

王静,袁文,闵凡贵,等. 实验动物病原 PCR 检测方法系列团体标准的编制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 60-66.
Wang J, Yuan W, Min FG, et al. Establishment of a series of social organization standards on a PCR method for pathogen detection in laboratory animals [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 60-66.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.03.010

实验动物病原 PCR 检测方法系列团体标准的编制

王 静,袁 文,闵凡贵,吴瑞可,潘金春,罗银珠,李 舸,郭鹏举,张 钰*,黄 韧

(广东省实验动物监测所,广东省实验动物重点实验室,广州 510663)

【摘要】 实验动物质量检测是实验动物质量管理的重要手段,标准的制定和更新是促进我国实验动物质量提升的主要方法。近年来,实验动物新的疾病病原不断出现,新的检测技术不断更新,仅靠国家标准的制定和更新已不能满足我国实验动物的质量管理的需求。利用团体标准搞创新的优势,结合实际需求,制定了一批实验动物病原 PCR 检测方法团体标准。这些团体标准是国家标准的有力补充,对促进我国实验动物质量提升具有重要作用。

【关键词】 实验动物;团体标准;病原检测;聚合酶链式反应

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 03-0060-07

Establishment of a series of social organization standards on a PCR method for pathogen detection in laboratory animals

WANG Jing, YUAN Wen, MIN Fangui, WU Ruike, PAN Jinchun, LUO Yinzhu,
LI Ge, GUO Pengju, ZHANG Yu*, HUANG Ren

(Guangdong Laboratory Animal Monitoring Institute, Guangdong Key Laboratory of
Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

【Abstract】 Determination of the quality of laboratory animals is essential for managing them, and the formulation and revision of standards are the main approaches for promoting the quality of laboratory animals in our country. In recent years, new pathogens of laboratory animals have emerged and novel detection techniques are constantly being updated. The establishment and renewal of national standards do not meet the quality management requirements of laboratory animals in our country. In this project, taking advantage of social organization standards for innovation, a number of laboratory animal social organization standards on PCR for pathogen detection were developed, combined with the practical needs of laboratory animals. These standards are useful supplements to national standards and should play an important role in improving the quality of laboratory animals in our country.

【Keywords】 laboratory animal; social organization standard; pathogen detection; PCR

实验动物是生命科学研究创新和生物医药产业发展不可或缺的支撑保障条件,被誉为“活的试剂和度量衡”,其质量直接关系到研究和评价数据

的准确性。实验动物质量检测方法是实验动物质量管理的重要手段,标准的制定和更新是促进我国实验动物质量提升的主要方法。近年来,实验动物

【基金项目】 国家科技支撑计划(2015BAI07B00);广东省科技计划项目(2016A030303016, 2016A030303023, 2016A030303024, 2017A070702001, 2017B030314171)。

【作者简介】 王静(1977—),女,副研究员,硕士,研究方向:实验动物检测技术及标准化。E-mail: Carolwang0117@hotmail.com

【通信作者】 张钰(1970—),女,硕士,研究员,研究方向:实验动物质量控制及标准化。E-mail: Zhangyuzh@hotmail.com

新的疾病病原不断出现,新的检测技术不断更新,仅靠国家标准的制定和更新已不能满足我国实验动物的质量管理的需求。本项目围绕实验动物病原检测技术,利用团体标准搞创新的优势,结合实际需求,制定了一批实验动物团体标准。这些团体标准是国家标准的有力补充,对促进行业内实验动物质量提升具有重要作用。

1 编制背景

我国实验动物的管理是行政许可管理方式。国家颁布了一系列实验动物管理法规和实验动物质量国家标准,各级实验动物管理机构按照标准要求进行实验动物质量监管,从而保障了我国实验动物的标准化应用。质量检测是实验动物质量监管的主要手段,标准的研究制定和发布实施是实验动物质量监管的技术措施。因此,需要对标准不断完善和提升,保持标准的适用性、科学性、先进性。2018 年 1 月 1 日新修订的《中华人民共和国标准化法》开始施行,在原有的国家标准、行业标准、地方标准、企业标准外,增加了团体标准,赋予团体标准法律地位。我国标准化体系,要最终形成“强制性标准守底线、推荐性标准保基本、行业标准补遗漏、企业标准强质量、团体标准搞创新”的格局。近年来,实验动物新的疾病病原不断出现,新的检测技术不断更新,利用团体标准搞创新的优势,开展实验动物质量检测方法研究,在行业内推广实施团体标准,是解决目前实验动物管理中国家标准更新滞后的较好方法^[1-2]。

当前,在实验动物检测方法国家标准中,以针对抗体检测的血清学检测方法为主。但是抗体检测有一定局限性,不能应用于非血清样本的检测,如对免疫缺陷动物、动物接种物、生物制品、病死动物或环境样本的检测。以 PCR 技术为基础的病原学检测方法,针对特定病原体核酸序列中的保守片段设计特异性引物,检测某一种特定的病毒、细菌或寄生虫,具有特异性强、敏感度高、诊断快速等优点,可应用于实验动物疾病感染的早期诊断,无血清样本的检测,较好地弥补了传统抗体检测方法的不足,还可应用于新发传染病病原检测,难培养的病原的检测等,是实验动物病原监测的有力手段。美国和欧盟许多实验动物质量检测实验室都将 PCR 技术应用于实验动物病原监测,与抗体检测方法并行对设施微生物污染进行控制^[3]。在国内增

加实验动物病原 PCR 检测方法标准,制定成一系列团体标准,对加强实验动物质量和动物实验环境设施污染的质量控制具有重要意义。对提升和完善我国实验动物质量标准体系具有重要作用^[3]。

2 标准范围

本系列团体标准包括螺杆菌、小鼠细小病毒 MPV 株、MVM 株、汉坦病毒、肺支原体、大鼠泰勒病毒、大鼠细小病毒 RMV 株和 RPV 株等 17 种病原 PCR 检测方法(表 1)。检测项目对照国家标准已设立的病原项目有 12 个(表 1 中 1~12),其中病毒 11 个,细菌 1 个。并增设了 5 个目前国标中没有要求的病原项目(表 1 中 13~17)。

3 内容编制

各项团体标准基本结构主要有以下内容组成:范围;规范性引用文件;术语、定义及缩略语;检测方法原理;主要设备和材料;试剂;检测方法、结果判定、检测过程中防污染措施、附录等。

3.1 范围

规定了表 1 中所列各项病原 PCR 检测方法。适用于实验动物非血清样本病原核酸检测。

3.2 术语、定义及缩略语

介绍了标准中所涉及的几种 PCR 检测方法的定义,包括聚合酶链式反应(PCR)、逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)、巢式 PCR、实时荧光 PCR、实时荧光 RT-PCR 的定义。

3.3 检测方法原理

用合适的方法提取样本中的总 RNA 或/和 DNA,分别针对病毒或细菌保守基因设计特异的引物探针序列,通过 PCR 对模板进行扩增,根据 PCR 检测结果判定该样品中是否含有某种病原特异核酸。

实时荧光 PCR 方法是在常规 PCR 的基础上,加入了一条特异性的荧光探针,探针两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭荧光基团。探针完整时,报告基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收;PCR 扩增时,Taq 酶的 5'→3'外切酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭荧光基团分离,淬灭作用消失,荧光信号产生并被检测仪器接收,随着 PCR 反应的循环进行,PCR 产物与荧光信号的增长呈对应关系。因此,可以通过检测荧光信号对核酸模板进行检测。

表 1 已发布实施的实验动物 PCR 检测方法团体标准
Table 1 Catalog of issued social organization standards on PCR method

序号 No.	标准号 Number of standards	标准名称 Name of standards	国标项目 Included in GB or not
1	T/CALAS39-2017	实验动物 汉坦病毒 PCR 检测方法 PCR method for detection of hantavirus	是 Yes
2	T/CALAS40-2017	实验动物 肺支原体 PCR 检测方法 PCR method for detection of Mycoplasma pulmonis	是 Yes
3	T/CALAS44-2017	实验动物 鼠痘病毒 PCR 检测方法 PCR method for detection of ectromelia virus	是 Yes
4	T/CALAS45-2017	实验动物 小鼠腺病毒 PCR 检测方法 PCR method for detection of murine adenovirus	是 Yes
5	T/CALAS46-2017	实验动物 多瘤病毒 PCR 检测方法 PCR method for detection of polyoma virus	是 Yes
6	T/CALAS47-2017	实验动物 猴免疫缺陷病毒 PCR 检测方法 PCR method for detection of simian immunodeficiency virus	是 Yes
7	T/CALAS48-2017	实验动物 猴 D 型逆转录病毒 PCR 检测方法 PCR method for detection of simian type D retrovirus	是 Yes
8	T/CALAS49-2017	实验动物 仙台病毒 PCR 检测方法 PCR method for detection of Sendai virus	是 Yes
9	T/CALAS50-2017	实验动物 呼肠孤病毒 III 型 PCR 检测方法 PCR method for detection of reovirus types 3	是 Yes
10	T/CALAS25-2017	实验动物 小鼠肝炎病毒 PCR 检测方法 PCR method for detection of murine hepatitis virus	是 Yes
11	T/CALAS26-2017	实验动物 小鼠脑脊髓炎病毒 PCR 检测方法 PCR method for detection of Theiler's murine encephalomyelitis virus	是 Yes
12	T/CALAS28-2017	实验动物 小鼠细小病毒 MVM 株 PCR 检测方法 PCR method for detection of minute virus of mice	是 Yes
13	T/CALAS 22-2017	实验动物 小鼠诺如病毒检测方法 Detection methods for murine norovirus	否 No
14	T/CALAS41-2017	实验动物 大鼠泰勒病毒检测方法 Detection methods for rat theilovirus	否 No
15	T/CALAS24-2017	实验动物 螺杆菌 PCR 检测方法 PCR method for detection of Helicobacter sp.	否 No
16	T/CALAS27-2017	实验动物 小鼠细小病毒 MPV 株 PCR 检测方法 PCR method for detection of murine parvovirus	否 No
17	T/CALAS42-2017	实验动物 大鼠细小病毒 RMV 株和 RPV 株检测方法 Detection methods for rat minute virus (RMV) and rat parvovirus (RPV)	否 No

3.4 设备和仪器

PCR 仪、荧光 PCR 仪、生物安全柜等常规分子生物学实验室仪器设备。

3.5 试剂

RNA/DNA 抽提试剂、PrimeScript™ One Step RT-PCR Kit; One Step Primerscript™ RT-PCR Kit (Perfect Realtime)或其他等效产品。引物和探针及其他辅助试剂

引物和探针:针对实验动物常见病原微生物核酸保守序列设计特异引物,进行 PCR 或反转录 PCR 扩增;根据表 2 和表 3 的序列合成引物和探针,引物和探针加无灭菌去离子水配制成 10 μmol/L 储备液,-20℃保存。

3.6 检测方法

3.6.1 样本采集和处理

标准中方法适用于动物组织样本、盲肠内容物或粪便、细胞培养样本、实验动物环境样本、饲料、垫料及饮水中病原核酸检测。根据不同样本处理要求,无菌采集样本进行核酸提取,采样过程中防止核酸降解及样本交叉污染。

3.6.2 RT-PCR 检测

当目标病原核酸为 RNA 时,按 RNA 提取步骤进行核酸提取,再将提取的核酸反转录为 cDNA 后进行 PCR 反应。或者采用一步法 RT-PCR 试剂进行检测。反应液的配制在冰上操作,每次反应同时设计阳性对照、阴性对照和空白对照。按标准中推荐反应体系和参数进行 PCR 反应,或用其他等效的 PCR 检测试剂盒进行检测,反应体系和反应参数可做相应调整。反应结束,将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测和拍照。

表 2 普通 PCR 检测引物
Table 2 Primer sequences for conventional PCR method

检测项目 Tested items	引物名称 Primer names	引物序列(5'→3') Sequences of primers	产物大小 (bp) Product size	退火温度(°C) Annealing temperature	参考文献 References
螺杆菌属 <i>Helicobacter genus</i>	H-F	CTATGACGGGTATCCGGC	780	55	[4]
	H-R	CTCACGACACGAGCTGAC			
肝螺杆菌 <i>H. hepaticus</i>	Hh-F	ATGGGTAAGAAAATAGCAAAAAGATTGCAA	705	55	[4]
	Hh-R	CTATTTTCATATCCATAAGCTCTTGAGAATC			
胆汁螺杆菌 <i>H. bilis</i>	Hb-F	ATGGAACAGATAAAGATTTTAAAGCAACTTCAG	435	55	[4]
	Hb-R	CTATGCAAGTTGTGCGTTAAGCAT			
啮齿类螺杆菌 <i>H. rodentium</i>	Hr-F	TTGTGAAATGGAGCAAATCTTAAAAACT	191	55	[4]
	Hr-R	TAGCCAGTTTGGCATTCC			
小家鼠螺杆菌 <i>H. muridarum</i>	Hm-F	ATGACAAAAAATATTCCTTTCACAAAATATTCAATTGGT	807	55	[4]
	Hm-R	TTTTATTTAGATTCCATTTAACTGCTAAATCATCAATAGT			
盲肠螺杆菌 <i>H. typhlonius</i>	Ht-F	AGGGACTCTTAAATATGCTCCTAGACT	122	55	[4]
	Ht-R	ATTCATCGTGTTTGAATGCGTCAA			
大鼠细小病毒 RMV 株 Rat minute virus	RMV-F	ACTGAGAACTGGAGACGAATTC	843	55	[5]
	RMV-R	GGTCTCAGTTTGGCTTTAAGTG			
大鼠细小病毒 RPV 株 Rat parvovirus	RPV-F	CGCACATGTAGAATTTTTGCTG	487	55	[5]
	RPV-R	CAAAGTCACCAGGCAATGTGTT			
大鼠泰勒病毒 Rat theilovirus	RTV-F	GACCTCTTTCACGCGACG	363	55	[6]
	RTV-R	CGATGTCTGTTCTAAGTTCC			

3.6.3 普通 PCR 反应

当目标病原核酸为 DNA 时,按 DNA 提取步骤进行核酸提取,提取到的 DNA 作模板进行 PCR 检测。按标准中推荐反应体系和参数进行 PCR 反应,或用其他等效的 PCR 检测试剂盒进行检测,反应体系和反应参数可做相应调整。反应结束,将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测和拍照

3.6.4 巢式 PCR 或巢式 RT-PCR

当待检样本中可能含有的目标模板 DNA/RNA 含量极低时,使用巢式 PCR 或巢式 RT-PCR 提高检测敏感性。使用巢式 PCR 引物进行 2 轮 PCR,第二轮 PCR 反应时以第一轮 PCR 产物为模板进行,反应完成后取 10 μL 扩增产物,1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察结果。

3.6.5 实时荧光 PCR

采用实时荧光 PCR 检测方法,可实现闭管操作,敏感性及特异性均优于普通 PCR,是病原检测的首选检测方法。根据检测目标核酸,选择进行 RT-实时荧光 PCR 或者实时荧光 PCR 检测。反应液的配制在冰上操作,每次反应同时设计阳性对照、阴性对照和空白对照。按标准中推荐反应体系和参数进行实时荧光 PCR 反应,或用其他等效的实时荧光 PCR 检测试剂盒进行检测,反应体系和反应参数可做相应调整。反应结束,根据收集的荧光曲线和 Ct 值判定结果。

3.7 结果判定

3.7.1 普通 PCR/普通 RT-PCR

在阴性、阳性对照成立条件下,即阳性对照的扩增产物经电泳检测可见到目的扩增条带(目的片段条带大小参见表 1),阴性对照的扩增产物无任何条带,可进行结果判定。样本孔观察到特定大小的目的扩增条带,判为该病原核酸阳性,否则为阴性。

3.7.2 实时荧光 PCR/实时荧光 RT-PCR

反应结束,对扩增曲线基线和阈值根据仪器的噪声情况进行调整,以阈值线刚好超过正常阴性样本扩增曲线的最高点为准。质控标准为空白对照无 Ct 值,无荧光扩增曲线,阴性对照无 Ct 值,并且无荧光扩增曲线。阳性对照 Ct 值应 ≤35,并且有明显的荧光扩增曲线,则表明反应体系运行正常,否则此次试验无效,需重新进行实时荧光 PCR 扩增。质控成立条件下进行结果判定。

若待检测样本无荧光扩增曲线,则判定该病毒核酸阴性;待检测样本有荧光扩增曲线,且 Ct 值应 ≤35 时,则判断该病毒核酸阳性;若待检测样本 Ct 值介于 35 和 40 之间时,应重新进行实时荧光 PCR 检测。重新检测后,若 Ct 值 ≥40 时,则判定该病毒核酸阴性。重新检测后的 Ct 值仍介于 35 和 40 之间,则判定该病毒核酸可疑阳性,需进一步进行序列测定。

表 3 实时荧光 PCR 扩增引物和探针
Table 3 Primer and probe sequences for qPCR method

病毒 Viruses	引物和探针名称 Primer and probe names	引物和探针序列(5'→3') Sequences of primers and probes	参考文献 References
汉滩型 HTN	HTN-F	CAATCAYATTTTACTATTATTATCAGG	
汉坦病毒	HTN-R	TTAACTGACCCACCKYTGARTAAT	
Hantaan virus	HTN-Probe	FAM- TTCCCACCCATAAATG -MGB	
汉滩型 SEO	SEO-F	GGTGATGAYATGGAYCCAGA	
汉坦病毒	SEO-R	TTCATAGGTTCTGCTHAGAGA	
Seoul virus	SEO-Probe	VIC-CTTCGTAGCCTGGCTCA -MGB	
鼠痘病毒	Ect-F	ATCCGGATACTACTGCGAATTTG	
Ectromelia virus	Ect-R	CCGTAACCAGAACCACACTTTG	[7]
	Ect-Probe	Fam -CAAACGGTTGCAGGCTATGTGTACCACAA-BHQ-1	
小鼠肝炎病毒	MHV-F	GGAACTTCTCGTTGGCATTATACT	
Murine hepatitis virus	MHV-R	ACCACAAGATTATCATTTTCACAACATA	[8]
	MHV-Probe	FAM -ACATGCTACGGCTCGTGAACCGAACTGT-BHQ-1	
仙台病毒	SV-F	GGCGGCATCTGTAGAAATC	
Sendai virus	SV-R	CGGAAATCACGAGGGATGG-	[7]
	SV-Probe	FAM-AGGCCTCGATGCGGTCTTCCAAC- BHQ-1	
小鼠细小病毒 MVM 株	MVM-F	GCCATACACACCTGCAGCAA	
Minute virus of mice	MVM-R	TGGYGATGCTATGTTGGT	[9]
	MVM-Probe	FAM-TCAATGAAAACACTTGGTTTCTACCCTTGA-BHQ-1	
小鼠细小病毒 MPV 株	MPV-F	TGGTTGCTCTKGAYTCTAAACAACATA	
Murine parvovirus	MPV-R	TTAAAGTAGTACCTGTAAGGACTTGG	
	MPV-Probe	FAM-CCTTACACACCAGCAACAGACAACCAAGA-BHQ-1	
小鼠脑脊髓炎病毒	TMEV-F	CTTGTGAAGTGTTCCTCC	
Theiler's murine	TMEV-R	GGGAGGCATGATGCTAGTTT	[10]
encephalomyelitis virus	TMEV-Probe	FAM-TCCGCGACTGCTGGAGATCTAA-BHQ-1	
小鼠腺病毒	Mad-F	ACTCTGAGCGGTGTCCGC	
Murine adenovirus	Mad-R	GATGTGCATGAAGGCCACT	[7]
	Mad-Probe	FAM - TGACGACGCCTCAATGCAGCC-BHQ1	
多瘤病毒	Poly-F	CGGCGTCTCTAAATGCGAG	
Polyoma virus	Poly-R	AGCAGTTTGGGAACGGGTG	[7,11]
	Poly-Probe	FAM-CAAAATGTACAAGGCCTGTCCAAGACCC -BHQ1	
小鼠诺如病毒	MNV-F	TCTGTYCTGCGCTGGGTGC	
Murine norovirus	MNV-R	GCTGCGCCATCACTCATCC	[12]
	MNV-Probe	FAM- ATGCTGAGACCCCGAGGAACG -BHQ-1	
大鼠泰勒病毒	RTV-F	CCAAGCGTGTCTCTATTTCG	
Rat theilovirus	RTV-R	TCCATAGTAAGAAGATCCGCTGG	[6]
	RTV-ProAGCCAThe	FAM-CAGCCATTGACAAAAGTTCCGACGGAAT-BHQ1	
肺炎原体	Mpul-F	GGAAATGCCCTAAGTATGACGG	
Mycoplasma	Mpul-R	CGGATAACGCTTGCACCCCTA	
pulmonis	Mpul-Probe	FAM-CCTTGTGAGAAAGCACCAGGCTAACTATGTG -BHQ-1	
呼肠孤病毒 III 型	Reo3-F	TGTGAGGTGGACGCGAATAG	
Reovirus types 3	Reo3-R	CCTTGATGCAGCGTGAAGAG	[7]
	Reo3-Probe	FAM-CGGCCGGCTGTGATCAGAGTATG-BHQ-1	
猴 D 型逆转录病毒	SRV-F	CTGWCAGCCAATGACGGG	
Simian type D retrovirus	SRV-R	CGCCTGTCTTAGGTTGGAGTG	[13]
	SRV-Probe	FAM-TCACTAACCTAAGACAGGAGGCTGTC-A-BHQ1 FAM-TCCTAACCTAAGACAGGAGGCTGTC-A-BHQ1	
猴免疫缺陷病毒	SIV-F	GGAAACAGGAACAGCAGAACTAT	
Simian immunodeficiency virus	SIV-R	ACCACCTATTTGTTGTACTGGGTA	[14]
	SIV-Probe	FAM-CCTCTCTGCCGCTAGATGCTGT-BHQ1	

注:未注明出处的为自行设计。

Note. Those without reference are self-designed.

3.7.3 序列测定

必要时,可取待检样本扩增出的阳性 PCR 产物进行核酸序列测定,序列结果与已公开发表的特异性片段序列进行比对,序列同源性在 90% 以上,可确诊待检样本某种病原核酸阳性,否则判定某种病原核酸阴性。

4 编制说明

4.1 本系列团体标准的适用性说明

PCR 检测方法属于病原学检测方法,针对样本中的病原核酸进行检测,适用于非血清样本的病原检测,如免疫缺陷动物的健康监测、病死动物疾病诊断、实验动物接种物、实验动物环境样本检测等,是传统血清学检测方法的补充和完善。需要指出的是,当采用血清学和病原学检测方法对同一只动物进行检测时,可能出现不一致的结果,这是由于病原感染动物后抗原和抗体不同消长规律、检测对象不同造成。

4.2 本系列团体标准验证情况说明

17 个团体标准已通过人工感染参考毒株的组织样品进行了方法可行性确认。完成了 17 项团体标准检测方法的 3 家单位验证。此外,利用 9 个参考毒株制备的样本,组织了全国范围内的实验室内比对,通过全国 7 个检测单位建立的核酸检测体系进行检测方法效果评价,除了一个单位的 1 个病原检测结果不一致,其它单位的检测结果完全一致。其中,部分检测单位使用的 PCR 检测方法与团体标准规定的方法一致。

4.3 本系列标准在临床应用的情况说明

本系列标准发布实施以来,已逐步被实验动物业内认识和接受,并被部分单位采纳作为实验动物病原的检测技术手段。如螺杆菌由于培养条件要求较高,较难通过培养进行鉴定,通过 PCR 方法采集动物盲肠内容物,就可以准确检测出阳性样本,耗时短,简单、易行,已成为临床螺杆菌检测的首选方法。国外研究报导,螺杆菌的感染率高达 16.08%,病毒性病原中小鼠诺如病毒(MNV)、小鼠细小病毒 MPV 株(MPV)、小鼠肝炎病毒(MHV)、小鼠细小病毒 MVM 株(MVM)、小鼠脑脊髓炎病毒(TMEV)的感染率较高,依次为 32.37%、1.86%、1.59%、0.33%、0.26%^[15],我国实验动物质量检测数据统计显示,MNV、TMEV、MHV、MVM、螺杆菌具有较高的感染率,依次为 16.2%~42.2%^[16-18],

5.29%~15.1%^[18-19]、8.5%~19.9%^[18-19]、12.0%^[18]和 45.3%^[19]。这些病原一旦污染实施,往往难以清除。本标准实施以来,本单位应用团体标准中 MHV PCR 检测方法对广东某生产单位转基因动物环境样本进行检测,实现了该设施中 MHV 病原的逐步净化。通过灵敏的病原 PCR 检测方法,对环境设施污染的监控是维护实验动物设施生物安全的有利措施之一。

5 标准实施意义和展望

《实验动物 小鼠螺杆菌 PCR 检测方法》等系列团体标准的发布,为我国实验动物新发疾病的监控提供了标准技术方法,对提升实验动物质量具有重要意义,也对我们从国外引进动物的新发病原监控提供了技术手段。制定的实验动物高发病原新检测方法团体标准,从病原角度控制动物质量,再结合我国实验动物质量检测国标中的抗体检测方法,对彻底清除实验动物高发病原提供了规范的检测技术手段,完善了我国实验动物质量检测标准。实验动物质量检测技术方法团体标准的制定,将有效解决国家标准制定和更新滞后而严重影响实验动物质量问题,团体标准的创新模式,完善行业自律,对加速我国实验动物质量国家标准的制定和更新也具有重要作用。

对于实验动物行业来说,团体标准的编制与实施,突破了标准地域限制,应大力加强行业中推广应用,使其经得起实践和验证,为转化国家标准打好基础。

参考文献:

- [1] 贺争鸣,李根平,赵德明,等.把握改革机遇,建立严谨的实验动物技术标准体系[J].实验动物与比较医学,2016,36(1):57-60.
- [2] 贺争鸣,李根平,陈梅丽,等.实验动物地方标准的查新和确认机制的建立及地方标准的应用[J].实验动物科学,2017,34(2):4-50.
- [3] Mahler M, Berard M, Feinstein R, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units[J]. Lab Anim, 2014, 48(3):178-192.
- [4] Feng S, Ku K, Hodzic E, et al. Differential detection of five mouse-infecting helicobacter species by multiplex PCR[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2005, (12):531-536.
- [5] Wan CH, Bauer BA, Pintel DJ, et al. Detection of rat parvovirus type 1 and rat minute virus type 1 by polymerase chain reaction [J]. Lab Anim, 2006, 40(1):63-9.

- [6] Yuan W, Wang J, Xu FJ, et al. Development of a duplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of Theiler's murine Encephalomyelitis virus and rat theilovirus[J]. *Virology Methods*, 2016, 236, 139-146.
- [7] Bootz F, Sieber I, Popovic D, et al. Comparison of the sensitivity of *in vivo* antibody production tests with *in vitro* PCR-based methods to detect infectious contamination of biological materials [J]. *Lab Anim*, 2003 37; 341-351.
- [8] Besselsen DG, Wagner AM, Loganbill JK. Detection of rodent coronaviruses by use of fluorogenic reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis [J]. *Comp Med*, 2002, 52 (2):111-116.
- [9] Redig AJ, Besselsen DG. Detection of rodent parvoviruses by use of fluorogenic nucleic acid polymerase chain reaction assays [J]. *Comp Med*, 2001, 51(4):326-31.
- [10] 袁文,张钰,王静,等.小鼠脑脊髓炎病毒非编码蛋白(UTR)片段实时荧光定量 PCR 标准品的构建[J]. *实验动物与比较医学*, 2012,32(1):1-6.
- [11] 袁文,王静,黄韧,等.结合内标的小鼠诺如病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国实验动物学报*, 2015,23(1):49-56.
- [12] 尹雪琴,袁文,王静,等.实时荧光定量 TaqMan PCR 检测小鼠多瘤病毒方法的建立[J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25 (6):53-58.
- [13] White JA, Todd PA, Rosenthal AN, et al. Development of a generic real-time PCR assay for simultaneous detection of proviral DNA of simian Betaretrovirus serotypes 1, 2, 3, 4 and 5 and secondary uniplex assays for specific serotype identification[J]. *J Virology Methods*, 2009, 162(1-2):148-154.
- [14] 王静,张钰,闪凡贵,等.猴免疫缺陷病毒(SIV)实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23 (9):68-72.
- [15] Pritchett-Corning KR, Cosentino J, Clifford CB. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats [J]. *Lab Anim*. 2009;43(2):165-73.
- [16] 袁文,张钰,刘忠华,等.广东省实验小鼠自然感染鼠诺如病毒的调查[J]. *中国比较医学杂志*, 2009,20(2):78-82.
- [17] 袁文,张钰,黄碧洪,等.小鼠脑脊髓炎病毒自然感染调查以及人工感染小鼠试验[J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27 (4):75-81.
- [18] 王翠娥,陈立超,周倩,等.实验大鼠和小鼠多种病毒的血清学检测结果分析[J]. *实验动物科学*, 2014,31(2):20-24.
- [19] 潘金春,赵维波,陈梅玲,等.2013 年~2015 年广东地区实验小鼠和大鼠微生物学及寄生虫学调查[J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27 (2):64-69.

[收稿日期]2018-09-19

(上接第 13 页)

- [10] Kuenzig ME, Barnabe C, Seow CH, et al. Asthma is associated with subsequent development of inflammatory bowel disease: A population-based case-control study [J]. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2017, 15(9):1405-1412.e1403.
- [11] Raj AA, Birring SS, Green R, et al. Prevalence of inflammatory bowel disease in patients with airways disease [J]. *Respir Med* 2008, 102(5):780-785.
- [12] 杨胜兰,李道本,吴嫣然.“肺与大肠相表里”的理论基础与临床应用[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2012, 20(10):475-477.
- [13] 朱叶珊,陈建权,刘建平.运用“土郁夺之”理论指导治疗湿热内蕴型溃疡性结肠炎的系统评价[J]. *中国医药导报*, 2017, 14(10):109-112.
- [14] Adar T, Shteingart S, Ben-Ya'acov A, et al. The importance of intestinal eotaxin-1 in inflammatory bowel disease: new insights and possible therapeutic implications [J]. *Dig Dis Sci* 2016, 61 (7):1915-1924.
- [15] Ahrens R, Waddell A, Seidu L, et al. Intestinal macrophage/epithelial cell-derived CCL11/eotaxin-1 mediates eosinophil recruitment and function in pediatric ulcerative colitis [J]. *J Immunol* 2008, 181(10):7390-7399.
- [16] Coburn LA, Gong X, Singh K, et al. L-arginine supplementation improves responses to injury and inflammation in dextran sulfate sodium colitis [J]. *PLoS One* 2012, 7(3):e33546.
- [17] Kivela AJ, Kivela J, Saarnio J, et al. Carbonic anhydrases in normal gastrointestinal tract and gastrointestinal tumours [J]. *World J Gastroenterol* 2005, 11(2):155-163.
- [18] Wang DB, Lu XK, Zhang X, et al. Carbonic anhydrase 1 is a promising biomarker for early detection of non-small cell lung cancer[J]. *Tumour Biol* 2016, 37(1):553-559.
- [19] 白雪,李世拥,于波,等.结直肠癌原发灶和正常肠黏膜组织相关差异表达蛋白研究[J]. *解放军医学杂志*, 2008, 5:495-497.
- [20] Yin L, Wu N, Lazar MA. Nuclear receptor Rev-erbalpha: a heme receptor that coordinates circadian rhythm and metabolism [J]. *Nucl Recept Signal* 2010, 8:e001.
- [21] Graff LA, Vincent N, Walker JR, et al. A population-based study of fatigue and sleep difficulties in inflammatory bowel disease [J]. *Inflamm Bowel Dis* 2011, 17(9):1882-1889.
- [22] Kojetin DJ, Burris TP. REV-ERB and ROR nuclear receptors as drug targets [J]. *Nat Rev Drug Discov* 2014, 13(3):197-216.
- [23] Polidarova L, Houdek P, Sumova A. Chronic disruptions of circadian sleep regulation induce specific proinflammatory responses in the rat colon [J]. *Chronobiol Int* 2017, 34(9):1273-1287.
- [24] Voigt RM, Forsyth CB, Green SJ, et al. Circadian rhythm and the gut microbiome [J]. *Int Rev Neurobiol* 2016, 131(2):193-205.
- [25] 武光东,邱彬,王婷婷,等. *Fkbp51* 基因敲除小鼠心脏与肝脏 RNA 表达谱的分析比较[J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27 (7):1-5.

[收稿日期]2018-09-23