

Dole qPCR 检测嗜肺巴斯德杆菌的可靠性研究 及在啮齿类实验动物质量监测中的应用*

王立鹏, 李永旺, 王晨娟, 杨玲焰 (苏州西山生物技术有限公司, 江苏苏州 215123)

摘要:目的 研究适用于啮齿类实验动物质量监测中嗜肺巴斯德杆菌快速可靠的检测方法。方法 对17株标准菌株及76株嗜肺巴斯德杆菌疑似分离菌株进行检测,分析比较文献中4种PCR检测方法的敏感度和特异度,选择最优PCR方法,并将其应用于22个厂家的312只实验动物(包括191只小鼠,57只大鼠,64只沙鼠)气管和肠内容物样本的检测,同时与国标中的细菌分离培养加生化鉴定方法检出率进行比对。结果 Dole qPCR和Benga mPCR能特异检出疑似嗜肺巴斯德杆菌的分离株中所有的Heyl型和Jawetz型;Benga mPCR和巴斯德菌科引物的Bootz PCR虽能检出疑似分离菌株中所有嗜肺巴斯德杆菌Heyl型和Jawetz型,却不能与巴斯德菌科其它细菌相区分;高正琴等^[8]报道的qPCR方法,虽然敏感度高,但特异度较差。因此选择了敏感度高、特异度强的Dole qPCR方法,应用于啮齿类实验动物呼吸道与肠内容物样本嗜肺巴斯德杆菌的筛查。对191只小鼠,57只大鼠以及64只沙鼠调查显示,小鼠气管和肠内容物中阳性率分别为25.7%和27.2%,大鼠分别为28.1%和29.8%,沙鼠分别为26.6%和21.9%;小鼠、大鼠和沙鼠的PCR总阳性率(气管和/或肠内容物阳性)分别为39.3%、35.1%和34.4%,而传统分离培养方法总检出率仅为4.7%、15.8%和23.4%。结论 嗜肺巴斯德杆菌Dole qPCR方法的阳性检出率远高于传统培养方法,更适合于实验动物的快速质量监测。

关键词:嗜肺巴斯德杆菌;Dole;PCR;啮齿类;实验动物

中图分类号:R-332 文献标志码:A 文章编号:1671-7414(2019)05-109-06

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2019.05.027

Reliability Research of Dole qPCR Method on *Pasteurella Pneumotropica* and Application in Health Screening of Laboratory Rodents

WANG Li-peng, LI Yong-wang, WANG Chen-juan, YANG Ling-yan

(Suzhou Xishan Biotechnology CO. LTD, Jiangsu Suzhou 215123, China)

Abstract: **Objective** To study the rapid and reliable detection method for *Pasteurella pneumotropica* (PP) and apply it to the quality monitoring of laboratory rodents. **Methods** To compare the sensitivity and specificity of 4 different polymerase chain reaction (PCR) methods on 17 standard strains and 76 suspected isolates of PP and select the best PCR method, tracheas and intestinal contents from 312 rodent experimental animal (191 mice, 57 rats, 64 gerbils) were chosen to compare the detection rates of PCR and national standard bacterial isolation culture plus biochemical identification methods. **Results** Dole qPCR and Benga Multiplex PCR (mPCR) could detect *Pasteurella pneumotropica* specifically, but the former was much more sensitive than the other. Both Benga mPCR and Bootz PCR could detect all Heyl and Jawetz types in suspected isolates, but not distinguish them from other bacteria in Pasteuraceae. Gao's qPCR had a high sensitivity but lack of specificity. Therefore, Dole qPCR was selected to test PP health screening samples, and the positive rate in tracheas and intestinal contents of mice were 25.7% and 27.2%, 28.1% and 29.8% in rats, 26.6% and 21.9% in gerbils respectively. The total PCR positive rates (tracheas and/or intestinal contents) in mice, rats and gerbils were 39.3%, 35.1% and 34.4% respectively. While the positive rates of traditional cultivation method were only 4.7%, 15.8% and 23.4% respectively. **Conclusion** With far higher sensitivity and specificity than other reported PCR methods and biochemical identification method, the Dole's qPCR is more suitable for the health screening of PP in laboratory rodents.

Keywords: *Pasteurella pneumotropica*; dole; PCR; rodent; laboratory animals

嗜肺巴斯德杆菌(*Pasteurella pneumotropica*, PP),属于巴斯德杆菌科,是一种革兰氏阴性、不运动、无芽孢的短杆菌或球杆菌,是啮齿类实验动物感染率最高的病原菌之一^[1],它有两种生物型,即“Heyl”型和“Jawetz”型(简称H型和J型)^[2]。在实验动物中,嗜肺巴斯德杆菌是一种条件致病菌,

主要感染咽、气管、肺、子宫、眼部以及肠道等器官,对免疫功能健全的动物一般不会影响健康状态,但感染免疫缺陷动物后会引起疾病发作甚至死亡。嗜肺巴斯德杆菌被认为是感染啮齿类实验动物最重要的巴斯德菌科细菌^[3],是国际上和我国国标SPF级啮齿类实验动物必须排除的病原菌之一^[4]。

* 作者简介:王立鹏(1989—),男,硕士,主管技师,研究方向:主要从事实验动物病原体分子诊断研究,E-mail:wlpburry@126.com。

通讯作者:杨玲焰,女,硕士,技术总监,E-mail:lingyan.yang@vrlasia.cn。

嗜肺巴斯德杆菌实验室诊断方法有细菌分离培养及生化鉴定和 PCR 检测方法,我国国标要求的诊断方法是分离培养后生化和血清学鉴定(凝集试验)^[5]。细菌分离及生化鉴定费时、操作繁琐且敏感度低;PCR 方法虽然对实验条件要求高,但因快速、敏感且特异度强,已成为实验动物质量检测的重要方法。本研究拟用本公司保存的标准菌株和分离菌株对文献中报道的四种 PCR 方法进行敏感度和特异度比较,选择最佳方法应用于临床气管和肠内容物两种样本检测,并和传统生化鉴定进行综合比较,确立适用于啮齿类实验动物健康监测中嗜肺巴斯德杆菌的检测方法。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 实验动物:来源于 2015 年不同机构送检的 191 只 SPF 级或清洁级小鼠,57 只 SPF 级或清洁级大鼠和 64 只清洁级沙鼠,来自全国 22 个不同厂家的 312 只实验动物,均活体运输至本公司,在人道处死后,在生物安全柜内按无菌操作采集气管和肠内容物拭子以及相应组织。

1.1.2 标准菌株:标准菌株嗜肺巴斯德杆菌 J 型 ATCC 35149,嗜肺巴斯德杆菌 H 型 ATCC 12555,多杀巴斯德杆菌 CVCC458 等 17 种菌株购自广东微生物菌种保藏中心、ATCC 全球生物资源中心等,均-70℃保存于本实验室。

1.2 试剂和仪器 生物安全柜为上海力申科学仪器有限公司产品;细菌基因组 DNA 提取试剂盒为天根生化科技有限公司产品;生化鉴定仪为生物梅里埃公司 ATB1525 Expression 系统;所有引物均由苏州金唯智生物技术有限公司合成;10×buffer (含 Mg^{2+}),dNTP Mixture,rTaq DNA 聚合酶,2×Premix Ex Taq(Probe),ROX(50×)均为日本 Takara 公司产品;PCR 仪为 Eppendorf 公司产品;荧光定量 7500 PCR 仪(Applied Biosystem,美国);凝胶成像分析仪 Genosens1560 为上海勤翔科学仪器有限公司产品。

1.3 方法

1.3.1 样本采集:动物无菌暴露后切下气管(约 5 mm)并放置于含 100 μ l 无菌水的无菌管中充分震荡漂洗,用无菌棉签蘸取漂洗液后划平板培养^[6]。暴露结肠回盲部,用无菌剪刀剪开盲肠壁,用两支无菌棉签在无菌水中湿润后蘸取回盲内容物少许用于划板培养,另外取绿豆大小(约 50 mg)肠内容物置于无菌管中用于核酸检测。气管和肠内容物置于-20℃保存待用。

1.3.2 细菌分离及生化鉴定:严格按照实验动物嗜肺巴斯德杆菌检测方法 GB/T 14926.12-2001

进行,将各动物的气管拭子或肠内容物拭子在含 5 ml/dl 脱纤维羊血的哥伦比亚血琼脂平板(血平板)上划线涂布,36±1℃培养 18~24 h 后,观察菌落大小、颜色和形态等,挑取灰白色或黄色露滴样可疑菌落于血平板上三区划线分纯,36±1℃培养 18~24 h,并对分纯后的可疑菌落进行革兰氏染色,确认为革兰氏阴性的小杆菌,再挑取此菌进行生化鉴定。

1.3.3 DNA 提取:根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取标准菌株核酸,用于 PCR 方法的敏感度和特异度测试。取各动物的气管(约 5 mm)和肠内容物样本(约 50 mg),操作严格按照试剂盒说明书提取核酸,-20℃保存待用。

1.3.4 引物合成:嗜肺巴斯德杆菌 PCR 检测方法有 Dole qPCR,qPCR 和 Benga PCR 三种方法,其中 Dole qPCR 与 Benga mPCR 可以分型;另有 Bootz 普通 PCR 方法为巴斯德科通用引物。引物见表 1。

1.3.5 普通 PCR 反应:程序参考 Benga 和 Bootz 设计的方法。反应体系为 25 μ l,含 10×buffer(含 Mg^{2+})2.5 μ l,dNTP Mixture 2 μ l,上下游引物各 0.5 μ l,0.2 μ l rTaq DNA 聚合酶,5 μ l DNA 模板和 ddH₂O 14.3 μ l。在 PCR 仪中 95℃预变性 5 min;95℃变性 30 s,55℃退火 30 s(Bootz 法退火温度 55℃;Benga 法为 58℃),72℃延伸 30 s,进行 35 个循环;之后 72℃继续延伸 7 min。16s rDNA 程序为 94℃预变性 5 min;94℃变性 45 s,55℃退火 45 s,72℃延伸 90 s,进行 35 个循环;72℃延伸 7 min。1.5 mg/dl 琼脂糖凝胶电泳,电压为 5 V/cm,由凝胶成像分析仪采集电泳结果。每次实验中,均设置质粒阳性对照和空白对照。PCR 产物送交苏州金唯智生物技术有限公司进一步测序,对测序结果通过 NCBI 数据库比对。

1.3.6 荧光定量 PCR 反应:反应程序分别参考 DOLE 等^[7]和高正琴等^[8]设计的方法。反应体系为 20 μ l,含 2×Premix Ex Taq(Probe)10 μ l,ROX(50×)0.4 μ l,上下游引物各 0.2 μ l,探针 0.2 μ l,5 μ l DNA 模板和 ddH₂O 4 μ l。在荧光定量 7500 PCR 仪中 95℃预变性 30 s,95℃变性 5 s,60℃退火延伸 31 s(采集信号),进行 40 个循环。

1.4 统计学分析 在同一试验中每个稀释度标准品(J 型菌株核酸)做 3 个复孔,以分析组内差异。通过统计计算循环阈值(threshold cycle,Ct)、相对标准偏差(relative standard deviation,RSD),验证该方法的稳定性。

2 结果

表1 巴斯德菌科,嗜肺巴斯德杆菌以及 16S rRNA 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	文献来源	PCR 类型
Dole F	CGGGTTGTAAAGTTCTTTCGGT	[7]	qPCR
Dole R	GGAGTTAGCCGGTGCTTCTTC		
Jawetz Probe	FAM-AATAAGGGTATTAACCTTATCACCTTCCTCATC-BHQ1		
Heyl Probe	FAM-CAGCTTGGCTATTAACCAAACTGCCT-BHQ1		
Gao F	AATTGACGTTAGTCACAGAAGAAGCA	[8]	qPCR
Gao R	CGATTAACGCTCGCACCT		
Gao Probe	FAM-CTGGCACGGAGTTAGC-NFQ-MGB		
Benga F	ATGGGAGTGGGTGTACCA		
Benga R	CAATCTGTGTGRACACTTTC	[9]	普通 PCR
Jawetz-451R	GGCATCCTAAAATACCCATCC		
Heyl-326R	TTGCAGATACTTGCCCTTAC		
Bootz F	CATAAGATGAGCCCAAG		
Bootz R	GTCAGTACATTCCCAAGG	[10]	普通 PCR
16S rDNA F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	[11]	普通 PCR
16S rDNA R	ACGCGTACCTTGTACGACTT		

2.1 四种 PCR 方法的敏感度和特异度比较 以 J 型标准菌株(ATCC 35149)DNA 为模板(3.2×10^9 CFU/ml),10 倍梯度稀释后分别用于 Dole qPCR, Gao qPCR, Benga mPCR and Bootz PCR 方法的敏感度实验,Bootz PCR 和 Benga 普通 PCR 检测下限分别为 3.2×10^3 CFU/ml 和 3.2×10^5 CFU/ml (Bootz PCR 的特异性目的片段大小为 533 bp; Benga mPCR 的方法 J 型目的片段大小为 326 bp, H 型为 451 bp);而 Dole PCR 与高正琴 qPCR 方法敏感度都高达 320 CFU/ml。高正琴 qPCR Ct 值组内重复测定 RSD 值在 0.06%~0.38%之间,

Dole qPCR Ct 值在 0.20%~1.15%之间,均在可接受的合理范围内。两对普通 PCR 引物是巴斯德菌科引物,虽能检出 H 型和 J 型,但也能检出巴斯德菌科其他细菌,如:多杀巴斯德杆菌和小鼠放线杆菌;Dole qPCR 法特异度较强,且对 H 型和 J 型 PP 分型。而高正琴 qPCR 方法虽敏感度较高,但也能扩增大肠埃希菌、沙门氏菌、假结核耶尔森菌等多种非巴斯德杆菌科细菌,由于该引物特异度较低,因此后续试验中不再采用,4 种 PCR 方法的特异度测试结果见表 2。

表2 嗜肺巴斯德杆菌 4 种 PCR 的特异度比较

标准菌株	来源	PCR			
		Bootz	Benga	Dole	Gao
嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型	ATCC35149	+	+	+	+
嗜肺巴斯德杆菌 Heyl 型	ATCC12555	+	+	+	+
多杀巴斯德杆菌	CVCC458	+	+	-	+
小鼠放线杆菌	ATCC49577	+	+	-	+
鸡白痢沙门氏菌	CVCC528	-	-	-	+
假结核耶尔森菌	CMCC53504	-	-	-	+
小肠结肠炎耶尔森	GIM1.265	-	-	-	+
金黄色葡萄球菌	CMCC26003	-	-	-	-
铜绿假单胞菌	ATCC9027	-	-	-	+
空肠弯曲杆菌	ATCC33291	-	-	-	-
大肠埃希氏菌	CMCC44102	-	-	-	+
念珠状链球菌	ATCC25373	-	-	-	-
支气管鲍特杆菌	CVCC3320	-	-	-	-
鼠棒状杆菌	ATCC15677	-	-	-	-
肺炎克雷伯氏杆菌	CVCC3699	-	-	-	+
肺炎链球菌	ATCC49619	-	-	-	-
乙型溶血性链球菌	CMCC32210	-	-	-	-

注:-;PCR 阴性;+:PCR 阳性。

2.2 疑似嗜肺巴斯德杆菌分离菌株鉴定 用 Bootz, Dole 和 Benga 三种 PCR 方法及 ATB 生化鉴定法对本实验室分离留存的 76 株嗜肺巴斯德杆菌可疑菌进行检测比较, 见表 3。

表 3 3 种 PCR 方法与培养法对 76 株嗜肺巴斯德杆菌疑似菌株的检测结果

PCR 鉴定方法		培养法		总数
		阳性数	阴性数	
Dole qPCR	阳性数	51	15	66
	阴性数	9	1	10
Benga mPCR	阳性数	60	16	76
	阴性数	0	0	0
Bootz PCR	阳性数	60	16	76
	阴性数	0	0	0

ATB 生化鉴定 60 株为嗜肺巴斯德杆菌(阳性率为 78.9%), 但 76 株可疑菌用 Benga mPCR 法和 Bootz 普通 PCR 法检测均为阳性(阳性率均为 100%), Dole qPCR 方法检出 66 株嗜肺巴斯德杆菌(阳性率 86.8%, 66/76), 34 个 H 型和 32 个 J 型, 且与 Benga mPCR 法的分型结果一致, 表明培养的可疑菌株中存在巴斯德菌科中其它菌。10 株

Dole qPCR 阴性的分离菌株用 ATB 鉴定有 9 株为嗜肺巴斯德杆菌(其中 8 株分离自大鼠, 1 株源于小鼠), 1 株阴性(源于仓鼠的分离株), 这 10 株疑似菌株经 16S rRNA 测序分析表明这些菌株虽为巴斯德菌科细菌, 但不是嗜肺巴斯德杆菌, 无法确定种属。

2.3 样本中嗜肺巴斯德杆菌的检测 小鼠、大鼠和沙鼠的气管和肠内容物拭子培养分离细菌后生化鉴定, 或从样本中直接提取核酸后用高度敏感、特异的 Dole qPCR 进行检测, 结果见表 4。这三种动物用细菌分离与生化鉴定法检测, 气管中阳性率分别为 4.2%, 15.8% 和 18.8%, 肠内容物中阳性率为 0.5%, 0% 和 4.7%。Dole qPCR 法检测上述 3 种啮齿动物中嗜肺巴斯德杆菌, 气管中阳性率分别为 25.7%, 28.1% 和 26.6%, 肠内容物中阳性率分别为 27.2%, 29.8% 和 21.9%。小鼠、大鼠和沙鼠的 PCR 总阳性率(气管和/或肠内容物阳性)分别为 39.3%, 35.1% 和 34.4%, 而传统分离培养方法检出率仅为 4.7%, 15.8% 和 23.4%。Dole qPCR PP 检出率显著高于国标要求的细菌分离及生化鉴定法。

表 4 不同方法检测三种啮齿动物的气管和肠内容物中嗜肺巴斯德杆菌阳性率比较[n(%)]

方法	小鼠(n=191)			大鼠(n=57)			沙鼠(n=64)		
	气管	肠内容物	总计	气管	肠内容物	总计	气管	肠内容物	总计
培养法	8(4.2)	1(0.5)	9(4.7)	9(15.8)	0(0)	9(15.8)	12(18.8)	3(4.7)	15(23.4)
Dole qPCR	49(25.7)	52(27.2)	75(39.3)	16(28.1)	17(29.8)	20(35.1)	17(26.6)	14(21.9)	22(34.4)

3 讨论 现行国标中嗜肺巴斯德杆菌的检测方法(GB/T 14926.12-2001)仍为分离培养后生化结合血清学(凝集试验)鉴定, 可疑菌落必须进行生化鉴定, 目前生化鉴定试剂大多采用商业试剂盒, 鉴定结果通过计算机处理、判定, 根据判定值, 得出相应的鉴定结果。本公司采用的是 ATB1525 Expression 系统对 76 株 PP 可疑菌株进行生化项鉴定, 鉴定结果为阳性 60 株(其中 9 株经 PCR 方法鉴定为巴斯德菌科细菌), 阴性 16 株(其中 15 株经 PCR 方法鉴定为假阴性), 说明 ATB1525 Expression 系统鉴定嗜肺巴斯德杆菌(包含 d-甘露醇、海藻糖、β-葡萄糖苷酶、鸟氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、肌醇、β-半乳糖苷酶、α-葡萄糖苷酶、尿素酶、α-半乳糖苷酶等)还不能完全区分巴斯德菌科内其它菌种, 需要增加更多项生化指标, 如吡啶、甘露醇、蜜二糖、棉子糖、甘油、糊精等^[12], 另外菌株对烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)的依赖性也可作为鉴定嗜肺巴斯德杆菌的指标。

目前, 文献中有多个嗜肺巴斯德杆菌 PCR 方

法的报道。2009 年 BOOT 等^[13]报道的 Bootz PCR 方法适于检测巴斯德菌科细菌, 且敏感度较高。2010 年 Dole 设计了 qPCR 方法, 针对 H 和 J 型两种菌株 16S rRNA 分别设计检测探针, 达到区分嗜肺巴斯德杆菌两种生物型的目的。2012 年高正琴等^[8]报道了一种新的嗜肺巴斯德杆菌 qPCR 方法, 具有很高的敏感度, 检测灵敏度达 22 copies/μl, 并可用于啮齿类实验动物气管样本直接检测, 而不需先培养分离。2013 年 BENGAL 等^[9]设计的 4 重 PCR(mPCR)可对嗜肺巴斯德杆菌分型, 同时能检出非 PP 的巴斯德菌科细菌。我们以嗜肺巴斯德杆菌标准菌株和分离菌株对 BOOTZ (1998), DOLE (2010), 高正琴 (2012) 和 BENGAL (2013) 4 种 PCR 方法进行了验证, 高正琴等^[8] (2012) 报道的 qPCR 方法虽然敏感度很高, 但特异度较差, 通过 DNAMAN 软件进行序列分析, 发现该方法使用的引物和探针不特异, 与我们实验结果相符。2014 年, 邢进等^[14]对 306 株嗜肺巴斯德杆菌可疑菌株的 16S rDNA 测序确认有 74.2% (227

株)为嗜肺巴斯德杆菌,用BD自动生化鉴定仪鉴定的阳性率为53.6%,也反映了生化鉴定的局限性,与我们生化鉴定方法结果一致。他们也使用了Benga mPCR法(2013),可检出所有嗜肺巴斯德杆菌,其中有8.4%(19株)Benga mPCR阳性但不能分型,提示该方法同时可检出非PP的巴斯德菌科细菌。我们以3种PCR方法和ATB生化鉴定法对76株本室分离的PP可疑菌进行鉴定,结果表明PCR阳性率显著高于生化鉴定ATB法,与邢进等^[14]报道一致。我们用Benga mPCR与Bootz普通PCR检测也发现这两种方法不能将嗜肺巴斯德杆菌与巴斯德菌科其它细菌相区分,不适于PP可疑菌株的鉴定,且敏感度较低。相比之下Dole qPCR的灵敏度更高且可达到H型和J型分型的目的,因此Dole qPCR更适于PP可疑分离株的核酸鉴定。

我国国标要求SPF级小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠、沙鼠等啮齿类实验动物必须排除嗜肺巴斯德杆菌。国内外的嗜肺巴斯德杆菌检测一般均以咽和气管为样本,而对肠道中嗜肺巴斯德杆菌感染情况调查甚少。小鼠和大鼠肠内容物的嗜肺巴斯德杆菌PCR阳性检出率均高于气管,虽然沙鼠肠内容物阳性检出率略低于气管,提示采集粪便使用qPCR检测不失为嗜肺巴斯德杆菌日常监测的可行方法,特别是珍贵动物必须活体采样时。当然单一样本的qPCR检测均会产生一定漏检,同时使用气管和肠内容物样本可以更精准的反映嗜肺巴斯德杆菌的携带或感染状况。

我们对国内多家机构提供的SPF级小鼠和大鼠,分别以细菌分离培养生化鉴定法和组织提取核酸PCR法进行检测,后者不仅检出培养法所有的阳性样本,而且直接qPCR检测样本阳性检出率远高于培养法,可替代ATB鉴定方法。

2017年,嗜肺巴斯德杆菌和亲缘性相近的啮齿类巴斯德菌科细菌被重新归类为新的啮齿类杆菌属(rodentibacter),该属包括8个不同的菌种,其中嗜肺巴斯德杆菌的Heyl和Jawetz生物型分别被定义为啮齿杆菌H型(rodentibacter heylii, R. heylii)和嗜肺啮齿杆菌(rodentibacter pneumotropicus, R. pneumotropicus)^[12]。因此Dole qPCR方法应用于啮齿类实验动物嗜肺巴斯德杆菌检测不受分类改变的影响。

总之,Dole qPCR方法直接检测组织样本比传统的培养分离后生化鉴定方法的敏感度和特异度均大大提高,同时检测气管和肠内容物可显著提高嗜肺巴斯德杆菌的阳性检出率。对需保留活体的珍贵啮齿类品种采集粪便使用qPCR检测不失为

有效、可行的嗜肺巴斯德杆菌监测手段。我国实验动物中嗜肺巴斯德杆菌的感染率长期被严重低估,我们推荐将Dole qPCR方法列入我国嗜肺巴斯德杆菌的检测国标或团标,以便于更有效监测并及时控制、清除该菌。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] FREDERIKSEN W. Pasteurella taxonomy and nomenclature[J]. Contrib Microbiol Immunol, 1973, 2: 170-176.
- [3] Felasa Working Group on Revision of Guidelines for Health Monitoring of Rodents and Rabbits, MAHLER CONVENOR M, BERARD M, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies inbreeding and experimental units[J]. Lab Anim, 2014, 48(3): 178-192.
- [4] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 14922. 2-2011 实验动物微生物学等级及监测[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011: 1-12.
General Administration of Quality Supervision Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 14922. 2-2011. Laboratory Animal-Microbiological standards and Monitoring [S]. Beijing: China Standard Press, 2011: 1-12.
- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 14926. 12-2001. 实验动物嗜肺巴斯德杆菌检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001: 1-6.
General Administration of Quality Supervision Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 14926. 12-2001. Laboratory Animal-Method for examination of Pasteurella pneumotropica[S]. Beijing: China Standard Press, 2011: 1-6.
- [6] 张钰, 张谱华, 黄韧. 啮齿类动物嗜肺巴斯德杆菌的临床检测和鉴定方法的改良[C]. 广州: 第四届中南地区实验动物科技交流会, 2008: 474-478.
ZHANG Yu, ZHANG Puhua, HUANG Ren. Improvement of clinical diagnosis in *Pasteurella pneumotropica* from rodents [C]. Guangzhou: Fourth South-Central Laboratory Animal Science and Technology Exchange, 2008: 474-478.
- [7] DOLE V S, BANU L A, FISTER R D, 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.
- [8] 高正琴, 岳秉飞, 贺争鸣. 嗜肺巴斯德菌 TaqMan MGB探针实时荧光定量PCR快速检测方法的建立及应用研究[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(1): 11-14.

- GAO Zhengqin, YUE Bingfei, HE Zhengming. Development and application of TtaqMan MGB probe real-time fluorescence quantitative PCR for rapid detection of *Pasteurella pneumotropica*[J]. J Mod Lab Med, 2012, 27(1): 11-14.
- [9] BENGAL, BENTEN W P, 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.
- [10] BOOTZ F, KIRSCHNEK S, NICKLAS W, et al. Detection of *Pasteurellaceae* in rodents by polymerase chain reaction analysis[J]. Lab Anim Sci, 1998, 48(5): 542-546.
- [11] WEISBURG W G, BARNES S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. J Bacteriol, 1991, 173(2): 697-703.
- [12] 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.
- [13] BOOT R, VLEMMINX M J, REUBSAET F A. Comparison of polymerase chain reaction primer sets for amplification of rodent *Pasteurellaceae*[J]. Lab Anim, 2009, 43(4): 371-375.
- [14] 邢进, 冯育芳, 岳秉飞, 等. 北京地区实验动物中嗜肺巴斯德杆菌的表型分析[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(6): 54-57.
- XING Jin, FENG Yufang, YUE Bingfei, et al. Phenotypic analysis of *Pasteurella pneumotropica* in laboratory animals in Beijing area[J]. Chinese Journal of Comparative Medicine, 2014, 24(6): 54-57.
- 收稿日期: 2019-05-07 修回日期: 2019-05-29
-
- (上接 108 页)
- [8] 孙伟, 李亚娜, 苏建荣. 棒状杆菌属细菌感染的流行病学特点和药物敏感性分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(20): 2228-2231.
- SUN Wei, LI Yana, SU Jianrong. Study on the epidemiological features and drug sensitivity of *Corynebacterium spp* bacterial infection[J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2018, 17(20): 2228-2231.
- [9] RENOM F, GOMILA M, GARAU M, et al. Respiratory infection by *Corynebacterium striatum*: epidemiological and clinical determinants[J]. New Microbes New Infect, 2014, 2(4): 106-114.
- [10] WANG Junrui, WANG Yanyan, DU Xiaoli, et al. Rapid transmission of multidrug-resistant *Corynebacterium striatum* among susceptible patients in a tertiary hospital in China[J]. J Infect Dev Ctries, 2016, 10(12): 1299-1305.
- [11] 汪一萍, 应建飞, 俞燕红, 等. 32 株纹带棒杆菌的感染及其耐药分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(10): 1454-1455.
- WANG Yiping, YING Jianfei, YU Yanhong, et al. Identification and resistance analysis of 32 strains of *Corynebacterium striatum* clinical isolates[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2008, 18(10): 1454-1455.
- [12] 陈东科, 许宏涛, 艾晓曼, 等. 临床分离棒状杆菌对常用抗菌药物的敏感性分析[J]. 临床检验杂志, 2011, 29(3): 191-192.
- CHEN Dongke, XU Hongtao, AI Xiaoman, et al. Antibiotic susceptibility of *Corynebacterium isolated* from clinical specimens [J]. Chinese Journal Clinical Laboratory Science, 2011, 29(3): 191-192.
- [13] 杨雪静, 曹俊敏, 孙西铃. 纹带棒状杆菌的分离鉴定及方法学评价[J]. 检验医学, 2008, 23(1): 114.
- YANG Xuejing, CAO Junmin, SUN Xiling. Isolation, identification and methodological evaluation of *Corynebacterium striatum* [J]. Laboratory Medicine, 2008, 23(1): 114.
- [14] 陈东科, 沙丽塔娜提·贺纳亚提, 许宏涛, 等. 纹带棒杆菌在临床标本中的分布及耐药性调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, 20(2): 285-287.
- CHEN Dongke, SHALITANAT Hetnayay, XU Hongtao, et al. Distribution and drug resistance of *Corynebacterium striatum* in clinical specimens[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2010, 20(2): 285-287.
- [15] 曹俊敏, 杨雪静, 王原. 棒杆菌属细菌分类鉴定的方法学比较及对四环素与大环内酯类抗菌药物耐药机制的研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(2): 241-244.
- CAO Junmin, YANG Xuejing, WANG Yuan. Methodology of identification of *Corynebacterium* and the drug resistance mechanisms to tetracycline and macrolides antibiotics[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2013, 23(2): 241-244.
- [16] ALIBI S, FERJANI A, BOUKADIDA J, et al. Occurrence of *Corynebacterium striatum* as an emerging antibiotic-resistant nosocomial pathogen in a Tunisian hospital[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 9704.
- [17] GALIMAND M, FISHOVITZ J, LAMBERT T, et al. AAC(3)-XI, a new aminoglycoside 3-N-acetyltransferase from *Corynebacterium striatum*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(9): 5647-5653.
- 收稿日期: 2019-06-14 修回日期: 2019-07-04