



嗜肺巴斯德杆菌研究进展

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】 嗜肺巴斯德杆菌(*Pasteurella pneumotropica*)是一种条件致病菌,人兽共患。主要危害啮齿类动物,特别是免疫缺陷或抑制的动物,可引起炎症和脓肿等症状。该菌是实验动物中感染率最高的病原菌之一,多呈隐性感染,给动物实验带来了极大的干扰。本文针对嗜肺巴斯德杆菌的流行病学、检测和鉴定、分子分型和防治等方面进行综述。

【关键词】 嗜肺巴斯德杆菌;检测方法;分子分型;防治

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 02-0090-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.02.0020

Research progress on *Pasteurella pneumotropica*

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】 *Pasteurella pneumotropica* is an opportunistic and zoonotic pathogen. It mainly infects rodents, especially immunodeficient or immunosuppressed animals, and causes inflammation and abscesses. It is one of the highest positive rate infection pathogens in laboratory animals. The contamination and asymptomatic infections of Infection of *P. pneumotropica* could significantly interfere in vary experiments. This review will deal with *P. pneumotropica* epidemiology, detection and identification methods, molecular typing and control and so on.

【Key words】 *Pasteurella pneumotropica*, test methods, molecular typing, control

1 概述

嗜肺巴斯德杆菌(*Pasteurella pneumotropica*, PP)属于巴斯德菌科(Pasteurellaceae),巴斯德菌属(*Pasteurella*),是一种革兰阴性,无动力,无芽孢的短杆或球杆菌。PP主要有两种生物型,分别是Jawetz生物型和Heyl生物型,二者对碳源和氨基酸的利用有所不同。

PP作为一种条件致病菌,分布广泛,主要感染啮齿类动物,对实验动物中小鼠、大鼠和豚鼠的危害较大。在国内外的实验动物中,PP是目前感染率最高的病原菌之一^[1,2]。PP也是人兽共患病原,能

够引起免疫缺陷动物或免疫功能低下的动物发病,引起人的局部和全身感染。与*Haemophilus-Pasteurella-Actinobacillus*(HPA)中的菌株(如流感嗜血杆菌、多杀巴斯德杆菌等)相比,对其研究还很欠缺。本文通过对PP的检测方法、分型研究、毒力因子、免疫应答和防控措施等方面进行综述,了解PP在国内外的研究现状,促进对PP检测的准确性和研究的深入。

2 感染和致病性

2.1 动物感染

PP能够感染啮齿类动物和其他动物,如猫、狗和禽类等。某些寄生虫可以作为中间宿主。有报道

[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@nicbp.org.cn。

显示,脾体内携带的人兽共患病原中,PP 所占比例最高,分布最广泛^[3],极易通过叮咬进行传播。

PP 主要能够引起动物肺、子宫、眼部以及肠道的感染,可以在小肠内生长繁殖。一般临床症状为皮下脓肿及眼炎、结膜炎、泪腺炎、子宫炎症等。从发病啮齿动物的上呼吸道(鼻咽部),结膜和鼻泪管及其他组织中,包括气管、肺、膀胱、表皮、精囊、阴道和子宫均可分离到此菌。PP 引起动物发病取决于感染菌株、动物的品种、品系及环境因素等。包括免疫功能是否异常,是否混合感染其他病原菌,饲养密度的大小,以及所进行的动物实验等。ATCC35149 和 CNP160 两 NAD 依赖型标准株感染 F344 大鼠后,可至大鼠喷嚏。病理检查可见鼻腔黏膜的炎症和坏死。而 NAD 非依赖型的菌株无致病性和病理变化^[4]。乳鼠更易发生鼻咽部的感染,经接触上呼吸道、子宫的分泌物或粪便形成感染。

不同动物来源的 PP 菌株对宿主有着较强的选择适应性,大鼠分离株不一定能够感染小鼠,而小鼠分离株则可以感染大鼠。Boot 将大、小鼠来源的 PP 人工感染小鼠,先感染了 PP 小鼠株(生物型 Jawetz, NCTC 8141)后,再被感染大鼠株(生物型 Heyl, SSI P331)。证实两株 PP 不能同时存在于小鼠体内,之前所感染的小鼠株被后感染的大鼠株竞争性去除^[5]。

2.2 人类感染

人感染此菌多数情况是接触了带菌宠物,被咬伤、抓伤后受到感染。不同年龄和型别的人均可感染,主要引起关节炎、脓肿,严重者可发热、盗汗、明显消瘦和菌血症。PP 可造成手术部位红肿,流绿脓,造成院内感染^[6]。

2.3 毒力因子和免疫应答

PP 的毒力因子尚不明确,但编码 RTX 毒素的 *pnxIA* 和 *pnxIIA* 两基因在 PP 感染后的表达量均有所升高。在早期阶段,*pnxIA* 的表达量升高,而 *pnxIIA* 在后期和平台期升高。用 Southern blotting 方法在 82% 的分离株中检测到了 *pnxIA* 基因,而 *pnxIIA* 为 39%。两基因的表达蛋白对绵阳和啮齿动物的红血球具有一定的溶血作用,推测这两种基因很可能是 PP 的毒力因子之一。另外 *pnxIIIA* 的编码蛋白对细胞的毒性与前两种毒素蛋白相比,对细胞的毒性更小,可以粘附于细胞表面并存在于胞外基质中,能增强对红细胞的溶血作用^[7]。

将 PP 人工感染 C57BL/6 小鼠后,IL1 α , TNF α -

pha, CCL3, CXCL1, and CXCL2 等细胞因子在感染后 7 d 均轻微上调。IL1 β mRNA 在感染后 28 d 仍呈上调状态,而且不随着感染菌量的多少而出现大的变化^[8]。因此在进行对数据要求精细的动物实验时,避免动物受到 PP 污染非常必要。See 和 Thomas^[9]用流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)与 PP 的同源蛋白 P4、P6、P26 和 D15 免疫小鼠,证实 P6 等重组蛋白具有对小鼠的保护作用,能够保护肺部不受 PP 侵染。

3 检测方法

3.1 分离培养和生化鉴定

PP 在血琼脂平皿上 37 $^{\circ}$ C 培养 24 ~ 48 h,能够形成 0.5 ~ 1.5mm 左右灰白色,或者浅黄色,光滑圆润的不溶血菌落,少数菌株轻微溶血。但血琼脂中加入血的不同会对溶血结果产生影响。有的菌株在马血琼脂培养基上溶血,而在羊血琼脂培养基上则不溶血,相反的情况也会出现。Jawetz 型菌落的颜色通常为灰白色,Heyl 型菌落的颜色则为黄色。大多数菌株在麦康凯琼脂上培养 48h 不生长。其表型和基因特征与放线菌属相似,不同的菌株在吡啶和鸟氨酸脱羧酶的产生有所不同,不发酵甘露醇。另外菌株对 NAD 的依赖性也可以作为 PP 的鉴定指标。

3.2 血清学方法

血清凝集试验是检测 PP 的一项重要参考项目。凝集试验所用阳性血清是由全菌抗原免疫相应动物获得的。基于两种生物型的差异,可疑菌株需要用生物型 Jawetz 和 Heyl 两种免疫血清分别进行检测。由于全菌抗原极易发生交叉反应,国内已有研究用脂多糖(LPS)和外膜蛋白(OMP)作为免疫抗原,具有更好的抗原特异性和敏感性^[10]。在实际检测过程中,经常会遇到分离培养和血清凝集试验不能完成对 PP 的有效检测,这时还需要采用 PCR 方法进行验证。

3.3 PCR

3.3.1 基于 16S rRNA

对 PP 进行 PCR 鉴别的目的基因主要是 16S rRNA、蛋白编码基因、转录间隔区(ITS)等。其中 16S rRNA 进化速率缓慢,区别力好,相对保守,在 PP 的 PCR 鉴定中也是最常用的区段。有的方法已被证明能够将大部分 PP 菌株与巴斯德菌属的其他菌株相区别。Wang 等^[11]首先根据 PP 标准菌株 ATCC35149 株的 16S rDNA 序列建立了 PP 的 PCR

检测方法。该方法对于检测 Jawetz 型具有很好的特异性,可得到 395bp 的目的片段,但是不能对 Heyl 型进行有效的扩增。Nozu 等^[12]同样根据 16SrRNA 建立了能扩增两种生物型菌株的 PCR 方法,目的片段均为 296bp。可是此方法特异性不佳,对巴斯德菌科的其他属也会产生相同的目的条带。在此之后,Bootz 等随后建立巴斯德菌科的 PCR 检测方法,能够对巴斯德菌科的巴斯德杆菌属、放线杆菌属、嗜血杆菌属等进行检测。该方法可以对巴斯德菌科的几乎所有菌株进行有效扩增,扩增出 510bp 的目的条带。但是其最大的不足是无法对上述种属的菌株进行区分,只能用于初筛是否含有巴斯德菌科的菌株,不能单独用于 PP 的检测。Kodjo 等^[13]将 PCR 和 EcoRI 限制性酶切相结合扩增 16S rDNA,能将 Jawetz 和 Heyl 型的菌株分别切为 596 /341bp 和 346/218bp 两组片段,成功的区分了两型菌株。

Dole 等^[14]根据两型菌株分别设计了各自的 16Sr RNA 检测探针,达到了区分两型的目的,与 PCR 相比具有更好的特异性和敏感性。目前对于国内实验动物质量检测而言,real-time PCR 的成本是其普遍应用的最大障碍。

3.3.2 基于蛋白编码基因

除了 16S rRNA 基因外,编码 DNA 促旋酶 B 亚单位蛋白基因(*gyrB*)更适合亲缘关系相近菌株的区分。Hayashimoto 等^[15]针对 *gyrB* 基因设计了一对简并引物,能够同时扩增 Jawetz 和 Heyl 两种生物型的 PP。Jawetz 的扩增产物为 1039bp,Heyl 的产物为 1033bp,一定程度上实现了一对引物同时区分两种 PP 生物型。不过两种生物型产生的条带太过接近,以至于无法从琼脂糖电泳中用肉眼分辨。Dole 等^[15]利用编码 RNA 聚合酶 β 亚基基因(*rpoB*)对 PP 进行检测,产生 560bp 的目的片段,尽管经测序后能够鉴别 PP,问题依然是不能将某些相近菌株区分开。Gautier 等^[16]根据多杀巴斯德杆菌 Pm70 株设计的 *SodA_{im}* 基因特异性引物,扩增巴斯德菌科的菌株,通过对目的片段的测序实现对巴斯德菌科菌株的鉴定区分。其中 PP 分离株的 *SodA_{im}* 基因与其他同科菌属的差异最小,相似度大于 98%,而典型菌株的相似度仅有 92%,因此对 *sodA_{im}* 基因的测序有可能成为 PP 准确快速鉴定的有效方法之一。

3.3.3 基于转录间隔区 ITS

Benga 等^[17]尝试利用转录间隔区(ITS)对从啮齿动物分离到的 PP(Jawetz 和 Heyl 型)、小鼠放线

杆菌、鼠流感嗜血杆菌等 56 株巴斯德菌科进行鉴别。经测序发现种间的 ITS 区间明显不同,而同种的 ITS 区间高度保守,能够进一步用于设计探针对巴斯德菌科各菌株的鉴别。

PP 在啮齿类实验动物中的感染率始终居高不下,对动物实验的干扰始终存有隐患。另外它在临床感染的趋势也在逐渐增高,应该引起我们足够的重视,因此对 PP 的检测就显得尤为重要。现阶段单独使用生化鉴定或是 PCR 方法都有一定的局限性,传统的生化鉴定结合血清学方法虽然经典,但很可能由于检测试剂和主观判断的差异而影响结果。市场上几种自动化细菌鉴定试剂盒对 PP 的生化反应仍然缺乏全面数据支持,经常无法鉴定或鉴定错误。通过 16S rDNA 的测序表明,生化结果的准确率仅有 54.6%。使用 Wang 的引物能扩增出目的片段的菌株,PP 准确率为 100%。而且在假阳性结果中,使用 Nozu 的 PCR 方法均能扩增出目的片段。受限于 Genbank 数据库中 PP 序列信息的不足,PCR 检测方法的特异性、相近菌株区分和两种生物型的区分仍然是亟待解决的问题。

4 分型研究

4.1 表型分型

对 PP 的表型分型主要包括菌株的菌落颜色、形态、溶血性、菌体颜色和生化反应等。我们曾对 164 株 PP 分离株的上述表型特征进行了分析。受试的 164 株菌株共分出了 81 个型别,相似度 59.5% ~ 100%。结果没有明显体现出菌株与宿主、分离时间的相关性。

4.2 ARDRA (Amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis)

Sasaki 等^[18]对 PP 的 16S rDNA 用限制性内切酶 Hae III 进行酶切进行分型,结果显示这种方法能够将受试的 52 株 PP 酶切出 4 种不同带型。分型结果同样没有反应出菌株与宿主间具有相关性。

4.3 基因测序

4.3.1 16S rDNA

对菌株 16S rDNA 的序列比对分型相对更为简便直接,Sasaki 等^[19]通过对 30 株 PP 16S rDNA 1344bp 片段(包括 24 株分离株,3 株标准株和 3 段 Genbank 序列)比对和系统发育分析,将参比序列分出 5 种类型,分型结果能够与菌株宿主和溶血性相对应,显示出一定的相关性。但是由于 HPA 菌属之

间 16S rDNA 的相似程度太高,仅依靠 16S rDNA 很难实现对这些菌株的区分,仍需要生化试验和溶血性试验的辅助。

4.3.2 gyrB 基因

Hayashimoto 等^[20]对 49 株 PP 分离株进行了 gyrB 基因的测序,绘制了系统发育树。受试菌株被分为了 A、B 和 C 三个基因簇,A 簇为 Jawetz 型的小鼠分离株,B 簇为 Heyl 型的大鼠分离株,C 簇都为分离自小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠和兔的 Heyl 型菌株。说明用 gyrB 基因进行分型,能够很好的将两种生物型的菌株分开,能够体现出分型与菌株宿主来源的关系。

4.4 PFGE

嗜肺巴斯德杆菌 PFGE 分型所用限制性内切酶主要是参考多杀巴斯德杆菌和流感嗜血杆菌。Sasaki 等^[19]选择 ApaI 和 NotI 限制性内切酶对 PP 进行 PFGE 分型,两种内切酶的分型能力相似,分型的相似度分别为 59% 和 75%。有 14 株菌两种内切酶都不能够有效分型,限制性内切酶的选择还有待更多的尝试。

5 防治

5.1 自身免疫

PP 在免疫功能正常的动物中一般呈隐性感染,不表现出任何的临床症状。小鼠在感染后 PP 后的第 2 天,肺中的 T 淋巴细胞(CD4 + 和 CD8 +)、自然杀伤细胞 CD49b(DX5)和巨噬细胞 F4/80 + 明显增多。而在感染后一周,这些细胞的又会恢复到正常范围^[21]。MHCII, Tlr4 和 Nramp1 三个基因在小鼠肺部免疫中起着重要的作用,参与免疫的重要性程度为 MHCII = Tlr4 > Nramp1。缺乏这三种基因的小鼠对 PP 更加易感^[22]。其中 Tlr4 对防止 PP 感染具有至关重要的作用。跨膜受体 Tlr4 有助于巨噬细胞在感染早期对 PP 进行识别和清除,即使是缺乏 CD4 + T 细胞,也可以实现对机体的保护。

5.2 药物治疗

PP 对 1-4 代头孢菌素类抗生素及四环素、哌拉西林、复方新诺明、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、青霉素等各类抗生素均敏感。通过药敏试验表明大部分 PP 菌株对恩氟沙星菌敏感, MIC \leq 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[23]。用恩氟沙星经由饮水长期饲喂小鼠,可以有效去除小鼠种群中 PP。而使用恩氟沙星是否会对动物实验、微生物菌群和生理指标造成影响有

待进一步研究。

5.3 环境因素

在各种环境因素中,饮水、饲料、垫料和换气次数等是主要应该控制的项目。室温下(20 ~ 25℃), PP 在 PBS 中最长可存活 6 d,在蒸馏水和自来水中只能存活 3d^[24]。在饲料、垫料中,PP 的污染几率也很小,即便是纯培养的 PP 菌落,血琼脂培养基上存活也不会超过一周。饮水、饲料和垫料的污染并不是实验动物感染 PP 的主要原因。

使用强制空气通风微隔离系统(FVMIS),可以有效避免 PP 在小鼠之间的传播。而同样条件下饲养在开放环境中的小鼠则感染了 PP。由此可见,空气的净化对控制 PP 的传播是至关重要的。相信随着独立通风笼具(IVC)的广泛使用,以及严格的饲养管理,包括 PP 在内的呼吸道病原菌能够得到有效的控制。

6 公共卫生意义

到目前为止,国内尚未见嗜肺巴斯德杆菌感染人的报道。但根据实验动物微生物监测的结果可以推测,该菌在我国环境中同样广泛存在。由于流浪猫、犬的大量存在,以及饲养各种动物作为宠物的人越来越多,该菌的暴露人群的基数是非常庞大的。这些动物都可能作为该菌的中间宿主,通过抓咬感染于人,因此应该引起我们足够的重视。

参 考 文 献

- [1] 范薇,隋丽华,刘永梅,等. 普通级啮齿类实验动物部分细菌携带情况的初步调查[J]. 实验动物科学与管理, 2001, 18(2):18-20.
- [2] Hayashimoto N, Morita H, Ishida T, et al. Current microbiological status of laboratory mice and rats in experimental facilities in Japan[J]. Exp Anim. 2013, 62(1):41-48.
- [3] Stojek NM, Dutkiewicz J. Studies on the occurrence of Gram-negative bacteria in ticks; Ixodes ricinus as a potential vector of Pasteurella[J]. Ann Agric Environ Med. 2004, 11(2):319-322.
- [4] Hayashimoto N, Yasuda M, Ueno M, et al. Experimental infection studies of Pasteurella pneumotropica and V-factor dependent Pasteurellaceae for F344-rnu rats[J]. Exp Anim. 2008, 57(1):57-63.
- [5] Boot R. A Pasteurella pneumotropica Strain of mouse origin colonizes rats but is out competed by a P. pneumotropica strain of rat origin[J]. Scand. J. Lab. Anim. Sci. 2010, 37(4):261-265.
- [6] Guillard T, Martin M, Duval V, et al. Respiratory tract colonization by Pasteurella pneumotropica in a patient with an alpha1 -

- antitrypsin deficiency unexpectedly well identified by automated system Vitek 2[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010,68(2):190-192.
- [7] Sasaki H, Ishikawa H, Sato T, et al. Molecular and virulence characteristics of an outer membrane-associated RTX exoprotein in *Pasteurella pneumotropica* [J]. *BMC Microbiol.* 2011, 17(11):55.
- [8] Patten CC Jr, Myles MH, Franklin CL, et al. Perturbations in cytokine gene expression after inoculation of C57BL/6 mice with *Pasteurella pneumotropica* [J]. *Comp Med.* 2010,60(1):18-24.
- [9] See SB, Thomas WR. Protective anti-outer membrane protein immunity against *Pasteurella pneumotropica* infection of mice [J]. *Microbes Infect.* 2013,15(6-7):470-479.
- [10] 张丽芳,刘星,李红. 嗜肺巴斯德杆菌外膜蛋白和脂多糖抗原在血清学诊断中的意义[J]. *中国实验动物学报*,2003,11(4):225-229.
- [11] Wang RF, Campbell W, Cao WW, et al. Detection of *Pasteurella pneumotropica* in laboratory mice and rats by polymerase chain reaction[J]. *Lab Anim Sci* 1996,46:81-85.
- [12] Nozu R, Goto K, Ohashi H, et al. Evaluation of PCR as a means of identification of *Pasteurella pneumotropica* [J]. *Exp Anim* 1999,48:51-54.
- [13] Kodjo A, Villard L, Veillet F, et al. Identification by 16S rDNA fragment amplification and determination of genetic diversity by random amplified polymorphic DNA analysis of *Pasteurella pneumotropica* isolated from laboratory rodents. *Lab Anim Sci* 1999, 49:49-53.
- [14] Dole VS, Banu LA, Fister RD, et al. Assessment of rpoB and 16S rRNA genes as targets for PCR-based identification of *Pasteurella pneumotropica* [J]. *Comp Med.* 2010,60(6):427-435.
- [15] Hayashimoto N, Ueno M, Takakura A, et al. A specific polymerase chain reaction based on the gyrB gene sequence and subsequent restriction fragment length polymorphism analysis of *Pasteurella pneumotropica* isolates from laboratory mice [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2007;46(2):54-58.
- [16] Gautier AL, Dubois D, Escande F, et al. Rapid and accurate identification of human isolates of *Pasteurella* and related species by sequencing the sodA gene [J]. *J Clin Microbiol.* 2005,43(5):2307-2314.
- [17] Benga L, Benten WP, Engelhardt E, et al. Analysis of 16S-23S rRNA internal transcribed spacer regions in *Pasteurellaceae* isolated from laboratory rodents [J]. *J Microbiol Methods.* 2012,90(3):342-349.
- [18] Sasaki H, Kawamoto E, Okiyama E, et al. Molecular typing of *Pasteurella pneumotropica* isolated from rodents by amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis and pulsed-field gel electrophoresis [J]. *Microbiol Immunol.* 2006,50(4):265-272.
- [19] Sasaki H, Kawamoto E, Ueshiba H, et al. Phylogenetic relationship of *Pasteurella pneumotropica* isolates from laboratory rodents based on 16S rDNA sequence [J]. *J Vet Med Sci.* 2006,68(6):639-641.
- [20] Hayashimoto N, Ueno M, Takakura A, et al. Phylogenetic analysis of isolates of *Pasteurella pneumotropica* from laboratory animals based on the gyrB gene sequence [J]. *Exp Anim.* 2006,55(5):487-490.
- [21] Schroeder WG, Mitrescu LM, Hart ML, et al. Flexible low-cost system for small animal aerosol inhalation exposure to drugs, proteins, inflammatory agents, and infectious agents [J]. *Biotechniques*, 2009,46(3 Suppl):Piii-Pviii.
- [22] Chapes SK, Mosier DA, Wright AD, et al. MHCII, Tlr4 and Nramp1 genes control host pulmonary resistance against the opportunistic bacterium *Pasteurella pneumotropica* [J]. *J Leukoc Biol.* 2001,69(3):381-386.
- [23] Sasaki H, Kawamoto E, Kunita S, et al. Comparison of the in vitro susceptibility of rodent isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pasteurella pneumotropica* to enrofloxacin [J]. *J Vet Diagn Invest.* 2007,19(5):557-560.
- [24] Serre S, Veillet F, Hardy P, et al. Survival of rodent isolated *Pasteurella pneumotropica*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* in different types of water [J]. *Revue Méd Vét*, 2004, 155(8-9):435-439.

[收稿日期] 2013-09-03