



王申锋,钱明珠,谢军强,等.重组禽流感病毒 H5 亚型三价灭活疫苗对商品蛋鸡免疫程序优化[J].黑龙江农业科学,2021(7):48-51.

# 重组禽流感病毒 H5 亚型三价灭活疫苗对商品蛋鸡免疫程序优化

王申锋<sup>1</sup>,钱明珠<sup>1</sup>,谢军强<sup>2</sup>,王德刚<sup>3</sup>,朱红标<sup>4</sup>,胡梅<sup>1</sup>,化军<sup>1</sup>

(1.河南农业职业学院 牧业工程学院,河南 郑州 451450;2.郑州航空港经济综合试验区社会事业局,河南 郑州 450019;3.汤阴县畜牧兽医总站,河南 汤阴 456150;4.河南健恒动物药业有限公司,河南 郑州 451476)

**摘要:**为优化商品蛋鸡场禽流感的免疫程序,掌握商品蛋鸡场 H5 亚型禽流感母源抗体的消长规律和不同首免日龄免疫禽流感病毒 H5 亚型三价灭活疫苗(Re-6 株+Re-7 株+Re-8 株)疫苗的抗体效价消长情况,本试验将商品蛋鸡分成 5 组,1~4 组为试验组,分别于 7、10、14 和 21 日龄免疫禽流感病毒 H5 亚型三价灭活疫苗,第 5 组为空白对照组,于 14 日龄肌注生理盐水,然后进行禽流感抗体检测。结果表明:蛋鸡 2 日龄时母源抗体水平最高,平均效价都在 6 log<sub>2</sub> 以上,且群体抗体合格率都在 99% 以上。随后,逐渐下降,在 10 日龄时处在 6 log<sub>2</sub> 附近,这表明鸡群面临禽流感病毒感染风险较大;首免日龄在 7 日龄、10 日龄时,接种疫苗到鸡只产生具有保护作用的抗体大概在 14~17 d,此间母源抗体水平也较低,疫苗刺激机体产生的抗体不足以保护鸡只。如果首免日龄在 14 日龄以后则更不利于鸡群禽流感的防控。建议该蛋鸡场雏鸡 H5 亚型禽流感疫苗首免时间在 7 日龄最佳。

**关键词:**禽流感 H5 亚型三价灭活疫苗;商品蛋鸡;抗体水平;免疫程序

禽流感(Avian influenza, AI)是由 A 型流行性感病毒引起的家禽和野鸟的一种急性传染病。表现为呼吸道和严重全身性感染。因其传播快,危害大,被世界动物卫生组织列为 A 类传染病,由于其囊膜 5 纤突上含有血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)两种抗原性不同的抗原物质,据此可将禽流感病毒分为多种亚型。近年来, H5 亚型高致病性禽流感的频繁爆发给全世界的养禽业和人类公共卫生安全带来了威胁。禽流感严重影响蛋鸡的产蛋性能,对养殖业造成巨大经济损失。如何减轻禽流感给养禽业乃至整个畜牧业造成的巨额亏损成为养殖业面临的重要难题,也是广大兽医工作者的主要研究方向。目前,免疫接种仍是禽流感预防的重要措施。雏鸡可以从种鸡获得一定的母源抗体以抵抗禽流感病毒的侵害<sup>[1]</sup>,但被动性免疫应答具有一定时效性,会随着母源抗体的衰减而消失<sup>[2]</sup>。因此,在雏鸡母源抗体失去效力之前适时进行疫苗接种,使其产生主

动免疫应答,就需要对雏鸡母源抗体的消长规律和疫苗免疫后抗体的消长情况进行研究<sup>[3]</sup>,以确定禽流感疫苗最佳的首免时间。河南农业职业学院畜禽健康养殖课题组受校企合作企业郑州市某蛋鸡场委托,从做好禽流感整体防治角度出发,通过血凝抑制试验(HI)方法对该场蛋鸡的禽流感 H5 亚型抗体效价进行了监测,旨在为该蛋鸡场科学预防 H5 亚型禽流感提供试验依据,进而优化该蛋鸡场禽流感的免疫程序。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

材料为 1 日龄京红蛋鸡 300 只,饲养于郑州市某蛋鸡场。试验于 2019 年在鸡场内的校企共建动物疫病快速诊断实验室进行。

重组禽流感病毒 H5 亚型三价灭活疫苗(Re-6 株+Re-7 +Re-8 株)购自青岛易邦生物工程有限公司,批号 1910209;禽流感亚型标准抗原和标准阳性血清及阴性血清购自哈尔滨维科生物技术有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 试验分组 将 1 日龄京红蛋鸡随机分成 5 组,每组 60 只(表 1),1~4 组为试验组,第 5 组为空白对照组,于 14 日龄肌注生理盐水。

收稿日期:2021-03-30

基金项目:河南农业职业学院科研创新团队项目(HNACKT-2020-3)。

第一作者:王申锋(1978—),男,博士,副教授,从事动物疫病防控及中兽药开发应用研究。E-mail: zmfengwang@163.com。

表 1 试验动物分组情况

| 组别 | 首免    | 鸡只数量 | 疫苗                                    |
|----|-------|------|---------------------------------------|
| 1  | 7 日龄  | 60   | 肌肉注射重组禽流感病毒 H5                        |
| 2  | 10 日龄 | 60   | 亚型三价灭活疫苗 (Re-6 株 +                    |
| 3  | 14 日龄 | 60   | Re-7 + Re-8 株) 0.3 mL·只 <sup>-1</sup> |
| 4  | 21 日龄 | 60   |                                       |
| 5  | 14 日龄 | 60   | 肌注生理盐水 0.3 mL·只 <sup>-1</sup>         |

1.2.2 血样采集 将 1、2、3、4 组受试蛋鸡分别于免疫前及免疫后 7、14、21、35 d 时采集血样;第 5 组受试蛋鸡分别于 2、7、10、14、17、21、24、28、30、35、42 日龄采集血样,各组随机选取 30 只蛋鸡翼下静脉采血,分离血清,标记,-20℃保存备检。

1.2.3 禽流感抗体效价检测 按照高致病性禽流感诊断技术(GB/T18936-2003)标准,采用血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验进行禽流感抗体效价检测。

1.2.4 判定标准 按照张雪花等研究方法<sup>[4-6]</sup>,禽流感 HI 抗体效价≥6 log2 判为合格、<4 log2 判为不合格。

1.2.5 数据分析 试验数据采用 Excel 2013 软件进行整理,采用 GraphPad Prism 7 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同日龄蛋鸡禽流感 H5 亚型母源抗体消长情况

由图 1 和表 2 可知,禽流感 H5 各亚型母源抗体效价下降趋势基本一致,蛋鸡禽流感 H5 亚型 Re-6、Re-7、Re-8 母源抗体效价和群体抗体合格率都在 2 日龄时最高,抗体效价分别为 6.92,6.48 和 6.86 log2,且群体抗体合格率均在 99% 以上;到 10 日龄时,抗体水平维持在 6.00 log2 左

右,母源抗体仍在一定程度上保护雏鸡免受病毒侵袭;在 2~10 日龄,试验鸡群母源抗体呈缓慢下降趋势,试验鸡群禽流感 H5 亚型母源抗体合格率在 80% 以上,能起到较好的被动免疫保护作用;10~14 日龄时,试验鸡群母源抗体合格率急剧下降,在 14 日龄时,H5 Re-6、Re-7、Re-8 亚型抗体效价水平分别是 3.71、2.21 和 3.04,H5 Re-6 亚型合格率为 45.2%、Re-7 和 Re-8 亚型合格率仅有 20% 左右。禽流感 H5 亚型母源抗体平均效价和群体抗体率均急剧下降至抗体保护水平以下,说明此时禽流感 H5 亚型母源抗体已完全不能抵抗病毒侵袭。

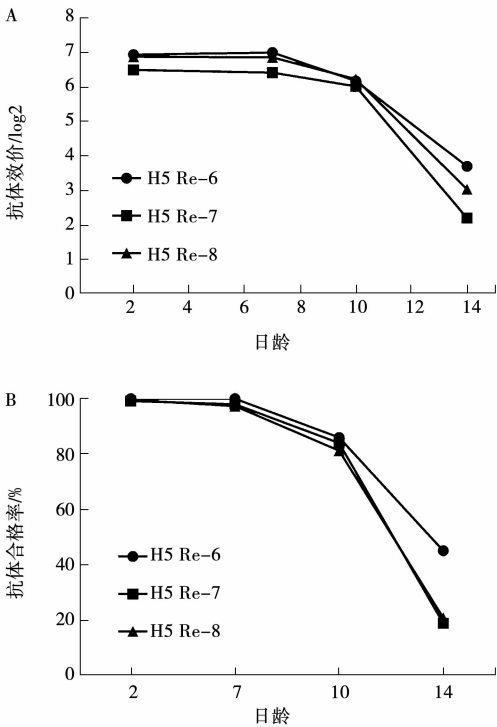


图 1 2~14 日龄商品蛋鸡母源抗体效价(A)和合格率(B)

表 2 不同日龄蛋鸡禽流感 H5 亚型母源抗体平均水平

| 日龄 | H5 Re-6/log2 | 合格率/%  | H5 Re-7/log2 | 合格率/% | H5 Re-8/log2 | 合格率/% |
|----|--------------|--------|--------------|-------|--------------|-------|
| 2  | 6.92±0.56    | 100.00 | 6.48±0.61    | 99.2  | 6.86±0.60    | 99.6  |
| 7  | 6.84±0.58    | 100.00 | 6.40±0.49    | 98.0  | 6.84±0.61    | 97.4  |
| 10 | 6.16±0.48    | 86.00  | 6.01±0.51    | 84.0  | 6.22±0.59    | 81.3  |
| 14 | 3.70±0.33    | 45.20  | 2.21±0.17    | 19.0  | 3.04±0.42    | 21.0  |

2.2 不同首免日龄禽流感 H5 亚型疫苗抗体水平情况

由图 2 可知,各组鸡只在各首免日龄 7 d 后

陆续产生抗体,14 d 左右抗体平均效价达到 6 log2,可以保护鸡只免受禽流感侵袭。首免日龄在 7 日龄、10 日龄时,接种疫苗到产生具有保

护作用的抗体大概在 14~17 d,此时母源抗体水平也较低,存在一段时间鸡群抗体水平较低。如果首免日龄在 14 日龄以后,更不利于鸡群禽流感的防控。

### 3 讨论与结论

#### 3.1 母源抗体的干扰作用

雏鸡通过卵黄所获得母源抗体可以起到天然被动免疫作用。随着鸡场规模化程度不断提高、免疫程序的照抄照搬,加之母源抗体对疫苗免疫应答也存在一定的干扰作用,使得禽流感疫情控制显得尤为复杂<sup>[7]</sup>。

本试验结果表明,蛋鸡禽流感 H5 亚型母源抗体效价和群体抗体合格率在 2 日龄时达到了最高水平,之后,随着日龄增加而抗体水平逐渐下降;5~10 日龄,母源抗体水平呈缓慢下降,10 日龄后呈直线下降趋势。鸡群禽流感 H5 亚型 Re-6 株、Re-7 株和 Re-8 株抗体水平在 10 日龄前后处在 6 log<sub>2</sub> 以上,合格率在 80% 以上,这表明鸡群仍受母源抗体保护,14 日龄时,抗体合格率远远低于 80%,鸡群将面临禽流感威胁。

#### 3.2 免疫程序的优化

H5 亚型禽流感流行毒株多样,对蛋鸡危害严重,对养鸡业疫病防控挑战极大,疫苗免疫仍是控制该病重要措施<sup>[8-10]</sup>。本试验结果表明,重组禽流感病毒 H5 亚型三价灭活疫苗免疫蛋鸡后,各组鸡只从接种灭活疫苗到产生抗体至少需要 7 d 时间,同时为避免母源抗体对疫苗免疫应答的干扰作用,建议该商品蛋鸡场雏鸡 H5 亚型禽流感最佳首免时间在 7 日龄,最好不晚于 14 日龄。

#### 参考文献:

- [1] 田健民,史选荣,王建国,等. 鸡新城疫与禽流感母源抗体的测定及后天免疫后抗体消长规律的测定[J]. 畜牧兽医杂志,2015,34(20):62-65.
- [2] 刘琨. 樱桃谷肉鸭 H5N1 亚型禽流感(Re-6 株)灭活疫苗母源抗体消长规律及免疫程序研究[J]. 湖北农业科学,2015,54(2):402-404.
- [3] 蒋维维,李毅,朱静民. 广西地方麻鸡、三黄鸡禽流感与新城疫母源抗体消长规律的研究[J]. 广西畜牧兽医,2016,32(1):3-6.
- [4] 张雪花,陆吉虎,华涛,等. 通用型 H5 亚型禽流感病毒亚单位疫苗抗原表达和免疫效力研究[J]. 病毒学报,2019,35(6):864-872.
- [5] 冯艳男,孙德君,秦立鑫,等. 重组禽流感病毒 H5 亚型三价灭活疫苗(Re-6 株+Re-7 株+Re-8 株)免疫 SPF 鸭免疫持续期试验[J]. 饲料博览,2018(1):44-45,50.
- [6] 王孝德,李志贤,罗扬生,等. 蛋鸡重组禽流感(H5+H7)二价灭活苗免疫效果监测分析[J]. 广西畜牧兽医,2020,36(5):211-214.
- [7] 吴婷婷,卞红春,陈丽珠,等. 重组禽流感(H5+H7)三价灭活苗免疫蛋鸡抗体消长规律研究[J]. 上海畜牧兽医通讯,2020(6):31-33.

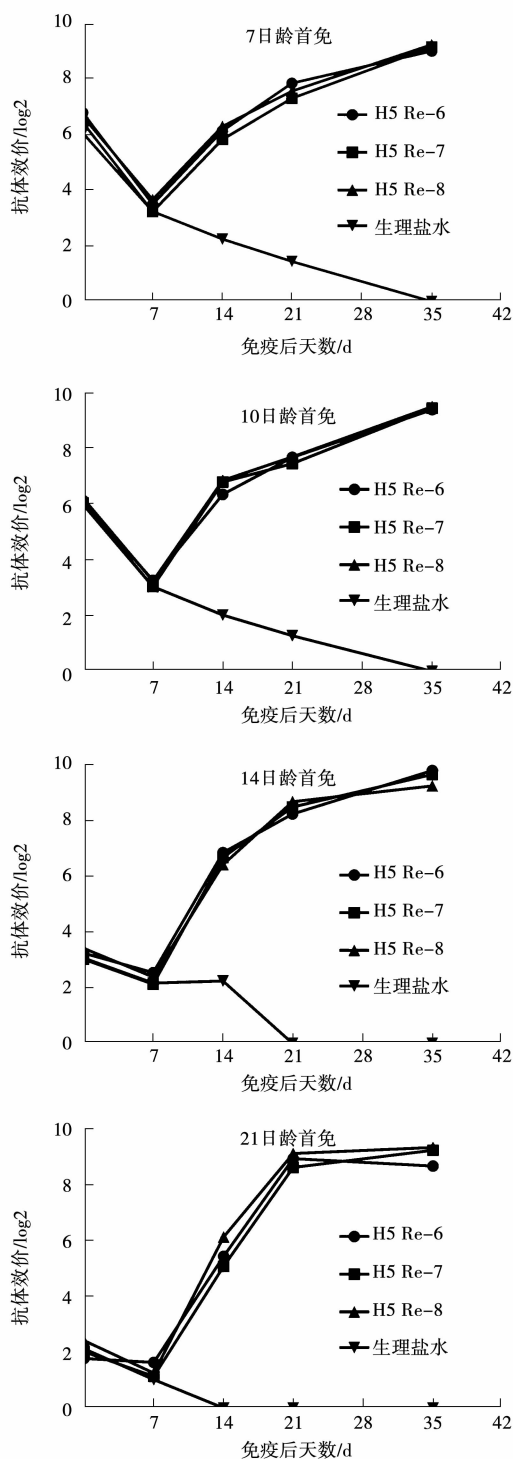


图2 不同首免日龄禽流感 H5 亚型疫苗抗体效价水平

[8] 赵明军,吴志明,闫若潜,等. 重组鸡白细胞介素 6 对重组禽流感病毒 H5 亚型二价灭活疫苗(H5N1, Re-6 株+Re-7 株)免疫增强作用的观察[J]. 中国家禽, 2015, 37(22): 49-51.

[9] 李家凯,郭康康,刘丽娜,等. 肉鸡与蛋鸡 H5、H7、H9 亚型禽流感病毒抗体水平调查[J]. 湖北农业科学, 2020, 59(11): 104-106.

[10] 王秋艳,张志刚,刘光辉. 重组禽流感病毒(H5+H7)三价灭活疫苗免疫鸡群的临床效果评价[J]. 中国动物检疫, 2020, 37(11): 112-115.

# Optimization of Immune Procedure for Commercial Layers with Trivalent Inactivated Vaccine of H5 Subtype of Recombinant Avian Influenza Virus

WANG Shen-feng<sup>1</sup>, QIAN Ming-zhu<sup>1</sup>, XIE Jun-qiang<sup>2</sup>, WANG De-gang<sup>3</sup>, ZHU Hong-biao<sup>4</sup>, HU Mei<sup>1</sup>, HUA Jun<sup>1</sup>

(1. College of Animal Husbandry Engineering, Henan Agricultural Vocational College, Zhengzhou 451450, China; 2. Social Affairs Bureau of Zhengzhou Airport Economic Comprehensive Experimental Zone, Zhengzhou 450019, China; 3. Animal Husbandry and Veterinary Station of Tangyin County, Tangyin 456150, China; 4. Henan Jianheng Animal Pharmaceutical Limited Company, Zhengzhou 451476, China)

**Abstract:** In order to optimize the immunization procedure of avian influenza in commercial layer farms, master the growth and decline rule of maternal antibody against H5 subtype avian influenza in commercial layer farms and the antibody titer of trivalent inactivated vaccine (Re-6 strain+Re-7 strain+Re-8 strain) against H5 subtype avian influenza virus at different first immunization days. The commercial layers were divided into 5 groups in this experiment. Groups 1-4 were immunized with trivalent inactivated vaccine of H5 subtype of avian influenza virus at 7, 10, 14 and 21 days of age, respectively. Group 5 was the blank control group, and the normal saline was injected intramuscularly at 14 days of age, and then avian influenza antibody was detected. The results showed that the maternal antibody level of laying hens was the highest at the age of 2 days, the average titer was more than 6 log<sub>2</sub>, and the qualified rate of group antibody was more than 99%. Then, it decreased gradually, and it was near 6 log<sub>2</sub> at the age of 10 days, which indicated that the chickens were at high risk of avian influenza virus infection; when the first immunization age was 7 days and 10 days, the protective antibody produced by the vaccinated chickens was about 14-17 d, and the maternal antibody level was also low. The antibody produced by the vaccinated chickens was not enough to protect chickens. If the first immunization age is after 14 days, it will be more unfavorable for the prevention and control of avian influenza in chickens. We suggested that the first immunization time of H5 subtype avian influenza vaccine should be 7 days old.

**Keywords:** trivalent inactivated vaccine of H5 subtype of avian influenza; commercial layers; antibody level; immunization program

(上接第 47 页)

1 500 times solution leaf spray of Amino Acid Water-Soluble Fertilizer within 5 d could significantly promote the growth of grape seedlings in Day 1 and Day 2 of Glyphosate toxicity. The application of 1 500 times solution irrigation root of Amino Acid Water-Soluble Fertilizer and high-tech active Titanium Ertilizer 2 000 times solution leaf spray within 5 d could significantly promote the high growth of grape seedling in Day 3 of Glyphosate toxicity. Secondly, several herbicide relieving agents after Glyphosate application did not have a significant improvement effect on the number of leaves, lateral branches and relative chlorophyll content of grape seedlings. To sum up, several herbicide relieving agents had a relieved effect on a part of the growth index or relative chlorophyll content of the injured plants in the short term, but can not comprehensively and effectively alleviate the effect of Glyphosate toxicity on grape growth and relative chlorophyll content.

**Keywords:** grape; glyphosate; growth index; relative chlorophyll content; chemical damage relieved effect; Bihui; Amino Acid Water-Soluble Fertilizer; Titanium Ertilizer