

五加芪粉对鸡免疫新流二联灭活疫苗 免疫效果的影响

潘贵珍,周德刚,高艳艳,李召斌

(国家兽用药品工程技术研究中心,河南洛阳 471003)

[收稿日期] 2016-01-14 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 03-0011-05 [中图分类号] S853.72

[摘要] 研究了五加芪粉对鸡免疫新流二联灭活苗后免疫功能的影响。180只20日龄鸡随机分为6组,每组30只,分别为五加芪粉高、中、低剂量组、阳性药物对照组、免疫对照组、空白对照组。于免疫后第10、17、24、31和38天检测血清中新城疫抗体水平、禽流感抗体水平、IL-2含量,并于免疫后第38天检测免疫器官指数。结果表明,0.2、0.5 g/L的五加芪粉组与免疫对照组相比,显著或极显著的提高了新城疫(ND)和禽流感(AI)抗体水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。不同剂量的五加芪粉组和紫锥菊末组与免疫对照组相比,显著或极显著的提高了法氏囊指数、脾脏指数和胸腺指数($P < 0.05$, $P < 0.01$)。免疫给药后第31天,0.2、0.5、1 g/L的五加芪粉组、紫锥菊末组与免疫对照组相比,显著或极显著的提高了IL-2的水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),以上实验结果初步表明五加芪粉可以提高鸡免疫新流二联灭活疫苗免疫效果,增强机体的免疫力。

[关键词] 五加芪粉;新城疫;抗体

Effect of Wujiqi Powder to Improve the Immune Efficacy of Inactivated Vaccine by Newcastle Disease Virus and Avian Influenza in Chicken

PAN Gui-zhen, ZHOU De-gang, GAO Yan-yan, LI Zhao-bin

(National Research Center for Veterinary Medicine, Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: To explore the effect of Wujiqi powder on immune efficacy of inactivated vaccine by newcastle disease virus(NDV) and avian influenza in chicken. 180 20-day-old chickens were averagely divided into 6 groups with 30 in each group, respectively, with the Wujiqi at high, medium and low concentrations, in positive control, vaccination control and blank control group. At 10, 17, 24, 31 and 38 days after inoculation, each group was detected serum antibody titers and IL-2 concentrations. The immune organ index was determined at 38 days after vaccination. The results indicated the groups of Wujiqi powder(0.2 g/L, 0.5 g/L) could significantly improve the immune efficacy of vaccine($P < 0.05$, $P < 0.01$), it also showed the bursa of fabricius index, spleen index and thymus index of the first four groups were significantly higher than that of corresponding vaccine control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$) at 38 days after vaccination. At 31 days after vaccination, the groups of Wujiqi powder

and Zizhujia powder could significantly or extremely significantly improve the level of IL-2 than vaccine control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The conclusion was Wujiaqi powder could improve the immune efficacy. It would be as the candidate of effectively improving immunity.

Key words: Wujiaqi powder; NDV; antibody titer

灭活疫苗免疫是目前预防低致病性 H₉N₂ 亚型禽流感的重要防线。在我国 H₉N₂ 亚型禽流感病毒的灭活疫苗已经得到广泛应用,灭活全病毒疫苗安全性好,抗原组分齐全,免疫原性强,不会出现毒力返强和变异危险,能够经受同亚型禽流感病毒(AIV)的攻击,能给免疫鸡群提供一定的免疫保护。由于 AIV 血清型众多,变异性强,给免疫预防工作带来极大的挑战。目前疫苗效力均已达到国际上要求的灭活苗标准,但新城疫病毒仍不能得到有效控制,有研究者^[1]提出,目前常用新城疫病毒株与当前流行毒株基因型不匹配,免疫保护力不足。从分子遗传学角度证实了 VIIId 型 NDV 是导致新城疫免疫失败的重要原因。新城疫和禽流感目前没有特效药物及疫苗,只能通过增强机体抵抗力,以预防为主。然而,因免疫程序不合理、一些免疫抑制病存在、集约化饲养环境、鸡群受到惊吓等,诱发机体产生应激,导致机体免疫力和抗病力的下降,也会导致疾病的发生。针对集约化养殖业中存在的问题,临床生产中,确实需要一种能增强机体免疫力的产品。刺五加为五加科植物,其作为药材用于临床历史悠久,最早见于《神农本草经》,被列为上品,现代研究表明其具有补中、益精、强意志、祛风湿、壮筋骨、活血去瘀等功效^[2],具有免疫调节、抗肿瘤、抗衰老、抗辐射、抗损伤、抗疲劳等作用^[3]。黄芪的主要成分为黄芪多糖,具有促进免疫器官发育^[4]、促进细胞因子分泌^[5-8]、增强 T 和 B 细胞功能^[9]、增强机体免疫^[10]、纠正创伤引起的细胞免疫功能紊乱等作用^[11]。五加芪粉是由几家公司研制开发的中药免疫增强剂,由黄芪和刺五加经提取、浓缩、喷雾干燥制成,本试验将五加芪粉与新流二联灭活疫苗配合应用,探讨五加芪粉对鸡免疫新流二联灭

活疫苗免疫效果的影响,以期在生产中提高鸡群抵抗力,保证免疫效果奠定基础。

1 材料

1.1 试验动物 罗曼蛋公雏,1 日龄,300 只,购于洛阳畜康养殖场,常规饲养至 20 日龄备用。

1.2 药品与试剂 五加芪粉,批号:20120201,由洛阳惠中兽药有限公司提供;紫锥菊末(商品名:紫奇),批号:1210002,购自齐鲁动物保健品有限公司;新城疫(ND)标准抗原(批号:201205)、鸡新城疫病毒血凝抑制试验(HI)阳性血清(批号:201301),均购自中国兽医药品监察所;禽流感病毒 H9 亚型血凝抑制试验抗原(批号:2015005)、禽流感病毒 H9 亚型阳性血清(批号:2014002),均购自哈尔滨维科生物技术开发公司。新城疫病毒(LaSota 株)禽流感病毒(H9 亚型:HL 株)二联灭活疫苗,批号:121258,由普莱柯生物工程股份有限公司提供;柠檬酸钠,批号:F20090416,国药集团化学试剂有限公司;20 × PBS,批号:130119081Z,购自上海生物工程股份有限公司;IL-2 试剂盒购于美国的 R&D;LOT-13-02(96T);LOT-13-04(96T)。

1.3 试验器材 一次性 96 孔 V 型板(江苏新康医疗器械有限公司);JA2003 型电子天平(上海上平仪器有限公司);台式高速冷冻离心机(Sigma 公司);MM-2 微量振荡器(金坛市医疗仪器厂);微量移液器(德国 Eppendorf);Nu-425-400S 生物安全柜(美国 Nuair 公司);SPF 鸡隔离器,设备型号:GJ-1,苏州市冯氏实验动物设备有限公司;Sunrise 酶标仪(瑞士 Teacan 公司)。

2 方法

2.1 试验设计与分组 选择平均抗体效价在(0.8 ± 0.2)log₂、体重相近的 180 只 20 日龄健康鸡,随机分为 6 组,每组 30 只。除空白对照组外,其余各

组鸡只于 22 日龄时颈背部皮下注射鸡新城疫二联灭活疫苗,0.3 mL/羽。疫苗免疫后第 2 天,1~3 组分别按照不同剂量给予五加芪粉;第 4 组给予紫锥菊末;第 5、第 6 组不给药。各组具体分组和给药情况见表 1。

表 1 试验动物的分组及处理情况表

组别	给药剂量	给药次数
1 五加芪粉高剂量组	1 g/L	每日 1 次,连续 7 d
2 五加芪粉中剂量组	0.5 g/L	每日 1 次,连续 7 d
3 五加芪粉低剂量组	0.2 g/L	每日 1 次,连续 7 d
4 紫锥菊末对照组	1 g/kg 饲料	拌料,饲喂,自由采食,连续 10 d
5 免疫对照组	不给药	-
6 空白对照组	不给药	-

2.2 新城疫和禽流感抗体水平测定 分别于免疫前(0 d)和免疫后(10、17、24、31、38 d),固定选取 20 只鸡,采血,离心,分离血清。按常规方法用 96 孔“V”形血凝板进行血凝抑制(HI)试验,抗体效价检测方法参考 2010 年版《中国兽药典》三部附录 12 页,血清抗体的血凝抑制效价以 \log_2 表示。

2.3 雏鸡免疫器官指数的测定 在免疫后第 38 天,各组随机抽取 15 只,称体重。剖取法氏囊、脾脏、胸腺,用滤纸吸去表面的水分后,称重,计算法氏囊指数、脾脏指数和胸腺指数。

法氏囊指数 = 法氏囊(mg)/体重(g);脾脏指数 = 脾脏重(mg)/体重(g);胸腺指数 = 胸腺(mg)/体重(g)。

2.4 血清细胞因子 IL-2 的检测 血清白细胞介素-2(IL-2),采用 IL-2 酶联免疫吸附试验试剂盒,依照说明书测定 IL-2 水平(10 只/组)。

2.5 数据处理 试验数据用 SPSS 18.0 进行处理,同日龄不同剂量组间比较采用方差分析法,显著性用 P 值表示,其中 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

3 结果与分析

3.1 五加芪粉对鸡新城疫抗体水平的影响 五加芪粉对鸡新城疫抗体水平的影响见图 1。免疫后第 10、31 和 38 天时,0.2 g/L 的五加芪粉组与免疫对照组相比极显著提高了其 ND 抗体水平($P < 0.01$)。免疫后 31 d 和 38 d,0.5 g/L 的五加芪粉组

与免疫对照组相比显著或极显著提高了其 ND 抗体水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。免疫后 38 d,1 g/kg 饲料剂量的紫锥菊末组与免疫对照组相比显著提高了 ND 抗体水平($P < 0.05$)。

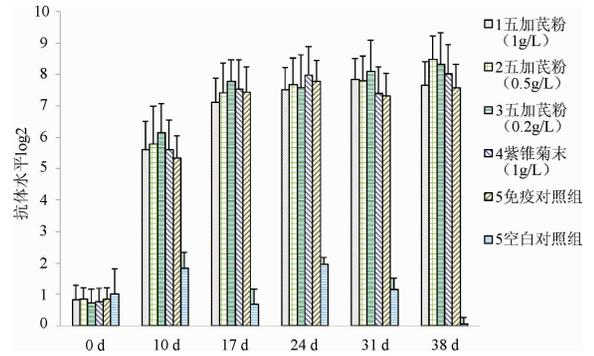


图 1 五加芪粉对鸡 ND 抗体水平的影响(单位: \log_2)

3.2 五加芪粉对鸡禽流感抗体(H9)水平的影响

五加芪粉对鸡禽流感抗体(H9)水平的影响见图 2。由图 2 可知,免疫后 10 d,0.5、0.2 g/L 的五加芪粉与免疫对照组相比显著或极显著的提高了禽流感抗体水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。免疫后 17 d,不同剂量的五加芪粉、紫锥菊末组与免疫对照组相比,显著的提高了禽流感抗体水平($P < 0.05$)。免疫后 24、31、38 d,不同剂量的五加芪粉组与免疫对照组相比差异不显著($P > 0.05$)。

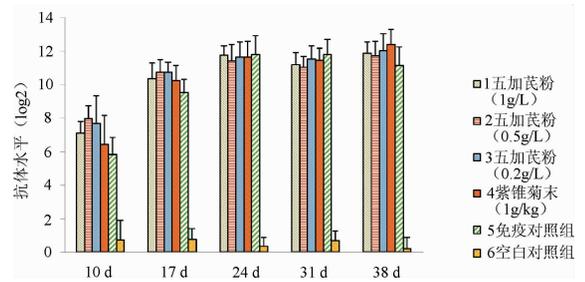


图 2 五加芪粉对鸡禽流感抗体(H9)水平的影响(单位: \log_2)

3.3 五加芪粉对鸡免疫器官指数的影响 五加芪粉对鸡免疫器官指数的影响见图 3。免疫后第 38 天,0.5、1 g/L 的五加芪粉组与免疫对照组相比极显著的提高了法氏囊指数($P < 0.01$),1 g/kg 的紫锥菊末组与免疫对照组相比显著的提高了法氏囊指数($P < 0.05$)。五加芪粉不同剂量组、紫锥菊末组与免疫对照组相比极显著的提高了脾脏指数(P

<0.01)。0.2、0.5、1 g/L 的五加芪粉与免疫对照组相比极显著的提高了胸腺指数 ($P < 0.05, P < 0.01$)。

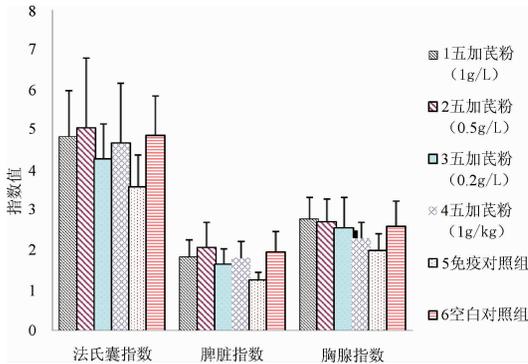


图3 五加芪粉对鸡免疫器官指数的影响(免疫后38 d)

3.4 五加芪粉对血清细胞因子 IL-2 水平的影响

五加芪粉对血清细胞因子 IL-2 水平的影响见图4。免疫后 17 d, 免疫对照组和空白对照组相比极显著的降低了 IL-2 水平 ($P < 0.05$), 其他组别与免疫对照组相比差异不显著 ($P > 0.05$)。免疫后 31 d, 0.2、0.5 g/L 五加芪粉组、紫锥菊末组与免疫对照组相比, 显著的提高了 IL-2 的水平 ($P < 0.05$)。1 g/L 五加芪粉组与免疫对照组相比, 极显著的提高了 IL-2 的水平 ($P < 0.01$)。免疫后 38 d, 1 g/L 的五加芪粉组、紫锥菊末组与免疫对照组相比显著的提高了 IL-2 的水平 ($P < 0.05$), 0.2、0.5 g/L 的五加芪粉组与空白对照组相比, 显著的低于该组 IL-2 水平 ($P < 0.05$)。

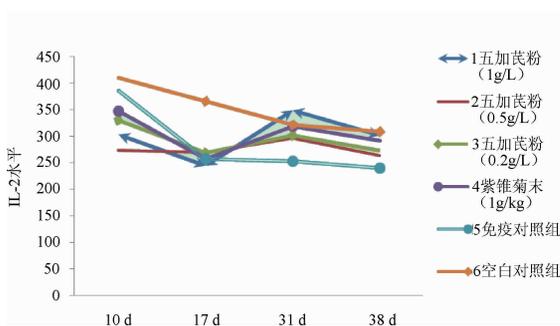


图4 五加芪粉对鸡血清 IL-2 水平的影响 (pg/mL)

4 讨论和小结

抗体水平的高低直接反映机体的体液免疫状

态, 抗体测定方法简单, 结果准确, 因此选择检测抗体水平。鸡只在 14 日龄时, 进行检测, ND 母源抗体效价为 2^4 左右, 这与文献^[12]报道相一致, 为避免母源抗体影响, 选择 20 日龄的鸡只进行试验。鸡免疫后 6~10 d 在血液中产生抗体, 因此本实验选择免疫后 10 d 检测血清中抗体水平。试验结果表明, 五加芪粉可以提前使 ND 抗体水平升高并且一直维持较高水平, 五加芪粉可提前升高禽流感抗体水平。这对于提高鸡群的抗病力具有重要意义。期望五加芪粉可以用于新流二联灭活疫苗免疫前后, 对疫苗免疫造成的应激具有一定的缓解作用, 可防止因机体抵抗力较低时进行疫苗免疫, 造成免疫失败。是否对其他疫苗免疫后机体抗体水平有提高作用, 还有待进一步研究。

本试验研究表明, 不同剂量五加芪粉和紫锥菊末可提高罗曼蛋鸡免疫器官指数。由此可知, 五加芪粉可以促进免疫器官的综合发育, 使鸡群整体免疫器官机能增强。有研究显示黄芪、刺五加联合应用具有协同作用, 其免疫效果优于单剂, 且具有扶正健脾之功效, 刺五加中药复合制剂可以提高雏鸡的生长速度和抗病能力, 红细胞花环率显著提高, 对免疫器官的发育有促进作用^[13], 与本研究结果相似。免疫后 31、38 d, 五加芪粉可以提高机体 IL-2 水平, 说明其能激活 T 细胞和促进 B 细胞分化和分泌抗体, 和 ND 抗体水平产生时间相一致。IL-2 能诱导产生干扰素, 增强单核细胞及自然杀伤细胞(NK)的杀伤活性, 在机体的免疫反应中具有重要的调节作用。

本试验对 IL-2 水平、免疫器官指数、抗体水平进行测定, 试验结果提示五加芪粉可以提高鸡免疫新流二联灭活疫苗后的免疫效果, 增强机体免疫力。

参考文献:

[1] 秦卓明, 徐怀英, 刘玉山, 等. 疫苗免疫压力下新城疫病毒的动态演化[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(2): 1-6.
 [2] 贾继明, 王宏涛, 王宗权. 刺五加的药理活性研究进展[J]. 中国现代中药, 2010, 12(2): 7-10.
 [3] 王志睿, 林敬明, 张忠义. 刺五加化学成分与药理研究进展

- [J]. 中药材,2003,26(8):603-606.
- [4] 单俊杰,王顺春. 黄芪多糖的化学和药理研究进展[J]. 上海中医药大学学报,2000,14(3):61-64.
- [5] 梁华平,张艳. 黄芪多糖调节创伤小鼠白介素-2及白介素-2受体基因表达的实验研究[J]. 中医学报,1999,21(3):27-29.
- [6] 高文学,李庆章,张柳,等. 黄芪多糖和香菇多糖对雏鸡 MΦ 活性和 IL-1 体外诱生活性的影响[J]. 中国兽医杂志,2000,26(5):39-40.
- [7] 刘永杰,李庆章,郝艳红. 黄芪多糖和香菇多糖对雏鸡 IL-2 活性和淋巴细胞增殖反应的影响[J]. 吉林农业大学学报,1999,21(3):89-91.
- [8] 刘永杰,李庆章,郝艳红. 香菇多糖和黄芪多糖对马立克氏病强毒感染雏鸡白细胞介素-2活性和淋巴细胞增殖反应的影响[J]. 中国兽医杂志,1999,25(7):20-23.
- [9] 高微微,曹丽,李展,等. 黄芪成分对鸡外周血淋巴细胞增殖反应的影响[J]. 中国兽药杂志,2001,35(6):16-18.
- [10] 许杜娟,陈敏珠. 黄芪多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 安徽医药,2003,7(6):418-419.
- [11] 曾广仙,刘俊英,熊金蓉,等. 黄芪多糖调节创伤应激小鼠免疫功能的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2004,24(12):942-945.
- [12] 姚远,张帆,郝正林,等. 蛋雏鸡新城疫母源抗体消长规律的分析[J]. 家禽科学,2013,1:41-43.
- [13] 刘桂芹,刘文强,樊琛,等. 刺五加中药复合剂对雏鸡免疫性能和血常规的影响[J]. 湖北农业科学,2009,48(9):2208-2210.

(编辑:侯向辉)

科学看待兽用抗生素——相关专家就我国兽用抗生素使用及动物产品兽药残留情况答记者问

近日,复旦大学公共卫生学院关于“儿童时期抗生素暴露可能是儿童肥胖的危险因素之一”的研究引起社会关注。我国兽用抗生素使用及动物产品兽药残留情况如何?动物源性食品中含有抗生素残留是否一定会危害人体?记者25日采访了国家兽药残留基准实验室研究员徐士新。

兽药残留超标率从1.43%降至0.11%

记者:如何看待兽用抗生素?

徐士新:抗生素的出现和使用为人类健康作出了贡献,对动物疫病的预防与控制作用同样功不可没。许多致病性细菌,如大肠杆菌O157、副伤寒沙门氏菌等,不仅会感染动物,而且会通过食物链感染人。养殖业使用抗生素,减少了人类感染人畜共患病的几率,保证了食品安全和人类健康。

在养殖过程中规范使用兽用抗生素,动物产品不会出现抗生素残留超标情况。规范使用,是指使用的兽用抗生素产品必须是经国家兽医行政管理部门批准的,并严格按产品标签和说明书使用,包括使用动物对象、适应症、用法和用量、休药期等。

记者:我国兽药残留限量标准与国际标准差距如何?

徐士新:国际上兽药残留安全限量标准主要以国际食品法典委员会(CAC)制定的标准为主要依据。我国兽药残留限量标准主要参考CAC,少量参考美国和欧盟。据了解,我国有302个残留限量指标值与CAC相同,26个残留限量指标值严于CAC,8个残留限量指标值宽于CAC。因此,我国兽药残留限量标准中有98%的可比指标值已达到或超过CAC标准。

记者:我国畜禽产品抗生素残留检测的结果怎么样?

徐士新:我国批准作为兽药使用的抗菌药,在上市前均要履行严格的审批手续,必须完成相关的药理学、安全性和药效试验,并经过严格评价和严格审查后,方予批准生产、使用。

(下转第34页)