

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2015.03.010

鹅源多杀性巴氏杆菌分离鉴定及系统进化分析^①

韩冠双¹, 简艳娟¹, 宋振辉¹, 吕朋沙¹,
刘书超¹, 范才良², 陈莹¹, 程方俊¹

1. 西南大学(荣昌校区)动物医学系, 重庆 荣昌 402460; 2. 重庆市荣昌县畜牧局, 重庆 荣昌 402460

摘要: 试验从重庆市荣昌县盘龙镇鹅场发病的雏鹅肝脏中分离出一种细菌, 进行了形态学、理化特性鉴定和 16S rRNA 基因的系统进化分析, 并进行药物筛选试验. 结果表明, 所分离的细菌在鲜血培养基和马丁琼脂培养基上生长良好, 革兰氏染色为阴性的球杆菌. 该分离菌株 16S rRNA 基因序列与 Genbank 公布的多杀性巴氏杆菌 DQ228979.1, HM746978.1, JX975446.1 菌株同源性均为 99.9%, 表明所分离的细菌为多杀性巴氏杆菌. 药物筛选试验结果显示该分离菌株对菌必治、复达欣、氨苄青霉素等药物敏感.

关键词: 鹅; 多杀性巴氏杆菌; 分离鉴定; 系统进化分析

中图分类号: S835 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-9868(2015)03-0060-05

巴氏杆菌是引起多种畜禽巴氏杆菌病的病原体, 主要使动物发生出血性败血症或传染性肺炎. 禽巴氏杆菌病又称为禽霍乱或禽出血性败血症, 是由多杀性巴氏杆菌 *Pasteurella multocida* 引起的一种急性、高度接触性、败血性传染病, 是目前危害养禽业的主要疫病之一, 给养禽业带来巨大损失^[1-3].

近年来, 在重庆市荣昌县盘龙镇养鹅场雏鹅发生败血性传染病, 给养殖户造成严重的经济损失. 为了确定发病原因, 进行有效的防控与治疗, 我们采集雏鹅的病料组织进行病原分离, 并进行理化试验、16S rRNA 鉴定、动物回归试验和药敏试验, 为临床防治该病创造了条件.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物

8 只 9 日龄雏鹅(购于非疫区的健康雏鹅), 饲养 3 d 未发现有异常现象.

1.1.2 病料

病料来源于荣昌盘龙镇鹅场疑病鹅的心、肝、脾病理组织.

1.1.3 培养基与试剂

鲜血培养基、马丁肉汤培养基、马丁琼脂培养基、微量生化培养管(购于杭州微生物试剂有限公司, 批号 20110915)、药敏纸片(全套 30 种, 购于杭州微生物试剂有限公司)、革兰氏染液、VP 试剂、MR 试剂、吡哌试剂, 以上均由西南大学荣昌校区预防兽医教研室提供.

通用引物^[4], 正向: 5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3'; 反向 5'-ACGGTTACCTTGTTAC GACTT-3' 由上海英俊生物技术有限公司合成.

小剂量 DNA 提取试剂盒、DNA 回收试剂盒, 购于广州飞扬生化有限公司. Ex TaqDNA 聚合酶、

① 收稿日期: 2013-07-16

基金项目: 重庆市科委基础与前沿研究项目(CSTC2014jcyjA80015); 西南大学科研专项资金项目(XDJK2012C100).

作者简介: 韩冠双(1990-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事动物微生物学与免疫学研究.

通信作者: 程方俊, 副教授.

dNTPs、MgCl₂、DNA Marker、Gold View 购自大连宝生物有限公司。

1.1.4 主要仪器

恒温培养箱、冰箱、超净工作台、高压蒸汽灭菌锅、显微镜、高速离心机、PCR 仪、凝胶电泳仪、紫外成像仪、紫外照相系统等,均由西南大学荣昌校区预防兽医教研室提供。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离纯化

取患病鹅的病料组织分别划线接种于鲜血培养基和马丁琼脂培养基,置于 37℃ 恒温箱静置培养 24 h,观察并记录菌落形态。挑选可疑单个菌落接种于马丁琼脂斜面培养基,置于 37℃ 恒温箱静置培养 24 h,进一步纯化,纯培养物命名为 RC(Yi),置于 4℃ 冰箱备用。

1.2.2 染色镜检

对肝脏组织触片并进行瑞氏染色镜检,观察其染色特性及形态。取马丁琼脂培养基上的可疑单个菌落涂片,革兰氏染色镜检,观察其染色特性及形态。

1.2.3 生化鉴定

在无菌环境条件下,挑取分离菌株的纯培养物分别接种于 MR、VP、吡啶、枸橼酸盐、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖的微量生化培养管内,置于 37℃ 恒温培养箱 24~48 h,观察并记录结果。

1.2.4 药敏试验

药敏试验按照 CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute)推荐的 K-B 法进行。采用世界卫生组织(WHO)质控标准菌的敏感性及抑菌圈大小划分方法报告结果^[5]。

1.2.5 动物回归试验

将纯化的细菌接种于马丁肉汤培养基,置于 37℃ 恒温箱静置培养 24 h,制成细菌悬液待用。将 8 只健康雏鹅分成试验组和对照组,每组 4 只。试验组每只雏鹅腿部肌肉注射细菌悬液 0.1 mL(3×10^7 cfu/mL),病死雏鹅进行病理剖检观察。

1.2.6 16S rRNA 基因扩增及测序

挑取单个菌落接种在 5 mL 马丁肉汤培养基中,37℃ 振荡培养 12 h。使用小剂量 DNA 提取试剂盒进行 DNA 提取,4℃ 保存备用。

用上述引物扩增细菌 16S rRNA 基因,PCR 扩增采用 25 μL 体系:10×buffer 2.5 μL, Mg²⁺ 2 μL,上游引物 1 μL,下游引物 1 μL,模板 DNA 2 μL, dNTPs 2.5 μL, rTaq 酶 0.2 μL,双蒸水 13.3 μL。

PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s、54℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 60 s、经 35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min^[6]。扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳,观察结果。

PCR 产物按照 DNA 回收试剂盒说明书进行胶回收,回收产物由上海生物工程有限公司进行测序。测序结果与 Genbank 中相似性较高的巴氏杆菌进行同源性分析,并使用 DNA Star 软件进行多序列匹配排列,构建进化树。

1.2.7 16S rRNA 基因序列分析

以供试菌株的 16S rRNA 基因序列通过 NCBI 的 Blast 检索系统进行同源性分析,并使用 DNA Star 软件与从 GenBank 数据库中获得的序列相似性较高的菌株构建分支系统树。

2 试验结果

2.1 细菌分离纯化

在鲜血琼脂培养基上生长良好为灰白色、半透明、微隆起、表面光滑、边缘整齐的露珠样小菌落,菌落周围不溶血。在马丁琼脂培养基上成灰白色圆形湿润的小菌落。

2.2 染色镜检

肝脏组织触片经瑞氏染色后可在组织细胞之间发现典型的两极着色的短杆菌。纯化细菌进行革兰氏染色为阴性球杆菌,两端钝圆,单个存在,有时成对排列。

2.3 生化鉴定

菌株 RC(Yi)的葡萄糖、甘露醇、蔗糖、吡噪的生化试验为阳性, 乳糖、MR、VP、硫化氢、枸橼酸盐的生化试验为阴性(表 1)。

表 1 分离菌株的生化试验

项目菌株	葡萄糖	甘露醇	蔗糖	乳糖	MR	VP	吡噪	硫化氢	枸橼酸盐
RC(Yi)	+	+	+	—	—	—	+	—	—

注: “+”阳性, “—”阴性。

2.4 药敏试验

由表 2 可知, 菌株 RC(Yi)对菌必治、复达欣、氨苄青霉素等药物敏感, 对万古霉素耐药。

表 2 对 13 种抗菌药的抑菌圈直径及敏感性

抗 菌 药	菌株 RC(Yi)		抗 菌 药	菌株 RC(Yi)	
	抑菌环直径/mm	敏感性		抑菌环直径/mm	敏感性
氨苄青霉素	24	S	多粘霉素 B	18	S
复达欣	27	S	四环素	16	I
菌必治	37	S	红霉素	19	S
氟哌酸	22	S	万古霉素	8	R
羧苄青霉素	15	I	卡那霉素	21	S
青霉素	10	I	新霉素	21	S
阿米卡星	22	S			

注: R 耐药, I 中介, S 敏感。

2.5 动物回归试验

由表 3 可知, 试验组雏鹅死亡率为 100%, 对照组无发病死亡。雏鹅于 24 h 出现症状, 剖检病死鹅呈典型败血性变化, 主要病变是皮下组织淤血; 肝脏肿大, 表面有大量针尖大的白色坏死点; 肺出血、水肿; 喉头及气管环出血; 心包膜增厚, 心包腔内积有大量淡黄色液体; 心脏冠状脂肪出血、心外膜上有大小不一的出血点; 心内膜出血; 肠道中以十二指肠变化最明显, 肠粘膜出血, 内容物呈血色。

表 3 健康雏鹅感染试验结果

结 果	数 量	剂量/mL	发病数	死亡数	死亡率/%
试验组	4	0.5	4	4	100
对照组	4	0	0	0	0

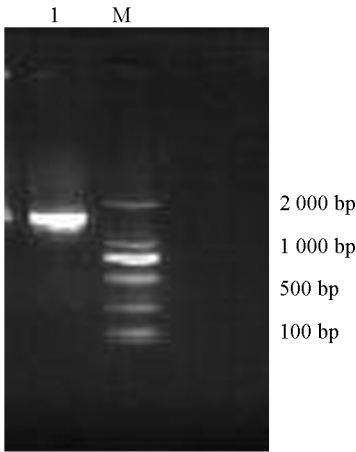
2.6 16S rRNA 扩增及测序结果

菌株 RC(Yi)经过 16S rRNA 扩增测序, 获得大小为1 375 bp 的片段(图 1), 与目的片段大小一致。

2.7 同源性分析与进化树构建

将获得的核苷酸序列与 GenBank 中已知序列进行同源性比较分析, 结果显示该菌株 RC(Yi)与巴氏杆菌成员的 16S rRNA 序列具有 94.9%以上的高度同源性, 其中与 multocida Pasteurella DQ228979.1, HM746978.1, JX975446.1 的同源性最高, 达到 99.9%(图 2)。

根据 BLAST 比对结果, 选出具有代表性不同菌株序列建立进化树, 进行系统发育分析。结果显示, 重庆荣昌分离菌株 RC(Yi)与多杀性巴氏杆菌 DQ228979.1 的同源性最高(图 3)。



Marker: DL-2000 Marker.

图 1 16S rRNA 扩增结果

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1		98.6	98.0	98.5	98.4	95.0	98.2	98.4	97.8	98.6	98.5	98.6	96.4	96.4	1
2	1.4		99.5	99.9	99.9	96.5	99.4	99.9	99.3	100.0	99.9	100.0	97.5	97.9	2
3	1.5	0.1		99.4	98.8	94.6	99.5	99.9	99.0	99.5	99.4	99.5	96.9	99.9	3
4	1.4	0.1	0.2		99.8	96.3	99.3	99.9	99.1	99.9	99.8	99.9	97.4	97.7	4
5	1.5	0.1	0.1	0.2		96.0	99.9	99.9	99.4	99.9	99.9	99.9	97.4	99.9	5
6	1.6	0.1	0.2	0.3	0.1		98.1	97.5	96.6	97.7	97.5	97.7	95.0	94.9	6
7	1.4	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1		99.9	98.2	99.7	99.5	99.6	96.8	97.9	7
8	1.5	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1		99.4	99.9	99.9	99.9	97.3	99.9	8
9	1.4	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0	0.1		98.2	98.2	98.5	96.5	97.4	9
10	1.4	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2		99.3	99.5	97.5	97.9	10
11	1.4	0.1	0.1	0.2	0.1	0.4	0.2	0.2	0.4	0.6		99.7	97.4	97.8	11
12	1.4	0.0	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.3	0.3		97.5	97.9	12
13	3.1	2.2	2.3	2.3	2.3	2.2	2.2	2.3	2.1	2.2	2.3	2.2		95.3	13
14	1.6	0.4	0.1	0.6	0.1	0.4	0.3	0.1	0.4	0.5	0.6	0.6	2.7		14
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	

P. multocida (AF326325.1)

P. multocida (AY078997.1)

P. multocida (DQ228979.1)

P. multocida (DQ286929.1)

P. multocida (HM746978.1)

P. multocida (JN092614.1)

P. multocida (JX869945.1)

P. multocida (JX975446.1)

P. multocida (M35018.1)

P. sp (FJ405344.1)

P. sp (FJ405348.1)

P. sp (FJ405350.1)

P. sp (JF706218.1)

RC(Y1)

图 2 菌株 RC(Yi)16S rRNA 基因的同源性比较

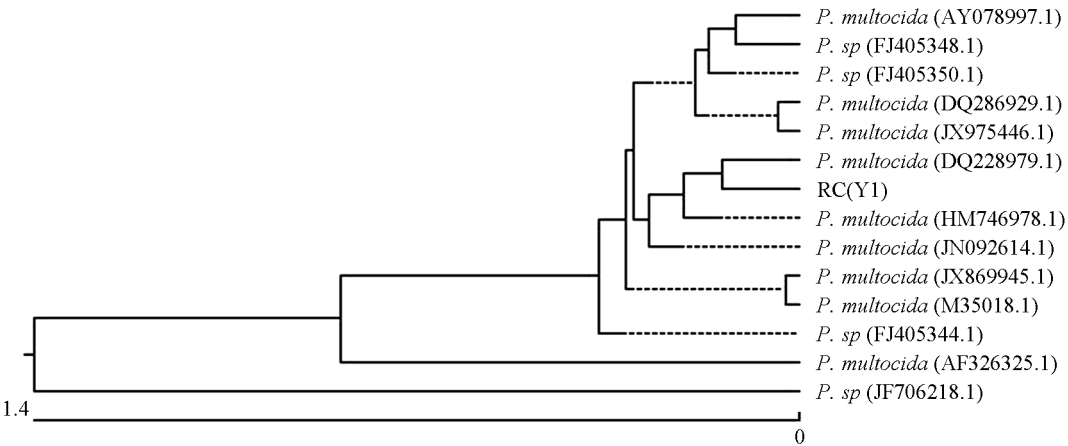


图 3 16S rRNA 基因序列系统发育树

3 讨 论

本研究采用常规细菌学培养方法，从临床死亡的雏鹅肝脏中分离鉴定出 1 株多杀性巴氏杆菌 RC(Yi)，选取 16S rRNA 细菌鉴定的通用引物对该分离菌株进行 PCR 扩增并测序，测序结果与 GenBank 中已知巴氏杆菌的 16S rRNA 序列进行同源性分析和进化树构建，从分子水平上进行细菌种属的鉴定，结合细菌学诊断结果，确诊该鹅场雏鹅发病的病源为多杀性巴氏杆菌。

管宇等^[7]应用 16S rRNA 基因测序法，以强、弱毒株分别作为阳性对照，对分离鉴定的 2 株禽源多杀性巴氏杆菌进行 16S rRNA 基因测序分析，结果表明 2 株分离菌株与强、弱毒株对照菌株之间的同源性均为 100%，从而完成了分离菌株的鉴定。杨霞等^[8]用 PCR 扩增出鸡源鲍氏志贺菌 16S rRNA 的部分基因(16S rDNA)并测序，将所获得的序列与 GenBank 中人志贺菌序列相比较，计算种间相似性，并构建志贺菌的系统发育树，对分离菌株进行分类与鉴定。

传统的细菌学方法为兽医病原菌的研究奠定了坚实的基础，然而这些方法同时存在许多缺点，如准确性不足，耗费人力及时间等。分子生物学方法的建立极大地提高了兽医病原菌鉴定的准确性，特别是聚合酶链式反应(PCR)技术的出现及核酸研究技术的不断完善^[9]，特别是 16S rRNA 基因序列分析技术的出现，使细菌进化与否可以通过试验研究来证实，这是兽医病原菌分类史上的一次革命。目前，关于 PCR 扩增 16S rRNA 基因用于兽医病原菌分类和鉴定的研究越来越多，大多数致病菌的 16S rRNA 基因均已被测序^[10]。随着微生物核糖体 RNA 数据库的日臻完善，该技术已成为兽医病原菌分类鉴定的一个有力工具。

动物药物敏感性试验显示分离菌株对多种药物敏感。菌株 RC(Yi)对供试的卡那霉素、新霉素敏感，宋晓娜等^[11]2012 年报道其分离的巴士杆菌对卡那霉素、新霉素耐药。说明不同地区不同禽源的巴氏杆菌对某些抗生素的耐药情况有所差异，可能与当地对家禽用药情况有关，也可能与巴氏杆菌种系发育有关，如要

进一步分析, 需做长期大范围的流行病学调查研究. 重庆地区少有报道禽巴氏杆菌的病例, 但本地区气温较高、多雨潮湿、气候多变, 一旦禽类受到各种应激, 体质下降就有散发、暴发疫病风险. 另外, 巴氏杆菌极易产生耐药性, 耐药谱也逐年扩大, 因此本文研究其耐药性及菌种系统发育对重庆地区禽巴氏杆菌疾病的防控具有重要意义.

参考文献:

[1] QUINN P J, MARKEY B K, LEONARD F C, et al. Veterinary Microbiology and Microbial Disease [M]. Newark: Wiley Backwell, 2013: 300—301.

[2] CATRY B, CHIERS K, SCHWARZ S, et al. Fatal Peritonitis Caused by Multocida Pasteurella Capsular Type Fin Calves [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(3): 1480—1483.

[3] UMEMORI Y, HIRAKI A, MURAKAMI T, et al. Chronic Lung Abscess with *Pasteurella multocida* Infection [J]. Intern Med, 2005, 44(7): 754—756.

[4] SIQUEIRA J F J, ROCCAS I N. Uncultivated Phylotypes and Newly Named Species Associated with Primary and Persistent Endodontic Infections [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(7): 3314—3319.

[5] 赵德明, 王彩虹. 鸡肠炎沙门氏菌感染症 [J]. 中国兽医杂志, 1988, 24(8): 52—53.

[6] 王佃鹏, 董瑞玲, 张艳芳, 等. 细菌直接 PCR 和双引物策略鉴定 16S rRNA 基因技术的建立 [J]. 热带医学杂志, 2012, 12(2): 181—183.

[7] 管 宇, 沈志强, 刘吉山, 等. 应用 16S rRNA 基因测序法鉴定禽多杀性巴氏杆菌的研究 [J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(5): 349—352.

[8] 杨 霞, 陈 陆, 许兰菊, 等. 鸡源志贺菌 16S rRNA 基因克隆、测序及同源性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(9): 43—45.

[9] REGISTER K B, YERSIN A G. Analytical Verification of a PCR for Identification of *Bordetella Avium* [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(11): 5567—5573.

[10] 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.

[11] 宋晓娜, 刁有祥, 高绪慧, 等. 一株鹅源巴氏杆菌强毒株的分离及鉴定 [J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2012, 43(4): 522—528.

Isolation, Identification and Phylogenetic Analysis
of *Pasteurella multocida* from Goose

HAN Guan-shuang¹, JIAN Yan-juan¹, SONG Zhen-hui¹,
LV Peng-sha¹, LIU Shu-chao¹, FAN Cai-liang²,
CHEN Ying¹, CHENG Fang-jun¹

1. Department of Veterinary Medicine, Southwest University (Rongchang Campus), Rongchang Chongqing 402460, China;
2. The Husbandry Bureau of Rongchang County, Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: A bacterium was isolated from the liver of diseased goslings at a goose-breeding farm in Panlong town. Its morphological and physico-chemical characteristics were studied, and 16S rRNA identification and a drug screening test were conducted. The isolated bacterium was shown to be a gram-negative coccobacillus, and it grew well in blood agar medium and in Martin agar medium. The 16S rRNA sequences of the isolate shared 99.9% homology with *Pasteurella multocida* strains DQ228979.1, HM746978.1 and JX975446.1 in Genbank. The above results indicated that the isolate was a strain of *P. multocida*. An antibiotic resistance experiment showed that the isolate was sensitive to ceftriaxone, fortum and norfloxacin.

Key words: gosling; *Pasteurella multocida*; isolation and identification; phylogenetic analysis

