

恽佳蕾,毛立,杨蕾蕾,等. 山羊副流感病毒 3 型和巴氏杆菌混合感染的诊断与病原分离鉴定[J]. 江苏农业科学,2021,49(11):124-127.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.11.022

山羊副流感病毒 3 型和巴氏杆菌混合感染的 诊断与病原分离鉴定

恽佳蕾^{1,2}, 毛立¹, 杨蕾蕾¹, 何苗峰^{1,3}, 李文良^{1,2,3}, 张纹纹¹, 孙敏¹, 刘茂军^{1,2,3}

(1. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地,江苏南京 210014;2. 江苏大学食品与生物工程学院,江苏镇江 212013;3. 南京农业大学动物医学院,江苏南京 210095)

摘要:随着规模化养羊业的发展,肉羊呼吸道疾病流行普遍、发病严重、防治困难,给养殖业及养殖户造成较大的经济损失。为明确安徽某肉羊养殖场呼吸道疾病的病因,结合流行病学、临床症状、剖检病变观察、细菌学及病毒学检测与分离鉴定以及血清学检测对病因进行分析,结果表明该病是由山羊副流感病毒 3 型与巴氏杆菌混合感染所致。分离菌株对丁胺卡那霉素、氟苯尼考、阿奇霉素、恩诺沙星和头孢曲松敏感,对青霉素、克林霉素和强力霉素不敏感。通过 MDBK 细胞成功分离获得山羊副流感病毒 3 型毒株,其 M 基因片段与已有毒株同源性达 99%。血清学检测也进一步证实病毒的感染。这为临床上科学防控山羊呼吸道疾病提供了指导和借鉴。

关键词:山羊副流感病毒 3 型;巴氏杆菌;呼吸道疾病;混合感染;分离鉴定

中图分类号:S858.27 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2021)11-0124-03

近年来,随着规模化养羊业的发展,肉羊呼吸道疾病流行普遍、发病严重、防治困难,给养殖业及养殖户造成较大的经济损失^[1-3]。研究表明,与牛呼吸道疾病综合征(BRDC)是由多种病毒、细菌感染导致的^[4]类似,临床上肉羊呼吸道疾病的发生可由多种病毒[如山羊副流感病毒 3 型(CPIV3)、小反刍兽疫病毒(PPRV)、呼吸道合胞病毒(RSV)]和细菌性病原(巴氏杆菌、曼氏杆菌、绵羊肺炎支原体、肠外致病性大肠杆菌、链球菌等)单独或混合感染引起,尤其在机体健康状态低下、环境改变、长途运输等应激条件下引起严重的临床症状^[1,3,5-6]。

2020 年 9 月,安徽一山羊养殖场外购育肥山羊(182 头)于到场后 10 d 陆续发生严重的呼吸道疾病,治疗效果较差。发病羊主要表现为发热、咳嗽、流涕、精神萎靡,严重者呼吸困难并出现死亡。剖检 2 只病死羊均可见肺脏严重实变、化脓并与胸腔、

心包膜黏连,胸腔积液,气管出血并充满泡沫与黏液。发病率约 35%,死亡率 8.2%。为查明病因,本研究结合流行病学、临床症状、剖检病变观察、病原学、血清学检测以及病原分离鉴定等方法对病因进行分析,明确致病病原,为该病的防治提供指导和依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

RNA/DNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒,购自 Axygen 公司;一步法 RT-PCR 试剂盒、胎牛血清、DNA 分子量标准 DL2000 plus,购自北京全式金生物科技有限公司;PCR Mix,购自南京诺唯赞生物科技有限公司;血平皿、药敏纸片,购自杭州微生物试剂有限公司;革兰氏染色液,购自北京索莱宝生物科技有限公司;DMEM 培养基,购自 Hyclone 公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 细菌分离鉴定

1.2.1 染色与镜检 取肺、肝组织病料,涂布于绵羊血平板,37℃ 恒温过夜培养,24 h 后取出。挑取典型菌落涂片并进行革兰氏染色、镜检。

1.2.2 细菌 16S rRNA 序列测定 挑取纯化的菌落,采用 16S rRNA 通用引物进行菌落 PCR 扩增,预期扩增片段为 1 500 bp。引物序列如下:F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';R:5'-GGWTACCT

收稿日期:2020-12-06

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(19)3020];国家重点研发计划(编号:2016YFD0500900)。

作者简介:恽佳蕾(1996—),女,江苏无锡人,硕士研究生,从事食源性/人兽共患传染病防控技术研究。E-mail:834462138@qq.com。

通信作者:李文良,博士,研究员,主要动物重要病原感染致病机制与防控技术研究。E-mail:kfliwenliang@163.com。

TGTTACGACTT-3'。反应体系为 20 μ L, 2 \times PCR buffer 10 μ L, 引物各为 1 μ L, 提取的核酸 4 μ L, ddH₂O 4 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增后 PCR 样品于 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳观察结果。用胶回收试剂盒将 PCR 扩增产物纯化后, 送南京擎科生物科技有限公司进行测序并对结果进行 BLAST 分析。

1.2.3 药敏试验 挑取纯化培养的菌落, 涂布血平板, 用纸片法进行药敏试验。37 $^{\circ}$ C 培养一昼夜, 观

察结果, 根据美国临床与实验室标准化协会 (CLSI) M100-S21 标准判定敏感性^[7]。

1.3 病毒与支原体检测

分别取 200 μ L 鼻拭子 (2 份)、肺脏组织匀浆上清 (2 份) 样品, 按照 RNA/DNA 提取试剂盒说明书提取样品中的核酸。分别使用 CPIV3、RSV、PPRV、绵羊肺炎支原体的引物分别进行 RT-PCR 或 PCR 检测 (引物序列如表 1 所示), 一步法 RT-PCR 和 PCR 反应均参照试剂说明书进行。取扩增产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果。

表 1 核酸检测所需引物

检测病原	引物序列 (5'-3')	片段大小 (bp)	退火温度 ($^{\circ}$ C)
CPIV3	F: GCAATCCACCAAAGCATGGGCT; R: GGGCAAGTGCTACTTTTGTAGCA	346	54
RSV ^[8]	F: TGCCAAAACATAACAGAAAG; R: TTTATTCACCTCTCCCTC	426	52
PPRV ^[9]	F: ATTGTCCACTATTGATCCTTGAT; R: TTGTCGTTGTAGACCTGACTGTTG	670	51
绵羊肺炎支原体 ^[10]	F: TGAACGGAATATGTTAGCTT; R: GACTTCATCTGCACTCTGT	361	54

1.4 病毒分离与序列分析

选取 CPIV3 检测阳性的鼻拭子样品, 参照文献 [6] 方法采用 MDBK 细胞进行病毒分离、传代, 观察细胞病变 (CPE) 情况, 检测病毒血凝价。采用 RT-PCR 检测 CPIV3, 将扩增产物送南京擎科生物科技有限公司进行测序并进行 BLAST 分析。

1.5 血清学检测

按照报道的阻断 ELISA 方法^[11] 对发病期 (15 份, 其中 2 份为剖检羊) 和 1 个月 (31 份) 采集的血清样品进行 CPIV3 抗体检测。

2 结果与分析

2.1 细菌分离鉴定

从肺脏、肝脏样品中均分离到单一的透明、湿润、光滑、不溶血的小菌落。染色后镜检可见大量革兰氏阴性杆菌并呈两极着染。菌落 PCR 后电泳结果显示, 得到的扩增的核苷酸片段与预期结果大小相符。测序表明, 该菌株 16S rRNA 基因部分序列与巴氏杆菌同源性最高。药敏试验结果显示, 此菌对丁胺卡那、氟苯尼考、阿奇霉素、恩诺沙星和头孢曲松敏感 (表 2)。

2.2 病毒检测与分离鉴定

结果显示, 2 份鼻拭子和 1 份肺脏样品检测到 CPIV3 为阳性, 而 RSV、PPRV 和绵羊肺炎支原体均未检出 (图略)。

选择阳性的鼻拭子样品经离心、过滤除菌后接

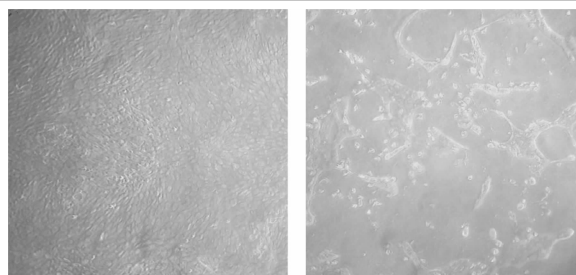
表 2 分离菌株的药敏试验结果

药物名称	抑菌圈直径 (cm)	耐药性
青霉素	0.8	不敏感
克林霉素	0.9	不敏感
强力霉素	1.3	不敏感
庆大霉素	1.7	中度敏感
氟苯尼考	2.1	敏感
阿奇霉素	2	敏感
恩诺沙星	2.2	敏感
丁胺卡那霉素	2.7	敏感
头孢曲松	3.0	敏感

种 MDBK 细胞进行病毒分离, 接种后 4 d 可见细胞出现 CPE, 传代至第二代时 3 d 即可出现明显的 CPE, 5 d 时细胞出现融合、死亡、脱落 (图 1), 与已有报道^[6] 一致。通过血凝试验检测第 3 代病毒血凝价为 128。对第 3 代病毒进行 RT-PCR 检测, 结果为阳性 (图略)。将扩增产物纯化后进行测序, 并进行 BLAST 分析, 与已报道 CPIV3 毒株同源性为 99%。

2.3 CPIV3 抗体检测

采用阻断 ELISA 方法检测采集的血清样品, 结果见图 2。发病早期采集的 15 份血清样品抗体阳性率为 53.33%, 但阻断率不高, 有 6 份样品在临界值 (35%) 左右, 2 份剖检病死羊的血样均为阴性。发病 1 个月后血清抗体阳性率为 96.77%, 绝大多



正常细胞 第二代接毒细胞

图1 分离病毒产生 CPE 情况(100×)

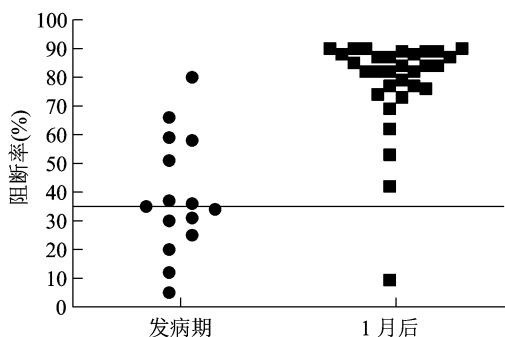


图2 血清 CPIV3 抗体的检测

数阻断率达到 70% 以上,仅有 1 份为阴性。

3 讨论

根据流行病学、临床症状、病理观察和实验室检测,综合判定发病羊场为 CPIV3 和巴氏杆菌的混合感染。建议对发病羊隔离饲养,使用专用的器具与饲料等;对死亡羊尸体及圈舍、粪便等污染物进行无害化处理;对整个羊舍,尤其对发病羊舍及其污染的环境、器具等进行全面消毒,1~2 d/次;对发病羊使用氟苯尼考、氟尼辛葡甲胺和维生素 C 注射治疗,疗程 3~7 d,同时采用氟苯尼考进行全群预防用药 2 次,1 周后病情逐步好转,死亡率显著降低,1 个月后回访已基本恢复正常。

近年来,随着国内养羊规模化、集约化的发展,集约化增加、流通运输频繁,但相应的防疫措施不到位,相关疾病频发,逐渐引起大家关注,其中呼吸道疾病造成的危害最为突出。临床上肉羊呼吸道疾病的发生可由多种病毒和细菌性病原引起,疾病的严重程度与感染病原的致病性、混合感染的程度以及应激、饲养管理等有关。小反刍兽疫致病性强,自 2014 年流行以来已通过疫苗免疫得到有效控制,但仍有散发的病例^[12-13]。养殖户需提高防范意识,做好疫苗免疫,定期监测抗体水平,保证免疫效果。CPIV3 是新近报道的羊源副流感病毒,其流行分布

较广,尚无疫苗和特效药物,应给予重视并采取预防为主措施^[6,14]。此外,根据笔者所在实验室调查发现,绵羊肺炎支原体流行普遍^[15],危害较大且缺乏针对性的疫苗,巴氏杆菌、曼氏杆菌、肠外致病性大肠杆菌等常与之混合感染。针对这些细菌性病原,应重视病原的检测、鉴定,筛选敏感药物进行治疗。本病例中检测到 CPIV3 与巴氏杆菌混合感染,未检测到 PPRV 和绵羊肺炎支原体,该株巴氏杆菌耐药性不强,但养殖户最初使用的是不敏感药物,根据检测结果调整药物并配合对症支持治疗药物后即收到良好的效果,发病率和死亡率明显下降并最终恢复正常。

总之,面对规模化养殖模式下肉羊呼吸道疾病多发难防的问题,养殖户和研究人员均应给予足够的重视,贯彻预防为主的综合防控措施,发病后应结合流行病学和病原学检测科学分析病因并采取针对性的防治方案,最大限度降低造成的损失。

参考文献:

- [1] Chakraborty S, Kumar A, Tiwari R, et al. Advances in diagnosis of respiratory diseases of small ruminants[J]. Veterinary Medicine International, 2014, 2014: 508304.
- [2] 孙宏业. 目前羊流行性呼吸道疾病病因分析[J]. 农民致富之友, 2018(12): 199.
- [3] 胡玉婷, 刀筱芳, 王成龙, 等. 羊呼吸道主要支原体和细菌病原的多重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(5): 416-420, 430.
- [4] 王洪梅, 赵贵莉, 侯佩莉, 等. 牛呼吸道疾病综合征流行现状及防控技术研究进展[J]. 中国畜牧杂志, 2015, 51(16): 33-39.
- [5] 何融泽, 甘霖莉, 杜玉兰, 等. 简述几种山羊的呼吸道疾病[J]. 广西畜牧兽医, 2018, 34(6): 305-306.
- [6] Li W, Mao L, Cheng S, et al. A novel parainfluenza virus type 3 (PIV3) identified from goat herds with respiratory diseases in eastern China[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 174(1/2): 100-106.
- [7] 钟舒红, 吴翠兰, 李军, 等. 一起牛呼吸道疾病综合征的病原分析与药敏试验[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(19): 168-171.
- [8] Eleraky N Z, Kania S, Potgieter L N. The ovine respiratory syncytial virus F gene sequence and its diagnostic application[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2001, 13(6): 455-461.
- [9] 毛立, 窦永喜, 翟军军, 等. 小反刍兽疫病毒 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(6): 593-597.
- [10] Meauliffe L, Hatchell F M, Ayling R D, et al. Detection of mycoplasma ovipneumoniae in pasteurized - vaccinated sheep flocks with respiratory disease in England[J]. The Veterinary Record, 2003, 153(22): 687-688.
- [11] Mao L, Li W, Zhou T, et al. Development of a blocking ELISA for Caprine parainfluenza virus type 3[J]. Journal of Virological Methods, 2017, 250: 59-65.

王礼伟,周 刚,柏传茂,等. 苏淮仔猪腹泻细菌性病原的分离鉴定与耐药性分析[J]. 江苏农业科学,2021,49(11):127-131.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.11.023

苏淮仔猪腹泻细菌性病原的分离鉴定与耐药性分析

王礼伟¹, 周 刚¹, 柏传茂², 杨生明², 郭永久², 唐 炎², 汪国莲¹

(1. 江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所, 江苏淮安 223001; 2. 江苏省金湖县吕良中心畜牧兽医站, 江苏金湖 211600)

摘要: 为了解淮安地区苏淮仔猪出现细菌性腹泻的病因并提供治疗方案, 采集腹泻仔猪的肛拭子样品共 95 份, 对采集的样品进行细菌分离与鉴定、动物致病性鉴定及耐药性分析。结果显示, 本次试验共分离鉴定到 78 株大肠杆菌, 92 株沙门氏菌; 动物致病性试验显示, 大肠杆菌致小鼠死亡率为 65.38%, 沙门氏菌致小鼠死亡率为 95.84%; 药敏试验结果显示, 大肠杆菌耐药率高于沙门氏菌, 且均对青霉素类和林可霉素类高度耐药, 对氟喹诺酮类耐药率最低。多重耐药结果显示, 所有分离菌株均为多重耐药菌株, 大肠杆菌主要表现 8~10 耐, 沙门氏菌主要表现在 6~8 耐。

关键词: 仔猪; 腹泻; 大肠杆菌; 沙门氏菌; 耐药性

中图分类号: S855.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)11-0127-05

仔猪腹泻伴有不同程度的腹泻、脱水、自身免疫力下降, 是仔猪死亡和继发其他疾病的重要原因, 影响养猪生产效率和盈利情况, 给养猪业带来严重的经济损失, 主要体现在发病率高、降低日增质量、延长出栏时间、饲料转化率下降、饲料成本增加等^[1-2]。仔猪腹泻是病原体、肠道环境和管理之间相互作用的结果, 其中病原体的感染是导致仔猪发生腹泻的主要原因, 根据病原体的不同, 细菌引发的可分为埃希氏大肠杆菌、沙门氏菌、产气荚膜梭菌等; 病毒引发的如流行性腹泻病毒、传染性胃肠炎病毒、非洲猪瘟病毒等; 寄生虫引发的如刚地弓形虫、艾美耳球虫等^[3]。鉴于细菌性腹泻在规模化养猪场患病中的普遍性和重要性, 为进一步了解淮安地区苏淮仔猪腹泻细菌性病原流行病学和抗生素耐药情况, 本试验采集腹泻仔猪的肛拭子样本

进行了细菌的分离鉴定、致病力试验及耐药性分析, 旨在为疾病防控、减抗禁抗、食品安全提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 2020 年 1 月至 4 月采集来自淮安地区 3 个苏淮猪养殖场出现腹泻症状的仔猪肛拭子 95 份。发病仔猪主要表现为精神不振、食欲不振、被毛耸乱、拉黄白色稀软或水样粪便等。以灭菌棉拭子采集发病仔猪肛拭样品置于灭菌 EP 中, 保存于 -20 ℃ 冰箱待用。

1.1.2 试验材料 麦康凯琼脂培养基、SS 琼脂培养基、MH 琼脂培养基、MH 液体培养基均购自青岛海博生物技术有限公司; 无菌脱纤维兔血琼脂培养基的制备参考文献^[4]; 兽医临床常用药敏纸片均购自杭州微生物试剂有限公司, 包括红霉素、阿奇霉素、克林霉素、林可霉素、链霉素、庆大霉素、多西环素、四环素、头孢唑啉、青霉素、利福平、氧氟沙星。

1.2 方法

1.2.1 细菌的富集、分离与纯化 将采集的肛拭子接种于 5 mL MH 液体培养基中, 37 ℃ 恒温培养 12 h。然后用接种环按照常规细菌分离方法分别接

收稿日期: 2020-09-08

基金项目: 苏北科技专项科技帮扶项目(编号: SZ-HA2019032); 淮安市农科院科技发展基金项目(编号: HNY202025)。

作者简介: 王礼伟(1989—), 男, 江苏淮安人, 硕士, 助理研究员, 主要从事动物传染病防控及农业科技服务。E-mail: wlv58@sian.cn。
通信作者: 汪国莲, 硕士, 研究员, 主要从事农业科技服务。E-mail: 2567327519@qq.com。

[12] 兰德松, 刘 贺, 王海丰, 等. 辽宁省一起小反刍兽疫疫情的紧急流行病学调查[J]. 中国动物检疫, 2020, 37(10): 1-6.

[13] 王治维, 图门巴雅尔, 胡明明, 等. 2017—2019 年山西省小反刍兽疫血清学和病原学监测[J]. 中国动物检疫, 2020, 37(8): 1-4.

[14] Mao L, Yang L, Li W, et al. Epidemiological investigation and

phylogenetic analysis of caprine parainfluenza virus type 3 in sheep of China[J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2019, 66(3): 1411-1416.

[15] 霍晓丽, 李文良, 毛 立, 等. 绵羊肺炎支原体和小反刍兽疫病病毒双重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(19): 185-189.