DOI:10.16016/j.2097-0927.202211213

不同佐剂对重组鲍曼不动杆菌 PKF 的免疫效果研究

张珊珊[1,2],李郭成[2],冯 壤[2],薛若怡[2],段 浩[1],曹 宇[1],刘婧怡[2],李海波[2],高英英[1] 154007 黑龙江 佳木斯,佳木斯大学临床医学院[1];400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)药学与检验医学系微生物与生化药学教研室,国家免疫生物制品工程技术研究中心[2]

[摘要] **目的** 比较不同免疫方式、不同佐剂对重组鲍曼不动杆菌 PKF 的免疫效果。**方法** 构建重组质粒,经诱导表达纯化获得重组 PKF,分别联合氢氧化铝、AS03 肌注(intramuscular, im)免疫以及 LTK63、LP1-34 滴鼻(intranasally, in)免疫小鼠,共分为 7 组:PBS 组;肌注免疫组:PKF(im)组、PKF+Al(im)组、PKF+AS03(im)组;滴鼻免疫组:PKF(in)组、PKF+LTK63(in)组、PKF+LP1-34(in)组。ELISA 检测免疫后小鼠血清中特异性 IgG 以及黏膜部位 sIgA 的水平;构建鲍曼不动杆菌肺部感染亚致死模型,测定攻毒后小鼠血液和肺部细菌定植量,评价疫苗保护作用。**结果** 肌注免疫组中,AS03 辅助 PKF 诱导最高的特异性 IgG 抗体水平($P<0.01$);滴鼻免疫组中,LTK63 显著提升肺泡灌洗液中特异性 sIgA 水平($P<0.01$);攻毒后细菌定植量检测结果显示,PKF+AS03 肌注组细菌定植量与单用 PKF 组相当,而滴鼻组中 LTK63 可以显著降低细菌定植量($P<0.01$)。**结论** LTK63 可以辅助 PKF 更好地发挥对鲍曼不动杆菌肺部感染的保护作用,表明疫苗介导的黏膜免疫应答对保护感染可能更加重要。

[关键词] 鲍曼不动杆菌;佐剂;PKF;免疫效果
[中图法分类号] R378.7; R392.7 [文献标志码] A

Comparison of different adjuvants for immune efficacy of recombinant PKF protein of *Acinetobacter baumannii*

ZHANG Shanshan[1,2], LI Guocheng[2], FENG Rang[2], XUE Ruoyi[2], DUAN Hao[1], CAO Yu[1], LIU Jingyi[2], LI Haibo[2], GAO Yingying[1] [1]Clinical Medical School, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang Province, 154007; [2]Department of Microbiology and Biochemical Pharmacy, National Engineering Technology Research Center for Immune Biological Products, Faculty of Pharmacy and Laboratory Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To compare the immune effects of recombinant PKF protein of *Acinetobacter baumannii* with different immune modes and different adjuvants. **Methods** After recombinant PKF protein was obtained by plasmid expression and purification, the protein was then combined with aluminum hydroxide (Al) or with AS03 to immunize mice by intramuscular (im) injection. In another experiment, the combination of PKF and LTK63 or PKF and LP1-34 was adopted to intranasally (in) immunize mice, respectively. The total animals were thus divided into 7 groups: PBS group; PKF group (im), PKF+Al group (im), PKF+AS03 group (im), PKF group (in), PKF+LTK63 group (in), and PKF+LP1-34 group (in). The levels of serum specific IgG and mucosal sIgA in the immunized mice were detected by ELISA. Moreover, the sublethal model of *Acinetobacter baumannii* pulmonary infection was established, and then the bacterial colonization amount in blood and lung of mice after challenge was measured to evaluate the protective immune

[基金项目] 重庆市自然科学基金重点项目(cstc2020jcyj-zdxmX0027);国家自然科学基金面上项目(32270988)
[通信作者] 高英英,E-mail:happygaoyingying@163.com
李海波,E-mail:lihaibo@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

efficacy of the recombinant vaccine. **Results** In the intramuscular immunization group, AS03-assisted PKF produced the highest specific IgG antibody level ($P<0.01$), and in the nasal immunization group, LTK63 significantly increased the level of specific sIgA in the alveolar lavage fluid ($P<0.01$). Bacterial challenge test showed that the bacterial colonization amount was similar in the PKF+AS03 (im) group and PKF (im) alone group, while the PKF+LTK63 group (in) obtained remarkably reduced bacterial colonization amount ($P<0.01$). **Conclusion** LTK63 assists PKF to better protect against *Acinetobacter baumannii* pulmonary infection, suggesting that vaccine-mediated mucosal immune response may play a more important role in the infection protection.

[**Key words**] *Acinetobacter baumannii*; adjuvant; PKF; immun efficacy

Supported by the Key Project of Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2020jcyj-zdxmX0027) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (32270988). Corresponding author: GAO Yingying, E-mail: happygaoyingying@163.com; LI Haibo, E-mail: lihaibo@tmmu.edu.cn

鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*,*Ab*)是重症监护病房的第五大常见病原体,对常用的抗生素容易产生耐药,感染后死亡率很高[1-2]。鲍曼不动杆菌常引起肺炎、菌血症、尿路感染、脑膜炎、伤口和软组织感染等一系列感染性疾病[3],其对消毒剂也具有高度的耐受性,已成为医院防治的一个巨大挑战[4]。

疫苗接种是一种有效且具有成本效益的传染病预防形式[5],现有鲍曼不动杆菌疫苗的候选抗原,包括OmpA[6]、OmpK[7]、OmpW[8]、Omp22[9]、PKF[10]、BamA[11]、NucAb[12]、FilF[13]等。其中PKF是一种可抵抗补体杀伤和抑制生物膜形成的蛋白酶[14]。BOLOURCHI等[10]将PKF作为Ab疫苗抗原,用氢氧化铝作为佐剂,*A. baumannii ATCC* 19606攻毒后小鼠存活率可达到80%。表明PKF作为抗原对于Ab具有一定保护作用,是很有前途的Ab疫苗靶点。

AS03是一种基于角鲨烯的水包油型乳剂佐剂,含有α-生育酚作为免疫增强成分,其佐剂效应要显著优于氢氧化铝佐剂[15]。此外,鲍曼不动杆菌主要引起肺部感染,抗原特异性黏膜免疫应答可能更有利于保护鲍曼不动杆菌感染。LTK63是一种不具有毒素活性的大肠杆菌突变体重组蛋白,具有显著的黏膜佐剂效应[16];本课题组前期还设计与合成了一种新型脂肽类佐剂LP1-34,其具有显著的TLR2激动活性,并可以辅助抗原诱导特异性呼吸道黏膜免疫应答[17]。本研究分别评价氢氧化铝、AS03作为肌注免疫佐剂以及LTK63、LP1-34作为滴鼻免疫佐剂对重组PKF的免疫增强作用以及攻毒保护效果,以期为鲍曼不动杆菌的免疫途径以及佐剂选择提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 实验动物和菌株

SPF级雌性C57小鼠,6~8周龄,体质量16~20 g,购于北京维通利华生物科技有限公司,所有小鼠饲养在本实验室SPF级动物房。鲍曼不动杆菌*A. baumannii ATCC* 17978和*A. baumannii* LAC-4菌株由本实验室自存。

1.2 试剂

胰酪胨大豆肉汤培养基(TSB)购自北京奥博星公司;TMB ELISA底物及TMB显色终止液购自Abcam公司;PBS缓冲液粉末(pH值7.3)、HRP标记的山羊抗小鼠IgG购自中杉金桥公司;HRP标记的山羊抗小鼠IgA、HRP标记的山羊抗小鼠IgG1、HRP标记的山羊抗小鼠IgG2a购自Abcam公司;吐温-20购自碧云天公司;质粒大提试剂盒购自Promega公司;彩色预染蛋白Marker(26616)购自赛默飞公司;SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5×)购自达科为生物公司。

1.3 重组质粒的构建和转化

根据核苷酸序列设计PCR扩增引物,上游引物序列为PKF-pGEX-1:5′-CGCGGATCCgctgttgatttttcaaa-3′,下游引物序列为PKF-pGEX-2:5′-CCGGAATTCttactgaatacgtaaac-3′。按照试剂盒说明书方法提取PKF全基因组作为模板,随后进行PCR扩增,并将PCR产物回收。按照常规方法构建pGEX-6p2载体,用*Bam H*Ⅰ和*EcoR*Ⅰ对PKF-PCR回收产物和pGEX-6P-2载体进行双酶切,将载体pGEX-6p-2酶切后回收产物和PKF-酶切后回收产物置于TaKaRa DNA T4 Ligase和TaKaRa 10×T4 DNA Ligase Buffer体系中16 ℃过夜连接;随后将连接产物pGEX-6p-2-PKF序列转化至DH5α感受态细胞,利用氨苄青霉素进行抗性筛选。挑取单菌落培养后提取质粒,以质粒为模板通过双酶切验证,最后将鉴定成功的重组质粒pGEX-6p-2-PKF转化至*XL*1-blue感受态细胞。

1.4 重组质粒的诱导表达和蛋白纯化

1.4.1 重组质粒的诱导表达

吸取5 μL pGEX-6p-2-PKF/*XL*1-blue菌液加入60 mL含100 μg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基中,37 ℃震荡培养过夜;在

6 L 含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,按 1∶100 接种培养过夜的菌液,37 ℃震荡培养 6 h;加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,25 ℃诱导过夜表达。

1.4.2 PKF 蛋白的纯化及验证 菌液诱导 16 h 后,收集菌液,5 000 r/min 离心 15 min,弃上清,按 1∶10(质量体积分数)加入 PBS 重悬菌体;将重悬菌液经超声破碎仪破碎;破碎后的菌液 12 000 r/min 离心 15 min。上柱:将上清与 15 mL GST 填料 4 ℃结合过夜,将柱子保持在一定高度,打开盖子,用离心管收集流穿液,用 1 mol/L NaCl PBS 洗脱填料 3 次并收集洗脱液;然后向填料中加 5 mL PP 酶和 50 mL PBS,4 ℃酶切 5 h,再次收集流穿液,之后加入 50 mL PBS 洗脱填料并收集洗脱液;最后用 0.1 mol/L NaOH 洗脱填料并收集洗脱液。将上述收集的破菌上清、破菌沉淀、各步骤流穿、高盐洗柱液、PP 酶切后上清、PBS 洗柱液留样,SDS-PAGE 电泳检测表达结果。留样中分别加入 5×SDS-PAGE 上样缓冲液,混匀,100 ℃煮 6 min,10 μL/孔上样,5 μL/孔加入彩色预染蛋白标准品,电泳结束用瞬蓝溶液染色并清水脱色,在凝胶成像仪观察电泳结果。

1.5 小鼠免疫分组和程序

本实验动物分 2 批进行,第 1 批实验小鼠分 7 组:PBS 组、PKF 肌注(intramuscular, im)组、PKF+铝佐剂 Al(im)组、PKF+AS03(im)组、PKF 滴鼻(intranasally, in)组、PKF+LTK63(in)组、PKF+LP1-34(in)组,每组 6 只小鼠。第 2 批攻毒实验小鼠分 5 组:PBS 组、PKF 肌注组、PKF+AS03 肌注组、PKF 滴鼻组、PKF+LTK63 滴鼻组,每组 10 只小鼠。

疫苗样品的制备:每剂含 20 μg PKF,肌注组铝佐剂为 50 μg/只,AS03 佐剂为 25 μL/只,50 μL/只于小鼠大腿两侧肌注。滴鼻组 LTK63 佐剂为 5 μg/只,LP1-34 为 10 μg/只,先行腹腔注射 1%异戊巴比妥麻醉后,20 μL/只滴注于小鼠两侧鼻腔。分别于第 0、14、28 天免疫小鼠。

1.6 样本采集

末次免疫后 14 d 取小鼠阴道灌洗液样品,处死小鼠并采集小鼠眼球血、肺泡灌洗液和鼻腔灌洗液,低温离心后分别收集上清并于-80 ℃保存待用。

1.7 ELISA 方法检测特异性抗体滴度

10 μg/mL PKF 蛋白于酶标板包被 4 ℃过夜;次日用 1%BSA/PBST 封闭液 37 ℃封闭 2 h;样品用 PBST 缓冲液稀释后加入酶标板,37 ℃孵育 1 h;HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG、IgG1、IgG2a 按 1∶5 000 稀释,HRP 标记的山羊抗小鼠 IgA 按 1∶10 000 稀释,37 ℃孵育 40 min;每孔加入 100 μL TMB 显色液,室温条件下避光显色,随后每孔加入 100 μL 终止液终止反应。测定光密度值 $D(450)$,待测样品孔 $D(450)$/阴性对照孔 $D(450)\geq 2.1$ 的最高稀释倍数为待测血清的抗体滴度。各步骤间用 PBST 缓冲液洗酶标板 3 次。

1.8 鲍曼不动杆菌 LAC-4 菌株特异性小鼠血清 IgG 抗体水平

将 *A. baumannii* LAC-4 菌株用三线法接种于 TSA 平板 37 ℃培养过夜;挑取单菌落接种于 20 mL TSB 培养基中,37 ℃、220 r/min 振荡培养过夜;取 200 μL 活化后的菌液加入 20 mL TSB 培养基中 37 ℃振荡培养 3 h。8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,菌体加入 PBS 缓冲液重悬并用超声破碎仪裂解,破菌后 5 000 r/min 离心 15 min 并收集上清液。按 BCA 法检测上清中蛋白的浓度,按 200 μg/mL 全蛋白包被酶标板,小鼠血清用 PBST 缓冲液按 1∶200 稀释,其他详细步骤同实验 1.7。

1.9 Western blot 检测

LAC-4 菌株培养方法同实验 1.8,菌液与蛋白上样缓冲液混合,100 ℃金属浴加热 6 min 使蛋白变性。电泳时样品 10 μL/孔,彩色预染蛋白标准品 5 μL/孔,电泳结束后将目的条带转移到 PVDF 膜上;用含 5%脱脂奶粉的 TBST 浸泡 PVDF 膜,室温摇床封闭 2 h;随后用含 5%脱脂奶粉的 TBST 按 1∶500 稀释血清,使膜浸于一抗孵育液中室温孵育 1 h,TBST 反复洗膜 15 min;用稀释血清的相同稀释液稀释 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG,将 PVDF 浸于二抗孵育液中室温孵育 1 h,再次 TBST 充分洗涤 PVDF 膜;发光液 A 液与 B 液按 1∶1混合,用滤纸吸干膜上水分后滴加发光液,最后将 PVDF 膜放置于成像仪上曝光成像。

1.10 鲍曼不动杆菌攻毒

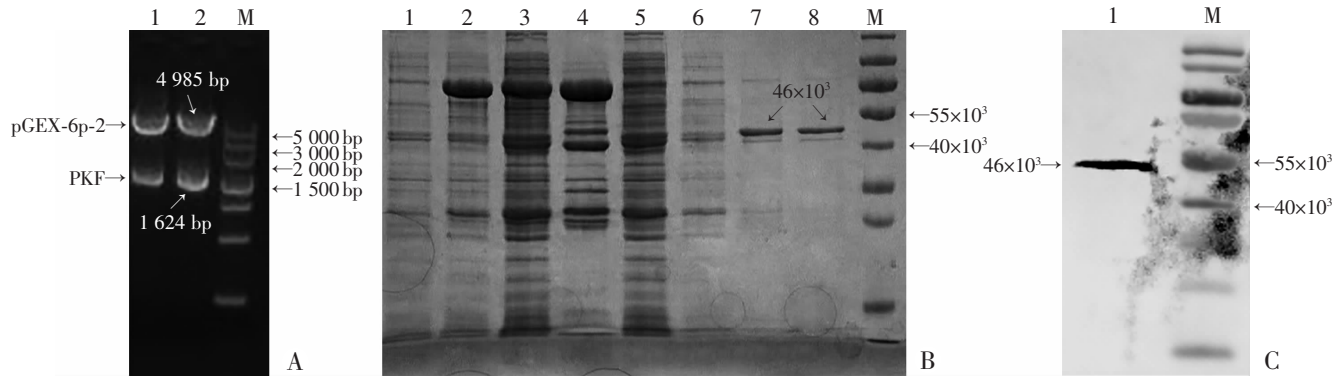
1.10.1 小鼠攻毒 小鼠末次免疫 14 d 后采取腹腔注射 1%异戊巴比妥麻醉,用鲍曼不动杆菌 *A. baumannii* LAC-4 菌株 0.5×10^7 CFU/只进行气管插管攻毒,24 h 后处死小鼠。

1.10.2 细菌定植 小鼠眼球血处理:为防止血凝,眼球血需快速稀释 10 倍并连续稀释 10^8 倍,随后,取 10 μL 稀释后的眼球血滴在 TSA 平板上。

小鼠肺部处理:取出小鼠肺部,取 1 mL 无菌 PBS 缓冲液加入组织研磨器中研磨,将研磨液连续稀释 10^{10} 倍后取 10 μL 进行点板。点板时需注意稍倾斜平板使液体缓慢滑下,菌液尽量舒展开,拖出尾部。平板放在 37 ℃培养箱过夜。

1.11 统计学分析

数据通过 Graph Pad Prism9.4.0 软件分析,连续变量以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。



A:质粒双酶切鉴定 1、2:质粒;M:标准;B:重组 PKF 的表达与纯化;1:IPTG 诱导前;2:IPTG 诱导后;3:菌液离心后上清;4:菌液离心后沉淀;5:流穿液;6:第 1 次洗脱液;7:PP 酶切后回收液;8:第 2 次洗脱液;M:标准;C:Western blot 检测重组 PKF 免疫血清与全菌蛋白中天然 PKF 的反应性 1:PKF;M:标准

图 1 重组质粒双酶切验证以及 PKF 蛋白的诱导表达、纯化及表征

2 结果

2.1 重组质粒的构建和转化

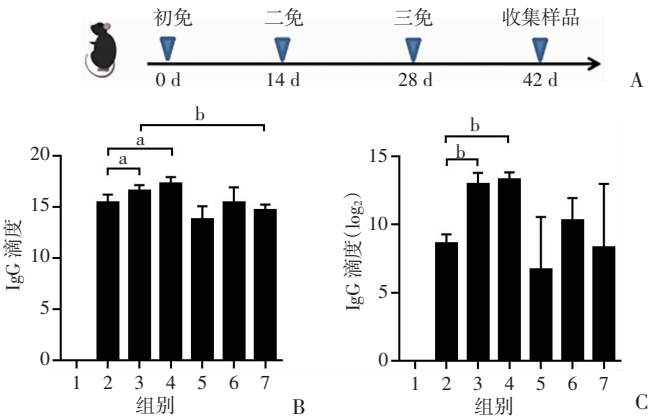
以 *A. baumannii ATCC* 17978 全基因组为模板,PCR 扩增 PKF 基因片段,片段大小为 1 624 bp。将目的基因构建至表达载体 pGEX-6p-2,双酶切鉴定结果显示基因片段大小与预期一致,表明 pGEX-6P-2-PKF 重组表达质粒构建成功(图 1A)。将鉴定正确的质粒转化至 *XL*1-blue 感受态细胞,获得 pGEX-6P-2-PKF/XL1-blue 重组基因工程菌株。

2.2 重组 PKF 的表达、纯化以及表征

利用 IPTG 对 pGEX-6P-2-PKF/*XL*1-blue 重组基因工程菌株进行诱导,并采用亲和层析法进行重组 PKF 蛋白的纯化。SDS-PAGE 蛋白电泳跟踪重组蛋白的表达以及纯化情况(图 1B),纯化后 PKF 蛋白经灰度扫描计算其纯度为 97.0%,相对分子量约为 46×10^3。Western blot 结果显示重组 PKF 免疫血清可以与鲍曼不动杆菌 LAC-4 全菌蛋白中的 PKF 蛋白进行特异性结合(图 1C),表明重组表达的 PKF 蛋白结构正确,并具有显著的免疫原性和免疫反应性。

2.3 重组 PKF 联用不同佐剂免疫后小鼠血清特异性 IgG 抗体水平

小鼠免疫及采样时间如图 2A 所示。末次免疫后 14 d,ELISA 测定小鼠血清中 PKF 以及全菌特异性 IgG 抗体滴度。肌注组中,与氢氧化铝佐剂相比,AS03 可以显著诱导更高的 PKF 以及全菌特异性 IgG 抗体水平($P<0.01$);而滴鼻免疫组中,与单用抗原相比,LTK63 和 LP1-34 两种佐剂均未能显著促进特异性血清 IgG 抗体应答(图 2B、C)。



1:PBS 组;2:PKF(im)组;3:PKF+Al(im)组;4:PKF+AS03(im)组;5:PKF(in)组;6:PKF+LTK63(in)组;7:PKF+LP1-34(in)组;a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

A:免疫程序;B:PKF 特异性血清 IgG 抗体滴度;C:全菌特异性血清 IgG 抗体滴度

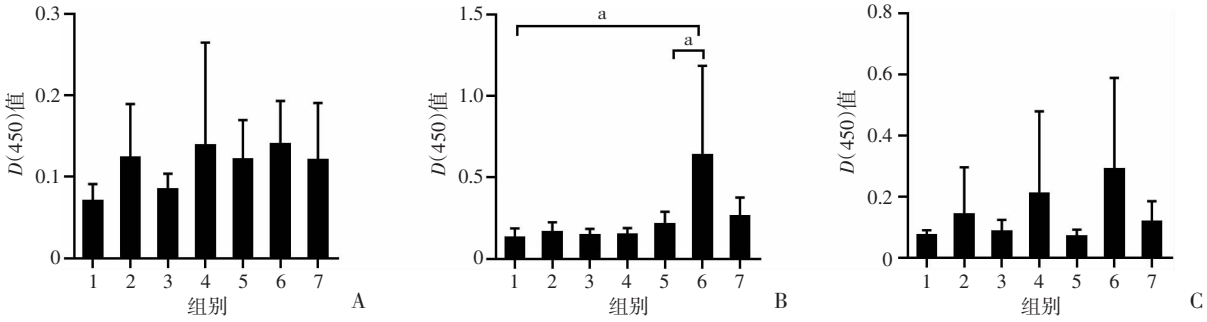
图 2 小鼠免疫程序以及血清特异性 IgG 抗体效价

2.4 重组 PKF 联用不同佐剂免疫后小鼠黏膜特异性 sIgA 抗体水平

末次免疫后 14 d,ELISA 检测小鼠阴道灌洗液、肺泡灌洗液以及鼻腔灌洗液等黏膜部位 PKF 特异性 sIgA 抗体水平。结果显示,滴鼻免疫组中 LTK63 显著提升肺泡灌洗液中的特异性 sIgA 抗体水平($P<0.01$,图 3),其他各组均未能检测到显著的 sIgA 抗体应答,表明 LTK63 与 PKF 联用可以显著促进呼吸道特异性黏膜免疫应答。

2.5 重组 PKF 联用不同佐剂免疫后小鼠血清 IgG 抗体亚型的水平

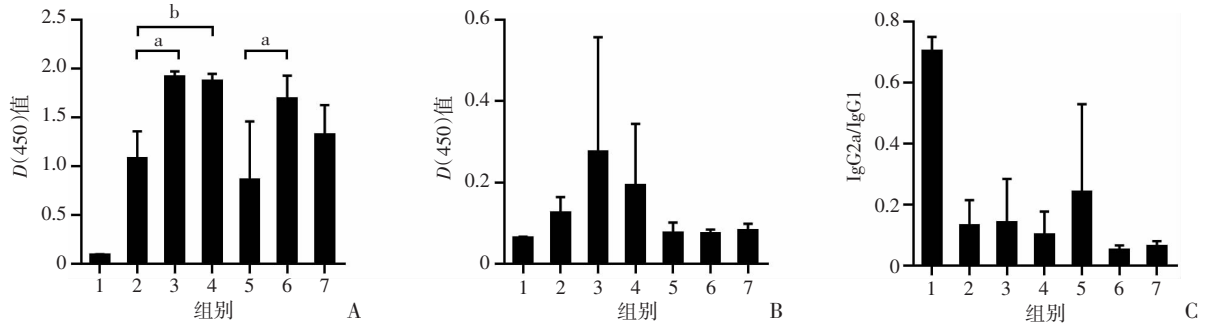
通过 ELISA 检测免疫后小鼠血清中 IgG 抗体亚型



1:PBS 组;2:PKF(im)组;3:PKF+Al(im)组;4:PKF+AS03(im)组;5:PKF(in)组;6:PKF+LTK63(in)组;7:PKF+LP1-34(in)组;a: $P<0.01$

A:阴道灌洗液特异性 sIgA 抗体水平;B:肺泡灌洗液特异性 sIgA 抗体水平;C:鼻腔灌洗液特异性 sIgA 抗体水平

图 3 小鼠黏膜部位特异性 sIgA 抗体水平



1:PBS 组;2:PKF(im)组;3:PKF+Al(im)组;4:PKF+AS03(im)组;5:PKF(in)组;6:PKF+LTK63(in)组;7:PKF+LP1-34(in)组;a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

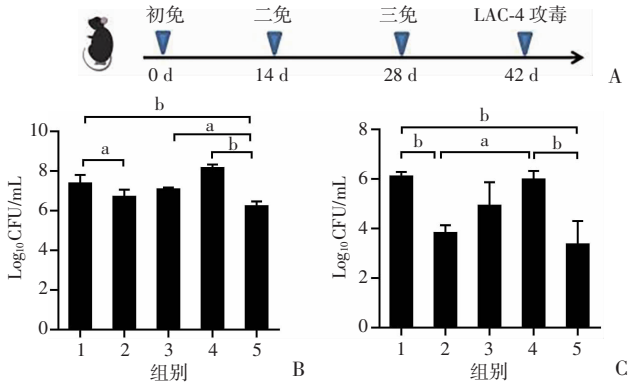
A:血清特异性 IgG1 抗体水平;B:血清特异性 IgG2a 抗体水平;C:血清特异性抗体 IgG2a 与 IgG1 比值

图 4 小鼠血清中特异性 IgG2a 与 IgG1 抗体水平

的水平。结果显示,不同途径、不同佐剂均可提升特异性 IgG1 抗体水平($P<0.05$,$P<0.01$,图 4A),但是对特异性 IgG2a 抗体的水平无影响(图 4B)。此外,从 IgG2a/IgG1 比值看,各佐剂均辅助抗原激发了 Th2 偏向性免疫应答(图 4C)。

2.6 重组 PKF 联用不同佐剂对鲍曼不动杆菌肺部感染的保护作用

于末次免疫后 14 d,对小鼠进行鲍曼不动杆菌肺部感染亚致死攻毒,通过分析小鼠肺组织和血液中的细菌载量来评估疫苗的保护效果。攻毒后肺组织细菌定植量检测结果显示,PKF+AS03 肌注组细菌定植量与单用 PKF 组相当,而滴鼻组中 LTK63 佐剂可以辅助 PKF 显著降低肺部的细菌定植量($P<0.01$);血液中细菌定植结果显示,肌注免疫中,PKF+AS03 组与单用抗原组相比定植量无统计学差异;而滴鼻免疫中,LTK63 佐剂同样可显著降低血液细菌载量($P<0.01$)。LTK63 佐剂与 PKF 联用时,肺组织和血液中的细菌定植量均显著降低,见图 5。说明 LTK63 可以辅助 PKF 更好地发挥对鲍曼不动杆菌肺部感染的保护作用,这与 PKF+LTK63 组小鼠黏膜部位特异性 sIgA 抗体水平升高的结果相符。



1:PBS 组;2:PKF(im)组;3:PKF+AS03(im)组;4:PKF(in)组;5:PKF+LTK63(in)组;a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

A:免疫攻毒程序;B:肺部细菌定植量;C:血液细菌定植量

图 5 小鼠免疫攻毒程序以及肺部和血液中细菌定植量

3 讨论

目前鲍曼不动杆菌的候选疫苗分为外膜囊泡疫苗、灭活全菌疫苗和重组蛋白亚单位疫苗。鲍曼不动杆菌主要通过肺部呼吸道途径感染,传统肌肉注射途径接种疫苗可有效诱导保护性全身免疫反应,难以在黏膜表面引发抗原特异性免疫应答[18],所以,黏膜途径免疫可能在控制病原体从黏膜部位进入机体方面更具优势。

PKF 作为鲍曼不动杆菌的候选保护性抗原,是一种分泌的丝氨酸蛋白酶,间接抑制 C3 和备解素,与血清抗性相关的补体失活相关。PKF 蛋白暴露在细胞外的空间中,具有主要的免疫原性表位和大量的 MHC(Ⅰ类和Ⅱ类)结合位点,可以在人类或动物模型中引起保护性免疫反应[19]。

佐剂可以增强抗原特异性反应,并重塑免疫应答类型。佐剂通过多种机制的组合发挥作用,包括招募免疫细胞,增强抗原的摄取和呈递,诱导细胞因子和趋化因子的产生,以及促进抗原和抗原递呈细胞运输到引流淋巴结[20]。本研究除了选择传统氢氧化铝佐剂,还比较了几种不同佐剂,如 AS03、LTK63 和 LP1-34,探究不同佐剂对重组鲍曼不动杆菌 PKF 的免疫效果。实验结果表明,肌注免疫中联用 AS03 佐剂诱导显著的特异性血清 IgG 抗体水平,滴鼻免疫中联用 LTK63 佐剂显著提升了特异性 sIgA 抗体水平。

在 BOLOURCHI 等[10]的实验中只加入传统氢氧化铝佐剂,证明重组蛋白 PKF 作为鲍曼不动杆菌疫苗抗原对血流感染具有一定的保护作用,未对其他佐剂诱导抗体水平以及保护作用进行评估。本研究采用滴鼻、肌注两种免疫途径,重组 PKF 联合氢氧化铝、AS03、LTK63 和 LP1-34 等多种佐剂免疫小鼠。结果表明,与单用抗原组相比,虽然 AS03 肌肉注射可以诱导更高水平的 PKF 特异性血清 IgG 应答,但对鲍曼不动杆菌肺部感染的保护作用却与单用抗原相当。在滴鼻免疫组中,LTK63 可以显著提升呼吸道黏膜特异性 sIgA 的抗体水平,并且发挥了比单用抗原更显著的免疫保护效果,提示在保护鲍曼不动杆菌肺部感染中,黏膜免疫应答可能发挥了更加重要的作用。下一步,我们将构建鲍曼不动杆菌肺部感染致死模型,进一步评价疫苗的保护效果,并深入探讨其保护机制。

参考文献:

[1] DIANCOURT L, PASSET V, NEMEC A, *et al*. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool [J]. PLoS One, 2010, 5(4): e10034. DOI: 10.1371/journal.pone.0010034.

[2] ROCA I, ESPINAL P, VILA-FARRÉS X, *et al*. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace [J]. Front Microbiol, 2012, 3: 148. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00148.

[3] WONG D, NIELSEN T B, BONOMO R A, *et al*. Clinical and pathophysiological overview of *Acinetobacter* infections: a century of challenges [J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(1): 409-447. DOI: 10.1128/CMR.00058-16.

[4] BENTANCOR L V, ROUTRAY A, BOZKURT-GUZEL C, *et al*. Evaluation of the trimeric autotransporter Ata as a vaccine candidate against *Acinetobacter baumannii* infections [J]. Infect Immun, 2012, 80(10): 3381-3388. DOI: 10.1128/IAI.06096-11.

[5] LAVELLE E C, WARD R W. Publisher correction: mucosal vaccines - fortifying the frontiers [J]. Nat Rev Immunol, 2022, 22(4): 266. DOI: 10.1038/s41577-021-00599-8.

[6] ZHANG X J, YANG T X, CAO J, *et al*. Mucosal immunization with purified OmpA elicited protective immunity against infections caused by multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Microb Pathog, 2016, 96: 20-25. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.04.019.

[7] GUO S J, REN S, XIE Y E. Evaluation of the protective efficacy of a fused OmpK/Omp22 protein vaccine candidate against *Acinetobacter baumannii* infection in mice[J]. Biomed Environ Sci, 2018, 31(2): 155-158. DOI: 10.3967/bes2018.019.

[8] HUANG W W, WANG S J, YAO Y F, *et al*. OmpW is a potential target for eliciting protective immunity against *Acinetobacter baumannii* infections [J]. Vaccine, 2015, 33(36): 4479-4485. DOI: 10.1016/j.vaccine.2015.07.031.

[9] HUANG W W, YAO Y F, WANG S J, *et al*. Immunization with a 22-kDa outer membrane protein elicits protective immunity to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. Sci Rep, 2016, 6: 20724. DOI: 10.1038/srep20724.

[10] BOLOURCHI N, SHAHCHERAGHI F, SHIRAZI A S, *et al*. Immunogenic reactivity of recombinant PKF and AbOmpA proteins as serum resistance factors against sepsis of *Acinetobacter baumannii*[J]. Microb Pathog, 2019, 131: 9-14. DOI: 10.1016/j.micpath.2019.03.031.

[11] SINGH R, CAPALASH N, SHARMA P. Immunoprotective

potential of *BamA*, the outer membrane protein assembly factor, against MDR *Acinetobacter baumannii*[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 12411. DOI: 10.1038/s41598-017-12789-3.

[12] GARG N, SINGH R, SHUKLA G, *et al*. Immunoprotective potential of in silico predicted *Acinetobacter baumannii* outer membrane nuclease, NucAb[J]. Int J Med Microbiol, 2016, 306(1): 1-9. DOI: 10.1016/j.ijmm.2015.10.005.

[13] SINGH R, GARG N, SHUKLA G, *et al*. Immunoprotective efficacy of *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein, FilF, predicted in silico as a potential vaccine candidate[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 158. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00158.

[14] KING L B, PANGBURN M K, MCDANIEL L S. Serine protease PKF of *Acinetobacter baumannii* results in serum resistance and suppression of biofilm formation[J]. J Infect Dis, 2013, 207(7): 1128-1134. DOI: 10.1093/infdis/jis939.

[15] PULENDRAN B, S ARUNACHALAM P, O'HAGAN D T. Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants[J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(6): 454-475. DOI: 10.1038/s41573-021-00163-y.

[16] DA HORA V P, CONCEIÇÃO F R, DELLAGOSTIN O A, *et al*. Non-toxic derivatives of LT as potent adjuvants[J]. Vaccine, 2011, 29(8): 1538-1544. DOI: 10.1016/j.vaccine.2010.11.091.

[17] MAO L, LIU C, LIU J Y, *et al*. Novel synthetic lipopeptides as potential mucosal adjuvants enhanced SARS-CoV-2 rRBD-induced immune response[J]. Front Immunol, 2022, 13: 833418. DOI: 10.3389/fimmu.2022.833418.

[18] LYCKE N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations[J]. Nat Rev Immunol, 2012, 12(8): 592-605. DOI: 10.1038/nri3251.

[19] SOLTANI SHIRAZI A, AZIZI O, BOLOURCHI N, *et al*. Comparative in silico analyses of proteins involved in serum resistance as promising vaccine candidates against *Acinetobacter baumannii*[J]. Vacres, 2017, 4(3): 64-71. DOI: 10.29252/vacres.4.3.4.64.

[20] AWATE S, BABIUK L A, MUTWIRI G. Mechanisms of action of adjuvants[J]. Front Immunol, 2013, 4: 114. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00114.

(收稿:2022-11-28;修回:2023-01-21)

(编辑 张 维)