

ICS 65.020.30  
B40/49

# DB50

重 庆 市 地 方 标 准

DB 50/T 1043—2020

## 无菌（Germ-free, GF）猪生产技术规范

Production Technical Practice 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

1. 范围.....	3
2. 规范性引用文件.....	3
3. 术语和定义.....	3
4. 设施设计.....	4
5. 隔离器.....	6
6. 日粮.....	8
7. 无菌猪的制备.....	9
8. 无菌猪的饲养管理.....	10

## 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、重庆百斯达生物科技有限公司。

本标准主要起草人：孙静、葛良鹏、刘作华、梁浩、丁玉春、吴梦、林保忠、黄勇、杨松全。

# 无菌（Germ-free, GF）猪生产技术规范

## 1 范围

本标准规定了无菌猪的术语和定义、设施设计、隔离器、日粮，无菌猪获取与人工饲养等内容。本标准适用于无菌猪的制备、培育和相关实验。

## 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。

- GBZ 133 医用放射性废物的卫生防护管理
- GB/T 191 包装储运图示标志
- GB/T 4789.18 食品卫生微生物学检验 乳与乳制品检验
- GB 5749 生活饮用水卫生标准
- GB 8978 污水综合排放标准
- GB/T 18641 伪狂犬病诊断技术
- GB 14925 实验动物 环境及设施
- GB/T 14926.41 实验动物 无菌动物生活环境及粪便标本的检测方法
- GB 16551 猪瘟检疫技术规范
- GB 50052 供配电系统设计规范
- GB 50068 建筑结构可靠性设计统一标准
- GB 50447 实验动物设施建筑技术规范
- SN/T 1919-2016 猪细小病毒病检疫技术规范
- 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

隔离环境的第一层保障，用于放置和使用无菌隔离器。

## 4 设施设计

### 4.1 选址

4.1.1 场址远离有严重空气污染、噪声干扰和生物安全风险等区域。

4.1.2 设施供电符合 GB 50052 的要求。屏障设施和隔离环境设施应采用不低于二级电力负荷供电。宜具备双路供电或具备应急电源，保持屏障设施和隔离环境设施的不间断运转。

4.1.3 水源充足，取用方便，有存储、净化设施，能够保证生产、生活用水，水质应符合 GB 5749 的规定。

### 4.2 规划布局

#### 4.2.1 生产区布局

4.2.1.1 无菌猪生产区按照非净化区、净化区、粪污处理区等功能分区。各功能区之间应设置防疫隔离带或墙。

4.2.1.2 非净化区的设置包括办公室、监控室、库房、机械设备室（维修室）、淋浴室、工作人员休息室、更衣室、母猪准备室、走廊、废弃物存放处理间、清洗消毒室、污物走廊、以及人员用卫生间等。

4.2.1.3 净化区的设置一般按照无菌猪接生区、无菌猪生产区、实验区和辅助区分区。净化生产区包括更衣间、缓冲间、风淋室、洁净手术室、无菌猪生产饲养室等。净化实验区包括更衣间、缓冲间、风淋室、洁净手术室、隔离饲养室等。净化生产区和净化实验区可共用更衣间、缓冲间、风淋室和洁净手术室等功能区。辅助区包括熏蒸房、洁净物品存放室、洁净走廊。

4.2.1.4 粪污处理区主要包括兽医室、隔离猪舍、病死猪处理区、贮粪池、污水池。应设在场区下风向或侧风向及地势较低处，与生产区保持 100m 以上的间距。粪污处理应有单独通道，便于病死猪消毒和污物处理。

### 4.3 设施要求

#### 4.3.1 设施一般要求

4.3.1.1 无菌猪生产区应合理组织气流和布置送、排风口的位置，避免死角、断流、短路。无菌猪生产场区建筑物门、窗应有良好的密封性。净化生产区和净化实验区的洁净走廊净宽度不应小于 1.5m，门净宽度不应小于 0.8m。

4.3.1.2 屏障环境设施由非洁净区进入洁净区及洁净区的各类管线管口，应采取可靠的密封措施。排水管道管径不宜小于 DN150。屏障环境设施应设环境监控系统，其他级别设施根据需要设置环境监控系统。各类环境控制设备应定期保养维修。

4.3.1.3 外环境应整洁，便于清扫和消毒。应排水畅通，无废物堆积和无水积存。

4.3.1.4 应设置人、动物、物品专用出入口，道路通畅，配置专用的消毒设施与设备。

4.3.1.5 应有防治外来动物进入的措施。

#### 4.3.2 设施建筑构造要求

4.3.2.1 屏障环境设施的结构安全等级应不低于 GB50068 中建筑结构安全等级二级的要求。

4.3.2.2 屏障环境设施应能承载吊顶内设备管线的荷载，以及高压灭菌器、空调设备、清洗池等设备的荷载。

4.3.2.3 屏障环境设施和隔离器放置的净化区内不宜设排水沟或者地漏；若已存在排污管口，应加上密封盖，防止异味或其他污物窜入。非净化区内设置地漏的房间，坡度不应小于 1%，地面应做防水处理。

4.3.2.4 屏障环境设施的清洗消毒间与洁净物料储存间之间应设置消毒灭菌设施设备。

4.3.2.5 淋浴室、清洗消毒区的地面和墙面均应做防水处理。

#### 4.3.3 主要分区设置要求

4.3.3.1 净化区内墙表面应光滑平整，阴阳角均为圆弧形，易于清洗、消毒。墙面应采用不易脱落、耐腐蚀、无反光、耐冲击的材料。地面应防滑、耐磨、无渗漏。天花板应耐水、耐腐蚀。上、下水系统应有防止逆流以及防止外来动物进入的措施。

4.3.3.2 净化区的辅助区应实行环境控制，便于设备和配件的清洗处理，防止病原微生物污染、寄生虫污染和外来动物进入，墙壁和地板应作防水处理。设置熏蒸房，对进入净化区的大型设备进行熏蒸消毒，其墙壁和地板应作防水、防腐处理，设排风口。

4.3.3.3 非净化区应设置母猪准备室和配套设备，方便手术前动物体表清洁和消毒。

#### 4.3.4 给排水要求

4.3.4.1 无菌猪的饮用水定额应满足无菌猪饮用水需要。

4.3.4.2 净化区的用水应达到无菌要求，按 GB/T 14926.41 规定的饮水检测方法执行。非净化区用水应符合 GB 5749 的要求。

4.3.4.3 无菌猪生产区（实验区）的给水干管宜布设在专用夹层内。管道穿越净化区的壁面处应采取可靠的密封措施。

4.3.4.4 屏障环境设施的给水管道和管件，应选用环保、耐腐蚀、连接方便可靠、不生锈、不易老化的管材和管件。管道外表面可能凝露时，应采取有效的防凝露措施。

4.3.4.5 屏障环境设施生产区（实验区）内无排水管或者地漏。

4.3.4.6 屏障环境设施清洗消毒室的地漏应采用密闭型。

4.3.4.7 排水管道应选用耐腐蚀、连接方便可靠、不生锈、不易老化的管材和管件。

4.3.4.8 屏障环境设施的排水宜与其他生活排水分开设置。

#### 4.3.5 粪污、废弃物及动物尸体处理

4.3.5.1 生产区应设有污水初级处理设备或化粪池，粪污、废液经处理后应达到 GB 8978 二类一级标准要求。

4.3.5.2 一次性工作服、口罩、帽子、手套及实验废弃物等应按《中华人民共和国卫生部令（第 36 号）——医疗卫生机构医疗废物管理办法》进行无害化处理。注射针头、刀片等锐利物品应收集到利器盒中统一处理。

4.3.5.3 动物尸体及组织应装入专用尸体袋中，低温存放，并按照《病死动物无害化处理技术规范（农医发[2013]34 号）》要求，集中做无害化处理。

4.3.5.4 无菌猪饲养用的隔离器设计有污物存储层，污物排放频率根据污物产量确定。排放前，隔离器的排污管出口应浸入消毒液；排放后，应先关闭排污阀门，再将管口撤出消毒液。

## 5 隔离器

### 5.1 分类

无菌猪隔离器分为无菌子宫剥离器、无菌运输隔离器和无菌饲养隔离器。

#### 5.1.1 无菌子宫剥离器

适用于无菌子宫剖除术获取无菌仔猪。无菌状态下，结扎并脱离母体的子宫经子宫剥离器的消毒渡槽，进入子宫剥离器内操作平台，在平台上获取新生仔猪。

#### 5.1.2 无菌运输隔离器

与无菌子宫剥离器对接，用于无菌新生仔猪的转移；单独使用时，用于无菌猪转运。

#### 5.1.3 无菌饲养隔离器

正压时，适用于无菌猪和悉生猪的饲养，阻断外源微生物侵入到隔离器内部区域；负压时，适用于猪感染性动物实验，阻断感染源扩散到隔离器外部区域。无菌猪始终生活于无菌饲养隔离器内。

### 5.2 结构

#### 5.2.1 无菌猪子宫剥离器

应由架体、密封罩、隔离腔体、消毒液槽、操作手套、无菌操作台、传递通道、进出风过滤系统等组成。

#### 5.2.2 无菌猪运输隔离器

应由架体、密封罩、隔离腔体、传递通道、操作手套、进出风过滤系统等组成。

#### 5.2.3 无菌猪饲养隔离器

应由架体、密封罩、隔离腔体、传递通道、操作手套、进出风过滤系统、饲喂系统等组成。

### 5.3 规格

#### 5.3.1 无菌子宫剥离器

应根据实验猪饲育品种的要求确定子宫剥离器的消毒液槽和无菌操作台的尺寸。

#### 5.3.2 无菌运输隔离器

应根据无菌猪大小、运输数量的要求确定无菌运输器的尺寸。

#### 5.3.3 无菌饲养隔离器

应根据实验猪饲育品种、动物实验的要求确定隔离器的尺寸。1月龄内的无菌仔猪，饲养隔离器的最小空间宜满足表1的要求。

表1 1月龄无菌猪饲养隔离器最小空间

项目	体重 (kg)		
	<5	≥5 且 ≤10	>10kg
底板面积 m <sup>2</sup> /头	0.17~0.35	0.35~0.52	0.52~0.70
笼内高度 m	0.4	0.4	0.5

### 5.4 要求

#### 5.4.1 隔离腔体

可选用软质或硬质材料。软质隔离腔体主体空间大小可随通风而变化，宜用于无菌饲养隔离器。硬质隔离腔体主体空间大小应不随通风而变化，宜用于无菌运输隔离器、无菌子宫剥离器。

#### 5.4.2 架体

采用不锈钢材料制作，表面应光洁、耐腐蚀。架体应稳定、牢固、平整，装拆和移动方便。风机与架体采用管道连接，运行时无明显振动。

#### 5.4.3 密封罩

宜采用耐腐蚀、耐高温、耐压、易清洗、透明、柔韧、无毒塑料密封罩，具有带塞消毒孔。宜用于无菌猪隔离器内物品传递系统的密封。观察窗宜置于隔离器顶部，使用耐腐蚀、耐高温、易清洗、透明等硬质材料密封连接。

#### 5.4.4 传递通道

用于物品和动物的密封传递。应密封。

#### 5.4.5 操作手套

连接于隔离器密封罩的操作用胶质手套，应密封、大小适用。

#### 5.4.6 进出风过滤系统

进风处应有初效、中效、高效过滤，出风处应有高效过滤。

#### 5.4.7 消毒液槽

宜采用耐腐蚀的不锈钢等硬质材料密封连接组成，具有开口，应可以液封，具有放水口，可排放废液。

#### 5.4.8 无菌操作台

采用耐腐蚀的不锈钢等硬质材料密封连接组成，底部具有水平推拉盖，应可密封。

#### 5.5 性能

空气进风口应经初效、中效、高效三级过滤，出风经高效过滤，使隔离器内在静态时的送风口洁净度达到 GB 14925-2010 要求的 7 级或更高洁净度要求，沉降菌不应检出，气流速度应为 0.1-0.3m/s，内外梯度压差应为 20-55Pa，换气次数应为 20-50 次/h，噪音应≤55db。

#### 5.6 用途

在隔离环境下，无菌猪隔离器的用途见表 2。

表 2 无菌猪隔离器用途

项目	环境分类	使用功能	适用实验动物
无菌子宫剥离器	正压	无菌猪子宫外表面消毒和新生无菌仔猪的获取	无菌猪
无菌运输隔离器	正压	新生无菌仔猪运输、体表清洁和运输	无菌猪
无菌饲养隔离器	正压/负压	正压用于无菌猪的饲养和动物实验和悉生猪的实验/负压用于猪感染性动物实验	无菌猪、悉生猪

### 6 日粮

#### 6.1 分类

根据无菌猪的日龄，日粮主要分为代乳粉、粉料、颗粒料。

##### 6.1.1 代乳粉

宜选用商业化新生乳猪奶粉或新生婴儿奶粉。采用辐照、高压高温处理等方法灭菌。宜采用 Co<sup>60</sup> 辐照灭菌。

##### 6.1.2 粉料

选用乳猪全价粉料。采用辐照、高压高温处理等方法灭菌。宜采用 Co<sup>60</sup> 辐照灭菌。

##### 6.1.3 颗粒料

选用成年猪用全价颗粒料。采用辐照、高压高温处理等方法灭菌。一般采用钴 60 辐照灭菌。

#### 6.2 卫生要求

细菌、真菌不得检出，黄曲霉毒素、砷、铅以及亚硝酸盐 4 项指标应符合 GB/T 4789.18 要求。不宜添加任何药物。

### 6.3 包装

装于防潮的纸箱、纸桶（袋）或聚丙烯塑料桶（袋）中，内衬包装食品用高阻隔材质的真空包装袋。

### 6.4 贮存

应贮存在清洁、干燥、阴凉、通风的专用仓库中。要防虫蛀、鼠害、防挤压、霉变和污染。

### 6.5 保质期

不少于3个月，不宜超过6个月。

## 7 无菌猪的制备

### 7.1 品种选择

根据使用用途选择合适的品种。以畜牧研究为主或短期实验时，宜选择体型较大品种；以医学生物学研究为主或长期实验时，宜选择小型品种。

### 7.2 妊娠母猪的筛选

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；不宜选择初产和第六胎次以上的母猪。应排除经胎盘垂直传播的四种病毒，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。

### 7.3 饲养环境与条件的准备

#### 7.3.1 隔离器的准备

无菌子宫剥离器、无菌运输隔离器和无菌饲养隔离器宜在手术前7-10天开始准备。隔离器内部，宜选用1.5%-2.0%新制的过氧乙酸喷雾10分钟，1-2小时后开启隔离器上送风装置，过夜排出残留消毒液。经微生物检测合格，持续空转备用。手术前1天，将无菌子宫剥离器和无菌运输隔离器用传递系统连接，1.5%-2.0%新制的过氧乙酸喷雾消毒传递通道内部空间，静置1小时后送风过夜，排出隔离器内部残余消毒液，备用。

#### 7.3.2 屏障环境的维持

上述三类隔离器应始终在屏障设施下使用。无菌猪净化区内各功能区，宜采用1.5%-2.0%新制的过氧乙酸每天喷雾消毒1次。根据实验人员进出次数增加，适当增加喷雾消毒次数。

### 7.4 剖腹产手术

#### 7.4.1 时间

宜在预定分娩日的前两天内进行。妊娠末期应积极观察母猪行为，减少因提前分娩而终止手术的事件发生。

#### 7.4.2 妊娠母猪术前准备

动物准备间内，母猪限于移动栏中，以温水冲洗母猪体表，擦干；移动至手术准备间，用海绵刷子蘸取碘伏，将母猪体表全部擦拭；再将妊娠猪移至手术间，进行麻醉、并绑定于手术床上。宜采用异

氟烷呼吸麻醉法，配合肌肉松弛剂使用。

### 7.4.3 剖腹产手术

麻醉后，对整个腹部再次进行碘伏消毒。剃毛，垫灭菌手术创巾，切开腹腔，拉出子宫，结扎子宫颈部、切断两端，将子宫浸入无菌子宫剥离器的消毒液槽内 10-20s，之后移入无菌子宫剥离器的无菌操作台，取出胎儿、擦干羊水、剪断脐带。

## 7.5 无菌仔猪的获取与转运

### 7.5.1 无菌仔猪的获取

将取出的无菌新生仔猪通过灭菌后的传递通道，快速移入无菌运输隔离器，封闭密封罩，尽量降低消毒液对新生仔猪的刺激。利用加热设备对隔离器外底部进行加热，保持隔离器内温度在 34-36℃，防止仔猪受冻。根据新生仔猪情况，进行人工辅助呼吸。从切开腹腔到人工辅助呼吸结束，时间控制在 30min 内。

### 7.5.2 无菌仔猪的转运

上述操作完成后，保持密封状态，将无菌运输隔离器与无菌子宫剥离器断开连接，将无菌运输隔离器传递通道外部密封罩罩上，并采用 1.5%-2%新制的过氧化氢喷雾消毒隔离器外表面。根据使用目的，将无菌运输隔离器推入无菌猪生产区或者实验区，并通过灭菌的连接通道和无菌饲养隔离器对接，应对连接通道内部空间消毒。静置 10min 后，开启连接通道，将新生无菌仔猪从无菌运输隔离器转入无菌饲养隔离器内。保持隔离器内温度在 34-36℃。根据新生仔猪情况，进行人工辅助呼吸。转运操作时间控制在 30min 内。

## 8 无菌猪的饲养管理

### 8.1 饲养流程

新生仔猪取出后 2h 内第一次人工哺乳。将灭菌的代乳粉和灭菌水按比例混合后（根据商业化奶粉使用说明确定比例），倒入隔离器内各食槽内。每日早、中、晚各哺乳 1 次。3 日龄前，每次宜给料量 100-200mL；4 日龄后宜逐渐增加给料量，每次 200-300mL。不喂水。21 日龄后，饮水不间断，宜补饲无菌猪用粉料。42 日龄后，宜更换为无菌猪用颗粒料。

### 8.2 温度管理

7 日龄内，无菌饲养隔离器内温度保持 32-35℃；8-14 日龄内，无菌饲养隔离器内温度不低于 30℃；21 日龄后隔离器内温度不低于 26℃。

### 8.3 光照管理

仔猪进入隔离器后，按照光照 12h，黑暗 12h 执行。

### 8.4 物品进出消毒

#### 8.4.1 屏障环境物品进出消毒操作

##### 8.4.1.1 物品转入屏障环境

进入屏障环境的物品应经过严格的消毒灭菌处理。灭菌之前，耐高温高压物品，如手术器械、器具、

纱布，宜打包放入灭菌盒或灭菌袋，应首选压力蒸汽灭菌；不耐热、不耐湿的物品，如采样拭子、采血针宜选用包装完整的商业化产品，并经过环氧乙烷等低温灭菌处理；无菌猪饲养中使用的其他物品，如称重器、皮尺、记号笔、塑料制品等，宜纯水清洁物品外表面、晾干后，用消毒液（如新制的 1.5%–2% 过氧乙酸）喷雾表面至湿润、静置 1h 以上。之后，所有待进入屏障环境的灭菌物品应放置于传递窗，经紫外消毒 30min 后，转入屏障环境。

#### 8.4.1.2 物品转出屏障环境

屏障环境内，可循环使用的物品（如手术器械、器具、创巾等），应从污物走廊转出至清洗消毒室，清洗、烘干、保存。不可循环使用的物品（如采样拭子、采血管、采血针、刀片、纱布等），应从污物走廊转出至废弃物品存放处理间，分类处理。

#### 8.4.2 隔离环境物品进出消毒操作

##### 8.4.2.1 物品进入隔离环境

与无菌猪饲养无关的物品不转入隔离环境。物品进入隔离环境前，应保持隔离器传递通道内侧密封罩为密封状态。打开隔离器传递通道外侧密封罩，将物品（如袋装灭菌奶粉、袋装灭菌饲料、称重器、皮尺等）放入传递通道内，关闭传递通道外侧密封罩，打开外侧密封罩上消毒孔，用消毒液（如新制的 1.5%–2% 过氧乙酸）喷雾处理至物品外表面湿润，关闭消毒孔，静置 1h 及以上；打开隔离器传递通道内侧密封罩，将物品转入隔离器内部操作台上，再次关闭内部密封罩。完成物品转入操作。

##### 8.4.2.2 物品转出隔离环境

物品转出隔离环境前，应保持隔离器传递通道外侧密封罩关闭状态。打开隔离器传递通道内侧密封罩，将物品转入传递通道内部；关闭传递通道内侧密封罩后，再开启传递通道外侧密封罩，将物品转出，关闭传递通道外侧密封罩，打开消毒孔，用消毒液（如新制的 1.5%–2% 过氧乙酸）喷雾传递通道内部空间 1–2min，关闭消毒孔。完成物品转出隔离环境。

#### 8.5 粪污处理

根据污物产量确定粪污处理频率。屏障环境下，消毒桶内准备消毒液（如新制的 1.5%–2% 过氧乙酸）。粪污排放前，保持无菌饲养隔离器的排污管口浸入消毒液（如新制的 1.5%–2% 过氧乙酸）；打开排污管阀门，排出粪污；排放后，应先关闭排污管阀门，再将排污管口提出消毒液面。装有粪污的消毒桶应立即从污物走廊转出非洁净区，倒入舍外的排污管道，汇总到贮粪池。

饲养实验结束后，将无菌猪隔离器从污物走廊转出至清洗消毒室，拆分、清洗、晾干，重新组装；组装的隔离器推入熏蒸房，用消毒液（如新制的 1.5%–2% 过氧乙酸）喷雾隔离器内外表面，静置 1h 以上；开启熏蒸房内排气设备，排出残留消毒液。工作人员在洁净区内，开启熏蒸房内侧门，将消毒后的无菌猪隔离器拉入洁净区的洁净储物间，存放、备用。