

马超锋. 肉鸭重组禽流感病毒灭活疫苗(H5N1 亚型, Re-6 株)母源抗体消长规律及免疫程序研究[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(2): 216-217, 290. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.02.070

# 肉鸭重组禽流感病毒灭活疫苗(H5N1 亚型, Re-6 株)母源抗体消长规律及免疫程序研究

马超锋

(河南省信阳市动物疫病预防控制中心, 河南信阳 464000)

**摘要:**选取 1 d 健康无免疫肉鸭 480 羽, 随机分成 A、B、C、D 4 组, 每组 120 羽。B 组、C 组、D 组在 10 d 分别免疫 0.5、0.8、1.0 mL H5N1 亚型禽流感(Re-6 株)灭活疫苗, A 组为非免疫对照组。用 HI 方法检测母源抗体、免疫抗体, 根据母源抗体、免疫抗体消长规律, 探讨 H5N1 亚型禽流感(Re-6 株)灭活疫苗的合理免疫程序。结果显示: 7 d 之前, 鸭群中 90% 以上的个体 HI 效价在 4 log<sub>2</sub> 及以上, 获得的母源抗体可以有效保护鸭群; 14 d 时, 鸭群仅有 56.7% 的个体有保护性抗体; 21 d 还能够检测到极低的母源抗体, 鸭群中 6.7% 的个体有一定的保护力; 28 d 之后, 鸭群所有个体的 HI 效价均在 4 log<sub>2</sub> 以下, 鸭群已经丧失对禽流感病毒的抵抗力。

**关键词:**肉鸭; H5N1 高致病性禽流感; 母源抗体; 免疫抗体; 消长动态; 免疫程序; 血凝抑制试验

**中图分类号:** S852.4    **文献标志码:** A    **文章编号:** 1002-1302(2015)02-0216-02

河南省信阳地区河网密布, 非常适合养殖鸭鹅等水禽。近年来, 信阳地区养鸭业发展迅猛, 饲养量、存栏量逐年增长。肉鸭因其具有饲养周期短、成本低、出栏早等优点, 养殖规模在信阳市各县区逐步扩大。目前, 全市肉鸭存栏量已达 1 800 万羽, 年出栏量达 5 000 万羽, 均居河南省首位。随着肉鸭养殖业的发展, 鸭病尤其是病毒性疾病(鸭瘟、鸭病毒性肝炎、鸭副黏病毒等)流行日趋严重, 特别是禽流感对肉鸭养殖业的打击几乎是毁灭性的。禽流行性感冒简称禽流感(avian influenza, AIV), 是由禽流感病毒引起的 1 种人畜禽共患的传染病。AIV 根据其对家禽致病力的不同分为 3 种, 即高致病性、低致病性、无致病性。H5N1 高致病性禽流感病毒(HPAIV)是严重危害禽类的病原之一, 对人类健康威胁较大, 该亚型禽流感病毒是目前发现的禽流感病毒中感染性最强、致死率最高、流行范围最广的病毒, 已在多个国家发生流行, 给养殖业带来了巨大的经济损失<sup>[1-2]</sup>。现阶段, 疫苗接种仍是我国控制禽流感的主要措施之一<sup>[3]</sup>。根据农业部及河南省畜牧局的要求, 信阳地区从 2012 年 5 月开始, 使用 H5N1 新型禽流感 Re-6 株疫苗对水禽进行防疫<sup>[4]</sup>。养殖户在饲养周期内何时免疫高致病性禽流感疫苗、剂量多少, 国内尚无相关研究。为探讨重组禽流感病毒灭活疫苗(H5N1 亚型, Re-6 株)对肉鸭的免疫效果, 根据国家强制免疫计划及前人的研究, 本研究采用不同剂量疫苗对相同日龄肉鸭进行免疫接种, 并监测抗体的消长规律, 以制定合理的肉鸭免疫程序, 旨在为预防、控制禽流感提供参考。

## 1 材料与方法

收稿日期: 2014-02-23

基金项目: 河南省科技攻关项目(编号: 122102110022)。

作者简介: 马超锋(1981—), 男, 河南禹州人, 硕士研究生, 兽医师, 主要从事重大动物疫病防控研究。E-mail: machaofeng5@163.com。

### 1.1 材料

重组禽流感病毒灭活疫苗(H5N1 亚型, Re-6 株)由辽宁益康生物股份有限公司提供, 批号: 20130801。禽流感 H5 亚型(Re-6 株)血凝抑制试验诊断抗原(批号: 2013005)、禽流感 H5 亚型(Re-6 株)阴性血清(批号: 2013004)。采集 2~3 羽无禽流感及新城疫等抗体的健康公鸡自行配制 1% 鸡红细胞悬液。1 日龄健康无免疫肉鸭 480 羽(河南省潢川县华英集团某饲养场专人饲养)。将雏鸭随机分成 A、B、C、D 4 组, 每组 120 羽, A 组为非免疫对照组, 其余各组均为试验组。B 组、C 组、D 组于 10 日龄分别免疫 0.5、0.8、1.0 mL 重组禽流感病毒灭活疫苗(H5N1 亚型, Re-6 株)。

### 1.2 仪器

Eppendorf 10~1 000 μL 单道移液器及 25~300 μL 多道移液器(德国 Eppendorf 公司), 303 系列电热恒温培养箱(上海树立仪器仪表有限公司), TDZ5-WS 台式低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 采样 A、B、C、D 4 组分别在 1、7、14、21、28、35、42 日龄通过翅静脉采血, 每组随机抽取 30 羽采其血样, 每羽 1~2 mL, 分离血清后冷冻保存备检。

1.3.2 检测 采用血凝(HA)及血凝抑制试验(HI)进行禽流感抗体检测, 按照 GB/T 18936—2003《高致病性禽流感诊断技术》规定的方法进行。禽流感病毒血凝试验抗体检测方法判定标准: 以完全抑制 4 单位抗原的最高血清稀释倍数为该血清的 HI 效价。当阳性对照血清的 HI 效价与已知效价误差不得超过 1 个滴度, 阴性对照血清的 HI 效价不高于 2 log<sub>2</sub> 时, 试验方可成立。被检血清 HI 效价 ≤ 3 log<sub>2</sub> 判为阴性; 效价 = 4 log<sub>2</sub> 判为可疑(可疑样品应重检, 重检效价 ≥ 4 log<sub>2</sub> 判为阳性, ≤ 3 log<sub>2</sub> 判为阴性); 效价 ≥ 5 log<sub>2</sub> 判为阳性。

### 1.4 数据处理

采用算术平均数表示 HI 效价, 采用抗体合格率表示群体

免疫合格情况,群体免疫抗体阳性率达到 70% 判定为群体合格。采用 one-way ANOVA 分析差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同日龄肉鸭 H5N1 亚型禽流感 (Re-6 株) 灭活疫苗

表 1 不同日龄肉鸭 H5N1 亚型禽流感 (Re-6 株) 母源抗体检测结果

| 采血日龄<br>(d) | 检测数量<br>(羽) | HI 效价分布 |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    | HI 效价平均值<br>(log <sub>2</sub> ) | 抗体合格率<br>(%) |                    |
|-------------|-------------|---------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------------------|--------------|--------------------|
|             |             | 0       | 1 log <sub>2</sub> | 2 log <sub>2</sub> | 3 log <sub>2</sub> | 4 log <sub>2</sub> | 5 log <sub>2</sub> | 6 log <sub>2</sub> | 7 log <sub>2</sub> | 8 log <sub>2</sub> |                                 |              | 9 log <sub>2</sub> |
| 1           | 30          |         |                    |                    | 1                  | 2                  | 3                  | 9                  | 6                  | 5                  | 4                               | 6.60         | 96.7               |
| 7           | 30          |         |                    |                    | 3                  | 7                  | 7                  | 10                 | 2                  | 1                  |                                 | 5.13         | 90.0               |
| 14          | 30          |         | 2                  | 5                  | 6                  | 7                  | 5                  | 3                  | 1                  | 1                  |                                 | 3.87         | 56.7               |
| 21          | 30          | 4       | 13                 | 7                  | 4                  | 1                  | 1                  |                    |                    |                    |                                 | 1.60         | 6.7                |
| 28          | 30          | 25      | 5                  |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                                 | 0.17         | 0                  |
| 35          | 30          | 30      |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                                 | 0            | 0                  |
| 42          | 30          | 30      |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                    |                                 | 0            | 0                  |

### 2.2 不同日龄肉鸭 H5N1 亚型禽流感 (Re-6 株) 灭活疫苗保护性母源抗体群体合格率

由图 1 可见,雏鸭 1 d 时,抗体合格率为 96.7%;7 d 时 90% 的个体达到保护要求;14 d 时,30 羽雏鸭中 11 羽抗体效价在 4log<sub>2</sub> 以下,抗体合格率下降至 56.7%;21 d 时只有 2 羽在 4log<sub>2</sub> 以上,鸭群保护率为 6.7%;28 d 以后,整个鸭群无有效禽流感保护性抗体。

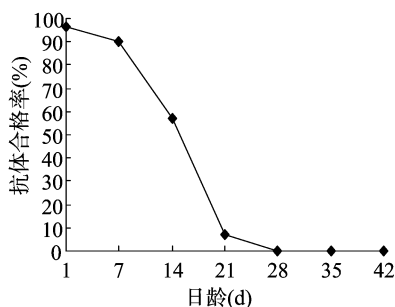


图 1 不同日龄肉鸭 H5N1 亚型禽流感 (Re-6 株) 母源抗体群体合格率

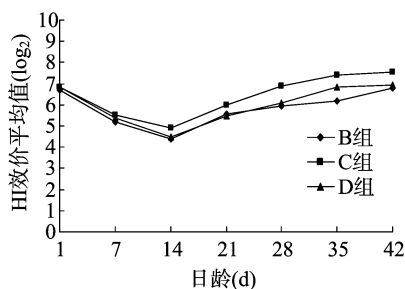


图 2 试验组不同日龄肉鸭 H5N1 亚型禽流感 (Re-6 株) 抗体消长动态

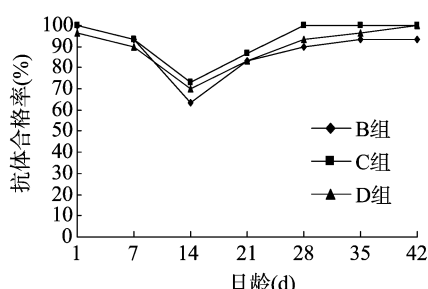


图 3 试验组不同日龄肉鸭 H5N1 亚型禽流感 (Re-6 株) 抗体群体合格率

## 3 结论与讨论

### 3.1 肉鸭 H5N1 亚型禽流感 (Re-6 株) 灭活疫苗母源抗体消长规律

研究表明,种鸭产生的免疫抗体可以通过卵黄传递给雏鸭,起到天然被动免疫的作用,保护雏鸭免受禽流感病毒的侵袭<sup>[5]</sup>。当 HI 效价  $\geq 4 \log_2$  时,可以保护鸭体免受禽流感野毒感染。本研究表明,7 d 之前,鸭群中 90% 以上的个体 HI 效价在  $4 \log_2$  及以上,获得的母源抗体可以有效保护鸭群;14 d 时,鸭群仅有 56.7% 的个体有保护性抗体;21 日龄还能够检测到极低的母源抗体,鸭群中 6.7% 的个体有一定的保护力;28 d 之后,鸭群所有个体的 HI 效价均在  $4 \log_2$  以下,鸭群已经丧失对禽流感病毒的抵抗力。

### 3.2 肉鸭 H5N1 亚型禽流感 (Re-6 株) 灭活疫苗免疫程序

重组禽流感病毒灭活疫苗 (H5N1 亚型, Re-6 株) 是农业部兽医局根据病毒流行病学监测情况、疫苗评估结果以及专家评审意见授权疫苗厂家生产的用于防控水禽禽流感的产品。家禽日龄及品种不同,对疫苗免疫的敏感性也不一致,

### 母源抗体检测情况

由表 1 可知,雏鸭母源抗体效价在 1 d 最高,平均值达  $6.6 \log_2$ ,保护力较好;随着日龄增加,母源抗体开始下降,至 14 d,HI 平均值为  $3.87 \log_2$ ,保护作用大大降低;28 d 鸭群基本无母源抗体,已起不到保护作用。

### 2.3 H5N1 亚型禽流感 (Re-6 株) 灭活疫苗试验组不同日龄肉鸭免疫抗体消长情况

由图 2、图 3 可见,B 组、C 组、D 组 HI 效价均值及抗体合格率均在 14 d 达到最低值,此后逐渐上升。对 B 组、C 组、D 组的 HI 效价均值进行生物统计分析,  $P=0.468 > 0.05$ ,差异不显著;对 B 组、C 组、D 组的抗体合格率进行生物统计分析,  $P=0.665 > 0.05$ ,差异不显著,就数值而言 C 组稍好。

HI 抗体产生的时间、所能达到的高度及维持的时间也存在差别<sup>[6]</sup>。鸭的高致病性禽流感免疫一般需要 2 次免疫才能得到较高的免疫抗体<sup>[7]</sup>。由于肉鸭饲养周期短,45 ~ 60 d 就出栏,免疫时机、剂量选择显得尤为重要。本研究表明,试验期间 3 个试验组的 HI 效价均值均在  $4 \log_2$  以上,0.8 mL 组及 1 mL 组的抗体合格率都在 70% 以上,10 d 对肉鸭注射 0.8 mL 疫苗是比较合理的免疫程序。本试验中,禽流感抗体水平一直偏低,鸭群中个体达到  $9 \log_2$  或  $10 \log_2$  滴度的很少,一方面可能与鸭对重组禽流感病毒灭活疫苗 (H5N1 亚型, Re-6 株) 敏感性较低有关,另一方面与水禽血清中可能存在某种非特异性的凝集因子对鸡红细胞有非特异性凝集作用有关<sup>[8]</sup>。禽流感对鸭群危害极大,一旦发病,会造成巨大的经济损失。为提高禽流感疫苗对肉鸭的免疫效果,建议采取以下措施:疫苗的免疫接种要严格按照说明书进行,免疫注射时,要轻速轻放;提高禽群的免疫力、抗应激能力,免疫前后,给禽群的饮水或饲料中添加黄芪多糖、植物血凝素、蜂灵散等免疫促进剂促进鸭群免疫应答,添加适量的电解多维等营养

(下转第 290 页)

果酸与柠檬酸之间以及奎尼酸与莽草酸含量之间呈极显著正相关<sup>[16]</sup>。但是目前为止,对不同成熟期黄肉桃的糖、酸组成的系统比较还未见报道。在其他果品如砂梨中比较了不同成熟期的酸组分和含量,发现早熟品种总酸较中熟、中晚熟品种高,且与中晚熟品种有显著性差异<sup>[17]</sup>。

本研究对不同成熟期黄肉桃各种糖酸组分进行了系统的比较分析。结果表明,黄肉桃 4 种可溶性糖含量从高到低依次为蔗糖、葡萄糖、果糖、山梨醇,3 种有机酸含量从高到低依次为苹果酸、柠檬酸、奎尼酸,葡萄糖和果糖含量比值接近 1,与前人研究结果<sup>[12,16,18]</sup>一致。本研究结果不同成熟期黄肉桃的可溶性糖、有机酸含量有显著差异,并表现出明显的规律。

随着熟期从早熟到晚熟,蔗糖、奎尼酸含量及其所占总量的比例依次降低,山梨醇、苹果酸和柠檬酸含量及其所占总量的比例依次升高,而葡萄糖和果糖则是先降低再升至最高。早、中、晚熟品种相比较,蔗糖含量依次降低,与 Sweeney 等研究结果<sup>[14]</sup>不一致,这可能是由于 Sweeney 等的研究样本只有 10 份,也可能是本试验晚熟品种样本量与早熟和中熟品种相比偏少,还需增加晚熟品种样本量进行研究。本研究还发现早、中、晚熟黄肉桃比较,苹果酸含量依次升高,奎尼酸相反,表现为依次降低。相关机制有待进一步研究阐明。本研究结果不同成熟期的可溶性糖和有机酸总量差异并不显著,但总酸含量明显表现为早、中、晚熟依次升高,与在砂梨中的研究结果<sup>[17]</sup>相反,可能是树种间的差异。同时糖酸比和甜酸比明显表现为早熟高于中熟和晚熟品种,主要是由于与早熟品种相比,中熟和晚熟品种的蔗糖含量显著降低,苹果酸含量显著升高。本研究结果可为培育甜酸适口风味的黄肉桃品种时选择适宜材料提供依据。

#### 参考文献:

- [1] 王力荣,朱更瑞,方伟超. 桃种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京:中国农业出版社,2005.
- [2] 马之胜,贾云云,王越辉,等. 我国黄肉桃育种研究进展[J]. 江西农业学报,2011,23(10):55-57.
- [3] Nishino H, Murakoshi M, Tokuda H, et al. Cancer prevention by carotenoids[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics,2009,483(2):165-168.
- [4] Rojas - Garbanzoa C, Péreza A M, Bustos - Carmonab J, et al. Identi-

fication and quantification of carotenoids by HPLC - DAD during the process of peach palm(*Bactris gasipaes* H. B. K.) flour[J]. Food Research International,2011,44:2377-2384.

- [5] 蒯定运. 黄桃的颜色与类胡萝卜素的研究[J]. 园艺学报,1983,10(4):225-230.
- [6] 王力荣,朱更瑞,方伟超. 桃种质资源若干植物学数量性状描述指标探讨[J]. 中国农业科学,2005,38(4):770-776.
- [7] Cevallos - Casals B A, Byrnea D, Okie W R, et al. Selecting new peach and plum genotypes rich in phenolic compounds and enhanced functional properties[J]. Food Chemistry,2006,96:273-280.
- [8] 沈志军,马瑞娟,俞明亮,等. 桃果实发育过程中主要糖及有机酸含量的变化分析[J]. 华北农学报,2007,22(6):130-134.
- [9] Keutgen A, Pawelzik E. Modifications of taste - relevant compounds in strawberry fruit under NaCl salinity[J]. Food Chemistry,2007,105(4):1487-1494.
- [10] Roussos P A, Sefferou V, Denaxa N, et al. Apricot (*Prunus armeniaca* L.) fruit quality attributes and phytochemicals under different crop load[J]. Scientia Horticulturae,2011,129(3):472-478.
- [11] Génard M, Bruchou C. multivariate analysis of within - tree factors accounting for the variation of peach fruit quality[J]. Sci Hort, 1992,52:37-51.
- [12] Moriguchi T, Ishizawa Y, Sanada T. Differences in sugar composition in *Prunus persica* fruit and the classification by the Principal Component Analysis[J]. J Japan Soc Hort Sci,1990,59:307-312.
- [13] Wu B H, Quilot B, Kervella J, et al. Analysis of genotypic variation of sugar and acid contents in peaches and nectarines through the Principle Component Analysis[J]. Euphytica,2003,132(3):375-384.
- [14] Sweeney J P, Chapman V J, Hepner P A. Sugar, acid and flavor in flesh fruits[J]. J Amer Diet Asso,1970,57:432-435.
- [15] 沈志军,马瑞娟,俞明亮,等. 红肉桃与其他肉色类型桃糖酸组分的比较[J]. 江苏农业学报,2012,28(5):1119-1124.
- [16] 牛景,赵剑波,吴本宏,等. 不同来源桃种果实糖酸组分含量特点的研究[J]. 园艺学报,2006,33(1):6-11.
- [17] 霍月青,胡红菊,彭抒昂,等. 砂梨品种资源有机酸含量及发育期变化[J]. 中国农业科学,2009,42(1):216-223.
- [18] Robertson J A, Horvat R J, Lyon B G, et al. Comparison of quality characteristics of selected yellow - and white - fleshed peach cultivars[J]. Journal of Food Science,1990,55(5):1308-1311.

(上接第 217 页)

性药物以提高禽群抗应激能力<sup>[9]</sup>;加强对防疫人员的培训,确保免疫效果、免疫密度。

#### 参考文献:

- [1] 郭元吉. 高致病性禽流感研究进展[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2006,20(2):90-93.
- [2] 冯书营,董仕桢,张树道. H5N1 亚型禽流感病毒疫苗的研究现状及应用前景[J]. 中国畜牧兽医,2013,40(9):208-213.
- [3] 张文俊,薛海,钟蕾,等. HA 基因 138 位点突变提高 H5 亚型禽流感疫苗候选株在鸡胚中的繁殖能力[J]. 江苏农业科学,2011,39(3):38-41.
- [4] 陈培赛,林昌荣,薛成俊,等. 樱桃谷肉鸭超早期接种禽流感

(H5N1)疫苗的免疫效果试验[J]. 浙江畜牧兽医,2010(6):29.

- [5] 何芳兴. 樱桃谷肉鸭禽流感母源抗体消长规律研究及最佳首免日龄的探讨[J]. 福建畜牧兽医,2008,30(1):9.
- [6] 金大春,王跃川,潘杭君,等. 快速型肉鸡禽流感母源抗体消长变化的观察及最佳首免日龄的探讨[J]. 中国家禽,2008,30(24):54-55.
- [7] 卫龙兴,俞财荣,王福泉,等. 白羽肉鸭高致病性禽流感疫苗免疫效果研究[J]. 现代农业科技,2009,21:263-264.
- [8] 苏敬良,张国中,黄瑜,等. 商品鸭流感疫苗免疫抗体的监测[J]. 中国兽医杂志,2004,40(10):15-17.
- [9] 张济培,陈建红,刘佑明,等. 白鸭禽流感 H5 亚型疫苗免疫促进剂的筛选[J]. 中国兽医杂志,2012,48(7):27-29.