

研究报告

两株 SPF 级实验小鼠病原细菌的分离、鉴定及其基因组特征分析

石伟雄^{#1}, 高飞^{#2}, 苏磊^{*1}

1 中国医学科学院医学实验动物研究所 国家人类疾病动物模型资源库, 北京 100021

2 吉林大学 动物科学学院(实验动物中心), 吉林 长春 130062

石伟雄, 高飞, 苏磊. 两株 SPF 级实验小鼠病原细菌的分离、鉴定及其基因组特征分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(2): 859-874.

SHI Weixiong, GAO Fei, SU Lei. Isolation, identification, and genomic characterization of two strains of pathogenic bacteria from SPF mice[J]. Microbiology China, 2025, 52(2): 859-874.

摘要:【背景】实验动物中不断发现干扰科学研究的新病原体, 库氏棒杆菌(*Corynebacterium kutscheri*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)作为影响实验动物健康的病原微生物, 是国标中要求的必检微生物。本研究从吉林大学实验动物中心饲养的无特定病原体(specific pathogen-free, SPF)级小鼠体内分离到 1 株疑似库氏棒杆菌和 1 株疑似铜绿假单胞菌。【目的】鉴定这些病原微生物的种类、生物学特性、系统发育关系及基因组特征, 为该病原微生物标准物质的研制及检测评价技术体系的建立提供生物资源并奠定基础。【方法】采用革兰氏染色、药敏试验、生理生化等方法对病原生物学特征进行鉴定; 结合 PCR 鉴定、系统发育分析、全基因组测序、生物信息学等技术明确该菌的遗传学特征。【结果】形态观察、16S rRNA 基因序列、基因组分析及系统发育分析证实, 该分离菌株分别被鉴定为库氏棒杆菌 CCPM-B-B-019-2402-1 和铜绿假单胞菌 CCPM-B-B-013-2402-3; 药敏试验表明, 库氏棒杆菌 CCPM-B-B-019-2402-1 对苯唑西林、呋喃妥因和苄青霉素耐药, 铜绿假单胞菌 CCPM-B-B-013-2402-3 对替卡西林/克拉维酸和替加环素耐药, 对头孢他啶、环丙沙星、左氧氟沙星等 9 种抗生素敏感; 全基因组测序结果表明, 库氏棒杆菌 CCPM-B-B-019-2402-1 携带有 *fagA*、*fagB*、*fagC*、*fagD* 等重要毒力基因, 铜绿假单胞菌 CCPM-B-B-013-2402-3 携带有 *plcB*、*tse6*、*tse5* 等毒力基因。【结论】对 SPF 级小鼠气管组织和盲肠内容物中分离出的 2 株病原菌进行了鉴定,

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFF0702900); 吉林省科技发展计划(20230203145SF); 国家科技资源共享服务平台项目(国家病原微生物资源库-NPRC-32)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFF0702900), the Science and Technology Development Program of Jilin Province (20230203145SF), and the National Science and Technology Infrastructure of China (National Pathogen Resource Center-NPRC-32).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: sulei@pumc.edu.cn

Received: 2024-11-29; Accepted: 2024-12-30; Published online: 2025-01-13

并对 2 株病原菌进行了基因组特征分析, 该研究为实验动物病原细菌标准株的建立, 以及实验动物病原标准物质的研制和实验动物的质量控制提供了重要资源和支持。

关键词: 库氏棒杆菌; 铜绿假单胞菌; 生物学特征; 基因组特征; 系统发育分析

Isolation, identification, and genomic characterization of two strains of pathogenic bacteria from SPF mice

SHI Weixiong^{#1}, GAO Fei^{#2}, SU Lei^{*1}

1 National Human Diseases Animal Model Resource Center, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China

2 College of Animal Sciences (Laboratory Animal Center), Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China

Abstract: [Background] New pathogens that interfere with scientific research have been constantly discovered in laboratory animals. *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa* as pathogenic microorganisms affecting the health of laboratory animals are required to be monitored in the national standard. In this study, suspected strains of *C. kutscheri* and *P. aeruginosa* were isolated from specific pathogen-free (SPF) mice reared at the Laboratory Animal Center of Jilin University. [Objective] To identify the species and reveal the biological characteristics, phylogenetic relationship, and genomic characteristics of these pathogens, providing valuable biological resources and laying a foundation for developing reference materials and establishing an evaluation system for these pathogens. [Methods] The biological characteristics of the pathogens were studied by Gram staining, drug sensitivity test, and physiological and biochemical methods. PCR, phylogenetic analysis, whole genome sequencing, and bioinformatics analysis were performed to clarify the genetic characteristics of the strains. [Results] Through morphological observation, 16S rRNA sequencing, genome analysis, and phylogenetic analysis, the isolates were identified as *C. kutscheri* CCPM-B-B-019-2402-1 and *P. aeruginosa* CCPM-B-B-013-2402-3, respectively. *C. kutscheri* CCPM-B-B-019-2402-1 was resistant to oxacillin, nitrofurantoin, and benzylpenicillin. *P. aeruginosa* CCPM-B-B-013-2402-3 showed resistance to ticarcillin/clavulanic acid and tigecycline, while it demonstrated sensitivity to 9 antibiotics including ceftazidime, ciprofloxacin, and levofloxacin. The results obtained from whole genome sequencing indicated that *C. kutscheri* CCPM-B-B-019-2402-1 carried key virulence genes such as *fagA*, *fagB*, *fagC*, and *fagD*, whereas *P. aeruginosa* CCPM-B-B-013-2402-3 harbored virulence genes like *plcB*, *tse6*, and *tse5*. [Conclusion] In this study, two strains of pathogenic bacteria isolated from the tracheal tissue and cecum of SPF mice were identified, and their genomic characteristics were analyzed. This study provides important resources and support for the establishment of standard strains of pathogenic bacteria in laboratory animals, the development of reference materials of pathogenic bacteria in laboratory animals, and the quality control of laboratory animals.

Keywords: *Corynebacterium kutscheri*; *Pseudomonas aeruginosa*; biological characteristics; genomic characteristics; phylogenetic analysis

病原微生物菌(毒)种是开展传染性及其感染性疾病防治、食品药品安全、出入境检验检疫等研究工作的重要对象及物质基础,是直接关系国家生物安全的重要战略资源^[1]。病原微生物菌(毒)种的溯源和标准化是病原检测中的关键环节。常见的鉴定方法包括根据生理特征、生化反应、血清学反应、耐药谱及分子型别等特征,将疑似菌株与模式种相比,从而确定其病原微生物菌(毒)种。病原菌检测是实验动物微生物等级和监测中的重要内容,根据国家标准 GB 14922—2022《实验动物 微生物、寄生虫学等级及监测》^[2]规定,在无菌动物、无特定病原体(specific pathogen-free, SPF)动物的检测中,针对小鼠、大鼠病原细菌检测项目共 15 项。其中,必须检测项目并要求阴性的有 7 项,包括支原体、库氏棒杆菌(*Corynebacterium kutscheri*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和沙门氏菌(*Salmonella*)等^[2]。由于缺乏病原细菌生理和遗传特性数据,我国在实验动物病原检测方面缺少可应用的标准物质。目前,国家标准物质资源共享平台仅提供了淀粉中金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)标准物质(<https://www.ncrm.org.cn/Web/Material/Components?autoID=21261&pageIndex=1>),导致新型病原检测技术缺乏有效的质量控制手段。

库氏棒杆菌(*Corynebacterium kutscheri*)首次于 1925 年提出^[3],这种细菌常存在于动物的口腔、颈部淋巴结和胃肠道内,但通常不会表现出明显的临床症状^[4]。然而,伴随年龄的增长、环境压力的变化、实验操作的变化及免疫功能的低下,库氏棒杆菌可能经血液传播。此时,感染症状往往较为非特异性,感染小鼠表现出体重减轻和皱皮等表征^[5]。库氏棒杆菌感染典型的病理变化主要出现在小鼠的肝脏、肾

脏和肺脏等器官,通常呈现灰白色结节。在显微镜下观察,病变区域出现坏死中心(即干酪样坏死灶),其周围环绕着大量嗜中性粒细胞。此外,在脓性病变部位,病原体非常容易被发现^[5-6]。这些病理特征表明,库氏棒杆菌能够引起局部免疫反应并对重要器官造成损伤,影响实验动物的健康状态。因此,在实验动物健康监测中,库氏棒杆菌的检测和控制显得尤为重要。铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)最早由 Migula 于 1900 年提出^[7],这是一种多重耐药的条件致病菌,能够引起免疫功能低下个体的多种急性和慢性感染,包括慢性阻塞性肺疾病、囊性纤维化、癌症、创伤感染、烧伤、败血症及呼吸机相关肺炎等^[8-10]。铜绿假单胞菌在生物膜状态下尤其具有适应性,可以在低氧或其他极端恶劣的环境中存活^[11-12],这种生物膜的形成不仅增强了其对环境压力的抵抗力,还使其对抗生素的耐药性显著增强,从而增加了治疗难度^[13]。另外,铜绿假单胞菌常在潮湿的表面繁殖,特别是医疗设备(如通风设备、呼吸机管道等)中^[14],这些设备成为了铜绿假单胞菌感染的潜在来源。虽然大多数动物感后不立即表现症状,通常呈现潜伏感染的状态,但当免疫系统受到抑制或受到其他外界因素影响时,感染可迅速激化,导致炎症反应、败血症甚至死亡^[15-17]。在实验动物中,库氏棒杆菌和铜绿假单胞菌的潜在危害尤为突出,严重影响实验动物健康状态和实验数据的可靠性^[5,9]。这 2 种病原菌不仅能引发动物的潜伏感染、炎症反应和免疫抑制,还可能在实验过程中导致疾病传播、败血症等严重并发症,进而干扰实验结果真实性^[6]。因此,库氏棒杆菌和铜绿假单胞菌已成为实验动物健康监测中的重点病原菌,是科研人员必须密切关注的对象。为了提高实验动物的健康质量,科

研究人员应加强对这些病原菌的监测,并采取有效的预防和控制措施,以减少病原微生物对实验动物的干扰。此外,建立标准化的检测体系和参考标准物质,将有助于确保实验动物的微生物安全,进而为实验的顺利进行提供有力保障。

本研究通过对这 2 株病原菌进行鉴定及基因组特征分析,以期为实验动物病原细菌标准株的建立,实验动物病原标准物质的研制,以及实验动物质量控制提供重要资源和支撑。

1 材料与方法

1.1 样品

SPF 级实验小鼠饲养于吉林大学实验动物中心,饲养期间各组小鼠自由饮水,饲喂普通维持饲料。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 22–25 °C。所有操作均按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀^[18]。动物实验方案获中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用和管理委员会批准(IACUC XZG-22002)。

本研究实施地点为中国医学科学院医学实验动物研究所三层 BSL-2 实验室(病原微生物学实验室),实验室已获得北京市病原微生物实验室及实验室活动备案,同时实验室已对库氏棒杆菌和铜绿假单胞菌的菌株使用进行了备案,实验室属于生物安全二级实验室,符合三类病原微生物使用标准。

1.2 培养基和主要试剂、仪器

LB 肉汤, Oxoid 公司;血琼脂,北京陆桥技术股份有限公司。PBS 溶液,北京百泰克生物技术有限公司;梅里埃 ANC VITEK2 试剂/VITEK2 革兰氏阴性细菌鉴定卡、革兰氏棒状杆菌鉴定卡、革兰氏阳性细菌药敏卡和革兰氏阴性细菌药敏卡,梅里埃诊断产品上海有限公司;NaCl 试剂,

国药集团化学试剂有限公司。

小型台式冷冻离心机, Eppendorf 公司;高速冷冻离心机, Thermo 公司;微分干涉显微镜, 奥林巴斯株式会社;生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司;生物安全柜, 北京东联哈尔仪器制造有限公司;涡旋振荡器, 精骐有限公司;振荡恒温金属浴, 杭州博日科技有限公司; VITEK2 Compact 微生物全自动分析仪, Biomerieux 公司;台式恒温摇床, 上海世平实验设备有限公司;PCR 扩增仪, Bio-Rad 公司。

1.3 菌株分离及形态学观察

菌株分离及形态学观察参考 Su 等^[18]的研究,取小鼠盲肠内容物和气管组织,溶解于一定的 PBS 溶液中,梯度稀释后涂布接种于 LB 固体培养基上,置于 37 °C 培养箱中培养 24 h。观察菌落生长情况,挑取疑似单菌落接种于 LB 固体培养基上纯化,37 °C 培养过夜,挑取单个菌落进行革兰氏染色,并观察染色结果。所有菌种均分别保藏在 4 °C 和 -80 °C 含有 20% 甘油的冻存管中。

1.4 细菌的生理生化特征及对常见抗生素的药敏测试

挑取纯培养物转接至新的 LB 固体培养基上,放置于 37 °C 恒温培养箱中,在有氧条件下培养 8–16 h 后,在生物安全柜内用无菌棉签挑取单菌落于无菌生理盐水中制备菌悬液。然后使用 VITEK2 Compact 微生物全自动分析仪进行菌种鉴定和药敏测试。采用配套的棒状杆菌鉴定卡(21348),阳性细菌药敏卡(22226),阴性细菌鉴定卡(21241),阴性细菌药敏卡(418985),并按照 Vitek2 系统及各鉴定卡和药敏卡说明书进行生化鉴定和抗生素药敏测试。

1.5 DNA 的提取、PCR 扩增和系统发育分析

DNA 的提取和 PCR 扩增参考 Su 等^[18]的报

道,使用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGAT CCGGCTCAG-3')和 1492R (5'-CCTTACCTTGT TACGACTT-3')对菌株 16S rRNA 基因序列进行 PCR 扩增^[18-19]。PCR 反应体系(50 μ L):2 \times Premix Taq Mixture 25 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 2.5 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 18 μ L。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。基因测序由北京诺赛基因组研究中心有限公司完成,使用 EzBioCloud BLAST (www.ezbiocloud.net/identify)^[20]完成序列比对。

在 EzBioCloud 和 GenBank 数据库中下载相关模式种 16S rDNA 序列,并用 MEGA 11.0^[21]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 11.0^[21]软件抽样分析 1 000 次运算获得。

1.6 基因组测序和分析

菌株基因组序列的测定和组装由深圳华大基因股份有限公司(BGI)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(N50 的比例为 50%,N90 的比例为 90%)时的最后一条 Scaffold 或 Contig 的长度。平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)分析在 EzBioCloud (www.ezbiocloud.net/tools/ani)中由 OrthoANI 计算获得^[22],基因组 DNA-DNA 杂交(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)值通过 GGDC 软件 3.0 运算获得(<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>)^[23]。

1.7 基因组注释

采用 RNAmmer 软件预测 rRNA;采用 tRNAscan 软件预测 tRNA 区域和 tRNA 的二级结构;采用 Infernal 软件与 Rfam 数据库进行比

对得到 sRNA。利用 KEGG、COG 对预测的全部编码蛋白进行功能注释。另外,用毒力基因数据库(virulence factor database, VFDB)和 UniProtKB/Swiss-Prot 蛋白功能数据库进行毒力基因分析^[24]。

2 结果与分析

2.1 形态学特征

疑似库氏棒杆菌分离株在血琼脂平皿呈杆状菌落,颜色为白色,边缘光滑且无溶血现象(图 1A),将该菌株进行革兰氏染色后,镜检结果为革兰氏阳性菌,呈棒锤状或稍弯曲,通常成对或链状排列,偶尔可见栅栏状排列(图 1B),利用干涉显微镜测得该分离株的平均长度为 1.29 μ m。疑似铜绿假单胞菌分离株在 LB 固体培养基上菌落呈杆状或扁平状,边缘不光滑,表面有光泽(图 1C),将该菌株进行革兰氏染色,镜检结果为革兰氏阴性菌,菌体两端钝圆,排列较为松散或不规则,未见荚膜和芽孢(图 1D),利用干涉显微镜测得该分离株的平均长度为 1.80 μ m。

2.2 生理生化特征

利用 VITEK2 Compact 微生物全自动分析仪进行生理生化试验。结果显示,疑似库氏棒杆菌分离株能分解 D-葡萄糖、D-麦芽糖、D-半乳糖、蔗糖、D-甘露醇和 D-山梨醇等,脂肪酶、尿素酶呈阳性反应,但不能分解 D-木糖,并且 α -甘露糖苷酶呈阴性。具体结果已提交到国家微生物科学数据中心,编号为 NMDCX0001774。疑似铜绿假单胞菌分离株能分解 D-葡萄糖和 D-甘露糖等,尿素酶呈阳性反应,但不能分解蔗糖、D-麦芽糖、D-海藻糖和 D-山梨醇等。具体结果已提交到国家微生物科学数据中心,编号为 NMDCX0001775。

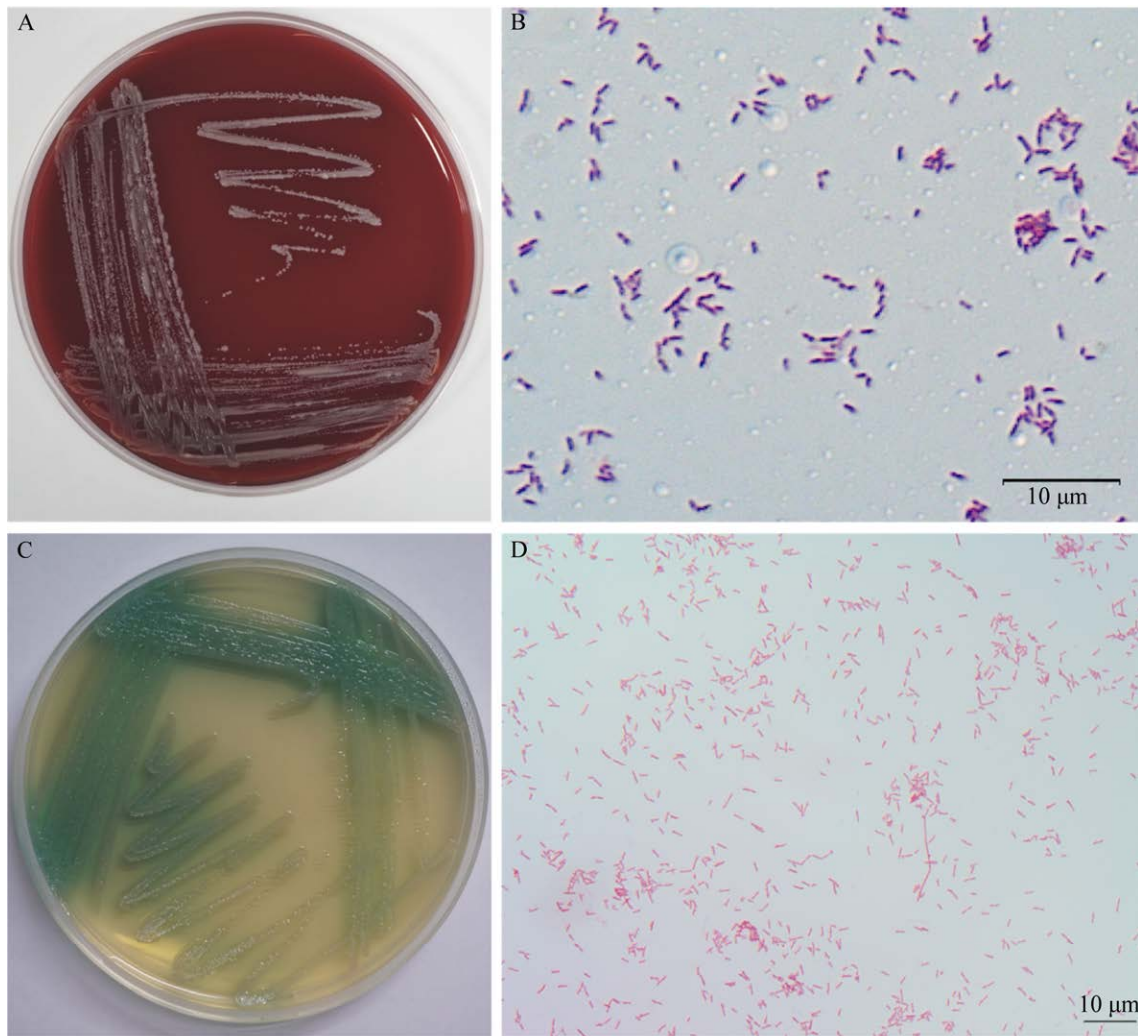


图 1 疑似库氏棒杆菌和铜绿假单胞菌形态学观察 A: 疑似库氏棒杆菌菌落形态; B: 疑似库氏棒杆菌微观形态特征(2 000×); C: 疑似铜绿假单胞菌菌落形态; D: 疑似铜绿假单胞菌微观形态特征(2 000×)。

Figure 1 Morphological observation of suspected *Corynebacterium kutscheri* and *Pseudomonas aeruginosa*. A: Colony morphology of suspected *Corynebacterium kutscheri*. B: Microscopic morphological characteristics of suspected *Corynebacterium kutscheri*. C: Colony morphology of suspected *Pseudomonas aeruginosa*. D: Microscopic morphological characteristics of suspected *Pseudomonas aeruginosa*.

2.3 药敏试验结果

药敏结果显示, 疑似库氏棒杆菌分离株对苯唑西林、呋喃妥因和苄青霉素耐药, 而对庆大霉素、红霉素和万古霉素等 12 种抗生素均敏感(表 1)。疑似铜绿假单胞菌分离株对替卡西林/克拉维酸和替加环素耐药, 对头孢他啶、环丙沙星和左氧氟沙星等 9 种抗生素敏感(表 2)。

2.4 管家基因序列分析

对疑似库氏棒杆菌分离株的 16S rRNA 基因序列进行测序, 得到的片段长度为 1 408 bp, 将该序列提交至 GenBank (登录号: PP762195), 并在 EzBioCloud BLAST (www.ezbiocloud.net/identify)^[20]进行 BLAST 比对。比对结果显示, 该菌株的 16S rRNA 基因序列与 *Corynebacterium*

表 1 疑似库氏棒杆菌分离株药敏试验结果

Table 1 Results of drug sensitivity test of suspected *Corynebacterium kutscheri*

Antimicrobial	MIC	Standard			Result
		S	I	R	
Oxacillin	≥4	≤0.25		≥0.5	R
Quinupristin/Dalfopristin	≤0.25	≤1	2	≥4	S
Gentamicin	≤0.5	≤4	8	≥16	S
Ciprofloxacin	≤0.5	≤1	2	≥4	S
Levofloxacin	≤0.12	≤2	4	≥8	S
Erythromycin	≤0.25	≤0.5	1–4	≥8	S
Clindamycin	≤0.25	≤0.5	1–4	≥8	S
Linezolid	≤0.5	≤2			S
Vancomycin	≤0.5	≤4	8–16	≥32	S
Tetracycline	≤1	≤4	8	≥16	S
Tigecycline	≤0.12	≤0.5			S
Nitrofurantoin	128	≤32	64	≥128	R
Moxifloxacin	≤0.25	≤2	4	≥8	S
Rifampicin	≤0.5	≤1	2	≥4	S
Benzylpenicillin	≥0.5	≤0.125		≥0.25	R

S: Sensitivity; I: Intermediary; R: Resistance; MIC: Minimum inhibitory concentration. The same below.

表 2 疑似铜绿假单胞菌的药敏试验结果

Table 2 Results of drug sensitivity test of suspected *Pseudomonas aeruginosa*

Antimicrobial	MIC	Standard			Result
		Sensitivity (S)	Intermediary (I)	Resistance (R)	
Ticarcillin/Clavulanic acid	≥128	≤16	32–64	≥128	R
Piperacillin/Tazobactam	32	≤16	32–64	≥128	S
Ceftazidime	8	≤8	16	≥32	S
Cefepime	8	≤8	16	≥32	S
Imipenem	2	≤4	8	≥16	S
Meropenem	4	≤4	8	≥16	S
Tobramycin	≤1	≤4	8	≥16	S
Ciprofloxacin	0.5	≤1	2	≥4	S
Levofloxacin	2	≤2	4	≥8	S
Tigecycline	≥8	≤2	4	≥8	R
Amikacin	≤2	≤16	32	≥64	S

kutscheri DSM 20755^T 具有高度同源性, 相似性为 99.93%。随后, 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^[18], 最终采用最大似然法对疑似库氏棒杆菌分离株及其相关模式种进行系统发育分析, 以探讨各菌株

之间的系统演化关系。其系统发育树如图 2A 所示, 疑似分离株与模式种 *C. kutscheri* DSM 20755^T 聚为一个分支, 并且自举数据值为 93%。16S rRNA 基因的系统发育学结果表明, 疑似库氏棒杆菌分离株与模式种 *C. kutscheri* DSM

20755^T具有更近的亲缘关系。

对疑似铜绿假单胞菌分离株的 16S rRNA 基因序列进行测序,获得的片段长度为 1 404 bp,将该基因序列提交至 GenBank (登录号 PP762185),并在 EzBioCloud BLAST (www.ezbiocloud.net/identify)^[20]中进行 BLAST 比对。比对结果显示,该菌株的 16S rRNA 基因序列与 *Pseudomonas aeruginosa* JCM 5962^T具有高度同源性,相似性为 99.64%。随后,选取同源性较高的 16S rRNA 基因序列进行系统发育学分析^[18]。最终,采用最大似然法对疑似铜绿假单胞菌分离株及其相关模式种进行系统发育分析,以探讨各菌株之间的系统演化关系。其系统发育树如图 2B 所示,疑似分离株与模式种 *P. aeruginosa* JCM 5962^T聚为一个分支,且自举数据值为 93%。16S rRNA 基因的系统发育学结果表明,疑似铜绿假单胞菌分离株与模式种 *P. aeruginosa* JCM 5962^T具有更近的亲缘关系。

2.5 全基因组测序

采用深圳华大基因股份有限公司 BGI 自主平台对 2 个样本进行全基因组测序,测序数据通过质控后进行组装,并将 2 株细菌全基因组序列提交至 GenBank (疑似库氏棒杆菌分离株 GenBank 登录号为 JBHOLU000000000;疑似铜绿假单胞菌分离株 GenBank 登录号为 JBHUPQ000000000)。其中,疑似库氏棒杆菌分离株的 G+C 含量为 46.48%,基因组总长度为 2 380 722 bp,而模式种 *C. kutscheri* DSM 20755^T的 G+C 含量平均值为 46.5%,基因组总长度平均值为 2 371 434 bp^[25],疑似铜绿假单胞菌分离株的 G+C 含量为 66.35%,基因组总长度为 6 447 774 bp,模式种 *P. aeruginosa* JCM5962^T的 G+C 含量平均值为 66.1%,基因组总长度平均值为 6 639 581.8 bp^[26](表 3)。

基因组结构注释结果表明,疑似库氏棒杆

菌分离株和疑似铜绿假单胞菌分离株的基因组均包含 1 个拷贝的 5S rRNA 基因、1 个拷贝的 16S rRNA 基因和 1 个拷贝的 23S rRNA 基因,具体的组装信息见表 4。

基于全基因组测序,本研究将分离株与相关模式种的基因组数据进行比较分析。通过将疑似库氏棒杆菌分离株与模式株 *C. kutscheri* DSM 20755^T基因组进行比较,发现两者之间的 ANI 值为 99.31%,dDDH 值为 94.2%,均高于国际标准分类界限(分别是 95%和 70%),表明疑似库氏棒杆菌分离株与 *C. kutscheri* DSM 20755^T相似度最高。同样,通过将疑似铜绿假单胞菌分离株与模式株 *P. aeruginosa* JCM 5962^T的基因组进行比较,发现两者之间的 ANI 值为 99.41%,dDDH 值为 95.2%,均高于国际标准分类界限,表明疑似铜绿假单胞菌分离株与 *P. aeruginosa* JCM 5962^T的相似度最高。

2.6 基因组注释

将疑似库氏棒杆菌分离株基因组中预测得到的 2 201 个基因编码序列与 COG 数据库进行 BLASTp 比对,功能的注释结果分类见图 3A。结果显示,1 493 个基因完成了蛋白注释,占全部基因的 67.83%。其中,注释数量较多的基因功能分别为参与翻译、核糖体结构及生物合成(translation, ribosomal structure and biogenesis)的基因 171 个(11.5%),参与氨基酸的运输与代谢(amino acid transport and metabolism)的基因 171 个(11.5%)及参与辅酶运输和代谢(coenzyme transport and metabolism)的基因 135 个(9%)。经 KEGG 数据库注释,注释分类见图 3B,疑似库氏棒杆菌分离株共有 1 299 个基因参与相应代谢通路,约占总基因数的 59.01%。其中,参与全局和总览图谱(global and overview maps)的蛋白质最多,共 464 个,约占注释蛋白总数的 35.7%,参与氨基酸代谢(amino acid metabolism)

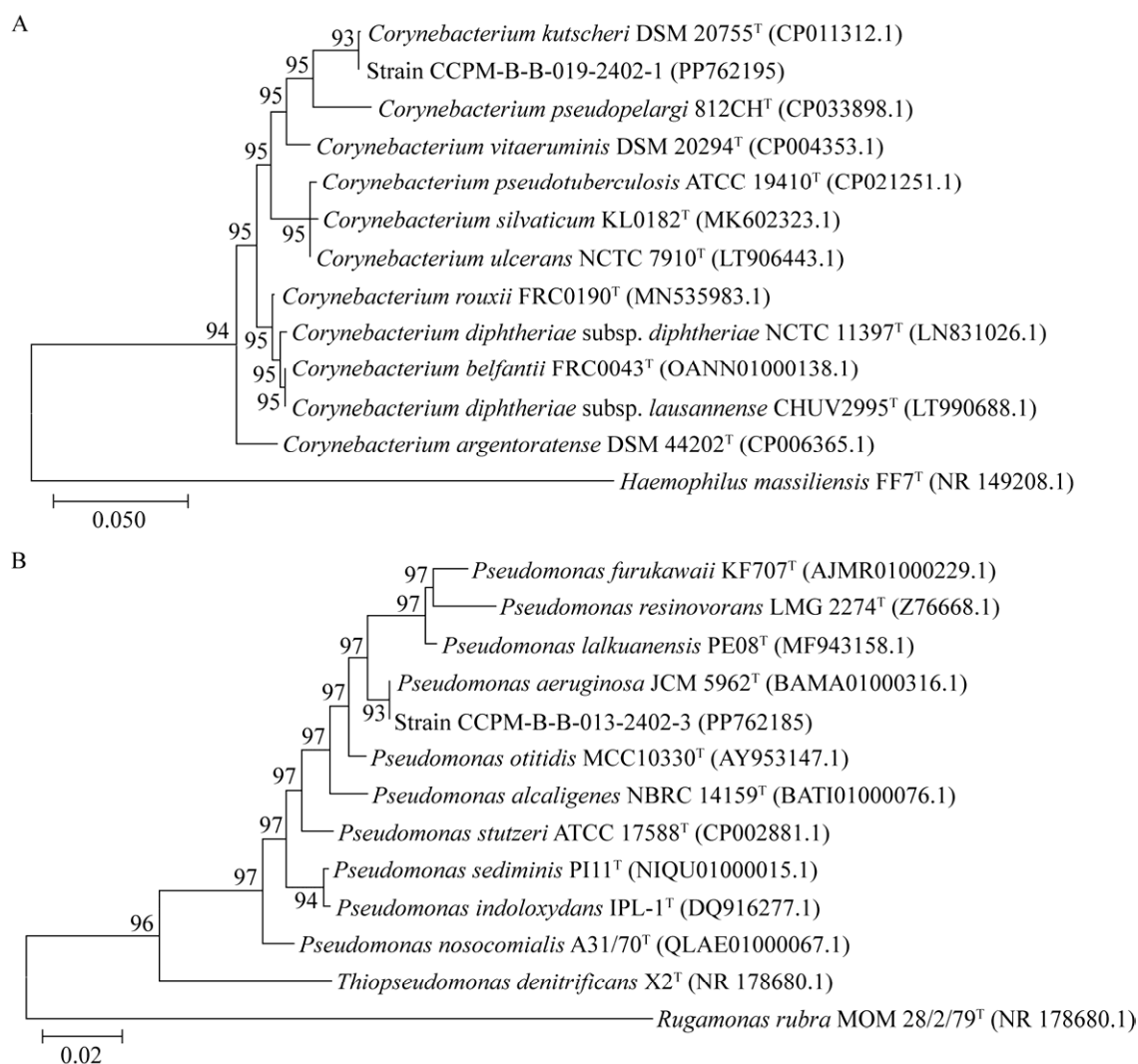


图 2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析 A: 基于 16S rRNA 基因通过最大似然法对库氏棒杆菌 CCPM-B-B-019-2402-1 和相关模式种进行系统发育分析。*Haemophilus massiliensis* FF7^T 为外群。“T”代表模式菌株, 节点上的数字是基于 1 000 个重复的百分比引导值, 每个核苷酸位置有 0.01 个置换, 仅给出超过 50% 的值。B: 基于 16S rRNA 基因通过最大似然法对铜绿假单胞菌 CCPM-B-B-013-2402-3 和相关模式种进行系统发育分析。*Rugamonas rubra* MOM 28/2/79^T 为外群。“T”代表模式菌株, 节点上的数字是基于 1 000 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。

Figure 2 Phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequence. A: Phylogenetic analysis of *Corynebacterium kutscheri* CCPM-B-B-019-2402-1 and related model species was performed based on 16S rRNA gene by maximum likelihood method. *Haemophilus massiliensis* FF7^T is an outgroup. The “T” represents the model strain, and the number on the node is based on a percentage lead value of 1 000 replicates, 0.01 substitutions per nucleotide position, only giving value over 50%. B: Phylogenetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* CCPM-B-B-013-2402-3 and related model species was performed by maximum likelihood method based on 16S rRNA gene sequence. *Rugamonas rubra* MOM 28/2/79^T is an outgroup. The “T” represents the model strain, and the number on the node is based on a percentage lead value of 1 000 repeats, 0.01 substitutions per nucleotide position, only giving value over 50%.

表 3 基因组组装结果

Table 3 Results of gene assembly

Item	Strain CCPM-B-B-019-2402-1		Strain CCPM-B-B-013-2402-3	
	Scaffold	Contig	Scaffold	Contig
Total number (>500 bp)	13	14	61	62
Total length (bp)	2 380 722	2 380 466	6 447 774	6 447 729
N50 length (bp)	741 049	514 834	351 149	351 149
N90 length (bp)	242 911	242 911	106 304	106 304
Max length (bp)	884 723	714 049	663 566	663 566
Min length (bp)	731	731	507	507
Sequence G+C%	46.48	46.48	66.35	66.35

表 4 基因组预测结果统计表

Table 4 Statistical prediction of genomic formation

Sample Name	Genotype	Number	Average length (bp)	Total length (bp)	Genomic proportion (%)
<i>Corynebacterium kutscheri</i>	tRNA	53	76.01	4 029	0.169 2
CCPM-B-B-019-2402-1	5S rRNA	1	116	116	0.004 8
	16S rRNA	1	1 521	1 521	0.063 8
	23S rRNA	1	3 083	3 083	0.129 4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	sRNA	8	90.75	726	0.030 5
CCPM-B-B-013-2402-3	tRNA	60	78.65	4 719	0.073 2
	5S rRNA	1	115	115	0.001 7
	16S rRNA	1	1 524	1 524	0.023 6
	23S rRNA	1	2 889	2 889	0.044 8
	sRNA	576	45.38	26 139	0.405 4

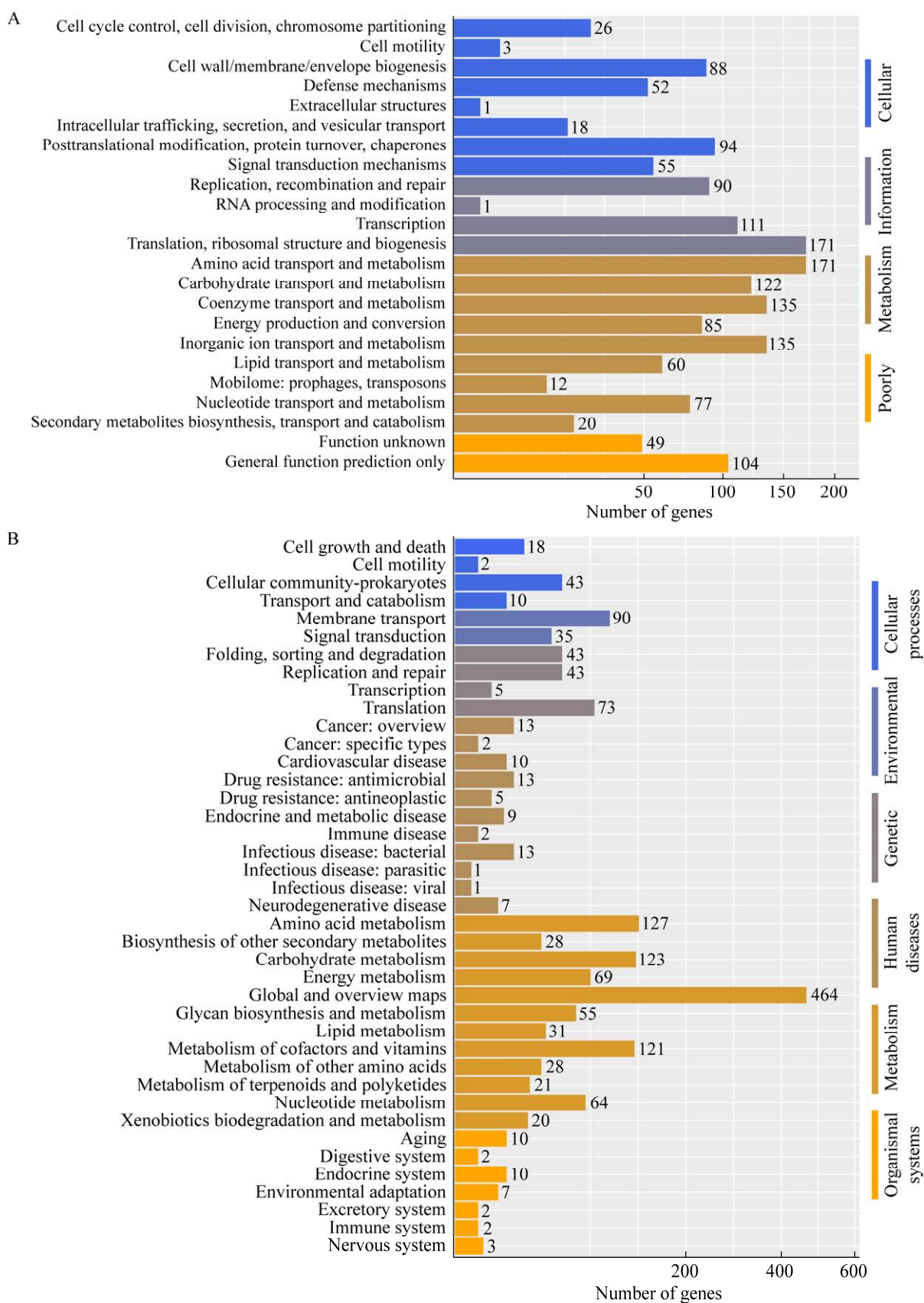
的蛋白质 127 个(9.8%)，参与碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)的蛋白 123 个(9.5%)。

将疑似铜绿假单胞菌分离株基因组中预测得到的 6 091 个基因编码序列与 COG 数据库进行 BLASTp 比对，功能注释结果分类见图 3C。结果显示，4 765 个基因完成了蛋白注释，占全部基因的 78.23%。其中，注释数量较多的基因功能分别为：参与氨基酸的运输与代谢(amino acid transport and metabolism)的基因 522 个(11.0%)，参与转录(transcription)的基因 507 个(10.6%)以及参与信号转导机制(signal transduction mechanisms)的基因 394 个(8.3%)。经 KEGG 数据库注释的功能分类结果见图 3D，疑似铜绿假单胞菌分离株共有 3 850 个基因参与相应代谢

通路，约占总基因数的 63.2%。其中，参与全局和总览图谱(global and overview maps)的蛋白质最多，共有 1 192 个，约占注释蛋白总数的 31.0%，参与氨基酸代谢(amino acid metabolism)的蛋白质 359 个(9.3%)以及参与膜运输(membrane transport)的蛋白质 304 个(7.9%)。

2.7 毒力基因预测结果

经过全基因组测序及序列比对分析，发现疑似库氏棒杆菌分离株携带有 *fagA*、*fagB*、*fagC*、*fagD* 等棒状杆菌属典型毒力因子基因，这些基因与 NCBI 数据库中其他棒状杆菌属相似性在 86.3%–88.1%之间。进一步通过 VFDB 分析，发现疑似库氏棒杆菌分离株的基因组中携带有 139 种潜在的毒力因子基因，结果如图 4A



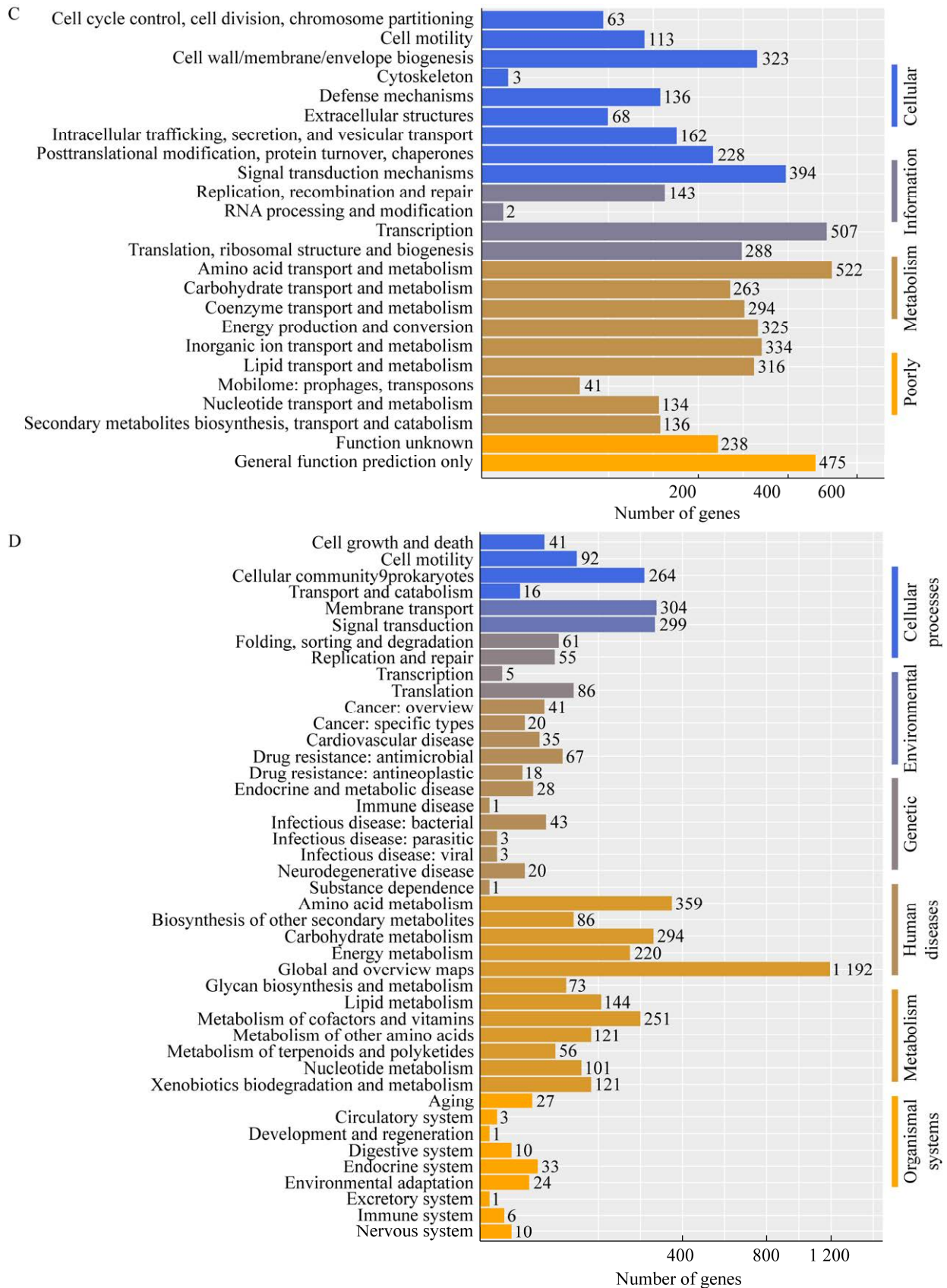


图3 基因组注释图 A: 库氏棒杆菌 COG 数据库功能注释图; B: 库氏棒杆菌 KEGG 数据库注释图; C: 铜绿假单胞菌 COG 数据库功能注释图; D: 铜绿假单胞菌 KEGG 数据库注释图。

Figure 3 Genome annotation map. A: Functional annotation map of COG database about *Corynebacterium kutscheri*; B: Functional annotation map of KEGG database about *Corynebacterium kutscheri*; C: Functional annotation map of COG database about *Pseudomonas aeruginosa*; D: Functional annotation map of KEGG database about *Pseudomonas aeruginosa*.

所示。根据 VFDB 对毒力基因的分类(黏附、入侵、免疫调控、生物膜和抗菌活性/竞争优势等)进行统计分析可知,疑似库氏棒杆菌分离株的基因组中携带的潜在毒力因子基因包括:与营养代谢因素功能相关的基因 55 个,与免疫调控功能相关的基因 21 个,与黏附功能相关的基因 18 个、与生存压力功能相关的基因 14 个,与外泌酶功能相关的基因 2 个、与外源毒素相关的基因 1 个,与生物膜功能相关的基因 1 个。同时,疑似铜绿假单胞菌分离株携带有 *plcB*、*tse6*、*tse5* 等典型毒力因子基因,这些基因与 NCBI 数据库中其他铜绿假单胞菌相似性在 99.8%–100%。通过 VFDB 分析,发现疑似铜绿假单胞菌分离株的基因组中携带有 694 种潜在的毒力因子基因,结果如图 4B 所示。根据 VFDB 对毒力基因的分类进行统计分析可知,疑似铜绿假单胞菌分离株的基因组中携带的潜在毒力因子基因包括与效应因子传输系统功能相关的基因 163 个,与营养代谢因素功能相关的基因共 156 个,与黏附功能相关的基因 88 个,与免疫调控功能相关的基因 76 个,与运动功能相关的基因 74 个,与生物膜功能相关的基因 59 个,与抗菌活性/竞争优势相关的基因 14 个,与生存压力功能相关的基因 14 个,与外源毒素功能相关的基因 8 个,与外泌酶功能相关的基因 4 个,与入侵功能相关的基因 1 个。

2.8 菌种分类位置

根据分离株的形态特征、生理生化特征、16S rRNA 基因同源性检索及系统发育学分析

结果,结合基因组序列分析等实验数据,判定实验小鼠气管来源的疑似库氏棒杆菌分离株为库氏棒杆菌(*C. kutscheri*),该分离株已在国家实验动物与人兽共患病菌毒种保藏分中心保藏,保藏编号为 CCPM-B-B-019-2402-1。同样,基于上述实验结果,判定实验小鼠盲肠内容物来源的疑似铜绿假单胞菌分离株为铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*),该分离株也在国家实验动物与人兽共患病菌毒种保藏分中心保藏,保藏编号为 CCPM-B-B-013-2402-3。

3 讨论

库氏棒杆菌作为动物源性致病菌,通常寄生于大小鼠的上呼吸道,是一种隐性感染源^[8]。在临床上,通常表现为伪结核症状或化脓性炎症等,当动物免疫功能受到损害或者抑制时,可能会导致急性死亡^[9]。铜绿假单胞菌作为条件致病菌,广泛存在于自然界,能在不同的黏膜表面定殖,如呼吸道、消化道、眼睛和生殖系统等,导致多种动物和人类感染,并且症状多样^[27-28]。这 2 种病原微生物均是我国实验动物微生物等级和监测中必须检测的微生物,库氏棒杆菌最早是通过显微镜观察感染的组织和革兰氏染色等方法发现病灶内有小杆菌群,并根据其感染症状进行诊断^[4]。铜绿假单胞菌具有类似特征,另外,通过确证性试验,如在氰胺琼脂上产生蓝绿色色素(pyocyanin)以及在 42 °C 生长,也可用于确定铜绿假单胞菌^[8]。目前,检测这些病原的方法主要包括分离培养、血清学检测、

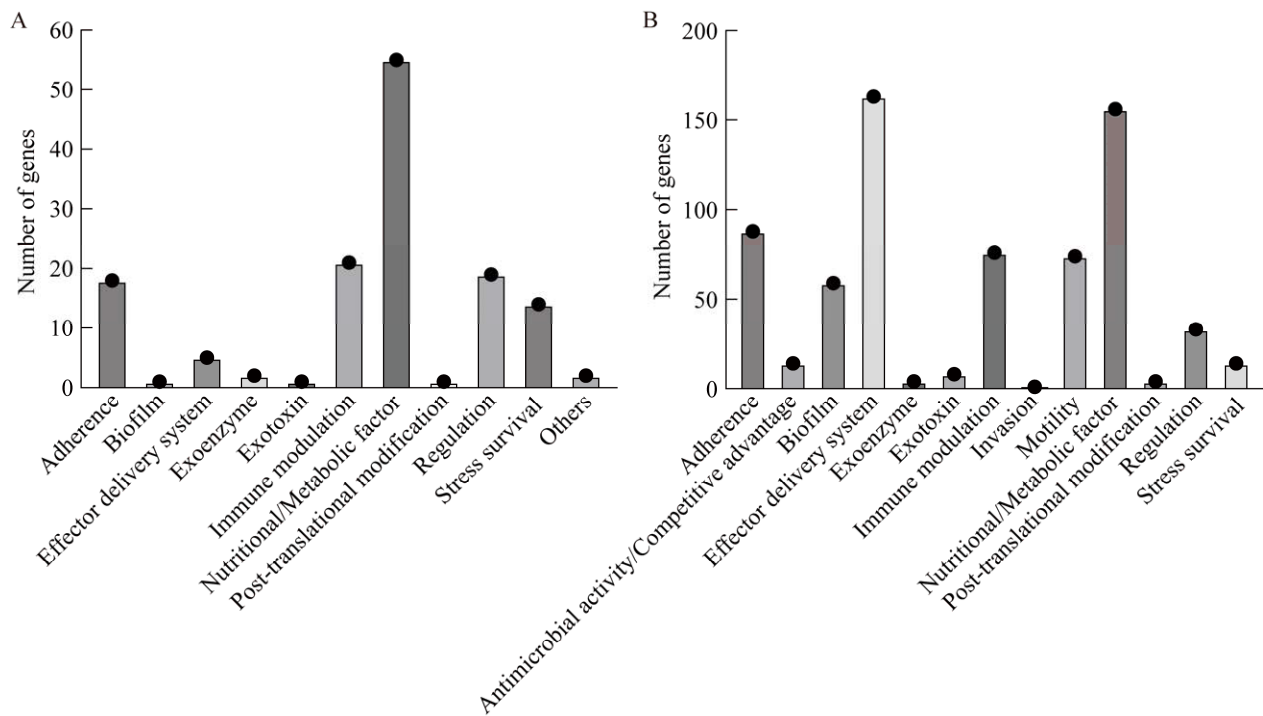


图4 库氏棒杆菌(A)和铜绿假单胞菌(B)基于VFDB的毒力基因统计

Figure 4 Statistical diagram of virulence gene based on the VFDB about *Corynebacterium kutscheri* (A) and *Pseudomonas aeruginosa* (B).

免疫学方法和分子生物学方法。随着分子生物学和分子遗传学的发展, 我们对于微生物的认知已从表面结构特征深入到基因结构层次, 因此, 微生物的检测手段也逐步向生化、免疫与分子生物学技术相结合的方向发展。本研究以实验小鼠体内分离的库氏棒杆菌和铜绿假单胞菌为研究对象, 通过分析其形态特征、生物学特性、药敏特征、系统发育关系及基因组特征, 深入了解其基因组成和功能。

实验动物病原检测方法的建立通常包括检测方法的开发、确认和验证, 而验证过程需要依赖标准物质。然而, 当前实验动物病原检测领域缺乏标准物质, 主要原因在于病原标准株的缺乏。本文旨在通过标准化的方法研究实验动物常见病原的溯源与标准化, 为后续标准物质和标准血清的研发奠定基础。该研究将涉及

标准菌株的建立、标准物质的制备、标准鉴定方法的开发, 以及对检测方法的验证, 确保实验动物病原感染检测研究的规范性和有效性。为进一步建立多种实验动物病原感染的检测方法, 研究实验动物病原感染的消长规律, 以及开展实验动物病原标准株的溯源和标准化研究提供重要支撑。

近年来, 感染性疾病已成为危害人类生命和健康的重大隐患之一。引发这些疾病的病原微生物种类日益复杂, 常见的病原微生物威胁不仅未得到有效消除, 而且部分耐药菌株, 如葡萄球菌、肠球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌等也逐渐出现, 此外, 新兴病原体的出现也增加了临床诊断和治疗的难度。因此, 研究与发展病原微生物的标准化检测技术, 能够准确、快速地确认和检测病原体, 对于感染性疾病的

治疗和预后具有重要意义。

4 结论

本研究从 SPF 级实验小鼠气管组织中分离鉴定出 1 株库氏棒杆菌(*C. kutscheri*) CCPM-B-B-019-2402-1, 从盲肠内容物中分离鉴定出 1 株铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*) CCPM-B-B-013-2402-3。通过革兰氏染色、药敏试验、生理生化试验、PCR 鉴定、系统发育分析、全基因组测序及生物信息学方法, 明确了这 2 株病原细菌的生物学和遗传学特征。本研究为实验动物病原细菌标准株的建立、实验动物病原标准物质的研制以及质量控制提供了重要资源和支撑。

REFERENCES

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 病原微生物: WS/T 812—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
Technical requirements for evaluation of national standard strains of pathogenic microorganisms: WS/T 812—2022[S]. Beijing: Standards Press of China, 2022 (in Chinese).
- [2] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 实验动物 微生物、寄生虫学等级及监测: GB 14922—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
Standardization Administration of the People's Republic of China. Laboratory animal—Microbiological and parasitological standards and monitoring: GB 14922—2022[S]. Beijing: Standards Press of China, 2022 (in Chinese).
- [3] BERGEY DH, HARRISONFC, BREED RS, HAMMER BW, HUNTOON FM. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 2th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1925.
- [4] AMAO H, KANAMOTO T, KOMUKAI Y, TAKAHASHI KW, SAWADA T, SAITO M, SUGIYAMA M. Pathogenicity of *Corynebacterium kutscheri* in the Syrian Hamster[J]. The Journal of Veterinary Medical Science, 1995, 57(4): 715-719.
- [5] HOLMES NE, KORMAN TM. *Corynebacterium kutscheri* infection of skin and soft tissue following rat bite[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2007, 45(10): 3468-3469.
- [6] HANSEN AK, NIELSEN DS, KRYCH L, HANSEN CHF. Bacterial species to be considered in quality assurance of mice and rats[J]. Laboratory Animals, 2019, 53(3): 281-291.
- [7] MIGULA W. System der Bakterien[M]. Jena: G. Fischer, 1900.
- [8] ROSSI E, ROSA RL, BARTELL JA, MARVIG RL, HAAGENSEN JAJ, SOMMER LM, MOLIN S, JOHANSEN HK. *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis[J]. Nature Reviews Microbiology, 2021, 19(5): 331-342.
- [9] JURADO-MARTÍN I, SAINZ-MEJÍAS M, McCLEAN S. *Pseudomonas aeruginosa*: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(6): 3128.
- [10] del MAR CENDRA M, TORRENTS E. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their partners in crime[J]. Biotechnology Advances, 2021, 49: 107734.
- [11] SINHA M, GHOSH N, WIJESINGHE DS, MATHEW-STEINER SS, DAS A, SINGH K, EL MASRY M, KHANNA S, INOUE H, YAMAZAKI K, KAWADA M, GORDILLO GM, ROY S, SEN CK. *Pseudomonas aeruginosa* theft biofilm require host lipids of cutaneous wound[J]. Annals of Surgery, 2023, 277(3): e634-e647.
- [12] TANG P, HASAN MR, CHEMAITELLY H, YASSINE HM, BENSLIMANE FM, AL KHATIB HA, AIMUKDAD S, COYLE P, AYOUB HH, AL KANAANI Z, AL KUWARI E, JEREMIJENKO A, KALEECKAL AH, LATIF AN, SHAIK RM, ABDUL RAHIM HF, NASRALLAH GK, AL KUWARI MG, AL ROMAIHI HE, BUTT AA, et al. BNT162b2 and mRNA-1273 COVID-19 vaccine effectiveness against the SARS-CoV-2 Delta variant in Qatar[J]. Nature Medicine, 2021, 27(12): 2136-2143.
- [13] BLOMQUIST KC, NIX DE. A critical evaluation of newer β -lactam antibiotics for treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. The Annals of Pharmacotherapy, 2021, 55(8): 1010-1024.
- [14] JANGRA V, SHARMA N, CHHILLAR AK. Therapeutic approaches for combating *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. Microbes and Infection, 2022, 24(4): 104950.
- [15] DAIKOS GL, Da CUNHA CA, ROSSOLINI GM, STONE GG, BAILLON-PLOT N, TAWADROUS M, IRANI P. Review of ceftazidime-avibactam for the treatment of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Antibiotics, 2021, 10(9): 1126.
- [16] BOTELHO J, GROSSO F, PEIXE L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms, epidemiology and evolution[J]. Drug Resistance Updates, 2019, 44: 100640.
- [17] HAQUE M, SARTELLI M, McKIMM J, ABU BAKAR M. Health care-associated infections: an overview[J]. Infection and Drug Resistance, 2018, 11: 2321-2333.
- [18] 苏磊, 熊莉娟, 张丽芳, 李夏, 李雪, 石伟雄, 肖芳平, 鲍琳琳, 周银平, 向志光. 国家病原微生物资源库对一株嗜肺嗜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, LI X, LI X, SHI WX, XIAO FP, BAO LL, ZHOU YP, XIANG ZG. Standardized identification and inclusion of a strain of *Rodentibacter pneumotropicus* in a national pathogenic microorganism resource database[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2023, 33(4): 36-42 (in Chinese).
- [19] PHENG S, HAN HL, PARK DS, CHUNG CH, KIM SG. *Lactococcus kimchii* sp. nov., a new lactic acid bacterium isolated from kimchi[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,

- 2020, 70(1): 505-510.
- [20] YOON SH, HA SM, KWON S, LIM J, KIM Y, SEO H, CHUN J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(5): 1613-1617.
- [21] FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 1985, 39(4): 783-791.
- [22] AUCH AF, von JAN M, KLENK HP, GÖKER M. Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison[J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2010, 2(1): 117-134.
- [23] MEIER-KOLTHOFF JP, AUCH AF, KLENK HP, GÖKER M. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions[J]. *BMC Bioinformatics*, 2013, 14: 60.
- [24] 谭佳, 曾艳兵, 李海琴, 张帆帆, 杨群, 方绍培, 季华员, 谭美芳. 一株猪源化脓隐秘杆菌的鉴定、生物学特性研究与基因组分析[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(11): 4198-4208.
TAN J, ZENG YB, LI HQ, ZHANG FF, YANG Q, FANG SP, JI HY, TAN MF. Identification, biological characterization, and genomic analysis of *Trueperella pyogenes* isolated from swine[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(11): 4198-4208 (in Chinese).
- [25] TATUSOVA T, CIUFO S, FEDOROV B, O'NEILL K, TOLSTOY I. RefSeq microbial genomes database: new representation and annotation strategy[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(Database issue): D553-D559.
- [26] NAKANO K, TERABAYASHI Y, SHIROMA A, SHIMOJI M, TAMOTSU H, ASHIMINE N, OHKI S, SHINZATO M, TERUYA K, SATOU K, HIRANO T. First complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* (schroeter 1872) migula 1900 (DSM 50071^T), determined using PacBio single-molecule real-time technology[J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(4): e00932-15.
- [27] LÓPEZ-CALLEJA AI, MORILLA MORALES E, NUÑEZ MEDINA R, FERNÁNDEZ ESGUEVA M, SAHAGÚN PAREJA J, GARCÍA-LECHUZ MOYA JM, FERRER CERÓN I, VIÑUELAS BAYON J, REZUSTA LÓPEZ A. Antimicrobial activity of ceftolozane-tazobactam against multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a Spanish hospital[J]. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 2019, 32(1): 68-72.
- [28] McCARTHY K, PATERSON D. Increased risk of death with recurrent *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2017, 88(2): 152-157.