

副猪嗜血杆菌江西株的分离鉴定 及生物学特性研究

宋德平, 肖根辉, 王萍*, 何后军, 鄢向东, 黄冬艳

(江西农业大学 动物科技学院 江西 南昌 330045)

摘要:为调查江西省副猪嗜血杆菌的感染情况, 从而为江西副猪嗜血杆菌病的防治提供基础。从江西省 32 个规模化养猪场的 80 份表现纤维素性炎症的病料中分离得到了 20 株革兰氏阴性杆菌, 经细菌形态、生化反应及 PCR 鉴定。结果表明分离菌为副猪嗜血杆菌, 16S rRNA 序列与 NCBI 上公布的序列同源性在 97% 左右。生物学特性研究表明, 该菌只能在含血清和辅酶(NAD)的营养丰富的培养基上能生长, 在不同的保存条件下该菌的存活时间差异很大。

关键词:副猪嗜血杆菌; 生化鉴定; PCR 鉴定; 生物学特性

中图分类号: S852.61+2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)04-0769-05

Isolation, Identification and Characterization in Biology of *Haemophilus parasuis* in Jiangxi Province

SONG De-ping, XIAO Gen-hui, WANG Ping*,
HE Hou-jun, WU Xiang-dong, HUANG Dong-yan

(College of Animal Science and Technology, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract: In order to investigate the current situation of *Haemophilus parasuis* (Hps) infections in Jiangxi Province and then provide a foundation for prevention and cure of disease caused by Hps. 20 strains of Gram negative, small polymorphic bacillus were isolated from 80 samples characterized by serofibrinous, from 32 large-scale farms in Jiangxi Province. The results of morphological and biochemistry tests and PCR all validated that these bacteria were *Haemophilus parasuis*. A comparison of the 16S rRNA sequence between Jiangxi isolates and data posted on NCBI showed that the homology was about 97%. The study on its biological characteristics showed that it required nicotinamide adenine dinucleotide and serum of newborn calves added into the medium. The *in vitro*-living time of this bacterium depended on the culture medium in which it was planted.

Key words: *Haemophilus parasuis*; biochemistry test; PCR; characterization in biology

副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, Hps)是格拉泽氏病(Glasser's disease)的病原菌, 是一种革兰氏阴性、短小或呈细丝状的多形态小杆菌, 体外培养需要血清和辅酶(NADH)^[1-2]。该菌属于巴斯德菌科嗜血杆菌属, 无鞭毛、无芽孢、有荚膜, 但体外培养时不易产生。美蓝染色两极着染, 革兰氏染色阴性^[1]。该菌体外培养的要求苛刻, 必须在含血清及辅酶的营养培养基上才能生长, 初次分离培养需要供给 5% 的 CO₂。

收稿日期: 2010-09-19 修回日期: 2011-06-14

基金项目: 江西省科技厅科技支撑计划(2009BNA0700)和江西省教育厅研究生创新基金(YC10A060)

作者简介: 宋德平(1987—), 男, 硕士生, 主要从事动物免疫学基础理论与运用研究; * 通讯作者: 王萍, 教授, E-mail: jxjs6263wplm@163.com。

近些年来,随着世界养猪业的快速发展,该病已成为全球范围内影响养猪业的典型细菌性疾病之一。特别是繁殖与呼吸障碍综合症、圆环病毒、猪瘟病毒等一些免疫抑制性疾病的爆发使得该病更加频繁的出现,给养猪业造成了重大的损失^[3-4]。国内外均已对副猪嗜血杆菌病高度重视,美国、日本、加拿大、德国、澳大利亚、丹麦、西班牙等养猪业较发达的国家均已深入进行了对本国的副猪嗜血杆菌流行病学进行了调查和研究^[5-6]。自2000年来,我国对副猪嗜血杆菌病进行了大量的报道^[7-9],但是关于细菌分离、血清分型及更为深入的研究较少。蔡旭旺对分离自全国11个省市的278株Hps进行了血清分型,表明我国以血清4型、5型和13型为主要流行血清型。

本实验室2008年11月起,从江西省4个市32个规模化养猪场的80份发生纤维素性心包炎、浆膜炎、关节炎及脑膜炎的经临床诊断为副猪嗜血杆菌感染的病例中分离得到20株革兰氏阴性,细小的多形态杆菌。经细菌形态、生化反应及PCR鉴定确定为副猪嗜血杆菌。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 病料来源 采自江西省4个市32个规模化养猪场的80份发生纤维素性心包炎、浆膜炎、关节炎及脑膜炎的经临床诊断为副猪嗜血杆菌感染的肺脏、心包积液、关节液及脑组织等。

1.1.2 标准株 Hps血清4型标准菌株由华中农业大学蔡旭旺博士惠赠。

1.1.3 培养基的配置 胰蛋白大豆琼脂、胰蛋白大豆肉汤、巧克力琼脂培养基、鲜血琼脂培养基、麦康凯培养基、普通琼脂培养基等参照相关标准进行制备。

1.1.4 主要实验试剂 TSA和TSB:购自Difco™公司;新生小牛血清:购于杭州四季青有限公司;NAD:购于上海生工生物工程有限公司;微量生化发酵管:购自杭州天和微生物有限公司;ExTaq DNA聚合酶和dNTPs:购自北京全式金生物有限公司;DL2000-DNA ladder Marker:购自北京天根生物有限公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌分离与纯化 无菌操作将带回的病料立即接种于TSA固体培养基和液体培养基。置于体积分数为5% CO₂的培养箱中或烛缸中,37℃培养12h后观察细菌的生长。挑取大小约为0.5~1mm左右的灰白色或半透明的菌落进行革兰氏染色并镜检。将怀疑为Hps的菌落接种于新的TSA培养基进行纯化培养,直到菌落及菌体形态一致为止。

1.2.2 生化鉴定 在无菌操作台上,用接种环分别挑取经纯化的可疑菌的单菌落,水平划线于新的TSA培养基上37℃培养12h。挑取菌落接种于尿酶、氧化酶、接触酶、硝酸盐还原、吲哚、葡萄糖、蔗糖、果糖、半乳糖、核糖和麦芽糖等微型生化鉴定管中,并同时加入2μL 0.05% NAD及8μL新生小牛血清,24h及48h各观察和记录结果,按厂家说明书判定结果。

1.2.3 PCR鉴定 将分离纯化的菌株用接种环刮取2个菌落洗脱于含100μL灭菌双蒸水的离心管中,沸水浴10min后迅速放入-20℃冰箱中,放置30min取出,室温融化后10000 r/min离心5min,取上清液即为PCR检测时DNA模板。根据Simone Oliveira等^[10]设计的引物,上游引物:5'-GTG ATG AGG AAG GGT GGT GT-3',下游引物:5'-GGC TTC GTC ACC CTC TGT-3'。反应体系(50μL体系):10×PCR Buffer 5μL, dNTPs(10 mmol/L) 1μL, 上游引物(20 pmol/μL) 0.5μL, 下游引物(20 pmol/μL) 0.5μL, DNA模板 5μL, ddH₂O 37.5μL。反应条件:94℃预变性5min;94℃ 1min 55℃ 1min 72℃ 1min 30个循环;72℃延伸10min。结果观察:取5μL PCR产物与1μL 6×loading buffer混匀后加到质量分数为1.5%的琼脂糖制备的凝胶的点样孔中,电泳30min后于凝胶成像系统或紫外光下观察条带。

1.2.4 副猪嗜血杆菌江西分离株的生物学特性 将鉴定为Hps的细菌接种于TSA、TSB、巧克力培养基、鲜血培养基、麦康凯培养基及普通琼脂培养基上,观察其生长情况。在含不同浓度的新生小牛血清的TSA培养基上培养Hps,观察其生长快慢及菌落形态,以确定Hps生长所需要的新生小牛血清最合适浓度。摸索其在TSA培养基、巧克力琼脂培养基上且4℃下的保存时间;在16%甘油浓度-20℃,30%甘油浓度-80℃,脱脂牛奶冻干保存下该菌的存活时间。

2 结果分析

2.1 副猪嗜血杆菌江西株的分离鉴定

生物学特性、生化试验及 16S rRNA 序列比对均表明:20 株分离菌均为副猪嗜血杆菌。其中从宜春地区分离出 6 株,赣州 2 株,九江 2 株,南昌 10 株,分离率为 20%。绝大部分的菌株均从肺脏分离,有 3 株分离自发生心包炎或心包积液的心包液或心血,2 株分离自关节液。

2.1.1 菌落特征与菌体形态 纯化好的细菌在 TSA 培养基上 37 °C 培养 24 h 后为灰白色半透明菌落,菌落表面光滑湿润,直径约为 1~1.5 mm(图 1)。革兰氏染色证明该菌为革兰氏阴性,比大肠杆菌更为细小的多形态杆菌,从肺脏新分离的菌体多以丝状为主(图 2),而从心包液、关节液及脑组织中分离的细菌多以短杆状为主(图 3)经过几次传代后均为短杆菌(图 4)。

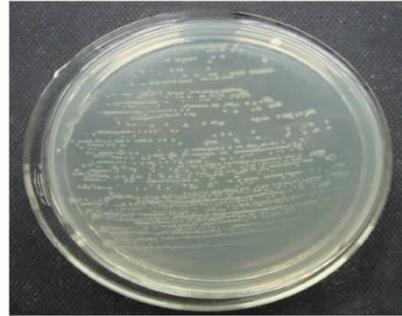


图 1 Hps TSA 培养 24 h 形态

Fig. 1 Morphology of Hps colony culture on TSA

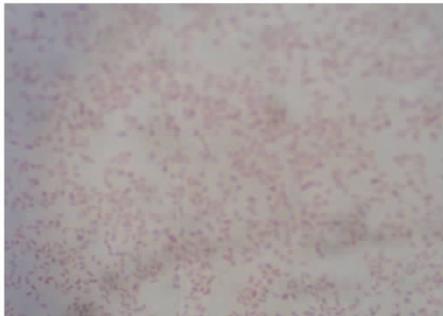


图 2 肺脏新分离 Hps 菌体形态

Fig. 2 Morphology of Hps isolated from pericardial fluid



图 3 心包液中新分离 Hps 菌体形态

Fig. 3 Morphology of Hps isolated from lung

表 1 Hps 血清 4 型标准株及江西分离株的生化鉴定结果

Tab. 1 The results of biochemistry tests of *Haemophilus parasuis* serovar 5 reference strain HS0165 and Jiangxi isolates

项目 Items	HS0165	江西株 Jiangxi strains	项目 Items	HS0165	江西株 Jiangxi strains
NAD 依赖性 NAD dependence	+	+	葡萄糖 Glucose	+	+
溶血性 Haemolysis	-	-	麦芽糖 Maltose	+	+
尿酶 Allantoinase	-	-	蔗糖 Sucrose	+	+
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	果糖 Fructose	+	+
吲哚 Indole	-	-	核糖 Ribose	+	+
氧化酶 Oxidase	-	-	半乳糖 Galactose	+	+
接触酶 Catalase	+	+			

2.1.2 生化鉴定 将 Hps 接种于微量生化发酵管中,37 °C 培养 24~48 h 后,结果为尿酶、吲哚试验、氧化酶试验阴性,过氧化氢酶、硝酸盐还原试验阳性,该菌可以发酵葡萄糖、蔗糖、果糖、核糖、麦芽糖和半乳糖,结果见表 1。

2.1.3 PCR 鉴定 根据 Hps 16S rRNA 序列设计引物经 PCR 扩增的产物为 822 bp 大小的片段。20 株分离菌的条带与血清 4 型标准株条带大小一致(图 4),以 JXNC03 株进行测序证实其序列与副猪嗜血杆菌 16S rRNA 序列相符(图 5)。序列在 NCBI 上 Blast 对比与其他 Hps 分离菌的 16S rRNA 序列同源率为 97%~98%。

2.2 副猪嗜血杆菌的培养特性

2.2.1 不同培养基上 Hps 的生长情况 将鉴定为 Hps 的菌株接种于 TSA、巧克力培养基、鲜血琼脂培养

基、麦康凯培养基及普通琼脂培养基上,发现在 TSA 及巧克力培养基上生长良好,12 h 可以长出可见菌落;而在鲜血琼脂平板上经过 48 h 培养后可观察到针尖大小的菌落,可见在这种培养基上 Hps 生长十分缓慢;而在加了 NAD 的鲜血平板上生长的速度与巧克力平板上几乎一样;在麦康凯和普通琼脂培养基上不生长。

2.2.2 培养基的优化

本实验发现在 TSA 培养基中加入 1% 的新生小牛血清就能满足 Hps 生长需要,加入 3% 的新生小牛血清的 TSA 上 Hps 生长与含 5% 新生小牛血清的 TSA 上生长没有区别。因此,在培养基中加入 3% 的新生小牛血清,在掌握好加入血清的培养基温度时足够满足该菌的生长(表 2)。

2.3 副猪嗜血杆菌的保存条件

本实验结果表明:在 TSA 平板上 4 °C Hps 能存活 5 d;在巧克力培养基上 4 °C Hps 能保存 15 d 左右;在含 16% 甘油 -20 °C 下 Hps 能保存 20 d 左右;在含 30% 甘油 -80 °C 保存时 3 个月后仍能复苏;脱脂牛奶保存的 Hps,在 -20 °C 下两年仍可以复苏(表 3)。

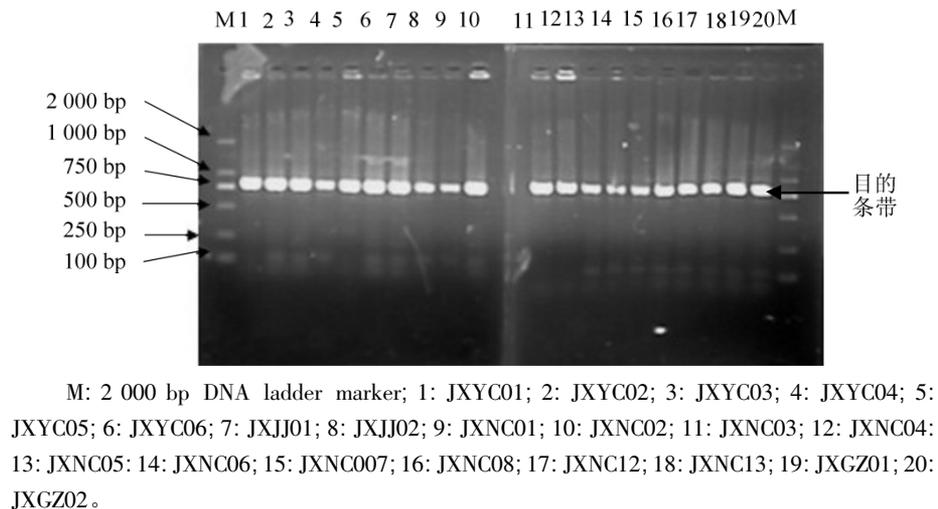


图 4 琼脂糖凝胶电泳结果
Fig. 4 Amplification of *Haemophilus parasuis* 16S rRNA with PCR

ATTGGGCTTTCGGTCTCCCTCTGTATGCACCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATG
ATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCAGTTTACTACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCGGACCGAAT
CGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAAACACGAGCT
GACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTAAGTTCGCGAAGGCACAACTCATCTCTGAGTCTTCTTACG
GATGTCGAAGACTAGGTAAGTTCTTCGCGTTCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGG
GCCCCGTCATTTGAGTTTTAACCTTGGGGACGTACTCCCCAGGGCGTTCGATTATACAGTTAG
CTACGGGCACCAAGCTCTAAGCCCAATCCCCAAATCGACAGCGTTTACAGCGTGGACTACCAGGGTAT
CTAATCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGCACATGAGCGTCAGTATTTTCCCAAGGGGCTGCCTTCGCCCT
CGGTATTCCTCCACATCTCTACGGATTTACCCGCTACACGTGGAATTTACCCCTCCCTAAAATACTCT
AGCAACCCAGTATGAAATGCAATTCCTCAAGTTAAGCTCGGGGCTTTCACATCTCACTTAAGTACCCGC
CTGCGTGCCCTTACGCCAGTCATTCCGATTAACGCTCGCACCCCTCCGTATTACCGGGCTGCTGGCA
CGGAGTTAGCCGGTCTTCTTGTGACTAACGTCAATGTAATGTTCTAAAACACCACCTCCCCATCA

图 5 副猪嗜血杆菌 JXNC03 株 16S rRNA 扩增片段序列
Fig. 5 Sequence of *Haemophilus parasuis* JXNC03 isolate 16S rRNA amplicon

表 2 JXNC03 在不同血清浓度 TSA 培养基上的菌落直径大小
Tab.2 Colony diameters of strain JXNC03 cultured on TSA with different concentration of serum

血清浓度 /%	菌落直径/mm				
	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h
5	0.5	1	1~1.5	2	2
4	0.5	1	1~1.5	2	2
3	0.5	1	1~1.5	2	2
2	0.1~0.5	0.5	0.5~1	1	1~1.5
1			0.1~0.5	0.1~0.5	0.5

3 讨论与小结

(1) 本实验证实了 Hps 在江西省的流行。国内对副猪嗜血杆菌的研究起步较晚,到目前为止,有关 Hps 分离鉴定的报道很多^[11-13],但是对江西省 Hps 的研究报道很少^[14]。本次是第一次较为系统和广泛地对江西省 Hps 感染情况调查。16S rRNA 序列与 NCBI 公布的其他序列同源率为 97% 左右。

表3 不同温度和介质副猪嗜血杆菌的保存时间

Tab.3 The survival time of *Haemophilus parasuis* conserved under different conditions

保存条件	4 °C		-20 °C		-80 °C
	TSA	巧克力培养基	16% 甘油	5% 蔗糖脱脂牛奶冻干	30% 甘油
保存时间	5 d	15 d	20 d	>2 年	3 个月

副猪嗜血杆菌的分离培养常受到病料采集之前抗生素治疗以及病料转运条件等因素的影响,加之对营养要求苛刻,使得即使是从临诊确定为副猪嗜血杆菌病的病料分离 HPs 也有一定难度^[15],所以实际的发病率可能要比临床分离率高。据我们的临床观察,该菌引起的疾病一年四季均可发生,常作为高致病性蓝耳病的继发感染而存在,但以冬春季节多见。采集病料的细菌分离成功率可能与气温有很大关系,夏秋季采集的病料细菌分离率远低于冬春季。所以在夏秋季采集的病料立即放入含冰袋的泡沫盒中,密封后立即运回实验室进行操作。对于心包积液、胸腔积液等,一般用一次性无菌注射器吸取后置于含有 TSB 培养基的 EP 管内低温保存带回实验室后放入恒温箱中增菌 6 h 后接种固体培养基。

(2) Hps 只能在添加了辅酶(NAD)的营养培养基上生长,鲜血琼脂平板上经过 48 h 培养后可观察到针尖大小的菌落,生长过于缓慢而不适合于该菌培养,而在添加了血清的巧克力培养基或 TSA 上则生长迅速。与其他报道^[16-17]结果类似,本研究表明:在 TSA 平板上 4 °C Hps 仅能存活 5 d,而在巧克力培养基上能存活 15 d,所以在实验中短期存放宜接种于巧克力培养基上。脱脂牛奶保存的 Hps 两年仍可以复苏,该方法也是长期保存 Hps 最可靠的方法。李鹏、姜平等^[18]通过优化培养基成分,在 TSA 和 TSB 中补充一定比例的 BSA 和 NAD 后,仅需 8~12 h 即可生长旺盛。本实验也对培养基进行了一些优化,只需添加 1% 的血清即可满足 Hps 的生长,在添加 3% 血清的培养基上生长旺盛。

参考文献:

- [1] Oliveira S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control [J]. *Vet Microbiol* 2004; 99: 1-12.
- [2] Smart N L, Miniats O P, Macinnes J L. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting [J]. *Can J Vet Res* 1988; 52: 319-324.
- [3] Narita M, Kawashima K, Matsuura S, et al. Pneumonia in pigs infected with pseudorabies virus and *Haemophilus parasuis* serovar 4 [J]. *J Comp Pathol* 1994; 110: 329-339.
- [4] Kim J, Chung H, Jung T et al. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting multisystemic wasting syndrome microorganisms [J]. *J Vet Med Sci* 2002; 64: 57-62.
- [5] Morikoshi T, Kobayashi K, Kamino T, et al. Characterization of *Haemophilus parasuis* isolated in Japan [J]. *Jpn J Vet Sci* 1990; 52: 667-669.
- [6] Blackall P J, Pahoff J L. Characterisation of porcine *Haemophilus* isolated from Australian pigs between 1988 and 1992 [J]. *Aust Vet J* 1995; 72: 18-21.
- [7] Oliveira S, Blackall P J, Pijoan C. Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use of serotyping and genotyping [J]. *Am J Vet Res* 2003; 64: 435-442.
- [8] 蔡旭旺, 陈焕春, 刘正飞, 等. 副猪嗜血杆菌的分离培养和血清型鉴定 [J]. *华中农业大学学报* 2005; 24: 55-58.
- [9] 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.
- [10] Oliveira S, Galina L, Pijoan C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections [J]. *J Vet Diagn Invest* 2001; 13(6): 495-501.
- [11] 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): 134-138.
- [12] 蒋征, 李军星, 姜平, 等. 副猪嗜血杆菌分离与基因分型鉴定 [J]. *畜牧与兽医* 2008; 40(6): 47-49.
- [13] 朱小宁, 余兴龙, 李润成, 等. 副猪嗜血杆菌的分离与鉴定及其 16S rRNA 生物信息学分析 [J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版* 2009; 35(5): 517-520.
- [14] 方泉明, 黄建珍, 黄冬艳. 副猪嗜血杆菌江西株的分离鉴定及药敏试验 [J]. *中国畜牧兽医* 2009; 4: 882-884.
- [15] Oliveira S, Pijoan C, Morrison R. Evaluation of *Haemophilus parasuis* control in the nursery using vaccination and controlled exposure. *J Swine Health Prod* 2004; 12: 123-128.
- [16] 王艳. 副猪嗜血杆菌灭活疫苗的研制 [D]. 南京: 南京农业大学 2006.
- [17] 蔡旭旺. 副猪嗜血杆菌的分离鉴定及诊断方法与灭活疫苗的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学 2006.
- [18] 李鹏, 李军星, 姜平, 等. 中国东南部地区副猪嗜血杆菌分离株 ERIC-PCR 指纹图谱分析 [J]. *中国兽医学报* 2009; 29(12): 1566-1599.