



实验鼠群的健康监测管理

庞万勇¹, 贺争鸣², 何 诚³, 朱德生⁴, 赵德明³

(1. 赛诺菲研发中心药物安全评价和动物实验部, 北京 100022; 2. 中国食品药品检定院实验动物管理处, 北京 100050; 3. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193; 4. 北京大学实验动物中心, 北京 100876)

【摘要】 虽然实验鼠种群的总体健康水平得到了显著的提高, 但还是有很多重要的传染性病原体在实验鼠群中流行。实验鼠群的健康状况对于动物福利、科学研究甚或人类健康都很重要。所以必须要对实验鼠群进行健康监测。笔者依据自身的实践和经验, 对鼠群健康监测的基本原理进行了分析, 包括以下的内容: 鼠群健康监测的必要性、健康检测规程的建立、哨兵鼠、常用的监测方法、样本采集原则、对检测结果的解读和应对。相信读者在了解这些基本的原理后, 能设定出符合自身设施实际的鼠群健康监测计划并逐步在实践中完善。

【关键词】 实验鼠群; 健康监测; 哨兵鼠; 管理

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)10-11-0087-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.10.11.020

Health Surveillance for Laboratory Rodent Colonies

PANG Wan-yong¹, HE Zheng-ming², HE Cheng³, ZHU De-sheng⁴, ZHAO De-ming³

(1. Disposition Safety, Animal Research and Welfare, Sanofi R&D, Beijing 100022, China; 2. Department of Administration of Laboratory Animals, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 3. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 4. Laboratory Animal Center, Peking University, Beijing 100876, China)

【Abstract】 In recent years, the health status of laboratory rodent colonies is dramatically improved. However, there are still quite a few important infectious microorganisms staying prevalent or emerging in the laboratory rodent colonies. The health of laboratory rodents affects their suitability for research, accuracy and integrity of research data, animal welfare and human health. Therefore, an animal health quality control program, often termed health surveillance, health monitoring, is important to any research facility. Based upon authors' hands-on experiences, the basic principles of health monitoring program were summarized as follows; the necessity of health monitoring, how to develop an effective health monitoring program, sentinel program, common testing methodologies, sampling strategy, and how to interpret and respond to health monitoring results. An effective and practical health monitoring program should be established based on those aforementioned principles, and being consummated during implementation.

【Key words】 Laboratory rodents; Health surveillance; Sentinels; Management

近几十年来,实验鼠种群的总体健康水平得到了显著的提高,但还是有很多对人类和/或动物健康以及对动物实验研究有影响的病原体在实验鼠群中流行。实验小鼠大概占到生物医学领域中所用实验动物总数的80~90%,尤其基因工程鼠的使用成对数增长。疾病的发生和流行受到遗传学、环

境因素(如饲料、垫料、传染病等)等的影响。基因工程鼠因为其遗传改变所以其免疫状况和对传染性疾病和其它疾病的易感性和临床表现都可能和其它普通的实验鼠不一样。因此基因工程鼠群的健康管理更复杂更具挑战性。因为实验动物的健康状况会直接或间接地影响到科学研究,所以对任

何实验动物设施而言,动物健康质量控制规划,或简单称之为动物健康监测,都是很重要的。

1 进行实验鼠群健康监测的必要性

实验动物的健康状况会影响到其在科研中的使用,对科研本身、人类健康(如人畜共患病)和实验动物种群都有可能造成影响。实验大、小鼠的传染性病原体一般不会造成明显的临床疾病,但多造成亚临床感染,个别病原体的强毒株除外。亚临床感染虽然不引起明显的临床病症和死亡,但是这些感染对生理学、免疫学、甚或形态学的影响都可能影响到实验结果的科学性、真实性和可重复性。例如小鼠肝炎病毒感染,在免疫学方面,因为病毒在巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞内增殖所以会影响到这些细胞的功能、可激活自然杀伤细胞并诱导干扰素的生成、可造成免疫刺激或抑制(因感染时机不同而异)、减少脾细胞体外培养时细胞因子的生成、永久性地降低皮肤移植排斥反应、并在疾病恢复后永久性降低 T 细胞依赖性的抗体应答。在微生物学方面,降低对病毒如仙台病毒和鼠肺炎病毒的易感性、增强对鼠伤寒沙门氏菌的抵抗性。在生理学方面,改变肝脏酶的水平 and 蛋白合成、改变外周血计数、增强单核细胞的促凝血活性、降低 NOD 小鼠糖尿病的发生率。在肿瘤学方面,改变肿瘤传代间隔和肿瘤侵袭性、污染移植性肿瘤等。亚临床感染需要用灵敏的和精确的监测方法进行确定。实验鼠群健康管理的一个首要目标就是确定种群中是否存在某些特定的病原体,所以健康监测有时可称为微生物监测。

现代实验鼠群存在的有些传染性病原可能是因为与人类接触或由野生鼠污染所致,所以一种或多种新的或已从种群中净化出去的病原体重新入侵的风险依然存在。因此建立并执行全面的种群健康监测对于确保人类健康、动物健康福利、以及实验研究结果的有效性和可重复性是非常重要的。

2 实验鼠群健康监测规程的建立

首先要做好风险分析。实验机构需要了解在其设施里饲养和使用的实验动物有哪些品种及其健康状况如何、有无和有哪些基因工程鼠、过去/现在和未来会有什么研究项目涉及到实验动物的使用和生物材料的使用、实验设施的类型(屏障或普通环境、以及人流、物流、动物流和气流等)、生物安

全措施(包括实验动物供应商的遴选、不同种属的和不同来源的动物分开饲养、隔离检疫、生物材料的微生物污染监测、虫害控制措施等)、既往健康问题、实验动物供应商的动物健康状况、引入新动物或生物材料的频度、(单位内外的)动物运输情况等。然后还要通过文献查询、专家咨询等途径了解当前在实验鼠群所流行的疾病,主要侧重于传染性疾病,特别是相关品系或基因工程鼠对相关疾病的易感性、病理学、临床表现和对科研的影响。这样才能分析出传染性病原体入侵实验动物设施的隐患大小,以及入侵后是否能和如何限制或根除感染。

其次是要对监测项目即病原进行选择。在选择病原之前,应该了解选择病原进行监测的标准或理由。理论上讲,应该选取可影响到科研以及动物和人的健康的病原(如人畜共患病病原)进行监测,尤其是那些如果检测到以后可以采取控制措施最好是能根除的病原。可以理解为如果必须监测的病原监测结果为阳性,但是又没有将其根除的办法,则可不再监测或减少监测频度(如果依据法律法规必须强制性监测的话)。另外也应该考虑到所涉及动物的微生物等级。例如,悉生动物应该检测所有的外源性微生物。无特定病原体动物应该按照相应的标准(在中国主要的依据是现行版的《实验动物微生物学等级及监测》国家标准)来监测,如不应该有外寄生虫、多细胞的体内寄生虫、以及致病性的肠道原虫。另外不应该有大多数外源病毒感染或没有针对它们的抗体,因为病毒都寄生于细胞内会影响细胞的代谢和功能并影响机体的防御机制。对细菌的监测要依动物的免疫状况而定,如无免疫缺陷的动物只要没有少数的“原发性”细菌病原就可适用于绝大多数的研究,但对于免疫缺陷动物而言则还要监测那些条件性病原菌甚至于监测“正常菌群”中的个别细菌,因为它们可能引起免疫缺陷动物的疾病。关于应该监测或不监测哪些病原,国际上现在尚无统一的标准,这也是实验动物生产商和使用单位之间经常讨论的一个热点问题。相关病原的监测与否请参考相关指南,如美国国立卫生研究院出版的由日美科学家编撰的“Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals”、欧洲实验动物学会联盟(FELASA)的相关指南、美国密苏里大学实验动物疾病诊断实验室(RADIL)和美国 Charles River Laboratories 的相关网站,可作为参考。北美的大多数研究机构对常见的

病毒至少每季度监测一次,然后每年度进行完全的病毒监测,并对细菌进行选择性的监测。对寄生虫的监测,一般是每季度作内部监测,或使用第三方实验室做年度检测。欧洲的情况也大体差不多,或者说对核心的重要的病原的监测在国际上都比较一致。每个单位应该建立一份具有单位特色的清单,列出实验设施里不应该有的或者说应该排除的病原,即应该进行监测的病原清单。这种清单,不是一成不变的,而应该是与时俱进的,因为不断有新的病原出现也会有老的病原发生新的变化。因为有很多关于病毒致病性及其对科研影响的文献,所以病毒的清单一般比较好建立。虽然有的病毒可能不致病,但通行的共识是实验鼠群不应该有病毒感染。一个问题就是有无必要对一些已经早就从实验鼠群根除的病毒,如小鼠胸腺病毒、鼠多瘤病毒等,进行监测。比较保险的做法是进行监测,但监测频率可依监测阴性结果而酌情递减。关于寄生虫,对其是否对研究有影响及影响大小知之甚少。但寄生虫的检出可揭示动物种群的清洁状况差,或揭示屏障体系有疏漏或与野鼠有直接或间接的接触(如非致病性鞭毛虫如毛滴虫),因此常常应该监测寄生虫并从种群中净化出去。有关细菌的选取则很复杂,与病毒不同的是,我们经常通过评估其能否导致病变或临床症状的能力来认定细菌对于实验鼠的重要性,这是因为我们对大多数细菌对宿主造成其它影响和干扰研究的“潜能”知之甚少。而且,目前对于众多的啮齿类动物的细菌如嗜肺巴氏杆菌和巴氏杆菌属的其它成员(如鼠放线杆菌、鼠流感嗜血杆菌)的分类和鉴定的认识尚有诸多不足,所以难免造成误判,而且由于对它们的特性了解不多,因此妨碍了净化效率。有研究表明鼠的某些生长因子依赖性的巴氏杆菌与副流感嗜血杆菌密切相关(因此其传播可能源于人类)。尚不清楚是否可以将这些细菌从实验鼠群中根除,因为屏障设施生产的鼠会接触到人类,因此有再感染的风险。另外人类是大肠杆菌、克雷伯氏菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌等的宿主,所以也会有人将这些细菌传播给鼠的可能性。有些细菌可能在实验鼠群中不常见,如念珠状链杆菌,许多设施都监测该菌,这是因为该菌引起一种叫做鼠咬热的人畜共患病,而且可作为衡量是否有野大鼠污染的标志。再如卡氏肺孢子虫在实验大鼠群中存在,而且并不少见,是所谓的“大鼠呼吸病毒”病的真正病原。先

前该病原主要通过组织病理学诊断和监测,现在可以通过血清学和 PCR 监测了。

第三要考虑监测的频度。微生物监测的频度应该适宜,以便及时地发现设施里是否有不应该有的病原。监测的频度主要取决于所要监测的种群的用途、某一或某些病原或污染物对该种群的重要性、病原侵入的风险以及经费上的考虑。例如 FELASA 建议对重要病原至少每季度监测一次。大多实验动物生产供应商则监测得更频繁些,如每 4~6 周一次。在经常引入新动物的设施,与不常有新动物的设施相比较,则监测频度可能要适度地提高。一般性的原则是高频度的小样本监测(如每 4~6 周检测 3~5 个动物)比低频度的大样本监测(如每 3 个月监测 10 个动物)更可靠。对于常见的或对研究有严重影响的病原如冠状病毒、细小病毒、肺炎支原体、蛲虫等应该频繁监测,如每季度甚至每月一次;而对于不常见的病原如小鼠巨细胞病毒、仙台病毒、汉坦病毒等则不必频繁监测,如可每半年甚至每年一次。对于隔离器中饲养的无菌动物或悉生动物来说,应该更频繁地监测细菌(环境微生物)而不是病毒和寄生虫,因为一旦屏障出现问题,细菌侵入的风险更大。例如可在一年中的第 1、2 和 3 季度送哨兵鼠的血清进行常见病原的血清学检测,在第 4 季度则送检活体哨兵鼠进行全面的检测。

第四要考虑健康监测的内容和范畴。如果动物种群中至少有一个动物存在有某病原体,那么健康监测的目的就是在抽的样本中检测出有该病原的存在。反之亦然,即如果在抽样中没检测出病原,则种群中不存在该病原。健康监测体系包含以下范畴:对种群中的动物进行监测或对哨兵动物进行监测,后者可称为哨兵鼠计划,也是我们通常所说的(狭义的)健康监测。其次,是对新引进的动物进行监测或作检疫监测。第三是对将用于鼠的生物材料进行监测。单位一般都有一个实验鼠的健康准入标准,即供应商所提供的健康报告应该包括必检的项目和不能有特定病原的存在。

新引进动物的监测:单位可以多订购一定数量的鼠,在接收后立即安乐死进行检测或送到第三方实验室检测,以便核实供应商的健康报告,减少污染设施的风险。需要注意的是,该做法必须通过单位的伦理审查委员会的审核批准才能实施。现在的实验动物供应商一般都有较完备的健康监测计

划,一般都可提供不同的屏障或房间的健康报告。一般可以通过严格评估选定一个或少数几个实验动物供应商,开始合作时可能需要核实其健康报告,但良好的互信的合作关系建立后可不执行此计划或抽检即可。如果动物来自科研院所则情况有所不同,其健康监测计划各不相同,所以以防万一可以采用此方法进行核实。

检疫期监测:绝大多数情况下,来自高品质的实验动物供应商的、用有高效滤膜的运输盒运输的、且运抵时运输盒完整的实验鼠对设施里的动物造成污染的风险很低,一般不需要隔离而可直接运至设施内的动物房。在这种情况下,接收时应该仔细检查运输盒是否完整、拒收运输盒有破损的动物、细心地拿放运输盒并对其表面进行消毒,以减少其表面污染对设施所造成的危害。对于其他来源的实验鼠,一般其生产质量控制、装运等都不太严格,执行适宜的检疫可能很重要。这些动物可能多为特殊的模型/基因工程小鼠,因此其提供方的健康监测计划可能是针对这些特定的动物的,不能完全符合接收设施的健康监测规程。而且这些动物多为“稀缺”动物,所以对其接收和接收后的检疫工作等应该进行精心准备。检疫期通过前应该视它们为可疑的感染源,因此应该遵循检疫期的相关操作规程。检疫期的动物和别的动物应该隔离开,最好是房间水平的隔离,但如果空间有限可使用隔离器等设备。另外,如果对动物供应商的品质不怀疑,但对动物的运输有疑虑,可对动物进行监测以排除运输过程中的污染。如果使用血清学方法进行检测,则不能在接收时立即安乐死动物监测,可将其置于检疫期一定时间后再监测。因为动物如果在运输过程中感染/污染,至少需要大约一周的时间才能产生抗体。也可在到达后第 3 天,从每只鼠采集粪便样本(注意尽量“无菌”操作),每 10 个动物的样本混合后可采用 PCR 的方法检测常见的肠道病原。或者从每一动物采集粪样、口腔拭子或鼻/肺冲洗物、和无毛动物的皮肤拭子,10 只动物的样本按不同的类型分别混合,进行鼠常见病原的 PCR 检测。也可采粪样、肛周胶带粘贴取样、毛发等进行寄生虫的检测。

生物材料的监测:生物材料如细胞培养物和肿瘤组织/细胞等的微生物污染可危及实验动物设施的生物安全以及对动物实验研究造成负面影响。所有的生物材料在接种实验鼠之前都应该进行检

测以确定没有外源性微生物(主要是鼠的一些传染病病原体)污染。可通过将生物材料接种鼠,4~6 周后检测是否有相关抗体产生。现多用 PCR 的方法检测。

直接从种群中随机抽取动物进行监测:啮齿类动物体型小、能采集的血样少,所以不可能用大动物(如猪、犬、猴等)的疾病监测方法诸如采血样检测等来进行动物群体健康监测。一般的鼠群的健康监测都得安乐死动物并采集足够的血样和组织样品。可直接随机从动物群中选取动物作为群体的代表来检测。用这种监测模式不需要在种群中引入哨兵鼠,因此可以避免通过哨兵鼠而引入感染。另外的一个优点是,在需要进行监测时,一般可立即从种群中选取所需要数目的鼠进行采样,而使用哨兵鼠时则需要把哨兵鼠置于种群中一定的时间以确保其获得机会来暴露给种群中存在的病原并产生感染。直接抽取动物检测的前提是选取的动物已经尽可能地暴露给了存在于种群中的病原微生物。例如可以使用开放性笼盖的鼠笼、甚或采用与哨兵鼠相似的“脏垫料”法,即转移最可能有感染的垫料至预先选定的鼠笼。如果使用血清学方法监测,则选取的动物必须能产生抗体。因为基因工程鼠的免疫学状况未知或很难确定,所以选取基因工程鼠进行监测时有很多的不确定因素,即这些动物能否产生有效的抗体水平。如果某些动物有免疫缺陷,则不适于血清学检测(可造成假阴性结果),但如果运用得当,采用直接检测病原的方法如 PCR、细菌学和寄生虫学,则也能很好地应用免疫缺陷动物来进行动物种群的健康监测,因为这些免疫缺陷的动物对寄生虫和细菌的抵抗力较弱,一般可长时间的乃至终生的保持活动性感染。选取动物时应该在一个动物房内多点取样,以尽可能的监测出仅在局部分布(如某个笼架)的感染,这也因房间通风方式以及使用的笼具体系等的不同而异。如果一个动物房内有不同的品系或封闭群的动物,则应该各选取其代表动物进行监测。在动物年龄的选择上,应该尽量选取年幼的和老的动物,但要避免使用年龄过大的动物,因为寄生虫多寄生于年幼鼠,而年老的鼠则有最大的可能暴露给设施内的微生物从而产生血清阳转。但是年老的特别是无免疫缺陷的鼠可能对感染其的病原产生了免疫反应进而部分或全部地把大多数的寄生虫或病毒等都清除了,所以这些鼠用直接检测病原的方法来检测

的话很可能是阴性的。太小的鼠因为其母源抗体的存在可能也会影响到血清学的检测。对于繁殖种群而言,最好的是选取因年老而淘汰的种鼠和过剩的断奶鼠。例如,选择 4~5 周龄的鼠检测肠道原虫最好、8~10 周龄检测蛲虫最好、10~12 周龄监测卡氏肺孢子虫最好,但是超过几月龄的鼠则对细小病毒不易感。健康监测的目的是准确地检测出在一个种群中是否有某(些)病原体的存在(即在某种群中至少有一例阳性),而不是准确地确定感染或疾病的流行率(即多少动物感染了)。理论上讲,样本的量是依赖于种群中的病原的流行率的。运用统计学的原理和公式,有不同的作者或机构制定了样本大小的指南,如可用 $\log(1 - \text{置信度}) / \log(1 - \text{预期的流行率})$ 来计算样本大小。例如,一个鼠群某病原的流行率估计为 30%,置信度为 95% 时,则样本量为 8~10;若流行率为 10%,则需要 25~30 个样本。另外可参考现行的《实验动物微生物学等级及监测》国家标准。显而易见,对于流行率低的病原,如果使用独立通风笼具则使病原传播率更低,因此需要采集的样本数量很大,所以大多设施采用哨兵鼠来进行健康监测。

使用哨兵鼠进行鼠群健康检测:现在的实验鼠设施多使用小隔离器、层流架、独立通风笼具等使得疾病传播率很低(流行率多低于 30%)而且流行或分布不均一。另外从动物群中抽取动物要做到真正随机的话则不影响到科研很难。这些都使得随机抽取动物进行健康监测的方法不太适用。可以在鼠群中放置哨兵鼠,尽可能地让这些鼠暴露给动物设施中的微生物,然后通过检测这些鼠来反推出种群的健康状况或者其微生物感染状况。可从哨兵鼠采血、取样、甚至安乐死来进行检测,而不干扰在研的动物实验。原则上哨兵动物应该是免疫健全的年轻成年鼠(多为 6~8 周),多在 3~5 周龄时引入并在种群中放置足够长的时间以让这些哨兵鼠充分地暴露给种群中和/或动物房间中的病原,一般为至少 4~6 周,以便检测抗体和寄生虫。也应避免使用太老的动物作为哨兵鼠,因为可能导致血清学假阴性。哨兵鼠的品系/封闭群的选择也要慎重。使用和所要检测的种群相同品系的动物较好如可以多购买几只作为哨兵鼠使用,因为这样可以避免因哨兵鼠而引入感染的风险。但也要考虑到所要检测动物的免疫学状况,如免疫有缺陷的动物就不适用这一方法。一般选用封闭群的鼠作

为哨兵鼠,如 CD 小鼠和 SD 大鼠,因为它们对病原易感但不发病、能产生很好的免疫学应答,而且价格不贵。有些近交系的鼠对有些病原部分或完全不易感,因此应该酌情避免使用,例如 C57BL/6 对小鼠细小病毒 MPV 不易感、SJL 对小鼠肝炎病毒的呼吸道株(多器官亲嗜性)不易感等。还有 DBA/2 小鼠的抗体应答缓慢,也应避免使用。引入哨兵鼠的风险也有很多。例如,要考虑到由哨兵鼠本身的感染而污染/感染其它动物的可能性。但这种风险可以通过对哨兵鼠来源的慎重选择而降低,例如可从高品质的实验动物供应商购买动物作为哨兵鼠(并确定没有针对要检测的病原的抗体)。也可以在将哨兵鼠引入种群之前对新购进哨兵鼠进行适宜的隔离检疫,以弄清其微生物状况。可以使用设施里生产的鼠,但一般不提倡,因为这样会涉及到很多额外的生物安全问题。有种做法是尽量只使用来自隔离器中饲养的微生物学状况清楚的动物,如可使用无免疫缺陷的杂合子的裸鼠来作为哨兵鼠。

哨兵鼠都是以间接的方式来暴露给病原,如通过采集种群中其它鼠使用过的垫料即脏垫料,特别是疑似感染的动物的脏垫料,放置到哨兵鼠笼。这种方法是标准的方法,适用于独立通风笼具饲养的鼠、免疫缺陷鼠等的健康监测。但也可使用直接接触法来感染哨兵鼠,即将哨兵鼠和种群中其它的鼠合养(也就是直接接触),多适用于检疫期,这样做的风险在于哨兵鼠可感染其它的鼠或造成遗传学污染或打斗,而且很难采集很多笼的鼠进行检测。这种情况下,可选用毛色上和种群中的其它动物不同的哨兵鼠。脏垫料法也存在诸多缺陷,例如纤毛相关呼吸道杆菌和乳酸脱氢酶增高症病毒就不通过脏垫料传播,仙台病毒和螺旋杆菌则不能很好地通过垫料传播。通常的做法是在每次换垫料时,尽可能多的把种群中动物的脏垫料(每笼取 5~15 mL)转到哨兵鼠笼。一般不添加新的垫料,因为新的垫料会稀释脏垫料中可能含有的病原,使其达不到最低感染剂量。一个折中的办法是,如果使用筑巢材料作为一种丰富环境的措施,则可放置新的筑巢材料于哨兵鼠笼。动物排毒会随着病毒感染过程的推进而减弱直至感染结束。采样作血清学检测的时间和哨兵鼠最后接触脏垫料的时间应该间隔 2~3 周(3~4 周可能更好),因为对于大多的病原来说,哨兵鼠需要 7~14 d 的时间来产生抗体。但是

针对鼠诺瓦克病毒的血清阳转则可能需要 8 周的时间。然而,哨兵鼠放置在种群中的时间不宜超过 3 个月,主要是因为鼠对小鼠细小病毒这个小鼠最常见的病毒的易感性随年龄增长而下降。

哨兵鼠和其所“代表”的种群动物的比例也要适当,但是没有相关的正式指南。如 1 个有 2~3 只哨兵鼠的笼子可用来检测 50~80 笼的动物。依据所希望保持的微生物学状态、饲养方式、笼具系统等的不同,这个比例会有不同。大多独立通风笼具在笼架的每侧都放置一哨兵鼠笼。应该平衡一下风险和费用的关系。例如,如果 1 个哨兵鼠笼代表 50~80 笼鼠,如果哨兵鼠检测阳性,为找出是哪笼鼠除了问题则可能需要对 50~80 个笼的动物分别检测。如果同样的 50~80 笼鼠,设置两笼哨兵鼠,如果其中一笼检测阳性,则只需要检测其所代表的那 25~40 笼鼠。一般每季度采样检测,这种安排最适于血清学检测。因同年龄的鼠放在一个笼子里,其微生物状态会大致一致,所以不用对哨兵鼠笼的所有动物都进行检测,一般每笼检测一只。在样本(哨兵鼠和/或血清等)送检后,即可引入新的哨兵鼠,这些新的动物可以去接触已有的感染并作为桥梁来承上启下即对那些上批哨兵鼠尚未发生血清阳转的病原产生免疫应答。当结果出来时,可对“老”的哨兵鼠实施安乐死,一来可以去验证那些阳性结果,二来可以采样用于检测其它感兴趣的但尚未检测的病原(即未列在上次检测计划中的病原等)。因为可能不是所有的哨兵鼠都会对小鼠细小病毒发生血清阳转,所以要注意的是如每笼哨兵鼠只检测一只可能会降低微生物监测的灵敏度,但这样做可省钱,或者对剩余的哨兵鼠只进行细小病毒检测。

哨兵鼠笼的放置位置应考虑尽量增大这些动物的感染机会。如和种群中的动物接近、放在笼架底层、离出风口近等。另外可固定在某些位置,这样能引起饲养人员和科研人员的注意。哨兵鼠多为雌性,一来可减少动物的打斗,二来可避免对种群因计划外的交配而造成遗传学污染。

哨兵鼠计划有以下内在的缺陷:一是对微生物的检测是间接的(即不是对种群中的动物直接检测)而且有时间上的滞后。制约因素有哨兵鼠必须易感、种群中的动物是否处在排毒的活动期、某些病原在环境中易灭活(所以要使用新鲜脏垫料)、哨兵鼠能否暴露给足够量的病原(脏垫料的量要够而

且要混合均匀)、哨兵鼠必须血清阳转或开始排毒(滞后 1~8 周)等。二是如果哨兵鼠检测为阳性,则不易判断其感染的来源。感染可能源自哨兵鼠本身、哨兵鼠经由其它意外的途径(如饮水、饲料、试验处理、笼具清洗等)而感染,而且感染可能来自任何一个该哨兵鼠所代表的鼠笼。

3 实验鼠群健康监测的方法

实验鼠群健康检测所涉及的方法学有很多,如剖检前的检查(如环境检测数据、饲养管理情形、种群的大小、动物品种、遗传学背景、免疫学状况、动物标识等)、大体剖检、血清学、细菌培养、分子生物学诊断技术如 PCR、寄生虫学检查、组织病理学和其它的一些诊断方法。最常用的还是血清学和 PCR。详尽的方法学恕不详述。要注意的是对样本及样本的处理过程进行适宜的质控、以及阴、阳性对照的合理使用。

4 实验鼠群健康监测的样本采集原则

因拟定使用的检测方法的不同和/或检测的病原的不同采集的样本也有所不同。如采用血清学方法,则要采集血液分离血清。血清可用 PBS 进行适度稀释,如 1 份血清加入 4 份 PBS。如对生物安全 3 级实验室内的鼠进行健康检测,则血清应该进行灭活如加热灭活。另外,对生物安全 3 级实验室,可使用经福尔马林固定的组织/粪便样品等来进行 PCR 检测、寄生虫检测和组织病理学检测。

合并样品(把不同动物的样品混合在一起作为一个样品检测)可减少需要检测的样本数量,从而可以减少费用。但是需要满足以下两个条件。一是检测的方法要足够灵敏(即可检测出仅存在于混合样品中的某一样品中的微量微生物或其成分),一般适用于 PCR 和寄生虫粪检,不适用于血清学。二是在经济上要合理,即假设要混合 X 个样品成一个混合样,只有少于 $(X-1)/X$ 的混合后样品为阳性时,在经济上才是合理的。例如有 100 个样品,10 个混为一个(即上述公式中的 X),即有 10 个混合样。如果混合样一旦为阳性,则可能需要检测其混合前的每一样品。按照这样的推理,如果有 $(10-1)/10$ 即 10 个混合样中有 9 个为阳性,则总共的检测次数为 100,和不混合样品一样。如果 10 个样中有 8 个为阳性,则总共的检测次数为 90,比较经济。

最好是和检测实验室联系,咨询如何取样及样

品处理等问题。运送活体动物和相关样本应该按照国际国内的相关法规和标准来进行。

另外,如果鼠群中有动物死亡,也可多剖检和诊断,这可以作为常规健康检测计划的一个很有益的补充甚至组成部分。

5 实验鼠种群健康检测结果的解读及应对措施

应该由负责该动物种群健康的相关专家来解读健康检测结果,看是否有异常的或意外的结果。如果没有异常结果,可以按照相关要求对结果进行数据管理或对报告进行归档。如果检出阳性,建议在采取措施之前,联系诊断实验室,确定阳性结果以及其可能的意义,然后启动相应的应对措施。诊断实验室可以给出他们对阳性结果的看法,如属强阳性还是弱阳性、是否某检测方法常有假阳性结果、或者说某病原很少见所以其检测结果为阳性的意义不大等。另外诊断实验室还可就如何最快最好确证阳性结果提供建议。在对某阳性结果采取措施之前,要将检测结果知会单位内部的动物伦理审查委员会和其他相关的部门和人员。单位要及时地对健康检测的结果进行汇总和分析,进而可以对监测计划进行修订,如增/减检测的病原、对个别病原增/建检测频率、采用新的检测方法等。

总之,没有一成不变的健康监测计划,也没有一个放诸四海而皆准的健康监测规程。读者在了解上述的一些有关实验鼠群健康监测的基本原理之后,在制订监测计划时,可参考前文有关“如何建立实验鼠群健康监测规程”一节的内容,充分用好互联网等资源,对国内外一些著名大学、科研机构的相关资料进行仔细研究和推敲,结合我国的实情,建立并在实践中逐步完善富有单位特色但确实

行之有效的实验鼠群健康管理体系。

参考文献:

- [1] Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW. 2002. Laboratory animal medicine[M]. 第二版,California: Academic Press 365 - 372.
- [2] Percy DH, Barthold SW. 2007. Pathology of Laboratory Rodents and Rabbits[M]. 第三版, Iowa: Blackwell Publishing. 17 - 77; 126 - 153.
- [3] Suckow MA, Wseibroth SH, Franklin CL. 2005. The Laboratory Rat[M]. 第二版, California: Academic Press 548 - 563.
- [4] Hedrich HJ, Bullock G. 2004. The Laboratory Mouse. California: Academic Press 449 - 462.
- [5] Charles River Laboratories Technical Resources website <http://www.criver.com/en-US/TrainEducation/RMS/InfectiousAgent/Pages/home.aspx>.
- [6] Pritchett-Corning KR, Shek WR, Henderson KS, Clifford CB, Warren SK. 2010. Companion Guide to Rodent Health Surveillance for Research Facilities[M]. 第二版. Charles River Laboratories.
- [7] Clifford CB. 2011. Emerging rodent diseases. 13th Current Laboratory Animal Sciences Seminar. VA, USA.
- [8] Clifford CB. 2009. Cost - effective Health Surveillance of laboratory rodents. 23rd Charles River Short Course on Laboratory Animal Sciences. Boston, MA, USA.
- [9] Shek WR. 2011. Current Challenges to Accurate Microbiologic Surveillance of Research Animals. 25th Charles River Short Course on Laboratory Animal Sciences. Boston, MA, USA.
- [10] Shek WR, Heanderson KS, Clifford CB. 2011. Emerging Diagnostic Approaches. 25th Charles River Short Course on Laboratory Animal Sciences. Boston, MA, USA.
- [11] 赵德明, 庞万勇. 2011. 动物实验中的兽医作用. (贺争鸣, 李根平, 李冠民, 陈振文, 王禄增主编. 2011. 实验动物福利与动物实验科学. 科学出版社[M]. 489 - 498.

(修回日期)2011-09-07