



## 简 报

## 副猪嗜血杆菌安徽株血清型、基因型及耐药性

陈章<sup>Δ1</sup> 汪清峰<sup>Δ1</sup> 刘晓露<sup>1</sup> 何长生<sup>2</sup> 魏建忠<sup>1</sup> 孙裴<sup>1</sup> 刘雪兰<sup>1</sup> 李郁<sup>\*1</sup><sup>1</sup> 安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036<sup>2</sup> 安徽省动物疾病预防控制中心 安徽 合肥 230061

**摘 要:**【背景】副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)是猪革拉瑟氏病(Glässer's disease)的病原体, 由于长期使用抗生素产生的耐药性以及灭活疫苗缺乏交互免疫保护力, 目前对该病无法形成有效防控。【目的】了解安徽地区副猪嗜血杆菌血清型、基因型及耐药性特征, 为猪革拉瑟氏病的有效防控提供科学依据和技术支撑。【方法】针对 2008–2017 年安徽地区分离的 44 株 HPS, 利用 PCR 反应鉴定血清型, 应用多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)进行基因分型, 通过微量稀释法测定最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。【结果】44 株 HPS 共检测出 6 种血清型(1、4、5、7、13、14), 血清型 4 型和 13 型为优势血清型, 各占 40.91%; 9 种 ST 型(ST241、ST267、ST268、ST269、ST270、ST271、ST272、ST273 和 ST274)中 ST267 和 ST268 为优势基因型, 各占 40.91%; 对庆大霉素、青霉素的敏感率分别为 100%和 93.2%, 86.4%的分离株呈现多重耐药, 耐药谱型有 33 种, 其中以甲氧苄啶/磺胺甲噁唑-四环素构成比最大, 为 42.4%。【结论】安徽地区 HPS 流行血清型和基因型呈现多元化, 具有较高的遗传异质性, 多重耐药现象严重, 血清型、ST 型与耐药性之间无明显相关性。

**关键词:** 副猪嗜血杆菌, 血清型, 基因型, 耐药性

**Foundation items:** Key Project of National Spark Program of China (2014GA710002); Key Research and Development Plan of Anhui Province (201904a06020013); Science and Technology Project of the Yangtze River Delta in Anhui Province (1101c0603065); Anhui Province Quality Engineering Project (2013sxx008); Anhui Province Pig Industry System Fund (Anhui Agricultural Science [2016]84)

<sup>Δ</sup>These authors equally contributed to these work

**\*Corresponding author:** E-mail: liyouer@163.com

**Received:** 23-04-2019; **Accepted:** 15-08-2019; **Published online:** 16-09-2019

**基金项目:** 国家星火计划重点项目(2014GA710002); 安徽省重点研究与开发计划(面上攻关)项目(201904a06020013); 安徽省长三角联合科技攻关项目(1101c0603065); 安徽省质量工程项目(2013sxx008); 安徽省生猪产业体系基金项目(皖农科[2016]84 号)

<sup>Δ</sup> 对本文贡献相同

**\*通信作者:** E-mail: liyouer@163.com

**收稿日期:** 2019-04-23; **接受日期:** 2019-08-15; **网络首发日期:** 2019-09-16

## Serotype, genotype and drug resistance of *Haemophilus parasuis* in Anhui province

CHEN Zhang<sup>Δ1</sup> WANG Qing-Feng<sup>Δ1</sup> LIU Xiao-Lu<sup>1</sup> HE Chang-Sheng<sup>2</sup>  
WEI Jian-Zhong<sup>1</sup> SUN Pei<sup>1</sup> LIU Xue-Lan<sup>1</sup> LI Yu<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China

<sup>2</sup> Anhui Animal Disease Prevention and Control Center, Hefei, Anhui 230061, China

**Abstract:** [Background] HPS is the pathogen of Glässer's disease. Due to the drug resistance caused by long-term use of antibiotics and the lack of interactive immune protection of inactivated vaccines, it's impossible to effectively prevent and control Glässer's disease at present. [Objective] The purpose of this study was to understand the serotypes, genotypes and drug resistance characteristics of HPS in Anhui province, and to prevent and control Glässer's disease more effectively. [Methods] The serotypes of 44 strains of HPS, isolated in Anhui province from 2008 to 2017 were identified by polymerase chain reaction (PCR), the genotyping was carried out by MLST, and MIC was determined by microdilution method. [Results] A total of 6 serotypes (1, 4, 5, 7, 13 and 14) were detected in 44 strains of HPS, serotypes 4 and 13 were dominant serotypes, each accounting for 40.91%. A total of 9 ST types (ST241, ST267, ST268, ST269, ST270, ST271, ST272, ST273 and ST274) were detected in MLST classification, the dominant genotypes were ST267 and ST268, respectively accounting for 40.91%. Drug resistance analysis showed that the susceptibility rates of gentamycin (GEN) and penicillin (PEN) were 100% and 93.2%, respectively. There were 86.4% of the isolates showed multiple drug resistance, and there were 33 types of multi-drug resistance spectrum, among which the ratio of COT-TET was the largest (42.4%). [Conclusion] The epidemic serotypes and genotypes of HPS in Anhui province are diversified, with high genetic heterogeneity and severe multi-drug resistance. There was no significant correlation between serotype, ST type and drug resistance.

**Keywords:** *Haemophilus parasuis*, Serotype, Genotype, Drug resistance

猪革拉瑟氏病(Glässer's disease)是由副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)引起的猪细菌性传染病,以关节炎和多发性纤维性浆膜炎为主要特征,存在于许多养猪国家,流行趋势日益上升,危害愈发严重。目前预防和控制猪革拉瑟氏病的主要措施是使用抗生素和接种疫苗。由于 HPS 血清型众多且地方性特征明显,不同的血清型菌株之间交叉保护性较低,毒力与血清型的严格关系尚未得到证实<sup>[1]</sup>。相比于血清分型,基因分型的一个重要优势是可以对所有 HPS 分离株分型,对于区分致病的毒力菌株与寄居的无毒菌株以及促进疫苗的发展具有重要意义<sup>[2]</sup>。不同国家、地区和时间 HPS 分离菌对抗生素的敏感性存在差异,因而影响着对药物的选择和使用<sup>[3]</sup>。

本研究针对安徽地区 2008–2017 年临床分离

鉴定的 44 株 HPS,先利用 PCR 进行血清型鉴定分析,再应用 MLST 进行基因分型研究,最后通过微量稀释法测定抗生素对 HPS 的 MIC。本实验旨在了解安徽地区 HPS 血清型的特征性分布,评价安徽地区 HPS 流行株的遗传背景和进化关系,并掌握安徽地区 HPS 分离株对抗生素的敏感性,为安徽地区有效防控猪革拉瑟氏病提供科学依据和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

#### 1.1.1 受试菌株

受试菌株源于 2008–2017 年临床发病猪,由安徽农业大学动物传染病实验室分离、鉴定与保存,共计 44 株 HPS (表 1)。

表 1 44 株 HPS 安徽分离株的背景信息

Table 1 Background information of 44 HPS Anhui isolates

序号 Order	菌株编号 Strains	分离时间 Time	分离地点 Location	分离部位 Origin	疾病 Disease
1	HB-1	20170106	淮北 Huaibei	肺 Lung	多发性浆膜炎 Polyserositis
2	HB-3	20170323	淮北 Huaibei	脾 Spleen	多发性浆膜炎 Polyserositis
3	FX-1	2008	肥西 Feixi	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
4	FY-1	2008	阜阳 Fuyang	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
5	HS-1	2008	黄山 Huangshan	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
6	LA	2008	六安 Liuan	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
7	SZ-1	2008	宿州 Suzhou	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
8	WH-1	20090816	芜湖 Wuhu	脾 Spleen	肺炎 Pneumonia
9	AT-1	20101115	合肥 Hefei	脾 Spleen	多发性浆膜炎 Polyserositis
10	BB-1	20110424	蚌埠 Bengbu	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
11	BB-2	20130312	蚌埠 Bengbu	肺 Lung	多发性浆膜炎 Polyserositis
12	HF-2	20130313	合肥 Hefei	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
13	AT-2	20130706	合肥 Hefei	脾 Spleen	肺炎 Pneumonia
14	LX	20131214	淮北 Huaibei	脑 Brain	多发性浆膜炎 Polyserositis
15	HJ-1	20140109	合肥 Hefei	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
16	SX-1	20141020	寿县 Shou county	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
17	HJ-4	20141226	合肥 Hefei	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
18	FY-2	20150803	阜阳 Fuyang	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
19	FN	20160404	阜南 Funan	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
20	HF-3	20160618	合肥 Hefei	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
21	LA-1	20151128	六安霍邱 Liuan Huoqiu	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
22	FX-5	20161123	肥西 Feixi	肺 Lung	多发性浆膜炎 Polyserositis
23	CH-1	20151009	巢湖 Chaohu	肺 Lung	多发性浆膜炎 Polyserositis
24	HB-2	20170106	淮北 Huaibei	鼻腔 Nasal cavity	多发性浆膜炎 Polyserositis
25	LA-2	20170628	六安 Liuan	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
26	SC	2008	舒城 Shucheng	关节 Joint	关节炎 Arthritis
27	LJ-2	2008	庐江 LuJiang	脑 Brain	多发性浆膜炎 Polyserositis
28	LJ-3	2008	庐江 LuJiang	肺 Lung	多发性浆膜炎 Polyserositis
29	TL	2008	铜城 Tongcheng	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
30	FD-1	20090816	肥东 Feidong	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
31	FD-2	20101115	肥东 Feidong	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
32	FX-2	20101122	肥西 Feixi	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
33	DY	20110522	定远 Dingyuan	肺 Lung	多发性浆膜炎 Polyserositis
34	AQ	20111027	安庆 Anqing	肺 Lung	多发性浆膜炎 Polyserositis
35	HB	20131214	淮北 Huaibei	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
36	CF	20140307	长丰 Changfeng	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
37	CZ	20140808	滁州凤阳 Chuzhou Fengyang	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
38	SX-2	20141020	寿县 Shou county	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
39	FX-3	20141202	肥西 Feixi	关节 Joint	多发性浆膜炎 Polyserositis
40	HJ-2	20141202	合肥 Hefei	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
41	HJ-3	20141226	合肥 Hefei	关节 Joint	关节炎 Arthritis
42	HQ-2	20150408	六安霍邱 Liuan Huoqiu	肺 Lung	肺炎 Pneumonia
43	CZ-1	20160113	池州 Chizhou	脾 Spleen	多发性浆膜炎 Polyserositis
44	SZ-2	20160121	宿州泗县 Suzhou Si county	肺 Lung	肺炎 Pneumonia

### 1.1.2 质控菌株

大肠埃希菌(*Escherichia coli*, *E. coli*) ATCC 25922 和胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) ATCC 27090 均由安徽农业大学动物传染病实验室保存和提供。

### 1.2 主要试剂和仪器

0.6%酵母浸膏胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE)、0.6%酵母浸膏胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE), 绍兴天恒生物科技有限公司; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD), 生工生物工程(上海)股份有限公司; 新生小牛血清, 北京索莱宝科技有限公司; 细菌基因组提取试剂盒, TaKaRa 公司; 18 种抗生素, 杭州天和微生物试剂有限公司。

PCR 扩增仪, Bio-Rad 公司; 恒温振荡培养箱, 上海福玛实验设备有限公司; 双目生物显微镜, 南京江南光电股份有限公司; 8 孔微量多点加样器, V&P Scientific 公司。

### 1.3 引物合成

参照汪清峰<sup>[4]</sup>的方法合成 HPS 血清分型用 15 种基因引物和 HPS MLST 分型用 7 种管家基因引物, 引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

### 1.4 血清分型

采取细菌基因组提取试剂盒提取 HPS 基因组 DNA 作为模板, 用于 PCR 鉴定 HPS 的血清型。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L, 上、下游引物(20  $\mu$ mol/L)各 0.25  $\mu$ L, 模板 DNA 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 10  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 56  $^{\circ}$ C 30 s, 68  $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 68  $^{\circ}$ C 5 min。将 PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像仪上进行观察, 并记录结果。

### 1.5 MLST 分型

参照 Mullins 等<sup>[5]</sup>建立的 HPS MLST 分型方法。PCR 反应体系(50  $\mu$ L): 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 25  $\mu$ L, 上、下游引物(20  $\mu$ mol/L)各 2  $\mu$ L, 模板 DNA 2.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 1 min, 45  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物由上海桑尼生物科

技有限公司测序。将所有测序菌株的 7 种基因位点序列上传至 HPS MLST 数据库(<http://pubmlst.org/hparasuis>), 得到对应等位基因的编号, 最终确定 ST 型, 并在 MLST 数据库中完成新发现等位基因序列的提交。

### 1.6 MLST 分析

利用 eBURST3.0 软件对 HPS MLST 分型结果展开 ST 型克隆群(clonal complex, CC)的归类, 当单个克隆群中的 ST 型存在 6 种等位基因与某个 ST 型相同时, 则可以将此 ST 型归于该克隆群。利用 START V2.0 软件构建 UPGMA 系统进化树作聚类分析。

### 1.7 耐药性测定

根据 CLSI 推荐的微量稀释法, 挑取单个菌落接种于 TSB-YE 培养液, 于 37  $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 24 h, 将细菌浓度调至 0.5 麦氏浊度并稀释 1 000 倍, 同时将 18 种抗生素储存液以初浓度 5 120  $\mu$ g/mL、体积 100  $\mu$ L 连续 2 倍比稀释 14 次, 配制成梯度浓度的抗生素微量稀释盘, 分别加入 100  $\mu$ L 稀释菌悬液, 37  $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后, 通过肉眼观察无细菌生长的最低抗生素浓度即为该菌株的 MIC。由于依据 MIC 值选择抗生素浓度不能达到很好的抑菌效果, 需借助 MIC<sub>50</sub> 和 MIC<sub>90</sub> 来对抗生素进行抗菌评价。依照 CLSI 所公布的细菌耐药临界点, 完成各试验菌株对不同抗生素的耐药率计算。实验设置阳性对照(受试菌株菌液)、阴性对照(TSB-YE)以及两组平行对照, 同时以 *E. coli* (ATCC 25922)和 APP (ATCC 27090)作为质控菌株。

### 1.8 数据分析

采用 SPASS 22.0 软件进行数据处理,  $P>0.05$  表示差异不显著,  $P<0.05$  表示差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 血清分型

44 株 HPS 安徽株共检测出 6 种血清型, 包括血清 1、4、5、7、13 和 14 型(图 1)。血清 4 型和 13 型各 18 株, 占 40.91% (18/44); 血清 5 型 3 株,

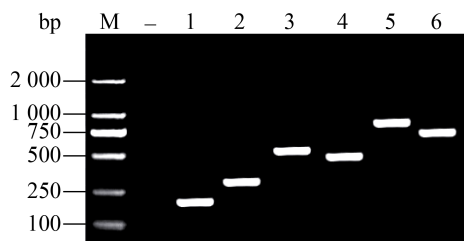


图 1 HPS 不同血清型的 PCR 鉴定  
Figure 1 PCR identification of different serotypes of HPS  
注: M: DL2000 DNA marker; -: 阴性对照; 1: 血清 1 型 *funB*; 2: 血清 4 型 *wciP*; 3: 血清 5 型 *funK*; 4: 血清 7 型 *funQ*; 5: 血清 13 型 *gltP*; 6: 血清 14 型 *funAB*.  
Note: M: DL2000 DNA marker; -: Negative control; 1: Serotype 1 *funB*; 2: Serotype 4 *wciP*; 3: Serotype 5 *funK*; 4: Serotype 7 *funQ*; 5: Serotype 13 *gltP*; 6: Serotype 14 *funAB*.

占 6.82% (3/44); 血清 1 型和 7 型各 2 株, 占 4.55% (2/44); 血清 14 型 1 株, 占 2.27% (1/44) (表 2)。

2.2 MLST 分型

44 株 HPS 安徽株共检测出 9 种 ST 型, 包括 ST241、ST267、ST268、ST269、ST270、ST271、

表 2 44 株 HPS 安徽株血清分型结果  
Table 2 Serotype typing results of 44 HPS Anhui isolates

血清型 Serotype	百分比 Percentage (%)
1	4.55 (2/44)
4	40.91 (18/44)
5	6.82 (3/44)
7	4.55 (2/44)
13	40.91 (18/44)
14	2.27 (1/44)

表 3 44 株 HPS 安徽株 MLST 分型结果  
Table 3 MLST typing results of 44 HPS Anhui isolates

ST type	<i>atpD</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>rpoB</i>	<i>6pgd</i>	<i>g3pd</i>	<i>frdB</i>	Percentage (%)
241	2	22	4	6	7	3	2	2.27 (1/44)
267	2	2	4	6	27	19	6	40.91 (18/44)
268	26	39	34	1	60	1	2	40.91 (18/44)
269	7	11	17	3	21	3	49	4.55 (2/44)
270	7	4	6	5	27	3	23	2.27 (1/44)
271	7	1	6	3	27	19	38	2.27 (1/44)
272	5	11	4	1	3	1	2	2.27 (1/44)
273	24	23	43	1	3	1	50	2.27 (1/44)
274	5	11	4	3	21	1	2	2.27 (1/44)

ST272、ST273 和 ST274 (图 2)。ST267 和 ST268 各 18 株, 占 40.91% (18/44); ST269 为 2 株, 占 4.55% (2/44); ST270、ST271、ST272、ST273、ST274 和 ST241 各 1 株, 占 2.27% (1/44) (表 3)。

2.3 MLST 分析

运用 eBURST3.0 软件将 9 个 ST 型分成 7 个单一 ST 型和 2 个克隆群。其中 ST254 (2008 年上海分离株 HK036)、ST94 (2005 年比利时分离株 05-11621)和 ST241 (2014 年肥西分离株 FX-3)归类于同一克隆群; ST176 (2008 年广东分离株 H44)和 ST268 (2009 年肥东分离株 FD-1)归类于同一克隆群; ST269、ST270、ST271、ST272、ST273、ST274 和 ST267 为单个 ST 型(图 3)。构建的 UPGMA

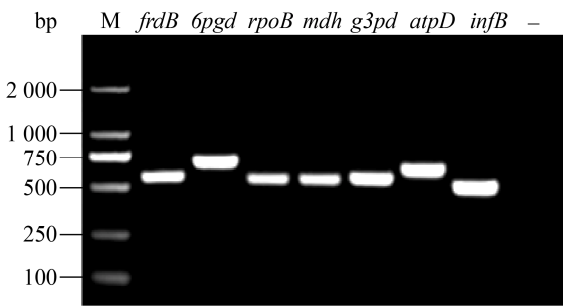


图 2 HPS 7 种管家基因的 PCR 鉴定  
Figure 2 PCR identification of 7 housekeeping genes of HPS  
注: M: DL2000 DNA marker; 其他条带为 7 种管家基因; -: 阴性对照。  
Note: M: DL2000 DNA marker; The other strips are 7 housekeeping genes; -: Negative control.

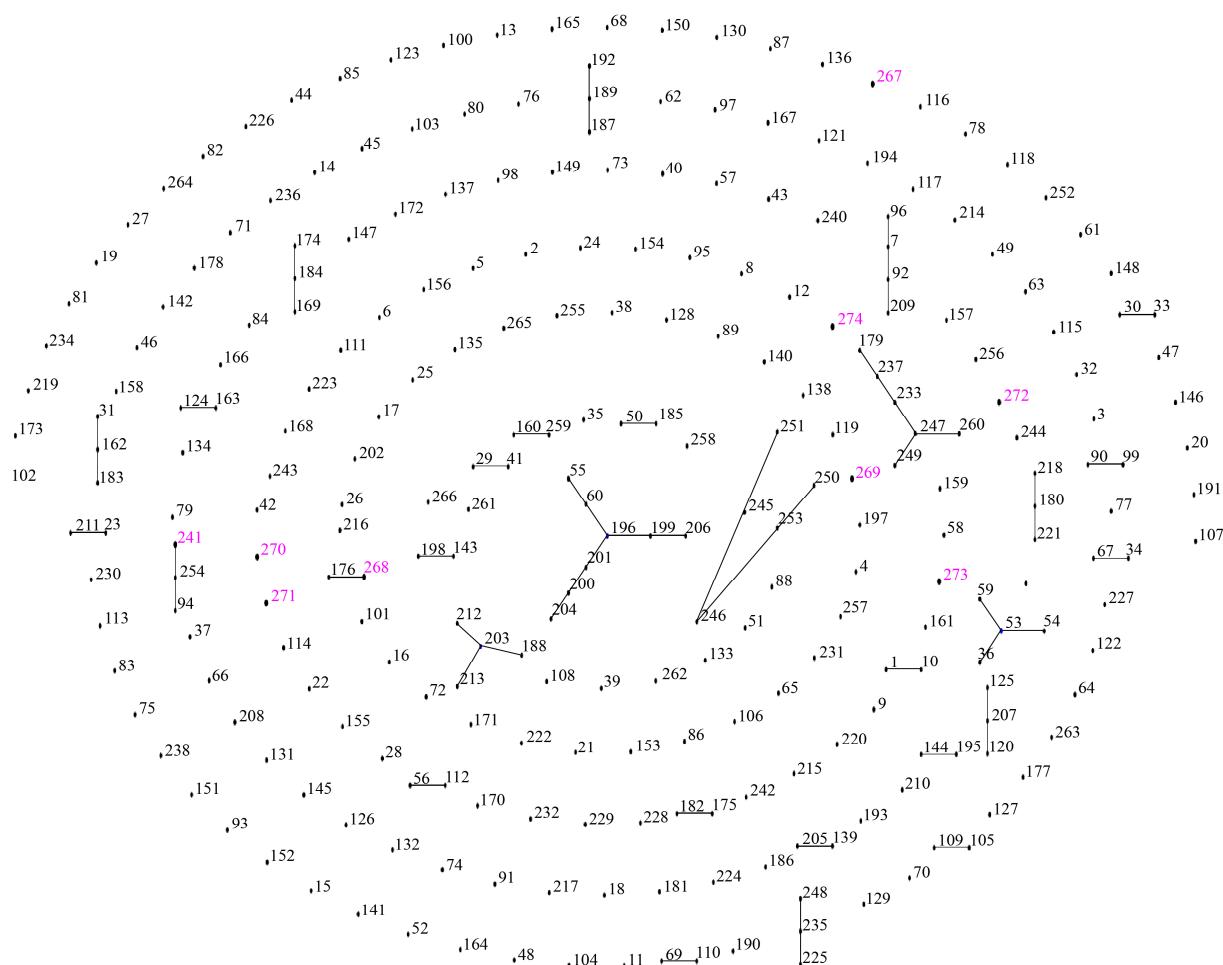


图3 274株HPS的eBURST分群图谱

Figure 3 The 274 HPS in eBURST cluster map

注：黑色字体为HPS的MLST数据库中ST型，红色字体为本研究中HPS的ST型。

Note: Black font is ST type in MLST database, red font is ST type of this study.

系统发育树中，9种ST型分为4个分支，其中分支1包含ST269(血清1型)、ST270(血清7型)和ST271(血清7型)；分支2包含ST241(血清14型)和ST267(血清4型)；分支3包含ST268(血清13型)、ST272(血清5型)和ST274(血清5型)；分支4包含ST273(血清5型)。而分支1中既有无毒力菌株也有强毒力菌株，分支2、3和4中的菌株则全部趋向于强毒力(图4)。

## 2.4 耐药性测定

### 2.4.1 MIC

44株HPS安徽株对18种抗生素的MIC测定

结果(表4)显示，氨苄西林、红霉素、头孢噻吩、青霉素和庆大霉素具有较强的抑菌效果，敏感率为88.6%–100%；其次为氟苯尼考、四环素和左氧氟沙星，敏感率为59.1%–77.3%，氟苯尼考的MIC<sub>50</sub>值距耐药临界点只相差1个稀释度，而四环素和左氧氟沙星MIC<sub>50</sub>值距耐药临界分别相差4和3个稀释度；对甲氧苄啶+磺胺甲噁唑耐药率最高，为56.8%；其次是恩诺沙星，为43.2%；林可霉素、阿米卡星、强力霉素、链霉素、卡那霉素和阿莫西林等由于缺乏参照，耐药率无法计算(表5)。

2.4.2 多重耐药性

44 株 HPS 安徽株对 11 种抗生素的多重耐药性结果显示, 11 株(25.0%)耐受 2 种, 11 株(25.0%)耐受 3 种, 7 株(15.9%)耐受 4 种, 5 株(11.4%)耐受 5 种, 2 株(4.5%)耐受 6 种, 耐受 7 种和 8 种的各 1 株(2.3%), 无单一耐药菌株(图 5); 共呈现 33 种多重耐药谱, 其中 COT-TET 构成比最大, 为 42.4% (表 6)。

2.4.3 耐药性变化趋势

2008–2012 年, HPS 安徽株对青霉素、氨苄西林、头孢噻肟、红霉素、环丙沙星、四环素、头孢噻唑、左氧氟沙星、氟苯尼考、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑和恩诺沙星的耐药率分别为 4.5%、4.5%、9.1%、0.0%、36.4%、59.1%、9.1%、27.3%、4.5%、45.5%和 27.3%; 2013–2017 年, 耐药率分别为 9.1%、9.1%、9.1%、22.7%、27.3%、18.1%、9.1%、

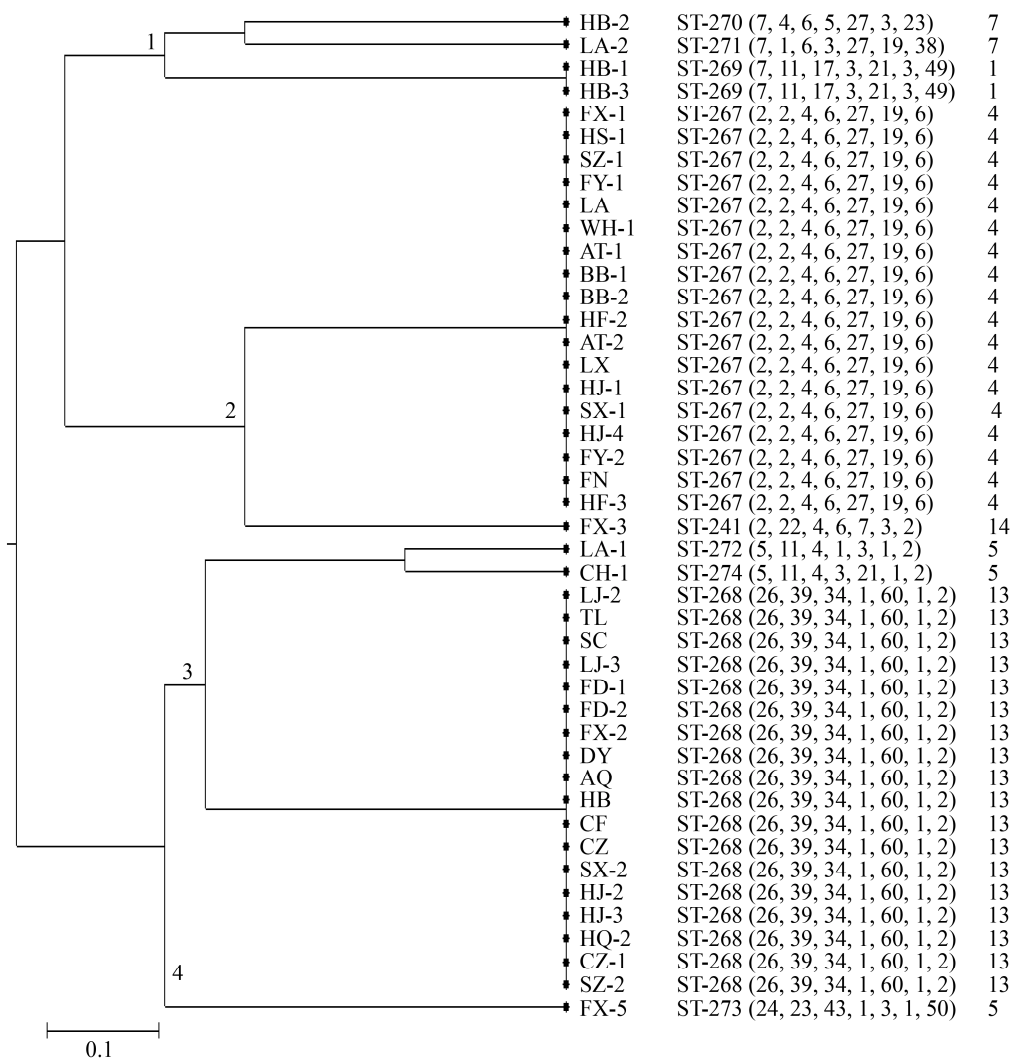


图 4 基于 44 株 HPS 安徽株 ST 型构建的 UPGMA 系统发育树

Figure 4 UPGMA dendrogram was constructed based on the STs of 44 HPS Anhui isolates

注: 标尺表示序列差异的分支长度; 分支点上的数字为菌株编号和 ST 型号; 括号内的数字为 7 个管家基因所对应的等位基因编号; 括号后的数字表示血清型; 分支干上的数字为分支编号。

Note: Bar: Nucleotide divergence; Numbers at the branch point are strain number and ST type; Numbers in parenthesis represented the allele number corresponding to the 7 housekeeping gene; Numbers after parentheses indicated serotype; Numbers on the branch trunk are the branch number.

表 4 44 株 HPS 安徽株对 18 种抗生素的 MIC 测定结果

Table 4 MIC of 18 antimicrobials in 44 HPS Anhui isolates

抗生素 Antimicrobial	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )												
	$\leq 0.031$	0.062	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	$\geq 218$
阿莫西林 AMX		4	4	10	8	1	3	4	6	3	1		
庆大霉素 GEN	1	2	3	1	2	8	12	15					
左氧氟沙星 LEV	2	2	6	8	16			3		5	2		
氟苯尼考 FLO			1	2	1	12	12	12	2	2	2		
强力霉素 DOX		2	4	14	2			12	2	4	2	2	
环丙沙星 CIP				2	3	14	11	1	1	8	4		
氨苄西林 AMP	3	4	10	14	2	2	4	2		2	1		
卡那霉素 KAN		5	5	15	5	3	1	1	1	1	3	5	
甲氧苄啶/磺胺甲噁唑 COT				1	6	4	8	1	6	11	7		
链霉素 STR		1	5	15	5	1	2		2	2	2	3	6
林可霉素 LIN					2	2	2	2	4	4	11	8	9
红霉素 ERY	2	5	9	7	6	10				2	1	2	
恩诺沙星 ENO	2	4	4	4	7	4	2	4		2	3	7	1
青霉素 PEN	6	3	9	8	8	5	2	2	1				
四环素 TET		3	2	7	4	5	2	4		8	5	4	
阿米卡星 AMI		1	2	7	9	2	2	6	6	5	4		
头孢噻呋 EFT		4	10	14	3	6	2	1	1	2	1		

表 5 44 株 HPS 安徽株对 18 种抗生素的 MIC<sub>50</sub>、MIC<sub>90</sub> 和耐药率Table 5 MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> and drug resistance rates of 18 antimicrobials in 44 HPS Anhui isolates

抗生素 Antimicrobial	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	敏感率 Sensitivity (%)	耐药率 Resistance rate (%)
阿莫西林 AMX	0.5	8	—	—
庆大霉素 GEN	2	8	100	0
左氧氟沙星 LEV	0.5	16	77.3	15.9
氟苯尼考 FLO	2	8	59.1	13.6
强力霉素 DOX	0.5	16	—	—
环丙沙星 CIP	2	16	43.2	31.8
氨苄西林 AMP	0.25	4	88.6	6.8
卡那霉素 KAN	0.5	64	—	—
甲氧苄啶/磺胺甲噁唑 COT	8	32	43.2	56.8
链霉素 STR	0.5	218	—	—
林可霉素 LIN	32	218	—	—
红霉素 ERY	0.25	32	88.6	11.4
恩诺沙星 ENO	1	64	—	43.2
青霉素 PEN	0.25	2	93.2	6.8
四环素 TET	2	32	61.4	38.6
阿米卡星 AMI	2	16	—	—
头孢噻呋 EFT	0.25	4	88.6	9.1

注：—：无可引用的耐药临界点。

Note: —: An unreferenced critical point for drug resistance.



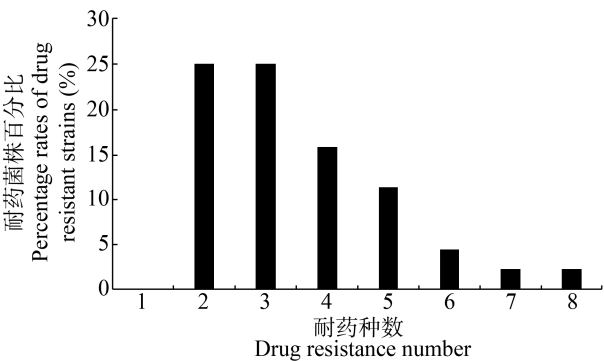


图 5 44 株 HPS 安徽株多重耐药性  
Figure 5 The multi-drug resistance of 44 HPS Anhui isolates

表 6 44 株 HPS 安徽株对 18 种抗生素的多重耐药谱  
Table 6 The multi-drug resistance spectrum of 18 antimicrobials in 44 HPS Anhui isolates

耐抗生素种数	菌株数	耐药谱
Number of antibiotics	Number of strains	Antibiogram
2	1	COT+AMP
	2	COT+CIP
	3	COT+ENO
	1	COT+LEV
	1	COT+TET
	1	ENO+FLO
	1	ENO+GEN
	1	ENO+TET
3	2	COT+ENO+CIP
	1	COT+ENO+FLO
	1	COT+ENO+GEN
	1	COT+ENO+TET
	1	COT+TET+AMP
	1	COT+TET+ERY
	1	COT+TET+PEN
	1	ENO+CIP+FLO
	1	ENO+CIP+ERY
	1	ENO+TET+EFT
4	1	COT+ENO+TET+ERY
	2	COT+ENO+TET+CIP
	1	CIP+TET+EFT+FLO
	1	ENO+LEV+CIP+AMP
	1	ENO+TET+CIP+ERY
	1	TET+PEN+CIP+FLO
5	1	COT+TET+ENO+LEV+CIP
	1	COT+TET+ERY+CIP+AMP
	1	COT+TET+ERY+CIP+FLO
	1	ENO+AMP+CIP+TET+ERY
	1	ENO+AMP+TET+EFT+FLO
6	1	COT+CIP+TET+ERY+ENO+FLO
	1	COT+CIP+TET+ERY+EFT+AMP
7	1	COT+CIP+EFT+ENO+ERY+FLO+TET
8	1	COT+CIP+EFT+ENO+ERY+FLO+TET+AMP
多重耐药谱(构成比)		COT-TET (42.4%)
Multi-drug resistance spectrum to antibiotics (constituent ratio)		

4.5%、22.7%、68.1%和 59.1% (图 6), 对比分析显示 HPS 分离株对青霉素、氨苄西林、红霉素、氟苯尼考、甲氧苄啶/磺胺甲噁唑和恩诺沙星耐药率分别上升 4.6%、4.6%、22.7%、18.2%、22.6%和 31.8%, 对环丙沙星、四环素和左氧氟沙星耐药率分别下降 9.1%、41.0%和 22.8%。

2.5 耐药性与血清型及基因型的关系

在 44 株 HPS 安徽株中, 有 38 株对抗生素产生耐药性(表 7), 血清型和基因型鉴定结果显示, 其中 36 株优势血清型/基因型菌株有 32 株耐药, 耐药率为 88.9%; 而 8 株其他血清型/基因型菌株中有 6 株菌株耐药, 耐药率为 75%。通过卡方检验显示, 优势血清型/基因型与其他血清型/基因型菌株之间的耐药率无显著性差异( $\chi^2=1.072$ ,  $P=0.3>0.05$ ), 表明不同血清型/基因型菌株之间的耐药性无显著性差异。

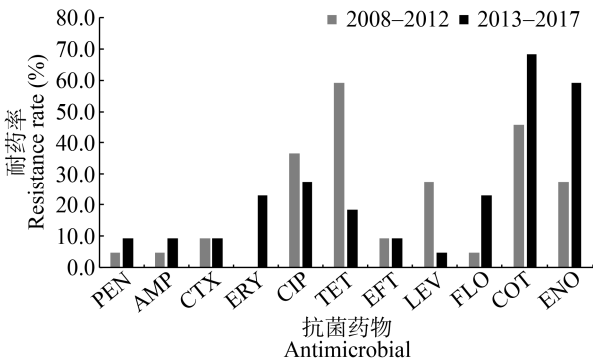


图 6 2008-2017 年 HPS 安徽分离株耐药性的变化趋势  
Figure 6 Trends of drug resistance to HPS Anhui isolates from 2008 to 2017

表 7 HPS 安徽株的耐药性与其血清型、基因型的相关性  
Table 7 Correlation between drug resistance and serotype and genotype of HPS Anhui isolates

项目	Item	敏感株数	耐药株数	合计株数	耐药率
		Sensitive strains	Resistant strains	Total strains	Resistance rate (%)
优势血清型/基因型	Dominant serotypes/genotypes	4	32	36	88.9a
其他血清型/基因型	Other serotypes/genotypes	2	6	8	75a
合计	Total	6	38	44	86.4

注: 同列字母相同表示差异不显著( $P>0.05$ ).  
Note: No significant difference was found with the same letter ( $P>0.05$ ).

### 3 讨论

近几年,国内猪革拉瑟氏病的流行愈发猛烈,给养殖业带来了巨大的经济损失。目前主要采用药物治疗和疫苗接种进行防控,但已知的 HPS 血清型就有 15 种,且不同血清型菌株之间的交叉保护力较低<sup>[6]</sup>,因而监测和调查 HPS 流行血清型有助于筛选对应型别的疫苗对该病进行有效防控。同时,鉴于当前 HPS 利用血清型分型还存在较高比例无法定型的菌株,MLST 作为一种高分辨率的分型方法,可实现跨区域细菌流行病学监测,广泛应用于 HPS 的流行病学调查。此外,抗生素的滥用拓宽了 HPS 的耐药谱,引发日趋严重的多重耐药现象,通过耐药性分析可正确选择有效药物防控猪革拉瑟氏病。

国外 HPS 流行血清型主要是血清 4 型和 5 型,我国流行的血清型是血清 4、5 和 13 型<sup>[7]</sup>,不同国家和地区的的血清型流行情况不同,相同血清型的不同地方分离株其致病力也不尽相同,具有明显的地方性特征<sup>[8]</sup>。2008–2013 年安徽地区 HPS 主要流行血清 4 型和 13 型,2014–2017 年新增了血清 1、5、7 和 14 型,流行血清型不断增多且不同时间段的流行情况存在差异,提示安徽地区商品化灭活疫苗所针对的血清型与 HPS 流行血清型型别之间不契合,在免疫保护中存在局限性<sup>[9]</sup>。

与血清型分型相比,基因分型的一个重要优势是能够对所有 HPS 进行分型。Olvera 等<sup>[10]</sup>通过 MLST 方法对 131 株 HPS 西班牙分离株进行分型,共获得 109 个 ST 型,最常见的 ST 型是 ST46;贾爱卿等<sup>[11]</sup>通过 MLST 方法对 21 株 HPS 广东分离株进行分型,共获得 16 个 ST 型,ST121 出现频率最高。不同国家和地区 HPS 的基因型流行情况存在差异,甚至采集于相同猪场的同一头猪的菌株基因型都可能有所不同。2008–2013 年安徽地区 HPS 主要流行 ST267 和 ST268,2014–2017 年新增了 ST241、ST269、ST270、ST271、ST272、ST273 和 ST274,基因型种类不断增多,呈现复杂化趋势,

表明 HPS 存在高度的遗传异质性<sup>[10]</sup>。本研究通过 MLST 方法对 44 株 HPS 安徽分离株进行分型时也发现这 7 种管家基因位点存在不同程度的突变,且每个位点都具有多个等位基因,但通过基因位点多态性分析显示这些突变大部分为同义突变,不会改变编码的蛋白质。利用 BURST 软件进行菌群结构分析,发现 ST241 和 ST268 型 HPS 分别被划分在不同的克隆群,其中同一克隆群中的 HPS 分离株均来源于不同地区以及不同猪场,但具有一定的亲缘关系,推测 ST268 和 ST241 型 HPS 的出现与地区间生猪贸易引起的菌株流入存在相关性。

HPS 共有 15 种血清型,血清型 1、5、10、12、13、14 型菌株为强毒力菌株,2、4、8 和 15 型菌株具有中等毒力,而 3、6、7、9 和 11 型菌株没有毒力,血清型与毒力之间存在一定联系<sup>[12]</sup>。本研究通过构建 UPGMA 系统发育树进行聚类分析,发现血清型 7 型菌株的基因型有 ST270 和 ST271,血清型 5 型菌株的基因型有 ST272、ST273 和 ST274,而不同基因型菌株之间只对应一种血清型,表明 ST 型与血清型之间存在一定的交叉性,同一血清型菌株可具有多个 ST 型,但单个 ST 型只能被定义到唯一血清型<sup>[13]</sup>。44 株安徽地区 HPS 分离株被划分在 4 个分支上,分支 1 中分离株包含无毒力和强毒力菌株,主要分离于鼻腔,分支 2、3 和 4 中分离株全部趋向于强毒力,多分离于肺、脑和关节等病理损害部位,这表明在特定分支之间不同 ST 型 HPS 菌株的毒力具有一定联系,该发现为基因水平上区分非致病性和致病性 HPS 提供了依据。

耐药性分析是选择有效药物的基本依据。本研究测定了 44 株 HPS 安徽分离株对 18 种抗生素的 MIC,结果显示庆大霉素、青霉素、氨苄西林、头孢噻呋和红霉素对细菌的抑制效果最好,敏感率为 88.6%–100%。而英国 HPS 分离株对红霉素、头孢噻呋、替米考星、氟苯尼考和青霉素敏感<sup>[14]</sup>,上海 HPS 分离株对替米考星、头孢噻呋、泰妙菌素、阿奇霉素和阿米卡星敏感<sup>[15]</sup>,这表明不同地区

HPS 分离株对抗生素的敏感性存在差异, 因此, 在实际生产中一定要通过药敏试验筛选出有效药物, 并科学合理使用。然而, 不同地区 HPS 分离株的多重耐药性日趋严重, 耐药谱不断扩大。四川地区的 82 株 HPS 分离株中 5-8 种耐药占比最多, 为 21.95%-30.49%, 有 7 株可耐受多达 13 种药物<sup>[16]</sup>。华南地区的 115 株 HPS 分离株对 3 种或 3 种以上药物耐药率为 100%, 7 重耐药菌株占 19.13%, 8 重耐药菌株占 17.39%<sup>[17]</sup>。抗生素的不合理使用, 以及不同耐药基因在细菌间的相互传递和蔓延导致多重耐药性的流行<sup>[18]</sup>。此外, 安徽地区 HPS 分离株在 2008-2012 年间主要对环丙沙星、四环素和甲氧苄啶/磺胺甲噁唑表现出较强的耐药性, 而在 2013-2017 年间则对甲氧苄啶/磺胺甲噁唑和恩诺沙星耐药严重, 表明不同时间段内 HPS 分离株的耐药情况都在发生变化, 这主要是药物的选择压力所造成<sup>[19]</sup>。

#### 4 结论

安徽地区 HPS 流行菌株血清型和基因型呈现多元化, 具有较高的遗传异质性; HPS 耐药率逐年上升, 多重耐药现象严重, 青霉素和庆大霉素为目前临床防治猪革拉瑟氏病的首选药物, 血清型、ST 型与耐药性之间无明显相关性。

#### REFERENCES

- [1] Wang L, Zhao ZQ, Xue Y, et al. Comparative study on pathogenicity of the most prevalent serovars of *Haemophilus parasuis* isolates in China[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, 34(11): 1748-1752 (in Chinese)  
王乐, 赵战勤, 薛云, 等. 副猪嗜血杆菌国内流行血清型菌株的致病性比较研究[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(11): 1748-1752
- [2] Vanderhaeghen W, Cerpentier T, Adriaensen C, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 associated with clinical and subclinical mastitis in Belgian cows[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 144(1/2): 166-171
- [3] Fu D, Tan XT, Cao YQ, et al. Advances in drug resistance of *Haemophilus parasuis*[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2016, 38(7): 591-594 (in Chinese)  
付丹, 谭晓婷, 曹玉琴, 等. 副猪嗜血杆菌耐药性研究进展[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(7): 591-594
- [4] Wang QF. Research on serotype, genotype and antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* isolated from Anhui porcine[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2018 (in Chinese)  
汪清峰. 副猪嗜血杆菌安徽分离株的血清型、基因型及耐药性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2018
- [5] Mullins MA, Register KB, Brunelle BW, et al. A curated public database for multilocus sequence typing (MLST) and analysis of *Haemophilus parasuis* based on an optimized typing scheme[J]. Veterinary Microbiology, 2013, 162(2/4): 899-906
- [6] Bak H, Riising HJ. Protection of vaccinated pigs against experimental infections with homologous and heterologous *Haemophilus parasuis*[J]. Veterinary Record, 2002, 151(17): 502-505
- [7] Zhang JM, Xu CG, Guo LL, et al. Prevalence and characterization of genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* isolates from southern China[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2012, 76(3): 224-229
- [8] Bello-orti B, Costa-hurtado M, Martinez-moliner V, et al. Time course *Haemophilus parasuis* infection reveals pathological differences between virulent and non-virulent strains in the respiratory tract[J]. Veterinary Microbiology, 2014, 170(3/4): 430-437
- [9] Li M, Cai RJ, Song S, et al. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of recombinant outer membrane proteins of *Haemophilus parasuis* serovar 5 in a murine model[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0176537
- [10] Olvera A, Cerdà-cuellar M, Aragon V. Study of the population structure of *Haemophilus parasuis* by multilocus sequence typing[J]. Microbiology, 2006, 152(12): 3683-3690
- [11] Jia AQ, Yuan ZY, He YL, et al. MLST study of the *Haemophilus parasuis* isolated from Guangdong province[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2014, 36(1): 23-26 (in Chinese)  
贾爱卿, 袁子彦, 何永龙, 等. 副猪嗜血杆菌广东分离株 MLST 分型研究[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(1): 23-26
- [12] Amano H, Shibata M, Kajio N, et al. Pathologic observations of pigs intranasally inoculated with serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* using immunoperoxidase method[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 1994, 56(4): 639-644
- [13] Ma LN. Study of *Haemophilus parasuis* on population genome sequencing, molecular typing and resistance[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017 (in Chinese)  
马丽娜. 副猪嗜血杆菌群体基因组测序、分子分型和耐药性研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士学位论文, 2017
- [14] de la Fuente AJM, Tucker AW, Navas J, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of *Haemophilus parasuis* from pigs in the United Kingdom and Spain[J]. Veterinary Microbiology,

- 2007, 120(1/2): 184-191
- [15] Zhang Y, Li BB, Wei JC, et al. Isolation and antibiotic resistance of *Haemophilus parasuis* in Shanghai[J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2015, 23(4): 25-30 (in Chinese)  
张悦, 李蓓蓓, 魏建超, 等. 上海副猪嗜血杆菌分离鉴定及其耐药性分析[J]. 中国动物传染病学报, 2015, 23(4): 25-30
- [16] Yu JF, Wang WG, Wei Y, et al. Study on biological characteristics and drug sensitivity of *Haemophilus parasuis* isolated in Sichuan province[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 42(6): 1566-1570 (in Chinese)  
于吉锋, 王文贵, 魏甬, 等. 副猪嗜血杆菌四川株生物学特性及药物敏感性研究[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(6): 1566-1570
- [17] Xu CG, Guo LL, Zhang JM, et al. Resistance to antibiotics and distribution of tetracycline resistance determinants in *Haemophilus parasuis* from pigs in south China[J]. Scientia Agricultural Sinica, 2011, 44(22): 4721-4727 (in Chinese)  
徐成刚, 郭莉莉, 张建民, 等. 华南地区副猪嗜血杆菌的耐药性特点及四环素耐药基因携带情况[J]. 中国农业科学, 2011, 44(22): 4721-4727
- [18] Hu JY, Tang XB, Tang D, et al. Monitoring of multiple resistance of *Streptococcus suis* and *Haemophilus parasuis* strains from clinical isolates[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2012, 31(5): 623-628 (in Chinese)  
胡军勇, 汤细彪, 汤电, 等. 临床分离猪链球菌和副猪嗜血杆菌多重耐药性监测[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31(5): 623-628
- [19] Zhou XL, Xu XJ, Zhao YX, et al. Distribution of antimicrobial resistance among different serovars of *Haemophilus parasuis* isolates[J]. Veterinary Microbiology, 2010, 141(1/2): 168-173

## 征订启事

### 欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年,月刊,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展,以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊,中国科技核心期刊,CSCD核心期刊,曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计,本刊2012年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”,并入选“中国精品科技期刊”,成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2020年每册定价130元,全年1560元,我们免邮费寄刊。

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413