

鸡大肠杆菌(*O*₇₈)超声波灭活菌苗研究^{*}

陈水龙 丘振芳 林维庆

(华南农业大学动物医学系, 广州 510642)

摘要 菌毛提取液、荚膜多糖—破伤风类毒素(CPS—TT)载体抗原液及热、甲醛和超声波灭活菌液中加入蜂胶佐剂, 制成菌苗免疫石岐杂鸡, 77及112 d攻毒保护试验结果表明, 超声波灭活菌体的免疫原性最好, 热灭活菌体最差, 菌毛、CPS—TT及甲醛灭活菌体的免疫原性相当。间接血凝试验(IHA)较微量凝集试验对抗大肠杆菌(*E. coli*)抗体更敏感, 尤其采用超声波处理的菌液作抗原为明显。

关键词 鸡; 大肠杆菌; 超声波; 微量凝集试验; 间接血凝试验

中图分类号 S 854.23

近年来鸡大肠杆菌病已随着养禽业的发展成为当代养禽业中危害最严重的疾病之一。除了严格的饲养管理和卫生防疫措施以及合理的药物防治外, 免疫接种是控制本病的最有效措施。李晋红等(1995)研究认为荚膜多糖(CPS)蛋白质结合菌苗比通用型灭活菌苗及菌毛菌苗的免疫效果好。通过化学试剂把CPS与破伤风类毒素(TT)交联成荚膜多糖—破伤风类毒素(CPS—TT), 可进一步提高其免疫原性(黄淑坚等, 1996)。

本研究旨在前人工作的基础上研究超声波灭活菌体菌苗, 并比较菌毛、CPS—TT、及通用型灭活菌苗对鸡的免疫原性。

1 材料和方法

1.1 主要材料

E. coli *O*₇₈菌种由华南农业大学动物医学系禽病学研究室提供, 试验鸡购于华南农业大学动物科学系实验禽场, 实验兔购自广东省农科院畜牧研究所实验兔场, 绵羊血购自广州市南方医院实验动物场; 碳化二亚胺、CaCl₂、十六烷基三甲基溴化铵等均为分析纯。

1.2 方法

大肠杆菌的培养: 采用韩文瑜(1992)介绍的方法及由此改进而来的摇瓶培养方法。

菌毛的提取: 按李晋红等(1995)的方法进行。

荚膜多糖—破伤风类毒素抗原的制备: 按林世棠等(1984)采用高渗NaCl提取CPS, 按黄淑坚等(1996)的方法制备CPS—TT载体抗原。

菌体的灭活: 按Melamed等(1990)的方法采用热、甲醛和超声波结合 γ —射线辐射灭活法进行, 并比较了在功率为220 V, 1.0、1.2、1.4和1.6 A下超声波对*E. coli* *O*₇₈的灭活效果。

菌苗的制备: 往菌毛、CPS—TT及热、甲醛和超声波灭活菌体等抗原液中将蜂胶干物质按15 g/L的量加入蜂胶佐剂制成菌苗。

1997-12-22 收稿 陈水龙, 男, 26岁, 硕士

^{*} 广东省自然科学基金(90106)资助项目

试验设计: (1)安全试验. 将上述菌苗分别注射 7 周龄黄鸡经确认对鸡只安全后才用于免疫试验. (2)免疫试验. 试验鸡分成 7 个组, 1~5 组分别为热、甲醛、超声波灭活菌体菌苗和菌毛菌苗以及 CPS—TT 菌苗免疫组, 设立阴性及阳性对照组. 试验组分别于第 8 和第 11 周接受 2 次免疫, 剂量分别为 1 和 1.5 mL/只, 肌肉注射. (3)同源菌株攻毒保护试验. 5 个试验组及阳性组分别于第 77 及第 112 d 用 10^9 CFU/只的强毒攻毒, 观察 2 周后扑杀, 检察心包膜、气囊膜及肝脏的病变, 并进行细菌分离与鉴定, 计算平均病变级数及保护率.

抗体效价检测: (1)阳性血清的制备. 用超声波灭活菌液免疫健康公兔, 每次 1.5 mL/只共免疫 4 次, 间隔 1 周, 首免加等量弗氏完全佐剂(CFA), 二免加等量弗氏不完全佐剂(IFA), 三免及未免不加佐剂, 分点皮下注射, 未免后 15 d 心脏采血分离血清. (2)抗体效价检测. 采用间接血凝试验(IHA)(黄淑坚等, 1996)和微量直接凝集试验(MA)(李晋红等, 1995)检测抗体, 分别用超声波和高温处理 *E. coli* O₈ 菌液制成 IHA 抗原, MA 抗原为非着色菌体和结晶紫草酸染液着色菌体.

2 结果

2.1 菌液的制备

摇振条件下用营养肉汤培养的菌液浊度大, 活菌数多, 可达 $5 \times 10^{12} \sim 8 \times 10^{12}$ CFU/L; 静置条件下菌液呈半透明, 菌体易下沉形成沉淀, 活菌数通常不超过 1×10^{11} CFU/L.

2.2 超声波灭活效果

菌液在 220 V 1.2 A 下作用 15 min 即可获得 93.4%(通常在 90%~95%之间)的灭活效果.

2.3 不同疫苗的保护效果比较

首免后 21 d 疫苗源菌株攻毒保护试验结果: 攻毒后阳性组鸡均表现极度的精神沉郁、羽毛松乱、拉绿色稀粪、卧地不起并有 2 只死亡; 热灭活菌苗及 CPS—TT 亚单位菌苗免疫组鸡只精神状态较差, 拉绿色粪便, 并各有一只死亡, 其他菌苗免疫鸡除个别精神稍差、下绿色粪便外, 表现正常, 结果见表 1.

二免后 40 d 疫苗同源菌株攻毒保护试验结果: 攻毒后阳性对照组鸡精神状态最差, 羽毛松乱, 个别下绿色稀粪, 卧地不起; 热灭活菌苗免疫组(1 组)个别鸡精神状态较差, 下绿粪, 其他组别的鸡临诊表现均较正常; 全部攻毒鸡只在观察期内均未出现死亡, 结果见表 2.

表 1 首免后 21 d 同源菌株攻毒保护试验结果¹⁾

组别	日龄	试验鸡数	死亡鸡数	平均病变级数	细菌分离数	保护指数/%
1	77	6	1	1.5	3	25
2	77	6	0	1.1	1	45
3	77	6	0	0.8	0	60
4	77	6	0	0.8	0	60
5	77	6	1	0.9	1	55
阳性组	77	6	2	2.0	6	0
阴性组	77	6				

1) 1、2、3、4、5 组分别为热、甲醛、超声波灭活菌体菌苗和菌毛菌苗以及 CPS—TT 菌苗免疫组; 保护指数= $[(\text{阳性组平均病变级数}-\text{免疫组平均病变级数})/\text{阳性组平均病变级数}] \times 100\%$

表 2 二免后 40 d 同源菌株攻毒保护试验结果¹⁾

组别	日龄	试验鸡数	死亡鸡数	平均病变级数	细菌分离数	保护指数/ %
1	112	6	0	1. 0	1	50
2	112	6	0	0. 6	0	70
3	112	6	0	0. 4	0	80
4	112	6	0	0. 5	0	75
5	112	6	0	0. 7	0	65
阳性组	112	6	0	2. 0	6	0
阴性组	112	6				

1) 1、2、3、4、5 组分别为热、甲醛、超声波灭活菌体菌苗和苗毛菌苗以及 CPS—TT 菌苗免疫组; 保护指数= [(阳性组平均病变级数—免疫组平均病变级数)/ 阳性组平均病变级数] × 100%

2. 4 抗体效价检测

微量凝集试验: (1) 特异性反应. *E. coli* O₇₈ 抗原均不与 ND、IBD、MG、EDS—76 和鸡白痢标准阳性血清发生特异性反应, 具有很高的特异性. 结晶紫着色抗原对抗体的敏感性并未比非着色抗原高, 但其制作程序麻烦, 易脱色污染微量反应板且妨碍观察, 故本试验用非着色抗原检测抗体. (2) 抗体消长规律. 各菌苗的抗体消长规律相似, 首免后 7 d 抗体上升到一定水平, 14 d 达到峰值, 然后逐渐下降, 二免后血清抗体水平于 1 周后迅速达到峰值, 然后呈缓慢下降趋势.

间接血凝试验: (1) 特异性反应. 2 种不同方法处理抗原致敏的 SRBC 均不与 ND、IBD、MG、EDS—76 和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) 抗体消长规律. 与微量凝集试验相似, 但抗体平均效价比同期微量凝集价高 4 倍以上, 差异极显著 ($P<0. 01$). 另外, 超声波处理抗原较高温处理抗原对抗 *E. coli* 抗体的敏感性高些 ($P<0. 05$).

不同菌苗 IHA 价的比较: 按超声波处理抗原致敏 SRBC 的 IHA 价看, 第 3 组血清抗体平均效价最高, 抗体水平上升最快, 二免后抗体水平下降趋势平缓, 在二免后 4 d 内均保持在高水平, 第 2、4、5 组血清抗体 IHA 价相近, 相互间差异不显著, 第 1 组血清抗体效价最低, 与第 3 组间差异极显著 ($P<0. 01$), 与第 2、4 组间差异显著 ($P<0. 05$).

3 结论

IHA 在检测 *E. coli* 抗体上较微量凝集试验灵敏度高, 且 IHA 抗原以超声波处理抗原为好.

同源菌株攻毒试验结果表明, 超声波灭活菌体菌苗具有最好的免疫原性, 在鸡体内诱导的抗体水平也高, 对鸡的保护率最高, 菌毛、CPS—TT 和甲醛灭活菌体则具有相似的免疫原性, 而热灭活菌体由于蛋白质抗原受到严重破坏而对鸡的保护作用最差.

不管对哪一种菌苗, 经 2 次免疫后才能取得较满意的保护效果, 故推荐临床上应用该类菌苗时采用二次免疫, 推荐间隔期为 4 周.

采用超声波结合 γ —射线辐射双重灭活法既保证完全灭活, 杜绝其它有害杂菌污染的可能性, 又有保持较好的免疫原性, 是一种值得推荐的灭活方法. 综上所述, 超声波灭活大肠杆菌菌体菌苗是一种使用安全、副作用小、保护率高的灭活菌苗.

参 考 文 献

- 李晋红, 林维庆, 黄淑坚. 1995. 鸡病原性大肠杆菌(O₂)亚单位疫苗的研究. 华南农业大学学报, 16(3): 72~78
- 黄淑坚, 林维庆. 1996. 鸡大肠杆菌荚膜多糖—蛋白质抗原免疫原性研究. 华南农业大学学报, 17(2): 28~32
- 林世棠, 陈月英, 林 苹. 1984. 禽多杀性巴氏杆菌荚膜脂多糖—蛋白质复合物免疫原性的研究——提纯及免疫试验. 家畜传染病, (3): 11~14
- Melamed D, Leitner G, Heller E D. 1990. A vaccine against colibacillosis based on ultrasonic inactivation of *Escherichia coli*. Avian Diseases, 35: 17~22

The Immunogenicity of Ultrasonicated Vaccine of Chicken Pathogenic *E. coli* (O₇₈) Against Colibacillosis

Chen Shuilong Qiu Zhenfang Lin Weiqing
(Dept. of Vet. Med., South China Agric. Univ., Guangzhou 510642)

Abstract The pili extract, capsular polysaccharide-tetanus toxoid (CPS-TT) and heat-, formaldehyde- and ultrasound-inactivated bacteria were mixed with propolis adjuvant respectively to make five vaccines. Challenge experiments at 21 days post first injection and 40 days post second vaccination revealed that ultrasonic inactivation followed by irradiation was the most efficient method for the preparation of an effective anticolibacillosis vaccine. Formaldehyde-inactivated bacteria, the pili and the CPS-TT vaccines provided similar protection but were less protective. Indirect hemagglutination test was much more sensitive in detecting *E. coli* antibodies than the micro-agglutination test ($P < 0.01$), especially when used on ultrasonicated antigen.

Key words chicken; *Escherichia coli*; ultrasound; micro-agglutination test; indirect hemagglutination test

【责任编辑 柴 焰】