

中图分类号 _____

学校代码 10224

密 级 公开

学 号 130610507

東北農業大學

硕士学位论文

山东省貂源铜绿假单胞菌的分离鉴定及三价灭活菌对小鼠的免疫效力评价

作 者 赵志腾

导 师 师东方 教授

学位类别 农学硕士

所在学院 动物医学学院

一级学科 兽医学

二级学科 预防兽医学

二〇一六年六月

Classified Index:
Confidential (yes/no): no

Code: 10224
NO. : 130610507

Dissertation for the Master Degree

Isolation and Identification of *Pseudomonas aeruginosa* from mink in Shandong Province and Immune Efficacy Evaluation of Tervalent Inactivated Vaccine in Mice

Candidate: Zhao Zhiteng

Supervisor: Prof. Shi Dongfang

Degree Category: Master of Agriculture

College: College of Veterinary Medicine

First level discipline: Veterinary Science

Second level discipline: Preventive Veterinary Medicine

Harbin China

June 2016

独 创 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，也不包含未获得_____

(注：如没有其他需要特别声明的，本栏可空)或其他教育机构的学位或证书使用过的材料。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：赵志鹏 日期：2016年6月14日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，学校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。本人授权学校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：赵志鹏 日期：2016年6月14日

导 师 签 名：师东才 日期：2016年6月14日

目 录

摘要	I
英文摘要	III
1 引言	1
1.1 铜绿假单胞菌概述	1
1.1.1 分类及其理化特性	1
1.1.2 铜绿假单胞菌分型	1
1.1.3 致病性及毒力因子	3
1.1.4 耐药性	4
1.2 水貂出血性肺炎及其防治	5
1.2.1 病原	5
1.2.2 流行病学和临床症状	5
1.2.3 发病机制和病理变化	6
1.2.4 诊断	6
1.2.5 防治	7
1.3 研究目的与意义	9
2 材料与方法	10
2.1 实验材料	10
2.1.1 病料样本、参考菌株和实验动物	10
2.1.2 主要试剂和培养基	10
2.1.3 DNA 扩增引物	10
2.1.4 主要仪器	11
2.2 实验方法	11
2.2.1 病原菌的分离鉴定	11
2.2.2 分离菌部分生物学特性检测	12
2.2.3 疫苗候选菌株培养及灭活条件优化	13
2.2.4 候选菌株传代稳定性检测	14
2.2.5 灭活菌的制备及免疫效力检测	15
3 结果	18
3.1 细菌的分离鉴定	18
3.1.1 分离菌的染色镜检和培养特性	18
3.1.2 生化鉴定	20
3.1.3 PCR 鉴定	21
3.1.4 血清型鉴定	23
3.2 分离株部分生物学特性检测	25
3.2.1 标准曲线测定	25
3.2.2 血清交叉凝集试验	26

3.2.3 致病性测定	26
3.2.4 生长曲线测定	28
3.3 疫苗株培养条件及甲醛灭活浓度优化	28
3.3.1 培养基的选择	28
3.3.2 培养温度确定	29
3.3.3 培养基 pH 的确定	29
3.3.4 培养时间确定	30
3.3.5 甲醛灭活浓度确定	31
3.4 候选菌株传代稳定性检测	31
3.4.1 传代菌生长稳定性	31
3.4.2 传代菌致病性	32
3.4.3 传代菌对小鼠的免疫保护	32
3.5 三价灭活菌免疫效力检测	33
3.5.1 三价灭活菌制备及检验	33
3.5.2 最小免疫剂量确定	33
3.5.3 三价灭活菌对小鼠免疫保护	35
4 讨论	38
4.1 细菌的分离鉴定	38
4.2 三价灭活菌候选菌株的选择	38
4.3 候选菌株致病性和传代稳定性	39
4.4 三价灭活菌对小鼠免疫效力评估	39
5 结论	41
致谢	42
参考文献	43
攻读硕士学位期间发表的学术论文	52

CONTENTS

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	III
1 Introduction	1
1.1 Overview of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1.1 Classification and properties	1
1.1.2 Typing of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.1.3 Pathogenicity and virulence factors.....	3
1.1.4 Drug resistance.....	4
1.2 Mink hemorrhagic pneumonia and prevention	5
1.2.1 Pathogeny	5
1.2.2 Epidemiology and clinical symptoms.....	5
1.2.3 Pathogenesis and pathological changes	6
1.2.4 Diagnosis	6
1.2.5 Prevention.....	7
1.3 Purpose and significance	9
2 Materials and Methods	10
2.1 Materials	10
2.1.1 Disease material、strains and experimental animals	10
2.1.2 Reagents and mediums	10
2.1.3 Primers for PCR	10
2.1.4 Apparatus.....	11
2.2 Methods.....	11
2.2.1 Isolation and identification of pathogenic bacteria	11
2.2.2 Partial biological characteristic detections of isolates	12
2.2.3 Cultivation and optimization of inactivation conditions.....	13
2.2.4 Passage stability detection of candidate strains	14
2.2.5 Preparation of inactivated vaccine and detection of immune efficacy.....	15
3 Results	18
3.1 Isolation and identification of pathogenic bacteria	18
3.1.1 Microscopic examination and culture characteristics.....	18
3.1.2 Biochemical identification	20
3.1.3 PCR detection	21
3.1.4 Serotype identification	23
3.2 Partial biological characteristic detections of isolates	25
3.2.1 Standard curve determination	25
3.2.2 Serological cross agglutination test.....	26

3.2.3 Pathogenicity test.....	26
3.2.4 Growth curve determination	28
3.3 Optimization of culture conditions and formaldehyde inactivation	28
3.3.1 Medium determination	28
3.3.2 Culture temperature determination	29
3.3.3 pH determination	29
3.3.4 Time determination	30
3.3.5 formaldehyde inactivation determination.....	31
3.4 Passage stability detection of candidate strains	31
3.4.1 Growth stability of passage strains.....	31
3.4.2 Pathogenicity of passage strains	32
3.4.3 Immune protection of the passage bacteria in mice	32
3.5 Immune efficacy detection of trivalent inactivated strains.....	33
3.5.1 Preparation and inspection of trivalent inactivated strains	33
3.5.2 Minimum immune dose determination	33
3.5.3 Immune protection of trivalent inactivated bacteria in mice.....	35
4 Discussion	38
4.1 Isolation and identification of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
4.2 Selection of candidate strains	38
4.3 Pathogenicity and passage stability of candidate strains	39
4.4 Immune efficacy evaluation of trivalent inactivated vaccine.....	39
5 Conclusion	41
Acknowledgement.....	42
References	43
Papers published in the period of Ph.M. education	52

摘要

水貂出血性肺炎是一种由铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, PA) 引起的以肺部瘀血、败血症为主要特征的水貂急性呼吸道传染病。该病以地方性流行为主, 发病迅速, 病死率高, 常造成水貂养殖业巨大的经济损失。由于该病病原菌存在广泛, 耐药菌株较多, 致使貂感染发病后药物治疗效果不佳。目前认为, 防治该病的主要措施是应用与致病菌血清型相匹配的灭活菌进行免疫接种。因此, 水貂出血性肺炎流行地区的致病菌分离鉴定, 血清型调查是制备多价灭活疫苗的前提和基础。本研究开展了山东省水貂源铜绿假单胞菌的分离鉴定、病原菌血清型分布调查和三价灭活菌对小鼠的免疫效力检测等方面的研究。

病原菌分离鉴定。2013年至2014年, 从山东省诸城、潍坊、临沂、文登、日照、莒县、胶南等地区的18个养貂场共采集77份病貂肺脏样本, 分离得到120株疑似铜绿假单胞菌。经生化试验、16S rDNA的PCR扩增和血清型鉴定, 最终确定其中53株分离菌为铜绿假单胞菌, 分离率为44.2% (53/120)。53株铜绿假单胞菌包含11个已知血清型和一株未确定型。其中G型菌株最多, 有27株; 其次为B型、D型, 分别为5株和4株。分离菌株中主要流行血清型为G型、B型和D型。

免疫原的筛选。将分属于11个血清型的15株铜绿假单胞菌分别用甲醛灭活, 与佐剂混合后对新西兰白兔连续免疫三次, 采集免疫血清。用免疫血清分别与15株菌做交叉凝集试验, 结果显示, G型、B型、D型、N型血清与多种血清型的菌株发生凝集。依据血清型鉴定结果和血清学交叉保护结果确定可以作为水貂出血性肺炎灭活疫苗的血清型为G、B、D型。通过血清交叉凝集试验、对小鼠半数致死量测定和生长曲线测定, 确定了候选疫苗株为SD004、SD050、SD052。

三价灭活菌免疫效力检测。测定候选株SD004、SD050、SD052传代稳定性, 结果显示候选株SD004、SD050、SD052在20代内连续传代菌体含量虽有所变化, 但都在同一数量级内浮动; 20代内3株疫苗候选株致病性也在同一数量级内波动, 3株候选株20代内的生长性能、致病性均稳定; 对三株疫苗株进行包括培养基的选择, 培养温度、时间、培养基pH等培养条件的优化, 发现37℃条件下pH7.0~7.5的肉汤培养基中培养22~24h对候选株菌液生产应用最适宜; 分别用相同菌体含量不同免疫剂量的三价灭活菌免疫昆明鼠, 21d后用10LD₅₀的候选株菌液攻毒, 确定疫苗对小鼠的最小免疫剂量为0.15mL, 即接种 1.125×10^{11} CFU三价灭活菌可以保证小鼠受到100%保护; 小鼠肺脏病理组织学观察发现疫苗免疫剂量的增强可以有效保护小鼠, 预防铜绿假单胞菌的感染; 血清抗体水平检测表明水貂出血性肺炎三价灭活菌免疫小鼠后在28d血清抗体达到峰值, 42d开始下降, 49d仍能检测到抗体存在; 同时发现对小鼠两次免疫血清抗体滴度比一次免疫的抗体滴度要高, 保护效果更好; 将三价灭活菌0.15mL/只免疫昆明鼠, 21d后攻毒, 小鼠无一死亡, 证明其受到100%免疫保护。同时剖取免疫组小鼠的肺、肾、肝等内脏, 发现免疫过三价灭活菌的小鼠攻毒后小鼠内脏无明显病理学变化, 进一步证明三价灭活菌可以对小鼠提供有效保护。

本研究证明，通过血清学调查并对优势流行菌株进行生物学特性的检测，获得分离菌株具有良好的免疫原性，诱导小鼠产生良好的免疫应答，可以作为预防水貂出血性肺炎流行的候选疫苗菌株。

关键词：铜绿假单胞菌；血清型；水貂出血性肺炎；疫苗

Isolation and Identification of *Pseudomonas aeruginosa* from mink in Shandong Province and Immune Efficacy Evaluation of Tervalent Inactivated Vaccine in Mice

Abstract

Mink hemorrhagic pneumonia is an acute mink respiratory infectious disease caused by *Pseudomonas aeruginosa* and its main symptoms are lung congestion and sepsis. It harmed the mink industry because it has some characteristics like acute occurrence, high mortality, local epidemic et al. With the increasing of drug-resistant strain and the pathogen strains are more widespread, drug treatment are more poor after the onset of infection in mink. The main prevention measures of the disease are employing inactivated strains whose serotypes as same as pathogenic strains. Therefore, bacterial isolation and identification in mink hemorrhagic pneumonia epidemic area is the basis and prerequisite for the preparation of multivalent inactivated vaccines as same as serotype survey. The contents of this study include bacterial isolation and identification in mink hemorrhagic pneumonia epidemic area, pathogen serotype distributional investigation and immune efficacy of trivalent inactivated bacteria in mice.

Bacterial isolation and identification. During 2013 to 2014, our laboratory isolated 120 strains from 77 mink lung samples which come from 18 mink farms like Zhucheng, Weifang, Linyi, Wendeng, Rizhao, Juxian, Jiaonan, et al. Using biochemical tests and 16S rDNA PCR identification ultimately determine the 53 strains of isolated bacteria were *Pseudomonas aeruginosa*. The isolation rate of *Pseudomonas aeruginosa* was 44.2% (53/120). The 53 isolates of *P. aeruginosa* were classified into 11 serotypes and an undetermined strain using the slide agglutination method. Serotype G was the most frequent (27/53). Serotype B was found in 5 isolates, serotype D was found in 4 isolates. Thus the most frequent serotypes were serotype G, serotype B and serotype D.

Selection of immunogen. We prepared monovalent vaccines by mixing adjuvant with 15 inactivated strains which included 11 serotypes and immunizing rabbits which agglutination test are negative. Three immunizations could make us obtain 11 kinds positive serums of *Pseudomonas aeruginosa*. Each antiserum was challenged against 11 strains using slide agglutination test. The results showed that the serum G-type, B-type, D-type and N-type had higher cross-reactivity than others. According to serotype identification results and serological cross-protection results, the mink hemorrhagic pneumonia inactivated vaccine

serotypes are serum G-type, B-type and D-type. Through the screening of virulent strains, half lethal dose test and growth curve test, the alternative vaccine strains were SD004, SD050 and SD052.

Inactivated vaccine immunogenicity detection. As the stability of SD004, SD050 and SD052 were determined, the candidate strains were continuously cultured in the same order of magnitude during twenty generation as same as the pathogenicity. The virulence and bacteria content of these strains all were stable in continuous passages. The three candidate strains including medium, culture temperature, culture time, culture medium pH, fermentation conditions were optimized and found the condition of 37°C under pH7.0~pH7.5 broth medium culture 22-24 h for vaccine production is appropriate; Subsequently the trivalent inactivated strains was evaluated by immunizing mice. Respectively using four different immune doses with the same cell concentration of Kunming mice to immune, determined the minimum immune dose was 0.15 mL(1.125×10^{11} CFU) that can protect against infections in mice with 10 LD₅₀ of bacteria liquid poison attack after 21 days; The observation of the lung pathological changes in mice showed that the enhancement of the immune vaccine dose could protect the mice effectively and prevent the infection of *Pseudomonas aeruginosa*. The antibody titer peaked on 28 days post-immunized and began to decline on 42 days post-immunized. We could also detect antibodies at 49 day. The results of the two immunization of mice were higher than once. The protective effect was better, which could effectively reduce the possibility of infection of *Pseudomonas aeruginosa* in mice. After immunization 21 days we immuned candidate strains with live strains, the mice didn't die and were protected completely by inactivated strains. The observation of lung, liver and kidney pathological changes in mice showed that there were not pathological changes in mouse viscera, it proved that trivalent inactivated strains could protect the mice effectively.

This study showed that we isolated predominant strains by serological investigation and biological characteristics detection with good immunogenicity which induced good immune response in mice, which could be candidate vaccine strains to prevent mink hemorrhagic pneumonia epidemic.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*; serotype; hemorrhagic pneumonia; vaccine

Candidate: Zhao Zhiteng

Speciality: Preventive Veterinary Medicine

Supervisor: Prof. Shi Dongfang

1 引言

1.1 铜绿假单胞菌概述

1.1.1 分类及其理化特性

铜绿假单胞菌 (P.A) 也称为绿脓杆菌, 是 1882 年由 Gesard 首次分离到的一种中等大小的革兰氏阴性杆菌^[1]。生物学分类为 γ -变形菌纲、假单胞菌目、假单胞菌科、假单胞菌属。铜绿假单胞菌作为机会致病菌本身无芽孢和荚膜、单鞭毛且多菌毛、两端钝圆。划线接种在琼脂培养基上能长成边缘整齐、中心扁平或微隆起、自身带蓝绿色荧光的单一菌落。

铜绿假单胞菌生长温度在 35~37℃ 较为适宜, 42℃ 也可生长。实验室培养中铜绿假单胞菌在麦康凯琼脂上生长良好, 在血琼脂培养基上能产生明显的 β -溶血, 还能在 NAC 鉴别培养基上产生绿色荧光^[2]。铜绿假单胞菌自身能分解葡萄糖和木糖, MR 试验和硫化氢试验都为阴性, 可以分解尿素, 液化明胶并能产生绿脓菌素。

1.1.2 铜绿假单胞菌分型

现阶段细菌的分型方法主要包括血清学分型、分子分型、绿脓菌素分型等, 铜绿假单胞菌常用的分型方法为血清学分型和分子分型。

1.1.2.1 血清学分型

铜绿假单胞菌含有 O-抗原、菌毛抗原、鞭毛抗原等成分。O-抗原分为原内毒素蛋白质 (Original endotoxin protein, OPE) 和内毒素两种成分^[3]。内毒素中的脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 具有群特异性, 是铜绿假单胞菌血清学分型的重要表型依据。国际抗原分型系统 (International Antigenic Typing Scheme, IATS) 依据脂多糖的不同分为 20 个血清型^[4]。目前国际分型系统是依据多个国家的抗原分型系统综合统一得来的, 不同国家的抗原分型系统因为抗原表位发生漂移和转移, 导致群和群之间的分属仍处在研究阶段。

一些国家依据自己国家的常见流行菌株统合整理, 创建了自己的血清分型系统^[4, 5]。1991 年我国王世鹏等研制了铜绿假单胞菌 IATS-20 分型血清, 分型率可达 99%^[6, 7]。目前我国最常用的分型血清是日本生研株式会社生产的铜绿假单胞菌血清分型鉴定试剂盒, 是以 Homma 根据 O-抗原将铜绿假单胞菌分成 A-N 群为基础所建立的^[8, 9]。因其基本涵盖了常见的血清型, 且便于现场使用, 使得其在铜绿假单胞菌的血清学研究上被广泛使用。表 1-1 是四种最常用的铜绿假单胞菌血清分型系统的对应关系。

铜绿假单胞菌的抗原组成复杂, 除现以被用来做血清分型标准的 O-抗原外, 包括菌毛抗原等在内的表面抗原目前还未有可以实际应用的分型方法, 血清学分型方法及所依

据的抗原仍需我们进一步研究和验证。

表 1-1 不同血清系统相应血清型关系表

Table 1-1 Revised list of corresponding serogroups of *Pseudomonas aeruginosa* from various serotyping schemata

Meitert	Homma	IATS	日本分型血清系统
5	1	3	A
2、6、16	2、7、13、16	2、5、16H、16L	B
3	3	7、8	C
14	4	9	D
15	5	11	E
8	6	4	F
1、4	8	6	G
11	9	10	H
13	10	1	I
-	11	15	J
-	12	13、14	K
7	14	12	L
-	15、16	-	M

東北農業大學

硕士学位论文

山东省貂源铜绿假单胞菌的分离鉴定及三价灭活菌对小鼠的免疫效力评价

况^[16]。

(2) 以PCR为基础的分型方法主要包括随机扩增多态性指纹图谱 (RAPD)^[15]、重复序列PCR(rep-PCR)、扩增片段长度多态性 (AFLP)^[17]、多位点可变数目串联重复序列分析 (MLVA)^[18]以及多位点序列分析 (MLST)^[19]。

RAPD是由Williams等基于PCR技术研究出的一种基因多态性分析方法^[20]。由于不同菌株的扩增条带是不同的, 通过设计单一小片段的随机引物 (一般为10 bp以内) 扩增目标基因组, 可以得到多条条带, 这些条带不具有特异性, 但可以用于区分菌株, 结合血清学研究揭示病原菌的流行病学特征^[21]。RAPD由于无法统合不同研究结果进行比较, 使其缺乏统一标准, 并且退火温度较低导致其重复性较差。目前的分型结果表明, RAPD的分辨率优于RFLP和核糖体分型^[15]。

rep-PCR是由Versalovic等以RAPD为技术基础发展出来的一种基因组指纹分析方法^[22]。其原理为通过扩增细菌基因组中高度保守重复序列分析基因型间差异^[23]。依据基因组中短重复序列的不同, 又分为BOX-PCR、REP-PCR和ERIC-PCR三种。应用REP-PCR和ERIC-PCR的进行病原菌分型研究, 发现其分辨率高于RAPD和核糖分型^[24]。国内临床用药的依据都是应用REP-PCR, 对病房和移植脏器中的铜绿假单胞菌进行分型^[25, 26]。Kidd等研究囊化纤维化肺炎患者痰液中分离到的铜绿假单胞菌, 发现MLST、PFGE的分子分型率略高于ERIC-PCR^[27]。

与rep-PCR相比, 其他几种方法存在某些缺陷, AFLP需要特定的识别碱基和相关的内切酶以供其对细菌分型; MLVA只适用已知基因序列细菌的检测; MLST则是由于成本较高、对设备要求严格难以广泛使用。总之BOX-PCR、REP-PCR和ERIC-PCR的分辨率和重复性大致相同。rep-PCR优于RFLP和核糖体分型, 略低于PFGE的分辨效果, 但相对而言操作简便, 可实现自动化分型^[12]。

除了血清学分型和分子分型外, 铜绿假单胞菌还有绿脓菌素分型^[28-31]和噬菌体分型^[32], 但绿脓菌素分型和噬菌体分型存在局限性, 目前应用较少。由于铜绿假单胞菌受环境影响容易发生变异, 表型分型的方法很难来分辨, 分子分型方法能弥补表型分型的不足。将表型分型和分子分型相结合, 有助于对铜绿假单胞菌的流行病学研究。

1.1.3 致病性及毒力因子

铜绿假单胞菌对人和动物都有致病性。作为条件致病菌, 在医院内可广泛存在于各类物体表面、医患人员的皮肤和呼吸道、且能污染任何液体。铜绿假单胞菌几乎可以感染人类的任何器官和部位, 当人免疫力低下或承受各类侵袭性操作 (如手术或皮肤烧伤) 时容易诱发感染。铜绿假单胞菌多造成术后伤口的化脓性感染或老年人的各类器官衰竭, 严重者导致患者死亡。在动物养殖方面, 铜绿假单胞菌可以污染草料和水源从而引起奶牛子宫炎、乳房炎、羊化脓性肝炎、雏鸡败血症、水貂出血性肺炎^[33]等疾病, 也可与大肠埃希氏菌、葡萄球菌、嗜血杆菌等混合感染致病。Sadikot等研究发现如果人体有完整的免疫机制, 铜绿假单胞菌感染的几率很小^[34]。如果人体存在免疫缺陷疾病比如白血病、艾滋病等或者经历烧伤、器官移植等造成机体免疫屏障功能减弱, 则会大大增加感染几

率。其原因是免疫功能健全的人体内的中性粒细胞可以产生蛋白酶降解铜绿假单胞菌分泌的外毒素A，呼吸道黏膜纤毛能清除异物从而避免铜绿假单胞菌定植感染。

铜绿假单胞菌的III型分泌系统（Type III secretion system, T3SS）由于可以分泌很多毒力因子而做为重要的毒力因素^[35]，其分泌的可以损害细胞的蛋白包括胞外酶U(*exoU*)^[36, 37]、胞外酶S (*exoS*)^[38]和胞外酶T (*exoT*)^[39]。胞外酶U作为T3SS分泌的效应器蛋白可以破坏细胞膜并使细胞溶解；胞外酶S和胞外酶T均可以破坏细胞骨架从而诱导细胞凋亡^[40]。T3SS毒力岛虽然做为铜绿假单胞菌最常见的毒力基因，但极少诱导胞外酶U和胞外酶S在同一菌体内分泌表达^[41, 42]，并且Le等研究发现临床中分离到的铜绿假单胞菌分泌胞外酶S或胞外酶T比分泌胞外酶U更为常见^[43]。

除了T3SS外，铜绿假单胞菌自身也可以向周围组织分泌毒力因子，包括有磷脂酶C、弹性蛋白酶^[44-46]、外毒素A (ETA) 以及鼠李糖脂^[47, 48]。弹性蛋白酶可以降解肺上皮细胞的弹性蛋白，破坏其连接的紧密性。磷脂酶C和鼠李糖脂都具有溶血性，前者可以增强血管通透性造成内脏的损伤，后者可以清除多核中性粒细胞，阻碍纤维素的生成从而影响生物膜生成功能^[49]。此外，绿脓菌素做为铜绿假单胞菌标志性的代谢产物^[50, 51]，可以通过抑制宿主的过氧化氢酶及细胞呼吸，诱导中性粒细胞凋亡。LPS作为铜绿假单胞菌等革兰氏阴性细菌外膜的重要组成成分，也可以在宿主体内产生免疫反应，诱导一些炎性信号分子的分泌。

外毒素A是一个613肽的单链蛋白，包含信号肽和三个结构功能区组成的常用肽^[52]。自然条件下外毒素产量低，但毒性最强。可以导致皮肤黏膜坏死，更能破坏角膜基质细胞^[53]。其细胞毒性原理是：通过结构功能区 I 与靶细胞表面受体结合，结构功能区 III 将毒素单位导入细胞中，催化胞内延伸因子 (EF22) ADP2核糖基化反应，导致延伸因子失活从而杀死细胞；结构功能区 II 的 α -螺旋则有助于毒素的跨膜转移。作为铜绿假单胞菌研究最深入的毒力因子，中外学者已对外毒素A的结构、功能^[54]、提取和纯化方法^[55]、重组毒素^[56, 57]、基因工程疫苗以及应用^[52, 58-64]等方面开展了大量研究。

1.1.4 耐药性

铜绿假单胞菌感染难以治疗的原因源于其耐药机制十分复杂，可以对多种不同成分的抗生素高度耐药^[65, 66]，其原因主要包括以下四点：首先细菌的外膜通透性极低，造成这种情况的原因很多，微孔蛋白内径太小，OprC、OprD₂仅允许相对分子质量 3×10^5 以下的糖类通过^[67]，内径相对较大的 OprF 开放时间较短，有时还会无效^[68]；微孔蛋白数量减少、微孔蛋白基因突变也对通透性有所影响^[69]；其次铜绿假单胞菌拥有主动外排系统，根据铜绿假单胞菌的全基因组序列分析，推测其至少含有 12 种主动外排系统^[70]，包括 MexAB-OprM^[71, 72]、MexCD-OprJ、MexEF-OprN 等。这些主动外排系统失活，会提高其对 β 2-内酰胺类、喹诺酮类^[73]、大环内酯类^[74]、氯霉素类、碳青霉烯类^[74-76]等的敏感性；再次铜绿假单胞菌极易形成生物被膜^[77]，大大提高了其存活能力^[78]；最后 β -内酰胺酶、氨基糖苷类修饰酶等通过修饰多种氨基糖苷类药物使之失活^[79]或控制基因表达等方式产生耐药^[80]。复杂的耐药机制使得临床上用抗生素、消毒剂等很难根除铜绿假

单胞菌，这给防治铜绿假单胞菌带来了巨大挑战。

1.2 水貂出血性肺炎及其防治

水貂出血性肺炎是一种常以地区性季节性流行的水貂急性呼吸道传染病，以肺部出血、充血和败血症为主要症状。是目前危害水貂养殖业发展的重要传染病之一。

1.2.1 病原

引起水貂出血性肺炎的病原菌有很多种，铜绿假单胞菌是引起水貂出血性肺炎的主要病原菌^[81-84]。近年来，也有其他病原菌引起水貂出血性肺炎暴发。邹玲对山东省青岛、诸城等地的水貂养殖场病死貂的心、肺、肝等检测证明，引起水貂出血性肺炎的是嗜血杆菌^[85]；胡本钢、杨艳玲、孙虎芝等分别从水貂出血性肺炎病死貂上分离到了克雷伯氏菌^[86-88]；刘自健等报道了由链球菌引起的水貂出血性肺炎的病例^[89]。以上这些报道说明，能够引起水貂肺炎的病原菌越来越多，且发病症状极为相似：均表现为患病前期咳嗽，后期食欲减退、发热，病死貂口鼻腔流出血样液体。嗜血杆菌做为革兰氏阴性菌可以发酵葡萄糖、乳糖、蔗糖，不发酵甘露醇^[85]，在普通琼脂平板上不生长，在兔血琼脂平板上可以形成不溶血的小菌落；克雷伯氏菌和铜绿假单胞菌同样是革兰氏阴性短杆菌、菌体都呈单个或成对排列、两端钝圆。两者主要区别是克雷伯氏菌的耐药谱没有铜绿假单胞菌广泛，尤其是对卡那霉素、左氧氟沙星、链霉素等抗生素较为敏感。链球菌是革兰氏阳性球菌^[89]，血琼脂平板上呈现细小、球形、半透明菌落。菌落接种在血清肉汤中培养会出现白色絮状沉淀，能够分解葡萄糖、麦芽糖和蔗糖，但不能分解阿拉伯糖^[90]。引起水貂出血性肺炎的病原菌种类虽然较多，但危害性最大、流行范围最广的是铜绿假单胞菌。

1.2.2 流行病学和临床症状

1953年Knox等在丹麦首次报道了水貂出血性肺炎。之后在欧洲、亚洲多国也有该病发生^[91]。1983年我国首次报道该病^[92]。2000~2010年间我国黑龙江、吉林、辽宁、河北、内蒙古等省的水貂养殖场相继暴发水貂出血性肺炎^[81, 93-95]。该病在我国的死亡率达6%-54%^[96]。发病或带菌的水貂是主要的传染源，病原携带者如鼠等也应引起重视。感染铜绿假单胞菌的途径一般是呼吸道和消化道，鼻腔感染发病率最高。传播途径主要是飞沫传播，或者是经污染的肉类饲料或水源传播^[97]。

水貂出血性肺炎多发病于夏秋季节，这一时期幼貂的母源抗体消失，温度气候多变，加上水貂秋季换毛等因素造成水貂出血性肺炎的多发^[31]。水貂出血性肺炎多为急性和最急性发病。病程稍长的水貂多出现呼吸困难、食欲废绝、体温升高、流泪、流鼻涕、咳嗽剧烈、精神萎靡、动作迟缓，个别出现惊厥，典型症状为咳血，从鼻口中会有血样泡沫状液体流出，常在咳嗽和抽搐后死亡。病程较短，急性一般1~2 d。

1.2.3 发病机制和病理变化

铜绿假单胞菌广泛附着于人或动物的皮肤、呼吸道等处。幼年、老年、体弱者由于免疫系统不健全或免疫能力低下，一旦体内外有创口，该菌会在入侵处定植下来，迅速分裂繁殖，形成局灶性脓肿^[33]。当机体的免疫功能下降或衰弱时，病原会沿着淋巴系统迅速扩散，在代谢过程中由于其含有很多具有溶血性的毒力因子（包括磷脂酶、鼠李糖脂等）导致红细胞大量溶解，血液成分改变，血管壁受损，最终导致实质器官充血或出血。

病貂剖检特征为出血性肺炎，肺脏出血，严重者肺脏外观呈现大理石样且有明显出血点，切开肺脏时有血样泡沫状液体流出。淋巴结水肿，出血。心肌松弛，冠状沟有出血点。病理组织学观察肺脏炎性细胞浸润，肺泡壁增厚，肺泡间隔变大，肺泡上皮细胞大量坏死脱落。在肺的血管周围有铜绿假单胞菌^[98]。

1.2.4 诊断

阻碍水貂出血性肺炎确诊的原因有很多：水貂脑膜炎和水貂出血性肺炎的病理学变化相似，肺部都呈出血性肺炎，有大量出血点、肾肿大、有坏死灶^[98]。同样，大肠埃希氏菌和嗜血杆菌也可以引起水貂出血性肺炎相似病状。Salomonsen 等比较了铜绿假单胞菌和大肠埃希氏菌引起的水貂出血性肺炎的病理变化：少量的铜绿假单胞菌感染就会呈现肺脏大量出血，菌体分布在血管周围；大肠埃希氏菌感染肺脏病理表现为坏死，菌体主要在肺泡内^[99]。鉴于影响水貂出血性肺炎诊断的因素较多，因此建立准确的病原学诊断方法，对该病的防治至关重要。水貂出血性肺炎病原学诊断主要是生化鉴定^[100, 101]和 PCR 鉴定。人医上关于铜绿假单胞菌的诊断建立了很多方法，如 ELISA、DNA 探针、基因芯片等。

(1)目前最常用的铜绿假单胞菌的诊断方法就是针对其基因上的一些保守基因进行 PCR 鉴定。Song^[102]、Khan^[103]等分别根据外毒素 A 基因设计引物进行扩增，特异性可达 100%；Atzél 根据 16S rDNA 序列设计引物进行 PCR 鉴定，检出率为 100%^[104]。陈晨等同样用 16S rDNA 序列设计引物对 43 份水貂肺组织样本进行 PCR 鉴定，并且对扩增结果进行了 BLAST 分析，确定了分离株之间的 16S rDNA 序列核酸同源性达 98.9%^[105]。马俊等用 oprF 基因和外毒素 A 基因的 PCR 引物对 425 株水貂源疑似铜绿假单胞菌的目的片段进行扩增，分辨率为 100%^[106]。除了外毒素 A、16S rDNA 基因、外膜蛋白基因外，还有 algD、PS21 等基因用于 PCR 检测，特异性也很好。实时荧光定量 PCR 可以对菌体感染进行定量分析，提高检测的敏感性，其目的基因很多，包括 gyrB^[107]、oprL^[108]。这些方法主要应用于人医，敏感性和特异性很高。

(2) ELISA 是一种以抗原抗体反应为基础的最常用的病原菌诊断检测技术。将外毒素 A、磷脂酶 C、全菌体等制备抗体^[109]，发现其敏感性较差，特异性不好，易与其它菌交叉反应。因此很多科研工作者选择铜绿假单胞菌具有良好免疫原性且特异性高的外膜蛋白来提高 ELISA 试验的检测水平。王燕等制备了抗铜绿假单胞菌 OprF 的单克隆抗

体，并以此建立了双抗夹心 ELISA 方法，可以检测到 10^3 CFU/mL 的菌体浓度^[110]。由于 ELISA 操作步骤繁琐，不利于在基层快速便捷的现场诊断，因此 ELISA 方法无法作为铜绿假单胞菌诊断的主要方法，不过可以作为一个辅助的检测分析手段。

(3) 环介导等温扩增技术 (LAMP) 因其对设备要求低、易操作、灵敏性特异性高等优点，在铜绿假单胞菌的临床诊断上起到了重要作用。Goto 等根据 *oprL* 基因建立了 LAMP 比色法，全过程仅需要 2 h，缩短了检测时间同时结果的特异性和敏感性较高^[111]。姜莉莉等根据铜绿假单胞菌外毒素 A 的一段约 240 bp 大小的序列设计了一套 LAMP 引物，因其便于操作和使用等优点，可广泛应用在基层检测^[112]。

(4) 基因芯片是一种具有 PCR 的高敏感性和分子杂交的高特异性双重优势新型基因检测技术。即能同时对多基因位点检测；又能同时对多种不同来源致病菌检测，降低了假阳性概率并且降低了检测成本。瞿良等对 78 例疑似铜绿假单胞菌感染病例和 20 例非铜绿假单胞菌病例进行基因芯片检测，并且进行比对分析，铜绿假单胞菌的检出率达 100%。由此可知将基因芯片技术应用于铜绿假单胞菌的检测，能够提高铜绿假单胞菌的检出率，缩减检测时间，具有重要的现实和经济意义^[113]。

随着研究技术的进步，相应的检测方法也在不断升级，如何快速便捷低成本高效的诊断水貂出血性肺炎的病原，从而及早治疗和预防则是目前研究的重中之重。

由于水貂出血性肺炎病原多样性广泛，且非出血性肺炎病原多样性广泛，因此水貂出血性肺炎的流行应针对局部地区研制特异性疫苗。

(2)弱毒疫苗: Kamei A 等将铜绿假单胞菌的 *aroA* 基因敲除, 获得了弱毒菌株^[114]。这些基因敲出的菌株不能合成芳香族氨基酸也不能从宿主细胞获得^[115], 导致在免疫后只能在宿主体内存活 3~4 d。但通过鼻腔粘膜免疫小鼠和兔子, *aroA* 基因缺失株可以诱导机体产生高滴度抗体^[115], 不仅能为同源血清型菌株提供保护^[116], 也可为异源血清型菌株提供部分保护^[116]。Zaidi 等通过研究小鼠角膜感染模型发现主动免疫 *aroA* 缺失株和被动免疫抗血清均可提供对异源血清型菌株感染的保护^[117]。

全菌疫苗对于诱导抗铜绿假单胞菌多种抗原的免疫简单安全。研究减弱铜绿假单胞菌毒力并且维持其免疫原性的方法和技术将会有利于实现该疫苗在临床上的应用。

1.2.5.2 组分疫苗

组分疫苗是以病原微生物的部分或者某一特定成分为抗原制备的疫苗。相对于全菌疫苗保护性虽强但保护周期短等特点, 组分疫苗可以更有针对性的提高机体对病原菌的免疫效果, 从而延长免疫保护周期, 更有效的保护易感动物防止病原微生物的侵袭。铜绿假单胞菌的组分疫苗研究最多的是其外膜蛋白、LPS 等部分。

铜绿假单胞菌的外膜蛋白中, 最常被研究的是 *OprF*^[118-121]和 *OprI*^[122-124]。由于铜绿假单胞菌的外膜蛋白 F 对机体产生的抗体具有保护型和高度特异性, 已有国外学者将 *oprF* 基因连接在载体上, 对小鼠皮下接种免疫, 检测到针对全细胞或者不同血清型铜绿假单胞菌外膜蛋白 F 的高滴度 IgG 抗体水平^[118]。*OprI* 是一种高度保守的脂蛋白, 将纯化的大肠埃希氏菌表达的 *OprI* 混合铝胶佐剂接种^[125], 所有接种疫苗的受试者耐受表现良好, 无不良反应, 酶联免疫试验证明不同的免疫剂量抗体效价有所不同, 但都显著提高。除了最常研究的 *OprF* 和 *OprI*, 更多的是将多种外膜蛋白^[126]制成外膜蛋白复合疫苗^[126-128], 不仅具有良好的免疫原性, 还能保护小鼠免受铜绿假单胞菌的感染。

LPS 因为其多糖侧链的糖成分有所不同而造成的特异性被作为铜绿假单胞菌血清型的依据, 选择 LPS 作为疫苗研究方向的也很多。谢茂超等将提取的脂多糖去除类脂 A 得到 O-特异性多糖 (O-SP), 与破伤风类毒素组成结合疫苗^[129-131], 可以刺激小鼠产生高滴度的 IgG 抗体, 能保护小鼠免受 10 LD₅₀ 活菌的攻击。由于 LPS 的抗原性较强, 但不同血清型之间存在较大差别, 为了更好地预防铜绿假单胞菌的感染, 常将多种血清型病原菌的脂多糖混合制成疫苗。Gallina AM 等研制了一种免疫保护率可达 100% 的 7 价 LPS 疫苗 Pseudogen^[132]。

除了外膜蛋白、脂多糖外, 胞外黏液多糖^[133]、外毒素 A、内毒素蛋白^[134, 135]也被作为组分疫苗的研究方向, 研究前景也很光明。

1.2.5.3 基因工程疫苗

基因工程疫苗主要是指用 DNA 重组技术研制的疫苗, 具有安全性好、成本低等特点。目前用于预防水貂出血性肺炎的基因工程疫苗研究较少, 在人医预防铜绿假单胞菌感染的研究较多。现已研究了重组蛋白 *OprF*、重组蛋白 *OprI* 的基因工程疫苗, 小鼠三免后, IgA、IgG 抗体水平明显升高, 免疫保护效果良好^[136, 137]。朱佑明等将 *OprF* 克隆进 pGEX-1 λ T 载体, 转入双歧杆菌从而构建了铜绿假单胞菌重组 Bb-*OprF* 疫苗, 分别用皮下、滴鼻、口服、肌肉注射四种方式免疫 Balb/c 鼠, 免疫后第八周攻毒。结果显示脾

脏 T 淋巴细胞明显增殖, 脾细胞培养上清 IFN- γ 、IL-10、IL-12 等水平显著提高。证明重组的 Bb-OprF 疫苗可以诱导良好的 Th1 和 Th2 混合免疫应答^[138, 139]。

弱毒沙门氏菌作为疫苗载体表达异源抗原是目前研究最多的一种弱毒菌, 主要因其可以诱导多种粘膜感染的特异性应答^[140]。用弱毒沙门氏菌表达铜绿假单胞菌的 O-抗原, 小鼠口服免疫, 发现可以更多的清除肺泡内的细菌并且面对同源菌攻毒存活时间更长^[141]。表达融合的铜绿假单胞菌外膜蛋白 OprF-OprI 的沙门氏菌在初次免疫和二次加强免疫后, 人体产生了抗 OprF-OprI 的 IgG 和 IgA 抗体^[142]。临床试验中横向比较了表达 OprF-OprI 的弱毒沙门氏菌不同免疫途径的区别, 发现粘膜免疫和系统免疫血清抗体滴度相当, 但只有粘膜免疫在下呼吸道产生了 IgG 和 IgA 抗体^[142]。

1.3 研究目的与意义

目前我国主要的养貂地区为山东、河北、辽宁、吉林、黑龙江等省, 其中山东省的水貂养殖数量占全国的 80%^[143]。近些年由于水貂集约化养殖规模的不断扩大、养殖密度的增加、抗生素的违规滥用等因素, 以铜绿假单胞菌为主要病原菌的水貂出血性肺炎连年爆发, 耐药菌株不断出现, 不仅给养貂业造成巨大的经济损失, 而且也给临床治疗带来巨大困难。如何防治该病? 除了继续筛选敏感药物用于临床治疗外, 疫苗免疫预防也成为近年来学者们关注的研究方向。

目前用于水貂出血性肺炎防治的疫苗主要是灭活疫苗。由于水貂铜绿假单胞菌的血清型较多, 不同地区的致病菌血清型可能不同, 菌苗血清型是否与该病流行血清型相一致直接影响到疫苗的免疫预防效果。因此, 及时准确地了解和掌握发病地区致病菌血清型, 对疫苗的选择具有重要的参考价值。仅靠一种疫苗不能在多个地区同时获得理想的免疫预防效果, 必须研制针对不同地区流行血清型的不同多价疫苗才能获得良好的免疫预防效果。

本研究旨在对 2013、2014 年水貂出血性肺炎流行期间山东省多个貂场引起水貂出血性肺炎的铜绿假单胞菌进行分离鉴定, 了解和掌握致病菌优势血清型, 为研究多价灭活疫苗提供科学的实验依据。筛选优势血清型致病菌株作为疫苗候选菌株进行致病性、生长曲线、免疫原性研究, 为水貂出血性肺炎多价灭活疫苗的研究奠定基础。本研究对了解山东省多地貂场铜绿假单胞菌的优势血清型及其分布, 灭活疫苗候选菌株的筛选以及该病的防治具有重要的理论和实际意义。

2 材料与amp;方法

2.1 实验材料

2.1.1 病料样本、参考菌株和实验动物

2013年、2014年的6~9月间，山东省诸城、胶南、文登等18个市县的养貂场发生疑似水貂出血性肺炎，从送检的病料中采集了77份病死貂肺脏样品，其中2013年采集样品52份，2014年采集样品25份，这些样品用于铜绿假单胞菌的分离鉴定；3周龄清洁级雌性昆明鼠、2kg重清洁级雌性新西兰白兔购自辽宁长生生物技术有限公司，玻片凝集试验确定兔子血清与分离鉴定的铜绿假单胞菌无凝集现象。禽巴氏杆菌和沙门氏菌由东北农业大学动物医学学院传染病教研室保存。

2.1.2 主要试剂和培养基

尿素、吐温-20、吐温-80购自MYM BIOLOGICAL TECHNOLOGY COMPANY LIMITED；D-海藻糖、琼脂购自BIOSHARP公司；葡萄糖购自天津市风船化学试剂科技有限公司；磷酸氢二钾购自天津市永大化学试剂有限公司；硫酸镁、硫酸钾购自天津市凯通化学试剂有限公司；Tris Base、明胶购自Solarbio公司；牛肉膏、氯化钠、蛋白胨、甘露醇、蔗糖、麦芽糖购自北京博奥星生物技术有限责任公司；三糖铁琼脂购自青岛高科园海博生物技术有限公司；甲醛购自丹东市龙海试剂厂；酵母粉购自OXOID公司；乳糖购自天津市天力化学试剂有限公司；十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）、甲基红、溴甲酚紫购自上海源叶生物科技有限公司；D-木糖购自上海蓝季科技发展有限公司；白油佐剂由哈尔滨生物疫苗有限公司惠赠；96孔聚苯乙烯反应板购自COSTA公司；佐剂（QuickAntibody-Rabbit8W）购自北京博奥龙免疫技术有限公司；辣根过氧化物酶（HRP）标记羊抗鼠IgG购自北京博奥森生物技术有限公司；DNA分子质量标准（Trans 2k Plus II Molecular Marker）、Easy Taq DNA聚合酶、dNTPs（2.5mM）购自全式金生物公司；铜绿假单胞菌血清型鉴定试剂盒（A-N型）购自日本生研株式会社。

十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）琼脂培养基、营养肉汤培养基（NB）、金氏B培养基、普通琼脂培养基等按常规方法配制。血琼脂培养基购自郑州人福博赛生物技术有限责任公司。

2.1.3 DNA扩增引物

参照文献[144]和GenBank中发表的铜绿假单胞菌16S rDNA序列（登录号：AB091760.1），利用引物设计软件设计一对引物，16S-P1/16S-P2，扩增铜绿假单胞菌16S rDNA序列，引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。序列及片段大小见表2-1。

表 2-1 PCR 引物序列
Table 2-1 Primer sequences of PCR

引物名称 Name of primers	引物序列 (5'—3') Sequence of primers (5' to 3')	片段大小 (bp) Size
16S-P1	GGGGATCTTCGGACCTCA	956
16S-P2	TCCTTAGAGTGCCACCCG	

2.1.4 主要仪器

PCR 仪: GeneAmp PCR System 9700, 美国应用生物系统公司
 台式酸度计: DELTA 320, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司
 超净工作台: DL-CJ-2ND, 北京东联哈尔仪器制造有限公司
 电热恒温培养箱: DH4000AB 型, 天津市泰斯特仪器有限公司
 电子天平: BS224S 型, 北京赛多利斯仪器系统有限公司
 核酸电泳仪: DYCP-31BN, 北京六一仪器厂
 台式离心机: 1-14, 美国 SIGMA 公司
 凝胶成像系统: Alphamager TM2200 型, 美国阿尔法科技公司
 分光光度计: Spectrum752 上海光谱仪器有限公司
 紫外分光光度计: Gene Quant 1300/100
 自动酶标检测仪: Labsystems Uniskan

2.2 实验方法

2.2.1 病原菌的分离鉴定

2.2.1.1 细菌的分离培养和培养特性

将 2013 采集的样品编号为 1~52 号, 2014 年采集的样品编号为 53~77 号, CTAB 琼脂平板也按 1~77 顺序编号, 与样品号一一对应。按常规方法无菌操作, 用吊菌环挑取病料样品在 CTAB 琼脂培养基上划线, 每份病料样品划线在一个 CTAB 琼脂培养基上, 37℃ 恒温培养 18 h 后, 吊菌环挑取 1/2 淡绿色、扁平或微隆起、边缘整齐的中等大小的菌落, 然后涂片, 革兰染色, 镜检; 挑取菌体呈革兰阴性的剩余菌落在 CTAB 琼脂培养基上划线纯培养, 37℃ 恒温培养 18 h 后, 吊菌环挑取纯培养的扁平或微隆起、边缘整齐的中等大小单个菌落涂片, 染色镜检, 确认菌体为革兰染色阴性、无杂菌后, 挑取剩余菌落接种肉汤培养基扩大培养, -20℃ 保存。将已确认革兰氏染色阴性的菌株分别划线接种在金氏 B 培养基和血琼脂平板上, 37℃ 恒温培养 18 h, 观察菌株在血琼脂平板上的溶血情况、在金氏 B 培养基上培养及颜色变化情况以及在紫外光下菌落在金氏 B 培养基上的荧光现象。

2.2.1.2 病原菌生化鉴定

参照文献^[145], 对纯培养的疑似铜绿假单胞菌进行生化试验鉴定。生化实验内容包括硫化氢还原试验、MR 试验、糖分解实验和明胶液化试验。铜绿假单胞菌生化特性见表 2-2。

表 2-2 铜绿假单胞菌生化特性

Table 2-2 The Biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa*

试验项目 tests	结果 results	试验项目 tests	结果 Results
葡萄糖	+	明胶液化	+
麦芽糖	-	MR (甲基红)	-
蔗糖	-	硫化氢产生	-
乳糖	-	D-海藻糖	-
D-木糖	+	甘露醇	-

注：+，阳性；-，阴性。 Notes: +, Positive; -, Negative.

2.2.1.3 病原菌 PCR 鉴定

DNA 模板制备：分别挑取生化鉴定符合铜绿假单胞菌特性的分离菌单菌落悬浮于 100 μ L 去离子水中，混匀，沸水中加热 10 min，冰上冷却 10 min，10 000 r/min 离心 3 min，取上清液作为 PCR 反应的 DNA 模板。

PCR 反应体系为：Easy Taq Buffer 2.5 μ L，dNTP 2 μ L，DNA 模板 2 μ L，引物 16S-P1 和 16S-P2 各 1 μ L，Easy Taq 酶 0.5 μ L，去离子水 16 μ L。反应条件为：95 $^{\circ}$ C 5 min，95 $^{\circ}$ C 30 s，57 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 45 s，30 cycles，72 $^{\circ}$ C 7 min。同时设巴氏杆菌、沙门氏菌和去离子水对照。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

2.2.1.4 病原菌血清学鉴定

按日本生研株式会社生产的铜绿假单胞菌血清型鉴定试剂盒操作方法，用玻片凝集试验对经生化试验鉴定、PCR 鉴定的铜绿假单胞菌进行血清型鉴定。操作步骤如下：在干净的玻片上滴加各种血清型血清 20 μ L，然后滴加 20 μ L 铜绿假单胞菌分离株菌液，充分混匀，室温条件下作用 5 min，观察凝集块形成情况。结果判定：在 5~10 min 内形成凝集块者为阳性，其血清型即为对应发生凝集的血清型。同时用生理盐水作为阴性对照。

经过病原菌的分离培养、革兰氏染色镜检、生化鉴定、PCR 鉴定和血清学鉴定，将确定的分离菌标注编号和血清型。

2.2.2 分离菌部分生物学特性检测

2.2.2.1 标准曲线测定

从已鉴定过的铜绿假单胞菌中随机挑选出 1 株，复苏活化，将菌株按照 0.1% 比例接种在 5 mL 肉汤培养基中，37 $^{\circ}$ C 培养 18 h，将纯培养物进行 0.8、0.6、0.4、0.2 倍稀释，

分别测定菌液的吸光度值 OD_{600nm} 。同时对菌液进行 10^{-10} 倍稀释，吸取 $100\ \mu\text{L}$ 涂布于 LB 平板上，设置 3 个重复， 37°C 下恒温培养 24 h，平板涂布活菌计数，并用 EXCEL 绘制菌体含量和 OD_{600nm} 的菌体标准曲线。

2.2.2.2 血清交叉凝集试验

分别将活化的各种血清型的铜绿假单胞菌部分菌株共 15 株用 0.4% 甲醛灭活 24 h，经无菌检验后与佐剂按照说明书比例充分混匀。每个菌株肌肉注射 1 只兔子，每次免疫 $0.2\ \text{mL}$ ，21 d 时二免，42 d 时三免，每次免疫兔子的菌体含量都相同，定期采血用全菌作包被抗原的 ELISA 方法测血清抗体效价，免疫后第 55 d 对兔心脏采血，制备血清， -20°C 保存备用。另取 3 只兔子分别作佐剂对照、生理盐水对照和空白对照。

将 15 株菌的菌液浓度调整为 $1 \times 10^{12}\ \text{CFU/mL}$ ，先取 $20\ \mu\text{L}$ 血清滴加在载玻片上，再取 $20\ \mu\text{L}$ 菌液与血清混合，轻轻摇晃使其充分反应，5~10 min 后观察是否出现凝集现象，同时设置阴性对照（生理盐水）。

2.2.2.3 致病性测定

依据血清学调查结果，从已确定血清型的分离菌株中选取 3 种优势血清型的分离菌分别接种肉汤培养基， 37°C 恒温静置培养 24 h，调整菌液浓度至相同的适宜浓度，每株菌颈背部皮下注射小鼠 5 只， $0.1\ \text{mL/只}$ ，24 h 内观察小鼠的精神状态和死亡情况，3 个血清型各筛选出 1 株毒力较强菌株。

取筛选的 3 株菌分别接种于肉汤培养基， 37°C 静置培养 24 h，对菌液进行 10^{-1} ~ 10^{-10} 倍稀释后用平板涂布计数法计数。参考强毒力株筛选试验结果，将 3 株菌的菌液调至适宜浓度，再对菌液进行 10^{-2} 、 $10^{-1.5}$ 、 10^{-1} 、 $10^{-0.5}$ 倍稀释；随机将 96 只小鼠分为 12 组，8 只/组，每组小鼠经颈背部皮下注射不同稀释度的受试菌， $0.1\ \text{mL/只}$ ，连续观察 72 h，采用 Reed-Muench 法计算对小鼠半数致死量 (LD_{50})。

结合分离菌交叉凝集试验和致病力测定试验结果，依据优势血清型、交叉谱较广和致病力较强的原则，从 3 个血清型中各选 1 株分离菌作为灭活疫苗候选菌株进行下一步研究。3 株筛选出来的分离株暂命名为候选株 I、候选株 II 和候选株 III。

2.2.2.4 生长曲线测定

取 3 株疫苗候选菌株分别按 0.2% 的比例分别接种在 $5\ \text{mL}$ 肉汤培养基中， 37°C 恒温静置培养 24 h，从 0 h 到 24 h 每隔 2 h 取培养物用生理盐水倍比稀释，在 LB 平板上进行平板涂布活菌计数，用 EXCEL 统计数据，绘制生长曲线。

2.2.3 疫苗候选菌株培养及灭活条件优化

2.2.3.1 培养基选择

用本实验室的常用液体培养基做为疫苗候选株的候选培养基，筛选步骤如下：各取 $10\ \mu\text{L}$ 3 株疫苗候选菌株分别接入 $5\ \text{mL}$ LB 培养基、肉汤培养基和改良 Minca 培养基， 37°C 温箱静置培养 18 h，每株菌每个培养基设置 3 个重复，测定菌液 OD_{600nm} ，计算菌

液浓度，确定最佳培养基。

2.2.3.2 培养温度确定

各取 10 μL 3 株疫苗候选菌株分别接入 5 mL pH7.0 肉汤培养基，分别置于 22 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、42 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 18 h，每株菌每个温度设置 3 个重复，测定菌液 OD_{600nm}，计算菌液浓度，确定最佳培养温度。

2.2.3.3 培养基 pH 确定

配制肉汤培养基，分别将培养基的 pH 调整至 pH5.0、pH6.0、pH6.5、pH7.0、pH7.5、pH8.0、pH8.5、pH9.0、pH10.0；各取 10 μL 3 株疫苗候选菌株分别接入 5 mL 不同 pH 值的肉汤培养基中，每个菌株、每个 pH 梯度设置 3 个重复，37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 18 h，测定菌液 OD_{600nm}，计算菌液浓度，确定最佳培养基 pH 值。

2.2.3.4 培养时间确定

准备 66 支装有 5 mL pH7.0 肉汤培养基的试管，随机分为 3 组，每组接种 1 株候选菌株，接种 21 管，每管接种 10 μL ，余下的 3 只试管作为空白对照。接种后将试管置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养，分别在第 12、14、16、18、20、22、24 h 每组取出 3 管测定菌液 OD_{600nm}，计算菌液浓度，参照生长曲线确定最佳培养时间。

2.2.3.5 灭活甲醛浓度确定

在 3 株候选菌菌液中（各 5 mL）分别加入终浓度为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5% 的甲醛，每个浓度设置 3 个重复，37 $^{\circ}\text{C}$ 静置作用，48 h 后吸取 100 μL 灭活菌液涂布在营养琼脂平板上，37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 48 h，观察是否有菌落生长。

2.2.4 候选菌株传代稳定性检测

2.2.4.1 传代菌生长情况测定

将 3 株候选疫苗株菌液按照 0.1% 比例接种于 5 mL 肉汤培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 静置培养 18 h，以此类推，连续传代 30 代。在第 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 代测定菌液 OD_{600nm}，计算菌液浓度。

2.2.4.2 传代菌致病性测定

分别将 3 株疫苗候选菌株的第 5、10、15、20、25、30 代的菌液浓度调整为相同的适宜菌体浓度后进行 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 倍稀释，取 0.1 mL 皮下接种小鼠，每个稀释度 5 只小鼠，观察小鼠死亡情况，利用 Reed-Muench 法计算对小鼠 LD₅₀。

2.2.4.3 传代菌对小鼠的免疫保护

将 3 株疫苗候选菌株的第 5、10、15、20、25、30 代菌液调整至相同的适宜浓度，用 0.4% 甲醛灭活，然后分别和无菌白油佐剂按照体积比 1:1 比例混合，充分乳化后免疫小鼠，每株菌每代次免疫 5 只，0.1 mL/只，设立生理盐水对照组；21 d 后分别用 10LD₅₀

的菌液皮下接种攻毒，观察小鼠死亡情况。

2.2.5 灭活菌的制备及免疫效力检测

2.2.5.1 菌株灭活和浓缩

选取最初分离保存的 3 株候选菌株按照 0.1% 的比例接种入肉汤中，37℃ 恒温静置培养 18 h。然后向前述菌液中加入终浓度为 0.4% 的甲醛溶液，37℃ 静置作用 24 h；将灭活后菌液沉降 3 d，去除上清，调整菌液浓度为 1×10^{12} CFU/mL，进行无菌检验。

2.2.5.2 三价灭活菌制备及安全检验

将灭活后的 3 株菌液浓度相同 (1×10^{12} CFU/mL) 的候选菌与白油佐剂按照 1:1:1:1 混合，充分乳化，即为水貂出血性肺炎三价灭活菌。

(1) 无菌检验

将制备的三价灭活菌接种于肉汤琼脂培养基，37℃ 恒温静置培养 48 h，观察肉汤琼脂培养基上是否有菌落生长。

(2) 超剂量检验

取 0.3 mL 三价灭活菌免疫小鼠 5 只，设置生理盐水对照组，30 d 内观察小鼠免疫后采食、精神状态及局部吸收状况。

2.2.5.3 间接 ELISA 方法条件优化

通过方阵滴定先固定酶标二抗稀释度，用 5% 脱脂乳 PBST 溶液将抗原进行 1:5、1:10、1:20、1:40 倍稀释，自左至右依次包被 96 孔板，100 μ L/孔，4℃ 过夜；第二日 96 孔板洗涤封闭后，将小鼠阴、阳性血清分别进行 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800 倍稀释，自上至下依次包被 96 孔板，100 μ L/孔，37℃ 孵育 1 h；然后进行间接 ELISA 试验，比较免疫小鼠阳性、阴性血清的 OD_{450nm} 值和 P/N 值确定包被灭活全菌抗原浓度和血清最佳稀释度，然后用确定的抗原浓度和血清稀释度来进行 ELISA 试验，确定酶标二抗稀释度。这样初步优化出包被抗原浓度、血清稀释度和酶标二抗稀释度。然后依根据初步建立的间接 ELISA 方法测定所采集的小鼠阴性血清，确定以候选株 I、候选株 II 和候选株 III 全菌为包被抗原的间接 ELISA 方法的阴阳性临界值，作为小鼠血清抗体检测的依据。

2.2.5.4 最小免疫剂量确定

将 75 只昆明鼠，随机分成 15 组，5 只/组，免疫不同剂量的三价灭活菌。免疫 21 d 后，分别皮下注射 10 LD₅₀ 的 3 株候选菌株，0.1 mL/只，72 h 内观察记录小鼠死亡情况。具体的免疫剂量、攻毒剂量、攻毒菌株和分组情况见表 2-3。

同时剖取攻毒后免疫不同免疫剂量的小鼠、攻毒未免疫小鼠和健康鼠的肺、肝、肾等内脏，用 10% 中性甲醛溶液固定，石蜡包埋切片，H.E. 染色，光学显微镜下观察并拍照。

表 2-3 对小鼠最小免疫剂量测定分组

Table 2-3 Groups of mice with MID

组别	免疫剂量	攻毒剂量	攻毒菌株	组别	免疫剂量	攻毒剂量	攻毒菌株
1	0.05mL	10 LD ₅₀	候选株 I	9	0.05mL	10 LD ₅₀	候选株 III
2	0.1mL	10 LD ₅₀	候选株 I	10	0.1mL	10 LD ₅₀	候选株 III
3	0.15mL	10 LD ₅₀	候选株 I	11	0.15mL	10 LD ₅₀	候选株 III
4	0.2mL	10 LD ₅₀	候选株 I	12	0.2mL	10 LD ₅₀	候选株 III
5	0.05mL	10 LD ₅₀	候选株 II	13	-	10 LD ₅₀	候选株 I
6	0.1mL	10 LD ₅₀	候选株 II	14	-	10 LD ₅₀	候选株 II
7	0.15mL	10 LD ₅₀	候选株 II	15	-	10 LD ₅₀	候选株 III
8	0.2mL	10 LD ₅₀	候选株 II				

2.2.5.5 三价灭活菌对小鼠免疫保护

随机选择 50 只健康昆明鼠，每组 5 只共分 10 组，第 1、2 组分别颈背部皮下注射 0.15 mL 三价灭活菌，第 2 组在 14 d 同等剂量进行第二次免疫注射，第 3 组注射 0.15 mL 生理盐水做对照。每组每次随机选取 3 只昆明鼠，分别在免疫后第 3、7、10、14、21、28、35、42、49 d 尾静脉采血，提取小鼠血清。同时测定免疫后的 14 d 内 3 组小鼠的体重变化，观察小鼠的进食状况和精神状态。

应用已建立的间接 ELISA 检测方法进行血清抗体效价的检测：分别将候选株 I、候选株 II、候选株 III 浓度调至方阵法确定的包被抗原浓度，包被 96 孔板，每孔 100 μ L，4 $^{\circ}$ C 包被过夜；用 PBST 清洗 3 次，5 min/次，甩干；用 5% 脱脂乳封闭包被抗原 37 $^{\circ}$ C 封闭 3 h，200 μ L/孔，然后用 PBST 清洗 3 次，5 min/次，甩干；将血清用 5% 脱脂乳 PBST 稀释，每孔加入 100 μ L；37 $^{\circ}$ C 放置 1 h；用 PBST 清洗 3 次，5 min/次，甩干；加入 5% 脱脂乳 PBST 稀释 HRP 标记羊抗鼠二抗 (IgG)，100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C 放置 1 h；PBST 清洗 3 次，5 min/次，甩干；加入显色液，100 μ L/孔；室温条件下避光作用 5~10 min；加入 2 mol/L 硫酸终止液，50 μ L/孔；酶标仪读取 OD_{450nm} 值。

第 4、6、8 组同样颈背部皮下注射 0.15 mL 三价灭活菌，免疫 1 次，第 5、7、9 组注射 0.15 mL 生理盐水，免疫 21 d 后，用 10LD₅₀ 的候选株 I 攻毒第 4、5 组小鼠，0.1 mL/只；用 10LD₅₀ 的候选株 II 攻毒第 6、7 组小鼠，0.1 mL/只；用 10LD₅₀ 的候选株 III 攻毒第 8、9 组小鼠，0.1 mL/只。观察记录小鼠死亡情况。第 10 组做为空白对照。具体免疫剂量、攻毒菌株和攻毒菌体浓度见表 2-4。

剖取免疫攻毒组鼠、未免疫攻毒组鼠和正常健康鼠的肺、肝、肾等内脏，用 10% 中性甲醛溶液固定，石蜡包埋切片，H.E. 染色，光学显微镜下观察并拍照。

表 2-4 免疫攻毒保护分组

Table 2-4 The groups of immunity protection test

组别	免疫剂量	注射疫苗	攻毒菌株	攻毒菌体浓度
4	0.15 mL	三价灭活菌	候选株 I	10 LD ₅₀
5	0.15 mL	生理盐水	候选株 I	10 LD ₅₀
6	0.15 mL	三价灭活菌	候选株 II	10 LD ₅₀
7	0.15 mL	生理盐水	候选株 II	10 LD ₅₀
8	0.15 mL	三价灭活菌	候选株 III	10 LD ₅₀
9	0.15 mL	生理盐水	候选株 III	10 LD ₅₀

3 结果

3.1 细菌的分离鉴定

3.1.1 分离菌的染色镜检和培养特性

将 2013 年采集的 1~52 号样品和 2014 年采集的 53~77 号样品在 CTAB 琼脂平板上划线分离培养，根据铜绿假单胞菌的菌落形态共挑选了 120 个单菌落进行革兰氏染色，镜检。在同一平板上菌落形态略有差别的单菌落用 A、B、C 区别，如 6A、6B。显微镜观察显示，其中 66 株菌是革兰氏阴性菌，将 66 株革兰氏阴性菌分别接种在血琼脂平板和金氏 B 培养基上，发现有 56 株菌有溶血现象，53 株菌同时产绿脓菌素和荧光素。分离菌的来源、样品采集时间、培养特性等信息见表 3-1。

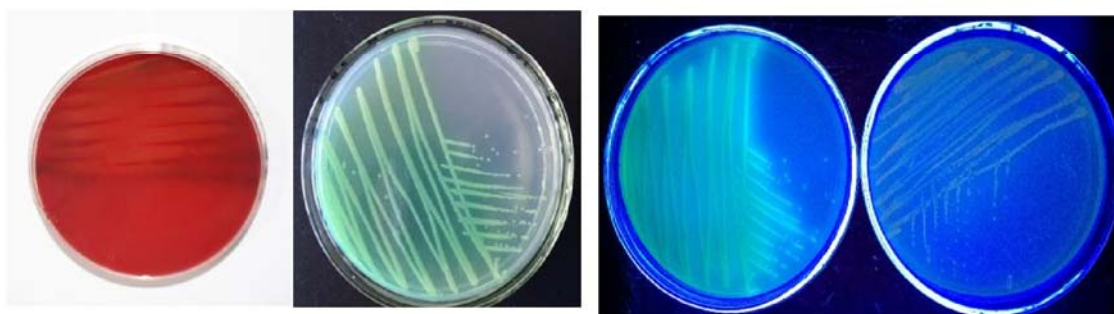


图 3-1A

图 3-1B

图 3-1C

图 3-1D

图 3-1A 血琼脂平板上的铜绿假单胞菌

Figure 3-1A *Pseudomonas aeruginosa* on blood agar

图 3-1B 金氏 B 上的铜绿假单胞菌（自然光下）

Figure 3-1B *Pseudomonas aeruginosa* on King B medium (nature light)

图 3-1C 金氏 B 上的铜绿假单胞菌（紫外光下）

Figure 3-1C *Pseudomonas aeruginosa* on King B medium (ultraviolet)

图 3-1D LB 上的铜绿假单胞菌

Figure 3-1D *Pseudomonas aeruginosa* on LB medium

铜绿假单胞菌在金氏 B 琼脂培养基上呈现草绿色或绿色边缘整齐、圆润的菌落，可以产生绿脓菌素（图 3-1B），在紫外光照射下会呈现绿色荧光（图 3-1C），在 LB 琼脂培养基上不会出现荧光（图 3-1D）；在血琼脂平板上会出现溶血现象（图 3-1A）。

结 果

表 3-1 水貂出血性肺炎病原菌分离情况
Table 3-1 The isolates of mink hemorrhagic pneumonia

平板编号	来源	溶血性	绿脓菌素/荧光素	平板编号	来源	溶血性	绿脓菌素/荧光素
8C	诸城	+	+/+	62B	红岛	+	+/+
24B	临沂	—	—/—	62C	红岛	+	+/+
31A	城阳	+	—/—	63B	红岛	—	—/—
32	诸城	+	+/+	64B	胶南	—	—/—
33	莒县	+	+/+	65A	文登	—	—/—
36	诸城	+	+/+	65B	文登	—	—/—
37A	乳山	+	+/+	65C	文登	—	—/—
40	红岛	+	+/+	66A	红岛	+	—/—
41	临沂	+	+/+	66B	红岛	—	—/—
42B	日照	+	+/+	66C	红岛	+	—/—
42C	日照	+	+/+	66D	红岛	—	—/—
43A	潍坊	+	+/+	67	诸城	—	—/—
43B	潍坊	+	+/+	69A	文登	+	+/+
45B	莒县	+	+/+	69B	文登	+	+/+
45C	莒县	+	+/+	70A	红岛	—	—/—
46A	河套	+	+/+	71A	红岛	+	+/+
46B	河套	+	+/+	71B	红岛	+	+/+
48A	诸城	+	+/+	71C	红岛	+	+/+
48B	诸城	+	+/+	71D	红岛	+	+/+
49A	文登	+	+/+	72A	黄岛	+	+/+
49B	文登	+	+/+	72B	黄岛	+	+/+
50A	胶南	+	+/+	72C	黄岛	+	+/+
51B	日照	+	+/+	74A	威海	+	+/+
52	诸城	+	+/+	74B	威海	+	+/+
53A	胶南	+	+/+	75A	胶州	+	+/+
53B	胶南	+	+/+	75B	胶州	+	+/+
53C	胶南	+	+/+	75C	胶州	+	+/+
53D	胶南	+	+/+	75D	胶州	+	+/+
55	胶南	+	+/+	75E	胶州	+	+/+
60A	诸城	+	+/+	77A	红岛	+	+/+
60B	诸城	+	+/+	77B	红岛	+	+/+
61	红岛	+	+/+	77C	红岛	+	+/+
62A	红岛	+	+/+	77D	红岛	+	+/+

注：+，阳性；—，阴性。Notes: +, Positive; —, Negative.

3.1.2 生化鉴定

生化试验结果显示，66株分离菌中有53株均能分解葡萄糖、D-木糖，不能分解蔗糖、麦芽糖、乳糖、D-海藻糖和甘露醇，MR试验为阴性，硫化氢试验不产酸不产气，可以液化明胶，符合铜绿假单胞菌的生化特性（表3-2）。

表3-2 分离株生化试验结果

Table 3-2 The results of biochemical test

菌株	MR 实 验	葡萄 糖	D-木 糖	乳糖	蔗糖	麦芽 糖	三糖 铁	D-海 藻糖	甘露 醇	明胶液 化
8C	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
32	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
33	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
36	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
37A	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
40	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
41	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
42B	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
42C	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
43A	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
43B	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
45B	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
45C	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
46A	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
46B	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
48A	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
48B	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
49A	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
49B	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
50A	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
51B	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
52	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
53A	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
53B	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
53C	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
53D	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
56	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+

（转下页）

结 果

(接上页)

菌株	MR 实 验	葡萄 糖	D-木 糖	乳糖	蔗糖	麦芽 糖	三糖 铁	D-海 藻糖	甘露 醇	明胶 液化
60A	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
60B	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
61	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
62A	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
62B	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
62C	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
69A	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
69B	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
71A	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
71B	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
71C	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
71D	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
72A	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
72B	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
72C	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
74A	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
74B	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
75A	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
75B	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
75C	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
75D	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
75E	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
77A	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
77B	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
77C	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
77D	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+

注：+，阳性或产酸产气；—，阴性或不产酸不产气。 Notes: +, Positive; —, Negative.

3.1.3 PCR 鉴定

分别以生化试验鉴定出的 53 株铜绿假单胞菌 DNA 为模板，以 16S-P1 和 16S-P2 为上下游引物扩增铜绿假单胞菌 16S rDNA 中特异性片段，核酸电泳分析结果显示，53 株分离菌均可以扩增出大约 1000 bp 左右的单一条带，与预期结果一致（图 3-2A、图 3-2B、图 3-2C、图 3-2D）。同时 PCR 引物设计具有特异性，对于同样常见的巴氏杆菌和沙门氏菌均不能鉴定。

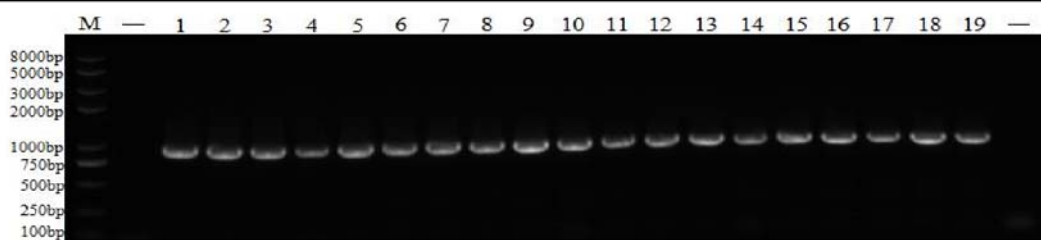


图 3-2A

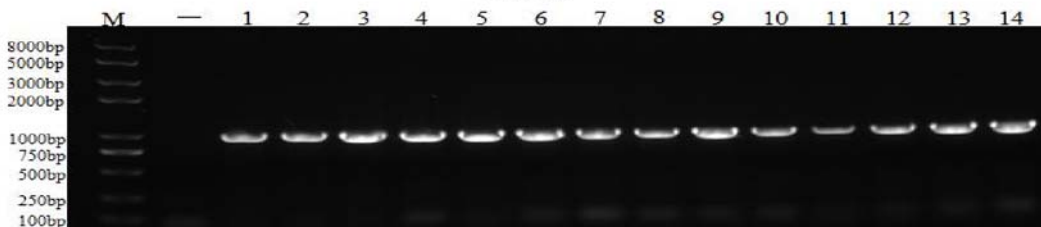


图 3-2B

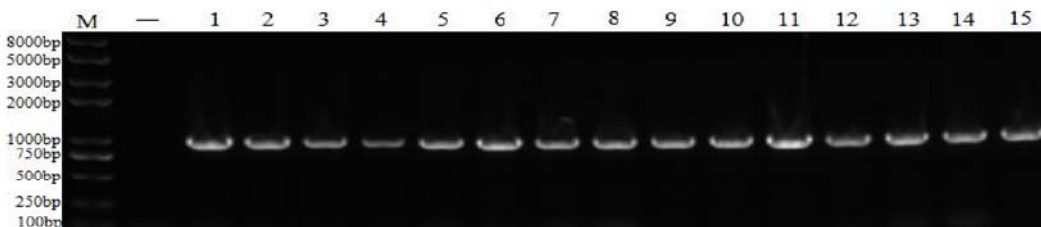


图 3-2C

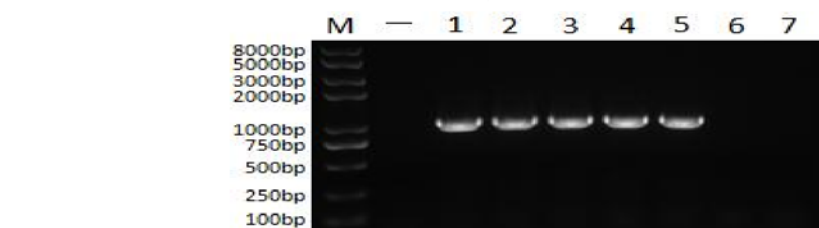


图 3-2D

图 3-2A: M: DNA Marker 2 000 Plus II Molecular Marker; N: 阴性对照; 1-19: 分离菌株 8C、32、33、36、37A、40、41、42B、43C、43A、43B、45B、45C、46A、46B、48A、48B、49A 和 49B; N: 阴性对照。

图 3-2B: M: DNA Marker 2 000 Plus II Molecular Marker; N: 阴性对照; 1-14: 分离菌株 50A、51B、52、53A、53B、53C、53D、56、60A、60B、61、62A、62B 和 62C。

图 3-2C: M: DNA Marker 2 000 Plus II Molecular Marker; N: 阴性对照; 1-15: 分离菌株 69A、69B、71A、71B、71C、71D、72A、72B、72C、74A、74B、75A、75B、75C 和 75D。

图 3-2D: M: DNA Marker 2 000 Plus II Molecular Marker; N: 阴性对照; 1-5: 分离菌株分别为 75E、77A、77B、77C 和 77D; 6: 沙门氏菌; 7: 巴氏杆菌。

图 3-2 53 株铜绿假单胞菌 PCR 鉴定结果

Figure 3-2 The results of PCR test

经生化试验和 PCR 鉴定结果确定 53 株分离菌均为铜绿假单胞菌，其与样品编号的对应关系见表 3-3。

表 3-3 样品编号和统一编号对应关系表

Table 3-3 Relationship between serial numbers and samples

样品编号	统一编号	样品编号	统一编号	样品编号	统一编号
8C	SD001	49B	SD019	71B	SD037
32	SD002	50A	SD020	71C	SD038
33	SD003	51B	SD021	71D	SD039
36	SD004	52	SD022	72A	SD040
37A	SD005	53A	SD023	72B	SD041
40	SD006	53B	SD024	72C	SD042
41	SD007	53C	SD025	74A	SD043
42B	SD008	53D	SD026	74B	SD044
42C	SD009	56	SD027	75A	SD045
43A	SD010	60A	SD028	75B	SD046
43B	SD011	60B	SD029	75C	SD047
45B	SD012	61	SD030	75D	SD048
45C	SD013	62A	SD031	75E	SD049
46A	SD014	62B	SD032	77A	SD050
46B	SD015	62C	SD033	77B	SD051
48A	SD016	69A	SD034	77C	SD052
48B	SD017	69B	SD035	77D	SD053
49A	SD018	71A	SD036		

3.1.4 血清型鉴定

用日本生研株式会社生产的铜绿假单胞菌血清分型鉴定试剂盒对 53 株铜绿假单胞菌的血清型鉴定结果显示,53 株分离菌中有 52 株分属于 11 个血清型,1 株菌未能定型。其中 G 型 27 株 (27/53)、B 型 5 株 (5/53)、D 型 4 株 (4/53), 其他血清型分离菌较少, 具体血清型分布情况见表 3-4。

表 3-4 分离菌血清型及其分布

Table 3-4 The distribution of the serotype of isolates

地区	样品数/ 年份	分离 菌数	血清型/年份											
			G 型	B 型	D 型	F 型	M 型	J 型	H 型	K 型	E 型	I 型	N 型	未确 定型
诸城	15/2013	8	5				0	1						
	2/2014		0				2	0						
胶南	2/2013	6	0		0					1		0	0	
	3/2014		1		2					0		1	1	
文登	2/2013	4	1	0		1				0				
	4/2014		0	1		0				1				
红岛	3/2013	13	1	0	0	0		0			0		0	
	9/2014		4	2	2	1		1		1			1	
黄岛	1/2013	3				0	0							0
	1/2014					1	1							1
潍坊	2/2013	2	2											
威海	2/2013	2		0				0						
	4/2014			1				1						
日照	3/2013	3	3											
莒县	3/2013	3	3											
乳山	1/2013	1	1											
河套	1/2013	2	2											
临沂	8/2013	1	1											
胶州	1/2013	5	0	0							0			
	1/2014		3	1							1			
即墨	2/2013	0												
	1/2014													
崂山	2/2013	0												
城阳	2/2013	0												
莒南	1/2013	0												
河北	1/2013	0												
合计	52/2013	22	19	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
	25/2014	31	8	5	4	2	3	2	1	2	1	1	1	1

经生化试验和 PCR 鉴定结果确定 53 株分离菌为铜绿假单胞菌,统计整理病料样品、菌株编号和对应血清型之间的关系,结果见表 3-5。

表 3-5 貂源铜绿假单胞菌编号与产地关系表

Table 3-5 Relationship between serial number and origin

平板编号	统一编号	来源地	血清型	平板编号	统一编号	来源地	血清型
8C	SD001	诸城	G 型	60A	SD028	诸城	M 型
32	SD002	诸城	G 型	60B	SD029	诸城	M 型
33	SD003	莒县	G 型	61	SD030	红岛	F 型
36	SD004	诸城	G 型	62A	SD031	红岛	G 型
37A	SD005	乳山	G 型	62B	SD032	红岛	B 型
40	SD006	红岛	G 型	62C	SD033	红岛	G 型
41	SD007	临沂	G 型	69A	SD034	文登	H 型
42B	SD008	日照	G 型	69B	SD035	文登	B 型
42C	SD009	日照	G 型	71A	SD036	红岛	J 型
43A	SD010	潍坊	G 型	71B	SD037	红岛	K 型
43B	SD011	潍坊	G 型	71C	SD038	红岛	G 型
45B	SD012	莒县	G 型	71D	SD039	红岛	G 型
45C	SD013	莒县	G 型	72A	SD040	黄岛	未确定型
46A	SD014	河套	G 型	72B	SD041	黄岛	F 型
46B	SD015	河套	G 型	72C	SD042	黄岛	M 型
48A	SD016	诸城	J 型	74A	SD043	威海	B 型
48B	SD017	诸城	G 型	74B	SD044	威海	J 型
49A	SD018	文登	G 型	75A	SD045	胶州	K 型
49B	SD019	文登	F 型	75B	SD046	胶州	G 型
50A	SD020	胶南	H 型	75C	SD047	胶州	G 型
51B	SD021	日照	G 型	75D	SD048	胶州	B 型
52	SD022	诸城	G 型	75E	SD049	胶州	G 型
53A	SD023	胶南	G 型	77A	SD050	红岛	D 型
53B	SD024	胶南	I 型	77B	SD051	红岛	N 型
53C	SD025	胶南	D 型	77C	SD052	红岛	B 型
53D	SD026	胶南	E 型	77D	SD053	红岛	D 型
56	SD027	胶南	D 型				

3.2 分离株部分生物学特性检测

3.2.1 标准曲线测定

采用平板活菌计数法, 对 37℃ 恒温培养 18 h 条件下 OD_{600nm} 值和菌体含量进行线性回归方程, 结果见图 3-3, 回归方程为 $Y=221.38X-14.572$, 相关系数为 $R^2=0.9897$ 。

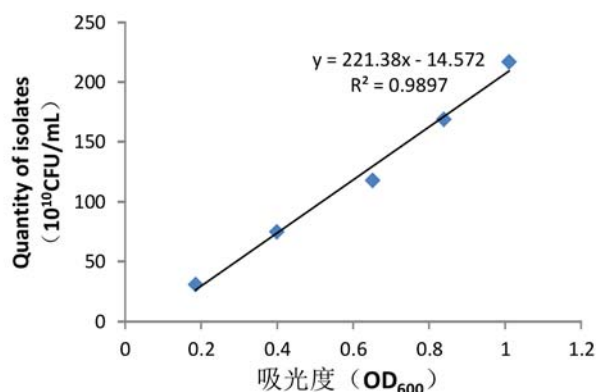


图 3-3 铜绿假单胞菌的标准曲线

Figure 3-3 Standard curve of *Pseudomonas aeruginosa*

3.2.2 血清交叉凝集试验

通过免疫注射获得抗铜绿假单胞菌不同血清型的兔血清，用玻片凝集技术，对采集到的兔血清和免疫用的 15 株活菌液进行血清交叉凝集试验，依据凝集效果的梯度不同，统计分离到的铜绿假单胞菌 11 种血清型交叉凝集效果。结果见表 3-6。

3.2.3 致病性测定

致病性试验显示，27 株 G 型分离菌株中 SD004 株致病性较强，0.1 mL 的菌液 (1×10^{12} CFU/mL) 在 18 h 内使全部小鼠死亡；5 株 B 型分离菌株中 SD052 株致病性较强，0.1 mL 的菌液在 22 h 内使全部小鼠死亡；4 株 D 型分离菌株中 SD050 株在 48 h 内使全部小鼠死亡。故优势流行血清型中致病性较强的菌株为 SD004 (G)、SD050 (D) 和 SD052 (B)。结合优势血清型、血清交叉凝集谱和致病性，选取 SD004 (G)、SD050 (D) 和 SD052 (B) 为三价灭活菌候选菌株进行后续研究。暂命名的候选株 I 即为 SD004，候选株 II 即为 SD050，候选株 III 即为 SD052。

对小鼠的半数致死量测定结果显示，3 株分离菌 SD004、SD050、SD052 对小鼠的 LD_{50} 分别为 2.5×10^{10} CFU、 7.5×10^{10} CFU 和 5.6×10^{10} CFU，详细结果见表 3-7。

表 3-7 分离株对小鼠的 LD_{50} 测定结果Table 3-7 The results of isolates about LD_{50} in mice

菌株	血清型	稀释倍数	死亡数/攻毒数				菌液菌数 (CFU/mL)	LD_{50} (CFU)
			$10^{-0.5}$	10^{-1}	$10^{-1.5}$	10^{-2}		
SD004	G	—	8/8	6/8	1/8	0/8	3.16×10^{12}	2.5×10^{10}
SD050	D	—	7/8	6/8	2/8	0/8	3.16×10^{12}	7.5×10^{10}
SD052	B	—	5/8	4/8	1/8	0/8	3.16×10^{12}	5.6×10^{10}

结 果

表 3-6 分离菌血清交叉反应性
Table 3-6 The serological cross reaction of isolates

血清	菌株														
	SD004	SD016	SD019	SD020	SD024	SD025	SD026	SD028	SD035	SD037	SD047	SD049	SD050	SD051	SD052
SD004 (G)	++	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
SD016 (J)	—	++++	+++	—	+++	—	—	—	—	—	—	++++	+	—	—
SD019 (F)	—	—	+++	++	—	+++	—	—	—	—	—	+++	++	+++	—
SD020 (H)	—	—	++++	++++	++++	+++	—	—	—	—	+++	++	—	++++	—
SD024 (I)	—	—	—	+++	+++	+++	—	—	—	—	++++	++++	—	—	+++
SD025 (D)	—	—	++	—	—	++++	—	—	—	—	+++	+++	—	—	—
SD026 (E)	—	—	++++	—	—	—	++++	—	—	—	—	+++	—	—	—
SD028 (M)	—	—	+++	+	++	++	—	++++	—	—	++	++++	—	++	—
SD035 (B)	—	—	+++	—	++	++	++	—	++++	—	+++	++++	—	+++	—
SD037 (K)	—	—	+++	—	—	++	—	—	+	++++	+++	++	—	—	—
SD047 (G)	—	—	+++	++	—	—	—	—	—	—	++++	++++	—	—	—
SD049 (G)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++++	++++	—	++	—
SD050 (D)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++++	++++	++++	—	—
SD051 (N)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	++++	—	++++	+
SD052 (B)	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—	+++	—	—	++++

注：“+”表示 25%凝集；“++”表示 50%凝集；“+++”表示 75%凝集；“++++”表示 100%凝集；“—”表示不凝集。 Notes: “+”means 25% agglutination; “++”means 50% agglutination; “+++”means 75% agglutination; “++++”means 100% agglutination; “—”means no agglutination.

3.2.4 生长曲线测定

对分离菌 SD004、SD050、SD052 测定其 37℃ 培养 24 h 的生长曲线，绘制时间和菌落数对数的曲线，生长曲线表明分离菌 SD004、SD050、SD052 在 37℃ 培养 20 h 后菌体浓度达到 10^{12} CFU/mL，至 24h 菌体浓度变化相对稳定（图 3-4）。

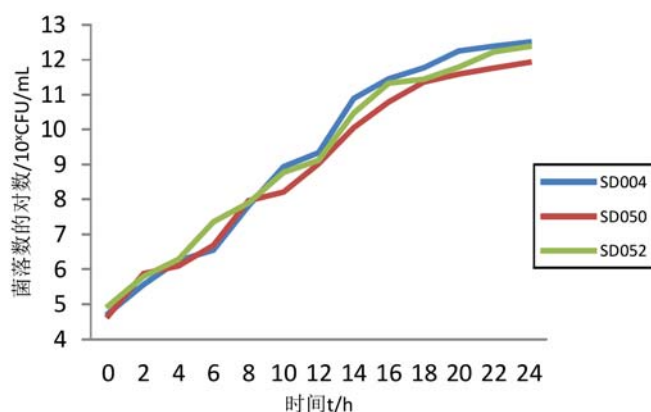


图 3-4 候选疫苗株生长曲线

Figure 3-4 The growth curves of vaccine strains

3.3 疫苗株培养条件及甲醛灭活浓度优化

3.3.1 培养基的选择

将 3 株疫苗候选菌株的纯培养菌液各取 10 μ L 分别接入 pH7.0 的 5 mL LB 液体培养基、pH7.0 的肉汤培养基和 pH7.0 的改良 Minca 培养基中，在 37℃ 的温箱中恒温培养 18 h，测定 OD_{600nm} 值，结果发现在同样的培养温度、pH 和培养时间条件下，疫苗候选菌株肉汤培养基上生长状态最好，3 株候选疫苗株的 OD_{600nm} 值分别为 1.127、1.032、1.116；在 LB 和改良 Minca 上分别为 0.892、0.932、0.987 和 0.993、1.004、0.936，结果如图 3-5 所示。

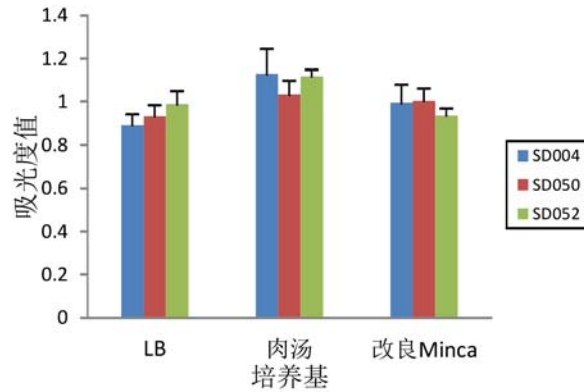


图 3-5 培养基对疫苗株的影响
Figure 3-5 Effect of medium on

3.3.2 培养温度确定

各取 10 μL 3 株疫苗候选菌株分别接入 pH7.0 的 5 mL 肉汤培养基，分别置于 22 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、37 $^{\circ}\text{C}$ 、42 $^{\circ}\text{C}$ 温箱静置培养 18 h，测定菌液 OD_{600nm}，发现在同样的培养基、pH 和培养时间条件下，3 株疫苗候选株在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 OD_{600nm} 值最高，菌体 OD_{600nm} 为 1.148、1.004、0.938，详细结果如图 3-6 所示。

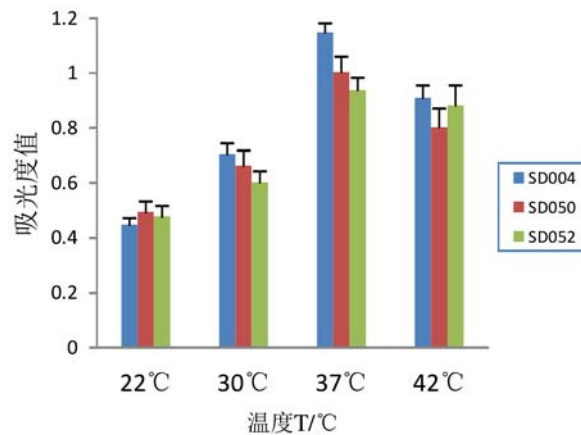


图 3-6 培养温度对疫苗株的影响
Figure 3-6 Effect of temperature on isolates

3.3.3 培养基 pH 的确定

各取 10 μL 3 株疫苗候选菌株分别接入 5 mL 不同 pH 值的肉汤培养基中，37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱恒温培养 18 h，测定菌液 OD_{600nm}，结果如图 3-7 所示，在相同的培养时间、培养温度和成分相同的培养基等条件下，不同的 pH 对于菌株菌体含量影响不同，其中 3 株疫苗候选株在 pH7.0~pH7.5 的时候 OD_{600nm} 值最高，菌体浓度最大。

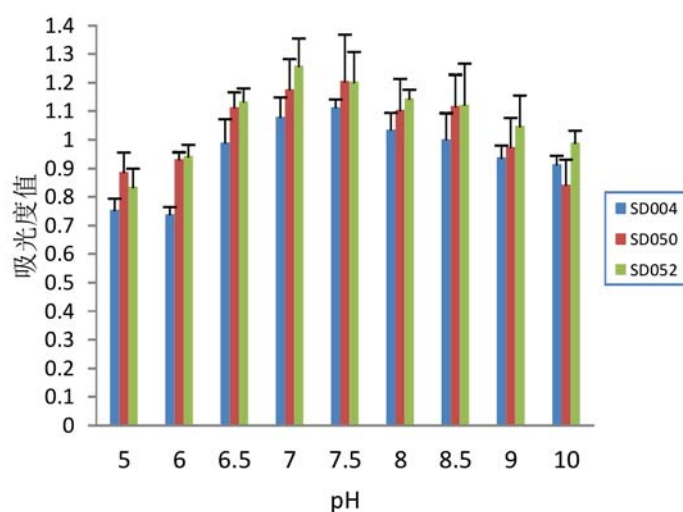


图 3-7 pH 对疫苗株的影响

Figure 3-7 Effect of pH on isolates

3.3.4 培养时间确定

接种 3 株疫苗候选株的 pH7.0 的肉汤培养基在 37℃ 温箱静置培养, 分别在第 12、14、16、18、20、22、24 h 每组取出 3 管测定菌液 OD_{600nm}, 结果如图 3-8 所示, 3 株疫苗株在相同 pH 的培养基、相同培养温度的条件下, 22~24 h 时 OD_{600nm} 值最高, 菌株生长状态最好。

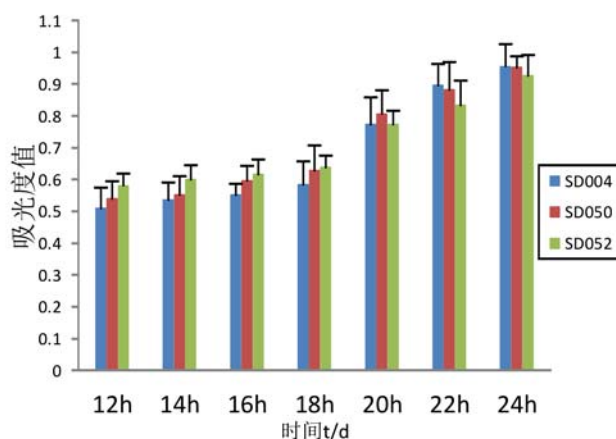


图 3-8 培养时间对疫苗株的影响

Figure 3-8 Effect of time on isolates

总结上述对疫苗候选菌株培养条件的优化情况, 选择 pH 在 7.0~7.5 的肉汤培养基, 在 37℃ 恒温培养 22~24 h 是最适的候选菌株培养条件。

3.3.5 甲醛灭活浓度确定

将 5 种甲醛灭活浓度（0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%）灭活过的菌液涂布在营养琼脂平板上，37℃静置培养 48 h，观察平板上是否生长菌落，如表 3-8 所示，结果发现 SD004 和 SD050 需要浓度在 0.3%以上的甲醛才能完全灭活，SD052 需要浓度在 0.4%以上的甲醛才能完全灭活。

表 3-8 甲醛灭活浓度

Table 3-8 The inactivated concentration of formaldehyde

甲醛灭活浓度	SD004	SD050	SD052
0.1%	+	+	+
0.2%	+	+	+
0.3%	—	—	+
0.4%	—	—	—
0.5%	—	—	—

注：“+”表示有菌落生成；“—”表示无菌落生成。Notes: +, Positive; —, Negative.

3.4 候选菌株传代稳定性检测

3.4.1 传代菌生长稳定性

将分离菌 SD004、SD050、SD052 用肉汤培养基连续传代 30 代，在第 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 代分别进行活菌计数。结果表明 SD004、SD050、SD052 菌株在 24 代前菌体含量相对稳定，菌落形态无变化，SD004 菌株的菌液浓度为 2.27×10^{12} CFU/mL~ 3.84×10^{12} CFU/mL，SD050 菌株的菌液浓度为 1.53×10^{12} CFU/mL~ 4.26×10^{12} CFU/mL，SD052 菌株的菌液浓度为 1.49×10^{12} CFU/mL~ 4.52×10^{12} CFU/mL。菌体含量变化如图 3-9 所示。

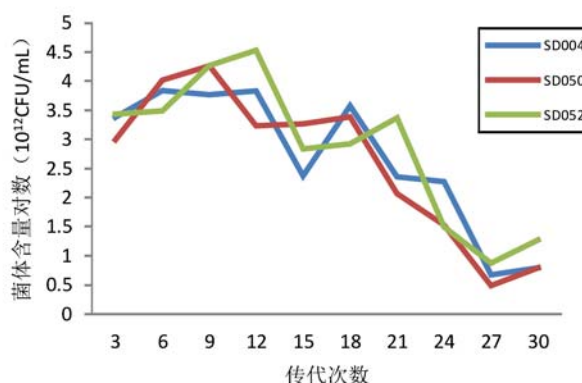


图 3-9 疫苗株 SD004、SD050、SD052 传代过程中菌体含量变化

Figure 3-9 Content of isolates in continuous passages

3.4.2 传代菌致病性

连续传代培养 SD004、SD050、SD052 菌株，分别将这三株菌的第 5 代、第 10 代、第 15 代、第 20 代、第 25 代、第 30 代菌液用生理盐水 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 倍稀释，0.1 mL/只，用 Reed-Muench 法计算对小鼠的 LD_{50} 。结果见图 3-10，SD004、SD050、SD052 在 20 代前 LD_{50} 变化较稳定，一直在 10^{10} ~ 10^{11} CFU 之间浮动；20 代后 LD_{50} 下降，菌株的致病性减弱。

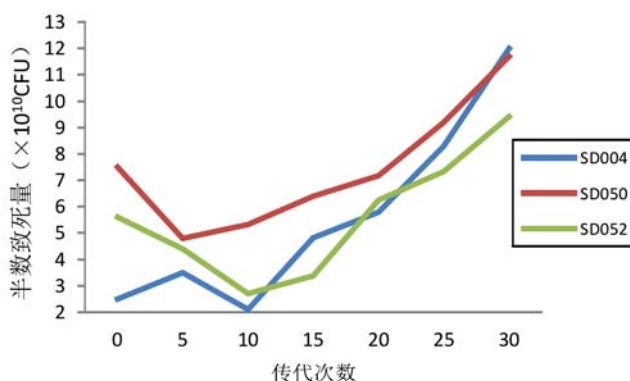


图 3-10 疫苗株 SD004、SD050、SD052 传代对小鼠致病性影响

Figure 3-10 The influence on pathogenicity of the vaccine strains

3.4.3 传代菌对小鼠的免疫保护

分别将铜绿假单胞菌 SD004、SD050、SD052 第 5 代、第 10 代、第 15 代、第 20 代、第 25 代、第 30 代菌液灭活，分别免疫小鼠，21 d 后分别用 10 LD_{50} 的 SD004、SD050、SD052 强毒攻击，在 20 代前均能全部保护，25 代、30 代菌液免疫原性略有下降，生理盐水对照组全部死亡，试验结果表明培养至第 25 代对毒株的免疫原性无明显影响，见表 3-9。

表 3-9 疫苗株传代对免疫原性影响

Table 3-9 The influence on immunogenicity of the vaccine strains

菌株	存活数/总数					
	5 代	10 代	15 代	20 代	25 代	30 代
SD004	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5
SD050	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	3/5
SD052	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	3/5
生理盐水	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

3.5 三价灭活菌免疫效力检测

3.5.1 三价灭活菌制备及检验

本研究制备了水貂出血性肺炎三价灭活菌，3 株菌的含量均调整为 1×10^{12} CFU/mL。无菌检验结果显示，菌苗在肉汤琼脂培养基上 37°C 培养 48 h，无菌落生长，符合无菌检验要求。三倍超剂量免疫试验检验结果显示，免疫小鼠和对照组小鼠在 30 d 观察期内采食、精神状态、毛发、局部吸收情况均未出现明显的异常变化，符合预期结果。

3.5.2 最小免疫剂量确定

3.5.2.1 不同免疫剂量对小鼠的免疫保护作用

将水貂出血性肺炎三价灭活菌用不同免疫剂量 (0.05 mL、0.1 mL、0.15 mL、0.2 mL) 免疫小鼠 21 d 后，用含有 10 LD_{50} 菌体含量的 SD004、SD050、SD052 菌株分别攻毒，0.15 mL、0.2 mL 可以使免疫组均达到 100% 保护；0.1 mL 可使 SD050、SD052 均达到 100% 保护，SD004 达到 80% 保护；0.05 mL 可使 SD004、SD052 达到 40% 保护，SD050 达到 60% 保护。根据实验结果，水貂出血性肺炎 G、B、D 型三价灭活菌对小鼠最小免疫剂量为 0.15 mL，即 1.125×10^{11} CFU，每血清型组分分别是 3.75×10^{10} CFU。如表 3-10 所示。

图 3-11F 是健康未免疫小鼠用铜绿假单胞菌攻毒后的 HE 染色 $400\times$ 的石蜡切片图，呈现间质性肺炎特征：肺泡隔血管充血，细胞增生，肺泡上皮细胞增生，有的肺泡边缘见少量巨噬细胞。图 3-11A、图 3-11B、图 3-11C、图 3-11D 是免疫不同剂量疫苗 21 d 后攻毒铜绿假单胞菌的 HE 染色 $400\times$ 石蜡切片图，图 3-11E 是健康小鼠肺组织切片，图 3-11A 到图 3-11D，肺泡隔周界不清，融合成片的现象减少；中性粒细胞浸润和破碎情况大大减少；单核细胞和巨噬细胞聚集也减少。可见疫苗免疫效果在病理学观察上得到了证实。

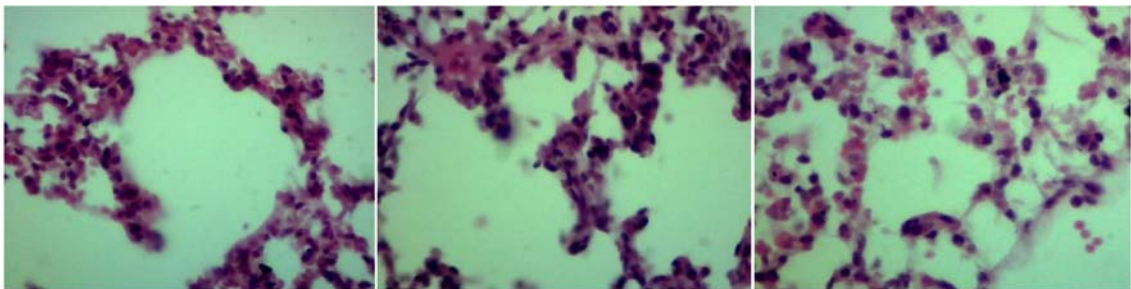


图 3-11A 免疫 50 μL 组肺 ($400\times$) 图 3-11B 免疫 100 μL 组肺 ($400\times$) 图 3-11C 免疫 150 μL 组肺 ($400\times$)

Figure 3-11A Lung cells of
immunized 50 μL dose ($400\times$)

Figure 3-11B Lung cells of
immunized 100 μL dose ($400\times$)

Figure 3-11C Lung cells of
immunized 150 μL dose ($400\times$)

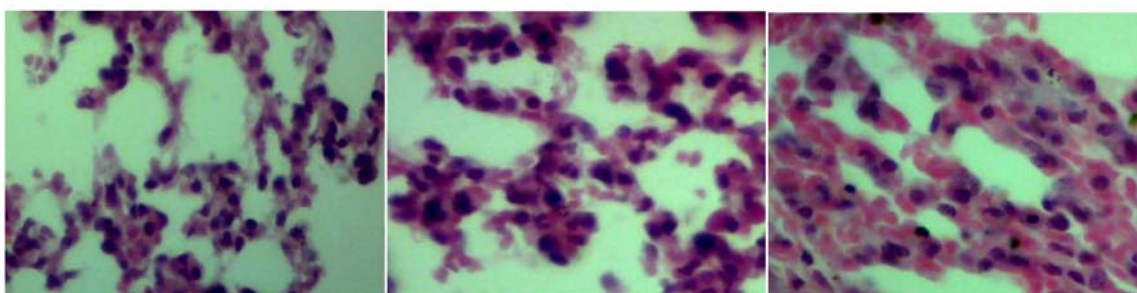


图 3-11D 免疫 200 μ L 组肺 (400 \times)

图 3-11E 健康鼠肺 (400 \times)

图 3-11F 攻毒组鼠肺 (400 \times)

Figure 3-11D Lung cells of immuned 200 μ L dose (400 \times)

Figure 3-11E Healthy lung cells (400 \times)

Figure 3-11F Lung cells of strains attacked (400 \times)

表 3-10 三价灭活菌对小鼠 MID 测定结果

Table 3-10 MID of inactivated strains in mice

组别	免疫剂量	攻毒剂量	攻毒菌株	存活数/总数	保护率 (%)
1	0.05mL	10 LD ₅₀	SD004	2/5	40%
2	0.1mL	10 LD ₅₀	SD004	4/5	80%
3	0.15mL	10 LD ₅₀	SD004	5/5	100%
4	0.2mL	10 LD ₅₀	SD004	5/5	100%
5	0.05mL	10 LD ₅₀	SD050	3/5	60%
6	0.1mL	10 LD ₅₀	SD050	5/5	100%
7	0.15mL	10 LD ₅₀	SD050	5/5	100%
8	0.2mL	10 LD ₅₀	SD050	5/5	100%
9	0.05mL	10 LD ₅₀	SD052	2/5	40%
10	0.1mL	10 LD ₅₀	SD052	5/5	100%
11	0.15mL	10 LD ₅₀	SD052	5/5	100%
12	0.2mL	10 LD ₅₀	SD052	5/5	100%
13		10 LD ₅₀	SD004	0/5	0%
14		10 LD ₅₀	SD050	0/5	0%
15		10 LD ₅₀	SD052	0/5	0%

3.5.2.2 间接 ELISA 反应条件优化

通过方阵滴定进行 ELISA 试验, 比较阳性、阴性血清的 OD_{450nm} 值和 P/N 值确定全菌包被抗原最佳稀释度为 1:10 倍稀释、血清最佳稀释度为 1:400 倍稀释和酶标二抗稀释度为 1:4000 倍稀释。

应用 SD004 全菌为包被抗原建立的 ELISA 方法, 检测了 8 份阴性血清, 其平均 OD_{450nm} 值为 0.0865, 标准方差 (s) 为 0.01627, 临界值为 $\bar{X}+3s=0.1353$, 因此确定血清样品的 P/N ≥ 2 , 且 OD 值 ≥ 0.1353 即可判定为阳性, 反之则为阴性。

应用 SD050 全菌为包被抗原建立的 ELISA 方法, 检测了 8 份阴性血清, 其平均 OD_{450nm} 值为 0.093, 标准方差 (s) 为 0.01744, 临界值为 $\bar{X}+3s=0.1453$, 因此确定血清样

品的 $P/N \geq 2$ ，且 OD 值 ≥ 0.1453 即可判定为阳性，反之则为阴性。

应用 SD052 全菌为包被抗原建立的 ELISA 方法，检测了 8 份阴性血清，其平均 OD_{450nm} 值为 0.09325，标准方差 (s) 为 0.02058，临界值为 $\bar{X} + 3s = 0.155$ ，因此确定血清样品的 $P/N \geq 2$ ，且 OD 值 ≥ 0.155 即可判定为阳性，反之则为阴性。

3.5.3 三价灭活菌对小鼠免疫保护

3.5.3.1 小鼠血清抗体测定

水貂出血性肺炎三价灭活菌 0.15 mL/只免疫小鼠后，在第 3、7、10、14、21、28、35、42、49 d 尾静脉采血，分别运用 ELISA 方法检测小鼠血清中对 SD004、SD050、SD052 抗体水平。结果显示无论是免疫一次还是两次免疫，小鼠血清抗体水平均在 28 d 达到峰值，在 42 d 开始下降，如图 3-12A、图 3-12B、图 3-12C 所示。

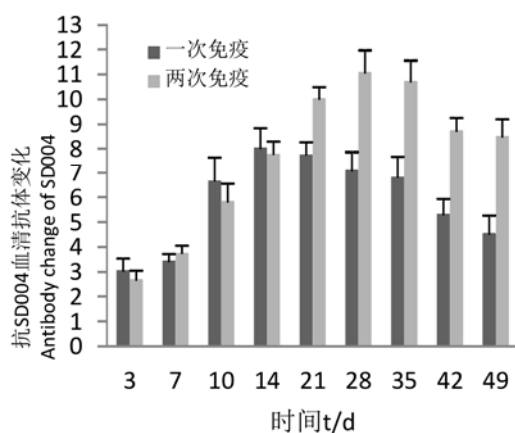


图 3-12A 免疫鼠对 SD004 血清抗体水平

Figure 3-12A Antibody change of SD004

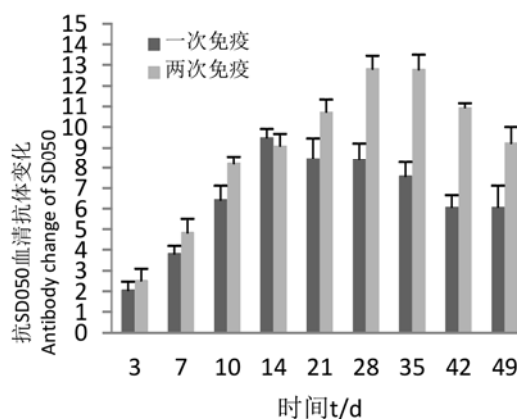


图 3-12B 免疫鼠后 SD050 血清抗体水平

Figure 3-12B Antibody change of SD050

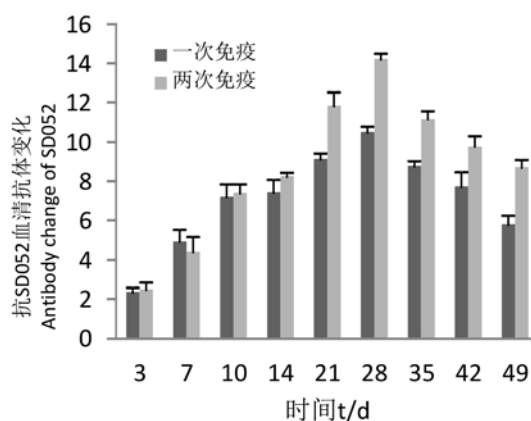


图 3-12C 免疫鼠对 SD052 血清抗体水平

Figure 3-12C Antibody change of SD052

3.5.3.2 小鼠免疫体重变化

测定小鼠免疫水貂出血性肺炎三价灭活菌后 14 d 内的体重变化,发现小鼠免疫后体重变化稳定上升,无明显不良反应,免疫一次组、免疫两次组和正常组无明显差别,如图 3-13 所示。

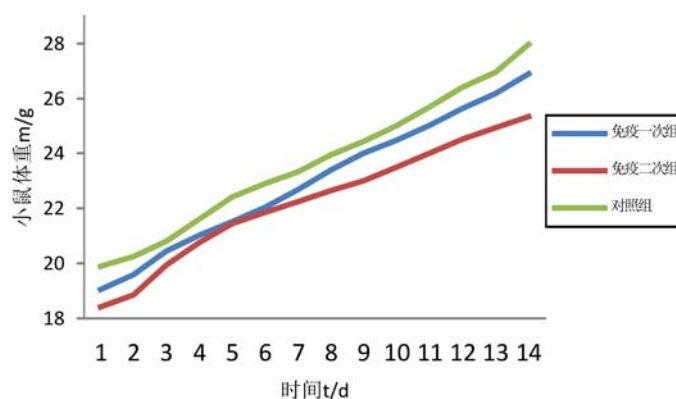


图 3-13 灭活疫苗免疫小鼠后体重变化

Figure 3-13 Weight of mouse on 14 days

3.5.3.3 攻毒保护实验

三价灭活菌免疫小鼠 21 d 后分别用对应的 10 LD₅₀ SD004、SD050、SD052 菌株攻毒,均可保证保护率在 100%。结果表明水貂出血性肺炎 G、B、D 三价灭活菌对小鼠提供对 SD004、SD050、SD052 的免疫效果,如表 3-12 所示。

表 3-12 三价灭活菌对小鼠免疫攻毒保护结果

Table 3-12 Relative percentage survival of mice immunized by inactivated strains

组别	免疫剂量	注射疫苗	攻毒菌株	攻毒菌液浓度	鼠存活数/总数	存活率%
1	0.15 mL	三价灭活菌	SD004 (G)	10 LD ₅₀	5/5	100
2	0.15 mL	生理盐水	SD004 (G)	10 LD ₅₀	0/5	0
3	0.15 mL	三价灭活菌	SD050 (D)	10 LD ₅₀	5/5	100
4	0.15 mL	生理盐水	SD050 (D)	10 LD ₅₀	0/5	0
5	0.15 mL	三价灭活菌	SD052 (B)	10 LD ₅₀	5/5	100
6	0.15 mL	生理盐水	SD052 (B)	10 LD ₅₀	0/5	0

3.5.3.4 攻毒保护试验病理组织学观察

图 3-14A、图 3-14D、图 3-14G 为健康小鼠攻毒铜绿假单胞菌后的肝、肾、肺组织切片图,可见肝细胞索排列混乱,肝细胞肿胀,细胞界限不明,胞浆淡染;肾小管上皮细胞高度肿胀,部分细胞发生崩解、坏死,肾细胞水肿;肺脏炎性细胞浸润,毛细血管淤血。图 3-13B、图 3-13E、图 3-13H 为健康小鼠的肝、肾、肺组织切片图,可见细胞形态完整,排列整齐,细胞核清晰。图 3-13C、图 3-13F、图 3-13I 为免疫组攻毒后的肝、

肾、肺组织切片图，可见肝细胞虽有一定的胞浆淡染，但细胞界限完整，细胞不肿胀；肾细胞同样未出现崩解和坏死，不水肿；肺脏细胞未出现明显的炎性细胞浸润，肺泡壁毛细血管不淤血。

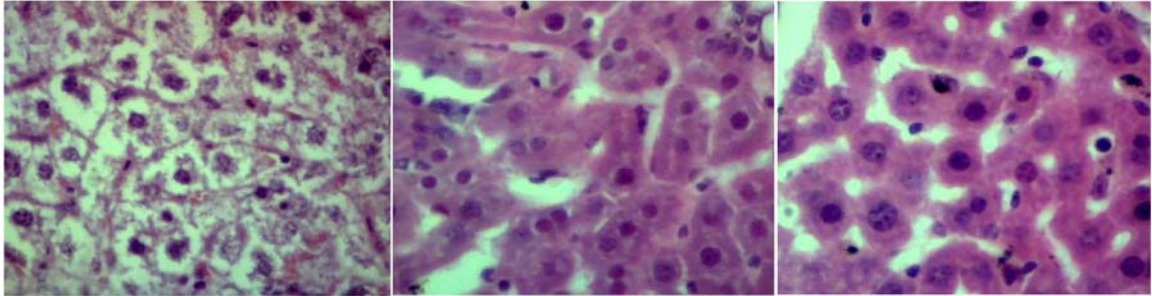


图 3-14A 攻毒组鼠肝细胞 (400×) 图 3-14B 健康鼠肝细胞 (400×) 图 3-14C 免疫组鼠肝细胞 (400×)
Figure 3-14A The mouse hepatic cells of strains attacked Figure 3-14B The healthy mouse hepatic cells Figure 3-14C The mouse hepatic cells of immuned

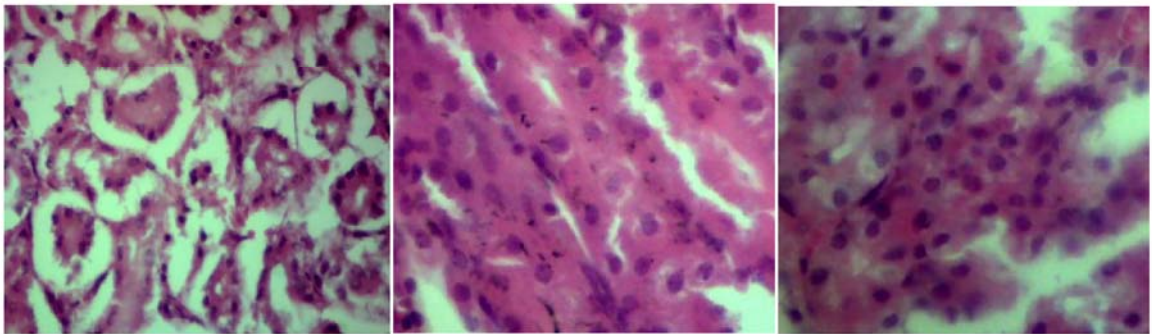


图 3-14D 攻毒组肾细胞 (400×) 图 3-14E 健康鼠肾细胞 (400×) 图 3-14F 免疫组鼠肾细胞 (400×)
Figure 3-14D The mouse renal cells of strains attacked Figure 3-14E The healthy mouse renal cells Figure 3-14F The mouse renal cells of immuned

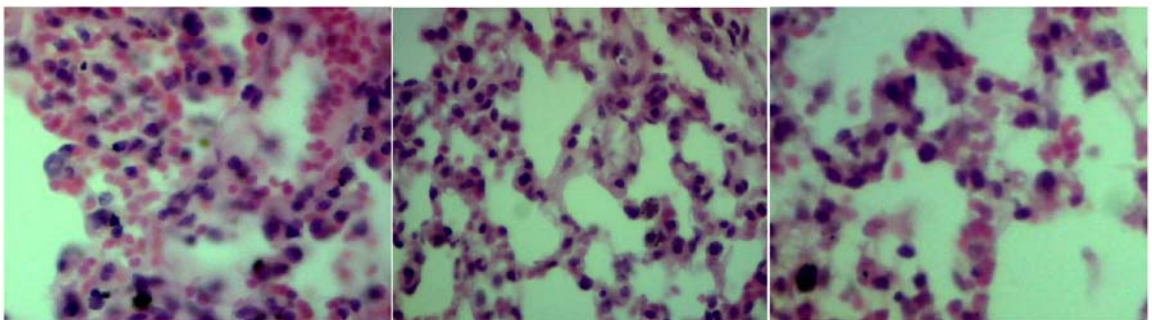


图 3-14G 攻毒组鼠肺细胞 (400×) 图 3-14H 健康鼠肺细胞 (400×) 图 3-14I 免疫组鼠肺细胞 (400×)
Figure 3-14G The mouse lung cells of strains attacked Figure 3-14H The healthy mouse lung cells Figure 3-14I The mouse lung cells of immuned

4 讨论

4.1 细菌的分离鉴定

本研究中的病料样本是在 2013 年和 2014 年水貂出血性肺炎高发期,从山东省诸城、胶南、文登等 18 个县市的水貂养殖场送检的疑似水貂出血性肺炎的肺脏样本中采集的,具有一定的区域代表性。通过细菌分离培养、染色镜检、生化试验和分子生物学鉴定,获得了 53 株铜绿假单胞菌,分离率达 44.2% (53/120)。该研究结果进一步证明在山东省引起水貂出血性肺炎的主要病原菌是铜绿假单胞菌,与文献报道一致^[146-149]。

近年来多名学者报道了关于貂源铜绿假单胞菌血清型的研究。杨海燕等从山东青岛、诸城等地分离到铜绿假单胞菌 15 株,主要血清型为 G、B、E 型^[143];韩明明等从山东 7 个规模养殖场分离到貂源铜绿假单胞菌 24 株,主要血清型是 G、C 型^[8];闫新武等从山东潍坊、烟台等地分离到貂源铜绿假单胞菌 22 株,主要血清型为 G、B 型^[150]。从以上研究结果可以看出 G 型和 B 型是山东多个地区流行的主要血清型,而其他血清型有地区差异。本研究共分离获得了 53 株铜绿假单胞菌,其中 27 株为血清 G 型,5 株为血清 B 型,4 株为血清 D 型,其他 8 种血清型菌株很少。可以看出 G 型和 B 型仍是山东省多个地区流行的铜绿假单胞菌主要流行血清型,但此次分离鉴定的 D 型分离株也较多。其他血清型都存在地区流行差异,例如 M 型主要在诸城、黄岛流行,H 型主要在文登、胶南流行。不仅如此,2013 年和 2014 年分离菌的血清型也有不同,2013 年除分离 G 型外还有 F、J、H 型,而 2014 除 G 型外则是 B、D、M、K 型,说明铜绿假单胞菌血清型分布随地区不同和时间不同都有差异,这给该病的防治和疫苗研究带来了困难。正因为如此,本研究开展山东省貂源铜绿假单胞菌的分离鉴定和血清型分布分析,对了解该地区貂源铜绿假单胞菌流行的优势血清型具有重要参考价值,也为多价灭活疫苗候选菌株的筛选提供了科学实验依据,对该病的防治具有重要意义。

4.2 三价灭活菌候选菌株的选择

铜绿假单胞菌广泛存在于自然界中,随着貂的养殖量增加,近年来由该菌引起的水貂出血性肺炎在养殖量较大的山东、辽宁、吉林、黑龙江地区貂场不断流行,给养殖业造成了严重的经济损失^[151, 152]。多年来临床上以药物治疗为主。由于抗生素的大量使用和不合理用药,使耐药性菌株不断出现,临床药物治疗已达不到预期效果。治疗上的困难凸显了预防的重要性。疫苗免疫是现阶段最有效的控制感染的办法。由于铜绿假单胞菌血清型较多,各地流行的优势血清型存在地区差异,单价疫苗的在不同地区的预防效果有很大差异,因此,多价疫苗是目前研究和使用的主要疫苗。在多价灭活菌苗的研究过程中,如何选择疫苗菌株成为研究者重点关注的问题。

通常的研究中多以分离到的铜绿假单胞菌主要血清型菌株作为疫苗候选菌株,这样的选择可以使疫苗抗原的针对性。本研究也将优势血清型作为三价灭活菌候选菌株的选择原则之一。

全菌灭活疫苗的抗原成分较多,如共同保护性抗原、弹性蛋白、蛋白酶和类毒素等^[121, 125, 129, 130],有些是多种血清型菌株共有的抗原,全菌免疫动物后产生的血清抗体为多克隆抗体,这些抗体在该病的预防过程中都将发挥一定的作用,可能使疫苗对其他血清型引起的发病也有预防作用。因此,本研究从所获得的 53 株分离菌中选取了包括 11 种血清型的 15 株菌分别免疫家兔,用家兔的免疫血清进行了交叉凝集试验,检测了各种血清对 15 株菌的凝集谱,将血清凝集谱广作为三价灭活菌候选菌株的选择原则之二。同时,本研究对本次分离的优势血清型菌株的致病性进行了测定,将致病性强作为候选菌株的原则之三。

根据以上选择三价灭活菌候选菌株的三个原则,综合分离菌株血清型、交叉凝集试验和致病性情况,最终确定分离菌株 SD004 (G 型)、SD050 (D 型)、SD052 (B 型)作为三价灭活菌的候选菌株。

4.3 候选菌株致病性和传代稳定性

LD₅₀的测定是评价病原致病性的常规方法,也用于铜绿假单胞菌的致病性测定。韩明明等从山东省多个养貂场分离到的貂源铜绿假单胞菌对小鼠的 LD₅₀为 2.1×10⁶CFU~5×10⁶CFU;陈晨等从山东诸城、文登和临沂等地分离的貂源铜绿假单胞菌对小鼠的 LD₅₀为 1.6×10⁶CFU^[153];Shimizu T 分离的貂源铜绿假单胞菌对小鼠的 LD₅₀为 10¹⁰^[154]。从中可以看出不同地区的分离株对小鼠的致病性有所不同。本研究确定的三价菌苗候选菌株对小鼠的 LD₅₀分别是在 2.5×10¹⁰CFU (SD004)、7.5×10¹⁰CFU (SD050)和 5.6×10¹⁰CFU (SD052),与韩明明和陈晨分离的菌株比较致病性较弱,与 Shimizu T 分离的菌株相近。出现这种情况的原因可能有以下几个方面:①铜绿假单胞菌广泛存在于自然界中,是一种条件致病菌,其致病性存在菌株间差异,不同菌株的致病性不同;②LD₅₀的测定与小鼠的清洁级别、日龄、体重、健康状况、饲养管理等多种因素相关,受试菌对 SPF 小鼠和普通清洁级小鼠的致病性可能就有差异;③不同接种途径的 LD₅₀也有不同。本研究是在同一情况下进行的 LD₅₀的测定,旨在区别分离菌株对小鼠的相对致病性,因此没有使用 SPF 小鼠。

所选的 3 株候选菌株传代后虽然菌液浓度有所变化,但都在同一个数量级内,相对稳定,不会影响菌苗抗原的生产。20 代内 3 株传代菌的致病性也是在同一数量级内波动,没有明显变化。该研究结果证明所选的 3 株候选菌株在 20 代内其生长性能、致病性相对稳定,可以用于后续的疫苗研究。

4.4 三价灭活菌对小鼠免疫效力评估

灭活疫苗作为最常用的疫苗在疾病防治过程中有着不可估量的作用,因此疫苗的安全性、免疫效力评价等对疫苗的和实际应用有着重要的意义,是衡量灭活疫苗能否应用在生产实际上的重要标准。疫苗的安全性是前提,疫苗无菌检验需为阴性,谨防菌苗被其他细菌或霉菌等污染;超剂量安全试验确保实验动物在免疫过程中不会因疫苗本身而受到伤害,并且采食、精神状态以及接种部位的吸收情况都要良好无明显变化。

由于实验过程中本体动物水貂的成本较高、且在研究过程中难以驯养，因此选用小白鼠做为疫苗评价的实验动物。本研究对制备出的水貂出血性肺炎三价灭活菌进行了免疫效果评估：通过对小鼠免疫不同剂量的三价灭活菌，21 d 后攻毒 10LD₅₀ 候选菌株，结果表明小鼠最小免疫剂量（MID）为 0.15 mL，菌体含量为 1.125×10¹¹CFU 时可对小鼠 100%免疫保护。同时对疫苗免疫过程中通过对不同免疫剂量小鼠的剖检，病理组织学观察到疫苗随着剂量的增强可以有效减少小鼠肺脏的病理变化，进一步证实了三价灭活菌的免疫保护性。对小鼠用间接 ELISA 方法测定其血清抗体消长变化，水貂出血性肺炎三价灭活菌免疫小鼠后在 28 d 血清抗体达到峰值，42 d 开始下降，49 d 时小鼠体内仍能检测到血清抗体；在第 21 d 时对免疫一次三价灭活菌的小鼠攻毒 10LD₅₀ 候选菌株，三价灭活菌可以对小鼠提供 100%免疫保护，病理组织学观察小鼠的肺、肝、肾在免疫后细胞没有明显的病理学变化，和健康小鼠的肺、肝、肾没有明显差别。在测定小鼠的血清抗体消长变化时，发现对小鼠免疫两次血清中的抗体滴度比免疫一次的抗体滴度要高，保护效果更好，并且小鼠并无任何不良反应，采食、精神状态等也均正常。免疫一次三价灭活菌已足以对小鼠提供保护，两次免疫的效果不仅更好，还可以防止因不当操作或其他原因造成的免疫失败。因此，在免疫保护的前提下，对实验动物进行多次免疫可以更好地预防疾病的暴发和流行。

由于研究过程中时间和成本的限制，未能完成疫苗对本体动物水貂的免疫效果的评估及疫苗免疫期和保存周期的研究，希望本研究可以给后续对水貂出血性肺炎的研究人员提供技术支持和理论指导，完成对水貂出血性肺炎灭活疫苗的研究和制备。

5 结论

(1) 本研究通过细菌分离鉴定,从山东省水貂肺脏病料样品中分离获得铜绿假单胞菌 53 株,分属 11 个血清型。进一步明确了 2013~2014 年山东诸城、胶南、文登等 18 个县市的水貂出血性肺炎的主要致病菌为铜绿假单胞菌,主要流行的优势血清型为 G、B 和 D 型。

(2) 综合分离菌优势血清型、血清交叉凝集性和致病性情况,确定分离菌 SD004 (G 型)、SD050 (D 型)、SD052 (B 型) 为三价灭活菌候选菌株,其 20 代内的传代菌生长特性、致病性均无明显差异,可以作为候选菌株进行后续疫苗研究。

(3) 通过免疫效力评价,本研究制备的三价灭活菌免疫小鼠后可诱导小鼠产生良好的体液免疫应答,免疫后 28 天血清抗体达到峰值,可抵抗 10LD₅₀ 疫苗菌株的攻击,对免疫鼠具有良好的免疫保护作用,为水貂出血性肺炎灭活疫苗提供了免疫原性良好的候选菌株。

致 谢

首先感谢我的导师师东方教授，本研究成果是在导师的指导和帮助下完成的。在此向我的导师师东方教授表达我最诚挚的感谢和最崇高的敬意。感谢老师这三年来对我的培养和关怀，给我留下了一段难忘的青春岁月和美好回忆。

感谢东北农业大学动物医学学院的所有老师，特别是传染病教研室的魏萍教授、朱妍副教授、董秀梅老师、张萍老师对我的无私帮助与关怀。

感谢东北农业大学动物医学学院的刘文鑫、关玮琨、李金萍、孟相秋、韩林林、杜元策、唐杰、袁超文、周兴东、李星月、陶婧、李婷婷、祖少坡、张恩瑜、苏瑞红、唐毓、侯美佳等同学，感谢他们营造了一个热情、温馨和积极向上的实验室氛围。

感谢一直默默支持我的家人和朋友，是他们给予我理解和包容让我更加成熟。

最后，我会在今后的学习、工作和生活中用优异的成绩回报帮助和支持过我的老师、同学、家人和朋友。

参考文献

- [1] 牛钟相, 李雅林. 动物绿脓杆菌病研究进展[J]. 动物医学进展, 2003, (01): 16-18.
- [2] 于守平, 许淑杰. 貂出血性肺炎的实验室诊断[J]. 经济动物学报, 2005, (02): 66-67+70.
- [3] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 第3版. 北京, 2007: 155-156.
- [4] Liu PV, Wang S. Three new major somatic antigens of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(5): 922-925.
- [5] Meitert E, Meitert T, Sima F, et al. New *Pseudomonas aeruginosa* serotypes following the individualization of new antigenic "O" structures[J]. Arch Roum Pathol Exp Microbiol, 1978, 37(3-4): 161-178.
- [6] 王世鹏, 彭如惠, 谢茂超, 等. 关于三株新血清型菌株补充绿脓杆菌国际抗原分型系统(IATS)的建议[J]. 生物制品学杂志, 1989, (01): 21-27.
- [7] 王世鹏, 谢茂超, 彭如惠. 绿脓杆菌国际抗原分型系统(IATS)-20型血清的试制及应用[J]. 中国生物制品学杂志, 1991, (01): 13-16.
- [8] 韩明明. 绿脓杆菌比色 LAMP 检测法的建立及水貂出血性肺炎绿脓杆菌三价灭活疫苗的研制. (10), 2014.
- [9] Homma JY. Designation of the thirteen O-group antigens of *Pseudomonas aeruginosa*: an amendment for the tentative proposal in 1976[J]. Jpn J Exp Med, 1982, 52(6): 317-320.
- [10] Osman KM, Alabady MS, Ata NS, et al. Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from human and animal sources in Egypt[J]. Zoonoses Public Health, 2010, 57(5): 329-338.
- [11] Wolska K, Kot B, Jakubczak A, et al. BOX-PCR is an adequate tool for typing of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates[J]. Folia Histochem Cytobiol, 2011, 49(4): 734-738.
- [12] 邢进, 岳秉飞, 贺争鸣. 绿脓杆菌分子分型方法研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2012, (08): 62-67.
- [13] Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis[J]. Cell, 1984, 37(1): 67-75.
- [14] Salomonsen CM, Themudo GE, Jelsbak L, et al. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hemorrhagic pneumonia in mink (*Neovison vison*)[J]. Vet Microbiol, 2013, 163(1-2): 103-109.
- [15] Wu F, Della-Latta P. Molecular typing strategies[J]. Semin Perinatol, 2002, 26(5): 357-366.
- [16] Salimi H OP, Yakhchali B. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* in Burn Patients Using PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism and Random Amplified Polymorphic DNA Analysis[J]. 2010, 35(3): 236-241.
- [17] Fanci R, Bartolozzi B, Sergi S, et al. Molecular epidemiological investigation of an outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infection in an SCT unit[J]. Bone Marrow

- Transplant, 2009, 43(4): 335-338.
- [18] Singh A, Goering RV, Simjee S, et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(3): 512-530.
- [19] van Mansfeld R, Jongerden I, Bootsma M, et al. The population genetics of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from different patient populations exhibits high-level host specificity[J]. PLoS One, 2010, 5(10): 13482.
- [20] Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [21] Hafiane A, Ravaoarino M. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients by different typing methods[J]. Pathol Biol (Paris), 2011, 59(5): 109-114.
- [22] Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19(24): 6823-6831.
- [23] Hulton CS, Higgins CF, Sharp PM. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria[J]. Mol Microbiol, 1991, 5(4): 825-834.
- [24] Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(6): 1661-1669.
- [25] 李浩, 顾雁, 邢同海, 等. 肝移植受者中多重耐药革兰阴性菌的检测和同源性分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, (06): 457-462.
- [26] 孙珍, 向军, 宋菲, 等. 烧伤病房铜绿假单胞菌的流行性分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, (18): 3774-3776.
- [27] Kidd TJ, Grimwood K, Ramsay KA, et al. Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(1): 263-268.
- [28] 郭宝福, 于丽萍. 绿脓菌素分型的研究[J]. 微生物学通报, 1986, (05): 218-220.
- [29] 郭宝福, 郭鑫. 217株绿脓杆菌的绿脓菌素分型与药敏[J]. 抗生素, 1988, (01): 41-43.
- [30] 李文建, 贾成良, 府伟灵. 绿脓菌素(PyocIn)纸片分型方法的建立及应用[J]. 陕西医学检验, 1993, (01): 7-9.
- [31] 白雪, 柴秀丽, 闫喜军. 水貂出血性肺炎流行病学调查及绿脓杆菌疫苗研究进展[J]. 现代农业科技, 2011, (15): 317-318.
- [32] 王世鹏, 孙夷中. 绿脓杆菌噬菌体分型及其与血清学分群关系[J]. 中国公共卫生, 1987, (06): 365-367.
- [33] 韩青松, 简永利, 涂宜强, 等. 绿脓杆菌研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2012, (01): 122-124.
- [34] Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, et al. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171(11):

- 1209-1223.
- [35] Roy-Burman A, Savel RH, Racine S, et al. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. *J Infect Dis*, 2001, 183(12): 1767-1774.
- [36] 梁海华, 孔伟娜, 沈托, 等. 铜绿假单胞菌中 *pmpR* 基因对 III 型分泌系统的调节[J]. *科学通报*, 2012, (06): 424-430.
- [37] 魏金花. 铜绿假单胞菌 PA2800 在耐药性和致病性中的作用研究. (09) , 2010.
- [38] 宋琳. 铜绿假单胞菌肺部炎症及其肺损伤的发病机制[J]. *国外医学. 呼吸系统分册*, 2005, (07): 500-502.
- [39] 孔伟娜. 铜绿假单胞菌中 III 型分泌系统受 Rh1 和 PQS 群体感应系统调节. (09) , 2009.
- [40] Engel J, Balachandran P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2009, 12(1): 61-66.
- [41] Schulert GS, Feltman H, Rabin SD, et al. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia[J]. *J Infect Dis*, 2003, 188(11): 1695-1706.
- [42] Shaver CM, Hauser AR. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(12): 6969-6977.
- [43] Le BR, Nguyen S, Nowak E, et al. Relative contribution of three main virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia[J]. *Crit Care Med*, 2011, 39(9): 2113-2120.
- [44] Döring G, Goldstein W, Röhl A, et al. Role of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzymes in lung infections of patients with cystic fibrosis[J]. *Infect Immun*, 1985, 49(3): 557-562.
- [45] Azghani AO, Connelly JC, Peterson BT, et al. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* elastase on alveolar epithelial permeability in guinea pigs[J]. *Infect Immun*, 1990, 58(2): 433-438.
- [46] Mariencheck WI, Alcorn JF, Palmer SM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 28(4): 528-537.
- [47] Lau GW, Hassett DJ, Ran H, et al. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection[J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10(12): 599-606.
- [48] Bleves S, Viarre V, Salacha R, et al. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons[J]. *Int J Med Microbiol*, 2010, 300(8): 534-543.
- [49] Davey ME, Caiazza NC, O'Toole GA. Rhamnolipid surfactant production affects biofilm architecture in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *J Bacteriol*, 2003, 185(3): 1027-1036.
- [50] 郭宝福. 绿脓菌素的研究[J]. *微生物学杂志*, 1987, (04): 63-66+60.
- [51] 王多宁. 绿脓菌素的抗菌作用及其与临床感染的关系[J]. *中国抗生素杂志*, 1992, (03): 240-241.
- [52] 夏海华, 于冲, 曲晓军, 等. 绿脓杆菌外毒素 A 的最新研究进展[J]. *生物技术*, 2012, (02): 81-85.
- [53] 郝继龙, 王菲, 周鸿雁, 等. 绿脓杆菌外毒素 A 对兔角膜基质细胞的毒性作用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2007, (03): 488-490+398.

- [54] 杜世. 绿脓杆菌外毒素 A 的结构、功能及其重组毒素[J]. 生物化学与生物物理进展, 1995, (02): 112-117.
- [55] 刘晓明, 刘子. 绿脓杆菌外毒素 A 的纯化[J]. 中国兽医学报, 1996, (05): 47-51.
- [56] 郭学军, 朱平, 孟锐奇, 等. 绿脓杆菌外毒素 A 受体结合亚单位基因的克隆与表达[J]. 中国兽医学报, 1997, (03): 19-22.
- [57] 刘绮明, 冯木林, 陶爱林. 绿脓杆菌外毒素 A 常用肽编码基因的克隆与鉴定[J]. 广东医学, 2008, (08): 1270-1272.
- [58] 史新昌, 韩春梅, 李响, 等. 绿脓杆菌外毒素 A 功能片段重组蛋白 GP38 质控方法和质量标准的建立[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, (04): 399-402.
- [59] 王幸兴. 绿脓杆菌外毒素 A 基因的密码子优化、脱毒改造及其特性研究. (07), 2011.
- [60] 冯越, 张国利, 赵福广, 等. 绿脓杆菌外毒素 A 受体结合亚基-结核分枝杆菌热休克蛋白 65 融合蛋白的表达及纯化[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, (10): 1395-1399.
- [61] 刘红彬, 顾小龙. 绿脓杆菌 ATCC9027 外毒素 PE40 基因克隆与系统发育分析[J]. 中国老年学杂志, 2013, (19): 4769-4771.
- [62] 扈进冬, 魏艳丽, 杨合同, 等. 重组免疫毒素 GnRH-PTD-PE39KDEL 的构建及表达[J]. 山东科学, 2013, (03): 5-10+14.
- [63] 于新海. 融合蛋白 GTH 的原核表达载体构建及制备, 2015.
- [64] 吴建勇. 金黄色葡萄球菌表面多糖偶联抗原的制备及其免疫原性分析. (05), 2011.
- [65] 潘健. 85 例铜绿假单胞菌耐药性分析[J]. 安徽预防医学杂志, 1999, (03): 111-112.
- [66] 谢才文. 铜绿假单胞菌多药耐药性分子流行病学研究. (05), 2010.
- [67] Yoneyama H, Nakae T. Mechanism of efficient elimination of protein D2 in outer membrane of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37(11): 2385-2390.
- [68] Benz R, Hancock RE. Properties of the large ion-permeable pores formed from protein F of *Pseudomonas aeruginosa* in lipid bilayer membranes[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1981, 646(2): 298-308.
- [69] Ochs MM, McCusker MP, Bains M, et al. Negative regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD selective for imipenem and basic amino acids[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(5): 1085-1090.
- [70] 刘德华. 铜绿假单胞菌耐药性及其变迁研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, (19): 4852-4854.
- [71] 姚慧琳. 铜绿假单胞菌 MexAB-OprM、MexXY-OprM 主动外排系统的耐药作用[J]. 中国感染与化疗杂志, 2012, (01): 32-35.
- [72] 魏志华, 沈继录, 徐元宏. 多药耐药铜绿假单胞菌 MexAB-OprM 主动外排系统的耐药作用[J]. 中华医院感染学杂志, 2010, (09): 1205-1207.
- [73] Jo JT, Brinkman FS, Hancock RE. Aminoglycoside efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of novel outer membrane proteins[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(3): 1101-1111.

- [74] Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, et al. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(12): 3322-3327.
- [75] Giske CG, Borén C, Wretling B, et al. Meropenem susceptibility breakpoint for *Pseudomonas aeruginosa* strains hyperproducing mexB mRNA[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2005, 11(8): 662-669.
- [76] 刘永芳, 吕晓菊, 宗志勇, 等. 铜绿假单胞菌对碳青霉烯类抗生素的耐药表型与外排泵表达水平的关系, 2006.
- [77] Green SL, Maddox JC, Huttenbach ED. Linezolid and reversible myelosuppression[J]. *JAMA*, 2001, 285(10): 1291.
- [78] 徐建国. 分子医学细菌学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 173-178.
- [79] 蒋晓飞, 孙景勇, 倪语星. 多重耐药铜绿假单胞菌超广谱 β -内酰胺酶分析[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2002, (04): 101-104.
- [80] 施凯舜, 潘发愤. 铜绿假单胞菌耐药研究进展[J]. *浙江医学*, 2008, (02): 199-202.
- [81] 王显峰. 一起水貂绿脓杆菌病的诊断与防制[J]. *养殖技术顾问*, 2009, (10): 143.
- [82] 任桥, 李丽, 邹本革, 等. 水貂出血性肺炎的诊治[J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2012, (02): 177.
- [83] 岳志刚, 宁浩然, 刘学庆, 等. 水貂出血性肺炎的诊治[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2012, (05): 83.
- [84] 刘晓飞, 母连志, 范永鑫, 等. 一起水貂出血性肺炎的诊断与治疗[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2013, (24): 112-113.
- [85] 邹玲, 刘文华, 温建新, 等. 水貂出血性肺炎的微生物学检查, 2008.
- [86] 胡本钢, 杜崇涛, 雷连成, 等. 貂源肺炎克雷伯菌的分离与鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, (08): 598-600.
- [87] 杨艳玲, 陈峙峰, 王成福, 等. 水貂肺炎克雷伯氏菌的分离鉴定[J]. *特产研究*, 2012, (04): 10-12.
- [88] 孙虎芝, 张灿, 邹玲, 等. 水貂肺炎克雷伯菌感染的诊断与药敏试验[J]. *动物医学进展*, 2015, (09): 128-130.
- [89] 刘自建, 曲文燕, 李永芳. 水貂链球菌肺炎的诊治[J]. *山东畜牧兽医*, 2013, (12): 90.
- [90] 刘吉山, 沈志强, 林初文, 等. 水貂肺炎链球菌病的诊断与防治措施[J]. *经济动物学报*, 2009, (03): 178-182.
- [91] Hammer AS, Pedersen K, Andersen TH, et al. Comparison of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from mink by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis[J]. *Vet Microbiol*, 2003, 94(3): 237-243.
- [92] 潘镰生, 孟令新, 郑丽敏. 水貂假单胞菌脂多糖菌苗研制初报[J]. *毛皮动物饲养*, 1984, (01): 1-4.
- [93] 崔红英, 吴秀友. 水貂出血性肺炎的诊治[J]. *中国兽医杂志*, 2002, (07): 54.

- [94] 魏玉荣, 沈国顺, 常爽, 等. 水貂铜绿假单胞杆菌的诊治[J]. 现代畜牧兽医, 2005, (12): 39.
- [95] 王学慧, 张立富. 绿脓杆菌引发水貂出血性肺炎的诊治[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006, (08): 77-78.
- [96] 白雪, 柴秀丽, 闫喜军, 等. 水貂绿脓杆菌分离株的生物学特性和血清型分析[J]. 畜牧与兽医, 2011, (07): 31-35.
- [97] 阎新华. 水貂出血性肺炎[J]. 中国兽医杂志, 1988, (04): 22-23.
- [98] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 第5版: 中国农业出版社, 2006.
- [99] Salomonsen CM, Boye M, Høiby N, et al. Comparison of histological lesions in mink with acute hemorrhagic pneumonia associated with *Pseudomonas aeruginosa* or *Escherichia coli*[J]. *Can J Vet Res*, 2013, 77(3): 199-204.
- [100] 王勇. 雏鸡绿脓杆菌病病原的分离与鉴定[J]. 现代农业科技, 2011, (15): 319+321.
- [101] 王敏, 韩天龙, 王丽萍, 等. 雏鸡绿脓杆菌病的诊断及综合防治[J]. 家畜生态学报, 2013, (07): 70-72.
- [102] Song KP, Chan TK, Ji ZL, et al. Rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* from ocular isolates by PCR using exotoxin A-specific primers[J]. *Mol Cell Probes*, 2000, 14(4): 199-204.
- [103] Khan AA, Cerniglia CE. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from clinical and environmental samples by amplification of the exotoxin A gene using PCR[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(10): 3739-3745.
- [104] Atzél B, Szoboszlay S, Mikuska Z, et al. Comparison of phenotypic and genotypic methods for the detection of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2008, 211(1-2): 143-155.
- [105] 陈晨, 李朋, 韩铠怿, 等. 貂源绿脓杆菌的分离鉴定及其致病性[J]. 兽类学报, 2015, (02): 196-202.
- [106] 马俊, 张超, 曲新泽, 等. 水貂绿脓杆菌的分离与鉴定[J]. 中国动物传染病学报, 2014, (01): 44-49.
- [107] Lavenir R, Jocktane D, Laurent F, et al. Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target[J]. *J Microbiol Methods*, 2007, 70(1): 20-29.
- [108] De Vos D, Lim A, Pirnay JP, et al. Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, *oprI* and *oprL*[J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(6): 1295-1299.
- [109] Burns JL, Gibson RL, McNamara S, et al. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis[J]. *J Infect Dis*, 2001, 183(3): 444-452.
- [110] 王燕, 窦恒利, 陈世敏, 等. 抗铜绿假单胞菌外膜蛋白 F 单克隆抗体制备及夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, (09): 880-883.

- [111] Goto M, Shimada K, Sato A, et al. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* in mouse feces by colorimetric loop-mediated isothermal amplification[J]. *J Microbiol Methods*, 2010, 81(3): 247-252.
- [112] 姜莉莉, 樊兆斌, 高文玉. 水貂绿脓杆菌环介导等温扩增快速检测方法的建立[J]. *中国农学通报*, 2012, (29): 79-82.
- [113] 瞿良, 王惠萱, 谭德勇, 等. 铜绿假单胞菌的基因芯片检测研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2010, (11): 1201-1202+1206.
- [114] Kamei A, Coutinho-Sledge YS, Goldberg JB, et al. Mucosal vaccination with a multivalent, live-attenuated vaccine induces multifactorial immunity against *Pseudomonas aeruginosa* acute lung infection[J]. *Infect Immun*, 2011, 79(3): 1289-1299.
- [115] Priebe GP, Brinig MM, Hatano K, et al. Construction and characterization of a live, attenuated *aroA* deletion mutant of *Pseudomonas aeruginosa* as a candidate intranasal vaccine[J]. *Infect Immun*, 2002, 70(3): 1507-1517.
- [116] Priebe GP, Meluleni GJ, Coleman FT, et al. Protection against fatal *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice after nasal immunization with a live, attenuated *aroA* deletion mutant[J]. *Infect Immun*, 2003, 71(3): 1453-1461.
- [117] Zaidi TS, Priebe GP, Pier GB. A live-attenuated *Pseudomonas aeruginosa* vaccine elicits outer membrane protein-specific active and passive protection against corneal infection[J]. *Infect Immun*, 2006, 74(2): 975-983.
- [118] Price BM, Galloway DR, Baker NR, et al. Protection against *Pseudomonas aeruginosa* chronic lung infection in mice by genetic immunization against outer membrane protein F (OprF) of *P. aeruginosa*[J]. *Infect Immun*, 2001, 69(5): 3510-3515.
- [119] Staczek J, Gilleland HE, Gilleland LB, et al. A chimeric influenza virus expressing an epitope of outer membrane protein F of *Pseudomonas aeruginosa* affords protection against challenge with *P. aeruginosa* in a murine model of chronic pulmonary infection[J]. *Infect Immun*, 1998, 66(8): 3990-3994.
- [120] Gilleland HE, Parker MG, Matthews JM, et al. Use of a purified outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine in mice[J]. *Infect Immun*, 1984, 44(1): 49-54.
- [121] Matthews-Greer JM, Gilleland HE. Outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine against heterologous immunotype strains in a burned mouse model[J]. *J Infect Dis*, 1987, 155(6): 1282-1291.
- [122] Duchêne M, Barron C, Schweizer A, et al. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane lipoprotein I gene: molecular cloning, sequence, and expression in *Escherichia coli*[J]. *J Bacteriol*, 1989, 171(8): 4130-4137.
- [123] Finke M, Duchêne M, Eckhardt A, et al. Protection against experimental *Pseudomonas aeruginosa* infection by recombinant *P. aeruginosa* lipoprotein I expressed in *Escherichia coli*[J]. *Infect Immun*, 1990, 58(7): 2241-2244.

- [124] Finke M, Muth G, Reichhelm T, et al. Protection of immunosuppressed mice against infection with *Pseudomonas aeruginosa* by recombinant *P. aeruginosa* lipoprotein I and lipoprotein I-specific monoclonal antibodies[J]. *Infect Immun*, 1991, 59(4): 1251-1254.
- [125] von SBU, Lücking HC, Blum B, et al. Safety and immunogenicity of a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein I vaccine in human volunteers[J]. *Vaccine*, 1996, 14(12): 1111-1117.
- [126] Mizuno T, Kageyama M. Isolation and characterization of major outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* strain PAO with special reference to peptidoglycan-associated protein[J]. *J Biochem*, 1979, 86(4): 979-989.
- [127] Lee NG, Jung SB, Ahn BY, et al. Protection of mice against *P. aeruginosa* infections by large-scale affinity-purified human IgG specific to *P. aeruginosa* outer membrane proteins[J]. *Vaccine*, 1999, 18(7-8): 665-674.
- [128] Jang IJ, Kim IS, Park WJ, et al. Human immune response to a *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein vaccine[J]. *Vaccine*, 1999, 17(2): 158-168.
- [129] 谢茂超, 陈明拓, 姜晓, 等. 铜绿假单胞菌 3 型 O-特异性多糖-破伤风类毒素结合疫苗的制备及其免疫特性分析[J]. *中国生物制品学杂志*, 2012, (12): 1565-1568.
- [130] 谢茂超, 陈明拓, 姜晓, 等. 氢氧化铝佐剂对铜绿假单胞菌 11 型 O-特异性多糖与破伤风类毒素结合物免疫原性和免疫保护性的影响[J]. *微生物学免疫学进展*, 2013, (04): 12-18.
- [131] 谢茂超, 陈明拓, 姜晓, 等. 铜绿假单胞菌 6 型 O-特异性多糖与破伤风类毒素结合物免疫原性研究[J]. *微生物学免疫学进展*, 2012, (04): 10-14.
- [132] Long GG, Gallina AM, Gorham JR. *Pseudomonas pneumonia* of mink: pathogenesis, vaccination, and serologic studies[J]. *Am J Vet Res*, 1980, 41(10): 1720-1725.
- [133] Pier GB, DesJardin D, Grout M, et al. Human immune response to *Pseudomonas aeruginosa* mucoid exopolysaccharide (alginate) vaccine[J]. *Infect Immun*, 1994, 62(9): 3972-3979.
- [134] 敬德仲, 李文贤, 刘秉锟, 等. 绿脓杆菌内毒素蛋白疫苗治疗绿脓杆菌感染 207 例[J]. *新药与临床*, 1989, (06): 347-349+342.
- [135] 姜德福. 绿脓杆菌内毒素蛋白(EP)疫苗防治绿脓杆菌性肺炎的临床小结[J]. *第三军医大学学报*, 1983, (03): 210-212.
- [136] Baumann U, Mansouri E, von SBU. Recombinant OprF-OprI as a vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infections[J]. *Vaccine*, 2004, 22(7): 840-847.
- [137] Arnold H, Bumann D, Felies M, et al. Enhanced immunogenicity in the murine airway mucosa with an attenuated *Salmonella* live vaccine expressing OprF-OprI from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(11): 6546-6553.
- [138] 朱佑明, 罗永艾, 李文桂. 铜绿假单胞菌重组 Bb-OprF 疫苗诱导小鼠细胞免疫应答的研究[J]. *免疫学杂志*, 2012, (03): 217-221.
- [139] 朱佑明, 罗永艾, 李文桂. 铜绿假单胞菌重组 Bb-OprF 疫苗构建及鉴定[J]. *中国人兽*

- 共患病学报, 2011, (04): 303-306.
- [140] Baud D, Ponci F, Bobst M, et al. Improved efficiency of a Salmonella-based vaccine against human papillomavirus type 16 virus-like particles achieved by using a codon-optimized version of L1[J]. *J Virol*, 2004, 78(23): 12901-12909.
- [141] DiGiandomenico A, Rao J, Goldberg JB. Oral vaccination of BALB/c mice with Salmonella enterica serovar Typhimurium expressing Pseudomonas aeruginosa O antigen promotes increased survival in an acute fatal pneumonia model[J]. *Infect Immun*, 2004, 72(12): 7012-7021.
- [142] Bumann D, Behre C, Behre K, et al. Systemic, nasal and oral live vaccines against Pseudomonas aeruginosa: a clinical trial of immunogenicity in lower airways of human volunteers[J]. *Vaccine*, 2010, 28(3): 707-713.
- [143] 杨海燕, 王颖, 张传美, 等. 貂源绿脓杆菌分离株的鉴定、血清学分型及药敏试验[J]. *动物医学进展*, 2014, (07): 127-131.
- [144] Spilker T, Coenye T, Vandamme P, et al. PCR-based assay for differentiation of Pseudomonas aeruginosa from other Pseudomonas species recovered from cystic fibrosis patients[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(5): 2074-2079.
- [145] 姚火春. 兽医微生物学实验指导[M]. 第2版: 中国农业出版社, 2002.
- [146] 孙娜, 陈强, 温永俊, 等. 水貂绿脓杆菌分离鉴定及药物敏感性分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, (10): 2788-2793.
- [147] 陈晨. 貂源绿脓杆菌的分离鉴定及其致病性研究, 2015.
- [148] 孙娜, 杨勇, 陈强, 等. 水貂出血性肺炎病原分离鉴定及药物敏感性分析, 2014.
- [149] 王海洲. 水貂出血性肺炎的诊断和治疗[J]. *特种经济动植物*, 2008, (12): 10-11.
- [150] 闫新武, 雷连成, 张明亮, 等. 貂源绿脓杆菌的分离鉴定及生物学特性[J]. *中国兽医学报*, 2014, 34(10): 1610-1614.
- [151] 王刚, 丛培强, 汤日新, 等. 水貂假单胞菌病的诊治[J]. *特种经济动植物*, 2007, (12): 17.
- [152] 罗国良, 闫喜军, 赵春霏, 等. 水貂出血性肺炎的诊断与治疗[J]. *特种经济动植物*, 2007, (10): 16.
- [153] 陈晨. 貂源绿脓杆菌的分离鉴定及其致病性研究, 2015.
- [154] Shimizu T, Homma JY, Aoyama T, et al. Virulence of Pseudomonas aeruginosa and spontaneous spread of pseudomonas pneumonia in a mink ranch[J]. *Infect Immun*, 1974, 10(1): 16-20.

攻读硕士学位期间发表的学术论文

- [1] 袁超文, 刘文鑫, 关玮琨, 孟相秋, 唐杰, 李星月, 赵志腾, 师东方. 2014. 牛源产 II 型不耐热肠毒素大肠杆菌的分离鉴定及重组毒素制备[J]. 畜牧与兽医学报 (已录用)
- [2] 杜元策, 刘文鑫, 关玮琨, 孟相秋, 韩林林, 李金萍, 袁超文, 唐杰, 李星月, 赵志腾, 师东方. 2014. 肠毒素大肠杆 LTa₁₉₂-STa₁₃ 融合基因的表达及其诱导小鼠体液免疫的研究[J]. 中国预防兽医学报 (已录用)
- [3] 唐杰, 袁超文, 刘文鑫, 孟相秋, 关玮琨, 李星月, 赵志腾, 王时, 葛建松, 郭德民, 江松泽, 师东方. 2015. 东北地区仔猪腹泻大肠杆菌 EAST1 基因调查[J]. 黑龙江畜牧兽医 (已录用)
- [4] 赵志腾, 关玮琨, 李星月, 陶婧, 李婷婷, 师东方. 2016. 山东省貂源铜绿假单胞菌分离株的血清型及其致病性[J]. 中国预防兽医学报 (已录用)