

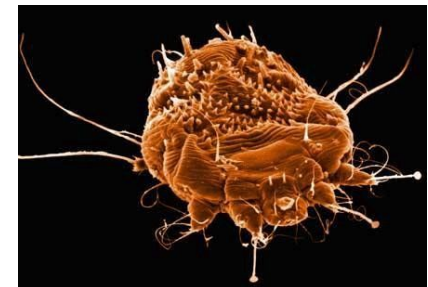
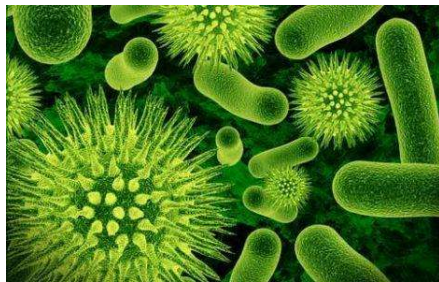
感染性疾病动物模型 型与研究





感染性疾病：

医学上将所有由病原体引起的疾病统称为感染性疾病，常见的病原体有：细菌、真菌、病毒、寄生虫等。



感染性疾病与传染病

- 感染即为病原体与宿主之间相互作用的过程，凡是由病原微生物引起的疾病统称为感染性疾病。
- 其中感染性较强，可以引起宿主间相互传播的疾病成为传染病。



人类与疾病的斗争将是永远的

- 人类在同疾病作艰苦的斗争中，一些传染病被控制，但是一些新的传染病却逐个地出现，最能说明问题的例子就是天花和艾滋病，1980年5月第33届世界卫生大会上，主席郑重而兴奋地宣布：“全球已消灭了天花”，但仅在一年之后的1981年6月5日，美国却宣布：在美国东西海岸同时发现一种不明原因所致的获得性免疫缺陷综合症，简称艾滋病（AIDS）。

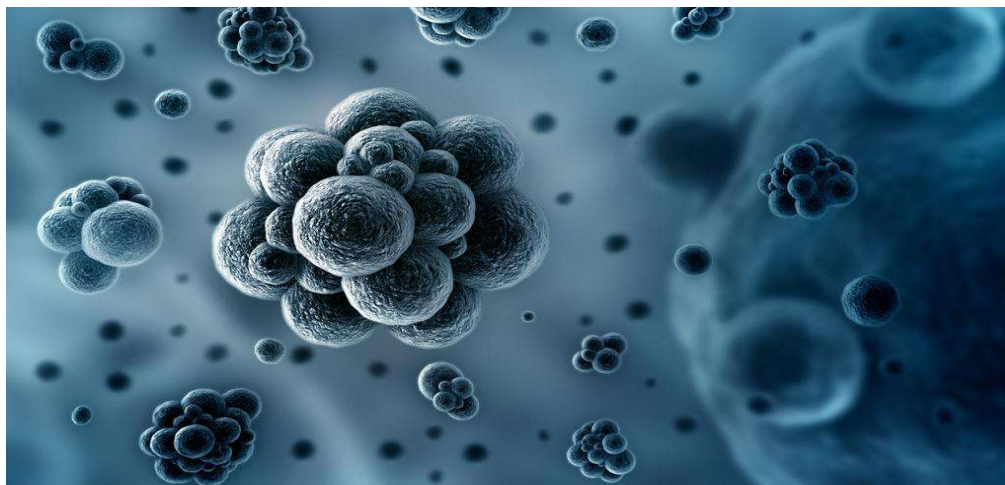
21世纪人类同感染性疾病的斗争

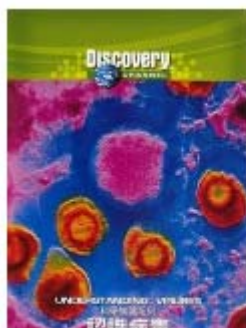
- 新发传染病不断出现；
- 旧传染病复燃，抗药性增强；
- 重大传染病、感染性疾病多发国；
- 面临重大挑战；

艾滋病、结核病、乙型肝炎、**SARS**、手足口病、禽流感、新型流感病毒.....

病毒性疾病的威胁

- 新发传染病中50%以上为病毒性传染病
- 来势凶猛，席卷全球。
- 4000多种，有400种与人类疾病密切相关
- 埃博拉病毒、汉坦病毒、HIV、SARS、塞卡病毒……………



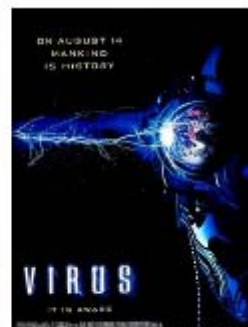


探索频道 认识病毒

幽灵电脑

天外来菌

嗜血破晓



传染病

感染列岛

末日病毒

病毒

感染性疾病的预防*

- 消灭传染源（发病动物、疫源地、污染物）
- 切断传播途径（清洗、消毒、个人防护、卫生管理）
- 增强易感动物的抵抗力（疫苗、药物、育种等）





昵图网 www.nipic.com by: 11111111

NO:20100315165921082653

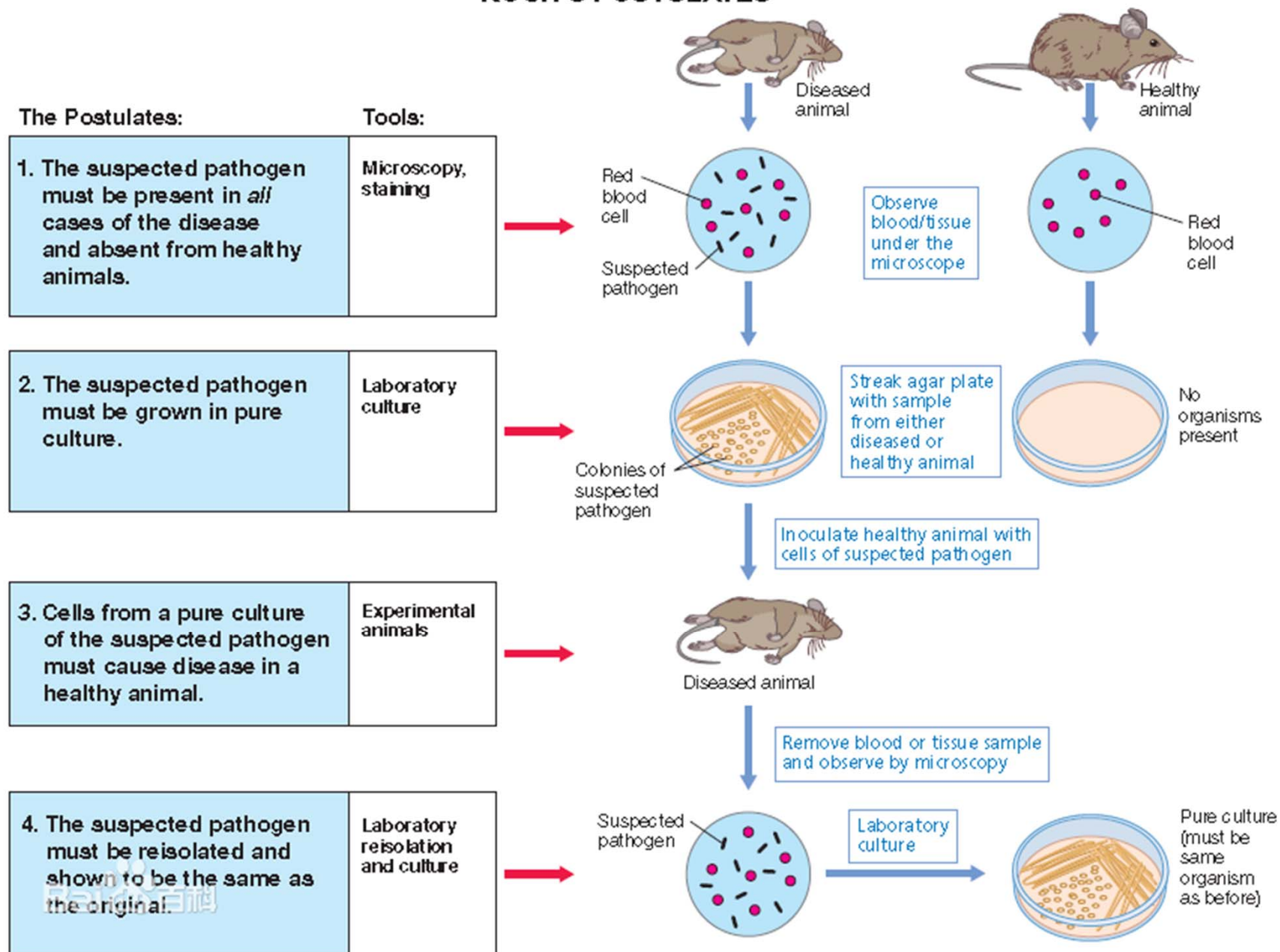
**在早期，如何确定病毒性的病原是
某种疾病的病原体呢？**

确定病毒性病原需要满足Koch定律

科赫定律6大要素：

- 能从患者中分离到病毒；
- 能在某种宿主细胞中培养；
- 病原具有滤过性；
- 在同一宿主种类或相关动物种类中能复制病毒；
- 在感染的动物体内能在分离到病毒；
- 能够检测到针对此病毒产生的特异性免疫反应；

KOCH'S POSTULATES



科赫法则的缺陷：

(1) 并不是所有的病毒感染都会产生临床症状；

1893年发现有些霍乱带原者以及伤寒等案例并无任何症状表现，未必能在不同个体产生相同表现。小儿麻痹、疱疹、艾滋病、丙型肝炎都有类似发现，甚至都认同小儿麻痹病毒只会对少数感染者造成瘫痪。

(2) 许多病毒还无法通过培养基分离培养；

病毒学发展窒碍难行。目前，已有不少疾病证实为某种病原体造成，却不能满足科赫提出的理论。



感染性疾病动物模型制备的关键*

- (1) 在感染的动物中能够分离到病毒；
- (2) 能检测到针对此病毒产生的特异性免疫反应；
- (3) 病原对动物的致病性：动物是否能被病原感染、复制、模拟出全部或部分疾病特征；



- 并不是所有的病原都可以构建动物模型。
- 有些病原没有理想的动物模型。



病原没有理想的动物模型的原因？

- ◆病原的进化表现为：共生、机体损伤（疾病）、病原不存活等情况。
- ◆病原：体外寄生感染、器官、组织内感染、细胞内感染形式不同
- ◆感染机制不同，对宿主的特异性选择不同
- ◆病毒受体进化
- ◆动物遗传构成和生物学特性与人的差异
- ◆动物敏感性问题
- ◆大量不同种类动物测试、筛选

第一节

感染性疾病模型制备原则

一、什么是感染性动物模型

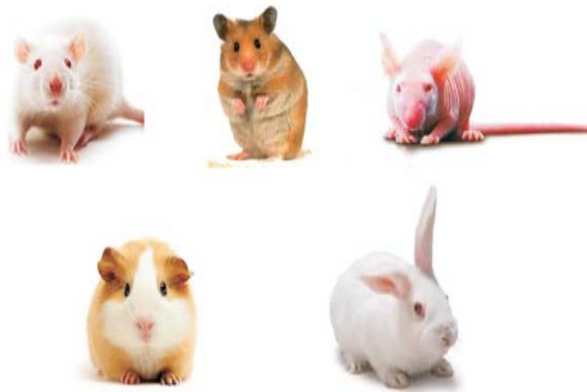
以导致感染性疾病的病原感染动物，或人工导入病原遗传物质，使动物发生与人类相同疾病、部分疾病、部分疾病改变或者机体对病原产生反应、为疾病系统研究、比较医学研究以及抗病原药物和疫苗的研制、筛选和评价提供的模型。

二.病原性动物模型的三个要素*

确切的病原

明确的动物

充分的实验室指标



三.病原性动物模型制备的原则

1.动物选择

种类

遗传分类

生物学特性

对感染性疾病的敏感性

新发感染性疾病病原不明时，可扩大到实验用动物、经济动物、野生动物。

- 实验动物:

定向培育的动物，没有人遗传状态的复杂性、环境条件完全不同、病原致病性不同。但病原敏感性较好，首选



- 经济动物:

环境条件类似人类生活环境，疾病发生模式相近，但影响因素多，标准化程度不高



- 野生动物:

最接近于自然，接触病原最多，免疫系统强，对实验影响的不确定因素多，往往带来生物安全等问题。



2.病原选择原则

活化状态的好病原

病原标准株

代表株

强势病原

活化状态

流行状态

轮状病毒标准株SA11

禽流感病毒H1N1，H5N9

采用生物学特性明确，经过鉴定的标准株进行模型感染，
以确保疾病模型保持最高的真实性。

3. 疾病再现最大化原则

制备的感染性疾病动物模型能最大程度地模拟疾病临床表现、疾病过程、病理生理学变化、免疫学反应。

“全部模拟，部分体现”



4.标准化、规范化原则

动物

病原

实验控制

操作程序

标本处理

数据采集

检测指标

结果分析

统一、规范、标准化

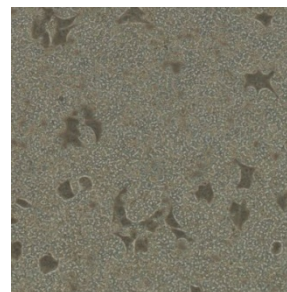
**重复性好、检测指标
稳定、利于客观公正、
真实有效、模型稳定**

5. 生物安全性原则

严格按照国家关于病原微生物相关规定进行。
实验室活动按照病原危害等级和防护要求进行。



病原污染
动物接触
污物扩散
样本采集
意外事件



四、感染性动物模型的规范化



“标尺、衡量器”
→



模型稳定成熟后的各种要素应该达到统一、规范化和标准化。

动物；病原；实验控制；操作程序；
标本处理；数据采集；检测指标；
结果分析

1. 对动物规范化要求

- 实验动物（标准化）回忆知识点
- 野生动物和经济动物（自然感染机会多，不确定因素多）
- 实验前需检测动物是否有同类病原的感染情况，选择阴性结果动物
- 动物种类，性别，年龄，体重，营养状态，健康状况尽量一致，作为规范化模型的基础数据和结果分析的依据。

2. 对病原的规范化要求

(1) “标准株” “模式株” “代表株”

轮状病毒代表株SA-11

流感病毒H5N1, H7N9

商品化的代表株：生物特性明确、来源清楚
(有权威机构的保存号)

科学研究

- ▶ 系统微生物学
- ▶ 应用微生物学
- ▶ 微生物遗传学
- ▶ 低温生物学
- ▶ 病毒感染细胞生物学

◦ **传染病病原体资源和信息平台**

信息搜索:

平台资源号(请点击)	菌株保藏编号	中文名称	属名	收藏时间
1542C0001WPV208159	GDV012	传染性造血器官坏死病毒	诺拉弹状病毒属	2008.3
1542C0001WPV208160	GDV013	出血性败血症病毒	弹状病毒属	2008.3
1542C0001WPV208161	GDV014	牛白血病病毒	肿瘤病毒亚科	2008.3
1542C0001WPV208162	GDV015	柯萨奇病毒B-3型	肠道病毒属	2009.9
1542C0001WPV208163	GDV016	人疱疹病毒1型	单纯疱疹病毒属	2009.9
1542C0001WPV208164	GDV017	人疱疹病毒2型	单纯疱疹病毒属	2009.9
1542C0001WPV208165	GDV018	麻疹病毒	麻疹病毒属	2009.9
1542C0001WPV208166	GDV019	风疹病毒	风疹病毒属	2009.9
1542C0001WPV208167	GDV020	腮腺炎病毒	腮腺炎病毒属	2009.9
1542C0001WPV208168	GDV022	甲型流感病毒	甲、乙型流感病毒属	2009.9
1542C0001WPV208169	GDV024	乙型肝炎病毒	正嗜肝DNA病毒属	2009.9

1542C0001WPV208196	GDV096	小鼠白血病病毒	肿瘤病毒亚科	2009.9
1542C0001WPV208197	GDV099	人腺病毒	哺乳动物腺病毒属	2009.9
1542C0001WPV208198	GDV100	柯萨奇病毒	肠道病毒属	2010.12
1542C0001WPV208199	GDV101	柯萨奇病毒	肠道病毒属	2009.12
1542C0001WPV208200	GDV102	人肠道病毒	肠道病毒属	2010.9
1542C0001WPV208201	GDV103	人肠道病毒	肠道病毒属	2010.11
1542C0001WPV208202	GDV104	流感病毒	流感病毒属(群)	2009.5
1542C0001WPV208203	GDV105	流感病毒	流感病毒属(群)	2010.8
1542C0001WPV208204	GDV106	流感病毒	流感病毒属(群)	2010.9
1542C0001WPV208205	GDV107	流感病毒	流感病毒属(群)	2009.5
1542C0001WPV208206	GDV108	流感病毒	流感病毒属(群)	2009.9
1542C0001WPV208207	GDV109	流感病毒	流感病毒属(群)	2009.9
1542C0001WPV208208	GDV110	流感病毒	流感病毒属(群)	2009.4

(2) 模型制备使用的病原致病性与活化状态密切相关

- 大量制备同批次的病原，进行小包装储存，保证不同时间制备的模型动物具有致病性的一致性。
- 例如：病毒培养的细胞，同一起来源，培养代数一致，病毒感染量一致



3. 研究过程规范化

- 疾病观察
- 检测指标
- 检测时间点：覆盖整个疾病过程
- 病原检测方法：空斑法、免疫荧光等
- 免疫反应检测方法
- 对照(阴性对照、空白对照)
- 感染方式相同
- 感染剂量一致性：少量多次

4. 传播途径研究规范化要求

- 严格按照单一途径感染，满足感染动物基本要求，避免交叉途径感染。



5. 感染剂量规范化要求

- 标准计量方法测定病原的剂量

如：病毒性病原体：TCID₅₀ ; PFU/ml

细菌：菌数

病原体的稀释倍数？

6. 动物模型临床研究规范化要求

- 表征观察、体征测定
- 设计评判标准：
- 动物精神状态
- 客观评价分值0-10分
- 发热指标

eg: 粪便样本形态观察，腹泻分值

表1 粪便状况评分标准

腹泻程度	粪便外观描述	评分
正常	条状或粒状	0
轻度	软便，能成形	1
中度	糊状粪水无分离现象，稀便	2
重度	液体，不成形，粪水分离，粘液便或脓便	3

7. 感染病原学规范化要求

(1) 病原来源

- 来自于患者或者动物的哪个部位

(2) 检测指标：检测方法规范而全面，能够检测到“活”的病毒。

- eg: 经过细胞培养证实病毒存活（不是存在，核酸）、体内复制，通过免疫荧光和TCID50检测病毒滴度。

8. 感染性疾病免疫学规范要求

- 动物感染病原后进行免疫学检测，动物模型成功的关键：感染动物中必须能够检测到活性病原和诱导的特异性免疫抗体，能够使动物产生免疫应答。
- 检测方法：ELISA、IFA等
- 检测到抗体是否能证明病原体已经感染了动物体？
- NO，排除经过体内途径的抗原免疫作用引起的免疫反应。

9. 感染性疾病的病理生理学规范化

- 特征性的病理改变：器官、组织、细胞，是否引起炎性细胞，包涵体，坏死，细胞病变
- 缺乏特征性的病理改变：一般性出血，炎性细胞浸润等（不成功）
- 感染性模型的成功：免疫组化、原位杂交等方法证实病原的组织定位。

10. 药物和疫苗研究的规范化要求

- 药物和疫苗的评价：成功的动物模型；
- 药物实验：体内实验：动物实验
- 体外实验：细胞
- 感染对照模型（疾病对照模型）
- 药物和疫苗通过什么机制发挥作用？
- 机体和病原在药物、疫苗的作用下，各自发生了哪些变化？这些变化对机体和病原产生了怎样的影响？

五、感染性模型的局限性

人源性病原体感染动物，与人的病程不完全相同。研究结果需要进行慎重的对比研究在外推到人类。

1. 动物种类和等级限制

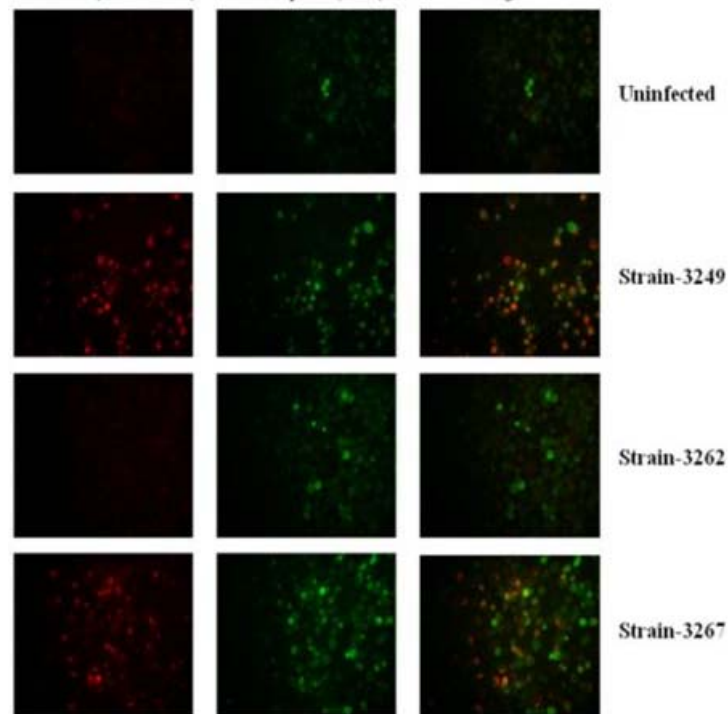
- 不同的遗传和生物学特性对病原体的感染性表现不同，不同种属和品种品系的动物个体差异影响模型一致性。



可感染小鼠、大鼠、猕猴、食蟹猴、雪貂等，但是致病性在不同动物中有差异，国外推荐采用雪貂，疾病过程与患者相似，但是雪貂在我国尚未实验动物化，来源困难。

2.病原的生物学特性、来源等影响

- 标准株，地方毒株的毒力差异
- 病原培养条件、活性程度、微生物污染等影响



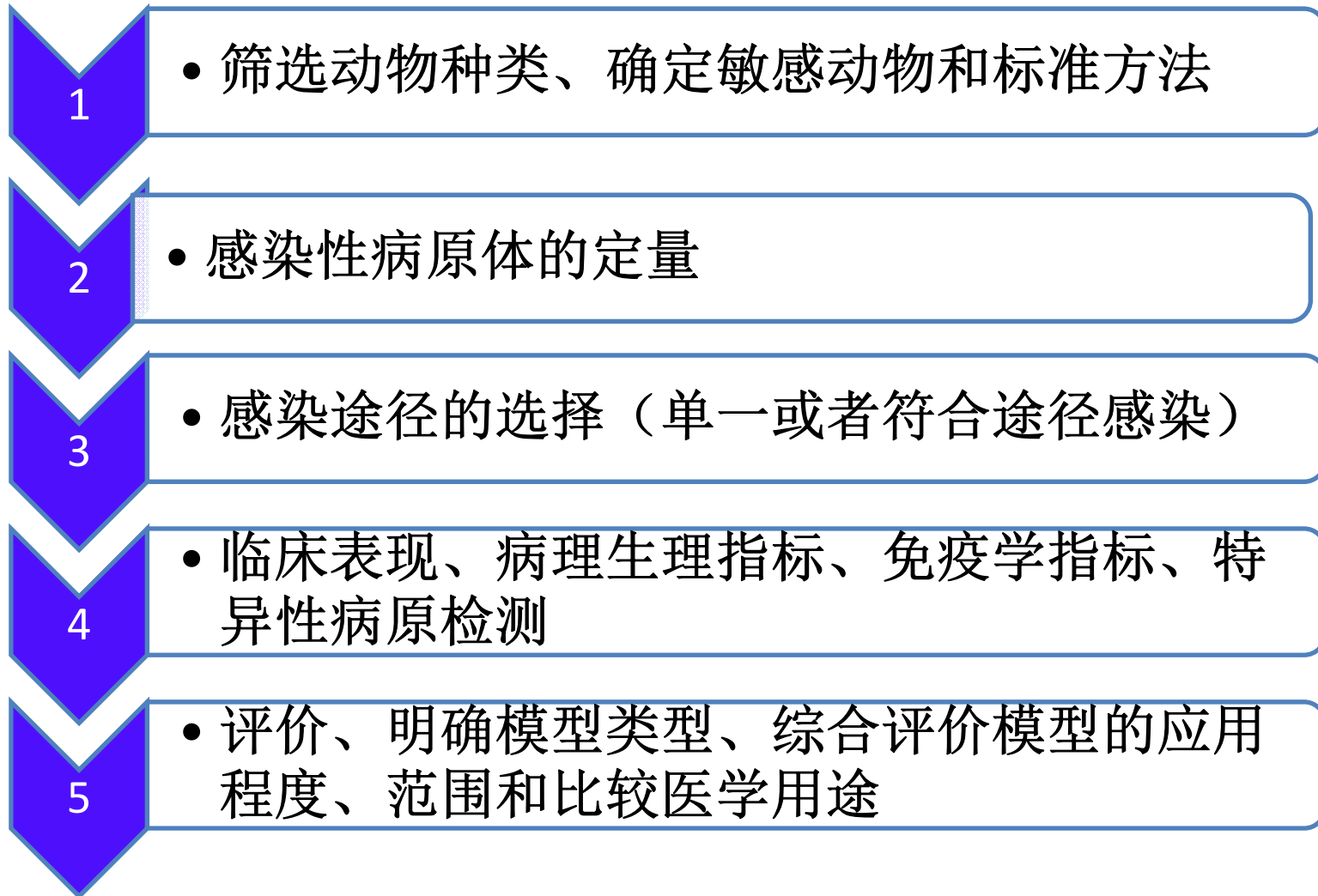
3. 方法学影响

- 感染途径不同病原毒力有差异
- 有些实验室毒株和自然感染的野毒株存在差异。
- 生物安全要求的实验室条件和普通实验室条件毒力也存在差异
- HIV灵长类模型安全级三级实验室不会出现后期严重的复合感染情况。

4.动物和人体存在差异

- 病原在不同机体的表现不同。
- 人类在遗传背景、生理基础、生活环境与动物都有区别。
- 尽量选择进化树与人类相近的动物

六、感染动物模型的制备步骤、方法*



案例分析1：消化系统模型 轮状病毒乳鼠模型建立与评价



轮状病毒 (Rotavirus, RV)

- 导致 5 岁以下婴幼儿急性腹泻和死亡的重要病原；
- 占儿科肠道感染病因的 50% 以上。
- 是引起婴幼儿腹泻的最主要病原，同时也可引起肠外脏器损害，致病率及病死率均较高；
- 但目前对其发病机制仍未完全清楚，也未能研制出很满意的疫苗；

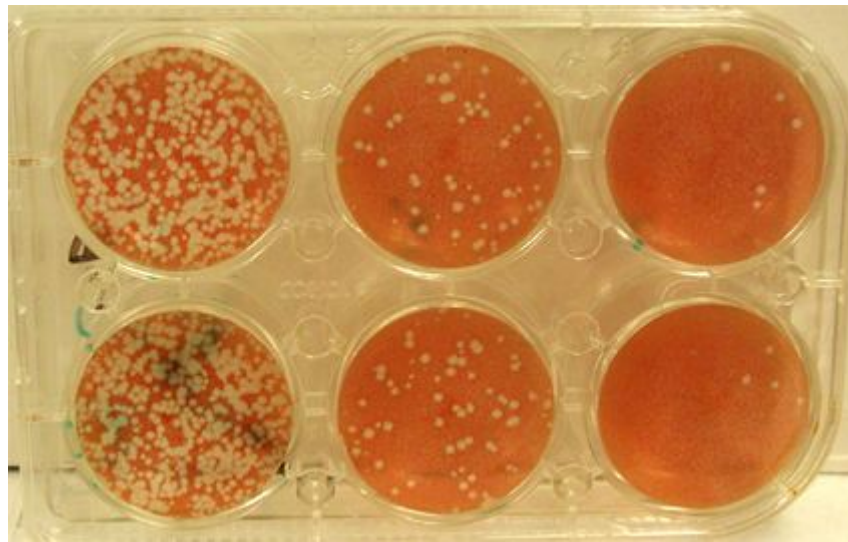
研究目标

建立 RV 感染的乳鼠动物模型，利用动物模型研究轮状病毒腹泻及肠外脏器损伤发病机制，为RV 疫苗研制及更好地防治 RV 感染提供理论依据。

模型构建方法

1.病毒

- 以恒河猴胚肾细胞（MA-104）培养猴 RV SA-11，扩增，空斑实验确定病毒滴度。



2.实验动物与分组

- 用生后7 天清洁级昆明乳鼠；雌雄不拒。26 只乳鼠随机分为实验组和对照组，每组 13 只，两组乳鼠分别与母鼠同养并正常哺乳。
- 实验组每只乳鼠经口接种 0.1 ml 病毒培养细胞冻融液（RV 含量为 3.75×10^7 PFU/ml），而对照组每只乳鼠经口接种0.1 ml 正常无病毒对照培养细胞冻融液。



3. 观察指标

- ① 感染后 1~7 天，逐日观察
- ② 乳鼠活动状态、进食情况及皮毛光泽改变。
- ③ 逐日测量乳鼠体重。
- ④ 逐日记录腹泻严重程度按大便性状评分而定

4. 模型小鼠感染病毒检测

- ① 乳鼠大便中 RV 抗原检测
- ② 空斑实验滴定大便中 RV 滴度
- ③ 肠道组织显微组织病变观察

腹泻评分方法:

- ① 没有收集到大便不计分,
 - ② 棕色成形大便 1 分,
 - ③ 棕色软大便 2 分,
 - ④ 黄色软大便 3 分,
 - ⑤ 黄色水样便 4 分,
 - ⑥ ≥ 2 分表示有腹泻, 分值越高则腹泻越重。
- 每天每只乳鼠定时检查大便 1 次, 记录实验组和对照组每只乳鼠大便得分, 每组总分数除以该组所收集到的大便份数, 所得的值代表该组乳鼠当天平均腹泻严重程度, 该值越大表明该组乳鼠当日腹泻越严重。
 - 腹泻百分数: 每天腹泻乳鼠只数占该组乳鼠总数百分比

实验结果

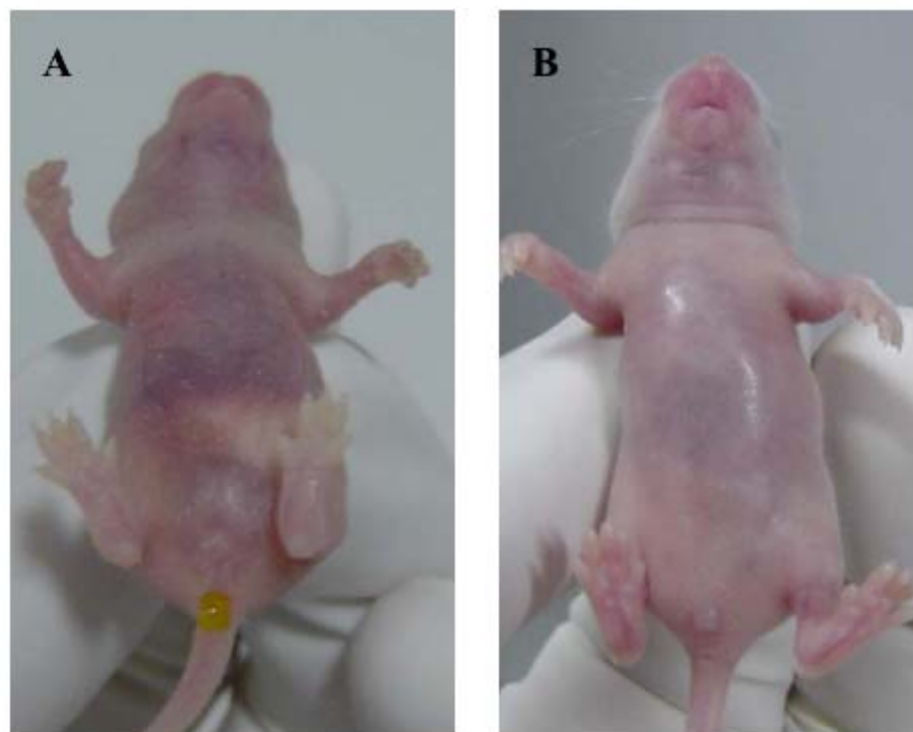
1. 病毒接种后乳鼠反应

实验组乳鼠均出现不同程度的腹泻，且活动减少，皮毛光泽差，哺乳情况尚可，有的乳鼠可见腹胀，肛周有大便污染痕迹，对照组乳鼠较接种前无改变。



A: 棕色成形大便 (1分) **B:** 棕色软大便 (2分) **C:** 黄色软大便 (3分) **D:** 黄色稀水样便 (4分) **E:** 肛周粪便污染 (4分) **F:** 未见大便排除 (0分)

图 1-3 乳鼠腹泻记分参考



A: 实验组 B: 对照组

图 1-4 RV 感染后乳鼠状态

A: EG B: CG

2. 体重动态变化

- RV 感染后 0~7 天实验组乳鼠体重与对照组相比，虽然体重增长有一定程度落后，但统计分析表明，各时间点实验组和对照组之间体重差别无统计学意义（P 值均 > 0.05 ）。

表格 1-1 RV 感染后乳鼠体重变化 ($\bar{X} \pm S$ g)

Table 1-1 The weight changes of sucking mice post inoculation ($\bar{X} \pm S$ g)

Group	Days post inoculation							
	0	1	2	3	4	5	6	7
EG (n=13)	5.21±0.59	5.67±0.83	6.04±0.97	6.50±0.96	6.88±0.79	7.23±0.55	7.48±0.40	7.78±0.33
CG (n=13)	5.25±0.57	5.78±0.80	6.25±1.01	6.69±1.03	6.97±1.00	7.35±1.10	7.6±1.03	7.81±0.89

各时间点实验组和对照组体重比较无统计学意义 ($P > 0.05$)

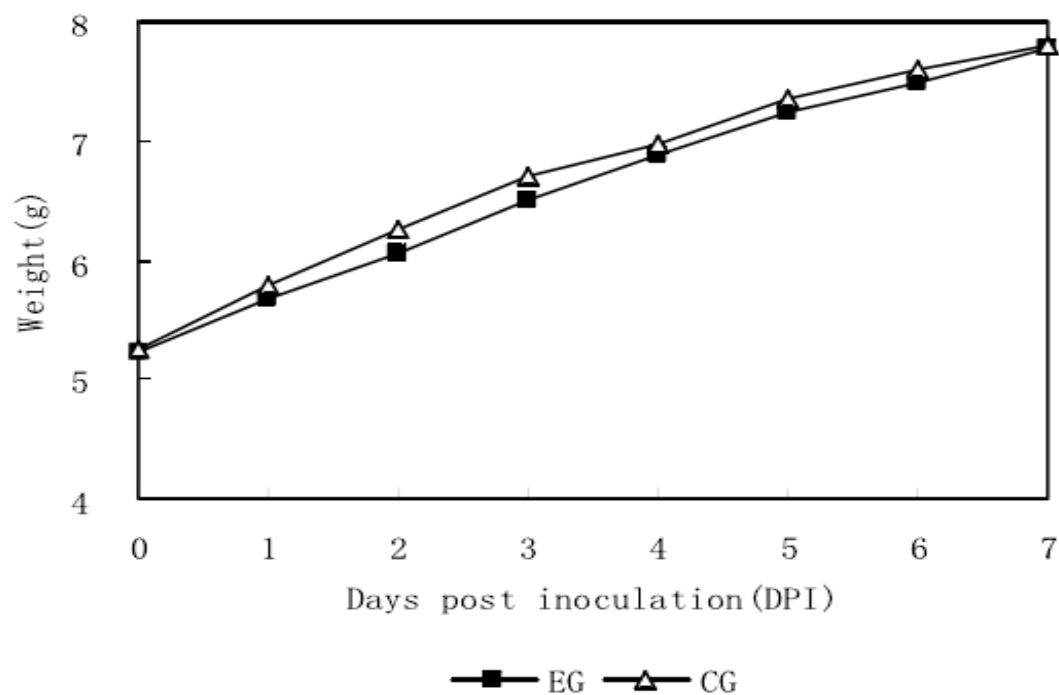


图 1-5 RV 感染后乳鼠体重动态变化

3.腹泻情况

- ① 接种 RV 后乳鼠腹泻潜伏期为 1~5 天，持续时间为 1~5 天。
- ② 1~7 DPI 平均腹泻严重程度及腹泻百分数，3~4 DPI 为腹泻高峰期，5~6 DPI 腹泻好转，个别乳鼠腹泻有反复，此后减轻，至第 8 天所有乳鼠均无腹泻。
- ③ 对照组所有乳鼠均无腹泻表现。

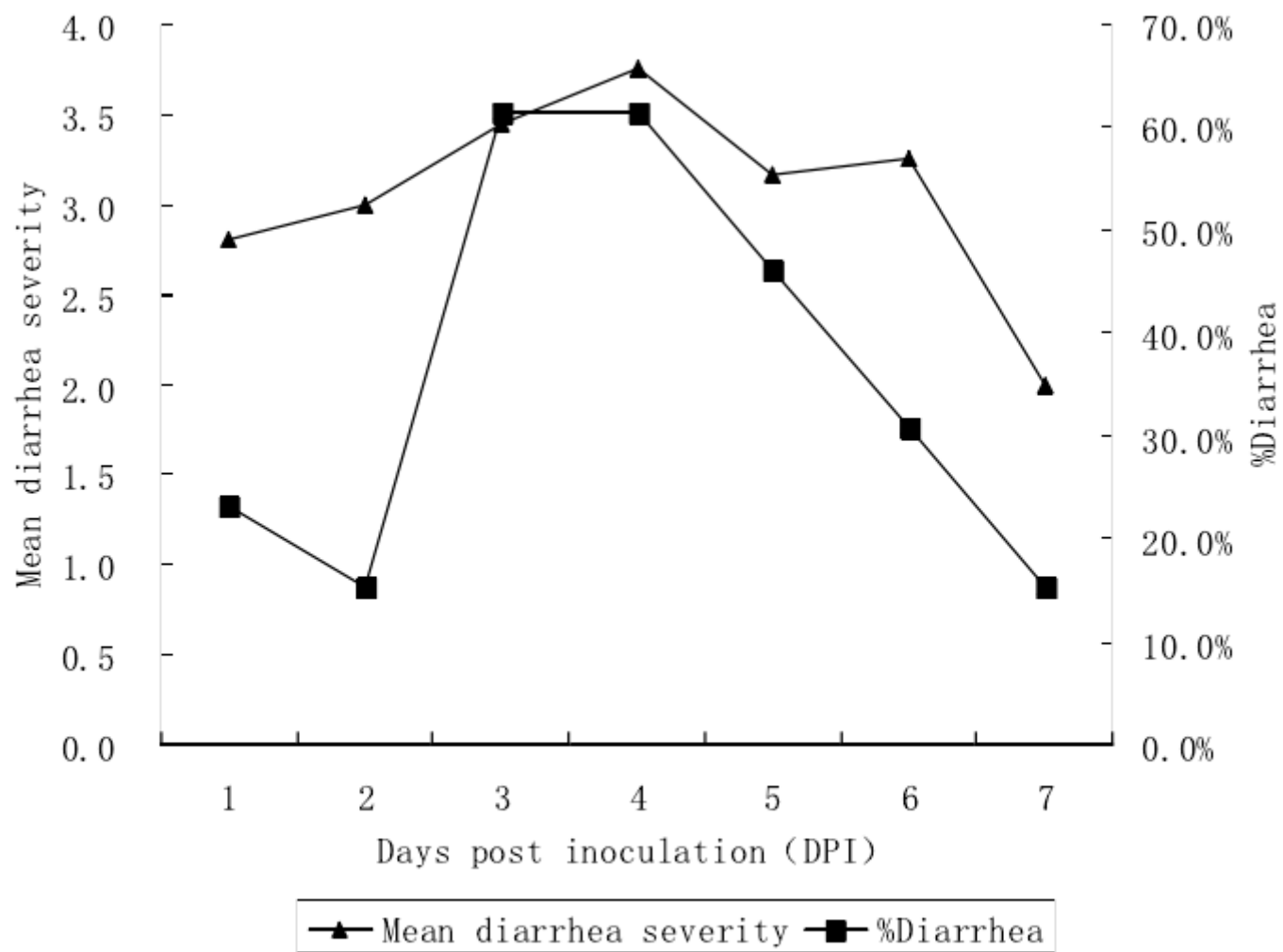


图 1-6 RV 感染后乳鼠平均腹泻严重程度及腹泻百分数

4. ELISA 检测大便中 RV 抗原

- 实验组乳鼠 1~7 DPI 所收集的大便中 RV 抗原均呈阳性。对照组全为阴性。

5. 空斑实验测定粪便中 RV 滴度

- 实验组 1~7 DPI 大便 RV 滴定结果依次为 3.75×10^3 、 6.25×10^3 、 1.25×10^4 、 5.00×10^4 、 6.25×10^3 、 8.75×10^3 、 8.75×10^2 PFU/ml，如图 1-7 所示，排毒情况与腹泻情况明显相关（ $R^2 = 0.9458$ ， $P < 0.05$ ）。

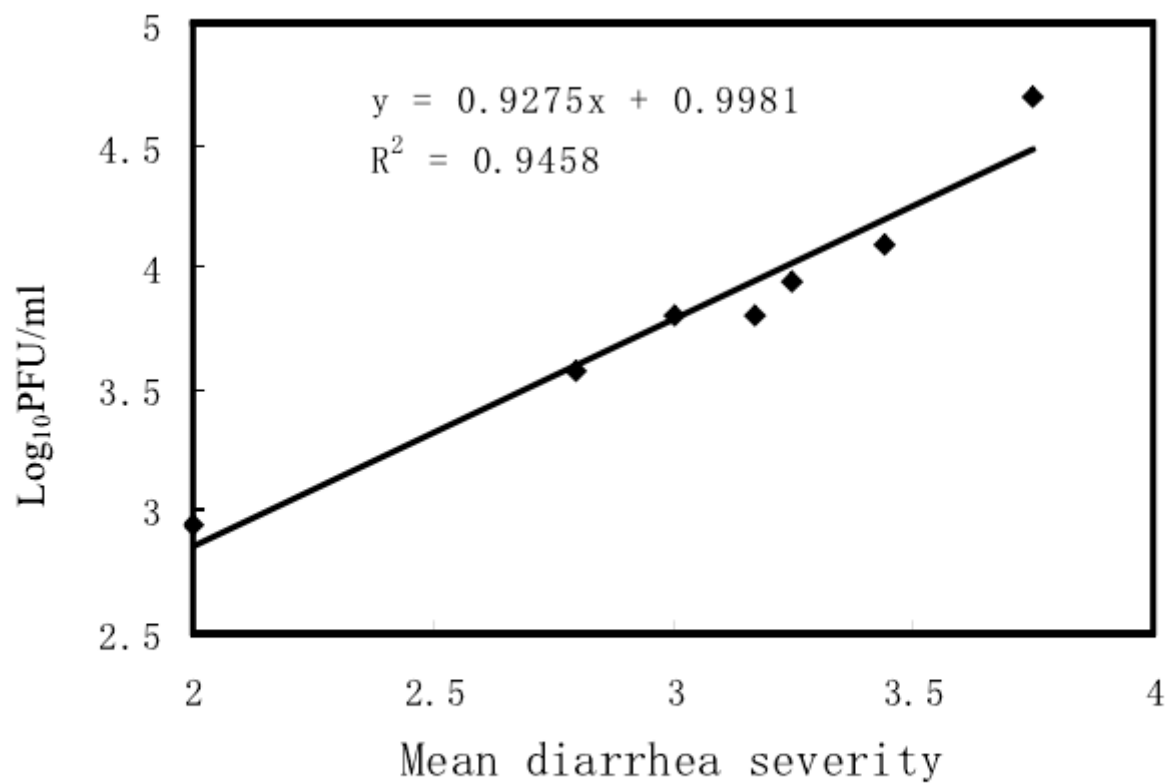


图 1-7 乳鼠平均腹泻严重程度与大便病毒滴度相关性



A: 实验组, × 250 B: 对照组, × 250。

图 1-1 RV SA-11 致 MA-104 细胞病变效应

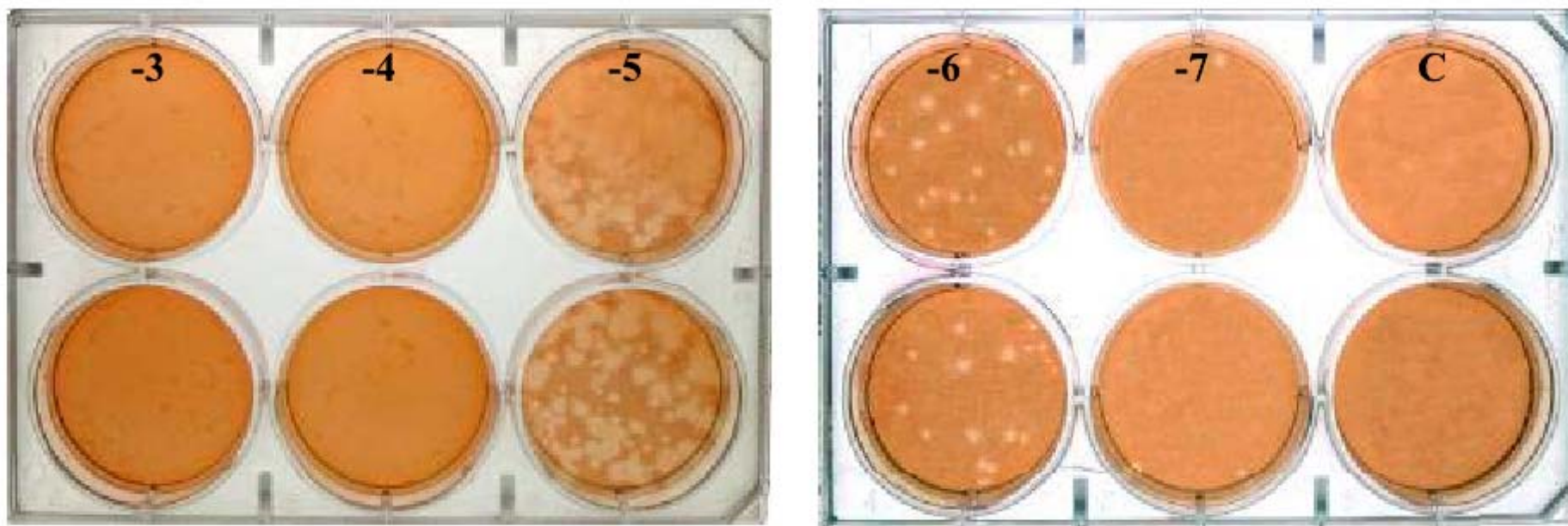
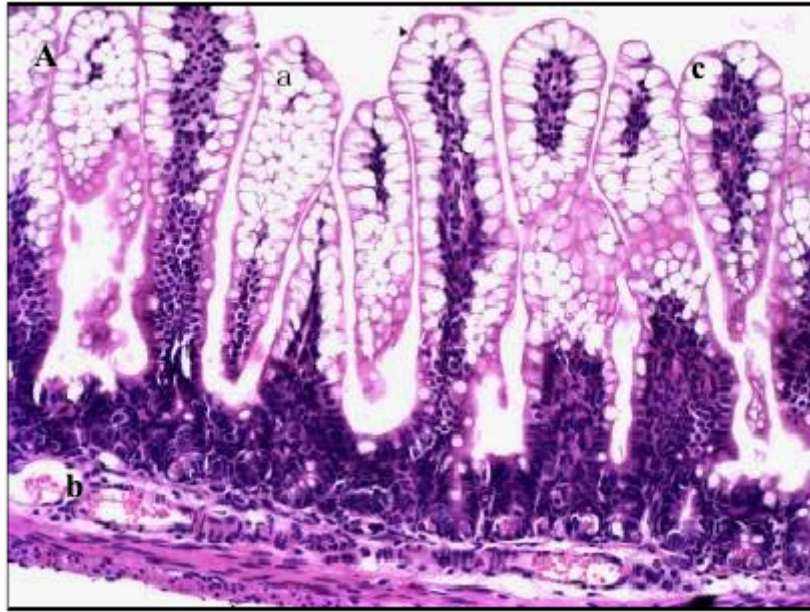


图 1-2 空斑试验



A: 实验组 B: 对照组

(a) 绒毛空泡变性 (b) 肠壁充血水肿 (c) 上皮完整性破坏

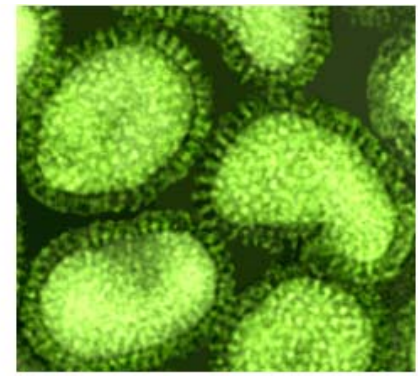
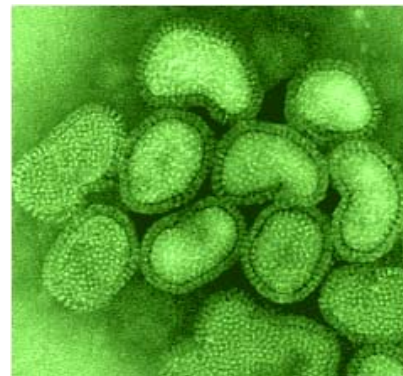
图 2-1 3 DPI 乳鼠空肠形态学改变 (光镜) (HE × 200)

A: EG B: CG

结论

RV 感染昆明乳鼠动物模型建立成功。

案例分析2:
呼吸系统疾病模型
甲型流感病毒动物模型建立与评价



流行性感冒病毒

(influenza virus)

有包膜，单链分段RNA病毒

简称**流感病毒**，有甲、乙、丙三型，其中，甲型流感病毒是反复流行最为频繁和引起流感全球流行的重要病原体。

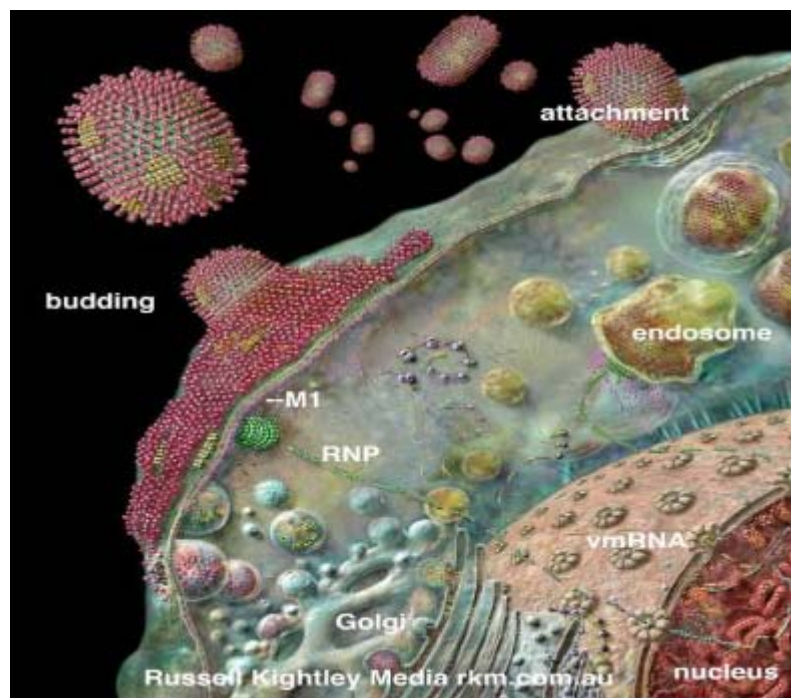
致病性：传染源-----病人或病毒携带者
致病机理----病毒不入血

病毒-----呼吸道-----毒素样物质进入血液

局部粘膜上皮炎症

全身中毒症状

- ① 吸附：通过血凝素吸附
- ② 穿入：包膜-细胞膜融合
- ③ RNA合成（转录）：单负股RNA为模板，合成单正股RNA
- ④ 蛋白质合成：以单正股RNA为模板，合成蛋白质
- ⑤ 成熟释放：核衣壳成为成熟的病毒颗粒



流感病毒分型

- 根据流感病毒的核蛋白(Nucleoprotein, NP)和膜蛋白I(Matrix1,MI)抗原性的不同,流感病毒分为A、B、C和D四型,其中A型流感病毒又根据病毒表面蛋白血凝素(Hemagglutinin,HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase,NA)的不同分为18种HA亚型和11种NA亚型。
- **A型流感病毒：人、哺乳动物、禽类**
- B型流感病毒：人、海豹
- C型流感病毒：人、猪
- D型流感病毒：牛、猪（新发）

A型流感病毒概述

- 1997年香港H5N1亚型高致病性禽流感事件
- 2009年甲型H1N1流感大流行,
- 2013年H7N9亚型禽流感感染人的事件。

A型流感病毒对公共卫生安全构成严重威胁。开展A型流感病毒哺乳动物致病性分子基础的研究可为及时发现新出现的高致病性流感病毒提供分子标记,增强对流感病毒的监测能为,同时还可提升对流感病毒的认识。

A型流感小鼠模型的优势

目前最常用的流感病毒哺乳动物致病性分子基础研究模型是小鼠。

- 小鼠并非流感病毒的自然宿主,但在实验条件下,多种亚型流感病毒均可感染小鼠。
- 病毒能在小鼠肺脏等器官内复制。
- 病毒可通过鼠肺连续传代,获得致病性差异明显的模式病毒。
 - ◆ 鼻内接种后,肺脏内病毒复制
 - ◆ H1N1, H3N2, H5N1, H7N7, H7N9, H9N2均成功在小鼠中复制
- 容易操作、价格低、遗传背景清晰、对多种亚型流感病毒表现出易感性和适于作为研究流感病毒哺乳动物致病机理的动物模型
- 流感病毒小鼠感染模型在抗流感药物和流感疫苗的研发方面也发挥了重要作用。

为什么小鼠在实验条件下对人、禽流感病毒都比较易感？



给我 答案



- ① 近交系和杂交系小鼠的呼吸道都表达 $\alpha(2,3)$ 交联唾液酸受体和 $\alpha(2,6)$ 交联唾液酸受体这两种唾液酸受体;但数量并不相同,其中 $\alpha(2,3)$ 交联唾液酸受体占有优势,
- ② 小鼠的品系不同,其唾液酸受体的分布也略有差别
 - BALB/C小鼠的大部分器官(气管、肺、小脑、脾、肝和肾)都表达 $\alpha(2,3)$ 交联唾液酸受体和 $\alpha(2,6)$ 交联唾液酸受体
 - C57BL/6J小鼠的肺泡上皮口型细胞上则只表达 $\alpha(2,3)$ 交联唾液酸受体
 - $\alpha(2,6)$ 交联唾液酸受体结合偏嗜性的人流感病毒一般要经过在小鼠体内的适应性传代才能获得在小鼠体内进行高效复制的能力。

A型流感小鼠模型的缺点

- ① 不同毒株在小鼠的体内的致病性有高有低。
- ② 但无论是流感病毒野毒株还是流感病毒鼠适应株几乎均不能在小鼠间进行有效的水平传播。
- ③ 小鼠并非流感的天然宿主、缺少人流感病毒的临床症状 (例如, 小鼠感染多数流感病毒株后往往表现出体温过低而非发热症状)、很难通过接触或非接触的方式在小鼠间进行有效地传播及病毒对小鼠的致病性和在小鼠体内复制的能力与小鼠的品系有关。

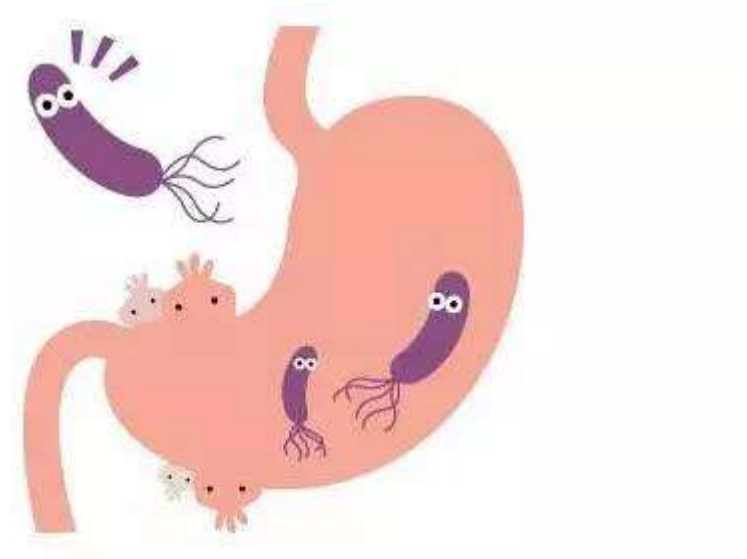
实验设计及思路

- ① 2009年甲型H1N1流感病毒鼠适应株UI182
- ② MDCK细胞上进行病毒扩增
- ③ 鸡胚半数致死量/小鼠半数致死量实验
- ④ 滴鼻感染小鼠
- ⑤ 小鼠发病率、死亡率、组织特异性检测
- ⑥ 肺脏、鼻甲骨、脑、肠、肝脏、脏脏和肾脏病毒滴度检测
- ⑦ 病毒在动物体内复制动力学实验
- ⑧ 模型动物分离到的病毒在细胞上的动力学实验

案例分析3

幽门螺旋杆菌国内流行株动物模型

建立



幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*, HP)

在胃炎、胃溃疡、胃癌等疾病中的治病机制
研究主要方式是建立动物感染HP模型，模拟在人体内的致病机制。



毒株

- 1997年Lee等人从临床分离出幽口螺杆菌悉尼株SS1，此菌株能有效的定植在实验动物胃中，并成功的在实验动物胃中产生慢性炎症，萎缩性胃炎，肠上皮化生及不典型增生等病理变化。
- 现在**SS1菌株作为国际标准株**，被广泛的应用到动物建模中。

动物选择

- 用来建立幽门螺旋杆菌感染模型的动物种类有很多,如沙鼠、小鼠、大鼠、豚鼠、猫、无菌猪、恒河猴等,其中一些动物因价格贵、饲养条件高等原因限制其在试验中的广泛应用。
- 目前蒙古沙鼠和小鼠较为常用。其中,蒙古沙鼠的Hp感染模型能较好复制人类的胃中的行为模式,但是蒙古沙鼠化有价格相对较高,饲养方法较复杂。

小鼠HP模型

- 最易建立并且容易饲养的动物模型为小鼠,尤其是C57BI76及FVB小鼠,能够感染不同种类的Hp。
- BALB/C小鼠虽然负前菌量和C57BL/6差不多,但是其感染后主要产生辅助性T细胞,对上皮的损伤较小。
- 现阶段**SS1株感染的C57BI76小鼠已经成为标准的HP动物模型。**

HP动物模型研究现状

- 在国内,感染相关的动物模型的建立仍处于初级阶段,建模成功率较低,动物模型多为SS1菌株感染C57BL/6小鼠或者BALB/C小鼠
- 不同的菌株对于不同的宿主也会有不同的致病性,我国致病性较强的菌株为vacAS1、cagA、iceA1阳性的菌株。
- 若能建立一个我国流行菌株的标准动物模型,对于我国Hp相关消化道疾病的研究能够建立一个更好的研究平台。

实验目的

- HP阳性菌株为致病菌
- 选用无特殊病原体 (SPF) 的C57BIV6小鼠为研究对象, 来建立国内幽口螺杆菌流行株的动物模型, 为进一步研究致病机制、药物治疗、疫苗研究提供更好的动物模型和研究平台。

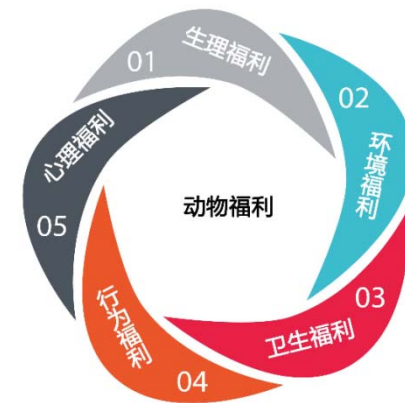
实验材料-----菌株

- 幽口螺杆菌临床分离株六株,标记为标本1-6,分别取自浙江境内各地的慢性胃炎、胃溃疡、胃癌、十二指肠溃疡等患者的胃黏膜标本;胃镜下取胃黏膜标本1-2块
- 先对临床分离的六株幽口螺杆菌行基因组检查,确认vacA⁺、cagA⁺、iceA⁺阳性的致病株,并进行培养扩增。

实验材料：实验动物

- 实验用SPF级C57BL/C小鼠, 6周龄, 体质量18-22g, 均雄性, 自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 生产许可证号: SCXK(沪)2012-0002
- 取60只SPF级C57BL/6小鼠, 随机分为对照组, 模型组, 每组30只。
- 对照组正常饲养, 模型组经口灌服vacAS1、cagA、iceA1阳性的Hp临床分离株, 每周一次, 连续灌服5周, 距末次灌胃后5w, 10w, 15w, 20w, 25w, 30w分6批处死小鼠, 每批次5只。

- 实验动物给予每笼六只, 随化分配, 笼其2周一次更换, 包括饮水和灭菌木屑垫料, 不锈钢食盘每周更换一次。实验室条件符合国家(GB14925-2001)标准, 保持室温保持在21-25° C, 相对湿度40-60%, 12小时光照和12小时暗室循环, 噪音小于60分贝。动物福利遵从动物福利法案, 遵守实验动物的使用及关怀指导原则。
- 实验过程接受动物管理会的监督。饲料为浙江省实验动物中记提供的育成实验动物配合的, 已经经过高温高压消毒的饲料, 饮水为高温灭菌后的纯净水



研究方法及步骤

1. *H.pylori*菌株

- 菌株的培养
- HP的鉴定
- 菌液制备：细菌浓度为 10^8 CFU/mL,用PBS将细菌浓度调至 10^9 CFU/mL备用。

2.实验前预处理:

- 两组小鼠灌胃前12小时禁食禁水后,对照组仅喂1ml的PBS,模型组喂1ml含HP的PBS,接种后禁食4小时。
- 每周灌胃一次,连续灌胃5周。其余时间正常进食饮水

3.实验动物的处理:

- 距末次灌服幽口螺杆菌菌液后5,10,15, 20, 25,30wk分化分批各处死5只小鼠。处死前禁食12小时,小鼠先给予眼球摘除取血,再颈椎脱臼处死。
- 处死后四肢固定,正中开腹取出全胃,沿大弯切开,暴露胃黏膜,生理盐水冲洗干净。
- 先肉眼观察小鼠胃粘膜大体特征,然后分离出胃黏膜组织,分成两部分,一部分组织行尿素酶试验,另一部分组织用大头针铺平固定在事先准备好的泡沫小片上,福尔马林常规固定,石蜡包埋。

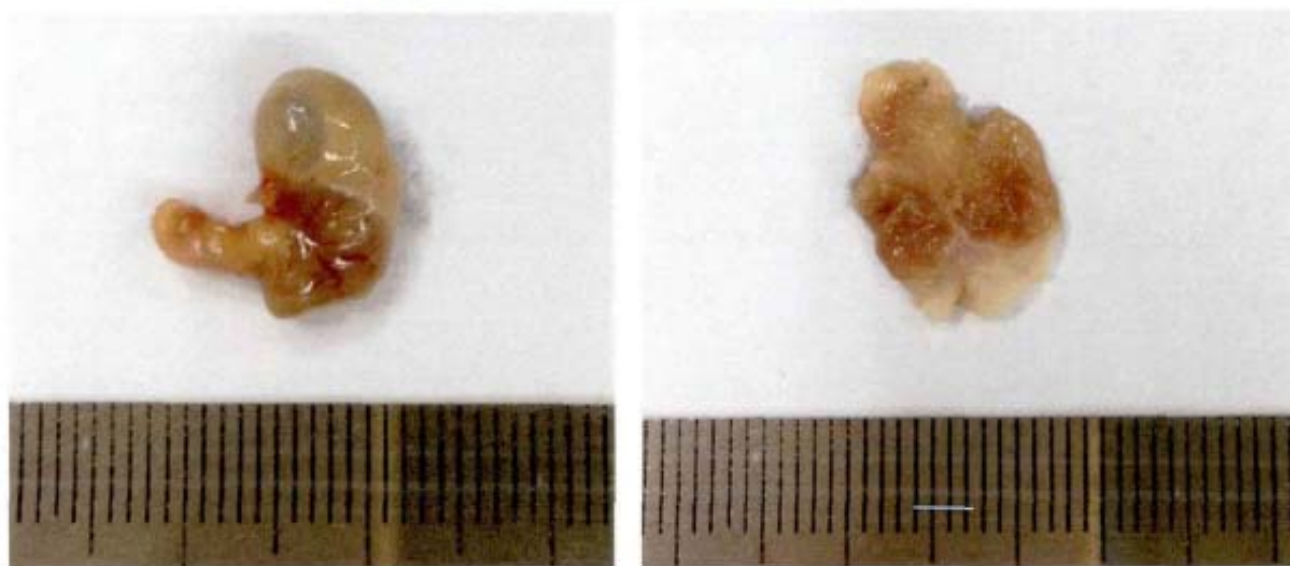


图 2 实验照，依次为：小鼠处死、小鼠胃十二指肠大体、胃十二指肠切开

4.病理标本的制作:

石蜡包埋后连续垂直切片，60°C 烤片 2 小时。HE 染色，组织切片经脱蜡和梯度酒精处理脱水，苏木素染色液中染色，盐酸酒精分色，冲洗后伊红染色 5 分钟，常规脱水、透明、封片，胞核染成蓝色，胞质和 Hp 染成淡红色。Giemsa 染色，石蜡切片入二甲苯中脱蜡，各级酒精梯度脱水，2%Giemsa 染色液中染色 30 分钟，100%乙醇脱水，二甲苯透明、封片，Hp 菌体为深蓝色。（HE 和 Giemsa 染色的试剂由浙江大学附属邵逸夫医院病理科提供）。详见图 3

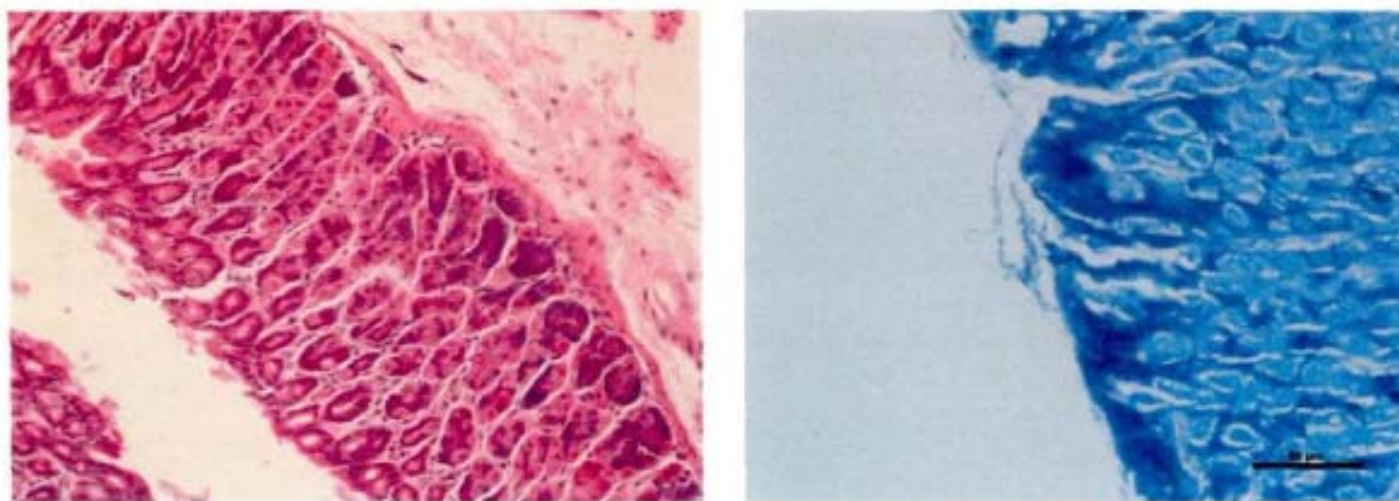


图 3 HE 染色（左）和 Giemsa 染色（右）

5.Hp 定植判断标准^[9]: 高倍镜下观察 10 个视野胃小凹的 Hp 定植情况, 以定植量的多少进行计分: 0=无 Hp 定植; 1=胃小凹有 1-2 条 Hp, 但不是每个胃小凹都有细菌存在; 2=多数胃小凹有 3-10 条 Hp; 3=几乎所有的胃小凹均有成堆的 Hp。实验动物幽门螺杆菌的检测以尿素酶试验和 Giemsa 染色均阳性者为幽门螺杆菌阳性感染。

6.病理改变判断标准 由两名不知菌株背景, 具有高级职称的病理科医师分别盲法读片, 慢性胃炎观察内容包括 5 项组织学变化和 4 个分级。5 项组织学变化包括 Hp 感染、慢性炎症(单个核细胞浸润)、活动性(中性粒细胞浸润)、萎缩(固有腺体减少)、肠化生(肠上皮化生)。4 级包括 0 提示无,+提示轻度,++提示中度,+++ 提示重度。根据慢性炎症细胞密集程度和浸润深度分级确定慢性炎症程度, 具体病理改变按我国慢性胃炎病理诊断标准^{[24][25]}。

实验结果

表 3 HP 感染 C57BL/6 小鼠不同时间定植率及胃黏膜病理组织学改变

时间 (周)	定植率 (%)	非萎缩性炎 症 (%)	萎缩性炎 症 (%)	肠化 (%)	异型增生 (%)	胃癌 (%)
5	60	100	0	0	0	0
10	80	100	0	0	0	0
15	100	100	0	0	0	0
20	100	100	40	0	0	0
25	100	100	60	0	0	0
30	100	100	60	0	0	0

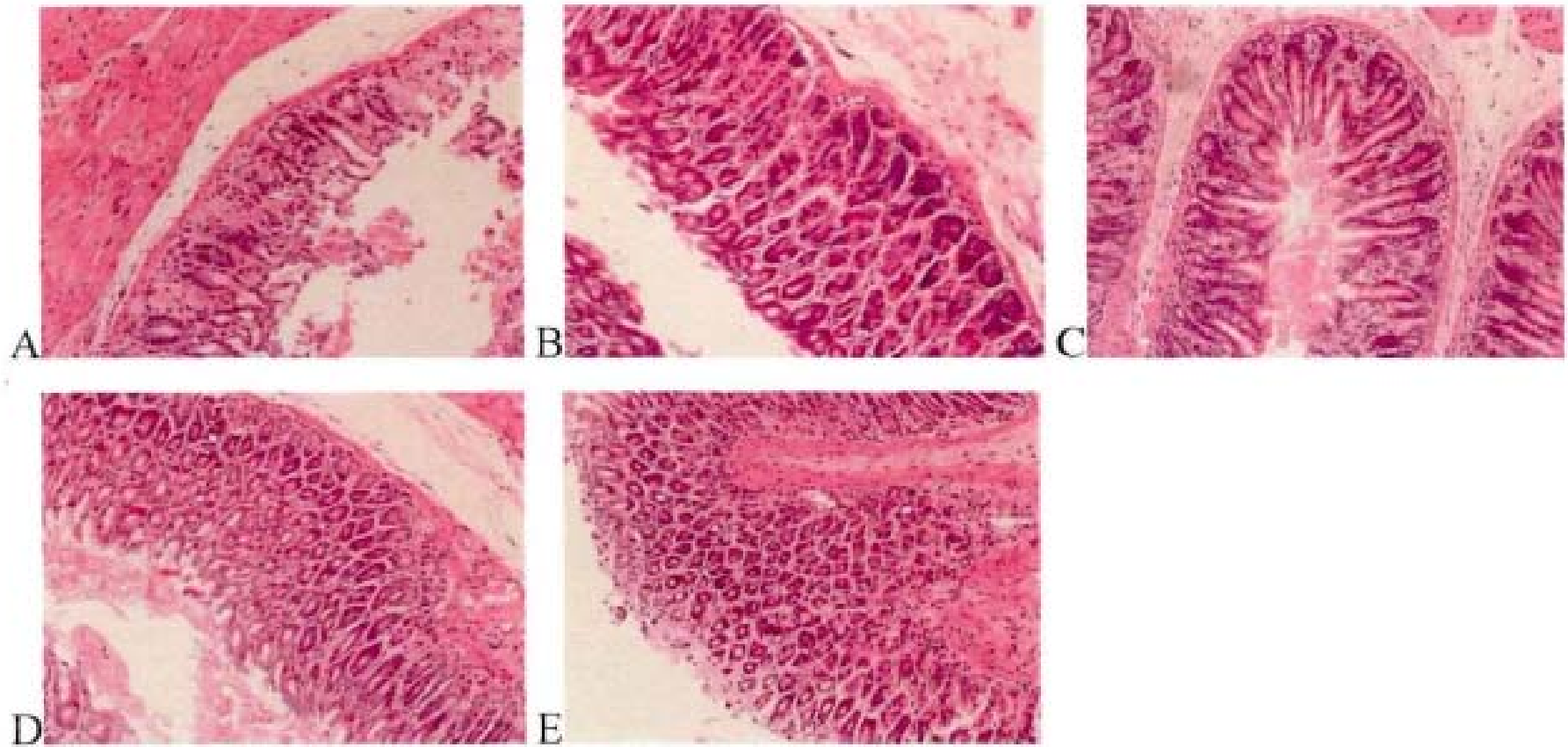


图 4 典型病理图片展示：A 正常 B HP 感染 C 轻度炎症 D 中度炎症 E 萎缩

讨论

- ◆ 对致病机制研究主要是建立其自身的动物模型，能够模拟人体相关疾病的发生、发展及转归,并通过模型了解微生物的致病机理,对药物的疗效、抗原的免疫保护性能及宿主对抗原的免疫应答反应进行评价。
- ◆ 理想的动物模型应该很好地模拟人类在自然状态下的感染和病变发展过程。构建动物模型时所用动物并非级别越高越好,采用无菌动物、免疫缺陷动物等构建感染动物模型存在着饲养条件苛刻、饲养成本高、实验操作受限、管理难度大等缺陷。
- ◆ 理想的动物模型,其动物选择必须满足以下条件:
 - ① 动物来源充足,操作经济简单;
 - ② 胃内没有同属细菌的定植和繁殖;
 - ③ 能充分模拟人类感染HP的组织病理学特征;
 - ④ 感染持续时间够长,易于开展长期或较长的时间观察;

⑤纯系动物, 易控制各种处望因素; ⑧模型可重复性强, 便于国际间对比和交流。最易建立并且容易饲养的啮齿类动物模型为小鼠, 小鼠已经成为目前最广泛、最方便、最便宜并能大多数实验室所接受的是幽口螺杆菌动物模型。

- ◆本实验选用无特殊病原体的C57BI76小鼠建立模型, 获取方便, 饲养控制条件较低, 对疾病的模拟效能较高。
- ◆实践中发现C57BL/6小鼠建立模型成功比率高, 模型较稳定, 能很好的复制HP感染模式。
- ◆多次高浓度Hp的连续攻击能明显提高感染率。

在建立动物模型时, 菌株的选择对模型构建更接近临床有很大的影响。人类对HP普遍易感, 是细菌的唯一自然宿主, 但是感染后的症状轻重却各不相同, 表现出明显的致病差异性, 轻者长期无症状携带, 重者可引起慢性胃溃疡、甚至肿瘤, 这种现象和宿主的遗传易感性、HP菌株的基因多态性和菌株的毒力等因素相关。

本堂课小结

- 掌握感染性动物模型的制备原则与制备要素
- 掌握感染性动物模型制备的方法。
- 通过阅读文献及查阅自行设计感染性动物模型，撰写实验报告及实验方案，通过答辩形式，优选最佳设计方案，为申请大学生创新实验设计课题做准备。

课后思考题

- 1.如何预防传染病的发生？
- 2.感染性动物模型制备的步骤和方法？
- 3.感染性疾病动物模型制备的关键点？