

分类号：
学 号：20212013036

密 级：内部一年
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



巨噬细胞清道夫受体 A 在 MO 继发 Pm 感 染中的作用机理研究

学 位 申 请 人	曹鑫艳
指 导 教 师	孙延鸣 教授 张彦兵 副教授
申请学位门类级别	农学硕士
学 科 、 专 业 名 称	兽医学
研 究 方 向	临床兽医学
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子
2024 年 6 月

分类号：
学 号：20212013036

密 级：内部一年
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



巨噬细胞清道夫受体 A 在 MO 继发 Pm 感染中的 的作用机理研究

学 位 申 请 人	曹鑫艳
指 导 教 师	孙延鸣 教授 张彦兵 副教授
申请学位门类级别	农学硕士
学 科、专 业 名 称	兽医学
研 究 方 向	临床兽医学
所 在 学 院	动物科技学院

中国·新疆·石河子
2024 年 6 月

**Study on the mechanism of action of macrophage scavenger receptor A
in MO secondary Pm infection**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Agriculture

By

Cao Xin-yan

(Clinical Veterinary Medicine.)

Dissertation Supervisor: Prof. Sun Yan-ming; Assoc. Zhang Yan-bing

June,2024

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

本人所提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：曹鑫艳

时间：2024年5月11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：曹鑫艳 时间：2024年5月11日

导师签名：孙延明 时间：2024年5月11日

摘要

绵羊肺炎支原体(*Mycoplasma ovipneumoniae*, MO)继发多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)感染在养羊场逐渐成为常态,继发感染加快了疾病的发展,死亡率升高。清道夫受体 A(Scavenger Receptor A, SRA)也称为巨噬细胞清道夫受体 1(macrophage scavenger receptor 1, MSR1),是一种表达于巨噬细胞并能够识别和摄取病原体的模式识别受体,然而目前对绵羊 SRA 的研究未见报道。

目的:为了探究 SRA 在 MO 继发 Pm 感染中的作用机制,本论文从感染 MO 的盘羊杂交羊肺部分离 Pm,进行致病性和基因组学分析,鉴定绵羊 SRA 生物学特性及其功能,探究 MO 感染对 SRA 介导吞噬 Pm 的影响,进一步探讨 MO 感染下调 SRA 表达的机制,为有效防控 MO 继发 Pm 感染提供理论依据。

方法:(1)感染 MO 盘羊杂交羊肺部 Pm 的分离鉴定,Pm 腹腔注射小鼠鉴定其致病性,K-B 纸片扩散法药敏试验鉴定其耐药性。提取 Pm 基因组 DNA 进行全基因组测序分析,构建进化树和绘制基因组圈图,分析毒力基因和耐药基因。(2)SRA ORF 扩增,连接 pcDNA3.1(+)载体构建真核表达载体;生物信息学分析 SRA 的理化性质;SRA 抗原肽免疫新西兰大白兔和昆明鼠制备多克隆抗体,间接 ELISA 检测其效价,间接免疫荧光试验(IFA)检测其特异性。(3)荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 SRA 的表达分布;pcDNA3.1-MSR1 转染 CHO 细胞后,分析 SRA 介导 Pm 的吞噬作用,Western blotting 检测 SRA 表达水平;利用药物褐藻多糖(Fucoidan)阻滞 SRA 的方法,分析 SRA 介导 Pm 的吞噬作用;分析 AMs 感染 MO 不同时间点后 SRA 介导 Pm 的吞噬作用;pcDNA3.1-MSR1 转染 AMs 24 h 并感染 MO,分析 MO 感染影响 SRA 介导吞噬 Pm 的作用;利用 qRT-PCR 和 Western blotting 方法分析 MO 感染对 SRA 表达的影响。(4)克隆 SRA 启动子,预测潜在的活性区域以及转录因子结合位点。同源重组方法构建 SRA 启动子报告基因载体,并命名为 pGL3-SRA,双荧光素酶报告基因实验分析启动子活性。将 pGL3-SRA 分别与 Flag-IRF-1、Flag-TNF- α 、Flag-IL-6 共转染于 HEK293T 细胞,转染 24 h 后,分析 IRF-1、TNF- α 和 IL-6 对 SRA 启动子活性的影响。靶向 SRA 3'UTR 的 miRNAs 预测,加 A 法 qRT-PCR 检测 miRNAs 的表达,选取上调表达的 miRNAs 与 pmirGLO-SRA 3'UTR 共转染 HEK293T 细胞,检测其对 SRA 3'UTR 的靶向调控。Flag-TNF- α 、Flag-IL-6 和选取的 miRNAs 分别转染 AMs,转染 24 h 分析其对 SRA 介导吞噬 Pm 的影响,qRT-PCR 和 Western blotting 分析 SRA 表达的水平。

结果:(1)盘羊杂交羊肺部分离到一株血清型为 A 型的 Pm,Pm SHZ01 株对氨基糖苷类、大环内酯类等多种药物敏感,致病性较强,感染小鼠出现肺脏出血水肿、肺粘连、脾脏肿大、肝脏肿大和表面有白色小点等病理特征。全基因组大小为 2,378,508 bp,GC 含量为 40.89%,编码 2,418 个基因,与 40540 菌株亲缘关系最近,存在 82 个毒力基因和 54 种耐药基因。(2)SRA ORF 全长为 1362

bp, 有 7 个潜在的糖基化位点和多个磷酸化位点, 与同属于牛科动物的序列相似性较高。利用抗原肽成功制备了鼠源 SRA 和兔源 SRA 多克隆抗体, 兔源 SRA 抗体具有良好的特异性和反应性。(3) 相比于肺脏、脾脏, SRA 在 AMs 表达丰度最高。SRA 蛋白大小为 50~70 kDa, 过表达 SRA 可以显著增加 CHO 细胞摄取 Pm ($P<0.05$); Fucoidan 处理组 AMs 吞噬作用显著下降 ($P<0.001$); MO 感染组细胞吞噬率显著低于未感染组 ($P<0.01$); SRA 过表达而后感染 MO 组细胞与转染空载体细胞吞噬率无明显差异 ($P>0.05$)。MO 感染 AMs 中 SRA 的 mRNA 水平和蛋白表达显著低于未感染组 ($P<0.05$, $P<0.01$)。(4) SRA 启动子大小约为 1200 bp, 含有 1 个潜在活性区域和 6 个转录因子结合位点, 其中 IRF1 和 c-Jun 结合位点出现频率较高。实验证实 SRA 启动子具有较强的活性, IRF1、TNF- α 和 IL-6 过表达能显著激活 SRA 的启动子活性 ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.001$)。与正常的 AMs 相比, oar-miRNA-23a、oar-miRNA-23b、oar-miRNA-26a、oar-miRNA-26b、oar-miRNA-194、oar-miRNA-496-3p 和 oar-miRNA-1185-5p 在 MO 感染 AMs 中的相对表达极显著升高 ($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.0001$)。miR496-3p、miR26a 和 miR23a 能与 SRA 3'UTR 靶向结合。TNF- α 和 IL-6 能够显著抑制 SRA 介导的 AMs 对 Pm 的吞噬 ($P<0.05$), TNF- α 和 IL-6 过表达使 SRA 的 mRNA 水平显著下降 ($P<0.01$), 且下调了 SRA 的蛋白表达。miR496-3p、miR26a 和 miR23a 过表达显著抑制了 AMs 对 Pm 的吞噬 ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$)。

结论: (1) 首次构建了盘羊杂交羊源 Pm SHZ01 株的全基因组框架, 明确了盘羊杂交羊源 Pm 的毒力基因和遗传进化关系。(2) 成功克隆了 SRA ORF, 分析了 SRA 的理化性质, 制备了针对 SRA 的兔源和鼠源多克隆抗体。(3) 证明了 SRA 可以介导 AMs 吞噬 Pm; MO 感染下调 SRA 表达, 进而抑制 SRA 介导 AMs 对 Pm 的吞噬作用。(4) 成功克隆了 SRA 启动子, 证明了 SRA 启动子具有活性, 过表达 IRF1、TNF- α 和 IL-6 能激活 SRA 启动子的活性; TNF- α 和 IL-6 下调 AMs 中 SRA 的表达, 进而抑制 SRA 介导对 Pm 的吞噬作用。miR496-3p、miR26a 和 miR23a 靶向 SRA 3' UTR, 抑制了 AMs 对 Pm 的吞噬。在 MO 感染过程中, TNF- α 、IL-6、miR496-3p、miR26a 和 miR23a 抑制 SRA 介导巨噬细胞对 Pm 的吞噬作用, 这为防控 MO 继发细菌感染提供理论指导。

关键词: 绵羊肺炎支原体; 多杀性巴氏杆菌; 清道夫受体 A; 肺泡巨噬细胞; 继发感染

Abstract

Mycoplasma ovipneumoniae (MO) secondary *Pasteurella multocida* (Pm) infection has gradually become the norm in sheep farms. Secondary infections accelerate disease progression and increase mortality. Scavenger receptor A (SRA), also known as macrophage scavenger receptor 1 (MSR1), is a pattern recognition receptor expressed in macrophages and capable of recognizing and ingest pathogens. However, there are currently no reports on SRA in sheep.

Objective: In order to explore the mechanism of SRA in secondary Pm infection in MO, this thesis isolated Pm from the lungs of MO-infected argali hybrid sheep and conducted pathogenic and genomic analyses. Identification of biological characteristics and functions of sheep SRA. Exploring the effect of MO infection on SRA-mediated phagocytosis of Pm. And further exploring the mechanism by which MO infection down-regulates SRA expression. This provides a theoretical basis for the effective prevention and control of Pm infection secondary to MO.

Methods: (1) Pm was isolated and identified from the lungs of MO-infected argali hybrid sheep. Pm was injected intraperitoneally into mice to identify its pathogenicity. Drug susceptibility test was used to identify its drug resistance by K-B disk diffusion method. Then the genomic DNA of Pm was extracted to conduct whole-genome sequencing analysis of the strain. An evolutionary tree and a genome circle diagram were constructed, and the virulence genes and drug resistance genes were analyzed. (2) *SRA* ORF was amplified and connected to the pcDNA3.1(+) vector to construct a eukaryotic expression vector. Bioinformatics methods were used to analyze the physical and chemical properties of *SRA*. Polyclonal antibodies were constructed by immunizing New Zealand white rabbits and Kunming mice with *SRA* antigen peptide. Indirect ELISA was used to detect the titer of *SRA* polyclonal antibodies. Indirect immunofluorescence assay (IFA) was used to detect the specificity of *SRA* polyclonal antibodies. (3) Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) detects the expression distribution of *SRA*. After pcDNA3.1-*MSR1* was transfected into CHO cells, the phagocytosis of Pm mediated by SRA was analyzed. *SRA* expression level was detected by Western blotting. The drug (Fucoidan) was used to block SRA to analyze the phagocytosis of Pm mediated by SRA; Analyzing the phagocytosis of Pm by SRA at different time points after AMs were infected with MO; AMs were transfected with pcDNA3.1-*MSR1* for 24 h and infected with MO, and the effect of MO infection on SRA-mediated phagocytosis of Pm was analyzed; The effect of MO infection on *SRA* expression was analyzed using qRT-PCR and Western blotting methods. (4) Cloning the *SRA* promoter and predicting potential active regions and transcription factor binding sites. The

SRA promoter reporter gene vector was constructed by homologous recombination method and named pGL3-SRA. Dual-luciferase reporter gene assay detects the activity of *SRA* promoter. pGL3-SRA was co-transfected into HEK293T cells with Flag-IRF-1, Flag-TNF- α , and Flag-IL-6 respectively, and the effects of IRF-1, TNF- α , and IL-6 on SRA promoter activity were analyzed 24 h after transfection. Prediction of miRNAs which target *SRA* 3'UTR, the expression of miRNAs was detected by plus method A qRT-PCR. Selecting up-regulated miRNAs and pmirGLO-*SRA* 3'UTR to co-transfect HEK293T cells to detect its targeted regulation of *SRA* 3'UTR. Flag-TNF- α , Flag-IL-6 and selected miRNAs were transfected into AMs respectively, and their effects on SRA-mediated phagocytosis of Pm were analyzed 24 h after transfection. QRT-PCR and Western blotting were used to analyze the level of SRA expression.

Results: (1) A strain of Pm with serotype A was isolated from the lungs of argali hybrid sheep. The Pm SHZ01 strain was sensitive to aminoglycosides, macrolides and other drugs. It is highly pathogenic, and infected mice developed pathological characteristics such as pulmonary hemorrhage and edema, pulmonary adhesions, splenomegaly, liver enlargement, and white dots on the surface. The whole genome size and GC content of this strain were 2,378,508 bp and 40.89%, respectively. It encodes 2,418 genes and is the closest genetic relationship to strain 40540 (A:12). What's more, it contains 82 virulence genes and 54 drug resistance genes. (2) The full length of *SRA* ORF is 1362 bp. It has 7 potential glycosylation sites and multiple phosphorylation sites. The sequence similarity is high with that of animals belonging to the family Bovidae. Mouse-derived SRA and rabbit-derived SRA polyclonal antibodies were successfully prepared using antigen peptides. The rabbit-derived SRA antibodies have good specificity and reactivity. (3) Compared with lung and spleen, *SRA* has the highest expression abundance in AMs. The size of SRA protein is 50~70 kDa. Overexpression of *SRA* could significantly increase the uptake of Pm by CHO cells ($P<0.05$); The phagocytosis of AMs in the Fucoidan-treated group was significantly reduced ($P<0.001$); The phagocytosis rate of cells in the MO-infected group was significantly lower than that in the uninfected group ($P<0.01$); There is no significant difference in the phagocytosis rate between cells in the SRA overexpressed group and then infected with MO and cells transfected with empty vector ($P>0.05$). The mRNA level and protein expression of SRA in MO-infected AMs were significantly lower than those in the uninfected group ($P<0.05$, $P<0.01$). (4) The *SRA* promoter is approximately 1200 bp in size and contains 1 potentially active region and 6 transcription factor binding sites, among which IRF1 and c-Jun binding sites appear more frequently. Experiments confirmed that the SRA promoter has strong activity. Overexpression of IRF1, TNF- α and IL-6 can significantly activate the promoter activity of SRA ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.001$). Compared with normal AMs, the relative expression of oar-miRNA-23a, oar-miRNA-23b, oar-miRNA-26a, oar-miRNA-26b, oar-miRNA-194, oar-miRNA-496-3p and oar-miRNA-1185-5p in MO-infected AMs was extremely significantly increased ($P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.0001$). MiR496-3p, miR26a and miR23a can target and bind to *SRA* 3'UTR. TNF- α and IL-6 can significantly inhibit SRA-mediated phagocytosis of Pm by AMs ($P<0.05$).

Overexpression of TNF- α and IL-6 significantly decreased the mRNA level of *SRA* ($P<0.01$), and down-regulated the protein expression of *SRA*. Overexpression of miR496-3p, miR26a and miR23a significantly inhibits the phagocytosis of Pm by AMs ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$).

Conclusion: (1) The whole genome framework of the argali hybrid sheep-derived Pm SHZ01 strain was constructed for the first time, and the virulence genes and inheritance evolutionary relationship of Pm derived from argali hybrid sheep were clarified. (2) The *SRA* ORF was successfully cloned. The physical and chemical properties of SRA were analyzed. Rabbit and mouse polyclonal antibodies against SRA were prepared. (3) It was proved that SRA can mediate the phagocytosis of Pm by AMs; MO infection down-regulates the expression of *SRA*, thereby inhibiting SRA-mediated phagocytosis of Pm by AMs. (4) The *SRA* promoter was successfully cloned and proved to be active. Overexpression of IRF1, TNF- α , and IL-6 can activate the activity of *SRA* promoter. And overexpression of TNF- α and IL-6 downregulates the transcriptional expression of *SRA* in AMs, thus inhibiting SRA-mediated phagocytosis of Pm. Moreover, miR496-3p, miR26a and miR23a target *SRA* 3'UTR and inhibit the phagocytosis of Pm by AMs. During MO infection, TNF- α , IL-6, miR496-3p, miR26a, and miR23a inhibit SRA-mediated macrophage phagocytosis of Pm, which provides theoretical guidance for the prevention and control of MO secondary bacterial infection.

Key words: *Mycoplasma ovipneumoniae*; *Pasteurella multocida*; Scavenger receptor A; alveolar macrophages; Secondary infection

目录

摘要.....	I
Abstract.....	III
缩略词表.....	IX
第 1 章 绪论.....	1
1.1 文献综述.....	1
1.1.1 支原体与细菌共感染概况.....	1
1.1.2 绵羊肺炎支原体概况.....	2
1.1.3 多杀性巴氏杆菌概况.....	3
1.1.4 全基因组测序技术概况.....	5
1.1.5 SRA 的生物学特性.....	6
1.2 研究目的与意义.....	9
1.3 研究内容与技术路线.....	10
1.3.1 研究内容.....	10
1.3.2 技术路线.....	11
第 2 章 盘羊杂交羊源多杀性巴氏杆菌的全基因组特征分析和致病性研究.....	12
2.1 材料与方法.....	13
2.1.1 试剂和仪器.....	13
2.1.2 实验动物和伦理申明.....	14
2.1.3 菌株的来源.....	14
2.1.4 多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及致病性研究.....	14
2.1.5 多杀性巴氏杆菌的耐药性分析.....	17
2.1.6 建库以及基因组测序.....	17
2.2 结果.....	19
2.2.1 多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及致病性研究.....	19
2.2.2 耐药性分析结果.....	24
2.2.3 全基因组概述.....	24
2.2.4 系统进化树构建.....	27
2.2.5 基因组功能分析结果.....	28
2.2.6 效应子分析结果.....	29
2.2.7 毒力基因和耐药基因注释结果.....	30

2.3 讨论.....	33
2.3.1 基因注释分析.....	33
2.3.2 毒力基因分析.....	33
2.3.3 耐药性分析.....	34
2.4 小结.....	35
第3章 绵羊 <i>SRA</i> 的生物信息学分析和多克隆抗体制备.....	36
3.1 材料与方法.....	37
3.1.1 材料.....	37
3.1.2 方法.....	38
3.2 结果.....	41
3.2.1 绵羊 <i>SRA</i> 克隆及真核表达载体构建.....	41
3.2.2 绵羊 <i>SRA</i> 蛋白生物信息学分析.....	42
3.2.3 <i>SRA</i> 多克隆抗体滴度分析.....	47
3.2.4 <i>SRA</i> 多克隆抗体特异性分析.....	48
3.3 讨论.....	48
3.4 小结.....	49
第4章 MO 感染抑制 <i>SRA</i> 介导对 Pm 的吞噬作用.....	50
4.1 材料与方法.....	51
4.1.1 材料.....	51
4.1.2 方法.....	52
4.2 结果.....	56
4.2.1 <i>SRA</i> 的相对表达量检测结果.....	56
4.2.2 <i>SRA</i> 介导 CHO 细胞对 Pm 的吞噬.....	57
4.2.3 <i>SRA</i> 介导 AMs 对 Pm 的吞噬.....	59
4.2.4 MO 感染抑制 <i>SRA</i> 介导 AMs 对 Pm 的吞噬.....	60
4.2.5 <i>SRA</i> 过表达对 MO 感染的 AMs 吞噬 Pm 的调节作用.....	61
4.2.6 MO 感染抑制 <i>SRA</i> 的转录表达.....	63
4.3 讨论.....	65
4.3.1 <i>SRA</i> 介导吞噬功能的分析.....	65
4.3.2 MO 感染抑制 <i>SRA</i> 介导吞噬的作用分析.....	66
4.4 小结.....	66
第5章 绵羊肺炎支原体抑制 <i>SRA</i> 转录表达的机制研究.....	67
5.1 材料与方法.....	68
5.1.1 材料.....	68

5.1.2 方法.....	69
5.2 结果.....	75
5.2.1 <i>SRA</i> 启动子克隆及报告基因载体构建.....	75
5.2.2 <i>SRA</i> 启动子生物信息学分析.....	76
5.2.3 <i>SRA</i> 启动子活性分析.....	78
5.2.4 合成质粒的酶切鉴定结果.....	78
5.2.5 IRF1、TNF- α 和 IL-6 对绵羊 <i>SRA</i> 启动子活性的影响.....	79
5.2.6 靶向 <i>SRA</i> 3'UTR 的 miRNAs 预测及相对表达检测.....	80
5.2.7 miR496-3p、miR26a 和 miR23a 靶向结合绵羊 <i>SRA</i> 3'UTR.....	82
5.2.8 TNF- α 和 IL-6 抑制 <i>SRA</i> 介导 AMs 对 Pm 的吞噬.....	83
5.2.9 miR496-3p、miR26a 和 miR23a 抑制 AMs 对 Pm 的吞噬.....	84
5.3 讨论.....	85
5.3.1 <i>SRA</i> 启动子影响其转录表达的分析.....	85
5.3.2 <i>SRA</i> 的表达调控机制分析.....	86
5.4 小结.....	87
全文总结.....	88
本研究创新点.....	89
参考文献.....	90
附录.....	105
致谢.....	107
作者简介.....	108

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
MO	<i>Mycoplasma ovipneumoniae</i>	绵羊肺炎支原体
Pm	<i>Pasteurella multocida</i>	多杀性巴氏杆菌
SRAs	Class A Scavenger receptors	A 类清道夫受体
SRA	Scavenger Receptor A	清道夫受体 A
AMs	Alveolar macrophages	肺泡巨噬细胞
PMT	<i>Pasteurella multocida</i> toxin	多杀性巴氏杆菌毒素
WGS	Whole genome sequencing	全基因组测序
TNF- α	tumor necrosis factor- α	肿瘤坏死因子 α
IL-6	Interleukin-6	白介素 6
IRF-1	Interferon regulatory factor-1	干扰素调节因子 1
PAMP	pathogen-associated molecular patterns	病原体相关分子模式
LPS	Lipopolysaccharide	脂多糖
PRR	Pattern recognition receptors	模式识别受体
Mh	<i>Mannheimia haemolytica</i>	溶血性曼氏杆菌
TLR	Toll-like receptors	Toll 样受体
LOS	lipo-oligosaccharides	脂寡糖
Mp	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	肺炎支原体
Mhp	<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>	猪肺炎支原体
M.bovis	<i>Mycoplasma bovis</i>	牛支原体
MG	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	鸡毒支原体
S.aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>	金黄色葡萄球菌
Bb	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	支气管败血波氏杆菌

第1章 绪论

1.1 文献综述

1.1.1 支原体与细菌共感染概况

支原体是呼吸道疾病中独特的病原体，是最小的自我复制的原核生物，它们没有细胞壁，这使得它们对 β -内酰胺类药物不敏感。此外，支原体在营养上对体外生长条件较为苛刻，是一种具有球形、梨形、烧瓶状细胞的微生物。支原体肺炎感染可导致小型反刍动物养殖业严重的健康问题和经济损失^[1]。有关肺炎支原体(*Mycoplasma pneumoniae*, Mp)、猪肺炎支原体(*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp)、牛支原体(*Mycoplasma bovis*, M.bovis)、鸡毒支原体(*Mycoplasma gallisepticum*, MG)和MO等继发细菌感染的病例报道越来越多，支原体感染继发细菌感染已成为支原体危害动物健康的关键因素之一。据报道，Mp与肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*, Sp)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, S.aureus)等共感染是引发儿童肺炎的主要元凶，与Mp单一感染相比，Mp与细菌共感染的儿童发烧时间更长、肺炎更严重^[2, 3]。Mhp感染猪可继发Pm和支气管败血波氏杆菌(*Bordetella bronchiseptica*, Bb)等的感染，有学者证实，Mhp与Pm共感染猪出现发烧、咳嗽和呼吸困难，而Mhp感染猪仅有轻微的症状^[4]。M.bovis与海藻百伯史坦菌(*Bibersteinia trehalosi*)混合感染已被记录为牛犊急性肺炎的原因之一，而溶血性曼氏杆菌(*Mannheimia haemolytica*, Mh)作为一种继发性病原体普遍存在于小母牛肺炎中^[5]。MG与大肠杆菌(*Escherichia coli*, E.coli)混合感染会引起鸡咳嗽、打喷嚏、流鼻涕、气管鸣音和气管炎，导致鸡严重的呼吸道疾病，加剧了经济损失^[6]。

在MO引起的绵羊严重的呼吸道疾病中，常能检测到Pm、Mh等病原体，MO感染导致动物的免疫力下降使之感染其他细菌，从而较快地发展为致命性肺炎^[7]。有研究发现麝香牛出现严重化脓性中耳炎，这与MO和Pm混合感染有关^[8]。而研究表明MO混合感染更具有致病性，因此对养羊业的经济影响很大。MO感染绵羊不会致死，而MO继发Pm感染导致绵羊发烧、咳嗽和呼吸困难，以及肺部出现实变的病理特征。MO与Pm共感染的绵羊死亡率较高，发病更快，肺部病理损伤程度更高，抗生素对患病绵羊治疗效果欠佳，仅能缓解症状却难以治愈^[9]。羊群中MO与Pm混合感染的情况普遍存在，在国内外均有报道。在新疆等地区羊群内MO和Pm抗体双阳性率高达83%^[10]，国外学者在研究盘羊肺炎时发现大多数患病羊为MO与其他细菌混合感染，其中Pm的16S rRNA基因丰度最高^[8, 11]。

1.1.2 绵羊肺炎支原体概况

绵羊肺炎支原体于1963年在苏格兰首次从患有肺腺瘤病的绵羊的肺中分离^[12]，经气管、支气管灌洗培养，得到葡萄糖发酵的煎蛋菌落，经聚合酶链式反应鉴定为绵羊肺炎支原体^[13]。MO的分离和培养是用来检测的一个重要工具，MO的分离相对较容易，但在培养中维持MO是困难且耗时的，通常用来培养MO的培养基有PPLO肉汤、Hayflick和SP4基质^[14]。尽管MO经常与表面上健康的动物隔离，但它是严重呼吸道疾病暴发的罪魁祸首，这些疾病往往与多种异源菌株的感染有关^[15]。MO是引起绵羊呼吸道疾病的主要支原体，以咳嗽、喘息、进行性消瘦和慢性增殖性间质性肺炎为特征^[16]，病变始于暗红色的腹侧塌陷区，它们在2-3周内进展为红灰色实变区域，之后可能持续为实变的灰色区域，通常伴有局限性胸膜粘连^[17]。感染MO绵羊生长速度和生产力较低，给养羊业造成巨大的经济损失^[18, 19]。由MO感染引起的疾病有多种名称，包括绵羊非典型肺炎、支原体肺炎、慢性支气管炎、慢性非进行性肺炎和增殖性渗出性肺炎^[20, 21]。在澳大利亚和新西兰，天气炎热时这种疾病的患病率增加，因此也被称为夏季肺炎^[17]。

MO现在被认为是一种全球分布的绵羊和山羊的呼吸道病原体，最近还在包括鹿科动物在内的野生反刍动物中检测到。它也是巴氏杆菌病和病毒感染导致肺炎的常见触发因素，并可能加剧病理过程^[22]。感染通常会导致不同的发病率和低死亡率，然而，疾病的结局和严重程度将取决于不同毒力菌株的存在、宿主的反应以及混合感染的存在。近年来，在美国、瑞典、法国和英国等地区MO感染的病例增加^[15]，而在中国南疆，有超过40%的绵羊鼻拭子样本呈MO阳性^[16]。目前，更多国家进行大规模的研究，通过全球检测系统可以获知MO的真实流行情况。MO主要通过密切接触后的呼吸道途径传播，但是在波斯尼亚和黑塞哥维那地区^[23]，无围栏的开放化饲养的羊群中发现感染MO的患病率更高，猜测可能是因为缺乏对动物活动的控制，以及将新获得的、表面上健康的和年龄较大的羊引入年轻的羊群中^[24]，因为，与山羊相比，MO在较年轻的绵羊中比较年长的绵羊中更常见^[16, 25]。

MO的致病机制有多种，包括过氧化氢、活性氧和毒素的产生^[15]。目前关于其致病机制的观点是，MO通过空气飞沫传播时，可侵入呼吸道并定植于气管上皮细胞。它附着并感染呼吸道上皮细胞，可通过细胞外信号调节的激酶信号转导的线粒体途径引起氧化损伤和细胞凋亡。支原体通常依赖于粘附宿主细胞，这可能是通过帮助支原体粘附的粘附素和膜蛋白来实现的。此外，MO可以通过引起巨噬细胞活性的改变来调节宿主免疫系统，抑制淋巴细胞活性，并诱导产生针对宿主纤毛抗原的自身抗体，导致严重的混合感染^[25]。在绵羊中，呼吸道疾病通常与初次病毒和细菌感染或在应激情况下免疫抑制后的继发性感染有关^[26]。MO感染继发细菌感染后引起严重的病理损伤，很可能是

MO 引起的呼吸道粘液纤毛防御丧失促进了 Mh 的快速增殖和下降到下呼吸道^[27], 并诱导了致命性的支气管肺炎。Mh 和 Pm 是 MO 继发感染最常见的病原体, 这些微生物导致了大多数绵羊的呼吸道疾病^[7]。

1.1.3 多杀性巴氏杆菌概况

1.1.3.1 多杀性巴氏杆菌的基因分型

1881 年, 巴斯德首次证明多杀性巴氏杆菌是家禽霍乱的病原体^[28]。从那时起, 这种细菌在广泛的宿主中被确认为许多其他重要经济疾病的病原体。这种细菌入侵粘膜、逃避天然免疫并导致全身性疾病。Pm 是一种非运动性、无芽孢形成、无鞭毛的革兰氏阴性菌^[29]。它是一种正常存在于多种健康动物的口腔和咽部粘膜的条件致病菌。目前, Pm 根据荚膜抗原被分为 A、B、D、E 和 F 血清型, 基于脂多糖抗原进一步分为 16 个血清型 (1-16)^[30]。不同的动物感染 Pm 患病与 Pm 的多种基因分型有关, 具有一定的宿主偏好性。禽霍乱主要是由血清 A 型菌株引起的, 出血性败血症主要是由 B 型和 E 型 Pm 引起的一种影响牛和水牛的急性疾病, 其特征是头颈部水肿性肿大和出血性淋巴结肿。表达 PMT 的 Pm 会引起猪萎缩性鼻炎, 这类 Pm 属于血清 D 型。萎缩性鼻炎最明显的症状是会出现深色泪痕和肺炎。因为各荚膜血清型之间具有较低交叉性保护的特点, 所以对荚膜血清型的鉴定尤为重要, 现在对血清学分型的鉴定可以从荚膜、脂多糖、MLST 基因以及主要毒力基因这四个方面出发^[9]。Pm 可能是牛 (主要由 A: 1 引起)、猪以及偶尔引起绵羊肺炎的主要或次要病原体^[28]。在许多呼吸道疾病中, 它还是最常见的继发性病原体^[31]。Pm 也可以感染兔子, 更甚的是, 人类在被猫咬了之后也会感染 Pm^[32]。

1.1.3.2 多杀性巴氏杆菌的流行病学

与多杀性巴氏杆菌相关的下呼吸道感染 (肺炎和胸膜炎) 可表现为急性暴发性疾病 (如所谓的牛“船运热”) 或慢性大叶性肺炎, 如家养的猪、小牛和绵羊的所谓“地方性肺炎”。Pm 不是这些肺炎的唯一细菌种类, 但它是猪肺炎最常见的分离物种之一^[33]。然而, 很少有研究 Pm 在患肺炎绵羊中的流行情况。在山羊中, 关于 Pm 流行率的研究甚至更少。据统计, 国外的羊源 Pm 已存在 A、B、D 三种血清型, 而我国羊群感染 Pm 主要以 B 型为主, 还有一些地区分离出了 A 型和 D 型 Pm^[34]。Ehsan Gharib Mombeni^[25]等在研究绵羊感染 Pm 基因分型的过程中, 从绵羊肺和山羊肺中分离到 Pm 的比例分别为 29.4%和 13.8%, 并从中检出 A 和 D 荚膜血清型, 脂多糖 L3 和 L6 型, 其中 A: L6 型在绵羊和山羊中最常见。Kalkidan Getnet^[35]等在研究埃塞俄比亚西阿姆哈拉亚区 Pm 血清分型及绵羊巴氏杆菌病影响因素的评估时, 研究发现个体血清型患病率以 A7 型最