



研究报告

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

谭佳 曾艳兵 李海琴 张帆帆 杨群 方绍培 季华员 谭美芳*

江西省农业科学院畜牧兽医研究所 江西 南昌 330200

摘要:【背景】化脓隐秘杆菌作为一种条件致病菌,常与蓝耳病病毒、猪圆环病病毒、巴氏杆菌等混合感染猪,引起各种非特异性化脓性感染,部分临床症状与副猪嗜血杆菌相似。本试验从江西某猪场一起因呼吸道症状急性死亡病猪的肺脏分离到一株具有 β 溶血特性、疑似化脓隐秘杆菌的细菌病原。【目的】鉴定该病原的菌属种类、生物学特性及基因组特征,为该菌疾病的基础研究与临床防控奠定理论基础。【方法】采用透射电镜、扫描电镜结合PCR鉴定等方法对菌属种类进行鉴定;通过动物实验、药敏试验,分析菌株的生物学特性;借助全基因组测序、生物信息学等技术发掘该菌的基因组特征。【结果】形态观察、16S rRNA基因鉴定及系统发育分析证实,该分离菌株是化脓隐秘杆菌,命名为JX18;药敏试验表明,该菌株对克林霉素和林可霉素不敏感,对其余所选药物均敏感;动物实验结果显示,对小鼠腹腔攻毒后,小鼠腹部出现明显脓肿病灶,最高剂量组的小鼠全部死亡;全基因组测序结果表明,该菌株携带*plo*、*nanH*、*nanP*、*fimA*、*fimC*、*fimE*等重要毒力基因,并且与其他化脓隐秘杆菌菌株毒力基因的相似性较高;根据同源基因数据库(Cluster of Orthologous Groups, COG)预测,菌株JX18中参与碳水化合物代谢的基因占比最高;通过毒力基因数据库(Virulence Factor Database, VFDB)、UniProtKB/Swiss-Prot等数据库预测,JX18菌株基因组中携带有多个组氨酸激酶、反应调节因子等与细菌双组分调控系统相关基因,以及多种与粘附、侵入及分泌系统相关的毒力基因。【结论】在江西省分离鉴定出一株猪源强致病性化脓隐秘杆菌,丰富了猪源化脓隐秘杆菌病原信息,为进一步开展猪源化脓隐秘杆菌相关研究与防控奠定了理论依据。

关键词: 化脓隐秘杆菌, 分离鉴定, 生物学特性, 基因组特征, 毒力基因

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31960713); Jiangxi Modern Agriculture Pig-Industry Technology Research System (JXARS-01)

*Corresponding author: Tel: 86-27-85702433; E-mail: missphd@126.com

Received: 29-01-2021; Accepted: 16-04-2021; Published online: 05-06-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31960713); 江西省生猪产业体系赣抚平原试验站(JXARS-01)

*通信作者: Tel: 027-85702433; E-mail: missphd@126.com

收稿日期: 2021-01-29; 接受日期: 2021-04-16; 网络首发日期: 2021-06-05

Identification, biological characterization, and genomic analysis of *Trueperella pyogenes* isolated from swine

TAN Jia ZENG Yanbing LI Haiqin ZHANG Fanfan YANG Qun FANG Shaopei
JI Huayuan TAN Meifang*

Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang,
Jiangxi 330200, China

Abstract: [Background] As an opportunistic pathogen, *Trueperella pyogenes* is frequently associated with mixed infections with porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus, or *Pasteurella*, which can cause various non-specific suppurative infections. Some clinical symptoms are similar to those of *Haemophilus parasuis* infection. In this study, a bacterial pathogen showing β -hemolysis was isolated from the lung of an infected pig that died of respiratory symptoms in Jiangxi Province. **[Objective]** To investigate the species, biological characteristics, and genomic characteristics of the isolated pathogen. Our study aimed for better understanding of the pathogenesis of bacterial infection. **[Methods]** The morphology of the isolated bacteria was characterized by transmission electron microscopy and scanning electron microscopy. The pathogenicity, biological characteristics, and genomic characteristics of the bacteria were confirmed through animal experiments, drug sensitivity test, whole genome sequencing and bioinformatics analysis, respectively. **[Results]** Through morphology observation, identification of 16S rRNA gene, and phylogenetic analysis, it was confirmed that the isolated pathogen was *Trueperella pyogenes* and named JX18. Results of the drug sensitivity test showed that JX18 was resistant to clindamycin and lincomycin, but sensitive to other selected drugs. The results of animal experiments showed that typical symptoms of suppurative infection appeared in the abdomen of mice after the challenge of *T. pyogenes* JX18. All mice challenged with the highest dose died. Results of the whole-genome sequencing showed that JX18 carries important virulence genes, including *plo*, *nanH*, *nanP*, *fimA*, *fimC* and *fimE*. Moreover, these virulence genes have high homology with that of other *T. pyogenes* strains. Results suggested that genes involved in the carbohydrate transport and metabolism have the highest proportion in the genome of JX18. According to the VFDB and UniProtKB/Swiss-Prot databases, JX18 carries multiple histidine-kinase genes, response regulator genes, genes of the bicomponent regulatory system, and virulence genes related to adhesion, invasion, and secretion. **[Conclusion]** In this study, a high pathogenic pathogen, *T. pyogenes* JX18, was isolated in Jiangxi province and had been identified. Our study may enrich the pathogenic information of *T. pyogenes*, and provide the foundation for exploring strategies for the prevention and control of *T. pyogenes* infection.

Keywords: *Trueperella pyogenes*, isolation and identification, biological characterization, genomic characteristics, virulence genes

化脓隐秘杆菌(*Trueperella pyogenes*, TP)是一种兼性厌氧的革兰氏阳性菌,在普通琼脂培养基上形成针尖大小的菌落,在血琼脂平皿上可形成 β -溶血环。1893年TP首次被报道,1997年被重新分类至隐秘杆菌属^[1]。该菌是牛、羊、猪、禽、野生哺乳动物及鸟类黏膜上的一种常在共生菌^[2],也是造成这些动物感染的一种条件性致病菌,当皮肤和黏膜出现机械损伤或其他病原感染时,该病原可

从局部迁延至致肺部、肝脏、肾脏、骨骼、关节或其他组织,引起各种化脓性感染,如子宫炎、乳房炎、肺炎和脓肿,甚至导致败血症^[3],给畜牧业造成重大经济损失^[4]。

目前,国内外关于牛源TP的研究相对较多,该菌引起牛感染并致病的报道也比较普遍。据统计,23.5%的奶牛子宫内膜炎是由TP感染引起的^[5]。近些年来,国内猪源TP相关报道呈上升趋势

势,多个省份相继出现了猪源 TP 感染病例^[6]。TP 通常与引起免疫抑制的病毒发生混合感染或者继发感染,例如猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV),感染后常引起猪的肺炎、胸膜炎、心内膜炎、骨关节炎、多发性关节炎、乳腺炎、生殖道感染和败血症等^[7]。江西省内目前尚无猪源 TP 分离的相关报道。

本研究从江西省某猪场 1 例病死猪的肺组织中分离到一株疑似 TP 的病原菌株,在该菌株进行分离与鉴定的基础上结合系统发育分析,阐明了该菌株的遗传进化关系;进而对该菌株的耐药性、致病性等生物学表型及基因组特征进行研究,以期为 TP 致病分子机制研究提供思路,为猪源化脓隐秘杆菌的临床防控、疫苗与治疗药物开发奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料来源

2018 年,江西省萍乡市某规模化猪场内有保育猪发生高热、气喘、减食、四肢无力等病症,病程短,3–4 d 内急性死亡,剖检病死猪可见肺脏边缘实变后形成的化脓性坏死灶。无菌采集肺脏组织,低温运送至实验室,进行病原的分离培养。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

胰蛋白胨大豆琼脂(Tryptic Soy Agar, TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤(Tryptic Soy Broth, TSB)、无菌脱纤维绵羊血,青岛海博生物技术有限公司。新生牛血清(无噬菌体低内毒素),杭州四季青生物工程有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;Premix Taq Mixture、DNA Marker 等,宝日医生物技术(北京)有限公司;细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F 和 1492R,深圳华大基因科技有限公司;革兰氏染色试剂盒、药敏纸片,杭州滨和微生物技术有限公司;清洁级健康昆明小鼠,长沙市天勤生物技术有限公司。冷场发射扫描电子显微镜,透射电子

显微镜,日立(中国)有限公司;生化培养箱,上海博讯实业有限公司;PCR 仪,Bio-Rad 公司;GridION 测序仪,Oxford Nanopore Technologies 公司。

1.2 菌株分离及形态学观察

将肺脏样品表面充分消毒,利用无菌剪刀获取样品内部的小块组织,无菌研磨后,涂布接种于含 5%新生牛血清的 TSA 平板上,37 °C 恒温静置培养 24 h,可见无色、透明、针尖大小的露珠样小菌落。挑取单菌落进一步纯化培养,经革兰氏染色后于光学显微镜下观察分离菌株的形态特征,并将菌株送至武汉赛维尔(谷歌)生物科技有限公司进行扫描电镜和透射电镜观察。

1.3 菌株 PCR 鉴定及系统进化树分析

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒制备分离菌株的基因组 DNA,将其作为模板用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTGATCMTGGCT CAG-3')和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACCTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 µL): Premix Taq Mixture (2×) 10 µL,上游引物(10 µmol/L) 1 µL,下游引物(10 µmol/L) 1 µL,模板 2 µL,ddH₂O 6 µL。PCR 反应条件:95 °C 5 min;95 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 1 min,28 个循环;72 °C 10 min。扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,进一步将 PCR 产物送至深圳华大基因科技有限公司进行测序,将测定的基因序列提交 GenBank 并进行同源性比对。利用软件 MEGA-X 的 Muscle 功能,选择 BLAST 比对相似性较高的 20 株化脓隐秘杆菌 16S rRNA 基因序列及 2 株外源菌株 16S rRNA 基因序列与本试验菌株的 16S rRNA 基因序列进行多序列对比,采用邻接法(Neighbor-Joining Method)构建化脓隐秘杆菌的系统发育树,探讨各菌株之间的系统演化关系。

1.4 药物敏感性实验

根据美国临床实验室标准化协会(Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI)推荐的 Kirby-Bauer 纸片扩散法和判断标准检测细菌的药敏情况。将细

菌接种至含 5%新生牛血清的 TSA 平板上, 37 °C 恒温静置培养 24 h; 用无菌棉签蘸取 3–5 个单菌落于 1 mL 生理盐水中稀释, 将菌液浓度调整至 0.5 麦氏比浊度; 另取无菌棉签浸润菌悬液, 均匀涂布到新鲜 TSA 培养基表面; 待平板室温干燥 5 min, 用镊子取药敏片贴在琼脂表面; 贴好药敏片后 15 min 内将平板倒置放入培养箱中, 在 37 °C 条件下恒温静置培养 24 h, 取出平板, 量取抑菌圈直径, 抑菌环的边缘以肉眼看不见细菌为限判读结果, 以敏感(S)、中介(I)、耐药(R)报告。

1.5 动物致病性试验

将纯化后的细菌单菌落接种至含 5%新生牛血清的 TSB 培养基中, 37 °C、150 r/min 培养过夜后, 1:100 转接到新鲜培养基中, 继续培养至对数期 (OD_{600} 约为 0.50)。将新鲜菌液 8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用生理盐水洗涤重悬细菌, 并采用平板计数法将菌悬液浓度调整至 3 个稀释度: 3×10^7 、 3×10^8 和 3×10^9 CFU/mL。取 32 只雌性昆明小鼠(4–5 周龄)随机分成 4 组, 每组 8 只。将不同稀释度的菌悬液分别腹腔接种于 3 组昆明鼠, 0.1 mL/只, 对照组腹腔注射等量的生理盐水。小鼠接种后连续观察 5 d。对各组出现症状及死亡的小鼠进行临床症状记录或剖检观察, 绘制存活曲线图。

取最高接种剂量(3×10^8 CFU)感染下小鼠的脑、肺叶、肝脏组织, 同时取对照组小鼠的脑、肺和肝脏组织作为阴性对照。组织经 4%多聚甲醛溶液中充分固定, 脱水, 石蜡包埋, 制片(4 μ m 厚), HE 染色后在光学显微镜下观察。病理组织切片制作、染色及拍照委托武汉塞维尔(谷歌)生物科技有限公司完成。

1.6 全基因组的测序与组装

全基因组的测序与组装委托武汉未来组生物科技有限公司完成。首先用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取细菌基因组 DNA, 构建 1D 测序文库, 利用 GridION 测序仪对 DNA 进行实时单分子测序, 获得原始测序数据。然后对原始数据进行统计

与质控, 进行基因组组装、矫正及优化, 分析测序深度、质粒等, 得到最终的基因组信息。

1.7 基因组注释

1.7.1 基因组结构注释

根据编码序列(Coding Sequence, CDS)的基本特征, 用 Prodigal 软件预测基因组中完整的 CDS, 统计密码子使用频率; tRNA 基因用 tRNAscan-SE 软件进行预测; rRNA 基因用 RNAmmer 软件进行预测; 用 Infernal 软件将序列比对到 Rfam 数据库中预测其他非编码 RNA (Non-Coding RNA, ncRNA); 成簇的规律间隔的短回文重复(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat, CRISPR)序列用 MinCED 软件进行预测; 基因组岛用 Islander 软件进行预测。

1.7.2 基因组功能注释

利用基因产物功能数据库(Gene Ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)、直系同源基因数据库(Cluster of Orthologous Groups, COG)、Pfam 蛋白质家族数据库和 TIGRFAMs 数据库对预测的全部的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。

2 结果与分析

2.1 菌株形态与亲缘关系分析

2.1.1 菌株形态学分析

该分离菌株在含 5%新生牛血清的 TSA 固体培养基上生长良好, 形成光滑、湿润、表面凸起、边缘整齐的透明小菌落(图 1A); 在不含牛血清的 TSA 固体培养基上不生长; 在鲜血琼脂平板上可见深色菌落, 呈 β -溶血现象(图 1B)。将分离纯化后的菌株进行革兰氏染色, 镜检结果显示为革兰氏阳性的多形态杆菌(图 1C)。进一步在透射电镜(图 1D)和扫描电镜(图 1E 和 1F)下观察菌株形态, 菌体呈细长杆状, 无荚膜、无鞭毛、无芽孢。

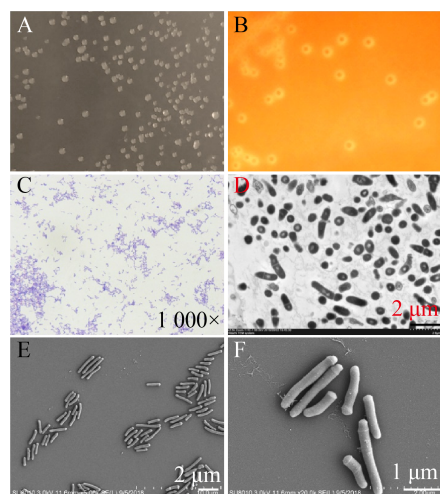


图1 分离菌株的形态观察

Figure 1 Morphological observation of the isolated strain

注: A: 菌落形态; B: 溶血环; C: 革兰氏染色试验; D: 透射电镜形态; E 和 F: 扫描电镜形态

Note: A: Colony morphology; B: Zone of hemolysis; C: Gram-staining test; D: Morphology of the bacteria under the transmission electron microscope; E and F: Morphology of the bacteria under the scanning electron microscope

2.1.2 菌株的 PCR 鉴定与系统发育分析

利用细菌 16S rRNA 基因的通用引物扩增出大小为 1.6 kb 的目的片段。将 PCR 产物进行测序, 并将 16S rRNA 基因序列提交至 GenBank (登录号: MW737795)。将测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对后显示, 该菌株的 16S rRNA 基因核苷酸序列与其他化脓隐秘杆菌属的 16S rRNA 基因序列高度同源。由进化树分析结果(图 2)可知, 菌株 JX18 与国内的牛源分离株 *T. pyogenes* TP1 处于较近分支, 亲缘关系较近; 而与 *T. pyogenes* TP-2849、*T. pyogenes* TP4479 等国内的猪源分离株及伊朗的水牛源分离株 *T. pyogenes* Arash114 处于遗传演化关系较远的分支。

2.2 药敏试验

药敏结果显示, 在选择的 22 种药物中, 菌株 JX18 对克林霉素(林可酰胺类)和林可霉素(林可酰胺类)耐药, 对其他 20 种抗生素均敏感(表 1)。

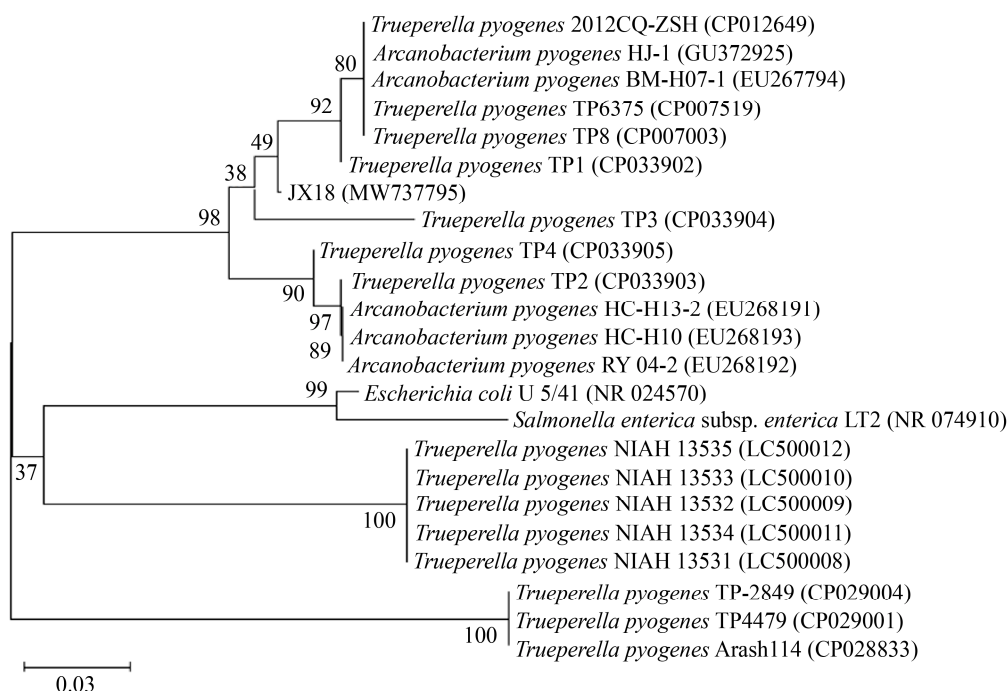


图2 菌株 JX18 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of strain JX18

注: 分支上的数字为 Bootstrap 值; 括号内表示 GenBank 登录号; 比例尺长度代表 3% 的核苷酸序列的进化差异

Notes: Numbers on the branch are the bootstrap values; The parentheses indicate the GenBank login number; The scale length means a 3% nucleotide sequence difference

表 1 菌株 JX18 的药敏试验结果

Table 1 Results of drug sensitivity test of strain JX18

药物名称	含量	抑菌圈/结果	药物名称	含量	抑菌圈/结果
Drugs name	Content	Inhibition zone (mm)/Results	Drugs name	Content	Inhibition zone (mm)/Results
克林霉素	2 µg	0 (R)	青霉素 G	10 U	61 (S)
Clindamycin			Penicillin G		
恩诺沙星	5 µg	39 (S)	氯霉素	30 µg	43 (S)
Enrofloxacin			Chloramphenicol		
杆菌肽	0.04 U	26 (S)	克拉霉素	15 µg	35 (S)
Bacitracin			Clarithromycin		
多西环素	30 µg	27 (S)	万古霉素	30 µg	35 (S)
Doxycycline			Vancomycin		
林可霉素	2 µg	11 (R)	环丙沙星	5 µg	30 (S)
Lincomycin			Ciprofloxacin		
阿莫西林	10 µg	56 (S)	红霉素	15 µg	30 (S)
Amoxicillin			Erythromycin		
卡那霉素	30 µg	38 (S)	四环素	30 µg	33 (S)
Kanamycin			Tetracycline		
链霉素	10 µg	26 (S)	米诺环素	30 µg	41 (S)
Streptomycin			Minocycline		
庆大霉素	10 µg	36 (S)	左氟沙星	5 µg	36 (S)
Gentamicin			Levofloxacin		
诺氟沙星	10 µg	27 (S)	多粘菌素 B	30 µg	25 (S)
Norfloxacin			Polymyxin B		
壮观霉素	100 µg	48 (S)	呋喃妥因	300 µg	41 (S)
Spectinomycin			Nitrofurantoin		

Note: R: Resistance; S: Sensitivity

2.3 动物致病性实验

为检测菌株 JX18 的致病性, 对 4–5 周龄雌性昆明小鼠腹部注射定量的细菌, 生理盐水作为阴性对照(图 3)。最高接种剂量(3×10^8 CFU)引起所有接种小鼠腹部化脓(图 4A), 4 d 内全部发病、死亡。在较高接种剂量(3×10^7 CFU)下, 小鼠出现体重减轻、皮毛粗乱、腹部化脓等症状, 5 d 内陆续死亡, 未死亡小鼠后期化脓部位愈合, 症状减轻, 有所好转。在低接种剂量(3×10^6 CFU)下, 小鼠出现采食量下降、精神沉郁及腹部皮肤化脓等症状, 但未出现死亡, 腹部皮肤化脓病灶能自行愈合。对死亡小鼠脏器进行细菌分离并对 16S rRNA 基因进行扩增、测序, 结果与从病猪体内分离到的化脓隐秘杆菌 JX18 序列一致。

对最高剂量下的死亡小鼠进行剖检, 发现其脑膜充血, 伴随有出血点, 肝脏肿大呈褐色, 其他组织器官则无明显病变。病理组织切片分析结果显

示, 感染组小鼠的肺组织未见明显异常, 支气管上皮结构完整, 上皮细胞形态结构正常、排列紧密, 肺泡壁未见明显增厚, 未见炎性细胞浸润。但与对照组小鼠的肝组织相比, 感染组小鼠的肝组织中可见大量肝细胞气球样变性, 细胞肿胀, 核居中, 胞质中空泡化(黑色箭头, 图 4B); 局部可见

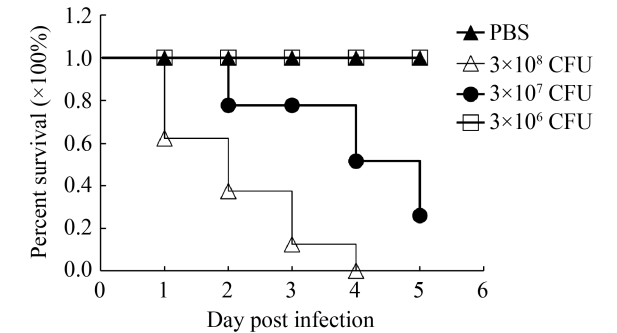


图 3 菌株 JX18 攻毒昆明鼠存活率
Figure 3 Survival rate of Kunming mice challenged by strain JX18

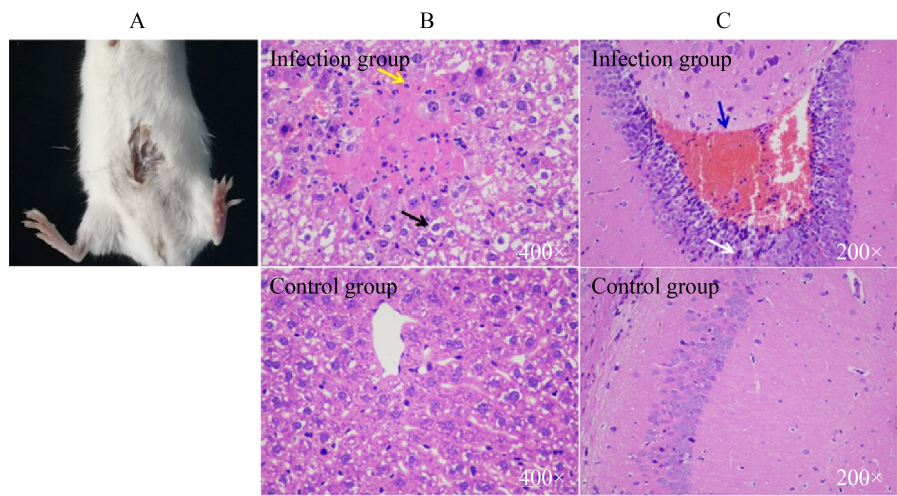


图 4 受试小鼠和组织的病理观察结果

Figure 4 Pathological observation of challenged mice and tissues

注：A：菌株感染形成的腹部脓肿病灶；B：肝病理组织切片形态；C：脑病理组织切片形态

Note: A: Abdominal abscess; B: Histological examination of liver; C: Histological examination of brain

少量肝细胞坏死，核溶解，并伴有少量炎性细胞浸润(黄色箭头，图 4B)。感染组小鼠的脑组织中可见神经元皱缩，染色加深，胞核胞质分界不清(白色箭头，图 4C)；局部出血，可见较多红细胞(蓝色箭头，图 4C)。

2.4 全基因组测序

用 GridION 测序平台测序了 1 个 Cell，总共产出 7 483 760 523 bp 原始数据，通过质控的数据量为 6 662 264 744 bp。对质控后的数据进行基因组组装，矫正及优化后最终得到由 1 个 Contig 组成的基因组，大小为 2 415 007 bp (NCBI 检索号：CP050810)，GC 含量为 59.34% (表 2)，预测到 2 192 个完整的基因编码序列。全基因组每 1 000 bp 区域碱基平均被读取次数在 2 000 次以上(图 5)，表明组装结果具有较好的完整性和测序的均一性。将全基因组测序深度、GC 分布、GC-skew 及基因组结构注释进行整合后，形成核基因组圈图(图 6)。基因组结构注释表明，菌株 JX18 的基因组中有 3 个拷贝的 5S rRNA 基因、3 个拷贝的 16S rRNA 基因、3 个拷贝的 23S rRNA 基因、1 个串联重复序列(CRISPR)及 3 个非编码 RNA，未预测到基因岛结构(表 3)。

表 2 基因组碱基分布统计表

Figure 2 Statistical table of base distribution of the genome

碱基 Base	数量 Number (bp)	基因组占比 Genomic proportion (%)
A	493 516	20.44
T	488 438	20.23
G	716 822	29.68
C	716 231	29.66
N	0	0.00
GC	1 433 053	59.34
Total	2 415 007	100.00

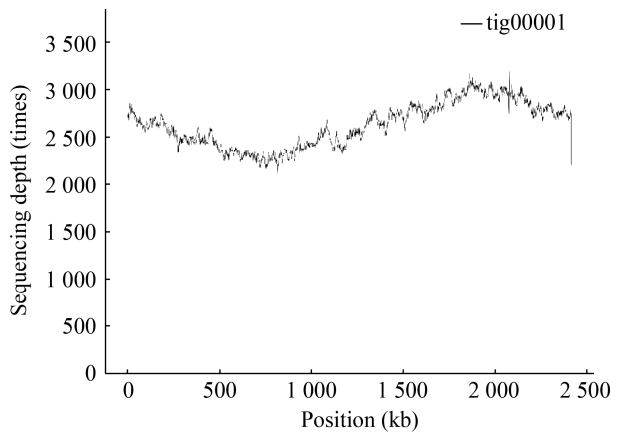


图 5 基因组测序深度分布

Figure 5 Depth distribution of genome sequencing

Note: Window=1 000 bp

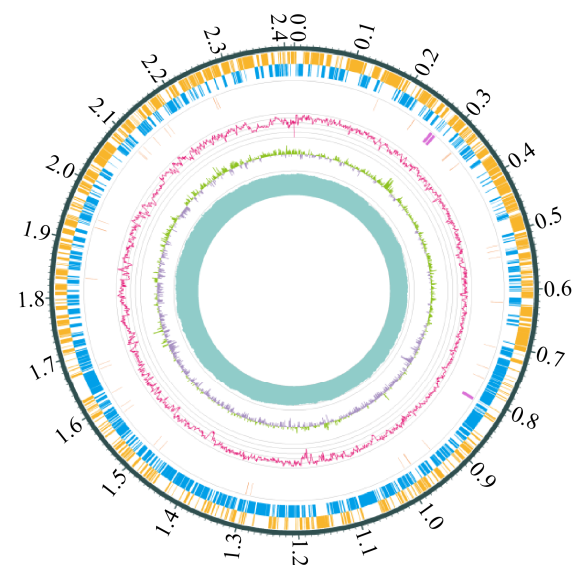


图 6 核基因组圈图

Figure 6 Nuclear genome circle map

注：由外到内依次为编码基因(正义链)、编码基因(负义链)、tRNA (橙色)和 rRNA (紫色)、CRISPR (蓝色)和基因岛(绿色)、GC 比、GC-skew、测序深度

Note: The sequences from outside to inside are coding genes (sense strand), coding genes (antisense strand), tRNA (orange) and rRNA (purple), CRISPR (blue), gene island (green), GC ratio, GC-skew, and sequencing depth

2.5 基因组注释

将菌株 JX18 基因组中预测的 2 192 个基因编码序列与 COG 数据库进行 BLASTp 比对, 获得基因功能的注释结果, 注释分类见图 7。结果显示, 1 426 个基因完成了蛋白注释, 占全部基因的 65.05%。注释数量较多的基因功能分别为: 参与

表 3 基因组预测结果统计表

Figure 3 Statistical prediction of genomic formation

基因类型	数量	长度	基因组占比
Genotype	Number	Length (bp)	Genomic proportion (%)
tRNA	47	3 579	0.15
16S rRNA	3	4 546	0.19
23S rRNA	3	9 228	0.38
5S rRNA	3	351	0.01
CDS	2 192	2 181 567	90.33
CRISPR	1	3 444	0.14
Genomic island	0	0	0.00

碳水化合物运输和代谢(Carbohydrate Transport and Metabolism)的基因 213 个(14.9%), 参与翻译、核糖体结构及生物合成(Translation, Ribosomal Structure and Biogenesis)的基因 162 个(11.4%), 参与转录(Transcription)的基因 122 个(8.6%), 参与氨基酸的运输与代谢(Amino Acid Transport and Metabolism)的基因 105 个(7.4%)。

2.6 毒力基因预测

全基因组测序及序列比对分析显示, 菌株 JX18 携带有 *plo*、*nanP*、*nanH*、*fimA*、*fimC*、*fimE* 等 TP 典型毒力因子的基因, 上述基因与 NCBI 数据库中其他化脓隐秘杆菌高度同源, 相似性在 96.05%–99.88%间。另外, 通过 VFDB 分析发现, 菌株 JX18 的基因组中还携带有 100 种潜在的毒力因子基因。按 VFDB 对毒素的分类(进攻型毒素、防守型毒素、非特异性毒素和毒素调控)进行统计, 进攻型毒素基因共 63 个(图 8), 其中, 与黏附和侵袭功能相关的基因 18 个、与分泌系统功能相关的基因 37 个(III型分泌系统 16 个、VI型分泌系统 8 个、IV型分泌系统 8 个、VII型分泌系统 4 个、转运系统 1 个)、细菌毒素基因 8 个; 防守型毒素基因 22 个, 其中, 细胞代谢类 9 个、抗血清杀伤基因 1 个、抗吞噬基因 3 个、抗溶解基因 5 个、相变异基因 4 个; 非特异性毒素基因 9 个, 其中, 镁离子转运基因 2 个、铁离子转运基因 4 个、胞外酶基因 3 个; 毒素调控相关基因 3 个。此外, 根据 UniProtKB/Swiss-Prot 蛋白功能数据库注释反馈, 菌株 JX18 中携带有多个拷贝与细菌双组分调控相关基因, 如组氨酸激酶 HK、反应调节因子 RR (*citB*、*ompR*)等。

3 讨论与结论

溶血素(Pyolysin, PLO)属于胆固醇依赖性家族(Family of Cholesterol-Dependent Cytolysin, CDCs)蛋白, 被认为是 TP 的主要毒力因子和免疫保护性抗原, 截至目前, 编码该蛋白的基因已在所有野生型 TP 中检测到^[2,8-9]; 菌毛(Fimbriae, Fim)

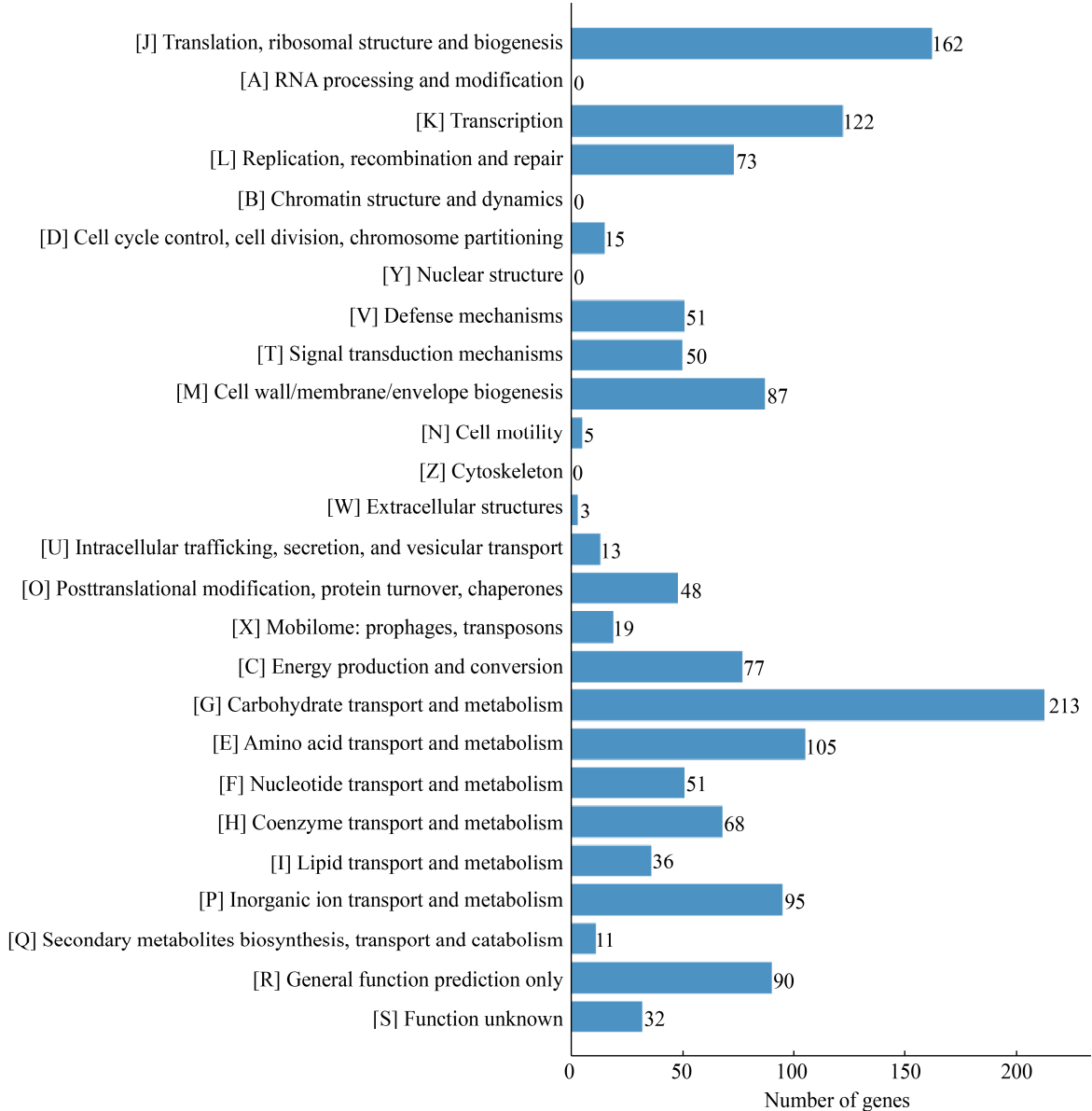


图 7 COG 功能分类图
Figure 7 Gene distribution based on the COG database

和胶原结合蛋白(Collagen-Binding Protein A, CbpA)在 TP 感染中的作用与细菌对宿主细胞的粘附有关^[10-11], 而 CbpA 基因仅在 48%的 TP 中存在^[12]; 神经氨酸酶(Neuraminidase, Nan)是唾液酸分解代谢的重要酶之一, 能暴露宿主细胞受体促进 TP 黏附, 也可通过降低黏度来促进 TP 在组织定殖、削弱宿主的免疫功能^[8]。全基因组测序结果显示, 菌

株 JX18 同时携带 *plo*、*nanP*、*nanH*、*fimA*、*fimC*、*fimE* 等 6 个 TP 的典型毒力基因; 另外, 在 VFDB 数据库中还对出大量黏附、侵入及分泌系统相关毒力基因; 动物致病性实验也表明, 菌株 JX18 感染昆明鼠后可引发明显的化脓病变, 并导致小鼠死亡。结果表明临床分离株 JX18 具有较强的致病能力, 对这种机会型致病菌的防控不容忽视。

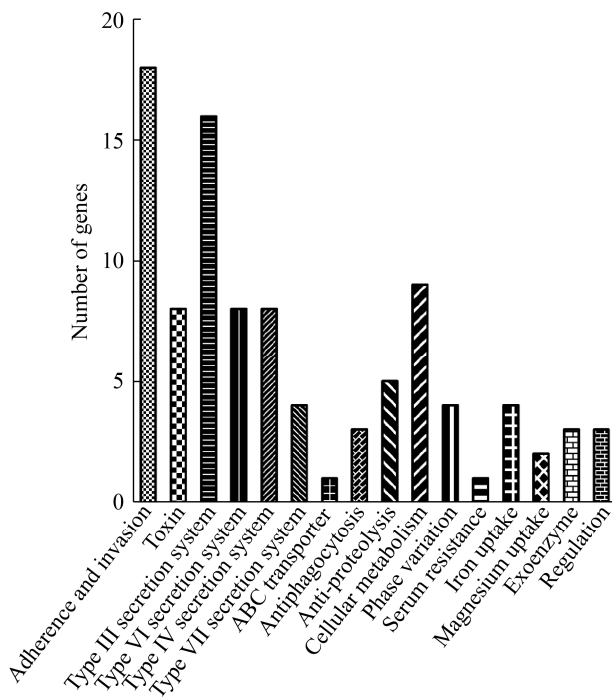


图8 基于VFDB的毒力基因统计

Figure 8 Statistical diagram of virulence gene based on the VFDB

本研究证实菌株 JX18 除对林可霉素和克林霉素耐药外, 对其他 22 种常用抗生素均敏感。但在治疗过程中, 由于到达病灶部位的药量有限, 导致抗生素在化脓隐秘杆菌治疗中常常是无效的^[13]。因此, 接种疫苗应被视为控制猪化脓性肺炎的主要方法。目前, 预防化脓隐秘杆菌的疫苗主要有: 灭活疫苗、针对 PLO 设计的 DNA 疫苗、基因缺失活疫苗以及亚单位疫苗, 而这些疫苗主要是用于牛病防控, 暂无相关证据显示牛源疫苗对猪具有保护作用^[14]。因此, 临床分离的菌株 JX18 可作为疫苗候选株用于猪源化脓隐秘杆菌疫苗研究。

宿主对 TP 的清除等环境压力在 TP 引起的感染中起着至关重要的作用^[9,15]。共生型分离株和临床分离株在毒力基因型之间没有明显的差异^[16], 表明 TP 在与环境、宿主对抗过程中, 其自身存在着一定的基因表达调控方式, 以帮助其突破动物机体免疫屏障。目前对 TP 毒力基因的表达调控机制研究较少, 仅有部分研究人员提出在 TP 中普遍存

在一个由传感器组氨酸激酶(HK)和反应调节蛋白(RRs)组成的双组分调节系统^[17-19]。近期四川大学学者研究证实, 大肠杆菌、铜绿假单胞菌等一些革兰氏阴性菌的群体感应系统信号分子 AHLs 类似物(C8HSL、C12HSL), 能激发林麝源强毒株 TP7 的双组分调控系统, 触发下游信号通路, 导致 TP7 相关毒力基因表达下调, 从而降低 TP 对不利环境和宿主清除的耐受。同时, C8HSL、C12HSL 对动物无毒性作用, 可作为 TP 感染的备选药物^[20-21]。本研究中证实菌株 JX18 携带有与细菌双组分调控系统相关基因: 多个拷贝组氨酸激酶 HK 和多个拷贝的反应调节因子 RR, 可为后续 JX18 感染宿主机制研究提供思路 and 方向。

REFERENCES

- [1] Xu N. Isolation and identification of *Trueperella pyogenes* and independent factor detection[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2013 (in Chinese)
徐凝. 牛化脓隐秘杆菌分离鉴定及毒力因子检测[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2013
- [2] Jost BH, Billington SJ. *Arcanobacterium pyogenes*: molecular pathogenesis of an animal opportunist[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2005, 88(2): 87-102
- [3] Milanov D, Petrovic J, Kapetanov M, Suvajdzic L. *Arcanobacterium pyogenes*: virulence factors, importance in mastitis etiology and therapeutic (im)possibilities[J]. *Veterinarski Glasnik*, 2011, 65(3/4): 235-246
- [4] Rzewuska M, Kwiecień E, Chrobak-Chmiel D, Kizerwetter-Świda M, Stefańska I, Gieryńska M. Pathogenicity and virulence of *Trueperella pyogenes*: a review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(11): 2737
- [5] Yang YL. Advances in the study of *Trueperella pyogenes*[J]. *Modern Animal Husbandry*, 2012(6): 21-22 (in Chinese)
杨蕴力. 化脓隐秘杆菌的研究进展[J]. *当代畜牧*, 2012(6): 21-22
- [6] Zhang LY, Cai RJ, Song CX. Isolation and identification of *Arcanobacterium pyogenes* of swine and studies on the pathogeny speciality[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2014, 35(5): 44-49 (in Chinese)
张乐宜, 蔡汝健, 宋长绪. 猪化脓隐秘杆菌的分离鉴定及病原特性研究[J]. *动物医学进展*, 2014, 35(5): 44-49
- [7] Moreno LZ, Matajira CEC, Da Costa BLP, Ferreira TSP, Silva GFR, Dutra MC, Gomes VTM, Silva APS, Christ APG, Sato MIZ, et al. Characterization of porcine

- Trueperella pyogenes* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), molecular typing and antimicrobial susceptibility profiling in Sao Paulo State[J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2017, 51: 49-53
- [8] Taylor G. Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1996, 6(6): 830-837
- [9] Ishiyama D, Mizomoto T, Ueda C, Takagi N, Shimizu N, Matsuura Y, Makuuchi Y, Watanabe A, Shinozuka Y, Kawai K. Factors affecting the incidence and outcome of *Trueperella pyogenes* mastitis in cows[J]. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2017, 79(3): 626-631
- [10] Høie S, Falk K, Lium BM. An abattoir survey of pneumonia and pleuritis in slaughter weight swine from 9 selected herds. IV. bacteriological findings in chronic pneumonic lesions[J]. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 1991, 32(3): 395-402
- [11] Esmay PA, Billington SJ, Link MA, Songer JG, Jost BH. The *Arcanobacterium pyogenes* collagen-binding protein, CbpA, promotes adhesion to host cells[J]. *Infection and Immunity*, 2003, 71(8): 4368-4374
- [12] Ponnuraj K, Xu Y, Moore D, Deivanayagam CCS, Boque L, Hook M, Narayana SVL. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of Ace: a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1596(2): 173-176
- [13] Dong WL, Kong LC, Wang Y, Gou CL, Xu B, Ma HX, Gao YH. Aminoglycoside resistance of *Trueperella pyogenes* isolated from pigs in China[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2017, 79(11): 1836-1839
- [14] Heuck AP, Moe PC, Johnson BB. The cholesterol-dependent cytolysin family of Gram-positive bacterial toxins[J]. *Cholesterol Binding and Cholesterol Transport Proteins*, 2010, 51: 551-577
- [15] Bicalho MLS, Lima FS, Machado VS, Meira EB Jr, Ganda EK Jr, Foditsch C Jr, Bicalho RC Jr, Gilbert RO Jr. Associations among *Trueperella pyogenes*, endometritis diagnosis, and pregnancy outcomes in dairy cows[J]. *Theriogenology*, 2016, 85(2): 267-274
- [16] Bicalho MLS, Machado VS, Oikonomou G, Gilbert RO, Bicalho RC. Association between virulence factors of *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, and *Arcanobacterium pyogenes* and uterine diseases of dairy cows[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 157(1/2): 125-131
- [17] Iwamatsu S, Morio A, Watanabe K, Ikeo T, Yamashita T, Yoshino H. Suppurative cerebral lesions caused by infection with *Actinomyces pyogenes* in breeding swine[J]. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, 1986, 39(4): 238-242
- [18] Zschiedrich CP, Keidel V, Szurmant H. Molecular mechanisms of two-component signal transduction[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(19): 3752-3775
- [19] Herrou J, Crosson S, Fiebig A. Structure and function of HWE/HisKA2-family sensor histidine kinases[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 36: 47-54
- [20] Zhao KL, Li WJ, Huang T, Song XH, Zhang XY, Yue BS. Comparative transcriptome analysis of *Trueperella pyogenes* reveals a novel antimicrobial strategy[J]. *Archives of Microbiology*, 2017, 199(5): 649-655
- [21] Huang T, Song XH, Zhao KL, Jing J, Shen YM, Zhang XY, Yue BS. Quorum-sensing molecules N-acyl homoserine lactones inhibit *Trueperella pyogenes* infection in mouse model[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 213: 89-94