

一株 X 型鸭疫里默氏杆菌 GN52 稳定性的研究

孙亚妮 赵 钦 姜世金* 张兴晓 孔义波 魏秀丽

(山东农业大学动物科技学院 泰安 271018)

摘 要: 选取鸭疫里默氏杆菌的一株地方分离株 GN52, 按照生长的最适条件, 在马丁固体培养基上连续传代。分别选取第 3 代、第 11 代、第 21 代、第 31 代、第 41 代、第 51 代和第 61 代的细菌, 对其进行染色镜检、生化试验、药敏试验及动物实验。结果表明, 随着代次的增加, 该菌株染色形态、生化特性及抗药性均未发生明显变化, 但毒力有逐渐下降的趋势。

关键词: 鸭疫里默氏杆菌, 细菌, 代次

The Research on Stability of an Isolate of *Riemerella anatipestifer*

SUN Ya-Ni ZHAO Qin JIANG Shi-Jin* ZHANG Xing-Xiao KONG Yi-Bo WEI Xiu-Li

(The College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018)

Abstract: The isolate GN52 of *Riemerella anatipestifer* was passaged on the Martin Medium successively according to the optimum condition. The experiments included Gram staining, biochemical test, drug sensitivity test and animal experiments were carried out on the bacteria of 3rd, 11th, 21st, 31st, 41st, 51st and 61st generations. It indicated that the bacterial morphs, biochemical character, drug resistance of the strain had no obvious change, but the virulence showed a trend of reduction.

Keywords: *Riemerella anatipestifer*, Bacteria, Generation

鸭疫里默氏杆菌病又称鸭传染性浆膜炎 (infectious serositis), 是由鸭疫里默氏杆菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA) 引起鸭的一种急性、接触性和败血性传染病。该病主要侵害 2~7 周龄各品种雏鸭, 同时还可感染雏鹅、火鸡和多种其它鸟类, 是目前造成养鸭业经济损失最严重的疾病之一^[1]。目前对该病的控制主要是使用疫苗进行免疫接种, 但是 RA 的血清型较多, 各血清型之间没有交叉保护^[2], 这就要求使用的疫苗的抗原血清型必须与生产中流行菌株的血清型一致^[3]。目前, 国内外尚无对 RA 菌

株稳定性的研究报道, 本研究选取一株 RA 广东优势血清型菌株 GN52, 对该菌株的不同代次进行了系统的研究。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

对来自广东疑似鸭疫的病料的鸭脑按照常规无菌操作进行细菌分离、纯化, 并采用革兰氏染色、培养基筛选、动物回归及 PCR 方法^[4]鉴定为 RA, 命名为 GN52, 血清型鉴定为 10 型。

1.2 实验动物

1 d 龄健康樱桃谷雏鸭, 购自山东博大种鸭场, 在滨州沃华生物工程有限公司标准化实验动物房严格饲养至 2 周龄。

1.3 培养基与试剂

加有 2%~3% 新生牛血清的马丁固体培养基和改良马丁肉汤, 由本研究室自行制备; 药敏纸片购自北京天坛药物生物技术开发公司, 微量生化反应管购自杭州天和微生物试剂有限公司。

1.4 不同代次菌株的准备

将纯化好的第 2 代 GN52, 按照常规细菌传代方法在加有 2%~3% 新生牛血清的马丁固体培养基上进行连续传代, 37 ℃ 烛缸培养 18 h~24 h。将第 2 代、第 10 代、第 20 代、第 30 代、第 40 代、第 50 代和第 60 代细菌用 15% 灭菌甘油保存至 -20 ℃ 冰箱备用。

将上述代次冻存的细菌用加有 2%~3% 新生牛血清的马丁固体培养基同时复苏, 37 ℃ 烛缸培养 24 h~48 h, 然后将各代菌株按照常规传代方法各传 1 代, 37 ℃ 烛缸培养 18 h~24 h。

用灭菌的 0.01 mol/L PBS(pH 7.0) 分别将第 3 代、第 11 代、第 21 代、第 31 代、第 41 代、第 51 代、第 61 代的细菌洗下, 调整其浓度为 10⁶ CFU/mL (OD₆₀₀ 值为 0.04~0.05), 备用。

1.5 细菌形态观察

将上述 7 个代次的 GN52 菌株按照革兰氏染色的常规方法进行染色, 在普通光学显微镜下观察细菌形态。

1.6 生化试验

将上述 7 个代次的菌株按照常规方法接种于细菌微量生化反应小管, 包括葡萄糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、甘露糖、覃糖、棉子糖、丙二酸盐、尿素、甘露醇、水杨素和精氨酸双水解酶, 并进行 VP 试验和 MR 试验。

1.7 药敏试验

将上述 7 个代次的菌株接种于加有 1% 新生牛血清的改良马丁肉汤培养基中, 37 ℃ 振荡培养, 在对数生长期(8 h~9 h)停止培养, 分别无菌吸取每个代次的菌液 400 μL 均匀的涂布在加有 2%~3% 新生牛血清的马丁固体培养基上, 进行纸片扩散法药敏试验^[5]。

1.8 动物攻毒实验

选取 35 只 2 周龄的健康鸭, 体重相差不大于 20 g,

以排除动物个体差异对结果带来的误差。用 1.4 制备的不同代次的菌液对雏鸭进行攻毒, 颈部皮下注射 1 mL/只, 每个代次攻毒 5 只, 隔离饲养, 观察发病及死亡情况。记录每天出现死亡的鸭子数量。

2 结果

2.1 细菌形态观察

本实验菌株在马丁固体培养基上连续传代后菌落形态未发生明显变化(见图 1), 经革兰氏染色在普通光学显微镜下均为革兰氏阴性的细小球杆菌, 偶见呈丝状, 单个, 成双偶尔成链排列, 部分细菌呈两极着色。

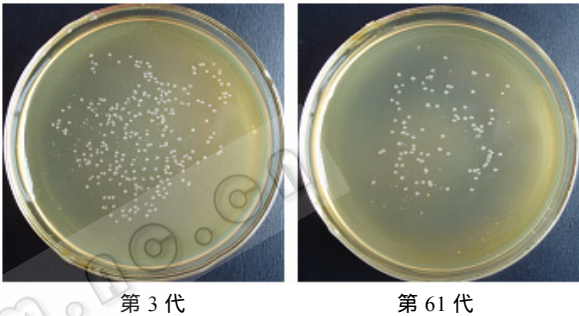


图 1 细菌培养菌落形态图
Fig.1 The colony morphology of bacteria

2.2 生化试验

GN52 株 RA 的 7 个不同代次的菌株的生化试验结果见表 1。

表 1 生化试验结果							
Table 1 The result of biochemical test							
项目 Item	代次 Generation						
	3	11	21	31	41	51	61
葡萄糖 Glucose	-	-	-	-	-	-	-
乳糖 Lactose	-	-	-	-	-	-	-
麦芽糖 Maltose	-	-	-	-	-	-	-
蔗糖 Sucrose	-	-	-	-	-	-	-
甘露糖 Mannose	-	-	-	-	-	-	-
覃糖 Mycose	-	-	-	-	-	-	-
棉子糖 Raffinose	-	-	-	-	-	-	-
丙二酸盐 Malonate	-	-	-	-	-	-	-
尿素 Urea	+	+	+	+	+	+	+
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	-	+	+	-	-	+
水杨素 Salicin	-	-	-	-	-	-	-
甘露醇 Manicol	-	-	-	-	-	-	-
甲基红 MR	-	-	-	-	-	-	-
乙酰甲基甲醇 VP	-	-	-	-	-	-	-

由表 1 可知,除了精氨酸双水解酶在不同代次之间存在差异外,GN52 株RA的 7 个不同代次的菌株的生化试验结果基本没有变化,符合RA生化试验的一般规律^[6]。

2.3 药敏试验

GN52 的 7 个不同传代代次菌株的药敏试验结果见表 2。

表 2 抑菌试验结果							
Table 2 The result of bacteriostasis test							
药物 Drug	不同代次(抑菌圈直径: mm)						
	Different generations						
	(The diameter of inhibition zone: mm)						
	3	11	21	31	41	51	61
CIP	1	4	0	3	5	3.5	3.5
C	3.5	3.5	4	3.5	5	3.5	3.5
DO	1.5	3.5	2	2	3.5	1.5	3
OFL	2.5	4.5	4.5	0	3	3.5	4
GM	0	2.5	0	0	2	0	0
AN	0	2.5	0	0	0	0	0
CTX	11	22	6.5	12	20	19	15
TM	0	0	4	0	0	0	0
S	0	2	1.5	2	5.5	1.5	2
FT	13.5	12	8.5	8	12.5	11	9
CFP	15	16	13.5	11.5	14	11	10
E	4	3.5	3	4	4.5	3.5	3.5
NOR	3	2.5	2	2	4	2	2
P	5	6	3.5	3	4	5.5	5
SMK	2	4	4.5	3.5	2.5	3	4
AM	5	9	5	4.5	8	6.5	7.5
VA	4	4	5	4.5	4	5.5	4
N	3	3.5	1.5	0	3	3	2.5
TE	2	3.5	1.5	1	2	2	2
CED	13.5	17	13.5	12.5	18.5	14	13

注:“CIP”:环丙沙星;“C”:氯霉素;“DO”:多西环素;“OFL”:氧氟沙星;“GM”:庆大霉素;“AN”:阿米卡星;“CTX”:头孢噻肟;“TM”:妥布霉素;“S”:链霉素;“FT”:呋喃妥因;“CFP”:头孢哌酮;“E”:红霉素;“NOR”:诺氟沙星;“P”:青霉素;“SMK”:磺胺甲异噁唑;“AM”:氨苄西林;“VA”:万古霉素;“N”:新霉素;“TE”:四环素;“CED”:头孢拉定

由表 2 可知,GN52 株 RA 在加有 2%~3%新生牛血清的马丁固体培养基连续传代 60 代后,其抗药性没有发生明显变化。其中第 41 代对部分抗生素的抑菌圈直径稍有变大,但是第 51 代和 61 代又变小。推测可能是由于涂板时菌液浓度的不同导致的。这一现象表明进行纸片扩散药敏试验时,不同的细菌其方法必须标准化,尤其是接种菌量必须严格控制。

2.4 动物攻毒试验

GN52 株 RA 的 7 个不同代次菌株的菌液攻毒雏鸭后,雏鸭每天死亡情况的统计结果见表 3,未死亡的鸭子逐渐康复。

表 3 动物实验结果							
Table 3 The result of animal experiment							
天数 Days (d)	不同代次菌液攻毒鸭子死亡情况(只)						
	The death of ducks challenged by the material of different generations						
	3	11	21	31	41	51	61
1	0	0	0	0	0	0	0
2	1	0	0	0	0	0	0
3	2	3	3	0	0	0	0
4	1	1	1	1	1	1	1
5	1	0	0	1	1	1	1
6		1	1	0	0	0	0
7				1	1	0	0
8				0	0	0	0
9				1	0	0	0
10					1	0	0
11						0	0
12						2	2

由表 3 可以看出第 3 代菌液攻毒雏鸭,攻毒后第 5 天死亡率达到 100%,第 11 代和第 21 代菌液攻毒的动物在攻毒后第 6 天全部死亡,第 31 代和第 41 代菌液攻毒的动物在攻毒后第 9、10 天死亡率才达到了 80%,而第 51 代和第 61 代菌液攻毒的动物更是在攻毒后第 12 天死亡率才达到了 80%,表明随着传代代次的增加,GN52 株 RA 对鸭的致死性发生了较为明显的变化,表现在攻毒同样数量的活菌时,导致雏鸭死亡时间的逐渐延长和死亡率的逐渐下降。

3 讨论

鸭疫里默氏杆菌感染可以引起鸭子特别是雏鸭的传染性浆膜炎,目前全世界公认该菌有 21 个血清型^[3,7,8],不同血清型相互之间没有交叉保护力^[2]。我国流行的主要血清型有 1、2、5、7 型等^[9-11]。近年来在对广东、福建等地区鸭疫里默氏杆菌的分离鉴定过程中发现在上述地区的优势血清型是 10 型(魏秀丽.鸭疫里默氏杆菌的分离鉴定及外膜蛋白 A 基因的克隆与序列分析.山东农业大学硕士毕业论文,2007),所以本实验以一株 10 型鸭疫里默氏杆菌 GN52 为实验对象,对其进行了连续传代后的生物

学特性研究。

由于 RA 对培养基的要求较高, 寻找适宜的培养基是进行 RA 分离鉴定及相关研究所必需的。GN52 菌株通过在改良的马丁固体培养基上的连续传代, 其菌体形状、大小和生化特性基本没有发生变化, 由此判定加有 2%~3% 新生牛血清的马丁固体培养基比较适宜 GN52 的生长。

由于实际生产中抗生素的滥用, 导致细菌对大部分抗生素产生了耐药性^[11,12]。细菌的耐药性主要由耐药基因控制, 耐药基因一部分位于细菌染色体上, 另一部分由耐药质粒即 R 因子所携带。理论上认为, 如果细菌的耐药基因是由质粒所携带, 在没有受到药物的选择压力的培养基上连续传代, 耐药质粒拷贝数会逐渐减少, 表现为随着传代次数的增加, 细菌对相应药物的敏感性会逐渐增加, 药敏试验时表现为抑菌圈直径的变大^[13]。RA 的分离株大多表现出多重耐药性, GN52 株 RA 也表现出了这一特点, 但关于 RA 耐药性质粒的研究未见报道。本研究对于 GN52 株 RA 不同传代代次菌株的药敏试验结果显示, 在不含药物的适宜培养基中连续传代并未导致其抑菌圈直径发生明显变化, 由此推论该菌株的耐药基因主要位于细菌染色体上。

选用某菌株生产疫苗时, 必须对该菌株在适宜的培养基上传代后细菌的稳定性有系统的研究, 毒力的稳定性是主要指标之一^[14], 因为病原微生物毒力的减弱常常伴随着抗原性的降低。本研究用 GN52 株 RA 进行了动物回归实验, 结果表明随着代次的增加, 被攻毒雏鸭发生死亡的时间延长, 死亡率呈现降低趋势。除此之外, 在整个试验过程中, 随着 GN52 株 RA 传代代次的增加, 同等剂量活菌攻毒鸭子出现的临床症状也呈现逐渐减轻的规律。本研究结果表明, 本实验菌株 GN52 在适宜的培养基上连续传代可以将其毒力逐渐致弱, 但是毒力致弱的过程是否导致保护性抗原的抗原性减弱仍需进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Seger P, Mannheim W, vancanneyt M, et al. *Riemerella*

anatipestifer gen nov., com b.nov., the causative agent of septicemia anserum exsudative, and its phylogenetic affiliation within the Flavobacterium-Cytophaga rRNA homology group. *Int J Syst Bacterial*, 1993, **43**(3): 768-776.

- [2] Sandhu TS. Immunization of White Pekin ducklings against *Pasteurella anatipestifer* infection. *Avian Dis*, 1979, **23**: 662-669.
- [3] Sandhu TS, Leister ML. Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolates from poultry in different countries. *Avian Pathol*, 1991, **20**: 233-239.
- [4] 胡青海, 刘晓文, 赵世华, 等. 应用 PCR 技术检测鸭疫里默氏杆菌的研究. *中国预防兽医学报*, 2002, **24**(6): 471-473.
- [5] 桂炳东, 孙 敬, 徐建民, 等. 细菌药物敏感性试验测定手册. 江西: 江西科学出版社, 2001, pp. 28-42.
- [6] 郭玉璞. 我国对鸭传染性浆膜炎研究概况. *中国兽医杂志*, 1998, **24**(6): 44-46.
- [7] Loh H, Teo TP, Tan HC. Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolates from ducks in Singapore: a proposal of new serotypes. *Avian Pathology*, 1992, **21**: 453-459.
- [8] Pathanasophon P, Sawada T, Tantivharoenyos T. New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. *Avian Pathology*, 1995, **24**: 195-199.
- [9] 张大丙. 用 3 种分型方法研究鸭疫里默氏菌的血清型. *畜牧兽医学报*, 2005, **36**(3): 258-263.
- [10] 程安春, 汪铭书, 陈孝跃, 等. 我国鸭疫里默氏杆菌血清型调查及新血清型的发现和病原特性. *中国兽医学报*, 2003, **23**(4): 320-323.
- [11] 高 福, 郭玉璞. 小鸭传染性浆膜炎疫苗的研究. 鸭疫巴氏杆菌的血清型鉴定. *中国兽医杂志*, 1987, **13**(4): 47-48.
- [12] 牛艺儒, 宁官保. 大肠杆菌的药敏试验. *动物科学与动物医学*, 2005, **12**: 30-33.
- [13] Tan YT, Tillett DJ, McKay IA. Molecular strategies for overcoming antibiotic resistance in bacteria. *Mol Med Today*, 2000, **8**(6): 309.
- [14] Orman BE, Pinheiro SA, Galas SA. Evolution of multiresistance in nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984-1988 in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, **46**(12): 3963-3970.