

微囊化大肠杆菌口服灭活疫苗对大鼠免疫效果的研究

夏瑞阳¹, 徐新龙^{1,2}, 董明娣¹, 陈俐静¹, 祁来芳¹, 王玲³, 姚刚^{1*}

(1. 新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052; 2. 阿拉山口出入境检验检疫局, 阿拉山口 833418;

3. 新疆合普联科检测技术研究院, 乌鲁木齐 830019)

摘要: 不同血清型的致病性大肠杆菌是引起幼畜腹泻的主要病因之一。笔者拟对采用微囊包被技术制备的羊大肠杆菌灭活口服疫苗对大鼠的免疫效果进行评价。将制备的羊大肠杆菌蜂胶佐剂灭活苗作为芯材, 天然高分子材料海藻酸钠为壁材, 采用喷雾干燥法制备微囊化口服疫苗。微囊化口服疫苗的含菌量为 7.52×10^{11} 菌 \cdot g⁻¹。100 只成年健康大鼠随机分为对照组、注射组和微囊包被口服疫苗组(再分为基础剂量、10 倍基础剂量和 20 倍基础剂量三组), 免疫后采用微量凝集试验和本室建立的间接 ELISA 方法检测免疫血清抗体效价并对细胞和黏膜免疫进行检测。微量凝集试验检测结果显示, 免疫后 7 d 各试验组即可产生抗体, 免疫后 28 d 时抗体效价达到高峰, 随后开始下降。间接 ELISA 方法检测结果显示, 免疫后 14 d 各试验组特异抗体转阳, 并持续到 28 d。口服组的抗体效价均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而与注射组无差异 ($P > 0.05$), 且各口服剂量组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。免疫后 35 d 口服试验组特异抗体转为阴性, 而注射组可维持到 35 d; T 淋巴细胞转化结果显示, 免疫 7 d 后, 三个口服剂量组的 SI 值均显著高于对照组和注射组 ($P < 0.05$)。免疫后口服各剂量组的肠黏膜分泌型免疫球蛋白 A (sIgA) 含量均高于同期的对照组和注射组, 21 d 后 sIgA 含量达到高峰。微囊包被口服疫苗能够产生与注射组同样的体液免疫, 同时还可以刺激大鼠机体产生较好的细胞免疫和黏膜免疫。

关键词: 大肠杆菌; 口服疫苗; 微囊包被; 免疫; 大鼠

中图分类号: S855.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2017)02-0307-09

Evaluation of the Immune Effect of Microencapsulated *E. coli* Inactivated Oral Vaccine in Rats

XIA Rui-yang¹, XU Xin-long^{1,2}, DONG Ming-di¹, CHEN Li-jing¹,

QI Lai-fang¹, WANG Ling³, YAO Gang^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China;

2. Alashankou Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau of the P. R. China, Alashankou

833418, China; 3. Xinjiang Hope-Link Institute of Detection Technology, Urumqi 830019, China)

Abstract: The pathogenic *E. coli* of different serotypes is a major sort of the causative agents of the diarrhea of young animals. In the present study a microencapsulated *E. coli* inactivated oral vaccine was prepared and its immune effect in rats was evaluated. The prepared ovine pathogenic *E. coli* inactivated vaccine with propolis-adjuvant as the core material was microencapsulated by natural alginate polymer as wall material, in which 7.52×10^{11} bacteria \cdot g⁻¹ dry powder were encapsulated. A hundred Wistar rats were divided into randomly 3 groups, i. e., the control, injec-

收稿日期: 2016-06-12

基金项目: 新疆维吾尔自治区科技厅高技术项目(200911112); 新疆农业大学研究生科研创新项目(XIAUGRI2015013); 重点研发计划项目(2016YFD0500508)

作者简介: 夏瑞阳(1990-), 女, 新疆人, 硕士生, 主要从事基础兽医学研究。徐新龙对本文有相同贡献

* 通信作者: 姚刚, 男, 博士生导师, 教授, 主要从事动物生长发育、畜产品质量安全研究, E-mail: yaogang516@163.com

tion immunization and oral immunization groups, in which the oral immunization group was further-divided in to the basal dose, 10-fold dose and 20-fold dose groups. After the inoculation the specific antibody was tested by the micro-agglutination test and the indirect ELISA, and the cellular immunity and mucosal IgA were detected. The micro-agglutination test showed that the specific antibody was produced from day 7 after the inoculation and reached to the peak at day 28, then declined thereafter. The indirect ELISA test showed that the antibody was positive from day 14 to day 28 after inoculation. The antibody titers in oral vaccine groups were significantly higher than that in the control ($P < 0.05$), but not in the injection group ($P > 0.05$), and were not significantly between the oral vaccine groups ($P > 0.05$). The antibody titers in the oral vaccine groups declined to negative level at day 35 after inoculation whereas the injection group remained to be antibody-positive; T lymphocyte transformation test showed that SI index in 3 oral vaccine groups was higher than that in the control or the injection group significantly ($P < 0.05$). The sIgA levels in oral vaccine groups were also significantly higher than either in the control or injection group, reaching to the peak at day 21 after inoculation. These data suggest that microencapsulated *E. coli* inactivated oral vaccine could produce the humoral immunity equivalent to the injected vaccine but with better cell and mucosal immunity in rats.

Key words: *Escherichia coli*; oral vaccine; microcapsule coating; immunization; rat

不同血清型的致病性羊大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)是引起羔羊腹泻的主要病因之一,给养羊业的发展造成严重影响^[1]。目前,此病的防治主要以药物治疗和疫苗接种为主,免疫接种途径主要为注射免疫法。该法具有用量少、免疫效果好的优点,但免疫过程中的抓捕、针刺等操作环节易造成被免疫动物产生应激反应,注射免疫法也较为费时费力^[2]。口服给药(免疫)是一种最为方便、有效的途径^[3]。

研究表明,哺乳动物的胃肠道黏膜是一种特殊的黏膜免疫器官^[4],黏膜上皮及固有层内含有大量免疫细胞及免疫分子,通过分泌型 IgA (sIgA) 和 IgM 发挥作用,阻止病原微生物在黏膜上皮层定殖^[5]。在小鼠试验中,口服免疫可有效刺激小鼠肠道免疫系统产生特异性免疫应答,机体产生明显免疫反应,黏膜免疫水平效果明显,且小鼠无机体应激反应^[6]。将日本血吸虫 Sm GST-28 基因克隆至载体上,并与不同佐剂混合制成微球口服免疫小鼠,发现小鼠产生特异 s-IgA 抗体反应,并诱导小鼠产生抗攻击感染的免疫保护作用^[7-8]。

口服疫苗在通过反刍动物胃肠道时,易遭到胃肠道 pH 变化、蛋白酶的消化分解及复杂的微生态环境等影响,限制了口服疫苗的效果。利用微囊包被技术(microencapsulation)对口服疫苗进行包被,拌饲投喂免疫反刍动物可抵御胃肠道内各段微生物

和化学性消化的降解^[9]。微胶囊其常见粒径介于 5~200 μm ,壁厚通常为 0.2~10 μm ,微胶囊可遮蔽异味、防止芯材物质流失、降解、缓释与控释,对较为敏感的活性成分具有保护作用^[10-15]。微囊化口服疫苗粒直径大小直接影响疫苗的免疫效果,研究表明:粒径 < 10 μm 的微胶囊颗粒可经肠道 Peyer 氏结内的 M 细胞摄取吸收,诱导局部和全身散在的黏膜 sIgA 抗体免疫反应^[16]。

反刍动物用大肠杆菌口服疫苗研究缺乏报道,因此本研究拟采用微囊包被技术制备羊源致病性大肠杆菌口服灭活疫苗,免疫接种大鼠,建立针对微囊化的羊大肠杆菌灭活口服疫苗免疫抗体酶联免疫试验(ELISA)检测方法。对其体液免疫、细胞免疫和黏膜免疫效果进行评价,以期为研制防治羔羊大肠杆菌性腹泻口服疫苗新剂型奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

C83-1、C83-2、C83-3,血清型 O78:K80 为新疆畜牧科学院兽医研究所惠赠。佐剂为市售固体蜂胶经纯化后制得。海藻酸钠为天津市光复精细化工研究所产品。BCA 蛋白测定试剂盒、D-hank's 液购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。大肠杆菌阳性血清为本室制备。辣根过氧化物酶标记山羊抗大鼠 IgG 购自中杉金桥公司。大鼠分泌型免疫球

蛋白 A(sIgA)定量检测试剂盒购自 Rapidbio 公司。

健康未免疫雄性 Wistar 大鼠 100 只,体重在 180~220 g,健康未免疫新西兰家兔均购自新疆疾病预防控制中心实验动物中心。

主要仪器:YC-015 实验型喷雾干燥机(上海雅程仪器设备有限公司);DIGICEN20-R 型高速低温离心机(西班牙 ORTOALRESA 公司);超声波破碎仪(苏州安泰公司);Thermo Scientific Forma CO₂ 细胞培养箱(美国 Forma scientific 公司);SynergyTMHTX 多功能酶标仪(美国伯腾仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 免疫抗原制备 参照农业部 2000 年版《兽用生物制品规程》中的羊大肠杆菌灭活苗制造规程制备蜂胶佐剂灭活疫苗,使菌液浓度达 100 亿·mL⁻¹,蜂胶质量浓度达 15 mg·mL⁻¹。利用正交试验最终优化的条件进行喷雾干燥制得微囊化口服疫苗产品,微囊化口服疫苗的含菌量为 7.52×10¹¹·g⁻¹。

1.2.2 动物分组及免疫程序 前述 Wistar 大鼠和新西兰家兔免疫前供给基础日粮(商品日粮)预饲 1 周,观察活动正常。大鼠心脏采血,待血液凝固后分离血清,制备阴性血清。

免疫试验分为三组,每组 20 只大鼠,分别为空白对照组(基础日粮组),注射组(基础日粮+腹腔注射蜂胶佐剂大肠杆菌灭活疫苗组,菌液浓度:100 亿·mL⁻¹)和口服组(基础日粮+微囊包被大肠杆菌口服疫苗组)。以注射组的疫苗含菌量为基础剂量,口服试验组分为低、中、高三组,其中口服组又分为基础剂量组(含菌量 1.5×10¹¹·kg⁻¹)、10 倍剂量组(含菌量 1.5×10¹²·kg⁻¹)、20 倍剂量组(含菌量 3×10¹²·kg⁻¹)三个组。将微囊包被法制备的疫苗干粉(含菌量:7.52×10¹¹·g⁻¹)拌入饲料中压制成柱状颗粒,参照黄嘉骝等^[17]制备的大肠杆菌微囊化口服疫苗对大鼠免疫试验中的剂量(0.2 g·kg⁻¹)作为基础剂量进行口服免疫。口服组首次免疫后间隔 7 d 进行二免(同首免);注射组采用传统针剂接种方式进行免疫,首免注射加蜂胶佐剂的灭活苗 0.5 mL·只⁻¹,间隔 7 d 后再次注射该灭活苗 1 mL。实验大鼠试验期为 35 d,分别采取 0、7、14、21、28 和 35 d 的实验大鼠血样及黏膜样进行抗体效价的检测。

1.2.3 血清抗体效价的检测

1.2.3.1 阳性血清的制备:选用健康无免疫家兔 3

只,按 100 亿菌·mL⁻¹的全菌抗原(含蜂胶佐剂)皮下注射 1 mL 免疫,间隔 7 d 后加强免疫全菌抗原 2 mL。末次注射后 14 d 采用玻板凝集法试血,效价达标后,取血,无菌分离血清,加万分之一硫柳汞,-20 °C 冻存。作为微量凝集试验中阳性对照之用。

1.2.3.2 凝集抗原的制备^[18]:取二级种子菌液接种营养琼脂平板,37 °C 培养 20~24 h,然后用含 0.5% 甲醛的生理盐水洗下菌苔,4 °C 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 洗涤沉淀,重复 3 次,121 °C 高压 2 h 热灭活,利用麦氏比浊管调整浓度至 30 亿菌·mL⁻¹,即为凝集原,-4 °C 冻存。

1.2.3.3 微量凝集试验:参照刘纪成^[18]及新城微量血凝抑制试验的方法略加修饰,设立阳性、阴性血清及抗原对照,置 37 °C 温箱作用 4 h,观察结果。

1.2.3.4 间接 ELISA 检测血清抗体效价:采用本室自建的“用于微囊化大肠杆菌口服疫苗免疫抗体检测的检测方法及检测试剂盒”对口服免疫大鼠产生的免疫抗体进行抗体效价检测。具体检测方法包括抗原包被、标准曲线绘制及回归方程的建立及免疫血清效价检测(专利受理号:201610220735.4)^[19]。

抗原包被:用碳酸盐缓冲液将抗原按一定比例稀释,加入抗原包被板,4 °C 包被过夜;经室温平衡后弃去液体,用 PBST 洗涤后,在吸水纸上拍干,每孔加入 BSA 封闭液,经温育、洗涤后吸水纸拍干,加入经 BSA 稀释的血清,再经温育、洗涤后拍干,加入经 BSA 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标羊抗大鼠 IgG,温育、洗涤后,加入 OPD(邻苯二胺)底物溶液,经振荡、温育后,加入终止液经振荡、静置作用后,酶标仪 492 nm 和 630 nm 双波长测定其 OD 值。

标准曲线及回归方程的建立:取 15 份按 1:50 稀释的效价不同的已知羊大肠杆菌阳性血清,以 1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800 系列稀释,按优化好的间接 ELISA 操作程序进行操作。定义每份血清的 ELISA 效价(ET)为 OD_{492/630 nm} 值大于阴性临界值所对应的最高稀释倍数。以每份血清按 1:50 稀释时的 OD_{492/630 nm} 值为横坐标,以相应的 ELISA 效价倒数的对数为纵坐标,作散点图,得出标准曲线及回归方程。

1.2.4 淋巴细胞转化试验

1.2.4.1 大鼠脾淋巴细胞悬液的制备:分别于免疫

后 7、21、28 d 后每组颈椎脱臼处死大鼠 3 只, 无菌摘取大鼠脾, 按照郭曦等^[20]的方法制备大鼠脾淋巴细胞悬液; 活细胞数应在 95% 以上, 调整细胞浓度至 $2 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

1.2.4.2 T 淋巴细胞转化试验(MTT 法): 参照张冰冰等^[21]建立的羔羊外周血单个核细胞转化检测的 MTT 比色法略加改动: 在 96 孔细胞培养板中按 $2 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞密度铺板, 每孔加入细胞 100 μL , 其他步骤与文献介绍方法相同, 酶标仪 OD_{492 nm} 处测定吸光度值。按下列公式计算刺激指数 SI (stimulate index, SI):

刺激指数 = (试验组平均 OD 值 - 机器底板平均 OD 值) / (对照组平均 OD 值 - 机器底板平均 OD 值)。

1.2.5 肠黏膜分泌型免疫球蛋白 A (sIgA) 的检测

1.2.5.1 样品采集及处理: 分别在免疫后 7、14、21、28、35 d 各组颈椎脱臼处死大鼠 3 只, 参照牡丹等^[22]方法摘取大鼠自幽门下 5 cm 至回盲部间约 20 cm 肠段, 平铺于滤纸上, 纵行剪开, 无菌 PBS 反复冲洗肠腔表面后, 用载玻片轻刮黏膜表面黏液, 收集于 1.5 mL 无菌 Eppendorf 管内, 分别加入 0.5 mL 的 PBS, 振荡混匀, 4 °C 离心 ($10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15 min), 取上清 -20 °C 保存。参照朱洪艳等^[23]利用双抗体夹心 ELISA 法检测牛初乳 sIgA, 该方法简单、快速、灵敏性高, 本试验同样采用双抗体夹心 ELISA 法对大鼠进行肠黏膜 sIgA 水平检测, 按试剂盒说明书进行检测。

1.2.5.2 试剂盒操作步骤: 按顺序在标准品孔加入标准品 S₀→S₅, 每孔加入 50 μL , 质量浓度分别为 0、2、4、8、16 和 32 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。待测样品孔每孔加

待测样 10 μL , 然后加样品稀释液 40 μL 。分别设标准品孔、待测样品孔和空白对照孔。空白孔不加任何液体。每孔加辣根过氧化物酶标二抗 100 μL , 37 °C 60 min。加洗涤液, 静置 1 min 后弃去, 如此重复洗板 5 次, 拍干。每孔先加显色剂 A 液 50 μL , 再加显色剂 B 液 50 μL , 轻轻振荡混匀, 37 °C 避光显色 15 min。加终止液 50 μL 终止反应 (颜色由蓝色立转黄色)。以空白孔调零, 在加终止液后 15 min 内, 用 450 nm 波长测量各孔的吸光度 (OD 值)。

根据标准品的浓度及对应的 OD 值, 计算出标准曲线的直线回归方程, 再根据样品的 OD 值, 在回归方程中计算出对应样品的浓度, 再乘以样品稀释倍数算出样品最终浓度。

1.2.6 试验数据处理 本试验中每组样本数 $n=3$, 数据结果以 " $\bar{x} \pm s_x$ " 表示。所有数据采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学处理, 对照组与各试验组之间进行单因素方差分析 (ANOVA)。

2 结果

2.1 特异抗体水平微量凝集试验检测

微量凝集试验检测疫苗免疫后各试验组大鼠不同免疫时间的凝集效价对数 (log₂) 结果如图 1 所示, 口服试验组和注射组的抗体效价在免疫后均不断增高, 并在二免后两周即免疫 28 d 时达到高峰, 此后抗体效价出现下降。其中, 口服试验组的抗体效价均低于同期的注射组。

2.2 特异抗体水平间接 ELISA 检测

经测定获得的最佳抗原包被浓度为 15 亿菌 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的细菌浓度 (其蛋白质含量为 4.75 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 血清稀释度选用 1:50。

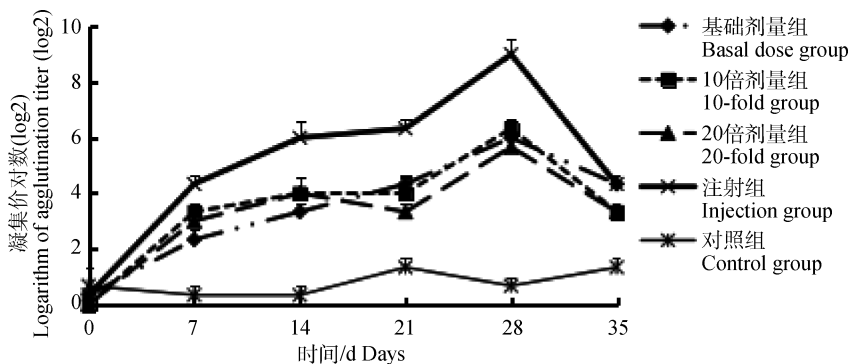


图 1 微量凝集试验检测不同疫苗免疫后大鼠特异抗体水平变化结果

Fig. 1 The specific antibody level on rats by micro-agglutination test

依据公式:阴阳性临界值=阴性样本 OD 平均值 + $3 \times s$, 经测定获得其阴性血清平均值为 0.163, 标准差为 0.093。经计算获得阴阳性临界值为 0.444。确定血清样品的 P/N 值 ≥ 2.1 且临界值 ≥ 0.444 即为阳性。

2.2.1 效价标准曲线和回归方程的建立 以血清按 1:50 稀释时的 OD 值为横坐标, 以相应的 ELISA 效价(ET)倒数的对数为纵坐标, 所得的标准曲线见图 2, 标准曲线的回归方程 $\lg[1/ET] = 1.5564OD_{492/630\text{ nm}} + 1.3295, R^2 = 0.6927$ 。

2.2.2 不同免疫时间各组特异抗体间接 ELISA 检测 对大鼠饲喂蜂胶佐剂口服疫苗免疫后 7、14、21、28、35 d 各试验组的免疫血清进行间接 ELISA 检测, 所测得 OD 值见表 1。免疫后口服试验组的各剂量组和注射组的 OD 均显著高于对照组 ($P <$

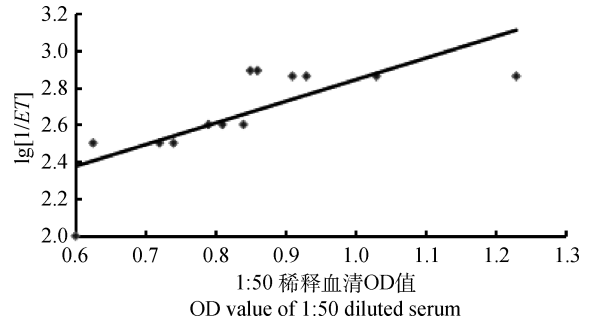


图 2 标准曲线

Fig. 2 Standard curve

0.05), 免疫后 28、35 d 注射组 OD 显著高于口服试验组 ($P < 0.05$)。免疫后口服试验组的各剂量组之间 OD 差异不显著 ($P > 0.05$)。

2.3 T 淋巴细胞转化试验

如表 2 所示, 免疫 7 d 后, 微囊化口服疫苗三个

表 1 大鼠特异抗体的间接 ELISA 检测结果 ($OD_{492/630\text{ nm}}, \bar{x} \pm s_x, n=3$)

Table 1 The results of specific antibody level in rats by indirect ELISA test ($OD_{492/630\text{ nm}}, \bar{x} \pm s_x, n=3$)

免疫时间/d Immunization days	对照组 Control group	注射组 Injection group	口服试验组 Oral test group		
			基础剂量 Basal dose	10 倍剂量 10-fold	20 倍剂量 20-fold
7	0.10 ± 0.06	0.40 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.38 ± 0.13	0.38 ± 0.04
14	0.12 ± 0.05	0.50 ± 0.06	0.42 ± 0.04	0.49 ± 0.03*	0.50 ± 0.07*
21	0.08 ± 0.01	0.60 ± 0.02**	0.52 ± 0.05**	0.53 ± 0.09**	0.56 ± 0.05**
28	0.09 ± 0.02	0.89 ± 0.10***	0.67 ± 0.05b**	0.71 ± 0.03b**	0.75 ± 0.05b**
35	0.09 ± 0.02	0.55 ± 0.03a**	0.40 ± 0.03 ^b	0.39 ± 0.02 ^b	0.41 ± 0.05 ^b

表中数据进行单因素方差分析, 同行数据间均与对照组比较, 不同上标小写字母表示 $P < 0.05$, 差异显著, 大写字母表示 $P < 0.01$, 差异极显著; 同列数据间均与免疫第 7 天数据比较, * 表示 $P < 0.05$, 差异显著, ** 表示 $P < 0.01$, 差异极显著

The data was analyzed by one way ANOVA test, in each row the data was compared with the control, the different superscript lowercase letters represent $P < 0.05$, showing the significant difference, whereas the different superscript capital letters present $P < 0.01$, showing the extremely significant difference; in each column the data was compared with that at day 7, * and ** mean as the aforementioned

表 2 大鼠脾淋巴细胞转化试验结果 (SI 值, $\bar{x} \pm s_x, n=3$)

Table 2 The results of T lymphocyte transformation test of spleen of rat (SI value, $\bar{x} \pm s_x, n=3$)

免疫时间/d Immunization days	对照组 Control group	注射组 Injection group	口服试验组 Oral test group		
			基础剂量 Basal dose	10 倍剂量 10-fold	20 倍剂量 20-fold
7	0.23 ± 0.03 ^d	0.21 ± 0.02 ^d	1.38 ± 0.05 ^a	1.28 ± 0.11 ^{bc}	1.23 ± 0.08 ^b
21	1.12 ± 0.01 ^b	1.13 ± 0.02 ^{ab}	1.18 ± 0.03 ^a	1.14 ± 0.05 ^{ab}	1.16 ± 0.02 ^{ab}
28	1.78 ± 0.15	1.75 ± 0.58	1.13 ± 1.09	1.15 ± 1.17	1.48 ± 0.60

表中数据进行单因素方差分析, 同行数据间均与对照组比较, 不同上标小写字母表示 $P < 0.05$, 差异显著, 大写字母表示 $P < 0.01$, 差异极显著

The data was analyzed by one way ANOVA, in each row the data was compared with the control, the different superscript lowercase letters represent $P < 0.05$, showing the significant difference, whereas the different superscript capital letters present $P < 0.01$, showing the extremely significant difference

剂量组的 T 淋巴细胞转化 SI 值均显著高于注射组和对照组 ($P < 0.05$); 口服基础剂量组的 SI 值显著高于 20 倍剂量组 ($P < 0.05$), 10 倍剂量组与 20 倍剂量组之间差异不显著 ($P > 0.05$); 免疫 21 d 后, 口服基础剂量组的 SI 值显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而其他组的 SI 值与对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。在免疫后 28 d 时, 口服各剂量组和注射组的 SI 值与对照组差异均不显著 ($P > 0.05$)。

2.4 大鼠肠黏膜分泌型免疫球蛋白 A (sIgA) 的检测

2.4.1 标准曲线的建立 制得试剂盒标准曲线回归方程为 $y = 0.0354x - 0.0045$ ($R^2 = 0.9896$), 见图 3。

2.4.2 大鼠肠黏膜分泌型免疫球蛋白 A 检测 各试验组大鼠肠黏膜分泌型免疫球蛋白 A (sIgA) 的含量随免疫时间的变化如图 4 所示: 口服试验组的各剂量组的 sIgA 含量与同期的注射组和对照组

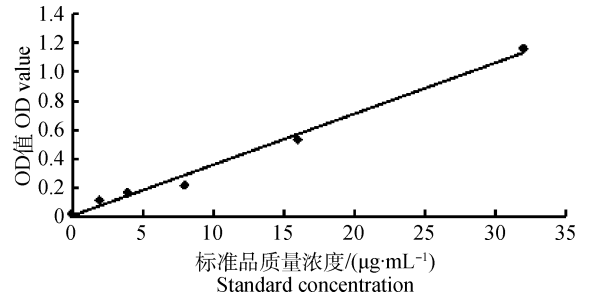


图 3 标准曲线

Fig. 3 Standard curve

相比含量均较高。除 10 倍剂量组外其余各组的 sIgA 含量均在免疫后 21 d 达到高峰, 其中基础剂量组 sIgA 的含量最高, 达 $33.7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。但在免疫后 21 d 后各试验组的 sIgA 含量均出现下降趋势, 且在免疫后 35 d 时各组之间的 sIgA 含量变化不大, 基本相同。

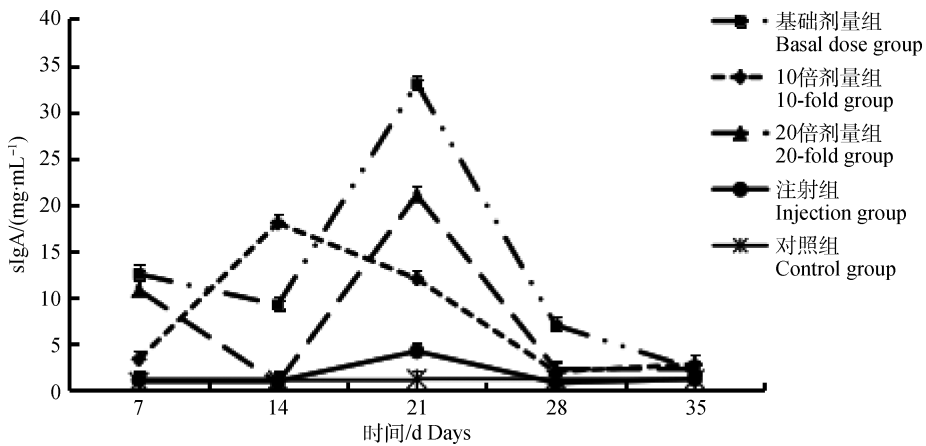


图 4 各组 sIgA 含量免疫后的变化

Fig. 4 sIgA content in rats after the inoculation

3 讨论

黏膜免疫系统是机体抵御外界病原微生物入侵和感染的第一道防线, 也是机体感染致病菌的主要部位之一, 它对于分布于呼吸道、消化道和泌尿生殖道等黏膜处的病原尤为重要^[24]。口服接种疫苗后不仅可以刺激机体在胃肠道产生局部免疫应答, 而且可以通过共同黏膜免疫系统 (CMIS) 引起全身黏膜系统产生免疫效果^[25]。缺点是所需抗原量和接种次数要比非胃肠道途径的多。

任燕等^[26]制备包裹哈维弧菌 (*Vibrio harveyi*, Vh) 重组外膜蛋白 Omp K 的壳聚糖-海藻酸钠复合微囊口服疫苗免疫斜带石斑鱼, 发现微囊疫苗组血

清抗体效价峰值为 29, 明显高于 Omp K 蛋白组; 微囊疫苗组后肠黏膜上清的吸光值明显高于 Omp K 蛋白组和空白对照组, 说明制备的壳聚糖-海藻酸盐复合微囊疫苗口服石斑鱼后, 具有较好的免疫效果。H. C. Flick-Smith 等^[27]将微囊化炭疽杆菌疫苗通过口服途径接种于小鼠, 主要抗原为炭疽杆菌重组保护性抗原 (RPA), 以此刺激小鼠胃肠黏膜诱导其产生特异性免疫保护, 免疫的全部小鼠 RPA—特异性抗体滴度高于空白对照组并差异显著, 其后对全部小鼠进行攻毒试验, 结果证明 RPA 微囊化口服疫苗经口给药可刺激胃肠黏膜免疫应答, 有效保护小鼠。

为达到较好的免疫效果, 本试验过程中用含菌

量为 $7.52 \times 10^{11} \cdot \text{g}^{-1}$ 干粉的微囊化口服疫苗按基础剂量 ($0.05 \text{ g} \cdot \text{只}^{-1}$)、10 倍剂量 ($0.5 \text{ g} \cdot \text{只}^{-1}$) 和 20 倍剂量 ($1 \text{ g} \cdot \text{只}^{-1}$) 分别进行两次免疫,同时设立注射组和对照组。本试验是首次对微囊包被羊大肠杆菌灭活疫苗的口服效果的初步评价,剂量选取范围较大,然后在后续研究中再进一步缩小剂量范围,筛选最佳口服免疫剂量。添加蜂胶作为口服疫苗的佐剂,可引起特异性免疫反应,且能够刺激机体产生良好的免疫保护^[27]。

微量凝集试验和酶联免疫吸附试验是目前检测羊大肠杆菌病抗体效价的有效检测方法,本次试验通过微量凝集试验和间接 ELISA 法对血清进行抗体效价的检测发现两种方法下均可检出口服组与注射组于免疫 28 d 抗体效价达到高峰。微量凝集试验用时较短,2~3 h 便可完成整个试验流程,但通过肉眼观察结果具有一定主观性,适用于基层养殖户快速、初步检测羊大肠杆菌病抗体效价,而 ELISA 方法的特异性和灵敏度较微量凝集试验高,且待检血清用量较少,操作简便,便于大批量检测。通过间接 ELISA 方法检测不同免疫时间大鼠免疫血清的抗体效价发现疫苗免疫后 7、14、21 d 口服组和注射组均可产生抗体效价,口服试验组分为基础剂量组、10 倍剂量组和 20 倍剂量组,试验结果表明三个不同剂量组的实验大鼠均产生了免疫保护,因而在不影响血清抗体效价水平前提下,尽量采用最低剂量作为推荐剂量,为将来产业化利用奠定成本基础。

大鼠肠黏膜分泌型免疫球蛋白 A 检测结果发现口服试验组的各组 sIgA 含量均高于注射组和对照组,对照组免疫前后 sIgA 含量基本无变化。证明微囊化口服大肠杆菌疫苗可通过刺激胃肠道黏膜产生确实的黏膜免疫,产生大量 sIgA,通过阻滞外界羊源大肠杆菌病原微生物在全身黏膜处黏附定殖,从而减轻对机体的损害伤,产生一定的免疫保护作用。

笔者采用 MTT 法测定大鼠疫苗免疫后脾 T 淋巴细胞增殖情况,以刺激指数变化评价细胞免疫情况。免疫 7 d 后口服组的刺激指数 SI 值显著高于对照组和注射组 ($P < 0.05$),口服低剂量组 SI 值高于高剂量组。至免疫后 28 d 各试验组的 SI 值差异均不显著 ($P > 0.05$)。试验中发现当延长培养时间或增大细胞密度时,对应检测到 $\text{OD}_{492 \text{ nm}}$ 值随之增大,并随着免疫时间的增加,各组 $\text{OD}_{492 \text{ nm}}$ 值也不断

增大,但由于阴性对照本底值也较高,所以 SI 值变化尚不足以说明细胞免疫效果,有待进一步研究确定。本次研究证明通过疫苗口服免疫大鼠后,可以诱导机体产生与注射组一样的体液免疫,但相应的抗体效价低。口服组的各剂量组疫苗的含菌量分别是注射组的 3.76 倍、37.6 倍和 75.2 倍,由此可以看出要产生相同的血清抗体效价,口服免疫需要数倍甚至数十倍于注射组的抗原剂量,因此,在后续试验中可以通过提高单位疫苗中的菌含量或寻找高效的口服免疫佐剂来提高动物体液免疫水平。

综上所述,微囊化羊源大肠杆菌口服灭活疫苗可产生与注射组同样的体液免疫,同时还可以刺激大鼠机体产生较好细胞免疫和黏膜免疫。本次试验中所制备的微囊化羊源大肠杆菌口服灭活疫苗经过进一步工艺优化后有望成为一种大肠杆菌口服疫苗新剂型。

参考文献 (References):

- [1] 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所. 动物传染病 [M]. 哈尔滨:哈尔滨出版社, 1999.
Harbin Veterinary Research Institute. Animal infectious diseases [M]. Harbin: Harbin Publishing House, 1999. (in Chinese)
- [2] 郎洪武,杨汉春. 口蹄疫研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2005, 39(10): 16-21.
LANG H W, YANG H C. A review on foot-and-mouth disease [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2005, 39(10): 16-21. (in Chinese)
- [3] WANG J, MEERS J, SPRADBROW P B, et al. Evaluation of immune effects of fowlpox vaccine strains and field isolates [J]. *Vet Microbiol*, 2006, 116(1-3): 106-119.
- [4] LIN D G, SUN S S, DU L J, et al. Natural and experimental infection of dogs with pandemic H1N1/2009 influenza virus [J]. *J Gen Virol*, 2012, 93(Pt 1): 119-123.
- [5] WALKER R I. Considerations for development of whole cell bacterial vaccines to prevent diarrheal diseases in children in developing countries [J]. *Vaccine*, 2005, 23(26): 3369-3385.
- [6] 唐丽杰,欧 笛,葛俊伟,等. 表达猪传染性胃肠炎病毒 S 基因的重组乳酸乳球菌的构建及免疫原性分析 [J]. 微生物学报, 2007, 47(2): 340-344.
TANG L J, OU D, GE J W, et al. Construction of recombinant *Lactococcus lactis* expressing porcine

- transmissible gastroenteritis spike glycoprotein and analysis of immunogenicity[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(2): 340-344. (in Chinese)
- [7] BARAS B, BENOIT M, POULAIN-GODEFROY O, et al. Vaccine properties of antigens entrapped in microparticles produced by spray-drying technique and using various polyester polymers[J]. *Vaccine*, 2000, 18(15): 1495-1505.
- [8] LEBENS M, SUN J B, SADEGHI H, et al. A mucosally administered recombinant fusion protein vaccine against schistosomiasis protecting against immunopathology and infection[J]. *Vaccine*, 2003, 21(5-6): 514-520.
- [9] 马 蕾,姚 刚,杨 光,等. 微囊化与非微囊化胆囊收缩素卵黄抗体对小鼠促生长免疫效果的比较研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2013, 40(12): 216-219.
- MA L, YAO G, YANG G, et al. Comparative study of microencapsulated and unmicroencapsulated CCK-IgY on the growth immunizing effect in mice[J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2013, 40(12): 216-219. (in Chinese)
- [10] WANG G, CHEN J, SHI Y. Preparation of microencapsulated xanthophyll for improving solubility and stability by nanoencapsulation [J]. *J Food Eng*, 2013, 117(1): 82-88.
- [11] AGHBASHLO M, MOBILI H, RAFIEE S, et al. Energy and exergy analyses of the spray drying process of fish oil microencapsulation[J]. *Biosystems Eng*, 2012, 111(2): 229-241.
- [12] SCHER H B, RODSON M, LEE K S. Microencapsulation of pesticides by interfacial polymerization utilizing isocyanate or aminoplast chemistry[J]. *Pest Manage Sci*, 1998, 54(4): 394-400.
- [13] FRIEDMAN-RUDOVSKY J. Chagas disease. With novel paint, chemist aims to vanquish the vinchuca [J]. *Science*, 2012, 336(6082): 666-667.
- [14] STOJAKOVIC D, BUGARSKI B, RAJIC N. A kinetic study of the release of vanillin encapsulated in Carnauba wax microcapsules[J]. *J Food Eng*, 2012, 109(3): 640-642.
- [15] WANG Q X, YAN D D, MAO L G, et al. Efficacy of 1, 3-dichloropropene plus chloropicrin gelatin capsule formulation for the control of soilborne pests[J]. *Crop Protection*, 2013, 48: 24-28.
- [16] SHAKWEH M, BESNARD M, NICOLAS V, et al. Poly (lactide-co-glycolide) particles of different physicochemical properties and their uptake by peyer's patches in mice[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2005, 61(1-2): 1-13.
- [17] 黄嘉骊,苏 艳,周 军,等. 致病性大肠杆菌微胶囊口服疫苗的制备及对其免疫功能的评价[J]. *新疆农业大学学报*, 2009, 32(1): 31-34.
- HUANG J S, SU Y, ZHOU J, et al. Preparation of the oral microencapsulated vaccine of *Escherichia coli* and its immunological function[J]. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 2009, 32(1): 31-34. (in Chinese)
- [18] 刘纪成. 鸡痢疾志贺氏菌灭活苗免疫抗体微量凝集试验方法的建立及应用[D]. 郑州: 河南农业大学, 2007.
- LIU J C. Establishment and application of micro-agglutination test for detection of vaccine immunological antibodies against shigella infection in chicken[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2007. (in Chinese)
- [19] 新疆农业大学. 用于微囊化大肠杆菌口服疫苗免疫抗体检测的检测方法及检测试剂盒: 中国, 201610220735. 4[P]. 2016-4-11.
- Xinjiang Agriculture University. Detection methods and kit of the oral microencapsulated vaccine of *Escherichia coli*; China, 201610220735. 4[P]. 2016-4-11. (in Chinese)
- [20] 郭 曦,王继宏,肖雪珍,等. 4种中药多糖对小鼠脾淋巴细胞增殖的影响[J]. *中国兽医杂志*, 2011, 47(8): 56-59.
- GUO X, WANG J H, XIAO X Z, et al. Effect of four Chinese herbal polysaccharides on the proliferation of mouse splenic lymphocytes[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2011, 47(8): 56-59. (in Chinese)
- [21] 张冰冰,赵 魁,贺文琦,等. 羔羊外周血单个核细胞转化 MTT 比色法最佳检测条件的筛选[J]. *动物医学进展*, 2011, 32(3): 65-68.
- ZHANG B B, ZHAO K, HE W Q, et al. Study on optimal condition of MTT in PBMC transformation [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2011, 32(3): 65-68. (in Chinese)
- [22] 杜 丹,方立超,陈丙波,等. 乳酸杆菌和低聚异麦芽糖对抗生素相关腹泻大鼠肠粘膜 SIgA 的影响[J]. *放射免疫学杂志*, 2005, 18(1): 37-40.
- DU D, FANG L C, CHEN B B, et al. Effect of lactobacillus acidophilus combined with ISO-malto-oligosaccharide on the intestinal mucosal secretion of SIgA in rat models with antibiotic-associated diarrhea

- (AAD) [J]. *Journal of Radioimmunology*, 2005, 18(1): 37-40. (in Chinese)
- [23] 朱洪艳,赵红宇,周盛华,等.牛初乳中 sIgA 双抗夹心 ELISA 检测方法的建立[J]. *中国乳品工业*, 2011, 39(3): 50-52.
ZHU H Y, ZHAO H Y, ZHOU S H, et al. Establishment of a sandwich ELISA for quantitative measurement of sIgA[J]. *China Dairy Industry*, 2011, 39(3): 50-52. (in Chinese)
- [24] TAKAHASHI I. Mucosal immune system: the second way of the host defense [J]. *Nihon Rinsho*, 2007, 65: 102-108.
- [25] 姜 燕,吕昌龙.口服疫苗与肠粘膜免疫效应机制 [J]. *国际免疫学杂志*, 2006, 29(5): 273-276.
JIANG Y, LV C L. Effects and mechanism of oral vaccine on intestinal mucosal immunity[J]. *International Journal of Immunology*, 2006, 29(5): 273-276. (in Chinese)
- [26] 任 燕,张小江,陶家发,等.壳聚糖-海藻酸盐复合微囊疫苗的制备及其对斜带石斑鱼的口服免疫效果 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2015, 28(2): 110-114.
REN Y, ZHANG X J, TAO J F, et al. Preparation and immune effect of chitosan-alginate microcapsules containing *Vibrio harveyi* antigen Ompk in orange-spotted groupers [J]. *Chinese Journal of Biologics*, 2015, 28(2): 110-114. (in Chinese)
- [27] FLICK-SMITH H C, EYLES J E, HEBDON R, et al. Mucosal or parenteral administration of microsphere-associated Bacillus anthracis protective antigen protects against anthrax infection in mice [J]. *Infect Immun*, 2002, 70(4): 2022-2028.
- [28] REDFIELD R R, INNIS B L, SCOTT R M, et al. Clinical evaluation of low-dose intradermally administered hepatitis B virus vaccine. A cost reduction strategy [J]. *JAMA*, 1985, 254(22): 3203-3206.

(编辑 白永平)