

肉牛溶血性曼氏杆菌的分离鉴定及药敏试验^①

张升杨, 李前勇, 张德志, 詹飞, 别凤斌

西南大学(荣昌校区) 动物医学系, 重庆 荣昌 402460

摘要: 从发生运输应激病牛鼻咽部采取鼻拭子 3 个, 经细菌分离培养、致病性试验、生化试验及 16S rRNA 序列分析, 结果表明所分离出的 3 株菌均为致病性、溶血性曼氏杆菌; KB 药敏试验法证实, 3 株菌对磷霉素、菌必治、阿米卡星、克拉霉素、阿奇霉素、乙酰螺旋霉素等呈现出高度敏感, 而对牛病临床常用的青霉素类、头孢菌素类、氨基糖苷类药物表现出明显的耐药性。

关键词: 肉牛; 溶血性曼氏杆菌; 分离鉴定; 药敏试验

中图分类号: S823

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)01-0021-04

溶血性曼氏杆菌 *Mannheimia haemolytica* 原名溶血性巴氏杆菌 *Pasteurella haemolytica*。以往的学者依据反刍兽曼氏杆菌、肉芽肿曼氏杆菌等的分子结构特征建立了曼氏杆菌属, 随即溶血性巴氏杆菌被归入曼氏杆菌属并命名为溶血性曼氏杆菌^[1-3], 它既是牛羊肺炎、新生羔羊急性败血症的主要病原菌, 也是引起牛运输应激、甚至致死的最重要病原菌之一。据资料记载, 全球大约 30% 的病死牛与曼氏杆菌感染有关, 每年给北美国家导致的经济损失超过 10 亿美元^[4-5]。我国关于山羊、绵羊溶血性曼氏杆菌感染的病例及相关研究报道较多^[6-8], 但尚未见肉牛溶血性曼氏杆菌病的相关报道。本试验将传统的病原学分离与 16S rRNA 序列分析技术相结合, 对发生运输应激病牛鼻拭子中分离出的 3 株致病性牛溶血性曼氏杆菌进行了分离鉴定, 并结合牛病诊疗实际, 开展了该病原的药敏试验, 旨在为当前肉牛生产呼吸道疾病的有效防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 病料来源

2013 年 11 月 12 日, 重庆市永川区远略牛场从山东购买了一批肉牛, 体质量为 90 kg 左右, 购回后 22 头陆续发病, 3 d 后死亡 1 头。患病牛临床症状表现为体温升高到 41 ℃, 精神萎靡, 食欲下降, 鼻镜湿度加大, 流粘脓性鼻液, 咳嗽, 肺呼吸音增强, 肺听水泡音; 大多水样腹泻, 严重者粪便夹杂血凝块; 牛只站立不稳, 有的卧地不起。当地兽医初诊为支原体感染, 用氨苄青霉素、泰乐菌素分别肌注, 大观霉素粉剂口服治疗无效, 遂采取 3 个病牛鼻拭子进行实验室确诊。

1.2 病原菌的分离

将采集的鼻拭子无菌涂抹接种于鲜血营养琼脂平板上, 37 ℃ 培养 24 h, 然后无菌分别挑取鲜血琼脂板上单个菌落, 分别接种于麦康凯琼脂平板和 LB 琼脂平板上培养, 观察细菌的培养特性及菌落形态, 并挑取单个菌落进行革兰氏染色, 镜检。

^① 收稿日期: 2015-11-11

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAD36B01); 重庆市科技支撑示范工程项目(jcsf121-2012-01-1)。

作者简介: 张升杨(1990-), 男, 云南昆明人, 硕士研究生, 主要从事临床兽医学研究。

通信作者: 李前勇, 博士, 副教授。

1.3 生化试验

用细菌的微量生化反应管(杭州微生物试剂有限公司出品,批号 201403170113)对所分离菌株进行生化指标测定,操作方法及判断标准参照该公司操作方法和标准进行,在 37℃下培养 24 h,观察试验结果.

1.4 致病性试验

28 只小鼠随机分成对照组,试验 I,II,III,IV,V,VI 组,每组 4 只.试验 I,III,V 组分别腹腔注射 3 株菌纯培养物 0.25 mL/只,实验 II,IV,VI 组分别腹腔注射 0.5 mL/只,对照组腹腔注射灭菌血清营养肉汤 0.25 mL,0.5 mL 各 2 只.注射后观察小鼠的发病及死亡情况,并剖检;用接种环分别挑取心血、肝组织接种血清营养肉汤,37℃增菌培养 24 h.然后将培养物分别在麦康凯琼脂平板和鲜血营养琼脂平板上划线接种,37℃培养 24 h.观察细菌的培养特性及菌落形态,革兰氏染色观察细菌形态,并比较与之前细菌培养与分离的结果是否一致.

1.5 16S rDNA 序列分析

利用细菌基因组 DNA 试剂盒(北京天根生物技术有限公司出品)提取分离菌基因组,以细菌 16S rDNA 通用引物(上游:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';下游:5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,切胶后送上海英俊生物技术公司进行测序,将测定的序列在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>)进行 BLAST 搜索比对,鉴定细菌的种属.

1.6 药敏试验

采用纸片扩散试验法,选用杭州微生物试剂有限公司出品的药敏试纸片进行.试验操作方法及判断标准参照该公司相关技术资料.所用的试纸片有磷霉素(200 μg/片)、氧氟沙星(5 μg/片)、庆大霉素(120 μg/片)、链霉素(10 μg/片)、卡那霉素(30 μg/片)、红霉素(15 μg/片)、痢特灵(300 μg/片)、阿米卡星(30 μg/片)、洛美沙星(10 μg/片)、新生霉素(30 μg/片)、强力霉素(30 μg/片)、万古霉素(30 μg/片)、呋喃妥因(30 μg/片)、先锋必(75 μg/片)、克拉霉素(15 μg/片)、恩诺沙星(5 μg/片)、阿奇霉素(15 μg/片)、乙酰螺旋霉素(30 μg/片)、菌必治(30 μg/片)、壮观霉素(100 μg/片)、多黏菌素 B(30 μg/片)、林可霉素(2 μg/片)、先锋噻肟(30 μg/片)、头孢呋肟(30 μg/片)、头孢氨苄(30 μg/片)、头孢噻吩(30 μg/片)、苯唑青霉素(1 μg/片)、羧苄青霉素(100 μg/片)、罗红霉素(30 μg/片)、青霉素 G(10 μg/片)、氨苄青霉素(10 μg/片)等.

2 结 果

2.1 细菌分离

37℃培养 24 h 后在鲜血营养琼脂平板上生长良好,形成圆形光滑、半透明的菌落,直径多在 1.0 mm 左右(图 1),在麦康凯琼脂上生长较慢.在血清营养肉汤里形成沉淀,轻摇成云雾状;在普通肉汤中生长呈均匀浑浊,带少量沉淀.镜鉴为革兰阴性杆菌,无芽胞,呈分散或成对排列(图 2).

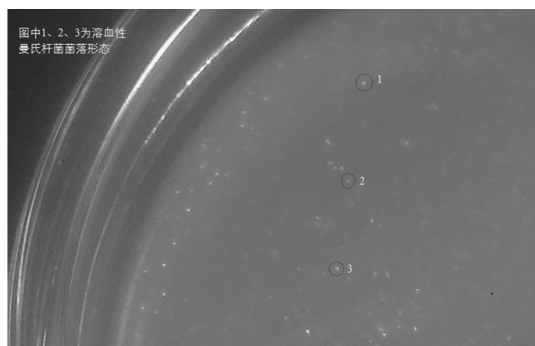


图 1 分离菌株菌落形态

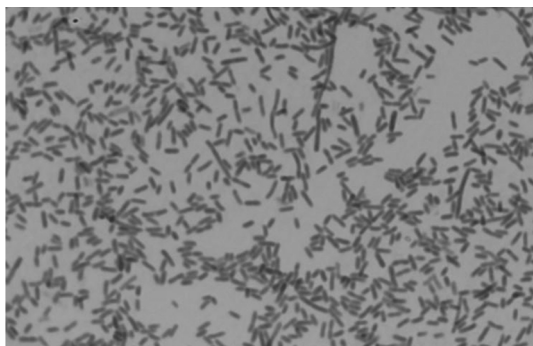


图 2 分离菌株在普通光学显微镜下细菌形态(10×100)

2.2 生化试验

所得 3 株纯培养菌接种生化发酵管,37℃培养 24 h,生化试验结果显示分离菌 β 溶血,发酵葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露醇,不发酵甘露糖,触酶阳性,氧化酶阳性,脲酶阴性.该结果符合溶血性曼氏杆菌生

化反应特征.

2.3 致病性试验

6 个试验组的小鼠均在 6 h 内死亡, 对照组无死亡; 剖检感染病死小鼠, 均发现肠道黏膜出血明显, 有轻微的纤维素性渗出, 肝脏有出血点; 分离培养出的细菌与接种细菌的培养特性、菌落形态和革兰氏染色镜检的细菌形态均一致.

2.4 16S rRNA 鉴定

3 株纯化菌经基因组 DNA 提取、16S rRNA 基因扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测均获得了约 1 540 bp 左右的序列(图 3). 紫外灯下切取目的条带凝胶送上海英俊生物技术公司测序后, 将测定的序列在 NCBI 网站上进行 BLAST 搜索比对, 结果表明所得的序列与已公布的曼氏杆菌 NCTC 90380 株 16S rRNA 基因部分序列(NR_11448.1)同源性为 99%.

2.5 药敏试验

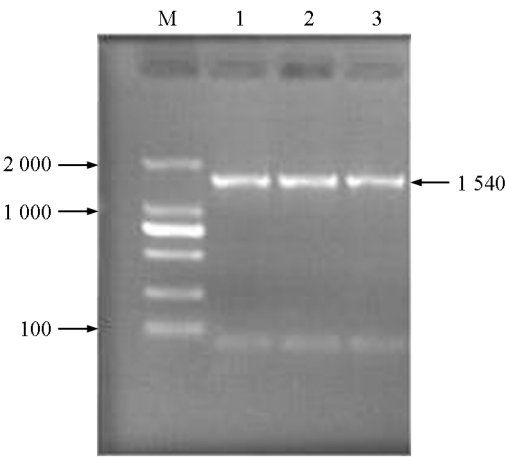
3 株菌药敏试验结果显示, 分离菌对磷霉素、菌必治、阿米卡星、新生霉素、强力霉素、万古霉素、克拉霉素、阿奇霉素、乙酰螺旋霉素、先锋必呈现出高度敏感; 对氧氟沙星、红霉素、痢特灵、呋喃妥因、恩诺沙星、壮观霉素、多黏菌素 B、林可霉素表现出中度敏感; 对链霉素、庆大霉素、卡那霉素、先锋噻肟、头孢呋肟、头孢氨苄、头孢噻吩、苯唑青霉素、羧苄青霉素、罗红霉素、洛美沙星、青霉素 G、氨苄青霉素等有耐药性.

3 讨 论

1) 发病牛群病牛均表现出体温升高(41 ℃), 流粘液脓性鼻液, 咳嗽, 肺呼吸音增强, 肺听水泡音; 多数呈水样腹泻, 便中夹杂血块. 分离出的 3 株菌均为两段钝圆、无芽孢、分散或成对排列的革兰氏阴性杆菌, 能发酵大多数糖类、甘露醇, 不发酵甘露糖. 据此生化反应特征, 可知分离菌株与溶血性曼氏杆菌相似. 通过 16S rRNA 鉴定, 分离菌与溶血性曼氏杆菌同源性达到 99%, 小鼠致病性试验得知分离菌有较强的致病性, 从而证实分离到的 3 株菌为致病性、溶血性曼氏杆菌.

2) 曼氏杆菌是反刍牛羊上呼吸道内的共栖菌, 主要分布于鼻咽部, 是牛羊肺炎、新生羔羊败血症、犊牛“船运热”等的主要病原菌^[7]. 本试验从山东运至本地的发病牛群鼻咽分离到了 3 株一致的溶血性曼氏杆菌, 小鼠致病性试验呈现较强的致病性, 说明该牛群发生的疾病与试验分离菌——溶血性曼氏杆菌密切相关. (犊)牛在运输时通常引起运输应激, 运输应激往往导致机体抵抗力下降, 呼吸道防卫机能减弱, 引起气道内外源菌、共栖菌增殖, 有致病作用的溶血性曼氏杆菌增殖可引起牛只发病^[8]. 国内学者李娟等^[9]曾从运输后发病死亡羊的肺组织中分离出了羊溶血性曼氏杆菌, 周玉龙等^[10]从内蒙古满洲里某奶牛场病死奶牛肺、肝等组织中分离出了牛溶血性曼氏杆菌, 但尚未见在肉牛方面的报道. 本试验从运输后病牛鼻咽部分离出了牛致病性、溶血性曼氏杆菌, 增加了该病原菌致病方面的重要资料. 溶血性曼氏杆菌产生的脂多糖(LPS)、白细胞毒素(LKT)是其主要的毒力因子, 与疾病的进程有密切的关系^[11], 但它在上呼吸道黏膜上的具体致病机制尚待进一步研究.

3) 药敏试验结果显示, 该病原菌对牛病临床使用较少的磷霉素、菌必治、阿米卡星、克拉霉素、阿奇霉素、乙酰螺旋霉素、先锋必等呈现出高度敏感; 对喹诺酮类、壮观霉素、多黏菌素 B、林可霉素等呈现出中度敏感, 而对牛病临床常用的青霉素类、头孢菌素类、氨基糖苷类药物表现出明显的耐药性. 随着我国肉牛养殖业的快速发展, 肉牛疾病的发生必然会不断增多, 势必导致抗生素的使用在肉牛生产上日益广泛, 随之其对药物的耐药性也会愈来愈严重, 这就要求牛病临床一定要做到科学用药, 正确分析临床用药现状及进行科学的药敏试验是显著减少病菌耐药性的重要途径之一. 溶血性巴氏杆菌与多杀性巴氏杆菌不能交互免疫, 这表明我国现用的多杀性巴氏杆菌疫苗不能有效地保护奶牛不受溶血性巴氏杆菌侵袭^[12]. 此外,



M 为 D2000 标准分子质量; 1—3 分别为 3 个分离菌株.
图 3 分离菌株 16S rRNA 基因 PCR 扩增

疫苗接种等非抗菌素防治也是临床防治细菌性疾病的有效办法,但从我国牛病防控现状看,尚无有效防治牛溶血性曼氏杆菌病的疫苗面市.所以,溶血性曼氏杆菌将是一个严重危害动物健康的病原菌.

参考文献:

- [1] BISGAARD M. Ecology and Significance of *Pasteurel laceae* in Animals [J]. Zbl bakteriol, 1993, 279(1): 7—26.
- [2] MUTTERS R, IHM P, POH L S, et al. Reclassification of the Genus *Pasteurella trevisan* 1887 on the Basis of Deoxyribonucleic Acid Homology, with Proposals for the Newspecies *Pasteurellad agmatis*, *Pasteurell acanis*, *Pasteurella stomatis*, *Pasteurella anatis*, and *Pasteurella langaa* [J]. Int J Syst Bacteriol, 1985, 35(3): 309—322.
- [3] REGGIE Y C. Lo Genetic Analys is of Virulence Factors of *Mannheimia* (*P asteurella*) *Haemolytica* A1 [J]. Veterinary Microbiology, 2001, 83(1): 23—35.
- [4] FRANK G H. *Pasteurellosis* of Cattle [M] // ADLAM A C, RYTIER J M. *Pasteurella* and *Pasteurellosis*. London: Academic Press, 1989.
- [5] GILMOUR N J L, GILMOUR J S. *Pasteurellos* is of Sheep [M] //ADLAM C, RYTTER J M. *Pasteurella* and *Pasteurellosis*. London: Academic Press, 1989.
- [6] 邹灵秀. 牛源 A 型多杀性巴氏杆菌溶血特性分析及灭活疫苗候选菌株筛选 [D]. 重庆: 西南大学, 2013.
- [7] 陆承平. 兽医微生物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [8] 刘翊中, 毛东风, 陈世恩, 等. 绵羊溶血性曼氏杆菌灭活疫苗免疫效果观察 [J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(1): 86—88.
- [9] 李 娟, 刘 阳, 彭欠欠, 等. 羊溶血性曼氏杆菌的分离鉴定 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013(10): 96—97.
- [10] 周玉龙, 李国军, 李 阳, 等. 奶牛曼氏杆菌与大肠杆菌混合感染病原分离鉴定 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2007(11): 80—82.
- [11] 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.
- [12] 刘华英, 彭远义. 奶牛溶血性巴氏杆菌病研究 [J]. 西南农业大学学报, 1995, 17(6): 553—556.

Isolation, Identification and Susceptibility Testing of *Mannheimia haemolytica* in Beef Cattle

ZHANG Sheng-yang, LI Qian-yong, ZHANG De-zhi,
ZHAN Fei, BIE Feng-bin

The Department of Veterinary Medicine, Southwest University (Rongchang Campus), Rongchang Chongqing 402460, China

Abstract: Three nasopharyngeal swabs were taken from sick cattle with transport stress syndromes, and bacterial isolation and culture, pathogenicity test, biochemical test and 16SrRNA sequence analysis were made. The results showed that the three strains isolated were pathogenic *Mannheimia haemolytica*. In a KB sensitivity test, the three strains were confirmed to be highly sensitive to Fosfomycin, Ceftriaxone, Amikacin, Clarithromycin, Azithromycin and Acetylspiramycin, and resistant to such drugs commonly used in clinical treatment of the cattle disease as Penicillins, Cephalosporins and Aminoglycosides.

Key words: beef cattle; *Mannheimia haemolytica*; isolation and identification; susceptibility test

责任编辑 夏 娟

