

苏磊,熊莉娟,张丽芳,等. 国家病原微生物资源库对一株嗜肺啮齿杆菌的标准化鉴定与收录 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(4): 36-42.

Su L, Xiong LJ, Zhang LF, et al. Standardized identification and inclusion of a strain of *Rodentibacter pneumotropicus* in a national pathogenic microorganism resource database [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(4): 36-42.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.04.005

## 国家病原微生物资源库对一株嗜肺啮齿杆菌的 标准化鉴定与收录

苏磊<sup>1#\*</sup>, 熊莉娟<sup>2#</sup>, 张丽芳<sup>1</sup>, 李夏<sup>1</sup>, 李雪<sup>1</sup>, 石伟雄<sup>1</sup>, 肖芳平<sup>2</sup>, 鲍琳琳<sup>1</sup>,  
周银平<sup>2</sup>, 向志光<sup>1\*</sup>

(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021; 2. 江西省职业病防治研究院, 南昌 330006)

**【摘要】** 目的 参照国家病原微生物资源库中国医学科学院菌毒种保藏中心实验动物与人兽共患病保藏中心的鉴定、收藏程序以及国家标准菌株的鉴定要求,对一株分离自江西省实验小鼠呼吸道的嗜肺啮齿杆菌进行标准化鉴定并保存入库。方法 江西省职业病防治研究院(江西省实验动物质量检测站)按照 GB14922.1 和 GB14926.12 的要求对实验小鼠进行常规监测采样,分离病原菌株,初步鉴定为嗜肺啮齿杆菌;菌株由国家菌毒种保藏中心进行菌落、菌体特征、生理生化特性、16S rRNA 管家基因系统发育分析和基因组序列分析,并进行人工感染小鼠实验评价其致病性。结果 实验小鼠分离出 1 株嗜肺啮齿杆菌,动物无其他明显异常;经鉴定该菌株的菌落、菌体特征以及生理生化特征与模式株 NCTC 8141(*Rodentibacter pneumotropicus*)相似;16S rRNA 基因序列与模式株 NCTC 8141 的同源性为 98.37%,在系统发育树中与模式株 NCTC 8141 聚为一个分支,自举数据值达 96%;基因组序列分析,分离株与模式株 NCTC 8141 之间的 ANI 值为 97.97%,dDDH 值为 80.3%,高于国际标准 95%和 70%的分类界限;嗜肺啮齿杆菌江西分离株滴鼻感染 ICR(Institute of Cancer Research)小鼠临床病症及肺组织病理改变与模式株 NCTC 8141 相似。结论 国家实验动物与人兽共患病菌毒种保藏分中心将之命名为嗜肺啮齿杆菌江西株(*Rodentibacter pneumotropicus*),并对该菌株进行标准化保藏,收录编号 CCPM-B-B-006-2209-2。

**【关键词】** 标准株;实验动物;国家病原微生物资源库

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 04-0036-07

### Standardized identification and inclusion of a strain of *Rodentibacter pneumotropicus* in a national pathogenic microorganism resource database

SU Lei<sup>1#\*</sup>, XIONG Lijuan<sup>2#</sup>, ZHANG Lifang<sup>1</sup>, LI Xia<sup>1</sup>, LI Xue<sup>1</sup>, SHI Weixiong<sup>1</sup>, XIAO Fangping<sup>2</sup>, BAO Linlin<sup>1</sup>,  
ZHOU Yinping<sup>2</sup>, XIANG Zhiguang<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS), Beijing 100021, China.

2. Institute of Occupational Medicine of Jiangxi, Nanchang 330006)

**【基金项目】** 国家重点研发计划(2021YFF0702900);医科院重大协同创新项目(2021-I2M-1-039,2021-I2M-1-034);中央引导地方科技发展专项基金项目(20201ZDD02003)。

**【作者简介】** 苏磊(1985—),男,副研究员,研究方向:病原生物学。E-mail: sulei@cnilas.org

熊莉娟(1989—),女,副研究员,研究方向:微生物学。E-mail: Xionglij@foxmail.com # 共同第一作者

**【通信作者】** 苏磊(1985—),男,副研究员,研究方向:微生物学。E-mail: sulei@cnilas.org

向志光(1980—),男,副研究员,研究方向:实验动物学、比较免疫学。E-mail: xiangzg@cnilas.org \* 共同通信作者

**【Abstract】 Objective** To conduct standardized identification of a strain of *Rodentibacter pneumotropicus* isolated from the respiratory tract of mice in Jiangxi Province according to the identification and collection procedures for laboratory animals and zoonosis preservation at the Center of Bacteria and Virus Species Preservation, Chinese Academy of Medical Sciences, National Pathogenic Microorganism Resource Bank, and the requirements of national standard strain identification. **Methods** According to the requirements of GB14922.1 and GB14926.12, routine health-monitoring animals were examined and pathogen strains were isolated. The samples were transported to the National Bacterial and Viral Species Preservation Center at low temperatures for further classification and identification of pathogenic microorganisms by means of colony, cell characteristics, physiological and biochemical characteristics, phylogenetic analysis of 16S rRNA steward gene, and genome sequence analysis. Whole-genome sequencing result were compared and analyzed, and the pathogenicity was evaluated by artificial infection of mice. **Results** According to GB14926.2, one strain of *R. pneumophilus* was isolated from a batch of mice from Ganzhou, Jiangxi Province, and the animals had no other obvious abnormalities. The isolated strain was similar to NCTC 8141 (*R. pneumotropicus*) colony, cell, and physiological and biochemical characteristics. The strain had 98.37% homology with the NCTC 8141 16S rRNA gene sequence and formed a branch with *R. pneumotropicus* NCTC 8141 in the phylogenetic tree, with 96% self-promotion data value. On genome sequence analysis, the ANI and dDDH values between the isolated and *R. pneumotropicus* type strain NCTC 8141 were 97.97% and 80.3%, respectively, higher than the international standard classification limits of 95% and 70%. The clinical symptoms and pathological changes to the lung tissue were similar to those of the type strain NCTC 8141 infected with ICR (Institute of Cancer Research) mice via nasal drops. **Conclusions** The isolate was named *R. pneumotropicus* Jiangxi strain by the National Laboratory Animal and Zoonosis Preservation sub-center, and the strain was stored in a standardized way and numbered CCPM-B-B-006-2209-2.

**【Keywords】** standard strain; laboratory animal; National Pathogenic Microorganism Resource Bank

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

嗜肺巴斯德杆菌 (*Pasteurella pneumotropica*) 在啮齿类实验动物中条件致病, 对免疫缺陷动物有严重危害, 干扰科研实验准确性, 是 GB14922 中 SPF 级实验大鼠、小鼠必须排除的特定病原。嗜肺巴斯德杆菌在形态及一般培养特性上与嗜血杆菌、放线菌及其它巴斯德氏菌属细菌相似, 早期研究中常发生分类混乱<sup>[1]</sup>, 将其它菌误认为嗜肺巴斯德杆菌。嗜肺巴斯德杆菌最初由 Jawetz<sup>[2]</sup> 描述是从实验室小鼠的肺病变组织中分离出来。以前被认为是 *Pasteurella multocida* 的一种特殊生物型, 后被 Henriksen<sup>[3]</sup> 重新分类为 *P. pneumotropica*。Jawetz<sup>[2]</sup> 报道的与 *P. pneumotropica* 密切相关的物种被 Heyl<sup>[4]</sup> 描述并命名为 *P. pneumotropica* var. *xylophila*。随后, Frederiksen<sup>[5]</sup> 提出在 *P. pneumotropica*-complex 中存在三个生物变种, 并提出以最先报道属于这些生物变种发现人 (Jawetz, Heyl, Henriksen) 的名字来命名它们。基于 DNA-DNA 复性 (DDN) 的方法, Mutters 等<sup>[6]</sup> 将 *P. pneumotropica* Henriksen 重新分类为 *P. dagmatis*, *P. pneumotropica* types *Jawetz* 和 *Heyl* 以及与 *Actinobacillus* 紧密相关的类群。根据相关文献报道, 在实验动物中也发现了其他几个属于巴氏菌科

的物种和分类群, 尽管 *P. pneumotropica* 在鉴定方面仍然存在困难, 但这与遗传多样性和商业鉴定试剂盒的准确性密切相关。为了更好的解决巴氏菌科的分属学问题, Adhikary 等<sup>[7]</sup> (2017) 对来自于啮齿类动物的 48 株巴氏杆菌科菌株基于表型和遗传学特征进行了分类鉴定, 结果表明起初描述的 *P. pneumotropica* 菌株包括变种 *Heyl*, *Jawetz* 和 *Henriksen* 以及先前报道属于放线杆菌 (*Actinobacillus* sp.) 的菌株和 *Avibacterium* (*Pasteurella*) *gallinarum* 的菌株被重新命名为 *Rodentibacter* (啮齿杆菌) 属, 并将其基于多相分类的方法鉴定为 8 个种, 分别为 *Rodentibacter pneumotropicus*, *R. heylii*, *R. myodis*, *R. ratti*, *R. heidelbergensis*, *R. trehalosifermentans*, *R. rarus* 和 *R. mrazii*。随后, Benga 等<sup>[8]</sup> (2021) 对分离自大鼠和小鼠中的 9 株 *Rodentibacter* 属细菌进行了系统分类研究, 并将其鉴定为啮齿杆菌属新种 *R. haemolyticus*。因此, 目前啮齿杆菌属已发现并有效发表包含 9 个种。

在实验动物质量检测中, 应用规范、准确的菌株对检测工作进行控制是 ISO17025 (或 CNAS CL01) 的基本要求。对于重要的病原微生物进行规范化分离、鉴定和保藏也是我国高度重视的工作。

在 2018 年,中国医学科学院成立了国家级的菌毒种保藏中心,并建立了实验动物与人兽共患病菌毒种保藏分中心的专业保藏机构。2020 年,国家卫生健康委整合多个国家菌毒种保藏中心,建立了国家病原微生物资源库,将菌毒种的重要性提高到国家资源的高度。为了对菌毒种资源进行标准化分离、鉴定和保藏,国家卫健委发布了行业标准 WS/T 812-2022;为了更好的指导实验动物领域的菌毒种保藏工作,中国实验动物学会发布了团体标准 T/CALAS 53-2018,并对《实验动物微生物菌种鉴定与保藏要求》标准进行了立项。中国实验动物菌毒种分离、鉴定和保藏工作迎来标准化时代。

2022 年 5 月,江西省职业病防治研究院(江西实验动物质量检测站)向本机构送来一株菌,初步鉴定为嗜肺嗜齿杆菌。参比本中心保藏的嗜肺嗜齿杆菌的模式株,我们对该病原进行了鉴定,并命名其为国家菌毒种标准株:嗜肺嗜齿杆菌江西株,保藏编号 CCPM-B-B-006-2209-2。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

9 只 SPF 级雌性 ICR 小鼠,4 周龄,体重约为 12 g,购于北京华卓康生物科技有限公司[SCXK(京)2019-0008],饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所[SYXK(京)2019-0014],感染实验在 ABSL-2 实验室进行,饲养期间各组小鼠自由饮水,饲喂普通维持饲料由军事医学科学院实验动物中心提供。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22~25℃。所有操作均符合本单位实验伦理学要求(IACUC XZG-22002),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

LB 肉汤(英国 OXOID 公司,批号:2495802);血琼脂(北京陆桥技术股份有限公司,批号:PB001);PBS 溶液(北京百泰克生物技术有限公司,批号:8119421);梅里埃 ANC VITEK2 试剂/VITEK 2 革兰氏阴性细菌鉴定卡(梅里埃诊断产品上海有限公司,批号:21341);NaCl 试剂(国药集团化学试剂有限公司,批号:20201104);NaClO 试剂(国药集团化学试剂有限公司,批号:20200601)。

小型台式冷冻离心机(TY2012000052,德国 Eppendorf);高速冷冻离心机(ST16R,美国 Thermo);微分干涉显微镜(BX53,日本奥林巴斯株

式会社);生化培养箱(LRH-250F,中国上海一恒科学仪器有限公司);生物安全柜(BSC-1800IIA2,中国北京东联哈尔仪器制造有限公司);涡旋振荡器(HYQ-3110,美国精骐有限公司);震荡恒温金属浴(MB102,杭州博日科技有限公司);紫外分光光度计(CARY-50,美国瓦里安中国有限公司);全自动细菌生化鉴定仪(梅里埃 VITEK2,法国 Biomerieux);台式恒温摇床(SPH-200B,上海世平实验设备有限公司);PCR 扩增仪(T100,美国 Bio-Rad)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 菌株分离、表型和生理生化特征

参考 GB14922 和 GB14926 规定的方法进行<sup>[9]</sup>。取病料接种于血琼脂,37℃ 培养 24 h 后观察,挑取直径 1~2 mm、透明、光滑、湿润的疑似菌落接种于普通肉汤培养基平板上纯化,然后挑取单个菌落进行革兰氏染色,观察结果。对于模式菌株采用扫描电镜对其微观形态进行观察。对符合革兰氏染色结果的菌落做生化鉴定试验。用接种针从平板上挑取分离纯化的单一菌落分别接种于各安瓿瓶中。置(36±1)℃ 培养 18~24 h,无须加盖<sup>[10]</sup>。同时采用细菌生化鉴定仪 Biolog GEN III 碳源进行鉴定。菌种分别冻干保藏在 4℃ 冰柜和含有 20% 甘油的冻存管中-80℃ 超低温保藏。

#### 1.3.2 系统发育分析

菌株 16S rDNA 序列的扩增使用细菌通用引物 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')<sup>[11]</sup>。基因测序在(Invitrogen 公司完成,序列比对在 EzBioCloud BLAST([www.ezbiocloud.net/identify](http://www.ezbiocloud.net/identify))<sup>[12]</sup> 比对完成。相关模式种 16S rDNA 序列从 EzBioCloud 和 GenBank 数据库中下载,并用 Clustal X 软件比对。系统发育树的构建分别用邻接法,最大似然法和最大简约法计算,树的拓扑结构和支持率使用 MEGA version 11.0<sup>[13]</sup> 软件抽样分析 1000 次运算获得。

#### 1.3.3 基因组测序和分析

菌株基因组序列的测定和组装由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。统计范围为 500 bp 以上的 Scaffold,其中 N50 和 N90 概念为从大到小覆盖到总长一定比例(对 N50 为 50%,对 N90 为 90%)时的最后一条 Scaffold 或 Contig 的长度。核酸一致性分析(ANI)在 EzBioCloud([www.ezbiocloud.net/tools/ani](http://www.ezbiocloud.net/tools/ani))中 OrthoANI 计算获得<sup>[14]</sup>,基因组

DNA-DNA (dDDH) 杂交值通过 GGDC 软件 3.0 运算获得 (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>)<sup>[15-16]</sup>。使用 Diamond 软件,把目标物种的氨基酸序列,与 KEGG 数据库进行比对,把目标物种的基因和其相对应的功能注释信息结合起来,得到注释结果。由于每一条序列比对结果可能超过一条,为保证其生物意义,注释时保留一条最优比对结果作为该基因的注释。最后提供的 Diamond 比对结果为 M8 格式,同时还提供部分数据库的注释结果汇总及 KEGG 二级信号通路等相关统计结果。

#### 1.3.4 动物实验

将分离株和模式株分别滴鼻感染 ICR 小鼠,每组 3 只,观察小鼠感染后的临床和病理学特征。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22~25℃。

#### 1.4 统计学方法

菌株感染实验和相关统计学数据均以平均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,分别采用 *T* 检验和 Graphpad 8.0 进行分析、绘图, $P<0.05$  为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 菌株来源

2020 年 11 月,江西省赣州市某单位将 7 周龄雌性 KM 小鼠送至江西省职业病防治研究院(江西省实验动物质量检测站)进行检测。动物无菌包装,经过 5~6 h 汽车运输。检测人员外观检查,发现小鼠被毛蓬松、干燥无光泽,大体剖检未见明显异常;自 KM 小鼠呼吸道样品中分离到疑似嗜肺嗜齿杆菌菌株。2022 年 5 月将该菌株送至国家病原

微生物资源库实验动物与人兽共患病病毒种保藏分中心进行鉴定。

### 2.2 形态学特征

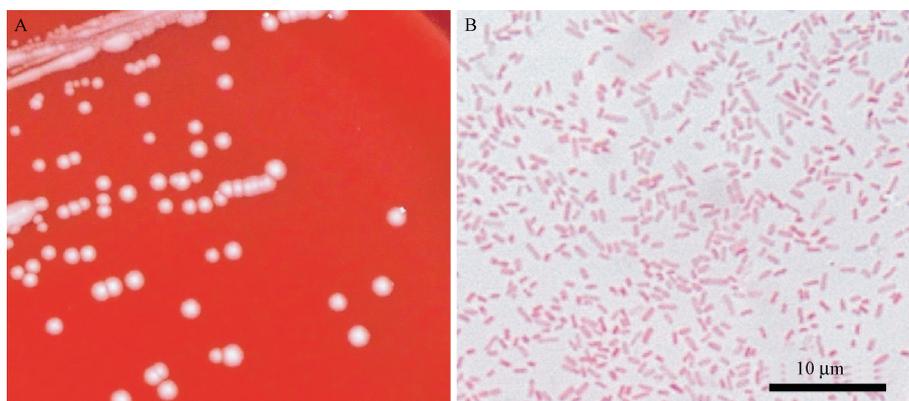
疑似菌株在血琼脂平皿上( $36\pm 1$ )℃ 培养 18~24 h 可形成 1~2 mm、光滑圆润、灰白色甚至微透明的不溶血菌落,纯化培养能良好生长(见图 1A)。纯培养物堆集时可呈现浅黄色,质地似奶油。染色镜检观察,革兰氏染色阴性小杆菌,无芽孢,有荚膜,在生长初期也可见较细长的杆菌(见图 1B)。

### 2.3 生理生化特征

挑取纯培养物接种普通肉汤培养基 37℃ 有氧培养 16 h 后,取 1~2 滴菌液接种不同的生化试验管,置 37℃ 连续培养观察 7 d。利用梅里埃系列 VITEK2 细菌鉴定卡反应后发现,其表型和模式株 ATCC 35149 相似,D-葡萄糖、葡萄糖发酵、D-麦芽糖、D-甘露糖、蔗糖、D-海藻糖、磷酸酶、尿素酶阳性等阳性,但  $\gamma$ -谷氨酸转移酶呈阴性。结果见表 1。

### 2.4 管家基因序列分析

对分离株的 16S rRNA 基因序列(OQ186079)进行测定,其长度为 1414 bp,通过 BLAST 同源性检索发现,分离株的 16S rRNA 基因序列与 *R. pneumotropicus* NCTC 8141 同源性均在 98.37%。分别选取同源性较高的 16S rRNA 基因序列进行系统发育学分析,其系统发育树如图 2 所示,在图 2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发生树中,分离株与 *R. pneumotropicus* NCTC 8141 聚为一个分支,且自举数据值为 96%;16S rRNA 基因的系统发育学结果表明分离株与模式株 *R. pneumotropicus* NCTC 8141 亲缘关系更近。



注:A:标准株菌落形态;B:标准株微观形态特征。

图 1 嗜肺嗜齿杆菌形态学观察

Note. A, Colony morphology of standard strain. B, Microscopic morphological characteristics of standard strains.

Figure 1 Morphological observation of *R. pneumotropicus*

表 1 疑似菌株与嗜肺啮齿杆菌模式株生理生化特性比较

Table 1 Comparison of physiological and biochemical characteristics between suspected strains and type strain of *Rodentibacter pneumotropicus*

生理生化试验 Physiological and biochemical tests	ACCC 35149	CCPM-B-B-006-2209-2
侧金盏花醇 Lateral calendulin	-	-
L-阿拉伯醇 L-arabinol	-	-
D-纤维二糖 D-fibrinose	-	-
$\beta$ -半乳糖苷酶 $\beta$ -galactosidase	-	-
$\beta$ -N-乙酰葡萄糖苷酶 $\beta$ -N-acetylglucosidase	-	-
D-葡萄糖 D-glucose	+	+
$\gamma$ -谷氨酸转移酶 $\gamma$ -glutamate transferase	+	-
葡萄糖发酵 Glucose fermentation	+	+
$\beta$ -葡萄糖苷酶 $\beta$ -glucosidase	-	-
D-麦芽糖 D-maltose	+	+
D-甘露醇 D-mannitol	-	-
D-甘露糖 D-mannose	+	+
脂酶 Lipase	-	-
古老糖 Archaic sugar	-	-
尿素酶 Urease	+	+
D-山梨醇 D-sorbitol	-	-
蔗糖 Sucrose	+	+
D-海藻糖 D-trehalose	+	+
丙二酸盐 Malonate	-	-
$\alpha$ -半乳糖苷酶 $\alpha$ -galactosidase	-	-
磷酸酶 Phosphatase	+	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-
$\beta$ -葡萄糖苷酸酶 $\beta$ -glucosidase	-	-

## 2.5 基因组序列分析

本研究基于全基因组测序江西株 CCPM-B-B-006-2209-2 (GenBank 访问号: JAQOLQ000000000) 与模式细菌全基因组数据比较分析进行 *R. pneumotropicus* 的鉴定分类。通过全基因组测序, 得到江西分离株基因组序列和组装信息(表 2)。通过与模式株 *R. pneumotropicus* NCTC 8141 基因组序列比较分析, 发现江西分离株与已知模式菌株 *R. pneumotropicus* NCTC 8141 之间的 ANI 值为 97.97%, dDDH 值为 80.3%, 均高于国际标准 95% 和 70% 的分类界限, 因此与 *R. pneumotropicus* NCTC 8141T 相似度最高。

## 2.6 症状及病理变化

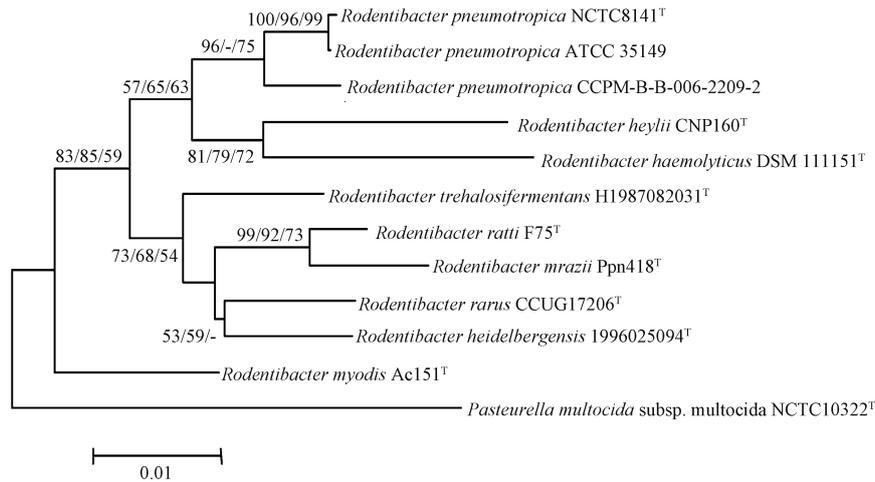
嗜肺啮齿杆菌江西株, 对 3 周龄雌性 ICR 小鼠进行滴鼻感染, 每只 30  $\mu$ L ( $1 \times 10^7$  CFU)。小鼠感染 24~48 h 后出现眼睑闭合, 分泌物增多、轻度弓背等表征, 感染 72 h 后上述症状减轻至消失。感染后 1 周处死小鼠。两组肺组织病理变化相似, 肺间质宽度增加, 有一定充血和出血。与同期感染模式株的动物相比, 江西株感染动物的临床表征、大体病理、组织病理改变无明显差异(图 3)。

## 2.7 菌种分类位置

综合分离株形态、生理生化特征、16S rRNA 基因的同源性检索与系统发育学分析、基因组序列分析以及菌株对实验动物致病性等实验结果, 判定江西实验小鼠分离菌株为嗜肺啮齿杆菌江西株 (*Rodentibacter pneumotropicus*), 对其进行保藏, 保藏编号为 CCPM-B-B-006-2209-2。

表 2 江西分离菌株基因组组装结果  
Table 2 Results of genome assembly from Jiangxi isolates

基因组 Genome	长片段 Scaffold	重叠群 Contig
总数(>500 bp) Total number	26	28
总长度(bp) Total length	2 462 630	2 462 610
N50 长度(bp) N50 length	256 919	256 919
N90 长度(bp) N90 length	54 204	54 204
最大长度(bp) Max length	636 813	636 813
最小长度(bp) Min length	1 196	1 196
序列中 GC% 含量 Sequence GC%	39.76	39.76

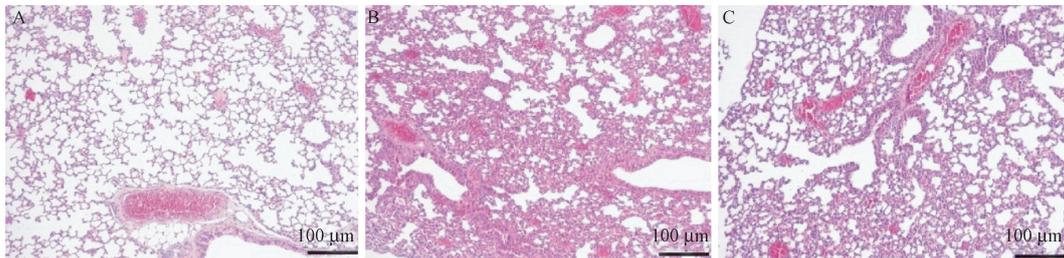


注:基于 16S rRNA 基因通过邻接法/最大似然法/最大简约法对嗜肺嗜齿杆菌分离株 CCPM-B-B-006-2209-2 和相关模式种进行系统发育分析。*Pasteurella multocida* subsp. *multocida* NCTC 10322<sup>T</sup> 为外群。“T”代表模式菌株,节点上的数字是基于 1000 个重复的百分比引导值,每个核苷酸位置有 0.01 个置换,仅给出超过 50% 的值。

图 2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

Note. Phylogenetic analysis of *R. pneumotropicus* strain CCPM-B-B-006-2209-2 and related type species was performed by collation method based on 16S rRNA genes. *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* NCTC 10322<sup>T</sup> is an outgroup. The “T” represents the model strain, and the number on the node is based on a percentage lead value of 1000 replicates, 0.01 substitutions per nucleotide position, only giving values over 50%.

Figure 2 Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence



注:A:空白对照;B:6 周龄雌性 ICR 小鼠在  $1 \times 10^7$  CFU 时鼻内感染嗜肺嗜齿杆菌江西分离株;C:6 周龄雌性 ICR 小鼠在  $10^7$  CFU 时鼻内感染嗜肺嗜齿杆菌模式菌株 NCTC 8141,结果显示嗜肺嗜齿杆菌江西分离株感染与模式菌株 NCTC 8141 有相似的组织病理学变化。

图 3 动物感染实验病理学观察

Note. A, Blank control. B, 6-week-old female ICR mice were intranasally infected with *P. lungophilus* Jiangxi strain at  $1 \times 10^7$  CFU. C, 6-week-old female ICR mice were intranasally infected with the type strain NCTC 8141 at  $10^7$  CFU. Results showed that the Jiangxi strain had similar histopathological changes to the type strain NCTC 8141.

Figure 3 Experimental for pathological observation of animal infection

### 3 讨论

嗜肺嗜齿杆菌在啮齿类实验动物中是重要的条件致病菌之一,该菌主要感染上呼吸道、肺部、消化道和阴道。通常嗜肺嗜齿杆菌感染不导致免疫功能正常动物发病。但是,在免疫缺陷动物中嗜肺巴斯德杆菌会导致严重或致命肺部感染<sup>[16-18]</sup>。在啮齿类动物实验设施管理中需要关注的重要问题<sup>[19-20]</sup>。

目前 *Rodentibacter* 属细菌,多数菌种都可以感染啮齿类动物。本研究从江西昆明小鼠上呼吸道中分离到一株嗜肺巴斯德杆菌变异株。与模式株 *Rodentibacter pneumotropicus* 相比,形态学上相似,生理生化  $\gamma$ -谷氨酸转移酶呈阴性;化学分类学特征无显著差异,分子系统学上,基于 16S rRNA 基因序列通过邻接法/最大似然法/最大简约法分析构建的系统发育树中,菌株 CCPM-B-B-006-2209-2 均与 *R. pneumotropicus* 聚为一个分支,且菌株 CCPM-B-B-

006-2209-2 与 *R. pneumotropicus* NCTC 8141 (GenBank 登录号 NR\_118763) 在同一个进化枝上并具有 96%/-/75% 的自举值(图 3);基因组分析表明,无论基因组序列还是基因结构或功能都与模式株具有高度的相似性。通过以上研究结果,表明该疾病的病原是 *R. pneumotropicus* 遗传变异株,因此在本研究中将其鉴定为 *Rodentibacter pneumotropicus* 江西株。

由于我国保藏的微生物菌种资源分散,对微生物菌种资源的描述不统一,给微生物菌种资源的共享带来许多困难,同时也限制了微生物菌种资源收集和保藏工作的进一步发展。因此,卫健委成立了国家病原微生物资源库,重点开展病原微生物菌种资源的标准化分离、鉴定、保藏工作,并对现有资源进行整理、整合,通过数据化和网络化,最终实现微生物菌种资源的收集、整理、保藏、评价、共享、规范化,为生物、医药行业的生产、科研服务。本文以一株分离自实验动物呼吸道的嗜肺嗜齿杆菌菌株为例,对实验动物标准株进行鉴定,并详细描述其生物特性,为实验动物病原微生物标准株的评价和保藏提供参考。同时,通过对嗜肺嗜齿杆菌的溯源分类研究,丰富了嗜齿杆菌属菌种资源,以避免在属内的错误分类问题。对嗜肺嗜齿杆菌的正确分类将有助于更好地了解它们的流行病学,并将为选择菌株进行此类细菌感染的发病机理研究奠定坚实的基础。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Boot R, Bisgaard M. Reclassification of 30 Pasteurellaceae strains isolated from rodents [J]. Lab Anim, 1995, 29(3): 314-319.
- [ 2 ] Jawetz E. A pneumotropic pasteurilla of laboratory animals; bacteriological and serological characteristics of the organism [J]. J Infect Dis, 1950, 86(2): 172-183.
- [ 3 ] Henriksen SD. Some *Pasteurella* strains from the human respiratory tract [J]. Acta Pathol Microbiol Scand, 2009, 55(3): 355-356.
- [ 4 ] Heyl JG. A study of *Pasteurella* strains from animal sources [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1963, 29: 79-83.
- [ 5 ] Frederiksen W. *Pasteurella* taxonomy and nomenclature [J]. Contrib Microbiol, 1973, 2: 170-176.
- [ 6 ] Mutters R, Ihm P, Pohl S, et al. Reclassification of the genus *Pasteurella* trevisan 1887 on the basis of deoxyribonucleic acid homology, with proposals for the new species *Pasteurella dagmatis*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa* [J]. Int J Syst Bacteriol, 1985, 35(3): 309-322.
- [ 7 ] Adhikary S, Nicklas W, Bisgaard M, et al. *Rodentibacter* Gen. nov. including *Rodentibacter pneumotropicus* comb. nov., *Rodentibacter heylii* sp. nov., *Rodentibacter myodis* sp. nov., *Rodentibacter ratti* sp. nov., *Rodentibacter heidelbergensis* sp. nov., *Rodentibacter trehalosifermentans* sp. nov., *Rodentibacter rarus* sp. nov., *Rodentibacter mrazii* and two genomospecies [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2017, 67(6): 1793-1806.
- [ 8 ] Benga L, Nicklas W, Lautwein T, et al. *Rodentibacter haemolyticus* sp. nov. isolated from laboratory rodents [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2021, 71(8): 4947.
- [ 9 ] 中华人民共和国国家标准.《实验动物微生物学检测方法》, GB/T14926.4243-2001 [S]. 北京:国家技术监督局, 2001.
- [ 10 ] 中华人民共和国国家标准.《实验动物嗜肺嗜齿杆菌检测方法》, GB/T14926.2-2001 [S]. 北京:国家技术监督局, 2001.
- [ 11 ] Pheng S, Han HL, Park DS, et al. *Lactococcus kimchii* sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from kimchi [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2020, 70(1): 505-510.
- [ 12 ] Yoon SH, Ha SM, Kwon S, et al. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2017, 67(5): 1613-1617.
- [ 13 ] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap [J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791.
- [ 14 ] Auch AF, von Jan M, Klenk HP, et al. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison [J]. Stand Genomic Sci, 2010, 2(1): 117-134.
- [ 15 ] Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, et al. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions [J]. BMC Bioinformatics, 2013, 14: 60.
- [ 16 ] Manning PJ, DiGiacomo RF, Delong D. Pasteurellosis in laboratory animals [J]. Pasteurella Pasteurell, 1989, 23: 263-302.
- [ 17 ] 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.
- [ 18 ] 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.
- [ 19 ] Boot R, van de Berg L. Evaluation of antigen panels for ELISA monitoring of mouse colonies for antibodies to *Pasteurellaceae* [J]. Lab Anim, 2006, 40(2): 194-199.
- [ 20 ] Fray MD, Pickard AR, Harrison M, et al. Upgrading mouse health and welfare: direct benefits of a large-scale rederivation programme [J]. Lab Anim, 2008, 42(2): 127-139.

[ 收稿日期 ] 2023-02-07