

鸡病原性大肠杆菌(O₂)亚单位疫苗的研究

李晋红 林维庆 黄淑坚

(华南农业大学动物医学系, 广州, 510642)

摘要 试验提取并纯化了鸡病原性大肠杆菌血清型(O₂)的菌毛,并电镜观察了菌毛及菌毛表达。提取了鸡病原性大肠杆菌血清型(O₂)荚膜多糖及菌体可溶性蛋白质,电镜观察了提取过程中荚膜、细胞壁以及胞内物质等细菌结构变化。将提取的菌毛、荚膜多糖和灭活的菌体作为抗原,蜂胶作佐剂,制成蜂胶疫苗,免疫鸡只,于7周龄进行同源攻毒保护试验,从保护指数、细菌分离和病变级数三方面比较了3种疫苗的免疫效果,试验结果表明:荚膜疫苗效果最好,菌体疫苗次之,菌毛疫苗最差;疫苗交叉保护试验表明菌毛疫苗和荚膜多糖疫苗都有血清型特异性而无明显交叉保护力。并利用微量凝集试验检测这3种蜂胶疫苗的抗体消长情况。

关键词 鸡; 致病性大肠杆菌; 菌毛; 荚膜多糖; 灭活疫苗; 亚单位苗

中图分类号 S852.43

鸡大肠杆菌病是由大肠埃希氏杆菌(*E.coli*)中的某些致病性菌株引起的鸡感染性疾病的总称。随着集约化养鸡业的发展,该病已成为危害养鸡业的重要传染病之一。

免疫接种是目前防治大肠杆菌病有效方法之一,也是我们研究的重点。致病性大肠杆菌通过菌毛来吸附或粘附于宿主细胞表面,是引起感染必须具备的条件(Beachey et al, 1981; Grymah et al, 1985; Naveh et al, 1984)。但是这种粘附作用能为抗菌毛抗体所阻止(Moon et al, 1981; Nagy et al, 1978; Naveh et al, 1984)。因而用菌毛制成疫苗来免疫保护鸡群成为可能(Grymah et al, 1985; 1986)。荚膜抗原也是表面抗原组成成分,巴氏杆菌荚膜疫苗早已有人研制(吴彤等, 1985),但大肠杆菌的荚膜的提取及制苗,至今尚未见报道。

本研究内容有:1、提取出菌毛、荚膜多糖制成疫苗;2、比较菌毛疫苗、荚膜疫苗和菌体灭活疫苗三者的免疫效果。目的是筛选出较为理想的一种疫苗,以便在防制本病上取得更好的效果。

1 材料和方法

1.1 主要材料

E.coli 菌株由华南农业大学动物医学系禽病研究室提供;试验鸡(石岐杂鸡)购于华南农业大学动物科学系试验鸡场;96孔聚乙烯微量反应板;牛血清白蛋白、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、无水乙醇均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 菌毛亚单位疫苗制备 菌毛表达的观察:将菌种按1:100的比例接种新鲜牛肉汤中37℃培养72h,然后3000g 4℃离心10min,沉淀的菌体用Tris-HCl缓冲液(0.05 mol/L

1994-12-26 收稿

pH7.3)洗3次。最后悬浮液用1%磷钨酸负染,于电镜下进行观察。

菌毛提取、纯化及菌毛观察:将上悬浮液于60℃下高速搅拌30 min(王永红等,1988),11 000 g 4℃离心20 min,取上清液重复离心一次,最后上清液为菌毛粗提物。菌毛粗提液中加入1 mL氯化镁溶液,使其浓度为0.1 mol/L(Grymah et al, 1985),于4℃静置12 h以上,4℃24 000 g离心45 min,收集菌毛沉淀,悬浮于0.05 mol/L pH 7.3 Tris-HCl缓冲液中,悬浮液用1%磷钨酸负染,电镜观察。

菌毛蛋白含量测定及疫苗配制:牛血清白蛋白作为标准蛋白,紫外吸收法测定菌毛蛋白含量为1.005 g/L。按每毫升菌毛抗原加15 mg蜂胶干物质,充分振荡后即成菌毛蜂胶疫苗。

1.2.2 荚膜亚单位苗制备(吴彤等,1984;1985;1986) 荚膜多糖提取:菌种按1:100接种于新鲜牛肉汤中,37℃培养24 h后置60℃水浴灭活1 h,振荡几次后置冰箱过夜,次日4 000 g离心25 min,收集上清,加入适量CTAB(预先水浴溶解),充分振荡后冰箱过夜,4000 g离心45 min,弃上清,收集沉淀,用原菌液量2.5%的去离子水研磨,再加入等量2 mol/L的CaCl₂溶液,振荡1 h,按体积比加入25%(v/v)预冷无水乙醇,充分振荡,冰箱过夜,4000 g离心25 min,弃沉淀,收集上清继续加入无水乙醇,使乙醇总量为80%(V/V),冰箱过夜,4000 g离心45 min,弃上清,收集沉淀。用原菌液量5%的去离子水研磨让其溶解,即为20倍浓度的荚膜多糖抗原。

菌体可溶性蛋白的提取:将1.2.2中第一次离心沉淀的菌体,按原菌液量5%加入3.8%NaCl溶液,充分振荡,冰箱过夜后4000 g离心25 min,上清液即为20倍浓度的可溶性蛋白。

提取过程中的细菌结构变化的观察:将刚培养好的细菌、水浴灭活的细菌以及经过3.8%NaCl溶液处理过的菌体,制成样品,进行电镜观察。

配苗:1份浓缩荚膜多糖抗原加1份浓缩可溶性蛋白抗原后按每毫升加入15 mg蜂胶干物质,充分振荡后即成荚膜多糖蜂胶疫苗。

1.2.3 菌体灭活苗制作 将菌种按1:100比例接种于新鲜牛肉汤中,37℃培养24 h,加入0.3%的福尔马林室温灭活2 d,检查无活菌后,每毫升加入15 mg蜂胶干物质即成传统的蜂胶灭活苗。抗原含量为 2×10^{12} CFU/L。

1.2.4 试验设计 免疫试验:试验鸡分为8个组,即为:荚膜多糖苗一免组、荚膜多糖苗二免组、菌毛苗一免组、菌毛苗二免组、灭活苗一免组、灭活苗二免组及阳性和阴性对照组。于3周龄时进行首免,所有的免疫鸡均肌注0.5 mL的疫苗;于5周龄时,二免组的鸡进行二免,每只鸡肌注1 mL。免疫部位为胸部肌肉。

疫苗同源保护试验:7周龄时通过胸肌用同源*E.coli*肉汤24 h培养物进行攻毒,攻毒量为 7×10^8 CFU/只(平板稀释计数法),观察一周后全部扑杀,麦康凯培养基接种作细菌检查;并观察气囊、心包、肝的病变;据病变程度定为0~4级:1级:气囊、心包混浊,轻度肝周炎;2级:浆液性气囊炎,心包炎,中度肝周炎;3级:纤维素性心包炎、气囊炎、肝周炎;4级:严重纤维素性气囊炎,心包炎,肝周炎。

疫苗交叉保护试验:7周龄通过胸肌用血清型O1和O78的24 h培养肉汤进行攻毒。O1, O78攻毒量分别为 5.2×10^8 CFU/只和 5.2×10^8 CFU/只(平板稀释计数法)。观察一周全部扑杀,麦康凯培养基接种作细菌检查,观察气囊、心包、肝的病变。

1.2.5 微量凝集试验检测抗体消长 阳性血清制备:用提取的菌毛、荚膜及灭活菌体分

别免疫成年健康兔,剂量为1 mL/只·次,免疫3次,第一次加福氏完全佐剂,两后掌及两腋窝免疫,后两次加福氏不完全佐剂,腹部皮下注射,1,2次之间相隔时间4周,第2,3次相隔2周,第3次免疫后1周静脉采血,用微量直接凝集法测定血清效价,菌毛疫苗为 2^9 ,荚膜疫苗为 2^5 ,菌体疫苗为 2^9 。

待检血清:免疫后2,4,6,9,12,14,19,27,33,40,46,67,90 d采血,0.5 mL/只,每组5份,尽可能避免采同只鸡,室温下静置,自然分离血清,备用。

抗原制备:培养菌种倒入装有普通琼脂的培养皿中 37°C 温箱培养24 h后,用无菌生理盐水适量洗下菌苔,洗液2 500 g 20 min离心2次,弃上清,菌泥用生理盐水稀释成1:6稀释度。 4°C 冰箱保存备用。

最佳反应条件的确定 最佳抗原工作浓度的选择:将1:6稀释的抗原再分别按1:2, 1:2², 1:2³, …… , 1:2¹¹, 1:2¹²倍稀释后,与阳性血清分别进行微量直接凝集试验。

判定标准:+++孔底可见细小沉淀点,边缘有大凝集片;++孔底可见沉淀点,边缘有明显凝集片;+孔底抗原沉淀为点状,边缘有较明显的凝集片;-:抗原在孔底沉淀为清晰的圆点状。结果表明 $1:6\times 2^4$ 为抗原最佳工作浓度。

最佳反应温度的确定:用阳性血清与 $1:6\times 2^4$ 稀释的抗原分别置于 37°C 和室温下进行微量凝集反应。结果表明 37°C 为最佳反应温度。

最佳反应时间确定:将 $1:6\times 2^4$ 稀释的抗原与3份阳性血清作微量直接凝集,置 37°C 感作,每小时观察一次,连续观察14 h。结果表明6 h为最佳反应时间。

1.2.6 微量直接凝集反应 在聚乙烯96孔“V”形孔反应板上进行。先用微量吸液器于1~12各孔加入50 μL 生理盐水。再加待检血清50 μL 于第一孔,依次作倍比稀释至第11孔,然后于每孔中加入抗原50 μL 。同时设阴性、阳性血清对照,轻微震荡,置 37°C 温箱作用6 h后观察结果,判定标准同上,以出现“++”的最高血清稀释倍数为血清的凝集价。

1.2.7 敏感性试验 在玻板和微量反应板上分别进行凝集反应,玻板上血清稀释至1:2⁵时反应呈“-”。而微量反应板上血清稀释至 2^9 仍有“++”。结果表明微量直接凝集试验敏感性明显高于玻板凝集试验。

1.2.8 特异性试验 将抗原分别与鸡新城疫、鸡法氏囊病和鸡霉形体阳性血清进行微量直接凝集试验。结果凝集价均不高于1:2,而鸡大肠杆菌阳性血清凝集价可达1:2⁹。说明本试验有较强特异性。

2 结果

2.1 菌毛、脱菌毛菌体、菌毛表达的电镜观察结果

细菌在牛肉汤中 37°C 培养72 h表达菌毛见图版1。脱了菌毛的菌体见图版2。电镜观察的菌毛图版3。

2.2 灭活前、灭活后细菌和用3.8%NaCl处理过菌体的电镜观察结果

灭活前细菌结构见图版4。灭活后菌结构见图版5。3.8%NaCl处理过菌体结构见图版6。

2.3 疫苗保护情况比较

2.3.1 疫苗同源保护情况比较 7周时攻毒,阳性对照鸡精神沉郁,羽毛蓬松,有关节炎,卧地不起,拉绿色粪便,并有死亡,而免疫鸡除有少量精神不振,拉绿稀粪,并有个别死亡,其余表现正常。观察一周后全部扑杀。试验结果见表1。

表 1 同源攻毒试验的结果

疫苗组	试验鸡数	死亡鸡数	保护指数/%	病变级数	分离细菌鸡数
菌毛苗一免组	10	2	50	1.100	5
菌毛苗二免组	10	0	100	0.400	2
菌体苗一免组	10	1	75	0.700	1
菌体苗二免组	10	0	100	0.500	3
荚膜苗一免组	10	0	100	0.200	1
荚膜苗二免组	10	0	100	0.300	1
阳性对照组	10	4		2.200	10
阴性对照组	10	0		0.000	0

2.3.2 疫苗交叉保护情况 攻毒后阳性对照鸡和免疫鸡均表现为有关节炎、卧地不起、拉绿色粪便,部分鸡全眼球炎、眼球变白、失明,有少量死亡。观察一周后全部扑杀,试验结果见表2和表3。

2.4 鸡免疫后抗体消长情况比较 各种疫苗抗体消长情况比较见图 1。

2.5 免疫期测定

每个免疫组都留5只鸡,免疫后3个月,通过胸肌用同源细菌进行攻毒,攻毒量为 7×10^8 CFU/只,观察一周,最后全部扑杀观察,并用麦康凯培养基分离细菌。结果所有的鸡都精神正常,无任何病变,也分离不出细菌。

表 2 异源菌株(血清型 O1)攻毒试验的结果

疫苗组	试验鸡数	死亡鸡数	病变级数	分离细菌鸡数
菌毛苗一免组	10	0	1.100	8
菌毛苗二免组	10	0	1.300	9
荚膜苗一免组	10	1	1.500	10
荚膜苗二免组	10	0	1.300	9
阳性对照组	10	1	1.300	10
阴性对照组	10	0	0.000	0

表 3 异源菌株(血清型 O78)攻毒试验的结果

疫苗组	试验鸡数	死亡鸡数	病变级数	分离细菌鸡数
菌毛苗一免组	10	0	2.600	10
菌毛苗二免组	10	2	2.400	10
荚膜苗一免组	10	1	2.200	9
荚膜苗二免组	10	2	1.900	10
阳性对照组	10	1	1.800	10
阴性对照组	10	0	0.000	0

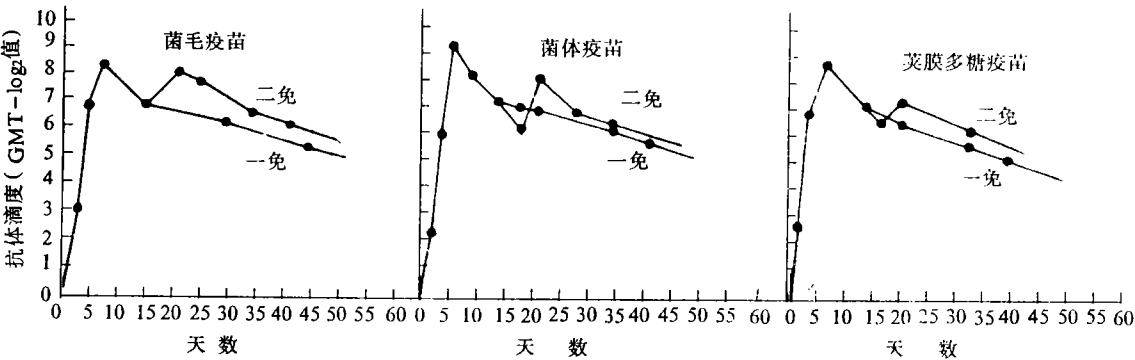


图 1 各疫苗抗体消长情况的比较

3 讨论与结论

本试验采用的微量直接凝集试验是一种敏感性高、特异性强、设备简单、方法简便的抗体检测方法。

从抗体消长的曲线来看,3种疫苗产生的抗体效价变化规律十分相似。免疫后2d可以检测到抗体,并且水平上升很快,到第6d达到抗体最高水平 $2^{8.4} \sim 2^{9.4}$,然后抗体水平出现下降,但下降的幅度不大;在14d时进行二免,抗体水平出现稍微下降或无明显变化,又在6d内达到第2个抗体高峰,以后稍微下降,其水平维持在 $2^5 \sim 2^6$,一直到3个月不变。抗体这种变化曲线是符合抗体产生的一般规律的,只是抗体出现和达到最高水平的时间如此的短,主要是所用疫苗的佐剂——蜂胶的作用,据沈志强等(1989;1990a;1990b)对禽霍乱蜂胶疫苗研究表明蜂胶疫苗接种后5d即产生较强免疫力,比氢氧化铝疫苗产生免疫力提早7~9d,且免疫期达6个月。本试验的免疫后6d抗体即达到最高水平,3个月时对鸡的攻毒全保护,此结果与之相符。蜂胶是一种良好的免疫佐剂,能增强机体特异性和非特异性免疫力,是一种有待开发的、有实际运用价值的新型佐剂。

同源保护试验的结果表明:从保护指数、病变级数、分离细菌三方面来比较,荚膜疫苗效果最好,菌体疫苗次之,菌毛疫苗最差。二免组的鸡保护效果要比一免组的鸡好,特别菌毛疫苗,经二免的加强作用后,其保护力大大加强。而交叉保护试验的结果表明:大肠杆菌菌毛疫苗和荚膜疫苗均没有交叉保护力,这与大肠杆菌灭活苗一样,具有血清型特异性。

综上所述,荚膜多糖疫苗免疫效果比菌毛疫苗和全菌体灭活苗要好。当然,有关载体的选择问题有待今后作进一步研究。

参 考 文 献

- 沈志强,杨永福.1989.禽霍乱蜂胶菌苗的研究.Ⅰ、制备工艺、安全性与免疫原性.中国畜禽传染病,5:1~3
- 沈志强,徐可利,杨永福,等.1990.禽霍乱蜂胶菌苗的研究.Ⅱ、菌苗的免疫期、保存期及免疫强度试验.中国畜禽传染病,4:15~16
- 沈志强,徐可利,陆峰,等.1990.禽霍乱蜂胶菌苗的研究.Ⅲ、禽霍乱蜂胶菌苗与氢氧化铝菌苗的免疫对比试验.中国畜禽传染病,5:18~19
- 王永红,刘兴汉,黄侠芳,等.1988.肠毒性大肠杆菌菌毛抗原987P和F41的提纯及部分特性分析.中国畜禽传染病,3:56~58
- 吴彤,缪玲,刘金胜.1984.禽霍乱荚膜多糖菌苗的研究.家畜传染病,1:36~38
- 吴彤,刘金胜,缪玲.1985.禽霍乱菌苗研究概况.中国兽医科技,2:32~35
- 吴彤,缪玲,刘金胜.1986.禽霍乱荚膜多糖菌苗的研究:菌苗制造与品质测定.中国兽医科技,5:3~6
- Beachey E H. 1981. Bacterial adherence: Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. J Infect Dis, 143:325~345
- Grymah J E, Panigrahy B. 1985. Immunogenicity of an oil-emulsified *Escherichia coli* (serotype O1) pili vaccine in chickens. Avian Dis, 29(4):1078~1083
- Grymah J E, Panigrahy B, Williams J D. 1986. Immunogenicity of an *Escherichia coli* Multivalent pilus vaccine in chickens. Avian Dis, 30:687~689

- Moon H W. 1981. Protection against Enteric colibacillosis in pigs sucking Orally vaccinated Dams: Evidence for pili as protective antigens. *Amer J Vet Res* 43:173 ~ 177
- Nagy B, Moo H W, Isaason R E C C, et al. 1978. Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic *Escherichia coli*: Selection of piliated forms in vivo, adhesion of piliated forms to epithelial cells in vitro, and incidence of a pilus antigen among porcine enteropathogenic *E. coli*. *Infect Immun*, 21:269 ~ 274
- Naveh M W, Znsman T, Skite, et al. 1984. Adherence pili in avian strains of *Escherichia coli*: Effect on pathogenicity. *Avian Dis*, 28:651 ~ 661

STUDIES ON THE SUBUNIT VACCINES OF ESCHERICHIA COLI (SEROTYPE O₂) PATHOGENIC TO CHICKENS

Li Jinhong Lin Weiqing Huang Shujian

(Dept. of Veterinary Medicine, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

The pili of *Escherichia coli* (serotype O₂) pathogenic to chicken were collected, roughly purified and observed under the transmission electron microscope (TEM). The polysaccharides of capsules and the soluble protein of *E. coli* were also extracted, and the structural changes of *E. coli* which occurred during the extraction were observed under TEM. With propolis as adjuvant, the antigens (the collected pili, the extracted polysaccharides of capsules and inactivated whole bacteria) were used to make three vaccines respectively. Through challenging 7-week-old broilers with the same serotype bacteria, the results of the protection index, bacteria isolation and lesion score showed that, the capsules polysaccharides vaccine was the best of the three, the inactivated whole bacteria vaccine came next, and the pili vaccine third. But 7-week-old broilers challenged with the different serotype bacteria could not be protected. The antibody levels of chickens induced by these three vaccines were measured by the microplate agglutination test.

Key words chicken; *E. coli* pili vaccine; inactivated bacteria vaccine; capsules polysaccharides vaccine; subunit vaccine

