

王璐璐, 刘怡宁, 吴莹霞, 等. 胸膜肺炎放线杆菌 5 型的毒力评价与病理学研究 [J]. 畜牧与兽医, 2025, 57 (10): 68-75.

WANG L L, LIU Y N, WU Y X, et al. Virulence evaluation and pathological study of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2025, 57 (10): 68-75.

胸膜肺炎放线杆菌 5 型的毒力评价与病理学研究

王璐璐[#], 刘怡宁[#], 吴莹霞, 张宇, 张国良, 孙哲^{*}, 田克恭^{*}

(国家兽用药品工程技术研究中心, 河南 洛阳 471000)

摘要: 采集临床疑似猪传染性胸膜肺炎的发病猪的肺组织病料进行细菌分离鉴定, 对分离菌株进行毒力评价和病理学研究, 以了解胸膜肺炎放线杆菌 (APP) 的致病性、病变特点及在组织中的定位特点等。通过细菌分离培养、卫星现象、生化鉴定、PCR 鉴定、琼脂扩散试验等方法对临床分离株及血清型进行鉴定, 攻毒小鼠和猪进行毒力评价, 采集样品进行苏木素-伊红 (HE) 和免疫组化 (IHC) 染色观察病理学变化。结果: 分离到的 APP 鉴定为血清 5 型, 命名为 LY2105 株; LY2105 株以 0.86×10^8 CFU/只腹腔注射感染小鼠, 感染 1 d 内小鼠 100% 死亡; LY2105 株以 1.87×10^8 、 1.87×10^9 CFU/头的剂量对猪滴鼻攻毒后可导致体温升高、精神萎靡、食欲废绝、呼吸困难等临床症状, 死亡率 60%~80%, 可见 LY2105 株对猪具有较强的致病性; 剖检感染猪, 结果以出血性坏死性肺炎、纤维素性坏死性肺炎为主; HE 染色可见肺组织大片出血、坏死或形成坏死性肉芽肿样病变等典型的组织学病变特征; IHC 染色可见 APP 抗原主要定位于气管、肺的中性粒细胞、肺泡巨噬细胞。本研究结果为 APP 感染的病理学、发病机理以及诊断方法、防控措施等提供了一定的理论依据。

关键词: 胸膜肺炎放线杆菌; 血清 5 型; 毒力评价; 病理学

中图分类号: S855 文献标志码: A 文章编号: 0529-5130(2025)10-0068-08

Virulence evaluation and pathological study of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5

WANG Lulu[#], LIU Yining[#], WU Yingxia, ZHANG Yu,

ZHANG Guoliang, SUN Zhe^{*}, TIAN Kegong^{*}

(National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang 471000, China)

Abstract: The aim of this study was to isolate and identify *Actinobacillus pleuropneumoniae* in pigs, to evaluate the virulence and the pathological characteristics of the isolated strains, and to determine their pathogenicity, pathological characteristics and tissue localization characteristics. Isolated strains and serotypes were identified by bacterial isolation, satellite phenomenon, biochemical identification, PCR, and AGAR diffusion test. The virulence of the strains was evaluated in mice and pigs, and the samples were collected for hematoxylin-eosin and immunohistochemical staining for pathological study. The results showed that the isolated *Actinobacillus pleuropneumoniae* was identified as serotype 5 and named the LY2105 strain. The clinical symptoms, such as high body temperature, listlessness, loss of appetite and dyspnea, and 60%–80% mortality were observed after intranasal challenge with the LY2105 strain in pigs at the doses of 1.87×10^8 and 1.87×10^9 CFU, respectively. The necropsy of the pigs infected with the LY2105 strain was mainly hemorrhagic necrotizing pneumonia or fibrinous necrotizing pneumonia. The H. E. staining showed large areas of hemorrhage, necrosis or formation of necrotizing granuloma-like lesions in the lung tissue. The immunohistochemical staining showed that APP antigen was mainly localized in macrophages and neutrophils in the trachea and lung. This provided theoretical support for research on pathology and pathogenesis, diagnosis methods, prevention and control measures of APP infection in pigs.

Keywords: *Actinobacillus pleuropneumoniae*; serotype 5; virulence evaluation; pathology

收稿日期: 2024-11-20; 修回日期: 2025-07-18

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2023YFD1800505, 2023-YFD1800304-4)

第一作者: 王璐璐, 女, 硕士; 刘怡宁, 女, 学士。[#]共同第一作者

^{*}通信作者: 孙哲, 硕士, 兽医师, 主要从事动物疫病防控与兽医病理学技术方面的研究, E-mail: sunzhe@pulike.com.cn; 田克恭, 博士, 研究员, 主要从事动物疫病诊断与防控技术方面的研究, E-mail: vetvac@126.com。

猪传染性胸膜肺炎 (porcine pleuropneumonia, PCP) 是由胸膜肺炎放线杆菌 (*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP) 引起的以胸膜肺炎和出血性坏死性肺炎为特征的传染病, 危害严重, 分布于世界各地, 所有年龄段猪均易感, 多发于2~4月龄猪, 在患病猪的鼻腔、肺、淋巴结中都能检测到病原^[1]。患猪典型临床症状表现为急性死亡、口鼻出血、精神不振、食欲减退、呼吸急促与咳嗽等, 给养猪业造成较大损失。APP为有荚膜、球杆状的革兰阴性菌, 已知至少有19种血清型^[2], 我国主要流行血清1、2、3、5、7型等^[3-4], 根据培养时是否需要辅酶I (NAD), 将APP分为生物I型 (NAD依赖型) 和生物II型 (NAD非依赖型) 2种。APP能分泌表达Apx I、Apx II、Apx III、Apx IV这4种Apx毒素, Apx毒素的细胞毒性和溶血活性强弱不一, 菌株分泌的Apx毒素类型在很大程度上决定了毒株的毒力强弱^[5], 其中血清1、5、9、11型可分泌Apx I和Apx II毒素, 毒力较强。

APP为猪重要的呼吸道病原之一, 目前国内对APP的研究多关注于不同血清型菌株的流行病学、致病性与疫苗等方面, 而对其感染猪后引起的组织病理学损伤及病原菌的定位等方面研究较少。本研究通过对河南省某规模养殖场分离鉴定到的血清5型APP菌株进行毒力评价, 进一步研究其感染猪后引起的组织病理学损伤, 并通过免疫组化方法研究病原菌在各组织脏器的定位和分布规律, 为APP感染猪的病理学研究和发病机制研究提供基础数据, 并为APP感染的诊断方法和防控措施提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 病料来源

国家兽用药品工程技术研究中心于2021年5月收集来自河南省洛阳某规模化猪场疑似PCP猪的新鲜肺组织病料进行细菌分离鉴定。发病猪出现体温升高、精神萎靡、食欲减退、咳嗽、呼吸困难等临床症状, 死后口鼻出血, 剖检发现气管内充满血性泡沫样分泌物, 肺脏出血, 肺与心包膜和胸膜粘连, 大面积坏死性脓肿灶等病变。

1.2 主要试剂与菌株

胰酪大豆胨琼脂 (TSA) 培养基、胰酪大豆胨液体培养基 (TSB) 均购自BD Difco公司; NAD购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 新生牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司; 革兰染液购自北京索莱宝科技有限公司; 微量生化管购自杭州微生物试剂有限公司; 脱纤维绵羊血购自郑州益康生物工程有限公司; 细菌基因组DNA提取试剂盒购自北京天根

生化科技有限公司; *ExTaq* 酶、dNTP、DNA Marker (DL2000) 均购自TaKaRa公司; 金黄色葡萄球菌参考菌株ATCC 6538、APP 1~10血清型参考菌株CVCC 259~268均购自中国兽医药品监察所; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔IgG购自Invitrogen公司; 正常马血清、胰蛋白酶消化液、AEC显色盒、水溶性封片剂均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; APP 1~10血清型参考菌株单因子兔阳性血清由国家兽用药品工程技术研究中心制备并鉴定; 其余化学试剂均为分析纯产品。

1.3 试验动物

20头70~77日龄健康易感猪筛选自洛阳周边养殖场, APP、非洲猪瘟病毒 (ASFV)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪圆环病毒2型 (PCV2)、伪狂犬病病毒 (PRV)、猪肺炎支原体 (Mhp) 抗原均为阴性, APP间接血凝抗体效价 $\leq 1:4$ 。20只5~6周龄BALB/c小鼠, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.4 细菌分离

无菌采集病变肺组织接种于含1% NAD、5%新生牛血清的TSA培养基上, 37℃恒温培养箱中培养18~24 h, 挑取可疑菌落于含1% NAD、5%新生牛血清的TSA培养基上纯化培养, 取纯化的典型单个菌落进行革兰染色, 在油镜下观察菌体形态。同时接种于不含1% NAD但含5%新生牛血清的TSA培养基上, 观察菌落生长情况以及形态大小。

1.5 卫星现象观察

挑取纯化的单个菌落接种于血平板表面, 用金黄色葡萄球菌ATCC 6538作垂直划线, 37℃条件下培养18~24 h, 观察是否有卫星现象。

1.6 生化鉴定

挑取纯化的单个菌落接种于含1% NAD、5%新生牛血清的TSB液体培养基中, 37℃条件下培养24~48 h至液体浑浊, 将培养菌液接种于微量生化反应管中, 37℃条件下培养24~48 h, 接种前在微量生化管中补加1% NAD并混匀, 观察其生化反应特性。

1.7 APP特异性PCR鉴定

参考文献[6]中APP Apx IV A基因序列设计的特异性引物用于APP的鉴定, 引物APP-F: 5'-TGGCACTGACGGTGATGA-3'; APP-R: 5'-GGC-CATCGACTCAACCAT-3', 扩增目的片段大小为422 bp, 引物由金唯智生物科技有限公司合成。使用细菌基因组DNA提取试剂盒提取DNA作为模板, PCR扩增体系为: Premix *Taq*TM 12.5 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各1 μ L, 模板2.0 μ L, 双蒸水补足至

25 μL 。反应程序为：95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s，55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，68 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。取上述产物于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。若待测样品出现与目的条带相符情况，判为阳性，同时设 APP 参考菌株为阳性对照，DNase/RNase-free ddH₂O 为阴性对照。

1.8 血清型鉴定

参考文献 [7] 和农业行业标准 NY/T 573—2023 《猪传染性胸膜肺炎诊断技术》^[8]，采用琼脂扩散试验进行血清型鉴定，使用酚水法提取待检菌和 APP 1~10 血清型参考菌株的多糖抗原，并制备 APP 1~10 型参考菌株单因子阳性血清。琼脂板的中间孔加入待检菌多糖抗原，周边孔加 1~10 型单因子血清和对应型参考株多糖抗原，加样完毕后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 24 h 观察结果。备检抗原与单因子血清之间出现明显清晰的沉淀线，并与标准型抗原和单因子血清之间形成的沉淀线融合，即可判为该血清型。

参考文献 [9] 血清 5 型 APP 的 *cps5B* 基因的序列设计的特异引物，引物为 APP 5F：5'-AGCCA-CAAGACCCGAATGGTATAATG-3'；APP 5R：5'-CC-ATCAAATGCAGCTTCAAGGAGC-3'，目的片段大小为 825 bp，引物由金唯智生物科技有限公司合成。DNA 提取方法以及 PCR 扩增体系与 1.7 相同。反应程序为：95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s，63 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，68 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。设 APP 血清 5 型参考菌株 CVCC 263 为阳性对照，DNase/RNase-free ddH₂O 为阴性对照。将 PCR 产物进行测序并与 APP 序列进行 BLAST 比对分析。

1.9 分离菌株对小鼠的毒力试验

分离的血清 5 型 APP 分离株在 1% NAD、5% 新生牛血清的 TSA 培养基上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h，挑取单个菌落至 TSB 液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 16 h，按 1% 比例转接至 200 mL 摇瓶，37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 6 h 收获菌液，对培养菌液进行活菌预计数，计算每毫升菌液的活菌数。

将 20 只 BALB/c 小鼠分成 4 组，即高、中、低剂量攻毒组和空白组，每组 5 只。参考文献 [10] 中血清 5 型 APP 对小鼠的致死剂量，根据预计数结果稀释攻毒培养菌液至 1.0×10^8 、 1.0×10^7 和 1.0×10^6 CFU/只，即高、中、低攻毒剂量，均腹腔注射，攻毒 0.5 mL/只，同时对攻毒菌液进行计数；空白组腹腔注射 0.5 mL PBS。攻毒后连续观察 7 d，观察小鼠的精神状态、行为、采食及死亡情况，试验结束时将存活小鼠实施安乐死，并采集病变肺组织进行细菌分离鉴定。

1.10 分离菌株对猪的毒力试验

按照 1.9 的方法，培养攻毒菌液并进行预计数。将 20 头健康易感猪，分成 4 组，即高、中、低剂量攻毒组和空白组，每组 5 只。参考文献 [10] 中血清 5 型 APP 对猪的攻毒剂量，按预计数结果稀释攻毒培养菌液至 1.0×10^9 、 1.0×10^8 和 1.0×10^7 CFU/头，即高、中、低攻毒剂量，均滴鼻攻毒 2 mL/头，同时对攻毒菌液进行计数；空白组滴鼻 PBS 2 mL/只。攻毒后每日测温，连续观察 14 d，观察猪的精神状态、行为、采食、咳嗽、气喘、呼吸急促或呼吸困难等呼吸道症状及死亡情况。试验结束时将存活猪实施安乐死，剖检观察是否存在肺脏出血、坏死、纤维素渗出、脓肿，肺与胸壁、心包粘连，胸腔积液等气管、心、肺、扁桃体、肺门淋巴结等肉眼可见的大体病变。

1.11 苏木素-伊红 (HE) 和免疫组化 (IHC) 染色

采集 1.10 中 1.0×10^9 CFU/头剂量组试验结束时存活猪的气管、心、肺、扁桃体、肺门淋巴结等组织，置于 10% 中性福尔马林溶液中固定 24 h 以上，制作石蜡切片进行 HE 和 IHC 染色。HE 染色按常规步骤^[11]进行。IHC 染色所用一抗为血清 5 型 APP 菌株 CVCC 263 制备的兔阳性血清，二抗为 HRP 标记的羊抗兔 IgG，染色步骤为：常规石蜡切片脱蜡至水，3% H₂O₂ 室温 20 min，PBS 洗 5 min \times 3 次，0.125% 胰酶 37 $^{\circ}\text{C}$ 5 min，PBS 洗 5 min \times 3 次，正常马血清封闭 37 $^{\circ}\text{C}$ 20 min，甩去马血清，加入 1:3 200 稀释的一抗 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜，PBS 洗 5 min \times 3 次，加入 1:400 稀释的二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 60 min，PBS 洗 5 min \times 3 次，AEC 室温显色 5~8 min，苏木素衬染 10 s。风干后水溶性封片剂封片，显微镜下观察结果并拍照记录。

2 结果

2.1 细菌分离

病变肺组织在含 1% NAD、5% 新生牛血清的 TSA 平板上 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 18~24 h 后，生长为圆形、表面光滑、灰白色半透明的黏液型菌落。经纯化培养一代后挑取单个菌落涂片，经革兰染色镜检呈革兰阴性菌、球杆状或短杆状（图 1），分离菌在不含 1% NAD 但含 5% 新生牛血清的 TSA 培养基上不生长。分离菌符合 APP 的菌落特性和菌体形态，为生物 I 型（NAD 依赖型），将其命名为 LY2105。

2.2 卫星现象

LY2105 株在血琼脂平板上金黄色葡萄球菌 ATCC 6538 线两侧有针尖大小、边缘整齐的菌落生

长,越靠近金黄色葡萄球菌的菌落越大,越远的菌落越小,远离金黄色葡萄球菌的地方甚至不见菌落生长,即有卫星现象。

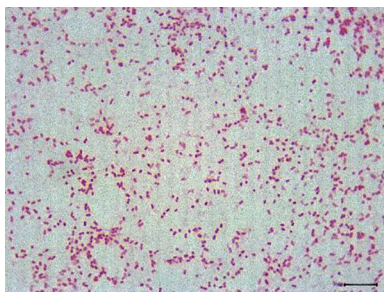


图1 分离菌革兰染色结果(标尺=10 μm)

2.3 生化鉴定

生化试验结果显示,LY2105株能分解木糖、甘露醇、葡萄糖、甘露糖、蔗糖、果糖和麦芽糖,不能分解乳糖、七叶苷、山梨醇、棉子糖、阿拉伯糖和鼠李糖。ONPG试验、尿素酶试验、硫化氢试验、硝酸盐还原试验为阳性,靛基质试验、甲基红试验、V-P试验和氧化酶试验均为阴性。以上生物学特性与APP一致。

2.4 APP特异性PCR鉴定

APP Apx IV A特异性引物对LY2105株进行PCR扩增,目的片段长度为422 bp,与预期结果一致(图2)。

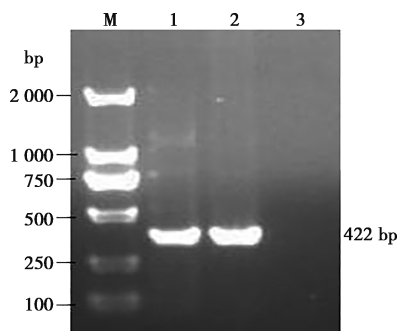


图2 LY2105株APP Apx IV A的PCR鉴定
M. DNA Marker DL2000; 1. LY2105株; 2. APP参考株CVCC 259; 3. 阴性对照。

图2 LY2105株APP Apx IV A的PCR鉴定

2.5 血清型鉴定

琼脂扩散试验对LY2105株进行血清型鉴定,结果显示LY2105株提取抗原与血清5型的单因子血清之间出现明显清晰的沉淀线,并与血清5型APP菌株CVCC 263抗原和血清5型的单因子血清之间形成的沉淀线交叉融合,鉴定LY2105株为血清5型APP。

APP血清5型*cps5B*基因的特异性引物对LY2105株进行PCR扩增鉴定,结果LY2105株和APP血清5型菌株CVCC 263扩增目的片段长度均为825 bp,与预期结果一致(图3)。将其测序结果在NCBI数据库中进行BLAST比对,进一步确定LY2105株为血清型5型。

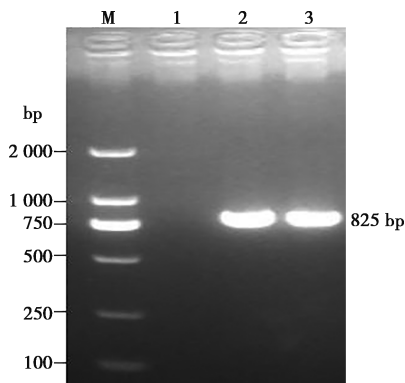


图3 LY2105株的血清型鉴定
M. DNA Marker DL2000; 1. 阴性对照; 2. APP血清5型菌株CVCC 263; 3. LY2105株。

图3 LY2105株的血清型鉴定

2.6 LY2105株对小鼠的毒力试验

按照预设对小鼠的3个攻毒剂量,即 1.0×10^8 、 1.0×10^7 和 1.0×10^6 CFU/只稀释攻毒菌液并同步计数,得出小鼠的实际攻毒剂量分别为 0.86×10^8 、 0.86×10^7 、 0.86×10^6 CFU/只。3个剂量攻毒组BALB/c小鼠均在攻毒9~12 h开始出现精神萎靡、嗜睡、身体蜷缩、食欲减退至废绝等症状;攻毒1~2 d小鼠相继死亡,其中 0.86×10^8 、 0.86×10^7 CFU/只2个剂量组在攻毒1 d内小鼠死亡率分别为100%和80%, 0.86×10^6 CFU/只低剂量组在攻毒2 d内小鼠死亡率为60%;攻毒3 d之后未死亡小鼠症状开始减轻并逐渐恢复。空白组小鼠全部表现正常,无死亡(表1)。采集攻毒组小鼠肺脏进行细菌分离鉴定,分离到的菌株菌落形态、染色形态、卫星现象、生化特性、PCR与血清型鉴定结果均与攻毒菌株完全一致。依据各攻毒组小鼠的死亡情况,表明APP血清5型LY2105株对小鼠有较强毒力。

表1 APP血清5型LY2105株攻毒后小鼠死亡情况

组别	实际攻毒剂量/ (CFU·只 ⁻¹)	死亡比例	死亡时间
高剂量攻毒	0.86×10^8	5/5	攻毒1 d内
中剂量攻毒	0.86×10^7	4/5	攻毒1 d内
低剂量攻毒	0.86×10^6	3/5	攻毒2 d内
空白	0	0/5	/

2.7 APP 血清 5 型 LY2105 株对猪的毒力试验

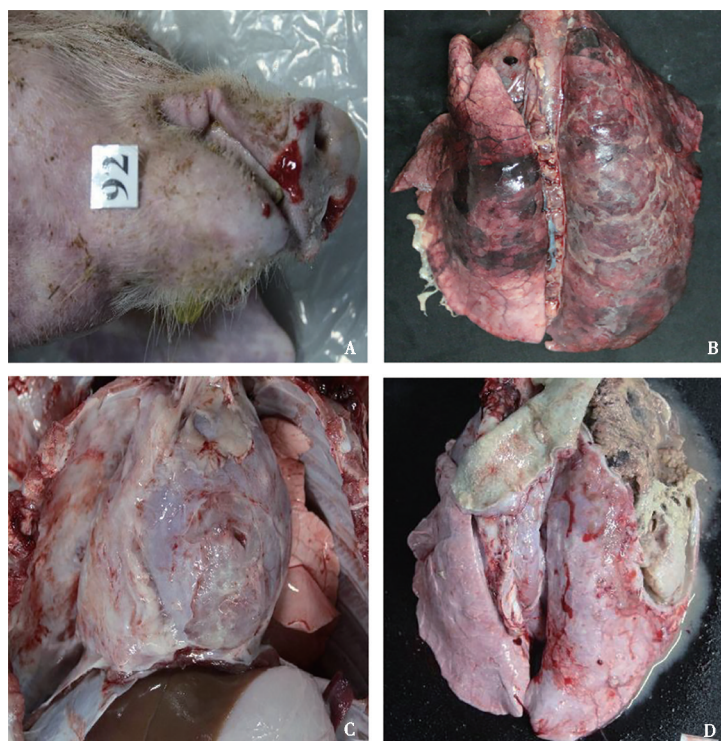
按照预设对猪的 3 个攻毒剂量，即 1.0×10^9 、 1.0×10^8 和 1.0×10^7 CFU/头稀释攻毒菌液并同步计数，得出猪的实际攻毒剂量分别为 1.87×10^9 、 1.87×10^8 、 1.87×10^7 CFU/头。由表 2 可知， 1.87×10^9 和 1.87×10^8 CFU/头这 2 个剂量攻毒组猪在攻毒 1~3 d 内均出现最急性型和急性型症状，体温高达 41°C ，呕吐、精神萎靡、食欲废绝、呼吸困难等，甚至死亡；攻毒 4~14 d 猪的精神和食欲有所恢复，但仍不及空白组，咳嗽、气喘等呼吸道症状逐渐加重。 1.87×10^7 CFU/头低剂量组攻毒后，60% 猪出现体温升高、精神不振、食欲降低、咳嗽等临床症状。低剂量组出现临床症状的猪于攻毒 14 d 安乐死后剖检观察大体病变，可见肺脏局灶性坏死灶，灶内为黄白色干酪样坏死物。

攻毒后死亡猪口鼻出血（图 4A），剖检观察见气管内大量血样泡沫和黏液，肺脏大面积出血、坏死、表面附着黄白色纤维素样渗出物，小叶间隔增宽（图 4B），肺门淋巴结和扁桃体淤血、颜色发红等大

体病变。存活猪于攻毒 14 d 实施安乐死，剖检可见心外膜与心包膜增厚、粘连；肺与胸壁、心包膜等多处粘连；肺表面附着一层质地坚硬的结缔组织增生膜（图 4C），肺大面积坏死，坏死部位中央有棕黄色、黄黑色渗出液或脓液及干酪样渗出物，外层被增生的纤维结缔组织包裹（图 4D）；肺门淋巴结灶性出血等。可见 APP 攻毒后急性死亡猪以出血性坏死性肺炎为主，而亚急性型和慢性型以纤维素性胸膜肺炎和化脓性坏死性肺炎为主。

表 2 APP 血清 5 型 LY2105 株对猪的致病性试验结果

组别	实际攻毒剂量/ (CFU · 只 ⁻¹)	出现临床症状和 肺病变比例	死亡比例
高剂量攻毒	1.87×10^9	5/5	4/5
中剂量攻毒	1.87×10^8	5/5	1/5
低剂量攻毒	1.87×10^7	3/5	0/5
空白	0	0/5	0/5



A. 死亡猪口鼻出血；B. 死亡猪肺脏出血坏死；C. 存活猪肺与心外膜粘连；D. 存活猪的肺脏坏死。

图 4 APP 血清 5 型 LY2105 株感染猪剖检变化

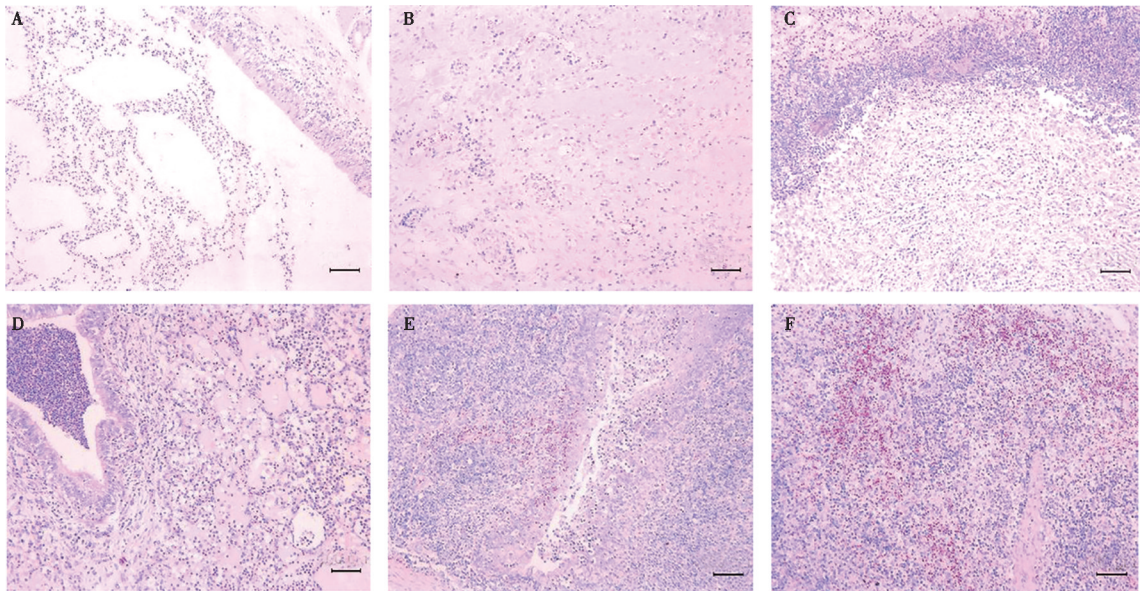
2.8 组织病理学观察

HE 染色组织病理学观察可见：气管管腔内见大量中性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞等炎性细胞浸润、均质红染的渗出液（图 5A）。心外膜增厚、附

着大量纤维素样渗出物混合坏死组织、崩解的细胞及红细胞和蓝染的菌团，外膜下变性坏死的心肌纤维间成纤维细胞增生和淋巴细胞浸润（图 5B）。肺脏内有大量坏死细胞灶形成肉芽肿样结构，内层为坏死的组

织、变形崩解的细胞碎片、蓝染的菌团及散在的红细胞等，中间层为一层上皮样细胞，最外层为大量增生的成纤维细胞和浸润的淋巴细胞（图5C）；肺脏的其他区域可见肺泡腔内大量均质红染的蛋白性渗出液、脱落的肺泡上皮细胞及淋巴细胞、中性粒细胞等炎性细胞浸润，肺细支气管腔内大量中性粒细胞浸润（图5D），符合猪传染性胸膜肺炎纤维素样坏死性肺炎的组织病变。扁桃体隐窝黏膜上皮细胞变性、坏死、少量脱落，隐窝周围及隐窝黏膜层内见少量红细

胞（图5E）；肺门淋巴结结构紊乱、淋巴滤泡数量减少、被膜下淋巴窦及弥散淋巴组织内见大量红细胞（图5F）；同时扁桃体和肺门淋巴结中均可见局部淋巴细胞数量减少、遗失。根据以上HE染色病变特点，攻毒后14d剖检的亚急性型和慢性型发病猪的心、肺等可观察到以细胞坏死崩解、纤维结缔组织增生及肉芽肿等为主的慢性增生性组织学病变；同时根据扁桃体、淋巴结中淋巴细胞减少、遗失等病变，表明APP感染后也会引起免疫系统的组织学损伤。

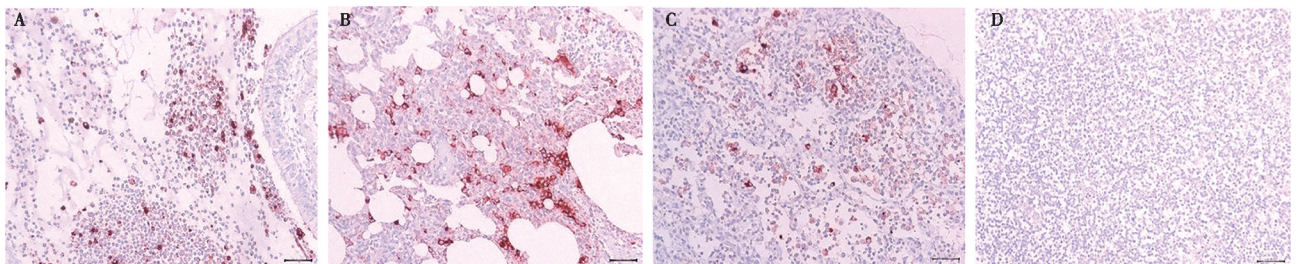


A. 气管；B. 心；C、D. 肺；E. 扁桃体；F. 淋巴结。

图5 LY2105株感染猪HE染色组织病理学观察（标尺=100 μm）

IHC染色可见：气管、肺为阳性，气管中的阳性细胞为管腔的中性粒细胞、巨噬细胞（图6A），肺中的阳性细胞为肺泡隔增宽部位的肺泡巨噬细胞及肺泡腔中脱落的巨噬细胞（图6B、C）。心、扁桃体、淋巴结为阴性（图6D）。上述结果表明，亚急性型

和慢性型发病后期，APP抗原主要存在于气管和肺的脱落细胞及肺泡巨噬细胞中，体现了细菌增殖部位与病变部位有相关关系，同时提示临床上亚急性慢性病例也应采集肺进行细菌分离鉴定。



A. 气管；B、C. 肺；D. 淋巴结。

图6 LY2105株感染猪IHC染色组织学观察（标尺=50 μm）

3 讨论

本研究分离到的 APP 血清 5 型 LY2105 株对小鼠和猪均具有较强的毒力, 以 0.86×10^8 CFU/只感染小鼠时, 在感染 1 d 内小鼠 100% 死亡; 每头猪以滴鼻 2 mL 1.87×10^9 CFU 攻毒时, 可导致猪 80% 死亡。与张哲玮^[10] 研究结果相近, 即 APP 血清 5 型菌株在 1.13×10^8 CFU/只攻毒时可致小鼠全部死亡, 每头猪气管注射 2 mL 含 1×10^9 CFU 时, 攻毒后 1~2 d 内可致猪 100% 死亡, 该研究使用气管注射攻毒, 菌液可直接进入肺中增殖, 发病快、病程短、猪急性死亡。口鼻或吸入感染时, APP 先定殖于上呼吸道的上皮细胞, 之后在扁桃体隐窝中, 到达下呼吸道黏附于肺泡上皮细胞中^[12], 菌液在体内的增殖过程与气管注射不同。APP 的传播途径为鼻-鼻接触传播或近距离的飞沫传播, 本研究中的滴鼻攻毒方法与 APP 在临床上的感染途径更接近, 可更直接地反映出 APP 血清 5 型在临床上的致病性, 同时相比气管注射, 滴鼻的攻毒方法更易操作, 可为疫苗研究和发病机理相关研究的感染模型提供参考依据。

根据临床症状的不同, PCP 一般分为最急性型、急性型、亚急性型和慢性型, 最急性型和急性型发病猪体温升高、精神沉郁、呕吐、呼吸困难等^[13], 一般 1~4 d 内死亡, 死亡猪气管和支气管充满泡沫样血性黏液, 肺呈紫红或深紫色, 间质增宽, 充满血性胶冻样物质, 肺门淋巴结肿大、出血等^[14]。亚急性或慢性型多为急性型耐过猪, 表现为食欲减退、间歇性咳嗽、料重比降低等^[13], 肺多发生干酪样病变, 出现坏死灶、空洞或结节, 与胸壁粘连等^[14]。本研究中 1.87×10^9 、 1.87×10^8 CFU/头攻毒剂量组猪在攻毒 1~3 d 的临床表现和死亡猪剖检病变与最急性型和急性型较符合, 1.87×10^9 、 1.87×10^8 CFU/头攻毒猪 4 d 之后和 1.87×10^7 CFU/头攻毒的临床表现以及试验结束时猪的剖检病变与亚急性型和慢性型较符合。李瑜祥等^[15] 研究表明, PCP 病死猪肺脏有明显的出血性纤维素性渗出, 大量肺泡上皮细胞呈岛屿状聚集, 推测可能是疾病正在由急性向亚急性转变, 继续发展有可能成为亚急性型特征性病变“肉芽肿”。本研究采集 1.87×10^9 CFU/头剂量组感染后期存活猪的样品进行 HE 染色, 组织病理学观察可见肺脏大片坏死、局部形成坏死灶或为典型的坏死性肉芽肿样结构, 与李瑜祥等^[15] 研究相一致, 同时心肌也可观察到大量成纤维细胞增生、淋巴细胞浸润等病变, 即本研究中存活猪肺脏和心脏的组织学也支持为亚急性或慢性型的病变特征。此外, HE 染色在扁桃体和淋巴结均可观察到一定程度的淋巴细胞数量减少、淋巴细

胞遗失等, 这也与李瑜祥等^[15] 研究相近, 可见不管是急性型、亚急性型或慢性型均可对淋巴组织造成一定的损伤。

有学者通过间接荧光技术方法检测出 APP 感染猪肺脏中的细菌抗原, 该方法能够区分出不同的血清型, 具有较高的特异性和敏感性^[16]; 使用亲和生物素-过氧化物酶复合物结合的方法^[17] 在血管、支气管、细支气管的管腔、肺泡腔及肺泡巨噬细胞中可检测到 APP 抗原阳性, 比细菌分离的方法检出率更高, 因此认为免疫组化方法可能是猪传染性胸膜肺炎常规诊断的一个很好的选择。本研究通过免疫组化方法, 使用单因子兔阳性血清可在血清 5 型 APP 感染猪的气管腔、肺泡腔和肺泡巨噬细胞中检测到大量细菌抗原阳性, 也证明了免疫组化方法的敏感性和特异性较好, 定位性也与相关学者的研究结果一致^[18-19]。有研究发现, APP 分泌产生的毒素 Apx I、Apx II、Apx III 能损害巨噬细胞和中性粒细胞的吞噬功能^[18], Apx I 可以诱导猪肺泡巨噬细胞的凋亡^[19]。本研究证实血清 5 型 APP 感染后可在中性粒细胞、肺泡巨噬细胞中定殖, 推测其也必然会影响到定殖部位的相关功能, 值得进一步探讨。

参考文献:

- [1] TOBIAS T J, BOUMA A, DAEMEN A J J M, et al. Association between transmission rate and disease severity for *Actinobacillus pleuropneumoniae* infection in pigs [J]. *Vet Res*, 2013, 44 (1): 2.
- [2] STRINGER O W, BOSSÉ J T, LACOUTURE S, et al. Proposal of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 19, and reformulation of previous multiplex PCRs for capsule-specific typing of all known serovars [J]. *Vet Microbiol*, 2021, 255: 109021.
- [3] 卢碧凯, 袁秀芳, 徐丽华, 等. 胸膜肺炎放线杆菌分离株血清型的 PCR 鉴定和 Apx 毒素基因检测 [J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54 (3): 1341-1346.
- [4] 王丹丹, 陈国强, 张常印, 等. 猪胸膜肺炎放线杆菌血清 8 型菌株的分离鉴定及耐药性研究 [J]. *中国畜牧兽医*, 2019, 46 (10): 3124-3130.
- [5] SOUTTER F, PRIESTNALL S L, CATCHPOLE B, et al. An experimental dermal oedema model for apx toxins of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *J Comp Pathol*, 2022, 195: 12-18.
- [6] SCHALLER A, DJORDJEVIC S P, EAMENS G J, et al. Identification and detection of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by PCR based on the gene apxIVA [J]. *Vet Microbiol*, 2001, 79 (1): 47-62.
- [7] 李开玉, 朱士盛, 杜华宏, 等. 用琼扩法测定胸膜肺炎嗜血杆菌的血清型 [J]. *中国兽医科技*, 1991, 21 (1): 37-39.
- [8] 中华人民共和国农业农村部. 猪传染性胸膜肺炎诊断技术: NY/T 537—2023 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2023.
- [9] BOSSÉ J T, LI Y, FERNANDEZ CRESPO R, et al. Comparative sequence analysis of the capsular polysaccharide loci of *Actinobacillus*

- pleuropneumoniae* serovars 1-18, and development of two multiplex PCRs for comprehensive capsule typing [J]. *Vet Microbiol*, 2018, 220: 83-89.
- [10] 张哲玮. 猪传染性胸膜肺炎-猪巴氏杆菌病二联亚单位疫苗的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- [11] 周庚寅. 组织病理学技术 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 12-14.
- [12] JEFFRE Y Z, LOCKE A K, ALEJANDRO R, et al. 猪病学 [M]. 11 版. 杨汉春, 主译. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2021: 782.
- [13] 罗满林. 动物传染病学 [M]. 2 版. 北京: 中国林业出版社, 2021: 233-234.
- [14] BOSSÉ J T, JANSON H, SHEEHAN B J, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection [J]. *Microbes Infect*, 2002, 4 (2): 225-235.
- [15] 李瑜祥, 魏唐婷, 胡秀花, 等. 猪传染性胸膜肺炎病例报告 [J]. 中国兽医杂志, 2023, 59 (11): 110-116.
- [16] BUNKA S, MÜLLER E, PETZOLDT K. Direct detection of *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* in the lungs of swine [J]. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 1989, 96 (7): 371-373.
- [17] HERNÁNDEZ-CASTRO R, CHÁVEZ-GRIS G, GUTIÉRREZ-PABELLO J Á. Identificación de *Actinobacillus pleuropneumoniae* biotipo 1, serotipo 1, de pulmones de cerdo con y sin lesiones neumónicas utilizando la técnica de inmunohistoquímica [J]. *Veterinaria Mexico*, 2002, 33: 355-362.
- [18] FREY J. Detection, identification, and subtyping of *Actinobacillus pleuropneumoniae* [J]. *Methods Mol Biol*, 2003, 216: 87-95.
- [19] CHIEN M S, CHAN Y Y, CHEN Z W, et al. *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10 derived ApxI induces apoptosis in porcine alveolar macrophages [J]. *Vet Microbiol*, 2009, 135 (3/4): 327-333.

· 信息 ·

《畜牧与兽医》征稿要约

1 来稿要求和注意事项。

- 1.1 文稿要求论点明确, 论据可靠, 数字准确, 文字精炼, 若为基金项目资助论文请注明项目名称和编号。
- 1.2 要求论文题名简明、确切, 一般不超过 20 个汉字; 中文摘要 400 字左右 (研究目的、方法、结果与结论), 3~8 个关键词, 紧跟其后要有相对应的英文, 包括: 题名、作者姓名 (汉拼)、作者工作单位、摘要和关键词, 引用资料请列出文献。
- 1.3 表格应有表序和表题, 且用三线表。表格中各栏目单位相同时, 将单位写于表题右侧; 单位不同时分别注于各栏目中。图应有图序和图题, 线条图线条要流畅, 图中的文字、数字及其位置要标注清楚; 照片一定要清晰, 黑白反差明显。用表格或图时, 文中不要再一一重复其数据, 且图表内容不可重复。
- 1.4 文中计量单位请用法定计量单位和单位符号, 请明确字母的正斜体、大小写。
- 1.5 参考文献一般用顺序编码制著录, 并用阿拉伯数字加方括号标于正文中相应位置的右上角。引用文献作者有 3 人以上者, 需列出前 3 人, 后加“等”字。主要文献类型的著录请按下列格式书写:

期刊: [序号] 作者. 题名 [J]. 期刊名称, 出版年, 卷 (期): 引用页码。

书籍: [序号] 作者. 书名 [M]. 版本项 (第 1 版不标注). 出版地: 出版者, 出版年: 引用页码。

学位论文: [序号] 作者. 题名 [D]. 保存地点: 保存单位, 年份。

论文集: [序号] 作者. 题名 [C]. 编者. 论文集名. 出版地: 出版者, 出版年: 引用页码。

网上资料: [序号] 作者. 题名 [EB/OL]. (更新或修改日期) [引用日期]. 获取和访问路径。

2 文稿的著作权属于作者。来稿文责自负, 作者署名请慎重。请提供第一作者及通信作者的详细地址、邮政编码、工作单位、联系电话及 E-mail 地址等, 给出第一作者的简介, 包括性别, 民族, 学位, 职称, 通信作者的职称及主要研究方向。本刊有权在不影响主要内容的前提下, 对原稿进行文字修改、删节。

3 文稿被录用后, 即由编辑部发送录用通知及发表费通知, 请勿一稿多投和学术造假, 否则, 本刊有权对相关稿件按规定予以处理, 以维护本刊及作者的信誉和权益。论文的汇编权、复制权、发行权、信息网络传播权、翻译权等归本刊编辑部所有。

4 本刊已被国内多家数据库全文收录和传播, 作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意上述声明。

5 本刊只接受在线采编系统投稿, 请作者登录本刊投稿网站在线注册投稿, 网页链接地址: <http://xmys.cbpt.cnki.net/EditorB3N/index.aspx? t=1>。编辑部唯一官方邮箱: muyizz@njau.edu.cn。

(本刊编辑部)