

副猪嗜血杆菌对部分常用实验动物的致病性试验

高鹏程, 储岳峰, 赵萍, 贺英, 逯忠新*

(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室
农业部畜禽病毒学重点实验室, 兰州 730046)

摘要: 为筛选对副猪嗜血杆菌易感的实验动物, 对部分常用的不同品种、不同品系实验动物进行了副猪嗜血杆菌致病性试验。用副猪嗜血杆菌血清型 5 型标准株 (Strain Nagasaki) 培养物, 以 $2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^{10}$ CFU 的接种量, 通过腹腔感染 SPF 级小鼠、大鼠、金黄地鼠、豚鼠以及清洁级豚鼠和兔。结果当接种量达到 2×10^9 CFU 时, SPF 豚鼠、清洁级豚鼠和 SPF 昆明小鼠出现死亡, 在死亡豚鼠观察到典型的副猪嗜血杆菌病理变化, 而在死亡小鼠未见。其它各实验动物在上述剂量范围内均未发病或死亡, 感染 7 d 后剖检也未见任何异常。对死亡豚鼠和小鼠的各个组织器官进行副猪嗜血杆菌分离, 结果在豚鼠的大脑、心血、肺、肝和腹水中分离到了副猪嗜血杆菌。提示豚鼠对副猪嗜血杆菌易感, 可以作为建立副猪嗜血杆菌感染动物模型的候选实验动物。

关键词: 副猪嗜血杆菌; 实验动物; 致病性; 血清型 5 型标准株

中图分类号: S852.612

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)01-0138-04

Pathogenic Experiment of *Haemophilus parasuis* to Certain Experimental Animals

GAO Peng-cheng, CHU Yue-feng, ZHAO Ping, HE Ying, LU Zhong-xin*

(Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology, Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: The pathogenicity of *Haemophilus parasuis* to experimental animals including specific pathogen-free (SPF) mice, SPF rats, SPF syrian hamsters, SPF guinea pigs, clean guinea pigs and rabbits was identified in this study. These experimental animals were inoculated intraperitoneally with 2×10^8 to 2×10^{10} CFU culture of strain Nagasaki. Guinea pigs (SPF and Clean) and KM mice (SPF) inoculated with 2×10^9 CFU organisms suspended were died and other animals survived. The dead guinea pigs showed pathological changes of Glass's disease, but there were no lesions in all dead mice. *H. parasuis* were isolated from the organs of the dead guinea pigs, including the brain, liver, heart blood, lung and peritoneal fluid. These results suggested that the guinea pig was susceptible to *H. parasuis*, and can be the candidate for developing animal model for investigation on the pathogenesis of *H. parasuis*.

Key words: *Haemophilus parasuis*; experimental animals; pathogenicity; strain Nagasaki

副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, HPS) 是猪 Glasser's 病的病原, 引起仔猪的纤维素性多发性浆膜炎、脑膜炎和关节炎^[1]。也有报道 HPS 能

引起幼猪肺炎, 能导致幼猪突然死亡, 具有高发病率和死亡率的特征^[2]。目前, HPS 病已成为严重危害世界养猪业的典型细菌性疾病之一。HPS 病原

收稿日期: 2007-12-28

基金项目: 973 计划子课题 (2006CB504403); 国家科技支撑计划子课题 (2006BAD06A01)

作者简介: 高鹏程 (1978-), 男, 甘肃会宁人, 硕士生, 主要从事细菌分子生物学研究

* 通讯作者: 逯忠新

特性复杂,其致病机理和毒力因子至今尚不清楚。而筛选出对 HPS 易感的实验动物,建立可靠、实用和经济的动物模型可为开展这一工作打下基础。目前国内对此病的报道多在病原分离鉴定、血清学调查、诊断技术和疫苗研制方面,而有关 HPS 致病机理方面的研究很少报道。作者用对猪具有致病性的 HPS 血清型 5 型标准株 (Strain Nagasaki),腹腔接种常用的不同品种、不同品系实验动物,通过观察发病或死亡情况和病理变化以及病原再分离,筛选出对 HPS 最易感的实验动物,为 HPS 感染动物模型的建立和致病机理研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 培养基

TSB 液体培养基和 TSA 平板,美国 BD 公司产品。配制时分别加入终浓度为 5% 马血清、3% 酵母浸出液和 0.05% NAD。

1.2 HPS 菌株

Nagasaki 菌株,由澳大利亚昆士兰动物研究所 Pat Blackall 博士惠赠。

1.3 实验动物

雄性 SPF 小鼠 (生产许可证号: SCXK (甘) 2005-0007): 昆明 (KM)、NIH、BALB/c、C57 和 C3H 品系,购自兰州大学医学部,体质量 18 g 左右; 雄性 SPF 大鼠 (生产许可证号: SCXK (甘) 20050007): SD 和 Wistar 品系,购自兰州大学医学部,体质量 280 g 左右; 雄性 SPF 豚鼠和清洁级豚鼠 (生产许可证号: SCXK (甘) 20050007): 购自兰州大学医学部,体质量 250 g 左右; 雄性 SPF 金黄地鼠 (生产许可证号: 14-005): 购自兰州生物制品所,体质量 180 g 左右; 清洁级雄性兔 (生产许可证号: SYXK (甘) 2004-0005): 新西兰和青紫蓝品系,购自兰州兽医研究所,体质量 1.3 kg 左右。所有实验动物试验前用 HPS 血清型 5 型标准株间接血凝诊断抗原检测, HPS 抗体为阴性。

1.4 动物感染试验

将 Nagasaki 菌株接种含 10% 马血清、3% 酵母浸出液和 0.5% NAD 的 TSB 培养基, 37 °C、180 r·min⁻¹ 摇床培养 11 h, 将培养物配制成 2×10⁸、2×10⁹ 和 2×10¹⁰ CFU 不同剂量, 参照 Morozumi 等报道的方法^[3], 腹腔感染上述不同品种、不同品系的实验动物, 每组均设对照, 对照组腹腔注射灭菌生理盐水。

1.5 临床和病理观察

感染后临床观察 7 d, 记录实验动物的临床表现; 对死亡实验动物进行剖解, 观察并记录各组织器官的病变。取死亡豚鼠主要器官进行组织学观察, 并记录结果。

1.6 细菌学检查

感染动物死亡后 10 h 内, 无菌取大脑、心血、肺、肝、脾等组织接种 TSA 平板进行 HPS 再分离, 并根据 Angen 等人报道的方法^[4], 对分离到的细菌进行 PCR 鉴定。

2 结 果

2.1 实验动物的感染试验

表 1 显示, 在所有试验剂量下, 除 KM 小鼠和豚鼠外, 其它品种的实验动物均存活。接种量为 2×10⁹ CFU 时, KM 小鼠 4/12 死亡, SPF 豚鼠 8/12 死亡、清洁级豚鼠 6/12 死亡; 当接种量达 2×10¹⁰ CFU 时, KM 小鼠的死亡率为 3/12, SPF 豚鼠和清洁级豚鼠死亡率均为 12/12。

2.2 临床症状和剖检变化

腹腔接种 2×10⁹ CFU 时, 部分小鼠 6 h 后出现精神沉郁、震颤、背毛竖立和眼睛紧闭等症状。但除 KM 小鼠在 30 h 开始出现死亡外, 其它品系的小鼠在 24 h 后上述症状全部消失。大鼠、金黄地鼠和兔没有观察到任何明显的临床反应。SPF 豚鼠和清洁级豚鼠 10 h 内均出现精神沉郁、震颤、背毛竖立和相互拥挤, 在 14 h 后试验组豚鼠出现死亡。腹腔接种 2×10¹⁰ CFU 时, 在 48 h 内试验组豚鼠全部死亡。

对死亡小鼠和豚鼠进行剖检观察, 小鼠均无任何肉眼可见的病理变化。但在死亡豚鼠可观察到腹腔纤维素性渗出和腹部皮下胶胨样渗出等明显病变 (图 1 和图 2)。其它未死亡实验动物在接种后 7 d 全部剖杀, 剖检均未观察到肉眼可见病变。

组织学观察发现, 死亡豚鼠肝细胞大量坏死, 被膜部分区域有明显的纤维蛋白和白细胞渗出, 甚至纤维蛋白和白细胞堆积成团。心外膜有大量中性粒细胞及巨噬细胞浸润, 血管扩张, 血管壁有炎性反应, 说明 HPS 对豚鼠的血管也有一定的作用。脑组织、脑膜能见到散在的红细胞和白细胞, 出现了轻微的炎性反应。其它组织 (如肾脏、肺脏和脾脏) 都出现了不同程度的淤血。

2.3 病原菌的分离与鉴定

对死亡小鼠和豚鼠各组织器官进行 HPS 分离

表 1 HPS 对实验动物的感染试验结果

Table 1 Results of experimental infection of HPS

实验动物 Experimental animals	2×10^8 CFU HPS		2×10^9 CFU HPS		2×10^{10} CFU HPS		对照组 Control		
	接种数	死亡数	接种数	死亡数	接种数	死亡数	接种数	死亡数	
SPF 小鼠 SPF mice	KM	12	0	12	4	12	3	6	0
	NIH	12	0	12	0	12	0	6	0
	C57	12	0	12	0	12	0	6	0
SPF 大鼠 SPF rat	BALB/c	12	0	12	0	12	0	6	0
	C3H	12	0	12	0	12	0	6	0
兔 Rabbit	SD	12	0	12	0	12	0	6	0
	Wistar	12	0	12	0	12	0	6	0
豚鼠 Guinea pig	新西兰 青紫蓝	12	0	12	0	12	0	6	0
	SPF 清洁级	12	0	12	8	12	12	6	0
SPF 金黄地鼠 SPF syrian hamsters	12	0	12	6	12	12	6	0	

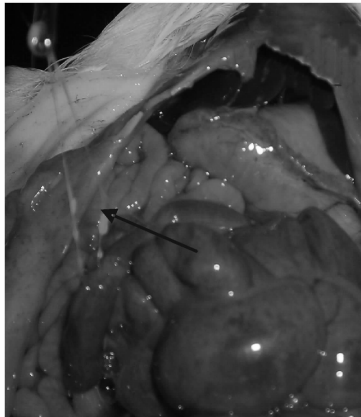


图 1 腹腔浆液性纤维素渗出物
Fig. 1 Serofibrinous exudate in abdominal cavity

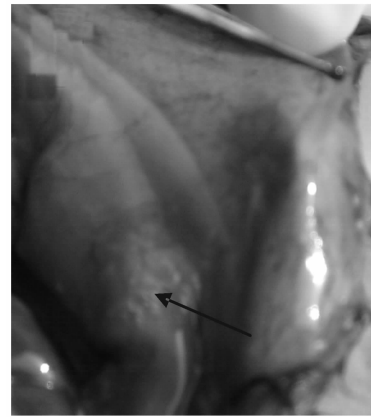


图 2 皮下胶冻样浸出物
Fig. 2 Jelly exudate in subcutaneous tissue

鉴定,结果见表 2,死亡豚鼠各组织器官 HPS 再分离率比死亡小鼠相应各组织器官普遍高;2 种动物心血和腹水 HPS 的分离率比其他病料高。死亡小鼠的大脑和肝脏中未分离到 HPS,但豚鼠大脑和肝脏中都能分离到 HPS。对分离菌进行 PCR 鉴定,

均扩增到 1 090 bp 的预期片段(图略),表明是 HPS。

3 讨论

HPS 是猪群上呼吸道的一种常在定居菌,其能够突破黏膜屏障并导致全身性感染,但其致病机理

表 2 死亡豚鼠和小鼠不同脏器 HPS 的分离结果

Table 2 Isolation of HPS from various sites of dead guinea pigs and mice

		组织 HPS 分离率 Isolation rate of HPS from different samples				
		大脑	心血	肺	肝	腹水
		Cerebrum	Heart blood	Lung	Liver	Peritoneal fluid
小鼠	2×10^9 CFU	0/4	1/4	1/4	0/4	3/4
Mice	2×10^{10} CFU	0/2	2/2	0/2	0/2	2/2
豚鼠	2×10^9 CFU	4/13	13/13	10/13	12/13	13/13
Guinea pig	2×10^{10} CFU	6/24	24/24	24/24	22/24	24/24

仍不清楚。HPS 人工接种本动物或实验动物进行感染试验为阐明该病的致病机理和寻找毒力因子提供了手段,因此建立有效的 HPS 动物感染模型一直是研究者十分关注的问题。但在普通条件下进行本动物的感染试验,结果往往因本菌的早期定居特性而不理想或重复性很差,研究者们利用剖腹产不喂初乳(CDCD)猪^[5]和自然分娩后不喂初乳(NFCD)猪^[6]复制出了典型的 Glasser's 病例,表明 CDCD 和 NFCD 猪可作为理想的 HPS 致病性研究的动物模型,但由于其对于实验条件的高要求和不易获得性,使得在实际研究中极少采用。作者以常用的不同品种、不同品系的实验动物为研究对象,通过腹腔感染 HPS 血清型 5 型标准株后,观察了受试动物的发病、死亡和病变情况,并对感染后各组织器官进行了 HPS 再分离,从而较系统地评估了 HPS 对各种常用实验动物的致病性。结果表明豚鼠是对 HPS 较敏感的实验动物,且 SPF 和清洁级豚鼠之间没有差异,从试验的可操作性和经济方面考虑,可选用清洁级豚鼠作为建立 HPS 感染动物模型的候选实验动物,从而为下一步动物模型建立的研究打下基础。

在本试验中,KM 小鼠在接种剂量为 2×10^9 CFU 以上时也出现死亡,且能从死亡小鼠脏器中再分离到 HPS,表明 HPS 可对 KM 小鼠致病。但与豚鼠相比较,其死亡情况不规律,如死亡率不高,随着感染剂量升高死亡率反而下降等。且对死亡 KM 小鼠剖检也未见明显病理变化。另外,其他 4 个品系的小鼠均未出现死亡。这表明 KM 小鼠对 HPS 的易感性较豚鼠弱。

HPS 主要引起仔猪的纤维素性多发性浆膜炎、脑膜炎和关节炎。作者在死亡豚鼠观察到了与猪自然感染 HPS 相同的病理变化,如在腹腔中有大量纤维素性蛋白渗出物,肝脏被膜部分区域纤维蛋白渗出,心血管扩张,脑组织、脑膜炎性反应等。而且从死亡豚鼠的大脑中再分离到了 HPS,提示 HPS 能突破豚鼠的血-脑屏障,这与已有报道 HPS 能突破猪的血-脑屏障引起典型细菌性脑膜炎^[7]一致,进一步说明豚鼠更适合作为理想的建立 HPS 感染动物模型的候选动物。

PCR 已成为实验室进行细菌快速鉴定的常用方法,比常规生化试验鉴定方法快捷准确。本试验采用了 Angen 等于 2007 年改进的 HPS PCR 方法^[4]对再分离的 HPS 进行鉴定,提高了结果的准确性。

在试验中还发现,培养时间对 HPS 的活力和致

病力有很大影响,Nagasaki 菌株在含马血清、鲜酵母浸出液的 TSB 培养基中 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 10~12 h,对实验动物的致病力最强。这与国外学者^[8]报道的处于生长稳定期的 HPS 继续培养后伴随有活力的显著下降的结果相一致。因此,在进行 HPS 感染实验动物的研究中,HPS 的培养条件控制是试验成功与否的关键之一。

总之,作者在国内首次较系统地进行了 HPS 对常用的不同品种、不同品系实验动物致病性的研究,初步筛选出了对 HPS 最易感的实验动物,为下一步 HPS 感染动物模型的建立和致病机理的研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 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]. *Vet Med Sci*, 1994, 56(4):639-644.
- [2] ROSENDAL S, MINIATS O P, SINCLAIR P. Protective efficacy of capsule extracts of *Haemophilus pleuropneumoniae* in pigs and mice[J]. *Vet Microbiol*, 1986, 12(13):290-240.
- [3] MOROZUMI T, HIRAMUNE T, KOBAYASHI K. Experimental infection of mice and guinea pigs with *Haemophilus parasuis*[J]. *Natl Inst Anim Health Q* (Tokyo), 1982, 22(1):23-31.
- [4] ANGEN Ø, OLIVEIRA S, AHRFENS P, et al. Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis*[J]. *Vet Microbiol*, 2007, 119(2-4):266-276.
- [5] O'REILLY T, NIVEN D F. Tryptone-yeast extract broth as a culture medium for *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Haemophilus parasuis* to be used as challenge inocula[J]. *Can J Vet Res*, 1986, 50(3):441-443.
- [6] VANIER G, SZCZOTKA A, FRIEDL P, et al. *Haemophilus parasuis* invades porcine brain microvascular endothelial cells[J]. *Microbiology*, 2006, 152(1):135-142.
- [7] OLIVEIRA S, GALINA L, BLANCO I, et al. Naturally-farrowed, artificially-reared pigs as an alternative model for experimental infection by *Haemophilus parasuis*[J]. *Can J Vet Res*, 2003, 67(2):146-150.
- [8] VAHLE J L, HAYNES J S, ANDREWS J J. Interaction of *Haemophilus parasuis* with nasal and tracheal mucosa following intranasal inoculation of cesarean derived colostrum deprived (CDCD) swine[J]. *Can J Vet Res*, 1997, 61(3):200-206.