

哨兵动物概述

李雨函, 魏 强

(中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物检测中心, 北京 100021)

【摘要】 哨兵动物在我国还未作为一个“工具”用于实验动物微生物检测工作,但随着实验动物种类和特殊动物的日益增加,现有方法已经不能满足检测需要。探讨哨兵动物的应用,采用国外先进方法,对提高我国实验动物质量显得非常重要。本文对哨兵动物的概念、使用方法和设置做一概述。

【关键词】 哨兵动物;实验动物健康监测

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)10-0072-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.010.017

A Brief Introduction of Laboratory Sentinel Animals

LI Yu-han, WEI Qiang

Laboratory Animal Monitoring Center, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of
Medicinal Sciences (CAMS), Beijing 100021, China

【Abstract】 Sentinel animals are rarely used in microorganism detection as a ‘tool’ in our country, but along with the increasing application of various species of laboratory animals and special animals, the currently used laboratory animals are more and more not enough to satisfy the requirement of various detection tests. It is very important to explore and learn from developed countries how to use sentinel animals. In this paper, we will introduce the concept and application methods of sentinel animals.

【Key words】 Sentinel animal; Laboratory animal, health monitoring

实验动物哨兵动物是用于监控实验动物饲养环境中病原及病原感染的动物。除特殊监测需要之外,哨兵动物一般来源于与被监测动物遗传背景相同的无菌或 SPF 级动物。此外,根据监测方式、目标病原的不同需要选择不同性别和年龄的哨兵动物。哨兵动物的设置方式和数量根据动物饲养环境和饲养数量不同而有所区别,监测过程中哨兵动物与被监测动物之间的接触方式主要分为间接接触和直接接触。使用哨兵动物需要遵从两个要点,一是要保证足够检测数量的同时使用最少量的

哨兵动物,二是在整个监测过程中要使哨兵动物最大限度的暴露于潜在的病原感染环境中。为监测动物群中病原微生物,必须对哨兵动物定期进行检测。由于使用少量哨兵动物能够敏感、有效的反映整个实验动物群的病原微生物状态,因此,是一种非常高效的动物健康监测方式。

1 哨兵动物定义和适用性

实验动物学中所指的哨兵动物来源于实验动物,但使用目的不是用于动物实验,而是为了监测

【作者简介】 李雨函(1986-),女,硕士,研究方向主要为实验动物质量控制。Email: liyuhangz@sina.com。

【通讯作者】 魏强,男,博士,教授。Email: weiqiang0430@sohu.com。

实验动物群中病原微生物。也就是说哨兵动物是被特意放置在一定条件下或被饲养在特定位置,而这些位置最有可能是病原传染的区域,使哨兵动物感染疾病的机率增加。哨兵动物作为检测样本,反映群体中病原传播,当没有足够动物(如:仅有少量动物且全部用于实验)用来做检测时或同一个饲养单元中没有合适的动物用于做检测(如:免疫缺陷动物的血清学检测会导致漏检)的情况下,哨兵动物是最适用的监测方法^[1,2]。

由于哨兵动物的设置和管理没有统一的国际标准或者法规,不同地区的实验动物学会对该区域内的哨兵动物使用有一些建议和参考,具体的设置和管理要根据不同的目的而有所不同。因此,哨兵动物的选用依实验而定。

2 哨兵动物的选择

2.1 基本原则

由于没有统一施行的国际标准,并且哨兵动物的使用和设置需根据实验而定,因此对哨兵动物的选择会不同,但应遵循以下要素:①必须无菌或不携带有待监测的特定病原以及抗体。②如果哨兵动物和被监测动物来自不同的繁殖群,则需要选择已知微生物状态的动物作为哨兵动物。③尽可能与被监测动物群的品系相同,但根据监测目的的不同,可选择不同品系的哨兵动物。④免疫反应正常的适龄动物。适龄动物必须能反映出被监测动物的健康状况^[3],一般选用 4~8 周龄的鼠^[1,2]。

2.2 遗传背景

因非近交系动物容易繁殖、成活率高,因而相对便宜,通常情况下用非近交系动物做哨兵动物。虽然他们对大多数病原较敏感,但有的动物发病时的临床症状并不明显。近交系动物(如 DBA/2, BALB/c)相对杂交动物较难繁殖且成本较高,不同品系之间对疾病的易感性和临床表现有较大的区别。例如,鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus, MHV)感染的 A/J 小鼠通常没有非常明显的临床症状,但其他品系(如 C57BL/6)鼠感染率和死亡率都很高。C57BL/6 和其它有抵抗力的品系(如 C57BL/10)感染鼠痘病毒(*Ectromelia virus*)后并不会有明显症状^[5],然而敏感品系(如 A、DAB/2、BALB/c、C3H)感染鼠痘将导致鼠群内高达 80%~90% 的感染率和死亡率^[4,5]。另外,由于近交系动物和转基因动物对某些病原易感,所以适用于特殊情况下的病原

监测。

2.3 其他

因免疫缺陷动物更容易被感染,所以在使用中应特别注意对饲养环境中微生物和其他污染物的控制。免疫缺陷动物不能通过血清学检测它们是否被感染,但是对病原持续性感染有利于病原的分离。若需使用免疫缺陷动物作为哨兵动物,最好将免疫缺陷动物(胸腺发育不完全的 *Foxn1*^{nu} 小鼠和 *Whn*^{nu} 大鼠, B 细胞和 T 细胞缺乏的 *Prkdc*^{scid} 或 *Rag*^{tm1Mom} 小鼠)和免疫系统正常的动物放在相同饲养单元内饲养(最好是有毛杂合体和裸鼠一起饲养)^[1]。

此外,哨兵动物进场之前必须隔离观察和检测,这些都有助于减少经哨兵动物传入的病原,这对免疫缺陷动物尤其重要。为减少动物间的打斗,尤其是雄性动物为争夺资源的打斗行为,接触式哨兵动物一般选用雌性动物较容易与被监测动物群相容^[2]。

3 哨兵动物的应用

3.1 使用方式

哨兵动物与被监测动物的接触方式分为间接接触和直接接触。

3.1.1 间接接触:常用于监测经排泄物传播的疾病,被监测动物数量较多,也用于监测设备或运输材料是否带有病原。间接接触法中最常用的是旧垫料法,即每次换垫料时将被监测笼盒内取出约 2 盎司(约 50 g)垫料放入哨兵动物笼盒内,或使用 100% 旧垫料^[7]。为了保证有足量的垫料满足动物筑巢行为,也可加入一些新的垫料,但至少要保证 50% 的垫料是旧垫料。建议一个小鼠哨兵笼每次接受 12~20 个的被监测笼的垫料,;大鼠和仓鼠每次最多接受来自 10 个被监测笼的垫料^[6]。4~10 周后,该批次哨兵动物被送至检测部门进行检测。如果饲养设施可以将收集的废气通入哨兵笼盒内,也可利用废气法监测经呼吸道传播的病原。因此,对哨兵动物同时用旧垫料和废气可以有效增加 IVC 系统中的微生物监测效率。

3.1.2 直接接触:即将哨兵动物直接放入被监测动物群中,可监测小范围内的经气溶胶或排泄物,分泌物传播的疾病,这种方法可检测到间接接触法不能检测到的病原,被监测动物数量较少^[2]。虽然该法是病原更容易传播的方法未得到证实,但该法可

以有效的检出一些经气溶胶和排泄、分泌物传播的病原^[3,8],最适合用于小群体的健康监测,也适用于一些经由笼具或交叉感染引起的传染病^[2]。但在实际操作中,应注意由于新个体的介入可能引起被监测动物与哨兵动物打斗或者雄性动物选择哨兵动物作为配偶等行为^[9]。

3.2 监测范围和设置方法

3.2.1 入场前监测:对新到的即将进场的动物必须进行检测和监测。未进场之前建议饲养在生物安全级别 2 级的负压环境中。操作人员必须按照生物安全二级实验室要求穿戴工作服。动物到达的 72 h 内采集血、皮肤、粪便样本进行检测。在动物群中放入接触式哨兵动物,18 d 后取出哨兵动物进行检测。检测结果符合要求后动物才能进场饲养^[2]。在之后的饲养阶段中可以使用间接接触式哨兵动物。

3.2.2 入场后监测:在使用开架饲养和层流柜饲养小鼠时,应在饲养架底层每侧放置一个哨兵笼盒,用旧垫料法最多可以监测 34 个笼位。饲养架上少于 35 个笼子的需要在饲养架进口处放置一个哨兵笼。在饲养大鼠和地鼠架的底层每侧放置一个哨兵笼,最多可以监测 24 ~ 30 个笼子^[10]。其它啮齿动物哨兵笼设置要根据需要而定。

IVC 系统中根据饲养方式、条件和要求的不同,每个哨兵笼监测的范围也不同。整个系统中饲养的动物都是同一品系、相同健康标准(如生产繁殖群)、且生产成本并不高的动物群时,可采用随机抽检的方法。但因为每一个被抽检到的笼盒只能代表其相近区域,要求均匀抽检。

当系统内饲养的动物比较珍贵但没有足够的剖检资源;或同一系统内饲养的动物健康要求相同、但笼与笼之间品系不同,旧垫料法或者废气法监测都很适用。若要求较高,可以同时用旧垫料加上废气法更加严格的控制动物质量^[11]。在废气出口处顺其流动方向依次设置仅接受废气的哨兵动物笼,仅接受旧垫料的哨兵动物笼、及接受废气又接受旧垫料的哨兵动物笼^[11]。

每个笼内饲养 4 只哨兵动物,若实验没有特殊要求,一批哨兵动物使用不超过 12 周^[10,11]。在第 6 周时取两只哨兵动物进行剖检,可以检测前 6 周微生物状态。同时在哨兵笼中加入两只新的哨兵鼠以便检测后 6 周微生物状态。在 12 周结束后将哨兵笼中的 4 只哨兵鼠全部进行剖检^[11],后加入的两

只哨兵动物可以反映出后六周的微生物污染状况,另外 2 只可反映出 1 ~ 12 周的微生物状态。

3.2.3 运输和设施监测:为使运输过程中污染风险降低到最小,用哨兵动物监测整个运输过程是保证动物质量的一个有利方法^[9]。在运输设备使用前,将哨兵动物饲养其中,4 周后用血清学检测哨兵动物是否有感染。运输途中由于空气对动物质量影响较大,哨兵动物要和被监测动物饲养在同样的笼子和环境中(如被监测群体的笼具有过滤盖,那么哨兵动物的笼具也要有过滤盖)^[9],运抵目的地后隔离检疫,没有可疑状况再转入正常饲养环境^[10]。

在用哨兵动物对环境设施进行监测时,根据检测目的的不同来设置哨兵动物。若被监测设施有气流和气压的设置,要求在气流进气口处和排气口处都放置哨兵动物进行监测^[6,9]。

3.3 检测数量

哨兵动物检测数量根据被监测动物数量和待监测微生物特性以及实验计划而设定。取样通常以饲养单元为基础。一个饲养单元是指由同一个人(动物饲养员或研究人员)管理的、卫生标准相同的特定动物饲养区。为使检测样本在一定置信区间内能代表整个群体的状况,被检动物的数量要能适当的反应出动物群中的感染率。FELASA 推荐的公式,但仅适用于群体数大于 100 只,感染随机分布于群体中,被检样本是随机采样,传染不受性别年龄影响^[3]。按照 FELASA 推荐的计算公式,期望检出的感染率为 30%,置信度分别为 95%、99%、99.9% 时,所需样本量分别为 10 只、13 只和 20 只动物,在这些待检动物中至少有一只检出为阳性。

3.4 检测频率

检测频率是至少每季度检测一次,也需要根据当地的环境和研究需要增加检测的频率。发病和死亡的动物必须剖检,这是在常规检测之外必须要做的,剖检结果将指导是否要增加检测频率或者增加被检动物的数量。由于一些病原的宿主特异性还并不完全明了,有的饲养单元中不止饲养一种动物,根据检测日程,每种动物要分开检测。同理,如果不同的品系对病原的血清学反应不同也要分开检测。如果相同饲养单元内饲养多个品系就需要至少每年对品系进行一次检测。检测的样本大小主要取决于被监测动物总数的多少、最终要检出的感染率和检测周期。如果病原感染的机率较高,检

测的频率也要随之增多。

4 总结

设置有效地监测项目是保证实验动物质量的重要保障。设计一个有效地检测项目要求将目标置信度,被监测实验动物数量、监测时段,以及为达到质量保障要求所必须的饲养环境都应考虑周全。虽然质量监测项目需花费经费和时间,但这样的成本比发生疫情后导致损失或重建动物种群的支出要少。根据监测目标来确定项目的花费、监测的有效时间和统计学意义都应体现在监测项目的设计中,以确定操作和统计数据的有效性。由于监测项目的可行性是建立在统计学上的,所以当检测项目设立的假设条件难以满足时也会有监测失败。通过增加被检动物数量等适当的补充方法和限制措施来减少检测项目失败的概率也是有必要的。

参考文献:

- [1] Homberger FR, Nicklas WM. Microbiological monitoring of laboratory animals in various housing systems [S]. 2006.
- [2] Lipman NS, Homberger FR. Rodent quality assurance testing: use of sentinel animal systems [J]. Lab Animal, 2003, 32: 36 - 43.
- [3] Nicklas W, Baneux P, Boot R, et al. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units [J]. Lab Animals, 2002, 36: 20 - 42.
- [4] Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research [J]. Clin Microbiol Rev, 1998, 11: 231 - 266.
- [5] National Research Council. Infectious diseases of mice and rats [M]. Washington, D. C. : National Academy Press, 1991: 164 - 171.
- [6] 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 - 392.
- [7] University of Missouri at Kansas City-UMKC, Laboratory animal research core. Rodent Sentinel Program [S]. 2003.
- [8] 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.
- [9] Rehg JE, Toth LA. Rodent quarantine programs: purpose, principles, and practice [J]. Lab Anim Sci, 1998, 48: 438 - 447.
- [10] University of Wisconsin-Madison. Rodent colony health monitoring program policies and placement procedures [S]. 2011.
- [11] Brielmeier M, Mahabir E, Needham JR, et al. Microbiological monitoring of laboratory mice and biocontainment in individually ventilated cages: A field study [J]. Laboratory Animals, 2006, 40: 247 - 260.

[修回日期] 2012-09-25