

毒的分离与血清学初步鉴定[J]. 中国兽医杂志, 1994, 22(10):3-5.

[3] 王秀荣,李冬梅,陈化兰,等. 禽流感病毒 N1 和 N2 亚型神经氨酸酶 RT-PCR 鉴别方法的建立[J]. 中国兽医科技, 2004,

34(4):9-13.

[4] 林秋敏,施少华,万春和,黄瑜,等. H9N2 亚型禽流感诊断与防控技术研究进展来源. 福建畜牧兽医, 2011 年, 第 1 期, 34-39.

### 3 株 H9 亚型禽流感病毒的分离鉴定

李冰<sup>1</sup>, 陈瑞爱<sup>1</sup>, 贺东生<sup>1,2</sup>, 李琳<sup>1</sup>, 李宏星<sup>1</sup>, 汤钦<sup>1</sup>

(1. 广东大华农动物保健品股份有限公司, 广东广州 510642;

2. 华南农业大学兽医学院, 广东广州 510642)

#### 前言

H9N2 亚型禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 可引起低致病性禽流感。自 1994 年 H9N2 亚型禽流感病毒首次在中国报道以来, H9 亚型禽流感已经在中国大陆广泛流行。近年来 H9 亚型禽流感在国内大多数地区禽类中流行广泛, 造成了巨大经济损失。禽流感病毒血凝素蛋白 (HA) 是病毒感染宿主细胞重要的致病因子, 且变异频繁, 是造成禽流感疫情控制困难的重要因素。本研究对分离获得的三株病毒的 HA 基因序列与代表毒株、疫苗株及国内新发毒株进行同源性比较, 以初步了解免疫鸡群中 H9N2 AIV 感染的原因, 进而为当前我国 H9 亚型禽流感防控提供参考。

#### 材料与与方法

鸡的肝、脾、肺、气管等组织病料来自华南动物疫病检测中心收检病料; SPF 鸡胚由广东大华农动物保健品股份有限公司提供。新城疫阳性血清、H9 亚型禽流感阳性血清购自哈尔滨兽医研究所; AMV 反转录酶, DNA 聚合酶购自 Takara 公司。本研究按照常规方法分离获得了三株禽流感病毒, 首先利用血清学方法对病毒进行初步鉴定。提取病毒基因组 RNA, 反转录后利用特异性引物 H1 和 H2 扩增得到了三株病毒的 HA 基因, 回收 PCR 扩增获得的目的片段并连入 pMD-18T 载体进行测序鉴定。利用 DNASTar 软件对本研究分离的三株病毒的 HA 基因序列与参考毒株 A/Duck/Hong Kong/Y280/97、广泛应用的疫苗株 A/Chicken/Shanghai/F/98 以及近年国内新发毒株的 HA 基因序列进行同源性比较。

#### 结果与讨论

本研究通过鸡胚接种的方式分离得到了三株禽流感病毒, 经血清学方法及 RT-PCR 鉴定此三株病毒均为 A 型 H9 亚型禽流感病毒。测序鉴定结果表明三株病毒的 HA 蛋白裂解位点均为 PSRSSR/GLF, 是典型的低致病性禽流感病毒。利用 DNASTar 软件对本研究分离的三株病毒与近年国内新发毒株、参考毒株 A/Duck/Hong Kong/Y280/97 以及广泛应用的疫苗株 A/Chicken/Shanghai/F/98 的 HA 基因序列进行同源性比较, 结果表明本研究分离到的三株病毒其 HA 基因核苷酸序列同源性较高, 在 98.6% - 99.8% 之间; 与国内流行毒株 A/chicken/Anhui/XMS/2011 有着较高的同源性, 同源率约为 99.0%; 与参考毒株 A/Duck/Hong Kong/Y280/97 的同源率约为 92.5%, 而与目前广泛使用的 H9N2 亚型禽流感灭活疫苗的种毒株同源率较低, 约为 90.0%。因此, 初步推断疫苗株与流行株之间的抗原差异可能是导致近年来 H9N2 亚型禽流感广泛发生的重要因素。禽流感病毒流行情况和遗传演化较为复杂, 使得该病的防制困难重重。因此广泛开展禽流感流行病学调查, 对于当前流行毒株的起源及演化趋势进行研究, 对于 H9N2 亚型禽流感病的防控意义重大。

#### 参考文献

- [1] GUAN Y, SHORTRIDGE K F, KARUSS S, et al. Two lineages of H9N2 influenza viruses continue to circulate in landbased poultry in southeastern China [J]. International Congress Series, 2001, 1219: 187-189.
- [2] HUANG Y, HU B, WEN X, et al. Diversified reassortant H9N2 avian influenza viruses in chicken flocks in northern and eastern China [J]. Virus Res, 2010, 151(1): 26-32

[3] JI K, JIANG W M, LIU S, et al. Characterization of the hemagglutinin gene of subtype H9 avian influenza viruses isolated in 2007-2009 in china [J]. J Virol Methods, 2010, 163(2): 186-189.

[4] KOBASA D, RODER M E, WELL K, et al. Neuraminidase hemadsorption activity, conserved in avian influenza viruses, does not influenza viral replication in ducks [J]. J Virol, 1997, 71: 6707-6713.

## H5 亚型禽流感灭活疫苗对鹅的免疫效果观察

沈欣悦, 刘梅, 程旭, 刘加圣, 徐玲霞, 周生, 戴亚斌\*

(中国农业科学院家禽研究所, 江苏省扬州市仓颉路 58 号, 225125)

H5 亚型高致病性禽流感(AI)是禽类的一种烈性传染病,目前我国已采取强制免疫措施对该病进行防控。本研究分别采用重组禽流感病毒灭活疫苗(H5N1, Re-5 株)和二价灭活疫苗(H5N1, Re-4 株 + Re-5 株)进行了鹅的免疫试验,对免疫鹅的抗体水平进行了动态检测,旨在为鹅禽流感免疫程序的制定提供理论依据。

### 1 材料与方法

重组禽流感病毒灭活疫苗(H5N1, Re-5 株)和二价灭活疫苗(H5N1, Re-4 株 + Re-5 株)均为国内某定点厂家生产。重组 H5N1 亚型禽流感病毒 Re-4 株和 Re-5 株 HI 试验抗原为哈尔滨维科生物技术公司生产。使用时,疫苗和抗原均在有效期内。

1 日龄雏鹅购自扬州某养殖户。在 1~21 日龄时,定期随机采集部分雏鹅血清,检测其 Re-4 株与 Re-5 株的母源抗体水平。

21 日龄时,择 40 只鹅随机分为 2 组,每组 20 只。第 1 组接种 Re-5 株灭活疫苗,第 2 组接种 Re-4 株 + Re-5 株二价灭活疫苗。2 周后,两组中分别随机选取 10 只鹅用初免相同的疫苗进行二免。疫苗接种采用颈部皮下注射方法,初免和二免的疫苗剂量分别为 0.3 mL/只和 1.0 mL/只。鹅免疫后定期采血,检测抗体水平。

试验期间鹅群未接种其它疫苗,各组均在同一

饲养条件下按常规方法饲养。

### 2 结果与分析

从检测结果来看,母源抗体都在 4 日龄后开始快速下降,至 6 日龄时已低于临界保护值  $4\log_2$ 。

用 Re-5 株单价苗免疫一次的鹅血清中 Re-5 抗体水平在免疫后第 1 周开始上升,于第 3 周高于临界保护值,第 5 周达到峰值  $5.8\log_2$ ,此后逐渐下降,第 12 周依然稍高于临界保护值。二免后抗体水平快速上升,并于二免后第 2 周达到峰值  $8.4\log_2$ ,此后逐渐下降,直到第 12 周依然维持临界保护值之上。同一时间点,免疫两次的鹅抗体水平平均高于免疫一次的鹅 2 个滴度左右。

用 Re-4 + Re-5 株二价苗免疫一次的鹅血清中 Re-4 与 Re-5 抗体水平均在免疫后第 1 周开始上升,Re-4 株的抗体水平在第 3 周到达峰值  $5.2\log_2$ ,此后一直在临界保护值附近徘徊。而 Re-5 株抗体水平虽有所上升,但始终低于临界保护值,第 5 周达到的峰值也仅为  $2.8\log_2$ 。二免后,Re-4 与 Re-5 株抗体水平快速上升,并分别于二免后第 2、3 周达到峰值  $8.2\log_2$ 、 $7.2\log_2$ ,第 12 周依然维持临界保护值之上。同一时间点,免疫两次的鹅抗体水平平均高于免疫一次的鹅 3 个滴度左右。

目前,疫苗免疫依然是防制禽流感暴发的主要措施。本实验结果表明:①由于种鹅开产期间常常缺少加强免疫,到产蛋后期抗体水平不高,导致雏鹅的母源抗体水平也较低,因此在制定免疫程序时,可适当提前初免时间,以提高雏鹅抵抗力。②无论免疫单苗还是二价苗,仅免疫一次常常难以达到理想的效果,初免后 2~3 周加强免疫一次,可有效增加抗体水平的峰值与维持时间。③在饲养过程中,应

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项经费项目(201003012);江苏省农业三项工程项目[SX(2011)178];江苏省科技计划项目(BM2008171)

作者简介:沈欣悦(1985-),女,硕士,研究实习员。E-mail:shenxy0618@163.com

\*通讯作者:戴亚斌,E-mail:ybdai@163.com