

鸭疫里默氏杆菌(RA)检测方法研究进展

蒋 姝¹, 王白雪¹, 王康锐², 方 英², 黄承洪²

¹重庆轻工职业学院, 重庆

²重庆科技学院, 重庆

Email: chhuang2007@sinano.ac.cn

收稿日期: 2020年11月28日; 录用日期: 2020年12月10日; 发布日期: 2020年12月17日

摘 要

鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)属于革兰氏阴性菌, 引起鸭、鹅等水禽严重的肝周炎、心周炎、腹膜炎, 是导致水禽重大经济损失病原菌之一。但至今为止仍然缺乏对其快速准确的现场检测方法。本文从病原体、血清学、ELISA以及核酸检测方法等方面进行了综述, 以资为研究者提供回顾性参考。

关键词

鸭疫里默氏杆菌, 病原, 生化分析, ELISA, PCR

Progress of Detection Method for *Riemerella anatipestifer* (RA)

Shu Jiang¹, Baixue Wang¹, Kangrui Wang², Ying Fang², Chenghong Huang²

¹Chongqing Light Industry Polytechnic College, Chongqing

²Chongqing University of Science and Technology, Chongqing

Email: chhuang2007@sinano.ac.cn

Received: Nov. 28th, 2020; accepted: Dec. 10th, 2020; published: Dec. 17th, 2020

Abstract

Riemerella anatipestifer (RA) belongs to Gram-negative bacterium. It can cause severe pericarditis, perihepatitis, and peritonitis to ducklings. It is also one of the major causative diseases of water flow. Till now, it is still short of immediate techniques of on-spot and accurate diagnosis. This pa-

per aims to obtain reference of retrospective for relating researchers by reviewing several detection methods including causative pathogen, serological test, enzyme-linked immunoassay (ELISA) and nucleic acid amplification (PCR).

Keywords

RA, Pathogen, Biochemistry Analysis, ELISA, PCR

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

鸭疫里默氏杆菌病是由鸭疫里默氏杆菌(*Riemrella anatipestifer*, RA)引起的一种严重危害雏鸭、野鸭、鹅、火鸡甚至猪的细菌性传染病,最早可以追溯到 1932 年 Hendrickson 与 Hilbert 的报道[1]。到目前为止,已经发现多达 21 个血清型[2] [3] [4] [5]。本病呈急性败血症或慢性过程,以 10~35 日龄的雏鸭发病率最高,死亡率也高,耐过鸭多成为僵鸭,生长迟缓,造成极大的经济损失,及时采取有效的防治措施对控制该病的发生十分重要。该病的临床症状与常见的鸭大肠杆菌病和沙门菌病十分相似,往往导致临床误诊[6] [7]。但至目前为止,仍然缺少快速有效的现场的准确性检测方法。本文就当前的病原诊断方法进行综述,以资为相关研究者提供参考。

2. 病原体观察

病原体观察是利用光学显微镜或者电子显微镜对 RA 的表面及形态进行观察。该法通过对细菌菌落形态及细菌个体的基本形态特征观察,再结合革兰氏染色法或是瑞氏染色法染色观察结果及生化试验结果进行初步判断。韦强等[8] [9]人利用扫描电镜不仅观察到 RA 的完整的细菌形貌,而且还发现 RA 培养物在特定条件下产生的赘生物,大小从 20~40 nm 不等。Huang 等[10]用基于椭圆偏振光技术,在改性硅基底表面固定 RA 抗体,获得其显微图像,证明与常规磷钨酸染色 SEM 观察的图像形态基本一致。但光学显微镜形貌观察只能粗略疑似判定 RA 感染,光学显微镜放大倍数有限,只能看到细菌的整体形貌,电子显微镜放大倍数足以对细菌鞭毛、纤毛、甚至荚膜等附属结构进行观察,但是病原体观察法特异性差,只能作为辅助判断依据。

3. 生化鉴定

各种细菌所具有的酶系统不尽相同,对营养基质的分解能力也不一样,因而代谢产物存在差别,以此用生理生化试验的方法检测细菌对各种基质的代谢作用及其代谢产物,从而鉴别细菌的种属。不同血清型 RA 的生化特性差异较大,但也会表现出某些特异性差异。例如李文扬等[11]研究 3 株 RA 的生化特性发现其对麦芽糖、葡萄糖、过氧化氢酶、尿素酶试验阳性,其余均为阴性生化试验结果不尽相同,但以过氧化氢酶试验均呈阳性,硫化氢试验均呈阴性,几乎不分解醇类为特征。Brogden [12]测试了 46 株 RA 的生化特性,发现其中 40 株在尿酶活性,产协同溶血素,明胶液化等存在差异。Hinz 等[13]采用单底物和酚红指示剂葡萄糖发酵实验测试了野外 121 株 RA 的结果表明,有 10 株吡啶阳性突变子,与 ATCC 参考株比较,葡萄糖、果糖、甘露糖的代谢阳性率分别达到 9/10、2/10、6/10。根据生化特性也只能作为

菌株及其血清型的重要辅助鉴定手段。

4. 血清学鉴定

利用抗原-抗体的特异性相互作用,出现肉眼可直接观察到凝集现象或者琼脂糖扩散实验对抗原或者抗体进行定性判定,可用于 RA 血清学判定和分型。早在 1982 年 Bisguard 等[6]就采用凝集实验和琼脂糖扩散实验证实美国存在 6 种血清型,而且还与英国的血清型比较后认为有两个血清型相同,提出用阿拉伯数字代替字母表示血清型。Pathanasophon 等在[14] 1995 年应用琼脂糖扩散实验证实台湾出现了 RA 血清 20 和 21 型。但凝集实验和琼脂糖扩散实验都是以 RA 的表面抗原对 RA 进行鉴定或者分型有其局限性,比如 Ryll 等[7]在 2000 年对 670/89 株 RA 的脂肪酸数值分析后指出该株 RA 不能作为血清型 20 的代表株,是因为凝集实验容易发生假阳性,特别是抗原交叉反应性为甚。为了提高凝集实验的准确性,高福等[15]用 1 型 RA 熟浸抗原致敏醛化绵羊红细胞进行间接血凝试验,检测不同日龄的鸭血清中的鸭疫里默氏菌抗体,初步证明其敏感性较高。利用抗原-抗体相互作用,经孵育在琼脂糖凝胶中出现肉眼可见的沉淀线进行判定,琼脂糖扩散实验最大的问题是敏感性不高。Sandhu 等[16]认为玻片凝集是检测大量野外分离株的一种快速方法,但存在部分菌株发生交叉反应,如果能将细菌进行洗涤可解决这一问题。2005 年张大丙等[2][17]采用琼脂糖扩散沉淀试验、玻片和试管凝集试验以及血清吸收凝集试验,对 6 株 RA 分离株进行了抗原性分析,表明与 10 血清型与已知的 4 个亚型菌株之间又存在明显的抗原差异,因此,以菌株 C919 为代表的 6 个分离株被鉴定为血清 10 型的第 5 个亚型。Brogden 等[12]认为琼脂糖扩散试验是分型的好方法,但也有交叉反应,如果将琼脂糖抗原适当稀释后可解决这一问题。

5. 酶联免疫吸附测定(ELISA)

荧光抗体技术(Fluorescence Antibody Technique, FAT)检测法分为直接荧光抗体法和间接荧光抗体法。直接荧光抗体法特异性强,检测效果良好,操作简便,只需要取病料进行涂片、固定、染色和镜检,但该法的缺点是染色切片不能长期保存,且实验室必须具备荧光显微镜,对设备要求较高。郭玉璞等[18]应用直接荧光抗体法检测感染 RA 的急性病例,发现涂片黑暗背景上有绿色荧光的菌体。苏敬良等[19]应用间接免疫荧光抗体法检测 RA,该法特异性较强,可将 RA 与鸭大肠杆菌、多杀性巴氏杆菌进行区分鉴别。直接荧光抗体法和间接免疫荧光抗体法均具有种的特异性,但没有血清型的特异性,可适用于菌种的鉴定,不适用于亚型鉴定。间接免疫酶组织化学法最大的优点是在切片中能够对抗原进行定位,该法不仅能够检测到活菌,也能检测到死菌,切片染色后能够长久保存。孟琼华等[20]利用鹅源血清 1 型 RA 作为抗原免疫制备兔抗 RA 的 IgG,建立检测鹅感染 RA 的间接免疫酶组织化学法。刘维平等[21]应用鸭源血清 1 型 RA 作为抗原免疫制备兔抗 RA 的 IgG,建立了检测 RA 的间接免疫酶组织化学法,该法与鸭源大肠杆菌、多杀性巴氏杆菌与沙门氏菌不出现阳性反应,表明该法具有特异性。此外,研究学者已建立多种 ELISA 法鉴定 RA。Hatfield 等[22]利用裂解菌体作为包被抗原,建立用于检测 RA 血清 1 型的 ELISA 方法。Huang 等[23]用 RA 的 P45 基因 N'末端片段在原核表达的 41 kDa 重组蛋白作为包被抗原,建立 ELISA 方法,该法成功的检测出血清 1 型、10 型、15 型、19 型及 ATCC11845 株免疫鸭血清中的抗体。方钦等[24]以提取到的血清 1 型 RA 脂多糖作为包被抗原,建立了检测血清 1 型 RA 抗体的间接 ELISA 方法。孙龚等[25]利用 RA 外膜蛋白 A(OmpA)基因进行体外诱导表达得至 OmpA,以纯化后的 OmpA 作为包被抗原建立间接 ELISA 法检测血清 1 型 RA,为 SPF 鸭的监测提供了快速、特异的血清型诊断方法。陈素娟等[26]以纯化的兔抗血清 1 型 RA 抗体作为捕获抗体,纯化的 RA 单克隆抗体作为检测抗体,首次建立了检测 RA 的双抗体夹心 ELISA 法,该法特异、敏感。ELISA 虽然在特异性高,但操作相对繁琐。

6. 基因扩增鉴定

基因扩增(polymerase chain reaction, PCR)早已发展成成熟的微生物检测方法。应用 PCR 法检测 RA 一般是基于 16S rRNA 基因序列和外膜蛋白基因序列的研究。比如, 胡清海等[27]根据 RA 血清 15 型参考株 CVL 110/89 外膜蛋白 A 基因设计引物, 在国内较早建立用于检测 RA 的 PCR 法。曲丰发等[28]利用 16S rRNA 基因建立种特异性的 PCR 法快速检测 RA, 26 株 RA 均能扩增出大小为 654 bp 的特异性片段, 而鸭大肠杆菌、鸭沙门氏菌和禽多杀性巴氏杆菌等 PCR 扩增结果呈阴。基于外膜蛋白基因序列检测也有较多研究, 杨建远等[29]根据 GenBank 中已发布的 25 株 RA 的 OmpA 基因序列进行比较, 在其高度保守区设计引物, 成功的建立了 RA 准确、快速的 PCR 检测方法。谢永平等[30]基于 RA 编码 42 kDa 的主要外膜蛋白 A 基因序列设计引物, 分别以 21 株来自广西地区各鸭场的 RA 全菌体作为模板, 建立检测 RA 的 PCR 法, 该法敏感性检测结果表明可检测的最低菌数为 1×10^2 CFU/mL, 具有高度的敏感性。季权安等[31]根据 GenBank 中已发布的 RAATCC 株 OmpA 基因序列设计引物, 直接挑取 RA 单菌落作为模板, 建立检测该菌的方法。该法最低检出限量为 80 个菌体, 且与常规 PCR 检测方法结果高度一致, 更快速简捷。基因检测的另一个方法是根据 DNA 指纹对 RA 进行差别鉴定。Rimler 早在[32] 1998 年采用 DNA 限制性内切酶研究了来自美国、英国、澳大利亚、加拿大、德国和以色列的 RA, 获得了 52 种具差异性 DNA 指纹图谱。Huang 与 Fulton 等[33] [34]设计了重复序列 PCR(rep-PCR)技术用于 RA 表征。这些方法操作简单, 但需要在实验室才能进行。

7. 结语

鸭疫里默氏杆菌(RA)对很多水禽具有致命性危害, 对其快速和准确检测是防治重要保障。传统的病原观察与生化分析费时费力而应用受限。血清学分析快速准确, 但对于未知菌株严重依赖抗体生产。核酸检测快速准确, 但有仪器依赖且对人员操作技术要求较高。临床非常需要快速而又准确, 且操作简单的新型检测方法。

基金项目

研究得到重庆市科委项目(cstc2019jscx-msxm1542), 重庆市教委项目 (KJ1605703, KJQN201906402, KJZD-K201906401, KJZD-K201806401)的资助。

参考文献

- [1] Hendrickson, J.M. and Hilbert, K.F. (1932) A New and Serious Septicemic Disease of Young Ducks with a Description of the Causative Organism, *Pfeifferella anatipestifer*, N.S. *The Cornell Veterinarian*, **22**, 239-252.
- [2] 张大丙, 郭玉璞. 我国鸭疫里氏杆菌血清型的鉴定[J]. 畜牧兽医学报, 1998, 30(6): 536-542.
- [3] Leavitt, S. and Ayroud, M. (1997) *Riemerella anatipestifer* Infection of Domestic Ducklings. *Canadian Veterinary Journal*, **38**, 113.
- [4] Pathanasophon, P., Phuektes, P., Tanticharoenyos, T., Narongsak, W. and Sawada, T. (2002) A Potential New Serotype of *Riemerella anatipestifer* Isolated from Ducks in Thailand. *Avian Pathology*, **31**, 267-270. <https://doi.org/10.1080/03079450220136576>
- [5] 黄承洪, 李继祥, 黄伟, 李鑫, 杨平东, 杨永红. 重庆和四川地区鸭疫里默氏杆菌流行动态研究[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(1): 67-70.
- [6] B. M. (1982) Antigenic Studies on *Pasteurella anatipestifer*, Species Incertae Sedis, Using Slide and Tube Agglutination. *Avian Pathology*, **11**, 341-350. <https://doi.org/10.1080/03079458208436109>
- [7] Ryll, M. and Hinz, K.H. (2000) Exclusion of Strain 670/89 as Type Strain for Serovar 20 of *Riemerella anatipestifer*. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, **113**, 65-66.
- [8] 韦强, 鲍国连, 季权安, 俞坚群, 盛楚江, 章红兵. 鸭疫里氏杆菌形态特征的电镜观察[J]. 畜牧兽医学报, 2004,

- 35(3): 314-317.
- [9] 韦强, 鲍国连, 王一成, 徐丽华, 季权全. 鸭疫里氏杆菌赘生物提取及其理化特性研究[J]. 浙江大学学报, 2005, 31(3): 250-254.
- [10] Huang, C., Li, J., Tang, Y., Wang, C., Hou, C., Huo, D., Chen, Y. and Jin, G. (2011) Biosensor Based on Imaging Ellipsometry for Serotype-Specific Detection of *Riemerella anatipestifer*. *Materials Science and Engineering C*, **31**, 1609-1613. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.05.018>
- [11] 李文杨, 黄瑜, 程龙飞, 苏敬良, 吕艳丽, 郭玉璞. 3株鸭疫里氏杆菌血鉴定及其生化特性的比较[J]. 福建农业大学学报, 2000, 29(1): 87-89.
- [12] Brogden, K.A., Rhoades, K.R. and Rimler, R.B. (1982) Serologic Types and Physiologic Characteristics of 46 Avian *Pasteurella anatipestifer* Cultures. *Avian Diseases*, **26**, 891-896. <https://doi.org/10.2307/1589877>
- [13] Hinz, K.-H., Ryll, M. and Kohler, B. (1998) Detection of Acid Production from Carbohydrates by *Riemerella anatipestifer* and Related Organisms Using the Buffered Single Substrate Test. *Veterinary Microbiology*, **60**, 277-284. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(97\)00187-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(97)00187-9)
- [14] Pathanasophon, P., Tanticharoenyos, T. and Sawada, T. (1994) Physiological Characteristics, Antimicrobial Susceptibility and Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* Isolated from Ducks in Thailand. *Veterinary Microbiology*, **39**, 179-185. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90098-1](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90098-1)
- [15] 高福, 郭玉璞, 王忠平, 吴志达, 潘再杰. 上海地区小鸭传染性浆膜炎的流行病学调查[J]. 中国畜禽传染病, 1989(2): 28-29.
- [16] Sandhu, T.S. and Leister, M.L. (1991) Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* Isolated from Poultry in Different Countries. *Avian Pathology*, **20**, 233-239. <https://doi.org/10.1080/03079459108418760>
- [17] 张大丙, 郭玉璞. 鸭疫里氏杆菌 6 型、12 型与 16 型之间的交叉反应[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(6): 565-566.
- [18] 朱琪, 张加勇, 刘吨辉. 应用间接免疫荧光抗体试验检测鸭疫里氏杆菌[J]. 黑龙江畜牧兽医, 1982, 3(31): 31.
- [19] 苏敬良, 黄瑜, 吕艳丽, 郭玉璞, 孙艳争, 樊丽红. 间接荧光抗体技术检测鸭疫里氏杆菌[J]. 中国兽医杂志, 1999, 25(2): 3-5.
- [20] 孟琼华, 程安春, 汪铭书, 陈孝跃, 周毅, 刘维, 朱德康, 刘菲, 黄诚, 宋涌. 间接免疫酶组织化学法检测雏鹅感染鸭疫里氏杆菌的研究[J]. 中国兽医杂志, 2004, 40(9): 10-14.
- [21] 刘维平, 程安春, 汪铭书, 陈孝跃, 周毅, 朱德康, 刘菲, 孟琼华, 黄诚, 宋涌. 间接免疫组化法检测鸭疫里氏杆菌感染和抗原定位[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(4): 362-365.
- [22] Hatfield, R.M., Morris, B.A. and Henry, R.R. (1987) Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Humoral Antibody to *Pasteurella anatipestifer*. *Avian Pathology*, **16**, 123-140. <https://doi.org/10.1080/03079458708436358>
- [23] Huang, B., Kwang, J., Loh, H., Frey, J., Tan, H.-M. and Chu, K.-L. (2002) Development of an ELISA Using a Recombinant 41 kDa Partial Protein (P45N) for the Detection of *Riemerella anatipestifer* Infections in Ducks. *Veterinary Microbiology*, **88**, 339-349. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00123-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00123-2)
- [24] 方钦. 间接 ELISA 检测鸭疫里氏杆菌抗体方法的建立及应用[D]: [硕士学位论文]. 重庆: 西南大学, 2007.
- [25] 孙龚. 鸭疫里氏杆菌 PCR 方法初步建立及应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2011(1): 14-16.
- [26] 陈素娟, 陈冰, 孙化露, 高以明, 彭大新, 刘秀梵. 鸭疫里氏杆菌单克隆抗体的研制及免疫胶体金检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(11): 1651-1655.
- [27] Hu, Q., Tu, J., Han, X., Zhu, Y., Ding, C. and Yu, S. (2011) Development of Multiplex PCR Assay for Rapid Detection of *Riemerella anatipestifer*, *Escherichia coli*, and *Salmonella enterica* Simultaneously from Ducks. *Journal of Microbiological Methods*, **87**, 64-69. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.07.007>
- [28] 曲丰发, 蔡畅, 郑献进, 张大丙. 利用 16sRDNA 建立种特异性 PCR 快速检测鸭疫里氏杆菌[J]. 微生物学报, 2006, 46(1): 13-17.
- [29] Zheng, F., Lin, G., Zhou, J., Wang, G., Cao, X., Gong, X. and Qiu, C. (2011) Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay Targeting the ompA Gene for Rapid Detection of *Riemerella anatipestifer*. *Molecular and Cellular Probes*, **25**, 65-67. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.10.004>
- [30] 谢永平, 盘宝进, 陈泽祥, 许力干, 杨威, 韦梅良. 鸭疫里氏杆菌实时荧光定量 PCR 快速检测方法的建立与应用研究[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(10): 87-91.
- [31] 季权安, 刘燕, 肖琛闻, 韦强, 霍翠梅, 鲍国连. 鸭疫里氏杆菌 PCR 快速检测方法的建立[J]. 浙江农业学报, 2012, 24(3): 388-391.
- [32] Rimler, R.B. and Nordholm, G.E. (1998) DNA Fingerprinting of *Riemerella anatipestifer*. *Avian Diseases*, **42**, 101-105.

-
- <https://doi.org/10.2307/1592581>
- [33] Huang, B., Subramaniam, S., Chu, K.-L., Kwang, J., Loh, H., Frey, J. and Tan, H.-M. (1999) Molecular Fingerprinting of *Riemerella anatipestifer* by Repetitive Sequence PCR. *Veterinary Microbiology*, **67**, 213-219.
[https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(99\)00032-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(99)00032-2)
- [34] Fulton, R.M. and Rimler, R.B. (2010) Epidemiologic Investigation of *Riemerella anatipestifer* in a Commercial Duck Company by Serotyping and DNA Fingerprinting. *Avian Diseases*, **54**, 969-972.
<https://doi.org/10.1637/9087-092409-Case.1>