

5 型副猪嗜血杆菌河南分离株的毒力基因研究

张青娴^{1,2}, 徐引弟^{1,2}, 王治方^{1,2}, 朱文豪^{1,2}, 焦文强^{1,2}, 李海利^{1,2}

(1. 河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002;

2. 河南省畜禽繁育与营养调控重点实验室, 河南 郑州 450002)

中图分类号: S858.282.61*2

文献标志码: A

文章编号: 1002-1957(2020)05-0105-05

摘要 为了探究豫北某猪场呼吸道疾病发病原因, 通过 PCR 鉴定分离株血清型, 检测了 14 个可能与致病力有关的毒力基因 (*lsgB*、*capD*、*vta1*、*vta2*、*vta3*、*wza*、*hhdA*、*hhdB*、*ompP2*、*nanH*、*cdtA*、*cdtB*、*cdtC*、*espP2*), 分析其与血清型可能存在的关系, 并做了豚鼠致病性试验。结果显示, 该分离株含有全部上述毒力基因, 对豚鼠致病力强, 为 5 型副猪嗜血杆菌强毒株。

关键词 副猪嗜血杆菌; 血清型; 毒力基因

DOI: 10.13257/j.cnki.21-1104/s.2020.05.033

Research on Virulence Genes of the *Haemophilus Parasuis* Serovar 5 Isolate in Henan Province

ZHANG Qingxian^{1,2}, XU Yindi^{1,2}, WANG Zhifang^{1,2}, ZHU Wenhao^{1,2}, JIAO Wenqiang^{1,2}, LI Haili^{1,2}

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Key Laboratory of Livestock Breeding and Nutrition Regulation, Zhengzhou 450002, China)

Abstract In order to investigate the cause of respiratory diseases in a pig farm in Northern Henan Province, the serotypes and 14 virulence genes (*lsgB*, *capD*, *vta1*, *vta2*, *vta3*, *wza*, *hhdA*, *hhdB*, *ompP2*, *nanH*, *cdtA*, *cdtB*, *cdtC*, *espP2*) of the isolated strain were identified by PCR, pathogenicity test of guinea pigs were detected, and then their possible relationship were analyzed. The results showed that the isolated strain had all the above-mentioned virulence genes, and had strong pathogenicity to guinea pigs, indicating that the isolate is a virulent strain of *Haemophilus parasuis* serovar 5.

Key words *Haemophilus parasuis*; serotype; virulence gene

副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, HPS) 是猪多发性浆膜炎和关节炎 (格拉瑟病) 的病原体, 常定植在猪的上呼吸道, 在环境应激和感染免疫抑制性疾病时副猪嗜血杆菌进入血液暴发本病, 引发全身性细菌感染^[1]。

副猪嗜血杆菌至少分为 15 种血清型, 我国流行的血清型为 1、4、5 和 13, 河南省以 4 型和 5 型居多^[2-9]。目前常用的疫苗为全细菌灭活苗, 但只对血清型 1、4、5 和 6 有保护力。血清型之间的交叉保护不一致, 也缺乏区分感染猪和疫苗猪的可用方法, 当疫苗株与临床分离株血清型不一致时, 疫苗无法提供足够的免疫保护^[7-9]。到目前为止尚未发现毒力和血清型之间的绝对关系, 不同血清型的副猪嗜血杆

菌分离株可携带不同的毒力基因^[10-12]。检测田间分离株的毒力基因, 探究其与血清型的相关性, 有助于预测副猪嗜血杆菌分离株的致病力, 而确定菌株的致病潜力对诊断和疾病控制很重要。

本试验对豫北某猪场疑似副猪嗜血杆菌病进行分离鉴定、血清型分型、毒力基因扩增和致病性试验, 旨在探究副猪嗜血杆菌毒力因子的功能及其与血清型的相关性, 为进一步认识其致病机理及研发新型亚单位疫苗和诊断试剂提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 病料来源于豫北某猪场的疑似病猪, 包括肺脏、心血、肝脏、脾脏、肾脏、脑脊液、关节液等, 于 2019 年 10 月至 2020 年 1 月在河南省农业科学院畜牧兽医研究所传染病研究室进行分离鉴定及后续工作。

1.1.2 主要试剂 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (tryptic soy agar, TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (tryptic

收稿日期: 2020-07-14

基金项目: 河南省农业科学院 2020 年自主创新项目 (2020ZC40)

作者简介: 张青娴 (1979-), 女, 河南南阳人, 助理研究员, 硕士, 主要从事畜禽传染病临床诊断及防控研究工作。

E-mail: 253818452@qq.com

soybroth, TSB)为美国 BD 公司产品;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)为 Sigma 公司产品;革兰氏染色液为珠海贝索生物技术有限公司产品;新生牛血清为郑州益康生物工程有限公司产品;PCR 分子生物学试剂为宝生物(大连)工程有限公司产品。DMSO、甘油和甲氧氟醚等普通化学试剂购自北京陆桥技术股份有限公司。

1.1.3 试验动物 体重 250~300 g 的雄性豚鼠,购于郑州大学第一附属医院实验动物中心。

1.1.4 引物 参考 Angen 等^[13]的方法,根据 HPS M75065 株 16S rRNA 的保守区基因设计特异性鉴定引物 HPS F1/F2/R,扩增片段长度为 1 090 bp。

F1:5'-TATCGRGAGATGAAAGAC-3',F2:5'-GT AATGTCTAAGGACTAG-3',R:5'-CCTCGCGGCTTCG TC-3'。

参考 Howell 等^[14]的方法,合成用于鉴定 HPS 血清型的引物(表 1);参考乐敏等^[15-17]的方法,合成鉴定 HPS 毒力因子的引物(表 2)。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表 1 血清型分型引物序列

血清型	引物	引物序列 5'-3'	片段长度/bp
1	<i>funB</i>	fun B-F: CTGTGTATAATCTATCCCGATCATCAGC fun B-R: GTCCAACAGAATTTGGACCAATTCCTG	180
2	<i>wzx</i>	wzx-F: CTAACAAGTTAGGTATGGGGTTTTGGTG wzx-R: GGCACGAATAAGGGATAATGTACTG	295
3	<i>gly</i>	gly C-F: CATGGTGTTTTCTCCTGACTTGGCTGT gly C-R: TCCACATGAGGCGCTTCTAATACT	650
4	<i>wci P</i>	wci P-F: GGTTAAGAGGTAGAGCTAAGAATAGAGG wci P-R: CTTTCCACAACAGCTCTAGAAACC	320
5/12	<i>wcw K</i>	wcw K-F: CCACTGGATAGAGAGTGGCAGG wcw K-R: CCATACATCTGAATTCCTAAAGC	450
6	<i>glt I</i>	glt I-F: GATTCTGATGATTTTTGGCTGACCGAAGC glt I-R: CCTATTCTGTCTATAAGCATAGACAGGAC	360
7	<i>fun Q</i>	fun Q-F: CTCCGATTTCATCTTTTCTATGTGG fun Q-R: CGATAAACATAACAATTCCTGCCAC	490
8	<i>scd A</i>	scd A-F: GGAAGGGGATTACTACTACTGAAAG scd A-R: CTCCATAGAACCTGCTGCTTGAG	650
9	<i>fun V</i>	fun V-F: AGCCACATCAATTTTAGCCTCATCA fun V-R: CCTTAAATAGCCTATGTCTGTACC	710
10	<i>fun X</i>	fun X-F: GGTGACATTTATGGCGGAGTAAGTC fun X-R: GCACTGTCTCAATAACAATCTTAAGACC	790
11	<i>amt</i>	amt A-F: CCATCTCTTTAACTAATGGGACTG amt A-R: GGACGCCAAGGAGTATTATCAAATC	890
13	<i>glt P</i>	glt P-F: GCTGGAGGAGTTGAAAGAGTGTGTAC glt P-R: CAATCAAATGAAACAACAGGAAGC	840
14	<i>fun AB</i>	fun AB-F: GCTGGTTATGACTATTCTTTTCGCG fun AB-R: GCTCCCAAGATTAACCAACAGCAAG	730
15	<i>fun I</i>	fun I-F: CAAGTTCGGATTGGGAGCATATATC fun I-R: CCTATATCATTGTGTGATGTACG	550

表 2 毒力基因引物序列

序号	基因	引物序列 5'-3'	片段长度/bp
1	<i>lsgB</i>	lsgb-F: ATGAATTTGATTATTTGTATGACTCCATTTTC lsgb-R: CTATTGGCATGTGTAGTCAATTACTTTC	969
2	<i>capD</i>	capd-F: ATGTTAATGCCATTAATTTTATTCATTG capd-R: TCGAACCGATAGAACCAGCAGCACCAGTC	780
3	<i>vta1</i>	vta1-F: TTTAGGTAAGATAAGCAAGGAAATCC vta1-R: CCACACAAAACTACCCTCCTCC	406
4	<i>vta2</i>	vta2-F: AGCTTATATTCTCAGCACAAAGGTGC vta2-R: CCACTGATAACCTACCCACAGAG	294
5	<i>vta3</i>	vta3-F: AATGGTAGGCAGTTGTATAATGTTGC vta3-R: CCACTGTAATGCAATACCTGCACC	293
6	<i>wza</i>	wza-F: ATGTGTAAGTTAACTAAAGCTCTTG wza-R: AGCAATTGCTTCGGTTAACGTCATAC	840
7	<i>hhdA</i>	hhdA-F: GGTCTAGTTCACAAACAGCCAATAC hhdA-R: GATATTTACCCTGCCTTCATTGTATC	964
8	<i>hhdB</i>	hhdB-F: ATCTTGCCTGATTAGAGACTAGGAGT hhdB-R: GTGAATATAGCCCTTATCCAAATAGGC	557
9	<i>ompP2</i>	ompP2-F: ATGAAAAAACACTAGTAGCA ompP2-R: TTACCATAATACACGTTAAACC	1 077
10	<i>nanH</i>	nanH-F: AGGGAGCGGAGACTAAGAGG nanH-R: CCGCTTTATTTCCAGAACCA	304
11	<i>cdtA</i>	cdtA-F: CTTTGGATGTATCCGCCACT cdtA-R: CACAACGATCCAAAGTCAGC	301
12	<i>cdtB</i>	cdtB-F: CGTCCAGCCATAGGTATTTCG cdtB-R: GGCTTGATTCCGATTGTGTA	303
13	<i>cdtC</i>	cdtC-F: CAGTGGCAGCTTGTGTATGT cdtC-R: CGGAGCAATGATCCAAAGAT	294
14	<i>espP2</i>	espP2-F: TGGGGTAACAGTGACGCATA espP2-R: AAATCACTTCCGCTTGTGGT	299

1.2 方法

1.2.1 细菌的分离培养 无菌采集病死猪的肺脏、心血、肝脏、脾脏、肾脏、脑脊液、关节液等病料,于生物安全柜内接种于 TSA 平皿(含 5%新生牛血清和 10 μg/mL NAD)上,37 °C 恒温培养 36~48 h。接种环挑取纯培养的细菌重悬于 30 μL 超纯水中,加入蛋白酶 K 56 °C 裂解 1 h。将混合物煮沸 30 min,冰上冷却,于 12 000 r/min 离心 3 min 后收集上清液。使用动物全基因组 DNA 提取试剂盒提取 1657 株 DNA。

16S rRNA PCR 反应体系(总体积 25 μL)包括 12.5 μL 2×Taq PCR master mix,上游引物(50 μmol/L)下游引物(50 μmol/L)1 μL,8.5 μL 超纯水和 2 μL DNA 模板(浓度>10 ng/μL)。反应条件如下:94 °C 初始变性 3 min;35 个循环,94 °C 1 min,56 °C 45 s,72 °C 1 min,最终 72 °C 延伸 5 min。使用 1%琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物。

将 16S rRNA 扩增阳性产物测序,鉴定所有可疑的副猪嗜血杆菌菌落。无菌条件下接种环挑取 PCR 鉴定阳性的菌落置于 2 mL TSB 肉汤(含 5%新生牛血清和 10 μg/mL NAD)中,37 °C 培养 18~24 h,添加 30%甘油分装保存在-80 °C 备用。

1.2.2 血清分型 配置反应体系如下:25 μL 体系, 12.5 μL 2 \times Taq PCR master mix, 1.5 μL 上游引物(50 $\mu\text{mol/L}$), 1.5 μL 下游引物(50 $\mu\text{mol/L}$), 2 μL DNA 模板(浓度 >10 ng/ μL), 0.25 μL 的 DMSO 和 7.25 μL 的超纯水进行 PCR: 94 $^{\circ}\text{C}$ 初始变性 2 min; 35 个循环, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 最终 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。使用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物。

1.2.3 毒力基因鉴定 已知的毒力基因、引物和每种扩增产物的大小如表 2 所示。PCR 反应体系(总体积 25 μL)包括 12.5 μL 2 \times Taq PCR master mix, 2 μL 每条引物(50 $\mu\text{mol/L}$), 7.5 μL 超纯水和 1 μL DNA (浓度 >10 ng/ μL)。94 $^{\circ}\text{C}$ 初始变性 2 min; 35 个循环, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 最终 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。使用 2% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物。

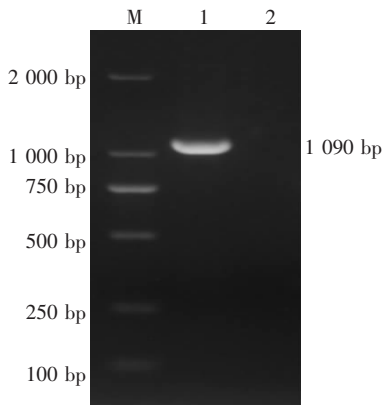
1.2.4 致病力试验 经预试验, 副猪嗜血杆菌 1657 株腹腔感染的半数致死量为 1.8×10^9 CFU。故将腹腔感染试验分组和菌量安排如下: 分为 3 个试验组和 1 个空白对照组, 每组 5 只豚鼠, 试验组每只豚鼠接种的剂量为 1 mL, 菌量分别为 4.0×10^9 CFU、 2.0×10^9 CFU 和 4.0×10^8 CFU。空白对照组接种 1 mL 生理盐水。试验结束时, 存活的小鼠用过量的甲氧氟醚杀死。

2 结果

2.1 HPS 1657 株的分离鉴定

肺组织经 48 h 培养后, 在 TSA 平皿上长出直径约 0.2 mm、光滑圆润、无色透明的针尖状小菌落, 革兰氏染色为多个不同形状的菌体, 呈短杆状、杆状或长丝状。将该菌株命名为 1657 株。其他组织未分离出可疑致病菌。

经 16S rRNA PCR 鉴定后, 1% 琼脂糖凝胶电泳可见大小为 1 090 bp 的目的片段(图 1)。测序结果经 NCBI 网站 BLAST 序列对比后与 HPS 吻合率 99.8% 以上, 故 1657 株为 HPS。



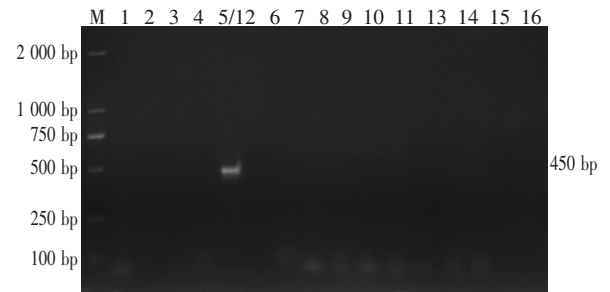
M: DNA 分子标准 2 000; 1: 分离株; 2: 阴性对照。

图 1 HPS 分离株的 PCR 鉴定

2.2 HPS 1657 株的血清型鉴定

用 PCR 方法扩增 15 种血清型, 经 2% 琼脂糖凝

胶电泳后, 在 450 bp 处出现一条明亮的目的条带(图 2), 将扩增产物测序, 经 NCBI 网站 BLAST 序列对比后与 5 型 HPS 吻合率 99.8% 以上, 故 1657 株为 5 型 HPS。

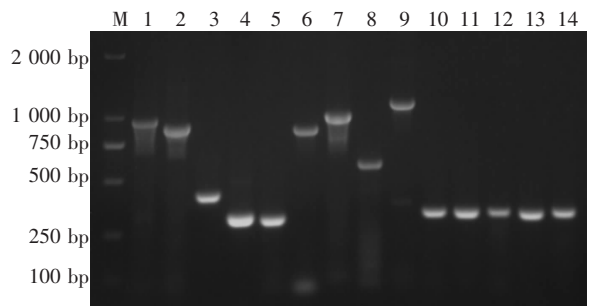


M: DNA 分子标准 2 000; 1~15: 1~15 血清型; 16: 阴性对照。

图 2 HPS 分离株的血清型鉴定

2.3 HPS 1657 株的毒力基因测定

以分离株的 DNA 为模板, 用 PCR 方法扩增上述 14 种毒力基因, 2% 琼脂糖凝胶电泳分析, 得到全部为阳性的目的条带(图 3)。



M: DNA 分子标准 2 000; 1~14: 毒力基因。

图 3 HPS 分离株的毒力基因测定

2.4 HPS 1657 株的致病性试验

腹腔注射试验结果显示, 豚鼠感染后 4 h 内即出现食欲废绝、呼吸困难、精神沉郁和共济失调等症状, 6 h 后出现死亡。最终 7 d 内高剂量组豚鼠死亡 4 只, 中间剂量组有 2 只死亡, 而最低剂量组和空白对照组无死亡豚鼠。剖检死亡豚鼠后可见典型的败血症、纤维素性多发性浆膜炎、胸腹腔积液、关节炎和脑膜炎等症状, 中间剂量组未出现浆膜炎症状, 未死亡豚鼠无明显症状。无菌取死亡豚鼠的肺脏、肾脏、脾脏、肝脏、心血、关节液和脑脊液等主要器官, 接种含 NAD 和新生小牛血清的 TSA 培养基, 能再次分离到该种病原菌, 未死亡的豚鼠未分离出该菌。上述试验表明 1657 株在菌液浓度为 2.0×10^9 CFU/mL 即可达到半数致死量, 说明 1657 株毒力较强。

3 小结

本次分离的副猪嗜血杆菌 1657 株为肺分离株, 血清型为 5 型, 14 种毒力基因(*lsgB*、*capD*、*vta1*、*vta2*、*vta3*、*wza*、*hhdA*、*hhdB*、*ompP2*、*nanH*、*cdtA*、*cdtB*、*cdtC*、*espP2*)均为阳性, 且致病性试验显示为强毒株。

4 讨论

菌株的血清型通常被视为菌株毒力强弱的标志,血清型与毒力之间存在一定的相关性,也有研究发现这种关系并不确定^[18]。部分血清型相同但不同分离地区的菌株在毒力试验时表现出差异性,约有15%~41%毒力较强的菌株无法确定血清型,使HPS流行病学研究遇到一定阻力^[19]。

目前对副猪嗜血杆菌致病性的研究主要集中在毒力因子,但毒力因子的数量与功能尚未完全探究清楚。唾液酸转移酶编码基因 *lsdB* 基因主要存在于组织部位分离的副猪嗜血杆菌中,而从鼻腔分离的菌株中均未检测到,且 *lsdB* 只存在于毒性菌株中^[20]。副猪嗜血杆菌具有神经氨酸酶基因 *nanH* 和神经氨酸酶活性。神经氨酸酶基因 *nanH* 能够清除宿主的唾液酸,唾液酸可作为碳源和/或氮源通过唾液酸转移酶 *lsdB* 被整合入脂寡糖^[21]。假定荚膜产生基因 *capD* 基因编码一种多糖生物合成蛋白,该蛋白与副猪嗜血杆菌的毒性有关^[22]。*wza* 基因在毒力因子荚膜多糖转运过程起重要作用,缺失 *wza* 基因能使HPS毒力显著降低^[23]。*vta3* 在毒力菌株和无毒力菌株中均高度保守,而 *vta1* 和 *vta2* 主要在致病菌株中为阳性^[24]。体内感染条件下,细胞致死膨胀毒素操纵子 (cytotoxic distending toxin, *cdt*) 和溶血毒素操纵子 *hhd* 均出现上调表达,表明该类毒素基因是副猪嗜血杆菌直接发挥细胞毒性作用的重要武器^[15]。McVicker 等发现副猪嗜血杆菌与流感嗜血杆菌具有同源性的外膜蛋白 *ompP2* 和 *ompP5*,该蛋白与细菌黏附有关,在毒力株和非毒力株中蛋白的分子质量大小有所不同^[25]。血清2、4、5、10、12、13、14、15型HPS株的 *ompP2* 基因在450~524 bp 和770~844 bp 范围内,存在共计100 bp左右的碱基缺失,而血清1、3、6、7、8、9、11型参考菌株 *ompP2* 基因不存在缺失,并且这些发生碱基连续缺失的参考血清型菌株均为公认的毒力菌株^[26]。胞外丝氨酸蛋白酶 (extracellular serine protease, ESP) 在感染猪的过程中发生表达, *esp P2* 蛋白与流感嗜血杆菌编码 IgA 蛋白酶的基因具有同源性,豚鼠用重组 *esp P2* 蛋白免疫后,对HPS的攻毒产生了部分保护^[27]。Chao 等通过研究越南中部副猪嗜血杆菌分离株的血清型和毒力基因的特征发现, *lsdB*、*capD*、*wza*、*hpm-1372*、*hpm-1373*、*vta2* 和 *vta3* 等大多数毒力基因分布在高度和中度毒力血清型组,5/12型血清型与 *capD* 有一定相关性^[28]。乐敏首次绘制出副猪嗜血杆菌 SH0165 株基因组的潜在毒力因子图,筛选出部分主要的毒力相关基因或操纵子基因 (*nanH*、*oapA*、*ompP5*、*spilA*、*ompP2*、*cdtABC*、*hhdAB*、*prtC*、*sodAC*、*sphB*、*espP*、*flpA*、*mip*、*mviN* 和 *HAPS-0694*),发现所筛选出的基因在我国

HPS 流行菌株中高度保守,推测这些毒力基因很有可能是 HPS 致病关键因子^[15]。HPS 毒力因子的界定将大大提高毒力和非毒力菌株的鉴别,需要更多的研究来验证副猪嗜血杆菌各毒力蛋白的具体作用^[29]。

综上所述,本研究分离的副猪嗜血杆菌 1657 株为血清型 5 型菌株,且含有多种毒力基因,其强致病性可能由于多个毒力基因的协同作用,是否上述毒力因子是决定 HPS 致病力的基因还有待于进一步的基因敲除与回归试验验证^[30];是否被界定为强毒株的血清型中均含有上述毒力基因有待进一步扩大田间分离株范围。

Morozumi 等选择小鼠作为 HPS 试验模型,基本不发病或者死亡很少,且病变很少^[31]。但由于小鼠操作上的优越性,可作为筛选 HPS 毒力蛋白的模型^[23-32]。本试验采用豚鼠做为试验动物模型,很大程度上还原了副猪嗜血杆菌病的流行病经过,相比 SPF 猪代价低,周期短,可以作为 HPS 试验动物首选。

本文提供了豫北某发病猪场副猪嗜血杆菌血清型和毒力基因的第一手资料,研究了该分离株血清型与毒力基因的相关性,对了解该地区的副猪嗜血杆菌流行病学特征和防控该病具有重要意义。

参考文献

- [1] Oliveira S, Galina L, Pijoan C. Development of a PCR test to diagnose *Haemophilus parasuis* infections[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2001, 13: 495-501.
- [2] 王萍,黄建珍,黄冬艳.副猪嗜血杆菌 OMP5 的克隆表达及其对豚鼠的免疫保护作用[J]. *畜牧与兽医*, 2012(4): 26-30.
- [3] 王治方,徐引弟,朱文豪,等.副猪嗜血杆菌流行优势菌株调查和耐药性分析[J]. *中国兽医学报*, 2019(10): 1942-1946.
- [4] 李新果,史志斌,张磊,等.副猪嗜血杆菌河南流行株的分离鉴定及分型[J]. *河南农业科学*, 2018, 47(11): 116-119.
- [5] 徐引弟,鲁杨超,王治方,等.4型副猪嗜血杆菌的分离鉴定与生物学特性研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2018(13): 131-134.
- [6] 常洪涛,杨霞,张辉,等.2011年河南副猪嗜血杆菌分离株的 ER-IC-PCR 指纹图谱分析[J]. *中国兽医杂志*, 2013(12): 37-38, 41.
- [7] Angen O, Svensmark B, Mittal K R. Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates[J]. *Vet Microbiol*, 2004, 103: 255-258.
- [8] Bak H, Riising H J. Protection of vaccinated pigs against experimental infections with homologous and heterologous *Haemophilus parasuis*[J]. *Veterinary Record*, 2002, 151: 502-505.
- [9] Takahashi K, Naga S, Yagihashi T, et al. A cross-protection experiment in pigs vaccinated with *Haemophilus parasuis* serovars 2 and 5 bacterins, and evaluation of a bivalent vaccine under laboratory and field conditions[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2001, 63: 487-491.
- [10] Boerlin P, Poljak Z, Gallant J, et al. Genetic diversity of *Haemophilus parasuis* from sick and healthy pigs[J]. *Vet Microbiol*, 2013, 167: 459-467.
- [11] Aragon V, Cerdà-Cuellar M, Fraile L, et al. Correlation between clinico-pathological outcome and typing of *Haemophilus*

我国猪瘟疫苗研究与应用进展

李 娇¹, 祖立闯¹, 王文秀², 谢金文², 沈志强^{1,2}

(1. 山东绿都生物科技有限公司, 山东 滨州 256600; 2. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 滨州 256600)

中图分类号: S858.285.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-1957(2020)05-0109-04

摘 要 文章对我国猪瘟商品化疫苗的应用现状以及新型疫苗的研究进展进行了综述, 以期为新形势下进一步开展猪瘟疫苗的研发提供借鉴与参考, 对我国猪瘟的综合防控和净化工作具有一定的参考价值。

关键词 猪瘟; 疫苗; 研究; 应用

猪瘟(Classical swine fever, CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起猪的一种高度接触性、致死性的传染病, 长期以来我国通过采取以疫苗免疫接种为主, 结合抗体监测、生物安全等综合性防控措施有效防止了猪瘟的大规模暴发和流行^[1-3]。随

着全球范围内猪瘟净化工作的不断开展, 部分欧洲和美洲国家已经彻底消灭了猪瘟, 这对我国净化猪瘟具有重要的借鉴和指导意义。目前, 我国商品化的猪瘟疫苗主要是基于中国猪瘟兔化弱毒株(C株)的系列弱毒疫苗, 但该类疫苗均无法区分自然感染猪和疫苗接种猪, 这种技术上的不足在很大程度上限制了我国猪瘟净化工作的开展, 已经无法满足我国猪瘟净化的需要^[3]。研制新型、安全、高效和能够区分疫苗免疫接种动物和野毒感染动物的新型标记疫苗逐步成为猪瘟防控领域的研究

收稿日期: 2019-12-22

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目(31560696); 海南省热带动物繁育与疫病研究重点实验室开放课题(HKL201601)
作者简介: 李 娇(1981-), 女, 满族, 辽宁铁岭人, 助理研究员, 硕士, 主要从事动物疫病诊断与防控技术研究。

E-mail: lijiao_zone@163.com

- parasuis field strains[J]. *Vet Microbiol*, 2010, 142: 387-393.
- [12] Bouchet B, Vanier G, Jacques M, *et al*. Interactions of *Haemophilus parasuis* and its LOS with porcine brain microvascular endothelial cells[J]. *Vet Res*, 2008, 39(5): 42-55.
- [13] Angen O, Oliveira S, Ahrens P, *et al*. Development of an improved species specific PCR test for detection of *Haemophilus parasuis*[J]. *Vet Microbiol*, 2007, 119: 266-276.
- [14] Howell K J, Peters S E, Wang J, *et al*. Development of a multiplex PCR assay for rapid molecular serotyping of *Haemophilus parasuis*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53: 3812-3821.
- [15] 乐敏. 副猪嗜血杆菌基因组学及毒力相关因子研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [16] 江军, 姜平, 王一成, 等. 浙江省副猪嗜血杆菌血清型调查及其潜在毒力相关基因分析[J]. *畜牧与兽医*, 2016, 48(8): 1-7.
- [17] Chao N Van, Tam V T, Zou G, *et al*. Characterization of serotypes and virulence genes of *Haemophilus parasuis* isolates from Central Vietnam[J]. *Vet Microbiol*, 2019, 230: 117-122.
- [18] 陈奇. 用豚鼠感染模型筛选副猪嗜血弱毒菌株[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.
- [19] Rafiee M, Bara M, Stephens C P, *et al*. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*[J]. *Aust Vet J*, 2000, 78(12): 846-849.
- [20] Martinez-Moliner V, Soler-Llorens P, Moleres J, *et al*. Distribution of genes involved in sialic acid utilization in strains of *Haemophilus parasuis*[J]. *Microbiol*, 2012, 158(8): 2117-2124.
- [21] Steenbergen S M, Lichtensteiger C A, Caughlan R, *et al*. Sialic acid metabolism and systemic pasteurellosis [J]. *Infect Immun*, 2005, 73(3): 1284-1294.
- [22] Zhou H, Yang B, Xu F, *et al*. Identification of putative virulence-associated genes of *Haemophilus parasuis* through suppression subtractive hybridization[J]. *Vet Microbiol*, 2010, 144: 377-383.
- [23] 康磊, 李军星, 王一成, 等. 副猪嗜血杆菌 wza 基因缺失株的构建及生物学特性研究 [J]. *农业生物技术学报*, 2015(6): 806-815.
- [24] Pina S, Olvera A, Barcelo A, *et al*. Trimeric autotransporters of *Haemophilus parasuis*: generation of an extensive passenger domain repertoire specific for pathogenic strains[J]. *J Bacter*, 2009, 191: 576-587.
- [25] Mcvicker J, Tabatabai L, Muriel V S. *Haemophilus parasuis* novel proteins hopes for vaccine[J]. *Respirat Diseasea Livestock*, 2005, 10: 22.
- [26] 赵倩, 汤承, 杨发龙, 等. 副猪嗜血杆菌 omp P2 基因的结构特征及其与毒力的联系[J]. *中国科学*, 2010, 40(6): 522-532.
- [27] Zhang N Z, Chu Y F, Gao P C, *et al*. Immunological identification and characterization of extracellular serine protease-like protein encoded in a putative espP2 gene of *Haemophilus parasuis*[J]. *J Vet Med Sci*, 2012, 74(3): 983-987.
- [28] Chao Nguyen Van, Tam Vu Thi Thanh, Zou Geng, *et al*. Characterization of serotypes and virulence genes of *Haemophilus parasuis* isolates from Central Vietnam[J]. *Vet Microbiol*, 2019, 203: 117-122.
- [29] 贾爱卿, 王贵平, 宣华, 等. 副猪嗜血杆菌毒力因子的研究进展[J]. *中国动物传染病学报*, 2015, 23(4): 72-80.
- [30] Falkow S. Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity[J]. *Rev Infect Dis*, 1988, 10(2): S274-S276.
- [31] Morozumi T, Hiramune T, Kobayashi K. Experimental infections of mice and guinea pigs with *Haemophilus parasuis*[J]. *Nat Inst Anim Health Q(Tokyo)*, 1982, 22(1): 23-31.
- [32] 任梅滢, 王印, 杨泽晓, 等. 副猪嗜血杆菌 Hfq 基因缺失株的构建与鉴定[J]. *中国兽医科学*, 2016, 46(2): 203-209.

(编辑: 富春妮)