

一株猪链球菌的分离鉴定及其生物学特性研究

郑成坤¹, 贾梦蝶¹, 王彦红^{2,3*}

(1. 扬州大学生物科学与技术学院, 江苏扬州 225009; 2. 扬州大学兽医学院, 江苏扬州 225009; 3. 江苏省动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏扬州 225009)

摘要 为了确定扬州市某猪场发病猪的病原, 对该猪场送检的病猪心脏进行了细菌分离与培养。通过 16S rDNA 测序和 *gdh* 基因 PCR 扩增, 确定细菌种类; 用血清型特异性引物进行 PCR 扩增, 确定分离菌株的血清型; 通过生长曲线测定、小鼠感染试验和药敏试验对分离菌株的生物学特性进行研究。结果表明, 分离菌株为猪链球菌 2 型; 分离菌株的生长情况与猪链球菌 2 型 SC19 菌株相似, 但最高 OD₅₉₅ 值略低于 SC19 菌株; 分离菌株对小鼠具有高致病性; 分离菌株主要对青霉素类和头孢类药物敏感。这说明猪链球菌 2 型很可能是该猪场发病猪的病原, 该猪场对猪链球菌感染的防控应优先选用青霉素类和头孢类药物。

关键词 猪链球菌; 分离鉴定; 血清型; 致病性; 药敏试验

中图分类号 S852.61 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)01-0087-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.01.027



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Isolation, Identification and Biological Characterization of a *Streptococcus suis* Strain

ZHENG Cheng-kun¹, JIA Meng-die¹, WANG Yan-hong^{2,3} (1. College of Biosciences and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009; 2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009; 3. Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonoses, Yangzhou, Jiangsu 225009)

Abstract To detect the pathogen of diseased pigs from a pig farm in Yangzhou, bacterial isolation and culture were conducted on the heart sample of a diseased pig. The bacterial species were determined by 16S rDNA sequencing and PCR amplification of *gdh* gene. The serotype of the isolated strain was determined by PCR amplification using the serotype-specific primers. The biological characteristics of the isolated strain were explored by growth curve analysis, experimental infection of mice and antimicrobial susceptibility testing. The results showed that the isolated strain belonged to *Streptococcus suis* serotype 2. The isolated strain exhibited similar growth kinetics compared to *S. suis* 2 strain SC19, except that the maximum OD₅₉₅ value was lower than that of strain SC19. The isolated strain also displayed high pathogenicity in a mouse infection model. Moreover, the isolated strain was sensitive to penicillins and cephalosporins. Collectively, the results suggested that *S. suis* 2 was likely to be the pathogen of the diseased pigs from the pig farm, and that penicillins and cephalosporins should be the preferred drugs for the prevention and control of *S. suis* infections.

Key words *Streptococcus suis*; Isolation and identification; Serotype; Pathogenicity; Drug susceptibility test

猪链球菌是一种革兰氏阳性致病菌, 可以感染猪, 导致脑膜炎、败血症、肺炎、心内膜炎和关节炎, 给养猪业带来重大经济损失^[1]。此外, 猪链球菌可以通过伤口和胃肠道途径感染人, 引起脑膜炎和链球菌中毒性休克综合征等^[2]。根据荚膜多糖抗原的差异, 猪链球菌目前被分为 29 个血清型^[3]。其中 1、2、7 和 9 型为发病猪中最流行的血清型^[4]。尤其是 2 型被认为是全球范围内临床分离率最高、致病性最强的血清型^[5]。在 1998 和 2005 年, 我国 2 次暴发大规模人感染猪链球菌疫情, 分别导致 25 人感染、14 人死亡和 215 人感染、39 人死亡^[6]。截至 2013 年, 全球范围内累计报道了超过 1 600 例人感染猪链球菌病例^[1]。近年来, 国内外仍然经常见到人感染猪链球菌的病例报道^[7-10], 说明猪链球菌对公众健康和养猪业是一个持续的威胁。

最近扬州市某猪场发生一起疑似细菌感染事件, 每天有 3~5 只猪(70 日龄)死亡, 持续 5 d 左右。笔者从该猪场送检的病猪心脏中分离出 1 株细菌; 经 16S rDNA 测序和 *gdh* 基因扩增证实该菌为猪链球菌; 经 PCR 鉴定, 该猪链球菌为血清 2 型; 小鼠感染试验结果显示, 该菌具有较高的致病性; 进

一步对该菌进行了药敏试验, 为猪场对猪链球菌感染的防控提供了参考依据。

1 材料与方法

1.1 病料及试验动物 病料为扬州市某猪场送检的病猪心脏。雌性 BALB/c 小鼠(24 只, SPF 级, 5 周龄)购自南京市青龙山动物繁殖场。

1.2 主要试剂 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit 和 PrimeSTAR Max Premix, 购自宝生物工程(大连)有限公司; 2×Taq Plus Master Mix II 和 DL2000 Plus DNA Marker, 购自南京诺唯赞生物科技有限公司; TSA(胰蛋白胨大豆琼脂)和 TSB(胰蛋白胨大豆肉汤)培养基, 购自美国 BD 公司; 新生牛血清为浙江天杭生物科技股份有限公司产品; 药敏纸片为杭州微生物试剂有限公司产品。

1.3 细菌的分离纯化与保藏 将病料剪开, 用接种环深入病料内部蘸取细菌, 划线接种于添加 10% 新生牛血清的 TSA 平板, 37 °C 恒温培养箱中培养约 20 h。挑取单菌落划线接种于新的平板, 进行纯化。再挑取单菌落, 接种于添加 10% 新生牛血清的 TSB 培养基, 37 °C 摇床中培养约 5 h, 用甘油保菌, 冻存于 -20 °C 条件下, 用于后续试验。

1.4 细菌鉴定 参考 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit 说明书, 以纯化细菌的基因组 DNA 为模板, 用试剂盒中的 16S rDNA 引物进行 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后送交北京擎科新业生物技术有限公司测序。测

基金项目 国家自然科学基金项目(31802210); 中国博士后科学基金项目(2018M630615); 江苏高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)。

作者简介 郑成坤(1989—), 男, 河南信阳人, 讲师, 博士, 从事病原微生物学研究。* 通信作者, 讲师, 博士, 从事动物疾病诊断与防治研究。

收稿日期 2019-07-06; **修回日期** 2019-07-19

序结果在 NCBI 网站上用 Blastn 进行比对,以确定细菌种属。同时,以纯化细菌的基因组 DNA 为模板,用猪链球菌 *gdh* 基因特异性引物(表 1)进行 PCR 扩增,进一步确定细菌种属。

1.5 细菌血清型鉴定 参考文献[11]设计猪链球菌血清 1 型(含 14 型)、2 型(含 1/2 型)、7 型和 9 型的特异性引物(表 1)。以纯化细菌的基因组 DNA 为模板,用 4 对分型引物分别进行 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后送交北京擎科新业生物技术有限公司测序。测序结果用 Clustal Omega 进行多序列比对,以确定细菌血清型。

表 1 试验所用引物
Table 1 Primers used in this study

基因 Gene	引物 Primer	引物序列 Primer sequences (5'-3')	大小 Size bp	血清型 Serotypes
<i>gdh</i>	<i>gdh</i> -1	CGTATTCTGTCAAACGAGCG	653	所有血清型
	<i>gdh</i> -2	CAACCGTGGCTACCGTGT		
<i>cps1I</i>	<i>cps1I</i> -1	GTTGGCITTATGAACTATCCT	444	1 或 14
	<i>cps1I</i> -2	TAGCCTGAATGACTTCCGAG		
<i>cps2I</i>	<i>cps2I</i> -1	CTCATCGCGTTAATGGTCTT	314	2 或 1/2
	<i>cps2I</i> -2	TGTTGCAGATAGGACTACAATGAT		
<i>cps7L</i>	<i>cps7L</i> -1	GGTGGAGGAAGTATTGGAGAG	590	7
	<i>cps7L</i> -2	GAAGTTGAAGCTGGTGATAAATT		
<i>cps9J</i>	<i>cps9J</i> -1	GTTTAAATAGCCCTACTGTGCGAT	442	9
	<i>cps9J</i> -2	TCCACCTGAGCTTCGAT		

1.6 细菌生长曲线的绘制 挑取平板上的单菌落,接种于添加 10% 新生牛血清的 TSB 培养基,37 °C 摇床中培养约 5 h。将该菌液 1:100 转接于新鲜培养基,然后分装到 96 孔板中,每孔 200 μL,设置 5 个重复。将 96 孔板置于 37 °C 摇床中,每隔 1 h 取出,用酶标仪测定 OD₅₉₅ 值,绘制细菌的生长曲线。

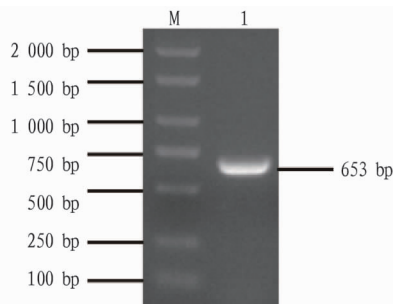
1.7 小鼠感染试验 将细菌培养至稳定期前期,取菌液 5 000 r/min 离心去上清,菌体用 PBS 重悬,并将细菌浓度调整到 1×10⁹ CFU/mL。将 BALB/c 小鼠随机分为 3 组(I、II、III),每组 8 只。I 组小鼠腹腔感染 2×10⁸ CFU/只的分离菌株;II 组小鼠腹腔感染相同剂量的猪链球菌 2 型强毒株 SC19^[12];III 组小鼠腹腔注射 200 μL PBS,作为对照。感染后观察 7 d,每隔 12 h 记录 1 次小鼠症状及存活情况。

1.8 药敏试验 挑取平板上的单菌落,接种于添加 10% 新生牛血清的 TSB 培养基,37 °C 摇床中培养过夜。用 PBS 将菌液稀释到 0.5 麦氏浊度标准,然后用灭菌棉签将其均匀涂布于添加 10% 新生牛血清的 TSA 平板上。选取 20 种常用药物的药敏纸片,贴于涂布细菌的平板上,每块平板上贴 4 个药敏纸片。平板在 37 °C 恒温培养箱中培养过夜,取出并测量抑菌圈直径。参考药敏纸片说明书判定药敏结果。

2 结果与分析

2.1 细菌的鉴定结果 分离的细菌在平板上形成圆形、光滑、有淡蓝色荧光的小菌落,与猪链球菌的菌落特征相一致。采用 PCR 扩增分离细菌的 16S rDNA 序列并测序,结果表明分离细菌为猪链球菌。用猪链球菌 *gdh* 基因特异性引物进

行 PCR 鉴定,结果显示扩增出大小为 653 bp 的 DNA 片段(图 1),进一步证实分离的细菌为猪链球菌。将分离菌株命名为 YZ1802。



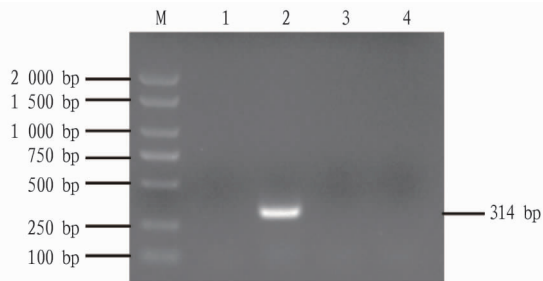
注:M;DL2000 Plus DNA Marker;1. *gdh* 基因扩增产物

Note:M. DL2000 Plus DNA Marker;1. PCR product of *gdh* gene

图 1 分离菌株的 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR identification of the isolated strain

2.2 细菌的血清型 用表 1 中的分型引物分别进行 PCR 扩增,结果显示用 *cps2I*-1/*cps2I*-2 引物扩增出大小为 314 bp 的 DNA 片段,而用其他分型引物未扩增出 DNA 片段(图 2),说明分离菌株 YZ1802 为血清 2 型或 1/2 型。参照文献[11]可知,*cps2I* 基因(GenBank 号为 KC537364. 1)的第 981 个碱基为 T,而 *cps1I*/*2I* 基因(GenBank 号为 KC537384. 1)的第 981 个碱基为 C。将扩增出的 DNA 片段测序后进行多序列比对,结果显示第 981 个碱基对应的位置为 T(图 3),因此分离菌株 YZ1802 为血清 2 型。



注:M. DL2000 Plus DNA Marker;1~4 分别为 *cps1I*、*cps2I*、*cps7L*、*cps9J* 基因特异性引物扩增产物

Note:M. DL2000 Plus DNA Marker;1~4 were PCR amplification products by using the specific primers of the *cps1I*、*cps2I*、*cps7L* and *cps9J* genes respectively

图 2 分离菌株的血清型鉴定

Fig. 2 Serotype identification of the isolated strain

2.3 分离菌株的生长曲线 生长曲线显示,分离菌株 YZ1802 在接种后 1 h 进入指数期,5 h 进入稳定期;YZ1802 菌株的生长情况与猪链球菌 2 型 SC19 菌株相似,但最高 OD₅₉₅ 值略低于 SC19 菌株(图 4)。

2.4 分离菌株的致病性 用小鼠感染模型评估分离菌株 YZ1802 的致病性。在感染后 12 h, YZ1802 组 3 只小鼠死亡, SC19 组 5 只小鼠死亡;在感染后 24 h, YZ1802 组小鼠再死亡 2 只, SC19 组小鼠再死亡 3 只。总体来看, YZ1802 组小鼠死亡 5 只, SC19 组小鼠全部死亡, 对照组小鼠全部存活(图 5)。尽管 YZ1802 组存活的小鼠数量多于 SC19 组, 结果显示 2 组

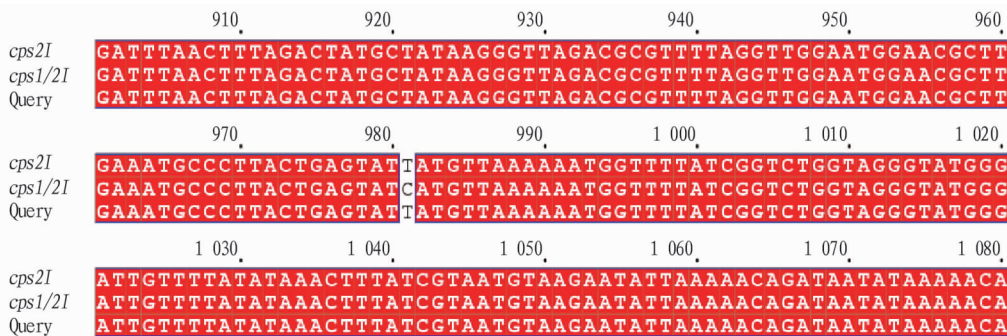


图 3 cps2I-1/cps2I-2 引物扩增 DNA 片段的多序列比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of the DNA fragment amplified by the cps2I-1/cps2I-2 primer pair

小鼠的存活率没有显著差异 ($P=0.0898$), 说明 YZ1802 菌株同样具有高致病性。

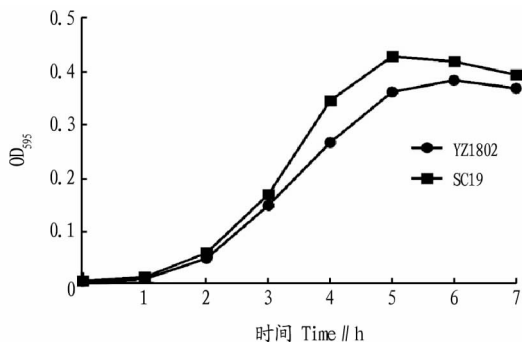


图 4 分离菌株与 SC19 菌株的生长曲线

Fig. 4 Growth curves of the isolated strain and strain SC19

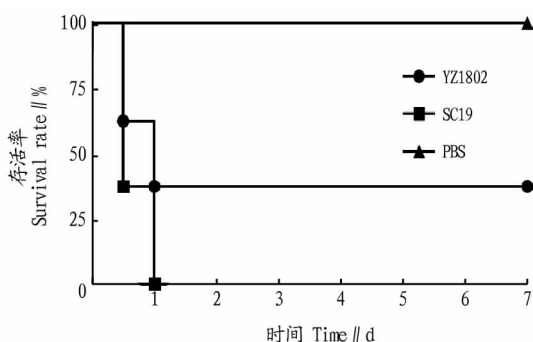


图 5 分离菌株和 SC19 菌株感染小鼠的存活曲线

Fig. 5 Survival curves of mice infected with the isolated strain and strain SC19

2.5 分离菌株的药物敏感性 采用纸片扩散法测定分离菌株的药物敏感性, 结果如表 2 所示, YZ1802 菌株对 13 种药物敏感, 对 7 种药物表现耐药或中介。YZ1802 菌株表现敏感的药物主要是青霉素类 (氨苄西林、羧苄西林、苯唑西林、青霉素、哌拉西林钠) 和头孢类 (头孢氨苄、头孢唑啉、头孢拉定、头孢哌酮、头孢他啶、头孢曲松、头孢呋辛)。YZ1802 菌株对氨基糖苷类中的庆大霉素表现敏感, 而对该类别中的其他药物 (丁胺卡那、卡那霉素、新霉素) 表现耐药。此外, YZ1802 菌株对大环内酯类 (红霉素) 和四环素类 (四环素、多西环素、米诺环素) 药物表现耐药或中介。

3 讨论与结论

猪链球菌是一种重要的人兽共患病原菌, 其中 2 型是危

害最严重的血清型^[1]。该研究从扬州市某猪场送检的病猪心脏中分离出 1 株细菌, 用 16S rDNA 测序和 PCR 扩增 2 种分子生物学方法证实该菌为猪链球菌。PCR 法也经常用于猪链球菌血清型的鉴定, 但该方法无法区分 1 型和 14 型、2 型和 1/2 型^[11]。该研究创新地将 PCR 法和 DNA 测序技术相结合, 利用 2 型和 1/2 型猪链球菌荚膜多糖合成相关基因上的一个碱基差异, 证实分离的猪链球菌为 2 型。该研究也对 1 型和 14 型猪链球菌的区分具有借鉴意义。

表 2 药敏试验结果

Table 2 The results of antimicrobial susceptibility test

药敏纸片 Drug sensitive paper	抑菌圈直径 Diameter of antibacterial circle/mm	敏感性 Susceptibility
氨苄西林 Ampicillin	34.0	S
羧苄西林 Carbenicillin	32.0	S
苯唑西林 Oxacillin	20.0	S
青霉素 Penicillin	32.0	S
哌拉西林钠 Piperacillin	31.5	S
头孢氨苄 Cefalexin	28.5	S
头孢唑啉 Cefazolin	28.0	S
头孢拉定 Cefradine	31.5	S
头孢哌酮 Cefoperazone	30.5	S
头孢他啶 Ceftazidime	21.5	S
头孢曲松 Ceftriaxone	28.5	S
头孢呋辛 Cefuroxime	27.0	S
丁胺卡那 Amikacin	13.5	R
庆大霉素 Gentamicin	16.5	S
卡那霉素 Kanamycin	0	R
新霉素 Neomycin	0	R
红霉素 Erythromycin	0	R
四环素 Acheomycin	0	R
多西环素 Doxycycline	10.0	R
米诺环素 Minocycline	18.5	I

注: S 表示敏感, R 表示耐药, I 表示中介
Note: S. Sensitive; R. Resistance; I. Intermediate

小鼠感染模型被广泛用于猪链球菌毒力的评估^[13]。因此, 该研究以高致病性猪链球菌 2 型 SC19 菌株为参考菌株, 用 BALB/c 小鼠评估分离菌株的毒力。虽然分离菌株感染组小鼠的死亡数量少于 SC19 菌株组, 但 2 组小鼠的存活率没有显著差异, 说明分离菌株同样具有高致病性。据此可推断猪链球菌 2 型感染很可能是该猪场猪发病的原因。

害比例较高且总体发芽率低,正常千粒重应大于 7 235.6 g。

试验发现,受损种子仍具有一定的发芽能力,可能是由于胚芽等分生组织没有或仅部分受到损伤,而种皮外观正常的部分种子也存在不同程度的受损情况。根据种皮外观进行人为分检得到的受损种子发芽率为 31.0%,明显低于外观正常的种子(72.0%),说明依据种皮外观进行挑选分类可以显著提高播种效率,这对选种和育苗生产具有一定的指导意义。该试验在中国无忧花的实生苗中发现有一定比例的变异苗(1.1%)和双顶芽苗(2.3%),推测可能由于虫害或病菌对胚芽的破坏和侵染导致顶端分生组织的二次分化有关。此外,部分种子萌发过程中出现的花蝇科幼虫,鉴于播种前已对种子进行过浸泡消毒,推测这些幼虫可能是以虫卵的形式寄生于种子内部,很难通过外部消毒的办法予以杀死。但此类幼虫的外形和大小明显不同于鳞翅目的荔枝异形小卷蛾,其具体种类和侵染途径还有待进一步鉴定和研究。

中国无忧树是近年来在华南地区畅销的高档新优绿化树种^[5],且树皮和根可供药用,又是优良的紫胶虫(*Laccifer lacca* Kerr)寄主。该树种在台湾台北市早有应用,但大量用作南宁优美的行道和绿化树种^[3]。目前种植在南宁园湖路的中国无忧花已经取得了很好的景观效果,为该树种在周边市区的应用提供了样板,也为优良乡土树种的开发应用提供了范例。目前中国无忧花胸径 5~6 cm 的容器苗在南宁苗木

市场的售价达 250~400 元,但仅能满足于少量需求,种苗的缺少是限制该树种发展的一个重要因素。除了加强中国无忧花实生苗繁育的相关技术研究外,建立并完善其植物组织培养技术体系,是破解中国无忧花种苗瓶颈的有效途径,也是实现其大面积推广应用的重要环节。

参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志:第 39 卷[M]. 北京:科学出版社,1988:207-209.
- [2] 庄雪影. 园林树木学(华南本)[M]. 广州:华南理工大学出版社,2002:135.
- [3] 王越,温放. 中国无忧树与红花荷——记广西两种色彩绚烂的乡土树种[J]. 中国花卉盆景,2006(6):20-21.
- [4] 罗伟聪. 中国无忧花历史文化特性及在华南地区的种植养护研究[J]. 中国园艺文摘,2016(6):164-166.
- [5] 曾宋君. 无忧树的繁殖与栽培管理[J]. 广东园林,2001(2):40-41.
- [6] 广西壮族自治区林业科学研究所. 一种无忧花绿化苗培育方法:CN201310188206.7[P]. 2013-08-07.
- [7] 刘东明,伍有声,董祖林,等. 干基注射内吸性杀虫剂防治无忧花蛀茎害虫研究初报[J]. 广东园林,2002(1):45-46.
- [8] 温小莹,陈建新,吴泽鹏,等. 中国无忧花在广州地区的生长及其育苗技术[J]. 广东林业科技,2005,21(4):58-60.
- [9] 吕武杭,余汉元,陈子英. 中国无忧树的引种试验[J]. 粤东林业科技,2006(1):8-10.
- [10] 朱海波. 中国无忧花育苗栽培技术[J]. 现代农业科技,2009(19):222-223.
- [11] 广东省质量技术监督局. 中国无忧花栽培技术规程:DB 44/T 1576—2015[S]. 广州:南方医科大学,2015:1-2.
- [12] 王宏志. 热带亚热带主要树种采种育苗技术[M]. 南宁:广西人民出版社,1985.

(上接第 89 页)

为了给猪场对猪链球菌病的防控提供参考,该研究检测了分离菌株的药物敏感性。结果显示,分离菌株主要对青霉素类和头孢类药物敏感,对氨基糖苷类、大环内酯类和四环素类药物表现耐药或中介。该研究的药敏试验结果与 Chen 等^[14]的研究结果类似。该猪场防控猪链球菌感染应优先选择青霉素类和头孢类药物。

该研究分离到一株猪链球菌 2 型菌株,该菌株具有高致病性,很可能是引起猪场猪发病的病原菌。药敏试验结果显示,分离菌株主要对青霉素类和头孢类药物敏感。该研究结果为猪场对猪链球菌感染的防控提供了参考依据。

参考文献

- [1] GOYETTE-DESJARDINS G, AUGER J P, XU J, et al. *Streptococcus suis*, an important pig pathogen and emerging zoonotic agent—an update on the worldwide distribution based on serotyping and sequence typing[J]. Emerg Microbes Infect, 2014, 3(6):1-20.
- [2] SEGURA M, CALZAS C, GRENIER D, et al. Initial steps of the pathogenesis of the infection caused by *Streptococcus suis*: Fighting against nonspecific defenses[J]. FEBS Lett, 2016, 590(21):3772-3799.
- [3] TIEN LE H T, NISHIBORI T, NISHITANI Y, et al. Reappraisal of the taxonomy of *Streptococcus suis* serotypes 20, 22, 26, and 33 based on DNA-DNA homology and *sodA* and *recN* phylogenies[J]. Vet Microbiol, 2013, 162(2/3/4):842-849.
- [4] 张纯瑶,解倩倩,宋子杰,等. 猪链球菌的分离鉴定及耐药性分析[J].

- 黑龙江畜牧兽医, 2019(1):69-72.
- [5] FENG Y J, ZHANG H M, WU Z W, et al. *Streptococcus suis* infection: An emerging/reemerging challenge of bacterial infectious diseases? [J]. Virulence, 2014, 5(4):477-497.
- [6] YU H J, JING H Q, CHEN Z H, et al. Human *Streptococcus suis* outbreak, Sichuan, China[J]. Emerg Infect Dis, 2006, 12(6):914-920.
- [7] 冯元贵,韩茹欣,马宾. 海南省首例人感染猪链球菌病流行病学调查[J]. 中国热带医学, 2019, 19(3):298-300.
- [8] 杜国明,邹艳,陈海明,等. 江苏省苏州市首例人感染猪链球菌病病例的调查报告[J]. 医学动物防制, 2019, 35(7):709-710.
- [9] NEMETH A, KNAUSZ M, SCHMIDT P. Special case of purulent meningitis caused by *Streptococcus suis*. Case report[J]. Orv Hetil, 2019, 160(1):30-34.
- [10] YANASE T, MORII D, KAMIO S, et al. The first report of human meningitis and pyogenic ventriculitis caused by *Streptococcus suis*: A case report [J]. J Infect Chemother, 2018, 24(8):669-673.
- [11] LIU Z J, ZHENG H, GOTTSCHALK M, et al. Development of multiplex PCR assays for the identification of the 33 serotypes of *Streptococcus suis* [J]. PLoS One, 2013, 8(8):1-11.
- [12] TENG L, DONG X X, ZHOU Y, et al. Draft genome sequence of hypervirulent and vaccine candidate *Streptococcus suis* strain SC19 [J]. Genome Announc, 2017, 5(3):1-2.
- [13] SEGURA M, FITTIPALDI N, CALZAS C, et al. Critical *Streptococcus suis* virulence factors: Are they all really critical? [J]. Trends Microbiol, 2017, 25(7):585-599.
- [14] CHEN L, SONG Y J, WEI Z G, et al. Antimicrobial susceptibility, tetracycline and erythromycin resistance genes, and multilocus sequence typing of *Streptococcus suis* isolates from diseased pigs in China [J]. J Vet Med Sci, 2013, 75(5):583-587.