

徐引弟, 蔡旭旺, 徐晓娟, 等. 副猪嗜血杆菌血清 7 型 *crp* 基因缺失株的部分生物学特性[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(6):1372-1379.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2023.06.013

副猪嗜血杆菌血清 7 型 *crp* 基因缺失株的部分生物学特性

徐引弟¹, 蔡旭旺², 徐晓娟², 王治方¹, 张家庆¹, 朱文豪¹, 雷亚楠¹, 张立宪¹,
李海利¹, 焦文强¹, 王克领¹

(1. 河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002; 2. 华中农业大学动物医学院农业微生物国家重点实验室, 湖北武汉 430070)

摘要: 副猪嗜血杆菌(HPS)是引起猪格拉瑟病(Glasser's disease)的病原菌, 给全球和中国规模化养猪业造成了重大经济损失。副猪嗜血杆菌血清型众多, 其中血清 7 型是近年来分离比例越来越高的血清型, 也是危害越来越严重的血清型。*crp* 是最重要的系统调控因子之一, 在细菌感染过程中对细菌适应环境变化起着至关重要的作用。为了筛选副猪嗜血杆菌血清 7 型 *crp* 基因缺失弱毒株, 采用自然转化法构建了副猪嗜血杆菌血清 7 型临床分离株 HPS7 的 *crp* 基因缺失株, 对 HPS7 及其 *crp* 基因缺失株的生长特性、生物膜形成、抗药性、毒力等进行了研究。结果表明, HPS7 的 *crp* 基因缺失后, 生长显著减慢, 自凝速度减慢, 生物膜形成能力明显减弱, 对大部分抗生素的抗性降低, 对豚鼠的毒力降低。以上结果说明 *crp* 基因对 HPS7 的生长、抗药性、毒力均有明显影响。本研究结果为筛选副猪嗜血杆菌血清 7 型弱毒株提供了参考。

关键词: 副猪嗜血杆菌血清 7 型; *crp* 基因缺失株; 生长特性; 抗药性; 毒力

中图分类号: S858.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2023)06-1372-08

Partial biological characteristics of *Haemophilus parasuis* serotype 7 *crp* gene deletion strain

XU Yin-di¹, CAI Xu-wang², XU Xiao-juan², WANG Zhi-fang¹, ZHANG Jia-qing¹, ZHU Wen-hao¹,
LEI Ya-nan¹, ZHANG Li-xian¹, LI Hai-li¹, JIAO Wen-qiang¹, WANG Ke-ling¹

(1. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Research, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: *Haemophilus parasuis* (HPS) is the pathogen that causing porcine Glasser's disease, causing great economic losses to the large scale pig industry in the world and China. There are many serotypes of HPS, serotype 7 is a serotype with increasing proportion of isolation in recent years, and also a serotype with more and more serious harm. The *crp* is one of the most important systemic regulatory factors and plays a crucial role in adapting to environmental changes during bacterial infection. In order to screen HPS serotype 7 *crp* gene deletion attenuated strain, the *crp* gene deletion strain of HPS serotype 7 clinical isolate HPS7 was constructed by natural transformation method. Growth characteristics, biofilm formation, drug resistance and virulence of HPS7 and *crp* deletion strain were studied. The results showed that the growth speed

收稿日期: 2023-03-11

基金项目: 国家重点研发计划项目(2021YFD1301205); 河南省科技攻关项目(212102110378); 河南省农业科学院自主创新项目(2022ZC43)

作者简介: 徐引弟(1974-), 女, 湖北浠水人, 博士, 副研究员, 主要从事动物病原微生物学研究。(E-mail)445177674@qq.com

was significantly reduced, autoagglutination speed was showed down, the ability of biofilm formation was obviously weakened, resistance to most antibiotics was reduced, and the virulence to guinea pig was decreased after *crp* was deleted in HPS7. The results showed that *crp* gene had significant influence on growth, drug resistance and

virulence of HPS7. The results of this study provide a reference for the screening of HPS serotype 7 attenuated strains.

Key words: *Haemophilus parasuis* serotype 7; *crp* gene deletion strain; growth characteristics; drug resistance; virulence

引起猪格拉瑟病(Glasser's disease)的副猪嗜血杆菌(HPS)是临床上危害猪群健康最严重的细菌性病原之一。格拉瑟病以猪严重上呼吸道感染、多发性纤维素性浆膜炎、关节炎、脑膜炎为特征,给全球及中国的养猪业造成巨大的经济损失^[1-4]。副猪嗜血杆菌血清型有 15 种,其中血清 1 型、血清 5 型、血清 10 型、血清 12 型、血清 13 型、血清 14 型被认为是高毒力的血清型,血清 2 型、血清 4 型、血清 15 型为中等毒性,血清 3 型、血清 6 型、血清 7 型、血清 8 型、血清 9 型、血清 11 型被认为是无毒的^[5-7]。但血清 7 型是近年来临床典型发病病例中分离比例越来越高的血清型,也是危害越来越严重的血清型^[8-10]。

crp 基因编码 cAMP 受体蛋白(cAMP receptor protein, CRP),全长 675 bp 核苷酸,编码 225 个氨基酸,是大肠杆菌中 7 个系统调控因子之一^[11-14]。CRP 调控 490 多个基因的表达,在细菌感染过程中,系统调控因子在细菌适应环境变化方面起着至关重要的作用。CRP 可以提高大肠杆菌在各种压力条件下的适应性,CRP 蛋白调节多种基因的表达,与多种毒力因子的表达有关。由于 *crp* 基因与毒力密切相关,常被选为研制减毒疫苗的靶点^[14-16]。

crp 基因在副猪嗜血杆菌中的功能报道较少, Jiang 等^[17-18]的研究结果显示, *crp* 基因参与血清 5 型 HPS 的生长、生物膜形成、应激耐受、抗血清活性提高和铁利用。进一步试验发现, *crp* 基因缺失后

HPS 毒力显著降低。由于血清 7 型在临床上分离比例越来越高,而目前还没有针对血清 7 型的疫苗。因此本研究构建副猪嗜血杆菌血清 7 型 *crp* 缺失株,对缺失株的生长、抗性、毒力进行初步研究,为进一步研究 *crp* 基因在 HPS 中的功能以及筛选更加安全有效的 HPS 疫苗候选株提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

副猪嗜血杆菌血清 7 型临床分离株 HPS7 由本实验室分离鉴定并保存^[8-10]。自杀性质粒 pK18mobsacB、副猪嗜血杆菌-大肠杆菌穿梭载体 pSHK3-Kan 由华中农业大学徐晓娟、蔡旭旺副教授馈赠。

1.2 引物的设计与合成

参考 GenBank 报道的副猪嗜血杆菌血清 7 型 vHPS7 株全基因组(CP049089)序列,设计含有酶切位点及 USS 序列(DNA 摄取信号序列)的引物 *crpuF/crpuR*、*crpdF/crpdR*,用于扩增 *crp* 上下游同源臂, *crpF/crpR* 用于扩增 *crp* 基因,去掉酶切位点和 USS 序列的 *crpuuF/crpdR* 用于鉴定 *crp* 亲本株与缺失株,参考质粒 pSHK3-Kan 序列设计 *KanF/KanR* 用于扩增卡那霉素基因(*Kan*)。构建及鉴定副猪嗜血杆菌 *crp* 基因缺失株的引物见表 1,引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

表 1 用于构建和鉴定 *crp* 缺失株的引物

Table 1 Primers for construction and identification of *crp* deletion strains

引物名称	引物序列(5'→3')	片段大小(bp)/缺失株	用途
<i>crpuF</i>	CGGAATTCACCGCTTGTTTGAGGCTTTGATTGAACGGA	714	扩增 <i>crp</i> 上游片段
<i>crpuR</i>	TTTTTATCTTGTGCAATGAGAAACCTCTATAAATCATTT		
<i>crpdF</i>	ATCAGAATTGGTTAATTGCATATTAATAAATGCAAAGTGC	714	扩增 <i>crp</i> 下游片段
<i>crpdR</i>	CGGGATCCACAAGCGGTCTAGCCGAGGGGAATACACACC		
<i>KanF</i>	CATTGCACAAGATAAAAA	909	扩增 <i>Kan</i>
<i>KanR</i>	CAATTAACCAATTCTGAT		
<i>crpF</i>	ATGCAAGATGTTTCAATC	675	扩增 <i>crp</i>
<i>crpR</i>	TTATCTTGTCCCATACAC		
<i>crpuuF</i>	TTGAGGCTTTGATTGAACGGA	2 103(亲本株)/2 337(缺失株)	PCR 鉴定 <i>crp</i> 缺失株
<i>crpdR</i>	CTAGCGAGGGGAATACACACC		

斜体和下划线分别表示 *Bam* H I、*Eco* R I 酶切位点和 USS 序列。

1.3 试验动物

雌性豚鼠购自华兴实验动物养殖场,6~8 周龄,体质量 200~250 g。

1.4 *crp* 基因序列同源性分析

使用 MEGA 6 软件,分析副猪嗜血杆菌 *crp* 基因序列与同一种属中其他菌株 *crp* 基因序列之间的同源性。在 TSA[胰蛋白胨大豆琼脂培养基,含 5% 的胎牛血清,0.01% 的 NAD(辅酶 I)] 上复苏本实验室分离鉴定保存的副猪嗜血杆菌临床株和标准株,提取基因组,用引物 *crpF/crpR* 扩增 *crp* 基因,测序。

1.5 *crp* 缺失株的构建与鉴定

将副猪嗜血杆菌血清 7 型菌株 HPS7 复苏,挑取单菌落于 5 ml TSB(胰蛋白胨大豆肉汤培养基,含 5% 的胎牛血清,0.01% 的 NAD) 中,37 °C 培养 12 h,离心去上清液重悬菌体,提取基因组,分别用引物 *crpuF/crpuR* 和 *crpdF/crpdR* 扩增 *crp* 基因上、下游片段,用引物 *KanF/KanR* 从 pSHK3 质粒中扩增 909 bp 卡那霉素基因。利用 PCR 扩增原理,用引物 *crpuF/crpdR* 将这 3 个片段通过 PCR 重叠延伸连接在一起,形成重叠片段 UKD。使用 *Bam* H I 和 *Eco* R I 酶切 UKD 片段,连接到自杀性质粒 pK18mobsacB,阳性质粒命名为 pKUKD。参考文献 [17] 报道的自然转化法,大量提取重组质粒 pKUKD,测定 A_{260} 值。挑取 HPS7 单菌落于 5 ml TSB 中,37 °C 培养至 OD_{600} 值为 0.8,取 20 μ l 菌液加入 20 μ l 8 mmol/L cAMP(环腺苷酸),混匀,反应 10 min,加入 2 μ g 重组质粒 pKUKD,混匀,反应 10 min 后加入到 TSA 固体培养基上,涂布均匀,37 °C 孵育 5 h。用 TSB 洗涤菌体,转移到含 *Kan* 的 TSA 上,37 °C 培养 24~48 h。挑取转化子,提取基因组,用引物 *crpuF/crpdR*、*crpF/crpR*、*KanF/KanR* 扩增 UKD 序列、*crp* 基因和 *Kan*,电泳检测目的片段的大小及有无来鉴定是否成功构建 *crp* 缺失株,并测序验证。

1.6 *crp* 缺失株的生长曲线

HPS7 及其 *crp* 缺失株 Δcrp 在 TSB 中 37 °C 培养过夜,用 TSB 将 HPS7、 Δcrp 的 OD_{600} 值调整为 0.8。按 1:1 000 的接种比例将 HPS7、 Δcrp 接种至新的锥形瓶中,在气浴恒温振荡器中 37 °C、180 r/min 培养。每隔 2 h 取样 100 μ l,加入到 900 μ l 稀释液中 10 倍稀释,取样至 48 h,根据菌液 OD_{600} 值和预试验取 3 个适宜稀释度,取 100 μ l 在平板上涂

匀,各 3 个重复,置于 37 °C 培养 36 h,统计菌落数,取平均值,绘制出 *crp* 缺失株 Δcrp 的生长曲线。

1.7 *crp* 缺失株的自凝特性试验

HPS7 及其 *crp* 缺失株 Δcrp 在 2 ml TSB 中培养过夜,测定 OD_{600} ,用 TSB 调节 OD_{600} 值为 0.8,37 °C 静置培养,分别在 0 h、3 h、6 h、9 h、12 h、24 h、36 h、48 h 和 60 h 时,从培养液顶部取 200 μ l,测定 OD_{600} 。

1.8 生物膜的形成能力试验

将 HPS7 及其 *crp* 缺失株 Δcrp 培养过夜, OD_{600} 值调整为 0.8。96 孔微孔板中每孔中加入 90 μ l 培养液,加入 10 μ l 菌液,37 °C 孵育 60 h,吸去菌液,用 200 μ l 无菌 PBS(磷酸缓冲液)洗 3 次,100 μ l 甲醇固定 15 min,风干后,加入 100 μ l 1% 结晶紫染色 10 min,清洗、干燥,待完全干燥后,加入 100 μ l 的 33% 乙酸溶液溶解,用酶标仪测量 OD_{630} 值。3 个重复,取平均值。用未接种菌液的作为空白对照。

1.9 抗生素抗性试验

采用 Kirby-Bauer 纸片扩散法(K-B 法)进行抗生素抗性试验,将过夜培养的 HPS7 及其 *crp* 缺失株 Δcrp ,用灭菌 PBS 调整为适宜浓度,将菌液均匀涂抹于 TSA 上,选取 24 种临床上常用的药敏片(包括头孢噻唑、头孢他啶、氨苄西林、替米考星、阿莫西林、青霉素 G、阿米卡星、氟苯尼考、庆大霉素、头孢噻肟、痢特灵、链霉素、强力霉素、四环素、土霉素、氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星、左氟沙星、复方新诺明、阿奇霉素、红霉素、罗红霉素),将药敏片均匀贴于涂有菌液的平板上,37 °C 培养 36 h,测量药敏片抑菌圈直径。

1.10 豚鼠感染试验

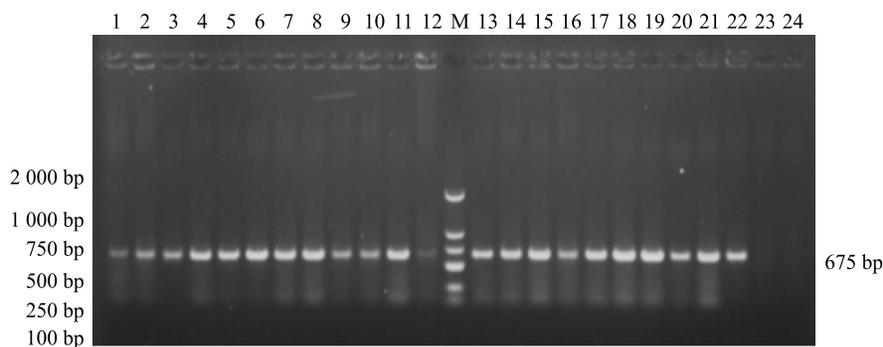
选取体质量为 250 g 左右的清洁级豚鼠 45 只,随机分成 9 组(HPS7、 Δcrp 菌株各 4 组,空白对照 1 组),每组 5 只。将 HPS7 和 Δcrp 接种到 TSA 固体培养基上,过夜培养,用无菌生理盐水洗涤,反复吹打, OD_{600} 值调整为 2.0,10 倍稀释成 4 个滴度梯度,每个滴度腹腔注射 5 只豚鼠,每只豚鼠注射 1 ml,对照组注射生理盐水,同时原液 10 倍稀释,进行活菌计数。观察豚鼠发病和死亡情况,连续观察 14 d,死亡豚鼠取脏器组织抹片观察,接种到 TSA 培养基。肝脏、肺脏用多聚甲醛固定后送武汉赛维尔生物科技有限公司进行病理切片。

2 结果与分析

2.1 *crp* 基因序列同源性比对

PCR 扩增副猪嗜血杆菌各血清型临床分离株和 15 个标准株的 *crp* 基因,结果 *crp* 基因在副猪嗜

血杆菌的临床分离株和标准株中均能扩增出(图 1),测序比对,在不同副猪嗜血杆菌血清型和标准株之间 *crp* 基因高度同源,同源性均在 95% 以上。表明 *crp* 基因在副猪嗜血杆菌中是保守的基因。



M;DL2000 marker;1~15:HPS 血清 1~15 型标准株;16~22:HPS 临床分离株血清 2 型、4 型、5 型、6 型、7 型、9 型、13 型;23:阴性对照;24:空白对照。

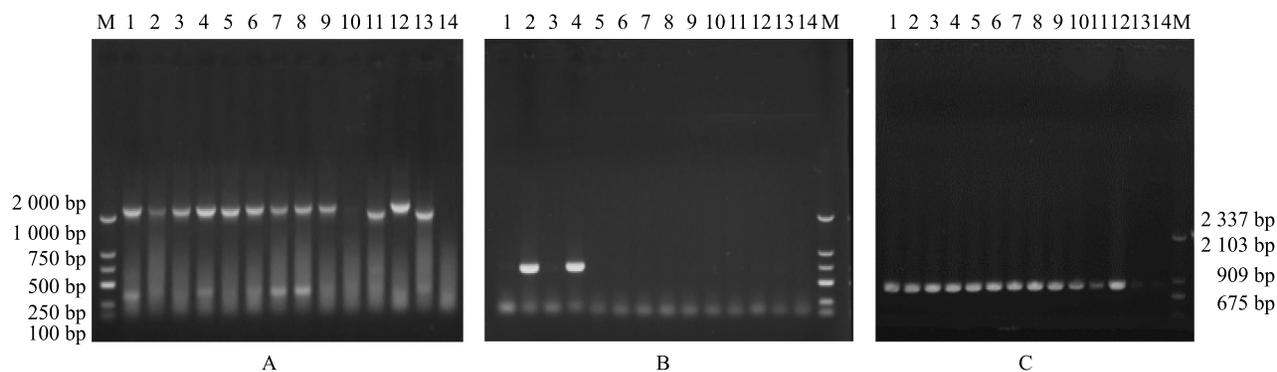
图 1 副猪嗜血杆菌 *crp* 基因扩增

Fig.1 Amplification of *crp* gene of *Haemophilus parasuis* (HPS)

2.2 *crp* 缺失株的构建与验证

如图 2 所示,使用引物 *crpuuF/crpddR* 鉴定 UKD,缺失株片段长 2 337 bp,亲本株片段长 2 103 bp。使用引物 *crpF/crpR* 鉴定 *crp* 基因,缺失株不能扩增到 675 bp 的 *crp* 基因片段,亲本株能扩增到。

使用引物 *KanF/KanR* 鉴定 *Kan* 基因,缺失株扩增到 909 bp 的 *Kan* 基因,亲本株不能扩增到。阳性扩增片段测序比对结果显示 100%同源。表明 HPS7 的 *crp* 基因缺失株构建成功。



M;DL2000 marker;A:UKD(*crp* 上游片段+*kan* 基因+*crp* 下游片段);B:*crp* 基因;C. *Kan* 基因。A 图中,1:空白对照;2、4:HPS7;3:PKUKD;5~14:缺失株;B 图中,1:空白对照;2、4:HPS7;3:PKUKD;5~14:缺失株;C 图中,1:PKUKD;2~12:缺失株;13:HPS7;14:空白对照。

图 2 *crp* 缺失株鉴定

Fig.2 Identification of *crp* deletion strain

2.3 *crp* 缺失株的生长特性

在 37 °C 下对 HPS7 和 Δcrp 菌株的生长特性进行测定,结果 2 种菌株的生长特性有显著差异。与亲本株 HPS7 相比, Δcrp 的菌落明显细小,生长速度明显缓慢(图 3、图 4)。表明 *crp* 基因对副猪嗜血杆菌血清 7 型的生长有明显的影

响。

2.4 *crp* 缺失株的自身凝集能力

与 HPS7 相比, Δcrp 表现出自身凝集能力降低,HPS7 凝集较快, Δcrp 凝集较慢,60 h 后,HPS7 的 OD_{600} 值明显低于 Δcrp (图 5),表明,*crp* 基因的缺失对 HPS7 的自身凝集有影响。

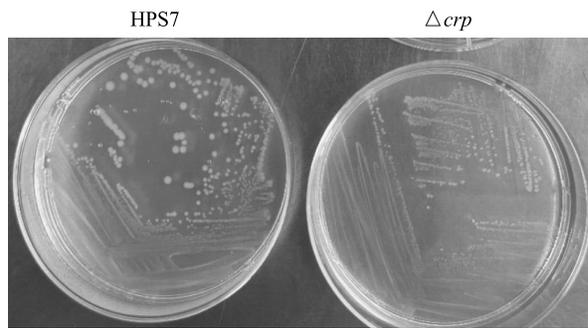


图3 副猪嗜血杆菌血清7型菌株(HPS7)和 crp 缺失株(Δcrp)的菌落形态

Fig.3 Clony morphology of *Haemophilus parasuis* serotype 7 strain and crp deletion strain (Δcrp)

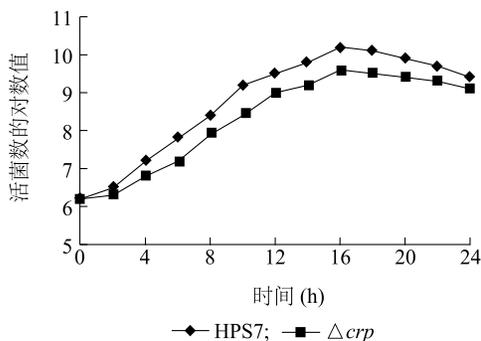


图4 副猪嗜血杆菌血清7型菌株(HPS7)和 crp 缺失株(Δcrp)的生长曲线

Fig.4 Growth curves of *Haemophilus parasuis* serotype 7 strain (HPS7) and crp deletion strain (Δcrp)

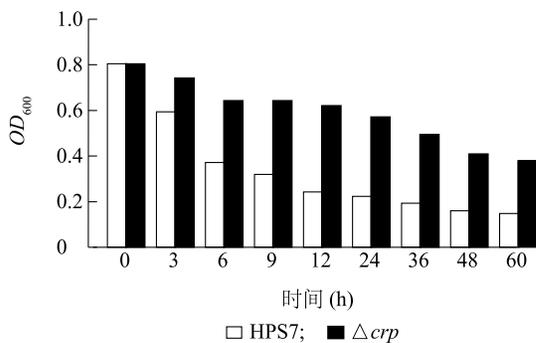


图5 副猪嗜血杆菌血清7型菌株(HPS7)和 crp 缺失株(Δcrp)的自凝集能力

Fig.5 Autoagglutination result of *Haemophilus parasuis* serotype 7 strain (HPS7) and crp deletion strain (Δcrp)

2.5 crp 缺失株的生物膜形成能力

比较 HPS7 和 Δcrp 在聚苯乙烯微滴板中形成生物膜的能力,进行定量分析。肉眼可见 Δcrp 生物膜形成明显比 HPS7 弱(图 6),溶解后,测定的

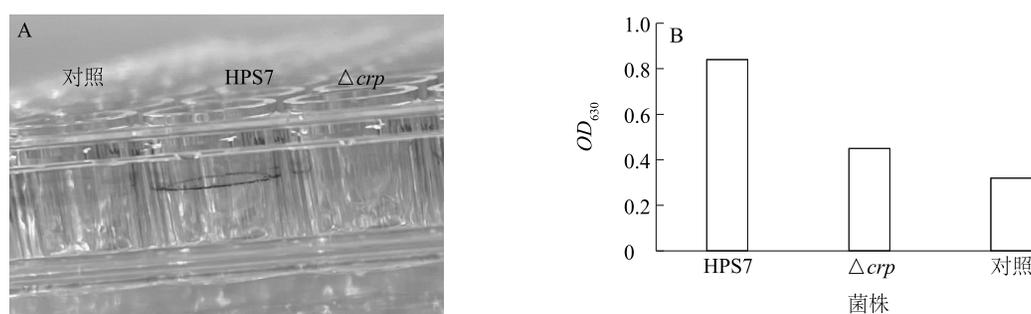
OD_{630} 值比 HPS7 低(图 7)。结果表明 crp 基因在 HPS7 中的缺失降低了细菌形成生物膜的能力, crp 基因与生物膜形成有关。

2.6 crp 缺失株对抗生素的抗性

HPS7 及其 crp 缺失株 Δcrp 对不同药物的敏感性差异见表 2, crp 基因缺失后,对不同药物的敏感性差异较为明显,对大部分药物如头孢噻吩、头孢他啶、氨苄西林、替米考星、阿莫西林、青霉素 G、庆大霉素、头孢噻肟、痢特灵、链霉素、强力霉素、四环素、土霉素、氧氟沙星、恩诺沙星、左氟沙星、阿奇霉素、罗红霉素抗性降低,敏感性增加($P < 0.05$);对少部分药物如阿米卡星、氟苯尼考、诺氟沙星、环丙沙星、复方新诺明、红霉素抗性增加,敏感性降低($P < 0.05$),表明 crp 基因对药物的敏感性影响较大。

2.7 crp 缺失株对豚鼠的感染

利用 HPS7 和 Δcrp 菌株对豚鼠致病力试验比较 HPS7 和 Δcrp 菌株的毒力差异,豚鼠感染试验发病死亡情况见表 3。结果显示,HPS7 的 1 ml 1.0×10^{11} 剂量组未发病,1 ml 1.0×10^{12} 剂量组有 2 只发病,感染 2 h 后出现了明显的发病症状,如精神沉郁、被毛粗乱、震颤、卷缩、挤堆等症状,1 ml 1.0×10^{13} 剂量组 5 只均发病,感染 9 h 后出现了死亡,共死亡 1 只,1 ml 1.0×10^{14} 剂量组 5 只均发病,感染 6 h 后出现了死亡,共死亡 3 只。 Δcrp 的 1 ml 1.0×10^{11} 、 1.0×10^{12} 剂量组均未发病,1 ml 1.0×10^{13} 剂量组 2 只发病,未发生死亡,1 ml 1.0×10^{14} 剂量组 5 只均发病,死亡 1 只, Δcrp 组发病症状明显轻于 HPS7 组,对照组未出现任何症状(图 7)。剖检发病死亡豚鼠发现其肝脏、肺脏出血,部分腹壁出血,腹腔内有腹水、纤维素性渗出,程度不一(图 8)。肝、肺、心、脾、肾组织抹片观察到短杆状细菌,脑部未见细菌。各个脏器接种 crp 缺失株后培养,肝、肺、心、脾、肾分离到与接种菌株一致的细菌,脑部没有分离出与接种菌株一致的细菌。发病豚鼠病理切片显示,肝脏出现不同程度的肝细胞水样变性,肝细胞肿胀,淋巴细胞、中性粒细胞浸润,肺脏不同程度的出血,肺泡壁增厚,淋巴细胞与中性粒细胞浸润(图 9)。以上结果表明低剂量 HPS7 对豚鼠不致病,剂量越高致病力越强,根据 Reed-Munch 法计算出 HPS7 的 LD_{50} 为 3.162×10^{13} CFU, Δcrp 的 LD_{50} 大于 1.0×10^{14} CFU, Δcrp 的毒力显著低于 HPS7。

A: 聚苯乙烯微滴板中形成的生物膜; B: OD_{630} 值。图6 副猪嗜血杆菌血清7型菌株(HPS7)和 *crp* 缺失株(Δcrp)生物膜形成能力Fig.6 Biofilm formation capacity of *Haemophilus parasuis* serotype 7 strain and *crp* deletion strain (Δcrp)表2 副猪嗜血杆菌血清7型菌株(HPS7)、*crp* 缺失株(Δcrp)药敏试验结果Table 2 Drug sensitivity test results of *Haemophilus parasuis* serotype 7 strain and *crp* deletion strain (Δcrp)

抗菌药	抑菌圈直径(mm)		抗菌药	抑菌圈直径(mm)	
	HPS7	Δcrp		HPS7	Δcrp
头孢噻吩	26.53±0.25a	32.50±0.26b	强力霉素	25.43±0.47a	29.93±0.57b
头孢他啶	23.76±0.73a	30.60±0.53b	四环素	20.27±0.57a	34.30±0.26b
氨苄西林	26.56±0.40a	31.23±0.70b	土霉素	26.33±0.15a	28.23±0.55b
替米考星	16.27±0.21a	22.03±1.09b	氧氟沙星	14.33±0.25a	20.30±0.44b
阿莫西林	30.23±0.51a	34.03±0.21b	诺氟沙星	34.13±0.31b	21.17±0.42a
青霉素G	32.27±0.61a	36.13±0.35b	环丙沙星	18.20±0.56b	15.57±0.25a
阿米卡星	18.17±0.35b	14.43±0.57a	恩诺沙星	25.23±0.40a	30.13±0.35b
氟苯尼考	36.23±0.42b	20.27±0.35a	左氟沙星	15.53±0.31a	20.27±0.15b
庆大霉素	16.20±0.46a	25.17±0.45b	复方新诺明	24.43±0.57b	18.17±0.38a
头孢噻肟	38.23±0.40a	41.96±0.15b	阿奇霉素	20.47±0.15a	28.13±0.47b
痢特灵	13.17±0.31a	20.17±0.51b	红霉素	22.23±0.21b	18.23±0.55a
链霉素	12.47±0.38a	19.17±0.31b	罗红霉素	11.47±0.38a	18.27±0.35b

同一行数据后不同小写字母表示不同处理间差异显著($P < 0.05$)。

表3 副猪嗜血杆菌血清7型菌株(HPS7)、*crp* 缺失株(Δcrp)豚鼠致病性试验结果Table 3 Pathogenicity test results of *Haemophilus parasuis* serotype 7 strain and *crp* deletion strain (Δcrp) in guinea pig

菌株	感染剂量(CFU, 1 ml)	豚鼠数	发病数	死亡数	发病率(%)	死亡率(%)
HPS7	1.0×10^{11}	5	0	0	0	0
HPS7	1.0×10^{12}	5	2	0	40	0
HPS7	1.0×10^{13}	5	5	1	100	20
HPS7	1.0×10^{14}	5	5	3	100	60
Δcrp	1.0×10^{11}	5	0	0	0	0
Δcrp	1.0×10^{12}	5	0	0	0	0
Δcrp	1.0×10^{13}	5	2	0	40	0
Δcrp	1.0×10^{14}	5	5	1	100	20
生理盐水	0	5	0	0	0	0



图7 豚鼠接种副猪嗜血杆菌血清7型菌株(HPS7)后发病死亡情况
Fig.7 Incidence and death of guinea pig after vaccinate (HPS7)

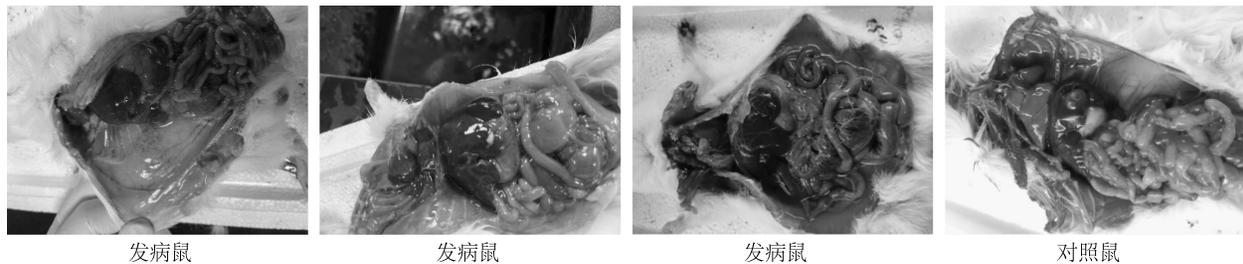


图8 接种副猪嗜血杆菌血清7型菌株(HPS7)后发病死亡豚鼠解剖情况
Fig.8 Anatomy of diseased and dead guinea pigs after vaccinate (HPS7)

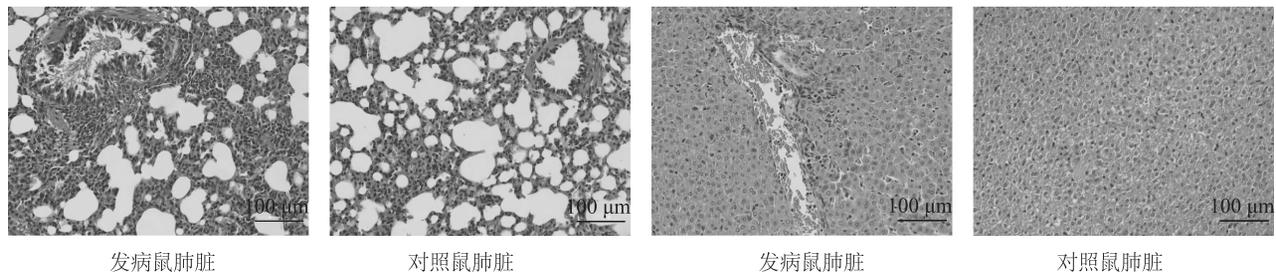


图9 接种副猪嗜血杆菌血清7型菌株(HPS7)发病死亡豚鼠病理切片
Fig.9 Pathological sections of diseased and dead and control guinea pigs after vaccinate (HPS7)

3 讨论

副猪嗜血杆菌引起的猪格拉瑟病是危害最为严重也是防控难度最大的疫病之一,由于副猪嗜血杆菌血清型众多,相互之间缺乏交叉保护力,且同一血清型不同毒株的毒力差异很大,其中血清7型被认为是无毒力毒株,但是近年来我们不断地从临床典型发病甚至死亡病例中分离到血清7型HPS,分离出的比例越来越高,也是危害越来越严重的血清型,因此有必要重视血清7型。在前期研究中HPS7低剂量感染豚鼠,毒力较低,而在加大剂量感染时,也能引起豚鼠发病死亡,血清7型也应该是具有毒力的,因此迫切需要研制出更加安全有效的血清7型弱毒株。

crp 基因是系统调控因子之一,对环境适应和毒力调节起着重要作用。副猪嗜血杆菌血清7型 *crp* 基因缺失后,生长速度明显慢于亲本菌,生物膜形成能力明显减弱,自凝速度减慢,表明 *crp* 基因在HPS的生长特性中起重要作用,这与Jiang等^[17]关于 *crp* 缺失对血清5型副猪嗜血杆菌标准株的生长特性、生物膜、血清抗性均产生影响的报道一致。副猪嗜血杆菌 *crp* 基因缺失对不同抗生素的抗性影响不一致,*crp* 基因缺失对大部分抗生素的抗性降低,敏感性增加。为进一步了解 *crp* 基因与HPS致病性的关系,试验用豚鼠测定了亲本株和缺失株的毒力,低剂量血清7型均是无毒力的,但在高剂量和超高剂量感染时血清7型亲本株表现出毒力,缺失株毒力明显减弱。高剂量组引起豚鼠急性死亡,发病死亡豚

鼠表现出与仔猪副猪嗜血杆菌引起的猪格拉瑟病相似的临床症状和病理变化,表明 *crp* 基因参与了 HPS7 的毒力调节,毒力试验结果与 Jiang 等^[18]2021 年的报道相似,但也有差异, Jiang 等用血清 5 型 HPS 标准株及其 *crp* 缺失株各接种 10 只 Balb/C 小鼠,亲本株血清 5 型标准株接种小鼠 2 d 内全部死亡,而 *crp* 缺失株接种小鼠观察期内全部存活,毒力完全消失,而本研究中 HPS7 的 *crp* 缺失株毒力有所降低,但还有一定的毒力。副猪嗜血杆菌的毒力因子极多,致病机理十分复杂,*crp* 调节的机制也十分复杂,豚鼠和小鼠的敏感性也有差异,不同血清型,不同毒株 *crp* 基因缺失后,结果可能会有所不同,为了探究 *crp* 基因对不同血清型和不同毒株毒力的影响,需要对更多的血清型和毒株进行进一步的研究。

4 结论

本研究构建了副猪嗜血杆菌血清 7 型临床分离株 HPS7 的 *crp* 缺失株,*crp* 基因缺失后,菌株增长速度减慢,生物膜形成能力减弱,自身凝集能力降低,对大部分抗生素的抗性降低,对豚鼠的毒力降低,说明 *crp* 基因对副猪嗜血杆菌血清 7 型的生长、抗药性和毒力有明显的影 响。本结果为进一步研究 *crp* 基因在副猪嗜血杆菌血清 7 型中的功能及筛选更加安全有效的副猪嗜血杆菌血清 7 型弱毒株提供参考。

参考文献:

- [1] SUN Q, YU X X, HE D X, et al. Investigation and analysis of etiology associated with porcine respiratory disease complex in China from 2017 to 2021 [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2022, 9: 960033.
- [2] ZHU H D, CHANG X J, ZHOU J Z, et al. Co-infection analysis of bacterial and viral respiratory pathogens from clinically healthy swine in Eastern China [J]. *Veterinary Medicine Science*, 2021, 7 (5): 1815-1819.
- [3] YUE W D, LIU Y H, MENG Y K, et al. Prevalence of porcine respiratory pathogens in slaughterhouses in Shanxi province, China [J]. *Veterinary Medicine Science*, 2021, 7(4): 1339-1346.
- [4] HAU S J, EBERLE K C, BROCKMEIER S L. Importance of strain selection in the generation of heterologous immunity to *Glaesserella (Haemophilus) parasuis* [J]. *Veterinary Immunology Immunopathology*, 2021, 234: 110205.
- [5] NI H B, GONG Q L, ZHAO Q, et al. Prevalence of *Haemophilus parasuis* ' *Glaesserella parasuis* ' in pigs in China: a systematic review and meta-analysis [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 182: 105083.
- [6] CAI X W, CHEN H C, BLACKALL P J, et al. Serological characterization of *Haemophilus parasuis* isolates from China [J]. *Veterinary Microbiology*, 2005, 111: 231-236.
- [7] 储岳峰, 高鹏程, 赵 萍, 等. 副猪嗜血杆菌分型血清的制备及其在流行病学研究上的应用 [J]. *江苏农业学报*, 2010, 26 (5): 999-1002.
- [8] 王治方, 徐引弟, 朱文豪, 等. 副猪嗜血杆菌流行优势菌株调查和耐药性分析 [J]. *中国兽医学报*, 2019, 39(10): 1942-1946.
- [9] 王治方, 徐引弟, 朱文豪, 等. 副猪嗜血杆菌血清 7 型菌株毒力及耐药性分析 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(8): 3245-3255.
- [10] 王治方, 朱文豪, 徐引弟, 等. 副猪嗜血杆菌血清 7 型菌株的分离鉴定及生物学特性研究 [J]. *养猪*, 2022(4): 89-93.
- [11] GENG H F, JIANG R. R cAMP receptor protein (CRP)-mediated resistance/tolerance in bacteria: mechanism and utilization in biotechnology [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99: 4533-4543.
- [12] ZHANG H F, CHONG H Q, CHING C B, et al. Random mutagenesis of global transcription factor cAMP receptor protein for improved osmotolerance [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(5): 1165-1172.
- [13] BASAK S, GENG H F, JIANG R R. Rewiring global regulator cAMP receptor protein (CRP) to improve *E. coli* tolerance towards low pH [J]. *Biotechnology*, 2014, 173: 68-75.
- [14] LEE J Y, YANG K S, JANG S A, et al. Engineering butanol-tolerance in *Escherichia coli* with artificial transcription factor libraries [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(4): 742-749.
- [15] KIM Y R, LEE S E, KIM B, et al. A dual regulatory role of cyclic adenosine monophosphate receptor protein in various virulence traits of *Vibrio vulnificus* [J]. *Microbiology Immunology*, 2013, 57: 273-280.
- [16] ZHANG H F, CHONG H Q, CHING C B. Engineering global transcription factor cyclic AMP receptor protein of *Escherichia coli* for improved 1-butanol tolerance [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2012, 94: 1107-1117.
- [17] JIANG C S, CHENG Y F, CAO H, et al. Effect of cAMP receptor protein gene on growth characteristics and stress resistance of *Haemophilus parasuis* serovar 5 [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 19.
- [18] JIANG C S, REN J P, ZHANG X Q, et al. Deletion of the *crp* gene affects the virulence and the activation of the NF- κ B and MAPK signaling pathways in PK-15 and iPAM cells derived from *G. parasuis* serovar 5 [J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 261: 109198.

(责任编辑:陈海霞)