

副猪嗜血杆菌的流行病学研究及人工感染猪病理学观察

朱国良¹ 金福源^{2*} 陆晓健³ 徐国东²

1.江苏省苏州市吴江区动物卫生监督所盛泽分所,江苏苏州 215200;

2.江苏省苏州市吴江区动物卫生监督所,江苏苏州 215200;

3.苏州上方山森林动物世界,江苏苏州 215000

摘要 2016年3月-2017年11月,选取患病仔猪165头进行细菌分离培养试验,并使用副猪嗜血杆菌的分离株对断奶仔猪进行人工感染,以研究该病原的病理学特征。试验结果表明,检测的165份病例中,有83份病例分离出了革兰氏阴性小球杆菌,阳性率达50.3%。副猪嗜血杆菌病在秋季和冬季的发病率比春季和夏季高,且31~50日龄的猪发病率最高;在仔猪全身的各个组织脏器的内,都能够分离出副猪嗜血杆菌。

关键词 副猪嗜血杆菌;流行病学;人工感染;病理学

副猪嗜血杆菌病主要通过呼吸系统传播,尤其是猪群中有繁殖呼吸综合症、流感或地方性肺

炎发生的条件下,该病的发病率更高。发病与饲养环境的关系较大,在环境卫生条件差、缺少水源的

收稿日期:2018-03-30

* 通讯作者

朱国良,男,1968年生,兽医师。

4 结 论

高脂饲料中添加中草药 A 和 B 对草鱼生长性能没有显著影响,可以促进肝脏功能,提高养殖过程中的存活率。中草药 A 和 B 可以提高草鱼抗嗜水气单胞菌感染能力,增强鱼体的免疫机能,说明发酵中草药可以添加到草鱼饲料中。

参 考 文 献

[1] 仇登高,陈礼强.中草药饲料添加剂在我国水产中的应用[J].北京水产,2007(4):56-58.

[2] 靳二辉,陈耀星,周金星,等.黄芪、枸杞、金银花等中草药复方制剂对肉鸡免疫器官发育及免疫功能的影响[J].畜牧兽医学报,2017(6):1128-1139.

[3] 张盈娇,夏陈,曾晓丹,等.饲料中添加复方中草药对史氏鲟肝脏保护作用的研究[J].饲料工业,2011(12):12-14.

[4] 黄凯,吴宏玉,朱定贵,等.饲料脂肪水平对凡纳滨对虾生长、肌肉和肝胰腺脂肪酸组成的影响[J].水产科学,2011(5):249-255.

[5] 林紫薇,汤菊芬,简纪常,等.复方中草药在罗非鱼养殖中的安全

性评价[J].广东海洋大学学报,2017(3):43-48.

[6] 李小梅,劳惠燕,王蔚森,等.复合中草药对草鱼生长性能和非特异性免疫功能的影响[J].粮食与饲料工业,2013(12):49-51.

[7] WU Y S, CHEN Y Y, UENG P S, et al. Effects of medicinal herbs "Plantago asiatica", "Houttuynia cordata" and "Mentha haplocalyx" on non-specific immune responses of cobia (*Rachycentron canadum*) [J]. Fish & shellfish immunology, 2016, 58: 406-414.

[8] 韩光明,王爱民,徐跑,等.饲料脂肪水平对吉富罗非鱼体脂沉积及脂肪酸组成的影响[J].中国水产科学,2011(2):338-349.

[9] 郭小泽. 饲料中非蛋白能量源对草鱼脂肪蓄积及脂肪代谢的影响研究[D].武汉:华中农业大学,2013.

[10] 林洁荣,刘庆华.中草药制剂对鳊鱼肠绒毛高度和肝细胞的影响[J].中国畜牧兽医文摘,2015(11):218-219.

[11] 杜震宇. 养殖鱼类脂肪肝成因及相关思考 [J]. 水产学报,2014(9):1628-1638.

[12] 彭墨. 饲料脂肪水平和脂肪酸组成对大菱鲂幼鱼脂沉积的影响[D].青岛:中国海洋大学,2014.

[13] MO W Y, LUN C H I, CHOI W M, et al. Enhancing growth and non-specific immunity of grass carp and Nile tilapia by incorporating Chinese herbs (*Astragalus membranaceus* and *Lycium barbarum*) into food waste based pellets [J]. Environmental pollution, 2016, 219: 475-482.

情况下,发病率高。此外,断奶、转群、驱赶或运输等应激因素也是常见的致病因素。副猪嗜血杆菌能够作为继发病原与其他疾病发生混合感染,常见的混合感染疾病是地方性猪肺炎。通常副猪嗜血杆菌要与猪繁殖与呼吸综合征、圆环病毒、猪流感和猪呼吸道冠状病毒等细菌或病毒共同作用才能诱发猪肺炎。副猪嗜血杆菌能够感染 2 周龄至 4 月龄的猪,其中在断奶前后以及保育阶段的发病率最高,病情严重时死亡率高。急性感染的患病猪主要是膘情良好的猪,患病猪体温上升至 41.0 ℃ 左右、精神萎靡、食欲不振,呼吸不畅、呈腹式呼吸,皮肤表面呈红色或显苍白,耳朵呈紫色,眼睑肿胀,行走困难,共济失调,腕关节、跗关节处有明显的肿胀,在发生死亡前侧躺或表现出神经症状,部分患病猪没有明显的临床症状就发生死亡。保育猪通常是慢性发病,表现为食欲不振,咳嗽,被毛杂乱,行走困难,直至衰竭而亡。

副猪嗜血杆菌是一种革兰氏阴性细小杆菌,在病原中分离出的菌株形态不同,大多数为球杆状或者是双球状,少数呈短链状。副猪嗜血杆菌属于猪上呼吸道的正常菌群,但在一定条件下能够通过鼻黏膜引发全身性感染。解剖病死猪可见病猪的肺脏、心脏、脾脏等多个组织器官病变,表现为多发性浆膜炎、脑膜炎及支气管肺炎^[1]。

本文对几个地区的患病猪进行细菌分离培养试验,并进行 PCR 检测,以了解副猪嗜血杆菌在我国的流行情况。选用的样品取自 2016 年 3 月 -2017 年 11 月,共 165 头患病仔猪,采集其肺脏进行试验、检测。另外,本文使用副猪嗜血杆菌的分离株对断奶仔猪进行人工感染,以研究该病原的病理学特征。

1 材料与方法

1.1 副猪嗜血杆菌的流行病学研究

1) 样品及材料。取自 2016 年 3 月 -2017 年 11 月期间的 165 头患病猪,分别来自于江苏、辽宁、安徽、广西、山东、江西、河南的猪场。Taq 酶、dNTPs、MgCl₂、10 × buffer、TSAS、培养基。

2) 资料收集。对患病猪场中的饲养人员进行询问,并观察现场情况,充分了解患病猪的临床表现、日龄、发病时间、猪场中的发病率和死亡率、发病前后的饲养管理条件以及治疗情况等。同时解剖患病

仔猪,检查其脏器的组织病变。

3) 细菌分离。无菌条件下,采集病变的肺部组织,接种在 TSAS 平板或巧克力琼脂平板上,在 37 ℃ 的环境下恒温培养 48 h,挑选菌落进行革兰氏染色,观察结果,置于 4 ℃ 下保存备用。

4) 细菌 DNA 提取。将分离菌悬浮液离心,弃上清液,静置沉淀后使用溶菌缓冲液重悬,在 56 ℃ 下作用 30 min,再煮沸 15 min 后收集上清液,置于 20 ℃ 下保存备用。

5) PCR 反应。在 94 ℃ 5min (预变性),94 ℃ 30 s (变性),60 ℃ 30 s (退火),72 ℃ 45 s (延伸) 下 30 个循环,最后在 72 ℃ 下延伸 10 min。将扩增后的 PCR 样品置于琼脂糖凝胶中电泳^[2]。凝胶用溴化乙啶染色,并在紫外线透射下观察。

1.2 副猪嗜血杆菌的病理学观察

1) 试验材料。6 头 25 日龄的 HPs 抗体阴性断奶仔猪,副猪嗜血杆菌分离株。

2) 动物感染。仔猪隔离饲养一段时间,观察 3 d,如果没有异常情况发生,将 6 头仔猪随机分成 2 组 (A 组、B 组),每组 3 头,A 组为试验组,编号 A-1、A-2、A-3;第 2 组为对照组,编号 B-1、B-2、B-3,将 A、B 2 组分别饲养。在进行动物感染前,要对体温进行观测,随后采集鼻拭子涂布平板,并采集血液分离血清。试验组仔猪每头滴鼻使用副猪嗜血杆菌分离株菌液进行感染,采用滴鼻的方式,每头猪 1 mL;B 组对照组,使用每头滴鼻 1 mL PBS。滴鼻感染后,密切观察仔猪的情况,每天记录临床症状和体温变化。如果发现有仔猪患病,应进行解剖检验,并采集血液及各脏器,制作切片。同时对病变组织器官进行细菌分离和 PCR 检测。

3) 细菌分离与鉴定。解剖患病猪,取腹水、心包液、心血、肺、脾、肾、淋巴结、气管等,在无菌条件下,划线在巧克力平板上,24 ~ 48 h 后观察分离细菌的情况,并进行 PCR 检测。

4) 组织切片的制作和观察方法。将采集的脏器组织固定,并制作成石蜡切片、使用 HE 染色后,置于显微镜下观察病变情况。此外,使用原位杂交的方法检测组织切片中细菌感染的不同位置。

2 结果与分析

2.1 副猪嗜血杆菌的流行病学研究结果

1) 细菌分离与鉴定。检测的 165 份病例中,有

83 份病例分离出了革兰氏阴性小球杆菌,菌落为无色透明、表面潮湿、光滑、呈露珠状,老龄培养物的形态多样,有细小杆状、短链状以及长丝状。用 HPs 的特异性引物进一步进行 PCR 扩增^[1],根据结果可知,83 份病例均为副猪嗜血杆菌感染,阳性率达 50.3%。

2)不同时间段送检样品的检测结果。从表 1 可以看出,副猪嗜血杆菌病在秋季和冬季的发病率比春季和夏季高。

表 1 不同时间副猪嗜血杆菌病的阳性率

送检时间	检测数量/头	阳性数量/头	阳性比例/%
2016.3-2016.7	22	8	36.4
2016.8-2016.11	37	22	59.5
2016.12-2017.3	18	11	61.1
2017.4-2017.8	42	21	50.0
2017.9-2017.11	46	21	45.7
总计	165	83	50.3

3)不同日龄猪的发病情况。由表 2 可知,31~50 日龄的猪发病率最高,达 76.5%。

表 2 不同日龄猪的阳性率

日龄	阳性率/%
0~30	12.3
31~50	76.5
51~80	9
81 以上	2

2.2 人工感染猪病理学观察结果

1)人工感染后临床症状。试验组仔猪在接种 7 h 后,开始表现出临床症状,精神不振,挤堆、嗤鼻等;接种 24 h 后,试验组仔猪流鼻涕,打喷嚏,被毛杂乱无光泽;接种 120 h 后,临床症状加重,表现为嗤鼻、聚堆、皮肤表面无光泽、被毛杂乱、精神不振、体重降低、摇晃、食欲下降。其中 A-3 号仔猪发生腹泻的现象,并呈现腹式呼吸,A-2 号仔猪颤抖、也有腹式呼吸的症状,并且 A-2 号、A-3 号仔猪出现了体

温上升的情况,能够达到 41 ℃左右。对照组 3 头仔猪的体温正常,也没有明显的临床症状。

表 3 6 组仔猪临床症状表现

观察指标	A-1 号	A-2 号	A-3 号	B-1 号	B-2 号	B-3 号
体温上升	无	有	有	无	无	无
呼吸困难	有	有	有	无	无	无
神经症状	有	有	有	无	无	无
关节肿大	有	有	有	无	无	无
腹泻	无	无	有	无	无	无

2)人工感染后仔猪的解剖病变。对照组 3 头仔猪没有明显的病理变化,试验组仔猪表现出了程度不等的病理变化,具体为:A-3 号仔猪出现严重的胸腹腔纤维素渗出,多个脏器发生黏连,腹水增多,心包腔内有大量的纤维蛋白,并发生严重的凝集反应,肺尖叶和心叶发生病变,肝脏出血,脑充血;A-2 号仔猪的脏器有纤维素沉着,肺部病变,但病变的程度较轻;A-1 号仔猪的肝脏表面有白色坏死灶,肺脏出血,其他器官没有明显的病变。

3)细菌分离与鉴定。在仔猪全身的各个组织脏器内,都能够分离出副猪嗜血杆菌。

3 小 结

副猪嗜血杆菌是猪上呼吸道的正常菌群,但在一定条件的作用下,能够突破鼻黏膜的保护侵害猪只,令猪患病,并且造成较高的经济损失。本研究对该病流行病学和人工感染的防治提供指导作用。

参 考 文 献

- [1] 索青利,郭小参,阮坤祥,等.副猪嗜血杆菌病的流行病学及临床诊断[J].养猪,2016(4):3-4.
- [2] 尹秀凤.副猪嗜血杆菌流行病学与人工感染猪病理学研究[D].南京:南京农业大学,2005.
- [3] 杨春蕾,池晶晶,张莉,等.天津部分猪场副猪嗜血杆菌的分离鉴定[J].动物医学进展,2016,37(3):63-66.