



北京地区实验动物中嗜肺巴斯德杆菌的表型分析

邢 进,冯育芳,岳秉飞,贺争鸣

(中国食品药品检定研究院 实验动物资源研究所,北京 100050)

【摘要】 目的 对北京地区实验动物中的嗜肺巴斯德杆菌分离株进行表型分析,提高检测的准确性。**方法** 通过生化鉴定和 16S rDNA 测序,对 306 株嗜肺巴斯德杆菌可疑菌株进行鉴定。结合分离株在血琼脂平皿上的菌落特征和生化特性,组成 53 个特征数据谱,进行表型特征的聚类分析。**结果** 306 株分离株中,BD 自动细菌鉴定系统和 16S rDNA 测序鉴定出嗜肺巴斯德杆菌的阳性率分别为 164/306 和 227/306。227 株嗜肺巴斯德杆菌真阳性的表型特征共有 140 种,Heyl 型 106 种,Jawetz 型 23 种。**结论** 北京地区实验动物中嗜肺巴斯德杆菌主要为 Heyl 型感染,Jawetz 型较少,表型特征多样,分布广泛。

【关键词】 嗜肺巴斯德杆菌;表型;细菌鉴定;16S 核糖体 DNA

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 06-0054-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.006.012

Phenotypic analysis of *Pasteurella pneumotropica* in laboratory animals in Beijing area

XING Jin, FENG Yu-fang, YUE Bing-fei, HE Zheng-ming

(National Institutes for Food and Drug Control, Institute of Laboratory Animal Resources, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To improve the accuracy of detection through analyzing the phenotypes of *P. pneumotropica* isolates in laboratory animals in Beijing area. **Methods** 306 suspicious *P. pneumotropica* strains were identified by biochemical identification and 16S rDNA sequencing. Then, to obtain the phylogenetic relationships combined with colony characteristics on blood agar plates and biochemical characteristics of 53 biotypes. **Results** BD Phoenix 100 automated bacterial identification system and 16S rDNA sequencing identified *P. pneumotropica* positive rate of 306 isolates were 164/306 and 227/306, respectively. There were 140 phenotypes in 227 true-positive strains, of which 106 were biotype Heyl and 23 were biotype Jawetz. **Conclusions** In the samples of laboratory animals in Beijing area, *P. pneumotropica* infection mainly are of biotype Heyl, and less is of biotype Jawetz. The phenotypes are diverse and widely distributed.

【Key words】 *Pasteurella pneumotropica*; Biotype; Bacteria identification; 16S rDNA; Laboratory animals

嗜肺巴斯德杆菌 (*Pasteurella pneumotropica*, PP) 是一种主要感染啮齿类动物的条件致病菌。其主要存在于啮齿类动物的上呼吸道、肺、消化道和泌尿道^[1]。一般 PP 不会影响到免疫功能正常动物

的健康,但是会引起免疫缺陷动物严重的肺炎,并可能导致死亡^[2,3]。PP 是实验动物检测国家标准^[4]中 SPF 级动物必须要排除的病原菌之一。国家标准中对 PP 的检测方法进行了说明^[5]。但是在实际的检测工作中,巴斯德杆菌所属的巴斯德菌科

[基金项目] 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金项目(编号:2012B8)。

[作者简介] 邢进(1979-),男,副研究员,研究方向:实验动物微生物学。Email: xjvet@nifdc.org.cn。

[通讯作者] 岳秉飞(1960-),男,博士,研究员,研究方向:动物遗传学。Email: yue-bingfei@nicbbp.org.cn。

中,放线杆菌属、嗜血杆菌属以及巴斯德菌属的很多菌株都会给鉴别造成困难,经常会遇到难以鉴别的情况。本研究通过对 PP 的分离株的生化结果进行分析,通过 16S rDNA 的测序对结果进行验证,改进国家标准中的 PP 的生化鉴定项目,提高对 PP 检测的准确性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:嗜肺巴斯德杆菌 Heyl 型 ATCC12555 和 Jawetz 型 ATCC35149,购自美国 ATCC。采用国家标准分离鉴定的 306 株 PP 分离株,小鼠 258 株,大鼠 39 株,豚鼠 3 株,沙鼠 6 株。

1.1.2 试剂:OXIOD 哥伦比亚血琼脂培养基;BD 革兰氏阴性菌生化鉴定板,梅里埃氧化酶试剂;PP 诊断血清由本实验室制备。Qiagen DNA 提取试剂盒;PCR 和琼脂糖电泳相关试剂购自宝生物工程(大连)公司。

1.1.3 主要仪器:上海安亭 WGP-600 隔水式恒温培养箱,BD Phoenix100 全自动细菌鉴定仪,ABI Verit PCR 仪。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定:所有菌株接种于 5% 脱纤维羊血的哥伦比亚血琼脂平皿,置 37℃ 培养 48 h。观察菌落的大小、颜色、溶血特性等表型特征。

1.2.2 生化鉴定:所有菌株在血琼脂平皿上 37℃ 培养 16 h,培养物用 BD 的革兰氏阴性细菌鉴定板进行生化鉴定,其生化项目与国家标准中的生化项目、菌落颜色、溶血特性合并组成表型谱,共 53 个特征数据,应用 Bionumerics 3.0 软件进行聚类分析。

1.2.3 DNA 测序:受试菌株基因组 DNA 用 Qiagen 提取试剂盒提取。参考 Weiburg^[6]的方法,对 16S rDNA 进行扩增,产物送上海生工测序,测序结果在 NCBI 中进行 Blast 比对,取得 16S rDNA 鉴定结果。

1.2.4 生物型区分:Jawetz 和 Heyl 型的鉴别参考 Benga 等^[7]设计的多重 PCR 方法,针对巴斯德菌属

16S-23S 间隔区,分别设计巴斯德菌属, Jawetz 型和 Heyl 型的特异性引物,见表 1。对生化鉴定和测序结果为阳性的菌株进行多重 PCR,反应体系为 20 μL,其中 10 × buffer(含 Mg²⁺) 2 μL, dNTP(2.5 mM) 1.6 μL, TaqHS 酶(5 U/μL) 0.2 μL, PastF、PastR 和 HeylR(均 10 μmol/L)各 0.5 μL, JawR(10 μmol/L)0.4 μL, 菌株模板 DNA 2 μL, ddH₂O 12.3 μL。PCR 扩增条件为:95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s,30 个循环;最后 72℃ 延伸 4 min。

表 1 巴斯德菌属, Jawetz 型和 Heyl 型特异性引物

Tab.1 Oligonucleotide primers of Pasteurellaceae, *P. pneumotropica* biotypes Jawetz and Heyl used in this study

引物名称 Primers	引物序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')	目的片段 大小(bp) Target fragments size (bp)
PastF	ATGGGACTGGGTTGTACCA	/
PastR	CAATCTGTGTGRACACTTRC	165 - 170
JawR	GGCATCCTAAAATACCCATCC	326
HeylR	TTGCAGATACTTGCCCTTAC	451

2 结果

2.1 菌株鉴定

2.1.1 生化和菌落特征鉴定:所有 306 菌株分离株按照国家标准鉴定符合 PP 阳性条件。其中轻微 a 溶血菌株有 70 株,用棉签刮取菌落,颜色灰白色的有 35 株,黄色的有 189 株。使用 BD 自动细菌鉴定系统进行再次鉴定,有 164 株鉴定为 PP。

2.1.2 16 S rDNA 测序鉴定:经 16S rDNA 的测序,与 NCBI 上 BLAST 比对后又确定有 63 株为 PP。结合菌落形态、生化反应以及 16S rDNA 测序结果综合分析,排除 BD 细菌鉴定仪鉴定结果中 2 株假阳性。在 306 株可疑 PP 分离株中共确定真阳性菌株 227 株。不同动物分离株生化和测序鉴定结果真阳性比例见表 2。

表 2 分离自不同动物嗜肺巴斯德杆菌生化鉴定和 16S rDNA 测序鉴定结果

Tab.2 Positive rates of biochemical characteristics and 16S rDNA sequencing of the isolates from various animals

鉴定方法 Identification method	阳性率 Positive rate			
	小鼠 Mice	大鼠 Rats	豚鼠 Guinea pigs	长爪沙鼠 Mongolian gerbil
生化鉴定 Biochemical identification	141/259 ^a	17/39	2/3	2/6
16S rDNA 测序 16S rDNA sequencing	201/259	18/39	3/3	5/6

a:嗜肺巴斯德杆菌阳性率

Note: positive rate of *P. pneumotropica*

227 株真阳性菌株主要生化项目阳性率,见表 3。其中国家标准中要求的几项生化试验:氧化酶、过氧化氢酶、硫化氢、硝酸盐均为阳性,动力和明胶液化均为阴性,尿素阳性率 95.2%,脲基质阳性率 5.3%。其中脲基质为阳性的菌株以 Jawetz 生物型居多,占 52.6% (10/19),Heyl 生物型只有 21.1% (4/19)。在国家标准外的生化试验:ONPG 全部为阳性;麦芽糖、鼠李糖、山梨醇和七叶苷全部为阴性;另外磷酸盐和醋酸盐试验阳性率分别为 98.2% 和 1.3%。

在之前分离的 306 株菌株中,鉴定出与 PP 相似的菌株有产气巴斯德杆菌 (*Pasteurella aerogenes*) 22 株、林氏放线杆菌 (*Actinobacillus lignieresii*) 15 株和小鼠放线杆菌 (*Actinobacillus muris*) 10 株。

表 3 227 株嗜肺巴斯德杆菌主要生化反应阳性率

Tab.3 Positive rate of biochemical characteristics of 227 isolates

生化项目 Biochemical items	阳性率 Positive rate	生化项目 Biochemical items	阳性率 Positive rate
氧化酶	100.0%	七叶苷	0.0%
过氧化氢酶	100.0%	明胶液化	0.0%
硫化氢	100.0%	动力	0.0%
ONPG	100.0%	葡萄糖	66.5%
磷酸盐	98.2%	果糖	30.8%
硝酸盐	100.0%	半乳糖	29.1%
醋酸盐	1.3%	蔗糖	26.9%
枸橼酸盐	4.8%	麦芽糖	0.0%
丙二酸盐	17.2%	阿拉伯糖	14.1%
尿素	95.2%	鼠李糖	0.0%
脲基质	5.3%	蜜二糖	46.3%
鸟氨酸	81.1%	甘露醇	2.6%
精氨酸	37.0%	山梨醇	0.0%

2.2 生物型和表型聚类分析

16S-23S rRNA 间隔区 PCR 结果显示,227 株 PP 分离株中,Heyl 型有 184 株,Jawetz 型有 24 株,不

能区分的有 19 株,见表 4、图 1。根据表型特征聚类分析结果,在北京地区实验动物中,Heyl 生物型的污染占绝大多数,分离自 16 个来源,其以菌苔微黄为特征,并多伴有轻微的 α 溶血。其中有个分离源同时存在 Jawetz 型菌株的污染。

PP077 和 PP277 的表型特征与标准菌株 ATCC12555 (Heyl 型) 的完全相同,先后分离自两个不同的单位。结果中未发现与标准菌株 ATCC35149 (Jawetz 型) 表型相同的菌株,24 株 Jawetz 型分离株与 ATCC35149 标准株的相似性仅有 65% ~ 74%。

表 4 227 株嗜肺巴斯德杆菌生物型

Tab.4 Biotypes of 227 *P. pneumotropica* isolates

PP 菌株 PP stains	16S-23S rRNA 间隔区 PCR 结果 16S-23S rRNA ITS PCR results		
	Heyl 型 Biotype Heyl	Jawetz 型 Biotype Jawetz	其他 Other
ATCC12555	+	-	/
ATCC35149	-	+	/
PP 分离株 PP isolates	184/227	24/227	19/227

经 Bionumerics 3.0 软件分析,227 株 PP 的表型特征共有 140 种,其中 184 株 Heyl 型有 106 种,24 株 Jawetz 型有 23 种,19 株不能确定生物型的菌株表型均不相同,但有 8 种与 Heyl 型相符,如图 2。

3 讨论

本研究中,有 4 株分离株没能复苏成功,未能鉴定,其余菌株均获得 53 项表型特征鉴定结果。结合生化反应、表型特征、PCR 和 16S rDNA 测序,最终确定 PP 的真阳性菌株比例 74.2%。对受试菌株表型特征的聚类分析发现北京地区实验动物中的 PP 表型丰富多样,增加了常规分离鉴定的难度。

国家标准中的 PP 脲基质给出的参考是阴阳性



1、17:100bp DNA marker;2~6:Jawetz 型,分别为 PP、PP、PP、PP、PP;
7~11:Heyl 型,分别为 PP、PP、PP、PP、PP;12~16:其他(非 Jawetz 和 Heyl 型),
分别为 PP、PP、PP、PP、PP;18:ATCC12555;19:ATCC35149;20:空白对照。

图 1 嗜肺巴斯德杆菌生物型的鉴别结果图例

Fig.1 Illustration of the results of *P. pneumotropica* biotypes identification

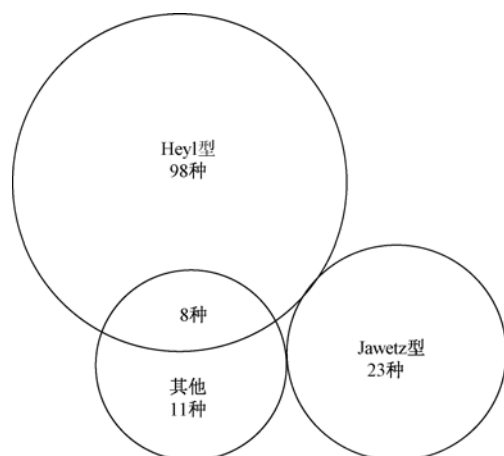


图2 嗜肺巴斯德杆菌表型特征与生物型的分布

Fig. 2 Relationship of phenotypes and biotypes of *P. pneumotropica* in samples of this study.

均有可能,本研究发现在北京地区分离到的菌株中,靛基质阳性率仅为 5.3%,以 Jawetz 生物型居多。提示在检测中,当其他生化项目相符时,靛基质阳性、菌苔为灰白色的菌株应考虑为 PP 的 Jawetz 生物型菌株。

由于目前国家标准中对 PP 的鉴定程序中的生化项目有限,血清凝集反应也会存在假阳性,当遇到菌落形态等表型特征与 PP 常接近的菌株时,容易造成与 PP 的混淆,造成假阳性的出现。因此有必要在检测标准中增加生化鉴定项目,并引入分子生物学鉴定方法对检测结果实施验证。

16S rDNA 的测序比对结果为 *Pasteurellaceae* gen. sp. Forsyth A3 的有 33 株,占比例较高,根据 16S rDNA 的聚类结果,其序列与 PP 标准菌株

ATCC35149 的相似性为 30% 左右,与 ATCC12555 的相似性为 97% 左右。序列的相似性表明这些菌株很可能是 Heyl 型嗜肺巴斯德杆菌的野生型菌株。此类菌株应如何确定归属有待从微进化角度进一步研究。

参考文献:

- [1] Sasaki H, Kawamoto E, Tanaka Y, et al. Comparative analysis of *Pasteurella pneumotropica* isolates from laboratory mice and rats [J]. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2009, 95(4):311–317.
- [2] Macy JD Jr, Weir EC, Compton SR, et al. Dual infection with *Pneumocystis carinii* and *Pasteurella pneumotropica* in B cell-deficient mice; diagnosis and therapy [J]. *Comp Med*, 2000, 50(1):49–55.
- [3] Hart ML, Mosier DA, Chapes SK. Toll-like receptor 4-positive macrophages protect mice from *Pasteurella pneumotropica*-induced pneumonia [J]. *Infect Immun*, 2003, 71(2):663–670.
- [4] GB 14922.2–2001. 实验动物微生物学等级及监测 [S]. 国家质量监督检验检疫总局. 2011.
- [5] GB/T 14926.12–2001. 实验动物嗜肺巴斯德杆菌检测方法 [S]. 国家质量监督检验检疫总局. 2001.
- [6] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. *J Bacteriol*, 1991, 173(2):697–703.
- [7] Benga L, Benten WP, Engelhardt E, et al. Development of a multiplex PCR assay based on the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer for the detection and identification of rodent *Pasteurellaceae* [J]. *J Microbiol Methods*. 2013, 95(2):256–261.

[修回日期]2014-04-08