陶志云,徐文娟,施祖灏,等. 感染鸭疫里默氏菌对鸭小肠黏膜形态结构的影响[J]. 江苏农业科学,2022,50(8):166 - 168,175.
doi:10.15889/j.issn.1002 - 1302.2022.08.030

感染鸭疫里默氏菌对鸭小肠黏膜形态结构的影响

陶志云[1], 徐文娟[1], 施祖灏[2], 朱春红[1], 宋卫涛[1], 刘宏祥[1], 章双杰[1], 李慧芳[1]
(1. 江苏省家禽科学研究所,江苏扬州 225125; 2. 谱尼测试集团江苏有限公司,江苏苏州 215000)

摘要:为了解感染鸭疫里默氏菌后鸭肠道形态结构的变化,采用石蜡切片、HE 染色方法测定鸭感染鸭疫里默氏菌 1、2、3、5、9、14 d 十二指肠、空肠和回肠 3 个小肠段肠黏膜厚度、肠绒毛高度和隐窝深度,并计算绒毛高度和隐窝深度比值。结果表明,与对照组相比,在感染鸭疫里默氏菌 1 ~ 9 d 后,鸭的十二指肠、空肠和回肠肠黏膜厚度和肠绒毛高度变化一致,均表现为明显下降;隐窝深度在 3 个小肠段的变化不同;肠绒毛高度/隐窝深度的值在感染鸭疫里默氏菌的 3 个小肠段中总体均呈下降趋势。说明感染鸭疫里默氏菌显著影响了鸭小肠形态结构,该研究为鸭疫里默氏菌的致病机制研究奠定了基础。

关键词:鸭;鸭疫里默氏菌;肠道;形态结构;黏膜厚度;绒毛高度;隐窝深度
中图分类号:S858.32 **文献标志码:** A **文章编号:**1002 - 1302(2022)08 - 0166 - 04

规模化养殖过程中,病原菌的入侵和感染是影响生产的重要因素[1-2]。鸭疫里默氏杆菌病是由鸭疫里默氏杆菌(riemerella anatipestifer)感染引起的一种急性败血性传染病[3],主要危害 2 ~ 7 周龄雏鸭,发病率高达 90% 以上,死亡率高达 75% 以上,给养鸭业造成了巨大的经济损失,是严重危害养鸭生产的主要疾病[4-5]。

小肠是机体最为重要的消化器官,肠道黏膜屏障是机体抵抗肠道病原菌和外界病原感染的第 1 道防线,在维持肠道功能正常发挥和机体内环境稳定中具有重要作用[6-7]。而肠道形态结构的完整性是构成肠道机械屏障的基础[8-9],对鸭疫里默氏菌感染后小肠形态结构完整性的评价有助于了解鸭疫里默氏菌病的致病特征,因此,本研究以鸭肠道为研究对象,观察鸭疫里默氏菌感染不同时间小肠形态结构的变化,以探讨鸭疫里默氏菌对肠道的致病性及鸭肠道结构在抗鸭疫里默氏菌感染过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株培养 试验所用鸭疫里默氏菌菌株为 ATCC11845 标准菌株,购自北京北纳创联生物技术研究院。按 1 ∶ 100 的比例将鸭疫里默氏菌标准菌株加入到添加有 5% 血清的 TSB(胰蛋白胨大豆肉汤)培养液中,37 ℃摇床中过夜培养。1 000 r/min 离心 10 min,去上清,采用生理盐水将沉淀稀释为 10^9 CFU/mL。

1.1.2 试验鸭 试验鸭来源于江苏高邮鸭集团,为健康高邮雏鸭,相同饲养条件下饲养至 30 日龄时进行分组。

1.1.3 人工感染试验及样品采集 人工感染试验于 2019 年 9 月在试验动物房进行,采用 10^9 CFU/mL 鸭疫里默氏菌人工感染健康 30 日龄育成期高邮鸭 80 羽,按照该品种鸭国家标准的要求饲养,随机分为对照组和感染组等 2 组,其中对照组的鸭注射 0.5 mL/羽的生理盐水,感染组的鸭注射 0.5 mL/羽用生理盐水稀释的鸭疫里默氏菌菌液(2×10^9 ~ 5×10^9 CFU/mL)。在感染 1、2、3、5、9、14 d,随机取 5 羽/组鸭屠宰。屠宰后分别采集十二指肠、空肠、回肠组织各约 1.0 cm 的肠段,用生理盐水小心冲洗肠内容物,置于 10% 福尔马林溶液中固定、密封,室温放置 24 h。

1.2 主要试剂与仪器

胰蛋白胨大豆肉汤培养基(HB4114,青岛海博生物技术有限公司),血平皿(9 cm,YB3400071,上海钰博生物科技有限公司),国产血清(四季青,11011 - 8611,北京索莱宝科技有限公司)。

收稿日期:2021 - 07 - 01
基金项目:江苏省现代农业(水禽)产业技术体系建设项目(编号:JATS[2020]361)。
作者简介:陶志云(1979—),女,安徽滁州人,博士,副研究员,主要从事家禽免疫及遗传育种研究。E - mail:zhiyun2@126.com。
通信作者:李慧芳,博士,研究员,主要从事家禽遗传育种与家禽资源保护研究。E - mail:lhfxf_002@aliyun.com.cn。

智能型恒温摇床（MSK，中国）；生物安全柜（BHC1300A2，中国）；石蜡切片机（Leica，RM2235），购自北京盛科信德科技有限公司，光学显微镜（ZEISS Axio Scope. A1 正置显微镜），购自北京派迪威仪器有限公司。

1.3　试验方法

按常规方法制作石蜡切片，进行苏木精－伊红（HE）染色法染色，采用光学显微镜、数字摄像机及图像处理系统测定肠黏膜厚度、肠道绒毛高度和隐窝深度，并计算绒毛高度和隐窝深度的比值。

1.4　数据统计

采用 Excel 对相对定量数据进行整理，用 SPSS 20.0 生物统计软件进行数据分析，数据以“平均值 ± 标准差”表示，$P<0.05$ 表示差异显著。

2　结果与分析

2.1　不同肠段肠黏膜厚度变化

由表 1 可知，与对照组相比，感染鸭疫里默氏菌后 1～9 d 十二指肠、空肠和回肠的黏膜厚度均有显著下降，在感染后 2、5 d 时，十二指肠差异达显著水平（$P<0.05$）；在 9 d 空肠和 1、3、5 d 回肠中，黏膜厚度的差异达显著水平（$P<0.05$）；14 d 时，在每段肠段的黏膜厚度均无显著差异（$P<0.05$）。

表 1　感染鸭疫里默氏菌鸭在不同时间后不同肠段黏膜厚度

肠段	组别	黏膜厚度（μm）					
		1 d	2 d	3 d	5 d	9 d	14 d
十二指肠	对照组	1 091.21 ± 82.05a	1 156.00 ± 47.95b	1 159.16 ± 93.75a	1 091.57 ± 180.77b	1 080.16 ± 20.70a	1 240.14 ± 210.81a
	感染组	1 054.33 ± 58.46a	870.05 ± 65.95a	1 103.67 ± 11.24a	848.50 ± 76.81a	968.22 ± 91.74a	1 365.05 ± 93.50a
空肠	对照组	912.89 ± 89.23a	962.08 ± 68.88a	923.15 ± 25.87a	1 052.34 ± 56.37a	1 163.98 ± 56.00b	1 233.71 ± 46.30a
	感染组	857.60 ± 11.85a	838.15 ± 81.82a	880.16 ± 19.17a	907.75 ± 244.72a	895.21 ± 38.84a	1 278.94 ± 63.98a
回肠	对照组	700.74 ± 61.11a	782.88 ± 56.36a	840.74 ± 74.87a	961.91 ± 119.36a	950.68 ± 19.12a	980.69 ± 62.75a
	感染组	581.83 ± 34.88b	764.75 ± 169.75a	588.26 ± 240.41b	764.34 ± 38.93b	823.59 ± 81.91a	883.68 ± 7.12a

注：同一肠段同列数据后不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。表 2～表 4 同。

2.2　不同肠段肠绒毛高度变化

由表 2 可知，与对照组相比，感染鸭疫里默氏菌后 1～9 d 的十二指肠肠绒毛高度明显下降，在感染后 2 d 差异达显著水平（$P<0.05$）；空肠肠绒毛高度明显下降，在感染后 2、9 d 差异达显著水平（$P<0.05$）；在回肠中肠绒毛高度总体呈下降趋势，但差异不显著。在感染后 14 d 所有肠段肠绒毛高度在感染组和对照组间均无显著差异。

表 2　感染鸭疫里默氏菌不同时间后在不同肠段肠绒毛高度

肠段	组别	肠绒毛高度（μm）					
		1 d	2 d	3 d	5 d	9 d	14 d
十二指肠	对照组	795.18 ± 100.99a	750.43 ± 41.94b	576.84 ± 181.78a	627.06 ± 202.02a	645.46 ± 57.89a	722.47 ± 212.93a
	感染组	620.50 ± 41.12a	434.70 ± 13.68a	654.67 ± 77.58a	476.98 ± 100.47a	490.01 ± 90.98a	690.68 ± 109.55a
空肠	对照组	647.04 ± 89.56a	629.32 ± 89.78b	614.17 ± 65.45a	619.71 ± 77.40a	709.24 ± 6.29b	789.98 ± 76.75a
	感染组	564.31 ± 87.38a	418.66 ± 39.04a	465.35 ± 31.19a	502.10 ± 152.73a	458.73 ± 89.24a	759.68 ± 141.44a
回肠	对照组	439.91 ± 31.26a	504.08 ± 81.88a	484.32 ± 57.25a	526.22 ± 70.68a	556.14 ± 67.03a	574.41 ± 35.53a
	感染组	337.51 ± 57.04a	420.31 ± 109.05a	440.33 ± 178.23a	404.74 ± 36.34a	468.98 ± 36.51a	572.61 ± 31.81a

2.3　不同肠段肠隐窝深度变化

由表 3 可知，与对照组相比，十二指肠的隐窝深度在感染鸭疫里默氏菌后几个时间点差异均不显著；空肠的隐窝深度在感染后 1 d 显著下降（$P<0.05$），在 9 d 时显著上调（$P<0.05$），在其他时间点差异不显著；回肠的隐窝深度在感染后 3、5、9 d 显著增加（$P<0.05$）。

2.4　不同肠段肠绒毛高度/隐窝深度变化

由表 4 可知，与对照组相比，不同小肠段肠道中肠绒毛高度与隐窝深度的比值在感染鸭疫里默氏菌后总体均呈下降趋势。在十二指肠中，感染后 2、5、9 d 感染组的比值显著低于对照组（$P<0.05$）；在空肠中，感染后 2、9 d 感染组的比值显著低于对照组（$P<0.05$）；在回肠中，感染后 3、5、9 d 感染组的

表 3　感染鸭疫里默氏菌不同时间后在不同肠段肠隐窝深度

肠段	组别	肠隐窝深度(μm)					
		1 d	2 d	3 d	5 d	9 d	14 d
十二指肠	对照组	68.71 ±10.49a	71.63 ±11.57a	60.64 ±5.35a	71.99 ±11.35a	70.98 ±5.62a	70.18 ±10.99a
	感染组	53.12 ±2.03a	78.09 ±11.66a	61.75 ±2.18a	79.36 ±9.44a	67.62 ±6.35a	93.05 ±20.89a
空肠	对照组	66.28 ±15.35b	70.54 ±2.39a	70.87 ±9.31a	80.53 ±12.92a	65.91 ±8.32a	75.91 ±6.16a
	感染组	39.00 ±8.08a	94.55 ±14.43a	63.11 ±7.39a	76.31 ±4.92a	92.10 ±6.17b	67.74 ±11.83a
回肠	对照组	59.78 ±6.59a	62.34 ±16.19a	58.87 ±1.36a	57.63 ±3.37a	51.82 ±4.76a	59.56 ±7.22a
	感染组	65.72 ±14.74a	62.19 ±3.59a	82.33 ±10.20b	76.88 ±3.16b	82.22 ±7.60b	58.76 ±8.91a

表 4　感染鸭疫里默氏菌不同时间后在不同肠段肠绒毛高度/隐窝深度

肠段	组别	肠绒毛高度/隐窝深度					
		1 d	2 d	3 d	5 d	9 d	14 d
十二指肠	对照组	10.74 ±2.88a	10.85 ±2.34b	7.70 ±1.95a	8.62 ±1.94b	9.35 ±1.66b	10.63 ±1.56a
	感染组	11.99 ±0.51a	6.40 ±1.02a	6.73 ±0.36a	5.79 ±0.59a	7.53 ±1.50a	10.70 ±5.31a
空肠	对照组	9.55 ±1.39a	8.88 ±1.08b	12.85 ±0.24a	6.00 ±1.49a	10.87 ±0.53b	9.89 ±1.34a
	感染组	10.63 ±2.27a	6.24 ±2.13a	9.61 ±0.35a	6.01 ±0.79a	5.21 ±0.86a	11.12 ±0.44a
回肠	对照组	7.82 ±1.58a	7.59 ±1.39a	8.64 ±5.04b	8.59 ±1.37b	10.08 ±1.01b	9.49 ±1.66a
	感染组	5.91 ±1.35a	6.72 ±0.49a	5.88 ±0.30a	5.46 ±0.84a	6.16 ±1.43a	9.31 ±2.58a

比值显著低于对照组($P<0.05$)。

3　讨论与结论

肠道完整性是发挥肠道功能的基础,病原菌的感染会破坏肠道的完整性,引起疾病[10-11]。小肠是动物体内重要的消化器官,是营养物质在体内进行消化吸收最多的场所,对营养物质消化、吸收和转运有着重要作用[12-13]。肠壁厚度的增加有助于肠道蠕动,提高肠对营养物质的消化吸收;肠绒毛越长,与营养物质接触面积就越大,吸收越好;隐窝越浅,肠上皮细胞成熟率越高,消化吸收能力就越强;绒毛高度/隐窝深度的值综合反映肠道功能状况,比值越小,说明消化吸收能力越弱[14-16]。

研究表明,一些不利因素可引起肠道损伤,如阿司匹林大量灌胃引起大鼠肠道损伤,表现为肠绒毛高度和绒毛高度与隐窝深度比值下降[17]。番鸭感染呼肠弧病毒后,其十二指肠、空肠和回肠的绒毛高度、肠壁厚度、绒毛高度/隐窝深度的值均显著低于对照组[18]。脂多糖(LPS)应激能显著增加大鼠十二指肠隐窝深度,显著降低十二指肠绒毛高度与隐窝深度比值、空肠黏膜厚度[19]。本研究表明,感染鸭疫里默氏菌后 1 ~9 d,十二指肠、空肠和回肠段的黏膜厚度及绒毛高度均有不同程度的下降,说明感染鸭疫里默氏菌后鸭小肠的肠吸收能力减弱。感染鸭疫里默氏菌后,鸭空肠和回肠中隐窝深度增加,说明其肠道吸收功能下降。鸭疫里默氏菌感染后绒毛高度/隐窝深度的值下降,说明感染鸭疫里默氏菌 1 ~9 d 后显著影响肠吸收功能,但 14 d 时鸭小肠的黏膜厚度、绒毛高度、隐窝深度、绒毛高度/隐窝深度的值在 3 个鸭小肠肠段均无显著差异,说明鸭疫里默氏菌对感染 14 d 的鸭小肠肠吸收功能无显著影响,这是因为感染鸭疫里默氏菌后 14 d,肠吸收功能基本恢复。

本研究结果表明,不利因素感染鸭疫里默氏菌也可引起肠道形态结构的改变,引起吸收功能下降,这可能是其致病方式之一;感染后期,肠道形态结构基本修复,说明感染鸭疫里默氏菌的个体在康复后其肠道的吸收功能仍然可恢复。该研究为鸭疫里默氏菌的致病机制及机体的修复机制研究奠定基础,但具体的致病机制及修复机制尚需深入研究。

参考文献:

[1]徐韶颐. 畜禽养殖疫病发生原因及预防[J]. 畜牧兽医科学(电子版),2019(16):14 -15.

[2]高杰雄. 规模化畜禽养殖中的疾病预防与消毒浅析[J]. 兽医导刊,2020(4):7.

[3]宁玲忠,雷红宇,胡仕凤,等. 鸭疫里默氏菌病研究进展[J]. 湖南畜牧兽医,2013(3):4 -5.

[4]Gong Y S,Yang Y S,Chen Y,et al. Characterization of the hemolytic activity of *Riemerella anatipestifer*[J]. Microbiology,2020,166(5):436 -439.

(下转第 175 页)

道及其养殖环境菌群结构分析[J]. 青岛农业大学学报(自然科学版),2020,37(2):129－134.
[11]张立强,李　媛,邓　平,等. 健康和患病克氏原螯虾肠道微生物群落结构和多样性分析[J]. 水产科技情报,2020,47(1):37－40.
[12]胡　骞. 克氏原螯虾源维氏气单胞菌的鉴定、致病性研究及抗菌中草药筛选[D]. 武汉:华中农业大学,2020:42－43.
[13]江　枫. 群体感应抑制剂对蜂房哈夫尼菌生物膜形成的影响[D]. 大连:大连工业大学,2017:26－27.
[14]Liu F,Qu Y K,Geng C,et al. Effects of hesperidin on the growth performance,antioxidant capacity,immune responses and disease resistance of red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*)[J]. Fish & Shellfish Immunology,2020,99:154－166.
[15]Wu Z B,Zhang Q Q,Zhang T L,et al. Association of the microbiota dysbiosis in the hepatopancreas of farmed crayfish (*Procambarus clarkii*) with disease outbreaks[J]. Aquaculture, 2021, 536:736492.
[16]Yuan G L,Zhu L,Jiang X Y,et al. Diagnosis of co－infection with white spot syndrome virus and *Aeromonas veronii* in red swamp crayfish *Procambarus clarkii*[J]. Aquaculture,2021,532:736010.
[17]邱吉宇. 中蜂蜂房哈夫尼菌病的诊断与中西药防治[D]. 贵阳:贵州大学,2018:12－13.
[18]王　霞. 蜂房哈夫尼菌引起化脓性脑膜炎病例报告[J]. 实用医技杂志,2002(12):920.
[19]赵淑芳,曹卢园,唐子晴,等. 棘胸蛙新型病菌蜂房哈夫尼菌的分离、鉴定与药敏试验[J]. 丽水学院学报,2019,41(5):29－33.
[20]闫艳新,邹　玲,刘文华,等. 一例水貂感染蜂房哈夫尼菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 经济动物学报,2015,19(2):74－76,79.
[21]袁　瑞. 中国大鲵主要病原菌的鉴定及皮肤分泌液抗菌活性成份的分离[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2014:28－29.
[22]郁维娜,戴文芳,陶　震,等. 健康与患病凡纳滨对虾肠道菌群结构及功能差异研究[J]. 水产学报,2018,42(3):399－409.
[23]吴亚锋,王楠楠,王晶晶,等. 2017 年和 2018 年江苏省水生动物气单胞菌分离鉴定及耐药分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(24):156－162.
[24]孟　愔,胡　骞,金玉立,等. 复方中草药制剂对克氏原螯虾生长、免疫功能及肝胰腺组织的影响[J]. 中国饲料,2019(21):60－65.
[25]刘云宁,李小凤,班旭霞,等. 中药抗菌成分及其抗菌机制的研究进展[J]. 环球中医药,2015,8(8):1012－1017.
[26]朱　淼,夏艳洁,李虹晔,等. 鱼用中草药饲料添加剂主要有效成分及其作用机制的研究进展[J]. 中国畜牧杂志,2020,56(2):39－43.
[27]王洪彬,李永慧,朱利霞,等. 24 味中草药对舌鳎源嗜水气单胞菌的体外抑菌效果[J]. 水产学杂志,2018,31(1):21－24.
[28]郝晨光,冼健安,李军涛,等. 中草药饲料添加剂在克氏原螯虾养殖中的应用[J]. 饲料研究,2021,44(2):122－124.
[29]巫爱军,赵　楠,李　浩,等. 一种中草药配合饲料对小龙虾的防病效果[J]. 水产养殖,2020,41(12):66－69.

(上接第 168 页)

[5]Chikuba T,Uehara H,Fumikura S,et al. Riemerella anatipestifer infection in domestic ducks in Japan,2014[J]. The Journal of Veterinary Medical Science,2016,78(10):1635－1638.
[6]Tsujikawa T,Fujiyama Y. Small intestinal:development,structure,function[J]. Nihon Rinsho,2008,66 (7):1240－1242.
[7]Wu Y P, Tang L, Wang B K, et al. The role of autophagy in maintaining intestinal mucosal barrier[J]. Journal of Cellular Physiology,2019,234(11):19406－19419.
[8]Morozov I A. Structure and function of the small intestinal mucosal[J]. Eksp Klin Gastroenterol,2002,6:88－92,114.
[9]Jankowski J A,Goodlad R A,Wright N A. Maintenance of normal intestinal mucosa:function,structure,and adaptation[J]. Gut,1994,35(Suppl):S1－S4.
[10]Camilleri M,Madsen K,Spiller R,et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease[J]. Neurogastroenterology & Motility,2012,24(6):503－512.
[11]Farhadi A,Banan A,Fields J,et al. Intestinal barrier:an interface between health and disease[J]. Journal of Gastroenterology and Hepatology,2003,18(5):479－497.
[12]Xu R J, Wang F, Zhang S H. Postnatal adaptation of the gastrointestinal tract in neonatal pigs:a possible role of milk－borne growth factors[J]. Livestock Production Science,2000,66(2):95－107.
[13]王前光,李　闯,黄　璇,等. 葡萄糖氧化酶对 1～6 周龄临武鸭生长性能、血清生化和抗氧化指标、肠道形态结构和微生物多样性的影响[J]. 动物营养学报,2020,32(8):3605－3614.
[14]沈霞芬. 家畜组织学与胚胎学[M]. 4 版. 北京:中国农业出版社,2010.
[15]Mekbungwan A,Yamauchi K. Growth performance and histological intestinal alterations in piglets fed dietary raw and heated pigeon pea seed meal[J]. Histology and Histopathology,2004,19(2):381－389.
[16]Caspary W F. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption[J]. The American Journal of Clinical Nutrition,1992,55(1):299S－308S.
[17]陈勇江,王金荣,苏兰利,等. 阿司匹林诱导大鼠肠道损伤模型的构建[J]. 动物营养学报,2020,32(2):898－904.
[18]姜慧慧,黄丽娜,吴宝成,等. 猴头菇多糖对 MDRV 感染番鸭病死率及肠道形态结构的影响[J]. 中国家禽,2015,37(5):22－26.
[19]吴　杰,邓　波,李孝辉,等. 丁酸梭菌抑制脂多糖致急性应激大鼠肠道损伤的效果研究[J]. 动物营养学报,2018,30(4):1530－1537.