



## 鸭疫里默氏杆菌毒力及耐药机制研究进展

刘马峰<sup>1,2,3</sup>, 田琇<sup>1,2,3</sup>, 程安春<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>四川农业大学动物医学院, 禽病防治中心, 四川 成都 611130

<sup>2</sup>四川农业大学动物医学院, 预防兽医研究所, 四川 成都 611130

<sup>3</sup>动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川 成都 611130

**摘要:** 鸭疫里默氏杆菌(*Riemerella anatipestifer*, RA)是引起鸭浆膜炎的一种革兰氏阴性病原菌, 属黄杆菌科。该菌自发现以来, 在我国各养鸭地区时有暴发和流行, 具有多种血清型及对多种抗生素耐药的特点, 给我国养鸭业的健康发展造成严重威胁。近年来, 随着分子生物学及相关技术的发展, 越来越多的科研工作人员对鸭疫里默氏杆菌的毒力、耐药及耐药机制等方面进行了研究并取得了一定的进展。本文将针对以上研究结果进行总结和评述, 以期为进一步深入研究该菌及有效防控该菌引起的疾病带来启示与借鉴。

**关键词:** 鸭疫里默氏杆菌, 毒力基因, 铁利用, 耐药机制

鸭疫里默氏杆菌是一种革兰氏阴性杆状菌, 属于拟杆菌门, 黄杆菌科, 里氏菌属<sup>[1]</sup>。自 1982 年郭玉璞首次从北京雏鸭分离出该菌以来<sup>[2]</sup>, 由该菌引起的疾病在全国范围内时有发生和流行。目前已报道的鸭疫里默氏杆菌血清型超过 21 种, 且各个血清型之间无明显的交叉保护作用<sup>[3-4]</sup>。目前, 用于防治鸭疫里默氏杆菌感染的主要手段为疫苗免疫和药物治疗。由于鸭疫里默氏杆菌血清型众多且同一养鸭场可能存在不同血清型的流行, 所以欲通过疫苗实现有效预防面临一些实际困难。另一方面, 鸭疫里默氏杆菌对多种抗生素敏感,

生产实践中应用抗生素药物防治该病, 致使鸭疫里默氏杆菌的耐药情况愈发严重, 对环境造成严重污染及对人类健康造成威胁。

### 1 鸭疫里默氏杆菌病在我国流行现状

鸭疫里默氏杆菌病是由鸭疫里默氏杆菌引起的一种接触性传染病, 是造成雏鸭死亡的原因之一。该病主要侵害 2–7 周龄的雏鸭, 其中 2–3 周龄的雏鸭最易感<sup>[5]</sup>, 且有向大龄化发展的趋势。鸭

基金项目: 国家自然科学基金(31572521)

\*通信作者。Tel: +86-835-2885774; E-mail: chenganchun@vip.163.com

收稿日期: 2018-08-09; 修回日期: 2018-11-14; 网络出版日期: 2018-11-29

疫里默氏杆菌病于 1932 年在美国纽约长岛的北京鸭中发现<sup>[6]</sup>, 在我国于 1982 年首次报道<sup>[2]</sup>。近年来, 在我国的北京<sup>[7]</sup>、四川<sup>[8]</sup>、山东<sup>[9]</sup>、河北<sup>[9]</sup>、江苏<sup>[10]</sup>、安徽<sup>[11]</sup>、广东<sup>[12-13]</sup>等几乎所有的养鸭地区均有报道。目前在我国鉴定的血清型主要有 1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、13、14、15、17、22、23、24、25 型等 10 多种血清型<sup>[7-8]</sup>。由此可见, 鸭疫里默氏杆菌病的防控形势依然严峻且难以根除。

## 2 鸭疫里默氏杆菌毒力相关基因的鉴定

### 2.1 铁离子利用相关基因参与毒力

对于包括细菌在内的几乎所有的生命体而言, 铁离子是必需的营养元素。研究表明, 铁离子参与了电子传递、抗氧化反应以及核酸的合成等多种生命活动<sup>[14]</sup>。在高等动物体内, 游离的铁离子浓度非常低且不能够满足细菌的生长需求。一部分三价铁离子被结合在乳铁蛋白、转铁蛋白等宿主铁蛋白上<sup>[15]</sup>。大多数的铁离子(90%以上)主要以血红素的形式存在于血红素结合蛋白(Hemoprotein)中, 如血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素等<sup>[16]</sup>。因此, 细菌进化出了多种铁离子转运系统。

亚铁离子被认为是细菌利用铁的首选形式, 可溶性的亚铁离子通过外膜直接进入胞周质, 在 Feo 转运系统的作用下将铁离子转运至胞质供细菌利用<sup>[17-18]</sup>。另外, 一些细菌可以合成和分泌对铁离子具有高亲和力的铁载体(Siderophores), 它能够螯合三价铁离子形成铁载体-Fe<sup>3+</sup>复合物, 这些铁载体-Fe<sup>3+</sup>复合物被特定外膜受体识别并在 TonB 复合物提供能量的帮助下转运进入细胞中

供自身使用<sup>[19]</sup>。铁载体能螯合宿主体内铁结合蛋白中的铁离子, 包括转铁蛋白和乳铁蛋白等<sup>[20-21]</sup>。目前发现的革兰氏阴性菌血红素转运系统主要包括直接的血红素转运系统和血红素载体(Hemophore)介导的间接血红素转运系统<sup>[22]</sup>。在直接的血红素转运系统中, 外膜受体可以直接从宿主摄取游离的血红素或血红素结合蛋白中的血红素。如小肠结肠耶尔森菌(*Yersinia enterocolitica*)的 hemR-hemSTUV 系统、鼠疫耶尔森菌(*Yersinia pestis*)的 hmuRSTUV 系统等<sup>[16]</sup>。而在血红素载体介导的血红素转运系统中, 则是由血红素载体从血红素结合蛋白中摄取血红素, 然后将其传递给相应的外膜血红素受体。血红素载体的这种作用方式不但增大了利用宿主血红素结合蛋白的范围, 而且提高了血红素的利用效率。目前已经鉴定的血红素载体主要有 3 种, 分别为 HasA 型、HxuA 型、HmuY 型<sup>[22]</sup>。

鸭疫里默氏杆菌基因组序列分析表明, 该菌编码 3 个 TonB 依赖性的铁载体受体、1 个铁载体相互作用蛋白、2 个 TonB 依赖性的血红素受体蛋白、1 个 FeoAB 系统、2 套 TonB-ExbB-ExbD 复合物及 1 个单独存在的 TonB 家族蛋白<sup>[23]</sup>。Liao 等(2015)对鸭疫里默氏杆菌的 3 个 TonB 蛋白进行了鉴定, 结果表明 TonB1 和 TonB2 均参与了鸭疫里默氏杆菌三价铁离子和血红素的转运且与 TonB1 相比, TonB2 更为重要<sup>[24]</sup>。随后, Liao 等(2016)鉴定了鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株中 45、37、33、23、20、13 kDa 胞浆血红素结合蛋白以及 90、70、60、50、15 kDa 的外膜血红素结合蛋白, 说明鸭疫里默氏杆菌确实存在血红素转运系统<sup>[25]</sup>。Liu 等(2016)通过干扰和过表达的方法对 TonB3 (TbfA)进行了功能鉴定, 结果表明 TonB3 并没有参与鸭疫

里默氏杆菌血红素的转运<sup>[26]</sup>。为进一步发现更多的参与铁离子利用的基因, Liu 等(2017)比较了鸭疫里默氏杆菌在铁离子丰富和铁离子限制性培养基中的转录组<sup>[27]</sup>。在铁离子限制性培养基中, 80 个基因上调, 383 个基因下调, 这些基因的发现为进一步鉴定鸭疫里默氏杆菌铁离子利用机制奠定了良好的基础<sup>[27]</sup>。

**2.1.1 TonB:** Miao 等(2015)构建了鸭疫里默氏杆菌 CH3 株 *tonB* 基因缺失株。与野生株相比, *tonB1* 和 *tonB2* 缺失株对 Vero 细胞的粘附能力均明显降低<sup>[28]</sup>。动物试验表明, 野生株对 10 日龄雏鸭的半数致死量(LD<sub>50</sub>)为  $2.29 \times 10^7$ , 而 *tonB1* 缺失株的 LD<sub>50</sub> 为  $5.13 \times 10^9$ , *tonB2* 缺失株的 LD<sub>50</sub> 为  $2.00 \times 10^9$ 。相应的, 与野生株相比, *tonB1* 和 *tonB2* 缺失株在雏鸭组织定殖的能力均明显降低<sup>[28]</sup>。由此说明, 鸭疫里默氏杆菌 TonB 参与了毒力。

**2.1.2 TonB 依赖性受体:** Lu 等(2013)对鸭疫里默氏杆菌 CH3 株的 TonB 依赖性受体编码基因 *tbR1* 进行了缺失<sup>[29]</sup>。与野生株相比, 缺失株生物被膜形成的能力降低, 同时对 Vero 细胞的粘附、入侵能力也降低。动物试验表明, 缺失株的 LD<sub>50</sub> 比野生株提高了 45 倍, 且在各个组织器官的定殖能力下降。由此证明 *tbR1* 基因参与了鸭疫里默氏杆菌的致病<sup>[29]</sup>。Wang 等(2017)对鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株的 TonB 依赖性受体编码基因 *B739\_1208* 进行了缺失<sup>[30]</sup>。与野生株相比, 缺失株利用铁离子的能力降低。动物试验表明, 缺失株的 LD<sub>50</sub> 明显高于野生株, 且在体内与野生株的竞争能力减弱<sup>[30]</sup>。Liu 等(2018)在鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株鉴定了另一个 TonB 依赖性的受体 *B739\_1343*<sup>[31]</sup>。与野生株相比, *B739\_1343* 缺失株利用铁离子的能力降低且毒力减弱。将 *B739\_1343* 缺失株作

为弱毒疫苗免疫动物发现可以有效阻止野生株的攻击<sup>[31]</sup>。

**2.1.3 铁摄取调节子(Ferric uptake regulator, Fur):** 铁离子是大多数细菌生存所必需的营养物质, 但是过多的铁离子通过芬顿反应产生的活性氧会对细菌造成损伤。在细菌体内, 铁离子的稳态受到严格的调控。铁摄取调节子是细菌铁离子代谢中最重要的调节子。当胞内游离铁浓度过高时, Fur 以二聚体的形式与铁摄取相关基因的启动子结合从而抑制其转录; 当胞内铁离子浓度过低时, Fur-Fe<sup>2+</sup>二聚体解离, 变为 Fur 单体, 从而解除对铁摄取相关基因的抑制作用<sup>[32]</sup>。Guo 等(2017)将鸭疫里默氏杆菌 YM 株中的 *fur* 基因进行了缺失。结果表明, 与野生株相比, *fur* 缺失株的毒力降低了 80 倍且在各组织器官的定殖能力降低<sup>[33]</sup>。

## 2.2 外膜蛋白 A (Outer membrane protein A, OmpA)

在大肠杆菌中, OmpA 是一种重要的多功能蛋白。OmpA 可以维持细胞的完整性<sup>[34]</sup>, 并在细菌接合转移<sup>[35]</sup>、细胞粘附入侵<sup>[36]</sup>中发挥重要的作用。OmpA 存在于目前已测序的所有鸭疫里默氏杆菌菌株中。Subramaniam 等(2000)将 OmpA 鉴定为鸭疫里默氏杆菌主要的免疫原性外膜蛋白<sup>[37]</sup>。Huang 等(2002)研究表明 OmpA 免疫可以产生针对鸭疫里默氏杆菌特异性的抗体, 但不能提供针对强毒攻击的保护作用<sup>[38]</sup>。Hu 等(2011)对鸭疫里默氏杆菌血清 2 型 Th4 的 *ompA* 基因进行缺失。与野生株相比, 缺失株生长状态和菌落形态并无明显改变。然而, *ompA* 基因缺失株的粘附和入侵 Vero 细胞的能力均显著下降, 且 LD<sub>50</sub> 增加 100 倍以上。证明 *ompA* 基因是鸭疫里默氏杆菌中的毒力因子之一, 并有可能是作为一种粘附素发挥作用<sup>[39]</sup>。

### 2.3 脂多糖合成相关基因

脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是革兰氏阴性菌外膜的主要组成成分,由核心多糖、O 抗原链和类脂 A 三部分构成。LPS 在革兰氏阴性菌的抗吞噬、耐药等方面起非常重要的作用<sup>[40]</sup>。

Wang 等(2014)研究表明鸭疫里默氏杆菌 Yb2 株 *AS87\_04050* 基因缺失后, LPS 形成受阻,同时对抗生素、消毒剂、鸭血清的抵抗能力降低。相反,与野生株相比, *AS87\_04050* 基因缺失株对 Vero 细胞的粘附和入侵能力增强。尽管如此,缺失株的毒力仍降低了  $10^5$  倍,由此说明, LPS 参与了鸭疫里默氏杆菌的致病<sup>[41]</sup>。相似的, Zou 等(2015)发现鸭疫里默氏杆菌 CH3 脂多糖合成相关基因 *M949\_1556* 缺失株对鸭血清的抵抗力降低,粘附入侵 Vero 细胞的能力增强,而毒力降低了 50 倍。将该缺失株制备为弱毒疫苗并免疫动物,结果发现对其他血清型鸭疫里默氏杆菌均具有有效保护作用<sup>[42]</sup>。Dou 等(2017)在鸭疫里默氏杆菌 CH3 脂多糖合成相关基因 *M949\_RS01915* 缺失株中得到了类似的结果<sup>[43]</sup>。

### 2.4 荚膜合成相关基因

细菌的荚膜主要在免疫逃避、免疫调节等方面起重要作用,被认为是宿主致病的重要毒力因子<sup>[44]</sup>。Yi 等(2017)构建了鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株荚膜合成基因 *wza* 的缺失株<sup>[45]</sup>。与野生株相比,基因缺失株不再生成荚膜且对外界环境胁迫如氧化应激、干燥的抵抗能力降低,对补体更加敏感<sup>[45]</sup>。通过动物试验表明,与野生株相比,缺失株毒力降低了 250 倍,说明鸭疫里默氏杆菌荚膜参与了致病<sup>[45]</sup>。

### 2.5 调控相关基因

*luxE* 基因编码脂酰蛋白合成酶,参与脂肪酸

代谢,在生物发光的脂肪酸还原系统中起重要作用<sup>[46]</sup>。Wang 等(2016)将鸭疫里默氏杆菌 Yb2 株 *luxE* 基因(*AS87\_03730*)缺失后发现,与野生株相比,其在 TSB 培养基的生长速度降低,入侵 Vero 细胞的能力降低,毒力降低 80 倍,证明其参与了鸭疫里默氏杆菌的致病<sup>[47]</sup>。转录组测序表明, Yb2Δ*AS87\_03730* 株 19 个基因上调,2 个基因下调。上调基因主要参与细胞膜的合成、氨基酸的转运与代谢等<sup>[47]</sup>。

## 3 鸭疫里默氏杆菌耐药机制

细菌的耐药性是指细菌对抗生素表现出的抵抗特性,有天然耐药性(或固有耐药性)和获得性耐药性之分。天然耐药性是指细菌对某种抗菌药物表现出的先天性不敏感,由细菌自身生物学特性(如结构、代谢机制)所决定。获得性耐药是指细菌对某些抗菌药物由本来的敏感状态自发转变为耐受状态的特性。

在已经感染了鸭疫里默氏杆菌的鸭群当中,药物治疗是最常见的治疗措施。但在临床实践和实验室研究中发现鸭疫里默氏杆菌对多种抗生素表现出耐药,并且其耐药谱呈愈发广泛的趋势。Zhong 等(2009)对中国 1998–2005 年分离的 224 株鸭疫里默氏杆菌进行了耐药性测定<sup>[48]</sup>。结果表明,50%的分离株对氨苄、头孢他啶、氨基糖苷、头孢唑林、青霉素和利福平等多种抗生素耐药,其中 4 株对 29 种抗生素均表现出耐受<sup>[48]</sup>。Gyuris 等(2017)对匈牙利 2000–2014 年分离的 185 株鸭疫里默氏杆菌分离株进行耐药性测定。结果表明,对氟苯尼考的敏感率为 97.9%;对氨苄西林的敏感率为 95.1%;对盘尼西林的敏感率为 93.0%;对甲氧苄啶的敏感率为 92.4%;对壮观霉素的敏感率为

86.5%；对氟甲喹、四环素、红霉素和链霉素的耐药率分别为 94.0%、91.4%、75.1%和 71.4%<sup>[49]</sup>。

虽然已经发现鸭疫里默氏杆菌对氯霉素、青霉素、卡那霉素、庆大霉素、林可霉素和氟苯尼考等抗生素耐受<sup>[48]</sup>，但是大部分鸭疫里默氏杆菌的耐药基因以及耐药机制仍然是未知的。Chen 等(2010)报道了编码了氯霉素乙酰转移酶的基因 *cat* 是鸭疫里默氏杆菌对于氯霉素具有抗性的原因之一<sup>[50]</sup>。Huang 等(2017)对中国 192 株分离株检测发现，有 69 株具有 *cat* 基因，其中在 CH-2 株具有 2 个拷贝且只有当 2 个拷贝均缺失时鸭疫里默氏杆菌 CH-2 株才能对氯霉素敏感<sup>[51]</sup>。Tsai 等(2012)在台湾地区 66 株鸭疫里默氏杆菌分离株当中对氟苯尼考耐药的 9 株分离株当中均检测出 *floR* 基因。并且通过进一步的研究结果表明 *floR* 基因是一个外排泵，对氯霉素以及氟苯尼考均有外排作用<sup>[52]</sup>。Luo 等(2015)对中国 206 株鸭疫里默氏杆菌鉴定发现有 64 株编码核糖体 RNA 甲基转移酶 *ermF* 基因，该基因的缺失会导致鸭疫里默氏杆菌对大环内酯类抗生素比如红霉素、阿奇霉素、泰乐菌素以及林可酰胺类抗生素变得敏感<sup>[53]</sup>。随后，Xing 等(2015)对中国 80 株鸭疫里默氏杆菌鉴定发现有 43 株对红霉素耐受。43 株红霉素耐药的菌株中有 30 株携带 *ermF* 或 *ermFU* 基因，MIC 值的范围为 32–2048 μg/mL。另外 13 株菌株携带有 *ereD* 基因，MIC 值的范围为 4–16 μg/mL。此外，序列分析显示 *ermF*、*ermFU* 和 *ereD* 基因均位于鸭疫里氏杆菌基因组的多抗性区域内<sup>[54]</sup>。Luo 等(2018)对鸭疫里默氏杆菌当中 *lnu(H)* 基因进行了研究，发现 Lnu(H) 蛋白是一种新型的林可酰胺核苷酸转移酶，可以通过核苷酸化使得林可霉素失活，从而使鸭疫里默氏杆菌对林可酰胺产生高水平的抗

性<sup>[55]</sup>。Sun 等(2012)测定了 2008–2010 年中国南方地区的 103 株鸭疫里默氏杆菌对 23 种抗生素的耐药性，发现 *gyrA* 基因与鸭疫里默氏杆菌对于喹诺酮的耐药有关<sup>[56]</sup>。

Zhang 等(2017)在鸭疫里默氏杆菌 CH-1 株鉴定了一个编码外排泵的基因 *B739\_0873*<sup>[57]</sup>。与野生株相比，*B739\_0873* 缺失株对氨基糖苷类药物和去污剂更为敏感。用低浓度的链霉素、卡那霉素或庆大霉素处理鸭疫里默氏杆菌 CH-1 发现，*B739\_0873* 的表达上调了 2–7 倍<sup>[57]</sup>。Li 等(2017)研究表明鸭疫里默氏杆菌 CH3 株 *M949\_0459* 基因缺失后对替加环素变得敏感，且用低浓度的替加环素处理鸭疫里默氏杆菌后 *M949\_0459* 的表达量上调<sup>[58]</sup>。随后，在大肠杆菌 BL21 株表达 *M949\_0459* 发现大肠杆菌对替加环素的耐药性增加，表明 *M949\_0459* 参与了鸭疫里默氏杆菌对替加环素的耐药<sup>[58]</sup>。Zhu 等(2018)对 2011–2017 年中国分离的 212 株鸭疫里默氏杆菌对四环素耐药情况进行了检测，结果表明 192 株(90.6%)对四环素耐药，在这些菌株中 170 株(80.2%)携带有 *tet(X)* 基因。其中一株携带有 *tet(M)*、*tet(O)* 和 *tet(X)* 这 3 个基因。将 *tet(A)*、*tet(B)*、*tet(M)*、*tet(O)*、*tet(O/W/32/O)*、*tet(Q)* 和 *tet(X)* 分别转入鸭疫里默氏杆菌四环素敏感菌株 ATCC11845 使该菌株对四环素变得耐药，说明这些基因参与了鸭疫里默氏杆菌对四环素的耐药<sup>[59]</sup>。

## 4 问题和展望

鸭疫里默氏杆菌自发现已有 100 余年，至今仍然严重威胁着养鸭业的健康发展。由于其血清型众多且不断变异，给有效防控该病带来诸多不便。目前对于鸭疫里默氏杆菌的致病机制、耐药

机制、遗传变异机制虽有研究但不够深入,且缺乏标准化的血清型分型方法。因此,在未来的研究中首先应建立统一的血清型分型的方法或其他分型方法,掌握其流行规律。其次,要进一步研究其致病机制,如毒力基因的鉴定、毒力因子的作用机制等;进一步研究鸭疫里默氏杆菌耐药的产生机制,是由基因突变造成的耐药还是从外界环境获取了耐药基因?进一步研究近期发现的鸭疫里默氏杆菌自然转化现象在耐药基因获取及血清型转换中的作用<sup>[60]</sup>;进一步研究鸭疫里默氏杆菌从宿主获取铁离子或血红素等营养物质的机制,如参与营养物质摄取基因的鉴定、血红素载体从血红素结合蛋白摄取血红素的作用机制及调控机制等。通过上述的研究进一步指导鸭疫里默氏杆菌的有效防控。

## 参 考 文 献

- [1] Segers P, Mannheim W, Vancanneyt M, de Brandt K, Hinz KH, Kersters K, Vandamme P. *Riemerella anatipestifer* gen. nov., comb. nov., the causative agent of septicemia anserum exsudativa, and its phylogenetic affiliation within the *Flavobacterium-Cytophaga* rRNA homology group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1993, 43(4): 768–776.
- [2] Guo YP, Chen DW, Fan GX, Liu RP. Studies on infections serositis in white Beijing ducklings. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 1982, 13(2): 35–41. (in Chinese)  
郭玉璞, 陈德威, 范国雄, 刘瑞萍. 北京鸭小鸭传染性浆膜炎的调查. *畜牧兽医学报*, 1982, 13(2): 35–41.
- [3] Pathanasophon P, Sawada T, Tanticharoenyos T. New serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. *Avian Pathology*, 1995, 24(1): 195–199.
- [4] Pathanasophon P, Phuektes P, Tanticharoenyos T, Narongsak W, Sawada T. A potential new serotype of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in Thailand. *Avian Pathology*, 2002, 31(3): 267–270.
- [5] Guo YP, Zhang DB. Disease of *Riemerella anatipestifer*. *Poultry Husbandry and Disease Control*, 1999, (10): 6–7. (in Chinese)  
郭玉璞, 张大丙. 鸭疫里默氏杆菌病. *养禽与禽病防治*, 1999, (10): 6–7.
- [6] Hendrickson JM, Hilbert KF. A new and serious septicaemic disease of young ducks with a description of the causative organism, *Pfeiferella anatipestifer*. *N.S. Cornell Veterinary*, 1933, 22: 239–252.
- [7] Zhang DB, Guo YP. Distribution of *Riemerella anatipestifer* and its serotype in Beijing area. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 1998, 24(4): 15–17. (in Chinese)  
张大丙, 郭玉璞. 北京地区鸭疫里默氏杆菌及其血清型的分布. *中国兽医杂志*, 1998, 24(4): 15–17.
- [8] Cheng AC, Wang MS, Chen XY, Zhu DK, Huang C, Liu F, Zhou Y, Guo YF, Liu ZY, Fang PF. Epidemiology and new serotypes of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks in China and studies on their pathogenic characteristics. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2003, 23(4): 320–323. (in Chinese)  
程安春, 汪铭书, 陈孝跃, 朱德康, 黄城, 刘菲, 周毅, 郭宇飞, 刘兆宇, 方鹏飞. 我国鸭疫里默氏杆菌血清型调查及新血清型的发现和病原特性. *中国兽医学报*, 2003, 23(4): 320–323.
- [9] Yuan XY, Wang YL, Wang XL, Qi LH, Shao GB, Shao GP, Yang JX, Ai W, Wang YM. Epidemiological investigation on *Riemerella anatipestifer* in Shandong and Hebei province in 2015–2016. *China Poultry*, 2017, 39(4): 70–72. (in Chinese)  
袁小远, 王友令, 王晓丽, 亓丽红, 邵桂宾, 邵桂平, 杨金兴, 艾武, 王永明. 2015–2016年山东、河北地区鸭疫里默氏杆菌流行病学调查. *中国家禽*, 2017, 39(4): 70–72.
- [10] Yun SL, Yang Y, Wang XB, Lu YW, Gao S, Wu YT, Gao YM, Peng DX, Liu XF. Isolation and identification of serotype 11 *Riemerella anatipestifer*. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2009, 31(8): 605–609. (in Chinese)  
云水丽, 杨勇, 王小波, 卢焱炜, 高崧, 吴艳涛, 高以明, 彭大新, 刘秀梵. 11型鸭疫里默氏杆菌分离鉴定及致病性研究. *中国预防兽医学报*, 2009, 31(8): 605–609.
- [11] Jing YW, Chen FF, Zuo JK, Hu JG, Shi XC, Mi RS, Huang Y, Chen ZG, Han XG. Characterization of eight Anhui isolates of *Riemerella anatipestifer*. *Chinese Journal of Animal*

- Infectious Diseases*, 2018, 26(2): 34–39. (in Chinese)  
荆雅玮, 陈芳芳, 左佳坤, 胡剑刚, 石欣池, 米荣升, 黄燕, 陈兆国, 韩先干. 8 株鸭疫里默氏杆菌安徽分离株的生物学特性分析. *中国动物传染病学报*, 2018, 26(2): 34–39.
- [12] Ding X. Identification of serotype and virulence of *Riemerella anatipestifer* strains in some areas of Guangdong. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2013, 32(5): 15–18. (in Chinese)  
丁晓. 广东部分地区鸭疫里默氏杆菌分离株的血清型及致病性鉴定. *畜牧兽医杂志*, 2013, 32(5): 15–18.
- [13] Wei XL, Zhang XX, Jiang SJ, Sun YN, Liu ML, Yang LZ. Isolation identification and development of duplex PCR method for detection of *Riemerella anatipestifer* from Guangdong province. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2009, 29(6): 721–725. (in Chinese)  
魏秀丽, 张兴晓, 姜世金, 孙亚妮, 刘美丽, 杨灵芝. 广东地区鸭疫里默氏杆菌的分离鉴定及双重 PCR 检测方法的建立. *中国兽医学报*, 2009, 29(6): 721–725.
- [14] Wandersman C, Delepelaire P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology*, 2004, 58: 611–647.
- [15] Contreras H, Chim N, Credali A, Goulding CW. Heme uptake in bacterial pathogens. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 19: 34–41.
- [16] Tong Y, Guo ML. Bacterial heme-transport proteins and their heme-coordination modes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2009, 481(1): 1–15.
- [17] Feng Y, Liu MF, Cheng AC. Component and functional mechanism of the ferrous iron acquisition system in gram-negative bacteria - A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(7): 1061–1069. (in Chinese)  
冯言, 刘马峰, 程安春. 革兰氏阴性菌亚铁离子转运系统的组成及作用机制. *微生物学报*, 2016, 56(7): 1061–1069.
- [18] Sestok AE, Linkous RO, Smith AT. Toward a mechanistic understanding of Feo-mediated ferrous iron uptake. *Metallomics*, 2018, 10(7): 887–898.
- [19] Hardy CD, Butler A.  $\beta$ -Hydroxyaspartic acid in siderophores: biosynthesis and reactivity. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2018, 23(7): 957–967.
- [20] Schalk IJ, Guillon L. Fate of ferrisiderophores after import across bacterial outer membranes: different iron release strategies are observed in the cytoplasm or periplasm depending on the siderophore pathways. *Amino Acids*, 2013, 44(5): 1267–1277.
- [21] Zhang L, Liu MF, Cheng AC. Siderophore-antibiotic conjugates: the new antimicrobial agents. *Microbiology China*, 2016, 43(7): 1598–1604. (in Chinese)  
张利, 刘马峰, 程安春. 铁载体-抗生素耦合物: 一种新型的抗菌制剂. *微生物学通报*, 2016, 43(7): 1598–1604.
- [22] Li L, Liu MF, Cheng AC. Structural and functional reveal of the hemophore in Gram-negative bacteria. *Microbiology China*, 2015, 42(7): 1358–1365. (in Chinese)  
李岭, 刘马峰, 程安春. 革兰氏阴性菌血红素载体蛋白 Hemophore 的结构及作用机制. *微生物学通报*, 2015, 42(7): 1358–1365.
- [23] Wang XJ, Liu WB, Zhu DK, Yang LF, Liu MF, Yin SJ, Wang MS, Jia RY, Chen S, Sun KF, Cheng AC, Chen XY. Comparative genomics of *Riemerella anatipestifer* reveals genetic diversity. *BMC Genomics*, 2014, 15: 479.
- [24] Liao HB, Cheng XJ, Zhu DK, Wang MS, Jia RY, Chen S, Chen XY, Biville F, Liu MF, Cheng AC. TonB energy transduction systems of *Riemerella anatipestifer* are required for iron and heme utilization. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0127506.
- [25] Liao HB, Liu MF, Cheng XJ, Zhu DK, Wang MS, Jia RY, Chen S, Sun KF, Yang Q, Biville F, Cheng AC. The detection of heme-binding proteins in *Riemerella anatipestifer* CH-1. *Current Microbiology*, 2016, 72(2): 152–158.
- [26] Liu MF, Wang MY, Zhu DK, Wang MS, Jia RY, Chen S, Sun KF, Yang Q, Wu Y, Chen XY, Biville F, Cheng AC. Investigation of TbfA in *Riemerella anatipestifer* using plasmid-based methods for gene over-expression and knockdown. *Scientific Reports*, 2016, 6: 37159.
- [27] Liu MF, Huang M, Zhu DK, Wang MS, Jia RY, Chen S, Sun KF, Yang Q, Wu Y, Biville F, Cheng AC. Identifying the genes responsible for iron-limited condition in *Riemerella anatipestifer* CH-1 through RNA-seq-based analysis. *BioMed Research International*, 2017, 2017: 8682057.
- [28] Miao S, Xing LL, Qi JJ, Yu H, Jiang P, Sun BQ, Cui JS, Ou CC, Hu QH. Roles of the TonB1 and TonB2 proteins in

- haemin iron acquisition and virulence in *Riemerella anatipestifer*. *Microbiology*, 2015, 161(8): 1592–1599.
- [29] Lu FY, Miao S, Tu J, Ni XT, Xing LL, Yu H, Pan L, Hu QH. The role of TonB-dependent receptor TbdR1 in *Riemerella anatipestifer* in iron acquisition and virulence. *Veterinary Microbiology*, 2013, 167(3/4): 713–718.
- [30] Wang MY, Zhang PY, Zhu DK, Wang MS, Jia RY, Chen S, Sun KF, Yang Q, Wu Y, Chen XY, Biville F, Cheng AC, Liu MF. Identification of the ferric iron utilization gene *B739\_1208* and its role in the virulence of *R. anatipestifer* CH-1. *Veterinary Microbiology*, 2017, 201: 162–169.
- [31] Liu MF, Huang M, Shui Y, Biville F, Zhu DK, Wang MS, Jia RY, Chen S, Sun KF, Zhao XX, Yang Q, Wu Y, Chen XY, Cheng AC. Roles of *B739\_1343* in iron acquisition and pathogenesis in *Riemerella anatipestifer* CH-1 and evaluation of the RA-CH-1Δ*B739\_1343* mutant as an attenuated vaccine. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0197310.
- [32] Beauchene NA, Mettert EL, Moore LJ, Keleş S, Willey ER, Kiley PJ. O<sub>2</sub> availability impacts iron homeostasis in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(46): 12261–12266.
- [33] Guo YQ, Hu D, Guo J, Li XW, Guo JY, Wang XL, Xiao YC, Jin H, Liu M, Li ZL, Bi DR, Zhou ZT. The role of the regulator Fur in gene regulation and virulence of *Riemerella anatipestifer* assessed using an unmarked gene deletion system. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 382.
- [34] Sonntag I, Schwarz H, Hirota Y, Henning U. Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *Journal of Bacteriology*, 1978, 136(1): 280–285.
- [35] Schweizer M, Henning U. Action of a major outer cell envelope membrane protein in conjugation of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 1977, 129(3): 1651–1652.
- [36] Meier C, Oelschlaeger TA, Merkert H, Korhonen TK, Hacker J. Ability of *Escherichia coli* isolates that cause meningitis in newborns to invade epithelial and endothelial cells. *Infection and Immunity*, 1996, 64(7): 2391–2399.
- [37] Subramaniam S, Huang B, Loh H, Kwang J, Tan HM, Chua KL, Frey J. Characterization of a predominant immunogenic outer membrane protein of *Riemerella anatipestifer*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2000, 7(2): 168–174.
- [38] Huang B, Subramaniam S, Frey J, Loh H, Tan HM, Fernandez CJ, Kwang J, Chua KL. Vaccination of ducks with recombinant outer membrane protein (OmpA) and a 41 kDa partial protein (P45N') of *Riemerella anatipestifer*. *Veterinary Microbiology*, 2002, 84(3): 219–230.
- [39] Hu QH, Han XG, Zhou XJ, Ding C, Zhu YY, Yu SQ. OmpA is a virulence factor of *Riemerella anatipestifer*. *Veterinary Microbiology*, 2011, 150(3/4): 278–283.
- [40] Zhang G, Meredith TC, Kahne D. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 2013, 16(6): 779–785.
- [41] Wang XL, Ding C, Wang SH, Han XG, Hou WW, Yue JP, Zou JC, Yu SQ. The *AS87\_04050* gene is involved in bacterial lipopolysaccharide biosynthesis and pathogenicity of *Riemerella anatipestifer*. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109962.
- [42] Zou JC, Wang XL, Tian MX, Cao SL, Hou WW, Wang SH, Han XG, Ding C, Yu SQ. The *M949\_1556* gene plays a role on the bacterial antigenicity and pathogenicity of *Riemerella anatipestifer*. *Veterinary Microbiology*, 2015, 177(1/2): 193–200.
- [43] Dou YF, Wang XL, Yu GJ, Wang SH, Tian MX, Qi JJ, Li T, Ding C, Yu SQ. Disruption of the *M949\_RS01915* gene changed the bacterial lipopolysaccharide pattern, pathogenicity and gene expression of *Riemerella anatipestifer*. *Veterinary Research*, 2017, 48(1): 6.
- [44] Hu XM, Chen ZJ, Xiong K, Wang J, Rao XC, Cong YG. Vi capsular polysaccharide: synthesis, virulence, and application. *Critical Reviews in Microbiology*, 2017, 43(4): 440–452.
- [45] Yi HB, Yuan B, Liu JB, Zhu DK, Wu Y, Wang MS, Jia RY, Sun KF, Yang Q, Chen S, Liu MF, Chen XY, Cheng AC. Identification of a *wza*-like gene involved in capsule biosynthesis, pathogenicity and biofilm formation in *Riemerella anatipestifer*. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 107: 442–450.



- [46] Lin JW, Chao YF, Weng SF. Nucleotide sequence and functional analysis of the *luxE* gene encoding acyl-protein synthetase of the *lux* operon from *Photobacterium leiognathi*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996, 228(3): 764–773.
- [47] Wang XL, Yue JP, Ding C, Wang SH, Liu BB, Tian MX, Yu SQ. Deletion of *AS87\_03730* gene changed the bacterial virulence and gene expression of *Riemerella anatipestifer*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 22438.
- [48] Zhong CY, Cheng AC, Wang MS, Zhu DK, Luo QH, Zhong CD, Li L, Duan Z. Antibiotic susceptibility of *Riemerella anatipestifer* field isolates. *Avian Diseases*, 2009, 53(4): 601–607.
- [49] Gyuris É, Wehmann E, Czeibert K, Magyar T. Antimicrobial susceptibility of *Riemerella anatipestifer* strains isolated from geese and ducks in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 2017, 65(2): 153–165.
- [50] Chen YP, Tsao MY, Lee SH, Chou CH, Tsai HJ. Prevalence and molecular characterization of chloramphenicol resistance in *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks and geese in Taiwan. *Avian Pathology*, 2010, 39(5): 333–338.
- [51] Huang L, Yuan H, Liu MF, Zhao XX, Wang MS, Jia RY, Chen S, Sun KF, Yang Q, Wu Y, Chen XY, Cheng AC, Zhu DK. Type B chloramphenicol acetyltransferases are responsible for chloramphenicol resistance in *Riemerella anatipestifer*, China. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 297.
- [52] Chen YP, Lee SH, Chou CH, Tsai HJ. Detection of florfenicol resistance genes in *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks and geese. *Veterinary Microbiology*, 2012, 154(3/4): 325–331.
- [53] Luo HY, Liu MF, Wang LY, Zhou WS, Wang MS, Cheng AC, Jia RY, Chen S, Sun KF, Yang Q, Chen XY, Zhu DK. Identification of ribosomal RNA methyltransferase gene *ermF* in *Riemerella anatipestifer*. *Avian Pathology*, 2015, 44(3): 162–168.
- [54] Xing LL, Yu H, Qi JJ, Jiang P, Sun BQ, Cui JS, Ou CC, Chang WS, Hu QH. *ermF* and *ereD* are responsible for erythromycin resistance in *Riemerella anatipestifer*. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0131078.
- [55] Luo HY, Liu MF, Wang MS, Zhao XX, Jia RY, Chen S, Sun KF, Yang Q, Wu Y, Chen XY, Biville F, Zou YF, Jing B, Cheng AC, Zhu DK. A novel resistance gene, *lnu(H)*, conferring resistance to lincosamides in *Riemerella anatipestifer* CH-2. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2018, 51(1): 136–139.
- [56] Sun N, Liu JH, Yang F, Lin DC, Li GH, Chen ZL, Zeng ZL. Molecular characterization of the antimicrobial resistance of *Riemerella anatipestifer* isolated from ducks. *Veterinary Microbiology*, 2012, 158(3/4): 376–383.
- [57] Zhang X, Wang MS, Liu MF, Zhu DK, Biville F, Jia RY, Chen S, Sun KF, Yang Q, Wu Y, Zhao XX, Chen XY, Cheng AC. Contribution of *RaeB*, a putative RND-type transporter to aminoglycoside and detergent resistance in *Riemerella anatipestifer*. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2435.
- [58] Li T, Shan M, He J, Wang XL, Wang SH, Tian MX, Qi JJ, Luo TR, Shi YH, Ding C, Yu SQ. *Riemerella anatipestifer* *M949\_0459* gene is responsible for the bacterial resistance to tigecycline. *Oncotarget*, 2017, 8(57): 96615–96626.
- [59] Zhu DK, Luo HY, Liu MF, Zhao XX, Jia RY, Chen S, Sun KF, Yang Q, Wu Y, Chen XY, Cheng AC, Wang MS. Various profiles of *tet* genes addition to *tet(X)* in *Riemerella anatipestifer* isolates from ducks in China. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 585.
- [60] Liu MF, Zhang L, Huang L, Biville F, Zhu DK, Wang MS, Jia RY, Chen S, Sun KF, Yang Q, Wu Y, Chen XY, Cheng AC. Use of natural transformation to establish an easy knockout method in *Riemerella anatipestifer*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(9): e00127–17.

## Research advances in the virulence and antibiotics resistance mechanism of *Riemerella anatipestifer*

Mafeng Liu<sup>1,2,3</sup>, Xiu Tian<sup>1,2,3</sup>, Anchun Cheng<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Avian Disease Research Center, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan Province, China

<sup>2</sup> Institute of Preventive Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, Sichuan Province, China

<sup>3</sup> Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Chengdu 611130, Sichuan Province, China

**Abstract:** *Riemerella anatipestifer* is a Gram-negative bacterium causing serositis in ducks and belongs to Flavobacteriaceae. Since its discovery, its outbreak and epidemic happen from time to time in various duck industries of China. Furthermore, it has a variety of serotypes and resistance to multiple antibiotics, leading to a serious threat to the duck industries. In recent years, with the help of molecular biology and related new technologies, more and more researchers have studied the virulence, antibiotics resistance and antibiotics resistance mechanism. Our review summarizes the above research progress, provide enlightenment and reference for further understanding this bacterium to prevent this disease.

**Keywords:** *Riemerella anatipestifer*, virulence genes, use of iron, resistance mechanism

(本文责编: 李磊)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31572521)

\*Corresponding author. Tel: +86-835-2885774; E-mail: chenganchun@vip.163.com

Received: 9 August 2018; Revised: 14 November 2018; Published online: 29 November 2018