

张敬峰, 董永毅, 卢凤英, 等. 鸭疫里氏杆菌 1 型流行株的生物学特性及免疫原性[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(4): 1021-1025.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.04.019

鸭疫里氏杆菌 1 型流行株的生物学特性及免疫原性

张敬峰¹, 董永毅², 卢凤英¹, 刘青涛¹, 徐彬¹, 赵莎¹, 孙华伟¹, 吴坤², 张小飞¹

(1. 江苏省农业科学院兽医诊断检测中心, 江苏 南京 210014; 2. 江苏省动物疫病预防控制中心, 江苏 南京 210036)

摘要: 为研究当前鸭疫里氏杆菌 1 型(RA1)流行株的生物学特性及免疫原性, 对从江苏省、山东省等不同地区规模鸭场采集的病料中分离的 23 个疑似 RA 的菌株纯化培养后进行细菌形态观察, 并利用 RA 16S rRNA 基因特异性引物进行 PCR 鉴定及基因序列测定、生化试验、血清学分型鉴定、致病性分析、交叉攻毒保护试验。结果表明, 16 株分离株符合 RA 生物学特性, 经 PCR 检测为 RA 阳性, 与 GenBank 中 RA 相应基因同源性 $\geq 99\%$, 其中 11 株血清学鉴定为 RA1, 占分离 RA 总数的 68.7%; 选取的 5 株 RA1 分离株中 JP01、SD02、GY01 等 3 株致病率和致死率达 80%~100%; 对 3 株 RA1 分离株进行免疫原性研究, 结果显示 JP01 株对各毒株的交叉攻毒保护率可达 100%, 说明 JP01 株具有良好的免疫原性。

关键词: 鸭疫里氏杆菌 1 型; 生物学特性; 交叉免疫保护

中图分类号: S858.322.61 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)04-1021-05

Biological characteristics and immunogenicity of *Riemerella anatipestifer* serotype 1 epidemic strains

ZHANG Jing-feng¹, DONG Yong-yi², LU Feng-ying¹, LIU Qing-tao¹, XU Bin¹, ZHAO Sha¹, SUN Hua-wei¹, WU Kun², ZHANG Xiao-fei¹

(1. Veterinary Diagnostic Testing Center, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. Jiangsu Center for Animal Disease Control and Prevention, Nanjing 210036, China)

Abstract: In order to study the biological characteristics and immunogenicity of *Riemerella anatipestifer* serotype 1 (RA1) epidemic strains, 23 strains of suspected RA isolated from disease materials collected from duck farms in different regions of Jiangsu, Shandong and other provinces were purified and cultured. Subsequently, these bacteria were subjected to morphological observation, PCR identification, gene sequencing, biochemical tests, serological identification, pathogenicity tests and cross-challenge protection tests by using RA 16S rRNA gene-specific primers. The results showed that 16 isolates were in line with the biological characteristics of RA and were identified as positive by PCR. The homology with the corresponding genes of RA in GenBank was not less than 99%. Among them, 11 strains were serologically identified as RA1, accounting for 68.7% of the total isolated RA. Among the five selected RA1 isolates, the morbidity and mortality of JP01,

SD02 and GY01 ranged from 80% to 100%. The immunogenicity study of three RA1 isolates showed that the cross-challenge protection rate of JP01 strain against each virulent strain could reach 100%, indicating that JP01 strain had good immunogenicity.

Key words: *Riemerella anatipestifer* serotype 1; biological characteristics; cross-immune protection

收稿日期: 2021-11-30

基金项目: 江苏现代农业(水禽)产业技术体系疾病防控创新团队项目[JATS(2021)357]; 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(19)3002]

作者简介: 张敬峰(1982-), 男, 安徽含山人, 硕士, 副研究员, 主要从事畜禽重大疫病防控技术及兽用生物制品研究。(Tel)025-84390131; (E-mail)42642098@qq.com

鸭传染性浆膜炎是由鸭疫里氏杆菌(*Rimerella anatipestifer*, RA)引起的一种接触性传染病,多发于 1~8 周龄鸭,可导致大批鸭发病死亡以及生长迟缓^[1]。鸭传染性浆膜炎不但常见于肉鸭各个生长阶段,还会引起成年蛋(种)鸭发病,造成较大的经济损失,是目前危害中国鸭养殖业的主要细菌性疾病之一。RA 在自然界尤其是鸭场广泛分布,其血清型较为复杂,在世界范围内存在 20 余种^[2],不同血清型及同型的不同毒株间毒力与免疫保护率有较大差异。中国目前流行的 RA 血清型主要以 1 型为主,也有 2 型、3 型等报道。由于一般的鸭场、设施以及饲养方式相对落后,加之 RA 易形成耐药性,而上市的含某些 RA 血清型灭活疫苗因不同地区流行菌株的不同往往临床应用效果不佳,导致该病的防控较为困难。

本研究对 2019 年 7 月-2020 年 6 月在江苏省、山东省等不同地区 32 个规模鸭场采集分离的 RA 菌株进行相关生物学特性研究,了解上述地区 RA 感染的优势血清型情况,并针对分离的 1 型 RA 流行菌株进行交叉攻毒保护等免疫原性研究,以期对 RA 的疫苗研发以及科学免疫防控提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源与实验动物

病料样品为无菌采集的发病/死亡鸭脑、肝脏等组织。7 日龄健康非免疫鸭(经间接血凝法测定血清 1 型 RA 抗体为阴性)来自江苏省农业科学院句容黄梅动物实验基地。

1.2 主要试剂

TSA、TSB 培养基购自美国 BD 公司,马丁氏汤培养基购自北京奥博星公司,新生牛血清购自呼和浩特草原绿野公司,DNA 提取试剂盒、PCR 相关试剂均购自 TaKaRa 公司,SS、MAC 培养基、微量生化发酵管等均购自杭州微生物试剂公司。1 型、2 型 RA 标准阳性血清由南京农业大学提供,矿物油佐剂由南京兆丰华生物科技公司提供。

1.3 细菌分离及形态观察

无菌操作挑取病死鸭脑组织、心血等病料接种于 MAC 平板、TSA 平板(含 2%新生牛血清)以及 SS 平板,置于 5% CO₂ 培养箱 37 ℃ 培养 48 h。观察细菌生长及菌落特征,选取典型菌落分别进行纯培养,挑取符合特征的单菌落,革兰氏染色并观察其形态。

1.4 分离菌 PCR 鉴定

参照文献[3]方法合成 RA 16S rRNA 鉴定引物,对各分离菌 DNA 进行 PCR 扩增,电泳观察分析 PCR 产物后由南京金斯瑞公司测序。运用 BLAST 将测序结果与 GenBank 上登录的 RA 进行基因序列比对分析^[4]。

1.5 分离菌生化试验

按照微量生化反应试剂盒说明书,对各株分离纯培养物进行生化试验。

1.6 细菌血清型鉴定

载玻片上各滴加生理盐水 20 μl,用接种环分别挑取方法 1.3 中纯化培养的各菌株菌落 2~3 个,在水中混匀后,滴加 1 型或 2 型 RA 阳性血清 20 μl,混匀,进行凝集法血清分型鉴定。

1.7 分离株致病性试验

1.7.1 菌液制备 分别挑取 5 株 RA1 分离株(JP01、JP02、SD02、GY01、XZ01)单菌落各接种于 5 ml 改良马丁汤培养基,置 37 ℃ 恒温箱振荡培养 24 h。对培养物进行活菌计数后用无菌生理盐水稀释成约 2.0×10^9 CFU/ml 菌液备用。

1.7.2 动物回归试验 取上述配制好的菌液,颈部皮下注射 15 日龄健康非免疫鸭各 10 只,每只注射 1 ml,另设空白对照 5 只。连续观察 10 日,记录试验鸭发病、死亡等情况,剖检观察病理变化。参照方法 1.3~1.6 分别对回收细菌进行鉴定。

1.7.3 最小致病剂量的测定 根据方法 1.7.2 结果,选择其中 3 株致病力较强的 RA1 分离菌株,将其培养物分别稀释为 2.0×10^9 CFU/ml,再作 2 倍、5 倍、20 倍、100 倍稀释,各稀释液分别取 1 ml 皮下注射 15 日龄健康非免疫鸭。其中试验组鸭分为 4 组,每组 5 只,另 5 只作为阴性对照。接种后连续观察 10 d,根据各组鸭发病及死亡情况统计出致实验鸭全部发病的最小剂量。

1.8 不同分离株免疫原性测定

1.8.1 疫苗制备 将 RA1 分离株 JP01、SD02、GY01 分别接种含 2%新生牛血清的 TSB 培养基,振荡培养 24 h,进行菌落计数。按体积加入 0.2% 甲醛,37 ℃ 灭活 24 h,经灭活检验合格后做为水相,按水相:油相为 1.0:2.5(体积比)分别制备疫苗,使 3 个菌株疫苗的最终含菌量均为 3.0×10^9 CFU/ml 左右。

1.8.2 分组与免疫 将 60 只 7 日龄健康非免疫鸭平均分为 4 组,其中 3 个组为免疫组,1 个组为对照

组,每组 15 只。分别颈背部皮下注射 JP01、SD02、GY01 菌株灭活疫苗,每羽 0.3 ml。另设一组注射同剂量生理盐水作为对照。

1.8.3 交叉攻毒保护试验 上述实验鸭免疫后 14 d,进行交叉攻毒试验。将每一组实验鸭(包括免疫组和对照组)平均分为 3 组,每组 5 只,分别用 JP01、SD02、GY01 菌株最小致病剂量菌液(1 只 1 ml)进行皮下接种攻毒。在攻毒后 10 d 内,连续观察,记录发病和死亡情况。

2 结果与分析

2.1 病料样品的细菌分离及形态鉴定

病料样品接种培养 24 h 后,23 株分离菌中有 16 株在 MAC 平板、SS 平板上未见细菌生长,但在含 2%新生牛血清 TSA 培养基上生长出大小均匀的小菌落,呈圆形、微突起,直径约 1~2 mm。16 株细菌均为革兰氏阴性菌,菌体呈杆状,多为单个排列,培养及形态符合 RA 菌落特征^[1]。

2.2 分离菌株的 PCR 鉴定

16S rRNA 特异性引物 PCR 结果显示,16 个菌株均可扩增出与目的片段 800 bp 大小一致的条带。将扩增产物测序结果在 GenBank 中进行比对分析,结果表明与登录的 RA 相应基因序列同源性均≥99%。根据分类标准,确定该 16 株分离菌为 RA。

2.3 分离菌株的生化特性

16 个 RA 分离株均不发酵葡萄糖、甘露醇、果糖、蔗糖等多种碳水化合物,不产生靛基质,产生硫化氢,甲基红(MR)试验阴性,触酶试验阳性。生化特性均符合 RA 特征^[1]。

2.4 分离菌株的血清型

16 个分离株中有 11 株与 1 型 RA 标准阳性血清出现凝集现象,与 2 型 RA 标准阳性血清均不出现凝集现象,表明该 11 株分离菌为血清 1 型 RA(表 1)。

2.5 RA 分离株的致病性

动物回归试验结果(表 2)显示,5 株 RA1 分离株菌液(约 2.0×10⁹ CFU/ml)分别皮下接种 15 日龄非免疫鸭后 24 h 均引起实验鸭发病和死亡。其中有 3 株 RA1 分离株 JP01、GY01、SD02 发病率和死亡率较高,达到 80%~100%,为强毒力菌株;2 株 RA1 分离株 JP02、XZ01 引起部分鸭发病和死亡,死亡率为 40%~60%,为中等毒力菌株。发病鸭死亡前期可见精神沉郁、卧地不起、食欲废绝、眼睑流泪等

症状。死亡鸭剖检观察显示:24 h 内死亡的实验鸭无明显病理变化;24~72 h 死亡鸭部分肝脏出血,大部分死亡鸭心脏、肝脏表面有灰白色纤维素性渗出物,形成包膜;从病死鸭脑部、肝脏均分离回收到 1 型 RA。

表 1 16 株 RA 分离鉴定结果

Table 1 Results of isolation and identification of 16 RA strains

来源	代号	PCR 鉴定	血清型
江苏南京	JP01	+	1
江苏南京	JP02	+	1
江苏南京	LH01	+	-
江苏扬州	GY01	+	1
江苏扬州	GY02	+	1
江苏徐州	XZ01	+	1
江苏徐州	XZ02	+	1
江苏泰州	TZ01	+	1
江苏泰州	TZ02	+	-
安徽和县	AH01	+	1
山东泰安	SD01	+	-
山东泰安	SD02	+	1
山东潍坊	WF01	+	1
山东潍坊	WF02	+	1
山东济宁	JN01	+	2
山东聊城	LC01	+	-

+表示 PCR 鉴定为 RA 阳性,-表示为其他血清型。

表 2 RA1 动物回归试验结果

Table 2 Animal regression test of RA1

菌株	实验鸭数量	日龄	接种菌数(CFU)	发病数/攻毒数	死亡数/攻毒数
JP01	10	15 日	2.0×10 ⁹	10/10	10/10
JP02	10	15 日	2.0×10 ⁹	7/10	6/10
SD02	10	15 日	2.0×10 ⁹	9/10	8/10
GY01	10	15 日	2.0×10 ⁹	10/10	10/10
XZ01	10	15 日	2.0×10 ⁹	5/10	4/10
对照组	10	15 日	/	0	0

5 株 RA1 分离株最小致病剂量测定结果(表 3)显示,3 株分离强毒力菌株(JP01 株、GY01 株、SD02 株)引起实验鸭全部发病的最小致病剂量分别为 1.0×10⁸ CFU、4.0×10⁸ CFU、1.0×10⁹ CFU,JP01 株毒力最强,其次为 GY01、SD02 株。

表 3 RA1 对鸭的最小致病剂量

Table 3 Minimum pathogenic dose of RA1 to ducks

菌株	攻毒剂量 (CFU)	日龄 (日)	试验鸭 数量(只)	发病数/ 攻毒数	死亡数/ 攻毒数
JP01	1.0×10^9	15	5	5/5	5/5
	4.0×10^8	15	5	5/5	5/5
	1.0×10^8	15	5	5/5	5/5
	2.0×10^7	15	5	4/5	2/5
GY01	1.0×10^9	15	5	5/5	5/5
	4.0×10^8	15	5	5/5	5/5
	1.0×10^8	15	5	4/5	3/5
	2.0×10^7	15	5	2/5	1/5
SD02	1.0×10^9	15	5	5/5	3/5
	4.0×10^8	15	5	4/5	3/5
	1.0×10^8	15	5	3/5	1/5
	2.0×10^7	15	5	2/5	0/5
对照组	-	15	5	0	0

2.6 RA1 分离株的交叉免疫保护特性

将制备的 JP01、GY01、SD02 株灭活疫苗免疫 7 日龄实验鸭 14 d 后,连同对照组鸭分别用各菌株的最小致病剂量菌液进行交叉攻毒。结果(表 4)显示:各对照组鸭于攻毒后 24 h 均陆续出现发病、死亡;各免疫组整体精神状态良好,于攻毒后 48 h 出现部分实验鸭发病及死亡。统计结果表明:以 JP01

表 4 3 株 RA1 分离株灭活疫苗免疫攻毒保护试验结果

Table 4 Test results of immune challenge protection of three RA1 strains

组别	JP01 菌株攻毒			GY01 菌株攻毒			SD02 菌株攻毒		
	发病数	死亡数	保护率 (%)	发病数	死亡数	保护率 (%)	发病数	死亡数	保护率 (%)
JP01 株灭活疫苗免疫	0	0	100	0	0	100	0	0	100
GY01 株灭活疫苗免疫	1	1	60	2	1	80	1	0	80
SD02 株灭活疫苗免疫	3	1	40	2	2	60	2	1	80
对照组	5	4	/	5	5	/	4	4	/

RA 血清型的准确鉴定对于获取流行病学资料以及免疫防治极其重要。自 Harry^[11]采用凝集试验进行 RA 血清型鉴定至今,该方法已成为 RA 菌株分型的主要手段。国际上虽就 RA 血清型的命名形成了统一认识^[12],但因国内近年来缺乏系统性的标准血清相关研究,传统的分型方法受标准血清来源以及抗原差异等影响,导致存在某些血清分型上的

株灭活疫苗免疫组保护率最高,为 100% 保护;GY01 株灭活疫苗保护率为 60%~80%,SD02 株灭活疫苗保护率为 40%~80%。由此可见,JP01 株灭活疫苗免疫交叉攻毒保护性能优于 GY01、SD02 株灭活疫苗,对 RA1 具有良好的免疫原性。

3 讨论

本研究自 2019 年 7 月至 2020 年 6 月从江苏省、山东省等同地区规模鸭场分离到 16 株 RA,其中 11 株为 RA1 型,占 RA 分离株的 68.7%。中国在 1997 年之前,除了 RA1 型外,几乎没有关于其他血清型的报道^[5]。随后几年间,张大丙等^[6]在中国部分地区分离到 2 型、6 型、10 型、11 型、13 型等多种血清型。2003 年程安春等^[7]报道在全国 29 个省(市、自治区)病死鸭中分离到 1 842 株 RA,包括 17 个血清型,其中 RA1 型占比为 34.9%,为主要血清型。至今鲜见国内大范围的 RA 血清型调查研究报道。2013 年刘运镇等^[8]报道在江苏省多地分离的 41 株 RA 菌株中 29 株为 1 型,占分离 RA 的 70.7%。2015-2016 年袁小远等^[9]在山东省等地分离的 18 株 RA 菌株全部为 1 型。2018-2019 年王昊等^[10]在江苏省苏北及周边地区分离的 30 株 RA 菌株中 15 株为 1 型,占分离 RA 的 50%。以上三者报道与本研究 RA1 分离情况相似,说明 RA1 仍然是江苏省、山东省等省份鸭场流行的优势血清型。

混淆现象,给 RA 的免疫防控等造成了一定干扰。随着分子生物学技术的发展,关于 RA 分子学分型等方法研究也逐渐丰富^[13],期望能够尽快得到广泛应用。

鸭传染性浆膜炎在中国被发现以来,已成为危害鸭乃至水禽养殖业最主要的细菌性疾病。2019 年张敬峰等^[14]报道显示鸭疫里氏杆菌阳性率占所

检测的水禽 5 种主要细菌性病原的 36.01%,其感染发病在临床最为常见。由于近年来水禽养殖过程中抗菌药的频繁使用以及耐药菌株不断产生等因素,导致在鸭细菌性疾病尤其是鸭传染性浆膜炎的临床药物治疗效果越来越差,而药物残留也威胁人类健康,影响公共卫生安全^[15]。防控该病除加强生物安全管理等措施外,疫苗免疫是较为有效的手段,但 RA 血清型众多且各血清型之间的交叉保护作用差^[16],血清型的多样化分布也直接制约了疫苗的免疫效果发挥。本研究选取 RA1 流行株对雏鸭进行免疫保护试验,从结果可看出各受试菌株制备的灭活疫苗免疫实验鸭后,各菌株对同型同源的交叉保护率均为 80%以上,部分菌株对同型不同源的交叉免疫保护率相对较低,其中 SD02 菌株灭活疫苗保护率仅 40%~80%,也有如 JP01 菌株灭活疫苗对同型菌株的攻击显示出良好的免疫保护率(100%)。提示在商品化 RA 灭活疫苗制备时除应考虑不同血清型 RA 的存在与分布差异,还应在地区优势血清型中选择对同型菌株免疫率较高的代表性菌株灭活疫苗。

参考文献:

- [1] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2001: 253-254.
- [2] 张大丙, 曲丰发, 郑献进. 鸭疫里氏杆菌血清型的研究概况 [J]. 中国兽医杂志, 2006, 42(11): 38-40.
- [3] 朱飞舟, 陈利玉, 陈汉春. 16S rRNA 基因序列分析法鉴定病原细菌 [J]. 中南大学学报(医学版), 2013, 38(10): 1035-1041.
- [4] 张敬峰, 李 银, 刘宇卓, 等. 鸭疫里氏杆菌 RA JS01 菌株的 PCR 鉴定及生物学特性 [J]. 江西农业学报, 2011, 23(6): 111-112, 115.
- [5] 郭玉璞. 我国对鸭传染性浆膜炎研究概况 [J]. 中国兽医杂志, 1997, 23(12): 37-38.
- [6] 张大丙, 郭玉璞. 我国鸭疫里氏杆菌血清型鉴定 [J]. 畜牧兽医学报, 1999, 34(6): 536-542.
- [7] 程安春, 汪铭书, 陈孝跃, 等. 我国鸭疫里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(7): 320-323.
- [8] 刘运镇, 陈 高, 徐婷婷, 等. 苏中地区鸭疫里氏杆菌血清型鉴定和药敏试验 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(2): 185-187.
- [9] 袁小远, 王友令, 王晓丽, 等. 2015-2016 年山东、河北地区鸭疫里氏杆菌流行病学调查 [J]. 中国家禽, 2017, 39(4): 70-72.
- [10] 王 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): 185-187.
- [11] HARRY E G. *Pasteurella (Pfeifferella) anatis* serotypes isolated from cases of anatis septicaemia in ducks [J]. Veterinary Record, 1969, 84: 673.
- [12] SANDHU T S, LEISTER M L. Serotypes of *Pasteurella anatis* isolates from poultry in different countries [J]. Avian Pathology, 1991, 20: 233-239.
- [13] 周 迪, 朱必凤. 鸭疫里氏杆菌分子分型技术研究进展 [J]. 畜牧与兽医, 2014, 46(4): 103-105.
- [14] 张敬峰, 董永毅, 卢凤英, 等. 江苏部分地区水禽主要细菌性疾病监测与分析 [J]. 江苏农业科学, 2020, 48(23): 172-174.
- [15] 李志中, 韩珊珊, 高永伟, 等. 细菌性疾病区域普查在肉鸭生产过程中的应用 [J]. 中国家禽, 2017, 39(10): 60-62.
- [16] PATHANSOPHON P, SAWADA T, TANTICHARONEYOS T. New serotypes of *Riemerella anatis* isolated from ducks in Thailand [J]. Avian Pathol, 1995, 24(1): 195-199.

(责任编辑: 张震林)