

实验动物环境设施 质量要求与管理

清华大学实验动物中心
常在

2018年11月6日

内容

- 我最熟悉小鼠，所以只能以小鼠设施为例
- 运行管理：
 - 新动物房的设计和建造：敞亮、高大上
 - 环境质量控制：消毒剂的选择及监测方法改变
 - 动物质量控制：微生物质量、遗传质量
 - 动物福利管理：enrichments/toys
 - 人员培训和职业健康：新设备运用（下一讲）
 - 运行成本控制：走向职业化管理，努力做到收支平衡
 - 文件资料管理：做到有据可查，应对各种检查认证
- 目的：如何维持环境正常运行，保障动物质量

运行管理之 环境质量控制

- 环境洁净度控制
- 动物饮用水、饲料、垫料的质量控制
- 灭菌设备灭菌效果监测
- 笼架及笼具的消毒和灭菌
- 消毒剂的选择

环境监测的项目和频率

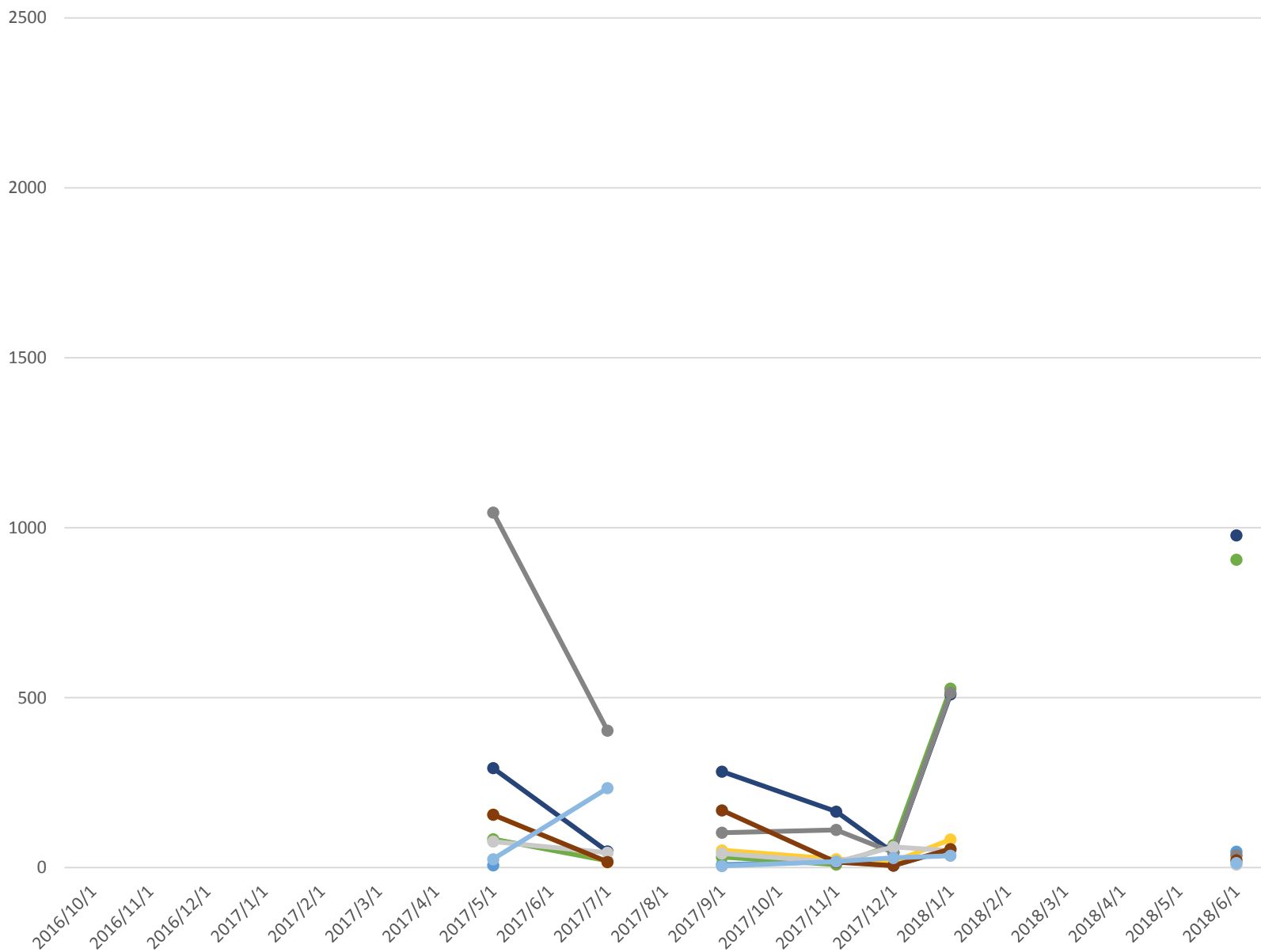
- 以前的做法：自己备一套监测设备（坏/不合适最佳使用状态）
- 委托第三方检测机构检测：每半年一次
 - 尘埃粒子数
 - 换气次数
 - 氨气浓度
 - 噪音等
- HEPA更换频率：节约/性价比
 - 1次/年（与检测结果也相关）
 - 虽然不便宜，但是更换后节省电费支出

表面洁净度监测

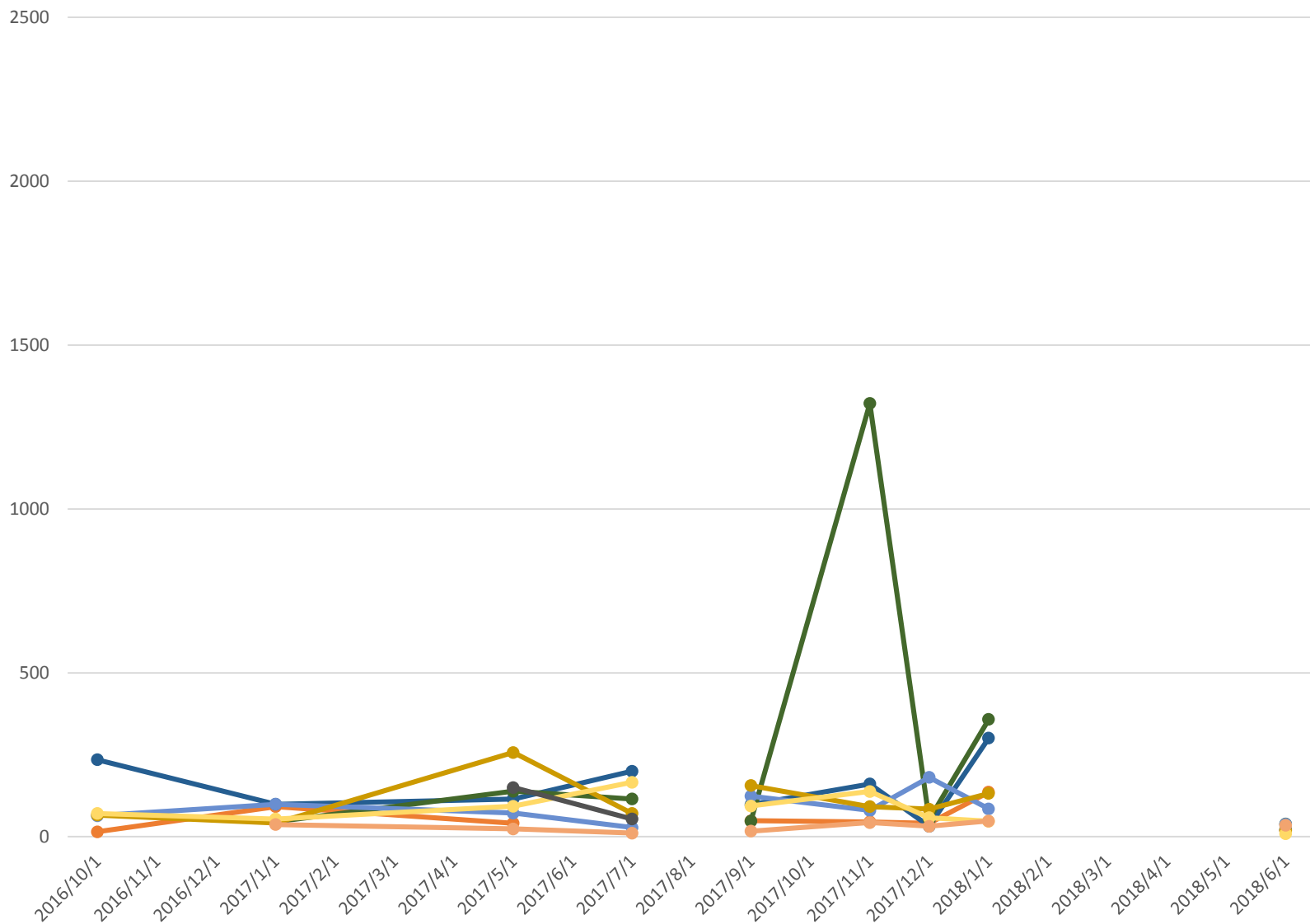
- 屏障内物品表面洁净度：
 - 1次/季度（不定期）：
 - 检测时间应在消毒前后
 - 排风口应在清洗笼架前后
- 饲养员工作是否认真负责
- 消毒剂的选择是否正确
- 目的：建立监督的机制
 - 质检员/饲养员/主管，通过报告记录联系在一起
- 方法：
 - 棉拭子→培养（时间3-7d）
 - ATP荧光检测仪（Guide推荐，几分钟就可以完成）



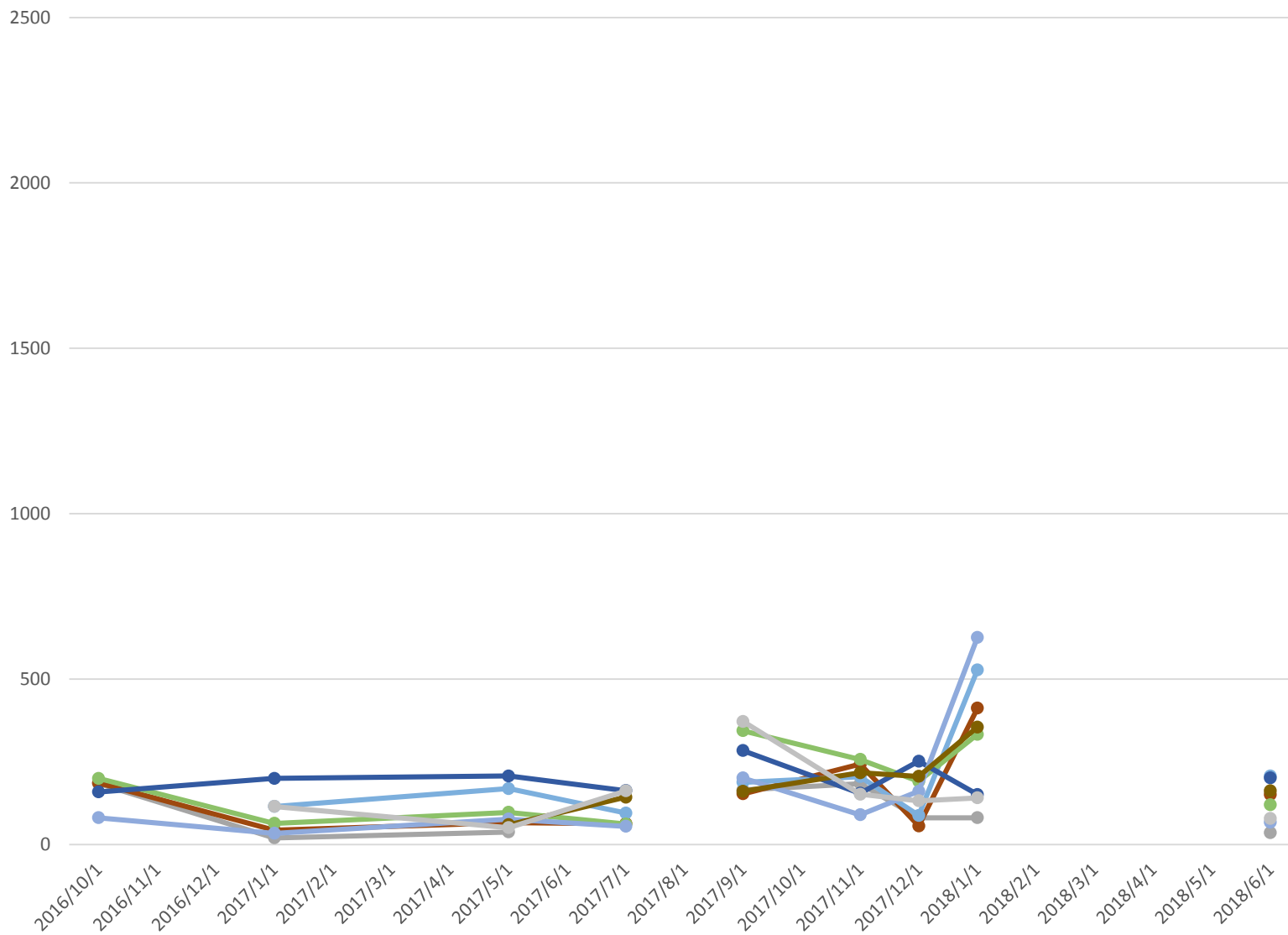
桌面洁净度检测



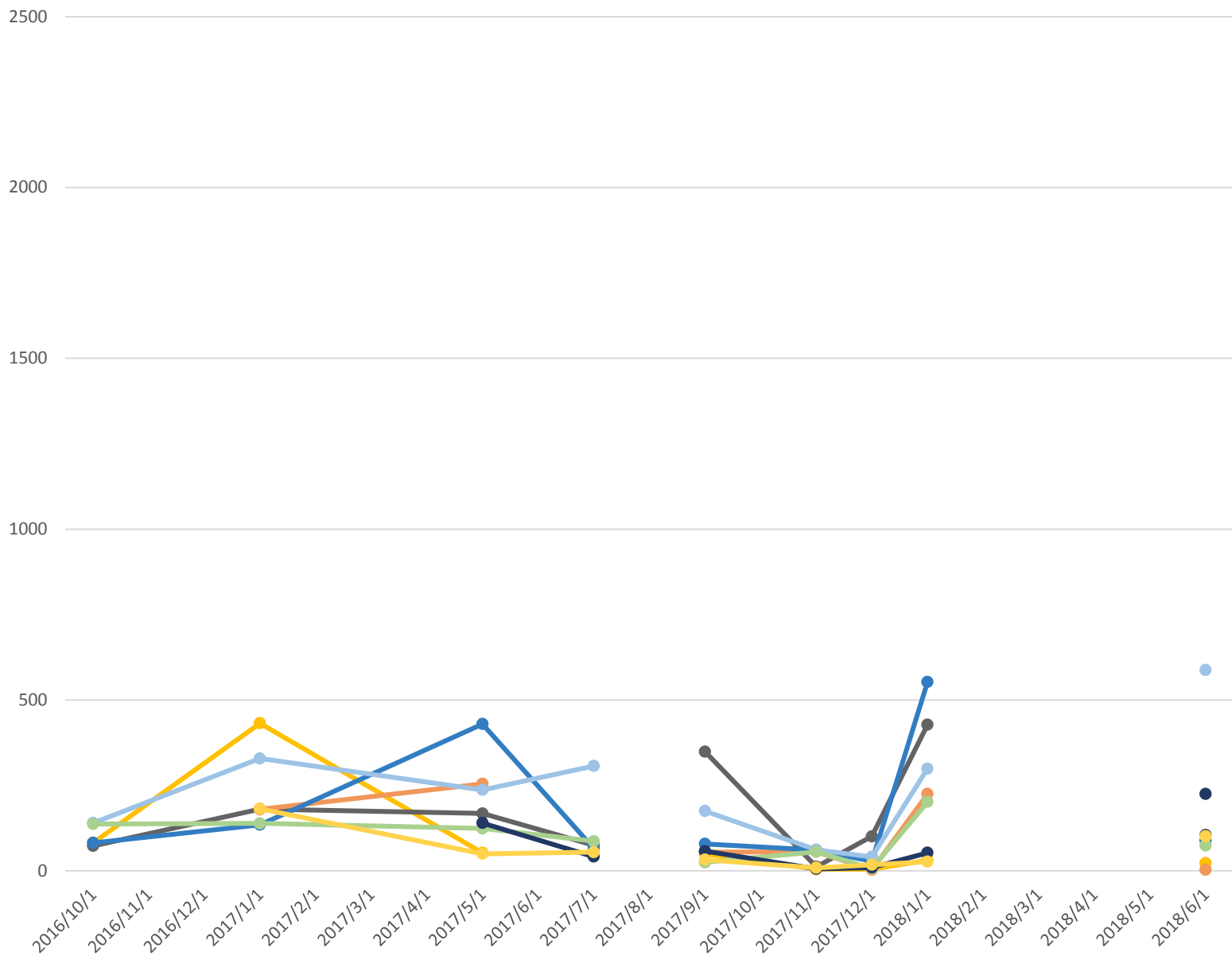
地面洁净度检测



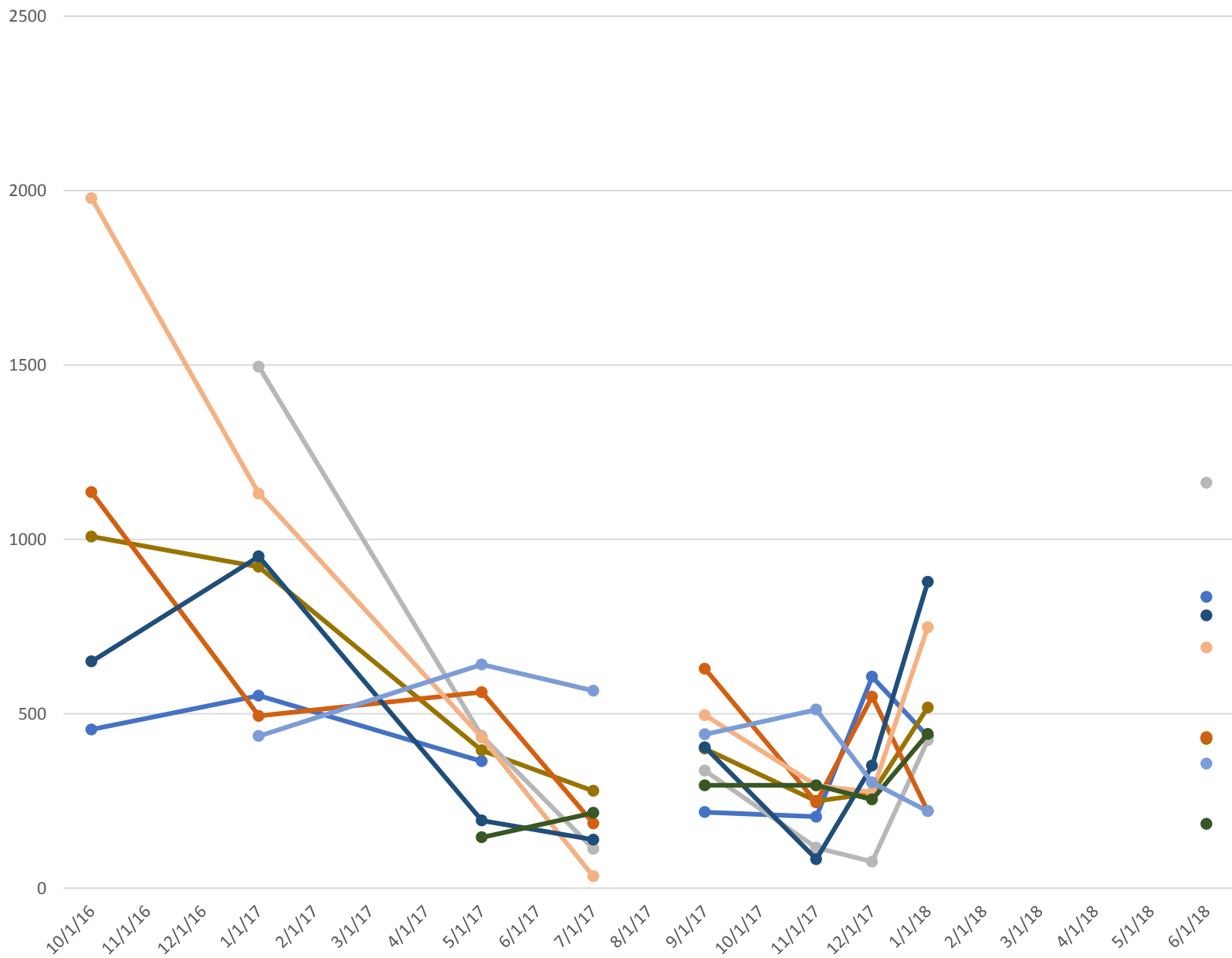
IVC笼盖洁净度检测



收纳柜洁净度检测



IVC排风口洁净度检测



饲料饲养成分质量

- Co^{60} 辐照灭菌，不同公司成分含量不同
- 中国国家标准：繁殖、生长脂肪含量 $\geq 4\%$
- JAX：脂肪含量是6%，不分繁殖生长饲料
- CRL (VRF1 (P))：脂肪含量是4.75%
- 饲料全部换成接近于JAX用的类似LabDiet-5752
- 但我们需要知道的是脂肪含量检测有2种方法：
酸水解法，乙醚提取法

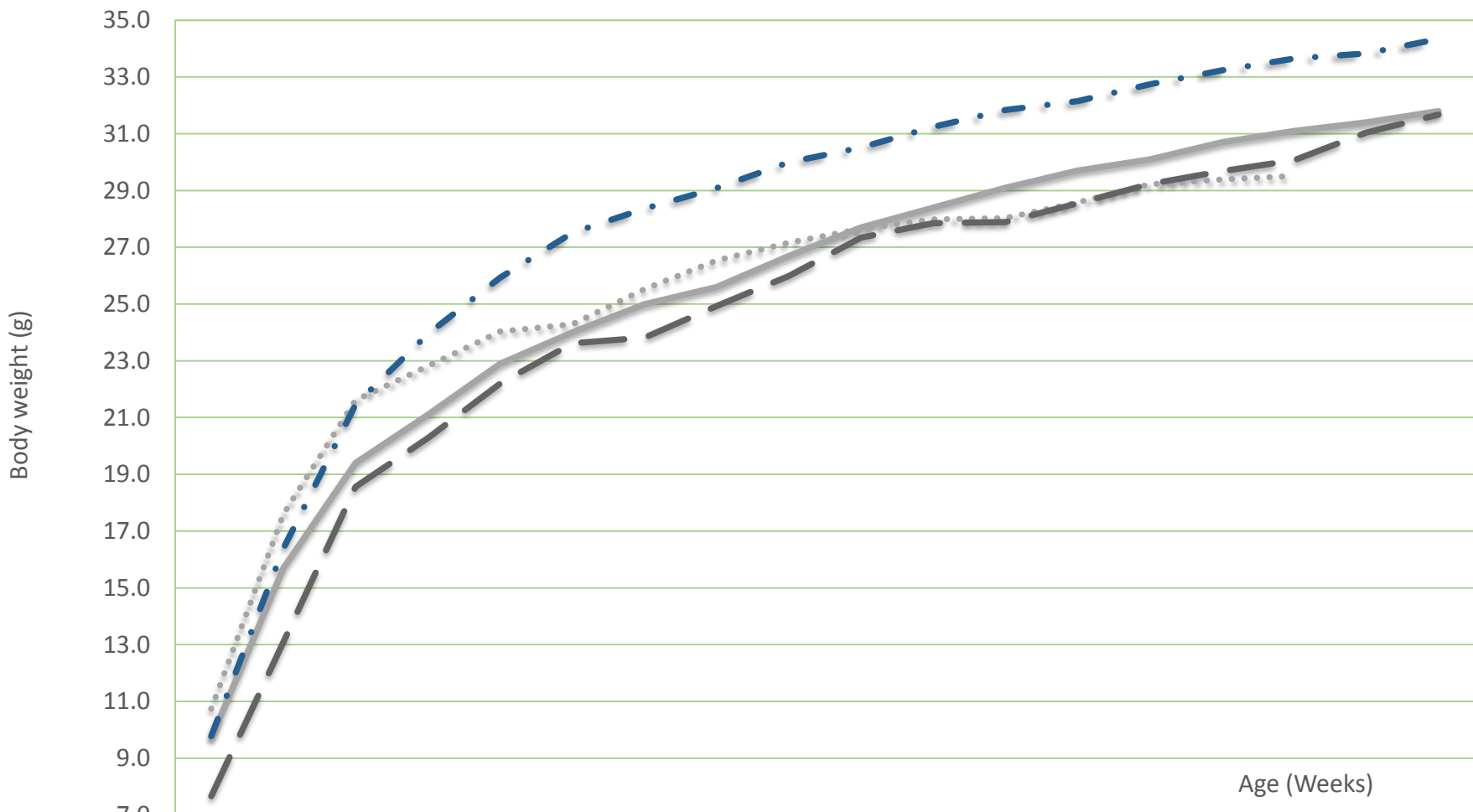
Fat (ether extract), %6.2

Fat (acid hydrolysis), %7.2

饲料的选择和微生物质量

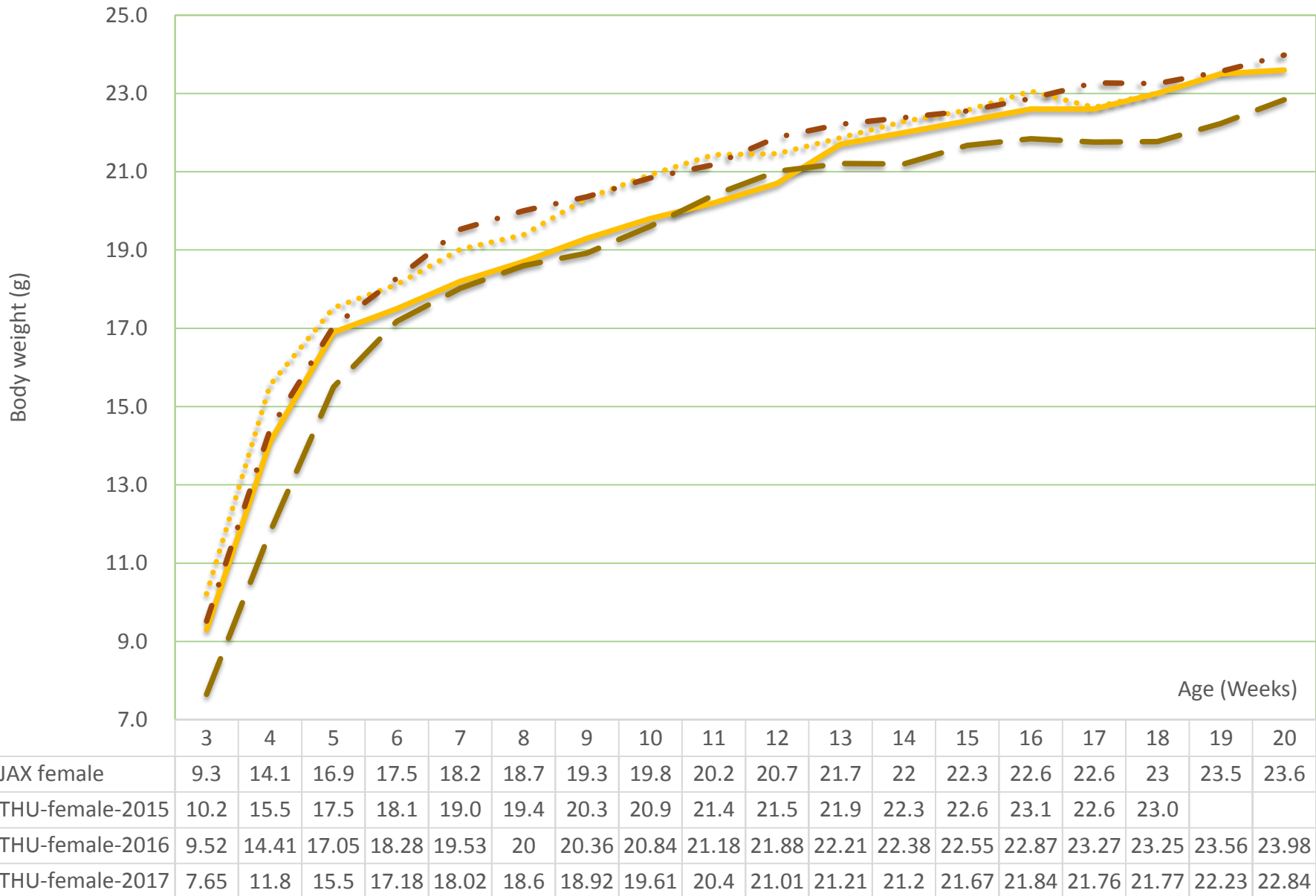
- 高压料（131°C，25min）
 - 灭菌条件是固定的吗？
- Co⁶⁰辐照饲料（25kGy）
 - “任何食品、药品当其总体平均吸收剂量不超过10kGy（1百万特拉）时，不需再做毒性试验，营养学和微生物学上也是安全的”，因此称之为“国际安全线”。
 - 辐照完全杀菌：25-50kGy
 - 辐照消毒杀菌：1-10kGy

饲料等因素对B6体重的影响



	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
— JAX male	9.7	15.7	19.4	21.1	22.9	24.0	25.0	25.6	26.7	27.7	28.4	29.1	29.7	30.1	30.7	31.1	31.4	31.8
..... THU-male-2015	10.7	17.6	21.6	22.8	24.0	24.3	25.5	26.5	27.2	27.6	28.0	28.0	28.6	29.2	29.4	29.5		
-•- THU-male-2016	9.78	16.39	21.46	23.95	25.93	27.51	28.36	29.09	29.99	30.51	31.24	31.84	32.15	32.74	33.23	33.65	33.83	34.34
- - THU-male-2017	7.66	13.09	18.56	20.28	22.2	23.62	23.81	24.93	25.99	27.34	27.85	27.89	28.55	29.23	29.68	30.07	31.04	31.67

饲料等因素对B6体重的影响



垫料的选择

- 建议采用垫料填充笼盒后灭菌
 - 灭菌更加彻底
 - 减少灭菌后室的灰尘
- 在动物设施设计过程中需要适当加大洗消前室
- 假如使用全自动垫料倾倒装填系统
 - 垫料的类型：刨花和玉米芯混合（不行），刨花和纸卷（行）
 - 装填的比例
 - 玩具enrichment的选择和加入时机



自动垫料装填设备-刨花和纸卷



动物无菌饮用水

- JAX: RO+酸 (pH2.8-3.1) +灭菌
- CRL: RO+次氯酸钠水 (2-3ppm)
- VRL: RO+次氯酸钠水 (2-3ppm)
- HFK: RO+酸 (pH2.8-3.1) +灭菌
- THU: RO+O₃+酸 (pH2.8-3.1), 自动灌瓶机缩小批次间差异
- RO反渗透膜冲洗、消毒、更换
 - 反渗透设备在制药厂有热消毒流程, 但不强制
 - 反渗透设备自带RO膜自动反冲洗装置, 当设备不工作时, 定时定量的反向注入消毒剂, 然后排放
 - 如无维护, 反渗透膜寿命就很短
 - 所以我们现在每年换一次膜。正常可以2-3年

自动灌瓶机的使用



减少水污染，增加一致性

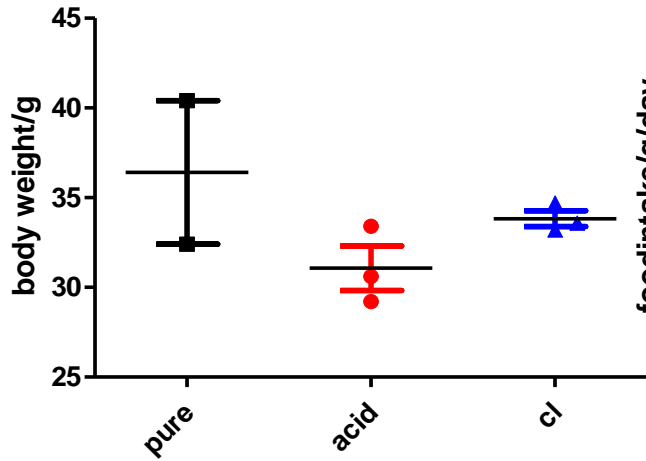
加酸后对水存放时间的微生物含量的影响

位置		304房间门口				313房间门口				306房间操作台边			
类型		纯水		加酸水		纯水		加酸水		纯水		加酸水	
检测日期	天数	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
08月28日	第三天	50+	50+	0	0	50+	50+	0	0	10	30+	0	0
08月29日	第四天	100+	100+	0	0	100+	100+	0	0	80+	80+	0	0
08月30日	第五天	100+	100+	0	0	100+	100+	4	0	100+	100+	0	0
08月31日	第六天	/	/	0	0	/	/	50+	0	/	/	0	0
09月01日	第七天	/	/	0	0	/	/	70+	0	/	/	0	0

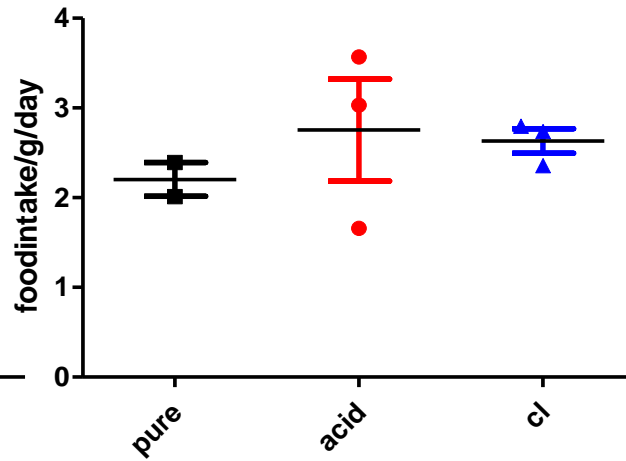
数据检测时间：2017/8/25-2017/9/1

不同饮水对动物的影响-1

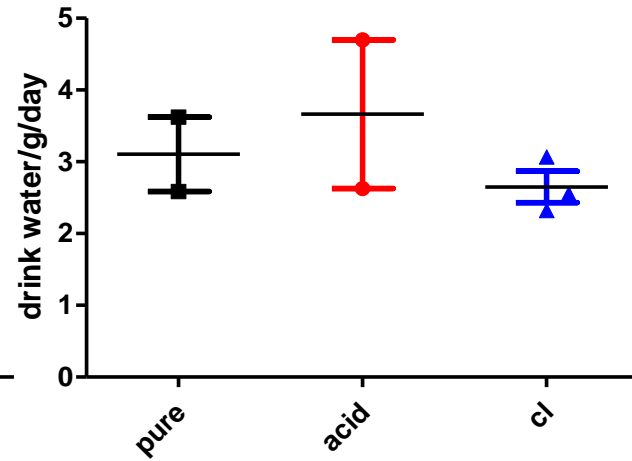
body weight



food intake

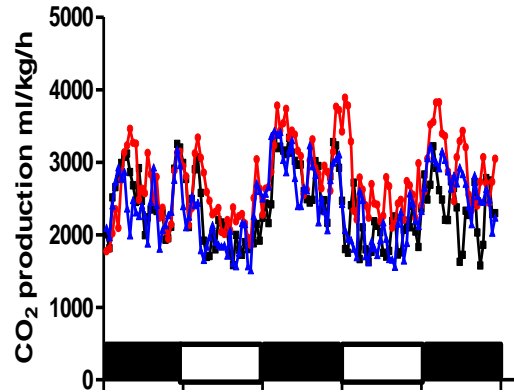


drink water

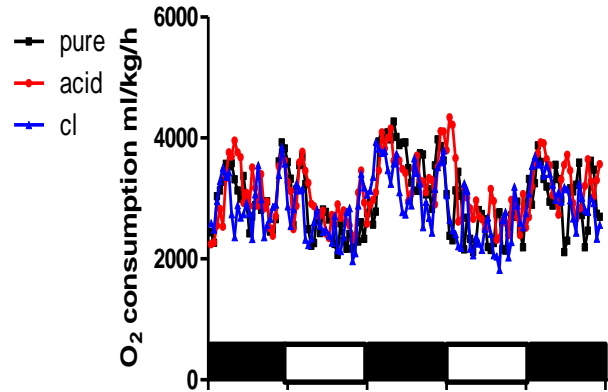


不同饮水对动物的影响-2

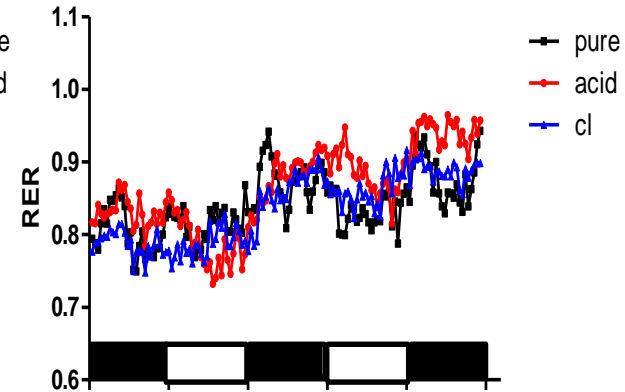
CO₂ Prouction



O₂ comsumption

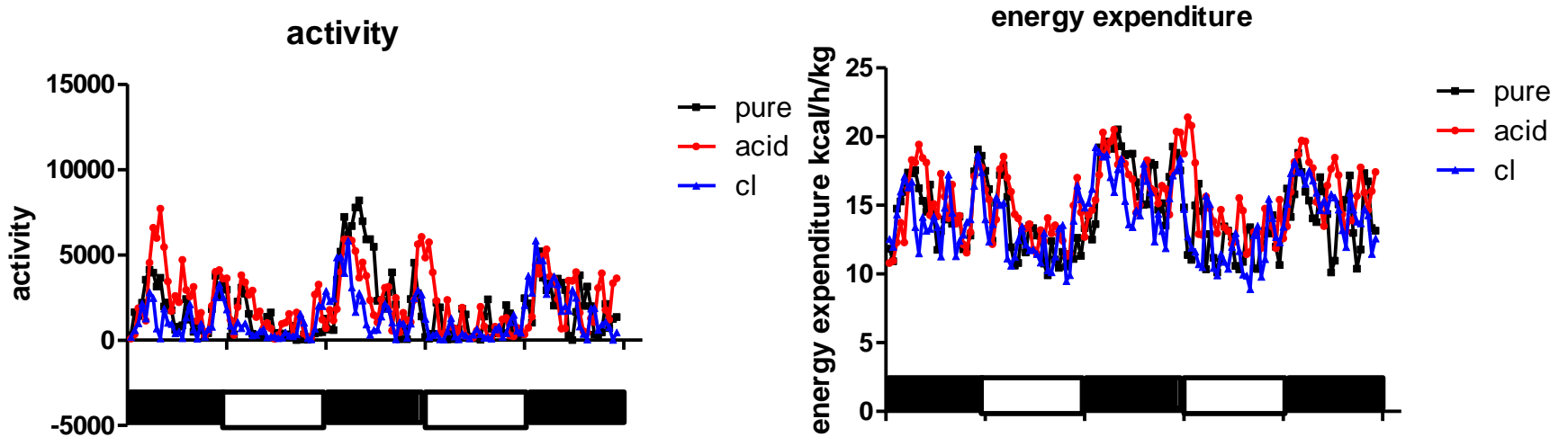


RER



RESPIRATORY EXCHANGE RATIO **RER** = V_{CO_2}/V_{O_2}

不同饮水对动物的影响-3



对肠道微生物的影响

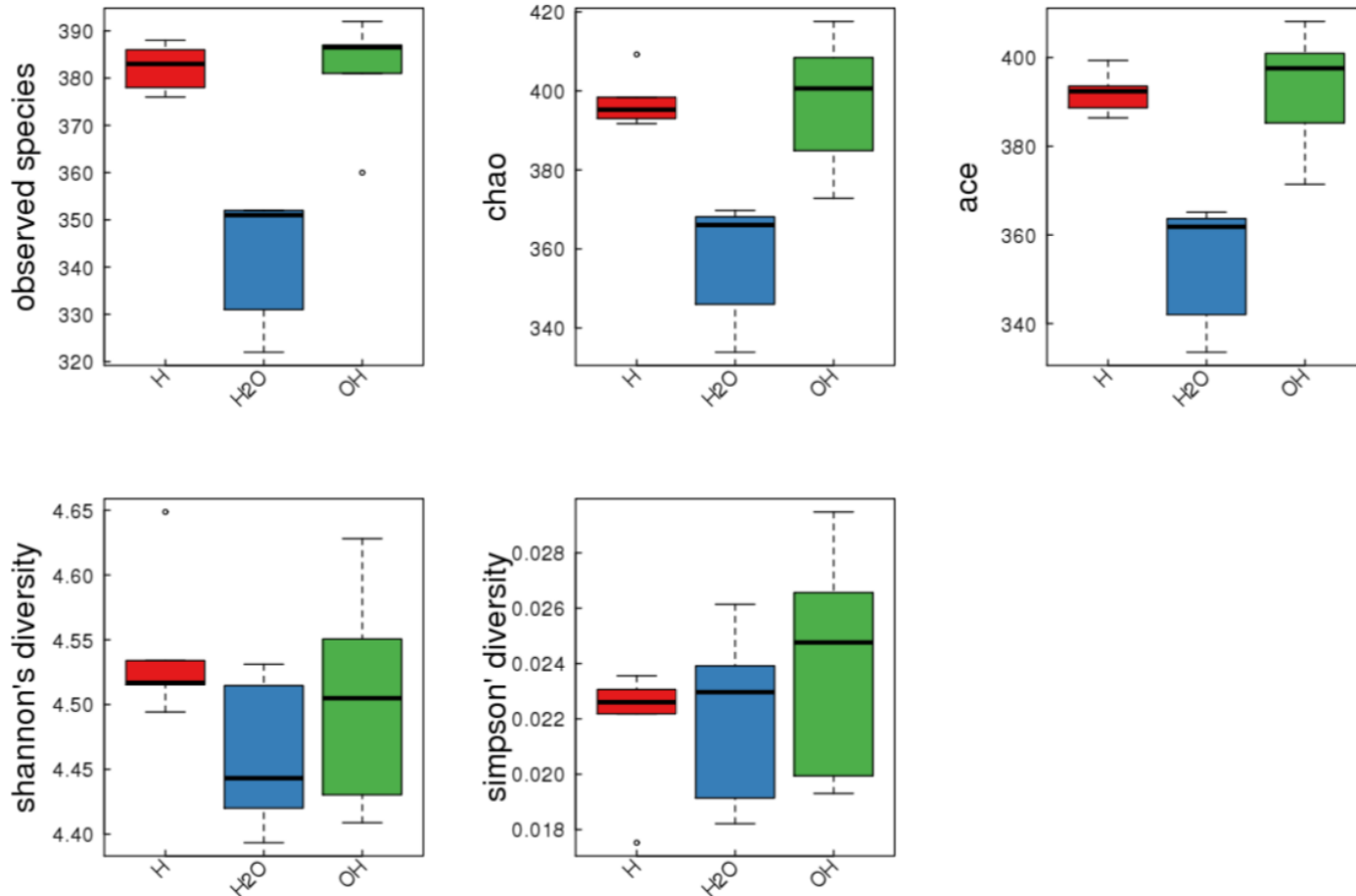


图4-2-1 组间Alpha多样性盒形图(按Description分组结果)

对肠道微生物的影响

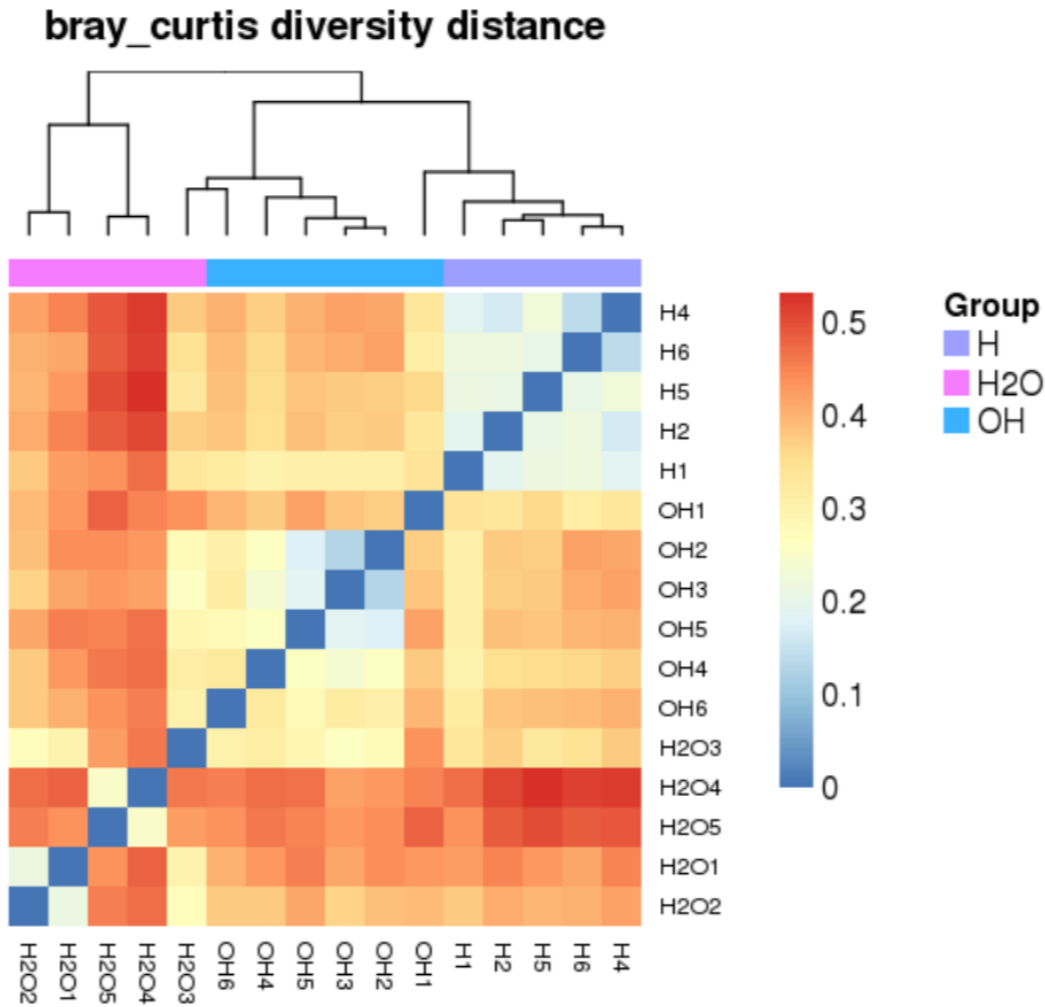


图4-3-3 Beta多样性heatmap(按Description分组, bray_curtis)

消毒剂的选择

- 百毒杀
- 次氯酸钠
- 高乐氏
- 84
- 卫可 (***Virkon S Fragrance Free***)
- Novuswater<sporicide>
- 新洁尔灭
- Clidox
- 过氧乙酸
- 过氧化氢
- 二氧化氯 (水夫)
- 乙醇 (酒精)、甲醛、戊二醛、环氧乙烷.....



各种消毒液的比较

消毒剂配置和使用方法如下：

编号	消毒剂	来源	使用浓度		中和剂
1	NSE 电解水 消毒剂	德国 aquagroup	100 ppm	5 ppm	硫代硫酸钠
2	国产电解水 消毒剂	无锡迅朗	生产原液		硫代硫酸钠
3	过氧乙酸	国产（消毒剂产品）	0.36%	2%	硫代硫酸钠
4	70%乙醇	国产	70%		2%卵磷脂
5	卫可	杜邦(消毒剂产品-粉末)	1:100 质量		
6	高乐氏	淘宝	原液 8000 ppm， 稀释 比例 1:100		
待补充					

用于悬浮液，作用 5/10 分钟；

测试用菌种

验证用菌种和建筑材料

测试菌选用 ATCC 菌种。根据理论消毒效率，从以下类群中分别选取至少一种菌：

Classification 分类	Test strains 测试菌
	ATCC strains (Abbr.) ATCC 菌种（简称）
Gram negative rod 革兰氏阴性杆菌	<i>Escherichia coli</i> ATCC8739 (Ec) 大肠埃希氏菌
Gram positive rod 革兰氏阳性杆菌	<i>Bs 6633</i> 枯草芽孢杆菌
Gram positive coccus 革兰氏阳性球菌	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC6538 (Sa) 金黄色葡萄球菌

最后的选择

NSE次氯酸钠消毒剂

卫可



最后的选择



为什么不选择其他的消毒剂？

- 百毒杀：容易打滑
- 次氯酸钠：效果好，腐蚀性不强
- 高乐氏：其实和84较为相近
- 84：说腐蚀性强，味道不好闻
- 卫可（*Virkon S Fragrance Free*）：较贵，现在无菌动物用
- Novuswater<sporicide>：??
- 新洁尔灭：太温和，消毒效果差
- Clidox：太贵
- 过氧乙酸：刺鼻呛人，OHS
- 过氧化氢：不适用于有人或动物消毒
- 二氧化氯（水夫）：发粘
- 乙醇（酒精）、甲醛、戊二醛、环氧乙烷.....

灭菌设备的消毒和效果监测

- 高压灭菌锅的灭菌效果检测（检测方法）
 - 1次/月→1次/2月→1次/3月
- 渡槽（消毒剂更换，1次/2周）
- 传递窗的消毒效果
- 仪器设备的消毒
- 净化和非净化动物共用仪器设备的消毒
 - 在试验中常遇到
 - 2套仪器：如使用不满，造成浪费
 - 假如仪器内还有分容器，最好备2套

水、垫料、饲料无菌状态的监测

- 水：1次/月
- 垫料：1次/月（灭菌后要求无菌）
- 饲料：1次/月（开袋使用后）

应用中的IVC笼架的消毒和灭菌

- 风管：每两周彻底清洗一次，用消毒液清洗后继续使用。
- 初效过滤器：每周更换清洗一次，注意更换时关闭主机，并擦拭初效过滤器空间位置。更换后的过滤器洗涤，通过渡槽传递。
- IVC笼架主排风管道：每两周用专用工具进行疏通，清除残存的粉尘。
- IVC笼架进出风风嘴：每两月用含有1%高乐氏消毒剂的喷壶喷洒并用抹布擦拭一次。
- IVC笼架：每两月用1%高乐氏消毒剂喷洗出风口，清洗IVC出风笼架和管道。

笼具更换频率

- 底盒（1次/周）
- 水瓶（1次/周）
- 网格（1次/2月）
- 上盖（1次/2月）

运行管理之 动物质量控制

动物质量面临的最大威胁

- 饮水、饲料、垫料问题
- 日常操作
- 实验者和工作人员
- 带入屏障的试剂和仪器设备
- 屏障环境洁净度的维护利于动物质量的维护
- 外来动物--国内外PI之间的动物交流增加
- 动物供应商的动物质量

国内外动物质量现状

- 北方（不准确）：
 - 肺炎克雷伯/嗜肺巴斯德/MHV/鞭毛虫/毛滴虫/螨虫/绿脓/金葡/MVM?
- 南方（不准确）：
 - 肺炎克雷伯/嗜肺巴斯德/MHV/鞭毛虫/阿米巴/螨虫/泰泽
- 台湾阳明大学（准确）：
 - MNV/*Helicobacter H.*/Trichomonads (毛滴虫)

美国

- **University of Oregon**

April: MNV, MAD-2, *H.He*, *H.ganmani*, *H.typhlonius*, *Pseudomonas aeruginosa*,
Proteus mirabilis;

July: MVV MPV

Oct.: MNV

- **MD Anderson Cancer Center**

fur mites, MNV , helicobacter

- **University of California, Davis**

Pinworms

- **Department of animal resource**

Pinworms

- **La Jolla Institute for Allergy and Immunology**

MNV , Helicobacter species

美国（续）

- **Taconic**

Pseudomonas aeruginosa

- **EIB/NCI/NIH**

MNV, *Trichomonas*, *Helicobacter* species

- **Hospital for Special Surgery**

MNV, *Helicobacter* spp

- **Genentech**

MNV, *Helicobacter* spp, *H.He H.bilis*, *Pasteurella pneumotropica*, *staph.aureus*

- **JAX-Research facility**

MNV , *Pasteurella pneumotropica* , *Trichomonas* , *Klebsiella* spp.

- **JAX-Repository & production facility**

Klebsiella spp.

- **North Carolina State University**

MNV, *H.bilis*, *H.He*, *H.ganmani*, *Helicobacter* spp.

北美及欧洲

- 加拿大 **Institut de Recherches Cliniques de Montreal(IRCM)**

MNV, *chilomastix sp.*, *entamoeba sp.*

- 加拿大 **Department of Microbiology and Infectious Diseases
University of Calgary**

MNV

- 西班牙 **EMMA**

Trichomonas spp.

针对外来动物威胁一般采取的方法

- 隔离检疫
 - 耗时
 - 检查哨兵鼠，并不能完全代表
 - 假如疏漏，仍会带来污染

繁殖用动物全部经过生物净化

- 小鼠生物净化（通过ET或IVF-ET）
 - 截至2018年10月份已净化约3000余个品系
 - 符合SPF标准
 - 已经为校内外多位PI服务过
- 协助校外单位建立他们的净化实验室
- 所有动物进入主饲养间均需通过净化（降低净化费用，保证净化速度，让PI们满意）

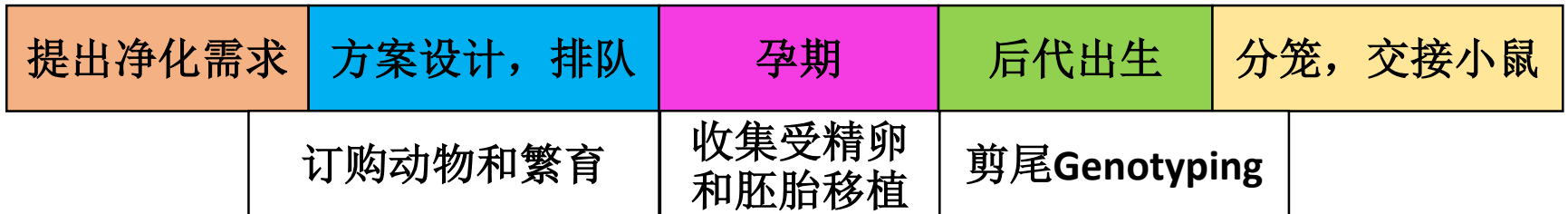
净化需要的时间

7-9周可以拿到3-4周龄净化后的小鼠

1-2周

3周

3-4周



精子冷冻需要提供的材料

- 1-2只Genotyping正确的健康雄鼠
- 需要提供这2只雄鼠的Genotyping gel 图片
- 填写《胚胎冷冻申请表》

精子冷冻需要的时间

7-9周可以拿到3-4周龄净化后的小鼠

1-2周

3周

3-4周

提出精子冷冻需求

方案设计, 排队

孕期

后代出生

分笼, 交接小鼠

订购动物和繁育

收集受精卵
和胚胎移植

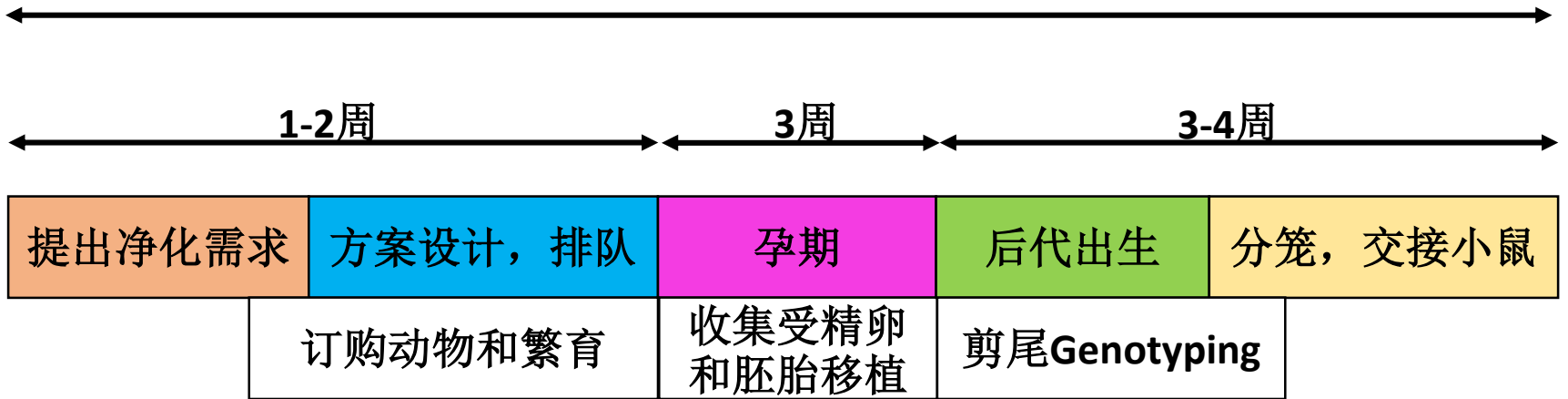
剪尾Genotyping

胚胎冷冻需要提供的材料

- 1-2只Genotyping正确的健康雄鼠
- 需要提供这2只雄鼠的Genotyping gel 图片
- 供体是B6，平台准备或者申请者提供雌鼠
- 填写《胚胎冷冻申请表》

胚胎冷冻需要的时间

7-9周可以拿到3-4周龄净化后的小鼠



精子/胚胎复苏的影响因素

- 取决于冷冻的是胚胎还是精子。胚胎可以直接复苏做移植，精子需要通过IVF实验室获得胚胎，然后移植
- IVF时卵子的提供者可以是B6等背景鼠，也可以是欲交配形成双杂合的小鼠品系
- 当时的实验繁忙情况，也要根据假孕母鼠是否足够等情况
- 一次复苏有时也不一定能够生仔。我们目前胚胎冷冻复苏一次的生仔率是45.4%，精子冷冻复苏一次的生仔率是26.5%

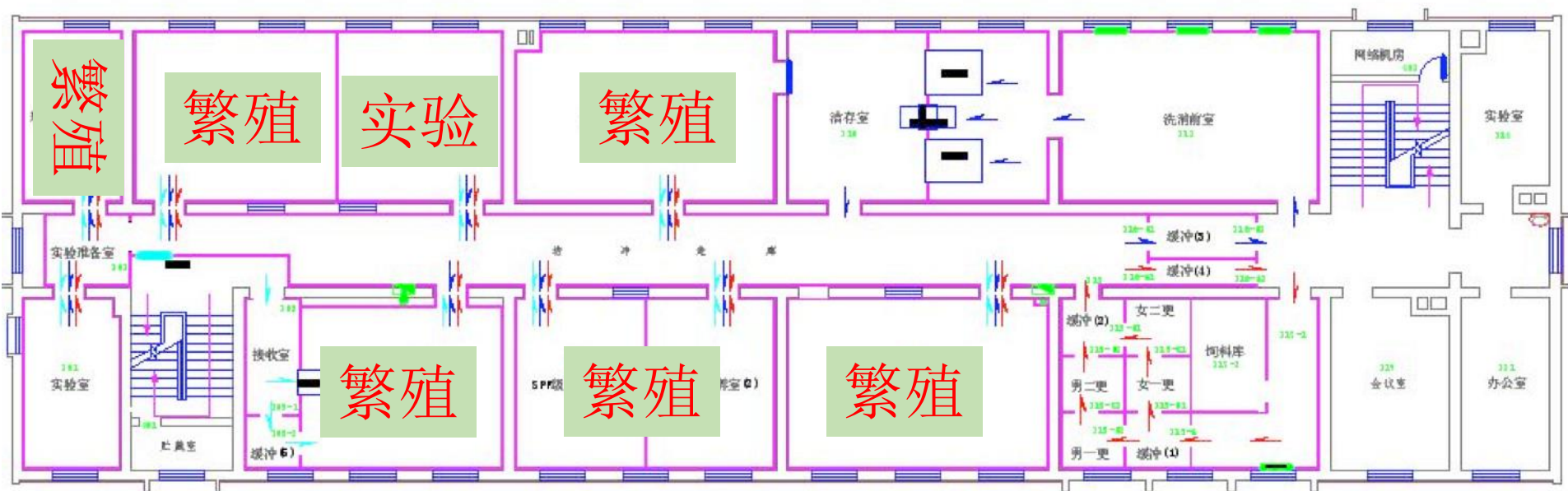
精子/胚胎复苏的影响因素

- 复苏胚胎时，需要考虑胚胎回收率，移植后生仔数目=回收胚胎总数 \times 20-30%，也就是说20-30%的胚胎可以变为活体小鼠，当然也有全部转换成小鼠的情况
- 生仔后有可能在断奶分笼前死亡
- 复苏的后代有可能没有想要的Genotype

分享一些胚胎操作的相关数据

- 某单位：
 - 注射胚胎生存率（Cas9-Cko/Ki）~12%（IVF后的胚胎）
 - IVF胚胎生存率35%
 - 体内胚胎生存率45%
 - 复苏胚胎生存率30%
- 2017年数据：
 - 注射胚胎生存率（Cas9-Cko/Ki）15%（体内的胚胎）
 - IVF胚胎复苏胚胎生存率25%
 - 体内胚胎生存率50%
 - 复苏胚胎生存率25%
- 2018年1月到8月数据：
 - 注射胚胎生存率（Cas9-Cko/Ki）~22%（体内的胚胎）
 - IVF胚胎生存率26.5%
 - 体内胚胎生存率45.4%
 - 复苏胚胎生存率25.2%

免疫缺陷动物控制实践



图例: 人流通道 物流通道 动物通道

小鼠微生物及寄生虫质量检测项目

国家/国际组织	病毒项目	细菌、真菌、支原体	寄生虫
ICLAS	14	13	3
中国	5+6	8+8	5+2
日本	8	10	4
美国 (JAX)	18	14	5
THU实验动物中心	17	17	7

要求净化的动物质量检测结果

- 2012年小鼠共送检和自检3次
 - 2012年3月：符合国家小鼠SPF标准（20只）
 - 2012年7月：符合国家小鼠SPF标准（30只）
 - 2012年11月：符合国家小鼠SPF标准（Mad1 1/46只）
- 2013年小鼠目前共送检和自检3次
 - 2013年3月：符合国家小鼠SPF标准（51只）
 - 2013年7月：符合国家小鼠SPF标准（69只）
 - 2013年10月：符合国家小鼠SPF标准（73只）
- 2014年小鼠目前共送检和自检4次
 - 2014年2月：符合国家小鼠SPF标准（86只）
 - 2014年5月：符合国家小鼠SPF标准（104只）
 - 2014年9月：符合国家小鼠SPF标准（104只）
 - 2014年12月：符合国家小鼠SPF标准（114只）
 - 2014年B6遗传质量检测一次：符合国家标准

要求净化的动物质量检测结果

- 2015年小鼠共送检和自检7次
 - 2015年3月：符合国家小鼠SPF标准（116只）
 - 2015年6月：除209房间外，符合国家小鼠SPF标准（MNV 1/116只）
 - 2015年9月：符合国家小鼠SPF标准（120只）
 - 2015年12月：除209房间外，符合国家小鼠SPF标准（MNV 1/122只，鞭毛虫1/122只，螨虫1/122只）
 - 20151218：R209-1随机检测 MNV 13/78只，阳性动物降级移出209房间
 - 20151225：R209 CZJ lab筛查MNV 0/110只
- 2016年小鼠目前共送检和自检5次
 - 20160202：R209随机检测 MNV 0/86只
 - 2016年2月：符合国家小鼠SPF标准（20160328-MCMV 1? /120只）
 - 20160309：R209随机送检，鞭毛虫0/5只，螨虫0/5只；
 - 20160414：R209随机检测 MNV 0/107只；R304随机检测 MCMV 1? /64只。
 - 2016年5月：符合国家小鼠SPF标准（122只）
 - 2016年8月：符合国家小鼠SPF标准（122只）
 - 2016年11月：符合国家小鼠SPF标准（144只）

要求净化的动物质量检测结果

- 2017年小鼠目前共送检和自检4次
 - 2017年2月：R313-12 MHV 1/18（常规送检）
 - 20170328：R313-12 MHV 1/17
 - 20170329：R313-12 MHV 1? /14（ELISA+，IFA-）
 - 20170417：R313-12 MHV 0/213
 - 20170524：R306-3 MHV 2/35（R306是实验用房间，动物是循环的）
 - 20170822：符合国家/国际小鼠SPF标准（130只）
 - 20171121：符合国家/国际小鼠SPF标准（150只）
- 2017年遗传质量检测（SNP）：10只鼠均为阳性纯合子，与Jackson lab SNP库（96个位点）结果一致

要求净化的动物质量检测结果

- 2018年小鼠目前共送检和自检3次
 - 2018年2月：符合国家/国际小鼠SPF标准（150只）
 - 2018年3月9日自检发现209-12螨虫阳性，药浴3次，目前已经阴性
 - 2018年4月20日自检发现207-xx螨虫阳性，药浴3次，目前已经阴性
 - 2018年5月：符合国家/国际小鼠SPF标准（150只）
 - 2018年8月：符合国家/国际小鼠SPF标准（156只）

清华大学实验动物中心动物质量检测报告

Animal Health Report of Laboratory Animal Research Center, Tsinghua University

Room No.: 313 Type: Breeding Started from Aug 26, 2012 Species: Mice

检测项目 (Organism)	Sample Tested	Test Method	May 30 2018	Feb 28 2018	Nov 21 2017	Before Nov 2017
病毒 (VIRUSES)						
Sendai virus (SV)	Serum	ELISA	0/20	0/20	0/20	1/489*
Mouse hepatitis virus (MHV)	Serum	ELISA	0/20	0/20	0/20	3/635**
Pneumonia virus of mice (PVM)	Serum	ELISA	0/20	0/20	0/20	0/331
Mouse Reovirus 3 (Reo-3)	Serum	ELISA	0/20	0/20	0/20	0/331
Ectromelia virus (Ect)	Serum	ELISA	0/20	0/20	0/20	0/331
Minute virus of mice (MVM)	Serum	ELISA	0/20	0/20	0/20	0/329
Hantavirus (HANT)	Serum	ELISA	0/20	---	0/20	0/299
Theiler's Mouse Encephalomyelitis Virus (TMEV)	Serum	ELISA	---	0/20	0/20	0/317
Lymphocytic choriomeningitis (LCMV)	Serum	ELISA	---	0/20	0/20	0/318
Polyoma Virus (POLY)	Serum	ELISA	---	0/20	0/20	0/317
Mouse Adenovirus FL (MAD 1)	Serum	ELISA	---	0/20	0/20	0/317
Mouse Adenovirus K87 (MAD 2)	Serum	ELISA	0/20	---	0/20	0/292
Mouse Parvovirus (MPV)	Serum	ELISA	0/20	---	0/20	0/292
K Virus	Serum	ELISA	---	---	0/20	0/292
Mouse Cytomegalovirus (MCMV)	Serum	ELISA	---	---	0/20	0/292
Epizootic Diarrhea of Infant Mice (EDIM)	Serum	ELISA	0/20	---	0/20	0/292
Murine norovirus (MNV)	Serum	ELISA	---	0/20	0/20	0/206
Lactate dehydrogenase elevating virus (LDHV)	Serum	ELISA	0/20	---	---	---
细菌和支原体 (BACTERIA & MYCOPLASMA)						

2017/6/6 中心抽检R313的78份血清检测MHV，均为阴性；
 2017/7/13 中心抽检R313的100份血清检测MHV，均为阴性；
 2017年9月及之后送检，结果均为阴性。

清华大学实验动物中心动物质量检测报告

Animal Health Report of Laboratory Animal Research Center, Tsinghua University

Room No.: 306 **Type:** Experiment **Started from April 1, 2012** **Species:** Mice

检测项目 (Organism)	Sample Tested	Test Method	May 30 2018	Feb 28 2018	Nov 21 2017	Before Nov 2017
病毒 (VIRUSES)						
Sendai virus (SV)	Serum	ELISA	0/12	0/12	0/12	0/168
Mouse hepatitis virus (MHV)	Serum	ELISA	0/12	0/12	0/12	5/302 ^{*1*2}
Pneumonia virus of mice (PVM)	Serum	ELISA	0/12	0/12	0/12	0/168
Mouse Reovirus 3 (Reo-3)	Serum	ELISA	0/12	1/12 ^{*3}	0/12	0/169
Ectromelia virus (Ect)	Serum	ELISA	0/12	0/12	0/12	0/169
Minute virus of mice (MVM)	Serum	ELISA	0/12	0/12	0/12	0/168
Hantavirus (HANT)	Serum	ELISA	0/12	---	0/12	0/161
Theiler's Mouse Encephalomyelitis Virus (TMEV)	Serum	ELISA	---	0/12	0/12	0/161
Lymphocytic choriomeningitis (LCMV)	Serum	ELISA	---	0/12	0/12	0/167
Polyoma Virus (POLY)	Serum	ELISA	---	0/12	0/12	0/159
Mouse Adenovirus FL (MAD 1)	Serum	ELISA	---	0/12	0/12	0/167
Mouse Adenovirus K87 (MAD 2)	Serum	ELISA	0/12	---	0/12	0/167
Mouse Parvovirus (MPV)	Serum	ELISA	0/12	---	0/12	0/167
K Virus	Serum	ELISA	---	---	0/12	0/165
Mouse Cytomegalovirus (MCMV)	Serum	ELISA	---	---	0/12	0/167
Epizootic Diarrhea of Infant Mice (EDIM)	Serum	ELISA	0/12	---	0/12	0/168
Murine norovirus (MNV)	Serum	ELISA	---	0/12	0/12	0/306
Lactate dehydrogenase elevating virus (LDHV)	Serum	ELISA	0/12	---	---	---

万一污染了怎么办

PATHOLOGY OF LABORATORY RODENTS AND RABBITS

THIRD EDITION

Dean H. Percy, Stephen W. Barthold

 Blackwell
Publishing



万一发现疑似污染，怎么办？

- 预防为主
- 一旦发现疑似污染阳性：
 - 确认是否阳性：自己购买试剂盒，或者送其他检测机构
 - 确认阳性后，隔离笼架，挑选年龄大的小鼠抽检
 - 仍有阳性：房间降级，根据阳性污染的传播途径
 - 没有其他阳性：房间降级，加强消毒，1-3月后重新检测
- 治疗：万不得已的时候使用
 - 对转基因小鼠来说，一般治疗都是针对寄生虫
 - 我们有革螨治疗成功的案例

万一污染了怎么办？--实例1

- 2012年7月18日送检，8月底结果307房间#8架子1只哨兵鼠仙台病毒阳性，房间降级至隔离观察
- 2012购买了2个公司的进口试剂盒，检测162个样本，结果全部是阴性
- 考虑到假阳性，所以要建立自己的检测实验室

万一污染了怎么办？--实例2

- Mad1: 2012年12月18日发现4/36阳性
- Mad1传播途径: Infection is transmitted by direct contact through urine, feces, and nasal secretions.
- 阳性结果的处理方式:
 - 阳性哨兵鼠及抽检动物尽快处死。
 - 阳性项目检测频率从每三个月增加到每个月一次。检测结果会再更新到下一季度的检测报告中。
 - 房间降级。工作人员不允许从低级别的饲养间进出高级别饲养间，此房间的实验动物也不允许从低级别的饲养间进出高级别饲养间。
 - 用100ppm的次氯酸钠消毒剂清洗笼架，更换IVC主机过滤器，用消毒液浸泡清洗，1次/周，连续3周。
 - 此笼架的所有笼盒每周全部更换一次，包括底盒、网格、水瓶和上盖全套笼具，1次/周，连续3周。此项工作在笼架清洗消毒之后进行。
 - 此面笼架尽可能的延长空置期，期望最少保持空置1个月时间。

清华大学实验动物中心动物质量检测报告

Animal Health Report of Laboratory Animal Research Center, Tsinghua University

Room No.: 307 **Type:** Breeding **Started from** Aug 26, 2012 **Species:** Mice

检测项目 (Organism)	Sample Tested	Test Method	May 30 2018	Feb 28 2018	Nov 21 2017	Before Nov 2017
病毒 (VIRUSES)						
Sendai virus (SV)	Serum	ELISA	0/14	0/14	0/14	0/259
Mouse hepatitis virus (MHV)	Serum	ELISA	0/14	0/14	0/14	0/215
Pneumonia virus of mice (PVM)	Serum	ELISA	0/14	0/14	0/14	0/214
Mouse Reovirus 3 (Reo-3)	Serum	ELISA	0/14	0/14	0/14	0/214
Ectromelia virus (Ect)	Serum	ELISA	0/14	0/14	0/14	0/214
Minute virus of mice (MVM)	Serum	ELISA	0/14	0/14	0/14	0/214
Hantavirus (HANT)	Serum	ELISA	0/14	---	0/14	0/198
Theiler's Mouse Encephalomyelitis Virus (TMEV)	Serum	ELISA	---	0/14	0/14	0/202
Lymphocytic choriomeningitis (LCMV)	Serum	ELISA	---	0/14	0/14	0/205
Polyoma Virus (POLY)	Serum	ELISA	---	0/14	0/14	0/199
Mouse Adenovirus FL (MAD 1)	Serum	ELISA	---	0/14	0/14	5/262*
Mouse Adenovirus K87 (MAD 2)	Serum	ELISA	0/14	---	0/14	0/199
Mouse Parvovirus (MPV)	Serum	ELISA	0/14	---	0/14	0/199
K Virus	Serum	ELISA	---	---	0/14	0/199
Mouse Cytomegalovirus (MCMV)	Serum	ELISA	---	---	0/14	0/199
Epizootic Diarrhea of Infant Mice (EDIM)	Serum	ELISA	0/14	---	0/14	0/197
Murine norovirus (MNV)	Serum	ELISA	---	0/14	0/14	0/205
Lactate dehydrogenase elevating virus (LDHV)	Serum	ELISA	0/14	---	---	---
细菌和支原体 (BACTERIA & MYCOPLASMA)						

实例 2 的最近检测结果

万一污染了怎么办？ --实例3

- 209房间#1架子：
 - 此架设置并仅有2只哨兵鼠检测结果是MNV阳性
- 发现阳性1周内随机抽取同架年龄最老的6只小鼠，全部阴性
- 1月后再次抽取118笼，发现17笼阳性，全部集中在一个学生的所有小鼠
- MNV是非中国SPF国标要求，但It is likely that the orofecal route is an important means of natural transmission of MNV (*Pathology of laboratory rodents and rabbits, 3rd.Ed*)
- 处理方式和上次一样

清华大学实验动物中心动物质量检测报告

Animal Health Report of Laboratory Animal Research Center, Tsinghua University

Room No. 209 Type: Breeding/Experiment Started from Oct 1, 2013 Species: Mice

检测项目 (Organism)	Sample Tested	Test Method	May 30 2018	Feb 28 2018	Nov 21 2017	Before Nov 2017
病毒 (VIRUSES)						
Sendai virus (SV)	Serum	ELISA	0/20	0/20	0/19	0/199
Mouse hepatitis virus (MHV)	Serum	ELISA	0/20	0/20	0/19	0/198
Pneumonia virus of mice (PVM)	Serum	ELISA	0/20	0/20	0/19	0/198
Mouse Reovirus 3 (Reo-3)	Serum	ELISA	0/20	0/20	0/19	0/198
Ectromelia virus (Ect)	Serum	ELISA	0/20	0/20	0/19	0/191
Minute virus of mice (MVM)	Serum	ELISA	0/20	0/20	0/19	0/198
Hantavirus (HANT)	Serum	ELISA	0/20	---	0/19	0/199
Theiler's Mouse Encephalomyelitis Virus (TMEV)	Serum	ELISA	---	0/20	0/19	0/199
Lymphocytic choriomeningitis (LCMV)	Serum	ELISA	---	0/20	0/19	0/191
Polyoma Virus (POLY)	Serum	ELISA	---	0/20	0/19	0/199
Mouse Adenovirus FL (MAD 1)	Serum	ELISA	---	0/20	0/19	0/190
Mouse Adenovirus K87 (MAD 2)	Serum	ELISA	0/20	---	0/19	0/190
Mouse Parvovirus (MPV)	Serum	ELISA	0/20	---	0/19	0/198
K Virus	Serum	ELISA	---	---	0/19	0/198
Mouse Cytomegalovirus (MCMV)	Serum	ELISA	---	---	0/19	0/190
Epizootic Diarrhea of Infant Mice (EDIM)	Serum	ELISA	0/20	---	0/19	0/198
Murine norovirus (MNV)	Serum	ELISA	---	2/20*8	0/19	2/397*112*5
Lactate dehydrogenase elevating virus (LDHV)	Serum	ELISA	0/20	---	---	---
细菌和支原体 (BACTERIA & MYCOPLASMA)						

实例的最近检测结果

检测出阳性的处理

- 首先得确定是否是阳性
- 告知XX实验室，暂停移动这个架子上的动物。能不能把小仔和年老的动物全部处死？
- 继续购买MHV检测试剂盒，把整个313-12都进行筛选
- 增加检测频率，每月都检测
- 2017年3月29日 小莉清洗整个架子，更换整套笼具
- 2017年3月30日 把XX老师的12号架子小鼠全部移到110。安排张静开始净化
- 2017/4/5 确定净化方案，4/20 所有13个品系净化完成

运行管理之 人员培训和职业健康

建立良好的人员培训机制

- 每年2次上岗证培训，或参加其他单位组织的
- 不断、反复、长期培训
- 针对员工：
 - 动物相关基本常识和操作
 - 如何换笼
 - 如何维持屏障环境洁净度
 - 职业健康安全
 - 例会培训计划

新入职工作人员培训材料

一、饲养相关 FAQ

1. 笼笼为什么要一个更换，而不是同时取下两笼一起更换？

避免把动物弄混，假如笼盒内十多日龄的小仔更有可能逃逸或爬到其他笼盒内。另外，也方便认真核对笼号和笼内动物数量是否一致。

2. 换一个笼子后，镊子为什么要消毒？为什么只能用镊子夹取尾巴？

防止交叉污染。假如一个笼盒感染绿脓杆菌，用消毒液浸泡后就减少了传染给下一笼的可能性。另外，镊子若生锈必须除锈，防止锈迹给动物造成潜在伤害。锈迹也容易造成破伤风感染，请注意。和我们抓取小鼠一样，基本都是从小鼠尾巴开始。夹取尾部相对于其他部位损伤更小一些，常见错误是夹小鼠腹部，假如有怀孕，将有可能导致流产。

3. 哨兵鼠如何制作？SOP中写的“用镊子夹一撮脱刨花垫料”是什么意思？多少量？

检测哨兵鼠的目的是替代整面笼架的微生物和寄生虫状况。制作中写了“用镊子夹一撮脱刨花垫料”，意思是只要能夹到，并确保保证哨兵鼠笼盒的垫料可以铺满盒底，厚度约2cm左右即可。

4. 为什么房间分为5个级别？5个级别分别是什么，适用什么级别的动物饲养、繁殖或实验。房间负责人应该注意什么？

需要注意原则上是小鼠一大鼠一豚鼠一兔子，非感染性动物实验一感染性动物实验。动物及人员可以从洁净度高的房间向动物洁净度低的房间移动，level-1级别最高，level-2次之，依次类推。可以参考 SOP: A101、A102、

-1-0

A103、A109。

level-1: 304 房间。

level-2: 313、308、307、311、309、204、207、209。

level-3: 306。

level-4: 211、206、208、213；110、111、112、109。

level-5: 105、107。

P2: 102、104、101。

5. 不同房间之间的动物转移为什么只能由工作人员完成？

动物转移必须由动物中心工作人员完成。见 SOP “A110-1_不同防区区域动物流动指南-附动物转移申请表”。

申请者发邮件告知欲转移的动物位置(房间号-笼架编号-笼位号)，转移的时间，转到哪个实验室以及位置等必要信息，具体见《笼位转移申请表》。工作人员转移后邮件通知以上各位。

6. 房间负责人为什么需要知道房间有哪些PI以及PI的大部分学生姓名？

准确的喊出和写出别人姓名是对别人的尊重。认识PI和同学们，了解他们正在做的实验是什么，对我们中心和实验室之间的沟通和关系的建立非常有帮助。也方便有些问题，及时沟通解决。

7. 你所负责的房间有哪些小鼠品系？每个小鼠的小鼠颜色是什么？

不需要记住所有小鼠品系，但必须做到所有品系有印象。另外，方便笼位掉落，或者同学们放置在桌子上忘记放回笼架等情况时，我们准备的帮助放回，减少我们的出错率。通过小鼠颜色是最容易区分的方法。

8. 换笼时发现笼架上动物数量和笼盒内实际只数不符应该怎么做？换笼时

-2-0

12. 换笼过程发现动物异常如何处理？如何判定是否需要汇报给兽医？

脱毛、尾部溃烂、身体外伤、腹泻、脱肛、扁状体浑浊、行为异常如转圈、难产、口鼻肿大、眼睑肿胀等需要向兽医汇报，具体汇报流程见相应 SOP。

13. 成年鼠一日的饮食量大约多少，饮水量多少？

一只成年小鼠(20-25g)的喂食量为4~8克/天，饮水量4~7毫升/天，排粪量1.4~2.8克/天，排尿量1~3毫升/天。

一只成年大鼠喂食量: 5g (100g 体重 24小时)，饮水量 8-11ml (100g 体重 24小时) 尿量: 5.5ml (100g 体重 24小时)。

哨兵鼠都放在整个笼架排风口的末端笼位。我们采用的哨兵鼠多为灰色，有少部分是黑色。

假如出现脱毛、尾部溃烂、身体外伤、腹泻、脱肛、扁状体浑浊、行为异常如转圈、难产、口鼻肿大、眼睑肿胀等需要向兽医汇报，具体汇报流程见相应 SOP “B221-1_动物健康状况异常汇报及护理操作指南”。

17. 灭菌后的器材保质期是几天？我们现在用的消毒剂是什么？

保质期一周，我们现在用的消毒剂包括高乐氏(1:100 配制使用)、卫可(1:100 配制使用)、NES 次氯酸钠消毒剂，200ppm，直接接后使用。

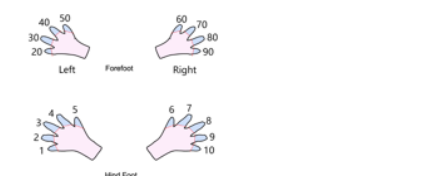
笼得多个掉落怎么办？

在笼架上做好记录，记录格式: 日期 多少×只。发现多个笼位掉落，假如上面问题提到的都有印象，那么就提供了第一建议，方法如下: 1) 看笼位颜色，小鼠品系，数量; 2) 假如鼠数量正确，也必须确定一下小鼠编号和笼位上相符。

9. 移植后的小鼠笼位需要注意什么？

做移植的小鼠都是相对珍贵的小鼠品系，换笼时要比普通笼盒更加小心，避免导致流产、吃仔等情况，以期保障净化、转基因制作成功生下后代，节约同学们的时间。

10. 假如用脚趾趾编号，那么如何辨认编号？还有哪些编号方法？



还有 ear punch (打耳孔)，ear-tag (打耳耳)，具体见 <http://www.larcstinghua.edu.cn/post/358>。

11. 小鼠孕期是多少天，多少天睁眼，多少天分笼？

小鼠孕期 19-21 天，和大鼠一样。小仔出生后第二天是在腹部胃里看不到奶白，将有可能出现死亡。13 天左右睁眼。21-24 天分笼，假如超过 24 天还不分笼的话，雌性小仔将有可能和其爸爸交配怀孕，耽误以后的交配生存。

-3-0

二、职业健康相关 (OHSP)

21. 工作中被小鼠咬伤了怎么办？

被小鼠咬伤不必过分忧心，保持积极的心态，还能帮助我们发现人体自身最大的免疫功能。

第一时间对伤口进行彻底的清洗和消毒处理。

挤压伤口使其少量出血，流水冲洗。香皂清洗，也可用 0.1% 新洁尔灭清洗，再用流水冲洗干净。(水流具有一定的冲击力有助于减少伤口的小鼠唾液残留)。

针对学生和PI的培训

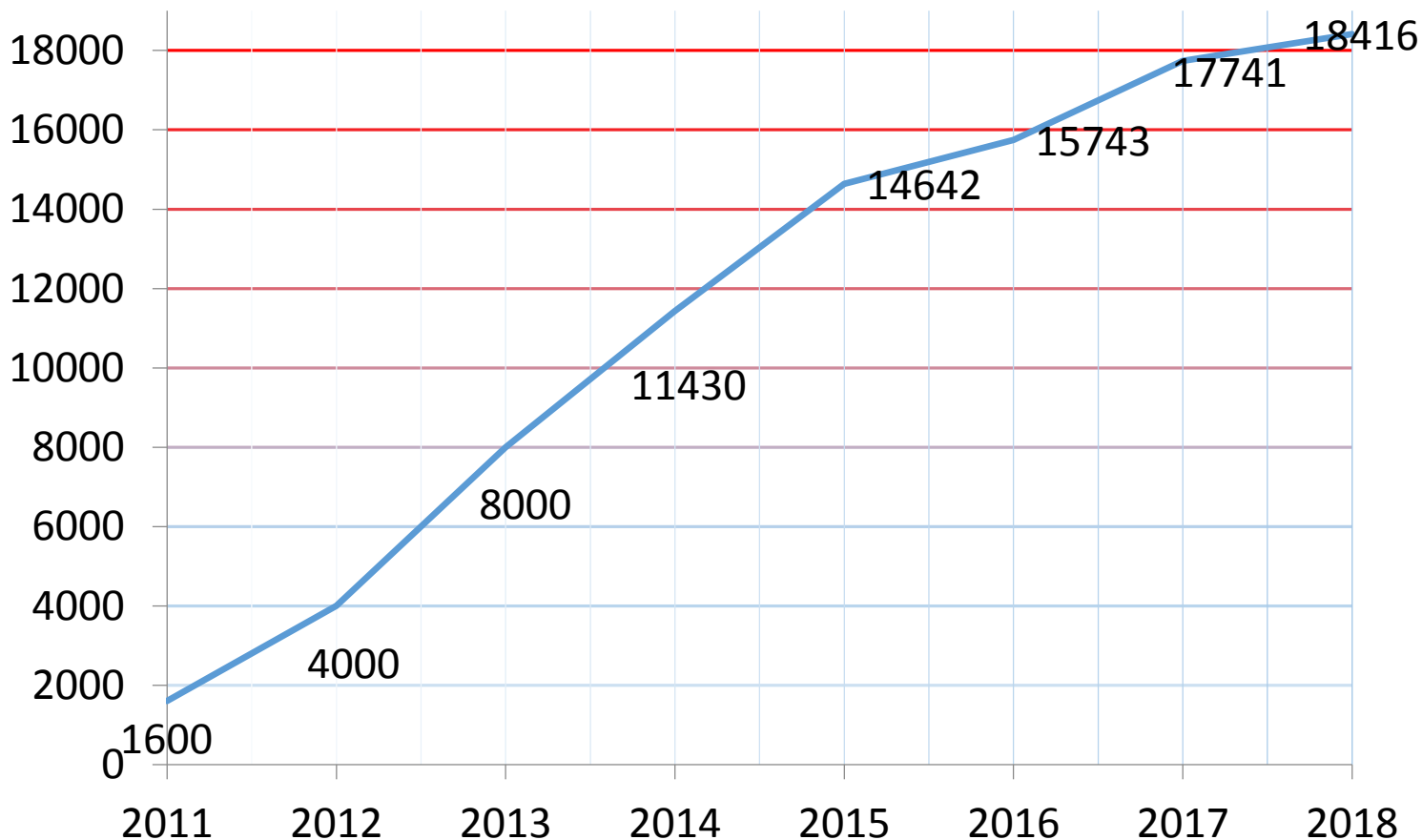
- 每周五下午进行屏障设施使用前培训（讲课和实操）
- 动物中心的仪器设备和简单功能介绍
- 动物基本操作
- 无菌手术操作培训（每月的周二周四下午）
- 如何繁殖遗传工程动物

X-Ray辐照专用笼牌

动物辐照申请专用笼牌	
PI: _____	申请人: _____
辐照日期/时间: _____	
第一次剂量: _____	第二次剂量: _____ 间隔时间: _____
其他说明:	
是否已辐照: <input type="checkbox"/> 是 <input type="checkbox"/> 否	操作者: _____
第一次辐照时间: _____	实测剂量: _____
第二次辐照时间: _____	实测剂量: _____

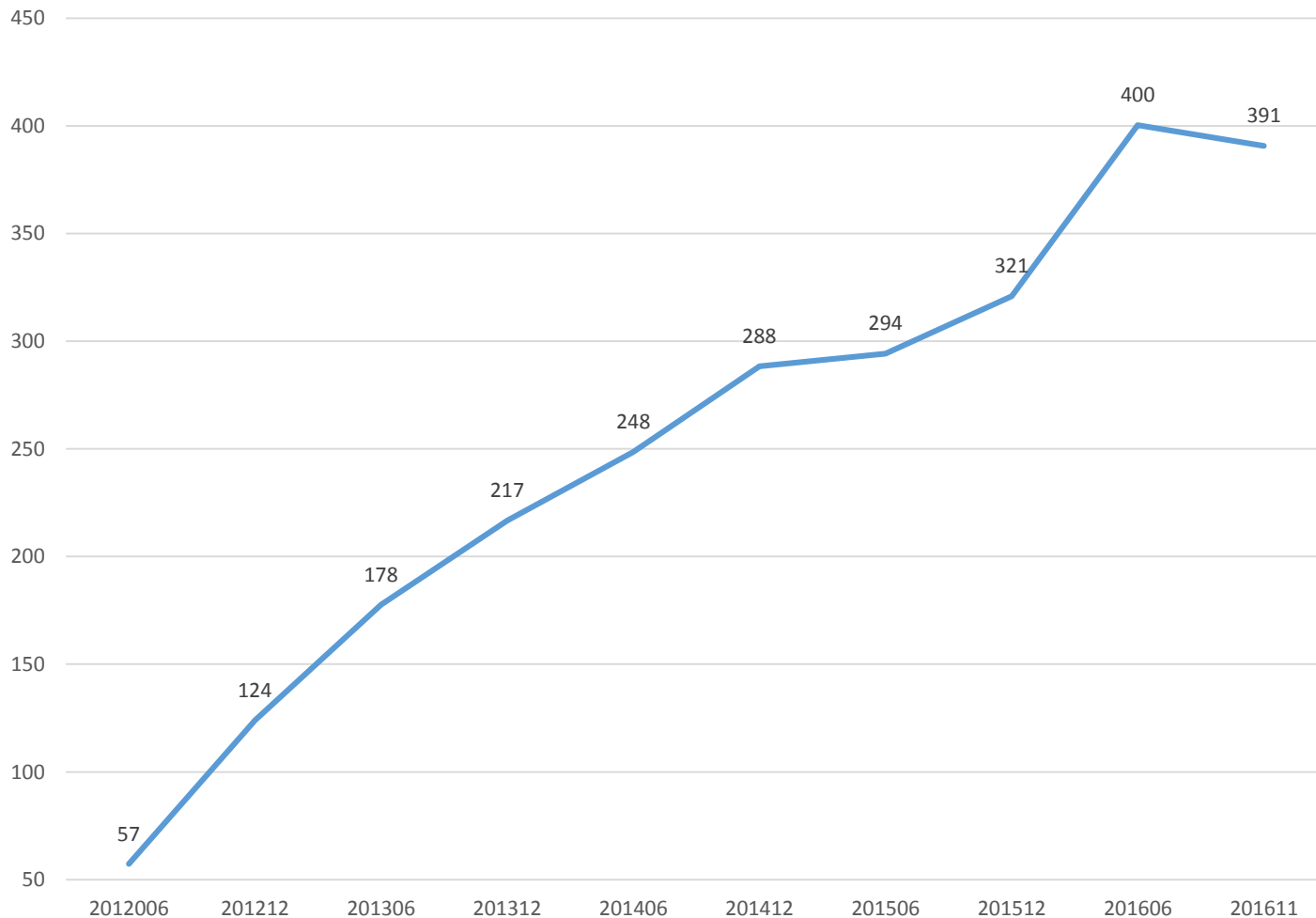
运行管理之 运行成本控制、文件资料管理

动物饲养量增加



- 2018年6月底，共有19068笼（平均使用率98.0%）

PI实验室笼位使用量变化情况



数据来源：清华大学19位PI，从入职到现在的笼位发展情况

饲养费价格变化

- 2011之前：1元/只，免疫缺陷1.5元/只
- 20110526起：按笼收费，4元/笼/天（实收3.2元/笼/天）
- 20120216起：按笼收费，3元/笼/天
- 20130626起：下调P2收费
- 20170301起：按笼收费，5元/笼/天
- 20180301起：按笼收费，4元/笼/天

继续完善和丰富技术服务

- 动物饲养
- 组织病理学
- 小鼠代管
- 小鼠生物净化：
- 小鼠进出口
- 每周五屏障使用及动物操作相关技术培训
- 每月2次无菌手术操作培训
- 楼宇巡检
- 利用IVF快速大量繁殖遗传工程小鼠
- 利用IVF挽救繁育不好的小鼠品系

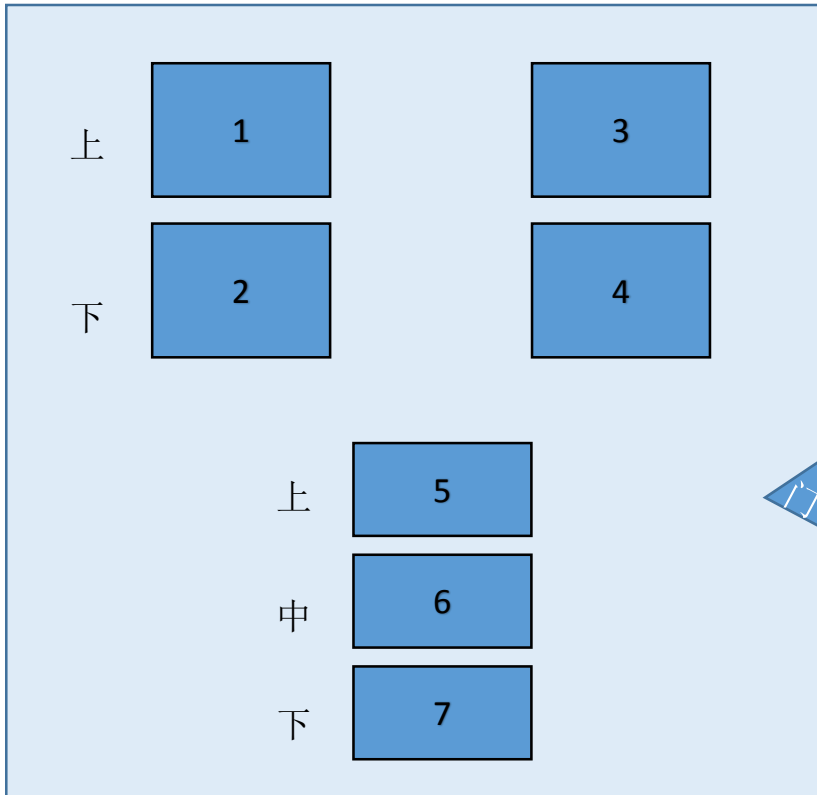
继续完善和增加技术服务

- 供SPF级B6、B6CBAF1、CBA/CaJ小鼠
- 参加认可委和中检院组织的检测能力验证比对
- 胚胎冷冻：
- 精子冷冻：
- 转基因小鼠的制作
- 提供Cas9介导的小鼠KO/KI/CKO：154个Projects
- 卵巢移植（死去的母鼠可有亲生后代）：1例
- 附睾运输与保存（死去的雄鼠可有亲生后代）
- 无菌动物饲养和质量检测

Germ Free mice



无菌动物饲养和质量检测



- 建立一套适用的SOP
- 创新性建立无菌动物检测系统
- 现在已经向广大师生少量提供C57BL/6NTac、BALB/cTac和C57BL/6Nslac

无菌动物质量检测系统的建立

- ATP RLU
- 各种苛养型培养

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1	20180621 包内取出样本ATP RLU值 (1颗粪便+0.2ml NB培养基mix后读取新鲜粪便的ATP RLU值)					6/21 1颗粪便+300微升NB, mix取100微升血平血涂板, 37°C培养; 6/25 观察 #2一个菌落。									
2	6/21 ATP	BHI	NB	SOYA	新鲜粪便										
3	#1	15	129	5	312										
4	#2	18	84	5	215										
5	#3	23	58	6	422										
6	#4	28	122	13	278										
7	#6	21	78	9	237										
8	#7	27	109	9	215										
9	304 PC				8621										
10	灭菌水 NC				0										
11															
12															
13															
14															
15															
16															
17	20180626 新鲜粪便在NB培养基中有氧70rpm摇床和厌氧条件下37°C培养5天后ATP RLU值														
18	6/26 ATP	NB 有氧	NB 厌氧												
19	#1	52	60												
20	#2	58	49												
21	#3	43	81												
22	#4	43	47												
23	#6	51	52												
24	#7	47	82												
25	304 PC	7843	8138												
26	灭菌水 NC	96	70												
27															
28															
29	20180628 将6/26已培养5天的培养基接种到哥伦比亚血平皿, 分别有氧和厌氧培养2天。														
30	将6/26已厌氧培养5天的NB培养基, 取100微升血平血涂板, 仅PC有菌生长														
31															
32															
33															
34															
35															
36															
37															
38															
39															
40															
41															
42															
43															
44															
45															
46															
47															
48															
49															
50	总上检测结果: #1#2#3#4#6#7自动物粪便中未检出活菌。														

推荐一本无菌动物饲养的书籍

CRC Press
Taylor & Francis Group

Gnotobiotic Mouse Technology

AN ILLUSTRATED GUIDE



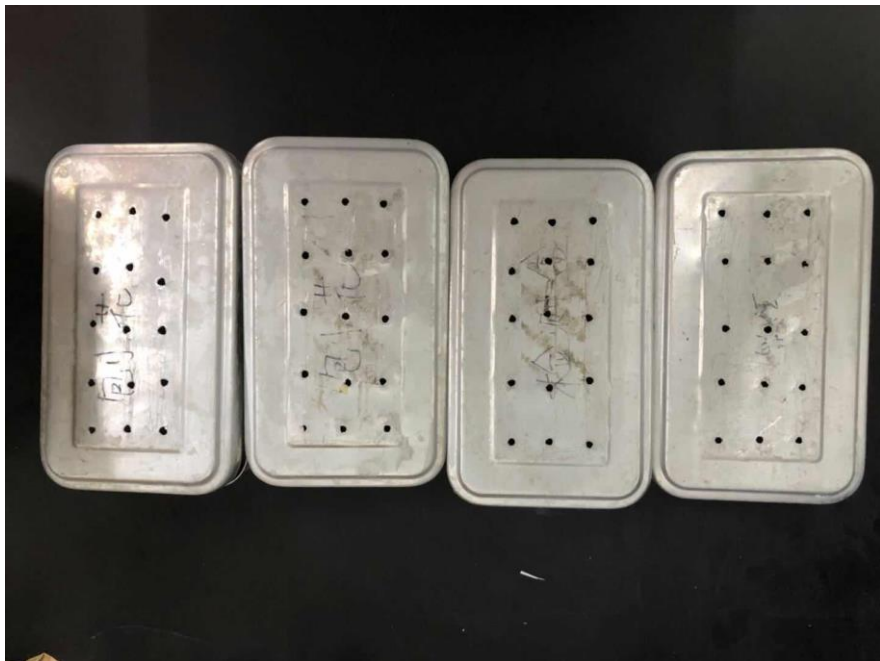
Germ-Free Mouse Facility

Established in 2004, the germ-free mouse facility, part of the [Unit for Laboratory Animal Medicine](#), U Of Michigan

Chriss J. Vowles • Natalie E. Anderson
Kathryn A. Eaton

无菌动物饲料的准备

- 双倍剂量辐照（ $25\text{kGy} * 2 = 50\text{kGy}$ ）
 - 并不能保证无菌
- 高压饲料灭菌：
 - 131°C ，60min，完全无菌，但饲料营养成分已变
 - 高压料辐照 25kGy 后， 131°C ，25min，可以达到无菌

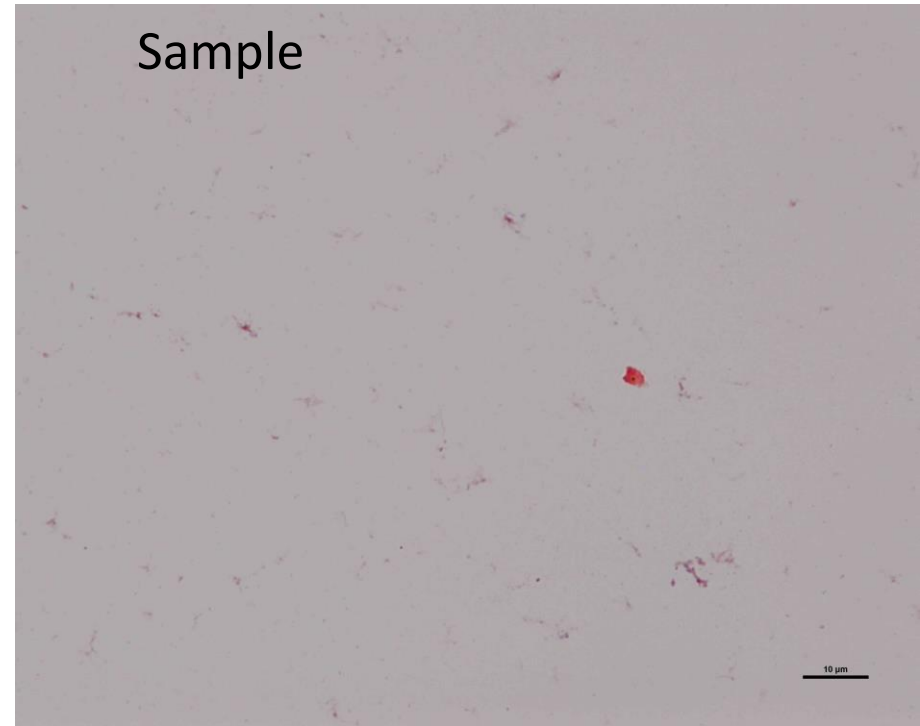
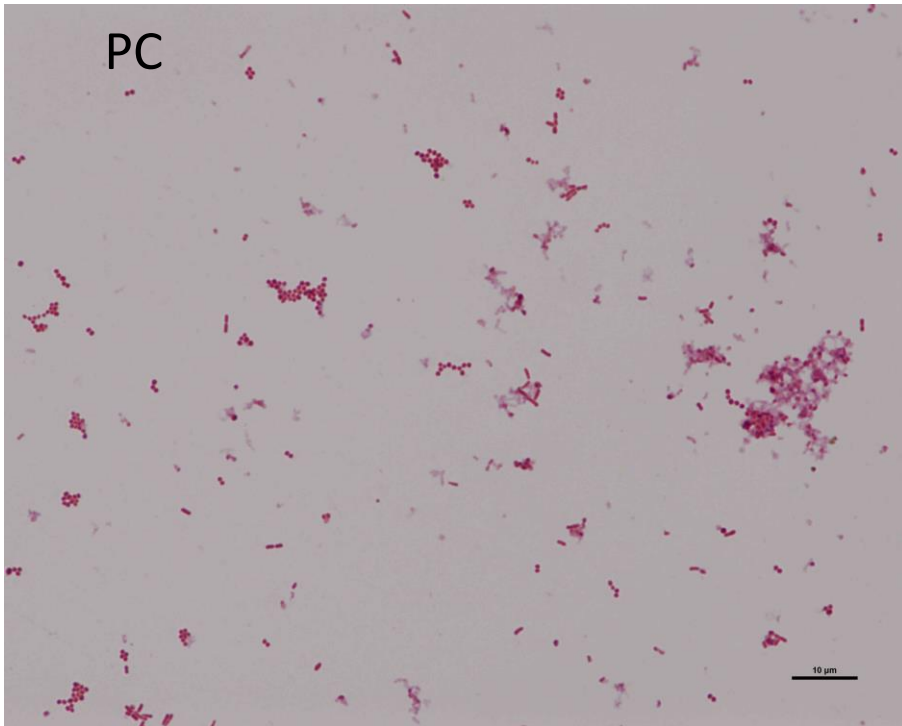




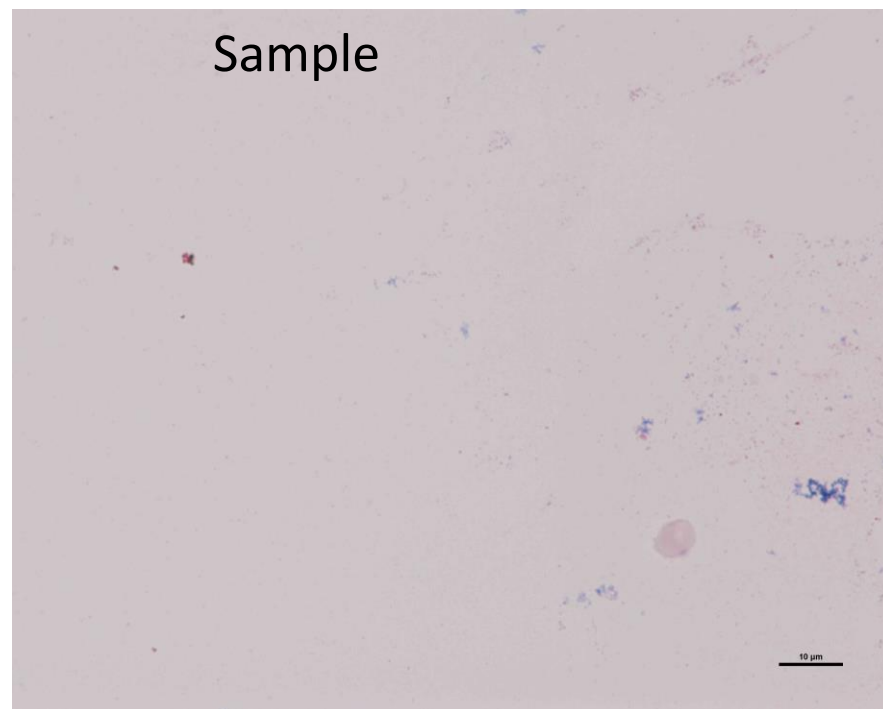
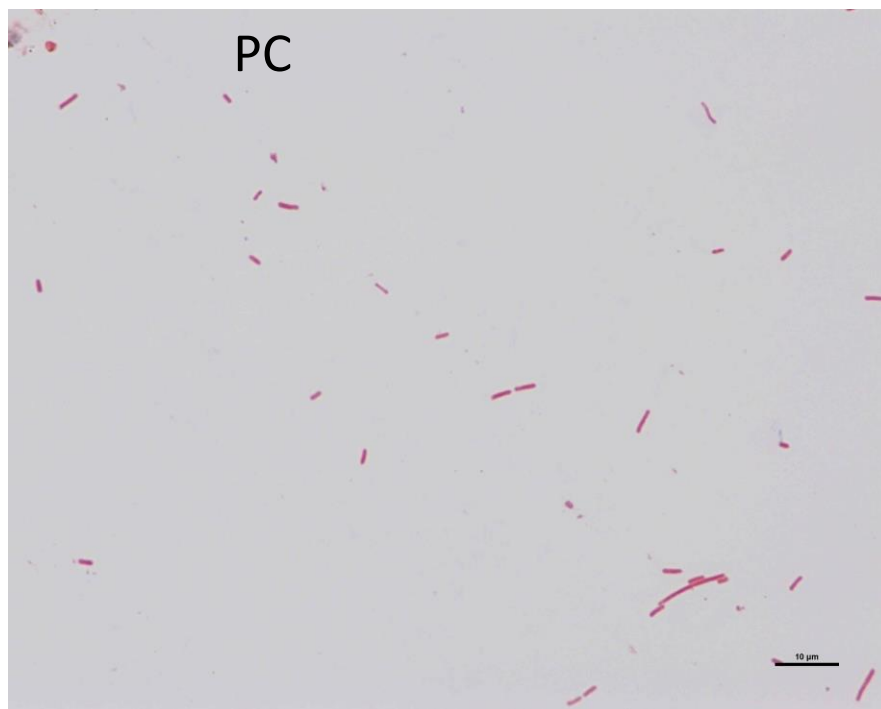
无菌动物饮用水的准备

- 高压灭菌水
- 准备水瓶
- 一个疏忽可能导致感染
- 娃哈哈+50kGy辐照，无菌，可浸泡风险小

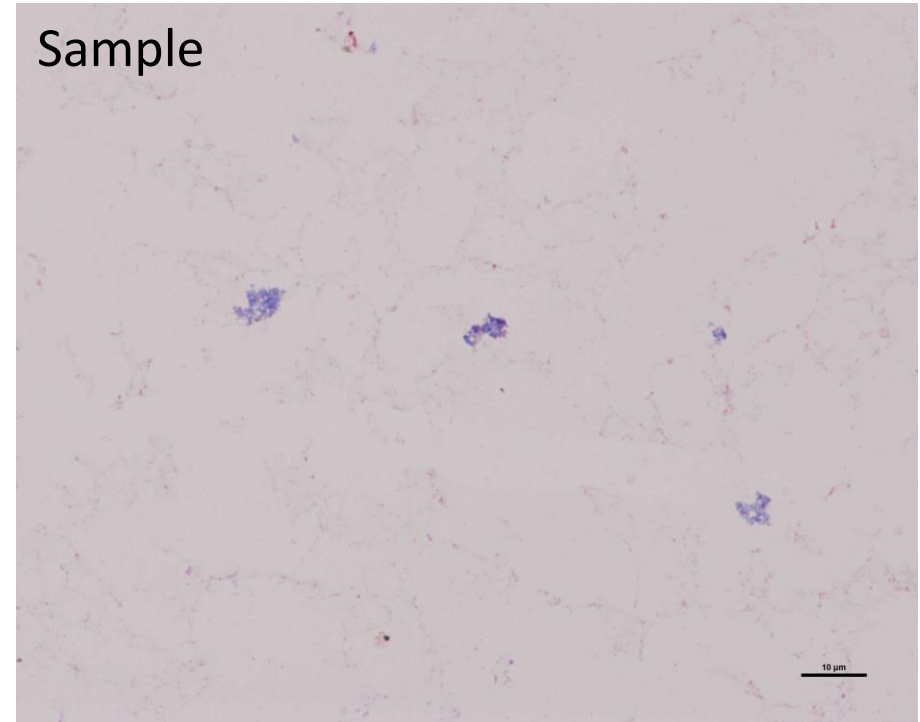
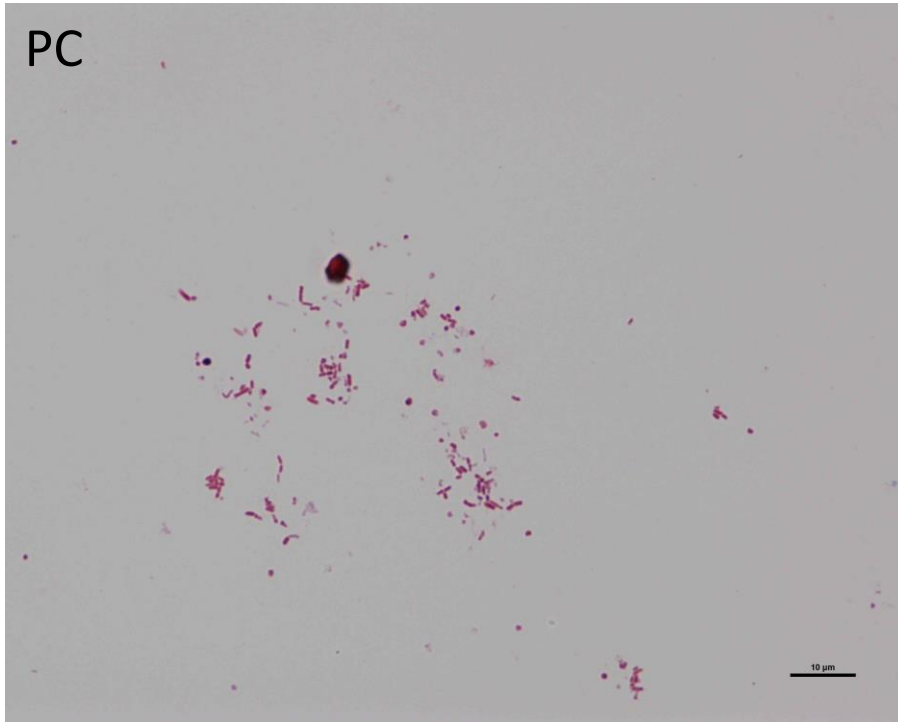
BHI (60x)



FTM (60x)



SOYA (60x)

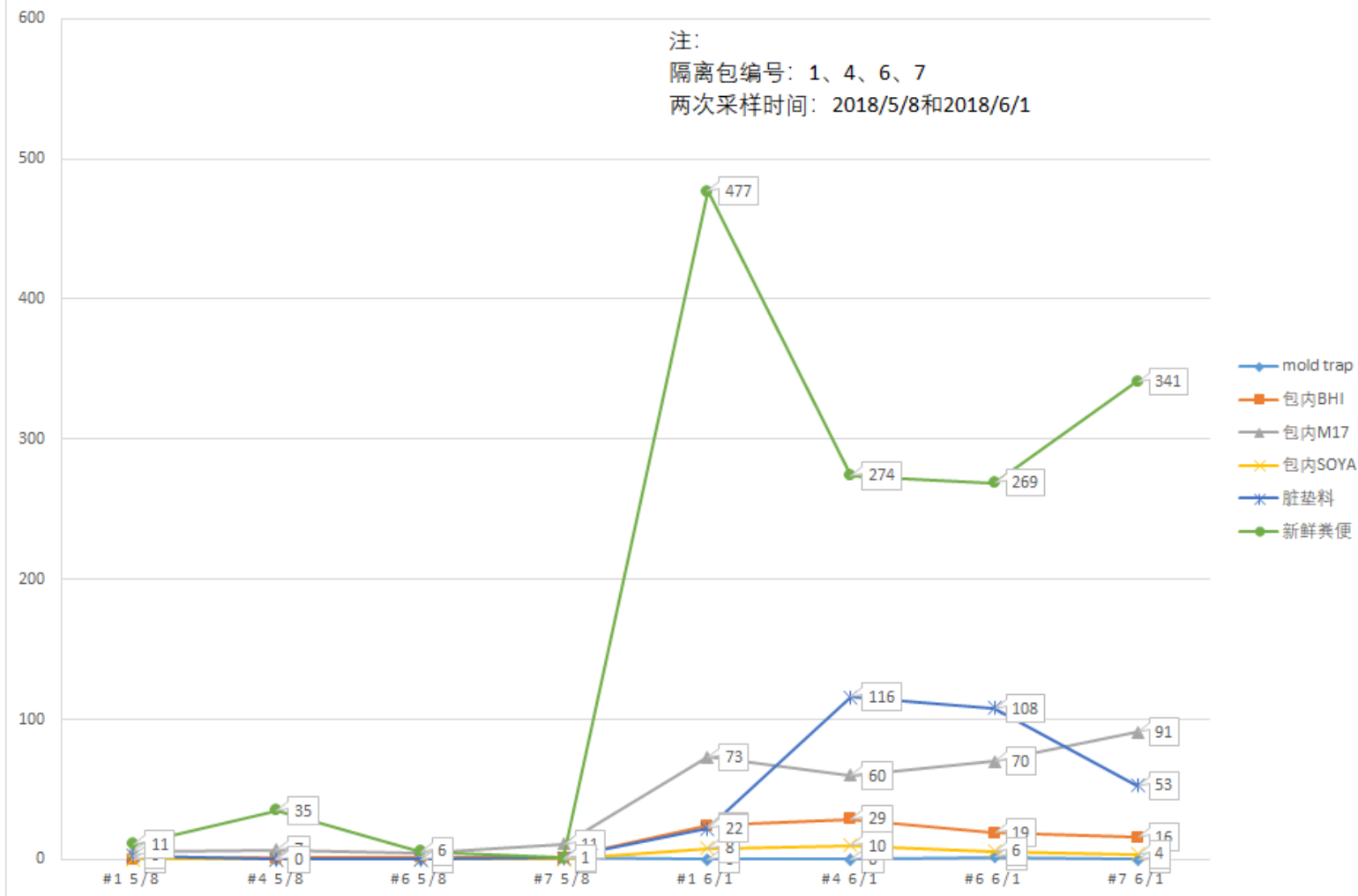


20180919

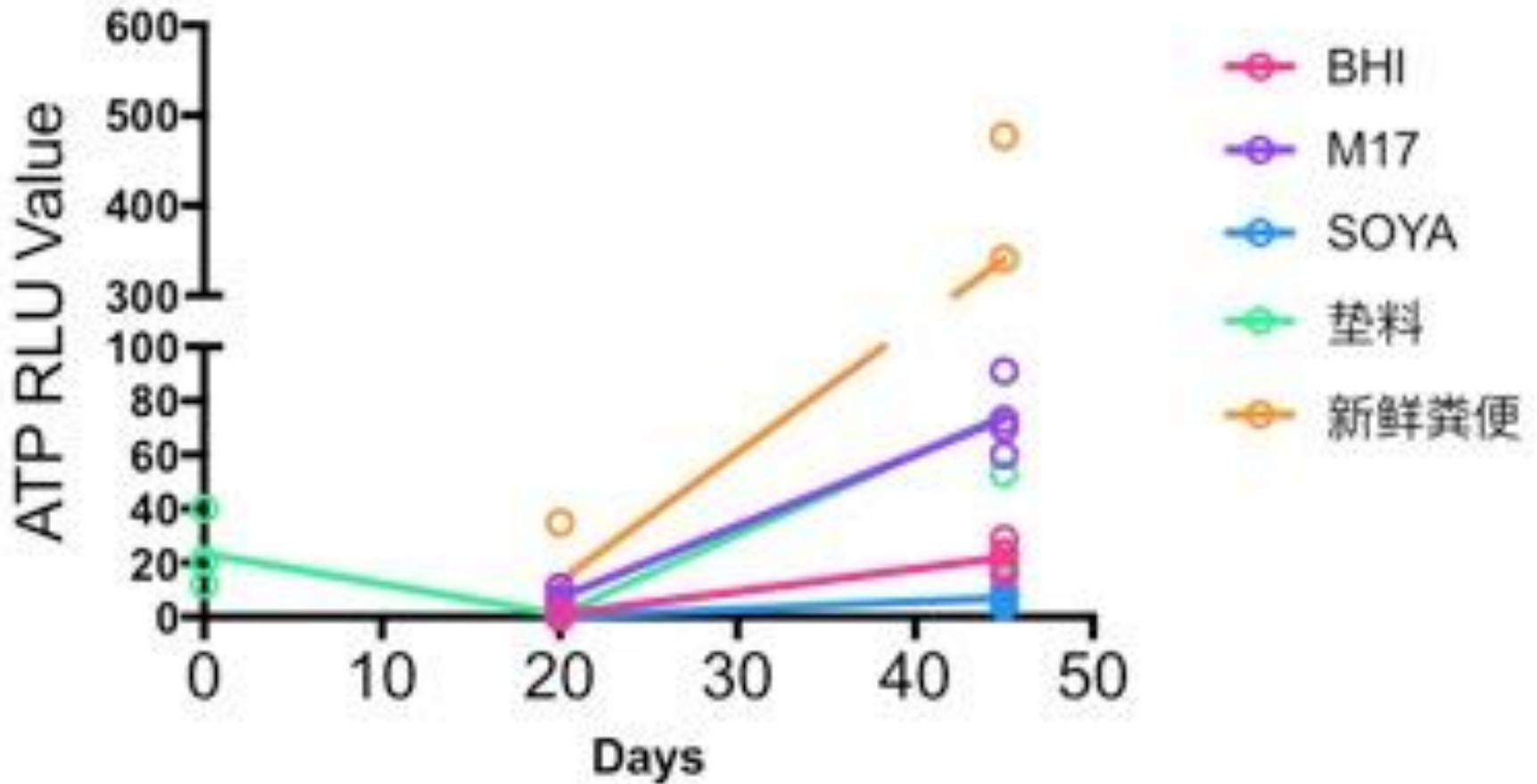


无菌小鼠微生物质量检测

GF小鼠隔离包内6个样本两次采样ATP值波动曲线



无菌小鼠微生物质量检测



运行成本控制

- 水费、电费：
- 人员费（工资+绩效+加班+奖励，含五险一金）：
（最不应该吝啬的花费）
- 饲料：
- 垫料：
- 动物费：
- 进口：
- 质量检测：
- 设备、耗材试剂、日常维修：
- 学校提留管理费：

动物中心人才梯队建设

- 共有员工63人，其中事编3人，合同制60人（截至2018年11月）
 - 主管1人（事编），主治兽医1人（事编），胚胎操作1人（新事编）
 - 技术员16人
 - 设施维护6人
 - IT程序员1人
 - 饲养员：15人（3层）+13人（2层）+8人（1层）+1人（兔房）+1人（洗叠净化服和卫生）
- 技术员参加技术培训和会议至少平均1人次
- 培训校外技术员，帮助建立净化、饲养体系等

文件资料管理



日常维护

- 空调设施
- 气味管理

空调设施、气味管理

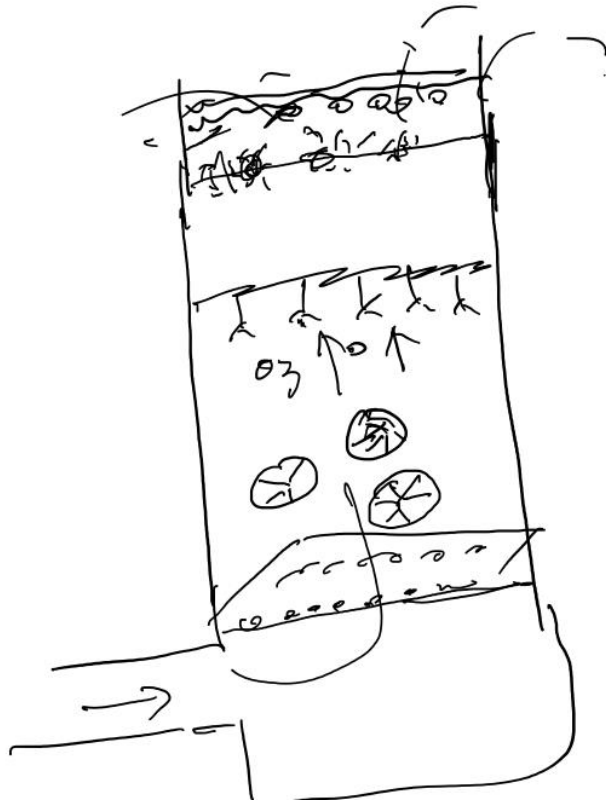
- 空调设施：服务外包
- 气味管理：
 - 气流流向设计：管道漏风、夹层气味外泄等
 - 房间气味的控制：次氯酸水喷雾消毒除味
 - 废气排放处理： +/-水淋/处理（+次氯酸水） +/-高空喷射



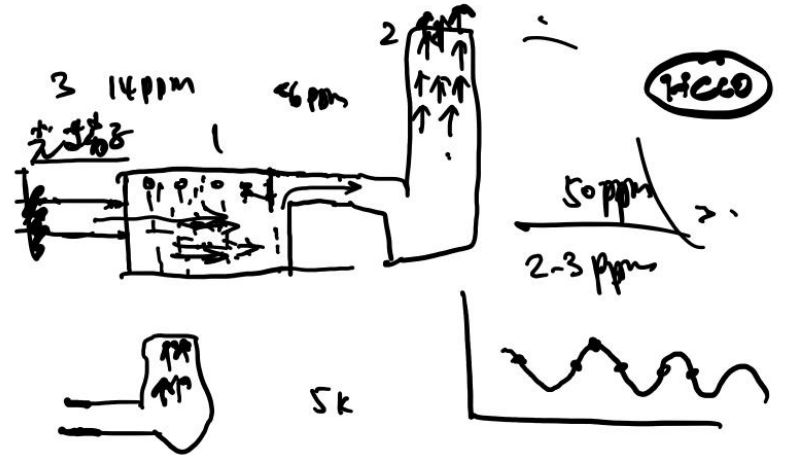
+



水淋喷雾除味设计



$\phi 50$
 $\phi 73$
 $\phi 100$



200 ~~1200~~ ~~1200~~

$HCl + NaClO = HClO$ 锡
 ca: 1/6 2/7

$HCl + H_2O = H_3O^+$
 Δ 50ppm

$\Delta 32e$ { 800ppm 1:10
 800ppm 1:600-50

2号子 X
 Anigee X

使用
 使用
 每100L
 0.5



新动物房建设中的思考

干净垫料处理



脏垫料处理



1. 门禁卡关联animal protocol中的#AP, PI, 实验者 (≥1人), 是否P2, 起止日期。以上数据可以手动输入, 也可以导入。这些数据更多的是后台数据, 后台数据还包括实验者的《实验动物从业人员证书号码》。
2. 经过培训, 初次办理门禁卡时, 输入实验者名字, PI名字, 会弹出包含实验者名字的#AP: 15-CZ1 (示例), 上岗证号 (假如没有为空, 并提示没有取得上岗证)。这时, 需要输入此申请者的详细信息, 包括:
 - a. 人员类型: 实验者 (默认)、工作人员
 - b. 院系:
 - c. PI姓名 (可以关联后台数据):
 - d. 手机号:
 - e. email:
 - f. 实验室电话:
 - g. 实验室地址: 楼宇: _____ 房间号:
 - h. 授权开通在动物中心外做动物实验的房间 (与PI关联):
 - i. 需要开通的房间: 比如开通306房间, 需要弹出是否需要同时开通的是315房间, 310房间
 - j. 开通时限: 默认当日至animal protocol截止日期, 最长半年。
 - k. 操作人: 此项假如和修改录入权限相一致, 可以默认为登陆者。
3. 软件设置查看权限和修改录入权限。
 - a. 查看权限只能看
 - b. 修改录入权限包括了办理卡、修改权限、等
4. 后期修改记录: 包括更换个人信息变更、PI变更、AP变更、授权房间的变更要自动记录修改的时间、变更内容和操作者。
5. 门禁卡显示窗口: 刷卡时应显示的内容包括姓名、性别、照片、上岗证号、授权区域、AP#
6. 软件查找:
 - a. 查询方式更加灵活, 按照卡号、姓名、上岗证号、PI、门区、AP#等可以进行任意时间段的查询。
 - b. 查询的内容自动生成表格下载、转出或打印;
7. 批处理功能, 以PI整个实验室为单位, 此实验室内的所有实验者一起调整
8. 每个门应该设置防疫级别。从防疫级别上分类 (后台有“门禁区域防疫级别分类表”), 要求刷过防疫级别高的门区可以随后进入其他同级别或低级别的授权区域, 而刷过防疫级别低的门区, 只能在48h后才可以刷开授权的防疫级别高的区域。对于实验者应该这种设置。对于工作人员无需这种设置。比如, 对于人员类型为实验者的, 假如刷了206, 208, 213, 104, 102, 101, 111, 105等房间 (级别是Level 4), 将在48小时内不可以刷开级别是Level 4以上的房间。
9. 实现员工考勤功能:
 - a. 每天定时自动查询生成人员类型为工作人员的考勤表, 首次和末次刷卡时间、进入门区记录, 没有出大门刷卡记录的, 显示特殊颜色标识。生成的表格定时发邮件给尹玉涛yinyutao@biomed.tsinghua.edu.cn、抄送给changzai@biomed.tsinghua.edu.cn。
 - b. 工作人员出动物房超过15min若未再次刷卡, 发邮件给尹玉涛yinyutao@biomed.tsinghua.edu.cn, 抄送给changzai@biomed.tsinghua.edu.cn。
10. 动物取出登记功能, 如下图:

动物进入楼宇入口证明 (盖章有效)
Entrance permit for animals

最好还是有二维码, 作为防伪标识

楼宇/Building _____ 授权房间/Room _____
院系/Department _____ PI _____

设施维保软件的应用

- 今年下半年完成原型图



欢迎各位老师、同学指导！

changzai@biomed.tsinghua.edu.cn