

实验大鼠和小鼠多种细菌 PCR 检测与分析

冯 洁^{1,2}, 谢建云², 魏晓锋², 冯丽萍², 张 泉^{1*}, 高 诚^{2*}

(1. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009; 2. 上海实验动物研究中心, 上海市实验动物质量监督检验站, 上海 201203)

【摘要】 目的 调查上海市实验动物生产设施大鼠、小鼠细菌携带状况。**方法** 比较国内外实验动物细菌监测方案, 选取螺杆菌、啮齿柠檬酸杆菌、牛棒状杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和肺炎克雷伯杆菌作为检测项目, 分别于2014年和2016年收集样品共计848份, 采用PCR方法对上述6种病原体进行检测。**结果** SPF级设施均无金黄色葡萄球菌污染, 清洁级设施2014年无肺炎克雷伯杆菌污染, 其它病原体在不同级别设施内均有不同程度的污染, 所有清洁级设施均存在螺杆菌和牛棒状杆菌污染。螺杆菌、啮齿柠檬酸杆菌和牛棒状杆菌在不同级别动物上均检出阳性。螺杆菌、绿脓杆菌阳性率呈下降趋势, 而啮齿柠檬酸杆菌、牛棒状杆菌、肺炎克雷伯杆菌阳性率则呈上升趋势。**结论** 本研究全面、系统地分析了上海地区实验大鼠、小鼠细菌携带状况, 为提高实验动物质量和饲养管理水平起促进作用, 为我国实验动物国家标准的修订和完善提供依据和参考。

【关键词】 大鼠; 小鼠; 细菌; PCR

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 10-0089-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.10.015

Investigation of various bacteria in laboratory rats and mice by PCR assay

FENG Jie^{1,2}, XIE Jianyun², WEI Xiaofeng², FENG Liping², ZHANG Quan^{1*}, GAO Cheng^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai Quality Monitoring Center of Laboratory Animals, Shanghai 201203)

【Abstract】 Objective To investigate bacterial infection in laboratory rats and mice from production facilities in Shanghai. **Methods** Programs for monitoring bacteria in laboratory animals were compared between China and elsewhere. A total of 848 samples were collected from the laboratory animal production facilities of Shanghai from 2014 to 2016. *Helicobacter* spp., *C. rodentium*, *C. bovis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, and *K. pneumoniae* were tested by PCR for the monitoring project. **Results** *S. aureus* contamination was not identified in SPF facilities in 2014 and 2016. *K. pneumoniae* contamination was not identified in clean level facilities in 2014. There were different degrees of contamination by other pathogens in facilities of different levels. *Helicobacter* spp. and *C. bovis* could be detected in all clean level facilities. *Helicobacter* spp., *C. rodentium*, and *C. bovis* were detected in animals at all levels. The rates of positivity for *Helicobacter* spp. and *P. aeruginosa* declined over time, but those of *C. rodentium*, *C. bovis*, and *K. pneumoniae* rose. **Conclusions** This study investigated the prevalence of bacteria in rats and mice in Shanghai from 2014 to 2016. This work should promote the quality of laboratory animals and the levels of feeding and management, and also provide an important reference for the optimization of standards for laboratory animals.

【Keywords】 rat; mouse; bacterium; PCR

[基金项目] 上海市科技创新行动计划(17140900600)。

[作者简介] 冯洁(1981—), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 实验动物质量控制, E-mail: moyifj@163.com

[通信作者] 张泉(1979—), 男, 教授, 研究方向: E-mail: zquan@yzu.edu.cn。高诚(1961—), 男, 研究员, E-mail: gaocheng@slarc.org.cn。

* 共同通信作者

实验动物微生物学质量是评价实验动物质量的重要指标之一,定期对实验动物进行微生物质量监测是确保动物质量的重要手段。欧洲实验动物联合会(FELASA)定期发布和更新详细全面的实验动物健康监控指南和人员培训计划,详细阐述了监测病原体的种类、采样要求和检测方法等^[1]。国际知名的实验动物企业(如 CRL、Taconic)均制定一系列企业标准和检测制度,对于病原体项目、动物年龄、检测方法和频率均有明确指示。我国于 1994 年颁布了国家标准《实验动物微生物学等级及监测标准》并陆续进行了修改和完善,按照微生物学和寄生虫学规定了不同等级实验动物应排除的病原体及对应的检测方法。2017 年以来中国实验动物学会制定并发布两批团体标准,新增了部分病原体项目及检测方法,对于我国实验动物质量保证和提升起到了促进作用。本研究在详细比较国内外实验动物细菌监测方案并结合实际的基础

表 1 不同年份实验动物生产设施、动物数量统计表

Table 1 Numbers of laboratory animals and production facilities tested in different years							
年份 Year	检测设施数量/个 Number of facilities		大鼠/只 Rats		小鼠/只 Mice		动物总数/只 Total number
	屏障环境(清洁级) Barrier system (CL)	屏障环境(SPF 级) Barrier system (SPF)	清洁级 CL	无特定病原体动物 SPF	清洁级 CL	无特定病原体动物 SPF	
2014	4	9	30	78	64	191	363
2016	4	13	18	60	91	316	485
累计 Total	/	/	48	138	155	507	848

表 2 动物品系分布表
Table 2 Animal strain distribution

品系 Strain	样本总数 Total number	
	2014 年	2016 年
SD	58	57
Wistar	44	17
ZDF	6	4
C57	40	73
BALB/c	44	63
ICR	46	54
Scid	18	36
KM	46	66
Nude	30	75
GEM	31	6
db/db db/db	/	6
ob/ob	/	6
F1	/	22
合计	363	485

上,选取国外普遍要求检测而我国国标暂未纳入(螺杆菌、啮齿柠檬酸杆菌、牛棒状杆菌)以及国标规定检测(金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和肺炎克雷伯杆菌)的细菌指标作为调查项目,采用 PCR 方法对 2014 年和 2016 年上海市实验动物生产许可证单位实验大鼠、小鼠的部分细菌携带状况进行调查。调查结果可为上海乃至全国实验动物微生物质量控制提供参考,也可为国家标准的修订和完善提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本次调查的实验动物包括小鼠和大鼠,来源于 2014 年和 2016 年上海市具有实验大鼠、小鼠生产许可证的单位。清洁级和 SPF 级动物均饲养于屏障环境。各年度检测设施数量、动物数量及品系分布详见表 1 和表 2。

1.2 主要试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,Taq DNA 聚合酶、2 × Taq Plus Master Mix (Dye Plus)、DL2000 plus DNA Marker 购自南京诺唯赞生物科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 样品处理

无菌采集动物回盲部内容物,取 0.2 g 悬浮于 1 mL 的 PBS(pH7.4),850 r/min 离心 5 min 后取上清液,按照细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书进行 DNA 模板抽提。获得的 DNA 样品于 -20℃ 保存备用。

1.3.2 PCR 引物序列

参考文献^[2-5],根据 GenBank 登录的牛棒状杆菌 16S rRNA 序列(NR_118465.1),利用 Primer 5.0 设计 1 对特异性引物。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物信息见表 3。

表 3 PCR 引物列表
Table 3 Sequences of PCR primers

细菌名称 Bacteria	引物序列 Primer name	退火温度(°C) Annealing temperature	产物长度(bp) Fragment length
螺杆菌 <i>Helicobacter. spp</i>	P7: CTATGACGGGTATCCGGC P8: ATTCCACCTACCTCTCCCA	53	374
啮齿柠檬酸杆菌 <i>C. rodentium</i>	CR1: TGCTGGTGCTATCTCATCTGTC CR2: GCAAGGCTGCTAACACAACAA	61	420
牛棒状杆菌 <i>C. bovis</i>	CB1: GTGGCGAACGGGTGAGTAA CB2: ACACACTAAAGCACGGTCTAT	61	100
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	SA1: CTTTAGCCAAGCCTTGACGAAC SA2: AAAGGGCAATACGCAAAAGAGGT	56	484
绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i>	PA1: GCACCCGCAACGCATCAA PA2: CCTGGAAGGCTCCGAATAGTG	56	278
肺炎克雷伯杆菌 <i>K. pneumoniae</i>	KP1: TGGCCCCGCCCGAGGGTTCGAAA KP2: GATGTCGTCATCGTTGATGCCAG	56	368

1. 3. 3 PCR 反应程序

PCR 反应体系 50 μL,包括 2 × Taq Plus Master Mix(Dye Plus)25 μL,上下游引物(10 μM)各 1 μL, DNA 模板 2 μL。

PCR 反应程序:95℃ 预变性 5 min 后,按 95℃ 变性 30 s,退火 30 s,72℃ 延伸 30 s 的程序循环 34 次,最后 72℃ 延伸 10 min。

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测分析。将不同来源的阳性 PCR 产物进行归类,随机挑选阳性产物经凝胶电泳纯化回收后送至至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序结果与 GenBank 中已知核酸序列进行 BLAST 比对、验证。

2 结果

2.1 设施分析

如图 1 所示,在 SPF 级设施未检出金黄色葡萄球菌污染,清洁级设施 2014 年未检出肺炎克雷伯杆菌污染,其它病原体在不同级别设施内均有不同程度的污染。所有清洁级设施均存在螺杆菌和牛棒状杆菌污染,SPF 级设施的螺杆菌和牛棒状杆菌污染率分别为 77.78% (2014 年)、61.54% (2016 年)和 66.67% (2014 年)、92.31% (2016 年)。

2.2 病原检测结果分析

如图 2 所示,大鼠螺杆菌阳性率为 34.26% (2014 年)和 25.64% (2016 年),啮齿柠檬酸杆菌阳性率为 4.63% (2014 年)和 17.95% (2016 年),牛棒状杆菌阳性率为 23.15% (2014 年)和 33.33% (2016 年),金黄色葡萄球菌阳性率为 5.56% (2014

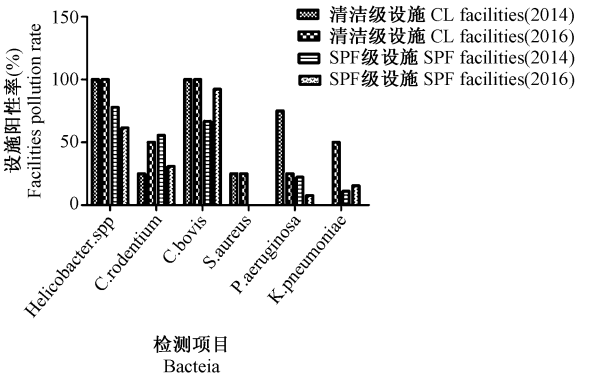


图 1 不同细菌检测项目的设施污染率比较
Figure 1 Comparison of rates of contamination of facilities with different bacteria

年)和 7.69% (2016 年),绿脓杆菌和肺炎克雷伯杆菌均未检出阳性。小鼠螺杆菌阳性率为 40.39% (2014 年)和 29.73% (2016 年),啮齿柠檬酸杆菌阳性率为 5.88% (2014 年)和 15.48% (2016 年),牛棒状杆菌阳性率为 19.22% (2014 年)和 38.33% (2016 年),金黄色葡萄球菌阳性率为 1.57% (2014 年)和 0% (2016 年),绿脓杆菌阳性率为 9.80% (2014 年)和 0.74% (2016 年),肺炎克雷伯杆菌阳性率(2014 年 0.78%,2016 年 3.69%)。

分别对不同级别动物不同年份的阳性率进行分析。如表 4 所示,螺杆菌仅清洁级大鼠阳性率呈上升趋势,其他级别均下降。啮齿柠檬酸杆菌和牛棒状杆菌在不同级别动物上的阳性率均呈上升趋势。国标要求排除的 3 种细菌,金黄色葡萄球菌仅清洁级有阳性检出,SPF 级均为阴性,符合国标要求。大鼠绿脓杆菌无阳性检出,不同年份、不同级

别的小鼠均有阳性检出,但均呈下降趋势。大鼠肺炎克雷伯杆菌无阳性检出,小鼠仅 2014 年清洁级为阴性,其他均有阳性检出。

对阳性动物品系进行分析,螺杆菌阳性率相对较高的品系有 BALB/c、ICR、KM 等,仅 KM 阳性率升高,其它品系阳性率均下降。来自同一设施的 22 只清洁级 F1 小鼠螺杆菌全部为阳性。所有品系动物均检出牛棒状杆菌阳性。大多数品系的啮齿柠檬酸杆菌和牛棒状杆菌阳性率均呈升高趋势。金黄色葡萄球菌仅 SD 大鼠和 BALB/c 小鼠检出阳性。绿脓杆菌和肺炎克雷伯杆菌阳性样品均集中在小鼠。在动物饲养管理和使用过程中应加以关注(表 5,表 6)。

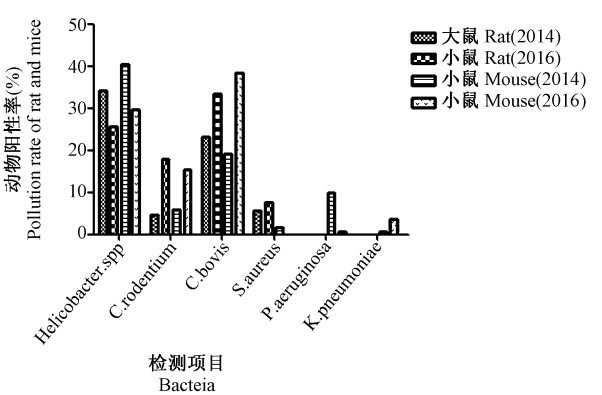


图 2 PCR 检测不同动物阳性率统计
Figure 2 Contamination rates of rats and mice determined by PCR

表 4 PCR 检测不同级别动物阳性率统计(%)

检测项目 Bacteria	清洁级大鼠 CL rats		SPF 级大鼠 SPF rats		清洁级小鼠 CL mice		SPF 级小鼠 SPF mice	
	2014	2016	2014	2016	2014	2016	2014	2016
	2014	2016	2014	2016	2014	2016	2014	2016
螺杆菌 <i>Helicobacter. spp</i>	20.00	38.89	39.74	21.67	87.50	75.82	24.61	16.46
啮齿柠檬酸杆菌 <i>C. rodentium</i>	6.67	33.33	3.85	13.33	6.25	8.79	5.76	17.41
牛棒状杆菌 <i>C. bovis</i>	43.33	66.67	15.38	23.33	12.50	21.98	21.47	43.04
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	20.00	33.33	0	0	6.25	0	0	0
绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i>	0	0	0	0	23.44	2.20	5.24	0.32
肺炎克雷伯杆菌 <i>K. pneumoniae</i>	0	0	0	0	0	8.79	1.05	2.22

表 5 PCR 检测不同品系动物阳性率统计(%,2014 年)
Table 5 Contamination rates of different strains determined by PCR (2014)

品系 Strain	螺杆菌 <i>Helicobacter. spp</i>	啮齿柠檬酸杆菌 <i>C. rodentium</i>	牛棒状杆菌 <i>C. bovis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i>	肺炎克雷伯杆菌 <i>K. pneumoniae</i>
SD	32.76	8.62	34.43	10.34	0	0
Wistar	36.36	0	11.36	0	0	0
ZDF	33.33	0	0	0	0	0
C57	35	2.5	22.5	0	15	0
BALB/c	52.27	4.55	27.27	9.09	13.64	4.55
ICR	56.52	0	21.74	0	8.70	0
scid	16.67	22.22	22.22	0	22.22	0
KM	50	8.70	15.22	0	4.35	0
裸鼠	40	6.67	16.67	0	13.33	0
转基因	6.45	6.45	6.45	0	0	0
合计	38.57	5.51	20.39	2.75	6.89	0.55

表 6 PCR 检测不同品系动物阳性率统计(%,2016 年)
Table 6 Contamination rates of different strains determined by PCR (2016)

品系 Strain	螺杆菌 <i>Helicobacter. spp</i>	啮齿柠檬酸杆菌 <i>C. rodentium</i>	牛棒状杆菌 <i>C. bovis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i>	肺炎克雷伯杆菌 <i>K. pneumoniae</i>
SD	22.81	19.30	33.33	10.53	0	0
Wistar	35.29	17.65	35.29	0	0	0
ZDF	25	0	25	0	0	0
C57	8.22	12.39	34.25	0	1.37	8.22
BALB/c	11.11	12.70	47.62	0	1.59	4.76
ICR	37.04	0	37.04	0	0	0
Scid	0	58.33	41.67	0	2.78	0
KM	60.66	25.76	36.37	0	0	3.03
裸鼠	32	10.67	40	0	0	0
转基因	33.33	0	0	0	0	0
db/db	0	0	66.67	0	0	50
ob/ob	0	0	83.33	0	0	16.67
F1	100	0	13.63	0	0	0
合计	29.07	15.88	37.53	1.24	0.62	3.09

3 讨论

细菌病原学检测方法可分为传统的分离培养以及 PCR 等分子生物学方法。当前国际先进标准已广泛使用 PCR 方法对实验动物病原体进行监测,中国实验动物学会制定的团体标准中亦发布了部分病原体(如螺杆菌、牛棒状杆菌)的 PCR 检测规程。但我国国标目前主要采用分离培养法进行检测,尚未采用分子生物学方法。培养法需要培养基配制、采样、分离培养、染色镜检和生化鉴定等多个环节,存在检测周期长、操作流程繁琐、检测试剂的供应及标准化不足、对检测人员的专业技术要求较高等诸多不足,严重制约了我国实验动物质量标准以及检测体系的完善与发展。PCR 方法相较于传统分离培养法特异性强,敏感性高。在规范试验试剂、设备以及人员操作流程的前提下,可用于病原体的快速检测,尤其适用于大规模筛查。

国外先进标准中普遍要求实验大鼠、小鼠须排除的病原体,如螺杆菌、牛棒状杆菌、柠檬酸杆菌等均未出现在我国标准中。螺杆菌主要以隐性感染形式存在于动物消化道,可致小鼠肝炎、肝细胞瘤、盲肠结肠炎、胆肝炎等多种疾病,严重影响实验动物质量,已被公认为是啮齿类实验动物的重要致病菌。啮齿柠檬酸杆菌为肠杆菌科柠檬酸杆菌属成员之一,为条件性致病菌,可引起小鼠传染性结肠增生、腹泻、结肠炎甚至直肠脱垂等症状。对于免疫功能健全的成年小鼠,一般无明显症状。牛棒状杆菌可导致裸鼠表皮角化过度,俗称“鳞皮病”。无毛鼠和免疫缺陷鼠一旦感染,几乎终身携带。动物感染通常伴随体重减轻、摄水量增加、结膜充血、异种植物生长缓慢等现象,设施一旦污染很难清除^[6]。金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌是我国实验动物微生物学等级及监测标准(14922.2-2011)中明确规定 SPF 级实验大鼠、小鼠必须检测和排除的病原菌^[7],均属于条件性致病菌,正常存在于动物体内和环境中,当动物免疫功能低下时可感染动物。国外多数将其作为环境监测的参考指标,当评估认为该病原体可能会对正在进行的实验存在干扰时则要求监测。

本研究参照文献所述 PCR 检测程序,对上海地区实验鼠群进行大规模质量监测,并从设施、动物级别、动物品系等多角度全面系统地分析了当前实验大鼠、小鼠细菌的携带状况。数据显示,螺杆菌、

啮齿柠檬酸杆菌和牛棒状杆菌在不同级别动物上均有阳性检出。尤其是清洁级小鼠螺杆菌、所有级别动物的牛棒状杆菌和柠檬酸杆菌污染率高、污染范围广,应引起重视。啮齿柠檬酸杆菌、牛棒状杆菌、肺炎克雷伯杆菌阳性率呈明显上升趋势,但螺杆菌、绿脓杆菌阳性率均呈下降趋势。文献数据显示,螺杆菌呈全球性分布,Charles River 对北美和欧洲实验鼠群螺杆菌进行调查发现,螺杆菌是实验鼠群主要流行的病原体。金黄色葡萄球菌是日本实验大鼠和小鼠流行最普遍的病原体,小鼠设施阳性率达 18.8%,大鼠设施阳性率达 58.62%,欧美小鼠金黄色葡萄球菌的携带率为 6%~11%,啮齿柠檬酸杆菌感染率极低^[8-10]。我国北京、广东等地区也有螺杆菌、牛棒状杆菌、金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌阳性报道^[11-14]。由此可见,国内外实验鼠群病原体污染的流行趋势基本一致。

虽然 PCR 方法具备精准、高效、便捷的优势,仍需结合经典方法进行验证。笔者认为后续应进一步溯源至阳性的设施和品系,开展细菌的分离培养及鉴定等病原学方面的工作,以全面细致了解本市实验动物生产设施内上述细菌的分布情况。本研究的调查结果对于提高实验动物质量和饲养管理水平起促进作用,为我国实验动物国家标准的修订和完善提供依据和参考。鉴于上述病原体对于动物本身及从业人员和环境的影响,生产单位作为国内实验动物的源头,应结合行业发展趋势,加强饲养管理,制定并优化监测方案,从而提高动物品质和企业竞争力。

参考文献:

- [1] Mahler Convenor M, Berard M, Feinstein R, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental unit [J]. Lab Anim, 2014, 48(3): 178-192.
- [2] Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene [J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(7): 1654-1660.
- [3] 谭燕玲,朱瑞良,王慧,等.鸡胚胎性病原菌多重 PCR 检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2011,33(5):374-377.
- [4] Riley LK, Franklin CL, Hook RR Jr, et al. Identification of murine helicobacters by PCR and restriction enzyme analyses [J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(4): 942-946.
- [5] 冯洁,谢建云,张泉,等.啮齿柠檬酸杆菌 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2017,39(5):393-397.

(下转第 116 页)