

李基棕,李文良,毛立,等. 1 株绵羊溶血性曼氏杆菌的分离鉴定及致病性研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(7):156-158.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.07.042

1 株绵羊溶血性曼氏杆菌的分离鉴定及致病性研究

李基棕,李文良,毛立,郝飞,杨蕾蕾,张纹纹,江杰元

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心,江苏南京 210014)

摘要:为确定导致绵羊细菌性感染死亡的病原,从送检病死绵羊肺脏中分离纯化出 1 株细菌,并对其进行培养特性观察、生化反应、PCR 鉴定、药敏试验和动物致病性试验。结果显示,分离纯化的细菌为革兰氏阴性短杆菌,经生化反应和 PCR 鉴定为溶血性曼氏杆菌;该细菌对庆大霉素、头孢噻肟高度敏感;对青霉素、四环素、红霉素、利福平、卡那霉素、恩诺沙星和大观霉素耐药;将 1×10^9 CFU/mL 菌液 10 倍系列稀释后感染 6~8 周龄小白鼠,该细菌对小白鼠的半数致死量为 $1 \times 10^{6.2}$ CFU/mL;死亡动物的剖检病变与发病绵羊类似,并从病变器官内分离到细菌。本研究为进一步探讨溶血性曼氏杆菌的致病机理奠定了基础。

关键词:绵羊;溶血性曼氏杆菌;分离鉴定;致病性

中图分类号: S855.1⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)07-0156-03

溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*, Mh)别称溶血性巴氏杆菌,该菌属于机会致病菌,可长期寄生于牛、绵羊、山羊等反刍动物及其他动物上呼吸道^[1-2]。当受到外界环境骤变、长途运输等刺激出现应激反应,动物机体抵抗力下降,病菌可趁机侵入从而致病,病毒和支原体感染如绵羊肺炎支原体、多杀性巴氏杆菌、副流感病毒等,可使得机体对溶血性曼氏杆菌更易感^[3-4]。它能够引起牛、羊肺炎,新生羔羊的急性败血症,给养牛业和养羊业带来较大的经济损失^[5]。

2015 年底,安徽宣城某养羊场发生疫情,死亡率达 10% 以上,发病羊主要表现为咳嗽、喘气、流鼻涕等呼吸道症状,剖检病变主要为肺脏出血、充血、水肿、实变。从发病羊肺脏中分离出 1 株菌株,通过生化鉴定和 PCR 鉴定,确定该分离株为溶血性曼氏杆菌。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

绵羊鲜血琼脂培养基、微量生化反应管、抗菌药物药敏纸片均购自浙江杭州微生物试剂公司;Taq DNA 聚合酶、dNTP、

DNA Marker 等均购自北京全氏金生物技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 试验动物

6~8 周龄 BALB/c 小鼠,购自扬州大学比较医学中心。

1.3 病原的分离

无菌采集绵羊肺脏组织块接种于鲜血琼脂平板上,培养 24 h 后,挑取单个菌落进行纯化。挑取纯化的菌落涂片进行革兰氏染色镜检。

1.4 生化试验

将纯化的菌落按照常规方法接种于葡萄糖、麦芽糖、甘露醇等生化鉴定管中,置于 37 ℃ 恒温培养箱中培养,观察其生化特性。

1.5 PCR 鉴定

参照 Alexander 等基于 *lkt* 基因设计的溶血性曼氏杆菌特异性引物(LktF:5'-GCAGGAGGTGATTATTAAGTGG-3'; LktR:CAGCAGTTATTGTCATACCTGAAC)^[4]进行 PCR 扩增,预期扩增片段大小为 206 bp。

以纯培养细菌的染色体 DNA 为模板,PCR 反应体系为 25 μL: Taq DNA 聚合酶 0.5 μL, DNA 模板 2 μL, 引物 P1、P2 各 1 μL, 10 × PCR buffer 2.5 μL, dNTPs 1 μL, 无菌水 18 μL。反应程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 35 个循环;72 ℃ 10 min。反应结束后取 PCR 产物于 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳检测。将目的片段切胶回收,并与 pMD19-T 载体连接,转化 DH5α 感受态细胞,经鉴定正确后送南京金斯瑞生物技术有限公司测序。

收稿日期:2016-02-19

基金资助:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(15)1007]。

作者简介:李基棕(1986—),男,湖南怀化人,博士,助理研究员,主要从事动物传染病防治和诊断技术研究。Tel:(025)84391152; E-mail:lijizong22@sina.com。

通信作者:江杰元,博士,研究员,主要从事动物疫病诊断技术研究。Tel:(025)84391135; E-mail:1776556843@qq.com。

- [9]刘宁,张权益,徐廷生,等. 发酵酶解豆粕对肉鸡生产性能和养分消化率的影响[J]. 中国畜牧兽医,2009,36(11):9-11.
- [10]付晓,马力周,于俊瑶,等. 不同微生物酶解和发酵豆粕对断奶仔猪生产性能和养分消化率的影响[J]. 中国饲料,2009(14):24-26.
- [11]冯杰,刘欣,卢亚萍,等. 微生物发酵豆粕对断奶仔猪生长、血清指标及肠道形态的影响[J]. 动物营养学报,2007,19(1):40-43.

- [12]Feng J, Liu X, Xu Z R, et al. Effects of aspergillus oryzae 3.042 fermented soybean meal on growth performance and plasma biochemical parameters in broilers[J]. Animal Feed Science and Technology, 2007,134(3/4):235-242.
- [13]刘海燕,闫晓刚,邱玉朗,等. 发酵酶解豆粕对小鼠血液抗氧化指标和胃肠道消化酶活性及肠道菌群的影响[J]. 中国畜牧杂志,2011,47(21):41-44.

1.6 耐药性试验

采用纸片扩散法进行药敏试验,将分离的溶血性曼氏杆菌均匀涂布于鲜血琼脂平板上,然后将药敏纸片紧贴于琼脂表面,37℃培养 24 h,测量抑菌圈直径。

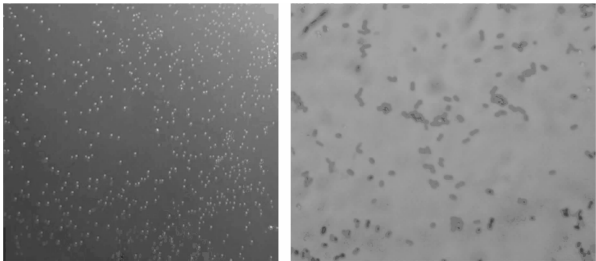
1.7 小鼠致病性试验

将分离纯化的菌株接种于含犊牛血清的 LB 液体培养基中,37℃培养 24 h,取菌液 10 倍系列稀释,进行活菌平板计数。取小鼠 30 只,随机分为 6 组,将计数后的菌液进行腹腔注射,菌液(10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 CFU/mL)0.2 mL/只,测定其致病性。对照组注射等量的培养基。对死亡小鼠进行剖检,观察组织病变,同时采集肺、脾、肝进行细菌分离培养。

2 结果与分析

2.1 细菌的分离培养

病原菌在绵羊鲜血琼脂平板上培养 24 h 后,形成圆形、光滑、湿润、半透明、不溶血的小菌落。革兰氏染色呈短小、多个的阴性菌(图 1)。



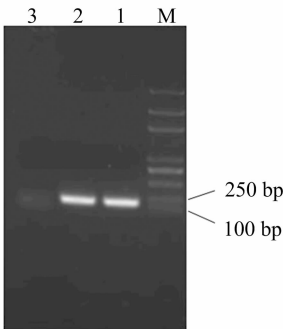
A. 菌落形态 B. 革兰氏染色
图1 分离细菌的形态学观察

2.2 生化鉴定

该菌可发酵葡萄糖、麦芽糖、鼠李糖、L-阿拉伯糖、甘露醇,不发酵乳糖、吡啶、甘露糖,符合曼氏杆菌生化特性。

2.3 PCR 鉴定

将分离的病原菌进行 PCR 扩增,得到与预期结果相符合的 206 bp 的特异性核酸片段(图 2)。测序结果表明,该分离株与 GenBank 中登录的 AF314503、M24179、M20730、AF314512、AF314520、AF314522、AS314519、AF314518、AY425280、AF314517、AF314521、AF314506 同源性较高,均在 94% 以上。进化树分析发现,该毒株与 AF314503、M24179、M20730 亲缘关系最近,共同组成 1 组微小分支(图 3)。



M—DNA 分子质量标准; 1—阳性对照;
2—分离株的 PCR 产物; 3—阴性对照

图2 溶血性曼氏杆菌分离株 *hlyA* 基因的 PCR 扩增

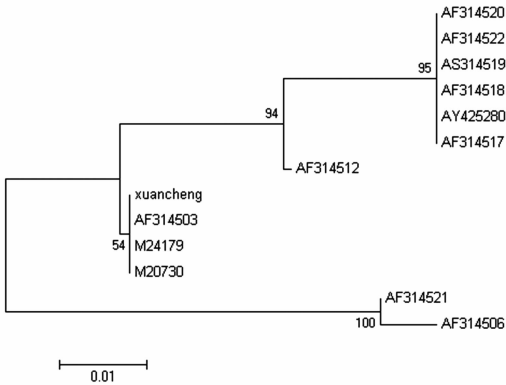


图3 溶血性曼氏杆菌分离株 *hlyA* 基因的进化分析

2.4 药敏试验

对分离到的菌株进行药敏试验,结果表明,该细菌仅对庆大霉素和头孢噻肟高度敏感;对链霉素、阿奇霉素、头孢曲松和氨苄西林中度敏感;对青霉素、四环素、红霉素、利福平、卡那霉素、恩诺沙星和大观霉素不敏感(表 1)。

表 1 溶血性曼氏杆菌分离株药敏试验结果

药物	抑菌圈大小 (mm)	敏感性
青霉素	0	R
链霉素	13	M
四环素	6	R
红霉素	10	R
利福平	12	R
阿奇霉素	15	M
氨苄西林	12	M
庆大霉素	15	S
头孢噻肟	20	S
卡那霉素	12	R
头孢曲松	16	M
恩诺沙星	14	R
大观霉素	12	R

注:R 表示耐药,S 表示高度敏感,M 表示中度敏感。

2.5 致病性试验

过夜培养的细菌经平板计数,菌液细菌数为 1×10^9 CFU/mL,取菌液 10 倍系列稀释腹腔接种小鼠,6 h 后 10^8 、 10^7 CFU/mL 剂量组均有不同程度的发病,12 h 后除 10^5 、 10^4 CFU/mL 组外均出现死亡,对照组小鼠未见异常(表 2)。因此,该分离菌对 6~8 周龄 BALB/c 小鼠的 LD_{50} 为 $10^{6.2}$ CFU/mL。

表 2 不同稀释度溶血性曼氏杆菌的致病性试验

试验动物	不同稀释度的致死数					LD_{50} (CFU/mL)
	10	10^2	10^3	10^4	10^5	
试验鼠	5/5	5/5	3/5	0/5	0/5	$10^{6.2}$

3 讨论

溶血性曼氏杆菌是牛和羊鼻咽部的共生菌,主要引起肺炎、新生羔羊败血症、羊乳腺炎等,也是犊牛“船运热”的主要病原。目前,该病原流行较广,Shanthalingam 等从 40 份发病羊肺脏中分离到 8 株溶血性曼氏杆菌^[6];冯旭飞等对四川地

区临床采集的 120 份肺组织和鼻拭子进行检测,结果检出率达 51.67%^[7];李娟等、徐慧等和李雪霞等分别证实了该病原在江苏、新疆和云南地区的流行^[5,9-10]。

本研究从发病羊肺脏中分离并纯化细菌,经菌落形态、生化特征和 PCR 鉴定,最终确定其为溶血性曼氏杆菌。综合临床症状、染色镜检可以有效缩小病原菌范围,结合 PCR 和测序鉴定,能够更加准确地确定该病原。致病性结果表明,10⁸、10⁷ CFU/mL 剂量组感染小白鼠后,6 h 出现不同程度发病症状,表现为精神沉郁、食欲废绝等,12 h 相继出现死亡,而对照组未见异常。死亡小鼠的剖检病变为肺脏充血,肝脏和脾脏肿大等,从死亡小鼠脏器中分离出与感染菌株形态特征一致的菌株。

抗生素的使用是养殖户预防和治疗疾病的重要手段,细菌的耐药性是困扰养殖户的一大难题。本研究的试验结果表明,溶血性曼氏杆菌对庆大霉素和头孢噻肟高度敏感;对青霉素、四环素、红霉素、利福平、卡那霉素、恩诺沙星和大观霉素等药物产生了耐药性,与冯旭飞等^[6]、Katsuda 等^[11]和 Lubbers 等^[12]报道不尽相同,说明不同地域分离株耐药性存在一定差异。该试验结果也为发病羊群正确合理用药提供参考。

目前,疫苗免疫是控制溶血性曼氏杆菌病的重要措施之一,由于各血清型之间交叉免疫保护性较低,疫苗的免疫谱窄,以至于本病未能得到有效的控制。因此,有待于研发预防溶血性曼氏杆菌病更佳的疫苗^[13-14]。

参考文献:

- [1] Rice J A, Carrasco - Medina L C, Hodgins D C, et al. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease [J]. *Animal Health Research Reviews*, 2008, 8(2): 117 - 128.
- [2] 陈艳红, 颜 忠, 查振林, 等. 溶血性曼氏杆菌致病机制的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(12): 153 - 155.
- [3] 韩猛立, 康立超, 钟发刚, 等. 细菌性牛呼吸道疾病的研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(5): 165 - 172.
- [4] Alexander T W, Cook S R, Yanke L J, et al. A multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosidal* and *Mannheimia ruminalis* [J]. *Veterinary Microbiology*, 2008, 130(1/2): 165 - 175.
- [5] 李 娟, 刘 阳, 彭欠欠, 等. 羊溶血性曼氏杆菌的分离与鉴定[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2013(20): 96 - 97.
- [6] Shanthalingam S, Goldy A, Bavananthasivam J, et al. PCR assay detects *Mannheimia haemolytica* in culture - negative pneumonic lung tissues of bighorn sheep (*Ovis canadensis*) from outbreaks in the western USA, 2009 - 2010 [J]. *Journal of Wildlife Diseases*, 2014, 50(1): 1 - 10.
- [7] 冯旭飞, 刀筱芳, 王志敏, 等. 绵羊肺脏中溶血性曼氏杆菌的分离鉴定及其药物敏感性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2014, 41(8): 224 - 228.
- [8] 冯旭飞, 刀筱芳, 李定菲, 等. 溶血性曼氏杆菌和多杀性巴氏杆菌双重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国兽医科学*, 2014, 44(6): 624 - 629.
- [9] 徐 慧, 贺云霞, 龚玉梅, 等. 溶血性曼氏杆菌的分离鉴定[J]. *黑龙江畜牧兽医(科技版)*, 2009(12): 97 - 98.
- [10] 李雪霞, 李富祥, 赵文华, 等. 云南羊溶血性曼氏杆菌的分离鉴定及药敏试验[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2014(1): 36 - 38.
- [11] Katsuda K, Kohmoto M, Mikami O. Relationship between serotype and the antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolates collected between 1991 and 2010 [J]. *Research in Veterinary Science*, 2013, 94(2): 205 - 208.
- [12] Lubbers B, Hanzlicek G. Antimicrobial multidrug resistance and coresistance patterns of *Mannheimia haemolytica* isolated from bovine respiratory disease cases—a three - year (2009—2011) retrospective analysis [J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2013, 25(3): 413 - 417.
- [13] Ayalew S, Confer A, Hartson S, et al. Immunoproteomic analyses of outer membrane proteins of *Mannheimia haemolytica* and identification of potential vaccine candidates[J]. *Proteomics*, 2010, 10(11): 2151 - 2164.
- [14] Confer A, Ayalew S, Panciera R, et al. Recombinant *Mannheimia haemolytica* serotype 1 outer membrane protein PlpE enhances commercial *M. haemolytica* vaccine - induced resistance against serotype 6 challenge[J]. *Vaccine*, 2006, 24(13): 2248 - 2255.
- [15] 史学波, 苏成石. 黑山县小反刍兽疫科学防控体会[J]. *畜牧兽医科技信息*, 2014(10): 63 - 64.
- [16] 张 兵. 依法处置一起输入性小反刍兽疫疫情[J]. *广西畜牧兽医*, 2014, 30(5): 276 - 277.
- [17] 刘玉洪, 徐自忠, 花群义, 等. 小反刍兽疫病毒分子生物学研究进展[J]. *动物医学进展*, 2006, 27(12): 1 - 6.
- [18] 南文金, 王清华, 赵永刚, 等. 携带小反刍兽疫病毒 *H* 基因的重组山羊痘病毒构建和鉴定[J]. *中国动物检疫*, 2011, 28(7): 33 - 35.
- [19] Mcginnes L W, Morrison T G. Disulfide bond formation is a determinant of glycosylation site usage in the hemagglutinin - neuraminidase glycoprotein of Newcastle disease virus[J]. *Journal of Virology*, 1997, 71(4): 3083 - 3089.
- [20] Kwiatek O, Minet C, Grillet C, et al. Peste des petits ruminants (PPR) outbreak in Tajikistan [J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2007, 136(2/3): 111 - 119.
- [21] 刘永宏, 曹胜波, 赵 丽, 等. 中国小反刍兽疫疫情分析[J]. *西北农业学报*, 2014, 23(9): 19 - 26.
- [22] 中华人民共和国农业部. 农业部办公厅关于推进做好小反刍兽疫防控工作的通知[EB/OL]. (2014 - 04 - 10) [2016 - 03 - 10]. http://www.moa.gov.cn/govpublic/SYJ/201404/t20140411_3847701.htm.
- [23] EFSA Panel on Animal Health and Welfare. Scientific opinion on peste des petits ruminants[J]. *EFSA Journal*, 2015, 13(1): 3985.

(上接第 152 页)