

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.03.01

# 2017 年我国猪源多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及耐药性分析

胡星星, 郭龙, 宋文博, 贾双, 袁意, 喻红艳, 汤细彪\*

(武汉科前生物股份有限公司, 武汉 430070)

[收稿日期] 2018-12-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 03-0001-06 [中图分类号] S852.61

**[摘要]** 为了解 2017 年我国猪源多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm) 的流行情况及其耐药情况, 利用细菌分离培养和 PCR 方法分离鉴定 Pm, 对其荚膜血清型、地区分布和感染方式进行调查, 并采用纸片法测定分离株对 20 种抗菌药物的敏感性。结果显示, 从全国 6288 份临床病料中分离并鉴定出 236 株 Pm, 总分离率为 3.75%。随机选取 55 株进行血清型分型, 其中 A 型 25 株, D 型 27 株, F 型 1 株, 未定型 2 株; 分离率最高的省份为广东省(4.97%), 其次是河南省(3.69%) 和湖北省(3.25%); 感染模式中, Pm 单纯感染占比 42.80%, 混合感染占比 57.2%, 最常与链球菌和副猪嗜血杆菌共感染, 比例分别为 28.81% 和 12.29%。耐药性试验显示, Pm 对强力霉素的耐药率高达 83.64%, 对卡那霉素、庆大霉素、链霉素和阿米卡星等氨基糖苷类药物的耐药率为 43.64% ~ 52.73%, 对多粘菌素 B 和氧氟沙星最敏感(耐药率均为 1.82%)。研究表明我国猪群中 Pm 流行的主要血清型仍然是 A 型和 D 型, 临床上 Pm 与其他细菌发生混合感染的情况普遍存在, 并且对多种抗生素产生耐药性。

**[关键词]** 多杀性巴氏杆菌; 分离鉴定; 流行情况; 耐药性

## Isolation, Identification and Drug Resistance of *Pasteurella multocida* in Chinese Pigs in 2017

HU Xing-xing, GUO Long, SONG Wen-bo, JIA Shuang, YUAN Yi, YU Hong-yan, TANG Xi-biao\*

(Wuhan Keqian Biological Co Ltd., Wuhan 430070, China)

Corresponding author: TANG Xi-biao, E-mail: tangren77@126.com

**Abstract:** To investigate the prevalence and the drug resistance of porcine *Pasteurella multocida* (Pm) in China in 2017, Pm was isolated and identified by bacterial isolation culture and PCR method. The capsule serotype, the regional distribution and the infection pattern were also investigated. The susceptibility of the isolates to 20 kinds of antimicrobial agents was determined by disk method. 236 strains of Pm were isolated and identified from 6288 clinical samples collected in China with the total isolation rate of 3.75%. 55 isolates were randomly selected for

基金项目: 湖北省技术创新专项重大项目(2018ABA109)

作者简介: 胡星星, 硕士, 从事动物传染病诊断研究; 郭龙, 与胡星星为共同第一作者。

通讯作者: 汤细彪。E-mail: tangren77@126.com

serotyping, including 25 serotype A strains, 27 serotype D strains, 1 serotype F strain, and 2 untyped strains. Among different provinces, Guangdong possessed the highest isolation rate (4.97%) followed by Henan (3.69%) and Hubei (3.25%). The proportion of simple infection and co-infection were 42.80% and 57.2%, respectively. The most common co-infectious bacteria were *Streptococcus* (28.81%) and *Haemophilus parasuis* (12.29%). The resistance rate of Pm to doxymycin was the highest (83.64%). The resistance rates to kanamycin, gentamycin, streptomycin and amikacin were 43.64%~52.73%. Pm was mostly sensitive to polypeptide B and ofloxacin (both with the resistance rate of 1.82%). This study suggests that the main serotypes of Pm prevalent in pig herds in China are still serotypes A and D. The co-infections of Pm with other bacteria are clinically common and Pm is resistant to many antibiotics.

**Key words:** *Pasteurella multocida*; isolation and identification; prevalence; drug resistance

多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)是一种革兰阴性兼性厌氧球杆菌,正常定植于多种健康动物的口腔、鼻咽和上呼吸道<sup>[1]</sup>。当 Pm 大量繁殖导致内源性感染时可引起猪、禽、牛、羊、兔等经济动物发生呼吸系统疾病、局灶性感染及出血性败血症<sup>[2-3]</sup>。此外,Pm 还可通过猫狗咬伤、抓伤或舔舐感染人,威胁人类健康<sup>[1,4]</sup>。根据荚膜抗原的不同,Pm 可分为 A、B、D、E 和 F 五个血清型。不同血清型可引起不同的疾病症状<sup>[5-8]</sup>,其中 A 型和 D 型产毒多杀性巴氏杆菌可以引起猪萎缩性鼻炎,造成世界养猪产业的重大经济损失<sup>[7]</sup>。某些区域流行的血清型可随时间变化,如 1990 年之前我国最流行 A 型和 B 型,其次为 D 型<sup>[9]</sup>。30 年之后,A 型和 D 型成为我国主要流行血清型,然后是 B 型<sup>[10]</sup>。目前猪巴氏杆菌病的控制主要依赖抗生素,然而,Pm 易与其他病毒和细菌发生混合感染和继发感染的特点<sup>[4]</sup>和临床上滥用抗菌药导致多重耐药现象越来越严重的问题致使该病的防控极具挑战。本实验对 2017 年我国 Pm 的流行情况及其耐药情况进行研究,以期为该病的防治提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要试剂 DL2000 DNA Marker 购自大连宝生物工程有限公司;2×Easy Taq PCR SuperMix(+dye)购自北京全式金生物技术有限公司。胰蛋白大豆琼脂(TSA)购自美国 BD 公司;辅酶 I(烟酰胺

腺嘌呤二核苷酸,NAD)购自上海化学试剂公司;新生牛血清购自内蒙古金源康生物工程有限公司,20 种药敏试纸均购自杭州滨和微生物试剂有限公司。1.1.2 样品来源 样品来自于全国 24 个省市的规模化猪场和散养户送检的有呼吸系统疾病症状病死猪的肺脏组织以及少量气管、脑、肝脏、脾脏等其他组织样品,共 6288 份。

### 1.2 方法

1.2.1 细菌的分离培养 无菌剪取肺脏等病变组织,划线接种于含 10 mg/L NAD 和 5%(V/V)新生牛血清的 TSA 平板上。将 TSA 平板置于 37 ℃、50 mL/L CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱培养 18~24 h,观察菌落形态并挑取优势单菌落进行传代培养。

1.2.2 细菌的 PCR 鉴定 根据 Townsend 等<sup>[11]</sup>建立的 PCR 方法,对分离菌株进行种属鉴定和荚膜血清学分型。本实验用于检测 Pm 及其荚膜血清型的引物(表 1)均由北京擎科创新生物科技有限公司合成。

Pm 的 PCR 鉴定/血清型分型的反应体系如下(20 μL/25 μL):2×Easy Taq PCR SuperMix(+dye) 10 μL,10 μmol/L 上下游引物各 1 μL,模板 1 μL,无核酸水补足至 20 μL/25 μL。反应条件如下:94 ℃ 预变性 5 min;然后进入 30 个循环,94 ℃ 变性 45 s、56 ℃ 退火 45 s、72 ℃ 延伸 1 min;最后 72 ℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物进行 7.5 g/L 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统扫描照相。

表 1 本实验所用 PCR 引物

Tab 1 PCR primers used in this experiment

血清型 Serotype	目的基因 Target gene	引物编号 Primer number	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	PCR 产物 / bp PCR product / bp
Pm	Kmt1	Pm-1	ATCCGCTATTTACCCAGTGG	457
		Pm-2	GCTGTAACGAACTCGCCAC	
A 型 Pm	hyaD-hyaC	APm-1	GATGCCAAAATCGCAGTCAG	1048
		APm-2	TGTTGCCATCATTGTCACTG	
B 型 Pm	hcbD	BPm-1	CATTTATCCAAGCTCCACC	758
		BPm-2	GCCCCGAGAGTTTCAATCC	
D 型 Pm	dcbF	DPm-1	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC	647
		DPm-2	CATCTACCCACTCAACCATATCAG	
E 型 Pm	ecb-J	EPm-1	TCCGCAGAAAATTATTGACTC	512
		EPm-2	GCTTGCTGCTTGATTTTGTGTC	
F 型 Pm	feb-D	FPm-1	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG	852
		FPm-2	TTCCGCCGTCAATTACTCTG	

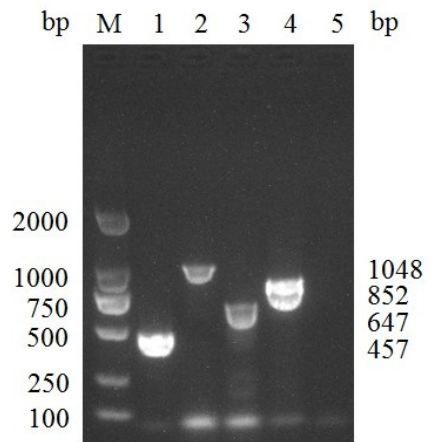
1.2.3 药敏试验 对经 PCR 鉴定并分型的 Pm 分离株进行药敏试验。取培养好的菌液用无菌棉签均匀涂布在 TSA 培养基上,用镊子夹取药敏纸片放置在平板上,每个平板上不超过 6 张药敏纸片。将平板置于 37 °C 恒温培养箱中正置培养 24~36 h 后测量并记录抑菌圈直径。

## 2 结果与分析

2.1 Pm 的分离鉴定及血清型分型 从 6288 份病死猪肺脏和其他病料组织中共分离出 236 株 Pm,总分离率为 3.75%。从 236 株 Pm 中随机挑出 55 株进行 PCR 鉴定及血清型分型,其中 A 型菌株 25 株,D 株菌株 27 株,F 型菌株 1 株,未定型菌株 2 株,部分菌株的 PCR 鉴定如图 1 所示。

2.2 Pm 的地区流行情况 对各省市的地区分离率进行统计,结果如图 2 所示,广东省的地区分离率最高(4.97%,54/1087),其次为湖南省(4.64%,15/323),然后是河南省(3.69%,38/1030)、四川省(3.61%,9/249)、山东省(3.50%,9/257)和湖北省(3.25%,69/2125),最后是福建省(1.87%,4/214)。其余各省份地区样品数目少,且分离率较低,合计后其总分离率为 3.79%(38/1003)。

2.3 Pm 的单纯感染和混合感染情况 在分离出



M.DL2000 DNA marker;1.Pm 的鉴定产物;2.A 型菌株 PCR 产物;  
3.D 型菌株 PCR 产物;4.F 型菌株 PCR 产物;5.阴性对照  
M: DL2000 DNA marker; 1. PCR product of Pm for identifying;  
2. PCR product for capsular type A; 3. PCR product for capsular type D;  
4. PCR product for capsular type F; 5. Negative control

图 1 多杀性巴氏杆菌的 PCR 鉴定及荚膜分型

Fig 1 Identification and capsular typing of Pm by PCR

Pm 的 236 份病料中,仅分离出 Pm 的病料有 101 份,所占比例为 42.80%,其余 135 份病料能同时分离出 Pm 和其他各种不同的共感染菌,占比 57.2%。如图 3 所示,两种菌混合感染时最常见的共感染菌为链球菌(28.81%,68/236),其次是副猪嗜血杆菌

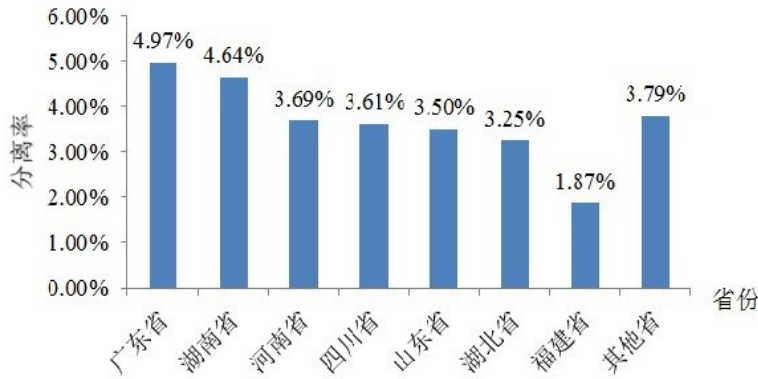
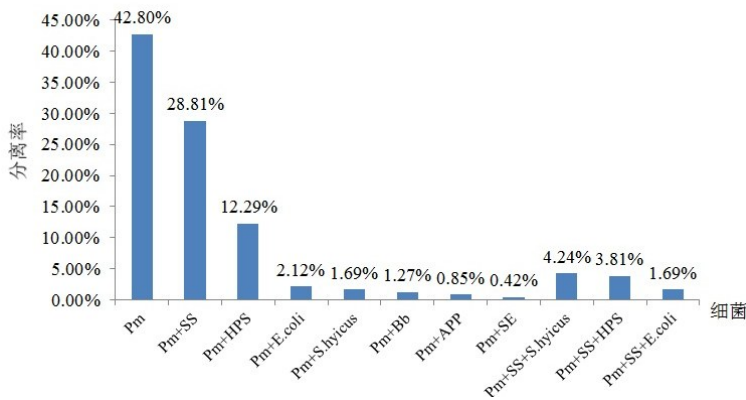


图 2 2017 年我国猪源多杀性巴氏杆菌地区分布图

Fig 2 Map of the regional distribution of *Pasteurella multocida* in 2017 in China

(12.29%, 29/236), 然后是大肠杆菌(2.12%, 5/236)、葡萄球菌(1.69%, 4/236)和支气管败血波氏杆菌(1.27%, 3/236), 猪丹毒丝菌和猪传染性胸膜肺炎放线杆菌也偶尔共感染。三种菌混合感染时最常

见的共感染菌为链球菌和葡萄球菌(4.24%, 10/236), 其次是链球菌和副猪嗜血杆菌(3.81%, 9/236), 最后是链球菌和大肠杆菌(1.69%, 4/236)。



Pm. 多杀性巴氏杆菌; SS. 猪链球菌; HPS. 副猪嗜血杆菌; E.coli. 大肠杆菌; Bb. 支气管败血波氏杆菌; S.hyicus. 葡萄球菌; APP. 传染性胸膜放线杆菌; SE. 猪丹毒杆菌

Pm. *Pasteurella multocida*; SS. *Streptococcus suis*; HPS. *Haemophilus parasuis*; E.coli. *Escherichia coli*;

Bb. *Bordetella bronchiseptica*; S.hyicus. *Staphylococcus*; APP. *Actinobacillus pleuropneumoniae*; SE. Swine erysipelas

图 3 2017 年我国猪源多杀性巴氏杆菌感染情况

Fig 3 Infection of *Pasteurella multocida* in 2017 in China

2.4 Pm 的耐药情况 经鉴定并分型的 55 株 Pm 对 20 种临床常用抗菌药物的敏感性检测结果见表 2, 由表可知 Pm 对强力霉素的耐药率最高(83.64%), 对卡那霉素、庆大霉素、链霉素和阿米卡星等氨基糖苷类药物的耐药率次之(43.64%~52.73%), 对

氨基青霉素、壮观霉素、甲氧胺嘧啶和环丙沙星也有较高的耐药率(21.82%~29.09%)。Pm 对氧氟沙星和多粘菌素 B 的耐药率最低(均为 1.82%), 另外 Pm 对头孢类抗生素、阿莫西林、阿奇霉素等耐药性也较低。

表 2 55 株猪源多杀性巴氏杆菌分离株对 20 种药物的敏感性

Tab 2 The sensitivities of 55 strains of porcine *Pasteurella multocida* isolates to 20 drugs

类别 Category	药名 Antibacterial agents	敏感株 No. of sensitive isolates	中敏株 No. of medium sensitive isolates	耐药株 No. of resistant isolates	耐药率 Drug resistance rate
头孢类	头孢拉定	49	4	2	3.64%
	头孢曲松	53	0	2	3.64%
	头孢他啶	47	3	5	9.09%
	头孢噻肟	48	4	3	5.45%
青霉素类	阿莫西林	51	2	2	3.64%
	氨苄青霉素	36	3	16	29.09%
	链霉素	17	14	24	43.64%
氨基糖苷类	庆大霉素	16	11	28	50.91%
	卡那霉素	16	10	29	52.73%
	阿米卡星	11	20	24	43.64%
	壮观霉素	33	8	14	25.45%
大环类脂类	阿奇霉素	50	2	3	5.45%
四环素类	强力霉素	1	8	46	83.64%
	诺氟沙星	43	6	6	10.91%
喹诺酮类	氧氟沙星	53	1	1	1.82%
	环丙沙星	42	1	12	21.82%
	恩诺沙星	49	0	6	10.91%
	氯霉素类	氟苯尼考	49	0	6
多肽类	多粘菌素 B	54	0	1	1.82%
磺胺增效剂	甲氧胺嘧啶	32	10	13	23.64%

### 3 讨论与结论

Pm 是猪呼吸系统疾病综合征 (Porcine Respiratory Disease Complex, PRDC) 的重要致病原之一。Tang X 等从 2003-2007 年采集的 2912 份呼吸道疾病病料中分离出 233 株 Pm, 总分离率为 8.0%<sup>[10]</sup>; LIU H 等报道 2011 至 2015 年我国 12 个省病料中 Pm 的分离率为 9.2% (295/3212)<sup>[12]</sup>; 本文的研究结果显示 2017 年来自我国 24 个省市的 6288 份病料中 Pm 的总分离率为 3.7%, 相比其他学者的报道总分离率明显下降, 一方面可能是由于样品来源地区和病料份数增多, 另一方面也说明随着我国养殖水平的提高, 大部分猪场对猪巴氏杆菌病等细菌病的防控更加规范、有效。本实验随机挑选的 55 株 Pm 中 A 型和 D 型菌株的占比分别为 45.5% (25/55) 和 49.1% (27/55), 相较于 2003 年至 2007 年的占比 (39.5% 和 54.9%)<sup>[10]</sup> 和 2011 年至 2015 年的占

比 (49.3% 和 47.6%)<sup>[12]</sup> 有所变化, 可能与样品来源地区增加和不同地区流行的主要血清型不同有关。例如湖南省主要流行 A 型菌株 (64.5%), 其占比明显高于 D 型菌株 (30.6%)<sup>[13]</sup>; 而河南省 A 型菌株和 D 型菌株占比分别为 43.86% 和 56.14%<sup>[14]</sup>。

Pm 属于条件致病菌, 在猪抵抗力低下时可侵入机体而发生内源性感染。Gao 等认为炎热和潮湿的气候会增加猪巴氏杆菌病发生的风险<sup>[15]</sup>, 这可能是广东省的 Pm 地区分离率 (4.97%) 明显高于总分离率 (3.75%) 的原因之一。河南省和湖北省的地区分离率 (分别为 3.69% 和 3.25%) 接近总分离率, 且 Pm 分离株占比较大 (分别为 16.10% 和 29.24%)。尽管湖南省和山东省的 Pm 地区分离率分别高达 4.64% 和 3.50%, 但是其 Pm 分离株所占比例均较少 (6.36% 和 3.81%), 且检测病料份数相对较少 (323 份和 257 份)。



Pm 常与多种病原发生混合感染,从而增加猪群呼吸道疾病的发病率和死亡率,造成极大经济损失。本研究仅分离出 Pm 株数所占比例(42.80%)不到总 Pm 分离株的一半,表明 Pm 与其他细菌发生混合感染的情况非常普遍,其中与链球菌和副猪嗜血杆菌最为多见,Tang X 和 Zhao Z 等也曾报道过相似的结果<sup>[10,16]</sup>。因此,在治疗猪巴氏杆菌病时需多管齐下,针对这些共感染菌的多价疫苗而非针对 Pm 的单价疫苗的研制是控制该病的方向之一<sup>[12]</sup>。药敏试验的结果显示,Pm 对氧氟沙星、多粘菌素 B、头孢类和阿莫西林的耐药率均较低,临床上常用头孢类抗生素和阿莫西林来控制 Pm。Pm 对强力霉素的耐药率高达 83.64%,这与临床上该类药物的广泛使用和本身特点有关,混合感染的细菌间交换四环素耐药基因会产生很强的选择压力<sup>[17]</sup>。Pm 对青霉素类、磺胺类、氨基糖苷类药物的耐药率相对较高,与 2016 年上海市分离的 20 株 Pm 的耐药性相似<sup>[18]</sup>。定期监测细菌耐药性可有效避免药物滥用,并指导临床科学用药。

参考文献:

[1] Wilson B A, Ho M. *Pasteurella multocida*: from zoonosis to cellular microbiology [J]. *Clinical microbiology reviews*, 2013, 26 (3): 631-655.

[2] Hunt M L, Adler B, Townsend K M. The molecular biology of *pasteurella multocida* [J]. *Veterinary microbiology*, 2000, 72 (1): 3-25.

[3] Harper M, Boyce J D, Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis; 125 years after Pasteur [J]. *FEMS microbiology letters*, 2006, 265(1): 1-10.

[4] Wade T, Booy R, Teare E L, et al. *Pasteurella multocida* meningitis in infancy - (a lick may be as bad as a bite) [J]. *Eur J Pediatr*, 1999, 158(11): 875-878.

[5] Davies R L. Genetic diversity among *Pasteurella multocida* strains of avian, bovine, ovine and porcine origin from England and Wales by comparative sequence analysis of the 16S rRNA gene [J]. *Microbiology*, 2004, 150(12): 4199-4210.

[6] Davies R L, Maccorquodale R, Caffrey B. Diversity of avian *Pasteurella multocida* strains based on capsular PCR typing and variation of the OmpA and OmpH outer membrane proteins [J]. *Veterinary microbiology*, 2003, 91(2): 169-182.

[7] Davies R L, Maccorquodale R, Reilly S. Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with

isolates of avian, ovine and porcine origin [J]. *Veterinary microbiology*, 2004, 99(2): 145-158.

[8] Davies R L, Watson P J, Caffrey B. Comparative analyses of *Pasteurella multocida* strains associated with the ovine respiratory and vaginal tracts [J]. *The Veterinary record*, 2003, 152(1): 7-10.

[9] Guo D H, Zheng M, Sn P. Serological identification of capsular antigen of *pasteurella multocida* in China [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 1979, 2(1): 67-68.

[10] Tang X, Zhao Z, Hu J, et al. Isolation, antimicrobial resistance, and virulence genes of *Pasteurella multocida* strains from swine in China [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2009, 47(4): 951-958.

[11] Townsend K M, Boyce J D, Chung J Y, et al. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and development of a multiplex capsular PCR typing system [J]. *Journal of clinical microbiology*, 2001, 39(3): 924-929.

[12] 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): 1-6.

[13] 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]. 湖南: 湖南农业大学, 2017.

Fang C. Identification of *Pasteurella multocida* serotype and pathogenesis investigation of capsule serotype F strain isolated from pigs in Hunan Province [D]. Hunan: Hunan Agricultural University, 2017.

[14] 乔鹏芸. 猪源多杀性巴氏杆菌的分型及其毒力特性研究 [D]. 河南: 河南科技大学, 2017.

Qiao P Y. Determination of the Types and Virulence of *Pasteurella Multocida* Isolates from Swine [D]. Henan: Henan University of Science and Technology, 2017.

[15] Gao X, Xiao J, Qin H, et al. Impact of meteorological factors on the prevalence of porcine pasteurellosis in the southcentral of Mainland China [J]. *Prev Vet Med*, 2016, 125: 75-81.

[16] Zhao Z, Wang C, Xue Y, et al. The occurrence of *Bordetella bronchiseptica* in pigs with clinical respiratory disease [J]. *Vet J*, 2011, 188(3): 337-340.

[17] Corinna Kehrenberg, Sarah A. Salmon, Jeffrey L. Watts, et al. Tetracycline resistance genes in isolates of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia varigena* from bovine and swine respiratory disease: intergeneric spread of the tet(H) plasmid pMHT1 [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001, 1(48): 631-640.

[18] 刘东良. 上海市猪源多杀性巴氏杆菌分离鉴定及其耐药性分析 [J]. *中国动物传染病学报*, 2016, 24(6): 19-23.

Liu D L. Isolation and antibiotic resistance of porcine *Pasteurella Multocida* strains in Shanghai [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*. 2016, 24(6): 19-23.