



河北农业大学
HEBEI AGRICULTURAL UNIVERSITY

全日制硕士专业学位（毕业）论文

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

学位申请人：石保秋

指导教师：左玉柱 教授

学位名称：兽医硕士

授予单位：河北农业大学

答辩日期：二〇一九年六月四日

分类号: S855.1
密 级: 公 开

单位代码: 10086
学 号: 20177200835

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

Serotype Identification of *Haemophilus parasitae* Isolated from Hebei Province and Establishment and Application of Indirect ELISA

学位申请人: 石保秋

指导教师: 左玉柱 教授

学位名称: 兽医硕士

授予单位: 河北农业大学

答辩日期: 二〇一九年六月四日

独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得河北农业大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名：石保秋

签字日期：2019年6月11日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解河北农业大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权河北农业大学可以将学位论文的全部或部分内 容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名：石保秋

导师签名：杨晓

签字日期：2019年6月11日

签字日期：2019年6月11日

学位论文作者毕业后去向：

工作单位：

电话：

通讯地址：

邮编：

摘要

副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis* HPS)是猪上呼吸道的一种常在菌,当机体免疫力下降时,会侵入体内并导致以纤维素性浆膜炎、心包炎、关节炎和脑膜炎为特征的全身性疾病,又被称作革拉瑟氏病。该病主要影响 4-7 周龄的保育猪,给养猪业造成了严重的损失。

本研究对 2017 年 9 月至 2018 年 7 月自河北地区收集的疑似副猪嗜血杆菌感染的 107 份病料进行细菌分离,对分离菌进行革兰氏染色、卫星生长现象试验,初步判定是否疑似 HPS。疑似 HPS 的细菌再进行 PCR(聚合酶链式反应)试验,PCR 产物回收测序,在分子水平确定分离细菌为 HPS 以及所属血清型。共分离出 HPS 23 株,其中 1 型 3 株,4 型 5 株,5 型 4 株,7 型 3 株,14 型 4 株,4 株不能定型,分离率 21.49%。比较了不同条件下 HPS 保存时间,结果显示菌落直接在 TSA 划线培养后在 4℃ 冰箱可以保存 8-10 天,TSB 菌液用 30% 的甘油作保护剂,在 -20℃ 可以保存 45-60 天,在 -80℃ 可以保存 90 天以上。

为便于对河北地区 HPS 的流行进行血清学调查,本研究建立了一种 HPS 的间接 ELISA 血清学诊断方法。尽管 HPS 具有多种血清型,但是所有血清型均能合成细胞致死膨胀素(CDT),该毒素包括三个亚基 CdtA、CdtB 和 CdtC。利用 DNASTAR 软件比较发现,CdtC 的免疫原性最好。本研究成功利用大肠杆菌表达了副猪嗜血杆菌致死膨胀素的 C 亚基—CdtC 蛋白,使用专用试剂盒对蛋白进行纯化,纯化后的蛋白经变性处理,经 Western blot 试验鉴定抗原性良好。将纯化的蛋白作为包被抗原,建立了 ELISA 方法并优化了最佳反应条件。最佳工作条件如下:重组 CdtC 蛋白以 1 μg/mL 浓度包被,每孔 100 μL,37℃ 包被孵育 2 小时;用 5% 的脱脂奶粉做封闭液,每孔 200 μL,37℃ 封闭 1 小时;血清稀释比例 1:200,37℃ 孵育 1 小时;酶标二抗 1:10 000 比例稀释,37℃ 孵育 1 小时;显色时间为 10 分钟。用建立的方法检测了 30 份阴性血清,计算出阳性临界值为 0.420,大于该值为阳性;阴性临界值为 0.341,小于该值为阴性;介于两值之间的样品需重测。使用猪常见病的阳性血清检测建立方法的特异性,结果显示建立的方法具有较好特异性。批内、批间重复性试验鉴定所建立方法的重复性良好,批内、批间变异系数均在 10% 以内。使用该方法,检测了 2017 年 9 月至 2018 年 7 月收集的 561 份血清样品,阳性率为 39.9%。

本研究对河北省分离的副猪嗜血杆菌进行了血清型鉴定,并建了对 HPS 的抗体检测的间接 ELISA 方法,为河北省副猪嗜血杆菌的调查与防治奠定基础。

关键词: 副猪嗜血杆菌; 河北省; 血清型; ELISA

Serotype Identification of *Haemophilus parasitae* Isolated from Hebei Province and Establishment and Application of Indirect ELISA

Author: Shi Baoqiu

Advisor: Professor Zuo Yuzhu

Major: Veterinary Medicine

Abstract

Haemophilus parasuis (HPS) is a common bacterium in the upper respiratory tract of pigs. When the body's immunity decreases, it may invade the body and lead to systemic diseases characterized by cellulose serositis, pericarditis, arthritis, and meningitis. And It is also known as Glässer's disease. It affects pigs for 4-7 weeks old weaner and will cause serious losses to the pig husbandry.

In this study, a total of 107 sick pigs and suspected *H. parasuis* infections in Hebei Province were collected from September 2017 to July 2018. The bacteria were isolated, gram staining and satellite growth test were conducted to preliminarily determine whether the isolates were suspected of HPS. The PCR (polymerase chain reaction) test is performed on the bacteria suspected of HPS, and the PCR product is recovered and sequenced, and the isolated bacteria are determined to be HPS and the serotypes at the molecular level. A total of 23 strains of HPS were isolated, including 3 strains of serovar 1, 5 strains of serovar 4, 4 strains of serovar 5, 3 strains of serovar 7 and 4 strains of serovar 14 with 4 strains of untyped, and the isolation rate was 21.49%. Comparing the storage time of HPS under different conditions, the results showed that the colonies could be stored in the refrigerator at 4 °C for 8-10 days directly after TSA scribing. Using the protective agent for the TSB bacteria solution was treated with 30% glycerol, HPS can be stored at -20 °C for 45-60 days and at -80 °C for more than 90 days.

In order to facilitate the serological investigation of the prevalence of HPS in Hebei, this study established an indirect ELISA serological diagnosis method for HPS. Although HPS has multiple serotypes, all serotypes are capable of synthesizing Cytolethal distending toxin (CDT), which includes three subunits CdtA, CdtB and CdtC. Compared through DNASTAR software, CdtC has the best immunogenicity. In this study, the Cytolethal distending toxin C subunit CdtC protein of *Haemophilus parasuis* was expressed by *E. coli*. The protein was purified by a special kit. The purified protein was denatured and identified as having good antigenicity by Western blot. Using the purified protein as a coating antigen, an ELISA method was established and optimal reaction conditions were optimized. The optimal working conditions were as follows: recombinant CdtC protein was coated at a concentration of 1 µg/mL, 100 µL per well, and incubated at 37 °C for 2 hours; 5% skim milk powder was used as a blocking solution, 200 µL per well, and blocked at 37 °C for 1

hour; The serum dilution ratio was 1:200, and incubation was carried out for 1 hour at 37 ° C; the enzyme-labeled secondary antibody was diluted 1:10000, and incubated at 37 ° C for 1 hour; the color development time was 10 minutes. Thirty samples of negative serum were detected by the established method, and the critical value of positive was calculated to be 0.420, which was positive when the value was higher than that. The critical value of negative is 0.341, less than that which is negative. Samples between the two values should be retested. The specificity of the established method was tested using positive serum of common pig disease, and the results showed that the established method has better specificity. The method established in the batch and batch repetitive test identified the method with good repeatability, and the intra and inter-assay coefficient of variation was within 10%. Using this method, 561 serum samples collected from September 2017 to July 2018 were tested, with a positive rate of 39.9%.

In this study, the seroserovar identification of HPS isolated from Hebei Province was carried out, and an indirect ELISA method for antibody detection of HPS was established. This lays the foundation for the investigation and prevention of HPS in Hebei Province.

Key words: *Haemophilus parasuis*; Hebei Province; serotype; ELISA

缩写词表

LIST OF ABBREVIATION

英文缩写	英文全称	中文全称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
bp	Base pair	碱基对
CFU	Colony forming units	菌落形成单位
d	Day	天
EB	Ethylene bromide	溴化乙锭
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
g	Gram	克
h	Hour	小时
HPS	Haemophilus parasuis	副猪嗜血杆菌
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IPTG	β -D-thiogalactopyranoside	异丙基硫代半乳糖苷
kDa	Kilodalton	千道尔顿
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
mg	Milligram	毫克
min	Minute	分钟
mL	Milliliter	毫升
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
NC 膜	Nitrocellulose membrane	硝酸纤维膜
OD	Optical density	光密度
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
r/min	Rotation per minute	每分钟转速
s	Second	秒
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide gelelectrophoresis	SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳
TSA	Tryptic soy agar	胰蛋白大豆琼脂
TSB	Tryptic soy broth	胰蛋白大豆肉汤
μ g	Microgram	微克
μ L	Microliter	微升

目 录

1 引言	1
1.1 副猪嗜血杆菌的概述.....	1
1.1.1 HPS 的培养及生化特性	1
1.1.2 HPS 血清型的研究进展	1
1.1.3 HPS 的临床症状	4
1.1.4 HPS 的致病机理	4
1.1.5 HPS 的诊断	5
1.1.6 HPS 的防控	6
1.2 细胞致死膨胀素综述.....	6
1.2.1 CDT 的结构和各亚基功能.....	7
1.2.2 CDT 的毒性作用。	7
1.3 研究的目的是和意义.....	7
2 材料与方法	8
2.1 材料	8
2.1.1 病料	8
2.1.2 菌株	8
2.1.3 实验用血清.....	8
2.1.4 主要培养基、酶、耗材与试剂盒.....	8
2.1.5 实验所用培养基及溶液的配制.....	9
2.1.6 试验相关设备、仪器.....	10
2.2 方法	11
2.2.1 副猪嗜血杆菌河北株的分离与血清型鉴定	11
2.2.2 HPS 细胞致死膨胀素 C 亚基 (CdtC) 全基因的扩增与分析.....	13
2.2.3 CdtC 优势抗原表位的扩增及重组表达质粒的构建	14
2.2.4 重组质粒 pET-32a-CdtC 的表达及纯化与鉴定	17
2.2.5 血清中 HPS 的 IgG 抗体间接 ELISA 检测方法的建立	18
3 结果	21
3.1 副猪嗜血杆菌河北株的分离与血清型鉴定.....	21
3.1.1 菌落特征及油镜下细菌形态.....	21
3.1.2 “卫星现象”实验结果	22
3.1.3 PCR 血清型鉴定结果	22
3.1.4 副猪嗜血杆菌的保存.....	23
3.2 HPS 的 CdtC 基因序列分析.....	23
3.2.1 HPS 的 CdtC 扩增结果.....	23
3.2.2 pMD19T-CdtC 质粒 PCR 鉴定	23
3.2.3 基因序列测定及分析.....	24

3.3 重组表达质粒 pET-32a-CdtC 的构建及鉴定.....	25
3.3.1 HPS- CdtC414 优势抗原表位的扩增及克隆.....	25
3.3.2 重组质粒 pMD19-T- CdtC414 的双酶切.....	26
3.3.3 CdtC414 基因的测序结果.....	26
3.4 重组质粒 pET-32a-CdtC 的构建及鉴定.....	26
3.4.1 重组质粒 pET-32a-CdtC 的构建.....	26
3.4.2 重组质粒 pET-32a-CdtC 的双酶切鉴定.....	26
3.5 pET-32a-CdtC 的原核表达及重组蛋白的鉴定.....	27
3.5.1 pET-32a-CdtC 的原核表达.....	27
3.5.2 重组蛋白的可溶性检测.....	28
3.5.3 重组蛋白的纯化.....	28
3.5.4 重组蛋白的 Western blot 鉴定.....	29
3.5.5 蛋白浓度的测定.....	29
3.6 ELISA 检测方法条件的确定及优化.....	29
3.6.1 重组抗原最佳包被浓度和血清的最佳稀释比例.....	29
3.6.2 抗原最佳包被时间的确定.....	30
3.6.3 最佳封闭液的确定.....	30
3.6.4 最佳封闭时间的确定.....	31
3.6.5 一抗最佳作用时间的确定.....	31
3.6.6 酶标抗体最佳稀释倍数.....	31
3.6.7 二抗最佳反应时间的确定.....	31
3.6.8 底物最佳显色时间的确定.....	32
3.6.9 阴阳性临界值判断.....	32
3.6.10 特异性试验.....	33
3.6.11 重复性实验.....	33
3.6.12 ROC 曲线分析.....	34
3.6.13 临床样品的检测.....	34
4 讨论.....	36
4.1 HPS 的分离鉴定.....	36
4.2 CdtC 基因优势抗原表位区的克隆及原核表达.....	36
4.3 间接 ELISA 检测方法的建立.....	37
5 结论.....	38
参考文献.....	39
在读期间发表的学术论文.....	46
作者简介.....	47
致谢.....	48

1 引言

1.1 副猪嗜血杆菌的概述

副猪嗜血杆菌（HPS）是属于巴斯德菌科的一种不运动，多形性的革兰氏阴性杆菌。该菌引起的疾病叫作副猪嗜血杆菌病。1910年，Glässer首次在文章中描述了猪的这种具有胸腔腹腔出现纤维素性炎症、心包积液增多浑浊、关节肿大而且有神经症状等特征的疾病，因此该病又被称作格拉瑟氏病（Glässer's disease），到1922年才由Schermer和Ehrlich首次分离到该菌^[1]。根据当时研究得出的该菌培养所需生长因子的特性，先后被命名为猪流感嗜血杆菌（1931年）和猪嗜血杆菌（1943年）^[2]。1969年Biberstein和White发现这种细菌的生长仅依赖V因子（烟酰胺腺嘌呤，NAD），并最终根据国际惯例命名为副猪嗜血杆菌^[3]。

1.1.1 HPS 的培养及生化特性

HPS是一种无鞭毛、无芽孢、不运动、有荚膜形态多样性的革兰氏阴性杆菌，有螺旋丝状、球杆状、短杆状、长杆状等多种形状^[4]，但是荚膜在体外培养过程中容易丢失^[5]。该菌对培养基要求较高，并且依赖V因子（NAD），一般的培养基上不生长^[3]，但是最近有人分离到不严格依赖V因子的菌株^[6]，这对之前报道的该菌严格依赖V因子提出挑战。研究表明加入5%的血清和终浓度为1 μg/mL NAD的TSA固体培养基和TSB液体培养基是最适合HPS生长的培养基之一，接种在TSA培养基上，37℃培养18-24小时，可形成凸起、圆形、光滑、湿润、白色半透明的露珠样、针尖大小的菌落，随着培养时间的延长，菌落直径可增大到3-4 mm，在TSB液体培养基中37℃，180 r/min震荡培养16-18小时活菌数达到最大值^[7]。HPS不在血液平板培养基上生长，可在巧克力培养基上缓慢生长。在血液琼脂培养基上，把金黄色葡萄球菌与副猪嗜血杆菌交叉划线，倒放在37℃的培养箱，经过24-36小时，会观察到金黄色葡萄球菌周围会出现呈“卫星现象”生长的HPS，且不溶血^[8]。金黄色葡萄球菌在生长的过程中可以分泌NAD，并向周围扩散，满足了HPS的生长需求。HPS最适合生长的温度为37℃-38℃，二氧化碳含量3%-5%，有氧条件下生长速度比无氧环境下生长速度略快^[9]。该菌生长速度缓慢，并且十分娇嫩，所以在临床上分离有一定的困难，要选择未经药物治疗新鲜的病料进行分菌，即使这样可能被其他生长速度较快的细菌掩盖而不能成功分离纯化^[10]。生化结果显示，HPS的生化反应较弱，对糖类发酵不稳定，可以把麦芽糖、葡萄糖、果糖、半乳糖、蔗糖发酵，接触酶试验和硝酸盐还原试验阳性^[11, 12]，蜜三糖发酵试验阴性，该项生化指标也是区分与其亲缘关系较近的吡啉放线杆菌的一项指标，吡啉放线杆菌可以发酵蜜三糖并且生成吡啉^[13]。

1.1.2 HPS 血清型的研究进展

副猪嗜血杆菌存在多种血清型，并且自然界中还存在无法分型的菌株，因此人们尝试多种分型方法去研究HPS。总的分型方法大致可以分为两种，一种是传统的血清学分型方法，一种是新

兴分子生物学分型方法。

1.1.2.1 血清学分型

经过多名科研工作者的努力,用不同的方法证实了 HPS 有多个血清型存在,分型的方法也有很多种,较常用的有琼脂免疫扩散试验(GD)、协同凝集(GA)、间接血凝试验(IHA)等几种方法。目前公认的血清型至少是 15 种,是 1992 年 Kielstein 等建立的 KRG 方法区分的,但是仍然有三分之一左右的分离株不能区分血清型^[14],随着分离株增多,该方法不可分型的比例不断增高^[15]。后来的 IHA 和 GA 提高了特异性,降低了不可分型的比例^[16]。近几年有学者 Kate J. Howell 等人和 Jia A 等人基于副猪嗜血杆菌的 15 个血清型的基因座的变异特点设计引物建立多重 PCR 快速分子血清型分型方法,比 IHA(间接血凝试验)更快,更灵敏,不用购买 15 种标准菌株,制备标准血清^[17, 18]。根据研究,15 种 HPS 的血清型的毒力存在一定的差异。通过 SPF 猪接种 15 种血清型的 HPS 证实 3 型、6-9 型、11 型是无毒力菌株;2 型、4 型、15 型属中等毒力菌株;1 型、5 型、10 型、12 型、13 型是强毒力菌株^[14, 19]。HPS 的流行病学主要调查的就是各地流行的血清型和发病日龄。HPS 可以引起 2 周龄到 4 月龄的猪发病,主要是影响 4-7 周龄保育猪。国内各地区流行血清型存在一定差异^[20-23],世界各国的流行血清型也不尽相同。在美国以 4 型和不可分型的菌株最为流行^[24],西班牙以 4 型和 5 型最为流行^[25],丹麦和澳大利亚主要是血清 5 型和 13 型^[26, 27]。从全国范围来看我国主要是 4 型、5 型、13 型为主,其次是 14 型和 12 型^[7]。

1.1.2.2 分子生物学分型

传统的血清学分型方法存在一定的局限性,自然界中约有 20%-40%的菌株无法区分血清型,为了提高分型的特异性和敏感性,研究者把现在分子生物学引用到副猪嗜血杆菌的分型中。目前主要有,肠杆菌科基因间重复一致序列 PCR(ERIC-PCR),限制性内切酶指纹图谱(REF),限制性片段长度多态性 PCR 分型法(RELP-PCR),多位点序列分型(MLST),Hsp60 基因分型法,随机扩增多态性 DNA 分型法(RAPD),有外膜蛋白(OMP)指纹图谱法,。

肠杆菌科基因间重复一致序列 PCR 既 ERIC-PCR,该方法利用肠道细菌基因间的保守性较高的重复序列设计引物,扩增相邻两段 ERIC 之间的 DNA。细菌不同,基因组上的保守序列的数不同,扩增后呈现指纹图谱也不同^[28]。在 2000 年, M.Rafiee 等人建立了副猪嗜血杆菌的 ERIC-PCR 分型方法^[29],对已经明确血清型的 15 中血清型的标准菌株进行扩增,结果每个血清型均有其唯一的指纹图谱,而后又对澳大利亚分离 14 株 HPS、3 个爆发副猪嗜血杆菌猪场分离到的 12 株分离菌和两个较远的猪场分离株进行扩增,结果从 3 个发病猪场分离的 12 株 HPS 具有相同的指纹图,但不同于 15 个标准菌株和 2 个远缘菌株,证明发病猪场菌株同源性很高。学者 Oliveira 等人^[30],在 2003 年对北美 15 个猪场分离的 98 株副猪嗜血杆菌运用 ERIC-PCR 结合传统血清学进行分型比较,结果鉴定出 34 个基因型,用传统方法血清学鉴定的血清 4 型证实有 12 个基因型,传统方法血清学不可分型的血清型具有 18 个基因型,实验结果证实 ERIC-PCR 具有更高的鉴定血清型的能力。我国学者李鹏等对我国东南地区分离的 HPS 进行了 ERIC-PCR 鉴定,结果 111 株分离菌可以分成 23 种指纹图谱^[31]。2007 年朱必凤等对 6 株 HPS 进行 ERIC-PCR 分型鉴定,结果

鉴定出 4 个基因型^[32]。贾爱卿等、彭昊等分别对广东、广西地区的 HPS 进行了 ERIC-PCR 分型鉴定^[33,34]。该方法可以把血清学相同的血清型区分成不同的 ERIC 型,更有利于分离菌株的描述和流行病学调查。

限制性内切酶指纹图谱(REF)是指用限制性内切酶酶切基因组,酶切产物利用 SDS-PAGE 电泳,在对电泳带型分析。Smart 等在 1988 年把这种方法用于 HPS 的分型研究^[35],对加拿大不同来源的 69 株 HPS 进行酶切分析,发现有 24 株具备相似的图谱,其他菌株大致可以分成 13 组酶切图谱,大部分 SPF 猪分离出带有相同酶切指纹图谱的 HPS 菌株,其他猪场的分离株酶切指纹图谱呈现出多样性,患病猪的不同部位分离株具有相似的指纹图谱但有别于健康猪分离菌的指纹图谱。在 1993 年,Smart 等用此方法对 HPS 进行调查,得出致病株、鼻腔分离株、疫苗株的酶切指纹图谱不同^[36]。

在细菌分型方法中,还通过 PCR 扩增多个管家基因的等位基因进行序列比较,分析菌株变异规律的分型方法既多位点序列分型(MLST)^[37]。Olvera 等根据副猪嗜血杆菌 *mdh*、*6pgd*、*atpD*、*g3pd*、*frdB*、*infB*、*rpoB* 等 7 个管家基因的序列多样性,建立了 HPS 的 MLST 分型方法,对 11 个标准菌株和 120 个分离株进行分型,结果显示每个基因都存在数目不同的多个等位基因,以 *6pgd* 基因最明显^[38]。该方法需要大量测序,所以成本比较昂贵,但是随着测序速度的加快和成本的降低,分析软件的发展,MLST 将成为细菌的常规分型方法之一。

还有一种将 PCR 方法与限制酶酶切和电泳分析相结合的分型方法,既限制性片段长度多态性 PCR 分型法(RELP-PCR)。Redondo 等人在 2003 年建立了以副猪嗜血杆菌的转铁蛋白的基因 *tbpA* 为研究对象的分型方法^[39],并对 15 个标准血清型和多株野外分离株进行该方法分型,结果 15 个标准血清型被分成 12 个基因型,野外分离的 HPS 均可用此方法分型。Yue-Feng, Chu 等人以副猪嗜血杆菌的外膜蛋白 A 基因(*OpmA*)为研究对象对 HPS 进行 RELP-PCR 分型,把 HPS 分为 8 种基因型^[40]。2009 年李军星等人以 *tbpA* 为基础的 PCR-RFLP 的分型方法研究了我国 6 个省市的 HPS 基因型,结果显示我国至少存在 15 个 RFLP 基因型,并且以 DBN、ABN、DBP 为主要血清型^[41]。

2006 年,学者 Olvera 等人建立了以副猪嗜血杆菌的 60kDa 热休克蛋白(Hsp60)基因的部分序列为研究对象的分型方法^[42]。通过建了 Hsp60 基因和部分 16s RNA 的序列比对,并且与 ERIC-PCR 指纹图谱分型方法进行比较,结果发现 Hsp60 基因分型作为 HPS 流行病的调查更加可靠。Dijkman 等人在 2012 年发表了关于对副猪嗜血杆菌血清学分型、60kDa 热休克蛋白(Hsp60)基因序列,肠杆菌科重复基因间共有序列(ERIC)PCR 和多重 PCR 用于检测 *vtA* 毒力相关三聚体进行基因分型的比较,共测出 46 种不同的 Hsp60 序列类型,使用 98% 序列相似性作为分组标准,分成 22 个独立的 Hsp60 序列簇,指出 HPS 血清型与 Hsp60 序列类型或 ERIC-PCR 分型之间没有相关性,然而,ERIC-PCR 和 Hsp60 序列分型都适合作为副猪嗜血杆菌流行病学研究的指标^[43]。

Ruiz,A 等在 2001 年^[44],对来自发病猪和健康猪分离的 HPS 的 OMP 和 DNA 谱进行比较,发现从发病猪全部分离的菌株比具有比从呼吸道分离的菌株更均匀的 OMP 和 DNA 谱,在同一基因群中菌株表现出不同的 OMP 谱,说明 OMP 图谱可以用于 HPS 分型。

1.1.3 HPS 的临床症状

HPS 临床症状先是反应迟钝、抑郁、食欲不振和体重减轻,随着病情加重,被毛粗糙、呼吸困难、部分皮肤发紫,有的尖叫、侧卧做划水样,最终死亡。剖检可见典型的“绒毛心”和胸腔腹腔积液,有的可见关节积液^[45],耐过猪易形成僵猪。该病易发生在免疫抑制病后,猪只体质下降继发感染。最近有报道在猪群爆发蓝耳病、伪狂犬病、猪瘟、圆环等免疫抑制病的情况下,HPS 的分离率明显增高^[46]

1.1.4 HPS 的致病机理

细菌引起的机体发病是一个复杂的过程。首先进入宿主,逃避宿主的免疫清除机制,在宿主体内定植,生长繁殖,引起宿主机体损伤。HPS 是猪上呼吸道的常在菌,一般不引起发病,属条件致病菌^[1],这和 HPS 的血清型和猪机体的免疫力有关系。已鉴定的 15 种血清型的毒力经 SPF 猪攻毒试验验证^[14],不同血清型,毒力不同。学者 Vahle 等用正常仔猪和初乳剥夺仔猪作为试验对象,分不同的时间剖检试验猪与对照猪,进行细菌分离和组织病变观察。在接种副猪嗜血杆菌 12 小时后,试验猪无临床症状体温略高,剖检组织病理变化轻微,胸腔、腹腔和心包积液浑浊,在气管和鼻窦中分离出该菌,鼻窦和气管粘膜损伤;攻菌 36 小时,试验猪三分之一体温明显升高,四肢无力,剖检可见胸腔、腹腔和心包等部位的积液中出现少量纤维蛋白凝块,四肢关节因纤维蛋白脓性渗出物而肿胀,从试验猪的血液中分离到 HPS,推测 HPS 在接种后 12-36 小时之间进入血液;攻菌 84 小时试验猪出现死亡,108 小时剖检试验猪,胸腔、腹腔和心包等组织被大量纤维蛋白渗出物覆盖,关节明显肿胀,扩展到周围的软组织,并且全身各组织均可以分离到试验菌;证实了 HPS 首先定植鼻粘膜进入鼻窦和气管并造成黏膜损伤,从而入侵到血液,形成菌血症,到达全身各组织^[47, 48]。使用免疫组化技术和透射电子显微镜技术,发现在接种的早期阶段,有菌株存在鼻窦和气管的中下部,表明细菌的定植引起化脓性鼻炎,病变处纤毛脱落以及鼻腔和器官粘膜细胞急性肿胀,然而,鼻腔中却未检测到细菌抗原,但在感染猪的扁桃体中检测到了副猪嗜血杆菌抗原。Amano 等人用副猪嗜血杆菌攻击 SPF 猪 16 个小时后,在血液中可以检测出内毒素并且可以分离到 HPS,与 Vahle 等人的研究结果相符,在攻菌 24 小时后,试验猪出现以血糖降低和白细胞减少为特征的血液变化,并且出现凝血功能紊乱,导致组织血管内出现血栓。更为严重的是内毒素在猪临死前急速上升,推测,血栓的形成和内毒素的升高加速了试验猪的死亡^[49]。研究发现,从健康动物的鼻腔中分离的菌株可被猪肺泡巨噬细胞(PAM)有效地吞噬,而从全身感染中分离的菌株对这种吞噬作用具有抗性^[50],这说明致病的 HPS 可以有效的逃避肺巨噬细胞(PAM)的清除作用。肺泡巨噬细胞(PAM)在肺的天然免疫系统中起重要作用,并且是抵抗哺乳动物呼吸道病原体侵袭的重要防线。它吞噬、杀死病原,也能释放细胞因子和趋化因子来调控肺部的炎症反应^[51]。研究表明 HPS 的荚膜以及三体转运蛋白 VtaA8 和 VtaA9 等与其抗吞噬作用有关^[52]。HPS 还可以合成一些蛋白,具有粘附细胞的功能,帮助其定植入侵细胞。脂寡糖(LOS)介导副猪嗜血杆菌与猪脑微血管内皮细胞(PBMEC)的粘附,进而引起脑膜炎^[53, 54]。细菌通过粘膜进入机体,首先应该突破机体的粘膜防御系统,在粘膜防御系统中 IgA 是重要的抗体,IgA 可以和病原结合,阻断病原和机体受体相互作用^[55],HPS 的培养液上清中存在具有 IgA 切割活性的

蛋白酶类^[56]，然而，关于编辑 IgA 蛋白酶的基因有待进一步研究。研究表明，HPS 可以产生唾液酸酶，可以降低黏蛋白的黏性，清除唾液酸，干扰宿主的防御系统，暴露细菌攻击机体的受体^[57-58]。补体系统是血液中天然免疫的重要成分，可以杀灭进入血液循环的病原菌^[59]，但是有一些病原可以逃避血液中的补体作用，在血液中存活^[60]。有研究发现从全身感染的猪身上分离出来的 HPS 对血清中补体的杀灭作用不敏感，说明毒力较强的 HPS 可以逃避血清的补体作用^[61]，最近有研究证明 HPS 中的细胞致死膨胀素和血清抗性有关^[62]。

1.1.5 HPS 的诊断

该病的诊断可以依据该病的流行特点，主要临床症状及解剖症状做出初步的判断，再结合实验室诊断技术，最终对该病确诊。

首先根据发病日龄，散发还是集中发病，是否出现发热，食欲不振甚至废绝，关节肿胀，跛行，呼吸困难，严重腹式呼吸，尖叫疼痛等症状^[63]，有的慢性感染表现为被毛粗乱、消瘦。剖检可见胸腔积液增多，内有胶冻样物质，可见心外膜有纤维素样渗出物包裹，出现典型的“绒毛心”，肺脏水肿，表面可见大量的纤维蛋白性渗出物，甚至粘附在胸壁上。剖检肿大的关节腔，可见积液或者胶冻样物质^[64-66]，但是要确诊该病还得结合实验室诊断技术。

1.1.5.1 病原的分离鉴定

副猪嗜血杆菌的成功分离培养，常作为一个鉴定该病标准，但该细菌非常脆弱，在外界容易死亡^[67]。猪是该菌的唯一天然宿主，从患病猪或感染猪的肺部及分泌物可以分出该菌^[68,69]，细菌分离的原料最好选取具有关节肿大和呼吸困难等典型症状并且在生前未经抗生素治疗过的，发病急性期的猪，具有纤维素性浆膜炎病变猪的体液样品，具有现神经症状猪的脑脊液样品均可以用于副猪嗜血杆菌的分离。病料收集后不易长时间放置或者冷冻保存，以防副猪嗜血杆菌死亡。病料应尽快送去检测，若无法及时送出，可在 4 摄氏度冰箱保存，不超过 48 小时，送检的途中防止温度过高或者过低。如果需要更长时间才可以送检可以取小块病料接种于液体转移培养基，再进行 HPS 的分离^[70]。还可以采用平板稀释技术来提高分离效率^[71]。培养基最好选用添加了血清和 NAD 的 TSA 培养基或者 TSB 培养基，巧克力琼脂培养基也可以用于副猪嗜血杆菌的分离，但是生长速度较慢。为了提高副猪嗜血杆菌的分离率，可以在培养基加入抑制革兰氏阳性菌生长的药物，如杆菌肽和林可霉素等^[72,73]。挑选疑似菌落进行“卫星现象”鉴定^[74]，结合革兰氏染色镜检观察。由于 HPS 的本身特点，病原菌分离率比较低。

1.1.5.2 分子生物学诊断

分子生物学诊断主要是指 HPS 的 PCR 检测技术。PCR (Polymerase Chain Reaction) 是聚合酶链式反应的简称，由于副猪嗜血杆菌难分离，临床上许多病例不能通过分离病原来确诊，因此，就需要一种更加快速并且可靠的检测技术。有学者根据 HPS 的 16S rRNA 序列设计了一对特异性引物，建立了 PCR 诊断方法^[75]。在细菌的 16S rRNA 上存在多个保守区和可变区，并根据保守区设计引物，以扩增大多数细菌的 16SrRNA 片段；依据细菌的 16S rRNA 可变区设计引物来区分不同的细菌^[76]。PCR 方法的建立大大提高检测的灵敏度，最低检测的细菌浓度可低至 100 CFU/mL，目的片段大小为 821 bp，但是该方法容易出现假阳性。吡咯放线杆菌与其亲缘关系较近^[13]，PCR 方法易把呼吸道中的吡咯防线杆菌误诊为副猪嗜血杆菌，后来经另一学者改进，弥补了上述缺点

[77]。2004年 Jung 等建立巢式 PCR 方法对 HPS 诊断,把最低检测浓度降到 3 CFU/mL,提高了灵敏度[78],2010年 Turni 等利用 *infB* 为目的基因建立了实时 PCR 检测 HPS,特异性和灵敏度有所提高[79]。2017年我国制定了以细菌分离、巢式 PCR、实时荧光 PCR 等方法检测副猪嗜血杆菌的国家标准[80]。

1.1.5.3 血清学诊断

血清学诊断主要是通过检测血清中的抗体,来反映出 HPS 的感染情况以及分析抗体水平。目前主要有酶联免疫吸附试验(ELISA)、间接血凝试验(IHA)、新型微量凝集试验抗体检测方法(MAT)和补体结合试验(FC)。在 2001 Takahashi, K 等用补体结合试验评价了以 HPS 血清 2 型和 5 型为抗原的二价疫苗的效果[81],间接血凝试验被证实是一种高度敏感、高度特异性的检测方法[16],该方法可以作为 Kielstein-Rapp-Gabrielson (KRG) 分型的补充[82]。酶联免疫吸附试验是目前应用较多的一种血清抗体检测方法,只是包被的抗原不同,有的利用灭活的全菌体[83],有利用菌体超声破碎处理后的产物致敏醛化红细胞的[84],有使用荚膜多糖作为抗原,建立间接血凝试验(IHA)和间接 ELISA 两种方法[85],也有利用外膜蛋白建立 ELISA 方法的[86],还有一种使用 4 型、5 型、12 型和 13 型 HPS 作为抗原建立的新型微量凝集试验抗体检测方法,这四种方法之间存在轻微交叉反应,但都在可控范围内[87]。

1.1.6 HPS 的防控

副猪嗜血杆菌是条件致病菌,在机体免疫力低下的时候容易发病,首先应该加强饲养管理,关注猪舍的空气新鲜度,氨气浓度,温度以及猪群密度,给猪只提供良好的生存环境。在断奶、转群、注射疫苗前,猪群补充电解维生素,降低应激反应。猪群做好猪瘟、蓝耳、伪狂犬、圆环等疾病基础免疫,防止因发生此类疾病而发生 HPS[88]。疫苗接种也是预防该病的有效措施,但是疫苗的效果差异较大,这可能与 HPS 血清型较多有关系,根据当地的流行病学,初步断定当地的流行 HPS 血清型,再针对性的选择疫苗菌株,如 2006 年蔡旭旺利用 HPS4 型和 5 型研制了灭活疫苗[7],Takahashi K 在 2001 年用 HPS 的 2 型和 5 型研制二价灭活疫苗[89],为了更加有针对性,有的研制了自家疫苗,可以保护自家猪群[90]。为了能研究一种对所有血清型的 HPS 感染都具有保护力的疫苗,亚单位疫苗开始被研究,2009 年 Zhou 等选用 HPS 血清 5 型的几种外膜蛋白以小鼠作为动物模型,研究了外膜蛋白的免疫原性,并证实所选外膜蛋白作为抗原可以保护小鼠不被 HPS 感染[91]。最近有学者用猪作为实验动物,发现 Zhou 等人所选的外膜蛋白不能提供有效的保护[92],这也提示我们在研究亚单位疫苗的时候,最好选择本动物作为研究对象。对于已经发病的猪群治疗,要进行细菌分离,经过药敏试验选用针对性的药物,防止滥用抗生素,使细菌产生耐药性,近几年对 HPS 的耐药性报道不断增多[93],急需合理用药。

1.2 细胞致死膨胀素综述

细胞致死膨胀素(CDT)和外膜蛋白(OMP)、脂多糖(LPS)、荚膜多糖、神经氨酸酶等一样是 HPS 的毒力因子之一。2012 年, Zhang 等人利用自然转化方法构建了缺失了 CDT 基因的 SC096 菌株,证明了该毒素与血清抗性和细菌粘附有关[62]。CDT 是一种具有核酸酶活性的热不

稳定的 AB2 型毒素，该毒素首先在大肠杆菌和弯曲杆菌中被发现^[94, 95]，后来又陆续在其他革兰氏阴性菌中被发现，如嗜血杆菌、放线杆菌、肝螺旋杆菌等都发现 CDT^[96, 97]。

1.2.1 CDT 的结构和各亚基功能

完整的 CDT 是由三个亚基 CdtA, CdtB 和 CdtC 组成的三聚体复合物，各个亚基由三个连续相邻的 cdtA、cdtB 和 cdtC 三个基因编码，并且在 HPS 的基因组中存在两组 CDT 的编码基因，并且两组基因具有高同源性^[97]。有些细菌中 CDT 并不完整，只有 CdtB，而没有另两个亚基^[98]，各个细菌中，每个亚基的大小也是不同的。根据该毒素的三聚体结构，学者引入了 AB 型毒素的概念，CdtB 亚基代表有催化活性“A”单位，而 CdtA 和 CdtC 共同构成辅助作用的“B”单位^[99, 100]。已经解析的 CDT 晶体结构表明，CdtB 亚基具有 DNase I 家族结构特点，并且存在与哺乳动物 DNase I 活性位点一致的结构域，亚基 CdtA 和 CdtC 是具有和植物蓖麻毒素相似的分子结构凝集素型分子^[101]，CdtB 在三者中起到主要的作用，进入细胞，使细胞膨胀死亡，CdtA 和 CdtC 起到协助 CdtB 进入细胞的作用^[102]。

1.2.2 CDT 的毒性作用。

CDT 对细胞主要毒性作用就是致细胞周期阻滞、细胞膨胀和细胞凋亡^[103]，已有研究表明体外提纯 CDT 可以导致多种细胞膨胀^[104]，CDT 具有 DNase I 活性，可以导致 DNA 双链断裂^[105]。在细菌的致病作用中，CDT 也起到了重要的作用，痢疾杆菌中的 CDT 可以导致小鼠水样腹泻或严重的肠道疾病，杜克雷嗜血杆菌的 CDT 可以导致家兔皮肤溃疡^[106]；2008 年研究发现肝螺旋杆菌 CDT 可以诱导肝炎导向肝癌^[107]；空肠弯曲菌中的 CDT 可导致小鼠消化道持续感染，加重盲肠粘膜炎症反应^[108]；CDT 还可以通过抑制受损细胞的增殖来干扰新的肉芽组织和毛细血管的发育，从而延缓软下疳的愈合。还可以破坏牙周组织的生理平衡，引起牙周炎^[109]。2012 年陈西^[110]原核表达了 HPS 的 CDT 并对其毒性及致病性进行研究，结果证实 CDT 可以损伤豚鼠组织，在初乳缺乏仔猪腹腔注射 20 mg，可以复制出典型的革拉瑟氏病的病理变化：心包积液，胸腔积液和腹水，肺部纤维蛋白渗出和胸壁粘连，肝脏粘附在腹壁上。2015 年刘佳^[111]通过自然转化法获取了 HPS 的 CDT 基因缺失株，比较了野生菌株和基因缺失菌株对仔猪的致病作用。结果表明，基因缺失株毒力下降，证明 CDT 对仔猪有一定致病作用。

1.3 研究的目的是和意义

河北省是养猪大省，有必要对河北省副猪嗜血杆菌发病情况进行调查，明确河北省 HPS 的流行血清型，对猪群 HPS 的抗体进行检测调查。本研究收集临床病料，进行 HPS 的分离，血清型鉴定，并建立一种可以快速、准确检测 HPS 抗体的 ELISA 方法，对河北省猪群 HPS 的抗体进行血清学调查，期望对河北省副猪嗜血杆菌病的诊断与防控提供参考。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 病料

样品来自 2017 年 9 月至 2018 年 7 月保定、邢台、沧州、衡水、唐山、石家庄、廊坊等地送检的疑似病例，包括病猪、死猪、肺、关节、心脏、肝脏、肾脏等，共 107 份。

2.1.2 菌株

副猪嗜血杆菌 (HPS)、金黄色葡萄球菌，大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)感受态细菌，表达载体 pET-32a(+), 由河北农业大学传染病实验室保存。

2.1.3 实验用血清

PEDV、CSFV、PRRSV、FMDV、*E.coli* 阳性血清由河北农业大学传染病实验室收集并保存。

待检血清是 2017 年 9 月至 2018 年 7 月在河北地区采样收集。

HPS 阳性血清，在分离出 HPS 的发病猪场收集，并经过 Western Blot 筛选所得。

阴性血清从未吃初乳的仔猪采血所得。

HRP-兔抗猪 IgG(二抗)，购自北京博奥龙免疫技术有限公司。

2.1.4 主要培养基、酶、耗材与试剂盒

表 1 主要培养基、酶、耗材与试剂盒

Table 1 The main media, enzymes, consumables and kits for the test

试剂	厂家
TSA/TSB 培养基	北京奥博星
NAD	Solarbio 公司 (北京)
DNA 回收试剂盒	美国 BIOMIGA 公司
新、胎牛血清	杭州四季青
牛血清白蛋白/脱脂奶粉	Sigma 公司 (美国)
DL1000/DL2000/DL5000 DNA Marker	Takara 公司 (大连)
6 \times Loading Buffer	Takara 公司 (大连)
T4 DNA 连接酶/限制性内切酶 <i>EcoR</i> I、 <i>Xho</i> I	Takara 公司 (大连)
蛋白纯化试剂盒	康为世纪生物科技有限公司
pMD19-T 克隆载体	Takara 公司 (大连)
质粒小提试剂盒	美国 BIOMIGA 公司
DAB 显色试剂盒	Solarbio 公司 (北京)
Blue Plus Protein Marker	Takara 公司 (大连)
NC 膜、96 孔酶标板/ TMB 单组份显色液	Solarbio 公司 (北京)
5 \times 蛋白上样缓冲液	Solarbio 公司 (北京)

2.1.5 实验所用培养基及溶液的配制

2.1.5.1 主要培养基

0.02%NAD: 称取 2 mg NAD 溶于 10 mL 双蒸水, 过滤除菌, -20 °C 保存备用。

TSA 固体培养基: 准确称取 40 g 胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA), 加入 940 mL 蒸馏水, 充分摇匀, 加热至完全溶解, 在 121°C 高压蒸汽灭菌 15 min, 冷却至约 45°C, 无菌添加 50 mL 新牛血清, 10 mL 灭菌的 0.02%NAD, 充分摇匀后倒入平皿, 凝固后标明配制日期, 4°C 保存。

TSB 液体培养基: 准确称取 12 g 胰酪大豆胨液体培养基 (TSB), 溶于 400 mL 蒸馏水中, 加热至完全溶解, 在 121°C 高压灭菌 15 min, 冷却至室温, 标记配制日期, 并储存在 4°C 备用。用前无菌操作按百分之五比例加入新牛血清, 百分之一的比例加入 0.02%NAD。

鲜血琼脂培养基: 准确称取 12 g 营养琼脂, 将其溶于 360 mL 双蒸水中, 充分摇匀, 加热至充分溶解。在 121°C 高压蒸汽灭菌 15 min, 冷却至约 45°C, 并在无菌环境中添加 40 mL 新鲜兔血, 充分摇匀后倒入平皿。凝固后标明配制日期, 4°C 保存。

LB 液体培养基: 将 3 g 的胰蛋白胨、3 g NaCl 和 1.5 g 酵母粉溶解于 300 mL 的三蒸水中, 然后经高压灭菌, 冷却至室温, 标明配制日期, 放置 4 °C 冰箱中备用。

Amp (100 mg/mL): 将 1 g Amp 粉末溶于 10 mL 去离子水中, 过滤并灭菌, 分装, 储存在 -20 °C。

60%甘油—TSB: 体积按照 6: 4 将甘油与 TSB 液体培养基混匀后, 经高压灭菌后冷却至常温, 标明配制日期, 放置 4 °C 冰箱保存。

60%甘油—LB: 体积按照 6: 4 将甘油与 LB 液体培养基混匀后, 经高压灭菌后冷却至常温, 标明配制日期, 放置 4 °C 冰箱保存。

Amp/LB 固体培养基: 将 12 g 营养琼脂粉末溶解在 300 mL 的 LB 液体培养基中, 并在 121°C 高压灭菌 15 min, 冷却至约 45°C, 按照千分之一的比例无菌添加 Amp 储存液, 然后倒入平板, 凝固后, 标注配制日期, 放于 4 °C 冰箱中。

2.1.5.2 琼脂糖凝胶电泳相关试剂

电泳相关试剂的配制方法, 参考论文《猪丁型冠状病毒 HB-BD 株分离鉴定及生物学特性研究》^[112]

2.1.5.3 连接转化及表达主要试剂的配制

0.1 mol/L CaCl₂ 溶液: 将 2.22 g 无水 CaCl₂ 溶解在 200 mL 去离子水中, 高压灭菌, 于 4 °C 储存。

60%CaCl₂-甘油: CaCl₂ 溶液与甘油 6:4 混匀后, 高压灭菌后储存于 4 °C。

100 mmol/L IPTG: 量取 20 mL 去离子水溶解 0.4766 g 的 IPTG 粉, 充分溶解后, 使用 0.22μm 滤器过滤, 分装保存 -20 °C 冰箱。

2.1.5.4 SDS-PAGE 相关试剂的配制

SDS-PAGE 电泳相关试剂的配制方法, 参考论文《猪伪狂犬病毒 gE 基因亚克隆、原核表达及 ELISA 抗体检测方法的建立》^[113]。

2.1.5.5 Western Blot 相关溶液的配制

转膜液: 用 500 mL 的去离子水溶解 3.03 g Tris 碱和 14.3 g Gly, 加入 200 mL 甲醇, 充分混合定容至 1000 mL, 并在 4 °C 下储存。

10×TBS: 用去离子水 900 mL 溶解 24.2 g Tris 碱和 80 g NaCl, 用浓盐酸调 pH 至 7.5 后, 加去离子水至 1 L, 在室温下储存。用时用去离子水稀释至 1 倍。

洗涤液 TBST (1×): 量取 50 mL 的 10×TBS, 加入 450 mL 去离子水, 再加入 0.25 mL 的吐温-20。

5%脱脂奶粉封闭液: 称取 5 g 脱脂奶粉, 加入 100 mL 的 TBST 洗涤液中, 现用现配。

2.1.5.6 ELISA 相关试剂的配制

酶标板包被液: 称取 2.93 g NaHCO₃ 粉末, 1.59 g 的 Na₂CO₃ 粉末, 用 950 mL 蒸馏水充分溶解, 把 pH 值调整到 9.6, 用 1000 mL 容量瓶定容, 转入广口瓶 4°C 保存。

洗涤液 (PBST): 称取 4 g NaCl, 0.72 g Na₂HPO₄, 0.12 g KH₂PO₄, 0.10 g KCL 溶于 400 mL 蒸馏水中, 充分溶解, 定容到 500 mL, 加入 250 μL 吐温-20, 混匀保存 4 °C 冰箱。

封闭液: 称取脱脂奶粉 5 g, 溶解到 100 mL 的 PBST 洗涤液, 充分摇匀, 现用现配。

硫酸终止液: 将 22.2 mL 浓 H₂SO₄ 缓慢的加入到 150 mL 的双蒸水中, 稀释至 200 mL, 保存在 4°C 冰箱。

2.1.6 试验相关设备、仪器

表 2 试验相关设备、仪器

Table 2 Test related equipment and instruments

设备、仪器	型号规格	制造厂家
振荡培养箱	HZQ-F100	豪城实验仪器制造有限公司
离心机	Neofuge-13R	Heal Force
PCR 仪	T100	BIO-RAD 公司
超低温冰箱	BCD-205TA	Haier 公司
电泳仪	DYY-8C	北京六一仪器厂
电子天平	FA(N)/JA(N)	上海民桥精密科学仪器有限公司
超声波细胞粉碎机	KS-600	宁波科生仪器厂
全自动立式蒸汽灭菌器	YXQLS18SI	上海博讯医疗生物股份有限公司
洁净工作台	DL-CJ-2ND1	北京东联
凝胶成像系统	FluorChem-E、M、E 型	美国 ProteinSimole
酶标仪	Multiskan FC 型	Thermer Fish

2.2 方法

2.2.1 副猪嗜血杆菌河北株的分离与血清型鉴定

2.2.1.1 病理剖检及病原分离

对病猪进行剖检,采集组织器官、腹水、关节积液等样品,对剖检样品和送检样品进行分菌。在超净台内用灼烧过的载玻片把组织表面灭菌,无菌剪取深层组织(关节液、腹水用接种环无菌操作)涂布在含有 NAD (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和 5% 新牛血清的 TSA 培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温恒湿培养箱 24-60 小时,挑取圆形、光滑湿润、白色半透明的露珠样菌落进行革兰氏染色,油镜下观察。

2.2.1.2 “卫星现象”实验

HPS 的“卫星现象”试验一般采取金黄色葡萄球菌和副猪嗜血杆菌垂直交叉划线,为了便于观察,在此做了一些变动。挑取疑似副猪嗜血杆菌的单菌落均匀涂布在鲜血琼脂板上,再分 5 点涂上金黄色葡萄球菌,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱 24-36 小时,观察结果。

2.2.1.3 PCR 鉴定 HPS 的血清型

挑取具有“卫星现象”生长的疑似 HPS 菌落,接种到加入血清(5%)和 NAD 的 TSB 液体培养基,200 r/min,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌 16-18 个小时,以菌液为模板,做菌液 PCR。因为副猪嗜血杆菌血清型较多,其中一些不可分型,造成 PCR 鉴定 HPS 的引物对数较多,所以在每一个鉴定血清型的反应中都加入目的片段为 275 的引物,保证所用模板为副猪嗜血杆菌,在此基础上在进行血清型鉴定。

PCR 引物参考 Howell K J 等^[17]和 Aiqing Jia^[18]等, 由北京三博远志公司合成。

表 3 HPS 血清型 PCR 鉴定引物

Table 3 HPS serotype PCR identification primers

基因	上游 (5' -3')	下游 (5' -3')	血清型	产物 (bp)
<i>funB</i>	CTGTGTATAATCTATCCCCGATCATCAGC	GTCCAACAGAATTTGGACCAATTCCTG	1	180
<i>wzx</i>	CTAACAAGTTAGGTATGGAGGGTTTTGGTG	GGCACTGAATAAGGGATAATTGTACTG	2	295
<i>glyC</i>	CATGGTGTTCCTGACTTGGCTGT	TCCACATGAGGCCGCTTCTAATAACT	3	650
<i>wciP</i>	GGTTAAGAGGTAGAGCTAAGAATAGAGG	CTTTCCACAACAGCTCTAGAAACC	4	320
<i>wcwK</i>	CCACTGGATAGAGAGTGGCAGG	CCATACATCTGAATTCCTAAGC	5	450
<i>glI</i>	GATTCTGATGATTTTTGGCTGACGGAACG	CCTATTCTGTCTATAAGCATAGACAGGAC	6	360
<i>funQ</i>	CTCCGATTCATCTTTTCTATGTGG	CGATAAACCATAACAATTCCTGGCAC	7	490
<i>scdA</i>	GGAAGGGGATTACTACTACCTGAAAG	CTCCATAGAACCTGCTGCTTGAG	8	650
<i>funV</i>	AGCCACATCAATTTTAGCCTCATCA	CCTTAAATAGCCTATGTCTGTACC	9	710
<i>funX</i>	GGTGACATTTATGGGCGAGTAAAGTC	GCACTGTCAATAACAATCTTAAAGACG	10	790
<i>amtA</i>	CCATCTCTTAACTAATGGGACTG	GGACGCCAAGGAGTATTATCAAATG	11	890
<i>hypothetical</i>	ATGGCTCACGATCCGAAAG	ATTTCCCTTTCCTAAACGC	12	508
<i>glpP</i>	GCTGGAGGAGTTGAAAGAGTTGTTAC	CAATCAAATGAAACAACAGGAAGC	13	840
<i>funAB</i>	GCTGGTTATGACTATTTCTTTTCGCG	GCTCCCAAGATTAAACCACAAGCAAG	14	730
<i>funI</i>	CAAGTTCGGATTGGGAGCATATATC	CCTATATCATTTGTTGGATGTACG	15	550
HPS_219690793	ACAACCTGCAAGTACTTATCGGGAT	TAGCCTCCTGTCTGATATCCCACG	All	275

PCR 体系 24 μ :

2×Mix	12 μ L
N 上游引物	1 μ L
N 下游引物	1 μ L
A 上游	1 μ L
A 下游	1 μ L
模板	2 μ L
ddH ₂ O	6 μ L
总体系	24 μ L

注: N 代表 HPS 的 1-15 型; A 代表目的片段为 275 的引物

PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 29 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

将 PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (BIOMIGA) 说明书进行操作, 回收产物并测序, 测序结果与 NCBI 公布相关序列比对。

2.2.1.4 HPS 的保存

经过 PCR 鉴定 HPS，分别采取以下几种方法保存。1、直接在 TSA 培养基上划线，培养 24-36 小时，密封保存 4℃ 冰箱。2、接种 TSB 肉汤，摇菌 16-18 小时，分装到 1.5 mL 的离心管，每管 1mL，分别储存于 4℃、-20℃。3、TSB 摇菌 16-18 小时，菌液与 60%的甘油-TSB 各 500 μL 混匀，分装到 1.5 mL 离心管，封口膜密封。分别保存到-20℃和-80℃。4℃保存菌种每 2 天接种一次，加入甘油保存的菌种每 15 天复苏一次。

2.2.2 HPS 细胞致死膨胀素 C 亚基 (CdtC) 全基因的扩增与分析

2.2.2.1 扩增 CdtC 基因引物的设计

在引物设计软件 Primer5.0 中，输入 GenBank 中下载的 HPS 全基因 SH0165(登录号 CP001321.1)中 CdtC 序列，设计了上游引物 F1，下游引物 R1。目的片段为 641 bp。

F1: 5'-CCAAAAGGCGGAGCAATG-3'

R1: 5'-TACACAATGCGAATCAAACCAC-3'

以上引物由北京三博远志公司合成

2.2.2.2 HPS 基因组 DNA 的提取

用 1000 μL 纯水洗脱 TSA 培养基上的 HPS 菌落，煮沸 10 min，13201×g，4℃离心 3 min，DNA 在上清中，作为模板，存放在-20℃冰箱。

2.2.2.3 CdtC 基因的 PCR 扩增

以获得的 HPS 的 DNA 为模板，设计的引物 F1、R1 扩增 CdtC 的全基因。

反应体系如下

ddH ₂ O	6 μL
模板	2 μL
2×Mix	10 μL
引物 F1	1 μL
引物 R1	1 μL
<hr/>	
总体系	20μL

扩增程序为，94℃4 min，进行预变性。然后循环反应，94℃变性 30 s，55℃退火 30 s，72℃延伸 1 min，循环 30 次；最后 72℃延伸 10 min。取 PCR 扩增产物 8 μL 进行电泳，使用凝胶成像系统拍照观察结果。

2.2.2.4 PCR 产物的回收与纯化

按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (BIOMIGA) 说明书进行操作。回收的产物放-20℃冰箱保存。

2.2.2.5 CdtC 全基因与克隆载体的连接

上一步纯化回收得到的 CdtC 全基因 DNA 与 pMD19-T、Ligation Solution I 按如下体系混匀, 放入 16 °C 连接 1 小时。连接产物命名为 pMD19-T-CdtC。

Solution I	5.0 μL
CdtC 全基因 DNA	4.5 μL
pMD19-T 载体 (50 ng/μL)	0.5 μL
<hr/>	
总体系	10.0 μL

2.2.2.6 感受态细胞的制备与连接产物的转化

该部分的具体操作, 详见论文《猪圆环病毒 3 型抗体 ELISA 方法的建立及初步应用》^[14]。

2.2.2.7 重组质粒的提取

重组质粒的提取按照高纯度质粒小提取试剂盒说明书进行操作。提取的质粒放到-20℃的冰箱保存。

2.2.2.8 pMD19-T-CdtC 重组质粒的序列测定

对重组质粒 pMD19-T-CdtC 进行 PCR 鉴定, 用 60 %甘油 LB 保存阳性克隆菌, 并送至北京中科西林公司测序。登录 NCBI 官网并利用其中的 Blast 功能将测序结果比对, 不同血清型的扩增测序结果使用 DNASTAR 软件对其进行同源性分析。

2.2.3 CdtC 优势抗原表位的扩增及重组表达质粒的构建

2.2.3.1 表达引物设计及合成

利用 DNASTAR 软件筛选出 CdtC 蛋白优势抗原部分, 获得相应的基因序列, 利用 Primer5.0 设计了带有酶切位点的表达引物 F2、R2, 下划线的序列为酶切位点。目的基因大小为 414 bp, 由北京三博远志公司合成。

上游 F2: 5'-CCGGAATTCGAAACACCCACCGATGCCA-3' (*EcoRI* 酶切位点)

下游 R2: 5'-CCGCTCGAGATTGCTAGGTTCTGCAGA-3' (*XhoI* 酶切位点)

2.2.3.2 靶基因的扩增和回收

以表达引物 F2 和 R2 为 PCR 扩增的引物, 质粒 pMD19-T-CdtC 为模板, 建立 20 μL 的反应体系, 扩增靶基因并命名为 CdtC414。

ddH ₂ O	6 μL
2×Mix	10 μL
F2	1 μL
R2	1 μL
pMD19-T-dtC	2 μL
<hr/>	
总体系	20 μL

反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min 预变性, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 循环反应 30 次, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。将扩增产物进行电泳, 使用凝胶成像系统拍照观察结果。按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (BIOMIGA) 说明书进行操作, 回收产物并保存。

2.2.3.3 质粒 pMD19-T-CdtC414 的重组

将 pMD19-T 载体与上步回收的产物连接, 连接方法同 2.2.2.5。转化方法同 2.2.2.6, 将重组质粒命名为 pMD19-T-CdtC414。

2.2.3.4 pMD19-T-CdtC414 重组质粒的提取

质粒的提取参考 2.2.2.7。

2.2.3.5 pMD19-T-CdtC414 测序鉴定

具体操作方法同 2.2.2.8。

2.2.3.6 质粒 pMD19-T-CdtC414 与载体 pET-32a 的双酶切

把 pMD-19-T-CdtC414 质粒和 pET-32a 载体, 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切。体系如下:

灭菌 ddH ₂ O	4 μL
<i>Xho</i> I	1 μL
<i>EcoR</i> I	1 μL
10×buffer K	2 μL
pET-32a/ pMD19-T- CdtC414	12 μL
<hr/>	
总体系	20 μL

充分混合, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中反应 3 小时, 电泳酶切产物, 使用凝胶成像系统拍照观察结果。

2.2.3.7 产物的回收

参考 2.2.2.4 回收酶切产物。

2.2.3.8 表达质粒 pET-32a 与靶基因的连接

用连接酶连接回收的 CdtC414 靶基因与酶切后 pET-32a 进行连接, 命名产物为 pET-32a-CdtC。体系如下:

T4 连接酶	1 μ L
10 \times T4 DNA 连接酶 Buffer	1 μ L
pET-32a (酶切后)	5 μ L
CdtC414	3 μ L
<hr/>	
总体系	10 μ L

连接产物转化转至 DH5 α 感受态细胞中。

2.2.3.9 质粒 pET-32a-CdtC 的抽提

质粒的提取参考 2.2.2.7。

2.2.3.10 质粒 pET-32a-CdtC 的双酶切鉴定

把 pET-32a-CdtC 重组质粒用 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切, 采用 10 μ L 酶切体系。

ddH ₂ O	2 μ L
10 \times buffer K	1 μ L
<i>Xho</i> I	0.5 μ L
<i>EcoR</i> I	0.5 μ L
pET-32a-CdtC	6 μ
<hr/>	
总体系	10 μ L

使各反应物充分混合, 放入 37 $^{\circ}$ C 水浴 3 小时, 酶切产物跑电泳, 拍照观察。

2.2.3.11 表达质粒 pET-32a-CdtC 转入 *E.coli* BL21 (DE3) 感受态细胞

经过双酶切鉴定, 正确的阳性质粒, 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞。*E.coli* BL21 感受态细胞的制备方法与感受态 DH5 α 的制备方法相同, 转入方法同 2.2.2.6。

2.2.4 重组质粒 pET-32a-CdtC 的表达及纯化与鉴定

2.2.4.1 重组质粒 pET-32a-CdtC 的表达

使用表达引物对转入 pET-32a-CdtC 重组质粒的 *E.coli* BL21 的菌落进行菌落 PCR，鉴定为阳性的菌落进行摇菌扩增，先用试管摇菌，摇菌的 LB 培养基中加入 Amp，培养基以 4-5mL 比较合适。摇菌试管封口倾斜固定在摇床上，温度设定为 37℃，转速设定为 180 r/min，振荡培养过夜，作为菌种保存备用。取 1 mL 菌种，加入到 100 mL 的 LB 液体培养基，加入 Amp 进行摇菌。每隔 1 小时取 3 mL 菌液测定 OD 值，当 OD_{600nm} 在 0.6~0.8 之间时，加入千分之一比例的诱导剂 IPTG，取出 1 mL 菌液保存备用，剩余菌液继续放入摇床振荡培养。每隔两小时取菌液一次，共取 4 次，停止摇菌。取的菌液样品处理后，用 SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达效果，并将空载体（转入感受态 BL21）作对照。

2.2.4.2 pET-32a-CdtC 重组蛋白的可溶性检测

取 0.5 mL 菌种，加入到 50 mL 的 LB 液体培养基中，加入千分之一的 Amp，在 180 r/min，37℃ 的摇床进行培养，分时间段取样测 OD 值，当 OD_{600nm} 在 0.6~0.8 之间时加入千分之一的 IPTG 诱导蛋白表达。摇菌 6 小时，将菌液转入无菌离心管离心，转速 7 000 r/min，时间为 10 min，弃掉上清，用裂解液处理沉淀，使沉淀充分悬浮，置于冰上低温下超声波粉碎。菌液破碎裂解至清亮，12 000 r/min 离心 15 min，上清与沉淀分开收集，变性处理后，跑 SDS-PAGE 电泳检测蛋白的存在形式。

2.2.4.3 重组 pET-32a-CdtC 蛋白的纯化

用锥形瓶加入 100 mL 液体 LB 培养基，进行重组菌体的诱导表达，6 小时后把菌液离心，弃掉上清，将菌体冰上超声破碎裂解，再次离心，弃掉上清，沉淀用 Binding Buffer 充分溶解，再次 10 000 r/min，4℃ 离心 15 min，取上清。按照包涵体蛋白 His 标签纯化试剂盒(康为世纪)说明书，纯化重组蛋白。

1) 向层析柱中加入 2 mL 混匀得填料，静置 9-10 min，等待凝胶沉降，打开出液口使乙醇流出。

2) 用 10-12 mL 去离子水和 8 倍柱体积的 Binding Buffer 分别冲洗、平衡柱子。

3) 收集的上清转移到 1 mL 的注射器，缓慢地滴加向柱子中，用 10 mL 的离心管收集流穿液，再次过柱子纯化，提高蛋白产量。

4) 用 Binding Buffer 缓慢的冲洗杂蛋白，约需要 15 mL 的量。

5) 向柱子中缓慢滴加 Elution Buffer 洗脱蛋白，收集到 1.5mL 的离心管，每管 1 mL，收集洗脱峰 6 管，并编号。

6) 用 3mL 的 Elution Buffer 冲洗镍柱，洗净目的蛋白，用去离子水 10 mL 冲洗柱子，用的 20%乙醇平衡柱子，并浸没柱子，将柱子上下口密封，放在 4℃ 冰箱。

2.2.4.4 重组 pET-32a-CdtC 蛋白的 Western blot 鉴定

将重组蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 切胶, 将蛋白转印到 NC 膜上。转膜采用半干转印法, 把转膜液浸泡过的胶、NC 膜、软垫, 以软垫-凝胶-NC 膜-软垫的顺序放好, 赶出空气, 电压调到 21 V, 转印 30 min。用 TBST 配制的 5%脱脂奶粉溶液封闭转印后的 NC 膜, 4℃过夜, 次日取出 NC 膜, 先用 TBST 洗膜 5 min, 再用 TBS 洗膜 5 min, 交替清洗三次, 可放入大小合适平皿, 低速摇床洗膜。清洗后加入用 TBST 按 100:1 稀释 HPS 阳性血清, 室温摇荡反应 1.5 h, 洗涤三次。将 HRP 标记的兔抗猪 IgG 按 10 000 倍稀释, 加入到放置 NC 膜平皿中, 室温摇荡反应 1.5 h, 然后洗涤。使用 DAB 在暗处显色 NC 膜, 在显色明显清晰后, 用蒸馏水冲洗终止显色。

2.2.4.5 纯化蛋白浓度的测定

用 Thermo Scientific NanoDrop 2000 超微量分光光度计测定纯化蛋白浓度, 冷冻保存, 短期可放入 -20℃, -80℃ 可长期保存。

2.2.5 血清中 HPS 的 IgG 抗体间接 ELISA 检测方法的建立

2.2.5.1 最佳包被抗原浓度及血清稀释倍数的确定

用包被液稀释纯化的重组蛋白, 稀释到 8 μg/mL, 取出 5 列空酶标板, 每孔加入 100 μL 包被液, 在第一列的每孔中加入 100 μL 稀释后的蛋白, 吹打均匀, 在吸出 100 μL, 加入到第二列孔中, 混匀, 再吸出 100 μL 加入第 3 列孔, 以此类推, 第 5 列孔混匀后, 吸出 100 μL 弃掉。这样第一列到第 5 列的蛋白浓度依次为 4 μg/mL, 2 μg/mL, 1 μg/mL, 0.5 μg/mL, 0.25 μg/mL, 把酶标板放 37 °C 孵育 1 h, 再放 4 °C 冰箱过夜; 次日, 甩出包被蛋白, 用缓冲液 PBST 洗涤 3 次, 每次每孔 200 μL, 放置 3 min, 可轻轻晃动酶标板; 洗涤后拍出剩余的洗涤液, 加入用 PBST 配制的 5%脱脂奶粉封闭液, 每孔 200 μL, 放入 37 °C 恒温箱封闭 1 h; 甩出封闭液, 用缓冲液 PBST 洗涤 3 次, 每次每孔 200 μL。在稀释板中, 用封闭液按照稀释蛋白的倍比稀释方法, 将阳性、阴性血清稀释成 1 : 50、1 : 100、1 : 200、1 : 400 的比例, 用移液枪吸取 100 μL 加入到每一行酶标板, 放到 37 °C 恒温箱反应 1 h; 小心快速的甩出一抗溶液, 防止污染相邻孔, 使用 PBST 洗涤酶标板 3 次, 排干; 然后每孔加入用封闭液按 10 000 倍稀释的 HRP-兔抗猪 IgG, 每孔 100 μL, 放入 37 °C 恒温箱孵育 1 小时; 使用 PBST 洗涤酶标板 3 次, 拍干。每孔加入 100 μL 的 TMB 单组份显色液盖上黑色的盖子, 室温下显色 15 min; 每孔加入 50 μL 的 2 mol/L 浓硫酸终止液, 终止显色反应, 用酶标仪读取各反应孔的 OD_{450nm} 值。最佳工作条件的选定标准是: 阳性/阴性 OD_{450nm} 值 (P/N) 比值最大, 阳性血清的 OD_{450nm} 值 (P 值) 接近 1.0。

2.2.5.2 蛋白包被最佳条件的确定

用确定的最佳蛋白浓度包被酶标板, 分别按 37 °C 反应 1 h 后再 4 °C 过夜; 37 °C 反应 2 h 后 4 °C 过夜; 直接放入 4 °C 过夜; 37 °C 反应 2 h 等 4 种反应条件进行包被, 选择最佳包被条

件，剩余操作方法同 2.2.5.1。

2.2.5.3 最佳封闭液的确定

使用最佳抗原浓度最佳包被条件包被酶标板，用四种不同的封闭液对酶标板进行封闭。这 4 中封闭液分别是 PBST 缓冲液稀释的 1% BSA 溶液，5% 的脱脂奶粉溶液、5% 胎牛血清溶液、5% 新牛血清溶液。其它操作按 2.2.5.1 进行。根据阴阳性血清 OD_{450nm} 和 P/N 的值来确定最合适的封闭液。

2.2.5.4 封闭最佳时间的确定

使用确定的最佳包被条件，分别在 37 °C 封闭 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h 等 4 种不同时间，其它操作按照 2.2.5.1 进行操作，比较阴阳性血清的 OD_{450nm} 值，选择封闭的最佳时间。

2.2.5.5 一抗最佳作用时间的确定

采用最佳反应条件包被、封闭酶标板，加入 1: 200 倍稀释的一抗，分别在 37 °C 作用 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h。其它操作按照 2.2.5.1 进行操作，根据 P/N 最大确定最合适的作用时间。

2.2.5.6 酶标二抗浓度的确定

按照以上确定的最佳反应条件操作，用 1: 5000、1: 10000、1: 15000、1: 20000 等不同浓度的酶标二抗进行反应，每孔加入 100 μ L，放在 37 °C 反应 1 小时，其它操作同 2.2.5.1，计算出 P/N 的值最后确定最合适的作用浓度。

2.2.5.7 二抗最佳反应时间的确定

根据上述确定的最佳反应条件，最佳二抗浓度分别在 37 °C 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h 反应，其它操作同 2.2.5.1 进行，计算出 P/N 的值最后确定最合适的作用时间

2.2.5.8 显色时间的确定

根据上述确定的最佳反应条件，用 TMB 显色液，每孔 100 μ L 盖上黑色的遮光盖，显色 5 min、8 min、10 min、15 min，比较不同的显色时间，根据血清 OD_{450nm} 值确定最佳显色时间。

2.2.5.9 ELISA 临界值的确定

选取 30 份 HPS 的阴性血清，用新建的 ELISA 方法检测。测出 30 份血清 OD_{450nm} 值，计算出平均值(AV)和标准方差(SD)。利用统计学原理，计算出 $AV+3\times SD$ 和 $AV+2\times SD$ 值，前者得出的

值为阳性临界值，后者得出的为阴性临界值，两者之间为可疑值，需重测。

2.2.5.10 新建方法的特异性试验

用猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪瘟病毒(CSFV)、口蹄疫病毒(FMDV)、蓝耳病毒(PRRSV)及大肠杆菌(*E.coli*)的阳性血清及 HPS 的阴阳性血清检测新建 ELISA 方法的特异性。

2.2.5.11 新建方法的重复性试验

对建立方法进行批内、批间重复试验，检验方法的重复性。批内试验选取 5 份血清样品，每份重复 5 个孔，进行检测；批间试验，选用 3 批次纯化的蛋白包被酶标板，检测 5 份相同的血清样品。利用表格分析批内、批间的变异系数。

2.2.5.12 ELISA 方法的 ROC 曲线分析

选取明确阴阳性的猪血清样品 60 个(28 个阴性、32 个阳性)分别使用 ELISA 方法和 western blot 分别测试，用 SPSS 软件以 western blot 的结果为标准，绘制 ROC 曲线，分析 ELISA 方法的敏感性和特异性。

2.2.5.13 临床样品的检测

对 2017 年 9 月至 2018 年 7 月从河北省不同地区猪场收集的血清 561 份进行 HPS 抗体的检测。

3 结果

3.1 副猪嗜血杆菌河北株的分离与血清型鉴定

3.1.1 菌落特征及油镜下细菌形态

将纯化的 HPS 划在含有 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 NAD 和 5% 的新牛血清的 TSA 培养基上于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 36-48 小时, 形成圆形、针尖大小、光滑湿润、白色半透明的露珠样菌落, 如图 1.



图 1 HPS 在 TSA 培养基上的菌落
Fig. 1 Morphology of HPS colony on TSA

挑选单菌落涂片, 革兰氏染色, 在油镜下观察, 细菌被染成红色, 呈球杆状、短杆状、长杆状、螺旋丝状等多种形态, 如图 2 (A 为 14 型 B 为 5 型)

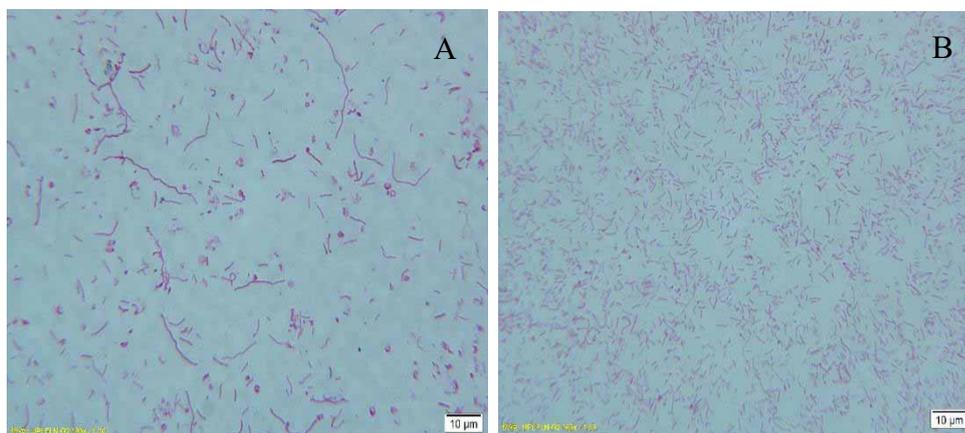


图 2 HPS 在显微镜下的形态 (1000 \times) A: HPS14 型 B: HPS 5 型
Fig. 2 Microscopic morphology of HPS (1000 \times) A:HPS14 serovar B:HPS 5 serovar

3.1.2 “卫星现象”实验结果

在涂有疑似副猪嗜血杆菌的血琼脂培养基上，金黄色葡萄球菌菌落周围出现“卫星现象”，即离金黄色葡萄球菌越近，菌落越大；越远，菌落越小，并且菌落周围不溶血。未接种金黄色葡萄球菌的部分，无 HPS 生长。结果表明，分离细菌是 NAD 生长依赖性细菌，这与副猪嗜血杆菌的培养特征一致。（图 3）

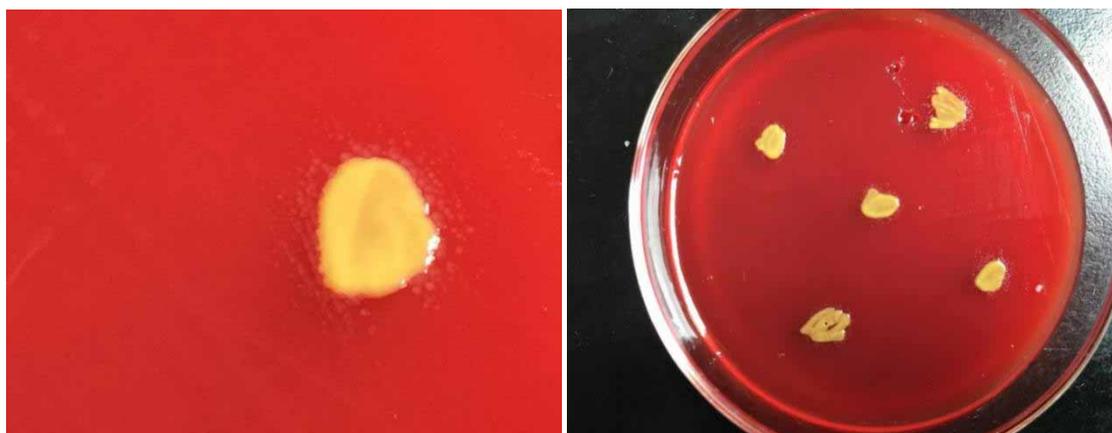


图 3 HPS 的“卫星”现象
Fig. 3 The "satellite" phenomenon of HPS

3.1.3 PCR 血清型鉴定结果

对疑似副猪嗜血杆菌的菌株进行菌液 PCR，分别获得 1、4、5、7、14 型副猪嗜血杆菌，还有 4 株分离菌确定是 HPS 但是不能确定血清型。

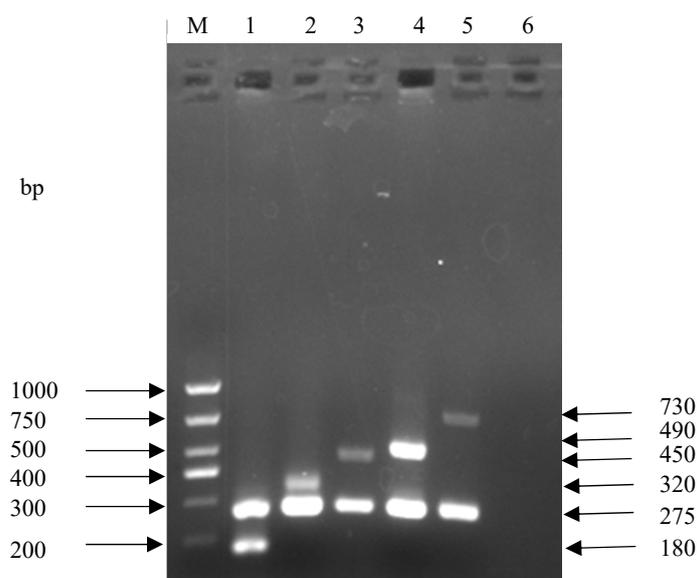


图 4 HPS 分离株的 PCR 结果
Fig. 4. PCR results of HPS isolates

M: DL1000 DNA Maker 1:1 型; 2:4 型; 3:5 型; 4:7 型; 5:14 型; 6:阴性对照
M: DL1000 DNA Maker 1:1 serovar; 2:4 serovar; 3:5 serovar; 4:7 serovar; 5:14 serovar; 6: control

3.1.4 副猪嗜血杆菌的保存

不同条件下 HPS 保存的时间如下表：

表 4 不同条件下 HPS 的保存时间

Table 4 Preservation Time of HPS under Different Conditions

保存条件	4℃		-20℃		-80℃
	TSA	TSB	TSB	30%甘油-TSB	30%甘油-TSB
保存时间 (d)	8-10	4-6	0	45-60	90 以上

在 TSA 培养基上划线 4℃ 保存中发现，菌落数越少，菌落直径越大，保存的时间较长。TSB 菌液-20℃ 冷冻既死，在病料分离中也发现冷冻保存的病料中无法分离出 HPS。

3.2 HPS 的 CdtC 基因序列分析

3.2.1 HPS 的 CdtC 扩增结果

用分离的不同血清型的 HPS 基因组作模板，用特异性引物 F1、R1 进行扩增，照胶结果显示在 500 bp-750 bp 之间出现比较一致的条带，出现的位置符合所预测的 641 bp 大小。

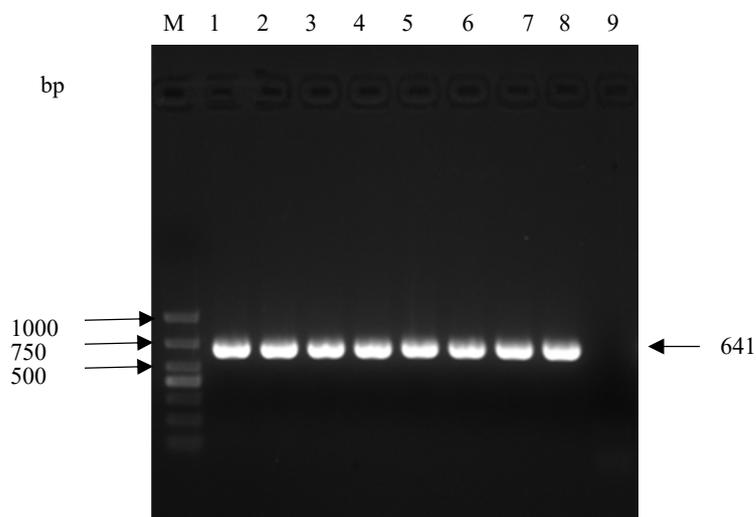


图 5 HPS-CdtC 基因的扩增

Fig. 5 Amplification of HPS-CdtC Gene

M: DL1000 DNA Maker 1:1 型; 2:4 型; 3:5 型; 4:7 型; 5:14 型; 6-8:未定型; 9: 阴性对照
M: DL1000 DNA Maker 1:1 serovar; 2:4 serovar; 3:5 serovar; 4:7 serovar;
5:14 serovar; 6-8: Unfinalized 9: negative control

3.2.2 pMD19T-CdtC 质粒 PCR 鉴定

以连接转化的大肠杆菌 DH5α 菌液为模板，以 F1、R1 为特异性引物进行 PCR 扩增，出现

641 bp 的扩增条带，与预测产物大小一致，结果如图 6:

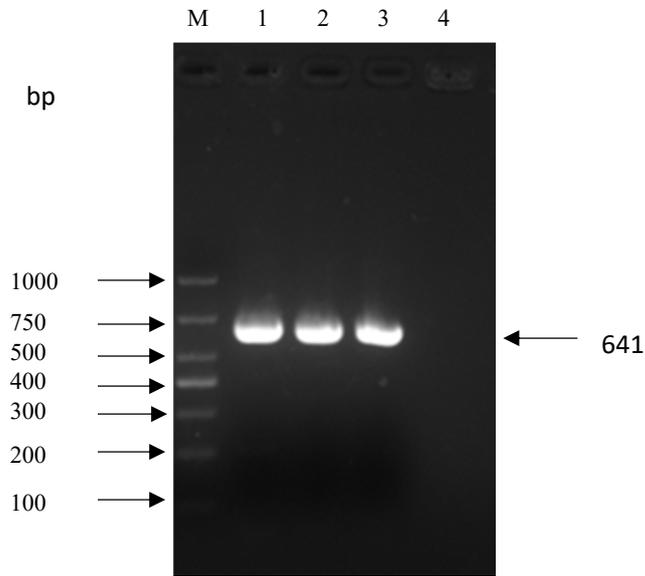


图 6 pMD19-T-CdtC 质粒 PCR 鉴定结果
 Fig. 6 Identification of pMD19-T-CdtC Plasmid by PCR
 M: DL1000 DNA Maker 1-3 平行实验
 M: DL1000 DNA Maker; 1-3 Parallel Experiments

3.2.3 基因序列测定及分析

将测序的结果进行 BLAS，并利用 DNASTar 软件比对不同血清型 CdtC 基因与 GenBank 中 SH0165（登录号：CP001321.1）的序列。比对如下图 7，说明该基因非常保守。

		Percent Identity										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Divergence	1	■	99.4	99.5	96.9	94.3	96.9	94.2	94.5	94.0	1	c
	2	0.6	■	99.5	97.2	94.5	97.2	94.7	94.7	94.5	2	1
	3	0.5	0.5	■	97.0	94.5	97.0	94.3	94.7	94.2	3	4
	4	3.2	2.9	3.1	■	96.9	99.7	96.7	96.7	96.5	4	5
	5	5.9	5.7	5.7	3.2	■	96.9	97.6	98.0	97.5	5	7
	6	3.2	2.9	3.1	0.3	3.2	■	96.7	96.7	96.5	6	14
	7	6.1	5.6	5.9	3.4	2.4	3.4	■	98.7	99.8	7	a
	8	5.7	5.6	5.6	3.4	2.1	3.4	1.3	■	98.6	8	b
	9	6.2	5.7	6.1	3.5	2.6	3.5	0.2	1.4	■	9	SH0165
		1	2	3	4	5	6	7	8	9		

图 7 不同血清型 CdtC 基因的序列比对
 Fig. 7 Sequence alignment of different serotypes of CdtC gene

3.3 重组表达质粒 pET-32a-CdtC 的构建及鉴定

3.3.1 HPS- CdtC414 优势抗原表位的扩增及克隆

利用 DNASTar 筛选的 CdtC 优势抗原表位如图 8，优势抗原是第 20-157 个氨基酸，对应碱基 414 bp。

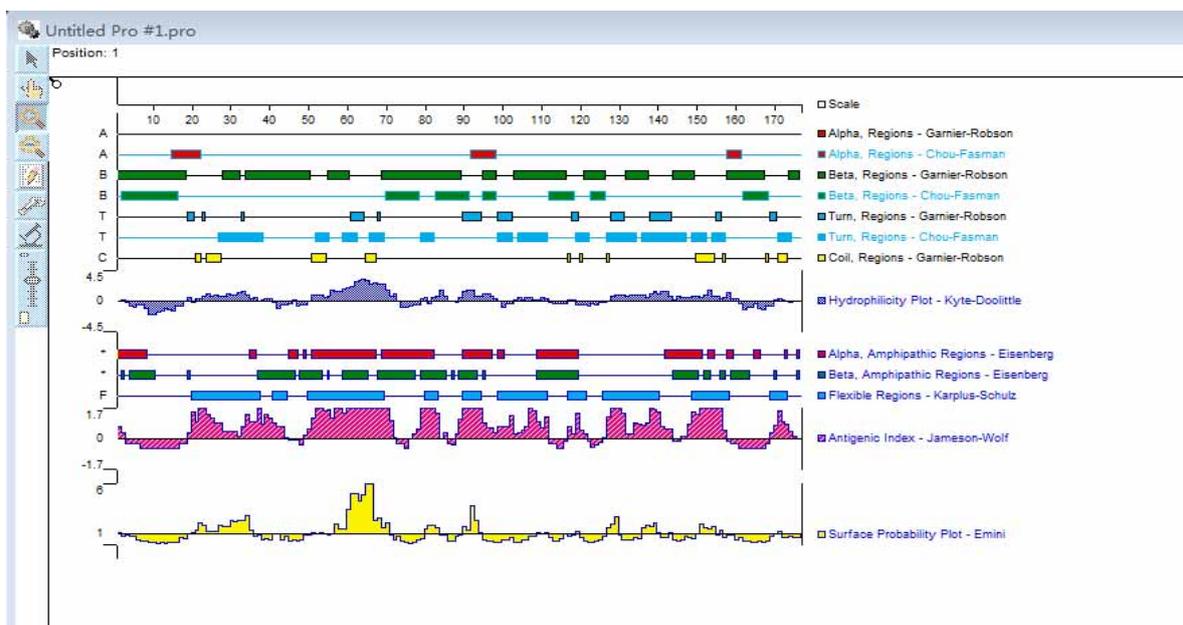


图 8 CdtC 优势抗原表位分析
Fig. 8 Analysis of dominant antigen epitopes of CdtC

重组质粒 pMD19-T-CdtC 为模板，F2 和 R2 为 PCR 扩增引物。结果如下图，在 400 bp 附近出现单一的条带，符合预计大小。用 pMD19-T 载体连接靶基因产物，构建质粒 pMD19-T-CdtC414。

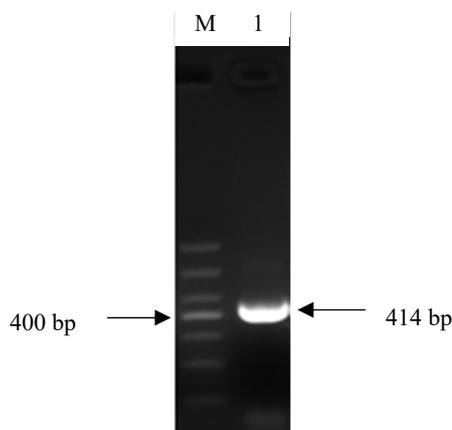


图 9 目的基因 PCR 结果
Fig. 9 The results of Target gene by PCR
M:DL1000; 1 :PCR 产物
M: DL1000 DNA Maker; 1: PCR products

3.3.2 重组质粒 pMD19-T- CdtC414 的双酶切

用 *EcoRI* 和 *XhoI* 两个限制性内切酶消化重组质粒 pMD19-T- CdtC414，产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳，拍照观察如图 10，在 3000 bp 附近、500 bp 附近各出现一条带，符合预期大小，双酶切鉴定阳性。

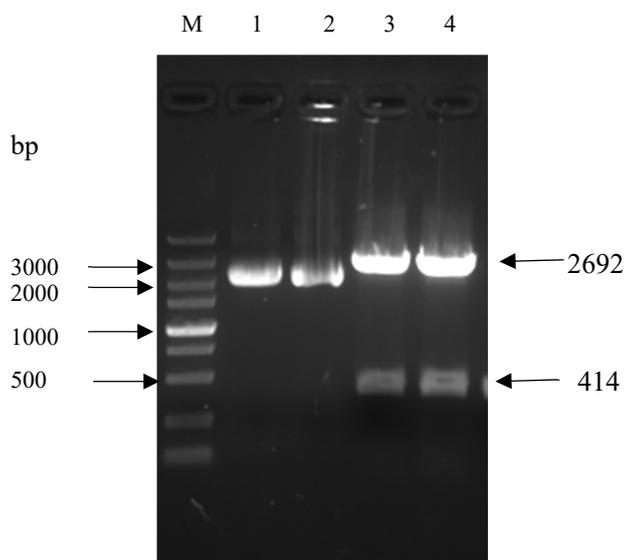


图 10 pMD-19-T- CdtC414 双酶切结果

Fig. 10 The result of pMD19-T-CdtC414 by double digestion

M. DL5000 DNA Marker; 1,2 重组质粒; 3,4.酶切产物

M.DL5000 DNA Marker; 1,2 recombinant plasmid; 3,4. Enzyme digestion products

3.3.3 CdtC414 基因的测序结果

经过 NCBI Blast 比较分析，扩增 CdtC414 基因无插入、无缺失，靶基因已经正确插入载体。

3.4 重组质粒 pET-32a-CdtC 的构建及鉴定

3.4.1 重组质粒 pET-32a-CdtC 的构建

重组质粒 pMD19-T- CdtC414 和 pET-32a 质粒分别用 *EcoRI* 和 *XhoI* 两个酶进行双酶切，将切下来的 CdtC414 基因和线性 pET-32a 载体进行胶回收，构建表达质粒 pET-32a-CdtC。

3.4.2 重组质粒 pET-32a-CdtC 的双酶切鉴定

表达质粒 pET-32a-CdtC 经 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切，酶切产物电泳拍照观察，结果如下图，产物片段与预期大小一致。

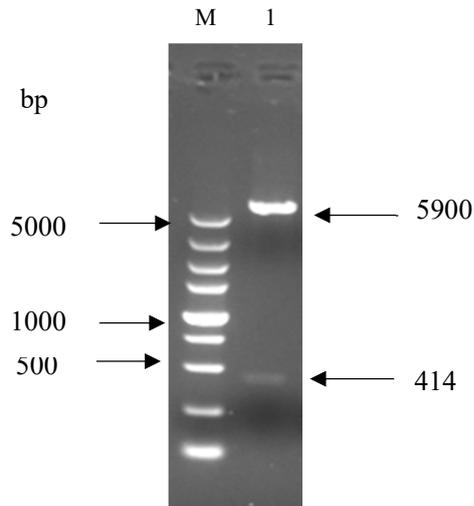


图 11 质粒 pET-32a-CdtC 的双酶切结果

Fig.11 The result of the recombinant plasmid pET-32a-CdtC by double digestion
M. DL5000; 1. 酶切产物
M. DL5000 DNA Marker; 1. Products of enzyme digestion

3.5 pET-32a-CdtC 的原核表达及重组蛋白的鉴定

3.5.1 pET-32a-CdtC 的原核表达

IPTG 诱导后，在不同时间取样，然后通过 SDS-PAGE 电泳分析，可见大小约 36 kDa 的蛋白条带。蛋白表达水平在 6 h 效果最好，诱导前和空载体没有出现目的条带（图 12）。

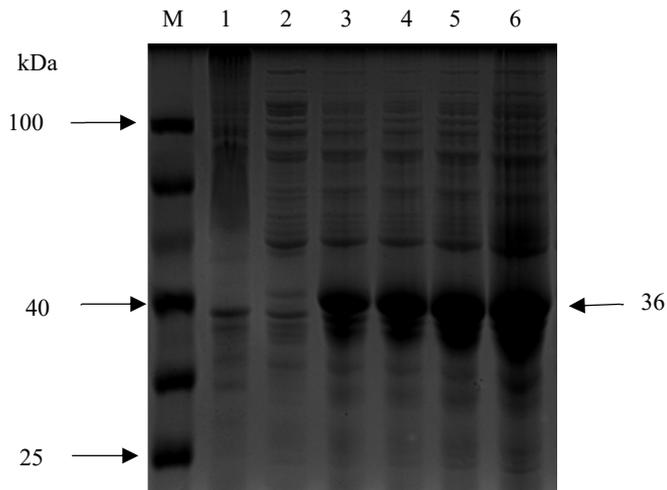


图 12 诱导不同时间 pET-32a-CdtC 的 SDS-PAGE 检测结果

Fig.12 The results of SDS-PAGE detection of pET-32a-CdtC at different induction times
M:蛋白分子质量标准;1:pET-32a 空载体诱导后 6 h ;2-6: 重组菌诱导 0、2、4、6、8 h
M: Protein molecular weight Marker; 1:Not induce uninduced plasmid in 6 h;
2-6:pET-32a-CdtC induced in 0、2、4、6、8 h

3.5.2 重组蛋白的可溶性检测

用超声波裂解含重组质粒的细菌溶液，分别收集上清和沉淀，变性处理后，跑 SDS-PAGE 电泳。拍照观察，如下图 13。结果显示裂解菌液的沉淀中有约 36 kDa 的条带，而上清没有，表明重组蛋白 pET-32a-CdtC 存在包涵体中。

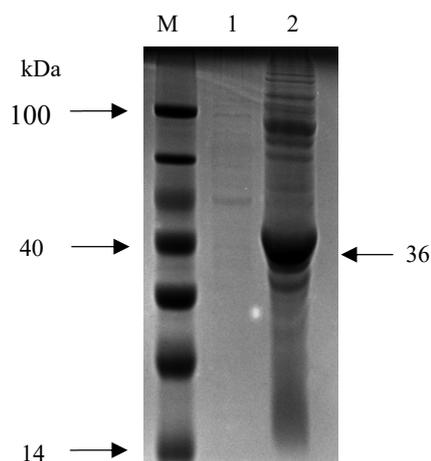


图13. 蛋白的可溶性检测结果
Fig.13 The Results of protein solubility test
M:蛋白分子质量标准; 1:上清; 2:沉淀
M.:Protein Marker; 1: Supernatants; 2.:Sedimentation

3.5.3 重组蛋白的纯化

裂解诱导的重组菌体，并纯化重组蛋白，纯化的产物变性处理后进行 SDS-PAGE 电泳，拍照观察。结果显示纯化的蛋白质在 36 kDa 处（图 14）显示出明显的条带，表明重组蛋白得被纯化。

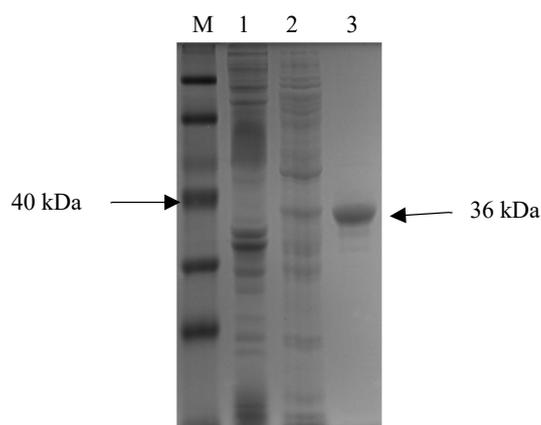


图 14 纯化的 pET-32a-CdtC 蛋白 SDS-PAGE 结果
Fig.14 The SDS-PAGE results of pET-32a-CdtC Protein purification
M:蛋白分子质量标准; 1: pET-32a; 2:流穿液; 3: 蛋白洗脱液
M. Protein Marker; 1. pET-32a; 2.Liquid flow in protein; 3: Protein e-lutions

3.5.4 重组蛋白的 Western blot 鉴定

如图 15 所示，在暗处用 DAB 显色，在 36 kDa 的位置出现清晰条带。表明重组蛋白可以与 HPS 阳性血清特异性反应。

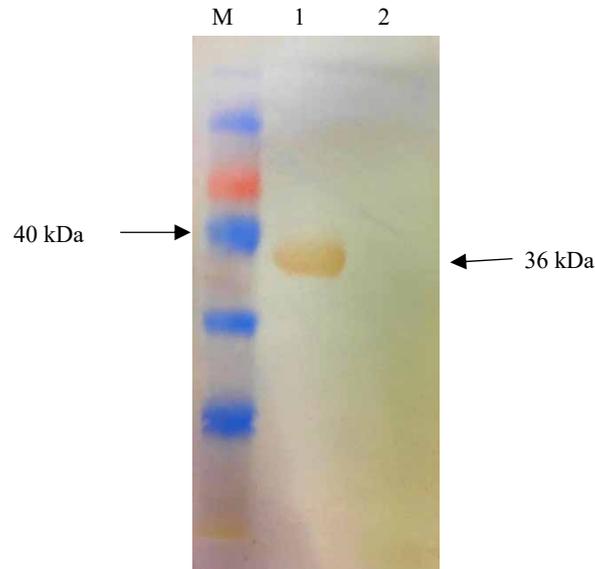


图 15 重组蛋白的 Western blot 检测
Fig.15 Western blot detection of pET-32a-CdtC protein
M:蛋白分子质量标准; 1: 重组蛋白; 2::对照
M:Protein marker; 1. Recombinant protein; 2: Control

3.5.5 蛋白浓度的测定

利用 NanoDrop 2000 超微量分光光度计测定纯化蛋白浓度，现只把第一次纯化后测定的浓度列出。1 号管 3.913 mg/mL，2 号管 4.810 mg/mL,3 号管 0.648 mg/mL，4 号管 0.167 mg/mL,5 号管为 0.038 mg/mL，因 5 号管浓度已经很低，6 号管未测。

3.6 ELISA 检测方法条件的确定及优化

3.6.1 重组抗原最佳包被浓度和血清的最佳稀释比例

如表中所示，当血清稀释度为 1：200 时，重组蛋白质 pET-32a-CdtC 1 μ g/mL 是最佳的，P/N 值较高（19.018）且阳性血清的 OD_{450nm} 值在 1.0 附近。

表 5 pET-32a-CdtC 重组蛋白方阵试验

Table 5 The checkerboard titration test of recombinant pet-32a-cdtc protein

血清稀释度	抗原包被浓度 (μg/mL)					
	4	2	1	0.5	0.25	
1:50	P	3.067	2.461	2.269	2.153	1.834
	N	0.069	0.114	0.086	0.123	0.064
	P/N	44.449	21.588	26.384	17.504	28.656
1:100	P	1.790	1.647	1.591	1.504	1.160
	N	0.059	0.064	0.169	0.071	0.067
	P/N	30.339	25.734	9.414	21.183	17.313
1:200	P	1.129	1.155	1.065	0.982	0.848
	N	0.070	0.065	0.056	0.071	0.061
	P/N	16.129	17.769	19.018	13.831	13.902
1:400	P	0.555	0.600	0.523	0.460	0.410
	N	0.051	0.076	0.063	0.060	0.093
	P/N	10.882	7.895	8.302	7.667	4.409

注: P: 阳性血清的值; N: 表示阴性血清值。(下同)

Note: P : positive sera value ; N : negative sera value

3.6.2 抗原最佳包被时间的确定

由表 6 可知, 当选用 37℃ 恒温作用 2 h 包被时, 阳性血清的 OD_{450nm} 值在 1.0 附近, P/N 值较高 (15.843) 效果最好

表 6 不同包被条件的影响

Table 6 The influence of different coating condition

血清稀释度	不同包被条件			
	4℃ 过夜	37 °C 1h	37 °C 1h4℃ 过夜	37 °C 2h,
1:200 (P)	0.928	1.133	1.185	1.077
1:200 (N)	0.067	0.075	0.078	0.068
P/N	13.851	15.107	15.253	15.843

3.6.3 最佳封闭液的确定

由表 7 可知, 当以脱脂奶粉 (5%) 为封闭液时, 阳性血清的 OD_{450nm} 值在 1.0 附近且 P/N 值较高 (16.313)

表 7 不同封闭液的确定

Table 7 Determination of different blocking buffer

血清稀释度	不同封闭液			
	5% 脱脂奶粉	5% 新牛血清	5% 胎牛血清	1% BSA
1:200 (P)	1.093	1.100	1.510	1.348
1:200 (N)	0.067	0.112	0.290	0.550
P/N	16.313	9.821	5.207	2.451

3.6.4 最佳封闭时间的确定

从表 8 可以看出, 当封闭时间为 1 h 时, P/N 值较高 (16.636), 阳性血清的 OD_{450nm} 值在 1.0 附近。

表 8 封闭时间
Table 8 Sealing time

血清稀释度	封闭时间 (h)			
	0.5	1	1.5	2
1:200 (P)	0.847	1.098	1.167	1.286
1:200 (N)	0.063	0.066	0.078	0.088
P/N	13.444	16.636	14.962	14.614

3.6.5 一抗最佳作用时间的确定

如表 9 所显示, 当血清于 37 °C 反应 1 h, P 值在 1.0 左右, 阳性与阴性的 OD_{450nm} 比值 (P/N) 最大 (16.683)。

表 9 一抗反应时间
Table 9 Reaction time of checked serum

血清稀释度	一抗反应时间 (h)			
	0.5	1	1.5	2
1:200 (P)	0.886	1.051	1.045	1.221
1:200 (N)	0.061	0.063	0.065	0.075
P/N	14.530	16.683	16.082	16.280

3.6.6 酶标抗体最佳稀释倍数

如表 10 所示, 当酶标二抗以 1 : 10 000 稀释时, P 值接近于 1.0。阳性与阴性血清的 OD_{450nm} 比值 (P/N) 最大 (17.100)

表 10 酶标二抗稀释浓度
Table 10 Dilution of enzyme labeled antibody

血清稀释度	二抗稀释倍数			
	1:5000	1:10000	1: 15000	1: 20000
1:200 (P)	1.349	1.026	0.816	0.595
1:200 (N)	0.08	0.06	0.052	0.049
P/N	16.863	17.100	15.692	12.143

3.6.7 二抗最佳反应时间的确定

二抗反应时间最佳为 37°C, 1 h 时, P 值接近于 1.0, 阳性与阴性血清的 OD_{450nm} 比值 (P/N)

最大 (14.877), 如表 11

表 11 酶标抗体作用时间

Table11 Reaction time of enzyme labeled antibody

血清稀释度	二抗反应时间 (h)			
	0.5	1	1.5	2
1:200 (P)	0.854	1.086	1.316	1.573
1:200 (N)	0.063	0.073	0.087	0.105
P/N	13.550	14.877	15.069	14.984

3.6.8 底物最佳显色时间的确定

采用以上确定的最佳条件, 通过不同的显色时间比较, 结果如表 12 所示, 显色 10 min 时, 阳性与阴性血清的 OD_{450nm} 值的比值 (P/N) 最大 (14.338)。

表 12 底物显色时间

Table 12 Substrate color development time

血清稀释度	显色时间 (min)			
	5	8	10	15
1:200 (P)	0.585	0.827	1.018	1.191
1:200 (N)	0.062	0.065	0.071	0.116
P/N	9.441	12.784	14.338	10.270

3.6.9 阴阳性临界值判断

用已建立的 ELISA 方法检测 30 份 HPS 的阴性血清。结果如表 13 所示。检测血清 OD_{450nm} 的平均值(AV)为 0.183, 标准方差(SD)为 0.079。OD_{450nm} 平均值(AV)+3×SD=0.420, OD_{450nm} 均值(AV)+2×SD=0.341。如果待测样品 OD_{450nm} 值≥0.420 时, 则判定为阳性; 如果待测样品 OD_{450nm} 值<0.341 时, 则判定为阴性; 若测试的样品在两者之间 OD_{450nm} 值, 可疑需重测。

表 13 ELISA 临界值的确定

Table13 The cut-off of ELISA

样本编号	样本号	OD _{450nm} 值	样本	OD _{450nm} 值
1	11	0.220	21	0.201
2	12	0.166	22	0.293
3	13	0.203	23	0.134
4	14	0.272	24	0.058
5	15	0.145	25	0.151
6	16	0.125	26	0.191
7	17	0.135	27	0.197
8	18	0.196	28	0.235
9	19	0.189	29	0.194

3.6.10 特异性试验

为了检验所建立的间接 ELISA 方法的特异性，用此方法同时检测了猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、猪瘟病毒 (CSFV)、口蹄疫病毒 (FMDV)、蓝耳病毒 (PRRSV) 及大肠杆菌(*E.coli*)的阳性血清，结果如表 14 所示，除 HPS 阳性血清 OD_{450nm} 值达到 0.883，其它样品均为阴性，表明此方法具较好的特异性。

表 14 ELISA 方法的特异性试验
Table14 The specificity of ELISA

血清	CSFV	PRRSV	FMDV	PEDV	<i>E.coli</i>	HPS 阳性	HPS 阴性
OD _{450nm} 均值	0.101	0.131	0.151	0.186	0.201	0.883	0.053
结果判定	-	-	-	-	-	+	-

注：“—”代表阴性，“+”代表阳性

3.6.11 重复性实验

3.6.11.1 批内重复性试验

使用相同批次纯化的蛋白质包被酶标板，检测 5 份血清，各重复 5 个孔，并计算变异系数。结果如表 15，可以看出，批内变异系数在 3.232%~6.148%之间，在 10%以内，建立的 ELISA 方法具有较好的批内重复性。

表 15 间接 ELISA 批内重复试验
Table 15 Test of Intra-assay variability of indirect ELISA

样品 序号	孔号					平均值 AV	标准差 SD	变异系数 CV(%)
	1	2	3	4	5			
1	0.891	1.038	0.986	0.936	0.981	0.966	0.056	5.746
2	1.175	1.028	1.092	1.150	1.056	1.100	0.062	5.623
3	0.875	0.861	0.936	0.879	0.885	0.887	0.029	3.232
4	1.053	1.123	1.120	0.998	0.986	1.056	0.065	6.148
5	1.228	1.134	1.200	1.111	1.248	1.184	0.059	5.017

3.6.11.2 批间重复性试验

利用三个不同批次纯化的蛋白包被酶标板，对 5 份血清检测。结果如表 16，计算变异系数不大于 10%，建立的方法在批次之间具有较好的重复性。

表 16 间接 ELISA 批间重复试验

Table 16 Test of Inter-assay variability of indirect ELISA

样品 序号	抗原批次			平均值 AV	标准差 SD	变异系数 CV(%)
	1	2	3			
1	0.995	1.058	0.928	0.994	0.065	6.542
2	1.064	1.185	1.195	1.148	0.073	6.352
3	0.882	0.901	0.931	0.905	0.025	2.731
4	1.149	1.067	1.187	1.134	0.061	5.407
5	1.114	1.211	1.153	1.159	0.049	4.210

3.6.12 ROC 曲线分析

用 ROC 曲线分析，当阴阳性临界值为 0.422 时，与 western blot 相比，所建 ELISA 的敏感性和特异性分别达到 100%和 92.9%，且 ROC 曲线下的面积为 0.991，表明了该 ELISA 检测方法具有很高的诊断准确性（图 16、表 17），也验证了本试验所确定的临界值 0.420 可作为判断 HPS 抗体阴阳性的临界标准。

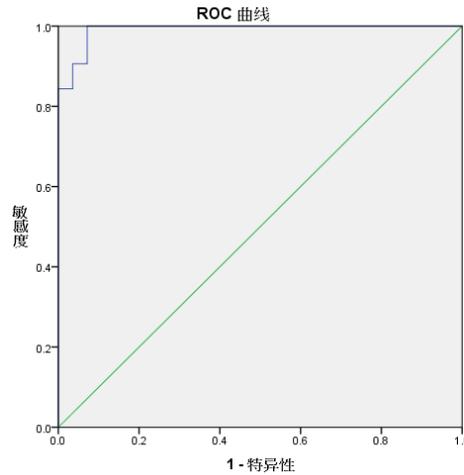


图 16 ROC 曲线（Western blot 为标准）

Fig.16 The ROC curve using western blot as diagnostic standard

表 17 ROC 曲线的下面积

Table 17 The area under the ROC curve

Area	Std. Error ^a	Asymptotic Sig ^b	Asymptotic 95% confidence interval	
			Lower bound	Upper bound
0.991	0.008	0.000	0.976	1.000

a. Under the nonparametric assumption; b. Null hypothesis: true area=0.5

3.6.13 临床样品的检测

对河北地区猪场送检的 561 份血清（未免疫 HPS 疫苗）进行 HPS 抗体检测，其中衡水、沧

州、石家庄检测的血样包括 HPS 分离阳性场，所以阳性率偏高。从表 18 可以看出，阳性血清样品总数为 224 份，总阳性率为 39.9%。

表 18 河北省各市血清样本的检测

Table 18 Detection of serum samples in hebei province

地区	样品数 (份)	阳性数 (份)	阳性率 (%)
保定	125	43	34.4
衡水	78	35	44.8
沧州	56	33	58.9
石家庄	110	47	42.7
邢台	63	20	31.7
邯郸	44	16	36.4
廊坊	85	30	35.3
总数	561	224	39.9

4 讨论

4.1 HPS 的分离鉴定

近几年对副猪嗜血杆菌的发病报道不断增多,各地关于分离菌的血清型报道也不断增多,各地报道优势血清型略有不同。Cai 等于 2005 年首次报道了我国副猪嗜血杆菌以 4 型、5 型和 13 型为主^[23],郭伶对辽宁地区副猪嗜血杆菌血清型进行鉴定,发现以血清 5 型和 13 型为主要血清型^[10],车勇良等报道了福建地区以 13 型、4 型和 5 型为主^[15],于江等对 2008 年至 2012 年,来自山东省,河南省,河北省,江苏省,上海市的多个养殖场送检的样本进行了副猪嗜血杆菌的检测,并鉴定血清型,结果显示血清 4 型和 5 型最为流行^[21],江军对 2010—2015 年浙江省分离的副猪嗜血杆菌进行血清鉴定,结果浙江省以 5 型、4 型和 13 型为主^[16],并且发现连续 6 年浙江省流行的优势血清型没有明显改变。虽然不同地区和不同年份报道的优势血清型存在一些差异,但综合来看,我国仍然以 4 型、5 型和 13 型为优势血清型。在本研究中,对 2017 年 9 月至 2018 年 7 月收集河北地区疑似副猪嗜血杆菌感染的病猪、病料 107 份进行病原分离,血清型鉴定。共鉴定出 23 株副猪嗜血杆菌,分离率为 21.49%。其中 1 型分离到 3 株,4 型分离到 5 株,5 型分离到 4 株,7 型分离到 3 株,14 型分离到 4 株,有 4 株不能区分血清型。分离鉴定结果表明 4 型、5 型、14 型和不能定型为河北地区的主要血清型,在全国来看属于优势血清型的 13 型并未分离到。研究报道,7 型副猪嗜血杆菌属于无毒菌株^[4],本研究成功分离到 3 株 7 型的副猪嗜血杆菌,其中两组病料中只分出了副猪嗜血杆菌,未分出其它细菌,关于 7 型副猪嗜血杆菌是否致病,有待进一步研究。在分菌的过程发现在同一猪场存在着 2-3 个血清型共同感染,石家庄某猪场同时鉴定出 1 型、4 型、5 型三种血清型,沧州某猪场同时鉴定出 5 型和 14 型两种血清型。本研究采用了 Howell K J 等建立的 PCR 的方法对副猪嗜血杆菌进行分型,比 IHA 更方便,更简单,不用购买 15 种标准菌株制备标准血清,更加节省时间,即使有其他生长速度较快的细菌干扰,无法纯化副猪嗜血杆菌,利用 PCR 的方法也可以进行血清型的鉴定,大大提高了诊断效率和准确性。本研究通过不同的保存条件比较,发现 TSA 划线培养后 4℃ 冰箱可以保存 8-10 天,菌液用 30% 的甘油-TSB,在 -20℃ 保存 45-60 天,在 -80℃ 可以保存 90 天以上,和其他相关报道结果一致^[17],长期保存可采取卵黄液或脱脂奶粉冻干保存,保存时间可以达到 5 年以上^[7]。由于本研究收集病料的时间有限,份数有限,可能还有其他血清型存在,有待后续收集鉴定。

4.2 CdtC 基因优势抗原表位区的克隆及原核表达

细胞致死膨胀素 (CDT) 目前仅在一些革兰氏阴性菌中发现,可在真核细胞静止和分裂前期造成 DNA 双链断裂的细菌毒素,导致真核细胞周期阻断在 G₂ 期^[118]。三个亚基均可诱导机体产生中和抗体^[105]。本研究中,利用分离到的几种不同血清型的 HPS 作为模板,进行了 CdtC 全基因的扩增,并且进行了序列比对,发现该基因非常保守,同源性在 94.0%~99.7%,这和李军星^[119]等人的研究结果基本一致,李军星等人还比较副猪嗜血杆菌与其他细菌的 CdtC 的氨基酸序列,发现该蛋白的同源性小于 40%。CdtC 在副猪嗜血杆菌中的保守性和与其他细菌间的特异性,并

且可以诱导机体产生中和抗体,这说明该蛋白可以作为 HPS 的一种诊断标识,所以本研究选择了该蛋白进行表达,为了更加突出蛋白的抗原性,使用 DNASTAR 软件筛选该蛋白质的优势抗原表位区域。首先根据 GenBank 上公布的 CdtC 的基因序列,设计了一对引物扩增了 CdtC 的全基因序列,回收进行测序,保证扩增序列的正确性。根据筛选的优势抗原表位区设计了一对表达引物,以扩增的 CdtC 为模板进行扩增,扩增后再次进行测序,保证酶切位点成功引入,优势抗原表位区的碱基序列正确。本研究选择了大肠杆菌原核表达系统,因为该系统具有成本低,表达量大,连接转化成功阳性菌易保存等特点。选用了带有的 His.Tag 标签的 pET-32a 作为原核表达载体,以便于对重组蛋白的纯化,选用了 *E.coli* BL21(DE3)作为表达宿主。在不同的诱导时间对样品取样,通过 SDS-PAGE 电泳确定最佳诱导表达时间为 37℃6 小时,重组蛋白大小为 36 kDa。可溶性检测结果显示,重组蛋白存在包涵体中,采用低温超声裂解菌体,此过程中防止蛋白降解。通过包涵体-His 标签蛋白纯化试剂盒纯化蛋白质,并在纯化的过程中控制滴加速度,提高蛋白的纯化率。将纯化的蛋白质变性,在 SDS-PAGE 跑电泳,把蛋白质转到 NC 膜用于 Western blot 鉴定,结果显示纯化的蛋白有良好的反应原性。

4.3 间接 ELISA 检测方法的建立

由于 HPS 比较娇嫩,对营养要求高,分离要求送检的病料新鲜,未经过冷冻保存,发病猪没有用过抗生素治疗。即便这样 HPS 的分离率也比较低,病原菌的分离周期也比较长,为了更快的确诊该病的发生,就需要一种快速、准确、特异性强可以大批量检测的方法,因此,血清学检测通常被用来检测猪群的 HPS 感染情况。本研究选用纯化的 CdtC 蛋白为包被抗原,HRP 标记的兔抗猪 IgG 作为二抗,建立了 HPS 的血清抗体检测的间接 ELISA 方法。通过对 ELISA 各个反应条件的筛选,最终选定以 1 μg/mL 的蛋白浓度在 37℃恒温作用 2 小时包被酶标板,用脱脂奶粉(5%)为封闭液在 37℃的恒温下封闭 1 小时,待检测血清按 1:200 稀释,37℃孵育 1 小时,二抗按 1:10000 的比例稀释,在 37℃孵育 1 小时,以 TMB 显色液避光显色 10 min,作为最终的工作条件。通过特异性、重复性试验检测所建立的方法的特异性和稳定性。测试结果证实,所建立的方法重复性良好,批间、批内重复试验变异系数均小于 10%,且无交叉反应特异性良好。使用 30 份阴性血清检测结果的平均值和标准方差确定的阴阳性临界值为 0.420。用建立的间接 ELISA 方法和 western blot 方法,分别检测了来源相同的 60 份血样,并以 western blot 的结果为标准对间接 ELISA 方法进行了 ROC 曲线分析,得出当 cut-off 值为 0.422 时,所建的间接 ELISA 方法的敏感性和特异性分别达到 100%和 92.9%。该值与利用 30 份阴性血清检测结果的平均值和标准方差确定的临界值接近,说明确定的临界值 0.420 可以作为诊断的临界值标准。采用建立的间接 ELISA 方法检测自河北地区收集的 561 份血样的 HPS 抗体。阳性血清总数为 224 份,总阳性率为 39.9%,各地区阳性率有一定的差异,血清抗体的阳性率高于病原的分离率。

5 结论

5.1 在收集的病料中成功的分离出 23 株副猪嗜血杆菌，并鉴定了血清型。

5.2 成功的利用原核表达了 CdtC 亚基的优势抗原表位区，经 Western blot 鉴定了重组蛋白的抗原性良好。

5.3 利用重组的 CdtC 蛋白作为抗原，建立了 HPS 血清抗体的间接 ELISA 检测方法，优化了反应条件，并利用该方法检测了河北地区收集的血清样品，具有一定的临床应用价值。

参考文献

- [1] Oliveira S, Pijoan C. *Haemophilus parasuis* : new trends on diagnosis, epidemiology and control[J]. *Veterinary Microbiology*, 2004,99(1):1-12.
- [2] Lewis P A, Shope R E. Swine influenza : ii. A hemophilic bacillus from the respiratory tract of infected swine[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1931,54(3):361-371.
- [3] Biberstein E L, White D C. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 1969,2(1):75-78.
- [4] Morozumi T, Nicolet J. Morphological variations of *Haemophilus parasuis* strains[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1986,23(1):138-142.
- [5] Rapp-Gabrielson V J, Gabrielson D A, Schamber G J. Comparative virulence of *Haemophilus parasuis* serovars 1 to 7 in guinea pigs[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1992,53(6):987-994.
- [6] 梁留存. 副猪嗜血杆菌陕西株的分离鉴定及生物学特性研究[D]., 2014.
- [7] 蔡旭旺. 副猪嗜血杆菌的分离鉴定及诊断方法与灭活疫苗的研究[D]. 华中农业大学, 2006.
- [8] M Ller K, Kilian M. V factor-dependent members of the family Pasteurellaceae in the porcine upper respiratory tract[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1990,28(12):2711-2716.
- [9] 方勤. 副猪嗜血杆菌的鉴定及培养条件优化[D]. 湖南农业大学, 2016.
- [10] 郭伶, 刘孝刚. 辽宁地区副猪嗜血杆菌血清型的鉴定[J]. *畜牧与兽医*, 2014,46(03):91-93.
- [11] Kielstein P, Wuthe H, Angen O, *et al.* Phenotypic and genetic characterization of NAD-dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of pigs and their possible pathogenetic importance[J]. *Veterinary Microbiology*, 2001,81(3):243-255.
- [12] 尹秀凤, 姜平, 邓雨修, 等. 副猪嗜血杆菌的分离与鉴定[J]. *畜牧与兽医*, 2004,36(7):6-8.
- [13] Møller K, Fussing V, Grimont P A D, *et al.* *Actinobacillus minor* sp. nov., *Actinobacillus porcinus* sp. nov., and *Actinobacillus indolicus* sp. nov., Three New V Factor-Dependent Species from the Respiratory Tract of Pigs[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996,46(4):951-956.
- [14] Kielstein P, Rapp-Gabrielson V J. Designation of 15 serovars of *Haemophilus parasuis* on the basis of immunodiffusion using heat-stable antigen extracts[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1992,30(4):862-865.
- [15] Rafiee M, Blackall P J. Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*[J]. *Australian Veterinary Journal*, 2000,78(3):172-174.
- [16] Río M L D, Gutiérrez C B, Ferri E F R. Value of indirect hemagglutination and coagglutination tests for serotyping *Haemophilus parasuis*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003,41(2):880-882.
- [17] Howell K J, Peters S E, Jinhong W, *et al.* Development of a Multiplex PCR Assay for Rapid Molecular Serotyping of *Haemophilus parasuis*[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015,53(12):3812-3821.
- [18] Jia A, Zhou R, Fan H, *et al.* Development of serotype-specific PCR assays for typing of *Haemophilus parasuis* circulating in southern China[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2017,55(11):3249-3257.
- [19] Rapp-Gabrielson V J, Gabrielson D A. Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars among

- isolates from swine[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1992,53(5):659-664.
- [20] 尹秀凤, 王艳, 姜平. 我国部分地区副猪嗜血杆菌病的流行病学调查[J]. *畜牧与兽医*, 2007,39(6):11-13.
- [21] 于江, 吴家强, 张玉玉, 等. 副猪嗜血杆菌的分离与血清型鉴定[J]. *家畜生态学报*, 2014,35(4):64-66.
- [22] 王建, 邵卫星, 吕占军, 等. 2012年我国部分省市规模化猪场副猪嗜血杆菌分离鉴定及菌株血清分型[J]. *动物医学进展*, 2014(3):48-52.
- [23] Cai X, Chen H, Blackall P J, *et al.* Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2005,111(3):231-236.
- [24] Oliveira S, Blackall P J, Pijoan C. Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use of serotyping and genotyping[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 2003,64(4):435-442.
- [25] Rúbies X, Kielstein P, Costa L, *et al.* Prevalence of *Haemophilus parasuis* serovars isolated in Spain from 1993 to 1997[J]. *Veterinary Microbiology*, 1999,66(3):245-248.
- [26] Angen Ø, Svensmark B, Mittal K R. Serological characterization of Danish *Haemophilus parasuis* isolates[J]. *Veterinary Microbiology*, 2004,103(3):255-258.
- [27] Rafiee M, Blackall P J. Establishment, validation and use of the Kielstein-Rapp-Gabrielson serotyping scheme for *Haemophilus parasuis*[J]. *Australian Veterinary Journal*, 2010,78(3):172-174.
- [28] Versalovic J, Koeuth T, Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes.[J]. *Nucleic acids research*, 1991,19(24):6823-6831.
- [29] Rafiee M, Bara M, Stephens C P, *et al.* Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*[J]. *Australian veterinary journal*, 2000,78(12):846-849.
- [30] Oliveira S, Blackall P, Pijoan C. Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use of serotyping and genotyping.[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 2003,64(4):435-442.
- [31] 李鹏, 李军星, 李玉峰, 等. 中国东南部地区副猪嗜血杆菌分离株ERIC-PCR指纹图谱分析[J]. *中国兽医学报*, 2009,29(12):1566-1570.
- [32] 朱必凤, 杨旭夫, 刘主, 等. 6株副猪嗜血杆菌基因组DNA的PCR指纹图谱研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2007(03):177-179.
- [33] 贾爱卿, 李春玲, 王贵平, 等. 广东地区副猪嗜血杆菌KRG血清分型及基因分型多态性分析[J]. *农业生物技术学报*, 2010,18(1):103-107.
- [34] 彭昊, 李军, 谢宇舟, 等. 广西地区副猪嗜血杆菌ERIC-PCR指纹图谱分型研究[J]. *动物医学进展*, 2011,32(11):49-52.
- [35] Smart N L, Miniats O P, MacInnes J I. Analysis of *Haemophilus parasuis* isolates from southern Ontario swine by restriction endonuclease fingerprinting[J]. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche veterinaire*, 1988,52(3):319-324.
- [36] Smart N L, Hurnik D, Macinnes J I. An investigation of enzootic Glasser's disease in a specific-pathogen-free grower-finisher facility using restriction endonuclease analysis[J]. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 1993,34(8):487-490.
- [37] Perez-Losada M, Browne E, Madsen A, *et al.* Population genetics of microbial pathogens estimated from multilocus sequence typing (MLST) data[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2006,6(2):97-

- [38] Olvera A, Cerda-Cuellar M, Aragon V. Study of the population structure of *Haemophilus parasuis* by multilocus sequence typing[J]. *Microbiology*, 2006,152(12):3683-3690.
- [39] De La Puente Redondo V A, Navas Méndez J, García Del Blanco N, *et al.* Typing of *Haemophilus parasuis* strains by PCR-RFLP analysis of the *tbpA* gene.[J]. *Veterinary microbiology*, 2003,92(3):253-262.
- [40] Yue-Feng C, Peng-Chen G, Ping Z, *et al.* Genotyping of *Haemophilus parasuis* isolated from northwest China using PCR-RFLP based on the *ompA* gene.[J]. *The Journal of veterinary medical science*, 2011,73(3):337-343.
- [41] 李军星, 姜平, 王艳, 等. 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.
- [42] Olvera A, Calsamiglia M, Aragon V. Genotypic diversity of *Haemophilus parasuis* field strains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006,72(6):3984-3992.
- [43] Dijkman R, Wellenberg G J, van der Heijden H M J F, *et al.* Analyses of Dutch *Haemophilus parasuis* isolates by serotyping, genotyping by ERIC-PCR and Hsp60 sequences and the presence of the virulence associated trimeric autotransporters marker[J]. *Research in Veterinary Science*, 2012,93(2):589-595.
- [44] Ruiz A, Oliveira S, Torremorel M, *et al.* Outer membrane proteins and DNA profiles in strains of *Haemophilus parasuis* recovered from systemic and respiratory sites.[J]. *Journal of clinical microbiology*, 2001,39(5):1757-1762.
- [45] 谷禹. 天津地区副猪嗜血杆菌病的流行病学调查及其防治措施的制定[D]., 2016.
- [46] 司振书, 王桂英. 副猪嗜血杆菌病研究进展[J]. *中国畜牧兽医*, 2011,38(6):179-182.
- [47] Vahle J L, Haynes J S, Andrews J J. Experimental Reproduction of *Haemophilus Parasuis* Infection in Swine: Clinical, Bacteriologic, and Morphologic Findings[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 1995,7(4):476-480.
- [48] Vahle J L, Haynes J S, Andrews J J. Interaction of *Haemophilus parasuis* with nasal and tracheal mucosa following intranasal inoculation of cesarean derived colostrum deprived (CDCD) swine.[J]. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire*, 1997,14(61):200-206.
- [49] Amano H, Shibata M, Kajio N, *et al.* Pathologic Observations of Pigs Intranasally Inoculated with Serovar 1, 4 and 5 of *Haemophilus parasuis* Using Immunoperoxidase Method[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1994,56(4):639-644.
- [50] Olvera A, Ballester M, Nofrarias M, *et al.* Differences in phagocytosis susceptibility in *Haemophilus parasuis* strains.[J]. *Veterinary Research*, 2009,40(3):24-35.
- [51] Wang Y. Transcription analysis on response of porcine alveolar macrophages to *Haemophilus parasuis*[J]. *BMC Genomics*, 2012,13(1):68-80.
- [52] Costa-Hurtado M, Ballester M, Galofré-Milà N, *et al.* VtaA8 and VtaA9 from *Haemophilus parasuis* delay phagocytosis by alveolar macrophages[J]. *Veterinary Research*, 2012,43(1):57-66.
- [53] Ghyslaine V, Anna S, Peter F, *et al.* *Haemophilus parasuis* invades porcine brain microvascular endothelial cells[J]. *Microbiology*, 2006,152(1):135-142.
- [54] Bouchet B, Vanier G, Jacques M, *et al.* Interactions of *Haemophilus parasuis* and its LOS with porcine brain microvascular endothelial cells[J]. *Veterinary Research*, 2008,39(5):42-55.
- [55] Woof J M, Kerr M A. The function of immunoglobulin A in immunity[J]. *Journal of Pathology*,

2010,208(2):270-282.

- [56] Mullins M A, Register K B, Bayles D O, *et al.* Haemophilus parasuis exhibits IgA protease activity but lacks homologs of the IgA protease genes of Haemophilus influenzae [J]. Veterinary Microbiology, 2011,153(3):407-412.
- [57] Lichtensteiger C A, Vimr E R. Neuraminidase (sialidase) activity of Haemophilus parasuis[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997,152(2):269-274.
- [58] Lichtensteiger C A, Vimr E R. Purification and renaturation of membrane neuraminidase from Haemophilus parasuis[J]. Veterinary Microbiology, 2003,93(1):79-87.
- [59] Davide S, Rino R, Maria S, *et al.* Molecular mechanisms of complement evasion: learning from staphylococci and meningococci[J]. Nature Reviews Microbiology, 2010,8(6):393-399.
- [60] Rautemaa R, Meri S. Complement-resistance mechanisms of bacteria[J]. Microbes & Infection, 1999,1(10):785-794.
- [61] Cerdà-Cuellar M, Aragon V. Serum-resistance in Haemophilus parasuis is associated with systemic disease in swine[J]. Veterinary Journal, 2008,175(3):384-389.
- [62] Zhang B, He Y, Xu C, *et al.* Cytolethal distending toxin (CDT) of the Haemophilus parasuis SC096 strain contributes to serum resistance and adherence to and invasion of PK-15 and PUVeC cells[J]. Veterinary Microbiology, 2012,157(1-2):237-242.
- [63] Oliveira S, Galina L, Blanco I, *et al.* Naturally-farrowed, artificially-reared pigs as an alternative model for experimental infection by Haemophilus parasuis[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 2003,67(2):146-150.
- [64] 粟硕, 付新亮, 张桂红. 副猪嗜血杆菌的诊断及防治策略[J]. 广东饲料, 2014,22(2):46-48.
- [65] 尹秀凤, 张书霞, 王艳, 等. 副猪嗜血杆菌人工感染猪的病理学观察[J]. 中国兽医学报, 2007,27(1):91-94.
- [66] 张清华, 付强, 房杰良, 等. 副猪嗜血杆菌病的病理组织学观察[J]. 广东畜牧兽医科技, 2009,34(1):22.
- [67] Morozumi T, Hiramune T. Effect of temperature on the survival of Haemophilus parasuis in physiological saline[J]. National Institute of Animal Health Quarterly, 1982,22(2):90-91.
- [68] Harris F W, Janzen E D. The Haemophilus somnus disease complex (Hemophilosis): A review[J]. Canadian Veterinary Journal La Revue Vétérinaire Canadienne, 1989,30(10):816-822.
- [69] Smart N L, Miniats O P, Rosendal S, *et al.* Glasser's disease and prevalence of subclinical infection with Haemophilus parasuis in swine in southern Ontario[J]. Canadian Veterinary Journal, 1989,30(4):339-343.
- [70] 马艳平, 刘永生, 张杰. 副猪嗜血杆菌检测技术研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2009,9(8):1545-1547.
- [71] Møller K, Andersen L V, Christensen G, *et al.* Optimization of the detection of NAD dependent Pasteurellaceae from the respiratory tract of slaughterhouse pigs [J]. Veterinary Microbiology, 1993,36(3 - 4):261-271.
- [72] Möller L V, Van Alphen L, Grasselie H, *et al.* N-acetyl-D-glucosamine medium improves recovery of Haemophilus influenzae from sputa of patients with cystic fibrosis.[J]. Journal of clinical microbiology, 1993,31(7):1952-1954.
- [73] Möller L V, Ruijs G J, Heijerman H G, *et al.* Haemophilus influenzae is frequently detected with monoclonal antibody 8BD9 in sputum samples from patients with cystic fibrosis.[J]. Journal of clinical microbiology, 1992,30(9):2495-2497.

- [74] 刘明志, 吴孝君, 王涛, 等. 副猪嗜血杆菌的分离及实验室检测方法[J]. 畜禽业, 2013(7):52-53.
- [75] Oliveira S, Galina L, Pijoan C. Development of a PCR Test to Diagnose Haemophilus Parasuis Infections[J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2001,13(6):495-501.
- [76] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. Journal of Bacteriology, 1991,173(2):697-703.
- [77] Angen Ø, Oliveira S, Ahrens P, *et al.* Development of an improved species specific PCR test for detection of Haemophilus parasuis[J]. Veterinary Microbiology, 2007,119(2):266-276.
- [78] Jung K, Chae C. In-situ hybridization for the detection of Haemophilus parasuis in naturally infected pigs[J]. Journal of Comparative Pathology, 2004,130(4):294-298.
- [79] Turni C, Pyke M, Blackall P J. Validation of a real-time PCR for Haemophilus parasuis[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010,108(4):1323-1331.
- [80] 河南省动物疫病预防控制中心, 河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 河北农业大学动物科技学院, 等. 副猪嗜血杆菌检测方法[S]. 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局; 中国国家标准化管理委员会, 2017.
- [81] 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(5):487-491.
- [82] Turni C, Blackall P J. Comparison of the indirect haemagglutination and gel diffusion test for serotyping Haemophilus parasuis[J]. Veterinary Microbiology, 2005,106(1):145-151.
- [83] 王艳, 夏万田, 柏坤桃, 等. 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.
- [84] 魏子贡, 蔡旭旺, 金梅林, 等. 副猪嗜血杆菌抗体间接血凝检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2006,36(9):713-718.
- [85] 石碧, 崔耀文, 贾凡, 等. 副猪嗜血杆菌血清5型间接血凝试验和间接ELISA抗体检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2007,37(11):964-968.
- [86] 陈善真. 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[D]., 2010.
- [87] 薛云, 王乐, 王臣, 等. 副猪嗜血杆菌新型微量凝集试验抗体检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2018,40(9):806-811.
- [88] 牛长波, 雷万海, 淳艳华, 等. 副猪嗜血杆菌病症状和综合防治措施[J]. 中国畜禽种业, 2018(3):133.
- [89] 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(5):487-491.
- [90] 王金合, 石冬梅, 郭素琴, 等. 副猪嗜血杆菌的分离鉴定及自家灭活疫苗的研制[J]. 中国畜牧兽医, 2009,36(8):144-146.
- [91] Zhou M, Guo Y, Zhao J, *et al.* Identification and characterization of novel immunogenic outer membrane proteins of Haemophilus parasuis serovar 5[J]. Vaccine, 2009,27(38):5271-5277.
- [92] Álvarez-Estrada Á, Martínez-Martínez S, Martín C G, *et al.* Immunogenic characterization of vaccines based on Haemophilus parasuis Nagasaki strain, OmpP2, OmpP5 and OmpD15, in colostrum-deprived pigs experimentally challenged with the same strain[J]. Research in Veterinary Science, 2018,119:292-301.
- [93] 魏海林, 付丹, 王正皓, 等. 四川省副猪嗜血杆菌分离株β-内酰胺类药物药敏特性及质粒介

- 导耐药基因检测研究[J]. 中国预防兽医学报, 2018(3):186-189.
- [94] Johnson W M, Lior H. Response of Chinese hamster ovary cells to a cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin[J]. FEMS Microbiology Letters, 1987,43(1):19-23.
- [95] Johnson W M, Lior H. A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by *Campylobacter* spp[J]. Microbial Pathogenesis, 1988,4(2):115-126.
- [96] Jinadasa R N, Bloom S E, Weiss R S, *et al.* Cytolethal distending toxin: a conserved bacterial genotoxin that blocks cell cycle progression, leading to apoptosis of a broad range of mammalian cell lineages[J]. Microbiology, 2011,157(Pt 7):1851-1875.
- [97] Min Y, Fan Y, Jian Y, *et al.* Complete genome sequence of *Haemophilus parasuis* SH0165[J]. Journal of Bacteriology, 2009,191(4):1359-1360.
- [98] Erik H, Galán J E. *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial-internalization pathway[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004,101(13):4614-4619.
- [99] Lara-Tejero M, Galán J E. A bacterial toxin that controls cell cycle progression as a deoxyribonuclease I-like protein[J]. Science, 2000,290(5490):354-357.
- [100] Lara-Tejero M, Galán J E. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity[J]. Infection & Immunity, 2001,69(7):4358-4365.
- [101] Dragana N, Yun H, C Erec S. Assembly and function of a bacterial genotoxin[J]. Nature, 2004,429(6990):429-433.
- [102] Yamada T, Komoto J, Saiki K, *et al.* Variation of loop sequence alters stability of cytolethal distending toxin (CDT): crystal structure of CDT from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*[J]. Protein Science A Publication of the Protein Society, 2006,15(2):362-372.
- [103] Dragana N, C Erec S. Mechanisms of assembly and cellular interactions for the bacterial genotoxin CDT[J]. Plos Pathogens, 2005,1(3):214-224.
- [104] 陈西, 王湘如, 徐晓娟, 等. 副猪嗜血杆菌细胞致死膨胀毒素的细胞毒性研究[J]. 畜牧兽医学报, 2011,42(12):1750-1755.
- [105] Wising C, Svensson L A, Ahmed H J, *et al.* Toxicity and immunogenicity of purified *Haemophilus ducreyi* cytolethal distending toxin in a rabbit model[J]. Microb Pathog, 2002,33(2):49-62.
- [106] Wising C, Mölne L, Jonsson I M, *et al.* The cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi* aggravates dermal lesions in a rabbit model of chancroid[J]. Microbes & Infection, 2005,7(5):867-874.
- [107] Ge Z, Schauer D B, Fox J G. In vivo virulence properties of bacterial cytolethal-distending toxin[J]. Cellular Microbiology, 2010,10(8):1599-1607.
- [108] Shen Z, Feng Y, Rogers A B, *et al.* Cytolethal distending toxin promotes *Helicobacter cinaedi*-associated typhlocolitis in interleukin-10-deficient mice.[J]. Infection & Immunity, 2009,77(6):2508-2516.
- [109] Guerra L, Cortesbratti X, Guidi R, *et al.* The Biology of the Cytolethal Distending Toxins[J]. Toxins, 2011,3(3):172-190.
- [110] 陈西. 副猪嗜血杆菌细胞致死膨胀毒素的致病性研究及cdt基因缺失突变株的筛选[D]. 华中农业大学, 2012.
- [111] 刘佳. 副猪嗜血杆菌细胞致死膨胀毒素对细胞和仔猪致病作用研究[D]. 华中农业大学, 2015.
- [112] 刘宝京. 猪丁型冠状病毒HB-BD株分离鉴定及生物学特性研究[D]. 河北农业大学, 2018.

- [113] 裴丽华. 猪伪狂犬病毒gE基因亚克隆、原核表达及ELISA抗体检测方法的建立[D]. 河北农业大学, 2014.
- [114] 郑志强. 猪圆环病毒3型抗体ELISA方法的建立及初步应用[D]. 河北农业大学, 2018.
- [115] 车勇良, 王隆柏, 陈如敬, 等. 福建地区副猪嗜血杆菌的主要生物学特性[J]. 中国兽医科学, 2012(12):1237-1241.
- [116] 江军. 浙江省副猪嗜血杆菌血清型调查和IscR对荚膜多糖合成相关基因表达的影响[D]. 南京农业大学, 2016.
- [117] 张定全. 副猪嗜血杆菌陕西株的分离鉴定及弱毒株的初步筛选[D]. 西北农林科技大学, 2013.
- [118] Cortes-Bratti X, Karlsson C T, Thelestam M, *et al.* The Haemophilus ducreyi cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest and apoptosis via the DNA damage checkpoint pathways[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001,276(276):5296-5302.
- [119] 李军星, 王一成, 袁秀芳, 等. 副猪嗜血杆菌不同分离株CDT基因序列测定及其遗传变异分析[J]. 华北农学报, 2011,26(6):79-84.

在读期间发表的学术论文

- 1 石保秋,张迪,管朔,张晓亮,贾敬亮,袁广富,王晶,范京惠,左玉柱.猪源奇异变形杆菌的分离鉴定及 I 类整合子的检测 [J/OL]. 中国动物传染病学报 :1-9[2019-03-12].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2031.s.20190130.1603.006.html>.

作者简介

姓 名：石保秋

性 别：男

出生年月：1986.09

籍 贯：河北省邢台市威县

学习工作经历：

2008.09-2011.06 就读于河北农业大学 动物科技学院 畜牧兽医专业

2011.07-2012.05 就职于保定冀中药业有限公司

2012.06-2012.11 就职于邯郸中道牧业

2012.12-2017.08 就职于唐人神集团河北美神种猪育种有限公司

2017.09-2019.06 就读于河北农业大学 动物医学院 兽医硕士

致谢

美好的时光总是那么短暂，转眼间两年的研究生学习就要结束了。对于我这种工作几年之后，重新走进校园的人来说，学习机会显得更加珍贵。这两年的学习、生活得到了老师、同学、朋友以及家人的莫大帮助与支持，在此要表示我衷心的感谢。

首先感谢我的导师左玉柱教授和范京惠副教授。两位老师以其渊博的专业知识、严谨的治学态度，在我的论文选题、试验设计、技术路线、试验思路等方面给予很多指导和建议；以其精益求精的工作态度，要求我试验要严谨，并及时纠正我试验中的错误；以其开拓性思维，勇于创新的精神，启发拓展我的思路；以其宽厚仁慈的胸怀、积极乐观的生活态度，为我的生活指点迷津。本论文从选题到完成，都倾注了老师的大量汗水和心血，再次感谢我的老师。

我的实验是在河北农业大学动物医学院传染病实验室完成，我要感谢实验室的王家鑫教授、宋勤叶教授、李丽敏副教授对我的帮助与指导。感谢已经毕业的刘宝京、罗尚星、牛山等师兄师姐在试验上是的指导与帮助，感谢顾文源师姐和师乾凯、侯林杉师兄的帮助，感谢陈少杰、袁广富、高佩佩等同学以及在读师弟师妹的帮助。

最后我要感谢家人对我的理解与支持，尤其要感谢我的妻子，担起了家庭的负担，在精神上和生活上给予我莫大的支持。

再次向所有关心帮助过我的老师、同学、朋友、亲人表示感谢。

石保秋
2019年6月