

# 鹅源鸭疫里默氏杆菌的分离、鉴定与生物学特性研究

吕敏娜 戚南山 覃宗华 廖申权 吴彩艳 孙铭飞\*

(广东省农业科学院兽医研究所 广东省兽医公共卫生公共实验室 广东 广州 510640)

**摘要:**【目的】从疑似鸭疫里默氏杆菌病的病死雏鹅分离病原菌进行鉴定。【方法】根据细菌培养特性、生化特性、动物试验、血清型鉴定及分子生物学特性对分离菌株进行鉴定。【结果】分离菌株为革兰氏阴性菌，不发酵糖类和醇类，尿素酶试验和氧化酶还原试验为阳性，致病，不同分离株的 16S rRNA 基因经多重序列比对分析，结果显示鹅源分离株与鸭源鸭疫里默氏杆菌处于同一进化支上，与鸡源鸭疫里默氏杆菌进化关系稍远，血清型鉴定为 1 型。【结论】分离菌株为血清 1 型的鸭疫里默氏杆菌，对鸭和鹅均有高致病性，自家疫苗能够较好地保护雏鹅。

**关键词:** 鹅，鸭疫里默氏杆菌，16S rRNA 基因

## Isolation, identification and biological characterization of *Riemerella anatipestifer* from goose

LÜ Min-Na QI Nan-Shan QIN Zong-Hua LIAO Shen-Quan  
WU Cai-Yan SUN Ming-Fei\*

(Institute of Veterinary Medicine, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Open Laboratory of Veterinary Public Health, Guangzhou, Guangdong 510640, China)

**Abstract: [Objective]** To identify pathogenic bacteria isolated from dead goslings suspected

基金项目: 广东省科技厅国际合作专项(No. 2008A050200015); 广东省自然科学基金项目(No. 9251064001000010)

\*通讯作者: Tel: 86-20-85291691; ✉: smf7810@126.com

收稿日期: 2012-02-29; 接受日期: 2012-05-25

*Riemerella anatipestifer* disease. [Methods] The isolated bacterial strain was subjected to examine by the cultural performances, biochemical properties, animal text, serological identification and biological features. [Results] The results showed that the isolated strain was identified as gram-negative bacteria, which could not ferment and alcohols, and it was positive of ureolysis test and oxidase test. Pathogenic. The multiple sequence alignment from different isolated stains 16S rRNA genes showed, the strain in this study was at the same evolution branches with the *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks, but it was in little relation to the *Riemerella anatipestifer* isolated from chicken. It belongs to the serotype I of *Riemerella anatipestifer*. [Conclusion] The isolated bacterium belongs to the serotype I of *Riemerella anatipestifer*, which was highly pathogenic to the ducking and goosing, and the self-development vaccine could protect the goslings effectively against to be infected by *Riemerella anatipestifer*.

**Keywords:** Goose, *Riemerella anatipestifer*, 16S rRNA gene

鸭疫里默氏杆菌病又称为鸭疫巴氏杆菌病、传染性浆膜炎、新鸭病、鸭败血症等,它是由鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)感染引起的一种接触传染性疾病,呈急性或慢性败血症,以纤维素性心包炎、肝周炎、气囊炎、脑膜炎为特征,除了主要感染雏鸭外,还可感染雏鹅及雏火鸡等,其发病率、死亡率都高<sup>[1-2]</sup>。1986年 Piechulla 等研究发现该菌与黄杆菌/噬胞菌属某些成员有一些共同的特性,建议将该菌划入黄杆菌/噬胞菌属。之后,随着分子生物学的发展,Segers 等(1993)分析了该菌各种表型参数和基因特征,认为该菌应列为一个单独的属,为纪念在1904年最早发现鹅感染本菌的 Riemer,遂将本菌的属名定为 *Riemerella*, 为避免命名上的混淆,因而保留了原来的种名 *anatipestifer*, 故定名为 *Riemerella anatipestifer*, 并已获得公认。1932年美国学者 Hendrickson 和 Hilbert 首次报道 RA 的流行。在我国,养鸭地区发生该病的报道很多,近几年来,也陆续见雏鹅发病的报道。

广东省珠江三角洲某养鹅场的鹅苗养至 15 d 时,部分雏鹅表现倦怠,眼和鼻有分泌物,拉白

色或淡绿色稀粪,运动失调,头颈震颤以及昏睡,行动迟缓,死亡率在 20%–30%之间,30 d 龄后死亡逐渐减少。幸存鹅生长发育受阻,残次鹅较多,尸体剖检可见纤维素性心包炎,肝周炎,气囊炎,疑为鸭疫里默氏杆菌病,本研究室对该病原进行了分离与鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

病料,采自广东省珠江三角洲某鹅场的病死雏鹅;生化反应管,购自广东环凯微生物科技有限公司;药敏试纸、瑞氏、革兰氏染色液,购自杭州天和微生物试剂有限公司;RA 标准血清型 1 型、2 型抗原、抗体。

*E. coli* DH5 $\alpha$ 、琼脂糖、基因组 DNA 提取试剂盒购自 Promega 公司;pGMD-T Easy Vector、DNA Marker (DL2000)、Premix Taq 购自 TaKaRa 公司;胶回收试剂盒购自 Omega 生物科技公司。

设计扩增鸭疫里默氏杆菌的 16S rRNA 通用引物: 16S-P<sub>1</sub>: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCA

G-3'; 16S-P<sub>2</sub>: 5'-GTGACGGGCGGTGTGTAC-3'。  
引物由上海英骏生物技术公司合成。

## 1.2 方法

**1.2.1 细菌的分离培养:** 无菌条件下采取病死雏鹅的心血、肝脏、脑等组织, 分别接种于巧克力琼脂、普通琼脂、麦康凯琼脂培养基, 于 37 °C 在 CO<sub>2</sub> 环境中培养 24–48 h, 观察生长结果。经巧克力培养基进一步纯化菌落, 用 TSB 培养基进行增菌培养。

**1.2.2 细菌形态观察:** 取巧克力琼脂平板上经过纯化的单个菌落, 按常规方法进行涂片, 革兰氏染色, 瑞氏染色, 镜检。

**1.2.3 生化试验:** 取巧克力琼脂平板上单个菌落分别接种于系列生化反应管中, 具体的操作方法按生化反应管说明书的操作步骤进行, 37 °C 培养 24–48 h, 观察结果。

**1.2.4 动物回归试验:** 将巧克力琼脂平板上的分离菌株菌落, 用灭菌生理盐水洗脱成细菌菌液, 并调节细菌数为  $2 \times 10^9$  CFU/mL, 选用 15 d 龄的雏鹅、雏鸭各 20 只, 各随机分为试验组和空白对照组, 10 只/组。试验组腿部肌肉注射菌液 1 mL/只, 空白对照组注射生理盐水 1 mL/只; 并将从攻毒后病死鸭中再次分离的同源菌再一次攻击 15 d 龄的雏鸭 10 只, 另设 10 只空白对照注射生理盐水, 观察试验结果。

**1.2.5 血清型鉴定:** 参照文献[3]介绍的方法做玻片凝集试验和琼脂凝胶沉淀反应进行血清型鉴定。

**1.2.6 药敏试验:** 将分离菌株采用药敏纸片扩散法, 对所选择的药物进行药敏试验, 37 °C 恒温培养, 24 h 观察结果。

**1.2.7 分离菌株 16S rRNA 基因的克隆及序列分析:** 以分离菌基因组 DNA 为模板, 用 16S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增分离菌的 16S rRNA 基因。PCR 反应体系(50 μL): Premix Taq™ 25 μL,

上、下游引物 16S-P<sub>1</sub>/16S-P<sub>2</sub> 各 1 μL, 模板 1 μL, 双蒸水 22 μL。PCR 反应程序: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s; 57 °C 30 s; 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 7 min。PCR 反应结束后取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段并与 pGEM-T Easy Vector 连接后转化 *E. coli* DH5α, 挑单菌落经 PCR 鉴定为阳性的克隆送华大基因公司测序, 测序后经 BLAST 进行序列分析。

**1.2.8 田间免疫试验:** 取分离菌株的种子液接种于 TSB 培养基, 于 37 °C、180 r/min 振荡培养 20–22 h, 纯检后, 按常规用甲醛灭活 24 h, 调节其浓度, 再加入经 95% 酒精浸提 7 d 以上的蜂胶佐剂制成自家蜂胶灭活苗, 疫苗里蜂胶的含量为 10 g/L, 于 4 °C 冰箱保存备用。在原发病的鹅场选用同一批雏鹅随机分成免疫组和非免疫组, 免疫组 5 000 只, 非免疫组 3 000 只, 免疫组于 7 d 龄接种免疫剂量为  $8 \times 10^9$  CFU/只的自家苗, 非免疫组注射 1 mL/只生理盐水, 试验期间随访观察, 至上市日龄, 并采用卡方检验对结果进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 培养特性

分离菌株在普通琼脂、麦康凯琼脂培养基上不生长, 在巧克力琼脂培养基上可长成直径为 1 mm–2 mm 的菌落, 凸起, 湿润, 光滑, 呈露珠状。

### 2.2 形态及染色特性

瑞氏染色镜检可见菌体呈两极着染, 杆状, 多数单个存在, 少数成双排列。革兰氏染色呈阴性。

### 2.3 生化特性

分离菌株不发酵糖类和醇类, 尿素酶试验和氧化酶还原试验为阳性, 结果见表 1。

表 1 鸭疫里默氏杆菌分离菌株生化试验结果  
Table 1 Biochemical test results of the isolated *Riemerella anatipestifer*

项目 Items	结果 Results	项目 Items	结果 Results	项目 Items	结果 Results
葡萄糖	—	麦芽糖	—	肌醇	—
Glucose		Maltose		Inositol	
乳糖	—	蔗糖	—	山梨醇	—
Lactose		Sucrose		Sorbitol	
甘露醇	—	木糖	—	淀粉	—
Mannitol		Xylose		Amylolysis	
鼠李糖	—	氰化钾	—	靛基质	—
Rhamnose		Potassium cyanide		Indole	
硝酸盐还原	—	尿素酶	+	氧化酶还原	+
Nitrate reduction		Urease		Oxidase	
MR	—	VP	—	硫化氢	—
Methyl red test		Voges proskauer test		Hydrogen sulfide	

注: +: 分解/阳性; -: 不分解/阴性。  
Note: +: Decomposition/Positive; -: Non-decomposition/Negative.

2.4 回归动物试验

分离菌株以 2×10<sup>9</sup> CFU/只攻击雏鹅后, 24 h 开始出现临床症状: 嗜睡, 缩颈, 不食或少食, 脚软, 不愿走动或行动不便, 部分雏鹅出现神经症状, 如痉挛、摇头或点头, 背脖和两脚伸直, 呈角弓反张。48 h 出现死亡, 72 h 全部死亡。剖检与自然病例呈现病变完全相同: 心包炎、肝周炎(图 1); 而且可从死亡雏鹅中分离到同源菌株。对照组雏鹅食欲、精神状态及生长均无异常变化。

分离菌株以 2×10<sup>9</sup> CFU/只攻击雏鸭后, 48 h 开始出现临床症状, 72 h 出现死亡, 观察 10 d, 共死亡 6 只, 对照组雏鸭正常, 从死亡雏鸭中可分离到同源菌株, 结果见表 2。

从死亡雏鸭中分离到的同源菌株培养后, 以 2×10<sup>9</sup> CFU/只再一次攻击 15 d 雏鸭, 结果在攻击后 24 h 出现症状, 72 h 全部死亡, 从死亡雏鸭中可再次分到同源菌株, 结果见表 3。

2.5 血清型鉴定

分离菌株与标准血清 1 型抗体的玻片凝集试验结果出现清晰的乳白色絮状凝集块, 与标准血清 2 型抗体无反应。分离菌株的抗原、抗体与标准血清 1 型的抗原、抗体的琼脂扩散试验结果均出现清晰的沉淀线, 而与标准血清 2 型的抗原、抗体均无反应, 表明分离菌株为鸭疫里默氏杆菌血清 1 型。



图 1 心包炎、肝周炎  
Fig. 1 Pericarditis, and perihepatitis

表 2 鸭疫里默氏杆菌分离菌株动物致病性试验  
Table 2 Animal pathogenicity test of the isolated *Riemerella anatipestifer*

组别 Groups	试验动物数 Number of test animals (bird)	感染剂量 Dosage (CFU/bird)	死亡数 Death (bird)	死亡率 Mortality rate (%)
试验雏鹅 Test goslings	10	$2 \times 10^9$	10	100
对照组雏鹅 Control group goslings	10	0	0	0
试验雏鸭 Test ducklings	10	$2 \times 10^9$	6	60
空白对照组雏鸭 Blank control group ducklings	10	0	0	0

表 3 分离菌株经雏鸭传代后对雏鸭致病性试验  
Table 3 Pathogenicity test of ducklings of the isolated strains by ducklings passage

组别 Groups	试验动物数 Number of test animals (bird)	感染剂量 Dosage (CFU/bird)	死亡数 Death (bird)	死亡率 Mortality rate (%)
试验雏鸭 Test ducklings	10	$2 \times 10^9$	10	100
空白对照组雏鸭 Blank control group ducklings	10	0	0	0

## 2.6 分离菌株的药敏试验

药敏试验结果表明分离菌株对氨苄西林、先锋霉素 V、利福平、红霉素、林可霉素、氧氟沙星、痢特灵、头孢噻吩、壮观霉素、先锋 VI、舒普深、阿奇霉素、克拉霉素、罗红霉素、恩诺沙星、氨苄西林/舒巴坦等高度敏感, 对新霉素、氯霉素、万古霉素、强力霉素、环丙沙星等中度敏感, 对链霉素、卡那霉素、阿米卡星、庆大霉素、复方新诺明、氟哌酸、阿莫西林、洛美沙星等低敏或不敏感。

## 2.7 PCR 扩增结果及进化关系比较

以鸭疫里默氏杆菌分离株基因组 DNA 为模板, 用细菌 16S rRNA 基因的通用引物 16S-P<sub>1</sub>/16S-P<sub>2</sub> 进行 PCR 扩增, 结果可扩增出大小约为 1 300 bp 的 DNA 片段, 见图 2。

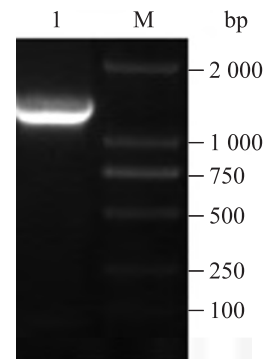


图 2 分离株 16S rRNA 基因扩增结果

Fig. 2 PCR amplification of isolated strain 16S rRNA gene

注: M: DL2000 marker; 1: PCR 产物。

Note: M: DL2000 marker; 1: PCR products.

PCR 产物经电泳回收, 回收后的 DNA 片段与载体 pGEM-T Easy Vector 连接后转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 经 PCR 鉴定后的阳性克隆测序结果显示其大小为 1 384 bp, 选取不同来源的鸭疫里默氏

杆菌 16S rRNA 基因序列, 进行多重比对分析, 结果表明此鹅源 RA 分离菌株与所有不同地区分离的 RA 处于同一进化分支上, 但与鸡源的 RA 进化关系稍远, 不处于同一进化分支上; 与作为

参照的多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)、*E. coli* 等进化关系均较远。基于此分子进化树, 认为该研究分离获得的菌株为 RA, 与鸭源 RA 分子进化关系较近, 而区别于鸡源 RA, 见图 3。

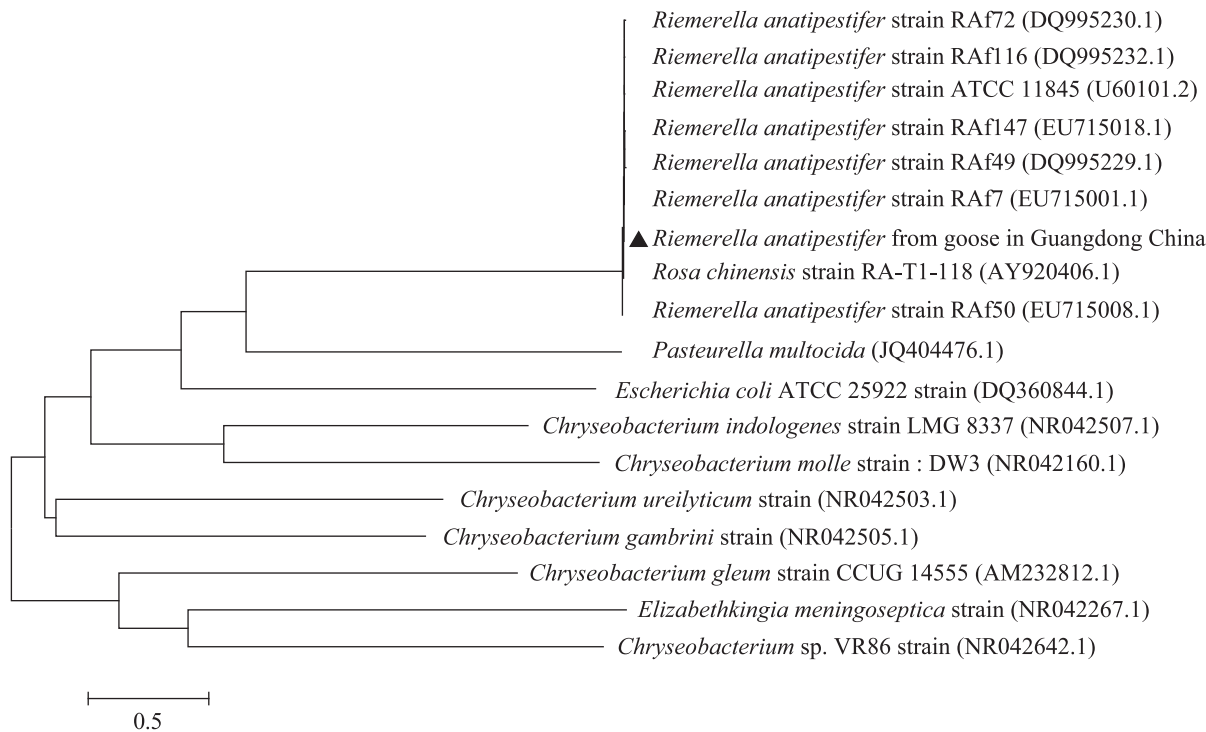


图 3 分离菌株 16S rRNA 基因序列的系统进行树

Fig. 3 Phylogentic tree based on 16S rRNA gene sequence of the isolated strain

注: ▲: 分离株; 括号内代表 GenBank 序列接受号; 标尺代表进化距离。

Note: ▲: Isolated strains. The serial number in the bracket is GenBank accession number. The scaleplate is evolutionary distance.

2.8 自家菌苗田间免疫试验结果

在鹅场免疫后, 观察免疫效果如表 4 所示。

利用 DPS (Data processing system) V 8.01 统计软件<sup>[4]</sup>对免疫组与非免疫组进行卡方检验, 试验结果表明, 免疫组的鹅病死率明显低于非免疫组鹅的病死率,  $\chi^2$  检验差异极显著( $\chi^2=126.861$  8,  $P<0.01^{**}$ ), 可见, 将分离菌株制成自家蜂胶灭活苗, 对雏鹅进行免疫可有效预防鸭疫里默氏杆菌病, 减少死亡。

表 4 分离菌株田间免疫试验保护效果  
Table 4 Feld immunity test protection effect of the isolated strains

组别 Groups	试验鹅数 Number of test goose (bird)	病死率 Case fatality rate (%)
免疫组 Immune group	5 000	0.1
非免疫组 Non-immune group	5 000	2.9



### 3 讨论

从广东省珠江三角洲某鹅场病死的疑似鸭疫里默氏杆菌病的雏鹅分离的细菌, 根据临床症状、剖检结果、实验室的细菌培养特性、生化试验、动物回归试验以及分子生物学特性鉴定, 确认所分离的菌株为鸭疫里默氏杆菌, 经平板凝集反应和琼脂凝集沉淀反应确定为血清 I 型。

该研究所分离到的鹅源菌株能使雏鹅、雏鸭出现典型的传染性浆膜炎症状及病理变化, 且经腿部肌肉注射, 对雏鹅的易感性比雏鸭强, 但经鸭体传代复壮后, 对雏鸭的毒力增强。胡清海等<sup>[5]</sup>也报道雏鹅经腿部肌肉注射进行攻击, 对鸭源 RA 和鹅源 RA 的易感性均比雏鸭强。

鸭疫里默氏杆菌在我国鸭场中广泛存在, RA 血清型较多, 迄今为止, 国际上确认的血清型共有 21 个(1-21 型)<sup>[6]</sup>, 不同血清型之间几乎没有交叉保护<sup>[7]</sup>。由于菌苗诱导的免疫力具有血清型特异性, 所以自家疫苗的研制是防治本病的关键。

细菌 16S rRNA 基因由可变区和保守区交替组成, 保守区在所有细菌中高度一致, 而可变区序列则因菌种的不同而有较大变化<sup>[8-9]</sup>。遗传进化分析表明, 该研究分离获得的菌株为 RA, 与鸭源 RA 分子进化关系较近, 而区别于鸡源 RA。

长久以来 RA 感染多见于各品种雏鸭, 其它禽类罕见报道, 但近年来我国陆续有鹅感染 RA 的报道<sup>[5,10-12]</sup>, 表明近年来我国雏鹅自然感染 RA 的病例逐渐增多, 应引起重视。

### 参考文献

- [1] Saif YM. 禽病学[M]. 苏敬良, 高福, 索勋, 译. 第11版. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [2] Kiss I, Kardos G, Nagy J, et al. DNA fingerprinting of *Riemerella anatipestifer* isolates from ducks[J]. Veterinary Record, 2007, 160(1): 26-28.
- [3] 高福, 郭玉璞. 鸭疫里氏杆菌的血清型鉴定[J]. 中国兽医杂志, 1987, 13(4): 47-48.
- [4] 唐启义, 冯明光. 实用统计分析及其 DPS 数据处理系统[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 93-99.
- [5] 胡清海, 刘晓文, 苗晋锋, 等. 一株鹅源鸭疫里氏杆菌与鸭源分离株的致病性比较[J]. 畜牧和兽医, 2002, 34(9): 3-4.
- [6] 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[J]. 中国兽医学报, 2003, 23(4): 320-323.
- [7] Pathanasophon P, Sawada T, Tanticharoenyos T. New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand[J]. Avian Pathology, 1995, 24(1): 195-199.
- [8] Trkov M, Avguštin G. An improved 16S rRNA based PCR method for the specific detection of *Salmonella enterica*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 80(1): 67-75.
- [9] Yoon JH, Yim DK, Goodfellow M, et al. Sequence analysis of 16S rRNA genes amplified from two ribosomal RNA gene clusters of *Bifidobacterium bifidum*[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 1999, 75(4): 329-333.
- [10] 程龙飞, 李文杨, 傅光华, 等. 鹅源2型鸭疫里氏杆菌的分离与鉴定[J]. 中国兽医科技, 2003, 33(11): 36-38.
- [11] 朱国贤. 一起鹅传染性浆膜炎与大肠杆菌病混合感染的诊治[J]. 福建畜牧兽医, 2008, 30(2): 34-35.
- [12] 赵宝华, 徐步, 范建华. 鹅源鸭疫里默氏杆菌的分离和鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(8): 189-192.