

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.04.02

鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白 A 原核表达及间接 ELISA 方法的建立和初步应用

陈汝佳^{1,2}, 李婷², 余波², 张亚楠², 蒲龄², 欧德渊¹, 徐景峨^{2*}

(1. 贵州大学动物科学学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省农科院畜牧兽医研究所, 贵阳 550005)

[收稿日期] 2021-12-03 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 04-009-08 [中图分类号] S852.61

[摘要] 为建立鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)间接酶联免疫吸附试验(ELISA)方法,以 RA 贵州分离株 RAG06 基因组为模板扩增并克隆鸭疫里默氏杆菌 OmpA 基因,构建 pET32a-OmpA 重组原核表达质粒,转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,重组菌经诱导、超声、纯化后,通过 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析鉴定获得 OmpA 重组蛋白大小约 57 KD;以 OmpA 重组蛋白为包被抗原初步建立 ELISA 方法并优化,经多次方阵检测结果显示,OmpA 蛋白以 2.243 mg/mL 的浓度进行包被,血清以 1:100 稀释,抗原包被条件为 4 ℃ 过夜、封闭条件为 37 ℃ 120 min、血清反应时间为 37 ℃ 60 min、酶标抗体工作浓度为 1:1000、酶标抗体反应时间为 37 ℃ 60 min、显色时间为 15 min 为最佳条件。确定临界值为 0.389。特异性试验表明 RA 阳性血清有较好反应外,其他血清均无明显反应。批内变异系数 2.77%~8.00%,批间变异系数为 1.10%~7.80%。当阳性血清稀释比例为 1:1600 时,仍可判断为阳性,敏感性较高。应用该方法检测贵州省 120 份鸭血清、65 份鹅血清证明该方法能用于水禽源鸭疫里默氏杆菌的检测,应用该方法检测灭活疫苗免疫后的鸭血清和卵黄抗体,结果表明符合灭活疫苗消长规律。试验建立的 ELISA 方法,为 RA 的流行病学调查和 RA 抗体监测提供了血清学诊断方法。

[关键词] 鸭疫里默氏杆菌;外膜蛋白 A;原核表达;ELISA。

Prokaryotic Expression of Outer Membrane Protein A of *Riemerella Anatipestis* and Establishment and Preliminary Application of Indirect ELISA Method

CHEN Ru-jia^{1,2}, LI Ting², YU Bo², ZHANG Ya-nan², PU Ling², OU De-yuan¹, XU Jin-ge^{2*}

(1. College of Animal Science, Guizhou University, Guiyang 550025, China;

2. Institute of animal husbandry and veterinary medicine of GAAS, Guiyang 550005, China)

Corresponding author: XU Jing-e, E-mail: xje0809@163.com

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2019]2287号);财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系;贵州省科技计划项目(黔科合平台人才[2019]5203号);贵州省农科院科技创新项目(黔农科院科技创新[2017]03号)

作者简介: 陈汝佳,硕士研究生,从事兽医免疫技术方向研究。

通讯作者: 徐景峨。E-mail: xje0809@163.com

Abstract: This trial was conducted to develop an indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for *Riemerella anatipestifer* (RA). The recombinant prokaryotic expression plasmid PET32A – OMPA was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) competent cells. After induction, ultrasound and purification of the recombinant strain, the OmpA gene of RA was amplified and cloned using the RAG06 genome of Guizhou strain RA as template. About 57 KD OmpA recombinant protein was identified by SDS – PAGE and Western blotting analysis. ELISA method was preliminarily established and optimized by using OmpA recombinant protein as coated antigen. The results of multiple square array detection showed that OmpA protein was coated at the concentration of 2.243 mg/mL and the serum was diluted at 1:100. The optimal conditions were as follows: 4 °C overnight for antigen coating, 37 °C for 120 min for sealing, 37 °C for 60 min for serum reaction time, 37 °C for 60 min for elisa concentration 1:1000, 37 °C for 60 min for ELISA reaction time, and 15 min for chromogenic time. The critical value is determined to be 0.389. The specificity test showed that RA positive serum had good reaction, but no obvious reaction to other serums. The coefficient of variation within batches was 2.77% ~ 8.00%, and the coefficient of variation between batches was 1.10% ~ 7.80%. When the dilution ratio of positive serum is 1:1600, it can still be judged as positive with high sensitivity. 120 duck serum samples and 65 goose serum samples were detected in Guizhou Province, which proved that the method could be used for the detection of RA from waterfowls. The serum and egg yolk antibodies of ducks immunized with inactivated vaccine were detected by this method, and the results showed that it was consistent with the growth and decline rule of inactivated vaccine. The ELISA method established in this study provided a serological diagnosis method for the epidemiological investigation and antibody monitoring of RA.

Key words: *Riemerella anatipestifer*; outer membrane protein A; prokaryotic expression; ELISA.

鸭疫里默氏杆菌 (*Riemerella anatipestifer*, RA) 是具有荚膜,未产生芽孢,没有鞭毛的革兰氏阴性短小杆菌^[1]。目前暂定为里氏杆菌属,未定为哪一科,纯培养菌落涂片可见菌体呈单个、成对或偶呈丝状,菌体大小不一,0.2 ~ 0.4 μm $\times$ 1 ~ 5 μm ^[2]。RA 在全国各地广泛分布,且在鸭、鹅中具有高感染率,主要通过呼吸道和损伤皮肤等传播,也可经蛋垂直传播^[3]。该病一年四季皆可发生,其主要病变特征为纤维素性心包炎,纤维素性肝周炎和脑膜炎等多系统性综合征^[4],在临床上 RA 与鸭圆环病毒、鸭坦布苏病毒、鸭源呼肠孤病毒、新城疫病毒等发生混合感染,给水禽业带来严重危害^[5]。

鸭疫里默氏杆菌外膜蛋白 A (Outer Membrane Protein A, OmpA) 具有较强的免疫原性和反应原性,不同来源的 OmpA 基因同源性较高。OmpA 蛋白是 RA 的主要外膜蛋白维持细菌完整,同时参于吸附定植于宿主细胞^[6]。此外,有研究已证明^[7],

OmpA 蛋白是 RA 的主要免疫原性蛋白。本研究利用原核表达系统成功制备了重组 OmpA 蛋白,并进一步建立了检测 RA IgG 抗体的间接 ELISA 方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料 RA 分离株 (G06 株) 由本实验室分离并保存; RA 阳性及阴性血清、多杀性巴氏杆菌、沙门氏菌、坦布苏病毒、大肠杆菌阳性血清由本实验室保存; pET32a 原核表达载体购自南京钟鼎生物技术有限公司; BamHI、XhoI、BL21 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; DNA 胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自 OMEGA; IPTG、Urea 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; Tris、Glycine、SDS、酶标板、TMB 显色液、PBST 购自北京索莱宝科技有限公司; HisPur™ Ni – NTA 纯化试剂盒购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司; HRP – 羊抗鸭 IgG 购自美国 KPL 公司。鸭传染性浆膜炎二价灭活疫苗 (1 型 RAf63 株 + 2 型 RAf34 株) 购自天津瑞普生物技术

股份有限公司。

1.2 引物设计及合成 根据 RA 毒株中 OmpA 基因序列和 pET32a 原核表达载体载体序列中的克隆位点,利用 Primer5.0 设计一对特异性引物。选用 BamHI 和 XhoI 作为酶切位点,引物由上海生工公司合成,上游引物:5′-GGATCCATGTTGATGACTG-GACTTGGT-3′,下划线为 BamH I 酶识别位点;下游引物:5′-CTCGAGTTATTTTCTTTTCTTTTAC-TACT-3′,下划线为 XhoI 酶识别位点;目的片段大小约为 1149 bp。

1.3 pET32a-OmpA 原核表达质粒的构建 提取 RA 总核酸,PCR 扩增 OmpA 基因,利用 BamHI 和 XhoI 限制性内切酶双酶切 PCR 产物同时双酶切 pET32a 原核表达载体,将获得的线性化目的基因与目标载体连接,连接产物转化 E. coliBL21 (DE3) 感受态细胞,挑取单个菌落,抽提质粒,双酶鉴定和测序验证。将测序结果与预期序列进行比对,验证正确的质粒命名为 pET32a-OmpA。

1.4 OmpA 重组蛋白的诱导表达与纯化 将 pET32a-OmpA 载体转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞,挑取转化平板上的单个菌体扩大培养。用 IPTG 诱导表达重组菌 37 ℃,4 h;取 1 mL 菌液,10000 g 室温离心 2 min 弃掉上清,用 PBS 重悬菌体,上样。剩余菌液 4000 g 离心,10 min,弃上清,PBS 重悬后超声波破碎,分别取上清和沉淀,上样。

1.4.1 OmpA 重组蛋白可溶性分析 取阳性菌培养 18 h,按 1:100 接种 50 mL LB(Amp+)锥形瓶,37 ℃摇到 OD₆₀₀ 值约为 0.6,加终浓度 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4 h,离心 5 min,沉淀用 PBS 洗三遍,加 20 mL PBS 重悬,超声破碎后 4 ℃离心,收集包涵体。

1.4.2 OmpA 蛋白的纯化 包涵体使用 Tris 缓冲液洗涤 3 次后,用含 2 mol/L 尿素的 Tris 缓冲液洗去杂蛋白,离心取沉淀用含 8 mol/L 尿素的 TGE 缓冲液于 4 ℃过夜溶解,离心取上清置于透析袋中,分别用 6、5、4、3、2 mol/L 尿素的 TGE 复性溶液梯次复性,蔗糖浓缩。

1.4.3 OmpA 蛋白再纯化 将蛋白质提取物与平衡缓冲液混合制备样品使得总体积等于二倍树脂体积;将 HisPurNi-NTA 旋转柱 700 g 离心 2 min,去除存储缓冲液;向平衡柱中加入二倍树脂床体积的平衡缓冲液。使得缓冲液进入树脂层 700 g 离心 2 min,收集缓冲液;将制备好的蛋白提取物加入柱中,使其吸附于树脂床 700 g 离心 2 min;用二倍树脂床体积的洗涤缓冲液清洗树脂,700 g 离心 2 min,收集离心液;重复以上步骤两次。上样 12% SDS-PAGE。

1.5 OmpA 重组蛋白的 Western-blotting 鉴定 将纯化后的重组 OmpA 蛋白上样经 SDS-PAGE 后转印至 NC 膜,5%脱脂粉封闭液封闭 37 ℃1 h。用封闭液稀释一抗(RA 鸭阳性血清),膜在一抗稀释液中 4 ℃过夜。次日将膜取出后用 PBST 洗膜 4 次,每次 5 min,用封闭液稀释二抗(HRP-羊抗鸭 IgG)。膜在二抗中 37 ℃反应 1 h。反应完毕后,把膜取出后置于干净的盒子中洗膜 4 次,每次 5 min。ECL 显影,曝光。

1.6 OmpA 间接 ELISA 检测方法的初步建立 根据文献^[8]设计好包被板,在板条上做上标记。用包被液将 OmpA 蛋白抗原稀释成需要的浓度,混匀后加入板中,每孔加入 100 μL,4 ℃冰箱 12 h。包被好后,弃除包被液,洗板 3 次,每孔加入 200 μL 5% BSA 封闭液,37 ℃恒温孵育 1 h。取出酶标板,弃除封闭液,洗板 1 次。RA 阳性血清 1:100 倍稀释,每孔 100 μL,37 ℃恒温孵育 1 h。取出酶标板,弃去内液,洗板 3 次,向每孔中加入 100 μL 稀释好的酶标二抗:HRP-羊抗鸭,1:1000。37 ℃恒温孵育 1 h。取出酶标板,弃去二抗,洗板 5 次,每孔先加入 200 μL TMB 显色液,室温 15 min。每孔加 50 μL 终止液,终止反应。即刻在酶标仪上读 OD₄₅₀ 值。

1.6.1 OmpA 间接 ELISA 检测方法的优化 以纯化的 OmpA 蛋白为抗原,羊抗鸭-HRP 为二抗,对下列条件进行优化,抗原包被浓度(1:5、1:10、1:50、1:100、1:200、1:400)、封闭条件(37 ℃ 15 min、37 ℃ 30 min、37 ℃ 60 min、37 ℃ 90 min、37 ℃ 120 min)、血清反应条件(37 ℃ 15 min、37 ℃

60 min、37 ℃ 90 min、37 ℃ 120 min)、酶标反应条件(37 ℃ 15 min、37 ℃ 60 min、36 ℃ 90 min、37 ℃ 120 min)、显色时间(5 min、10 min、15 min、20 min)。

1.6.2 阴阳性临界值的判定标准 利用优化后的条件通过间接 ELISA 方法对 40 份 RA 阴性血清样本进行检测,测定 OD_{450} 值并计算 40 份血清的平均值($\bar{X}$)和标准差(SD),计算临界值公式为:临界值 = $\bar{X} + 3SD$,当 $OD_{450} \geq \bar{X} + 3SD$ 判定为阳性,当 $OD_{450} < \bar{X} + 3SD$ 判定为阴性。

1.6.3 特异性试验 利用优化后的条件对本试验室保存的多杀性巴氏杆菌、沙门氏菌、葡萄球菌和大肠杆菌阳性血清进行检测,并设立 RA 阴阳性血清对照,评估该方法的特异性。

1.6.4 重复性试验 批内重复试验:使用同一批次纯化的 OmpA 蛋白包被酶标板,对 6 份临床阳性血清样品进行检测,每个样品重复 3 孔。

批间重复性试验:使用 3 个批次纯化的 OmpA 蛋白包被酶标板,检测同样的 6 份阳性血清样品。计算批内和批间变异系数,以检测其重复性。

1.6.5 敏感性试验 将 5 份 RA 抗体阳性血清进行倍比稀释(1:50、1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200),利用建立的 ELISA 方法进行检测、评价其敏感性。

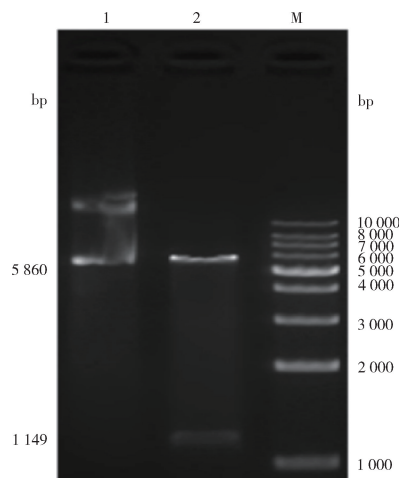
1.6.6 临床样品的检测 利用本研究建立的 OmpA 间接 ELISA 方法对 2020 年-2021 年在贵州地区采集的 120 份鸭、76 份鹅血清进行检测,计算 RA 抗体阳性率。

1.6.7 OmpA 间接 ELISA 检测方法的初步应用 将 40 只 1 日龄健康雏鸭随机分成 2 组,20 只/组。分别设 A 组为灭活疫苗组(0.2 mL)、B 组为生理盐水阴性对照组(0.2 mL)。对饲养至 7 日龄健康雏鸭分别采用皮下注射进行接种免疫(首免),间隔 1 周(14 日龄)后进行二次免疫。在首免(7 d 采血)和二次免疫(14 d 采血)后 21 d、28 d、35 d、42 d、49 d、56 d,各组随机采集 10 只雏鸭外周血样本,分离血清,测定 OD_{450} 值。

将 40 只健康产蛋鸭随机分成 2 组,20 只/组。分别设 A 组为灭活疫苗组(0.40 mL)、B 组为生理盐水阴性对照组(0.40 mL)。对产蛋鸭分别采用皮下注射进行接种免疫(首免),隔上 1 周后对产蛋鸭进行二次免疫。收集免疫产蛋鸭 0、1、2、3、4、5、6、7 w 下的种蛋,每组 10 枚蛋,采用间接 ELISA 方法检测卵黄抗体,测定 OD_{450} 值。

2 结果与分析

2.1 OmpA 基因的 PCR 扩增及重组质粒鉴定 OmpA 扩增产物及双酶切重组质粒 pET32a-OmpA 的电泳结果均与预期片段一致,表明重组质粒构建正确(图 1)。



M: DL10000 Marker; 1: 酶切前质粒; 2: 酶切后质粒

图 1 原核表达质粒双酶切鉴定

Fig 1 Double digestion identification of prokaryotic expression plasmid

2.2 OmpA 重组蛋白的诱导表达与纯化 原核表达质粒 pET32a-OmpA 体外诱导表达后经 12% SDS-PAGE 分析,结果显示,在 57 KD 处有预期大小的目的条带,目标蛋白主要在沉淀中,上清中无明显条带(图 2.1),表明 OmpA 重组蛋白主要以包涵体形式表达。进一步利用 His 标签蛋白纯化试剂盒对 OmpA 重组蛋白进行纯化。将 11 μ g 纯化后的重组蛋白上样 12% SDS-PAGE,显示,在 57 KD 处有明显单一条带(图 2.2),表明 OmpA 蛋白纯化效果较好。用 BCA 法测得的纯化 OmpA 蛋白的浓度约为 2.243 mg/mL。

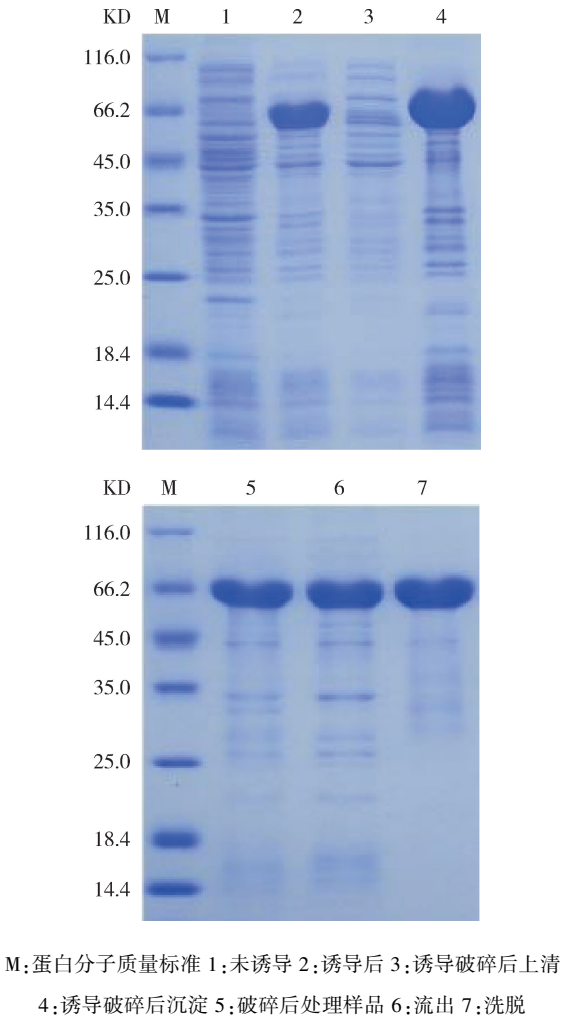


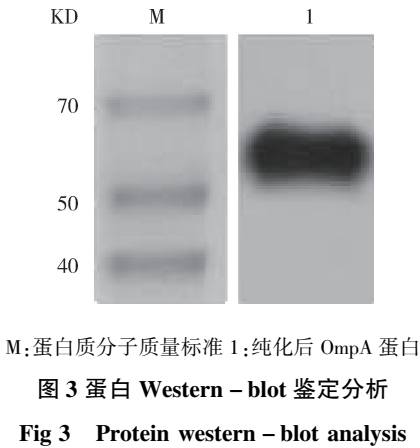
图 2 蛋白表达鉴定 SDS - PAGE 分析

Fig 2 Protein expression identification

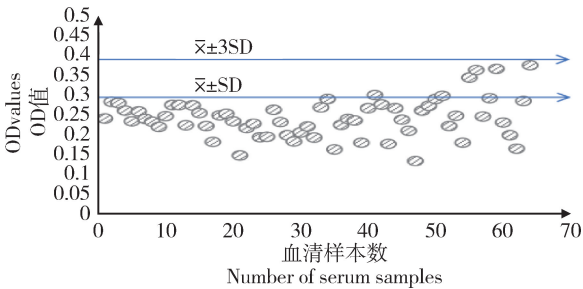
SDS - PAGE analysis

2.3 OmpA 蛋白的 Western - blot 鉴定 用鸭疫里默氏杆菌抗体阳性血清鉴定纯化的 OmpA 蛋白。Western - blotting 结果显示,在 57 KD 处有一条清晰带(图 3),表明重组 OmpA 单边具有良好的反应原性。

2.4 OmpA - ELISA 检测条件的优化结果 经多次方阵检测结果显示,OmpA 蛋白以 2.243 mg/mL 的浓度进行包被,血清以 11:100 稀释,抗原包被条件为 4 ℃ 过夜、封闭条件为 37 ℃ 120 min、血清反应时间为 37 ℃ 60 min、酶标抗体工作浓度为 1:1000、酶标抗体反应时间为 37 ℃ 60 min、显色时间为 15 min。



2.5 OmpA - ELISA 阴阳性临界值确定 根据本试验建立的 OmpA - ELISA 方法对 64 份 OmpA 阴性血清进行测定,计算检测结果显示,阴性血清的平均值($\bar{X}$)约为 0.242,标准差(SD)约为 0.049, OD_{450} 值最小值为 0.147,最大值为 0.374,根据临界值计算公式 $\bar{X} \pm 3SD \approx 0.389$ (图 4)。当待测样品 OD_{450} 值 ≥ 0.389 ,判定为 RA 抗体水平为阳性;待测样品 OD_{450} 值 < 0.389 ,判定 RA 抗体水平为阴性。



2.6 特异性试验 利用建立的 OmpA - ELISA 方法对本实验室保存的多杀性巴氏杆菌、沙门氏菌、葡萄球菌和大肠杆菌阳性血清进行检测,并设立 RA 阴阳性血清对照,结果显示,除 RA 阳性血清有较好反应外,对其他血清均无明显反应,说明该 ELISA 方法对 RA 特异性较好。

2.7 重复性试验 选择同批次包被 ELISA 板,进行批内重复试验和批间重复试验,结果显示,批内变异系数 2.77% ~ 8.00%,批间变异系数为

1.10% ~ 7.80%, 变异系数均小于 10%, 证明该 ELISA 方法可重复。

表 1 特异性试验		
Tab 1 Specific tests		
血清	OD ₄₅₀ 值	判定结果
多杀性巴氏杆菌阳性血清	0.237	阴
沙门氏菌阳性血清	0.119	阴
鸭坦布苏病毒阳性血清	0.171	阴
大肠杆菌阳性血清	0.225	阴
鸭疫里默氏杆菌阳性血清	1.021	阳
鸭疫里默氏杆菌阴性血清	0.132	阴

表 2 重复性试验						
Tab 2 Repeatability test						
样品	批内重复			批间重复		
	标准差	平均值	变异系数	标准差	平均值	变异系数
1	0.0675	1.0264	6.58%	0.0648	1.010	6.42%
2	0.0815	1.0183	8.00%	0.0796	1.0208	7.80%
3	0.0682	1.0780	6.33%	0.0731	1.0579	6.91%
4	0.0382	1.0324	3.70%	0.0498	1.0407	4.79%
5	0.0294	1.0632	2.77%	0.0189	1.0446	1.10%
6	0.0556	1.1008	5.05%	0.0310	0.9742	3.19%

2.8 敏感性试验 运用建立的 OmpA - ELISA 方法将 RA 阳性血清稀释 7 个梯度后, 结果显示当阳性血清稀释比例为 1:1600 时, OD₄₅₀ 值仍大于 0.389(图 5), 仍可判断为阳性, 表明该方法敏感性较高。

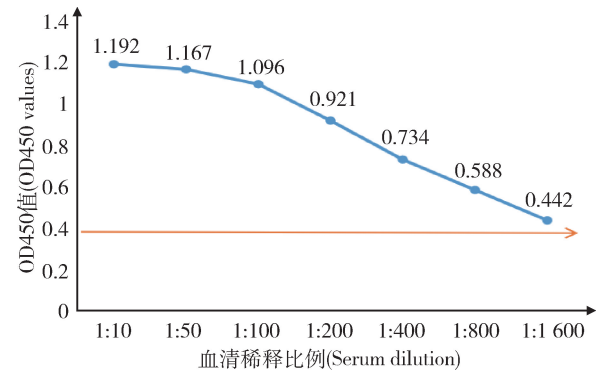


图 5 敏感性试验

Fig 5 Sensitivity test

2.9 临床样品的检测 利用试验建立的 OmpA -

ELISA 方法对贵州省 120 份鸭、76 份鹅血清样本进行检测, 结果显示, 120 份鸭血清样本中 57 份血清样本为阳性, 63 份血清样本为阴性, 阳性率为 47.5%。76 份鹅血清样本中 17 份血清样本为阳性, 59 份血清样本为阴性, 阳性率为 22.4%。

2.10 OmpA 间接 ELISA 检测方法的初步应用 应用本试验建立的 OmpA - ELISA 方法检测经灭活疫苗免疫后雏鸭 RA 抗体及免疫产蛋鸭后鸭蛋中卵黄抗体规律变化水平。如图 6、图 7 所示。

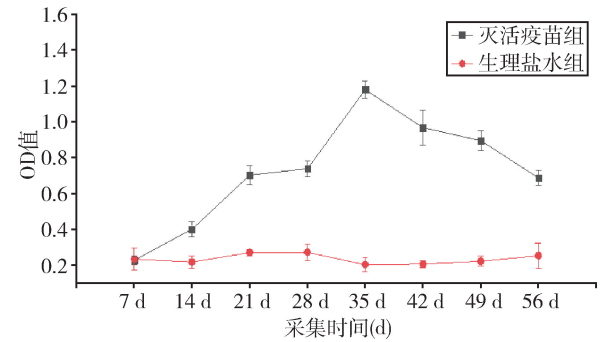


图 6 雏鸭血清中 RA 特异性抗体检测

Fig 6 Detection of RA specific antibody in serum of ducklings

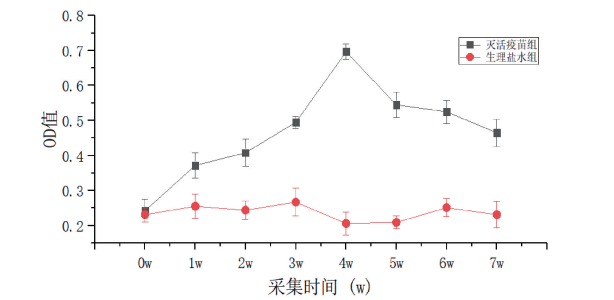


图 7 鸭蛋卵黄中 RA 特异性抗体检测

Fig 7 RA specific antibody detection in yolk of duck eggs

3 讨论与结论

RA 病是目前危害水禽养殖产业最主要的细菌源传染病之一, RA 传播性和致病性强, 患病鸭感染后死亡率高、生长缓慢且治疗难度增大, 对水禽养殖产业打击巨大^[9]。使用抗生素是治疗该病的主要措施, 而滥用抗生素致使 RA 易产生多重耐药, 甚至造成药物残留, 严重危害环境和人类健康^[10]。

出于对耐药性和食品安全性等问题的考虑,采用疫苗免疫预防该病仍是当前最为安全、有效的途径^[11]。因此,在临床上检测鸭群中 RA 抗体是有必要的,通过抗体检测可以判断鸭场中 RA 抗体水平,从而制定有效的防控措施。间接 ELISA 方法是检测 RA 抗体的重要手段,但由于目前商品化的试剂盒多以裂解菌体或脂多糖作为抗原,而血清中存在较多针对血清型相关的特异性抗体,血清型针对性较强,使检测结果易出现假阴性或假阳性^[12]。实验室前期使用江苏某公司鸭疫里氏杆菌(RA Ab)ELISA 试剂盒检测灭活疫苗免疫鸭血清抗体,检测结果均为阴性。因此,建立一种临床检测不同血清型 RA 抗体的间接 ELISA 方法非常有必要。

外膜蛋白 A(OmpA)是细菌外膜蛋白的主要组成成分,在维持细菌结构的完整性、参与黏附侵袭宿主和逃逸宿主防御机制中发挥重要作用^[13]。近年来研究表明 OmpA 是 RA 各血清型共有的外膜蛋白,并且具有很高的保守性与很强的抗原性^[14]。余波^[15]等基于鸭疫里氏杆菌 OmpA 基因构建的真核表达质粒 pVAX₁-OmpA,通过免疫雏鸭后表明该质粒能够诱导鸭机体产生 RA 特异性抗体,并且具有较强的免疫保护效果。Yang 等^[16]将鸭 IgY Fc 基因与 RA 的 OmpA 基因融合真核表达,并转化毕赤酵母重组表达,免疫雏鸭后能够显著提高血清抗体滴度,具有良好的免疫效力、保护性及安全性。因此本研究构建了 pET32a-OmpA 的原核表达质粒,成功表达了 OmpA 重组蛋白,并以该蛋白为抗原初步建立 ELISA 方法,通过特异性、敏感性、重复性试验表明本研究建立的间接 ELISA 方法特异性强,敏感性高,重复性好。应用本方法检测 2020 年 9 月到 2021 年 9 月贵州省 120 份鸭血清样本 5 中 7 份血清样本为阳性,阳性率为 47.5%。76 份鹅血清样本中 17 份血清样本为阳性,阳性率为 22.4%。应用该方法检测灭活疫苗免疫后的鸭血清和卵黄抗体,结果符合灭活疫苗消长规律。

现今各养殖场面对 RA 的感染,均出现在对抗生素耐药的情况,感染后很难治疗^[17],因此预防和早期检测对于 RA 的广泛爆发具有重要作用,试验

研究表明,OmpA 蛋白间接 ELISA 检测 RA 抗体效果明显,对无抗养殖技术的推广普及提供了有力支持。

参考文献:

- [1] 陈国权,吴征卓,姚碧琼,等. 两株鸭疫里氏杆菌的分离鉴定及生物学特性分析[J]. 中国预防兽医学报,2020,42(12): 1226-1232.
Chen G Q, Wu Z Z, Yao B Q, et al. Isolation, identification and biological characteristics analysis of two strains of *riemeria anatipestille*[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2020,42(12):1226-1232.
- [2] 谢郁超. 中药复方制剂对鸭传染性浆膜炎的防治试验[D]. 华南农业大学,2017.
Xie Y C. Experimental study on prevention and treatment of infectious serositis of duck by Chinese herbal compound preparation [D]. South China Agricultural University,2017.
- [3] Shousha A, Awad A, Younis G. Molecular Characterization, Virulence and Antimicrobial Susceptibility Testing of *Riemerella anatipestifer* Isolated from Ducklings. *Biocontrol Sci.* 2021; 26(3):181-186. Brogden K A, Rhoades K R, Rimler R B. Serologic types and physiologic characteristics of 46 avian *Pasteurella anatipestifer* cultures [J]. *Avian Diseases*, 1982, 26(4): 891-896.
- [4] Tao Z, Zhu C, Xu W, Shi Z, Zhang S, Song W, Liu H, Li H. *Riemerella anatipestifer* infection affects intestinal barrier structure and immune reactions in the duck caecum. *Avian Pathol.* 2020 Dec;49(6):572-580.
- [5] 李婷,徐景峨,杨莉,等. 鸭坦布苏病毒病、鸭圆环病毒病与鸭疫里氏杆菌混合感染的诊断[J]. 贵州农业科学,2020, v. 48;No. 360(08):77-81+173.
Li T, Xu J E, Yang L, et al. Diagnosis of duck tembusu virus disease, duck circovirus disease and *riemeria anatipestille* mixed infection [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2020, V. 48; No. 360(08):77-81+173.
- [6] Confer A W, Ayalew S. The OmpA family of proteins: Roles in bacterial pathogenesis and immunity[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 163(3-4): 207-222.
- [7] Liu Y, Wei Q, Bao G, Ji Q. Analysis of outer membrane proteins of *Riemerella antipestifer*[J]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.* 2008 Apr;24(4):586-91.
- [8] 杭天宇,赵洪哲,宋前进,等. 布鲁菌 BAB 基因的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医,2020,47

- (11):3641–3650.
- Hang T Y, Zhao H Z, Song Q J, et al. Prokaryotic expression of BAB gene in Brucella and establishment of indirect ELISA method [J]. Chinese Animal Husbandry and Veterinarian, 2020, 47 (11):3641–3650.
- [9] 蒋 姝,王白雪,王康锐,等. Progress of Detection Method for *Riemerella anatipestifer* (RA) [J]. 农业科学, 2020, 10(12): Jiang S, Wang B X, Wang K R, et al. Progress of Detection Method for *Riemerella anatipestifer* (RA) [J]. Hans Journal of Agricultural Sciences, 2020, 10(12):
- [10] 董洪燕,张 燕,王彦红,等. 江苏地区 10 株鹅源鸭疫里默氏杆菌的耐药性以及致病性特征分析[J/OL]. 微生物学通报; 1–13[2021–12–23].
- Dong H Y, Zhang Y, Wang Y H, et al. Antimicrobial resistance and pathogenicity analysis of 10 strains of *Riemerella anatipestifer* from goose in Jiangsu Province [J]. Microbiology Bulletin : 1–13[2021–12–23].
- [11] Han W, Chen Z, Niu P, Ren X, Ding C, & Yu S. (2020). Development of a colloidal gold immunochromatographic strip for rapid detection of *Riemerella anatipestifer* in ducks. Poultry science, 99(10), 4741–4749.
- [12] 孙 奕,郭东春,刘家森,等. 1 型鸭疫里氏杆菌 OmpA 蛋白间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(08): 635–639.
- Sun Y, Guo D C, Liu J S, et al. Development of an indirect ELISA method for the OmpA protein of *Riepestilence anatipestifer* type 1 [J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2011, 33(08): 635–639.
- [13] Moxon E R, Kroll J S. The role of bacterial polysaccharide capsules as virulence factors [J]. Current Topics in Microbiology and Immunology, 1990, 150: 65–85.
- [14] Yu G J, Wang X L, Dou Y F, Wang S H, Tian M X, Qi J J, Li T, Ding C, Wu Y T, Yu S Q. *Riemerella anatipestifer* M949_1360 gene functions on the lipopolysaccharide biosynthesis and bacterial virulence [J]. PLoS ONE, 2016, 11(8): e0160708.
- [15] 余 波,李 婷,徐景峨,等. 鸭疫里氏杆菌 OmpA 基因真核表达载体构建及免疫效果初步评价[J]. 畜牧与兽医, 2021, 53(03): 84–88.
- Yu B, Li T, Xu J E, et al. Construction of eukaryotic expression vector and preliminary evaluation of immune efficacy of *Riesseria anatipestis* OmpA gene [J]. Animal Science and Veterinary Medicine, 201, 53(03): 84–88.
- [16] Shifa Yang, Wenwen Dong, Guiming Li, Zengcheng Zhao, Minxun Song, Zhongli Huang, Jian Fu, Fengjuan Jia, Shuqian Lin. A recombinant vaccine of *Riemerella anatipestifer* OmpA fused with duck IgY Fc and *Schisandra chinensis* polysaccharide adjuvant enhance protective immune response[J]. Microbial Pathogenesis, 2019, 136:
- [17] 朱元军,王小莺,杨德鸿,等. 我国南方部分地区鸭疫里氏杆菌的分离鉴定及耐药情况调查[J]. 畜牧与兽医, 2019, 51(12): 106–111.
- Zhu Y J, WANG X Y, Yang D H, et al. Isolation, identification and drug resistance of *Riesella anatipestifer* in southern China [J]. Animal Science and Veterinary Medicine, 2019, 51(12): 106–111.

(编辑:陈 希)