



实验动物细菌学监测工作中存在的问题及建议

张丽芳

(中国医学科学院 北京协和医学院医学实验动物研究所 卫生部实验动物检测中心, 北京 100021)

【摘要】 实验动物细菌学质量控制标准是评价实验动物质量的重要指标,本文在分析发达国家实验动物质量标准的基础上,结合目前的检测现状,对我国实验动物细菌学监测标准在检测项目、检测方法、检测频率、取样要求等方面存在的问题进行了分析并提出建议。

【关键词】 动物;实验;细菌学;监测

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)08-0074-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.08.019

Problems and Suggestions for Bacteriological Quality Monitoring of Laboratory Animals in China

ZHANG Li-fang

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Peking Union Medical College (PUMC), Monitoring Center for Laboratory Animal of Ministry of Health, Beijing 100021, China)

【Abstract】 The standards of bacteriological quality monitoring of laboratory animals are very important index to evaluate the quality of laboratory animals. Based on the analysis of the standards of microbiological quality monitoring of laboratory animals in developed countries, in this paper, we will discuss some current problems such as test item, test methods, test frequency and sampling method and make suggestions for bacteriological quality monitoring of laboratory animals in China.

【Key words】 Laboratory animals; Bacteriology; Quality monitoring

实验动物微生物质量控制标准是评价实验动物质量的重要指标,随着生命科学研究对实验动物质量不断提出新的更高要求,已有的实验动物质量标准 and 检测体系已不能完全适应其发展的需求,现将我国实验动物细菌学监测标准中存在的问题及建议分述如下:

1 我国细菌检测项目不全,难以对动物质量进行准确客观的评价

与国际上多数实验动物质量标准相比^[1-7],以下病原微生物未列入我国国家标准检测项目,这些

病原缺乏基础性研究,未建立相应的检测方法,检测项目和检测能力的不足造成难以对动物质量进行准确客观的评价。

(1) 螺杆菌(*Helicobacter spp.*): 螺杆菌的宿主范围非常广泛,包括整个哺乳类动物、禽类、家畜、非人灵长类动物和海洋生物如鲸鱼等,引起各种症状包括癌症的疾病^[8]。目前从大鼠、小鼠、沙鼠。

等啮齿类实验动物中已陆续分离到至少13种啮齿动物螺杆菌^[9],其中重要的有 *H. bilis*, *H. hepaticus*, *H. rodentium*, *H. typhlonius*, *H. trogontum*, *H. gammani*。啮齿动物螺杆菌能导致小鼠肝炎、肝

[通讯作者]张丽芳,女,助理研究员,研究方向:实验动物微生物学。E-mail: zhanglifanghl@yahoo.com.cn。

细胞瘤、盲肠结肠炎、胆管炎、肝胆肿瘤等多种肠肝疾病^[10-13],严重影响实验动物质量。更重要的是,感染螺杆菌的动物用于人类消化道疾病研究,以及药品、保健食品、化妆品等安全性评价时,其结果将受到干扰。螺杆菌在啮齿类实验动物中有较高的感染率,如 2001~2005 年间,亚洲、欧洲及北美洲不同来源的 34 个实验小鼠群中有 30 个感染螺杆菌,阳性率为 88%^[9];我国实验动物也存在该类螺杆菌感染^[14],对北京市部分清洁级大鼠、小鼠和沙鼠检测结果表明,螺杆菌带菌率几乎为 100%^[15]。国外已将螺杆菌作为啮齿类实验动物必须排除的病原菌列入常规检测项目,PCR 方法和测序是目前螺杆菌检测的金标准,我国已陆续开展螺杆菌检测方法的研究^[14-16]。

(2) CAR 杆菌 (*Cilia-associated respiratory bacillus*, CAR): CAR 杆菌首先分离自实验大鼠,随后从实验小鼠、兔、猪、山羊、牛、羚羊、鹿、狍等多种动物中发现^[17-22],引起大、小鼠慢性呼吸道疾病,多与肺支原体和病毒协同感染,引起细支气管扩张、化脓性支气管炎、气管炎,肺脓肿、肺不张,检测方法有血清学、PCR、组织病理学。CAR 杆菌不能在无活细胞的人工培养基上生长,这种生物学特性给该菌的检测带来一定困难,不同来源菌株差异很大,兔株和大鼠株 16S rRNA 序列同源性仅达 48.8%^[23],菌株的差异使分子生物学方法如 PCR 在我国也无法开展。我国没有将其列为实验动物检测项目,对该菌的研究基本为空白,缺乏病原学、流行病学资料。

(3) 牛棒状杆菌 (*Corynebacterium bovis*, *C. bovis*): 牛棒状杆菌是裸鼠角化过度性皮炎、棘皮症的病原^[24],发病裸鼠背部及两侧出现鳞片样小白点,此病为一过性,但传播迅速,几天内发病率达 80%,乳鼠死亡率相当高,Seid 成年小鼠也可致病^[25]。*C. bovis* 是国外免疫缺陷小鼠必检项目,检测方法为分离培养法,国内未见相关的研究报告。

(4) 啮齿柠檬酸杆菌 (*Citrobacter rodentium*, *C. rodentium*): 美国、日本爆发流行以小鼠降结肠严重增厚为病理特征的传染性鼠结肠增生症,造成乳鼠中等死亡率,病原分离证实为啮齿柠檬酸杆菌(曾用名非典型性柠檬酸杆菌,弗氏柠檬酸杆菌 4280),是柠檬酸杆菌属中唯一分离自小鼠的基因种。近年来啮齿柠檬酸杆菌成为研究的热点不仅仅是其对实验动物质量及动物实验的影响,啮齿柠檬酸杆

菌是目前所知唯一与人类肠出血性大肠杆菌 (enterohemorrhagic *E. coli*, EHEC) 和肠致病性大肠杆菌 (enteropathogenic *E. coli*, EPEC) 拥有相同 Lee 毒力岛的鼠类自然病原^[26-28]。*C. rodentium* 与致病性大肠杆菌在生物学特性上相似,在日本曾经被归为小鼠的致病性大肠杆菌 O115 血清型,我国国家标准中列为必要时检测的项目的大肠杆菌 O115 a, C, K(B) (*Escherichia coli* O115 a, C, K(B)) 为 *C. rodentium* 的一种,国标中推荐的检测方法仅仅针对 *Escherichia coli* O115 a, C, K(B), 因此对 *C. rodentium* 在我国的影响程度尚不得而知。

2 部分检测方法特异性、敏感性不高,检测试剂标准化不足

我国国家标准中虽然对各种微生物均提出一种或多种检测方法,但对具有一定难度的病原微生物检测技术,仅停留在引用已有的基本方法,满足常规检测的水平上,致使将某些可操作性较差的方法写入国家标准,部分项目检测试剂的供应和试剂标准化严重不足,某些项目的检测在实际工作中无法实施,或由于方法自身的问题导致检测结果不准确,使实验动物微生物质量检测工作缺乏可信性和可靠性,阻碍了国家标准的实施。以下病原虽然列入国家标准检测项目,由于检测方法缺陷使检测结果可信度不高:

(1) 泰泽病原体 (*Clostridium piliforme*): 目前泰泽病原体感染尚无可靠的诊断方法。欧美对该菌常用的检测方法有血清学 (MFI、ELISA、IFA)、分子生物学 (PCR) 和组织病理学等方法,我国已将 IFA 作为常规检测方法应用于泰泽病原体检测,由于难以纯化诊断抗原,ELISA 方法还未开展。泰泽病原体是近年来国内外检出率较高的细菌之一,西欧 2000-2003 年间实验大鼠泰泽抗体阳性率高达 65%^[29-31]。我国清洁级大鼠泰泽抗体阳性率达 50% 左右,但追踪抗体连续阳性的动物群均未发现任何临床症状(未发表资料),而且大鼠阳性率显著高于小鼠。病原学和血清学检测的相符性,病原确切的体内规律均需深入研究。

(2) 支原体 (*Mycoplasma spp*): 支原体为我国国家标准中必须检测项目,分离培养法和 ELISA 方法为我国国标推荐的支原体检测方法,由于缺乏诊断试剂,各检测实验室多使用分离培养法,但多年未见检出报道;国外多采用血清学方法 (ELISA、

IFA、MFI) 进行实验动物肺支原体 (*Mycoplasma pulmonis*, *M. pulmonis*) 感染的检测,大小鼠肺支原体阳性的报道近年来屡见不鲜,被认为是实验动物最常见的污染菌之一。2007-2008 年西欧实验大鼠肺支原体抗体阳性率达 3.6%,小鼠抗体阳性率为 0.08%^[32]。韩国 2006-2007 年 56 个研究机构和 8 个实验动物生产机构的小鼠,肺支原体抗体阳性率为 1.8%^[33],支原体检测方法的改进已是迫在眉睫的工作。

(3) 念珠状链杆菌 (*Streptobacillus moniliformis*, *S. moniliformis*):念珠状链杆菌对人、实验小鼠、非人灵长类等动物有极强的致病性,美国和加拿大等国已将其作为致死性人兽共患病列入了新发感染性疾病的范畴^[34]。国外均采用 PCR 方法作为 *S. moniliformis* 常规检测方法^[1-7],而我国仍采用分离培养法对念珠状链杆菌进行检测,其培养营养要求高、生长缓慢、生化反应不活泼、高度多形性、染色特性不稳定和极易形成 L 型等特点,上述生物学特性采用分离培养法极易造成假阴性结果,检测方法在念珠状链杆菌感染的控制方面显得尤其重要。

我国细菌学检测取材部位较单一,如呼吸道病原的检测部位仅为气管会厌部,而 Taconic 除此之外还选取鼻咽冲洗物和抽取中耳内容物,大大提高了检出率^[1]。

3 检测频率单一,缺乏灵活性

我国国家标准规定小动物检测频率是 3 个月,而国外检测频率是根据病原特性确定的,分别为 2~4、4、12、26、52 周。国内近年实验动物常见污染菌为金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、嗜肺巴斯德杆菌、泰泽病原体,根据本地的感染谱、病原特性和检测方法的敏感性,调整监测计划,增加易感菌的检测频率,既保证动物质量,又可节省经费,使检测工作在确保实验动物质量方面起到应有的作用。

4 现有国家标准取样要求不适用于特殊动物检测,应建立哨兵动物标准

我国国家标准规定的动物取样数量和取样方法是针对相同饲养条件的动物群体而言,并不适用于基因工程动物和饲养于特殊设施内的动物。

近年来,转基因、基因突变、基因敲除等基因工程动物的数量和种类迅速增多,转基因动物在各研究机构的流通,其后果是一些多年前消灭的病原微

生物如螨和蛲虫等重新出现,基因工程动物创制过程中所使用细胞及生物制品污染可能使动物群全军覆没^[35]。如何对转基因动物进行检测,在最大程度上保证这类造价高,群体小而可能风险大的动物群体质量,已引起人们的高度重视。加之各种小型的相对独立的动物饲养设备应用于各研究机构,增加了监测程序尤其是动物取样数量的复杂性。

上述问题都可通过放置哨兵动物解决,国外对哨兵动物进行了诸多研究^[36],我国在这方面还是空白。FELASA 明确规定了哨兵动物年龄、性别、在各种设施中放置的位置等,为我国基因工程动物的检测提供了借鉴^[7]。

5 缺乏新资源的质量标准和监测体系

随着生命科学研究的迅猛发展,新的实验动物资源不断被开发,并逐步应用于生命现象和人类疾病研究。已有的实验动物质量标准和检测体系不能完全适应实验动物新资源开发利用的需求,质量标准滞后和检测手段不完善已成为制约实验动物新资源开发、标准化研究与推广利用的瓶颈,建立和制定新资源的质量标准和检测体系,是今后一段时期内的研究重点。

6 建议

6.1 完善标准内容,实现标准国际化

为保证我国生命科学领域中动物实验结果在国际上具有可比性、得以公认,为使我国实验动物能够参与国际实验动物商品流通,可制定地方和企业标准,加入 *Helicobacter. spp.*、CAR 杆菌、*C. bovis*、*C. rodentium* 等病原菌的检测项目,使我国实验动物标准与国际接轨。制定哨兵动物标准。

6.2 增加特殊动物的微生物检测标准

各国微生物监测标准均规定不同等级动物应排除的病原微生物,这并不完全适用于基因工程动物。人工导致的基因突变可能改变动物的免疫应答反应,基因工程动物可出现检测标准之外的人类了解很少的微生物引起的临床感染,实验动物检测实验室应能鉴定用于生物医学研究动物相关的所有微生物,即了解实验动物携带的所有菌群,这对检测人员的检测能力提出了更高的要求。

6.3 加强检测方法标准化研究,提升监测能力

对未列入我国国家标准的病原菌和检测方法有缺陷的病原菌如 *Clostridium piliforme*、*Mycoplasma*

spp.、*S. moniliformis* 等开展病原学、流行病学和诊断方法的研究,建立切实可行的检测方法。

根据生物学特性、表型特征鉴定细菌的传统的分离培养法是实验动物国家标准中推荐的检测方法,相对于血清学方法而言,细菌学检测很难标准化,各个检测实验室所用培养基、检测程序、培养条件及检测人员经验和技术的差异导致各实验室间检测结果的差异^[37];国外实验动物检测机构已采用各种全自动细菌鉴定系统,大大提高了细菌鉴定的准确性,缩短了鉴定时间。过去 20 年中,细菌分类学发生了巨大变化,16S rDNA 代替细菌表型分类法作为《伯杰氏系统细菌学手册》(Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)细菌菌种分类的客观基础,在各级分类单位中全面应用核酸研究,在表型特征的基础上,以 DNA 资料给予决定性的判断。当表型鉴定为致病菌时,鉴定结果应用 16S rDNA 测序等分子生物学方法确认,相对表型鉴定方法,16S rDNA 测序鉴定细菌更准确和客观。这并不意味着表型鉴定方法陈旧过时,模棱两可的表型和基因结果可能意味着新种的发现。与国外相比,分子生物学技术在国标中应用较少,我国各实验动物细菌学检测实验室应将 PCR 等分子生物学方法纳入监测能力范围之内,对提升实验动物细菌学监测能力和检测技术水平将发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Taconic Animal Health Standards [S/OL]. <http://www.taconic.com/user-assets/Documents/Quality/overview> [S/OL]. 2011-2-18, 2011-2-18.
- [2] Routine Health Monitoring of Charles River Barrier Production Colonies in Europe and North America [M/OL]. <http://www.criver.com/SiteCollectionDocuments/hmssummary> [M/OL]. 2011-2-18, 2011-2-18.
- [3] Performance Evaluation Program for Diagnostic Laboratories [M/OL]. <http://www.iclas.org/NetworkPEP.htm> [M/OL]. 2011-2-18, 2011-2-18.
- [4] Europe/Israel Health Monitoring Program [M/OL]. http://www.harlan.com/about_harlan_laboratories/quality_programs [M/OL]. 2011-2-18, 2011-2-18.
- [5] Diseases of Research Animals (DORA) [M/OL]. <http://www.radil.missouri.edu/info/dora/Dora.htm> [M/OL]. 2011-2-18, 2011-2-18.
- [6] List of agents monitored and policy for communication of changes in health status [M/OL]. http://jaxmice.jax.org/health/agents_list.html [M/OL]. 2011-2-18, 2011-2-18.
- [7] Working Group on Health Monitoring of Rodent and Rabbit Colonies accepted by the FELASA Board of Management. Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units, Recommendations of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) [J]. *Lab Anim*, 2002, 36: 20-42.
- [8] Harbour S, Sutton P. Immunogenicity and pathogenicity of *Helicobacter* infections of veterinary animals [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008, 122: 191-203.
- [9] Taylor NS, Xu S, Nambiar P, et al. Enterohepatic *Helicobacter* species are prevalent in mice from commercial and academic institutions in Asia, Europe, and North America [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(7): 2166-2172.
- [10] Whary MT, Fox JG. Detection, eradication, and research implications of *Helicobacter* infections in laboratory rodents [J]. *Lab Anim*, 2006, 53(7): 25-36.
- [11] Ward JM, Fox JG, Anver MR, et al. Chronic active hepatitis and associated liver tumors in mice caused by a persistent bacterial infection with a novel *Helicobacter* species [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86(16): 1222-1227.
- [12] Franklin CL, Riley LK, Livingston RS, et al. Enterohepatic lesions in SCID mice infected with *Helicobacter bilis* [J]. *Lab Anim Sci*, 1998, 48(4): 334-339.
- [13] Fox JG, Li X, Yan L, et al. Chronic proliferative hepatitis in A/JCr mice associated with persistent *Helicobacter hepaticus* infection: a model of helicobacter-induced carcinogenesis [J]. *Infect Immun*, 1996, 64(5): 1548-1558.
- [14] 张丽芳, 刘星, 李红. 啮齿类螺杆菌的分离鉴定 [J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(3): 1697-1706.
- [15] 张丽芳, 刘星, 李红. 啮齿类螺杆菌不同检测方法的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(5): 62-65.
- [16] 陈锡福, 刘星, 张丽芳, 等. 抗胆汁螺杆菌单克隆抗体的制备 [J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(5): 50-53.
- [17] Bergottini R, Mattiello S, Crippa L, et al. Cilia-associated respiratory (CAR) bacillus infection in adult red deer, chamois, and roe deer [J]. *J Wildl Dis*, 2005, 41(2): 459-462.
- [18] Griffith JW, White WJ, Danneman PJ, et al. Cilia associated respiratory (CAR) bacillus infection of obese mice [J]. *Vet Pathol*, 1988, 25: 72-76.
- [19] Nietfeld JC, Franklin CL, Riley LK, et al. Colonization of the tracheal epithelium of pigs by filamentous bacteria resembling cilia associated respiratory bacillus [J]. *J Vet Diag Invest*, 1995, 7(3): 338-342.
- [20] Kakrada MK, Lumsden JS, Lee EA, et al. Cilia-associated respiratory bacillus infection in rats in New Zealand [J]. *N Z Vet J*, 2002; 50(2): 81-2.
- [21] Pravettoni D, Toccaceli S, Monestiroli S, et al. Cilia-associated respiratory (CAR) bacillus infection in veal calves and adult cattle [J]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 2001, 108(9): 386-9.
- [22] Fernández A, Orós J, Rodríguez JL, et al. Morphological evidence of a filamentous cilia-associated respiratory (CAR) bacillus in goats [J]. *Vet Pathol*, 1996, 33(4): 445-447.
- [23] Cundiff DD, Besch-Williford CL, Hook RR Jr, et al. Characterization of cilia associated respiratory bacillus in rabbits

- and analysis of the 16SrRNA gene sequence[J]. Lab Anim Sci, 1995, 45(1): 22-26.
- [24] Clifford CB, Walton BJ, Reed TH, et al. Hyperkeratosis in nude mice is caused by a coryneform bacterium: microbiology, transmission, clinical signs, and pathology[J]. Lab Anim Sci, 1995, 45: 131-9.
- [25] Scanziani E, Gobbi A, Crippa L, et al. Outbreaks of hyperkeratotic dermatitis of athymic nude mice in Northern Italy [J]. Lab Anim, 1997, 31(3): 206-11.
- [26] Iuperchio SA, Schauer DB. Molecular pathogenesis of *C. rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia [J]. Microbes Infect, 2001, 3(4): 333-340.
- [27] Okutani A, Tobe T, Sasakawa C, et al. Comparison of bacteriological, genetic and pathological characters between *Escherichia coli* O115a_ϕ:K(B) and *Citrobacter rodentium* [J]. Exp Anim 2001, 50(2): 183-6.
- [28] Mundy R, MacDonald TT, Dougan G, et al. *Citrobacter rodentium* of mice and man [J]. Cell Microbiol, 2005, 7(12): 1697-706.
- [29] Smith KJ, Skelton HG, Hilyard EJ, et al. *Bacillus piliformis* infection (Tyzzer's disease) in a patient infected with HIV-1 confirmation with 16S ribosomal RNA sequence analysis [J]. J Am Acad Dermatol, 1996, 34: 343-8.
- [30] Schoondermark-van de Ven EM, Philipse-Bergmann IM, van der Logt JT. Prevalence of naturally occurring viral infections, *Mycoplasma pulmonis* and *Clostridium piliforme* in laboratory rodents in Western Europe screened from 2000 to 2003 [J]. Lab Anim 2006 40(2): 137-43.
- [31] Pritt S, Henderson KS, Shek WR. Evaluation of available diagnostic methods for *Clostridium piliforme* in laboratory rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) [J]. Lab Anim, 2010, 44(1): 14-9.
- [32] Mähler M, Köhl W. serological survey to evaluate contemporary prevalence of viral agents and *Mycoplasma pulmonis* in laboratory mice and rats in western Europe [J]. Lab Anim, 2009, 38(5): 161-5.
- [33] Na YR, Seok SH, Lee HY, et al. Microbiological quality assessment of laboratory mice in Korea and recommendations for quality improvement [J]. Exp Anim 2010, 59(1): 25-33.
- [34] Wallet F, Savage C, Loiez C, et al. Molecular diagnosis of arthritis due to streptococcus moniliformis [J]. Diagn Microbiol Infect Dis 2003, 47(4): 623-624.
- [35] Otto G, Tolwani RJ. Use of microisolator caging in a risk-based mouse import and quarantine program: a retrospective study [J]. Contemp Top Lab Anim Sci 2002, 41: 20-27.
- [36] Lipman NS, Homberger FR. Rodent quality assurance testing: use of sentinel animal systems [J]. Lab Anim (NY), 2003, 32(5): 36-43.
- [37] Boot R, Reubsaet FA. Identification of bacterial strains by laboratories participating in the Deutsches Krebsforschungszentrum quality assurance programme [J]. Lab Anim, 2007, 41: 481-491.

(修回日期)2011-02-20