

ICS 65.020.30

B 44

备案号:

DB11

北 京 市 地 方 标 准

DB11/T 828.1—2011

实验用小型猪 第 1 部分：微生物学等级及监测

Experimental minipig

Part 1: Microbiological standards and surveillance

2011 - 11 - 10 发布

2012 - 03 - 01 实施

北京市质量技术监督局 发布

目 次

前言..... 11

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 2

4 微生物学等级分类..... 2

5 检测要求..... 2

6 检测程序..... 3

7 检测方法..... 4

8 检测规则..... 5

9 结果判定..... 6

10 判定结论..... 6

附录 A（资料性附录） 猪圆环病毒 2 型 ELISA 抗体检测 7

前 言

DB11/T 828 的本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

DB11/T 828《实验用小型猪》分为六个部分：

- 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：病理学诊断规范；
- 第 5 部分：配合饲料；
- 第 6 部分：环境及设施。

本部分为 DB11/T 828 的第 1 部分。

本部分由北京市科学技术委员会提出并归口。

本部分由北京市科学技术委员会组织实施。

本部分起草单位：中国食品药品检定研究院、中国动物疫病预防控制中心、中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心、北京实验动物研究中心。

本部分主要起草人：贺争鸣、田克恭、范薇、巩薇、遇秀玲、付瑞、卢胜明。

实验用小型猪

第1部分：微生物学等级及监测

1 范围

DB11/T 828 的本部分规定了实验用小型猪微生物学等级分类、检测要求、检测程序、检测方法、检测规则、结果判定、判定结论等。

本部分适用于实验用小型猪微生物学等级监测。

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 14926.4 实验动物 皮肤病原真菌检测方法
- GB/T 14926.8 实验动物 支原体检测方法
- GB/T 14926.46 实验动物 钩端螺旋体检测方法
- GB/T 16551 猪瘟诊断技术
- GB/T 18090 猪繁殖与呼吸综合症诊断方法
- GB/T 18638 流行性乙型脑炎诊断技术
- GB/T 18641 伪狂犬病诊断技术
- GB/T 18646 动物布鲁氏菌病诊断技术
- GB/T 18935 口蹄疫诊断技术
- GB/T 19200 猪水泡病诊断技术
- GB/T 19915.1 猪链球菌 2 型平板和试管凝集试验操作规程
- GB/T 19915.2 猪链球菌 2 型分离鉴定操作规程
- GB/T 19915.3 猪链球菌 2 型 PCR 定型检测技术
- GB/T 19915.7 猪链球菌 2 型荧光 PCR 检测方法
- GB/T 21674 猪圆环病毒聚合酶链反应试验方法
- GB/T 22333 日本乙型脑炎病毒反转录聚合酶链反应试验方法
- GB/T 22915 口蹄疫病毒荧光 RT-PCR 检测方法
- GB/T 22917 猪水泡病病毒荧光 RT-PCR 检测方法
- NY/T 537 猪放线杆菌胸膜肺炎诊断技术
- NY/T 541 动物疫病实验室检验采样方法
- NY/T 545 猪痢疾诊断技术
- NY/T 546 猪萎缩性鼻炎诊断技术
- NY/T 548 猪传染性胃肠炎诊断技术
- NY/T 550 动物和动物产品沙门氏菌检测方法
- NY/T 564 猪巴氏杆菌病诊断技术
- NY/T 679 猪繁殖和呼吸综合症免疫酶试验方法

- SN/T 1379.1 猪瘟单克隆抗体酶联免疫吸附试验
- SN/T 1445 动物流行性乙型脑炎微量血凝抑制试验
- SN/T 1446.1 猪传染性胃肠炎阻断酶联免疫吸附试验
- SN/T 1919 猪细小病毒病红细胞凝集抑制试验操作规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

实验用小型猪 experimental minipig

经人工饲养，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，12 月龄体重不超过 35kg，用于科学研究、教学、生产和检定以及其他科学实验的小型猪。

3.2

普通级小型猪 conventional (CV) minipig

不携带所规定的重要人兽共患病病原和猪烈性传染病病原。

3.3

清洁级小型猪 clean (CL) minipig

除普通级应排除的病原外，不携带所规定的对猪危害大和对科学研究干扰大的病原。

3.4

无特定病原体级小型猪 specific pathogen free (SPF) minipig

除清洁级应排除的病原外，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。

4 微生物学等级分类

实验用小型猪微生物学等级分为普通级、清洁级和无特定病原体级。

5 检测要求

5.1 临床观察

外观检查无异常。

5.2 微生物检测项目

各等级实验用小型猪病原微生物检测项目见表1。

表1 各等级实验用小型猪病原微生物检测项目

动物等级			微生物	检测要求
无特定病原体级	清洁级	普通级	口蹄疫病毒 Foot and mouth disease virus	▲
			猪瘟病毒 Classical swine fever virus	▲
			猪繁殖与呼吸综合征病毒 Porcine reproductive and respiratory syndrome virus	▲
			乙型脑炎病毒 Japanese encephalitis virus	▲
			布鲁氏菌 <i>Brucella spp</i>	●
			皮肤病原真菌 Pathogenic dermal fungi	●
			钩端螺旋体 <i>Leptospira spp</i>	○
			伪狂犬病病毒 Pseudorabies virus	●
	无特定病原体级		猪痢疾蛇样螺旋体 <i>Serpul - Mahyodysenteriae</i>	●
			支气管败血波氏杆菌 <i>Bordetella bronchiseptica</i>	●
			多杀巴氏杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>	●
			肺炎支原体 <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	●
			猪细小病毒 Porcine parvovirus	●
			猪圆环病毒 2 型 Porcine circovirus type 2	●
			猪传染性胃肠炎病毒 Porcine transmissible gastroenteritis virus	●
			猪水泡病病毒 Swine vesicular disease virus	○
			猪胸膜肺炎放线杆菌 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> ,	●
			沙门氏菌 <i>Salmonella spp</i>	○
			猪链球菌 2 型 <i>Streptococcus suis</i> type 2	○
注：▲必须检测，普通级可以免疫，清洁级和无特定病原体级不能免疫；●必须检测；○必要时检测				

5.3 检测项目分类

5.3.1 必检项目

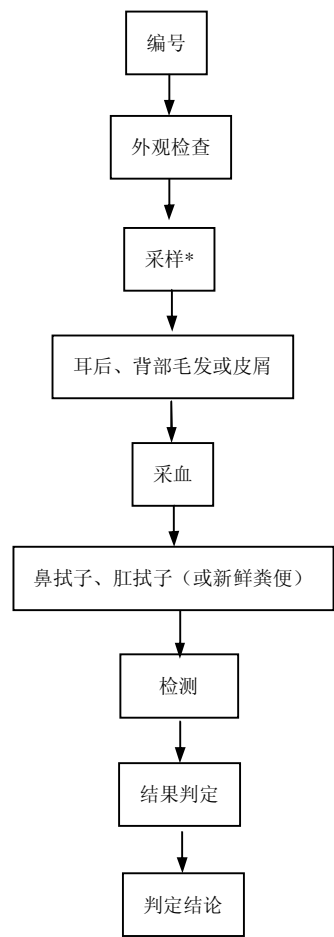
在进行实验用小型猪质量评价时必须检测的项目。

5.3.2 必要时检测项目

申请生产许可证、从国外引进实验用小型猪和疑有该病原体感染时必须增加检测的项目。

6 检测程序

检测程序见图 1。



*：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。

图1 检测程序

7 检测方法

检测方法见表2。

表2 实验用小型猪病原微生物检测方法

微生物	方法
口蹄疫病毒	GB/T 18935; GB/T 22915
猪瘟病毒	GB 16551; SN/T 1379.1
猪繁殖与呼吸综合征病毒	GB/T 18090; NY/T 679
乙型脑炎病毒	GB/T 18638; GB/T 22333; SN/T 1445
伪狂犬病病毒	GB/T 18641

表 2 实验用小型猪病原微生物检测方法（续）

微生物	方法
猪细小病毒	SN/T 1919
猪圆环病毒 2 型	GB/T 21674；附录 A
猪传染性胃肠炎病毒	NY/T 548
猪水泡病病毒	GB/T 19200；GB/T 22917
布鲁氏菌	GB/T 18646
皮肤病原真菌	GB/T 14926.4
猪痢疾蛇样螺旋体	NY/T 545
支气管败血波氏杆菌	NY/T 546
多杀巴氏杆菌	NY/T 546；NY/T 564
肺炎支原体	GB/T 14926.8
猪胸膜肺炎放线杆菌	NY/T 537
钩端螺旋体	GB/T 14926.46
沙门氏菌	NY/T 550
猪链球菌 2 型	GB/T 19915.1~3；GB/T 19915.7

8 检测规则

8.1 检测频率

每 6 个月至少检测一次。

8.2 抽样

8.2.1 方式

选择 6 月龄以上的实验用小型猪用于检测，随机抽样。

8.2.2 数量

根据实验用小型猪群体大小，抽样数量见表 3。

表3 抽样数量

群体大小（头）	抽样数量
<100	不少于 5 头
100~500	不少于 10 头
>500	不少于 15 头

8.2.3 方法

8.2.3.1 按病毒、细菌、真菌、寄生虫检测要求联合采样。

8.2.3.2 采样方法按照 NY/T 541 进行。

8.3 样本要求

样本要求有明显标识，写明检品名称、品系、等级、数量及检测项目等内容，安全送达实验室。

9 结果判定

9.1 抗体检查

免疫项目，群体免疫合格率 $\geq 70\%$ ，判为合格。

非免疫项目，血清抗体阴性判为合格。

9.2 抗原和核酸检查

未见阳性结果判为合格。

10 判定结论

所有项目的检测结果均合格，判为符合相应的等级标准。否则，判为不符合相应的等级标准。

附录 A (资料性附录)

猪圆环病毒 2 型 ELISA 抗体检测

A.1 原理

采用猪圆环病毒2型ORF2合成肽抗原包被微孔板，加入稀释的待检血清，经温育后，若样品中含有特异性抗体，则将与微孔板上抗原结合，经洗涤除去未结合的抗体和其他成分后，加入酶标二抗，与微孔板上抗原抗体复合物发生特异性结合，再经洗涤除去未结合的酶标二抗，在孔中加入TMB底物液，与酶反应产生蓝色产物，加入HF溶液终止反应后，用酶标仪630nm波长测定各反应孔中的OD值。

A.2 样品采集

A.2.1 样品类型

猪血清。

A.2.2 样品采集

无菌条件下用一次性注射器取耳静脉血3mL~5mL，置于试管中，分离血清，待检。

A.3 操作步骤

A.3.1 用样品稀释液将待检样品40倍稀释后加入预包被的抗原板孔中，每孔加100 μ l。阴、阳性对照各设2孔，每孔100 μ l。另设一空白对照孔，空白对照孔加100 μ l稀释液。轻轻振匀孔中样品（勿溢出），置37℃温育30min。

A.3.2 甩掉板孔中的溶液，用洗涤液洗板3次，300 μ l/孔，每次静置3min后倒掉，最后一次洗涤后在干净吸水纸上拍干。

A.3.3 每孔加酶标二抗（抗猪IgG-HRP结合物）100 μ l，置37℃温育30min。

A.3.4 洗涤3次，方法同A.3.2。

A.3.5 每孔加底物A液、B液各50 μ l，混匀，室温避光显色10min。

A.3.6 每孔加终止液50 μ l，10min内测定结果。

A.4 结果判定

A.4.1 肉眼判定

“++++”深度蓝色，液体不透明；“+++”蓝色，液体微透明；“++”中度蓝色，液体透光；“+”浅蓝色，液体透明；“-”无色，液体完全透明。以显色“++”以上判为阳性。

A.4.2 酶标仪判定

A.4.2.1 以空白孔调零，在酶标仪上测各孔OD₆₃₀值。试验成立的条件是阳性对照孔平均OD₆₃₀值 ≥ 0.6 ，阴性对照孔平均OD₆₃₀值 < 0.2 。

DB11/T 828.1—2011

A.4.2.2 样品OD₆₃₀值 >0.42 ，判为阳性；样品OD₆₃₀值在0.38到0.42之间，判为可疑；样品OD₆₃₀值 <0.38 ，判为阴性。
