

探讨药物 GLP 试验用 Beagle 犬检疫验收的技术要点

孙昌华, 刘毅, 肖英, 魏霞, 祝清芬

(山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

【摘要】 实验动物的检疫验收是一项控制动物在流通环节免受污染、防止疫病发生和传播的重要工作, 是实现实验动物质量标准化的关键。Beagle 犬因其遗传稳定, 对环境的适应能力和抗病力较强, 在试验中反应一致性好, 是被国际所公认的专用实验犬, 在药物安全性评价实验中应用广泛。建立药物 GLP 机构试验用 Beagle 犬检疫验收的标准操作规程, 细化检疫验收的技术要点, 加强检疫人员的技术培训, 努力提高检疫水平, 最终确保实验动物质量。

【关键词】 GLP; Beagle 犬; 检疫

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 06-0063-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2017. 06. 013

Main technical points of quarantine inspection of Beagle dogs used for drug GLP experiment

SUN Chang-hua, LIU Yi, XIAO Ying, WEI Xia, ZHU Qing-fen

(Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

【Abstract】 The quarantine inspection and acceptance of laboratory animals is an important work, which can protect animals from pollution, occurrence and spread of diseases in the surrounding area, and it is the key point to realize the quality standardization of laboratory animals. Beagle dogs are acknowledged widely as specialized laboratory dogs which is widely employed in experiments of drug safety evaluation because of the good genetic stability, environmental adaptability, disease resistance and consistency testing in the experiments. Establishment of standard operating procedures of beagle dog quarantine acceptance check for drug GLP organization tests, refining technical points, strengthen the technical training of quarantine officers, and efforts to improve the level of quarantine are needed to finally ensure the quality of laboratory animals.

【Key words】 Good laboratory practice; Beagle dog; Quarantine; Drug safety evaluation; Laboratory animals

实验动物的健康是保证动物试验结果准确性, 实现动物质量标准化的基础。在实验动物饲养与应用条件标准化的基础上, 防止实验动物流通环节免受污染、切断传播途径、淘汰非健康实验动物显的尤为重要。同时, “以检促防” 严格的检疫验收也

是对实验动物供给单位的有效监督^[1]。优良实验室规范 (Good Laboratory Practice, GLP) 是用于规范与人类健康和环境有关的非临床安全性研究的一整套组织管理体系, 包括机构设置、人员资质、试验计划、试验实施过程、试验的监督、记录、档案和报

【作者简介】 孙昌华 (1984 -), 男, 兽医学博士, 国家执业兽医师, 研究方向: 食品药品安全性评价, E-mail: sunchanghuavip@163.com。

【通讯作者】 祝清芬 (1973 -), 男, 药理学博士, 主任药师, 研究方向: 药检药理及食品药品安全性评价, E-mail: zhuqingfen73@163.com。

告的管理^[5]。GLP 的目的是组织、规范和管理科学技术人员的研究行为,促进科研人员提高实验数据的质量和完整性,从而避免出现假阴性或假阳性结果,保障实验结果的可靠性、完整性和可重复性^[2]。在试验实施过程中,实验动物的检疫验收是试验即将开始的第一步,做好动物的检疫验收工作,对动物质量进行把关,也是保证实验顺利开展的重要一步。

Beagle 犬(比格犬),又叫小猎兔犬,原产英国,是猎犬中较小的一种。1880 年引入美国,体型小(成年体重为 7~10 kg,体长为 30~49 cm),短毛和体质均一,性温和,具有性成熟期早(8~12 个月),产仔数多等优点,而且对环境的适应力强、抗病力强^[3,4]。Beagle 犬在试验中反应一致性好,是目前生命科学领域中最标准的犬种,是被国际所公认的专用实验犬,在药物安全性评价实验中获得广泛应用^[5]。结合本中心的在实际工作中的情况,现将 Beagle 犬在检疫验收环节的经验进行交流,相互学习,共同进步。

1 Beagle 犬的采购

实验专题负责人根据实验方案填写《动物申购书》,动物管理负责人依据《动物申购书》,选择有动物生产许可资质、质量合格、管理体制健全、信誉好^[6]和具有一定规模的实验动物供应单位。如果初次建立供求关系,可以提前安排人员到供应单位进行实地考察或参考兄弟单位的意见。兽医应依据实验方案和/或《动物申购书》提前了解供应单位情况及所购进 Beagle 犬的数量、年龄、性别、体重范围等基本信息。

2 Beagle 犬的运输

国家科学技术委员会 1988 年发布的《实验动物管理条例》第 21 条规定,实验动物的运输应当有专人负责,运装工具应当安全、可靠,不得将不同品种、品系或者不同等级的实验动物混合装运^[7]。国家科技部 2006 年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》关于实验动物运输的内容已经相对完备^[8,9]。《实验动物环境及设施》国家标准中对运输笼具、运输工具、运输动物都做了明确的规定,在运输途中,运输工具应配备空调等设备,使实验动物周围环境的温度和湿度维持在正常范围内,以保证动物的质量。如果运输时间超过 6 h,应保证实验动

物在运输途中有充足的符合要求的饲料和饮水^[10,11]。此外,《中华人民共和国动物防疫法》^[12],《中华人民共和国野生动物保护法》^[13],《国家重点保护野生动物驯养繁殖许可证管理办法》^[14]等法律法规从各方面对全部或特定的实验动物的运输提出了监管要求。

3 运输工具、运输笼具的检查

动物管理负责人应与动物运输负责人保持畅通的联系,安排相关人员进行动物接收。当动物到达目的地后,动物管理负责人和兽医应对运输工具和笼具进行检查,查看运输条件是否符合要求,检查车厢内的温湿度、运输密度。运输犬的笼具要坚固耐用,内外角圆滑,笼内无尖锐的突起,保证犬的安全^[3]。同时,检查笼具内有无饮水用具及动物饮水情况。

4 Beagle 犬的验收检查

动物管理人员按照《动物申购书》的要求,结合供应商提供的《实验动物生产许可证》复印件、《动物质量合格证》、《动物健康档案》、《动物检疫合格证》,认真核对相关信息。信息核对完毕无误后,动物管理人员将全部动物资料移交兽医。新入室的动物应由兽医进行检疫^[15],兽医是药物安全性评价单位中的检疫验收的负责人,负责整个检疫验收环节。

犬常用的标识方法主要有挂牌法和针刺法。挂牌法是指用金属或其他材质等制作的标牌,写上编号挂在动物的颈部、耳朵等部位,但挂牌可能使动物感到不适,常会用前爪搔抓号牌而使挂牌的部位损伤。针刺法则是采用人工或机器针刺号码打号,然后涂以酒精黑墨即可,通常选择耳部进行标记。供应商所选择的动物标识方式各不相同,通常情况下大多选择犬耳廓内侧针刺标记法识别。

由于在运输过程中 Beagle 犬处于一种特殊的不断变化的环境之中,非常容易遭遇惊恐、疲劳或导致额外的痛苦或损伤,以及病原微生物的感染。此外,运输也会对犬造成一定的应激,因此在卸车时一定要轻卸轻放,动物卸车由动物管理负责人统筹安排,卸车过程切不可着急,以井然有序为标准。动物卸车后工作人员及时向兽医报告动物编号,兽医根据动物编号逐一核查《动物质量合格证》、《动物检疫合格证》、《健康档案》的信息,随后进行动物

个体进行验收检查。

4.1 动物整体及一般状态检查

4.1.1 体格发育、营养程度的检查:体格、发育状况通常可根据骨骼与肌肉的发育程度及各部的比例关系来判定。体格分为体格强壮、体格中等和体格纤弱;发育状况可分为发育良好和发育不良^[16]。营养程度通常根据肌肉的丰满度,特别是皮下脂肪的蓄积量来判定,被毛的状态和光泽,也可作为参考。动物的营养状态,是动物体营养代谢情况的标志^[17]。通常情况下将营养程度分为营养过肥和营养不良。

首先对 Beagle 犬做一个初步的检查,包括躯体结构的匀称度,肌肉结实度。下一步用手紧贴皮肤触摸其躯干部,感受皮肤的弹性、肌肉的丰满度。正常状态犬应表现为躯体匀称、发育良好、肌肉丰满、被毛光泽;反之病理状态则表现为躯体矮小、结构不匀称、消瘦、被毛蓬乱无光泽、皮肤缺乏弹性等,多提示为营养不良或慢性消耗性疾病的表现。

4.1.2 精神状态、姿势与体态的检查:动物的精神状态,是其中枢神经机能的标志,可根据其对外界刺激的反应能力及其行为表现进行判定^[17]。犬有不同的神经类型,导致不同的性格。巴甫洛夫将犬分为四种神经类型:均衡的灵活性,即多血质(活泼型);均衡的迟钝型,即黏液质(安静型);不均衡,兴奋占优势的兴奋型,即胆汁质(不可抑制型);兴奋和抑制不发达,即忧郁质(衰弱型)^[18]。因此,在检疫验收过程中应与其他检查项目相结合进行综合考虑和分析。

姿势与体态则是指动物在相对静止或运动过程中的空间位置和呈现的姿态。此项检查相对来讲比较直观,很容易发现,主要是犬姿势的自然、动作的灵活性。若犬在站立或行走时,四肢软弱无力,四肢强拘,不敢负重,多数情况下表明四肢有异常;如果犬躺卧不起,躯体蜷缩,头置于腹下或卧姿不自然,不时翻动,则表明有腹痛症状。

4.1.3 表被状态、浅表淋巴结的检查:表被状态的检查,主要注意被毛、鼻尖、皮肤、皮下组织的变化,以及表在外科病变的有无情况。犬的浅表淋巴结检查通常选择下颌淋巴结。

正常情况下,犬每年春、秋季节会脱换新毛。健康的犬被毛平顺而富有光泽,病理状态下被毛蓬松粗乱、失去光泽、容易脱毛,多伴有精神不振等表现。通常情况下,病理性脱毛现象分营养性脱毛

和皮肤病及外寄生虫病脱毛。

正常犬鼻尖呈油状滋润,能灵敏反应其全身的健康状况,人以手背触其鼻尖有凉感,若发现鼻尖如滋润,手背触其无凉感,或有热感,则将得病,或以得病^[18]。

犬的汗腺不发达,仅鼻尖有一种鼻镜腺和脚(枕部)有汗腺。在炎热的季节,犬常常将舌头伸出口外做喘式呼吸^[1,18,19]。健康犬皮肤湿度触诊时表现不湿不粘。皮肤温度触诊时最好用手背,因手背对温度比较敏感,并应与邻近部位相比较,这样感觉更准确。皮肤的弹力与皮肤的神经营养状态、肌纤维的收缩力量以及皮下脂肪含量的多少有密切关系^[17]。临床上常把皮肤弹力减退程度作为判定机体脱水的指标之一^[17]。临诊上根据皱褶恢复的速度进行判定,皮肤弹性良好则立即恢复原状,皮肤弹性减退则恢复原状缓慢^[16]。在药物非临床研究机构中,依据国家食品药品监督管理局颁布的《药物重复给药毒性试验技术指导原则》要求,应根据试验期限和临床拟用人群确定动物年龄,Beagle 犬 6~12 月龄^[20]。兽医依据《动物申购书》的年龄要求综合考虑,幼龄及营养好的犬皮肤富有弹性。

犬皮下组织与表在外科病变通常一起检查,兽医通过触诊方式主要检查是否有局灶性的肿物、疖、创伤等。

浅表淋巴结的检查犬主要以下颌淋巴结为主,触诊下颌支内侧,感触其大小、形状、硬度、敏感性 & 活动性。

4.1.4 眼睛、可视粘膜的检查:健康犬双眼明亮、不羞明、不流泪、眼睑无肿胀、眼睑无外伤、眼角物分泌物。可视粘膜的检查通常以检查眼结膜为主,因其具有丰富的毛细血管,颜色变化除反应其局部的病变外,还可推断全身的血液循环状态及血液某些成分的改变^[21]。可视粘膜检查可以在光线良好的条件下或光线不好借助于器械进行检查。通常用两手的拇指和食指配合打开上下眼睑进行检查^[16]。健康犬的眼结膜呈淡红色,病理情况下可表现为潮红、苍白、黄染、发绀。

4.1.5 呼吸系统的观察:呼吸系统主要以观察呼吸方式和呼吸是否困难为主。健康动物一般为胸腹式呼吸,即在呼吸时,胸壁和腹壁的运动很协调,强度也大致相等,因此亦可称为混合式呼吸。只有犬例外,正常时即以胸式呼吸占优势^[17]。

4.1.6 消化、泌尿系统的观察:消化、泌尿系统主要

以观察是否有呕吐状况、粪尿情况为主。因犬是很容易呕吐的动物,尤其是在机体不适的情况下,主要观察是否有呕吐状况,如有呕吐,注意呕吐物的数量、气味及性质。此外,还应注意粪尿的气味、色泽、性状等。

兽医对新购入的 Beagle 犬进行整体及一般状态检查完毕后,详细填写《动物检疫书》,对检查合格的犬进行检疫验收的下一个环节,对检查有异常或有疑似疾病倾向的犬及时汇报实验专题负责人,并与动物运输负责人进行沟通,做好 Beagle 犬的退还工作。

4.2 驱虫

Beagle 犬整体及一般状态检查合格后进入检疫室之前,先进入洗浴室进行体外驱虫。GLP 机构购进的 Beagle 犬,绝大部分是普通级犬,供应单位在每只犬的健康档案中详细记录了疫苗接种、驱虫等情况。为了更好的保护动物自身的健康,有效的保障动物实验室的生物安全和实验人员的人身安全,及时安排体外驱虫还是非常有必要的。

体外寄生虫是指寄生于动物体外并暂时性吸取营养的寄生虫。如蚊、白蛉、蚤、虱、蜱等,吸血时与宿主体表接触,多数饮饱后即离^[22]。犬常见的体外寄生虫主要分为蚤和螨两大类。其中感染犬的跳蚤以猫蚤为常见;感染犬的螨类主要包括耳痒螨、疥螨、虱子、蜱虫。

随着驱虫药的研发和使用,犬的体外驱虫方式也有较多的选择。传统的体外驱虫方法主要以药浴为主,药物价格比较便宜,以双甲脒溶液等为代表,此药为接触性广谱杀虫剂,驱虫效果好但具有一定的毒性,在使用时一定要掌握好用药剂量及注意事项。另一种为非药浴方式,即使用喷剂或滴剂驱虫药。此类药具有使用方便、疗效好等特点,价格比传统药浴方式要高。代表药品为辉瑞的大宠爱、梅里亚的福来恩、英国的埃尔金等。喷剂主要是逆毛喷洒,让犬全身湿透,注意保护眼睛和口鼻(避免接触药物);滴剂给药部位主要选择犬颈背部,拨开毛发,直接将药物滴在皮肤上即可。两种体外驱虫方式需要注意的是药浴方式洗完后需要用吹风机吹干;非药浴方式最好不用吹风机,自然晾干驱虫效果更好。

4.3 体重称量

犬体外驱虫结束后进行体重称量,兽医应结合《动物申购书》认真核对《动物健康档案》中的体重

记录,填写《动物检疫书》,查找最大体重和最小体重,核对《动物申购书》中所要求的体重范围,如有异常及时汇报实验专题负责人。

4.4 移入检疫室

犬称重完毕后,雌雄区分,依次放入检疫室内,进行单笼检疫期饲养。

4.5 笼卡标识

犬进入检疫室后,依据《实验方案》要求进行检疫期笼卡标识。

4.6 完善检疫记录

犬进入检疫室后兽医检查标识笼卡,核对笼卡与犬耳廓内侧刺青标编号,核对雌雄犬饲养位置及数量,检查《动物检疫书》中需要详细记录的内容,完善检疫记录,确认签字后方可离开检疫室。

5 Beagle 犬的检疫检查

Beagle 犬通过验收环节移入检疫室后,进入了检疫期检查及驯化饲养阶段。《药物重复给药毒性试验技术指导原则》要求,给药前应对动物进行适应性饲养,非啮齿类动物不少于 2 周^[20]。犬经过至少 2 周的检疫期及驯化饲养阶段,首先让其适应新的生活环境,其次通过一定时间的饲养观察能及早发现动物潜在的病症,最后动物得到了饲养员、试验员的驯化,增加了与人的亲密度,性情也趋于温顺,便于试验的顺利开展。

检疫期内兽医应在每天上班后、饲养人员清理卫生前,进行大体观察并询问饲养人员动物的饮水、采食情况,边观察边记录。大体观察事项主要包括:营养状况、自发活动、步态、神经症状、皮肤、呼吸、粪便、尿液、眼睛分泌物、饮食、饮水等情况。此外犬在检疫期内还应进行至少 2 次体温、血液学、血液生化和至少 1 次心电图检测^[20]。兽医详细记录观察结果,发现问题时及时向动物管理负责人和/或实验专题负责人汇报,共同讨论处理措施。

实验动物质量限于实验动物生产单位控制微生物的程度。在药物非临床研究机构中所使用的 Beagle 犬主要以普通级犬为主,在市场供需关系的调控下,如何把握好犬检疫验收的尺度,如何把握好检疫验收的质量控制点,是关系检疫验收工作成败的关键。期盼在实验动物管理部门、实验动物生产和使用单位以及从事实验动物工作的人员共同努力下,实验动物的检疫验收工作会不断开创新的局面。

参考文献:

- [1] 胡楚元. 试论如何在实践中做好实验动物的检疫验收 [J]. 中国畜禽种业, 2010, 6(11): 24-25.
- [2] 张伟, 杨威, 李波, 等. 中国药物 GLP 理论与实践 [M]. 北京, 中国医药科技出版社, 2013.
- [3] 何诚. 实验动物科学 [M]. 北京, 中国农业大学出版社, 2007: 95-99.
- [4] 窦如海, 金东庆, 郝君良, 等. 实验动物与动物实验技术 [M]. 济南, 山东科学技术出版社, 2006: 28-30.
- [5] 杨光, 吕耀中. 药物安全评价试验中普通级 Beagle 犬的管理 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(S1): 350-351.
- [6] 李松滨, 李宝龙. GLP 试验用 Beagle 犬的饲养管理 [J]. 实验动物科学, 2015, 32(3): 54-55.
- [7] 山东省实验动物管理政策法规汇编. 2010 年出版. 济南: 山东省实验动物中心, 2010: 2-7.
- [8] 梁春南, 李明, 李保文, 等. 实验动物运输中的福利保障 [J]. 中国动物保健, 2012, 14(9): 20-23.
- [9] 国科发财(2006)398 号. 关于善待实验动物的指导性意见. 中华人民共和国科学技术部关于发布《关于善待实验动物的指导性意见》的通知, 2006.
- [10] 王宁, 王箫, 王金林. 基于动物福利的实验动物管理 [J]. 动物医学进展, 2010, 31(12): 148-152.
- [11] GB/14925-2001. 实验动物环境及设施 [S].
- [12] 中华人民共和国主席令第七十一号. 中华人民共和国动物防疫法. 2007.
- [13] 中华人民共和国主席令第二十四号. 中华人民共和国野生动物保护法. 2004.
- [14] 国家林业局令第 37 号. 《国家重点保护野生动物驯养繁殖许可证管理办法》. 2015.
- [15] 蒋婀娜, 张春光, 刘兆平. GLP 实验中的动物福利 [J]. 实验动物科学, 2008, 25(4): 76-77.
- [16] 执业兽医资格考试应试指南(下册) [M]. 中国兽医协会. 北京, 中国农业出版社, 2010: 899-911.
- [17] 陆承平. 兽医硕士专业学位兽医基础知识全国统一(联合)考试大纲及复习指南 [M]. 北京, 中国农业大学出版社, 2004: 324-376.
- [18] 秦川. 医学实验动物学 [M]. 北京, 人民卫生出版社, 2008: 110-113.
- [19] 孙德明, 李根平, 郑振辉, 等. 实验动物从业人员上岗培训教材 [M]. 北京, 中国农业大学出版社. 2015;3: 95-99.
- [20] 国家食品药品监督管理总局. 药物重复给药毒性试验技术指导原则 [S]. 北京: 2014.
- [21] 李国江. 动物普通病 [M]. 北京, 中国农业出版社. 2001:8: 14-40.
- [22] 刘光磊, 刘景利, 李一经, 等. 犬常见的体外寄生虫及驱虫药的选择 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2015, (08): 112.

[修回日期]2016-12-07

专家问答

1、问:如何建立小鼠心肌肥厚模型?

答:心肌肥厚是心脏功能从代偿期转向失代偿的关键阶段,是心力衰竭的重要病理生理基础,主要包括生理性肥厚和病理性肥厚。心肌肥厚是导致临床心血管疾病的独立风险因素,并可使得心血管病人死亡率至少提高两倍。心肌肥厚主要发生在长期压力负荷过重的情况下,心肌总量增加,收缩力加强,但长期功能代偿会最终导致心肌收缩力减退,失代偿并转为心衰。临床症状包括呼吸困难,胸痛,乏力,心悸,晚期出现心力衰竭。目前制备心肌肥厚的常用方法(1)压力超负荷法:主动脉缩窄法,肾动脉缩窄法和自发性高血压模型。(2)容量负荷法:动静脉短路致右心室肥厚,肾切除后高盐诱导心肌肥厚。(3)心肌梗死致心肌肥厚(如结扎左前降支)。(4)激素诱导法(去甲肾上腺素,异丙肾上腺素,甲状腺素等)。诱导机制包括压力负荷及神经内分泌和细胞信号转导途径等导致心肌肥厚。其中压力负荷法是目前应用最广泛的方法,即经开胸手术结扎主动脉弓重建血管导致心肌肥厚。

2、问:心肌肥厚小鼠模型评价指标?

答:目前常用的评价指标包括:利用超声分析模型小鼠心脏功能(经典超声参数,如短轴缩率(percent fractional shortening, FS%),射血分数(ejection fraction, EF%))和形态变化(经典超声参数,如左室后壁厚度(left ventricular posterior wall, LVPW),左室前壁厚度(left ventricular anterior wall, LVAW),左室内径(left ventricular diameter, LVD));心重与体重比值(heart weight/body weight ratio, HW/BW ratio);利用病理组织学分析心脏整体几何形态及心肌细胞形态(如,H&E 染色后定量测量形态变化);心肌纤维化程度(如利用 masson's stain 观察胶原沉积情况,定量 PCR 分析 I 型及 III 型胶原的表达变化)。

(感谢中国医学科学院医学实验动物研究所 吕丹 的解答)