

禽源多杀性巴氏杆菌多位点序列分型研究

李伟杰,田野,岂晓鑫,蒋颖,魏财文,蒋桃珍*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2016-11-21 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 02-0001-06 [中图分类号] S852.61

[摘要] 为了解国内禽源多杀性巴氏杆菌流行情况,对分离自 18 省份的 84 株多杀性巴氏杆菌采用荚膜多重 PCR 分型和多位点序列分型对其血清型和基因型进行鉴定。结果表明:禽源多杀性巴氏杆菌主要以血清 A 型为主,占 96.4% (81/84);多位点序列分型可将禽源多杀性巴氏杆菌分为 5 种 ST 型,其中 ST129 为主要流行型,占 94.0% (79/84)。本研究为我国禽源多杀性巴氏杆菌的流行病学监测和基因多样性提供了数据支持。

[关键词] 多杀性巴氏杆菌;荚膜分型;多位点序列分型

Multi-locus Sequence Typing of *Pasteurella multocida* Isolated from Avian

LI Wei-jie, TIAN Ye, QI Xiao-xin, JIANG Ying, WEI Cai-wen, JIANG Tao-zhen*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: To investigate the epidemic status of the *Pasteurella multocida* isolated from avian, eighty-four *P. multocida* isolates collected from 18 provinces were subject to identifications of the serotypes and genotypes by capsular multiplex PCR and multi-locus sequence typing. The results showed that *P. multocida* isolated from avian were mainly classified into serotype A, accounting for 94.6%. Five different sequence types including ST129, ST122, ST107, ST62, ST44 were identified by MLST, and the predominate genotype was ST129, accounting for 94.6%. The present study provides data support for the epidemiological surveillance and genetic diversity of *P. multocida* isolated from avian.

Key words: *Pasteurella multocida*; capsular serotyping; multi-locus sequence typing

禽霍乱是由多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)引起的鸡、鸭和鹅等多种禽类的一种接触性、败血性传染病^[1]。病禽、康复禽或健康带菌禽是主要的传染源,主要通过被污染的饲料、饮水经消化道感染,多发生于性成熟的禽类,自然感染潜伏期为 2~9 d。在潮湿、多雨、气温较高的季节时有发生。本病

是危害我国养禽业的重要细菌性传染病之一。

脉冲场凝胶电泳(PFGE)^[2]、肠道细菌基因间重复序列(ERIC-PCR)指纹图谱技术^[3]和多位点序列分型(MLST)^[4]等方法推动了对多杀性巴氏杆菌分子流行病学和基因多样性的研究。现在 MLST 已经成为病原菌基因分型的金标准,在分子流行病

基金项目:生物安全关键技术研发(2016YFC1201603);国家微生物资源平台(NIMR-5)

作者简介:李伟杰,副研究员,从事兽医微生物和兽用生物制品研究。

通讯作者:蒋桃珍。E-mail:jiangaozhen@ivdc.org.cn

学调查中得到广泛应用^[5-7]。由于国内对禽源多杀性巴氏杆菌的基因多样性和分子流行病学状况研究的不多,因此本研究拟对分离和收集的禽源多杀性巴氏杆菌进行 MLST 分型,以便为我国多杀性巴氏杆菌病暴发的流行病学监测和基因多样性研

究提供支持。

1 材料与方法

1.1 菌株 84 株分离株分离自国内的不同地区和不同年代(表 1),由中国兽医微生物菌种保藏管理中心提供。

表 1 多杀性巴氏杆菌的血清分型和 MLST 分型

菌株	分离源	分离地	分离/收集时间	荚膜血清型	ST 型
458	鸡	内蒙古	不详	A	129
459	鸭	广东	1982	A	129
460	鸭	贵州	1980	A	129
461	鸭	北京	1980	A	129
462	鸭	陕西	1980	A	129
463	鸭	青海	1980	A	129
464	鸡	江苏	1980	A	129
466	鸡	黑龙江	1980	A	129
467	鹅	北京	1963	A	129
468	鸡	陕西	1980	A	129
469	鸡	广东	1980	A	129
470	鸡	黑龙江	1983	A	129
471	鸭	黑龙江	1983	A	129
472	鸭	北京	1966	A	129
474	鸡	河南	1983	A	129
475	鸡	江苏	1983	A	129
476	鸡	江苏	1983	A	129
478	鸭	广东	1986	A	129
480	鸡	四川	1986	A	129
481	鹅	四川	1986	A	129
482	鸭	四川	1986	A	129
483	鸡	上海	1986	A	129
484	鸡	江苏	1986	A	129
485	鸭	上海	1986	A	129
486	鸭	江苏	1986	A	129
487	鸭	广西	1986	A	129
488	鸡	广西	1986	A	129
489	鸭	辽宁	1985	A	129
490	鸡	辽宁	1986	A	129
491	鸡	湖南	1986	A	129
492	鸭	湖南	1986	A	129
1674	鸡	广东	1980	A	129
1678	鸡	河南	1980	B	122
1686	鸡	河南	1983	B	122

续表

菌株	分离源	分离地	分离/收集时间	荚膜血清型	ST 型
1688	鸡	广东	1986	A	129
1690	鸭	湖南	1986	A	129
1691	鸡	湖南	1986	A	129
1707	鸭	广东	1959	A	129
1708	鸡	四川	1965	A	129
1709	鸡	四川	1979	A	129
1710	鸡	河北	1979	A	129
1711	鸡	河北	1979	A	129
1712	鸡	河北	1979	A	129
1713	鸡	河北	1979	A	129
1714	鸡	河北	1979	A	129
1715	鸡	河北	1979	A	129
1716	鸡	河北	1979	A	129
1717	鸭	江苏	1983	A	129
1718	鸡	广西	1979	A	129
1719	鸭	四川	1983	A	129
1720	鸭	四川	1983	A	129
1721	鸭	四川	1983	A	129
1722	鸭	四川	1983	A	129
1729	鸡	江苏	1983	A	129
1730	鸡	江苏	1983	A	129
1735	鸡	江苏	1984	A	129
1739	鸭	北京	1984	A	129
1740	鸡	河南	1988	A	129
1754	麻雀	江苏	1982	A	129
1767	鸡	北京	1987	A	129
1768	鸡	黑龙江	1989	A	129
1769	鸭	黑龙江	1989	A	129
1770	鸡	北京	1989	A	129
1771	鸡	广东	1978	A	129
1772	鸡	江西	1979	A	129
1773	鸡	江西	1979	A	129
1774	鸡	北京	1979	A	129
1775	鸡	河北	1982	A	129
1776	鸡	海南	1978	A	129
1777	鸡	不详	1992	A	129
1781	鸡	江苏	1989	A	129
1782	鸡	甘肃	1989	A	129
1783	鸡	黑龙江	1980	A	129
1784	鸡	北京	1990	A	129

续表

菌株	分离源	分离地	分离/收集时间	荚膜血清型	ST 型
1787	鹌鹑	河北	1988	A	107
2082	鸡	河北	1984	A	129
2083	鸡	河北	1984	A	129
3047	鸡	黑龙江	2005	B	62
3362	鸡	黑龙江	2005	A	129
3363	大雁	黑龙江	2005	A	44
3364	鸡	黑龙江	2005	A	129
44801	鸡	江苏	1953	A	129
44802	鸡	陕西	1964	A	129
44808	鸡	北京	1959	A	129

1.2 主要试剂 胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)和胰蛋白胨大豆肉汤(TSB)购自 OXOID 公司,马血清购自 GIBCO 公司,Ex Taq 酶、DL2000 DNA Maker 购自宝生物工程(大连)有限公司,琼脂糖购自 Biowest 公司,Goldview 购自北京赛百盛基因技术有限公司。

1.3 菌株 DNA 的提取 分离株在含 5% 马血清的 TSA 培养基上,37 °C 培养 24 h 采用热裂解法^[8]提取基因组 DNA,挑取纯培养菌落于 100 μL 无菌蒸馏水中,沸水浴 10 min,然后冰浴 10 min,12000

r/min 离心 1 min,上清作为 PCR 扩增的模板 DNA。

1.4 菌株 *kmtI* 基因的扩增及序列分析 按照文献方法^[9]对分离株进行 *kmtI* 基因的 PCR 扩增,扩增产物测序后与 NCBI 核酸数据库进行 BLAST 序列比对。

1.5 菌株血清型的鉴定 按照 Townsend 等^[9]建立的多杀性巴氏杆菌荚膜多重 PCR 方法对分离株血清型进行鉴定,引物见表 2,PCR 扩增产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

表 2 多杀性巴氏杆菌种鉴定、荚膜血清分型和 MLST 的引物

基因	检测目的	引物序列(5' - 3')	扩增片段大小
<i>kmtI</i>	定种	ATC CGC TAT TTA CCC AGT GG GCT GTA AAC GAA CTC GCC AC	460
<i>hyaD - hyaC</i>	荚膜分型	TGC CAA AAT CGC AGT CAG TTG CCA TCA TTG TCA GTG CAT TTA TCC AAG CTC CAC C	1044
<i>bcbD</i>	荚膜分型	GCC CGA GAG TTT CAA TCC	760
<i>debF</i>	荚膜分型	TTA CAA AAG AAA GAC TAG GAG CCC CAT CTA CCC ACT CAA CCA TAT CAG	657
<i>ecbJ</i>	荚膜分型	TCC GCA GAA AAT TAT TGA CTC GCT TGC TGC TTG ATT TTG TG	511
<i>febD</i>	荚膜分型	AAT CGG AGA ACG CAG AAA TCA G TTC CGC CGT CAA TTA CTC TG TTT TTC GTC CCG TCT AAG C	851
<i>adk</i>	MLST	GGG GAA AGG GAC ACA AGC	570
<i>est</i>	MLST	GGG GAA AGG GAC ACA AGC CCA AAT TCT TGG TTG GTT GG	641
<i>pmi</i>	MLST	TGC CTT GAG ACA GGG TAA GC GCC TTA ACA AGT CCC ATT CG AAT CGG TCG TTT GAC TGA GC	739
<i>zuf - 1</i>	MLST	TGC TTC ACC TTC AAC TGT GC ATT TCG GGA TCA GGG TTA GC	808
<i>mdh</i>	MLST	CGA AAA CCG GTA ATG GAA GG ATC GAC TTC TTC CGC AGA CC	620
<i>gdh</i>	MLST	GCG GGT GAT ATT GGT GTA GG ACC ACG CTA TTT TTG GTT GC	702
<i>pgi</i>	MLST	ATG GCA CAA CCT CTT TCA CC TGT TAG GTG TGG CAA GAA CG	784
<i>zuf - 2</i> *	MLST	TTG CAA CAA ATG GTT TTG GA	614

* 在 *zuf - 1* 对应的引物不能有效扩增的情况下使用

1.6 MLST 分型 根据 Subaaharan 等^[4]建立的禽源多杀性巴氏杆菌 MLST 分型方法,对本研究中 84 株分离株的 7 个看家基因(腺苷酸环化酶基因 *adk*、酯酶基因 *est*、6-磷酸-甘露糖异构酶基因 *pmi*、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因 *zwf*、苹果酸脱氢酶基因 *mdh*、谷氨酸脱氢酶基因 *gdh*、磷酸葡萄糖异构酶基因 *pgi*) 进行扩增及测序,引物见表 2。序列经 MEGA7 软件编辑后,提交到 RIRDC MLST 在线数据库进行比对,获得菌株的序列型,并利用 MEGA7 软件对 RIRDC MLST 数据库中的部分 ST 型进行序列比对,构建系统发育树,分析其分子进化关系。

2 结果与分析

2.1 分离株的 *kmtI* 鉴定 通过对 84 株分离株进行 *kmtI* 基因的扩增和测序,提交 GenBank 进行 BLAST 比对,结果显示与多杀性巴氏杆菌的相似性均达 99% 以上。表明本研究中收集和分离的 84 株分离株均为多杀性巴氏杆菌。

2.2 血清分型 利用荚膜多重 PCR 方法将 84 株多杀性巴氏杆菌分为 A 和 B 共 2 种血清型,其中 81 株为 A 型,占 96.4%;其余 3 株为 B 型,且均分离自霍乱鸡(表 1)。

2.3 MLST 分型 对 84 株多杀性巴氏杆菌分别进行 *adk*、*est*、*pmi*、*zwf*、*mdh*、*gdh* 和 *pgi* 7 个看家基因的扩增和测序,结果显示可以将其分为 ST129、ST122、ST107、ST62 和 ST44 5 种 ST 型,其中禽源多杀性巴氏杆菌主要以 ST129 型为主,占 94% (79/84) 具体见表 1。利用 MEGA7 对本研究确定的 5 个 ST 型和国内报道的其他 ST 型^[10] 进行序列分析,结果表明:国内分离株 ST122 和 ST44 亲缘关系最近,ST62 和 ST58 亲缘关系最近;主要流行的 ST-129 型与 ST122、ST44、ST62、ST58 具有较近的亲缘关系,在同一大的分支上;ST8 和 ST107 与其他的 ST 型亲缘关系较远(图 1)。

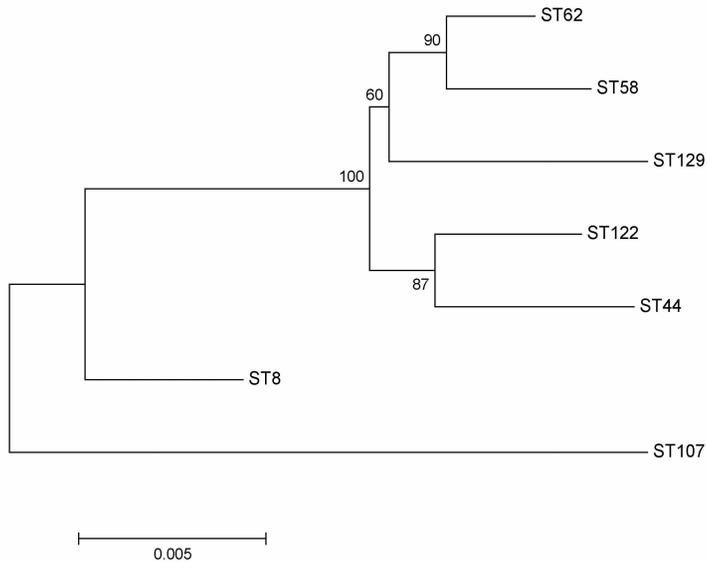


图 1 84 株禽源多杀性巴氏杆菌的多位点序列系统进化树

3 讨论与小结

多杀性巴氏杆菌根据荚膜抗原可分为 A、B、D、E 和 F 5 种血清型,本研究通过荚膜多重 PCR 方法对 84 株禽源多杀性巴氏杆菌(主要分离收集自 1953 年至 1990 年)进行血清分型,结果有 81 株为荚膜 A 型。程安春等^[11]对从 1990-1995 年分离自四川省不同地区的 256 株鸭源多杀性巴氏杆菌进行血清分型,其中 254 株为荚膜 A 型,2 株未定

型;程龙飞等^[12]收集 2007-2013 年福建及邻近省份分离的 95 株禽源多杀性巴氏杆菌,经鉴定荚膜型全为 A 型;Wang 等^[5]对 2011-2012 年分离自江苏省不同地区的 40 株禽源多杀性巴氏杆菌流调结果显示全部为荚膜 A 型。以上研究都表明多年来国内引起禽霍乱的优势血清型为 A 型。

多杀性巴氏杆菌的 MLST 是由多位点酶电泳(MLEE)衍生出来,主要通过看家基因序列的多态

性对细菌进行分类^[4]。由 MLST 得到的分型结果可与数据库中已有的信息进行比对,从而使不同地点和不同时间分离的菌株可以进行横向和纵向比较。目前多杀性巴氏杆菌多位点序列分型的在线数据库有两个(<http://pubmlst.org/pmultocida/>): Multiple host MLST 由英国格拉斯哥大学开发,针对不同宿主来源的多杀性巴氏杆菌;RIRDC MLST 由澳大利亚动物研究所开发,针对禽源多杀性巴氏杆菌。截止 2016 年 11 月 18 日,RIRDC MLST 数据库中已经鉴定有 329 种 ST 型。本研究通过对 84 株多杀性巴氏杆菌 MLST 的鉴定,获得 5 个 ST 型,主要以 ST129 为主,占 94% (79/84),与文献报道^[5,10]的一致。还鉴定到 ST122、ST107、ST62 和 ST44,这在禽源多杀性巴氏杆菌中为国内首次报道。由于 MLST 能够区分亲缘关系较近的菌株,能够对爆发的流行菌株进行溯源,因此本研究中基因型相同的 79 株菌株可能来源于同一株多杀性巴氏杆菌。考虑到 ST129 型已在斯里兰卡^[6]、印度^[7]和丹麦等(<http://pubmlst.org/pmultocida/>)许多国家被发现,此基因型可能在全球都有分布。同时它可以从发生禽霍乱的鸡、鸭、鹅和麻雀体内分离到,说明它具有多动物宿主的特性。

综上所述,本研究为禽源多杀性巴氏杆菌的流行病学提供了一些本底数据,为今后多杀性巴氏杆菌的监测起到了支撑作用,同时对于研制有效的疫苗预防和控制禽霍乱有一定的帮助。

参考文献:

- [1] Wilson B A, Ho M. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology [J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 2013, 26 (3): 631 - 655.
- [2] Blackall P J, Miflin J K. Identification and typing of *Pasteurella multocida*: a review [J]. *Avian Pathology*, 2000, 29 (4): 271 - 287.
- [3] Loubinoux J, Lozniewski A, Lion C, et al. Value of enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR for study of *Pasteurella multocida* strains isolated from mouths of dogs [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 37 (8): 2488 - 2492.
- [4] Subaaharan S, Blackall L L, Blackall P J. Development of a multi - locus sequence typing scheme for avian isolates of *Pasteurella multocida* [J]. *Vet Microbiol*, 2010, 141 (3/4): 354 - 361.
- [5] Wang Y, Zhu J, Lu C, et al. Evidence of circulation of an epidemic strain of *Pasteurella multocida* in Jiangsu, China by multi - locus sequence typing (MLST) [J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2013, 20: 34 - 38.
- [6] Hotchkiss E J, Hodgson J C, Lainson F S, et al. Multilocus sequence typing of a global collection of *Pasteurella multocida* isolates from cattle and other host species demonstrates niche association [J]. *BMC Microbiol*, 2011, 11: 115 - 123.
- [7] Sarangi L N, Thomas P, Gupta S K, et al. Molecular epidemiology of *Pasteurella multocida* circulating in India by multilocus sequence typing [J]. *Transbound Emerg Dis*, 2016, 63(2): 286 - 292.
- [8] 李伟杰,魏财文,田野,等. 猪源多杀性巴氏杆菌荚膜分型及外膜蛋白 H 基因序列分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 42 (1): 32 - 37.
- [9] Townsend K M, Boyce J D, Chung J Y, et al. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(3): 924 - 929.
- [10] 王林柏,孙久鹤,郭东春,等. 国内部分地区多杀性巴氏杆菌荚膜血清型和基因型的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38 (2): 116 - 119.
- [11] 程安春,汪铭书,陈孝跃,等. 256 株鸭源多杀性巴氏杆菌血清学鉴定及病原特性研究[J]. *中国兽医科技*, 1997, 27(7): 13 - 15.
- [12] 程龙飞,许利娜,林建生,等. 福建及邻近省份禽源多杀性巴氏杆菌的分离鉴定[J]. *中国动物传染病学报*, 2014, 22(4): 40 - 44.

(编辑:李文平)