

运输后犊牛感染多杀性巴氏杆菌及溶血性曼氏杆菌的多样性分析

吕荣华¹, 刘心语¹, 王菡鹭¹, 杨洋¹, 郝成武², 何芳¹, 赵光夫¹, 彭远义¹, 李能章^{1*}

1 西南大学 动物医学院, 重庆

2 天康生物制药有限公司, 新疆 乌鲁木齐

吕荣华, 刘心语, 王菡鹭, 杨洋, 郝成武, 何芳, 赵光夫, 彭远义, 李能章. 运输后犊牛感染多杀性巴氏杆菌及溶血性曼氏杆菌的多样性分析[J]. 微生物学报, 2026, 66(3): 1152-1166.

LYU Ronghua, LIU Xinyu, WANG Hanlu, YANG Yang, HAO Chengwu, HE Fang, ZHAO Guangfu, PENG Yuanyi, LI Nengzhang. Diversity of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* in transported calves[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(3): 1152-1166.

摘要: 多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*, Pm) 和溶血性曼氏杆菌 (*Mannheimia haemolytica*, Mh) 是导致牛呼吸道疾病的主要细菌性病原。目前, 对这 2 种病原在运输后犊牛群中存在的多样性情况仍缺乏了解, 严重影响了其感染的有效防控。【目的】调查一批从内蒙古某犊牛交易市场购买并运送到重庆合川某养殖场的育肥犊牛群中存在的 Pm 和 Mh 多样性情况。【方法】犊牛运送到牛场后分 4 个时间点采集有呼吸道症状的犊牛鼻拭子进行细菌分离培养。根据菌落特点、溶血特性及瑞氏染色特性挑取 Pm 和 Mh 疑似菌落, 通过特异 PCR 鉴定及 16S rRNA 基因序列分析进行确定, 进而测定各分离株的血清型、生化及耐药特性, 以及毒力基因和耐药基因的存在情况。【结果】在 4 个时间点所采集的 68 个有呼吸道症状的鼻拭子中共分离到 23 株 A 型 Pm、10 株 A6 型 Mh 和 1 株 A2 型 Mh, 总分离率达 50%。仅在 1 个样本中同时分离到了 Pm 和 Mh, 部分菌株的生化特性及耐药特性呈现多样性, 且与样本采集时间点无显著相关性。耐药性测定发现 Pm 及 Mh 分离株对多数青霉素类、氨基糖苷类及林可胺类抗生素具有耐药性, 对头孢菌素类及喹诺酮类抗生素较为敏感。耐药基因检测显示, Pm 及 Mh 分离株中 β -内酰胺类基因 (*bla_{TEM}*) 检出率分别为 73.91%、90.91%, 磺胺类基因 (*sul2*) 检出率分别为 69.57%、18.18%, 仅 1 株 Mh 检出氨基糖苷类基因 (*aadA25*、*aadB*), 部分分离株的耐药表型与所选择测定的耐药基因间存在差异。所有

资助项目: 重庆市博士后特别资助项目(2023CQBSHTB2030); 中央引导地方科技发展资金(ZYYD2025CG12); 西南大学大学生创新基金(S202410635289)

This work was supported by the Special Funding for Chongqing Postdoctoral Research Project (2023CQBSHTB2030), the Central Guidance for Local Technology Development Funding (ZYYD2025CG12), and the Innovation Training Program for College Students of Southwest University (S202410635289).

*Corresponding author. E-mail: lich2001020@163.com

Received: 2025-09-30; Accepted: 2025-11-14; Published online: 2025-12-08

Pm 及 Mh 分离株均具有致病性, 毒力基因检出发现, Pm 分离株均能检出 *tonB*、*hsf-1*、*nanB*、*oma87*、*tbpA* 等毒力相关基因, Mh 分离株中毒力基因 *gapA*、*dnaN* 检出率为 100%, *lktA*、*plpB*、*tbpB* 基因检出率均为 82%, 并未检出 *ptfA*。【结论】长途运输到新养殖场的犊牛群所携带的 Pm 和 Mh 在生化特性及耐药性等方面呈现出多样性, 这给饲养期 Pm 和 Mh 感染的防控带来了较大挑战。该研究为运输后犊牛 Pm 和 Mh 感染的防控策略制定提供了参考依据。

关键词: 长途运输犊牛; 多杀性巴氏杆菌; 溶血性曼氏杆菌; 分离培养; 多样性分析

Diversity of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* in transported calves

LYU Ronghua¹, LIU Xinyu¹, WANG Hanlu¹, YANG Yang¹, HAO Chengwu², HE Fang¹, ZHAO Guangfu¹, PENG Yuanyi¹, LI Nengzhang^{1*}

1 College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing, China

2 Tecon Biopharmaceutical Co., Ltd., Urumqi, Xinjiang, China

Abstract: *Pasteurella multocida* (Pm) and *Mannheimia haemolytica* (Mh) are major bacterial pathogens responsible for bovine respiratory diseases. However, the diversity of these two pathogens in transported calf populations remains poorly understood, which severely hinders the effective prevention and control of their infections. **[Objective]** To investigate the diversity of Pm and Mh in a group of fattening calves purchased from a calf trading market in Inner Mongolia and transported to a breeding farm in Hechuan, Chongqing. **[Methods]** After arrival, nasal swabs were collected from calves showing respiratory symptoms at four time points for bacterial isolation and culture. Suspected Pm and Mh colonies were selected based on colony morphology, hemolytic characteristics, and Wright-Giemsa staining results, followed by PCR identification and 16S rRNA gene sequencing for confirmation. Furthermore, the serotypes, biochemical and antibiotic resistance profiles, virulence genes, and resistance genes of the isolates were analyzed. **[Results]** A total of 23 strains of Pm serotype A, 10 strains of Mh serotype A6, and 1 strain of Mh serotype A2 were isolated from 68 nasal swabs collected at 4 different time points, and only 1 nasal swab harbored both Pm and Mh. Some isolates exhibited diversity in biochemical and antibiotic resistance profiles, which had no significant correlation with sampling time points. Antimicrobial susceptibility testing revealed that Pm and Mh isolates were resistant to most penicillins, aminoglycosides, and lincosamides but remained sensitive to cephalosporins and quinolones. Resistance gene detection showed that β -lactamase resistance (*bla*_{TEM}) genes were detected in 73.91% of Pm isolates and 90.91% of Mh isolates, while sulfonamide resistance (*sul2*) genes were found in 69.57% of Pm isolates and 18.18% of Mh isolates. Only one Mh isolate carried aminoglycoside resistance genes (*aadA25* and *aadB*). Discrepancies were observed between resistance phenotype and the presence of selected resistance genes. All Pm and Mh isolates were pathogenic. Virulence gene analysis confirmed that Pm isolates consistently carried *tonB*, *hsf-1*,

nanB, *oma87*, and *tbpA*, while Mh isolates showed the detection rates of 100% for *gapA* and *dnaN*, 82% for *lktA*, *plpB*, and *tbpB*, and 0 for *ptfA*. [Conclusion] These findings suggest that calves purchased from trading markets and transported over long distances to new farms harbor Pm and Mh strains exhibiting diversity in biochemical characteristics and drug resistance, which pose challenges for effective infection control. This study provides critical insights for developing prevention and control strategies against Pm and Mh infections in transported calves.

Keywords: long-distance transported calves; *Pasteurella multocida*; *Mannheimia haemolytica*; isolation; diversity analysis

近年来, 随着我国肉牛养殖业的迅速发展, 形成了“北繁南育”和“北牛南调”的养殖模式^[1]。然而, 因长途运输引发的“运输应激”严重影响了所调运牛的健康。长途运输过程中路途颠簸、运输车厢环境拥挤、饲养条件差异以及气候变化等不良因素易导致牛只发生严重的应激反应, 致使机体免疫力下降, 诱发运输应激综合征, 进而引发呼吸道、消化道乃至全身性病理性反应症状^[2]。运输应激是引发犊牛患病和死亡的重要因素之一, 严重影响了犊牛的生产性能, 给我国肉牛养殖业带来了巨大的经济损失^[3]。

运输应激所诱发的牛呼吸道疾病(bovine respiratory disease, BRD)是多种细菌性病原和病毒呼吸道感染共同作用的结果, 其细菌性病原主要包括多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)、溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*, Mh)、化脓隐秘杆菌(*Trueperella pyogenes*, Trp)和昏睡嗜血杆菌(*Histophilus somni*, Hs)等^[4-5]。其中, 以多杀性巴氏杆菌(*P. multocida*, Pm)和溶血性曼氏杆菌(*M. haemolytica*, Mh)最为常见^[6], 它们可引起咳嗽、流鼻涕、呼吸困难等呼吸道症状。Pm可分为A、B、D、E、F等5种荚膜血清型, 其中A、F型可引发BRD, 但以A型为主; 而Mh共分为12个血清型, 临床分离株以A1、A2、A6血清型为主^[7]。Pm和Mh作为条件致病菌, 常作为正常菌群定植于牛上呼吸道。在非应激状态下其含量较低, 而在应激状态下其在上呼吸道中的含量会急速上升, 并侵入牛下呼吸道, 进而导致肺部炎症^[5], 这是复杂环境

条件综合作用的结果^[8-9]。目前, 虽然已知Pm和Mh可引发牛呼吸道疾病, 但对于长途运输后一段时间内, 同一群有呼吸道疾病的犊牛所感染的Pm和Mh的多样性情况仍了解甚少, 这不利于Pm和Mh感染的有效防控。

本研究采用鼻拭子采样进行细菌分离培养的方法调查分析了一批长途运输后2个月内犊牛群中Pm和Mh的存在情况。通过测定各分离株的致病性、生化特点、耐药特性, 以及所含毒力基因和耐药基因的情况, 旨在揭示犊牛群中Pm和Mh的多样性特点, 为牛呼吸道疾病的流行病学调查及防控策略制定提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 牛鼻拭子采集及实验动物

一批购自内蒙古通辽市某肉牛交易市场的60头犊牛(180-250 kg, 雄性, 西门塔尔品种)被运送到重庆合川某肉牛养殖场进行育肥(运输时间为45 h, 距离>2 600 km)。运输前和运输期间均未使用抗生素, 养殖场提前1周进行了彻底消毒处理。在运回当天及之后的2个月内, 分4个时间点采集了牛群中有呼吸道症状犊牛的鼻拭子, 共计68份。犊牛运送到牛场的当天(D0)采集有呼吸道症状犊牛鼻拭子6份, 编号分别为1-1, ..., 1-6; 第7天(D7)采集22份, 编号分别为2-1, ..., 2-22; 第30天(D30)采集20份, 编号分别为3-1, ..., 3-20; 第60天(D60)采集20份, 编号分别为4-1, ..., 4-20。所采集的鼻拭子均加冰袋低温运送回实验室进

行细菌病原的分离鉴定。102 只雌性昆明小鼠 (18–20 g) 购自重庆恩斯维尔生物科技有限公司, 2 只新西兰大耳白兔 (2 kg) 购自重庆市北碚区某养殖场, 实验动物饲养及试验方法均已获得西南大学实验动物伦理审查委员会批准, 编号为 IACUC-20210625-05。

1.2 主要试剂和仪器

马丁肉汤培养基, 青岛高科园海博生物技术有限公司; 细菌微量生化反应管、药敏纸片、革兰染色试剂盒和瑞氏染色试剂盒, 杭州微生物试剂有限公司; 2×*San Taq* PCR Mix、DL2000 DNA marker, 北京博迈德生物技术有限公司; 基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。

PCR 仪, Bio-Rad 公司; 常温离心机、冷冻

离心机, Eppendorf 公司; 电泳仪, 北京六一仪器厂; 凝胶成像仪, 上海天能科技有限公司; 超纯水仪, Milipore 公司; -80 °C 超低温冰箱, Thermo 公司; 4 °C 冰箱, 青岛海尔股份有限公司; 隔水式恒温培养箱, 上海齐欣科学仪器有限公司; 生物安全柜, 苏州净化设备有限公司; 电子天平, 上海精天电子仪器有限公司; 高压蒸汽灭菌锅, TOMY 公司; 37 °C 恒温摇床, 上海智城分析仪器制造有限公司。

1.3 引物设计与合成

细菌 16S rRNA 基因序列扩增通用引物、多杀性巴氏杆菌及曼氏杆菌特异性基因 *Kmt1* (Pm) 和 *Lkt* (Mh) 鉴定引物、荚膜血清型分型引物、耐药基因及毒力相关基因引物^[10-14] (表 1), 均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表1 本研究所使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer names	引物序列 Primer sequences (5'→3')	扩增长度 Amplification length (bp)
16S rRNA-F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	1 540
16S rRNA-R	GGTTACCTTGTTACGACTT	
<i>Kmt1</i> -F	ATCCGCTATTACCCAGTGG	460
<i>Kmt1</i> -R	GCTGTAAACGAACCTCGCCAC	
<i>Lkt</i> -F	GCAGGAGGTGATTATTAAGTGG	206
<i>Lkt</i> -R	CAGCAGTTATTGTCATACCTGAAC	
<i>hyaD-hyaC</i> -F	TGCCAAAATCGCAGTCAG	1 044
<i>hyaD-hyaC</i> -R	TTGCCATCATTGTCAGTG	
<i>bcbD</i> -F	CATTTATCCAAGCTCCACC	760
<i>bcbD</i> -R	GCCCGAGAGTTTCAATCC	
<i>dcbF</i> -F	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC	657
<i>dcbF</i> -R	CATCTACCCACTCAACCATATCAG	
<i>ecbJ</i> -F	TCCGCAGAAAATTATTGACTC	511
<i>ecbJ</i> -R	TGCTGCTTGATTTTGTG	
<i>fcgD</i> -F	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG	851
<i>fcgD</i> -R	TTCCGCCGTCAATTACTCTG	
<i>Hyp</i> -F	CATTTCTTAGGTTTCAGC	306
<i>Hyp</i> -R	AAGTCATCGTAATGCCT	
<i>Core2</i> -F	GGCATATCCTAAAGCCGT	160
<i>Core2</i> -R	AGAATCCACTATTGGGCACC	

(待续)

(续表 1)

引物名称 Primer names	引物序列 Primer sequences (5'→3')	扩增长度 Amplification length (bp)
<i>TupA</i> -F	TGAGAATTTTCGACAGCACT	78
<i>TupA</i> -R	ACCTTGGCATATCGTACC	
<i>aadA25</i> -F	TATGGAGGCTTCGGCTTT	217
<i>aadA25</i> -R	GCTATGTTCTCTTGCTTTTGTC	
<i>aadB</i> -F	CAGTCGCCCTAAAACAAA	247
<i>aadB</i> -R	CAGTCAAGTAACTCATCCCC	
<i>bla_{TEM}</i> -F	GAGTATTCAACATTTTCGT	857
<i>bla_{TEM}</i> -R	ACCAATGCTTAATCAGTGA	
<i>sul2</i> -F	ATGATCTAACCCTCGGTCTC	722
<i>sul2</i> -R	CGGCATCGTCAACATAACC	
<i>sul1</i> -F	TTCGGCATTGTGAATCTCAC	822
<i>sul1</i> -R	ATGATCTAACCCTCGGTCTC	
<i>lnuA</i> -F	GCATGTTATTGATTTTAAATT	500
<i>lnuA</i> -R	GCTTAGGAGGGATAAAATGAA	
<i>ermC</i> -F	GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	572
<i>ermC</i> -R	GCTAATATTGTTAAATCGTCAAT	
<i>hgbB</i> -F	TGAGTACGGCTTGACATTTAGGT	831
<i>hgbB</i> -R	GTTATGCGGTTCGTGGTGTT	
<i>tonB</i> -F	CGACGGTGAAACCTGAGCCA	261
<i>tonB</i> -R	CCGAGCGATAAGCATTGACT	
<i>hsf-1</i> -F	GGATTAACAAGACTCAAGGTTG	703
<i>hsf-1</i> -R	ATGGTAAGAATGGCGGAA	
<i>nanB</i> -F	ATAAAGTGACGCCGAAAGCT	573
<i>nanB</i> -R	AGGAAGACTGTCCTTTATTCCG	
<i>tbpA</i> -F	TTGGTTGGAAACGGTAAAGC	728
<i>tbpA</i> -R	TAACGTGTACGGAAAAAGCCC	
<i>oma87</i> -F	GGCAGCGAGCAACAGATAACG	838
<i>oma87</i> -R	TGTTTCGTCAAATGTCGGGTGA	
<i>lktA</i> -F	CTTACATTTTAGCCCAACGTG	497
<i>lktA</i> -R	TAAATTCGCAAGATAACGGG	
<i>plpB</i> -F	CGTACAGGCGGATACCTCAC	272
<i>plpB</i> -R	ACCAACCTTTCACCACACCA	
<i>tbpB</i> -F	GATTTTACTACCGATGCGAGA	165
<i>tbpB</i> -R	TTTATTAGCAAAATCAGCCGTA	
<i>gapA</i> -F	GGTATTACCTGCATTAACGG	210
<i>gapA</i> -R	GCACCATTGAAGTCTGTTGAA	
<i>dnaN</i> -F	GCGAGGCAGAACTCGGCGGT	171
<i>dnaN</i> -R	ATCGTGCCACGCAAAGCCGT	
<i>ptfA</i> -F	TGTGGAATTCAGCATTTTAGTGTGTC	480
<i>ptfA</i> -R	TCATGAATTCCTATGCGCAAAATCCT	

1.4 PCR 反应

参照基因组 DNA 提取试剂盒的操作步骤提取细菌 DNA。PCR 反应体系 (20 μL): $2\times\text{San Taq PCR Mix}$ 10 μL , 上、下游引物 (100 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , DNA 模板 1 μL , ddH_2O 7 μL 。PCR 反应条件: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 40 s, 共 30 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 终延伸 5 min。

1.5 多杀性巴氏杆菌及曼氏杆菌的分离鉴定

将鼻拭子放入装有 1 mL 马丁肉汤培养基的离心管中, 充分振荡, 使鼻拭子中的细菌悬浮于培养基中, 取菌悬液进行 10 倍比梯度稀释至 10^{-2} , 取不同稀释度的悬液 100 μL , 分别涂布于马丁肉汤琼脂平板及马丁+兔血平板, 置于 CO_2 培养箱中 37 $^\circ\text{C}$ 培养 48 h。根据多杀性巴氏杆菌的菌落特点及曼氏杆菌的溶血特性挑取菌落, 进行瑞氏染色。对菌落光滑并带有一定荧光特性, 且菌体染色呈两极浓染的初步判定为多杀性巴氏杆菌, 而对有菌落有溶血特性及菌染色两极浓染的初步判定为溶血性曼氏杆菌。其后, 通过多杀性巴氏杆菌及曼氏杆菌各自特异的鉴定基因 *Kmt1* 及 *Lkt* 进行 PCR 扩增, 最终通过 16S rRNA 基因序列扩增测序分析进行确定。将鉴定准确的多杀性巴氏杆菌及曼氏杆菌于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。为便于统计分析, 所分离菌株的编号与鼻拭子编号对应。

1.6 致病性测定

取 Pm 及 Mh 各分离株分别划线于马丁平板, 37 $^\circ\text{C}$ 培养 24 h。各挑取 2-3 个菌落于 5 mL 马丁液体培养基中, 200 r/min 培养 12 h 后, 进行菌落计数。分别取 2×10^8 CFU 的菌对昆明小鼠进行腹腔攻毒, 记录小鼠死亡结果, 分析各菌株的致病性。

1.7 血清型分子鉴定

对 Pm 及 Mh 各分离株, 分别以 Pm 的 5 个荚膜血清型基因 (*hyaD-hyaC*、*bcbD*、*dcfF*、

ecbJ、*fcfD*) 及 Mh 的 3 个荚膜血清型基因 (*Hyp*、*Core2*、*TupA*) 进行 PCR 扩增, 依据各基因的扩增情况确定分离株的血清型。

1.8 生化鉴定试验

取 1.5 节中分离出的 Pm 及 Mh 各菌株分别划线于马丁平板, 37 $^\circ\text{C}$ 培养 12 h。挑取单菌落接种到微量生化管中, 37 $^\circ\text{C}$ 培养 24-36 h, 观察并记录生化结果, 参照细菌生化管说明书进行结果判定, 比较不同时间点分离株的生化特点。

1.9 药物敏感性试验

采用纸片扩散法 (K-B 法) 测定 Pm 及 Mh 各分离菌的药物敏感性。取 100 μL (1×10^8 CFU/mL) 细菌悬液分别涂布于马丁肉汤固体培养基上, 以 5 片/平板放置药敏片, 测试 28 种抗生素, 37 $^\circ\text{C}$ 恒温培养 12 h, 测量抑菌圈直径大小, 并根据美国临床实验室标准化委员会 (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) 标准判定各菌株的药物敏感性与耐药性。

1.10 毒力基因及耐药基因检测

以 Pm 及 Mh 基因组 DNA 为模板, 选择 Pm 的毒力基因 (*hgbB*、*tonB*、*hsf-1*、*nanB*、*tbpA*、*oma87*) 和 Mh 的毒力基因 (*lktA*、*plpB*、*tbp*、*gapA*、*dnaN*、*ptfA*) 及耐药基因 (*aadA25*、*aadB*、*bla_{TEM}*、*sul2*、*sul1*、*lnuA*、*ermC*) (引物见表 1) 进行 PCR 扩增, 分析各菌株耐药基因及毒力基因的存在情况。

2 结果与分析

2.1 多杀性巴氏杆菌和溶血性曼氏杆菌的分离鉴定结果

经细菌分离培养, 从犍牛运输到牛场后 4 个时间点所采集的共 68 个鼻拭子中, 共分离到 Pm 和 Mh 合计 34 株。所分离菌株编号与所来源鼻拭子的编号对应, 其中 23 株为 Pm, 血清型均为 A 型; 1 株为 Mh, 血清型为 A6 型的有 10 株, A2 型的有 1 株, 编号为 Mh 3-3。仅

在 1 个鼻拭子样本中同时分离到了 Pm 和 Mh。其中, Pm 在 4 个时间点所采集的样本中均能分离到, 但 Mh 在犊牛运送到育肥场的当天(D0)所采集的样本中未分离到(表 2)。Pm 整体分离率

显著高于 Mh。在刚运输到育肥场的有呼吸道症状的犊牛中, Pm 的分离率较高, Mh 分离率为 0; Mh 在运输后 1 月左右的有呼吸道症状的犊牛中分离率高(图 1)。

表2 各时间点分离菌株

Table 2 Isolates from the nasal swabs collected at each time point

Time point	Pm					Mh										
D0	1-1	1-2	1-4	1-5	1-6											
D7	2-2	2-6	2-9	2-11	2-13	2-14	2-17	2-18	2-18	2-22						
D30	3-6	3-17							3-1	3-2	3-3	3-8	3-9	3-11	3-12	3-13
D60	4-1	4-5	4-8	4-10	4-11	4-14	4-16	4-20	4-6							

Pm: *Pasteurella multocida*; Mh: *Mannheimia haemolytica*.

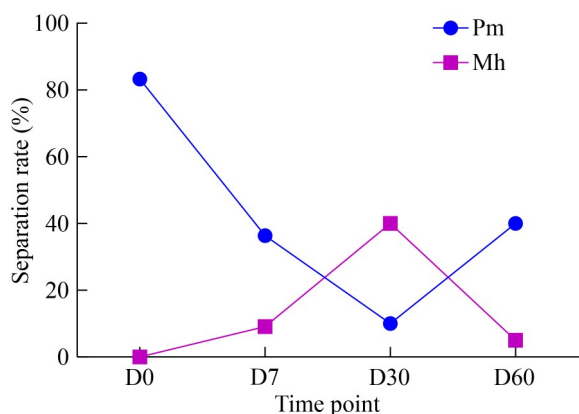


图1 Pm及Mh的分离率比较

Figure 1 Curves of separation rate of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*. Pm: *Pasteurella multocida*; Mh: *Mannheimia haemolytica*.

2.2 各分离株的生化测定

为了解 Pm 和 Mh 各分离株的生化特点, 本研究利用微量生化管分别测定了各分离株对蔗糖、乳糖等 12 种底物的发酵情况。研究结果显示, Pm 所有分离株均可发酵蔗糖、海藻糖、葡萄糖、甘露醇、麦芽糖、山梨醇, 对于其他几种底物则是部分菌株可发酵(图 2); 而针对 Mh, 其分离株均可发酵蔗糖和甘露醇, 对于另 10 种底物, 也只有部分菌株可以发酵(图 3)。不同时

间点所分离的菌株其生化特点并无明显规律, Pm 和 Mh 各分离株生化特点的差异反映了运输后犊牛群体中所携带的 Pm 和 Mh 菌株存在多样性。

2.3 耐药性及耐药基因检测

为进一步了解 Pm 和 Mh 各分离株的药物敏感性, 首先选用 K-B 法分别测定了各分离株对 28 种抗生素的敏感性。结果发现, 除少数分离株外, Pm 和 Mh 多数分离株的整体耐药性不强。Pm 和 Mh 所有分离株对头孢类及沙星类抗生素均较为敏感, 而对苯唑西林、丁胺卡那、克林霉素等几种抗生素完全耐药(图 4、图 5)。各分离株间的耐药特性均存在明显差异, 分离株耐药性与其分离时间点间无线性相关性。根据各分离株耐药特性综合分析, 选择了部分耐药基因进行检测(表 1), 发现部分 Pm 和 Mh 菌株中含有 *bla_{TEM}* 和 *sul2* 基因, *aadA25* 基因和 *aadB* 基因仅在 Mh 3-11 中检测到, 其他分离菌均未检测到这 2 个基因, 而 *lnuA* 基因和 *ermC* 基因在 Pm 和 Mh 所有分离株中均未检测到(图 4、图 5)。比对耐药表型与耐药基因检出情况, 发现 Pm 和 Mh 均对林可胺类克林霉素完全耐药, 却未检出与林可胺类耐药

Result \ Strain	D0						D7						D30			D60							
	Pm 1-1	Pm 1-2	Pm 1-4	Pm 1-5	Pm 1-6	Pm 2-2	Pm 2-6	Pm 2-9	Pm 2-11	Pm 2-13	Pm 2-14	Pm 2-17	Pm 2-18	Pm 3-6	Pm 3-17	Pm 4-1	Pm 4-5	Pm 4-8	Pm 4-10	Pm 4-11	Pm 4-14	Pm 4-16	Pm 4-20
Biochemical tube																							
Sucrose	[Gray]																						
Lactose	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Rhamnose	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Trehalose	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Fructose	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Arabinose	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Urease	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Glucose	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Galactose	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Mannitol	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Maltose	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Sorbitol	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]

图2 Pm生化发酵结果。灰色：发酵；白色：不发酵。

Figure 2 Biochemical fermentation results of *Pasteurella multocida* strains. Gray: Fermentation; White: Non fermentation.

Result \ Strain	D7		D30							D60		
	Mh 2-18	Mh 2-22	Mh 3-1	Mh 3-2	Mh 3-3	Mh 3-8	Mh 3-9	Mh 3-11	Mh 3-12	Mh 3-13	Mh 4-6	
Biochemical tube												
Sucrose	[Gray]	[Gray]	[Gray]	[Gray]	[Gray]	[Gray]	[Gray]	[Gray]	[Gray]	[Gray]	[Gray]	[Gray]
Lactose	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Rhamnose	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Trehalose	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Fructose	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Arabinose	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Urease	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Glucose	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Galactose	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Mannitol	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Maltose	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]
Sorbitol	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]	[White]

图3 Mh生化发酵结果。灰色：发酵；白色：不发酵。

Figure 3 Biochemical fermentation results of *Mannheimia haemolytica* strains. Gray: Fermentation; White: Non fermentation.

相关的 *InuA* 及 *ermC* 耐药基因；大部分 Pm 分离菌株对氨基糖苷类耐药，但未检测到与氨基糖苷类耐药相关的 *aadA25* 和 *aadB* 基因；而分离菌株 Mh 2-18、Mh 2-22 对 β-内酰胺类耐药，同时检测到含有 β-内酰胺类基因(*bla_{TEM}*)。Pm 及 Mh 分离株中，β-内酰胺类基因(*bla_{TEM}*)检出率分别为 73.91%、90.91%，而磺胺类基因(*sul2*)检出率则分别为 69.57%、18.18%，仅在 1 株 Mh 中检出氨基糖苷类基因(*aadA25*、*aadB*)。所分离到的 Pm 和 Mh 有部分菌株的耐药表型与测定的耐药基因间存在一定偏差，预示着这

些菌株的耐药表型应由其他耐药基因或耐药机制所决定。

2.4 致病性及毒力基因检测

采用小鼠腹腔途径攻毒对 Pm 和 Mh 分离株进行致病性测定(每株菌 3 只小鼠)，发现所有分离株均可致小鼠死亡，这表明从有呼吸道症状的牛鼻拭子中分离到的 Pm 和 Mh 与牛呼吸道疾病密切相关。毒力相关基因检测发现，Pm 所有分离株均含有 *tonB*、*hsf-1*、*nanB*、*oma87* 及 *tbpA* 等毒力相关基因，但未检出 *hgbB* 基因

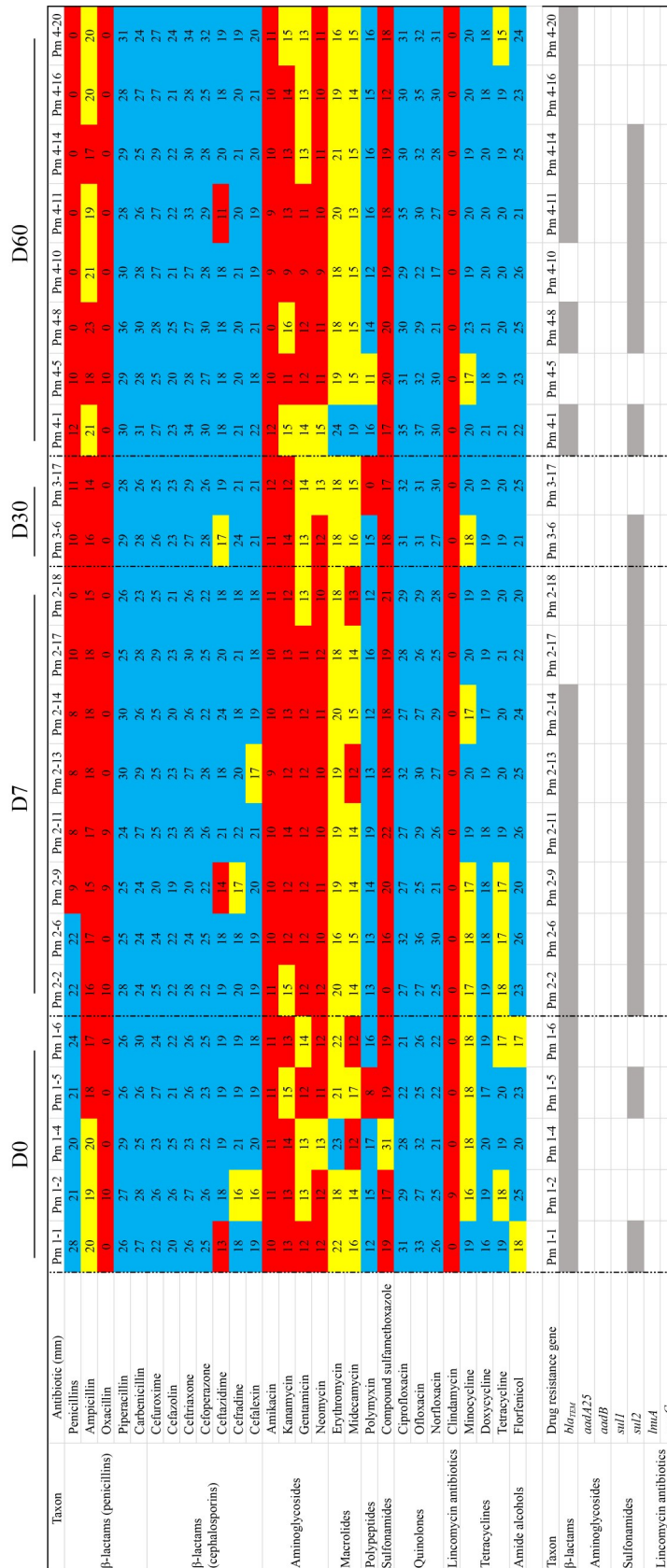


图4 多杀性巴氏杆菌药物敏感性与耐药基因分布。Pm: *Pasteurella multocida*。蓝色: 敏感; 黄色: 中介; 红色: 耐药; 灰色: 携带该基因; 白色: 缺失该基因。

Figure 4 Drug resistance and resistance genes distribution in *Pasteurella multocida* strains. Pm: *Pasteurella multocida*; Blue: Sensitivity; Yellow: Intermediate; Red: Drug resistance; Gray: Carrying this gene; White: Missing this gene.

Taxon	Antibiotic (mm)	D7		D30								D60
		Mh 2-18	Mh 2-22	Mh 3-1	Mh 3-2	Mh 3-3	Mh 3-8	Mh 3-9	Mh 3-11	Mh 3-12	Mh 3-13	Mh 4-6
β-lactams (penicillins)	Penicillins	0	0	0	11	12	0	0	0	0	0	0
	Ampicillin	0	0	24	22	23	0	0	18	15	0	25
	Oxacillin	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Piperacillin	0	9	30	29	35	0	10	30	25	0	33
	Carbenicillin	0	10	36	31	38	10	9	28	30	12	32
β-lactams (cephalosporins)	Cefuroxime	26	27	32	29	39	30	28	30	33	27	30
	Cefazolin	15	16	22	32	30	19	20	20	20	20	30
	Ceftriaxone	21	27	34	31	39	30	33	29	31	30	36
	Cefoperazone	17	22	28	30	32	23	21	28	31	26	35
	Ceftazidime	23	24	23	25	25	23	27	22	30	26	30
	Cefradine	14	19	25	25	28	18	18	21	25	20	27
	Cefalexin	17	14	25	26	27	16	19	22	26	16	25
Aminoglycosides	Amikacin	13	13	14	12	11	9	13	12	14	14	14
	Kanamycin	15	17	15	14	16	12	17	16	0	16	17
	Gentamicin	15	14	15	16	15	16	15	13	14	15	14
	Neomycin	13	15	13	14	14	13	13	13	13	11	14
Macrolides	Erythromycin	17	17	20	14	24	23	22	13	11	16	15
	Midecamycin	12	10	12	12	15	13	12	12	16	12	11
Polypeptides	Polymyxin	14	14	14	13	16	14	16	12	15	14	15
Sulfonamides	Compound sulfamethoxazole	0	11	19	18	25	18	17	11	13	16	18
Quinolones	Ciprofloxacin	19	20	27	23	32	20	20	17	18	20	27
	Ofloxacin	17	18	22	26	22	19	21	19	19	20	28
	Norfloxacin	15	15	23	24	26	19	19	15	15	19	26
Lincomycin antibiotics	Clindamycin	0	0	0	0	11	0	0	0	10	0	0
Tetracyclines	Minocycline	17	17	17	16	20	15	17	16	15	16	15
	Doxycycline	15	17	17	18	22	16	19	16	13	18	17
	Tetracycline	15	17	18	17	22	21	20	0	9	18	18
Amide alcohols	Florfenicol	17	16	21	22	22	25	22	16	24	23	23
Taxon	Drug resistance gene	Mh 2-18	Mh 2-22	Mh 3-1	Mh 3-2	Mh 3-3	Mh 3-8	Mh 3-9	Mh 3-11	Mh 3-12	Mh 3-13	Mh 4-6
β-lactams	<i>bla_{TEM}</i>											
	<i>aadA25</i>											
Aminoglycosides	<i>aadB</i>											
	<i>sul1</i>											
Sulfonamides	<i>sul2</i>											
	<i>lnuA</i>											
Lincomycin antibiotics	<i>ermC</i>											

图5 溶血性曼氏杆菌药物敏感性与耐药基因分布。Mh: *Mannheimia haemolytica*。蓝色：敏感；黄色：中介；红色：耐药；灰色：携带该基因；白色：缺失该基因。

Figure 5 Drug resistance and resistance genes distribution in *Mannheimia haemolytica* strains. Mh: *Mannheimia haemolytica*; Blue: Sensitivity; Yellow: Intermediate; Red: Drug resistance; Gray: Carrying this gene; White: Missing this gene.

(图 6A)。在 Mh 分离株中，毒力相关基因 *lktA*、*plpB* 及 *tbpB* 的检出率为 82%，*gapA* 和 *dnaN* 的检出率则为 100%，未检测到 *ptfA* 基因(图 6B)。从测定的毒力基因来看，有 2 株 Mh 菌株(Mh 3-11 和 Mh 3-12)与其他 Mh 分离株显著不同，这 2 株菌的生化特点及所含的耐药基因也明显与其他 Mh 分离株不同(图 3、图 5)。

3 讨论与结论

牛呼吸道疾病(BRD)是肉牛养殖业最常见的

疾病之一，对肉牛行业的经济稳定产生重大不利影响^[15]。美国 90% 的大型养殖场报道 BRD 是其最常见疾病^[16]。近年来，BRD 也成为限制我国肉牛产业发展的重要疫病，每年带来数十亿元的经济损失。Pm 和 Mh 是导致 BRD 的主要细菌病原，在患 BRD 的牛中分离率较高^[17]，其分离率可达 60% 以上^[18]。然而，目前对这 2 种病原在同一患 BRD 牛群中的多样性情况了解较少，这不利于其有效防控。

本研究选取了一批从内蒙古通辽市经连续

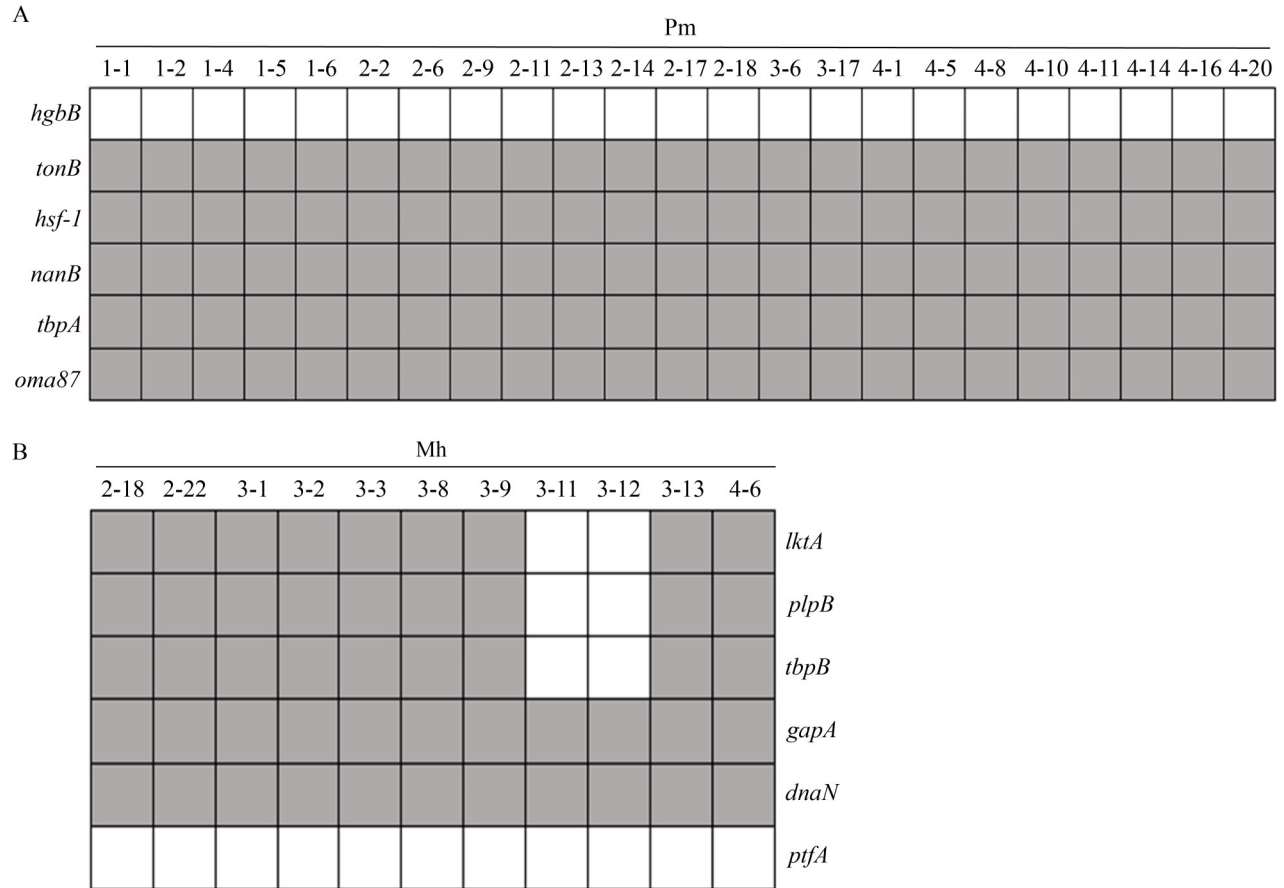


图6 毒力基因分布情况。A: Pm毒力基因分布; B: Mh毒力基因分布。灰色: 携带该基因; 白色: 缺失该基因。

Figure 6 Distribution of virulence genes in different strains. A: Virulence genes in different strains of *Pasteurella multocida*; B: Virulence genes in different strains of *Mannheimia haemolytica*. Gray: Carrying this gene; White: Missing this gene.

>40 h 长途运输到重庆合川某肉牛育肥场的 60 头犊牛, 调查分析了这批犊牛运送到牛场后 2 个月内, 犊牛群中 Pm 和 Mh 的存在情况及分离株特性差异。这批犊牛运输到牛场的 2 个月内陆续有犊牛出现发热、咳嗽、流鼻涕及腹泻等症状。根据实际情况, 本研究总共采集了 4 个时间点的犊牛鼻拭子, 所采集鼻拭子的犊牛均具有一定呼吸道症状。这主要是从病原参与感染的可能性及分离率的角度考虑, 通常参与感染的病原数量较高, 易于分离。针对 Pm 和 Mh 的分离, 采用具有一定鉴别作用的适宜培养基: Pm 选用马丁固体培养基, 其上生长的菌落

透光具有一定荧光特性; Mh 选用兔血培养基, 其初次分离出的菌落周围会有溶血环。这批犊牛运到牛场当天, 有 6 头犊牛流鼻涕, 对这 6 头犊牛采集了鼻拭子, 细菌分离发现, 其中 5 头犊牛的鼻拭子中均有大量 Pm, 但未分离到 Mh。其后 2 个月, 即便有针对性地用药, 但始终有犊牛陆续出现呼吸道症状。其后 3 个时间点所采集的鼻拭子中均分离到不同数量的 Pm 和 Mh。从 4 个时间点来看, Pm 和 Mh 的分离率呈现起伏, 这可能与犊牛所处的应激状态对 Pm 和 Mh 生长繁殖的影响有关, 但其具体原因还需深入研究。本研究所采集的 68 份鼻拭子中仅从

1 个样本中同时分离到了 Pm 和 Mh, 其原因可能与 Pm 和 Mh 的生长存在邻近依赖性抑制有关^[19], 二者在牛呼吸道上皮细胞表面的生长也存在相互抑制作用^[20]。Pm 和 Mh 总分离率虽达 50%, 但也有 50% 的鼻拭子样本中并未分离到 Pm 和 Mh。Pm 和 Mh 的这种分离率可能与呼吸道其他微生物有关, 有报道称牛呼吸道合胞体病毒可以抑制 Pm 在上呼吸道的定殖^[21-22], 而牛呼吸道存在的乳酸菌则可抑制 Mh 在呼吸道定殖^[23]。因此, 未来可从调节牛呼吸道微生物群落入手, 限制 Pm 和 Mh 的生长繁殖, 从而减少抗生素的使用。

这一批犍牛运输到牛场后全场进行了运输应激干预, 对有呼吸道症状的犍牛使用了抗生素。早期使用过咳喘康(免疫因子)、30% 氟苯尼考、板蓝根注射液及加米霉素, 晚期使用过多西环素及卡那霉素等。在选择采样时间点期间, 即便牛场采取了应激干预并使用了抗生素, 仍然在有呼吸道症状的犍牛中分离到大量 Pm 和 Mh, 而在另外未发生呼吸道症状的犍牛中采集鼻拭子, 其 Pm 和 Mh 的分离率非常低。这种分离率差异应与犍牛的应激状态密切相关。本研究对所有分离株进行了生化测定和耐药性分析, 发现不同时间点所分离菌株间无明显规律, 多数分离株表现出不同的生化特性和耐药性。这表明在这一批犍牛群中存在多种不同特性的 Pm 和 Mh 菌株, 其原因应与这批犍牛来源于肉牛交易市场有关。交易市场中很多犍牛来源于不同的生产地, 不同来源的犍牛可能携带不同的菌株, 在交易市场这样一个复杂环境条件下, 病原在不同个体中相互交叉传播, 导致犍牛群所携带的 Pm 和 Mh 毒株具有多样性和复杂性。此外, 本研究发现所分离的 Pm 和 Mh 菌株生化特性与《兽医微生物学》^[24]相关教材中的描述有所出入, 书中提到 Pm 可分解果糖及半乳糖, 一般对麦芽糖、乳糖、鼠李糖及阿拉伯糖不发酵, 但此研究中分离到的 Pm 有少部分菌株并不能分解果糖及半乳糖, 而多数菌株可发酵乳糖、鼠

李糖, 少部分菌株可发酵阿拉伯糖; 针对 Mh, 教材中提到一般分解乳糖、麦芽糖, 不分解阿拉伯糖、海藻糖及甘露醇, 尿素酶阴性。本研究中分离的 Mh 菌株均不分解乳糖, 与董海燕^[13]、韩瑞等^[25]的研究结果一致; 有 1 株不分解麦芽糖, 部分菌株可分解海藻糖及甘露醇, 少部分菌株可分解阿拉伯糖, 多数菌株尿素酶阳性, 也与董海燕^[13]、谢倩茹等^[26]的研究结果一致。

这批犍牛虽然在运输后进行了抗生素干预, 但从中分离出的 Pm 和 Mh 菌株整体耐药性并不强, 仅对少数抗生素表现出耐药性。犍牛运抵牛场后使用了多西环素和氟苯尼考, 然而分离到的 Pm 和 Mh 菌株绝大多数对这 2 种抗生素仍保持敏感性。这表明, 菌株对某一抗生素的耐药性是长期累积的结果, 因此应避免长时间和频繁使用单一抗生素。本研究进一步对比分析了 Pm 和 Mh 的耐药表型与耐药基因检测结果, 发现分离菌株的耐药表型与所测耐药基因的携带情况不完全一致。这一现象与贾开文等^[27]、董海燕^[13]和王子杰等^[28]的研究结果相似, 但与高瑞等^[29]和李贵琴等^[30]的研究结果不同。对于 Pm 和 Mh 耐药基因与耐药表型不完全一致的原因, 可能包括: 一是所检测的耐药基因不够全面, 存在多个具有相同耐药特性的基因; 二是某一耐药特性可能由多个基因共同作用所致, 而非单一基因决定; 此外, 外界环境因子也可能对相关基因的表达调控产生影响^[31]。该研究表明, 仅依赖耐药基因检测来指导临床用药存在一定局限性, 因为病原细菌的耐药表型是多种因素共同作用的结果。因此, 在临床用药过程中应综合考虑病原耐药表型、基因型以及临床实际情况进行综合诊断, 并制定精准的治疗方案。

毒力基因与细菌的毒力密切相关, 因此毒力基因的鉴定分析对深入研究菌株的致病机制、疫苗研发和分子分型具有重要意义^[32-33]。研究表明 A 型 Pm 的唾液酸 *nanB* 基因的检出率与毒

力强弱密切相关, 缺失这种毒力基因的 Pm 致病性会有所下降^[34]。本研究 *nanB* 基因检出率为 100%, 与邬琴等^[35]的研究结果一致, 而高瑞^[36]的研究菌株却并未检测到 *nanB* 基因, 表明不同分离株携带 *nanB* 基因的情况存在差异。邬琴等^[35]研究显示, *hgbB* 基因仅在 B 型 Pm 中检出, *hsf-1* 基因仅在 A 型 Pm 中检出, *tbpA* 基因只在牛源 Pm 中检出, 本研究对这几个基因的检测结果与此一致。Mh 毒力因子众多, 其中白细胞毒素(leukotoxin, LKT)是 Mh 最重要的毒力因子^[37]。在本研究中未在 Mh 分离株中检测到黏附素相关基因(*pfhA*), 这与贾开文等^[27]、韩小丽^[11]的 Mh 毒力基因检测结果不同。有研究显示, *lktA* 基因在 Mh 中的检出率为 100%^[13], 然而在本研究分离的 Mh 菌株中 *lktA* 基因的检出率仅为 75%。这表明并非所有 Mh 菌株都含有 *lktA* 基因。因此, 单一依赖 LktA 因子制备的亚单位疫苗对那些不含 *lktA* 基因的 Mh 菌株感染将无法提供保护作用。这一发现表明, 针对 Mh 有必要研发多价、多抗原的疫苗以应对其血清型的多样性和毒力基因的变异, 从而实现对 Mh 病的有效防控。

综合研究结果来看, 从肉牛交易市场购买的犊牛, 其所携带的 Pm 和 Mh 菌株存在显著多样性, 在各种环境应激下均可导致牛呼吸道感染, 这显著增加了防控难度。因此, 为降低犊牛群中携带的 Pm 和 Mh 的多样性, 降低防控难度, 应尽量从繁育场直接购买犊牛, 减少犊牛流通中间环节。

作者贡献声明

吕荣华: 数据分析, 撰写文章; 刘心语: 软件程序; 王菡鹭: 验证; 杨洋: 数据收集与监管; 郝成武: 项目管理; 何芳: 监督管理; 赵光夫: 方法论; 彭远义: 提供资源; 李能章: 提出概念, 获取基金, 执行调研。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 韦泽星, 朱梅芳, 覃仕善. 降低新购肉牛发病率的技术措施[J]. 广西畜牧兽医, 2023, 39(6): 260-262.
- [2] 孙文阳, 谢建亮, 施安, 陈志龙, 姜武, 王瑞刚, 侯鹏霞, 梁小军. 长途运输影响安格斯育肥牛肝脏功能关键基因的筛选[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(10): 4096-4105. SUN WY, XIE JL, SHI A, CHEN ZL, JIANG W, WANG RG, HOU PX, LIANG XJ. Screening of key genes affecting liver function in Angus fattening cattle after long-distance transportation[J]. *China Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 50(10): 4096-4105 (in Chinese).
- [3] 曹兆立, 徐正中, 陈祥, 焦新安. 呼吸道微生物区系与牛呼吸道疾病综合征发生的关系[J]. 动物医学进展, 2022, 43(7): 113-118. CAO ZL, XU ZZ, CHEN X, JIAO XA. Relationship between respiratory microbiota and bovine respiratory disease syndrome[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2022, 43(7): 113-118 (in Chinese).
- [4] 谢倩茹, 童胜涛, 邵咏旋, 姜鹏, 陈颖钰, 胡长敏, 郭爱珍. 牛呼吸道感染细菌病原的致病机理与防控研究进展[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(12): 2183-2188. XIE QR, TONG ST, SHAO YX, JIANG P, GUO AZ. Research on pathogenic mechanism and prevention of bovine respiratory tract bacterial infection[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2016, 36(12): 2183-2188 (in Chinese).
- [5] SNYDER E, CREDILLE B. *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in bovine respiratory disease: how are they changing in response to efforts to control them?[J]. *The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 2020, 36(2): 253-268.
- [6] HOLSCHBACH CL, AULIK N, POULSEN K, OLLIVETT TL. Prevalence and temporal trends in antimicrobial resistance of bovine respiratory disease pathogen isolates submitted to the Wisconsin Veterinary Diagnostic Laboratory: 2008–2017[J]. *Journal of Dairy Science*, 2020, 103(10): 9464-9472.
- [7] 朱杰, 赵旭, 东笑, 骆建铎, 席俊程, 王贵平, 贾爱卿. 牛多杀性巴氏杆菌和溶血性曼氏杆菌的分离鉴定及致病力评估[J]. 中国兽医学报, 2024, 44(1): 80-87. ZHU J, ZHAO X, DONG X, LUO JH, XI JC, WANG GP, JIA AQ. Isolation, identification, and pathogenicity evaluation of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2024, 44(1): 80-87 (in Chinese).
- [8] RAWAT N, GILHARE VR, KUSHWAHA KK, HATTIMARE DD, KHAN FF, SHENDE RK, JOLHE DK. Isolation and molecular characterization of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* associated with pneumonia of goats in Chhattisgarh[J]. *Veterinary World*, 2019, 12(2): 331-336.

- [9] CHAI JM, LIU XT, USDROWSKI H, DENG FL, LI Y, ZHAO JC. Geography, niches, and transportation influence bovine respiratory microbiome and health[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 961644.
- [10] 马雪. 新疆地区犊牛呼吸道巴氏杆菌分子检测及分离株部分生物学特性研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2021. MA X. Molecular detection and biological characteristics of *Pasteurella* isolated from calf respiratory tract in Xinjiang[D]. Shihezi: Shihezi University, 2021 (in Chinese).
- [11] 韩小丽. 致肉牛运输热溶血曼氏杆菌的分离鉴定及某些生物学特性研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2019. HAN XL. Isolation identification and partial biological characteristics of *Mannheimia haemolytica* in shipping fever of beef cattle[D]. Shihezi: Shihezi University, 2019 (in Chinese).
- [12] 高磊, 李旭雯, 宫枫举, 潘子豪, 姚火春. 牛源溶血性曼氏杆菌的分离鉴定及其生物学特性分析[J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55(8): 57-63. GAO L, LI XW, GONG FJ, PAN ZH, YAO HC. Isolation, identification and biological characterization of *Mannheimia haemolytica* from cattle[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2023, 55(8): 57-63 (in Chinese).
- [13] 董海燕. 牛源溶血性曼氏杆菌的毒力和耐药性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2023. DONG HY. Study on the virulence and drug resistance of bovine *Mannheimia haemolytica*[D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [14] 范正波. 牛源A型多杀性巴氏杆菌毒力相关基因和药物敏感性分析[D]. 重庆: 西南大学, 2020. FAN ZB. Virulence genes and drug sensitivity analysis of bovine serotype a *Pasteurella multocida*[D]. Chongqing: Southwest University, 2020 (in Chinese).
- [15] NICOLA I, CERUTTI F, GREGO E, BERTONE I, GIANELLA P, D'ANGELO A, PELETTI S, BELLINO C. Characterization of the upper and lower respiratory tract microbiota in Piedmontese calves[J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 152.
- [16] United States Department of Agriculture (USDA). Feedlot 2011 Part iv: health and health management on us feedlots with a capacity of 1 000 or more head[R]. NAHMS Feedlot Studies. Fort Collins: National Animal Health Monitoring System, 2013.
- [17] 刘立兵, 王金凤, 李睿文, 张晓利, 孙晓霞, 王建昌. 牛呼吸道疫病综合征常见病原实时荧光PCR检测平台的建立及初步应用[J]. *中国兽医科学*, 2025, 55(1): 86-93. LIU LB, WANG JF, LI RW, ZHANG XL, SUN XX, WANG JC. Establishment and preliminary application of a multiplex real-time PCR platform for detection of common pathogens causing BRDC[J]. *Chinese Veterinary Science*, 2025, 55(1): 86-93 (in Chinese).
- [18] CALDERÓN BERNAL JM, SERNA C, GARCÍA MUÑOZ Á, DÍEZ GUERRIER A, DOMÍNGUEZ L, FERNÁNDEZ-GARAYZÁBAL JF, VELA AI, CID D. Genotypic comparison of *Pasteurella multocida* from healthy animals at entry to the feedlots with that and from bovine respiratory disease-affected animals during the fattening period[J]. *Animals*, 2023, 13(17): 2687.
- [19] BAVANANTHASIVAM J, DASSANAYAKE RP, KUGADAS A, SHANTHALINGAM S, CALL DR, KNOWLES DP, SRIKUMARAN S. Proximity-dependent inhibition of growth of *Mannheimia haemolytica* by *Pasteurella multocida*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(18): 6683-6688.
- [20] BOUKAHIL I, CZUPRYNSKI CJ. Mutual antagonism between *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* when forming a biofilm on bovine bronchial epithelial cells *in vitro*[J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 216: 218-222.
- [21] SUDARYATMA PE, SAITO A, MEKATA H, KUBO M, FAHKRAJANG W, OKABAYASHI T. Bovine respiratory syncytial virus decreased *Pasteurella multocida* adherence by downregulating the expression of intercellular adhesion molecule-1 on the surface of upper respiratory epithelial cells[J]. *Veterinary Microbiology*, 2020, 246: 108748.
- [22] SUDARYATMA PE, MEKATA H, KUBO M, SUBANGKIT M, GOTO Y, OKABAYASHI T. Co-infection of epithelial cells established from the upper and lower bovine respiratory tract with bovine respiratory syncytial virus and bacteria[J]. *Veterinary Microbiology*, 2019, 235: 80-85.
- [23] TIMSIT E, McMULLEN C, AMAT S, ALEXANDER TW. Respiratory bacterial microbiota in cattle from development to modulation to enhance respiratory health[J]. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 2020, 36(2): 297-320.
- [24] 胡桂学. 兽医微生物学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2018: 125-133. HU GX. *Veterinary Microbiology*[M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2018: 125-133 (in Chinese).
- [25] 韩瑞, 郝成武, 马长宾, 张锐, 凌晨, 贺笋. 牛源溶血性曼氏杆菌新疆株的分离鉴定和生物学特性[J]. *中国兽医杂志*, 2023, 59(10): 70-75. HAN R, HAO CW, MA CB, ZHANG R, LING C, HE S. Isolation, identification and biological characteristics of *Mannheimia haemolytica* strains from bovine sources in Xinjiang[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2023, 59(10): 70-75 (in Chinese).
- [26] 谢倩茹, 姜鹏, 彭清洁, 赖金伦, 刘玉辉, 童胜涛, 邵咏旋, 陈颖钰, 胡长敏, 郭爱珍. 牛溶血性曼氏杆菌和多杀性巴氏杆菌A型、B型的比较鉴定研究[J]. *中国奶牛*, 2015(14): 48-54. XIE QR, JIANG P, PENG QJ, LAI JL, LIU YH, TONG ST, SHAO YX, CHEN YY, HU CM, GUO AZ. Study on comparative identification for cattle *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* type a and B strains[J]. *China Dairy Cattle*, 2015(14): 48-54 (in Chinese).
- [27] 贾开文, 操义恒, 王子杰, 胡亚辉, 周霞, 黄新, 钟发刚, 吴桐忠, 韩猛立, 张星星, 张倩. 新疆牛源溶血性曼氏杆菌和多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及耐药性和毒力分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2023, 45(2): 201-206. JIA KW, CAO YH, WANG ZJ, HU YH, ZHOU X, HUANG X, ZHONG FG, WU TZ, HAN ML, ZHANG

- XX, ZHANG Q. Isolation, identification, drug resistance and virulence analysis of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* from a cattle farm in Xinjiang[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2023, 45(2): 201-206 (in Chinese).
- [28] 王子杰, 操义恒, 马雪, 张丽媛, 王燕, 周霞, 黄新, 吴桐忠, 张星星, 钟发刚. Beltex羊肺源多杀性巴氏杆菌和溶血曼氏杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(9): 1823-1829, 1850.
WANG ZJ, CAO YH, MA X, ZHANG LY, WANG Y, ZHOU X, HUANG X, WU TZ, ZHANG XX, ZHONG FG. Isolation, identification and drug resistance analysis of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolyticus* from Beltex sheep lung[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2022, 42(9): 1823-1829, 1850 (in Chinese).
- [29] 高瑞, 谢玉杰, 缪西鹏, 姜兴佳, 牛耀祖, 许立华. 牛源多杀性巴氏杆菌和溶血性曼氏杆菌双重PCR检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医学报, 2022, 42(10): 2009-2013, 2030.
GAO R, XIE YJ, MIAO XP, JIANG XJ, NIU YZ, XU LH. Establishment of duplex PCR assay for detection of bovine-derived *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2022, 42(10): 2009-2013, 2030 (in Chinese).
- [30] 李贵琴, 尚远昊, 程璐, 冯玉树, 李勤凡. 3株牛源A型多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及耐药性分析[J]. 畜牧与兽医, 2022, 54(11): 80-83.
LI GQ, SHANG YH, CHENG L, FENG YS, LI QF. Isolation, identification and drug resistance analysis of three strains of *Pasteurella multocida* from cattle[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2022, 54(11): 80-83 (in Chinese).
- [31] 马雪, 张丽媛, 陶乔孝慈, 操义恒, 李劼, 周霞, 韩猛立, 黄新, 吴桐忠, 张星星, 钟发刚. 萨福克羊呼吸道感染多杀性巴氏杆菌生物学特性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2021, 43(6): 591-596.
MA X, ZHANG LY, TAO Q, CAO YH, LI J, ZHOU X, HAN ML, HUANG X, WU TZ, ZHANG XX, ZHONG FG. Study on the biological characteristics of *Pasteurella multocida* in Suffolk sheep respiratory tract infection[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2021, 43(6): 591-596 (in Chinese).
- [32] GRIFFIN D. Bovine pasteurellosis and other bacterial infections of the respiratory tract[J]. The Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice, 2010, 26(1): 57-71.
- [33] MAHU M, VALGAEREN B, PARDON B, DEPRES P, HAESEBROUCK F, BOYEN F. Non-haemolytic *Mannheimia haemolytica* as a cause of pleuropneumonia and septicemia in a calf[J]. Veterinary Microbiology, 2015, 180(1/2): 157-160.
- [34] KHAMESIPOUR F, MOMTAZ H, AZHDARY MAMOREH M. Occurrence of virulence factors and antimicrobial resistance in *Pasteurella multocida* strains isolated from slaughter cattle in Iran[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 536.
- [35] 郭琴, 张星星, 顾晓晓, 陶乔孝慈, 黄新, 韩猛立, 吴桐忠, 周霞, 钟发刚. 牛源多杀性巴氏杆菌血清分型及毒力相关基因的检测研究[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(6): 1910-1920.
WU Q, ZHANG XX, GU XX, TAO Q, HUANG X, HAN ML, WU TZ, ZHOU X, ZHONG FG. Study on serotyping and detection of virulence-associated genes of *Pasteurella multocida* isolated from bovine[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(6): 1910-1920 (in Chinese).
- [36] 高瑞. 牛源 *P. multocida* 和 *M. haemolytica* 双重PCR检测方法的建立及 *P. multocid* 分离株耐药基因与毒力基因分析[D]. 银川: 宁夏大学, 2022.
GAO R. Establishment of duplex PCR assay for detection of bovine-derived *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* and antibiotic resistance genes and virulence genes analysis of *P. multocida* isolates[D]. Yinchuan: Ningxia University, 2022 (in Chinese).
- [37] 张继鑫, 彭远义, 李能章. 溶血性曼氏杆菌白细胞毒素研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41(11): 1178-1182.
ZHANG JX, PENG YY, LI NZ. Progress on *Mannheimia haemolytica* leukotoxin[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2019, 41(11): 1178-1182 (in Chinese).