

ICS 65.020.30
B40/49

DB50

重 庆 市 地 方 标 准

DB 50/T 1044—2020

无菌 (Germ-free, GF) 猪微生物学监测技术规范

Technical Specification for Microbiological Monitoring of Germ-free Pig

2020-10-10 发布

2020-12-30 实施

重庆市市场监督管理局 发布

目 次

前 言.....	2
1 范围.....	3
2 规范性引用文件.....	3
3 术语和定义.....	3
4 妊娠母猪微生物学监测.....	4
5 无菌猪微生物学监测.....	4
6 饮水和日粮微生物学监测.....	6
7 隔离器和物品微生物学监测.....	7

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则编写。

本标准由重庆市畜牧科学院提出。

本标准由重庆市农业农村委员会归口。

本标准主要起草单位：重庆市畜牧科学院。

本标准主要起草人：葛良鹏、孙静、梁浩、刘作华、丁玉春、吴梦、黄勇。

无菌（Germ-free, GF）猪微生物学监测技术规范

1 范围

本标准规定了无菌猪生产及使用过程中的妊娠母猪、无菌猪、饮水和日粮、隔离器和物品等微生物学监测技术要求。

本标准适用于无菌猪生产和使用时微生物学质量控制。

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 16551 猪瘟检疫技术规范
- GB/T 18090-2008 猪繁殖与呼吸综合诊断方法
- GB/T 18448.1-2001 实验动物体外寄生虫检测方法
- GB/T 18448.2-2008 实验动物弓形虫检测方法
- GB/T 18641 伪狂犬病诊断技术
- GB/T 18935-2003 口蹄疫诊断技术
- GB/T 21674-2008 猪圆环病毒聚合酶链反应试验方法
- SN/T 1559-2010 非洲猪瘟检疫技术规范
- SN/T 1919-2016 猪细小病毒病检疫技术规范
- NY/T 544-2015 猪流行性腹泻诊断技术
- NY/T 548-2015 猪传染性胃肠炎诊断技术
- NY/T 678 猪伪狂犬病免疫酶试验方法
- NY/T 679 猪繁殖与呼吸综合症免疫酶试验方法

3 术语和定义

下列术语与定义适用于本文件。

3.1

无菌猪 Germ-free (GF) pig

利用现有检测手段，无可检出一切活的微生物（包括细菌、病毒）和寄生虫，能保证猪源性细胞、组织、器官研究的生物安全性和清晰的微生物背景的实验用猪，简称无菌猪。

3.2

悉生猪 Gnotobiotic (GN) pig

以无菌猪为对象，通过微生物移植技术构建出只含有特定菌群，并始终在可屏蔽外界微生物条件下生活的实验用猪，可分为单一菌株移植悉生猪和组合菌群移植悉生猪。

3.3

隔离环境 Isolation environment

与外界完全隔离，可阻断任何外源微生物侵入的封闭空间。

3.4

屏障环境 Barrier environment

屏障环境应作为隔离环境的第一层保障，用于放置和使用无菌隔离器。

4 妊娠母猪微生物学监测

妊娠猪应未注射猪繁殖与呼吸综合征弱毒疫苗，外观健康、无异常；应排除经胎盘垂直传播的四种疾病，包括猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征、猪伪狂犬病、猪细小病毒病。病原筛查方法参照 GB/T16551、GB/T18641、NY/T679 和 SN/T 1919-2016 执行。

5 无菌猪微生物学监测

5.1 采样

5.1.1 采样管的准备

宜采用螺帽盖的采样管，内部自带 1 支拭子。也可通过带螺帽盖的离心管和 1 支棉签自制而成。采样管选择在保质期内的、且包装完好的无菌采样管（宜经过环氧乙烷灭菌处理），或提前高温高压灭菌处理。采样当天，无菌采样管放入屏障设施的传递窗内，并紫外光照 30min 及以上。

5.1.2 采样管转入隔离器

在保持无菌猪饲养隔离器传递通道内部密封罩密封状态下，取下传递通道外侧密封罩，将无菌采样管放入传递通道，密封外侧密封罩。采用 1.5%-2%新制的过氧乙酸从传递通道外侧密封罩上的消毒孔，对传递通道内部空间进行喷雾消毒。喷雾时间不宜低于 5min。密封消毒孔，并等待 30min 以上。通过无菌猪饲养隔离器操作手套，从隔离器内部取下传递通道内侧密封罩，将无菌采样管移入隔离器内，重新罩上传递通道的内侧密封罩。

5.1.3 采样过程

根据实验要求用拭子采集样本（如猪肛门拭子、鼻拭子或新鲜粪便），立即装回采样管，并盖紧螺帽盖。

5.1.4 采样管转出隔离器

取下传递通道内部密封罩，将采样管转到隔离器的传递通道内部，罩好内部密封罩，再打开隔离器传递通道的外部密封罩，将采样管取出，重新罩上外部密封罩。采用 1.5%-2%新制的过氧乙酸从传递通道外部密封罩上的消毒孔，对传递通道内部空间进行喷雾。喷雾时间宜不少于 5min。

5.2 细菌监测

5.2.1 培养及观察

将采集的样本分别接种于血琼脂培养基、脑心浸液肉汤和硫乙醇酸盐培养基，分别在需氧和厌氧条件下 37℃ 培养 48h 及以上。无菌条件下，取培养后的样本，涂片、固定、革兰染色后显微镜下检查菌体及形态。每个隔离器，宜平行检测重复 3 次。

5.2.2 判定标准

固体培养基上，应无任何可见菌落；液体培养基内，应无浑浊、无沉淀，且镜检无细菌菌体。

5.2.3 监测频率

宜每周检测 1 次。

5.3 真菌监测

5.3.1 培养及观察

将采集的样本接种于大豆酪蛋白固体培养基，分别在 20℃、28℃ 和 37℃ 下需氧培养 48h 及以上。每个隔离器，宜平行检测重复 3 次。

5.3.2 判定标准

固体培养基上，应无任何可见菌落，且镜检无真菌菌体。

5.3.3 监测频率

宜每周检测 1 次。

5.4 无菌猪病毒监测

5.4.1 监测指标

应对 4 种垂直传播病毒进行监测，包括猪瘟病毒、细小病毒、猪伪狂犬病病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒。应对 5 种猪常见病毒进行监测，包括口蹄疫病毒 0、猪圆环-2 型病毒、猪流行性腹泻病毒、猪传染性胃肠炎病毒、非洲猪瘟病毒。

5.4.2 指标检测标准

无菌猪的 9 种病毒指标及其检测标准见表 1。

表 1 9 种病毒指标及检测标准

病毒指标	检测标准
猪瘟病毒	GB/T 16551-2008
猪繁殖与呼吸综合征病毒按照	GB/T 18090-2008
猪细小病病毒	SN/T 1919-2016

猪伪狂犬病病毒	NY/T 678-2003
猪圆环-2 型病毒	GB/T 21674-2008
猪口蹄疫病毒 0	GB/T 18935-2003
猪流行性腹泻病毒	NY/T 544-2015
猪传染性胃肠炎病毒	NY/T 548-2015
非洲猪瘟病毒	SN/T 1559-2010

5.4.3 判定标准

上述 9 种病毒不应检出。

5.4.4 监测频率

宜每月检测 1 次。

5.5 无菌猪寄生虫监测

5.5.1 监测指标

对猪弓形虫、猪血虱、猪疥螨 3 种猪寄生虫指标进行监测。

5.5.2 指标检测方法

猪弓形虫检测按照 GB/T 18448.2-2001 执行，猪血虱、猪疥螨按照 GB/T 18448.1-2001 执行。

5.5.3 判定标准

不应检出任何寄生虫。

5.5.4 监测频率

宜每周检测 1 次。

6 饮水和日粮微生物学监测

6.1 饮水微生物学监测

6.1.1 采样与培养

无菌条件下，取冷却的灭菌纯水 1mL，接种到大豆酪蛋白固体培养基，分别在 28℃ 和 37℃ 需氧培养 24h。宜平行检测重复 3 次。

6.1.2 判定标准

不应检出任何细菌。

6.2 日粮微生物学监测

6.2.1 采样与培养

按照日粮总量的5%进行抽样检查。无菌条件下，每袋无菌猪日粮取25g，加入25mL灭菌水，充分混匀，静置10min。取上清液1mL，分别接种到大豆酪蛋白固体培养基、脑心浸液肉汤和硫乙醇酸盐培养基，在分别在需氧和厌氧条件下37℃培养72h及以上。无菌条件下，取培养后的样本，涂片、固定、革兰染色后镜检。宜平行检测重复3次。

6.2.2 判定标准

不应检出任何细菌。

7 隔离器和物品的微生物学监测

7.1 隔离器的微生物学监测

7.1.1 隔离器检测前的准备

隔离器的准备按照CQDB2018-0005要求进行。准备完成后并运行24h以上，利用无菌拭子对隔离器内部表面擦拭采样，装管密封后无菌传出。

7.1.2 培养

超净工作台内，将采样拭子分别接种到大豆酪蛋白固体培养基、脑心浸液肉汤和硫乙醇酸盐培养基，分别在需氧条件下28℃和37℃培养72h及以上。无菌条件下，取培养后的样本，涂片、固定、革兰染色后镜检菌体。

7.1.3 判定标准

不应检出任何细菌。

7.2 隔离器内物品的微生物学监测

7.2.1 采样与培养

对传入的物品表面充分擦拭采样并装管，传出隔离器。超净工作台内，将采样拭子分别接种到大豆酪蛋白固体培养基、脑心浸液肉汤和硫乙醇酸盐培养基，在分别在需氧条件下28℃和37℃培养72h及以上。无菌条件下，取培养后的样本，涂片、固定、革兰染色后镜检。

7.2.2 判定标准

不应检出任何细菌。