

# 青海省部分地区副猪嗜血杆菌流行病学研究

逯忠新<sup>1</sup>, 高鹏程<sup>1</sup>, 贺英<sup>1</sup>, 储岳峰<sup>1</sup>, 赵萍<sup>1</sup>, 赵海燕<sup>1</sup>, 马利青<sup>2</sup>, 陆艳<sup>2</sup>, 蔡其刚<sup>2</sup>

(1. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 家畜疫病病原生物学国家重点实验室, 农业部草食动物疫病重点开放实验室, 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 甘肃兰州 730046; 2. 青海大学畜牧兽医科学院, 青海西宁 810016)

**摘要:** 为了明确青海省4个地区12个猪场副猪嗜血杆菌病的流行情况, 应用间接血凝对不同猪场639份血清进行了检测; 对疑似副猪嗜血杆菌病的15份病料进行了病原分离鉴定, 应用琼脂扩散试验对分离菌进行了分型。结果4个地区副猪嗜血杆菌最高阳性率为58.73%, 最低阳性率为0, 平均阳性率为25.19%; 从疑似副猪嗜血杆菌病患病的肺脏和腹膜中分离到2株革兰氏阴性细小杆菌, 经生化试验和PCR鉴定, 确定分离菌为副猪嗜血杆菌, 分型结果为副猪嗜血杆菌血清5型(QH0804)和7型(QH0811)。结果表明, 副猪嗜血杆菌病在4个地区一些猪场有不同程度的流行和发生。这一结果为该地区有效控制该病防制提供了依据。

**关键词:** 副猪嗜血杆菌; 流行病学; 分离鉴定

中图分类号: S432.4<sup>+</sup>2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)增刊-0236-04

## Epidemiological Investigation of *Haemophilus parasuis* of Qinghai Province

LU Zhong-xin<sup>1</sup>, GAO Peng-cheng<sup>1</sup>, HE Ying<sup>1</sup>, CHU Yue-feng<sup>1</sup>,  
ZHAO Ping<sup>1</sup>, ZHAO Hai-yan<sup>1</sup>, MA Li-qing<sup>2</sup>, LU Yan<sup>2</sup>, CAI Qi-gang<sup>2</sup>

(1. Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Key Laboratory of Grazing Animal Diseases of Ministry of Agriculture Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, Lanzhou 730046, China;  
2. Academy Animal and Veterinary Medicine Science, Qinghai University, Xining 810016; China)

**Abstract:** The research aimed to study the infected rate of *Haemophilus parasuis* in Qinghai Province. 639 serum were detected by the indirect haemagglutination (IHA) tests. Isolates were serotyped by the gel diffusion based upon heat-stable antigens. Finding that total positives rate of this area was 25.19%. Isolates was a gram-negative bacterium that were derived from Suspect *Haemophilus parasuis* 15 samples of lung and peritoneum of euthanized clinically affected pigs from Qinghai Province. Two strains of Gram-negative bacillus were isolated were identified as *Haemophilus parasuis* serovar5(QH0804) and serovar7(QH0811) based on biochemical characteristics and polymerase chain reaction (PCR). finding show that part of pigs were infected by *Haemophilus parasuis* of this region.

**Key words:** *Haemophilus parasuis*; Epidemiology; Isolation and identification

副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, Hps)是猪 Glasser's 病的病原体, 引起的猪多发性浆膜炎、关节炎和脑膜炎等<sup>[1]</sup>。在1910年德国学者 Glasser 首次对发生浆液性纤维素性胸膜炎、心包炎和脑膜炎猪的浆液性分泌物中的一种革兰氏阴性杆菌进行描述<sup>[2]</sup>, 直到1922年才由 Schemmer 和 Ehrlich 首次分离到 Hps<sup>[3]</sup>。近年来, 许多地区都有该病发生的报道,

Hps 引起的疾病已逐渐成为危害世界养猪业的重要细菌性疾病之一<sup>[4]</sup>。国外对 Hps 流行病学调查表明, Hps 病从临床病猪中的分离率高达20%左右, 而且流行的血清型通常是 Hps 毒力比较强的血清型, 如血清5型、4型和13型等<sup>[4-6]</sup>。在国内, 蔡旭旺等<sup>[7]</sup>对该病在我国的流行病学研究显示, 优势血清型为血清4型、5型、12型和13型。随着我国养猪业规模化

收稿日期: 2009-03-14

基金项目: 国家科技支撑计划子课题(2006BAD06A01); 国家科技支撑计划子课题(2006BAD06A12); 国家科技基础性工作专项计划(2008FY210200)

作者简介: 逯忠新(1955-), 男, 甘肃秦安人, 研究员, 主要从事细菌分子生物学研究。

和集约化猪场的发展, Hps 病已在我国的发生呈逐年上升趋势, 给我国的养猪业造成了巨大的经济损失。为了明确该病在青海地区的感染状况, 更准确地为该病防制提供依据, 本试验采用了间接血凝试验对来此不同猪场的 639 份血清进行了 Hps 抗体检测, 并对疑似 Hps 病料进行病原分离鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

- 1.1.1 待检血清 采集青海省不同地区猪场不同年龄段猪血清 639 份。
- 1.1.2 IHA 试剂盒 IHA 诊断试剂和 Hps 血清 1~15 型多抗均由本实验室自制。
- 1.1.3 病料 剖杀患病猪, 无菌取肺脏、心血、关节液、腹膜和胸水。
- 1.1.4 培养基 TSA、TSB 培养基美国 BD 公司生产。
- 1.1.5 生化试验试剂 脲酶、氧化酶、接触酶、吡啶、葡萄糖、半乳糖、果糖、蔗糖和核糖等, 均购自杭州微生物试剂有限公司。
- 1.1.6 菌株 Hps 国际参考菌株由澳大利亚昆士兰州动物研究所 PJ Blackall 博士惠赠
- 1.1.7 细菌 DNA 提取试剂盒 购自上海生工生物公司。

1.2 方法

- 1.2.1 检测方法 将 IHA 稀释液加于 96 孔的“V”型反应板中, 每孔 25  $\mu$ L; 在第 1 孔加被检血清 25  $\mu$ L, 与稀释液混匀后吸取 25  $\mu$ L 至第 2 孔, 依次作对倍稀释至所需的稀释度; 每孔加抗原 25  $\mu$ L, 振荡均匀, 置 37  $^{\circ}$ C 反应 2 h 后判定结果。被检血清效价大于或等于 1:8 者判为阳性, 小于或等于 1:4 者判为阴性。
- 1.2.2 细菌分离培养 剖检发病猪, 观察剖检病变, 无菌取肺组织、心血、关节液、腹膜和胸水划线接种 TSA 平板。置 37  $^{\circ}$ C, CO<sub>2</sub> 培养箱培养 36~48 h。观察结果。
- 1.2.3 生化鉴定 挑去纯化菌落接种脲酶、氧化酶、接触酶、吡啶、葡萄糖、半乳糖、果糖、蔗糖、核糖等生化管中, 观察结果。
- 1.2.4 PCR 引物的设计与合成 按照文献<sup>[8]</sup>合成引物: HP1F3: tatcgggagatgaagac; HP2F2: gtaatgtctaaggactag; HPRevx: cctgcggcttcgtc; 引物由大连宝生物公司合成。
- 1.2.5 分离菌分型 根据 Kielstein<sup>[9]</sup>报道的方法, 对 2 株分离菌进行血清学分型。

2 结果与分析

2.1 血清抗体检测结果

应用 IHA 对 639 份猪血清进行副猪嗜血杆菌抗体定性检测, 检测结果见表 1。

表 1 IHA 检测阳性率结果  
Tab. 1 IHA results of positives rate

种群	猪						场					
	湟中县			大通自治县			互助土族自治县			祁连县		
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	G	K	L
乳猪	1/ 19			4/ 10		1/ 32						
保育猪	6/ 20		4/ 20	1/ 10		7/ 7						
2月龄	13/ 20	20/ 30	15/ 30		6/ 25			3/ 19		0/ 28		0/ 23
育肥猪	3/ 15			5/ 10								
哺乳母猪	5/ 20			3/ 10								
后备母猪	3/ 20	15/ 20	12/ 30						2/ 11		0/ 9	
后备猪	3/ 20			1/ 10		2/ 31						
种猪	1/ 18	2/ 13	4/ 20				19/ 89					
平均阳性/%	25. 19											

表 1 结果显示, Hps 对所有年龄段猪都感染。不同猪场的感染率乳猪为 9. 84%、保育猪为 31. 58%、2 月龄猪为 32. 57%、育肥猪为 32%、哺乳母猪为 26. 67%、后备母猪为 35. 56%、后备猪为 9. 84%、种猪为 18. 57%, 12 个猪场的平均感染率 25. 19%。

2.2 细菌分离培养

无菌取肺组织、心血、关节液、腹膜和胸水划线接种 TSA 平板, 置 37  $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养, TSA 平

板在 36~48 h, 接种肺脏和腹膜病料平板了出现无色、透明、边缘整齐的小菌落, 该菌接种无 NAD 的 TSA 培养基不生长, 涂片镜检可见革兰氏阴性的细小杆菌。

2.3 生化鉴定

纯化好的液体培养物, 接种加入 NAD 的生化管中, 结果见表 2。

表 2 分离菌生化结果

Tab. 2 Biochemical characteristics of isolated strains

项目 Item	氧化酶 Oxydases	接触酶 Contact enzyme	吲哚 Indole	葡萄糖 Glucose	半乳糖 Galactose	果糖 Fructose	蔗糖 Sucrose	核糖 Ribose	脲酶 Urease
结果 Result	—	+	—	+	+	+	+	—	—

注：—，阴性；+，阳性。  
Note: —, Negative; +, Positive.

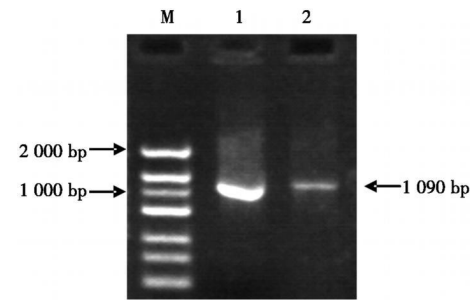
上表结果显示,分离菌生化反应与 Hps 的生化特性基本相符。

2.4 PCR 鉴定

将分离菌的 TSB 培养物取 2 mL, 1 000 r/min 离心 5 min, 将沉淀收集在 2 mL 的离心管中, 按照细菌 DNA 提取试剂合的步骤提取分离菌基因组。用上述 Hps 特异引物进行 PCR 扩增, 结果两株分离菌均扩增出了与预期 1 090 bp 大小相符的片段, 结果见图 1。

2.5 分离菌分型鉴定

按照 Kielstein 报道的方法, 将分离菌 121 ℃ 高压 2h, 提取热稳定抗原, 用琼扩试验进行对 2 株分离菌分型, 结果见图 2。



M. DNA 标准 DL200Q; 1, 2. 分离菌株。  
M. DNAMarker DL200Q; 1. Isolated strains QH0804; 2. Isolated strains QH0811.

图 1 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR identification

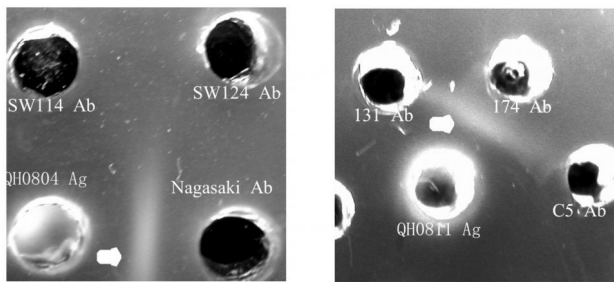


图 2 QH0804、QH0811 琼扩分型结果

Fig. 2 Isolates were serotyped by both the gel diffusion

琼扩试验结果显示,分离株 QH0804 热稳定抗原与 Hps 标准株 Nagasaki (血清 5 型) 抗体之间出现沉淀带, QH0811 热稳定抗原与 Hps 标准株 174 (血清 7 型) 抗体之间出现沉淀带, 表明分离株 QH0804 和 QH0811 分别为血清 5 型和血清 7 型。

3 讨论

副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, Hps) 是正常饲养猪上呼吸道的一种共栖菌, 但在特定的条件下可以侵入机体并引起全身性疾病, 以纤维素性多发性浆膜炎、关节炎和脑膜炎为特征, 称为猪的 Glasser's 病, Hps 病已成为严重危害世界养猪业的典型细菌性疾病之一。近年来, 由于早期断奶和饲养管理模式的改变, 已造成猪场保育仔猪大量死亡。另一方面, 一些病毒感染使 Hps 致病性增强, 特别是一些免疫抑制性的疾病如猪的繁殖与呼吸综合征、圆环病毒等经常与 Hps 混合感染, 对全球的养猪业带来巨大的经济损失<sup>[10]</sup>。Hps 通常只感染猪, 可以

影响 2 周龄到 4 月龄的青年猪, 主要在断奶后和保育阶段发病, 发病率一般为 10% ~ 15%, 严重时病死率可达 50%<sup>[11]</sup>。

本试验参照魏子贡<sup>[12]</sup> 等的方 法, 制备 IHA 诊断试剂, 对青海省不同地区猪场的 639 份 Hps 非免疫猪血清进行检测, 检测结果显示, Hps 可以感染各个年龄阶段的猪, 不同猪场的 Hps 感染率相差很大为 0 ~ 58.73%, 可能由于不同的饲养管理条件造成在猪场间 Hps 感染率的巨大差异, 该地区 Hps 平均感染率为 25.29%。结果显示, 保育猪、2 月龄猪、育肥猪和后备母猪感染率高于其他年龄段猪, 分别为 31.58%, 32.57%, 32.00% 和 35.56%。结果表明, 青海地区猪场有 Hps 不同程度的流行。

Hps 在病料中的分离率比较低, 一般患病猪死亡 12 h 后, 在病料中几乎分离不到, 因此需在患猪剖杀或死亡后 12 h 以内及时进行病原分离。而且 Hps 十分娇嫩, 对营养要求苛刻。其在巧克力培养基上培养 36 ~ 48 h 生长较差, 一般病原分离应采用

含NAD、酵母浸出液和10%马血清的TSA培养基。此外,目前猪场在实际生产中广泛使用抗生素,也是副猪嗜血杆菌分离率比较低原因之一。本试验对青海不同地区送检的病料进行了Hps的分离鉴定,结果在肺脏和腹膜病料中分离到了2株Hps,经琼脂扩试验分型,结果为7型(QH0811)和5型(0804),与我国流行的Hps优势菌株基本一致。

PCR方法是快速、准确鉴定副猪嗜血杆菌的有效途径,一般都以16S rDNA为靶基因设计引物进行特异性扩增,最早Oliveira等<sup>[13]</sup>据此建立了副猪嗜血杆菌PCR诊断方法。但由于副猪嗜血杆菌与吡哆放线杆菌(*A. indolicus*)的16S rDNA同源性达97.14%~97.17%<sup>[14]</sup>,用该方法无法区别这两种细菌。因此,本试验采用了Angen等<sup>[8]</sup>改进的PCR方法对分离的Hps进行鉴定,避免了吡哆放线杆菌的假阳性,提高了鉴定结果的准确性。

Hps发病率和死亡率在国外呈显著上升趋势,已给养猪业造成较大的经济损失。近几年,国内关于HPs的报道明显增多。Hps已成为引起猪呼吸道疾病的又一重要病原,研究猪场Hps病原的流行病学,为制定切实有效的防治方法起着到重要意义。

## 参考文献:

- [1] Amano H, Shibata M, Kajio N, *et al.* Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method[J]. Vet Med Sci, 1994, 56(4): 639—644.
- [2] Madnnes J I, Desrosiers R. Agents of the “Suis—ide Diseases” of Swine; *Actinobacillus suis*, *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis*[J]. Can J Vet Res, 1999, 63(2): 83—89.
- [3] Oliveira S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis epidemiology and control[J]. Vet Microbiol, 2004, 99(1): 1—12.
- [4] Kielstein P, Rapp Gabrielson V J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using

heat—stable antigen extracts[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(4): 862—865.

- [5] Rafiee M, Blackall P J. Establishment validation and use of the Kielstein—Rapp—Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis* [J]. Aust Vet J, 2000, 78(3): 172—174.
- [6] Rapp—Gabrielson V J, Gabrielson D A. P revalence of *Haemophilus parasuis* serovars among isolates from swine [J]. Am J Vet Res, 1992, 53(5): 659—654.
- [7] Cai X, Chen H, Blackall P J. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China[J]. Vet Microbiol, 2005, 111(3—4): 231—236.
- [8] Angen, Oliveira S, Ahlfens P, *et al.* Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis*[J]. Veterinary Microbiology, 2007, 119(2—4): 266—276.
- [9] Kielstein P, Rapp—Gabrielson V J. Designation of 15 Serovars of *Haemophilus parasuis* on the Basis of Immunodiffusion Using Heat—Stable Antigen Extracts[J]. J Clin Microbiol, 1992, 30(4): 862—865.
- [10] Vahle J L, Haynes J S, Andrews J J. Experimental reproduction of *Haemophilus parasuis* infection in swine: clinical, bacteriological, and morphologic findings[J]. J Vet Diagn Invest, 1995, 7(4): 476—480.
- [11] Olvera A, Segalés J, Aragón V. Update on the diagnosis of *Haemophilus parasuis* infection in pigs and novel genotyping methods[J]. Vet J, 2007, 174(3): 522—529.
- [12] 魏子贡, 蔡旭旺, 金梅林. 副猪嗜血杆菌抗体间接血凝检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2006, 36(9): 713—718.
- [13] Oliveira S, Galina L, Pijoan C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections[J]. Vet Diagn Invest, 2001, 13(6): 495—501.
- [14] Moller K, Fussing V, Grimont P A, *et al.* *Actinobacillus minor* sp. nov., *Actinobacillus porcinus* sp. nov., and *Actinobacillus indolicus* sp. nov., three new V—factor dependent species from the respiratory tract of pigs[J]. Int J Syst Bacteriol, 1996, 46(4): 951—956.