

ICS 65.020.30

B44

中华人民共和国国家质量监督

检验检疫总局备案号：29190-2010

DB53

云 南 省 地 方 标 准

DB53/T 328.1—2010

实验树鼯 第 1 部分：微生物学等级及监测

2010 - 11 - 16 发布

2011 - 03 - 01 实施

云南省质量技术监督局 发布

前 言

DB53/T 328分为五个部分：

——第1部分：微生物学等级及监测；

——第2部分：寄生虫学等级及监测；

——第3部分：遗传质量控制；

——第4部分：配合饲料；

——第5部分：环境及设施。

本部分为DB53/T 328的第1部分。

本部分由云南省科学技术厅提出并归口。

本部分起草单位：昆明医学院。

本部分主要起草人：宝福凯、张才军、柳爱华、郑红、角建林、沈培清。

实验树鼯 第 1 部分：微生物学等级及监测

1 范围

本部分规定了实验树鼯的微生物学等级和监测，包括等级分类、检测指标、检测程序、检测方法、结果判定和检测报告等要求。

本部分适用于实验树鼯微生物学等级分类、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
- GB/T 14926.17 实验动物 绿脓杆菌检测方法
- GB/T 14926.22 实验动物 小鼠肝炎病毒检测方法
- GB/T 14926.48 实验动物 结核分枝杆菌检测方法
- GB/T 14926.49 实验动物 空肠弯曲杆菌检测方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本部分。

3.1

实验树鼯 laboratory tree shrew

指经人工饲养、繁殖，对其携带的微生物及寄生虫实行控制，遗传背景明确或来源清楚的用于科学研究、教学、生产、检定以及其他科学实验的树鼯。

4 实验树鼯微生物学等级分类

4.1 普通级实验树鼯 conventional (CV) tree shrew

不携带所规定的人与树鼯共患病病原和树鼯烈性传染病病原的实验树鼯。

4.2 无特定病原体级实验树鼯 specific pathogen free (SPF) tree shrew

除普通级实验树鼯应排除的病原外，不携带对实验树鼯主要潜在感染或条件致病性和对科学实验

干扰大的病原。

5 检测指标

5.1 外观指标

外观行为、体征正常。

5.2 病原微生物检测指标要求

病原微生物检测指标要求见表1。

表1 实验树鼩病原微生物检测指标要求

等级		应排除的病原微生物	检测	要求
无特定病原体级	普通级	沙门菌 <i>Salmonella spp.</i> 皮肤病原真菌 Pathogenic dermal fungi 结核分支杆菌 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	┃ ┃ ┃	检测结果阴性
		空肠弯曲杆菌 <i>Sampylobaceter jejuni</i> 肝炎病毒 Hepatitis Virus 肺炎链球菌 <i>Streptococcus pnemoniae</i> 伯氏疏螺旋体 <i>Borreli a burgdorferi</i> 金黄色葡萄球菌 <i>Staphyl ocooccus aureus</i> 乙型溶血性链球菌 β -hemoliti cstreptococcus 腺病毒 Adnovirus 绿脓杆菌 <i>Pseudomonas aerugi nosa</i>	┃ ┃ ┃ ○ ○ ○ ○ ○	
<p>●必须检测项目：指在进行实验树鼩质量评价时必须检测的项目</p> <p>○必要时检测项目：指引进实验树鼩时或怀疑本病流行等必要时要求检测的项目</p>				

5.3 检测频率

普通级实验树鼩每年检测一次，无特定病原体级实验树鼩每6个月检测一次。

6 检测程序

6.1 检测的实验树鼩应当日按细菌、真菌、病毒要求联合取样检查。

6.2 检测程序见图1。

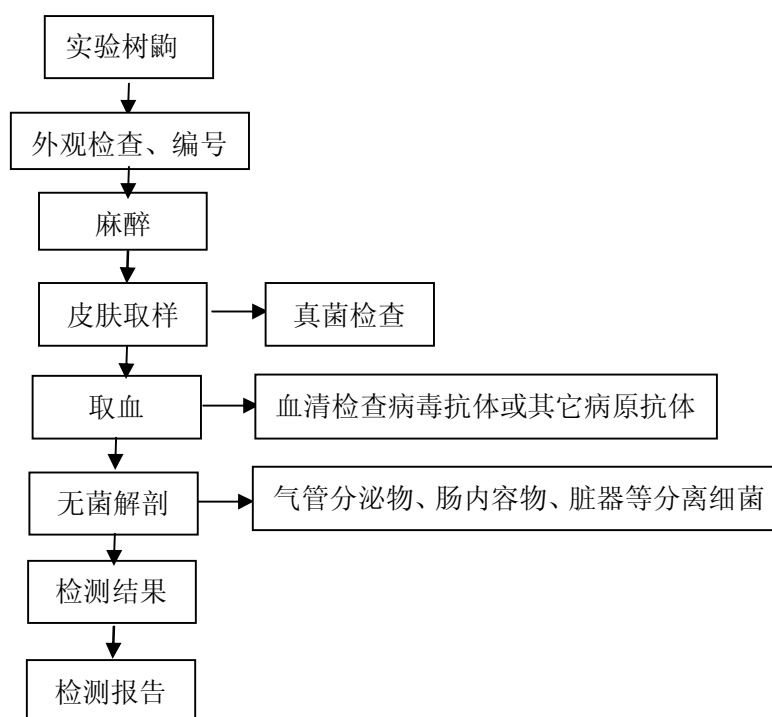


图1 检测程序

7 检测方法

- 7.1 沙门菌按 GB/T 14926.1 的规定检测。
- 7.2 皮肤病原真菌按 GB/T 14926.4 的规定检测。
- 7.3 结核分支杆菌按 GB/T 14926.48 的规定检测。
- 7.4 空肠弯曲杆菌按 GB/T 14926.49 的规定检测。
- 7.5 肝炎病毒按 GB/T 14926.22 的规定检测。
- 7.6 肺炎链球菌按 GB/T 14926.15 的规定检测。
- 7.7 金黄色葡萄球菌按 GB/T 14926.14 的规定检测。
- 7.8 乙型溶血性链球菌按 GB/T 14926.16 的规定检测。
- 7.9 绿脓杆菌按 GB/T 14926.17 的规定检测。
- 7.10 伯氏疏螺旋体和腺病毒选用 PCR 方法进行，见附录 A。

8 采样

8.1 取样

按表2取样

表2 实验树鼩不同生产繁殖单元取样数量

群体大小, 只	取样数量 (雌雄各半)
< 100	不少于 5 只
100~500	不少于 10 只
> 500	不少于 20 只

8.2 样本采集

8.2.1 采集要求

8.2.1.1 样本采集应按从体外到体内, 从头到尾的顺序无菌操作采样。

8.2.1.2 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。

8.2.1.3 所采集的样本中不混有抗菌药物、消毒剂以及防腐剂。

8.2.1.4 样本应保持新鲜; 用活体采样, 不能立即接种的病变组织、拭子等须放无菌的试管 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。

8.2.2 采集方法

8.2.2.1 皮毛

在动物皮毛消毒前, 剪取头、颈、腹股沟处皮毛接种于培养基。

8.2.2.2 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。

8.2.2.3 气管分泌物

处死动物, 仰卧固定于解剖板上, 剪除颈部皮毛, 用碘酊和75%酒精消毒皮肤后解剖, 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; 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成洗脱液。

8.2.2.4 回盲部内容物

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, 暴露回盲部, 于该处剪一“V”形口, 用灭菌接种环沾取内容物; 需液体培养者应取培养液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。

8.2.2.5 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。

8.2.2.6 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。

9 结果判定

在被检测的实验树鼯中，如果有一只树鼯的一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。

10 报告

报告应包括检测项目、检测方法、检测设备、检测结果、检测结论、检测人员等内容。

附录 A
(规范性附录)

实验树鼩的伯氏疏螺旋体和腺病毒的检测方法

A.1 伯氏疏螺旋体的PCR检测方法

A.1.1 材料

A.1.1.1 主要试剂

总DNA提取试剂盒和PCR试剂盒；伯氏疏螺旋体PCR检测引物：上游引物BbP1序列为：5'-CAAGCGTCTTGACTTTAAGAGTT-3' (T_m 58.2)，下游引物BbP2：5'-GAAAGCACCTAAATTTGCCCTTTGA-3' (T_m 58.4)，扩增产物为316bp。

A.1.1.2 主要仪器

PCR仪、高速离心机、37℃水浴箱、电泳仪、紫外可见光分光光度计、凝胶成像仪。

A.1.2 方法

A.1.2.1 动物的处理和取材

树鼩用乙醚过量麻醉后无痛处死，立即取肝、脾、肾、膀胱保存在-30℃冰箱中备用。

A.1.2.2 标本总DNA提取

树鼩膀胱在低温下匀浆，用Takara总DNA提取试剂盒提取总DNA，具体操作按说明书进行。DNA标本经紫外可见光分光光度计测定浓度，通过OD₂₆₀/OD₂₈₀比值判断质量。

A.1.2.3 PCR体系和方法

PCR体系按Takara PCR试剂盒说明书进行，每个反应管总体积为50 μl，引物终浓度为50nmol，DNA样品1 μl。

采用渐降PCR (touchdown PCR, TD-PCR) 技术。具体方法为：热启动94℃ 10min；92℃ 1min，62℃ 1min，72℃ 1min，10个循环；92℃ 1min，52℃ 1min，72℃ 1min，5个循环；最后一步，72℃ 延伸1min。PCR过程中设阳性和阴性对照。实验重复3次。

A.1.2.4 PCR产物电泳和凝胶成像

取5 μl PCR产物电泳，用DNA marker确定PCR产物长度。用BioRad凝胶成像仪检测PCR产物并照相。

A.1.3 结果判断

扩增到特异性条带可确诊。对阳性检测结果，选用同一种方法或另一种方法重试。如仍为阳性则判为阳性。

A.2 腺病毒的PCR检测方法

A.2.1 材料

A.2.1.1 主要试剂

总DNA提取试剂盒和PCR试剂, MHV RT-PCR引物: AV-HF 5'-GCCGCAGTGGTCTTACATGCA CAT-3'; AV-HR 5'-CAGCACGCCGCGATGTCAAAG-3'; 扩增片段300bp。

A.2.1.2 主要仪器

PCR仪、高速离心机、37℃水浴箱、电泳仪、紫外可见光分光光度计、凝胶成像仪。

A.2.2 方法

A.2.2.1 动物的处理和取材

动物用乙醚过量麻醉后无痛处死, 立即取肺、肝、脾、肾、膀胱保存在-30℃冰箱中备用。

A.2.2.2 PCR方法

A.2.2.2.1 病毒RNA的提取: 采用Trizol按说明提取, 制备模板RNA。

A.2.2.2.2 逆转录、合成cDNA: 采用SuperScript™II或AMV逆转录酶, 按说明书进行。

A.2.2.2.3 PCR扩增: 反应条件为95℃预变性10min, 92℃60s、56℃60s、72℃60s、扩增30~35个循环, 72℃延伸15min。

A.2.2.2.4 扩增产物用1~2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。若条带的分子量与预期片段大小相同, 则表明为特异性扩增产物。

A.2.2.3 PCR产物电泳和凝胶成像

取5μl PCR产物电泳, 用DNA marker确定PCR产物长度。用BioRad凝胶成像仪检测PCR产物并照相。

A.2.3 结果判断

扩增到特异性条带可确诊腺病毒感染。对阳性检测结果, 选用同一种方法或另一种方法重试。如仍为阳性则判为阳性。
