

第十五章 T/CALAS 43—2017《实验动物 鼠放线杆菌检测方法》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 鼠放线杆菌检测方法》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。

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,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 鼠放线杆菌检测方法》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 6 条,编制组根据专家提出的修改意见和建议,采纳 4 条,未采纳 2 条。对《实验动物 鼠放线杆菌检测方法》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鼠放线杆菌检测方法检测方法空白,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 鼠放线杆菌检测方法》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

鼠放线杆菌(*Actinobacillus muris*)属于巴斯德杆菌成员,《伯杰氏系统细菌学手册》(第二版)中将分离自啮齿类动物的巴斯德杆菌归类为啮齿动物群(rodent cluster)。该群由9个种组成,已命名的种包括鼠放线杆菌、嗜肺巴斯德杆菌、小鼠流感嗜血杆菌(*H. influenzae-murium*),未命名的包括 Bisgaard 17 分类群(大鼠)、Kunstyr 507 株(MCCM 02120 [仓鼠])、Mannheim Michael A (CCUG28028 [豚鼠])、Kunstyr 246 (CCUG 28030 [仓鼠])、Mannheim A/5a (MCCM 00235 [大鼠])和 Forsyth A3 (小鼠)。巴斯德杆菌是目前啮齿类实验动物中最常见的细菌,嗜肺巴斯德杆菌感染可引起动物炎症,严重的可形成脓肿。鼠放线杆菌可感染小鼠并致病。国标中,嗜肺巴斯德杆菌是实验动物必须排除的病原,鼠放线杆菌是国外实验动物健康监测的一个项目,欧盟实验动物科学协会(FELASA)建议 SPF 级小鼠中需要排除所有啮齿动物巴斯德杆菌。我国实验动物国家标准中虽然尚未把鼠放线杆菌列入检测项目,但是一些实验动物生产或使用单位,以及一些 CRO 公司都把鼠放线杆菌列为筛查项目。

分离培养法是鼠放线杆菌检测的首选方法,本研究参照文献报道建立了鼠放线杆菌分离培养鉴定检测方法。为了使该病原检测技术能更好地为生产服务,特制定本检测方法标准。这一标准的制定,对实验动物鼠放线杆菌的日常监测、流行病学调查及临床诊断都具有重要的实用意义。

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;检测方法原理;主要设备和材料;培养基发热试剂;检测程序;操作步骤、结果报告,共8章。现将《实验动物 鼠放线杆菌检测方法》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

本标准规定适用于啮齿类实验动物中鼠放线杆菌的检测。

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 14926.42 《实验动物 细菌学检测 标本采集》

GB/T 14926.43 《实验动物 细菌学检测 染色法、培养基和试剂》

三、检测方法原理

简要介绍了标准中采用的技术方法原理。鼠放线杆菌为革兰氏阴性杆菌，在血琼脂平皿上形成特殊的菌落形态，有独特的生化反应，据此可进行该菌的分离培养和检测。

四、主要设备和材料

规定了检测方法所需要的设备和材料。

五、培养基和试剂

规定了检测方法所需要的培养基和试剂。这些培养基、生化试剂的配制均引用国家标准“GB/T 14926.43 实验动物 细菌学检测 染色法、培养基和试剂”。

六、检测程序

以图的形式规定了鼠放线杆菌标准检测程序。

七、检测方法的确定

（一）生物安全措施

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

（二）采样

鼠类柠檬酸杆菌为巴斯德杆菌科细菌，定殖于呼吸道，因此标准规定了采样部位为呼吸道分泌物。

（三）分离培养

将样本接种血琼脂平皿置（36±1）℃，培养 24~48h。

（四）鉴定

规定了染色镜检、生化鉴定试验结果及判定标准。生化反应特征主要参考《伯杰氏系统细菌学手册》。

八、结果报告

根据染色镜检、生化鉴定试验结果及判定标准,符合各项检测结果者为阳性,不符合者为阴性。

第六节 分 析 报 告

一、材料与方法

(一) 菌株

鼠放线杆菌 (*Actinobacillus muris*, ATCC 49577) 购自美国典型微生物菌种保藏中心。

(二) 培养基

(1) 血琼脂平板: 购自广州迪景微生物有限公司。

(2) 生化管: 购自杭州天和微生物试剂有限公司。

(三) 培养条件

37℃培养 48h。

二、结果

(一) 菌落特征

培养 24 h 即可见特征菌落。菌落为灰白色、湿润、光滑、圆形、凸起、不溶血; 直径为 1~2 mm, 48 h 可以长到 3~4 mm。

(二) 染色镜检

革兰氏阴性杆菌, 无芽胞, 无荚膜 (图 1)。

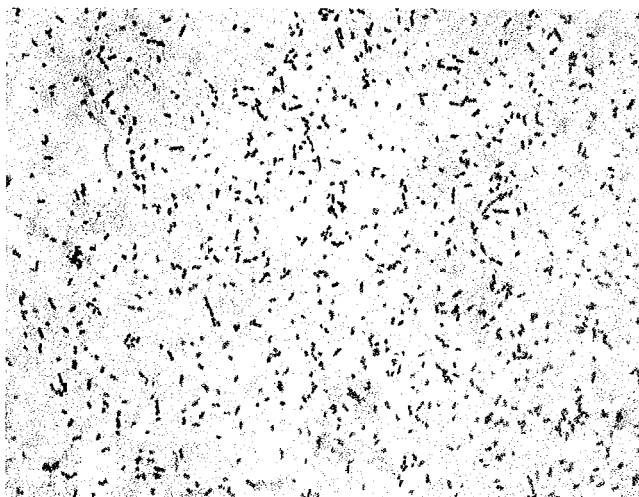


图 1 染色镜检结果

(三) 生化反应结果

生化鉴定结果均符合鼠放线杆菌的生化特征(表1)。

表1 生化鉴定结果

生化反应	结果	生化反应	结果
核糖	+	棉子糖	+
甘露醇	+	水杨苷	+
果糖	+	ONPG	-
葡萄糖	+	靛基质	-
甘露糖	+	山梨醇	-
纤维二糖	+	木糖	-
麦芽糖	+	尿素酶	+
蜜二糖	+	硝酸盐还原	+
蔗糖	+	氧化酶	+
海藻糖	+	过氧化氢	+
松三糖	-		

(四) 鉴别诊断

鼠放线杆菌与嗜肺巴斯德杆菌同属于巴斯德杆菌成员,可以通过生化反应区别鉴定(表2)。

表2 鼠放线杆菌与嗜肺巴斯德杆菌的鉴别

项目	鼠放线杆菌	嗜肺巴斯德杆菌
核糖	+	+
甘露醇	+	-
果糖	+	+
葡萄糖	+	+
甘露糖	+	-
纤维二糖	+	-
麦芽糖	+	+
蜜二糖	+	+/-
蔗糖	+	+
海藻糖	+	+
棉子糖	+	+/-
水杨苷	+	-
ONPG	-	+
靛基质	-	+/-
山梨醇	-	-
木糖	-	+/-
磷酸酶	-	+

注: +表示阳性; -表示阴性; +/-表示大多数菌株阴性; +/+表示大多数菌株阳性。

第七节 其他说明

一、国内外同类标准分析

本标准作为国内原创标准，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鼠放线杆菌检测方法标准，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

- Ackerman JI, Fox JG. 1981. Isolation of *Pasteurella ureae* from reproductive tracts of congenic mice. *J Clin Microbiol*, 13: 1049-1053.
- GB/T 14926.43—2001 实验动物 细菌学检测 标本采集.
- GB/T 14926.43—2001 实验动物 细菌学检测 染色法、培养基和试剂.
- GB/T 14926.42~14926.43—2001 实验动物 微生物学检测方法（1）.
- Holt JG. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, ninth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.