

黄银云,胡新岗,郭广富,等.一例副猪嗜血杆菌病的综合诊断[J].江苏农业科学,2016,44(6):333-335.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.095

一例副猪嗜血杆菌病的综合诊断

黄银云,胡新岗,郭广富,徐婷婷

(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300)

摘要:以苏北地区某个体猪场疑似副猪嗜血杆菌感染的病猪为对象,从流行病学调查、临床症状观察、病理变化剖检、病原菌株分离鉴定、药敏试验等多方面和多手段开展综合诊断,确诊为副猪嗜血杆菌病。

关键词:副猪嗜血杆菌;分离;鉴定;PCR

中图分类号: S858.28 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0333-02

副猪嗜血杆菌病是由猪上呼吸道常在菌副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, Hps)引起的一种猪细菌性传染病,该病由德国专家格拉泽氏(Glasser)于1910年首次报道,故也被称为猪格氏病(Glasser disease)^[1]。副猪嗜血杆菌病常见于5~8周龄断奶后及保育阶段的猪,发病率约为15%,病猪临床主要表现为消瘦、发热、呼吸困难、咳嗽、跛行、共济失调等,剖检病变主要为纤维索性胸膜炎、心包炎、关节炎、脑膜炎。临床上该病多继发于猪圆环病毒病、猪繁殖与呼吸综合征或与其混合感染,病死率可达50%,对仔猪和青年猪构成了极大威胁。随着世界养猪业的规模化、集约化发展,该病已成为严重危害养猪业而备受关注的典型细菌性传染病之一^[2-4]。本试验结合临床病例开展了副猪嗜血杆菌病的动物流行病学、病原学、病理学、分子生物学综合诊断实践,以期为养猪生产中及时有效地诊断与监控该病提供可行方法。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 无菌采集苏北地区某个体猪场疑似副猪嗜血杆菌病病猪具有典型病变的心包液、胸膜积液、肺组织。

1.1.2 培养基与主要试剂 胰酪胨大豆琼脂培养基(TSA-YE)、胰蛋白胨大豆酵母肉汤培养基(TSB-YE)为绍兴天恒生物科技有限公司产品。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、微量生化反应管、药敏纸片购自杭州微生物试剂公司。PCR反应试剂由宝生物(大连)有限公司提供,细菌DNA抽提试剂盒为上海生工生物工程技术有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 流行病学调查 通过查看猪场养殖档案,掌握猪场的免疫程序、消毒措施、用药情况、治疗效果等,约谈猪场工作人员以了解猪群日龄、进场时间、发病时间、饮食情况、管理水平。深入猪舍进行群体观察和个体检查,调查猪场周围环境及当地气候变化,为副猪嗜血杆菌病的正确诊断提供流行病学依据。

1.2.2 临床症状观察 重点观察患猪的发育情况、呼吸状态、行走姿态、体表颜色、关节形态等有无异常。

1.2.3 病理剖检 常规剖检病死猪,重点观察肝脏、脾脏、心脏、肺脏、肾脏、淋巴结有无异常,胸腔有无积液、纤维索性渗出物,关节有无积液。

1.2.4 细菌分离培养 无菌采集心包液、胸水、腹水及肺、脾的病变组织,分别划线接种于添加NAD的TSA培养基、不添加NAD的TSA及TSB培养基,烛缸法37℃下培养18~24h。

1.2.5 组织触片镜检 无菌采集心血、胸水、腹水、肺组织制作抹片或触片,革兰氏染色并镜检。

1.2.6 卫星现象观察 挑取分离菌纯培养物水平划线接种于TSA培养基,再挑取金黄色葡萄球菌于培养基中央垂直划1条线,置于37℃下培养48h,观察培养结果。

1.2.7 分离株生化试验 将分离菌株纯培养物分别接种于预加入5μL 0.01% NAD的麦芽糖、葡萄糖、半乳糖、棉籽糖、蜜二糖、L-阿拉伯糖、乳糖、蔗糖、木糖、果糖、核糖、吡啶、接触酶、氧化酶、脲酶等微量生化反应管^[5],以烛缸法于37℃下培养48h,观察结果。

1.2.8 PCR引物设计 根据文献[6]中的方法,按照副猪嗜血杆菌16S rRNA的基因序列合成1对引物,目的基因片段大小为822 bp,由上海生工生物工程技术有限公司合成。上游引物序列为:5'-GTGATGAGGAAGGGTGGTGT-3';下游引物序列为:5'-GGCTTCGTCACCCTCTGT-3'。

1.2.9 PCR检测 PCR反应体系共25μL:上下游引物各1.0μL(均为10 pmol/μL)、菌液2.0μL、MgCl₂ 1.5μL(25 mmol/L)、缓冲液2.5μL(不含Mg²⁺)、dNTPs混合物2.0μL(2.0 mmol/L)、Taq DNA聚合酶1.5 U,余量为超纯水。PCR反应条件为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,54℃ 1 min,72℃ 1.5 min,30个循环;72℃延伸10 min。试验设有阴性及阳性对照。对PCR产物进行1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.10 纸片扩散法药敏试验 取适量分离菌株的TSB纯培养物,均匀涂布于含NAD的TSA固体培养基平板。将选取的20种药敏纸片贴于平板内,每皿贴5种,以烛缸法于37℃下培养48h,观察结果。抑菌圈直径大于15 mm为高度敏感,小于10 mm为不敏感或耐药,两者间为中度敏感。

2 结果与分析

2.1 流行病学调查结果

该猪场饲养商品猪400余头,多批次引进导致猪体质量

收稿日期:2015-05-04

基金项目:江苏省高校“青蓝工程”。

作者简介:黄银云(1977—),女,江苏泰州人,硕士,副教授,从事动物疫病防控研究及动物医学教学工作。E-mail:gxh008@qq.com。

大小不一。2015年3月进栏80余头,从未接种过疫苗,阉割约3d后接种了猪瘟、口蹄疫疫苗,随即发病。病猪起初表现为发热、厌食、皮肤发红,之后皮肤发紫、干裂起痂皮;5d左右波及全群,病猪体质量减轻,严重者体质量下降可达15kg,至送检时发病率达80%以上,死亡率约为35%。采用替米考星、氟苯尼考等药物进行治疗,效果不明显。

2.2 临床症状

临床检查可见病猪被毛粗乱、精神沉郁、食欲不振或废食、体温升高至40℃以上,部分病猪腹泻或便秘。发病猪头

颈、腹下、尾部皮肤发红(图1),部分病猪的耳尖至耳背面、腹下、臀部、尾部皮肤发绀或干裂起痂(图2),后肢关节肿大、瘫痪、伏卧不走。病猪消瘦、频繁咳嗽,以腹式呼吸为主。

2.3 病理剖检变化

胸腔大量积液呈淡黄色,心包积液、扩张,心包壁层附着纤维素性渗出物,形成“绒毛心”(图3)。肺脏广泛性肉变,肺间质增宽,弹性变差(图4)。肿大的关节内有较多淡黄色液体(图5)。肠系膜淋巴结肿大、出血、坏死。脾脏肿大,呈暗红色(图6)。



图1 病猪头颈、耳部、胸前皮肤发红



图2 病猪耳背面发绀、起痂



图3 病猪心包壁层附着纤维素性渗出物

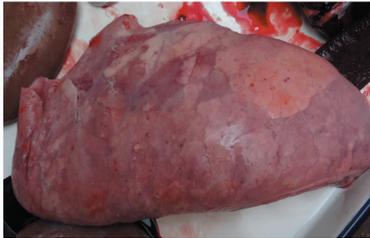


图4 病猪肺脏肿胀、呈肉样变、间质增宽



图5 病猪股关节积液



图6 病猪脾脏肿大呈暗红色

2.4 细菌培养特性

添加NAD的TSA平板上形成的菌落呈针尖状,边缘齐整、圆形隆起、光滑湿润、无色透明,直径约为1mm;未添加NAD的TSA平板上不生长或生长不良。TSB中含NAD时,肉汤均匀浑浊,反之则肉汤透明。可见,该菌株对NDA具有依赖性。

2.5 分离菌株的形态特点

分离菌株革兰氏染色呈阴性,菌体散在或成双、成链,形态不一。菌体细小,呈短小杆菌。

2.6 卫星现象

TSA平板上可见金黄色葡萄球菌线两侧有透明的灰白色露珠样菌落,距线越近菌落越大,距线越远菌落越小,呈典型的“卫星现象”。分离菌株的生长对金黄色葡萄球菌产生的NAD(V因子)具有依赖性,符合副猪嗜血杆菌的生长特点。

2.7 分离菌株的生化特点

分离菌株的生化反应结果见表1。该结果符合副猪嗜血杆菌的生化特性。

表1 分离菌株的生化反应结果

检测项目	葡萄糖	麦芽糖	甘露糖	鼠李糖	乳糖	木糖	果糖	蔗糖	核糖	阿拉伯糖	半乳糖	山梨醇	甘露醇	硫化氢	鸟氨酸脱羧酶	精氨酸水解酶	氧化酶	接触酶	吡啶酶	脲酶	硝酸盐还原试验	V.P.试验	靛基质
结果	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-

注:“+”、“-”分别表示阳性、阴性。

2.8 PCR检测结果

以分离菌株的抽提DNA为模板进行PCR检测,得到副猪嗜血杆菌目的基因片段,片段大小为822bp(图7),与预期结果相符。

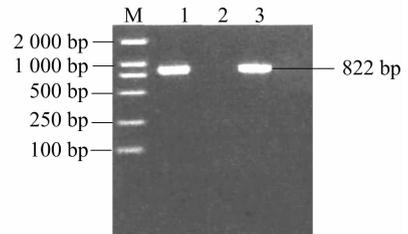
2.9 药敏试验结果

分离菌株对头孢噻呋、头孢他啶、头孢唑啉、头孢噻吩、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢曲松高度敏感,对强力霉素、丁胺卡那、安普霉素、红霉素、庆大霉素、四环素中度敏感,对青霉素G、氨苄西林、链霉素、替米考星、氟苯尼考、复方新诺明、新霉素均不敏感。

3 结论与讨论

副猪嗜血杆菌定居于猪上呼吸道,属于条件性致病菌,有

15个以上血清型^[7]。临床上须对患猪全身各病变部位广泛采样,才能准确诊断该病。该猪场对仔猪群体阉割时不重视



M—2 000 bp DNA marker, 1—阳性对照, 2—阴性对照, 3—引物扩增结果

图7 分离菌株PCR检测电泳结果

赵忠添,张益峰,陆专灵,等. 山瑞鳖小水体无沙养殖试验[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):335-337.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.096

山瑞鳖小水体无沙养殖试验

赵忠添¹, 张益峰¹, 陆专灵¹, 黎建斌¹, 苏光雅²

(1. 广西水产科学研究院, 广西南宁 530021; 2. 广西南宁盛满源水产畜牧有限公司, 广西南宁 530008)

摘要:挑选体质量为8~10 g的鳖苗50只,人工设置(28±1)℃的恒温条件,以棕榈片代替泥沙作为隐蔽物,营造自然生态环境,用鱼肉和配合饲料拌合投喂,对山瑞鳖进行无沙养殖对比试验。养殖1年,收获山瑞鳖48只,平均体质量为1.53 kg,成活率为96.0%,比有沙恒温养殖的平均体质量多0.9 kg,提高70.0%;成活率为80.0%,提高20.0%;比有沙常温养殖的平均体质量多0.4 kg,提高282.5%,成活率为75%,提高28.0%,养殖效果显著。采取棕榈片代替泥沙进行山瑞鳖无沙养殖,具有设施简易、水质易于调控、投喂方便、易于管理等优点,鳖苗摄食均匀,生长快、成活率高,为城乡居民开展山瑞鳖的庭院养殖提供依据。

关键词:山瑞鳖;无沙养殖;棕榈片;成活率;生长速度

中图分类号: S966.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0335-03

山瑞鳖(*Palea steindachneri*)别称山瑞、瑞鱼,属龟鳖目鳖科山瑞鳖属,是国家二级野生保护动物,主要分布于我国广西壮族自治区、云南省、贵州省、广东省等南方山区,其中以广西壮族自治区的自然分布量最多。山瑞鳖食性杂、个体大、产量高、养殖效益高,是当前鳖类养殖的热门品种之一,已发展成

收稿日期:2015-05-20

基金项目:广西直属公益性科研院所基本科研业务专项(编号:GXIF-2012-10);广西水产畜牧兽医局科技计划(编号:桂渔牧科1304530);南宁市西乡塘区农业科技攻关项目(编号:西科发2013303)。

作者简介:赵忠添(1966—),男,广西南宁人,副研究员,主要从事龟鳖繁育技术研究。E-mail:scsztt@163.com。

消毒,阉割后几天内进行疫苗接种,造成仔猪抵抗力下降,进而感染发病。该猪场引入的苗猪质量不一,混群饲养,给防疫造成了很大困难,且发病时未及时发现隔离病猪,自行诊断用药,这不仅是缺乏防疫意识的表现,也是使猪场发病率高达80%的重要原因。应执行自繁自养、全进全出制度,每购进一批苗猪必须隔离饲养并观察一段时间,确认无传染性疫病、不携带病原后方可混群饲养。进猪的首周内循序渐进更换饲料,加强饲养管理,严格进行预防性消毒,减少应激因素,使猪充分适应新环境。待猪完全适应并恢复正常生活后再进行阉割、接种等工作。

副猪嗜血杆菌病属于细菌性传染病,理论上诊断该病最有效、最准确的方法为分离鉴定菌株。然而,副猪嗜血杆菌对营养的要求较高^[8],故分离成功率一般不高;病猪是否用药也有很大影响,使用过抗生素的病猪病原分离率较低;在实践中,分离副猪嗜血杆菌的技术要求较高,耗时耗材。PCR技术具有快速、准确、灵敏度高、可靠性强的特点,在疫病诊断中辅以PCR检测可极大提高准确率。

临床治疗副猪嗜血杆菌病时,应避免盲目、超剂量、单一长期用药,最好于发病早期进行药敏试验,选择高敏药物并全群按疗程注射给药,避免治疗不彻底及过度治疗。如果药物用足疗程仍不见效,应及时更换药物,西药无效时可尝试中药

为广西壮族自治区特色养殖品种,年产值达3亿元,养殖前景广阔。山瑞鳖栖息于泥沙中,具有喜静怕惊、好打斗的习性,常因相互争夺食物和地盘引起斗咬;山瑞鳖属变温动物,具有冬眠的习性,生长温度为22~31℃,最适水温26~29℃,水温低于15℃便进入冬眠^[1]。目前,山瑞鳖的常规养殖方法是在泥沙厚度10 cm的水池中放养鳖苗,保持水深5~30 cm,投喂鱼糜和配合饲料,10~15 d换水1次,根据水质变化情况适时换水。由于鳖苗躲在泥沙中,饥饿时才出来觅食,导致摄食少、生长慢;由于温度低,饲料转化率低,10 g左右的鳖苗养至1 kg的中鳖需要2~3年,养成5 kg的商品需要5年;且水质不易控制,常因细菌滋生诱发疾病,从8~10 g的鳖苗养成1 kg的中鳖成活率不到70%,制约了山瑞鳖养殖产业的发

治疗。临床用药要有整体观念,治疗副猪嗜血杆菌病时,采用抗生素消灭细菌是手段,使猪康复是根本目的;因此,治疗时须综合考虑抗菌、抗炎、抗过敏、退热、防脱水、维持机体水电平衡各个方面,以获得良好的临床效果。

参考文献:

- [1] 蔡宝祥. 家畜传染病学[M]. 4版. 北京:中国农业出版社,2001:144-146.
- [2] 斯劳特,阿莱尔,蒙加林,等. 猪病学[M]. 8版. 北京:中国农业科学技术出版社,2000:357-367.
- [3] 陈博言. 兽医传染病学[M]. 北京:中国农业出版社,2006:264-265.
- [4] 周斌,储岳峰,李超,等. 华东地区副猪嗜血杆菌的分离、血清型鉴定与药敏分析[J]. 畜牧与兽医,2009,41(11):84-86.
- [5] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:125.
- [6] 万世平,王建,葛菲菲,等. 副猪嗜血杆菌PCR检测方法的建立与初步应用[J]. 动物医学进展,2009,30(1):9-12.
- [7] 薛国聪,徐成刚,涂玉蓉,等. 副猪嗜血杆菌的分离鉴定与药敏试验[J]. 中国畜牧兽医,2010,37(1):134-137.
- [8] 仇微红,张盼锋,郭世宁. 副猪嗜血杆菌的分离鉴定及中药药敏试验[J]. 动物医学进展,2009,30(2):53-55.