

猪传染性胸膜肺炎病原学研究进展

梁望旺, 伍锐, 杨克礼, 熊忠良, 刘泽文, 徐涤平* (湖北省农业科学院畜牧兽医研究所, 湖北武汉 430064)

摘要 猪传染性胸膜肺炎是由胸膜肺炎放线杆菌引起的, 该病是一种呼吸道疾病, 影响着全世界养猪业的发展。综述了猪传染性胸膜肺炎的病原学研究进展, 为该病的诊断及研究高效的猪传染性胸膜肺炎疫苗提供理论依据。

关键词 胸膜肺炎放线杆菌; APP; 病原学

中图分类号 S858.28 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)13-05455-02

The Research Advance on Etiology of Porcine Contagious pleuropneumonia

LIANG Wang-wang et al (Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan, Hubei 430064)

Abstract Actinobacillus pleuropneumoniae (APP) is the etiological agent of Porcine Contagious pleuropneumonia (PCP), a severe respiratory contagious disease effecting swine industry worldwide. This article summarized the research advance on etiology of APP and provided theory to diagnose PCP and to investigate high performance vaccine of the disease.

Key words Actinobacillus pleuropneumoniae; APP; Etiology

猪传染性胸膜肺炎(PCP)是由胸膜肺炎放线杆菌(APP)引起的一种高度传染性和高死亡率的呼吸道疾病, 该病由英国科学家 Pattison 于1957年首次发现并报道^[1]。该病在许多国家存在, 造成了巨大的经济损失。我国自1990年杨旭夫等首次报道存在PCP以来^[2], 伴随着集约化养猪的突飞猛进, 该病的发生一直呈上升趋势, 且主要以1、3、7血清型为主^[3]。笔者就猪传染性胸膜肺炎的病原学研究现状进行概述, 以期为该病的诊断及高效疫苗的研制提供理论依据。

1 病原形态及理化、生长特性

1.1 病原形态 胸膜肺炎放线杆菌于1983年归入巴氏杆菌科、放线杆菌属^[4], 是革兰氏阴性小球杆菌, 无芽孢, 有荚膜、菌毛和鞭毛, 具有运动性^[5], 病料中菌体可呈两极着色。

1.2 生化特性 该菌能发酵葡萄糖、麦芽糖、蔗糖和果糖, 产酸不产气; 触酶和尿素酶试验阳性; VP、MR、靛基质试验阴性; 硝酸盐还原试验阳性; CAMP试验阳性。

1.3 生长特性 胸膜肺炎放线杆菌兼性厌氧, 营养要求较高, 初次分离时可供给5%~10%的CO₂, 且最适合在巧克力琼脂平皿、TSA平皿及绵羊血平皿中生长。

2 病原的生物型与血清型

根据是否对烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)有依赖性, 可将胸膜肺炎放线杆菌分为两个生物型(Ⅰ型和Ⅱ型), 生物型Ⅰ对NAD具有依赖性, 而生物型Ⅱ能够利用烟酰胺或其前体物质来合成NAD^[1,4,6]。试验证明, 生物型ⅠAPP的毒力低于生物型Ⅱ^[7]。另外, 在初次分离培养生物型ⅠAPP时, 在培养基上划一条金黄色葡萄球菌线, 其产生的NAD可供生物型ⅠAPP生长需要, 培养24h后, 可在葡萄球菌附近形成光滑、圆形、针尖大小的菌落, 称为“卫星现象”; 且在葡萄球菌-溶血素周围产生更宽的溶血带, 形似杯状, 即“CAMP现象”。根据APP的荚膜和脂多糖抗原性差异, 将该菌划分为15个血清型, 血清1~12、15属生物型Ⅰ, 血清13、14属生物型Ⅱ, 其中1和5型又可分为1a、1b和5a和5b亚型^[6,8]。

3 毒力相关因子

细菌在入侵机体的过程中, 会受到机体免疫系统的抵御, 所以多数病原菌均可采取相应措施来逃避这些干扰因素。APP即可对此产生几种防御和攻击相关的毒力因子。

3.1 毒素 Rosendal等利用APP培养液的滤过上清, 可使猪产生与接种病原菌一样的坏死病灶或溶血病灶, 证实胸膜肺炎放线杆菌所分泌的毒素可引起发病^[9]。迄今为止, 已发现4种APP毒素, 分别被命名为Apx₁、Apx₂、Apx₃和Apx₄^[10]。各血清型胸膜肺炎放线杆菌的Apx毒素分泌与Apx操纵子结构见表1。

3.1.1 Apx₁。分子量为105~110 kDa, 有强溶血活性和细胞毒性, 其产生、激活和分泌受一个操纵子调控, 该操纵子包括apx₁C、apx₁A和apx₁BD基因, 其中apx₁C负责编码毒素激活蛋白, apx₁A编码毒素结构蛋白, apx₁B和apx₁D与毒素的分泌有关^[11-12]。

3.1.2 Apx₂。分子量为103~105 kDa, 溶血毒性较弱, 细胞毒性较毒素强, 但比毒素弱, 其产生、激活和分泌受两个操纵子——Apx₂BD和Apx₂CA的调控, 可能是在进化过程中, Apx₂操纵子的BD基因发生了缺失, 但因其功能与apx₂BD的功能相同, 故Apx₂的分泌可依赖于apx₂BD的表达产物而照常进行^[13]。

3.1.3 Apx₃。分子量约为120 kDa, 没有溶血毒性, 却有极强的细胞毒性, 其操纵子也含有apx₃C、apx₃A、apx₃B和apx₃D基因^[14]。

3.1.4 Apx₄。1999年首次报道, 胸膜肺炎放线杆菌所有的血清型均可分泌, 其操纵子不含BD基因, 毒力弱, 种间特异性强, 适合建立APP的普查诊断方法^[10]。由于该毒素仅在活体内表达, 而当前国内所用的猪传染性胸膜肺炎疫苗为灭活苗, 其中均不含Apx₄, 所以利用Apx₄蛋白建立的诊断方法, 可以区分疫苗抗体和自然感染抗体。

作为APP主要的毒力因子的Apx毒素, 其溶血性及细胞毒性均不相同, 各血清型APP毒力的差异也与其所分泌的毒素种类密切相关。Apx₁的毒力最强, 能分泌Apx₁毒素的血清型1、5a、5b、9、10、11致病力也最强; Apx₂的毒力较弱, 相应地, 仅分泌Apx₂毒素的血清型7和12的毒力也减弱; 因血清型3型只分泌Apx₃, 所以3型APP在临床上几乎不能

基金项目 国家支撑计划项目(2006BAD6A18)。

作者简介 梁望旺(1979-), 男, 河南光山人, 硕士, 实习研究员, 从事动物传染病及病原分子生物学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2008-03-17

表1 胸膜肺炎放线杆菌毒素分泌与Apx操纵子结构

Table 1 The secretion and operon structure of APP-RTXtoxin

外毒素 RTX	毒性Toxicity		分泌血清型 Serotype	Apx 操纵子 Apx operon		
	溶血性 Haemolytic	细胞毒性 Cytotoxic		激活基因 Activator	结构基因 Structural	分泌基因 Secretor
Apx	strong	strong	1,5,9,10,11	apx C	apx A	apx BD
Apx	weak	moderate	all but 10	apx C	apx A	apx BD
Apx	None	strong	2,3,4,6,8	apx C	apx A	apx BD
Apx	Weak	Not determined	all	ORF1	apx A	None

引起疾病的流行。

另外,Apx 毒素具有很好的免疫原性,能够诱导机体产生良好的保护力,主要成分为毒素的亚单位疫苗对动物有较好的保护力^[15]。虽然尚无商品化 APP 弱毒疫苗,但由于它可激发良好的体液免疫、细胞免疫和黏膜免疫,具有良好的交叉保护力,且生产成本低,所以是今后 APP 疫苗的主要研究方向。Bei 等通过基因工程手段使 apxC 基因失活,抑制了毒素的激活,从而达到弱化毒株的目的^[16-17],可对不同血清型的 APP 毒株提供良好的保护力。

3.2 荚膜 所有血清型 APP 均可产生荚膜,其成分为多聚寡糖的衍生物。APP 血清型的划分依据就是荚膜多糖的组成和结构,其各个血清型的荚膜多糖都有独特的组成结构,在免疫学上不同于其他型。APP 荚膜的免疫原性很差,提纯的荚膜也没有毒性^[18]。将纯化的荚膜注入猪的支气管不会产生任何临床症状,也不会造成肺部损伤^[19]。但无荚膜突变株的毒力弱于其有荚膜的亲本株,不同的血清型的毒力也与其荚膜的厚度与黏度成一定正比^[20],说明荚膜也是影响胸膜肺炎放线杆菌毒力的因素之一。

3.3 脂多糖(LPS) LPS 是 APP 外膜的重要组成成分,在对猪呼吸道及肺的吸附上起着重要作用。作为胸膜肺炎放线杆菌的毒力因子,纯化的 LPS 能够激活血凝因子,从而诱导血液凝集及纤维蛋白溶解,最终导致组织坏死^[19],并且可与外毒素相互作用而增加 APP 的毒力^[21]。

3.4 转铁结合蛋白(TBP) Nven 等研究表明,胸膜肺炎放线杆菌表面存在转铁蛋白受体,即转铁结合蛋白,当铁缺少时,这种受体就会被表达出来,从而捕获宿主体内的转铁蛋白,进而摄取其中的铁^[22]。

3.5 酶类 包括蛋白酶、脲酶等。蛋白酶可通过降解黏膜抗体 IgA 及明胶,从而促进 APP 在猪呼吸道的黏膜上吸附、增殖,有助于 APP 在宿主体内扩散^[23]。脲酶可以水解尿素产生氨水,从而抑制吞噬溶酶体的融合,提高巨噬细胞内溶酶体的 pH 值,导致酸性水解酶的失活^[24]。

4 APP 的致病机理

目前,APP 的致病机理并不十分清楚。据推测,可能是 APP 经猪呼吸道进入肺脏后,借助细菌细胞表面物质在肺泡内定居,并产生外毒素从而导致纤维素性、出血性胸膜肺炎。由于 APP 具有荚膜,对肺泡上皮具有很强的亲和力,从而使其分泌的外毒素很容易进入到宿主细胞,导致靶细胞受损。

综上所述,猪传染性胸膜肺炎给养猪业带来了严重的危害。由于 APP 的血清型众多,各个血清型之间的交叉反应有限,因此给该病的诊断和防治带来了很大困难。随着对胸膜肺炎放线杆菌分子生物学研究及诊断方法、疫苗研究的深

入,猪传染性胸膜肺炎必将得到有效的控制乃至根除。

参考文献

- [1] NICOLET J, LEMAN A D, STRAW B E, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* in diseases of swine[M]. [s.l.]: Iowa State University Press, 1992: 401 - 408.
- [2] 杨旭夫, 彭发泉. 我国猪胸膜肺炎嗜血杆菌感染症的确定和诊断[J]. 畜牧兽医学报, 1990, 21(3): 243 - 245.
- [3] 何启盖, 吴斌, 吴信明, 等. 接触传染性胸膜肺炎的防制现状[J]. 华中农业大学学报, 2000, 33(7): 58 - 62.
- [4] POHL S, BERISCHINGER H U, FREDERICKSEN W, et al. Transfer of *Haemophilus pleuropneumoniae* and *Pasteurella haemolytica*-like organisms causing porcine necrotic pleuropneumonia to the genus *Actinobacillus* (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) on the basis of phenotypic and deoxyribonucleic acid relatedness[J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1983, 119: 357 - 368.
- [5] NEGREIE ABASCAL E, REYES ME, GARCIA R M, et al. HageII and Miliityin *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. *J Bacteriol*, 2003, 185(2): 664 - 668.
- [6] NIELSEN R, ANDRESEN L O, FLAMBECK T, et al. Serological characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotype 2 strains isolated from pigs in two Danish herds[J]. *Vet Microbiol*, 1997, 54: 35 - 46.
- [7] JACOBSEN MJ, NIELSEN J P, NIELSEN R. Comparison of virulence of different *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotypes and biotypes using an aerosol infection model[J]. *Vet Microbiol*, 1996, 49(9): 159 - 168.
- [8] BLACKALL P J, KLAASEN H L, VAN DEN BOSCH H, et al. Proposal of a new serovar of *Actinobacillus pleuropneumoniae*: serovar 15[J]. *Vet Microbiol*, 2002, 84: 47 - 52.
- [9] ROSENDAL S, BOYD D. *Haemophilus pleuropneumoniae* serotyping[J]. *J Clin Microbiol*, 1982, 16: 840 - 846.
- [10] ALAIN SCHALLER, ROLF KUHN, PETER KUHNERT. Characterization of apx A, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. *Microbiology*, 1999, 145: 2105 - 2116.
- [11] GYG D, NICOLET J, HUGHES C, et al. Functional analysis of the G2+ regulated hemolysin operon of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1[J]. *Infect Immun*, 1992, 60: 3059 - 3064.
- [12] JANSEN R, BRIARE J, KAMP E M, et al. Structure analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxin (Apx) operon[J]. *Infect Immun*, 1993, 61: 3688 - 3695.
- [13] FREY J, BECK M, STUCK U, et al. Analysis of hemolysin operons in *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. *Gene*, 1993, 123: 51 - 58.
- [14] CHANG Y F, SH J R, MA D P, et al. Molecular analysis of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX Toxin gene cluster[J]. *DNA Cell Biol*, 1993, 12: 351 - 362.
- [15] FEDORKA CRAY P J, HUETHER M J, STINE DL, et al. Efficacy of a cell extract from *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* serotype 1 against disease in swine[J]. *Infect Immun*, 1990, 58: 358 - 365.
- [16] BEI WC, HE Q G, ZHOUR, et al. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of *Actinobacillus pleuropneumoniae* HB4C(-) mutant lacking a drug resistance marker in the pigs[J]. *Vet Microbiol*, 2007, 125: 120 - 127.
- [17] IIUJ L, BEI WC, IINL W, et al. Construction and characteristics of a recombinant strain apx II C- / apx I A+ of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 7[J]. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 2007, 47: 973 - 977.
- [18] WARD C K, INZANA T J. Resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to bactericidal antibody and complement is mediated by capsular polysaccharide and blocking antibody specific for lipopolysaccharide[J]. *J Immunol*, 1994, 153: 2110 - 2121.
- [19] FENWICK B W, OSBURN BI, CLANDER H J. Isolation and biological characterization of two lipopolysaccharides and a capsular-enriched polysaccharide preparation from *Haemophilus pleuropneumoniae*[J]. *Am J Vet Res*, 1986, 47: 1433 - 1441.
- [20] JENSEN A E, BERTRAMT A. Morphological and biochemical comparison of virulent and avirulent isolates of *Haemophilus pleuropneumoniae* serotype 5[J]. *Infect Immun*, 1986, 51: 419 - 424.
- [21] INZANA T J. Virulence properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*[J]. *Microb Path*, 1991, 11: 305 - 316.

在医学图像分析系统中观察染片,记录嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、淋巴细胞、单核细胞数量,并求出百分数。

1.4 数据处理 试验数据用平均数 \pm 标准差($X \pm SD$)表示,应用SPSS13.0 for Windows 统计软件进行单因素方差分析。采用LSD法比较。

2 结果与分析

2.1 淋巴细胞百分含量变化情况 由表2可知,补饲黄芪组家兔血液中淋巴细胞百分含量均有所增加,其中1组与2组、3组、4组(CK)差异显著($P < 0.05$),2组与3组、4组(CK)差异极显著($P < 0.01$),3组与4组(CK)差异不显著($P > 0.05$),以补饲20g试验组增加明显。这说明黄芪只在一定剂量范围内增加家兔机体的免疫机能。

2.2 单核细胞百分含量变化情况 由表2可知,补饲黄芪可明显增加血液中单核细胞百分含量,其中1组与4组(CK)差异极显著($P < 0.01$),1组与2组、3组差异不显著($P >$

0.05),2组与3组、4组(CK)差异极显著($P < 0.01$),3组与4组(CK)差异极显著($P < 0.01$)。添加20g黄芪的试验组家兔单核细胞数增加幅度最大。这说明补饲黄芪对机体的防御机制起着重要的作用。

2.3 嗜酸性粒细胞百分含量变化情况 由表2可知,各试验组差异不显著($P > 0.05$)。这说明黄芪对家兔血液中的嗜酸性粒细胞影响不大。

2.4 嗜碱性粒细胞百分含量变化情况 由表2可知,各试验组间差异不显著($P > 0.05$)。这说明黄芪对家兔血液中的嗜碱性粒细胞没有较大影响。

2.5 嗜中性粒细胞百分含量变化情况 由表2可知,补饲黄芪组血液中嗜中性粒细胞百分含量均有所减少,其中1组与2组差异显著($P < 0.05$),1组与3组、4组(CK)差异极显著($P < 0.01$),2组与3组、4组(CK)差异极显著($P < 0.01$),3组与4组(CK)差异不显著($P > 0.05$),以补饲20g试验组减少明显,其原因有待于进一步研究。

表2 补饲黄芪家兔白细胞数量变化情况

%

Table 2 The leukocyte change of rabbit astragalus feeded

组别 Group	淋巴细胞 Leukocyte	单核细胞 Monocytes	嗜酸性粒细胞 Eosinophils	嗜碱性粒细胞 Basophils	嗜中性粒细胞 Neutrophils
1	56.433 \pm 6.396 *	5.511 \pm 0.405 **	3.266 \pm 0.256	0.516 \pm 0.154	33.739 \pm 6.101 **
2	62.739 \pm 9.490 **	5.955 \pm 0.498 **	3.245 \pm 0.231	0.566 \pm 0.187	26.380 \pm 10.142 **
3	49.939 \pm 2.481	5.013 \pm 0.759 **	3.096 \pm 0.326	0.506 \pm 0.120	43.214 \pm 3.523
4(CK)	47.093 \pm 0.615	4.291 \pm 0.188 **	3.220 \pm 0.104	0.594 \pm 0.269	44.705 \pm 0.601

注:*表示差异显著($P < 0.05$),**表示差异极显著($P < 0.01$)。

Nte:* means significant difference ($P < 0.05$), ** means extremely significant difference ($P < 0.01$).

3 讨论

血液中嗜中性粒细胞主要吞噬、水解细菌及坏死细胞,是炎症时的主要反应细胞。当急性感染时,白细胞总数增多,尤其是中性粒细胞增多。单核细胞进入组织转变为巨噬细胞后,其吞噬力大为增强,能吞噬较大颗粒。单核-巨噬细胞还参与激活淋巴细胞的特异性免疫功能。嗜碱性粒细胞胞内的颗粒中含有多种具有生物活性的物质,其中肝素具有抗凝血作用,组胺和过敏性慢反应物质参与过敏反应。嗜酸性粒细胞不能杀菌,可限制嗜碱性粒细胞和肥大细胞的致敏作用,其胞内的过氧化物酶和某些碱性蛋白质参与对寄生虫的免疫反应。淋巴细胞参与机体特异性免疫能力。T淋巴细胞主要与细胞免疫有关;B淋巴细胞主要与体液免疫有关。动物血液中不同种类白细胞的变化直接与机体免疫力、过敏反应、抗炎能力、寄生虫感染及血液生理功能有密切关系^[8]。研究其动态变化规律有重要的临床意义。

从试验组与对照组各类白细胞动态变化情况可以看出,补饲黄芪粉后家兔外周血液中淋巴细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞变动较大,并以补饲20g黄芪粉组变化最明显,其他白细胞因在血液含量较少波动幅度不明显。其中,黄芪可增加血液中淋巴细胞和单核细胞百分数,说明黄芪对增强动物

机体的免疫力有重要意义;黄芪可降低嗜中性粒细胞百分数,表明黄芪可增强机体的抗炎能力;黄芪对家兔外周血液白细胞中的淋巴细胞、单核细胞和嗜中性粒细胞产生不同程度的影响,并以补饲20g黄芪粉试验组影响较大,说明在饲料中添加20g黄芪粉对增加家兔免疫能力、抗病力效果较好。深入了解黄芪对家兔分类白细胞的影响及其动态变化规律,还需要增加试验动物的数量和延长补饲黄芪的时间,并且改进试验条件和方法,减少各种环境因素的影响,使试验结果更为准确、可靠。

参考文献

- [1] 李凯年, 逯德山. 植物饲料添加剂的作用与开发利用趋势[J]. 世界农业, 2007(7): 50-52.
- [2] 袁晓春, 何丽涛, 苏凤红. 中草药饲料添加剂筛选试验[J]. 现代畜牧兽医, 2006(12): 15-16.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 249-250.
- [4] 王俊辉, 孙志良. 黄芪的有效成分及在畜牧生产中的应用[J]. 饲料研究, 2006, 12: 19-21.
- [6] 刘清源, 赵献军. 中草药黄芪在畜牧业中的应用[J]. 畜牧兽医杂志, 2002, 21(4): 17-18.
- [7] 李淑红, 王京仁. 日粮中不同黄芪水平对家兔血液理化指标及生长性能的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(12): 3546-3547.
- [8] 杨秀平. 动物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002: 72-74.

1083-1089.

- [23] MLLKS M H, MOXON E R, BRICKER J, et al. Examination of haemophilus pleuropneumoniae for immunoglobulin A protease activity[J]. Infect Immun, 1984, 45(1): 276-277.

- [24] GORDON A H, HART P D, YOUNG M R. Ammorin inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages[J]. Nature, 1980, 286: 79-80.

(上接第5456页)

- [21] INZANA T J. Virulence properties of Actinobacillus pleuropneumoniae[J]. Microb Path, 1991, 11: 305-316.

- [22] NVEN D F, DONGA J, ARCHBALD F S. Responses of Haemophilus pleuropneumoniae to iron restriction: changes in the outer membrane protein profile and the removal of iron from porphyrin transferrin[J]. Microbiol, 1989, 3(8):