

第十章 T/CALAS 72—2019《实验动物 无菌猪隔离器》实施指南

第一节 工作简况

生命科学、医药行业 and 现代畜牧业领域的迅猛发展离不开无菌实验动物。随着菌群与宿主互作研究的深入，菌群与健康关系越来越受到关注，客观上促进了科学研究对高等级实验动物的需求。其中，对高等级大型实验动物（无菌猪）的需求日益增多。无菌猪是一种特殊的实验大动物模型，它具有微生物背景清晰、体型大、无伦理限制等特点。通过无菌猪和有菌猪的比较，可以明确菌（群）的作用；此外，利用无菌猪构建目的菌群猪模型，可以揭示宿主动物与肠道菌群之间的关系，亦可进行新药、新营养品和疫苗的临床前安全性及有效性等评价研究。

2013 年起，重庆市畜牧科学院率先开展了无菌猪的培育相关研究工作，建立了猪用屏障设施，2016 年，重庆市畜牧科学院在重庆市科技计划项目《无菌动物应用示范平台》（项目编号：cstc2015pt-nsjg80003）资助下开展了无菌猪培育的标准化技术体系的研究，自主研发了无菌猪培育用关键设备，建立了猪无菌剖腹产获取、无菌猪的传递和人工饲养，以及无菌猪微生物和寄生虫监测等技术体系。2018 年 7 月，经中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会审查通过并下达《实验动物 无菌猪隔离器》团体标准编制任务。承担单位为重庆市畜牧科学院和重庆医科大学。

第二节 工作过程

自 2018 年 7 月，接到中国实验动物学会下达的编制任务之后，启动编制工作，编写人员开始查阅文件资料并将建立的无菌猪培育经验进行总结，对收集的相关资料进行整理。工作组召开内部会议，讨论并确定了标准编制的原则和指导事项；制订了编制大纲和工作计划。2018 年 9 月，工作组形成初稿，并组织相关专家进行修改，经过多次修改后，本标准征求意见稿分别在 2018 年 10 月、2019 年 3 月和 5 月又经过标委会专家的审议和修改，最终在 2019 年 6 月形成报批稿。

第三节 编写背景

猪与人类具有相似的生理特点和解剖结构，特别是猪的消化代谢特点和肠道结构与人

高度相似，在前沿基础科学研究中具有重要地位。由于没有微生物背景干扰，无菌猪被认为是研究人类胃肠道、免疫及大脑发育等影响因素的首选非灵长类动物模型。无菌猪的应用，已从最早用于畜牧生产重大疫病净化，逐渐扩展为用于肠道微生物与生长发育、疾病发生关系研究，以及儿童疫苗、婴幼儿奶粉等质量评价研究。目前，无菌猪已用于肠出血性大肠杆菌感染、艰难梭菌感染等研究；与菌群移植技术结合，适用于肠道菌群与环境互作研究。此外，利用基因编辑技术和猪的无菌净化技术，未来有望将猪作为人类自体器官培养的工厂，有效解决器官移植供体不足和安全性问题。

然而，国内外至今尚没有无菌猪的获取、生产、饲养和微生物质量控制等相关规范或标准，行业迫切需要对无菌猪生产和质控技术等加以规范，标准的制定将极大促进我国无菌猪的标准化水平。

第四节 编制原则

本标准的编制遵循下列原则：

- (1) 保证标准修订过程的科学性；
- (2) 保证标准执行过程的可操作性；
- (3) 充分考虑我国国情，符合我国技术发展水平。

第五节 内容解读

本标准由范围、规范性引用文件、用途、结构类型和尺寸、要求、试验方法、检验规则，以及标志、包装、运输与储存共 8 部分组成，现将主要技术内容说明如下。

一、范围

本标准规定了无菌猪饲养隔离器、无菌猪运输隔离器、无菌猪子宫剥离器的要求、试验方法、检验规则、标志、包装、运输和储存。

本标准适用于无菌猪及相应微生物控制级别的饲养隔离器、运输隔离器、子宫剥离器。

二、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标准。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 191—2008	《包装储运图示标志》
GB/T 12218	《一般通风用空气过滤器性能试验方法》
GB 14922.2—2011	《实验动物 微生物学等级及监测》
GB 14925	《实验动物 环境及设施》

三、用途

根据功能要求,无菌猪隔离器分为无菌子宫剥离器、无菌运输隔离器和无菌饲养隔离器。

(一) 无菌子宫剥离器

适用于无菌剖除术获取无菌仔猪。无菌状态下,结扎并脱离母体的子宫经子宫剥离器的消毒液槽,进入子宫剥离器内操作平台,在平台上获取新生仔猪。

(二) 无菌运输隔离器

与无菌子宫剥离器对接,可用于无菌新生仔猪的转移;单独使用时,可用于无菌猪中转与异地运输。

(三) 无菌饲养隔离器

正压时,适用于无菌猪和悉生猪的饲养,控制外源微生物扩散到隔离器内部区域;负压时,适用于猪感染性动物实验,控制感染源扩散到隔离器外部区域。

无菌猪始终生活于无菌猪隔离器内。

四、结构类型和尺寸

(一) 结构

1. 无菌猪饲养隔离器

应由架体、密封罩、观察窗、隔离腔体、传递系统、操作手套、进出风过滤系统等组成。

2. 无菌猪运输隔离器

应由架体、密封罩、观察窗、隔离腔体、传递系统、操作手套、进出风过滤系统等组成。

3. 无菌猪子宫剥离器

应由架体、密封罩、观察窗、隔离腔体、消毒液槽、操作手套、无菌操作台、传递系统、进出风过滤系统等组成。

(二) 类型

可选用软质或硬质材料。软质隔离腔体主体空间大小可随通风而变化,宜用于无菌猪饲养隔离器。硬质隔离腔体主体空间大小应不随通风而变化,宜用于无菌猪运输隔离器、无菌猪子宫剥离器。

(三) 尺寸

1. 无菌猪饲养隔离器尺寸

应根据实验猪饲育品种、动物实验的要求确定隔离器的尺寸。

2. 无菌猪运输隔离器尺寸

应根据无菌猪大小、运输数量的要求确定无菌猪运输隔离器的尺寸。

3. 无菌猪子宫剥离器尺寸

应根据实验猪饲育品种的要求确定子宫剥离器的消毒液槽和无菌操作台的尺寸。

五、要求

(一) 架体

采用不锈钢材料制作,架体应稳定、牢固、平整、装拆和移动方便、耐腐蚀。隔离器

风机与架体采用管道连接,架体应无明显振动。

(二) 密封罩

宜采用耐腐蚀、耐高温、耐高压、易清洗、透明、柔韧、无毒塑料密封罩,具有带塞消毒孔,宜用于无菌猪隔离器内物品传递系统的密封。

(三) 观察窗

采用耐腐蚀的不锈钢、有机玻璃等硬质材料一体成型或密封焊接组成,顶部宜具有透明硬质观察窗,应密封、无泄漏。

(四) 隔离腔体

应密封、无泄漏。

(五) 传递系统

应密封。用于不同种类物品、动物体传递空间。

(六) 操作手套

连接隔离器密封罩操作作用的胶质手套应密封、大小适用。

(七) 进出风过滤系统

进风处应有初、中、高效过滤,出风处应有中、高效过滤。

(八) 消毒液槽

采用耐腐蚀的不锈钢等硬质材料密封焊接组成,具有开口,应可以液封,具有放水口,可排放废液。

(九) 无菌操作台

采用耐腐蚀的不锈钢等硬质材料密封焊接组成,底部具有水平推拉盖,应可密封。

(十) 外观

表面应光洁、耐腐蚀。

(十一) 性能

空气进风口应经初效、中效、高效三级过滤,出风口径中效、高效二级过滤,使隔离器内在静态时的送风口洁净度达到 GB 14925 要求的 7 级或更高洁净度要求。

隔离器内落下菌数不应检出。

隔离器内气流速度应为 $0.1\text{m/s} \sim 0.3\text{m/s}$ 。

隔离器内外梯度压差应为 $20\text{Pa} \sim 55\text{Pa}$ 。

隔离器内换气次数应为 $20\text{次/h} \sim 50\text{次/h}$ 。

隔离器内饲养区内噪声应 ≤ 55 分贝。

六、试验方法

(一) 外观

手触、目测。

(二) 耐腐蚀

将隔离器腔体使用材料取一部分分别在 pH2、pH10 的溶液中浸泡 24h,应无损坏。

(三) 饲养隔离器内气流速度

按 GB 14925—2010 附录 B 规定执行。

(四) 饲养隔离器内换气次数

按 GB 14925—2010 附录 C 规定执行。

(五) 饲养隔离器内空气洁净度

按 GB 14925—2010 附录 E 规定执行。

(六) 饲养隔离器内沉降菌数

按 GB 14925—2010 附录 F 规定执行。

七、检验规则

应对产品逐台进行检验，检验合格并附合格证方可出厂。

产品经检验如有不合格项目，允许修复一次，复检后不合格则该台产品不合格。

八、标志、包装、运输、储存

(一) 标志

产品上应标明：

注册商标、产品名称、型号、数量、标准编号。

制造厂名称、地址、生产日期。

体积（长×宽×高）。

符合 GB/T 191 规定的图示标志。

(二) 包装

隔离器先用软体材料包裹衬垫，再用打包带紧密捆扎牢固。

最外层用硬质材料包装。

密封罩、手套等配件应单独装箱、打包并用纸箱包装。

(三) 运输与储存

储存时应防潮、通风，避免腐蚀性气（液）体污染和剧烈碰撞。

第六节 分 析 报 告

本标准作为无菌猪关键设备的设计、用途和技术要求，可参考本技术要求对无菌猪隔离器进行设计和指标验证，并编制报告。

第七节 国内外同类标准分析

目前国内外尚无对无菌猪隔离器提出具体技术要求的标准，本标准为第一个针对无菌猪培育用关键设备要求的团体标准。

第八节 与法律法规、标准的关系

本标准按 GB/T 1.1—2009 规则和实验动物标准的基本结构撰写，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》等国家相关法规和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。

第九节 重大分歧的处理和依据

无。

第十节 作为推荐性标准的建议

本标准发布实施后建议作为推荐性标准使用。

第十一节 标准实施要求和措施

本标准发布实施后,建议通过培训班、会议和网络宣传等形式积极开展宣传贯彻活动,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。

第十二节 本标准常见知识问答

无。

第十三节 其他说明事项

无。

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.
- 黄勇,杨松全,游小燕,等.2016. 一种无菌仔猪运输隔离器. ZL201620645582-3 (专利号).
- 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.