



培养法和 PCR 法用于实验大、小鼠细菌检测的比较分析

冯 洁, 谢建云, 冯丽萍, 魏晓锋, 高 诚

(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)

【摘要】 目的 比较培养法和 PCR 法对实验大、小鼠的细菌检测效果。方法 分别采用传统细菌分离培养结合生化鉴定方法和 PCR 方法, 对 78 只 SPF 级大鼠和 422 只 SPF 级小鼠进行检测, 对两种方法的检测结果进行比较分析。结果 78 只 SPF 级大鼠均未检测出阳性。422 只 SPF 级小鼠, 培养法检测阳性率 7.11% (30/422), 其中金黄色葡萄球菌 10 只, 绿脓杆菌 22 只, 肺炎克雷伯杆菌 2 只。PCR 法检测阳性率 7.58% (32/422), 其中金黄色葡萄球菌 10 只, 绿脓杆菌 25 只, 肺炎克雷伯杆菌 2 只。结论 PCR 法的敏感性高于培养法, 操作简便、快捷, 适用于实验动物细菌的快速诊断和大规模的质量筛查。

【关键词】 培养法; PCR 法; 实验动物; 细菌

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 08-0023-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.008.005

Comparison of culture and PCR assays for detection of bacteria in laboratory rats and mice

FENG Jie, XIE Jian-yun, FENG Li-ping, WEI Xiao-feng, GAO Cheng

(Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai Quality Monitoring Center of Laboratory Animals, Shanghai 201203, China)

【Abstract】 **Objective** To compare the efficiency of bacteria culture and PCR assays for detection of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) and *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) in laboratory rats and mice. **Methods** Bacteria culture combined with biochemical identification and PCR assay were used to detect 78 SPF rats and 422 SPF mice and the results of the two methods were compared. **Results** All the 78 rats were negative. Of the 422 mice, the positive rate by culture was 7.11% (30/422), of which, 10 were *S. aureus*, 22 were *P. aeruginosa*, and 2 were *K. pneumoniae*. The positive rate by PCR was 7.58% (32/422), of which, 10 were *S. aureus*, 25 were *P. aeruginosa*, and 2 were *K. pneumoniae*. **Conclusions** The high sensitivity, rapid procedure and easy to operate of PCR assay makes it valuable for rapid bacteria diagnosis and large-scale screening in laboratory animals.

【Key words】 Culture; PCR; Laboratory animals; Bacteria; *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) and *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) Rats; Mice

金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌这 3 种细菌均属于条件性致病菌, 广泛分布于自然界, 正常情况下不会导致人和动物的临床症状和疾病发生, 但在免疫功能低下、定居部位改变或失调等特定

情况下可引起机体的感染。这类细菌主要通过接触和空气传播, 以潜伏感染为主, 对于免疫系统受损的宿主, 常表现为感染、炎症甚至死亡^[1-3], 对实验动物质量以及实验结果均造成影响。我国实验动物微生物

[基金项目] 上海市科委基金项目 (12140900500, 14140900600)。

[作者简介] 冯洁 (1981 -), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 实验动物质量控制, E-mail: moyif@163.com。

物等级及监测标准 GB/T14922.2-2011 明确规定,无特定病原体级(specific pathogen free,SPF)实验大、小鼠必须检测和排除上述 3 个项目。近年来文献报道关于实验动物金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌等条件性致病菌的阳性率屡见不鲜^[4-6]。国标推荐的检测方法为经典的分离培养法,也是微生物诊断的金标准。但鉴于培养法存在耗时费力、操作繁琐、结果受检测人员主观判定干扰较大等多方面原因,本实验室尝试建立金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和肺炎克雷伯杆菌 3 重 PCR 检测方法,并与国标推荐的分离培养法进行对比,以探索 PCR 方法作为实验动物细菌快速检测方法的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物:所有检测的实验大鼠、小鼠均为 SPF 级,来自上海 10 家实验动物生产单位。

1.1.2 菌株:金黄色葡萄球菌 ATCC 6538、绿脓杆菌 ATCC 27853 购自美国标准生物物品收藏中心,肺炎克雷伯杆菌 CMCC 46117 购自中国医学微生物菌种保藏管理中心。

1.1.3 主要试剂:血琼脂平皿、营养肉汤、NAC 培养基、革兰氏染液、细菌生化鉴定管、琼脂粉均购自上海伊华医学科技有限公司,高盐甘露醇平皿、DHL 平皿均购自上海科玛嘉微生物技术有限公司。

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司,Taq DNA 聚合酶、PCR buffer、 Mg^{2+} 、2 × Taq Plus Master Mix (Dye Plus)、DL2000 plus DNA marker 均购自南京诺唯赞生物科技有限公司,琼脂糖购自西班牙 Bio-West 公司,GoldViewTM 核酸染料购自上海赛百盛(SBS)基因技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 培养法检测:按国家标准 GB/T14926-2001《实验动物 微生物学检测方法(1)(2)》进行金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌的常规分离培养、鉴定。无菌采集动物回盲部内容物,分别接种至高盐甘露醇平皿、NAC 增菌液和 DHL 平皿,36℃培养(24~48)h,观察培养结果。若有可疑样品则按国标实验步骤继续进行下一步纯化和鉴定工作。

1.2.2 DNA 提取:取上述回盲部内容物 0.2 g,悬浮于 1 mL 的 PBS(pH 7.4)中,850 r/min 离心 5 min

后取上清液,按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书严格操作,提取 DNA 模板,用于 PCR 检测。获得 DNA 样品于 -20℃ 保存。

1.2.3 PCR 法检测:采用本单位已建立好的金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌 3 重 PCR 方法对样品进行检测^[7-9]。引物序列见表 1。

PCR 反应体系 50 μL,包括 2 × Taq Plus Master Mix (Dye Plus) 25 μL,其中 Mg^{2+} 终浓度为 2.5 mmol/L,dNTP 终浓度为 200 μmol/L,引物各 0.2 μmol/L。

PCR 反应程序:95℃ 预变性 5 min 后,按 95℃ 变性 30 s,57℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s 的程序循环 34 次,最后 72℃ 延伸 10 min。

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测分析。PCR 阳性产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司,经凝胶电泳纯化回收后进行测序,测序结果与 GenBank 中已知核酸序列进行 BLAST。

2 结果

2.1 培养法检测结果

采用培养法对 422 只 SPF 级小鼠、78 只 SPF 级大鼠进行检测,共检出 30 只阳性动物(7.11%),均为小鼠。其中检出金黄色葡萄球菌 10 只,绿脓杆菌 22 只,肺炎克雷伯杆菌 2 只。其中有 4 只动物检测结果显示金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌均为阳性。

2.2 PCR 法检测结果

对上述动物同时进行金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌 3 重 PCR 检测,共检出 32 只阳性动物(7.58%),均为小鼠。其中检出金黄色葡萄球菌 10 只,绿脓杆菌 25 只,肺炎克雷伯杆菌 2 只。对阳性样品进行测序后,与 GenBank 发表的序列进行比对,同源性均可达 98% 以上。其中有 5 只动物金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌均为阳性。

2.3 培养法与 PCR 法检测结果比较

被检动物的品系和检测结果详情见表 2。培养法检测出阳性样品 30 只,PCR 法检测出阳性样品 32 只。培养法分别检测金黄色葡萄球菌 10 只、绿脓杆菌 22 只、肺炎克雷伯杆菌 2 只;PCR 方法分别检测金黄色葡萄球菌 10 只、绿脓杆菌 25 只、肺炎克雷伯杆菌 2 只。其中有 1 例金黄色葡萄球菌和 3 例绿脓杆菌经培养法检测为阴性,但 PCR 检测为阳性。有 1 例经培养法检测金黄色葡萄球菌为阳性,但 PCR 法未能检出。

表 1 PCR 引物列表
Tab. 1 The sequences of PCR primers

细菌名称 Bacteria	引物序列 Primer names	产物长度(bp) Fragment length
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	SA1;CTTTAGCCAAGCCTTGACGAAC SA2;AAAGGGCAATACGCCAAAGAGGT	484
绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i>	PA1;GCACCCGCAACGCATCAA PA2;CCTGGAAAGGCTCCGAATAGTG	278
肺炎克雷伯杆菌 <i>K. pneumoniae</i>	KP1;TGGCCCGCGCCAGGGTTCGAAA KP2;GATGTCGTCATCGTTGATGCCAG	368

表 2 被检动物品系及检测结果统计
Tab. 2 Detection results of the tested animals and their strains

品系 Strains	数量 Number	培养法阳性数(%) Positive results of cultured samples			PCR 法阳性数(%) Positive number of samples detected by PCR		
		金葡 <i>S. aureus</i>	绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i>	肺炎克雷伯菌 <i>K. pneumoniae</i>	金葡菌 <i>S. aureus</i>	绿脓杆菌 <i>P. aeruginosa</i>	肺炎克雷伯菌 <i>K. pneumoniae</i>
KM mice	39	0	0	0	0	0	0
Nod-scid mice	22	0	0	0	0	0	0
Scid mice	16	0	0	0	0	0	0
ICR mice	45	0	0	1	0	0	1
C57 mice	62	4	6	1	3	7	1
BALB/c nude mice	68	1	7	0	2	7	0
BALB/c 裸小鼠	44	0	5	0	0	5	0
ICR × BALB/c F1 nude mice	22	0	0	0	0	0	0
裸鼠	34	5	4	0	5	6	0
C57BL/6	12	0	0	0	0	0	0
遗传工程小鼠 Genetic engineering mice	58	0	0	0	0	0	0
SD rats	50	0	0	0	0	0	0
Wistar rats	22	0	0	0	0	0	0
ZDF	6	0	0	0	0	0	0
合计 Total	500	10	22	2	10	25	2

3 讨论

实验动物细菌质量控制是评价动物质量好坏的重要指标之一。细菌感染对实验动物本身的生长发育、实验动物的生产使用、科学研究的成果以及从业人员和环境均能造成不同程度的影响。因此,开发新型检测手段无论从实验动物质量控制还是从生物安全的角度都显得尤为必要。

目前细菌检测的方法一般包括分离培养、血清学检测抗体、抗原以及核酸检测方法等^[10,11]。细菌分离培养被认为是金标准,也是最为常用的方法。我国实验动物国标推荐的金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、肺炎克雷伯杆菌检测,采用的就是分离培养法。该方法根据细菌生物学特性、表型特征进行鉴定,经典、准确,但存在操作繁琐、实验周期长、效率较低等缺陷,受检测试剂、检测程序、软硬件等多因素

限制,易造成检测结果的偏离。分子生物学技术则是针对细菌的特异性 DNA 进行检测,因具有敏感、快速、简便等优点已被广泛应用,我国实验动物科研工作者已陆续开发了多种病原体的分子生物学检测技术^[12,13]。多重 PCR 是以普通 PCR 为基础,同时加入多对引物,同时扩增多个目的基因,从而达到快速高效的一种新型手段^[14-16]。但 PCR 方法也存在易污染、易出现假阳性、产物需经测序验证等缺点,实际应用中应加以规避。

本研究针对金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和肺炎克雷伯杆菌同时开展了培养法和 PCR 法检测。通过比较发现,PCR 法检出率略高于培养法,在实际操作过程中采用国标推荐的分离培养法,全程至少需要 3~7 d 时间,而 PCR 法仅需 1 d 时间即可完成。因此 PCR 方法在效率和敏感性上都具有较大优势,适用于实验动物细菌感染的快速诊断和大

规模的质量筛查。但值得注意的是,PCR 产物易造成对实验环境的污染,导致假阳性的出现,因此在操作过程中应尽量避免。

理论上讲培养法检测呈阳性的样品,PCR 法检测应均能检出。但本研究中有 1 例样品经培养法检测金黄色葡萄球菌为阳性,但 PCR 法检测为阴性。这一现象在其他类似文献报道中也出现过^[17],我们认为原因可能是样品 DNA 提取失败,以后的 PCR 检测过程中可考虑加入质控引物,以评估被检样品的 DNA 模板质量是否合格。

综上,分离培养法和 PCR 法均能用于实验动物的金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和肺炎克雷伯杆菌检测,应将两者结合,以达到准确、高效的目的。对少量样品进行感染诊断,采用分离培养法较为合适。当出现动物疫情爆发需要快速诊断或进行流行病学调查时可采用 PCR 结合测序法进行筛查。

参考文献:

- [1] 金宁一,胡仲明,冯书章.人兽共患病学[M].北京:科学出版社.2007:552-697
- [2] 王惠川,白广星,刘文军,等.实验小鼠疾病[M].北京:北京农业大学出版社.1988:111-112,153-175,540-548.
- [3] Bteieh A, Kimeh P, Sahly H, et al. Klebsiella oxytoca: opportunistic infections in laboratory rodents [J]. *Lab Anim*, 2008,42(3):369-375.
- [4] 葛文平,张旭,高翔,等.中国商业化 SPF 级小鼠病原体污染分析[J].中国比较医学杂志,2012,22(3):65-68.
- [5] 邢进,高正琴,冯育芳,等.北京地区 2008-2011 年实验动物绿脓杆菌检测结果与分析[J].实验动物科学,2012,29(3):24-26.
- [6] 隋丽华,范薇,杨敬,等.实验动物微生物、寄生虫抽样调查及分析[J],实验动物与比较医学,2008,28(4):259-262.
- [7] 冯洁,谢建云,胡建华,等.3 种条件性致病菌三重 PCR 检测方法的建立及初步应用[J].中国畜牧兽医,2015,42(6):1384-1395.
- [8] Brakstad O G, Aasbakk K, Maeland J A. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene[J]. *J Clin Microbiol*,1992,7:1654-1660.
- [9] 谭燕玲,朱瑞良,王慧,等.鸡胚胎性病原菌多重 PCR 检测方法的建立[J].中国预防兽医学报,2011,33(5):374-377.
- [10] 王瑶,徐英春.临床细菌和真菌快速诊断技术[J].中华检验医学杂志,2009,32:257-259.
- [11] 张卓然,高鹏,李琳,等.微生物非培养鉴定技术在临床标本检测中的临床应用研究[J].微生物学杂志,2009,29:18-24.
- [12] 张小飞,张召军,张广州,等.产肠毒素大肠杆菌快速检测方法的建立和评价[J].中国实验动物学报,2013,21(5):31-35.
- [13] 韦莉,魏立雯,赖国旗,等.金黄色葡萄球菌反向线性杂交探针检测方法的建立[J].中国实验动物学报,2012,20(6):78-81.
- [14] 许一平,成炜,邵彦春,等.沙门菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的多重 PCR 检测[J].微生物学通报,2006,33(6):89-94.
- [15] 杨明柳,吴斌,汤细彪,等.致猪水肿病大肠杆菌毒力因子二重 PCR 检测方法的建立及应用[J].中国兽医学报,2008,28(9):996-999.
- [16] 李伟杰,赵耘,魏财文,等.致猪水肿病大肠埃希菌多重 PCR 检测方法的建立及应用[J].中国畜牧兽医,2015,42(3):537-543.
- [17] 薛冠华,徐文建,马晓红,等.PCR 法与培养法检测儿童肺炎易感细菌结果比较[J].北京医学,2012,34(6):466-469.

[修回日期]2015-06-17