

禽流感病毒抗原-抗体复合物的制备及其免疫原性

孙瑞芹^{1,2} 高云英² 王新卫¹ 何宏轩¹

【摘要】目的 制备禽流感病毒抗原-抗体复合物,并检测其免疫原性。方法 以 H5 亚型禽流感病毒的 HA 蛋白为抗原,其病毒的高免卵黄为抗体,将抗原与抗体按不同比例混合,制备禽流感病毒抗原抗体复合物。免疫 1 日龄 SPF 仔鸡,进行保护力试验,于免疫后不同时间检测血清 HI 抗体水平,并与 H5 亚型油乳剂灭活疫苗进行比较。结果 抗原与抗体比例为 1:0.6 的抗原-抗体复合物在免疫仔鸡 15 d 后,其诱导的平均抗体水平达 6.5 log₂,与 H5 亚型禽流感油乳剂灭活疫苗(6.2 log₂)相比,差异无统计学意义;在等量病毒攻击后,二者对仔鸡的保护率相同(93.3%)。结论 制备的禽流感病毒抗原-抗体复合物具有良好的免疫原性,为研制禽流感新型复合物疫苗提供了依据。

【关键词】 禽流感病毒;H5 亚型;抗原-抗体复合物;免疫原性;保护率

Preparation and Immunogenicity of Antigen-Antibody Complex of Avian Influenza Virus

SUN Rui-qin^Δ, GAO Yun-ying, WANG Xin-wei, et al(^ΔInstitute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

【Abstract】 Objective To prepare antigen-antibody complex of avian influenza virus and determine its immunogenicity. Methods Yolk antibody was prepared by immunizing hens with HA protein of avian influenza virus subtype H5, and mixed with HA protein at various ratios. SPF chickens at 1 d of age were immunized with the prepared antigen-antibody complex and challenged with avian influenza virus strain A/Environment/Qinghai/1/2008 (H5N1) to observe the protective effect. The HI antibody titers in sera of chickens were determined on various days after immunization and compared with those of chickens immunized with inactivated avian influenza H5 virus oil-emulsion vaccine. Results The mean antibody level of chickens 15 d after immunization with antigen-antibody complex at a concentration ratio of 1:0.6 reached 6.5 log₂, which showed no significant difference with that of chickens immunized with inactivated avian influenza H5 virus oil-emulsion vaccine. Both the protective rates of the prepared antigen-antibody complex and inactivated avian influenza H5 virus oil-emulsion vaccine against the challenge with avian influenza virus at equal concentrations were 93.3%. Conclusion The prepared antigen-antibody complex of avian influenza virus showed good immunogenicity, which provided a basis for development of novel avian influenza virus complex vaccines.

【Key words】 Avian influenza virus; H5 subtype; Antigen-antibody complex; Immunogenicity; Protective rate

禽流感(Avian influenza, AI)是由禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)引起的一种急性传染病。AIV 为正黏病毒科的单股负链 RNA 病毒,根据血凝素(HA, 1~16)和神经氨酸酶(NA, 1~9)的不同,可以分为许多亚型,又可根据致病性的差异,分为高致病性和低致病性禽流感病毒^[1]。AIV 亚型众多,其 HA、NA 基因易发生漂移^[2],导致抗原性改变,而且病毒在长期的进化过程中,其他各段基因也不同程度地发生改变,因此 AIV 的宿主^[3]范围在不断扩大,某些突变株的致病力也有所增加,从而增加了在人际间传播的可能性^[4]。AIV 可在宿主中不断

发生变异和基因重组^[5,6],将是 21 世纪养禽业面临的巨大威胁,同时也间接威胁人类健康,因此,预防禽流感具有重要的公共卫生意义。

目前,尚无可有效预防和治疗禽流感的药物,抗原-抗体复合物疫苗(Antigen-antibody complex vaccine, Ag-Ab)也称治疗性疫苗或免疫复合物疫苗,具有这种功能。Haddad 等^[7]已成功研制出法氏囊抗原-抗体复合物疫苗,并在家禽中得到应用。本实验将具有生物学活性的 HA 蛋白与相应的高免卵黄抗体进行配比,制备禽流感病毒抗原-抗体复合物,检测其免疫原性,并与常规禽流感油乳剂灭活疫苗进行比较,现将结果报道如下。

1. 材料与方 法

1.1 病毒、抗原及疫苗

禽流感病毒 A/Environment/Qinghai/1/2008(H5N1)

基金项目:中国科学院动物研究所前沿领域创新项目(KSCX3-10Z0617),十一五国家科技支撑计划(2006BAD06A01)。

作者单位:1 中国科学院动物研究所(北京 100101) 2 西北农林科技大学动物医学院(陕西杨凌 712100)。

通讯作者:何宏轩 E-mail hehx@ioz.ac.cn;

高云英 E-mail gayuyi16@tom.com

由中国科学院动物研究所野生动物疫病研究组分离并保存 ,血凝效价为 1 : 512 ,ELD 为 $10^{-7}/0.1 \text{ ml}$, $LD_{50} \leq 10^{-8.5}/\text{ml}$;HA 蛋白抗原由清华大学提供 ,为真核表达的 H5 亚型禽流感病毒 HA 基因融合蛋白 ,浓度为 13.8 mg/ml ,HA 效价为 2^5 ,H5 亚型禽流感油乳剂灭活疫苗购自中国兽药监察所。

1.2 实验动物

1 日龄 SPF 仔鸡购自北京梅里亚实验动物中心。

1.3 高免卵黄抗体(IgY)的制备

参照文献[8]方法。选择健康蛋鸡 ,接种 H5 亚型禽流感油乳剂灭活疫苗 , 1 ml/只 ,初免后 7 ~ 10 d 加强免疫 2 ml/只 ,2 次免疫后 ,每隔 3 d 采用中和试验测定其卵黄抗体效价 ,当效价达 $9 \log_2$ 以上时 ,收集鸡蛋 ,分离蛋黄 ,用无菌超纯水 1 : 1 稀释 ,制成卵黄液 ,用改良水稀释法纯化^[9] ,浓缩 ,过滤除菌 ,制成禽流感高免卵黄抗体 ,按文献[10]方法进行检定 ,中和效价为 1 : 128 ,浓度为 12.2 mg/ml , -80°C 保存备用。

1.4 抗原-抗体复合物的制备

将 HA 蛋白作 10 倍系列稀释 (1.38 mg/ml) ,分别与浓度为 1.22 、 0.83 和 0.56 mg/ml 的高免卵黄抗体混匀 , 37°C 孵育 1 ~ 2 h , 4°C 过夜 , $12\,000 \text{ r/min}$ 离心 30 min ,弃上清 ,沉淀用 pH 7.0 的 PBS 1 000 倍重悬 , 4°C 保存备用。

1.5 抗原-抗体复合物的免疫原性检测

1.5.1 动物分组及免疫 :取 1 日龄 SPF 仔鸡 75 只 ,随机分为 5 组 ,每组 15 只。 、 、 组分别经皮下接种 3 种不同配比的抗原-抗体复合物(Ag : Ab 比例分别为 : 组 : $1.38 \text{ mg/ml} : 1.22 \text{ mg/ml}$; 组 : $1.38 \text{ mg/ml} : 0.83 \text{ mg/ml}$; 组 : $1.38 \text{ mg/ml} : 0.56 \text{ mg/ml}$) 0.5 ml/只 ; 组皮下接种 H5 亚型禽流感油乳剂灭活疫苗 0.5 ml/只 ; 组为空白对照组 ,皮下接种无菌 PBS 0.5 ml/只 。

1.5.2 保护力试验 :各组动物于免疫后 35 d ,用 $10^{-8.5}LD_{50}/0.1 \text{ ml}$ 的禽流感病毒 A / Environment / Qinghai / 1 / 2008(H5N1)经静脉攻毒 0.1 ml/只 。攻毒后每天观察各组鸡群有无死亡、流鼻涕、咳嗽、甩鼻等支气管炎症状 ,连续观察 10 d。整个试验在中国科学院动物研究所生物安全实验室隔离器内完成。

1.5.3 HI 抗体水平的检测 : 、 、 、 组动物分别于免疫后 7、15、21、28 和 35 d 采血 ,分离血清 ,检测 HI 抗体水平。

1.6 统计学分析

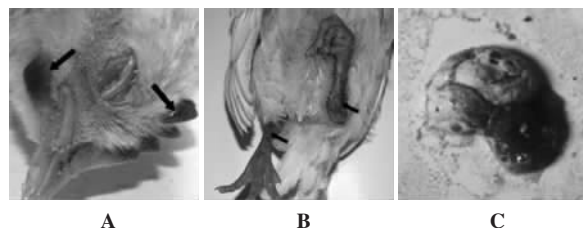
采用 SPSS15.0 统计分析软件进行数据处理 ,

对 HI 抗体水平、攻毒后各组鸡群发病率和死亡率进行单变量双因素方差分析 ,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2. 结果

2.1 抗原-抗体复合物的保护力

结果显示 ,V 组仔鸡在攻毒后第 2 ~ 3 天出现羽毛蓬松、扎堆 ,绿色粪便中带有大量白色尿酸盐 ,冠、肉垂、翅下、趾部有不同程度的出血现象 ,见图 1 ,剖检可见皮下多处出血 ,气管、喉内充满黏液 ,肝脏肿大并呈土黄色花肝 ,小肠黏膜出血 ,盲肠、扁桃体出血等大量禽流感典型症状。在观察期间对照组仔鸡全部死亡。 、 组仔鸡在攻毒后第 4 天出现死亡高峰 ,7 d 后再无死亡发生。 组仔鸡在攻毒后第 4 天死亡 1 只 , 组在攻毒后第 3 天死亡 1 只 ,各组保护率见表 1。抗原-抗体复合物配比以 组($1.38 \text{ mg/ml} : 0.83 \text{ mg/ml}$)最佳 ,其保护率与油乳剂灭活疫苗(组)相当 ,表明抗原-抗体复合物保护效果良好。



A 鸡冠和肉垂出血 ;B 趾部出血 ;C 绿色粪便带有大量尿酸盐

图 1 攻毒后各组仔鸡的临床表现

Fig 1. Clinical symptom of chickens after challenge

表 1 不同配比抗原-抗体复合物的保护力

Tab 1. Protective effect of antigen-antibody complex of various formula

组别	保护率 (%)
组	53.3(8/15)
组	93.3(14/15)
组	66.7(10/15)
组	93.3(14/15)
组	0(0/15)

2.2 免后不同时间的 HI 抗体水平

免后第 7 天 ,各组 HI 抗体滴度均较低($< 1.0 \log_2$) ,且各組间差异无统计学意义($F = 1.550$, $P > 0.05$) ;免后第 15 天 ,各组抗体水平均显著上升($F = 15.401$, $P < 0.01$) ;免后第 21 天抗体水平达平台期。 组的平均抗体滴度始终低于 $5 \log_2$, 组和 组免后 15 d ,平均抗体滴度即达较高水平(组 $6.5 \log_2$, 组 :

6. 2 log₂) ,攻毒前两组的抗体水平仍在 9 log₂ 以上 ,且在 整个 试验 中 ,两者 抗体 水平 差异 均无 统计 学意义 (F = 1. 545 P > 0. 05) ; 组 免 后 21 d 抗体 水平 开始 逐渐 下降 ,攻 毒 前 降 至 6. 8 log₂。 见 图 2。

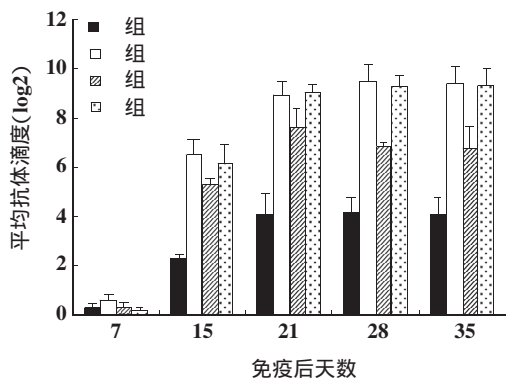


图 2 免后不同时间的 HI 抗体水平

Fig 2. HI antibody levels on various days after immunization with antigen-antibody complexes

3. 讨论

抗原-抗体复合物由于自身具有局限性 ,同时 抗 菌 素 等 发 展 迅 速 ,其 研 究 一 直 处 于 低 迷 状 态 。 近 几 年 ,由 于 一 些 新 病 毒 出 现 [11] 和 旧 病 毒 变 异 [5 6] 导 致 的 疾 病 常 规 疗 法 难 以 治 愈 ,使 抗 原 - 抗 体 复 合 物 重 新 成 为 研 究 的 热 点 。

禽 流 感 病 毒 不 断 重 组 、 变 异 , 难 以 预 防 , 各 种 药 物 也 难 以 取 得 满 意 的 疗 效 。 目 前 市 场 上 用 于 预 防 高 致 病 性 禽 流 感 的 疫 苗 有 灭 活 疫 苗 、 基 因 重 组 疫 苗 、 DNA 疫 苗 等 [12] , 其 中 油 乳 剂 灭 活 疫 苗 比 较 常 用 , 具 有 一 定 的 防 治 作 用 , 但 毒 副 作 用 大 [13] , 效 果 不 理 想 , 对 于 发 病 鸡 群 无 任 何 治 疗 作 用 。 本 实 验 制 备 的 禽 流 感 抗 原 - 抗 体 复 合 物 制 剂 的 特 点 是 以 抗 原 - 抗 体 复 合 为 载 体 , 携 带 抗 原 进 入 机 体 , 一 方 面 其 为 可 溶 性 物 质 , 对 机 体 几 乎 无 副 作 用 , 可 模 仿 机 体 的 二 次 免 疫 应 答 , 在 短 时 间 内 产 生 快 而 强 的 免 疫 反 应 ; 另 一 方 面 这 种 载 体 还 能 起 到 延 缓 病 毒 释 放 的 作 用 [12] 。 本 研 究 结 果 表 明 , 该 复 合 物 接 种 无 母 源 抗 体 的 仔 鸡 后 , 只 有 个 别 仔 鸡 出 现 轻 微 的 反 应 , 在 接 种 后 2 周 抗 体 即 达 较 高 水 平 (> 6 log₂) , 与 油 乳 剂 灭 活 疫 苗 抗 体 水 平 相 当 , 能 有 效 保 护 机 体 免 受 强 毒 的 攻 击 , 二 者 在 攻 毒 后 对 鸡 群 的 保 护 率 基 本 一 致 。

本 实 验 另 外 一 个 关 键 点 是 复 合 物 制 剂 中 抗 体 与 抗 原 之 比 。 复 合 物 制 剂 中 抗 原 - 抗 体 的 最 佳 比 例 应 以 抗 原 稍 过 量 , 延 缓 病 毒 释 放 为 度 。 Jeurissen 等 [12] 在 研 究 法 氏 囊 病 毒 与 抗 体 复 合 物 的 作 用 机 制 中 发 现 , 复 合 物 中 抗 原 与 抗 体 的 比 例 对 其 免 疫 原 性 有 重 要 影 响 , 抗 体 过 量 会 抑 制 复 合 物 对 免 疫 淋 巴 细 胞 的 刺 激

作 用 , 抗 原 稍 过 量 或 抗 原 抗 体 等 价 , 才 能 产 生 有 效 的 免 疫 刺 激 。 Pokric 等 [14] 的 研 究 也 得 出 相 似 结 果 。 本 实 验 参 考 文 献 [15] 方 法 , 得 出 HA 蛋 白 与 IgY 的 最 佳 比 例 为 1 : 0. 6 (组) , 能 有 效 刺 激 机 体 产 生 保 护 性 抗 体 , 抵 抗 高 致 病 性 禽 流 感 病 毒 的 攻 击 。 其 与 常 规 油 乳 剂 灭 活 疫 苗 相 比 , 接 种 时 产 生 的 刺 激 较 小 , 提 高 了 疫 苗 的 安 全 性 。 此 外 , 在 制 备 复 合 物 时 还 发 现 , 抗 原 - 抗 体 复 合 物 孵 育 时 间 越 长 , 复 合 物 制 剂 的 效 价 越 低 。

综 上 所 述 , H5 亚 型 禽 流 感 HA 蛋 白 与 其 高 免 卵 黄 抗 体 复 合 物 能 刺 激 机 体 产 生 特 异 性 抗 体 , 并 有 效 保 护 仔 鸡 免 受 H5 亚 型 禽 流 感 病 毒 的 攻 击 , 但 其 保 护 率 与 H5 亚 型 禽 流 感 油 乳 剂 灭 活 疫 苗 相 比 无 明 显 提 高 。 应 进 一 步 探 索 免 疫 复 合 物 制 剂 中 抗 原 与 抗 体 的 配 比 、 作 用 时 间 以 及 作 用 机 理 , 为 复 合 物 疫 苗 的 商 品 化 奠 定 基 础 。

参 考 文 献

- [1] Kamps B, Hoffmann C, Preiser W. Influenza Report 2006. Paris: Flying Publisher, 2006.
- [2] Ferguson NM, Galvani AP, Bush RM. Ecological and immunological determinants of influenza evolution. Nature, 2003, 422: 428-433.
- [3] Gabriel G, Dauber B, Wolff T, et al. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102 (51): 18590-18595.
- [4] Wang H, Feng Z, Shu Y, et al. Probable limited person-to-person transmission of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus in China. Lancet, 2008, 371 (9622): 1392-1394.
- [5] Lowen AC, Mubareka S, Tumpey TM, et al. The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103(26): 9988-9992.
- [6] Crawford PC, Dubovi EJ, Castleman WL. Transmission of equine influenza virus to dogs. Science, 2005, 310 (5747): 482-485.
- [7] Haddad EE, Whitfill CE, Avakian AP, et al. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. Avian Dis, 1997, 41(4): 882-889.
- [8] 伍海芽, 喻正军, 陈剑锋, 等. AIV H5N1 亚型高免卵黄抗体的制备及理化特性研究. 动物医学进展, 2007, 28(4): 5-8.
- [9] 林元藻, 黄清松, 李春梅, 等. 抗加特纳杆菌卵黄免疫球蛋白 (IgY) 的研究. 广东药学院学报, 2004, 20(5): 517-519.
- [10] 韩克光, 古少鹏. 精制禽流感高免卵黄抗体的研究. 畜禽业, 2004, 147(12): 36-37.
- [11] 向浩, 雷正龙, 聂绍发. 新发传染病应对策略与措施. 疾病控制杂志, 2006, 10(2): 183-185.
- [12] Jeurissen SH, Janse EM, Lehrbachp RD, et al. The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease. Immunology, 1998, 95(3): 494-500.
- [13] 于康震, 付朝阳, 唐秀英, 等. 我国禽流感防控研究进展. 中国兽医学报, 2001, 21(1): 103-106.
- [14] Pokric B, Sladic D, Juros S, et al. Application of the immune complex for immune protection against viral disease. Vaccine, 1993, 11 (6): 655-659.
- [15] 李永红, 毕英佐, 曹永长. 鸡新城疫抗原抗体复合物疫苗的研究. 华南农业大学学报(自然科学版), 2004, 25(1): 88-91.

(收稿日期 2008-12-03)