

猪萎缩性鼻炎的微生物学诊断与防制^{*}

张耀相¹, 仇建华², 穆 杨¹, 邢福珊¹, 许信刚¹, 李健强¹

(1 西北农林科技大学 畜牧兽医学院, 陕西 杨陵 712100; 2 宁夏特种动物养殖场, 银川 750004)

[摘 要] 从某猪场猪萎缩性鼻炎病料中分离到一株细菌, 经形态与染色特性、培养特征、生化试验、动物致病性试验、溶血性试验证实为支气管败血波氏杆菌; 该菌对庆大霉素、链霉素、卡那霉素等抗生素敏感, 对羧苄青霉素、氨苄青霉素、痢特灵、红霉素等抗生素不敏感; 对豚鼠有致病性, 对小白鼠无致病性。以该菌制备的油佐剂灭活疫苗对免疫猪有一定的保护作用。

[关键词] 猪; 萎缩性鼻炎; 支气管败血波氏杆菌; 微生物学诊断; 免疫防治

[中图分类号] S858.286; S858.285.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2782(2001)02-044-03

猪传染性萎缩性鼻炎是由波氏杆菌引起的一种重要的猪传染病, 严重影响养猪业的发展, 特别是对集约化饲养带来较大的经济损失。由于本病为慢性传染病, 治疗比较困难, 目前防制本病主要是用自家分离菌制备油佐剂灭活苗来预防, 可有效控制该病的流行。1997年5月宁夏某猪场发生一种以2~3月龄猪多发的以萎缩性鼻炎为主要特征的接触性传染病, 临床主要表现为打喷嚏、呼吸困难、鼻腔流脓性粘液或清液, 鼻发痒、乱拱地、个别鼻甲骨严重萎缩, 面部变形或歪斜, 鼻向上翘起, 上下门齿错开、不能正常咬合, 眼分泌物增多, 活动减弱、不愿采食, 体温正常、皮毛不整齐。从一二对前白齿间锯成横断面, 可见鼻粘膜红肿、有出血点、分泌物增多、鼻道脓液多有恶臭且有糜烂, 鼻甲骨卷曲、软化、萎缩、鼻中隔弯曲变形。以棉拭子采取鼻腔后部脓性分泌物进行微生物学诊断, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材 料

普通肉汤、普通琼脂平板、鲜血琼脂平板、麦康凯琼脂平板、马铃薯琼脂平板及各种糖发酵管、邓亨氏蛋白胨水、葡萄糖蛋白胨水、西蒙氏柠檬酸钠琼脂斜面、石蕊牛乳、三糖铁琼脂斜面等生化试验用培养基均为本室自制; 药敏纸片, 购自上海市医学化验所, 批号9611; 鸡、羊、鼠等动物红细胞为本室自制。

1.2 方 法

1.2.1 样品采集 病猪剖检后, 用无菌棉拭子采集

鼻腔后部脓性分泌物, 放入无菌肉汤中涮洗棉签, 肉汤用于接种。

1.2.2 细菌分离 用肉汤分别划线接种麦康凯琼脂平板、鲜血琼脂平板、马铃薯琼脂平板、普通琼脂平板, 37℃、24~48 h 有氧培养, 分别生长不同性状菌落。

1.2.3 细菌鉴定 用已纯化的分离菌进行常规生理生化鉴定及药敏试验、溶血性试验和动物致病性试验。

2 结果与分析

2.1 结 果

2.1.1 生长表现特征 鲜血琼脂平板: 菌落中等大小、乳白色、略带暗灰色、边缘不整齐、凸起、表面粗糙、湿润, 呈 β 溶血。麦康凯琼脂平板: 菌落较血平板小, 无色、细小、凸起、光滑湿润、边缘整齐、透明状有粘性。马铃薯琼脂平板: 菌落为绿色, 圆形中等大小, 边缘不整齐, 表面光滑, 24 h 后由绿色变为黄棕色或微带绿色。在马铃薯琼脂平板连续传2~3代菌落绿色消失, 变为无色。普通琼脂平板: 菌落小、扁平, 暗灰色, 圆形, 边缘整齐, 表面粗糙, 有粘性, 较麦康凯平板上粘性差。普通肉汤: 培养24 h 呈浑浊状, 表面形成厚菌膜, 有臭味, 肉汤未变绿色, 继续培养仍未变绿色。

2.1.2 形态特征 为革兰氏阴性杆菌, 散在排列, 类似大肠杆菌, 无芽胞、无鞭毛、无荚膜, 个别菌有两极着色现象。不运动, 镜下菌体大小差异显著。在血

* [收稿日期] 2000-05-18

[作者简介] 张耀相(1960-), 男, 陕西杨陵人, 兽医师, 主要从事兽医临床检验及灭活疫苗的研制工作。

平板, 马铃薯琼脂平板生长的菌形态较大, 有时可看到微荚膜, 两极着色明显。

2.1.3 生化试验 按《兽医微生物实验实习指导》中的方法^[1]进行, 结果如表 1 所示。从表 1 中可以看出, 分离菌的生化试验结果与波氏杆菌相符合。

2.1.4 药敏试验 结果如表 2 所示。从表 2 可以看出, 分离菌对链霉素、庆大霉素、新霉素、卡那霉素高度敏感, 因而发病初期可考虑用这几种抗生素做紧急治疗。

2.1.5 溶血性试验 分别用鸡、羊、鼠、兔、猪等动物的血液及人的 O 型血液制成鲜血琼脂平板, 观察该菌在血平板上的溶血情况, 结果如表 3 所示。从表 3 可知, 该菌在生长过程中能产生溶血素。

表 1 分离株生化试验结果

Table 1 Biochemical test results of the isolate	
测定项目 Identification	结果 Result
葡萄糖 Glucose	—
乳糖 Lactose	—
麦芽糖 Maltose	—
甘露糖 Mannose	—
M-R 试验 Methyl red test	-
V-P 试验 Voges-Proskauer test	-
硝酸盐还原 Returning nitrate	+
柠檬酸盐利用 Use citrate	+
尿素酶分解 Urease decomposition	+
过氧化氢酶 Catalase	+
石蕊牛乳产碱 Litmus milk produce alkali	+
氧化酶 Oxidase	+
三糖铁斜面/底部及 H ₂ S 产生 Tilted side/Bottom and produce H ₂ S	红色加深/红色 Red/heavied/ red H ₂ S=

表 2 分离株药敏试验结果

Table 2 Results of drug sensitivity test on the isolate					
抗生素种类 Type of antibiotic	抑菌环直径 d/mm Diameter of inhibitory ring	敏感度 Sensitivity	抗生素种类 Type of antibiotic	抑菌环直径 d/mm Diameter of inhibitory ring	敏感度 Sensitivity
链霉素 Streptomycin	19	高度敏感 High sensitive	丁胺卡那 Amikacin	9	中度敏感 Middle sensitive
氧哌嗪青霉素 Piperacilin	8	中度敏感 Middle sensitive	新霉素 Neomycin	17	高度敏感 High sensitive
头孢唑啉 Cefazolin	2	不敏感 No sensitive	妥布霉素 Tobramycin	7	中度敏感 Middle sensitive
先锋 VI 号 Cephalosporin	2.5	不敏感 No sensitive	红霉素 Erythromycin	5	中度敏感 Middle sensitive
庆大霉素 Gentamycin	18	高度敏感 High sensitive	痢特灵 Furazolidone	4.5	不敏感 No sensitive
万古霉素 Vancomycin	3	不敏感 No sensitive	卡那霉素 Kanamycin	20	高度敏感 High sensitive
羧苄青霉素 Carbenicillin	3.5	不敏感 No sensitive	麦迪霉素 Medemycinin	3	不敏感 No sensitive
苯唑青霉素 Oxacillin	4	不敏感 No sensitive	磺胺 Sulfonamides	3	不敏感 No sensitive
氯霉素 Chloramphenicol	2	不敏感 No sensitive	磺胺+TM P Cotrimoxazole (cos)	4	不敏感 No sensitive
氨苄青霉素 Ampicillin	1.5	中度敏感 Middle sensitive	头孢拉定 Cephadrine	2.5	不敏感 No sensitive

注: $d \geq 10$ 为高度敏感, $10 > d \geq 5$ 为中度敏感, $d < 5$ 为不敏感。
Notes: $d \geq 10$ high sensitive, $10 > d \geq 5$ middle sensitive, $d < 5$ no sensitive

表 3 分离菌溶血性试验结果

Table 3 Hemolytic test results of the strain						
血液来源 Source of blood	鸡 Chicken	羊 Sheep	鼠 Mouse	兔 Rabbit	猪 Pig	人 People
结果 Result	α 溶血 α hemolysis	α 溶血 α hemolysis	α 溶血 α hemolysis	α 溶血 α hemolysis	β 溶血 β hemolysis	β 溶血 β hemolysis

2.1.6 动物致病性试验

用该菌 24 h 普通肉汤培养物腹腔注射小白鼠 0.2 mL/只, 4 d 后未发现临床症状及死亡, 剖检分离到该菌。腹腔注射豚鼠 0.5 mL/只, 注射后 40 h 出现临床症状, 表现为毛焦体缩、烦躁不安、毛竖立、尖叫不止、不采食。死后剖检, 肝有出血、坏死, 颜色苍白、变脆软; 脾肿大出血、严重坏死, 表面有一层白

色厚的假膜; 心脏有针尖状出血; 肺苍白、有萎缩变性; 黑色坏死灶, 间质肺水肿变大; 肠粘膜形成假膜; 腹腔内渗出液增多; 肠粘膜淋巴结肿大出血变为紫黑色。并从豚鼠病料中分离到接种菌。

2.1.7 免疫与防制

对已发病但有治疗价值的猪, 选用敏感抗生素 2 种, 进行药物治疗。对全群未发病猪用波氏杆菌油

佐剂灭活疫苗进行免疫预防,菌种采用分离自该猪场的“自家菌”波氏杆菌,37℃培养36h,获取菌液,调整菌量为3000亿/mL。用甲醛灭活,白油佐剂乳化,使油佐剂苗含菌量为1500亿/mL,每头猪不论大小均免疫2次,间隔7~10d,每次免疫剂量2mL/头,可有效地控制该猪场猪萎缩性鼻炎的流行。

3 讨论

1) 根据流行病学、临床症状、病理剖检、细菌学诊断及免疫防治结果,确诊该猪场发生的以萎缩性鼻炎为主要特征的传染病是由支气管败血波氏杆菌引起的疾病,与达能太、阎兴民等的报道相符^[2]。

2) 在对该菌培养特性进行鉴定过程中,作者发现该菌具有较强的变异性,即易于由强毒力的I相菌变异为弱毒力的II、III相菌,表现为初代分离物在马铃薯琼脂平板和血平板上培养可产生绿色色素,在普通琼脂平板及普通肉汤中生长不产生,此特征为强毒力的I相菌的表现。随着在马铃薯平板上的

传代次数的增加,3~5代后便不再产生绿色色素,表明该菌已变异为弱毒力的II、III相菌,这与《动物微生物学》和《兽医微生物学》报道的一致^[3,4]。

3) 一般认为,支气管败血波氏杆菌正常时即存在于成年猪的上呼吸道内,当机体抵抗力下降或有其他病原菌如巴氏杆菌、放线杆菌、绿脓杆菌协同作用时便可诱发该病的发生^[5]。通过对该菌进行药敏试验发现,本菌对磺胺、氯霉素、红霉素、氨苄青霉素等临床常用抗生素具有耐药性,更进一步证明该菌是猪体内正常存在的菌体而非初次侵入的病原。同时在对病料进行涂片染色以及病原分离过程中均未得到其他致病菌,说明支气管败血波氏杆菌单独作用猪体是可以引起疾病的。

4) 参照《兽医生物制品学》^[6]和童光玉^[7]介绍的方法,采用分离菌株制备的自家疫苗,对该猪场所有猪连续免疫2次,使该病的发病率由30%降至2%,有效地控制了该病在猪场的发生和蔓延。作者认为,为了根除该病,应对已发病并有明显临床症状的种猪和商品猪及时予以隔离治疗,以控制该病的流行。

[参考文献]

- [1] 李健强,李六金 兽医微生物学实验实习指导[M]. 第2版 西安:陕西科技出版社,1999 32-44
- [2] 达能太,净兴民 猪传染性萎缩性鼻炎诊断[J]. 中国兽医科技,1996,26(6):33
- [3] 杨本升,刘玉斌 动物微生物学[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1995 550-557
- [4] 甘肃农业大学 兽医微生物学[M]. 北京:农业出版社,1980 206-208
- [5] 林永祯 家畜传染病学[M]. 四川:四川科学技术出版社,1999 135-138
- [6] 刘宝全 兽医生物制品学[M]. 北京:中国农业出版社,1995 186-187
- [7] 童光玉 猪传染性萎缩性鼻炎油苗的应用效果观察[J]. 养猪,1996,(4):41-42

M icrobiologic diagnosis and control of swine atrophic rhinitis

ZHANG Yao-xiang¹, QIU Jian-hua², MU Yang¹, XIN Fu-san¹, XU Xing-gang¹, LI Jian-qiang¹

(1 College of Animal Sciences and Veterinary Medicine, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 The Aquatic Breeding Farm of Special Type Animal of Ningxia, Yinchuan, Ningxia, 750004, China)

Abstract: A strain was isolated from a case of swine atrophic rhinitis. Based on the results of morphology and staining, cultural character, biochemical test, animal pathogenic test and hemolytic test, the bacterium was identified as *Bordetella branchiseptica*. It is sensitive to gentamycin, streptomycin, kanamycin and other antibiotics and resistant to carbenicillin, ampicillin, furazolidone, erythromycin and so on. The strain showed pathogenicity to guinea pig and no pathogenicity to mouse. The inactivated vaccine cultivated from this isolated strain has certain protection to immunized pigs.

Key words: swine; atrophic rhinitis; *bordetella branchiseptica*; microbiologic diagnosis; immune and control