

鸭疫里默氏杆菌 PT-RA1 的分离鉴定、遗传进化分析及致病性试验

林志敏¹, 林彬彬¹, 谢碧林¹, 徐以娟¹, 林锋强², 闫露², 李翠婷², 周海欧², 李兆龙^{*2}

1 莆田市农业科学研究所, 福建 莆田 351100

2 福建省农业科学研究院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013

林志敏, 林彬彬, 谢碧林, 徐以娟, 林锋强, 闫露, 李翠婷, 周海欧, 李兆龙. 鸭疫里默氏杆菌 PT-RA1 的分离鉴定、遗传进化分析及致病性试验[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2576-2585.

LIN Zhimin, LIN Binbin, XIE Bilin, XU Yijuan, LIN Fengqiang, YAN Lu, LI Cuiting, ZHOU Hai'ou, LI Zhaolong. Isolation, identification, genetic evolution analysis, and pathogenicity test of *Riemerella anatipestifer* PT-RA1[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2576-2585.

摘要: 【背景】鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)是一种主要引起以鸭的纤维素性心包炎、肝周炎和气囊炎为临床特征的传染病病原, 其血清型众多, 防治困难。【目的】了解莆田市鸭疫里默氏杆菌的遗传特征、耐药情况和致病力情况, 为该菌的治疗和防控提供科学依据。【方法】对来自莆田某养殖场疑似感染鸭传染性浆膜炎 15 日龄患病番鸭的脑组织进行分离纯化、16S rRNA 基因鉴定和血清型鉴定, 对该分离株的 16S rRNA 基因序列进行测序及遗传进化分析, 并进一步测定其耐药性和对雏番鸭的致病性。【结果】分离得到一株 11 型鸭疫里默氏杆菌, 将其命名为 PT-RA1。PT-RA1 分离株 16S rRNA 基因遗传进化上与鸭疫里默氏杆菌参考株广州株 GZ-RA12、北京株 CZ-RA03 和山东株 SD-RA2018 处在同一进化分支上, 相似性为 100%, 提示鸭疫里默氏杆菌可能存在跨地区传播; 分离株对链霉素、庆大霉素和卡那霉素等 15 种抗生素表现多重耐药, 而对氨苄西林、阿莫西林、头孢唑林、头孢曲松、四环素、强力霉素、头孢克肟、头孢吡肟、氧氟沙星、氟苯尼考敏感; 对该分离株进行雏番鸭致病性试验, 死亡率 80%, 病死鸭出现纤维素性心包炎、肝周炎、气囊炎和脾脏肿大等典型的鸭疫里默氏杆菌病临床特征症状。【结论】分离并鉴定一株 11 型鸭疫里默氏杆菌 PT-RA1, 为鸭疫里默氏杆菌病的防控及后续研究提供参考依据。

关键词: 鸭疫里默氏杆菌; 分离鉴定; 遗传进化; 致病性

资助项目: 福建省科技计划引导性项目(2019N0038); 福建省特色现代农业发展专项(2023PTNK01); 福建省科技厅公益类竞争性项目(2023R1076)

This work was supported by the Fujian Provincial Science and Technology Program Guiding Project (2019N0038), the Special Project for the Development of Modern Agriculture with Characteristics in Fujian Province (2023PTNK01), and the Fujian Provincial Science and Technology Department Public Welfare Competitive Program (2023R1076).

*Corresponding author. E-mail: lizhaolong522@163.com

Received: 2023-10-26; Accepted: 2023-11-24; Published online: 2024-01-26

Isolation, identification, genetic evolution analysis, and pathogenicity test of *Riemerella anatipestifer* PT-RA1

LIN Zhimin¹, LIN Binbin¹, XIE Bilin¹, XU Yijuan¹, LIN Fengqiang², YAN Lu², LI Cuiting², ZHOU Hai'ou², LI Zhaolong^{*2}

1 Putian Institute of Agricultural Science, Putian 351100, Fujian, China

2 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, Fujian, China

Abstract: [Background] *Riemerella anatipestifer* is a pathogen causing fibrinous pericarditis, perihepatitis, and airsacculitis in ducks. With a variety of serotypes, this pathogen is difficult to be prevented and controlled. [Objective] To understand the genetic characteristics, drug resistance and pathogenicity of *Riemerella anatipestifer* in Putian city, and provide scientific basis for its treatment and prevention. [Methods] Isolation and purification, 16S rRNA gene identification, and serotype identification were performed on the brain tissue of 15-day-old ducklings suspected to be infected with orrhomeningitis from a breeding farm in Putian. The 16S rRNA gene of this isolate was sequenced, based on which the genetic evolution analysis was performed. Furthermore, the antibiotic resistance of the strain and the pathogenicity to ducklings were determined. [Results] A strain of *Riemerella anatipestifer* serotype 11 was isolated, named PT-RA1. The 16S rRNA gene of PT-RA1 was in the same branch on the genetic evolution tree as those of the reference strains (GZ-RA12, CZ-RA03, and SD-RA2018) of *R. anatipestifer*, with 100% similarity, which suggested that *R. anatipestifer* may have spread across different regions. The isolate was resistant to 15 antibiotics including streptomycin, gentamicin, and kanamycin, while it was sensitive to ampicillin, amoxicillin, cefazolin, ceftriaxone, cefixime, cefepime, tetracycline, doxycycline, ofloxacin, and florfenicol. The isolate caused a mortality rate of 80% in ducklings, and the dead ducks showed typical symptoms such as fibrinous pericarditis, perihepatitis, airsacculitis, and spleen enlargement of *R. anatipestifer* infection. [Conclusion] We isolated and characterized a *R. anatipestifer* strain PT-RA1, which provided a basis for the prevention and control of *R. anatipestifer* infection and subsequent research.

Keywords: *Riemerella anatipestifer*; isolation and identification; genetic evolution; pathogenicity

鸭疫里默氏杆菌病又称为鸭传染性浆膜炎,是由鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)引起的以纤维素性心包炎、肝周炎、气囊炎为主要临床特征的急性或慢性、败血性、接触性传染病^[1]。该病的易感动物有鸭^[2]、鹅^[3]、鸡^[4]、火鸡^[5],其最易感染1-8周龄雏鸭,病鸭生长发育迟缓,致死率高,给国内外水禽养殖业带来极大危害,严重阻碍水禽养殖业的健康

发展。

2021年10月,莆田市荔城区某番鸭养殖场育雏番鸭苗6000羽,在15日龄开始发病并死亡,患病鸭临床主要症状是大群采食下降,部分食欲废绝,部分出现精神沉郁、站立不稳及转圈等神经症状,剖检可见脑组织充血水肿、心脏表面纤维素性渗出物、肾脏充血水肿等,初步怀疑为鸭疫里默氏杆菌感染。对该养殖场

发病鸭进行隔离治疗,鸭群饮水中加入 30%氟苯尼考可溶性粉、复方磺胺嘧啶混悬液(规格:200 mL,磺胺嘧啶 80 g,甲氧嘧啶 16 g)、清瘟解毒口服液,2次/d,视情况连用3-5 d,并加强饲养管理。经过治疗,3 d后未发现新的病鸭。5 d后鸭群的状况趋于稳定,并逐渐恢复正常。为进一步确诊该番鸭养殖场雏番鸭异常死亡原因,本研究采用细菌分离纯化、16S rRNA 基因鉴定、血清型鉴定等实验室诊断方法分离并鉴定该番鸭养殖场鸭疫里默氏杆菌病原,并进行药敏试验和雏番鸭的致病性试验,为该病的防控提供参考。

1 材料与方 法

1.1 样品

病料为莆田市荔城区某番鸭养殖场疑似感染鸭传染性浆膜炎的患病番鸭的脑组织,发病日龄 15 d,采集于 2021 年 10 月。40 只未接种任何疫苗、抗血清的 1 日龄试验雏番鸭(福建省农业科学院畜牧兽医研究所实验动物伦理委员会批准,批准号:202203FZ05),购自莆田市荔城区某番鸭场,经实验室检测常见鸭瘟病毒、鸭肝炎病毒、鸭呼肠孤病毒、鸭细小病毒、鸭疫里氏杆菌和巴氏杆菌等病原呈阴性。将试验雏番鸭饲养于环境相对洁净试验场,15 日龄时进行鸭疫里默氏杆菌的致病性试验。

1.2 主要试剂和仪器

实验所用 1、2、6、7、10、11、13、14 型鸭疫里默氏杆菌阳性血清,由福建省农业科学院畜牧兽医研究所提供^[6]。TSA、TSB 和麦康凯琼脂,广州环凯生物科技有限公司;微量生化反应管和药敏纸片,北京博来生物试剂有限公司;新生胎牛血清,厦门天杭生物科技股份有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒、2×Taq PCR Master Mix、DL2000 DNA Marker、

GeneRed 核酸染料和琼脂糖,福州开化生化科技有限公司。CO₂ 培养箱,上海一恒科技仪器有限公司;恒温摇床,常州国华电器有限公司;高速台式冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;PCR 仪,西安天隆科技有限公司;水平电泳仪,北京六一生物科技有限公司;凝胶成像分析系统,Bio-Rad 公司;微量移液器,艾本德股份有限公司。

1.3 菌株的分离纯化

无菌采集病死鸭脑组织,划线接种于含 2% 新生胎牛血清 TSA 平板,再置于 5% CO₂ 培养箱中,37 °C 培养 24-48 h。无菌挑取单个疑似菌落接种在含 2% 新生胎牛血清 TSB 中,37 °C、160 r/min 振荡培养 24-48 h。

1.4 革兰氏染色镜检

按照革兰氏染色液操作说明,挑取纯培养的单个菌落进行革兰氏染色镜检试验。

1.5 生化鉴定

按生化鉴定操作说明,取纯化分离菌液各 0.06 mL,分别接种于氧化酶、硫化氢、明胶、乳糖、枸橼酸盐、硝酸盐还原、尿素、精氨酸、赖氨酸、葡萄糖蛋白胨水、葡萄糖磷酸盐、蛋白胨水、麦芽糖、甘露醇、蔗糖等微量生化反应管中,置于 5% CO₂ 培养箱中,37 °C 培养 24-48 h 后观察并记录结果。

1.6 分离株 16S rRNA 基因序列测定及系统进化分析

参考文献[2]设计鸭疫里默氏杆菌 16S rRNA 基因特异性引物 RA-16SF (5'-CTTCGGATACT TGAGAGCG-3')和 RA-16SR (5'-GCAGCACCT TGAAAATTGT-3'),引物由福州博莱生物科技有限公司合成。再参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒,提取分离株菌液的 DNA,然后以该 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL): 2×Taq PCR Master Mix 25 μL, RA-16SF、

RA-16SR 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , 模板 2 μL , ddH₂O 21 μL 。PCR 反应条件: 98 $^{\circ}\text{C}$ 6 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 54 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。PCR 产物以 1.6% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 预期目的片段大小为 960 bp。

将扩增产物送福州博莱生物科技有限公司测序, 所得序列与 NCBI 数据库进行比对, 用 DNASTar Lasergene 7.0 软件对分离株和 17 株 RA 参考株的 16S rRNA 基因序列进行比对分析, 构建 16S rRNA 基因序列系统发育树。

1.7 血清型鉴定

参考文献[2]进行菌株的血清型鉴定。

1.8 药敏试验

参照美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, 2018)^[8]的 K-B 纸片扩散法测定分离株对复方新诺明、多黏菌素 B、多西环素、红霉素、阿奇霉素、恩诺沙星、氨苄西林、阿莫西林、头孢唑林、头孢曲松、头孢克肟、头孢吡肟、链霉素、庆大霉素、卡那霉素、阿米卡星、新霉素、四环素、环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、萘啶酸、吡哌酸、氟苯尼考、利福平等 25 种抗生素的敏感性。

取 0.5 麦氏单位的 100 μL 分离株纯培养液, 用无菌涂板玻棒均匀涂布于含 2% 胎牛血清 TSA 平板上, 待菌液干燥后, 各药敏纸片有序贴于平板表面, 各药敏纸片间距 1.5 cm。置于 5% CO₂ 培养箱中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 观察、测量并记录结果。

1.9 动物致病性试验

将 40 只 15 日龄雏番鸭随机分成感染组和对照组, 感染组 20 只雏番鸭分别肌肉注射 1.15×10^8 CFU/mL 鸭疫里默氏杆菌分离株纯化菌液(1 mL/只); 对照组 20 只雏番鸭分别肌肉注射等量生理盐水, 两组中间隔一定距离进行饲

养, 期间连续观察 14 d, 并记录试验雏番鸭的发病和死亡情况。同时采集病死雏番鸭的心脏、肝脏和脾脏分离鸭疫里默氏杆菌, 并进行革兰氏染色和生化鉴定试验, 随后进行 PCR 验证。

2 结果与分析

2.1 分离培养结果

分离株在 TSA 平板上生长出光滑湿润、半透明的奶油状小菌落, 直径为 0.5–1.5 mm、经斜射光观察可见淡蓝色光泽。革兰氏染色后镜下可见单个或少数成对排列的阴性短小杆菌。将该分离株命名为 PT-RA1。

2.2 生化试验结果

PT-RA1 分离株生化反应结果表明, 该分离株均不发酵麦芽糖、葡萄糖、甘露醇、乳糖和蔗糖; 甲基红试验和 VP 试验、靛基质、硝酸盐还原试验均为阴性; 不产生硫化氢, 不利用枸橼酸盐, 不分解尿素, 不水解精氨酸和赖氨酸, 液化明胶和氧化酶试验呈阳性, 符合鸭疫里默氏杆菌的生化特性。

2.3 16S rRNA 基因鉴定结果

以 RA 16S rRNA 基因特异性引物进行 PCR 扩增, PT-RA1 分离株可扩增出 960 bp 大小的条带, 与预期条带大小一致(图 1)。测序后所得序列经 BLAST 比对结果显示, PT-RA1 分离株 16S rRNA 基因与鸭疫里默氏杆菌相似性超过 99%, 确定该分离株为鸭疫里默氏杆菌。

2.4 基于 16S rRNA 基因的系统发育分析

系统发育树结果显示, PT-RA1 分离株(GenBank 登录号 C_AA048472.1)与鸭疫里默氏杆菌参考株广州株 GZ-RA12 (GenBank 登录号 KY399255.1)、北京株 CZ-RA03 (GenBank 登录号 KT734781.1)、山东株 SD-RA2018 (GenBank 登录号 MK641456.1)处在同一进化分支上, 相似性为 100%; 与该分支相近的参考菌株为四川

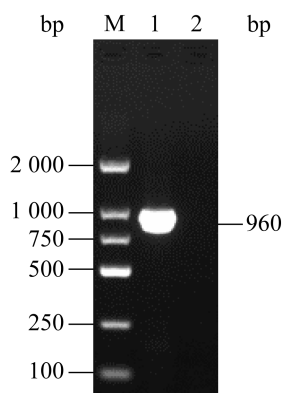


图1 PT-RA1分离株的16S rRNA基因PCR产物电泳图 M: DL2000 DNA Marker; 1: PT-RA1 16S rRNA基因的扩增产物; 2: 空白对照(ddH₂O)
Figure 1 Electrophoretic map of 16S rRNA gene PCR product of PT-RA1 isolates. M: DL2000 DNA Marker; 1: Amplified product of PT-RA1 16S rRNA gene; 2: Blank control (ddH₂O).

株 RA-CH-2 (GenBank 登录号 CP004020.1), 相似性为 99.8% (图 2)。

2.5 血清型鉴定结果

经琼脂扩散试验鉴定分离菌株血清型, 结果显示 PT-RA1 分离株为血清 11 型。

2.6 药敏试验结果

对 PT-RA1 分离株进行药敏试验, 结果显示该分离株对卡那霉素、阿米卡星、新霉素、红霉素、链霉素、庆大霉素、阿奇霉素、恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、萘啶酸、吡哌酸、复方新诺明、多黏菌素 B 和利福平耐药, 对氨苄西林、阿莫西林、头孢唑林、头孢曲松、头孢克肟、头孢吡肟、四环素、多西环素、氧氟沙星、氟苯尼考敏感(表 1)。

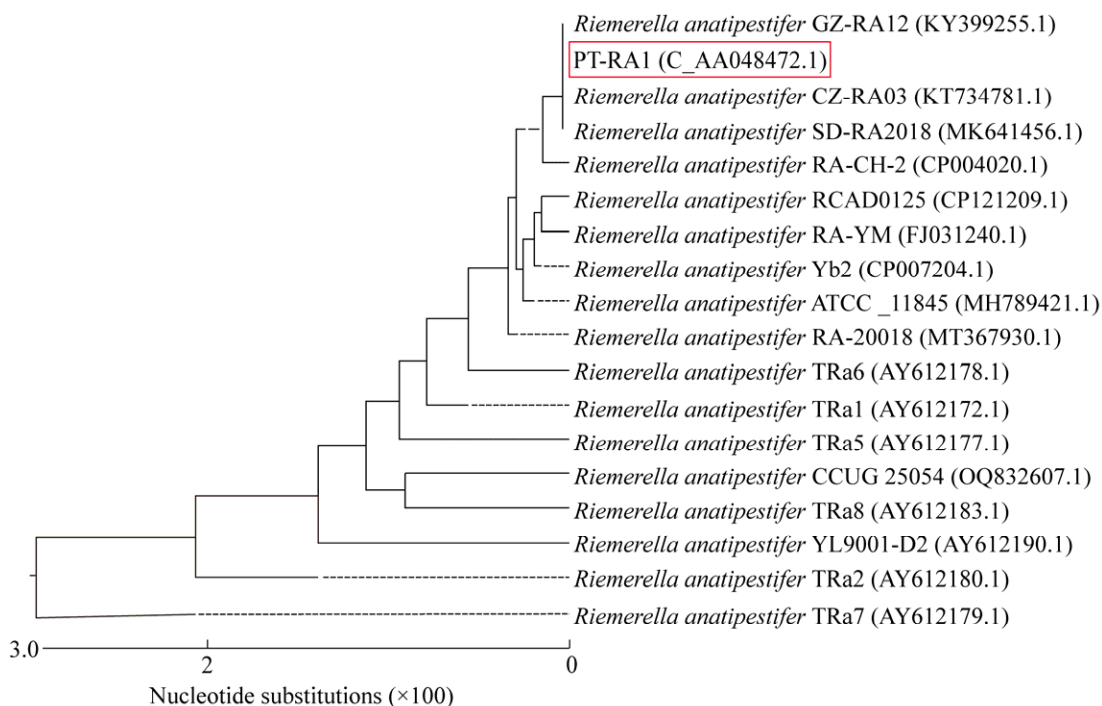


图2 基于 PT-RA1 分离株的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 方框为分离菌株, 括号中是其 GenBank 序列号; 其他为参考菌株, 括号中是其 GenBank 序列号

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of PT-RA1 isolates. The box represents the isolated strain, with its GenBank sequence number in parentheses; Other strains are reference strains, with their GenBank serial numbers in parentheses.

表 1 PT-RA1 分离株的药敏试验结果

Table 1 Results of drug susceptibility testing of PT-RA1 isolates

药物名称 Drug name	判断标准 Judgment criteria			抑菌圈直径大小 Diameter size of antibacterial zone (mm)	药敏结果 Drug sensitivity results
	R	I	S		
氨苄西林 Ampicillin	≤13	14-16	≥17	20	S
阿莫西林 Amoxicillin	≤13	14-17	≥18	32	S
头孢唑林 Cefazolin	≤14	15-17	≥18	30	S
头孢曲松 Ceftriaxone	≤14	15-17	≥18	33	S
头孢克肟 Cefixime	≤14	15-17	≥18	34	S
头孢吡肟 Cefepime	≤14	15-17	≥18	36	S
链霉素 Streptomycin	≤11	12-14	≥15	0	R
庆大霉素 Gentamicin	≤12	13-14	≥15	0	R
卡那霉素 Kanamycin	≤13	14-17	≥18	0	R
阿米卡星 Amikacin	≤14	15-16	≥17	0	R
新霉素 Amikacin	≤12	13-16	≥17	0	R
四环素 Tetracycline	≤14	15-18	≥19	26	S
多西环素 Doxycycline	≤12	13-15	≥16	29	S
红霉素 Erythromycin	≤13	14-22	≥23	0	R
阿奇霉素 Azithromycin	≤13	14-17	≥18	0	R
恩诺沙星 Enrofloxacin	≤15	16-20	≥21	12	R
环丙沙星 Ciprofloxacin	≤15	16-20	≥21	14	R
氧氟沙星 Ofloxacin	≤12	13-15	≥16	17	S
诺氟沙星 Norfloxacin	≤12	13-16	≥17	0	R
萘啶酸 Nalidixic acid	≤13	14-18	≥19	13	R
吡哌酸 Pipemidic acid	≤13	14-18	≥19	10	R
复方新诺明 SMZ-TMP	≤9	10-16	≥17	0	R
多黏菌素 B Polymyxin B	≤7	8-11	≥12	0	R
氟苯尼考 Florfenicol	≤12	13-17	≥18	39	S
利福平 Rifampicin	≤16	17-19	≥20	0	R

S: 敏感; I: 中度敏感; R: 耐药

S: Sensitive; I: Moderately sensitive; R: Resistant.

2.7 致病性试验结果

将 PT-RA1 分离株接种 20 只 15 日龄试验雏番鸭后均表现出鸭疫里默氏杆菌病的临床症状, 主要表现为精神沉郁, 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、转圈、角弓反张等神经症状。在接种 24 h 后试验雏番鸭开始出现死亡, 发病率 100%, 至试验结束共死亡 16 只, 死亡率 80% (图 3); 对照组试验雏番鸭无死亡, 精神状态和饮食均正

常。病死试验雏番鸭剖检可见典型的鸭疫里默氏杆菌病病理变化: 病鸭的心外膜与心包膜粘连, 不易剥离, 气囊混浊增厚, 气囊、心外膜和肝表面覆盖一薄层白色絮状纤维素性渗出物; 胆囊、脾脏肿大等。脾脏的 hematoxylin-eosin staining (HE) 图显示, 菌株 PT-RA1 导致雏番鸭脾脏红髓白髓模糊, 生化中心不明显, 脾脏嗜碱性粒细胞数量大增, 并出现明显的破裂和死亡 (图 4)。自接种鸭疫里默氏杆菌分离株试验雏

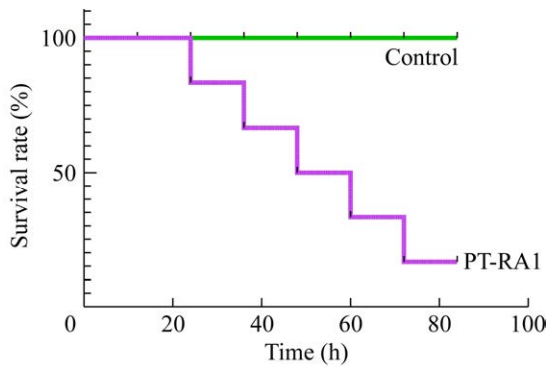


图3 PT-RA1对雏番鸭的存活率影响

Figure 3 Effect of PT-RA1 on the survival rate in Muscovy ducks.

番鸭的心脏、肝脏和脾脏中均可分离到接种菌，经革兰氏染色和生化试验鉴定结果皆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，确定从莆田番鸭场中分离得到一株鸭疫里默氏杆菌。

3 讨论

鸭疫里默氏杆菌的血清型多而复杂，我国多位学者先后分离鉴定了14种血清型(1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、13、14、15、17)^[6,9-14]和其他未知血清型^[2,6,15-16]，目前国际公认的有21种^[17]，在我国主要以1、2、10、11为主^[2,6,15-16]。但随着国内水禽养殖业的发展，鸭疫里默氏杆菌优势血清型也逐渐发生了一些变化，顾玉美等^[18]对从安徽、山东、江苏等地分离鉴定的1051株鸭疫里默氏杆菌进行血清型鉴定，发现血清7型由原来的非优势血清型成为优势血清型，原优势血清1、2型略有下降；血清6、

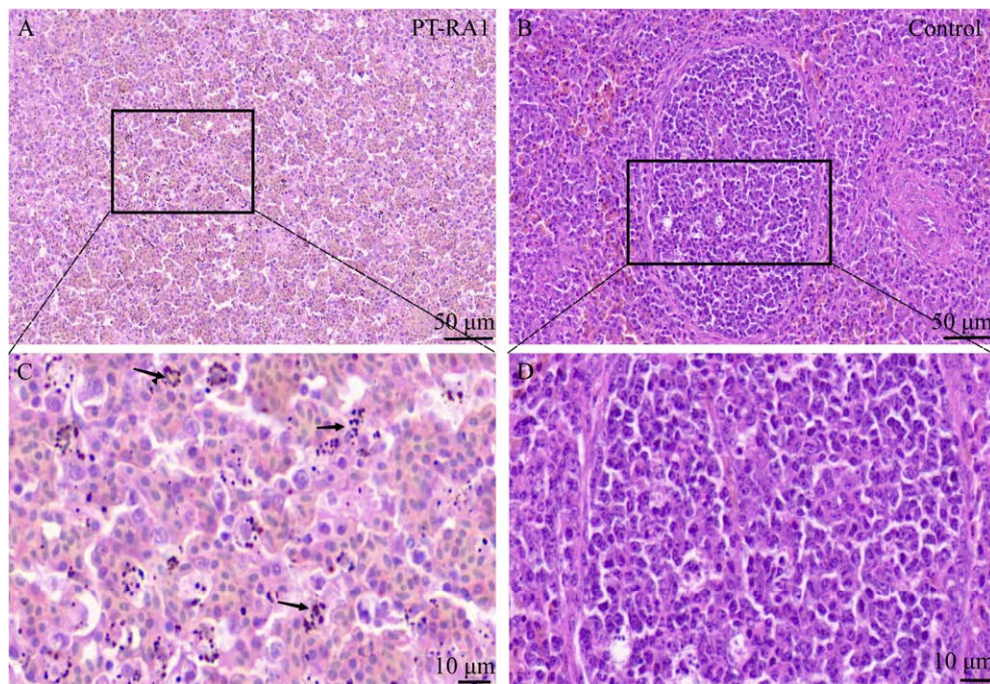


图4 PT-RA1对雏番鸭脾脏的损伤 A: PT-RA1攻毒组. B: 对照组. C: PT-RA1攻毒组放大5倍. D: 对照组放大5倍. 黑色箭头所指为细胞坏死灶

Figure 4 Damage of PT-RA1 in Muscovy ducks. A: PT-RA1 challenge group. B: Control group. C: PT-RA1 challenge group (5×). D: Control group (5×). The black arrow indicates the foci of cell necrosis.

10 型呈上升趋势。本研究分离得到一株 11 型鸭疫里默氏杆菌。

临床上流行菌株血清型分布具有多样性但缺乏有效的交叉免疫保护,导致疫苗接种免疫效果不佳,养殖过程中还是以药物防治为主来防控鸭疫里默氏杆菌,但由于盲目频繁且不规范使用抗生素,致使鸭疫里默氏杆菌在药物选择压力下对药物的耐药性越来越强,抗菌谱也越来越广。吴彩艳等^[19]发现分离自广东地区的 48 株鸭疫里默氏杆菌对庆大霉素、卡那霉素、盐酸环丙沙星高度耐药,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%。张燕等^[20]发现分离自安徽地区的 34 株鸭疫里默氏杆菌对卡那霉素、庆大霉素、丁胺卡那、链霉素、阿奇霉素等抗生素有较强的耐药性;其中 97%的菌株存在多重耐药现象,最高可耐 19 种抗生素。朱元军等^[21]发现分离自福建地区的 25 株鸭疫里默氏杆菌对庆大霉素、链霉素、丁胺卡那霉素、卡那霉素、环丙沙星的耐药率均达到 100%,对红霉素、阿莫西林、氨苄西林、头孢吡肟的耐药率高达 80%。本研究的 PT-RA1 分离株对 25 种供试抗生素中的 15 种耐药(链霉素、阿米卡星、新霉素、庆大霉素、卡那霉素、红霉素、阿奇霉素、恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、萘啶酸、吡哌酸、复方新诺明、多黏菌素 B 和利福平),但该分离株对氨苄西林、阿莫西林、头孢唑林、头孢吡肟、四环素、头孢曲松、头孢克肟、多西环素、氧氟沙星、氟苯尼考敏感,可为该番鸭养殖场后续用药提供指导。

PT-RA1 分离株的 16S rRNA 基因序列测定结果和遗传进化分析结果显示,该分离株与鸭疫里默氏杆菌参考株广州株 GZ-RA12、北京株

CZ-RA03、山东株 SD-RA2018 处在同一进化分支上,具有较近的亲缘关系;来自不同地区的菌株遗传距离相对较近,这表明鸭疫里默氏杆菌可能跨地区传播。此外,该分离株的致病性试验结果表明,它有较强的致病性,病死率高。为更好地防控鸭疫里默氏杆菌病,广大养殖人员要切实增强生物安全理念和科学饲养意识。

4 结论

本研究通过细菌分离纯化、16S rRNA 基因序列鉴定和血清型鉴定从病死雏番鸭的脑组织中分离得到一株 11 型鸭疫里默氏杆菌,该分离株多重耐药严重,致死率高,引起严重的脾脏病变。16S rRNA 基因遗传进化树分析显示该分离株与广州、北京、山东等地区的鸭疫里默氏杆菌亲缘关系较近,提示鸭疫里默氏杆菌可能存在跨地区传播。因此,在临床上应科学合理使用抗生素,防止耐药菌株的产生,同时也要预防不同地区细菌的频繁流动造成的跨地区传播。

REFERENCES

- [1] LYU ZH, HAN SS, LI J, GUO ZY, GENG NW, LYU C, QIN LT, LI N. Epidemiological investigation and drug resistance characteristics of *Riemerella anatipestifer* strains from large-scale duck farms in Shandong Province, China from March 2020 to March 2022[J]. *Poultry Science*, 2023, 102(7): 102759.
- [2] 林彬彬, 谢碧林, 王秀祯, 翁汉东, 程龙飞, 傅光华, 刘荣昌, 林志敏. 鸭疫里默氏菌的分离鉴定及药物敏感性分析[J]. *养禽与禽病防治*, 2021(11): 11-16.
LIN BB, XIE BL, WANG XZ, WENG HD, CHENG LF, FU GH, LIU RC, LIN ZM. Isolation, identification and drug sensitivity analysis of *Riemerella anatipestifer*[J]. *Poultry Husbandry and Disease Control*, 2021(11): 11-16 (in Chinese).
- [3] 高巍. 一株鹅源鸭疫里默氏杆菌 1 型菌株的分离鉴定与生物学特性分析[J]. *家禽科学*, 2023, 45(1): 44-46, 49.
GAO W. Isolation, identification and biological characteristics analysis of a strain of *Riemerella anatipestifer* type 1 from geese[J]. *China Poultry*

- Science, 2023, 45(1): 44-46, 49 (in Chinese).
- [4] 李维升, 王艳, 高亚东, 赵神鸿, 孙景昱, 张越, 尹建华. 1 株鸡源鸭疫里默氏杆菌的分离鉴定及其生物学特性分析[J/OL]. 中国动物传染病学报, 2022. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20221008.005.
LI WS, WANG Y, GAO YD, ZHAO SH, SUN JY, ZHANG Y, YIN JH. Isolation, identification and biological characteristics analysis of a strain of *Riemerella anatipestifer* from chickens[J/OL]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2022. DOI: 10.19958/j.cnki.cn31-2031/s.20221008.005 (in Chinese).
- [5] LOZICA L, MAZIĆ M, GOTTSTEIN Ž. A case study of a *Riemerella anatipestifer* infection on a commercial turkey farm in Croatia[J]. European Poultry Science, 2021, 85: 1-7.
- [6] 程龙飞, 陈红梅, 施少华, 傅光华, 万春和, 傅秋玲, 黄瑜, 林建生. 鸭疫里默氏菌的血清型及药物敏感性分析[J]. 中国动物传染病学报, 2013, 21(4): 23-28.
CHENG LF, CHEN HM, SHI SH, FU GH, WAN CH, FU QL, HUANG Y, LIN JS. Serotyping and drug sensitivity of *Riemerella anatipestifer* isolates from ducks and geese[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2013, 21(4): 23-28 (in Chinese).
- [7] 宋晓恒. 鸭疫里默氏菌的分离鉴定及 RCAD0122 株多重耐药基因簇的解析[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2016.
SONG XH. Isolation and identification of *Riemerella anatipestifer* and analysis of multidrug-resistant gene clusters in strain RCAD0122[D]. Yaan: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018, M100-S28.
- [9] 汪铭书, 程安春, 陈孝跃, 刘兆宇, 方鹏飞, 郭宇飞. 血清 3 型鸭疫里氏杆菌在我国的发现及其病原特性研究[J]. 中国家禽, 2001(22): 12-15.
WANG MS, CHENG AC, CHEN XY, LIU ZY, FANG PF, GUO YF. Serotype 3 *Riemerella anatipestifer* found in China and studied on its property[J]. China Poultry, 2001(22): 12-15 (in Chinese).
- [10] 汪铭书, 程安春, 陈孝跃, 刘兆宇, 方鹏飞, 郭宇飞. 血清 4 型鸭疫里氏杆菌在我国的发现及其病原特性研究[J]. 中国兽医杂志, 2002(12): 5-9.
WANG MS, CHENG AC, CHEN XY, LIU ZY, FANG PF, GUO YF. Studies on the isolation and pathogenicity of *Riemerella anatipestifer* serotype 4 in China[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2002(12): 5-9 (in Chinese).
- [11] 汪铭书, 程安春, 陈孝跃, 刘兆宇, 方鹏飞, 郭宇飞. 血清 5 型鸭疫里氏杆菌在我国的发现及其病原特性研究[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(9): 16-20.
WANG MS, CHENG AC, CHEN XY, LIU ZY, FANG PF, GUO YF. Discovery of *Riemerella anatipestifer* serotype 5 in China and study on its pathogenic properties[J]. Chinese Journal of Veterinary Science and Technology, 2002, 32(9): 16-20 (in Chinese).
- [12] 张大丙, 郭玉璞. 7 型鸭疫里氏杆菌分离株的鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(5): 18-19.
ZHANG DB, GUO YP. Identification of *Riemerella anatipestifer* serotype 7[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2003, 39(5): 18-19 (in Chinese).
- [13] 汪铭书, 程安春, 陈孝跃, 刘兆宇, 方鹏飞, 郭宇飞. 血清 8 型鸭疫里默氏杆菌在我国的发现及其病原特性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2003, 25(1): 47-52.
WANG MS, CHENG AC, CHEN XY, LIU ZY, FANG PF, GUO YF. Pathogenicity characteristic of *Riemerella anatipestifer* serotype 8 strain[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2003, 25(1): 47-52 (in Chinese).
- [14] 张大丙, 郭玉璞. 15 型鸭疫里氏杆菌分离株的鉴定[J]. 中国兽医杂志, 2002, 38(3): 23.
ZHANG DB, GUO YP. Identification of *Riemerella anatipestifer* serotype 15[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2002, 38(3): 23 (in Chinese).
- [15] 左春生, 李迎晓, 徐光科, 李洵, 饶丹, 吴海港, 刘锦妮, 黄立, 赵聘, 焦凤超. 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.
ZUO CS, LI YX, XU GK, LI X, RAO D, WU HG, LIU JN, HUANG L, ZHAO P, JIAO FC. Partial biological characteristics of 14 strains of *Riemerella anatipestifer* from ducks[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2020, 48(15): 221-225 (in Chinese).
- [16] 任晓梅, 王小兰, 韩文龙, 张雪梅, 陈宗超, 李涛, 丁铲, 于圣青. 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.
REN XM, WANG XL, HAN WL, ZHANG XM, CHEN ZC, LI T, DING C, YU SQ. Isolation, identification and biological characterization of *Riemerella anatipestifer*[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2018, 26(4): 47-51 (in Chinese).
- [17] PATHANASOPHON P, SAWADA T,

- TANTICHAROENYOS T. New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand[J]. Avian Pathol, 1995, 24(1): 195-199.
- [18] 顾玉美, 侯军, 钟万金, 朱晓玮, 周永银. 鸭疫里默氏杆菌流行菌株的血清型分析与最小感染量测试[J]. 中国禽业导刊, 2023, 40(3): 60-63.
GU YM, HOU J, ZHONG WJ, ZHU XW, ZHOU YY. Serotype analysis and minimal infection test of *Riemerella anatipestifer* epidemic strains[J]. Guide to Chinese Poultry, 2023, 40(3): 60-63 (in Chinese).
- [19] 吴彩艳, 廖申权, 戚南山, 廖晓萍, 孙阮洋, 方亮星, 周宇峰, 李林林, 孙铭飞. 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 CY, LIAO SQ, QI NS, LIAO XP, SUN RY, FANG LX, ZHOU YF, LI LL, SUN MF. Epidemiological surveillance and genetic evolution of *Riemerella anatipestifer* in Guangdong Province[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(2): 1-10 (in Chinese).
- [20] 张燕, 董洪燕, 于圣青, 杨静静, 吴植, 吴双, 洪双鹏, 朱善元, 邢华. 34 株鸭疫里默氏杆菌的分离鉴定及部分耐药基因调查分析[J]. 中国动物传染病学报, 2024, 32(1): 142-149.
ZHANG Y, DONG HY, YU SQ, YANG JJ, WU Z, WU S, HONG SP, ZHU SY, XING H. Isolation, identification and some drug resistance genes analysis of 34 *Riemerella anatipestifer* isolates[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2024, 32(1): 142-149 (in Chinese).
- [21] 朱元军, 杨德鸿, 麦凯杰, 刘洋洋, 罗翠芬, 周庆丰, 刘军发, 罗军荣. 浙、闽、粤地区鸭疫里默氏杆菌分离鉴定与药敏实验[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2019(2): 45-47.
ZHU YJ, YANG DH, MAI KJ, LIU YY, LUO CF, ZHOU QF, LIU JF, LUO JR. Isolation, identification and drug sensitivity test of *Riemerella anatipestifer* in Zhejiang, Fujian and Guangdong Provinces[J]. Jiangxi Journal of Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2019(2): 45-47 (in Chinese).