

汪阳, 张凌, 金映红, 等. 绵羊源荚膜血清 D 型多杀性巴氏杆菌的生物学特性及 2 种候选疫苗的免疫效果评价 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (4): 108-116.

WANG Y, ZHANG L, JIN Y H, et al. Biological characterization of *Pasteurella multocida* capsular serotype D from sheep and immune evaluation of two candidate vaccines [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (4): 108-116.

绵羊源荚膜血清 D 型多杀性巴氏杆菌的生物学特性及 2 种候选疫苗的免疫效果评价

汪阳^{1,2}, 张凌^{2,3}, 金映红^{2,3}, 汪萍^{2,3}, 薛晶^{2,3}, 梁芊芊^{1,2},
李晓卓^{1,2}, 郑启铭^{1,2}, 刘文锴^{2,4}, 韩翔舒^{2,4}, 夏俊^{2,3*}

(1. 新疆农业大学动物医学学院, 新疆 乌鲁木齐 830000;

2. 农业农村部草食动物疫病防控重点实验室(部省共建), 新疆 乌鲁木齐 830000;

3. 新疆畜牧科学院兽医研究所/动物临床医学研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830000;

4. 石河子大学动物科技学院, 新疆 石河子 832061)

摘要: 旨在研究新疆绵羊源荚膜血清 D 型多杀性巴氏杆菌 (PmD) 的生物学特性, 探索其灭活疫苗与 OmpH 重组疫苗对小鼠的免疫保护效果, 为防控新疆地区绵羊巴氏杆菌病提供参考。采用细菌分离鉴定、PCR 鉴定、药敏试验、耐药与毒力基因检测、致病性试验等方法初步明确 PmD 的生物学特性; 并通过最佳灭活条件和佐剂筛选、安全性试验、原核表达等方法制备 PmD 灭活疫苗与 PmD-OmpH 重组疫苗, 采取小鼠攻毒保护试验评价 2 种疫苗的免疫效力。结果: 从绵羊肺脏中分离出 1 株 PmD, 药敏试验显示, 该菌为 7 重耐药菌, 未检测到耐药基因; 毒力基因检测显示, 该菌具有 12 种毒力基因 (*exbB*、*exbD*、*hgbA*、*tonB*、*fimA*、*Oma87*、*OmpH*、*Psl*、*sodA*、*sodC*、*tbpA*、*toxA*); 致病性较强, 对小鼠的最小致死菌量为 2.2×10^5 CFU; 灭活疫苗和重组疫苗对相同血清型菌株攻毒的保护率分别为 80% 和 10%; 灭活疫苗对血清型 A、F 和未知菌株攻毒保护率分别为 0、20% 和 0, 而重组疫苗的保护率则全为 0。本研究发现 1 株强耐药、强毒力的绵羊源 PmD, 灭活疫苗对同种血清型菌株的保护性远高于重组疫苗, 发病地区羊场可采用同种血清型灭活疫苗进行预防和控制绵羊巴氏杆菌病, 对多价疫苗和新型疫苗的研制还有待进一步发掘。

关键词: 绵羊; 荚膜血清 D 型; 多杀性巴氏杆菌; 生物学特性; 灭活疫苗; OmpH 蛋白; 重组疫苗

中图分类号: S852.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2024)04-0108-09

Biological characterization of *Pasteurella multocida* capsular serotype D from sheep and immune evaluation of two candidate vaccines

WANG Yang^{1,2}, ZHANG Ling^{2,3}, JIN Yinghong^{2,3}, WANG Ping^{2,3}, XUE Jing^{2,3}, LIANG Qianqian^{1,2},
LI Xiaozhuo^{1,2}, ZHENG Qiming^{1,2}, LIU Wenkai^{2,4}, HAN Xiangshu^{2,4}, XIA Jun^{2,3*}

(1. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830000, China;

2. Key Laboratory of Herbivorous Animal Disease Prevention and Control, the Ministry of Agriculture and Rural Affairs (Provincial and Ministerial Co-construction), Urumqi 830000, China;

3. Institute of Veterinary Medicine, Xinjiang Academy of Animal Sciences/Animal Clinical Medical Research Center, Urumqi 830000, China;

4. College of Animal Science and Technology, Shihezi University, Shihezi 832061, China)

Abstract: This study was to identify the biological characteristics of *Pasteurella multocida* capsular serotype D (PmD) from sheep in the Xinjiang area, and to explore the immune protection effect of its inactivated vaccine and the OmpH recombinant vaccine in mice, in order to provide reference measures for the prevention and control of sheep pasteuriasis in Xinjiang. The biological characteristics of PmD were pre-

收稿日期: 2023-04-20; 修回日期: 2024-02-28

基金项目: 新疆维吾尔自治区中央引导地方项目 (ZYD2022B16); 新疆维吾尔自治区重大科技专项项目 (2022273334); 新疆维吾尔自治区天山英才青年科技拔尖人才项目 (2022196128)

第一作者: 汪阳, 女, 硕士

* 通信作者: 夏俊, 博士, 研究员, 主要从事动物传染病防控技术方面的研究, E-mail: 1065291747@qq.com。

liminarily clarified by bacterial isolation and identification, PCR identification, drug susceptibility test, drug resistance and virulence gene detection, and by pathogenicity test. PmD inactivated vaccine and PmD-OmpH recombinant vaccine were prepared using methods such as optimal inactivation conditions, adjuvant screening, safety test and prokaryotic expression. Then, mouse challenge protection test was used to evaluate the immune efficacy of both the vaccines. One strain of PmD was isolated from sheep lung, and drug susceptibility tests showed that the bacterium resisted against 7 resistant drugs at the same time, but no resistance gene was detected. The virulence gene test showed that the bacterium had 12 virulence genes (*exbB*, *exbD*, *hgbA*, *tonB*, *fimA*, *Oma87*, *OmpH*, *Psl*, *sodA*, *sodC*, *tbpA*, and *toxA*). Its pathogenicity was strong, and the minimum lethal quantity in mice was 2.2×10^5 CFU. The protection rates of the inactivated vaccine and recombinant vaccine against the same serotype strain were 80% and 10%, respectively. The protection rates against different serotypes (A, F, unknown) strains were 0, 20%, 0, 0, 0, and 0. In this study, a strong drug-resistant and virulent sheep-derived PmD was identified. The inactivated vaccine was much more protective against the same serotype strain than the recombinant vaccine. In sheep farms in the disease area, the inactivated vaccine could be used to prevent and control pasteulosis in sheep. The development of the multivalent vaccines and new vaccines still requires further exploring.

Keywords: sheep; capsular serotype D; *Pasteurella multocida*; biological characteristics; inactivated vaccines; OmpH protein; recombinant vaccine

巴氏杆菌病主要是由多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*, Pm) 引起的一种人畜共患传染病, 具有较高的发病率和死亡率, 以肺炎或多脏器出血为主要特征, 呈世界性分布, 对羊养殖业具有严重危害^[1]。根据荚膜多糖抗原的不同将 Pm 分为 A、B、D、E 和 F 这 5 种血清型。不同血清型的 Pm 功能相似, 但是其宿主特异性及流行性具有显著差异。PmA 常与禽霍乱有关; PmB、PmD 和 PmE 常与猪、牛等动物的败血症或肺炎有关; PmF 常与火鸡有关^[2]。

Pm 引起的巴氏杆菌病常使用抗生素治疗, 但是按照农业农村部制定的《全国兽用抗菌药使用减量行动方案 (2021—2025 年)》要求, 应落实减抗、无抗养殖行动, 做到规范科学用药。由于抗生素会引起耐药性、药物残留等生物和食品安全等诸多问题^[3], 采用预防性和治疗性疫苗才是最为安全有效的防治方法。

灭活疫苗属于传统疫苗, 是目前 Pm 防治常用的免疫疫苗, 其制备技术成熟, 使用过程安全性高。研究表明, Pm 灭活苗具有较高的同源保护效力, 但其不同血清型之间的交叉保护力较弱, 并且灭活苗通常都需要添加佐剂来刺激机体免疫系统反应^[4]。对此, 研究者们试图改进 Pm 疫苗, 以消除目前疫苗的缺点。Pm 的外膜蛋白 (Omps) 和菌毛蛋白等的重组疫苗对牛、山羊或小鼠都具有一定的保护作用, 其中 OmpH 以同源三聚体的形式存在于多个血清型, 核苷酸序列比对不同血清型之间具有较高的同源性^[5]。Muenthaisong 等^[6] 研究显示 PmB 型重组 OmpH 通过滴鼻免疫对牛或水牛具有保护能力, 并能诱导抗体和细胞介导的免疫反应。Sthitmatee 等^[7] 也证实禽中 OmpH 蛋白具有很强的同源性和交叉保护作用。马建伟^[8] 也证实牛源 Pm A 型 OmpH 蛋白对 PmA 和 PmB

型的具有交叉保护性。所有的感染动物 (牛、禽、猪、兔和羊等) Pm 分离株基本都含有 OmpH 蛋白^[9], 因此, OmpH 蛋白很可能是羊源不同血清型 Pm 的潜在交叉保护因子。

本研究从绵羊的肺中分离到 1 株 Pm, 采用分离鉴定、PCR 鉴定、药敏试验等方法初步研究其生物学特性, 并制备其灭活疫苗和 OmpH 重组疫苗, 评价不同疫苗的免疫保护性, 为新疆地区绵羊巴氏杆菌病的防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品来源

从新疆某地采集的病死犊羊肺脏, 于 4 °C 低温环境下运回实验室。PmA-XJ3、PmD-XJ3、PmF-XJ3 和 Pm 未知血清型菌株, 均由农业农村部草食动物疫病防控重点实验室 (部省共建) 保存。

1.2 主要试剂

马丁氏肉汤培养基、白油佐剂、铝盐佐剂、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂和 BL21 感受态细胞, 购自于 Thermo 公司; IPTG、非预染蛋白 Marker、预染蛋白 Marker、一抗鼠抗 His 标签抗体、二抗羊抗鼠抗体、聚乙二醇 20000 (PEG20000) 和 500 mmol/L 咪唑等, 购自于生工生物有限公司; PCR 相关试剂、DNA 分子质量标准 and PCR 凝胶回收试剂盒, 购自天根生化科技有限公司; pET-28a (+) -*OmpH* 重组质粒, 由本实验室制备。

1.3 细菌的分离鉴定

无菌条件下取病灶交界处约 25 g, 划线接种至马丁固体培养基 37 °C 培养 24 h, 同时将其置于马丁肉汤培养基 37 °C 150 r/min 培养 24 h。次日, 以马丁肉汤培养液 (菌液) 为模板, 同时采用 Pm 特异性基因 (*Kmt*) 和 5 个荚膜血清型特异基因 (*hyaD*-

hyaC、*bcbD*、*dcbF*、*ecbJ*、*febD*) 进行 PCR 扩增, 检测是否含有 Pm 及其分型, 扩增后均采用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。引物信息见表 1。

表 1 Pm 特异性检测引物和 5 个荚膜血清型鉴定引物信息

基因	引物序列 (5'→3')	目的片段/bp	退火温度/°C
<i>Kmt</i> (Pm)	F: ATCCGCTATTTACCCAGTGG R: GCTGTAAACGAACTCGCCAC	480	56
<i>hyaD-haC</i> (A 型)	F: TGCCAAAATCGCAGTCAG R: TTGCCATCATTGTCAGTG	1 045	56
<i>bcbD</i> (B 型)	F: GCCCGAGAGTTTCAATCC R: TTGCCATCATTGTCAGTG	750	56
<i>dcbF</i> (D 型)	F: TTACAAAAGAAAGACTAGGAGC R: CATCTACCCACTCAACCATATCA	648	56
<i>ecbJ</i> (E 型)	F: TCCGCAGAAAATTATTGACTC R: GCTTGCTGCTTGATTTTGTC	511	56
<i>febD</i> (F 型)	F: AATCGGAGAACGCAGAAATCAG R: TTCCGCCGTCAATTACTCTG	851	56

将 PCR 检测阳性菌液划线接种至马丁固体培养基, 挑取 5~10 个菌落, 进行 PCR 扩增, 将阳性菌落纯化 2 次后进行革兰染色镜检, 分离纯化的细菌以 1:1 置于 60% 甘油, -20 °C 保存。

1.4 最适培养条件的筛选

将纯化菌株分别接种至马丁肉汤和 BHI 培养基, 分别 75 r/min 和 250 r/min、1% 和 0.1% 接种量条件下 37 °C 培养 24 h, 参考文献 [10] 的方法测量菌液浓度, 绘制生长曲线, 筛选纯化菌株的最适培养条件。

1.5 药物敏感性试验

采用纸片扩散法 (K-B), 检测分离菌对 11 种临床常见药物 (阿米卡星、头孢曲松、氧氟沙星、阿齐霉素、氟苯尼考、头孢他啶、林可霉素、克林霉素、庆大霉素、诺氟沙星、环丙沙星) 的敏感性。

1.6 耐药相关基因检测

PCR 检测氨基糖苷类耐药基因 *aadA*、*aadB*, 氯霉素类耐药基因 *floR*, 四环素类耐药基因 *tetA*、*tetB*, β-内酰胺类耐药基因 *blaTEM*、*blaOXA*、*blaCTX-M-2*、*blaSHV*、*ermA*, 喹诺酮类耐药基因 *qnrS*、*qnrA*、*qnrB*, 共 13 种, 引物信息见表 2。扩增后均采用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统观察结果。

1.7 毒力相关基因检测

PCR 检测铁离子摄取相关基因 *exbB*、*exbD*、*hgbA*、*tonB*、*fur*, 黏附素相关基因 *fimA*, 外膜蛋白相关基因 *Oma87*、*OmpH*、*Psl*, SOD 相关基因 *sodA*、*sodC*、*tbpA* 和毒素相关基因 *toxA*, 共 13 种毒力基因, 引物信息见表 3。扩增后均采用 1% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统观察结果。

表 2 耐药相关基因引物信息

基因	引物序列 (5'→3')	目的片段/bp	退火温度/°C
<i>aadA</i>	F: TATGGAGGCTTCGGCTTT R: GCTATGTTCTCTTGCTTTTGTGTC	217	55
<i>aadB</i>	F: CAGTCGCCCTAAAACAAA R: CAGTCAAGTAACTCATCCCC	247	56
<i>floR</i>	F: AGCAGACAAGTAAGCCGC R: CGAGAAGAAGACGAAGAAGC	878	53
<i>tetA</i>	F: GTGAAACCCAACATACCCC R: GAAGGCAAGCAGGATGTAG	888	53
<i>tetB</i>	F: TTGGTTAGGGGCAAGTTTTG R: GTAATGGGCCAATAACACCCG	659	53

续表2

基因	引物序列 (5'→3')	目的片段/bp	退火温度/℃
<i>blaTEM</i>	F: GAGTATTCAACATTTTCGT R: ACCAATGCCTTAATCAGTGA	857	56
<i>blaOXA</i>	F: GCAGCGCCAGTGCATCAAC R: CCGCATCAAATGCCATAAGTG	198	56
<i>blaCTX-M-2</i>	F: GGCGTTGCGCTGATTAACAC R: TTGCCCTTAAGCCACGTCAC	486	56
<i>blaSHV</i>	F: TCGCCTGTGTATTATCTCCC R: CGCAGATAAAATCACCACAATG	572	56
<i>ermA</i>	F: GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC R: GTTCAAGAACAATCAATACAGAG	421	56
<i>qnrS</i>	F: CATTGAACAGGGTGATATCGAA R: ATAAATTGGCACCCCTGTAGGC	395	56
<i>qnrA</i>	F: CAAGAGGATTTCTCAGCCAG R: AATCCGGCAGCACTATTACTCC	628	56
<i>qnrB</i>	F: AGCGGCACTGAATTTATCGG R: CGCAATGTGTGAAGTTTGCT	418	56

表3 毒力相关基因引物信息

基因	引物序列 (5'→3')	目的片段/bp	退火温度/℃
<i>exbB</i>	F: TTGGCTTGTGATTGAACGC R: TGCAGGAATGGCGACTAAA	283	55
<i>exbD</i>	F: CGTTCTGATTACAGCCTCTT R: AACGAAATCTTGGAAACTGG	247	55
<i>hgbA</i>	F: CATATCGGATCCTTGAAACCAGAGGAA R: GAATCGGAGCTCACGACCTGGTGAGTAA	726	56
<i>tonB</i>	F: CGACGGTGAAACCTGAGCCA R: CCGAGCGATAAGCATTGACT	261	55
<i>Fur</i>	F: GTTTACCGTGTATTAGACCA R: CATTACTACATTTGCCATAC	244	56
<i>fimA</i>	F: CCATCGGATCTAAACGACCTA R: AGTATTAGTTCCTGCGGGTG	851	55
<i>Oma87</i>	F: GCCGTTTGTAGTGAAAGACATTC R: TATCTFTGTCGTCAAATGTCCG	923	55
<i>OmpH</i>	F: GGTGATTTAGTGATAACGGTTC R: CGTTAGTCACTTTAGATTGTGCGT	649	56
<i>Psl</i>	F: TCTGGATCCATGAAAAAATAACTAAAGTA R: AAGGATCCTTAGTATGCTAACACAGGACGACG	400	56
<i>sodA</i>	F: GTAAGACTAACCATGCCAACCT R: GGCTTATACACTACCAGAATTAGGC	401	56
<i>sodC</i>	F: AGACGGCAAGTTAGTAGCGG R: CCTAATGGTGTGGGTGATC	249	56
<i>tbpA</i>	F: TTGCTTGAAACGGTAAAGC R: TAACGTGTACGGAAAAGCCC	728	56
<i>toxA</i>	F: CTTAGATGAGCGACAAGGTT R: GGAATGCCACACCTCTATA	864	55

1.8 小鼠致病性试验

按照 1.4 筛选的最适培养条件复苏保存菌株, 活菌计数法及分光光度计测定细菌群落约为 1.1×10^{11} CFU/mL。选择新疆医科大学动物试验中心 6 周龄、体重 18~20 g 的昆明小鼠 20 只, 分为 5 组, 试验第 1、2、3、4 组每只腹腔接种 2.2×10^7 、 2.2×10^6 、 2.2×10^5 、 2.2×10^4 CFU 活菌, 另设 1 组阴性对照组 (注射无菌 PBS)。每日观察和记录小鼠死亡情况, 计算最小致死菌量, 同时解剖所有死亡小鼠, 取心血进行回归检测。

1.9 灭活疫苗的制备

1.9.1 最佳灭活条件的筛选

按照 1.4 筛选的最适培养条件对保存菌株进行复苏后, 按照 1% 的接种量接种至 5 份含有 20 mL 马丁肉汤的无菌试管中, 37 °C 75 r/min 培养 10 h 后分别加入菌液总体积的 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 的甲醛进行灭活, 充分混匀, 37 °C 培养 24 h, 每隔 4 h 抽取 100 μ L 菌液涂布于马丁肉汤固体培养基上, 37 °C 培养 24 h, 观察有无细菌生长。

1.9.2 最佳佐剂的筛选

选 40 只小鼠分为 4 组, 每组 10 只 (雌雄各半)。取 1.9.1 最佳灭活条件的灭活液, 试验第 1 组为不添加佐剂的甲醛灭活液, 第 2 组为铝盐佐剂和灭活液以 1:5 的比例混合的混合液, 第 3 组为白油佐剂和灭活液以 1:1 的比例混合的混合液, 阴性对照组为无菌 PBS。背部皮下分别注射相应制剂 400 μ L, 21 d 后每只背部皮下接种 2.2×10^5 CFU 活菌, 每天观察并记录小鼠的死亡情况。

1.9.3 安全性检测

取最适灭活条件和最佳佐剂制备的疫苗液 100 μ L 涂布至马丁固体培养基, 37 °C 培养 24 h, 观察有无细菌生长, 并取 500 μ L 腹腔注射小鼠, 对照组腹腔注射无菌 PBS, 观察 14 d, 记录小鼠有无临床反应, 第 14 天剖检免疫小鼠, 观察有无病变情况。

1.10 重组蛋白疫苗的制备

1.10.1 重组蛋白的诱导表达

重组 pET-28a (+) -*OmpH* 质粒转移到大肠杆菌感受态 BL21 (DE3) 细胞, 42 °C 热激后涂布至含有 30 μ g/mL 卡那霉素的平板上, 37 °C 培养 8 h, 挑取单克隆菌落至液体培养基 (30 μ g/mL 卡那霉素) 中培养。当 OD_{600} 值达到 0.6 时, 加入诱导剂 IPTG (0.5 mmol/L), 分别于 20 °C 过夜培养和 37 °C 培养 6 h; 4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液; 沉淀 (菌体) 用缓冲液 A (1 \times PBS, pH=7.4) 悬浮, 超声破碎仪完全溶解。离心收集上清液和沉淀, 沉淀使用缓冲液 B (8 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tris-HCl, pH =

8.0 的 300 mmol/L NaCl) 溶解, 对上清液和沉淀分别制样并采用 SDS-PAGE 检测。

1.10.2 蛋白纯化

扩大培养细菌后收集菌体进行亲和纯化。将细胞菌体用缓冲液 C (8 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tris-HCl, pH = 8.0 的 300 mmol/L NaCl, pH = 8.0 的 0.1% TritonX-100) 溶解, 超声破碎, 离心收集上清液获得粗蛋白; 取 5 mL Ni-NTA, 5 倍柱床体积的结合缓冲液清洗平衡柱; 粗蛋白与平衡柱填料孵育 1 h 并收集流出物; 将粗蛋白和流出组分进行 SDS-PAGE 检测。纯化后的组分透析到蛋白保存缓冲液 (50 mmol/L Tris, 300 mmol/L NaCl, 0.1% 十二烷基肌氨酸钠, pH = 8.0 的 2 mmol/L DTT) 中, 透析后用 PEG20000 浓缩, 0.45 μ m 滤膜过滤后分装, -80 °C 冻存。

1.10.3 目的蛋白检测

对纯化后的蛋白样品进行处理, 制样, 12% 分离胶, 5% 浓缩胶跑胶, SDS-PAGE 检测目的蛋白的表达。将上述胶进行转印, 以鼠抗 His 标签抗体为一抗, 羊抗鼠抗体为二抗进行 Western blot 分析。

1.10.4 安全性检测

将纯化验证后的蛋白与弗氏完全佐剂按照 1:1 的比例进行乳化, 乳化后多点注射小鼠 300 μ L, 阴性对照组注射同等剂量的无菌 PBS, 观察 14 d, 记录小鼠有无临床症状, 第 14 天剖检免疫小鼠, 观察有无病变情况。

1.11 免疫攻毒保护试验

灭活疫苗: 准备 50 只小鼠 (雌雄各半), 均取最适灭活条件和佐剂制备的疫苗液 400 μ L 进行背部皮下注射, 21 d 后将小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只。每组分别接种实验室保存菌株 PmA-XJ3、PmD-XJ3、PmF-XJ3 和 Pm 未知血清型 4.4×10^5 CFU, 阴性对照组注射无菌 PBS。每天观察记录小鼠的死亡情况。

重组疫苗: 准备 60 只小鼠 (雌雄各半), 按照 600 μ g/mL 的蛋白浓度, 首免以蛋白: 弗氏完全佐剂为 1:1 的比例, 每只小鼠 200 μ L 的剂量进行背部皮下注射; 2 周后重复 1 次; 2 周后再重复 1 次。3 次免疫后 7 d, 将小鼠分为 a~e 组和阴性对照组共 6 组, 每组 10 只。a~e 组分别接种实验室保存菌株 PmA-XJ3、PmD-XJ3、PmF-XJ3、Pm 未知血清型和本研究分离菌 PmD 2.2×10^5 CFU, 阴性对照组注射无菌 PBS。每天观察记录小鼠的死亡情况。

2 结果

2.1 细菌分离鉴定与培养特性观察

PCR 鉴定结果显示, *Kmt* 基因扩增产物大小约为

500 bp, D型特异性基因扩增产物大小约为 690 bp, 与预期片段大小相符 (图 1)。革兰染色镜检见两端钝圆, 呈球状或杆状, 单个、成对、短链状排列的革兰阴性菌。由此表明从肺脏中分离到的细菌是 PmD。

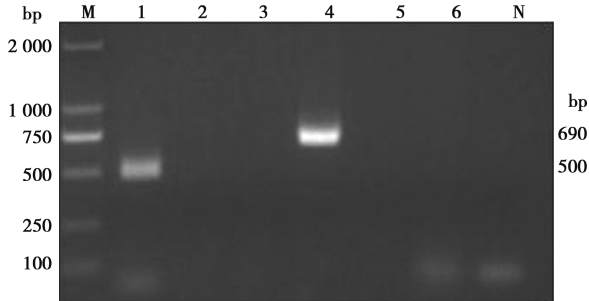


图 1 分离菌的 PCR 鉴定
M. DL2000 DNA Marker; 1. *Kmt* 基因; 2~6. 依次为 A、B、D、E、F 型特异性基因; N. 空白对照。

图 1 分离菌的 PCR 鉴定

2.2 药敏试验

游标卡尺测量抑菌圈直径, 结果显示 (表 4), PmD 对阿米卡星、头孢曲松、阿齐霉素、头孢他啶、林可霉素、克林霉素、庆大霉素 7 种药物耐药, 为 7 重耐药菌。

2.3 耐药相关基因检测

分离菌中未检测到氨基糖苷类 (*aadA*、*aadB*), 氯霉素类 (*floR*), 四环素类 (*tetA*、*tetB*), β -内酰胺类 (*blaTEM*、*blaOXA*、*blaCTX-M-2*、*blaSHV*、*ermA*) 和喹诺酮类 (*qnrS*、*qnrA*、*qnrB*) 耐药基因。

2.4 毒力相关基因检测

由图 2 可见, 在分离菌中检测到铁离子摄取相关基因 (*exbB*、*exbD*、*hgbA*、*tonB*), 黏附素相关基因 (*fimA*), 外膜蛋白相关基因 (*Oma87*、*OmpH*、*Psl*), SOD 相关基因 (*sodA*、*sodC*、*tbpA*), 毒素相关基因 (*toxA*), 共 12 种毒力基因。

表 4 药敏试验结果

抗生素	每片含量/ μg	抑菌圈 直径/mm	判定标准 (抑菌圈直径/mm)			结果
			R	I	S	
阿米卡星	30	11	≤ 14	15~16	≥ 17	R
头孢曲松	30	15	≤ 19	20~22	≥ 23	R
氧氟沙星	5	17	≤ 12	13~15	≥ 16	S
阿齐霉素	15	0			≥ 12	R
氟苯尼考	30	15	≤ 12	13~17	≥ 18	I
头孢他啶	30	10	≤ 14	15~17	≥ 18	R
林可霉素	2	0	≤ 12	13~15	≥ 16	R
克林霉素	2	0	≤ 14	15~20	≥ 21	R
庆大霉素	10	7	≤ 12	13~14	≥ 15	R
诺氟沙星	10	14	≤ 12	13~16	≥ 17	I
环丙沙星	5	21	≤ 15	16~20	≥ 21	S

注: R 表示敏感, I 表示中度敏感, S 表示耐药。

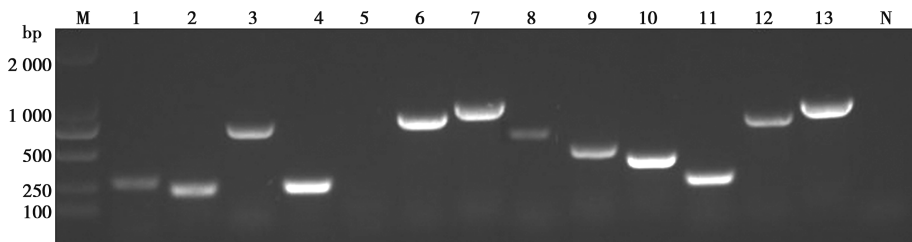


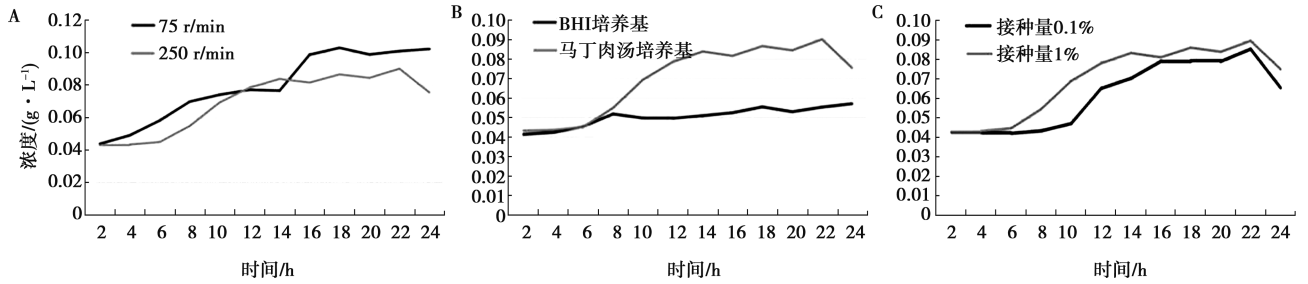
图 2 分离菌的毒力相关基因检测
M. DL2000 DNA Marker; 1. *exbB* (283 bp); 2. *exbD* (247 bp); 3. *hgbA* (726 bp); 4. *tonB* (261 bp); 5. *fur* (244 bp); 6. *fimA* (806 bp); 7. *Oma87* (703 bp); 8. *OmpH* (649 bp); 9. *Psl* (400 bp); 10. *sodA* (405 bp); 11. *sodC* (249 bp); 12. *tbpA* (728 bp); 13. *toxA* (864 bp)。

图 2 分离菌的毒力相关基因检测

2.5 最适培养条件筛选

汤培养基, 以 1% 接种量 37 °C 75 r/min 培养 16~18 h。

由图 3 可以看出 PmD 最佳培养条件为于马丁肉



A. 转速; B. 培养基; C. 接种量。

图 3 分离菌株最适培养条件的筛选

2.6 致病性试验

剖检结果可见, 死亡小鼠心脏充血、心包和胸腔积液, 肺脏淤血, 肝脏肿大、有大量出血点, 最小致死菌量为 2.2×10^5 CFU, 小鼠心血回归检测结果与攻毒菌株一致。

2.7 灭活疫苗的制备

2.7.1 最佳灭活条件的筛选

不同灭活浓度的菌液在 24 h 后的生长结果显示, 0.3%、0.4%、0.5% 的灭活液在 8 h 时就没有菌落生长, 因此最佳灭活条件为 0.3% 的甲醛灭活 8 h。

2.7.2 最佳佐剂的筛选

使用不同佐剂的灭活液对小鼠进行攻毒保护试验发现, 铝盐佐剂的灭活液对本研究分离菌株 PmD 的免疫保护率达到 80%, 免疫保护效果较好 (表 5), 确定铝盐佐剂为最佳佐剂。

2.7.3 灭活疫苗的安全性检测

用疫苗液涂布的马丁固体培养基上无细菌生长,

小鼠在 14 d 内无明显的临床反应, 食欲均正常, 剖检免疫小鼠, 小鼠各器官无明显病变。表明灭活疫苗安全性良好。

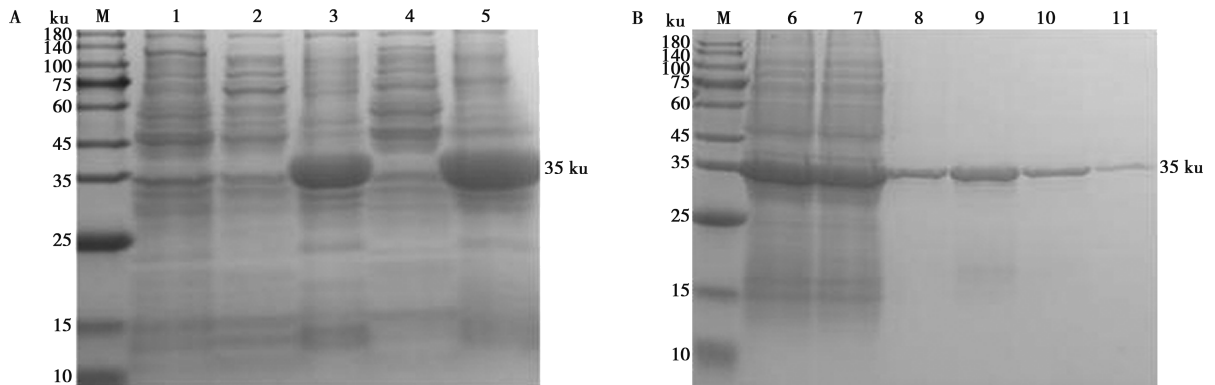
表 5 分离菌株 PmD 最佳佐剂的筛选

组别	处理	死亡数/只	保护率/%
第 1	甲醛灭活液	4	60.0
第 2	铝盐佐剂	2	80.0
第 3	白油佐剂	4	60.0
阴性对照	PBS	10	0

2.8 重组蛋白疫苗的制备

2.8.1 蛋白表达与纯化检测

蛋白表达结果显示, 在 20 °C 和 37 °C 培养条件下, 获得 35 ku 的目的蛋白条带, 该蛋白以包涵体的形式存在 (图 4A)。蛋白纯化结果显示, 500 mmol/L 咪唑洗脱组分得到了较纯的目的蛋白 (如图 4B)。

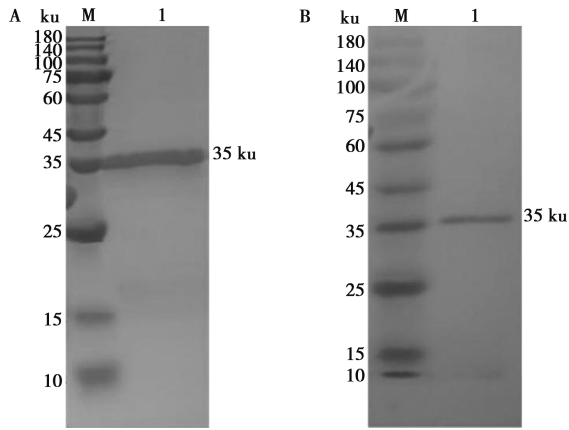


M. 蛋白 Marker; 1. 诱导前总蛋白; 2. 20 °C 上清液; 3. 20 °C 沉淀; 4. 37 °C 上清液; 5. 37 °C 沉淀; 6. 上样; 7. 流出; 8. 平衡; 9~11. 分别为 20、50 和 500 mmol/L 咪唑洗脱组分。

图 4 蛋白表达 (A) 和纯化 (B) 检测

2.8.2 融合目的蛋白验证

对融合蛋白进行 SDS-PAGE 分析,结果显示在理论分子量附近有明显的条带(如图 5A),可初步判断融合蛋白纯化成功。用 TMB 显色试剂盒显色,Western blot 结果显示,在相应位置出现 1 条明显条带(如图 5B),表明该蛋白为目的蛋白。



M. 蛋白 Marker; 1. 融合目的蛋白。

图 5 融合蛋白 SDS-PAGE (A) 和 Western blot (B) 检测验证

2.8.3 重组蛋白疫苗的安全性检测

小鼠背部皮下多点注射蛋白疫苗,48 h 后注射区域有明显肉芽肿出现,属于接种疫苗后常见的反应,无其他临床症状,食欲均正常。第 14 天进行剖检,脏器无明显病变,表明重组蛋白疫苗安全性良好。

2.9 免疫攻毒保护试验

灭活疫苗免疫攻毒保护试验结果显示(表 6),第 2 组小鼠 48 h 内死亡 2 只,其余小鼠均存活,保护率为 80%;第 1、4 组小鼠 24 h 内全部死亡,保护率为 0;第 3 组小鼠 48 h 内死亡 8 只,2 只状态良好,保护率为 20%;阴性对照组小鼠状态均良好。解剖死亡小鼠,心血培养后进行常规细菌检查,确认与注射菌一致。结果表明,本研究分离菌 PmD 灭活疫苗对相同血清型 Pm 的免疫保护效果较好,对不同血清型 Pm 的免疫保护效果差。

表 6 铝盐佐剂灭活疫苗对小鼠的免疫保护效果评价

组别	死亡数/只	保护率/%
1 (PmA-XJ3)	10	0
2 (PmD-XJ3)	2	80
3 (PmF-XJ3)	8	20
4 (Pm 未知型)	10	0
阴性对照 (PBS)	0	100

OmpH 重组疫苗对小鼠的免疫保护效果表明(表 7):18 h 内 b 组和 d 组小鼠精神状态良好, a 组、c 组和 e 组均死亡 2 只,其他组精神状态良好;48 h 内 a 组 2 只死亡, b、e 组 3 只死亡, d 组 1 只死亡;72 h 内 a 组全部死亡, b 组 3 只死亡, c 组 4 只死亡, d 组全部死亡;5 d 后 b 组 3 只死亡, e 组 4 只死亡, c 组全部死亡,对照组精神状态良好。解剖死亡小鼠,心血培养后进行常规细菌检查,确认与注射菌一致。结果表明,蛋白疫苗对小鼠的免疫保护效果差,但与灭活疫苗小鼠死亡时间相比,蛋白疫苗可以延迟小鼠的死亡时间,在临床研究中可为患病动物争取治疗时间。

表 7 OmpH 重组疫苗对小鼠的免疫保护效果评价

组别	死亡数/只	保护率/%
a (PmA-XJ3)	10	0
b (PmD-XJ3)	9	10
c (PmF-XJ3)	10	0
d (Pm 未知型)	10	0
e (PmD 分离株)	9	10
阴性对照 (PBS)	0	100

3 讨论

羊产业是我国规划在“十四五”期间大力发展的产业。新疆作为我国肉羊生产的主力地区,提高产羔数和保障羔羊存活率是非常重要的。Pm 是对羔羊具有严重危害的病原微生物,本研究从病死羔羊肺脏中分离到 1 株强毒力 PmD 菌株,该菌具有 7 重耐药性,与张继红^[11]研究的结果相似。分离菌株未检测到耐药基因,与耐药表型的结果不一致,王子杰等^[12]分析 Pm 和溶血性曼氏杆菌(Mh)的耐药性,发现 Pm 和 Mh 均对青霉素耐药,但并未检测到相关耐药基因;王镭^[13]的研究表明, PmA 和 PmD 菌株均对多种药物耐药,但耐药基因与耐药表型并不能完全吻合。这表明 Pm 菌株对某种抗生素的耐药是由多种机制共同作用的结果,由多种因素决定,如外界环境的诱导、耐药基因的突变等^[14]。由于我国羊肉的消费类型从成年羊转向羔羊^[15],羔羊肉抗生素易残留又是目前非常严峻的食品安全问题,因此,对该菌的控制不能再单纯地依赖于抗生素。Pm 疫苗则是避免严重疾病发生的最佳途径,也可避免生物和食品安全问题。

灭活疫苗因其制备技术成熟,使用过程安全性高,是目前 Pm 防控最常用的疫苗种类之一。但是迄今为止, Pm 商品化疫苗仅具有针对猪、牛、兔和禽

的灭活疫苗,目前暂无用于羊的任何类型商品化疫苗。因此,本研究制备了 PmD 灭活疫苗,其对同血清型菌株 (PmD) 的保护率达到 80%,对异型菌株的保护率较低,这与 Odugbo 等^[16]的研究结果一致,说明 Pm 的交叉保护率较低。

由于 Pm 不同血清型间具有一些同源性较高的保护因子,因此,本研究进一步研究了 OmpH 新型重组蛋白疫苗,即采用羊源 Pm OmpH 蛋白制备重组蛋白疫苗,结果显示其保护率极低,仅对 PmD 型菌株有 10% 的保护率,这与其他源 OmpH 重组蛋白疫苗的结果相差较大^[5-8]。但是也发现该疫苗能延缓小鼠的发病和死亡时间,这与杨成凯^[17]研究的猪源 Pm OmpH 重组蛋白疫苗的研究结果一致。OmpH 重组蛋白疫苗保护率较低的主要原因可能是重组蛋白也需要佐剂的辅助,不同的佐剂能够非特异性地增强或改变机体对抗原的免疫应答,对免疫原本身的影响较大;其次可能是 OmpH 通过原核表达后极易形成包涵体,其复性后对蛋白的功能产生了一定的影响,具体原因还有待进一步研究。

4 结论

本研究从犊羊的肺中分离到 1 株强毒力的 PmD 菌株,该菌具有 7 重耐药,提示对羊场进行日常治疗 Pm 感染时应谨慎使用抗生素。本研究评价了由 PmD 菌株制备的灭活疫苗与 OmpH 重组蛋白疫苗的免疫保护性,提示使用 PmD 灭活疫苗对同血清型菌株的免疫保护效果较好,对不同血清型的 Pm 交叉保护性较差,而 OmpH 重组蛋白疫苗对各种血清型菌株保护效果均不理想,因此,对于羊多杀性巴氏杆菌病的防控还需进一步研究多价疫苗和新型疫苗。

参考文献:

- [1] ALMOHEER R, ABD-WAHID M E, ZAKARIA H A, et al. Spatial, temporal, and demographic patterns in the prevalence of hemorrhagic septicemia in 41 countries in 2005-2019: a systematic analysis with special focus on the potential development of a new-generation vaccine [J]. *Vaccines*, 2022, 10 (2): 315.
- [2] PENG Z, WANG X R, ZHOU R, et al. *Pasteurella multocida*: genotypes and genomics [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2019, 83 (4): e00014-19.
- [3] 李亚菲, 张亚楠, 徐景峨, 等. 鸭源 A 型多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及喹诺酮类药物敏感性分析 [J]. *中国兽医科学*, 2021, 51 (6): 730-736.
- [4] 井郁金. 羊源荚膜血清 A 型多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及生物学特性研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2020.
- [5] HASSAN G M, EL-FEKY Z A, EISSA E A, et al. Rapid diagnosis of virulent *Pasteurella multocida* isolated from farm animals with clinical manifestation of pneumonia respiratory infection using 16S rDNA and KMT1 gene [J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2016, 6 (1): 21-26.
- [6] MUENTHAISONG A, NAMBOOPPHA B, RITTIPORNLERTRAK A, et al. An intranasal vaccination with a recombinant outer membrane protein H against haemorrhagic septicemia in swamp buffaloes [J]. *Vet Med Int*, 2020, 2020: 3548973.
- [7] STHITMATEE N, NUMEE S, KAWAMOTO E, et al. Protection of chickens from fowl cholera by vaccination with recombinant adhesive protein of *Pasteurella multocida* [J]. *Vaccine*, 2008, 26 (19): 2398-2407.
- [8] 马建伟. 牛源多杀性巴氏杆菌交叉保护性抗原的筛选及其融合蛋白免疫效果的研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2015.
- [9] SAHAY S, SHOME R, SANKARASUBRAMANIAN J, et al. Insights into the genome sequence of ovine *Pasteurella multocida* type A strain associated with pneumonic pasteurellosis [J]. *Small Ruminant Research*, 2018, 169: 167-175.
- [10] 石冬月. 分光光度法与酶标仪微量法测量菌液浓度的比较 [J]. *中国医疗器械信息*, 2021, 27 (20): 22-23.
- [11] 张继红. 新疆和静县羊源多杀性巴氏杆菌分离鉴定及耐药性分析 [J]. *中国动物检疫*, 2022, 39 (3): 37-40.
- [12] 王子杰, 操义恒, 马雪, 等. Beltex 羊肺源多杀性巴氏杆菌和溶血曼氏杆菌的分离鉴定及耐药性分析 [J]. *中国兽医学报*, 2022, 42 (9): 1823-1829.
- [13] 王镭. 猪源多杀性巴氏杆菌 A 型、D 型分离株病原学特性比较研究 [D]. 合肥: 安徽农业大学, 2022.
- [14] 马雪, 张丽媛, 陶乔孝慈, 等. 萨福克羊呼吸道感染多杀性巴氏杆菌生物学特性研究 [J]. *中国预防兽医学报*, 2021, 43 (6): 591-596.
- [15] 赵印. 2021 年中国羊业生产形势及 2022 年趋势展望 [J]. *畜牧产业*, 2022 (3): 28-31.
- [16] ODUGBO M O, ODAMA L E, UMOH J U, et al. *Pasteurella multocida* pneumonic infection in sheep: Prevalence, clinical and pathological studies [J]. *Small Ruminant Research*, 2005, 66 (1): 273-277.
- [17] 杨成凯. 猪源多杀性巴氏杆菌保护性抗原基因体外重组表达及免疫效果研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019.