

# 两种方法对上海及周边地区实验大小鼠 螺杆菌携带情况的调查

丁聪<sup>1</sup> 冯洁<sup>2</sup> 谢建云<sup>2</sup> 高诚<sup>2,3</sup> 胡建华<sup>2</sup>

(1. 扬州大学比较医学中心, 扬州 225009; 2. 上海实验动物研究中心, 上海市实验动物质量监督检验站, 上海 201203;  
3. 上海市计划生育科学研究所, 上海 200032)

**【摘要】** 目的 了解上海及周边地区实验小鼠、大鼠螺杆菌携带情况, 为我国实验动物等级及监测标准的制定提供参考和依据。方法 PCR法共检测了352只小鼠(清洁级101只, SPF级251只), 101只大鼠(清洁级69只, SPF级32只); ELISA法共检测了88只小鼠(清洁级26只, SPF级62只), 165只大鼠(清洁级84只, SPF级81只); 并对其中88只小鼠、101只大鼠的PCR和ELISA法阳性检测率进行比较。结果 PCR法检测小鼠平均阳性率为35.8% (126/352), 清洁级阳性率为51.5% (52/101), SPF级阳性率为29.5% (74/251); 大鼠平均阳性率为70.3% (71/101), 清洁级阳性率为69.6% (48/69), SPF级阳性率为71.9% (23/32); ELISA法检测小鼠平均阳性率为15.9% (14/88), 清洁级阳性率为19.2% (5/26), SPF级阳性率为14.5% (9/62); 大鼠平均阳性率为52.7% (87/165), 清洁级53.6% (45/84), SPF级51.9% (42/81); 88只小鼠PCR法阳性检测率为72.7% (64/88), ELISA法阳性检测率为15.9% (14/88); 101只大鼠PCR法阳性检测率为70.3% (71/101), ELISA法阳性检测率为49.5% (50/101)。结论 上海及周边地区实验大鼠、小鼠中皆存在着不同程度的螺杆菌感染, 两种方法阳性检出率比较结果表明回盲部内容物PCR法较检测血清中抗螺杆菌抗体ELISA法更为敏感。

**【关键词】** 螺杆菌; PCR; ELISA; 流行病学调查

**【中图分类号】** R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)12-0066-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.012.016

## An Epidemiological Survey of *Helicobacter spp.* in Laboratory Mice and Rats in the Area around Shanghai by Two Detection Methods

DING Cong<sup>1</sup>, FENG Jie<sup>2</sup>, XIE Jian-yun<sup>2</sup>, GAO Cheng<sup>2,3</sup>, HU Jian-hua<sup>2</sup>

(1. Comparative Medicine Center, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai Quality Monitoring Center of Laboratory Animals, Shanghai 201203; 3. Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai 200032)

**【Abstract】 Objective** To identify the prevalence of *Helicobacter spp.* infection in laboratory mice and laboratory rats in the area around Shanghai, and provide reference and basis for the establishment of Chinese laboratory animals grades and monitoring standards. **Methods** A total of 352 mice (101 clean grade mice, 251 SPF grade mice) and 101 rat (69 clean grade rats, 32 SPF grade rats) obtained from the area around Shanghai were detected by polymerase chain reaction (PCR). 88 mice (clean grade mice, 62 SPF grade mice) and 165 rats (84 clean grade rats, 81 SPF grade rats) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Next, the positive rate of the two methods in 88 mice and 101

[基金项目] 上海市科技基金项目(08140901300)。

[作者简介] 丁聪(1984-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物微生物检测。E-mail: dingcong1984@126.com。

[通讯作者] 冯洁, 女, E-mail: moyifj@163.com。

rats were compared. **Results** PCR detecting percentage in mice and rats were as follows: the average positive rate of mice was 35.8% (126/352), among them, the positive rates of clean grade rats and SPF grade mice were 51.5% (52/101) and 29.5% (74/251), respectively. The average positive rates of rats were 70.3% (71/101), among them, the positive rate of clean grade and SPF grade were 69.6% (48/69) and 71.9% (23/32), respectively. ELISA detecting percentage in mice and rats as follows: the average positive rate of mice were 15.9% (14/88), among them, the positive rates of clean grade and SPF grade mice were 19.2% (5/26) and 14.5% (9/62), respectively. The average positive rate of rats was 52.7% (87/165), among them, the positive rates of clean grade and SPF grade rats were 53.6% (45/84) and 51.9% (42/81), respectively. The positive rates of 88 mice tested by PCR were 72.7% (64/88) and by ELISA 15.9% (14/88). The positive rates of 101 rats detected by PCR were 70.3% (71/101) and by ELISA 49.5% (50/101). **Conclusions** *Helicobacter spp.* infection exists in laboratory mice and laboratory rats in the area around Shanghai. The PCR assay of feces is more sensitive than the examination of the serum antibody against *Helicobacter spp.*

**【Key words】** *Helicobacter spp.*; PCR; ELISA; Epidemiological survey

螺杆菌属(*Helicobacter spp.*)是一组最初从人类和其他哺乳动物胃中分离出来的革兰氏阴性、微需氧、螺旋弯曲状细菌,其中具有代表性的是 *H. pylori*。根据它们喜好的定居部位,可被分为胃螺杆菌和肠肝螺杆菌(enterohepatic helicobacter species, EHS)<sup>[1]</sup>。自 1992 年 Lee 等人发现了鼠型螺杆菌以来,已从啮齿类动物肠道中分离出了大量的螺杆菌属新菌株。目前,已有 20 余种寄生于某些动物和人类胃肠道且有致病性的螺杆菌被正式命名。对啮齿类而言,有肝型(*H. hepaticus*)、鼠型(*H. muridarum*)和胆型(*H. bilis*)。啮齿类螺杆菌以隐性感染的形式广泛存在于实验大鼠、小鼠中<sup>[1]</sup>,被感染动物大多数以慢性、潜伏性感染为主,无明显症状。现已有研究显示这类细菌不仅在人或动物的胃炎、消化性溃疡、胃恶性肿瘤的发生发展中起到致病作用,也可能与肠道、胆道、肝脏的炎症性疾病和一些肿瘤的发生相关。已有报道实验用啮齿类动物普遍存在螺杆菌自然感染<sup>[2,3]</sup>。

在构建肿瘤模型和毒理实验研究中,实验大鼠、小鼠模型无意中感染螺杆菌将会严重影响实验动物质量,影响实验进程,对实验数据的可靠性产生潜在干扰。在美国和欧洲,大鼠、小鼠群中螺杆菌有较高的流行率<sup>[3]</sup>。美国、日本、欧洲等发达国家,以及国际实验动物理事会早已将其列为啮齿类实验动物必须排除的病原微生物。由于缺乏模式菌株和有效的检测方法,我国实验动物质量国家标准至今尚未将其列入。这严重妨碍了我国实验动物事业的对外交流。因此,开展实验动物螺杆菌的监测与控制,是保证实验动物和动物实验质量的重要前提。

本研究分别应用 PCR 和 ELISA 方法对上海及周边地区实验小鼠和实验大鼠进行螺杆菌检测,并

对各自的阳性检测率进行比较。旨在填补我国实验大鼠、小鼠螺杆菌流行病学资料调查空白,分析评估实验动物微生物学质量,进一步补充和完善实验动物质量控制体系,为我国实验动物等级及监测标准的制定提供参考和依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物来源

所有检测的实验大鼠、小鼠来自上海、江苏、浙江地区不同实验动物生产单位,级别有清洁级和 SPF 级。

### 1.2 主要试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技公司; PCR 所用试剂: Taq 酶、dNTP、PCR buffer, DNA Marker 等购自宝生物工程(大连)有限公司;大鼠、小鼠螺杆菌抗体 IgG 检测试剂盒(血清 ELISA 试剂盒)购自美国 EBI 公司。

### 1.3 样品采集

无菌采取实验大鼠、小鼠的血液,分离血清,同时采集回盲部内容物。血清样品 -20℃ 冻存;回盲部内容物 -80℃ 冻存,备用。

### 1.4 大鼠、小鼠回盲部内容物中螺杆菌核酸检测——PCR 法检测

1.4.1 提取回盲部内容物螺杆菌总 DNA: 取 0.2 g 回盲部内容物,悬浮于 1 mL 的 PBS(pH 7.4)中制成细菌悬液,然后按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书严格操作。

1.4.2 引物: 根据螺杆菌属特异性 16SrRNA 基因,合成 1 对引物<sup>[4]</sup>编号为:

P7: 5'-CTATGACGGGTATCCGGC-3'

P8: 5'-ATTCCACCTACCTCTCCCA-3'

引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.4.3 反应体系: 20  $\mu\text{L}$  体系内含 2  $\mu\text{L}$  10  $\times$  PCR buffer, 1.6  $\mu\text{L}$  dNTP (each 2.5 mmol/L), 引物 P7、P8 (10 pmol/L) 各 1  $\mu\text{L}$ , 0.3  $\mu\text{L}$  Taq DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 3  $\mu\text{L}$  DNA 模板, 11.1  $\mu\text{L}$  灭菌双蒸水。

1.4.4 反应条件: 扩增程序为 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 产物经浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定。目的产物大小为 374 bp。

1.4.5 PCR 产物测序: 随机抽取阳性 PCR 产物经凝胶电泳回收纯化后送至上海英骏生物有限公司测序。

### 1.5 大鼠、小鼠血清抗螺杆菌 IgG 抗体检测 (ELISA 法)

具体操作和结果判定均严格按美国 EBI 公司试剂盒说明书操作。

## 2 结果

### 2.1 大鼠、小鼠回盲部内容物中螺杆菌抗原 PCR 扩增结果

共检测小鼠 352 只, 其中清洁级 101 只, SPF 级 251 只; 共检测大鼠 101 只, 其中清洁级 69 只, SPF 级 32 只。其详细结果见表 1。随机抽取阳性样本测序, 结果登录 NCBI 中进行 BLAST 比对, 与螺杆菌菌属 16SrRNA 序列的同源性均在 98% ~ 100% 之间, 部分样品 PCR 检测结果见图 1。

### 2.2 大鼠、小鼠血清抗螺杆菌抗体 ELISA 检测结果

应用 ELISA 法共检测小鼠 88 只, 其中清洁级 26 只, SPF 级 62 只; 共检测大鼠 165 只, 其中清洁级 84 只, SPF 级 81 只。其详细结果见表 2。

表 1 不同级别大鼠、小鼠粪便中螺杆菌抗原阳性率分析

Tab. 1 The positive rates of *Helicobacter* spp. antigen in the feces from different grade rats and mice

动物 Animals	小鼠 Mice			大鼠 Rats		
	总只数 No. of samples	阳性数 Positive samples	阳性率 (%) Positive rates (%)	总只数 No. of samples	阳性数 Positive samples	阳性率 (%) Positive rates (%)
清洁 Clean	101	52	51.5	69	48	69.6
SPF	251	74	29.5	32	23	71.9
小计 Total	352	126	35.8	101	71	70.3

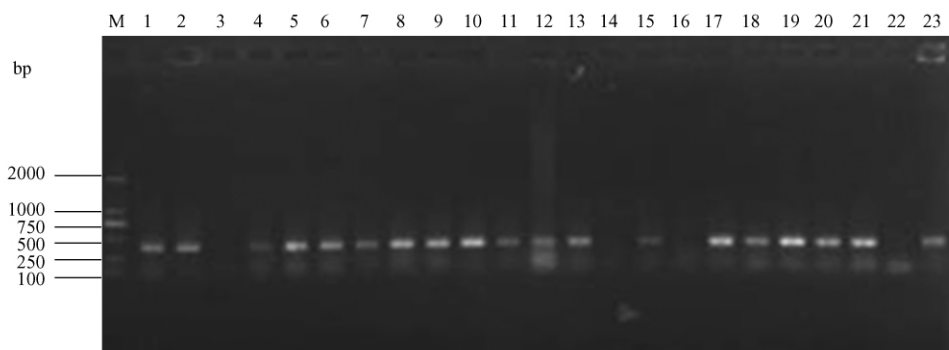


图 1 部分样品 PCR 检测结果

注: 泳道 1, 2, 4-13, 15, 17-21: 被检阳性样品; 泳道 3, 14, 16: 被检阴性样品; 泳道 22: 阴性对照; 泳道 23: 阳性对照; M: DNA 分子量标准 DL2000

Fig. 1 The results of some samples detected by PCR

Note: 1, 2, 4-13, 15, 17-21. The clinical positive samples; 3, 14, 16. The clinical negative samples; 22. Negative control; 23. Positive control; M. DNA marker DL2000.

表 2 不同级别大鼠、小鼠血清抗螺杆菌抗体阳性率分析

Tab. 2 The positive rates of serum *Helicobacter* spp. antibody in different grade rats and mice

动物 Animals	小鼠 Mice			大鼠 Rats		
	总只数 No. of samples	阳性数 Positive samples	阳性率 (%) Positive rates (%)	总只数 No. of samples	阳性数 Positive samples	阳性率 (%) Positive rates (%)
Clean	26	5	19.2	84	45	53.6
SPF	62	9	14.5	81	42	51.9
Total	88	14	15.9	165	87	52.7

### 2.3 大鼠、小鼠螺杆菌 PCR 和 ELISA 的阳性检测率比较

对 88 只小鼠, 101 只大鼠分别同时进行 PCR 和 ELISA 的检测, 结果 88 只小鼠 PCR 阳性检测率为 72.7% (64/88), ELISA 阳性检测率为 15.9% (14/88); 101 只大鼠 PCR 阳性检测率为 70.3% (71/101), ELISA 阳性检测率为 49.5% (50/101)。

### 3 讨论

啮齿类螺杆菌是革兰氏阴性, 螺杆菌状, 微需氧菌, 培养条件苛刻, 该菌呈潜伏性感染。国外已有大量报道大鼠、小鼠种群感染螺杆菌的比例呈增长趋势<sup>[5]</sup>, 虽然螺杆菌感染可能会导致临床疾病, 但由于螺杆菌所产生的病理现象是宿主依赖型的, 在临床上很少被察觉, 因此常发生实验人员不知道实验大鼠、小鼠已感染螺杆菌的情况。螺杆菌感染的影响不仅局限于胃肠系统, 也可能对繁殖、胃肠器官及其它器官如乳腺的肿瘤发展、疫苗免疫应答以及其它方面产生影响。已有大量数据显示, 大鼠和小鼠模型无意中感染螺杆菌将会对实验数据的可靠性产生潜在干扰。因此, 研究机构应定期检查实验大鼠和小鼠是否感染螺杆菌并将这些病原体清除<sup>[5, 6]</sup>。目前, 实验室啮齿类螺杆菌检测方法主要是细菌学分离培养、组织病理学、生化鉴定或电镜观察早期螺杆菌感染情况、免疫学方法(如 ELISA)检测感染后期的特异抗体以及分子生物学方法。传统的生化鉴定方法比较简单, 但操作繁琐, 检测周期一般为 1~2 周, 即使应用商业化的快速鉴定试条也需要 5~6 d。PCR 方法和免疫学方法相对简单。

本研究通过检测大鼠和小鼠回盲部内容物中螺杆菌抗原和血清中抗螺杆菌抗体, 对大鼠和小鼠中螺杆菌携带率进行了分析和评价。PCR 方法检测结果显示, 大鼠螺杆菌平均阳性率高于小鼠平均阳性率; 小鼠中清洁级阳性率高于 SPF 级; 大鼠中 SPF 级阳性率略高于清洁级。血清中抗螺杆菌抗体 ELISA 检测结果也显示, 大鼠螺杆菌平均阳性率高于小鼠平均阳性率。清洁级大鼠和小鼠血清中抗螺杆菌抗体阳性率皆高于 SPF 级。国外有报道螺杆菌在实验小鼠上有较高的携带率, SPF 级实验小鼠中肠肝科螺杆菌的检出率达到 87.5%, 并且动物之间交叉感染率达到 100%<sup>[7]</sup>。此次我们调查结果

显示上海及周边地区大鼠的螺杆菌携带率高于小鼠, 可提示这些地区今后要进一步加大对大鼠螺杆菌的定时监测与饲养管理力度, 同时也为我国实验动物螺杆菌等级标准的制定提供了一定参考和依据。

比较两种方法的阳性检出率结果可以看出 PCR 法的阳性检出率要高于 ELISA 法, 这与国内外的研究均相符<sup>[8, 9]</sup>。螺杆菌是经粪口途径传播, 长期存在于动物肠道及粪便中, 先天的体液及细胞介导的免疫反应不能清除螺杆菌感染<sup>[10]</sup>。但应注意到粪便和肠道中含有一些 PCR 反应的抑制物, 提高模板 DNA 的纯度可直接影响 PCR 的敏感性。PCR 检验是以检测病原基因为目标, 属“病因”诊断, 因而针对性强, 对在体外难培养的螺杆菌, 此方法特别有效, 适合于进行螺杆菌流行病学调查。ELISA 方法的特异性和敏感性较好, 血清学方法具有无创伤和重复性好的优点, 但由于抗体的持续存在和产生时间, 使血清学存在一定的假阳性和假阴性。在本次研究中就发现 PCR 法检测均阴性的 30 只大鼠和 24 只小鼠中 ELISA 法分别检出了 15 只阳性大鼠和 2 只阳性小鼠, ELISA 法检测均阴性的 51 只大鼠和 74 只小鼠中 PCR 法分别检出了 36 只阳性大鼠和 52 只阳性小鼠。国外的相关研究也都表明血清学不太适合啮齿类螺杆菌根除判断, 可用作螺杆菌感染后期的初筛, PCR 法可用于大鼠和小鼠感染螺杆菌最终诊断结果的判定。目前, PCR 方法是最快最敏感的检测螺杆菌的方法<sup>[9]</sup>。

综上所述, 不同检测方法的调查结果皆表明, 上海及周边地区大鼠螺杆菌的携带率高于小鼠, 大鼠和小鼠中存在着不同程度的螺杆菌感染, 这也与张丽芳、Goto 等人的文献报道相符<sup>[7, 11, 12]</sup>。两种方法阳性检出率比较结果表明回盲部内容物 PCR 法较血清抗螺杆菌抗体 ELISA 检测法更为敏感。因此, 应用 PCR 检测大鼠和小鼠中螺杆菌 DNA 是可行的, 且具有较高的特异性。本次研究也表明, 在加强 PCR 引物、试剂和操作的标准化前提下, PCR 检测方法可以用于大鼠和小鼠螺杆菌的初步调查和流行病学监测, 从而为我国实验动物螺杆菌的感染状况提供有用的流行病学数据, 这也有助于实验动物种群中螺杆菌隐性感染的及时监测, 从而进一步降低或减少对实验数据的潜在干扰。

(上接第 78 页)

### 3.3 关于权重的设置

在多指标系统的综合评价中,指标权重的确定很关键。权重是评价指标自身重要性程度的体现,是对调查结果进行科学处理的重要组成部分,因此在定量研究中,每一指标都应有恰当的权重系数与之对应。从权重系数分布的特点可以看出,一、制度管理和条件管理占据较大权重,说明二者是目前实验动物管理工作水平评价的一个重点;二、二级指标和三级指标权重基本与一级指标权重一致,指标体系结构合理;同层次各个指标间既相互独立又相互依赖,从不同角度综合反映评价目标。

### 3.4 关于实证研究

实证研究的结果显示,本研究中 Delphi 法选择的专家具有较好的代表性,且专家的意见较集中,建立的地方医科大学实验动物管理工作水平评价指标体系是科学可行的。应注意对实验动物管理工作的评价不应该是单一的、片面的针对某一方面

的评价,而是全面综合的评价。

#### 参考文献:

- [1] 曾光. 现代流行病学方法与应用 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1994: 250 - 259.
- [2] 郭秀花. 医学现场调查技术与统计分析 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 286 - 288.
- [3] 刘晓红, 段志光. 本科护理学专业教材质量评价指标体系研究 [D]. 山西医科大学, 2008: 5 - 17.
- [4] Hays RD, Anderson R, Revicki D. Psychometric considerations in evaluating health-related quality of life measures. *Qual Life Res.* 1993, 2(2): 441 - 449.
- [5] 沈林, 何炜, 杜亚平. 社区公共卫生服务绩效评价指标体系研究 [J]. *中国农村卫生事业管理*, 2011, 31(2): 127 - 130.
- [6] 贺鹭, 孙喜斌, 王晓力, 等. 应用 Delphi 法构建聋儿远期康复效果评价指标体系 [J]. *中国卫生统计*, 2010, 27(5): 485 - 487.

(修回日期) 2011-06-27

(上接第 69 页)

#### 参考文献:

- [1] Ceelen LM, Haesebrouck F, Ducatelle R, et al. The occurrence and clinical significance of enterohepatic *Helicobacter* species in laboratory rodents [J]. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 2007, 76: 103 - 116.
- [2] Whary MT, Fox JG. Natural and experimental *Helicobacter* infections [J]. *Comp Med*, 2004, 54: 128 - 158.
- [3] Nancy ST, Xu SL, 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.
- [4] Lela KR, Craig LF, Reuel RH, et al. Identification of murine *Helicobacter* by PCR and restriction enzyme analyses [J]. *J Clin Microbiol*, 1996, 34: 942 - 946.
- [5] Chichlowski M, Hale LP. Effects of *Helicobacter* infection on research: The case for eradication of *Helicobacter* from rodent research colonies [J]. *Comp Med*, 2009, 59(1): 10 - 17.
- [6] Sharp JM, Vanderford DA, Chichlowski M, et al. *Helicobacter* infection decreases reproductive performance of IL10-deficient mice [J]. *Comp Med*, 2008, 58(5): 447 - 453.

- [7] Goto K, Ohashi H, Takakura A, et al. Current status of *Helicobacter* contamination of laboratory mice, rats, gerbils, and house musk shrews in Japan [J]. *Current Microbiol*, 2000, 41(3): 161 - 166.
- [8] 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.
- [9] Shames B, Fox JG, Dewhirst F, et al. Identification of widespread *Helicobacter hepaticus* infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 2968 - 2972.
- [10] Whary MT, Fox JG. Detection, eradication, and research implications of *Helicobacter* infections in laboratory rodents [J]. *Lab Animal*, 2006, 35(7): 25 - 27.
- [11] 张丽芳, 李红. 从实验小鼠成功分离一株啮齿类螺杆菌—胆汁螺杆菌 [J]. *中国实验动物学报*, 2005, 13(2): 75.
- [12] Zenner L. Pathology, diagnosis and epidemiology of the rodent *Helicobacter* infection [J]. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 1999, 22: 41 - 61.

(修回日期) 2011-07-13