



生物实验室

基于 TbpA 蛋白的副猪嗜血杆菌抗体间接酶联免疫吸附试验检测方法的建立及应用

刘晓露^{Δ1} 王迪^{Δ1} 邢刚² 何长生³ 刘君雯¹ 陈章¹ 魏建忠¹ 孙裴¹
刘雪兰¹ 李郁^{*1}

1 安徽农业大学动物科技学院 安徽 合肥 230036

2 马鞍山史记动物健康管理有限公司 安徽 马鞍山 238251

3 安徽动物疫病预防与控制中心 安徽 合肥 230091

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, 抗生素治疗和疫苗接种对于防控该病效果不明显, 建立快速、准确的抗体检测方法尤为重要。

【目的】利用表达纯化的 HPS 转铁结合蛋白 A (TbpA)建立检测 HPS 抗体的间接酶联免疫吸附试验(ELISA)方法。【方法】PCR 扩增 HPS 的 *tbpA* 基因并与原核表达载体 pET-SUMO 连接, 通过 PCR、双酶切及测序鉴定, 将阳性重组质粒转入 *Escherichia coli* Rosetta(DE3), IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定产物。以纯化的 TbpA 蛋白作包被抗原, 通过各种反应条件优化, 建立检测 HPS 抗体的间接 ELISA 方法, 并进行临床应用与评价。【结果】该方法的最佳条件: 包被抗原浓度为 5 μg/mL, 4 °C 过夜; 5% 脱脂奶粉于 37 °C 封闭 2 h; 血清稀释度为 1:1 600, 37 °C 孵育 45 min; 酶标二抗稀释度为 1:5 000, 37 °C 作用 30 min; 显色时间为 37 °C 5 min。该方法可特异性检测 HPS 抗体, 阳性血清稀释至 1:12 800 仍可检出, 与其他猪病原阳性血清均无交叉反应, 批内及批间变异系数均小于 10%, 与全菌体包被间接 ELISA、商品化 ELISA 试剂盒及 Western Blot 比较, 该方法总符合率分别为 90.00%、86.67% 和 90.00%, 其中阳性符合率分别为 90.38%、88.46% 和 92.00%, 阴性符合率分别为 87.50%、75.00% 和 80.00%。该方法检测免疫抗体阳性率为 80.00%, 感染抗体阳性率为 19.50%。【结论】基于 TbpA 蛋白建立的 HPS 抗体间接 ELISA 检测方法, 具有良好的特异性、敏感性和重复性以及临床应用的可靠性, 为 HPS 的免疫监测和流行病学调查提供了技术手段。

关键词: 副猪嗜血杆菌, 转铁结合蛋白 A, 间接酶联免疫吸附试验, 抗体检测, 建立与应用

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 in Anhui Province (1101c0603065); Pig Industry System Fund of Anhui Province ([2016] 84)

^ΔThese authors equally contributed to this work

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

Received: 04-05-2020; Accepted: 03-06-2020; Published online: 27-08-2020

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) (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(皖农科[2016] 84 号)

^Δ对本文贡献相同

*通信作者: E-mail: liyouer@163.com

收稿日期: 2020-05-04; 接受日期: 2020-06-03; 网络首发日期: 2020-08-27

Indirect enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) detection method for *Haemophilus parasuis* antibody based on TbpA protein

LIU Xiaolu^{Δ1} WANG Di^{Δ1} XING Gang² HE Changsheng³ LIU Junwen¹
CHEN Zhang¹ WEI Jianzhong¹ SUN Pei¹ LIU Xuelan¹ LI Yu^{*1}

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

2 Maanshan Shiji Animal Health Management Company Limited, Maanshan, Anhui 238251, China

3 Anhui Animal Disease Prevention and Control Center, Hefei, Anhui 230091, China

Abstract: [Background] *Haemophilus parasuis* (HPS) is the pathogen of Glässer's disease. Antibiotic therapy and vaccination are not obvious for the prevention and control of the disease, it is particularly important to establish a rapid and accurate antibody detection method. [Objective] Using the expression and purified transferrin-binding protein (TbpA) of HPS to establish an indirect enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) method for detecting HPS antibodies. [Methods] The *tbpA* gene of HPS was cloned and connected pET-SUMO prokaryotic expression vector. After identification by PCR, double enzyme digestion and sequencing, the positive recombinant plasmid was transformed into the receptor bacteria *Escherichia coli* Rosetta(DE3), and the expression was induced by IPTG, and the expression products were identified by SDS-PAGE and Western Blot. Using purified TbpA as coating antigen, the indirect ELISA method for detecting HPS antibody was established through the optimization of a series of reaction conditions, and its clinical application and evaluation were carried out. [Results] The optimum reaction conditions of this method were as follows: 5 μg/mL, 4 °C overnight concentration of coated antigen; 5% skim milk powder sealed at 37 °C for 2 h; The dilution of serum was 1:1 600, 37 °C incubation 45 min; The dilution of HRP was 1:5 000, 37 °C action 30 min; The optimal reaction time of TMB was 5 min. This method can specifically detect the HPS antibody. The positive serum is still positive after 1:12 800 dilution, but no cross-reactivity with other porcine pathogen positive serum. The coefficient of variation between in the batch and batches all less than 6%. The total coincidence rates of this method were 90.00%, 86.67% and 90.00% compared with the commercial ELISA kit and Western Blot, whole bacterial for indirect ELISA, among which the positive coincidence rates were 90.38%, 88.46%, 92.00%, and the negative coincidence rates were 87.50%, 75.00% and 80.00%, respectively. The positive rate of immune antibody was 80%, and the positive rate of infection antibody was 19.50%. [Conclusion] This study based on the recombinant TbpA established indirect ELISA detection method for HPS antibodies with good specificity, sensitivity and repeatability, as well as the reliability of clinical applications, provides a technical means for HPS immune surveillance and epidemiological investigation.

Keywords: *Haemophilus parasuis*, transferrin-binding proteins A, indirect ELISA, antibody detection, establishment and application

猪革拉瑟氏病(Gläs­ser's Disease)是由副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)引起的以多发性浆膜炎、关节炎、脑膜炎为主要临床特征的一种高发病率和病死率的细菌性传染病^[1]。该病近年来呈流行上升趋势,而且影响猪生产的各个阶段,给养猪业带来了严重的损失。在当前全面开展减抗、限抗并逐步朝向禁抗的大趋势下,疫

苗接种无疑是防控猪革拉瑟氏病的最有效措施^[2]。然而,疫苗的合理选择及其免疫效果的科学评价是有效预防该病以提高生产效益的重要环节。抗体检测不仅能掌握猪群中 HPS 免疫抗体的消长情况和评估疫苗免疫的效果,而且有助于对未经疫苗免疫的猪群进行 HPS 感染的调查和诊断。因此,建立和应用一种快速、敏感且特异的

检测不同血清型 HPS 抗体的方法意义显著。目前检测 HPS 抗体的方法主要有补体结合试验(Complement Fixation, CF)、间接血凝试验(Indirect Hemagglutination Test, IHA)及酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay, ELISA)。CF 和 IHA 虽有较好的特异性和敏感性,但由于参与 CF 中的成分多、影响因素复杂, IHA 操作步骤繁琐、稳定性差、成本耗费较高,从而阻碍了两者在临床上的推广应用;然而间接 ELISA 抗体检测方法具有操作简便、成本低、快速灵敏等优点,所以在临床上普遍使用^[3]。

转铁结合蛋白(Transferrin-Binding Proteins, Tbp)是 HPS 的主要毒力因子之一,包括 TbpA 和 TbpB 这 2 种多肽结构^[4],可特异性结合宿主的转铁蛋白,为细菌的生长提供必需的铁离子。其中,编码 TbpA 的 *tbpA* 基因被证实存在于 15 种血清型 HPS 标准菌株和临床分离株中^[5],不仅具有良好的免疫原性和反应原性,而且针对同源菌及不同血清型菌株的攻毒均能提供良好的免疫保护力及较好的交互免疫力^[6]。本研究将临床分离的 HPS (4 型) *tbpA* 基因克隆到原核表达载体 pET-SUMO 构建重组质粒 pET-SUMO-*tbpA*,经诱导表达、纯化及鉴定,以 TbpA 蛋白作为包被抗原建立检测不同血清型 HPS 抗体的间接 ELISA 方法,以期为猪群的 HPS 免疫监测和流行病学调查提供一种可靠的技术手段。

1 材料与方 法

1.1 菌株、载体和血清及培养基

HPS 血清型 4 型安徽分离株(HPS-BZ)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) Rosetta 菌株和原核表达载体 PET-SUMO,安徽农业大学动物传染病实验室分离鉴定和保存;HPS 阴性血清、阳性血清和传染性胸膜肺炎放线杆菌(*Actinobacillus pleuropneumoniae*, APP)阳性血清,郑州百基生物科技有限公司;猪链球菌(*Streptococcus suis*, SS)、猪丹毒杆菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*, ER)和

E. coli 阳性血清,马鞍山史记动物健康管理有限公司惠赠;猪圆环病毒 2 型(*Porcine circovirus 2*, PCV2)、猪伪狂犬病毒(*Pseudorabies Virus*, PRV)、猪瘟病毒(*Classical Swine Fever Virus*, CSFV)、猪繁殖与呼吸综合症病毒(*Porcine reproductive and Respiratory Syndrome Virus*, PRRSV)阳性血清均来自 IDEXX 公司相应的 ELISA 检测试剂盒;临床检测应用的猪血清样品(已经和未经 HPS 免疫)均来自安徽地区部分猪场;LB 肉汤,绍兴天恒生物科技有限公司。

1.2 主要试剂和仪器

牛血清蛋白(BSA)、新生小牛血清、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液、二氨基联苯胺(DAB)显色液、限制性内切酶 *Sfo* I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶、180 kD 蛋白 Marker,生工生物工程(上海)股份有限公司;脱脂奶粉、HRP 标记羊抗猪 IgG 抗体, Sigma 公司;酶标板, Corning 公司;HPS 商品化 ELISA 试剂盒,上海酶联生物科技有限公司。恒温振荡培养箱,上海福玛实验设备有限公司;蛋白电泳仪、半干转印仪, Bio-Rad 公司。

1.3 目的蛋白的表达、纯化与鉴定

1.3.1 引物的合成

参照 GenBank 中登录的 HPS SH0165 株 *tbpA* 的全基因序列(登录号为 7277767)设计一对特异性引物,预期扩增片段为 2 700 bp,引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。引物序列为:上游引物: 5'-GGCATGAAAATAAATTAATCTTAT TAGCC-3';下游引物: 5'-CCGCTCGAGTTAGAA CTTCATCTCTACTGAAAGGA-3'。

1.3.2 目的片段的扩增及重组质粒的构建

采用煮沸法提取 HPS 基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR Master Mix 10 μL, 上、下游引物(20 μmol/L)各 1 μL, ddH₂O 6 μL, 模板 DNA 2 μL。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。反应结束后,将 PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳,并用 DNA 凝胶

回收试剂盒对目的片段进行回收纯化。用 *Xho* I 和 *Sfo* I 对回收的 *tbpA* 基因片段和 pET-SUMO 载体进行双酶切后经琼脂糖凝胶电泳回收, 两者用 T4 DNA 连接酶于 16 °C 连接过夜, 将连接产物转化入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 涂布于含 100 mg/L Amp 的 LB 平板, 经 PCR 鉴定为阳性的重组质粒送往安徽通用生物系统有限公司测序。

1.3.3 TbpA 蛋白的表达及纯化

将 PCR 鉴定和测序正确的阳性重组质粒 pET-SUMO-*tbpA* 转化至 *E. coli* Rosetta 感受态细胞, 挑取单菌落接种于 5 mL 含 50 μ g/mL Amp 的 LB 液体培养基中, 37 °C、120 r/min 振荡培养至菌液 OD_{650} 为 0.6–0.8, 加入 IPTG 诱导剂, 20 °C、180 r/min 诱导表达 10 h。将诱导后菌液于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 收集菌体沉淀, 经细胞裂解液重悬后, 在冰水浴条件下, 利用超声波细胞破碎仪(功率 1 500 W, 超声 4 s, 间歇 4 s)破碎菌体 30 min, 将破碎产物于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀即为包涵体。将包涵体复性后利用 Ni-His-Resin 纯化蛋白, 最后用 500 mmol/L 咪唑洗脱目的蛋白, 通过 SDS-PAGE 鉴定蛋白表达及纯化结果。

1.3.4 TbpA 蛋白的 Western Blot 鉴定

将纯化后的重组 TbpA 蛋白经 SDS-PAGE 后转印到硝酸纤维素膜上, 采用 5% 脱脂奶粉的封闭液于 4 °C 封闭 12 h, 以 HPS 阳性血清(1:500 稀释)为一抗, 37 °C、40 r/min 作用 1 h, PBST 洗膜后用羊抗猪 IgG-HRP (1:5 000 稀释)为二抗, 同样条件下作用 1 h, 洗膜后在二氨基联苯胺显色溶液中显色, 当出现目的条带后立即用蒸馏水冲洗以终止反应。

1.4 TbpA 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立

1.4.1 间接 ELISA 操作步骤

将包被液稀释后的 TbpA 蛋白以 100 μ L/孔包被酶标板, 4 °C 孵育 12 h, 弃去包被液; PBST 洗涤后(洗板 3 次, 每次加入洗涤液 200 μ L, 振荡

3 min), 每孔加入 200 μ L 2% BSA 封闭液, 37 °C 封闭 2 h 后 PBST 洗涤; 每孔加入 100 μ L 稀释后猪血清(1:3 200 稀释), 并设立 HPS 抗体阴性的猪血清作为阴性对照, 37 °C 作用 1 h, PBST 洗涤; 每孔加入 100 μ L 羊抗猪 IgG (1:10 000 稀释), 37 °C 作用 1 h, PBST 洗涤; 每孔加入 100 μ L TMB 显色液, 37 °C 避光显色 10 min; 每孔加入 100 μ L H₂SO₄ 终止反应, 于 450 nm 波长读取 OD 值并计算 P/N 值(P: 待检血清 OD_{450} 值; N: 阴性对照 OD_{450} 值)。每种反应条件 3 个重复, 取其平均值, 以阳性血清 OD_{450} 值约为 1.0 且 P/N 值最大的孔所对应的优化条件为最佳^[7]。

1.4.2 最佳抗原包被浓度和血清稀释度的确定

采用方阵滴定法确定最佳抗原包被浓度和血清稀释度。以 pH 9.6 的碳酸盐缓冲液将 TbpA 蛋白稀释至终浓度分别为 16.0、8.0、4.0、2.0 μ g/mL, 每孔 100 μ L 包被 96 孔酶标板, 4 °C 过夜。HPS 标准阴性血清和阳性血清均按 1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400 倍稀释后进行方阵滴定试验, 测定 OD_{450} , 计算 P/N 值以确定最佳抗原包被浓度和血清稀释度。

1.4.3 最佳抗原包被条件的确定

以最佳的抗原浓度进行包被, 将包被条件分成 5 种: 37 °C 2 h+4 °C 过夜、37 °C 1 h+4 °C 过夜、4 °C 过夜、37 °C 2 h 及 37 °C 1 h, 分别按照间接 ELISA 抗体检测方法的程序进行操作, 测定 OD_{450} , 计算 P/N 值以确定最佳抗原包被条件。

1.4.4 最佳封闭液及封闭时间的确定

以最佳的抗原包被浓度和条件包被酶标板, 分别以 1% BSA、2% BSA、5% 脱脂奶粉、5% 胎牛血清为封闭液, 按照间接 ELISA 操作程序筛选出最佳封闭液。将该封闭液分别于 37 °C 封闭 1、2、3 h 后进行间接 ELISA 抗体检测, 测定 OD_{450} , 计算 P/N 值以确定最佳封闭时间。

1.4.5 最佳血清作用时间的确定

按照确定好的最佳条件依次进行包被、封闭、加入血清, 分别在 37 °C 作用 30、45、60、

75 min 后进行间接 ELISA 抗体检测, 测定 OD_{450} , 计算 P/N 值以确定最佳血清作用时间。

1.4.6 最佳酶标二抗浓度及作用时间的确定

加入血清后, 将羊抗猪 IgG-HRP 分别进行 1:5 000、1:10 000、1:15 000 稀释后进行间接 ELISA 检测。确定最佳酶标二抗浓度后于 37 °C 分别孵育 30、45、60、75 min, 按照间接 ELISA 方法步骤进行抗体检测, 测定 OD_{450} , 计算 P/N 值以确定最佳酶标二抗作用时间。

1.4.7 最佳显色时间的确定

按照筛选的最佳条件进行间接 ELISA 抗体检测, 加入 TMB 显色液后分别于 37 °C 避光显色 5、10、15 min, 测定 OD_{450} , 计算 P/N 值以确定最佳显色时间。

1.4.8 临界值的确定

按照上述优化的方法检测 30 份已知 HPS 抗体阴性血清, 测定其 OD_{450} 值, 计算平均值 \bar{X} 和标准方差 SD , 以 $OD_{450} < \bar{X} + 2SD$ 作为阴性判定标准, $OD_{450} > \bar{X} + 3SD$ 作为阳性判定标准, 介于两者之间者则判为可疑。

1.5 特异性试验

采用优化的方法检测 ER、*E. coli*、SS、APP、PCV2、PRV、CSFV、PRRSV 阳性血清, 同时设立 HPS 标准阳性血清和阴性血清作对照, 以评估该方法的特异性。

1.6 敏感性试验

将 HPS 标准阳性血清用 PBST 按照 1:200、1:400、1:800...1:102 400 稀释, 利用优化的方法与商品化 ELISA 试剂盒进行抗体滴度的检测比较, 以评估该方法的敏感性。

1.7 重复性试验

取 4 份 HPS 阳性血清和 1 份 HPS 阴性血清样品, 用同一批次表达纯化的 HPS 重组 TbpA 蛋白包被酶标板, 对这 5 份血清样品进行 ELISA 检测, 每份样品重复 3 次操作, 结果进行统计学分析, 以检测批内重复性; 相同条件下, 使用 3 个不同批次包被的酶标板分别检测以上 5 份血清样

品, 结果进行统计学分析, 以检测批间重复性。

1.8 符合率试验

应用建立的方法(代号为 TbpA-ELISA)对 60 份经 HPS 疫苗接种的猪血清样品进行免疫抗体检测, 并与全菌体包被间接 ELISA 抗体检测方法(代号为全菌体-ELISA)、HPS 商品化抗体检测 ELISA 试剂盒、Western Blot 作平行比较, 计算符合率以考察该方法的可靠性。符合率=(阳性结果相同样本数+阴性结果相同样本数)/总样本数×100%。

1.9 临床猪血清样品的感染抗体检测

利用 TbpA-ELISA 对安徽 10 个地市 600 份未经 HPS 疫苗接种的猪血清样品进行感染抗体检测, 以验证该方法的应用性。通过 SPSS 20.0 软件对数据结果进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 *tbpA* 基因扩增产物

以 HPS-BZ 菌株基因组 DNA 为模板对其 *tbpA* 基因进行 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测, 得到与预期片段大小(2 700 bp)相符的产物(图 1)。

2.2 重组表达质粒 pET-SUMO-*tbpA* 的 PCR 鉴定

重组阳性质粒 pET-SUMO-*tbpA* 经 PCR 鉴定可得到 2 700 bp 的目的片段(图 2), 符合预期大小。

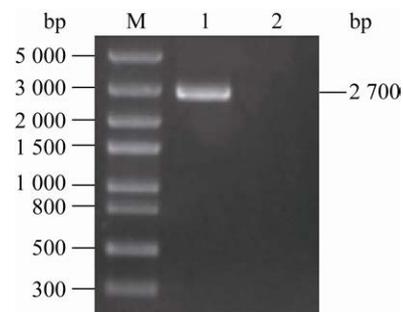


图 1 *tbpA* 基因的 PCR 扩增结果

Figure 1 The result of PCR amplification of *tbpA* gene

注: M: DL5000 DNA Marker; 1: *tbpA* 基因 PCR 扩增产物; 2: 阴性对照

Note: M: DL5000 DNA Marker; 1: The PCR product of *tbpA* gene; 2: Negative control

2.3 TbpA 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

对表达及纯化后的 TbpA 蛋白经 SDS-PAGE 电泳, 在 110 kD 处出现目的条带(图 3)。

2.4 TbpA 蛋白的 Western Blot 鉴定

对纯化后的 TbpA 蛋白进行 Western Blot 鉴定, 同样在 110 kD 处出现特异性条带(图 4), 证实该蛋白具有良好的反应原性。

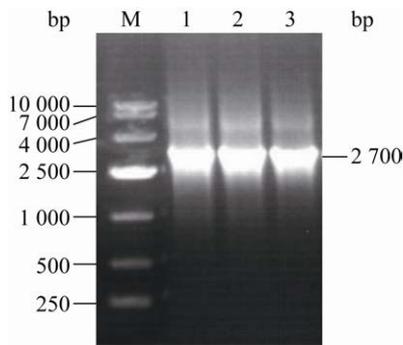


图 2 pET-SUMO-tbpA 的 PCR 鉴定结果
Figure 2 The result of PCR identification of pET-SUMO-tbpA
 注: M: DL10000 DNA Marker; 1-3: pET-SUMO-tbpA 的 PCR 扩增产物
 Note: M: DL10000 DNA Marker; 1-3: The PCR product of pET-SUMO-tbpA

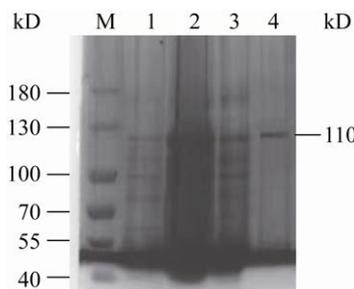


图 3 TbpA 蛋白的表达及纯化产物的 SDS-PAGE 鉴定结果
Figure 3 The result of SDS-PAGE analysis of the expressed and purified of TbpA protein
 注: M: DL180 蛋白 Marker; 1: HPS 重组 TbpA 表达产物; 2: HPS 重组 TbpA 变性产物; 3: HPS 重组 TbpA 复性产物; 4: HPS 重组 TbpA 纯化产物
 Note: M: DL180 Protein Marker; 1: HPS recombinant TbpA expression product; 2: HPS recombination TbpA denaturation; 3: HPS recombination TbpA complex product; 4: HPS recombinant TbpA purified product

2.5 TbpA 蛋白间接 ELISA 抗体检测方法的建立

2.5.1 最佳抗原包被浓度和血清稀释度的确定

表 1 结果显示, 当重组 TbpA 蛋白的包被浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$ 、血清稀释度为 1:1 600 时, 阳性血清 OD_{450} 值接近 1.0 且 P/N 值最大。因此, 确定最佳抗原包被浓度为 5 $\mu\text{g/mL}$, 血清稀释度为 1:1 600。

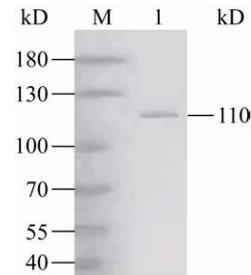


图 4 TbpA 蛋白的 Western Blot 鉴定结果
Figure 4 The result of Western Blot identification of TbpA protein
 注: M: DL180 蛋白 Marker; 1: HPS 重组 TbpA
 Note: M: DL180 Protein Marker; 1: HPS recombinant TbpA

表 1 最佳抗原包被浓度和血清稀释度的优化结果
Table 1 The optimized results of optimal coating concentration of antigen and dilution of serum

抗原包被浓度 Coating concentration of antigen ($\mu\text{g/mL}$)	指标 Index	血清稀释度 Serum dilutions			
		1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400
7	+	0.81	0.78	0.31	0.25
	-	0.08	0.08	0.07	0.07
	P/N	10.13	9.75	4.43	3.57
6	+	0.82	0.77	0.41	0.26
	-	0.08	0.08	0.07	0.07
	P/N	10.25	9.63	5.86	3.71
5	+	1.15	1.08	0.71	0.52
	-	0.08	0.07	0.08	0.07
	P/N	14.38	15.43	8.88	7.43
4	+	0.89	0.73	0.49	0.36
	-	0.08	0.08	0.08	0.08
	P/N	11.13	9.13	6.13	4.26

注: +: 阳性血清 OD_{450} 值; -: 阴性血清 OD_{450} 值。下同
 Note: +: The positive serum OD_{450} value; -: The negative serum OD_{450} value. The same below

2.5.2 最佳抗原包被条件的确定

表 2 结果显示, 当采用 4 °C 包被过夜时, 阳性血清 OD_{450} 值接近 1.0, P/N 值最大。因此, 确定最佳包被条件为 4 °C 过夜。

2.5.3 最佳封闭液种类及封闭时间的确定

表 3 和表 4 结果显示, 当采用 5% 的脱脂奶粉于 37 °C 封闭 2 h 时, 阳性血清 OD_{450} 值接近 1.0, P/N 值最大。因此, 确定最佳封闭液为 5% 脱脂奶粉, 封闭时间为 37 °C 2 h。

2.5.4 最佳血清作用时间的确定

表 5 结果显示, 当血清于 37 °C 作用 45 min 时, 阳性血清 OD_{450} 值接近 1.0, P/N 值最大。因此, 确定最佳血清作用时间为 37 °C 条件下 45 min。

表 2 最佳抗原包被条件的优化结果

Table 2 The optimized result of optimal coating condition of antigen

抗原包被条件	+	-	P/N
The coating condition of antigen			
37 °C 2 h+4 °C 过夜	1.25	0.12	10.42
37 °C 2 h+4 °C Stay overnight			
37 °C 1 h+4 °C 过夜	1.20	0.12	10.00
37 °C 1 h+4 °C Stay overnight			
4 °C 过夜	1.11	0.10	11.58
4 °C Stay overnight			
37 °C 2 h	0.83	0.10	8.30
37 °C 1 h	0.75	0.10	7.50

表 3 最佳封闭液的优化结果

Table 3 The optimized result of optimal blocking solution

封闭液种类	+	-	P/N
Blocking solutions			
1% BSA	2.40	0.14	17.62
2% BSA	2.39	0.14	17.50
5% 脱脂奶粉	2.25	0.10	22.25
5% Skimmed milk powder			
5% 胎牛血清	2.17	0.14	15.50
5% Fetal bovine serum			

表 4 最佳封闭时间的优化结果

Table 4 The optimized result of optimal blocking time

封闭时间	+	-	P/N
Blocking time			
37 °C 1 h	0.91	0.09	10.11
37 °C 2 h	1.01	0.08	12.22
37 °C 3 h	1.02	0.09	10.89

2.5.5 最佳酶标二抗稀释度及作用时间的确定

表 6 和表 7 结果显示, 当酶标二抗以 1:5 000 稀释、37 °C 作用 30 min 时, 阳性血清 OD_{450} 值接近 1.0, P/N 值最大。因此, 确定最佳酶标二抗稀释度为 1:5 000, 作用时间为 37 °C 30 min。

2.5.6 最佳显色时间的确定

表 8 结果显示: 当 37 °C 避光显色 5 min 时, 阳性血清 OD_{450} 值接近 1.0, P/N 值最大。因此, 确定最佳显色时间为 37 °C 条件下 10 min。

2.5.7 临界值的确定

利用建立的 TbpA-ELISA 统计 30 份阴性血清 OD_{450} 值。计算平均值 $\bar{X}=0.13$, 标准方差 $SD=0.03$, 阳性临界值 $\bar{X}+3SD=0.22$, 阴性临界值 $\bar{X}+2SD=0.19$ 。即当血清样品的 OD_{450} 值 >0.22

表 5 最佳血清作用时间的优化结果

Table 5 The optimized result of optimal reaction time of serum

血清作用时间	+	-	P/N
Reaction time of serum			
37 °C 30 min	0.68	0.07	9.71
37 °C 45 min	1.00	0.07	14.29
37 °C 60 min	1.06	0.08	13.25
37 °C 75 min	0.89	0.08	11.13

表 6 最佳酶标二抗稀释度的优化结果

Table 6 The optimized result of optimal dilution of goat-anti-swine IgG-HRP

指标	羊抗猪 IgG-HRP		
	Goat anti-swine IgG-HRP		
Index	1:5 000	1:10 000	1:15 000
+	1.50	1.25	0.93
-	0.08	0.10	0.09
P/N	18.65	12.20	9.79

表 7 最佳酶标二抗作用时间的优化结果

Table 7 The optimized result of optimal reaction time of goat anti-swine IgG-HRP

羊抗猪 IgG-HRP 作用时间	+	-	P/N
Reaction time of goat anti-swine IgG-HRP			
37 °C 30 min	1.17	0.09	11.70
37 °C 45 min	1.28	0.11	11.46
37 °C 60 min	1.25	0.11	11.36
37 °C 75 min	0.93	0.11	8.39

为阳性, OD_{450} 值 <0.19 则为阴性, 介于两者之间为可疑。

2.6 特异性试验

表 9 结果显示, 用建立的 TbpA-ELISA 检测 ER、APP、SS、*E. coli*、PCV2、PRV、CSFV, PRRSV 阳性血清的 OD_{450} 值均小于 0.19, 而且 HPS 阴性、阳性血清对照均成立。表明该方法与常见病原阳性血清无交叉反应, 具有良好的特异性。

2.7 敏感性试验

表 10 结果显示, 建立的 TbpA-ELISA 和商品化 ELISA 试剂盒均能检测到最高稀释度为 1:12 800 的 HPS 阳性血清, 具有相同的敏感性。

2.8 重复性试验

表 11 结果显示, 批内变异系数均小于 10% (2.63%–9.56%), 批间变异系数均小于 6% (2.35%–5.56%)。批内及批间重复试验的结果表明建立的 TbpA-ELISA 具有良好的重复性。

表 8 最佳显色时间的优化结果

Table 8 The optimized result of optimal reaction time of substrate

指标 Index	显色时间 Reaction time of substrate		
	37 °C 5 min	37 °C 10 min	37 °C 15 min
+	1.01	0.91	0.89
-	0.08	0.09	0.09
P/N	12.22	10.11	9.89

表 9 特异性试验结果

Table 9 Result of the specificity test

血清 Serum	OD_{450}	结果 Result
ER	0.14	-
<i>E. coli</i>	0.15	-
SS	0.13	-
APP	0.17	-
PCV2	0.16	-
CSFV	0.06	-
PRRSV	0.13	-
PRV	0.09	-
HPS(+)	1.09	+
HPS(-)	0.08	-

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative

表 10 敏感性试验结果(与商品化 ELISA 试剂盒相比)
Table 10 Result of sensitivity assay (compared to commercial ELISA kit)

HPS 阳性血清稀释度 HPS positive serum dilution	TbpA-ELISA	商品化 ELISA 试剂盒 Commercial ELISA kit
1:200	+	+
1:400	+	+
1:800	+	+
1:1 600	+	+
1:3 200	+	+
1:6 400	+	+
1:12 800	+	+
1:25 600	-	-
1:51 200	-	-
1:102 400	-	-

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative

表 11 重复性试验结果

Table 11 Result of the repeatability test

血清 编号 Serum No.	批内重复 Intra-bath repeatability			批间重复 Inter-bath repeatability		
	平均值 \bar{X}	标准方差 SD	变异系数 CV (%)	平均值 \bar{X}	标准方差 SD	变异系数 CV (%)
1	2.51	0.24	9.56	2.13	0.05	2.35
2	2.41	0.21	8.71	2.14	0.09	4.21
3	2.47	0.16	6.48	2.30	0.06	2.61
4	2.28	0.06	2.63	2.28	0.06	2.63
5	0.12	0.01	8.33	0.18	0.01	5.56

2.9 符合率试验

表 12–14 结果显示, 在 60 份已经 HPS 免疫的猪血清样品中, TbpA-ELISA 检测出 48 份 HPS 阳性血清, 免疫抗体阳性率为 80.00%。然而全菌体-ELISA、商品化 ELISA 试剂盒和 Western Blot 检测出 HPS 阳性血清分别为 52、52 和 50 份, 与该方法的总符合率分别为 90.00%、86.67% 和 90.00%, 其中阳性符合率分别为 90.38%、88.46% 和 92.00%, 阴性符合率分别为 87.50%、75.00% 和 80.00%, 均具有较高的一致性。

2.10 临床猪血清样品的感染抗体检测

表 15 结果显示, 在 600 份未经 HPS 免疫的猪血清样品中, TbpA-ELISA 检出 117 份 HPS 阳性血清, 感染率为 8.33%–43.33%, 平均感染率为 19.50%。

表 12 TbpA-ELISA 与全菌体-ELISA 检测结果比较
Table 12 The results of TbpA-ELISA compared with whole cell-ELISA

项目 Item	阳性数 Positive	阴性数 Negative	总数 Total
TbpA-ELISA	48	12	60
全菌体-ELISA Whole cell-ELISA	52	8	60
符合数 Coincidence number	47	7	54
符合率 Coincidence rate (%)	90.00		

表 13 TbpA-ELISA 与商品化 ELISA 试剂盒鉴定结果比较
Table 13 The results of TbpA-ELISA compared with commercial ELISA Kit

项目 Item	阳性数 Positive	阴性数 Negative	总数 Total
TbpA-ELISA	48	12	60
商品化 ELISA 试剂盒 Commercial ELISA Kit	52	8	60
符合数 Coincidence number	46	6	52
符合率 Coincidence rate (%)	86.67		

表 14 TbpA-ELISA 与 Western Blot 鉴定结果比较
Table 14 The results of TbpA-ELISA compared with Western Blot

项目 Item	阳性数 Positive	阴性数 Negative	总数 Total
TbpA-ELISA	48	12	60
Western Blott	50	10	60
符合数 Coincidence number	46	8	54
符合率 Coincidence rate (%)	90.00		

卡方检验结果显示, 芜湖、池州两地与马鞍山、合肥、六安、安庆、蚌埠、阜阳、亳州、淮南 8 个地区之间 HPS 感染率差异显著($P < 0.05$); 马鞍山与芜湖、池州、蚌埠、阜阳、淮南 5 个地区存在显著性差异($P < 0.05$), 而与合肥、六安、安庆、亳州 4 个地区之间 HPS 感染率差异不显著($P > 0.05$); 淮南与芜湖、马鞍山、池州、安庆 4 个地区存在显著性差异($P < 0.05$), 但与合肥、六安、蚌埠、阜阳、亳州 5 个地区之间 HPS 感染率差异不显著($P > 0.05$)。表明安徽 10 个地区均存在不同程度的 HPS 感染, 其中芜湖和池州两地感染率最高。

表 15 安徽 10 个地区 HPS 感染抗体的检测结果
Table 15 Detection results of HPS infection antibody in 10 cities of Anhui

地市 Cities	样品数(份) No. of samples (portion)	阳性数(份) No. of positive samples (portion)	阴性数(份) No. of negative samples (portion)	感染率 Infection rate (%)
芜湖 Wuhu	60	26	34	43.33a
池州 Chizhou	60	24	36	40.00a
马鞍山 Maanshan	60	12	48	20.00b
安庆 Anqing	60	11	49	18.33bc
六安 Lu'an	60	9	51	15.00bcd
合肥 Hefei	60	8	52	13.33bcd
亳州 Bozhou	60	8	52	13.33bcd
阜阳 Fuyang	60	7	53	11.67cd
蚌埠 Bengbu	60	7	53	11.67cd
淮南 Huainan	60	5	55	8.33d
总计 Total	600	117	483	19.50

注: 感染率(%)=阳性样品检出数/血清样品数 $\times 100$; 同列相同小写字母表示差异不显著($P > 0.05$); 同列小写字母不同时表示差异显著($P < 0.05$)

Note: The infection rate (%)=The number of positive samples/Serum samples $\times 100$; The difference was not significant ($P > 0.05$) when the shoulder scale was the same; The difference was significant when the shoulder scale was different ($P < 0.05$)

3 讨论与结论

选择合适的包被抗原是建立间接 ELISA 抗体检测方法的关键。采用全菌体^[8]、超声波破碎的 HPS 菌体上清液^[9]等作为包被抗原, 建立的检测 HPS 抗体的间接 ELISA 方法尽管均获得了较好的临床检测效果, 但这些抗原成分复杂, 可能干扰结果的稳定性, 而且具有一定的散毒危险。相反, 选用抗原成分单一且安全性较好的 HPS 蛋白包被建立的间接 ELISA 抗体检测方法, 不仅特异性强、灵敏性高、重复性良好, 而且对于临床

HPS 抗体检测效果显著, 诸如 OMP5^[10]、OMP2^[11]、OMP16^[12]、OppA^[13]、YfeA^[14]、CdtC^[15]、CdtB^[16]、MSD^[17]等。本研究采用的包被抗原为 TbpA 蛋白, 经镍柱亲和层析纯化后具有较高的纯度, 避免了其他杂蛋白干扰检测结果的准确度。相较于上述 HPS 蛋白, TbpA 作为 HPS 的主要毒力因子之一, 存在于 15 种血清型 HPS 标准菌株和临床分离株中^[5], 为 HPS 提供生长必需的铁离子。同时, 本实验室前期对豚鼠和猪的免疫保护试验结果显示, HPS 的 TbpA 蛋白不仅具有良好的免疫原性和反应原性, 而且能诱导机体对同源菌和不同血清型菌株的攻毒产生良好的免疫保护力和较好的交互免疫性^[6], 从而为建立检测不同血清型 HPS 抗体的间接 ELISA 方法奠定了基础。目前, 在利用 HPS 相关基因表达蛋白建立间接 ELISA 抗体检测方法的研究报道中, 常采用流行血清型的 HPS。因此, 本研究以国内外大多数地区主要流行的 HPS 血清型 4 型 TbpA 蛋白为包被抗原, 通过对抗原浓度、血清、酶标二抗稀释度及反应时间等条件进行优化, 建立检测 HPS 抗体的间接 ELISA 方法(TbpA-ELISA)。该方法可特异性检测 HPS 抗体, 阳性血清稀释至 1:12 800 仍可检出, 与其他猪病原阳性血清均无交叉反应, 批内及批间变异系数均小于 10.00%, 表明其具有敏感性高、特异性强、重复性好等优点, 可进一步进行临床 HPS 抗体检测的应用。

本研究对已经和未经 HPS 免疫的猪血清样品进行抗体检测的结果表明, HPS 免疫抗体阳性检出率为 80.00%, 与全菌体-ELISA、商品化 ELISA 试剂盒及 Western Blot 检测结果的总符合率分别为 90.00%、86.67% 和 90.00%, 阳性符合率分别为 90.38%、88.46% 和 92.00%, 阴性符合率分别为 87.50%、75.00% 和 80.00%, 均一性较高; HPS 感染抗体阳性检出率为 19.50%, 安徽各地区均有不同程度的 HPS 感染现象, 特别是芜湖、池州两地感染率最高, 其原因可能是猪群在外界因素如长途运输、气候骤变、饲养管理不当等刺激下出现

内源性感染, 或是由于带菌猪的引入以及目前大部分猪场存在猪繁殖与呼吸障碍综合征和猪圆环病毒病等免疫抑制性疾病的流行导致猪群的免疫力下降, 从而引起 HPS 的继发感染。

综上所述, 本研究以重组表达的 TbpA 蛋白为包被抗原, 成功建立了特异性强、敏感性高、重复性好的检测 HPS 抗体的间接 ELISA 方法, 应用建立的方法对已经和未经 HPS 免疫的猪血清样品进行抗体检测, 确证了该方法可用于临床 HPS 抗体检测和流行病学调查。

REFERENCES

- [1] Oliveira S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis*: new trends on diagnosis, epidemiology and control[J]. *Veterinary Microbiology*, 2004, 99(1): 1-12
- [2] Fu D, Tan XT, Cao YQ, Wen XT, Cao SJ, Huang XB, Wu R, Wen YP. Advances in drug resistance of *Haemophilus parasuis*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 38(7): 591-594 (in Chinese)
付丹, 谭晓婷, 曹玉琴, 文心田, 曹三杰, 黄小波, 伍锐, 文翼平. 副猪嗜血杆菌耐药性研究进展[J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(7): 591-594
- [3] Yao YB, Li QW, Yang ZP, Lu P, Wei JZ, Sun P, Li Y. Development of recombinant SpaA-based ELISA for detection of antibodies against swine erysipelas[J]. *Microbiology China*, 2017, 44(3): 739-748 (in Chinese)
姚焱彬, 李倩文, 杨志鹏, 陆萍, 魏建忠, 孙裴, 李郁. 检测猪丹毒杆菌抗体重组 SpaA ELISA 的建立[J]. *微生物学通报*, 2017, 44(3): 739-748
- [4] Charland N, D'Silva CG, Dumont RA, Niven DF. Contact-dependent acquisition of transferrin-bound iron by two strains of *Haemophilus parasuis*[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1995, 41(1): 70-74
- [5] Li JX, Jiang P, Wang Y, Li YF, Chen W, Wang XW, Li P. Characterization of *Haemophilus parasuis* field isolates from China by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* gene[J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2009, 17(1): 45-50 (in Chinese)
李军星, 姜平, 王艳, 李玉峰, 陈闻, 王先玮, 李鹏. 副猪嗜血杆菌 *tbpA* 基因 PCR-RFLP 分型[J]. *中国动物传染病学报*, 2009, 17(1): 45-50
- [6] Chen Z, Hu Z, Zhang NJ, Wei JZ, Sun P, Liu XL, Li Y. Protective effects of *Haemophilus parasuis* serotype 4, 13 and 14 TbpA on cross-immunity in guinea pigs[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(8): 2495-2504 (in Chinese)
陈章, 胡楨, 张乃嘉, 魏建忠, 孙裴, 刘雪兰, 李郁. 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[J]. 微生物学通报, 2020, 47(8): 2495-2504
- [7] Hua Y, Wang W, Li Y, Sun P, Wei JZ. Prokaryotic expression of the structural protein S of porcine epidemic diarrhea virus and establishment of an indirect ELISA for a detection of antibody against porcine epidemic diarrhea[J]. Microbiology China, 2016, 43(2): 434-443 (in Chinese)
华耀, 王玮, 李郁, 孙裴, 魏建忠. 猪流行性腹泻病毒 S 蛋白主要抗原表位区的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 微生物学通报, 2016, 43(2): 434-443
- [8] Wang Y, Xia WT, Bai KT, Yin XF, Jiang P. Development of an indirect ELISA for detection of antibodies against *Haemophilus parasuis*[J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2006, 38(3): 5-7 (in Chinese)
王艳, 夏万田, 柏坤桃, 尹秀凤, 姜平. 副猪嗜血杆菌间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(3): 5-7
- [9] Ma FL, Wang LR, Dong YJ, Liu YP, Wang QX, Liang YY. Establishment and application of an indirect ELISA for detection of antibody against *Haemophilus parasuis*[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2015, 24(5): 29-33 (in Chinese)
马福利, 王丽荣, 董永军, 刘运平, 王秋霞, 梁莹莹. 副猪嗜血杆菌抗体间接 ELISA 检测方法的建立及应用[J]. 西北农业学报, 2015, 24(5): 29-33
- [10] Chen SZ, Li CL, Jia AQ, Wang GP. Expression of outer membrane protein P5 gene of *Haemophilus parasuis* and establishment of an indirect ELISA based on the OMP5 protein[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(14): 3036-3044 (in Chinese)
陈善真, 李春玲, 贾爱卿, 王贵平. 副猪嗜血杆菌 OMP5 基因的克隆、表达及间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国农业科学, 2011, 44(14): 3036-3044
- [11] Jia AQ, Li CL, Wang GP, He YL, Yuan ZY. Cloning and expression of *Haemophilus parasuis ompP2* gene and development of an indirect enzyme-linked immune sorbent assay for detecting antibody against *Haemophilus parasuis*[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2011, 31(9): 1266-1269 (in Chinese)
贾爱卿, 李春玲, 王贵平, 何永龙, 袁子彦. 副猪嗜血杆菌 *ompP2* 基因的克隆、表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(9): 1266-1269
- [12] Zheng XT, Li XH, Hu XD, Xu JR, Lin WM, Yang XY. Establishment of an indirect ELISA for detection of antibodies against the Omp16 of *Haemophilus parasuis*[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2018, 40(7): 607-610,638 (in Chinese)
郑新添, 李晓华, 胡晓丹, 许君茹, 林伟明, 杨小燕. 基于外膜蛋白 Omp16 的副猪嗜血杆菌抗体间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(7): 607-610,638
- [13] Che YL, Chen RJ, Jiang B, Wang LB, Wei H, Wu XM, Zhuang XS, Zhou LJ. Cloning and expression of *oppA* gene and development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibody against *Haemophilus parasuis*[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2015, 44(3): 282-288 (in Chinese)
车勇良, 陈如敬, 江斌, 王隆柏, 魏宏, 吴学敏, 庄向生, 周伦江. 副猪嗜血杆菌 *oppA* 基因的克隆、表达及间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2015, 44(3): 282-288
- [14] Wang ZH. The serovar investigation of *Haemophilus parasuis* in partial Sichuan province and construction of the indirect ELISA assay[D]. Yaan: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2018 (in Chinese)
王正皓. 四川省部分地区副猪嗜血杆菌的血清型调查及间接 ELISA 方法的构建[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2018
- [15] Shi BQ. Serotype identification of *Haemophilus parasitae* isolated from Hebei province and establishment and application of indirect ELISA[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2019 (in Chinese)
石保秋. 副猪嗜血杆菌河北分离株的血清型鉴定及间接 ELISA 方法的建立与应用[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2019
- [16] Liu SH, Li DP, Xu SK, Xie F, Li G, Li T, Sun B, Wang CL. Establishment and verification of indirect ELISA for detection of antibodies against *Haemophilus parasuis*[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2016, 38(7): 576-579 (in Chinese)
刘双红, 李大鹏, 徐胜奎, 谢芳, 李刚, 李婷, 孙斌, 王春来. 副猪嗜血杆菌间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2016, 38(7): 576-579
- [17] Zhu XM, Zou Y, Chen P, Wang LM, Li YF. Screening of stably-expressed proteins in different serotypes of *Haemophilus parasuis* and establishment of an indirect ELISA[J]. Chinese Veterinary Science, 2015, 45(1): 68-74 (in Chinese)
朱晓明, 邹垚, 陈攀, 王丽敏, 李玉峰. 副猪嗜血杆菌不同血清型稳定表达蛋白的筛选及间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2015, 45(1): 68-74