

外审专家一审稿意见：

该报道具有一定的创新性，为微屏障系统在某些特定的使用场景下的应用，提供了一定的数据支撑。建议修后发表。以下是一些审稿意见：

1. 文章中有部分描述不准确或信息不全：
 - 1) 设施中对屏障系统的描述；
 - 2) 笼盒底面积准确数值需要核查；
 - 3) 饲养管理中，日常换笼和实验操作在何种条件下需补充；
2. 动物微生物检测的结果（表二）建议调整格式，能够体现出分别在第几季度并且 EVC 检出的比例是多少。
3. 建议在今后的进一步研究中，增加新进哨兵鼠的微生物检测，以排除购买的哨兵鼠本身携带病原菌。另外，建议进一步探究两种环境条件致病菌的源头来自于哪，是环境中的，还是动物或者物品中的。

外审专家二审稿意见：

本研究尝试在普通设施环境中用微屏障笼具来维持清洁级小鼠的繁育及实验研究，本文立意清晰，作者希望表达在动物试验的动物设施使用中，有时候不必高配，并且用具体的实验数据证明了清洁级啮齿类动物可以饲养在普通环境这一观点是值得推广的，避免动物设施的高配及便于操作均是很好的点。

但是在本人看来，本文中有些观点及论证是不正确的，具体如下，谨供作者考虑。

1. **前言部分对屏障系统的评价：**作者在文中写道“国家标准 GB14925-2010《实验动物 环境及设施》第 3.6 条款约定屏障环境为：‘符合动物居住要求、严格控制人员、物品和空气的进出，适用于饲育清洁级和/或无特定病原体级实验动物’^[1]。但这并不意味着屏障设施就是确保微生物等级的硬性指标和不可或缺的条件。且不论建设及维护屏障设施的巨大投入，在科研实践中屏障的存在也给使用者进出设施带来诸多不便。那么是否有既可以实现对微生物的控制，又能够做到使用者设施进出方便的替代系统呢”。但实际上，需要确认以下几点：
 - a) 动物设施的设计不是为了进出方便而设置的，屏障系统有屏障系统的用途，
 - b) 本文的意义不是推翻屏障系统的设置，而是在于用数据来推论今后可以使用普通环境+微屏障可以饲养清洁级小鼠，在某些动物实验可以这样操作。但是，并不是所有的实验均可以这样操作的。
 - c) 这个论点不太合适，因为不同等级的动物设施存在是需要满足各种实验的要求，尤其是屏障设施的存在是有必要性的。不能因为作者的观点就推翻屏障系统的存在。
2. 正文部分：
 - 1.2.2 **微屏障饲养区：**作者写道：“大鼠微屏障笼具用来群养小鼠”，因为作者还有小鼠饲养的微屏障，为什么需要用大鼠的笼盒来饲养小鼠？
 - 1.4.1 **进出流程：**为什么进入屏障系统需要穿手术衣+洁净服？绝大部分机构均需穿洁净服就可以了。此穿衣的要求原因是？
 - 1.4.2 **饲养管理：**文中写道“根据国标 GB 14925-2010《实验动物 环境与设施》中的相关规定，笼盒、笼盖、粮槽、垫料、饮用水在使用前经高压灭菌锅 121℃ 高温灭菌处理，设定笼盒、水瓶的更换频率为一周到二次，笼盖、料槽每两周更换一次，笼盒上的过滤器每三个月更换一次”；理解作者的原意，但是这样描述会对读者带来歧义，国标没有这样写要求，这段话容易引起对国标的歧义。
 - 2.1 **环境微生物检测：**文中写道“屏障饲养区有四次检测出落下菌，。。。。。。微屏障饲养区有 7 次检测出落下菌”。需要确认：a) 请检查屏障饲养区与为屏障饲养区微生物检出数量是否准确？从图上看不止；b) 另外请统一使用数字的描述，文字使用（四次，7 次）。

2.2 动物微生物检测:作者写道“但随着设施使用时间的延长,在后4次检测中屏障饲养区有2次检出嗜肺巴斯德杆菌和绿脓杆菌;微屏障饲养区有4次检出嗜肺巴斯德杆菌和2次检出绿脓杆菌。这两种病原菌并不在清洁级小鼠需排除列表中,说明设施内的小鼠符合清洁级指标要求”。作者的论证不太准确,设施使用时间长不是检查出病原微生物的可检出的原因。有的实施10-15年还可以保证无病原微生物的检出。动物实施无论是屏障还是普通实施有病原微生物的主要原因是管理及清洁消毒不够完善,主要的原因还是人、物、动物带入及操作过程中的交叉污染。虽然有些条件性致病病原微生物不在清洁级小鼠微生物检测的排除列表中,但是,管理人、物及动物也可以将此排除。可以看到,作者设施前期运行控制的不错,并没有上述病原微生物产生,说明设施的良好管理可以免除病原微生物,设施的老化不是产生病原微生物的结果。更不能推断屏障是老化,普通环境可以接受。

2.3 设施使用便捷度:作者写道“随机记录6位同时使用屏障和微屏障饲养区的实验人员5次进入不同饲养区所需时间结果显示:实验人员进入屏障饲养区平均用时为 281 ± 23 秒,而进入微屏障饲养区平均用时仅为 74 ± 4 秒。进入屏障饲养区的耗时是微屏障饲养区4倍,说明进入微屏障饲养区更便捷(图四)。”这个推论是不太正确的,原因有:

a) 设施的使用频率没有可比性。这个数据对作者单位可以,但是不能用此推论大部分机构进入屏障还是普通设施的多少次数,因为进入屏障还是普通设施的次数多是根据实验的安排来的,不是因为屏障需要更衣时间长,大家就不进屏障。

b) 进入普通设施的时间一定会比进入屏障设施的时间短,因为整个使用的个人防护用品的使用都不一样,但是便捷不是使用微屏障的理由。建议作者换个思路去写在什么情况下可以使用微屏障+普通设施而不用屏障设施。仅用进出人数及便捷程度不是很好的解释。

3. 讨论部分:根据文本及审阅意见,这些论点有的不太适合,建议换个思路去讨论为什么有些实验可以用微屏障在普通设施做将更有说服力。

4. 建议修后发表。

作者针对外审意见的修回说明:

专家一审稿意见: (修改说明见红色字体)

1.章中有部分描述不准确或信息不全,须补充,包括:

1)设施中对屏障系统的描述。

谢谢审稿人的建议,我们已经在修订稿的1.2.1屏障饲养区章节的描述中增加了更详细的说明,详见修订稿p2。

2)笼盒底面积准确数值需要核查。

谢谢审稿人的建议,我们已核查,并在修订稿的1.3微屏障笼具章节中修改,详见修订稿p4。

3)饲养管理中,日常换笼和实验操作在何种条件下进行?

谢谢审稿人的建议,日常换笼在换笼工作台进行,实验操作在超净台中进行。在修订稿的1.4.2章节中已添加补充,详见修订稿p6。

2.动物微生物检测的结果(表二)建议调整格式,能够体现出分别在第几季度并且EVC检出的比例是少。

谢谢审稿人的建议,更改了表二的提呈方式,按照季度进行了划分,详见修订稿p10。屏障饲养区和微屏障饲养区的微生物检出比例已补充在文稿中,详见修订稿p11。

3 建议在今的进一步研究中,增加新进兵鼠的微生物检测,以排除购买的哨兵鼠本身携带病原菌。另

外，建议进步探究两种环境条件致病菌的源头来自于哪，是环境中的，还是动物或者物品中的。

谢谢审稿人的建议，后续管理中会关注引进动物质量检测。

专家二修改意见：

1 对屏障系统的评价:作者在文中写道“国家标准 GB14925-2010《实验动物环境及设施》第 3.6 条款约定屏障环境为:“符合动物居住要求、严格控制人员、物品和空气的进出，适用于饲养清洁级和/或无特定病原体级实验动物”。但这并不意味着屏障设施就是确保微生物等级的硬性指标和不可或缺的条件。且不论建设及维护屏障设施的巨大投入，在科研实践中屏障的存在也给使用者进出设施带来诸多不变。那么是否有既可以实现对微生物的控制，又能够做到使用者设施进出方便的替代系统呢

a)动物设施的设计不是为了进出方便而设置的，屏障系统有屏障系统的用途

b)本文的意义不是推翻屏障系统的设置，而是在于用数据来推论今后可以使用普通环境+微屏障可以饲养清洁级小鼠，在某些动物实验可以这样操作。但是，并不是所有的实验均可以这样操作的。

c)这个论点不太合适，因为不同等级的动物设施存在是需要满足各种实验的要求，尤其是屏障设施的存在是有必要性的。不能因为作者的观点就推翻屏障系统的存在。

谢谢审稿人，但无法完全同意审稿人的意见，因为本文并非要推翻屏障系统的存在，只是想表达一个观点：动物的微生物防控应该除了依据国标外，还要考虑使用者的需求。僵化的一刀切并不可取。

1.2.2 微屏障饲养区:作者写道:"大鼠微屏障笼具用来群养小鼠“因为作者还有小鼠饲养的微屏障为什么需要用大鼠的笼盒来饲养小鼠?

谢谢审稿人的提问，对此说明如下：大鼠笼盒来饲养小鼠是用于一些需要更多动物在一起的群养实验。

1.4.1 进出流程:为什么进入屏障系统需要穿手术衣+洁净服?绝大部分机构均需穿洁净服就可以了。次穿衣的要求原因是?

谢谢审稿人的提问，对此说明如下：设施刚启用时，考虑为更好地降低由人带入病原微生物而引发设施污染的风险，制定了需加换手术衣的这项规则。实施下来觉得影响不大，后期设施运行会对更换手术衣不做强制要求。

1.4.2 饲养管理:文中写道“根据国标 GB 14925-2010《实验动物环境与设施》中的相关规定，笼盒、笼盖、粮槽、垫料、饮用水在使用前经高压灭菌锅 121 日高温灭菌外理，设定笼盒、水瓶的更换频率为一周一到一次，笼盖、料槽每两周更换一次，笼盒上的过滤器每三个月更换一次”;理解作者的原意，但是这样描述会对读者带来歧义，国标没有这样写要求，这段话容易引起对国标的歧义。

谢谢审稿人的建议，已在修订稿中的 1.4.2 章节做出修改，详见修订稿 p6。

2.1 环境微生物检测:文中写道“屏障饲养区有四次检测出落下菌，。。。。。。微屏障饲养区有 7 次检测出落下菌，

1 检查屏障饲养区与为屏障饲养区微生物检出数量是否准确?从图上看不止;

2.另外请统一使用数字的描述, 文字使用 (四次、7 次)。

谢谢审稿人的建议, 对此说明如下:

1.检出数量没有问题, 屏障饲养区 4 次; 微屏障饲养区 7 次。修订稿中对图三增加了标注, 详见修订稿 p9。

2.已修改为统一数字描述, 详见修订稿 p9。

2.2 动物微生物检测:作者写道“但随着设施使用时间的延长, 在后 4 次检测中屏障饲养区有 2 次检出嗜肺巴斯德杆菌和绿脓杆菌;微屏障饲养区有 4 次检出嗜肺巴斯德杆菌和 2 次检出绿脓杆菌。这两种病原菌并不在清洁级小鼠需排除列表中, 说明设施内的小鼠符合清洁级指标要求”。作者的论证不太准确, 设施使用时间长不是检查出病原微生物的可检出的原因。有的实施 10-15 年还可以保证无病原微生物的检出。动物实施无论是屏障还是普通实施有病原微生物的主要原因是管理及清洁消毒不够完善, 主要的原因还是人、物, 动物带入及操作过程中的交叉污染。虽然有些条件性致病病原微生物不在清洁级小鼠微生物检测的排除列表中, 但是, 管理人、物及动物也可以将此排除。可以看到, 作者设施前期运行控制的不错, 并没有上述病原微生物产生, 说明设施的良好管理可以免除病原微生物, 设施的老化不是产生病原微生物的结果。更不能推断屏障是老化, 普通环境可以接受。

对于审稿人的意见不太赞同。本人未见 10-15 年保证无病原微生物的研究文献。另外, 本文并没有在确保没有微生物检出的时间上进行对比, 也没有得出“设施老化”和“普通环境也能接受”这些结论, 烦请再斟酌。

2.3 设施使用便捷度;作者写道:“随机记录 6 位同时使用屏障和微屏障饲养区的实验人员 5 次进入不同饲养区所需时间结果显示:实验人员进入屏障饲养区平均用时为 281 ± 23 秒, 而进入微屏障饲养区平均用时仅为 74 ± 4 秒。进入屏障饲养区的耗时是微屏障饲养区 4 倍, 说明进入微屏障饲养区更便捷(图四)。”

这个推论是不正确的, 因为设施的使用频率没有可比性。这个数据对作者单位可以, 但是不能用此推论大部分机构进入屏障还是普通设施的 duoshao1 次数, 因为进入屏障还是普通设施的次数多是根据实验的安排来的, 不是因为屏障需要更衣时间长, 大家就不进屏障。

进入普通设施的时间一定会比进入屏障设施的时间短, 因为整个使用的个人防护用品的使用都不一样, 但是便捷不是使用微屏障的理由。

谢谢审稿人的建议, 对此说明如下。图四是用来说明: 在同样条件下, 使用者更愿意选择进出方便的微屏障。另外, 本文想表达的是在保障动物质量前提下, 应尽量方便使用者进出。

建议作者换个思路去写在什么情况下可以使用微屏障+普通设施而不用屏障设施。仅用进出数及便捷程度不是很好的解释

针对审稿专家提出的质疑，本文在文字表达上尽量做了一些修改，以便读者能准确理解本文所要表达的观点。

定稿会时常务编委一终审意见：

本文用两年的工作实践及检测数据证明了清洁级啮齿类动物可以饲养在普通环境加微屏障笼具中。这种微屏障加 EVC 是另外一种形式的 IVC，其在普通环境下能够饲养符合国标清洁级标准动物，在工作实践中有一定的应用场景及参考价值。外审两位专家都认可并同意该文章的参考价值，并提出了自己的观点。作者针对二位一审专家的意见进行了回复，达到预期的效果。文章语句通顺，观点明确，建议修改后发表。修改意见：

- 1) 在屏障和非屏障系统均出现国标 SPF 级动物需要排除的病原菌，需要作者探讨这种病原未能控制的可能原因：是购进野生型动物的质量问题，系统性问题，还是管理问题？如果是应用微屏障的系统性问题，则微屏障笼具对清洁级动物的病原控制（尤其是其他细菌性病原）有一定的风险。
- 2) 请作者参考李启富等 2007 年发表在《实验动物科学》中的论文《裸小鼠在普通环境中使用 IVC 笼具生产繁殖的初探》，其结论是在普通环境中应用 IVC 笼具，只要注意室内卫生消毒，在净化工作台上无菌操作，能够达 SPF 级，繁殖合格的裸小鼠。请讨论说明本文饲养模式与普通环境加 IVC 饲养模式的异同点及创新点在哪里？
- 3) 作者在前言中说“但这并不意味着屏障设施就是确保微生物等级的硬性指标和不可或缺的条件。”这句话本身没有问题，但本文采用的“微屏障笼具”实际上是把大的屏障设施的功能用“微屏障设备”替代，故文章在强调大的屏障设施的非必要性的同时，还需在讨论中强调利用小的“微屏障设备”时，规范操作维持“屏障”效应的必要性，以便读者能够准确掌握实验动物病原控制的基本原则。
- 4) 图 4 意义不大，相关数据文中已有说明，删除。

定稿会时常务编委二终审意见：

本研究用两年来的运行实践和微生物检测数据证明普通环境里放置 IVC 或 EVC 等微屏障笼具可以维持实验动物一定时间内的微生物控制质量（清洁级），具有一定的发表价值。但其推广应用是否符合国标尚有一定争议，而且新的国家标准可能会取消清洁级这一动物分级。所以，本文供行业交流与探讨吧。以下几点细节建议修改：

1. 材料与方法中 1.1，请标注动物来源单位的生产许可证号；“C57BL/6slac 小鼠”的品系名书写方式不准确，请与供应商核对；“F1（B6:DBA/2）代小鼠”的表述改为“B6D2F1 小鼠”，如果亲本 B6 为雄性、DBA/2 为雌性，则为“D2B6F1 小鼠”。
2. 材料与方法中 1.2，请标注设施使用许可证号。
3. 材料与方法中 1.4，请标注饲料生产许可证号。
4. 修改后建议在“经验交流”中发表。

作者针对终审意见再修回说明：

修改说明在下文中用红色字体标示

1) 在屏障和非屏障系统均出现国标 SPF 级动物需要排除的病原菌，建议作者探讨这种病原 未能控制的可能原因：是购进野生型动物的质量问题， 系统性问题， 还是管理问题？如果是 应用微屏障的系统性问题，则微屏障笼具对清洁级动物的病原控制(尤其是其他细菌性病原) 有一定的风险。

——感谢专家的建议，根据我们的了解， 出现的噬肺巴斯德杆菌和绿农杆菌这两种 SPF 级小鼠需要排除的微生物是供应商经常被检测的微生物，因此我们怀疑，这两种微生物来自供应商。我们在修回稿的讨论中已经添加了这部分论述，详见 p15。

2) 建议作者参考李启富等 2007 年发表在《实验动物科学》中的论文《裸小鼠在普通环境中 使用 IVC 笼具生产繁殖的初探》，其结论是在普通环境中应用 IVC 笼具, 只要注意室内卫生

消毒, 在净化工作台上无菌操作， 能够达 SPF 级，繁殖合格的裸小鼠。请讨论说明本文饲养 模式与普通环境加 IVC 饲养模式的异同点及创新点在哪里？

——感谢专家的建议，我们阅读了 2007 年的文章《裸小鼠在普通环境中使用 IVC 笼具生产繁殖 的初探》仅仅是报道用 IVC 在普通环境下饲养裸小鼠，并没有对其动物及环境进行微生物检测， 因此很难说该报道饲养的小鼠达到了 SPF 级。因此，我们认为对我们的工作没有参考意义。该文主要强调的是动物繁育，而本研究主要考察微屏障饲养条件下微生物质量控制，因此这两种饲养模式无法进行异同点对比。

3) 作者在前言中说“但这并不意味着屏障设施就是确保微生物等级的硬性指标和不可或缺 的条件。”这句话本身没有问题，但本文采用的“微屏障笼具”实际上是把大的屏障设施的 功能用“微屏障设备”替代，故文章在强调大的屏障设施的非必要性的同时，建议在讨论中 强调利用小的“微屏障设备”时，规范操作维持“屏障”效应的必要性，以便读者能够准确 掌握实验动物病原控制的基本原则。

——感谢专家的建议，我们在讨论中做了补充，特别强调了“规范操作”。详见 p15。

4) 图 4 意义不大，相关数据文中已有说明， 建议删除。

——感谢专家的建议，已在修回稿 2.3 设施使用便捷度章节中删除，详见 p14。

5) 材料与方法中 1.1，请标注动物来源单位的生产许可证号；“C57BL/6slac 小鼠”的品系 名书写

方式不准确，请与供应商核对：“F1 (B6:DBA/2) 代小鼠”的表述改为“B6D2F1 小鼠”，如果亲本 B6 为雄性、DBA/2 为雌性，则为“D2B6F1 小鼠”。

——感谢专家的建议，已在修回稿中材料与方法中 1.1 章节做出修改及补充，详见 p3。

6) 材料与方法中 1.2，请标注设施使用许可证号。材料与方法中 1.4，请标注饲料生产许可证号。

——感谢专家的建议，已在修回稿材料与方法中 1.2 和材料与方法中 1.4 两个章节中补充，详见 p4 和 p8。

7) 修改后建议发表，并辅以编委点评，效果可能更好。——同意。

8) 部分修改意见及示范请见以下正文中修订示范及标注。——均按要求修改完善。

9) 文章写作格式请对照本刊 2022 年第 4 期已发表论著文章格式进行补充和规范。如首页文章脚注信息里基金资助具体项目名称和作者 ORCID、文末作者贡献及利益冲突声明、图表中英文对照等。

——感谢专家的建议，已在修回稿中更改及添加，详见文章首页及末页。第一作者 ORCID 号没有，所以没有补充。

鉴于本文的创新性及可能存在的行业争议，出刊时本刊执行主编特别

撰写了一段专家点评：

本文介绍的微屏障系统是一种空气经过三级过滤的正压屏障系统，配合 EVC 笼具、超净台等设备，可在普通环境下用于清洁级小鼠的饲养。研究结果为微屏障系统在某些特定场景下的应用提供了数据支撑。这是国内第一次介绍微屏障+EVC 的小鼠饲养模式，具有一定的创新性。

本刊认为该文有几点值得关注：

1) 尽管该微屏障系统是一种新的动物饲养设备，但微屏障内的环境指标是根据国家标准设置的，其推广应用没有原则性问题。

2) 目前已有不少普通环境下采用 IVC 饲养小鼠的报道，使用这两种模式饲养小鼠的优劣性值得关注。

3) 微屏障是另外一种形式的屏障系统，使用微屏障笼具饲养动物时，要求小鼠饲养员和实验人员必须严格按照 SOP 操作，以减少因操作不当带来的污染风险。

3) 本研究采用微屏障饲养的小鼠检出了 SPF 级实验小鼠需要排除的嗜肺巴斯德杆菌和绿脓杆菌，尚未能确定它们的来源。正在酝酿的新的国家标准有可能会取消清洁级这一分级，如何界定携带相关病原的动物级别尚不清楚，新的国家标准是否会影响微屏障的使用需要引起注意。

总之，本文值得业内同行进一步交流与探讨。