

ICS 65.020.30

B 44



中国实验动物学会团体标准

T/CALAS 8—2017

实验动物 树鼩微生物学等级及监测

Laboratory animal - Microbiological standards and monitoring in tree shrew

2017-05-18 发布

2017-05-18 实施

中国实验动物学会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则编制。

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：中国医学科学院医学生物学研究所、中国食品药品检定研究院。

本标准主要起草人：孙晓梅、代解杰、贺争鸣、岳秉飞、罕园园、王文广、李娜、巩薇、王淑菁、邢进、付瑞、匡德宣、陆彩霞、仝品芬。

实验动物 树鼩微生物学等级及监测

1 范围

本标准规定了树鼩的微生物学等级分类、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。

本标准适用于树鼩微生物学等级监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准。然而，鼓励根据本标准达成协议的各方，研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

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 14926.47 《实验动物 志贺菌检测方法》

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 14926.30 《实验动物 兔轮状病毒检测方法》

GB/T 14926.49 《实验动物 空肠弯曲杆菌检测方法》

GB/T 14926.60 《实验动物 猕猴疱疹病毒 I 型（B 病毒）检测方法》

GB/T 14926.50 《实验动物 酶联免疫吸附实验》

GB/T 14926.52 《实验动物 免疫荧光试验》

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

普通级树鼩 conventional (CV) tree shrew

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树鼩。简称普通树鼩。

3.2

无特定病原体级树鼯 **specific pathogen free (SPF) tree shrew**

除普通级树鼯应排除的病原外，不携带所规定的潜在感染或条件致病和对科学实验干扰大的病原的树鼯。简称无特定病原体树鼯或 SPF 树鼯。

4 树鼯等级分类

树鼯微生物学等级分为普通级和无特定病原体级。

5 缩略语

IFA：免疫荧光试验

ELISA：酶联免疫吸附试验

PCR：聚合酶链式反应

6. 检测要求

6.1 外观指标

外观检查无异常。

6.2 病原微生物检测项目

各等级树鼯病原微生物检测项目见表 1。

表 1 各等级树鼯病原微生物检测项目

动物等级		病原微生物	检测要求
无特定病原体级	普通级	沙门菌 <i>Salmonella</i> spp.	●
		志贺菌 <i>Shigella</i> spp.	●
		皮肤病原真菌 <i>Pathogenic dermal fungi</i>	●
	无特定病原体级	疱疹病毒 <i>Herpesvirus</i>	●
		轮状病毒 <i>Rotavirus</i>	●
		呼肠孤病毒 <i>Reovirus</i>	●
		腺病毒 <i>Adenovirus</i>	○
		肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	●
		变形杆菌 <i>Proteus</i> spp.	●
		金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	○
空肠弯曲菌 <i>Campylobacter jejuni</i>	○		

●必须检测项目，要求阴性；

○必要时检测项目，要求阴性。

6.3 检测项目分类

6.3.1 必须检测项目

在进行树鼯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。

6.3.2 必要时检测项目

在引进树鼩时；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。

7. 检测程序

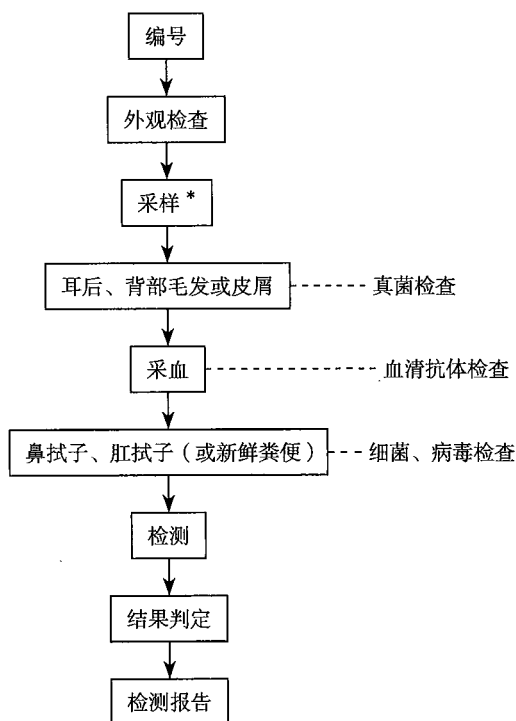


图 1 检测程序

*：结合临床症状和实验室检查结果，需要进一步确证时，可取特定样本进行检测

8 检测规则

8.1 检测频率 每三个月至少检测一次。

8.2 采样

8.2.1 方式

选择成年树鼩用于检测，随机取样。

8.2.2 方法

8.2.2.1 按真菌、病毒、细菌要求联合取样。

8.2.2.2 采样方法按照标准 NY/T 541 进行。

8.2.3 数量

根据树鼩群体大小，采样数量见表 2。

表 2 采样数量

群体大小 (只)	采样数量 *
< 100	不少于 5 只
100~500	不少于 10 只
> 500	不少于 15 只

* 血液不少于 1ml/ 只

8.3 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。

9 检测方法

- 9.1 沙门菌按 GB/T 14926.1 的规定进行。
- 9.2 皮肤病原真菌按 GB/T 14926.4 的规定进行。
- 9.3 志贺菌按 GB/T 14926.47 的规定进行。
- 9.4 金黄色葡萄球菌按 GB/T 14926.14 的规定进行。
- 9.5 肺炎链球菌按 GB/T 14926.15 的规定进行。
- 9.6 轮状病毒按 GB/T 14926.30 的规定进行。
- 9.7 空肠弯曲杆菌按 GB/T 14926.49 的规定进行。
- 9.8 疱疹病毒按 GB/T 14926.60 的规定进行。
- 9.9 呼肠孤病毒按附录 A 的方法进行。
- 9.10 腺病毒按附录 B 的方法进行。
- 9.11 变形杆菌按附录 C 的方法进行。

10 结果判定

- 10.1 抗体检查 疱疹病毒和轮状病毒经 ELISA 或 IFA 检测, 血清抗体阴性判为合格。
- 10.2 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。
- 10.3 病原体核酸 PCR 检查 呼肠孤病毒和腺病毒待检样品经核酸 PCR 检测, 无扩增目的条带判为合格。待检样品扩增出特异性目的条带即可判为疑似阳性; 对疑似阳性样品, 再用同一 PCR 或 ELISA 方法重试, 如仍为阳性则判为阳性, 判为不合格。

11 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。

附录 A 树鼩呼肠孤病毒 PCR 检测方法

A.1 材料

A.1.1 主要试剂

病毒总 RNA 提取试剂盒和 PCR 试剂盒; 树鼩呼肠孤病毒 PCR 检测引物及目的片段大小见附表 1。

附表 1

树鼩呼肠孤病毒 PCR 检测引物列表		
外围	上游引物 TRV-F1	5' -CCATGATACTGACTCAGTTTGGACCG -3'
	下游引物 TRV-R1	5' -CACTAAGAAAATACCRCTAGTRCAWGCCAT -3'
内围	上游引物 TRV-F2	5' -GATTAAGGCBCCWTTGGAGAAGTTTG -3'
	下游引物 TRV-R2	5' -GACAAGGGCRTRRCTCCCATGTACAT -3'

注：扩增目的片段 513bp

A.1.2 主要仪器

PCR 仪、高速离心机、恒温水浴箱、电泳仪、紫外分光光度计、凝胶成像系统。

A.2 方法

采用普通巢氏 RT-PCR 检测方法。

A.2.1 样品取材

用无菌棉签采取树鼩肛拭子，或新鲜粪便保存在 -20°C 冰箱备用。

A.2.2 标本总 RNA 提取

用病毒 RNA 提取试剂盒提取 RNA，具体操作按说明书进行。经紫外分光光度计测定浓度，通过 OD260/OD280 比值判定质量。

A.2.3 PCR 反应

cDNA 合成反应：按照 Fermentas RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 操作步骤，依据反转录体系见附表 2，反应条件为： 25°C 孵育 5min， 42°C 60min， 70°C 5min 获得 cDNA。

反转录反应体系见附表 2

附表 2

反应成分	反应体积
病毒 RNA	8 μL
Random Hexamer Primer	1 μL
Nuclease-free water	3 μL
5 \times Reaction buffer	4 μL
RiboLock RNase Inhibitor (20U/ μL)	1 μL
10mmol/L dNTP Mix	2 μL
RevertAid M-MuLV RT (200U/ μL)	1 μL
总体积	20 μL

第一次 PCR 反应体系及条件见附表 3。

附表 3

第一次 PCR 反应体系		第一次 PCR 反应扩增条件	
反应成分	反应体积	95℃ 5min	
反转录 cDNA 模板	3μL	} 35 个循环	
DreamTaq Green PCR Master Mix	12.5μL		95℃ 30s
nuclease-free water	7.5μL		50℃ 30s
TRV-F1 (5μmol/L)	1μL		72℃ 2min,
TRV-R1 (5μmol/L)	1μL		
总体积	25μL	72℃ 10min	

第二次 PCR 反应体系及条件见附表 4

附表 4

第二次 PCR 反应体系		第二次 PCR 反应扩增条件	
反应成分	反应体积	95℃ 5min	
反转录 cDNA 模板第一次 PCR 产物 3μL	3μL	} 35 个循环	
DreamTaq Green PCR Master Mix	12.5μL		95℃ 30s
Nuclease-free water	7.5μL		50℃ 30s
TRV-F2 (5μmol/L)	1μL		72℃ 2min,
TRV-R2 (5μmol/L)	1μL		
总体积	25μL	72℃ 10min	

A.2.4 电泳检测

取 5μL PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (含 0.5mg/mL 溴乙锭) 分离, 用 DNA marker 确定 PCR 产物大小。在凝胶成像系统观察是否有 513bp 扩增条带。

A.3 结果判定

在阴性、阳性对照成立的条件下, 待检样品扩增到 513bp 特异性条带判为阳性, 未扩增到判为阴性。对阳性检测结果, 再用同一 PCR 或 ELISA 方法重试, 如仍为阳性则判为阳性。

附录 B 树鼩腺病毒 PCR 检测方法

B.1 材料

B.1.1 主要试剂

DNA 提取试剂盒和 PCR 试剂盒; 树鼩腺病毒 PCR 检测引物: 上游引物: GCGGAGCGGGTTGTAGGGTA; 下游引物: TCGTGCGGCTGGCGTTTT; 扩增目的片段 495bp。

B.1.2 主要仪器

PCR 仪、高速离心机、恒温水浴箱、电泳仪、紫外分光光度计、凝胶成像系统。

B.2 方法

采用普通 PCR 检测方法。

B.2.1 样品取材

采取树鼩新鲜粪便保存在 -20°C 冰箱备用。

B.2.2 样品总 DNA 提取

用 DNA 提取试剂盒提取粪便 DNA，具体操作按说明书进行。经紫外分光光度计测定浓度，通过 OD260/OD280 比值判定质量。

B.2.3 PCR 反应

PCR 反应体系为 $25\mu\text{L}$ ，包括：10xPCR buffer $2.5\mu\text{L}$ ，dNTP $2\mu\text{L}$ ，ddH₂O $17.35\mu\text{L}$ ，引物各 $1\mu\text{L}$ ，DNA $1\mu\text{L}$ ，HS *Taq* 酶 $0.15\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为： 94°C 预变性 5min； 94°C 1min；退火温度 58°C 1min， 72°C 1min，35 个循环； 72°C 10min。

B.2.4 电泳检测

取 $5\mu\text{L}$ PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，用 DNA marker 确定 PCR 产物大小。用凝胶成像系统测定 PCR 产物，阳性片段为 495bp。

B.3 结果判定

在阴性、阳性对照成立的条件下，待检样品扩增到 495bp 特异性条带判为阳性，未扩增到判为阴性。对阳性检测结果，再用同一 PCR 或 ELISA 方法重试，如仍为阳性则判为阳性。

附录 C 树鼩变形杆菌检测方法

C.1 材料

C.1.1 主要试剂

S.S 琼脂；血琼脂培养基；麦康凯琼脂平板；氧化酶试纸。

C.1.2 主要仪器

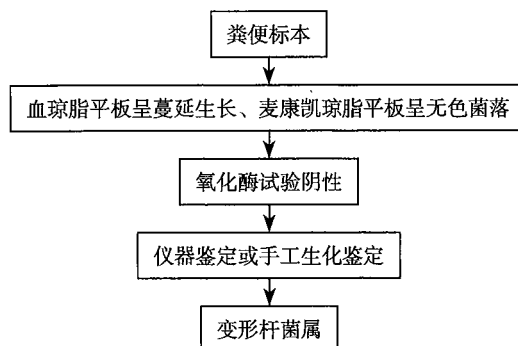
普通恒温培养箱。

C.2 方法

C.2.1 动物的取材

用无菌棉签采取树鼩肛拭子，或新鲜粪便。

C.2.2 检测流程



附图 1 检测流程图

C.2.3 形态与染色

革兰阴性菌落。

C.2.4 培养特性

在血琼脂平板上 $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24h, 可蔓延成波纹状薄膜, 布满整个平板表面(迁徙现象); 在 SS 平板上为无色透明中心黑色或灰色、中等大小菌落; 在麦康凯琼脂平板上形成圆形、扁平、无色半透明的菌落。

C.2.5 生化反应

氧化酶试验阴性, 发酵葡萄糖和蔗糖, 不发酵乳糖、肌醇和甘露醇, KCN 生长、动力、 H_2S 、脲酶和苯丙氨酸脱氨酶试验均为阳性, TSI 为 K/A。

C.2.6 鉴别要点

C.2.6.1 本菌属特征

血琼脂平板上菌落呈迁徙生长, SS 平板上为无色透明中心黑色或灰色、中等大小菌落; 脲酶、 H_2S 、苯丙氨酸脱氨酶试验均为阳性。

C.2.6.2 变形杆菌种间的鉴别见附表 5。

附表 5 变形杆菌种间的鉴别

菌名	VP	H_2S	吲哚	脲酶	鸟氨酸	麦芽糖	苯丙氨酸
奇异变形杆菌	50	98	2	98	99	0	98
普通变形杆菌	0	95	98	95	0	97	99
潘氏变形杆菌	0	30	0	100	0	100	99
产黏变形杆菌	100	0	0	100	0	100	100

C.2.7 操作步骤

C.2.7.1 氧化酶试验

将滤纸片浸泡于 1% 盐酸四甲基对苯二胺试剂中制成试剂纸片, 取菌涂于试剂纸上, 细菌在与试剂接触 10s 内呈深紫色, 则为阳性。

C.2.7.2 鉴定

从麦康凯琼脂平板上挑取可疑菌落, 用微生物鉴定仪(参见《仪器操作作业指导书》)或传统生化反应进行细菌鉴定。

参 考 文 献

- 李晓飞, 殷安国, 张媛, 等. 2014. 树鼩呼肠孤病毒 RT-nPCR 检测方法的建立及初步应用. 中国比较医学杂志, 24(6): 63-68.
- 刘丽君, 余柄廷, 胡凝珠, 等. 2015. 树鼩粪便细菌分离培养与鉴定. 中国比较医学杂志, 25(10): 64-68.
- 王新兴, 李靖潇, 王文广, 等. 2011. 野生中缅树鼩病毒携带情况的初步调查. 动物学研究, 32(1): 66-69.
- 邢进, 冯育芳, 付瑞, 等. 2012. 野生树鼩可培养细菌和真菌携带情况的调查. 实验动物科学, 29(3): 34-38.