

# 副猪嗜血杆菌河南流行株的分离鉴定及分型

李新果,史志斌,张磊,赵小月,王玉国,石昂,时庆贺,陈陆<sup>\*</sup>  
(河南农业大学 牧医工程学院,河南 郑州 450002)

**摘要:**为了解河南省副猪嗜血杆菌病的流行情况,对2017—2018年采自河南省不同地区的45份疑似病料,进行细菌分离及形态学观察、培养特征鉴定、PCR鉴定及分型。结果显示,共分离鉴定出12株副猪嗜血杆菌,血清型为1、2、4、5、7、13型和不可分型。其中,血清型1型2株,分别命名为XX-3、HB-1;血清型2型1株,命名为XX-4;血清型4型1株,命名为ZJ-1;血清型5型4株,分别命名为LY-1、DF-1、XX-2、KF-1;血清型7型2株,分别命名为SQ-2、XX-1;血清型13型1株,命名为NY-1;还有1株不可分型,命名为SQ-1。可见,河南省存在多个副猪嗜血杆菌血清型,且不同地区血清型不一致,1、5、7型为优势血清型。

**关键词:**副猪嗜血杆菌;猪;分离;鉴定;血清型分型

中图分类号:S855.1 文献标志码:A 文章编号:1004-3268(2018)11-0116-04

## Isolation, Identification and Typing of *Haemophilus parasuis* Strains in Henan Province

LI Xinguo, SHI Zhibin, ZHANG Lei, ZHAO Xiaoyue, WANG Yuguo, SHI Ang, SHI Qinghe, CHEN Lu<sup>\*</sup>  
(College of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** In order to find out the prevalence of *Haemophilus parasuis* in Henan Province, 45 samples from different areas of Henan Province from 2017—2018 were observed on bacterial morphology, identified by culture characteristics and detected by 16S rRNA gene PCR. Results a total of 12 *Haemophilus parasuis* strains were isolated and identified. The isolates included 2 strains of serotype 1, were named as XX-3, HB-1, 1 strains of serotype 2, was named as XX-4, 4 strains of serotype 5, were named as LY-1, DF-1, XX-2, KF-1, 2 strains of serotype 7, were named as XX-3, HB-1, 1 strains of serotype 13, was named as NY-1, and 1 unserotypeable strains in sick pigs. The results showed that there were many serotypes of *Haemophilus parasuis* in Henan Province, and the serotypes were different in different regions. Serotypes 1, 5 and 7 were the dominant serotypes.

**Key words:** *Haemophilus parasuis*; Swine; Isolation; Identification; Serotyping

副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)在中国、澳大利亚、美国、英国等世界多国普遍流行,主要引起猪的多发性浆膜炎、关节炎和脑膜炎,临幊上多与PRRSV、PCV-2等混合感染,给养殖业带来巨大损失,已经成为危害养殖业的重要细菌性病原<sup>[1-4]</sup>。HPS血清型众多,且在地域和时间上存在差异,中国主要流行的血清型为4、5、7、13型和不可

分型(NT)<sup>[5]</sup>。因此,对不同时间、不同区域的HPS分离鉴定,尤其是对分离株血清型鉴定,对预防HPS至关重要。

目前,基因分型法成为鉴定HPS血清型的主要方法。常用的基因分型法为多重PCR分型法,与过去常用的分型方法琼脂扩散试验相比,方便快捷且不易受外界因素干扰,可提高对不可分型菌株的

收稿日期:2018-06-20

基金项目:国家自然科学基金项目(31772781)

作者简介:李新果(1991-),女,河南孟津人,在读研硕士研究生,研究方向:动物疾病防控。E-mail:1296994619@qq.com

\*通讯作者:陈陆(1971-),男,河南罗山人,教授,博士,主要从事动物传染病发病机理与防控研究。

E-mail:chenluhau@126.com

鉴别<sup>[4-7]</sup>。

为了解 HPS 在河南省的感染和流行情况,对 2017—2018 年河南省不同地区养殖场的送检疑似病料,进行 HPS 分离鉴定及血清学分型,旨在为副猪嗜血杆菌病的预防和治疗提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 病料 于 2017 年 1 月—2018 年 1 月,采集来自南阳、新乡、商丘、焦作、鹤壁、洛阳、开封、登封等地区的 10 个大型养殖场的疑似病猪脾脏、肺脏、关节、肝脏和脑组织病料,共 45 份。

1.1.2 主要试剂 巧克力琼脂平板、麦康凯琼脂平板为郑州安图生物工程有限公司产品;胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB) 为美国 BD 公司产品;烟酰胺

腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 为 Sigma 公司产品;新生犊牛血清为浙江天杭生物科技有限公司产品;*Taq* DNA 聚合酶、DL1000 DNA Marker 为大连宝生物工程有限公司产品。

1.1.3 标准菌株 SH0165 株由华中农业大学馈赠,金黄色葡萄球菌阳性菌株由河南农业大学传染病实验室保存。

1.1.4 引物 参照 Oliveira 等<sup>[8]</sup>的方法,根据 HPS 16S rRNA (M75065) 的基因序列设计种特异性鉴定引物 F/R。

F: 5' - GTGATGAGGAAGGGTGGTGT - 3', R: 5' - GGCTTCGTCACCCCTCTGT - 3'。预期扩增的片段大小为 821 bp。参照 Howell 等<sup>[6]</sup> 和 Jia 等<sup>[7]</sup> 的报道,合成用于鉴定 HPS 血清型的引物(表 1)。引物由生工生物工程(上海)技术服务有限公司合成。

表 1 HPS 血清型鉴定多重 PCR 引物及扩增目的基因片段大小

引物名称	扩增基因	血清型	扩增片段长度/bp	引物名称	扩增基因	血清型	扩增片段长度/bp
HPS1R/1F	<i>funB</i>	1	180	HPS9R/9F	<i>funV</i>	9	710
HPS2R/2F	<i>wzx</i>	2	295	HPS10R/10F	<i>funX</i>	10	790
HPS3R/3F	<i>glyC</i>	3	650	HPS11R/11F	<i>amtA</i>	11	890
HPS4R/4F	<i>wciP</i>	4	320	HPS13R/13F	<i>gltP</i>	13	840
HPS5R/5F	<i>wcwK</i>	5	450	HPS14R/14F	<i>funAB</i>	14	730
HPS6R/6F	<i>gltI</i>	6	360	HPS15R/15F	<i>funI</i>	15	550
HPS8R/8F	<i>scdA</i>	8	650	HPS12R/12F	<i>H12</i>	12	508

### 1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离培养 剖检疑似病猪,无菌条件下取肝脏、肺脏、脾脏、胸膜积液和关节液等病料,接种于巧克力琼脂平板上,37 ℃ 培养 24~48 h。无菌条件下挑取光滑圆润、无色透明的露珠样菌落进行革兰氏染色,镜检,并挑取镜检可疑的单个菌落,再次接种巧克力琼脂平板纯化,备用。

1.2.2 病原菌 DNA 提取及 PCR 鉴定 挑取纯化后的单菌落,溶于 30 μL 单蒸水中,混匀后,煮沸法提取细菌基因组 DNA<sup>[9]</sup>。PCR 扩增方法按 Oliveira 等<sup>[8]</sup> 的方法进行。

1.2.3 病原菌卫星试验 将 PCR 检测 HPS 为阳性的可疑菌落水平划线于绵羊鲜血麦康凯琼脂平板上,再挑取金黄色葡萄球菌垂直于水平线划线,37 ℃ 培养 24~48 h,观察是否出现卫星生长现象。

1.2.4 病原菌血清型鉴定 根据 Howell 等<sup>[6]</sup> 和 Jia 等<sup>[7]</sup> 建立的多重 PCR 方法,鉴定 HPS 的血清型。煮沸法制备待测菌株基因组 DNA,按照表 1 的引物进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 25 μL;*Taq* DNA 聚合酶 12.5 μL,ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL,上游引物 1 μL,下游引物 1 μL,待检 DNA 2 μL。PCR 反应程序为:95 ℃

预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。取 PCR 产物 8 μL,80 V 电压 2% 琼脂糖凝胶电泳 1 h,AlphaImager Ep 型成像仪拍照保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌的分离培养结果

将病料接种于含 NAD 的巧克力琼脂平板,37 ℃ 培养 48 h 后,观察到 1~2 mm 左右针尖大小、灰白色半透明、圆润的菌落(图 1)。单个菌落涂片进行革兰氏染色后在显微镜下观察,结果为革兰氏阴性细小杆菌,有细长、杆状的菌体(图 2)。

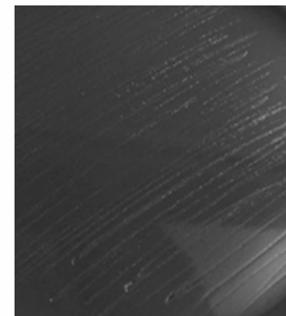


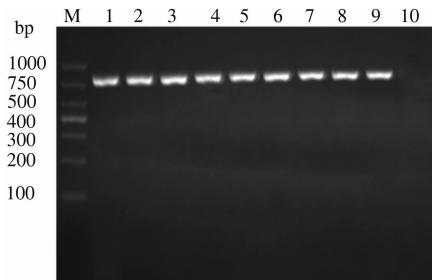
图 1 病原菌在巧克力琼脂平板的菌落形态



图 2 病原菌革兰氏染色镜检结果(1 000 ×)

## 2.2 病原菌 PCR 鉴定结果

对 2.1 中筛选获得的 12 株疑似 HPS 菌株的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 12 株菌株均能扩增出预期 821 bp 的目的条带, 且与标准株 SH0165 位置一致(图 3), 鉴定为 HPS 阳性, 初步确定为 HPS。



M: DL1000 DNA Marker; 1: LY - 1 株; 2: ZJ - 1 株;  
3: NY - 1 株; 4: HB - 1 株; 5: XX - 1 株; 6: SQ - 1 株; 7: KF - 1 株;  
8: DF - 1 株; 9: 阳性对照 SH0165 株; 10: 阴性对照

图 3 HPS 分离株 16S rRNA 基因 PCR 扩增电泳

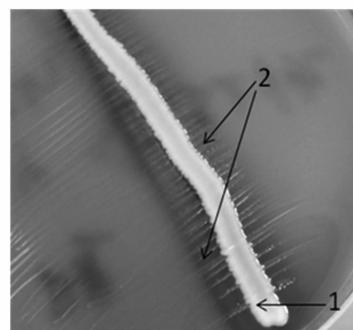
## 2.3 病原菌卫星试验结果

分离 HPS 菌株离金黄色葡萄球菌菌苔越近的菌落长势越好, 越远的菌落越小甚至未出现菌落, 呈卫星生长现象(图 4)。

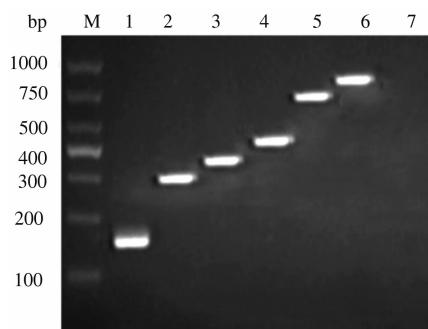
## 2.4 病原菌多重 PCR 鉴定血清型结果

对 HPS LY - 1、NY - 1 株等 12 株分离株进行血

清型鉴定, 结果见图 5。由图 5 可知, HB - 1、XX - 3 株扩增出约 180 bp 的目的片段, 与 *funB* 基因大小一致, 鉴定为血清 1 型; XX - 4 株扩增出约 295 bp 的目的片段, 与 *wzx* 基因大小一致, 鉴定为血清 2 型; JZ - 1 株扩增出约 320 bp 的目的片段, 与 *wciP* 基因大小一致, 鉴定为血清 4 型; LY - 1、KF - 1、DF - 1、XX - 2 株扩增出约 450 bp 的目的片段, 与 *wcuK* 基因大小一致, 鉴定为血清 5 型; XX - 1、SQ - 2 株扩增出约 490 bp 的目的片段, 与 *funQ* 基因大小一致, 鉴定为血清 7 型; NY - 1 株扩增出约 840 bp 的目的片段, 与 *gltP* 基因大小一致, 鉴定为血清 13 型。SQ - 1 株未能扩增出任何片段, 鉴定为不可分型(NT)。HPS 分离株详细信息见表 2。



1: 金黄色葡萄球菌; 2: HPS  
图 4 分离病原菌的卫星生长现象



M: DL1000 DNA Marker; 1: HB - 1 株; 2: XX - 4 株;  
3: JZ - 1 株; 4: LY - 1 株; 5: SQ - 1 株; 6: NY - 1 株; 7: SQ - 1 株

图 5 HPS 分离株血清型鉴定 PCR 扩增结果

表 2 病原菌分离株命名、来源、血清分型

菌株名称	样品来源	分离脏器	血清型	菌株名称	样品来源	分离脏器	血清型
LY - 1	洛阳	肺	5	NY - 1	南阳	肺	13
DF - 1	登封	肺	5	XX - 3	新乡	肺	1
XX - 1	新乡	肺	7	HB - 1	鹤壁	肺	1
XX - 2	新乡	肺	5	XX - 4	新乡	肺	2
JZ - 1	焦作	淋巴结	4	KF - 1	开封	肺	5
SQ - 1	商丘	肺	NT	SQ - 2	商丘	肺	7

## 3 结论与讨论

HPS 是一种革兰阴性细菌且具有宿主特异性,

是猪革拉瑟氏病的病原菌, 在临幊上常引起以多发性浆膜炎、关节炎和脑膜炎为特征的全身感染性疾病<sup>[10-11]</sup>。近年来, 由 HPS 感染导致猪革拉瑟氏病的

发病率和死亡率显著上升,给养猪业造成巨大的经济损失。猪革拉瑟氏病在临床诊断中十分常见,但其病原菌的分离比较困难,原因主要有以下 3 个方面:病料方面,从病料中分离该菌的最佳时间是 12 h 内,但临床分离一般都会超过最佳分离时间,所以不易分离病原菌,且病料采集部位也会影响分离率;HPS 生长特性方面,该菌生长条件严苛,培养基中必须添加 NAD 和血清才能生长,培养 48 h 菌落才明显可见,且在分离培养时,易被其他细菌掩盖或污染,导致分离失败;临床药物使用方面,临幊上对于副猪嗜血杆菌病的防治大多会使用抗生素,对于使用过抗生素的病猪,更不易分离病原菌。本研究针对以上原因,采取了以下方法分离 HPS,采集 HPS 易感染的肺支气管和淋巴结等部位的新鲜病料,并且分离时要避免污染;分离培养时,初步分离使用巧克力琼脂培养基,挑取灰白色圆润针尖状菌落进行纯化,纯化后镜检再进行 PCR 扩增鉴定。

HPS 经典血清型分型方法是琼脂扩散试验,但由于阳性血清不易制备,不可分型比率高,所以逐渐被多重 PCR 分型方法取代。Ma 等<sup>[5]</sup>在 2016 年运用多重 PCR 方法和琼脂扩散法对中国分离株进行血清型分型,两者分型结果一致,主要流行菌株血清型是 4、5、7、13、NT 型(不可分型),且多重 PCR 分型方法明显降低 NT 的比率。Jia 等<sup>[7]</sup>在 2017 年运用经典分型法和多重 PCR 分型法对 2007—2015 年南方 HPS 分离株进行血清型鉴定,结果表明,这 2 种方法鉴定的主要流行血清型结果一致,南方流行血清型为 2、4、5、12、13、NT 型。魏兴良<sup>[11]</sup>等于 2013 年对四川省 HPS 进行分离鉴定,结果显示,四川存在血清型有 4、5、10、12、13、NT 型。王乐<sup>[3]</sup>研究表明,河南省 2010—2012 年流行菌株血清型是 4、5、12、13、14 型。本研究分离的 HPS 血清型为 1、2、4、5、7、13 型,其中 1 型、5 型和 7 型为主要血清型,与 2016 年国内流行菌株相比,河南省存在血清型 1 型和 2 型,与 2014 年河南省流行趋势相比,5 型依旧为主要血清型,但也存在差异,强毒血清型 1 型为新增流行血清型,中等毒力血清型 2 型,不致病血清型 7 型也都存在。本研究结果表明,除 5 型外,1 型可能为河南省 HPS 血清型新的流行趋势。近几年,血清 7 型的临床分离率也逐渐升高<sup>[12-13]</sup>,Ma 等<sup>[5]</sup>从发生副猪嗜血杆菌病的临床病例中分离到了血清 7 型,之前研究表明,血清 7 型为不致病血清型,其致病特性有待进一步研究<sup>[12]</sup>。

本研究从河南省采集的病料中成功分离 12 株

HPS,血清型分别是 1、2、4、5、7、13、NT 型,不同地区血清型不同,证实了 HPS 血清型存在区域性,提示要针对本地区流行菌株的血清型使用对应的疫苗,从而进行有效的预防和治疗。

#### 参考文献:

- [1] 谷禹.天津地区副猪嗜血杆菌病的流行病学调查及其防治措施的制定[D].长春:吉林大学,2016.
- [2] 王治方,焦文强,张青娴,等.规模化猪场副猪嗜血杆菌、多杀性巴氏杆菌和化脓隐秘杆菌控制性研究[J].山西农业科学,2018,46(7):1181-1185.
- [3] 王乐.副猪嗜血杆菌的分离鉴定及生物学特性研究[D].洛阳:河南科技大学,2014.
- [4] 李大鹏.副猪嗜血杆菌病重组亚单位疫苗候选抗原蛋白的免疫保护效力评价[D].哈尔滨:中国农业科学院,2016.
- [5] Ma L,Wang L,Chu Y,et al. Characterization of Chinese *Haemophilus parasuis* isolates by traditional serotyping and molecular serotyping methods [J]. PLoS One, 2016, 11 (12):e0168903.
- [6] Howell K J,Peters S E,Wang J,et al. Development of a multiplex PCR for rapid molecular serotyping of *Haemophilus parasuis* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2015,53(12):3812-3819.
- [7] Jia A,Zhou R,Fan H,et al. Development of serotype-specific PCR assays for typing of *Haemophilus parasuis* circulating in southern China[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2017,55(11):3249.
- [8] Oliveira S, Galina L, Pijoan C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2001,13(6):495-501.
- [9] 池晶晶,杨春蕾,张莉,等.天津地区副猪嗜血杆菌的分离鉴定及敏感药物筛选[J].中国畜牧兽医,2015,42(5):1306-1310.
- [10] 司振书,王桂英.副猪嗜血杆菌病研究进展[J].中国畜牧兽医,2011,38(6):179-182.
- [11] 魏兴良,董敏,张禄滑,等.四川省部分地区副猪嗜血杆菌的分离鉴定及 *espp2* 基因序列分析[J].中国兽医学报,2015,35(1):42-49.
- [12] Wang Z,Zhao Q,Wei H,et al. Prevalence and seroepidemiology of *Haemophilus parasuis* in Sichuan province, China[J]. Peer J,2017,5(9):e3379.
- [13] 江军,姜平,王一成,等.浙江省副猪嗜血杆菌血清型调查及其潜在毒力相关基因分析[J].畜牧与兽医,2016,48(8):1-7.