

屏障环境的哨兵动物应用

赵 勇, 范 春, 朱闽娟, 金 益, 陈国强

(上海实验动物研究中心, 上海 201203)

[摘要] 屏障环境哨兵动物设置除考虑哨兵动物种属、品系、性别、周龄、数量、接触方式、放置位置、检测频次外, 也要考虑排除动物受到的应激对监测结果干扰。依据实验动物“3R原则”, 哨兵动物既可作微生物监测的指示动物, 又可用于饲料营养的监测, 提出设置哨兵动物数即实际检测哨兵动物数。

[关键词] 哨兵动物; 饲料营养监测; 实验动物; 3R 原则

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2020)01-0070-04

实验动物屏障环境(barrier environment)是指符合动物居住要求, 严格控制人员、物品和空气进出, 适用于饲养清洁级(clean animal, CL)和/或无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级实验动物的系统设施。实验动物隔离环境(isolation environment)是指采用无菌隔离装置以保持无菌状态或无外源污染物。隔离装置内的空气饲料、水、垫料和设备应无菌, 动物和饲料的动态传递须经特殊的传递系统, 该系统既能保证环境的绝对隔离, 又能满足转运动物时保持与内环境一致, 适用于饲养 SPF 级、悉生级、无菌(germfree)级实验动物^[1,2]。本文所指屏障环境哨兵动物设置技术也可应用于隔离环境。

屏障系统空气经初效、中效、高效过滤器进入屏障系统, 洁净度达到 7 级, 一般压差为 20 Pa, 沉降菌最大平均浓度(CFU/0.5 h · Φ 90 mm 平皿) ≤ 3, 要求工作人员身体健康, 在淋浴后穿戴无菌工作服、口罩、帽子、手套或者穿戴无菌衣、口罩、帽子、手套, 风淋后进入屏障环境。

实验动物的哨兵动物一般是指用于监控实验

动物饲养环境中病原及病原感染的动物^[3]。哨兵动物一般来源于与被监测动物遗传学背景相同、微生物背景明确的动物。本技术所述哨兵动物借鉴食品卫生哨兵动物应用范围, 除了作为微生物检测所设置的指示动物, 同时监测实验动物饮水、饲料的安全与营养水平, 以及其有害物质的污染状况和风险评估。

1 屏障环境哨兵动物设置总则

一是能够全面反映整个屏障系统的环境状况。二是设置的哨兵动物是同环境中在试实验动物替难者, 同时也要注意哨兵动物的福利, 做到一鼠多检、一鼠多用, 既是微生物监测的指示动物同时也是饲料营养、饮水等的监测动物。三是根据每个屏障设施特点设置哨兵动物, 遵循实验动物 3R 原则的实践^[4-6]。

2 实验动物哨兵动物设置

2.1 哨兵动物遗传学分类的设置选择

2.1.1 选择与被监测动物一致的品系 每个品系的动物各自都具有独特的生物学特性, 近交系动物由于等位基因完全一致, 动物对外界的反应所呈现的表现型也趋一致, 4 周龄 ICR 小鼠, BALB/c 小鼠, C57BL/6 小鼠, 分别饲喂同种含过期鱼粉

[收稿日期] 2019-04-18

[基金项目] 上海市科技创新行动计划(16140900700)

[作者简介] 赵 勇(1974-), 男, 高级工程师, 研究方向: 兽医公共卫生。E-mail: zhaoyong@slarc.org.cn

[通信作者] 陈国强(1967-), 男, 高级兽医师, 研究方向: 实验动物。E-mail: cgqqq@126.com

饲料,与饲喂正常饲料对照组小鼠产生体质量差异($P<0.05$)的时间分别是9周龄、7周龄和8周龄,并且差异随周龄延长而加大,说明不同品系动物对药物或毒物的耐受有差别。建议选择与被监测动物敏感性一致的动物作为哨兵动物。由于大鼠、小鼠的品种差异,大鼠、小鼠病毒感染范围不完全一致,那么同一设施内部大鼠、小鼠都必须分别设置哨兵动物。对于转基因小鼠,哨兵动物应尽量选择其背景小鼠。

2.1.2 选择近交系动物 虽然非近交品系繁殖性能强,且对饲料的营养缺乏有一定耐受性,动物便宜易得,但封闭群或远交系也同时存在对病原体和对某种营养素缺乏,机体反应比近交系动物慢的缺点,近交系动物相对非近交动物对疾病易感程度高,临床表现型也早。目前转基因小鼠应用广泛,转基因小鼠的背景品系小鼠多采用BALB/c和C57BL/6两种近交系小鼠,实验表明,BALB/c小鼠比C57BL/6小鼠对饲料营养缺乏敏感性更高。

2.2 实验动物哨兵动物微生物学分类的设置选择

2.2.1 选择SPF动物 理论上,选用的哨兵动物应为无菌动物或已知菌动物和SPF动物,并且要求预知动物体内抗体携带情况。但实际应用中大都采用SPF级动物。无菌动物或已知菌动物价格昂贵,病原体感染死亡率高,故多选用有针对性的SPF动物进行监测。例如小鼠肝炎病毒(MHV)的检测是动物饲育室比较重要的检测项目,运用BALB/c和C57BL/10小鼠感染率和死亡率都很高,但C57BL/10感染鼠痘病毒(mouse pox)后不出现明显症状^[7,8]。

2.2.2 免疫缺陷动物的选择 免疫缺陷动物感染病原体后抗体生成率低,尤其是NOD-SCID小鼠、NSG小鼠等重症免疫缺陷小鼠的血清学试验常呈阴性,故可能造成假阴性反应。裸小鼠等一些免疫缺陷鼠对饲料的营养及软硬度的要求均异于其它小鼠,除非有特殊需求,一般不选用裸小鼠作哨兵动物,但是考虑到对病原持续性感染有利于病原的分离,可选用有毛杂合体小鼠,例如BALB/c(+nu)^[5]。

2.3 实验动物哨兵动物性别及周龄的设置选择

2.3.1 哨兵动物性别的选择 有文献^[4]认为,选择哨兵动物以雌性动物为宜,既可减少动物打斗

机率,又可避免意外交配形成的遗传污染。但雄性BALB/c和C57BL/6的性成熟均晚于雌性动物,且不存有4~5 d的性同期,激素水平的波动也较雌性为小,雄性动物通过快速生长期到体质量平台生长期时间要比雌性动物晚一周左右,所以实验动物营养监测多采用雄性动物。而且目前饲育动物的IVC笼也不存在意外交配所形成的遗传漂变。故可以在饲育室设置二雌一雄或单一雄级哨兵鼠笼盒。

2.3.2 哨兵动物周龄选择 文献^[5,6,9]建议选择的适龄动物通常为3~8周龄,并能较好反映出被监测动物健康状况。但是目前使用的BALB/c雌鼠3周龄时体质量只有14 g左右,且在转基因动物繁育过程中离乳时间即为4周,建议选择4周龄以上动物作为哨兵动物。再则,考虑到对饲料营养的监测时的快速生长周期为4~10周左右,所以哨兵动物的周龄选择为4~6周为宜。

2.4 实验动物哨兵动物数量设置

2.4.1 哨兵动物的检测数量 实验动物哨兵动物放置数量为饲育动物数的千分之一,如为公用动物实验室则哨兵动物的数量要提高1倍,检测动物数量即为放置动物数量,每笼3只动物。以一个实验饲养单元(同饲养员,同实验人员)管理的SPF级特定饲养区50 m²,共4台IVC笼位数为560笼,设置哨兵动物为5只。这相对于欧洲实验动物学会联盟(FELASA)推荐的计算公式^[6]。当期望检出阳性率达30%时,所需的动物数至少为10只。建议哨兵动物放置和检测数量应该根据检测频率变化而有所调整,当连续3个检测频次的阳性检出率均为零时,也可适当减少哨兵动物数量。

2.4.2 哨兵动物的检测频率 无论是微生物监测和饲料营养监测,建议都是每月1次。检测频次增加相比检测动物数量增加,更可能提高哨兵动物使用效率及检测阳性率。由于病原的宿主特异性相差甚远,有的饲养单元的动物品系各异,对病原的血清学反应也不同,所以每月1次的监测是必要的;同时考虑到大鼠、小鼠的快速生长期为3~8周左右,所以在1个月内动物对营养需求旺盛,故营养检测的阳性率也可提高。当连续3个频次的阳性检出率均为零时,也可适当延长检测周期,但是不应该少于FELASA和我国通常使

用的检测频率即每季度1次^[9,10]。

2.5 哨兵动物设置的位置及接触方式

2.5.1 哨兵动物放置位置 实验动物饲养方式有开放平板架饲养, IVC 饲养及隔离器饲养等。动物室的气流出口一般设在饲养室四周角落, 那么在开放架饲养环境中的底层靠近出风口处为最佳放置位置。各型号 IVC 设置气流方式有所不同, 但一般在 T 字型笼位处气流较强, 故哨兵动物应放置在底层中间位置或正中位置^[11]。可以放置既接受旧垫料又接受废气的哨兵动物来增加检出率^[12]。在隔离器中饲养的哨兵动物, 可设置于出风口下方并可采用 50% 旧垫料法提高检出率^[13]。如果是对环境设施进行微生物监测, 那么对环境气流的进风口也必须设置哨兵动物^[14,15]。

2.5.2 哨兵动物接触方式 直接接触即将哨兵动物直接放入到被监测动物笼中与被监测动物共同饲养 2 周以上, 使哨兵动物直接接触气溶胶、尘埃粒子及排泄物^[9], 此法虽然快捷灵敏, 对接触传播病原及营养监测有高效性, 但缺陷是监测样本量少及动物间打斗和求偶行为等对其干扰影响轻大^[12]。间接接触即将被监测的动物笼盒中的废垫料部分或者全部给予哨兵动物饲养笼。建议 50% 脏垫料来源于 20 笼左右被监测的动物, 饲养时间 4 周以上^[13,14], 同时应用废气通入哨兵鼠笼(氨浓度控制在 14 mg/m³ 以下)可以有效增加 IVC 系统中的微生物监测效率^[14]。

无论是直接接触还是间接接触均不能排除雄性动物求偶及其打斗行为发生, 故建议设置单一雌性动物或前述 2 雌 1 雄的哨兵动物设置。

2.6 隔离检疫场所及动物运输过程监测设置

实验动物进出口的检疫工作除按照《中华人民共和国进出口动植物检疫条例》的规定办理外, 也必须按照《实验动物管理办法》的规定处理, 进口大鼠、小鼠要求有 14 d 的检疫隔离期, 隔离期间并未要求有哨兵动物参与, 但出于对动物饲养场所本身生物安全考虑, 动物到达的 72 h 内应采血样、皮毛和粪便样品进行检测并在动物群中放入接触式哨兵动物, 18 d 后进行检测^[12]。由于目前进口实验动物检疫期只有 14 d, 故可在检疫隔离期满即对哨兵动物进行检测。并对通过检疫入场后动物饲养的 IVC 每层放置哨兵笼

盒, 用旧垫料法进行监测。

运输是实验动物进出口必不可少的环节, 为使运输过程中的污染风险降低到最小, 应用哨兵动物对整个运输过程进行监测是一个有效的方法^[15]。陆路运输选择 UPS 供电的 IVC 或隔离器比较可靠, 同时长途运输对动物的应激较大, 其中空气对实验动物质量影响最大现有的纸盒包装不能完全避免污染, 所以运输期间安放哨兵动物以及在运输工具和隔离场所均可以放置哨兵动物 21 d 以上时间, 每月例检也同样重要。进口实验动物和出口实验动物均建议在其中加入哨兵动物共同运输, 运抵目的地后可进行剖检。目前实施的 14 d 检疫观察期如不进行实体动物剖检, 存在较大污染风险。

综上所述, 屏障环境哨兵动物的设置是保证实验动物质量的主要手段, 除根据环境设施的特点选择哨兵动物的种属、品系、性别、周龄、数量、接触方式、放置位置、检测频次外, 还应考虑哨兵动物的抓取应激和运输应激等人为因素对监测结果的干扰。

同时根据实验动物 3R 理念, 除了哨兵动物应用于微生物监测外, 充分利用哨兵动物对饲料营养进行监测。而不是检测哨兵动物呈阴性即处死其余同笼哨兵动物^[11]。提出设置哨兵动物数即为检测动物数。

参考文献:

- [1] Miller M, Brielmeier M. Environmental samples make soiled bedding sentinels dispensable for hygienic monitoring of IVC-reared mouse colonies [J]. Lab Anim, 2018, 52(3):233-239.
- [2] 黄小燕, 潘裕, 樊海艇, 等. 大鼠小鼠微生物学质量监测中的哨兵动物设置[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 20(8): 67-69.
- [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] Lipman NS, Homberger FR. Rodent quality assurance testing: use of sentinel animal systems[J]. Lab Anim(NY), 2003, 32(5):36-43.
- [5] Homberger FR, Nicklas WM. Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems [S]. 2006.
- [6] Nicklas W, Baneux P, Boot R, et al. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breed-

- ing and experimental units [J]. Lab Anim, 2002, 36(1): 20-42.
- [7] Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research [J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11(2):231-266.
- [8] National Research Council. Infectious diseases of mice and rats [M]. Washington DC: National Academy Press, 1991: 164-171.
- [9] Thigpen JE, 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(4):324-327.
- [10] 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.
- [11] Brielmeier M, Mahabir E, Needham JR, et al. Microbiological monitoring of laboratory mice and biocontainment in individually ventilated cages: A field study [J]. Lab Anim, 2006, 40(3):247-260.
- [12] University of Wisconsin-Madison. Rodent colony health monitoring program policies and placement procedures [S]. 2011.
- [13] University of Missouri. Laboratory animal research core. Rodent Sentinel Program [S] 2003.
- [14] Compton SR, Homberger FR, Paturzo FX, et al. Efficacy of three microbiological monitoring methods in a ventilated cage rack [J]. Com Med, 2004, 54(4):382-392.
- [15] Rehg JE, Toth LA. Rodent quarantine programs: purpose, principles, and practice [J]. Lab Anim Sci, 1998, 48(5): 438-447.
- [16] Dillehay DL, Lehner ND, Huerkamp MJ. The effectiveness of a microisolator cage system and sentinel mice for controlling and detecting MHV and Sendai virus infections [J]. Lab Anim Sci, 1990, 40(4):367-370.

Application of Sentinel Animals in Barrier Environment

ZHAO Yong, FAN Chun, ZHU Minjuan, JIN Yi, CHEN Guoqiang
(Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203 China)

[Abstract] Sentinel animals in barrier environment should not only take into account the species, strain, sex, age, quantity, contact mode, placement position and detection frequency, but also the elimination of interference of animal stress on the monitoring results. According to the 3R theory of laboratory animals, make full use of sentinel animals as feed nutrition monitoring sentinel animals, put forward to set up the number of sentinel animals, that is the actual detection number of sentinel animals.

[Key words] Sentinel animal; Feed nutrition monitoring; Laboratory animal; 3R