

鸡大肠杆菌荚膜多糖——蛋白质抗原 免疫原性的研究*

黄淑坚 林维庆

(华南农业大学动物医学系, 广州, 510642)

摘要 用碳化二亚胺作为交联剂将荚膜多糖与载体蛋白质交联后加入蜂胶佐剂制成疫苗免疫鸡只。7周龄同源菌株攻毒结果表明, 荚膜多糖—破伤风类毒素苗组鸡有很好的保护效果且试验重复性好; 在免疫后3个月的同源攻毒保护指数也达13/20以上。但对异源菌株的攻毒没有明显保护效果。该研究采用微量法间接血凝试验检测了免疫鸡抗体水平。

关键词 鸡; 大肠杆菌; 荚膜多糖—蛋白质抗原; 免疫原性

中图分类号 S854.23

鉴于李晋红(1995)的研究结果: 荚膜亚单位苗比通用型灭活苗及菌毛亚单位苗均要好, 本试验进一步对鸡致病性大肠杆菌荚膜多糖—蛋白质抗原的免疫原性进行了研究, 目的是为研制一种新型且更有效的大肠杆菌亚单位疫苗提供理论依据和实验手段。

1 材料与方法

1.1 主要材料

E.coli 菌种由华南农业大学动物医学系禽病研究室提供; 实验鸡(石岐杂)购于华南农业大学动物科学系实验鸡场; 实验兔购于广东省畜牧科研所实验兔场; 绵羊红细胞购于广州市南方医院实验动物场; 碳化二亚胺(EDC)、牛血清白蛋白(BSA)、CaCl₂、Sephadex G-200等均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌(血清型 O₂) 荚膜多糖(CPS)的提取 参照李晋红(1995)的方法。

1.2.2 荚膜多糖中的多糖、蛋白质含量测定 用3,5-二硝基水杨酸法(北京大学生物系生物化学教研室, 1985)测定荚膜多糖液(CPS)中多糖含量及用紫外吸收法(刘玉斌, 1989)测定其中的蛋白质含量。

1.2.3 荚膜多糖—蛋白质抗原的制备 参照 Beuvery(1982;1983)方法稍作改进。称取125 mgEDC 溶解于7 mL的去离子水中, 然后加入50 mL TT(破伤风类毒素)(含1.7554 g/L蛋白质)和120 mL 荚膜多糖提取液(含742.4 mg/L的多糖)混合液, 用0.1 mol/L HCl调pH值为4.7, 室温过夜, 次日用25 mL 乙醇胺终止反应, 于去离子水透析一周, 即成荚膜多糖—破伤风类毒素抗原(CPS-TT), 加入0.01% 硫柳汞, 置4℃冰箱中保存。荚膜多糖与牛血清

1995-06-26收稿

* 广东省自然科学基金资助项目

白蛋白(CPS-BSA)的交联方法同上。

1.2.4 荚膜多糖-蛋白质交联物的生化鉴定 Sephadex G-200 柱层析的样品: CPS/EDC/TT、CPS/EDC/BSA、CPS/EDC(上面3个样品的制备同1.2.3)、TT液、BSA液。柱层析前先将样品7000 r/min离心10 min。

柱层析的工作条件是:柱大小为22.5 cm×2 cm;填料:Sephadex G-200;溶胀剂:去离子水;溶胀时间:室温下72 h;洗脱剂为0.02 mol/L pH7.2 PB 0.5 mol/L NaCl溶液;部分收集:使用BSZ-100自动部分收集器部分收集;样品量:4 mL;流速:3.4 mL/管,40.8 mL/h;检测器:岛津紫外分光光度计,于280 nm下检测。

1.2.5 疫苗配制 将CPS、CPS-TT、CPS-BSA、灭活菌体(按常规方法制备)按每毫升加入15 mg蜂胶的比例加入蜂胶干物质即配制成CPS苗、CPS-TT苗、CPS-BSA苗、通用型菌体灭活蜂胶苗。

1.2.6 疫苗的安全试验 将上面的4种疫苗分别肌注38日龄鸡3只,1 mL/只,观察2周,全部鸡均无异常表现,注射部位也没有坏死块出现,确认这4种疫苗安全后才用于鸡的免疫试验。

1.2.7 免疫试验及攻毒保护试验 免疫试验:免疫鸡均设有一免组和二免组,同时设立2个对照组,即:阳性对照组和阴性对照组,3周龄时首免,所有免疫鸡均肌注0.5 mL疫苗;5周龄时二免组鸡进行二免,每只肌注1 mL疫苗。

同源菌株攻毒保护试验:7周龄时免疫组和阳性对照组鸡用同源菌株攻毒,攻毒量为 8.5×10^8 CFU/只,攻毒后1周全部扑杀,观察心包、肝脏、气囊的病变。病变级数:0级:心包、肝脏、气囊没有任何肉眼可见的病变;1级:心包膜、气囊混浊,中度的肝周炎;2级:浆液性心包炎、气囊炎,中度的肝周炎;3级:纤维素性心包炎、纤维素性气囊炎、纤维素性肝周炎;4级:严重的纤维素性心包炎、纤维素性气囊炎、纤维素性肝周炎。

交叉攻毒保护试验:7周龄时免疫组和阳性对照组鸡用异源菌株血清型01和血清型078攻毒,血清型01的攻毒量为 9×10^8 CFU/只,血清型078攻毒量为 10×10^8 CFU/只,攻毒后1周全部扑杀,观察心包、肝脏、气囊的病变。

同源攻毒的免疫期的测定:免疫后3个月免疫组和阳性对照组鸡用同源菌株攻毒。攻毒量为 18.4×10^8 CFU/只,攻毒1周后全部扑杀,观察心包、肝脏、气囊的病变。

重复试验:将4℃下保存4个月CPS-TT和通用型菌体灭活苗作重复试验。7周龄时所有免疫鸡及阳性对照组鸡用同源菌株攻毒,攻毒量为 6.8×10^8 CFU/只,攻毒后1周全部扑杀,观察心包、肝脏、气囊的病变。

1.2.8 微量法间接血凝试验检测抗体消长 阳性血清制备:每次用1.5 mL CPS免疫健康公兔,共免疫4次,隔周1次,第1次加等量佛氏完全佐剂,后面3次加等量佛氏不完全佐剂,分点皮下或肌肉注射,最后1次免疫后1周心脏采血,分离血清,用微量法间接血凝试验测定其效价为 2^{-6} 。

致敏绵羊红细胞制备:用CPS作为致敏源,按刘玉斌(1989)方法制备。

致敏红细胞的特异性反应:将致敏红细胞与IBD、EDS和鸡白痢的标准的阳性血清进行间接血凝反应。

微量法间接血凝试验:按刘玉斌(1989)方法。

2 结果

2.1 荚膜多糖提取液中多糖和蛋白质含量的测定

多糖、蛋白质含量分别为 742.4 mg/L 和 496.3mg/L。

2.2 荚膜多糖－蛋白质交联物的柱层析结果

CPS/EDC/TT、TT 液、CPS/EDC/BSA、BSA、CPS 分别在 18 管、23管、8 管和 21 管、13 管、21 管处出峰值。根据分子筛柱层析的效应原理可以看出，CPS/ EDC/TT 的反应物中形成一种比 TT 液和 CPS/EDC 的反应物均要大的大分子物质，即 CPS－TT 抗原；同样的，CPS/EDC/BSA 的反应物中也形成一种比 BSA 液和 CPS/EDC 的反应物均要大的大分子物质，即 CPS/BSA 抗原。

2.3 疫苗攻毒保护效果比较

2.3.1 疫苗同源菌株攻毒保护效果比较 7 周龄时攻毒，攻毒后阳性对照组鸡均表现极度的精神沉郁，羽毛松乱，拉绿色粪便，关节炎，卧地不起。CPS 苗免疫组鸡少数出现精神沉郁，关节炎和拉绿色粪便，并在一免组内有 1 只鸡死亡。其他免疫组鸡除个别出现精神沉郁，关节炎和拉绿色粪便外，均表现正常。观察 1 周后全部扑杀。试验结果见表 1。

表 1 同源菌株攻毒试验的结果

组别	试验鸡数	死亡鸡数	平均病变级数	保护指数 ⁽¹⁾
CPS－TT 苗一免组	10	0	0.5	11/16
CPS－TT 苗二免组	10	0	0.2	14/16
CPS－BSA 苗一免组	10	0	0.8	8/16
CPS－BSA 苗二免组	10	0	0.7	9/16
CPS 苗一免组	10	1	1.3	3/16
CPS 苗二免组	10	0	0.9	7/16
菌体灭活苗一免组	10	0	1.1	5/16
菌体灭活苗二免组	10	0	0.8	8/16
阳性对照组	10	0	1.6	—
阴性对照组	10	0	0.0	—

(1)保护指数 = (阳性对照组平均病变级数－免疫组平均病变级数)/ 阳性对照组平均病变级数。表 2,3 同。

2.3.2 疫苗的交叉保护效果 于 7 周龄时进行攻毒，攻毒后阳性对照组鸡和免疫组所有鸡均表现极度精神沉郁，拉绿色粪便，关节炎，卧地不起，出现全眼球炎，眼球变白、失明，而且在 CPS－BSA 苗组、CPS 苗组及菌体灭活苗组分别出现 3 只、1 只、1 只的死亡。观察 1 周后全部扑杀，所有免疫鸡的平均病变级数均十分接近甚至超过阳性对照组鸡的平均病变数。

2.3.3 免疫期测定情况 免疫后 3 个月，通过胸肌用同源菌株进行攻毒，攻毒后阳性对照组鸡均表现极度的精神沉郁，食欲明显下降，拉绿色粪便，个别出现关节炎，卧地不起，并有 1 只死亡。菌体灭活苗组和 CPS 苗组的鸡也均表现轻度的精神沉郁和食欲下降，个别鸡也表现有关节炎，卧地不起，并在菌体灭活苗一免组和二免组内各有 1 只死亡。而 CPS－TT 苗组和 CPS－BSA 苗组均表现正常。观察 1 周后全部扑杀。试验结果见表 2。

2.3.4 重复试验情况 7 周龄时攻毒，攻毒后阳性对照组鸡均表现极度的精神沉郁和

食欲下降,拉绿色粪便,个别鸡出现关节炎,卧地不起,并有 2 只死亡。免疫鸡均表现正常,不见有死亡。观察 1 周全部扑杀,试验结果见表 3。

表 2 免疫后 3 个月同源菌株攻毒试验的结果

组 别	试验鸡数	死亡鸡数	平均病变级数	保护指数
CPS-TT 苗一免组	5	0	0.7	13/20
CPS-TT 苗二免组	10	0	0.5	15/20
CPS-BSA 苗一免组	5	0	1.4	6/20
CPS-BSA 苗二免组	10	0	1.2	8/20
CPS 苗一免组	5	0	1.6	4/20
CPS 苗二免组	10	0	1.2	8/20
菌体灭活苗一免组	5	1	1.6	4/20
菌体灭活苗二免组	10	1	1.2	8/20
阳性对照组	10	1	2.0	—
阴性对照组	10	0	0.0	—

表 3 重复试验的试验结果

组 别	试验鸡数	死亡鸡数	平均病变级数	保护指数
CPS-TT 苗一免组	10	0	0.4	16/20
CPS-TT 苗二免组	10	0	0.1	19/20
菌体灭活一免组	10	0	1.1	9/20
菌体灭活二免组	10	0	0.6	14/20
阳性对照组	10	2	2.0	—
阴性对照组	10	0	0.0	—

2.4 微量法间接血凝试验检测抗体滴度

2.4.1 间接血凝试验的特异性反应 致敏 SRBC 均不与 IBD、MG、EDS-76、鸡白痢标准阳性血清发生特异性反应,具有很高的特异性。

2.4.2 微量法间接血凝试验检测抗体消长情况 首免后 5 d,抗体快速上升达到较高水平,至免疫后 7 d 达到最高峰,然后缓慢下降,免疫后 29 d 下降到最低峰,之后缓慢上升,至免疫后 3 个月还能检测到抗体;二免后 3 d,抗体快速上升达到高峰,然后缓慢下降,于二免后 16 d 下降到最低峰,然后又缓慢上升。3 组免疫鸡的抗体消长十分相似。

3 讨论与结论

试验中的微量法间接血凝试验是一种敏感性高、特异性强、设备简单和易行的检测方法。免疫鸡抗体出现和达到最高水平的时间如此的短,诸多研究(沈志强等,1989;1990a;1990b;李晋红等,1995)认为主要是所用疫苗的佐剂——蜂胶的作用。

同源攻毒试验结果表明,大肠杆菌载体亚单位疫苗有良好的免疫原性,两种荚膜多糖—载体蛋白质苗的保护效果比通用型菌体灭活蜂胶苗和单纯的荚膜多糖苗要好。而从两种载体亚单位疫苗间保护效果比较来看,荚膜多糖—破伤风类毒素苗比荚膜多糖—牛血清白蛋白苗好,这再次证实破伤风类毒素的载体效应比牛血清白蛋白要好(Beuvery,1983),免疫

鸡对异源菌株的攻毒均没有保护效果,说明其荚膜抗原具有很强的菌型和血清型特异性。

综上所述,可以看出大肠杆菌荚膜多糖-蛋白质苗是一种使用安全、副作用小、保护效果较好、免疫期较长的载体亚单位苗。

参 考 文 献

北京大学生物系生物化学教研室编. 1985. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 22 ~ 24

李晋红, 林维庆, 黄淑坚. 1995. 鸡病原性大肠杆菌 (O_2) 亚单位疫苗的研究. 华南农业大学学报, 16(3): 72 ~ 78

刘玉斌. 1989. 动物免疫学实验技术. 吉林: 吉林科学技术出版社, 33

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. 1990a. 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. 1990b. 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

Beuvery E C, Fred R, Jaap N, et al. 1982. Comparison of the induction of immunoglobulin M and G antibodies in mice with purified pneumococcal (type 3) and Meningococcal group C polysaccharides and their protein conjugates. Infection and Immunity, 7: 15 ~ 22

Beuvery E C, Rob W D, Frank M, et al. 1983. Immunological evaluation of meningococcal group C polysaccharides-tetanus toxoid conjugates in mice. Infection and Immunity, 1: 609 ~ 617

STUDIES ON THE IMMUNOGENICITY OF ANTIGENS OF CHICKEN PATHOGENIC *Escherichia coli* CAPSULAR POLYSACCHARIDES-PROTEIN CONJUGATES

Huang Shujian Lin Weiqing

(Dept. of Vet. Med., South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

Conjugation of capsular polysaccharides with carrier protein was carried out with N'-ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) as the coupling agent. The mean lesion score values of capsular polysaccharides (CPS)-tetanus toxoid (TT) (CPS-TT) groups showed that they provided significant protection against challenge with the same serotype strain in 7-week-old broilers. Moreover, the CPS-TT groups still exhibited more than 13/20 protection indices three months post-vaccination. All broilers challenged with different serotype strains could not be protected. The antibody levels of chickens induced by vaccines were measured with the microplate indirect hemagglutination test.

Key words chicken; *Escherichia coli*; capsular polysaccharides-carrier protein antigen; immunogenicity