

## 研究报告



## 副猪嗜血杆菌血清 4、13 和 14 型 TbpA 对豚鼠的交互免疫保护性

陈章 胡桢 张乃嘉 魏建忠 孙裴 刘雪兰 李郁\*

安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036

**摘要:**【背景】副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)是猪革拉瑟氏病(Gläsner's disease)的病原体,目前在对该病的防控中,由于长期使用抗生素产生的耐药性以及灭活疫苗缺乏交互免疫保护力,亟待寻求新的方法来解决这一问题。【目的】探究不同血清型 HPS 转铁结合蛋白 A (TbpA)对豚鼠的交互免疫保护性,为进一步用仔猪开展相关研究奠定基础。【方法】采用 HPS 血清型 4、13 和 14 型重组 TbpA 以 0.1 mg/只、经 2 次间隔期为 20 d 的免疫后,检测豚鼠血清 IgG 抗体和细胞因子(IL-2、IL-5、IL-8、IFN- $\gamma$ 、MCP-1、TNF- $\alpha$ )水平;以 HPS 血清型 4、13 和 14 型菌株 5 LD<sub>50</sub> 剂量腹腔攻毒,检查病理组织学变化及其免疫保护率。【结果】HPS 血清型 4、13 和 14 型重组 TbpA 均能诱导豚鼠产生较高水平的特异性抗体 IgG,并使细胞因子显著升高。HPS 血清型 4、13 和 14 型重组 TbpA 在免疫后均能对豚鼠产生交互免疫保护,其中 HPS 血清型 13 型 TbpA 免疫组的交互免疫保护率最高,对血清型 4、14 型 HPS 均为 50.0%,对相同血清型 HPS 的免疫保护率也最高,达到 83.3%,病理组织学检查显示与 HPS 血清型 4、14 型 TbpA 免疫组相比,13 型 TbpA 免疫组的组织切片病理变化与攻毒对照组之间差异更明显。【结论】HPS 血清型 4、13 和 14 型 TbpA 均能诱导豚鼠的体液免疫和相关细胞因子的分泌,产生交互免疫保护力,其中 HPS 血清型 13 型 TbpA 的交互免疫保护力最强,可作为一种新的疫苗候选抗原。

**关键词:** 副猪嗜血杆菌, 血清型, 转铁结合蛋白 A, 豚鼠, 交互免疫保护性

**Foundation items:** Key Project of National Spark Program of China (2014GA710002); Key Research and Development Plan of Anhui Province (201904a06020013); Science and Technology Project of the Yangtze River Delta of Anhui Province (1101c0603065); Pig Industry System Fund of Anhui Province ([2016]84); Quality Engineering Project of Anhui Province (2013sxzx008)

\*Corresponding author: E-mail: liyouer@163.com

**Received:** 26-09-2019; **Accepted:** 01-02-2020; **Published online:** 24-02-2020

**基金项目:** 国家星火计划重点项目(2014GA710002); 安徽省重点研究与开发计划(面上攻关)项目(201904a06020013); 安徽省长三角联合科技攻关项目(1101c0603065); 安徽省生猪产业体系基金项目(皖农科[2016]84 号); 安徽省质量工程项目(2013sxzx008)

\*通信作者: E-mail: liyouer@163.com

**收稿日期:** 2019-09-26; **接受日期:** 2020-02-01; **网络首发日期:** 2020-02-24

## Protective effects of *Haemophilus parasuis* serotype 4, 13 and 14 TbpA on cross-immunity in guinea pigs

CHEN Zhang HU Zhen ZHANG Nai-Jia WEI Jian-Zhong SUN Pei

LIU Xue-Lan LI Yu\*

College of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China

**Abstract:** [Background] *Haemophilus parasuis* (HPS) is the pathogen of Glässer's disease. Currently in the prevention and control of the disease, due to antibiotic resistance and the lack of cross-immunity protection of inactivated vaccines, new methods are urgently needed to solve this problem. [Objective] The aim of this study was to explore the cross-immunoprotective properties of different serotype HPS transferrin-binding protein A (TbpA) in guinea pigs for further research in piglets. [Methods] Recombinant TbpA of HPS serotypes 4, 13 and 14 were immunized at 0.1 mg with 20-day interval and then detected the serum antibody (IgG) and cytokines (IL-2, IL-5, IL-8, IFN- $\gamma$ , MCP-1 and TNF- $\alpha$ ) by ELISA. HPS-BZ, HPS-LJ3 and HPS-SZ strains were dosed at 5 LD<sub>50</sub> by intraperitoneal injection. Then, the pathological changes and immune protection rate were examined. [Results] Recombinant TbpA of HPS serotypes 4, 13 and 14 could induce high levels of antibody (IgG) and cytokines, and provide cross-immunity protection to guinea pigs. Among them, the HPS serotype 13 TbpA immunization group had the highest cross-immunity protection rate, both serotype 4 and 14 HPS were 50.0%, and the highest immune protection rate against the same serotype HPS was 83.3%. The pathological examination showed that compared with HPS serotype 4 and 14 TbpA immunization group, the difference between the pathological changes of HPS serotype 13 TbpA immunization group and the challenge control group was more significant. [Conclusion] Recombinant TbpA of HPS serotypes 4, 13 and 14 can induce the humoral and cellular immune responses in guinea pigs, among which HPS serotype 13 TbpA has the strongest cross-immunity protection and can be used as a new vaccine candidate antigen.

**Keywords:** *Haemophilus parasuis*, Serotype, Transferring-binding protein A, Guinea pigs, Cross-immunity protection

副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)为猪革拉瑟氏病(Glässer's disease)的病原体<sup>[1]</sup>。在HPS的感染过程中,为适应宿主细胞低铁离子的外环境,细菌通过转铁结合蛋白(transferrin-binding protein, Tbp)摄取铁元素<sup>[2]</sup>。Charland等<sup>[3]</sup>已证明猪血清中存在TbpA(94–96 kD)和TbpB(60 kD)两种Tbp受体,其中TbpA在HPS粘附过程中起到重要作用。Morton等<sup>[4]</sup>测序比对发现14种血清型HPS的TbpA具有高度保守性,且能够利用转铁蛋白摄取铁离子,可能是重要的毒力因子。2011年,本研究室对血清型13型HPS的*tbpA*分rTbpA1(62 kD)、rTbpA2(54 kD)和rTbpA3(44 kD)三段克隆表达,结果显示均有良好的反应原性,其中rTbpA1的免疫原性较强<sup>[5]</sup>,原核表达*tbpA*全基因证

实110 kD的重组TbpA具有良好的免疫活性<sup>[6]</sup>。豚鼠免疫攻毒试验结果显示当免疫血清型13型HPS重组TbpA蛋白量达到0.1 mg时,对血清型4型和13型HPS攻毒后的保护率分别达到60%和80%<sup>[7]</sup>,进一步免疫仔猪时,当以2 mg/mL免疫剂量免疫3次,对同型菌株攻毒的免疫保护率达到100%,具有与免疫灭活全菌体相同的抵抗力<sup>[8]</sup>。

为了解HPS不同血清型TbpA对不同血清型HPS的免疫保护力,本研究通过对豚鼠免疫HPS血清型4、13和14型重组TbpA,测定免疫后血清IgG抗体水平和细胞因子(IL-8、IL-5、IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、MCP-1)含量,同时利用不同血清型HPS进行交叉攻毒,观察和记录豚鼠的存活与死亡情况,比较病理组织学变化,探究HPS不同血清型TbpA

对豚鼠的交互免疫保护作用,为进一步用仔猪开展相关研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

*E. coli* Rosetta 菌株、重组质粒 pET-SUMO-*tbpA*<sup>[9]</sup>、HPS 血清型 4 型安徽分离株(HPS-BZ)、13 型安徽分离株(HPS-LJ3)和 14 型安徽分离株(HPS-SZ)均由安徽农业大学动物科技学院动物传染病实验室保存。

### 1.2 实验动物

40 日龄清洁级豚鼠,体质量为 150–200 g,购于安徽医科大学试验动物中心。

### 1.3 主要试剂和仪器

LB 肉汤、0.6% 酵母浸膏胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE)、0.6% 酵母浸膏胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE),杭州微生物试剂有限公司;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD),生工生物工程(上海)股份有限公司;兔抗豚鼠 IgG 抗体、HRP 标记羊抗猪 IgG 抗体、TMB 显色液, Sigma 公司;异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂,天根生化科技(北京)有限公司;6 种细胞因子(IL-8、IL-5、IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、MCP-1) ELISA 检测试剂盒, Rapidbio 公司。

超声波细胞破碎仪,南京先欧仪器制造有限公司;蛋白电泳仪, Bio-Rad 公司;8 孔微量多点加样器, V&P Scientific 公司;双层可编程恒温振荡培养箱,天津欧诺仪器股份有限公司。

### 1.4 重组 TbpA 的表达及纯化

参照黄晓慧等<sup>[6]</sup>方法,将构建成功的重组质粒 pET-SUMO-*tbpA* 转化至 *E. coli* Rosetta 感受态细胞,挑取单克隆接种于含 50  $\mu$ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中, 37 °C、150 r/min 振荡培养 12 h。按比例 1:100 将培养菌液转接至 100 mL 的 LB 液体培养基中, 37 °C、150 r/min 振荡培养至对数生长期( $OD_{600}$  值为 0.6–0.8)。加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG, 20 °C、150 r/min 诱导表达过夜,将诱导后菌液

12 000 r/min 离心 10 min,弃掉上清,收集菌体沉淀。加入 5 mL 裂解液重悬沉淀后对菌体进行超声破碎, 12 000 r/min 离心 15 min,收集包涵体沉淀。将包涵体变性复性后通过 Ni-His-resin 纯化蛋白,利用亲和层析技术吸附目的蛋白,洗去杂蛋白,最后再用高浓度咪唑洗脱目的蛋白,通过酶标仪测定纯化后的目的蛋白浓度, SDS-PAGE 分析 TbpA 的表达及纯化效果。

### 1.5 重组 TbpA Western blotting 反应特性鉴定

用半干转移电泳将纯化后的 HPS 血清型 4、13 和 14 型重组 TbpA 转至硝酸纤维素膜上(150 V, 45 min),含 5% 脱脂奶粉的 PBS 封闭液中 37 °C 封闭 2 h。分别以豚鼠抗 HPS 血清型 4、13 和 14 型 TbpA 阳性血清(1:500 稀释)为一抗, 37 °C 孵育 1 h,洗膜后以兔抗豚鼠 HRP-IgG (1:5 000 稀释)为二抗, 37 °C 孵育 1 h,最后用 DAB 显色液试剂盒显色。

### 1.6 HPS 菌株 LD<sub>50</sub> 测定

参照 Reed-Muench 法,筛选 HPS 抗体阴性健康豚鼠 30 只,随机分为 5 组,每组 6 只。第 1–5 组的豚鼠腹腔攻毒剂量分别为  $10^{11}$ 、 $10^{10}$ 、 $10^9$ 、 $10^8$  和  $10^7$  CFU/mL。攻毒 1 周后,记录豚鼠的存活与死亡数量并对病原菌进行回收鉴定。将试验动物存活数和死亡数进行累积相加和,再用加和的数据计算死亡率。距离比例  $r=(A-50)/(A-B)$  ( $A$  为刚好死亡率大于 50%;  $B$  为刚好死亡率小于 50%);  $\lg LD_{50} = \text{高于 50\% 死亡率稀释度倒数的对数} + \text{距离比例} \times \text{稀释倍数的对数}$ 。

### 1.7 HPS 血清型 4、13 和 14 型重组 TbpA 的乳化

将纯化后的重组 TbpA 蛋白浓度调整至 1 mg/mL,与弗氏佐剂按照体积比 1:1 进行配比乳化,置于 4 °C 备用。

### 1.8 HPS 血清型 4、13 和 14 型重组 TbpA 的免疫保护试验

#### 1.8.1 筛选 HPS 抗体阴性健康豚鼠

自心脏采集 150 只 40 日龄雌性健康豚鼠血液,采用 Huang 等<sup>[7]</sup>建立的间接 ELISA 检测方法筛选出 96 只 HPS 抗体阴性健康豚鼠。

### 1.8.2 免疫攻毒试验

将 96 只 HPS 抗体阴性健康豚鼠随机分为 16 组(编号分别为 A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>、A<sub>4</sub>、B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>、B<sub>4</sub>、C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>、C<sub>4</sub>、D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>、D<sub>4</sub>), 每组 6 只。A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>组免疫 HPS 血清型 4 型 TbpA, 0.1 mg/只; B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>组免疫 HPS 血清型 13 型 TbpA, 0.1 mg/只; C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>组免疫 HPS 血清型 14 型 TbpA, 0.1 mg/只; D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub>组注射 PBS 作攻毒对照; A<sub>4</sub>、B<sub>4</sub>、C<sub>4</sub>、D<sub>4</sub>组注射 PBS 作为空白对照。免疫途径均为背部皮下多点注射, 免疫剂量为 0.2 mL (浓度为 0.5 mg/mL), 共免疫 2 次, 免疫间隔时间为 20 d, 其中一免使用弗氏完全佐剂, 二免使用弗氏不完全佐剂。二免 20 d 后, 以 5 LD<sub>50</sub> 剂量的 HPS-BZ、HPS-LJ3 和 HPS-SZ 株对免疫组和攻毒对照组豚鼠分别进行腹腔攻毒, 空白对照组注射等体积无菌 PBS。

### 1.8.3 血清 IgG 抗体检测

自一免和二免 10 d 后, 从心脏采集豚鼠血液, 静置后 4 000 r/min 离心 5 min 分离血清, 保存于 -20 °C。利用纯化的重组 TbpA 包被酶标板的 ELISA 方法进行血清 IgG 抗体检测, 用包被液将重组 TbpA 稀释成 10 µg/mL, 4 °C 包被酶标板 12 h。洗板 3 次后, 加入 2% 的 BSA 37 °C 封闭 2 h。洗板 3 次后, 血清稀释度从 1:25 稀释至 1:819 200 (2 倍梯度进行), 37 °C 反应 1 h。洗板 3 次后, 加入兔抗豚鼠 HRP-IgG, 二抗稀释度为 1:1 500, 37 °C 反应 1 h。洗板 3 次后, 加入 TMB 显色液 37 °C 避光显色 10 min, 加入 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止液终止显色反应并测定 OD<sub>450</sub> 值。根据待检血清 OD(P)/阴性血清 OD(N) ≥ 2.1 的界限判断为阳性, 计算待测血清的抗体效价。

### 1.8.4 血清细胞因子检测

自一免和二免 10 d 后, 从心脏采集豚鼠血液, 静置后 4 000 r/min 离心 5 min 分离血清, 保存于 -20 °C。按照细胞因子 ELISA 检测试剂盒说明书进行细胞因子(IL-2、IL-5、IL-8、IFN-γ、TNF-α、MCP-1) 含量的测定。

### 1.8.5 免疫保护率测定

连续 14 d 观察并记录攻毒后豚鼠的精神状态、饮食欲及存活情况, 同时从各病变脏器中采样接种

于 TSA-YE 琼脂培养基 37 °C 恒温培养 24–36 h, 对可疑菌落进行染色镜检和 PCR 鉴定, 计算各试验组豚鼠的免疫保护率, 免疫保护率=存活豚鼠个数/攻毒豚鼠个数×100%。

### 1.8.6 病理组织学检查

采集各试验组豚鼠的肝脏、脾脏、肺脏、脑等内脏器官并观察和记录病理变化, 制作石蜡切片, HE 染色, 镜检病理组织学变化。

## 1.9 数据分析

采用 SPASS 19.0 软件进行数据处理,  $P > 0.05$  表示差异不显著,  $P < 0.05$  表示差异显著。运用 Graphpad Prism 6.01 软件进行作图, 数据最终以平均值±标准差(mean±SD)表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组 TbpA 的诱导表达及纯化

#### 2.1.1 重组 TbpA 的诱导表达

pET-SUMO-*tbpA* 转化至 *E. coli* Rosetta 感受态细胞, 重组 *E. coli* Rosetta 表达菌经过 IPTG 初步诱导表达后, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 在 110 kD 处出现了预期的特异性条带(图 1)。

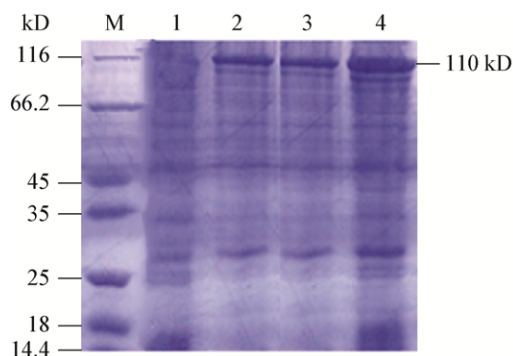


图 1 诱导表达 TbpA 的 SDS-PAGE 分析

Figure 1 SDS-PAGE analysis of induced expression of TbpA

注: M: 蛋白质标准; 1: 未诱导的重组菌表达产物; 2: HPS 血清型 4 型 TbpA 诱导产物; 3: HPS 血清型 13 型 TbpA 诱导产物; 4: HPS 血清型 14 型 TbpA 诱导产物。

Note: M: Protein Marker; 1: Uninduced expression products of recombinant bacteria; 2: HPS serotype 4 TbpA induction products; 3: HPS serotype 13 TbpA induction products; 4: HPS serotype 14 TbpA inducible products.

### 2.1.2 重组 TbpA 的纯化

通过 Ni-His-resin 对 TbpA 蛋白进行纯化, 获得了较高纯度的目的蛋白, 核酸蛋白仪检测重组 TbpA 浓度为 1.2 mg/mL (图 2)。

### 2.2 重组 TbpA Western blotting 反应特性鉴定

交互 Western blotting 鉴定结果显示纯化的 HPS 血清型 4、13 和 14 型重组 TbpA 在 110 kD 处均出现明显的条带, 而阴性对照无条带出现, 表明表达的产物均能够与 HPS 血清型 4、13 和 14 型 TbpA 阳性血清发生抗原抗体特异性结合, 具有良好的反应原性(图 3)。

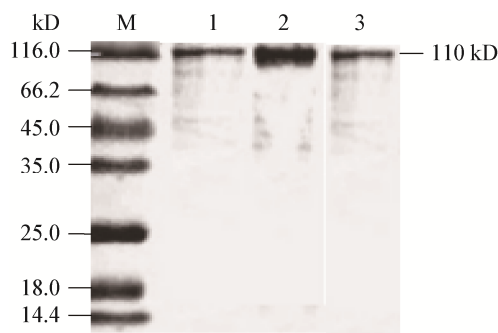


图 2 纯化 TbpA 的 SDS-PAGE 分析

Figure 2 SDS-PAGE analysis of purified TbpA

注: M: 蛋白质标准; 1: HPS 血清型 4 型 TbpA 纯化蛋白; 2: HPS 血清型 13 型 TbpA 纯化蛋白; 3: HPS 血清型 14 型 TbpA 纯化蛋白。  
Note: M: Protein Marker; 1: Purification of HPS serotype 4 TbpA protein; 2: Purification of HPS serotype 13 TbpA protein; 3: Purification of HPS serotype 14 TbpA protein.

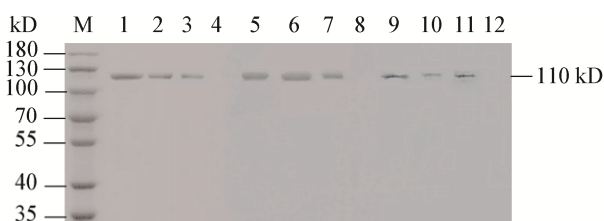


图 3 纯化后重组 TbpA 的交互 Western blotting 鉴定

Figure 3 Interactive Western blotting identification of recombinant TbpA after purification

注: M: 蛋白质标准; 1, 5, 9: HPS 血清型 4、13、14 型 TbpA 阳性血清+4 型 TbpA; 2, 6, 10: HPS 血清型 4、13、14 型 TbpA 阳性血清+13 型 TbpA; 3, 7, 11: HPS 血清型 4、13、14 型 TbpA 阳性血清+14 型 TbpA; 4, 8, 12: 阴性对照。

Note: M: Protein Marker; 1, 5, 9: HPS serotype 4, 13, 14 TbpA positive serum+serotype 4 TbpA; 2, 6, 10: HPS serotype 4, 13, 14 TbpA positive serum+serotype 13 TbpA; 3, 7, 11: HPS serotype 4, 13, 14 TbpA positive serum+serotype 14 TbpA; 4, 8, 12: Negative control.

### 2.3 HPS 菌株 LD<sub>50</sub> 测定

经计算, HPS-BZ 株对豚鼠的 LD<sub>50</sub> 为  $3.16 \times 10^9$  CFU/mL, HPS-LJ3 株对豚鼠的 LD<sub>50</sub> 为  $2.19 \times 10^9$  CFU/mL, HPS-SZ 株对豚鼠的 LD<sub>50</sub> 为  $2.07 \times 10^9$  CFU/mL。

### 2.4 HPS 血清型 4、13 和 14 型重组 TbpA 的免疫保护试验

#### 2.4.1 血清 IgG 抗体检测结果

应用 ELISA 方法检测豚鼠血清 IgG 抗体水平, 分别以 HPS 血清 4、13 和 14 型重组 TbpA 作为包被抗原, HPS 血清型 13 型 TbpA 免疫组的一免和二免抗体效价值均最高, 分别为 1:1 600、1:1 600、1:1 600 和 1:3 200、1:12 800、1:12 800 (图 4)。

#### 2.4.2 血清细胞因子检测结果

一免后 HPS 血清型 4、13 和 14 型 TbpA 免疫组细胞因子水平与空白对照组之间差异显著 ( $P < 0.05$ ); 二免后 HPS 血清型 4、13 和 14 型 TbpA 免疫组细胞因子水平与一免后相比显著上升 ( $P < 0.05$ ), 3 组免疫组之间细胞因子水平差异不显著 ( $P > 0.05$ ) (图 5)。

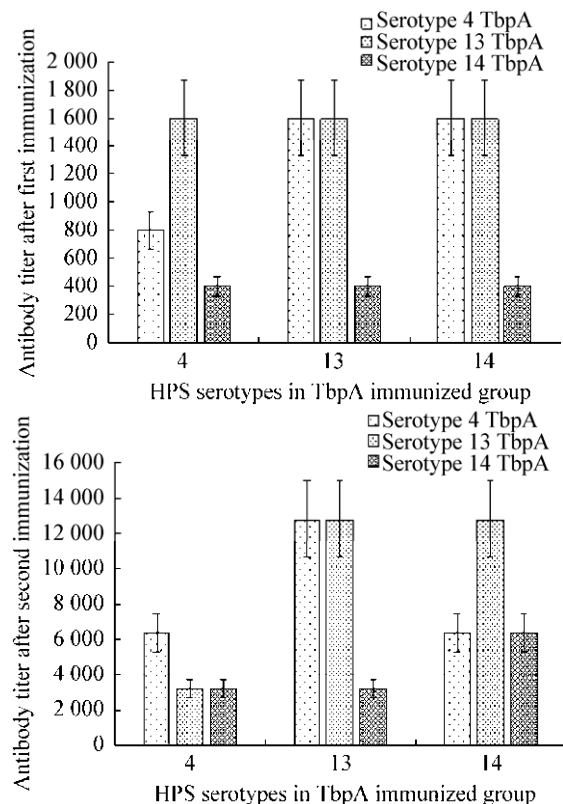


图 4 豚鼠血清中 IgG 抗体水平

Figure 4 Levels of IgG antibody to guinea pigs

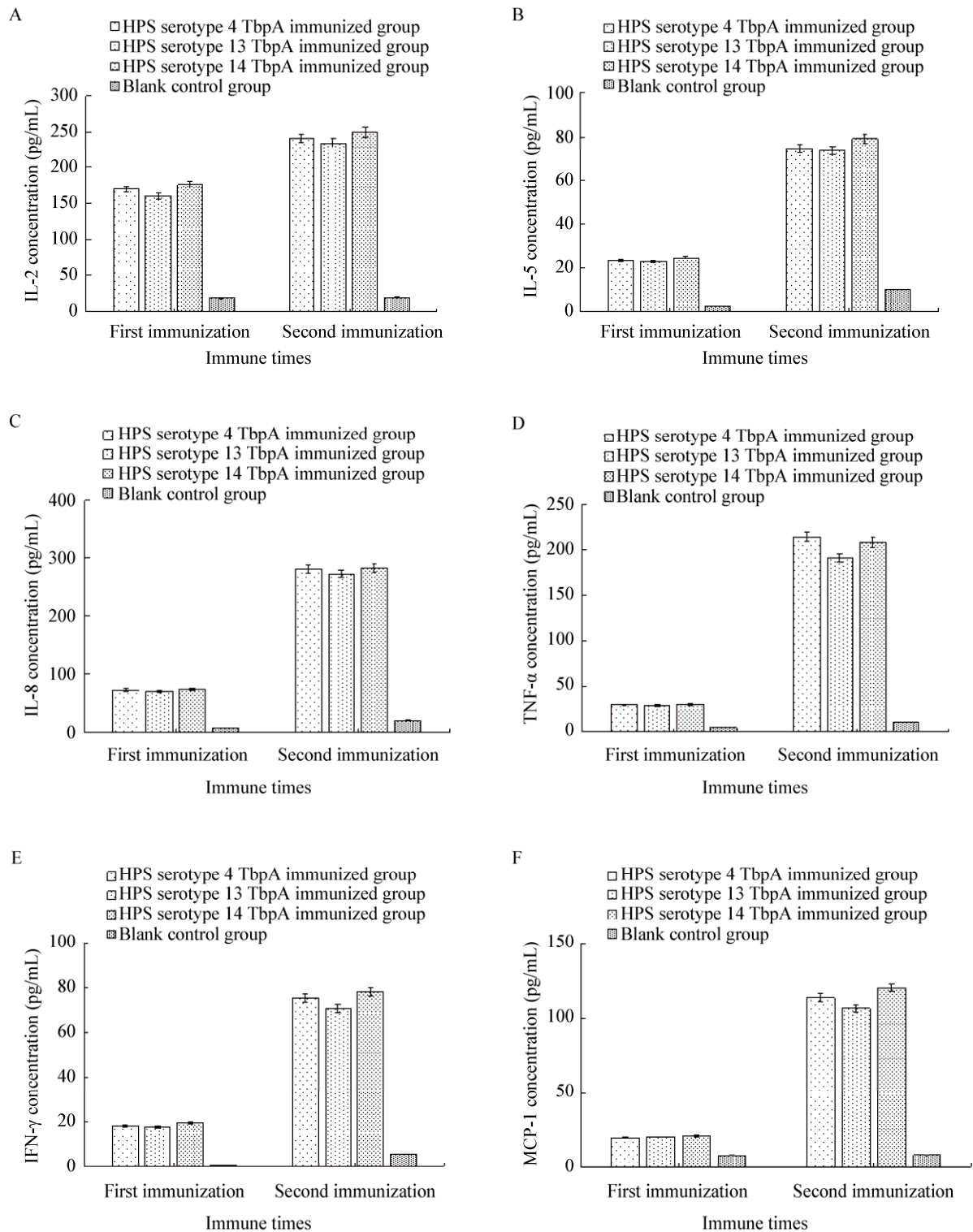


图 5 豚鼠血清中细胞因子水平

Figure 5 Levels of cytokine production to guinea pigs

Note: A: IL-2; B: IL-5; C: IL-8; D: TNF-α; E: IFN-γ; F: MCP-1.



2.4.3 免疫保护率测定结果

A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub> 组保护率分别为 66.7%、50.0%、16.7%；B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub> 组保护率分别为 50.0%、83.3%、50.0%；C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub> 组保护率分别为 50.0%、33.3%、66.7%；D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>、D<sub>3</sub> 组豚鼠全部死亡，而 A<sub>4</sub>、B<sub>4</sub>、C<sub>4</sub>、D<sub>4</sub> 组豚鼠全部存活(表 1)。

2.4.4 豚鼠的剖检及病理组织学检查

剖检发现，免疫组与攻毒对照组死亡豚鼠胸腔和腹腔有积液，脾脏边缘梗死，肝脏纤维素性渗出，肺脏组织出血、坏死，同时心包增厚；免疫组与空白对照组存活豚鼠未见明显肉眼病理变化。

病理组织学检查(图 6)发现：

(1) 空白对照组豚鼠肺脏(图 6A)无明显病理变化；攻毒对照组豚鼠肺脏(图 6B)支气管肺炎，肺脏严重出血，有炎性细胞渗出；免疫组存活豚鼠肺间质(图 6C)出现少量炎性细胞，肺小叶轻微出血，死亡豚鼠肺脏(图 6D)有炎性细胞浸润，血细胞渗出。

(2) 空白对照组豚鼠脾脏(图 6E)无明显病理变化；攻毒对照组豚鼠脾脏(图 6F)脾小体表现红染，

髓质出血，有大量炎性细胞渗出；免疫组存活豚鼠脾脏(图 6G)有炎性细胞，轻微出血，死亡豚鼠脾脏(图 6H)有炎性细胞浸润，血细胞渗出。

(3) 空白对照组豚鼠肝脏(图 6I)无明显病理变化；攻毒对照组豚鼠肝脏(图 6J)出血，有红细胞浸润；免疫组存活豚鼠脾脏(图 6K)无明显病理变化，死亡豚鼠肝脏(图 6L)有少量炎性细胞，轻微出血。

(4) 各实验组存活豚鼠脑部(图 6M、O)无明显病理变化，死亡豚鼠脑(图 6N、P)有炎性细胞浸润。

3 讨论

近年来，国内 Glässer’s disease 的流行趋势愈演愈烈，目前主要采用药物治疗和疫苗免疫的方式进行防控。但由于抗生素的滥用拓宽了 HPS 的耐药谱，同时 HPS 血清型众多，各分离株之间的致病力具有差异，且单价灭活疫苗对不同血清型 HPS 仅提供部分交叉保护力，这给 Glässer’s disease 的防控造成了很大的困难<sup>[10]</sup>。因此，防控该病的有效途径是筛选免疫保护性抗原以研制高效广谱的 HPS 新

表 1 各组豚鼠免疫保护率测定结果

Table 1 Guinea pigs protection rate test results in each group

组别	免疫组分	免疫剂量	感染数	感染 HPS 血清型	感染剂量	死亡数	死亡率	保护率
Groups	Immune component	Immune dose	Number of infection	Infected with HPS serotypes	Infective dose	Number of death	Rate of death (%)	Rate of protection (%)
A <sub>1</sub>	TbpA(Serotype 4)	0.1 mg	6	4	5 LD <sub>50</sub>	2	33.3	66.7
A <sub>2</sub>	TbpA(Serotype 4)	0.1 mg	6	13	5 LD <sub>50</sub>	3	50.0	50.0
A <sub>3</sub>	TbpA(Serotype 4)	0.1 mg	6	14	5 LD <sub>50</sub>	5	83.3	16.7
A <sub>4</sub>	PBS	200 μL	6	/	200 μL PBS	0	0	100
B <sub>1</sub>	TbpA(Serotype 13)	0.1 mg	6	4	5 LD <sub>50</sub>	3	50.0	50.0
B <sub>2</sub>	TbpA(Serotype 13)	0.1 mg	6	13	5 LD <sub>50</sub>	1	16.7	83.3
B <sub>3</sub>	TbpA(Serotype 13)	0.1 mg	6	14	5 LD <sub>50</sub>	3	50.0	50.0
B <sub>4</sub>	PBS	200 μL	6	/	200 μL PBS	0	0	100
C <sub>1</sub>	TbpA(Serotype 14)	0.1 mg	6	4	5 LD <sub>50</sub>	3	50.0	50.0
C <sub>2</sub>	TbpA(Serotype 14)	0.1 mg	6	13	5 LD <sub>50</sub>	4	66.7	33.3
C <sub>3</sub>	TbpA(Serotype 14)	0.1 mg	6	14	5 LD <sub>50</sub>	2	33.3	66.7
C <sub>4</sub>	PBS	200 μL	6	/	200 μL PBS	0	0	100
D <sub>1</sub>	PBS	200 μL	6	4	5 LD <sub>50</sub>	6	100	0
D <sub>2</sub>	PBS	200 μL	6	13	5 LD <sub>50</sub>	6	100	0
D <sub>3</sub>	PBS	200 μL	6	14	5 LD <sub>50</sub>	6	100	0
D <sub>4</sub>	PBS	200 μL	6	/	200 μL PBS	0	0	100

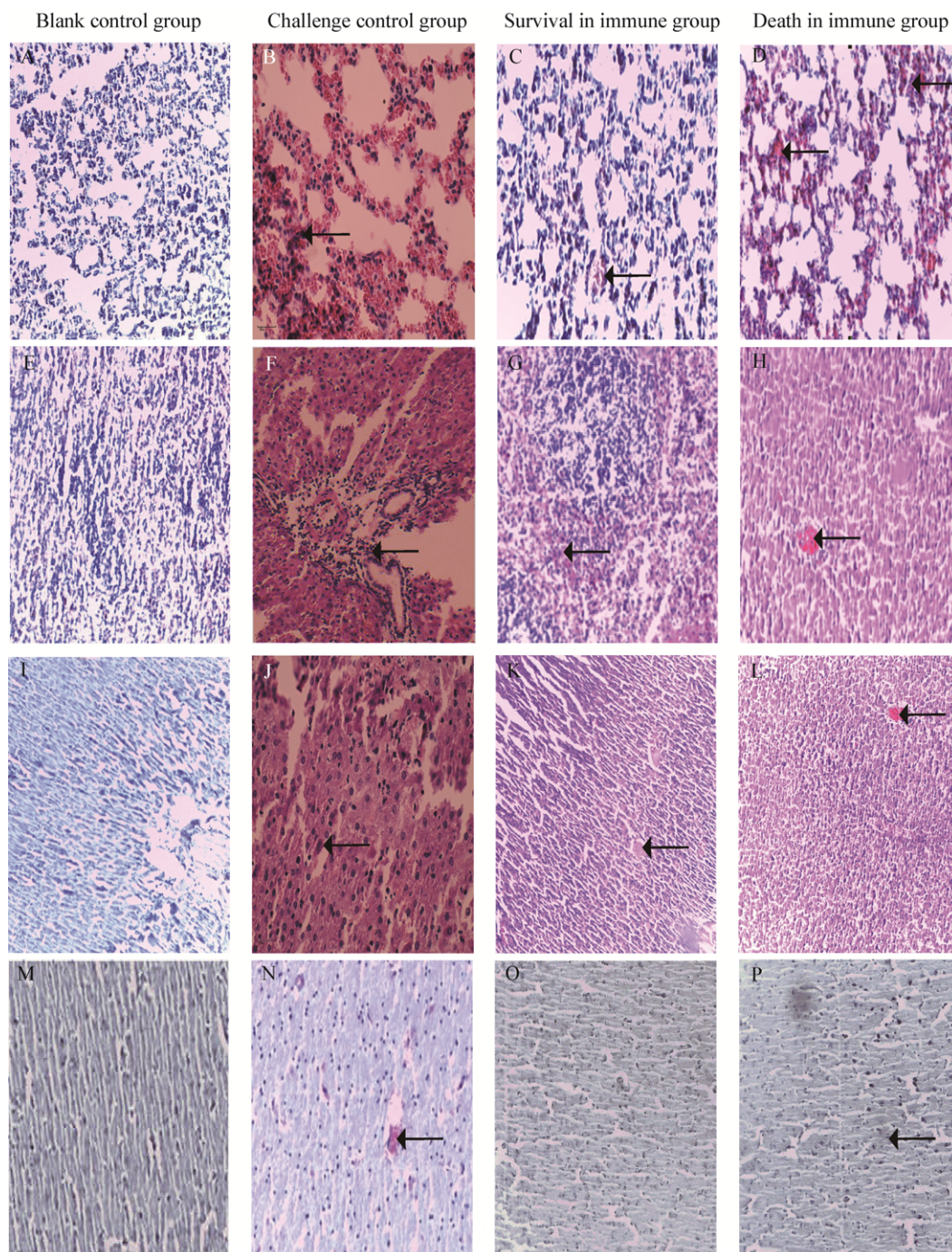


图 6 各组豚鼠主要脏器病理组织变化(H-E 染色, 40×)

Figure 6 Histological aspect of main organs from guinea pig of various groups (H-E staining, 40×)

注: A、E、I、M: 空白对照组豚鼠肺、脾、肝、脑病理组织; B、F、J、N: 攻毒对照组豚鼠肺、脾、肝、脑病理组织; C、G、K、O: 免疫组存活豚鼠肺、脾、肝、脑病理组织; D、H、L、P: 免疫组死亡豚鼠肺、脾、肝、脑病理组织(黑色箭头表示病灶).

Note: A, E, I, M: Pathological tissues of lung, spleen, liver and brain of guinea pigs in blank control group; B, F, J, N: Pathological tissues of lung, spleen, liver and brain of guinea pigs in challenge control group; C, G, K, O: Pathological tissues of lung, spleen, liver and brain of surviving guinea pigs in immune group; D, H, L, P: Pathological tissues of lung, spleen, liver and brain of dead guinea pigs in immune group (black arrows show lesions).



型疫苗。已有研究证实, HPS 的 TbpA、细胞致死膨胀毒素(cytolethal distending toxin, CDT)、外膜蛋白(outer membrane protein, OMP)等均可作为研制 HPS 亚单位疫苗的候选抗原, 但这些蛋白免疫仔猪后是否能够抵抗不同血清型 HPS 的侵染, 目前还尚未出现相关报道<sup>[11]</sup>。本研究是在姚焱彬等<sup>[8]</sup>研究基础上, 进一步探讨了 HPS 血清型 4、13 和 14 型 TbpA 对豚鼠的交互免疫保护作用, TbpA 蛋白在保护相同血清型 HPS 攻击的同时, 对不同血清型 HPS 攻击也具有保护效力, 从而为进一步用仔猪开展相关研究奠定基础。

本研究中, 分别以 HPS 血清型 4、13 和 14 型 TbpA 作为包被抗原进行检测, 结果显示, 与一免相比, 二免后 HPS 血清型 4、13 和 14 型 TbpA 免疫组均产生高水平的 IgG, 表明 HPS 血清型 4、13 和 14 型 TbpA 均能刺激机体产生较强的特异性体液免疫反应, 同时结合交互 Western blotting 鉴定结果显示其具有交叉免疫反应的能力。细胞因子具有修复损伤组织、生成血细胞及免疫调节等功能, 其中 TNF- $\alpha$  和 IFN- $\gamma$  主要由 Th1 细胞产生, 用于辅助细胞免疫效应<sup>[11]</sup>; IL-8、IL-5 和 IL-2 主要由 Th2 细胞产生, 可调节造血、免疫应答等过程, 能够辅助 B 细胞产生抗体, 增强体液免疫应答; MCP-1 及其受体对 Th1、Th2 细胞的分化具有重要作用。两次免疫豚鼠后的细胞因子(IL-2、IL-5、IL-8、MCP-1、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ )检测结果显示, HPS 血清型 4、13 和 14 型 TbpA 免疫组一免和二免后细胞因子水平与空白对照组之间差异显著, 二免后细胞因子水平与一免后相比显著上升, 表明不同血清型 TbpA 均能很好地诱导机体的体液免疫和相关细胞因子表达。

炎症反应实质上是一种以防御为主的病理过程, 炎性细胞可在炎症病灶局部发挥免疫作用和吞噬作用, 是炎症反应最重要的指征, 也是炎症防御作用中的重要环节<sup>[12]</sup>。病理切片结果显示, 试验组存活豚鼠各脏器中均未见明显的病理变化, 攻毒对照组豚鼠的脾脏、肝脏、肺脏和脑部有大量的血细

胞渗出和炎性细胞浸润, 对于 HPS 血清型 4、13 和 14 型 TbpA 免疫组死亡豚鼠, 同型菌株攻毒时, 豚鼠脾脏、肝脏、肺脏和脑部仅出现少量的血细胞渗出和炎性细胞浸润, 但不同型菌株攻毒时, HPS 血清型 4 型和 14 型 TbpA 免疫组呈现的炎症反应和组织损伤程度则较 13 型 TbpA 免疫组略加重, 这表明 TbpA 蛋白对相同血清型和不同血清型 HPS 引起的炎症反应和组织损伤均具有抵抗作用, 且 HPS 血清型 13 型 TbpA 相较于 4 型和 14 型 TbpA 具有更强的交互免疫保护力。

免疫攻毒试验结果显示, HPS 血清型 4、13 和 14 型 TbpA 免疫组对 3 种血清型 HPS 攻毒后的保护率分别为 16.7%–66.7%、50.0%–83.3%、33.3%–66.7%, 表明 HPS 血清型 4、13 和 14 型 TbpA 均能诱导豚鼠产生良好的免疫应答, 对豚鼠具有交互免疫保护作用。不同血清型 HPS 攻毒的免疫保护率均低于相同血清型, 可能是由于 HPS 不同血清型 TbpA 蛋白的氨基酸差异引起抗原性的改变, 无法形成较好的免疫保护<sup>[13]</sup>。其中 HPS 血清型 13 型 TbpA 对相同血清型 HPS 攻毒的免疫保护率高于 4 型和 14 型 TbpA, 达到 83.3%, 对不同血清型 HPS 攻毒的免疫保护率也能达到 50%, 一免和二免后刺激机体产生的 IgG 抗体水平最高, 病理组织学检查显示 HPS 血清型 13 型 TbpA 对豚鼠免疫后攻毒所引起机体的炎症反应和组织损伤程度最低, 表明 HPS 血清型 13 型 TbpA 的交互免疫保护力最强, 推测其免疫原性优于 4 型和 14 型, 可能原因是 HPS 不同血清型 TbpA 蛋白的空间构象差异影响了抗原蛋白的免疫原性<sup>[14]</sup>。本研究中血清型 4 型 HPS-BZ 株对豚鼠的 LD<sub>50</sub> 为  $3.16 \times 10^9$  CFU/mL, 血清型 13 型 HPS-LJ3 株为  $2.19 \times 10^9$  CFU/mL, 血清型 14 型 HPS-SZ 株为  $2.07 \times 10^9$  CFU/mL, HPS-SZ 株的毒力最高, 而编码 TbpA 蛋白的交互免疫保护率却低于 HPS-LJ3 株, HPS 的毒力与抗原性呈正相关<sup>[15]</sup>, 表明由毒力差异引起的抗原性差异不足以影响相互之间提供的交叉保护<sup>[14]</sup>。此外, 本研究中 HPS 血清型 13 型 TbpA 对豚鼠具有很好的交互免疫

保护作用, 这是否表明在相同试验条件下对仔猪也能达到同样的免疫效果, 有待于进一步探究。

#### 4 结论

HPS 血清型 4、13 和 14 型 TbpA 均能诱导豚鼠的体液免疫和相关细胞因子表达, 对血清型 4、13 和 14 型 HPS 攻毒具有交叉免疫保护, 其中 HPS 血清型 13 型 TbpA 的交叉免疫保护力最强, 为进一步开展 HPS 血清型 13 型 TbpA 对仔猪的交互免疫保护性研究提供了科学依据。

#### REFERENCES

- [1] Li M, Cai RJ, Song S, et al. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of recombinant outer membrane proteins of *Haemophilus parasuis* serovar 5 in a murine model[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0176537
- [2] Aarestrup FM, Seyfarth AM, Angen Ø. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark[J]. Veterinary Microbiology, 2004, 101(2): 143-146
- [3] Charland N, D'silva CG, Dumont RA, et al. Contact-dependent acquisition of transferrin-bound iron by two strains of *Haemophilus parasuis*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1995, 41(1): 70-74
- [4] Morton DJ, Williams P. Utilization of transferrin-bound iron by *Haemophilus* species of human and porcine origins[J]. FEMS Microbiology Letters, 1989, 65(1/2): 123-127
- [5] Xin W, Li Y, Huang XH, et al. Expression and immunogenicity of transferrin-binding protein A gene of *Haemophilus parasuis*[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2011, 42(12): 1743-1749 (in Chinese)  
辛伟, 李郁, 黄晓慧, 等. 副猪嗜血杆菌转铁结合蛋白 A 基因的分段表达及其免疫原性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2011, 42(12): 1743-1749
- [6] Huang XH, Xin W, Wei JZ, et al. Prokaryotic expression of transferrin-binding protein A gene from *Haemophilus parasuis* and immunological analysis of the recombinant protein[J]. Chinese Veterinary Science, 2012, 42(10): 1053-1057 (in Chinese)  
黄晓慧, 辛伟, 魏建忠, 等. 副猪嗜血杆菌转铁结合蛋白 A 基因的原核表达与鉴定[J]. 中国兽医科学, 2012, 42(10): 1053-1057
- [7] Huang XH, LI Y, Fu Y, et al. Cross-protective efficacy of recombinant transferrin-binding protein A of *Haemophilus parasuis* in guinea pigs[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2013, 20(6): 912-919
- [8] Yao YB, Chen Z, Chu XF, et al. Immune efficacy of transferrin-binding protein A of *Haemophilus parasuis* in piglets[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2018, 49(3): 588-596 (in Chinese)  
姚焱彬, 陈章, 储霞飞, 等. 副猪嗜血杆菌 TbpA 对仔猪的免疫效力评价[J]. 畜牧兽医学报, 2018, 49(3): 588-596
- [9] Hu Z. Transferrin binding protein A from serum type 13 and 14 of *Haemophilus influenzae* cross immune protection study by guinea pigs[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2017(in Chinese)  
胡楨. HPS 血清 13、14 型 TbpA 蛋白对豚鼠的交互免疫保护性研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2017
- [10] Zhang JM, Xu CG, Guo LL, et al. Prevalence and characterization of genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* isolates from southern China[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2012, 76(3): 224-229
- [11] Gall-Debrenci A, Lazar J, Kadas J, et al. Specific detection and quantitation of bovine IgG in bioreactor derived mouse mAb preparations[J]. Journal of Immunological Methods, 2016, 438: 26-34
- [12] Pinto RA, Arredondo SM, Bono MR, et al. T helper 1/T helper 2 cytokine imbalance in respiratory syncytial virus infection is associated with increased endogenous plasma cortisol[J]. Pediatrics, 2006, 117(5): e878-e886
- [13] Mullins MA, Register KB, Bayles DO, et al. Characterization and comparative analysis of the genes encoding *Haemophilus parasuis* outer membrane proteins P2 and P5[J]. Journal of bacteriology, 2009, 191(19): 5988-6002
- [14] Fu YJ, Guo LJ, Huang LP, et al. Cross-protections between porcine circovirus genotype 2a and 2b with inactivated virus and recombinant Cap subunit vaccines[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2012, 34(2): 128-132 (in Chinese)  
付玉洁, 郭龙军, 黄立平, 等. 猪圆环病毒 2a/2b 亚型病毒株灭活疫苗及其重组 Cap 蛋白亚单位疫苗的交互免疫实验[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(2): 128-132
- [15] Miniats OP, Smart NL, Rosendal S. Cross protection among *Haemophilus parasuis* strains in immunized gnotobiotic pigs[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 1991, 55(1): 37-41