

张国良, 吴营霞, 高盛果, 等. 猪源荚膜血清 F 型多杀性巴氏杆菌的分离鉴定与致病性分析 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (12): 65-73.

ZHANG G L, WU Y X, GAO S G, et al. Isolation, identification and experimental pathogenicity of capsule serogroup F *Pasteurella multocida* from swine [J].

Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2024, 56 (12): 65-73.

猪源荚膜血清 F 型多杀性巴氏杆菌的分离鉴定与致病性分析

张国良[#], 吴营霞[#], 高盛果, 高志远, 赵旭冉, 孙哲^{*}, 张云静^{*}, 田克恭^{*}

(国家兽用药品工程技术研究中心, 河南 洛阳 471000)

摘要: 旨在通过对猪源 F 型多杀性巴氏杆菌临床分离株进行免疫原性和毒力相关的基因鉴定、小鼠毒力试验、猪只致病性研究及药敏试验, 以期进一步认识 F 型多杀性巴氏杆菌的毒力和致病性, 为其亚单位疫苗的研发、临床防控及治疗用药提供参考依据。通过细菌分离培养、革兰染色、生化鉴定、种属和荚膜血清型 PCR 鉴定、基因测序、免疫原性和毒力相关基因 PCR 检测等方法进行细菌鉴定, 并分别在小鼠和猪上进行毒力试验和致病性研究。结果: 分离到 1 株荚膜血清 F 型多杀性巴氏杆菌并命名为 F-HN-2301 株; F-HN-2301 株对小鼠的毒力较强, 腹腔注射 465、48 和 6 CFU/只时, 小鼠在感染后 24~50 h 内全部死亡; F-HN-2301 株对猪的致病力也较强, 耳缘静脉和气管注射攻毒 2.72×10^{10} CFU/头时, 均可引起猪只出现体温升高、精神不振、食欲废绝、呼吸困难等临床表现, 其中耳缘静脉组猪只攻毒后 18~24 h 内全部死亡, 气管注射组猪只攻毒后 24~48 h 内 60% 死亡, 而耳缘静脉注射比气管注射攻毒途径发病更快、死亡率更高; 药敏试验显示 F-HN-2301 株对氨苄西林、阿莫西林、头孢噻吩等 9 种药物高敏。综上, 荚膜血清 F 型多杀性巴氏杆菌对猪有强致病性, 养殖企业和科研者应关注其在临床上的危害性和流行趋势。

关键词: 多杀性巴氏杆菌; 荚膜血清 F 型; 分离鉴定; 致病性

中图分类号: S855 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2024)12-0065-09

Isolation, identification and experimental pathogenicity of capsule serogroup F *Pasteurella multocida* from swine

ZHANG Guoliang[#], WU Yingxia[#], GAO Shengguo, GAO Zhiyuan, ZHAO Xuran, SUN Zhe^{*},

ZHANG Yunjing^{*}, TIAN Kegong^{*}

(National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang 471000, China)

Abstract: The aim of this study was to identify a strain of *Pasteurella multocida* of capsule serotype F by bacterial isolation; Gram staining; biochemical identification; PCR identification of species, capsule serotype of *Pasteurella multocida* and main virulence factors-associated genes; and sequencing analysis, in order to provide reference for clinical diagnosis, preventive vaccine research and development, and clinical therapeutic drugs application. The strain was named F-HN-2301. Then, mice were used and were intra-abdominally infected with 465, 48, 6 CFU of the F-HN-2301 strain; and the mice all died within 24-50 hours after the infection. The virulence tests of mice showed that the F-HN-2301 strain of capsule serogroup F *Pasteurella multocida* exhibited higher virulence. The pathogenicity test of pigs showed that intravenous or tracheal injection of 2.72×10^{10} CFU induced clinical manifestations such as elevated body temperature, mental depression, loss of appetite, and dyspnea. All of the intravenously injected pigs died in 18 to 24 hours, and 60% of the tracheal-injected pigs died in 24 to 48 hours. These results showed that the F-HN-2301 strain also had strong pathogenicity to pigs. Intravenous injection was the faster and higher mortality than tracheal injection. The results of drug sensitivity test showed that the bacterium was highly sensitive to 9 drugs such as ampicillin, amoxicillin and ceftiofur. These results showed that *Pasteurella multocida* capsule serogroup F was highly pathogenic to pigs, suggesting that pig-breeding companies and researchers should pay attention to its clinical harm and epidemic trend.

Keywords: *Pasteurella multocida*; capsule serogroup F; isolation and identification; pathogenicity

收稿日期: 2023-12-13; 修回日期: 2024-09-24

基金项目: 郑洛新国家自主创新示范区创新引领型产业集群专项 (201200211200)

第一作者: 张国良, 男, 学士; 吴营霞, 女, 学士。[#]共同第一作者

^{*} 通信作者: 孙哲, 硕士, 兽医师, 主要从事动物疫病防控与兽医病理学技术研究, E-mail: sunzhe@pulike.com.cn; 张云静, 硕士, 兽医师, 主要从事动物疫病诊断与防控技术研究, E-mail: zhang.yun.jing@163.com; 田克恭, 博士, 研究员, 主要从事动物疫病诊断与防控技术研究, E-mail: vetvac@126.com。

多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*, *P. multocida*) 是一种重要的病原菌, 对多种动物和人均有致病性, 在猪上常引发肺炎和进行性萎缩性鼻炎 (progressive atrophic rhinitis, PAR)。肺炎型猪巴氏杆菌病常表现为化脓性支气管炎、纤维素性肺炎、出血性肺炎等, 又称猪肺疫; 猪多杀性巴氏杆菌还常与其他病原体协同感染, 是导致猪呼吸道疾病综合征 (porcine respiratory disease complex, PRDC) 最常见也是危害最严重的病原之一。Carter 等^[1] 根据荚膜抗原的不同将多杀性巴氏杆菌分为 A、B、D、E 和 F 这 5 个血清型, 我国目前分离到的猪源多杀性巴氏杆菌的荚膜血清型有 A、B、D 和 F, 也有少数无法鉴定荚膜血清型的菌株^[2], 近年来 B 型较少分离到^[3], A 型和 D 型成为当前我国猪群的主要流行荚膜血清型^[4-7]。多杀性巴氏杆菌的荚膜血清型与致病性之间有着一定的相关性, 比如 A 型主要引起猪的巴氏杆菌肺炎, B 型主要引起猪的出血性败血症, 产毒素 D 型主要引起猪的萎缩性鼻炎^[3]。F 型多杀性巴氏杆菌最早分离于美国的火鸡^[8], 随后在全世界禽类中相继分离到, 被认为是引起禽霍乱的主要病原^[9-10], 已有研究报道 F 型多杀性巴氏杆菌对兔、羊和牛均具有较强的致病性^[11-13]。2003 年 Moreno 等^[14] 在巴西有肺炎等症状的猪体内首次分离到 F 型多杀性巴氏杆菌, 我国在 2015 年^[15-17] 也从有肺炎症状猪肺脏中分离到。目前国内在荚膜血清 F 型多杀性巴氏杆菌对猪致病力方面的研究数据有限, 尚不清楚其对猪群的危害性。本文从菌落生长特性、染色特性、生化特性、荚膜血清型分型 PCR 鉴定及小鼠和猪的毒力试验等方面展开研究, 以期对 F 型多杀性巴氏杆菌的临床危害、预防控制和药物治疗等方面提供一定的指导意义。

1 材料与方法

1.1 病料来源

2023 年 2 月河南省周边某规模化养猪企业先后出现 120 日龄左右育肥猪体温升高至 40.5~41 °C, 精神萎靡, 食欲废绝, 呼吸困难, 卧地不起、呈犬坐姿势或急性死亡后口鼻流出白色泡沫样黏液等疑似多杀性巴氏杆菌感染引起发病或死亡的病例。剖检病死猪见气管大量白色泡沫状分泌物, 肺脏广泛水肿出血、局灶性肝样变、表面大量纤维素性渗出物, 全身淋巴结出血等病理变化。随即无菌采集病变肺组织送往实验室进行细菌分离鉴定及药敏试验。

1.2 菌株及试验动物

多杀性巴氏杆菌 A、B、D、E、F 荚膜血清型参考菌株分别为 CVCC390、CVCC391、CVCC392、

CVCC393、CVCC395 均购自中国兽医药品监察所菌(毒)种保藏中心。20 只 18~22 g BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司; 20 头 120 日龄左右多杀性巴氏杆菌阴性的健康易感猪购自河南洛阳某养猪场。

1.3 主要试剂

胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 培养基、胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 购自美国 BD 公司, 无支原体新生牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司, 革兰染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司, 微量生化管、14 种商品化药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司, 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司, Premix *Ex Taq*TM 酶、DNA Marker (DL-2000) 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.4 细菌分离培养及染色鉴定

选取采集肺组织的病变与正常交界处, 表面消毒后使用无菌剪刀剪开一切面, 一次性接种环蘸取切面内部少量组织划线于 TSA 培养基上 (含 5% 新生牛血清) 和麦康凯琼脂培养基上, 置 37 °C 恒温培养 18~24 h, 挑取生长的优势单菌落进行纯化培养后观察菌落形态。挑取纯化的典型单个菌落进行革兰染色, 油镜下观察菌体形态。

1.5 生化鉴定

将分离菌在 TSA 培养基上的纯化培养物接种于 TSB 中 (含 5% 新生牛血清), 180 r/min、37 °C 摇床中培养 12~16 h 的培养物接种于微量生化反应管中, 37 °C 恒温培养 18~24 h, 进行葡萄糖、蔗糖、果糖、山梨醇、甘露醇、乳糖等糖 (醇) 的发酵试验, 并按常规方法分别进行吲哚试验、硫化氢试验、氧化酶试验、触酶试验、V-P 试验、甲基红试验和尿素酶试验, 观察其生化反应特性。

1.6 种属与荚膜血清型的 PCR 鉴定

参考 Townsend 等^[18] 发表的文献合成用于多杀性巴氏杆菌种属的 *KMT1* 基因, 荚膜血清型 A 型 *hyaD-hyaC* 基因、B 型 *bcbD* 基因、D 型 *dcbF* 基因、E 型 *ecbJ* 基因、F 型 *fcdbD* 基因的鉴定引物, 引物序列与目的片段大小见表 1。引物均由金唯智生物科技有限公司合成。

按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA。PCR 扩增体系为: Premix *Ex Taq*TM 12.5 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 1 μL, 模板 2.0 μL、加双蒸水至 25 μL。反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。扩增结束后取上述产物于 1.0% 琼脂糖凝胶上 120 V 电泳检测, 同时设 A、B、D、E、F 荚膜血清型参照菌株作为阳性参照。多

杀性巴氏杆菌种属和荚膜血清型鉴定的 PCR 产物由上海英骏生物技术有限公司测序。

表 1 多杀性巴氏杆菌种属及荚膜血清分型鉴定的 PCR 引物信息

基因名称	引物序列 (5'→3')	片段长度/ bp
KMT1	F: ATCCGCTATTTACCCAGTGG	460
	R: GCTGTAAACGAACCTCGCCAC	
A 型 <i>hyaD-hyaC</i>	F: TGCCAAAATCGCAGTCAG	1 044
	R: TTGCCATCATTTGTCAGTC	
B 型 <i>bcbD</i>	F: CATTATATCCAAGCTCCACC	760
	R: GCCCGAGAGTTTCAATCC	
D 型 <i>dcbF</i>	F: TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC	657
	R: CATCTACCCACTCAACCATATCAG	
E 型 <i>ecbJ</i>	F: TCCGCAGAAAATTATTGACTC	511
	R: GCTTGCTGCTTGATTTTGTCT	
F 型 <i>fcbD</i>	F: AATCGGAGAACGCAGAAATCAG	851
	R: TTCCGCCGTCAATTACTCTG	

1.7 免疫原性基因与毒力基因鉴定

参考 Khamesipour 等^[19]发表的文献中与免疫原性和毒力相关的外膜蛋白、铁代谢蛋白、黏附蛋白、唾液酸酶蛋白等 4 种蛋白的 21 个基因进行鉴定, 具体包括外膜相关蛋白基因: 转运蛋白 *OmpA*、*OmpH*、*Oma87*、脂蛋白 *PlpB*; 黏附相关的蛋白基因: 菌毛蛋白 *ptfA*、*FimA*, 自转运黏附素 *Hsf_1*、*Hsf_2*, 丝状血凝素 *PfhA*, 非特异性黏蛋白 *tadD*; 铁代谢相关蛋白基因: TonB 依赖复合系统蛋白 *ExbB*、*ExbD*、*TonB*, 血红蛋白结合蛋白 *HgbA*、*HgbB*, 铁摄取蛋白 *Fur*; 唾液酸酶 *NanH*; 超氧化物歧化酶 *sodA*、*sodC*; 毒素 PMT 蛋白 *toxA*; 透明质酸合成酶 *pmHAS*。以 F 荚膜血清型 CVCC395 标准菌株作为参考菌株, 引物均由金唯智生物科技有限公司合成, 引物序列与目的片段大小见表 2。PCR 扩增体系为 Premix *Ex Taq*TM 12.5 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 模板 2.0 μ L、加双蒸水至 25 μ L。扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.8 F 型分离株对小鼠的毒力试验

将分离到的菌株接种于 TSA 培养基 (含 5% 新生牛血清), 37 $^{\circ}$ C 复苏培养 18 h, 挑取单菌落传代 1 次后进行密集划线培养 12~18 h, 培养基表面的菌苔使用 5 mL pH 值为 7.2 的 PBS 洗脱混匀, 进行 2 倍倍比稀释 5 个梯度, 分别测定其 OD_{600} 值同时进行平板活菌计数并建立标准曲线。

根据标准曲线稀释制备的攻毒菌液活菌含量分别至 10^3 、 10^2 和 10 CFU/mL, 同时按照常规方法对攻毒菌液进行活菌计数确定其实际接种的活菌量。20 只 BALB/c 小鼠随机分为 4 组, 包括 3 组攻毒组和 1 组空白组, 攻毒组每只小鼠分别腹腔接种 0.5 mL 攻毒菌液, 空白组每只小鼠接种同剂量的 pH=7.2 的 PBS 溶液。攻毒后观察、记录临床表现及死亡数量至攻毒后第 7 天, 观察期内死亡小鼠立即进行剖检、观察组织脏器病变并采集肺进行细菌分离鉴定。

1.9 F 型分离株对猪的致病性试验

按照 1.8 中同样的方法拟制备攻毒菌液的活菌含量为 10^{10} CFU/mL, 同时对攻毒菌液进行活菌计数确定实际接种的活菌量。使用多杀性巴氏杆菌 A、B、D、E、F 参考菌株建立的全菌抗原包被的 ELISA 抗体检测盒和多杀性巴氏杆菌种属的 KMT1 基因核酸检测均为阴性的 120 日龄左右的健康易感猪 20 头, 随机分为耳缘静脉注射攻毒组、气管注射攻毒组和两个空白组, 每组 5 头; 其中耳缘静脉注射和气管注射攻毒剂量均为 2 mL, 空白组分别注射相同剂量的 pH=7.2 的 PBS 溶液。攻毒后观察、记录临床表现并每日测温至攻毒后第 10 天, 猪只死亡后或试验结束时均剖检观察心、肺等有明显病变的脏器组织, 取样进行细菌分离鉴定和病理组织学观察。

1.10 药敏试验

使用氨苄西林、阿莫西林、头孢噻唑、卡那霉素、大观霉素、多西环素、氟苯尼考、替米考星、恩诺沙星、甲氧苄氨嘧啶、环丙沙星、四环素、红霉素和林可霉素等 14 种商品化药敏试纸按照常规 K-B 琼脂扩散纸片法操作进行药敏试验, 测得其抑菌圈大小, 按美国临床试验标准研究所 (CLSI/NCCLS) 的判断标准^[20], 确定分离到的细菌对各种药物的耐药性。

表 2 免疫原性和毒力相关基因的 PCR 鉴定引物信息

基因名称	引物序列 (5'→3')	片段长度/bp
<i>OmpA</i>	F: CGCATAGCACTCAAGTTTCTCC R: CATAAACAGATTGACCGAAACG	201
<i>OmpH</i>	F: CGCCTATGAAGGTTTAGGT R: TTTAGATTGTGCGTAGTCAAC	438
<i>Oma87</i>	F: GGCAGCGAGCAACAGATAACG R: TGTTCTGCAAAATGTCGGGTGA	838
<i>PlpB</i>	F: TTTGGTGGTGCCTATGTCTTCT R: AGTCACTTTAGATTGTGCGTAG	282
<i>ptfA</i>	F: TGTGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC R: TCATGAATTCCTTATGCGCAAAATCCTGCTGG	488
<i>FimA</i>	F: CCATCGGATCTAAACGACCTA R: AGTATTAGTTCTGCGGGTG	866
<i>Hsf_1</i>	F: TTGAGTCGGCTGTAGAGTTTCG R: ACTCTTTAGCAGTGGGGACAACCTC	654
<i>Hsf_2</i>	F: ACCGCAACCATGCTCTTAC R: TGA CTGACATCGGCGGTAC	433
<i>PfhA</i>	F: TTCAGAGGGATCAATCTTCG R: AACTCCAGTTGGTTTGTGCG	286
<i>tadD</i>	F: TCTACCCATTCTCAGCAAGGC R: ATCATTTCGGGCATTACCC	416
<i>ExxB</i>	F: TTGGCTTGTGATTGAACGC R: TGCAGGAATGGCGACTAAA	283
<i>ExxD</i>	F: CGTCTGATTACAGCCTCTT R: AACGAAATCTTGAAACTGG	247
<i>TonB</i>	F: CGACGGTGAAACCTGAGCCA R: CCGAGCGATAAGCATTGACT	261
<i>HgbA</i>	F: TCAACGGCAGATAATCAGGG R: GCGGGAATGCTGAAGATAAG	267
<i>HgbB</i>	F: GTTTACCGTGTATTAGACCA R: CATTACTACATTTGCCATAC	244
<i>Fur</i>	F: ACCGCGTTGGAATTATGATTG R: CATTGAGTACGGCTTGACAT	788
<i>NanH</i>	F: GTGGGAACGGGAATTGTGA R: ACATGCCAAGTTTGCCTA	287
<i>sodA</i>	F: TACCAGAATTAGGCTACGC R: GAAACGGGTTGCTGCCGCT	361
<i>sodC</i>	F: AGTTAGTAGCGGGTTGGCA R: TGGTGCTGGGTGATCATCATG	235
<i>toxA</i>	F: CTTAGATGAGCGACAAGG R: GAATGCCACACCTCTATAG	864
<i>pmHAS</i>	F: TCAATGTTGCGATAGTCCGTTAG R: TGGCGAATGATCGGTGATAGA	430

2 结果与分析

2.1 细菌分离培养与革兰染色

TSA 培养基 (含 5% 新生牛血清) 上培养 18~24 h 后, 平板上可形成圆形、光滑、湿润、凸起、

直径 1~2 mm 的菌落 (图 1A), 而在麦康凯琼脂培养基上不生长。TSA 琼脂培养基上的菌落纯化培养后挑取单菌落进行革兰染色显微镜下观察为呈红色、两极浓染革兰阴性短小杆菌、单个存在或成双排列 (图 1B), 符合多杀性巴氏杆菌的形态特征。

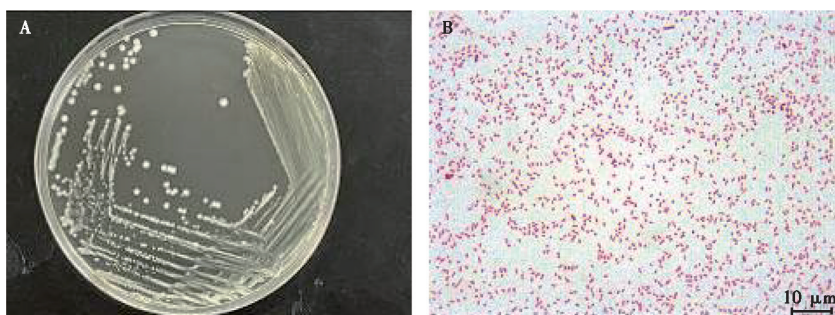


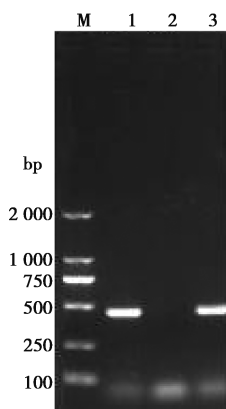
图 1 分离菌在 TSA 平板上的菌落形态 (A) 和革兰染色 (B)

2.2 生化鉴定

生化结果显示分离菌发酵葡萄糖、蔗糖、果糖和山梨醇、甘露醇, 不发酵乳糖、鼠李糖、棉子糖、菊糖, 吲哚试验、硫化氢试验、氧化酶试验、触酶试验均为阳性, V-P 试验、甲基红试验和尿素酶试验为阴性, 与多杀性巴氏杆菌的生物学特性一致。

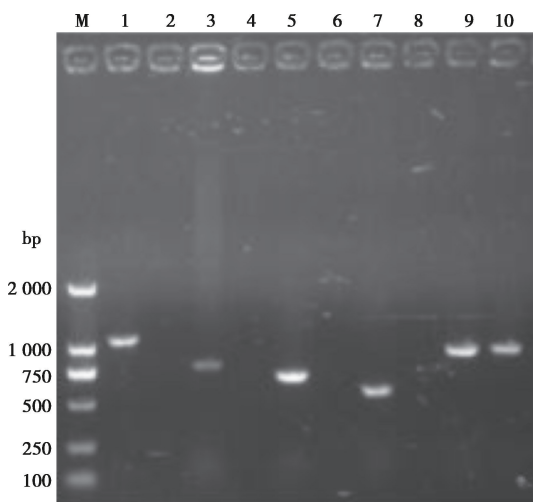
2.3 种属及荚膜血清型 PCR 鉴定

使用多杀性巴氏杆菌种属 *KMT1* 基因的特异性引物对目的基因进行扩增, 凝胶电泳检测结果显示 PCR 扩增产物大小 460 bp 左右, 与预期片段大小相符 (图 2)。使用 5 对多杀性巴氏杆菌荚膜血清型 A、B、D、E、F 的分型引物对各自的目的基因进行扩增, 凝胶电泳检测结果显示, 分离菌的 PCR 扩增产物大小在 851 bp 左右 (图 3), 与荚膜血清 F 型引物的扩增片段大小相符, 而 A、B、D、E 其他 4 种荚膜血清型引物均未扩增出目的基因条带, 由此确定该分离菌株为荚膜血清 F 型的多杀性巴氏杆菌。利用 NCBI 在线对种属 PCR 产物的序列进行 BLAST 分析, 与 GenBank 中多杀性巴氏杆菌的特异性基因 *KMT1* 序列 (AF016259) 的同源性为 99%, 将分离菌的分型 PCR 产物测序结果经 BLAST 比对分析其与 F 型特异性基因 *fcbD* 序列 (AY604234.1) 同源性为 100%。因此结合菌落形态、染色特征、生化鉴定、PCR 鉴定及测序结果分析, 确定此分离株为多杀性巴氏杆菌荚膜血清 F 型, 并将其命名为 F-HN-2301 株。



M. DNA Marker; 1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3. 分离菌株。

图 2 分离菌的 PCR 鉴定



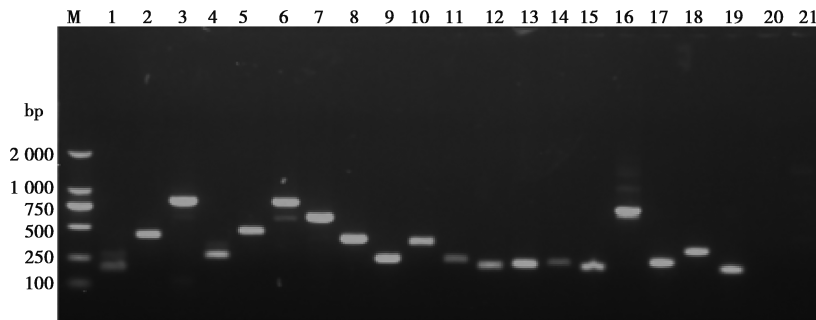
M. DNA Marker; 1、3、5、7、9. 分别为荚膜血清 A、B、D、E、F 型的参考菌株; 2、4、6、8、10. 分离菌株。

图 3 分离菌多杀性巴氏杆菌荚膜血清型 PCR 鉴定

2.4 F-HN-2301 株的免疫原性基因与毒力基因鉴定

使用文献 [19] 中免疫原性和毒力基因相关的 21 个基因的特异性引物对 F-HN-2301 株的目的基因

进行扩增, 凝胶电泳检测结果显示, 毒素 PMT 蛋白 *toxA* 和透明质酸合成酶 *pmHAS* 等两个基因未检测到目的片段, 而其他 19 个基因的扩增片段均与预期片段大小相符 (图 4)。



M. DNA Marker; 1. *OmpA*; 2. *OmpH*; 3. *Oma87*; 4. *PlpB*; 5. *ptfA*; 6. *FimA*; 7. *Hsf_1*; 8. *Hsf_2*; 9. *PflA*; 10. *tadD*; 11. *ExbB*; 12. *ExbD*; 13. *TonB*; 14. *HgbA*; 15. *HgbB*; 16. *Fur*; 17. *NanH*; 18. *sodA*; 19. *sodC*; 20. *toxA*; 21. *pmHAS*。

图 4 分离菌 21 种免疫原性基因与毒力基因 PCR 鉴定

2.5 F-HN-2301 株对小鼠的毒力试验

活菌计数后确定每攻毒组小鼠实际接种的活菌量分别为 465、48 和 6 CFU/只。小鼠毒力试验表明, 两个高剂量组小鼠在攻毒后 6 h 开始出现精神萎靡、嗜睡、身体蜷缩、被毛凌乱、不食等临床表现, 两组均在 24 h 内全部死亡; 6 CFU/只剂量组小鼠在攻毒后 18 h 开始出现精神不振、扎堆嗜睡、采食量减少或不食等症状, 攻毒后 50 h 内全部死亡; 空白组小鼠全部正常、无死亡。小鼠死亡后立即对其进行剖检观察, 空白组小鼠肺脏的颜色、质地均正常, 攻毒组小鼠的肺脏颜色呈黑红色、严重淤血出血、大面积红色肝样实变 (图 5), 且均能从死亡小鼠的肺脏中重新分离到与 F-HN-2301 株的菌落、染色形态及生化特性一致的菌株, 使用多杀性巴氏杆菌种属和荚膜血清 F 型的特异性引物分别能扩增出 460、851 bp 左右的特异性基因片段, 显示所分离的细菌确为多杀性巴氏杆菌荚膜血清 F 型。

2.6 F-HN-2301 株对猪的致病性试验

活菌计数后确定两个攻毒组的实际攻毒活菌量为 2.72×10^{10} CFU/头。耳缘静脉攻毒组猪只于攻毒后 4 h 左右体温升高, 出现精神萎靡、食欲废绝、卧地不起等临床症状, 5 头猪只在攻毒后 18~24 h 内全部死亡, 死亡猪只口鼻和气管内有白色泡沫样黏液, 剖检肺脏见出血点和出血斑等出血性肺炎的病变。气管注射攻毒组猪只在攻毒后 8 h 左右体温升高, 随后逐渐表现出精神沉郁、被毛粗乱、采食量下降、卧地不起、呼吸困难、咳嗽、呈犬坐姿势等临床症状并见腿关节肿胀, 其中 3 头于攻毒后 24~48 h 内死亡, 死亡猪只同样口鼻流出白色泡沫样黏液 (图 6A), 剖检见肺表面一层纤维素样渗出物、大面积出血淤血、红色肝样实变等出血性纤维素性肺炎的病变 (图 6B), 关节内大量黄色浑浊液体渗出。两头存活猪于攻毒后 10 d 试验结束时进行剖检, 可见心包膜及心外膜增厚并粘连一起、心包膜内大量黄白色纤维素样渗出物 (图 6C), 肺边缘纤维素样渗出物、局灶性红色肝样实变及弥漫性出血点等病变 (图 6D)。

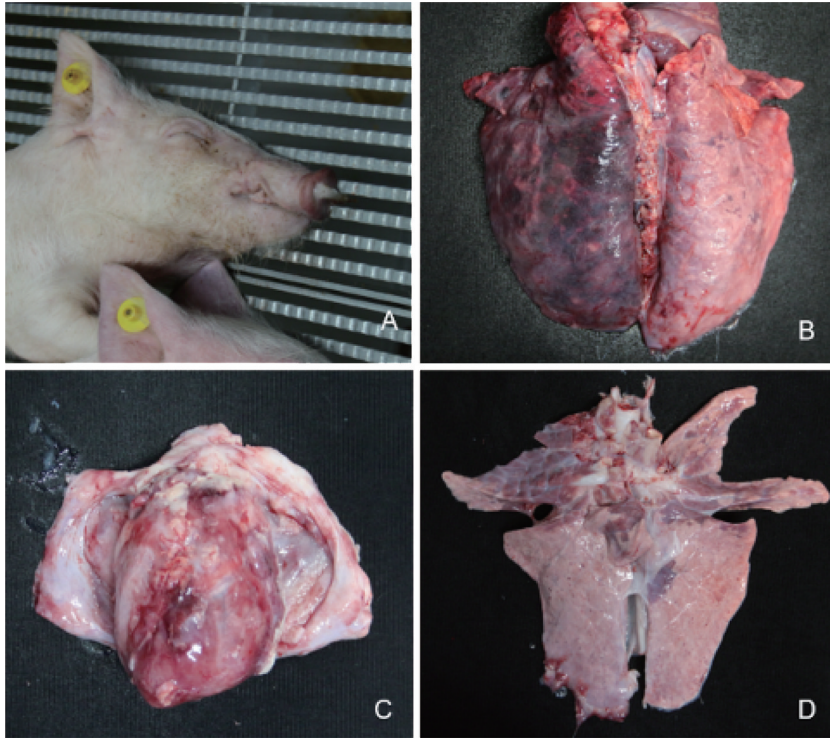
采集病变肺组织进行细菌分菌鉴定、特异性种属和荚膜血清 F 型的 PCR 鉴定, 确定分离到的菌株为 F 型多杀性巴氏杆菌。图 7 的 HE 染色病理组织学观察结果显示, 气管注射攻毒组死亡猪只的肺泡壁血管弥漫性淤血、局灶性出血, 肺泡腔内见均质红染的浆液性渗出物 (图 7A), 肺外膜增厚、成纤维细胞增生、附着大量红染的纤维蛋白性渗出物等出血性纤维素性肺炎的组织学病变。气管注射攻毒组存活猪只的肺泡间隔增宽、肺泡腔及肺泡隔内大量炎性细胞浸润



图 5 攻毒组小鼠死亡后剖检肺脏病变

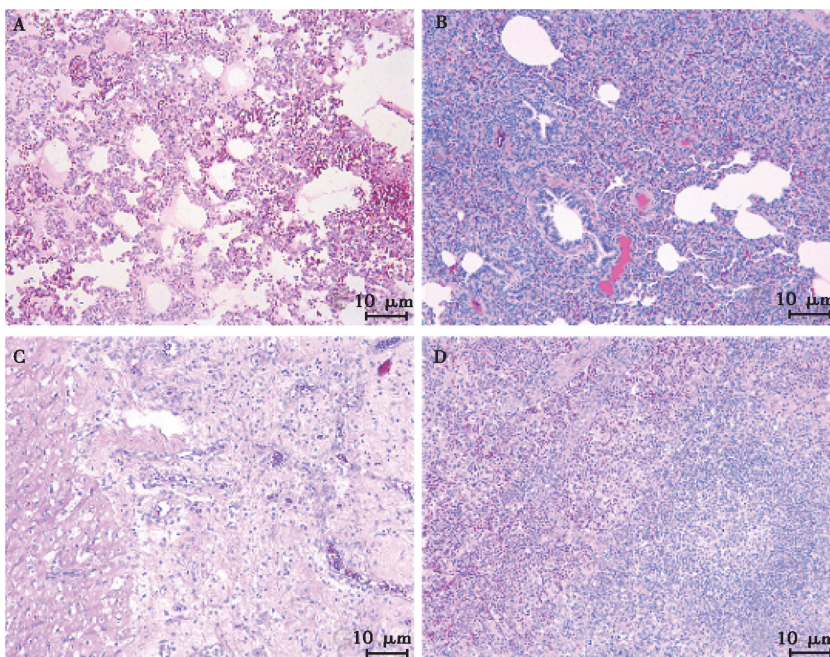
(图 7B), 局部肺外膜增厚、附着纤维蛋白性渗出物等组织学病变; 心外膜大量成纤维细胞和小血管增生、其间有红染的纤维蛋白性渗出物和炎性细胞浸润

(图 7C); 淋巴结被膜下窦和髓窦内出血、大量中性粒细胞浸润 (7D)。



A. 死后口鼻白色泡沫样黏液; B. 肺淤血出血、表面纤维素样渗出物;
C. 心外膜及心包膜内纤维素样渗出物; D. 肺局灶性肝样实变及出血点。

图 6 F-HN-2301 株对猪的致病性



A. 死亡猪只肺脏; B. 存活猪只肺脏; C. 存活猪只心脏; D. 存活猪只淋巴结。

图 7 气管注射组猪只病理组织学观察

2.7 药敏试验

通过测定抑菌圈大小,参考 CLSI/NCCLS 的判定标准,可见多杀性巴氏杆菌膜血清 F 型分离株 F-HN-2301 株对氟苯尼考、替米考星、红霉素、林可霉素等 4 种药物耐药,对卡那霉素中度敏感,对其他 9 种药物均为敏感(表 3)。

表 3 分离株 F-HN-2301 株的药敏试验

药敏纸片种类	抑菌圈直径/mm	结果判定
氨苄西林	24	敏感
阿莫西林	28	敏感
头孢噻唑	22	敏感
卡那霉素	15	中度敏感
大观霉素	19	敏感
多西环素	23	敏感
氟苯尼考	15	耐药
替米考星	14	耐药
恩诺沙星	21	敏感
甲氧苄氨嘧啶	27	敏感
环丙沙星	30	敏感
四环素	26	敏感
红霉素	14	耐药
林可霉素	6	耐药

3 讨论

近年来我国从患有肺炎症状的猪体内分离到一定数量的荚膜血清 F 型多杀性巴氏杆菌,这预示着荚膜血清 F 型可能也是导致肺炎型猪巴氏杆菌病的病原。多数研究表明荚膜 F 型对小鼠具有较强的致病力,王羽等^[21]测定出其分离的猪源荚膜血清 F 型多杀性巴氏杆菌对小鼠的 LD₅₀ 值为 6.29×10^7 CFU; 彭忠^[22]以 320 CFU/只剂量感染小鼠时,感染后 72 h 内全部死亡;方超^[2]研究 4 株猪源荚膜血清 F 型多杀性巴氏杆菌感染小鼠剂量分别为 4、5、11 和 17 CFU/只时,可导致小鼠 60 h 内全部死亡。本研究的结论基本与上述一致,F-HN-2301 株最低以 6 CFU/只感染小鼠时,在感染后 50 h 内小鼠全部死亡,可见荚膜血清 F 型菌株对小鼠的毒力普遍较强。关于猪源 F 型多杀性巴氏杆菌对猪的致病性研究相对较少,国内只有彭忠^[22]研究 8 周龄仔猪气管内接种荚膜 F 型 HN07 株 7.86×10^{10} CFU/头的剂量时,猪只在感染后 84 h 内 80% 死亡,说明荚膜 F 型 HN07 株对猪具有较强的致病力。本研究通过对 150 日龄猪只耳缘静脉和气管注射攻毒 F-HN-2301 株 $2.72 \times$

10^{10} CFU/头,猪只感染后分别 100% 和 60% 死亡,剖检和组织学观察可见肺出血淤血、纤维素性渗出等出血性肺炎和纤维素性肺炎的病变,同样得出 F-HN-2301 株也对猪具有较强的致病力。由此可见荚膜血清 F 型多杀性巴氏杆菌的毒力较强,对猪群的影响和危害应予以足够重视。除了目前流行的荚膜血清 A 型和 D 型之外,F 型将来也有可能成为我国猪群中流行的重要荚膜型之一。

本研究首次采用两种攻毒途径比较 F 型多杀性巴氏杆菌对猪致病性的差异,耳缘静脉攻毒的菌液直接进入血液循环中,猪只起病快、病程急、死亡率更高,其肺脏最显著的特点是出血,更接近临床上败血型巴氏杆菌病的特点。气管注射攻毒的菌液由气管直接进入肺中,其病程长、部分猪只不死亡可耐过、猪只的呼吸道症状也更明显,剖检和组织学病变均可观察到出血性肺炎和纤维素性肺炎的病变,其更接近肺炎型巴氏杆菌病的特点。然而,疾病病程的快慢、严重程度及感染率、死亡率还与不同菌株的毒力强弱有关,就 F-HN-2301 株而言,耳缘静脉途径比气管注射途径的致病性更强。本研究结果可为临床上不同表现型的猪多杀性巴氏杆菌病的鉴别诊断提供依据。

通过对 F-HN-2301 株的 21 种免疫原性与毒力相关基因鉴定,其中毒素 PMT 蛋白 *tox A* 基因和透明质酸合成酶 *pmHAS* 基因未鉴定出。据研究显示,PMT 是由 D 型和少数 A 型产毒素多杀性巴氏杆菌分泌的一种蛋白毒素,主要引起猪萎缩性鼻炎^[23],而透明质酸合成酶主要存在 B 型且导致牛出血性败血症^[24]。从猪肺炎病例中分离到的荚膜血清 F 型 F-HN-2301 株未鉴定出此两种蛋白的特异性基因,符合猪源荚膜血清 F 型的特性。与保护性相关的重要免疫原性蛋白基因 *OmpA*、*OmpH*、*Oma87*、*PlpB*、*ptfA*、*Fur* 等在 F-HN-2301 株均可鉴定出,推测此菌株的免疫原性相对较好。

目前我国用于预防猪多杀性巴氏杆菌病的疫苗主要为弱毒活疫苗,其次灭活疫苗两种,疫苗菌株多为荚膜血清型 B 型,少数为 A 型,而近年来国内少有猪源 B 型多杀性巴氏杆菌的分离报道,这可能与我国前期一直使用 B 型疫苗有很大关系。由于不同血清型疫苗的交叉保护性较低,当前国内使用的疫苗并不能完全对引起猪巴氏杆菌病的流行菌株 A 型、D 型,包括毒力较强的 F 型起到保护效果,所以针对现有流行菌株的疫苗需求迫切。通过研究荚膜血清 F 型菌株 F-HN-2301 对猪只的致病性试验,得到了感染后的临床症状、病程变化、剖检病变及不同攻毒途径的差异性可作为疫苗开发与研究的基础,对其 21 种免疫原性与毒力相关基因鉴定可为灭活疫苗开发和

亚单位疫苗靶蛋白抗原的筛选奠定基础；而药敏试验得出 F-HN-2301 株对氟苯尼考、替米考星、红霉素、林可霉素等 4 种药物耐药，也为养殖生产的治疗用药提供参考。

参考文献：

- [1] CATER G R. Studies on *Pasteurella multocida*. I. A hemagglutination test for the identification of serological types [J]. *Am J Vet Res*, 1955, 16 (60): 481-484.
- [2] 方超. 湖南省猪源多杀性巴氏杆菌血清型鉴定及 F 型的致病性研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2017.
- [3] 汤细彪. 猪源多杀性巴氏杆菌的分子流行病学与致病性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [4] TANG X B, ZHAO Z Q, HU J Y, et al. Isolation, antimicrobial resistance and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China [J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47 (4): 951-958.
- [5] 席晓剑, 赵战勤, 薛云, 等. 猪源多杀性巴氏杆菌的病原流行病学及其毒力特性 [J]. *中国兽医学报*, 2015, 48 (8): 1205-1210.
- [6] 胡星星, 郭龙, 宋文博, 等. 2017 年我国猪源多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及耐药性分析 [J]. *中国兽药杂志*, 2019, 53 (3): 1-6.
- [7] 乔鹏芸. 猪源多杀性巴氏杆菌的分型及其毒力特性研究 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2017.
- [8] RIMLER R B, RHOADES K R. Serogroup F, a new capsule serogroup of *Pasteurella multocida* [J]. *J Clin Microbiol*, 1987, 25 (4): 615-618.
- [9] RHOADES K R, RIMLER R B. Capsular groups of *Pasteurella multocida* isolated from avian hosts [J]. *Avian Dis*, 1987, 31 (4): 895-898.
- [10] WILSON M A, DUNCAN R M, NORDHOLM G E, et al. *Pasteurella multocida* isolated from wild birds of North America: a serotype and DNA fingerprint study of isolates from 1978 to 1993 [J]. *Avian Dis*, 1995, 39 (3): 587-593.
- [11] JAGLIC Z, JEKLOVA E, LEVA L, et al. Experimental study of pathogenicity of *Pasteurella multocida* serogroup F in rabbits [J]. *Vet Microbiol*, 2008, 126 (1): 168-177.
- [12] CATRY B, CHIERS K, SCHWARZ S, et al. Fatal peritonitis caused by *Pasteurella multocida* capsular type F in calves [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, 43 (3): 1480-1483.
- [13] DAVIES R L, WATSON P J, CAFFREY B. Comparative analyses of *Pasteurella multocida* strains associated with the ovine respiratory and vaginal tracts [J]. *Vet Rec*, 2003, 152 (1): 7-10.
- [14] MORENO A M, BACCARO M R, FERREIRA A J, et al. Use of single-enzyme amplified fragment length polymorphism for typing *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolates from pigs [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41 (4): 1743-1746.
- [15] 林星宇, 王印, 杨泽晓, 等. 猪源荚膜血清 F 型多杀性巴氏杆菌的分离鉴定 [J]. *中国兽医科学*, 2015, 45 (6): 567-571.
- [16] 彭忠, 王庚, 吴广敬, 等. 猪源多杀性巴氏杆菌的分离与鉴定 [J]. *中国兽医科学*, 2015, 45 (9): 943-951.
- [17] 王庚. 2014 年—2015 年部分省区猪源多杀性巴氏杆菌的分离鉴定 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2015.
- [18] TOWNSEND K M, BOYCE J D, CHUNG J Y, et al. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of multiplex capsular PCR typing system [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39 (3): 924-929.
- [19] KHAMESIPOUR F, MOMTAZ H, MAMOREH M E. Occurrence of virulence factors and antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* strains isolated from slaughter cattle in Iran [J]. *Front Microbiol*, 2014, 536: 1-8.
- [20] CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, 5th edition (VET01, 5th ed) [S]. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018: 104-107.
- [21] 王羽, 董文龙, 王巍, 等. 猪源荚膜血清 F 型多杀性巴氏杆菌分离鉴定 [J]. *中国兽医杂志*, 2017, 53 (6): 31-32.
- [22] 彭忠. 猪多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及全基因组重测 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.
- [23] FELIX R, FLEISCH H, FRANSEN P. L. Effect of *Pasteurella multocida* toxin on bone resorption *in vitro* [J]. *Infect and Immun*, 1992, 60 (12): 4984-4988.
- [24] CARTER G R, CHENGAPPA M M. Hyaluronidase production by type B *Pasteurella multocida* from cases of hemorrhagic septicemia [J]. *J Clin Microbiol*, 1980, 11 (1): 94-96.