

# 用 3 种分型方法研究鸭疫里默氏菌的血清型

张大丙

(中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

**摘要:** 用玻片凝集试验、试管凝集试验和琼脂扩散沉淀试验 3 种方法, 检测了鸭疫里默氏菌的 19 个参考菌株和部分分离株与同型和异型抗血清的反应。结果表明, 3 种分型方法具有很好的相关性, 但在检测异型菌株之间的交叉反应时表现出不同。玻片凝集试验适于对大量分离株的快速筛选, 但不能作出准确定型。以各型参考菌株为参照, 根据试管凝集试验可将被检菌株分型, 但当分离株与一个以上血清型的抗血清产生差异较小的凝集效价时, 则难以定型。琼扩试验也适合于对分离株进行进一步检测, 但要求制备较高效价的抗血清。对血清进行吸收可消除 3 种分型试验中的所有交叉反应, 并制备出单因子血清。但这些单因子血清只是相对于已知血清型具有特异性, 某些分离株虽然只与某型单因子血清发生凝集反应, 仍可能属于新的血清型或某个已知型的亚型。

**关键词:** 鸭疫里默氏菌; 血清型; 分型方法; 交叉反应; 单因子血清

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)03-0258-06

鸭疫里默氏菌(*Riemerella anatipestifer*, RA) 是鸭传染性浆膜炎的致病病原, 根据玻片凝集试验、试管凝集试验或琼扩试验的结果, 本菌被区分为 21 个血清型<sup>[1-3]</sup>, 其中 20 型参考菌株 670/89 不属于 RA<sup>[4]</sup>, 被另一个分离株 698/95 所替代<sup>[5]</sup>。国内已出现 14 个血清型<sup>[6,7]</sup>。

对 RA 分离株进行血清型鉴定是研究鸭传染性浆膜炎流行病学的内容之一, 其结果对于制定有效的免疫程序是至关重要的。然而, 在血清型鉴定过程中, 由于不同的试验方法以及菌株之间的血清学相关性等原因, 又易造成分型上的混淆<sup>[1]</sup>。因此, 对不同分型方法以及 RA 各血清型之间的抗原关系进行比较研究是非常必要的。

本文同时用 3 种分型方法对 1~19 型鸭疫里默氏菌参考菌株、属于 10 个已知血清型和 2 个未定型的部分分离株进行了研究, 对表现交叉反应的抗血清进行了吸收试验。

## 1 材料与方法

### 1.1 参考菌株及其抗血清

1~19 型 RA 参考菌株由美国的 Sandhu 先生惠赠, 菌株编号见文中表格, 兔抗 1~19 型 RA 参考菌株的血清为作者制备, 方法见文献[8]。

### 1.2 分离株

1、2、6、7、11、13、14、15 和 17 型分离株各 5 株、10 型分离株 10 株以及未定型菌株 17 株用于本研究。

### 1.3 血清型鉴定方法

用玻片凝集试验、试管凝集试验、琼脂扩散沉淀试验进行血清型鉴定, 方法见文献[8]。玻片凝集试验中, 根据凝集出现的快慢和凝集块大小将阳性结果记录为++++、+++、++和+; 试管凝集试验中用 1:10 作为第一个血清稀释度; 沉淀试验中, + 表明清晰的沉淀线。

### 1.4 吸收试验

对表现交叉反应的抗血清用相关菌株进行吸收, 方法见文献[9], 吸收后的血清采用上述 3 种试验方法进行检测。

## 2 结果

### 2.1 3 种试验检测 1~19 型参考菌株

表 1 和 2 是 1~19 型参考菌株与同源和异源抗血清之间的凝集试验结果。所有参考菌株均与同源抗血清发生清晰的凝集反应, 部分参考菌株与异源抗血清发生交叉反应。

琼扩试验中, 12 型抗原与 16 型抗血清之间出现明显的交叉沉淀线, 但沉淀反应模式表明, 12 型和 16 型的热稳定抗原只具有部分同一性; 其他血清型参考菌株的热稳定抗原都只与同源抗血清发生沉淀反应。除 3 型抗原与同源抗血清形成较弱的沉淀线外, 其他血清型参考菌株与同源抗血清均形成清

收稿日期: 2003-12-03

作者简介: 张大丙(1965-), 男, 湖北天门市人, 副教授, 硕士, 从事预防兽医学教学与科研



## 2.2 吸收试验

如表 3~ 6 所示, 3 种试验中的交叉反应都可通过吸收试验而消除, 且吸收几乎不影响抗血清的同源凝集能力和同源沉淀反应能力, 只有经过 12 型菌株吸收后的 16 型抗血清与同源抗原的凝集效价下降 2 个滴度, 并与同源热稳定抗原不再形成可见的

沉淀线。经过 16 型菌株吸收的 12 型抗血清还能与 6 型菌株发生凝集反应, 因此, 只有同时经过 6 型和 16 型菌株吸收的 12 型抗血清才是特异的。同样, 只有同时经过 5 型和 17 型菌株吸收的 2 型抗血清、同时经过 2 型和 19 型菌株吸收的 17 型抗血清才具有型特异性。

表 3 6 型、12 型和 16 型在 3 种试验中的抗原关系

Table 3 Antigenic relationship between serotype 6, 12 and 16 in three serotyping methods

抗原 血清型 Antigen Serotype		抗血清(吸收用菌) Antiserum( absorbed with)						
		P2123	8755	S4801	P2123 (8755)	8755 (S4801)	8755 (P2123+ S4801)	S4801 (8755)
P2123	6	++++ (80)+	+(0)-	-	++++ (80)+	+(0)-	-	
8755	12	+(0)-	++++ (80)+	++++ (40)+	-	++++ (80)+	++++ (80)+	-
S4801	16	-	++++ (10)-	++++ (80)+		-	-	++++ (20)-

表 3~ 7 中的符号和数据指玻片凝集试验、试管凝集试验和沉淀试验的结果

Symbol and figures in tables 3~ 7 indicate the results of slide agglutination test, tube agglutination test and AGP test

表 4 4 型和 18 型在 3 种试验中的抗原关系

Table 4 Antigenic relationship between serotype 4 and 18 in three serotyping methods

抗原 Antigen	血清型 Serotype	抗血清(吸收用菌) Antiserum( absorbed with)		
		H2565	540/86	540/86(H2565)
H2565	4	++++ (80)+	++++ (10)-	-
540/86	18	-	++++ (40)+	++++ (40)+

表 5 5 型与 2 型、7 型、9 型在 3 种试验中的抗原关系

Table 5 Antigenic relationship between serotype 5 and serotype 2, 7, 9 in three serotyping methods

抗原 血清型 Antigen Serotype		抗血清(吸收用菌) Antiserum( absorbed with)						
		D24046	D24123	D27179	H1785	D24046 (D24123)	D27179 (D24123)	H1785 (D24123)
D24046	2	++++ (160)+	-	-	-	++++ (160)+		
D24123	5	+(0)-	++++ (160)+	+++ (10)+	++++ (10)-	-	-	-
D27179	7	-	-	++++ (40)+	-		++++ (40)+	
H1785	9	-	-	-	++++ (160)+			++++ (160)+

表 6 17 型与 2 型、19 型在 3 种试验中的抗原关系

Table 6 Antigenic relationship between serotype 17 and serotype 2, 19 in three serotyping methods

抗原 血清型 Antigen Serotype		抗血清(吸收用菌) Antiserum( absorbed with)						
		D24046	977/83	30/90	D24046 (D24123)	D24046 (D24123+ 977/83)	977/83 (D24046)	977/83 (D24046+ 30/90)
D24046	2	++++ (160)+	++ (0)-	-	++++ (160)+	++++ (80)+	-	-
977/83	17	++++ (10)-	++++ (160)+	-	++++ (10)-	-	++++ (160)+	++++ (80)+
30/90	19	-	+(0)-	++++ (160)+			+(0)-	-

### 2.3 3 种试验检测分离株

玻片凝集试验中, 2 型、6 型和 17 型分离株除与同型抗血清发生强凝集反应外, 还分别与 17 型、12 型和 2 型抗血清发生交叉反应, 交叉反应程度与相应的参考菌株一样; 1、7、11、13、14 和 15 型分离株均只与同型抗血清发生强凝集反应。

试管凝集试验中, 17 型分离株与 2 型抗血清产生 1: 10 或 1: 20 的交叉凝集效价, 而 1、2、6、7、11、13、14 和 15 型分离株均只与同型抗血清发生凝集反应。若以某型参考菌株为参照, 所有这些血清型的分离株均与同型参照菌的凝集效价相等或仅差一个滴度。

琼扩试验中, 所有这些血清型分离株的热稳定抗原均只与同型抗血清形成清晰的沉淀线, 沉淀反

应模式表明, 它们与各自参考菌株的热稳定抗原具有同一性。

用吸收后的血清检测, 2 型、6 型和 17 型的分离株分别只与同型抗血清发生凝集反应, 且这些分离株与同型抗血清的凝集效价和沉淀线的形成几乎没有受到血清吸收的影响。

如表 7 所示, 被玻片凝集试验鉴定为 10 型的分离株中, 只有以 C2 为代表的 5 个菌株属于真正的 10 型, 而以 C598 为代表的 5 个菌株与 10 型参考菌株差异显著; 而以 C882 为代表的 13 个菌株、以 C515 为代表的 4 个菌株虽然分别只与 8 型和 19 型抗血清发生凝集反应, 但进一步检测表明, 它们只是分别与 8 型和 19 型存在低度交叉凝集反应。

表 7 用 3 种试验鉴定 10 型和未定型分离株

Table 7 Identification of serotype 10 and untypeable isolates using three serotyping methods

抗原 Antigen	血清型 Serotype	抗血清 Antiserum		
		D26220	H 2199	30/90
D26220	8	++++ / 640/ +	-	-
C882		++++ / 10/ -	-	-
H2199	10	-	++++ (160) +	-
C2		-	++++ (160) +	-
C598		-	++++ (20) -	-
30/90	19	-	-	++++ / 160/ +
C515		-	-	++++ / 10/ -

## 3 讨论

### 3.1 不同试验方法的相关性和不同之处

凝集试验中, 所有 RA 参考菌株或分离株都与同源或同型抗血清发生强凝集反应或形成一定的凝集效价。沉淀试验中, 所有参考菌株或分离株的热稳定抗原都与同源或同型抗血清形成清晰的沉淀线。只有 3 型抗血清的同源凝集效价较低, 同源沉淀反应线也较弱。对于大多数血清型菌株而言, 它们与异型抗血清既无可见的凝集反应也无可见的沉淀反应。结果表明, 凝集试验和沉淀试验在鸭疫里默氏菌的血清型分类中具有很好的相关性, 吸收试验对抗血清的凝集能力和沉淀反应能力具有同等的影响, 可进一步证实这一点。

凝集试验和沉淀试验在检测低水平抗原抗体反应时呈现不同的结果, 即沉淀试验检测不到相当于凝集效价低于 1: 20 的抗原抗体反应, 或仅检测到微弱的沉淀反应, 这是由于不同试验方法的敏感性不同所致。两种凝集试验的区别在于, 试管凝集试验通常忽略效价低于 1: 10 的抗原抗体反应, 而玻片凝集试验可检测到或强或弱的凝集反应, 这与抗血清用量有关。鉴于低水平抗原抗体反应多属于异型间的交叉反应, 因而 3 种分型试验的不同之处主要表现在检测异型菌株之间的低度交叉反应时呈现不同的结果。

研究具有相近血清学相关性的菌株之间的关系时, 凝集试验和沉淀试验都可检测到明显的交叉反应, 但对结果的判断表现不同, 即根据凝集反应程度

或凝集效价高低不能区分这类菌株之间的抗原差异,而沉淀反应模式可显示其抗原只有部分同一性。

### 3.2 菌株间的血清学相关性

虽然参与反应的抗原(全细胞或全细胞抽提物)和抗体(兔抗全细胞血清)很复杂,但无论在凝集试验还是沉淀试验中,多数血清型菌株只与同型抗血清发生反应,某些血清型之间虽然表现交叉反应,但交叉程度很低,说明已知各型之间存在较远的血清学相关性。本文观察到12型与16型之间具有较高级别的交叉反应,与以往结果有所不同。Sandhu等提出16型时,并未获得12型参考菌株,因而没有对它们之间的抗原关系进行比较<sup>[1]</sup>,而Loh等只检测到12型与16型之间存在单向低度交叉反应<sup>[2]</sup>。此外,本文在其他血清型之间所观察到的交叉反应与以往报道也只是部分相同,但是,不同研究者所观察到的交叉反应存在于不同的血清型之间的现象是普遍存在的<sup>[1-3, 10, 11]</sup>,这种现象可能与抗血清的制备有关<sup>[9]</sup>。

Sandhu等认为,使用不同的试验方法可导致分型混淆<sup>[1]</sup>,但本研究表明,不同试验方法只有在检测抗原结构不同的菌株之间的交叉反应时才表现出不同的结果,因此,菌株之间具有一定的或相近的血清学相关性才是影响分型的根本原因。据文献报道,存在低度交叉反应的异源菌株一般被鉴定为不同的血清型,而具有高度交叉反应的异源菌株往往被合并为同一个血清型<sup>[1-3, 10]</sup>,但是,如果不进行血清吸收试验,这种做法可能是不准确的;有数据表明,将C598等菌株鉴定为10型的亚型更为合适<sup>[12]</sup>。

### 3.3 3种分型试验在鉴定分离株时的优缺点

玻片凝集试验易检测到交叉反应,不足以对分离株作出准确定型,但适合于对大量分离株进行快速筛选。对于在玻片凝集试验中表现交叉反应的分离株,一般需用试管凝集试验进行进一步的检测<sup>[1, 2]</sup>,但试管凝集试验也容易检测到交叉反应,因此必需设立参照菌并以凝集效价的高低来判断。对分离株的检测表明,以某型参考菌株为参照,当分离株与参照菌的效价相差3个或3个以上滴度时,可判断它们为异型,或至少可肯定它们存在抗原差异;若分离株与参照菌的效价相等或相差1个滴度时,一般可认为它们属于同型,但也不能排除它们存在抗原差异的可能,例如以16型为参照检测12型菌株时即是如此;因此,当分离株与一个以上血清型的抗血清产生差异很小的凝集效价时,难以定型。

用琼扩试验进一步检测在玻片凝集试验中表现交叉反应的分离株不仅是可行的,而且还具有优势,因为该试验检测不到低度交叉反应,虽然可检测到程度较高的交叉反应,但沉淀反应模式可显示两个菌株之间是否具有抗原同一性。但是,沉淀试验的敏感性低又成为缺点,若制备的抗血清的抗体效价过低,即使同源抗原抗体之间也只能检测到微弱的沉淀反应;若吸收对抗血清的效价有较大影响时,也不适宜采用该方法。

通过吸收试验可制备出特异性的单因子血清,而不表现交叉反应的抗血清可视为单因子血清。但是,这些单因子血清只是相对于已知血清型具有特异性,对C598、C515、C882等分离株的检测表明,只与一个已知型的单因子血清发生强凝集反应的菌株仍可能属于一个新的血清型(或某个已知型的亚型),因此,经过玻片凝集试验的筛选后,选择部分分离株进行进一步检测仍然是必要的。

要明确C598、C515、C882等菌株的血清型,需制备出相应的抗血清,并与已知各型进行进一步交叉比较。

### 参考文献:

- [1] Sandhu T S, Leister M L. Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolates from poultry in different countries [J]. Avian Pathology, 1991, 20: 233~239.
- [2] Loh H, Teo T P, Tan H C. Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolates from ducks in Singapore: a proposal of new serotypes [J]. Avian Pathology, 1992, 21: 453~459.
- [3] Pathanasophon P, Sawada T, Tanticharoenyos T. New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand [J]. Avian Pathology, 1995, 24: 195~199.
- [4] Ryll M, Hinz K H. Exclusion of strain 620/89 as type strain for serovar 20 of *Riemerella anatipestifer* [J]. Berl Munch Tierarztl Wochenschr, 2000, 113(2): 65.
- [5] Pathanasophon P, Phuektes P, Tanticharoenyos T, et al. A potential new serotype of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand [J]. Avian Pathology, 2002, 31(3): 267~270.
- [6] 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.
- [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(4): 320~323.

- [ 8 ] 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, 1999, 30( 6 ): 536~ 542.
- [ 9 ] 张大丙, 郭玉璞. 鸭疫里氏杆菌 2 型和 17 型之间交叉反应的研究 [ J ]. 中国预防兽医学报, 2002, 24( 3 ): 192 ~ 194.
- [ 10 ] Bisgaard M. Antigenic studies on *Pasteurella anatipestifer*, species incertae sedis, using slide and tube agglutination [ J ]. Avian Pathology, 1982, 11: 341 ~ 350.
- [ 11 ] Sandhu T, Harry E G. Serotypes of *Pasteurella anatipestifer* isolated from commercial White Pekin ducks in the United States [ J ]. Avian Diseases, 1981, 25: 497~ 502.
- [ 12 ] 张大丙. 血清 10 型鸭疫里默氏菌 4 个亚型的分析 [ J ]. 畜牧兽医学报, 2005, 36( 2 ): 181~ 186.

## Studies on Serotype of *Riemerella anatipestifer* by Using Three Serotyping Methods

ZHANG Daoping

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

**Abstract:** 19 representative type strains and some isolates of *Riemerella anatipestifer* were detected by slide and tube agglutination and agar gel precipitin tests. Homologous and heterologous reactions of *R. anatipestifer* strains showed that three serotyping methods correlated well, but gave differences on detecting cross reactions between heterologous stains. Slide agglutination test is a convenient method to screen large number of isolates quickly, but it is not suited to correctly serotype isolates. Isolates could be serotyped by tube agglutination test using type strains as control, but it is difficult to serotyped isolates which produced titers with minor dilution difference with antisera to more than one representative strains. Agar gel precipitin test is also suitable for further detection of isolates, but antiserum with higher-level antibodies should be prepared. Serum absorption removed all cross-reactions in three serotyping tests, and mono-specific antiserum could be prepared. However, all mono-specific antiserum showed serotype-specificity only against the known serotypes. Further investigations indicated that some isolates which agglutinated in mono-specific antiserum against one serotype could belong to a new serotype or sub-serotypes of a known serotype.

**Key words:** *Riemerella anatipestifer*; serotype; serotyping method; cross reaction; mono-specific antiserum