



大鼠、小鼠微生物学质量监测中的哨兵动物设置

黄小燕, 潘 裕, 樊海艇, 张超超, 汤家铭, 蔡贞贞

(上海中医药大学科技实验中心, 上海 201202)

【摘要】 建立并执行全面的实验动物质量监测, 对于确保人员、动物健康和福利, 以及实验研究结果的真实性、有效性和可重复性是非常重要的。在实验动物中设置相应的哨兵动物能有效监测实验动物质量。本文对实验动物微生物质量监测中哨兵鼠选择, 哨兵鼠与被监测动物接触方式、时间, 哨兵鼠放置位置, 每笼哨兵鼠代表被监测群体的鼠笼数, 以及检测数量、检测频率和项目做一综述。

【关键词】 哨兵动物; 微生物; 微生物学监测; 大鼠; 小鼠

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 08-0067-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.008.015

Use of sentinel animals for the microbiological monitoring program in laboratory rats and mice

HUANG Xiao-yan, PAN Yu, FAN Hai-ting, ZHANG Chao-chao, TANG Jia-ming, CAI Zhen-zhen
(Experiment Center for Science and Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

【Abstract】 It is very important to establish and execute the all-sided experimental animal quality monitoring in order to guarantee human health, animal health and welfare as well as the authenticity, validity, and repeatability of the experimental research results. Setting corresponding sentinel animals in the experiment can effectively monitor the quality of experimental animals. This article gives a general review of the selection of sentinel rats in the microbiological quality monitoring of the experiment animals, contact form and time between the sentinel rats and the rats being monitored, the placement of sentinel rats, and the number of rat cages being monitored by each cage of sentinel rats, as well as the test quantity, test frequency and the project.

【Key words】 Sentinel animals; Microorganisms; Microbiological monitoring program; Rats; Mice

实验动物微生物学和寄生虫学质量控制是实验动物质量控制的重要一环。近几十年来, 实验动物的微生物学和寄生虫学质量有了显著的提高, 但不论在实验动物生产阶段还是在动物实验阶段, 时而又有一些对人类和/或动物健康以及对动物实验研究有影响的病原体在实验动物中流行^[1]。因此

建立并执行全面的实验动物质量监测, 对于确保人类健康、动物健康、动物福利以及实验研究结果的真实性、有效性和可重复性是非常重要的。

实验动物微生物学和寄生虫学质量监测可分为生产繁殖群的质量监测和进入动物实验阶段的质量监测, 前者一般采用随机抽样检测的方法[国

[基金项目] 上海中医药大学预算内项目(编号: A1-20140367)。

[通讯作者] 黄小燕(1982-), 职称: 助理研究员, 主要研究方向: 实验动物、中药药理, E-mail: huangxiaoyan8211@163.com。

标 GB14922.2-2011 实验动物微生物学等级及监测],而后者则通过设置“哨兵动物”的方法。所谓的“哨兵动物”(sentinel animal)是指为微生物监测所设置的指示动物。在鼠群中放置哨兵鼠,尽可能地让这些哨兵鼠暴露给动物群体和设施中的微生物,然后从哨兵鼠采血、取样进行检测,用检测结果来反映动物群体的微生物感染状况,而不干扰正在进行的动物实验。本文主要对实验动物微生物质量监测中哨兵鼠的设置做一综述。

1 哨兵鼠的选择

哨兵鼠一般选择免疫反应正常的封闭群动物,因封闭群动物易得,且价廉,对病原体易感但抵抗力强,能产生很好的免疫学应答。SD 大鼠和 ICR 小鼠都属于封闭群,适宜做哨兵鼠。Lipman 等^[2]认为,哨兵鼠选择雌性动物为宜,既可减少动物的打斗,又可避免对种群因计划外的交配而造成遗传学污染。

哨兵鼠选择适龄动物,一般在 3~5 周龄时引入,饲养 6~8 周后进行检查。哨兵鼠引入时应同时处死若干,保留血清或其他样品作为哨兵鼠的背景资料。应注意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。

除特殊监测需要之外,哨兵动物一般来源于与被监测动物同一种属的 SPF 级动物,如小鼠饲养室用小鼠哨兵,大鼠饲养室用大鼠哨兵。如一个饲养室内同时饲养大小鼠,则需要同时设大小鼠哨兵,因为大小鼠的一些病毒感染谱不尽相同。

裸小鼠等免疫缺陷动物感染病原体后抗体生成低下,血清学试验常呈阴性,因此,不论是生产繁殖还是用于动物实验,都应设置免疫功能正常的 SPF 动物作为“哨兵”,定期处死采血检查以监视裸鼠群中某些病原体的感染。

2 接触方式

哨兵鼠与被监测动物接触方式有两种:一是直接接触法,二是“脏垫料”法。直接接触法感染哨兵鼠,可选用毛色上不同或种群中的其它动物作为哨兵鼠。将哨兵鼠和被监测动物种群合养,多用于检疫期和小群体的健康监测^[3]。但是这样做的风险在于,可能引起被监测动物与哨兵鼠打斗,而且很难采集很多笼的鼠进行检测^[4]。

通常,哨兵鼠与被监测动物接触采用“脏垫料”

法^[5],即在更换垫料时采集部分所要监测动物使用过的垫料,特别是疑似感染的动物的脏垫料,放置到哨兵鼠笼内,如脏垫料中有病原体,就会感染哨兵鼠。哨兵鼠使用的垫料中脏垫料至少占 50%,也可以 100% 使用脏垫料^[6]。Compton 等报道应用这种方法在空气和垫料污染的哨兵鼠中能有效地检测到鼠类病原体,并且接触频率和“旧垫料”的稀释度可以影响传播效果^[7]。当然,脏垫料法也存在一些缺陷,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也不能很好地通过垫料传播^[8]。

适龄哨兵鼠在饲养单元中放置 4~6 周,让这些哨兵鼠充分地暴露给被监测动物群体或动物房中的病原,以便检测微生物抗体和寄生虫。哨兵鼠放置在群体中的时间不宜超过 3 个月,因为小鼠细小病毒的易感性随年龄增长而下降^[8]。

3 笼盒数

“脏垫料”法中,哨兵动物代表的是其使用的脏垫料的那些实验动物笼。哨兵动物和其所“代表”的群体动物的比例没有相关的标准;通常大鼠每笼代表不超过 10 笼,小鼠每笼代表 10~20 笼^[7]。但也有报道,开架饲养和层流柜饲养小鼠时,“脏垫料”法最多可以监测 34 个笼位,少于 35 个笼子的饲养架宜放置一个哨兵鼠;饲养大鼠和地鼠时,在饲养架的底层每侧放置一个哨兵鼠,最多可以监测 24~30 个笼子^[3,9]。

在实际操作中应该平衡一下风险和费用的关系。例如,在检测中发现哨兵鼠检测阳性,如果 1 个哨兵鼠笼代表 10~20 笼鼠(哨兵鼠使用量多且检测费用高),为找出是哪笼鼠出了问题可能需要对 10~20 笼的动物分别检测;如果 1 个哨兵鼠笼代表 50~80 笼鼠(哨兵鼠使用量少且检测费用低),为找出是哪笼鼠出了问题则可能需要对 50~80 笼的动物分别检测。

4 哨兵鼠摆放位置和数量

哨兵鼠笼的放置位置应考虑尽量增大这些动物可能的感染机会,如和群体中的动物接近、放在笼架底层、离出风口近等。一般哨兵鼠笼以笼架对角线放置,笼架底部两侧放置^[9],定期更换垫料;有将哨兵鼠笼仅放置在中间笼架的中间位置,每周两次固定时间更换包括哨兵鼠在内的饲养鼠垫料^[10];

还有些单位每个房间放置一个哨兵鼠笼,通过定期更换鼠笼垫料和位置使哨兵鼠充分暴露在垫料和环境空气中。

因同年龄的鼠放在一个笼子里,其微生物状态会大致一致,所以一般每笼放置 2-4 只哨兵鼠。对哨兵鼠笼内的动物随机选择一只检测,其他的哨兵鼠饲养至有检测结果。如果检测结果为阳性,余下的可以去验证阳性结果;如果检测结果为阴性,余下的哨兵鼠实施安乐死,也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)。

FELASA(欧洲实验动物学会联盟)建议对重要病原至少每季度监测一次。国内通用的检测频率也是每季度检测一次,当然也可根据各地的环境和研究需要增加检测的频率。在经常引入新动物的设施,与不常有新进动物的设施相比较,则监测频率可能要适度地提高。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^[8]。

根据以上每个哨兵鼠笼盒中哨兵鼠的只数、摆放位置,检测频率,各实验动物研究生产单位可估算出每年所需哨兵动物数量。

5 检测项目

检测项目主要的依据是现行版的 GB 14922.2-2011《实验动物微生物学等级及监测》。而国际上不同组织对微生物的质量检测标准不同。如对 SPF 级大小鼠病毒检测必须检测项目和必要时检查项目国家标准合计要求 14 种,国际实验动物科学理事会(International Council for Laboratory Animal Science, ICLAS)要求 17 种。国家标准比 ICLAS 少的三种病毒分别为:轮状病毒(rotavirus, RV),巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)和乳酸脱氢酶增高病毒(lactate dehydrogenase elevating virus, LDV)。

对 SPF 级大小鼠细菌检测必须检测项目和必要时检查项目国家标准要求 16 种,ICLAS 要求 13 种。其中 ICLAS 包含 GB 中的 10 种,但对国家标准内的假结核耶尔森菌(*Yersinia pseudotuberculosis*)、念珠状链杆菌(*Streptobacillus moniliformis*)、乙型溶血性链球菌(β -hemolytic streptococcus)等不作强制要求,而多出了其他 3 种细菌:螺杆菌属

(*Helicobacter. spp*), 纤毛相关呼吸道杆菌(*Cilia-associated respiratory Bacillus*, CAR)和柠檬酸杆菌(*Citrobacter Werkman and Gillen*)。

由于哨兵动物的设置和管理没有统一的国际标准或指导性文件,每个单位应该根据动物饲养环境和饲养数量不同而有所区别。哨兵鼠的选用依实际而定,设置不是一成不变的。使用哨兵鼠需要遵从两个要点,一是保证足够检测数量的同时使用最少量的哨兵鼠,二是在整个监测过程中要使哨兵鼠最大限度的暴露于潜在的病原感染环境中。

建立哨兵动物的微生物检测体系旨在加强动物实验过程的管理,及时有效控制病原体的传播;对哨兵动物的检测结果可以促进、完善有关的动物实验管理制度,预防类似的病原体感染情况的再次发生。

参考文献:

- [1] 陆嘉琦,刘吉宏,周艳,等. 浅谈实验动物饲养管理和使用计划中“灾难计划”的制定和实施[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(4):78-82.
- [2] Lipman NS, Homberger FR. Rodent quality assurance testing: use of sentinel animal systems [J]. Lab Animal, 2003, 32:36-43.
- [3] 李雨函,魏强. 哨兵动物概述 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(10):72-75.
- [4] Rehg JE, Toth LA. Rodent quarantine programs: purpose, principles, and practice [J]. Lab Anim Sci, 1998, 48: 438-447.
- [5] Thigpen J E, Lebetkin EH, Dawes ML, et al. The use of dirty bedding for detection of murine pathogens in sentinel mice [J]. Lab Anim Sci, 1989, 39:324-327.
- [6] University of Missouri at Kansas City-UMKC, Laboratory animal research core. Rodent Sentinel Program[S]. 2003.
- [7] Compton SR, Homberger FR, Paturzo FX, et al. Efficacy of three microbiological monitoring methods in a ventilated cage rack [J]. Comp Med, 2004, 54:382-92.
- [8] 庞万勇,贺争鸣,何诚,等. 实验鼠群的健康监测管理 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(10):87-93.
- [9] University of Wisconsin-Madison. Rodent colony health monitoring program policies and placement procedures [S]. 2011.
- [10] 马元元,孔申申,陶迎红,等. 实验动物设施内哨兵鼠对病原菌监控的研究 [J]. 实验动物科学 [J]. 2012, 29(4):25-28.

[修回日期]2014-06-06