

第四章 T/CALAS 70—2019《实验动物 东方田鼠微生物学和寄生虫学等级及监测》实施指南

第一节 工作简况

东方田鼠为哺乳纲啮齿目仓鼠科田鼠亚科田鼠属,中文俗名沼泽田鼠、远东田鼠、大田鼠、苇田鼠、水耗子、长江田鼠、豆杵子,英文名 reed vole,拉丁名 *Microtus fortis*,主要分布在我国,其中以长江流域为主要分布地。日本血吸虫可感染包括人类在内的约 40 种哺乳动物,而在我国洞庭湖,日本血吸虫病疫区栖居的野生动物东方田鼠对日本血吸虫具有抗感染性,是目前所知的唯一对日本血吸虫感染有特殊抗性的啮齿类哺乳动物,而且这种性状能稳定地进行遗传。

东方田鼠作为新的科技基础条件资源,其微生物、寄生虫等级及检测方法的标准化是重要环节。但是,东方田鼠标准化研究一直还没开展。2010 年,中南大学在湖南省科技厅科研条件创新专项计划立项资助下开展了东方田鼠标准化研究[“实验东方田鼠标准化研究”(2010TT1006,湖南省科技厅)]。2010 年 4 月至 2013 年 12 月,完成《实验东方田鼠饲养与质量控制技术规范》地方标准编制。2014 年 10 月,《实验东方田鼠饲养与质量控制技术规范》地方标准发布。2014 年 12 月,《实验东方田鼠饲养与质量控制技术规范》地方标准实施。目前国家尚未出台实验用东方田鼠的国家标准,2018 年 5 月 0 经过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 东方田鼠微生物与寄生虫学等级及监测》团体标准编制任务,由中南大学牵头,与长沙海关、湖南师范大学、湖南中医药大学等单位共同承担《实验动物 东方田鼠微生物与寄生虫学等级及监测》中国实验动物学会团体标准的编写任务。

第二节 工作过程

2010 年 4 月至 2013 年 12 月,完成《实验东方田鼠饲养与质量控制技术规范》地方标准编制。

2014 年 10 月,《实验东方田鼠饲养与质量控制技术规范》地方标准颁布实施。

2018 年 1 月,向中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会提出东方田鼠中国实验动物学会团体标准编制申请。

2018 年 5 月,收到中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会的立项批复通知后,立即启动编制工作,成立了标准编制小组,编制小组召开会议,讨论并确定了标准编写的

原则、指导思想,并进行了分工安排。

2018年5~10月,完成了《实验动物 东方田鼠微生物与寄生虫学等级及监测》征求意见稿和编制说明初稿。

2018年11月,由中国实验动物学会面向实验动物行业单位公开征求意见。

2019年5月,编制小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。

2019年5月21日,中国实验动物学会实验动物标准化专业委员会邀请全国的实验动物专家,组织召开了标准审查会议,起草单位在审查会上详细汇报了本标准(送审稿),现场专家们认真讨论了本标准送审稿、编制说明、征求意见汇总处理,提出了修改意见和建议。标准编制小组对专家意见进行了修改,形成本标准报批稿。

第三节 编写背景

微生物等级及监测是实验动物标准化(质量控制)中的重要组成部分。目前国家尚未出台实验用东方田鼠的国家标准,除湖南省外,其余各地方也没有实验用东方田鼠的地方标准。东方田鼠作为新的科技基础条件资源,其微生物、寄生虫等级及检测方法的标准化是质量标准化的重要环节。制定此标准可排除能够诱发人畜共患病、动物烈性传染病及对实验有重大干扰的微生物和寄生虫,保证实验动物从业人员身体健康、动物生产正常进行和动物实验结果可靠。

第四节 编制原则

本标准在制定中应遵循以下基本原则:

- (1) 本标准编写格式应符合 GB/T 1.1—2009 的规定;
- (2) 本标准规定的技术内容及要求应科学、合理,具有适用性和可操作性;
- (3) 本标准的水平应达到国内领先水平。

第五节 内容解读

本标准由范围、规范性引用文件、术语和定义、东方田鼠等级分类、缩略语、检测要求、检测程序、检测规则、检测方法、结果判定、判定结论共 11 部分组成,现将主要技术内容说明如下。

一、范围

本标准规定了东方田鼠的微生物学与寄生虫学等级分类、检测要求、检测程序、检测规则、检测方法、结果判定、判定结论等。

本标准适用于东方田鼠微生物学与寄生虫学等级监测。

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。

NY/T 541	《动物疫病实验室检验采样方法》
GB/T 14926.50 ~ 14926.55	《实验动物微生物学检测方法》
GB 19489	《实验室 生物安全通用要求》
GB/T 14926.1	《实验动物 沙门菌检测方法》
GB/T 14926.4	《实验动物 皮肤病原真菌检测方法》
GB/T 14926.5	《实验动物 多杀巴斯德杆菌检测方法》
GB/T 14926.6	《实验动物 支气管鲍特杆菌检测方法》
GB/T 14926.8	《动物实验 支原体检测方法》
GB/T 14926.9	《实验动物 鼠棒状杆菌检测方法》
GB/T 14926.10	《实验动物 泰泽病原体检测方法》
GB/T 14926.12	《实验动物 嗜肺巴斯德杆菌检测方法》
GB/T 14926.13	《实验动物 肺炎克雷伯杆菌检测方法》
GB/T 14926.14	《实验动物 金黄色葡萄球菌检测方法》
GB/T 14926.17	《实验动物 绿脓杆菌检测方法》
GB/T 14926.19	《实验动物 汉坦病毒检测方法》
GB/T 14926.23	《实验动物 仙台病毒检测方法》
GB/T 14926.24	《实验动物 小鼠肺炎病毒检测方法》
GB/T 14926.25	《实验动物 呼肠孤病毒 III 型检测方法》
GB/T 14926.46	《实验动物 钩端螺旋体检测方法》
GB/T 14926.50	《实验动物 酶联免疫吸附试验》
GB/T 14926.52	《实验动物 免疫荧光试验》
GB/T 18448.1	《实验动物 体外寄生虫检测方法》
GB/T 18448.2	《实验动物 弓形虫检测方法》
GB/T 18448.6	《实验动物 蠕虫检测方法》
GB/T 18448.10	《实验动物 肠道鞭毛虫和纤毛虫检测方法》

三、术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

1. 普通级东方田鼠 conventional (CV) *Microtus fortis*

经人工培育，遗传背景明确或者来源清楚，对其携带的微生物和寄生虫实行控制，不携带所规定的人兽共患病病原和烈性传染病病原，用于科学研究、教学、生产和检定，以及其他科学实验的东方田鼠，简称普通级东方田鼠。

2. 无特定病原体级东方田鼠 specific pathogen free (SPF) *Microtus fortis*

除普通级东方田鼠应排除的病原外，不携带主要潜在感染或条件致病和对科学实验干扰大的病原的东方田鼠，称无特定病原体级东方田鼠，简称 SPF 级东方田鼠。

四、东方田鼠等级分类

东方田鼠微生物学和寄生虫学等级分为普通级和无特定病原体级两个等级。

五、缩略语

IFA: 免疫荧光试验

ELISA: 酶联免疫吸附试验

PCR: 聚合酶链反应

IHA: 间接血凝试验

ME: 显微镜检查

六、检测要求

(一) 外观指标

动物外观检查无异常。

(二) 病原微生物和寄生虫检测项目

各等级东方田鼠病原微生物和寄生虫检测项目见表 1。

表 1 各等级东方田鼠病原微生物和寄生虫检测项目

动物等级	病原微生物与寄生虫	检测要求
普通级	汉坦病毒 <i>Hantavirus</i> (HV)	●
	致病性沙门菌 <i>Salmonella</i>	●
	体外寄生虫 (节肢动物) <i>Ectoparasites</i>	●
	弓形虫 <i>Toxoplasma gondii</i>	●
	钩端螺旋体 <i>Leptospira</i>	●
	支气管鲍特杆菌 <i>Bordetella bronchiseptica</i>	●
	多杀性巴斯德杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>	●
	鼠棒状杆菌 <i>Corynebacterium kutscheri</i>	●
	泰泽病原体 <i>Tyzer's organism</i>	●
	支原体 <i>Mycoplasma</i>	●
无特定病原体级	仙台病毒 <i>Sendai Virus</i> (SV)	●
	嗜肺巴斯德杆菌 <i>Pasteurella pneumotropica</i>	●
	肺炎克雷伯杆菌 <i>Klebsiella pneumonia</i>	●
	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	●
	绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	●
	小鼠肺炎病毒 <i>Pneumonia Virus of Mice</i> (PVM)	○
	呼肠孤病毒Ⅲ型 <i>Reovirus type III</i> (Reo-3)	○

● 必须检测项目，要求阴性；○ 必要时检测项目，要求阴性。

(三) 检测项目分类

1. 必须检测项目

在进行东方田鼠质量评价时必须检测的项目，要求阴性。必须检测项目用“●”表示。

2. 必要时检测项目

在引进东方田鼠时、怀疑有本病流行时、申请实验动物生产许可证时必须检测的项目。必要时检测项目用“○”表示。

七、检测程序

检测程序见图 1。

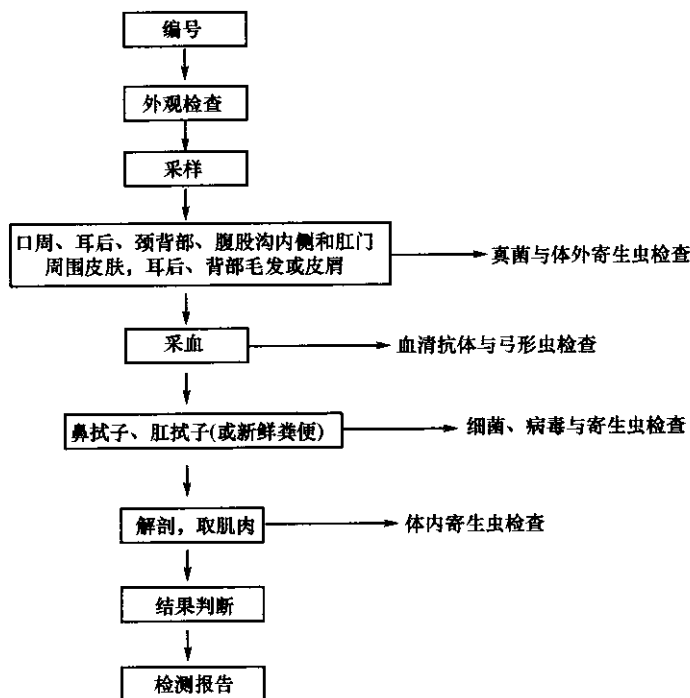


图 1 检测程序

八、检测规则

(一) 检测频率

每三个月至少检测一次。

(二) 采样

1. 方式

选择成年东方田鼠用于检测，随机取样。

2. 方法

按真菌、病毒、细菌与寄生虫要求联合取样，采样方法按照标准 NY/T 541 进行。

3. 数量

根据东方田鼠群体大小，采样数量见表 2。

表 2 采样数量

(单位：只)

群体大小	采样数量
<100	不少于 5
100 ~ 500	不少于 10
>500	不少于 20

注：若样本为血液，每只采样量不少于 1mL。

(三) 送检要求

样本要求有明显标识，安全送达实验室，送检单应写明检品名称、品系、等级、数量及检测项目等内容。样品的处理应符合 GB 19489 的规定。

九、检测方法

检测方法见表 3。

表 3 东方田鼠微生物与寄生虫检测方法

微生物检测项目	检测方法
沙门菌	GB/T 14926.1
皮肤病原真菌	GB/T 14926.4
汉坦病毒	GB/T 14926.19
金黄色葡萄球菌	GB/T 14926.14
支气管鲍特杆菌	GB/T 14926.6
多杀性巴斯德杆菌	GB/T 14926.5
支原体	GB/T 14926.8
嗜肺巴斯德杆菌	GB/T 14926.12
肺炎克雷伯杆菌	GB/T 14926.13
绿脓杆菌	GB/T 14926.17
小鼠肺炎病毒	GB/T 14926.24
呼肠孤病毒Ⅲ型	GB/T 14926.25
鼠棒状杆菌	GB/T 14926.9
泰泽病原体	GB/T 14926.10
体外寄生虫	GB/T 18448.1
弓形虫	GB/T 18448.2
蠕虫	GB/T 18448.6
鞭毛虫	GB/T 18448.10

十、结果判定

1. 病毒经 ELISA 或 IFA 检测，血清抗体阴性判为合格。

2. 病原体检查：细菌、真菌经分离培养鉴定，未见病原体判为合格。

3. 弓形虫抗体检查：经 ELISA 检测，血清抗体阴性判为合格；IHA 试验，将出现血凝“++”（即红细胞部分呈膜状沉着，周围有凝集团点，中央沉点大）时的最高稀释度定为该血凝素的效价。

4. 体外、体内寄生虫检查：在检测的各等级动物中，经 ME 检查，未见虫体、虫卵，判为合格；凡见到虫体或虫卵，判为不合格。如有一只动物的一项指标不符合该等级标准要求，则判为动物不符合该等级标准。

十一、判定结论

按照申报的等级标准，所有项目的检测结果均达到要求，判为合格。如有一只动物的一项指标不符合该等级标准要求，则判为动物不符合该等级标准。

第六节 分析报告

本标准作为东方田鼠的微生物和寄生虫质量控制的技术要求，可参考本技术要求对于检测方法进行验证并编制报告。

第七节 国内外同类标准分析

目前国内外尚无对东方田鼠微生物和寄生虫等级和检测方法提出具体的技术要求的标准，本标准第一个东方田鼠微生物和寄生虫等级及监测要求的团体标准。

第八节 与法律法规标准的关系

本标准严格遵守了国家《实验动物管理条例》《实验动物质量管理办法》等法规，同时也参考了实验动物相关的国家标准、湖南省地方标准，标准文本符合现行国家实验动物管理法规和实验动物标准的基本精神，没有与国家其他法律法规相抵触的内容。本标准作为团体标准是对现有标准的有利补充。

第九节 重大分歧意见的处理和依据

无。

第十节 作为推荐性标准的建议

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，建议积极开展宣贯、培训活动，面向各实验动物生产和动物实验的单位和个人，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

- 刘宗传,王志新. 2011. 东方田鼠微生物和寄生虫携带状况的检测及净化技术初探. 中国媒介生物学及控制杂志, 22 (5): 456-458.
- 俞远京,周智君,苏志杰. 2016. 野生东方田鼠的实验动物化及标准的建立. 实验动物科学, 33 (3): 32-36.