

第十四章 T/CALAS 42—2017《实验动物 大鼠细小病毒 RMV 株和 RPV 株检测方法》 实施指南

第一节 工作简况

根据中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会下达的 2017 年团体标准制(修)订计划,由广东省实验动物监测所负责团体标准《实验动物 大鼠细小病毒 RMV 株和 RPV 株检测方法》起草工作。该项目由全国实验动物标准化技术委员会(SAC/TC281)技术审查,由中国实验动物学会归口管理。

本标准的编制工作是按照中华人民共和国国家标准 GB/T1.1—2009《标准化工作导则》第 1 部分“标准的结构和编写规则”的要求进行编写的。本标准是在广东省科技计划项目“广东省实验动物检测技术平台”(项目编号 2011B040200010)课题基础上制定而成的。在制定过程中参考了国内外相关文献,对方法的敏感性、特异性、重复性等进行了研究,并对所建立的标准方法进行了应用研究。

第二节 工作过程

本标准由中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出,广东省实验动物监测所按照团体标准研制要求和编写工作的程序组成了由本单位专家和专业技术人员参加的编写小组,制订了编写方案,并就编写工作进行了任务分工。编制小组根据任务分工进行了资料收集和调查研究工作,在广东省科技计划项目“广东省实验动物检测技术平台”(项目编号 2011B040200010)课题研究基础上,组织编写实验动物大鼠细小病毒 RMV 株和 RPV 株检测方法技术资料。通过起草组成员的努力,经多次修改、补充和完善,形成了标准和编制说明初稿。

2017 年 3 月,标准草案首先征求中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会的意见,专家对标准稿提出了系列修订建议和意见。根据提出的意见,编制组对《实验动物大鼠细小病毒 RMV 株和 RPV 株检测方法》标准草案进行修改,形成本标准征求意见稿和编制说明。

2017 年 4~6 月,标准征求意见稿在中国实验动物学会网站公开征求意见,共收集意见或建议 5 条,编制组根据专家提出的修改意见和建议,采纳 2 条,未采纳 3 条。对《实验

动物 大鼠细小病毒 RMV 株和 RPV 株检测方法》团体标准整理修改后,形成标准送审稿、标准送审稿编制说明和征求意见汇总处理表。

2017 年 8 月 30 日,全国实验动物标准化技术委员会在北京召开了标准送审稿专家审查会。会议由全国实验动物标准化技术委员会的委员组成审查组,认真讨论了标准送审稿编制说明、征求意见汇总处理表,提出了修改意见和建议。与会专家认为本标准填补了大鼠细小病毒 RMV 株和 RPV 株检测方法空白,一致同意通过审查。会后,编制组根据与会专家提出的修改意见,对《实验动物 大鼠细小病毒 RMV 株和 RPV 株检测方法》团体标准修改完善后,形成标准报批稿、标准报批稿编制说明和征求意见处理汇总表。

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

大鼠细小病毒(RMV 株和 RPV 株)属于细小病毒科细小病毒属,核酸为单股 DNA,无囊膜。目前 RMV 株有 RMV-1 一种型,RPV 株至少存在 RPV-1、RPV-2 两种型。大鼠细小病毒(RMV 株和 RPV 株)对实验大鼠危害严重,成年大鼠感染多无临床症状,免疫抑制等因素可激发该病。种鼠群感染繁殖率下降。乳鼠感染表现发育不良、黄疸、运动失调等症状。该病毒还可以污染肿瘤抑制物和细胞系,对实验研究产生严重干扰。国外实验动物机构及国内一些 CRO 公司都把 RMV 和 RPV 列为日常健康监测中的一个常规检测项目。目前 RMV 和 RPV 的检测方法主要是 ELISA 方法,PCR 检测也是 RMV 和 RPV 诊断的一种有效方法。

第四节 标准编制原则

本标准的编制主要遵循以下原则。

- (1) 科学性原则。在尊重科学、亲身实践、调查研究的基础上,制定本标准。
- (2) 可操作性原则。本标准无论是从样品采集、处理到分离培养鉴定,均操作简单,具有可操作性和实用性。
- (3) 协调性原则。以切实提高我国实验动物病原微生物检测技术水平为核心,符合我国现行有关法律、法规和相关的标准要求。

第五节 内容解读

本标准内容组成:范围;规范性引用文件;术语、定义和缩略语;生物安全措施;酶联免疫吸附试验(ELISA);免疫荧光试验(IFA);普通 PCR;序列测定;检测过程中如

何防止交叉污染的措施;附录,共11章。现将《实验动物 大鼠细小病毒 RMV 株和 RPV 株检测方法》征求意见稿主要技术内容确定说明如下。

一、本标准范围的确定

本标准规定适用于实验动物大鼠细小病毒 RMV 株和 RPV 株的检测。

二、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。凡是注明日期的引用文件,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 19489 《实验室 生物安全通用要求》

GB/T 19495.2 《转基因产品检测 实验室技术要求》

三、术语、定义和缩略语

为方便标准的使用,本标准规定了以下术语、定义和缩略语:

CPE 细胞病变效应 cytopathic effect

Ct 值 荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数 cycle threshold

ELISA 酶联免疫吸附试验 enzyme-linked immunosorbent assay

IFA 免疫荧光试验 indirect immunofluorescence assay

PBS 磷酸盐缓冲液 phosphate buffered saline

PCR 聚合酶链反应 polymerase chain reaction

RNA 核糖核酸 ribonucleic acid

RT-PCR 逆转录-聚合酶链反应 reverse transcription polymerase chain reaction

RMV 大鼠细小病毒 RMV 株 rat minute virus

RPV 大鼠细小病毒 RPV 株 rat parvovirus

实时荧光 PCR 实时荧光逆转录-聚合酶链反应 real-time PCR

四、生物安全措施

规定了实验操作及处理按照 GB 19489 的规定执行,由具备相关资质的工作人员进行相应操作。

五、酶联免疫吸附试验(ELISA)

规定了 ELISA 检测方法的原理、试剂和材料、仪器和设备、操作步骤、结果判定。本章内容主要依据国家标准 GB/T14926.50—2001《实验动物 酶联免疫吸附试验》编写。

六、免疫荧光试验(IFA)

规定了 IFA 检测方法的原理、试剂和材料、仪器和设备、操作步骤、结果判定。本章内容主要依据国家标准 GB/T14926.52—2001《实验动物 免疫荧光试验》编写。

七、普通 PCR

规定了普通 PCR 检测方法的原理、试剂和材料、仪器和设备、操作步骤、结果判定。

八、实时荧光 PCR

规定了实时荧光 PCR 检测方法的原理、试剂和材料、仪器和设备、操作步骤、结果判定。

九、序列测定

必要时,可取待检样本扩增出的阳性 PCR 产物进行核酸序列测定,序列结果与已公开发表的大鼠细小病毒 RMV 株和 RPV 株特异性片段序列进行比对,序列同源性在 90%以上,可确诊待检样本大鼠细小病毒 RMV 株和 RPV 株核酸阳性,否则判定大鼠细小病毒 RMV 株和 RPV 株核酸阴性。

十、检测过程中防止交叉污染的措施

给出了检测过程中如何防止交叉污染的措施,具体按照 GB/T 19495.2 中的要求执行。

十一、附录 A

本标准附录为规范性附录,给出了 PBS 等试剂配制方法。

第六节 分 析 报 告

一、大鼠细小病毒 RMV 株 PCR 检测方法

(一) 材料与方法

1. 病毒

大鼠细小病毒 RMV 株和大鼠细小病毒 RPV 株病料由本实验室保存。小鼠细小病毒 MVM 株(MVM, ATCC VR-1346)、大鼠细小病毒 KRV 株(KRV, ATCC VR-235)、大鼠细小病毒 H-1 株(H-1, ATCC VR-356)购自美国典型微生物菌种保藏中心。

2. 引物设计合成

引物设计参照参考文献(Wan et al., 2006),引物位于 RMV 株的 VP1 序列。引物由 Invitrogen(广州)公司合成(表 1)。

表 1 普通 PCR 扩增引物

病原	引物	引物序列(5'→3')	目的基因	产物大小/bp
RMV	正向引物	ACTGAGAACTGGAGACGAATTC	VP1	843
	反向引物	GGTCTCAGTTTGGCTTTAAGTG		

3. 病原微生物 DNA 提取

纯化的病毒样品 DNA 的抽提按病毒基因组提取试剂盒(天根公司)操作说明书进行,病毒 RNA 的抽提采用 Trizol 试剂(Invitrogen 公司)按说明书进行。盲肠内容物和粪便样品按照下面的方法预处理,在装有样本的离心管中加入适量灭菌的 PBS,匀浆,采用粪便基因组 DNA 提取试剂盒(天根公司)按说明书进行抽提。

4. 普通 PCR 检测方法的建立

以 RMV 的基因组 DNA 为模板用各自引物进行 PCR 扩增,PCR 试剂采用 TaKaRa 的 rTaq Premix,反应体系为 20 μL : DNA 模板 2 μL , Premix Buffer 2 $\times$ (含 Mg^{2+} 、dNTP、rTaq 酶) 10 μL , 上游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 补 H_2O 至 20 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。反应完成后取 5 μL 扩增产物,1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果。

5. 特异性试验

采用建立的 PCR 方法对 RMV、RMV、KRV、H-1、MVM 和 MPV 的 DNA 进行检测,验证 RMV 检测方法的特异性。

同时将 RMV 阳性 PCR 产物送上海英潍捷基有限公司进行序列测定,并用 NCBI 网站 Blast 软件对其进行核苷酸同源性分析,验证产物的特异性。

6. 敏感性试验

1) RMV 质粒标准品的制备

以提取的 RMV DNA 为模板,用 Premix Ex Taq (TaKaRa 公司)进行 PCR,反应体系为: 2 $\times$ Premix Ex Taq 25 μL , 上游引物 MVM-F (10 $\mu\text{mol/L}$) 2.5 μL , 下游引物 MVM-R (10 $\mu\text{mol/L}$) 2.5 μL , DNA 5 μL , 加 RNase Free dH_2O 至 50 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 一个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。反应得到目的大小片段后,用胶回收试剂盒回收目的片段,将回收的目的片段连接至 pMD-19T 载体,并转化至 DH5 α 感受态细胞中。用含有 Amp 的 LB 琼脂平板筛选阳性克隆,用 PCR 鉴定阳性克隆菌,并对阳性重组质粒测序验证。用质粒提取试剂盒(Omega 公司)提取质粒,微量紫外分光光度计测定浓度与纯度,根据下面的公式计算拷贝数。拷贝数(copies/ μL) = 6.022×10^{23} (copies/mol) $\times$ DNA 浓度(g/ μL)/质量 MW (g/mol)。其中, MW = DNA 碱基数(bp) $\times$ 660 daltons/bp, DNA 碱基数 = 载体序列碱基数 + 插入序列碱基数。

2) 敏感性试验

将质粒标准品用 Easy dilution (TaKaRa 公司)做 10 倍系列稀释,得到 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μL 系列标准模板。按上述方法进行检测,测定模板最低检出量,判定该方法的敏感度。

7. 在临床样本检测中的应用

应用 RMV PCR 检测方法对 224 份 SPF 级大鼠的盲肠内容物或粪便样本进行检测。同时应用 RMV PCR 检测方法对 50 只普通环境饲养大鼠的盲肠内容物进行检测。

(二) 结果

1. 普通 PCR 检测方法的建立

以 RMV 的基因组 DNA 为模板用各自引物进行 PCR 扩增,PCR 试剂采用 TaKaRa 的 rTaq Premix,反应体系为 20 μL : DNA 模板 2 μL , Premix Buffer 2 $\times$ (含 Mg^{2+} 、dNTP、rTaq

酶) 10 μ L, 上游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, 下游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, 补 H₂O 至 20 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min, 94 $^{\circ}$ C 1 min、55 $^{\circ}$ C 1 min、72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应完成后取 5 μ L 扩增产物, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。结果表明, RMV 阳性样本在 843 bp 位置有一条目的条带, 与预期结果相符 (图 1)。

2. RMV PCR 检测方法特异性试验

采用建立的 PCR 方法对 RMV、RMV、KRV、H-1、MVM 和 MPV 的 DNA 进行检测, 验证 RMV 检测方法的特异性。结果显示只有 RMV 有目的条带, 其他病原核酸均为阴性, 表明建立的方法具有良好的特异性 (图 2)。

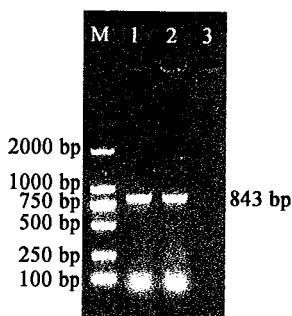


图 1 RMV PCR 电泳结果

M, DNA Marker DL2000;
1、2, RMV; 3, 阴性对照

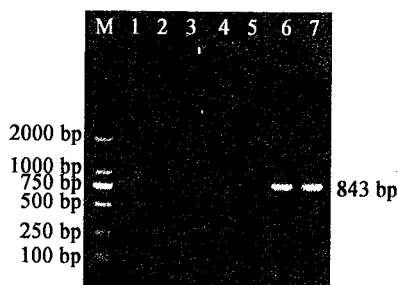


图 2 RMV PCR 检测方法特异性试验结果

M, DNA Marker DL2000; 1, RMV; 2, H-1;
3, KRV; 4, MPV; 5, MVM; 6、7, RMV

3. PCR 产物测序鉴定

将 RMV 阳性 PCR 产物送上海英潍捷基有限公司进行序列测定, 并用 NCBI 网站 Blast 软件对其进行核苷酸同源性分析, 验证产物的特异性。测序结果表明, RMV PCR 产物大小为 843 bp, 与 GenBank 中登录的核苷酸同源性为 99% 以上, 说明引物特性好。

4. RMV PCR 检测方法敏感性试验

将质粒标准品用 Easy dilution (TaKaRa 公司) 做 10 倍系列稀释, 得到 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μ L 系列标准模板。按所建立的方法进行检测, 测定模板最低检出量, 结果 RMV 敏感性为 1×10^3 copies/ μ L (图 3)。



图 3 RMV PCR 检测方法敏感性试验结果

M, DNA Marker DL100; 1~10, $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μ L 质粒 DNA; 11、12, NTC

二、鼠细小病毒 RPV 株 PCR 检测方法

(一) 材料与方法

1. 病毒

大鼠细小病毒 RPV 株病料和大鼠细小病毒 RMV 株由本实验室保存。小鼠细小病毒 MVM 株 (MVM, ATCC VR-1346)、大鼠细小病毒 KRV 株 (KRV, ATCC VR-235)、大鼠细小病毒 H-1 株 (H-1, ATCC VR-356) 购自美国典型微生物菌种保藏中心。

2. 引物设计合成

引物设计参照参考文献 (Wan et al., 2006), 引物位于 RPV 株的 NS 序列。引物由 Invitrogern (广州) 公司合成 (表 2)。

表 2 普通 PCR 扩增引物

病原	引物	引物序列 (5' → 3')	目的基因	产物大小/bp
RPV	正向引物	CGCACATGTAGAAATTTTGCTG	NS	487
	反向引物	CAAAGTCACCAGGCAATGTGTT		

3. 病原微生物 DNA 提取

纯化的病毒样品 DNA 的抽提按病毒基因组提取试剂盒 (天根公司) 操作说明书进行, 病毒 RNA 的抽提采用 Trizol 试剂 (Invitrogern 公司) 按说明书进行。盲肠内容物和粪便样品按照下面的方法预处理: 在装有样本的离心管中加入适量灭菌的 PBS, 匀浆, 采用粪便基因组 DNA 提取试剂盒 (天根公司) 按说明书进行抽提。

4. 普通 PCR 检测方法的建立

以 RPV 的基因组 DNA 为模板, 用各自引物进行 PCR 扩增, PCR 试剂采用 TaKaRa 的 rTaq Premix, 反应体系为 20 μ L: DNA 模板 2 μ L, Premix Buffer 2 $\times$ (含 Mg^{2+} 、dNTP、rTaq 酶) 10 μ L, 上游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, 下游引物 (10 μ mol/L) 1 μ L, 补 H_2O 至 20 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}C$ 5 min, 94 $^{\circ}C$ 1 min、55 $^{\circ}C$ 1 min、72 $^{\circ}C$ 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。反应完成后取 5 μ L 扩增产物, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。

5. 特异性试验

采用建立的 PCR 方法对 RPV、RMV、KRV、H-1、MVM 和 MPV 的 DNA 进行检测, 验证 RPV 检测方法的特异性。

同时将 RPV 阳性 PCR 产物送上海英潍捷基有限公司进行序列测定, 并用 NCBI 网站 Blast 软件对其进行核苷酸同源分析, 验证产物的特异性。

6. 敏感性试验

1) RPV 质粒标准品的制备

以提取的 RPV DNA 为模板, 用 Premix Ex Taq (TaKaRa 公司) 进行 PCR, 反应体系为: 2 $\times$ Premix Ex Taq 25 μ L, 上游引物 MVM-F (10 μ mol/L) 2.5 μ L, 下游引物 MVM-R (10 μ mol/L) 2.5 μ L, DNA 5 μ L, 加 RNase Free dH_2O 至 50 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}C$ 2 min, 一个循环; 94 $^{\circ}C$

30 s、55℃ 30 s、72℃ 30 s，共 35 个循环；最后 72℃ 延伸 5 min。反应得到目的大小片段后，用胶回收试剂盒回收目的片段，将回收的目的片段连接至 pMD-19T 载体，并转化至 DH5 α 感受态细胞中。用含有 Amp 的 LB 琼脂平板筛选阳性克隆，用 PCR 鉴定阳性克隆菌，并对阳性重组质粒测序验证。用质粒提取试剂盒（Omega 公司）提取质粒，微量紫外分光光度计测定浓度与纯度，根据下面的公式计算拷贝数。拷贝数（copies/ μ L）= 6.022×10^{23} （copies/mol） $\times$ DNA 浓度（g/ μ L）/质量 MW（g/mol）。其中，MW = DNA 碱基数（bp） $\times$ 660 daltons/bp，DNA 碱基数 = 载体序列碱基数 + 插入序列碱基数。

2) 敏感性试验

将质粒标准品用 Easy dilution（TaKaRa 公司）做 10 倍系列稀释，得到 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μ L 系列标准模板。按所建立的方法进行检测，测定模板最低检出量，判定该方法的敏感度。

7. 在临床样本检测中的应用

应用 RPV PCR 检测方法对 224 份 SPF 级大鼠的盲肠内容物或粪便样本进行检测。同时应用 RPV PCR 检测方法对 50 只普通环境饲养大鼠的盲肠内容物进行检测。

(二) 结果

1. 普通 PCR 检测方法的建立

以 RPV 的基因组 DNA 为模板用各自引物进行 PCR 扩增，PCR 试剂采用 TaKaRa 的 rTaq Premix，反应体系为 20 μ L：DNA 模板 2 μ L，Premix Buffer 2 $\times$ （含 Mg²⁺、dNTP、rTaq 酶）10 μ L，上游引物（10 μ mol/L）1 μ L，下游引物（10 μ mol/L）1 μ L，补 H₂O 至 20 μ L。反应条件：94℃ 5 min，94℃ 1 min、55℃ 1 min、72℃ 1 min，共 35 个循环，最后 72℃ 延伸 10 min。反应完成后取 5 μ L 扩增产物，1.5% 琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下观察结果。结果 RPV 阳性样本在 487bp 位置有一目的条带，与预期结果相符（图 4）。

2. RPV PCR 检测方法特异性试验

采用建立的 PCR 方法对 RPV、RMV、KRV、H-1、MVM 和 MPV 的 DNA 进行检测，验证 RPV 检测方法的特异性。结果显示只有 RPV 有目的条带，其他病原核酸均为阴性，表明建立的方法具有良好的特异性（图 5）。

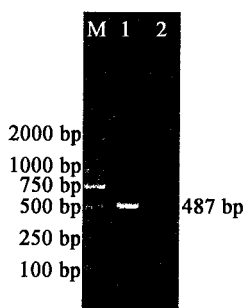


图 4 RPV PCR 电泳结果

M, DNA Marker DL2000; 1, RMV;
2, 阴性对照

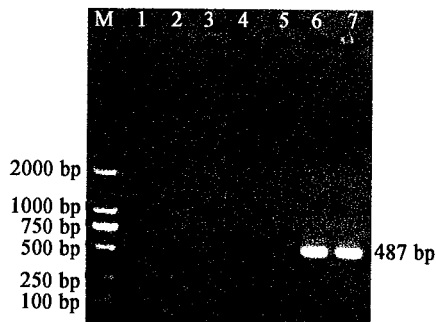


图 5 RPV PCR 检测方法特异性试验结果图

M, DNA Marker DL2000; 1, RMV; 2, H-1; 3, KRV;
4, MPV; 5, MVM; 6, 7, RMV

3. PCR 产物测序鉴定

将 RPV 阳性 PCR 产物送上海英潍捷基有限公司进行序列测定,并用 NCBI 网站 Blast 软件对其进行核苷酸同源性分析,验证产物的特异性。测序结果表明 RPV PCR 产物大小分别为 705 bp、843 bp 和 487 bp,与 GenBank 中登录的核苷酸同源性为 99%以上,说明引物特性好。

4. RPV PCR 检测方法敏感性试验

将质粒标准品用 Easy dilution (TaKaRa 公司)做 10 倍系列稀释,得到 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μ L 系列标准模板。按所立法的方法进行检测,测定模板最低检出量,结果 RPV 敏感性 1×10^2 copies/ μ L (图 6)。

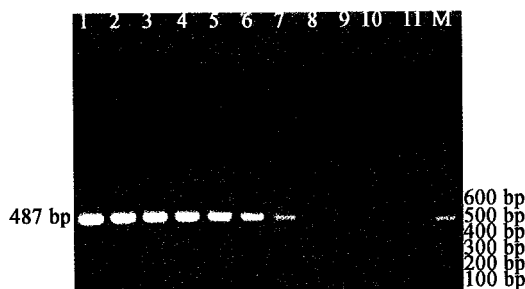


图 6 RPV PCR 检测方法敏感性试验结果

M, DNA Marker DL100; 1~10, $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^0$ copies/ μ L 质粒 DNA; 11, NTC

5. 在临床样本检测中的应用

应用 RMV 和 RPV PCR 检测方法对 224 份大鼠盲肠内容物或粪便样本进行检测,结果 SPF 级大鼠样本中未检出 RMV 和 RPV。应用 RMV PCR 检测方法对 50 只普通环境饲养大鼠的盲肠内容物进行检测。RMV 检出 4 份阳性,感染率为 8%。对 RMV 阳性样本进行测序,结果证实为 RMV。RPV 检出 3 份阳性,感染率为 6%。对 RPV 阳性样本进行测序,结果证实为 RPV。同时采用 ELISA 方法检测动物血清。需要指出的是,采用 PCR 和 ELISA 检测方法对同一只动物进行检测时,部分动物出现不一致的结果,这是由于病原感染动物后抗原和抗体不同消长规律所造成的。但是对整个动物群体进行检测时,两种方法具有较好的相关性。

表 3 临床样本检测结果

病毒	方法	阳性检出率 (阳性样本/总样本数量)	
		SPF 级大鼠	普通级大鼠
RMV	PCR	0/244	4/50
	ELISA	—	31/50
RPV	PCR	0/244	3/50
	ELISA	—	22/50

第七节 其他说明

一、国内外同类标准分析

本标准为国内原创标准，国际上无类似标准。

二、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；本标准与《实验动物管理条例》《实验动物质量管理办法》等国家相关法规和实验动物强制性标准的规定和要求协调一致。目前实验动物国家标准没有小鼠汉坦病毒 PCR 检测方法标准，本标准作为团体标准是对现有标准的有利补充。

三、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。

四、标准实施要求和措施

本标准发布实施后，建议通过培训班、会议宣传和网络宣传等形式积极开展宣传贯彻培训活动。面向各行业开展动物实验的机构和个人，宣传贯彻标准内容。

参考文献

田克恭. 1992. 实验动物病毒性疾病. 北京: 中国农业出版社: 76-83.

Wan CH, Bauer BA, Pintel DJ, et al. 2006. Detection of rat parvovirus type 1 and rat minute virus type 1 by polymerase chain reaction. Lab Anim Jan, 40 (1): 63-69.