

胞内劳森菌 LsaA 蛋白的原核表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立

吴艳阳, 杨东东, 高冬生, 李永涛, 常洪涛, 王川庆, 赵 军*

(河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

摘要: 为建立胞内劳森菌特异性抗体检测方法, 将密码子优化合成的胞内劳森菌表面蛋白 LsaA 的编码基因克隆于 pET32a(+) 载体, 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中诱导表达。用纯化的重组 LsaA 蛋白作为包被抗原, 通过一系列条件优化, 建立了检测胞内劳森菌抗体的间接 ELISA 方法。结果显示: 该方法可以特异地检测抗胞内劳森菌抗体, 与大肠杆菌、猪霍乱沙门菌、猪流行性腹泻病毒和猪传染性胃肠炎病毒等常见猪腹泻病原的抗血清均无交叉反应。来自 PCR 检测粪便呈胞内劳森菌阳性猪的血清, 用所建立 ELISA 检测均为胞内劳森菌抗体阳性。该方法具有较好的敏感性和重复性, 阳性血清经过 1:800 稀释检测结果仍为阳性, 批内和批间重复试验的变异系数分别为 0.352%~2.752% 和 0.877%~3.000%。应用建立的 ELISA 方法对河南省部分地区猪场胞内劳森菌的感染情况进行了血清流行病学调查, 结果显示被检地区猪场均存在不同程度的胞内劳森菌抗体阳性, 阳性率在 13.3%~57.1%, 平均阳性率为 30.6%。结果表明, 本研究所建立的 ELISA 方法可以用于胞内劳森菌抗体的检测, 为胞内劳森菌感染的监测和流行病学调查提供了方法。

关键词: 猪增生性肠炎; 胞内劳森菌; LsaA 蛋白; 间接 ELISA

中图分类号: S852.61

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2018)04-0786-08

Prokaryotic Expression of LsaA Protein of *Lawsonia Intracellularis* and Development of a LsaA-based Indirect ELISA for Antibody Detection

WU Yan-yang, YANG Dong-dong, GAO Dong-sheng, LI Yong-tao,

CHANG Hong-tao, WANG Chuan-qing, ZHAO Jun*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: In order to establish a method for detecting specific antibody against *Lawsonia intracellularis*, the codon-optimized LsaA gene encoding surface protein LsaA of *L. intracellularis* was cloned into pET32a(+) vector, and the expression of LsaA protein was induced in *E. coli* host BL21(DE3). After optimization of a series of conditions, an indirect ELISA for detecting antibodies against *L. intracellularis* was established by using purified LsaA protein as coating antigen. The results showed that the anti-*L. intracellularis* antibodies were detected specifically by the established ELISA, and there were no cross-reactions with the antibodies against common diarrhea-causing pathogens such as *E. coli*, *Salmonella choleraesuis*, porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus. Serum samples from fecal *L. intracellularis*-positive pigs which were identified by PCR, were also positive for anti-*L. intracellularis* antibodies detected by the established ELISA. The ELISA has good sensitivity and repeatability. Anti-*L. in-*

收稿日期: 2017-07-10

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0501102; 2016YFD0500802); 河南省高校科技创新团队支持计划(14IRTSTHN015)

作者简介: 吴艳阳(1993-), 女, 河南新乡人, 硕士生, 主要从事动物疫病监测与防控研究, E-mail: 357671806@qq.com

* 通信作者: 赵 军, E-mail: zhaoj@henau.edu.cn

intracellularis positive serum with 1: 800 dilution was still ELISA positive. The intra- and inter-assay coefficient of variation was 0.352%-2.752% and 0.877%-3.000%, respectively. Seroepidemiological prevalence of *L. intracellularis* infection in partial pig farms in Henan province was investigated by using the established ELISA. The results indicated that all the tested pig farms were anti-*L. intracellularis* antibody positive with positive rate of 13.3% to 57.1%, with average positive rate of 30.6%. The results showed that the established ELISA in this study can be used for the detection of antibodies against *L. intracellularis*, and provides a method for the monitoring and epidemiological investigation of *L. intracellularis*.

Key words: porcine proliferative enteritis; *Lawsonia intracellularis*; *LsaA* protein; indirect ELISA

胞内劳森菌(*Lawsonia intracellularis*)是一种专性细胞内寄生细菌,主要寄生在肠黏膜上皮细胞内,引起猪的增生性肠炎^[1]。临床上导致发病猪食欲下降、腹泻和生长发育迟缓,给养猪业造成巨大的经济损失^[2]。猪增生性肠炎自1931年被报道以来,已经在世界主要养猪国家流行。但由于该病造成的猪死亡率较低,我国对胞内劳森菌感染的关注度并不高,有关该菌在我国猪群中的流行现状尚没有全面和明确的了解。造成这种现状的主要原因除了关注度不高之外,更主要的原因是由于检测方法的欠缺。目前,国内外用于诊断胞内劳森菌感染的方法主要是血清学和检测粪便样品的各种PCR方法^[3-12]。PCR方法虽然具有特异性强、敏感度高等特点,可以实现临床样品的快速检测^[13],但是该方法仅限于感染猪排菌期的粪便样品检测,通常还需要特殊的仪器对PCR样品进行后续分析,不适合大批量样品的检测^[11]。通过组织病理学和免疫组织化学的方法也可以检查肠上皮细胞内的细菌,但该方法只适用于死后剖检分析^[14],不适用于早期诊断。血清学诊断不仅具有较高的敏感性和特异性,且抗胞内劳森菌的特异性抗体能够在体内存在更长时间,因此能够提供更好的检测替代方法。对于胞内劳森菌的血清学诊断,已有学者运用免疫过氧化物酶单层细胞测定(IPMA)^[15]和间接免疫荧光试验(IFAT)^[16]检测抗胞内劳森菌的抗体,但这两种方法均需要荧光显微镜,对人员及设备的要求较高,而且试验结果判定的主观性较强。因此,亟需建立一种能够快速、准确地检测胞内劳森菌特异性抗体的血清学方法,以便进行我国猪群胞内劳森菌流行病学调查。H. T. Boesen等采用培养的胞内劳森菌的脱氧胆酸钠提取物作为包被抗原建立了一种检测胞内劳森菌特异性抗体的ELISA方法,所建立的ELISA方法能很好地用于猪增生性肠炎的诊断和

猪群中增生性肠炎的流行状况评价^[17]。但胞内劳森菌是一种严格的细胞内寄生细菌,培养条件要求苛刻^[18],目前世界上仅有少数实验室实现了胞内劳森菌的分离培养。因此,用培养的胞内劳森菌全菌作为诊断抗原存在制备困难和成本高等诸多限制。研究能够替代胞内劳森菌全菌的新型廉价抗原将改进现有ELISA方法的不足和促进其他检测方法的建立和推广。

*LsaA*是胞内劳森菌的一种表面抗原,在细菌感染过程中合成,参与细菌的黏附和侵袭。已有研究证明,对猪和小鼠通过口服接种胞内劳森菌,可以在其血浆中检测出抗*LsaA*蛋白的抗体^[19]。利用这一蛋白质作为检测抗原将对胞内劳森菌感染的检测具有直接指示作用。*LsaA*基因全长为0.7 kb,仅含一个ORF,编码蛋白质的相对分子质量约为27.4 ku^[20]。本研究首次在大肠杆菌中表达*LsaA*蛋白,利用纯化的重组*LsaA*蛋白替代胞内劳森菌全菌提取物作为包被抗原,以期通过一系列条件的优化,初步建立检测胞内劳森菌抗体的间接ELISA方法,为胞内劳森菌流行病学调查、疫苗免疫效果的评价以及制定有效防控措施提供辅助工具。

1 材料与方 法

1.1 质粒和菌种

原核表达载体pET32a(+)由河南农业大学传染病实验室保存,*E. coli* DH5 α 和BL21(DE3)感受态细胞购自北京华越洋生物。

1.2 主要试剂和材料

限制性内切酶*Nde* I、*Xho* I、T4 DNA连接酶均购自宝生物工程(大连)有限公司;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、氨苄青霉素(Amp)购自生工生物工程(上海)股份有限公司,HRP标记的兔抗猪IgG购自Abcam公司;3,3',5,5'-四甲基联苯胺

(TMB)和3,3-二氨基联苯胺(DAB)显色液购自北京索莱宝科技有限公司;BCA蛋白定量试剂盒和Ni-Agarose Resin购自北京康为世纪生物科技有限公司;胞内劳森菌阳性血清为利用德国柏林格公司胞内劳森菌疫苗免疫胞内劳森菌阴性健康猪,采集血液而制备,胞内劳森菌阴性血清为采集胞内劳森菌阴性健康猪血液分离制备;猪流行性腹泻病毒(PEDV)和猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)阳性血清为PEDV和TGEV阴性健康猪经PEDV CH/ZM-DZY/11株(GenBank登录号:KC196276)和TGEV Purdue株(GenBank登录号:AJ271965)灭活疫苗分别免疫后采集血液分离制备;猪霍乱沙门菌阳性血清为猪霍乱沙门菌(菌株号CVCC2139)灭活疫苗免疫猪霍乱沙门菌阴性健康猪采血分离制备,上述材料均由河南农业大学传染病实验室制备与保存;大肠杆菌(*E. coli*) K88猪血清由辽宁益康股份有限公司惠赠;96孔酶标板购自Corning公司。

1.3 重组表达质粒的构建

根据GenBank中登录的猪胞内劳森菌*LsaA*基因序列(登录号:AF498259),由生工生物工程(上海)股份有限公司优化合成*LsaA*基因,合成基因上游和下游分别带有*Nde*I和*Xho*I限制性内切酶位点,合成基因和pET32a载体分别用*Nde*I和*Xho*I双酶切后经琼脂糖凝胶电泳回收,两者用T4 DNA连接酶连接,连接产物转化入DH5 α 感受态细胞,涂布于含有100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Amp的LB平板。PCR菌落鉴定阳性的克隆进一步测序鉴定,最终得到重组表达质粒pET32a-*LsaA*。

1.4 重组LsaA蛋白的表达与纯化

将鉴定正确的重组质粒pET32a-*LsaA*转化表达宿主菌BL21(DE3)感受态细胞,挑取单菌落于含有100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Amp的LB液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 250 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,培养至OD_{600 nm}为0.8,加入IPTG至终浓度0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,37 $^{\circ}\text{C}$,250 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡诱导培养6 h。离心收集菌体,超声波破碎菌体。按照Ni-Agarose His标签蛋白纯化试剂盒说明书纯化重组目的蛋白,用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白含量,并经SDS-PAGE分析。

1.5 重组蛋白的Western blot 鉴定

将纯化后的重组*LsaA*蛋白转移至硝酸纤维素(NC)膜上,将含有*LsaA*蛋白NC膜切成多条并置于含5%脱脂奶粉的封闭液中4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。分别以猪抗胞内劳森菌阳性血清(1:200稀释)、胞内劳

森菌阴性血清、猪流行性腹泻病毒阳性血清、猪传染性胃肠炎病毒阳性血清、猪霍乱沙门菌阳性血清和大肠杆菌K88猪血清为一抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h,洗膜后用HRP标记的兔抗猪IgG(1:5 000稀释)为二抗,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h,最后用DAB显色试剂盒显色。

1.6 最佳工作浓度与工作条件的确定

1.6.1 抗原最佳包被浓度与血清最佳稀释度的确定 采用方阵滴定法,将纯化的*LsaA*蛋白用包被稀释液稀释为2、4、6、8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 分别加入96孔酶标板内,每孔100 μL ,每个样品设置3个重复,于37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜;次日弃去包被液,用PBST洗涤3次;在相应浓度的抗原孔内加入1:25、1:50、1:100、1:200、1:400稀释的猪抗胞内劳森菌阳性血清和阴性血清,每孔100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5 h,洗涤3次;每孔加入100 μL 1:10 000稀释的兔抗猪IgG-HRP,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5 h,洗涤5次;每孔加入100 μL TMB显色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 显色10 min,每孔加入100 μL 终止液(2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂SO₄)终止显色。在Multiskan Go酶标仪(Thermo)上读取OD_{450 nm}值,比较阳性、阴性血清的OD值,并计算相应的阳性血清(P)与阴性血清(N)的OD值的比值(P/N值),以阳性血清OD_{450 nm}值接近于1.0,且P/N值最大的孔所对应的抗原包被浓度和血清稀释度为抗原最佳包被浓度和血清最佳稀释度。

1.6.2 抗原包被条件和封闭条件的确定 按照“1.6.1”确定的最适包被抗原浓度包被酶标板,按照以下3种方式进行包被:4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h后4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h,然后采用5%脱脂奶和含0.2%吐温-20的PBS做封闭液封闭抗原孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 分别封闭0.5、1、1.5、2 h,随后按照“1.6.1”条件进行ELISA测定,确定最佳抗原包被条件和封闭条件。

1.6.3 酶标抗体浓度及其反应条件的确定 按上述筛选的条件进行试验,将HRP标记的兔抗猪IgG进行1:5 000、1:10 000、1:20 000、1:40 000稀释,在37 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育1、1.5和2 h,比较各组阳性血清和阴性血清的OD_{450 nm}值,以阳性血清OD_{450 nm}值接近于1.0,且最大的P/N值所对应的酶标抗体浓度和反应时间作为酶标抗体的最佳工作浓度和反应条件。

1.6.4 显色时间的优化 按上述确定的条件进行间接ELISA,显色时间分别为10、15、20、25 min,比较阳性血清和阴性血清的OD_{450 nm}值,并计算P/N值,以阳性血清OD_{450 nm}值接近于1.0,且最大的

P/N 值所对应的显色时间为最佳显色时间。

1.7 血清阴阳性临界值的确定

用建立的间接 ELISA 检测 40 份胞内劳森菌抗体阴性血清,计算样品 OD_{450 nm} 值的平均值(\bar{x})和标准方差(s)。根据统计学分析,被检样品的 OD_{450 nm} 值 $\geq \bar{x} + 3s$ 时,判为阳性;当样品 OD_{450 nm} 值 $\leq \bar{x} + 2s$ 时,判为阴性;介于两者之间,判为可疑。

1.8 特异性与敏感性试验

用建立的间接 ELISA 方法检测大肠杆菌、沙门菌、猪流行性腹泻病毒和猪传染性胃肠炎病毒抗血清,同时设立抗胞内劳森菌阴、阳性血清对照,评价方法的特异性。

将胞内劳森菌的抗血清作 1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200 倍比稀释后,用建立的 ELISA 方法检测其中的特异抗体,每个稀释度设 3 个重复,评价方法的敏感性。

1.9 重复性试验

用同一批次重组蛋白包被酶标板,用建立的间接 ELISA 方法测定 5 份胞内劳森菌阳性血清和 5 份阴性血清。另取 3 个批次的重组蛋白包被酶标板进行间接 ELISA 检测,每份血清样品设 3 个重复,对检测结果进行统计学分析。

1.10 符合率试验

收集河南省及周边省份疑似胞内劳森菌感染的发病猪的血清和相应的回肠样品 50 份,分别用建立的间接 ELISA 方法和检测胞内劳森菌病原的 PCR 方法^[6]进行平行检测,并统计分析,比较两者的符合率。

1.11 临床血清样品检测

用所建立的间接 ELISA 方法对河南省不同地区猪场送检的 232 份来自临床有腹泻症状的病猪的血清样品进行胞内劳森菌抗体检测,初步了解河南省不同地区猪群中胞内劳森菌的感染和流行情况。

2 结果

2.1 重组胞内劳森菌 LsaA 蛋白的制备

在 37 °C 下经 IPTG 诱导 3 h 后,pET32a-LsaA/BL21(DE3)表达的重组蛋白相对分子质量约 27 ku,与预期大小一致,应用 Ni-Agarose His 标签蛋白纯化试剂盒能够有效地纯化目的蛋白(图 1A),经 Western blot 检测,该蛋白可以与胞内劳森菌抗血清特异性结合,在预计相对分子质量大小位置出

现特异性条带;而不与胞内劳森菌阴性血清、猪流行性腹泻病毒阳性血清、猪传染性胃肠炎病毒阳性血清、猪霍乱沙门菌阳性血清和大肠杆菌 K88 猪血清发生特异性反应(图 1B)。纯化后的蛋白用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度为 0.38 g · L⁻¹。

2.2 ELISA 抗原和抗体的最佳工作浓度和反应条件

采用方阵滴定法对不同浓度的包被抗原、包被条件、血清最佳稀释度、封闭液和封闭条件、酶标抗体的工作浓度和反应条件,以及显色液显色时间等因素进行优化。结果显示,用 2 μg · mL⁻¹的重组胞内劳森菌 LsaA 蛋白在 37 °C 孵育 1 h,然后 4 °C 包被过夜,用 0.2%吐温-20 的 PBS 在 37 °C 封闭 2 h,待检血清 1:200 倍稀释,与包被抗原 37 °C 下反应 2 h,酶标二抗 1:10 000 倍稀释,与待检血清在 37 °C 下作用 1.5 h,TMB 显色 10 min,ELISA 的 P/N 值最大。

2.3 血清阴阳性判定标准

利用建立的间接 ELISA 方法所测 40 份胞内劳森菌抗体阴性血清的 OD_{450 nm} 值的平均值(\bar{x})为 0.109,其 s 值为 0.065,临界值为 $\bar{x} + 3s = 0.304$ 。因此,当样品 OD_{450 nm} 值 ≥ 0.304 时,判定为阳性;当 OD_{450 nm} 值 ≤ 0.239 时,判为阴性,阴性样品检测结果呈正态分布;当 OD_{450 nm} 值介于两者之间时,判定为可疑。

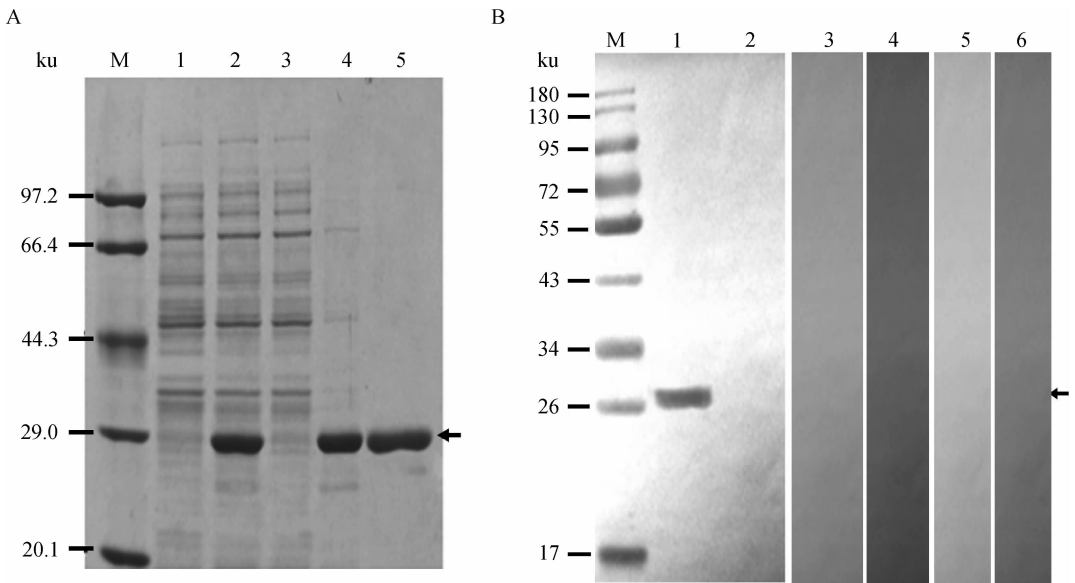
2.4 敏感性和特异性

用建立的方法检测大肠杆菌、沙门菌、猪流行性腹泻病毒和猪传染性胃肠炎病毒的抗血清时,OD_{450 nm} 值均小于 0.239,表明建立的 ELISA 方法与常见猪腹泻病原抗血清无交叉反应,具有良好的特异性。

敏感性的检测发现,当阳性血清做 1:800 倍稀释时,OD_{450 nm} 值为 0.353 ± 0.031,高于 0.304;当 1:1 600 倍稀释时,OD_{450 nm} 值为 0.206 ± 0.043,低于 0.239,所以,该试验能检出的血清抗体效价为 1:800,具有较好的敏感性。

2.5 重复性试验

当用同一批次重组 LsaA 蛋白包被酶标板,重复 3 次检测相同血清样品,或者用 3 个批次的重组蛋白包被酶标板进行间接 ELISA 检测,其变异系数分别为 0.352%~2.752%和 0.877%~3.000%,均小于 5%,批内和批间重复试验的结果表明,重组 LsaA 蛋白作为包被抗原建立的间接 ELISA 具有很好的重复性。



A. 猪胞内劳森菌重组 LsaA 蛋白的表达与纯化(M. 蛋白质低相对分子质量标准;1. pET32a-LsaA/BL21(DE3)未诱导;2. pET32a-LsaA/BL21(DE3)诱导;3. pET32a-LsaA/BL21(DE3)诱导破菌后上清;4. pET32a-LsaA/BL21(DE3)诱导破菌后沉淀;5. 纯化的重组 LsaA 蛋白);B. 重组 LsaA 蛋白的 Western blot 分析(M. 预染的梯度蛋白质相对分子质量标准;1. 重组 LsaA 蛋白与猪抗胞内劳森菌阳性血清反应性;2. 重组 LsaA 蛋白与胞内劳森菌阴性血清反应性;3. 重组 LsaA 蛋白与猪流行性腹泻病毒阳性血清反应性;4. 重组 LsaA 蛋白与猪传染性胃肠炎病毒阳性血清反应性;5. 重组 LsaA 蛋白与猪霍乱沙门菌阳性血清反应性;6. 重组 LsaA 蛋白与大肠杆菌 K88 猪血清反应性)

A. The expression and purification of recombinant *Lawsonia intracellularis* LsaA protein (M. Low molecular weight protein marker; 1. Non-induced pET32a-LsaA/BL21(DE3); 2. Induced pET32a-LsaA/BL21 (DE3); 3. Supernatant of induced pET32a-LsaA/BL21(DE3) lysate; 4. Pellet of induced pET32a-LsaA/BL21(DE3) lysate; 5. Purified recombinant LsaA protein); B. Western blot analysis for recombinant *L. intracellularis* LsaA protein (M. Prestained protein ladder; 1. Reactivity of recombinant LsaA protein against anti-*L. intracellularis* positive serum; 2. Reactivity of recombinant LsaA protein against anti-*L. intracellularis* negative serum; 3. Reactivity of recombinant LsaA protein against anti-porcine epidemic diarrhea virus serum; 4. Reactivity of recombinant LsaA protein against anti-transmissible gastroenteritis virus serum; 5. Reactivity of recombinant LsaA protein against anti-*Salmonella choleraesuis* serum; 6. Reactivity of recombinant LsaA protein against anti-*E. coli* K88 serum)

图 1 重组胞内劳森菌 LsaA 蛋白的 SDS-PAGE 与 Western blot 分析

Fig. 1 SDS-PAGE and Western blot analysis of recombinant *Lawsonia intracellularis* LsaA protein

2.6 符合率试验

利用建立的间接 ELISA 方法对临床疑似胞内劳森菌感染猪的 50 份血清样品进行检测,同时利用针对胞内劳森菌 *LspA* 基因的特异性引物进行 PCR 检测对应的 50 份回肠样品中的胞内劳森菌。结果显示,PCR 检测出胞内劳森菌阳性回肠样品 50 份,ELISA 检测对应猪血清中抗胞内劳森菌抗体亦为阳性,两者的符合率为 100%。

2.7 临床血清样品检测

用所建立的间接 ELISA 方法对河南省不同地区猪场送检的 232 份来自临床有腹泻症状的病猪的血清样品进行胞内劳森菌抗体检测,232 份猪血清样品共有 71 份显示为胞内劳森菌抗体阳性,阳性率在 13.3%~57.1%,平均阳性率为 30.6% (表 1)。

3 讨论

由专性细胞内寄生的胞内劳森菌引起的猪增生性肠炎自 1931 年首次被报道以来,目前已经分布于世界各主要养猪国家,成为集约化养殖场常见疾病之一。肖爱欢等首先报道了猪增生性肠炎在我国的流行^[21]。由于该病临床上导致的猪死亡率不高和受到检测方法的限制,对于该病在我国猪群中的流行情况至今没有全面的了解。目前用于粪便样品和肠道组织中检测胞内劳森菌的各类 PCR 方法和基于血清学的免疫荧光技术,受到排菌期和特定仪器设备的限制,较难实现对临床大量样品的检测。此外,PCR 并不能区分粪便中的胞内劳森菌是否有活性,从粪便中检测到胞内劳森菌并不能说明猪正感染着细菌,检测到胞内劳森菌 DNA 也并不能说明

表 1 河南省部分地区胞内劳森菌血清学调查情况

Table 1 Seroepidemiological survey of *L. intracellularis* infection in partial regions of Henan province

血清来源 Source of serum	样品数 No. of samples	阳性 Positive	阴性 Negative	阳性率/% Positive rate
信阳 Xinyang	24	4	20	16.7
驻马店 Zhumadian	35	9	26	25.7
南阳 Nanyang	56	32	24	57.1
周口 Zhoukou	15	2	13	13.3
商丘 Shangqiu	20	3	17	15.0
新乡 Xinxiang	18	5	13	27.7
洛阳 Luoyang	22	6	16	27.3
平顶山 Pingdingshan	12	3	9	25.0
郑州 Zhengzhou	30	7	23	23.3
合计 Total	232	71	161	30.6

该细菌就是引起腹泻的原因。但胞内劳森菌感染猪后能诱导机体产生特异性抗体,且抗体通常能在机体内存在相当长的时间。LsaA 作为胞内劳森菌的一种表面蛋白,参与细菌的黏附和侵袭,而且在感染动物血浆中可以检测出抗 LsaA 蛋白的抗体^[19]。因此,利用这一蛋白作为检测抗原建立间接 ELISA 检测针对胞内劳森菌的特异性抗体,不仅克服了现有其他检测方法的局限,而且检测结果可以作为胞内劳森菌前期感染的指示。借助大型 ELISA 工作站等平台可以实现大量临床血清样品的快速、准确检测。

胞内劳森菌是一种严格的细胞内寄生细菌,其培养条件要求苛刻,国内尚未见成功分离培养该菌的报道,国外已经有用胞内劳森菌全菌裂解物作为抗原研发的检测胞内劳森菌抗体的试剂盒,但价格昂贵。用该试剂盒检测临床大量血清样品,进行胞内劳森菌血清流行病学调查的成本很高。国内张曙俭和刘磊分别以胞内劳森菌外膜蛋白 OMP 作为抗原建立了 ELISA 方法^[12, 22],但未见后期临床应用的报道。本试验原核表达了胞内劳森菌表面蛋白 LsaA。Western blot 分析结果显示,表达的重组 LsaA 蛋白与胞内劳森菌阳性血清具有良好的免疫反应性,而与胞内劳森菌阴性血清和其他猪腹泻病原抗血清均不发生特异性反应。在此基础上,用纯化的 LsaA 蛋白替代胞内劳森菌全菌裂解物作为包被抗原建立了检测胞内劳森菌抗体的间接 ELISA,所建立 ELISA 方法特异性良好,检测抗 PEDV、TGEV、大肠杆菌、沙门菌阳性血清均无交叉反应;

敏感性也较高,阳性血清 1 : 800 稀释,P/N 值仍在阳性范围;批内和批间重复性试验显示所建立 ELISA 重复性良好。对临床上疑似胞内劳森菌感染猪血清样品的检测结果与胞内劳森菌病原检测结果一致,说明所建方法具有较高的可靠性和准确性,可用于胞内劳森菌感染期的诊断和血清流行病学调查。

在成功建立检测胞内劳森菌抗体间接 ELISA 方法的基础上,本试验对河南省内部分地区猪场送检的临床有腹泻症状猪的血清样品进行了检测。检测结果显示,河南省内被检猪场均存在胞内劳森菌抗体阳性猪,其中河南南阳地区送检样品阳性率最高,高达 57.1%,具体原因尚待进一步确定。通过样品溯源了解到南阳地区送样猪场的育肥猪确实存在排水泥样和带血稀粪,部分猪生长状况不佳的情况。从上述送检样品猪场采集的粪便样品经 PCR 检测也确为胞内劳森菌阳性,因长期便血而衰竭死亡猪的死后剖检也呈现典型的猪回肠炎病变。上述结果也在一定程度上反映了本试验所建立 ELISA 方法用于胞内劳森菌感染情况的血清流行病学调查的可靠性。

4 结 论

成功表达胞内劳森菌表面蛋白 LsaA,并建立基于 LsaA 蛋白的间接 ELISA 方法,该方法检测胞内劳森菌抗体与其他常见猪腹泻病病原抗血清不发生交叉反应,对胞内劳森菌感染阳性猪的检测结果与

PCR 检测病原结果有很高的符合率,敏感性和重复性良好。应用建立的 ELISA 方法对河南省部分地区猪场胞内劳森菌的感染情况进行了血清流行病学调查,结果显示被检地区猪场均存在不同程度的胞内劳森菌抗体阳性,提示养猪业应提高对胞内劳森菌感染的重视度,加强血清学监测,及早采取有效措施控制胞内劳森菌感染在我国的流行。

参考文献(References):

- [1] 王元凯, 严亚贤. 胞内劳森菌与猪增生性肠炎的研究进展[J]. 中国兽医科学, 2008, 38(6): 540-543.
WANG Y K, YAN Y X. Research advance in *Lawsonia intracellularis* and porcine proliferative enteritis [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2008, 38(6): 540-543. (in Chinese)
- [2] 余彦国, 张 瑾. 猪增生性肠炎的研究进展[J]. 畜牧兽医杂志, 2009, 28(3): 33-36.
YU Y G, ZHANG J. Research advance in porcine proliferative enteritis[J]. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2009, 28(3): 33-36. (in Chinese)
- [3] 李 磊. 胞内劳森菌 IPMA 抗体检测方法的建立及猪源性胞内劳森菌在小鼠体内的复制[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
LI L. The establishment of *Lawsonia intracellularis* IPMA antibody detection assay and porcine endogenous copy of *Lawsonia intracellularis* in mice[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2014. (in Chinese)
- [4] 罗 露. 猪胞内劳森氏菌 LAMP/PCR 快速检测方法的建立及应用[D]. 雅安: 四川农业大学, 2015.
LUO L. Construction and application of loop-mediated isothermal amplification and PCR for rapid detection of *Lawsonia intracellularis*[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2015. (in Chinese)
- [5] 马景霞, 杨灵芝, 郭显坡. 猪胞内劳森菌定量 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(2): 74-77.
MA J X, YANG L Z, GUO X P. Development and application of quantitative PCR for detection of *Lawsonia intracellularis*[J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2015, 47(2): 74-77. (in Chinese)
- [6] 董炳梅, 唐 娜, 王金良, 等. 胞内劳森氏菌 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(5): 370-373.
DONG B M, TANG N, WANG J L, et al. Develop-

ment and application of PCR assay for the detection of *Lawsonia intracellularis* [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2011, 33(5): 370-373. (in Chinese)

- [7] 孙 娜, 刘 杏, 陈 强, 等. 胞内劳森菌 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(1): 36-39.
SUN N, LIU X, CHEN Q, et al. Establishment and primary application of PCR method for detection of *Lawsonia intracellularis* [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(1): 36-39. (in Chinese)
- [8] 彭 忠, 涂志勤, 梁 婉, 等. 胞内劳森菌巢式 PCR 检测方法的建立及初步临床应用[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(1): 40-46.
PENG Z, TU Z Q, LIANG W, et al. Development and preliminary application of a nested PCR method for detection of *Lawsonia intracellularis* in feces of pigs [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(1): 40-46. (in Chinese)
- [9] 郑新添, 黄翠琴, 黄其春, 等. 胞内劳森菌 SYBR Green I real-time PCR 检测方法的建立[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2015, 43(12): 29-34.
ZHENG X T, HUANG C Q, HUANG Q C, et al. Establishment of SYBR Green I real-time PCR assay for detection of *Lawsonia intracellularis* [J]. *Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition*, 2015, 43(12): 29-34. (in Chinese)
- [10] 郑新添, 黄其春, 黄翠琴, 等. 基于胞内劳森菌 16S rDNA 基因的 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(11): 1753-1757.
ZHENG X T, HUANG Q C, HUANG C Q, et al. Establishment and application of TaqMan real-time fluorescent quantitative PCR for detection of *Lawsonia intracellularis*[J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2014, 34(11): 1753-1757. (in Chinese)
- [11] 白挨泉, 郭建超, 覃宗华, 等. 胞内劳森菌 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2014, 45(10): 1733-1738.
BAI A Q, GUO J C, QIN Z H, et al. Development of a TaqMan quantitative polymerase chain reaction assay for detecting *Lawsonia intracellularis*[J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2014, 45(10): 1733-1738. (in Chinese)
- [12] 张曙俭. 劳森氏胞内菌的 PCR 检测方法及其抗体间

- 接 ELISA 检测方法的建立与应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- ZHANG S J. Development of PCR and indirect ELISA method for *Lawsonia intracellularis* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012. (in Chinese)
- [13] JONES G F, WARD G E, MURTAUGH M P, et al. Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction[J]. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(10): 2611-2615.
- [14] JENSEN T K, MØLLER K, LESER T D, et al. Comparison of histology, immunohistochemistry and polymerase chain reaction for detection of *Lawsonia intracellularis* in natural porcine proliferative enteropathy[J]. *Eur J Vet Pathol*, 1997, 3(3): 115-123.
- [15] GUEDES R M C, GEBHART C J, ARMBRUSTER G A, et al. Serologic follow-up of a repopulated swine herd after an outbreak of proliferative haemorrhagic enteropathy[J]. *Can J Vet Res*, 2002, 66(4): 258-263.
- [16] KNITTEL J P, JORDAN D M, SCHWARTZ K J, et al. Evaluation of antemortem polymerase chain reaction and serologic methods for detection of *Lawsonia intracellularis*-exposed pigs[J]. *Am J Vet Res*, 1998, 59(6): 722-726.
- [17] BOESEN H T, JENSEN T K, MØLLER K, et al. Evaluation of a novel enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of porcine proliferative enteropathy[J]. *Vet Microbiol*, 2005, 109: 105-112.
- [18] LAWSON G H, MCORIST S, JASNI S, et al. Intracellular bacteria of porcine proliferative enteropathy: cultivation and maintenance *in vitro*[J]. *J Clin Microbiol*, 1993, 31(5): 1136-1142.
- [19] MCCLUSKEY J, HANNIGAN J, HARRIS J D, et al. LsaA, an antigen involved in cell attachment and invasion, is expressed by *Lawsonia intracellularis* during infection *in vitro* and *in vivo*[J]. *Infect Immun*, 2002, 70(6): 2899-2907.
- [20] 陈玉红, 郑新添, 李晓华, 等. 胞内劳森氏菌 *lsaA* 基因克隆与序列分析[J]. 福建畜牧兽医, 2015, 37(6): 18-20.
- CHEN Y H, ZHENG X T, LI X H, et al. Cloning and sequence analysis of *lsaA* gene of *Lawsonia intracellularis*[J]. *Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2015, 37(6): 18-20. (in Chinese)
- [21] 肖爱欢, 谢丽华, 廖承球, 等. 猪胞内劳森氏菌 GXNN 株 4 个抗原性候选基因抗原性分析[J]. 广西农业科学, 2010, 41(1): 62-65.
- XIAO A H, XIE L H, LIAO C Q, et al. Analysis of antigenicity in four antigenic candidate genes of *Lawsonia intracellularis* GXNN strain[J]. *Guangxi Agricultural Sciences*, 2010, 41(1): 62-65. (in Chinese)
- [22] 刘 磊. 猪胞内劳森氏菌抗原候选蛋白的原核表达及间接 ELISA 检测方法的建立与初步应用[D]. 南宁: 广西大学, 2013.
- LIU L. Prokaryotic expression the candidate antigen protein of porcine *Lawsonia intracellularis*, establishment of an indirect ELISA for detection of antibody against *Lawsonia intracellularis* and the preliminary application[D]. Nanning: Guangxi University, 2013. (in Chinese)

(编辑 白永平)