

曹维维, 韦馨琛, 何啟云, 等. 2019—2022年华中地区规模化猪场呼吸道病原菌感染的流行病学调查 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (5): 75–83.
CAO W W, WEI X C, HE Q Y, et al. Epidemiological survey of bacterial pathogens of respiratory diseases in large-scale pig farms in central China from 2019 to 2022 [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (5): 75–83.

2019—2022 年华中地区规模化猪场呼吸道病原菌感染的流行病学调查

曹维维^{1,2,3,4}, 韦馨琛^{1,2,3,4}, 何啟云^{1,2,3,4}, 韦祖丹^{1,2,3,4}, 陈云鹏^{1,2,3,4}, 贝为成^{1,2,3,4*}

1. 华中农业大学动物医学院, 湖北 武汉 430070;
2. 农业微生物资源发掘与利用全国重点实验室, 湖北 武汉 430070;
3. 生猪健康养殖协同创新中心, 湖北 武汉 430070;
4. 湖北洪山实验室, 湖北 武汉 430070)

摘要: 旨在调查华中地区(湖北、河南、湖南)规模化猪场猪呼吸道疾病综合征细菌性病原的流行感染情况。2019—2022年,采集湖北、河南、湖南等省份的45个规模化猪场中具有呼吸道症状猪的口鼻拭子及肺脏、气管、淋巴组织等临床病料1 895份,对其进行呼吸道病原菌的检测、分离培养、染色镜检、血清型分型鉴定和药敏试验。结果:呼吸道病原菌阳性样品总检出率为39.68%(752/1 895),其中猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)为20.11%(391/1 895),多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*, Pm)为7.39%(140/1 895),副猪格拉瑟菌(*Glaeserella parasuis*, GPS)为6.65%(126/1 895),胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)为14.35%(272/1 895);在保育阶段,SS和GPS的阳性样品检出率较高,在生长育肥阶段,APP和SS的检出率较高;混合感染结果显示,单一感染占比达75.66%(569/752),以SS感染为主,双重感染占比达23.80%(179/752),以SS+GPS和SS+APP为主,三重感染类型占比为0.53%(4/752),只有SS+GPS+APP一种类型;从病料中分离鉴定到218株呼吸道病原菌,其中包括157株SS、15株Pm、20株GPS和26株APP;血清分型鉴定结果显示,SS流行血清型为2型,Pm流行血清型为A和D型,GPS流行血清型为5和4型,APP流行血清型为1型;药敏结果显示,大多数呼吸道分离菌株对于头孢噻吩和氟苯尼考表现敏感,而对于链霉素和庆大霉素则表现耐药。结论:研究结果为华中地区猪呼吸道疾病综合征细菌性病原感染的防控提供了参考。

关键词: 猪呼吸道疾病综合征; 细菌; 分离鉴定; 血清型; 药敏试验

中图分类号: S852.6 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)05-0075-09

Epidemiological survey of bacterial pathogens of respiratory diseases in large-scale pig farms in central China from 2019 to 2022

CAO Weiwei^{1,2,3,4}, WEI Xinchen^{1,2,3,4}, HE Qiyun^{1,2,3,4}, WEI Zudan^{1,2,3,4},
CHEN Yunpeng^{1,2,3,4}, BEI Weicheng^{1,2,3,4*}

1. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
2. National Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Wuhan 430070, China;
3. The Cooperative Innovation Center for Sustainable Pig Production, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
4. Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China)

Abstract: In order to investigate the epidemic infection of bacterial pathogens of porcine respiratory disease syndrome in large-scale pig farms in central China (Hubei, Henan, and Hunan provinces). In the period of 2019–2022, 1 895 clinical samples of oral and nasal swabs and lung, trachea and lymph node tissues from pigs with respiratory symptoms were collected in 45 large-scale pig farms in Hubei, Henan, Hunan and other provinces. Then, detection, isolation and culture, staining microscopy, serovar identification and drug sensitivity test of respiratory pathogens were performed. The results showed that the total detection rate of positive samples of respiratory pathogens was 39.68%

收稿日期: 2024-05-16; 修回日期: 2025-03-20

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD1800905)

第一作者: 曹维维, 男, 博士研究生

*通信作者: 贝为成, 博士, 教授, 主要从事动物传染病方面的研究, E-mail: beiwc@mail.hzau.edu.cn.

(752/1 895), of which *Streptococcus suis* (SS) was 20.11% (391/1 895), *Pasteurella multocida* (Pm) was 7.39% (140/1 895), *Glaesserella parasuis* (GPS) was 6.65% (126/1 895), and *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP) was 14.35% (272/1 895). In the nursery pig stage, the detection rate of SS and GPS positive samples was higher; in the growth and fattening stage, the detection rate of APP and SS was higher. The results of the mixed infection showed that single infection accounted for 75.66% (569/752), mainly SS infection. Double infection accounted for 23.80% (179/752), mainly SS + GPS and SS + APP infection. The triple infection type accounted for 0.53% (4/752), only the SS + GPS + APP type. A total of 218 respiratory pathogens were isolated and identified, including 157 strains of SS, 15 strains of Pm, 20 strains of GPS and 26 strains of APP. The results of the serotyping showed that SS epidemic serovar was type 2, Pm epidemic serovars were types A and D, GPS epidemic serovars were types 5 and 4, and APP epidemic serovar was type 1. The susceptibility results showed that most respiratory tract isolates were sensitive to ceftiofur and florfenicol, but resistant to streptomycin and gentamicin. The above results provided reference for the prevention and control of bacterial pathogens of swine respiratory syndrome in the area of central China.

Keywords: Porcine respiratory disease complex; bacteria; isolation and identification; serovars; drug sensitivity test

猪呼吸道疾病综合征 (porcine respiratory disease complex, PRDC) 是一种由多种病原微生物 (细菌、病毒、寄生虫等) 及环境、饲养管理等多因素相互作用而引起的一种猪的呼吸道疾病^[1]。随着养猪业规模化发展, 养殖密度明显上升, 导致 PRDC 的发生也愈发频繁, 对生猪产业造成巨大的经济损失。PRDC 常见的细菌性病原包括猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS), 多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*, Pm), 副猪格拉瑟菌 (*Glaesserella parasuis*, GPS) 和胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)^[2]。PRDC 在临床上常表现为患病猪只发热、咳嗽、喘气、眼鼻分泌物增多等症状; 剖检时常见鼻腔病变、气管黏液增多、不同程度肺部病变等病理变化。PRDC 的发生一方面直接增加猪场治疗费用, 另一方面影响猪只的生长, 增加料重比, 甚至增加死淘, 严重影响经济效益^[3-4]。

为了解华中地区 (湖北、河南、湖南) 规模化猪场中呼吸道细菌性病原的感染情况, 本研究于 2019—2022 年期间, 采集华中地区 45 个规模化猪场中具有呼吸道症状的发病猪的口鼻拭子和组织病料, 对其进行了 SS、Pm、GPS 和 APP 的检测, 调查掌握呼吸道病原菌的感染, 旨在了解当前华中地区呼吸道病原菌的流行血清型和细菌耐药情况, 为该地区 PRDC 的细菌性病原感染防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 病料来源

2019—2022 年, 从湖北、河南、湖南 3 个省份的 45 个规模化猪场采集具有呼吸道症状猪只样品共 1 895 份, 其中口鼻拭子样品 1 725 份, 肺脏、气管、淋巴结等组织样品 170 份。样品信息见表 1。

1.2 主要试剂和仪器

胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA) 和胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB) 购自 BD Difco 公司; 10% NBCS 购自杭州四季青材料有限公司; 烟酰胺腺嘌呤

二核苷酸 (NAD) 购自 Biosharp 公司; 琼脂糖凝胶粉购自武汉擎科生物公司; 2×Taq Master Mix 酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; DNA Marker (DL2000) 购自 TaKaRa 宝生物 (大连) 有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 革兰染色试剂盒、生化鉴定管和药敏纸片购自杭州微生物试剂有限公司; PCR 仪器购自杭州博日科技有限公司; 恒温振荡培养箱购自上海智诚分析仪器制造有限公司; 光学显微镜购自日本 Nikon 公司; 电泳仪购自北京六一仪器厂; 凝胶成像系统购自美国 Alpha 公司。

表 1 临床样品信息

地区	猪场数/个	猪只类型	猪场规模/头	口鼻拭子样/份	组织样/份
湖北	1	繁育仔猪	2 000~3 000	35	5
	3	繁育仔猪	3 000~5 000	237	13
	1	繁育仔猪	5 000~10 000	187	0
	8	生长育肥	1 000~3 000	216	21
	5	生长育肥	3 000~5 000	189	19
河南	4	繁育仔猪	2 000~3 000	153	17
	2	繁育仔猪	3 000~5 000	82	10
	6	生长育肥	1 000~3 000	185	11
	3	生长育肥	3 000~5 000	52	22
湖南	3	繁育仔猪	2 000~3 000	133	12
	1	繁育仔猪	3 000~5 000	52	9
	7	生长育肥	1 000~3 000	169	25
	1	生长育肥	3 000~5 000	35	6
总计	45			1 725	170

1.3 试验方法

1.3.1 样品的处理

将口鼻拭子样品放入装有适量生理盐水的离心管中充分混匀。组织病料部分剪碎后装入含有 10%

NBCS 和 0.01% NAD 的 TSB 培养基内, 37 °C、180 r/min 振荡培养 12~24 h。

1.3.2 细菌 PCR 检测

取处理后的口鼻拭子样品和组织病料增菌后的 TSB 培养基, 使用水煮法裂解菌体并粗提其基因组, 具体操作步骤: 首先取已培养好的菌液 1 mL, 12 000 r/min 离心 15 min, 弃掉上清液, 向菌体沉淀中加入 50 μ L 灭菌水并用移液器吹打混匀, 将菌液重悬液沸水浴 10 min 后迅速置于 -20 °C 冷冻 10 min, 然后将冷冻的重悬液解冻, 最后 12 000 r/min 离心 10 min,

取上清液即为粗提的细菌基因组。

根据文献 [5-8] 合成 SS、Pm、GPS、APP 相关特异性基因鉴定引物, PCR 扩增体系为: PrimerSTAR Max Premix (2 \times) 10 μ L, ddH₂O 2 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, 模板 2 μ L, 总计 20 μ L。扩增程序为: 95 °C 预变形 5 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 °C 最后延伸 5 min, 相关引物信息见表 2。引物由武汉擎科生物科技有限公司合成。

表 2 病原菌 PCR 检测引物信息

病原菌	目的基因	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp	退火温度/°C
SS	<i>gdh</i>	F: GCAGCGTATCTCTGTCAAACG R: CCATGGACAGATAAAGATGG	689	55
Pm	<i>kmt1</i>	F: ATCCGCTATTTACCCAGTGG R: GCTGTAAACGAACTCGCCAC	457	56
GPS	16S rDNA	F: GTGATGAGGAAGGGTGGTGT R: GGCTTCGTCACCCCTCTGT	822	59
APP	<i>apxIV</i>	F: TGGCACTGACGGTGATGA R: GGCCATCGACTCAACCAT	422	57

1.3.3 细菌分离培养及革兰染色

将处理后的口鼻拭子样品和无菌采集的组织病料接种于含有 10% NBCS 和 0.01% NAD 的 TSA 培养基上, 37 °C 恒温培养 24~48 h, 挑取可疑菌落进一步纯化鉴定, 取纯培养物进行革兰染色、镜检。

1.3.4 细菌基因组 DNA 提取

对分离纯化得到的临床分离菌株进行细菌基因组 DNA 的提取, 根据细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书步骤进行操作。

1.3.5 分离菌株 PCR 鉴定

以步骤 1.3.4 制备的细菌基因组 DNA 作为模版

进行 SS、Pm、GPS 和 APP 的相关特异性基因 PCR 扩增鉴定, PCR 扩增体系为: PrimerSTAR Max Premix (2 \times) 10 μ L, ddH₂O 2 μ L, 上下游引物各 0.5 μ L, 模板 2 μ L, 总计 20 μ L。扩增程序为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.5 min, 循环 30 次; 72 °C 最后延伸 5 min, 相关引物信息见表 2。

1.3.6 血清型分型

根据文献 [8-11] 对 PCR 鉴定正确的菌落进行 SS、Pm、GPS、APP 血清型分型, 血清分型引物信息见表 3。引物由武汉擎科生物科技有限公司合成。

表 3 血清型鉴定引物信息

血清型	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp	退火温度/°C
SS-1	F: AATCATGGAATAAAGCGGAGTACAG R: ACAATTGATACGTCAAAATCCTCACC	550	55
SS-2	F: GATTGTGCGGGAGGGTACTGTG R: TAAATAATATGCCACTGTAGCGTCTC	450	55
SS-7	F: GATGATTTATGGCACCCGAGTAAGC R: AGTCACAATTGCTGGTCTCTGACACC	150	55
SS-9	F: GGGATGATTGCTCGACAGAT R: CCGAAGTATCTGGGCTACTG	300	55
Pm-A	F: TGCCAAAATCGCAGTCAG R: TTGCCATCATTTGTCACTG	1 048	56

续表3

血清型	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp	退火温度/℃
Pm-B	F: CATTATCCAAGCTCCACC R: GCCCGAGAGTTTCAATCC	760	56
Pm-D	F: TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCC R: CATCTACCCACTCAACCATATCAG	657	56
Pm-E	F: TCCGCAGAAAATTATFGACTC R: GCTTGCTGCTGATTTTGTCT	511	56
Pm-F	F: AATCGGAGAACGCAGAAATCAG R: TTCCGCCGTCAATTACTCTG	851	56
GPS-1	F: CTGTGTATAATCTATCCCCGATCATCAGC R: GTCCAACAGAATTTGGACCAATTCCTG	180	59
GPS-2	F: CTAACAAGTTAGGTATGGAGGGTTTTGGTG R: GGCACCTGAATAAGGGATAATTGTACTG	295	59
GPS-3	F: CATGGTGTATTATCCTGACTTGGCTGT R: TCCACATGAGGCCGCTTCTAATATACT	650	59
GPS-4	F: GGTTAAGAGGTAGAGCTAAGAATAGAGG R: CTTTCCACAACAGCTCTAGAAACC	320	59
GPS-5	F: CCACTGGATAGAGAGTGGCAGG R: CCATACATCTGAATTCCTAAGC	450	59
GPS-6	F: GATTCTGATGATTTTTGGCTGACGGAACG R: CCTATTCTGTCTATAAGCATAGACAGGAC	360	59
GPS-7	F: CTCCGATTTTCATCTTTTCTATGTGG R: CGATAAACATAACAATTCCTGGCAC	490	59
GPS-8	F: GGAAGGGGATTACTACTACCTGAAAG R: CTCCATAGAACCTGCTGCTTGAG	650	59
GPS-9	F: AGCCACATCAATTTTAGCCTCATCA R: CCTTAAATAGCCTATGTCTGTACC	710	59
GPS-10	F: GGTGACATTTATGGGCGAGTAAAGTC R: GCACTGTCATCAATAACAATCTTAAGA	790	59
GPS-11	F: CCATCTCTTTAACTAATGGGACTG R: GGACGCCAAGGAGTATTATCAAATG	890	59
GPS-12	F: ATGGCTCACGATCCGAAAAG R: ATTTCCCTTTCCTAAACGC	508	59
GPS-13	F: GCTGGAGGAGTTGAAAGAGTTGTTAC R: CAATCAAATGAAACAACAGGAAGC	840	59
GPS-14	F: GCTGTTATGACTATTTCTTTCCGG R: GCTCCCAAGATTAAACCACAAGCAAG	730	59
GPS-15	F: CAAGTTCGGATTGGGAGCATATATC R: CCTATATCATTTGTGGATGTACG	550	59
APP-1	F: CTGGAGTAATTACGGCGACTATTCC R: AGGAGAAGCTAGTAGTACTTGCATTTTC	959	58
APP-2	F: GAGTGTGATGATGATGCTCTGGTTC R: TACCAATAACTGTTGCAACTAACGC	247	58
APP-3	F: TTGTAGAGCCCGCCAGATTTACG R: CATTCCGACCAGCAATCACC	500	58
APP-4	F: CAGCATGGGTTTGGTCTCTGTTG R: GGCTTTCTCCGTGTATGAATAAAGTG	204	58

续表3

血清型	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp	退火温度/℃
APP-5	F: AGCCACAAGACCCGAATGGTATAATG R: CCATCAAATGCAGCTTCAAGGAGC	825	58
APP-6	F: TGACTGGCTTCGTGAAAATGAG R: GTCTGAAGTTTATTCGCAGCTCC	718	58
APP-7	F: TTGGAATGGATTCATGATTGGGC R: CGGAAATGGCCTATTGAAAAACG	601	58
APP-8	F: ACATCCAAGCCGTTCTCCAG R: CATCCATGAGCCAATGAGGG	1 126	58
APP-9	F: GTAGGACGTGGTAAAACATTGAGGC R: ACGGGTGCAATTTCTAAAGCTG	2 105	58
APP-10	F: GGTGGTGATGGAACAAGTTATGG R: CTGTAATTGATCGCAAATACTAGATTGGTGC	183	58
APP-12	F: TAAAGGTATTATAACGCCGGCTCT R: CTCCCATCTGTTGCTAAGTAGTAG	347	58
APP-13	F: GTTGTGTATCGAGGTTGGCATTTC R: ATGTAAAGGATCTAAGCCGTGTG	665	58
APP-14	F: TGCATTACGCTTATATTCTGAATGG R: TTGTCGATCGAGAGGGAGTAACC	1 911	58
APP-15	F: GCAACTTGGAGAACATGGTTAAATCAAG R: CAACCTCCAATGTAAGCGAAGG	1 595	58

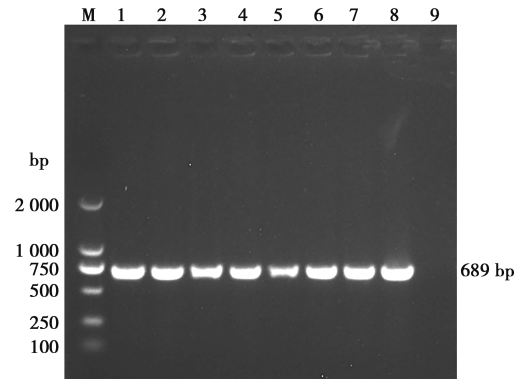
1.3.7 药敏试验

采用 Kirby-Bauer (K-B) 纸片琼脂扩散法测定临床分离菌株的耐药性。将细菌接种于含有 10% NBCS 和 0.01% NAD 的 TSA 培养基上, 37 °C 过夜培养。挑取单个菌落接种于含 10% NBCS 和 0.01% NAD 的 TSB 培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养 12 h, 用生理盐水调整菌液浓度至 0.5 麦氏单位。用无菌棉签蘸取适量菌液均匀涂布到含 10% NBCS 和 0.01% NAD 的 TSA 培养基表面。待培养基表面充分吸收菌液后, 放置药敏纸片紧贴于培养基表面, 于 37 °C 恒温培养 18~24 h。培养完成后测量抑菌圈直径, 记录结果, 并根据药敏纸片产品说明书判定分离菌株对药物的敏感性。

2 结果

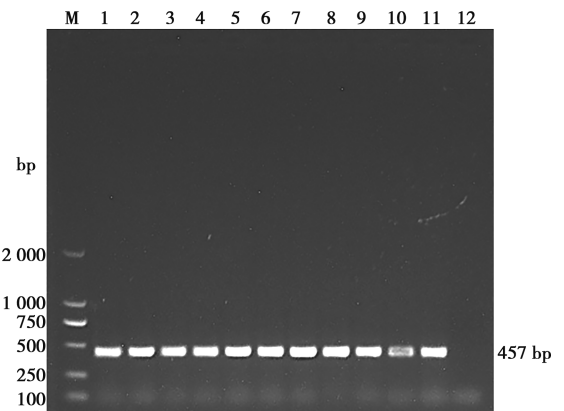
2.1 临床样品中 4 种病原菌的 PCR 检测

对 1 895 份临床样品进行 4 种呼吸道病原菌 PCR 检测, 部分样品 PCR 产物电泳图见图 1~图 4。检测结果显示, 4 种呼吸道病原阳性样品总检出率为 39.68% (752/1 895); SS、Pm、GPS、APP 的检出率分别为 20.11% (391/1 895)、7.39% (140/1 895)、6.65% (126/1 895)、14.35% (272/1 895); 湖北、河南和湖南 3 个地区均检测到 4 种呼吸道病原菌的存在, 其中 SS 检出率最高 (表 4)。



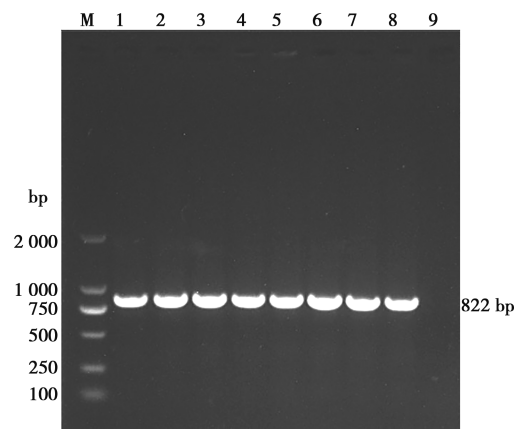
M. DNA Marker; 1~7. 样品; 8. 阳性对照; 9. 阴性对照。

图 1 SS 的 PCR 产物扩增结果



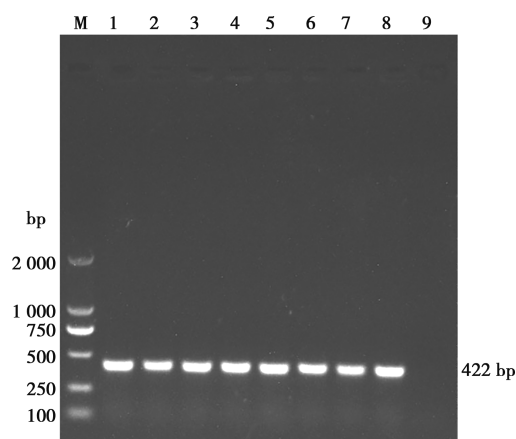
M. DNA Marker; 1~10. 样品; 11. 阳性对照; 12. 阴性对照。

图 2 Pm 的 PCR 产物扩增结果



M. DNA Marker; 1~7. 样品; 8. 阳性对照; 9. 阴性对照。

图3 GPS的PCR产物扩增结果



M. DNA Marker; 1~7. 样品; 8. 阳性对照; 9. 阴性对照。

图4 APP的PCR产物扩增结果

表4 呼吸道细菌性病原PCR检测阳性样品统计

地区	样品数/份	阳性样品总数/份	不同病原阳性样品数/份			
			SS	Pm	GPS	APP
湖北	922	349	158	68	55	138
河南	532	257	139	40	45	96
湖南	441	146	84	32	26	38
合计	1 895	752	381	140	126	272

2.2 不同阶段猪群感染情况分析

对各阶段猪群中SS、Pm、GPS和APP阳性样品进行统计分析,结果显示SS在保育阶段的检出率最高(31.51%),其次为生长育肥猪和后备母猪,检出率分别达到20.49%和18.72%;Pm在生长育肥阶段检出率较高(16.84%);在保育阶段,GPS的检出率高达20.21%,而在其他生长阶段的猪群样品中,GPS的检出率则较低;APP在生长育肥阶段的

终校

检出率最高,达到31.69%,其次在后备母猪群和生产母猪群样品中检出率也达到21.93%和15.37%(表5)。

表5 不同阶段猪群呼吸道病原检出情况

猪只类型	样品数/份	不同病原阳性样品数/份			
		SS	Pm	GPS	APP
哺乳仔猪	88	16	0	3	0
保育猪	584	184	2	118	12
生长育肥猪	366	75	62	2	116
后备母猪	187	35	19	1	41
生产母猪	670	71	57	2	103
合计	1 895	381	140	126	272

2.3 病原菌混合感染情况分析

对检出SS、Pm、GPS、APP的752份阳性样品进行统计分析,发现存在单一感染、双重感染和三重感染等现象(表6)。单一感染占比达75.66%,其中SS占比最高为31.91%,其次依次为APP占比24.07%,Pm占比10.77%,GPS占比8.91%;双重感染占比达23.80%,其中SS+GPS和SS+APP是最常见的双重感染类型;三重感染类型为SS+GPS+APP,占比0.53%。

混合感染结果显示,单一感染占比达75.66%(569/752),以SS感染为主;双重感染占比达23.80%(179/752),以SS+GPS和SS+APP为主;三重感染类型占比为0.53%(4/752),只有SS+GPS+APP一种类型。

表6 混合感染类型情况

感染类型	感染类型	阳性样品数	比例/%
单一感染	SS	240	31.91
	Pm	81	10.77
	GPS	67	8.91
	APP	181	24.07
双重感染	SS+Pm	29	3.86
	SS+GPS	62	8.24
	SS+APP	58	7.71
	Pm+GPS	4	0.53
	Pm+APP	26	3.46
三重感染	SS+GPS+APP	4	0.53

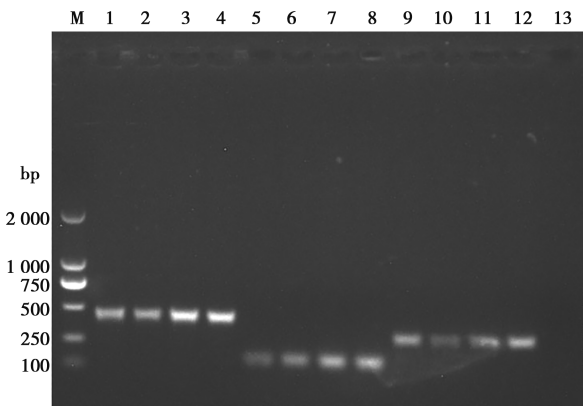
2.4 病原菌分离与血清型鉴定

通过对口鼻拭子和组织病料进行平板接种培养,根据呼吸道病原菌的菌落形态特点挑取疑似的单菌落

进行分离纯化，获得4种不同形态特点的单菌落。对这4种菌落进行革兰染色镜检，结果显示3种病原菌为革兰阴性菌，1种病原菌为革兰阳性菌。

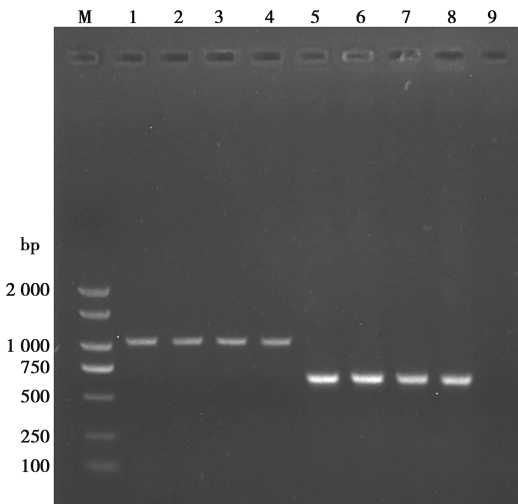
用分离纯化得到的菌株提取DNA为模版进行PCR扩增SS、Pm、GPS和APP的相关特异性基因，结果显示在689、457、822和422 bp处分别出现特异性条带。共分离得到菌株218株，其中SS菌株157株，Pm菌株15株，GPS菌株20株，APP菌株26株。

对分离得到的157株SS、15株Pm、20株GPS和26株APP进行PCR血清分型并进行统计分析，结果显示，SS主要流行血清型为2型（部分检测结果见图7）；Pm流行血清型为A、D型（部分检测结果见图8）；GPS主要流行血清型为5型，其次为7型（部分检测结果见图9）；APP主要流行血清型为1型（部分检测结果见图10）。详细数据见表7。



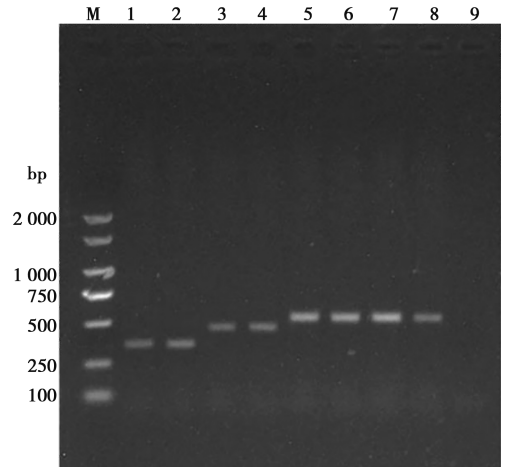
M. DNA Marker; 1~12. 临床分离菌株; 13. 阴性对照。

图5 SS分离株的血清分型



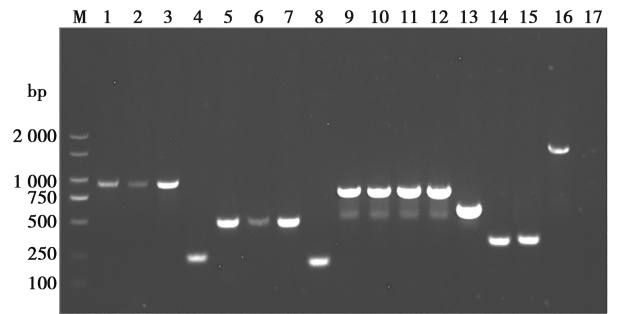
M. DNA Marker; 1~7. 临床分离菌株; 12. 阴性对照。

图6 Pm分离株的血清分型



M. DNA Marker; 1~8. 临床分离菌株; 9. 阴性对照。

图7 GPS分离株的血清分型



M. DNA Marker; 1~16. 临床分离菌株; 17. 阴性对照。

图8 APP分离株的血清分型

表7 不同菌株血清型分型情况

病原菌	血清型	菌株数量
SS	1	13
	2	76
	7	29
	9	24
	未定型	15
Pm	A	8
	D	7
GPS	4	7
	5	11
	12	2
APP	1	13
	2	1
	3	3
	4	1
	5	4
	7	1
	12	1
	15	2

2.5 病原菌药物敏感性分析

药敏试验结果显示,选取的 10 种抗生素中,SS 分离菌株对链霉素、庆大霉素、替米考星和林可霉素耐药性较高,耐药率占 60% 以上;而对阿莫西林、头孢噻唑和氟苯尼考敏感率占 70 以上。Pm 分离菌株对头孢噻唑、替米考星、多西环素、氟苯尼考和恩诺

沙星敏感率占 60% 以上,对林可霉素则大多表现出耐药,占比达 66.67%。GPS 分离菌株对头孢噻唑和氟苯尼考表现出高度耐药,耐药率达 85% 以上。APP 分离菌株对头孢噻唑、替米考星和恩诺沙星敏感率占 65% 以上(表 8)。

表 8 药敏试验结果

抗菌药	不同病原菌分离株对药物的敏感占比/%				不同判定结果的抑菌圈直径/mm		
	SS	Pm	GPS	APP	耐药	中介	敏感
青霉素	54.14	6.67	15.00	26.92	≤19	20~27	≥28
阿莫西林	71.34	46.67	20.00	19.23	≤13	14~17	≥18
头孢噻唑	81.53	80.00	90.00	76.92	≤17	18~20	≥21
链霉素	7.01	20.00	5.00	23.08	≤11	12~14	≥15
庆大霉素	11.46	6.67	10.00	26.92	≤12	13~14	≥15
替米考星	17.20	60.00	35.00	80.77	≤14	15~17	≥18
多西环素	11.46	60.00	40.00	57.69	≤12	13~15	≥16
氟苯尼考	78.98	66.67	85.00	53.85	≤17	18~20	≥21
恩诺沙星	66.88	80.00	45.00	65.38	≤16	17~22	≥23
林可霉素	9.55	13.33	40.00	30.77	≤13	14~17	≥18

3 讨论

本研究采集了 2019—2022 年年华中部分地区的 45 个规模化猪场的 1 895 份病料,进行了 4 种呼吸道细菌性病原包括 SS、Pm、GPS 和 APP 的检测,结果表明,4 种呼吸道细菌性病原总体阳性检出率达 39.68% (752/1 895),其中病原菌检出率由高到低依次为 SS、APP、Pm 和 GPS,这与 Zhang 等^[12]所报道的检出比例趋势大致相同,提示 SS 和 APP 应为华中地区重点关注和防范的呼吸道细菌性病原。本研究中 APP 检出率相对较高,这可能与样品来源地区猪群所流行的呼吸道病原菌不同有关;其次,APP 能够感染各年龄段的猪只,以 2~4 月龄的保育猪最为易感^[13],本研究样品主要来源于保育和生长育肥阶段具有呼吸道症状的患病猪只,这可能也是 APP 检出率相对较高的原因之一。

SS、Pm 和 GPS 均为猪呼吸道常在菌,定植于猪的鼻腔、扁桃体和气管等位置,在健康猪体内一般不会引起发病,而当猪的免疫系统受到抑制或处于应激状态时,可能会引发感染,导致猪发生多种疾病^[2]。通过分析不同阶段猪群呼吸道病原检出情况,发现哺乳阶段猪群的 4 种呼吸道病原阳性检出率较低,在保育阶段 SS 和 GPS 的检出率较高,在生长育肥阶段则是 APP 和 SS 的检出率较高,这可能是因为哺乳仔猪体内存在母源抗体,仔猪呼吸系统尚处于发育阶段,

加之此时养殖关注度高,栏舍内环境、密度等各方面饲养管理水平较高,所以哺乳仔猪发生呼吸道病原菌感染概率较低。而进入保育阶段之后,仔猪失去了母源抗体的保护,同时又受到外界环境的刺激,群体饲养密度变大、季节交替以及通风等其他饲养管理方面存在不足,常常导致呼吸道疾病的发生,提示从保育阶段就要开始注重对呼吸道病原菌的防控。

PRDC 可由细菌、病毒、寄生虫等多种病原混合感染引起,临床上常见的感染途径为原发性病原(如猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒、伪狂犬病病毒等)率先侵入猪的呼吸系统,破坏其防御屏障,引起免疫抑制,从而降低猪只抵抗力,随后与猪只体内的条件性致病菌或外源性致病菌(如 SS、Pm、GPS、APP)共同感染引起呼吸道疾病^[14]。本研究中,多数猪场虽然将猪繁殖与呼吸综合征、猪圆环病毒病、伪狂犬病等疫苗纳入常规免疫,但部分猪场仍然存在猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒、伪狂犬病病毒的感染(数据未展示)。此外,断奶、转群、饲养密度大、饲养环境恶劣或管理水平低下等因素也可诱发猪群呼吸道疾病的发生。防控 PRDC 不仅要重视细菌性病原的感染,还需从病毒性病原感染和饲养管理等方面加以考虑。

据报道,SS 至少可分为 29 种血清型, GPS 可分为 15 种血清型,而 APP 目前已知有 19 种血清型^[15-17]。然而,不同地区的呼吸道病原菌优势血清

型不同,且不同血清型之间缺乏交叉保护作用。对分离得到的 218 株呼吸道病原菌进行血清型分型鉴定,结果 SS 主要流行血清型是 2 型,这与赵战勤等^[18]报道相符;Pm 流行血清型仍为 A 和 D 型,这与彭忠等^[19]报道相一致;GPS 优势血清型为 5 和 4 型,这与 Zhang 等^[12]报道一致;APP 流行血清型为 1 型,与张飞等^[20]报道相符。通过本研究对华中部分地区猪呼吸道病原菌流行血清型分布进行调查,为该地区防控猪呼吸道细菌性疾病提供流行病学数据,可以及早采取针对性预防措施。

本研究中,多数猪场定期按季度或生产阶段对群体进行药物保健、季度保健、转群保健、分娩保健等,常用的保健药物包括阿莫西林、氟苯尼考、泰乐菌素、替米考星、多西环素等。选取 β -内酰胺类、氨基糖苷类、大环内酯类、喹诺酮类、林可酰胺类、四环素类和酰氨醇类等 7 类 10 种临床常用抗生素对分离菌株进行药敏试验,结果显示,大多数菌株表现出对氨基糖苷类药物(链霉素和庆大霉素)耐药,这与曹琪等^[21]报道一致;4 种呼吸道病原菌对于头孢噻唑和氟苯尼考大多表现敏感。在实际的生产中,一方面养殖场内兽药种类、剂型、规格多样;另一方面基层人员兽医相关专业素养较为薄弱,同时对于猪群呼吸道细菌性病原的诊断具有滞后性,导致养殖场内的兽药存在使用不规范或者未真正针对病因用药,导致兽药的使用成本增加,同时疾病的控制效果不佳,使得疾病的损失进一步加大。因此,有必要在养殖场内建立科学的疾病诊疗方案,充分掌握场内细菌性病原的耐药性,使用敏感抗生素进行疾病的治疗;同时建立规范的兽药使用管理制度,避免兽药的误用、滥用,减少细菌耐药性的产生。

综上所述,华中地区现阶段猪场呼吸道细菌性病原中,SS 较为流行,且 SS 多与其他呼吸道致病菌,如 Pm、GPS、APP 等混合感染。华中地区 SS 流行血清型为 2 型,Pm 流行血清型为 A 和 D 型,GPS 流行血清型为 5 和 4 型,APP 流行血清型为 1 型。呼吸道分离菌株对链霉素和庆大霉素表现出高耐药性,而对头孢噻唑和氟苯尼考则较为敏感。本研究对华中地区猪场呼吸道病原菌感染进行了系统的流行病学调查,为该地区呼吸道病原菌感染的防控提供了参考。

参考文献:

[1] OPIESSNIG T, GIMÉNEZ-LIROLA L G, HALBUR P G. Polymicrobial respiratory disease in pigs [J]. Anim Health Res Rev, 2011, 12 (2): 133-148.

[2] SUN Q, YU X, HE D, et al. Investigation and analysis of etiology

associated with porcine respiratory disease complex in China from 2017 to 2021 [J]. Front Vet Sci, 2022 (9): 960033.

[3] 赖贤信. 猪呼吸道疾病综合症的防治 [J]. 中国猪业, 2013, 8 (9): 37-38.

[4] 刘翠琴, 梁媛, 陈义祥, 等. 广西规模猪场猪呼吸道疾病综合征的病原学调查 [J]. 畜牧与兽医, 2010, 42 (10): 29-33.

[5] 王贵平, 何启盖, 刘军发, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌快速 PCR 检测方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2004 (2): 129-131.

[6] 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.

[7] 贺亚楠. 江苏部分地区 2016 年健康猪群猪链球菌流行病学调查 [D]. 南京: 南京农业大学, 2017.

[8] 彭忠. 猪多杀性巴氏杆菌的分离鉴定及全基因组重测序 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2018.

[9] KERDSIN A, DEJSIRILERT S, AKEDA Y, et al. Fifteen *Streptococcus suis* serotypes identified by multiplex PCR [J]. J Med Microbiol, 2012, 61 (12): 1669-1672.

[10] BOSSÉ J T, LI Y, ANGEN Ø, et al. Multiplex PCR assay for unequivocal differentiation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovars 1 to 3, 5 to 8, 10, and 12 [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52 (7): 2380-2385.

[11] HOWELL K J, WEINERT L A, CHAUDHURI R R, et al. The use of genome wide association methods to investigate pathogenicity, population structure and serovar in *Haemophilus parasuis* [J]. BMC Genomics, 2014, 15: 1179.

[12] ZHANG B, KU X, YU X, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens in Chinese pig farms from 2013 to 2017 [J]. Sci Rep, 2019, 9 (1): 9908.

[13] 张哲玮, 袁龙, 代小童, 等. 广西某规模化猪场胸膜肺炎放线杆菌血清 5 型的分离鉴定 [J]. 畜牧与兽医, 2022, 54 (5): 75-80.

[14] 王怀禹, 刘强, 何子双, 等. 四川南充地区部分猪场呼吸道疫病主要病原调查与分析 [J]. 中国动物保健, 2022, 24 (9): 19-21.

[15] 卢碧凯, 袁秀芳, 徐丽华, 等. 胸膜肺炎放线杆菌分离株血清型的 PCR 鉴定和 Apx 毒素基因检测 [J]. 畜牧兽医学报, 2023, 54 (3): 1341-1346.

[16] HILL J E, GOTTSCHALK M, BROUSSEAU R, et al. Biochemical analysis, *cpn60* and 16S rDNA sequence data indicate that *Streptococcus suis* serotypes 32 and 34, isolated from pigs, are *Streptococcus orisratti* [J]. Vet Microbiol, 2005, 107 (1/2): 63-69.

[17] KIELSTEIN P, RAPP - GABRIELSON V J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts [J]. J Clin Microbiol, 1992, 30 (4): 862-865.

[18] 赵战勤, 王松华, 王臣, 等. 2011 年—2015 年河南省及其周边省份猪源链球菌流行病学调查 [J]. 中国预防兽医学报, 2017, 39 (10): 845-847.

[19] 彭忠, 梁婉, 艾伟诚, 等. 我国猪群中多杀性巴氏杆菌的基因型分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50 (5): 1064-1072.

[20] 张飞, 曹三杰, 文心田, 等. 猪传染性胸膜肺炎疫苗的研究进展 [J]. 中国兽医学报, 2015, 35 (11): 1880-1886.

[21] 曹琪, 金清, 袁意, 等. 规模化猪场常见呼吸道细菌性病原的流行病学调查 [J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50 (6): 2439-2449.