

鸚鵡热衣原体重组主要外膜蛋白免疫肉鸡效果观察

何诚¹ 朱虹² 王传武¹ 何君² 张浩杰² 檀华² 端青²

(1. 中国农业大学 实验动物研究所,北京 100094; 2. 北京微生物流行病学研究所,北京 100071)

摘要 利用鸚鵡热衣原体重组主要外膜蛋白(MOMP)在大肠杆菌中的表达产物,纯化后与白油佐剂乳化成疫苗。对3批疫苗物理性状、无菌试验、安全试验、最小保护剂量、效力检验、免疫期、保存期和田间试验等各项技术指标进行了测定。重组MOMP疫苗为乳白色油包水型疫苗,黏度为 $8\text{ s } 0.4\text{ mL}^{-1}$;细菌培养阴性;10 d肉鸡分别以50和100 μg 注射免疫后,观察14 d,免疫鸡群除一过性发蔫外,临床采食、饮水,注射部位剖检无异常变化;以25, 50, 100和200 μg 分别免疫肉鸡后,30 d龄攻毒,发现50 μg 免疫组可以抵抗病原的攻击;选择每只50 μg 免疫肉鸡,分别在40, 50和60 d攻毒,其保护率分别为94%, 95%和84%。疫苗2~8 可储存240 d,室温(21~25)、37 不要超过30 d;利用本疫苗免疫肉鸡40 000只,保护率达93%,对照组为85%。本疫苗安全性高、保护率高、无副作用,能有效控制鸚鵡热衣原体的侵害。

关键词 鸚鵡热衣原体;主要外膜蛋白;疫苗;肉鸡

中图分类号 S 854.43

文章编号 1007-4333(2004)01-0045-04

文献标识码 A

Investigation on immune response in broiler immunized with recombinant major outer-membrane protein of *Chlamydia psittaci*

He Cheng¹, Zhu Hong², Wang Chuanwu¹, He Jun², Zhang Haojie², Tan Hua², Duan Qing²

(1. Laboratory Animal Institute, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China)

Abstract The purified recombinant major outer-membrane protein (MOMP) of *Chlamydia psittaci*(Cps) expressed in *E. coli* was mixed with oil adjuvant and manufactured as MOMP-vaccine. The various subjects of three batch vaccines were examined such as physical character, safety test, minimum effective dosage, effect test, immune period, stability test and field test. The viscosity of MOMP-vaccine was $8\text{ s } 0.4\text{ mL}^{-1}$; The MOMP and vaccine were free of bacteria in cultivating test. When the broilers were vaccinated by 50 and 100 μg per chicken on day 10, and observed everyday for two weeks, the chickens showed normal feeding and drinking except for low spirit for a short time; Using 25, 50, 100 and 200 μg per chicken respectively, it was found that 50 μg group could obtained ideal protection by challenging of a virulent strain on day 30. We also found that if the broilers were vaccinated by 50 μg vaccine, and then challenged with virulent strain on day 40, 50 and 60, the protective rate were 94%, 95% and 84%, respectively. The vaccine could be stored at 2~8 for more than 240 days, while the immune protection period could maintained 30 days at room temperature or 37 . It was tested in field with 40 000 broilers, the treated groups acquired 93% protection, while the control groups only obtained 85% protection. All these results demonstrated that the MOMP-vaccine was safety; no adverse effect, highly protection, and it would play a role in the prevention of *Chlamydia psittaci* from disease.

Key words *Chlamydia psittaci*; major outer-membrane protein; vaccine; broilers

2001年5月以来,北京、天津地区许多饲养公司的商品肉鸡发生了以腹泻、呼吸困难、采食量下降和死亡率上升为特征的传染病。发病日龄最早为15 d,死亡集中在32~49 d,病程多为14~20 d,造成

生长期鸡群增重严重受阻,80%的饲养户亏损或严重亏损。经病原分离、发病试验确诊为鸚鵡热衣原体(*Chlamydia psittaci*, Cps)感染^[1]。鸚鵡热衣原体是人畜共患病原菌,传染性强,耐受多种抗菌药

收稿日期:2003-07-15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370070)

作者简介:何诚,博士;朱虹,副研究员,通讯作者,主要从事军事医学研究。E-mail: judyzhu5056@sohu.com

物。该病诊断困难,病后恢复缓慢,病体免疫水平低,且可能长期带菌,甚至反复发作,对人畜构成愈来愈严重的威胁。目前尚无有效药物和疫苗预防本病流行,研究高效 Cps 疫苗是控制本病的有效方法之一。

鸚鵡热衣原体重组主要外膜蛋白是 Cps 重要的保护性抗原,并且不同来源的 Cps MOMP 基因有同源性^[2],利用 Cps 重组 MOMP 疫苗来预防 Cps 已成为可能。本研究利用鸚鵡热衣原体重组主要外膜蛋白基因工程疫苗并进行中间试验,以探讨其保护效果和应用价值。

1 材料与方法

1.1 疫苗制备

1) 抗原制备。鸚鵡热衣原体重组 MOMP 的制备、工程菌株的构建、蛋白的表达和纯化,见文献[2]。纯化后 MOMP 质量浓度为 $21 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2) 试剂。白油(杭州炼油厂),硬脂酸铝,司盘 80 和吐温 80(上海大众)。鸚鵡热衣原体血凝抑制诊断试剂购自湖北农业科学院(批次为 20020606、20020816、20021205),鸚鵡热衣原体荧光诊断试剂盒购自军事医学科学院微生物流行病学研究所(批次为 200101108)。

3) 攻毒用鸚鵡热衣原体。本所分离并经军事医学科学院鉴定。

4) 疫苗配制。3 个批次的重组 MOMP 做为水相,与乳化剂按一定比例进行乳化,制成油包水型乳剂疫苗。

5) 实验动物。1 d 爱拔益加(AA)肉鸡 250 只,购自北京华都肉鸡公司。测定血清中衣原体抗体阴性。正常饲养至 10 d,剔除病弱鸡,分组接种 Cps 的 MOMP 疫苗。效力检验、免疫保护剂量、免疫期试验等在负压隔离器中进行。

1.2 疫苗检查

1) 无菌检验。选用连续 3 个批次的疫苗产品(2000208,2002010,2002011),从每个批次的产品中任意抽取疫苗各 2 瓶,分别接种普通肉汤、厌气肉汤和普通琼脂斜面 3 种培养基,37℃ 培养 5 d,观察细菌生长。每批疫苗的抗原接种 7 日龄 SPF 鸡胚 2 枚,每枚接种 0.2 mL ($3.5 \sim 4.2 \text{ mg}$ 重组主要外膜蛋白),37℃ 培养,连续观察 12 d。

2) 物理性状检查。按照要求进行物理性状检测^[4,5]。

3) 疫苗的安全检验。接种 10 d 肉鸡,每组鸡分别注射疫苗 50 及 100 μg ,观察其全身反应及局部反应,14 d 扑杀,观察注射局部病理变化。

4) 效力检验。免疫 10 d 的 AA 肉鸡,分别于免疫后 21 和 30 d 采血测抗体,试验组、对照组同时用 Cps 攻毒。观察鸡肺脏、气囊等病变,涂片用荧光抗体检测,以测定鸡肺脏有无病原。攻毒采用鸡胚卵黄囊制成 10 倍稀释液,腹腔注射 0.5 mL,每天观察鸡群状况。

5) 最小免疫保护剂量测定。选用 10,25,50,100 和 200 μg 5 个剂量组分别免疫 AA 肉鸡,免疫 30 d 后用 Cps 腹腔注射攻毒,观察 14 d,计算死亡率和保护率。

6) 免疫期试验。连续 3 个批次的疫苗,注射疫苗后定期采血测定抗体,分别在免疫后 30,40 和 50 d 用鸚鵡热衣原体攻击,观察免疫效果及持续时间。

7) 保存期实验。分别将 3 个批次的疫苗,保存在 4℃ 冰箱、室温及 37℃ 温箱内,保存期为 1,2 和 8 个月取出,观察物理性状和免疫 10 d 肉鸡,免疫后 21 d 测定抗体并攻毒。

8) 田间试验。结合该疫苗的中试开发,选择北京地区具有不同发病史的代表鸡群进行田间试验。利用该油乳剂疫苗免疫 10 d AA 肉鸡 10 000 只,爱维茵肉鸡 30 000 只,每只接种 0.5 mL,免疫后 30 d 取 10 只分别采血测定效价,观察到出栏,计算肉鸡的保护率。

9) 攻毒方法和判断标准。按照文献[2]方法,将鸚鵡热衣原体感染的鸡胚卵黄囊膜 10 倍稀释为乳悬液,每只肉鸡腹腔注射 0.5 mL。免疫保护标准为不保护:临床可见肉鸡食欲减退,咳嗽,喘式呼吸;剖检肺脏有纤维性渗出、粘连。保护:无喘式呼吸临床症状,肺脏无纤维性渗出。

2 结果

2.1 疫苗检查

1) 疫苗的物理性状检查。制备的油乳剂为乳白色油包水型乳剂; $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 不分层,黏度平均为 $8 \text{ s} \cdot 0.4 \text{ mL}$ 。室温条件下放置 1,6 和 8 个月,或 4~8℃ 下放置 8 个月,乳剂不分层。

2) 疫苗的无菌检查。3 个批次的疫苗分别在 3 种培养基上培养 5 d,未见细菌生长。

3) 疫苗的残余细菌检查。3 个批次的蛋白抗原液接种 SPF 鸡胚后,观察 12 d,未见鸡胚出现死

亡和发育受阻,证明抗原液体无残余病原存活。

2.2 疫苗的安全试验

3 个批次疫苗,注射剂量分别为 50 和 100 μg ,免疫当天肉鸡出现发蔫状况,站立不稳。8 h 后精神、采食量均恢复正常,无发病及死亡。14 d 后肉鸡断颈处死,观察其颈部注射部位疫苗吸收良好,无肉芽肿等炎症,证明基因工程疫苗对雏鸡是安全的。

2.3 最小免疫剂量测定

不同剂量免疫鸡 30 d 后,检测抗体效价,同时用强毒攻击(表 1)。不同剂量的 MOMP 免疫后,血清抗体水平显示阳性,25 μg 保护率为 77.8%,50 μg 保护率均达到 95%,100 μg 保护率均达到 100%。提示临床每只肉鸡使用 50 μg ,就可以有效保护免受 Cps 的侵害。

表 1 重组主要外膜蛋白疫苗免疫最小剂量

Table 1 The minimum immunized dosage by recombinant MOMP of *Chlamydia psittaci*

| 批次 | 免疫剂量 ($\mu\text{g} \cdot \text{只}^{-1}$) | 保护数/攻毒数 | | 试验组 HI (\log_2) 平均值 |
|---------|---|---------|------|----------------------------|
| | | 试验组 | 对照组 | |
| 2000208 | 25 | 8/10 | 1/10 | 4.0 \pm 1.4 |
| | 50 | 10/10 | 0/10 | 4.5 \pm 1.0 |
| | 100 | 10/10 | 0/10 | 4.6 \pm 1.2 |
| | 200 | 10/10 | 0/10 | 4.8 \pm 1.0 |
| 2002010 | 25 | 8/10 | 0/10 | 3.1 \pm 1.3 |
| | 50 | 9/10 | 0/10 | 4.3 \pm 1.0 |
| | 100 | 9/10 | 0/10 | 4.7 \pm 1.3 |
| | 200 | 10/10 | 0/10 | 4.9 \pm 1.5 |
| 2002011 | 25 | 7/10 | 0/10 | 3.0 \pm 1.1 |
| | 50 | 10/10 | 0/10 | 4.2 \pm 0.7 |
| | 100 | 10/10 | 0/10 | 4.5 \pm 0.9 |
| | 200 | 10/10 | 0/10 | 5.1 \pm 1.1 |

2.4 免疫效力试验

3 个批次的疫苗以 50 μg 免疫 10 d 肉鸡,免疫后 30 d 分别测定血清抗体水平,并进行攻毒(表 2)。试验结果表明,50 μg 可以达到 95% 的保护率。攻毒对照组出现典型的喘气呼吸症状,肺脏出现渗出

性炎症,肺脏涂片出现典型的衣原体荧光。免疫组肺脏炎症和涂片荧光染色均为阴性。

表 2 重组主要外膜蛋白肉鸡免疫效力试验

Table 2 The protection test immunized by recombinant MOMP of *Chlamydia psittaci* in broilers

| 批次 | HI(\log_2) 平均值 | | 保护率/ % (保护数/攻毒数) | |
|---------|--------------------|---------------|---------------------|-----|
| | 试验组 | 对照组 | 试验组 | 对照组 |
| 2000208 | 4.5 \pm 1.0 | 0.7 \pm 0.3 | 100 | 0 |
| 2002010 | 4.3 \pm 1.0 | 0.4 \pm 0.2 | 90 | 10 |
| 2002011 | 4.2 \pm 0.7 | 0.3 \pm 0.1 | 100 | 0 |

2.5 免疫持续期试验

根据免疫攻毒保护率确定免疫持续期,试验结果(表 3)表明,免疫后 40,50 和 60 d,免疫保护率分别达到 94%,95% 和 84%,因此以免疫攻毒保护率不低于 80% 为标准,疫苗的免疫持续时间可达 60 d。

表 3 重组主要外膜蛋白肉鸡免疫持续期试验

Table 3 The proceeding time immunized by recombinant MOMP of *Chlamydia psittaci* in broilers

| 批次 | 免疫时间/d | 保护数/攻毒数 | |
|---------|--------|---------|------|
| | | 试验组 | 对照组 |
| 2000208 | 40 | 10/10 | 1/10 |
| | 50 | 10/10 | 1/10 |
| | 60 | 9/10 | 1/10 |
| 2002010 | 40 | 9/10 | 0/10 |
| | 50 | 9/10 | 1/10 |
| | 60 | 9/10 | 1/10 |
| 2002011 | 40 | 10/10 | 0/10 |
| | 50 | 10/10 | 1/10 |
| | 60 | 9/10 | 0/10 |

2.6 保存期试验

3 批次疫苗物理性状全部合格,攻毒后保护结果(表 4)表明,疫苗放置 4~8,60~180 d,其免疫攻毒保护率 100%,240 d 疫苗物理形状没有破坏,免疫保护为 80%;室温条件(20~25)放置 30 d,

表 4 重组主要外膜蛋白疫苗保存期试验

Table 4 Conservative period immunized by recombinant MOMP of *Chlamydia psittaci* in broilers

| 批 次 | 试 验 处 理(保护数/攻毒数) | | | | | | | |
|---------|------------------|-------|-------|------|------|------|------|-------|
| | 试 验 组 | | | | | | | 对 照 组 |
| | 4~8 | | 20~25 | | 37 | | 60 d | |
| 60 d | 180 d | 240 d | 30 d | 60 d | 30 d | 60 d | | |
| 2000208 | 10/10 | 10/10 | 9/10 | 9/10 | 9/10 | 8/10 | 4/10 | 1/10 |
| 2002010 | 9/10 | 9/10 | 9/10 | 9/10 | 7/10 | 9/10 | 3/10 | 1/10 |
| 2002011 | 10/10 | 9/10 | 9/10 | 9/10 | 8/10 | 8/10 | 4/10 | 0/10 |

疫苗免疫保护率平均为 84%,60 d 为 66.6%。在 37 保存,60 d 时疫苗出现少量破乳现象,免疫后保护率为 81.6%,60 d 保护率为 40%。因此 2~8 保存疫苗可以存放 8 个月,室温条件下保存不可超过 30 d,建议疫苗尽量放置在 4~8 保存。

2.7 田间试验

北京市郊区选择 6 个肉鸡饲养场共 40 000 只进行田间试验使用该疫苗。免疫组保护率达 93% 以上,血清抗体阳性率在 89% 左右,取得了良好的免疫效果,对照组平均保护率为 85%(表 5)。

表 5 重组主要外膜蛋白疫苗的田间试验

Table 5 Field test immunized by recombinant MOMP of *Chlamydia psittaci* in broilers

| 批次 | 品种 | 数量 | 试验组 | | 对照组 | |
|---------|------|--------|--------|----------|--------|----------|
| | | | 保护率/ % | 抗体阳性率/ % | 保护率/ % | 抗体阳性率/ % |
| 2002011 | 爱拔益加 | 10 000 | 96 | 90 | 85 | 10 |
| 2003018 | 爱维茵 | 20 000 | 90 | 87 | 83 | 5 |
| 2003019 | 爱维茵 | 10 000 | 95 | 90 | 87 | 5 |

3 讨论与结论

3.1 鸚鵡热衣原体重组主要外膜蛋白的免疫原性

鸚鵡热衣原体主要外膜蛋白分子质量为 40 ku,是一种多功能蛋白,在衣原体的外膜蛋白中占 60%,在感染过程中起重要作用,是衣原体疫苗中最被关注的抗原。MOMP 结构是 5 个保守区夹着 4 个可变区,血清型特异性的抗原决定基位于 VS1 或 VS2,而种或亚种特异性的抗原决定基位于 VS4。重要的是,此部位的多克隆或单克隆抗体能中和体内或体外的衣原体感染。研究证实,不同宿主来源的鸚鵡热衣原体的 MOMP 基因具有很高的同源性,是研究疫苗的位点。研究证实 Cps 重组 MOMP 在小鼠体内可诱导 Cps 特异性的体液免疫和细胞免疫应答^[3],本试验也显示具有较高的体液免疫水平,说明 MOMP 具有较好的免疫原性。

3.2 鸚鵡热衣原体重组主要外膜蛋白诱导肉鸡的免疫保护反应

鸚鵡热衣原体重组主要外膜蛋白基因工程疫苗的实验室免疫试验和田间试验结果证明,肉鸡注射免疫后,除短暂性的疫苗反应外,无其他不良反应,这提示本研究的疫苗是安全的。10 d 皮下注射,免疫后 14 d 产生抗体,20 d 后达到较高水平,最小免疫剂量为 50 μg,保护期达 60 d,基本确保肉鸡的健康生长和安全出栏。利用鸚鵡热衣原体重组 MOMP 免疫 AA 肉鸡、爱维茵肉鸡都得到较高的保护率,说明该疫苗能保护不同品种的肉鸡免受衣原体的侵袭,提高成活率,减少继发感染,受到肉鸡饲养场的欢迎和重视,显示了良好的应用效果。

国内研究者对鲁豫地区、浙江省 78 个县市鸡场

进行血清学调查,血清阳性率分别为 3.45%~32.14%,71.4%。江苏连云港市肉鸡发病率为 30%~40%,死亡率 20%~30%,认为鸡群中普遍存在着衣原体感染^[8]。研究高效 Cps 疫苗对流行疫区进行免疫是控制本病感染最有效措施之一,因此鸚鵡热衣原体重组主要外膜蛋白疫苗的开发研究有着广阔的前景。鸚鵡热衣原体重组主要外膜蛋白疫苗对于肉种鸡的免疫保护效果,以及免疫后能否保护雏鸡不受衣原体的感染和母源抗体保护时间,仍需要进一步研究和探讨。

参 考 文 献

- [1] 石岩,何诚,朱虹,等. 肉鸡鸚鵡热衣原体的确诊[J]. 中国实验动物学报,2003,13(4):60~63
- [2] 刘向伟,端青,张浩杰,等. 10 株鸚鵡热衣原体菌株主要外膜蛋白基因的比较性研究[J]. 中国人兽共患病杂志,2002,18(11):16~18
- [3] 朱虹,端青,张浩杰,等. 鸚鵡热衣原体重组主要外膜蛋白诱导小鼠免疫应答的观察[J]. 生命科学研究,2002,6(3):267~269
- [4] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国兽用生物制品规程[M]. 北京:化学工业出版社,2001.448~450
- [5] 王明俊 主编. 兽医生物制品学[M]. 北京:中国农业出版社,1997.50~70
- [6] 汤生玲,房海,朴范泽 主编. 兽医生物制品技术[M]. 北京:中国农业出版社,1994.10~70
- [7] Vanrompay D, Vanloock M, Cox E, et al. Genetic immunization for *Chlamydia psittaci*[J]. Verh K Acad Geneesk Belg,2001,63(2):177~188
- [8] 于维军,马维礼,朱其太,等. 鸡衣原体病的调查研究[J]. 中国兽医科技,1994,24(2):13~15