



实验动物运输盒微生物指标检测分析

张华琼, 赵田, 范方玲, 罗素兰, 夏爽, 黄麟, 吴燕茹

(成都生物制品研究所, 四川成都 610023)

【摘要】 目的 检测 SPF 金黄地鼠在从 204 车间转运到隔离器车间时微生物污染情况, 同时对不同运输盒进行比较, 筛选合格的实验动物运输盒。方法 用 TSA 培养皿模拟实验动物运输过程, 比较沉降菌检测结果。结果 大小 IVC 笼盒内环境微生物能控制在 14 cfu/4 h 以下, 而且菌落形态与 SPF 饲养间环境内的沉降菌基本一致, 符合标准要求; 甲乙普通运输盒内环境微生物却在 70 cfu/4 h 以上, 不符合标准要求。结论 SPF 金黄地鼠在从 204 车间转运到隔离器车间时未受到污染; 实验动物转移运输应选择大小 IVC 笼盒。

【关键词】 运输盒; 沉降菌; 微生物污染; 实验动物; 运输

【中图分类号】 R373; R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)02-0018-04

doi:10.3969/j.issn.1671.7856.2012.02.005

Comparison of Microbial Pollution during Transfer of Laboratory Animals between Production Workshops Using Different Transport Boxes

ZHANG Hua-qiong, ZHAO Tian, FAN Fang-ling, LUO Su-lan, XIA Shuang, HUANG Lin, WU Yan-ru
(Chengdu Institute of Biological Products, Chengdu 610023, China)

【Abstract】 Objective To determine whether the SPF hamsters transferred from building 204 to isolator workshop were microbially polluted using different transport boxes, and select qualified boxes for laboratory animal transportation. **Methods** Using triptic soy agar (TSA) culture dishes, simulating laboratory animal transportation process, and compare the results of settling plates in different boxes. **Results** The microorganisms in individually ventilated cages (IVC) could be controlled below 14 cfu/4 h, and the morphology was the same with the colony in SPF building, therefore, were accord with standard. But in the conventional transport boxes, the colony were above 70 cfu/4 h, which failed to meet the standards. **Conclusions** SPF hamsters are not microbially polluted during the transport from building 204 to the isolator workshop using IVC cages. IVC cages are much better than conventional transport boxes and should be used in laboratory animal transportation.

【Key words】 Transport boxes; Settling plates; Microbial pollution; Laboratory animal, transport

因乙型脑炎活疫苗扩大生产, 对实验动物的需求日益增大, 我们新建了隔离器车间和 207 车间, 并将 204 车间的 SPF 金黄地鼠全部转移到隔离器车间, 隔离器车间主要是保种育种, 为 207 车间提供种子; 207 车间主要是 SPF 金黄地鼠饲养繁殖, 为乙脑疫苗生产提供 10~14 日龄仔鼠。另外, 204 车间主要生产 SPF 小鼠和清洁级豚鼠, 供各种产品动物试

验用; 而 205 车间则是各种动物试验的场所。

在动物从 204 车间转移到隔离器车间的过程中, 独立通气笼盒 (individually ventilated cages, IVC) 是否能确保动物未受到污染? 在动物从 207 车间供应到乙脑生产车间以及从 204 车间供应到 205 车间的过程中, 各种动物运输盒又是否能确保动物未受到污染? 带着这样的问题, 我们开展了实

验动物运输盒微生物指标验证工作^[1]。

运输盒是 SPF 动物(或清洁动物)在不同车间之间转运的笼具,运输盒应具有一定的通透性,以保证其中的动物能正常呼吸,避免“出汗”或闷死;同时运输盒经过有效的高压灭菌后,在运输过程中应保持良好的密闭性,微生物指标应达到预期的要求,防止外界脏空气污染盒内动物^[2]。

本试验选用了不同规格的笼盒来做检测和比较,其中,小 IVC 笼盒主要用于金黄地鼠从 204 车间到隔离器车间的转移;大 IVC 笼盒和普通运输盒主要用于小鼠、豚鼠从 204 车间到 205 车间的运输;以及金黄地鼠仔鼠从 207 车间到乙脑活疫苗生产车间的运输。

连续 3 次测试,结果显示大、小 IVC 笼盒在整个实验动物的转运过程中微生物水平能始终保持在洁净度 C 级标准内,为控制实验动物运输盒质量提供了一定的参考依据。

1 材料和方法

1.1 运输盒

小 IVC 笼盒 15 个,规格(325×210×185) mm,盖子顶部有一直径 60 mm 的生命窗(带滤膜),外观完好,放入一个大的不锈钢箱子中,箱子加盖;大 IVC 笼盒 3 个,规格(500×360×280) mm,盖子顶部有一直径 86 mm 的生命窗(带滤膜),外观完好;甲普通运输盒 3 个,规格(466×314×200) mm,不锈钢盖子上有 2 张矩形滤膜,(229×111) mm,外观完好;乙普通运输盒 3 个,规格(600×400×210) mm,塑料盖子上有 1 张矩形滤膜,(402×203) mm,盒子两侧各有 2 张矩形滤膜,(188×66) mm,外观完好;滤膜均为单层,材质为无纺布,可清洗、耐高压。

1.2 沉降皿

胰蛋白胨大豆琼脂培养基(tryptic soy agar, TSA)平皿,直径 90 mm,由本所培养基室提供。

1.3 方法

TSA 平皿和高压灭菌后的运输盒按程序传入 204 车间动物饲养间内。在饲养间内逐一打开运输盒,放入已标记 TSA 平皿(小 IVC 笼盒 1 付/盒;大 IVC 笼盒 2 付/盒;普通运输盒 2 付/盒),打开平皿盖,盖好运输盒盖子。将运输盒传出饲养间,在 204 车间动物待发处放置 0.5 h。小 IVC 笼盒的转移:按照《SPF 金黄地鼠转移方案》,将小 IVC 笼盒从 204 车间经车间外周道路运送到 207 车间电梯口;

经电梯进入二楼隔离器车间,通过走廊,经清洗间传递窗进入隔离器室;在隔离器室,逐一将小 IVC 笼盒传入隔离器内,在隔离器内打开笼盒,盖上沉降皿盖,取出沉降皿。大 IVC 笼盒和普通运输盒的转移:将大 IVC 笼盒和普通运输盒从 204 车间经车间外周道路运送到 205 车间(中途绕行往返 3 次,相当于到达病毒性疫苗一室的时间),在超净工作台上打开笼盖,取出沉降皿。将培养皿送微生物实验室培养,于(20~25)℃下倒置孵放 3 d,计数菌落;再于(30~35)℃下倒置孵放 2 d,计数菌落。培养皿沉降菌应小于 50 cfu/4h 的标准规定^[3]。

2 结果

2.1 采样时间

平皿从放入笼盒打开盖子,到从笼盒中取出,每次时间均在 1 h 以上,按 1 h 计算;

2.2 小 IVC 笼盒检测结果

连续 3 次对小 IVC 笼盒进行检测,结果见表 1。第 1 次试验,各个笼盒都有不同程度长菌,1~6 个/皿不等;第 2、3 次试验效果较好,除一个平皿见 10 个菌落外,其余都为 0~2 个/皿;且每次检测平均结果都小于 50 cfu/4 h。

2.3 大 IVC 笼盒检测结果

连续 3 次对大 IVC 笼盒进行检测,结果见表 2。试验中各个笼盒都有不同程度长菌,0~6 个/皿不等;且每次检测平均结果都小于 50 cfu/4 h。

2.4 普通运输盒检测结果

第 1 次为甲普通运输盒,培养结果可见较多霉菌,多数在 10 个/皿以上,虽然细菌菌落数不多,都在 5 个/皿以下,但各种菌落总数平均结果都远远大于 50 cfu/4 h。第 2 次改为乙普通运输盒,检测结果与第 1 次一致,说明普通运输盒隔离保护效果不理想,故不再做第 3 次试验。详见表 3。

2.5 空白对照

每次试验都附带 3 个平皿作空白对照,培养结果均未见任何菌落,表明 TSA 培养基本身是没有被污染的。详见表 4。

2.6 菌落形态

IVC 笼盒试验结果均为细菌菌落,其中 90% 细菌的菌落为乳白色,突起,湿润,光滑,圆形,不透明,直径 1.5~3.0 mm;10% 细菌为浅黄色,突起,湿润,光滑,圆形,不透明,直径 0.5~1.5 mm。

普通运输盒试验结果多见霉菌,其中 80% 霉菌

为灰蓝色,较小霉菌点,表面呈粉末状;20%霉菌为大量绒毛状菌丝,黄色粉末,充满整个平皿。

表 1 小 IVC 笼盒 3 次检测结果

Tab. 1 Microbial test results of settling plates in small IVC cages

运输盒编号 Cage no.	采样点编号 Sample no.	第一次菌落计数 First time (cfu/h)	第二次菌落计数 Second time (cfu/h)	第三次菌落计数 Third time (cfu/h)
1	小-1	2*	1	0
2	小-2	4	0	0
3	小-3	3	0	0
4	小-4	2	0	1
5	小-5	2	1	1
6	小-6	2	10	1
7	小-7	3	0	0
8	小-8	1	0	0
9	小-9	1	0	1
10	小-10	1	0	1
11	小-11	1	1	1
12	小-12	1	0	0
13	小-13	6	2	0
14	小-14	1	0	0
15	小-15	1	1	1
平均 Average (cfu/h)		2.1	1.1	0.4
折合 Converted into (cfu/4h)		8.4	4.4	1.6

注:* 为两个培养温度下细菌总数。表 2、表 4 同。

Note: * Total bacterial colony number at different temperatures. The same in Tab. 2 and Tab. 4

表 2 大 IVC 笼盒 3 次检测结果

Tab. 2 Microbial test results of settling plates in large IVC cages

运输盒编号 Cage no.	采样点编号 Sample no.	第 1 次菌落计数 First time (cfu/h)	第 2 次菌落计数 Second time (cfu/h)	第 3 次菌落计数 Third time (cfu/h)
1	大-1	2	0	0
	大-2	3	5	0
2	大-3	5	2	1
	大-4	6	2	0
3	大-5	3	2	1
	大-6	2	5	1
平均 Average (cfu/h)		3.5	2.7	0.5
折合 Converted into (cfu/4h)		14	10.8	2.0

3 讨论

在国内,动物运输盒材料主要有纸质和塑料两种,运输盒上附带的滤膜也多是单层多孔无纺布;

表 3 普通运输盒 2 次检测结果

Tab. 3 Microbial test results of settling plates in conventional transport cages

运输盒编号 Cage no.	采样点编号 Sample no.	第 1 次菌落计数 First time (cfu/h)			第 2 次菌落计数 Second time (cfu/h)		
		20 ~ 25°C	30 ~ 35°C*	合计 Total	20 ~ 25°C	30 ~ 35°C*	合计 Total
1	普-1	18F+1**	4	23	25F+5	1	31
	普-2	19F+7	2	28	16F+3	3	22
2	普-3	15F+3	4	22	18F+2	0	20
	普-4	11F+1	2	14	17F+5	2	22
3	普-5	9F+0	1	10	28F+5	0	33
	普-6	8F+2	0	10	32F+2	2	36
平均 Average (cfu/h)		17.8			27.3		
折合 Converted into (cfu/4h)		71.2			109.2		

注:* 30 ~ 35°C 下新增细菌数;**18F+1 表示 18 个霉菌和 1 个细菌。

Note: * New colony at 30 ~ 35°C; ** 18F + 1 means 18 fungi + 1 bacteria.

表 4 空白对照 3 次检测结果

Tab. 4 Microbial test results of settling plates in blank controls

培养皿编号 Plate no.	第 1 次菌落计数 First time (cfu/h)	第 2 次菌落计数 Second time (cfu/h)	第 3 次菌落计数 Third time (cfu/h)
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0

膜面积越小,盒内污染的机会越小。本试验仅选择了塑料运输盒,供大家参考。

甲普通运输盒带不锈钢盖,盖子上方矩形面积内密布条形孔,夹一层滤膜;乙普通运输盒带塑料盖,盖子上方和盒子两侧打孔,密布直径 2 ~ 3 mm 圆孔,覆盖一层滤膜。较大面积的滤膜让其通透性倍增,微生物侵入的几率也同时增加,以至沉降菌检测结果大大超标,而且有许多霉菌,不能达到洁净度 C 级标准的微生物要求。

大小 IVC 笼盒盖上盖子后,只有生命窗通过滤膜与外界相通,密闭性很好,只有在开盖装动物时盒子内部才全部暴露在饲养间环境中,所以沉降菌检测结果较少,而且大都是细菌,菌落形态与饲养间环境内的沉降菌基本一致,符合 C 级标准的微生物要求;所以,与普通运输盒相比较,IVC 笼盒作为运输盒更理想。

试验中小 IVC 笼盒又被装入大不锈钢箱中,所以沉降菌检测结果比大 IVC 笼盒还少;因此可以证

明 SPF 金黄地鼠在从 204 车间转运到隔离器车间时未受到污染。

试验检测结果中第 1 次普遍高于第 2,3 次,这可能与开盖放平皿的熟练程度有关,第 1 次放入操作较慢,饲养间空气落下菌要多些,后来动作快了,落下菌就少了。

另外,试验中分离的细菌霉菌未进一步鉴定。是否有 SPF 动物要求排除的细菌;是否与饲养间环境菌、与外界空气中微生物的种类相一致,需要进一步鉴定、比较和分析。

[修回日期]2011-09-14



欢迎加入中国实验动物学会

中国实验动物学会是我国广大实验动物科技工作者的学术组织,经民政部批准于 1987 年成立。经过二十几年的努力,中国实验动物学会从创建至今已取得较大发展,很好地发挥了作为全国性学术团体的作用,为团结广大实验动物科技工作者,推动我国实验动物科学事业的发展做出了巨大贡献。中国实验动物学会围绕《中国实验动物学会章程》中的规定开展业务活动,其范围包括:开展国内外学术交流、编辑出版学术期刊、开展技能培训和岗位培训、科学普及与科技服务等。

会员是中国实验动物学会存在之本,从事实验动物学或相关专业的科技、教育、生产、出版或管理工作的单位或个人,均是我们的主要服务对象。各类会员都赋予基本权利和义务。学会能更好的发展,离不开会员队伍的不断扩大,中国实验动物学会将以服务促发展的工作理念,不断提高服务水平和服务质量,努力将学会建设成为中国实验动物科技工作者之家,欢迎您加入中国实验动物学会! 登陆 <http://www.calas.org.cn> 首页,点击“申请加入学会”。

作为中国实验动物学会的基本职能之一,中国实验动物学会长年举办各类技能培训班,如:“北京市实验动物从业人员岗位培训班”,为贯彻执行国家有关政策法规,规范动物实验的技术操作,普及实验动物的基本理论知识发挥重要作用。为保障培训班能顺利有序进行,现全部实现网上预约报名,有关培训班通知请随时浏览中国实验动物学会网站:<http://www.calas.org.cn>。

中国实验动物学会秘书处洪婧供稿