

佟巍,郭智,刘子洋,等. IVC换笼标准操作程序与小鼠病毒病原的传播风险[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(10): 107-109.

Tong W, Guo Z, Liu ZY, et al. Individual ventilated cage changing standard operating procedure and viral pathogen control in laboratory mice [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(10): 107-109.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.10.015

IVC换笼标准操作程序与小鼠病毒病原的传播风险

佟巍,郭智,刘子洋,潘思丹,高虹,向志光*

(中国医学科学院医学实验动物研究所 北京协和医学院比较医学中心,北京 100021)

【摘要】 目的 研究独立通风笼具换笼标准操作程序与实验动物负压屏障设施内使用 IVC (individual ventilated cage, IVC) 设备饲养小鼠的病毒感染风险。方法 选择小鼠易感的小鼠肝炎病毒 (MHV) A59 株感染 6 周龄 BALB/c 雄性小鼠,按照 IVC 换笼标准操作程序进行换笼操作;使用 IFA 和 ELISA 血清学方法以及针对 MHV 的核酸检测方法测定同一笼架具相邻笼盒、同一 IVC 系统不同笼架具的不同位置、以及 IVC 系统外负压屏障设施内哨兵动物的 MHV 感染情况。结果 接种病毒小鼠在感染 6 d 后出现临床症状,粪便中可检出 MHV 病原;动物感染 3 周后可检出 MHV 抗体阳性;其他监测组在 5 周实验终点均无 MHV 阳性检出。结论 IVC 换笼标准操作程序可指导 IVC 换笼操作,用以控制病毒类病原对小鼠的感染风险。

【关键词】 IVC;换笼标准操作程序;MHV;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 10-0107-03

Individual ventilated cage changing standard operating procedure and viral pathogen control in laboratory mice

TONG Wei, GUO Zhi, LIU Ziyang, PAN Sidan, GAO Hong, XIANG Zhiguang*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences;
Comparative Medical Center, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 **Objective** To evaluate the effect of the individual ventilated cage (IVC) changing standard operating procedure (SOP) for viral pathogen transmission in laboratory mice. **Methods** Six-week-old male BALB/c mice were infected with mouse hepatitis virus (MHV, A59 strain). The infection status of these infected mice and sentinel mice in close cages on the same shelf, in cages on a different shelf but in the same IVC system, and outside the IVC system but in the same facility were monitored. Serological conversion of MHV antibodies was detected using immunofluorescent antibody reaction and enzyme-linked immunosorbent assay. MHV in mouse feces was detected using reverse transcription polymerase chain reaction. **Results** MHV nuclear acid was detected 6 d after infection in the artificial infected mice, and serological conversion was detected 3 weeks postinfection. At 5 weeks postinfection, there was no positive detection in sentinel mice. **Conclusions** The IVC-changing SOP is useful for pathogen transmission management in laboratory mice.

【Keywords】 individual ventilated cages; cage-changing standard operating procedure; mouse hepatitis virus; mouse

实验动物需要对自身携带的微生物进行控制,我国实验动物国家标准对啮齿类动物实验动物的微生物和寄生虫监测做出了规定^[1-2]。对实验动物

饲养环境进行控制是微生物控制的有效的,也是必要的条件^[3]。目前我国清洁级以及 SPF 级实验动物大、小鼠需要饲养在屏障环境或是隔离环境中。

【基金项目】 十三五国家重大专项(2017ZX10304402-001-009);国家重点研发计划(2016YFD0501003)。

【作者简介】 佟巍(1972—),女,副主任技师,研究方向:实验动物病毒学免疫学。E-mail: tongw@cnilas.org

【通信作者】 向志光(1980—),男,副研究员,研究方向:实验动物质量控制。E-mail: xiangzg@cnilas.org

独立通风笼具(individual ventilated cages, IVC)是应用于实验动物饲养的设备,其自身可以为动物提供洁净空气,同时维持与外界的静压差,可有效控制气流走向。

每个 IVC 笼盒可以视为一个小型的隔离器,但其与隔离器又有一些区别。主要区别在于,隔离器中饲养的动物,其日常的饮水、饲料、垫料的更换是无菌传递进行的,人与动物不直接接触;而 IVC 笼具在进行此类操作时,需要借助一个层流微环境,如生物安全柜或是换笼机等,在此类设备中需打开笼盒后进行换笼等操作,人和动物有直接接触,人员操作是 IVC 笼具更换时微生物感染的主要风险。因此,有必要对 IVC 换笼进行规范化的管理。

本文对我单位制定的 IVC 换笼标准操作程序的实施效果进行了评价。在 ABSL-2 实验室内,用小鼠易感病毒病原模拟感染实验,对同一设施环境中不同位置笼具内哨兵动物感染病原情况进行了监测,进而测试使用该标准操作程序对病毒感染风险控制的有效性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

动物实验在中国医学科学院医学实验动物研究所 ABSL-2 实验室进行。实验动物为 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠,6 周龄,(18±2)g,共 38 只,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2014-0004],按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。本研究中实验动物的使用经过中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用和管理委员会的批准(XZG18001)。

1.1.2 病原

小鼠肝炎病毒(Mouse hepatitis virus, MHV) A59 株源自美国 ATCC,本室保存。

1.2 主要试剂

75%乙醇、“84”消毒液、QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Cat. No. 52904); One Step RT-PCR Kit (Solarbio, T2240); MHV 病毒抗体免疫荧光法(Immunofluorescent antibody, IFA)检测细胞抗原玻片(本室自制);MHV 病毒抗体酶联免疫吸附实验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(苏州西山生物技术有限公司,IM-692C)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组

动物分为四组,分别为人工感染组、同笼架相邻笼具哨兵组、相间笼架哨兵组,同设施内 IVC 系统外哨兵组。人工感染组 20 只,其他各组 6 只/组。人工感染组小鼠进行灌胃感染,使用病毒剂量为 100TCID₅₀。人工感染每周进行一次,共 4 次。各哨兵组同期饲养,仅在程序规定时间进行换笼操作。

1.3.2 IVC 笼具换笼标准操作程序

小鼠在实验前 3 d 进入设施,感染后,所有组动物每周进行换笼操作。IVC 笼具换笼标准操作程序基本内容简述如下:(1)使用生物安全柜或换笼机等设备进行笼具更换;(2)不同组别的动物在操作时应该保持时间和空间的距离,若无法做到空间隔离操作时,应以时间间隔来区分不同感染风险的动物组。即不同组动物使用同一换笼设备时,不同时操作,期间保证时间间隔,在对换笼设备进行消毒同时保证操作空间的自净;(3)动物笼具表面、操作台面等使用有效消毒剂消毒处理。本实验动物笼具表面使用 75%医用消毒乙醇喷洒消毒,操作台面使用有效氯含量 250 mg/L 的“84”消毒液擦拭后使用紫外灯照射消毒 30 min;(4)对笼具内动物及笼具的接触做好风险识别和处置,避免饮水、垫料、饲料在不同笼具间的交叉接触。

1.3.3 小鼠血清中抗 MHV 抗体的 IFA 和 ELISA 检测

在小鼠感染 3 周及 5 周分别采集动物全血,4℃过夜后离心分离血清,血清经 56℃灭活 30 min 后进行 MHV 病毒抗体检测。MHV 病毒抗体检测使用自行制备的 MHV 细胞抗原^[4-6]及商品化的 ELISA 试剂盒进行^[5,7]。

1.3.4 小鼠粪便样品 MHV 核酸检测

人工感染病毒组小鼠采集急性感染期粪便样品,各哨兵组小鼠采集实验 5 周后粪便样品,使用病毒 RNA 核酸提取试剂盒提取病毒 RNA 样品,采用针对 MHV 的 PCR 方法进行检测^[8]。

2 结果

2.1 ABSL-2 实验设施和 IVC 设备的运行参数

本实验在 ABSL-2 实验室进行,实验的动物饲养间仅本实验相关人员能够进入。饲养间与相邻准备间的静压差设定为-20 Pa,与外界绝对静压差为-45 Pa。实验室的温度、湿度等均符合国家标

准 GB14925-2010 对小鼠饲养环境的要求。IVC 设备笼盒与外界的压力梯度设定为-10 Pa。笼盒内换气次数达每小时 50 次。

2.2 人工感染组小鼠病原学和血清学检测

人工感染做小鼠感染后第 6 天采集粪便样品, MHV 病原 PCR 检测可见 MHV 阳性扩增。感染病毒 3 周后, 随机采集 3 只小鼠全血, 收集血清, IFA 法与 ELISA 法分别进行 MHV 抗体检测全部为阳性, IFA 法测定抗体滴度为 1:80~1:160。

感染 5 周后, 采集剩余小鼠样品, IFA 法与 ELISA 法检测, MHV 抗体均为阳性, IFA 法测定抗体滴度为 1:640~1:2560。粪便样品 PCR 检测, MHV 均有阳性扩增。

2.3 各哨兵组小鼠病原学和血清学均无阳性检出

实验感染 5 周后, 采集各对照组动物粪便样品进行 MHV 核酸检测, 各样品均无 MHV 特异扩增。采集各对照组小鼠全血, 使用 ELISA 和 IFA 两种方法进行 MHV 抗体检测, 检测结果均为阴性(表 1)。

表 1 实验终末点各组 MHV 检测结果
Table 1 Viral detection at the terminal point of the experiment

检测项目 Detection items	人工感染组 Artificial infection	同架相邻组 Sentinel cage in the same shelf	同架对照组 Sentinel cage in the near shelf	室内哨兵组 Sentinel cage in the same room
血清学检测 Serological detection	17/17	0/6	0/6	0/6
核酸检测 Nuclear acid detection	17/17	0/6	0/6	0/6

3 讨论

实验动物是一类特殊的动物, 为了对其自身携带病原进行控制, 需要使用物理屏障将实验动物与感染风险进行隔离。通常采用屏障设施, 或隔离设备来实现^[3]。IVC 笼具的最大优势在于可在有限的空间内饲养不同组的实验动物。该类设备本身为每个笼盒内的动物均提供了独立的通风, 每个独立的 IVC 笼盒可以作为一个单独的系统, 用于饲养不同分组的实验动物。理论上不同组动物饲养在不同的 IVC 笼盒中, 它们之间不存在微生物交叉感染的风险。但是此类设备在动物笼具垫料更换, 饲料、饮水添加等过程中, 需要使用公用的换笼设备。由于换笼操作多在同一空间, 当使用同一设备进行换笼, 动物之间仍存在一定的交叉感染风险。实验动物 IVC 笼具换笼的标准操作程序其控制的重点就在于对此交叉感染风险进行识别与控制。

既往的研究表明, 在生物安全柜中的换笼操作有一定的交叉污染的风险^[9], 需要对换笼的具体操作做出标准操作程序的规定。如安全柜内洁净区与污染区的分区。接触 IVC 笼具内材料的操作对于更换手套的要求等。本文采用的标准操作程序其要点在于将不同感染风险的动物进行分组操作。利用时间距离, 实现对不同组动物交叉感染风险的控制。MHV 病原极易传播, 特别是 A59 株既可通过消化道也可以通过呼吸道感染动物。本文做小鼠人工感染实验, 感染 6 d 后小鼠粪便就有 MHV 核酸

检出, 此时, 该动物已具有传播病原的风险; 在感染 3 周时, 人工感染小鼠已发生血清学转化。各哨兵组动物与人工感染组共同饲养 5 周时间, 期间进行了 4 次换笼操作。在充分的暴露周期内, 哨兵组动物粪便没有 MHV 核酸检出, 也没有发生 MHV 抗体血清学转化。本实验结果表明, 独立通风笼具的这种换笼标准操作程序技术要求在小鼠病毒性病原感染风险的控制上是有效的。

参考文献:

- [1] 全国信息与文献标准化技术委员会. 文献著录: 第 4 部分. 非书资料: GB14922. 1-2001 [S]. 2001.
- [2] 全国信息与文献标准化技术委员会. 文献著录: 第 4 部分. 非书资料: GB14922. 2-2011 [S]. 2011.
- [3] 全国信息与文献标准化技术委员会. 文献著录: 第 4 部分. 非书资料: GB14925-2010 [S]. 2010.
- [4] 佟巍, 吴小闲, 王欣. 免疫酶染色法(IEA)检测小鼠肝炎病毒抗体方法的建立 [J]. 中国实验动物学杂志, 1998, 2(3): 24-26.
- [5] 全国信息与文献标准化技术委员会. 文献著录: 第 4 部分. 非书资料: GB14926. 22-2001 [S]. 2001.
- [6] 全国信息与文献标准化技术委员会. 文献著录: 第 4 部分. 非书资料: GB14926. 52-2001 [S]. 2001.
- [7] 全国信息与文献标准化技术委员会. 文献著录: 第 4 部分. 非书资料: GB14926. 50-2001 [S]. 2001.
- [8] 熊炜, 蒋静, 张强, 等. 小鼠肝炎病毒核酸快速检测方法的建立和应用 [J]. 实验动物科学, 2013, 30(4): 1-5
- [9] 向志光, 佟巍, 谷有刚, 等. 负压屏障设施动物饲养笼具的选择及其感染风险的识别 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(9): 76-79.

[收稿日期] 2019-07-03