

石田, 韩生义, 章石楠, 等. 青海牧区不同动物源多杀性巴氏杆菌的生物学特性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (8): 94–105.

SHI T, HAN S Y, ZHANG S N, et al. Analysis of partial biological characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from different animals in the Qinghai pastoral area [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (8): 94–105.

青海牧区不同动物源多杀性巴氏杆菌的生物学特性分析

石田^{1,2,3}, 韩生义^{2,3}, 章石楠^{1,2,3}, 周雯雯^{1,2,3}, 李玲霞^{1,3},
胡国元^{2,3}, 李淑萍^{2,3}, 李生庆^{2,3*}

(1. 青海大学农牧学院, 青海 西宁 810016;

2. 青海大学畜牧兽医科学院, 青海 西宁 810016;

3. 青海省动物疾病病原诊断与绿色防控技术研究重点实验室, 青海 西宁 810016)

摘要: 为了探讨动物巴氏杆菌病的治疗药物及发病机制, 对来自青海牧区牦牛、藏羊、马中分离得到的 11 株多杀性巴氏杆菌进行血清型和多位点序列分型 (MLST) 鉴定, 以及毒力基因和耐药基因检测、耐药性分析、小鼠致病性试验等。结果: 牦牛源多杀性巴氏杆菌的血清分型主要是 B; L2 型, MLST 分型主要是 ST122; 藏羊源多杀性巴氏杆菌血清型为 D; L6 型, MLST 分型为 ST59; 马源多杀性巴氏杆菌血清型为 B; L2 型, MLST 分型为 ST122; 毒力基因和耐药基因检测结果显示, 11 株多杀性巴氏杆菌共同携带的毒力基因为超氧化物歧化酶 A (*sodA*)、超氧化物歧化酶 C (*sodC*)、外膜蛋白 A (*ompA*)、丝状血凝素同源蛋白 2 (*hsf-2*)、外膜蛋白 87 (*oma87*)、血红蛋白结合蛋白 A (*hgbA*)、铁摄取调节蛋白 (*Fur*) 基因, 共同携带的耐药基因为核糖体蛋白 S12 (*rpsL*) 和 16S rRNA (*rrs*) 基因; 药敏试验显示, 分离菌株对诺氟沙星、多西环素、氨苄西林等药物敏感; 小鼠致病性试验结果显示, 分离菌株具有较强的致病性, 且脾脏、肝脏触片镜检见大量的多杀性巴氏杆菌。综上, 本研究为青海牧区牦牛、藏羊巴氏杆菌病的防控、发病机制探讨及后续亚单位疫苗的开发奠定了基础。

关键词: 多杀性巴氏杆菌; 毒力基因; 荚膜血清型; MLST 分型

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2026)08-0094-12

Analysis of partial biological characteristics of *Pasteurella multocida* isolated from different animals in the Qinghai pastoral area

SHI Tian^{1,2,3}, HAN Shengyi^{2,3}, ZHANG Shinan^{1,2,3}, ZHOU Wenwen^{1,2,3}, LI Lingxia^{1,3},
HU Guoyuan^{2,3}, LI Shuping^{2,3}, LI Shengqing^{2,3*}

(1. College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, China;

2. College of Animal Husbandry and Veterinary Science, Qinghai University, Xining 810016, China;

3. Qinghai Province Key Laboratory of Pathogen Diagnosis of Animal Diseases and Research on Green Prevention and Control Technology, Xining 810016, China)

Abstract: In this study, 11 strains of *Pasteurella multocida* isolated from yaks, Tibetan sheep and horses in the Qinghai pastoral areas were analyzed by serotyping and multilocus sequence typing (MLST), as well as virulence gene carriage, resistance gene detection, drug resistance analysis and mouse pathogenicity. The results showed that there were differences in the capsular serotypes, lipopolysaccharide serotypes and MLST typing of *Pasteurella multocida* isolated from the different sources. Among them, the serotypes of *Pasteurella multocida* from the yak source were mainly B; L2 and MLST were mainly ST122; the serotypes of *Pasteurella multocida* from Tibetan sheep source were D; L6 and MLST were ST59; the serotypes of *Pasteurella multocida* from horse source were B; L2, and MLST was ST122. The results of virulence and resistance gene testing showed that the 11 strains of *Pasteurella multocida* shared the following virulence genes: Superoxide dismutase A (*sodA*), superoxide dismutase C (*sodC*), outer membrane protein A (*ompA*), hemagglutinin-like protein 2 (*hsf-2*), outer membrane protein 87 (*oma87*), hemoglobin-binding protein A (*hgbA*), iron regulation protein (*Fur*), and the following resistance genes: the ribosomal protein S12 gene (*rpsL*) and the 16S rRNA gene (*rrs*). The drug sensitivity test showed that the isolated strains were sensitive to the drugs

收稿日期: 2025-07-04; 修回日期: 2026-06-12

基金项目: 青海省动物疫病诊断与检测创新服务中心建设项目 (2024ZY014)

第一作者: 石田, 女, 苗族, 硕士研究生

* 通信作者: 李生庆, 研究员, 研究方向为动物疫病诊断与防治, E-mail: lsq8008@163.com。

of norfloxacin, doxycycline and ampicillin. The results of the pathogenicity test in mice showed that the isolated strain possessed strong pathogenicity, and that a large number of *Pasteurella multocida* was seen in the field of view of spleen and liver by microscopy. This study laid a valuable foundation for prevention and control of *Pasteurella multocida* in yak, Tibetan sheep and other leading breeding industries in Qinghai pastoral areas, and for exploration of the pathogenesis and subsequent development of effective subunit vaccines.

Keywords: *Pasteurella multocida*; virulence genes; capsular serotypes; MLST typing

多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*) 是属于巴氏杆菌科巴氏杆菌属的一种革兰阴性非运动和无芽胞的小杆菌^[1]。巴氏杆菌属在动物种群中非常普遍,通常作为口腔、鼻咽和上呼吸道正常微生物群存在^[2]。多杀性巴氏杆菌是一种重要的人畜共患病原,可在多种家畜和野生动物中定殖并引起感染,在家禽、水禽、羊、兔、牛、牦牛、绵羊、猫、犬以及人类上均有相关报道^[3]。不同动物感染多杀性巴氏杆菌后引发的疾病不同,例如,家禽和其他鸟类的禽霍乱^[4-5],羊的进行性萎缩性鼻炎和肺炎^[6],牛的出血性败血症和牛呼吸道疾病^[7],兔的出血性败血症^[8]等。多杀性巴氏杆菌的血清型分为荚膜血清型和脂多糖 (LPS) 血清型,目前按照荚膜抗原将其分为 A、B、D、E、F 这 5 个荚膜血清型, LPS 分为 16 种血清型和 8 种不同的基因型^[9]。对多杀性巴氏杆菌的流行病学研究应考虑血清分型的因素。有研究证明,动物所患疾病与荚膜血清型具有关联性,例如 A 型主要引起禽霍乱以及猪肺疫, B 型主要引发牛、猪、羊、鹿、骆驼、马等的出血性败血症, D 型和 E 型主要引发猪、牛、羊、兔的肺炎和败血症, D 型主要引发猪的萎缩性鼻炎^[9-10]。因此,检测菌株的荚膜血清型对于后续疾病的治疗至关重要。近年来,在青藏高原地区关于多杀性巴氏杆菌的病例逐渐增多,牦牛感染该菌会导致呼吸系统疾病及牛出血性败血症。该病发病无明显季节性,但在高原地区以夏、秋季节较常见,不同品种、年龄、性别的牛均可感染发病,病牛以肺炎、高热或急性胃肠炎以及全身内脏器官广泛性出血为主要特征^[11]。

本研究通过从牦牛、藏羊、马分离的多杀性巴氏杆菌进行分型分析,并对不同源菌株的毒力基因、耐药基因及耐药性进行调查,为后续巴氏杆菌病的治疗、发病机制探讨及亚单位疫苗的研制提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 样品及菌株来源

2 份肺组织病料采集于青海省都兰县发病牦牛; 9 株疑似多杀性巴氏杆菌 (马源 1 株, 藏羊源 1 株, 牦牛源 7 株) 由青海省动物疾病病原诊断与绿色防

控技术研究重点实验室分离并保存。

1.2 主要试剂

LB 琼脂培养基、LB 肉汤、马丁肉汤、胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB)、小牛血清等, 购自北京索莱宝科技有限公司; 血平板培养基, 购自青岛海博生物科技有限公司; 2×*Taq* Master Mix、DNA Marker 购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; PCR 扩增引物由西安擎科生物股份有限公司合成; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 抗生素药敏片, 购自上海士锋生物科技有限公司。

1.3 实验动物

昆明小鼠, 16~18 g, 雄性, 购自中国农业科学院兰州兽医研究所实验动物中心 (生产许可证号: SCXK (甘) 2020-0002)。本试验方案经青海省畜牧兽医科学院实验动物伦理委员会批准 (2025-QHMKY-014)。

1.4 菌株的分离镜检

在生物安全柜中将采集的肺部病料用无菌接种环划线接种于血平板培养基以及 LB 固体培养基, 37 °C 培养 18~24 h; 同时对保存于本实验室的 9 株多杀性巴氏杆菌菌株进行复苏, 复苏后划线接种于血平板培养基以及 LB 固体培养基, 37 °C 培养 18~24 h; 挑取血平板培养基和 LB 固体培养基上的单个菌落进行革兰染色镜检。

1.5 菌株 PCR 鉴定

参照 NCBI 上传的基因序列和文献 [9] 设计并合成 16S rDNA 通用引物和多杀性巴氏杆菌特异性基因 *Kmt1* 引物 (表 1), 提取分离纯化后的菌株 DNA 作为模板。PCR 反应体系 (50 μL): 上下游引物各 1 μL, 菌株 DNA 模板 2 μL, 2×*Taq* Master Mix 25 μL, ddH₂O 21 μL。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 进行 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 并送西安擎科生物股份有限公司进行测序, 测序结果与 NCBI 的 GenBank 已知序列进行比对分析, 通过 MEGA 11 软件构建 NJ 系统发育树, 确定菌种信息。

表 1 引物信息

基因名称	引物序列（5′→3′）	长度/bp	退火温度/℃
16S rDNA	F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 450	56
	R: GGTTACCTTGTTACGACTT		
<i>KmtI</i> ^[9]	F: ATCCGCTATTTACCCAGTGG	460	55
	R: GCTGTAAACGAACTCGCCAC		

1.6 菌株的荚膜血清型和 LPS 血清型鉴定

对鉴定为多杀性巴氏杆菌的菌株，采用 PCR 体外扩增法对其荚膜血清型和 LPS 血清型进行鉴定，引物信息见表 2^[9]。

PCR 反应体系同 1.5。PCR 扩增条件：94 ℃预

变性 5 min；94 ℃变性 50 s，退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，进行 32 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 1.0%琼脂糖凝胶电泳进行检测，并送西安擎科生物股份有限公司进行测序，测序结果与 NCBI 已知序列进行比对分析。

表 2 荚膜血清型和 LPS 血清型引物信息^[9]

名称	序列（5′→3′）	片段长度/bp	退火温度/℃
荚膜血清型	A F: GATGCCAAAATCGCAGTCAG R: TGTTGCCATCATTTGTCAGTG	1 044	55
	B F: CATTTATCCAAGCTCCACC R: GCCCGAGAGTTTCAATCC	760	
	D F: TTACAAAAAGAAAGACTAGGAGCCCC R: CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657	
	E F: TCCGCAGAAAATTATTGACTC R: GCTTGCTGCTTGATTTTGTGTC	511	
	F F: TCGGAGAACGCAGAAATCAG R: TTCCGCCGTCAATTACTCTG	851	
	L1 F: ATTGGAGCACCTAGTAACCC R: ACATTCCAGATAATACACCCG	1 307	
LPS 血清型	L2 F: TTTGATTTCCCTTGGGATAGC R: CTTAAAGTAACACTCGCTATTGC	810	55
	L3 F: CAAAGATTGGTTCCAAATCTGAATGGA R: TGCAGGCGAGAGTTGATAAACCATC	474	
	L4 F: CTTTATTTGGTCTTTATATATACC R: TTTCCATAGATTAGCAATGCCG	550	
	L5 F: CAATCCTCGTAAGACCCCC R: AGATTGCATGGCGAAATGGC	1 175	
	L6 F: AATGAAGGTTTAAAAAGAGATAGCTGGAG R: TCTTTATAATTATACTCTCCCAAGG	668	
	L7 F: CTAATATATAAACCATCCAACGC R: CCTATATTTATATCTCCTCCCC	931	
	L8 F: TCCTGGTTCATATATAGGTAGG R: GAGAGTTACAAAAATGATCGGC	255	

1.7 多位点序列分型（MLST）

用已提取的多杀性巴氏杆菌基因组，采用体外 PCR 扩增方法，对 7 种管家基因进行扩增，引物见表 3^[1-12]。PCR 反应体系同 1.5。PCR 扩增条件：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 30 s，退火 30 s，72 ℃

延伸 30 s，进行 30 个循环；最后 72 ℃延伸 7 min。PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测，并送西安擎科生物股份有限公司进行测序，测序上传 pubMLST 进行比对组装分析，确定菌株的序列型（ST）。

表 3 MLST 分型 7 种管家基因引物信息^[1-12]

基因名称	引物序列（5'→3'）	片段长度/bp	退火温度/℃
谷氨酸脱氢酶基因（ <i>gdh</i> ）	F：ATCGACTTCTTCGCAGACC	702	58
	R：GCGGGTGATATTGGTGTAGG		
苹果酸脱氢酶基因（ <i>mdh</i> ）	F：ATTTCGGGATCAGGGTTAGC	620	
	R：GGAAAACCGTAATGGAAGG		
磷酸葡萄糖异构酶基因（ <i>pgi</i> ）	F：ACCACGCTATTTTGGTTGC	784	
	R：ATGGCACAACCTCTTTCACC		
葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因（ <i>zwf</i> ）	F：TGTTAGGTGTGGCAAGAACG	614	48
	R：TTGCAACAAATGGTTTGG A		
腺苷激酶基因（ <i>adk</i> ）	F：TTTTTCGTCCCGTCTAAGC	570	
	R：GGGGAAGGGACACAAGC		
酯酶基因（ <i>est</i> ）	F：TCTGGCAAAAGATGTTGTCG	641	
	R：CCAAATTCCTTGGTTGGTTGG		
6-磷酸甘露糖异构酶基因（ <i>pmi</i> ）	F：TGCCTTGAGACAGGTAAGC	739	
	R：GCCTTAACAAGTCCCATTCCG		

1.8 菌株的致病性试验及脏器镜检

选取新分离的编号为 Pm1、Pm2 的 2 株菌进行小鼠攻毒试验。将 25 只小鼠平均分为 5 组，包括 4 个试验组和 1 个对照组，每组 5 只。将分离菌株扩大培养后，稀释菌液浓度至 0.2×10² CFU/mL、0.4×10² CFU/mL，试验组 1 和 2 对每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 不同浓度的 Pm1 菌悬液，试验组 3 和 4 对每只小鼠腹腔注射 0.2 mL 不同浓度的 Pm2 菌悬液，对照组小鼠腹腔注射 0.2 mL 生理盐水。观察 3 d 内小鼠状况，记录小鼠的死亡情况。采集死亡小鼠的肝脏和脾脏触

片并进行瑞氏染色镜检。

1.9 菌株的毒力相关基因检测

根据文献 [1-9] 和 NCBI 数据库基因序列设计毒力基因扩增引物，序列见表 4。PCR 反应体系（25 μL）：上下游引物各 0.5 μL，菌株 DNA 模板 1 μL，2×*Taq* Master Mix 12.5 μL，ddH₂O 10.5 μL。PCR 扩增条件：95 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 50 s，退火 30 s，72 ℃延伸 1min，进行 32 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 4 毒力相关基因引物信息^[1-9]

基因名称	引物序列（5'→3'）	片段长度/bp	退火温度/℃
σ 因子（ <i>rpoE</i> ）	F：ATGGCTGAACAGCTAACA	576	58
	R：TTAACGTTGCAACATAG		
菌毛结构蛋白（ <i>ptfA</i> ）	F：TGTGGAATTCAGCATTTTACTGTGTC	488	
	R：TCATGAATTCCTATGCGCAAAATCCTGCTGG		
菌毛蛋白 A（ <i>fimA</i> ）	F：CCATCGGATCTAAACGACCTA	866	
	R：AGTATTAGTTCCTGCGGGTG		
丝状血凝素同源蛋白 1（ <i>hsf-1</i> ）	F：TTGAGTCGGCTGTAGAGTTCCG	654	
	R：ACTCTTTAGCAGTG GGGACAACCTC		
丝状血凝素同源蛋白 2（ <i>hsf-2</i> ）	F：ACCGCAACCATGCTCTTAC	433	56
	R：TGACTGACATCGGCGGTAC		
丝状血凝素 A（ <i>pfhA</i> ）	F：TTCAGAGGGATCAATCTTCG	286	
	R：AACTCCAGTTGGTTTGTCG		
紧密黏附菌毛合成蛋白 D（ <i>tadD</i> ）	F：TCTACCCATTCTCAGCAAGGC	416	
	R：ATCATTTGCGGCATTACCC		
多杀性巴氏杆菌毒素（ <i>toxA</i> ）	F：CTTAGATGAGCGACAAGG	864	
	R：GAATGCCACACCTCTATAG		

续表4			
基因名称	引物序列（5′→3′）	片段长度/bp	退火温度/℃
超氧化物歧化酶 A（ <i>sodA</i> ）	F：TACCAGAATTAGGCTACGC R：GAAACGGGTTGCTGCCGCT	361	
超氧化物歧化酶 C（ <i>sodC</i> ）	F：AGTTAGTAGCGGGGTTGGCA R：TGCTGCTGGGTGATCATCATG	235	
外膜蛋白 A（ <i>ompA</i> ）	F：CGCATAGCACTCAAGTTTCTCC R：CATAAACAGATTGACCGAAACG	201	
外膜蛋白 A（ <i>ompH</i> ）	F：CGCGTATGAAGGTTTAGGT R：TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC	438	
外膜蛋白 87（ <i>oma87</i> ）	F：GGCAGCGAGCAACAGATAACG R：TGTTCTGTCAAATGTCGGGTGA	838	
脂蛋白 B（ <i>plpB</i> ）	F：TTTGGTGCTGCGTATGTCTTCT R：AGTCACTTTAGATTGTGCCTAG	282	
透明质酸合酶（ <i>pmHAS</i> ）	F：TCAATGTTTGCGATAGTCCGTTAG R：TGGCGAATGATCGGTGATAGA	430	
铁摄取蛋白（ <i>BexbB</i> ）	F：TTGGCTTGTGATTGAACGC R：TGCAGGAATGGCGACTAAA	283	56
铁摄取蛋白 D 基因（ <i>exbD</i> ）	F：CGTTCTGATTACAGCCTCTT R：AACGAAATCTTGGAACTGG	247	
TonB 转运蛋白（ <i>tonB</i> ）	F：CGACGGTGAACCTGAGCCA R：CCGAGCGATAAGCATTGACT	261	
血红蛋白结合蛋白 A（ <i>hgbA</i> ）	F：TCAACGGCAGATAATCAGGG R：GCGGGAATGCTGAAGATAAG	267	
血红蛋白结合蛋白 B（ <i>hgbB</i> ）	F：ACCGCGTTGGAATTATGATTG R：CATTGAGTACGGCTTGACAT	788	
铁摄取调节蛋白（ <i>Fur</i> ）	F：GTTTACCGTGTATTAGACCA R：CATTACTACATTTGCCATAC	244	
神经氨酸酶 B（ <i>nanB</i> ）	F：CATTGCACCTAACACCTCT R：GGACACTGATTGCCCTGAA	555	
神经氨酸酶 H（ <i>nanH</i> ）	F：GTGGGAACGGGAATTGTGA R：ACATGCCAAGTTTGCCCTA	287	

1.10 菌株的耐药基因检测

根据文献 [1-9] 和 NCBI 数据库基因序列设计

耐药基因，扩增引物序列见表 5。PCR 反应体系和扩

增条件同 1.9，PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表 5 耐药基因引物信息^[1-9]

基因名称	引物序列	片段长度/bp	退火温度/℃
链霉素耐药基因 A（ <i>strA</i> ）	F：GGTGAATCGCATTCTGACTGCT R：CCAAGTCAGAGGGTCCAATCG	774	
链霉素耐药基因 B（ <i>strB</i> ）	F：GCGTTGCTCCTCTTCTCCAT R：ACCTTTTCCAGCCTCGTTTG	723	56
核糖体蛋白 S5 基因（ <i>rpsE</i> ）	F：TGAGCTTTACTGCATTAACCTG R：TACCCCAAGATTTCATCAAC	409	
核糖体蛋白 S12 基因（ <i>rpsL</i> ）	F：GGCAACTATCAACCAGCTAGTA R：TTTAGAACGACCTTGTTCACGA	350	58
磺胺耐药基因 1（ <i>sulI</i> ）	F：GGCTGGTGGTTATGCACTCA R：CGAGACCAATAGCGGAAGC	263	62

续表5

基因名称	引物序列	片段长度/bp	退火温度/℃
磺胺耐药基因 2 (<i>sul2</i>)	F: CGGCATCGTCAACATAACCT R: TGTGCGGATGAAGTCAGCTC	721	56
磺胺耐药基因 3 (<i>sul3</i>)	F: GAGCAAGATTTTTGGAATCG R: CATCTGCAGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA	880	
16S 核糖体 RNA 基因 (<i>rrs</i>)	F: CTTAACACATGCAAGTCGAACG R: TCTGATTTGCGATTACTAGCGA	1 456	
林可酰胺类耐药基因 A (<i>lunA</i>)	F: GATATAGATTTTGACGCTCAACACACT R: GTCTGTTTCTGTAAATCATAACCAGAAT	309	
林可酰胺类耐药基因 B (<i>lunB</i>)	F: GAATCTTACTGAGTCAGATGAACGAAT R: GCCATACGTATAAGTTGTAGTGTAT	531	
林可酰胺类耐药基因 C (<i>lunC</i>)	F: GCAATAGATGCGGAGATTAAAGT R: GATATGAAGTGTCTCACACAATAACT	432	56
林可酰胺类耐药基因 D (<i>lunD</i>)	F: GAGATTGACATTTGGCTAGATGGT R: GCATAATAACCTTACGTCATGAACAT	405	
林可酰胺类耐药基因 E (<i>lunE</i>)	F: GAGAGAACACAGAGACATAGATATCGAT R: GACCTTCTTTCTTAACTTGATTTATTGACT	380	56
林可酰胺类耐药基因 G (<i>lunG</i>)	F: GTCCAGTCAGATGAACGAATATCT R: GAGAAGCAAAGAGTTCTTATAGGCT	669	
林可酰胺类耐药基因 P (<i>lunP</i>)	F: GAAACACGTCAGCATAATGACAT R: GAATATCACTTTCTCCAAATTCATACCCT	331	
林可酰胺类耐药基因 F (<i>lunF</i>)	F: GATCGAACGCTTCAAGGAAGCT R: GCCAGGTAGCGATTATACGAGTCCT	630	62
ROB-1 型 β-内酰胺酶基因 (<i>blaROB-1</i>)	F: CATTAAACGGCTTGTTTCGC R: CTTGCTTTGCTGCATCTTC	852	56
OXA-1 型 β-内酰胺酶基因 (<i>blaOXA-1</i>)	F: GCAGCGCCAGTGCATCAAC R: CCGCATCAAATGCCATAAGTG	198	
SHV 型 β-内酰胺酶基因 (<i>blaSHV</i>)	F: TCGCCTGTGTATTATCTCCC R: CGCAGATAAAATCACCACAATG	768	
CMY-2 型 β-内酰胺酶基因 (<i>blaCMY-2</i>)	F: GACAGCCTCTTTCTCCACA R: TGGAAACGAAGGCTACGTA	1 000	
TEM 型 β-内酰胺酶基因 (<i>861 blaTEM</i>)	F: ATGAGTATTCAACATTTCCGTG R: TTACCAATGCTTATTCAGTGAG	861	

1.11 药敏试验

用 K-B 纸片扩散法^[13]，选取临床常用的氨苄西林、卡那霉素、克林霉素等 15 种抗生素药物对多杀性巴氏杆菌分离菌株进行药物敏感性测定。取 200 μL 新鲜菌液均匀涂布于 TSA 培养基，待培养基表面菌液干燥后使用无菌镊子夹取药敏试纸片贴于培养基，37 ℃ 培养 24 h 后测量抑菌圈直径大小，依照美国临床和实验室标准化协会（CLSI）制定的药敏标准判定该分离株对不同药物的敏感性。

2 结果与分析

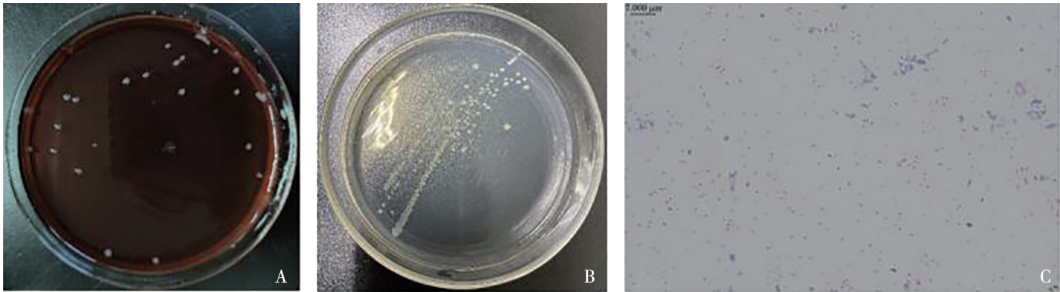
2.1 菌株分离培养及染色镜检

病料经分离培养，得到疑似多杀性巴氏杆菌 2 株；菌株在血平板培养基上呈淡灰色、圆形、湿润、

露珠样小菌落，无溶血环（图 1A）；在 LB 固体培养基上呈乳白色、圆形、湿润小菌落（图 1B）；对其进行革兰染色，镜检可见红色球状或短杆状细菌（图 1C）。

2.2 菌株 PCR 鉴定

经 16S rDNA 通用引物和多杀性巴氏杆菌特异性引物 *Kmt1* 进行 PCR 扩增以及凝胶电泳；经测序后比对，2 株分离菌株和 9 株疑似菌株与多杀性巴氏杆菌的相似度在 99% 以上，菌株信息见表 6；将分离出的菌株选取其中 6 株通过 MEGA 软件进行建树分析发现，分为 2 个大分支，其中分离株的 5 株（Pm2、Pm4、Pm5、Pm10、Pm11）亲缘关系较近，Pm1 与其余分离株亲缘关系较远（图 2）。



A. 血平板上菌落形态；B. LB 培养基上菌落形态；C. 革兰染色菌体形态（1 000×）。

图 1 分离菌株菌落形态观察及革兰染色镜检

表 6 11 株多杀性巴氏杆菌分离株信息

菌株编号	菌株来源
Pm1	牦牛
Pm2	牦牛
Pm3	马
Pm4	藏羊
Pm5	牦牛
Pm6	牦牛
Pm7	牦牛
Pm8	牦牛
Pm9	牦牛
Pm10	牦牛
Pm11	牦牛

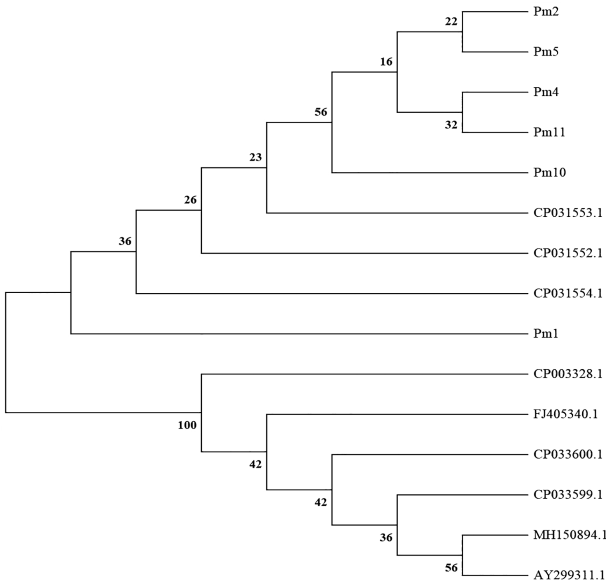
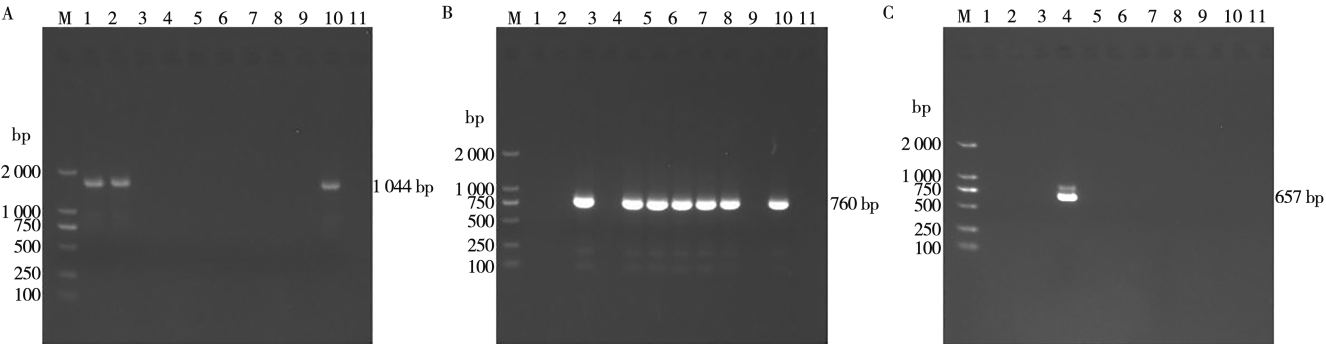


图 2 分离菌株进化树分析

2.3 菌株的荚膜血清型和 LPS 血清型鉴定

经 PCR 扩增以及凝胶电泳分析，荚膜血清 A、B、D 型引物均有相应条带扩出（图 3）；LPS 血清

L2、L3、L6 型引物均有相应条带扩出（图 4）。分离菌株的主要血清型见表 7。



M. DNA Marker；1~11. 分离菌株 Pm1~Pm11。

图 3 分离菌株荚膜血清 A 型（A）、B 型（B）、D 型（C）PCR 扩增电泳

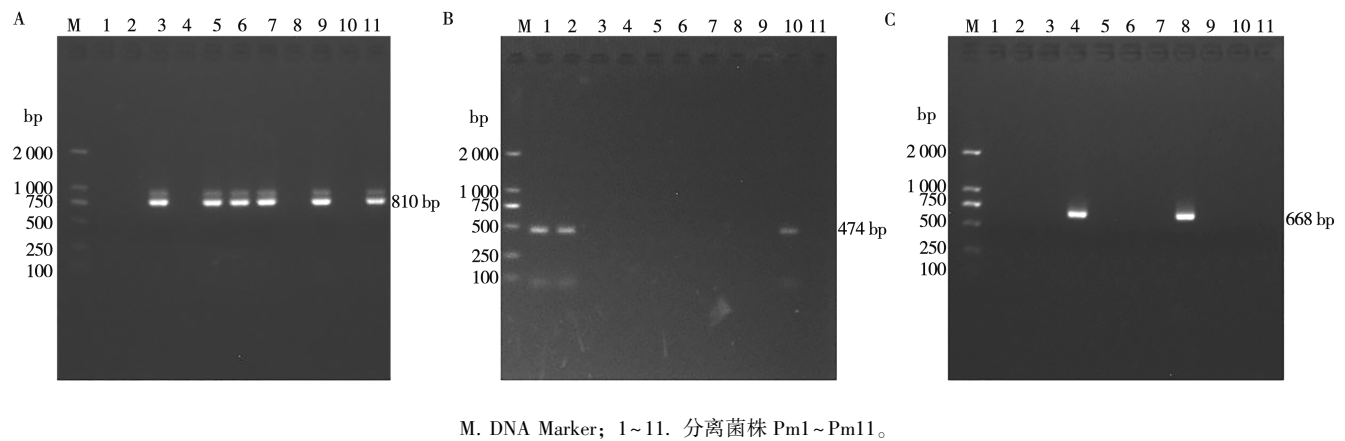


图 4 分离菌株 LPS 血清 L2 型 (A)、L3 型 (B)、L6 型 (C) PCR 扩增电泳

表 7 11 株多杀性巴氏杆菌菌株血清型

菌株	荚膜血清型	LPS 血清型	菌株	荚膜血清型	LPS 血清型
Pm1	A	L3	Pm7	B	L2
Pm2	A	L3	Pm8	B	L6
Pm3	B	L2	Pm9	B	L2
Pm4	D	L6	Pm10	A	L3
Pm5	B	L2	Pm11	B	L2
Pm6	B	L2			

2.4 MLST 分型

经 PCR 扩增以及凝胶电泳，各管家基因均有相应条带检出，以 *pmi* 和 *est* 基因（图 5）为例，与预期结果相符；分离菌株的测序结果呈单一峰值，表明测序结果可靠。经 *mub*MLST 比对，11 株分离菌株具有 5 种 ST 型，分别是 ST13、ST50、ST59、ST79、ST122，其中最主要的分型为 ST122（表 8）。

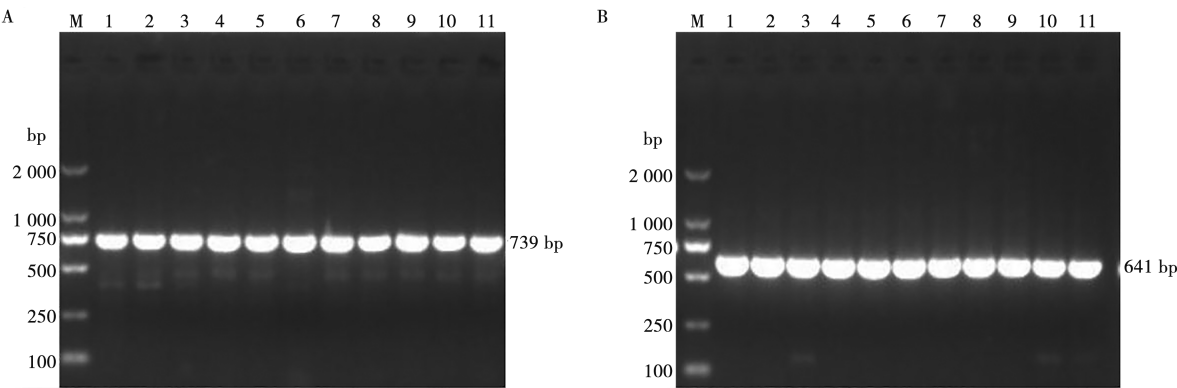


图 5 分离菌株 MLST 分型基因 PCR 扩增产物电泳

表 8 11 株多杀性巴氏杆菌 MLST 分型

菌株	MLST 分型	菌株	MLST 分型
Pm1	ST79	Pm7	ST122
Pm2	ST13	Pm8	ST50
Pm3	ST122	Pm9	ST122
Pm4	ST59	Pm10	ST13
Pm5	ST122	Pm11	ST122
Pm6	ST122		

2.5 致病性试验

对新分离的 Pm1、Pm2 菌株用 2 种浓度攻毒小鼠在接种后 48 h 内全部死亡，而对照组小鼠未见异常。采集死亡小鼠的肝脏和脾脏触片并进行瑞氏染色镜检，可见大量两极浓染的短杆菌（图 6）。

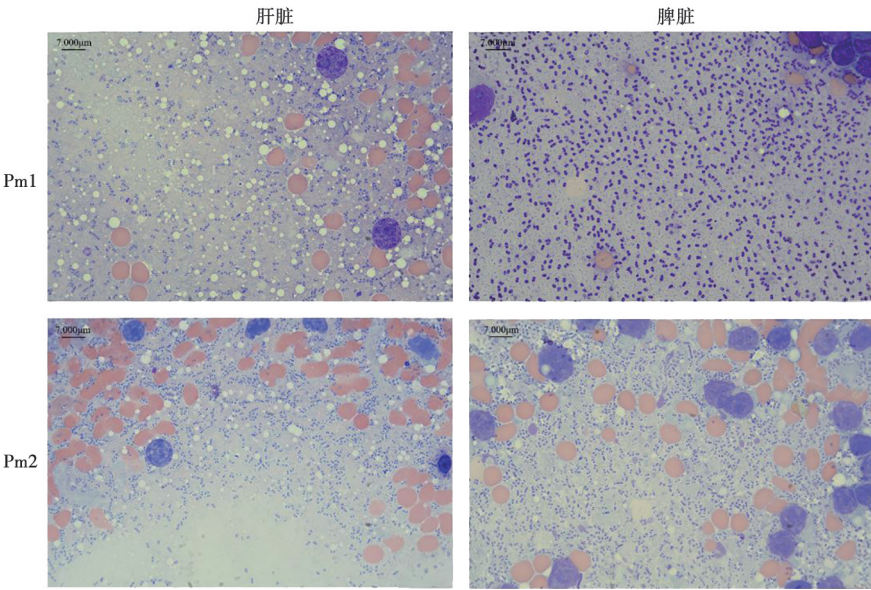


图 6 小鼠组织触片瑞氏染色 (1 000×)

2.6 菌株的毒力相关基因检测

对 11 株多杀性巴氏杆菌进行毒力相关基因检测，*rpoE* 的检出率为 100%，*hsf-2*、*sodA*、*sodC*、*ompA*、*oma87*、*hgbA*、*Fur*、*pmHAS*、*ptfA*、*fimA*、*hsf-1*、*pfhA*、*tadD*、*ompH*、*plpB*、*exbB*、*exbD*、*tonB*、*hgbB*、

nanH 等毒力基因有阳性检出 (图 7)。每株分离菌株至少携带 10 种毒力基因且有 7 种毒力基因分布型，其中最常见的是 *hsf-2* + *sodA* + *sodC* + *ompA* + *oma87* + *pmHAS* + *exbB* + *exbD* + *hgbA* + *hgbB* + *Fur* (表 9)。

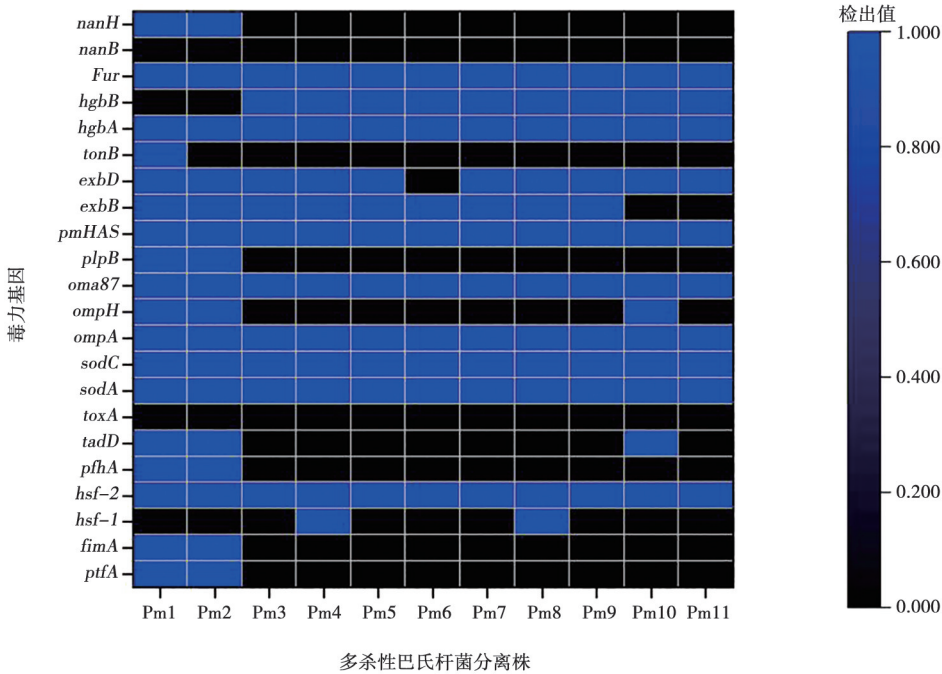


图 7 分离菌株毒力基因分布热图

2.7 耐药基因检测与药敏试验结果分析

对 11 株多杀性巴氏杆菌进行耐药基因检测，其中 *rpsL*、*rrs*、*strB*、*sul1*、*sul2*、*blaCMY-2*、*blaTEM* 耐药基因有阳性检出 (图 8)。药敏试验结果显示，

11 株分离菌株均对青霉素耐药，耐药率为 100%，耐药率 ≥ 50.0% 的药物为克林霉素 (63.6%)；对诺氟沙星、多西环素、四环素、氟苯尼考 100% 敏感；敏感率 > 50% 的药物有羧苄西林 (72.7%)、美罗培南

(72.7%)、阿 奇 霉 素 (90.9%)、氨 苄 西 林 (90.9%)、氯霉素 (90.9%) (表 10)。结合耐药基因检测和药敏试验检测结果分析可知，青海地区的多

杀性巴氏杆菌的耐药基因携带情况总体上不是太严重。

表 9 11 株多杀性巴氏杆菌毒力基因分布型

毒力基因分布型	数量
<i>hsf-2+sodA+sodC+ompA+oma87+pmHAS+exbD+hgbA+hgbB+Fur</i>	1
<i>hsf-2+sodA+sodC+ompA+oma87+pmHAS+exbB+hgbA+hgbB+Fur</i>	1
<i>hsf-2+sodA+sodC+ompA+oma87+pmHAS+exbB+exbD+hgbA+hgbB+Fur</i>	4
<i>hsf-1+hsf-2+sodA+sodC+ompA+pmHAS+oma87+exbB+exbD+hgbA+hgbB+Fur</i>	2
<i>hsf-2+tadD+sodA+sodC+ompA+pmHAS+oomph+oma87+pmHAS+exbD+hgbA+hgbB+Fur</i>	1
<i>ptfA+fimA+hsf-2+pflA+tadD+pmHAS+soda+sodC+ompA+oomph+oma87+plpB+exbB+exbD+hgbA+Fur+nanH</i>	1
<i>ptfA+fimA+hsf-2+pflA+tadD+pmHAS+soda+sodC+ompA+oomph+oma87+plpB+exbB+exbD+tonB+hgbA+Fur+nanH</i>	1

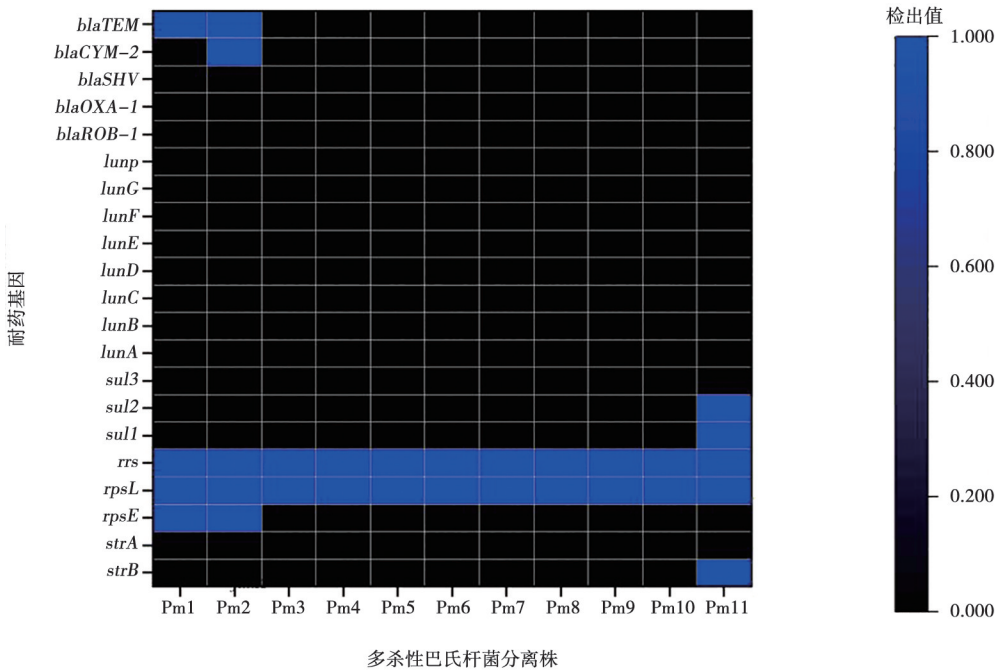


图 8 分离菌株耐药基因分布 heatmap

表 10 11 株多杀性巴氏杆菌药敏试验检测结果

抗生素药物	药物含量/μg	抑菌圈直径/mm			耐药率/%	中介率/%	敏感率/%
		敏感	中介	耐药			
卡那霉素 (KAN)	30	18	14~17	13	9.1	54.5	36.4
羧苄西林 (CRB)	100	23	20~22	19	18.2	9.1	72.7
头孢他啶 (CAC)	30/10	21	18~20	17	27.3	36.4	36.4
克林霉素 (CLI)	2	19	16~18	15	63.6	18.2	18.2
诺氟沙星 (NOR)	10	17	11~16	12	0	0	100
多西环素 (DOX)	30	14	11~13	10	0	0	100
阿奇霉素 (AZM)	15	18	14~17	13	9.1	0	90.9
青霉素 (PEN)	10	29	—	28	100	0	0

续表10

抗生素药物	药物含量/ μg	抑菌圈直径/ mm			耐药率/%	中介率/%	敏感率/%
		敏感	中介	耐药			
链霉素 (STR)	10	15	12~14	11	36.4	45.5	18.2
四环素 (TCY)	30	15	12~14	11	0	0	100
氟苯尼考 (FFC)	30	22	17~21	18	0	0	100
头孢唑林 (CZO)	30	23	20~22	19	18.2	54.5	27.3
美罗培南 (MEM)	10	23	20~22	19	0	27.3	72.7
氨苄西林 (AMP)	10	17	14~16	13	0	9.1	90.9
氯霉素 (CHL)	30	18	13~17	12	9.1	0	90.9

3 讨论

本研究从病死牦牛肺部病料中分离到 2 株 A：L3 型多杀性巴氏杆菌，电镜下可见为两极浓染的小杆菌，符合多杀性巴氏杆菌的染色特性。经 16S rRNA 基因扩增并测序后比对发现与多株多杀性巴氏杆菌的相似性在 99% 以上，多杀性巴氏杆菌 KMT1 基因与荚膜血清分型鉴定均扩增出相应条带。结合患病牛的发病症状、细菌的分离鉴定及致病性试验，确诊此次致死牦牛的病原为多杀性巴氏杆菌^[14-16]。

多杀性巴氏杆菌的流行病学研究结果表明，荚膜基因型 A、D 通常与家禽霍乱、结膜炎和呼吸系统疾病相关^[15]，B 型常与蹄类动物出血热、出血性败血症相关^[16]。有研究报道多杀性巴氏杆菌有多种 MLST 分型，其中 ST79 和 ST122 为常见 MLST 分型^[17]。与之类似，本研究的 MLST 分型有 5 类，其中主要分型为 ST122。本研究发现，不同动物来源多杀性巴氏杆菌的血清型具有差异，同时同种动物来源不同血清型会引发不同疾病，例如本研究中牦牛 B：L2 型主要引发出血性败血症，A：L3 型引发牦牛呼吸道疾病，该结果与才让周在等^[14]的研究结果一致。

多杀性巴氏杆菌基因组中含有许多编码毒力因子的基因，这些基因与该菌的发病机制有关，因此除了荚膜和 LPS 基因型之外，本试验还通过检测不同毒力基因来对菌株进行毒力基因分型^[17-18]。流行病学研究中通常选择用于分型的毒力基因包括编码菌毛和其他黏附素、毒素、铁获取蛋白、唾液酸酶、透明质酸酶、外膜蛋白和 SOD 的基因，其中 *ptfA*、*fimA*、*hsf-2*、*exbB*、*exbD*、*tonB*、*Fur*、*sodA*、*sodC*、*ompA*、*ompH*、*oma87*、*plpB* 等分布广泛，因此，在不同基因型以及不同宿主来源的分离株中具有较高的检出率。此外，一些毒力基因仅在特定类型的疾病存在，如 *toxA* 毒力基因仅在进行性萎缩性鼻炎相关的菌株中发现^[17-19]。本研究中牦牛源、马源、藏羊源多杀性巴氏杆菌均检测出 *hsf-2*、*sodA*、*sodC*、*ompA*、*oma87*、*exbB*、*exbD*、*Fur* 等毒力基因，但不携带 *toxA* 毒力基因，与以上结论相符。

本研究所有菌株均携带 *rpoE*。周赛赛等^[20]的研究表明 *rpoE* 是一种控制基因转录和翻译的 σ 因子，其主要存在于原核细胞中，在转录后期通过调控基因表达来调控菌体生物特性、毒力、逆胁迫应答。同时 *rpoE* 基因还影响多杀性巴氏杆菌菌株的生物被膜形成，敲除 *rpoE* 基因的菌株致病性会降低^[21]。因此，本研究的菌株可为后续研制减毒疫苗奠定基础。

本研究的试验结果表明，11 株菌株对大多数选用的临床抗菌药物敏感，与国内外的其他研究结果不一致^[17]。这说明青海地区对于多杀性巴氏杆菌病治疗可选择的抗生素药物较多，但是为了减少菌株耐药性的产生应合理使用抗生素，同时加强预防，加强牛群的管理，定期接种疫苗，以减少该病的发生，降低牧民的经济损失。

参考文献：

[1] MOUSTAFA A M, BENNETT M D, EDWARDS J, et al. Molecular typing of haemorrhagic septicaemia-associated *Pasteurella multocida* isolates from Pakistan and Thailand using multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis [J]. Res Vet Sci, 2013, 95 (3): 986-990.

[2] WILSON B A, HO M. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology [J]. Clin Microbiol Rev, 2013, 26 (3): 631-655.

[3] PENG Z, LIU J, LIANG W, et al. Development of an online tool for *Pasteurella multocida* genotyping and genotypes of *Pasteurella multocida* from different hosts [J]. Front Vet Sci, 2021, 8: 771157.

[4] 冉崇波, 杜小敏, 张美兰, 等. 一起肉鸡禽霍乱的诊断与防治 [J]. 吉林畜牧兽医, 2023, 44 (4): 57-58.

[5] 尹广. 禽霍乱的流行、诊断和防治 [J]. 现代畜牧科技, 2021 (10): 141-142.

[6] 其美拉姆, 胡涸圆, 曾南方, 等. 猪源多杀性巴氏杆菌分离鉴定及药敏试验 [J]. 畜禽业, 2023, 34 (11): 1-6.

[7] 朱杰, 赵旭, 东笑, 等. 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.
- [8] 陈洪, 吴双, 邱树磊, 等. 兔源多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及药物敏感性分析 [J]. 中国养兔杂志, 2023 (5): 26-28.
- [9] 贾小梅. 多杀性巴氏杆菌耐药性检测及致病性研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2021.
- [10] 关丽君, 薛云, 丁文文, 等. 多杀性巴氏杆菌荚膜的生物合成及其调控机制研究进展 [J]. 中国农业科学, 2020, 53 (3): 658-668.
- [11] 柴立旭, 苏发红. 牦牛巴氏杆菌病的防治措施 [J]. 畜禽业, 2022, 33 (10): 78-80.
- [12] SUBAACHARAN S, BLACKALL L L, BLACKALL P J. Development of a multi-locus sequence typing scheme for avian isolates of *Pasteurella multocida* [J]. Vet Microbiol, 2010, 141 (3/4): 354-361.
- [13] 赵奕朵, 张康, 王磊, 等. 1 株牛源 D; L3; L5 型多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及病原特性评价 [J]. 中国畜牧兽医, 2024, 51 (7): 3128-3141.
- [14] 才让周在, 丁晓宇, 简莹娜, 等. 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.
- [15] SHIVACHANDRA S B, VISWAS K N, KUMAR A A. A review of hemorrhagic septicemia in cattle and buffalo [J]. Anim Health Res Rev, 2011, 12 (1): 67-82.
- [16] DABO S M, TAYLOR J D, CONFER A W. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease [J]. Anim Health Res Rev, 2007, 8 (2): 129-150.
- [17] PENG Z, WANG X, ZHOU R, et al. *Pasteurella multocida*: genotypes and genomics [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2019, 83 (4): e00014-e00019.
- [18] PENG Z, WANG H, LIANG W, et al. A capsule/lipopolysaccharide/MLST genotype D/L6/ST11 of *Pasteurella multocida* is likely to be strongly associated with swine respiratory disease in China [J]. Arch Microbiol, 2018, 200 (1): 107-118.
- [19] LIU H, ZHAO Z, XI X, et al. Occurrence of *Pasteurella multocida* among pigs with respiratory disease in China between 2011 and 2015 [J]. Ir Vet J, 2017, 70: 2.
- [20] 周赛赛, 李天娇, 武琦, 等. 一株西藏牦牛源多杀性巴氏杆菌基因分型及 *rpoE* 基因生物信息学分析 [J]. 中国农业大学学报, 2021, 26 (5): 47-60.
- [21] 周赛赛, 武琦, 索朗斯珠, 等. 牦牛源多杀性巴氏杆菌 *rpoE* 基因缺失株的构建及生物学特性分析 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2022 (13): 77-83.