

共表达禽流感病毒 HA 和 NA 基因的重组禽痘病毒 在 SPF 鸡的免疫效力试验

乔传玲, 姜永萍, 于康震, 田国斌, 陈化兰

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 / 农业部动物流感重点开放实验室及兽医生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001)

摘要: 将禽流感病毒 A/Goose/Guangdong/3/96 (H5N1) 毒株的 HA 和 NA2 个基因同源重组到禽痘病毒基因组中, 获得了能同时高效表达这 2 种蛋白的重组禽痘病毒 (rFPV-HA-NA)。将 rFPV-HA-NA 经翅膀刺种途径接种 8 周龄 SPF 鸡, 免疫后 4 周分别用 10 LD₅₀ 的高致病力禽流感病毒 (HPAIV) A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) 和 A/FPV/Rostock/34 (H7N1) 毒株进行攻击。结果重组禽痘病毒免疫鸡群诱导产生了高水平的抗体, 能够完全抵抗 H5N1 和 H7N1 亚型病毒的致死性攻击; 并可有效阻止病毒在泄殖腔的排出。而禽痘病毒免疫组和非免疫对照组在攻毒后全部发病并死亡。

关键词: 禽流感病毒; HA; NA; 重组禽痘病毒; 免疫效力

Immune Efficacy of a Recombinant Fowlpox Virus Co-expressing HA and NA Genes of Avian Influenza Virus in SPF Chickens

QIAO Chuan-ling, JIANG Yong-ping, YU Kang-zhen, TIAN Guo-bin, CHEN Hua-lan

(Animal Influenza Laboratory of Ministry of Agriculture and National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001)

Abstract: A recombinant fowlpox virus co-expressing haemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) named as rFPV-HA-NA was produced by HA and NA gene of A/Goose/Guangdong/3/96 (H5N1) isolate of avian influenza virus recombined into the genome of fowlpox virus. In this study, to evaluate its ability to protect chickens against challenge with a lethal dose of highly pathogenic isolates of avian influenza virus, eight-week-old specific-pathogen-free (SPF) chickens were vaccinated with recombinant virus or the wildtype fowlpox virus by wing-web puncture. Following challenge 4 weeks later with 10 LD₅₀ highly pathogenic avian influenza virus H5N1 and H7N1 isolate, all chickens vaccinated with recombinant virus were protected, while the chickens vaccinated with the wildtype fowlpox virus or unvaccinated controls experienced 100% mortality respectively following challenge. And this complete protection was accompanied by the high levels of specific antibody response to the respective components of the recombinant virus.

Key words: Avian influenza virus; Haemagglutinin; Neuraminidase; Recombinant fowlpox virus; Immune efficacy

禽流感 (avian influenza, AI) 是由 A 型流感病毒引起的禽类的感染和/或疾病综合征, 该病自首次发现至今已有 100 多年的历史, 给世界上许多国家的养禽也造成了极大的经济损失。其中由部分 H5 及 H7 亚型病毒所引起的高致病力禽流感 (HPAI) 可以导致感染鸡群的全部死亡, 已

被国际兽疫局列为 A 类烈性传染病^[1]。对 HPAI 的控制最初是采取隔离和扑杀, 如今越来越多的国家倾向于应用疫苗进行免疫预防, 实践证明全病毒灭活疫苗具有良好的免疫效果^[2,3]。但其最大的不足是疫苗接种诱导机体产生的抗体会导致免疫鸡与自然感染鸡难以区分, 从而影响疫病的流行病

收稿日期: 2003-04-14

基金项目: 国家“863”高技术研究发展计划资助项目 (2001AA213041)

作者简介: 乔传玲 (1973-), 女, 河南宁陵人, 博士, 主要从事动物病毒分子生物学的研究。陈化兰为通讯作者, Tel: 0451-82725786 转 280; E-mail: hlchen1@yahoo.com

学普查。新型的基因工程重组疫苗只是仅仅利用AIV的某一(两)种保护性抗原基因来研制,往往可以弥补以上的不足,进而更好地满足生产的需要。

AIV的表面糖蛋白HA和NA是病毒的两种主要保护性抗原,抗HA的抗体对病毒的感染具有中和作用,从而可以阻止疾病的发生;抗NA抗体不能中和病毒的感染,但可以阻止病毒粒子从感染细胞中的释放,使病毒的增殖减少到感染发生所需的阈值以下,进而使疾病发生的严重程度大大降低^[4]。HA一直是AI基因工程疫苗研究中的热点,但由于其变异率极高,使得基于该基因的多种疫苗的保护性是具有亚型特异性的,即仅仅局限在与所表达的HA为同一亚型之间的作用。NA具有比HA基因变异速度慢的特点,在疫苗成分中添加此种成分有望提高疫苗的免疫效力^[5]。

禽痘病毒(FPV)以其宿主特异性、外源基因容量大、在哺乳动物中发生顿挫感染等特性成为兽医病毒活载体疫苗研究中的首选载体之一,显示了良好的应用前景^[6]。近几年来,相继有鸡新城疫重组禽痘病毒疫苗和H5亚型AIV HA重组禽痘病毒疫苗,获美国农业部批准正式投入预防实践,使禽痘病毒活载体疫苗由基础研究向成果实用化转化大大迈进了一步^[7, 8]。本研究对同时表达AIV HA和NA基因重组禽痘病毒rFPV-HA-NA在SPF鸡体内诱导产生的免疫效力进行了检测。

1 材料与方 法

1.1 病毒

免疫用重组禽痘病毒rFPV-HA-NA为哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室构建^[9];禽痘病毒疫苗株S-FPV-017由美国加利福尼亚大学Yilma教授惠赠。攻毒用高致病力禽流感病毒(HPAIV)A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1)和A/FPV/Rostock/34(H7N1)由农业部动物流感重点开放实验室保存。

1.2 SPF鸡胚和SPF鸡

由哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供,8周龄SPF鸡实验期间饲养于禽病感染实验室的负压隔离器中。

1.3 免疫

将60只8周龄SPF鸡随机分为3组,每组20只。第1组为非免疫对照组,攻毒前不作任何处理。第2组用禽痘病毒疫苗株S-FPV-017免疫,经

翅下刺种每毫升 2.5×10^6 PFU的病毒。第3组为rFPV-HA-NA免疫,接种方法同第2组,重组病毒的含量大约为每毫升 5×10^6 PFU。

1.4 攻毒

免疫后4周将各组鸡再分为2个小组,分别用 $10 LD_{50}$ 的A/Goose/Guangdong/1/96(H5N1)和A/FPV/Rostock/34(H7N1)2株HPAIV经胸部肌肉注射接种到鸡体内,每只0.2 ml,攻毒后每天观察并详细记录鸡群的发病和死亡情况,统计死亡率。

1.5 抗体检测

对每组鸡于免疫前、免疫后和攻毒后每周采集其翅静脉血,分离血清,置 $-20^{\circ}C$ 保存备用。分别采用HI和间接ELISA方法测定其相应的抗体水平。

1.5.1 抗原 针对H5和H7亚型AIV的HI抗原由农业部动物流感重点开放实验室提供;ELISA抗原为AIV NA蛋白的重组杆状病毒表达产物,由该实验室制备。

1.5.2 二抗 碱性磷酸酶标记的兔抗鸡IgG购自Sigma公司。

1.6 病毒分离

在攻毒后第4天采集每组鸡的泄殖腔拭子,置于1 ml的PBS中(含庆大霉素 $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$),室温下作用1 h,经尿囊腔接种于9~11日龄SPF鸡胚,一个样品至少接3枚鸡胚,每枚0.2 ml,收集24 h以后死亡鸡胚的尿囊液,微量血凝法(HA)检测病毒。第1次检测为阴性的样品,要进行3次盲传后方可判定结果。

2 结果与分析

2.1 重组禽痘病毒的免疫原性

于免疫前及免疫后每周采集鸡血清,根据重组病毒中的不同抗原成分采用相应的方法(HI和ELISA)检测各类抗体。

2.1.1 HI抗体 对所保存的血清测定其HI抗体,结果rFPV-HA-NA免疫组在免疫1周后即出现了HI抗体,效价为 $2.5 \log_2$;到2周时即可达 $6.45 \log_2$ 。而S-FPV-017免疫和非免疫对照组及各组的免疫前血清都没有检测到HI抗体(表1)。

2.1.2 ELISA抗体 杆状病毒表达的NA蛋白纯化后用作ELISA抗原,间接法检测重组病毒免疫鸡血清中NA特异性抗体;同时对S-FPV-017免疫组和非免疫对照组的血清进行检测。结果重组病毒免疫组的抗体水平明显高于对照组,在免疫后的第1周

即可检测到高水平的 ELISA 抗体, 而后略有下降; 攻毒后抗体效价迅速升高, 并一直持续到攻毒后第 3 周(图)。

2.2 病毒分离结果

于攻毒后第 4 天采集存活鸡泄殖腔拭子, 进行病毒分离。结果 H5N1 攻击后, rFPV-HA-NA 免疫组的样品均没有分离到病毒; 而 H7N1 病毒攻击时, 病毒分离的阳性率为 1/10。S-FPV-017 免疫组和非免疫对照组均能从所采的泄殖腔拭子中分离到病毒(表 2)。

2.3 发病和死亡情况

临床发病的判定标准为: 鸡群中个别鸡表现呆立、对外界刺激反应不灵敏, 头下垂、眼睛呈全闭或半闭状态、羽毛杂乱等; 眼观病变有流鼻涕和眼泪、无毛部位皮肤发绀、出血、水肿, 鸡冠肉髯坏死。结果 rFPV-HA-NA 免疫组的鸡完全抵抗了 H5N1 和 H7N1 毒株的攻击, 无一发病和死亡; S-FPV-017 免疫组和非免疫对照组在攻毒后第 3 天出现发病, 并于 9 d 内全部发病并死亡(表 2)。

—*— 非免疫对照 Unvaccinated control
—□— 禽痘病毒免疫 S-FPV-017 immunized
—△— 重组病毒免疫 rFPV-HA-NA immunized

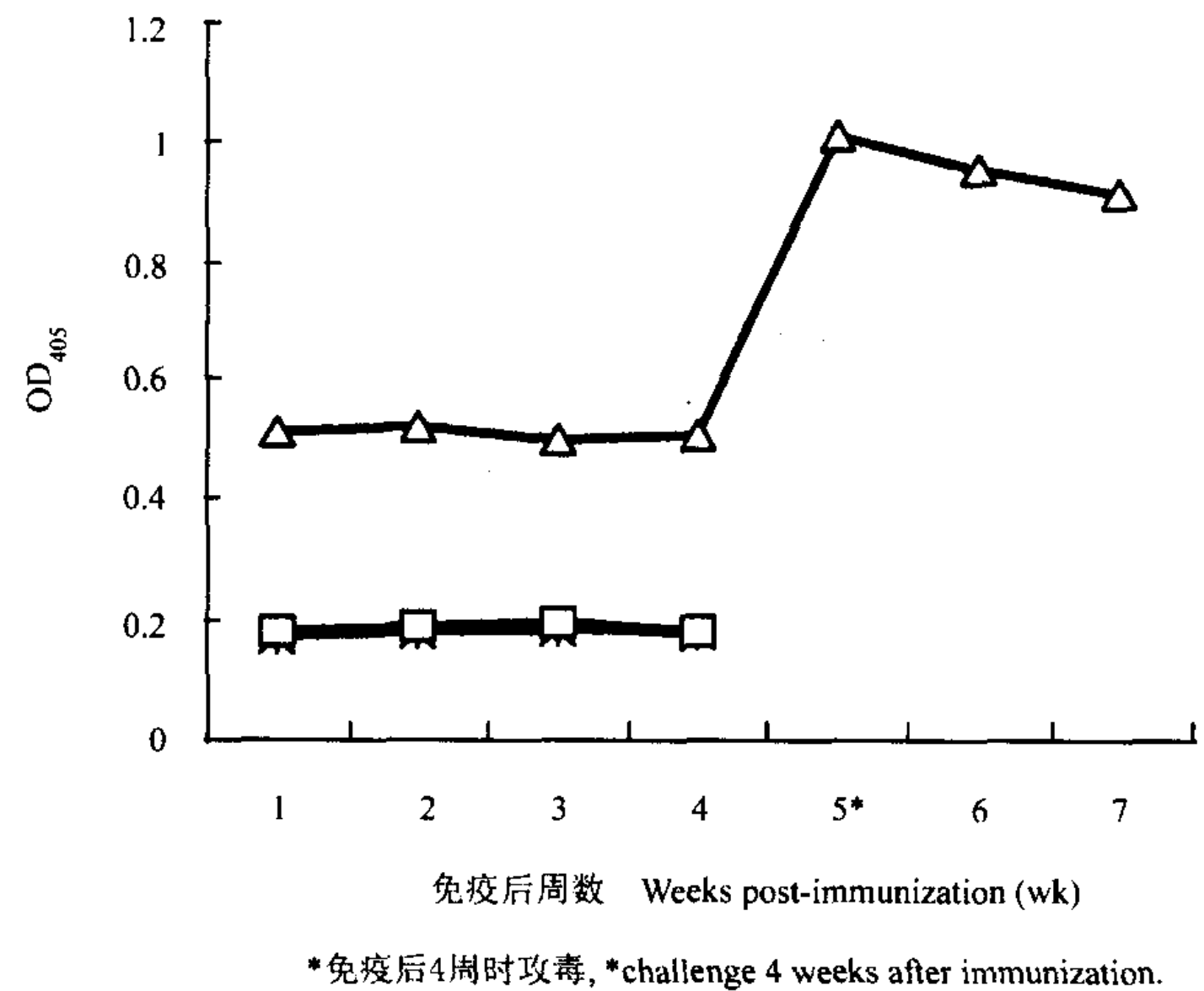


图 试验鸡在免疫和攻毒后 NA-ELISA 抗体的变化

Fig. ELISA antibody to NA of SPF chickens after immunization and challenge

表 1 试验鸡免疫和攻毒后 HI 抗体的检测结果¹⁾

Table 1 HI antibody of SPF chickens after vaccination and challenge

组别 Groups	免疫前 Pre-	免疫后周数 Weeks post-immunization				攻毒后周数 Weeks post-challenge		
		1	2	3	4	1	2	3
非免疫对照 Unvaccinated control	0	0	0	0	0	- a	-	-
禽痘病毒免疫 S-FPV-017 immunized	0	0	0	0	0	- a	-	-
重组病毒免疫 rFPV-HA-NA immunized	0	2.50 ± 0.75	6.45 ± 0.68	6.47 ± 0.92	6.29 ± 0.87	5.61 ± 1.08 a	6.67 ± 2.29	5.83 ± 1.80
						6.69 ± 1.13 b	9.44 ± 1.61	9.50 ± 0.87

¹⁾ a 和 b 分别为 H5N1、H7N1 病毒攻击后抗体检测结果; - 表示所有鸡在攻毒后全部死亡

a and b represent the result of HI antibody after challenge with H5N1 and H7N1, respectively; - represents all the chickens died after challenge

表 2 SPF 鸡用 HPAIV H5N1 和 H7N1 攻击后病毒分离、发病及死亡情况

Table 2 The result of virus re-isolation and protection of SPF chickens after challenge with H5N1 and H7N1

组别 Groups	攻击病毒 Challenge virus	阳性检出数/检测样品数 No. positive/No. tested	发病鸡数/总数 No. sick/total	死亡鸡数/总数 No. dead/total
非免疫对照 Unvaccinated control	H5N1	7/7	10/10	10/10
	H7N1	- ¹⁾	10/10	10/10
禽痘病毒免疫 S-FPV-017 immunized	H5N1	8/8	10/10	10/10
	H7N1	1/1	10/10	10/10
重组病毒免疫 rFPV-HA-NA immunized	H5N1	0/10	0/10	0/10
	H7N1	1/10	0/10	0/10

¹⁾ 此组免疫鸡在攻毒后第 4 天已全部死亡 All the chickens in this group died 4 days post challenge

3 讨论与结论

用重组禽痘病毒 rFPV-HA-NA 及其亲本株 S-FPV-017 经翅膀刺种的方式接种试验鸡后, 于第 4 天出现典型的痘斑, 1 周后病变基本消失。亲本株免疫

鸡的翅膀增厚程度较重组病毒稍大一些, 此结果进一步证实了禽痘病毒重组外源基因后导致其在鸡体内的致病力有所减弱。

通过 HI 和 ELISA 2 种抗体方法检测了重组病毒 rFPV-HA-NA 在 SPF 鸡体内所诱导产生的抗体水平,

结果重组病毒免疫后能够检测到高水平的HA-HI抗体和NA-ELISA抗体,表明重组禽痘病毒无论是在体外细胞培养的过程中还是在动物体内都能够对外源基因稳定复制并高效表达具有生物学活性的蛋白产物,进而诱导机体产生特异性的抗体。

在攻毒保护试验中,HA与NA双基因重组禽痘病毒rFPV-HA-NA免疫的鸡能够100%抵抗H5N1 HPAIV的致死性攻击,同时又获得了对H7N1亚型HPAIV攻击的保护力。从这2个毒株进行分析,H5N1是与重组病毒所表达的HA为同一亚型的病毒,多年来的研究表明,病毒糖蛋白HA对同一HA亚型流感病毒攻击具有免疫保护性^[10~12]。而H7N1却是一个完全不同的毒株,仅仅是其NA亚型与重组病毒中的NA为同一亚型。然而对于病毒的NA蛋白在免疫中的作用,以前人们一直认为它所诱导产生的抗体不具有中和作用,只能够在某种程度上限制病毒的增殖,从而使其在个体保护与限制流行方面有一定的作用。最近的一些研究发现,用NA蛋白成分辅以全病毒灭活疫苗免疫机体后可以相应地提高抗HA及NA抗体的滴度,并可在一定程度上增强对异源毒株攻击的保护性;还有用杆状病毒表达系统表达的HA及NA亚单位抗原,纯化后用来联合免疫或者是用所构建的HA-、NA-基因真核表达质粒直接进行联合肌注,所得的结果相似,均能相应地提高抗HA和NA这两种蛋白的抗体滴度,并且对异源毒株攻击的保护性相对增强^[13~16]。这些结果表明病毒的NA蛋白在诱导免疫力方面不再是停留在人们过去的那个认识水平上,而越来越引起学者的重视,特别是它在交叉保护性方面的功能。

通过研究证实,笔者所研制的这株重组禽痘病毒rFPV-HA-NA是一个能够对H5N1和H7N12种亚型HPAIV的攻击都具有坚强保护效力的基因工程活载体疫苗的候选株,目前正在进行该重组疫苗最佳免疫剂量及免疫持续期等方面的试验。

References

- [1] Alexander D J. A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*, 2000, 74(1-2): 3-13.
- [2] Crawford J, Wilkinson B, Vosnesensky A, Smith G, Garcia M, Stone H, Perdue M. Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. *Vaccine*, 1999, 17: 2 265-2 274.
- [3] 唐秀英, 田国斌, 于康震. 禽流感油乳剂灭活疫苗的研究. *中国预防兽医学报*, 1999, 21 (6): 401-405.
Tang X Y, Tian G B, Yu K Z. Studies on oil-emulsified inactivated vaccine of avian influenza. *Chinese Journal Prevent Veterinary Science*, 1999, 21 (6): 401-405. (in Chinese)
- [4] Deroo T, Jou W M, Fiers W. Recombinant neuraminidase vaccine protects against lethal influenza. *Vaccine*, 1996, 14(6): 561-569.
- [5] Kilbourne E D, Johansson B E, Grajower B. Independent and disparate evolution in nature of influenza A virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins. *Proceeding Academic Science USA*. 1990, 87(2): 786-790.
- [6] Paoletti E. Application of poxvirus vectors to vaccination: an update. *Proceeding of the National Academic Science of USA*, 1996, 93: 11 349-11 353.
- [7] Taylor J, Christensen L, Gettig R, Goebel J, Bouquet JF, Mickle T R, Paoletti E. Efficacy of a recombinant fowl pox-based Newcastle disease virus vaccine candidate against velogenic and respiratory challenge. *Avian Disease*, 1996, 40(1): 173-180.
- [8] Swayne D E, Garcian M, Beck J R, Kinney N, Suarez D L. Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert. *Vaccine*, 2000, 18: 1 088-1 095.
- [9] Qiao C L, Yu K Z, Jiang Y P, Jia Y Q, Tian G B, Liu M, Deng G H, Wang X R, Meng Q W, Tang X Y. Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes. *Avian Pathology*, 2003, 32: 25-31.
- [10] Webster R G, Kawaoka Y, Taylor J, Weinberg R, Paoletti E. Efficacy of nucleoprotein and haemagglutinin antigens expressed in fowlpox virus as vaccine for influenza in chickens. *Vaccine*, 1991, 9: 303-308.
- [11] Kodihalli S, Sivanandan V, Nagaraja K V, Shaw D, Halvorson D A. A type-specific avian influenza virus subunit vaccine for turkeys: induction of protective immunity to challenge infection. *Vaccine*, 1994, 12: 1 467-1 472.
- [12] Chamber T, Kawaoka Y, Webster R G. Protection of chickens from lethal influenza infection by vaccinia expressed hemagglutinin. *Virology*, 1988, 167: 414-421.
- [13] Chen Z, Kadowaki S, Hagiwara Y, Yoshikawa T, Matsuo K, Kurata T, Tamura S. Cross-protection against a lethal influenza virus infection by DNA vaccine to neuraminidase. *Vaccine*, 2000, 18: 3 214-3 222.
- [14] Chen Z, Matsuo K, Asanuma H, Takahashi H, Iwasaki T, Suzuki Y, Aizawa C, Kurata T, Tamura S. Enhanced protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with both hemagglutinin- and neuraminidase-expressing DNAs. *Vaccine*, 1999, 17(7-8): 653-659.
- [15] Johansson B E. Immunization with influenza a virus hemagglutinin and neuraminidase produced in recombinant baculovirus results in a balanced and broadened response superior to conventional vaccine. *Vaccine*, 1999, 17: 2 073-2 080.
- [16] Johansson B E, Matthews J T, Kilbourne E D. Supplementation of conventional influenza A vaccine with purified viral neuraminidase results in a balance and broadened immune response. *Vaccine*, 1998, 16: 1 009-1 015.

(责任编辑 林鉴非)