|  |  |
| --- | --- |
| ICS  | 01.120  |
| CCS  |

|  |
| --- |
| D:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T.pngD:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T后面的反斜杠.png GXAS |

A 00  |

团体标准

T/GXAS XXXX—XXXX

实验动物食蟹猴自发性脂肪肝模型筛选技术规范

Technical specification for laboratory animal of screening spontaneous fatty liver disease models in cynomolgus monkeys

XXXX - XX - XX发布

XXXX - XX - XX实施

广西标准化协会  发布

目次

[前言 II](#_Toc184134789)

[1 范围 1](#_Toc184134790)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc184134791)

[3 术语和定义 1](#_Toc184134792)

[4 缩略语 1](#_Toc184134793)

[5 自发性脂肪肝的筛选程序 2](#_Toc184134794)

[5.1 筛选程序 2](#_Toc184134795)

[5.2 筛选对象 2](#_Toc184134796)

[5.3 筛选流程 2](#_Toc184134797)

[6 自发性脂肪肝的评价 3](#_Toc184134798)

[附录A（资料性） BCS评分标准 5](#_Toc184134799)

[附录B（资料性） 采血及血液指标检查方法 7](#_Toc184134800)

[B.1 主要试剂 7](#_Toc184134801)

[B.2 主要仪器 7](#_Toc184134802)

[B.3 检查方法 7](#_Toc184134803)

[附录C（资料性） 组织学评价方法 8](#_Toc184134804)

[C.1 主要试剂 8](#_Toc184134805)

[C.2 主要仪器 8](#_Toc184134806)

[C.3 肝组织穿刺取材 8](#_Toc184134807)

[C.4 组织染色切片制备及阅片诊断 8](#_Toc184134808)

1. 前言

本文件参照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广西实验动物学会提出并宣贯。

本文件由广西标准化协会归口。

本文件起草单位：广西华仁济瀛生物科技有限公司、广西大学动物科学技术学院、南宁海关技术中心、广西桂科院华仁济瀛生物科技有限公司。

本文件主要起草人：韦祝梅、申果、张鹏飞、黄晓姣、石松平、盘宝进、陈樱、潘玺颖、肖艳宇、胡家豪、韦炎冶、黄中理、张绪哲、曾勇、季风。

实验动物食蟹猴自发性脂肪肝模型筛选技术规范

* 1. 范围

本文件规定了实验用食蟹猴自发性脂肪肝模型筛选流程和评价方法等。

本文件适用于实验用食蟹猴自发性脂肪肝疾病模型的筛选和评价。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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/T 14922 实验动物 微生物、寄生虫学等级及检测

DB53/T 293.3—2009 实验动物病理学检测

DB22/T 2781-2017 犬、猫脂肪肝诊断技术

WS/T 661-2020 静脉血液标本采集指南

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

实验用食蟹猴 experimental cynomolgus monkeys

经人工饲喂，对其携带的微生物和寄生虫等实行质量控制，遗传背景明确或来源清楚。用于科学研究、教学、生产、检定以及其他科学实验的食蟹猴。

脂肪肝 fatty liver disease

多种因素导致的肝脏脂肪代谢紊乱，脂类物质动态平衡失调，导致肝实质细胞内脂肪蓄积，以肝细胞内的脂质超过肝湿重的5%，或组织学上每单位面积有1/3以上的肝细胞发生脂肪变性为特征的脂肪代谢性疾病。

自发性疾病模型 spontaneousr disease model

指实验动物未经任何有意识的人工处置，在自然条件下发生了机体表型、生理功能、生化反应等方面的异常表现的疾病模型。

脂肪肝高危猴群 high-risk monkey of fatty liver

食蟹猴年龄≥7岁，且具有以下任何一个及以上脂肪肝危险因素，定义为脂肪肝高危猴群：

1. 有脂肪肝前期史；
2. 高血脂、高血压、动脉粥样硬化性心血管疾病猴；
3. 肥胖或超重猴（BMI≥35kg/m2或体况评分值大于3.5）。
4. 空腹血糖过高或患有糖尿病猴。
	1. 缩略语

AC：腹围；

AI：动脉粥样硬化指数；

ALT：丙氨酸氨基转氨酶；

AST：天门冬氨酸氨基转氨酶；

BCS：体况评分；

BMI：体质指数(BMI=体重÷身高²)；

BW：体质量；

CHE：胆碱酯酶；

CRL：冠臀长；

LDL-C：低密度脂蛋白胆固醇；

SFT：皮褶厚度；

TC：总胆固醇；

γ-GGT：谷氨酰基转移酶。

* 1. 自发性脂肪肝的筛选程序
		1. 筛选程序

见图1。



1. 筛选程序
	* 1. 筛选对象

筛查动物首先应满足普通级实验动物的要求，即获得动物检疫检查报告与动物质量合格证，符合GB/T 14922要求。为了提高工作效率，减少对猴群的干扰，推荐根据猴档案确定年龄、体重、病史等脂肪肝高危因素符合3.4中列出的条件，确定脂肪肝高危猴群，并在高危猴群中开展筛选工作。

* + 1. 筛选流程
			1. 临床体况评定

肥胖是脂肪肝常见的危险因素，临床体况评定宜在高危猴群中筛选出肥胖猴，将筛选范围进一步缩小。临床体况评定可采用BMI或体况评分或两者结合的方式判定动物的肥胖程度。BMI需测量BW和CRL。将BMI≥35或BCS≥3.5作为食蟹猴肥胖的初步判断依据并推荐测量AC和SFT作为辅助判断食蟹猴肥胖情况。BCS评分标准见附录A。

* + - 1. 影像学检查

影像学检查可为脂肪肝的初步判断提供依据。对食蟹猴脂肪肝的初步筛选，宜采用方便、便捷的影像学检查方法对动物进行就近检查，推荐采用便携式B超进行检查：动物麻醉后仰卧，进行胸腹部剃毛，涂抹适当量耦合剂后用B超诊断仪对腹部肝区进行超声检查,根据肝脏回声及肝肾回声对比进行初步诊断。

* + - 1. 血液指标检查

抽取静脉血并对能够反映脂肪肝和肝脏病变情况的血生化指标，如总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯、动脉粥样硬化指数、谷草转氨酶、谷丙转氨酶、谷草/谷丙、总胆红素、直接胆红素、间接胆红素、直胆/总胆红素、碱性磷酸酶、胆碱脂酶、谷氨酰基转移酶、空腹葡萄糖等进行检测，采血及血液指标检查方法见附录B。

* + - 1. 组织学评价

对食蟹猴实施麻醉状态下的肝脏穿刺，并对穿刺组织进行组织学检查和评定。组织学评定方法见附录C。

* 1. 自发性脂肪肝的评价

具体评价标准见表1。

1. 脂肪肝评价

|  |  |
| --- | --- |
| 筛查项目 | 判定结果 |
| 脂肪肝食蟹猴 | 正常食蟹猴 |
| 年龄、脂肪肝病史 | 见3.4 | 无上述危险因素 |
| 临床体况评价 | 见5.3.1 | 不符合上述体况 |
| 超声检查 | 1. 轻度脂肪肝：肝脏大小正常，回声稍增强，肝肾回声比稍增高，均匀分布，膈肌边界与肝内管道清晰可见，远场回声无衰减；
2. 中度脂肪肝：肝脏稍增大，回声中度增强，肝肾回声比增高，均匀分布，膈肌边界与肝内管道尚可见，远场回声轻度衰减；
3. 重度脂肪肝：肝脏增大，回声增强，明显高于肾脏，膈肌边界与肝内管道显示模糊，远场回声显著衰减。
 | ①正常肝脏表面光滑，被膜呈现均匀，前后场一致的线样高回声，肝实质呈致密、均匀、细小点状回声；②肝肾回声相当；③正常可显示肝静脉、门静脉、肝动脉和左右肝管及肝内胆管二级分枝。 |

表1 脂肪肝评价（续）

|  |  |
| --- | --- |
| 筛查项目 | 判定结果 |
| 脂肪肝食蟹猴 | 正常食蟹猴 |
| 血液指标检测 | 离心分层后上层血清呈黄色，或出现乳白色浑浊TC：升高；LDL-C：升高；AI：升高；CHE：升高；ALT：升高；AST：升高；γ-GGT：升高。当食蟹猴的某一指标高出上限的1.5倍以上，或者某2个以上指标高于上限，可结合体况、B超情况作为重点筛查对象。 | 离心分层后上层血清无色透明TC：2 mmol/L～3 mmol/L；LDL-C：0.7 mmol/L～1.1 mmol/L；AI：0.31～1.66；CHE：4 500 IU/L～8 000 IU/L；ALT：22 IU/L～68 IU/L；AST：25 IU/L～57 IU/L；γ-GGT：39 IU/L～98 IU/L。 |
| 组织学评价 | （1）大于5%肝细胞形成边界清晰的空泡样变性；（2）按照光镜下每单位面积出现脂肪变性的程度进行分型：轻度：1/3～2/3的肝细胞脂肪变性；中度：2/3的肝细胞脂肪变性；重度：几乎所有肝细胞都发生脂肪变性。 | 肝小叶结构清晰，肝索结构清晰，少见炎性细胞浸润，胞浆中不出现空泡性变化。 |

1.
2. （资料性附录）
BCS评分标准

见表A.1。

* 1. BCS评分标准

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1 | 极度瘦弱：髋骨，面骨、棘突、肋骨明显突出（清晰可见、轻易触诊）；脊柱、坐骨等处可触诊到极少或无肌肉；肛门可凹陷隐于两臀胝间；身体非常消瘦，无皮下脂肪层，腹部平坦。 |  |
| 1.5 | 瘦弱：髋骨、棘突、肋骨突出；面骨可能突出；臀部和背部有极少肌肉覆盖；肛门可凹陷隐于两臀胝间；身体消瘦，无皮下脂肪层，腹部平滑。 |  |
| 2 | 瘦：有极少的脂肪存在；髋骨和棘突突出；臀部和腰部仅有少量肌肉覆盖以致可轻易触诊到髋骨、棘突、肋骨。 |  |
| 2.5 | 偏瘦：臀部和脊柱有一定肌肉覆盖，看起来更结实；能轻易触诊到髋骨和棘突，但不突出；有较薄的皮下脂肪层。 |  |
| 3 | 最佳体况：稍用力便可触诊到髋骨、肋骨、棘突，但一般不明显；发育良好的肌肉和皮下脂肪层使得脊柱和臀部平滑且结实；腹部、腋窝、腹股沟等处无脂肪垫。 |  |

表A.1 BCS评分标准（续）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 3.5 | 偏重：用力按压可触诊到髋骨、棘突，但不明显；骨质突起平滑；胸廓平滑，仅在用力按压时可触诊到肋骨；可有少量腹部脂肪垫存在。 |  |
| 4 | 超重：骨质突起平滑，界线不明显；存在较多的皮下脂肪层以致较难触诊到髋骨、棘突、肋骨；腋窝、腹股沟、腹部等处开始堆积脂肪沉积体。 |  |
| 4.5 | 肥胖：常有明显的脂肪垫堆积于腋窝、腹股沟和腹部等处；坐立或走动时腹部下垂；很难触诊到髋骨和棘突；骨质突起平滑且难以分界。 |  |
| 5 | 极度肥胖：腋窝、腹股沟、腹部等处存在明显的、较大的脂肪沉积体；存在大量的肠系膜脂肪以致腹部触诊困难；显著的脂肪沉积体或使其坐姿、行动发生改变；髋骨、胸廓、棘突触诊须用深触诊法方能进行。 |  |

1. （规范性附录）
采血及血液指标检查方法
	1. 主要试剂

皮肤消毒剂，麻醉剂。

* 1. 主要仪器

剃毛器、灭菌棉签、一次性采血针、无菌真空促凝采血管、离心机、动物血细胞分析仪、血液生化仪。

* 1. 检查方法
		1. 食蟹猴采血

动物禁食：动物在采血前进行禁食，禁食时间至少8h，以12h～1h为宜，但不宜超过16h，宜安排在早上7:00～9:00采血。禁食期间动物自由饮水。

保定和备皮：将食蟹猴进行猴椅保定或麻醉保定，对采血区域的皮肤进行被毛的剃除和消毒。

采集全血分离血清（用于血生化检测）：宜使用真空促凝管或真空血清分离管，从上肢头静脉肘外侧段或其它四肢浅表静脉采血，采血具体操作要求见WS/T 661。

血生化采血量一般不超过5mL，具体需根据检测项目需求进行计算。

采血后采血管常温静置1h～2h，待血清析出后，以3000r/min离心15min并分离血清，所得血清应澄清透明无溶血，溶血样本应重新采血制备血清。采血后立即轻轻倒转采血试管4～5次混匀标本,放置30min等待标本充分凝固，离心半径8cm，离心速度维持在3500～4000r/min离心10min。血清与血凝块完全被分离胶分离，血清标本可直接上机检测或转移至仪器配套试杯中。

* + 1. 血液样本的检测

脂肪肝血生化检测涉及肝功和多种血液酶类检测，应在采血2h内用血液生化仪进行血生化检测。

1. （规范性附录）
组织学评价方法
	1. 主要试剂

耦合剂、4%中性缓冲甲醛固定液、麻醉药物、止血药物、病理切片制备相关试剂。

* 1. 主要仪器

B超仪、一次性18G自动活检穿刺针、活检穿刺枪、无菌纱布、无菌棉球、病理切片制备相关仪器、显微镜。

* 1. 肝组织穿刺取材
		1. 动物准备

穿刺前对食蟹猴进行凝血功能检测，排除凝血功能障碍后方可进行肝脏穿刺。穿刺前动物须禁食 8h～12h。术前对动物进行麻醉并对右上腹肋间到腰部肋缘下区域进行备皮。

* + 1. 肝组织穿刺

用B超仪，多断面连续扫查，探明肝脏及肝小叶、大的血管、胆囊及胆总管的位置，并实时监测穿刺针进入肝脏的位置和深度。使穿刺目标与穿刺针位置在引导线内，并避开大血管和胆囊及肝内胆管。

活检穿刺针装入活检穿刺枪，取材标本长度宜设定为1.5cm。B超锁定目标切面后，穿刺针紧贴B超探头，垂直刺入皮肤，穿破肝包膜刺入肝实质约2cm后，按下穿刺枪尾部的扳机按钮。

* + 1. 样本固定

样本采集完成后迅速拔出穿刺针，用4%中性缓冲甲醛固定液固定所取出的肝组织2h～4h。

* + 1. 动物护理

穿刺针拔出后，用无菌纱布或棉球按压穿刺孔10min～15min，待穿刺孔无出血、呼吸平稳、睫毛反射正常后，可将动物放回笼舍。

* 1. 组织染色切片制备及阅片诊断

按照DB53/T 293.3—2009制备肝脏组织标本的常规石蜡切片、伊红-苏木精染色，并由有病理诊断经验和资质的病理学专业人员进行阅片诊断。

