

# 日喀则绵羊溶血性曼氏杆菌的分离鉴定

元振杰,马弘财,拉巴次旦,曾江勇\*

(西藏自治区农牧科学院畜牧兽医研究所,西藏 拉萨 850009)

**摘要:**本研究对西藏日喀则市岗巴县某羊场疑似患有溶血性曼氏杆菌的病羊内脏组织样品进行病原分离,通过形态学鉴定、动物致病性试验和分子生物学鉴定。结果表明,所分离的菌株符合溶血性曼氏杆菌的基本特征,通过细菌 16srRNA 测序和结果比对,确定所分离的细菌为溶血性曼氏杆菌。本研究对探讨该羊场发病死亡原因和当地疫病流行情况研究提供了一定的科学依据。  
**关键词:**绵羊;溶血性曼氏杆菌;分离鉴定;  
**中图分类号:**S812      **文献标识码:**A

## Isolation and Identification of *Mannheimiahaemolytica* of Sheep in Xigaze

YUAN Zhen-jie, MA Hong-cai, LabaCidan, ZENG Jiang-yong\*

(Institute of Animal Science, Tibet Academy of Agricultural and Animal Husbandry Science, Tibet Lhasa 850009, China)

**Abstract:** This study was conducted to isolate the pathogen from visceral tissue samples of sheep that it suspected to be infecting *Mannheimiahaemolytica* of a farm in Gangba county, Xigaze city, Tibet, and to carry out bacterial morphological identification, animal pathogenicity test and molecular biological identification. The results showed that the isolated strains were in accordance with the basic characteristics of *Mannheimiahaemolytica*. Through bacterial 16srRNA sequencing and result comparison, the isolated bacteria were identified as *Mannheimiahaemolytica*. This study provided a scientific basis for the study of the cause of death and the epidemic situation of the local epidemic disease in the sheep farm.  
**Key words:** Sheep; *Mannheimiahaemolytica*; Isolation and identification

溶血性曼氏杆菌 (*Mannheimiahaemolytica*, Mh) 又称溶血性巴氏杆菌,该菌属于条件性致病菌,可长期寄生于牛、绵羊、山羊等反刍动物及其它动物的上呼吸道<sup>[1-2]</sup>。当受到外界环境气候聚变、长途运输等刺激时,致使动物机体抵抗力下降,病原可趁机侵入机体而致病;在发生病毒和支原体感染如副流感病毒、绵羊肺炎支原体、多杀性巴氏杆菌病等,也可使该病的易感性增加<sup>[3-4]</sup>。一般认为该菌只有毒力较强的致病菌才有致病性<sup>[5]</sup>,目前国内外对其报道的较多,它能够引起牛和绵羊的肺炎、新生羔羊急性败血症,给养牛和养羊业带来较大的经济损失,据报道全球 30 % 的病死牛与该病菌有关。该病每年给北美国家导致发经济损失已超过 10 亿美元<sup>[2]</sup>。  
2018 年 4 月,西藏自治区日喀则市岗巴县某养

羊场发生疫情,每天病死绵羊 5 ~ 10 只,死亡率达 10 % 以上,发病绵羊主要表现为咳嗽、喘气、呼吸急促、鼻流黏液等呼吸道症状,并伴有体温升高、精神沉郁、四肢僵硬等其它症状。笔者采集其内脏和血液样本,通过病原分离培养、细菌 16srRNA 测序和产物比对,确定所分离的细菌为溶血性曼氏杆菌。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

5 % 脱纤绵羊鲜血平板、5 % 犊牛血清 TSA 琼脂平板、胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB)、麦康凯琼脂 (MAC) 培养基来自甘肃农业大学动物疫病诊断中心实验室,PCR 反应体系、DNAMarker、核酸提取试剂购自 TaKaRa,核酸回收试剂盒购自于北京全氏金生物技术有限公司,其它试剂均为国产分析纯。

### 1.2 试验动物

发病绵羊为西藏自治区日喀则市岗巴县某养羊

收稿日期:2019 - 08 - 23  
作者简介:元振杰 (1986 - ),男,硕士研究生,助理研究员,研究方向为高原动物疫病防控,\* 为通讯作者。

场。实验用鼠为 32 日龄昆明系健康小白鼠 8 只,随机分为 2 组,来自甘肃农业大学动物疫病诊断中心实验室。

### 1.3 发病绵羊临床症状与剖检情况

发病绵羊主要表现为咳嗽、喘气、呼吸急促、鼻流黏液等呼吸道症状,并伴有体温升高、精神沉郁、四肢僵硬等其它症状。

通过对病死羊进行剖检,发现病死羊的胸腔有大量积液,肺部有严重淤血,气管和支气管黏膜有大量黏液分布,部分病死羊胆囊肿大,小肠充血严重。病理变化符合溶血性曼氏杆菌感染的基本特征。

无菌采集发病绵羊和濒死绵羊颈静脉血液 5 mL,无菌采集濒死绵羊和死亡绵羊心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、淋巴结组织样品,送甘肃农业大学动物疫病诊断中心实验室通过病原分离培养、细菌 16 srRNA 测序和产物比对进行分析。

### 1.4 病原的分离

将无菌采集发病绵羊颈静脉血液,濒死绵羊和死亡绵羊心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、淋巴结组织样品,分别将其接种于 5 % 脱纤维绵羊鲜血平板、5 % 犍牛血清 TSA 琼脂平板、MAC 平板,37 °C 恒温培养 24 h,挑取单个菌落进一步分离纯化。观察菌落特征,并挑取单个菌落进行涂片革兰氏染色镜检,所有试验在甘肃农业大学动物疫病诊断中心实验室进行。

### 1.5 致病性试验

将所分离的单个菌落分别接种于含犍牛血清的 TSA 液体培养基中,37 °C 静置培养 24 h,取培养后的菌液 0.5 mL 腹腔分别注射给已分好组的小白鼠,别外一组腹腔注射 0.5 mL 生理盐水做为对照,观察并记录小白鼠发病及死亡情况。对死亡的小白鼠进行剖检,采集肺、肝、脾等发病组织进行细菌分离培

养。

### 1.6 分离菌的 16SrRNA 扩增与序列分析

试验在采用常规的方法用基因提取试剂盒,对分离的细菌提取 DNA,以提取的 DNA 为模板,使用 16SrRNA 通用引物(上游引物:5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3';下游引物:5'-TACGGCTACCTT-GTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增,目标片断约为 1400 bp。PCR 反应体系为:PCR-MIX12.5 μl, ddH<sub>2</sub>O 9.5 μl,模板 1 μl,上下游引物各 1 μl。PCR 反应条件为:95 °C 5 min;95 °C 30 s,52 °C 40 s,72 °C 45 s,共进行 35 个循环;72 °C 10 min。扩增产物通过 1 % 琼脂糖凝胶电泳检测,切胶后通过胶回收试剂盒回收目的基因片断,然后送往西安擎科生物进行测序。将测序结果通过在 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>)进行 BLAST 同源性比对,确定该细菌的种属。

## 2 结果与分析

### 2.1 临床与剖检诊断

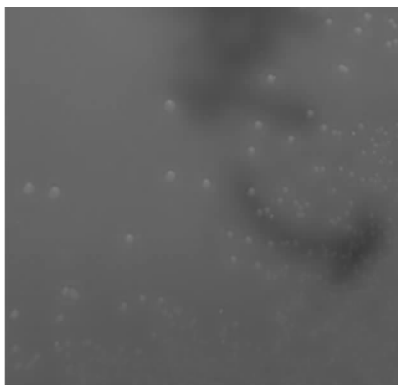
根据发病绵羊和濒死绵羊的临床症状与剖检濒死绵羊和死亡绵羊的剖检病理变化,符合溶血性曼氏杆菌感染的基本特征,即初步诊断为绵羊溶血性曼氏杆菌病。

### 2.2 细菌的分离与培养

通过对 12 份病变样本分别接种于 5 % 脱纤维绵羊鲜血平板、5 % 犍牛血清 TSA 琼脂平板、MAC 平板培养 24 h 后,在所有采集的肺病料中均培养大量呈圆形、光滑、具有溶血性、半透明的小菌落。革兰氏染色呈革兰氏阴性、短小的杆菌(图 1)。

### 2.3 分离菌株 16SrRNA 基因序列扩增与分析

以 3 株分离菌株的基因组为 DNA 模板,采用 16 srRNA 通用引物进行扩增,产物通过琼脂糖凝胶

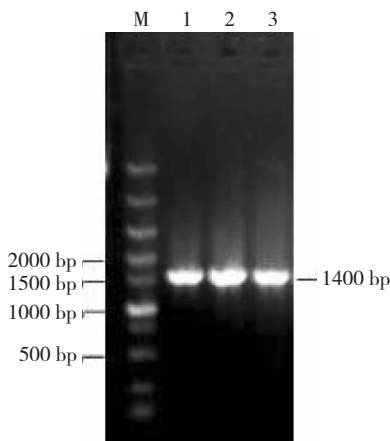


A.分离的细菌在 5 %脱纤维绵羊鲜血平板上的形态



B.所分离的细菌通过革兰氏染色在显微镜下的形态

图 1 分离的细菌形态学观察



M:DNA marker 2000;1、2、3 为样本

图 2 分离菌株 PCR 扩增电泳检测

进行电泳检测,结果可见约 1400 bp 的特异性条带,与预期的目的片断一致(图 2)。测序结果通过 NCBI 中 GenBank 数据库进行比对分析,确定为溶血性曼氏杆菌(图 3)。

### 2.4 致病性试验结果

试验组小白鼠在腹腔注射后约 6 h 后开始出现动作缓慢、精神沉郁;12 h 后约有 75 % 死亡(3/4);在试验 24 h 试验组小白鼠全部死亡;生理盐水对照组正常,未出现发病症状。对死亡的小白鼠进行剖检,发现其肺部严重出血淤血,取样品进行细菌分离培养,分离到与试验结果相同的菌株。

### 2.5 试验结果分析

本研究通过对西藏自治区日喀则市岗巴县某羊场患病羊的内脏组织进行病原分离,经菌落形态、染色镜检初步鉴定该细菌为溶血性曼氏杆菌,再结合 PCR 方法对细菌 16 S rRNA 基因进行扩增和序列比对分析,最终确定为该菌为溶血性曼氏杆菌。通过实验小白鼠动物致病性试验表明该菌株具有很强的致病性。

## 3 讨论

溶血性曼氏杆菌是牛和羊上呼吸道的一种常在的共生菌,一般认为毒力较强的致病菌才有致病性<sup>[6]</sup>,该菌主要引起肺炎、新生羔羊、羊乳腺炎等,也是犊牛“船运热”的主要病原,其大多数可以从肺脏中分离得到,也有少数从鼻腔拭子中成功分离的报<sup>[7-8]</sup>。目前该病国外对其的报道较多,每年给北美国家的养牛业造成了很大的损失<sup>[9]</sup>。在国内也有相关报<sup>[10]</sup>,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 %<sup>[10]</sup>;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<sup>[8,11-12]</sup>。

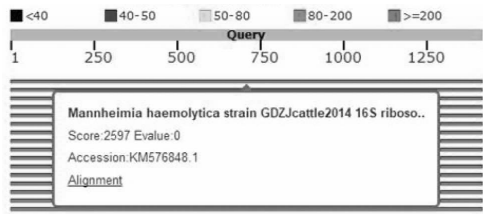


图 3 16s rRNA NCBI 数据库比对结果

结合调研及实验室检测结果,此次发病的主要原因为:一是饲养管理方式的突然转变。在发生此病之前,该羊殖场的羊均在在 A 乡放牧饲养,后突然转到 B 乡进行集中圈舍养殖,且路途较远,可能是该病发生的诱因。二是因饲草料不足,致使羊群整体营养不良、体质较差、抵抗力较差,是致使发病的内在因素。三是因 B 乡昼夜温差较大,基础设施条件较差,部分羊发生了呼吸道疾病,没有得到及时的治疗,且有寄生虫病感染,致使共生菌乘虚而入,是此次外病的外来因素,最终致使此次疾病的发生。因此,为有效防控该病的发生,建议采取以下措施:一是加强补饲青干草及精料,补充营养需求,提高免疫力。二是改善饲养条件,夜间采取防风保暖措施。三是加强管理,减少饲养管理方式的转变和运输期间的不适应、应激情况。四是制定有效的治疗计划,加强环境卫生和消毒工作,选用敏感药物进行对症治疗。据相关研究报道,溶血性曼氏杆菌已对部分药物如物如氨基糖苷类、四环素类、磺胺类和  $\beta$ -内酰胺类药物产生了耐药性<sup>[13-14]</sup>,在临床治疗时应选用大多数敏感性较高的诺氟沙星、阿米卡星、美洛西林、多西环素、头孢噻肟等药物进行治疗<sup>[15-16]</sup>。

### 参考文献:

[1] Rice J A, Carrasco-Medina L C, Hodgins D C, et al. Mannheimiahaemolytica 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 Mannheimiahaemolytica, Mannheimiahlyucosidal and Mannheimiaruminalis[J]. Veterinary Microbiology, 2008, 130(1/2): 165-175.

[5] 安烨, 龚玉梅, Jeanette Miflin, 等. Mannheimiagranulomatis PCR 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2007(5): 13-16.

[6] 安烨, 龚玉梅, JEANETTE M, 等. MannheimiagranulomatisPCR 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2007, 28(5): 13-16.

[7] KLIMA C L, ALEXANDER T W, READ R R, et al. Genetic characterization and antimicrobial susceptibility of Mannheimiahaemolytica isolated from the nasopharynx of feedlot cattle[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 149(3-4): 390-398.

- [8] 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]. 中国畜牧兽医,2014(1):36-38.
- [9] DUFF G C, GALYEAN M L. Recent advances in management of higelystressed, newly received feedlot cattle[J]. Journal of Animal Science,2007,85(3):823-840.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] LUBBERS B V, HANZLICEK G A. Antimicrobial multidrug resistance and coresistance patterns of Mannheimiahaemolytica isolated from bovine respiratory disease cases-A three-year(2009-2011) retrospective analysis[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2013,25(3):413-417.
- [14] KATSUDA K, KOHMOTOM, MIKEAMIO, et al. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone resisitant-Mannheimiahaemolytica isolates form cattle with bovine pneumonia [J]. Veterinary Microbiology,2009,139(1/2):74-79.
- [15] 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.
- [16] 刘康军,丁志国,李军朝,等. 三株羊溶血性曼氏杆菌的分离与鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医,2016(10):120-121.