

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 71—2019

实验动物 无菌猪微生物学和 寄生虫学等级及监测

Laboratory animals - Microbiological and parasitological monitoring of germ-free pigs

2019-07-10 发布

2019-08-01 实施

中国实验动物学会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则编写。

本标准由中国实验动物学会归口。

本标准由全国实验动物标准化技术委员会（SAC/TC281）技术审查。

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并组织起草。

本标准起草单位：重庆市畜牧科学院、重庆医科大学。

本标准主要起草人：葛良鹏、孙静、梁浩、刘作华、丁玉春、谭毅。

实验动物 无菌猪微生物学和寄生虫学等级及监测

1 范围

本标准规定了无菌 (germ-free, GF) 猪微生物学等级检测要求、检测程序、检测方法、检测规则、判定结论、样本保存等。

本标准适用于无菌 (GF) 猪微生物学等级监测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本标准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 5749	《生活饮用水卫生标准》
GB 14922.1	《实验动物寄生虫学等级及监测》
GB 14922.2	《实验动物微生物学等级及监测》
GB 16551	《猪瘟检疫技术规范》
GB 17013—1997	《包虫病诊断标准及处理原则》
GB/T 18090—2008	《猪繁殖与呼吸综合征诊断方法》
GB/T 18448.1—2001	《实验动物体外寄生虫检测方法》
GB/T 18448.2—2001	《弓形虫检测方法》
GB/T 18448.6—2001	《实验动物蠕虫检测方法》
GB/T 18641	《伪狂犬病诊断技术》
GB/T 18647—2002	《动物球虫病诊断技术》
GB/T 18935—2003	《口蹄疫诊断技术》
GB/T 21674—2008	《猪圆环病毒聚合酶链反应试验方法》
GB/T 22914—2008	《SPF 猪病原的控制与监测》
GB/T 22915—2008	《口蹄疫病毒荧光 RT-PCR 检测方法》
NY/SY 152—2000	《猪细小病毒病诊断技术规程》
NY/T 541	《动物疫病实验室检验采样方法》
NY/T 544—2015	《猪流行性腹泻诊断技术》
NY/T 548—2015	《猪传染性胃肠炎诊断技术》
NY/T 678	《猪伪狂犬病免疫酶试验方法》
NY/T 679	《猪繁殖与呼吸综合征免疫酶试验方法》
NY/T 2840—2015	《猪细小病毒间接 ELISA 抗体检测方法》
SN/T 1379.1—2004	《猪瘟单克隆抗体酶联免疫吸附试验》
SN/T 1396—2015	《弓形虫病检疫技术规范》

3 获取方法

3.1 临产母猪的筛选

怀孕母猪应来源于临床上无经胎盘垂直传播的疾病（即猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征、猪伪狂犬病、猪细小病毒病）症状的猪场。选择二胎以上怀孕母猪，并现场采集样本，检测猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征、猪伪狂犬病三种疾病：猪瘟为扁桃体活体采样，检测野毒感染情况；猪繁殖与呼吸综合征检查血清抗体；猪伪狂犬病检测感染抗体。

3.2 隔离与再检

三种疾病均为阴性的猪运至隔离舍饲养。30天后，再次检测上述三种疾病，仍均为阴性，实施剖腹产手术；否则，淘汰待产母猪，并彻底消毒整个可能的污染区。

3.3 剖腹产手术

母猪单笼运至准备间，温水清洗全身、吹干后，推入净化区手术间；经诱导麻醉后，保定于手术台上，消毒体表后，采取吸入式麻醉；术部剃毛、消毒，将整个子宫结扎、剥离，经渡槽消毒并传入含空气高效过滤系统的无菌子宫剥离器内，获取无菌仔猪。

3.4 仔猪的处理、转运与隔离饲养

无菌仔猪在子宫剥离器内复苏后，立即转入与子宫剥离器相连接的无菌猪运输隔离器内，后经脐带结扎等处理，再运入洁净饲养间；将无菌猪运输隔离器与无菌猪饲养隔离器相连，在无菌环境下将仔猪转入无菌猪饲养隔离器内，用灭菌的水、代乳料，人工饲养无菌仔猪。

4 检测标准和指标

4.1 外观指标

实验动物应外观健康、无异常。

4.2 检测标准

4.2.1 采样

将无菌猪隔离器内饮水、饲料、动物肛门拭子、咽拭子或新鲜粪便等分别收集于无菌小试管中，按无菌猪饲养操作程序从无菌猪饲养隔离器中取出。

4.2.2 细菌与真菌检测

利用不同的培养基、不同的培养温度和培养环境对污染无菌猪的微生物进行检测，应无任何可查到的细菌和真菌。

拭子或（和）新鲜粪便样本

将动物拭子或（和）新鲜粪便样本分别接种于大豆酪蛋白琼脂培养基，在 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 需氧和厌氧条件下培养过夜，观察有无细菌生长。同时，将动物拭子或新鲜粪便样本均匀涂布于洁净载玻片上，经风干、热固定、常规革兰氏染色后，进行微生物镜检。必要时，将无菌猪肠道置于厌氧工作台（0%氧气），无菌条件下取出肠内容物，并接种于脱氧处理后的血琼脂平板上。 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 下厌氧培养过夜，观察有无细菌生长。

饮水、饲料标本

按无菌操作程序在垂直流洁净工作台中进行标本接种前制备与接种。饲料标本加入少

量无菌生理盐水（以没过标本为宜）于待检样品小试管中，用毛细吸管充分吹打。分别吸取 0.5mL ~ 1mL 样品溶液（饮水标本为原液）于硫乙醇酸钠肉汤（已预先排出溶解氧，溶液呈无色为准）、脑心浸液肉汤和大豆酪蛋白琼脂培养基，分别置于需氧环境和厌氧环境（ 36 ± 1 ）℃培养 7 天，并在第 7 天涂片、革兰氏染色镜检，同时接种大豆酪蛋白琼脂培养基，（ 36 ± 1 ）℃培养过夜，观察有无细菌生长；另外，样品溶液接种于大豆酪蛋白琼脂培养基，置于 25℃ ~ 28℃需氧环境下培养 7 天，观察有无真菌生长。

4.2.3 病毒检测

病毒指标见表 1。

表 1 无菌猪病毒检测项目

病毒	必须检测项目	必要时检测项目	检测方法
伪狂犬病病毒 pseudorabies virus	√		GB/T 18641 或 NY/T 678
狂犬病病毒 rabies virus		√	GB/T 14926.56
猪瘟病毒 classical swine fever virus	√		GB/T 16551; SN/T 1379.1
猪传染性胃肠炎病毒 transmissible gastroenteritis		√	NY/T 548—2015
猪细小病毒 porcine parvovirus	√		NY/T 2840—2015
猪繁殖与呼吸综合征病毒 porcine reproductive and respiratory syndrome	√		GB/T 18090—2008
猪圆环病毒 2 型 porcine circovirus type 2	√		GB/T 21674
口蹄疫病毒 foot and mouth disease virus		√	GB/T 18935; GB/T 22915
猪流行性腹泻病毒 porcine epidemic diarrhea		√	NY/T 544—2015

4.2.4 寄生虫检测

寄生虫指标见表 2。

表 2 无菌猪寄生虫检测项目

寄生虫	必须检测项目	必要时检测项目	检测方法
体外寄生虫 Ectozoa	√		GB/T 18448.1—2001; GB/T 22914—2008
猪蛔虫 Ascarissuum		√	GB/T 18448.6—2001
棘手缘虫 Echinococcus sp.		√	GB/T 17013—1997
弓形虫 Toxoplasma gondii		√	GB/T 18448.2—2001; SN/T 1396

5 检测程序

5.1 检测的动物应于送检当日按细菌、真菌、病毒、寄生虫要求联合取样检查。

5.2 总检测程序（图 1）。

5.3 细菌、真菌检测流程（图 2）。

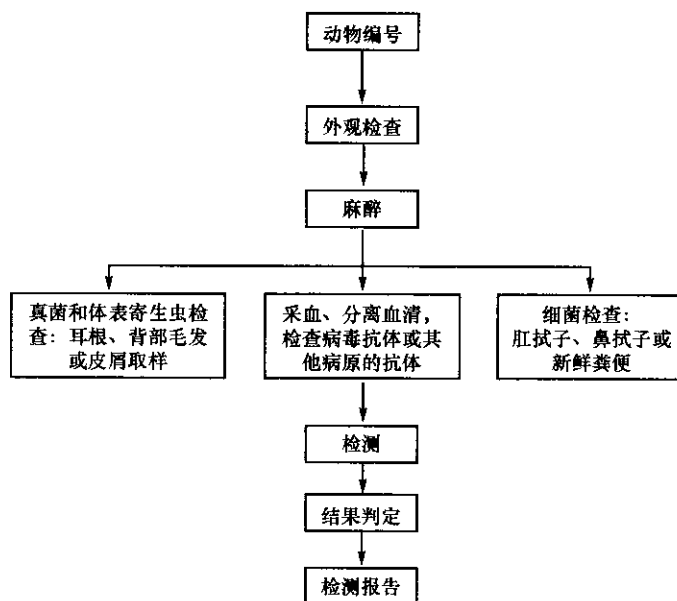


图1 总检测程序

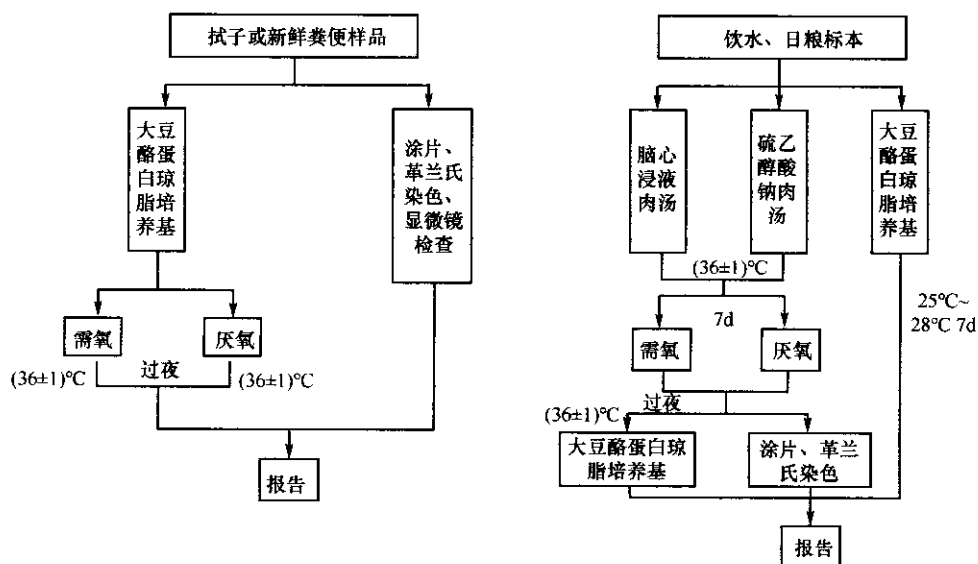


图2 细菌、真菌检测流程

6 检测规则

6.1 检测频率

每半年检测动物一次。每2周~4周检查一次动物的生活环境标本和粪便标本。

6.2 取样要求

6.2.1 选择1月龄及以上的无菌猪用于检测，随机抽样。

6.2.2 取样数量：根据无菌猪群体大小，取样数量见表3。

表 3 取样数量

群体大小/头	取样数量/%
<50	5
50 ~ 100	3
100 ~ 500	2
>500	1

6.3 取样、送检

6.3.1 按细菌、真菌、病毒、寄生虫检测要求联合取样。

6.3.2 取样方法按照 NY/T 541 及医学采样程序进行。

6.3.3 无特殊要求时，无菌猪的活体取样可在生产繁殖单元进行。

6.3.4 取样要求编号和标记，包装好，安全送达实验室，并附送检单，写明动物品种品系、数量、取样类型和检测项目。

6.4 检测项目的分类

6.4.1 细菌与真菌检测项目是无菌猪质量评价时必须检测的项目。

6.4.2 必须检测项目：指在无菌猪质量评价时必须检测的病毒和（或）寄生虫项目。

6.4.3 必要时检测项目：指在申请无菌猪动物生产许可证和实验动物质量合格证时必须检测的项目。

7 结果判定

7.1 合格判定

凡镜检未观察到细菌、大豆酪蛋白琼脂培养基上无细菌和真菌生长者，宜报告无菌检查合格，其中一项检出细菌或真菌者为不合格。按各个病毒检测项目结果判定方法判定检测结果：抗体检测项目，血清抗体阴性为合格；抗原和核酸检测项目，未见阳性为合格。各寄生虫检测项目无检出，为合格。

8 判定结论与报告

所有项目的检测结果均合格，判为符合 GF 等级标准；否则，判为不符合 GF 等级标准。根据检测结果，出具报告。

9 样本保存

9.1 样本资料、样本来源、动物编号、样本种类及编号，按医学病理资料档案管理规范保存。保存时间为 1 年。

9.2 检测样本应一式两份，其中一份应保存于液氮罐或-80℃冰箱中，保存器具应标志清晰，符合病理标本保存规范。

参 考 文 献

- 杜蕾, 孙静, 葛良鹏, 等. 2016. 无菌猪的研究进展. 中国实验动物学报, 24 (5): 546-550.
- 杜蕾, 孙静, 葛良鹏, 等. 2017. 肠道菌群对动物免疫系统早期发育的影响. 中国畜牧杂志, 53 (6): 10-14.
- 孙静, 杜蕾, 丁玉春, 等. 2017. 无菌猪的制备与微生物质量控制. 中国实验动物学报, 25 (6): 699-702.
- Brady M J, Radhakrishnan P, Liu H, et al. 2011. Enhanced actin pedestal formation by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 adapted to the mammalian host. *Frontiers in Microbiology*, 2: 226.
- Guilloteau P, Zabielski R, Hammon H M, et al. 2010. Nutritional programming of gastrointestinal tract development. Is the pig a good model for man? *Nutrition Research Reviews*, 23 (1): 4-22.
- Meurens F, Summerfield A, Nauwynck H, et al. 2012. The pig: a model for human infectious diseases. *Trends in Microbiology*, 20 (1): 50-57.
- Odle J, Lin X, Jacobi S K, et al. 2014. The suckling piglet as an agrimedical model for the study of pediatric nutrition and metabolism. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2: 419-444.
- Steele J, Feng H, Parry N, et al. 2010. Piglet models of acute or chronic *clostridium difficile* illness. *The Journal of Infectious Diseases*, 201 (3): 428-434.
- Wang M, Donovan S M. 2015. Human microbiota-associated swine: current progress and future opportunities. *ILAR Journal*, 56 (1): 63-73.
- Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, et al. 2017. Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells. *Cell*, 168 (3): 473-486 e15.
-