

不同材质的微生物捕捉滤膜在屏障环境设施中的应用效果初探

孔垂琴, 田苗苗, 蔡利东, 吴 东, 倪 露, 张楚漫, 杨慧欣

(江苏集萃药康生物科技股份有限公司, 南京 210032)

[摘要] **目的** 通过探究不同材质滤膜的微生物捕捉性能, 评估其对屏障环境实验设施中啮齿类动物健康状况的监测效果。**方法** 以嗜肺巴斯德杆菌和金黄色葡萄球菌为代表菌株, 在实验室条件下模拟滤膜捕捉微生物的过程, 以捕捉粉尘质量、最低检测限度及荧光定量PCR检测的Ct值差异综合评估5种具有吸附、透气性能的自选材质滤膜(M1~M5)和商品化捕捉滤膜(T1)的微生物捕捉效果。将性能最优的自选材质滤膜置于屏障设施内笼架的通风管道中, 用相应笼架的哨兵鼠作为对照组, 以表皮葡萄球菌和大肠埃希菌为指示菌, 计算阳性检出率和符合率, 探讨其作为微生物捕捉滤膜在屏障设施内监测实验动物健康状况的可行性。**结果** 从捕捉粉尘质量看, 自选材质滤膜M3(滤径为0.1 μm 的无纺布可作为材质)的捕捉效果仅次于T1, 捕捉量达0.126 g; 对于金黄色葡萄球菌, 除M4外, 其余材质的滤膜最低检测限度均为 10^2 CFU/g; 对于嗜肺巴斯德杆菌, 所有滤膜的最低检测限度皆为 10^2 CFU/g; 但M3的荧光定量PCR扩增结果Ct值显著小于其他材质, 故5种自选材质滤膜中M3的捕捉效果最好。滤膜检测验证实验中, 表皮葡萄球菌在哨兵鼠粪便和M3中的阳性检出率分别为50.00% (6/12)和58.33% (7/12), 符合率为92%; 大肠埃希菌在哨兵鼠粪便和M3中阳性检出率均为50.00% (6/12), 符合率为100%。**结论** 5种自选材质滤膜中, M3捕捉效果最佳; 在屏障环境设施内, M3对于表皮葡萄球菌的监测效果优于哨兵鼠。因此, 滤径为0.1 μm 的无纺布可作为微生物捕捉滤膜材质, 为笼架排风粉尘PCR监测用微生物捕捉滤膜的材质选择和应用提供借鉴经验。

[关键词] 微生物捕捉滤膜; 屏障环境设施; 笼架排风粉尘; 荧光定量PCR法; 哨兵鼠

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2024)04-0436-09



Exploration on Application Effectiveness of Microbial Capture Filter Membranes from Different Materials in Barrier Environment Facilities

KONG Chuiqin, TIAN Miaomiao, CAI Lidong, WU Dong, NI Lu, ZHANG Chuman, YANG Huixin

(GemPharmatech Co., Ltd., Nanjing 210032, China)

Correspondence to: YANG Huixin (ORCID: 0009-0003-6947-8256), E-mail: yanghx@gempharmatech.com

[ABSTRACT] **Objective** To evaluate the effectiveness of filter membranes made from different materials in monitoring the health status of rodents in barrier environment facilities by investigating their microbial capture performance. **Methods** *Pasteurella pneumotropica* (Pp) and *Staphylococcus aureus* (Sa) were used as representative strains to simulate the process of microbial capture by filter membranes under laboratory conditions. The microbial capture effectiveness of five self-selected filter membranes (M1, M2, M3, M4, and M5) with adsorption and breathability properties and a commercial filter membrane (T1) were comprehensively evaluated based on captured dust mass, minimum detection limit, and differences in Ct values obtained through fluorescence quantitative PCR detection. The best-performing self-selected filter membrane was placed in the ventilation ducts of cage racks within the barrier facility, with sentinel mice in corresponding cage racks as the control group. *Staphylococcus epidermidis* and *Escherichia coli* were

[基金项目] 江苏省实验动物协会2023年研究课题“笼架排风粉尘捕捉器滤材材料探索及多重EAD-QPCR检测方法建立”(DWXH202305)

[第一作者] 孔垂琴(1996—),女,硕士,兽医师,主要从事微生物检测工作。E-mail: kongcq@gempharmatech.com

[通信作者] 杨慧欣(1981—),女,硕士,中级实验师,主要从事动物遗传育种与繁育和实验动物管理工作。E-mail: yanghx@gempharmatech.com。ORCID: 0009-0003-6947-8256

used as indicator bacteria to calculate the positive detection rate and coincidence rate, thereby exploring the feasibility of using microbial capture filter membranes to monitor the health status of experimental animals in barrier facilities. **Results** In terms of the captured dust mass, the self-selected filter membrane M3 (non-woven filter membrane with a diameter of 0.1 μm); showed a capture effectiveness second only to T1, with a capture mass of 0.126 g. For *Sa*, all filter membranes except M4 had a minimum detection limit of 10^2 CFU/g. For *Pp*, the minimum detection limit for all filter membranes was 10^2 CFU/g. However, the Ct value of the quantitative fluorescence PCR amplification results for M3 was significantly lower than that of other materials, indicating that M3 had the best capture performance among the five self-selected materials. In the filter detection verification experiment, the positive detection rate of *Staphylococcus epidermidis* in sentinel mouse feces and M3 was 50.00% (6/12) and 58.33% (7/12), respectively, with a coincidence rate of 92%. The positive detection rate of *Escherichia coli* in both sentinel mouse feces and M3 was 50.00% (6/12), with a coincidence rate of 100%. **Conclusion** Among the 5 self-selected filter membranes, M3 exhibits the best capturing performance. Within the barrier environment facilities, M3 outperforms sentinel mice in monitoring *Staphylococcus epidermidis*. Therefore, non-woven filter membrane with a diameter of 0.1 μm ; can be used as the material for microbial capture filter membranes, providing valuable insights for the selection and application of microbial capture filter membranes used in PCR monitoring of cage exhaust air dust.

[Key words] Microbial capture filter membrane; Barrier environment facilities; Cage exhaust air dust; Fluorescence quantitative PCR

实验动物健康监测方式逐渐呈现丰富化和完善化趋势,通过制定严格的动物健康监测方案能有效保障屏障设施中实验动物的健康和动物实验结果的准确性^[1-2]。目前,在啮齿类动物设施中进行健康监测的方式主要有“脏垫料”哨兵鼠法和笼架排风粉尘(exhaust air dust, EAD) PCR监测法^[3-4]。哨兵鼠监测方式流程简单,但具有“延时性”和“偶然性”等缺点^[4-5]。随着独立通风笼盒(individually ventilated cage, IVC)系统的应用范围扩大,病原体在动物群体中的传播和流行相对减少,哨兵鼠监测方式的准确性和及时性也面临着巨大挑战^[6]。除哨兵鼠检测法外,还可以通过分子生物学方法检测EAD以达到及时、准确、便捷地评估啮齿类动物群体健康状况的目的^[7]。随着技术不断革新,国际上越来越多机构使用EAD来监测实验动物健康情况^[8]。

微生物捕捉滤膜是放置于IVC系统排风主机初效过滤器前或者笼架排风管内捕捉介质,可有效捕捉EAD中的病原体,是监测屏障环境中病原体的有效媒介。有研究表明,微生物捕捉滤膜可有效监测阿米巴(*Eutamoeba*)、鼠瘰螭(*Myocoptes musculus*)等^[9-10]寄生虫,小鼠诺如病毒(murine norovirus)^[9-11]、小鼠星状病毒(murine astrovirus)^[12]、小鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus)等病毒^[13],以及幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)^[14]、嗜肺巴斯德杆菌(*Pasteurella*

pneumotropica, *Pp*)^[15]、啮齿柠檬酸杆菌(*Citrobacter serrata*)^[16]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, *Sa*)^[17]等细菌。

目前,微生物捕捉滤膜在国内虽有商品化产品,但价格昂贵,且需与配套笼器具匹配,这阻碍了其在国内的发展和应用。本研究拟通过比较5种自选材质滤膜的捕捉性能,评估捕捉性能最优的滤膜材质在屏障设施内作为监测实验动物病原体介质的可行性,以期选出病原体捕捉效果更优的滤膜,为动物设施中微生物捕捉滤膜的材质选择、应用及推广提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 菌株和实验动物

嗜肺巴斯德杆菌(*Pp*, ATCC35149)和金黄色葡萄球菌(*Sa*, ATCC6538)均购自广东环凯微生物科技有限公司;大肠埃希菌(*Escherichia coli*)和表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)来源于本实验室。

实验用小鼠均为4~8周龄SPF级ICR雌鼠,由江苏集萃药康生物科技股份有限公司[SCXK(苏)2023-0009]提供。实验于江苏集萃药康生物科技股份有限公司[SYXK(苏)2023-0036]实施。实验动物饲养在屏障环境设施内同一房间的独立通风单元(individually ventilated unit, IVU)中,IVU采用独立集

中送排风方式。屏障环境设施内小鼠的生活条件均为温度 20~26℃,相对湿度 40%~70%,12 h 昼夜明暗交替,垫料为 6~8 目玉米芯,小鼠可自由饮水和采食饲料。该实验所用小鼠均经过检测,符合国家标准 GB 14922—2022 对 SPF 级动物的要求。

哨兵鼠设置:哨兵鼠选择 4~8 周龄免疫功能正常的 ICR 雌鼠,每面笼架最靠近排风口的位置初始放入 2 只哨兵鼠,定期检测,淘汰 1 只或 2 只老的哨兵鼠时补入 2 只新的哨兵鼠,保证笼盒中同时存在新的和老的哨兵鼠并在笼盒中至少生活 4 周,并通过耳标进行区分。实验方案经江苏集萃药康生物科技股份有限公司实验动物使用与管理委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)审核批准(批准文号:GPTAP003)。

1.2 主要仪器设备、试剂与材料

生物安全柜(型号 HFsafe-1200LC)购自力康生物医疗科技控股有限公司;荧光定量 PCR 仪 Roche Light Cycler96(型号 05815916001)购自罗氏诊断产品(上海)有限公司;智能梯度 PCR 仪(型号 GE9612T)购自杭州柏恒科技有限公司;分析天平(型号 BS124S)购自赛多利斯科学仪器有限公司;微量台式离心机(型号 PICO17)购自赛默飞世尔科技有限公司;麦氏比浊仪(型号 DensiCHEK plus)购自法国生物梅里埃公司;冷冻干燥机(型号 B01-10NE0005)购自宁波新芝冻干设备股份有限公司;IVU 笼器具(定制)购自苏州市冯氏实验动物设备有限公司。

蛋白酶 K(批号 WXBD8528V)购自上海鼓臣生物技术有限公司;EDTA(批号 22350887)与 Tris-HCl

(批号 IC22BA0021)均购自兰杰柯科技有限公司(BIOSHARP 品牌);PCR 酶(批号 7E730B3)购自南京诺唯赞生物科技有限公司;磁珠法核酸提取试剂盒(型号 GP211)购自凡知医学科技有限公司;脱脂乳粉(型号 BS102-500g)和甘露醇(型号 A100122-0100)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;粪便 DNA 提取试剂盒(型号 DP328)购自康为世纪生物科技有限公司;辐照灭菌实验用转基因鼠饲料购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司;动物垫料购自河北大厂科技有限公司。

1.3 粉尘采集及滤膜准备

EAD 粉尘采集:准备一个干净的空笼盒、10 mL EP 管和乳胶手套等耗材。将待采取粉尘的 IVU 及周围包面拉上拉链,使其与其他笼架之间相对隔离。用消毒液对初效过滤器插口附近进行喷雾消毒。将初效过滤器轻轻抽出,有粉尘的一面翻转向上,直接在其表面刮取粉尘,装在 10 mL EP 管中。每管收集粉尘量约为 2.5 g,共采集 40 管备用。

粉尘灭菌处理:将 EAD 样品以 121℃、1.10 MPa 高温高压灭菌处理 15 min,采用普通 PCR 技术检测确保无菌,制备无特定病原菌的 EAD。

不同材质的微生物捕捉滤膜准备:依据文献中报道的微生物捕捉滤膜材质特点,从市面上初步筛选了 5 种不同材质的微生物捕捉滤膜,分别命名为 M1~M5。同时,将某种商品化滤膜(材质未知)命名为 T1。相关滤膜信息具体见表 1。滤膜的滤径越小,过滤粉尘和细菌的效果越好,而不同材质的吸附性能和过滤性能等也会对微生物捕获效果有影响^[3]。

表1 不同材质的微生物捕捉滤膜信息

Table 1 Information of microbial capture filter membranes made from different materials

组别	材质	滤径/ μm	规格	厂家
Group	Material	Filter diameter/ μm	Specification	Manufacturer
M1	玻纤滤材	0.1	H13 高效	重庆再升科技股份有限公司
M2	PPK3 熔喷布	0.1	90 g/ m^2	上海仁益制毡有限公司
M3	无纺布	0.1	80 g/ m^2	东莞市佳联达无纺布有限公司
M4	聚丙烯微孔滤膜	0.3	PP-T 0.22 μm	山东新华医疗器械股份有限公司
M5	脱脂纱布	0.2	7.5 cm $\times$ 7.5 cm	徐州市徐卫卫生材料有限责任公司
T1	未知	未知	未知	泰尼百斯

注:表中 M1~M4 为自选材质, M5 为实验室常用材质, T1 为购买的商品。

Note: M1 to M4 are optional materials, M5 is a commonly used material in the laboratory, and T1 is a purchased product.

1.4 EAD 模拟阳性样品的制备与初步测试

阳性菌株确定:查阅文献得知,微生物捕捉滤膜能稳定检测 EAD 中的 *Pp*^[18] 和 *Sa*^[19]。将 *Pp*、*Sa* 分别

作为革兰阴性杆菌和阳性杆菌的代表菌株,用于制备模拟阳性 EAD。

菌体沉淀制备:取 1 mL *Pp* 或 *Sa* 菌液(MCF=1,

约为 10^8 CFU/mL) 以 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液得到菌体沉淀。所有菌液浓度均采用麦氏比浊仪测量, MCF 为麦氏浊度单位, CFU 为菌落形成单位。

菌粉冻干: 将 *Pp* 或 *Sa* 菌体沉淀分别与 0.5 mL 5% 脱脂乳粉和 0.5 mL 5% 甘露醇按照体积比为 1:1 混合, 制成悬液。取 400 μ L 悬液置于安瓿管中, 放入 -20°C 冰箱预冷 1 h, 再放入 -80°C 冰箱冷冻 24 h。最后, 将安瓿管置于冷冻干燥机中冷冻 24 h 后取出即可。

EAD 模拟阳性样品制备: 在生物安全柜中使用电子天平称取 0.1 g 菌粉与 0.9 g 无菌 EAD 混合, 制备菌浓度为 10^7 CFU/g 的 EAD 模拟阳性样品。重复上述操作, 用已知菌浓度的 EAD 模拟阳性样品与灭菌 EAD 混合, 依次制备菌浓度为 $10^2 \sim 10^6$ CFU/g 的 EAD 模拟阳性样品。

EAD 模拟阳性样品混合效果测试: 取 0.2 g 不同含菌量的 EAD 模拟阳性样品 (即不同浓度梯度的排风粉尘), 使用磁珠法核酸提取试剂盒提取样品中总 DNA。采用荧光定量 PCR 方法^[20-21] 检测 *Pp* 或 *Sa*, 测试 EAD 模拟阳性样品中菌体浓度与循环阈值 (cycle threshold, Ct) 值之间的关系, 以评估样品混合的均匀性和模拟阳性样品的制备效果。

1.5 不同材质滤膜的粉尘捕捉效果评价

将 6 种不同材质的滤膜裁剪成 5 cm $\times$ 3 cm 大小, 称重后分别放入灭菌、干净笼盒中。向笼盒中分别加入 0.2 g EAD 模拟阳性样品 (*Pp*、*Sa* 菌浓度为 10^6 CFU/g 的 EAD 模拟阳性样品各 0.1 g), 上下左右晃动 5 次, 每次 15 s。用无菌镊子小心夹取笼盒中的滤膜放在无菌塑封袋中编号, 称重 (注意去皮) 并记录数据。6 种材质滤膜均使用含菌量 $10^5 \sim 10^2$ CFU/g 的 EAD 模拟阳性样品依次重复上述操作 3 次, 共 90 个样品收集数据。

分别取不同材质滤膜放入笼盒前和捕捉完粉尘后 3 次称量结果的平均值, 计算质量差。原则上, 质量差越大, 表明滤膜的捕捉能力越好。质量差的计算公式为 $m = m_1 - m_2$ (m 为质量差; m_1 为滤膜未进行捕捉前的质量; m_2 为滤膜捕捉后的质量)。

1.6 不同材质滤膜捕捉粉尘量检测

将 1.5 节中称重后的微生物捕捉滤膜, 使用成品核酸提取试剂盒提取核酸, 具体操作过程参考说明书。使用 *Sa*、*Pp* 的特异性荧光定量 PCR 检测方法^[22-23] 检测所提取的核酸样品, 每个核酸样品做 3 个重复孔, 统计各核酸样品的 3 个 Ct 值的平均值作为最终 Ct 值, 并计算变异系数。以荧光定量 PCR 能稳定检出核酸样品所对应的最低菌浓度作为该材质滤膜的最低检

测限度。比较不同材质滤膜的最低检测限度、对应的 Ct 值。原则上, 滤膜的检测限度越低, 且对应的 Ct 值越小, 其捕捉效果越好。变异系数的计算公式为 $CV = \frac{SD}{M} \times 100\%$, 公式中 CV 为变异系数, SD 为标准差, M 为平均值。

1.7 滤膜检测验证实验

表皮葡萄球菌是实验小鼠皮肤上的一种共生菌, 除免疫缺陷鼠外, 在普通实验鼠身上广泛存在^[24-25]。大肠埃希菌是一种常见的细菌, 通常生活在人和实验小鼠的肠道中, 是肠道微生物组的重要成员。将筛选出的 M3 滤膜放在屏障设施内的 IVU 排风初效过滤器前, 以捕捉排风粉尘中的病原体。放置 30 d 后, 收集滤膜及对应笼架的哨兵鼠粪便 0.3 g, 采用粪便 DNA 提取试剂盒提取核酸样品, 使用荧光定量 PCR 技术检测采集样品中大肠埃希菌和表皮葡萄球菌含量^[26], 并通过比较两类样品的阳性检出率和符合率来评估 M3 滤膜的验证效果。以哨兵鼠检测结果为判定标准, 计算 M3 滤膜检测的总符合率, 计算公式为符合率 = $(a+d) / (a+b+c+d) \times 100\%$ 。公式中 a 为真阳性、 b 为假阳性、 c 为假阴性、 d 为真阴性。

1.8 数据统计与分析

所有数据均用 Excel 整理, 应用 SPSS 26.0 软件进行统计学处理, 应用 Origin 9.0 软件绘制图形。各实验所得结果数据用平均数 $\pm$ 标准差表示。独立样本两组间比较采用 t 检验; 符合正态分布的多组数据比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

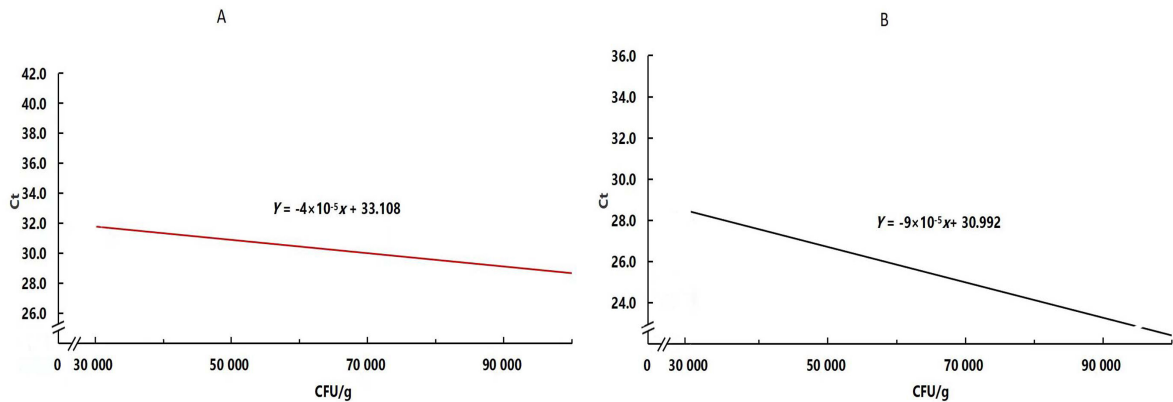
2 结果

2.1 EAD 模拟阳性样品的混合效果

随着 EAD 模拟阳性样品中 *Sa* 和 *Pp* 菌体浓度 (x) 增大, 其 Ct 值 (Y) 呈现降低趋势, 线性方程分别为 $Y = -4 \times 10^{-5}x + 33.108$ (图 1A), $Y = -9 \times 10^{-5}x + 30.992$ (图 1B), 说明 EAD 模拟阳性样品中的菌体浓度与 Ct 值存在线性关系, 混合效果良好。

2.2 不同材质滤膜的粉尘捕捉效果

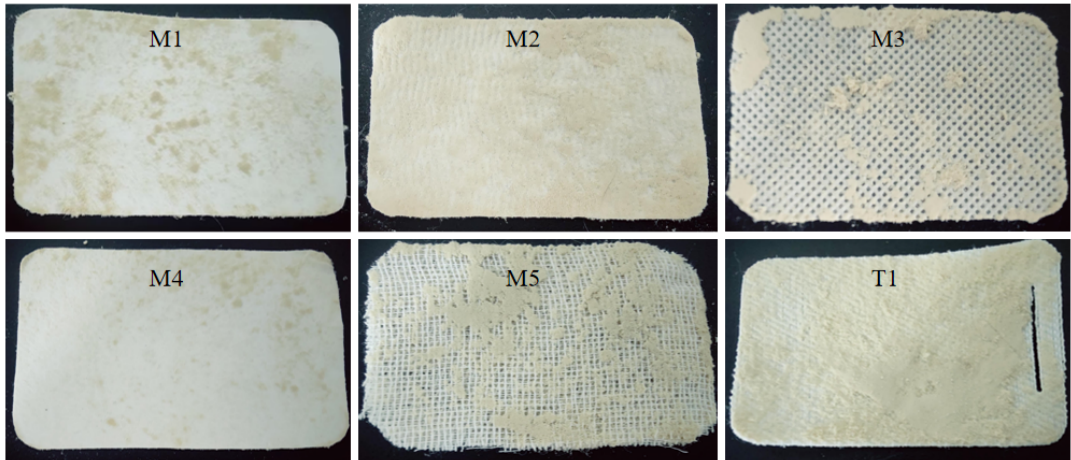
不同材质滤膜捕捉粉尘的实际效果如图 2 所示。观察发现, 在晃动相同时间时, 相同大小的不同材质滤膜其捕捉效果有所差异。M3、M5 和 T1 表面附着有大量粉尘, 而 M1、M2、M4 表面附着粉尘相对较少。表 2 中捕捉粉尘前后的质量差数据也显示, 5 cm $\times$ 3 cm 大小的不同材质滤膜, 相较于 M5 (实验室常用材质),



注：Ct为循环阈值，CFU为菌落形成单位。
Note: Ct, cycle threshold; CFU, colony forming unit.

图1 金黄色葡萄球菌(A)和嗜肺巴斯德杆菌(B)污染EAD模拟样品的混合效果

Figure 1 Mixing effect of exhaust air dust (EAD) simulated samples contaminated by *Staphylococcus aureus* (Sa) (A) and *Pasteurella pneumotropica* (Pp) (B)



注：图中M1、M2、M3、M4和M5为本次实验选用材质，T1为购买的成品。从观察结果来看，M3、M5和T1表面附着有大量粉尘，而M1、M2、M4表面附着粉尘相对较少；各滤膜材质附着粉尘前后的质量差从低到高依次为M4<M1<M2<M5<M3<T1。

Note: In the figure, M1, M2, M3, M4, and M5 were the materials selected for the experiment, and T1 was the purchased finished product. Based on visual observation, surfaces of M3, M5, and T1 had a large amount of dust attached, while surfaces of M1, M2, and M4 had relatively less dust attached. The mass differences of each filter membrane material, ranked from lowest to highest, were M4<M1<M2<M5<M3<T1.

图2 不同材质滤膜的粉尘捕捉效果图

Figure 2 Dust capture effectiveness of filter membranes made from different materials

表2 不同材质滤膜的粉尘捕捉效果评价

Table 2 Evaluation of dust capturing effectiveness of filter membranes made from different materials

材质种类 Material	材质大小/cm Size/cm	粉尘捕捉前滤膜质量/g m_1/g	粉尘捕捉后滤膜质量/g m_2/g	质量差/g $m(m_1 - m_2)/g$
M1	5×3	0.196±0.003	0.266±0.000	0.070±0.049
M2	5×3	0.070±0.000	0.164±0.000	0.094±0.067
M3	5×3	0.390±0.000	0.516±0.000	0.126±0.089*
M4	5×3	0.202±0.000	0.221±0.000	0.019±0.013
M5	5×3	0.203±0.000	0.286±0.000	0.084±0.059
T1	5×3	0.617±0.000	0.760±0.000	0.143±0.101*

注：与M5相比，* $P<0.05$ 。
Note: Compared to the M5, ** $P<0.05$.

在晃动相同时间时, M3、T1 捕捉粉尘的效果显著增强 ($P<0.05$)。各材质滤膜的质量差从低到高排序依次为 $M4<M1<M2<M5<M3<T1$ 。基于目视观察和质量差数据可知, 自选材质滤膜中 M3 的捕捉效果最好, 仅次于商品化的 T1 滤膜。

2.3 不同材质滤膜的最低检测限度

对于 *Sa* 检测项目, 除自选材质 M4 外其余材质滤膜的最低检测限度均为 10^2 CFU/g。在此检测限度下, 与 M5 相比, M3、T1 捕捉粉尘的能力均显著增强 ($P<0.05$); 不同材质滤膜的 Ct 值从大到小依次为 $M1>M4>M5>M2>M3>T1$ 。对于 *Pp* 检测项目, 不同材质滤膜的最低检测限度均为 10^1 CFU/g。在此检测限度下, 与 M5 相比, M3、T1 捕捉粉尘的能力均显著增强 ($P<0.05$); 不同材质滤膜的 Ct 值从大到小依次为 $M4>M1>M2>M5>M3>T1$ (表 3)。基于最低检测限度及对应的 Ct 值大小的评估结果显示, 自选材质中 M3 滤膜的微生物捕捉效果最好, 仅次于商品化的 T1 材质。

2.4 不同材质滤膜的检测验证结果

由表 4 可知, 针对采集的所有哨兵鼠粪便和 M3 滤膜样品, 表皮葡萄球菌在哨兵鼠粪便和 M3 滤膜中的阳性检出率分别为 50.00% (6/12) 和 58.33% (7/12), 符合率为 92%; 大肠埃希菌在哨兵鼠粪便和 M3 滤膜中阳性检出率均为 50.00% (6/12), 符合率为 100%。同时, 比较所有阳性样品的 PCR 测得 Ct 值发现, M3 滤膜的 Ct 值均比哨兵鼠粪便的 Ct 值更低 (表皮葡萄球菌 29.85 ± 3.43 vs 32.94 ± 2.89 ; 大肠埃希菌 31.13 ± 3.48 vs 33.05 ± 2.46), M3 滤膜与哨兵鼠粪便相比较, Ct 值更小, 说明 M3 材质滤膜在屏障环境设施中捕获大肠埃希菌和表皮葡萄球菌的效果比传统哨兵鼠的检测效果更加显著 ($P<0.05$)。

3 讨论

对于动物设施来说, 采用可靠、有效的微生物监测方案对实验动物质量控制至关重要。最常见的监测方式是脏垫料哨兵鼠法, 然而病原体排出方式、频率或传播途径等会导致传染源无法及时发现^[27-28]; 国际上一些知名机构如 Charles River 等已将 EAD 检测作为动物设施中微生物监测的常规手段^[24], 为维持 SPF 级实验动物健康提供了一种灵敏、简单和可靠的方法, 并减少了哨兵鼠的使用。EAD-PCR 作为一种新型的微生物检测技术能够有效替代或辅助脏垫料哨兵鼠法进行实验动物群体健康监测, 具有及时性、高准确性、

减少动物使用量等优点, 且符合“减少、替代、优化”(3R) 的科学原则^[11,24,29]。目前, 国内关于 EAD-PCR 检测的相关报道较少, 可能与笼架类型不匹配、配套的商品化微生物捕捉滤膜数量少、价格昂贵和 PCR 检测技术不成熟等原因有关。

微生物捕捉滤膜的材质至关重要, 其捕捉效果受材质的静电力、孔径、过滤率、摆放位置等因素影响。国外有研究表明, 纱布^[11]、无纺布^[3]等均可作为微生物捕捉滤膜的材质, 可有效监测种群实验动物的健康状况, 但其灵敏度尚未可知。因此, 深入研究不同材质滤膜对 EAD 及病原体的捕捉效果具有重要意义, 在国内市场也具备较大的开发价值。

本研究评估了不同材质滤膜作为微生物捕捉滤膜的可行性。通过对比 5 种自选材质滤膜捕捉粉尘的目视观察差异、质量差、最低检测限度以及验证结果来评估其捕捉粉尘的效果, 并与商品滤膜 T1 进行比较。本研究使用的 5 种自选材质滤膜中, M3 材质与 O'Connell 等^[3]研究中所用材质一致, 均为无纺布, 其粉尘捕捉量最高达 0.126 g, 直接反映出此材质对 EAD 具有更好的捕获效果。对于 2 种目标菌来说, 所有材质捕获粉尘的 PCR 所得 Ct 值随着粉尘中菌含量的降低而增大, 而 5 种自选材质中 M3 的 Ct 值均为最小, 即检测灵敏度最高, 间接反映出 M3 的捕获效果显著, 仅次于商品滤膜 T1。滤膜检测验证实验中, 表皮葡萄球菌在哨兵鼠粪便和 M3 滤膜中的阳性检出率分别为 50.00% (6/12) 和 58.33% (7/12), 符合率为 92%; 大肠埃希菌在哨兵鼠粪便和 M3 滤膜中阳性检出率均为 50.00% (6/12), 符合率为 100%。这些结果提示, M3 为自选材质滤膜的捕捉粉尘量最大, 微生物检测限度最低, 提示其微生物捕捉效果最好, 仅次于商品滤膜 T1。另外, 本研究在实验过程中发现滤膜捕获性能可能与静电力、滤径等有关, M3 和 T1 相对于其他滤膜, 静电力和粉尘捕获量较高 (数据尚未公布, 正在申请专利), 推测材质捕获效果可能与静电力等因素相关。

综上所述, 滤径为 0.1 μm 的无纺布可作为屏障设施内 EAD 微生物捕捉滤膜的候选材质。需要说明, EAD-PCR 检测技术虽然很有潜力, 可以替代或补充现有啮齿类实验动物健康监测手段, 但仍需更多的实际应用数据进一步研判其是否适用于不同机构屏障设施的不同项目监测, 如寄生虫、病毒和其他病原菌等, 同时解决不同品牌、不同类型笼架的适配问题。本研究不足包括: (1) 本研究中应用于实验的屏障环境设

表3 不同材质滤膜捕捉金黄色葡萄球菌和嗜肺巴斯德杆菌和检测灵敏度和变异系数

Table 3 Detection sensitivity and coefficient of variation (CV) for *Staphylococcus aureus* (Sa) and *Pasteurella pneumotropica* (Pp) using filter membranes made from different materials

材质 Material Bacteria	细菌浓度/(CFU·g ⁻¹) concentration/(CFU·g ⁻¹)	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> (Sa)		嗜肺巴斯德杆菌 <i>Pasteurella pneumotropica</i> (Pp)	
		<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa)		<i>Pasteurella pneumotropica</i> (Pp)	
		循环阈值($\bar{x}\pm s$) Ct ($\bar{x}\pm s$)	变异系数/% CV/%	循环阈值($\bar{x}\pm s$) Ct ($\bar{x}\pm s$)	变异系数/% CV/%
M1	10 ⁶	24.03±0.13	0.005	23.59±0.42	0.018
	10 ⁵	26.13±0.23	0.009	25.88±0.23	0.009
	10 ⁴	29.51±0.43	0.015	28.82±0.60	0.021
	10 ³	33.72±0.18	0.005	33.84±0.39	0.012
	10 ²	36.52±0.27	0.007	36.15±0.28	0.008
M2	10 ⁶	23.42±1.06	0.045	19.50±0.17	0.009
	10 ⁵	26.50±0.47	0.018	22.15±0.22	0.010
	10 ⁴	28.22±0.13	0.005	25.67±0.33	0.013
	10 ³	32.30±0.28	0.009	30.33±0.34	0.011
	10 ²	35.28±0.42	0.012	35.97±0.25	0.007
M3	10 ⁶	24.74±0.17	0.007	19.78±0.43	0.022
	10 ⁵	26.08±0.00	0.000	21.46±0.10	0.005
	10 ⁴	29.60±0.23	0.008	25.25±0.28	0.011
	10 ³	35.01±0.03	0.001	27.39±0.19	0.007
	10 ²	35.14±0.28*	0.008	32.91±0.80*	0.024
M4	10 ⁶	28.40±0.05	0.002	24.96±0.43	0.017
	10 ⁵	29.59±0.02	0.001	28.39±0.34	0.012
	10 ⁴	35.70±0.62	0.017	30.83±0.51	0.017
	10 ³	36.24±0.21	0.006	33.64±0.45	0.013
	10 ²	/	/	36.56±0.00	0.012
M5	10 ⁶	23.31±0.41	0.018	18.04±0.70	0.039
	10 ⁵	25.96±0.16	0.006	21.76±0.49	0.023
	10 ⁴	28.85±0.25	0.009	25.08±0.23	0.009
	10 ³	33.23±0.36	0.011	28.11±0.46	0.016
	10 ²	35.56±0.45	0.013	32.94±0.40	0.012
T1	10 ⁶	22.92±0.31	0.014	16.88±0.43	0.025
	10 ⁵	25.36±0.23	0.009	21.62±0.34	0.016
	10 ⁴	28.93±0.13	0.004	23.68±0.44	0.019
	10 ³	31.98±0.37	0.012	27.46±0.75	0.027
	10 ²	33.14±0.00*	0.024	32.10±0.28*	0.009

注：与 M5 相比，M3、T1 捕获粉尘的效果均显著增强，**P*<0.05。
Note: Compared to M5, M3 and T1 have significantly increased dust capture efficiency, **P*<0.05.

表4 滤膜 M3 的检测验证结果

Table 4 Detection validation results for filter membrane M3

检测项目 Testing item	M3 滤膜 M3 filter	哨兵鼠粪便样品 Sentinel mouse faeces			符合率/% Coincidence rate/%
		阳性 Positive	阴性 Negative	汇总 Summary	
表皮葡萄球菌 <i>Staphylococcus epidermidis</i>	阳性	6	1	7	92
	阴性	0	5	5	
	汇总	6	6	12	
大肠埃希菌 <i>Escherichia coli</i>	阳性	6	0	6	100
	阴性	0	6	6	
	汇总	6	6	12	

施数量不足, 导致 T1 材质未能进入临床验证实验;
(2) 选择大肠埃希菌和表皮葡萄球菌作为目标菌而不是国家标准要求的 SPF 级实验动物检测项目, 主要原因是本实验设施属于国家标准要求排除 SPF 的合格设施, 为保证本设施中实验动物健康, 无法开展阳性病原菌或病毒实验项目。因此, 本实验后续会通过建立模型设施, 进一步推进相关试验。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究所涉及的所有动物实验均已通过江苏集萃药康生物科技股份有限公司实验动物使用与管理委员会(IACUC)审核批准(批准文号:GPTAP003)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments involved in this study have been reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of GemPharmatech Co., Ltd. (Approval Letter No. GPTAP003). All experimental procedures were performed following the requirements of laws and regulations in China related to laboratory animals.

[作者贡献 Author Contribution]

孔垂琴负责课题设计, 实验过程管理, 数据统计分析, 论文写作、修改和定稿;

田苗苗负责荧光定量 PCR 方法检测和重复性验证;

蔡利东负责实验开展, 对初稿做审阅、评论或修订;

吴东和倪露负责开展实验设施和实验动物饲养管理、材料提供;

张楚漫辅助实验开展;

杨慧欣负责策划总体研究目标、获取基金资助。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] LIPMAN N S, HOMBERGER F R. Rodent quality assurance testing: use of sentinel animal systems[J]. Lab Anim, 2003, 32(5):36-43. DOI: 10.1038/labani0503-36.
- [2] LIVINGSTON R S, RILEY L K. Diagnostic testing of mouse and rat colonies for infectious agents[J]. Lab Anim, 2003, 32(5):44-51. DOI: 10.1038/labani0503-44.
- [3] O'CONNELL K A, TIGYI G J, LIVINGSTON R S, et al. Evaluation of in-cage filter paper as a replacement for sentinel mice in the detection of murine pathogens[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2021, 60(2): 160-167. DOI: 10.30802/AALAS-JAALAS-20-000086.
- [4] 于灵芝, 魏晓锋, 黎明, 等. 啮齿类实验动物健康监测用脏垫料哨兵动物法和排风粉尘 PCR 法比较[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(3): 321-327. DOI:10.12300/j.issn.1674-5817.2023.168.
YU L Z, WEI X F, LI M, et al. Comparison of methods between soiled bedding sentinels and exhaust air dust PCR for health monitoring of rodent laboratory animals[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(3): 321-327. DOI: 10.12300/j.issn. 1674-5817. 2023.168.
- [5] MILLER M, BRIELMEIER M. Environmental samples make soiled bedding sentinels dispensable for hygienic monitoring of IVC-reared mouse colonies[J]. Lab Anim, 2018, 52(3):233-239. DOI:10.1177/0023677217739329.
- [6] COMPTON S R, HOMBERGER F R, PATURZO F X, et al. Efficacy of three microbiological monitoring methods in a ventilated cage rack[J]. Comp Med, 2004, 54(4):382-392.
- [7] HENDERSON K S, PERKINS C L, HAVENS R B, et al. Efficacy of direct detection of pathogens in naturally infected mice by using a high-density PCR array[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2013, 52(6):763-772. DOI: 10.1136/vr.f6532.
- [8] BESSELSSEN D G, MYERS E L, FRANKLIN C L, et al. Transmission probabilities of mouse parvovirus 1 to sentinel mice chronically exposed to serial dilutions of contaminated bedding[J]. Comp Med, 2008, 58(2):140-144. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2008.00260.x.
- [9] JENSEN E S, ALLEN K P, HENDERSON K S, et al. PCR testing of a ventilated caging system to detect murine fur mites[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2013, 52(1): 28-33. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2013.01.001.
- [10] KÖRNER C, MILLER M, BRIELMEIER M. Detection of Murine Astrovirus and *Myocoptes musculus* in individually ventilated caging systems: investigations to expose suitable detection methods for routine hygienic monitoring[J]. PLoS One, 2019, 14(8): e0221118. DOI: 10.1371/journal.pone.0221118.
- [11] MILLER M, RITTER B, ZORN J, et al. Exhaust air dust monitoring is superior to soiled bedding sentinels for the detection of *Pasteurella pneumotropica* in individually ventilated cage systems[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2016, 55(6):775-781.
- [12] NIIMI K, MARUYAMA S, SAKO N, et al. The Sentinel™ EADR program can detect more microorganisms than bedding sentinel animals[J]. Jpn J Vet Res, 2018, 66(2): 125-129. DOI: 10.14943/jjvr.66.2.125.
- [13] PETTAN-BREWER C, TROST R J, MAGGIO-PRICE L, et al. Adoption of exhaust air dust testing in SPF rodent facilities [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2020, 59(2): 156-162. DOI: 10.30802/AALAS-JAALAS-19-000079.
- [14] WHARY M T, CLINE J H, KING A E, et al. Monitoring sentinel mice for *Helicobacter hepaticus*, *H. rodentium*, and *H. bilis* infection by use of polymerase chain reaction analysis and serologic testing[J]. Comp Med, 2000, 50(4):436-443.
- [15] DUBELKO A R, ZUWANNIN M, MCINTEE S C, et al. PCR testing of filter material from IVC lids for microbial monitoring of mouse colonies[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2018, 57(5):477-482. DOI: 10.30802/aalas-jaalas-18-000008.
- [16] GERWIN P M, RICART ARBONA R J, RIEDEL E R, et al. PCR testing of IVC filter tops as a method for detecting murine pinworms and fur mites[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2017, 56(6):752-761.
- [17] ZORN J, RITTER B, MILLER M, et al. Murine norovirus detection in the exhaust air of IVCs is more sensitive than

- serological analysis of soiled bedding sentinels[J]. Lab Anim, 2017, 51(3):301-310. DOI: 10.1177/0023677216661586.
- [18] MAILHIOT D, OSTDIEK A M, LUCHINS K R, et al. Comparing mouse health monitoring between soiled-bedding sentinel and exhaust air dust surveillance programs[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2020, 59(1):58-66. DOI: 10.30802/aalas-jaalas-19-000061.
- [19] LUCHINS K R, MAILHIOT D, THERIAULT B R, et al. Detection of lactate dehydrogenase elevating virus in a mouse vivarium using an exhaust air dust health monitoring program[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2020, 59(3): 328-333. DOI: 10.30802/AALAS-JAALAS-19-000107.
- [20] BAUER B A, BESCH-WILLIFORD C, LIVINGSTON R S, et al. Influence of rack design and disease prevalence on detection of rodent pathogens in exhaust debris samples from individually ventilated caging systems[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2016, 55(6):782-788.
- [21] LUPINI L, BASSI C, GUERRIERO P, et al. Microbiota and environmental health monitoring of mouse colonies by metagenomic shotgun sequencing[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2022, 39(1):37. DOI: 10.1007/s11274-022-03469-0.
- [22] 王立鹏, 李永旺, 王晨娟, 等. Dole qPCR检测嗜肺巴斯德杆菌的可靠性研究及在啮齿类实验动物质量监测中的应用[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(5):109-114. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.05.027.
- WANG L P, LI Y W, WANG C J, et al. Reliability research of Dole qPCR method on *Pasteurella pneumotropica* and application in health screening of laboratory rodents[J]. J Mod Lab Med, 2019, 34(5): 109-114. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7414.2019.05.027.
- [23] 于灵芝, 谢建芸, 冯丽萍, 等. 金黄色葡萄球菌荧光定量PCR检测方法的建立及其在大鼠、小鼠粪便检测中的应用[J]. 实验动物与比较医学, 2023(5):566-573. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.022.
- YU L Z, XIE J Y, FENG L P, et al. Establishment of fluorescence qPCR method for detection of *Staphylococcus aureus* and its application in feces detection of rats and mice [J]. Lab Anim Comp Med, 2023(5): 566-573. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2023.022.
- [24] RAGLAND N H, MIEDEL E L, GOMEZ J M, et al. *Staphylococcus xylosus* PCR-validated decontamination of murine individually ventilated cage racks and air handling units by using 'active-closed' exposure to vaporized hydrogen peroxide[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2017, 56(6): 742-751.
- [25] WON Y S, KWON H J, OH G T, et al. Identification of *Staphylococcus xylosus* isolated from C57BL/6J-Nos2 (tm1Lau) mice with dermatitis[J]. Microbiol Immunol, 2002, 46 (9):629-632. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2002.tb02744.x.
- [26] 史志远, 陈璐萍, 李博星, 等. 不同粪便DNA提取方法比较分析[J]. 生物工程学报, 2022, 38(9):3542-3550. DOI: 10.13345/j.cjb.220085.
- SHI Z Y, CHEN L P, LI B X, et al. Comparative analysis of different fecal DNA extraction methods[J]. Chin J Biotechnol, 2022, 38(9):3542-3550. DOI: 10.13345/j.cjb.220085.
- [27] WINN C B, ROGERS R N, KEENAN R A, et al. Using filter media and soiled bedding in disposable individually ventilated cages as a refinement to specific pathogen-free mouse health monitoring programs[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2022, 61(4): 361-369. DOI: 10.30802/AALAS-JAALAS-22-000013.
- [28] MANUEL C A, PUGAZHENTHI U, SPIEGEL S P, et al. Detection and elimination of *Corynebacterium bovis* from barrier rooms by using an environmental sampling surveillance program[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2017, 56(2): 202-209.
- [29] KIM E, YANG S M, WON J E, et al. Real-time PCR method for the rapid detection and quantification of pathogenic *Staphylococcus* species based on novel molecular target genes[J]. Foods, 2021, 10(11):2839. DOI: 10.3390/foods10112839.
- (收稿日期: 2024-01-10 修回日期: 2024-07-11)
(本文编辑: 张俊彦, 富群华, 丁宇菁, 洪怡)

[引用本文]

- 孔垂琴, 田苗苗, 蔡利东, 等. 不同材质的微生物捕捉滤膜在屏障环境设施中的应用效果初探[J]. 实验动物与比较医学, 2024, 44(4): 436-444. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.004.
- KONG C Q, TIAN M M, CAI L D, et al. Exploration on application effectiveness of microbial capture filter membranes from different materials in barrier environment facilities[J]. Lab Anim Comp Med, 2024, 44(4): 436-444. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2024.004.