



# 实验用生物样品的啮齿类微生物污染的检测管理

庞万勇<sup>1</sup>, 贺争鸣<sup>2</sup>

- (1. 赛诺菲研发中心药物安全评价和动物实验部, 北京 100022;  
2. 中国国家食品药品检定院实验动物管理处, 北京 100050)

**【摘要】** 实验用生物样品在生物医学研究中有着广泛的应用。生物样品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。因此在将生物样品接种到啮齿类动物之前, 要对其进行检测以确保无啮齿类动物传染性病原体的污染。因为检测技术和经济上的限制和局限性, 不可能对所有的啮齿类动物传染性病原都进行检测。本文依据科学文献、笔者的经验以及专家的意见, 尝试着去阐述如何建立一个有效可行的生物样品微生物污染检测计划。笔者建议对一些重要的微生物进行检测, 并简要综述了选取这些微生物的理由即它们对科研、实验动物生物安全以及职业健康安全的影响。

**【关键词】** 啮齿类动物; 实验用生物样品; 污染; 微生物检测

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)10、11-0094-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.10、11.021

## Monitoring for Rodent Microbiological Contamination of Research Biologics

PANG Wan-yong<sup>1</sup>, HE Zheng-ming<sup>2</sup>

- (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)

**【Abstract】** Research biologics are widely used in biomedical research. Contaminations of research biologics with infectious agents are risk factors for vivarium biosecurity and may compromise the in vivo research. Therefore, precautionary screening on the biologics should be performed, before inoculating those biologic materials into rodents, in order to confirm that they are free of rodent infectious agents. Due to scientific, technical and economic constraints, it is not feasible to screen for all rodent infectious organisms. This overview was a proactive attempt, based upon the current literature, personal experience and expert opinion, in trying to describe how to set up a strategy for microbiologic contamination screening and the rationale for selecting certain infectious agent for testing. The impact of those agents on research, vivarium biosecurity, and occupational health and safety, is also summarized.

**【Key words】** Rodents; Research biologics; Contamination; Microbiologic screening

生物样品广泛应用于实验研究和检测, 这些生物样品包括所有来源于动物的或经由动物传代的细胞、寄生虫、肿瘤株/组织、病毒株、鼠血清等。这些生物样品可能携带/污染有人和/或动物的传染性病原, 而且多为来源未知或不详。某些生物样品的来源可能很洁净无污染, 但它们可能在采集时、在液氮罐中保存时、或在操作或处理过程中(如用

处理过啮齿类动物血清的柱进行纯化时) 被污染。这些被污染的生物样品在用于实验研究前应该进行检测, 因为它们可能会造成整个实验动物种群的污染甚至淘汰, 并且对实验造成不可估量的损失。需要进行检测的生物样品包括(但不局限于) 细胞系(原代细胞、传代细胞、肿瘤细胞和肿瘤细胞系)、细胞系的产品(如基底膜基质蛋白)、饲养细胞(如

脾细胞和胸腺细胞等)、腹水、纯化的抗体或其它蛋白。本文拟对常规的微生物检测的项目作一综述,并简要地介绍各病原对科学研究、职业健康安全或动物种群生物安全的影响。

传统的检测方法是小鼠/大鼠/仓鼠抗体产生试验,即将待检生物样品接种到小鼠/大鼠/仓鼠体内,然后检测是否有相应的抗体产生,进而来反推生物样品中是否污染有特定的病原。其优点是只有在生物样品中含有足够量的能感染动物的活的病原体时(即接种的生物样品中含有不低于最低感染剂量的病原),该试验才会是阳性,即才会有抗体产生。该类试验常在 GMP 设施中应用。其缺点是比聚合酶链式反应(PCR)方法慢,而且该方法的有效性是基于一个假设(尤其是应用于 GMP 时),即如果在被检样品中的病毒或病原体是灭活的,那么在整批样品/产品中的病原都是灭活的。

现在多用的检测方法是 PCR 方法。PCR 方法的优点是灵敏(可检测出 1~2 个拷贝的病原基因序列)、快速而且无需使用动物,但其缺点是 PCR

的阳性结果不一定代表样品污染有感染性的病原(即活的病原)。待检样品的量通常很小,就算污染有活的病原体,病原体在待检样品中也不一定能达到最低感染剂量,因此抗体生成试验可能为阴性,所以用 PCR 比较保险。要注意的是在检测过程中要使用阴、阳性对照,以及样品中是否有抑制性成分,并考虑到核酸提取的质量控制。

理论上讲,每个实验动物设施应该监测对动物种群和实验研究(以及对人类健康和环境等)造成负面影响的病原体,尤其是那些能造成严重的临床疾病、和/或改变被感染细胞的功能进而诱发机体防御机制(如免疫系统)改变的病毒。研究机构应该根据自身的实际情况(科研项目的性质、本单位的和或第三方的检测机构的检测能力等),结合现行的国家标准来制订适宜的且可行的检测指标。常见的鼠源微生物检测项目(摘自 [http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm\\_ld\\_d\\_rodent\\_viral\\_PCR\\_for\\_research\\_biologics.pdf](http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/rm_ld_d_rodent_viral_PCR_for_research_biologics.pdf)) 举例如下表所示:

病原	小鼠重要病原	大鼠重要病原	“全面”检测
鼠诺瓦克病毒 Murine Norovirus	√		√
小鼠细小病毒 Mouse parvoviruses (MPV-1, MPV-2, MPV-3, MPV-4, MVM)	√		√
小鼠肝炎病毒 Mouse hepatitis virus	√		√
小鼠轮状病毒 Mouse rotavirus (MRV/EDIM)	√		√
鼠痘病毒 Mouse pox (Ectromelia)	√		√
多瘤病毒 Polyoma virus	√		√
小鼠腺病毒 Mouse adenovirus (MAV-1, MAV-2)	√		√
汉坦病毒 Hantavirus hantaan	√		√
汉坦病毒汉城株 Hantavirus Seoul		√	√
呼肠孤病毒 Reovirus (Type 1, 3)	√	√	√
淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 Lymphocytic choriomeningitis virus	√	√	√
乳酸脱氢酶增高症病毒 Lactate dehydrogenase-elevating virus	√	√	√
小鼠脑脊髓炎病毒 Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV [GD-7])	√	√	√
仙台病毒 Sendai virus	√	√	√
支原体属 Mycoplasma	√	√	√
肺炎支原体 Mycoplasma pulmonis	√	√	√
大鼠巨细胞病毒 Rat cytomegalovirus		√	√
大鼠脑脊髓炎病毒 Rat theilovirus		√	√
大鼠细小病毒 Rat parvoviruses (RPV, KRV, RMV, H-1)		√	√
大鼠轮状病毒 Rat rotavirus		√	√
大鼠冠状病毒 Rat coronavirus		√	√
K 病毒 K virus			√
小鼠巨细胞病毒 Mouse cytomegalovirus			√
小鼠胸腺病毒 Mouse thymic virus			√
小鼠肺炎病毒 Pneumonia virus of mice			√

对选取上述病原体进行检测的理由,即这些微生物对动物健康、种群的生物安全以及对实验或检测的影响简明地综述如下。

**鼠诺瓦克病毒:**鼠诺瓦克病毒(MNV)属于杯状病毒科,是一种小的无囊膜的单链 RNA 病毒。大约有 90% 的人类病毒性胃肠炎与该病毒有关。某实验室在进行人的样品(接种到 RAG2<sup>-/-</sup>,STAT1<sup>-/-</sup>小鼠体腔)的检测时,从死亡的小鼠分离到了 MNV-1。MNV-1 是首个在细胞上成功培养的 MNV 病毒。MNV 在小鼠的流行率超过 30% (是其它小鼠病毒的 10 倍)。在免疫健全的小鼠不引起临床症状,但可在其小肠、脾脏、肠系膜淋巴结和肝脏检测到病毒核酸。研究揭示该病毒对巨噬细胞和树突状细胞有亲嗜性,并且感染为持续性的,所以感染的小鼠不易用于免疫学(特别是与巨噬细胞源性细胞相关的)研究。在免疫缺陷小鼠,依品系/免疫缺陷以及接种途径等的不同,可引起肝炎、间质性肺炎、脑炎等,因此不适用于研究。

**小鼠细小病毒:**小鼠的细小病毒主要有两种即小鼠微小病毒(mouse minute virus,MMV 或 MVM)和小鼠细小病毒 1(mouse parvovirus,MPV)。小鼠细小病毒是当代实验小鼠种群中流行最广泛的病毒之一。MVM 是移植肿瘤最常见的污染物之一,因此 MVM 可通过被污染的肿瘤细胞而进入并污染实验动物设施。另外,MVM 可引起肿瘤细胞溶解并有免疫抑制作用。MPV 可引起感染小鼠的持续性感染和免疫紊乱。小鼠细小病毒的防控依赖于严格的屏障设施管理、隔离检疫、健康检测,并对计划引入并用于动物的生物样品进行检测。

**小鼠肝炎病毒:**小鼠肝炎病毒为大的、多形态的、有囊膜的 RNA 病毒,属于冠状病毒。其多嗜性、广泛分布和传染性使其最有可能影响到小鼠的生物学反应并污染移植肿瘤和细胞系等。感染免疫缺陷小鼠或污染来自免疫缺陷小鼠的肿瘤都会对研究造成破坏性的影响。该病毒感染淋巴组织,因而对免疫系统产生重大而持久的影响,可刺激或抑制免疫反应。合并感染该病毒可改变其它病毒、细菌、寄生虫的感染过程,使感染加重。小鼠肝炎病毒可改变肝脏酶活性、降低肝脏部分切除后的再生、引起贫血、白细胞减少症和血小板减少,并降低某些易感品系小鼠的糖尿病发生率。

**小鼠轮状病毒:**小鼠轮状病毒感染影响肠道吸收和酶的浓度,可引起腹泻和生长迟缓,影响到使

用年轻动物的研究。一过性的胸腺细胞坏死可影响到免疫反应。另外,B 细胞缺陷的小鼠感染后可持续排毒。

**鼠痘病毒:**鼠痘病毒具有多器官亲嗜性并且经常为亚临床活动性感染,使其极易污染小鼠组织和生物样品,并成为其传播到别的小鼠或小鼠种群的一个主要途径。易感动物近乎 100% 的死亡率对研究和实验动物设施都具有极大破坏性。

**多瘤病毒:**多瘤病毒的多嗜性使其易污染移植性肿瘤和细胞系,进而污染动物种群。成年无免疫缺陷小鼠自然感染多瘤病毒,对研究可能没有影响。没有多瘤病毒的种群的新生鼠感染该病毒可引起广泛分布的肿瘤,进而干扰实验和使动物寿命缩短。

**小鼠腺病毒:**小鼠腺病毒不大可能影响使用免疫健全小鼠的研究,但据报道 MAdV-1 可增加感染小鼠对大肠杆菌性肾盂肾炎的易感性。MAdV-1 可被用作实验工具(如用作基因工程载体),因而有可能造成小鼠种群的“医源性”污染。MAdV-2 更常见但基本无害,甚至于对幼鼠和免疫缺陷鼠也相对不致病。

**汉坦病毒:**汉坦病毒对研究的影响主要是因为它是啮齿类重要的人畜共患病病原,可能引起人类严重的感染。汉坦病毒在亚洲(日本)和欧洲(比利时和英国)引起过好几起和实验室感染相关的人类出血热和肾综合征(HFRS)。这些感染可追溯到感染的实验大鼠、野鼠和试验感染的鼠。该病毒广泛分布于北美的野鼠群中,因此必须时刻保持警惕。

**呼肠孤病毒:**繁育种群中对呼肠孤病毒没有免疫力的母鼠所产哺乳小鼠感染该病毒后死亡率很高。从移植性肿瘤中常可分离到该病毒。该病毒可能具有肿瘤溶解性,并可影响涉及肝脏、胰腺、心血管或神经系统的研究。

**淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒:**淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒是一种重要的人畜共患病病原,这也是该病毒对研究最重要的影响,尤其是涉及到实验仓鼠或免疫缺陷小鼠的感染时危险性更高。该病毒具有多器官亲嗜性并且宿主众多,因此常易污染移植性肿瘤、细胞培养、病毒(如白血病病毒、狂犬病毒、小鼠肺炎病毒等)和弓形体,进而污染别的动物设施。该病毒对免疫有刺激或抑制作用。小鼠感染该病毒可抑制由多瘤病毒和乳腺肿瘤病毒所引起的肿瘤,并干扰小鼠和豚鼠的移植性白血病。感

染该病毒可抑制细胞免疫,可延迟对皮肤移植物和移植性肿瘤的排斥。感染还可增加小鼠对鼠痘病毒和细菌内毒素的敏感性。

**乳酸脱氢酶增高症病毒:** 乳酸脱氢酶增高症病毒仍然是移植性肿瘤包括杂交瘤最常见的微生物污染之一。该病毒感染一般不引起临床疾病但可显著地改变巨噬细胞的功能和免疫反应(如一过性胸腺坏死、淋巴细胞减少、细胞免疫抑制、细胞因子活性增高、体液免疫改变、增强或抑制肿瘤生长、对其它病原的免疫力改变、高 $\gamma$ 免疫球蛋白血症、减少自身抗体的形成等),使得被感染的小鼠不能用于免疫学研究。另外,某些品系的动物感染该病毒可引起肾小球肾炎和/或中枢神经系统疾病。

**小鼠脑脊髓炎病毒:** 小鼠脑脊髓炎病毒一直是用于接种小鼠的临床样本包括小鼠血清在内的一种污染物。大多数自然感染的小鼠没有临床症状,但个别的强毒株可引起致死性脑炎,并伴有一过性病毒血症。该病毒可影响中枢神经系统、免疫系统和肌肉骨骼系统的研究。有关大鼠的脑脊髓炎病毒对研究的影响尚无报道,但应该可以视为与小鼠脑脊髓炎病毒相似。

**仙台病毒:** 仙台病毒可以在易感的和免疫缺陷的小鼠引起明显的疾病甚至死亡,使小鼠对细菌性呼吸系统疾病易感性增强,影响免疫反应,并使创伤愈合延缓。虽然未曾有过垂直传播的报道,但胎儿吸收、妊娠延长和胎儿死亡可能与母鼠感染该病毒有关联。该病毒的感染可抑制移植性肿瘤的生长(可能与病毒引起的肿瘤细胞膜的改变有关)。

**支原体:** 肺炎支原体可污染细胞培养,可经由被污染细胞及其产物的注射而传播感染。肺炎支原体可影响到很多的实验研究,感染的小鼠不宜用于研究。该病原可引起临床疾病,隐性感染的鼠可因其它呼吸道病毒如仙台病毒、小鼠肝炎病毒等的介入而出现下呼吸道疾病的暴发。肺脏是主要的靶器官(表现如纤毛功能降低、呼吸道神经支配错乱、内皮细胞形态和功能改变等)但该病原也可在动物体内散布而侵害多个器官系统。肺炎支原体感染可抑制体液和细胞免疫,使动物对其它疾病易感。感染的动物迟发型变态反应减弱、T 细胞亚类改变、淋巴细胞和嗜中性粒细胞数量增多。肺炎支原体感染能影响肿瘤转移实验。而且肺炎支原体感染的动物不能用于其它的支原体的研究。

**大鼠巨细胞病毒:** 大鼠巨细胞病毒与小鼠巨细

胞病毒的抗原性不同。该病原常见于野生大鼠(基于唾液腺的病变而做出的诊断)但不存在于实验大鼠种群。该病毒主要侵害唾液腺和泪腺,引起特异性的“巨细胞”和非化脓性间质性炎症。哺乳鼠脑内接种可引起非化脓性脑炎。据文献记载,该病毒可引起巨噬细胞功能改变、一过性的体液免疫抑制、在器官移植实验中引发(该病毒的)感染、并可加重胶原蛋白诱导的关节炎等。

**大鼠细小病毒:** 大鼠细小病毒的致病株感染可引起疾病和死亡,但其感染最可能影响到依赖于细胞增殖的那些生物学反应。大鼠病毒(RV)具有亲淋巴细胞性,因而可引起免疫反应的改变,例如 T 细胞对移植性肿瘤的应答、在对糖尿病不易感的大鼠品系(通过扰乱 Th1 样 T 细胞应答)引发自身免疫性糖尿病、减弱淋巴细胞混合培养中针对同种异型抗原的增生和细胞溶解性反应等。另外,大鼠的细小病毒具有亲瘤性,可干扰肿瘤动力学。如果细胞培养或其它生物样品污染该病毒可引起细胞病变或病毒传播。

**大鼠轮状病毒:** 大鼠轮状病毒是幼年大鼠传染性腹泻的病原,属于 B 组轮状病毒。该病毒在形态学与以前发现的轮状病毒株相似但具有不同的抗原性,可能来源于人类。哺乳大鼠接种人的轮状病毒分离株后产生和幼年大鼠传染性腹泻一致的腹泻性疾病。大鼠轮状病毒对研究的影响有两个方面,一是该病毒可能来源于人(人畜共患病?),二是造成幼年大鼠的腹泻和一过性生长迟缓。

**大鼠冠状病毒:** 大鼠冠状病毒感染可影响到呼吸系统、唾液腺、泪腺、免疫系统和眼科学的研究。可影响到上述器官、系统的功能和形态学。感染急性期的大鼠唾液腺增大并且呼吸道分泌物增多可妨碍正常呼吸,所以在吸入麻醉过程中常可出现意外死亡。部分大鼠会因泪腺炎和哈德氏腺的功能受损而出现永久性的眼损伤,这个问题常会影响到眼科学研究和长期毒性试验研究。该病毒可加重大鼠的肺炎支原体或纤毛相关呼吸道杆菌的感染。该病毒还能改变大鼠的采食行为、引起繁殖异常(发情周期异常以及新生鼠死亡)、抑制肺巨噬细胞的吞噬和白介素-1 的产生、增强 B 型流感嗜血杆菌在鼻内定植、损耗唾液腺上皮生长因子、加重同种骨髓移植大鼠的移植物排斥宿主疾病等。因为上皮生长因子对繁殖和肿瘤发生有影响,所以对这两方面的研究也可能有影响。胸腺缺如的大鼠对该

病毒尤其易感。

**K 病毒:** K 病毒在实验小鼠群中很少见或不存在, 所以其影响有限, 但是对实验感染的成年裸小鼠还是致病的。

**小鼠巨细胞病毒:** 自然感染小鼠巨细胞病毒的小鼠很少发生明显的疾病。但是该病毒有一系列的免疫抑制作用, 涉及到 B 细胞、T 细胞、巨噬细胞和干扰素等。持续性感染可导致免疫复合物性肾小球肾炎和抗核抗体。该病毒与条件性致病菌如绿脓杆菌有协同作用, 可加重其所致疾病。

**小鼠胸腺病毒:** 小鼠胸腺病毒对新生小鼠的 T 细胞有破坏性作用, 因而可对细胞免疫和体液免疫产生短期或长期的抑制。另外, 由唾液腺制备小鼠巨细胞病毒种子可污染该病毒。

**小鼠肺炎病毒:** 小鼠肺炎病毒对免疫缺陷小鼠有影响, 但在自然情况下对其它小鼠并无重大影响。可在实验大鼠和小鼠发生种间传播。该病毒可加重卡氏肺孢子虫的侵染。

随着科学技术进步和实验动物的产业化, 实验动物的微生物学质量取得了很大的提高并得以保持。但事实上我们现在所担忧的那些实验动物疾病大多都是在过去的 15 ~ 20 年间发现的。一个科研或实验机构在制订生物样品微生物学污染检测的方案时, 尤其是在选定对哪些微生物进行检测时, 应该首先考虑到所要从事的科研内容和实验时间长短、实验设施中饲养的实验动物品系和免疫学状况、某一特定研究要使用的实验动物品系和免疫学状况、生物样品的性质和来源等。其次要去查阅相关的实验动物医学参考资料(学习、了解哪些微生物或病原体可能会和本研究有关、是否有成熟的检测方法等)和/或咨询相关的专家, 初步选定需要

或最好要检测的微生物。再其次要考虑单位内部的微生物学检测机构是否能进行相关的检测。再次要看是否有第三方的实验室可以检测单位内部不能检测的那些微生物, 以及价格、出报告时间等。然后应该查询相关资料, 找出如果有检测出现阳性结果, 是否可以净化、如何净化, 如果不能净化实验可不可以做, 做的话负面影响有多大, 从而在对实验结果作分析时做到心中有数。应考虑采取防范措施以将污染对科研、动物种群生物安全等的影响降到最低。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW. 2002. Laboratory animal medicine[M]. 第二版, California: Academic Press 35 - 158.
- [ 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 426 - 445.
- [ 4 ] Charles River Laboratories Technical Resources website <http://www.criver.com/en-US/TrainEducation/RMS/InfectiousAgent/Pages/home.aspx>.
- [ 5 ] 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.
- [ 6 ] Clifford CB. 2011. Emerging rodent diseases. 13<sup>th</sup> Current Laboratory Animal Sciences Seminar. VA, USA.
- [ 7 ] Clifford CB. 2011. Infectious diseases of laboratory rats. 54<sup>th</sup> Pathology of Laboratory Animals. VA, USA.

(修回日期) 2011-09-07