



巴斯德杆菌属 CODEHOP PCR 检测方法的 建立与初步应用

邢进¹, 冯育芳¹, 岳秉飞¹, 贺争鸣^{1*}, 孙晓梅², 代解杰²

(1. 中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 100050; 2. 中国医学科学院/北京协和医学院医学
生物研究所树鼩种质资源中心, 昆明 650118)

【摘要】 目的 建立巴斯德杆菌的 CODEHOP PCR 快速检测方法, 为实验动物的呼吸道细菌的控制提供参考。方法 应用 CODEHOP 在线简并引物设计工具, 比对 Genbank 中 13 株巴斯德杆菌的 RNA 聚合酶 β 亚基 (*rpoB*) 氨基酸序列设计简并引物。对建立 CODEHOP PCR 方法用 21 株参考菌株进行特异性和敏感性评价, 并应用于实验动物中的巴斯德杆菌检测。结果 简并引物 PastF6/PastR5 扩增标准菌株的目的片段为 200 bp 左右。能够区分受试的巴斯德杆菌和主要的实验动物呼吸道病原菌。敏感性为 0.2 pg/ μ L ~ 2 pg/ μ L。在受试的 609 只实验动物中呼吸道样品中检测出巴斯德杆菌阳性率为 19.1%。样品阳性片段经测序验证, 准确率为 100%。结论 所建立的方法具有良好的特异性和敏感性, 可用于动物样品中巴斯德杆菌的检测。

【关键词】 巴斯德杆菌; 共有序列简并杂合寡核苷酸引物; PCR 检测; 实验动物

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0085-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.017

Establishment and application of CODEHOP PCR assay for detection of *Pasteurella* spp. in laboratory animals

XING Jin¹, FENG Yu-fang¹, YUE Bing-fei¹, HE Zheng-ming^{1*}, SUN Xiao-mei², DAI Jie-jie²

(1. National Institute of Food and Drug Control, Institute of Laboratory Animal Resources, Beijing 100050, China;
2. Center of Tree Shrews Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, CAMS and PUMC, Kunming 650118, China)

【Abstract】 **Objective** We established a rapid detection method of *Pasteurella* spp. and provided a reference for microbiological quality control of laboratory animal. **Methods** According to the β subunit of bacterial RNA polymerase (*rpoB*) protein multiple alignments of 13 different *Pasteurella* spp. published in NCBI. The degenerate primers were designed by CODEHOP designer online. CODEHOP PCR method was applied to detecting *Pasteurella* spp. after the specificity and sensitivity of the method had been evaluated by 21 reference strains. **Results** Standard strain amplified fragment were about 200 bp by degenerate primers PastF6/PastR5. The primers are able to distinguish between *Pasteurella* spp. and the other pathogenic organisms of laboratory animal respiratory tracts. Sensitivity of this method were 0.2 pg/ μ L ~ 2 pg/ μ L to different *Pasteurella*. The *Pasteurella* positive rate was 19.1% in 609 animal's respiratory samples. The accuracy of positive results was 100% through verifying by sequenced and blast. **Conclusions** The established method has good specificity and sensitivity. It can be used to detect *Pasteurella* spp. in animal samples.

【Key words】 *Pasteurella* spp.; CODEHOP; PCR detection; Laboratory animals

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2014BAI01B01)。

[作者简介] 邢进(1979-), 男, 副研究员。研究方向: 实验动物微生物检测。E-mail: xjvet@nifdc.org.cn

[通讯作者] 贺争鸣(1957-), 男, 研究员。研究方向: 实验动物微生物学。E-mail: zhengminghe57@163.com

巴斯德杆菌属 (*Pasteurella spp.*) 是一群革兰氏阴性, 不抗酸、不运动、无芽孢的短杆菌或球杆菌, 绝大部分存在于动物呼吸道粘膜, 特别是在啮齿类实验动物呼吸道中普遍存在。本属菌株表型特征相近^[1], 大部分菌株为条件致病菌, 以嗜肺巴斯德杆菌和多杀巴斯德杆菌较为常见, 为实验动物微生物国家标准中 SPF 级动物需排除的病原菌^[2]。感染发病时, 以呼吸系统症状为主, 根据具体感染部位的不同可引起各种炎症, 如肺炎、皮炎、眼炎、结膜炎、乳腺炎、关节炎等^[3]。与仙台病毒、腺病毒、支原体、支气管鲍特杆菌等合并感染, 更会加重感染症状, 对动物实验造成不可忽视的影响^[4-5]。

与我国标准不同, 欧盟实验动物联合会 (FELASA) 的检测标准中需要检测巴斯德菌科 (*Pasteurellaceae*) 中的所有菌株。在巴斯德菌科中, 除巴斯德杆菌属外, 放线杆菌属 (*Actinobacillus*)、嗜血杆菌属 (*Haemophilus*)、曼海姆菌属 (*Mannheimia*) 等菌属的菌株在实验动物中也比较常见, 其形态和基因组序列相似度高, 不易区分。根据我国的实验动物微生物控制现状, 短期内排除所有巴斯德菌科菌株并不现实, 因此首先从排除影响大、感染率最

高的巴斯德杆菌属着手, 建立有效的菌属检测方法。本研究旨在采用共有序列简并杂合寡核苷酸引物 (consensus degenerate hybrid oligonucleotide primers, CODEHOP) PCR 方法^[6,7], 建立针对巴斯德杆菌属的快速检测方法。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株

本研究共采用 21 株参考菌株, 依据伯杰氏系统细菌学手册^[8]和美国标准生物品收藏中心 (ATCC) 的分类, 其中巴斯德菌科菌株 16 株, 5 株巴斯德杆菌 (表 1)。

1.1.2 实验动物呼吸道样本

小鼠、大鼠、豚鼠、地鼠呼吸道样品取自 2015 年北京市会检, 沙鼠呼吸道样品采自普通环境生长的长爪沙鼠, 由浙江省实验动物中心 [SCXK (浙) 2014-0034] 和首都医科大学 [SCXK (京) 2015-0009] 提供。树鼩呼吸道样品采自昆明滇西亚种野生驯化树鼩咽拭子及气管, 由中国医学科学院医学生物学研究所提供 [SCXK (滇) K2013-0001]。

表 1 参考菌株

Tab. 1 Reference strains in this study

参考菌株 Reference Strains	菌株编号 Number
嗜肺巴斯德杆菌 <i>Pasteurella pneumotropica</i> biotype Heyl	ATCC 12555
嗜肺巴斯德杆菌 <i>Pasteurella pneumotropica</i> biotype Jawetz	ATCC 35149
多杀巴斯德杆菌 <i>Pasteurella multocida</i>	ATCC 43137
产气巴斯德杆菌 <i>Pasteurella aerogenes</i>	ATCC 27883
达科马巴斯德杆菌 <i>Pasteurella dagmatis</i>	ATCC 43325
鸡禽杆菌 <i>Avibacterium gallinarum</i>	ATCC 13361
豚放线杆菌 <i>Actinobacillus ureae</i>	ATCC 25976
副鸡禽杆菌 <i>Avibacterium paragallinarum</i>	ATCC 29545
鸟禽杆菌 <i>Avibacterium avium</i>	ATCC 29546
溶血曼海姆杆菌 <i>Mannheimia haemolytica</i>	ATCC 33369
溶血嗜血杆菌 <i>Haemophilus haemolyticus</i>	ATCC 33390
流感嗜血杆菌 <i>Haemophilus influenzae</i>	ATCC 33391
副流感嗜血杆菌 <i>Haemophilus parainfluenzae</i>	ATCC 33392
杜克雷嗜血杆菌 <i>Haemophilus ducreyi</i>	ATCC 33940
肉芽肿巴曼海姆菌 <i>Mannheimia granulomatis</i>	ATCC 49244
小鼠放线杆菌 <i>Actinobacillus muris</i>	ATCC 49577
支气管鲍特杆菌 <i>Bordetella bronchiseptica</i>	ATCC 19395
肺炎链球菌 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	CMCC 36001
乙型溶血性链球菌 <i>Streptococcus pyogenes</i>	CMCC 32210
鼠棒状杆菌 <i>Corynebacterium Kutscheri</i>	CMCC 65013
肺炎支原体 <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	ATCC 15531

注: (ATCC) 美国标准物质保藏中心; (CMCC) 中国医学细菌保藏管理中心。

Note. (ATCC) American Type Culture Collection. (CMCC) National Center for Medical Culture Collection.

1.2 主要试剂与仪器

哥伦比亚血琼脂(OXIOD);无菌脱纤维羊血(北京路桥生物技术有限公司);GC 琼脂(BD),肺炎支原体肉汤(北京三药科技开发有限公司);DNA 提取试剂盒(Qiagen);PCR 试剂(TAKARA);,琼脂糖(TAKARA)。

恒温培养箱(美国 Thermo IGS180);冷冻离心机(美国 Thermo X1R);超微量分光光度计(德国 NanoPhotometer);PCR 仪(美国 ABI veriti96);电泳仪(美国伯乐 Powerpac HC);紫外凝胶成像系统(美国 Kodak GL212pro)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌种复苏与 DNA 提取

巴斯德杆菌及其他参考菌种接种于哥伦比亚血琼脂平皿,至 36℃ 培养 24 h;嗜血杆菌接种于 GC 培养基,36℃ 微需氧培养 48 h;肺炎支原体接种于肺炎支原体肉汤培养基 36℃ 厌氧培养 5 d;根据试剂盒说明提取各参考菌株的基因组 DNA,冻存与 -20℃ 备用。

1.3.2 引物的设计与合成

将 13 株 Genbank 中获得的巴斯德杆菌 *ropB* 氨基酸序列(表 2)通过 CODEHOP 在线引物设计工具(<http://blocks.fhrc.org/codehop.html>)^[10]设计简并引物。巴斯德杆菌 *ropB* 氨基酸序列经分析后,被分为了三个保守的区域,从中选择高分、低简并度的引物,最终筛选出上游引物 PastF6: 5'-GGTGAACGCCAGGTGacngargarat-3' 和下游引物 PastR5: 5'-CTGGGTGGACACGTCCatrtartgdad-3' (图 1)。由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

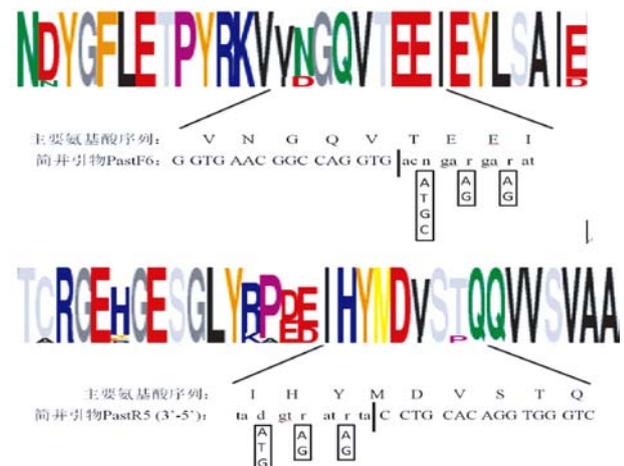


图 1 P-选简并引物 PastF6 和 PastR5

Fig.1 CODEHOP primer pair PastF6 and PastR5

表 2 13 株巴斯德杆菌 *ropB* 氨基酸序列信息

Tab.2 *ropB* amino acid sequence information of 13 *Pasteurella* spp.

菌名 Strains	Genbank 登录号 Genbank sequence No.
<i>P. pneumotropica</i>	AAR19033.1
<i>P. multocida</i> subsp. <i>gallicida</i>	AAR19034.1
<i>P. multocida</i> subsp. <i>Septica</i>	AAQ83545.1
<i>P. aerogenes</i>	AAQ83551.1
<i>P. bettyae</i>	AAQ83553.1
<i>P. caballi</i>	AAQ83547.1
<i>P. canis</i>	AAQ83549.1
<i>P. dagmatis</i>	AAR19030.1
<i>P. langaaensis</i>	AAR19031.1
<i>P. mairii</i>	AAQ19032.1
<i>P. oralis</i>	ADQ26769.1
<i>P. stomatis</i>	AAR19035.1
<i>P. testudinis</i>	AAR19036.1

1.3.3 PCR 体系及条件

PCR 体系为 20 μL: 10 × PCR Buffer(含 Mg²⁺)2 μL, dNTP(10 μM)1.6 μL, 1 U 的 Taq HS DNA 聚合酶(5 U/μL), PastF6/R5(10 μM)各 0.5 μL, 模板 DNA 1 μL, 灭菌水 14.2 μL。反应条件经优化后确定: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 45 s, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。产物经 1.5% 琼脂糖在 0.5% TBE 中 120 V 电泳 40 min, 并将阳性片段送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.3.4 特异性检测

对 5 株巴斯德杆菌及 16 株它属菌株基因组 DNA 进行扩增, 检测非巴斯德菌有无目的片段产生, 特异性条带进行测序和 Blast 比对验证。

1.3.5 敏感性检测

提取 5 株巴斯德杆菌的 DNA, 核酸浓度均调整至 20 ng/μL, 分别做 10 倍系列稀释至 10⁻⁶, 共 7 个稀释度(20 ng/μL ~ 20 fg/μL), 对本 PCR 方法进行敏感性检测。

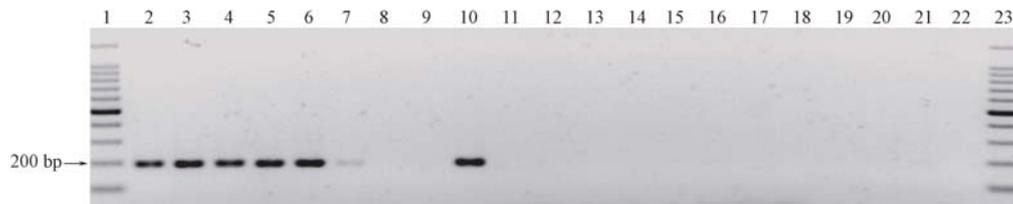
1.3.6 方法应用检测

用 DNA 提取试剂盒提取呼吸道样品的 DNA, 进行 PCR 扩增。部分 PCR 阳性产物进行测序和 Blast 比对, 验证结果的准确性。同时对相同样品进行血琼脂分离培养, 将结果进行比较。树鼩取样操作在中国医学科学院北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种属资源中心进行[SYXK(滇)K2013-0001], 其他实验动物操作在中国食品药品检定研究院进行[SYXK(京)2011-0008]。

2 结果

2.1 方法的建立与特异性结果

根据引物的配对组合结果, PastF6/R5 引物对能



注:(1,23)100 bp DNA Marker;(2)嗜肺巴斯德杆菌 ATCC12555;(3)嗜肺巴斯德杆菌 ATCC35149;(4)多杀巴斯德杆菌 ATCC43137;(5)产气巴斯德杆菌 ATCC27883;(6)达科马巴斯德杆菌 ATCC43325;(7)鸡禽杆菌 ATCC13361;(8)豚放线杆菌 ATCC25976;(9)副鸡禽杆菌 ATCC29545;(10)P. avium ATCC29546;(11)溶血曼海姆杆菌 ATCC33369;(12)溶血嗜血杆菌 ATCC33390;(13)流感嗜血杆菌 ATCC33391;(14)副流感嗜血杆菌 ATCC33392;(15)杜克雷嗜血杆菌 ATCC33940;(16)肉芽肿曼海姆菌 ATCC49244;(17)小鼠放线杆菌 ATCC49577;(18)支气管鲍特杆菌 ATCC19395;(19)肺炎链球菌 CMCC36001;(20)乙型溶血性链球菌 CMCC32210;(21)鼠棒状杆菌 CMCC65013;(22)肺炎支原体 ATCC15531。

图 2 P-选引物 PastF6/R5 特异性试验结果

Note. (1,23)100 bp DNA Marker. (2) *P. neotropica* ATCC12555. (3) *P. neotropica* ATCC35149. (4) *P. multocida* ATCC43137. (5) *P. aerogenes* ATCC27883. (6) *P. dagmatis* ATCC43325. (7) *A. gallinarum* ATCC13361. (8) *A. ureae* ATCC25976. (9) *A. paragallinarum* ATCC29545. (10) *P. avium* ATCC29546. (11) *M. haemolytica* ATCC33369. (12) *H. haemolyticus* ATCC33390. (13) *H. influenza* ATCC33391. (14) *H. parainfluenzae* ATCC33392. (15) *H. ducreyi*. (16) *M. granulomatis* ATCC49244. (17) *A. muris* ATCC49577. (18) *B. bronchiseptica* ATCC19395. (19) *S. pneumoniae* CMCC36001. (20) *S. hemolyticus* CMCC32210. *A. faecalis* ATCC8750, *S. pullorum* CMCC50047, *P. mirabilis* DJ150030, *B. cereus* CMCC63301. (21) *C. kutscheri* CMCC65013. (22) *M. pneumoniae* ATCC15531.

Fig. 2 Specific result of primers PastF6/R5 amplified reference strains

表 3 巴斯德杆菌阳性片段测序比对结果
Tab. 3 Blast results of the positive fragment

标准菌株 Standard strains	片段长度(bp) Fragment length	登录号 Accession	相似度(%) Ident
嗜肺巴斯德杆菌 Jawetz 型 <i>P. neotropica</i> biotype Jawetz	199	AB461843.1	98
嗜肺巴斯德杆菌 Heyl 型 <i>P. neotropica</i> biotype Heyl	198	GU809196.1	99
多杀巴斯德杆菌 <i>P. multocida</i>	201	CP008918.1	97
产气巴斯德杆菌 <i>P. aerogenes</i>	199	AY314040.1	96
达科马巴斯德杆菌 <i>P. dagmatis</i>	200	AY362966.1	96
鸡禽杆菌 <i>A. gallinarum</i>	198	JN592558.1	96
鸟禽杆菌 <i>P. avium</i>	202	AY362965.1	96

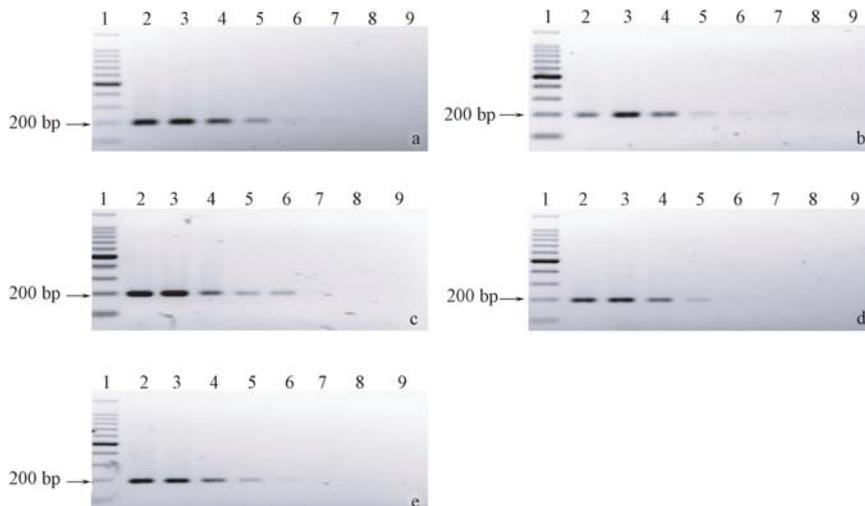
够较特异性的扩增出 5 株巴斯德杆菌标准菌株。而且均扩增出单一的 200 bp 左右目的条带(图 2)。目的片段经测序和 Blast 比对 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 结果相符(表 3)。

2.2 敏感性结果

用引物 PastF6/R5 分别扩增 5 株巴斯德杆菌参考菌株 DNA, 不同菌株的敏感性结果有所不同(图 3)。检测嗜肺巴斯德杆菌和产气巴斯德杆菌的检测限可达 0.2 pg/μL; 多杀巴斯德杆菌和达科马巴斯德杆菌的检测限为 2 pg/μL。

2.3 应用检测

用本方法检测 609 只动物呼吸道样品, 共有 116 份产生目的片段, 巴斯德杆菌属阳性率为 19%, 分离培养法鉴定出 77 份存在巴斯德杆菌, 阳性率为 12.6%(表 4)。用统计分析软件 SPSS19.0 对结果进行 McNemar 检验, $P < 0.001$, 两种方法差异显著; 一致性检验 Kappa 值 = 0.725, 结果比较一致。对树鼩的 58 份阳性片段(图 4)进行测序和序列比对, 结果中多杀巴斯德杆菌感染率为 32/58, 嗜肺巴斯德杆菌、达科马巴斯德杆菌和产气巴斯德杆菌各为 1/58, 其他未知巴斯德菌科菌株为 23/58。除 25 份样本为未知的巴斯德菌科菌株外, 阳性结果准确率 100%。

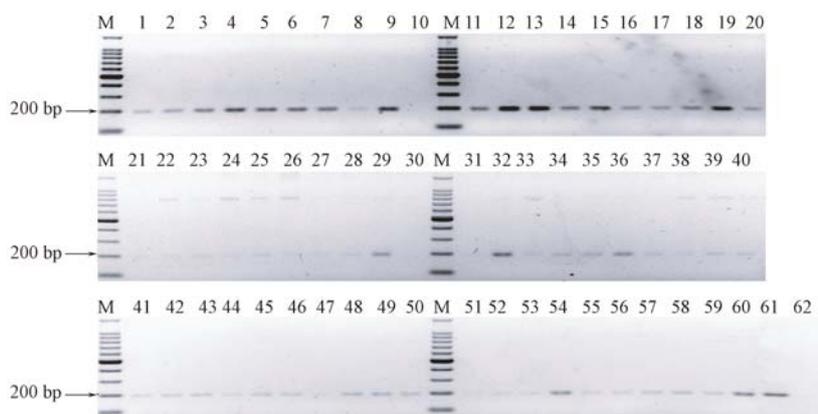


注：(a) 菌株 ATCC12555；(b) 菌株 ATCC27883；(c) 菌株 ATCC25149；(d) 菌株 ATCC43137；
(e) 菌株 ATCC43325；(1) 100bp DNA Marker；(2~8) 模板浓度分别为 20 ng/μL~20 fg/μL；(9) 空白对照。

图 3 引物 PastF6/R5 敏感性检测结果

Note. (a) Strain ATCC12555. (b) Strain ATCC27883. (c) Strain ATCC25149. (d) Strain ATCC43137. (e) Strain ATCC43325. (1) 100bp DNA Marker. (2~8) Template concentration of 20 ng/μL~20 fg/μL respectively. (9) Blank control.

Fig. 3 Sensibility results of primers PastF6/R5 amplified *Pasteurella* spp.



注：(M) 100bp DNA Marker；(1~60) 树鼩呼吸道样本；(61) 多杀巴斯德杆菌阳性对照；(62) 空白对照。

图 4 树鼩呼吸道样品巴斯德杆菌检测结果

Note. (M) 100bp DNA Marker. (1~60) *Tree shrew* respiratory tract samples. (61) *P. multocida* positive control. (62) Blank control.

Fig. 4 The results of Tree shrews *Pasteurella* test

表 4 CODEHOP PCR 方法检测 6 种实验动物呼吸道样品的结果

Tab. 4 Results of six kinds of animals respiratory samples by CODEHOP PCR detection methods

动物种类 Species	等级 Level			总计 Total
	普通级 CV	清洁级 CL	无特定病原体级 SPF	
小鼠 Mice	/	9/100(7/100)	5/150(3/150)	14/250(10/250)
大鼠 Rats	/	2/60(0/60)	0/50(0/50)	2/110(0/110)
豚鼠 Guinea pigs	0/80(0/80)	0/15(0/15)	0/10(0/10)	0/105(0/105)
地鼠 Hamster	/	0/20(0/20)	/	0/20(0/20)
沙鼠 Mongolian gerbil	42/64(37/64)	/	/	42/64(37/64)
树鼩 Tree shrew	58/60(30/60)	/	/	58/60(30/60) ^[9]

注：括号中为分离培养法阳性率。

Note. The content in round brackets is the positive rate of culture method.

3 讨论

本研究利用 CODEHOP 方法设计了巴斯德杆菌属的简并引物,在巴斯德菌科内能够排除绝大部分非巴斯德杆菌属菌株。巴斯德杆菌属、放线杆菌属和嗜血杆菌属仅通过 16SrRNA 很难进行区分,根据此前的报道,*rpoB* 蛋白能够识别 16SrRNA 不能区分的巴斯德菌科菌株^[10],因此我们将 RNA 聚合酶的 β 亚基(*rpoB*)作为了目标基因。所建立的 PCR 方法与传统分离培养法相比较,具有更高的敏感性,被检样品的阳性率从 12.6% 提高到 19.1%,不同种类动物的检出率均有提高。通过对目的片段的测序和序列比对,能够快速获取目标菌的种类,相比培养后进行生化鉴定具有更高的效率和可靠性。

虽然本方法能够比较好的区分出巴斯德杆菌属的菌株,但与禽杆菌属菌株仍存在交叉反应,与 Christensen 等^[10]所报道的结果一致。伯杰氏系统细菌学手册(2004 年第二版)中将狭义的巴斯德杆菌限制为多杀巴斯德杆菌、达科马巴斯德杆菌、犬巴斯德杆菌和口腔巴斯德杆菌。禽类菌株曾经归属于巴斯德杆菌属,但在系统进化上分属于不同的分支^[8]。在随后的基因型和表型研究进一步证实了禽类菌株的不同,对禽巴斯德杆菌 *P. gallinarum* 和鸡巴斯德杆菌 *P. avium* 等 4 株菌重新进行了分类,均归属于禽杆菌属(*Avibacterium spp.*),并更名为 *A. gallinarum* 和鸟禽杆菌 *A. avium*^[11]。因此寻找巴斯德杆菌属与禽杆菌菌株的之间的特异性差异片段仍需进一步研究。

参考文献:

[1] 邢进,冯育芳,岳秉飞,等. 北京地区实验动物中嗜肺巴斯德杆菌的表型分析[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(6): 54 -

57.

- [2] GB/T 14922.2 - 2010, 实验动物微生物学等级及监测[S]. 2011.
- [3] Bootz F, Kirschnek S, Nicklas W, et al. Detection of *Pasteurellaceae* in rodents by polymerase chain reaction analysis [J]. Lab Anim Sci, 1998, 48(5): 542 - 546.
- [4] Waggie K, Kagiyama N, Allen AM, et al. Manual of microbiologic monitoring of laboratory animals, Second Edition [M]. 1994, 145 - 150.
- [5] Pintore MD, Corbellini D, Chieppa MN, et al. Canine adenovirus type 1 and *Pasteurella pneumotropica* co-infection in a puppy [J]. Vet Ital, 2016, 52(1): 57 - 62.
- [6] Rose TM, Schultz ER, Henikoff JG, et al. Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences [J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(7): 1628 - 1635.
- [7] Rose TM, Henikoff JG, Henikoff S. CODEHOP (COnsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer) PCR primer design [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(13): 3763 - 3766.
- [8] Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume Two, The Proteobacteria, Part B, The Gammaproteobacteria [M]. 2005.
- [9] 邢进,冯育芳,付瑞等. 野生树鼩可培养细菌和真菌携带情况的调查 [J]. 实验动物科学, 2012, 29(3): 34 - 38.
- [10] Christensen H, Kuhnert P, Olsen JE, 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(Pt 5): 1601 - 1609.
- [11] Blackall PJ, Christensen H, Beckenham T, et al. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55(Pt 1): 353 - 362.

[收稿日期] 2016 - 06 - 28