

河南部分地区乌鸡群鸭源鸡杆菌的 分离鉴定及系统发育分析

皇甫和平*, 杜振隆, 董青, 王宏魁, 孙彦婷,

郭宏伟, 姬向波, 贾含笑, 余萌薇, 卜亚歌

(河南牧业经济学院, 郑州 450046)

摘要: 为了解乌鸡中鸡杆菌的流行情况及其分离株的遗传进化特点, 从河南信阳和南阳的两个乌鸡场采集棉拭子样品, 进行鸡杆菌的分离和荧光定量 PCR 检测, 对分离的菌株进行 PCR 鉴定、药敏试验和 16S rRNA、*rpoB* 及 *gyrB* 基因的 PCR 扩增, 随后进行三个管家基因的序列测定分析, 利用 DNASTar 中 MegAlign 程序计算分离株之间的相似性, 利用 MEGA5.0 构建进化树进行遗传进化分析。结果显示: 22 只乌鸡中 16 只为鸭源鸡杆菌阳性, 阳性率为 72.7%; 分离的 4 株鸡杆菌经鉴定均为鸭源鸡杆菌; 4 株鸭源鸡杆菌均为多重耐药菌株, 只对头孢曲松、头孢噻肟、阿米卡星和妥布霉素等药物具有一定的敏感性; 分离株与鸭源鸡杆菌的参考菌株相似性分别为 99.1%~99.8% (16S rRNA)、85.4%~99.6% (*rpoB*)、92.7%~99.8% (*gyrB*); 在 16S rRNA 基因进化树中分离的 4 株鸭源鸡杆菌与参考鸭源鸡杆菌位于同一分支, 在 *rpoB* 基因进化树中 GAC193 分离株与多杀性巴氏杆菌位于同一分支中, 与其他鸭源鸡杆菌不在同一分支中, *gyrB* 基因进化树中, GAC017 与鸡杆菌基因种 1 在一个小的分支。结果表明: 乌鸡中有鸭源鸡杆菌存在, 并具有较高的检出率; 从乌鸡中分离到 4 株鸭源鸡杆菌, 这些菌株多重耐药现象严重; 分离的部分鸭源鸡杆菌在 *rpoB* 和 *gyrB* 基因位点具有明显的遗传进化差异。

关键词: 乌鸡; 鸭源鸡杆菌; 分离鉴定; 药敏试验; 系统发育分析

中图分类号: S852.61

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)11-2451-10

Isolation, Identification and Phylogenetic Analysis of *Gallibacterium anatis* from Silky Population in Henan Province, China

HUANGFU He-ping*, DU Zhen-long, DONG Qing, WANG Hong-kui, SUN Yan-ting,

GUO Hong-wei, JI Xiang-bo, JIA Han-xiao, YU Meng-wei, BU Ya-ge

(Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: In order to understand the epidemic situation of *Gallibacterium* in silky and the genetic evolution characteristics of isolates, samples were collected for the isolation of *Gallibacterium anatis* and q-PCR identification from two silky farms in Xinyang and Nanyang, Henan province, then isolates were detected by *Gallibacterium* specific PCR followed by drug susceptibility test, and the PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA, *rpoB* and *gyrB* genes. Finally, the MegAlign program was used for calculating the similarity between isolates of *G. anatis*, and MEGA5.0 for constructing evolutionary tree and genetic evolution analysis. Results were as follows: Of 22 silky chickens, 16 were found positive to *G. anatis*, the positive rate was 72.7%;

收稿日期: 2018-02-27

基金项目: 国家自然科学基金(U1404328); 河南牧业经济学院科技创新团队(HUAHE2015014); 河南牧业经济学院预防兽医学重点学科(MXK2016102)

作者简介: 皇甫和平(1977-), 男, 河南博爱人, 副教授, 博士, 主要从事动物疾病发病机制研究; 杜振隆(1996-), 男, 河南嵩县人, 本科, 主要从事动物疾病发病机制研究, E-mail: 2955545212@qq.com。二人并列第一作者

* 通信作者: 皇甫和平, E-mail: hepinghf@163.com

the four *Gallibacterium* isolates were identified as *G. anatis*; the four isolates were all multidrug resistant, and were sensitive to ceftriaxone, cefotaxime, amikacin and tobramycin only; the homology between the isolates and the reference *G. anatis* species was 99.1%-99.8% (16S rRNA), 85.4%-99.6% (*rpoB*), and 92.7%-99.8% (*gyrB*), respectively. In the 16S rRNA gene evolution tree, the four isolates and the reference *G. anatis* were located in the same branch; the GAC193 isolate in the *rpoB* gene evolution tree were located in the same branch with *Pasteurella multocida*, not in the same branch with other *G. anatis*; in the *gyrB* gene evolution tree, GAC017 and *G. genomosp.* 1 were in a small branch. The results showed that *G. anatis* were found in the silky chickens with a high detection rate, and four strains of *G. anatis* were isolated, which showing serious multidrug resistance. There are significant genetic differences in the *rpoB* and *gyrB* gene of some isolates of *G. anatis*.

Key words: silky; *Gallibacterium anatis*; isolation and identification; drug sensitivity test; phylogenetic analysis

鸭源鸡杆菌是鸡杆菌属的代表种,是鸡上呼吸道和下生殖道的一种常在菌,具有条件致病性,是鸡输卵管炎和腹膜炎的重要致病因子^[1]。资料显示国内外鸡群中鸡杆菌流行广泛,2008年王川庆等^[1]首次对河南地区进行鸭源鸡杆菌感染情况调查,结果显示鸡场普遍存在鸭源鸡杆菌的感染,随后陆续见到山东、山西、四川、河北和湖北等地区鸡群中鸭源鸡杆菌感染的报道^[2-7],2014年杨晓林等^[8]从四川鸽场中分离出鸡杆菌基因种3型;2018年,El-Adawy等^[9]报道德国鸡群中有鸡杆菌的流行,Elbestawy等^[10]报道埃及的鸡群中也有鸭源鸡杆菌的流行。鸭源鸡杆菌的易感禽类包括鸡、鸭、鹅、鹌鹑、火鸡和鸽等^[1]。

乌鸡作为我国的一种特有珍禽,以其高营养价值闻名天下,在我国禽类养殖中占有特殊的地位,截至目前国内还未见到乌鸡中鸡杆菌流行情况的报道。因此,了解乌鸡中鸡杆菌的流行情况、流行种类及生物学特性,对乌鸡的健康养殖具有重要意义。

16S rRNA 基因进化速度缓慢,保守性强,是细菌分类的黄金标准。*gyrB* 基因编码 DNA 促旋酶 B 亚基,进化速度较 16S rRNA 快、碱基替换率高,在 DNA 复制等功能起重要作用^[11],*rpoB* 基因作为一个单一拷贝的管家基因,是 RNA 聚合酶的重要组成部分。*gyrB* 基因和 *rpoB* 基因也可以作为一种分析方法,辅助进行 16S rRNA 基因的系统发育分析^[12-17]。因此,在此前工作的基础上,笔者拟选取 16S rRNA、*rpoB* 和 *gyrB* 三个基因位点对分离的鸭源鸡杆菌进行遗传进化和耐药性分析。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

ETC-811 PCR 仪为北京东胜创新生物技术有限公司产品;Universal Hood II 凝胶成像系统为美国伯乐公司产品;3-30K 高速冷冻离心机为德国 Sigma 公司产品。

DNA Marker 购自上海生工生物工程技术有限公司(以下简称上海生工);TaKaRa Ex Taq、10×Ex. Taq Buffer(Mg²⁺)、dNTP 混合物、Premix Ex Taq、ROX Reference Dye II 均购自宝生物工程(大连)有限公司;绵羊血平板培养基购自郑州福博赛生物技术有限责任公司;OXOID 药敏纸片购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

1.2 引物

参考 Weisburg 等^[18]和 Christensen 等^[19]的方法分别设计 16S rRNA 和 *rpoB* 基因的 PCR 引物;参考 Johuson 等^[20]的方法设计 *gyrB* 基因的 PCR 引物;根据 Huangfu 等^[21]的方法设计鸭源鸡杆菌的 q-PCR 引物和探针;参考 Bojesen 等^[22]的方法设计鸡杆菌特异性 PCR 的两对引物,1133fgal、114r 分别定位于 16S rRNA 和 23S rRNA 基因,另一对引物与 *rpoB* 基因 PCR 引物一致,作为内参。委托上海生工合成上述引物及探针,序列详见表 1。

1.3 样品采集

从河南省信阳和南阳的两个乌鸡场随机采样,每只乌鸡采集上腭裂和泄殖腔棉拭子各一份,南阳地区的乌鸡场采集 12 只,信阳地区的乌鸡场采集 10 只,共采集了 22 只乌鸡的 44 份样品,所采集的

表 1 引物和探针

Table 1 Primers and probes

| 引物名称 Primer name | 基因 Gene | 引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3') |
|---------------------|-------------|--|
| F1 | 16S rRNA | CCGAATTCGACAACAGAGTTTGATCATGGCTCAG |
| R1 | | CCC GGGATCCAAGCTTACGGTTACCTTGTTACGACTT |
| rpoB-L | <i>rpoB</i> | GCAGTCAAAGARTTCTTTGGTTC |
| rpoB-R | | GTTGCATGTTIGIACCCAT |
| gyrB-F | <i>gyrB</i> | TGTGCGTTTCTGGCCAAGTC |
| gyrB-R | | CGCTCACCAACTGCAGATTC |
| Primer-F | <i>gtxA</i> | ATGGGACATTCTATCGCAAACC |
| Primer-R | | AACGGCGGTAGAGGCATTAG |
| Probe_IN | | FAM-TGTTAATACAAGTAGCGGGAAAGCGGC-TAMRA |
| 1133fgal | 16S rRNA | TATTCTTTGTTACCARCGG |
| 114r | 23S rRNA | GGTTTCCCCATTTCGG |

22 只乌鸡均为外观健康鸡。

1.4 鸡杆菌的分离与鉴定

1.4.1 鸡杆菌的分离 无菌方法将棉拭子涂布于血平板培养基,37 °C 培养 24 h,挑取圆形、隆起、直径 1~2 mm、β 溶血的菌落,显微镜检查后,接种于含 5% 胎牛血清的 LB 肉汤,37 °C 200 r·min⁻¹ 振荡培养 24 h 后,参考 Huangfu 等^[21] 的方法提取疑似菌株 DNA, -20 °C 保存备用。

1.4.2 鸡杆菌 PCR 鉴定 反应体系:10× Buffer(含 Mg²⁺) 2.5 μL, dNTP(10 U) 0.5 μL, 浓度均为 25 μmol·L⁻¹ 的引物 1133fgal、114r、rpoB-L 和 rpoB-R 各 0.5 μL, Taq 酶 1.25 U, 模板 2 μL, 补充灭菌去离子水至 25 μL。反应程序:95 °C 4 min; 95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。电泳检测反应产物。

1.5 棉拭子样品的 q-PCR 检测

参考 Huangfu 等^[21] 的方法提取 44 份棉拭子样品的 DNA 然后进行 q-PCR 检测, 反应体系(20 μL): Premix Ex Taq 10 μL, 引物 Primer-F(10 μmol·L⁻¹) 和 Primer-R(10 μmol·L⁻¹) 各 0.4 μL, 探针 Probe_IN(10 μmol·L⁻¹) 0.6 μL, ROX Dye II 0.2 μL, 棉拭子 DNA 2 μL, 补充灭菌去离子水至 20 μL。反应

程序:95 °C 预变性 5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 34 s, 40 个循环; 在每个循环 60 °C 结束时进行荧光检测, 检测结果 Ct 值小于 35 判定为阳性。

1.6 分离株的管家基因 PCR 扩增和测序

参考皇甫和平等^[17] 的方法扩增分离菌株的 16S rRNA、*rpoB* 基因, 参考 Johnson 等^[20] 的方法扩增 *gyrB* 基因, PCR 产物纯化后, 提交上海生工测序。

1.7 分离菌株的药敏试验

参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)抗菌药物敏感性试验标准(M100-S23), 选取 13 种药敏片(氨苄西林、环丙沙星、复方新诺明、克林霉素、庆大霉素、左氧氟沙星、头孢曲松、氯霉素、头孢噻肟、阿米卡星、妥布霉素、氧氟沙星、四环素), 采取纸片法对分离的 4 株鸭源鸡杆菌进行药敏试验。

1.8 遗传进化树的构建及相似性分析

以多杀性巴氏杆菌为外群, 将分离株与鸡杆菌属其他种进行比较分析, 菌株信息见表 2, 利用 DNASTar 软件中的 MegAlign 程序计算种间相似性, 再利用 MEGA5.0 构建进化树(NJ 建树法, 1 000 个重复), 对于遗传差异显著的基因, 推导出氨基酸序列后, 利用 DNASTar 和在线软件(<http://www.expasy.ch>)进行氨基酸序列的比较分析。

表 2 鸡杆菌菌株信息

Table 2 Information of *Gallibacterium* strains

| 菌株 Strain | 种 Speices | 登陆号 Accession | 基因 Gene | 分离地 Separation of places |
|-------------------|--------------|------------------|-------------|-----------------------------|
| GAC017 | 鸭源鸡杆菌 | MH393185 | 16S rRNA | 河南信阳 |
| | | MH423846 | <i>rpoB</i> | |
| | | MH423842 | <i>gyrB</i> | |
| GAC018 | 鸭源鸡杆菌 | MH393186 | 16S rRNA | 河南信阳 |
| | | MH423847 | <i>rpoB</i> | |
| | | MH423843 | <i>gyrB</i> | |
| GAC021 | 鸭源鸡杆菌 | MH393187 | 16S rRNA | 河南南阳 |
| | | MH423848 | <i>rpoB</i> | |
| | | MH423844 | <i>gyrB</i> | |
| GAC193 | 鸭源鸡杆菌 | MH393188 | 16S rRNA | 河南南阳 |
| | | MH423849 | <i>rpoB</i> | |
| | | MH423845 | <i>gyrB</i> | |
| CCM 5976 | 鸭源鸡杆菌 | HQ629846.1 | <i>rpoB</i> | 丹麦 |
| Yu-JZ-WZ-YQ-5-SLG | 鸭源鸡杆菌 | GQ464991.1 | <i>rpoB</i> | 河南郑州 |
| 19987/2 | 输卵管炎鸡杆菌 | EU424019.1 | <i>rpoB</i> | 瑞士 |
| F292 | 虎皮鸚鵡鸡杆菌 | EU424008.1 | <i>rpoB</i> | 瑞士 |
| B7/99/1 | 海藻糖发酵鸡杆菌 | EU424013.1 | <i>rpoB</i> | 瑞士 |
| CCM5974 | 鸡杆菌基因种 1 | AY314033.1 | <i>rpoB</i> | 瑞士 |
| 59/S3/89 | 鸡杆菌基因种 3 | EU424017.1 | <i>rpoB</i> | 瑞士 |
| K323 | 巴氏杆菌 | AY683501.1 | <i>rpoB</i> | 丹麦 |
| Yu-JZ-WZ-YQ-5-SLG | 鸭源鸡杆菌 | JN828469.1 | 16S rRNA | 河南郑州 |
| F149 | 鸭源鸡杆菌 | NR036870.1 | 16S rRNA | 丹麦 |
| F292 | 虎皮鸚鵡鸡杆菌 | EU423990.1 | 16S rRNA | 瑞士 |
| B7/99/1 | 海藻糖发酵鸡杆菌 | EU423995.1 | 16S rRNA | 瑞士 |
| CCM5975 | 鸡杆菌基因种 1 | AF228016.1 | 16S rRNA | 丹麦 |
| CCM5976 | 鸡杆菌基因种 2 | AF228017.1 | 16S rRNA | 丹麦 |
| 59/S3/89 | 鸡杆菌基因种 3 | EU423999.1 | 16S rRNA | 瑞士 |
| CCUG17976 | 巴氏杆菌 | NR041809.1 | 16S rRNA | 美国 |
| Yu-JZ-WZ-YQ-5-SLG | 鸭源鸡杆菌 | JN828478.1 | <i>gyrB</i> | 河南郑州 |
| GAF465 | 鸭源鸡杆菌 | JQ648194.1 | <i>gyrB</i> | 美国 |
| CCUG23139 | 鸡杆菌基因种 1 | AY258267.1 | <i>gyrB</i> | 丹麦 |
| Pm25 | 多杀性巴氏杆菌 | KM111361.1 | <i>gyrB</i> | 吉林长春 |

2 结果

2.1 鸡杆菌的分离鉴定

共分离到 4 株疑似菌株,菌株在血平板培养基上生长良好,菌落呈圆形、隆起、透明、边缘整齐的形状,

β 溶血(图 1)。油镜下细菌为革兰阴性菌,呈短杆状、单个或成对存在。LB 肉汤均变浑浊,有的管底可见絮状沉淀。4 株疑似菌株经鸡杆菌 PCR 扩增,均扩增到预期的 3 条 DNA 条带(1 030、790 和 560 bp),表明均为鸡杆菌,见图 2。

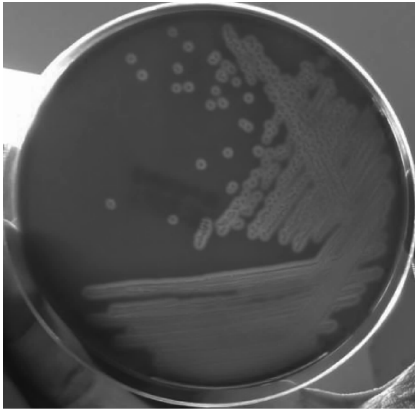
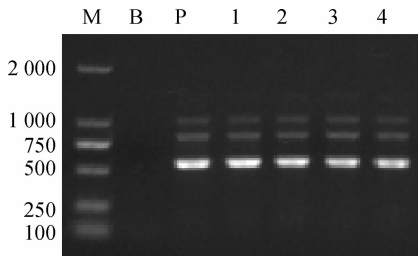
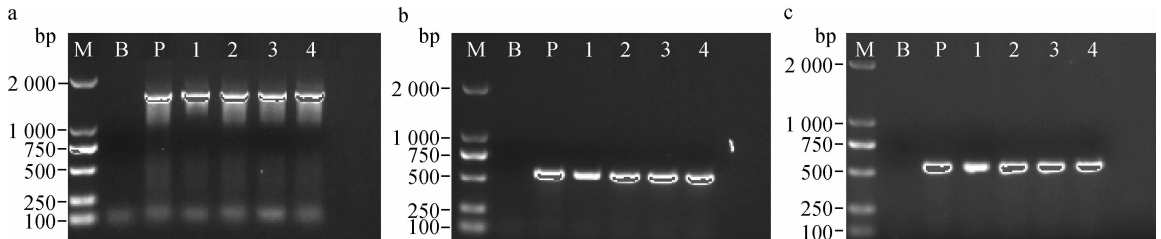


图1 鸡杆菌分离菌株血平板生长状态
Fig. 1 Blood plate growth state of isolated *Gallibacterium* strains



M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;B. 空白对照;P. 阳性对照;1. GAC017;2. GAC018;3. GAC021;4. GAC193
M. DL2000 DNA marker; B. Blank control; P. Positive control; 1. GAC017; 2. GAC018; 3. GAC021; 4. GAC193
图2 鸡杆菌特异性 PCR 鉴定
Fig. 2 *Gallibacterium* specific PCR



a, b 和 c 分别为 16S rRNA、*rpoB* 和 *gyrB* 基因的电泳结果。M. DL2000 DNA 相对分子质量标准;B. 空白对照;P. 阳性对照;1. GAC017;2. GAC018;3. GAC021;4. GAC193。条带中有标记的代表强阳性

a, b and c were electrophoretic results of 16S rRNA, *rpoB* and *gyrB* genes. M. DL2000 DNA marker; B. Blank control; P. Positive control; 1. GAC017; 2. GAC018; 3. GAC021; 4. GAC193. The tagged bands represent strong positive

图4 鸡杆菌分离株 3 个基因的 PCR 产物检测

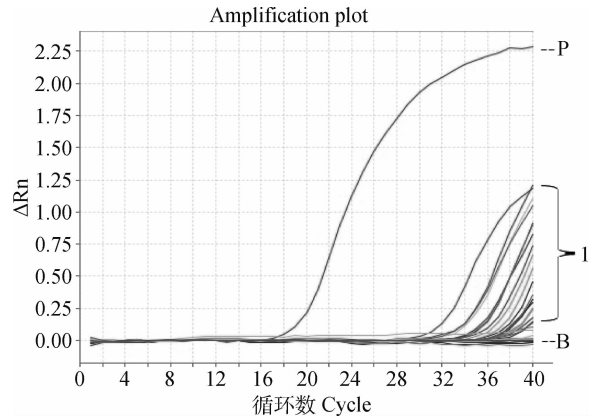
Fig. 4 Detection of PCR products of three genes of *Gallibacterium* isolates

2.4 分离株的药敏试验

药敏试验结果见表 3,由表可知 4 株鸭源鸡杆菌均为多重耐药菌株,耐药数量别为 9、7、11 和 11,有 3 种耐药谱: AMP-C-CIP-OFX-LEV-SXT-TE-CTX-DA、AMP-C-CIP-OFX-SXT-TE-DA、AMP-C-CIP-OFX-LEV-SXT-TE-CN-TOB-AK-DA。分离菌株对头孢曲松、头孢噻肟、阿米卡星和妥布霉素等药

2.2 棉拭子样品的 q-PCR 检测

44 份棉拭子样品中共检出 23 个阳性样本,鸭源鸡杆菌阳性乌鸡 16 只,检出率达 72.7% (16/22),q-PCR 检测结果见图 3。



B. 空白对照和阴性样品;P. 阳性对照;1. 阳性样品
B. Blank control and negative samples; P. Positive control; 1. Positive samples

图3 棉拭子样品 q-PCR 检测结果

Fig. 3 q-PCR test results of cotton swab samples

2.3 分离株的 PCR 扩增

三个管家基因 PCR 均扩增到了预期的目的片段,16S rRNA 基因 1 600 bp,*rpoB* 基因 560 bp,*gyrB* 基因 561 bp,电泳结果如图 4 所示。

物敏感。

2.5 分离株的遗传进化及相似性分析

以多杀性巴氏杆菌为外群,建立遗传进化树,结果见图 5。除 GAC193 在 *rpoB* 基因位点与多杀性巴氏杆菌位于同一分支、GAC017 在 *gyrB* 基因位点与鸡杆菌基因种 1 在一个小的分支之外,4 株细菌在三个进化树中均与鸭源鸡杆菌参考株在同一分支。

表 3 药敏试验结果

Table 3 Drug sensitivity test results

| 药物名称 Drug name | GAC017 | GAC018 | GAC021 | GAC193 |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|
| 氨苄西林 AMP | R | R | R | R |
| 环丙沙星 CIP | R | R | R | R |
| 复方新诺明 SXT | R | R | R | R |
| 克林霉素 DA | R | R | R | R |
| 庆大霉素 CN | S | S | R | R |
| 左氧氟沙星 LEV | R | I | R | R |
| 头孢曲松 CRO | I | S | I | I |
| 氯霉素 C | R | R | R | R |
| 头孢噻肟 CTX | R | S | I | I |
| 阿米卡星 AK | S | S | R | R |
| 妥布霉素 TOB | S | S | R | R |
| 氧氟沙星 OFX | R | R | R | R |
| 四环素 TE | R | R | R | R |

S. 高度敏感; I. 中度敏感; R. 耐药

S. Highly sensitive; I. Moderately sensitive; R. Resistant

3个管家基因相似性分析结果(表4)显示:分离株与参考鸭源鸡杆菌 16S rRNA 基因相似性在 99.1%~99.8%之间、*rpoB* 基因相似性在 85.4%~99.6%之间、*gyrB* 基因相似性在 92.7%~99.8%之间。分离株与鸡杆菌基因种 1 型 16S rRNA 基因相似性在 96.3%~97.0%之间、*rpoB* 基因相似性在 83.8%~92.7%之间、*gyrB* 基因相似性在 89.0%~96.1%之间。将 *rpoB* 基因序列推导为氨基酸序列,进行氨基酸序列分析,发现 GAC193 分离株的 RpoB 氨基酸序列有 10 处氨基酸的替换,替换后其稳定性参数由 40.42 升高为 45.64,不稳定性升高;同时对氨基酸序列进行相似性分析, GAC193 分离株的氨基酸序列与巴氏杆菌相似性为 95.6%,与其他鸭源鸡杆菌的相似性为 93.7%。

3 讨论

作为一种条件性致病菌,鸭源鸡杆菌的致病性和致病机制正逐渐被人们揭示,Kristensen 等^[23]报道了鸭源鸡杆菌的 GtxA 毒素,该毒素具有细胞毒性和溶血活性;张秀平等^[24]用鸭源鸡杆菌感染原代输卵管上皮细胞,感染的上皮细胞分泌的促炎细胞因子明显增多,能够造成输卵管上皮细胞的损伤;此外,鸭源鸡杆菌的外膜囊泡、菌毛和金属蛋白酶等毒

力因子也见诸报道^[25-28]。因此,鸭源鸡杆菌感染导致的相关疾病也应引起人们重视。

本研究通过细菌分离、显微镜镜检、q-PCR 及管家基因序列分析等方法证实乌鸡中有鸭源鸡杆菌存在,具有较高的检出率(72.7%),并分离到了 4 株鸭源鸡杆菌。乌鸡中较高的鸭源鸡杆菌检出率与蛋鸡中鸭源鸡杆菌的流行情况一致^[1-2],提醒人们也要关注乌鸡中鸭源鸡杆菌感染引起的相应疾病问题。22 只乌鸡中鸭源鸡杆菌的检出率为 72.7%,而只分离到 4 株鸭源鸡杆菌,鸡杆菌的低分离率与细菌的分离方法有关,鸭源鸡杆菌处于一个弱势菌群,分离时难免有大肠杆菌等优势菌群与之相竞争,导致鸡杆菌的分离率较低。

基于 16S rRNA 基因的相似性和进化树分析显示,4 株分离株与其他鸭源鸡杆菌参考株的相似性在 99.1%~99.8%之间,大于 97%,并且归在同一个分支中,证明了 4 株分离菌株均为鸭源鸡杆菌^[29]。*rpoB* 基因进化树中 GAC017、GAC018 和 GAC021 与鸭源鸡杆菌参考菌株归在一个分支,而 GAC193 分离株与巴氏杆菌位于同一分支,经同源性分析发现:GAC193 菌株与其他鸭源鸡杆菌相似性在 85.2%~86.0%,而与外群巴氏杆菌相似性为 86.9%,其氨基酸序列与巴氏杆菌相似性为 95.6%,与其他鸭源鸡杆菌的相似性为 93.7%,对该菌株的 *rpoB* 基因序列的比对分析发现其发生了大范围的突变,GAC193 分离株 *rpoB* 基因编码氨基酸序列有 10 处氨基酸的替换,替换后的 RpoB 不稳定性升高。但该基因突变究竟为适应乌鸡品种适应性改变还是药物压力选择等,以及其突变后相应功能是否发生改变均需要进一步深入的研究。*gyrB* 基因进化树显示:GAC017 分离株与其他鸭源鸡杆菌不在同一分支中,同源性分析显示:GAC017 分离株 *gyrB* 基因序列与鸡杆菌基因种 1 型的相似性最高,为该基因的部分碱基的替换导致。上述研究结果表明乌鸡中分离的部分鸭源鸡杆菌在 *rpoB* 和 *gyrB* 基因具有明显的遗传进化差异,也验证了 16S rRNA 基因保守性明显高于 *rpoB* 和 *gyrB* 基因^[30-31]。

鸡杆菌属目前包括鸭源鸡杆菌、输卵管炎鸡杆菌、虎皮鸚鵡鸡杆菌、海藻糖发酵鸡杆菌以及三个基因种(*G. genomsp.* 1、2、3)^[32-33],该属中部分鸭源鸡杆菌、鸡杆菌基因种 1 和鸡杆菌基因种 2 具有溶血活性。本次研究从乌鸡中仅分离到溶血表型的鸭源鸡杆菌,这与本研究中使用的细菌分离方法有一

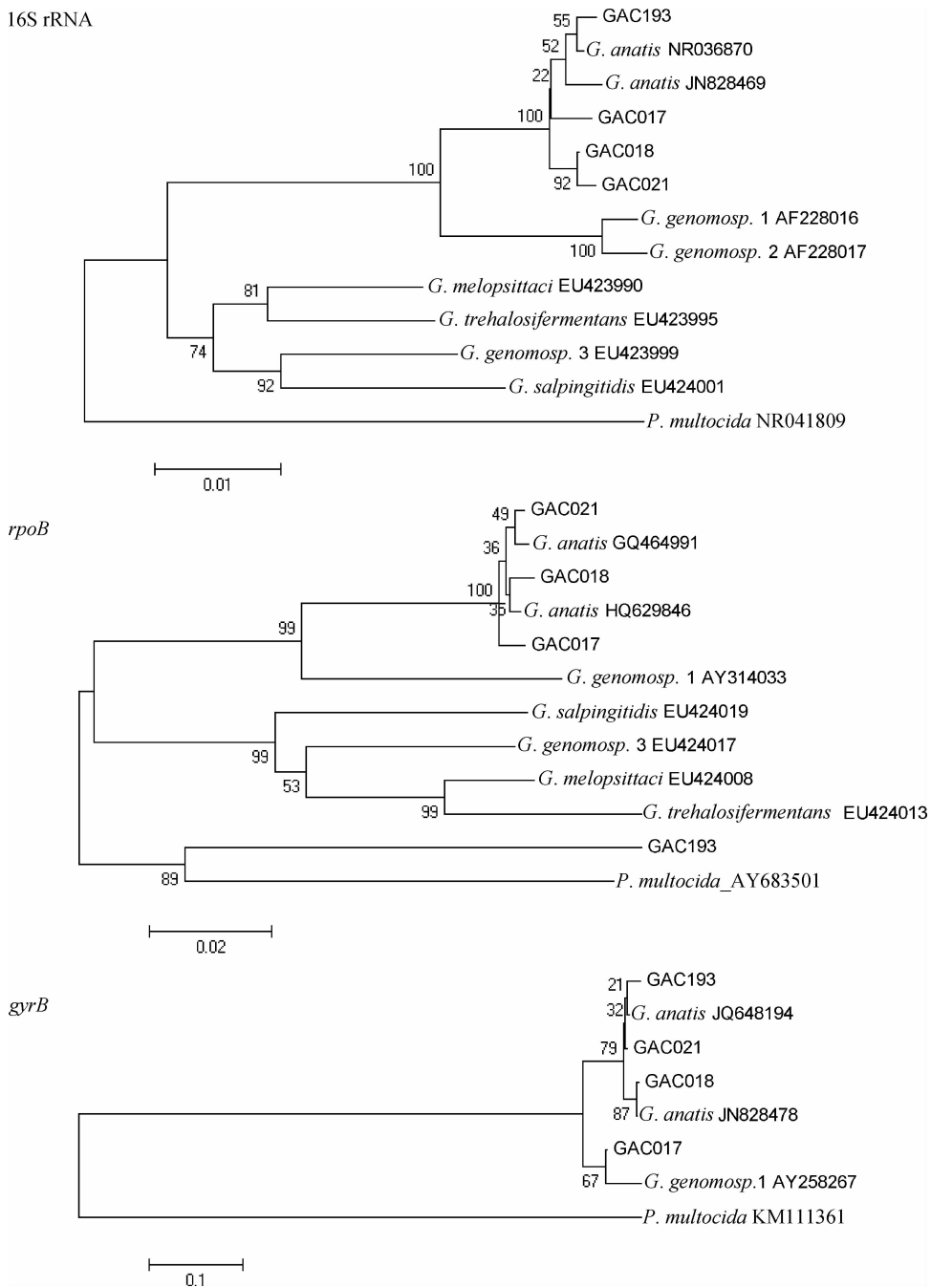


图 5 鸡杆菌分离株与参考株基于 3 个基因的遗传进化树

Fig. 5 Phylogenetic trees based on three genes of *Gallibacterium* isolates and reference strains

定关系,具体乌鸡中是否存在其他鸡杆菌种,需要进一步深入研究。

药敏试验结果显示,乌鸡分离的 4 株鸭源鸡杆菌产生了 3 种耐药谱,耐药数量最少的有 7 种,该结果与郭伦涛^[34]、高冬生^[35]的研究结果一致,说明鸭源鸡杆菌分离株严重的耐药性;分离株的耐药性与不同的地理来源有一定关系,信阳分离的两株细菌

耐药数量较少,且对庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素三种药物敏感,而南阳分离的两株鸡杆菌耐药数量较多,且耐药谱一致,对庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素药物出现耐药现象。鸭源鸡杆菌严重的多重耐药性已经引起人们的重视,彭志锋等^[36]的研究表明鸭源鸡杆菌 I 类整合子与其多重耐药有一定关联,但并不能完全揭示该菌的多重耐药机制,因此仍需进一

表 4 相似性分析结果

Table 4 Analysis of similarity

| 种 Species | 16S rRNA 基因 16S rRNA gene | <i>rpoB</i> 基因 <i>rpoB</i> gene | <i>gyrB</i> 基因 <i>gyrB</i> gene |
|---|------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 鸭源鸡杆菌 <i>Gallibacterium anatis</i> | 99.1~99.8 | 85.4~99.6 | 92.7~99.8 |
| 输卵管炎鸡杆菌 <i>Gallibacterium salpingitidis</i> | 92.6~92.9 | 84.4~87.1 | — |
| 虎皮鸚鵡鸡杆菌 <i>Gallibacterium melopsittaci</i> | 93.8~94.1 | 85.0~85.4 | — |
| 海藻糖发酵鸡杆菌 <i>Gallibacterium trehalosifementans</i> | 93.5~93.9 | 85.8~87.3 | — |
| 鸡杆菌基因种 1 <i>Gallibacterium genomosp.</i> 1 | 96.3~97.0 | 83.8~92.7 | 89.0~96.1 |
| 鸡杆菌基因种 2 <i>Gallibacterium genomosp.</i> 2 | 96.5~96.8 | — | — |
| 鸡杆菌基因种 3 <i>Gallibacterium genomosp.</i> 3 | 93.5~94.1 | 84.0~87.9 | — |
| 多杀性巴氏杆菌 <i>Pasteurella multocida</i> | 90.9~91.0 | 85.4~86.9 | 43.4~43.6 |

—. 未找到该基因序列

—. The gene sequence was not found

步深入研究。

4 结 论

乌鸡体内有鸭源鸡杆菌存在,并具有较高的检出率;本研究从乌鸡中分离到 4 株鸭源鸡杆菌,未分离到其他种鸡杆菌;分离的鸭源鸡杆菌多重耐药现象严重,耐药种类达 11 种;乌鸡群中分离的部分鸭源鸡杆菌在 *rpoB* 和 *gyrB* 基因位点具有明显遗传进化差异。

参考文献 (References):

- [1] 王川庆,陈 陆,杨 霞,等. 蛋鸡群卡氏杆菌感染情况的初步研究[J]. 河南农业科学, 2008, 37(3):97-100, 103.
WANG C Q, CHEN L, YANG X, et al. A preliminary study of *Gallibacterium anatis* infection in laying hens[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2008, 37(3):97-100, 103. (in Chinese)
- [2] 郑鹿平,杨 霞,陈 陆,等. 45 株鸡卡氏杆菌的分离鉴定[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(3):347-351.
ZHENG L P, YANG X, CHEN L, et al. Isolation and preliminary identification of 45 *Gallibacterium anatis* strains[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2010, 30(3):347-351. (in Chinese)
- [3] 田明星,林 艳,邹年莉,等. 鸡卡氏杆菌的分离与 16S rRNA 基因的分析鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(9):57-61.
TIAN M X, LIN Y, ZOU N L, et al. Isolation of

Gallibacterium and identification and analysis of 16S rRNA gene[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2010, 37(9):57-61. (in Chinese)

- [4] 王 珊,陈 陆,付仁一,等. 我国部分地区蛋鸡群鸭源鸡杆菌血清流行病学调查[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(2):114-117.
WANG S, CHEN L, FU R Y, et al. Seroepidemiological survey of *Gallibacterium anatis* infection in layer chicken flocks in some provinces[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2011, 33(2):114-117. (in Chinese)
- [5] 李乔晶,张九州,姬郭彪,等. 河北省鸡群鸭源鸡杆菌血清流行病学调查[J]. 河南农业科学, 2012, 41(2):132-135.
LI Q J, ZHANG J Z, JI G B, et al. Seroepidemiological survey of *Gallibacterium anatis* infection in chicken flocks in Hebei Province[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2012, 41(2):132-135. (in Chinese)
- [6] 方 翟,项 玉,谷长勤,等. 1 株鸭源鸡杆菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2014, 50(6):3-5, 8, 49.
FANG D, XIANG Y, GU C Q, et al. Isolation and identification of a *Gallibacterium anatis* isolated from chicks[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2014, 50(6):3-5, 8, 49. (in Chinese)
- [7] 董 青,史静柯,王海花,等. 郑州地区 7 株鸭源鸡杆菌的 MALDI-TOF MS 鉴定及其生物学特性分析[J]. 河南农业科学, 2017, 46(10):143-147.
DONG Q, SHI J K, WANG H H, et al. Identifica-

- tion of 7 *Gallibacterium anatis* strains by MALDI-TOF MS in Zhengzhou area and research on partial biological characteristics[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2017, 46(10):143-147. (in Chinese)
- [8] 杨晓林,陈英,余松城,等. 1株鸽源鸡杆菌复合群3的分离和鉴定[J]. *浙江大学学报:农业与生命科学版*, 2014, 40(3):249-256.
YANG X L, CHEN Y, YU S C, et al. Isolation and identification of one pigeon-origin *Gallibacterium genomsp.* 3[J]. *Journal of Zhejiang University: Agriculture & Life Sciences*, 2014, 40(3):249-256. (in Chinese)
- [9] EL-ADAWY H, BOCKLISCH H, NEUBAUER H, et al. Identification, differentiation and antibiotic susceptibility of *Gallibacterium* isolates from diseased poultry[J]. *Ir Vet J*, 2018, 71:5.
- [10] ELBESTAWY A R, ELLAKANY H F, EL-HAMID H S A, et al. Isolation, characterization, and antibiotic sensitivity assessment of *Gallibacterium anatis* biovar haemolytica, from diseased Egyptian chicken flocks during the years 2013 and 2015[J]. *Poultry Sci*, 2018, 97(5):1519-1525.
- [11] LA DUC M T, SATOMI M, AGATA N, et al. *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group[J]. *J Microbiol Methods*, 2004, 56(3):383-394.
- [12] 侯晓丽,曹清毅,潘劲草,等. 霍乱弧菌和副溶血弧菌分离株的 *gyrB* 基因系统发育分析[J]. *微生物学报*, 2006, 46(6):884-889.
HOU X L, CAO Q Y, PAN J C, et al. Classification and identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* isolates based on *gyrB* gene phylogenetic analysis[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46(6):884-889. (in Chinese)
- [13] 李路茜,李振军,楼永良. *GyrB* 基因在诺卡菌菌种鉴定中的应用研究[J]. *疾病监测*, 2016, 31(6):503-506.
LI L X, LI Z J, LOU Y L. Identification of *Nocardia* species based on *gyrB* gene[J]. *Disease Surveillance*, 2016, 31(6):503-506. (in Chinese)
- [14] 邵高祥,束长龙,耿丽丽,等. 茶卡盐湖中耐盐抗真菌芽孢杆菌的分离和鉴定[J]. *中国生物防治学报*, 2016, 32(4):440-448.
SHAO G X, SHU C L, GENG L L, et al. Isolation and identification of antifungal *Bacillus* with Salt-tolerant in Caka Salt Lake[J]. *Chinese Journal of Bio-logical Control*, 2016, 32(4):440-448. (in Chinese)
- [15] 倪萍,李美芽,葛尔宁,等. 肠道病原菌 *gyrB* 基因系统发育分析[J]. *浙江中医药大学学报*, 2015, 39(7):548-554.
NI P, LI M Y, GE E N, et al. Classification and identification of enteric pathogens based on *gyrB* gene phylogenetic analysis[J]. *Journal of Zhejiang Chinese Medical University*, 2015, 39(7):548-554. (in Chinese)
- [16] 何艳霞,向诗非,李尧,等. 基于 16S rRNA 和 *rpoB* 基因的分子系统发育分析在铜绿假单胞菌鉴定中的应用[J]. *微生物学杂志*, 2016, 36(4):27-35.
HE Y X, XIANG S F, LI J, et al. Molecular phylogeny analysis based on 16S rRNA and *rpoB* sequences for identification of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Journal of Microbiology*, 2016, 36(4):27-35. (in Chinese)
- [17] 皇甫和平,杨霞,赵军,等. 豫陕两省 14 株鸡杆菌的 *gyrB*、16S rRNA 和 *rpoB* 基因序列比较分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2012, 43(7):1103-1110.
HUANGFU H P, YANG X, ZHAO J, et al. Sequence analysis of fourteen *Gallibacterium* isolates from Henan and Shanxi Provinces based on *gyrB*, 16S rRNA and *rpoB* genes[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2012, 43(7):1103-1110. (in Chinese)
- [18] 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.
- [19] CHRISTENSEN H, KUHNERT P, OLSEN J E, et al. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the *Pasteurellaceae*[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(5):1601-1609.
- [20] JOHNSON T J, DANZEISEN J L, TRAMPEL D, et al. Genome analysis and phylogenetic relatedness of *Gallibacterium anatis* strains from poultry[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e54844.
- [21] HUANGFU H P, XU W B, WANG H K, et al. Detection of *Gallibacterium anatis* by TaqMan fluorescent quantitative PCR [J]. *Avian Pathol*, 2018, 47(3):245-252.
- [22] BOJESEN A M, VAZQUEZ M E, ROBLES F, et al. Specific identification of *Gallibacterium* by a PCR using primers targeting the 16S rRNA and 23S rRNA genes[J]. *Vet Microbiol*, 2007, 123(1-3):262-268.
- [23] KRISTENSEN B M, FREES D, BOJESEN A M.

- GtxA from *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX-toxin with a novel domain organisation[J]. *Vet Res*, 2010, 41(3):25.
- [24] 张秀平, 卢彩景, 陈 陆, 等. 鸭源鸡杆菌对鸡原代输卵管上皮细胞作用[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(2):228-233.
- ZHANG X P, LU C J, CHEN L, et al. Impact of *Gallibacterium anatis* on chicken oviduct epithelial cells[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(2):228-233. (in Chinese)
- [25] BAGER R J, PERSSON G, NESTA B, et al. Outer membrane vesicles reflect environmental cues in *Gallibacterium anatis*[J]. *Vet Microbiol*, 2013, 167(3-4):565-572.
- [26] BAGER R J, NESTA B, PORS S E, et al. The fibrillar protein FlfA from *Gallibacterium anatis* is a virulence factor and vaccine candidate[J]. *Infect Immun*, 2013, 81(6):1964-1973.
- [27] GARCÍA-GÉMEZ E, VACA S, PÉREZ-MÉNDEZ A, et al. *Gallibacterium anatis*-secreted metalloproteases degrade chicken IgG[J]. *Avian Pathol*, 2005, 34(5):426-429.
- [28] 王继洋, 王 艳, 彭志锋, 等. 鸭源鸡杆菌相关致病因子研究进展[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(8):1627-1632.
- WANG J Y, WANG Y, PENG Z F, et al. Research process on the virulence factors of *Gallibacterium anatis* in poultry[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(8):1627-1632. (in Chinese)
- [29] DRANCOURT M, BOLLET C, CARLIOZ A, et al. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(10):3623-3630.
- [30] PEI A Y, OBERDORF W E, NOSSA C W, et al. Diversity of 16S rRNA genes within individual prokaryotic genomes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(12):3886-3897.
- [31] KIM B J, KIM C J, CHUN J, et al. Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*) sequences [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2004, 54(2):593-598.
- [32] CHRISTENSEN H, BISGAARD M, BOJESEN A M, et al. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, '*Actinobacillus salpingitidis*' or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. Nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53(Pt 1):275-287.
- [33] BISGAARD M, KORCZA B M, BUSSE H J, et al. Classification of the taxon 2 and taxon 3 complex of bisgaard within *Gallibacterium* and description of *Gallibacterium melopsittaci* sp. nov., *Gallibacterium trehalosifermentans* sp. nov. and *Gallibacterium salpingitidis* sp. nov. [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009, 59(4):735-744.
- [34] 郭伦涛. 鸡杆菌地方分离株耐药性及耐药基因的研究[D]. 郑州:河南农业大学, 2010.
- GUO L T. Studies on drug resistance and resistant genes of *Gallibacterium anatis* strains isolated from chickens in different localities[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2010. (in Chinese)
- [35] 高冬生. 61株鸭源鸡杆菌部分耐药基因及其与耐药性关系的研究[D]. 郑州:河南农业大学, 2011.
- GAO D S. The correlation between drug resistance and some drug resistance genes in sixty-one *Gallibacterium anatis* isolates[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2011. (in Chinese)
- [36] 彭志锋, 高冬生, 刘红英, 等. 鸭源鸡杆菌整合子及其与耐药性的相关性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(8):1676-1681.
- PENG Z F, GAO D S, LIU H Y, et al. *Gallibacterium anatis* Integron and its correlation with the drug resistance[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(8):1676-1681. (in Chinese)

(编辑 白永平)