

网络出版时间:2020-04-17 16:26 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2020.10.002
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20200417.1316.004.html>

林麝肺源 ST1249 型铜绿假单胞菌的分离鉴定及其全基因组序列分析

伍 茜¹, 杨 威¹, 赵 位¹, 程建国², 罗 燕¹, 王 印¹, 杨泽晓¹, 姚学萍¹
(1 四川农业大学 动物医学院, 四川 成都 611130; 2 四川养麝研究所, 四川 都江堰 611800)

【摘 要】【目的】对分离自林麝化脓肺脏的 1 株疑似铜绿假单胞菌(PA)进行鉴定,并分析其致病和耐药机制,为林麝 PA 感染化脓性疾病的防控奠定基础。【方法】将病原菌分离纯化后,依次进行生化试验、16S rRNA 序列分析、药敏试验和小鼠致病性试验,并通过全基因组测序,对分离菌株进行群体进化和物种分型分析以及基因功能注释。【结果】分离自林麝化脓肺脏的 1 株疑似铜绿假单胞菌经鉴定与 PA 相符,命名为 FMDP001。药敏试验显示其对阿莫西林、头孢曲松、氨基南、多粘菌素 B 和林可霉素耐药;对小鼠半数致死量为 9.4×10^5 CFU/mL。全基因组序列分析显示该菌基因组大小为 6 955 100 bp,序列类型为 ST1249,与 B136-33 株同源性最高,且两菌株基因组平均核苷酸一致性(ANI)值达 98.93%;全基因组中共有 357 个序列编码 FMDP001 与致病性相关的基因,根据功能分为黏附、铁摄取、胞外毒性蛋白和调控系统;84 个序列编码耐药基因,其中多药耐药外排泵为主要成分。【结论】从林麝化脓肺脏中分离到 1 株致病性较强的 PA,并获得 ST1249 型林麝源 PA 的全基因组序列,序列显示该菌携带大量药物外排泵及生物膜形成相关基因,决定其具有多重耐药特性,哌拉西林等可作为该类型 PA 感染的临床用药。

【关键词】 林麝;铜绿假单胞菌;全基因组序列分析;致病性;耐药性
【中图分类号】 S852.61⁺4 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1671-9387(2020)10-0009-09

Isolation, identification and whole genome sequence analysis of *Pseudomonas aeruginosa* (ST1249) from lung of forest musk deer

WU Xi¹, YANG Wei¹, ZHAO Wei¹, CHENG Jianguo², LUO Yan¹,
WANG Yin¹, YANG Zexiao¹, YAO Xueping¹

(1 College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China;
2 Sichuan Institute of Musk Deer Breeding, Dujiangyan, Sichuan 611800, China)

Abstract: 【Objective】A strain of *Pseudomonas aeruginosa* (PA) isolated from the pyogenic lung of forest musk deer(FMD) was identified and its pathogenesis and drug resistance mechanism were analyzed to provide basis for the prevention and control of suppurative disease caused by PA infection in FMD. 【Method】Biochemical tests, 16S rRNA analysis, drug susceptibility tests, and pathogenicity tests in mice were conducted after isolation and purification of pathogens. Through the genome-wide sequencing, the population evolution and species typing were analyzed and gene function annotations were carried out. 【Result】A strain from the pyogenic lung of FMD was identified to be consistent with PA, and was named FMDP001. Drug susceptibility tests showed that it had resistance to amoxicillin, ceftriaxone, aztreonam, polymyxin B and lincomycin with 50% lethal dose (LD₅₀) of 9.4×10^5 CFU/mL. Genome sequence analysis

〔收稿日期〕 2019-10-05
〔基金项目〕 四川省科技厅 2020 年四川省科研院所科技成果转化资金项目;四川省科技厅应用基础研究项目(2018JY0644)
〔作者简介〕 伍 茜(1995—),女,四川德阳人,硕士,主要从事预防兽医学研究。E-mail: wuxi11@foxmail.com
〔通信作者〕 罗 燕(1974—),女,四川都江堰人,教授,博士,主要从事野生动物保护及病原微生物与分子生物学研究。
E-mail: lycjg@163.com

showed that the genome size was 6 955 100 bp and the sequence type was ST1249, which had the highest homology with B136-33 strains with average nucleotide identity (ANI) of 98. 93%. There were 357 sequences encoding FMDP001 related to pathogenicity in the whole genome, and they were divided into groups of adherence, iron uptake, extracellular toxic protein and regulation system according to functions. There were 84 sequences encoding drug resistance genes and efflux pump was the main component. 【Conclusion】 A strong pathogenic PA (ST1249) was isolated from the purulent lung of FMD and its whole genome sequence was obtained. The bacteria carried many genes related to drug efflux pump and biofilm formation, which determined its multi drug resistance. Piperacillin can be used as a clinical drug for such PA infection.

Key words: forest musk deer; *Pseudomonas aeruginosa*; genome sequence analysis; pathogenicity; drug resistance

麝(*Moschus* spp.)是国家一级保护野生动物, 林麝是麝属中体型最小的一种。雄麝腹部生殖器官前有香囊腺的分泌物——麝香, 麝香是传统名贵中药材和高级动物香料。由于人类发展对林麝栖息环境的干扰和破坏, 使其种群数量急剧下降。作为麝香需求大国, 我国建立了麝的人工养殖研究所, 对圈养林麝采用活体取香技术, 既能提高经济收入, 又能保护野生麝资源, 可谓一举多得。为了保证和促进人工养麝业的发展, 做好圈养麝的疾病防治十分重要^[1]。而化脓性疾病是限制林麝人工饲养种群数量增长的主要因素^[2-3], 其中铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是导致麝化脓性疾病的重要病原菌之一^[4]。

PA在自然界分布广泛, 是一种机会致病菌。该菌能够在机体内产生多种与毒力有关的物质, 广泛侵袭各个脏器组织, 引起多种病变和炎症。例如禽类的皮下水肿和急性败血症, 水貂的出血性肺炎, 犬的子宫蓄脓, 猪的心包炎和纤维素性肺炎等^[5-8]。PA主要攻击上皮细胞和免疫细胞, 导致宿主体表或体内多处炎症、化脓, 对林麝而言, PA常常引起其体表和内脏器官化脓, 一年四季均可发生。幼龄麝对PA的易感性最高^[7]。然而PA的耐药性特别显著, 一方面是由于其具有强大的生物被膜作为物理屏障, 另一方面是其具有多种药物外排泵^[9]。随着PA多药耐药(Multi-drug resistance, MDR)菌株和泛药耐药(Extensively-drug resistance, XDR)菌株的流行, 尤其是碳青霉烯和多粘菌素耐药菌株的出现, 打破了临床治疗PA感染的最后一道防线^[10-11]。基因组包含了生物体的全部遗传信息, 在MDR和XDR流行的情况下, 基于全基因组分析细菌特征, 掌握其传播机制和致病机制, 对抗击细菌尤为重要。然而目前对林麝源的PA全基因组研究尚

未深入。因此, 本研究对从病死林麝中分离出来的PA进行全基因组测序, 并分析其毒力基因、耐药基因、遗传进化, 探究林麝源PA的致病和耐药机制, 以为林麝PA感染的防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

营养琼脂(NA)培养基、血琼脂培养基、Muel-ler-Hinton(MH)培养基、Luria-Bertani(LB)培养基、药敏纸片、细菌微量生化鉴定管等, 均购自杭州微生物试剂有限公司。细菌基因组DNA提取试剂盒、DNA loading buffer、2×Taq PCR MasterMix, 购自天根生化试剂(北京)有限公司。细菌16S rRNA引物的合成和测序, 均由生工生物工程(上海)有限公司完成。64只SPF级昆明小鼠, 雌、雄各半, 购自成都达硕实验动物有限公司。

1.2 细菌的分离培养

四川都江堰养麝研究所一头病死林麝, 剖检可见肺脏出现化脓, 将无菌采集到的病变肺脏组织分别划线接种于NA、血琼脂和LB液体培养基, 于37℃培养箱中培养16~24 h, 根据菌落形态特征以及革兰氏染色结果, 挑取单菌落进一步纯化、保存。

1.3 分离菌的生化试验

依据《伯杰细菌鉴定手册》^[12], 将分离菌接种到细菌微量生化反应管中, 具体操作步骤按照说明书进行。

1.4 分离菌的16S rRNA基因扩增与测序

采用细菌基因组DNA提取试剂盒对分离菌DNA进行提取, 作为PCR反应模板。选用16S rRNA基因通用引物27F(5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTC-AG-3')和1492R(5'-TACGGTTAC-CTTGTTACG-ACTT-3')进行PCR扩增。反应体

系为:2×*Taq* PCR MasterMix 25 μL,27F 和 1492R 引物(10 mmol/L)各 2 μL,DNA 模板 1 μL,加 ddH₂O 补足 50 μL。以相同体系但不含模板的样本为阴性对照。PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;72 ℃ 恢复延伸 5 min,4 ℃ 保存。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后送至生工生物工程(上海)有限公司进行测序。测序结果使用 NCBI 的 Blast(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列相似性比对。

1.5 分离菌的药敏试验

用 0.5 麦氏浊度的麦氏标准管进行对比,将 LB 培养基内的菌液调至适宜浓度(1.5×10^8 CFU/mL)。用无菌棉拭子蘸取菌液,在管壁上挤压去掉多余菌液,用棉拭子均匀涂布整个 MH 培养基表面。采用 Kirby-Barer 纸片法,将 17 种标准药敏纸片按合适距离贴在每个培养基上,并用镊子轻轻压紧,于 37 ℃ 培养箱中培养 16~18 h,观察并测量抑菌圈直径大小,重复 3 次,记录数据。结果判定参照临床实验室标准化研究所(CLSI)鉴定手册(2017 版)^[13]进行。

1.6 分离菌对小鼠的致病性试验

将分离菌划线接种于 LB 固体培养基,置于 37 ℃ 培养箱培养 16 h,用无菌生理盐水洗下制成菌液,然后用平板计数法测定其浓度,将菌液制成 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 CFU/mL 共 8 个梯度。将 64 只小鼠平均分为 8 组,分别编号为 1~8,并由高到低依次腹腔注射 8 个浓度梯度菌液,0.4 mL/只。正常饲喂,攻毒后观察 7 d,并对小鼠死亡情况进行记录,然后采用 Bliss 法^[14]计算该菌对小鼠的半数致死量 LD₅₀。对死亡小鼠进行剖检,观察脏器变化,采集其心、肝、脾、肺、肾组织,经体积分数 4%甲醛固定后,制作病理组织切片。

1.7 病原菌全基因组测序及序列分析

利用 Illumina NovaSeq PE150 平台对病原菌全基因组进行测序,使用 SOAP denovo 组装软件进行组装、拼接,从而得到最终的组装结果,并采用 Glimmer V3.02 软件对其基因进行预测。选取 NCBI 上传的 43 株相关菌株进行全基因组比对分析,分别利用 MLST(<https://pubmlst.org/databases.shtml>)数据库测定这些菌株的序列类型,选择在线网站的工具 ANI calculator(<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/index>)与 FMDP001 对比平均核苷酸一致性(ANI),并基于各个基因组的 7 个管家基

因进行多基因联合建树分析。选择提供注释的通用功能数据库 KEGG 和 COG,将预测基因与各功能数据库进行 Blast 比对(blastp,*e* 值 $\leq 1 \times 10^{-5}$),对于每一条序列的 Blast 结果,选取得分最高的比对结果(默认一致性 $\geq 40\%$,覆盖率 $\geq 40\%$)进行注释。分别采用 VFDB 和 CARD 数据库对其携带的毒力基因和耐药基因进行注释。基因组测序工作由北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 分离菌的形态特征

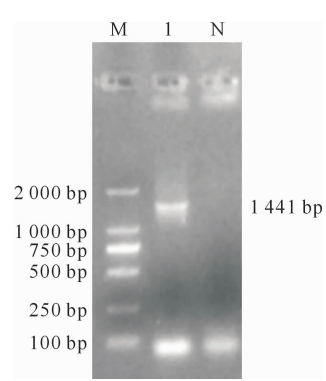
该病原菌在 NA 培养基上形成圆形、光滑、湿润、边缘呈波状的中等大小菌落,菌落和培养基均呈淡黄绿色;在血琼脂培养基上形成肉眼可见的 β 溶血环;在 LB 液体培养基中可见下层菌群聚集、浑浊,上层呈淡黄绿色、有长细丝状悬浮物。革兰氏染色镜检细菌呈红色长棒状,两端钝圆,单个或成对排列。

2.2 分离菌的生化试验

生化试验结果显示,分离菌株能分解葡萄糖和尿素,不分解麦芽糖、甘露醇、乳糖及蔗糖,吡唑试验阴性;MR-VP 试验阴性;氧化酶试验阳性;不产生 H₂S。

2.3 分离菌株 16S rRNA 基因的扩增结果及同源序列分析

由图 1 可知,该分离菌的琼脂糖凝胶电泳结果与预期结果一致。将目的条带切胶回收后测序,得到该菌 16S rRNA 大小为 1 441 bp。将测序结果上传 GenBank,登录号为 MN027911.1。



M. DNA Marker DL2000;1. 16S rRNA;N. 阴性对照
M. DNA Marker DL2000;1. 16S rRNA;N. Negative control

图 1 分离菌株 16S rRNA 基因的扩增结果

Fig. 1 PCR products of isolated strain 16S rRNA

Blast 比对结果表明,与该菌株 16S rRNA 基因序列相似性最高的均为 PA 基因,且与不同菌株的相似性高达 99% 以上。结合培养特性和生化试验,

初步鉴定该分离菌株为 PA。

2.4 分离菌株的药敏试验

药敏试验结果(表 1)表明,该分离菌对哌拉西林、头孢拉定、亚胺培南、庆大霉素、阿奇霉素、多西

环素、氟苯尼考、诺氟沙星、左氧氟沙星和恩诺沙星敏感,对阿莫西林、头孢曲松、氨曲南、多粘菌素 B 和林可霉素耐药。

表 1 分离菌株的药敏试验结果
Table 1 Antibiotic sensitivity of isolated strain

药物 Antibiotic	抑菌环直径/mm Inhibition circle diameter	敏感性判定标准/mm Sensitivity criteria			结果 Results
		耐药 Resistant	中间 Intermediate	敏感 Susceptible	
哌拉西林 Piperacillin	18	≤17	—	≥18	S
氨苄西林 Ampicillin	14	≤11	12~14	≥15	I
阿莫西林 Amoxicillin	9	≤13	14~17	≥18	R
头孢拉定 Cefradine	19	≤14	15~17	≥18	S
头孢曲松 Ceftriaxone	12	≤13	14~20	≥21	R
氨曲南 Aztreonam	7	≤15	16~21	≥22	R
亚胺培南 Imipenem	24	≤13	14~15	≥16	S
庆大霉素 Gentamicin	22	≤12	13~14	≥15	S
阿奇霉素 Azithromycin	24	≤13	14~17	≥18	S
多粘菌素 B Polymyxin B	11	≤11	—	≥12	R
多西环素 Doxycycline	21	≤12	13~15	≥16	S
四环素 Tetracycline	18	≤14	15~18	≥19	I
氟苯尼考 Florfenicol	23	≤14	15~18	≥19	S
林可霉素 Lincomycin	13	≤14	15~20	≥21	R
诺氟沙星 Norfloxacin	19	≤12	13~16	≥17	S
左氧氟沙星 Levofloxacin	20	≤13	14~16	≥17	S
恩诺沙星 Enrofloxacin	20	≤10	11~15	≥16	S

注:S.敏感;I.中间;R.耐药。
Note;S. Susceptible, I. Intermediate, R. Resistant.

2.5 分离菌株对小鼠的致病性

观察发现,分离菌液 10¹⁰ CFU/mL 浓度组小鼠在接种后 12 h 内全部死亡,10⁹ CFU/mL 浓度组小鼠在接种后 24 h 内全部死亡,其余各组小鼠在 7 d 连续观察中死亡情况见表 2。根据每组小鼠死亡情况,用 Bliss 法计算该病原菌对小鼠的半数致死量 LD₅₀ 为 9.4×10⁵ CFU/mL。

表 2 分离菌对小鼠致病性的试验结果
Table 2 Pathogenicity test of isolated strain on mice

小组编号 Group number	菌液浓度梯度/(CFU·mL ⁻¹) Bacterial concentration	死亡数/总数 Deaths/Total
1	10 ¹⁰	8/8
2	10 ⁹	8/8
3	10 ⁸	7/8
4	10 ⁷	5/8
5	10 ⁶	3/8
6	10 ⁵	2/8
7	10 ⁴	0/8
8	10 ³	0/8

采集死亡小鼠病变组织染色镜检,均可见大量 PA。对死亡小鼠进行剖检,发现其腹壁毛细血管充血,腹膜出血;心脏出现心包膜浑浊;肝脏肿大,表面光滑,颜色不一;脾脏弥散性肿大;肺脏出现化脓,肉

眼可见肺脏表面出血点;双侧肾脏大小不一,表面可见淤血。病理观察可见,肝脏肝小叶结构不清晰,中央静脉淤血(图 2-A);肝细胞肿胀,细胞质出现明显空泡,大小不等,呈脂肪变性,同时部分细胞伴有核固缩现象,肝索不清晰,肝窦狭窄,部分充满红细胞(图 2-A′)。脾脏脾小体数量增多,体积增大(图 2-B);脾窦大量血细胞浸润(图 2-B′)。肺脏肺泡腔塌陷(图 2-C);肺泡壁毛细血管扩张,充满红细胞,部分腔内有红细胞、中性粒细胞、淋巴细胞浸润(图 2-C′)。肾小球充血,有中性粒细胞浸润,毛细血管祥分辨不清,肾小管上皮细胞偶见空泡,间质水肿(图 2-D′)。

2.6 分离菌株全基因组基本信息

分离菌株全基因组大小为 6 955 100 bp,G+C 含量为 65.97%,编码 6 383 个基因,占整个序列的 87.13%,包含 tRNA 57 个,rRNA 7 个。从组装结果来看,Contig 数量 54,该基因组序列的完整性一般。将菌株命名为 FMDP001,原始数据以 FASTQ 的形式上传到 NCBI 的 SRA 数据库,获得登录号为 SRR9897520。组装后的序列以 FASTA 形式上传至 Genome 数据库,获得登录号为 VOIN00000000。

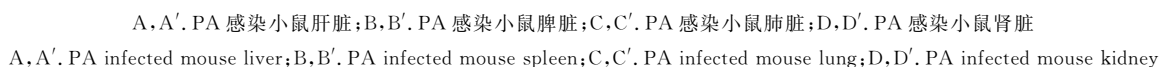


Fig. 2 HE staining of *Pseudomonas aeruginosa* infected mice liver, spleen, lung and kidney tissues

株序列类型为 ST1249。图 3 为 FMDP001 的系统进化树。

基于数据库中 PA 的 *acsA*、*aroE*、*guaA*、*mutL*、*D*、*ppsA* 和 *trpE* 7 个管家基因得到 FMDP001

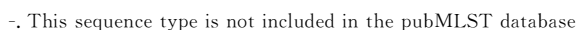


Fig. 3 Phylogenetic tree of FMDP001

由图 3 可知,其与 PA 标准菌株 PAO1 比对,ANI 值为 98.80%;其与分离于腹泻婴儿体内的 B136-33 菌株亲缘关系最近,ANI 值达 98.93%,在 43 株菌中最高;与 2 株荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*,PF)和 2 株恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*,PP)的 ANI 值均小于 80%,亲缘关系较远。除 PA7 株之外,FMDP001 与其余 PA 的 ANI 值均在 98%以上,根据 PA7 株在进化树上的位置,不排除其自身原因,按全基因组 ANI 值>96%作为同一菌种的判定依据^[15],FMDP001 可明确鉴定为 PA。

2.8 FMDP001 的基因功能分析

2.8.1 KEGG 通路分析 经 KEGG 数据库注释共有 3 734 个基因能够找到参与代谢通路的信息,其中新陈代谢类的基因占比最多,占注释基因总数的

63%。具体注释结果见表 3。

表 3 FMDP001 基因 KEGG 通路注释结果

Table 3 KEGG pathway annotation of FMDP001 gene

代谢通路 Pathways	基因数量 Number of genes
疾病 Diseases	203
新陈代谢 Metabolism	2 353
过程 Processes	378
加工 Processing	722
系统 Systems	78

2.8.2 COG 聚类分析 通过与 string 数据库进行比对注释,共有 5 092 个基因被注释到 25 组 COG 的功能中,其中 4 739 个蛋白与已知蛋白或已知的假设蛋白同源,353 个蛋白功能未知。用于通用功能预测的蛋白数量最多,共 595 个;其次是负责转录和氨基酸转运与代谢的蛋白,分别是 565 个和 526 个。COG 功能分类见表 4。

表 4 FMDP001 菌株 COG 功能分类结果

Table 4 COG function classification of FMDP001 genes

功能分类 Function class	基因匹配数 Number of matched genes
RNA 加工与修饰 RNA processing and modification	2
染色质结构与动力学 Chromatin structure and dynamics	3
能量生产与转换 Energy production and conversion	336
细胞周期调控,细胞分裂,染色体分裂 Cell cycle control,cell division,chromosome partitioning	55
氨基酸转运与代谢 Amino acid transport and metabolism	526
核苷酸转运与代谢 Nucleotide transport and metabolism	118
碳水化合物转运与代谢 Carbohydrate transport and metabolism	265
辅酶转运与代谢 Coenzyme transport and metabolism	261
脂质转运与代谢 Lipid transport and metabolism	309
翻译,核糖体结构与生物合成 Translation,ribosomal structure and biogenesis	281
转录 Transcription	565
复制、重组和修复 Replication,recombination and repair	160
细胞壁/膜/包膜生物合成 Cell wall/membrane/envelope biogenesis	299
细胞运动 Cell motility	155
翻译后修饰、蛋白质转换、分子伴侣 Posttranslational modification,protein turnover,chaperones	227
无机离子转运与代谢 Inorganic ion transport and metabolism	346
次生代谢产物的生物合成、运输和分解代谢 Secondary metabolites biosynthesis,transport and catabolism	203
仅通用功能预测 General function prediction only	595
功能未知 Function unknown	353
信号传导机制 Signal transduction mechanisms	416
细胞内运输、分泌和囊泡转运 Intracellular trafficking,secretion,and vesicular transport	169
防御机制 Defense mechanisms	153
胞外结构 Extracellular structures	60
移动基因组;原噬菌体转座子 Mobilome;prophages transposons	75
细胞骨架 Cytoskeleton	1

2.8.3 毒力因子注释 经 VFDB 注释、Blast 比对,选取一致性≥90%的结果,可知共有 357 个序列编码 FMDP001 与致病性相关的基因。除了 PA 分泌的毒素能够作为毒力因子直接对宿主产生致病性之外,其他与调控生物膜形成相关的蛋白也能通过调控毒力因子释放而间接发挥自身致病机制,包括菌体表面的蛋白附属结构、铁摄取系统、群体感应和分

泌系统等。各个毒力因子的功能存在交叉,根据其主要作用分类的相关基因见表 5。

2.8.4 耐药基因注释 在 FMDP001 中发现有 84 个 ORF 分别编码 β-内酰胺类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类、氯霉素类、依法霉素类、氨基香豆素、多粘菌素、磷霉素和莫匹罗星等耐药基因。绝大多数耐药基因注释为产生抗生素耐药性的外排泵,部分是抗

生素靶点修饰酶和抗生素灭活酶。结果见表 6。

表 5 FMDP001 基因组中与致病性相关的主要毒力因子

功能 Function	毒力因子 Virulence factor	相关基因 Related genes
黏附 Adherence	纤毛 Fimbriae	<i>cupA,cupB,cupC,cupE</i>
	鞭毛 Flagella	<i>flgC,flgD,flgE,fliC,flaG,flaE,flhA,motA,motA,cheA</i>
	Ⅳ型菌毛 Type Ⅳ pili	<i>pprA,tadA,tadB,tadC,tadD,tadF,tadG,rcpA,rcpC,fp pA,pprB,flp,tadZ,tadA,pilB,pilC,pilD,pilS,pilR,pilV,pilW,pilX,fimU,rpoN,rpoS,vfr,crs,chpE,chpD</i>
	脂多糖 LPS	<i>waaA,waaP,waaG,waaC,waaF,orfN,wbpM</i>
	褐藻酸盐 Alginate	<i>algA,algB,algZ,algR,algQ,algU,algB,alg44,algE,algL,algD,algG,algF,mucA,mucB,mucC</i>
铁摄取 Iron uptake	螯铁蛋白 Pyochelin	<i>pchA,PchB,PchC,PchD,PchE,PchF,PchG,PchH,PchI,PchR,fptA,fptB,fptC,fptX</i>
	荧光嗜铁素 Pyoverdine	<i>PA2383,PA2384,pvdQ,pvdA,mbtH-like,pvdM,pvdN,pvdO,pvdF,pvdE,pvcD,pvcA,pvcB,pvcC,pvdS,fpvA,fpvI,pvdD,pvdJ,pvdI,pvdH,pvdL,pvdG,pvdS,pvdY,ptxR</i>
	血红素摄取系统 Heme uptake system	<i>phuW,phuV,phuU,phuT,phuS,phuR</i>
	吩嗪类生物合成 Phenazines biosynthesis	<i>phzH,phzA,phzB,phzS,phzG1,phzF1,phzC1,phzD1</i>
胞外毒性蛋白 Extracellular toxic protein	鼠李糖脂 Rhamnolipid	<i>rhlA,rhlB,rhlC</i>
	弹性蛋白酶 Elastase	<i>lasA,lasB</i>
	碱性蛋白酶 Alkaline protease	<i>aprA</i>
	磷脂酶 C Phospholipase C	<i>plcB,plcH</i>
	绿脓菌素 Pyocyanin	<i>phzM</i>
	氰化氢合成酶 Hydrogen cyanide synthase	<i>hcnA,hcnB,hcnC</i>
	外毒素 A 前体 Exotoxin A precursor	<i>toxA</i>
调控系统 Regulation system	溶血素 Ⅲ Hemolysin Ⅲ	<i>hly Ⅲ</i>
	群体感应 Quorum sensing	<i>lasR,lasI,rhlR,bspR2</i>
	Ⅲ型分泌系统 Type Ⅲ secretion system	<i>popN,pcr1,pcr2,pcr4,pscF,pscG,pscH,pscJ,pscS,pscR,pscU,pcrR,pcrG,exsA,exsB,exsC,exsC,spcS,hrpY,prhI,hrpH</i>
	Ⅵ型分泌系统 Type Ⅵ secretion system	<i>pppA,ppkA,hsiH1,hsiE1,hcp1,tse2,clpV>tagT,hsiF,vgrG,vi-pA,vi pB,li p1,hsiJ1,dotU,hsiC3,sfa2,sfa3,stk1,stp1</i>

表 6 FMDP001 菌株的耐药基因预测

耐药基因种类 Resistant gene category	耐药基因 Resistant gene name
β-内酰胺类 β-lactamantibiotics	<i>PDC-6,OXA-50</i>
氨基糖苷类 Aminoglycoside	<i>APH(3′)-Iib</i>
氟喹诺酮类 Fluoroquinolone	<i>gyrA,gyrB,mfd</i>
氯霉素类 Chloramphenicols	<i>catB7</i>
依法霉素类 Elfamycin	<i>EF-Tu</i>
氨基香豆素 Aminocoumarin	<i>alaS,cysB</i>
多粘菌素 Polymyxin	<i>arnA,pmrA,pmrB,pmrC,pmrF</i>
磷霉素 Fosfomycin	<i>murA,FosA</i>
莫匹罗星 Mupirocin	<i>ileS</i>
多药耐药外排泵 Efflux pump conferring antibiotic resistance	<i>adeA,adeC,adeG,novA,mdtC,lrfA,mexA,mexE,mexJ,mexG,mexK,mexC,mexL,mexS,mexM,mexH,mexV,mexW,macA,macB,oprJ,oprM,oprN,rosB,triA,triB,triC,msbA,taeA,emrE,opmD,OpmH,farB,nalD,evgS,nfxB,nalC</i>

3 讨 论

PA 是目前已知的具有相对较大基因组的细菌,通常基因组越大的菌株,其代谢能力和耐受力越强,更能适应不同的环境^[16]。本研究对 PA 进行全基因组测序,序列注释结果表明了其强大的代谢能力和复杂的蛋白功能,在同源蛋白聚类中还有 353 个蛋白功能未知,仍有待后续研究。

在基因组比较分析中,用基于全基因组序列的 ANI 分析进行菌种鉴定和同源性研究结果准确且有效。与传统的 DNA-DNA 杂交试验相比,95% ANI 值与 70% DDH 水平效果类似^[17]。可以看到 FMDP001 株与 PP、PF 以及 PA 的 ANI 值在不同种属间差别显著,但在同属间差别不大,其 ANI 值高低与进化树的分布也并不完全一致,可能与管家基因相对于全基因组占比太小有关。其次在对 40

株 PA 进行多位点序列分型中发现,从林麝中分离到的 FMDP001 株是独特存在的序列, PubMLST 数据库仅收录到 2 株序列类型为 1249 的菌株,分别是 2009 年分离自痰液的西班牙 SD31 株和来源未知的中国 P2553 株,目前还没有关于该型的流行病学报道。

郝立新等^[18]对圈养林麝 PA 的病原特性分析发现,动物源菌株的致病力大于环境源菌株,且主要流行菌株的 3 个聚类组的致病力略大于其余菌群。而 PA 的致病性强弱在很大程度上取决于其复杂的基因组和毒力因子库带来的遗传灵活性^[19]。PA 的毒力因子中,纤毛、鞭毛、IV 型菌毛提供运动、粘附和侵袭能力;不同的铁摄取机制获取铁来完成各种生理功能^[20];血红素摄取系统与溶血素以及溶血性磷脂酶 C 等共同导致 PA 的溶血特性;褐藻酸盐辅助生物膜形成,同时作为黏附素阻止细菌从肺排出,拥有免疫逃避的功能^[21];鼠李糖脂作为表面活性剂,可能在 PA 入侵肺脏时导致肺泡塌陷^[22];绿脓菌素是由 PA 分泌的蓝绿色特征性毒素,是具有氧化还原能力的一种吩嗪类化合物,协助 Fe^{3+} 转化为 Fe^{2+} 并加以利用^[23]。此外,作为关键调控系统,群体感应允许 PA 协调对适应环境的重要基因的表达,如 PA 的丛集运动、鼠李糖脂及凝集素的产量均由其调控^[24]。而分泌系统是转运蛋白的基本装置,能将蛋白整合在细胞膜或直接分泌到环境与靶细胞内,参与多种生理学过程,如细胞粘附、病原菌的致病性和对环境的适应性等^[25]。在这些毒力因子中,多种基因调控生物膜的形成,共同构成了抗生素的第一道防线机制^[26]。

PA 的多个外排泵基因也决定了其具有多重耐药性^[27]。据报道,大多数 PA 都对多粘菌素敏感,因此多粘菌素被用于 MDR 和 XDR 型 PA 感染的治疗^[10,28]。但本研究分离到的 FMDP001 有多粘菌素相关的耐药基因 *arnA*、*pmrA*、*pmrB*、*pmrC*、*pmrF*,药敏试验显示该菌表型也为多粘菌素耐药,所幸流行的与耐药性相关的碳青霉烯酶未在该菌的耐药基因中发现,这提醒人们临床用药不能仅通过某一菌种的给药作为参考来选择,需综合考虑。与不同的是,基因序列显示 FMDP001 株有编码 β -内酰胺类、氨基糖苷类、氯霉素类和氟喹诺酮类的耐药基因,但药敏试验却对这些类别中的某些药物呈敏感状态。胡凡^[29]研究也发现,表型耐药率高,但相关基因检测的阳性率却较低。这一方面与宿主免疫力和抗生素的选择压力有关^[30],另一方面是由于 PA

极易形成生物被膜,并且在不同的条件下可以形成不同形态的生物被膜,这增加了对抗菌药物和宿主防御的抵抗力^[31]。此外,细菌生物被膜形成后会在临床上产生多种选择性的表型突变^[20],最终导致耐药性基因型和表型不一致的结果。

PA 作为人畜共患病原菌,其防控不管是在经济还是公共卫生方面都有非常重要的意义。由于细菌许多耐药基因定位于可移动遗传元件,近年来 MDR 和 XDR 的 PA 流行均呈上升趋势,因此研发以生物被膜为代表的新靶标药物是未来应对 PA 感染的新导向。

[参考文献]

- [1] 罗燕,王印. 麝常见细菌性疾病及其防治 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2018: 208-212.
Luo Y, Wang Y. Common bacterial diseases of musk and their prevention [M]. Chengdu: Sichuan Science and Technology Press, 2018: 208-212.
- [2] 戴卫国,伊淑媛. 家养麝死亡规律探讨 [J]. 成都科技大学学报, 1990, 53(5): 47-50.
Dai W G, Yi S Y. Investigation on the mortality rule of domestic musk-deer (*Moschus berezovskii* Flerov) [J]. Journal of Chengdu University of Science and Technology, 1990, 53(5): 47-50.
- [3] Zhao K, Ma J, Wang X, et al. Population divergence of *Pseudomonas aeruginosa* can lead to the coexistence with *Escherichia coli* in animal suppurative lesions [J]. Veterinary Microbiology, 2019, 231: 169-176.
- [4] 赵克雷,李旭鑫,帕哈尔定·帕拉哈提,等. 圈养林麝脓肿病原菌分离鉴定及药敏分析 [J]. 四川动物, 2011, 30(4): 522-526.
Zhao K L, Li X X, Palahati P, et al. Isolation and identification on pathogens of musk deer abscess disease and antibiotic susceptibility assay [J]. Sichuan Journal of Zoology, 2011, 30(4): 522-526.
- [5] 张香斋,张艳英,李蕴玉,等. 鸡源绿脓杆菌的分离鉴定及药敏试验 [J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(6): 1602-1607.
Zhang X Z, Zhang Y Y, Li Y Y, et al. Isolation, identification and drug susceptibility test of *Pseudomonas aeruginosa* in chickens [J]. China Animal Husbandry & Veterinary medicine, 2015, 42(6): 1602-1607.
- [6] 竹堃园,吴兰,刘燕霏,等. 犬子宫蓄脓中绿脓杆菌分离鉴定及耐药性分析 [J]. 天津农学院学报, 2018, 25(3): 47-51.
Zhu K Y, Wu L, Liu Y F, et al. Isolation, identification and susceptibility analysis of *Bacillus pyocyaneus* from a canine pyometra [J]. Journal of Tianjin Agricultural University, 2018, 25(3): 47-51.
- [7] 杨海燕,王颖,张传美,等. 貂源绿脓杆菌分离株的鉴定、血清学分型及药敏试验 [J]. 动物医学进展, 2014, 35(7): 127-131.
Yang H Y, Wang Y, Zhang C M, et al. Identification, serotyping

- and drug sensitivity test of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from minks [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2014, 35(7): 127-131.
- [8] 蒋增海, 邓同炜, 徐耀辉, 等. 猪源绿脓杆菌的分离鉴定及 16S rRNA 基因同源性分析 [J]. 河南农业科学, 2017, 46(4): 118-120, 133.
- Jiang Z H, Deng T W, Xu Y H, et al. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility test of *Pseudomonas aeruginosa* from the infected piglet and phylogenetic analysis of 16S ribosomal DNA sequences [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2017, 46(4): 118-120, 133.
- [9] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 5 版. 北京: 中国农业出版社, 2012: 152-153.
- Lu C P. Veterinary microbiology [M]. 5th ed. Beijing: China Agriculture Press, 2012: 152-153.
- [10] Orsi T D, Perdigão Neto L V, Martins R C R, et al. Polymyxin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* assigned as ST245: first report in an intensive care unit in São Paulo, Brazil [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2019, 8(16): 147-149.
- [11] Barrio-Tofiño E D, López-Causapé C, Cabot G, et al. Genomics and susceptibility profiles of extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* from Spain [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2017, 61(11): 1589-1617.
- [12] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 60-61.
- Buchanan R E, Gibbons N E. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984: 60-61.
- [13] Jean B P, Melvin P W, George M E, et al. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [M]. 27th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017: 42-44.
- [14] Rosiello A P, Essigmann J M, Wogan G N. Rapid and accurate determination of the median lethal dose (LD₅₀) and its error with a small computer [J]. J Toxicol Environ Health, 1977, 3(5/6): 797-809.
- [15] Konstantinidis K T, Tiedje J M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(7): 2567-2572.
- [16] Stover C K, Pham X Q, Erwin A L, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen [J]. Nature, 2000, 406(6799): 959-964.
- [17] Goris J, Konstantinidis K T, Klappenbach J A, et al. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57: 81-91.
- [18] 郗立新, 陈珍容, 宋宏宇, 等. 圈养林麝铜绿假单胞菌的分离鉴定及耐药性和病原特性分析 [J]. 微生物学通报, 2018, 45(2): 386-394.
- Xi L X, Chen Z R, Song H Y, et al. Isolation, identification and drug resistance, pathogen characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* from captive forest musk deer [J]. Microbiology China, 2018, 45(2): 386-394.
- [19] Maurice N M, Bedi B, Yuan Z, et al. *Pseudomonas aeruginosa* induced host epithelial cell mitochondrial dysfunction [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 11929.
- [20] 于 珊, 马旅雁. 铜绿假单胞菌铁摄取与生物被膜形成研究进展 [J]. 生物工程学报, 2017, 33(9): 1489-1512.
- Yu S, Ma L Y. Iron uptake and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Chin J Biotech, 2017, 33(9): 1489-1512.
- [21] Leid J G, Willson C J, Shirtliff M E, et al. The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN- γ -mediated macrophage killing [J]. J Immunol, 2005, 175(11): 7512-7518.
- [22] Cohen R, Todorov R, Vladimirov G, et al. Effect of rhamnolipids on pulmonary surfactant foam films [J]. Langmuir, 2010, 26(12): 9423-9428.
- [23] Wang Y, Newman D K. Redox reactions of phenazine antibiotics with ferric (hydr) oxides and molecular oxygen [J]. Environ Sci Technol, 2008, 42(7): 2380-2386.
- [24] Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Protein Cell, 2015, 6(1): 26-41.
- [25] Costa T R, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights [J]. Nat Rev Microbiol, 2015, 13(6): 343-359.
- [26] Gholami S, Tabatabaei M, Sohrabi N. Comparison of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in human and environmental isolates [J]. Microb Pathog, 2017, 109: 94-98.
- [27] Miryala S K, Anbarasu A, Ramaiah S. Systems biology studies in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to understand their role in biofilm formation and multidrug efflux pumps [J]. Microb Pathog, 2019, 136: 103668.
- [28] de Oliveira Santos I C, Pereira de Andrade N F, da Conceição Neto O C, et al. Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de Janeiro-Brazil: importance of mutational mechanisms over the years (1995-2015) [J]. Infect Genet Evol, 2019, 73: 411-415.
- [29] 胡 凡. 铜绿假单胞菌的耐药表型与耐药基因型研究 [D]. 河北保定: 河北农业大学, 2015.
- Hu F. The study of resistance phenotype and resistant genotype on *Pseudomonas aeruginosa* [D]. Baoding, Hebei: Hebei Agricultural University, 2015.
- [30] 李 颖, 杨 帆. 细菌的耐药性与适应性 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2010, 10(1): 76-80.
- Li Y, Yang F. The resistance and fitness of bacteria [J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2010, 10(1): 76-80.
- [31] Shrout J D, Chopp D L, Just C L, et al. The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional [J]. Mol Microbiol, 2006, 62(5): 1264-1277.