

李永军, 李兰娟. 无菌动物无菌检测的探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(1): 110-115.

Li YJ, Li LJ. Discussion on aseptic tests of germ-free animals [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(1): 110-115.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2021.01.016

# 无菌动物无菌检测的探讨

李永军, 李兰娟\*

(浙江大学医学院附属第一医院传染病诊治国家重点实验室, 国家感染性疾病临床医学研究中心,  
感染性疾病诊治协同创新中心, 杭州 310003)

**【摘要】** 近年来, 肠道微生物在人类的健康和疾病中的应用受到了广泛关注。无菌动物在肠道微生态中的模型应用越来越广泛, 为人类的生理、病理研究提供了非常有效的研究工具。为保证实验动物的质量, 必须对无菌动物频繁的进行无菌检测。但无菌检测受到诸多因素的干扰。目前传统的检测方法主要是细菌、真菌培养及革兰染色镜检。随着高通量测序的发展, 现在新增了一种分子生物学检测技术(PCR), 利用 16S rRNA 进行细菌的鉴定。但这些方法都存在一定的局限性。本文将对这些方法的利弊及影响因素进行简要探讨。

**【关键词】** 无菌动物; 无菌检测; 细菌培养; 16S rRNA; PCR

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2021) 01-0110-06

## Discussion on aseptic tests of germ-free animals

LI Yongjun, LI Lanjuan\*

(State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, National Clinical Research Center for Infectious Diseases, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, College of Medicine, Hangzhou 310003, China)

Corresponding author: LI Lanjuan. E-mail: ljli@zju.edu.cn

**【Abstract】** In recent years, the role of intestinal microorganisms in human health and diseases has been widely researched. The application of a germ-free animal model in intestinal microecology is extensive and this model provides a very effective research tool for human physiological and pathological research. To ensure the quality of experimental animals, aseptic tests must be frequently performed. However, sterility tests are affected by many factors. At present, the traditional detection method are mainly bacterial and fungal culture and Gram staining. With the development of high-throughput sequencing, polymerase chain reaction method have been used to identify bacteria using 16S rRNA. However, these method have some limitations. In this paper, we discuss the advantages and disadvantages of these method and the influencing factors.

**【Keywords】** Germ-free animal; aseptic test; bacterial culture; 16S rRNA; PCR

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

无菌动物(germ-free, GF)是指身体任何部位及生活环境中均检测不出任何活的细菌、真菌、病毒及寄生虫的动物<sup>[1]</sup>。无菌动物来源于剖腹产和胚

胎移植, 通过人工饲养, 维护在正压无菌隔离器中的动物<sup>[2]</sup>。所有的饲料、垫料及水均经灭菌处理, 检测无菌后方可传入无菌隔离器内。维持无菌动

**【基金项目】** 国家重点基础研究发展计划(2013CB531400)。

Funded by National Key Basic Research Program of China(2013CB531400)。

**【作者简介】** 李永军(1985—), 男, 本科, 技师, 研究方向: 无菌大小鼠的培育研究工作。Email: yongjunchina@126.com

**【通信作者】** 李兰娟, 女, 教授, 主任医师, 博士生导师, 中国工程院院士, 研究方向: 感染性疾病诊治、人工肝、感染微生态学和细菌耐药方面的研究。Email: ljli@zju.edu.cn

物需要严格的无菌操作技术和定期的无菌检测。由于不携带任何可检测的微生物,可排除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。这种动物可以有选择性的接种多菌和单菌,来研究菌种对宿主的作用<sup>[3]</sup>。无菌动物不是绝对无菌,而是相对无菌。在现有的无菌检测技术下检测不到任何微生物<sup>[4]</sup>。

1928 年到 1980 年,Reyniers 等<sup>[5-6]</sup>与 Knight 等<sup>[7]</sup>证实了哺乳动物、鸟、鱼、昆虫等可在无菌条件下饲养和维持。也是他们建立了第一代无菌大鼠和无菌小鼠。1945 年美国圣母大学 Lobund 实验室的 Reyniers 等<sup>[5]</sup>首次培育出能连续传代的无菌大鼠,接着 Gustafsson<sup>[8]</sup>也成功培育无菌大鼠。Gilbert 等<sup>[9]</sup>通过去除动物中不同微生物的方法来研究其与宿主的关系。Kirk<sup>[10]</sup>对微生物与宿主的关系做了详细的阐述。

微生物的质量控制成为无菌动物培育中至关重要的技术。从过去到现在,细菌、真菌的培养和革兰染色镜检仍然是最常用的方法<sup>[11-13]</sup>。但在人工培养基上,由于条件限制,有些微生物不能生长,这就导致了无菌检测结果的不准确。为此有些实验室增加了分子生物学检测技术 PCR,利用 16S rRNA 进行细菌的鉴定,用以弥补上述两种检测方法中的不足<sup>[13]</sup>。本文将结合国内外相关文献,对无菌动物无菌检测方法及影响因素进行简要探讨。

## 1 微生物培养

### 1.1 采样

#### 1.1.1 粪便标本的采集

选取无菌隔离器内健康成年无菌大鼠,抓取尾巴,让粪便自然排出,弃去第一粒粪便。收取第二粒新鲜粪便装于无菌小试管中。按照无菌操作程序从隔离器中传出,并尽快接种完毕,防止在转运过程中细菌死亡。

#### 1.1.2 隔离器内环境标本的采集

将无菌隔离器内灭菌棉签用无菌水浸湿,擦拭水瓶口、进出通风口、隔离器内壁、笼具表面、动物毛发、手套等。装于无菌小试管中,按照无菌操作程序从隔离器中传出。棉签必须使用高压蒸汽灭菌,干热灭菌会使脱脂棉产生杀菌物质,影响细菌的检出。

#### 1.1.3 饲料、垫料及水标本的采集

将无菌隔离器内饲料、垫料、水均取适量装于

无菌小试管中,按照无菌操作程序从隔离器中传出。

### 1.2 细菌、真菌培养

#### 1.2.1 国内无菌动物检测标准

污染无菌动物的微生物主要是厌氧菌、需氧菌及真菌,可以通过不同的培养基、不同的培养温度和培养环境对污染菌进行检测。目前我国无菌动物的检测标准主要根据 GB/T 14926.41-2001《实验动物 无菌动物生活环境及粪便标本的检测方法》,该标准中规定无菌检测中所使用的培养基及试剂、检测程序、操作步骤及结果报告等。3 种液体培养基为脑心浸液肉汤(brain heart infusion broth, BHI)、硫乙醇酸钠肉汤(thioglycollate broth, TB)、大豆蛋白胨肉汤(tryptic soy broth, TSB),1 种固体培养基血琼脂平板,试剂为无菌生理盐水。标本采集后,接种脑心浸液肉汤和硫乙醇酸钠肉汤、大豆蛋白胨肉汤增菌培养,放 37℃ 培养,分别以 7、14 d 转接血平板并革兰染色镜检。转接血平板后 37℃ 培养 48 h,观察有无细菌、真菌生长,最终判断是否存在细菌、真菌污染。此标准删除了 GB/T 14926.41-1994《无特定病原体动物无菌动物生活环境及粪便标本的检测方法》中的无特定病原体动物生活环境及粪便标本的检测方法,保留了无菌动物生活环境及粪便标本的检测方法。增加了硫乙醇酸钠培养基在使用前需煮沸驱氧程序。再从液体培养基转种血琼脂平皿时增加了涂片染色镜检。以防止在转种时细菌死亡而不能在平板培养基生长而造成漏检。GB/T 14926.43-2001《实验动物 细菌学检测、染色法、培养基和试剂》,该标准对培养基的配制、分装、高压灭菌条件、储藏条件及使用期限作了规定。

#### 1.2.2 国内无菌动物检测的优缺点

国内标准对标本采集数量、标本稀释程度、标本存放及接种时间都未做详细规定。检测时未对需氧、厌氧培养进行区分。对培养基的接种管数及阳性对照菌未详细规定。冷藏后培养基需怎样处理后使用未做详细规定。微生物培养方法被认为是有一定局限性的,三种培养基不能培养所有微生物。好多哺乳动物的肠道微生物在实验室里不容易培养,主要缺乏合适的培养基和方法。培养鉴定微生物污染技术较繁琐和困难。严格的厌氧菌培养需要特殊的设备和专业的操作。

脑心浸液肉汤适合细菌的增菌培养,大部分需氧菌、兼性厌氧菌都能生长,如粪性链球菌、大肠埃希菌及苛养菌的培养。硫乙醇酸钠肉汤适合需氧

菌、厌氧菌、兼性厌氧菌的培养,主要用于厌氧菌的培养。硫乙醇酸盐流体培养基在 2000 年、2005 年及 2015 年版中国药典中被用作无菌检查培养基,欧洲药典(EP)、日本药典(JP)、英国药典(BP)、美国药典(USP)无菌检查也均采用硫乙醇酸盐流体培养基,配方一致,用于需气菌、兼性厌氧菌、厌氧菌的培养。虽然硫乙醇酸盐流体培养基被各国用作无菌检查,但它自身也存在一定的局限性<sup>[14]</sup>:(1)一些苛养菌或强致病菌较难检出;(2)刃天青对微生物有抑制作用、与专门的厌氧菌培养方法如厌氧缸法、厌氧袋(bio-bag)、厌氧手套箱(anaerobic glovebox)、厌氧盒等相比较,其厌氧环境有限。

革兰染色镜检也存在各种干扰因素,如饮食中的蔬菜纤维、粪便中的各种物质、食物中留下的死菌。无法鉴别是死菌或活菌,需要培养方法来确认<sup>[15]</sup>。革兰染色阳性细菌相对容易检出和观察,而体积较小的革兰阴性球菌则较难观察到。革兰染色镜检的检出限量约  $10^9$  CFU/g 粪便<sup>[16]</sup>。对于无菌动物来说,污染初期肠道中微生物是比较少的,易受到粪便中的残渣、碎屑等因素的干扰。对于有经验的观察者来说也是非常极具挑战性的,极易造成漏检。总之,革兰染色镜检的确定是对检测灵敏度较低、易造成漏检,优点时即时出结果、速度较快、操作简便、成本较低。

### 1.2.3 中国药典(2015 版)无菌检查

相较于国内动物无菌检测,中国药典无菌检测方法相对比较全面,但仅适用医药用品。目前,美国、欧盟、日本等国家或组织无菌检查法已协调一致<sup>[17]</sup>。相比于 2010 版中国药典,2015 版中国药典对无菌检测法的检测范围及环境要求、培养体系、方法适用性、检查方法等做了进一步完善,接近国际通用标准。2015 版中国药典中规定了无菌检查必须在无菌环境下进行,实验环境必须达到无菌的要求。培养基主要使用硫乙醇酸盐液体培养基和胰酪大豆胨液体培养基。硫乙醇酸盐液体培养基主要用于厌氧菌的培养;胰酪大豆胨液体培养基主要用于需氧菌和真菌的培养。这与国内无菌动物检测采用的培养基相同。胰酪大豆胨液体培养基的  $\text{PH}=(7.3 \pm 0.2)$ ,接近中性,适用于需氧菌和真菌的培养<sup>[18-20]</sup>。药典规定了培养基 PH 测定的温度应在  $25^{\circ}\text{C}$ 。细菌培养的温度在  $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$  和  $30 \sim 35^{\circ}\text{C}$ ,符合了大部分微生物的需求。规定了微生

物的培养时间<sup>[21]</sup>。规定了培养基的接种管数,对阳性对照菌的选择做了细化。

### 1.2.4 国外无菌动物无菌检测

国外无菌检测所使用的培养基各不相同,培养时间和方法也不统一。国外无菌小鼠无菌检测使用培养基有 LB 培养基(LB)、沙保培养基、脑心浸液(brain heart infusion broth, BHI)、MRS 琼脂培养基、ML 琼脂培养基<sup>[22]</sup>。取 1 mL 标本悬液接种在 BHI、MRS、ML、LB 培养基  $37^{\circ}\text{C}$  培养 72 h,沙保培养基  $22^{\circ}\text{C}$  培养 3 周。标本悬液直接涂片镜检。

也有报道使用脑心浸液肉汤(需氧菌培养)、硫乙醇酸钠肉汤(厌氧菌培养)、沙保肉汤(真菌培养), $37^{\circ}\text{C}$  培养 1 周甚至更长,以防生长缓慢的细菌漏检。血平板和其它非选择性培养基  $37^{\circ}\text{C}$  至少培养 5 d。推荐接种一份标本于稍低温度培养,比如  $30^{\circ}\text{C}$  或室温,更适合环境微生物的生长<sup>[15]</sup>;也有研究推荐增加  $56^{\circ}\text{C}$  培养<sup>[23]</sup>。液体培养基出现浑浊再接种固体培养基培养和显微镜镜检。浑浊可能接种后几天出现,但不一定是细菌生长,有可能是粪便和其它有机物沉淀。此法与国内无菌动物检测标准所使用培养基基本一致。

有研究使用脑心浸液肉汤、沙保肉汤以及营养肉汤作为无菌检测培养基<sup>[11]</sup>,需氧和厌氧两种环境  $37^{\circ}\text{C}$  培养 48 h。两种环境下培养设置阴性对照和阳性对照。最好使用厌氧菌来确定无氧环境。

国外无菌检测的内容和方法包括:(1)直接涂片镜检法:当无菌动物肠道中有大量细菌繁殖时,可以利用相差显微镜快速的检测肠道中的细菌,但因为此法细菌未经染色,会对有些比较小和不运动的细菌造成漏检,需要非常有经验的操作者,对食物残渣和细菌进行辨别。(2)细菌染色镜检:包括革兰染色镜检、DNA 染色法。(3)细菌、真菌培养。(4)分子生物学检测。(5)病毒学检测。(6)寄生虫学检测<sup>[15]</sup>。

### 1.2.5 无菌检测培养方法的局限性

传统的细菌检测方法,容易培养的是需氧和兼性厌氧菌,只占肠道细菌总量的小部分。比如乳酸杆菌、链球菌、肠球菌和葡萄球菌等。但是严格厌氧菌在肠道细菌中所占的比例极高,每克粪便中含  $10^{11}$  个严格厌氧菌。通过培养容易检测的严格厌氧菌的比例约每克粪便  $10^6$  个,甚至更低<sup>[15]</sup>。

虽然微生物培养是比较敏感的方法,但它有一定的检出限量,当肠道细菌数量少于  $100 \sim 1000$



CFU/g 粪便<sup>[24]</sup>, 不容易检出。它的污染因素也有很多, 比如实验室里常用的细菌的污染; 实验室工作人员的皮肤和普通动物粪便的污染; 饲料、垫料、器械等高压灭菌不彻底而传进隔离器造成的污染。实验室里细菌的污染通常都是人工培养基上能较好生长的细菌。皮肤上的葡萄球菌和粪便中的大肠杆菌都能在人工培养基上较好生长。微生物培养必须经过严格无菌操作培训的专业人员进行操作, 必须在超净台或者生物安全柜中进行, 否则出现假阳性的概率还是挺高的。培养的标本量的多少也会影响结果。因此, 培养出现阳性结果必须借助其他方法证实其结果的可靠性。

## 2 分子生物学技术

### 2.1 采样

在无菌正压隔离器中, 取新鲜无菌动物粪便和饲料, 称量约 200 mg 于 1.5 mL 无菌离心管中。按照无菌操作传出隔离器, 立即液氮冷冻并转移至 -80℃ 冰箱保存, 直到 DNA 提取。

### 2.2 16S rRNA 基因测序应用于无菌动物无菌检测

目前 16S rRNA 基因测序是鉴定肠道细菌常用的分子生物学技术。利用 16S rRNA 分析肠道微生物群至少包括 1800 个种属和 40 000 种细菌<sup>[25]</sup>。提取哺乳动物新鲜粪便中的 DNA, 通过细菌通用引物进行 PCR 扩增, 再经 16S rRNA 基因测序, 得到细菌的种类。一般细菌鉴定选择细菌通用引物, 最常用的引物是 27F/1492R。27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'。有的文章中会使用不同的通用引物<sup>[26]</sup>。有文献提到利用 16S rRNA PCR 技术证明无菌动物的无菌状态<sup>[11]</sup>。RAPD PCR 用于鉴定已知定植菌动物的污染<sup>[15]</sup>。国外对 PCR、qPCR 等分子生物学技术在无菌动物和已知菌动物做了详细的比较, 结果 16S rRNA PCR 最适用于无菌动物的检测<sup>[13]</sup>。

### 2.3 16S rRNA 在无菌动物无菌检测中的优点

过去十几年, 分子生物学技术在肠道微生物中的应用超过了细菌培养方法。16S rRNA 技术因具有快速、高效的特点。相对于细菌培养技术, PCR 技术特异性较高, 被用于细菌的种属鉴定。16S rRNA 能够鉴定难以分类的微生物种类, 特别是需要严格厌氧的细菌, 鉴定培养阴性的细菌。现在人们开始使用 16S rRNA 技术检测无菌动物是否污

染, 可以增加检测的敏感性和最大限度的检出生长不良或较难检出的细菌污染<sup>[27-29]</sup>。相比较其它细菌测序方法, 16S rRNA 价格较便宜。分析时不需要太多的计算量。样本数量越大, 统计数据越准确<sup>[30]</sup>。

### 2.4 16S rRNA 在无菌动物无菌检测中的缺点

16S rRNA 技术相对于细菌培养, 敏感性较低, 16S rRNA 对细菌的检出限量约 10<sup>5</sup> CFU/g 粪便<sup>[16]</sup>。这与 16S rRNA 技术是个非常敏感的检测手段相矛盾。低于这个数量, 就很难检测出来。当无菌动物粪便中的含菌量低于这个数量, 就很容易造成漏检。但检测污染严重的无菌动物还是非常有效的。粪便样本 DNA 的提取结果和 PCR 引物的选择, 对 16S rRNA 鉴定的结果影响较大。16S rRNA 只能对细菌种属鉴定, 不能进行细菌定量。无法辨别粪便中是死菌或活菌<sup>[30]</sup>。相对于细菌培养和革兰染色镜检, 16S rRNA 测序花费时间较长, 而且检测时间较长。

虽然存在于肠道中的大部分微生物是细菌, 但仍有部分真菌和古菌的存在<sup>[31]</sup>。利用 16S rRNA 基因测序只能检测肠道中的细菌种类。大量不同形态的真菌存在哺乳动物的肠道中<sup>[32]</sup>。124 个健康欧洲人的粪便标本, 利用宏基因组测序 536 112 个独立基因, 其中 0.8% 是古菌<sup>[33]</sup>。16S rRNA 只是鉴定细菌的污染。有方法提到利用专门的 DNA 提取技术和 qPCR 来鉴定真菌<sup>[34]</sup>, 古菌的扩增引物也有被描述<sup>[35]</sup>。

### 2.5 16S rRNA 在无菌动物无菌检测中的影响因素

16S rRNA 在无菌动物无菌检测中, 需防止样本采样中、分析中的污染。在无菌隔离器中采样并称重, 保持样本无菌包装并密封。新鲜无菌动物粪便从无菌隔离器中传出后, 应尽快进行 PCR 分析, 以尽量减少样本和分析中的污染风险<sup>[11]</sup>。所有操作必须在超净台中进行, 每一步都必须无菌操作, 且操作人员必须通过专业培训。检测粪便样本中含有较多的植物, 聚合酶抑制剂可能会影响 PCR 分析。这些因素可以通过设计用于粪便样本中提取 DNA 的试剂盒来减少<sup>[15]</sup>。食物中存在细菌的 DNA 应该被考虑在内, 低含量的 DNA 通常在肠道中被检测到, 除非使用化学定义饮食<sup>[15]</sup>。辐照饲料中的叶绿素也会干扰 DNA 的提取, 不能确定是细菌 DNA 还是植物 DNA, 从而影响 PCR 分析。需通过 16S

rRNA 测序进一步来鉴定是否是细菌 DNA。如是细菌 DNA,需进行细菌培养和革兰染色确定是否为活菌<sup>[30]</sup>。DNA 的提取质量至关重要,直接影响 16S rRNA 测序的结果<sup>[30]</sup>。检测样本中含菌量的多少将会直接影响无菌检测结果,16S rRNA 测序具有一定的检出限量,需借助其它检测方法进一步检测<sup>[16]</sup>。

### 3 食物经过不同的灭菌方法对无菌检测的影响

现在无菌动物饲料的灭菌方法主要有两种:高压蒸汽灭菌与钴 60 辐照灭菌。灭菌饲料中的死菌会不会经过肠道存在动物粪便中。(1)当无菌动物饲喂辐照灭菌饲料,粪便微生物培养检测阴性。革兰染色镜检确存在典型的革兰阳性杆菌<sup>[15,36]</sup>。继续喂食同一批饲料,到第 4 天细菌数量开始下降,直至第 8 天细菌完全消失。重新引入新一批辐照饲料饲喂无菌动物,细菌重新出现,并于第 10 天消失。细菌数量未增加,证实不存在活菌。经过一段时间,死菌在肠道中会被分解消化<sup>[37]</sup>。(2)饲喂高压灭菌饲料,粪便微生物检测阴性。革兰染色镜检也会观察到少量死菌,但已经失去典型的形态学特征<sup>[16]</sup>。

关于高压灭菌饲料和辐照灭菌饲料利用 PCR 技术是否能检测到细菌 DNA,大部分仅介绍了 PCR 检测结果,描述了灭菌过的饲料未检测到细菌 DNA,但对哪种灭菌方法未做详细介绍<sup>[13]</sup>。我们对两种饲料作了比较,高压灭菌饲料经 PCR 扩增不出细菌 DNA。辐照灭菌的饲料由于含有叶绿体,PCR 扩增后,跑胶会出现明显条带,通过 16S rRNA 测序证明会有极少数细菌 DNA 未被完全破坏,可有少数死菌 DNA 会被扩增出来,造成假阳性。饲喂两种饲料,利用 16S rRNA PCR 技术,无菌动物粪便中均未扩增出细菌 DNA。这与报道的辐照饲料的细菌结构未被破坏,有可能存在无菌动物粪便中相吻合<sup>[15]</sup>。

### 4 无菌动物的检测频率

国外对无菌动物无菌检测频率未做规定,按照国外最近发行文章的无菌动物检测频率要求:(1)空隔离器(动物传递之前),湿棉拭子取隔离器表面,角落,通风口标本做 1 次无菌培养及 PCR 检测。(2)对无菌隔离器内饲料、垫料标本每 4 周做 1 次无菌培养。(3)无菌动物粪便标本每 4 周做 1 次无菌培养及 PCR 检测。(4)3 ~ 6 个月做 1 次动物全

身检测,包括无菌培养、病毒检测、寄生虫检测及 PCR 检测。(5)水、饲料、垫料每批灭菌均需灭菌指示剂合格,传递之前均需做无菌培养<sup>[15]</sup>。

一些机构报道无菌检测需 2 周 1 次或者每周 1 次,PCR 检测每月 1 次<sup>[11]</sup>。检测方法包括宏观和微观镜检、细菌和真菌培养和分子生物学方法<sup>[15]</sup>。美国 charles river 实验室对饲养的无菌小鼠检测频率,每周对每个隔离器饲料、垫料、粪便做 1 次细菌真菌培养和相差显微镜观察有无活的微生物。每季度取一次无菌小鼠粪便,做 16S rRNA PCR 检测。每年做 1 次动物组织和器官病原体检测、血清学检测、寄生虫检测等项目。

### 5 结语

综上所述,在无菌动物的无菌检测中,不管是培养方法、革兰染色镜检及 16S rRNA PCR。都有固有的缺陷和优点。只有三种方法互相结合,取长补短。把无菌动物的无菌检测漏检率降到最低,才能有效的确保无菌动物的无菌状态。

#### 参 考 文 献(References)

- [1] Trávníček J, Mandel L. Gnotobiotic techniques [J]. Folia Microbiol (Praha), 1979, 24(1): 6-10.
- [2] Inzunza J, Midtvedt T, Fartoo M, et al. Germfree status of mice obtained by embryo transfer in an isolator environment [J]. Lab Anim, 2005, 39(4): 421-427.
- [3] Zhao L. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality [J]. Nat Rev Microbiol, 2013, 11(9): 639-647.
- [4] Reyniers JA. Microgical and germ-free techniques, their application to experimental biology and medicine, a symposium [J]. JAMA, 1943, 124(12): 811.
- [5] Reyniers JA, Trexler PC, Ervin RF. Rearing germ-free albino rats [J]. Lobund reports, 1946, 1: 1-84.
- [6] Reyniers JA, Trexler PC, Ervin RF, et al. A complete life-cycle in the germfree Bantam chicken [J]. Nature, 1949, 163: 67-78.
- [7] Knight SG, Reyniers JA, Ervin RF, et al. Lobund reports. Germfree life studies no. 3 [J]. Aibs Bulletin, 1960, 10(6): 38.
- [8] Gustafsson B. Germ-free rearing of rats [J]. Acta anatomica, 1946, 2(3-4): 376-391.
- [9] Gilbert JA, Neufeld JD. Life in a world without microbes [J]. PLoS Biology, 2014, 12(12): e1002020.
- [10] Kirk RG. "Life in a germ-free world": isolating life from the laboratory animal to the bubble boy [J]. Bull Hist Med, 2012, 86(2): 237-275.
- [11] Arvidsson C, Hallén A, Bäckhed F. Generating and analyzing germ-free mice [J]. Curr Protoc Mouse Biol, 2012, 2(4): 307-316.

- [12] Hecht G, Ba NC, Milite G, et al. A simple cage-autonomous method for the maintenance of the barrier status of germ-free mice during experimentation [J]. Lab Anim, 2014, 48(4): 292–297.
- [13] Packey CD, Shanahan MT, Manick S, et al. Molecular detection of bacterial contamination in gnotobiotic rodent units [J]. Gut microbes, 2013, 4(5): 361–370.
- [14] 吴九玲. 硫乙醇酸盐流体培养基的特点及问题分析 [J]. 广东化工, 2009, 36(6): 109–259.
- Wu JL. Analysis of characteristics and problems of thioglycollate fluid medium [J]. Guangdong Chem Ind, 2009, 36(6): 109–259.
- [15] Nicklas W, Keubler L, Bleich A. Maintaining and monitoring the defined microbiota status of gnotobiotic rodents [J]. ILAR J, 2015, 56(2): 241–249.
- [16] Fontaine CA, Skorupski AM, Vowles CJ, et al. How free of germs is germ-free? Detection of bacterial contamination in a germ free mouse unit [J]. Gut microbes, 2015, 6(4): 225–233.
- [17] ICH. Guidance for industry Q4B evaluation and recommendation of pharmacopoeial texts for use in the ICH regions. Department of health and human services [EB/OL]. [2014–06–16]. <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm085364.pdf>.
- [18] 徐伟东, 许华玉, 范一灵, 等. 胰酪胨大豆培养基和改良马丁培养基的微生物促生长能力考察 [J]. 中国药品标准, 2013, 14(4): 271–275.
- Xu WD, Xu HY, Fan YL, et al. Study on the growth promoting ability of tryptone soybean medium and modified Martin medium [J]. Drug Stand Chin, 2013, 14(4): 271–275.
- [19] 杨晓莉, 李辉, 杨静, 等. 中、美、英、欧药典无菌检查用培养基促微生物生长能力对比研究 [J]. 西北药学杂志, 2013, 28(6): 619–622.
- Yang XL, Li H, Yang J, et al. Comparative study on the growth promoting ability of culture medium for sterility test in Pharmacopoeia of China, the United States, the United Kingdom and Europe [J]. Northwest Pharm J, 2013, 28(6): 619–622.
- [20] 卢勉飞, 蔡芷荷, 姚华卓, 等. 胰酪胨大豆培养基和改良马丁培养基药品无菌检查效果的对比研究 [J]. 中国药品标准, 2014, 15(6): 429–433.
- Lu MF, Cai ZH, Yao HZ, et al. Comparative study on the sterility test effect of tryptone soybean medium and modified Martin medium [J]. Drug Stand Chin, 2014, 15(6): 429–433.
- [21] 杨晓莉, 李辉, 绳金房. 中、美、英、欧药典制药用水微生物检查法对比研究 [J]. 西北药学杂志, 2013, 28(5): 515–517.
- Yang XL, Li H, Sheng JF. Comparative study on microbiological examination of pharmaceutical water in Pharmacopoeia of China, the United States, the United Kingdom and Europe [J]. Northwest Pharm J, 2013, 28(5): 515–517.
- [22] Giraud A. Axenic mice model [J]. Methods Mol Biol, 2008, 415: 321–336.
- [23] Kunstner I. Diagnostic microbiology for laboratory animals: viruses, bacteria, chlamydia, fungi and parasites [M]. Genterchnik: Gustav Fischer Verlag; 1992.
- [24] Tyler JS, Beeri K, Reynolds JL, et al. Prophage induction is enhanced and required for renal disease and lethality in an EHEC mouse model [J]. PLoS Pathog, 2013, 9(3): e1003236.
- [25] Frank DN, Pace NR. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2008, 24(1): 4–10.
- [26] Carroll IM, Ringel KT, Keku TO, et al. Molecular analysis of the luminal- and mucosal-associated intestinal microbiota in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011, 301(5): G799–G807.
- [27] Reeves AE, Theriot CM, Bergin IL, et al. The interplay between microbiome dynamics and pathogen dynamics in a murine model of clostridium difficile infection [J]. Gut Microbes, 2011, 2(3): 145–158.
- [28] Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases [J]. Gastroenterology, 2008, 134(2): 577–594.
- [29] Devkota S, Wang Y, Musch MW, et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in  $Il10^{-/-}$  mice [J]. Nature, 2012, 487(7405): 104–108.
- [30] Walker AW. Studying the human microbiota [J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 902: 5–32.
- [31] Samuel BS, Gordon JL. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(26): 10011–10016.
- [32] Scupham AJ, Presley LL, Wei B, et al. Abundant and diverse fungal microbiota in the murine intestine [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(1): 793–801.
- [33] Virgin HW, Todd JA. Metagenomics and personalized medicine [J]. Cell, 2011, 147(1): 44–56.
- [34] Iliev ID, Funari VA, Taylor KD, et al. Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis [J]. Science, 2012, 336(6086): 1314–1317.
- [35] Chachkhiani M, Dabert P, Abzianidze T, et al. 16S rDNA characterisation of bacterial and archaeal communities during start-up of anaerobic thermophilic digestion of cattle manure [J]. Bioresour Technol, 2004, 93(3): 227–232.
- [36] Taylor DM, Read L, Neal DL. Determining the viability of faecal bacteria present in germ-free mice [J]. Lab Anim, 1986, 20(1): 22–26.
- [37] Midtvedt T, Gustafsson BE. Digestion of dead bacteria by germ-free rats [J]. Curr Microbiol, 1981, 6(1): 13–15.

[收稿日期] 2020-07-02