

多重 PCR 技术在实验动物病原检测中的应用

张飞燕^{1#}, 赵玲^{1#}, 金洁¹, 王芸¹, 吕龙宝^{1,2*}

(1. 中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650000; 2. 中国科学院昆明灵长类研究中心, 昆明 650223)

【摘要】 多重 PCR 作为一种新型的分子生物学检测技术, 具有高效、快捷、特异性和灵敏度高等优点, 能够同时扩增出多个核酸片段, 克服了普通 PCR 缺点, 实现了对多种病原微生物的同时检测, 为临床病原鉴别诊断、基因分型、耐药基因等领域的研究提供了新思路, 具有较大的发展前景。笔者对多重 PCR 的原理及技术特点, 多重 PCR 技术在实验动物病毒、细菌、寄生虫病原体 and 微生物耐药等方面进行综述, 旨在为多重 PCR 技术应用在实验动物疫病病原体的检测提供参考依据。

【关键词】 多重 PCR 技术; 实验动物; 病原检测

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 10-0111-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.10.019

Application of multiplex PCR to detecting experimental animal pathogens

ZHANG Feiyan^{1#}, ZHAO Ling^{1#}, JIN Jie¹, WANG Yun¹, LYU Longbao^{1,2*}

(1. Kunming institute of zoology, Chinese academy of sciences, Kunming 650000, China;

2. Kunming primate research center, Chinese academy of sciences, Kunming 650223)

【Abstract】 Multiplex PCR is a new molecular biology detection technology, which is highly efficient, rapid, convenient, specific, and sensitive. It overcomes the shortcomings during amplification in conventional PCR and enables the synchronous detection of multiple pathogens in a single reacting system. It can thus provide new clues for research on differential diagnoses and the genotyping of resistance genes in a clinical context. This paper summarizes the research background and principles of multiplex PCR, and its use for the detection of viruses, bacteria, and parasites as well as microbial resistance in experimental animals. This paper provides a reference for the use of multiple PCR technology for detecting pathogens causing experimental animal epidemics and the establishment of method to combat them.

【Keywords】 multiplex PCR technology; experimental animal; pathogen detection

实验动物是生命科学研究的基础和条件, 实验动物的质量直接影响众多领域科学实验的准确性, 也关系到实验动物从业人员和动物实验操作者的健康^[1]。因此, 实验动物的质量控制成为制约性要素, 实验动物的微生物、寄生虫质量控制显得尤为重要。目前, 实验动物微生物学等级及监测国标 GB 14922.2-2011, 针对细菌检测推荐的方法是病原菌

的分离培养、生化鉴定, 但耗时长, 操作繁琐, 易受检测人员的主观判定干扰; 针对病毒检测主要采取血清学方法检测, 但对于一些动物病毒呈周期性病毒, 在排毒的时候, 体内无抗体, 通过血清学方法检测, 就易造成假阴性。针对寄生虫检测主要采用直接涂片法或饱和氯化钠漂浮法, 也受检测人员的判定干扰。此外, 实验动物多采用群体饲养, 易被各

【作者简介】 张飞燕(1993—), 女, 硕士, 研究方向: 主要从事动物质量控制与检测。E-mail: 1175905001@qq.com。

赵玲(1989—), 女, 本科, 研究方向: 主要从事实验动物管理。E-mail: zhaoling@mail.kiz.ac.cn。#共同第一作者

【通信作者】 吕龙宝(1974—), 男, 研究员, 研究方向: 主要从事实验动物学研究。E-mail: lvlongbao@mail.kiz.ac.cn

种易感病原所感染,从而导致疾病的爆发和流行,严重影响经济效益,并使公共卫生遭到威胁^[2]。因此,建立一种快速、敏感、易于标准化操作的检测技术尤为重要。多重 PCR 是近年来兴起的一种新型检测手段,实现在同一反应体系对多种病原微生物的检测,或对遗传病、癌基因、耐药基因的分型鉴定,具有高效、快速、经济简便等优点,实现对实验动物多种病原微生物或具体某一型病原体感染的鉴别诊断,以及为一些人兽共患病原如猴 B 病毒的监测提供强有力的保障,在临床上具有很高的应用价值^[3]。笔者将多重 PCR 技术应用在实验动物疫病病原体的检测综述如下,并提出多重 PCR 未来应用前景的展望。

1 多重 PCR 的原理及技术特点

多重 PCR 反应原理与普通 PCR 反应原理与试剂基本相同,通过模板 DNA 与引物之间的变性、退火和延伸三个步骤为一个循环,每次循环产生的 DNA 片段为下次循环的模板。多重 PCR 反应就是在一个 PCR 反应体系里,同时扩增多个核酸片段或同一核酸片段的的不同区域。目前,有很多文献对影响 PCR 反应的质量条件进行了讨论,然而对影响多重 PCR 实验的关键因素鲜有报道。多重 PCR 与单重 PCR 最大的不同就是多对引物,因此各引物之间的浓度搭配影响最大,其次是由于扩增多个目的 DNA,因此在 Mg^{2+} 、dNTP 的用量上面都需要做一些调整。大量实验研究报告也指出,影响多重 PCR 成功的主要因素是:多重 PCR 体系里不同基因的引物对浓度、退火温度、底物浓度应达到平衡。在最初进行多重 PCR 反应时,需要先优化单重 PCR 的引物浓度、底物浓度、退火温度这三大重要因素,再对多重 PCR 体系里各引物对浓度比例、底物浓度、退火温度探讨。首先,多重 PCR 引物的设计必须满足每对单引物的设计原则,根据靶基因设计的各引物对应具有高度的特异性,引物长度为 20 bp 左右,引物的 GC 含量应不小于 35%,大于 60%^[4];其次,多重 PCR 反应体系里,各引物对的浓度很重要^[5]。大部分文献研究报道,在最初的多重 PCR 反应体系里,需要不断的优化多重 PCR 各引物对浓度,各引物对的浓度搭配会影响某些基因的扩增量^[6-7]。解决这一问题,需要改变反应中各种引物的比例,增加“弱”基因的引物量,减少“强”基因的引物量^[8]。退火温度也是影响多重 PCR 反应的一个重要参数,

大部分学者经验表明多重 PCR 里的退火温度要比单独扩增时的退火温度低 4℃ 左右,退火温度 55℃ 左右,效果最优^[9],并建议所有引物对的最适退火温度要尽可能的相同,这样有助于多重 PCR 选择的退火温度保证每对引物都有相同的扩增率^[10]。也有学者提出,高的退火温度使基因的扩增量减少,尽管可用延长退火和延伸时间来解决这一问题。也有文献报道指出,多重 PCR 实验中,通过增长延伸时间能提高 PCR 产物的产量。Henegariu 等^[11]研究报道,在一个 X、Y 染色体引物同时扩增实验中,通过增加延伸时间,发现 PCR 产物的产量也增加了,同时试图增加一个反应体系扩增 4 个 Y 染色体上的基因的延伸时间,也发现 PCR 产物的产量增加。对于 dNTP 浓度,大量实验研究证明,使用 dNTP 浓度较低(最低 50 $\mu\text{mol/L}$),不抑制扩增,但会使扩增产物量减少;dNTP 浓度大于 400 $\mu\text{mol/L}$ 时,扩增被迅速抑制^[12-14]。另外,也有研究报道缓冲液中 dNTP、 $MgCl_2$ 、KCl 浓度的平衡,也影响着扩增的效率^[15]。有研究指出, Mg^{2+} 能提高 Taq DNA 聚合酶的活性,能提高扩增效率;同时指出长片段的扩增引物在低盐浓度下扩增效率更高好,短片段的扩增引物在高盐浓度下扩增效率更好^[16]。此外,dNTP 母液避免反复冻融。最后,对于反应体系中佐剂的使用,大部分学者认为在反应体系里加 DMSO 和甘油(参考范围为:5% ~ 10% (V/V)),可提高产物量和特异性^[17]。一部分学者认为,加入 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ BSA 能更好的提高 PCR 扩增效率^[18]。然而,也有反对的声音,在反应体系里加 DMSO 会影响实验结果。至于选择什么样的佐剂提高多重 PCR 扩增效率,有待更深入的研究。

多重 PCR 具有高效性,在同一 PCR 反应体系能同时检出多种病原微生物,或进行基因分型,只需要动物的一滴血,一根毛发或组织分泌物就可检测多种病原体。此外,多重 PCR 具有系统性,多重 PCR 适用于病毒、肠道细菌等多种混合病原体的检测,理论上只要条件允许,引物对的数量可以不限,目前有扩增 9 条目的片段的记录^[19]。但该技术需要对反应体系和反应条件进行多次优化。另外,多重 PCR 技术能在同一反应体系快速鉴别诊断实验动物多种病原体的混合感染,具有方便、快速、经济适用的优点,能及时为临床提供更多更准确的诊断信息。

2 多重 PCR 在细菌、真菌混合感染检测中的应用

目前我国实验动物微生物等级及监测标准 GB 14922.2-2011, 针对豚鼠、地鼠、兔、犬和猴; 清洁级以上小鼠、大鼠病原菌检测主要采用传统的细菌培养、镜检、生化鉴定, 此种方法费时费力。随着分子生物学的快速发展, 多重 PCR 技术可以同时对这几种病原菌进行检测, 具有高灵敏度、高效、低成本等优点。

祝岩波等^[20]建立了金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和肺炎克雷伯杆菌多重 PCR 检测方法, 对 76 份感染的实验动物粪便标本进行检测, 结果表明建立的多重 PCR 方法对每种病原菌 DNA 最低检测质量能达到 10 pg。王鹏飞等^[21]建立了金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和肺支原体多重 PCR 检测方法, 该方法对三种菌的检测灵敏度达到 1~10 pg。陆红玉等^[22]建立了适合食蟹猴志贺氏菌、沙门氏菌和小肠结肠炎耶尔森菌这三种致病菌快速检测的多重 PCR 方法, 该方法对 137 例食蟹猴肛拭子中志贺氏菌属、沙门氏菌属和小肠结肠炎耶尔森氏菌 3 种病原菌检测的灵敏度达到 100~200 CFU/mL。上述三种多重 PCR 方法都与传统分离培养方法和单重 PCR 方法比较, 证实该方法能从混合感染的标本中, 检测出不同的病原菌, 检测结果的一致性为 96%~100%, 且细菌检出率高于传统分离培养方法, 说明该方法具有很高的检测灵敏度和特异性, 具有很强的实用性和潜在的发展力。

邢进^[23]等建立了石膏样毛癣菌 (Tm)、石膏样小孢子菌 (Mg)、犬小孢子菌 (Mc) 和猴类毛癣菌 (Am) 的多重 PCR 检测方法, 对 260 份实验动物毛发样本进行检测, 最低检测限达到 5.9~9.5 pg/ μ L, 且检测结果均为阴性, 未发现 4 种真菌的感染, 与 SDA 方法检测结果一致, 证明在实验动物中的皮肤真菌感染率始终保持在极低水平; 对 15 份人工感染四种不同真菌的大鼠毛发检测, 准确的检测出不同的菌株组合。证明该法具有良好的可重复性、灵敏性、特异性, 可用于在实验动物皮肤病原真菌的快速检测和筛查, 具有较高的应用价值。

3 多重 PCR 在病毒性混合感染的病原检测中的应用

目前实验室病毒检测方法主要参照国标 GB 14922.2-2011, 采用 ELISA 血清学的方法检测, 但这种方法的敏感性和特异性取决于抗原的制备^[24]。

经研究发现, 病毒大量增殖时动物尚未产生抗体, 随着抗体的产生, 病毒逐渐清除^[25-26]。通常感染猴逆转录 D 型病毒 (SRV) 和猴 T 细胞趋向病毒 1 型 (STLV-1) 的猕猴通常不表现出临床症状, 体内可能会产生较低水平的抗体, 或在感染后很长一段时间, 体内仍无血清学转化。因此检测这两种病毒不应采用血清学方法。为确保实验结果的准确性, 通常对所有血清学阴性的动物再次结合 PCR 进行检测。李晓燕等^[27]建立了一种能同时检测猕猴 STLV-1 和 SRV/D-1 两种逆转录病毒的多重 PCR 方法, 结果显示建立的多重 PCR 方法能同时检测出猕猴体内可能存在的 STLV-1 和 SRV/D-1 两种逆转录病毒, 可用于猕猴种群逆转录病毒的定性监测。

大量文献对其它实验动物, 如大小鼠^[28]、水貂^[29]、犬^[30]、树鼩^[31]、兔^[32]等应用建立的多重 PCR 方法检测病毒混合感染, 结果表明所建立的多重 PCR 方法具有快速高效、特异性强、灵敏度高等优点, 可用于实验动物的质量监测。饶丹等^[33]建立了鉴别检测大鼠细小病毒 (RPV) 与其他三种大鼠细小病毒 (H-1、KRV、RMV) 的多重 PCR 方法, 多重 PCR 结合测序在检测 23 份临床样本中, PCR 的最低检测限可达 1000 拷贝每微升, 检测出 30.43% 的 RMV 阳性, 具有灵敏度高及操作简单等优点, 是一种简便、可靠的检测方法。以及近来广东实验动物监测所设利用多重 PCR 技术和 Luminex 技术结合, 建立了一种可以同时检测大鼠 5 种病原体的方法; 应用多重 PCR 荧光技术实现对小鼠脑脊髓炎病毒和大鼠泰勒病毒的检测等, 证实这两种方法都具有快速高效、特异性强、灵敏度高、重复性好等优点。综上所述, 表明多重 PCR 技术应用于实验动物病毒检测有很大的优势和发展潜力, 利用多重 PCR 技术与其它新型技术结合应用于实验动物的检测, 将是未来研究的一个方向。

4 多重 PCR 技术在细菌耐药性方面的研究

动物滥用药物导致的细菌耐药性已成为全世界关注的热点问题, 且我国动物源细菌性监测工作起步比较晚, 动物源细菌耐药性检测能力仍严重不足^[34]。大肠杆菌、沙门氏菌等是动物易感染的细菌, 虽然可通过改善养殖条件和加强饲养管理来防治, 但目前仍主要通过抗菌剂治疗^[35]。特别是针对实验猴这类高等动物, 沙门菌病和由志贺菌属引起的细菌性痢疾是实验猴常见的肠道病^[36]。这两种

病治疗均以抗菌为主,常选用氨苄西林、庆大霉素、氧氟沙星等来治疗,抗生素虽在短期内可缓解腹泻症状,但从整个慢性病程看,并无效^[37]。目前,一些动物机构的养殖人员对抗生素的使用存在错误认识,认为多使用几种抗生素总会有一种起作用,因此造成疗效不确切时易产生交叉感染,使致病菌和条件致病菌耐药性增强,而在有疗效时也无法弄清是哪一种药物起的作用^[38]。并且还存在着一些兽医在动物轻微感染的情况下就使用抗生素,随着时间的累积,一旦产生耐药,将导致患病的实验动物治疗效果不理想。目前细菌耐药性的监测手法主要为药敏监测方法。药敏试验由于方便、简捷、易判定的优点,尤其是药敏纸片琼脂扩散法,常用于临床上指导用药。但药敏试验是在体外用药物试探性的检验细菌的表型耐药特性,不能检测细菌的隐型耐药性,且药敏实验受不同药敏试验方法和判断药物敏感浓度差异等影响结果的准确性。另外,目前还存在着一些动物机构,动物患病直接先上抗生素,再采样进行培养及鉴定和药敏检测,根据这个流程,真正的致病菌往往已经受抗生素影响,等药敏实验的结果出来,往往出现药敏结果与临床疗效不符合的情况。而多重 PCR 具有的快速、敏感、特异等优点,可以在同一反应体系检测多种极微量的耐药基因,能更准确有效的提供细菌耐药的信息,且不需要经过费时的细菌培养,已广泛的应用于细菌耐药性的研究。杨鑫等^[39]利用多重 PCR 方法筛选了猪源鸡源大肠杆菌氯霉素类药物耐药基因(*cat1*、*cmlA*、*flor*),建立了这 3 种耐药基因筛选的三重试剂盒,并利用试剂盒对 33 株细菌的耐药性进行检测,同时将多重 PCR 检测结果和药敏试验结果比较,表明两者检出的符合率为 91%;共收集来自不同省猪、鸡养殖场的 417 株细菌,进行猪源鸡源大肠杆菌氯霉素抗性基因检测,三种基因的检出率分别为:41.5%、35.7% 和 37.2%,不同省的耐药基因检出率差异较明显。目前,我国尚未有对猴场耐药基因的分布及筛选的相关报道,大部分都是针对猪、鸡养殖场的耐药基因分布进行统计调查和筛选。因此,开发和建立一种能快速筛选病原微生物耐药基因的方法,特别是针对实验猴这类国家级保护动物,用于实验动物耐药性的研究,提高动物感染病原菌的治疗率非常有必要。因此,多重 PCR 技术对推进病原物的耐药性研究将具有十分重要的意义。

5 多重 PCR 技术的应用情景

多重 PCR 实验技术在实验动物的微生物、寄生虫、细菌耐药性等方面的检测比单一的普通 PCR 技术具有方便、快捷的优点,一次可以同时检测多种基因,即达到了保证实验动物的质量,又节省了人力与物力。但多重 PCR 技术应用在实验动物病原检测中也存在不足。比如假阳性结果,研究人员可以通过对实验室实现严格的分区,加强实验室的管理,每次实验设立严格的阴阳性对照等来消除。

多重 PCR 技术未来的研究主要集中在以下几个方面。首先,多重 PCR 试剂盒在开发并应用于实验动物的疫病检测中,当前主要用于猪、牛羊、大小鼠的病原微生物诊断,而应用于实验猴、树鼩的检测甚少。非人灵长类是人类的近亲,在生物学、遗传学和行为学等方面与人类高度相同,被广泛的应用于多种疾病动物模型的研究^[40-41],是极其珍贵的实验动物。树鼩,由于其体型小,孕期短,生长快、容易饲养、在生物进化史上更接近人类等优点,作为一种新型的实验动物资源,正受到广泛的重视^[42-43]。对实验猴、树鼩等其它一些新型的实验动物携带的病毒、细菌、寄生虫指标进行控制,开发和建立快速、可靠的新型监测手段非常迫切。因此,研制针对猴、树鼩等新型实验动物疫病的多重 PCR 标准诊断试剂盒,用于动物疫病的监测,将有很大的应用前景。其二,多重 PCR 试剂盒具有的高效快捷、高度特异敏感等优点,在面对人兽共患病,公共卫生危机方面避免了耗时、大量的费力排查^[44-45]。多重 PCR 试剂盒研发和生产,使其在公共卫生安全诊断中发挥更大的优势,也是未来的一个发展方向。最后,多重 PCR 技术最大的价值在于它能提高诊断的敏感性。目前,后基因组时代,对基因组候选区段的重测序需求日益增加,人们对序列的关注超过了少数的 SNP,候选区段的范围可能在 5~100 Kb 之间,使用传统 sanger 法或目标区域杂交捕获测序价格昂贵,使用多重 PCR 目标区域捕获测序很好的解决了这一难题。通过多重 PCR 对扩增整个基因区域,一次性捕获,结合高通量测序技术,多样本同时测序,在大样本量筛查的同时极大的降低成本。另外,多重 PCR 技术与其它技术的整合应用,如多重 PCR 技术与 LAMP、基因芯片等实验技术结合,进一步提高动物病原检测的灵敏性、可重复性,实现大批量实验动物病原检测、混合感

染样品基质中的多种微生物的有效检测、实验动物检测的标准化,必将在未来实验动物病原检测中有很好的应用前景。

参考文献:

- [1] 宁磊, 张新创. 实验动物的质量管理与控制[J]. 微生物学免疫学进展, 2014(1):79-83.
- [2] 魏强. 浅谈实验动物微生物国家标准[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(2):1-3.
- [3] Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples[J]. Nat Protoc, 2017, 12(6):1261-1276.
- [4] Abbs S, Bobrow M. Analysis of quantitative PCR for the diagnosis of deletion and duplication carriers in the dystrophin gene[J]. J Med Genet, 1992, 29(3):191-196.
- [5] Chamberlain JS, Chamberlain JR, Fenwick RG, et al. Diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophies by polymerase chain reaction. A multicenter study[J]. Jama, 1992, 267(19):2609-2615.
- [6] Beggs AH, Koenig M, Boyce FM, et al. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction[J]. Hum Genet, 1990, 86(1):45-48.
- [7] 何玲, 黎源倩. 多重 PCR-毛细管电泳-激光诱导荧光检测食源性致病菌[J]. 现代预防医学, 2009, 36(3):523-525.
- [8] Stoeck T, Hayward B, Taylor GT, et al. A Multiple PCR-primer Approach to Access the Microeukaryotic Diversity in Environmental Samples[J]. Protist, 2006, 157(1):31-43.
- [9] Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, et al. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(9):2095-2100.
- [10] Dong XZ, Gang C, Jian WY. Simultaneous identification of five Bifidobacterium species isolated from human beings using multiple PCR primers[J]. Syst Appl Microbiol, 2000, 23(3):386-390.
- [11] Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, et al. Multiplex PCR: Critical Parameter and step-by-step Protocol[J]. Biotechniques, 1997, 23(3):504-511.
- [12] Vandenvelde C, Verstraete M, Van BD. Fast Multiplex polymerase chain reaction on boiled clinical samples for rapid viral diagnosis[J]. J Virol Methods, 1990, 30(2):215-227.
- [13] Saiki RK. The Design and Optimization of the PCR[M]. Palgrave Macmillan UK:PCR Technology. 1989.
- [14] Dong XZ, Gang C, Jian WY. Simultaneous identification of five Bifidobacterium species isolated from human beings using multiple PCR primers[J]. Syst Appl Microbiol, 2000, 23(3):386-390.
- [15] Aznar R, Alarcón B. PCR detection of *Listeria monocytogenes*; a study of multiple factors affecting sensitivity[J]. J Appl Microbiol, 2010, 95(5):958-966.
- [16] Fernando GF, Nour-Eldin HH, Nielsen MT, et al. USER

fusion; a rapid and efficient method for simultaneous fusion and cloning of multiple PCR products[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(7):e55-e55.

- [17] Ouahid Y, Pérez-Silva G, del Campo FF. Identification of potentially toxic environmental *Microcystis* by individual and multiple PCR amplification of specific microcystin synthetase gene regions[J]. Environ Toxicol, 2010, 20(3):235-242.
- [18] 黄银花, 胡晓湘, 徐慰倬, 等. 影响多重 PCR 扩增效果的因素[J]. 遗传, 2003, 25(1):65-68.
- [19] 马锐, 黄小波, 杨国淋, 等. 多重 PCR 技术在猪病检测中的应用[J]. 四川畜牧兽医, 2016, 43(5):31-33.
- [20] 祝岩波, 郑龙, 尤红煜, 等. 金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和肺炎克雷伯杆菌多重 PCR 方法的建立与初步应用[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(5):94-98.
- [21] 王鹏飞. 实验动物金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和肺炎原体多重 PCR 检测方法的建立与初步应用[D]. 河北医科大学, 2016.
- [22] 陆红玉, 罗彬, 符明泰, 等. 食蟹猴志贺氏菌、沙门氏菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌多重 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 广东畜牧兽医科技, 2015, 40(1):34-39.
- [23] 邢进, 冯育芳, 岳秉飞, 等. 实验动物皮肤病原真菌多重 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(12):65-70.
- [24] Li L, Peng AH, Lin ZZ, et al. Biomimetic ELISA detection of malachite green based on molecularly imprinted polymer film[J]. Food Chem, 2017, 229(8):403-408.
- [25] 夏机良, 王涛, 季芳, 等. 巢式 PCR 检测食蟹猴和猕猴中 SRV 和 SFV[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(7):40-43.
- [26] 朱林, 韩建保, 张喜鹤, 等. 人工饲养中国猕猴中 SRV、STLV 和 BV 的流行病学调查[J]. 动物学研究, 2012, 33(1):49-54.
- [27] 李晓燕. 猕猴逆转录病毒多重 PCR 体系的建立与应用[D]. 北京协和医院, 2006.
- [28] 李瑞娇, 冯洁, 谢建云, 等. 啮齿动物螺杆菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(12):35-40.
- [29] 马芹, 王元智, 闫文卓, 等. 水貂阿留申病毒、肠炎病毒与犬瘟热病毒多重 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(12):97-101.
- [30] 冯育芳, 邢进, 岳秉飞, 等. 实验犬布氏杆菌的多重 PCR 检测与分型鉴定[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(5):57-61.
- [31] 冯育芳, 王莎莎, 邢进, 等. 实验树鼩空肠弯曲菌、沙门氏菌和志贺菌多重荧光定量 PCR 方法的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(6):56-62.
- [32] 杨少华, 柴同杰. 利用多重 PCR 检测兔肠致病性大肠杆菌和魏氏梭菌的毒力基因[J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(2):228-231.
- [33] 饶丹, 朱余军, 伍妙梨, 等. 大鼠细小病毒双重 PCR 检测方法的建立[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(1):32-35.
- [34] 赵晓彤, 周铁忠, 李欣南. 我国动物源细菌耐药性监测现状与耐药性控制策略分析[J]. 现代畜牧兽医, 2012

(12):45-48.

[35] 马苏, 沈建忠. 动物源细菌耐药性监测国内外比较[J]. 中国兽医杂志, 2016, 52(9):121-123.

[36] 杨宇容. 食蟹猴肠道志贺氏菌感染情况的调查[J]. 中国实验动物学报, 2000, 8(1):31-35.

[37] 徐海滨, 郭维植, 陈建辉, 等. 实验猕猴肠道病原菌检测分析[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(2):84-84.

[38] Guo ZZ, Wang P, Yi ZH, et al. The crosstalk between gut inflammation and gastrointestinal disorders during acute pancreatitis[J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(7):1051-1062.

[39] 杨鑫, 王红宁, 张安云, 等. 大肠杆菌氯霉素类耐药基因三重 PCR 检测试剂盒的研究与应用[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(2):11-13.

[40] Sharp LA. The Moral Lives of Laboratory Monkeys: Television and the Ethics of Care[J]. Cult Med Psychiatry, 2017,41(2):224-244.

[41] Flessert M, Taubert J, Liu N, et al. Rhesus monkeys are able to discriminate facial identity and expression[J]. J Vison, 2017, 17(10):1006.

[42] 庞义全, 冯悦, 孙晓梅, 等. 病毒性肝炎树鼩动物模型研究与建模策略[J]. 中国实验动物学报, 2014,22(2):95-102.

[43] 李妍, 代解杰, 孙晓梅, 等. 茄病镰刀菌性角膜炎树鼩模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(4):420-424.

[44] 郭旭龙, 肖璐, 姜睿姣, 等. 靶序列富集多重 PCR 技术的发展及其应用[J]. 湖南农业大学学报(自科版), 2016, 42(2):172-176.

[45] 曹洪志, 颜其贵, 郭万柱, 等. 多重 PCR 技术在动物疫病诊断中的应用[J]. 中国动物检疫, 2007, 24(1):45-47.

[收稿日期]2018-03-09

(上接第 93 页)

[6] Hanna N, Davis TW, Fidler IJ. Environmental and genetic factors determine the level of NK activity of nude mice and affect their suitability as models for experimental metastasis [J]. Int J Cancer, 1982, 30(3):371-376.

[7] GB 14922.2-2011, 实验动物微生物学等级及监测标准[S]. 2011.

[8] Pritchett-Corning KR, Cosentino J, Clifford CB. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats[J]. Lab Anim. 2009,43(2):165-73.

[9] Hayashimoto N, Morita H, Ishida T, et al. Current microbiological status of laboratory mice and rats in experimental facilities in Japan[J]. Exp Anim,2013,62(1):41-48.

[10] Grehan M, Tamotia G, Robertson B, et al. Detection of Helicobacter colonization of the murine lower bowel by genus-specific PCR denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Appl Environ Microbiol. 2002,68(10):5164-5166.

[11] 潘金春, 赵维波, 陈梅玲, 等. 2013-2015 年广东地区实验小鼠和大鼠微生物学及寄生虫学调查[J]. 中国比较医学杂志, 2017,27(2):64-69.

[12] 魏杰, 林建伟, 付瑞, 等. 2009-2013 年北京地区实验动物质量抽检结果分析[J]. 实验动物科学, 2014,31(2):1-6.

[13] 葛文平, 张旭, 高翔, 等. 我国商业化 SPF 级小鼠病原体污染分析[J]. 中国比较医学杂志, 2012,12(3):65-68.

[14] 白玉, 尹良宏, 卢胜明. 牛棒状杆菌感染及其防治措施[J]. 实验动物科学, 2015, 32(1):51-54.

[收稿日期]2018-03-13