



普通环境长爪沙鼠呼吸道菌群的分离鉴定

冯育芳, 邢进, 王吉, 岳秉飞, 贺争鸣

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 100050)

【摘要】 目的 调查普通环境长爪沙鼠呼吸道细菌及支原体携带情况, 为制定长爪沙鼠微生物学等级标准提供依据。方法 对普通环境饲养的65只长爪沙鼠进行解剖, 取气管分泌物接种血琼脂, 分别放入普通培养箱和5% CO₂培养箱中培养48 h, 分离菌株后同时进行生化分析和PCR测序鉴定, 以期准确判断分离菌株所属菌属; 气管浸液提取DNA, 用支原体特异性引物进行PCR检测, 并分别计算检出率。结果 本研究共检出22种细菌及支原体。不同细菌、支原体感染率相差很大, 阳性率在1.5% (1/65)到64.6% (42/65)之间, 其中部分细菌为大鼠和小鼠致病菌。结论 本研究为长爪沙鼠的微生物学等级标准的制定提供了参考数据。

【关键词】 长爪沙鼠; 呼吸道菌群; 普通环境; 分离鉴定

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)10-0050-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.010.012

Isolation and Identification of Respiratory Tract Flora of Mongolian Gerbils from Conventional Facility

FENG Yu-fang, XING Jin, WANG Ji, YUE Bing-fei, HE Zheng-ming

(National Institute of Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To investigate the respiratory tract flora and mycoplasma status in Mongolian gerbils from a conventional facility, and provide basic information for the developing microbiologic testing standards of gerbils. **Methods** Sixty-five gerbils from conventional facility of Capital Medical University were dissected to obtain the tracheal secretion, and then the samples were seeded in blood agar base, cultured in common or 5% CO₂ incubator for 48 h, separately. In order to accurately identify the genus to which the isolated strain belongs, biochemical analysis and PCR sequencing were performed. On the other hand, DNA was isolated from tracheal lixivium, and mycoplasma DNA was amplified by specific primer. The detection rate was calculated. **Results** In this study, 21 kinds of bacteria and mycoplasma were detected in the tracheas of these mongolian gerbils. The positive rates of different bacterial and mycoplasma infection were varying greatly, between 1.5% (1/65) to 64.6% (42/65), among which, some bacteria were pathogenic to mice and rats. **Conclusion** This study provides reference information for the development of microbiological standards of Mongolian gerbils.

【Key words】 Mongolian gerbils; Respiratory tract flora; Bacteria; Mycoplasma; Conventional facility; Isolation; Identification

长爪沙鼠 (*Meriones unguiculatus* Milne-Edwards) 亦称长爪沙土鼠, 在动物分类学上属于哺乳

[基金项目] 野生动物人工种群生物净化及相关疾病动物模型的建立与评价(2009BA183B02)。

[作者简介] 冯育芳(1981-), 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 实验动物微生物检测, E-mail: fyf307@126.com。

[通讯作者] 贺争鸣(1957-), 男, 研究员, 博士, 研究方向: 实验动物微生物学, E-mail: hezm@nicpbp.org.cn。

乳纲,啮齿目,仓鼠科,沙鼠亚科,沙鼠属;分布在内蒙古自治区及其毗邻的省区,包括河北省北部、山西、陕西、宁夏、青海等地的草原地带,蒙古人民共和国和苏联布里亚特地区也有分布,目前用于研究的沙鼠均来自同一沙鼠群。

长爪沙鼠在医学领域作为实验动物已有 30 多年的历史,使用量虽比大鼠、小鼠、豚鼠和仓鼠少,但其独特的解剖学、生理学和行为学特征对于某些领域的研究具有重要价值,是其他大、小鼠无法比拟的。而且,有研究表明,长爪沙鼠是一种“多能”性的实验动物,具有非常重要开发潜能。然而,目前尚未制定相应的长爪沙鼠微生物学等级标准,这在一定程度上制约和阻碍了长爪沙鼠作为实验动物的广泛使用。因此,本研究对普通环境饲养的长爪沙鼠呼吸道菌群进行了分离鉴定,了解长爪沙鼠的菌群携带情况,为长爪沙鼠微生物学等级标准的建立提供参考数据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物:首都医科大学实验动物科学部提供的长爪沙鼠 65 只,体重 20 g ~ 60 g 之间,3 月龄以上,雄性 32 只,雌性 33 只;实验动物生产许可证为 SCXK(京)2000-0012。

1.1.2 培养基:血琼脂基础培养基(blood agar base No. 2, CM0271)购自英国 Oxoid 公司;新鲜羊血购自个体供应商。

1.1.3 生化鉴定试剂:革兰氏阴性菌鉴定板(NMIC/ID-4)、革兰氏阳性菌鉴定板(PMIC/ID-55)及相关鉴定配套试剂购自美国 BD 公司。革兰氏染色液、API 20E 肠道菌鉴定系统(Ref. 20100)、API 20 NE 非肠道菌鉴定系统(Ref. 20050)、API STAPH 葡萄球菌和微球菌鉴定系统(Ref. 20500)、API 20 STREP 链球菌及有关种类的鉴定系统(Ref. 20600)购自生物梅里埃公司(Biomerieux)。生化管购自青岛高科技园海博生物技术有限公司。

1.1.4 PCR 相关试剂及引物:细菌 DNA 提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司;HS Taq 酶购自大连宝生物工程公司,引物合成自上海生物工程公司;细菌 16SrRNA 片段扩增引物^[1] FD1:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', RP2:5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'。支原体检测引物^[2,3] GP0-3:5'-

GGG AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T-3', MGS0:5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3',扩增产物为 270 bp。

1.1.5 主要仪器:隔水式恒温培养箱(上海安亭, WGP-600),二氧化碳培养箱(Thermo Scientific Series, 8000DH),全自动细菌测定仪(BD, Phoenix 100),PCR 仪(Biorad Mycycler)。

1.2 实验方法

1.2.1 细菌分离培养:眼球采血后采用安死术处死沙鼠,严格按照无菌操作要求解剖动物,用一次性接种环刮取呼吸道分泌物,接种两个血琼脂培养基。其中,一个置 5% 二氧化碳培养箱中 37℃ 培养 48 h,另一个置普通培养箱中 37℃ 培养 48 h,根据长出菌落的大小、形态、颜色、溶血类型等进行分类,然后对每一种类的细菌纯培养,革兰氏染色,以确定下一步的分离鉴定方法。

1.2.2 细菌的鉴定:革兰氏染色分类后的细菌分别用不同的鉴定条进行鉴定,用分析软件分析结果。根据软件提示补充相应的生化项目,结合 16S rRNA 的测序结果得出结论;对于部分不太确定的菌株用全自动细菌测定仪进行检测,同时结合 16S RNA 的测序结果进行分析得出最终结论。

2 结果

2.1 长爪沙鼠呼吸道细菌种类的初步确定

根据菌落形态、芽孢鉴定试验及染色镜检结果,初步确定长爪沙鼠呼吸道含有 21 种细菌,其中, G⁺ 球菌 10 株、G⁻ 球菌 1 株、G⁺ 杆菌 4 株、G⁻ 杆菌 6 株,见表 1。

表 1 普通环境长爪沙鼠呼吸道细菌种类的初步确定

Tab. 1 Identification of respiratory tract flora in the Mongolian gerbils

形态\染色 Morphology	G ⁺	G ⁻	合计 Total
杆菌 Bacillus	4	6	10
球菌 Coccus	10	1	11
合计 Total	14	7	21

2.2 长爪沙鼠呼吸道菌群分离鉴定结果

根据生化试验结果,结合菌落的生长表现、PCR 测序鉴定及染色特性综合分析,可确定 21 种长爪沙鼠呼吸道菌群的种属,在此基础上统计不同菌株的检出率,不同细菌感染率相差很大,阳性率在 1.5% (1/65) 到 64.6% (42/65) 之间,见表 2。

表 2 长爪沙鼠呼吸道菌群分离鉴定结果
Tab. 2 Isolation of respiratory tract flora from the Mongolian gerbils

编号 No.	菌株名称 Name	G 染色 Staining	菌株特征 Morphology	分离率 Isolation ratio	检出条件* Detection conditions	文献致病性 Pathogenicity reported in the literature
1	多杀巴斯德(多杀亚种)	G-杆菌	灰白,梭形	4/65	普通、CO ₂	致病菌
2	多杀巴斯德(败血亚种)	G-杆菌	灰白,中,湿润,光泽	5/65	CO ₂	致病菌
3	嗜肺巴斯德杆菌	G-杆菌	灰白,小,圆润	16/65	普通、CO ₂	条件致病菌
4	苛养颗粒链球菌	G+球菌	灰白,锥状,a溶血	30/65	普通、CO ₂	条件致病菌
5	猪放线杆菌	G+杆菌	灰白,大	42/65	普通、CO ₂	条件致病菌
6	鼠放线杆菌	G+杆菌	灰白,中等	21/65	普通、CO ₂	条件致病菌
7	副流感嗜血杆菌	G-杆菌	灰白,大	2/65	普通、CO ₂	条件致病菌
8	流感嗜血杆菌	G-杆菌	灰白,中,刮起黄色	8/65	普通、CO ₂	条件治病菌
9	绿色气球菌 I 型	G+球菌	灰白,a溶血,小	20/65	普通、CO ₂	条件致病菌
10	绿色气球菌 II 型	G+球菌	灰白,a溶血,小	11/65	普通、CO ₂	条件致病菌
11	绿色气球菌 III 型	G+球菌	灰白,a溶血,小	10/65	普通、CO ₂	条件致病菌
12	猪链球菌	G+球菌	a溶血,小	2/65	普通、CO ₂	致病菌
13	血链球菌	G+球菌	灰白,0.5mm左右,a溶血环	3/65	普通	非致病菌
14	少酸链球菌	G+球菌	灰白,锥状,a溶血	1/65	普通	条件致病菌
15	奇异变形杆菌	G-杆菌	迁徙生长	1/65	普通、CO ₂	条件致病菌
16	韦荣氏球菌	G-球菌	灰白,细小和灰白针尖	34/65	普通	非致病菌
17	动物乳酸菌	G+杆菌	针尖,刮不下来	2/65	CO ₂	非致病菌
18	耳炎假单胞菌	G+杆菌	β,浅灰绿	1/65	普通	条件致病菌
19	孔氏葡萄球菌	G+球菌	β,白色,小,成堆带绿色	16/65	CO ₂	条件致病菌
20	山羊葡萄球菌	G+球菌	β,白色,成堆带红色	1/65	CO ₂	对山羊具有致病性
21	木糖葡萄球菌	G+球菌	β,白色,小	2/65	CO ₂	致病性较弱

#:限于篇幅,只描述菌株在一种培养基上的培养特征。*:普通:普通培养箱,CO₂:5% CO₂培养箱。

表 3 长爪沙鼠呼吸道菌群致病性分析
Tab. 3 The pathogenicity analysis of respiratory tract flora of Mongolian gerbil

分类 Classification	致病菌 Pathogenic bacteria	条件致病菌 Conditional pathogenic bacteria	非致病菌 Non-pathogenic bacteria
种类(种) Species	5	13	3
平均检出率(%) * Mean detection rate (%)	4.31	19.29	20.00
所占比率(%) & Percentage (%)	7.69 (5/65)	21.18 (14/65)	20 (13/65)

*:每种细菌检出率的平均数。&:所占比率为包含该细菌动物占全部被检动物的百分率。

Note: *: Mean detection rate of each tyoe of bacteria. &: The percentage = number of animals containing the bacteria / total number of tested animals.

2.3 长爪沙鼠呼吸道菌群致病性分析

为了了解所分离菌株的致病性,参考相关文献,对检出的 21 种呼吸道细菌的致病性(包括对人致病性和对动物致病性)进行分析,对表 2 的数据进行统计。在检出的 21 种呼吸道菌中包含致病菌 5 种,平均检出率为 4.31%;条件致病菌 13 种,平均检出率为 19.29%;非致病菌为 3 种,平均检出率为 20.00%。而且,为了了解需排除动物的比率,我们计算了包含各类细菌动物占全部被检动物的百分率,见表 3。

2.4 呼吸道菌群在长爪沙鼠不同个体间的差异

我们还分析了不同的呼吸道菌在长爪沙鼠不同个体间的差异,通过对性别、月龄、体重等因素分组,分析发现,呼吸道菌群与上述因素没有明显相关性,不同个体间的菌群分布未发现明显规律性。

2.5 长爪沙鼠呼吸道支原体检测结果

PCR 方法检测发现,长爪沙鼠气管浸液中含有支原体,阳性率为 70.77% (46/65),结果见图 1。

3 讨论

长爪沙鼠已广泛应用于医学研究的众多领域,虽然较大鼠、小鼠的使用量要少很多,但是由于其

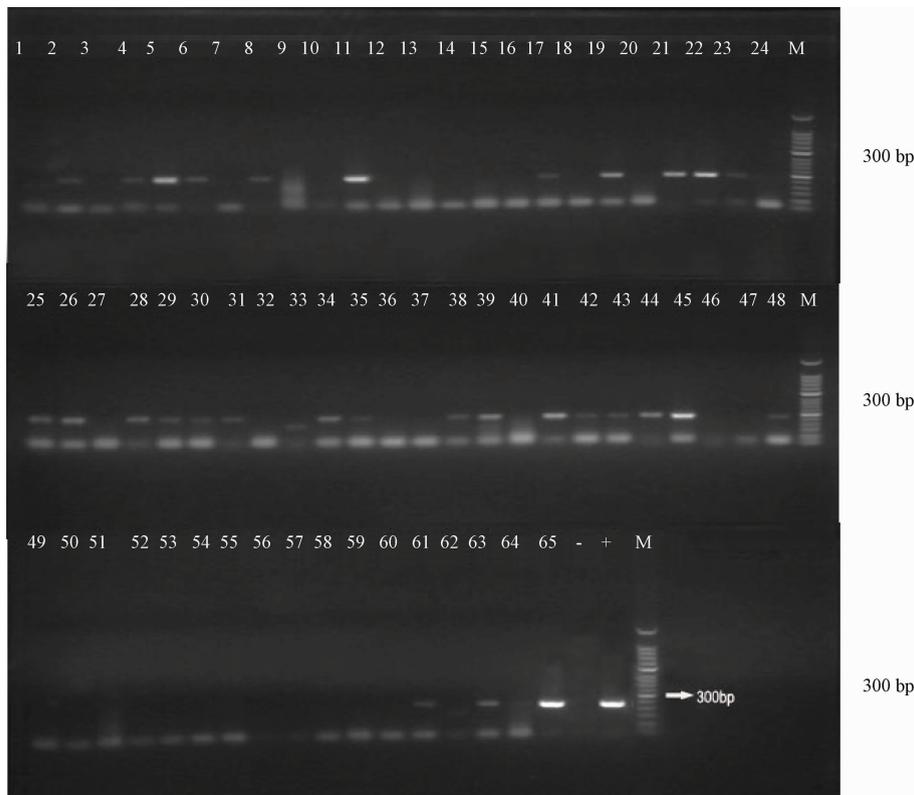


图 1 长爪沙鼠支原体检测结果

注: M 代表 50 bp 的 marker; - 代表阴性对照; + 代表阳性对照, 阳性片段大小为 270 bp

Fig. 1 Detection results of mycoplasma from the respiratory tract of the Mongolian gerbils

Note: M: 50 bp marker; -: negative control; +: positive control; The size of positive fragments was 270 bp.

自身不可替代的一些解剖生理和生物学特点,是一种具有明显应用优势和发展前景的实验动物种类^[4, 5],在寄生虫病学、微生物学、神经和脑血管疾病、肿瘤学等领域应用广泛^[1, 6-8],但对其呼吸道细菌情况调查的报道很少。Solomon 等^[9]从三个不同群体的长爪沙鼠的鼻咽部均分离到了木糖葡萄球菌。杜小燕等^[10]发现银川市和呼和浩特地区的野生长爪沙鼠分别携带了 12 种和 8 种细菌,屏障环境饲养的长爪沙鼠携带了 7 种细菌。本研究使用两种不同的培养条件对长爪沙鼠呼吸道分泌物携菌情况进行了研究,结果表明,普通环境中饲养长爪沙鼠呼吸道携带了 21 种细菌,其中 G⁺球菌 11 株、G⁺杆菌 2 株、G⁻杆菌 8 株。在此基础上,进一步对上述细菌鉴定到属,并计算了检出率。

本研究共检出呼吸道细菌 21 种,多于 Solomon 等^[9]和杜小燕等^[10]人的报告结果。原因之一是,本研究为尽可能全面的了解长爪沙鼠呼吸道菌群情况,防止目的菌株的漏检,使用了两种不同的培养方式,包括普通培养箱和 5% CO₂ 培养箱,增加了细菌检出效率,有效避免了可能存在的漏检。

从不同菌株的检出率来看,嗜肺巴斯德杆菌(24.61%)、猪放线杆菌(64.61%)、孔氏葡萄球菌(24.61%)和绿色气球菌(63.08%)等正常或条件致病菌分布较广,而多杀巴斯德菌(多杀亚种)(6.15%)、多杀巴斯德菌(败血亚种)(7.69%)、猪链球菌(3.08%)等致病菌检出率较少,说明控制环境条件对长爪沙鼠的种群净化具有重要的意义。但值得注意的是,嗜肺巴斯德杆菌(24.61%)检出率较高,虽然是条件致病菌,但这是 SPF 级大鼠和小鼠均要求排除的细菌,应引起重视。

对照现行国家标准(GB 14922.2-2011),本研究检出的多杀巴斯德菌是清洁级豚鼠、地鼠、兔子必须检测和排除的,嗜肺巴斯德菌是 SPF 级啮齿类动物必须检测和排除的。支原体是清洁级大鼠和小鼠必须检测和排除的。与国外标准相比较,鼠放线杆菌是国际实验动物科学委员会(ICLAS)要求排除的;杰克森实验室(JAX)需要排除链球菌属。

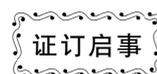
此外,本研究检出的多杀巴斯德菌、猪链球菌是一些重要的病原菌,可能对饲养人员、实验人员或其他动物产生危害,应考虑列为清洁级长爪沙鼠

应排除的细菌。对本研究检出的 13 种条件致病菌,应根据其对动物或人类的危害选其具有代表性的细菌,列为 SPF 级长爪沙鼠应排除的细菌。本研究为长爪沙鼠的微生物学等级标准的制定提供了参考数据。

参考文献:

- [1] Dotzauer A, Feinstone SM., Kaplan G. Susceptibility of nonprimate cell lines to hepatitis A virus infection[J]. J Virol. 1994, 68(9): 6064 - 6068.
- [2] van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification[J]. Appl Environ Microbiol. 1993, 59(2): 655.
- [3] van Kuppeveld FJ, van der Logt JT, Angulo AF, et al. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification[J]. Appl Environ Microbiol. 1992, 58(8): 2606 - 2615.
- [4] 卢耀增,蔡有余,王光明. 实验动物学[B],北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社. 1995: 18 - 19.
- [5] 岳秉飞. 实验动物资源开发,引进,共享,供应[J]. 中国比较医学杂志. 2011, 21(10, 11): 45 - 47.
- [6] 胡华军,萨晓婴,应华忠,等. 长爪沙鼠 Tim - 1 基因部分序列克隆及表达分析[J]. 中国计量学院学报. 2011, 22(4): 398 - 402.
- [7] 朱智勇,姚顺荣,付桂明,等. 长爪沙鼠是流行性出血热病毒敏感的实验动物[J]. 微生物学报. 1984, 24(1): 92 - 95.
- [8] 刘锋华,郭红刚,楼琦,等. 链脲佐菌素诱导长爪沙鼠 I 型糖尿病模型的实验研究[J]. 中国实验动物学报. 2010, 18(006): 489 - 494.
- [9] Worthington JM, Fulghum RS. Cecal and fecal bacterial flora of the Mongolian gerbil and the Chinchilla[J]. Applied Environ Microbiol. 1988, 54(5): 1210 - 1215.
- [10] 杜小燕,王钜,王迎,等. 野生和驯养长爪沙鼠携带细菌情况的调查研究[J]. 实验动物科学. 2008, 25(001): 15 - 17.

[修回日期]2012-09-25



《中国医药科学》杂志征订启事

《中国医药科学》杂志是中华人民共和国卫生部主管,海峡两岸医药卫生交流协会和二十一世纪联合创新(北京)医药科学研究院主办的国家级综合性医药科技期刊,国内统一刊号:CN 11 - 6006/R,国际标准刊号:ISSN 2095 - 0616,邮发代号:82 - 519。现已被中国知网、中国学术期刊网络出版总库、《中国学术期刊(光盘版)》全文检索系统、万方数据数字化期刊群、中国核心期刊(遴选)数据库、中文科技期刊数据库、解放军医学图书馆 CMCC 和 CMC I 全文收录,系中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊。

全国各地邮局均可订阅,脱订者可直接通过发行部订阅。每月出版 2 期,每期定价 20 元,订阅全年 24 期优惠价 360 元。国内外公开发行,本刊设有封面人物、业界关注、专家论坛、基础医学、药物研究、论著、综述、药理与毒理、临床研究、药物与临床、影像与介入、麻醉与镇痛、影像与介入、医学检验、临床病理、中医中药、医药教育、经营管理等栏目。内容涉及国内外医疗、教学、科研和管理工作者在医药科研领域中所取得的新理论、新成果、新经验、新技术、新方法。欢迎内科、外科、口腔科、耳鼻咽喉科、眼科、麻醉科、皮肤科和妇产科等相关专业的科研、教学、临床和护理人员订阅与投稿。本刊为半月刊,稿件容量大、审稿专家多、编辑效率高、处理稿件快和发稿周期短。根据全国继续医学教育委员会《继续医学教育学分授予与管理办法》的规定,在本刊发表论文可获得国家级继续医学教育学分。凭订阅单复印件投稿,同等条件优先录用。欢迎各医药单位、院校、厂家刊登产品和广告。

地 址:北京市朝阳区百子湾西里 402 号楼 1004 室 《中国医药科学》杂志社发行部

邮 编:100124 电话:010 - 59693870 - 8017 传真:010 - 59693848

联 系 人:线红宇 联系信箱:zgykxhrd@163.com