

ICS 65.020.30
B41
备案号: 60862-2018

DB63

青海省地方标准

DB 63/T 1699—2018

实验用喜马拉雅旱獭 微生物学等级及监测

地方标准信息服务平台

2018-09-25 发布

2018-12-01 实施

青海省质量技术监督局

发布

前 言

本部分按照GB/T 1.1-2009给出的规则编写。

本部分由青海省科学技术厅提出并归口。

本部分起草单位：青海喜马拉雅动物实验中心有限公司、青海央宗药业有限公司、青海省野生动植物保护协会。

本部分主要起草人：吴天一、范微、徐楠、张玲、周国华、张评许、张毓。

地方标准信息服务平台

微生物学等级及监测

1 范围

本部分规定了实验喜马拉雅旱獭的微生物学等级和监测，包括检测指标、检测程序、检测方法、结果判断和检测报告等要求。

本部分适用于实验用喜马拉雅旱獭微生物学等级分类、质量监测和管理。

2 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/T 14926.1 实验动物沙门菌的检测方法
- GB/T 14926.4 实验动物皮肤病原真菌检测方法
- GB/T 14926.14 实验动物金黄色葡萄球菌检测方法
- GB/T 14926.15 实验动物肺炎链球菌检测方法
- GB/T 14926.16 实验动物乙型溶血性链球菌检测方法
- Ws269-2008 布鲁杆菌PCR检测方法
- Ws279-2008 鼠疫诊断标准
- GB/T 4789.8 小肠结肠炎耶尔森氏菌检验
- 附录A 喜马拉雅旱獭肝炎病毒（WHV）的检测方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

实验用喜马拉雅旱獭 Experimental Himalayan Marmot

指经人工饲养适应青藏高原低氧环境，对其携带的病原微生物和寄生虫实行控制，遗传背景明确或者来源清楚，用于科学研究、教学、生产和检定等其他科学研究的青藏高原特有种鼠喜马拉雅旱獭。

3.2

实验用喜马拉雅旱獭微生物学等级分类

普通级实验用喜马拉雅旱獭(Conventional Marmota Himalayana)不携带所规定的人与喜马拉雅旱獭共患病原体病原和喜马拉雅旱獭烈性传染病病原的实验用喜马拉雅旱獭。

4 检测指标

4.1 外观

被毛清洁、光滑、有光泽；肌肉丰满、体态健壮、活泼；行动无异常；头脸不肿；背不穹起；四肢、尾和皮肤无缺损、无疥癣；泄殖孔清洁、正常。

4.2 病理解剖

各主要脏器无肉眼可见病理变化，如肿大、坏死灶或寄生虫包块等。

4.3 病毒

病毒见表1。

表1 实验用喜马拉雅旱獭病毒检测项目

项目	检测
旱獭肝炎病毒 <i>Woodchuck Hepatitis Virus, WHV</i>	●

注：●必须检测项目：指在进行实验用喜马拉雅旱獭质量评价时必须检测的项目。

4.4 病原菌

病原菌见表2。

表2 实验用喜马拉雅旱獭病原菌检测项目

项目	检测
沙门菌 <i>Salmonella. spp</i>	●
皮肤病原真菌 <i>Pathogenic dermal fungi</i>	●
鼠疫耶尔森菌 <i>Yersinia pestis</i>	●
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	○
小肠结肠炎耶尔森菌 <i>Yersinia enterocolitica</i>	○
肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	○
乙型溶血性链球菌 <i>B-hemolytic streptococcus</i>	○
布鲁氏菌 <i>Brucella. spp</i>	○

注1：●必须检测项目：指在进行实验用喜马拉雅旱獭质量评价时必须检测的项目。

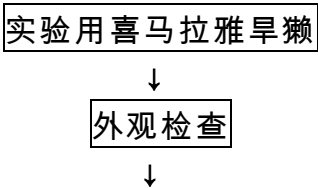
注2：○必要时检测项目：必要时要求检测的项目。

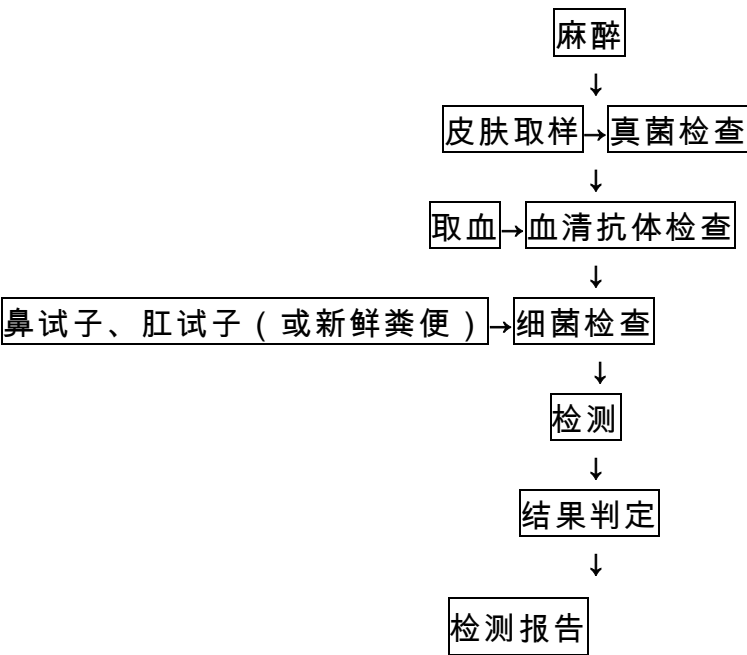
5 检测程序

5.1 检测动物应于送检当日按细菌、真菌、病毒要求联合取样检查。

5.2 检测程序见图 1。

图1 检测程序





6 检测方法

- 6.1 沙门氏菌检测按 GB/T 14926.1 的规定进行
- 6.2 皮肤病原真菌检测按 GB/T 14926.4 的规定进行
- 6.3 金黄色葡萄球菌检测 GB/T 14926.14 的规定进行
- 6.4 动物肺炎链球菌按 GB/T 14926.15 的规定进行
- 6.5 乙型溶血性链球菌按 GB/T 14926.16 的规定进行
- 6.6 布鲁杆菌按 Ws269-2008 的规定进行
- 6.7 鼠疫按 Ws279-2008 的规定进行
- 6.8 小肠结肠炎耶尔森氏菌按 GBT 4789.8-2016 的规定进行
- 6.9 早獼肝炎病毒核心抗体检测选用采用竞争抑制法、表面抗原采用双抗体夹心法检测、DNA 的检测采用 PCR 方法，检测方法见附录 A。

7 检测规则

7.1 检测频率

实验用喜马拉雅早獼病原微生物每年检测一次。

7.2 样本采集数量

样本采集数量见表3。

表3 实验用喜马拉雅早獼病原微生物检测样本采集数量要求

群体大小（只）	取样数量（雌雄各半，只）
<100	≥5
100～500	≥10

> 500	≥ 20
-------	------

7.3 样本采集要求

- 7.3.1 样本采集的部位应按从体外到体内，从头到尾的顺序无菌操作采样。
- 7.3.2 样本采集的部位决定于所检病原菌在宿主体内外的特异性定点或病变部位。对寄居于呼吸道的病原菌，通常采集鼻咽拭子或气管分泌物。定位于肠道的病原菌，采集回盲部内容物。
- 7.3.3 所采集的样本中不混有抗菌药物、消毒剂以及防腐剂。
- 7.3.4 样本应保持新鲜；用活体采样，不能立即接种的病变组织，拭子等放无菌的试管 4℃ 保存或放入运输培养基。血清样本尽量减少溶血并在低温下运送。

7.4 样本采集方法

7.4.1 皮毛

在动物皮毛消毒前，剪去头、颈、腹股沟处皮毛接种于培养基。

7.4.2 鼻咽拭子

灭菌生理盐水浸润的无菌棉拭子擦拭鼻咽部分泌物。

7.4.3 气管分泌物

- 7.4.3.1 处死动物，仰卧固定于解剖板，剪除颈部皮毛，用碘酊和75%酒精消毒皮肤后解剖。
- 7.4.3.2 暴露气管，于气管中段剪一“V”形口，用无菌棉拭子朝咽部方向擦拭，或用灭菌接种环刮取分泌物；
- 7.4.3.3 也可将整个气管剪下放入液体培养基；或剪下后用培养液吹打制成洗脱液。

7.4.4 回盲部内容物

- 7.4.4.1 处死动物，仰姿固定于解剖板上，剪除腹部皮毛，用碘酊和75%酒精消毒皮肤后解剖。
- 7.4.4.2 暴露回盲部，于该处剪一“V”形口，用灭菌接种环沾取内容物。
- 7.4.4.3 体液培养取培养液 1/10 体积内容物；如内容物极少，可将回盲部剪下放入液体培养基。

7.4.5 肛拭子

用灭菌生理盐水浸润后的无菌棉拭子插入肛门适当深度擦拭取样。

7.4.6 病变组织及分泌物

用灭菌接种环刮取病变组织及分泌物或剪下病变组织放入液体培养基；或用培养液冲洗剪下的病变组织制成洗脱液。

8 结果判定

在被检的实验用旱獭中，如果某项指标不符合该等级标准要求，则判该批动物不符合该等级标准。

9 检测报告

检测报告应包括检测项目、检测方法、检测结果、检查结论、检测人员等内容。

附 录 A
(规范性附录)
喜马拉雅旱獭肝炎病毒 (WHV) 的检测方法

A.1 WHV核心抗体的检测标准

A.1.1 方法

采用竞争抑制法检测。

A.1.2 操作流程

A.1.2.1 抗原的表达与纯化

A.1.2.1.1 将转化了pQEWHc149H的JM109菌种从-70℃取出复苏并用2mmol/L的IPTG进行大量WHcAg诱导表达,大量诱导表达后的菌液4℃ 8 000×g 10min离心沉淀后-40℃冻存。15% SDS-PAGE电泳验证诱导表达的结果。

A.1.2.1.2 用溶菌酶和超声破碎的方法裂解细菌,4℃ 12 000×g 30min使裂解液澄清,饱和硫酸铵(30%) 4℃沉淀蛋白过夜。

A.1.2.1.3 次日4℃15 000×g 30 min离心后PBS重悬,4℃56000×g 1 h超速离心,取沉淀重悬溶解后再4℃ 8000×g5min离心,留上清液-40℃冻存。

A.1.2.1.4 CsCl密度梯度离心:从超速离心管底部依次加入1.10g/cm³、1.20g/cm³、1.30g/cm³、1.40g/cm³CsCl溶液,再将-40℃冻存的粗制蛋白取出溶解后缓慢加至上层,10℃ 15000×g 19 h超速离心。离心后依次吸取超速离心管中不同密度的溶液,白色云雾状部分即为纯化后的目的蛋白。将经CsCl密度梯度离心后的目的蛋白用PBS进行透析,3d后取出,Bradford法测蛋白浓度,SDS-PAGE电泳后分析蛋白纯度。

A.1.2.2 多克隆抗体的制备

以每只BALB/c小鼠40μg纯化蛋白的量,混合等体积的氢氧化铝(2.2 mg/ml)后背部多点注射免疫,2周及4周时各加强免疫1次,共免疫3次。1周后取血分离血清。

A.1.2.3 ELISA检测方法的建立

确定ELISA中的抗体稀释度和待检血清稀释度:以0.6 μg/ml WHcAg包被ELISA板,次日洗板后用5%FBS-PBST 37℃封闭2 h,洗板,倍比稀释小鼠多克隆抗体,1:10、1:100、1:1000、1:10 000、1:100 000、1:1 000 000稀释已知阳性血清和阴性血清,分别等体积混合(50μL+50μL)后加入,37℃温育2 h,洗板后加入HRP标记羊抗小鼠IgG(H+L) 37℃温育45 min,洗板,显色。

A.1.3 结果判定

计算抑制率,大于50%为阳性。

A.1.4 质量控制

每次检测均设置强阳性对照、弱阳性对照、阴性对照、空白对照;所有样本、标准品均为双孔;强阳性对照、弱阳性对照、阴性对照标准品及所有试剂均小量分装后冷冻保存。

A.2 WHV表面抗原的检测标准

A.2.1 方法

采用双抗体夹心法检测。

A.2.2 操作流程

- A.2.2.1 以缓冲液稀释抗WHs并包被ELISA板过夜。
- A.2.2.2 PBS洗板三次。
- A.2.2.3 封闭液37℃封闭1小时，洗板同上。
- A.2.2.4 加入血清，37℃孵育30分钟，洗板同上。
- A.2.2.5 加入稀释的生物素标记抗WHs，37℃孵育30分钟，洗板同上。
- A.2.2.6 加入HRP标记亲和素，37℃孵育30分钟，洗板同上。
- A.2.2.7 加入显色剂A和显色剂B，室温避光显色15分钟。
- A.2.2.8 加入终止液，酶标仪读取OD450。

A.2.3 结果判定

计算S/N值，大于2.1判为阳性。

A.2.4 质量控制

每次检测均设置强阳性对照、弱阳性对照、阴性对照、空白对照；所有样本、标准品均为双孔；强阳性对照、弱阳性对照、阴性对照标准品及所有试剂均小量分装后冷冻保存。

A.3 WHV DNA的检测标准

A.3.1 方法

采用PCR方法检测。

A.3.2 操作流程

A.3.2.1 制作标准曲线

不同浓度的包含WHV全长序列的质粒pcDNA3.1WHV作为标准品。

A.3.2.2 血清DNA抽提

按Qiagen blood/tissue DNA抽提试剂盒说明书操作。具体操作如下：

- 1) 取无菌采集的早獭血清 200 μ L，加入 20 μ L 的蛋白酶 K 溶液，混匀后加入 200 μ L 缓冲液 AL，振荡混匀，56℃放置 10 min。
- 2) 加入 200 μ L 无水乙醇，充分振荡混匀 15 秒，简短离心去除管盖内壁的水珠。
- 3) 将上述所得溶液和絮状沉淀加入到吸附柱 DNeasy Mini 柱中(吸附柱放入收集管中)，8000rpm 离心 1 min，倒掉废液，将吸附柱放回新收集管中。
- 4) 向吸附柱中，加入 500 μ L 缓冲液 AW1，12,000 rpm 离心 30 秒，倒掉废液，将吸附柱 CB3 放回收集管中。

- 5) 向吸附柱中加入 700 μL 漂洗液 AW2，12,000 rpm 离心 30 秒，倒掉废液，将吸附柱放回收集管中。
- 6) 向吸附柱中加入 500 μL 漂洗液 PW，12,000 rpm 离心 30 秒，倒掉废液。
- 7) 将吸附柱放回收集管中，12,000 rpm 离心 2 min，倒掉废液。
- 8) 将吸附柱室温放置数分钟，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

向吸附柱吸附膜中间部位悬空滴加100 μL洗脱液AE，室温放置2 min-5 min，12,000 rpm离心2 min，将溶液收集到新的离心管中，放置于-20℃保存。

A. 3. 2. 3 配制PCR体系如下：

表A. 1 配制 PCR 体系

体系	体积 (μL)
2xPCR MIX Buffer	25
Primer 1	0.5
Primer 2	0.5
提取的病毒 DNA	2
H ₂ O	22

注：引物序列如下：Primer 1: 5'-CCTCCAACCTCCACCTCTAAG-3'; Primer 2:5'-TTGTGTTGGCGTTCGGT-3'。

A. 3. 2. 4 PCR反应条件如下

用离心机轻轻离心PCR反应管后放入PCR仪中进行PCR反应，进行Negative Control实验时的DNA模板使用了2μL的灭菌蒸馏水，每个样品做三个平行孔，PCR反应条件如下：

95℃ 5 min 1cycle

95℃ 20s

60℃ 20

72℃ 30s

} 30 Cycles

A. 3. 3 结果判定

取上述PCR产物5μl，进行DNA凝胶电泳进行PCR结果鉴定，跟阳性WHV模板对照，符合预期大小条带的特异性PCR产物，即确定WHV病毒阳性。

A. 3. 4 质量控制

每次检测均设置强阳性对照、弱阳性对照、阴性对照、空白对照；所有样本、标准品均为双孔；强阳性对照、弱阳性对照、阴性对照标准品及所有试剂均小量分装后冷冻保存。