



广东省 2014 ~ 2016 年普通级兔和豚鼠病毒抗体监测与分析

吴瑞可, 王 静, 潘金春, 李秀珍, 陈梅玲, 黄树武, 闵凡贵 *

(广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510663)

【摘要】 目的 依据 GB 14922.2 标准中 SPF 级动物质量要求, 对 2014 ~ 2016 年广东省生产许可单位的普通级兔和豚鼠进行病毒抗体监测, 分析从普通级动物中筛查 SPF 级动物的可行性。方法 累计收集到来自 6 家单位 9 批次的 167 只普通级兔和 155 只普通级豚鼠血清样本, 采用 ELISA 方法检测 GB 14922.2 标准中规定的 SPF 级动物排除的病毒抗体。结果 兔出血症病毒(RHDV)免疫阳性率 85.4% (134/157), 10 只非兔动物抗体均为阴性, 兔轮状病毒(RRV)阳性率 42.5% (71/167), 兔仙台病毒(SV)结果均为阴性。豚鼠呼肠孤病毒Ⅲ型(REO-3)阳性率 52.9% (82/155), 豚鼠小鼠肺炎病毒(PVM)阳性率 20% (31/155), 仙台病毒(SV)和淋巴细胞脉络丛脑炎病毒(LCMV)均为阴性。结论 普通级兔和豚鼠虽然满足国家标准要求, 但 SPF 级动物质量要求排除的病原污染率较高, 表明不适宜通过群体筛查获得满足 SPF 级质量要求的动物。

【关键词】 普通级; 兔; 豚鼠; 病毒; 抗体检测

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 10-0065-04

doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2017.10.013

Surveillance and analysis of virus antibodies in conventional rabbits and guinea pigs in Guangdong Province during 2014–2016

WU Rui-ke, WANG Jing, PAN Jin-chun, LI Xiu-zhen, Chen Mei-ling, HUANG Shu-wu, MIN Fan-gui *

(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

【Abstract】 Objective To analyze the possibilities of screening SPF rabbits and guinea pigs from conventional animals, viral antibodies of the conventional rabbits and guinea pigs bred by licensed companies in Guangdong province during 2014–2016 were determined according to the standard of SPF animals in GB14922.2. **Methods** Nine batches of 167 rabbit sera and 155 guinea pig sera were sampled from 6 companies. Serum antibodies to virus were determined by ELISA according to GB14922.2. **Results** Positivity of antibody to rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) was 82.2% (129/157) for the vaccinated rabbits, and negative result were obtained for unvaccinated rabbits. Positive rate of rabbit rotavirus (RRV) was 42.5% (71/167). No positive antibody responses to Sendai virus were detected out in all rabbits. The positive rates of guinea pig reovirus type III (REO-3) and pneumonia virus of mice (PVM) were 52.9% (82/155) and 20% (31/155) respectively. Antibody responses to Sendai virus (SV) and lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) were negative in all guinea pigs. **Conclusions** Although the conventional rabbits and guinea pigs could meet the national

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2015BAI07B01); 广东省科技计划项目(2015A030302028)。

[作者简介] 吴瑞可(1984-), 女, 本科, 研究方向: 实验动物微生物学。E-mail: 359295772@qq.com

[通讯作者] 闵凡贵(1980.2-), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 实验动物与比较医学研究。E-mail: minfangui@aliyun.com

standard, higher infection rates of virus excluded that SPF animals emerged in conventional animals, indicating that selection of SPF animals from conventional colonies is impracticable.

【Key words】 Conventional animals; Rabbits; Guinea pigs; Virus; Antibody detection

兔和豚鼠是目前国内使用量较大、标准化程度较高的实验动物,广泛应用于生物科学研究和医药检验等领域。随着科学研究和医药检验要求的提高,清洁级和 SPF 级兔和豚鼠的用量逐步增加,但因受制于较高的生产和使用成本,清洁级及 SPF 级兔和豚鼠尚未获得广泛应用,目前,仍以普通级兔和豚鼠为主。从家兔流行病学调查结果来看,兔轮状病毒(rabbit rotavirus, RRV)和兔出血症病毒(rabbit hemorrhagic disease virus, RHDV)感染率较高^[1,2],并且对动物健康危害较大。国内关于豚鼠病毒的流行病调查较少,相关报道显示淋巴细胞脉络丛脑炎病毒(lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV)是对豚鼠健康威胁较大的病毒^[3,4]。

由于普通级兔和豚鼠生产设施的环境质量控制措施有限,导致动物病原暴露机会增加,加之普通级动物需排除的病原较少,部分条件性致病微生物可能直接影响动物的质量及动物实验结果的准确性和重复性。本研究依照国家标准 GB 14922.2 规定的 SPF 级动物质量要求^[5],对 2014~2016 年本机构监督抽查的普通级兔和豚鼠的样本进行检测,分析病原携带情况,探讨在普通级动物群体中筛查 SPF 级动物的可行性,以期实验动物生产、管理、使用和实验动物标准的制(修)订提供参考。

1 材料和方法

1.1 血清样品

2014~2016 年,累计收集到来自广东省内 6 家实验动物生产单位(分别定义为 A、B、C、D、E、F 单位)的 9 批次 167 份普通级兔和 155 份普通级豚鼠血清,每批次抽样数量为 5~25 个。兔均为新西兰系,豚鼠主要以 FMMU、Hartley 等白化品系为主,并有少量三色豚鼠。兔经耳缘静脉或耳中央动脉采血,豚鼠经心脏采血,分离血清, -80℃ 保存。

1.2 主要试剂和仪器

ELISA 试剂盒均源于美国 XpressBio 公司,购自苏州西山生物科技有限公司。本次检测两种动物共计七种病毒的 ELISA 试剂分别为:兔出血症病毒(RHDV) ELISA 试剂(批号:K7057)、兔轮状病毒(RRV) ELISA 试剂(批号:K6951)、兔仙台病毒(SV) ELISA 试剂(批号:K6970)、豚鼠淋巴细胞脉

络丛脑炎病毒(LCMV) ELISA 试剂(批号:K6948)、豚鼠小鼠肺炎病毒(PVM) ELISA 试剂(批号:K6947)、豚鼠呼肠孤病毒 III(REO-3) ELISA 试剂(批号:K6617)、豚鼠仙台病毒(SV) ELISA 试剂(批号:K7008)。

酶标仪为 Thermo Multiskan Fc;洗板机为伯乐 BIO-RAD1575 酶标洗板机;恒温培养箱为上海跃进 PYX-DHS 隔水式电热恒温箱。

1.3 实验方法

1.3.1 检测项目

兔病毒检测项目包 RRV、RHDV 和仙台病毒(Sendai virus, SV)。豚鼠病毒检测项目包括呼肠孤病毒 III(Reovirus type III, REO-3)、小鼠肺炎病毒(Pneumonia virus of mice, PVM)、SV 和 LCMV。

1.3.2 检测方法

根据 ELISA 试剂盒说明书进行抗体检测。兔、豚鼠各病毒均按以下步骤进行检测:将血清样本 1:50 稀释,再向 ELISA 微孔板对应的样品孔各加 100 μL 稀释好的样本和阴性、阳性对照(阴性、阳性对照不稀释),37℃ 孵育 45 min 后洗板 5 次,拍干微孔板;每孔加 100 μL 酶标二抗,37℃ 孵育 45 min 后洗板 5 次,拍干微孔板;加显色液室温孵育 30 min;反应完毕,立即用酶标仪读板,测试波长为 405 nm。

结果判定方法:样本(或对照) OD 值 = 特异孔 OD 值 - 非特异孔 OD 值;阳性对照 OD 值 ≥ 0.600,阴性对照 OD 值 ≤ 0.250,则试验成立;样本 OD 值 ≥ 0.300 判为阳性,样本 OD 值 < 0.300 判为阴性。

1.4 统计学方法

根据病原的免疫和感染情况,分别计算抗体阳性率,评价免疫保护率和感染率。抗体阳性率为抗体阳性的个体数量占采样总量的百分比;免疫保护率为免疫群体中抗体检测结果为阳性的个体数量占采样总量的百分比;某病毒感染率是指该病的阳性个体数占总采样数量的百分比,而己知群体并未曾针对该病毒进行过免疫。

2 结果

2.1 普通级兔检测结果

本次检测结果见表 1。对于普通级兔,国家标准只对 RHDV 做出规定,可以免疫,也可不免疫。除 E 单位 2016 年未进行免疫外,其他单位各抽样时

间段均进行了免疫,免疫后群体抗体阳性率均在 70% 以上,3 年的总体阳性率为 85.4% (134/157),未免疫的动物抗体均为阴性。

E 单位未检出 RRV 外,其他 5 家受检单位均检出 RRV,3 年的总体检出率为 42.5% (71/167);对于 SV,3 年来,所有单位均未检出。

SPF 级兔另需排除的 2 种病毒 RRV 和 SV。除

表 1 2014 ~2016 年普通级兔检测结果
Tab. 1 Test results of conventional rabbits in 2014 -2016

单位 Companies	检测项目 Items	抗体阳性率(阳性数/样本总数) Positive rates(positive number/total number)			
		2014	2015	2016	合计 Total
A	RHDV *	85% (17/20)	85% (17/20)	81.8% (18/22)	83.9% (52/62)
	RRV	55% (11/20)	5% (1/20)	40.9% (9/22)	33.9% (21/62)
	SV	0% (0/20)	0% (0/20)	0% (0/22)	0% (0/62)
B	RHDV *	85% (17/20)		100% (25/25)	93.3% (42/45)
	RRV	65% (13/20)		92% (23/25)	80% (36/45)
	SV	0% (0/20)		0% (0/25)	0% (0/45)
C	RHDV *	85% (17/20)			85% (17/20)
	RRV	20% (4/20)			20% (4/20)
	SV	0% (0/20)			0% (0/20)
D	RHDV *	72% (18/25)			72% (18/25)
	RRV	20% (5/25)			20% (5/25)
	SV	0% (0/25)			0% (0/25)
E	RHDV #			0% (0/10)	0% (0/10)
	RRV			0% (0/10)	0% (0/10)
	SV			0% (0/10)	0% (0/10)
F	RHDV *			100% (5/5)	100% (5/5)
	RRV			100% (5/5)	100% (5/5)
	SV			0% (0/5)	0% (0/5)

注: * 表示动物已免疫;#表示动物未免疫。

Note. *, indicates that animals have been vaccinated; #, indicates that animals are not vaccinated.

表 2 2014 ~2016 年普通级豚鼠检测结果
Tab. 2 Test results of conventional guinea pigs in 2014 -2016

单位 Companies	检测项目 Items	抗体阳性率(阳性数/样本总数) Positive rates(positive number / total number)			
		2014	2015	2016	合计 Total
A	PVM	0% (0/20)	53.3% (8/15)	4.6% (1/22)	15.8% (9/57)
	REO-3	75% (15/20)	80% (12/15)	59.1% (13/22)	70.2% (40/57)
	SV	0% (0/20)	0% (0/15)	0% (0/22)	0% (0/57)
	LCMV	0% (0/20)	0% (0/15)	0% (0/22)	0% (0/57)
B	PVM	80% (16/20)		0% (0/25)	35.6% (16/45)
	REO-3	85% (17/20)		4% (1/25)	40% (18/45)
	SV	0% (0/20)		0% (0/25)	0% (0/45)
	LCMV	0% (0/20)		0% (0/25)	0% (0/45)
C	PVM	0% (0/20)			0% (0/20)
	REO-3	45% (9/20)			45% (9/20)
	SV	0% (0/20)			0% (0/20)
	LCMV	0% (0/20)			0% (0/20)
D	PVM	0% (0/13)			0% (0/13)
	REO-3	0% (0/13)			0% (0/13)
	SV	0% (0/13)			0% (0/13)
	LCMV	0% (0/13)			0% (0/13)
E	PVM			33.3% (5/15)	33.3% (5/15)
	REO-3			66.7% (10/15)	66.7% (10/15)
	SV			0% (0/15)	0% (0/15)
	LCMV			0% (0/15)	0% (0/15)
F	PVM			20% (1/5)	20% (1/5)
	REO-3			100% (5/5)	100% (5/5)
	SV			0% (0/5)	0% (0/5)
	LCMV			0% (0/5)	0% (0/5)

2.2 普通级豚鼠检测结果

普通级豚鼠检测结果见表 2。对于普通级豚鼠,国家标准只对 LCMV 做出规定,要求阴性,3 年来所有抽检的样本检测结果均为阴性。

清洁级豚鼠要求进一步排除 SV,SPF 级豚鼠在清洁级基础上排除 REO-3 和 PVM。3 年来,所有抽检的动物均未检测到 SV,但 PVM 和 Reo-3 抗体阳性率均较高,PVM 的总体检出率为 20% (31/155),Reo-3 的总体检出率为 52.9% (82/155)。

3 讨论

随着生物医药行业的快速发展,普通级兔和豚鼠已经不能完全满足科研和检验需求,而清洁级和 SPF 级兔和豚鼠的产能有限,从普通级动物群体中筛选满足清洁级和 SPF 级动物质量要求的兔和豚鼠成为解决当前供求矛盾的捷径。本研究对 2014~2016 年监督抽查的样本进行了复测,涵盖 SPF 级动物质量要求排除的病毒项目,旨在了解目前普通级动物病毒的感染情况,为动物实验应用和动物筛查提供参考。

从本次调查结果来看,普通级兔 RHDV 群体免疫合格率均达到 70%,未免疫的动物抗体检测结果均为阴性,符合国家标准的要求。RRV 是 SPF 级兔要求排除的病毒,调查结果显示该病毒感染率较高,9 次抽检结果仅 1 次未检出,表明该病毒污染严重。SV 已被证实可影响家兔的热原试验,存在交叉感染^[6,7],也是 SPF 级兔要求排除的病原,此次调查未发现普通级兔携带 SV。

普通级豚鼠均未检出 LCMV,满足普通级动物

质量要求。同时,所有动物均未检出 SV,表明 SV 感染率极低,可以通过日常管理控制该病原。然而,SPF 级豚鼠要求排除的 2 种病毒 Reo-3 和 PVM 的感染率均较高,表明基于现有的普通级豚鼠群体筛查满足 SPF 级质量要求的动物可行性低,批量获得满足 SPF 级质量要求豚鼠需要严格依照 SPF 级动物生产繁育的要求进行生产繁育。

综上所述,广东地区现有的普通级兔和豚鼠符合国家标准规定的普通级动物质量要求,但 SPF 级动物规定的病毒污染率高,基于普通级动物群体筛选高质量动物的可行性不高,需要建立 SPF 种群进行生产繁育。

参考文献:

- [1] 徐春厚,崔思列. 兔轮状病毒的流行病学调查[J]. 中国兽医杂志,1994,21(8):6-8.
- [2] 王孝友,杨睿,沈克飞,等. 三峡库区兔病毒性出血症流行情况调查[J]. 黑龙江畜牧兽医,2014,04:43-44.
- [3] 李雨函,魏强. 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒感染实验动物的情况概述[J]. 中国比较医学杂志,2013,23(1):46-49.
- [4] 周娉,董伟,刘建高,等. 湖南省实验动物中几种常见的人兽共患病监测[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(3):74-75.
- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 实验动物微生物等级及监测[S]. GB/T 14922. 2-2011.
- [6] 胡春萍. 仙台病毒对家兔体温的影响[J]. 中国养兔杂志 2000.1:13-14
- [7] 田克恭,贺争鸣,刘群,等. 实验动物疫病学[M]. 北京:中国农业出版社. 2015:360-366.

[收稿日期] 2017-03-16

专家问答

问:光声断层扫描系统介绍

答:多光谱光声断层扫描系统(multispectral optoacoustic tomography, MSOT)主要是利用了光声成像原理。光声成像是近年来发展起来的一种无创医学成像方法,是根据生物组织对光的吸收分布反映组织结构的一种新兴的成像模式。该技术检测的是超声信号,因而能够克服纯光学成像技术在成像深度与分辨率上不可兼得的缺陷,并解决单纯超声成像技术在对比度和功能性方面的不足。结合光学和超声这两种成像技术各自的优点,MSOT 能实现对组织体较大深度、高分辨率、高对比度三维功能成像。我们认为,MSOT 和 MR 搭配是目前搭建实验室最完美的方式。

(感谢第四军医大学 师长宏 教授和冷泉港生物科技股份有限公司分子影像部门副总经理 王志宇 先生的解答)