



中华人民共和国国家标准

GB/T 21035—2007

饲料安全性评价 喂养致畸试验

Feed safety evaluation—
Feeding teratogenicity test

2007-06-21 发布

2007-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准是在参阅了 GB 15193.14—2003 致畸试验及国内外相关文献的基础上,根据我国技术发展水平研究制定的。

本标准由农业部畜牧业司提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准负责起草单位:中国农业大学动物医学院、中国兽医药品监察所。

本标准主要起草人:沈建忠、肖希龙、黄齐颐、张素霞、吴聪明。

饲料安全性评价 喂养致畸试验

1 范围

本标准规定了喂养致畸试验的基本技术要求。
本标准适用于饲料和饲料添加剂的致畸性评价。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB 14922.1 实验动物 寄生虫学等级及监测
GB 14922.2 实验动物 微生物学等级及监测
GB 14924.1 实验动物 配合饲料通用质量标准
GB 14924.2 实验动物 配合饲料卫生标准
GB 14924.3 实验动物 小鼠大鼠配合饲料
GB 14925 实验动物 环境及设施

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

妊娠率 gestation index

妊娠鼠数占确认交配雌鼠数的百分比。

3.2

分娩率 parturition index

分娩活仔雌鼠数占妊娠鼠数的百分比。

3.3

死胎率 fetal mortality

死胎仔数占分娩胎仔总数的百分比。

3.4

畸胎出现率 incidence of terata

畸胎总数占活胎仔总数的百分比。

3.5

畸胎总数 sum of terata

出现畸形的所有活胎仔数。

3.6

单项畸形出现率 incidence of single teratosis

出现某种畸形的活胎仔数占活胎仔总数的百分比。

3.7

活胎仔平均畸形出现率 mean incidence of teratosis

畸形总数占活胎仔总数的百分比。

3.8

畸形总数 sum of teratosis

所有活胎仔出现的各种畸形种类数。

3.9

母体畸胎出现率 incidence of terata parturition

分娩畸胎的母体数占妊娠母体总数的百分比。

4 试剂及其配制

除特别注明外,本法所用试剂均为分析纯,水为去离子水,符合 GB/T 6682 规定的二级用水要求。

4.1 乙醇固定液:95%乙醇。

4.2 鲍因(Bouins)固定液:取饱和苦味酸溶液 750 mL、40%甲醛 250 mL 和乙酸 50 mL 混合而成。

4.3 氢氧化钾溶液:分别配制 1%和 2%两种不同浓度的氢氧化钾溶液。

4.4 茜素红(alizarin red)贮备液:将茜素红加入 5 mL 乙酸、10 mL 纯甘油和 60 mL 1%水合氯醛的混合液中至饱和。

4.5 茜素红应用液:取茜素红贮备液 1 mL,加 1%氢氧化钾溶液至 1 000 mL,用前临时配制。

4.6 脱水透明液 A:甘油 20 mL、2%氢氧化钾溶液 3 mL,加蒸馏水至 100 mL。

4.7 脱水透明液 B:甘油 50 mL、2%氢氧化钾溶液 3 mL,加蒸馏水至 100 mL。

5 仪器与设备

5.1 实验室常用设备。

5.2 放大器和解剖显微镜。

5.3 游标卡尺(百分尺)。

6 实验动物及饲养管理

常用实验动物为大鼠、小鼠。

首选大鼠,雌雄比例为 1:1 或 2:1,大鼠交配时约 12~14 周龄,小鼠 9~10 周龄。使用清洁级大鼠和小鼠应符合 GB 14922.1 和 GB 14922.2 的要求。

实验动物饲养环境应符合 GB 14925 的规定,并注明动物饲养室的光照和通风条件,每天记录温度、湿度。笼养大鼠每笼不超过 5 只。饲料应符合 GB 14924.1、GB 14924.2 和 GB 14924.3 的规定。

7 剂量分组

至少设 4 组,即 1 个空白对照组(或溶剂对照组)和 3 个试验组。

试验组剂量一般选择在 1/10~1/100 母体 LD₅₀ 之间。高剂量一般应使母体产生中毒症状;低剂量应不引起母鼠产生可观察到的中毒症状;在高剂量组与低剂量组之间设 1 个~2 个中剂量组。设 1 个空白对照组(或溶剂对照组),必要时,还要设阳性对照组。每组孕鼠不能低于 12 只。

8 操作步骤

8.1 受试物给予与观察

一般采用混饲或混饮给予受试物。原则上雄鼠交配前 4 周~8 周开始给予受试物直至交配成功,确证雌鼠受孕为止。雌鼠从交配前 2 周~4 周开始给予受试物至孕期的第 13 天~第 15 天。在试验期间,每天观察试验鼠的体征、行为活动、采食和饮水情况。每周至少称 1 次体重,并同时计算采食量。

8.2 受孕检查

雌、雄大鼠按 1:1(或 2:1)同笼后,每日早晨检查笼底有无阴道栓(石蜡状圆柱体)或用浸湿生理盐水的棉签取阴道分泌物涂布于滴有 1 滴生理盐水的玻片上,置低倍显微镜下检查有无精子。发现阴道栓或精子的当天定为孕期的 0 d。一般每组应获得 13 只~15 只受孕鼠,以保证实验结束时妊娠母鼠数不少于 12 只。

8.3 孕鼠称重

孕鼠于孕期的 0 d、7 d、14 d 和 20 d 称重,以观察孕鼠的体重变化,随时注意记录孕鼠的状况。

8.4 孕鼠处死和检查

大鼠在孕期第 20 天(小鼠第 19 天)将孕鼠处死。沿腹中线剖开腹腔,取出子宫。分别检查并记录左、右侧卵巢黄体数、窝重(子宫连胎鼠)、子宫重、着床数、活胎数、死胎数(含早期及晚期死胎)和吸收胎数。

8.5 活胎鼠检查

逐个记录活胎鼠体重、性别、体长,外观检查头颅外形、面部、躯干、四肢等有无畸形,包括露脑、脑膨出、眼部畸形(小眼、无眼、睁眼等)、鼻孔扩大、单鼻孔、唇裂、脊柱裂、四肢及尾畸形等等。

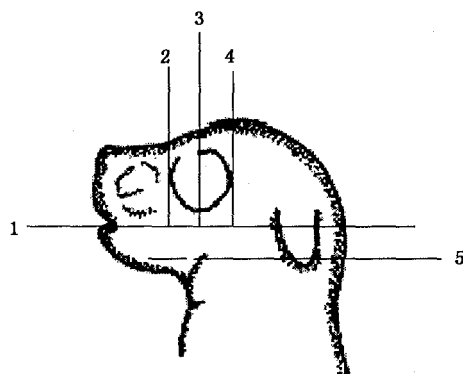
8.6 胎鼠骨标本制作与检查

将每窝二分之一的活胎(奇数或偶数)放入乙醇固定液(4.1)中固定 2 周~3 周。取出胎仔(可去皮、去内脏及脂肪)流水冲洗数分钟,放入至少 5 倍于胎仔体积的 1%~2%氢氧化钾溶液(4.3)中作用 8 h~72 h,然后将胎仔放入茜素红应用液(4.5)中染色 6 h~48 h,并轻摇 1 次/d~2 次/d,至头骨染红为宜。再将胎仔放入透明液 A(4.6)中 1 d~2 d,放入透明液 B(4.7)中 2 d~3 d,待骨骼红染而软组织基本褪色为止。将胎仔标本放入小平皿内,用透射光源,在体视显微镜下作整体观察,逐步检查骨骼。

检查时先测量囟门的大小、矢状缝的宽度、头顶间骨及后头骨缺损情况,然后检查胸骨的数目、缺失或融合(胸骨为 6 个,骨化不完全时首先缺第 5 胸骨、次缺第 2 胸骨),检查肋骨(肋骨通常为 12 对~13 对,常见畸形有融合肋、分叉肋、波状肋、短肋、多肋、缺肋、肋骨断裂),检查脊柱发育、椎体数目(颈椎 7 个,胸椎 12 个~13 个,腰椎 5 个~6 个,骶椎 4 个,尾椎 3 个~5 个)以及椎骨有无融合、纵裂等,最后检查四肢骨。

8.7 胎鼠内脏检查

将每窝二分之一的胎鼠放入鲍因固定液(4.2)中,两周后作内脏检查。先用自来水冲去固定液,将鼠仰放在石蜡板上,剪去四肢和尾,用刀片从头部到尾部逐段横切或纵切。观察不同切面器官的大小、形状和相对位置。切面制作见图 1。



- 1——经口从上腭与舌之间向枕部横切(切面 1),可观察大脑、间脑、正脑、舌及顎裂;
- 2——从眼眶前缘垂直纵切(切面 2),可观察鼻道、鼻中隔;
- 3——从头部经眼球中央垂直纵切(切面 3),可观察眼球、视网膜、嗅球;
- 4——从头部最大横位处纵切(切面 4),可观察大脑及脑室;
- 5——沿下顎水平穿过颈部横切(切面 5),可观察舌、咽、气管、食管和延髓。

图 1 胎鼠切面制作示意图

以后自腹中线剪开胸、腹腔,依次检查心、肺、横膈膜、肝、胃、肠等脏器的大小、位置,查毕将其摘除,再检查肾脏、输尿管、膀胱、子宫和睾丸位置及发育情况。然后将肾脏切开,观察有无肾盂积水与扩大等。

9 统计处理和结果评价

根据检查情况,分别计算各组实验动物的妊娠率、分娩率、死胎率、畸胎出现率、单项畸形出现率、活胎仔平均畸形出现数、母体畸胎出现率等。计算畸胎总数时,1个活胎仔出现1种或1种以上畸形均记为1个畸胎;计算畸形总数时,如1个活胎仔表现出几种畸形,则应将相应数目记入总数。

选用 χ^2 检验或方差分析对试验结果进行分析评价。如试验组的上述指标显著高于对照组,并有剂量-反应关系,可判定受试物具有致畸作用。
