

吴彩艳, 廖申权, 戚南山, 等. 广东省鸭疫里默氏杆菌流行病学监测及遗传进化关系 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(2): 1-10.
WU Caiyan, LIAO Shenquan, QI Nanshan, et al. Epidemiological surveillance and genetic evolution of *Riemerella anatipestifer* in Guangdong Province[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(2): 1-10.

广东省鸭疫里默氏杆菌流行病学 监测及遗传进化关系

吴彩艳^{1,2}, 廖申权², 戚南山², 廖晓萍¹, 孙阮洋¹, 方亮星¹, 周宇峰¹, 李林林², 孙铭飞²

(1 华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642; 2 广东省农业科学院 动物卫生研究所/岭南现代农业科学与技术
广东省实验室茂名分中心/广东省兽医公共卫生公共实验室/广东省畜禽疫病防治研究重点实验室/
农业农村部兽用药物与诊断技术广东科学观测实验站, 广东 广州 510640)

摘要:【目的】明确广东地区鸭疫里默氏杆菌 *Riemerella anatipestifer* 的血清型、耐药状况及遗传进化关系。【方法】从规模化鸭场分离鉴定鸭疫里默氏杆菌, 通过玻片凝集试验鉴定血清型; 利用试管两倍稀释法测试抗菌药物的最低抑菌浓度, 分析药物的敏感性; 采用全基因组测序技术分析序列特征并构建核心基因组遗传进化树。【结果】共分离鉴定鸭疫里默氏杆菌 168 株, 血清 1、2、3、5、6、7、8、10 型均有流行, 血清 1 型的菌株高达 54.17% (91/168), 其次为 2 型, 占 27.97%(47/168)。48 株代表性菌株对庆大霉素、卡那霉素、盐酸环丙沙星表现高度耐药, 耐药率均超过 80%; 对土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素、氧氟沙星、诺氟沙星、磺胺二甲嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶的耐药率均在 60% 以上; 对阿莫西林、头孢噻肟和大观霉素的耐药率低于 30%。受试菌株对 5~12 种药物耐药, 共有 44 种耐药谱型。成功获得 46 株菌株全基因组序列, 共检出 6 种耐药基因, 其中, 耐药基因 *erm*(F) 和 *tet*(X) 的检出率较高, 分别为 73.91%(34/46) 和 82.60%(38/46), 同时携带 2 种以上耐药基因的菌株占 95.65%(44/46)。18 株 (39.13%, 18/46) 菌株 ST 分型成功, 分属 11 个 ST 型。所有测序菌株与数据库中来自中国的菌株在遗传进化关系上最接近, 主要存在于优势克隆群系 Clade 1 和 Clade 3 中。【结论】本研究鸭疫里默氏杆菌分离株的优势血清型为 1 型, 耐药性严重, 所携带的耐药基因与耐药表型具有一定相关性, ST 型呈多样性, 与多位点序列分型 (Multi-locus sequence typing, MLST) 数据库中来自我国菌株的遗传背景相近。研究结果可为鸭疫里默氏杆菌病疫苗免疫预防与药物治疗提供依据, 有助于掌握鸭疫里默氏杆菌遗传进化特征。

关键词: 鸭疫里默氏杆菌; 血清型; 耐药性; 遗传进化; 流行病学

中图分类号: S83; S85

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2022)02-0001-10

Epidemiological surveillance and genetic evolution of *Riemerella anatipestifer* in Guangdong Province

WU Caiyan^{1,2}, LIAO Shenquan², QI Nanshan², LIAO Xiaoping¹, SUN Ruanyang¹,
FANG Liangxing¹, ZHOU Yufeng¹, LI Linlin², SUN Mingfei²

(1 College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Maoming Branch Center of Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agricultural Science and Technology/Guangdong Open Laboratory of Veterinary Public Health/Key Laboratory of Livestock Disease Prevention of Guangdong Province/Scientific Observation and Experiment Station of Veterinary Drugs and Diagnostic Techniques of Guangdong Province, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangzhou 510640, China)

收稿日期: 2021-05-12 网络首发时间: 2021-11-18 09:46:05

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20211117.1642.006.html>

作者简介: 吴彩艳, 研究员, 博士研究生, 主要从事禽传染病研究, E-mail: wucaiyang906@163.com; 通信作者: 孙铭飞, 研究员, 博士, 主要从事禽传染病研究, E-mail: smf7810@126.com

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金 (2019A1515010913); 广东省自然科学基金温氏集团联合基金重点项目 (2018B030315002)

Abstract: 【Objective】 To clarify serotype, drug resistance and genetic evolution of *Riemerella anatipestifer* in Guangdong. 【Method】 The isolates of *R. anatipestifer* were isolated and identified from samples of the large-scale duck farms. Serotype was identified by glass agglutination test. The minimum inhibitory concentration was tested by double dilution method in test tube, and the drug sensitivity was analyzed. Whole genome sequencing technology was used to analyze the sequence characteristics and construct the genetic evolution tree of the core genome. 【Result】 A total of 168 isolates of *R. anatipestifer* were isolated and identified. All serotype 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 and 10 were prevalent. Serotype 1 was dominant, reaching 54.17%(91/168), followed by serotype 2 (27.97%, 47/168). The 48 representative isolates were used for drug sensitivity test and sequence analysis. The isolates showed high drug resistance to gentamicin, kanamycin and ciprofloxacin hydrochloride, and the drug resistance rates were all more than 80%. The drug resistance rates to oxytetracycline, tetracycline hydrochloride, chlortetracycline hydrochloride, ofloxacin, norfloxacin, sulfadimidine and sulfamethoxydiazine were all more than 60%, and the drug resistance rates to amoxicillin, cefotaxime and spectinomycin were all less than 30%. The 48 representative isolates were resistant to 5–12 kinds of drugs, and there were 44 types of drug resistance spectrum. The whole genome sequences of 46 isolates were obtained successfully, and six drug-resistant genes were detected. The detection rates of drug-resistant genes *erm*(F) and *tet*(X) were 73.91% (34/46) and 82.60% (38/46), respectively. In addition, 95.65% (44/46) of the isolates carried more than two drug-resistant genes at the same time. Total 18 isolates (39.13%, 18/46) were typed successfully with 11 kinds of ST. Further genetic tree construction based on the core genome showed that all the sequenced isolates had a high similarity with the isolates from China in the multi-locus sequence typing (MLST) database, and mainly existed in the dominant clones of Clade 1 and Clade 3. 【Conclusion】 Serotype 1 is superior in the investigated *R. anatipestifer* isolates, and the drug resistance is serious. The drug-resistant genes and resistant phenotype have certain relevance. ST type has a high diversity. The genetic background of tested strains was similar with Chinese strains in MLST database. The results of this study can provide a basis for vaccine immunity prevention and drug therapy of *R. anatipestife* disease as well as for understanding the genetic evolution characteristics of *R. anatipestife*.

Key words: *Riemerella anatipestife*; Serotype; Drug resistance; Genetic evolution; Epidemiology

中国是世界上水禽养殖第一大国,肉鸭产量占世界总产量的 70% 左右,养殖量平均每年以 8%~10% 的速度增加。目前水禽养殖业已经成为我国解决“三农”问题的支柱产业,也是现代畜牧业的重要组成部分。虽然水禽业发展迅速,但也存在诸多制约因素,尤其是疫病多发、频发严重阻碍水禽业的健康发展。其中,由鸭疫里默氏杆菌 *Riemerella anatipestifer* 引起的鸭疫里默氏杆菌病已经成为影响水禽业经济最严重的细菌性传染病,发病率可达 100%,死亡率高于 75%,耐过的病鸭生长发育受阻,成为僵鸭,造成巨大的经济损失^[1]。一直以来主要采用疫苗免疫与药物治疗相结合的方式防控该病,但是防控的效果并不理想。一方面,鸭疫里默氏杆菌有 21 个血清型且各血清型间缺乏交叉保护性,而目前市售的灭活疫苗尚未涵盖所有流行的血清型,当出现疫苗株血清型以外的鸭疫里默氏杆菌感染时,

现有的灭活疫苗不能起到保护作用,导致疫苗应用受限;另一方面,虽然鸭疫里默氏杆菌对大多数抗生素或化学合成药物较敏感,但是由于长期连续使用或不规范使用药物导致耐药性普遍存在^[2],并且已经成为当前养殖业面临的最严峻问题。因此,本研究拟对广东地区鸭疫里默氏杆菌分离株进行血清型和耐药性调查及遗传进化关系研究,为开展针对性疫苗免疫预防及选用敏感药物治疗提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料样本 病料于 2015—2019 年采自广东省清远、惠州、佛山等地区鸭场,采集疑似患鸭疫里默氏杆菌病病死鸭的脑、肝脏、心脏等组织,病料样本及分离鸭疫里默氏杆菌信息见表 1,相同养殖场采集的样本分离的鸭疫里默氏杆菌记为 1 株。

表 1 采集样本与分离鸭疫里默氏杆菌信息

Table 1 Collected samples and isolation information of *Riemerella anatipestifer*

地区 District	采集时间 Acquisition time	养殖场数 Farm number	样本数 Sample number	分离株数 Isolate number	代表性株数 Representative isolate number
韶关 Shaoguan	2015-05—2019-04	19	69	15	5
河源 Heyuan	2015-07—2019-11	16	56	13	5
云浮 Yunfu	2015-09—2019-12	30	112	25	4
肇庆 Zhaoqing	2015-04—2019-10	17	63	12	4
清远 Qingyuan	2015-03—2019-12	23	91	19	5
佛山 Foshan	2015-05—2019-12	15	57	12	5
茂名 Maoming	2015-04—2019-11	20	80	16	5
惠州 Huizhou	2015-05—2019-11	23	80	17	5
汕头 Shantou	2015-03—2019-12	25	91	21	5
湛江 Zhanjiang	2015-05—2019-12	22	82	18	5
总计 Total	2015—2019	210	781	168	48

1.1.2 试剂与药品 改良胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 培养基, 含 5%(φ) 新生牛血清; 胰酶大豆琼脂 (TSA) 培养基, 含 5%(φ) 新生牛血清; 麦康凯培养基按细菌学常规方法配制; 革兰染色试剂和微量生化发酵管为广东环凯微生物科技有限公司产品; DNA marker DL 2000 和 Premix Taq 为 TaKaRa 公司产品; 药物标准品——氧氟沙星 (Ofloxacin, OFX)、诺氟沙星 (Norfloxacin, NOR)、盐酸四环素 (Tetracycline hydrochloride, TCY)、头孢噻肟 (Cefotaxime, CTX)、阿莫西林 (Amoxicillin, AMX)、土霉素 (Oxytetracycline, OXY)、盐酸金霉素 (Chlortetracycline hydrochloride, CTE)、氨苄西林 (Ampicillin, AMP)、庆大霉素 (Gentamicin, GEN)、盐酸环丙沙星 (Ciprofloxacin hydrochloride, CIP)、卡那霉素 (Kanamycin, KAN)、大观霉素 (Spectinomycin, STP)、磺胺嘧啶 (Sulfadiazine, SDI)、磺胺二甲嘧啶 (Sulfadimidine, SUL) 和磺胺对甲氧嘧啶 (Sulfametoxydiazine, SMD) 为中国兽医药品监察所产品。

1.1.3 试验动物 1 日龄商品代樱桃谷肉鸭, 大约 4 000 只, 购自广州郊区某鸭场, 未接种任何疫苗和抗血清, 饲养于洁净环境中, 至 7~14 日龄进行动物回归试验。

1.1.4 引物合成 引物参照文献 [3] 合成, 以 16S rRNA 为扩增基因。引物 (RA-F: 5'-ACGTCATCCCACC TTCCTC-3', RA-R: 5'-GTTTCAGACTAA GCGAAAG-3') 由 Invitrogen 公司合成。

1.1.5 参考菌株 血清 1 型鸭疫里默氏杆菌参考株由广东省农科院动物卫生研究所寄生生物学研

究室保存。

1.1.6 定型血清 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 型鸭疫里默氏杆菌参考株定型血清, 由广东省农科院动物卫生研究所寄生生物医学研究室自制。

1.1.7 质控菌 大肠埃希菌 ATCC25922 购自中国兽医药品监察所。

1.2 方法

1.2.1 病原分离与鉴定 病原分离: 将无菌采集的病死鸭的脑、肝脏、心脏组织, 划线接种于 TSA 培养基平板和麦康凯培养基平板, 于 37 ℃ 厌氧培养 24 h, 挑取单个可疑菌落进行纯化培养。

革兰染色: 挑取纯培养的单菌落进行革兰染色、镜检, 观察细菌的形态和染色特性。

生化试验: 将分离株的纯培养物接种于微量生化发酵管中, 于 37 ℃ 温箱中培养, 观察结果。

PCR 鉴定: 以分离株的菌液为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应总体积为 20 μ L: Premix Taq 10 μ L、上下游引物各 1 μ L、菌液 1 μ L、ddH₂O 7 μ L; 反应条件: 94 ℃ 预变性 5 min, 以 94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min 进行 30 个循环, 72 ℃ 延伸 7 min; 反应结束后, 将 PCR 产物以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 目的条带大小为 325 bp。

动物致病性试验: 将 168 株鸭疫里默氏杆菌分离株分别接种 7~14 日龄试验鸭, 每株接种 10 只试验鸭, 同时对照组设 10 只试验鸭, 连续观察 14 d; 接种组腿部肌肉注射鸭疫里默氏杆菌分离株活菌 1 $\times$ 10⁸ CFU/mL, 每只注射 1 mL, 对照组接种生理盐水, 每只注射 1 mL。隔离饲养, 观察致病力, 记录试验鸭发病及死亡情况; 同时根据试验鸭死亡和

发病情况在接种后 1~5 d 采集 3~4 只试验鸭的心脏和肝脏,分离鸭疫里默氏杆菌,并进行革兰染色、生化试验和 PCR 鉴定。

血清型鉴定:取洁净的载玻片分别滴加 30 μ L 参考株阳性血清,再滴加 30 μ L 分离株菌液,充分混匀,观察 1~2 min,以出现清晰凝集者判为阳性,否则判为阴性。

1.2.2 最低抑菌浓度的测定 从 168 株鸭疫里默氏杆菌分离株中选择 48 株作为代表性菌株,进行最低抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC) 测定。代表性菌株选择依据:所选菌株均来自不同的规模化鸭场,每个鸭场养殖时间均在 5 年以上,每批肉鸭养殖规模均在 20 000 只以上,从韶关、河源、清远、佛山、茂名、惠州、汕头、湛江的规模化鸭场随机各选 5 株,从云浮和肇庆的规模化鸭场随机各选 4 株,总计 48 株。

抗菌药物贮存液的制备:将药物制成 2 560 mg/L 的原液,抗菌药物贮存液按照梯度稀释。

抗菌药物浓度范围:根据抗菌药物敏感性试验操作标准,药物浓度范围应包含耐药、中介和敏感分界点值,特殊情况除外。

接种物的制备:采用直接菌落悬液配制法,将培养 18~24 h 的鸭疫里默氏杆菌菌落调配成 0.5 麦氏比浊标准的悬液,再以 TSB 培养基按体积比 1:100 稀释后备用;在 15 min 内接种完配制好的接种物,并取 1 份接种物在 TSA 平板上培养,以检查接种物的纯度。

抗菌药物稀释及菌液接种:以改良的试管两倍稀释法^[4]测定鸭疫里默氏杆菌分离株的 MIC,取 14 支灭菌试管为一排,除第 1 管加入 1.6 mL TSB 培养基外,其余每支试管均加入 1 mL TSB 培养基,于第 1 管中添加 0.4 mL 待测药物原液并混匀,吸取 1 mL 加入第 2 管,混匀后再吸取 1 mL 至第 3 管,如此连续倍比稀释至第 12 管,混匀后吸取 1 mL 弃掉,第 13 管为不加药物的阳性对照,第 14 管为不加药物和菌液、只加生理盐水的阴性对照;向第 1~13 管中各加入 1 mL 稀释菌液,此时第 1~12 管药物终质量浓度分别为 256、128、64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125 mg/L。

培养:将接种后的试管置于 37 $^{\circ}$ C 温箱中培养 22~24 h。

结果判断:在阳性对照和阴性对照成立且质控菌株的 MIC 处于质控范围的情况下,肉眼可见澄清的最低药物浓度管即为测试菌株的 MIC。

药物敏感性判定:根据标准 [4~5] 判断药物耐

药、敏感和中介。

1.2.3 全基因组序列特征分析与核心基因组进化树的构建 基因组 DNA 文库的构建与序列测定:使用天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒,按照操作说明,提取鸭疫里默氏杆菌分离株的基因组 DNA;通过浓度测定和琼脂糖凝胶电泳,初步质检合格后,构建 Illumina(250 bp)文库,利用 Illumina Novaseq 6000 平台进行测序,下机数据经质控和去除接头后运用 SPAdes v3.6.2 对原始数据进行拼接^[6],拼接后的数据使用 Quast 软件进行质控^[7]。

序列特征分析。耐药基因分析:将拼接好的测序结果上传至 CGE 的 ResFinder4.1 数据库^[8]以分析菌株所携带的耐药基因 (ARGs)(<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>); ST 分型:将拼接好的测序结果上传至多位点序列分型 (Multi-locus sequence typing, MLST) 数据库以分析菌株所属的 ST 型 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>)。

构建核心基因组进化树:从 NCBI Genome 下载数据库中全部共计 59 株鸭疫里默氏杆菌的全基因组序列,以标准菌株 ATCC 11845(NCBI 登录号:GCA_000252855.1)作为参考菌株,利用 Parsnp 软件比对全基因组序列并构建核心基因组进化树^[9],使用 hierBAPS 软件进行进化树分簇^[10],再利用 FigTree v1.4.2 和 iTOL v4 软件进行美化注释^[11]。

2 结果与分析

2.1 鸭疫里默氏杆菌分离与鉴定

分离株在 TSA 平板上长成光滑、湿润、半透明的奶油状菌落,在麦康凯平板上不生长;革兰染色呈阴性的单个或成双排列的短小杆菌;生化试验显示分离株均不发酵蔗糖、乳糖、木糖、葡萄糖、果糖、甘露糖、甘露醇、山梨醇,不产生硫化氢,不利用柠檬酸盐,甲基红试验、靛基质试验、硝酸盐还原试验阴性,氧化酶、过氧化物酶试验阳性;通过特异性 PCR 扩增,分离株均可扩增到约 300 bp 的条带,与目的条带大小一致 (图 1)。

2.2 动物回归试验

所有鸭疫里默氏杆菌分离株对试验鸭均有不同程度的致病力,发病率达 100%,致死率介于 70%~100%,其中 70.24%(118/168)的分离株的毒力较强,在接种后 48 h 内试验鸭全部死亡,剖检未见典型的鸭疫里默氏杆菌病理变化,其余分离株接种试验鸭后病程较长,剖检可见典型的鸭疫里默氏杆菌病理变化。所有试验鸭接种分离株后均表现

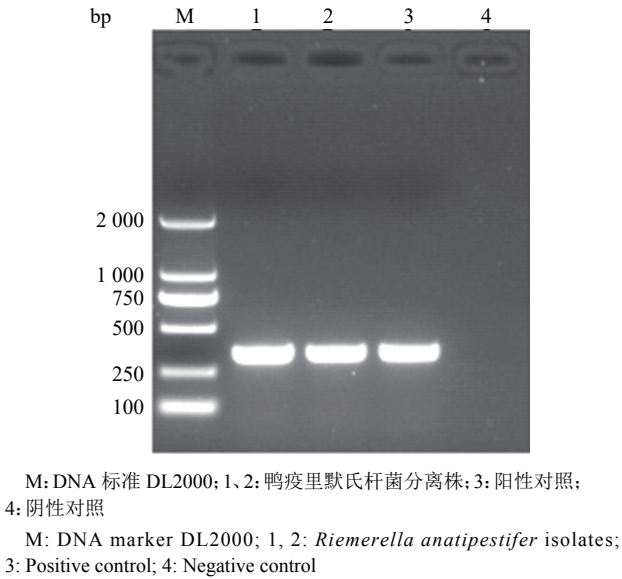


图 1 鸭疫里默氏杆菌分离株 PCR 鉴定结果

Fig. 1 PCR identification results of *Riemerella anatipestifer* isolates

表 2 各地区各血清型鸭疫里默氏杆菌分离株数量													
Table 2 Isolate number of each serotype for <i>Riemerella anatipestifer</i> isolates from different districts													
地区	分离株数	血清型 Serotype											
District	Isolate number	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	未定型 Undefined	
韶关 Shaoguan	15	7	2	2	0	0	1	0	1	0	0	2	
河源 Heyuan	13	7	4	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
云浮 Yunfu	25	15	8	0	0	1	0	0	0	0	0	1	
肇庆 Zhaoqing	12	6	3	1	0	0	0	0	1	0	1	0	
清远 Qingyuan	19	10	6	1	0	1	0	0	0	0	0	1	
佛山 Foshan	12	7	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
茂名 Maoming	16	8	5	1	0	0	0	0	1	0	1	0	
惠州 Huizhou	17	12	3	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
汕头 Shantou	21	12	7	0	0	0	0	0	0	0	2	0	
湛江 Zhanjiang	18	7	5	0	0	1	1	1	2	0	0	1	
总计 Total	168	91	47	6	0	3	2	3	5	0	6	5	

2.4 药物敏感性试验

药物对鸭疫里默氏杆菌代表性菌株的 MIC 测定结果及敏感性统计结果见表 3。根据 MIC 分析各药物抑制 50% 和 90% 鸭疫里默氏杆菌菌株生长的 MIC, 即 MIC₅₀ 和 MIC₉₀, MIC₅₀ 介于 0.25~>256 mg/L, 其中, 头孢噻肟最低, 仅 0.25 mg/L, 阿莫西林为 1 mg/L, 氨苄西林、土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素、氧氟沙星均为 8 mg/L, 盐酸环丙沙星为 16 mg/L, 诺氟沙星、大观霉素、庆大霉素分别为 32、64、128 mg/L, 磺胺嘧啶为 256 mg/L, 卡那霉素、磺胺二甲嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶均为>256 mg/L; MIC₉₀ 值介于 8~>256 mg/L, 其中, 头孢噻肟最低, 仅 8 mg/L; 土霉素和盐酸金霉

鸭疫里默氏杆菌临床症状, 主要表现精神沉郁, 采食、饮水减少或废绝, 排绿色或黄绿色粪便, 共济失调, 头颈震颤, 角弓反张及转圈运动等, 严重者导致死亡。从接种鸭疫里默氏杆菌分离株试验鸭的肝脏或心脏中均可分离到接种菌, 革兰染色均为阴性的短小杆菌, 生化试验结果符合鸭疫里默氏杆菌特性, PCR 鉴定结果与分离株初次分离鉴定结果一致。因此, 根据细菌分离鉴定结果和动物回归试验结果确定从广东地区的鸭场共分离到 168 株鸭疫里默氏杆菌菌株。

2.3 血清型鉴定

鸭疫里默氏杆菌分离株血清型鉴定结果见表 2, 血清 1、2、3、5、6、7、8、10 型和未定型均有流行, 其中高达 54.17%(91/168) 的分离株为 1 型, 其次为 2 型, 占 27.97%(47/168)。因此, 广东地区鸭疫里默氏杆菌分离株以 1 型为优势血清型。

素为 16 mg/L; 盐酸四环素、氧氟沙星、盐酸环丙沙星均为 32 mg/L; 诺氟沙星为 64 mg/L; 阿莫西林、氨苄西林、大观霉素均为 128 mg/L; 卡那霉素、庆大霉素、磺胺嘧啶、磺胺二甲嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶较高, 均为>256 mg/L。

分析鸭疫里默氏杆菌代表性菌株对受试药物的敏感性, 对庆大霉素的耐药率高达 91.67%(44/48); 对卡那霉素和盐酸环丙沙星的耐药率分别为 89.58%(43/48) 和 81.25%(39/48); 对土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素、氧氟沙星、诺氟沙星、磺胺二甲嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶的耐药率介于 60%~80%; 对磺胺嘧啶和氨苄西林的耐药率介于 30%~60%; 对阿莫西

表 3 48 株鸭疫里默氏杆菌代表性分离株最低抑菌浓度 (MIC) 测定结果¹⁾

药物类型 Drug type	药物 ¹⁾ Drug	MIC/ (mg·L ⁻¹)	MIC ₅₀ / (mg·L ⁻¹)	MIC ₉₀ / (mg·L ⁻¹)	占比/% Proportion		
					敏感 Sensitive	中介 Intermediate	耐药 Resistant
β-内酰胺类 β-lactams	AMX	<0.125~256	1	128	75.00(36/48)	6.25(3/48)	18.75(9/48)
	AMP	<0.125~256	8	128	64.58(31/48)	—	35.42(17/48)
	CTX	<0.125~256	0.25	8	91.67(44/48)	4.17(2/48)	4.17(2/48)
四环素类 Tetracyclines	OXY	<0.125~128	8	16	20.83(10/48)	14.58(7/48)	64.58(31/48)
	TCY	<0.125~128	8	32	18.75(9/48)	10.42(5/48)	70.83(34/48)
	CTE	<0.125~32	8	16	18.75(9/48)	20.83(10/48)	60.42(29/48)
氨基糖苷类 Aminoglycosides	GEN	0.25~>256	128	>256	8.33(4/48)	—	91.67(44/48)
	KAN	2~>256	>256	>256	8.33(4/48)	2.08(1/48)	89.58(43/48)
	STP	16~256	64	128	45.83(22/48)	25.00(12/48)	29.17(14/48)
喹诺酮类 Quinolones	OFX	0.5~64	8	32	20.83(10/48)	6.25(3/48)	72.92(35/48)
	NOR	0.25~128	32	64	14.58(7/48)	16.67(8/48)	68.75(33/48)
	CIP	0.5~64	16	32	14.58(7/48)	4.17(2/48)	81.25(39/48)
磺胺类 Sulfonamides	SDI	64~>256	256	>256	52.08(25/48)	—	47.92(23/48)
	SUL	32~>256	>256	>256	39.58(19/48)	—	60.42(29/48)
	SMD	128~>256	>256	>256	33.33(16/48)	—	66.67(32/48)

1)AMX: 阿莫西林, AMP: 氨苄西林, CTX: 头孢噻肟, OXY: 土霉素, TCY: 盐酸四环素, CTE: 盐酸金霉素, GEN: 庆大霉素, KAN: 卡那霉素, STP: 大观霉素, OFX: 氧氟沙星, NOR: 诺氟沙星, CIP: 盐酸环丙沙星, SDI: 磺胺嘧啶, SUL: 磺胺二甲嘧啶, SMD: 磺胺对甲氧嘧啶; MIC₅₀和MIC₉₀为能抑制50%和90%细菌生长所需的MIC; “—”表示未检测出菌株

1) AMX: Amoxicillin, AMP: Ampicillin, CTX: Cefotaxime, OXY: Oxytetracycline, TCY: Tetracycline hydrochloride, CTE: Chlortetracycline hydrochloride, GEN: Gentamicin, KAN: Kanamycin, STP: Spectinomycin, OFX: Ofloxacin, NOR: Norfloxacin, CIP: Ciprofloxacin hydrochloride, SDI: Sulfadiazine, SUL: Sulfadimidine, SMD: Sulfametoxydiazine; MIC₅₀ and MIC₉₀ are MIC values that can inhibit 50% and 90% bacteria growth; “—” indicates no detectable isolate

林、头孢噻肟和大观霉素的耐药水平较低 (30% 以下)。

根据药敏试验结果, 分析鸭疫里默氏杆菌代表性菌株的多重耐药性, 结果如图 2 所示。48 株鸭疫

里默氏杆菌对 5~12 种药物耐药, 其中 9 耐和 10 耐的菌株总数最多, 占 54.17%(26/48), 6 耐和 11 耐、7 耐与 8 耐的菌株数相同, 分别为 4 株和 5 株, 而 5 耐和 12 耐菌株数最少, 各有 2 株。

统计并分析鸭疫里默氏杆菌分离株的耐药谱, 48 株鸭疫里默氏杆菌具有 44 种耐药谱型, 其中 40 株为单一谱型, 构成比为 2.08%(1/48), 其余 4 种耐药谱型分别为 2 株所共有, 构成比为 4.16%(2/48) (表 4)。

2.5 全基因组测序分析

由北京诺禾致源科技股份有限公司对 48 株鸭疫里默氏杆菌代表性菌株进行全基因组测序, 经过 Quast 软件质检后, 其中 2 株拼接质量不高, 故仅有 46 株进行后续分析。共检出 6 种耐药基因, 其中携带四环素类耐药基因 *tet(X)* 的菌株最多, 阳性率高达 82.60%(38/46); 大环内酯类耐药基因 *erm(F)* 阳性率为 73.91%(34/46), 而大环内酯类另一耐药基因 *ere(D)* 的阳性率仅有 19.57%(9/46); β-内酰胺类

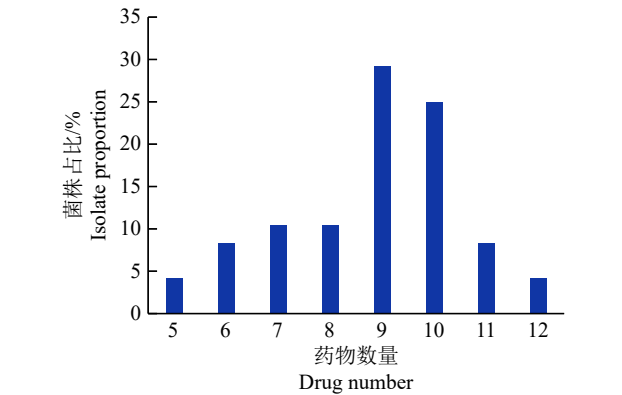


图 2 48 株鸭疫里默氏杆菌代表性分离株多重耐药性分布
Fig. 2 Results of multi-drug resistance of 48 Riemerella anatipestifer representative isolates

表 4 48 株鸭疫里默氏杆菌代表性分离株耐药谱统计结果

Table 4 Drug resistance spectrum of 48 representative isolates of *Riemerella anatipestifer*

药物数量	耐药谱 ¹⁾	菌株数	占比/%
Drug number	Resistant spectrum	Isolate number	Proportion
5	OFX-NOR-OXY-GEN-KAN	1	2.08
	OFX-CTE-GEN-CIP-KAN	1	2.08
6	OFX-NOR-TCY-GEN-CIP-KAN	1	2.08
	OFX-NOR-GEN-CIP-KAN-SMD	1	2.08
	NOR-GEN-CIP-KAN-SUL-SMD	1	2.08
	CIP-KAN-STP-SUL-SMD-SDI	1	2.08
7	OXY-TCY-CTE-GEN-KAN-SUL-NOR	1	2.08
	OXY-GEN-KAN-SDI-SUL-SMD-CIP	1	2.08
	OXY-TCY-CTE-GEN-KAN-OFX-CIP	1	2.08
	OXY-TCY-CTE-GEN-KAN-NOR-CIP	2	4.16
8	OFX-NOR-TCY-CTE-GEN-CIP-SUL-SMD	1	2.08
	NOR-TCY-CTE-GEN-CIP-KAN-SDI-SMD	1	2.08
	CIP-GEN-SDI-SUL-SMD-NOR-TCY-AMP	1	2.08
	AMX-AMP-OXY-TCY-CTE-GEN-KAN-OFX	1	2.08
	AMP-STP-SDI-SUL-SMD-GEN-KAN-OXY	1	2.08
9	OFX-NOR-TCY-OXY-CTE-GEN-CIP-KAN-SUL	2	4.16
	OFX-NOR-TCY-CIP-KAN-SDI-SUL-SMD-GEN	1	2.08
	OFX-NOR-AMX-CTE-GEN-CIP-KAN-SUL-SMD	1	2.08
	OXY-TCY-GEN-KAN-OFX-NOR-CIP-SDI-SUL	2	4.16
	TCY-GEN-CIP-KAN-SDI-SMD-CTE-OFX-SUL	1	2.08
	OXY-AMP-GEN-KAN-STP-SDI-SUL-SMD-NOR	1	2.08
	OFX-NOR-OXY-GEN-CIP-KAN-SUL-SMD-SMD	1	2.08
	OFX-TCY-OXY-GEN-KAN-STP-SDI-SUL-SMD	1	2.08
	AMP-CTX-SDI-GEN-SMD-OFX-STP-KAN-CIP	1	2.08
	AMX-AMP-OXY-TCY-STP-KAN-OFX-SDI-GEN	1	2.08
	SMD-ERY-OFX-SDI-CIP-AMX-AMP-CTE-TCY	1	2.08
	NOR-TCY-OXY-CTE-GEN-CIP-KAN-SUL-AMP	1	2.08
10	NOR-TCY-OXY-CTE-GEN-CIP-KAN-STP -SMD-SDI	1	2.08
	AMP-OXY-TCY-CTE-GEN-KAN-OFX-NOR-CIP-SMD	1	2.08
	OFX-NOR-TCY-CTE-GEN-CIP-KAN-SDI-SMD-SUL	1	2.08
	OFX-NOR-TCY-OXY-CTE-GEN-CIP-KAN-SMD-SDI	1	2.08
	OFX-NOR-AMX-AMP-GEN-CIP-KAN-SUL-SMD-CTE	1	2.08
	OFX-NOR-TCY-AMX-OXY-CTE-GEN-CIP-KAN-SDI	1	2.08
	OFX-NOR-TCY-OXY-CTE-GEN-CIP-KAN-SUL-SMD	1	2.08
	TCY-AMP-GEN-CIP-KAN-STP-SDI-SUL-SMD-KAN	1	2.08
	AMX-AMP-OXY-TCY-CTE-GEN-KAN-OFX-SDI-SUL	1	2.08
	OFX-NOR-OXY-CTE-AMP-GEN-CIP-KAN-SUL-SMD	1	2.08
	OFX-NOR-AMX-AMP-GEN-CIP-KAN-SDI-SMD-STP	1	2.08
	TCY-OXY-GEN-KAN-STP-SDI-SUL-SMD-CTX-AMP	1	2.08
11	OFX-NOR-TCY-CTE-OXY-GEN-CIP-KAN-STP-SDI-SMD	2	4.16
	OFX-NOR-TCY-OXY-CTE-AMP-GEN-CIP-KAN-STP-SUL	1	2.08
	OFX-NOR-TCY-OXY-CTE-AMP-GEN-CIP-KAN-STP-SMD	1	2.08
12	AMX-OXY-TCY-CTE-STP-KAN-OFX-NOR-SUL-SMD-SMD-CIP	1	2.08
	OFX-NOR-TCY-OXY-AMP-GEN-CIP-STP-SUL-SMD-SDI-CTE	1	2.08

1) AMX: 阿莫西林, AMP: 氨苄西林, CTX: 头孢噻肟, OXY: 土霉素, TCY: 盐酸四环素, CTE: 盐酸金霉素, GEN: 庆大霉素, KAN: 卡那霉素, STP: 大观霉素, OFX: 氧氟沙星, NOR: 诺氟沙星, CIP: 盐酸环丙沙星, SDI: 磺胺嘧啶, SUL: 磺胺二甲嘧啶, SMD: 磺胺对甲氧嘧啶

1) AMX: Amoxicillin, AMP: Ampicillin, CTX: Cefotaxime, OXY: Oxytetracycline, TCY: Tetracycline hydrochloride, CTE: Chlortetracycline hydrochloride, GEN: Gentamicin, KAN: Kanamycin, STP: Spectinomycin, OFX: Ofloxacin, NOR: Norfloxacin, CIP: Ciprofloxacin hydrochloride, SDI: Sulfadiazine, SUL: Sulfadimidine, SMD: Sulfametoxydiazine

耐药基因 *bla*_{OXA-209} 的阳性率为 54.35%(25/46); 氨基糖苷类耐药基因 *aadS* 和 氟苯尼考耐药基因 *floR* 的阳性率相对较低, 分别为 34.78%(16/46) 和 30.43%(14/46)。耐药基因结果见表 5。

表 5 46 株鸭疫里默氏杆菌代表性分离株耐药基因携带情况
Table 5 The resistance genes carried by 46 *Riemerella anatipestifer* representative isolates

药物 Drug	耐药基因 Resistant gene	阳性率/% Positive rate
大环内酯类 Macrolides	<i>erm</i> (F)	73.91(34/46)
四环素类 Tetracyclines	<i>ere</i> (D)	19.57(9/46)
氟苯尼考 Florfenicol	<i>tet</i> (X)	82.60(38/46)
氨基糖苷类 Aminoglycosides	<i>floR</i>	30.43(14/46)
β -内酰胺类 β -lactams	<i>aadS</i>	34.78(16/46)
	<i>bla</i> _{OXA-209}	54.35(25/46)

基于获得的 46 株鸭疫里默氏杆菌全基因组序列, 进一步分析其 MLST, 其中 18 株 ST 分型成功, 分别为 ST38(4 株)、ST13(2 株)、ST24(2 株)、ST35(2 株)、ST44(2 株), 其他 ST 型分别为 ST2、ST16、ST21、ST34、ST42 和 ST43, 均只有 1 株, 其余 28 株为未知 ST 型; 说明本研究测序菌株的 ST 型呈多样性, 未出现优势 ST 型。

将本研究 46 株鸭疫里默氏杆菌菌株的全基因组测序结果与数据库中 59 株鸭疫里默氏杆菌菌株的全基因组数据进行比对, 构建核心基因组进化树(图 3), 数据库 59 株鸭疫里默氏杆菌菌株中, 39 株来源于中国, 9 株来源于英国, 2 株来源于印度, 德国、俄罗斯和美国各有 1 株, 另有 6 株未标注来源。总计 105 株鸭疫里默氏杆菌菌株分布在 6 个

分簇群系中, 本研究所有测序菌株与数据库中来自中国的菌株相似度较高, 且集中分布在 3 个簇群中, 其中 Clade 1 群系最大, 包含 67 株, 我国菌株占 50.75%(34/67), 其次为 Clade 3 群系, 包含 17 株, 我国菌株占 47.06%(8/17), Clade 2 群系包含 5 株鸭疫里默氏杆菌, 我国菌株数占 60.00%(3/5)。数据库中大部分鸭疫里默氏杆菌菌株来自于中国, 而欧洲来源的菌株占比较低, 并且观察到来自世界各地的鸭疫里默氏杆菌菌株间存在地理分布差异。另外, 数据库中我国菌株从 1990 年到 2017 年间均有收集, 持续时间接近 30 年, 时间跨度较大, 但仍能与本研究测序菌株在进化树中聚集在一起, 说明在我国鸭疫里默氏杆菌存在区域内长时间持续传播的特点。

3 讨论与结论

3.1 讨论

鸭疫里默氏杆菌病血清型复杂, 在世界范围内流行, 目前在国内多个地区均有鸭疫里默氏杆菌血清型流行情况的报道, 广西百色分离株血清型比较单一, 全部为 1 型^[12]; 山东分离株至少存在 1、2、6、10 和 11 型 5 种血清型, 其中以 1 型和 2 型为优势血清型^[13-14]; 超过半数的江苏分离株为 1 型^[15]; 安徽分离株则多达 7 种血清型, 但以 1 型和 2 型发生最广泛^[16]; 河南分离株以 1 型和 2 型多发, 此外还流行 10 型和未定型^[17]; 血清 1、2、3、4、8、10、15 型在广东地区均有流行, 以 1 型最多发^[18-20]。与国内情况类似, 国外也流行多种血清型, 美国以 1 型为主, 此外还流行 1、2、5、11、13、15、19、21 型^[21]; 1 型和 2 型为英国多发血清型, 同时 5、9、13 和 15 型也有流行^[22]; 泰国主要流行 1、5、6、7、10 和 21 型^[23]; 新加坡以 1、5 和 10 型这 3 种血清型为主^[24]; 1 型和 3 型为丹麦的优势血清型^[25]; 韩国只有 1、4 和 7 型这 3 种血清型^[26]; 澳大利亚则流行 1、6、8、9、13 和 14 型^[27]。本研究高达 54.17% 的分离株为血清 1 型, 也是优势血清型。分析国内外鸭疫里默氏杆菌血清型流行情况发现多血清型流行已呈基本态势, 其中 1 型为最普遍发生的血清型, 也是重点防控的血清型。

在养殖过程中, 由于长期应用抗菌药物治疗鸭疫里默氏杆菌病, 导致广泛而严重的耐药性。调查显示山东分离株对氨基糖苷类药物高度耐药, 并且具有多重耐药性^[28]; 安徽分离株对恩诺沙星、新霉素、安普霉素表现不同程度的耐药性^[29]; 贵州分离株则对氨基糖苷类和大环内酯类等药物表现高度耐药, 多重耐药高达 17 耐^[30]; 同样, 广东地区分离株

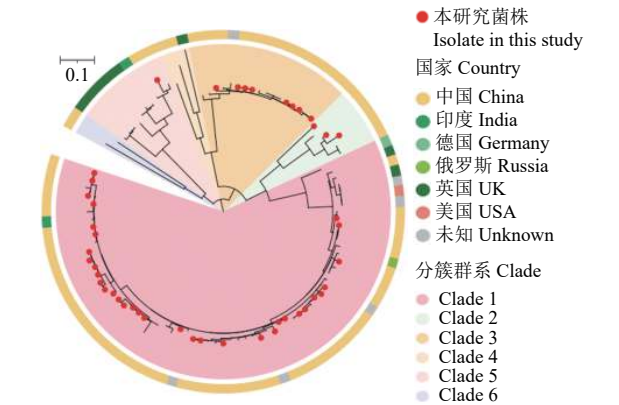


图 3 105 株鸭疫里默氏杆菌菌株核心基因组系统进化树
Fig. 3 Phylogenetic tree of core genomes for 105 isolates of *Riemerella anatipestifer*

耐药状况也比较严峻, 朱元军等^[31]报道分离株对丁胺卡那、卡那霉素、庆大霉素和链霉素高度耐药, 多数分离株表现七重以上耐药。另外, 耐药性还具有随药物使用时间延长进一步加剧的现象, 从同一地区采集的分离株对红霉素和多黏菌素 B 的耐药率呈逐年升高的趋势^[32-33]。本研究采样养殖场经常采用庆大霉素、卡那霉素、磺胺嘧啶、头孢类药物、喹诺酮类药物、环丙沙星、恩诺沙星、四环素、土霉素、多黏菌素 B、林可霉素等药物进行治疗, 从养殖场样本中分离的鸭疫里默氏杆菌对头孢噻肟、阿莫西林、大观霉素的耐药率低于 30%, 对土霉素、盐酸四环素、盐酸金霉素、庆大霉素、卡那霉素等药物均表现高度耐药。因此, 总体上养殖场用药与耐药表型具有一定的对应性, 在临床选择药物时, 最好先进行药敏试验, 选用抗菌效果较好的药物, 同时也要结合本养殖场的用药史合理用药。

通过分析本研究测序菌株耐药表型与耐药基因的相关性, 发现携带 *tet(X)* 基因的菌株对四环素类药物全部表现耐药, 因此, *tet(X)* 基因是介导四环素耐药的最重要基因^[34]; 氨基糖苷类耐药率高于耐药基因 *aadS* 的携带率, 说明除耐药基因外还存在其他因素导致氨基糖苷类耐药, 这一结果与蔡秀磊^[35]研究结论一致, 即氨基糖苷类耐药还与基因盒-整合子系统有关; *bla*_{OXA-209} 的阳性率与耐药率基本一致。由于本研究未对大环内酯类和氟苯尼考进行药物敏感性测试, 因此, 尚不清楚这 2 类药物耐药基因携带率与耐药表型的相关性。总体上, 耐药表型与耐药基因具有一定的相关性, 但是也要明确鸭疫里默氏杆菌分离株产生耐药性的原因比较复杂, 除与耐药基因有关外, 还与环境、药物等诸多因素有关。

通过系统进化树发现, 来自世界各地的鸭疫里默氏杆菌菌株间存在地理分布差异, 本研究的测序菌株主要分布在 Clade 1 簇群, 且血清型全部为 1 型, 由于数据库中其他菌株没有相关血清型信息, 因此, 具体血清型不明确, 但可以推测, 该簇群的分离株与血清 1 型密切相关。

鉴于本研究鸭疫里默氏杆菌血清型复杂及耐药性严重的现状, 应首先针对当地或本养殖场主要流行的血清型选取相应的灭活疫苗进行免疫, 当出现疫苗株以外的血清型感染时, 则以当地或本养殖场的分离株制备灭活疫苗, 同时选择敏感药物并合理用药辅助治疗, 可以达到更有效的防治效果。

3.2 结论

本研究在对广东地区鸭疫里默氏杆菌分离株的血清型和耐药性初步了解的基础上, 又结合全基

因组测序数据对耐药基因、ST 分型、遗传进化树做进一步分析, 发现分离株的优势血清型为 1 型, 耐药性严重, 所携带的耐药基因与耐药表型具有一定的相关性, ST 型呈多样性, 与 MLST 数据库中来自我国的菌株遗传背景相近, 研究结果为鸭疫里默氏杆菌疫苗免疫预防与药物治疗及掌握鸭疫里默氏杆菌遗传进化特征提供了依据。

参考文献:

[1] 罗满林. 动物传染病学[M]. 北京: 中国林业出版社, 2016: 413-416.

[2] HUANG L, WANG M S, MO T, et al. Role of LptD in resistance to glutaraldehyde and pathogenicity in *Riemerella anatipestifer*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1443. doi: 10.3389/fmicb.2019.01443.

[3] 覃宗华, 蔡建平, 吕敏娜, 等. 鸭疫里氏杆菌病和大肠杆菌病鉴别诊断双重 PCR 方法的建立和应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(4): 517-521.

[4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-eighth informational supplement: M100-S28[S]. Wayne, 2018.

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: Second informational supplement: VET01-S2[S]. Wayne, 2013.

[6] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, et al. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing[J]. *Journal of Computational Biology*, 2012, 19(5): 455-477.

[7] GUREVICH A, SABELIEV V, VYAHHI N, et al. QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies[J]. *Bioinformatics*, 2013, 29(8): 1072-1075.

[8] BORTOLAIA V, KAAS R S, RUPPE E, et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2020, 75(12): 3491-3500.

[9] TREANGEN T J, ONDOV B D, KOREN S, et al. The harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes[J]. *Genome Biology*, 2014, 15(11): 524. doi: 10.1186/s13059-014-0524-x.

[10] CORANDER J, MARTTINEN P, SIRÉN J, et al. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations[J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9: 539-553. doi: 10.1186/1471-2105-9-539.

[11] LETUNIC I, BORK P. Interactive tree of life (iTOL) v3: An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W242-W245.

[12] 言天久. 百色市鸭疫里默氏杆菌病流行病学调查与防治的研究[D]. 南宁: 广西大学, 2007.

[13] 林树乾, 何元龙, 赵增成, 等. 山东省鸭疫里默氏杆菌的

分离鉴定和血清型分析[J]. [山东农业科学](#), 2010(12): 92-94.

[14] 李振清. 山东地区鸭疫里氏杆菌的分离鉴定[J]. [畜牧与兽医](#), 2012, 44(6): 59-62.

[15] 王卓昊, 胡紫萌, 吴坤, 等. 苏北及周边地区鸭疫里氏杆菌分离鉴定与药敏试验[J]. [畜牧与兽医](#), 2019, 51(12): 70-75.

[16] 程冰花, 郝东敏, 钟洪义, 等. 安徽地区鸭疫里默氏杆菌的分离鉴定及药物筛选[J]. [当代畜牧](#), 2019(7): 12-15.

[17] 左春生, 李迎晓, 徐光科, 等. 14 株鸭疫里默氏杆菌的部分生物学特性分析[J]. [江苏农业科学](#), 2020, 48(15): 221-225.

[18] 吴彩艳, 覃宗华, 袁建丰, 等. 广东地区鸭疫里氏杆菌的血清型及抗性情况调查[J]. [畜牧与兽医](#), 2009, 41(5): 22-25.

[19] 张济培, 张小峰, 陈建红, 等. 珠三角及邻地鸭疫里默氏杆菌主要生物学特性的研究[J]. [中国预防兽医学报](#), 2012, 34(2): 100-103.

[20] 任晓梅, 王小兰, 韩文龙, 等. 鸭疫里默氏杆菌的分离鉴定与生物学特性研究[J]. [中国动物传染病学报](#), 2018, 26(4): 47-51.

[21] SANDHU T, HARRY E G. Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolated from commercial White Pekin ducks in the United States[J]. [Avian Diseases](#), 1981, 25(2): 497-502.

[22] TIMMS L M, MARSHALL T A. Laboratory assessment of protection given by experimental *Pasteurella anatipestifer* vaccine[J]. [British Veterinary Journal](#), 1989, 145(5): 483-493.

[23] PATHANASOPHON P, SAWADA T, TANTICHAR-OENYOS T. New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand[J]. [Avian Pathology](#), 1995, 24(1): 195-199.

[24] LOH H, TEO T P, TAN H C. Serotypes of ‘*Pasteurella*’ *anatipestifer* isolates from ducks in Singapore: A proposal of new serotypes[J]. [Avian Pathology](#), 1992, 21(3): 453-459.

[25] BISGAARD M. Antigenic studies on *pasteurella anatipestifer*, species incertae sedis, using slide and tube agglutination[J]. [Avian Pathology](#), 1982, 11(3): 341-350.

[26] CHA S, SEO H, WEI B, et al. Surveillance and characterization of *Riemerella anatipestifer* from wild birds in south Korea[J]. [Journal of Wildlife Diseases](#), 2015, 51(2): 341-347.

[27] OMALEKI L, BLACKALL P J, BISGAARD M, et al. Molecular and serological characterization of *Riemerella* isolates associated with poultry in Australia[J]. [Avian Pathology](#), 2021, 50(1): 31-40.

[28] 马芹, 宋甲宝, 王方正, 等. 鸭源致病菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. [中国兽医杂志](#), 2016, 52(10): 80-81.

[29] 荆雅玮, 陈芳芳, 左佳坤, 等. 8 株鸭疫里默氏杆菌安徽分离株的生物学特性分析[J]. [中国动物传染病学报](#), 2018, 26(2): 34-39.

[30] 包涛涛, 鲜思美, 包细明, 等. 六株鸭疫里默氏杆菌贵州株的分离鉴定与其耐药性分析[J]. [中国兽医科学](#), 2020, 50(10): 1278-1285.

[31] 朱元军, 王小莺, 杨德鸿, 等. 我国南方部分地区鸭疫里氏杆菌的分离鉴定及耐药情况调查[J]. [畜牧与兽医](#), 2019, 51(12): 106-111.

[32] 刑林林. 鸭疫里默氏杆菌红霉素耐药机制的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2015.

[33] 常陈星, 刘美含, 杨跃飞, 等. 鸭疫里默氏杆菌氨基糖苷类药物的耐药性分析[J]. [黑龙江畜牧兽医](#), 2020(13): 101-103.

[34] 仲崇岳. 鸭疫里默氏杆菌基因分型及耐药机理研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2009.

[35] 蔡秀磊. 鸭疫里默氏杆菌耐药性与耐药基因研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.

【责任编辑 李庆玲】