



鸭疫里默氏杆菌病诊断及分型鉴定

杨俊¹, 李伟强¹, 奉佳², 王慧¹, 杜丽飞¹, 彭苗苗¹, 张洁¹, 周望平^{1*}

(1. 湖南省农业科学院畜牧兽医研究所, 湖南长沙 410131; 2. 湖南省长沙市
动植物疫病预防控制中心, 湖南长沙 410128)

摘要:鸭疫里默氏杆菌是水禽中常见的病原菌之一, 其感染宿主后导致较高的发病率和死亡率, 其防控难度大, 严重威胁禽类养殖业的健康发展。本研究通过结合临床症状、病理变化和实验室诊断, 证实引起鸭群发病的病原为鸭疫里默氏杆菌, 并成功分离 1 株鸭疫里默氏杆菌 HN-RA2023。进一步通过 16S rRNA 测序和系统进化树分析, 发现 HN-RA2023 分离株与参考株的同源性为 98.9%~99.9%, 并且分离株与 SD-RA2018 株处于同一分支。本试验结果将为湖南地区鸭疫里默氏杆菌病的诊断与治疗提供参考。

关键词:鸭疫里默氏杆菌; 诊断; 分离鉴定

[中图分类号] S858.32 [文献标志码] A [文章编号] 1004-6704(2025)-03-0056-04

Diagnosis and Genotyping of *Riemerella Anatipestifer* Infection

YANG Jun¹, LI Weiqiang¹, FENG Jia², WANG Hui¹, DU Lifei¹,

PENG Miaomiao¹, ZHANG Jie¹, ZHOU Wangping^{1*}

(1. Animal and Veterinary Science, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha, Hunan 410131, China;

2. Changsha Animal and Plant Disease Prevention and Control Center, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: *Riemerella anatipestifer* (RA) is one of the common pathogenic bacteria in waterfowl, which causes high incidence rate and mortality after infecting the host. It is difficult to prevent and control, which seriously threatens the healthy development of poultry breeding industry. This study confirmed that *Riemerella anatipestifer* was the causative agent of the outbreak in duck flocks through the combination of clinical symptoms, pathological changes, and laboratory diagnosis, and successfully isolated a strain of *riemerella anatipestifer* HN-RA2023. Further analysis of 16S rRNA sequencing and phylogenetic tree revealed that the HN-RA2023 isolate shares homology of 98.9% to 99.9% with the reference strain, and was located on the same branch as the SD-RA2018 strain. The results of this study will provide reference for the diagnosis and treatment of *riemerella anatipestifer* in Hunan province.

Key words: *riemerella anatipestifer*; diagnosis; isolation and identification

鸭疫里默氏杆菌(*riemerella anatipestifer*, RA) 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感染引起的一种接触传染性疾病, 属于黄杆菌科的革兰氏阴性、无芽孢的杆状细菌, 可感染包括鸭、鸡和鹅等多种宿主, 引起心包、气囊和肝脏等器官发生纤维素性渗出性炎性病变, 并表现为呼吸道、跛行和中枢神经系统症状^[1-2]。鸭疫里默氏杆菌病多发于 1~8 周龄的雏鸭, 发病率和死亡率高。因此, 该病的流行给中国水禽养殖业造成了巨大的经济损失^[3]。迄今为止, 全球已发现至少 21 种不同血清型的鸭疫里默氏杆菌,

[收稿日期] 2024-12-30

[基金项目] 湖南省家禽产业技术体系项目; 长沙市动植物疫病预防控制中心合作项目

[第一作者] 杨俊(1978-), 男, 高级兽医师, 主要从事动物疫病诊断与防控技术研究。E-mail: yangjunpro@163.com

* [通信作者] 周望平, E-mail: 750081760@qq.com

而不同血清型之间缺乏足够的交叉保护作用,目前仍主要依赖抗生素治疗该病^[4-5]。但由于抗生素的广泛使用也加剧了耐药菌株的产生,给鸭疫里默氏杆菌病的预防和控制带来巨大挑战^[6-8]。因此,本研究通过对鸭疫里默氏杆菌进行感染诊断并对其分离鉴定,以期为该病的临床诊断提供参考。

1 材料和方法

1.1 病料采集

本研究采集的病料来源于湖南省浏阳市某养鸭场的雏番鸭,10 日龄左右开始发病,病鸭出现拉绿色稀粪、精神沉郁、头颈后仰等临床症状,日均死亡量递增。通过对患病鸭进行剖检,无菌采集脑、心脏、肝脏和脾脏等组织进行病原分离鉴定。

1.2 主要试剂与仪器

血平板购自广东环凯微生物科技有限公司;2× Rapid Taq Master Mix 和 DL2000 购自南京诺维赞生物科技股份有限公司;PCR 扩增仪(AG22331)购自 Eppendorf 公司,水平电泳仪和核酸成像系统(Tanon 3500R)购自上海天能有限公司。

1.3 细菌的分离培养

使用接种环进行无菌采集患病鸭的心脏和肝脏组织,将其接种于血平板上生长,37℃ 条件下培养 24 h,观察细菌的生长情况;进一步将菌落在新的血平板上进行划线培养,直至分离出单一菌落。

1.4 PCR 鉴定

使用 Oligo 7 设计针对细菌 16S rRNA 的扩增引物(16S-F: 5'-GTGTGCAACCTGCCTTTATC-3'; 16S-R: 5'-ACTCATTCAGCTACCTC-3'),以血平板上生长的单一菌落为模板进行 PCR,PCR 反应体系:2× Rapid Taq Master Mix 10 μL,正向引物 16S-F 和反向引物 16S-R(10 mmol/L)各 1 μL,使用无核酸酶水补齐至 20 μL 体系。将 PCR 产物通过 1% 琼脂糖核酸电泳进行检测,并将阳性产物送至北京擎科生物科技有限公司测序,获得 16S rRNA 的序列。

1.5 序列比对和系统进化树分析

将获得的 16S rRNA 序列在 Genbank 数据库中进行比对,确定分离株的类型。并从 Genbank 数据库中下载鸭疫里默氏杆菌的参考序列,利用 MegAlign 软件对其进行序列同源性分析和构建系

统进化树。

2 结果与分析

2.1 剖检病变

感染早期,患病鸭出现拉绿色稀粪、精神沉郁、头颈后仰等临床症状。剖检发现其心脏具有典型的纤维素性心包炎特征,肝脏颜色为土黄色,表面有纤维素样渗出,脑组织和肾脏组织出现多处出血,肺脏组织多处出血,伴有胶冻样渗出物(图 1)。结合患病鸭的临床症状和病理变化,怀疑鸭群感染鸭疫里默氏杆菌。

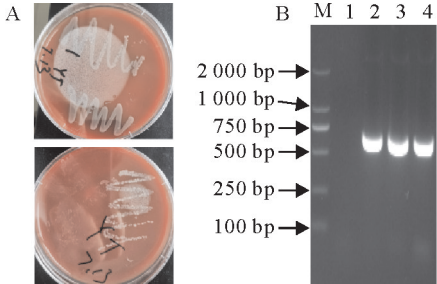


图 1 患病鸭的剖检病变

Fig. 1 Necropsy lesions of diseased ducks

2.2 鸭疫里默氏杆菌的分离培养

为了分离和获得病原菌,通过采集患病鸭的心脏和肝脏组织,将其接种于血平板培养。24 h 后,将平板上的菌落进一步在血平板划线培养,分离到单一菌落(图 2A)。以单一菌落为模版,使用 16S rRNA 特异性引物进行扩增,经琼脂糖核酸电泳,出现约 537 bp 大小的条带(图 2B)。为了获得该菌株的 16S rRNA 序列,将 PCR 阳性产物进行测序。



A. 血琼脂平板上的菌落;B. PCR 鉴定结果

图 2 鸭疫里默氏杆菌的分离培养与鉴定

Fig. 2 Isolation, culture and identification of RA

2.3 16S rRNA 序列比对

为了进一步确定分离株的类型,将测序获得的 16S rRNA 序列在 Genbank 数据库中比对。结果表明,分离株与鸭疫里默氏杆菌的 16S rRNA 的一致性达 99.4%以上(图 3)。因此,本研究的分离株为鸭疫里默氏杆菌,将其命名为 HN-RA2023。

2.4 基于 16S rRNA 序列的同源性分析与系统进化分析

为了分析 HN-RA2023 分离株与鸭疫里默氏杆菌参考株 16S rRNA 序列的同源性,从 Genbank 中下载参考毒株的 16S rRNA 序列。同源性分析结果表明,HN-RA2023 分离株与参考株的同源性为 98.9%~99.9%,其中与 SD-RA2018 株的同源性高达 99.9%,而与 S-4801 株的同源性为 98.9%,详见图 4。

为了研究 HN-RA2023 分离株与鸭疫里默氏杆

菌参考株 16S rRNA 序列的进化关系,构建了鸭疫里默氏杆菌的系统进化树。结果表明,HN-RA2023 分离株与 SD-RA2018 株处于同一分支,而与其他参考株的进化关系相对较远(图 5)。

3 讨 论

鸭疫里默氏杆菌病是一种高致病性、接触性传染病,主要引起败血症,是目前危害鸭的主要细菌性传染病之一^[9],给养鸭业带来较大影响,特别是对于养殖条件、防疫意识较差的散养户,感染导致死亡的损失更大。

从湖南某鸭场送检的病鸭临床症状和剖检病变看,疑似鸭疫里默氏杆菌病,跟文献中报道的基本相符,如食欲下降、共济失调等临床症状和以心包积液,纤维素性心包炎为主的眼观病变^[10-11]。经过实验室检测得到进一步确诊。另外,研究表明,通过血

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Riemerella anatipestifer strain CCUG 25004 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Riemerella anat...	1823	1823	99%	0.0	99.50%	1417	OQ832606.1
✓	Riemerella anatipestifer strain GZ-RA12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Riemerella anat...	1821	1821	99%	0.0	99.50%	1481	KY399255.1
✓	Riemerella anatipestifer strain RCAD0421 chromosome, complete genome	Riemerella anat...	1821	5454	99%	0.0	99.50%	2137672	CP121210.1
✓	Riemerella anatipestifer strain Z0190212E1-4 chromosome, complete genome	Riemerella anat...	1821	5465	99%	0.0	99.50%	2172808	CP081924.1
✓	Riemerella anatipestifer strain Z0190109E1-1 chromosome, complete genome	Riemerella anat...	1821	5465	99%	0.0	99.50%	2173597	CP072185.1
✓	Riemerella anatipestifer strain RA-1201 chromosome, complete genome	Riemerella anat...	1816	5449	99%	0.0	99.40%	2168142	CP045564.1
✓	Riemerella anatipestifer strain ATCC_11845 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Riemerella anat...	1816	1816	99%	0.0	99.40%	1438	MH789421.1
✓	Riemerella anatipestifer strain NCTC11014 genome assembly, chromosome-1	Riemerella anat...	1816	5449	99%	0.0	99.40%	2156703	LT906475.1
✓	Riemerella anatipestifer strain GZ-RA5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Riemerella anat...	1816	1816	99%	0.0	99.40%	1481	KY399252.1
✓	Riemerella anatipestifer strain GZ-RA6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Riemerella anat...	1816	1816	99%	0.0	99.40%	1481	KY399251.1
✓	Riemerella anatipestifer strain GZ-RA5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Riemerella anat...	1816	1816	99%	0.0	99.40%	1481	KY399248.1
✓	Riemerella anatipestifer strain GZ-RA4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Riemerella anat...	1816	1816	99%	0.0	99.40%	1481	KY399247.1
✓	Riemerella anatipestifer strain GZ-RA2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Riemerella anat...	1816	1816	99%	0.0	99.40%	1481	KY399246.1
✓	Riemerella anatipestifer strain GZ-RA1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Riemerella anat...	1816	1816	99%	0.0	99.40%	1481	KY399244.1
✓	Riemerella anatipestifer strain RA-3M chromosome, complete genome	Riemerella anat...	1816	5449	99%	0.0	99.40%	2127058	CP144351.1
✓	Riemerella anatipestifer strain D23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Riemerella anat...	1816	1816	99%	0.0	99.40%	1505	PP112080.1
✓	Riemerella anatipestifer strain SX-1 chromosome, complete genome	Riemerella anat...	1816	5449	99%	0.0	99.40%	2112539	CP134070.1
✓	Riemerella anatipestifer strain RCAD0569 chromosome, complete genome	Riemerella anat...	1816	5449	99%	0.0	99.40%	2107437	CP095467.1
✓	Riemerella anatipestifer strain RCAD0125 chromosome, complete genome	Riemerella anat...	1816	5449	99%	0.0	99.40%	2152792	CP121209.1
✓	Riemerella anatipestifer Ytb2, complete genome	Riemerella anat...	1816	3632	99%	0.0	99.40%	2184066	CP007204.1
✓	Riemerella anatipestifer strain 17, complete genome	Riemerella anat...	1816	5449	99%	0.0	99.40%	2152519	CP080750.1
✓	Riemerella anatipestifer strain SCVM0004 chromosome, complete genome	Riemerella anat...	1816	5443	99%	0.0	99.40%	2133658	CP104076.1
✓	Riemerella anatipestifer strain RA1206 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Riemerella anat...	1816	1816	99%	0.0	99.40%	1438	JX195662.1
✓	Riemerella anatipestifer strain RCAD0122 chromosome, complete genome	Riemerella anat...	1816	5432	99%	0.0	99.40%	2220138	CP088073.1

图 3 鸭疫里默氏杆菌 16S rRNA 序列比对结果

Fig.3 Results of 16S rRNA sequence alignment of RA 同源性

离散度		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	1	■	99.4	98.9	99.5	99.7	99.9	99.7	99.5	99.8	99.3	99.4	99.2	1
	2	0.6	■	99.2	99.8	99.9	99.9	99.9	99.5	99.7	99.4	99.5	98.8	2
	3	1.1	0.8	■	99.4	99.4	99.4	99.3	99.5	99.2	99.5	99.8	98.3	3
	4	0.5	0.2	0.6	■	100.0	100.0	99.9	99.5	99.9	99.6	99.6	98.9	4
	5	0.3	0.1	0.6	0.0	■	100.0	99.9	99.5	99.9	99.6	99.6	99.7	5
	6	0.1	0.1	0.7	0.0	0.0	■	99.9	99.5	99.9	99.6	99.6	99.9	6
	7	0.3	0.1	0.7	0.1	0.1	0.1	■	99.6	99.7	99.5	99.5	99.7	7
	8	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.4	■	99.4	99.7	99.5	99.4	99.4	8
	9	0.2	0.3	0.8	0.1	0.1	0.1	0.3	0.6	■	99.7	99.4	100.0	9
	10	0.7	0.6	0.5	0.4	0.4	0.4	0.5	0.3	0.3	■	99.8	99.5	10
	11	0.6	0.5	0.2	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5	0.6	0.2	■	99.4	11
	12	0.8	1.2	1.7	1.1	0.3	0.1	0.3	0.6	0.0	0.5	0.6	■	12
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

RA HN-RA2023.seq
RA JL-RA1(HQ392516.1).seq
RA S-4801(AY871832.2).seq
RA GZ-RA12(KY399255.1).seq
RA CZ-RA03(KT734781.1).seq
RA SD-RA2018(MK641456.1).seq
RA HAN-RA-2020(ON872938.1).seq
RA GD2019(MT860493.1).seq
RA 20018(MT367930.1).seq
RA SD-LiaoCheng 2021(OP984710.1).seq
RA YL9101-D1(AY612191.1).seq
RA SDAU-1(MZ220547.1).seq

图 4 鸭疫里默氏杆菌 16S rRNA 的同源性分析

Fig.4 Homology analysis of 16S rRNA of RA

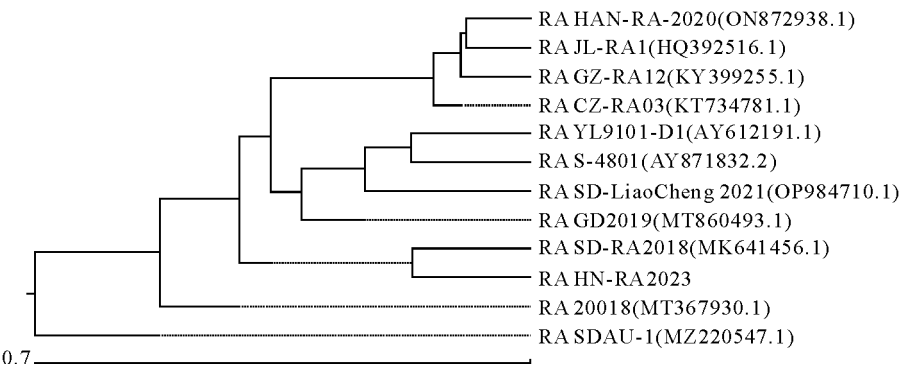


图5 鸭疫里默氏杆菌 16S rRNA 的系统进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree analysis of 16S rRNA of RA

清学分型鉴定方法,证实该菌血清型众多,国际公认的有 21 种,还有许多不在此内。随着新血清型的不断出现,加之各实验室标准血清和标准菌株的不完备,RA 血清学分型方法在 RA 流行病学监测和对鸭疫里默氏杆菌病的特异性防控等方面已有其局限性,而随着分子生物学技术发展,分子要分型技术在 RA 中得到了广泛应用。本研究通过分离到的鸭疫里默氏杆菌进行 16S rRNA 测序和序列比对,证实该鸭场感染分离到的鸭疫里默氏杆菌 HN-RA2023 分离株与参考株的同源性为 98.9%~99.9%,并且分离株与 SD-RA2018 株处于同一分支,进化关系较近。

湖南是水禽养殖大省,近年来虽然规模化养殖程度得到较快提升,但小散户养殖模式仍占较高比例,在种源不确定的情况下,加上后期防疫缺失,是发病的重要场所地和疫病地。从 2024 年送检的 4 批发病雏鸭中,2 次从心包液中分离到鸭疫里默氏杆菌,说明该病在水禽中的发生有一定比例,应在临床上引起关注。本研究通过对鸭疫里默氏杆菌的分离和鉴定,将对湖南地区该病的诊断和防控具有重要意义。

参考文献:

[1] 程安春,朱德康,王晓佳,等.鸭疫里默氏杆菌病原及其防控关键技术研究[J].中国家禽,2012,34(6):1-4.

[2] 张大丙.鸭疫里默氏杆菌病的防制思路[J].中国家禽,2009,31(21):51.

[3] LIU J F,HAO D M,DING X Y,et al. Epidemiological investigation and β -lactam antibiotic resistance of *Riemerella anatipestifer* isolates with waterfowl origination in Anhui Province, China[J]. Poultry Science, 2024,103(4):103 490.

[4] 林志敏,林彬彬,谢碧林,等.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):2 576-2 585.

[5] WANG M Y,WANG S Y,WANG M S,et al. Functional characterization of RhuB as a second TonB2-dependent hemin receptor in *Riemerella anatipestifer* CH-1[J]. Microbiology Spectrum,2024,12(4):313 323.

[6] ZHANG C X,WANG L L,ZHAO Q,et al. Research Note:Antibiotic resistance and pathogenicity of geese-derived *Riemerella anatipestifer* isolated from eastern regions of Hebei Province, China[J]. Poultry Science, 2024,103(4):103 517.

[7] VO T T,DANG V T,LE D H,et al. Identification,serotyping,and antimicrobial susceptibility of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Vietnam[J]. Open Veterinary Journal,2022,12(3):391-398.

[8] 杨苗,程安春,汪铭书,等.基于鸭疫里默氏杆菌 16SrRNA PCR 检测方法的建立和应用[J].四川农业大学学报,2007,25(3):343-347.

YANG M,CHENG A CH,WANG M SH,et al. Development and application of PCR based on 16SrRNA for the detection of *Riemerella anatipestifer*[J]. Journal of Sichuan Agricultural University,2007,25(3):343-347.

[9] 刘传华,赵艳丽,王玉海,等.鸭疫里默氏菌研究进展[J].动物医学进展,2008,29(5):91-93.

[10] SAWICKA-DURKALEC A,TOMCZYK G,GERILOVYCH I,et al. Molecular detection and phylogenetic analysis of *Riemerella anatipestifer* in poultry and wild geese in Poland[J]. Pathogens,2023,12(2):256.

[11] DONG H Y,ZHU S Y,SUN F,et al. Comparative analysis of antimicrobial resistance phenotype and genotype of *Riemerella anatipestifer*[J]. Veterinary Microbiology,2024,292:110 047.