



## 牛源多杀性巴氏杆菌的分离与初步鉴定

林立山<sup>1</sup>, 黄秦<sup>2</sup>, 才灵杰<sup>2</sup>, 马家乐<sup>1</sup>, 姚火春<sup>1</sup>, 潘子豪<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095

<sup>2</sup>勃林格殷格翰国际贸易(上海)有限公司, 上海 200131

**摘要:**【目的】本研究旨在对引起犊牛呼吸道综合征的多杀性巴氏杆菌进行分离鉴定, 分析其亲缘关系和毒力基因的分布情况。【方法】收集 2017 年 8 月至 2018 年 4 月疑似患有犊牛呼吸道综合征的病牛鼻拭子进行细菌分离培养, 对菌落形态和染色疑似巴氏杆菌的菌株进行 16S rRNA 测序和血清型鉴定, 选择巴氏杆菌 7 类 23 种毒力基因, 筛查临床分离株的毒力基因的分布。【结果】从 8 个省份的 237 份病料中分离出 31 株多杀性巴氏杆菌, 分离率为 13.1%。16S rRNA 测序分析表明 31 株 A 型多杀性巴氏杆菌属于同一亚群, 其序列同源性与中国分离株 HB01 以及国外分离株 USDA-ARS-USMARC-60712、USDA-ARS-USMARC-60214、ATCC 43137 以及 36950 亲缘关系较近。对分离出的 31 株 A 型多杀性巴氏杆菌的 7 类共 23 种毒力基因鉴定, 结果显示 31 株多杀性巴氏杆菌所携带的毒力因子大多分布在 17-19 个, 且集中度较高。【结论】A 型多杀性巴氏杆菌为犊牛呼吸道综合症的主要流行血清型, 通过对多杀性巴氏杆菌的临床分离株进化树和毒力基因分析, 内蒙古、黑龙江、新疆、山西以及河北的 7 株分离株进化来源于同一分支, 且均缺失毒力基因 *tadD* 和 *hgbA* 及携带毒力基因 *hsf-1*, 提示着其亲缘关系可能与其携带的特定毒力基因存在一定相关性。该研究为犊牛呼吸道综合征的病原学调查和多杀性巴氏杆菌流行病学调查提供了参考数据。

**关键词:** 多杀性巴氏杆菌, 血清型鉴定, 毒力基因, 16S rRNA 基因

多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm) 是一种革兰氏阴性短杆菌, 临床上能引起包括牛、羊、猪等在内的多种动物发病。根据其荚膜抗原差异, 多杀性巴氏杆菌可分为 A、B、D、E、F 等 5 种血清型<sup>[1]</sup>。关于多杀性巴氏杆菌的致病性以

及毒力因子的研究报道较多, 目前已被鉴定出的毒力因子包括黏附素(*ptfA* 等)、铁摄取调节蛋白(*exbB* 等)、胞外蛋白酶(*nanB* 等)、脂多糖及外膜蛋白等<sup>[2]</sup>。

多杀性巴氏杆菌是一种能引起牛呼吸道综合

基金项目: 南京农业大学校级大学生科研训练计划(1717A26)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-25-84395328; E-mail: panzihao@njau.edu.cn

收稿日期: 2018-05-31; 修回日期: 2018-07-18; 网络出版日期: 2018-08-01

征(Bovine respiratory disease complex, BRDC)的细菌性病原<sup>[3]</sup>。牛呼吸道综合征(BRDC), 俗称“运输热”, 是由于应激作用等因素引起牛出现肺炎、支气管炎等疾病的统称<sup>[4]</sup>。此外, 研究还发现多杀性巴氏杆菌能与牛类支原体生物(Mycoplasma-like organisms)、牛副流感病毒 3 型(Bovine parainfluenza type 3 virus)等牛呼吸道综合征其他相关病原发生混合感染<sup>[5]</sup>。因此, 由多杀性巴氏杆菌引起的牛呼吸道综合征对于我国乃至全球养牛业发展都造成了巨大的经济损失。本研究采集 2017 年 8 月至 2018 年 4 月份疑似患有呼吸道综合征的犊牛病料, 分离疑似多杀性巴氏杆菌的临床菌株, 通过血清型 PCR 鉴定方法和绘制 16S rRNA 的系统进化树对细菌进行分析, 并检测了 7 类共 23 种毒力基因在牛源多杀性巴氏杆菌中的分布情况。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要仪器和试剂

PCR 仪购自日本 TaKaRa 公司; Green Taq Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; Trans 2K DNA Marker 及 Trans 2K Plus DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit)购自天根生化科技(北京)有限公司; 无支原体新生牛血清购自浙江天杭生物技术股份有限公司。血琼脂平板以及 THB 液体培养基均为实验室配制。

### 1.2 多杀性巴氏杆菌的分离

**1.2.1 样品来源:** 2017 年 8 月至 2018 年 5 月采集持续性发热并伴有呼吸道炎症的 6–8 月龄犊牛鼻

拭子 327 份。

**1.2.2 细菌分离:** 往鼻拭子样品采集管中加入 300–500  $\mu\text{L}$  高压过的 PBS 充分混匀。用灼烧过的接种环蘸取样品上清液, 涂布于血平板上, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  温箱中培养 12–24 h 后进行肉眼观察, 挑取单菌落接种于含 10% 犊牛血清的 THB 液体培养基中, 置于 180 r/min、37  $^{\circ}\text{C}$  中进行纯培养。

### 1.3 多杀性巴氏杆菌的鉴定

**1.3.1 引物的设计与合成:** 根据文献报道<sup>[6]</sup>, 合成用于检测牛源多杀性巴氏杆菌的特异性引物(表 1)。所有引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

**1.3.2 PCR 体系及程序:** PCR 反应在 20  $\mu\text{L}$  体系中进行: Green Taq Mix 10  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu\text{L}$ , 上游及下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ 。反应程序如下: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR 反应结束后, 利用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用凝胶成像系统扫描照相。

### 1.4 多杀性巴氏杆菌的血清分型及 16S rRNA 基因的扩增测通

**1.4.1 引物的合成与设计:** 根据文献报道<sup>[6]</sup>, 合成用于鉴定多杀性巴氏杆菌血清型的引物(表 2)。利用通用引物对多杀性巴氏杆菌的 16S rRNA 基因进行扩增(表 2)。所有引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

表 1. 多杀性巴氏杆菌鉴定引物

Table 1. Primers used for detection of *P. multocida*

Primer name	Primer Sequence	Amplimer size/bp
Pm-F	ATCCGCTATTTACCCAGTGG	460
Pm-R	GCTGTAAACGAACCTCGCCAC	460

表 2. 多杀性巴氏杆菌的血清型鉴定及 16S rRNA 基因检测引物

Table 2. Primers used for detecting capsular serotypes and amplifying 16S rRNA genes of *P. multocida*

Functions	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Amplimer size/bp
Capsular type A	PmA-F	TGCCAAAATCGCAGTCAG	1044
	PmA-R	TTGCCATCATTGTCAGTG	
Capsular type B	PmB-F	CATTTATCCAAGCTCCACC	760
	PmB-R	GCCCGAGAGTTTCAATCC	
Capsular type D	PmD-F	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC	657
	PmD-R	CATCTACCCACTCAACCATATCAG	
Capsular type E	PmE-F	TCCGCAGAAAATTATTGACTC	511
	PmE-R	GCTTGCTGCTTGATTTTGTGTC	
Capsular type F	PmF-F	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG	851
	PmF-R	TTCCGCCGTCAATTACTCTG	
16S rRNA	16S-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1400
	16S-R	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	

**1.4.2 PCR 体系及程序:** 血清型鉴定 PCR 反应在 20  $\mu\text{L}$  体系中进行: Green *Taq* Mix 10  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu\text{L}$ , 上游及下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ 。反应程序如下: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 55  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。16S rRNA PCR 反应在 40  $\mu\text{L}$  体系中进行: Green *Taq* Mix 20  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 14  $\mu\text{L}$ , 上游及下游引物各 2  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ 。反应程序如下: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 54  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR 反应结束后, 鉴定血清型的 PCR 产物利用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用凝胶成像系统扫描照相。16S rRNA PCR 产物则送往金斯瑞生物科技有限公司进行双向测通, 并进行拼接。

**1.4.3 16S rRNA 全基因序列的系统进化树分析:** 利用分子进化遗传分析软件 MEGA 7.0 对已完成测序的多杀性巴氏杆菌 16S rRNA 全基因序列进行遗传进化分析, 并同时从 GenBank 下载已完成测序的多杀性巴氏杆菌 16S rRNA 全基因序列一并进行分析。

## 1.5 多杀性巴氏杆菌毒力因子的鉴定

**1.5.1 引物的设计与合成:** 根据已报道的文献[7]合成用于鉴定多杀性巴氏杆菌主要毒力因子的引物, 所有引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。主要毒力因子包括: 黏附素相关基因(*fimA*, *hsf-1*, *hsf-2*, *ptfA*, *pfhA*, *tadD*); 铁摄取相关基因(*exbB*, *exbD*, *Fur*, *hgbA*, *hgbB*, *tonB*); 外膜蛋白相关基因(*oma87*, *ompA*, *ompH*, *plpB*); 超氧化物歧化酶相关基因(*sodA*, *sodC*, *tbpA*); 唾液酸激酶相关基因(*nanB*, *nanH*); 透明质酸酶相关基因(*pmHAS*); 毒素相关基因(*toxA*)。

**1.5.2 PCR 体系及程序:** PCR 反应在 20  $\mu\text{L}$  体系中进行: Green *Taq* Mix 10  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu\text{L}$ , 上游及下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ 。反应程序如下: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min,  $\Delta$   $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。PCR 反应结束后, 利用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测, 并用凝胶成像系统扫描照相。

**1.5.3 数据统计:** 利用 Excel 卡方检验对多杀性巴氏杆菌的主要毒力因子进行统计分析。

## 2 结果

### 2.1 牛源多杀性巴氏杆菌的分离与鉴定

2017年8月至2018年4月期间对送检的237份临床病料采用绵羊血平板分离培养出疑似多杀性巴氏杆菌菌落,通过PCR反应共鉴定出31株多杀性巴氏杆菌(图1),分离率为13.1%。利用PCR方法对所分离出的菌株进行血清型鉴定,共分离出31株A型多杀性巴氏杆菌(图1),占比100%。就分离地区而言(表3),从山西、内蒙古以及河北的病料中分离出较多株的多杀性巴氏杆菌,这可能与3个地区送检病料总数较多有关。

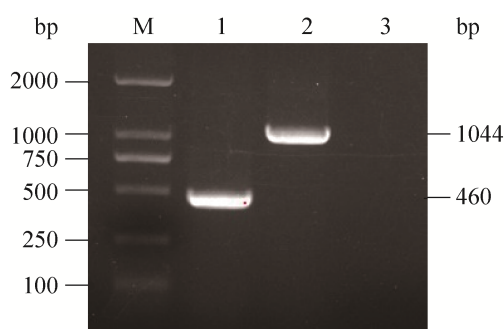


图1. 多杀性巴氏杆菌的PCR鉴定及血清型鉴定

Figure 1. PCR result of *P. multocida* identification and serological typing. M: Trans 2K DNA marker; lane 1: PCR identification for *P. multocida*; lane 2: PCR identification for capsular type A; lane 3: Negative control.

表3. 不同省份的检测分离情况

Table 3. The condition of the total samples, the number of isolated *P. multocida* and the corresponding regions

Province	Total Number	Positive sample
Shanxi	106	15
Inner Mongolia	40	5
Hebei	43	5
Heilongjiang	15	2
Anhui	16	1
Guangdong	8	1
Shandong	5	1
Xinjiang	4	1

### 2.2 牛源多杀性巴氏杆菌的血清分型及亲缘关系分析

利用PCR方法对所分离出的菌株进行血清型鉴定,共分离出31株A型多杀性巴氏杆菌,占比100%。31株菌株来自8个省份,表明牛源A型多杀性巴氏杆菌在我国分布的广泛性。此外,本研究基于16S rRNA全基因序列构建的遗传进化图中(图2)发现31株A型多杀性巴氏杆菌的亲缘关系极为接近,属于同一亚群,其序列同源性与中国分离株HB01以及国外分离株USDA-ARS-USMARC-60712、USDA-ARS-USMARC-60214、ATCC 43137以及36950亲缘关系较近。值得一提的是,本研究发现来自于内蒙古分离株NMG1708-1、NMG1709-2、NMG1804-1、黑龙江分离株HLJ1708-2、新疆分离株XJ1708-1、山西分离株SX1804-3以及河北分离株HB1709-3共7株分离株被归于同一分支,提示其可能存在有更为相近的遗传进化关系。

### 2.3 牛源多杀性巴氏杆菌毒力基因的扩增

本研究利用PCR方法共检测了7类共23对毒力基因(图3)。检测结果显示(图4),A型多杀性巴氏杆菌中均携带有大部分的毒力基因,但是不同菌株携带的情况有所差异。其中,黏附素相关基因(*fimA*, *hsf-2*, *ptfA*)、铁摄取相关基因(*exxB*, *exbD*, *Fur*, *tonB*)、外膜蛋白相关基因(*oma87*和*ompH*)、超氧化物歧化酶相关基因(*sodA*, *sodC*, *tbpA*)、唾液酸激酶相关基因(*nanH*)和透明质酸酶相关基因(*pmHAS*)共14对毒力基因的检出率高达100%;此外,铁摄取相关基因(*hgbB*)、唾液酸激酶相关基因(*nanB*)和毒素相关基因(*toxA*)共3对毒力基因的检出率为0。剩余的6对毒力基因:黏附素相关基因 *hsf-1*、*tadD* 和 *pfhA* 的检出率分别

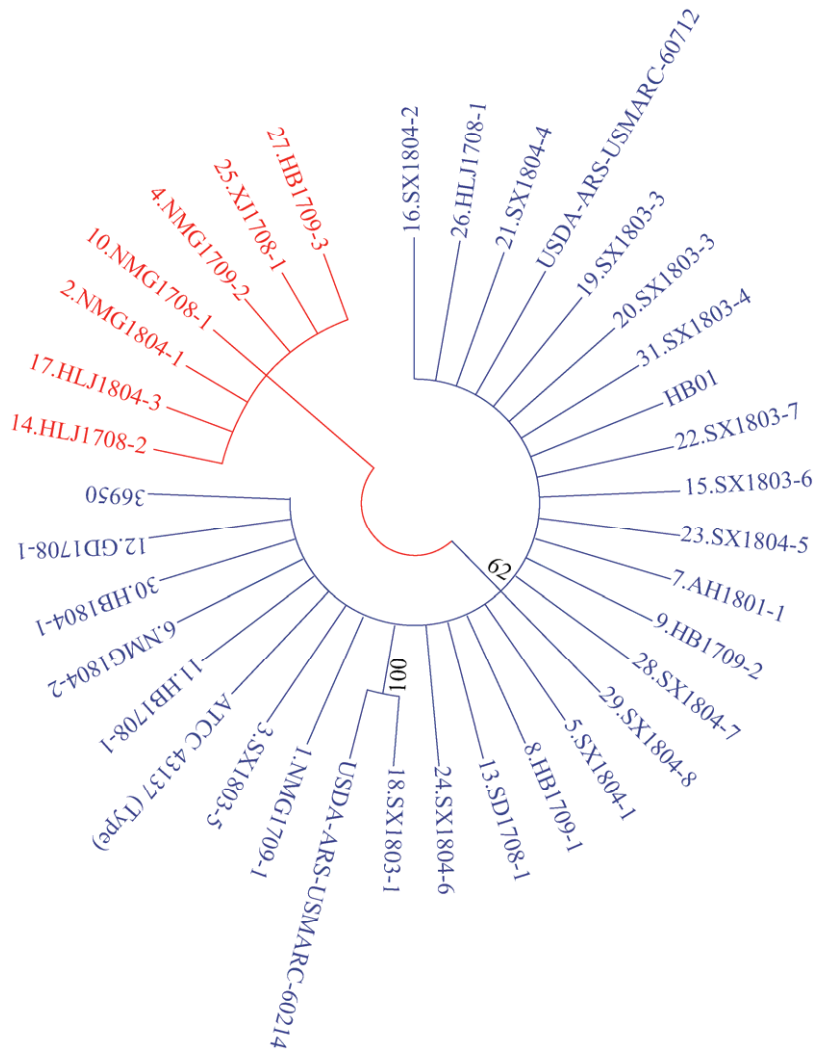


图 2. 多杀性巴氏杆菌 16S rRNA 全基因的遗传进化树

Figure 2. Phylogenetic tree established on the basis of 16S rRNA genes of *P. multocida*.

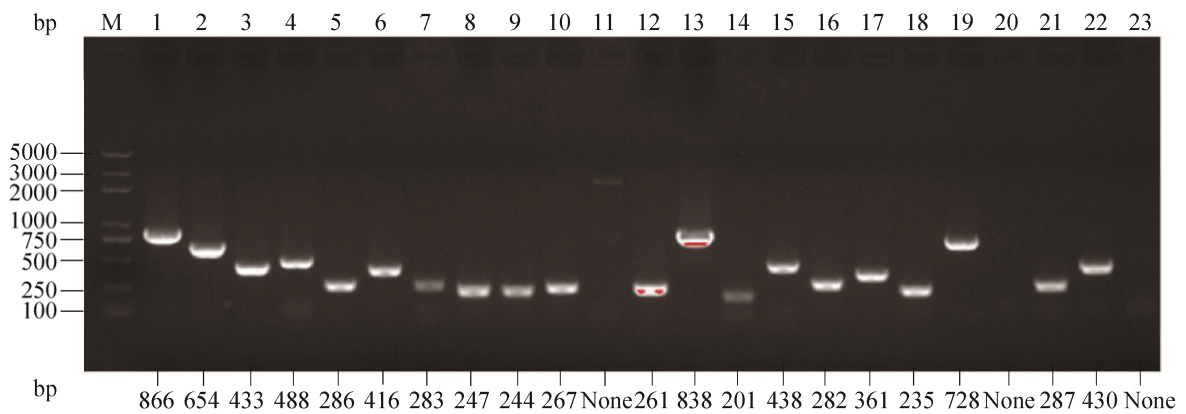


图 3. 23 种毒力基因的 PCR 扩增

Figure 3. PCR amplification of 23 virulence genes of *P. multocida*. M: Trans 2K Plus DNA marker; lane 1–23: PCR products of *fimA*, *hsf-1*, *hsf-2*, *ptfA*, *pfhA*, *tadD*, *exbB*, *exbD*, *Fur*, *hgbA*, *hgbB*, *tonB*, *oma87*, *ompA*, *ompH*, *plpB*, *sodA*, *sodC*, *tbpA*, *nanB*, *nanH*, *pmHAS* and *toxA* genes.

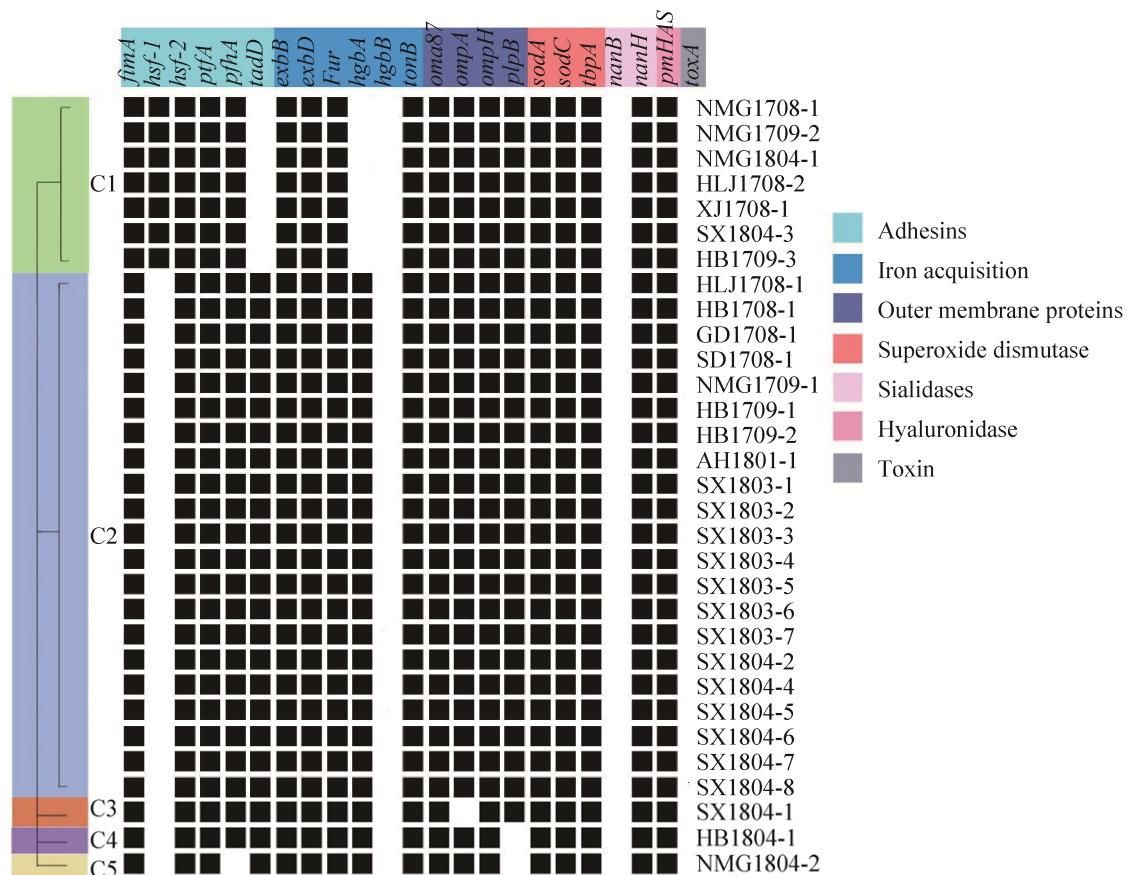


图 4. 多杀性巴氏杆菌中 23 种毒力基因的分布情况

Figure 4. Distribution of 23 virulence genes in *P. multocida*.

为 22.6%、77.4% 和 96.8%；铁摄取相关基因 *hgbA* 的检出率为 77.4%；外膜蛋白相关基因 *plpB* 的检出率为 93.6%；外膜蛋白相关基因 *ompA* 的检出率为 96.8%。以上结果表明，就本次研究的 23 种毒力基因而言，引起牛呼吸道综合征(BRDC)的 A 型多杀性巴氏杆菌中携带的毒力基因较多，携带个数在 17–19 个之间，且相似度较高，表明 A 型多杀性巴氏杆菌的亲缘关系可能较为相近，有待于进一步研究。

### 3 讨论

多杀性巴氏杆菌通常被认为是引起牛发生肺

炎的首要或次要病原体<sup>[8]</sup>。Blanco-Vutio 等<sup>[9]</sup>通过调查发现，在引起 BRDC 的多杀性巴氏杆菌中，A 型菌株与 D 型菌株分别占 61% 和 25%。而根据 Dabo 等<sup>[10]</sup>以及 Ewers 等<sup>[11]</sup>的报道，A 型菌株的比例甚至可以占到 80% 以及 92%。本研究在分型方面的结果与国外文献报道基本一致。除此之外，在本次分离多杀性巴氏杆菌的过程中，还发现了其与牛支原体发生混合感染的情况，提示牛呼吸道综合征发病情况的复杂性。这一发现也可以从 Virtala 等<sup>[12]</sup>的报道中得到验证。

黏附素是具有黏附作用的细菌结构成分的总称。通常是细菌表面的一些大分子结构物质。其中一种黏附素相关基因 *pflA* 编码产生的血凝素是

一种重要的流行病学标记, 并且与牛疾病的发生有着密切联系<sup>[13]</sup>。在本研究中, 4 种黏附素相关基因的检出率达到了 100% (*fimA*、*hsf-2*、*ptfA* 和 *pfhA*)。外膜蛋白是外膜中镶嵌的多种蛋白质的总称, 包括微孔蛋白及脂蛋白等。革兰氏阴性菌的外膜蛋白具有不同的功能包括促进铁吸收、耐抗菌以及抗血清等<sup>[14]</sup>, 以便病原菌适应各种不同的环境变化。本研究中 4 种外膜蛋白毒力因子 (*oma87*, *ompA*, *ompH* 和 *plpB*) 的检出率均达 90%, 表明外膜蛋白毒力因子分布的广泛性。铁元素的获取和利用能力对于细菌的生存来说是至关重要的, 许多细菌已经发展出了不同的获取与利用手段。多杀性巴氏杆菌能利用 *hgbA* 和 *hgbB* 蛋白从血红素中直接获取铁元素<sup>[15]</sup>。除此之外, *tonB* 蛋白被认为能协助运输铁复合物进入细菌内部<sup>[16]</sup>。在本研究检测的 6 种铁摄取相关基因中, 有 5 种毒力基因都被检出, 表明多杀性巴氏杆菌获取铁能力的多样化。

超氧化物歧化酶是生物体内一种重要的抗氧化酶, 几乎存在于所有需氧细菌中<sup>[17]</sup>。在本研究以及国外报道<sup>[11,22]</sup>中, *sodA* 和 *sodC* 的检出率均达到了 100%。然而, 值得一提的是, 另外一种超氧化物歧化酶 *tbpA* 的检出率则有所不同, 分别为 100%、70.2% 和 80.5%。*tbpA* 基因编码的转铁结合蛋白, 在细菌摄取和利用铁的过程中发挥了关键作用。唾液酸激酶在多杀性巴氏杆菌定殖于上皮细胞表面时发挥着重要作用。它能够通过暴露主要宿主受体和降低黏蛋白的有效性来提高细菌毒力<sup>[18]</sup>。就本研究中 A 型菌株的两种唾液酸激酶 (*nanB* 和 *nanH*) 而言, *nanH* 的检出率为 100% 而 *nanB* 的检出率则为 0, 提示唾液酸激酶 *nanB* 在多杀性巴氏杆菌中的分布具有一定的偏嗜性。*toxA* 基因编码产生的皮肤坏死性毒素最早被发现存在

于 D 型多杀性巴氏杆菌中且可以引起猪萎缩性鼻炎<sup>[19]</sup>。随后, 据 Jaglic 等<sup>[20]</sup>的报道, 分离自猪、牛等多种宿主的 A 型多杀性巴氏杆菌中同样存在着 *toxA* 基因, 表明了该基因分布的多样性。然而, 该基因编码的毒素与患病牛的病理变化之间的联系并未得到验证。

就同一类毒力基因而言, 在本研究中黏附素相关基因 *fimA*、*hsf-2*、*ptfA* 和 *pfhA* 的检出率显著高于 *hsf-1* 和 *tadD* 的检出率 ( $P < 0.05$ ), 铁摄取相关基因的检出率 *exxB*、*exxD*、*Fur*、*tonB* 的检出率显著高于 *hgbA* 和 *hgbB* 的检出率 ( $P < 0.05$ ), 唾液酸激酶相关基因 *nanH* 的检出率显著高于 *nanB* 的检出率 ( $P < 0.05$ ), 而其他 4 类毒力基因则无显著差别。比较而言, 本研究中 A 型牛源多杀性巴氏杆菌的毒力基因筛查结果与以往报道有较大差异, Gharibi<sup>[21]</sup>等检测了巴氏杆菌 A 型的 11 种毒力因子, 9 种毒力因子的检出率与本次结果差异显著 ( $P < 0.05$ ), 分别为 *ptfA*、*pfhA*、*nanB*、*nanH*、*ompH*、*hgbA*、*hgbB*、*toxA* 以及 *sodA*。而 Katsuda 等<sup>[22]</sup>检测的 15 对毒力基因中, 有 7 种毒力因子与本研究存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。综上所述, 存在于牛源多杀性巴氏杆菌的毒力因子分布呈现多样化, 而本研究分离出的牛源多杀性巴氏杆菌毒力因子分布情况较为集中。尽管如此, 本研究中分离株的毒力强弱情况较国外分离株相比并未明确, 因为携带毒力基因的多少与致病性强弱之间的关系尚待研究, 且不同类毒力基因之间的致病性强弱也有待鉴定。但值得注意的一点是, 聚类分析发现(图 4) C1 群多杀性巴氏杆菌较为特别, 该群菌株携带额外毒力基因(*hsf-1*), 且有 2 种毒力基因(*tadD* 和 *hgbA*) 缺失。不仅如此, C1 群菌株的 16S rRNA 遗传进化关系为同一分支, 提示着其亲缘关系可能与其携带的特定毒力基因存在一致性。该结论为

多杀性巴氏杆菌的流行病学和致病性分离提供了新的思路。

## 参 考 文 献

- [1] Boyce JD, Chung JY, Adler B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. *Journal of Biotechnology*, 2000, 83(1/2): 153–160.
- [2] Katoch S, Sharma M, Patil RD, Kumar S, Verma S. *In vitro* and *in vivo* pathogenicity studies of *Pasteurella multocida* strains harbouring different *ompA*. *Veterinary Research Communications*, 2014, 38(3): 183–191.
- [3] Griffin D, Chengappa MM, Kuszak J, McVey DS. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2010, 26(2): 381–394.
- [4] Confer AW. Update on bacterial pathogenesis in BRD. *Animal Health Research Reviews*, 2009, 10(2): 145–148.
- [5] Hotchkiss EJ, Dagleish MP, Willoughby K, McKendrick IJ, Finlayson J, Zadoks RN, Newsome E, Brulisauer F, Gunn GJ, Hodgson JC. Prevalence of *Pasteurella multocida* and other respiratory pathogens in the nasal tract of Scottish calves. *Veterinary Record*, 2010, 167(15): 555–560.
- [6] Townsend KM, Boyce JD, Chung JY, Frost AJ, Adler B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system. *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, 39(3): 924–929.
- [7] Khamesipour F, Momtaz H, Azhdary Mamoreh M. Occurrence of virulence factors and antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* strains isolated from slaughter cattle in Iran. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 536.
- [8] Harper M, Boyce JD, Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 265(1): 1–10.
- [9] Blanco-Viera FJ, Trigo FJ, Jaramillo-Meza L, Aguilar-Romero F. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from México. *Revista Latinoamericana De Microbiologia*, 1995, 37(2): 121–126.
- [10] Dabo SM, Confer AW, Murphy GL. Outer membrane proteins of bovine *Pasteurella multocida* serogroup A isolates. *Veterinary Microbiology*, 1997, 54(2): 167–183.
- [11] Ewers C, Lübke-Becker A, Bethe A, Kießling S, Filter M, Wieler LH. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. *Veterinary Microbiology*, 2006, 114(3/4): 304–317.
- [12] Virtala AM, Mechor GD, Gröhn YT, Erb HN, Dubovi EJ. Epidemiologic and pathologic characteristics of respiratory tract disease in dairy heifers during the first three months of life. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1996, 208(12): 2035–2042.
- [13] Verma S, Sharma M, Katoch S, Verma L, Kumar S, Dogra V, Chahota R, Dhar P, Singh G. Profiling of virulence associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from cattle. *Veterinary Research Communications*, 2013, 37(1): 83–89.
- [14] Lin J, Huang SX, Zhang QJ. Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes and Infection*, 2002, 4(3): 325–331.
- [15] Sarangi LN, Priyadarshini A, Kumar S, Thomas P, Gupta SK, Nagaleekar VK, Singh VP. Virulence genotyping of *Pasteurella multocida* isolated from multiple hosts from India. *The Scientific World Journal*, 2014, 2014: Article ID 814109.
- [16] Braun V. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membrane via *TonB-ExxB-ExbD*-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiology Reviews*, 1995, 16(4): 295–307.
- [17] McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 1969, 244(22): 6049–6055.
- [18] Hatfaludi T, Al-Hasani K, Boyce JD, Adler B. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*, 2010, 144(1/2): 1–17.
- [19] Rutter JM. Virulence of *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of gnotobiotic pigs infected with *Bordetella bronchiseptica*. *Research in Veterinary Science*, 1983, 34(3): 287–295.
- [20] Jaglic Z, Kucerova Z, Nedbalcova K, Pavlik I, Alexa P, Bartos M. Characterisation and comparison of *Pasteurella multocida* isolated from different species in the Czech Republic: capsular PCR typing, ribotyping and dermonecrotoxin production. *Veterinárni Medicina*, 2005, 50(8): 345–354.
- [21] Gharibi D, Hajikolaei MRH, Ghorbanpour M, Barzegar SK. Virulence gene profiles of *Pasteurella multocida* strains isolated from cattle and buffalo. *Veterinarski Arhiv*, 2017, 87(6): 677–690.
- [22] Katsuda K, Hoshino K, Ueno Y, Kohmoto M, Mikami O. Virulence genes and antimicrobial susceptibility in *Pasteurella multocida* isolates from calves. *Veterinary Microbiology*, 2013, 167(3/4): 737–741.



## Isolation and diversity analysis of bovine *Pasteurella multocida*

Lishan Lin<sup>1</sup>, Qin Huang<sup>2</sup>, Lingjie Cai<sup>2</sup>, Jiale Ma<sup>1</sup>, Huochun Yao<sup>1</sup>, Zihao Pan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu Province, China

<sup>2</sup> Boehringer Ingelheim International Trade (Shanghai) Co. LTD, Shanghai 200131, China

**Abstract:** [Objective] Our research focuses on the detection and the distribution of some important virulence genes in *Pasteurella multocida* associated with bovine respiratory disease (BRD). [Methods] In total 237 nasal swabs were collected from August 2017 to April 2018 in 8 areas of China. The bacteria were isolated to record the colony morphology and Gram staining, and phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences of the 31 isolates was drawn. Serotype classification was performed, and total 23 virulence factors were determined by PCR. [Results] In total 31 strains of *P. multocida* were identified from 237 samples. Serum typing found all the isolates were type A strains and phylogenetic tree showed the 31 strains related to HB01 strain (China), USDA-ARS-USMARC-60712, USDA-ARS-USMARC-60214, ATCC 43137 and 36950. PCR was used for detecting 23 virulence-associated genes occurred in those isolates, demonstrating that each *P. multocida* carried 17 to 19 virulence-associated genes with high concentration ratio. [Conclusion] Type A *P. multocida* were dominant strains in which 7 strains from different areas of China belong to one cluster, virulent genes *tadD* and *hgbA* were lost in this cluster as well as virulent *hsf-1* was carried. The analysis result reminds the virulence genotyping distribution has relevant to serum typing.

**Keywords:** *Pasteurella multocida*, identification of capsular serotype, virulence-associated genes, 16S rRNA genes

(本文责编: 张晓丽)

---

Supported by the Student Research Training Program of Nanjing Agricultural University (1717A26)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84395328; E-mail: panzihao@njau.edu.cn

Received: 31 May 2018; Revised: 18 July 2018; Published online: 1 August 2018