

第4.11章 实验用啮齿类动物和兔胚胎或卵的采集与处理

第4.11.1条

实验动物群体的微生物状态

不同种类和基因型的实验动物通常饲养在专门场所内，其微生物状态主要取决于种群建成和用以维持该种群的系统。在本章中，种群的微生物状态主要分为三类：确定型、普通型、非确定型。确定型种群是指至少在种群形成之初，动物完全不含致病性或非致病性微生物（即无菌动物），不排除饲养后会感染已知的非致病性微生物。确定型种群饲养在严格控制的封闭环境里，并配有排除所有潜在微生物污染的严格程序。普通型种群是指封闭饲养的动物，但可能存在已知（特定的）病原体和非致病性微生物。普通型种群的管理程序是控制潜在的微生物污染来源，其严格程度会略低于确定型种群。采取简单的无菌操作（如对饲料和垫料的高压灭菌）以确保动物不会感染任何不必要的微生物。最后，实验动物可以是微生物情况不明的非确定型种群，包括非隔离饲养动物和散养动物。对上述不同种群类型的描述详见欧盟实验动物科学协会（FELASA）的报告¹。

应至少每季度进行一次细菌学、病毒学、寄生虫学、血清学和其他检测确认确定型和普通型动物群的卫生状况，可通过对预先设定的哨兵动物或种群中其他代表性成员的检测进行确定，往往选用已繁育多代的老龄种公畜进行该检测。

对涉及国际运输的啮齿类实验动物和兔胚胎进行官方卫生管控，目的是控制与此类胚胎相关的特定病原微生物，并且避免感染受体动物、子代及动物群。根据群体的不同微生物状态〔确定型（包括无菌动物）、普通型或非确定型〕，针对供体动物管理及胚胎处理的要求也相应不同。

第4.11.2条

关于胚胎采集小组的规定

胚胎采集小组由具有资质的技术人员组成，应至少有一名经验丰富的专业技师。胚胎采集小组负责采集、处理和贮存胚胎/卵细胞。

¹ 欧盟实验动物科学协会（FELASA）的报告：《关于小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠和兔繁殖群落卫生监测的建议》。由FELASA管理委员会动物卫生工作小组发表于1992年11月。

胚胎采集小组应符合下列条件：

- 1) 应接受小组专业技师的监督。
- 2) 专业技师负责小组的所有活动，包括确定种群和供体动物的卫生状况、供体动物的卫生处理和外科手术，以及清洁和消毒处理等。该专业技师的工作应由单位主管兽医负责监督。
- 3) 单位主管兽医应获得实验动物管理认证或许可，并且有采集出口用胚胎的资格。单位主管兽医的职责是确保对动物采取与其状态相适应的卫生操作程序，并负责认证胚胎处理程序和实验室设施符合本章的规定。
- 4) 小组成员应接受疫病控制和胚胎无菌操作技术培训，应了解特定人畜共患病病原可能危害多种实验动物，避免病原在人与动物之间相互传播。
- 5) 小组应按规定严格执行卫生防护措施，保护供体动物、种群、动物饲养设施和设备，防止微生物污染。应建立制度，限制人员（尤其是接触过其他动物设备的人员）自由出入胚胎操作实验室。
- 6) 小组应为以下操作配备足够的设施设备：
 - a) 采集胚胎；
 - b) 在固定或流动式实验室内处理胚胎；
 - c) 贮存胚胎。
- 7) 单位主管兽医有责任确保保存完整的动物和胚胎记录，包括胚胎采集、处理和贮存的记录。最好采用《国际胚胎技术协会手册》¹中家畜记录表格式，各类信息应记录完整，包括供体的基因型鉴定、胚胎质量评级、形态学阶段，以及其他应提供的数据。胚胎采集小组的实验记录在胚胎出口后至少应保存两年，以供兽医主管部门检查。
- 8) 胚胎采集小组的工作如果涉及胚胎出口，应经过兽医主管部门的认可，并接受官方兽医的定期监督，以确保胚胎的采集、处理和贮存符合要求。

第4.11.3条

关于加工实验室的规定

胚胎采集小组使用的加工实验室是用来从供体（或从供体摘除的生殖器官）和培养液中采集胚胎的设施，进行胚胎检查和一切必要的处理，如洗涤、冷冻等。加工实验室可以是采集和加工专门设施的一部分，也可以是专门改建的现有设施的一部分。加工实验室可以在供体动物所在场所附近，但必须与供体动物进行物理隔离。

另外：

- 1) 加工实验室应接受单位主管兽医的监督，并受官方兽医的监管。
- 2) 在将出口用胚胎存入安瓿、小瓶或吸管前，加工时不应同时处理任何卫生状况较差的胚胎。

¹ 《国际胚胎技术协会手册》（1998年）。

- 3) 加工实验室的建筑材料应便于进行有效清洁和消毒，应经常对实验室进行清洁和消毒，特别是在每次处理出口胚胎前后均应清洁和消毒。

第4.11.4条

风险管理

就疫病传播而言，移植体内生产胚胎是一种疫病传播风险较低的实验动物遗传物质转移的方法。无论动物种类如何，在胚胎移植过程中主要有三个阶段决定风险最终水平：

- 1) 第一阶段：胚胎污染的潜在风险，取决于：
 - a) 出口国和/或地区的疫病情况；
 - b) 动物种群以及胚胎供体的微生物状况（即确定型、普通型或非确定型）；
 - c) 进口国/地区兽医主管部门关注的特定疫病病原体特征。
- 2) 第二阶段：利用《国际胚胎技术协会手册》中规定的国际公认胚胎处理程序降低风险，这些程序如下：
 - a) 根据种群的微生物状态，胚胎应至少洗涤10次，每次洗涤应至少达到稀释100倍，每次转移胚胎时均应更换新移液管。
 - b) 只有来自同一供体动物的胚胎才能一起洗涤，而且每次洗涤不得多于10个胚胎。
 - c) 如需灭活或消除某一病毒（如疱疹病毒），应按照《国际胚胎技术协会手册》的规定，修改标准洗涤程序，增加胰酶清洗处理这一环节。
 - d) 洗涤后，应在50倍及以上显微镜下观察每个胚胎透明带的整个表面，确保透明带完整且无附着物。
- 3) 第三阶段：适用于进口国/地区兽医主管部门关注的疫病，可用以下方法降低风险：
 - a) 基于相关疫病的确定潜伏期，对供体动物群的微生物状态进行采集后监测，在胚胎贮存在出口国/地区期间（适用于某些可有效冷冻胚胎的动物种类），可对供体动物卫生状况进行回顾性确定。
 - b) 供体动物死后检测或其他样本，如血液、胚胎采集（冲洗）液和无活性胚胎等实验室检测可用于检测特定疫病。

第4.11.5条

关于胚胎小组/兽医的规定

- 1) 兽医有责任确保采取必要的卫生检测程序，以证明种群的微生物状态（即确定型、普通型或非

确定型)。种群的微生物状态应在胚胎运输前经兽医审核。

- 2) 兽医负责出具证明,以证实胚胎操作程序和实验室条件符合本法典第4.11.2条及第4.11.3条的规定。
- 3) 兽医负责执行上述第4.11.4条列出的风险管理程序。
- 4) 兽医对所有胚胎的装运负责,确保兽医证明书填写正确,胚胎收集记录填写完整,并将这些文件附于装运胚胎包装内。

第4.11.6条

关于不同微生物状态类型种群供体的规定

需注意,关于供体动物的规定视动物来源群体的微生物状态而异(确定型、普通型或非确定型)。

每个确定型和普通型供体群的哨兵动物应接受常规微生物检测,最好每月一次,至少每季度一次。针对特定病原体的检测主要根据动物的种类而定,也可根据动物所处的地理位置适当调整。有关对不同种类实验动物进行特异性微生物因子检测的建议,已在其他文献报道(参见欧盟实验动物科学协会报告)。

1. 确定型

- a) 微生物确定型动物种群(第4.11.1条)代表最干净的配子源,从这些动物获取的胚胎可视为无病原体存在。
- b) 由于雄性和雌性供体动物本身无病原体,因此,剖取生殖器官和采集胚胎应在无菌实验室条件下进行,并尽可能在生物安全柜内操作。
- c) 无需一定按照第4.11.4条2)描述方法清洗胚胎,但建议需将胚胎至少清洗2~3次。每次清洗时应轻轻振荡培养基中的胚胎。
- d) 胚胎应视作来源于无菌或无特定病原微生物、在密闭环境下饲养的动物群体,因此,不必采取针对排除病原体的特定风险管理程序(第4.11.4条),但进口单位需对胚胎受体动物进行检疫。

2. 普通型

- a) 这种条件下饲养的动物通常是密闭式群体,需对其卫生状况进行常规检查(第4.10.1条)。由于动物可能暴露于各种病原体中,从而导致感染,并可能会检测到抗体,甚至出现临床症状。应充分了解每个群体所携带的病原体。
- b) 应在隔离场所摘除生殖器官(子宫、输卵管或卵巢),然后送往胚胎加工实验室。这些程序应由不同的专业技术人员操作,如果做不到这一点,至少要求技术人员在更换场所时同时更换防护服。如在实验室内处理动物,应在生物安全柜内剖取生殖器官,这样可以防止将病原体扩散到实验室内。

- c) 摘除生殖器官后,应在无菌条件下进行胚胎采集。如已确认动物体内存在病原体,则根据不同病原体,按照风险管理程序处理胚胎,包括第4.11.4条和《国际胚胎技术协会手册》所述的清洗方法等。
- d) 从抗体检测阳性或证明有特定病原体的动物中获得的胚胎,只有在采取隔离检疫措施且采用了微生物确定型受体母畜的情况下,才可将其移入新的受体动物。如果供体动物或胚胎的卫生状况不确定,也可进行检疫。在胚胎可能受细菌感染的某些情况下,应在冷冻前或解冻后移植前,将其置于含适当抗生素的培养基中培育24小时。
- e) 如果胚胎接受单位需要检疫受体母畜和子代畜以确认其卫生状态,则受体母畜应在断乳后进行特异病原体的检测。待检测结果合格后,其后代方可进入种群。

3. 非确定型

- a) 来自散养种群或卫生状况不明动物种群的胚胎必须按照第4.11.4条和《国际胚胎技术协会手册》的规定采取最严格的风险管理措施,这些措施类似于本法典第4.8章和第4.9章建议的程序。最好在配种(公畜)或胚胎收集(母畜)前,将供体公畜或受体母畜隔离15天。也可以将这些动物与普通型动物种群混群,并在较长一段时期内记录其卫生情况,以降低其监测和胚胎处理的要求严格程度。
- b) 所有供体动物、生殖系统组织和胚胎的处理都应在生物安全柜中进行。
- c) 在胚胎/卵细胞采集完毕后,可对供体母畜进行宰后检验,检测进口国/地区关注的疫病或病原体。如果胚胎是通过外科手术采集的,则应对每个供体的冲洗液样本或混合样本进行特定病原体的检测。
- d) 必须按照《国际胚胎技术协会手册》的规定,胚胎至少清洗10次,如可能存在某些致病性疱疹病毒,应进行胰酶处理。
- e) 完成对动物群、组织或液体必要的疫病筛检、证书等证明文件填写并由主管兽医签字之前,冻存胚胎应始终保存于出口国/地区实验室内。
- f) 胚胎运至进口国/地区时,应在隔离检疫系统下移植到受体动物。应根据所关注疫病的公认潜伏期,每隔一段时间对受体动物进行检测。除了移植后对受体检测外,其后代在12周龄时在将其引入检疫设施外的种群前,也应对之进行检测。

第4.11.7条

关于胚胎贮存和运输的规定

- 1) 出口胚胎应在新鲜液氮中冷冻,然后贮存在干净无菌的液氮容器里。
- 2) 胚胎应贮存在由出口国/地区兽医主管部门认可的卫生条件严格的场所,并保存在密封的无菌安瓿、小瓶或吸管中。只有来自同一供体的胚胎才可以贮存在同一个安瓿、小瓶或吸管中。

- 3) 安瓿、小瓶或细吸管应在冷冻的同时（如无法进行冷冻保存，则应在临出口前）密封，应根据或参考《国际胚胎技术协会手册》推荐的系统进行清楚标识。标识内容应包括动物种类/基因型、微生物状态（即确定型、普通型或非确定型）、采集/冷冻日期、胚胎数量和发育阶段、液氮罐号码以及任何特殊程序的细节，如体外受精、显微注射等。
- 4) 液氮罐应在即将从出口国/地区起运前在官方兽医的监督下密封。
- 5) 胚胎只有在完成相应的兽医认证后方可输出。

第4.11.8条

体外受精和显微操作程序

如果用卵细胞的体外受精方式生产胚胎，为减少可能的病原体暴露风险，建议仅使用清洗后的精子。如利用显微操作透明带穿刺程序获得胚胎，则首先应采取第4.10章所述必要的风险管理措施。

注：于1998年首次通过，于2010年最新修订。