



无菌猪的制备与微生物质量控制

孙静^{1,2,3}, 杜蕾^{1,4}, 丁玉春^{1,2,3}, 吴梦^{1,2,3}, 罗林^{1,2,3}, 杨松全^{1,2,3}, 黄勇^{1,2,3},
曹浩然^{1,2,3}, 钟浩⁵, 刘作华^{1,2,3*}, 葛良鹏^{1,2,3*}

(1. 重庆市畜牧科学院, 重庆 402460; 2. 农业部养猪科学重点实验室, 重庆 402460;
3. 重庆市养猪科学重点实验室, 重庆 402460; 4. 西南大学动物科学学院, 重庆 402460;
5. 重庆百斯达生物科技有限公司, 重庆 402460)

【摘要】 菌群与宿主相互关系等热点研究促进了对无菌动物需求的迅猛发展。无菌猪作为一种特殊的模式动物, 其在科学研究中不仅排除了背景微生物因素的影响, 而且与常用的无菌小鼠相比, 其在解剖、生理、代谢等方面与人更为相似, 因此在生命科学研究领域具有重要的应用价值。本文结合现有国外无菌猪研究进展和本实验室在无菌猪研究积累, 就无菌猪的制备与微生物质量控制进行简要探讨。

【关键词】 无菌猪; 屏障环境; 饲养隔离器; 微生物学监测

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2017) 06-0699-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2017.06.021

Breeding and microbiological quality control of germ-free pigs

SUN Jing^{1,2,3}, DU Lei^{1,4}, DING Yu-chun^{1,2,3}, WU Meng^{1,2,3}, LUO Lin^{1,2,3}, YANG Song-quan^{1,2,3}, HUANG Yong^{1,2,3},
CAO Hao-ran^{1,2,3}, ZHONG Hao⁵, LIU Zuo-hua^{1,2,3*}, GE Liang-peng^{1,2,3*}

(1. Chongqing Academy of Animal Husbandry Sciences, Chongqing 402460, China; 2. Key Laboratory of Pig Industry Science, Ministry of Agriculture, Chongqing 402460; 3. Chongqing Key Laboratory of Pig Industry Sciences, Chongqing 402460; 4. Chongqing BEST Bio-Technology Company Limited, Chongqing 402460)

【Abstract】 The industry of germ-free animals has been a hot spot in research along with the rapid development of studies on the relationship between microbiota and host diseases. Because it is pathogen-free, and the high degree of similarity in anatomy, physiology, pathogenesis to humans, germ-free pig is considered a clinical relevant model to be widely used in life science research. Based on the current state of research of germ-free pig cultivation at home and abroad and the experimental studies carried out in our laboratory as well, this article gives a simple discussion on germ-free technique of domestic pigs.

【Key words】 Germ-free pig; Barrier environment; Rearing isolator; Microbiological control

Corresponding author: GE Liang-peng. E-mail: geliangpeng1982@163.com; LIU Zuo-hua. E-mail: liuzuohua66@163.com

随着菌群与宿主相互作用研究的深入, 菌群与健康的关系越来越受到大家的关注, 客观上促进了科学研究对高等级实验动物的需求, 无特定病原体

(specific pathogen free, SPF) 动物已不能满足当前菌群与宿主相互作用的研究需求。无菌(germ-free, GF)动物由于不携带任何可检测的微生物, 可排除

【基金项目】 国家重点研发计划项目(No. 2017YFD0501600); 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项项目(No. 17306); 重庆市基本科研业务费项目(No. 16422); 重庆市农发资金项目(No. 17408)。

【作者简介】 孙静, 女, 博士, 研究方向: 无菌猪的培育与应用。E-mail: sunjing85026@163.com

【通讯作者】 葛良鹏, 男, 博士, 研究方向: 动物资源创新开发利用。E-mail: geliangpeng1982@163.com;

刘作华, 男, 博士, 研究方向: 地方猪资源保护与利用。E-mail: liuzuohua66@163.com

背景微生物对实验结果的干扰,获得高重复性、高敏感度的实验结果。相较常用的无菌小鼠,无菌猪由于在肠道组织结构、消化特性、以及解剖和生理代谢等方面与人类更为近似,特别是人肠道中的双歧杆菌属、乳杆菌属和梭菌属的一些菌种,无法在无菌小鼠中定植,却可以在无菌猪中定植^[1],因此利用无菌猪制备人源化肠道菌群动物模型,其重现度更高^[2]。无菌猪的应用,已从最早用于畜牧生产重大疫病净化,逐渐扩展为用于肠道微生物与生长发育、疾病发生关系研究,以及儿童疫苗、婴幼儿奶粉等质量评价研究^[3, 4]。此外,利用 CRISPR-Cas9 基因编辑技术和猪的无菌净化技术,未来有望将猪作为人类自体器官培养的工厂,有效解决器官移植供体不足和安全性问题^[5]。

微生物质量控制是无菌猪培育的核心质量指标,本文结合现有国内外无菌动物培育技术^[6]和课题组前期阶段性工作^[7],对无菌猪培育及微生物质量控制技术体系进行简要探讨。

1 无菌猪的制备过程

1.1 妊娠母猪的筛选

妊娠猪应在良好的饲养管理下,且从猪病少的猪场中选择。不宜选择初产和第 6 胎次以上的,且临床上排除经胎盘垂直传播的四种疾病,即猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征、猪伪狂犬病、细小病毒病的妊娠猪。

四种疾病均为阴性的妊娠猪,在实施手术当天移动到动物清洁间。移动时应在 3~4 h 内完成,尽可能减少母猪应激。一般在预定分娩日的前 3 d 内进行,早于该时间新生仔猪存活困难。妊娠末期应积极观察母猪行为,减少因提前分娩而终止手术的事件发生。手术需与子宫剥离器、动物无菌运输器的配合完成。

1.2 饲养环境与条件的准备

1.2.1 隔离装置及准备

猪的无菌获取与维持离不开子宫剥离器、动物无菌运输器和饲养隔离器的配合使用。此三类隔离装置都为耐腐蚀、密封性能好,具有独立的空气过滤系统、操作橡胶手套、观察窗和移动滚轮。

装置内,采用 2% 过氧乙酸喷雾灭菌,1~2 h 后送风,经微生物检测合格,持续空转备用。手术前 1 d,将子宫剥离器和动物灭菌运输器用 PVC 套筒连接,2% 过氧乙酸喷雾灭菌套筒,1 h 后送风过夜,排

除设备内残余消毒液,备用。

1.2.2 屏障环境的维持

上述三种装置始终在屏障设施下使用。需严格执行屏障设施的操作规范。净化猪舍的洁净区各房间,采用 1.5%~2% 过氧乙酸喷雾消毒,一般每天 1 次。若实验人员进出次数增加,应适当增加消毒次数。

1.3 无菌仔猪的获取

1.3.1 妊娠母猪术前准备

动物清洁间内,母猪限位于移动栏中,以温水冲洗母猪体表,擦干;移动至手术准备间,用海绵刷子将母猪胸腹部全部涂抹碘伏;再将妊娠猪移至手术间,进行异氟烷呼吸麻醉、绑定于手术床上。

1.3.2 剖腹产手术

待妊娠猪不动时,对其整个腹部再次进行碘伏消毒。之后,立即切开腹部,将整个子宫拉出,对子宫颈部结扎、割断,将子宫浸入子宫剥离器的灭菌渡槽内消毒 10~20 s。接着两名手术人员将子宫从渡槽拖出到剥离器内的操作平台上,从妊娠子宫中取出胎仔、擦干羊水、切断脐带。

1.3.3 仔猪的转移

将取出的胎猪通过灭菌的 PVC 套筒,快速移至动物无菌运输器中,密封运输器传递口上内外密封罩,以尽量降低消毒液对仔猪的刺激。可利用电炉加热运输器底部,保持在 37℃ 左右,防止仔猪受冻。如有必要,对仔猪进行人工辅助呼吸。以上手术操作时间控制在半小时内完成。

1.4 无菌仔猪的饲养

1.4.1 代乳料

饲喂无菌仔猪,采用⁶⁰Co 辐照、经微生物检测合格后的牛乳,加入维生素剂,制成无菌代乳料。考虑到市售猪用奶粉中添加有抗生素,推荐用无抗菌素的人用牛乳进行制作。辐照代乳料应按批次定期抽检,对微生物检测不合格的当批次代乳料全部不予使用,并及时移出洁净存放间。

1.4.2 人工哺乳与保温

无菌仔猪在饲养隔离器内哺乳。一般,新生仔猪取出后数小时内第 1 次哺乳。仔猪无需奶瓶等强制授乳,只需将灭菌牛乳倒入隔离器内各食槽即可。最初可将仔猪嘴部轻按入食槽,仔猪基本即可自行采食。3 日龄前,每天早晚两次给料,每次约 200 mL;4 日龄后逐渐增加给料量,每次 250~500 mL。不必给水。3 周龄后,可补充适量

辐照米粉。

新生无菌仔猪必须注意保温。从子宫灭菌用的消毒液,胎仔的取出、新生仔猪的无菌运输以及隔离饲养过程都需要加强保温措施。3 日龄内,饲养隔离器内温度应保持在 35 ~ 37℃,可采用电炉从隔离器底部加热;1 周龄内,隔离器内温度应维持在 32 ~ 35℃;此后逐渐降低,3 周龄时隔离器内温度不宜低于 25℃。

2 无菌猪培育的微生物学质量控制

2.1 饲养环境质量监测

2.1.1 屏障设施

无菌猪获取与饲养设备都必须在屏障设施内,屏障设施必须依据 GB 14925 - 2010《实验动物环境及设施》中无菌动物生产间和实验间的环境技术指标要求,设计、装修、运行以及日常监测。

2.1.2 隔离器

隔离器用于获取、运输和饲养无菌猪。根据 GB 14925 - 2010 的要求,洁净度应达到 5 级,空气沉降菌检测应无检出。

2.2 饲料和饮水的微生物检测

无菌猪用的饮水、饲料标本微生物学检测方法参见 GB/T 14926.41 - 2001。标本采集后,分别用脑心浸液肉汤和硫乙醇酸钠肉汤富集,在需氧和厌氧条件下 37℃ 培养 7 d 以上,再转接到血琼脂培养基上,37℃ 下 24 h 后观察是否存在细菌生长;同时,涂片与革兰染色,显微镜检查,最终判断是否存在细菌污染。

2.3 妊娠母猪的质量监测

宜根据实验目的选择合适的猪种:当以畜牧研究为主或短期实验时,选择荣昌猪、太湖猪等地方品种或约克夏等大型品种;若以医学生物学研究为主或长期实验时,选择巴马小型猪等品种。

妊娠猪要求未注射 PRRS 弱毒疫苗,应外观健康、无异常;应在良好的饲养管理下,且从猪病少的猪场中选择。不宜选择初产和第六胎次以上的,且临床上排除经胎盘垂直传播的四种疾病,即猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征、猪伪狂犬病、细小病毒病。本实验室病原筛查方法参照 GB/T16551、GB/T18641、NY/T679 和 NY/T2840 执行。

2.4 无菌猪微生物质量监测

无菌动物的微生物检测范围基本一致,都涉及细菌、病毒、真菌的检测^[8]。目前,我国未颁布无菌

猪微生物检测国标。本实验室主要通过血清学检测、细菌分离与培养、血涂片检测等技术,建立了一套无菌猪质量控制的企业标准,采用随机抽样法对隔离设施内猪群进行质量监控。

2.4.1 细菌检测

采用最常用的病原菌分离与培养方法进行细菌检测。采集猪肛门拭子、鼻拭子或新鲜粪便样品,接种于血琼脂培养基,分别在需氧和厌氧条件下培养 48 h 及以上;同时,对样品涂片、革兰染色后显微镜检查。

2.4.2 真菌检测

无菌猪的真菌检测一般采用大豆蛋白胨培养基分离培养。皮肤真菌一般在 25℃ 培养,深部真菌在 37℃ 时培养 7 d。根据培养基上菌落及特点,判断是否存在真菌污染。有时,还需借助于生物化学反应结果和免疫学方法进行最后诊断。

2.4.3 病毒检测

可感染猪的病毒有数百种之多,在实际生产过程中对每一种病毒都进行检测是不现实的。我们综合无菌检测结果,选择四种能在猪上进行垂直传播病毒进行无菌猪质量监控,他们是:猪瘟病毒、细小病毒、猪伪狂犬病病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒。

2.4.4 微生物检测采样要求

动物检测数量根据无菌猪饲养群体而确定。由于本实验室设计的无菌猪隔离器内最多可饲养四头无菌猪,因此随机取样数量为一头/隔离器。每 2 ~ 4 周检测一次动物的生活环境标本和粪便标本。检测结果阳性者表示该群动物有该病原体感染的存在,必须及时淘汰整个隔离器内所有动物体;并对该隔离器进行严格消毒灭菌处理后,再次检查合格后使用。

3 无菌猪制备的关键质量控制点

3.1 猪的品种选择

培育无菌猪的目的主要是为了研究菌群和宿主的作用,而菌群的定植与宿主的遗传背景密切相关,不同品种的猪其体内微生物定植各不相同,需要根据实验目的的不同选择不同品种的实验用猪。如在畜牧业研究方面,研究菌群对某品种猪饲料消化吸收的影响,可选择对应品种的猪培育无菌猪。而在医学研究方面,为保证重复性和操作方便,建议选择封闭群或近交系小型猪,如巴马猪等。

3.2 灭菌方法的选择

3.2.1 物品灭菌

进入屏障环境和无菌猪饲养隔离器内的物品都必须经过严格的灭菌处理。一般,耐热、耐高压物品,如手术器械、器具,应首选压力蒸汽灭菌;不耐热、不耐湿的物品,如采样拭子、采血针等宜采用环氧乙烷等低温灭菌方法。无菌猪生产、实验用大型笼具,宜采用低温甲醛熏蒸灭菌方法。而无菌猪用袋装辐照日粮则由紫外传递窗转入屏障环境,并在使用前 1 d 放入饲养隔离器上灭菌套筒内,用 2% 过氧乙酸喷雾灭菌后静置 1 h 以上,转入隔离器内,待用。

3.2.2 饮水灭菌

屏障设施内用水为纯水。纯水经装瓶、高温、高压灭菌处理,冷却后经隔离器上灭菌套筒,用 2% 过氧乙酸消毒瓶子表面后静置 1 h 以上,转入隔离器内,作为无菌猪的饮用水。

3.3 无菌猪的质量标准

无菌猪不含任何现有方法检测出活的微生物。其无菌是一个相对的概念,不是一个绝对的概念。目前存在数百种可以感染猪的病毒,而没有一种通用方法可一次检测出是否发生病毒感染,在实际工作中同时对数百种病毒进行检测也不现实。因此在制定无菌猪的质量标准时,需要统筹考虑标准的实用性和可操作性。根据本实验室的经验,采用无菌剖腹产获得无菌猪,只要细菌检测达到无菌要求,可排除外源病毒感染的风险,只需对四种能通过母胎屏障垂直传播的四种病毒进行检测,即可保证无菌猪的质量要求。

3.4 科学协作提高成功率

无菌猪的培育牵涉到多门学科知识,环节复杂,任何一个细节的疏忽和过程衔接的失误都会导致无菌猪培育的失败。因此,需要科学合理设置岗位,制定详细的岗位职责和操作规程,确保日常培训管理到位。岗位设置至少包括项目负责人、实验动物质量管理人员、动物实验操作技术人员、动物饲养员、环境保洁员、设备操作与维护人员等。同时,做好

“空气流”、“物流”、“物品流”和“人流”这四流进出设施的净化处理,建立和执行完善的规章制度和操作规程,才能保障屏障设施和隔离器的规范化运营,培育获得质量合格的无菌猪。

4 结语

随着肠道菌群功能研究的日益深入,对无菌猪的需求也随之日益增加,但在实际工作中,要培育获得无菌猪并长期维持无菌状态并非易事。无菌猪的培育离不开妊娠母猪的质量控制、饲料质量控制、环境与设施设备质量保证以及微生物质量监测,是一项复杂而细致的系统工程,与人员的管理,设备的维护、操作规程和技术标准的制定等因素息息相关。因此需要科学合理的统筹安排,严格细致的执行操作规程,精益求精的工作态度才能为科学研究培育出合格的无菌猪。

参 考 文 献

- [1] Arrieta MC, Walter J, Finlay BB. Human microbiota-associated mice; a model with challenges [J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(5): 575–578.
- [2] Wang M, Donovan SM. Human microbiota-associated swine: current progress and future opportunities [J]. *ILAR J*, 2015, 56(1): 63–73.
- [3] 杜蕾, 孙静, 葛良鹏, 等. 无菌猪的研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(5): 546–550.
- [4] 杜蕾, 孙静, 葛良鹏, 等. 肠道菌群对动物免疫系统早期发育的影响 [J]. *中国畜牧杂志*, 2017, 53(6): 10–14.
- [5] Wu J, Platero-Luengo A, Sakurai M, et al. Interspecies chimerism with mammalian pluripotent stem cells [J]. *Cell*, 2017, 168(3): 473–486 e15.
- [6] 前岛一淑, 柏崎守, 上村文雄. 实验动物的无菌技术 [M]. 1983, 北京: 科学出版社. 198.
- [7] 孙静, 杜蕾, 丁玉春, 等. 无菌猪生长、血液以及脏器相关指标的测定 [J]. *中国实验动物学报*, 2016, 24(4): 388–394.
- [8] 中华人民共和国国家标准. GB 14922.2–2011 实验动物 微生物学等级及监测 [S]. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局、中国国家标准化管理委员会, 2011.

[收稿日期] 2017–09–11