

实验动物垫料的微生物污染监测及影响因素研究

刘建琪, 张红, 张林青, 胡旃, 贾华云, 王岚, 湛志飞, 刘建高
湖南省疾病预防控制中心, 长沙 410005

摘要: **目的** 对实验动物垫料进行微生物指标监测, 为管理机构制定垫料的卫生标准提供依据, 为垫料生产企业在加工、灭菌、包装、运输、储存等环节及动物使用单位对动物实验结果影响因素分析方面提供参考依据。**方法** 对来自不同实验动物生产和使用单位的垫料, 参照 GB4789-2010、2012 检测方法进行菌落总数、霉菌及大肠杆菌计数、沙门氏菌的检测。**结果** 49 份未灭菌的垫料存在不同程度的细菌、霉菌及大肠杆菌污染, 未检出沙门氏菌; 不同材质的垫料在不同条件下灭菌, 在 121℃ 30min 的条件下具有最佳灭菌效果, 各项微生物指标均合格; 已灭菌的 21 份垫料有 19 份存在不同程度的细菌及霉菌污染, 未检出沙门氏菌及大肠杆菌; 松软的混合型刨花垫料在灭菌后 7 天检测到细菌; 采用敞开编织袋储存 5 天即检测到细菌污染; 垫料使用 1 天后的菌量可达 10^4 CFU/g, 细菌及霉菌含菌量按天数逐步递增, 但未检出沙门氏菌。**结论** 垫料使用前必须消毒灭菌, 采用合理的方式储存, 及时更换可改善饲养环境, 可减少微生物污染, 保障实验动物的质量及实验结果的可靠。

关键词: 实验动物; 垫料; 微生物污染指标

The microbial contamination monitoring in the experimental animal padding and the influence factors analysis

Liu Jianqi, Zhang Hong, Zhang Linqin, Hu Zhan, Jia Huayun, Wang Lan, Zhan Zhifei, Liu Jiagao

Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Key Laboratory of Microbial Molecular Biology of Hunan Province, Changsha 410005, China

Abstract: Objective To monitor the microbial contamination situation of the experimental animal padding, providing a basis to the management agency for the hygienic standard establish, and offering a reference to the manufacturing enterprise in padding processing, sterilization, packaging, transportation and storage links. **Methods** According to the standard of GB4789-2010, the aerobic bacterial count, mould, escherichia coli and salmonella were detected to the padding from different manufacturing enterprise. **Results** Forty nine of the padding without sterilization exist mould and escherichia coli contaminate, but there had not detected the salmonella. The sterilization condition of 121℃ for 30min has the optimum effect to vary texture padding, all microbiological indicator could not detectable under this method. Nineteen of twenty one sterilized padding exist vary degree bacteria or mould contaminate, the escherichia coli and the salmonella were not detected. The mixed wood shavings exist bacteria contaminate after sterilized seven days, when store the padding with the woven bag without seal, the bacteria can be detect in five days. When the padding was used than one day, the quality of the bacteria could be up to 10^4 CFU/g but without the salmonella contaminate. **Conclusion** It is necessary to sterilize and store appropriate before the padding use, change the padding timely could improve the animal's feeding environment and decrease the risk of the microorganism contaminate.

Key words: Experimental animal; padding; microbial contamination

基金项目: 湖南省科技计划项目 (2012TP1002, 2012TT2010, 2011TT1002)

作者简介: 刘建琪, 女, (1963-), 副主任技师, 主要从事于健康相关产品及实验动物的微生物检验工作。

通讯作者: 刘建高, E-mail: hnzgklig@136.com 电话: 0731-84305905

实验动物是指经人工饲养，对其携带的微生物实行控制，遗传背景明确或来源清楚的，用于科学研究、教学、生产、检定的动物，其生存条件和环境可直接影响动物实验的结果^[1, 2]。在它的体表、体内及饲养环境中存在种类繁多的微生物，这些微生物对实验动物、实验人员、实验结果都可能产生严重的影响。垫料是铺垫在动物笼具硬表面上的一种保护性材料，主要用于给实验动物生活提供舒适的生活环境，作为实验动物的直接接触物，它是进行实验动物质量控制的关键^[3, 4]。现阶段我国所使用的实验动物垫料主要是来源不能溯源的刨花，质量得不到保证。根据国外文献对垫料的一些研究及我国实验动物管理机构和科研单位正逐步建立的实验动物质量评估体系，我们对国内 5 省 24 家垫料生产企业、动物实验使用单位的松软混合型刨花、杉树垫料、玉米芯垫料、桦木垫料、泡桐垫料进行了菌落总数、大肠杆菌、霉菌及沙门氏菌监测，现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 垫料采集 共采集实验动物垫料 68 份，其中未灭菌垫料 44 份，灭菌垫料 21 份，实验动物污染垫料 3 份。垫料成分包括玉米芯（来自上海、北京、辽宁），桦木（来自辽宁、新疆），杉树、泡桐（来自湖南 9 个地市县）和混合型刨花（来自北京、上海、湖南）。盛装垫料容器为长×宽约 1.3×1.6m 的编织袋。

1.1.2 主要试剂 平板计数琼脂培养基、孟加拉红琼脂培养基、结晶紫中性红胆盐琼脂（VRBA）、结晶紫中性红胆盐琼脂-4-甲基伞形酮-β-D-葡萄糖苷琼脂（VRBA-MUG）、煌绿乳糖胆盐肉汤（BGLB）、BPW 增菌液、TTB 增菌液、SC 增菌液、BS 琼脂、XLD 琼脂、三糖铁琼脂、赖氨酸脱羧酶试验培养基、营养琼脂培养基均购自广东环凯微生物科技有限公司、沙门氏菌属诊断血清（宁波天润生物药业有限公司）、API 生化鉴定试剂盒购自生物梅里埃公司。

1.2 方法

1.2.1 样品处理 菌落总数、霉菌及大肠杆菌计数的检测，无菌称取 25g 样品，分别放入盛有 225mL 生理盐水、无菌蒸馏水、磷酸盐缓冲液的均质袋中均质 1min，制成 1: 10 的样品匀液。

1.2.2 样品稀释 根据对垫料污染状况的估计，制成 10 倍递增的稀释样品匀液，分别选择 2 个适宜稀释度，吸取 1mL 稀释液于无菌平皿内，每个稀释度做 2 个平皿，同时分别吸取 1mL 稀释液加入 2 个无菌平皿作空白对照。

1.2.3 培养 将冷却至 46℃的平板计数琼脂培养基、孟加拉红琼脂培养基、VRBA 培养基倾注平皿。VRBA 培养基倾注平皿待琼脂凝固后，再加 3-4mLVRBA-MUG 覆盖平板表层，翻转平板。分别置 36℃培养 48h、孟加拉红琼脂培养基 28℃培养 5d 观察结果。

1.2.4 沙门氏菌培养 无菌称取 25g 垫料放入盛有 225mLBPW 增菌液的无菌均质袋中均质 1min，36℃培养 24h 进行前增菌，轻轻摇动培养后的样品混合物，移取 1mL 接种于 10mLTTB，42℃培养 18h。同时取 1mL 转种于 10mLSC 内，36℃培养 24h 增菌。接种环取增菌液 1 环，划线接种 BS 琼脂平板和 XLD 琼脂平板，于 36℃培养 48h、24h 进行可疑菌落分离，观察各平板上菌落的生长情况。

1.2.4 生化实验 在选择性平板上挑取 2 个以上可疑菌落，接种三糖铁琼脂，同时直接接种赖氨酸脱酸酶试验培养基和营养琼脂平板，36℃培养 24h，观察菌落的生长情况，挑取可疑菌落分纯，对纯化的菌落采用 API20E 试剂盒进行生化鉴定。

2 结果

2.1 不同材质未灭菌的垫料微生物污染

对来自不同省份实验动物生产和使用单位的 44 份未灭菌的垫料进行菌落总数、霉菌、大肠杆菌计数及沙门氏菌微生物指标进行检测，未灭菌的垫料含有不同程度的细菌、霉菌及大肠杆菌污染，菌落总数及霉菌污染均以杉树垫料的含量最高，分别达到 2.3×10^4 CFU/g 和 6.4×10^3 CFU/g，未检出沙门氏菌，见表 1。

表 1 不同材质的垫料微生物指标检测

	玉米芯垫料	桦木垫料	杉树垫料	泡桐垫料	混合型刨花垫料
数量	6	6	10	6	16
菌落总数（CFU/g）	2.3×10^2	4.4×10^2	2.3×10^4	1.1×10^4	6.1×10^3
霉菌（CFU/g）	1.4×10^2	3.7×10^2	6.4×10^3	2.2×10^3	2.8×10^3
大肠杆菌（CFU/g）	-	12	7.6×10^2	2.0×10^3	2.7×10^2
沙门氏菌	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

注：表内“-”代表无菌生长

2.2 不同材质垫料在不同条件下灭菌的效果评价

不同材质的垫料在不同温度和时间下采用高压蒸汽灭菌，观察最佳灭菌效果，结果发现在 121℃采用高压蒸汽灭菌 30min 的条件下微生物各项指标检测均合格，具有最佳灭菌效果，见表 2。

表 2 不同材质垫料在不同条件下的灭菌效果

	115℃20min		115℃30min		121℃20min		121℃30min	
	菌落总数	霉菌	菌落总数	霉菌	菌落总数	霉菌	菌落总数	霉菌
玉米芯垫料	-	40	-	-	-	-	-	-
桦木垫料	-	60	-	10	-	-	-	-
杉树垫料	2.3×10^2	2.2×10^2	45	20	10	-	-	-
泡桐垫料	3.0×10^2	1.1×10^2	60	40	20	10	-	-
混合型木质垫料	2.2×10^2	4.2×10^2	72	60	-	20	-	-

注：表内“-”无菌生长；沙门氏菌“未检出”

2.3 不同垫料灭菌后的效果监测

对采集的 21 份已灭菌垫料进行菌落总数、大肠杆菌、霉菌及沙门氏菌的微

生物指标检测，发现灭菌后的垫料仍检出菌落总数和霉菌，其中混合型刨花垫料的菌落总数高达 3.5×10^2 CFU/g，霉菌以杉树垫料的含量最高，达到 40 CFU/g，未检出大肠杆菌和沙门氏菌，见表 3。

表 3 灭菌后垫料微生物污染指标观察

	玉米芯垫料	桦木垫料	杉树垫料	泡桐垫料	混合型刨花垫料
数量（份）	2	1	3	2	13
菌落总数（CFU/g）	—	12	66	24	3.5×10^2
霉菌（CFU/g）	—	—	40	30	38
大肠杆菌（CFU/g）	—	—	—	—	—
沙门氏菌	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

注：表内“—” 无菌生长

2.4 垫料灭菌后储存方式及保存期限的观察

对 4 个来源不同混合型刨花垫料在未灭菌前进行细菌培养，再将垫料经 121℃30min 高压灭菌，装入编织袋中分为 A、B 二组，每组 2 袋（编号：A-1、A-2、B-1、B-2），每袋 5 公斤，A 组 A-1、A-2 原封不动储存，B 组 B-1、B-2 分别敞开编织袋口储存，二组同时储存在同一个开放的房间内 2d、4d、6d、8d、10d 后，A 组在第 8d 检测到菌落总数，B 组在第 6d 检测到菌落总数。见表 4。

表 4 垫料灭菌后不同保存方式的菌落总数观察

编号	高压灭菌前（CFU/g）	高压灭菌后（CFU/g）				
		2d	4d	6d	8d	10d
A-1	5.4×10^4	—	—	—	70	1.6×10^2
A-2	3.6×10^4	—	—	—	30	3.0×10^2
B-1	3.2×10^4	—	—	80	1.6×10^2	3.4×10^2
B-2	4.0×10^4	—	—	50	1.4×10^2	3.3×10^2

注：表内“— “ 无菌生长；

2.5 实验动物使用过程中垫料细菌与霉菌的污染情况

采集实验动物使用中垫料（第 1d、2d、3d），观察动物饲养盒内垫料中细菌及霉菌的污染情况。结果显示使用 1 天的细菌达到 10^4 CFU/g，霉菌达 10^2 CFU/g，细菌及霉菌含菌量按天数逐步递增，未检出沙门氏菌。见表 5。

表 5 动物垫料使用中细菌与霉菌的污染情况

编号	消毒前	细菌污染情况（天数）					
		1d		2d		3d	
		菌落总数（CFU/g）	霉菌（CFU/g）	菌落总数（CFU/g）	霉菌（CFU/g）	菌落总数（CFU/g）	霉菌

(CFU/g)						
1	-	1.2×10^4	2.6×10^2	1.5×10^7	1.3×10^4	6.5×10^8
5.3×10^4						
2	-	4.3×10^4	4.3×10^2	1.1×10^7	7.8×10^3	3.7×10^8
1.5×10^4						
3	-	5.6×10^4	3.2×10^2	7.8×10^6	6.5×10^3	1.3×10^9
2.3×10^4						

注：表内“-”“无菌生长，未检出沙门氏菌

3 讨论

中国实验动物管理机构和科研单位至今尚未开展实验动物垫料质量评估体系的系统研究,没有可供参考的国家标准。发达国家对实验动物垫料质量的研究相对前沿,如日本除对垫料进行 17 项化学污染物检测外,还对细菌总数、大肠杆菌、真菌等微生物指标进行检测,欧美也有类似的规定^[5, 6]。

垫料因与实验动物直接接触,容易造成微生物繁殖,其质量特别是否携带有病原微生物,可直接影响实验动物机体的生理平衡,从而对实验结果的稳定性造成影响,在维持实验动物饲养环节中的微环境平衡起着重要作用^[7, 8]。本文对不同来源不同类型的实验动物垫料进行了微生物污染的多方面研究,为实验动物管理部门制定垫料的卫生标准提供了科学的依据。同时,也给垫料生产企业及动物使用单位在垫料的灭菌、储存、实验动物使用过程中怎样控制微生物的污染提供了重要的参考。从实验获得的各种监测数据来看,未灭菌处理的垫料其细菌总数与霉菌的含菌量相当高,在垫料类型上以杉树垫料的污染最严重,细菌总数和霉菌分别达到 2.3×10^4 CFU/g 和 6.4×10^3 CFU/g,这是导致实验动物感染疾病的主要来源。

垫料容易滋生细菌,在使用之前必须进行灭菌处理,《医学实验动物管理实施细则》对此有明确要求。本实验验证在 121℃30min 条件下对垫料进行高压蒸汽灭菌,具有操作简单,灭菌效果好的优点,灭菌后的垫料易于干燥,垫料经此法灭菌后,细菌总数与霉菌均未能检出,而在 115℃高压 20min 或 30min 的条件下,在不同材质的垫料中均检出了不同程度的菌落总数与霉菌。值得注意的是,采用此法对垫料进行灭菌后,必须有足够的干燥时间,才能提供给实验动物使用,因灭菌过程中垫料会吸收湿气,潮湿垫料有利于细菌与霉菌的繁殖。

在实验动物生产和使用单位已灭菌垫料中,存在细菌与霉菌二次污染的情况,这与灭菌的温度、时间、储存条件、放置时间有一定关系。我们对高压蒸汽灭菌后的垫料烘干后采用二种不同方式储存,结果显示细菌与霉菌含菌量是不一样的,灭菌后未开封保存比开封保存可多放置 2 天,随着放置时间的推移垫料的含菌量会逐步递增。灭菌后的垫料在一周内用完,可有效保证灭菌后

垫料不被二次污染。动物排泄物及食物残渣是滋生细菌与霉菌的根源，如盒子内垫料更换周期短，盒子内湿度和氨浓度就会相对较低，实验证明垫料每周更换 2-3 次为最佳，能保持动物笼内健康的微环境。

参考文献

- [1]孙永梅, 郭自荣, 张永侠, 等. 我国实验动物垫料的质量评价研究概述[J]. 湖南农业大学学报, 2009, 40 (10) : 139-144.
- [2] 刘军须, 冯旭, 张焕铃, 等. 两种新型实验动物垫料的性状研究[J]. 中国比较医学志, 2006, 16 (8):472-474.
- [3]柯贤福, 周莎桑, 楼琦等. 实验动物屏障系统微生物动态状况[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 26 (3) , 47-50.
- [4]田还成, 袁慧, 许超琪. 实验动物垫料的标准化[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21 (10) :72-75.
- [5]Ernest D. Olfert, DVM; Brenda M. Cross, DVM; and A. Ann McWilliam, GUIDE TO THE CARE AND USE OF EXPERIMENTAL ANIMALS, Canadian Council on Animal Care(1993)
- [6]B. Ewaldsson, B. Fogelmark, R. Feinstein, L. Ewaldsson1& R. Rylander, Microbial cell wall product contamination of bedding may induce pulmonary inflammation in rats, Laboratory Animals Ltd. Laboratory Animals (2002) 36, 282 - 290
- [7]E. Kaliste, M. Linnainmaa, T. Meklin, E. Torvinen & A. Nevalainen, The bedding of laboratory animals as a source of airborne contaminants, Laboratory Animals Ltd. Laboratory Animals (2004) 38, 25 - 37
- [8] 刘恩岐. 实验动物垫料质量的评估 [J]. 中国比较医学杂志[J], 2004, 14(3): 179-184.