

禽大肠杆菌血清型 O₂、O₇₈融合双价弱毒菌株免疫原性的研究^{*}

罗贤忠¹ 黄青云¹ 林泰松²

(1 华南农业大学动物医学系, 广州 510642; 2 广州粮油食品进出口公司)

摘要 试验鸡在 10 d 龄用禽大肠杆菌 O₂、O₇₈融合双价弱毒菌苗免疫, 免疫后 14 d 对 O₂、O₇₈强毒株攻击的保护率分别为 73% 和 80%, 免疫后 42 d 的保护率分别为 66.7% 和 73.3%, 与对照组比较差异极显著 ($P < 0.01$). 采用 ELISA 检测免疫鸡血清抗 O₂、O₇₈ 的 IgM、IgG、IgA 等类抗体的消长情况, 结果显示, 血清中各类抗体的 ELISA 总滴度与保护效果呈正相关. 其中, IgM 在免疫后 2 周内起主要保护作用, IgG 在 2 周后起主要保护作用, IgA 在血清中出现迟缓.

关键词 大肠杆菌; 弱毒菌苗; 酶联免疫吸附测定; 免疫原性

中图分类号 S 852.612

黄青云等(1996)选取禽致病性大肠杆菌最主要的 2 个血清型 O₂ 和 O₇₈, 分别用氟哌酸(Nor)、氯霉素(Chl)诱导成耐药标记弱毒菌株 O₂(Nor^r, Chl^r)、O₇₈(Chl^r, Nor^r)并以它们作亲本, 通过原生质体融合技术, 培育成为 O₂ 和 O₇₈融合双价弱毒菌株. 经安全试验及免疫试验, 证明其对鸡为安全有效的双价弱毒菌苗株. 本试验进一步对该融合双价弱毒菌株的免疫原性进行研究, 用 ELISA 检测免疫鸡血清中抗 O₂ 和 O₇₈ 的 IgM、IgG、IgA 等类抗体的消长规律, 为该融合双价弱毒菌株作为活苗株应用于生产实际及制定免疫程序提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 主要材料

禽大肠杆菌 O₂ 和 O₇₈融合双价弱毒菌株由黄青云培育; 禽大肠杆菌 O₂ 菌株由黄青云从病鸡中分离, 经中国兽医药品监督检验所鉴定; 禽大肠杆菌 O₇₈菌株由中国兽医药品监督检验所提供. 实验兔购于广州军区军事医学研究所; 实验鸡(AA 鸡)1 d 龄购于广东正大康地有限公司种鸡场, 严格饲养; 辣根过氧化物酶标记抗鸡 IgG 单克隆抗体(HRP-McAb)由广东省农科院兽医研究所杜伟贤研究员惠赠; 鸡阴性血清(SPF 鸡血清)由扬州大学农学院 SPF 鸡场提供; 辣根过氧化物酶(HRP, 上海丽珠东风生物技术有限公司 R、Z > 3.0); 聚苯乙烯反应板(4×10 孔, 上海塑料三厂).

1.2 方法

免疫试验及攻毒保护试验: 取 10 d 龄 AA 鸡 60 只, 每只肌注 O₂ 和 O₇₈融合双价弱毒菌株的 24 h 肉汤培养物 1 mL (1.45×10^8 CFU/只), 另取 50 只同批 AA 鸡作非免疫对照.

免疫后 14 d 随机取 30 只免疫鸡编号并分为 A、B 两组, 每组 15 只; 另取 30 只对照鸡编

号并分为 C、D 两组 每组 15 只. A、C 两组用 O₂ 强毒株攻击, 攻毒量为 4.5×10^8 CFU/只; B、D 两组用 O₇₈ 强毒株攻击, 攻毒量为 5.5×10^8 CFU/只, 攻毒后观察 10 d 记录死亡数并剖检分离大肠杆菌, 到第 10 d 剖检存活鸡检出大肠杆菌病鸡数(以出现心包炎、肝周炎为发病判定标准).

免疫后 42 d 另将 30 只免疫鸡编号并分为 E、F 两组 每组 15 只; 20 只对照鸡编号并分为 G、H 两组 每组 10 只. E、G 组用 O₂ 强毒株攻击, 攻毒量为 13.7×10^8 CFU/只; F、H 组用 O₇₈ 强毒株攻击, 攻毒量为 10.7×10^8 CFU/只. 观察与记录同上.

ELISA 检测免疫鸡血清抗体消长: 待检免疫鸡血清样品的采集. 试验鸡于免疫前和免疫后第 7、14、21、28、35、42 d 翅静脉采血, 其中在免疫后第 14、42 d 先采血后攻毒, 血样按攻毒鸡号码编号; 其它时间采血, 试验组与对照组各采 18 羽份, 血液凝固后 $2\,000\text{ r/min}$ 离心 5 min 分离血清, 20°C 保存.

HRP-兔抗鸡 IgM、IgG (HRP-RaCM) 的制备. 按李庆章等(1991)方法粗制鸡 IgM, 进一步纯化改用 Sephadex G-200 层析柱($d\ 2\text{ cm} \times 10\text{ cm}$)过滤, 用 PBS 洗脱, 收集第 1 峰洗脱液浓缩, 经免疫电泳鉴定纯度后, 免疫家兔制备高免血清, 按刘玉斌等(1989)方法提取兔 γ -球蛋白, 再经 Sephadex G-200 层析柱($d\ 2\text{ cm} \times 10\text{ cm}$)过滤提取 IgG 部份, 按郭春祥等(1983)进行 HRP 标记, 确定其工作浓度为 $1:2\,000$.

HRP-兔抗鸡 IgA、IgG (HRP-RaCA) 的制备. 按李庆章等(1989)方法从鸡胆汁中提纯 IgA, 再按上述制备 HRP-RaCM 的有关步骤制备 HRP-RaCA, 确定其工作浓度为 $1:1\,000$.

O₂、O₇₈ 包被抗原的制备. 参照 Cabrial 等(1990)方法 将血清型 O₂、O₇₈ 强毒菌分别接种于一定体积的营养肉汤中 37°C 培养 16 h, 用 PBS 于 4°C 离心洗涤 3 次, 每次 $4\,080\text{ g}$ 离心 30 min. 最后沉淀用一定量 PBS 悬浮, 于超声波细胞粉碎机粉碎至基本透明.

ELISA 程序. 按刘玉斌等(1989)方法操作, 包被抗原浓度为 2×10^{11} 菌/L, 每孔加 $100\ \mu\text{L}$; 抗原致敏板用体积分数 10% 小牛血清每孔 $150\ \mu\text{L}$ 于 37°C 封闭 2 h; 测定 IgM、IgG 时血清作 $1:400$ 稀释, 测定 IgA 时作 $1:100$ 稀释, 每份血清作 2 个重复孔, 于酶联免疫检测仪读取 OD_{490} 值, 计算阳性 $OD_{490}(P)$ 与阴性 $OD_{490}(N)$ 的平均值.

ELISA 滴度与 P/N 比值的回归方程. 参照 Briggs 等(1984)方法 以工作浓度的抗原和各类酶标记抗体按间接 ELISA 程序系列测定 18 份免疫时间不同的试验鸡血清, 测得下列直线回归方程:

抗 O₂ IgG $\ln ET = 5.47 + 0.584 a$, IgM $\ln ET = 5.01 + 1.090 b$, IgA $\ln ET = 3.76 + 0.801 c$.

抗 O₇₈ IgG $\ln ET = 5.08 + 0.884 a$, IgM $\ln ET = 4.32 + 1.752 b$, IgA $\ln ET = 4.07 + 0.574 c$.

a 、 b 为血清 $1:400$ 稀释时的 P/N 比值; c 为血清 $1:100$ 稀释时的 P/N 比值; ET 为血清的 ELISA 滴度.

将测得的待检血清 P/N 比值代入相应回归方程, 计算抗体滴度 ($\ln ET$), 绘出抗体滴度消长曲线, 分析抗体滴度与保护效果的关系.

2 结果

2.1 双价弱毒菌株对鸡的免疫保护效果

对照组的鸡在攻毒后表现极度精神沉郁和食欲下降, 陆续死亡; 免疫组的鸡仅个别出现 1~2 d 精神和食欲略差. 试验结果见表 1.

表 1 攻毒试验结果

组 别	$t_{免}/d$	攻毒血清型	试验鸡数	死亡数	大肠杆菌病鸡数	保护率 ¹⁾ (%)	
免疫组	A	14	O ₂	15	2	2	73.3
	B	14	O ₇₈	15	2	1	80.0
	E	42	O ₂	15	3	2	66.7
	F	42	O ₇₈	15	2	2	73.3
对照组	C	14	O ₂	15	11	4	0.0
	D	14	O ₇₈	15	14	1	0.0
	G	42	O ₂	10	6	4	0.0
	H	42	O ₇₈	10	5	5	0.0

1) 保护率=(试验鸡数-大肠杆菌病、死鸡数)/试验鸡数

2.2 ELISA 检测免疫鸡各类抗体滴度(lnET)

用间接 ELISA 检测免疫前和免疫后第 7、14、21、28、35、42 d 的各类抗体滴度(lnET)见表 2。IgA 于免疫后 35 d 才测到, 滴度低且上升缓慢。

表 2 ELISA 检测免疫鸡血清抗体滴度(lnET)

$t_{免}/d$	抗血清型 O ₂		抗血清型 O ₇₈	
	IgM	IgG	IgM	IgG
0	6.12±0.121	6.26±0.312	6.07±0.119	6.25±0.314
7	7.17±0.561	6.16±0.128	7.87±0.618	6.13±0.202
14	7.93±0.615	6.82±0.323	8.84±1.055	6.90±0.287
21	7.65±0.425	7.27±1.061	8.48±1.013	7.02±0.582
28	7.33±0.581	7.41±0.747	8.14±0.610	7.62±0.809
35	7.24±0.427	7.77±0.737	7.81±0.716	7.64±0.884
42	6.94±0.520	7.65±0.928	7.19±0.671	7.69±0.809

2.3 ELISA 检测抗体滴度变化曲线

免疫鸡抗 O₂ 各类抗体消长曲线见图 1, 抗 O₇₈ 各类抗体消长曲线见图 2。

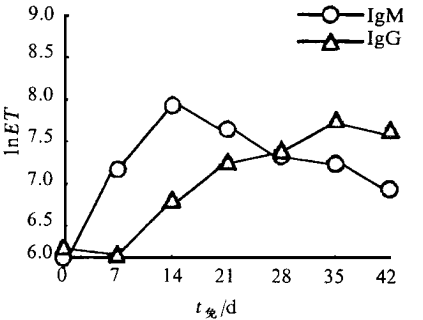


图 1 抗血清型 O₂ 抗体滴度消长曲线

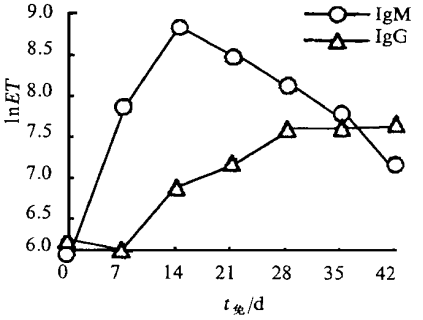


图 2 抗血清型 O₇₈ 抗体滴度消长曲线

2.4 血清各类抗体 lnET 与攻毒保护关系

将免疫鸡按血清各类抗体 lnET 由高至低分为 3 组, 每组 5 只, 检测各类抗体 lnET 与同源攻毒保护关系结果见表 3、4。

表 3 免疫后 14 d 抗 O₂、O₇₈各类抗体 lnET 与同源攻毒保护情况

组别	抗体类型	抗血清型 O ₂		抗血清型 O ₇₈	
		平均 lnET	保护情况	平均 lnET	保护情况
免	IgM	8.724±0.385	5/5	9.868±0.317	5/5
		7.691±0.292	4/5	8.840±0.275	5/5
		7.278±0.098	2/5	7.608±0.465	2/5
疫	IgG	7.102±0.109	5/5	7.058±0.037	5/5
		6.860±0.074	3/5	6.989±0.053	3/5
		6.402±0.214	3/5	6.326±0.448	4/5
组	IgM+IgG	15.282±0.276	5/5	16.756±0.363	5/5
		14.672±0.279	4/5	15.728±0.313	5/5
		14.098±0.159	2/5	14.216±0.734	2/5
对	IgM	6.210±0.113	0	6.112±0.052	0
		6.251±0.314	0	6.151±0.314	0
		12.461±0.221	0	12.263±0.116	0

表 4 免疫后 42 d 抗 O₂、O₇₈各类抗体 lnET 与同源攻毒保护情况

组别	抗体类型	抗血清型 O ₂		抗血清型 O ₇₈	
		平均 lnET	保护情况	平均 lnET	保护情况
免	IgM	7.274±0.251	5/5	7.961±0.168	5/5
		6.040±0.227	3/5	7.112±0.564	4/5
		6.360±0.039	2/5	6.350±0.009	2/5
疫	IgG	8.748±0.729	5/5	8.312±0.606	5/5
		7.110±0.282	3/5	7.291±0.186	5/5
		6.680±0.174	2/5	6.709±0.369	1/5
组	IgA	5.764±0.762	5/5	6.044±0.416	3/5
		4.970±0.143	2/5	5.420±0.137	4/5
		4.642±0.121	3/5	5.081±0.162	4/5
对	IgM+IgG+IgA	21.138±0.539	5/5	21.451±1.315	5/5
		19.102±0.374	3/5	19.760±0.511	4/5
		17.662±0.739	2/5	18.431±0.398	2/5
照	IgM	6.100±0.075	0	6.071±0.121	0
		6.129±0.078	0	6.061±0.213	0
		4.590±0.052	0	4.652±0.016	0
组	IgM+IgG+IgA	16.729±0.068	0	16.783±0.117	0

3 讨论与结论

融合双价弱毒菌苗免疫后 14 d 和免疫后 42 d 对血清型 O₂、O₇₈强毒株攻击具有 73.3%、80.0%和 66.7%、73.3%的保护效果($P<0.01$);诱导鸡体产生的抗 O₂ 和抗 O₇₈的抗体效价消长规律基本相同,并符合弱毒菌苗诱导抗体产生的一般规律.2 个血清型的抗体总滴度分别与其相同血清型强毒攻击的保护率成正相关,表明融合双价弱毒菌苗诱导的体液免疫起重要的作用.在免疫后 14 d 攻毒试验中,IgM 在血清中占主导地位,起主要保护作用;在免疫后 42 d 攻毒试验中,IgG 则起主要保护作用.试验结果综合表明融合双价弱毒菌株既具有优良的 O₂ 菌株免疫原性,又具有优良的 O₇₈ 菌株免疫原性.对肉用品种 AA 鸡来

说,一次免疫即能使之于上市前有效抵抗禽大肠杆菌 O₂、O₇₈ 的侵袭.同时,本试验建立的 ELISA 方法是可用于监测该双价弱毒菌苗免疫效果的特异、灵敏、准确、快速的方法.

本实验因时间关系, IgG 水平的下降和 IgA 的高峰尚未测到.同时,对融合双价弱毒菌株作为一种活苗,能否通过口服或喷雾免疫,刺激局部粘膜免疫系统来抵抗这 2 个血清型大肠杆菌模拟其自然感染途径的攻击,以及该双价弱毒菌株诱导鸡体产生的细胞免疫情况如何等,都有待于进一步研究.

参 考 文 献

- 刘玉斌, 苟仕金. 1989. 动物免疫学实验技术. 长春: 吉林科学技术出版社, 9~10, 153
- 李庆章, 刘忠贵. 1991. 鸡免疫球蛋白 MFc(IgMFc)重链的分离纯化及其抗血清的制备. 东北农学院学报, 22(3): 243~249
- 李庆章, 刘忠贵. 1989. 鸡免疫球蛋白 AFc(IgAFc)重链的分离纯化及其抗血清的制备. 兽医大学学报, 9(2): 155~158
- 郭春祥, 郭锡琼. 1983. 介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法. 上海免疫学杂志, 3(2): 97~100
- 黄青云, 任 涛, 欧守抒. 1996. 禽大肠杆菌 O₂ 与 O₇₈ 原生质体融合的研究. 见: 中国畜牧兽医学会主编. 中国畜牧兽医学会第十届全国会员代表大会暨学术年会论文集. 北京: 中国农业大学出版社, 188~192
- Gabrial L, Down M, Naomy D, et al. 1990. An enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Escherichia coli*: Association between indirect hemagglutination test and survival. Avian Diseases, 34: 58~62
- Briggs D J, Skeeles J K. 1984. An enzyme-linked immunosorbent assay for detecting antibodies to pasteurized *Salmonella multocida* in chicken. Avian Diseases, 28(1): 208~215

STUDIES ON IMMUNOGENICITY OF A FUSION BIVALENT ATTENUATED STRAIN OF *E. coli* O₂ AND O₇₈ FROM POULTRY

Luo Xianzhong¹ Huang Qingyun¹ Lin Taisong²

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

2 Guangzhou Oils & Foodstuffs Import & Export Co.)

Abstract

Chicks were vaccinated with the fusion bivalent attenuated vaccine(FBAV) of *E. coli* O₂ and O₇₈ at 10 days of age and challenged with virulent *E. coli* O₂ and O₇₈ respectively when 25、52 days old. The protective rates against O₂ and O₇₈ were 73.3% and 80.0% at 14 days post-immunization respectively and 66.7% and 73.3% at 42 days post-immunization respectively compared with that of control groups, showing significant difference ($P < 0.01$). The titers of IgM, IgG and IgA in chicken sera vaccinated with FBAV were measured by ELISA. The results showed a high correlation between the protective rates and total titers of antibodies. Protection was mainly due to IgM at 2 weeks after vaccination, while IgG played the major role at 6 weeks post-immunization. The titer of IgA in serum was very low, detected only at 35 days post-immunization and increasing slightly later. The experimental results suggested that FBAV exhibited good immunogenicity against *E. coli* O₂ and O₇₈.

Key words: *E. coli*; attenuated vaccine; ELISA; immunogenicity