



邢进, 兽医学博士, 中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所研究员, 硕士生导师。主要研究方向为实验动物质量控制和标准化研究。北京实验动物学会理事, 中国兽医协会实验动物兽医分会委员。参与完成国家科技支撑计划、国家自然科学基金和北京市科委资助项目等研究10余项。多次获得中国实验动物学会和北京实验动物行业协会科学技术奖。副主编《实验动物疫病学》和《食品药品医疗器械检验仪器设备维护保养规程》, 参编《实验动物检验技术》和《实验动物质量检测》等论著3部, 获发明专利2项, 以第一作者发表论文30余篇。

2013—2020年7次实验动物病原菌项目国际比对结果分析

邢进, 冯育芳, 王洪, 张雪青, 高强, 岳乘飞, 付瑞

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 102629)

[摘要] 目的 通过评估自身检测能力, 促进国内实验动物能力验证活动的开展和检测水平的提高。**方法** 中国食品药品检定研究院于2013—2020年共7次参加国际实验动物科学理事会(International Council for Laboratory Animal Science, ICLAS)实验动物检测能力验证活动[即诊断实验室性能评估程序(Performance Evaluation Program for Diagnostic Laboratories, PEP)](简称“国际比对”)。PEP活动中, 通过培养、生化鉴定、PCR和测序等方法对PEP病原菌样品开展检测, 并对国际比对结果进行总结分析。**结果** 7次国际比对能力验证活动共检测40份样品, 涉及27种病原菌, 结果符合率分别为8/8、2/2、5/8、9/9、5/5、6/7和1/1; 其中病原检测33项, 抗体检测7项。国内各项标准中尚缺少辛氏鲍特菌、黏质沙雷菌、乳腺炎棒状杆菌、CAR(Cilia-associated respiratory)杆菌、小鼠放线杆菌、弗劳地枸橼酸杆菌、产酸克雷伯杆菌、无乳链球菌和致病性大肠埃希菌共9种病原菌的检测项目。**结论** 通过参加国际比对活动, 发现了国内外标准差异以及自身急需提升的检测能力, 希望早日与国际接轨。

[关键词] 实验动物; 国际比对活动; 病原体; 抗体

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)06-0521-07

Analysis of Seven Performance Evaluation Program Results for Pathogenic Bacteria from Laboratory Animals in 2013—2020

XING Jin, FENG Yufang, WANG Hong, ZHANG Xueqing, GAO Qiang, YUE Bingfei, FU Rui

(Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Correspondence to: FU Rui, E-mail: furui78@nifdc.org.cn

[Abstract] **Objective** To promote the development of domestic laboratory animal detection proficiency testing activities and testing levels by assessing self testing capabilities. **Methods** The National Institutes for Food and Drug Control participated in the International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)

[作者简介] 邢进(1979—), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 实验动物微生物检测。E-mail: xjvet@nifdc.org.cn

[通信作者] 付瑞(1978—), 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物质量控制。E-mail: furui78@nifdc.org.cn

laboratory animal detection proficiency test (i.e. Performance Evaluation Program for Diagnostic Laboratories, PEP) in 2013—2020. PEP pathogenic bacteria samples were tested by culture, biochemical identification, PCR, and sequencing. Finally, the results were analyzed and summarized. **Results** There were 40 samples in seven international PEP activities, involving 27 kinds of pathogenic bacteria. The coincidence rates of the seven results were 8/8, 2/2, 5/8, 9/9, 5/5, 6/7, and 1/1, respectively, including 33 pathogen detection items and 7 antibody detection items. Nine pathogens were missing from the national standards: *Bordetella hinzii*, *Serratia marcescens*, *Corynebacterium mastitis*, CAR (Cilia-associated respiratory) bacillus, *Actinobacillus muris*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Streptococcus agalactiae*, and pathogenic *Escherichia coli*. **Conclusion** Through participating in PEP, we can identify the differences between domestic and foreign standards in laboratory animal detection and the testing capabilities that we need to improve, expecting to be in line with international standards as soon as possible.

[Key words] Laboratory animal; Performance evaluation program; Pathogenic bacteria; Antibody

国际实验动物科学理事会 (International Council for Laboratory Animal Science, ICLAS) 在 2007 年建立了诊断实验室性能评估程序 (Performance Evaluation Program for Diagnostic Laboratories, PEP) (简称“国际比对”)。通过 ICLAS 提供的 PEP 标准样品, 各参加实验室能够评估自身的检测水平和能力^[1]。参加 PEP 活动有助于检测实验室使用科学可靠的程序来监督检测质量, 同时可获得国际同行专家的帮助和建议, 促进实验室实施质量保证措施, 有助于提高动物质量检测技术、水平和能力, 确保实验动物的质量^[2]。样品由经国际认可的实验室制备和确认后, 发送给世界各地想要参加 PEP 活动的实验室进行比对检测。样品均为盲样, 当前的 PEP 样品库包括可以感染大鼠和小鼠的常见病原体, 涉及病毒、病原菌和寄生虫。每次 PEP 活动需要检测 10 个或 20 个样品, 可能是病毒、细菌、真菌、寄生虫等病原样品和微生物抗体血清样品的不同组合。PEP 对检测方法没有限制, 参加实验室依据自身检测体系和能力开展检测, 所得结果与 ICLAS 反馈的预期结果相比较, 对检测方法的特异性和敏感性进行监测和评估^[3]。2020 年的 PEP 活动共有 21 个实验室参与, 其中亚洲 6 个、大洋洲 2 个、欧洲 9 个和北美洲 4 个^[4]。

2013—2020 年, 本实验室共参与了 7 次 ICLAS 的 PEP 活动 (2015 年未参加), 是参加次数最多的国内实验室。病原菌项目在 PEP 中占有很大比例, 本文针对病原菌部分进行总结, 对国内实验动物的病原菌检测项目和方法起到查漏补缺的作用, 以促进我国实验动物质量控制的发展。

1 材料与方法

1.1 培养基和试剂

哥伦比亚血琼脂培养基为英国 Oxiod 公司产品; 无菌脱纤维羊血为北京陆桥技术股份有限公司产品; DHL 琼脂培养基、高盐甘露醇琼脂培养基为北京三药科技开发公司产品; 革兰染色液为法国生物梅里埃公司产品, 细菌鉴定板为美国 BD 公司和法国生物梅里埃公司产品; DNA 提取试剂盒为德国 Qiagen 公司产品; PCR 试剂为日本 TaKaRa 公司产品; 荧光定量反应预混液为美国 Applied Biosystems 公司产品; 普通 PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; 荧光定量 PCR 引物和探针由美国 Invitrogen 公司合成; 羊抗小鼠、大鼠辣根过氧化物酶为美国 KPL 公司产品; 支原体的酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂和泰泽病原体的间接免疫荧光法 (indirect immunofluorescence assay, IFA) 检测试剂均由本实验室自制; 泰泽病原体 ELISA 和 CAR 杆菌、肺孢子菌 ELISA 检测试剂盒购自苏州西山生物技术有限公司。

1.2 仪器设备

生物安全柜购自美国 Nuair 公司 (型号 NU-437-400S); 恒温培养箱购自美国 Thermo 公司 (型号 IGS180); 细菌鉴定仪购自美国 BD 公司 (型号 Phoenix100) 和法国梅里埃公司 (型号 Vitek2 Compact); 酶标仪购自美国 Thermo 公司 (型号 MK3); 冷冻离心机购自德国 Hettich 公司 (型号 22R); PCR 仪购自美国 ABI 公司 (型号

Verit96); 荧光定量PCR仪购自美国ABI公司(型号7500Fast); 电泳仪购自美国Bio-rad公司(型号Powerpac HC); 紫外凝胶成像系统购自美国Kodak公司(型号GL212pro)。

1.3 PEP样品

7次PEP样品共90份, 包含病毒、细菌、真菌、寄生虫和微生物抗体5个种类, 见表1。样品经冷链干冰运输, 到达本实验室后, 保持内包装完整, 置于-80℃冻存。经海关监管检查后开展实验。PEP样品的最小包装为螺口1.5~2.0 mL冻存管。根据ICLAS提供的样品清单, 含细菌样品32份、真菌样品1份、寄生虫样品2份、病毒样品15份和40份微生物抗体样品。在抗体样品中也包含病原菌检测项目。细菌培养或抗体检测样品体积均0.5 mL, 真菌DNA样品体积0.1 mL。

1.4 样品培养

依据国家标准^[5], 先对细菌样品进行培养和生化鉴定。用接种环蘸取样品液接种于5%血琼脂培养基、DHL琼脂和高盐甘露醇琼脂培养基, 36℃需氧培养24~48 h, 记录菌落形态。挑取典型单个菌落, 相同条件次代培养后, 用自动细菌鉴定仪鉴定。

表1 7次PEP样品的病原种类

Table 1 Pathogen types of seven batches of PEP samples

年份	病毒	细菌	真菌	寄生虫	微生物抗体
2013	2	8	0	0	0
2014	0	0	0	0	10
2016	5	5	0	0	10
2017	1	7	1	1	10
2018	4	5	0	1	0
2019	3	7	0	0	0
2020	0	0	0	0	10
总计	15	32	1	2	40

1.5 抗体检测

依据国家标准^[6-7]或试剂盒说明检测微生物抗体样品。将5倍PBS稀释的待检样品用PBS再稀释10倍或2倍, 至体积比为1:50或1:10, 然后分别用于ELISA和IFA检测。

1.6 核酸检测

通过前期的样品培养, 对已分离到病原菌的样品, 提取目标菌基因组DNA, 扩增16S rDNA, 将序列比对结果与生化鉴定结果相互验证。当采用培养法未见病原菌生长时, 吸取20 μL样品原液, 提取DNA, 扩增其16S rDNA。同时采用特异引物(表2)扩增可疑病原。对细菌

表2 7次PEP项目中所用PCR引物和探针

Table 2 Primers and probe used in seven PEP projects

检测项目	引物	引物序列(5'→3')	片段大小/bp
16S rDNA ^[8]	FD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 300~1 500
	RP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	
支原体 ^[9] (<i>Mycoplasma</i> spp.)	GPO3	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	270
	MGSO	TGCACCATCTGTACTCTGTAAACCTC	
泰泽病原体 (Tyzzer's organism; <i>Clostridium piliformis</i>)	Ty16SF	GTATGTAAACTTCTATCGACAGGGAAGAA	172
	Ty16SR	CGGCTGCTGGCACGTAT	
	Ty16SP	FAM-TTAGCCGGTGCTTCTT-MGB-NFQ	
CAR(Cilia-associated respiratory)杆菌 ^[10-11] (<i>Filobacterium rodentium</i>)	P1	TTAAAGCTCCGGCGCTGGAAG	267
	P2	ACACCCTTAGAAAAGGGGATT	
	Car5	TTCTACGGGAGGCAGCAGTG	320
	Car6	TCCGCAGTATTCAAGATAGGC	
螺杆菌属 ^[12] (<i>Helicobacter</i> spp.)	HgF	TATGACGGGTATCCGGC	375
	HgR	ATTCCACCTACCTCTCCCA	
	HF	CTATGACGGGTATCCGGC	780
	HR	CTCACGACACGAGCTGAC	
	HrF	TTGTGAAATGGAGCAAATCTTAAAAACT	
啮齿类螺杆菌 ^[13] (<i>Helicobacter rodentium</i>)	HrR	TAGCCAGTTTGGCATTCC	191
	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	290
真菌 ^[14] (Fungus)	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	

DNA 样品则直接扩增 16S rDNA, 对真菌 DNA 的样品扩增 ITS 序列。目的片段送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 所得序列在 Genbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中进行序列比对。

2 结果

2.1 预期结果

向 ICLAS 提交检测结果后, 即获得当次 PEP

样品的预期结果, 见表 3。

7 次 PEP 病原菌项目共 40 份样品, 涉及 27 种病原菌; 其中, 病原检测 33 项(含活菌样品 29 份、核酸样品 4 份), 抗体检测 7 项(抗体样品 7 份)。与预期结果相比较, 本实验室 7 次 PEP 检测结果的符合率分别为 8/8、2/2、5/8、9/9、5/5、6/7 和 1/1, 见表 4。

表 3 7 次 PEP 病原菌项目汇总

Table 3 Summaries of pathogenic bacteria in seven PEP projects

年份	PEP 样品编号	样品说明 ^a	预期结果 ^b
2013	34-1	小鼠肺匀浆 (Mouse lung homogenate)	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)
	34-2	水样分离菌 (Culture isolated from water sample)	绿脓杆菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
	34-3	大鼠鼻腔分离菌 (Culture isolated from rat nasal cavity)	肺炎链球菌 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)
	34-4	小鼠鼻支气管分离菌 (Culture isolated from mouse nasotrachea)	辛氏鲍特菌 (<i>Bordetella hinzii</i>)
	34-5	小鼠盲肠内容物分离菌 (Culture isolated from mouse cecal content)	黏质沙雷菌 (<i>Serratia marcescens</i>)
	34-6	小鼠皮肤拭子分离菌 (Culture isolated from mouse skin swab)	牛棒状杆菌 (<i>Corynebacterium bovis</i>)
	34-7	大鼠呼吸道分离菌 (Culture isolated from rat respiratory tract)	嗜肺巴斯德杆菌 (<i>Pasteurella pneumotropica</i>)
	34-9	小鼠粪便 (Mouse fecal sample)	啮齿类螺杆菌 (<i>Helicobacter rodentium</i>)
	2014	36-6	大鼠血清 (Rat serum)
36-10		大鼠血清 (Rat serum)	CAR 杆菌抗体 (Cilia-associated respiratory bacillus antibodies)
2016	41-4	5 倍 PBS 稀释大鼠血清 (Rat serum diluted 5 fold in PBS)	兔脑原虫抗体 (<i>Encephalitozoon cuniculi</i> antibodies)
	41-7	5 倍 PBS 稀释小鼠血清 (Mouse serum diluted 5 fold in PBS)	CAR 杆菌抗体 (Cilia-associated respiratory bacillus antibodies)
	41-8	5 倍 PBS 稀释大鼠血清 (Rat serum diluted 5 fold in PBS)	泰泽病原体抗体 (Tyzzer's antibodies)
	41-13	细菌培养 (Bacterial culture)	小鼠放线杆菌 (<i>Actinobacillus muris</i>)
	41-14	细菌培养 (Bacterial culture)	弗劳地枸橼酸杆菌 (<i>Citrobacter freundii</i>)
	41-15	细菌培养 (Bacterial culture)	乳腺炎棒状杆菌 (<i>Corynebacterium mastitidis</i>)
	41-18	小鼠体液 (Mouse fluid)	猪霍乱沙门菌 (<i>Salmonella choleraesuis</i>)
	41-20	细菌培养 (Bacterial culture)	假结核耶尔森菌 (<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>)
2017	44-1	5 倍 PBS 稀释大鼠血清 (Rat serum diluted 5 fold in PBS)	肺支原体抗体 (<i>Mycoplasma pulmonis</i> antibodies)

续表

年份	PEP 样品编号	样品说明 ^a	预期结果 ^b
	44-11	大鼠体液 (Rat fluid)	鼠棒状杆菌 (<i>Corynebacterium kutscheri</i>)
	44-12	小鼠粪便 (Mouse feces)	沙门菌 (<i>Salmonella</i> spp.)
	44-13	小鼠体液 (Mouse fluid)	肺支原体 (<i>Mycoplasma pulmonis</i>)
	44-14	细菌培养 (Bacterial culture)	支气管鲍特杆菌 (<i>Bordetella bronchiseptica</i>)
	44-15	细菌培养 (Bacterial culture)	乳腺炎棒状杆菌 (<i>Corynebacterium mastitidis</i>)
	44-17	细菌培养 (Bacterial culture)	产酸克雷伯杆菌 (<i>Klebsiella oxytoca</i>)
	44-18	细菌培养 (Bacterial culture)	辛氏鲍特菌 (<i>Bordetella hinzii</i>)
	44-19	真菌 DNA (Fungus DNA)	小鼠肺孢子菌 (<i>Pneumocystis murina</i>)
2018	49-2	小鼠肺 (Mouse lung)	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)
	49-3	水样 (Water sample)	绿脓杆菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
	49-5	细菌培养 (Bacterial culture)	牛棒状杆菌 (<i>Corynebacterium bovis</i>)
	49-6	细菌培养 (Bacterial culture)	啮齿类枸橼酸杆菌 (<i>Citrobacter rodentium</i>)
	49-7	小鼠生理盐水悬液 (Mouse saline suspension)	肺炎克雷伯杆菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)
2019	52-2	细菌培养 (Bacterial culture)	无乳链球菌 (<i>Streptococcus agalactiae</i>)
	52-3	细菌培养 (Bacterial culture)	黏质沙雷菌 (<i>Serratia marcescens</i>)
	52-4	细菌培养 (Bacterial culture)	海立啮齿杆菌 (<i>Rodentibacter heyltii</i>)
	52-5	小鼠粪便 (Mouse feces)	啮齿类螺杆菌 (<i>Helicobacter rodentium</i>)
	52-7	细菌培养 (Bacterial culture)	大肠埃希菌 (<i>Escherichia coli</i>)
	52-9	细菌培养 (Bacterial culture)	豚鼠气单胞菌 (<i>Aeromonas caviae</i>)
	52-10	细菌 DNA (Bacterial DNA)	念珠状链杆菌 (<i>Streptobacillus moniliformis</i>)
2020	54-2	小鼠血清 (Mouse serum)	肺支原体抗体 (<i>Mycoplasma pulmonis</i> antibodies)

注:^a指 ICLAS 随样品提供;^b指参与实验室向 ICLAS 提交检测结果后,方可获得此预期结果。

2.2 不符合项目

全部 40 份病原菌样品中,有以下 4 个项目的检测结果出现偏差:(1) 2016 年的 41-7 CAR 杆菌血清样品检出腺病毒 (Adenovirus) 抗体阳性,未检出目标抗体 CAR 杆菌抗体;(2) 41-8 大鼠血清中检出淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒

(lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) 抗体阳性,未检出泰泽病原体抗体;(3) 将 41-15 乳腺炎棒状杆菌 (*Corynebacterium mastitidis*) 误鉴定为眼棒状杆菌 (*Corynebacterium oculi*);(4) 在 52-5 小鼠粪便中检出泰泽病原体核酸阳性,漏检啮齿类螺杆菌。

表 4 检测方法和结果符合率

Table 4 Test methods and coincidence rates of results in seven PEP projects

年份	病原菌项目/样品总数 ^a	培养法(菌液)	抗体检测(血清)	核酸检测(DNA)	符合率
2013	8/10	8	0	0	8/8
2014	2/10	0	2	0	2/2
2016	8/20	5	3	0	5/8
2017	9/20	6	1	2	9/9
2018	5/10	5	0	0	5/5
2019	7/10	5	0	2	6/7
2020	1/10	0	1	0	1/1
总计	40/90	29	7	4	36/40

注:^a指每年 PEP 样品总数量,含病毒、病原菌和寄生虫样品。

3 讨论

PEP网站公布的现行样品库为2012版^[15],包括小鼠和大鼠两种动物的样品。其中,小鼠样品35项,病原菌和病毒分别为21项和14项;大鼠19项,病原菌11项,病毒7项,寄生虫1项。本实验室参与的7次PEP活动中,共40份病原菌样品,涉及27种病原,样品全部为液体,分为病原检测和抗体检测两种类型。样品形式涵盖菌液、水、气管冲洗物、血清、核酸等,采用病原菌培养、抗体检测和核酸检测3种方法。在27种病原菌中,绿脓杆菌、肺炎链球菌、辛氏鲍特菌、假结核耶尔森菌、乳腺炎棒状杆菌、肺炎克雷伯杆菌、大肠埃希菌和念珠状链杆菌这8种细菌超出了PEP样品库的范围,说明样品库仅为基础项目,实际检测项目仍在不断更新。相比而言,我国实验动物质量检测标准涉及的病原菌种类尚有欠缺,一些检测项目在我国缺少相应标准,比如PEP样品中出现的辛氏鲍特菌、黏质沙雷菌、乳腺炎棒状杆菌、CAR杆菌、小鼠放线杆菌、弗劳地枸橼酸杆菌、产酸克雷伯杆菌、无乳链球菌和致病性大肠埃希菌这9个项目,以及尚未出现的嗜麦芽假单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、兽疫链球菌(*Streptococcus zooepidemicus*)和弯曲菌属(*Campylobacter* spp.)等(后两项为Charles river检测项目)。在检测工作中,以上病原菌偶有检出,应引起重视,并尽快制定相应的检测标准。

我国实验动物质量检测标准中的检测技术和方法亟待补充和更新。PEP的微生物样品均为盲样,对检测方法不做要求。采用分离培养方法时,需要考虑到培养的温度、气体环境、时间等条件,检测过程复杂。根据ICLAS网站公布的检测项目,血琼脂平板可以满足绝大部分采用培养法检测病原菌的生长需要。根据在血琼脂皿上的生长特性,并参考在DHL和高盐甘露醇等选择性培养基上的生长状态,可直接缩小检测范围。对于单一病原的样品,检测过程相对简单,同时采用16S rDNA测序的方式则更为简便。如根据样品信息缩小检测范围,采用特异的PCR方法会事半功倍。34-9、44-13和52-5样品在血琼脂中未见菌落生长,直接对样品提取DNA,通过特异性PCR检测,以及16S rDNA测序验证,得到啮齿类螺杆菌和肺支原体的结果。因培养法

较为费时,对44-13肺支原体样品直接按核酸样品检测。肺孢子菌(*Pneumocystis* spp.)是一类条件致病真菌,国际上将其列为真菌检测项目。现行的国家标准GB/T 18448.4—2001规定了卡氏肺孢子菌(*Pneumocystis carinii*)的染色镜检方法仍作为寄生虫检测项目,对检测人员水平和样品要求较高^[16]。44-19小鼠肺孢子菌为真菌DNA样品,本研究中使用真菌通用引物ITS1/ITS4扩增和测序获得了结果。此外,病原菌名称也在不断更新变化。大肠埃希菌O115a, c: K(B)更新为啮齿类枸橼酸杆菌^[17],CAR杆菌的拉丁名称更新为*Filobacterium rodentium*^[18],嗜肺巴斯德杆菌Heyl生物型更新为*Rodentibacter heylii*^[19]。建议尽快修订相关标准,与国际标准名称一致。2017年中国实验动物学会颁布了首批团体标准,其中涉及牛棒状杆菌的实时荧光PCR检测方法,以及螺杆菌的普通PCR和实时荧光PCR检测方法;针对其他不易培养的病原菌,如泰泽病原体、CAR杆菌、支原体等,也应尽快制定相应的分子生物学检测标准,助力实验动物质量检测。

检测试剂与菌种资源的缺乏亟需解决。血清样品可能存在多种病原抗体的情况,如41-7和41-8样品同时检出腺病毒和LCMV抗体,44-6样品(鼠腺病毒2型血清样品,表3中未列出)检出泰泽病原体抗体;这可能与制备时的动物血清本底有关,更要求检测试剂具有良好的特异性和敏感性。CAR杆菌、兔脑原虫等ELISA检测试剂盒仍然需要进口,国内缺少自主知识产权的检测试剂,限制了检测工作的开展。例如,41-15样品的生化鉴定结果是眼棒状杆菌,16S rDNA序列与乳腺炎棒状杆菌(Genbank AY834747.1)和眼棒状杆菌(Genbank KJ938710.1)符合度分别为99.09%和97.00%,结合眼部病灶分离菌的备注提示,判定为眼棒状杆菌(系错误结果)。可见在实际检测中遇到新发病原菌时,设置阳性菌株对照很重要,而且应对生化结果进行验证,须结合测序结果和文献报道来慎重判定。再如,52-5的小鼠粪便样品检测结果是啮齿类螺杆菌,核酸检测结果却是泰泽病原体,对粪便革兰染色也同样提示梭菌,最终导致螺杆菌漏检。因此,如能建立同时检测多种病原的高通量抗原和抗体芯片检测方法,将会极大地促进实验动物微生物检测水平的提升。

经过连续参加PEP活动,充分评估和验证了本实验室的检测能力。目前我国实验动物质量检测水平仍不均衡,在检测新技术应用、病原检测种类方面与国际水平尚存在差距。我国实验动物质量检测项目的设置有较大局限性,国家标准中的检测方法相对落后,病原名称、检测方法和技术有待更新,检测试剂亟需开发。同时,本实验室作为能力验证提供者,在PEP活动中也获得了丰富的经验,这将有助于国内能力验证活动的改进,以促进国内实验室检测能力进一步提高。

参考文献:

- [1] Performance Evaluation Program (PEP) [EB/OL]. [2021-05-20]. <https://iclas.org/iclas-laboratory-animal-quality-network>.
- [2] GOTO K, HAYASHIMOTO N, ISHIDA T, et al. First trial in the developmental phase of the "performance evaluation program" based on the ICLAS animal quality network program: self-assessment of microbiological monitoring methods using test samples supplied by ICLAS[J]. *Exp Anim*, 2009, 58(1): 47-52. DOI:10.1538/expanim.58.47.
- [3] VERGARA P, HAYASHIMOTO N, KAGIYAMA N, et al. ICLAS performance evaluation program for diagnostic laboratories: a tool for monitoring diagnostic performance[J]. *J Am Assoc Lab Animal Sci: JAALAS*, 2011, 50(5):754-755.
- [4] PEP Participating Laboratories[EB/OL]. [2021-07-27]. <https://iclas.org/pep-participating-laboratories>.
- [5] 全国实验动物标准化技术委员会. 实验动物微生物学检测方法(2): GB/T 14926.1; 14926.6; 14926.9; 14926.11~14926.17; 14926.44-2001[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 实验动物酶联免疫吸附试验: GB/T 14926.50—2001[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
- [7] 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. 实验动物泰泽病原体检测方法: GB/T 14926.10—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [8] WEISBURG W G, BARNES S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *J Bacteriol*, 1991, 173(2): 697-703. DOI: 10.1128/jb.173.2.697-703.1991.
- [9] VAN KUPPEVELD F J, VAN DER LOGT J T, ANGULO A F, et al. Genus-and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, 59(2): 655. DOI:10.1128/aem.59.2.655-.1993.
- [10] 范薇, 隋丽华, 刘大伟, 等. 实验动物 CAR 杆菌 16SrRNA 基因 PCR 监测方法的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(4):308-311, 后插 7. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2010.04.009.
- [11] 冯育芳, 邢进, 岳秉飞. PCR 技术在小鼠 CAR 杆菌检测中的初步应用[J]. *实验动物与比较医学*, 2014, 34(2): 136-139. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2014.02.011.
- [12] BECKWITH C S, FRANKLIN C L, HOOK R R, et al. Fecal PCR assay for diagnosis of *Helicobacter* infection in laboratory rodents[J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(6): 1620-1623. DOI: 10.1128/jcm.35.6.1620-1623.1997.
- [13] 中国实验动物学会. 实验动物螺杆菌 PCR 检测方法: T/CALAS 24—2017[S]. 北京: 科学出版社, 2017.
- [14] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322. DOI: 10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1.
- [15] The current PEP Specimen Library [EB/OL]. (2012) [2021-05-17]. <https://media-01.imu.nl/storage/iclas.org/5197/pep-specimen-library-2012.pdf>
- [16] 冯洁, 林金杏, 高诚. 卡氏肺孢子的生物学特性简述[J]. *实验动物与比较医学*, 2018, 38(4):320-324. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2018.04.017.
- [17] OKUTANI A, TOBE T, SASAKAWA C, et al. Comparison of bacteriological, genetic and pathological characters between *Escherichia coli* O115a, c: K(B) and *Citrobacter rodentium*[J]. *Exp Animals*, 2001, 50(2):183-186. DOI:10.1538/expanim.50.183.
- [18] IKE F, SAKAMOTO M, OHKUMA M, et al. *Filobacterium rodentium* gen. nov., sp. nov., a member of Filobacteriaceae fam. nov. within the Phylum Bacteroidetes; includes a microaerobic filamentous bacterium isolated from specimens from diseased rodent respiratory tracts[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2016, 66(1):150-157. DOI:10.1099/ijsem.0.000685.
- [19] ADHIKARY S, NICKLAS W, BISGAARD M, et al. *Rodentibacter* gen. nov. including *Rodentibacter pneumotropicus* comb. nov., *Rodentibacter heylii* sp. nov., *Rodentibacter myodis* sp. nov., *Rodentibacter ratti* sp. nov., *Rodentibacter heidelbergensis* sp. nov., *Rodentibacter trehalosifermentans* sp. nov., *Rodentibacter rarus* sp. nov., *Rodentibacter mrazii* and two genomospecies[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2017, 67(6):1793-1806. DOI:10.1099/ijsem.0.001866.

(收稿日期: 2021-06-04 修回日期: 2021-09-18)