

猪伪狂犬病毒、副猪嗜血杆菌和猪链球菌混合感染的病原分离与鉴定

徐引弟,张青娴,李建林,张 彬,王克领,朱文豪
(河南省农业科学院 畜牧兽医研究所,河南 郑州 450002)

摘要: 为了探究河南省某规模化猪场育肥猪发生疫情的病因,进行了猪伪狂犬病毒的血清学和 PCR 鉴别诊断,同时对分离细菌进行了形态鉴定、PCR 鉴定、血清型鉴定和药敏试验。结果显示,猪伪狂犬野毒血清学和 PCR 检测均为阳性,同时分离到副猪嗜血杆菌和猪链球菌。经鉴定副猪嗜血杆菌为血清 4 型,链球菌为血清 2 型。药敏试验结果表明,副猪嗜血杆菌和链球菌对头孢哌酮、头孢他定、头孢噻肟、头孢曲松、头孢呋辛、头孢唑啉、亚胺培南、阿莫西林、氨苄西林、万古霉素敏感。

关键词: 猪伪狂犬病毒;副猪嗜血杆菌;猪链球菌;分离;鉴定

中图分类号: S858.285.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2015)09-0100-05

Pathogen Isolation and Identification of Mixed Infection of Pseudorabies Virus, *Haemophilus parasuis* and *Streptococcus suis*

XU Yindi,ZHANG Qingxian,LI Jianlin,ZHANG Bin,WANG Keling,ZHU Wenhao
(Institute for Animal Husbandry and Veterinary Research,Henan Academy of Agricultural Sciences,
Zhengzhou 450002,China)

Abstract: In order to explore the pathogen of outbreak of epidemic of fattening pigs in a large-scale pig farm in Henan province,the serology and PCR differential diagnosis of wild pseudorabies virus(PRV), morphology and PCR identification,serotype and drug sensitive test of bacteria were carried out. Results showed that the serology and PCR differential diagnosis of wild PRV were positive,*Haemophilus parasuis* (HPS) and *Streptococcus suis* (SS) were isolated. After identification HPS was serotype 4 and SS was serotype 2. Drug sensitive test showed that HPS and SS were sensitive to cefoperazone,ceftazidime,cefotaxime,ceftriaxone,cefuroxime,cefazolin,imipenem,amoxicillin,ampicillin and vancomycin.

Key words: PRV; *Haemophilus parasuis*; *Streptococcus suis*; isolation; identification

猪伪狂犬病是由伪狂犬病毒(PRV)引起的以产仔母猪流产、死胎、木乃伊及新生仔猪急性死亡和 3 周龄以内的仔猪表现神经症状为主要特征的传染性疾病。近年来,猪伪狂犬病毒的感染发生了一些新的变化,野毒毒力增强,除了引起母猪繁殖障碍、仔猪腹泻死亡以外,最突出的危害是引起保育猪、育肥猪的呼吸道症状、神经症状和死亡,同时极易继发其他细菌感染,从而加重病情^[1-2]。其中副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)和猪链球菌(*Strep-*

tococcus suis, SS)是极易在感染猪伪狂犬后继发感染的病原,而且危害严重^[1-2]。

2014 年 5 月初,河南省某规模化猪场保育猪发病,表现为高烧、呼吸困难、死前口吐白沫,有的有神经症状。剖检肺脏出血,间质增宽水肿,心包、肺脏、腹腔粘连,有大量纤维素渗出和大量浑浊胸水、腹水,肝脏有白色坏死灶,扁桃体灶性坏死,其余脏器未见明显病变。根据发病及剖检情况初步怀疑为猪伪狂犬病毒感染,同时混合感染副猪嗜血杆菌和猪

链球菌。本研究对以上 3 种可疑的病原进行实验室诊断,旨在确切诊断疫情的病因并及时控制疫情。

1 材料和方法

1.1 病料

病料采自河南某规模化猪场发病育肥猪的肺脏、扁桃体、淋巴结、脾脏、肾脏、心血、气管黏液,血清采自发病育肥猪及母猪。

1.2 工具酶及试剂

Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒、*Taq* PCR Master Mix 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。猪伪狂犬 gE 抗体检测试剂盒购自 IDEXX 公司。TSA(胰蛋白大豆琼脂)购自 Difco 公司,NAD(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)购自 Roche 公司,胎牛血清购自郑州益康公司。副猪嗜血杆菌 15 个标准血清型的标准血清自制^[3]。

1.3 引物设计

参考文献[3-4]报道以及 GenBank JQ809330 的序列,设计 2 对引物用于扩增 PRV 的 *gD* 和 *gE* 基因。HPS 引物序列参考文献[5]报道。SS 及 2 型 SS 引物序列参考文献[6]报道。引物序列见表 1,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 试验所用 PCR 引物		
病原或基因名称	序列(5'—3')	扩增长度/bp
PRV <i>gD</i>	CACGGAGGACGAGCTGGGGCT	217
	GTCCACGCCCGCTTGAAGCT	
PRV <i>gE</i>	GCCTGCCACCCGGACCTGGT	672
	CACGTACAGCCCGACTCGTCC	
HPS	GTGATGAGGAAGGGTGGTGT	822
	GGCTTCGTCACCTCTGT	
SS	GCAGCGTATTCTGTCAAACG	689
	CCATGGAUATAAAGATGG	
SS2	TGATAGTGATTTGTCGGGAGGG	557
	GAGTATCTAAAGAATGCCTATTG	

1.4 PRV 的 PCR 扩增

取 3 头发病育肥猪的扁桃体、肾脏、脾脏等组织约 0.5 g,剪碎,匀浆,按照 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒操作说明提取 DNA,最后融于 50 μL CE Buffer。50 μL PCR 反应体系:*Taq* PCR Master Mix 25 μL、上下游引物(10 μmol/L)各 2 μL、DNA 1 μL,加灭菌水至 50 μL。PCR 循环体系:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s,65 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。结束后取 10 μL 进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳。

1.5 PRV gE 抗体检测

发病育肥猪采血共 3 份,母猪血 5 份,分离血

清,按照猪伪狂犬 gE 抗体检测试剂盒说明操作。若 S/N 比值≤0.6,样品判为 PRV gE 抗体阳性。若 S/N 比值≤0.7 但 >0.6,该样品必须重测,如果结果相同,则过一段时间后重新从动物取样进行检测。若 S/N 比值>0.7,样品判为 PRV gE 抗体阴性。

1.6 细菌分离鉴定

1.6.1 形态鉴定 无菌将病料(肺、气管、心血)接种于含 NAD 和血清的 TSA 固体培养基,37 ℃ 培养 24~48 h。分别挑取可疑菌落抹片,革兰氏染色后在显微镜下观察。将可疑菌落分别接种不含 NAD 和血清的 TSA 平板、不含 NAD 但含血清的 TSA 平板,观察菌落生长情况和形态大小。

1.6.2 PCR 鉴定 HPS 及 SS 的 PCR 鉴定参考文献[5-6],反应体系(50 μL):*Taq* PCR Master Mix 25 μL、上下游引物(10 μmol/L)各 2 μL、模板(刮取少量新鲜菌落融于生理盐水中)1 μL,加灭菌水至 50 μL。反应条件:94 ℃ 变性 4 min;94 ℃ 1 min,56 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳。

1.6.3 血清型鉴定 HPS 血清型鉴定参考文献[1]进行。15 株副猪嗜血杆菌标准菌株培养灭活后,2 次免疫家兔,耳静脉攻毒,心脏采血,琼扩试验检测抗体效价,抗体效价在 1:8 以上颈静脉放血,分离血清,作为琼扩试验检测用标准血清。分离的副猪嗜血杆菌培养洗涤后,121 ℃ 高压蒸气处理 2 h,取上清即为用于琼脂扩散试验的分型抗原。制备琼脂平板,打孔,封底。中央孔加待检菌株的琼扩抗原,周围孔加入各型标准阳性血清和阴性血清,以抗原与抗体孔之间出现清晰白色沉淀线为阳性,反之为阴性。

SS 血清型鉴定参考文献[6]的方法,用 SS2 的引物扩增鉴定。

1.6.4 药敏试验 将分离鉴定好的菌接种于绵羊全血平皿,涂匀,选取头孢哌酮、头孢噻肟、头孢他定、头孢克肟、头孢曲松、头孢唑啉、头孢呋辛、阿莫西林、氨苄西林、亚胺培南、万古霉素、阿奇霉素、恩诺沙星、氧氟沙星、环丙沙星、氯霉素、壮观霉素、利福平、四环素、卡那霉素、红霉素、克林霉素、多西环素、庆大霉素、万古霉素、新霉素、复方新诺明、阿米卡星、林可霉素的药敏纸片贴于培养基上。于 37 ℃ 培养 24 h,测量抑菌环直径并根据判定标准判定结果。

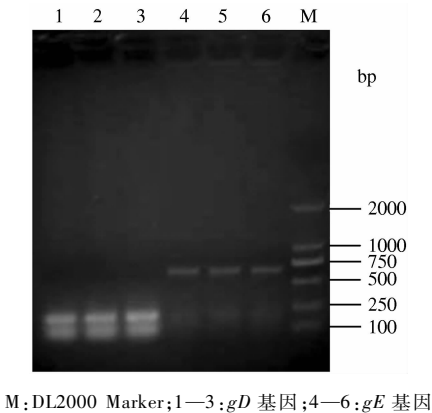
1.7 综合防制

根据伪狂犬的鉴定结果以及细菌分离鉴定和药敏试验结果,提出有针对性的综合防制措施。

2 结果与分析

2.1 PRV 的 PCR 扩增结果

以 PRV *gD*、*gE* 上下游引物扩增,分别扩增出与预期大小相同的 217 bp、672 bp 片段(图 1)。表明病料中 PRV 的 *gD* 和 *gE* 基因均为阳性。疫苗毒和野毒均含有 *gD* 基因,而疫苗毒缺失 *gE* 基因,野毒含有 *gE* 基因,此结果说明这些病料为野毒感染。



M:DL2000 Marker;1—3:*gD* 基因;4—6:*gE* 基因
图 1 PRV *gE* 和 *gD* 的 PCR 扩增

2.2 PRV gE 抗体检测结果

检测结果表明,5 份母猪和 3 份发病保育猪的 *gE* 抗体均为阳性(表 2)。由于疫苗株均缺失了 *gE* 基因,因此疫苗免疫不能产生 *gE* 抗体,而野毒感染产生 *gE* 抗体,因此 *gE* 抗体阳性表明感染了野毒。

表 2 *gE* 抗体检测结果

样品编号	S/N 值	判定结果
母猪 1	0.115	+
母猪 2	0.185	+
母猪 3	0.169	+
母猪 4	0.069	+
母猪 5	0.155	+
保育猪 1	0.054	+
保育猪 2	0.073	+
保育猪 3	0.151	+

2.3 细菌分离与鉴定结果

2.3.1 形态鉴定 培养 24 h 后,平皿上主要有 2 种菌落。一种在加有血清和 NAD 的 TSA 培养基上长成透明菌落,针尖大小。在不含 NAD 和血清的 TSA 培养基、不含 NAD 但含血清的 TSA 培养基上均不能生长。表明分离的菌株具有 NAD 依赖性。革兰氏染色为革兰氏阴性细小长杆菌,短链或长链,疑似副猪嗜血杆菌(图 2)。另一种菌落较大,在加有血清的 TSA 培养基上 24 h 长成半透明菌落。在不含 NAD 和含血清的 TSA 培养基上能生长。革兰氏染色为阳性球菌或球杆菌,多散在,大量短链,疑似猪链球菌(图 3)。

2.3.2 PCR 鉴定 对疑似副猪嗜血杆菌的菌落进行 HPS 的扩增,结果扩增出 822 bp 的条带(图 4),与预期大小一致,证实为副猪嗜血杆菌。对疑似猪链球菌的菌落进行 SS 的扩增,扩增出 689 bp 的条带(图 4),与预期大小一致,证实为猪链球菌。



图 2 HPS 菌体形态

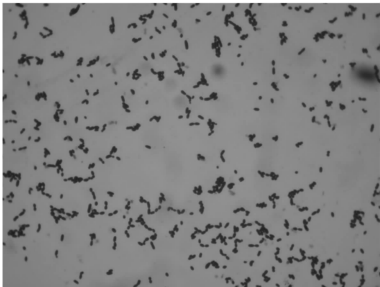
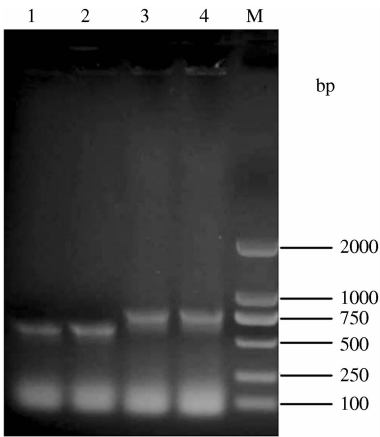


图 3 SS 菌体形态



M:DL2000 Marker;1—2:SS 的扩增;3—4:HPS 的扩增
图 4 HPS 和 SS PCR 扩增

2.3.3 血清型鉴定 HPS 血清型用琼扩试验鉴定,与 4 型标准血清有极粗沉淀线,与其他血清无沉淀线,鉴定为 4 型(图 5)。SS 经 PCR 鉴定为 2 型,与预期大小一致(557 bp,图 6)。4 型 HPS 为中等毒力菌株,2 型链球菌是毒力较强的菌株,二者混合感染引起败血症、脑膜炎、关节炎、肺炎、多发性浆膜炎及急性死亡等症状。

2.3.4 药物敏感试验 由表 3 可知,2 种菌同时敏感的药物有:头孢哌酮、头孢噻肟、头孢他定、头孢曲松、头孢唑啉、头孢呋辛、阿莫西林、氨苄西林、亚胺

培南、万古霉素。2 种菌耐药情况均十分严重,对大多数药物产生耐药性,仅对少数头孢类药物敏感。

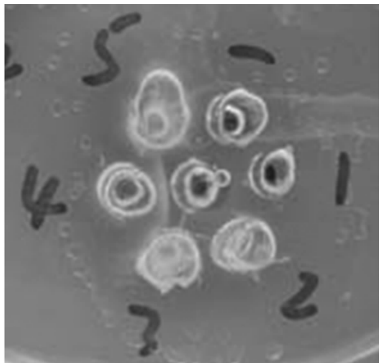
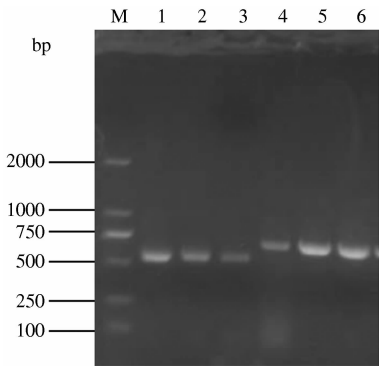


图 5 HPS 血清型



M:DL2000 Marker;1—3:2 型 SS 的扩增;4—6:SS 的扩增

图 6 2 型 SS PCR 扩增

表 3 HPS 和 SS 药敏试验结果

药物	HPS		SS	
	药敏圈 直径/mm	判定 结果	药敏圈 直径/mm	判定 结果
头孢曲松	30	S	26	S
头孢他定	25	S	20	S
头孢噻肟	30	S	30	S
头孢哌酮	30	S	26	S
头孢唑啉	28	S	28	S
头孢呋辛	28	S	30	S
亚胺培南	38	S	36	S
阿莫西林	34	S	36	S
氨苄西林	32	S	34	S
万古霉素	20	S	20	S
环丙沙星	0	R	0	R
氧氟沙星	0	R	0	R
恩诺沙星	0	R	0	R
阿米卡星	0	R	0	R
四环素	0	R	12	R
新霉素	0	R	0	R
复方新诺明	0	R	0	R
多西环素	0	R	8	R
氯霉素	20	R	20	S
卡那霉素	0	R	0	R
庆大霉素	0	R	0	R
阿奇霉素	0	R	0	R
利福平	0	R	26	S
林可霉素	0	R	0	R
克林霉素	0	R	0	R
壮观霉素	0	R	14	R

注:R 表示耐药,S 表示敏感。

2.4 综合防制策略及效果

根据鉴定结果,本次发病原因为猪伪狂犬野毒感染,同时继发感染副猪嗜血杆菌和猪链球菌,针对该结果采取了相应的综合防制措施。

首先隔离发病猪,彻底消毒,制定综合生物安全措施。随时监测淘汰病猪,做好防鼠、灭鼠工作。做好猪场、猪舍、外来人员和车辆的清洁卫生和日常消毒工作,加强饲养管理,增强猪体抵抗力。

发病后,对全场所有猪紧急接种 PRV 基因缺失弱毒疫苗,间隔 3 周后加强免疫 1 次,初生仔猪滴鼻和肌注同时免疫,种猪紧急普免弱毒苗 2 头份,产前 30 d 免疫灭活苗。

加强引种检测,保证外购种猪 PRV 阴性,加快野毒阳性猪群的淘汰。

疫情稳定后,调整加强 PRV 免疫程序,种猪每年 4 次免疫。初生仔猪滴鼻免疫,35 ~ 42 日龄肌注 1 次,70 ~ 75 日龄加强免疫 1 次。后备猪配种前 8 周、4 周各免疫 1 次,以后每年免疫 4 次。

全群添加敏感药物,发病猪注射头孢菌素类抗生素。种猪每年免疫副猪嗜血杆菌和猪链球菌疫苗 3 次,仔猪 2 ~ 3 周龄免疫 1 次,3 周后加强免疫 1 次。

疫苗免疫结合药物治疗 1 周后,病情得到了控制,猪群恢复正常,未再有发病死亡情况。

3 结论与讨论

自 2011 年以来,猪伪狂犬在我国规模化猪场呈暴发流行趋势,引起社会广泛关注,新的暴发流行,与 PRV 的毒力增强和变异相关,其病原特征是 *gB* 和 *gC* 基因等免疫原性基因和核苷酸还原酶小亚基 (*RRI*) 基因等重要功能基因出现变异,导致抗原性和毒力发生改变^[7-11]。临床特点是在免疫效果好的猪群可出现野毒抗体阳性但不出现明显的临床症状,如本研究中的某猪场母猪野毒阳性率 100%,但未出现母猪繁殖障碍和新生仔猪发生神经症状死亡现象,免疫力低下的猪群主要是保育和育肥猪群,可出现临床症状,引起严重的经济损失。

由于目前普遍使用基因工程疫苗,缺失了 *gE* 基因,动物体内不能产生 *gE* 抗体,而野毒感染猪体内能产生 *gE* 抗体,可见,确诊该病时,应将 *gE* - ELISA 和 *gD*、*gE* 的 PCR 结合。免疫猪群感染野毒后,仍可产生 *gE* 抗体,由于病猪可排出大量病毒,免疫猪仍可发生感染,但不出现临床感染,此时猪群的生产指标不会出现明显下降,如本案例中的母猪 *gE* 阳性率高,但未出现明显的临床症状。而育肥猪

gE 野毒阳性,会出现明显的临床症状。可见,gE 抗体阳性可来自感染猪群和发病猪群 2 种类型。因此,要同时结合 gD 和 gE 基因的扩增来判定,gD 基因是疫苗毒和野毒共有的保守基因,扩增阳性,无法区分疫苗毒和野毒,只有扩增出 gE 基因,才能判定野毒感染。本研究中 gE 抗体阳性,同时扩增出 gE 基因,确诊感染了 PRV 野毒,为下一步对 gE 基因进行序列分析、进化树分析、PRV 野毒毒力变异情况研究打下基础。

本次疫情除鉴定出猪伪狂犬外,同时还鉴定出了副猪嗜血杆菌、猪链球菌的混合感染。首先由于副猪嗜血杆菌和链球菌在浆膜、关节、脑膜、肺部等部位数量较多,而浆膜、关节、脑膜毛细血管分布少,一般药物难以到达,其次由于抗菌药物长期广泛和不合理使用,导致细菌产生耐药性非常严重,这 2 种细菌经常混合感染,而且感染时间很早,难以把握预防用药时机,因此,预防和治疗用药的同时,疫苗免疫是预防控制副猪嗜血杆菌和猪链球菌的最有效的措施。由于该场长期大量添加和乱用抗生素,使得细菌耐药性非常严重,大多数常用抗生素药敏圈直径为 0 mm,细菌完全耐药,治疗效果极差。因此,根据药敏结果,科学合理地用药是治疗细菌感染的关键。根据鉴定结果制定的防治措施科学得当,及时控制了疫情,减少了损失。

参考文献:

[1] 杨汉春. 2013 年猪病流行情况与 2014 年流行趋势及防控对策[J]. 猪业科学, 2014(2): 42-43.
[2] 彭金美, 安同庆, 赵鸿远, 等. 猪伪狂犬病病毒新流行

株的分离鉴定及抗原差异性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(1): 1-4.
[3] 徐引弟, 王治方, 朱文豪, 等. 副猪嗜血杆菌高免血清的制备与应用[J]. 中国农学通报, 2010, 26(13): 14-16.
[4] 周复春, 陈焕春, 李学伍, 等. PCR 诊断技术检测猪伪狂犬病毒及其潜伏感染部位的研究[J]. 动物医学进展, 1997(2): 22-25.
[5] 徐引弟, 郭成留, 王治方, 等. 猪高热病副猪嗜血杆菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 河南农业科学, 2007(10): 98-102.
[6] 徐引弟, 王治方, 朱文豪, 等. 河南省规模化猪场猪 2 型链球菌的分离鉴定和药敏试验[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(1): 155-157.
[7] 顾阳, 高晓云, 程琨, 等. 鉴别猪伪狂犬病病毒强毒与疫苗毒双重 PCR 检测方法的建立[J]. 华北农学报, 2014, 29(2): 94-97.
[8] An T Q, Peng J M, Tian Z J, et al. Pseudorabies virus variant in Bartha-K61-vaccinated pigs, China, 2012 [J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(11): 1749-1755.
[9] Yu X, Zhou Z, Hu D, et al. Pathogenic pseudorabies virus, China, 2012 [J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(1): 102-104.
[10] Wang C H, Yuan J, Qin H Y, et al. A novel gE-deleted pseudorabies virus (PRV) provides rapid and complete protection from lethal challenge with the PRV variant emerging in Bartha-K61-vaccinated swine population in China[J]. Vaccine, 2014, 32(27): 3379-3385.
[11] 樊振华, 姚敬明, 孟帆, 等. 山西部分种猪场猪伪狂犬病分子流行病学调研[J]. 山西农业科学, 2012, 40(9): 989-992.