

重组禽流感病毒（H5+H7）二价 灭活疫苗免疫效果评估

陈裕华, 朱建翠, 沈丹, 杨建宇, 于飞, 何日文

(广州市动物卫生监督所, 广东广州 510440)

摘要: 2017年7月, 农业部决定对全国家禽开展H7亚型流感免疫。为评价重组禽流感病毒(H5+H7)二价灭活疫苗(H5N1 Re-8株+H7N9 H7-Re1株)对家禽的安全性及免疫效果, 2017年10—12月以田间试验方式, 常规养殖肉鸡(江村黄鸡)、樱桃谷白鸭、黑棕鹅各120只。按程序免疫: 肉鸡9日龄首免(剂量0.3 mL), 30日龄二免(剂量0.5 mL); 樱桃谷白鸭15日龄首免(剂量1 mL); 黑棕鹅15日龄首免(剂量1 mL)、50日龄二免(剂量1.5 mL)。定期采集血清测定抗体效价直至出栏, 并每日观察禽群临床表现。试验结果显示: 鸡首免后21 d, H5亚型HI抗体效价为4.2 log₂, 抗体合格率均小于70%, H7亚型HI抗体效价为7.5 log₂, 抗体合格率均大于70%; 二免后H5和H7亚型HI抗体效价均大于8 log₂, 抗体合格率均大于70%。鸭首免后21 d, H5亚型HI抗体效价为5.1 log₂, 抗体合格率均大于70%, H7亚型HI抗体效价为5.6 log₂, 抗体合格率均大于70%, 出栏前(47日龄)H5和H7亚型HI抗体效价均大于6 log₂, 抗体合格率均大于70%。鹅首免后21 d, H5亚型HI抗体效价为3.9 log₂, 抗体合格率均小于70%, H7亚型HI抗体效价为5.2 log₂, 抗体合格率均大于70%; 二免后H5和H7亚型HI抗体效价均大于7 log₂, 抗体合格率均大于70%。通过临床观察, 未发现该疫苗有严重免疫副反应。试验结果表明, 该二价灭活疫苗安全有效, 但对于生长周期超过70 d天的家禽, 应免疫两次。

关键词: 重组禽流感病毒; 灭活苗; H5N1; H7N9; 免疫效果

中图分类号: S851.3 文献标识码: A 文章编号: 1005-944X(2018)08-0081-04

DOI: 10.3969/j.issn.1005-944X.2018.08.021

Evaluation on Immune Effects of Bivalent Inactivated Vaccine of Recombinant H5 and H7 Subtype Avian Influenza

Chen Yuhua, Zhu Jiancui, Shen Dan, Yang Jianyu, Yu Fei, He Riwen

(Guangzhou Animal Health Supervision Institution, Guangzhou, Guangdong 510440, China)

Abstract: In July 2017, it was decided to carry out immunization of H7 subtype influenza vaccine towards poultry in the whole China by the Ministry of Agriculture. In order to evaluate the immune effects of divalent inactivated vaccine of recombinant avian influenza virus (H5+H7), during October to December 2017, 120 broiler chickens, 120 Pekin-ducks and 120 geese were routinely raised by the approach of field trial and immunized with H5+H7 inactivated vaccine with given immunization program. For broiler chickens, first immunization was at the age of 9 days (dosage of 0.3 mL), second immunization was at the age of 30 days (dosage of 0.5 mL); for Pekin-ducks, first immunization was at the age of 15 days (dosage of 1 mL); for geese, first immunization was at the age of 15 days (dosage of 1 mL), the second immunization was at the age of 50 days (dosage of 1.5 mL). Then serum samples were collected periodically to determine antibody titers until the animals grew to the time for marketing. The results showed that: for chickens, on the 21th day after first immunization, the HI titer of antibodies against H5 subtype AIV was 4.2 log₂, the antibody qualified rates were all less than 70%, while the titer of antibodies against H7 subtype could reach 7.5 log₂ and the qualified rates were more than 70%. After second immunization, the HI titers of antibodies against whether H7 or H5 subtype AIV were all more than 8 log₂ and the qualified rates were more than 70%. For ducks, on the 21th day after first immunization, the HI titer of antibodies against H5 subtype AIV was 5.1 log₂, the antibody qualified rates were more than 70%, while the titer of antibodies

基金项目: 联合国粮农组织-中国兽医现场流行病学培训项目; 广州市动物疫病流行病学调查专项

通信作者: 何日文

against H7 subtype was 5.6 log₂ and the qualified rates were more than 70%, before marketing (at the age of 47 days), the HI titers of antibodies against whether H7 or H5 subtype AIV were all more than 6 log₂ and the qualified rates were more than 70%. For geese, on the 21th day after first immunization, the HI titer of antibodies against H5 subtype AIV was 3.9 log₂, the antibody qualified rates were all less than 70%, while the titer of antibodies against H7 subtype was 5.2 log₂ and the qualified rates were more than 70%. After second immunization, the HI titers of antibodies against whether H7 or H5 subtype AIV were all more than 7 log₂ and the qualified rates were more than 70%. No serious immune side effect was found after vaccination, and the production time of antibodies against H7 subtype AIV was earlier than that of H5 subtype. According to the results in this study, the poultry with a growth cycle over 70 days should be immunized twice.

Key words : recombinant avian influenza virus ; inactivated vaccine ; H5N1 ; H7N9 ; immunological effect

禽流感病毒是正粘病毒科流感病毒属单链负股 RNA 病毒^[1]。禽流感病毒亚型众多,病毒表面糖蛋白血凝素(HA)有16种(H1—H16),神经氨酸酶(NA)有9种(N1—N9)。HA和NA的抗原变异是相互独立的,各亚型之间缺乏交叉保护,同一亚型病毒有不同的变异株^[2]。高致病性禽流感是A型流感病毒引起的以感染禽类为主的烈性传染病,世界动物卫生组织(OIE)将其列为必须报告的动物传染病,我国将其列为一类动物疫病。

目前,各国采取的禽流感预防和控制措施各不相同。我国采用免疫和扑杀相结合的防控策略。疫苗免疫仍是我国当前预防高致病性禽流感的重要手段。2005年我国开始实施H5N1亚型高致病性禽流感全面免疫政策。此后至今,疫苗毒株从Re-1株、Re-4株、Re-5株、Re-6株、Re-8株,更替到现在的Re-10株^[3]。2017年1月,对鸡具有高致病性的H7N9变异株被证实,3月24日农业部公布了我国第一起蛋鸡H7N9高致病性流感疫情。2017年7月7日,农业部办公厅下发《农业部关于切实做好全国高致病性禽流感秋季免疫工作的通知》(农办医〔2017〕24号),要求各地在2017年秋季统一用重组禽流感病毒(H5+H7)二价灭活疫苗(H5N1 Re-8株+H7N9 H7-Re1株)(以下简称“H5+H7”二价灭活疫苗)替代重组禽流感病毒H5二价或三价灭活疫苗,对家禽实施免疫^[4]。为更好地了解家禽H7N9流感的免疫效果,广州市动物卫生监督所开展了田间“H5+H7”二价灭活疫苗免疫效果评估。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 肉鸡(江村黄鸡)、樱桃谷白鸭、黑棕鹅(以下分别简称鸡、鸭、鹅)各120只。在

选定的养殖场按常规方法饲养至出栏。

1.1.2 试验疫苗 “H5+H7”二价灭活疫苗(批号2017014):哈尔滨维科生物技术开发公司生产。

1.1.3 检测试剂 禽流感H5N1亚型HI试验抗原和阳性血清:哈尔滨维科生物技术开发公司生产;H7亚型HI试验抗原和阳性血清:哈尔滨维科生物技术开发公司生产。

1.2 方法

1.2.1 免疫程序 鸡9日龄首免,剂量0.3 mL,30日龄二免,剂量0.5 mL;鸭15日龄首免,剂量1.0 mL;鹅15日龄首免,剂量1.0 mL,50日龄二免,剂量1.5 mL(表1)。

表1 家禽重组禽流感病毒(H5+H7)二价灭活疫苗免疫程序

家禽种类	首免		二免	
	日龄/d	剂量/mL	日龄/d	剂量/mL
鸡	9	0.3	30	0.5
鸭	15	1		
鹅	15	1	50	1.5

1.2.2 母源抗体测定 对鸡、鸭、鹅,分别于9日龄、15日龄和15日龄,各采集血清10份测定母源抗体。

1.2.3 采集活禽咽肛拭子及血清 随机选取一定数量的活禽,采集每只家禽咽喉、泄殖腔棉拭子各1个,放入事先加入1 mL PBS液的离心管中,咽肛棉拭子与血清一一对应。采集鸡、鸭、鹅咽肛拭子及血清的时间点和样品量详情见表2。咽肛拭子-70℃保存待检,血清-20℃保存待检。

1.2.4 HI抗体效价测定 按照《高致病性禽流感诊断技术》(GB/T 18936-2003)中的血凝(HA)和血凝抑制(HI)试验技术进行。用H5N1亚型HI试验抗原和阳性血清检测H5抗体,用H7亚型HI试验抗原和阳性血清检测H7抗体。HI效价 $\geq 4 \log_2$ 判定为合格。

表2 活禽咽/肛拭子及血清采集情况 单位:份

鸡			鸭			鹅		
采样时间	咽肛双拭子	血清	采样时间	咽肛双拭子	血清	采样时间	咽肛双拭子	血清
免疫前	5	10	免疫前	5	10	免疫前	5	10
首免后7 d		30	首免后7 d		30	首免后7 d		30
首免后14 d		30	首免后14 d		30	首免后14 d		30
首免后21 d	15	30	首免后21 d	15	30	首免后21 d	15	30
二免后14 d	15	30	出栏前1 d (50日龄)		30	二免后14 d	15	30
二免后21 d		30				二免后21 d		30
二免后70 d	15	30				二免后70 d	15	30

1.2.5 填写“免疫后临床观察表” 免疫后需每日填写禽群的采食量、精神状况、发病与死亡情况、注射部位有无异常等信息。

1.2.6 数据整理和分析 对检测结果用 Excel、SPSS 20.0 等软件, 进行数据整理、统计分析。

2 结果

2.1 母源抗体测定情况

9日龄鸡的H5和H7母源HI抗体效价几何平均值(GMT)分别为7.3 log₂和1.0 log₂, 15日龄鸭的H5和H7母源HI抗体效价GMT分别为3.3 log₂和0, 15日龄鹅的H5和H7母源HI抗体效价GMT分别为2.3 log₂和0.3 log₂(表3)。

表3 实验动物母源抗体测定情况

种类	抗体类型	HI效价 GMT/log ₂	标准差 (SD)	标准误 (SE)	95% 置信区间
鸡	H5	7.300	0.483	0.153	(7.000, 7.600)
	H7	1.000	0.667	0.211	(0.600, 1.400)
鸭	H5	3.300	1.494	0.473	(2.400, 4.200)
	H7	0.000	0.000	0.000	(0.000, 0.000)
鹅	H5	2.300	1.703	0.539	(1.300, 3.300)
	H7	0.300	0.675	0.213	(0.000, 0.700)

2.2 免疫效果监测情况

2.2.1 免疫鸡群的HI抗体水平 试验结果显示: 首免后21 d, 免疫鸡群H5亚型HI抗体效价平均值为4.2 log₂, 抗体合格率为66.67%, 30日龄加强免疫后14~70 d(出栏), HI效价平均值为8.0~9.0 log₂, 抗体合格率为100%; 首免后21 d, 免疫鸡群H7亚型HI抗体效价平均值为7.5 log₂, 抗体合格率为100%, 30日龄加强免疫后14~70 d(出栏), HI效价平均值为8.2~9.0 log₂, 抗体合格率

为100%(图1)。

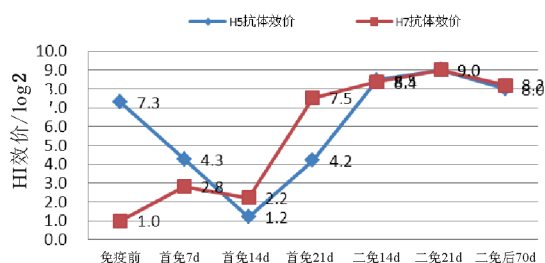


图1 鸡免疫抗体 HI 效价变化

2.2.2 免疫鸭群的HI抗体水平 试验结果显示:

首免后21 d, 免疫鸭群H5亚型HI抗体效价平均值为5.1 log₂, 抗体合格率为86.67%, 首免后32 d, HI效价平均值为6.1 log₂, 抗体合格率为100%; 首免后21 d, 免疫鸭群H7亚型HI抗体效价平均值为5.6 log₂, 抗体合格率为100%, 首免后32 d, HI效价平均值为6.4 log₂, 抗体合格率为100%(图2)。

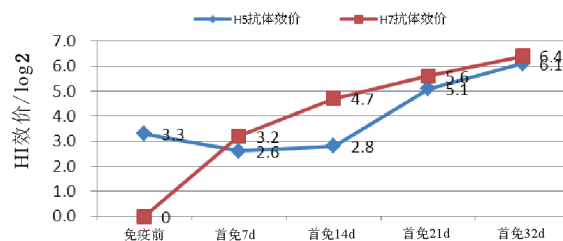


图2 鸭免疫抗体 HI 效价变化

2.2.3 免疫鹅群的HI抗体水平 试验结果显示,

首免后21 d, 免疫鹅群H5亚型HI抗体效价平均值为3.9 log₂, 抗体合格率为53.33%, 50日龄加强免疫后14~70 d(出栏), HI效价平均值为7.6~8.5 log₂, 抗体合格率为100%; 首免后21 d, 免疫鹅群H7亚型HI抗体效价平均值为5.2 log₂, 抗体合格率为100%, 50日龄加强免疫后14~70 d(出栏), HI效价均值为7.7~9.3 log₂, 抗体合格率为100%(图3)。

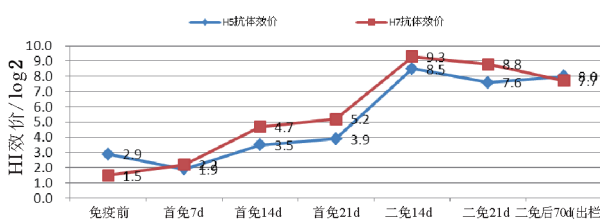


图3 鹅免疫抗体 HI 效价变化

2.3 病原检测情况

采集的所有咽肛拭子样品中,均未检出 H5、H7 亚型流感病毒核酸阳性。

2.4 免疫禽群临床情况

免疫后所有禽群采食量均正常,精神状况良好,注射部位无异常,没有出现发病死亡情况。

3 分析与讨论

“H5+H7”二价灭活疫苗的全面免疫是当前防控 H7N9 流感的主要措施和关键环节。2017 年 3 月以来,湖南、陕西、天津、内蒙古等地相继发生了家禽 H7N9 流感疫情。为有效控制疫情发生,农业部决定开展 H7N9 流感全面免疫。研究表明,“H5+H7”二价灭活疫苗能够对当前流行毒株产生良好的抗体反应,具有较强的抗原针对性,能抵御病毒攻击,具有较好的免疫保护效果,同时无免疫副反应,疫苗安全有效。

母源抗体的作用具有特异性和选择性,可以保护雏鸡免受特定病原体的攻击。但过高的母源抗体对雏鸡初次免疫反应的影响也很大。本试验发现,9 日龄(首免日龄)肉鸡的 H5 母源抗体效价较高,其几何均值为 7.3 log₂,免疫后 H5 抗体效价均值急剧下降,其原因可能是母源抗体中和了疫苗中的抗原,因而可能造成 H5N1 保护的真空期。为尽量减少或避免母源抗体影响,建议定期检测雏鸡母源抗体,根据雏鸡体内母源抗体水平确定首免时间,优化免疫程序。

本试验发现,鸡群在首免后 21d 均达到了较高的抗体效价(H5N1 Re-8 株、H7N9 Re-1 株抗体效价平均值均大于 4 log₂),达到了农业部要求的标准。二次免疫后抗体平均值均明显高于一次免疫,说明加强免疫效果明显。鹅群首免后 21 d 的 H7 抗体效价平均值大于 4 log₂,达到了农业部的标准,但 H5 抗体效价平均值小于 4 log₂,未达到农业部标准。二次免疫后的 H5 和 H7 抗体平均值均明显高于一次免疫,且均有较高的抗体效价(抗体效价平均值大于 4 log₂),说明加强免疫效果明显。这与金大春等^[5]、张济培等^[6]研究的“禽流感疫苗 2 次免疫的免疫效果较好”的结论一致。

群体免疫抗体合格率是衡量免疫质量、预警重大疫病的指标之一。研究表明,鸡、鹅首免后 21 d,群体 H5 亚型免疫抗体合格率低于 70% 的农业部标准,群体免疫不合格,达不到免疫保护要求,应加强免疫。这也与杨泽林^[7]的研究结论一致。

4 结论

本研究以田间试验方式,对常规养殖的肉鸡(江村黄鸡)、樱桃谷白鸭、黑棕鹅各 120 只,按照预定的免疫程序进行“H5+H7”二价灭活疫苗免疫,定期采集血清测定抗体效价,评估该疫苗的免疫效果。试验结果显示:首免后 21 d,鸡群和鹅群的 H7 亚型抗体合格率均大于 70%,H5 抗体合格率均低于 70%,但二免后的 H5 和 H7 抗体合格率均大于 70%;鸭群首免后 21d 的 H5 和 H7 抗体合格率均大于 70%。本试验结果表明,“H5+H7”二价灭活疫苗的安全性和免疫效果较好,但对于生长周期超过 70 d 的家禽,一次免疫,不能对这两种病毒同时提供保护,应免疫两次。

参考文献:

- [1] 甘孟侯. 禽流感 [M]. 2 版北京: 中国农业出版社, 2002.
- [2] FOUCHIER R A, MUNSLER V, WALLENSTENA, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from Black-headed gulls[J]. Journal of virology, 2005, 79: 2814-2822.
- [3] 蒋文明, 李金平, 侯广宇, 等. H5 亚型高致病性禽流感病毒抗原性变异分析 [J]. 中国动物检疫, 2016, 33 (9): 27-32.
- [4] 农业部兽医局. 关于切实做好全国高致病性禽流感秋季免疫工作的通知: 农医发(2017)24 号 [A]. 北京: 农业部, 2017.
- [5] 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.
- [6] 张济培, 陈建红, 陈响坤, 等. 肉鹅 H5 亚型禽流感疫苗免疫效果的研究 [J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33 (12): 94-97.
- [7] 杨泽林, 巫廷建, 凌洪权, 等. 重庆市部分地区 H5 和 H7 重组禽流感病毒二价灭活疫苗免疫效果监测 [J]. 中国动物检疫, 2018, 35 (2): 13-15.

(责任编辑: 朱迪国)