

研究报告

牛源溶血性曼氏杆菌和多杀性巴氏杆菌的分离与鉴定

于凡淞^{1,2,3}, 赵梦莹^{1,2,3}, 熊丽雯², 郭爱珍^{1,2,3}, 陈颖钰^{1,2,3}, 胡长敏^{1,2,3}, 陈建国^{*1,2,3}

1 华中农业大学 动物医学院 农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室, 湖北 武汉 430070

2 华中农业大学 动物科学技术学院、动物医学院, 湖北 武汉 430070

3 华中农业大学 生猪健康养殖协同创新中心华中农业大学湖北省兽医流行病学国际科技合作基地, 湖北 武汉 430070

于凡淞, 赵梦莹, 熊丽雯, 郭爱珍, 陈颖钰, 胡长敏, 陈建国. 牛源溶血性曼氏杆菌和多杀性巴氏杆菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2025, 52(3): 1281-1294.

YU Fansong, ZHAO Mengying, XIONG Liwen, GUO Aizhen, CHEN Yingyu, HU Changmin, CHEN Jianguo. Isolation and identification of bovine-derived *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*[J]. Microbiology China, 2025, 52(3): 1281-1294.

摘要:【背景】牛呼吸疾病综合征(bovine respiratory disease complex, BRDC)是由多病原和多因素互作引起的以支气管肺炎为主的牛呼吸系统疾病。引起 BRDC 的细菌性病原主要有溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*, Mh)、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)、睡觉嗜组织菌(*Histophilus somni*, Hs)等。【目的】了解我国引起 BRDC 相关的 Mh、Pm 分布和血清型种类。【方法】自 2022 年 7 月到 2024 年 1 月间, 通过 PCR 技术对来自河南、湖南、湖北、浙江、安徽、山东、宁夏、甘肃、贵州、黑龙江、内蒙古等 16 个地区的 54 个牧场共 698 头牛的 698 份样本(鼻拭子 359 份、气管拭子 321 份, 肺脏组织 18 份)进行溶血性曼氏杆菌及多杀性巴氏杆菌的检测, 对阳性样品进行细菌分离和血清型鉴定。【结果】溶血性曼氏杆菌和多杀性巴氏杆菌检测为阳性的样本量分别为 15/698 和 72/698, 阳性检出率分别为 2.15% (95% CI: 1.2%–3.5%)及 10.32% (95% CI: 8.2%–12.8%), 二者混合感染有 5/698 份, 阳性率为 0.72% (95% CI: 0.2%–1.7%)。PCR 检测后进一步对阳性样品进行细菌分离, 共获得 8 株溶血性曼氏杆菌, 其中 A1 型 1 株, A2 型 3 株, A6 型 4 株, 多位点序列分型(multi locus sequence typing, MLST)结果为 ST1 型 5 株(5/8), 均为血清型 A1 和 A6 型; ST2 型 3 株(3/8), 为血清型 A2 型; 21 株多杀性巴氏杆菌, 其中 A:L3 型 17 株, A:L6 型 4 株, MLST 分型结果为 ST1 型和 ST7 型, ST1 型 17 株(17/21), 均为 A:L3 型; ST7 型 4 株(4/21)为 A:L6 型。

资助项目: 国家重点研发计划(2023YFD1802502); 宁夏回族自治区重点研发计划(2023BCF01038)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1802502), and the Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region (2023BCF01038).

*Corresponding author. E-mail: chenjq@mail.hzau.edu.cn

Received: 2024-05-23; Accepted: 2024-08-11; Published online: 2024-10-23

【结论】通过对部分地区具有呼吸道症状的病牛进行细菌分离鉴定,对牛呼吸疾病综合征主要致病的细菌性病原进行分型以及生物学特性分析,确定了病原流行的优势血清型、毒力基因和耐药基因等,为相关疫苗的制备提供了基础,为防控该病提供了理论依据。

关键词:牛呼吸疾病综合征;溶血性曼氏杆菌;多杀性巴氏杆菌;细菌分离;PCR 鉴定

Isolation and identification of bovine-derived *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*

YU Fansong^{1,2,3}, ZHAO Mengying^{1,2,3}, XIONG Liwen², GUO Aizhen^{1,2,3}, CHEN Yingyu^{1,2,3}, HU Changmin^{1,2,3}, CHEN Jianguo^{*1,2,3}

1 National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

2 College of Veterinary Medicine, College of Animal Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

3 The Cooperative Innovation Center for Sustainable Pig Production, Hubei International Scientific and Technological Cooperation Base of Veterinary Epidemiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

Abstract: [Background] Bovine respiratory disease complex (BRDC), a bovine respiratory disease characterized by bronchopneumonia, is caused by interactions of multiple pathogens and factors. The main bacterial pathogens causing BRDC include *Mannheimia haemolytica* (Mh), *Pasteurella multocida* (Pm), and *Histophilus somni* (Hs). **[Objective]** To understand the distribution and serotypes of Mh and Pm associated with BRDC in China. **[Methods]** We employed PCR to detect Mh and Pm in 698 samples (359 nasal swabs, 321 tracheal swabs, and 18 lung tissue samples) collected from 698 cattle across 54 farms in 16 provincial-level administrative regions including Henan, Hunan, Hubei, Zhejiang, Anhui, Shandong, Ningxia, Gansu, Guizhou, Heilongjiang, and Inner Mongolia from July 2022 to January 2024. Bacterial isolation and serotyping were performed on the positive samples. **[Results]** The positive detection rates of Mh and Pm in the samples were 2.15% (15/698, 95% CI: 1.2%–3.5%) and 10.32% (72/698, 95% CI: 8.2%–12.8%), respectively. Co-infection was detected in 5 (0.72%, 95% CI: 0.2%–1.7%) samples. From the positive samples, 8 strains (1 of serotype A1, 3 of serotype A2, and 4 of serotype A6) of Mh and 21 strains (17 of serotype A:L3 and 4 of serotype A:L6) of Pm were isolated. The multi-locus sequence typing (MLST) results for Mh showed that 5 out of 8 strains were of sequence type (ST) 1 (serotypes A1 and A6), and 3 strains were of ST2 (serotype A2). The 21 strains of Pm included 17 strains of ST1 (serotype A:L3) and 4 strains of ST7 (serotype A:L6). **[Conclusion]** This study isolated and identified the main bacterial pathogens causing BRDC in cattle with respiratory symptoms in specific regions and revealed the prevalent serotypes, virulence genes, and resistance genes. These findings lay a foundation for the development of related vaccines and offer theoretical support for the prevention and control of BRDC.

Keywords: bovine respiratory disease complex; *Mannheimia haemolytica*; *Pasteurella multocida*; bacterial isolation; PCR identification

牛呼吸疾病综合征(bovine respiratory disease complex, BRDC)是由于气候或饲养环境改变、运输、断奶、营养物质缺乏和混群等多因素相互作用^[1],以及病毒性病原、细菌性病原与牛支原体等多种病原所引起的牛呼吸系统疾病^[2]。机体受到应激刺激致使免疫抑制,致病菌定殖和繁殖能力增强,机体发生以支气管肺炎为主的呼吸系统疾病,其治疗成本、生产损失和死亡率给国内外养牛业造成巨大经济损失。引起BRDC的细菌性病原主要有溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*, Mh)、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)、睡觉嗜组织菌(*Histophilus somni*, Hs)等^[3],细菌性病原通常以与其他病原混合感染的形式存在,可在宿主受到应激刺激时引起重要影响,病毒侵入机体后发生感染从而引起的免疫抑制也是引起细菌继发感染的重要原因之一^[4]。尽管一直在积极干预疾病的发生发展,BRDC依然是造成牛发病率、死亡率及生产损失变高的主要原因^[5]。因此,本研究通过采取我国部分地区BRDC发病牛的鼻拭子及肺脏样本,对这些临床样本进行Mh及Pm的PCR检测,对检测为阳性的样本进行细菌分离,进而检测分离株的血清型、多位点序列分型(multi locus sequence typing, MLST)、耐药表型,以及毒力及耐药基因等。本研究旨在了解我国BRDC细菌性病原的流行和分布特点,为开发新型有效的诊断方法、临床防治、研制疫苗及减少经济损失提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 样品

样本来源于2022年7月到2024年1月间,河南、湖南、湖北、浙江、安徽、山东、宁夏、

甘肃、贵州、黑龙江、内蒙古等16个地区的54个牧场共698头牛的698份样本,其中包括鼻拭子359份、气管拭子321份及肺脏组织18份。

1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组DNA提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;无菌脱纤维绵羊血,河南巨石生物公司;新生牛血清,中国杭州四季青生物工程公司;微量生化发酵管,杭州微生物试剂有限公司。凝胶电泳仪,北京六一生物科技有限公司;PCR仪,杭州博日科技有限公司。

1.3 培养基

胰蛋白胨大豆肉汤(tryptic soy broth, TSB)、胰蛋白胨大豆琼脂(tryptic soy agar, TSA)和脑心浸液(brain heart infusion, BHI),BD公司;MH肉汤(Mueller-Hinton Broth),青岛高科技工业园海博生物技术有限公司。

MH肉汤:MHB粉末21.0 g/L,121 °C灭菌15 min,备用。

胰蛋白胨大豆琼脂培养基:TSA粉末40.0 g/L,121 °C灭菌15 min,按照5%的比例加入新生牛血清或脱纤维绵羊血并混匀,制备为TSA固体培养基及绵羊血琼脂平板(血平板)。

1.4 特异性PCR检测

使用细菌基因组DNA提取试剂盒对样品DNA进行提取,用PCR扩增检测Pm、Mh的特异性序列KMT及LKT,检测Pm、Mh引物^[6-7]由北京擎科生物科技有限公司合成(表1)。PCR反应体系:2×Taq Master Mix 10 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各1 μL,DNA模板1 μL,ddH₂O 7 μL。PCR反应条件:95 °C 3 min;95 °C 15 s,55 °C 15 s,72 °C 15 s,35个循环;72 °C 5 min;16 °C暂时保存。PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

表1 *LKT*、*KMT* 及 16S rRNA 特异性基因引物序列Table 1 Primer sequences of *LKT*, *KMT* and 16S rRNA-specific genes

引物名称 Name of primer	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物大小 Size of product (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)
LKT	F: GCAGGAGGTGATTATTAAGTGG R: CAGCAGTTATTGTCATACCTGAAC	207	50
KMT	F: ATCCGCTATTTACCCAGTGG R: GCTGTAAACGAACTCGCCAC	460	55
16S rRNA	F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG R: GGTTACCTTGTTACGACTT	1 500	55

1.5 细菌的分离纯化培养

在生物安全柜中使用接种环将特异性 PCR 检测阳性的样品通过平板划线接种于血平板中, 倒置于 37 °C 恒温培养箱中培养 18–24 h, 观察菌落形态及生长情况, 将疑似为目的菌株的单菌落接种于含 5% 绵羊血的 TSA 平板上进行纯化。

1.6 纯化菌株的 16S rRNA 基因序列鉴定

将重复进行 3 次纯化后的菌株使用煮沸法提取细菌基因组 DNA, 并以其作为模板, 使用细菌 16S rRNA 基因通用引物(表 1)进行 PCR 扩增 16S rRNA 基因片段。PCR 反应体系同 1.4。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 55 °C 15 s, 72 °C 40 s, 34 个循环; 72 °C 5 min; 16 °C 暂时保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送擎科生物科技(北京)股份有限公司测序。测序结果在 BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上进行比对, 从而鉴定细菌的种类。

1.7 分离菌株血清型鉴定

将纯化后的分离菌株在血平板上划线, 37 °C 培养 18–24 h, 提取细菌基因组, 使用分型的特异性引物^[7-8]进行扩增(表 2), 反应体系及条件见 1.4。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后观察结果。

1.8 分离菌株的 MLST 分型

对 PubMLST (<https://pubmlst.org/>)网站上所

提供的溶血性曼氏杆菌的管家基因(*adk*, *aroE*, *deoD*, *gapDH*, *gnd*, *mdh*, *zwf*)及多杀性巴氏杆菌的管家基因(*Adk*, *aroA*, *deoD*, *g6pd*, *GdhA*, *Mdh*, *Pgi*)进行 PCR 扩增, 反应体系和条件同 1.4, 扩增后送擎科生物科技(北京)股份有限公司测序。测序结果在 PubMLST (<https://pubmlst.org/>)上进行比对, 从而鉴定细菌的 ST 型。

1.9 分离菌株毒力基因及耐药基因鉴定

对参考文献[6]中目前已经确定的溶血性曼氏杆菌 9 类 10 种毒力相关基因, 包括白细胞毒素基因、外膜脂蛋白相关基因、转铁蛋白结合蛋白相关基因、铁结合蛋白相关基因、参与糖酵解相关基因、超氧化物歧化酶相关基因、参与复制相关基因、四型菌毛相关基因及黏附相关基因^[9]进行 PCR 扩增, 以及对参考文献[8]中的目前已经确定的多杀性巴氏杆菌 7 类 25 个毒力相关基因, 包括铁离子摄取基因、黏附素相关基因、外膜蛋白相关基因、超氧化物歧化酶相关基因、唾液酸激酶相关基因、透明质酸酶相关基因、毒素相关基因进行 PCR 扩增, 反应条件、体系参照 1.4 及 1.6。以提取的 8 株溶血性曼氏杆菌和 21 株多杀性巴氏杆菌的 DNA 为模板, 菌株 8 大类 21 种耐药基因, 包括氨基糖苷类(*aadA25*, *aadB*)、氯霉素(*floR*)、链霉素(*strA*, *strB*)、氟喹诺酮类(*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*)、β-内酰胺类(*blaTEM*, *blaOXA*, *blaSHV*, *blaCTX-M-2*, *ermA*)、

表 2 荚膜血清分型、LPS 基因型分型所用引物

Table 2 Primers used for capsular serotyping and LPS genotyping

目的基因 Target gene	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物大小 Size of product (bp)	退火温度 Annealing temperature (°C)
<i>Hyp</i>	F: CATTTCCTTAGGTT CAG G R: CAAGTCATCGTAATGCCT	306	53
<i>CoreI</i>	F: GGCATATCCTAAAGCCGT R: AGAATCCACTATTGGGCACC	106	53
<i>TupA</i>	F: TGAGAATTTTCGACAGCACT R: ACCTTGGCATATCGTACC	78	53
<i>hyaD-hyaC</i>	F: GATGCCAAAATCGCAGTCAG R: TGTTGCCATCATTGTCAGTG	1 048	53
<i>bcbD</i>	F: CATTTATCCAAGCTCCACC R: GCCCGAGAGTTTCAATCC	758	53
<i>dcfF</i>	F: TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC R: CATCTACCCACTCAACCATATCAG	647	53
<i>ecbJ</i>	F: TCCGCAGAAAATTATTGACTC R: GCTTGCTGCTTGATTTTGTC	512	53
<i>fcfD</i>	F: TCGGAGAACGCAGAAATCAG R: TTCCGCCGTCAATTACTCTG	852	53
<i>L1</i>	F: ACATTCCAGATAATACACCCG R: ATTGGAGCACCTAGTAACCC	1 307	53
<i>L2</i>	F: CTAAAGTAACACTCGCTATTGC R: TTTGATTTCCCTTGGGATAGC	810	53
<i>L3</i>	F: TGCAGGCGAGAGTTGATAAACCATC R: CAAAGATTGGTTCCAAATCTGAATGGA	474	53
<i>L4</i>	F: TTTCCATAGATTAGCAATGCCG R: CTTTATTTGGTCTTTATATATACC	550	53
<i>L5</i>	F: AGATTGCATGGCGAAATGGC R: CAATCCTCGTAAGACCCCC	1 175	53
<i>L6</i>	F: TCTTTATAATTATACTCTCCCAAGG R: AATGAAGGTTTAAAAGAGATAGCTGGAG	668	53
<i>L7</i>	F: CCTATATTTATATCTCTCCCC R: CTAATATATAAACCATCCAACGC	931	53
<i>L8</i>	F: GAGAGTTACAAAATGATCGGC R: TCCTGGTTCATATATAGGTAGG	255	53

磺胺类药物(*sul1*, *sul2*, *sul3*)、四环素类(*tetA*, *tetB*, *tetH*, *tetG*)以及多肽类(*mcr-1*)基因^[8]进行 PCR 扩增, 反应条件、体系参照 1.4 及 1.6。

1.10 分离菌株的生化试验

挑取步骤 1.5 培养的平板上的单菌落用于以下试验。

用接种针蘸取单个菌落分别接种于糖发酵试验、尿素酶试验、枸橼酸盐利用试验、靛基质、硫化氢试验、甲基红试验、V-P 试验及鸟氨酸脱氢酶试验所需的微量生化管中, 接种后将管口用石蜡封口, 置于 37 °C 生化培养箱中培养, 24–48 h 后观察颜色变化, 紫色为阳性(+),

黄色为阴性(-)。

1.11 分离菌株生长曲线的测定

将纯化后的分离菌株按 1%接种量接种于 BHI 培养基中, 37 °C、180 r/min 培养过夜后按 1%接种量再次接种于 BHI 培养基中, 涡旋均匀后吸取 180 μL, 作 5 个重复, 放入全自动生长曲线分析仪 24 h 后取出, 进行数据整理。

2 结果与分析

2.1 特异性 PCR 检测结果

以提取的样本核酸作为 PCR 的模板, 分别对溶血性曼氏杆菌及多杀性巴氏杆菌特异性基因 *LKT*、*KMT* 进行检测, 所得产物经电泳后成

像可见大小分别为 207 bp 和 460 bp 左右条带, 部分结果见图 1; 对 698 份样本进行了溶血性曼氏杆菌及多杀性巴氏杆菌特异性基因 *LKT*、*KMT* 的检测, 检测到任意一个细菌为阳性的牧场定义其为阳性牧场, 结果显示溶血性曼氏杆菌阳性牧场有 10 个, 占比 18.52% (95% CI: 9.3–31.4), 多杀性巴氏杆菌阳性牧场有 20 个, 占比 37.04% (95% CI: 24.3–51.3); 从溶血性曼氏杆菌及多杀性巴氏杆菌的个体水平来看, 阳性样本量分别为 15/698、72/698, 阳性检出率分别为 2.15% (95% CI: 1.2–3.5) 及 10.32% (95% CI: 8.2–12.8), 二者混合感染仅有 5/698 份, 阳性率为 0.72% (95% CI: 0.2–1.7) (表 3)。

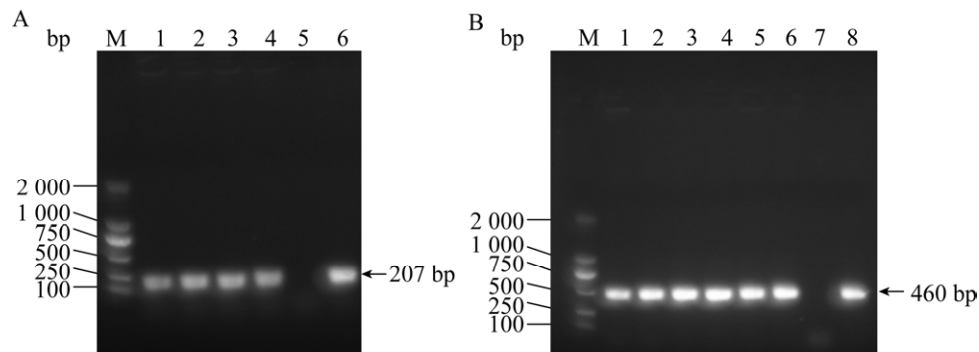


图 1 溶血性曼氏杆菌(A)与多杀性巴氏杆菌(B) PCR 检测结果 A: M: DL2000 DNA marker; 1: Mh4; 2: Mh5; 3: Mh6; 4: Mh8; 5: 阴性对照; 6: 阳性对照。B: M: DL2000 DNA marker; 1: Pm1; 2: Pm5; 3: Pm8; 4: Pm9; 5: Pm11; 6: Pm13; 7: 阴性对照; 8: 阳性对照。

Figure 1 PCR amplification results of *Mannheimia haemolytica* (A) and *Pasteurella multocida* (B). A: M: DL2000 DNA marker; 1: Mh4; 2: Mh5; 3: Mh6; 4: Mh8; 5: Negative control; 6: Positive control. B: M: DL2000 DNA marker; 1: Pm1; 2: Pm5; 3: Pm8; 4: Pm9; 5: Pm11; 6: Pm13; 7: Negative control; 8: Positive control.

表 3 送检样本阳性样本量及场阳性率

Table 3 The number of positive samples submitted for testing and the field positive rate

细菌名称 Bacteria	阳性样本量 Positive sample number	阳性样本率 Positive sample rate (95% CI)	阳性场 Positive field	场阳性率 Field positive rate (95% CI)
Mh	15/698	2.15% (1.2–3.5)	10/54	18.52% (9.3–31.4)
Pm	72/698	10.32% (8.2–12.8)	20/54	37.04% (24.3–51.3)
Pm+Mh	5/698	0.72% (0.2–1.7)	4/54	7.41% (2.1–17.9)

2.2 细菌的分离鉴定结果

选取血平板上有微弱 β 溶血、光滑湿润的露珠样菌落接种于血平板上划线继续进行纯化,挑取单菌落进行革兰氏染色镜检,可观察经革兰氏染色的溶血性曼氏杆菌在显微镜镜检的视野下呈现出明显的两极浓染,为单个或成对存在的短杆状 G⁻菌;经革兰氏染色的多杀性巴氏杆菌镜检视野下呈明显的两极浓染,球杆状 G⁻菌(图 2)。

2.3 分离菌株的血清型鉴定结果

溶血性曼氏杆菌和多杀性巴氏杆菌鉴定及血清型检测结果见图 3、图 4。共分离到 8 株 Mh, A1 型占比 12.5% (1/8); A2 型占比 37.5% (3/8); A6 型占比 50% (4/8); 分离到 21 株 Pm, A:L3 型占比 80.95% (17/21); A:L6 型占比 18.18% (4/21)。

2.4 分离菌株的生化试验结果

根据《伯杰细菌鉴定手册》^[10]中关于溶血性曼氏杆菌及多杀性巴氏杆菌的相关内容进行生化鉴定,可见溶血性曼氏杆菌的 8 株分离菌株在糖发酵试验中均不发酵乳糖、阿拉伯糖、山梨醇及卫矛醇,尿素酶试验、枸橼酸盐利用试验、靛基质、硫化氢试验、甲基红试验、V-P 试验及鸟氨酸脱氢酶试验结果均为阴性;多杀性巴氏杆菌的 15 株分离菌株在糖发酵试验中

均不发酵卫矛醇,其中 2 株对所有糖均不发酵,尿素酶试验、枸橼酸盐利用试验结果均为阴性、靛基质、硫化氢试验、甲基红试验、V-P 试验及鸟氨酸脱氢酶试验结果大部分为阴性(表 4 和表 5)。

2.5 分离菌株 MLST 分型结果

对溶血性曼氏杆菌的管家基因进行 PCR 扩增并测序。测序结果在 PubMLST (<https://pubmlst.org/>) 上进行比对,从而鉴定细菌的 ST 型。溶血性曼氏杆菌比对结果为 ST1 型和 ST2 型,ST1 型 5 株 (5/8),均为血清型 A1 和 A6 型;ST2 型 3 株 (3/8),为血清型 A2 型;多杀性巴氏杆菌比对结果为 ST1 型和 ST7 型,ST1 型 17 株 (17/21),ST7 型 4 株 (4/21) (表 6 和表 7)。

2.6 分离菌株毒力基因及耐药基因鉴定结果

溶血性曼氏杆菌分离株毒力基因中均含有 *LKT*、*dnaA* 这 2 个主要毒力基因(图 5),除在 A6 型 Mh8 与其他编号菌株存在有无 *fbpA* 与 *PtfA* 毒力基因的差异外,不同血清型的菌株毒力基因未见明显差异;不同血清型均 100% 携带 *floR*、*tetB*、*strA*、*strB* 这 4 种药物基因;多杀性巴氏杆菌分离株 A:L3、A:L6 型毒力基因中均不携带唾液酸激酶(*nanH*)及毒素相关基因

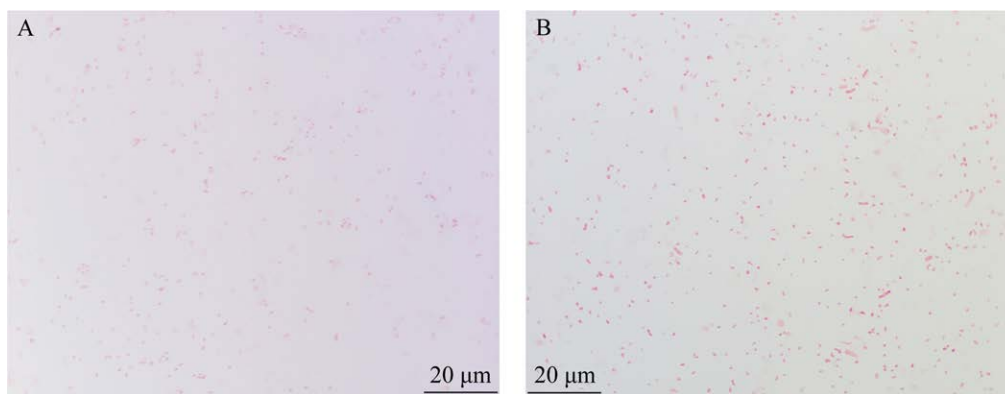


图 2 溶血性曼氏杆菌(A)及多杀性巴氏杆菌(B)的革兰氏染色镜检图

Figure 2 Microscopic image of Gram stain of *Mannheimia haemolytica* (A) and *Pasteurella multocida* (B).

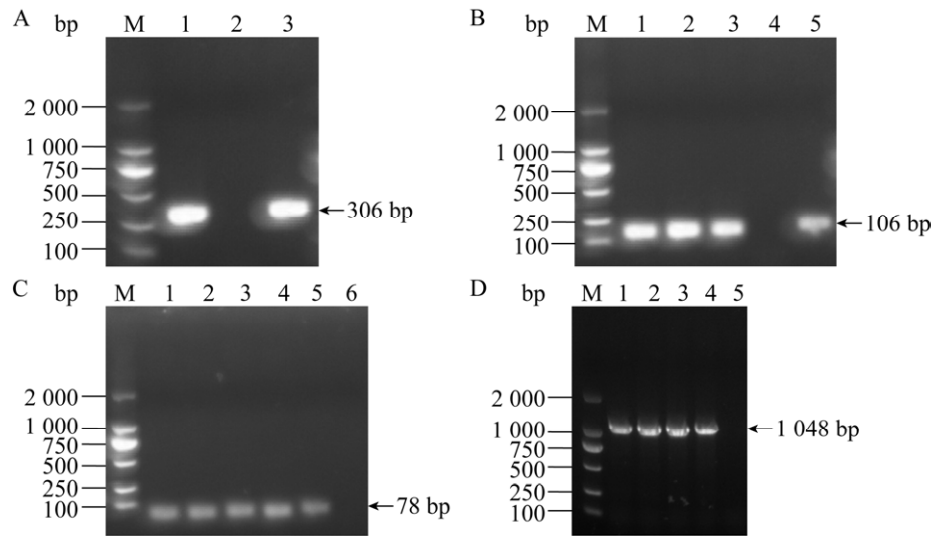


图3 溶血性曼氏杆菌 A1 (A)、A2 (B)、A6 (C)型及多杀性巴氏杆菌血清型 A 型(D) PCR 检测结果 A: M: DL2000 DNA marker; 1: Mh2; 2: 阴性对照; 3: 阳性对照。B: M: DL2000 DNA marker; 1: Mh4; 2: Mh6; 3: Mh7; 4: 阴性对照; 5: 阳性对照。C: M: DL2000 DNA marker; 1: Mh1; 2: Mh3; 3: Mh5; 4: Mh8; 5: 阳性对照; 6: 阴性对照。D: M: DL2000 DNA marker; 1: Pm1; 2: Pm2; 3: Pm3; 4: 阳性对照; 5: 阴性对照。

Figure 3 PCR amplification results of *Mannheimia haemolytica* A1 (A), A2 (B), A6 (C) and *Pasteurella multocida* serotype A (D). A: M: DL2000 DNA marker; 1: Mh2; 2: Negative control; 3: Positive control. B: M: DL2000 DNA marker; 1: Mh4; 2: Mh6; 3: Mh7; 4: Negative control; 5: Positive control. C: M: DL2000 DNA marker; 1: Mh1; 2: Mh3; 3: Mh5; 4: Mh8; 5: Positive control; 6: Negative control. D: M: DL2000 DNA marker; 1: Pm1; 2: Pm2; 3: Pm3; 4: Positive control; 5: Negative control.

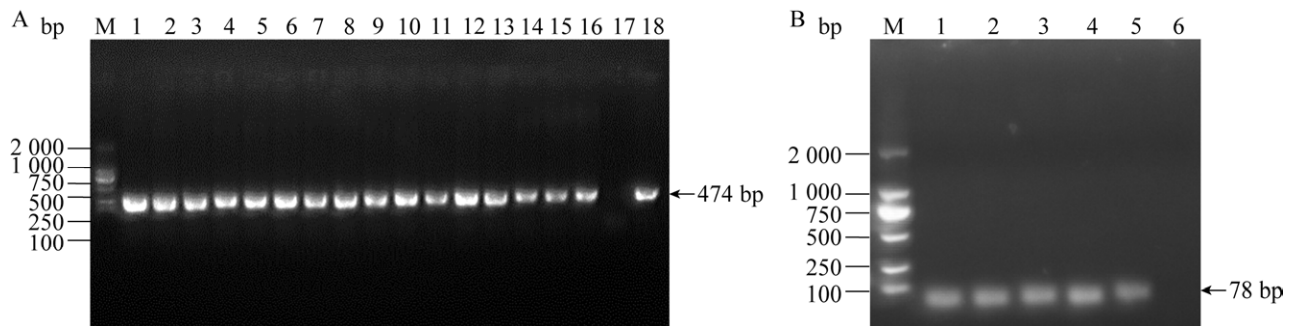


图4 多杀性巴氏杆菌脂多糖血清型 L3 型(A)及多杀性巴氏杆菌脂多糖血清型 L6 型(B) A: M: DL2000 DNA marker; 1: Pm1; 2: Pm4; 3: Pm5; 4: Pm7; 5: Pm8; 6: Pm9; 7: Pm11; 8: Pm12; 9: Pm13; 10: Pm14; 11: Pm15; 12: Pm16; 13: Pm17; 14: Pm18; 15: Pm19; 16: Pm20; 17: 阴性对照; 18: 阳性对照。B: M: DL2000 DNA marker; 1: Pm2; 2: Pm3; 3: Pm6; 4: Pm10; 5: 阳性对照; 6: 阴性对照。

Figure 4 *Pasteurella multocida* lipopolysaccharide serotype L3 (A) and L6 (B). A: M: DL2000 DNA marker; 1: Pm1; 2: Pm4; 3: Pm5; 4: Pm7; 5: Pm8; 6: Pm9; 7: Pm11; 8: Pm12; 9: Pm13; 10: Pm14; 11: Pm15; 12: Pm16; 13: Pm17; 14: Pm18; 15: Pm19; 16: Pm20; 17: Negative control; 18: Positive control. B: M: DL2000 DNA marker; 1: Pm2; 2: Pm3; 3: Pm6; 4: Pm10; 5: Positive control; 6: Negative control.

表 4 溶血性曼氏杆菌生化试验结果

Table 4 Biochemical identification of *Mannheimia hemolytica*

Item	Mh1	Mh2	Mh3	Mh4	Mh5	Mh6	Mh7	Mh8
乳糖 Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
蔗糖 Fructose	+	-	+	-	-	-	-	-
麦芽糖 Maltose	-	-	-	+	+	-	-	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
木糖 Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-
葡萄糖 Glucose	+	-	-	-	-	-	-	-
甘露糖 Mannose	+	-	-	-	-	-	-	-
果糖 Fructose	+	-	-	-	-	-	-	-
甘露醇 Mannitol	+	-	-	-	-	-	-	-
山梨醇 Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
卫矛醇 Guaiacol	-	-	-	-	-	-	-	-
靛基质 Indigo substrate	-	-	-	-	-	-	-	-
硫化氢 Hydrogen sulfide	-	-	-	-	-	-	-	-
甲基红 Methyl red	-	-	-	-	-	-	-	-
V-P	-	-	-	-	-	-	-	-
枸橼酸盐 Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-
尿素酶 Urease	-	-	-	-	-	-	-	-
鸟氨酸脱氢酶 Ornithine dehydrogenase	-	-	-	-	-	-	-	-

表 5 多杀性巴氏杆菌生化试验结果

Table 5 Biochemical identification of *Pasteurella multocida*

Item	Pm1	Pm2	Pm3	Pm4	Pm5	Pm6	Pm7	Pm8	Pm9	Pm10	Pm13	Pm18	Pm19	Pm20	Pm21
乳糖 Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
蔗糖 Fructose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
麦芽糖 Maltose	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
阿拉伯糖 Arabinose	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
木糖 Xylose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
葡萄糖 Glucose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
甘露糖 Mannose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
果糖 Fructose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
甘露醇 Mannitol	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
山梨醇 Sorbitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
卫矛醇 Guaiacol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
靛基质 Indigo substrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
硫化氢 Hydrogen sulfide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
甲基红 Methyl red	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
V-P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
枸橼酸盐 Citrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
尿素酶 Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
鸟氨酸脱氢酶 Ornithine dehydrogenase	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+

表 6 溶血性曼氏杆菌分离菌株分型结果

Table 6 Isolation of *Mannheimia haemolytica* strain typing result

编号 Number	荚膜血清型 Podocarp serotype	MLST
Mh1	A6	1
Mh2	A1	1
Mh3	A6	1
Mh4	A2	2
Mh5	A6	1
Mh6	A2	2
Mh7	A2	2
Mh8	A6	1

表 7 多杀性巴氏杆菌分离菌株分型结果

Table 7 *Pasteurella multocida* isolate strain typing result

编号 Number	荚膜血清型 Podocarp serotype	脂多糖血清型 Lipopolysaccharide serotypes	MLST
Pm1	A	L3	1
Pm2	A	L6	7
Pm3	A	L6	7
Pm4	A	L3	1
Pm5	A	L3	1
Pm6	A	L6	7
Pm7	A	L3	1
Pm8	A	L3	1
Pm9	A	L3	1
Pm10	A	L6	7
Pm11	A	L3	1
Pm12	A	L3	1
Pm13	A	L3	1
Pm14	A	L3	1
Pm15	A	L3	1
Pm16	A	L3	1
Pm17	A	L3	1
Pm18	A	L3	1
Pm19	A	L3	1
Pm20	A	L3	1
Pm21	A	L3	1

(*tox*A), A:L6 型不携带与定殖侵入起作用的黏附素相关基因 *pfh*A, 而 A:L3 型 100% 携带; A:L3 型无 *hgb*B 基因, A:L6 检出率为 100%; A:L3 和 A:L6 的链霉素基因携带率都非常高; 并且几乎没有 β -内酰胺基因(图 5-8)。

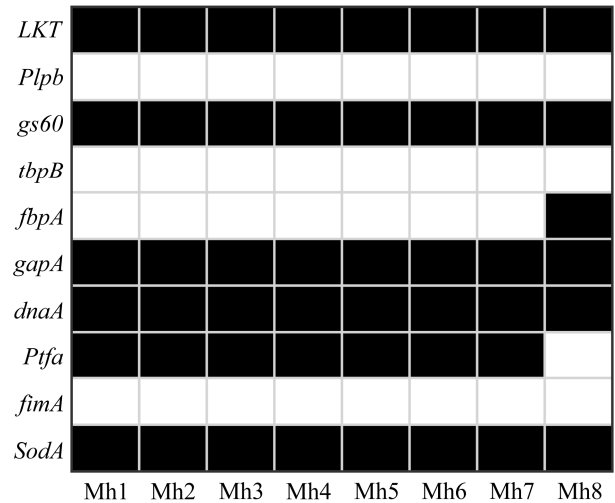


图 5 溶血性曼氏杆菌毒力基因

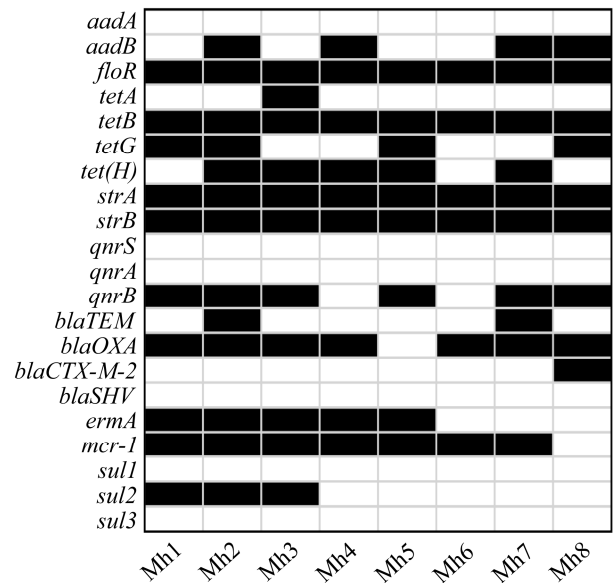
Figure 5 *Mannheimia haemolytica* virulence genes.

图 6 溶血性曼氏杆菌耐药基因

Figure 6 *Mannheimia haemolytica* resistance genes.

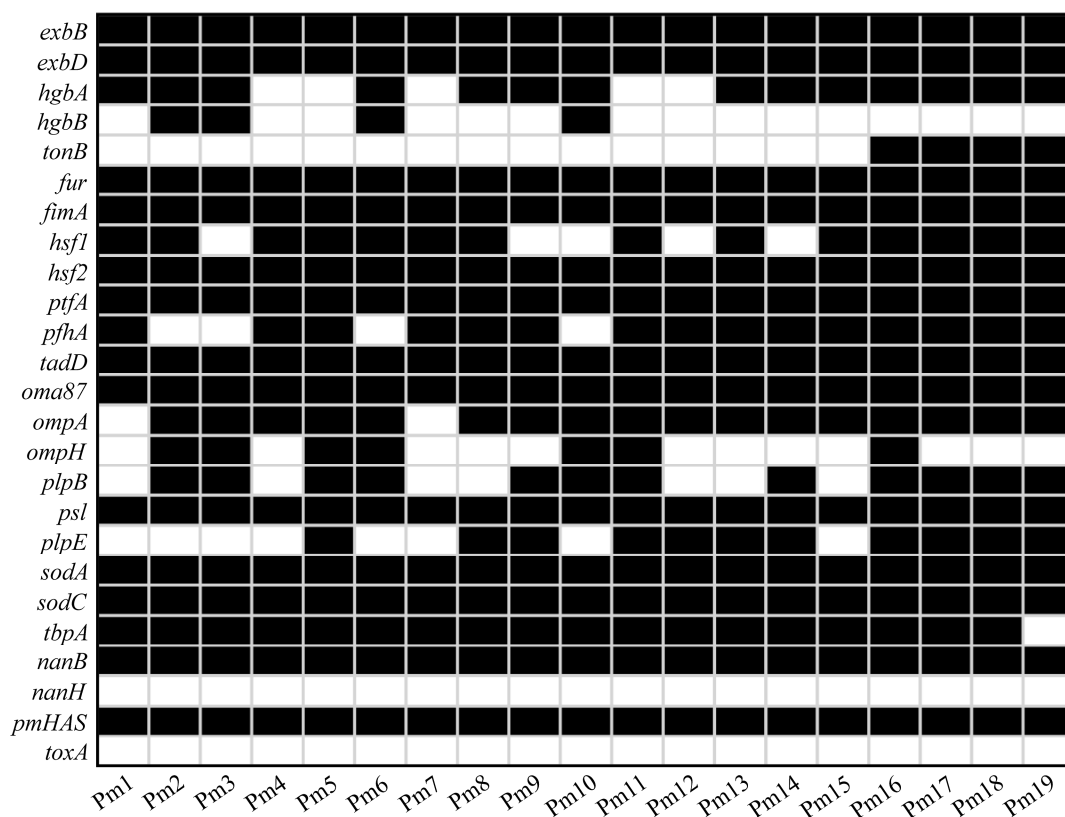


图 7 多杀性巴氏杆菌毒力基因
Figure 7 *Pasteurella multocida* virulence genes.

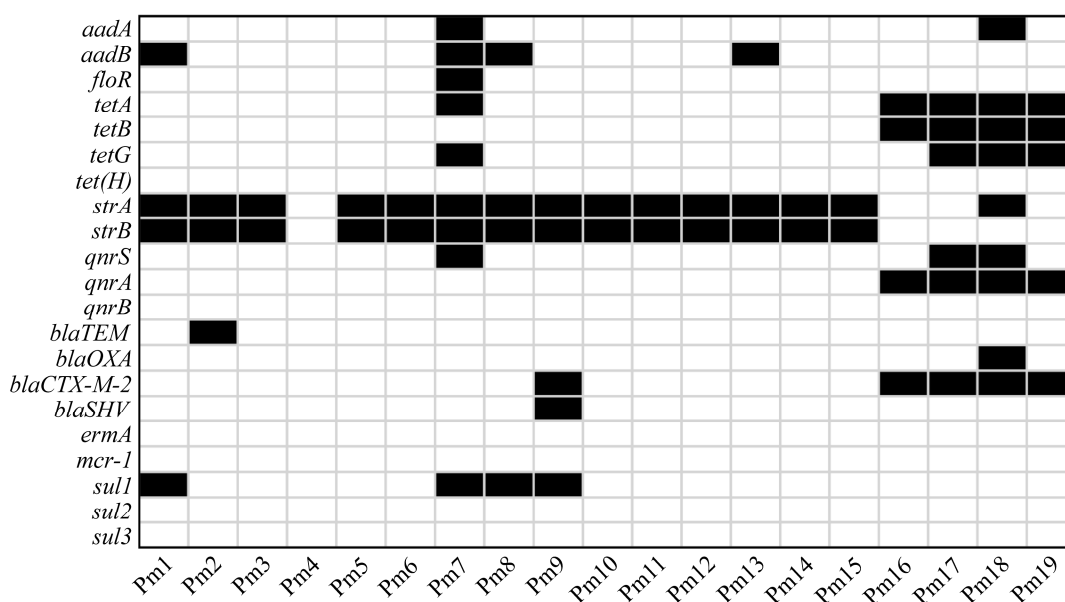


图 8 多杀性巴氏杆菌耐药基因
Figure 8 *Pasteurella multocida* resistance genes.

2.7 分离菌株的生长特性

使用全自动生长曲线分析仪测定结果后整理数据绘制分离菌株生长曲线(图 9), 显示溶血性曼氏杆菌的 0–3 h 为迟缓期, 4–8 h 为对数增长期, 然后进入稳定期; 多杀性巴氏杆菌在 0–2 h 为迟缓期, 3–6 h 进入对数增长期, 随后进入稳定期, 根据生长曲线测定结果可为日常细菌培养提供依据。

3 讨论

牛呼吸道疾病综合征(BRDC)涉及病原体、应激源、易感动物等多种危险因素^[3], 是引起养殖场牛群发病和死亡的主要原因, 尤其影响断奶犊牛和运输后牛群。与 BRDC 相关的病原体非常复杂, 主要包括溶血性曼氏杆菌、多杀性

巴氏杆菌、睡觉嗜组织菌和支原体属, 特别是牛支原体^[11], 发病率很高。

为针对临床流行菌株制备疫苗, 本研究对临床样本进行了 PCR 检测、细菌的分离, 并鉴定了具体血清型。本研究对临床送检的共 698 份样本进行了溶血性曼氏杆菌及多杀性巴氏杆菌特异性 PCR 检测, 溶血性曼氏杆菌及多杀性巴氏杆菌的阳性检出率分别为 2.15% (95% CI: 1.2–3.5)及 10.32% (95% CI: 8.2–12.8), 二者混合感染阳性率为 0.72% (95% CI: 0.2–1.7), 溶血性曼氏杆菌的阳性检出率不及多杀性巴氏杆菌, 说明多杀性巴氏杆菌在临床产生的影响较大, 因此对其的防控也应重视。本研究发现溶血性曼氏杆菌以 A6 型为主, 占比 50% (4/8); 多杀性巴氏杆菌以 Pm A:L3 型为主, 占比 80.95%。

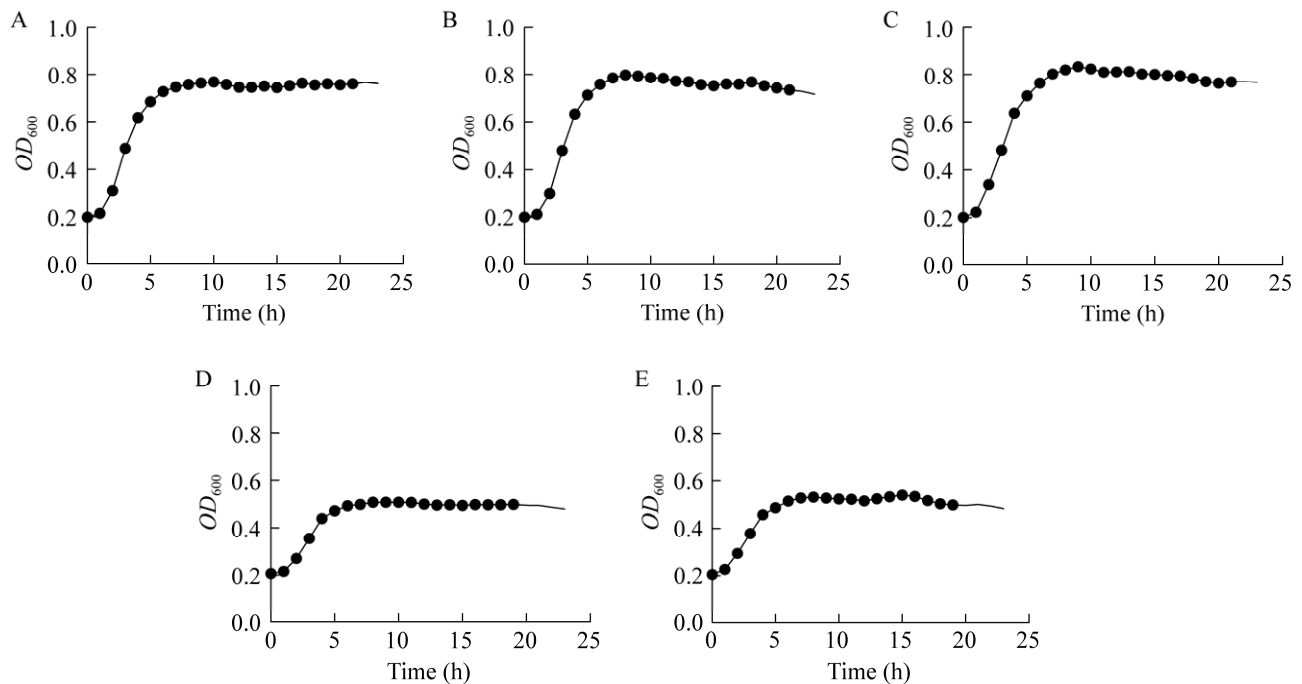


图 9 溶血性曼氏杆菌与多杀性巴氏杆菌不同血清型生长曲线 A–C 为溶血性曼氏杆菌 A1、A2、A6 型生长曲线, D、E 为多杀性巴氏杆菌 A:L3、A:L6 型生长曲线。

Figure 9 Growth curves of different serotypes of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. A–C were the growth curves of *Mannheimia haemolytica* A1, A2 and A6, and D and E were the growth curves of *Pasteurella multocida* A:L3 and A:L6.

查阅近年来细菌分离情况发现,2018年,冉艾等^[12]对四川地区新购进肉犊牛的养殖场进行细菌分离,分离到10株溶血性曼氏杆菌且均为A6型,随后在姜志刚等^[13]对东北地区对溶血性曼氏杆菌进行分离,A1型占比66.67%,A6型占比33.33%;2022年,朱杰等^[14]从我国内蒙古自治区、河北省、广东省分离到11株溶血性曼氏杆菌,其中A1型7株,A6型有4株,分离到12株多杀性巴氏杆菌,全部为A型;才让周在等^[15]在青海省的病死牦牛体内也分离到多杀性巴氏杆菌A:L3型,可以发现多杀性巴氏杆菌的相关研究中,A型检出率越来越高,其他研究者的检测也均为A型^[6,16-17],经上述研究结果可以发现目前我国牛源溶血性曼氏杆菌主要流行情况以A1、A6为主,因此疫苗的研制仍需持续监测该菌的流行趋势;多杀性巴氏杆菌的流行趋势为A型,所以应该重视对多杀性巴氏杆菌A型相关疫苗的研制。

本研究中对溶血性曼氏杆菌及多杀性巴氏杆菌进行多位点序列分型,发现MLST分型结果单一,临床上认为其主要致病的作用的A1、A6型为ST1型,而健康牛携带的A2型为ST2型。相关研究表明,最常见的ST1型大多数分离株是从牛体中分离出来的,第二常见的ST2型主要是绵羊分离株^[18],这与本研究检测的Mh MLST分型结果一致;Hotchkiss等的研究表明,105株多杀性巴氏杆菌全部为ST1型^[19]。由此可发现Pm的MLST基因型为ST1型居多,这也与本研究的結果一致。

合理使用抗菌药物能够有效地预防和治疗疾病,结果表明溶血性曼氏杆菌对多种药物敏感,可以为临床治疗提供思路;邬琴等^[6]从患病牛中分离到的多杀性巴氏杆菌对复方新诺明的耐药率为44%,而马雪等^[8]对来自新疆不同地区的养殖场分离的多杀性巴氏杆菌对复方新

诺明耐药率达10%,对氯霉素耐药率为2.5%,对恩诺沙星及多西环素中介,中介率分别为10%和5%,对四环素、氟苯尼考和庆大霉素100%敏感,但是对氨苄西林敏感率仅有27.5%。本研究中的分离菌株对四环素、庆大霉素及氟苯尼考同样敏感,但对磺胺类药物表现为100%敏感,说明不同地区临床治疗时的用药习惯不同,菌株的耐药性也不相同,并且本试验中耐药表型的结果和耐药基因检测的结果有差异,考虑到菌株对抗生素的耐药性可能是多因素作用造成的结果,从而导致耐药表型与基因结果不同。

4 结论

本研究通过PCR技术对华中、华南、西南、西北等地区共16个地区的牛场进行牛呼吸疾病综合征主要细菌性病原的检测,得知其主要流行血清型;从阳性样品中分离到8株溶血性曼氏杆菌及21株多杀性巴氏杆菌,并对其生物学特性进行分析,发现其具有多种毒力基因,并且其不同血清型间耐药基因也具有差异。本研究为临床防治疾病提供了参考依据,并且分离菌株为该病主要流行的优势血清型,可用于下一步相关疫苗研制。

致谢

感谢天康制药股份有限公司及公司郝成武总监、贺笋主任及技术中心科研管理部韩瑞部长对本文中涉及的所有检测样本的采集、运输工作提供的支持与帮助。

REFERENCES

- [1] 刘晓丹. 六种牛源致病性细菌多重PCR检测方法的建立[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2013. LIU XD. Establishment of multiplex PCR detection methods for six pathogenic bacteria from cattle[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2013 (in Chinese).

- [2] HOLMAN DB, McALLISTER TA, TOPP E, WRIGHT AD G, ALEXANDER TW. The nasopharyngeal microbiota of feedlot cattle that develop bovine respiratory disease[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 180(1/2): 90-95.
- [3] ZHOU Y, SHAO Z, DAI G, LI X, XIANG Y, JIANG S, ZHANG Z, REN Y, ZHU Z, FAN C, ZHANG G. Pathogenic infection characteristics and risk factors for bovine respiratory disease complex based on the detection of lung pathogens in dead cattle in Northeast China[J]. *Journal of Dairy Science*, 2023, 106(1): 589-606.
- [4] GRISSETT GP, WHITE BJ, LARSON RL. Structured literature review of responses of cattle to viral and bacterial pathogens causing bovine respiratory disease complex[J]. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2015, 29(3): 770-780.
- [5] APLEY M. The clinical syndrome of BRD: what it is and what it is not[J]. *Animal Health Research Reviews*, 2014, 15(2): 135-137.
- [6] 邹琴, 张星星, 顾晓晓. 牛源多杀性巴氏杆菌血清分型及毒力相关基因的检测研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2020, 47(6): 1910-1920.
WU Q, ZHANG XX, GU XX. Studing on Serotyping and Detection of Virulence-associated Genes of *Pasteurella multocida* Isolated from Bovine[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2020, 47(6): 1910-1920 (in Chinese).
- [7] KLIMA CL, ZAHEER R, BRIGGS RE, McALLISTER TA. A multiplex PCR assay for molecular capsular serotyping of *Mannheimia haemolytica* serotypes 1, 2, and 6[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2017, 139: 155-160.
- [8] 马雪. 新疆地区牦牛呼吸道巴氏杆菌分子检测及分离株部分生物学特性研究[D]. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 2021.
MA X. Molecular detection of *Pasteurella multocida* in calf respiratory tract in Xinjiang and study on some biological characteristics of the isolated strain[D]. Shihezi: Master's Thesis of Shihezi University, 2021 (in Chinese).
- [9] ROLAND L, DRILLICH M, KLEIN-JÖBSTL D, IWERSEN M. Invited review: Influence of climatic conditions on the development, performance, and health of calves[J]. *Journal of Dairy Science*, 2016, 99(4): 2438-2452.
- [10] BUCHANAN RE, GIBBONS NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8版. 北京: 科学出版社, 1984.
BUCHANAN RE, GIBBONS NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [11] 闵聪聪, 候强强, 于凡淞, 项志杰, 陈颖钰, 胡长敏, 郭爱珍. 牛呼吸疾病综合征诊断方法的研究进展[J]. *华中农业大学学报*, 2023, 42(2): 17-23.
MIN CC, HOU QQ, YU FS, XIANG ZJ, CHEN YY, HU CM, GUO AZ. Research progress on diagnostic methods of bovine respiratory disease complex[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2023, 42(2): 17-23 (in Chinese).
- [12] 冉艾, 张斌, 岳华, 汤承. 肉牛溶血性曼氏杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2018, 40(4): 301-305.
RAN A, ZHANG B, YUE H, TANG C. Isolation, identification and antibiotics resistance analysis of *Mannheimia haemolytica* from beef cattle[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2018, 40(4): 301-305 (in Chinese).
- [13] 姜志刚, 李奕欣, 于力. 我国东北部分地区牛溶血性曼氏杆菌的分子流行病学研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42(6): 555-560.
JIANG ZG, LI YX, YU L. Study on molecular epidemiology of bovine *Mannheimia haemolytica* in parts of Northeast China[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 42(6): 555-560 (in Chinese).
- [14] 朱杰, 赵旭, 东笑, 骆建铨, 席俊程, 王贵平, 贾爱卿. 牛多杀性巴氏杆菌和溶血性曼氏杆菌的分离鉴定及致病力评估[J]. *中国兽医学报*, 2024, 44(1): 80-87.
ZHU J, ZHAO X, DONG X, LUO JH, XI JC, WANG GP, JIA AQ. Isolation, identification, and pathogenicity evaluation of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2024, 44(1): 80-87 (in Chinese).
- [15] 才让周在, 丁晓宇, 简莹娜, 李秀萍, 王光华, 王戈平, 胡勇, 马利青. 牦牛源多杀性巴氏杆菌分离鉴定与药敏试验[J]. *青海畜牧兽医杂志*, 2023, 53(3): 5-10.
CAI R, DING XY, JIAN YN, LI XP, WANG GH, WANG GP, HU Y, MA LQ. Isolation, identification and drug sensitivity test of *Pasteurella multocida* in yak[J]. *Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2023, 53(3): 5-10 (in Chinese).
- [16] 刘朋, 陈萌, 程子龙, 闫振贵, 刘思当. 奶牛荚膜血清 A 型巴氏杆菌的分离鉴定及致病性[J]. *中国兽医学报*, 2018, 38(8): 1548-1552.
LIU P, CHEN M, CHENG ZL, YAN ZG, LIU SD. Isolation, identification and pathogenicity of the serotype a *Pasteurella multocida* in cow[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2018, 38(8): 1548-1552 (in Chinese).
- [17] 杜英立, 吴翠兰, 陆震, 蓝金红, 曾令越, 龙爱淑, 李军, 彭昊. 牛 A 型多杀巴氏杆菌的分离鉴定[J]. *今日畜牧兽医*, 2021, 37(6): 5-6.
DU YL, WU CL, LU Z, LAN JH, ZENG LY, LONG AS, LI J, PENG H. Isolation and identification of *Pasteurella multocida* type A from cattle[J]. *Today Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2021, 37(6): 5-6 (in Chinese).
- [18] PETERSEN A, CHRISTENSEN H, KODJO A, WEISER GC, BISGAARD M. Development of a multilocus sequence typing (MLST) scheme for *Mannheimia haemolytica* and assessment of the population structure of isolates obtained from cattle and sheep[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2009, 9(4): 626-632.
- [19] HOTCHKISS EJ, HODGSON JC, SCHMITT-VAN de LEEMPUT E, DAGLEISH MP, ZADOKS RN. Molecular epidemiology of *Pasteurella multocida* in dairy and beef calves[J]. *Veterinary Microbiology*, 2011, 151(3/4): 329-335.