分散是保证高孵化率的关键要素。

蝌蚪期饲养分为两个阶段，分别为 5 日龄前和 6 日龄至尾完全被吸收阶段。5 日龄前不需投喂，不充氧，于 0.75 g/L 的盐水中养殖，每天更换 50% 养殖水。6 日龄至尾完全被吸收阶段，投喂配合饲料，每天投喂 3~8 次，每次投喂量以 15 min 内吃完为宜。

幼成蟾期间每天投喂 1 次即可,投喂期间禁止惊扰爪蟾。在惊扰状态下,爪蟾会发生应激反应,有反刍现象。静水养殖每 2 天换水 1 次,每次换水量 100%,循环水养殖系统每周换水 1/3。水质因子的稳定是养殖的关键,应尽量保持换水前后水质因子一致。

每天观察爪蟾的生活状态是日常管理的重要环节,发现异常应及时处理。

随着科学交流的频繁,利用公共邮递系统进行爪蟾的运输也十分常见,运输过程中涉及的包装材料、标签、运输温度、密度和运输时间均需进行控制,标准给出了爪蟾适宜的运输条件。

(二) 病害预防与检测

1. 标准条款:“5.1 主要病原及其症状”

本标准列举的爪蟾病原遵循确定感染和危害较大两个基本原则。主要病原指标及症状依据 *The Laboratory Xenopus* sp. 第 4 章和国内外文献研究结果,为爪蟾微生物质量控制和健康检查提供参考。而本标准之外可能感染爪蟾并引起危害的病原,根据生产或使用单位需求进行预防和监测。

2. 标准条款:“5.2 病原控制”

病原控制是预防爪蟾病害发生的重要举措。病原控制首先需要从源头开始,新引进的爪蟾须经过隔离检疫,确定健康后方可进入养殖区域。隔离检疫过程需尽可能降低爪蟾应激反应,减少发生病害的风险,包括运输过程中和运输到达时水温、水质差异等均应控制在适度范围内,例如,运输到达时,缓慢、多次向运输容器添加养殖水(不超过运输水总体积的 20%)以达到水质条件缓慢变化和平衡的目的;其次,为了降低交叉感染的风险,不同来源、不同批次的爪蟾应置于不同养殖单元饲养,且隔离期 2 周以上为宜;此外,隔离期间,尽量减少隔离区的人流和物流,进出工作人员应做好病原防护措施,避免携带病原和交叉感染;最后,隔离结束后隔离区域要做好清理和消毒工作,避免病原潜伏和传播。

隔离检疫合格的爪蟾进入养殖区域正常养殖,日常病原控制措施也是必不可少的。由于爪蟾生活在水中,一切与水接触的物品均可能携带和传播病原,因此日常管理措施包括养殖设施设备使用前的消毒处理、养殖水和养殖工具的消毒处理等。其中,养殖前为了保证整个养殖区域消毒无死角,建议采用紫外线照射、醋酸熏蒸或 84 消毒液喷洒等消毒方式,覆盖面广,且对设施影响较小。养殖水采用 0.5 mg/L 高锰酸钾溶液或 2 mg/L 漂白水溶液等消毒,消毒频次根据养殖条件 and 水质状况而异,循环水系统如自带水质净化系统,则可对水体消毒,定期更换洁净养殖箱即可,而静水养殖或半流水养殖可增加消毒次数。养殖工具直接接触爪蟾和养殖水体,须保证洁净和避免交叉使用,每周至少彻底消毒 1 次。异常个体应及时捞出处理,切断可能的传播源。

3. 标准条款:“5.3 健康检查”

健康检查能尽早发现爪蟾异常个体,并及时采取措施隔离潜在的病原传播源,对预防和控制病害发生具有重要意义。爪蟾健康检查内容参考 *The Laboratory Xenopus* sp. 第 4 章的健康检查技术要点。为了尽可能减少健康检查过程对爪蟾产生的影响,本标准将健康检查内容分为日常检查和定期检查两个部分。日常检查主要包括肉眼易观察到的异常情况,如爪蟾体表皮肤脱落、行为异常等;对需要接触爪蟾进行细致观察的异常情况,定期检查即可(每月至少一次),如趾蹼有出血点、口腔有异物等,以减少对爪蟾的影响。

4. 标准条款：“5.4.1.1 抽样方法：一个养殖单元内随机取样”

实验爪蟾病原主要通过水体、各种操作工具、饵料等方式进行传播，水是最重要的传播媒介，因此抽样是以同一水环境下的养殖单元为单位。

5. 标准条款：“5.4.1.2 抽样数量”

用于病原检测的采样数量理论上是越多越准确，但数量过多会增大工作量，造成浪费。而且，目前国内实验爪蟾群体基数普遍不大，取样数量过多不利于检测工作的实施和推广。综合考虑我国实验爪蟾养殖现状和可操作性，建议取样数量按养殖单元内的群体数量 5% 取样，最小采样量为 5 尾，最大取样量 30 尾。水体中的微生物含量是动态变化的过程，正常情况下微生物含量较低，检测水体中的微生物理论上也是体积越多越准确，但同时也存在体积过大增加工作量的问题。本标准参照 GB 4789.7《食品安全国家标准 食品微生物学检验 副溶血性弧菌检验中对液体样品取样要求》，在养殖单元内随机取 25 mL 水样进行检测。

6. 标准条款：“检测指标”

实验动物微生物控制指标首先需要符合我国动物疫病相关法规规定，同时要排除对爪蟾危害程度大的烈性传染病病原。本标准要求蛙虹彩病毒、脑膜炎败血伊丽沙白菌、致病性嗜水气单胞菌为必检指标，其他为必要时检测指标。具体说明如下。

(1) 蛙虹彩病毒 *Ranavirus*

《水生动物疾病诊断手册》(OIE) 规定鱼类虹彩病毒是需向 OIE 申报的病原，而蛙虹彩病毒已确定为爪蟾的病原，常表现为短时间内暴发性死亡，列为爪蟾重点监测病原，为必检指标。

(2) 脑膜炎败血伊丽沙白菌 *Elizabethkingia meningosptica*

《一、二、三类动物疫病病种名录》规定脑膜炎败血伊丽沙白菌为两栖类动物三类疫病，Green 等研究表明该病原对爪蟾具有强致病性和传染性，死亡率高达 35%，且感染后死亡率 100%，因此该病原需要严格控制，列为必检指标。

(3) 嗜水气单胞菌 *Aeromonas hydrophila*

《一、二、三类动物疫病病种名录》规定嗜水气单胞菌为鱼类二类疫病，而嗜水气单胞菌对实验室条件下爪蟾具有较高发病率 (14/50) 和死亡率 (10/14)，且常引起其他病原混合感染，因此也列为爪蟾重点监测病原。但嗜水气单胞菌常存在于养殖水体中，为条件致病菌，因此本标准以致病性嗜水气单胞菌为必检指标。

(4) 其他病原

除上述病原外，文献研究表明，水霉 *Saprolegnia* spp. 为爪蟾条件致病菌，在实验室养殖条件下爪蟾偶有发病的报道；而分枝杆菌 *Mycobacterium* spp.、毛细线虫 *Pseudocapillarioides* spp.、小杆线虫 *Rhabdias* spp.、隐孢子虫 *Cryptosporidia* spp. 对爪蟾危害严重，但在野外较为常见或具有严格的生活史，因此这类病原指标在不同地区、不同养殖条件下感染概率存在差异，爪蟾生产和使用者可根据自身养殖特点及需求在必要时进行检测。

7. 标准条款：“5.4.1.4 检测频率：每 6 个月至少检测 1 次”

对于病原潜伏感染而未表现出异常症状的实验爪蟾，定期抽样进行病原检测是必要的，但检测频率过高势必会增加检测工作量，影响群体数量，增加养殖成本。基于目前国内实

验爪蟾养殖规模和数量有限,考虑到可行性,建议每6个月至少随机抽样检测1次,期间发现异常爪蟾,随时取样进行检测。爪蟾性成熟周期至少在半年以上,6个月检测1次的频率可保证爪蟾在繁殖前其所在群体至少抽检1次以上,可较好地了解其微生物质量状况。

8. 标准条款:“5.4.2 检测方法”

常用的细菌检测方法包括传统生化鉴定法和分子生物学鉴定法。生化鉴定作为细菌鉴定的经典方法,仍是细菌鉴定的基础;而对于同属种较多、生化鉴定较难区分的细菌,分子生物学方法是对其进行区分的有效补充,因此本标准建议细菌鉴定首先进行分离、培养和生化鉴定。分枝杆菌生长周期较长,生化鉴定操作难度大,可根据其菌落形态特征和细菌特性(抗酸染色)进行初步鉴定,并结合PCR方法进行检测确认。生化鉴定有生化管法、试剂盒法及半自动或全自动细菌鉴定试剂条法等。目前,采用半自动或全自动的细菌快速鉴定试剂条已成为国际细菌鉴定金标准,因此本标准建议采用半自动或全自动的细菌快速鉴定试剂条法进行鉴定,也可按已有标准方法进行鉴定(如致病性嗜水气单胞菌参考GB/T 18652)。

真菌的孢子和菌体较大,在显微镜下可见其形状和特征,因此本标准建议在病灶部位取样后,通过临床症状和镜检观察真菌孢子形态特征即可初步判定是否为真菌感染,种类鉴定可采用PCR的方法确定。

病毒较难分离和培养,因此本标准建议采用PCR的方法进行检测。

寄生虫个体较大,通过肉眼或显微镜观察,根据其形态特征进行检测。

9. 标准条款:“5.4.3 判定”

5.4.3是对实验爪蟾微生物质量的判定。当样品检出三种必检病原时,判定该养殖单元内的爪蟾不合格,需淘汰或隔离净化处理;当样品检出其他病原时,根据生产和使用者需求,可采取淘汰发病个体或隔离观察等措施进行处理。

10. 标准条款:“附录B”

附录B是对细菌和真菌的检测方法进行的规定,包括样品准备、取样部位、细菌培养及鉴定等。为了防止环境微生物对检测的影响,爪蟾在剖剪取样前需用75%乙醇消毒体表,取样过程需要无菌操作。不同病原感染爪蟾的部位有所差异,根据病原感染部位针对性取样,可以提高病原检出率。取样部位参考*The Laboratory Xenopus* sp.第4章的诊断方法,每个样品至少检测一个规定部位。水样经过0.2 μm滤膜过滤后,滤膜在1 mL无菌水中反复冲洗,制成浓缩的水样检测液用于病原分离和检测,从而提高水体中病原微生物的检出率。

11. 标准条款:“附录D”

附录D是对微生物PCR检测方法进行的规定。为了保证PCR检测结果的可靠性,每次检测需设立阳性对照组和阴性对照组,对非特异性PCR引物,需对扩增结果进行测序,并在NCBI数据库中进行分析比对。不同基因其保守性不一样,故判定同种的相似度仍无定论,因此本标准建议在比对分析时,90%以上相似序列判定为同种。

(三) 饲料

1. 标准条款:“6.1 配合饲料分类:爪蟾配合饲料分为蝌蚪粉料、蝌蚪颗粒料、幼蟾颗粒料和成蟾颗粒料4个类别,各类饲料规格应符合表2的要求。”

国外商品爪蟾饲料品牌Nasco将爪蟾饲料分为蝌蚪饲料、变态后饲料、幼蟾饲料和成蟾饲料,SC/T 1056—2002《蛙类配合饲料》标准将蛙类饲料分为蝌蚪粉料、蝌蚪粒料、仔

蛙料、幼蛙料和成蛙料。综合其他几种爪蟾商品饲料的分类及养殖经验的总结,将爪蟾配合饲料分为蝌蚪粉料、蝌蚪颗粒料、幼蟾颗粒料和成蟾颗粒料4个类别,且4个类别的饲料也分别对应了蝌蚪无明显四肢出现的阶段、蝌蚪的变态期、幼蟾期和成蟾期。

Nieuwkoop 和 Faber 在文章 *Normal Table of Xenopus laevis* (Daudin) 中将非洲爪蟾胚胎发育和蝌蚪的发育分为58个期,并说明了在23℃条件下发育到各期需要的时间。从养殖角度讲,可将56期也就是38日龄之前视为无明显四肢出现的阶段,由于胚胎发育期及孵化后4~5天都可以由卵黄提供营养,不需要摄食,所以非洲爪蟾开始投喂的时间为7日龄左右,非洲爪蟾蝌蚪粉料对应的养殖时间为7~38日龄。56~58期也就是39~60日龄左右可视为蝌蚪的变态期,应投喂蝌蚪颗粒料。*The Laboratory Xenopus sp.*指出非洲爪蟾的世代交替时间为1~2年,我们根据实际的养殖经验,将非洲爪蟾接近达到性成熟时间定为500日龄,所以61~500日龄的非洲爪蟾应投喂幼蟾饲料,大于500日龄的爪蟾应投喂成蟾饲料。《热带爪蟾繁殖生物学及其人工养殖研究》中指出蝌蚪出膜5天便可喂食,大约60%的蝌蚪在3周左右能长出后肢,5周左右能长出前肢,7~8周完全变态为幼蟾。同时,根据我们长期的养殖经验,将热带爪蟾蝌蚪粉料适宜日龄的范围定为7~35日龄,蝌蚪颗粒料适宜日龄范围为36~55日龄。*The Laboratory Xenopus sp.*指出热带爪蟾的世代交替时间小于5个月,所以我们将非洲爪蟾接近达到性成熟时间定为150日龄,56~150日龄的热带爪蟾应投喂幼蟾饲料,大于150日龄的爪蟾应投喂成蟾饲料。

对于不同类别饲料的粒径,文献和相关的商品介绍中很少有提及,标准里的粒径数据主要依靠对各品牌各期商品饲料粒径的实测数据及投喂效果的反馈。

2. 标准条款:“6.2 技术要求”

(1) 标准条款:“6.2.1 原料要求:应符合 GB/T 14924.1 的规定。”

GB/T 14924.1 对于饲料原料的质量要求规定:①本标准中的饲料原料是指为提供动物生长所需的蛋白质和能量的单一饲料原料,不包括饲料添加剂;②饲料原料如玉米、高粱、大豆、小麦和花生等均应符合标准列出的原料国家或行业标准的质量指标;③在实验动物配合饲料中使用的饲料添加剂执行其相关的国家和行业标准,不得使用药物添加剂;④为了保证实验动物的正常生长,饲料原料不得使用菜籽饼粕、棉籽饼粕、亚麻仁饼粕等含有有害毒素的饲料原料;⑤不得使用发霉、变质或被农药及其他有毒有害物质污染的饲料原料。

(2) 标准条款:“6.2.2 感官指标:色泽、颗粒大小均匀;无霉变、变质、结块和虫蛀现象;无霉味、酸败等异味。”

为实验动物饲料标准通用要求。

(3) 标准条款:“6.2.3 加工质量指标:应符合表3的规定。”

爪蟾饲料的加工质量标准主要参考 SC/T 1056—2002《蛙类配合饲料》和 SC/T 1077—2004《渔用配合饲料》通用技术要求。SC/T 1056—2002 中规定各型号蛙饲料原料粉碎粒度(筛上物)均应 $\leq 5\%$ 。SC/T 1056—2002 中指出各型号蛙饲料的混合均匀度(变异系数)应不大于5%,SC/T 1077—2004 规定蛙类颗粒饲料的水中稳定度应满足“浸泡60 min,颗粒不开裂,表面不开裂、不脱皮”。

(4) 标准条款:“6.2.4 营养成分指标:爪蟾配合饲料常规营养成分指标应符合表4规定,氨基酸、维生素、矿物质和微量元素成分推荐值见附录F。”

配合饲料的常规营养成分指标,即饲料配方。按合适的饲料配方生产出的饲料即为配合饲料。配合饲料营养全面,可提高营养物的消化利用率,降低饲料成本,并能很好地促进爪蟾的生长繁殖,可降低变态期蝌蚪的死亡率。

实验爪蟾配合饲料常规营养成分指标主要参考了爪蟾相关营养试验的数据、国外商品爪蟾饲料含量参数,综合总结得出。氨基酸、维生素、矿物质和微量元素成分推荐值可查的相关文献较少,数值主要来源于国外几种商品爪蟾的成分含量表,其含量为推荐值,不做强制要求。

3. 标准条款:“6.3 检测方法”

配合饲料各指标的检测方法均较为成熟,本标准直接引用相关检测标准。感官指标、原料粉碎粒度、混合均匀度、水中稳定性和卫生指标按照 SC/T 1056 的规定执行;配合饲料常规营养成分、氨基酸、维生素、矿物质和微量元素指标分别按照 GB/T 14924.9~GB/T 14924.12 的规定执行,氯化钠按照 GB/T 6439 的规定执行。

4. 标准条款:“6.4 检测规则:按照 SC/T 1056 的规定执行。”

SC/T 1056 中规定的蛙类配合饲料检测的取样、出厂检验、型式检验和判定规格均已较为规范,本标准参照执行。

(四) 设施与环境

1. 标准条款:“7.1 设施:地面、内墙和天花板都应使用无毒材料,且应易于清洗和消毒;应配备应急电源和漏电保护开关,电箱、插座和灯管等用电设施应有防水装置;门窗、下水道等与外界连通的部位应有预防敌害生物进入的设施。”

地面、内墙和天花板都应使用无毒材料,以免有毒材料分解污染室内空气及养殖设施。这些材料应易于清洗和消毒,以防霉菌等有害物质滋生。由于爪蟾养殖间一般湿度较大,电箱、插座和灯管等用电设施易老化受潮或生锈,应做好防水措施,避免漏电情况发生,实际操作中可在电箱有空隙与外界空气连接的地方涂抹防水胶,选择防水插座,选择密封较严密的 LED 灯、低压 LDE 灯或者防水灯,且漏电保护开关是必不可少的元件,一旦出现漏电可以及时切断电源。应急电源是保证停电时充气泵或循环泵等养殖系统基本设备正常运转的必备设施。外来敌害生物会给养殖间带来未知的病原及危害,在设施建造时应充分考虑到所有可能进入的外界敌害生物,并做好预防措施。

2. 标准条款:“7.2 设备”

标准条款:“7.2.2 辅助设备:应配有温湿度控制、照明、水质监测与消毒等辅助设备。”

养殖缸应选用无毒材质,防止有毒物质溶解到养殖水体里,对爪蟾有毒害作用。养殖缸应无锐边、尖角,内外壁光滑,因为爪蟾外皮很薄,如果养殖缸有锐边、尖角或者内外壁都很粗糙,爪蟾在缸内快速游动、打闹时,皮肤容易划伤或者撞伤。养殖缸应透明或者部分透明,以便于观察爪蟾的日常情况。出水口应根据养殖爪蟾的大小设置相应的隔离网。

养殖间内温湿度是生物养殖的最基本条件,温度一般用空调、加热棒或冷热机等设备控制,湿度用抽湿机控制。必须提供生物养殖和养殖人员操作所需的光照条件。养殖水体的定期监测可采用国家标准方法进行,也可采用便携式水质检测仪器(包括溶氧仪、pH 计、电导率仪和硬度计等)。

3. 标准条款：“7.3 环境”

(1) 标准条款：“7.3.1 养殖间环境：噪声小于 60 分贝；工作照度 ≥ 200 lx”

对很多动物（如哺乳类、鸟类等）的研究表明，高强度噪声对于动物通讯有损害作用。蛙类主要靠鸣叫声通讯，声传播效率下降会影响蛙类个体间识别、配偶关系、领域防卫等，所以应控制养殖间内噪声。目前两栖类适宜的噪声范围并无明确的规定，本标准参考了 GB 14925—2010 对于室内噪声的规定。工作照度是满足人员日常操作所需要的照度，如果光线太暗会导致视觉疲劳，工作照度参考 GB 14925—2010 的规定。

(2) 标准条款：“7.3.2 水环境”

a) 标准条款：“7.3.2.1 水环境指标：爪蟾水环境指标应符合表 5 要求。”

合适的温度是生物生存的必要条件，适宜的水温能促进水生动物的生长和繁殖。爪蟾对于温度的变化十分敏感，当温度低于适宜温度，它们的新陈代谢和免疫系统将会受到抑制；如果水温继续降低，就会出现冷休克或死亡；而当水温过高时，则会出现热休克甚至死亡。

过低的电导率会使爪蟾应激，流失体内的离子；同样，过高的电导率会增加爪蟾的渗透压负荷，浪费过多的能量，不利于爪蟾的生长发育。接近于爪蟾血液渗透压的电导率值会更加适宜爪蟾生长。

水的硬度主要是指钙镁离子的浓度。硬度偏高的水是雌性爪蟾卵母细胞发育的良好条件，也是显微注射时让爪蟾胚胎更加坚固的方法。

总碱度是衡量水体酸碱缓冲能力的一个重要的指标，对保证硝化细菌的硝化作用非常重要，不仅可以保持 pH 的相对稳定，还可以为硝化反应提供碳源，使有毒的氨氮氧化为无毒的硝酸盐，但这一过程会使总碱度慢慢降低，需要添加碳酸氢钠来稳定水体碱度。

pH 是反应水体酸碱度的指标，pH 过高或者过低都会对生物产生化学毒性。在生物忍耐范围内，pH 偏高会导致水体里的氨氮更多地以分子态存在，这对爪蟾的毒性更大；pH 偏低会抑制硝化作用和碳循环的效率。

溶解氧不仅可以为爪蟾的呼吸作用提供氧气，对于水体硝化系统的运行也是必不可少的。溶氧太低会导致爪蟾窒息，硝化系统效率降低，大量氨氮堆积；溶氧太高，过饱和的氧气又可导致爪蟾“气泡病”。

余氯具有强氧化性，可使爪蟾的皮肤黏膜及内脏黏膜溃烂，直接导致爪蟾死亡。应将余氯的值控制在安全范围内。

氨氮在水体有两种存在方式，即离子态和分子态。离子态氨氮没有毒性；分子态氨氮即非离子态氨，是一种与脂类有较高亲和力的物质，能轻易地穿过生物体的生物膜，使水生动物的免疫力下降；能渗入血液，降低血液载氧能力，从而导致机体呼吸机能下降，引起机体出现一系列的中毒症状，长期过高则将抑制生物的生长、繁殖，严重中毒者甚至死亡。

亚硝酸盐氮也是水体里的一种有毒物质，来源有氨氮的硝化作用、硝酸盐的还原作用及浮游植物的代谢作用。对水生动物来说，过量的亚硝酸盐会被吸收并与体内的血红蛋白发生反应而产生高铁血红蛋白，使血红蛋白的含量降低，不利于供氧，长时间会产生功能性贫血症、呼吸困难甚至窒息死亡，同时还会造成体内器官的损害。

硝酸盐本身没有毒性,但是硝酸盐可以被还原为亚硝酸盐甚至是氨氮,尤其是在厌氧的条件下,过量的硝酸盐不仅增加了被还原的压力,而且会使水体富营养化,藻类细菌大量繁殖。

光照强度对水生生物的生长发育有显著影响,主要对代谢与摄食产生影响,进而影响生长发育。光照对水生生物内分泌的影响是通过动物的视觉器官和中枢神经系统来刺激动物的分泌器官,特别是脑垂体的活动。

光照时间及昼夜更替的光信号刺激使生物体自身昼夜节律调节系统和外部环境保持一致,如睡眠-觉醒节律、运动节律及多种激素的分泌节律等,从而维持水生生物正常的生理及发育。光周期的稳定性和规律性能成为动物内源节律发生触动的因素,激素的分泌活动受光周期的影响。

b) 标准条款:“7.3.2.2 病原指标:养殖水环境中不得携带蛙虹彩病毒、脑膜炎败血伊丽莎白菌、致病性嗜水气单胞菌。”

爪蟾终生生活在水中,养殖水体是病原重要的传播途径和场所,因此有必要对爪蟾养殖水环境的病原指标进行控制。然而,养殖水体存在有益、有害等多种微生物,完全控制水环境中的微生物或无菌养殖操作难度大且没必要。养殖水体中的微生物多为条件致病菌,在水质、爪蟾体质等状况良好的情况下并不致病,因此本标准仅对水环境中三种危害严重的病原进行控制。

4. 标准条款:“7.4 检测方法:病原检测按照 5.4 的方法执行;环境项目检测方法按照附录 G 执行。”

病原检测方法见标准 5.4;环境项目检测方法均为常规方法见附录 G。

5. 标准条款:“7.5 检测频率:环境指标应至少每 6 个月检测 1 次。”

在监督检验时,环境指标应至少每 6 个月检测 1 次;对于实验室自检,常规环境因子如水温、24 小时温差、电导率、pH 等应每天检测 1 次。

第六节 分析报告

实验动物作为生物医学、药学甚至整个生命科学的重要研究基础和支撑条件,受到世界各国政府和科学家的重视及广泛关注。实验动物质量控制是保障动物实验科学、可靠的重要基础,是实验动物学科发展的必然趋势,能体现一个国家科学技术发展水平。为加强我国实验动物管理,我国政府相关管理部门发布了《实验动物质量管理办法》等一系列法规和强制要求,大、小鼠等啮齿类动物质量控制标准也已实施多年,极大地提高了我国实验动物质量,促进了我国生命科学技术的发展。本标准的制定,为我国实验动物爪蟾的质量控制提供了方法和依据,将规范我国实验爪蟾的生产和使用,极大地提高我国实验爪蟾的质量和 Related 科学技术水平。爪蟾作为两栖类实验动物的代表,是我国实验动物学科发展的重要补充,本标准的实施将提高我国两栖类实验动物标准化水平,对丰富我国实验动物学科内容、促进学科发展具有重要意义,应用前景广泛。

第七节 国内外同类标准分析

在实验爪蟾质量控制方面,国外已制定了一些指南,如 *Guidance on the housing and care of African clawed frog *Xenopus laevis**、*Guidelines for Egg and Oocyte Harvesting in *Xenopus laevis**、*Aquatic Frog Housing Density Guidelines-Animal Care and Use Program*、*Husbandry of *Xenopus tropicalis**、*The Laboratory *Xenopus* sp.*等;国内仅有湖南省地方养殖标准《DB43/T 1020—2015 非洲爪蟾室内养殖技术规程》。国内外至今尚无实验爪蟾质控标准,行业迫切需要制定《实验动物 爪蟾生产和使用指南》,以规范实验爪蟾的生产和使用,确保实验爪蟾的生产和使用质量。

第八节 其他说明

一、与法律法规、标准关系

本标准按 GB/T 1.1—2009 规则和实验动物标准的基本结构编写,与实验动物标准体系协调统一,与《实验动物管理条例》《实验动物质量管理办法》《实验动物许可证管理办法》《实验动物种子中心管理办法》等国家相关法规及实验动物强制性标准的规定和要求协调一致,是我国实验动物标准体系的重要补充。

二、作为推荐性标准的建议

本标准旨在规范和指导我国实验爪蟾的质量控制,促进实验爪蟾行业有序、较快发展。根据标准立项批复,本标准作为推荐性标准。

三、标准实施要求和措施

本标准作为我国首个实验爪蟾质量控制标准,标准制定经历了广泛的讨论、交流,使标准具有较强的科学性、先进性和适用性。

目前我国实验爪蟾质量良莠不齐,标准颁布后,工作组将通过现场培训、视频讲座、网站专栏、派发宣传资料等多形式、多途径宣传贯彻。标准颁布后,我们将建立示范基地,供全国实验爪蟾生产和使用单位人员学习、交流。

参考文献

- 陈爱平,江育林,钱冬,等. 2011,淡水鱼细菌性败血症. 中国水产, (3): 54-55.
- 陈爱平,江育林,钱冬,等. 2012. 蛙脑膜炎败血金黄色杆菌病. 中国水产, (5): 51-52.
- 全国动物防疫标准化技术委员会. 2002. GB/T 18652 致病性嗜水气单胞菌检验方法.
- 沈国鑫. 2008. 热带爪蟾繁殖生物学及其人工养殖研究. 南昌: 南昌大学硕士学位论文.
- 世界动物卫生组织(OIE)鱼病专家委员会组织. 2000. 水生动物疾病诊断手册. 北京: 中国农业出版社.

- Bravo Fariñas L, Monté Boada RJ, Cuéllar Pérez R, et al. 1989. *Aeromonas hydrophila* Infection in *Xenopus laevis*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 41 (2): 208-213.
- Brayton C. 1992. Wasting disease associated with cutaneous and renal nematodes, in commercially obtained *Xenopus laevis*. *Ann N Y Acad Sci*, 653: 197-201.
- Chai N, Deforges L, Sougakoff W, et al. 2006 *Mycobacterium szulgai* infection in a captive population of African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *J Zoo Wildlife Med*, 37: 55-58.
- Clothier RH, Balls M. 1973. Mycobacteria and lymphoreticular tumours in *Xenopus laevis*, the South African clawed toad. I. Isolation, characterization and pathogenicity for *Xenopus* of *M. marinum* isolated from lymphoreticular tumour cells. *Oncology*, 28: 445-457.
- Cunningham AA, Sainsbury AW, Cooper JE. 1996. Diagnosis and treatment of a parasitic dermatitis in a laboratory colony of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Vet Rec*, 138: 640-642.
- DB 43/T 1020—2015 非洲爪蟾室内养殖技术规程.
- Godfrey D, Williamson H, Silverman J, et al. 2007. Newly identified *Mycobacterium* species in a *Xenopus laevis* colony. *Comp Med*, 57: 97-104.
- Green SL. 2009. The laboratory *Xenopus* sp. CRC Press.
- Green SL, Bouley DM, Josling CA, et al. 2003. *Cryptosporidiosis* associated with emaciation and proliferative gastritis in a laboratory South African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Comp Med*, 53 (1): 81-84.
- Green SL, Bouley DM, Tolwani RJ, et al. 1999. Identification and management of an outbreak of *Flavobacterium meningosepticum* infection in a colony of South African clawed frogs (*Xenopus laevis*) *Am Vet Med Assoc*, 214: 1833.
- Green SL, Lifland BD, Bouley DM, et al. 2000. Disease attributed to *Mycobacterium chelonae* in South African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Comp Med*, 50: 675-679.
- Hill WA, Newman SJ, Craig LE, et al. 2010. Diagnosis of *Aeromonas hydrophila*, *Mycobacterium* species, and *Batrachochytrium dendrobatidis* in an African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Journal of The American Association for Laboratory Animal Science*, 49 (2): 215-220.
- Jaffkins A, Abu-Day A, Noble A, et al. 2012. Husbandry of *Xenopus tropicalis*. *Xenopus Protocols: Post-genomic Approaches*, 17-31.
- Mveobiang A, Lee RE, Umstot ES, et al. 2005. A newly discovered mycobacterial pathogen isolated from laboratory colonies of *Xenopus species* with lethal infections produces a novel form of mycolactone, the *Mycobacterium ulcerans* macrolide toxin. *Infection and Immunity*, 73 (6): 3307-3312.
- Poynton S L, Whitaker BR. 2001. Protozoa and metazoa infecting amphibians. *Amphibian Medicine and Captive Husbandry*, Krieger Publishing Company, Malabar, FL, USA, 193-222.
- Pritchett KR, Sanders GE. 2007. Epistylididae ectoparasites in a colony of African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Am Assoc Lab Anim Sci*, 46: 86-91.
- Reed BT. 2005. Guidance on the housing and care of the African clawed frog *Xenopus laevis*. London: Royal Society of the Prevention of Cruelty to Animals, Research Animals Department.
- Robert J, Abramowitz L, Morales HD. 2007. *Xenopus laevis*: a possible vector of *Ranavirus* infection. *Wildlife Dis*, 43 (4): 645-652.
- Robert J, George E, Andino FDJ, et al. 2011. Waterborne infectivity of the *Ranavirus* frog virus 3 in *Xenopus laevis*. *Virology*, 417 (2): 410-417.
- Sánchez-Morgado J, Gallagher A, Johnson LK. 2009. *Mycobacterium gordonae* infection in a colony of African clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). *Lab Anim*, Feb 23.

- Schaeffer DO, Kleinow KM, Krulisch L. 1992. The care and use of amphibians, reptiles, and fish in research.
- Schwabacher H. 1959. A strain of *Mycobacterium* isolated from skin lesions of a cold-blooded animal, *Xenopus laevis*, and its relation to atypical acid-fast bacilli occurring in man. Hyg (Lond), 57: 57-67.
- Sherril L. 2010. Green. The Laboratory *Xenopus* sp. Boca Raton: CRC Press.
- Suykerbuyk P, Vleminckx K, Pasmans F, et al. 2007. *Mycobacterium liflandii* infection in European colony of *Siluranatropicalis*. Emerg Infect Dis, 13: 743-746.
- Trott KA, Stacy BA, Lifland BD, et al. 2004. Characterization of a *Mycobacterium ulcerans*-like infection in a colony of African tropical clawed frogs (*Xenopus tropicalis*). Comp Med, 54: 309-317.