

# 副猪嗜血杆菌 TbpA 对仔猪的免疫效力评价

姚焱彬, 陈章, 储霞飞, 魏建忠, 孙裴, 李郁\*

(安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036)

**摘要:** 本研究旨在了解副猪嗜血杆菌(HPS)转铁结合蛋白 A(TbpA)对仔猪的免疫保护性,从而为 HPS 新型疫苗的研发奠定基础。采用 HPS 血清型 13 型灭活全菌体以及浓度分别为 0.5、0.25 mg · 4 mL<sup>-1</sup> 的重组 TbpA, 经 3 次间隔期均为 14 d 的免疫后,检测仔猪抗体(IgG)水平及细胞因子(IL-5、IL-10、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ )水平;以相同血清型菌株 7 LD<sub>50</sub> 剂量,腹腔攻毒,检查病理学变化及其免疫保护率。结果显示: HPS 的重组 TbpA 能诱导仔猪产生较高水平的特异性抗体 IgG,并使细胞因子显著升高。重组 TbpA 和灭活全菌体在免疫后均能使仔猪获得免疫保护,其中 0.5 mg · 4 mL<sup>-1</sup> TbpA 和灭活全菌体的免疫保护率均为 100%,组织切片病理变化与攻毒对照组之间差异明显。HPS 的 TbpA 能激发仔猪的体液免疫和细胞免疫,产生较强的免疫保护力,可以作为一种新的疫苗候选抗原。

**关键词:** 副猪嗜血杆菌;转铁结合蛋白 A;体液和细胞免疫;免疫保护率;仔猪

中图分类号: S855.12

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)03-0588-09

## Immune Efficacy of Transferrin-binding Protein A of *Haemophilus parasuis* in Piglets

YAO Yan-bin, CHEN Zhang, CHU Xia-fei, WEI Jian-zhong, SUN Pei, LI Yu\*

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

**Abstract:** The aim of this study was to investigate the immune efficacy of the transferrin-binding protein A of HPS and to lay a foundation for research and development of new vaccine. The piglets were immunized with the inactivated whole cell vaccine from HPS serotype 13 and recombinant protein TbpA(0.5 and 0.25 mg · 4 mL<sup>-1</sup>). The immunization was conducted at week 0, 2, 4 and then challenged with HPSLJ3 (7 LD<sub>50</sub>). Serum antibody (IgG) and cytokines (IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) levels were measured by ELISA and pathological examination was performed. Results were as follows: Immunization and challenge assay demonstrated the recombinant protein TbpA could induce high levels of antibody (IgG) and cytokines. The protective efficacy of the inactivated whole cell and TbpA (0.5 mg · 4mL<sup>-1</sup>) vaccines was 100%. There was a significant difference between the pathological changes and the control group. TbpA can stimulate the humoral and cellular immunity, and produce powerful immune protection. These results suggested that TbpA is a potential candidate for developing a novel HPS vaccine.

**Key words:** *Haemophilus parasuis*; transferring-binding protein A; humoral and cellular immunity; immunoprotection; piglets

副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS)是猪上呼吸道的一种常在菌,为格拉瑟氏病(Gläsler's

disease)的病原菌。随着养猪集约化程度的提高以及饲养条件和饲养管理的改变,由 HPS 引起的以猪

收稿日期: 2017-09-19

基金项目: 国家星火计划重点项目(2014GA710002); 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)

作者简介: 姚焱彬(1992-),男,江苏启东人,硕士生,主要从事动物传染病学研究, Tel: 0513-83683368, E-mail: 1147481655@qq.com

\* 通信作者: 李郁, E-mail: liyouer@163.com

纤维素性多发性浆膜炎、关节炎、脑膜炎、呼吸困难、高热及高死亡率为特征的传染性疾病呈现逐年上升的趋势,给养猪业带来巨大的经济损失,并已成为世界范围的一种严重的细菌性传染病<sup>[1-2]</sup>。目前针对 Glässer's 病的防控措施主要是应用抗菌药物和灭活疫苗。然而,随着抗菌药物的大量使用,甚至乱用或滥用,导致 HPS 的耐药谱逐渐拓宽,多重耐药现象日益严重<sup>[3]</sup>;同时由于 HPS 血清型众多,各型菌株间的毒力或致病性差异都很大,且相互之间缺乏有效的交叉保护力,致使 HPS 灭活疫苗的保护效果十分有限<sup>[4-5]</sup>。

铁是细菌生长代谢中不可缺少的元素,但宿主体内是一种低铁浓度的环境,铁离子往往是与宿主糖蛋白、转铁蛋白、乳铁蛋白等络合在一起,致使细菌必须以某种机制来摄取铁。目前已知的铁调节蛋白包括 6 种:铁调节外膜蛋白、铁结合蛋白、转铁结合蛋白(transferrin-binding protein, Tbp, 包括 TbpA 和 TbpB)、乳铁结合蛋白及血红素结合蛋白<sup>[6]</sup>。HPS 可利用转铁蛋白提供细菌生长必需的铁离子<sup>[7]</sup>。N. Charland 等已证明猪血清中 Tbp 受体的存在,并分析两种 Tbp 的多肽结构分别是:TbpA 94~96 ku, TbpB 60 ku,也只能特异性结合猪的转铁蛋白<sup>[8]</sup>。2010 年, S. Martínez 等克隆表达了 HPS 血清 5 型 *tbpA* 基因中一段 600 bp 核苷酸序列,并证实该片段具有免疫原性<sup>[9]</sup>。2011 年,本研究室辛伟等对血清型 13 型 HPS 的 *tbpA* 基因分 3 段进行克隆表达,研究结果显示三段重组蛋白(rTbpA1、rTbpA2、rTbpA3 大小分别为 62、54、44 ku)均具有良好的反应原性,其中 rTbpA1 更具有良好的免疫原性<sup>[10]</sup>。2012 年,本研究室黄晓慧等进一步对血清型 13 型 HPS 的 *tbpA* 全基因进行原核表达,大小为 110 ku 的重组 TbpA 具有良好的免疫活性<sup>[11]</sup>。

在前期研究中,我们利用 HPS 血清型 13 型重组 TbpA 蛋白(110 ku)免疫豚鼠,结果显示对豚鼠具有良好的免疫保护。当免疫蛋白量达到 100  $\mu\text{g}$  时,对血清型 13 型 HPS 的保护率高达 80%,血清型 4 型攻毒后保护率为 60%<sup>[12]</sup>。本试验系在此研究基础上,采用 HPS 血清型 13 型不同蛋白质浓度的重组 TbpA 免疫仔猪,通过测定血清抗体(IgG)及细胞因子(IL-5、IL-10、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ )水平,同时对免疫后仔猪进行同型菌株的攻毒,记录攻毒后仔猪存活和死亡情况,观察和比较病理学变化,结果表

明血清型 13 型 HPS 的 TbpA 蛋白可为仔猪提供较好的免疫保护并能抵抗同一血清型菌株的攻击,为下一步探究重组 TbpA 对本动物仔猪的免疫交互试验奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

HPS 血清型 13 型安徽分离菌株(HPS-LJ3)、重组质粒 pET-SUMO-*tbpA*、*E. coli* DH5 $\alpha$ /Rosetta(DE3)菌株均由安徽农业大学动物科技学院传染病实验室保存。

### 1.2 试验仔猪及试验场地

14 日龄及 42 日龄仔猪购自安徽浩翔农牧科技有限公司,试验场地由安徽东方帝维生物制品股份有限公司提供。

### 1.3 主要试剂

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、氨苄青霉素(Amp)、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液、二氨基联苯胺(DAB)、30%丙烯酰胺溶液、考马斯亮蓝 R250、 $\beta$ -巯基乙醇购自上海生工生物工程技术有限公司;新生小牛血清购自杭州四季青有限公司;含 0.6%酵母浸膏胰酪胨大豆肉汤(TSB-YE)、含 0.6%酵母浸膏胰酪胨大豆琼脂(TSA-YE)、LB 肉汤购自绍兴天恒生物科技有限公司;Ni-NTA His Bind Purification Kit 购自 Novagen 公司;十二烷基硫酸钠(SDS)、过硫酸铵、三羟甲基氨基甲烷(Tris 碱)、弗氏完全佐剂、HRP 标记山羊抗猪 IgG(IgG-HRP)购自 SIGMA 公司;细胞因子(IL-5、IL-10、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$ )ELISA 试剂盒购自美国 RB 公司。

### 1.4 重组 TbpA 的表达及纯化

参照黄晓慧等<sup>[11]</sup>的方法,对重组 TbpA 进行表达和纯化,具体方法如下:将重组质粒 pET-SUMO-*tbpA* 转化至 Rosetta(DE3)感受态细胞,挑取单克隆接种于含 50  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Amp LB 液体培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养(150  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ )过夜。按 1:100 将过夜培养的菌液转接至 100 mL 上述 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养至对数生长期( $\text{OD}_{600\text{nm}}$  为 0.6~0.8)。加入终浓度 0.3  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 IPTG,20  $^{\circ}\text{C}$  120  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  过夜诱导表达。将诱导后菌液 13 000 g 离心 5 min,弃上清,收集沉淀,5 mL 裂解液重悬沉淀后超声破碎。10 000 g 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 纯化蛋白质,最后用

500 mmol · L<sup>-1</sup>咪唑洗脱目的蛋白质,通过全波长多功能酶标仪测定纯化后的蛋白质浓度,并进行 SDS-PAGE 分析蛋白质表达及纯化效果。

### 1.5 重组 TbpA 的 Western blotting 鉴定

纯化后的重组 TbpA 用半干转移电泳转至硝酸纤维素膜上(15 V, 40 min),含 5%脱脂奶粉的封闭液中 4 °C 过夜。以免抗 HPS-LJ3 株阳性血清(1:400 稀释)为一抗,室温摇床孵育 1 h,洗膜后用带 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:5 000 稀释)为二抗,室温摇床孵育 1 h,最后用 DAB 显色液试剂盒显色。

### 1.6 筛选 HPS 抗体阴性健康仔猪

自前腔静脉采集 50 头 42 日龄左右的仔猪血液,采用黄晓慧(X. H. Huang)等建立的间接 ELISA 检测方法<sup>[12]</sup>筛选出 15 头 HPS 抗体阴性健康仔猪。

### 1.7 HPS-LJ3 株 LD<sub>50</sub> 的测定

采用 Reed-Muench 法,将 15 头 HPS 抗体阴性健康仔猪,随机分为 5 组,每组 3 头。第一组攻毒剂量为 10<sup>11</sup> CFU · mL<sup>-1</sup>,依次进行 10 倍稀释到第 5 组。腹腔攻毒后,观察仔猪临床症状并记录死亡数量,同时对死亡仔猪进行细菌分离回收。将试验死亡动物数和存活动物数进行累积相加和,再用加和的数据计算死亡率。距离比例  $r = (A - 50) \div (A - B)$  (A 为刚好死亡率大于 50%;B 为刚好死亡率小于 50%);lg LD<sub>50</sub> = 高于 50%死亡率稀释度倒数的对数 + 距离比例 × 稀释倍数的对数。

### 1.8 HPS-LJ3 株灭活全菌体的制备及重组 TbpA 的乳化

1.8.1 HPS-LJ3 株灭活全菌体的制备 挑取 HPS 单菌落接种于 5 mL TSB 肉汤培养基中,37 °C 200 r · min<sup>-1</sup> 振荡培养 12 h,将培养物 1:100 转接至新的 TSB 肉汤培养基中,37 °C 培养 18 h(菌落总数达 1.5 × 10<sup>9</sup> CFU · mL<sup>-1</sup>),0.3%甲醛 37 °C 灭活 24 h。无菌检验合格后,与弗氏佐剂按照 1:1 进行配比乳化。

1.8.2 重组 TbpA 的乳化 将重组 TbpA 与弗氏佐剂按照 1:1 进行配比乳化,置于 4 °C 备用。

### 1.9 重组 TbpA 和 HPS-LJ3 株灭活全菌体的免疫保护试验

1.9.1 免疫试验 25 头 HPS 抗体阴性健康仔猪,随机分为 5 组(编号分别为 A、B、C、D、E),每组 5 头(表 1)。其中 A、B 组接种纯化的重组 TbpA,蛋白质浓度分别为 0.5 和 0.25 mg · 4 mL<sup>-1</sup>,免疫剂量

均为 4 mL · 头<sup>-1</sup>;C 组接种 HPS-LJ3 株灭活全菌体,免疫剂量为 4 mL · 头<sup>-1</sup>;D 组为攻毒对照组,E 组为阴性对照组,均接种灭菌 PBS,4 mL · 头<sup>-1</sup>。接种途径均为颈部肌肉注射,共三次,每次间隔时间为 14 d。第一次免疫接种使用弗氏完全佐剂,第二、三次均使用弗氏不完全佐剂。

表 1 试验仔猪分组及免疫接种情况

Table 1 Grouping and vaccination of tested piglets

组别 Groups	免疫接种类型 Type of immunization	剂量/(mL · 头 <sup>-1</sup> ) Dose
A	0.5 mg · 4 mL <sup>-1</sup> 的重组 TbpA	4
B	0.25 mg · 4 mL <sup>-1</sup> 的重组 TbpA	4
C	HPS-LJ3 株灭活全菌体	4
D	灭菌 PBS(攻毒对照组)	4
E	灭菌 PBS(阴性对照组)	4

1.9.2 血清中 IgG 及细胞因子检测 自一免和二免 14 d、三免 10 d 后,从前腔静脉采集仔猪血液,静置后离心分离血清,保存于 -20 °C。参考黄晓慧(X. H. Huang)等<sup>[12]</sup>建立的方法,检测仔猪免疫后抗体水平,并按照细胞因子 ELISA 检测试剂盒说明书进行细胞因子(IL-5、IL-10、IFN-α、TNF-γ)含量的测定。

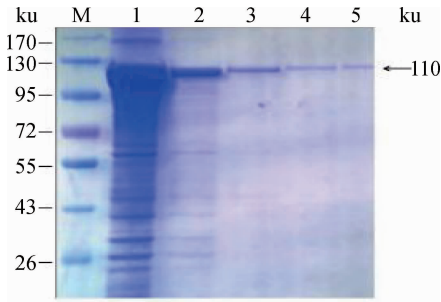
1.9.3 攻毒保护试验 三免 10 d 后,用 7 LD<sub>50</sub> 剂量的 HPS-LJ3 株对 A、B、C、D 组仔猪进行腹腔攻毒,E 组注射等体积无菌 PBS。攻毒后,连续 14 d 观察仔猪的精神状态、食欲及死亡情况,并按无菌操作从死亡仔猪的脾、肺、肝、肾中采样,分别接种于 TSA 琼脂培养基(含有 0.01% NAD 和 5% 小牛血清),37 °C 培养 18~24 h,取可疑菌落进行涂片、染色镜检,并经 PCR 鉴定。最终计算免疫保护率(免疫保护率 = 存活仔猪数/攻毒仔猪数 × 100%)。

1.9.4 病理学检查 眼观各组仔猪内脏器官(心、脾、肺、肝、肾)的病理变化,同时采集肺和脾,制作石蜡切片,HE 染色,镜检观察组织病理学变化。

## 2 结果

### 2.1 重组 TbpA 的诱导表达及纯化

pET-SUMO-*tbpA* 转化至 Rosetta(DE3)感受态细胞,经 IPTG 诱导产生大小约为 110 ku 的目的蛋白,经 Ni-his-resin 纯化的重组 TbpA 质量浓度为 1 mg · mL<sup>-1</sup>(图 1)。



M. 蛋白质相对分子质量标准;1. 纯化前的 TbpA;2~5. 纯化后的 TbpA

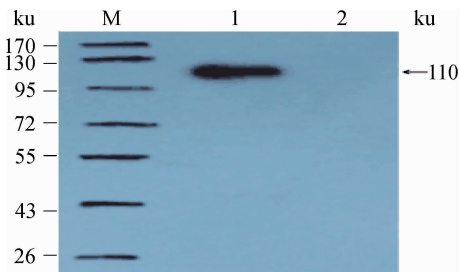
M. Protein molecular weight marker; 1. Unpurified TbpA; 2-5. Purified TbpA

图 1 纯化蛋白质 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified protein

## 2.2 重组 TbpA 的 Western blotting 鉴定

纯化的重组 TbpA 经 Western blotting 鉴定, 在 110 ku 处出现明显的条带, 而阴性对照无明显条带, 表明表达的产物能够与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 2)。



M. 蛋白质相对分子质量标准;1. 纯化的 TbpA;2. 阴性对照

M. Protein molecular weight marker; 1. Purified TbpA; 2. Negative control

图 2 纯化重组蛋白质的 Western blotting 分析

Fig. 2 Western blotting analysis of purified recombinant protein

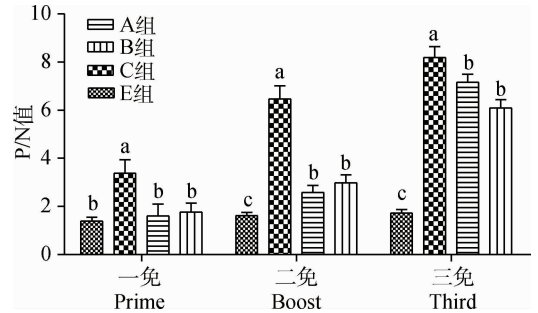
## 2.3 HPS-LJ3 株 LD<sub>50</sub> 的测定

以剂量  $10^{11}$  CFU · mL<sup>-1</sup> 腹腔注射后, 仔猪全部死亡; 以剂量  $10^{10}$  CFU · mL<sup>-1</sup> 腹腔注射后, 仔猪死亡 2 只; 以剂量  $10^9$  CFU · mL<sup>-1</sup> 腹腔注射后, 仔猪死亡 1 只; 以剂量  $10^8$  CFU · mL<sup>-1</sup> 腹腔注射后, 仔猪死亡 1 只; 以剂量  $10^7$  CFU · mL<sup>-1</sup> 腹腔注射后, 仔猪全部存活。经计算, HPS-LJ3 株对仔猪的 LD<sub>50</sub> 为  $1.778 \cdot 10^9$  CFU · mL<sup>-1</sup>。

## 2.4 重组 TbpA 和 HPS-LJ3 株灭活全菌体的免疫保护试验

2.4.1 IgG 检测 用不同剂量的重组 TbpA 和 HPS-LJ3 株灭活全菌体对仔猪进行了三次免疫。A、B 组在一免后 HPS 抗体水平与 E 组之间均差异

不显著 ( $P > 0.05$ ), 而二免和三免后 HPS 抗体水平均显著高于 E 组 ( $P < 0.05$ )。A、B 组三免后 HPS 抗体水平均显著高于二免抗体水平 ( $P < 0.05$ ), 且两组之间差异不显著。C 组一免、二免和三免后抗体水平显著高于 E 组 ( $P < 0.05$ )。一免和二免后 C 组抗体水平显著高于 A、B 组 ( $P < 0.05$ ), 三免后 C 组抗体水平与 A 组和 B 组之间差异大为缩小(图 3)。



A.  $0.5 \text{ mg} \cdot 4 \text{ mL}^{-1}$  重组 TbpA 免疫; B.  $0.25 \text{ mg} \cdot 4 \text{ mL}^{-1}$  重组 TbpA 免疫; C. HPS-LJ3 株灭活全菌体免疫; E. 灭菌 PBS 免疫对照。标注不同字母者表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

A.  $0.5 \text{ mg} \cdot 4 \text{ mL}^{-1}$  TbpA immunized group; B.  $0.25 \text{ mg} \cdot 4 \text{ mL}^{-1}$  TbpA immunized group; C. Inactivated HPS-LJ3 immunized group; E. PBS control. Bars with different letter are different significantly ( $P < 0.05$ )

图 3 仔猪免疫后血清中 IgG 抗体检测

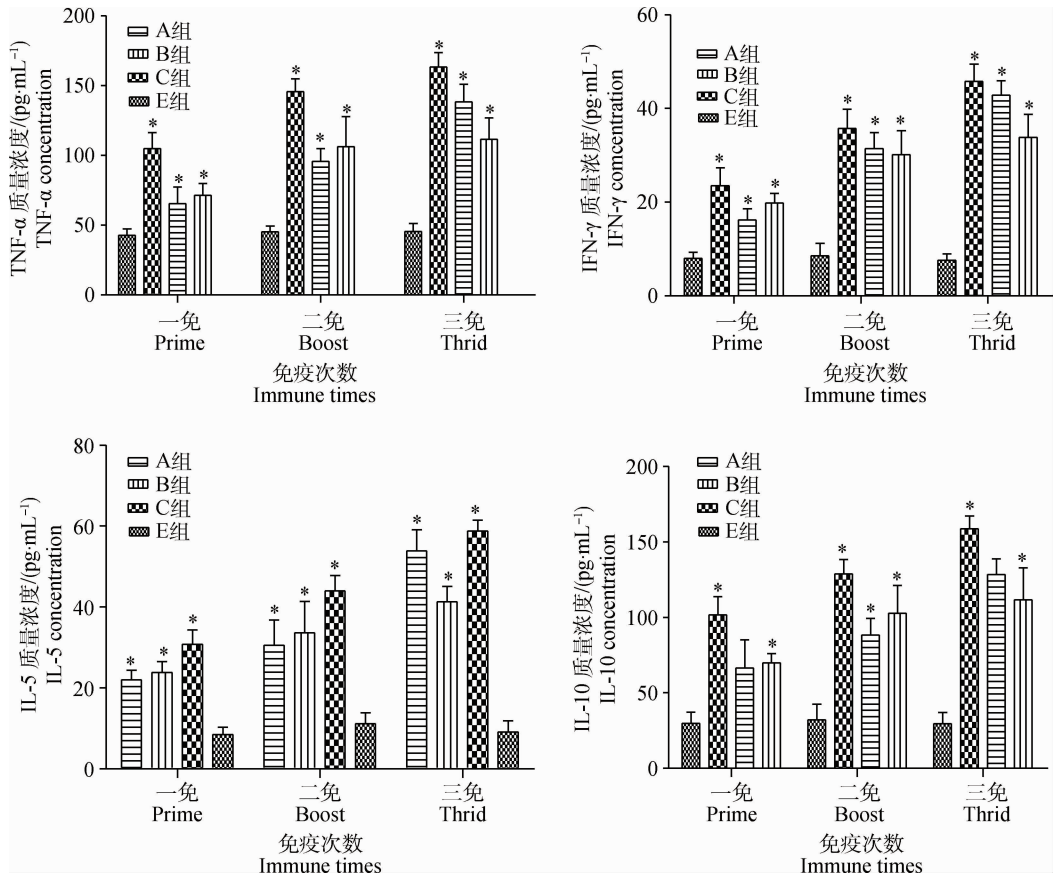
Fig. 3 Levels of IgG production to piglets after immunization

2.4.2 细胞因子检测 在一免和二免后, A、B、C 组的细胞因子 IL-5、IL-10、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  水平与 E 组之间大部分时间点差异显著 ( $P < 0.05$ ), 而三免后, A、B、C 组的细胞因子水平均显著高于 E 组 ( $P < 0.05$ )(图 4)。

2.4.3 攻毒保护试验 结果显示, A、C 组精神状况良好, 保护率均为 100%; B 组从 3 头死亡仔猪的肺、脾分离到大量 HPS, 2 头存活仔猪则分离到少量 HPS, 保护率为 40%; D 组仔猪精神沉郁, 死亡率 100%, 并从死亡仔猪的肺、脾分离到大量 HPS; E 组仔猪全部存活(图 5)。

## 2.4.4 病理学检查

2.4.4.1 大体病变: A、B、C、E 组存活仔猪剖检后均未见明显病理变化。B 组死亡仔猪后肢关节切开有积液, 腕关节和跗关节肿大, 触摸有波动感, 肺间质水肿, 肺两侧肺叶的尖叶、心叶、膈叶及副叶坏死, 纤维素性渗出, 胸腔黏连, 胸外膜出血。脾出血、稍肿大, 表面可见出血性梗死灶和大量纤维素性渗出物。腹腔黏连, 有纤维素性渗出, 腹水增多。肠系膜淋巴结及腹股沟淋巴结出血。D 组死亡仔猪表现肺出血、坏死, 纤维素性肺炎, 脾边缘坏死。

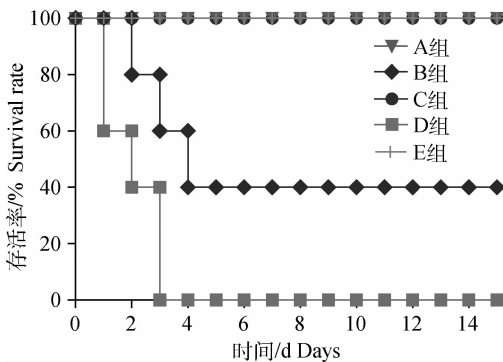


A. 0.5 mg · 4 mL<sup>-1</sup>重组 TbpA 免疫; B. 0.25 mg · 4 mL<sup>-1</sup>重组 TbpA 免疫; C. HPS-LJ3 株灭活全菌体免疫; E. 灭菌 PBS 免疫对照。\* . P < 0.05

A. 0.5 mg · 4 mL<sup>-1</sup> TbpA immunized group; B. 0.25 mg · 4 mL<sup>-1</sup> TbpA immunized group; C. Inactivated HPS-LJ3 immunized group; E. PBS control. \* . P < 0.05

图 4 仔猪免疫后细胞因子水平变化

Fig. 4 Levels of cytokine production after immunization



A. 0.5 mg · 4 mL<sup>-1</sup> TbpA 免疫 + 攻毒; B. 0.25 mg · 4 mL<sup>-1</sup> TbpA 免疫 + 攻毒; C. HPS-LJ3 株灭活全菌体免疫 + 攻毒; D. 攻毒对照组; E. PBS 免疫不攻毒对照

A. 0.5 mg · 4 mL<sup>-1</sup> TbpA immunization & challenge; B. 0.25 mg · 4 mL<sup>-1</sup> TbpA immunization & challenge; C. Inactivated HPS-LJ3 immunization & challenge; D. HPS-LJ3 challenge group; E. PBS control

图 5 免疫攻毒后仔猪存活情况

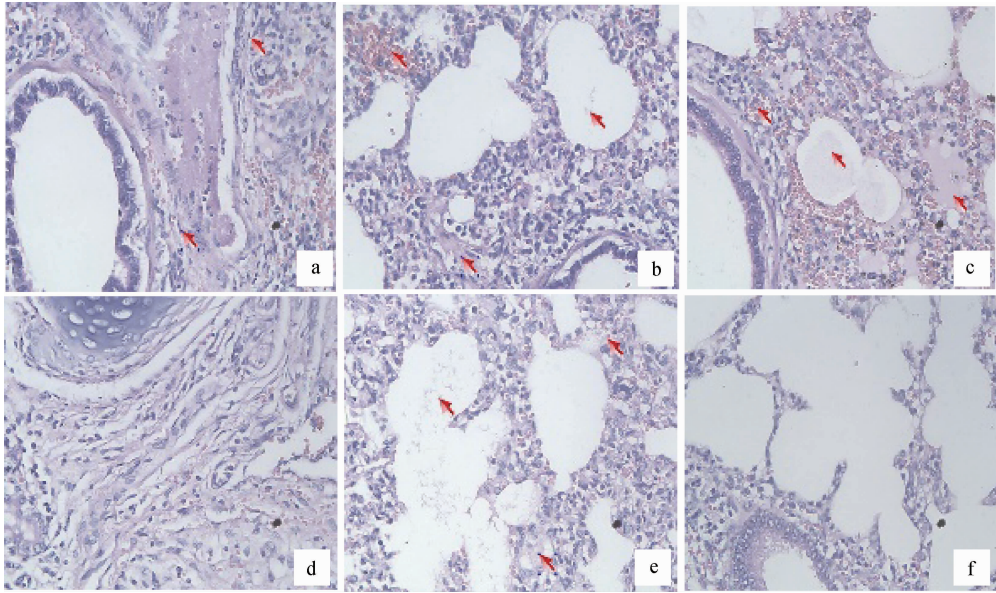
Fig. 5 Survival of immunized piglets following HPS challenge

2.4.4.2 组织学检查:取各组的 HE 染色石蜡切片,镜检。

肺:A 组肺间质有极少量炎性细胞、肺泡间隔增宽、肺小叶少量出血,有浆细胞和成纤维细胞。B 组存活仔猪肺间质有少量炎性细胞浸润、肺小叶出血严重,肺泡内有少量纤维素性渗出物;B 组死亡仔猪肺泡间隔增宽,支气管肺炎,肺间质大量炎性细胞浸润,肺泡内有渗出液和纤维素性渗出物,肺气肿、边缘塌陷,肺小叶严重出血,肺固有结构消失,有大量的红细胞。C 组肺间质只有极少量炎性细胞,肺小叶轻微出血,有浆细胞、成纤维细胞生成。D 组肺泡间隔增宽,支气管肺炎、肺小叶出血,肺泡内有纤维素性渗出物。E 组没有明显病理变化(图 6)。

脾:A 组无明显病理变化。B 组存活仔猪,脾小体有少量炎性细胞浸润,红髓区出血严重;B 组死亡仔猪,脾小体淡染,大量炎性细胞浸润,红髓区和边缘区严重出血,有大量红细胞弥漫性分布。C 组无

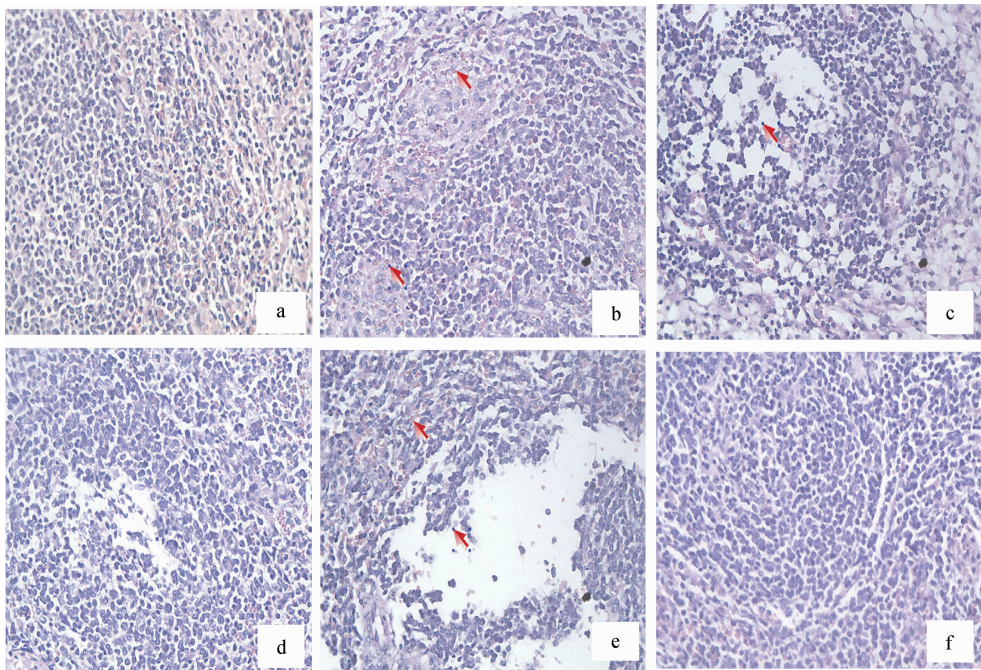
明显病理变化。D 组脾小体淡染,红髓区出血,有大量炎性细胞。E 组无明显病理变化(图 7)。



a.  $0.5 \text{ mg} \cdot 4 \text{ mL}^{-1}$  TbpA 免疫+攻毒; b.  $0.25 \text{ mg} \cdot 4 \text{ mL}^{-1}$  TbpA 免疫+攻毒(存活); c.  $0.25 \text{ mg} \cdot 4 \text{ mL}^{-1}$  TbpA 免疫+攻毒(死亡); d. HPS-LJ3 株灭活全菌体免疫+攻毒; e. 攻毒对照组; f. PBS 免疫不攻毒对照  
 a.  $0.5 \text{ mg} \cdot 4 \text{ mL}^{-1}$  TbpA immunization & challenge; b.  $0.25 \text{ mg} \cdot 4 \text{ mL}^{-1}$  TbpA immunization & challenge (alive); c.  $0.25 \text{ mg} \cdot 4 \text{ mL}^{-1}$  TbpA immunization & challenge (dead); d. Inactivated HPS-LJ3 immunization & challenge; e. HPS-LJ3 challenge group; f. PBS control

图 6 各组仔猪肺病理组织学检查(HE 染色,40×)

Fig. 6 The histology of lung from piglets in various groups(HE staining,40 ×)



a.  $0.5 \text{ mg} \cdot 4 \text{ mL}^{-1}$  TbpA 免疫+攻毒; b.  $0.25 \text{ mg} \cdot 4 \text{ mL}^{-1}$  TbpA 免疫+攻毒(存活仔猪); c.  $0.25 \text{ mg} \cdot 4 \text{ mL}^{-1}$  TbpA 免疫+攻毒(死亡仔猪); d. HPS-LJ3 株灭活全菌体免疫+攻毒; e. 攻毒对照组; f. PBS 免疫不攻毒对照  
 a.  $0.5 \text{ mg} \cdot 4 \text{ mL}^{-1}$  TbpA immunization & challenge; b.  $0.25 \text{ mg} \cdot 4 \text{ mL}^{-1}$  TbpA immunization & challenge (alive piglets); c.  $0.25 \text{ mg} \cdot 4 \text{ mL}^{-1}$  TbpA immunization & challenge (dead piglets); d. Inactivated HPS-LJ3 immunization & challenge; e. HPS-LJ3 challenge group; f. PBS control

图 7 各组仔猪脾病理组织学检查(HE 染色,40×)

Fig. 7 The histology of spleen from piglets in various groups (HE staining,40 ×)

### 3 讨论

近几年,国内关于 Glässer's 病的报道越来越多,该病给养殖业造成了巨大的经济损失。目前,主要采用药物治疗和接种疫苗防控此病,但由于养殖场滥用抗生素等因素,使得 HPS 的耐药谱逐年增加,产生大量的多重耐药菌株<sup>[3]</sup>。易新建等和赵战勤(Z. Q. Zhao)等虽研制了 HPS 三价(血清型 4 型、5 型、12 型)灭活疫苗,较传统的灭活疫苗相比,具有更高的免疫效力<sup>[13-14]</sup>,但由于 HPS 不同血清型菌株之间的致病力存在较大的差异,同时 HPS 各血清型菌株之间缺乏有效的交叉保护力<sup>[15]</sup>,此外, HPS 具有明显的地方性特征,相同血清型的不同地方分离株致病力也不尽相同<sup>[16-17]</sup>等原因,造成了灭活疫苗免疫效果的不确实。因此,筛选免疫保护性抗原,研制高效广谱的 HPS 新疫苗是防控 Glässer's 病的新途径。目前已有的研究表明, HPS 的外膜蛋白(OMPs)、TbpA、TbpB 等均可作为研制 HPS 亚单位疫苗的候选抗原,但迄今为止尚未见到这些蛋白质免疫仔猪后能抵抗不同血清型 HPS 的报道<sup>[18-19]</sup>。本研究是在黄晓慧(X. H. Huang)等<sup>[12]</sup>研究基础上,进一步探讨了 HPS 血清型 13 型的 TbpA 对仔猪的免疫保护作用, TbpA 不仅能诱导仔猪产生较好的免疫抗体水平,而且对同型 HPS 的攻击具有较强的抵抗力,从而为后续进行 TbpA 免疫仔猪是否能够抵抗不同血清型的 HPS 的感染,以及不同血清型 HPS 的 TbpA 可否使仔猪产生交叉免疫保护的研究奠定基础。

抗原能否刺激机体产生免疫反应及产生免疫反应的类型,对于其能否作为有效的疫苗候选抗原起着至关重要的作用。IgG 是动物自然感染和人工主动免疫后,机体所产生的主要抗体类型,是动物机体抗感染免疫的主力军<sup>[20]</sup>。本研究对仔猪进行了三次免疫,与前二次免疫相比,三免后, A、B、C 组均显著诱导机体产生 IgG,且其之间已很接近,表明重组 TbpA 与灭活全菌体免疫机体后均能产生良好的体液免疫反应。细胞因子表达水平的变化可以反映机体发生的免疫反应类型, Th1 细胞分泌 IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$  和 IL-2 等,其中 TNF- $\alpha$  在机体发热和炎症的发生中起免疫调节作用<sup>[21]</sup>,可促进细胞免疫应答; Th2 细胞分泌 IL-5 和 IL-10 等,其中 IL-5 可以促进 B 细胞分化与增长,诱导嗜酸性粒细胞分化<sup>[22]</sup>,可促进体液免疫应答。仔猪三免后, A、B、C

组的细胞因子水平(IL-5、IL-10、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ )均显著高于 E 组,且其之间也无显著差异,表明重组 TbpA 与灭活全菌体同样能够很好地诱导机体的 Th1 和 Th2 型免疫反应。

炎症反应实质上是一种以防御为主的病理过程。炎症细胞浸润是炎症反应的重要指征,炎症细胞在慢性炎症中吞噬病原体和组织碎片并进行消化,引起组织和细胞的损伤。本研究中,攻毒菌株毒力较强,攻毒后仔猪均出现急性死亡,故攻毒对照组仔猪病理变化以出血为主,组织损伤不明显。B 组仔猪死亡时间比 D 组迟,内脏出血比 D 组轻,但组织损伤较严重。B 组存活仔猪内脏也有一定程度的出血及组织损伤,但比死亡仔猪及 D 组仔猪轻。A、C 组仔猪内脏未见出血,仅有轻微组织损伤,两组仔猪病理组织损伤差异不明显。可见机体在发挥免疫作用的同时,也会造成自身组织和细胞的损伤。炎症痊愈的结局是机体溶解吸收炎症渗出物及坏死组织。本研究中, B 组存活仔猪肺和脾有一定量的炎症细胞变性坏死, A、C 组仔猪肺和脾只有少量炎症细胞并且发生变性坏死,均提示为炎症的转归。机体对所形成组织损伤进行修补恢复的过程称为修复,修复后可完全或部分恢复原组织的结构和功能。本研究中, B 组存活仔猪有一定程度组织损伤,处于修复初始阶段, A、C 组仔猪组织损伤很轻微,可见已基本完成修复过程<sup>[23]</sup>。

抗体是由浆细胞产生,正常机体浆细胞存在于脾和淋巴结相应组织处,浆细胞产生抗体并释放到周围的组织液中。浆细胞具有合成、贮存抗体的功能,参与机体体液免疫反应。成纤维细胞为多突的纺锤形,核仁大而明显。处于静止状态的纤维细胞,胞体较小,当在外伤等因素刺激下,部分纤维细胞可转为功能活动旺盛的成纤维细胞,当机体受到损伤时,均会造成不同程度的细胞变性、坏死和组织缺损,必须通过细胞增生和细胞间质的形成来进行组织修复并参加细胞免疫,成纤维细胞在积极参加细胞免疫过程中有很重要的作用<sup>[24]</sup>。A 组和 C 组的仔猪肺均出现浆细胞和成纤维细胞,表明对仔猪进行攻毒之后,重组 TbpA(0.5 mg · 4 mL<sup>-1</sup>)与灭活全菌体对仔猪均具有很好的免疫保护作用。

### 4 结论

HPS 血清型 13 型的 TbpA 能诱导仔猪产生免疫保护力,其中免疫剂量为 0.5 mg · 4 mL<sup>-1</sup>、免疫

3 次,对同型菌株的攻毒具有与免疫灭活全菌体相同的抵抗力,免疫保护率均为 100%,这为进一步开展仔猪免疫血清型 13 型 TbpA 对不同血清型 HPS 的抵抗力,以及不同血清型 HPS 的 TbpA 诱导仔猪交叉免疫保护力的研究奠定了良好基础。

### 参考文献(References):

- [1] 孙尚芬,白宁,姜振国,等.副猪嗜血杆菌病研究进展[J].农业灾害研究,2012,2(2):54-56,69.  
SUN S F, BAI N, JIANG Z G, et al. Research progress of *Haemophilus parasuis*[J]. *Journal of Agricultural Catastrophology*, 2012, 2(2): 54-56, 59. (in Chinese)
- [2] KIM J, CHUNG H K, JUNG T, et al. Postweaning multisystemic wasting syndrome of pigs in Korea: prevalence, microscopic lesions and coexisting microorganisms[J]. *J Vet Med Sci*, 2002, 64(1): 57-62.
- [3] 付丹,谭晓婷,曹玉琴,等.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.  
FU D, TAN X T, CAO Y Q, et al. Advances in drug resistance of *Haemophilus parasuis*[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 38(7): 591-594. (in Chinese)
- [4] 王乐,赵战勤,薛云,等.副猪嗜血杆菌国内流行血清型菌株的致病性比较研究[J].中国兽医学报,2014,34(11):1748-1752.  
WANG L, ZHAO Z Q, XUE Y, et al. Comparative study on pathogenicity of the most prevalent serovars of *Haemophilus parasuis* isolates in China[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(11): 1748-1752. (in Chinese)
- [5] LI M, CAI R J, 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.
- [6] PORCHERON G, DOZOIS C M. Interplay between iron homeostasis and virulence: fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity[J]. *Vet Microbiol*, 2015, 179(1-2): 2-14.
- [7] MEY A R, WYCKOFF E E, KANUKURTHY V, et al. Iron and fur regulation in *vibrio cholerae* and the role of fur in virulence[J]. *Infect Immun*, 2005, 73(12): 8167-8178.
- [8] CHARLAND N, D'SILVA C G, DUMONT R A, et al. Contact-dependent acquisition of transferrin-bound iron by two strains of *Haemophilus parasuis*[J]. *Can J Microbiol*, 1995, 41(1): 70-74.
- [9] MARTÍNEZ S, FRANDOLOSO R, RODRÍGUEZ-FERRI E F, et al. Characterization of a recombinant transferrin-binding protein A (Tbp A) fragment from *Haemophilus parasuis* serovar 5[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, 307(2): 142-150.
- [10] 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.  
XIN W, LI Y, HUANG X H, 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)
- [11] 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].中国兽医学报,2012,42(10):1053-1057.  
HUANG X H, XIN W, WEI J Z, 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)
- [12] HUANG X H, LI Y, FU F G, et al. Cross-protective efficacy of recombinant Transferrin-binding protein A of *Haemophilus parasuis* in guinea pigs[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2013, 20(6): 912-919.
- [13] 易新健,王小波,高清清,等.苏皖地区副猪嗜血杆菌的分离鉴定与三价灭活疫苗的初步研制[J].中国兽医学报,2017,37(5):823-827.  
YI X J, WANG X B, GAO Q Q, et al. Isolation and identification of *Haemophilus parasuis* in Jiangsu and Anhui province and preliminary development of trivalent inactivated bacterin[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(5): 823-827. (in Chinese)
- [14] ZHAO Z Q, LIU H S, XUE Y, et al. Analysis of efficacy obtained with a trivalent inactivated *Haemophilus parasuis* serovars 4, 5, and 12 vaccine and commercial vaccines against Glässer's disease in piglets[J]. *Can J Vet Res*, 2017, 81(1): 22-27.
- [15] ZHANG J M, XU C G, GUO L L, et al. Prevalence and characterization of genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* isolates from southern China[J]. *Can J Vet Res*, 2012, 76(3): 224-229.
- [16] GALINA PANTOJA L, STAMMEN B, MINTON B, et al. Serologic profiling of *Haemophilus parasuis*



- is-vaccinated sows and their litters using a novel oligopeptide permease A enzyme-linked immunosorbent assay reveals unexpected patterns of serological response and maternal antibody transfer[J]. *J Vet Diagn Invest*, 2014, 26(1): 125-130.
- [17] BELLO-ORTI B, COSTA-HURTADO M, MARTINEZ-MOLINER V, et al. Time course *Haemophilus parasuis* infection reveals pathological differences between virulent and non-virulent strains in the respiratory tract[J]. *Vet Microbiol*, 2014, 170(3-4): 430-437.
- [18] BARASUOL B M, GUIZZO J A, FEGAN J E, et al. New insights about functional and cross-reactive properties of antibodies generated against recombinant TbpBs of *Haemophilus parasuis*[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 10377.
- [19] LI M, CAI R J, 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.
- [20] GALL-DEBRECENI A, LAZAR J, KADAS J, et al. Specific detection and quantitation of bovine igG in bioreactor derived mouse mab preparations[J]. *J Immunol Methods*, 2016, 438: 26-34.
- [21] PINTO R A, ARREDONDO S M, BONO M R, 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.
- [22] SINGH U, KUMAR A, SINHA R, et al. Calreticulin transacetylase catalyzed modification of the TNF- $\alpha$  mediated pathway in the human peripheral blood mononuclear cells by polyphenolic acetates[J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 185(3): 263-270.
- [23] JUNG K, CHAE C. *In-situ* hybridization for the detection of *Haemophilus parasuis* in naturally infected pigs[J]. *J Comp Pathol*, 2004, 130(4): 294-298.
- [24] 张从纪. 成纤维细胞免疫调节作用新概念[J]. 西南国防医药, 2000, 10(2): 120-123.  
ZHANG C J. New concept of immunomodulatory effect of fibroblasts[J]. *Medical Journal of National Defending Forces in Southwest China*, 2000, 10(2): 120-123. (in Chinese)

(编辑 白永平)