

分类号：
学号：20222113044

密级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



牛多杀性巴氏杆菌-溶血性曼氏杆菌-肺炎克雷伯菌三联灭活疫苗候选株筛选及免疫效果评价

学位申请人 魏京京

周霞 教授

指导教师 钟发钢 研究员

吴洁 高级兽医师

申请学位门类级别 专业硕士

学科、专业名称 兽医

研究领域 动物疫病防控与检疫

所在学院 动物科技学院

中国·新疆·石河子

2025年6月

分类号：
学 号：20222113044

密 级：公开
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



牛多杀性巴氏杆菌-溶血性曼氏杆菌-肺炎克雷伯菌三联灭活苗候选株筛选及免疫效果评价

学 位 申 请 人	魏 京 京
	周 霞 教 授
指 导 教 师	钟 发 钢 研 究 员
	吴 洁 高 级 兽 医 师
申请学位门类级别	专 业 硕 士
学 科 、 专 业 名 称	兽 医
研 究 领 域	动 物 疫 病 防 控 与 检 疫
所 在 学 院	动 物 科 技 学 院

中国·新疆·石河子
2025 年 6 月

**Screening of candidate strains of bovine *Pasteurella multocida*
Mannheimia haemolytica and *Klebsiella pneumoniae* triple inactivated
vaccine**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Veterinary

By

Wei Jing-jing

(Master of Veterinary)

Dissertation Supervisor:

Prof. Zhou xia, Zhong Fa-gang, Wu jie

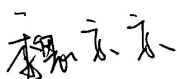
Jun, 2025

Shihezi, Xinjiang, China

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

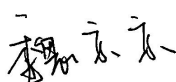
本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。


研究生签名： 

时间：2025 年 5 月 20 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：  时间：2025 年 5 月 20 日

导师签名：  时间：2025 年 5 月 20 日

摘要

目的:随着我国牛养殖业的不断发展,牛呼吸道疾病综合征(Bovinerespiratorydiseasescomplex, BRDC)时有发生,严重影响牛的生产性能。BRDC 的发生与细菌感染密切相关,其中多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)、溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*, Mh)和肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*, Kp)均是引起该疾病的重要病原。兽医临床中除了使用抗生素治疗 BRDC,疫苗免疫接种也是预防疾病的重要方式。目前针对 Pm、Mh 的商品化疫苗为全菌灭活疫苗,尚无针对 Kp 的商品化疫苗,也无同时预防 Pm、Mh、Kp 感染的多联疫苗。因此研究 Pm、Mh、Kp 三联灭活疫苗对预防 BRDC 具有重要意义。

方法: (1) 采用 PCR 基因扩增技术对实验室前期分离的 5 株 Pm、4 株 Mh、6 株 Kp 进行荚膜血清型鉴定,分析菌株毒力基因、耐药基因携带情况;通过细菌致病性试验分析 Pm、Mh、Kp 致病性并采用寇氏改良算法测定其半数致死量(LD₅₀)。(2) 将筛选的 6 株 Pm、Mh、Kp 的强毒株经 0.25% 甲醛灭活后,选用白油、蜂胶、黄芪多糖作为佐剂,以不同免疫剂量分别于第 0 d、14 d、28 d 经背部皮下分点注射免疫小鼠,利用间接 ELISA 检测免疫组小鼠血清中抗体水平,首免后第 42 d 以 3×LD₅₀ 的 Pm、Mh、Kp 相应菌株进行攻毒保护试验,确定 3 株菌最佳免疫剂量。(3) 将筛选出的 3 株 Pm、Mh、Kp 经甲醛灭活混合,选用白油、蜂胶、黄芪多作为佐剂分别于第 0 d、14 d、28 d 经背部皮下分点注射免疫小鼠,利用间接 ELISA 测定不同佐剂三联灭活制剂免疫小鼠后 7-119 d 内 IgG 及 IgG 亚型抗体消长规律;利用 ELISA 试剂盒检测首免后 7、42 d 小鼠血清中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17 分泌水平及脾淋巴细胞上清中 IFN- γ 、IL-4 分泌水平;ELISPOT 检测小鼠脾淋巴细胞 IFN- γ 的分泌水平;再以以 3×LD₅₀ 剂量通过腹腔注射方式进行攻毒保护试验;3 种细菌与白油、蜂胶佐剂组合后,分别于第 0 d、14 d 经颈部皮下注射免疫犊牛,采用间接 ELISA 检测免疫后 0-42 d 血清中的抗体水平。

结果: (1) 5 株 Pm 均为 A 型,4 株 Mh 均为 A1 血清型,6 株 Kp 中 1 株为 K2 血清型,2 株为 K54 血清型,2 株为 K57 血清型,1 株为荚膜未定性型;PmA1、Pm180、Mh95、Mh93、K17、K2 为致病性较强菌株,LD₅₀ 分别为 10^{6.1} cfu/mL、10^{6.5} cfu/mL、10⁷ cfu/mL、10^{8.2} cfu/mL、10^{5.9} cfu/mL、10^{6.7} cfu/mL。(2) 6 株 Pm (Pm180、PmA1)、Mh (Mh93、Mh95)、Kp (Kp2、Kp17) 与白油、蜂胶、黄芪多糖佐剂组合后均能诱导小鼠产生特异性 IgG,其中 PmA1、Mh95、Kp17 免疫剂量分别为 1×10¹⁰ cfu/mL、1×10⁶ cfu/mL、1×10⁹ cfu/mL 时产生的特异性抗体水平总体极显著高于其他 3 株菌免疫组小鼠 ($P<0.001$),且攻毒保护试验中上述 3 个剂量的不同菌株与不同佐剂组合保护率极显著高于其余剂量免疫组 ($P<0.001$),PmA1 攻毒后白油、黄芪多糖佐剂组存活率为 90%,蜂胶佐剂组存活率为 80%,Mh95 攻毒后白油、蜂胶、黄芪多糖佐剂组存活率分别为 90%、80%、80%,Kp17 攻毒后白油组存活率为 100%,蜂胶、黄芪多糖佐剂组存活率分别为 90%、80%。(3) PmA1、Mh95、

Kp17 混合后的白油、蜂胶、黄芪多糖佐剂组小鼠均能产生特异性的 IgG 及 IgG1、IgG2a 与 IgG2b 型抗体，白油佐剂组小鼠产生的针对 3 种菌的抗体水平极显著高于蜂胶佐剂与黄芪多糖佐剂组 ($P < 0.001$)，蜂胶与黄芪多糖佐剂组的 IgG 无显著性差异 ($P > 0.05$)，蜂胶佐剂组能产生 IgG2a 与 IgG2b 型抗体，黄芪多糖组主要诱导产生 IgG1、IgG2b 与 IgG3 型抗体；白油佐剂组能够诱导小鼠分泌 IFN- γ 、IL-4、IL-6、IL-10、IL-17，蜂胶与黄芪多糖佐剂组主要刺激产生 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-17 的分泌，其中白油组小鼠脾细胞 IL-4 分泌水平极显著或显著高于蜂胶、黄芪多糖和无佐剂组 ($P < 0.01$) ($P < 0.001$)，蜂胶与黄芪多糖组小鼠脾细胞 IFN- γ 分泌水平极显著高于白油组与无佐剂组 ($P < 0.001$)；Pm 攻毒后白油、蜂胶、黄芪多糖组保护率分别为 100%、90%、80%，Mh 攻毒后白油、蜂胶黄芪多糖组保护率分别为 90%、80%、70%，Kp 攻毒后白油、蜂胶黄芪多糖佐剂组保护率分别为 100%、80%、70%；犊牛抗体检测结果显示，在首免后 28 d 与 35d，白油佐剂所产生针对 3 种细菌的抗体水平极显著高于蜂胶佐剂灭活疫苗 ($P < 0.0001$)。

结论：（1）通过致病性、抗原性分析从 15 株细菌中筛选多杀性巴氏杆菌 PmA1、溶血性曼氏杆菌 Mh95、肺炎克雷伯氏菌 Kp17 为三联灭活制剂菌株。（2）以白油作为佐剂制备的 PmA1、Mh95、Kp17 三联免疫制剂免疫小鼠和犊牛后，小鼠能够产生较高水平且持续时间较长的特异性抗体，并能抵抗野毒株的攻击，犊牛能够产生针对 3 种细菌的特异性抗体。

关键词：牛源多杀性巴氏杆菌；牛源溶血性曼氏杆菌；牛源肺炎克雷伯氏菌；疫苗候选菌株

Abstract

Object: With the continuous development of cattle breeding industry in China, bovine respiratory disease complex (BRDC) occurs frequently, which seriously affects the production performance of cattle. The occurrence of BRDC is closely related to bacterial infection. The occurrence of BRDC is closely related to bacterial infection, among which Pm Mh Kp are important pathogens causing the disease. At present, the commercial vaccines against Pm and Mh are whole-cell inactivated vaccines, there is no commercial vaccine against Kp, and there is no multi-vaccine to prevent Pm, Mh and Kp infection at the same time. Therefore, the study of Pm, Mh, Kp triple inactivated vaccine is of great significance for the prevention of BRDC.

Methods: (1) PCR was used to identify the capsular serotypes of 5 Pm, 4 Mh and 6 Kp in the laboratory and the virulence genes and drug resistance genes of the strains. The pathogenicity of Pm, Mh and Kp was analyzed by bacterial pathogenicity test, and the median lethal dose (LD_{50}) was determined by Karber's improved algorithm. (2) The Pm(Pm180 PmA1), Mh(Mh93 Mh95) and Kp(Kp2 Kp17) were elected and inactivated by 0.25% formaldehyde, white oil, propolis and astragalus polysaccharides were used as adjuvants to immunize mice with different immune doses at 0 d 14 d and 28 d. The IgG in the serum of the immunized mice was detected by indirect ELISA. On the 42 nd day after the first immunization, the Pm, Mh and Kp with $3 \times LD_{50}$ were used to carry out the challenge protection test to determine the optimal immune dose of the strains. (3) The PmA1、Mh95、K17 were mixed by formaldehyde inactivation, and white oil, propolis and astragalus were used as adjuvants to immunize mice by subcutaneous injection on the back on 0 d、14 d and 28 d. Indirect ELISA was used to determine the IgG and subtype in mice within 7-119 d after immunization with different adjuvant triple inactivated preparations. ELISA were used to detect the levels of IFN- γ TNF- α IL-2 IL-4 IL-6 IL-10 IL-17 in serum and IFN- γ IL-4 in spleen lymphocyte supernatant on 7 and 42 days after the first immunization. The level of IFN- γ in spleen lymphocytes of mice was detected by ELISPOT. Then the challenge protection test was carried out by intraperitoneal injection with $3 \times LD_{50}$. The calves were immunized subcutaneously with 3 kinds of bacteria combined with white oil and propolis adjuvant on neck on day 0 and day 14, the IgG in serum were detected by indirect ELISA on 0-42 d after immunization.

Results: (1) 5 Pm were serotype A, 4 strains o Mh were serotype A1, 1 Kp was serotype K2, 2 were serotype K54, 2 were serotype K57, and 1 was capsular indeterminate type. The LD_{50} of PmA1, Pm180, Mh95, Mh93, K17 and K2 were $10^{6.1}$ $10^{6.5}$ 10^7 $10^{8.2}$ $10^{5.9}$ $10^{6.7}$ cfu/mL. (2) 6 Pm(Pm180 PmA1), Mh(Mh93 Mh95) and Kp(Kp2 Kp17) with white oil, propolis and astragalus polysaccharide adjuvants could induce mice to produce corresponding IgG. The IgG levels of PmA1, Mh95 and K17 with immune doses of

1×10^{10} cfu/mL, 1×10^6 cfu/mL, and 1×10^9 cfu/mL were significantly higher than those of the other strains immune groups ($P < 0.001$). The protection rate of PmA1, Mh95, K17 with different adjuvant groups by doses of 1×10^{10} , 1×10^6 and 1×10^9 cfu/mL in the challenge protection test was significantly higher than that of the other immune groups. The survival rate of the white oil and astragalus polysaccharide adjuvant group with PmA1 challenge was 90%, and the survival rate of the propolis adjuvant group was 80%. The survival rates of the white oil, propolis and astragalus polysaccharide adjuvant groups with Mh95 challenge were 90%, 80% and 80%. The survival rate of the white oil group was 100%, the propolis and astragalus polysaccharide adjuvant groups were 90% and 80% with Kp17 challenge. (3) The mice immunized with triple inactivating agents with 3 adjuvant could produce IgG against Pm, Mh and Kp and IgG1, IgG2a and IgG2b antibodies. The IgG levels against 3 bacteria with the white oil group were significantly higher than those in the propolis and astragalus polysaccharide groups. The propolis adjuvant group could produce IgG2a and IgG2b antibodies, the astragalus polysaccharide adjuvant group mainly induced mice to produce IgG1, IgG2b and IgG3 antibodies; the white oil adjuvant group could induce the secretion of IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10 and IL-17 in mice. The propolis adjuvant and astragalus polysaccharide adjuvant group mainly induce IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6 and IL-17. The level of IL-4 in spleen cells of mice in the white oil group was significantly or significantly higher than that in the non-adjuvant group and the propolis and astragalus polysaccharide group ($P < 0.001$). The level of IFN- γ in mice spleen cells in the propolis and astragalus polysaccharide group was significantly higher than that in the white oil group and the non-adjuvant group ($P < 0.001$); After Pm challenge, the protection rates of white oil and propolis astragalus polysaccharide group were 100%, 90% and 80%. After Mh challenge, the protection rates of white oil and propolis astragalus polysaccharide group were 90%, 80% and 70%. After Kp challenge, the protection rates of white oil and propolis astragalus polysaccharide adjuvant group were 100%, 80% and 70%. Both adjuvant immunization groups produced IgG specific to 3 bacteria, but the IgG levels in the white oil group were significantly higher than those in the astragalus polysaccharide group ($P < 0.0001$).

Conclusion: (1) Through the analysis of pathogenicity and antigenicity, *Pasteurella multocida* PmA1, *Mannheimia haemolytica* Mh95 and *Klebsiella pneumoniae* Kp17 were screened from 15 strains of bacteria as triple inactivated strains. (2) After immunizing mice and calves with PmA1, Mh95 and Kp17 triple immunogens prepared with white oil as adjuvant, mice could produce higher levels and longer duration of specific antibodies, and could resist the attack of wild strains. Calves could produce specific antibodies against the 3 bacteria.

Key words: Bovine *Pasteurella multocida*; Bovine *Mannheimia haemolytica*; Bovine *Klebsiella pneumoniae*; vaccine candidate strains

目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
第 1 章 绪论.....	1
1 多杀性巴氏杆菌的研究进展.....	1
1.1 多杀性巴氏杆菌病原特性.....	1
1.2 Pm 的毒力因子.....	2
1.2.1 外膜蛋白.....	2
1.2.2 脂多糖.....	2
1.2.3 黏附素.....	2
1.2.4 荚膜.....	3
1.3 Pm 的疫苗研究进展.....	3
1.3.1 Pm 灭活疫苗.....	3
1.3.2 Pm 弱毒疫苗.....	4
1.3.3 Pm 亚单位疫苗.....	4
2 溶血性曼氏杆菌的相关研究进展.....	4
2.1 溶血性曼氏杆菌病原特性.....	4
2.2 Mh 的毒力因子.....	5
2.2.1 白细胞毒素.....	5
2.2.2 脂多糖.....	5
2.2.3 外膜蛋白.....	6
2.2.4 黏附素.....	6
2.3 Mh 的疫苗研究进展.....	6
2.3.1 Mh 灭活疫苗.....	6
2.3.2 Mh 弱毒疫苗.....	7
2.3.3 Mh 亚单位疫苗.....	7
3 肺炎克雷伯氏菌的相关研究进展.....	8
3.1 肺炎克雷伯氏菌的病原特性.....	8
3.2 Kp 的毒力因子.....	8
3.2.1 荚膜多糖.....	8
3.2.2 脂多糖.....	8

3.2.3 菌毛	9
3.2.4 铁载体	9
3.3 Kp 的疫苗研究进展	9
3.3.1 Kp 灭活疫苗	9
3.3.2 Kp 弱毒疫苗	9
3.3.3 Kp 亚单位疫苗	10
4 总结	10
第 2 章 Pm、Mh、Kp 分离株部分生物学特性及其致病性分析	11
1 引言	11
2 材料	12
2.1 菌株来源	12
2.2 实验动物	12
2.3 主要试剂	12
2.4 主要仪器	12
2.5 主要溶液及其配制	13
3 方法	13
3.1 菌株培养	13
3.2 细菌特异性基因及荚膜血清型鉴定	14
3.2.1 细菌 DNA 提取	14
3.2.2 应用特异性基因 <i>kmt</i> 、 <i>lkt</i> 、 <i>khe</i> 鉴定 3 种细菌	14
3.2.3 细菌荚膜血清型鉴定	15
3.3 Pm、Mh、Kp 部分生物学特性分析	15
3.3.1 细菌毒力基因的检测	15
3.3.2 细菌耐药基因的检测	18
3.4 细菌致病性试验	20
3.5 细菌半数致死量测定 (LD ₅₀) 试验	20
4 结果	22
4.1 特异性基因 PCR 鉴定结果	22
4.1.1 多杀性巴氏杆特异性基因鉴定结果	22
4.1.2 Mh 特异性基因鉴定结果	22
4.1.3 Kp 特异性基因鉴定结果	22
4.2 细菌荚膜血清型 PCR 鉴定结果	23
4.2.1 Pm 荚膜血清型鉴定结果	23
4.2.2 Mh 荚膜血清型鉴定结果	23

4.2.3 肺炎克雷伯氏杆菌荚膜血清型鉴定结果	24
4.3 细菌毒力基因检测结果	24
4.4 细菌耐药基因检测结果	26
4.5 细菌致病性试验结果	27
4.6 细菌半数致死量测定 (LD50) 结果	28
5 讨论	29
6 小结	30
第3章 Pm、Mh、Kp 筛选株免疫小鼠抗体水平及攻毒保护作用分析	31
1 引言	31
2 材料	32
2.1 菌株来源	32
2.2 实验动物来源	32
2.3 主要试剂	32
2.4 主要仪器	32
2.5 主要试剂配置	33
3 方法	33
3.1 细菌的灭活及乳化	33
3.1.1 细菌复苏及培养	33
3.1.2 细菌灭活	33
3.1.3 细菌浓缩纯化	33
3.1.4 单菌灭活疫苗制剂的制备	33
3.1.5 单菌灭活制剂性状检验	34
3.1.6 疫苗安全性检验	34
3.2 小鼠免疫试验	34
3.2.1 小鼠免疫程序	34
3.2.2 小鼠血清抗体水平的检测	35
3.3 小鼠攻毒保护试验	36
4 结果	36
4.1 灭活制剂制备	36
4.1.1 细菌复苏及培养	36
4.1.2 细菌灭活试验结果	36
4.1.3 灭活制剂性状检验结果	37
4.1.4 灭活制剂安全性试验结果	37
4.2 小鼠免疫试验结果	37

4.2.1 BALB/c 小鼠血清中 Pm 抗体消长规律	37
4.2.2 BALB/c 小鼠血清中 Mh 抗体消长规律	38
4.2.3 BALB/c 小鼠血清中 Kp 抗体消长规律	39
4.3 小鼠攻毒保护试验结果	40
4.3.1 Pm 攻毒保护试验结果	40
4.3.2 Mh 攻毒保护试验结果	41
4.3.3 Kp 攻毒保护试验结果	42
5 讨论	43
6 小结	44
第 4 章 Pm、Mh、Kp 三联灭活制剂的制备及免疫原性分析	45
1 引言	45
2 材料	46
2.1 菌株来源	46
2.2 实验动物及来源	46
2.3 主要试剂	46
2.4 主要仪器	47
2.5 主要试剂配置	47
3 方法	47
3.1 灭活疫苗制备	47
3.1.1 细菌复苏及培养	47
3.1.2 细菌灭活	47
3.1.3 细菌浓缩纯化	48
3.1.4 三联灭活制剂的制备	48
3.1.5 三联灭活制剂性状及安全性检验	48
3.2 小鼠免疫试验	48
3.2.1 小鼠免疫流程	48
3.2.2 BALB/c 鼠血清抗体 IgG 及其亚型抗体水平的检测	49
3.2.3 BALB/c 鼠血清中 6 种细胞因子分泌水平检测	49
3.2.4 BALB/c 鼠脾脏淋巴细胞的分离	50
3.2.5 ELISpot 检测 BALB/c 鼠脾淋巴细胞 IFN- γ 细胞因子分泌情况	50
3.2.6 ELISA 检测 BALB/c 鼠脾淋巴细胞 IFN- γ 和 IL-4 分泌情况	50
3.2.7 BALB/c 鼠攻毒保护试验	50
3.3 犊牛免疫试验	50
3.4 统计学分析	51

4 结果	51
4.1 不同佐剂灭活制剂性状及安全性检验	51
4.2 BALB/c 小鼠免疫试验结果	51
4.2.1 BALB/c 小鼠血清中 Pm IgG 及其亚型检测结果	51
4.2.2 BALB/c 小鼠血清中 Mh IgG 及其亚型检测结果	52
4.2.3 BALB/c 小鼠血清中 Kp IgG 及其亚型检测结果	53
4.2.4 不同佐剂组小鼠血清中 Th2 型细胞因子分泌水平检测结果	54
4.2.5 不同佐剂组小鼠血清中 Th2 型细胞因子分泌水平检测结果	55
4.2.6 不同佐剂组小鼠血清中 Th17 型细胞因子分泌水平检测结果	56
4.2.7 免疫组小鼠脾淋巴细胞分泌 IFN- γ 水平检测结果	56
4.2.8 免疫组小鼠脾淋巴细胞分泌 IFN- γ 、IL-4 水平检测结果	57
4.2.9 小鼠攻毒保护试验结果	57
4.3 犊牛抗体检测结果	59
5 讨论	60
6 小结	62
第 5 章 全文总结	63
参考文献	64
附录 A 基因组的提取	77
附录 B 小鼠细胞因子 ELISA 检测试剂盒说明书	78
附录 C 小鼠淋巴细胞分离	79
附录 D 小鼠 IFN- γ ELISPOT 检测说明书	80
致谢	81
作者简介	82
导师评阅表	83

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文全称
s	Second	秒
min	Minute	分钟
h	Hour	小时
μL	microliter	微升
mL	milliliter	毫升
LB	Luria Bertani Broth	溶菌肉汤
BHI	Brain Heart Infusion Broth	脑心浸液肉汤
bp	Base-pair	碱基对
r/min	Round per minute	转/分钟
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
dd H ₂ O	double distilled H ₂ O	双蒸水
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸缓冲液
PBST	Phosphate Buffered Solution	含吐温-20 的磷酸盐缓冲液
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	酶联免疫吸附测定
ELISpot	Enzyme-linked immunospot assay	酶联免疫斑点实验
Pm	<i>Pasteurella multocida</i>	多杀性巴氏杆菌
Mh	<i>Mannheimia haemolytica</i>	溶血性曼氏杆菌
Kp	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	肺炎克雷伯氏菌

第1章 绪论

牛呼吸道疾病综合征(Bovinerespiratorydiseasescomplex, BRDC)是影响牛养殖业发展的重要疾病之一^[1]。调查显示我国 BRDC 的发病率占比约为 60%~65%^[2]。发病牛常见流涕、咳嗽、食欲下降、呼吸困难等临床症状,并引起继发感染,甚至导致牛死亡^[3]。饲养管理不当,天气骤变,或者运输途中动物受到应激,动物抵抗力下降,都会引起 BRDC 的发生^[4-5]。除此之外,细菌性感染也是导致 BRDC 发生的原因之一,其中多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)、溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*, Mh)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*, Kp)等均为引发 BRDC 的重要病原^[6]。由于抗生素的广泛使用,导致细菌耐药性逐渐增强,使 BRDC 的防控变得更困难,因此疫苗免疫成为防控 BRDC 的有效途径之一。

目前我国仅有针对牛 A 型 Pm 与 A1 型 Mh 的商品化灭活疫苗,尚无针对 Kp 的商品化疫苗,并且针对这 3 种病原的三联灭活疫苗相关研究比较少。因此本研究通过筛选出 Pm、Mh、Kp 作为疫苗候选菌株,经过灭活条件、抗原剂量等多重筛选后与不同佐剂组合,通过小鼠模型评价免疫保护效果,以期为牛 Pm、Mh、Kp 三联灭活苗的相关研究奠定坚实基础。

1 多杀性巴氏杆菌的研究进展

1.1 多杀性巴氏杆菌病原特性

多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)属于巴氏杆菌科巴氏杆菌属的一员,是革兰阴性厌氧菌。Pm 不形成芽胞与鞭毛,因此不具备运动能力^[7]。Pm 的生长需要较高的营养物质,能够分解蔗糖、果糖、葡萄糖、半乳糖,多数分解山梨醇、甘露醇,大多不分解乳糖、肌醇^{[8][9]}。可根据荚膜抗原(O 抗原)分为 A、B、D、E 和 F 5 种血清型,而根据菌体抗原(K 抗原)、脂多糖(Lipopolysaccharides, LPS)结构差异性划分为 16 个血清型、8 种基因型^[10-11]。不同血清型的 Pm 能引发不同的动物疾病,例如 A 型、D 型 Pm 引起猪的萎缩性鼻炎、牛肺炎及兔巴氏杆菌病。而 B 型则可能引起牛出血性败血症等^[12]。

1.2 Pm 的毒力因子

1.2.1 外膜蛋白

目前 OmpA、OmpH 已经证实是 Pm 的主要外膜蛋白(Outer membrane protein, Omp)^[13-14]。OmpA 由 349-360 个氨基酸编码组成, 分子质量约为 34~36kDa, 由于该蛋白经凝胶电泳实验时, 涌动速度缓慢, 因此又被称为慢孔蛋白, OmpA 具有热可修饰特性的免疫原性, 又称为热修饰蛋白^[15]。OmpA 在 Pm 致病过程发挥着重要的作用, 包括细菌黏附、侵袭、刺激促炎细胞因子的产生以及逃避宿主防御^[16]。报道显示^[17]OmpA 除了能够稳定 Pm 的细菌结构之外, 还能够参与细菌侵袭宿主细胞。Dabo^[18]发现 OmpA 能够与肝素或纤连蛋白结合从而参与 Pm 黏附宿主细胞。MarandiM 等人^[19]在自然感染 Pm 的家兔的血清中检测到 OmpA 蛋白的抗体, 表明该蛋白可能在发病机制中发挥重要作用。

OmpH 分子质量约为 37kDa, 在 Pm 的定植过程中也发挥着重要作用, Varinrak^[20]通过构建 Pm 的 OmpH 突变体, 证明了 OmpH 能够促进细菌黏附宿主细胞和组织。Nazierbiek^[21]通过敲除禽 Pm 中的 OmpH 基因, 与亲本株和互补株比较, 发现缺失 OmpH 的 Pm 黏附力显著性下降。以上结果均能说明 OmpH 与细菌的黏附密切相关。

1.2.2 脂多糖

脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)是细菌细胞壁外的一种物质, 主要由多糖类物质组成。LPS 具有抗吞噬、激活补体损伤内皮细胞等作用, 因此是细菌的主要毒力因子^[22]。Periasamy^[23]在研究中发现不同血清型 Pm 的 LPS 通过引起白细胞线粒体功能障碍以及 caspase 激活从而诱导牛白细胞的凋亡^[24]。在革兰氏阴性细菌感染中, LPS 通过诱导机体炎症反应引起机体的免疫应答^[25-26]。LPS 还能够引起肺间质损伤, Patiño^[27]在研究中表明 Pm 的 LPS 能够黏附在家兔的上呼吸道内皮细胞从而引起上下呼吸道产生病变。

1.2.3 黏附素

黏附素是细菌感染宿主的关键物质之一, 且与细菌的致病性密切相关^[28]。黏附素分为两种, 分别是菌毛 (Pili, fimbriae) 和非菌毛黏附物质 (Afimbrialadhesin)^[29]。Pm 菌毛主要存在于菌体表面, 由 ptfA 基因编码的IV型菌毛能使细菌黏附在牛的消化道、呼吸道和泌尿生殖道粘膜上皮细胞^[30]。冯思源等^[31]发现 ptfA 在不同毒力的 Pm 菌株中相对表达量无差异, 但是能够作为 Pm 在体内增殖的标志。丝状血凝素蛋白是一种非菌毛黏附物质, pfhAB1 基因与 pfhAB2 基因均能编码丝状血凝素, Tatum^[32]通过构建 pfhAB1 与 pfhAB2 的基因缺失株, 将构建后缺失株通过腹腔注射小鼠, 发现小鼠的病理症状有所减轻, 从而证明丝状血凝素与细菌的致病性存在一定关系。