

邢进,冯育芳,张雪青,等.牛棒状杆菌检测团体标准的编制[J].中国比较医学杂志,2019,29(3):84-87.

Xing J, Feng YF, Zhang XQ, et al. Establishment of group standards on *Corynebacterium bovis* detection[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 84-87.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.03.014

牛棒状杆菌检测团体标准的编制

邢进,冯育芳,张雪青,岳秉飞*

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所,北京 102629)

【摘要】 实验动物科学作为生命科学研究的支撑要素,需要有良好的动物质量做保证。动物质量的检测依靠完善、科学的检测标准。牛棒状杆菌作为引起裸鼠感染的一种重要病原菌,仍然缺少相关检测标准。本标准的制定,提供和规范了牛棒状杆菌的检测方法,有助于对此菌的及时发现与控制。

【关键词】 实验动物;牛棒状杆菌;标准;检测方法

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 03-0084-04

Establishment of group standards on *Corynebacterium bovis* detection

XING Jin, FENG Yufang, ZHANG Xueqing, YUE Bingfei*

(Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

【Abstract】 The good quality of laboratory animals is the foundation of laboratory animal science as a support for life science research. The monitoring of animal quality relies on well-established and scientific examination standards. *Corynebacterium bovis* is an important pathogen causing infection in nude mice, but no relevant examination standards have yet been developed for it. The development of such standards can provide and normalize the method for detecting *C. bovis*, which is helpful for timely monitoring and control of this bacterium.

【Keywords】 laboratory animal; *Corynebacterium bovis*; standards; examination method

牛棒状杆菌(*Corynebacterium bovis*, Cb)是一种革兰氏阳性短杆菌,是牛乳房炎的主要病原之一^[1]。日本、美国及欧洲都有裸鼠感染的报道^[2],Cb也可以感染人,主要存在于结膜和皮肤,常引起眼部感染^[3]。近年来随着国内生物制药和医学研究的快速发展,动物进口也增加了Cb引入的风险^[4]。在实验动物中,该菌主要感染免疫缺陷小鼠,但多不表现出临床症状,主要引起裸鼠过度角质化症(hyperkeratosis),致裸鼠发生过度角质化皮炎和棘皮症^[5]。裸鼠作为一种免疫缺陷动物,已成为医学、生物学研究领域不可缺少的实验动物模型,在肿瘤学、免疫学、药品和生物制品的安全性评价及药物筛选等方面具有特殊的应用价值。

1 编制背景

目前,我国尚无Cb相关检测标准颁布。为了适应现阶段的检测需求,有效检测和排除Cb的污染,填补实验动物检测标准上的空白,制定该菌检测的标准势在必行。本文对“实验动物牛棒状杆菌检测方法”团体标准的编制和初步应用情况进行详细的说明,推动本标准能够有效的实施,为Cb的检测和控制提供依据。

2 法规依据

《实验动物管理条例》(中华人民共和国国家科学技术委员会令第2号)第十六条规定,“对引入的

【作者简介】邢进(1979—),男,研究员,研究方向:实验动物微生物检测。E-mail: xjvet@nifdc.org.cn

【通信作者】岳秉飞(1960—),男,博士,研究员,研究方向:比较医学。E-mail: yuebingfei@nifdc.org.cn

实验动物,必须进行隔离检疫。”第十九条规定,“应用不合格实验动物取得的检定或者安全评价结果无效,所生产的制品不得使用。”第二十五条规定,“进口、出口实验动物的检疫工作,按照《中华人民共和国进出境动植物检疫法》的规定办理”^[6]。其中包括第二十七条,“进口动物产品经检疫发现有检疫对象和应检疫病的,签发《检疫处理通知单》,通知并监督报检人按下列原则处理,……(二)对无法有效消毒的产品,做整批退回或销毁处理。”第三十六条,“输往与国签订动植物检疫双边协定的国家的动植物产品,应按协定中规定的检疫要求检验;……”^[7]。因此,对于实验动物这种特殊的动物产品而言,感染 Cb 的动物势必会对动物设施^[8]及后期的饲养繁育^[9]和动物实验^[10]等操作带来直接的影响。本标准的制定为实验动物牛棒状杆菌的检测提供了重要依据。

《实验动物质量管理办法》(国科发财字[1997]593号)中第二十条规定,“国家实验动物质量检测机构是实验动物质量检测、检验方法和技术的研究机构,实验动物质量检测人员的培训机构和具有权威性的实验动物质量检测服务机构。其主要任务是:开展实验动物及相关条件的检测方法、检测技术研究”^[11]。面对检测 Cb 的需求,作为检测机构有义务及时建立检测方法,解决无标可依的情况。

3 编制内容

3.1 分离培养

分离培养是细菌检测的经典方法,能够直接分离获得病原菌并进行鉴定,结果准确。Cb 属需氧菌,在血琼脂上生长良好,但生长比较缓慢。采用分离培养的方法检测 Cb 无需特殊设备,简单易行。

3.1.1 样品采集

待检样品宜采取活体或刚死亡动物的皮肤拭子、肠内容物、新鲜粪便或病灶分泌物。活体采样时,可将无菌棉签用灭菌生理盐水湿润,轻轻擦拭皮肤表面,以疑似鳞屑分泌物覆盖处为主要部位,或采取新鲜的粪便,接种于血琼脂平皿上,置 36℃ 培养 48 h。如处死动物,则根据国家标准^[12]的操作,取盲肠内容物,接种于血琼脂平皿上培养。同时可将皮肤拭子、新鲜粪便或回盲内容物混悬于无菌 PBS 中,以备提取基因组 DNA。

3.1.2 生化鉴定

Cb 在血琼脂上形成 1 mm 左右、灰白色、凸起、无光泽、不溶血的菌落。检测时应首先关注血平皿

上的特征可疑菌落,根据目前国家标准中的检测项目^[13],与 Cb 菌落形态相似的只有鼠棒状杆菌(Ck),但相比 Cb,Ck 菌落颜色似石灰,凸起更为明显,触感较硬,涂片不易乳化。对血平皿上生长出的可疑菌落应用接种环小心挑取,再次接种于血琼脂平皿传代纯化,置 36℃ 再次培养 48 h。对纯培养菌落需进行生化鉴定以确定是否符合 Cb 的生化特征。生化鉴定项目的确定主要依据两个方面:①伯杰细菌手册,参考其中对棒状杆菌属各菌株的鉴别生化项目^[14];②便于获得试剂及操作的生化鉴定项目。Cb 的生化特征主要为:氧化酶阳性,碱性磷酸酶、吡嗪酰胺酶阳性^[15],葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、木糖、甘露醇、七叶苷、硝酸盐还原、CAMP 反应均为阴性,尿素酶根据菌株来源的不同会存在差别^[16]。

3.2 荧光定量 PCR

对病原菌的快速检测离不开分子生物学方法,目前已经报道的应用与 Cb 的分子生物学方法主要有普通 PCR^[5]、荧光定量 PCR(real-time fluorescent quantitative PCR, qPCR)^[16-17]、16SrDNA 测序^[18-19]和质谱检测方法^[20],其中 16SrDNA 的方法最为准确^[21],但检测成本和时间相比 qPCR 没有优势,因此目前 qPCR 是最理想的检测方法。

细菌的 16SrRNA V3 区具有高度的差异性,是非常理想的探针设计区域^[22]。qPCR 方法通过两条标记荧光发射基团和荧光淬灭基团的引物对牛棒状杆菌 16SrDNA 的 V3 区进行扩增,当完整的探针与目标序列配对时,荧光基团发射的荧光因与 3' 端的淬灭剂接近而被淬灭。但在进行延伸反应时,聚合酶的 5' 外切酶活性将探针进行酶切,使得荧光基团与淬灭剂分离。所发出的荧光信号可以被荧光定量 PCR 仪所记录捕捉。随着扩增循环数的增加,释放出来的荧光基团不断积累,荧光强度与扩增产物的数量呈正比关系。据此片段设计 MGB 荧光定量 PCR 引物和探针,可对皮肤、口腔、肠内容物或粪便样品进行荧光定量 PCR 检测。

4 实施难点

4.1 可疑菌落的挑选

Cb 在血琼脂上形成 1 mm 左右、白色无光泽、不溶血的菌落。因此在初代培养时,Cb 的可疑菌落容易被忽视,要求检测人员细致观察有无细小的菌落存在。经过纯传后 Cb 一般才会显现出其典型的菌落特征。

4.2 生化鉴定项目实施

氧化酶试剂,葡萄糖、甘露醇糖醇类培养基及

硝酸盐、尿素等培养基属于常规生化鉴定项目,比较容易操作; CAMP 反应需要有 β 溶血的金黄色葡萄球菌和 B 群溶血性链球菌作为试验用菌株,其原理是具有 CAMP 因子的细菌能够促进金黄色葡萄球菌 β 溶血素活性,从而在血琼脂上呈现出箭头状溶血区;碱性磷酸酶试验和吡嗪酰胺酶试验操作相对复杂,碱性磷酸酶试验原理是,碱性磷酸酶是底物专一性较低的非特异性磷酸单酯酶,能催化磷酸单酯的水解反应产生无机磷酸和的磷酸单酯的水解反应,产生无机磷酸和相对应的醇、酚或糖,在相应的基质液中可显出不同的颜色^[23-24];吡嗪酰胺酶试验是 Cb 具有吡嗪酰胺水解酶活力,可将吡嗪酰胺转化为杀菌的吡嗪酸,当加入硫酸亚铁铵后,可与吡嗪酰胺水解酶发生显色反应,它是棒状杆菌属鉴别的关键项目之一^[25]。某些自动细菌鉴定仪或试剂盒可检测碱性磷酸酶,吡嗪酰胺酶试验则需要单独购买吡嗪酰胺和硫酸亚铁铵手工鉴定。

4.3 结果的判定

4.3.1 生化鉴定结果判定的前提是确保生化试剂的有效性

每次生化鉴定须设置阴性、阳性对照来验证相对应生化试剂的合格有效。随着自动细菌鉴定设备和试剂盒的出现,简化了细菌生化鉴定操作,也避免了实验人员主观判断带来的误差。但在缺少此类设备时,仍要求检测人员能够依据相关生化项目准确鉴定可疑 Cb。在棒状杆菌属中,乳房炎棒状杆菌 (*Corynebacterium mastitidis*) 的生化鉴定常与 Cb 相混淆,此时宜采用 PCR 方法进行验证,避免得出错误结论。

Cb 基本不发酵糖醇类培养基,当遇到有些反应迟缓的非 Cb 菌株,容易造成混淆和误判。此外,因为菌株来源的不同,尿素会出现阴阳不定的情况。一般啮齿类来源的 Cb 菌株,尿素酶一般为阳性,而牛来源的菌株则为阴性。因此这种结果属于正常情况,通过此特点,可大致判断菌株的污染途径。

4.3.2 qPCR 结果的判定同样需要在阴、阳对照成立的情况下判定

本方法敏感性能够检测到 10 拷贝/mL 的 Cb 标准品 DNA, Ct 值为 (32.621 ± 0.128)。由此标准中设定 Ct 值 ≤ 32 时为阳性反应。当处于临界值 (Ct 值 32 ~ 35) 时判为可疑反应。有可能是操作污染所致,如复试仍为可疑,则需根据动物临床表现进行判断。研究表明,裸鼠即使在接触到轻微 Cb 污染后 4 d,其体表 Cb DNA 可达 1000 拷贝/拭子^[16],此时 Ct 值约为 24,远低于 32。因此 Cb 检测时可连

续取样,动态监测 Ct 值得变化,获得准确结果。

4.4 设备环境要求

Cb 属于生物安全 2 级病原微生物,对 Cb 的检测首先应具备生物安全 2 级实验室的实验条件。采用分离培养的方法检测 Cb 无需特殊设备,36℃ 恒温培养箱、生物安全柜、显微镜即可满足检测需求。有条件的实验室使用自动细菌鉴定仪能够极大的提高检测的准确率和检测效率。采用 qPCR 方法检测必须使用荧光定量 PCR 仪实时监测扩增曲线。此类设备购买和使用成本较高,须定期维护和检定,以保证所得结果的准确、有效。

4.5 检测成本

本标准制定了分离培养和 qPCR 方法,除了考虑实验设备的普及程度外,还兼顾检测成本因素。分离培养法和 qPCR 法相比较,检测成本花费由低至高依次为:国产生化试剂、qPCR、Vitek2 自动细菌鉴定系统、API 棒状杆菌试纸条。相比而言,qPCR 在检测效率、准确性和经济角度是比较理想的选择。另外对检测机构而言,有限的检测数量无疑会带来检测试剂的浪费,从而增加检测成本。找到检测方法、常备检测试剂和检测数量的平衡点至关重要。

5 讨论

经过多家检测实验室的验证,证明本标准适用于牛棒状杆菌的实验室检测,解决了现阶段国内牛棒状杆菌检测无标准可循的状态。

qPCR 技术以其灵敏度高、速度快、特异性强等优点在基因表达水平分析、突变和多态性研究、病原体的定性和定量检测等方面得到广泛应用。Taqman MGB 探针相比普通 Taqman 探针可设计的更短,不仅降低成本,也提高了保守区内搜寻特异探针的成功率。其经过了化学修饰,提高了 Tm 值,使反应的结果更精确,分辨率更高^[26]。

牛棒状杆菌可存在于口腔和消化道,可采集咽拭子和粪便作为日常监测样品。根据实际检测结果,当裸鼠表现出临床症状时,皮肤拭子的结果拷贝数高于回盲内容物约 100 倍。当动物皮肤出现黄白色鳞片状分泌物附着于皮肤表面时,宜采取皮肤样品。

细菌的生化鉴定结果的阴性或阳性是指绝大多数菌株的反应结果,并不能代表所有菌株。为了保证标准的可操作性,标准中所列 Cb 生化鉴定项目仅有 12 项。在实际检测中,很可能遇到结果不一致的情况,此时仍需 qPCR 及临床表现综合判定结

果。受限于已知参考菌株序列的限制, qPCR 的探针引物不可能涵盖所有 Cb 菌株, 或是区分所有其他棒状杆菌。随着检测的逐步开展, 本标准中的生化项目和 qPCR 方法也将适时更新和完善。

6 未来展望

从细菌的分离培养、生化鉴定到 qPCR 检测, 都存在各自的优缺点, 没有任何一种方法能够做到尽善尽美。全基因组测序技术是获得微生物全部遗传信息的最佳途径。在基因组测序如火如荼发展的今天, 测序费用已越来越低, 技术也越来越成熟。在大数据分析及数据共享的环境下, 期待测序技术能够应用于实验动物病原菌的检测。

参考文献:

[1] Dalal A, Urban C, Ahluwalia M, et al. *Corynebacterium bovis* line related septicemia: a case report and review of the literature [J]. *Scand J Infect Dis*, 2008, 40(6-7): 575-577.

[2] 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): 206-211.

[3] Chow SK, Bui U, Clarridge JE. *Corynebacterium bovis* eye infections, Washington, USA, 2013 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(9): 1687-1689.

[4] 张强, 熊炜, 李健, 等. 裸鼠过度角化症牛棒状杆菌的分离鉴定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(8): 581-584.

[5] Duga S, Gobbi A, Asselta R, et al. Analysis of the 16S rRNA gene sequence of the coryneform bacterium associated with hyperkeratotic dermatitis of athymic nude mice and development of a PCR-based detection assay [J]. *Mol Cell Probes*, 1998, 12(4): 191-199.

[6] 国家科委. 实验动物管理条例(国家科委 2 号令) [EB/OL]. 2011 [2018-08-24], http://www.gov.cn/gongbao/content/2011/content_1860757.htm.

[7] 国家技术监督局. 中华人民共和国进出境动植物检疫法(中华人民共和国主席 53 号令) [EB/OL]. 2017 [2018-08-24], http://www.aqsiq.gov.cn/wsbsdt/zcftzgg/201710/t20171017_499782.htm.

[8] Manuel CA, Pugazhenth U, Leszczynski, et al. Surveillance of a ventilated rack system for *Corynebacterium bovis* by sampling exhaust-air manifolds [J]. *MJ Am Assoc Lab Anim Sci*, 2016, 55(1): 58-65.

[9] Burr HN, Wolf FR, Lipman NS. *Corynebacterium bovis*: epizootologic features and environmental contamination in an enzootically infected rodent room [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2012, 51(2): 189-198.

[10] Manuel CA, Pugazhenth U, Spiegel SP, 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.

[11] 国家科学技术委员会. 实验动物质量管理办法(国科发财字 [1997]593 号) [EB/OL]. 1997 [2018-08-24], <http://www.most.gov.cn/kjzc/gjkjzc/kjtjybz/201308/P020130823579541563126.pdf>.

[12] GB/T 14922.1, 实验动物 细菌学检测标本采集 [S]. 北京: 标准出版社, 2001.

[13] GB/T 14922.2, 实验动物 微生物学等级及监测 [S]. 北京: 标准出版社, 2010.

[14] Whittman WB, Goodfellow M, Kampfer P, et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd Ed., Vol.5, Part A [M]. New York: Springer, 2012.

[15] Revathi G, Talwar V. A biochemical test based on pyrazinamidase activity for rapid differentiation of corynebacteria [J]. *Indian J Clin Biochem*, 1995, 10(1): 39-41.

[16] Dole VS, Henderson KS, Fister RD, et al. Pathogenicity and genetic variation of 3 strains of *Corynebacterium bovis* in immunodeficient mice [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2013, 52(4): 458-466.

[17] Ajitkumar P, Barkema HW, De Buck J. Rapid identification of bovine mastitis pathogens by high-resolution melt analysis of 16S rDNA sequences [J]. *Vet Microbiol*, 2012, 23, 155(2-4): 332-340.

[18] Kim TH, Kim DS, Han JH, et al. Detection of *Corynebacterium bovis* infection in athymic nude mice from a research animal facility in Korea [J]. *J Vet Sci*, 2014, 15(4): 583-586.

[19] Schröder J, Glaub A, Schneider J, et al. Draft genome sequence of *Corynebacterium bovis* DSM 20582, which causes clinical mastitis in dairy cows [J]. 2012, 194(16): 4437.

[20] Langoni H, Camargo da Silva CP, Troncarelli MZ, et al. Short communication: identification of *Corynebacterium bovis* by MALDI-mass spectrometry [J]. *J Dairy Sci*, 2017, 100(6): 4287-4289.

[21] Chow SK, Bui U, Clarridge JE. *Corynebacterium bovis* eye infections, Washington, USA, 2013 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2015, 21(9): 1687-1689.

[22] Chakravorty S, Helb D, Burday M, et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria [J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 69(2): 330-339.

[23] 李金钟, 段雄波, 相青珍, 等. 磷酸对硝基苯酚测定细菌碱性磷酸 [J]. *上海医学检验杂志*, 1997, 12(2): 99.

[24] 王继, 蔡乾英, 童明华. 细菌碱性磷酸酶试验纸片法 [J]. *中华医学检验杂志*, 1997, 20(1): 45.

[25] Colman G, Weaver E, Efstratiou A. Screening tests for pathogenic corynebacteria [J]. *J Clin Pathol*, 1992, 45(1): 46-48.

[26] Afonina IA, Reed MW, Lusby E, et al. Minor groove binder-conjugated DNA probes for quantitative DNA detection by hybridization-triggered fluorescence [J]. *Biotechniques*, 2002, 32(4): 940-944, 946-949.