

## 研究报告

## 鸭源鸡杆菌的分离鉴定及其全基因组序列分析

唐诗, 庞雪晴, 曾红梅, 王印, 罗燕, 姚学萍, 任梅滢, 杨泽晓\*

四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130

唐诗, 庞雪晴, 曾红梅, 王印, 罗燕, 姚学萍, 任梅滢, 杨泽晓. 鸭源鸡杆菌的分离鉴定及其全基因组序列分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3253-3266

Tang Shi, Pang Xueqing, Zeng Hongmei, Wang Yin, Luo Yan, Yao Xueping, Ren Meishen, Yang Zexiao. Isolation, identification and whole-genome sequencing of *Gallibacterium anatis* from chicken[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3253-3266

**摘要:** 【背景】鸭源鸡杆菌作为一种条件致病菌能引起家禽卵巢炎、输卵管炎和腹膜炎等疾病, 严重威胁养殖业的发展。【目的】四川某养鸡场送检了一批疑似感染鸭源鸡杆菌的病死鸡, 为探究其感染机制与防治方法, 对该菌进行分离鉴定及全基因组测序分析。【方法】从病料中分离并纯化细菌, 再依次进行生化试验、16S rRNA 基因序列分析和药敏试验, 同时通过全基因组测序对其进行物种分型与毒力、耐药等基因功能注释及遗传进化分析。【结果】该分离菌被鉴定为鸭源鸡杆菌, 菌株命名为 TS0001, 药敏试验显示其仅对硝基呋喃类和少数  $\beta$ -内酰胺类药物敏感, 对部分  $\beta$ -内酰胺类、氯霉素、部分氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类和磺胺类药物具有耐药性。全基因组序列长度为 2 626 722 bp, 蛋白质编码基因功能注释显示其有较强的自我加工修饰能力, 全基因组注释到 83 个与毒力因子和耐药性相关的基因, 包含 4 个前噬菌体区域。序列类型分析结果显示, 该菌株为 ST69 型, 而且管家基因联合建树表明其与墨西哥普通家鸡分离株 7990 一致性最高。【结论】本研究为鸭源鸡杆菌的感染机制与防治研究提供了参考, 丰富了后续研究的分子生物学背景。

**关键词:** 鸡; 鸭源鸡杆菌; 全基因组序列分析; 致病性; 耐药性

基金项目: 四川省科技计划(2021YFSY0005)

Supported by: Science and Technology Project of Sichuan Province (2021YFSY0005)

\*Corresponding author: E-mail: yzxyang2003@126.com

Received: 2021-12-23; Accepted: 2022-01-25; Published online: 2022-06-17

# Isolation, identification and whole-genome sequencing of *Gallibacterium anatis* from chicken

TANG Shi, PANG Xueqing, ZENG Hongmei, WANG Yin, LUO Yan, YAO Xueping, REN Meishen, YANG Zexiao\*

College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan, China

**Abstract:** [Background] As an opportunistic pathogen, *Gallibacterium anatis* can cause poultry diseases such as ovaritis, salpingitis and peritonitis, which seriously threatens the development of poultry industry. [Objective] A shipment of chickens, died from a suspected *G. anatis* infection, was sent from a henery in Sichuan. In order to explore the infection mechanism, prevention and treatment of *G. anatis*, we isolated and identified the bacterium and analyzed its whole genome sequence. [Methods] The bacterium was isolated and purified from the sample, followed by biochemical test, 16S rRNA gene sequence analysis, and drug sensitivity test. The whole-genome sequencing was carried out for species typing, annotation of virulence- and drug resistance-associated genes and phylogenetic analysis. [Results] The isolate was identified as *G. anatis* and named TS0001. Drug sensitivity test showed that the strain was sensitive to itrofurans and a few  $\beta$ -lactamines and resistant to some  $\beta$ -lactamines, chloramphenicol, some aminoglycosides, macrolides, tetracyclines and sulfonamides. The strain had a whole genome of 2 626 722 bp, and gene function annotation showed that it had strong self-modification capacity. A total of 83 genes related to virulence factors and drug resistance were annotated throughout the whole genome, and four prophage regions were predicted. The strain belonged to the sequence type ST69, and the phylogenetic tree constructed based on housekeeping genes demonstrated that it had the highest homology with the isolate 7990 from Mexican *Gallus domesticus*. [Conclusion] This study provides a reference for the research on the infection mechanism and prevention of *G. anatis* and enriches the molecular biological background for subsequent studies.

**Keywords:** chicken; *Gallibacterium anatis*; genome sequence analysis; pathogenicity; drug resistance

鸭源鸡杆菌(*Gallibacterium anatis*)是巴氏杆菌科(*Pasteurellaceae*)鸡杆菌属(*Gallibacterium*)的一种革兰氏阴性短杆菌<sup>[1]</sup>,属于条件性致病菌<sup>[2]</sup>,通常存在于禽类的呼吸道和生殖道<sup>[3]</sup>,能引起卵巢炎、输卵管炎和腹膜炎等疾病<sup>[4]</sup>,可导致蛋鸡产蛋量骤减、蛋品质下降、死亡率提高。其与大肠杆菌、鸡支原体等混合感染情况下会对养殖业造成巨大损失<sup>[5-6]</sup>,严重影响了亚洲、欧洲、美洲及非洲家禽产业的整体生产力<sup>[7]</sup>。鸭源鸡杆菌的感染范围十分广泛,除了禽类以外,还能感染包括牛、马、猪、羊和兔子等一些哺乳动物<sup>[8]</sup>,甚至在2013年从

一名免疫力低下且患有菌血症和腹泻的女性体内也分离到此菌<sup>[9]</sup>。

2008年王川庆等<sup>[10]</sup>首次对国内12个鸡场384份血清样品进行检测,检出鸭源鸡杆菌抗体阳性率为15.20%–90.90%,报道了鸭源鸡杆菌在我国鸡群中普遍感染的情况,阐明了鸭源鸡杆菌对鸡群有较大危害,尤其是开产后的蛋鸡。王珊等<sup>[1]</sup>检测到我国河南、山东和山西等地1314份鸡血清中,血清抗体阳性率分别为23.12%、25.27%和52.94%;李乔晶<sup>[11]</sup>从河北省10个不同地市的677份鸡血清样品中检测到平均抗体阳性率为48.60%。以上研究均表明鸭源

鸡杆菌在我国鸡群中持续存在且感染率较高。

现已确定的鸭源鸡杆菌毒力因子主要有外膜囊泡、GtxA 毒素、菌毛、荚膜及金属蛋白酶等<sup>[12]</sup>, 这些因子使该菌能够黏附于细胞和惰性物质表面对机体造成直接损伤<sup>[13]</sup>, 并且具有良好的免疫原性、溶血活性及较强的细胞毒性<sup>[8,14]</sup>。目前鸭源鸡杆菌的 24 个血清型之间无交叉免疫保护作用, 给该菌感染的防治造成困难<sup>[15]</sup>。此外, Bojesen 等<sup>[16-17]</sup>、郭伦涛等<sup>[18]</sup>均报道鸭源鸡杆菌的多重耐药性已普遍存在, 导致该菌的防治更为棘手。

2020 年 9 月四川某养鸡场送检了一批病死鸡, 其临床症状表现为精神沉郁、食欲废绝、机体消瘦、腹部肿大及产蛋量下降; 剖检后发现其肝脏肿大且表面有针尖大小白色坏死灶, 腹腔有积液。本研究通过常规微生物学技术, 从病死鸡肝脏中分离并鉴定一株菌。对其全基因组测序后, 通过生物信息学分析软件进行基因功能注释, 结合研究结果讨论其致病和耐药机制, 以期鸭源鸡杆菌的感染机制与后续防治提供参考基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

病料来源于四川某养鸡场病死鸡肝脏。药敏纸片、细菌培养基和细菌微量生化鉴定管, 广东环凯微生物科技有限公司; DNA Marker DL2000, 苏州近岸蛋白科技股份有限公司; 2×Rapid Taq Master Mix、胶回收试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

### 1.2 细菌的分离纯化

将无菌采集到的病死鸡肝脏组织分别划线接种于绵羊血琼脂平板、麦康凯培养基和胰蛋白胨大豆琼脂(tryptic soy agar, TSA)培养基, 倒置于 37 °C 培养箱 24 h 后, 观察并记录菌体

及菌落主要特征, 继续纯化并保菌。

### 1.3 生化试验

依据细菌微量生化反应管说明书进行操作并判定结果。

### 1.4 16S rRNA 基因扩增及序列分析

选用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-A GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')为 PCR 引物, 挑取新鲜的分离菌单菌落于 10 μL ddH<sub>2</sub>O 中稀释后作为 PCR 反应模板。PCR 反应体系 (50 μL): 模板 2 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 19 μL, 2×Rapid Taq Master Mix 25 μL。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 55 °C 15 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 5 min。PCR 产物经胶回收后由北京擎科生物科技有限公司进行测序。测序结果使用 NCBI BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行序列比对。

### 1.5 药敏试验

采取 Kirby-Barer 纸片扩散法, 参照 CLSI 鉴定手册(2021 版)筛选分离菌的药物敏感性<sup>[19]</sup>。

### 1.6 分离菌的全基因组测序

挑取分离菌单菌落连续纯化 3 代后, 涂布于 TSA 培养基倒置于 37 °C 恒温培养箱培养 24 h, 使用灭菌磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗下菌苔, 由上海派森诺生物科技股份有限公司提取细菌基因组 DNA 并进行全基因组测序。测序采用全基因组鸟枪法策略, 样品经质检后, 采用标准的 Illumina TruSeq Nano DNA LT 文库制备实验流程构建所需的基因组上机文库, 以 Illumina NovaSeq 测序平台为基础, 运用二代测序技术对文库进行双末端测序。采用 A5-MiSeq<sup>[20]</sup>和 SPAdes<sup>[21]</sup>对去除接头序列的测序数据进行从头拼装, 构建 scaffold 和 contig。对得到的拼装结果进行评估和比较, 并使用 Pilon<sup>[22]</sup>软件进行碱基校正。

## 1.7 分离菌全基因组序列分析

利用 FastANI (<https://github.com/ParBLiSS/FastANI>) 比对工具, 将分离菌株同鸭源鸡杆菌其余菌株及同鸡杆菌属的输卵管炎鸡杆菌典型菌株进行平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI) 比对。采用 GeneMarkS 软件对分离菌基因组的蛋白质编码基因进行预测, 将预测基因的蛋白质序列与 non-redundant protein database (NR)<sup>[23]</sup>、cluster of orthologous groups of proteins (COG)<sup>[24]</sup>、Swiss-Prot、gene ontology (GO)<sup>[25]</sup> 和 kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)<sup>[26]</sup> 这 5 个功能数据库进行 BLAST ( $E\text{-value} \leq 1e-5$ ), 注释 score 最高的结果。注释前噬菌体序列采用噬菌体搜索工具 (<http://phast.wishartlab.com/>)。运用毒力因子数据库 VFDB ([www.mgc.ac.cn/VFs/](http://www.mgc.ac.cn/VFs/)) 对分离菌的毒力基因进行注释。综合抗生素耐药性数据库 CARD (<https://card.mcmaster.ca>) 可注释分离菌所具有的耐药基因。分离菌序列类型用 PubMLST 数据库 (<https://pubmlst.org>) 测算, 同时基于分离菌的管家基因, 利用 MEGA 7.0 软件与 NCBI 中的关联菌株进行多基因联合建树分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 分离菌的菌落及形态特征

该分离菌在麦康凯培养基上不生长; 在 TSA 培养基上形成圆形、光滑的中等大小乳白色菌落; 在绵羊血琼脂平板上可见透明、滑润的圆形菌落, 边缘存在  $\beta$  溶血环。革兰氏染色镜检, 可见红色、短杆状的菌体(图 1)。菌落与菌体形态特征均符合鸭源鸡杆菌的鉴定特征<sup>[27]</sup>。

### 2.2 生化试验结果

生化试验结果显示, 该菌株可分解葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、木糖、纤维二糖等糖类; 能还原硝酸盐; MR-VP 试验阳性; 不产生  $H_2S$ ; 不

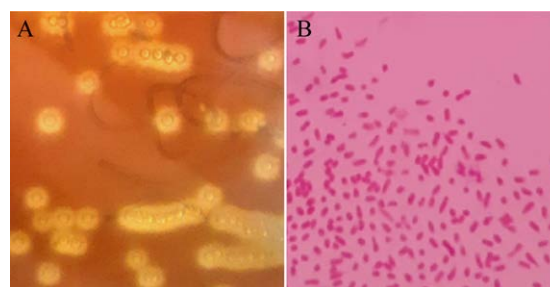


图 1 分离菌在绵羊血琼脂培养基(A)的菌落形态和革兰氏染色镜检结果(B)

Figure 1 The colony morphology of isolated bacteria on sheep-blood agar medium (A) and the result of Gram staining microscopy (B).

分解尿素; 枸橼酸盐、精氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶、苯丙氨酸脱氨酶试验为阴性; 无运动性。生化试验结果符合鸭源鸡杆菌的鉴定特征<sup>[28]</sup>。

### 2.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增与序列比对分析

将分离菌的 16S rRNA 基因 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 出现与预期结果一致的大小在 1 400 bp 左右的条带。经测序和序列比对发现, 与该菌株序列一致性最高的菌为鸭源鸡杆菌。将该菌培养结果与生化试验结果关联分析后, 初步鉴定该分离菌为鸭源鸡杆菌。

### 2.4 药敏试验结果

药敏试验结果(表 1)显示, 该分离菌仅对硝基咪唑类、少数  $\beta$ -内酰胺类药物(头孢曲松和头孢他啶)敏感, 对部分  $\beta$ -内酰胺类(氨苄西林和头孢噻吩)、氯霉素、部分氨基糖苷类(链霉素和卡那霉素)、大环内酯类、四环素以及磺胺类药物具有耐药性。

### 2.5 分离菌全基因组基本信息

测序后得到该分离菌全基因组大小为 2 626 722 bp, contig 数量为 117 个,  $N_{50}$  为 60 413 bp; scaffold 数量为 109 个,  $N_{50}$  为 64 239; GC 含量为 39.65%; 开放阅读框架(open reading framework, ORF)数量为 2 431 个, 平均序列长度为 943.6 bp,

其总长度占基因组长度的 87.23%; 含有 52 个 tRNA, rRNA 有 4 个(其中含 1 个 5S rRNA、1 个 16S rRNA 和 2 个 23S rRNA), ncRNA 83 个; CRISPRs 在 contig4 与 contig17 中各存在 1 个。菌株拼接序列以 FASTA 文件上传至 Genome 数据库获得登录号为 JAGMUQ000000000, 并将该菌株编号为 TS0001。

## 2.6 ANI 分析

物种划分与聚类的标准为 95% 的 ANI 值<sup>[29]</sup>, 由图 2 可见, TS0001 与分离于鸡泄殖腔的鸭源

鸡杆菌 21K2 菌株亲缘关系最为接近, ANI 值高达 97.41%; 其与鸭源鸡杆菌标准株 NCTC11413 比对的 ANI 值为 97.02%; 与其他同种 *Gallibacterium anatis* 菌株间的 ANI 值均高于 95% 的分类阈值且十分接近。与同鸡杆菌属的输卵管炎鸡杆菌 (*Gallibacterium salpingitidis*) 的 3 个代表菌株 F 150、19987/2 Salp 及 18469/18 相比, ANI 值均低于 80%。因此根据 ANI 比对结果可判断 TS0001 为鸭源鸡杆菌, 而且鸭源鸡杆菌亚种间亲缘关系极其相近。

表 1 药敏试验结果

Table 1 The results of antibiotic sensitivity tests

Antibiotics	Drug names	Inhibition zone diameters (mm)	Results
β-lactamines	Ceftriaxone	23	S
	Ceftazidime	32	S
	Ampicillin	0	R
	Piperacillin	15	I
	Cefoxitin	0	R
	Chloramphenicols	Chloramphenicol	0
	Florfenicol	15	I
Aminoglycosides	Neomycin	15	I
	Gentamycin	16	I
	Streptomycin	0	R
	Tobramycin	16	I
	Kanamycin	0	R
	Macrolides	Erythrocin	0
	Medemycin	0	R
Tetracyclines	Tetracycline	0	R
	Doxycycline	9	R
	Minocycline	18	I
Sulfonamides	Trimethoprim and sulphame-thoxazole	0	R
Fluoroquinolones	Norfloxacin	0	R
	Ciprofloxacin	10	I
	Galtixacin	10	I
	Ofloxacin	11	I
Itrofurans	Furazolidone	28	S
	Nitrofurantion	29	S
Polypeptide antibiotics	Polymyxin B	15	I
	Bacitracin	0	R

注: S: 敏感; I: 中介; R: 耐药

Note: S: Sensitive; I: Intermediary; R: Resistance.



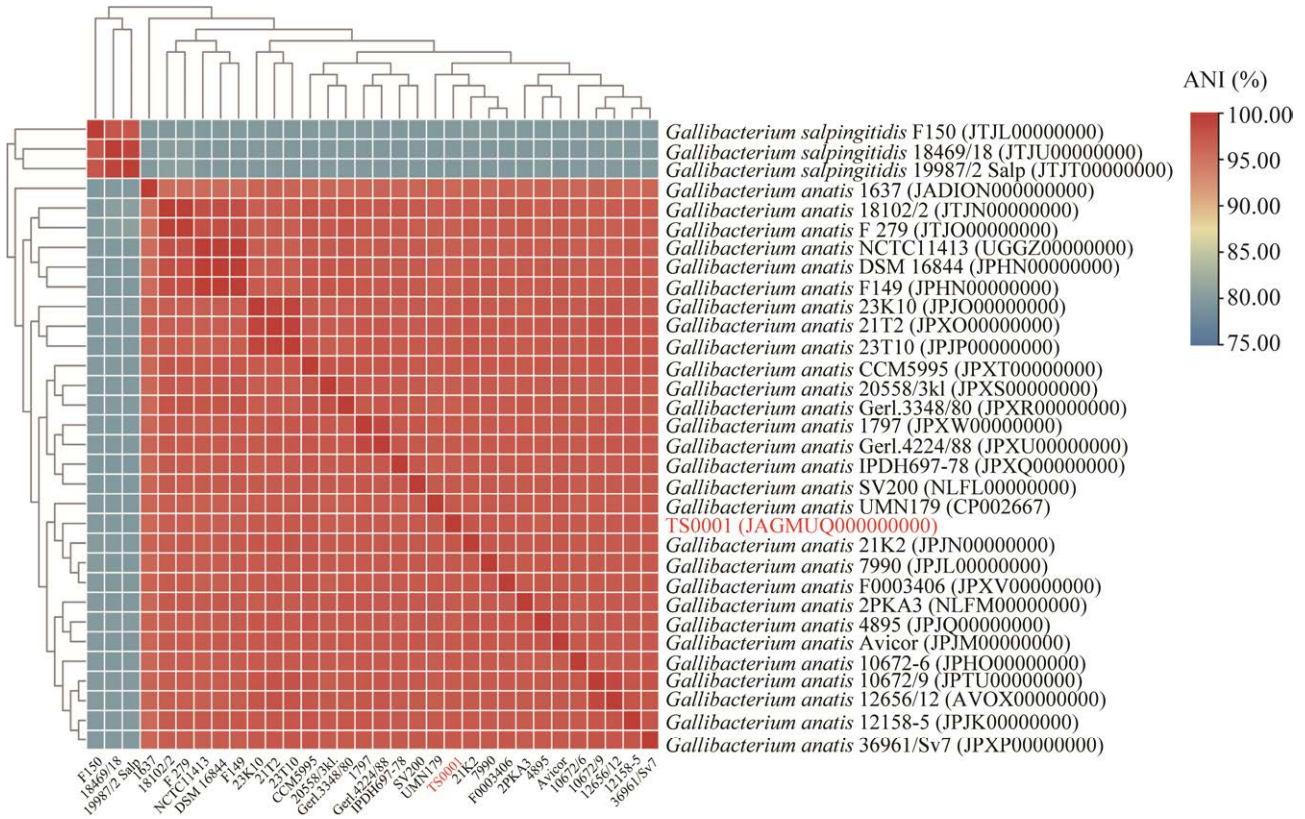


图2 TS0001与鸡杆菌属代表菌株的ANI比对 括号内为该菌株的登录号

Figure 2 ANI results among TS0001 and representative of *Gallibacterium*. The NCBI accession number of the strain is shown in brackets.

## 2.7 蛋白编码基因预测与功能注释

### 2.7.1 蛋白编码基因的NR注释

TS0001中有2360个基因在NR数据库中得到注释。

### 2.7.2 蛋白编码基因的COG注释

将TS0001的基因编码蛋白序列与COG数据库比对,总计注释有21组功能和2178个基因(图3)。其中,与已知蛋白或已知假想蛋白同源的有2001个基因所编码的蛋白;177个基因编码的蛋白功能未知(function unknown);相关基因最多的是氨基酸转运与代谢(amino acid transport and metabolism)相关基因,共182个;其次是复制、重组与修复(replication, recombination and repair)和碳水化合物转运与

代谢(carbohydrate transport and metabolism)相关基因,分别为163个和169个。

### 2.7.3 蛋白编码基因的KEGG注释

通过KEGG代谢通路分析,TS0001基因组共有1599个基因被注释(图4),其中参与BRITE层次遗传信息加工(genetic information processing)的基因数最多,其次是参与信号传导和细胞转化(signaling and cellular processes)相关的基因最多,再次是与碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)相关的基因。

### 2.7.4 蛋白编码基因的GO注释

在GO功能分析中,TS0001基因组中有1822个基因的蛋白序列功能得到注释(图5),其中分子功能中的DNA结合(DNA binding)和

离子束缚(ion binding)是基因富集程度最高的 2 个途径; 细胞组成中细胞(cell)和细胞内(intracellular)是基因富集程度最高的 2 个途径; 生

物过程中生化过程(biological process)和细胞氮化合物代谢过程(cellular nitrogen compound metabolic process)是基因富集程度最高的 2 个途径。

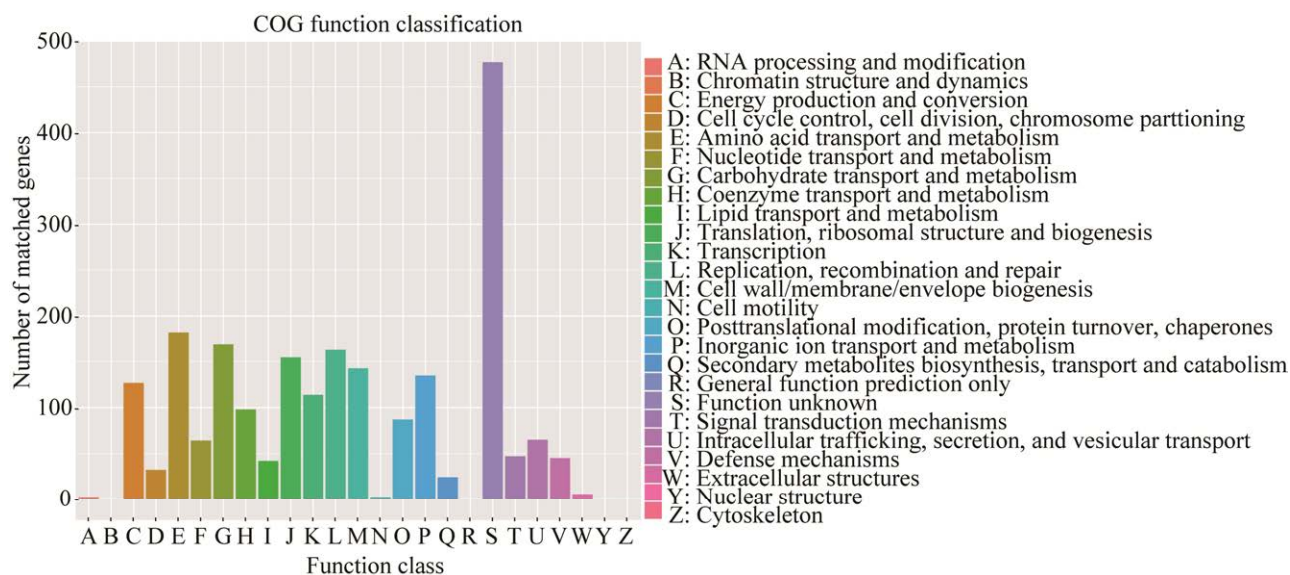


图 3 TS0001 基因组的 COG 功能分类

Figure 3 COG function classification diagram of the TS0001 genome.

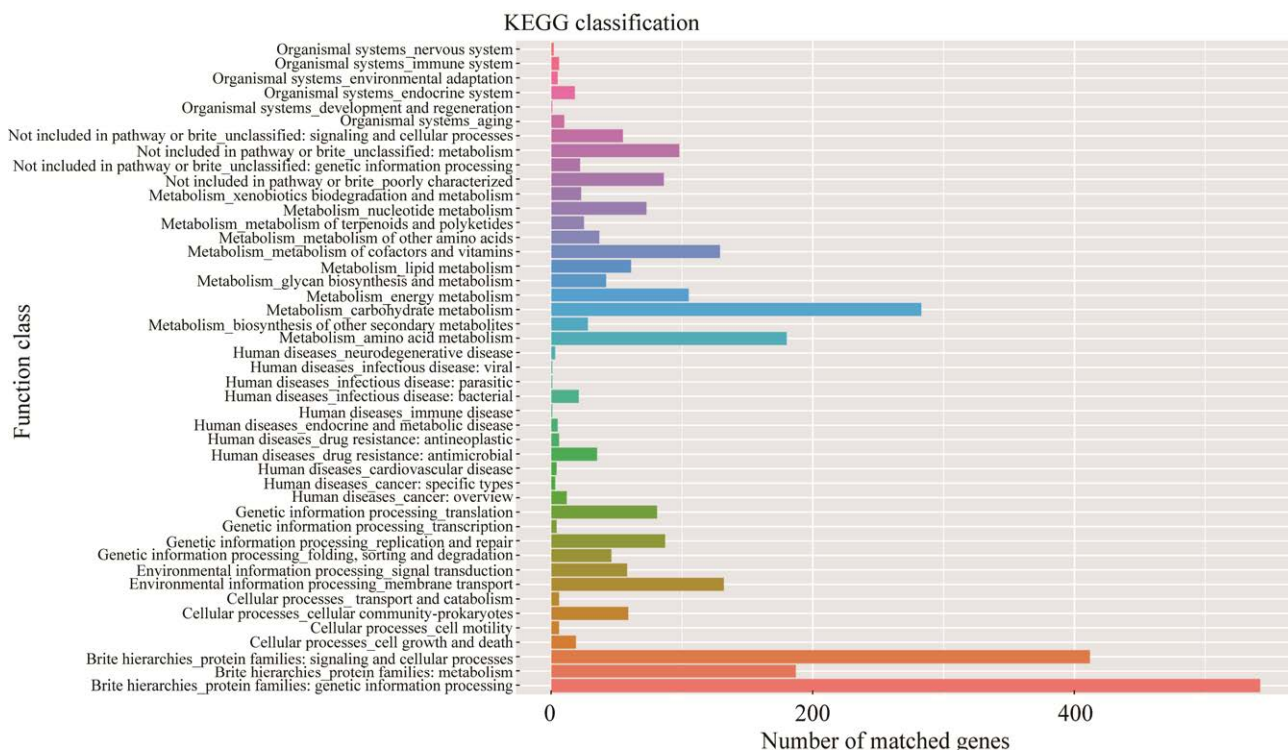


图 4 TS0001 基因组的 KEGG 代谢通路分类图

Figure 4 Classification diagram of KEGG metabolic pathway of the TS0001 genome.

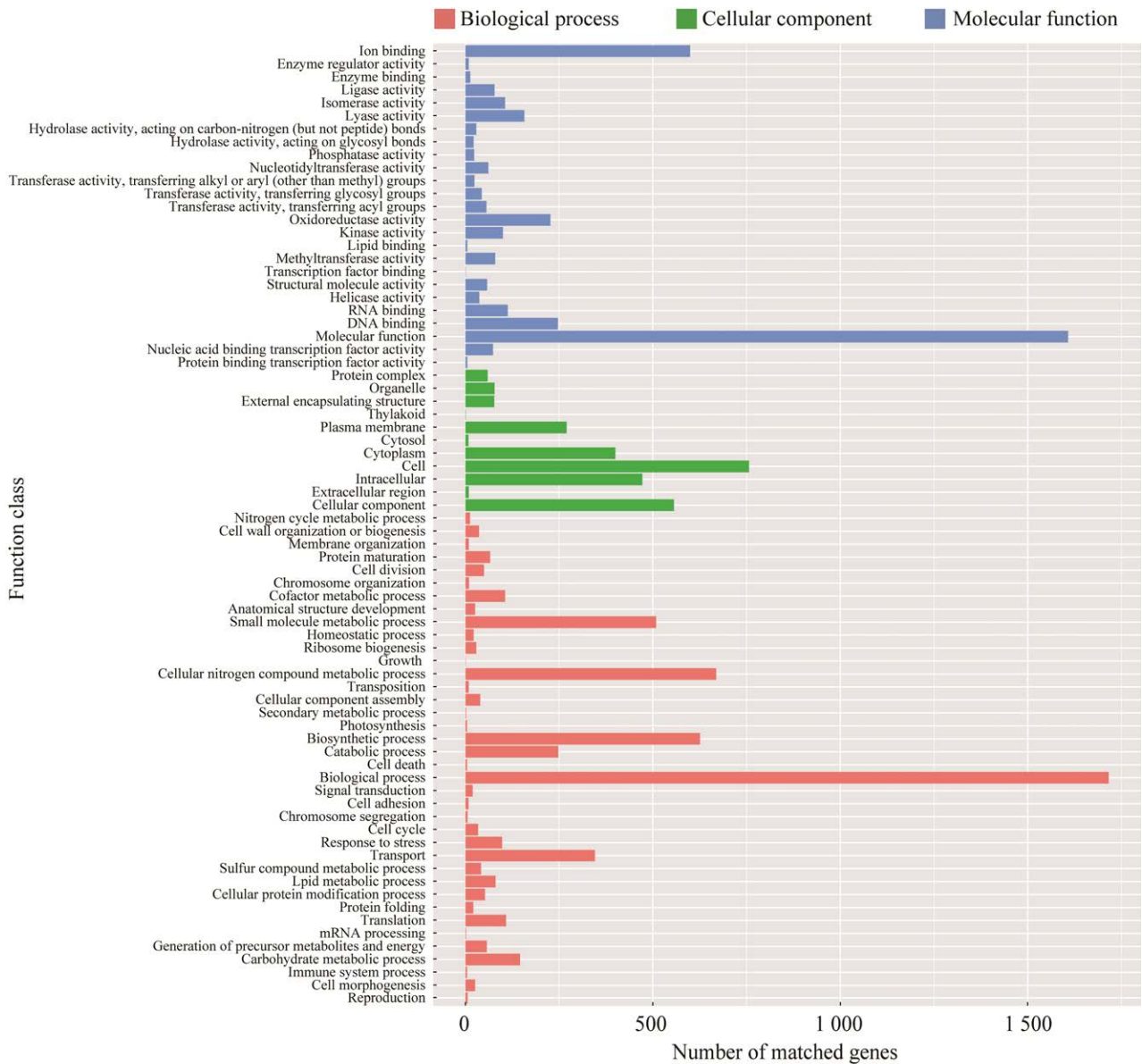


图5 TS0001 基因组的 GO 功能分类图

Figure 5 GO function classification map of the TS0001 genome.

### 2.7.5 蛋白编码基因的 Swiss-Prot 注释

TS0001 中有 1 984 个基因的蛋白序列功能注释到了 Swiss-Prot 数据库。

## 2.8 毒力及耐药分析

### 2.8.1 毒力因子注释

下载 VFDB 最新数据库注释, 经本地

BLAST 比对, 选取得分最高且  $E\text{-value} \leq 1e^{-5}$  的结果。在 TS0001 基因组中, 检测到了包括介导黏附、侵入、铁摄取以及抗吞噬能力的蛋白。现被报道过的鸭源鸡杆菌与毒力因子相关的基因 *GtxA*、*tolC*、*flaA* 和 *OmpW* 均被检测到。相关结果如表 2 所示。



表 2 TS0001 基因组中的毒力因子

Table 2 Virulence factors in TS0001 genome

Function	Virulence factors	Related genes
Adherence	EF-Tu	<i>tufA</i>
	RTX-like toxin	<i>GtxA</i>
	F-17 fimbria	<i>FlfA, flfC, flfD, flfG</i>
	Outer membrane protein	<i>OmpA, OmpW, tolC</i>
Iron uptake	Heme biosynthesis	<i>hemN</i>
Invasion	LPS	<i>rfaE, rfaF, kdsA, lpxD, lpxA, orfE, gmhA/lpcA, msbA</i>
Antiphagocytosis	Capsule	<i>IS1016-V2</i>

2.8.2 耐药基因注释

在 TS0001 基因组中,检测到了多种耐药基因,包括对 β-内酰胺类、氯霉素类、氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、磺胺类、硝基咪唑类、利福霉素类、氟喹诺酮类和依法霉素类这 10 类药物的靶向抗性,还有与多药耐药外排泵相关的基因。结果见表 3。

2.9 前噬菌体分析

通过 PHAST 预测, TS0001 基因组中可能有 4 个前噬菌体区域存在,区域长度分别为 16、18.8、37.1 和 69.8;分别包含 9、22、55 和

83 个 CDS; GC 含量分别为 39.28%、40.79%、43.69%和 39.31%。其中发现与噬菌体相关的蛋白类型有溶菌酶、蛋白酶、末端酶、整合酶和转座酶。

2.10 TS0001 系统进化树分析

基于 PubMLST 数据库中鸭源鸡杆菌的 *fumC*、*atpD*、*mdh*、*thdF*、*gyrB*、*recN*、*infB* 和 *adk* 这 8 个管家基因得到 TS0001 株序列类型为 ST69。由管家基因串联建立的系统进化树如图 6 所示,鸡源分离株 TS0001 与分离于墨西哥普通家鸡的 7990 菌株遗传距离最近且 ANI 值较高,为 97.34%。

表 3 TS0001 菌株的耐药基因预测

Table 3 Prediction of antibiotic resistance genes in TS0001 strain

Resistant genes category	Resistant genes
β-lactam antibiotics	<i>OXA-5, OXA-7, OXA-10, OXA-11, OXA-13, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-19, OXA-28, OXA-35, OXA-56, OXA-74, OXA-101, OXA-129, OXA-142, OXA-145, OXA-147, OXA-183, OXA-233, OXA-240, OXA-246, OXA-251, OXA-256, OXA-368, OXA-454, OXA-663, TEM-40, TEM-156, TEM-206</i>
Chloramphenicols	<i>TnSs1, cat-TC, catB3, pp-flo, floR, floR2</i>
Aminoglycosides	<i>aadA1, aadA1-pm, aadA2, aadA3, aadA6, aadA7, aadA8, aadA8b, aadA9, aadA6/aadA10, aadA11, aadA12, aadA13, aadA15, aadA16, aadA17, aadA21, aadA22, aadA23, aadA24, aadA25, aadB, AAC(3)-IIa, AAC(3)-IIc, AAC(3)-IId, AAC(3)-IIE, AAC(3)-IV, APH(6)-Id</i>
Macrolides	<i>EreA, EreA2, mphA, mphE</i>
Tetracyclines	<i>tet(A), tet(C)</i>
Sulfonamides	<i>sul1, sul2</i>
Nitroimidazoles	<i>msbA</i>
Rifomycins	<i>arr-3, rpoB</i>
Fluoroquinolones	<i>gyrA, gyrB, parC</i>
Elfamycin	<i>EF-Tu</i>
Efflux pump conferring antibiotic resistance	<i>qacE, qacEdelta1, floR, mdtM</i>

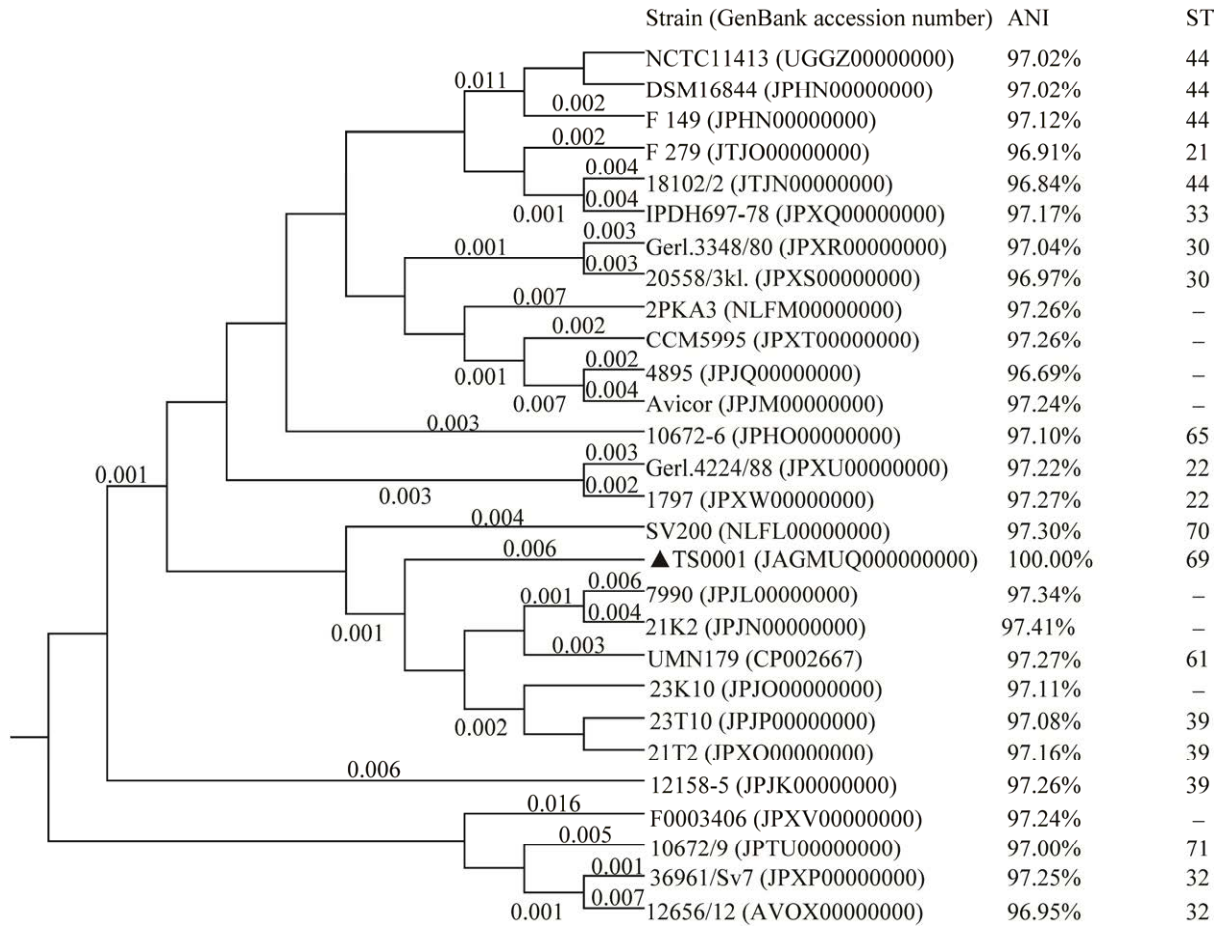


图 6 菌株 TS0001 基于管家基因序列构建的系统发育树 ▲: 本研究分离的 TS0001 菌株; ST: 序列类型; -: pubMLST 数据库未收录该种序列类型。分支上的数字表示遗传距离

Figure 6 Phylogenetic tree of TS0001 based on housekeeping genes sequences. ▲: The TS0001 strain isolated in this study; ST: Sequence type; -: This sequence type is not included in the pubMLST database. The number on each node represents the genetic distance.

### 3 讨论

鸭源鸡杆菌能造成家禽产蛋数量及质量的下降,甚至引起动物死亡。由于各血清型之间无交叉免疫保护作用,而且自身具有多样性抗原和多重耐药性<sup>[30]</sup>,使得该菌的防治十分棘手。在基因组比较分析中,与传统的 DNA-DNA 杂交和 16S rRNA 基因等物种鉴定方法相比,运用 ANI 分析进行菌种鉴定和同源性分析效率高且精准<sup>[29,31-32]</sup>。可以看出鸡杆菌属不同亚种间

ANI 值差别显著,但同亚种间差别不大。结合 COG、KEGG 和 GO 注释可知,TS0001 株有较强的自我加工修饰能力,但仍有 177 个基因编码的蛋白功能未知,有待后续探讨研究。

TS0001 株注释到了 19 个毒力基因,已报道过的相关基因 *GtxA*、*tolC*、*flfA*、*OmpA* 和 *OmpW* 均被检测到。*GtxA* 基因所编码的 RTX 样 *GtxA* 毒素是鸭源鸡杆菌分泌的最典型的毒力因子,使菌株在绵羊血琼脂平板引起溶血产生  $\beta$  溶血环<sup>[8,33]</sup>;此外,*GtxA* 毒素还被指出具

有白细胞毒性<sup>[34]</sup>, 能引起免疫反应<sup>[35-36]</sup>并帮助细菌进行免疫逃避<sup>[37]</sup>; 将 *GtxA* 基因从菌株中敲除后其突变株致病性减弱<sup>[38]</sup>, 表明该基因在宿主感染发病机制中起到重要作用。鸭源鸡杆菌的 F-17 菌毛是一种可以黏附于含 N-乙酰基-D-氨基葡萄糖的细胞表面受体, 使细菌能与宿主细胞黏附<sup>[39]</sup>, 具有良好的免疫原性且与毒力密切相关<sup>[40]</sup>, 而 *flfA*、*flfC*、*flfD* 和 *flfG* 这 4 个基因构成了 F-17 菌毛基因簇。与 *IS1016-V2* 基因相关的荚膜有助于鸭源鸡杆菌对宿主细胞进行黏附, 也有抗吞噬作用<sup>[41]</sup>。注释到致病性相关基因最多的外膜蛋白和脂多糖是外膜囊泡的重要组成部分, 研究报道显示鸭源鸡杆菌的外膜囊泡可参与黏附和定殖等生物过程<sup>[42]</sup>, 也可能包含凝集禽类血细胞的血凝素<sup>[43]</sup>, 可引起宿主机体强烈的免疫反应<sup>[44]</sup>; 其中 *OmpW* 基因所编码的外膜蛋白 W 已被证实与鸭源鸡杆菌抗渗透应激相关<sup>[45]</sup>。鸭源鸡杆菌的延长因子-Tu (EF-Tu) 具有淀粉样蛋白的特征, 被认为参与了发病机制<sup>[46]</sup>。另外, 在 TS0001 株中也发现了 CRISPRs, 其被认为可降解入侵的外源核酸, 是该菌的一种先天防御机制<sup>[47]</sup>。

对 28 株鸭源鸡杆菌进行多位点序列分型后发现, 本研究分离到的 TS0001 株是单一出现的 ST69 型序列, PubMLST 数据库中仅收录了一株相同分型的菌株, 是来源未知的美国分离株 187, 目前尚无关于该型的流行病学报道。Kudirkiene 等<sup>[48]</sup>指出鸭源鸡杆菌的 F1f、F1f1 和 F1f3 核心菌毛类型可在不同 ST 型之间转移, TS0001 株的核心菌毛类型转移情况还有待后续深入研究。

鸭源鸡杆菌作为条件致病菌, 许多病原学和流行病学因素决定了其在鸡体内的致病性, 包括菌株、感染途径和鸡群的生理状态等<sup>[49]</sup>。目前广泛认为鸭源鸡杆菌是经呼吸途径水平传

播, 部分研究显示其也能垂直传播<sup>[50]</sup>。宿主相关因素中, 如畜禽免疫状态、年龄、激素水平的变化在加重该菌在体内致病程度方面发挥重要作用。其他病原菌或病毒的联合感染导致宿主呼吸道损伤或免疫抑制, 以及环境因素的变化, 如季节交替温度骤变、圈舍过度拥挤、通风不良、营养不良等导致畜禽应激, 也加剧了鸭源鸡杆菌对宿主的感染。

由药物敏感表型可知, TS0001 株对部分  $\beta$ -内酰胺类、氯霉素类、氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类、磺胺类药物均具有高耐药性, 对应了与 CARD 数据库比对后注释的耐药基因种类, 表明此株鸭源鸡杆菌已呈现多重耐药趋势, 与以往的研究结果<sup>[16-18,51]</sup>一致, 其高耐药率可能与临床大量使用这些药物进行防治有关。在四环素类耐药基因 *tet* 的检测中并未发现鸭源鸡杆菌中常见的 *tet(B)*<sup>[16]</sup>和 *tet(31)*<sup>[17]</sup>基因, 而是检出与 UMN179 株相同的 *tet(A)*和 *tet(C)*基因<sup>[47]</sup>, 表现出仅对四环素的耐药性, 而对四环素类中的多西环素与米诺环素呈现中介的效果。同时, 在 TS0001 株中注释到 4 个多药耐药外排泵相关的基因, 均能介导细菌对多种抗菌药物的耐药性。

从 1950 年该菌被首次分离报道<sup>[52]</sup>至 2021 年 11 月 20 日, NCBI Gemone 数据库仅收录 29 株鸭源鸡杆菌的全基因组序列, 中国甚至亚洲地区的鸭源鸡杆菌全基因组测序研究还处于空白阶段。本研究在中国四川地区分离获得一株鸭源鸡杆菌, 对其进行全基因组测序后上传至 NCBI Gemone 数据库, 扩充了鸭源鸡杆菌的基因数据库信息。

## 4 结论

本研究对一株鸭源鸡杆菌进行分离鉴定及全基因组序列分析, 并探讨其进化分群情况、致

病和耐药机制，可为该菌的感染机制与后续防治提供参考基础。

## REFERENCES

- [1] 王珊, 陈陆, 付仁一, 杨霞, 赵军, 高冬生, 李乔晶, 姚惠霞, 王川庆. 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 RY, Yang X, Zhao J, Gao DS, Li QJ, Yao HX, Wang CQ. 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)
- [2] Bojesen AM, Nielsen SS, Bisgaard M. Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels[J]. Avian Pathology, 2003, 32(5): 503-510
- [3] Singh SV, Singh BR, Sinha DK, Vinodh KOR, Prasanna VA, Monika B, Sakshi D. *Gallibacterium anatis*: an emerging pathogen of poultry birds and domiciled birds[J]. Journal of Veterinary Science & Technology, 2016, 7(3): 100324.
- [4] Paudel S, Liebhart D, Hess M, Hess C. Pathogenesis of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model fulfils Koch's postulates: 1. Folliculitis and drop in egg production are the predominant effects in specific pathogen free layers[J]. Avian Pathology, 2014, 43(5): 443-449
- [5] Paudel S, Hess M, Hess C. Coinfection of *Avibacterium paragallinarum* and *Gallibacterium anatis* in specific-pathogen-free chickens complicates clinical signs of infectious coryza, which can be prevented by vaccination[J]. Avian Diseases, 2017, 61(1): 55-63
- [6] Neubauer C, De Souza-Pilz M, Bojesen AM, Bisgaard M, Hess M. Tissue distribution of haemolytic *Gallibacterium anatis* isolates in laying birds with reproductive disorders[J]. Avian Pathology, 2009, 38(1): 1-7
- [7] Krishnegowda DN, Dhama K, Mariappan AK, Munuswamy P, Yattoo MI, Tiwari R, Karthik K, Bhatt P, Reddy MR. Etiology, epidemiology, pathology, and advances in diagnosis, vaccine development, and treatment of *Gallibacterium anatis* infection in poultry: a review[J]. Veterinary Quarterly, 2020, 40(1): 16-34
- [8] Kristensen BM, Frees D, Bojesen AM. GtxA from *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX-toxin with a novel domain organisation[J]. Veterinary Research, 2010, 41(3): 25
- [9] Aubin GG, Haloun A, Treilhaud M, Reynaud A, Corvec S. *Gallibacterium anatis* bacteremia in a human[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(11): 3897-3899
- [10] 王川庆, 陈陆, 杨霞, 皇甫和平, 刘红英, 彭志峰, 郑鹿平, 徐雪, 刘惠敏, 付仁一, 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 CQ, Chen L, Yang X, Huangpu HP, Liu HY, Peng ZF, Zheng LP, Xu X, Liu HM, Fu RY, 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)
- [11] 李乔晶. 鸡群鸭源鸡杆菌流行病学调查及流行菌株对雏鸡和雏鸭的感染特性研究[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2012  
Li QJ. Epidemiological survey of *G. anatis* infection in chicken flocks and infection and transmission characteristics of epidemic strain in experimentally infected chicks and ducklings[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2012 (in Chinese)
- [12] 王艳, 王继洋, 王坤芑, 彭志锋, 杨霞, 王川庆. 鸭源鸡杆菌外膜蛋白 A 基因克隆及结构与功能分析[J]. 河南农业科学, 2017, 46(8): 147-151  
Wang Y, Wang JY, Wang KP, Peng ZF, Yang X, Wang CQ. Cloning of the outer membrane protein A gene of *Gallibacterium anatis* and analysis of its structure and function[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2017, 46(8): 147-151 (in Chinese)
- [13] Salgado Lucio ML, Vaca S, Vázquez C, Zenteno E, Rea I, Pérez-Márquez VM, Negrete-Abascal E. Adhesion of *Gallibacterium anatis* to chicken oropharyngeal epithelial cells and the identification of putative fimbriae[J]. Advances in Microbiology, 2012, 2(4): 505-510
- [14] Bager RJ, Nesta B, Pors SE, Soriani M, Serino L, Boyce JD, Adler B, Bojesen AM. The fimbrial protein FlfA from *Gallibacterium anatis* is a virulence factor and vaccine candidate[J]. Infection and Immunity, 2013, 81(6): 1964-1973
- [15] Bojesen AM, Christensen H, Nielsen OL, Olsen JE, Bisgaard M. Detection of *Gallibacterium* spp. in chickens by fluorescent 16S rRNA *in situ* hybridization[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(11): 5167-5172



- [16] Bojesen AM, Vazquez ME, Bager RJ, Ifrah D, Gonzalez C, Aarestrup FM. Antimicrobial susceptibility and tetracycline resistance determinant genotyping of *Gallibacterium anatis*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 148(1): 105-110
- [17] Bojesen AM, Bager RJ, Ifrah D, Aarestrup FM. The rarely reported Tet(31) tetracycline resistance determinant is common in *Gallibacterium anatis*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 149(3/4): 497-499
- [18] 郭伦涛, 王川庆, 杨霞, 陈陆, 郑鹿平, 付仁一, 徐雪, 刘慧敏. 卡氏杆菌对磺胺甲噁唑及链霉素的耐药性与耐药基因关系的初步研究[J]. *中国家禽*, 2009, 31(18): 22-24
- Guo LT, Wang CQ, Yang X, Chen L, Zheng LP, Fu RY, Xu X, Liu HM. Study of relation between drug resistance against sulfamethoxazole and streptomycin in *Gallibacterium* and resistant genes[J]. *China Poultry*, 2009, 31(18): 22-24 (in Chinese)
- [19] Humphries R, Bobenchik AM, Hindler JA, Schuetz AN. Overview of changes to the clinical and laboratory standards institute performance standards for antimicrobial susceptibility testing, M100, 31st edition[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2021, 59(12): e0021321
- [20] Coil D, Jospin G, Darling AE. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data[J]. *Bioinformatics*, 2014, 31(4): 587-589
- [21] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing[J]. *Journal of Computational Biology: a Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 2012, 19(5): 455-477
- [22] Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, Cuomo CA, Zeng QD, Wortman J, Young SK, et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112963
- [23] Li WZ, Jaroszewski L, Godzik A. Tolerating some redundancy significantly speeds up clustering of large protein databases[J]. *Bioinformatics: Oxford, England*, 2002, 18(1): 77-82
- [24] Galperin MY, Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. Expanded microbial genome coverage and improved protein family annotation in the COG database[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 43(D1): D261-D269
- [25] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology[J]. *Nature Genetics*, 2000, 25(1): 25-29
- [26] Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 44(D1): D457-D462
- [27] 张玉杰, 刘东, 孙宁, 刘红祥, 高天佐, 郭玉广, 于静, 袁飞, 宋姗姗, 王玉超, 等. 引起人工授精种鸡产蛋下降的鸭源鸡杆菌的分离鉴定[J]. *中国兽医学报*, 2021, 41(8): 1604-1611
- Zhang YJ, Liu D, Sun N, Liu HX, Gao TZ, Guo YG, Yu J, Yuan F, Song SS, Wang YC, et al. Isolation and identification of *Gallibacterium anatis* causing decline of egg laying capacity of artificially inseminated breeders[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2021, 41(8): 1604-1611 (in Chinese)
- [28] 方翟, 项玉, 谷长勤, 胡薛英, 李婷婷, 胡志斌, 邵华斌, 程国富. 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 CQ, Hu XY, Li TT, Hu ZB, Shao HB, Cheng GF. 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)
- [29] Jain C, Rodriguez-R LM, Phillippy AM, Konstantinidis KT, Aluru S. High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 5114
- [30] 刘盼盼. 鸭源鸡杆菌 *tolC* 基因缺失株的构建及生物学特性分析[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2020
- Liu PP. Construction of *tolC* gene mutant strain of *Gallibacterium anatis* and analysis of biological characteristics[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2020 (in Chinese)
- [31] Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(Pt 1): 81-91
- [32] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 2): 346-351
- [33] Kristensen BM, Frees D, Bojesen AM. Expression and secretion of the RTX-toxin GtxA among members of the genus *Gallibacterium*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 153(1/2): 116-123

- [34] Persson G, Bojesen AM. Bacterial determinants of importance in the virulence of *Gallibacterium anatis* in poultry[J]. Veterinary Research, 2015, 46(1): 57
- [35] Bager RJ, Kudirkiene E, Da Piedade I, Seemann T, Nielsen TK, Pors SE, Mattsson AH, Boyce JD, Adler B, Bojesen AM. *In silico* prediction of *Gallibacterium anatis* pan-immunogens[J]. Veterinary Research, 2014, 45(1): 80
- [36] Tang B, Pors SE, Kristensen BM, Skjerning RBJ, Olsen RH, Bojesen AM. GtxA is a virulence factor that promotes a Th2-like response during *Gallibacterium anatis* infection in laying hens[J]. Veterinary Research, 2020, 51(1): 40
- [37] Lemichez E, Barbieri JT. General aspects and recent advances on bacterial protein toxins[J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2013, 3(2): a013573
- [38] 王继洋, 彭志锋, 刘盼盼, 王坤芑, 王川庆, 陈陆, 赵军, 杨霞. 鸭源鸡杆菌 *gtxA* 突变株构建及其生物特性分析[J]. 中国兽医学报, 2019, 39(3): 414-420  
Wang JY, Peng ZF, Liu PP, Wang KP, Wang CQ, Chen L, Zhao J, Yang X. Construction and characterization of *gtxA* gene mutant strain of *Gallibacterium anatis*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2019, 39(3): 414-420 (in Chinese)
- [39] Le Bouguéne C, Bertin Y. AFA and F17 adhesins produced by pathogenic *Escherichia coli* strains in domestic animals[J]. Veterinary Research, 1999, 30(2/3): 317-342
- [40] Persson G, Pors SE, Thøfner ICN, Bojesen AM. Vaccination with outer membrane vesicles and the fimbrial protein FlfA offers improved protection against lesions following challenge with *Gallibacterium anatis*[J]. Veterinary Microbiology, 2018, 217: 104-111
- [41] Harper M, Boyce JD, Adler B. The key surface components of *Pasteurella multocida*: capsule and lipopolysaccharide[J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 2012, 361: 39-51
- [42] Bager RJ, Persson G, Nesta B, Soriani M, Serino L, Jeppsson M, Nielsen TK, Bojesen AM. Outer membrane vesicles reflect environmental cues in *Gallibacterium anatis*[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 167(3/4): 565-572
- [43] Zepeda VA, Calderón-Apodaca NL, Paasch ML, Martín PG, Paredes DA, Ramírez-Apolinar S, Soriano-Vargas E. Histopathologic findings in chickens experimentally infected with *Gallibacterium anatis* by nasal instillation[J]. Avian Diseases, 2010, 54(4): 1306-1309
- [44] Pors SE, Pedersen IJ, Skjerning RB, Thøfner ICN, Persson G, Bojesen AM. Outer membrane vesicles of *Gallibacterium anatis* induce protective immunity in egg-laying hens[J]. Veterinary Microbiology, 2016, 195: 123-127
- [45] 彭志锋, 杨霞, 刘红英, 王新卫, 常洪涛, 陈陆, 王川庆. 外膜蛋白 W 与鸭源鸡杆菌抗渗透应激相关[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(4): 827-833  
Peng ZF, Yang X, Liu HY, Wang XW, Chang HT, Chen L, Wang CQ. The outer membrane protein W of *Gallibacterium anatis* is involved in osmotic stress resistance[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2020, 51(4): 827-833 (in Chinese)
- [46] López-Ochoa J, Montes-García JF, Vázquez C, Sánchez-Alonso P, Pérez-Márquez VM, Blackall PJ, Vaca S, Negrete-Abascal E. *Gallibacterium* elongation factor-Tu possesses amyloid-like protein characteristics, participates in cell adhesion, and is present in biofilms[J]. Journal of Microbiology: Seoul, Korea, 2017, 55(9): 745-752
- [47] Johnson TJ, Danzeisen JL, Trampel D, Nolan LK, Seemann T, Bager RJ, Bojesen AM. Genome analysis and phylogenetic relatedness of *Gallibacterium anatis* strains from poultry[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e54844
- [48] Kudirkiene E, Bager RJ, Johnson TJ, Bojesen AM. Chaperone-usher fimbriae in a diverse selection of *Gallibacterium* genomes[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 1093
- [49] Bojesen AM, Christensen JP, Bisgaard M. *Gallibacterium* infections and other avian *Pasteurellaceae*[M]. Poultry Diseases. Amsterdam: Elsevier, 2008: 160-163
- [50] Wang C, Pors SE, Olsen RH, Bojesen AM. Transmission and pathogenicity of *Gallibacterium anatis* and *Escherichia coli* in embryonated eggs[J]. Veterinary Microbiology, 2018, 217: 76-81
- [51] 彭志锋, 高冬生, 刘红英, 杨霞, 赵军, 王新卫, 李永涛, 陈陆, 常洪涛, 王川庆. 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 ZF, Gao DS, Liu HY, Yang X, Zhao J, Wang XW, Li YT, Chen L, Chang HT, Wang CQ. *Gallibacterium anatis* integron and its correlation with the drug resistance[J]. Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2016, 47(8): 1676-1681 (in Chinese)
- [52] Bisgaard M. Isolation and characterization of some previously unreported taxa from poultry with phenotypical characters related to actinobacillus- and pasteurella species[J]. Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Series B: Microbiology, 1982, 90B(1/2/3/4/5/6): 59-67