



CHICK
PROGRAM

总第18期/2014年11月

新城疫（ND）弱毒活疫苗与rHVT-ND疫苗的联合应用效果 优于其与灭活疫苗的联合应用

F. Rauw^a, Y. Gardin^b, V. Palya^c, T. van den Berg^a & B. Lambrecht^a

a 禽类病毒与免疫实验室，兽医与农药研究中心（VAR），布鲁塞尔，比利时

b CEVA Santé Animale, Libourne, 法国

c CEVA Phylaxia, 布达佩斯，匈牙利

在世界各地的商业鸡群中，致死性新城疫（ND）的经常性爆发表明，常规疫苗不能充分诱导高水平的免疫来满足控制ND的需要。有必要寻找一种能够在1日龄雏鸡中大规模应用的免疫程序，该免疫程序能够诱导鸡群的持久免疫，无需在更大日龄进行加强免疫。在本文中，我们对比了在商业蛋鸡中两种疫苗免疫程序的免疫持续时间，其中一种为在1日龄联合免疫表达ND病毒F基因的火鸡疱疹病毒重组活载体疫苗（rHVT-ND）和ND弱毒活疫苗，另一种为传统的免疫程序，即在相同日龄联合免疫ND常规弱毒活疫苗和灭活疫苗。每周对免疫鸡群的体液免疫，细胞免疫和局部免疫进行监测，并在第6和10周龄使用嗜内脏型ND强毒株进行攻毒。我们发现，包含rHVT-ND疫苗的接种程序所诱导的免疫比使用常规疫苗免疫的接种程序提供了更多的保护。这可能与1型辅助T细胞（Th1细胞）所诱导的细胞免疫应答有关，而当前使用的常规疫苗的免疫接种程序激活的是2型辅助T细胞（Th2细胞）所诱导的体液免疫应答。

简介

新城疫病毒（NDV），也被称为禽I型副粘病毒，是养禽业中具有经济重要性的病原体，如果不采取严格有效的控制手段，就会迅速呈现出流行性的爆发。除了良好的生物安全手段，新城疫（ND）的控制主要是通过对鸡群进行预防接种以及对受感染鸡群和存在感染风险的鸡群（保护区）进行扑杀。疫苗接种方案的制定需要适应当时疾病的流行情况，并考虑到其他因素，如母源抗体，附加的疫苗接种计划，其它病原体的流行，鸡群种类，可用劳动力，气候条件以及成本预算。然而，世界许多地区的商品鸡群中致死性ND的经常爆发表明，常规疫苗不能充分诱导高水平的免疫来满足控制ND的需要。目前的疫苗和接种策略只能降低发病率和死亡率，但不能阻止病毒感染或病毒排出。另外，在产蛋鸡和种鸡中，需要在产蛋期开始时进行一次灭活疫苗的加强免疫，以诱导产蛋期中良好的免疫保护。



CHICK PROGRAM

人们研究了各种方法，为具有NDV母源抗体（MDA）的商品雏鸡制定一个合适的疫苗接种计划，该计划能够在单次孵化场疫苗接种后诱导长期持久的保护力。据报道，与单独进行灭活疫苗接种相比，在1日龄雏鸡中联合使用减毒活疫苗和灭活疫苗可以诱导更高和更持久的体液免疫。该免疫程序可针对过去流行的速发嗜肺型新城疫病毒分离株（vNDV）提供临床保护，并已在ND常发国家中常规应用。在本文中，我们对新的ND接种程序进行了研究，包括在1日龄联合免疫表达ND病毒F基因的火鸡疱疹病毒重组活载体疫苗（rHVT-ND）和ND弱毒活疫苗（使用或不使用壳聚糖作为佐剂）。结果证明，与单独接种活疫苗相比，这些疫苗接种计划在小于6周龄的商品鸡群中可以提高针对最近分离的嗜内脏型vNDV的保护力及免疫力。

在本研究中我们对上述ND疫苗联合免疫程序（使用或不使用壳聚糖作为佐剂）诱导的免疫力的持续时间进行了评价，并与传统的疫苗接种程序（在1日龄联合免疫ND活疫苗和灭活疫苗）进行了比较。我们在本文中展示了使用最近分离的嗜内脏型vNDV毒株进行攻毒的结果，以及这三种疫苗接种程序所诱导的免疫应答的研究。

材料和方法

鸡只：伊萨褐壳商品蛋鸡由Het Anker B.V（Ochten，比利时）提供的种蛋孵化得到。孵化后，所有的鸡均被放置在生物安全3级隔离器中进行饲养，所有动物实验均在兽医和农药研究所，生物安全和生物伦理委员会的授权和监督下，按照国家和欧洲法规进行。

疫苗，佐剂和攻毒毒株：ND活疫苗（Cevac VITAPEST L）由Ceva Santé Animale（CEVA- Phylaxia，布达佩斯，匈牙利）提供。这种疫苗是由非致病性嗜肠型毒株PHY. LMV. 42株制成的（脑内致病性指数（ICPI）在0.00到0.16之间；静脉内致病性指数（IVPI）= 0.00；平均死亡时间> 168h），属于新城疫病毒I型。将该疫苗溶于磷酸盐缓冲盐水（PBS）中，制成50微升含有1剂量疫苗，相当于 10^6 （EID₅₀）/剂量，在1日龄通过滴鼻点眼途径接种。ND灭活疫苗（Cevac Broiler NDK）由Ceva Santé Animale提供。该疫苗是La Sota株水包油乳剂疫苗，在1日龄进行100微升单剂量颈部皮下接种。表达非致病性新城疫D26毒株F蛋白的rHVT细胞结合性冻干苗（rHVT-ND，Vectomune® ND）由CEVA- Biomune（Lenexa，KS，USA）制造。将单剂量的重组疫苗稀释于100 μl相应疫苗稀释液（Ceva-Biomune）中，在1日龄进行颈部皮下接种。壳聚糖（壳聚糖盐酸盐）佐剂由Ceva Santé Animale提供。壳聚糖是一种无支链的含有两个N-乙酰基-D-葡萄糖胺和D-葡萄糖胺单元的二元杂多糖。将壳聚糖溶解于PBS中，终浓度为0.5%（重量/体积），用于重悬和稀释ND活疫苗以达到最终浓度。

用于攻毒的嗜内脏型Chimalhuacan NDV强毒株属于Class II中的基因V型（ICPI = 1.89），分离于墨西哥。对3至6周龄的无特定病原体（SPF）鸡只和商品肉鸡滴鼻点眼接种 10^5 EID₅₀的病毒，可在3到6天内引起100%的死亡率（个体观察）。



CHICK PROGRAM

促细胞分裂剂和新城疫病毒抗原：促细胞分裂剂巴豆醇-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯（PMA）和钙离子通道载体（IONO）购自Sigma（Diegem, Belgium）。由NDV的La Sota株制备NDV抗原的方法如前所述，并以灭活NDV及所有单独的NDV蛋白来命名（prot-NDV）。

脾脏、外周血、消化道及呼吸道中NDV特异性细胞免疫反应的测定：如前所述，通过评价脾细胞、外周血淋巴细胞（PBL），十二指肠固有层淋巴细胞，气管淋巴细胞和肺淋巴细胞体外抗原活化后ChIFN γ 的产生水平，来评价NDV特异性细胞免疫反应（CMI）。简单地说，无菌采取鸡脾脏，在血液样品中加入肝素，通过红细胞沉降分层，分别分离脾细胞和PBL。通过消化酶从消化道，气管和肺中分离淋巴细胞。使用NDV特异性抗原（PROT-NDV，1微克/毫升）激活体外淋巴细胞，并使用促细胞分裂剂（PMA / IONO，1微克/毫升）作为阳性对照。通过酶联免疫吸附试验（ELISA）测定ChIFN γ 。细胞免疫应答表示为刺激指数（SI）。通过将促细胞分裂剂活化和抗原活化的淋巴细胞的光密度值除以非激活淋巴细胞的光密度值来计算每只鸡的刺激指数，并计算每组的SI。

NDV特异性体液免疫和局部免疫反应的测定：NDV特异性体液免疫是通过血细胞凝集抑制试验（HI）及ELISA检测NDV特异性IgG，IgM和IgA进行评价的。HI试验和ELISA检测NDV特异性IgG的方法如前所述。检测NDV特异性IgM和IgA的方法为，将Maxisorp Nunc-免疫F96微孔板（International Medical, Watermaal, Belgium）分别用pH 9.6的碳酸盐/碳酸氢盐缓冲液稀释成5微克/毫升的小鼠抗鸡IgM或IgA抗体（SouthernBiotech，布鲁塞尔，比利时）4℃包被过夜。次日，用含有0.1%吐温80的PBS将板洗涤三次，在37℃下用含3%牛血清白蛋白的PBS（BSA）将板封闭30分钟，然后用稀释的样品孵育，随后按照说明，在室温下使用含有0.1%吐温80，5%NaCl和4%BSA的PBS作用1小时。然后加入稀释到1微克/毫升的灭活NDV和生物素标记的小鼠抗HN蛋白抗体4D6室温孵育1小时。将平板与链亲和素辣根过氧化物酶复合物（Biosource Europe, Nivelles, Belgium）在室温下孵育1小时。洗涤6次后，加入100微升四甲基联苯胺过氧化物酶底物（Thermo Fisher Scientific, Erembodegem, Belgium），在黑暗中作用15分钟，然后用1M H₃PO₄缓冲液终止反应，通过ELISA读数器测定450至560nm的光密度值来显示过氧化物酶活性。

通过ELISA方法检测疫苗复制靶器官-肺洗涤液、离体十二指肠上清液和气管组织培养物中的NDV特异性IgG，IgM和IgA抗体，来测定NDV局部免疫反应。收集肺洗液和离体十二指肠组织培养物的方法如前所述。气管组织的培养方法是根据Zoth等人的论文稍作修改得到。收集气管后，在含有5%（w/v）庆大霉素的PBS中除去浆膜中的结缔组织，血和脂肪，通过在气管环状部分的外侧沿一个方向轻轻摩擦去除大部分的粘液。在洗涤前，将气管组织用剪刀打开并切成1cm长的切片。在洗涤过程中，将组织条300×g离心沉淀5分钟。随后将组织重新悬浮于5ml含有10% FCSi的RPMI 1640培养基中。在39℃温育48



CHICK PROGRAM

小时后，通过离心收集上清液，并冷冻在-20℃直到进行测定。

攻毒后通过口咽和泄殖腔拭子测定病毒排毒：如先前所述，通过针对M 基因的实时荧光定量反转录聚合酶链式反应（QRRT-PCR）对口咽和泄殖腔拭子中的Chimalhuacan NDV 攻毒毒株进行定量。根据标准曲线数据，对该NDV QRRT - PCR方法中 1 个 EID_{50} ($10^{2.7} EID_{50}/ml$ 拭子)病毒/反应的灵敏度阈值进行了测定 ($R^2 = 0.998$, 有效率= 94.17 %)。统计分析中，不确定的样品被认为是阴性的，阴性临界值为 $10 EID_{50} / ml$ 拭子。结果表示为每毫升拭子中攻毒毒株的滴度 (\log_{10})。

此外如前所述，使用禽 β 肌动蛋白对样品和RNA提取程序的质量进行了验证。

试验设计：商业蛋鸡根据1日龄接种与否被分成四组。第一组接种rHVT - ND活载体疫苗和ND活疫苗，而第二组中的ND活疫苗与壳聚糖同时使用。分别被命名为“ rHVT -ND / ND活疫苗”与“ rHVT -ND / ND活疫苗-壳聚糖”组。第三组同时接种ND活疫苗和灭活疫苗，并命名为“ND灭活/ND活疫苗”组。最后一组不进行接种处理，作为阴性对照。在1日龄，采集10只未接种疫苗的鸡的血清，以确定母源抗体水平。免疫后第3, 4, 5, 6, 8, 10和12周采集血清，血液，脾，气管，肺和十二指肠样品 ($n = 5$)。接种后第6和10周，从每个组中选取10只鸡进行单独标记，并使用 $10^5 EID_{50} / 200$ 微升的Chimalhuacan NDV 毒株通过滴鼻点眼途径进行攻毒。攻毒后2周内，每天监测鸡的临床症状（头部肿胀，抑郁，虚脱和神经症状）和死亡。呈现典型ND临床症状或死亡的鸡只被认为是不受保护的。在攻毒后2, 4, 7和10天 (d. p. i) 采集口咽和泄殖腔拭子。

统计分析：使用Minitab 13 (Minitab公司，考文垂，英国)和STATA 10 (Stata Corp LP，得克萨斯，美国)软件（适用于Windows 2000）进行数据统计分析， $P < 0.05$ 被认为差异显著。如前所述，通过单向方差分析和Turkey’ s成对比较试验或通过非参数Kruskal- Wallis检验对各组ChIFN γ 的产生，抗体水平和病毒排毒滴度进行了比较。通过Fisher精确检验对标准“QRRT - PCR阳性反应”和“细胞活化阳性”进行定性，采用Bonferroni方法来调整风险 α

结果

新城疫病毒攻毒后，含有rHVT-ND疫苗的接种方案能够提供针对临床症状、死亡率和攻毒后排毒等方面更广泛和持续时间更长的保护。

在6周龄和10周龄使用嗜内脏型Chimalhuacan vNDV进行攻毒后，从攻毒3天开始，未接种疫苗的鸡显示出ND的典型临床症状，包括头部红肿，抑郁，虚脱和神经症状。攻毒5天时鸡只开始死亡。攻毒6天时所有鸡只全部死亡，证明攻毒成功。在两次攻毒后，“rHVT -ND / ND活疫苗”与“ rHVT -ND / ND活疫苗-壳聚糖”组，均未观察到临床症状和死亡（表1）。在6周龄攻毒后，接种ND灭活/ND活疫苗组的鸡只也可以达到完全的保护。在10周龄攻毒后，临床症状和死亡的保护率分别降低



CHICK PROGRAM

到70%和90%，但统计学差异不显著。

表1. 根据不同的疫苗接种方案，1日龄商品蛋鸡接种ND活疫苗和rHVT-ND疫苗或ND灭活疫苗后，使用Chimalhuacan vNDV毒株攻毒后，针对发病率和死亡率的保护力

攻毒日龄	组别	保护率	
		发病	死亡
6周龄	阴性对照	0	0
	rHVT-ND / ND活疫苗	100	100
	rHVT-ND / ND活疫苗-壳聚糖	100	100
	ND灭活/ND活疫苗	100	100
10周龄	阴性对照	0	0
	rHVT-ND / ND活疫苗	100	100
	rHVT-ND / ND活疫苗-壳聚糖	100	100
	ND灭活/ND活疫苗	70	90

数据表示滴鼻点眼途径使用 Chimalhuacan NDV 毒株攻毒后 2 周内的存活率和临床保护率。

在6周龄进行攻毒后，三种免疫程序在攻毒4天后均能显著减少口咽拭子中病毒排出的数量（表2）。包含rHVT-ND疫苗的两个免疫组中，攻毒10天后时排毒停止。同样，三种免疫程序在攻毒4天后均能显著减少泄殖腔拭子中病毒排出的数量，鸡只阳性率小于40%。在6周龄攻毒后，三个免疫组之间的排毒情况没有区别。在10周龄进行二次攻毒之后，三种免疫程序在攻毒4天后口咽拭子中病毒排出的数量均显著减少。有趣的是，与ND灭活/ND活疫苗免疫组相比，在攻毒4天和7天后，rHVT-ND / ND活疫苗免疫组和rHVT-ND / ND活疫苗-壳聚糖免疫组的排毒减少量更加显著。此外，包含rHVT-ND疫苗的两个免疫组可以完全抑制泄殖腔排毒，而在ND灭活/ND活疫苗免疫组中，在攻毒4, 7和10天后均检测到了鸡的排毒。

在12周的观测期中，rHVT-ND / ND活疫苗免疫组始终可检测到外周血CMI，而且在消化道和呼吸道中CMI值更加显著，持续时间也更长。在12周的观察期中，rHVT-ND / ND活疫苗免疫组外周血NDV特异性CMI始终高于阳性临界值（图1a），并且在第5, 6和12周，与非免疫组相比存在显著差异。ND灭活/ND活疫苗免疫组的CMI仅在4, 5, 8, 10和12周龄表现为阳性，而且只有在观察期的最后一周与非免疫组相比存在显著差异。rHVT-ND / ND活疫苗-壳聚糖免疫组仅在5周龄前检测到了外周血细胞免疫应答。



CHICK PROGRAM

从3周龄开始，三个疫苗免疫组均可以在消化道中诱导NDV特异性CMI（图1b）。rHVT -ND / ND活疫苗免疫组的十二指肠CMI在6周内迅速增加并达到峰值，而且在6周龄时显著高于其他接种组和未接种组。在12周的观察期内，包含rHVT -ND疫苗的两个疫苗接种组均能持续检测到消化道抗原特异性细胞免疫，而ND灭活/ND活疫苗免疫组的消化道CMI在8周龄后就已开始减弱。

rHVT-ND / ND活疫苗免疫组在6至10周龄可以在肺中检测到NDV特异性CMI，而rHVT -ND / ND活疫苗-壳聚糖免疫组可在8至10周龄检测到（图1c）。事实上，尽管与未接种疫苗组相比差异并不显著，40-80%的接种疫苗的鸡的肺可以检测到阳性CMI。整个实验过程中ND灭活/ND活疫苗免疫组始终为阴性。实验的12周内支气管中均未检测到NDV特异性CMI（数据未显示）。

在CMI应答检测中，我们观察到实验期间每天的标准偏差存在显著变化。这可能是由于鸡群个体之间存在生物学差异，特别是在传统动物中，淋巴细胞的有丝分裂激活之后所观察到的情况（数据未显示）。实验设计中，在每个试验日期每组采集多于5只鸡可能会降低标准偏差，但是在同一天进行四组的评估会很难操作。

表2 根据不同的疫苗接种方案，1日龄商品蛋鸡接种ND活疫苗和rHVT-ND疫苗或ND灭活疫苗后，使用Chimalhuacan vNDV毒株在6周龄和10周龄进行攻毒后的排毒情况

日龄	组别	2d.p.i	4d.p.i	7d.p.i	10d.p.i
口咽拭子 ^a					
6周龄	阴性对照	3.71 ± 1.69 ^{bA} 8/10 ^{cA}	6.77 ± 0.23 ^A 10/10 ^A	N. D.	N. D.
	rHVT -ND / ND活疫苗	1.75 ± 1.21 ^B 3/10 ^{AB}	3.03 ± 1.82 ^B 6/10 ^A	1.92 ± 1.89 ^A 3/10 ^A	1.09 ± 0.27 ^A 0/10 ^A
	rHVT -ND / ND活疫苗-壳聚糖	2.19 ± 1.56 ^{AB} 4/10 ^{AB}	3.47 ± 2.06 ^B 7/10 ^A	3.04 ± 2.61 ^A 4/10 ^A	1.03 ± 0.10 ^A 0/10 ^A
	ND灭活/ND活疫苗	1.48 ± 1.02 ^B 2/10 ^B	3.40 ± 2.16 ^B 6/10 ^A	2.35 ± 1.70 ^A 4/10 ^A	1.23 ± 0.72 ^A 1/10 ^A
10周龄	阴性对照	4.34 ± 0.75 ^A 10/10 ^A	6.36 ± 0.41 ^A 10/10 ^A	N. D.	N. D.
	rHVT -ND / ND活疫苗	2.22 ± 1.65 ^{BC} 4/10 ^{AB}	2.07 ± 1.30 ^C 4/10 ^{AB}	1.00 ± 1.00 ^B 0/10 ^B	1.00 ± 0.00 ^A 0/10 ^A
	rHVT -ND / ND活疫苗-壳聚糖	1.41 ± 0.87 ^C 2/10 ^B	2.05 ± 2.22 ^C 2/10 ^B	2.72 ± 2.28 ^B 4/10 ^{AB}	1.00 ± 0.00 ^A 0/10 ^A
	ND灭活/ND活疫苗	3.49 ± 1.01 ^{AB} 9/10 ^{AB}	4.25 ± 1.52 ^B 9/10 ^{AB}	4.99 ± 2.44 ^A 8/9 ^A	1.81 ± 1.65 ^A 2/9 ^A



CHICK PROGRAM

泄殖腔拭子					
6周龄	阴性对照	1.45 ± 0.96 ^A 1/10 ^A	6.52 ± 0.65 ^A 10/10 ^A	N. D.	N. D.
	rHVT -ND / ND活疫苗	1.18 ± 0.58 ^A 1/10 ^A	1.43 ± 1.35 ^B 1/10 ^B	2.03 ± 1.54 ^A 3/10 ^A	1.78 ± 1.46 ^A 3/10 ^A
	rHVT -ND / ND活疫苗-壳聚糖	1.00 ± 0.00 ^A 0/10 ^A	1.00 ± 0.00 ^B 0/10 ^B	2.10 ± 1.97 ^A 3/10 ^A	1.93 ± 1.32 ^A 2/10 ^A
	ND灭活/ND活疫苗	1.00 ± 0.00 ^A 0/10 ^A	1.00 ± 0.00 ^B 0/10 ^B	2.74 ± 1.76 ^A 4/10 ^A	1.79 ± 1.43 ^A 2/10 ^A
10周龄	阴性对照	1.50 ± 1.05 ^A 2/10 ^A	6.34 ± 0.46 ^A 10/10 ^A	N. D.	N. D.
	rHVT -ND / ND活疫苗	1.00 ± 0.00 ^A 0/10 ^A	1.00 ± 0.00 ^B 0/10 ^B	1.00 ± 0.00 ^B 0/10 ^B	1.00 ± 0.00 ^A 0/10 ^A
	rHVT -ND / ND活疫苗-壳聚糖	1.00 ± 0.00 ^A 0/10 ^A	1.00 ± 0.00 ^B 0/10 ^B	1.00 ± 0.00 ^B 0/10 ^B	1.00 ± 0.00 ^A 0/10 ^A
	ND灭活/ND活疫苗	1.00 ± 0.00 ^A 0/10 ^A	1.92 ± 2.65 ^B 2/10 ^B	2.89 ± 1.97 ^A 5/9 ^A	1.78 ± 2.35 ^A 1/9 ^A

a在特定d.p.i.通过QRRT-PCR对1毫升拭子进行检测的数据。不同的大写字母上标表示各组之间的差异显著 ($P < 0.05$) (每列)。QRRT-PCR对于Chimalhuacan NDV毒株的特异性临界值通过 $10^{2.7}$ EID₅₀/ml的拭子来确定。由于存在特异性死亡,检测鸡只的总数随着时间而减少(见结果部分)。**ND**,由于存在特异性死亡而没有检测。**b**表示1ml拭子中log₁₀EID₅₀NDV的平均值±标准偏差。统计分析时,数值 $< 2.7 \log_{10}$ EID₅₀/ml的样品被认为是阴性,未检测到病毒的样本也被认为是阴性的,为了进行统计将其认定为1 log₁₀ EID₅₀/ml拭子。**c**表示在1ml拭子中检测到病毒的频率(阳性数/检测鸡只总数)。

在6周龄之前各免疫组均可诱导脾脏中CMI的高表达。在3-6周龄内,三个免疫组的鸡只脾脏中的NDV特异性CMI显著高于未接种疫苗的鸡只(图1d)。在第3,4,6和12周,ND灭活/ND活疫苗免疫组脾脏CMI在4组之中最高,在第3周显著高于rHVT-ND/ND活疫苗-壳聚糖免疫组,而在第12周显著高于包含有rHVT-ND疫苗的两个免疫组。与未接种疫苗组相比,在8周龄时,rHVT-ND/ND活疫苗-壳聚糖免疫组的NDV特异性CMI维持在一个恒定和显著更高的水平,而其他两个免疫组开始降低。

ND灭活/ND活疫苗免疫组可能会诱导更高的全身性体液免疫。1日龄时平均HI抗体滴度为 $9.2 \pm 1.2 \log_2$ (数据未显示)。随后,4周龄内的HI滴度显示出母源抗体提供的被动免疫力的持续下降(图2)。从3周龄开始,通过HI实验检测到三个免疫组的初次主动免疫应答,而且从4周龄开始显著高于未接种疫苗组。在4周龄时ND灭活/ND活疫苗免疫组的HI效价显著高于包含有rHVT-ND疫苗的两个免疫组。这种优势在6,8和10周龄时持续存在,但差异不显著。在整个实验过程中,可以观察到NDV特异性IgG抗体的ELISA结果也存在类似的趋势(数据未显示)。在3到5周龄之间可以在ND灭活/ND活疫苗免疫组检测到NDV



CHICK PROGRAM

特异性IgM抗体，其水平显著高于未接种疫苗组（图3）。稍后在5到8周龄之间，rHVT-ND / ND活疫苗免疫组的IgM开始出现，并在5到6周龄时与未接种疫苗组存在显著差异。rHVT-ND / ND活疫苗-壳聚糖免疫组中只在5周龄检测到IgM的存在。整个实验期间没有从任何接种组的血清中检测到NDV特异性IgA（数据未显示）。

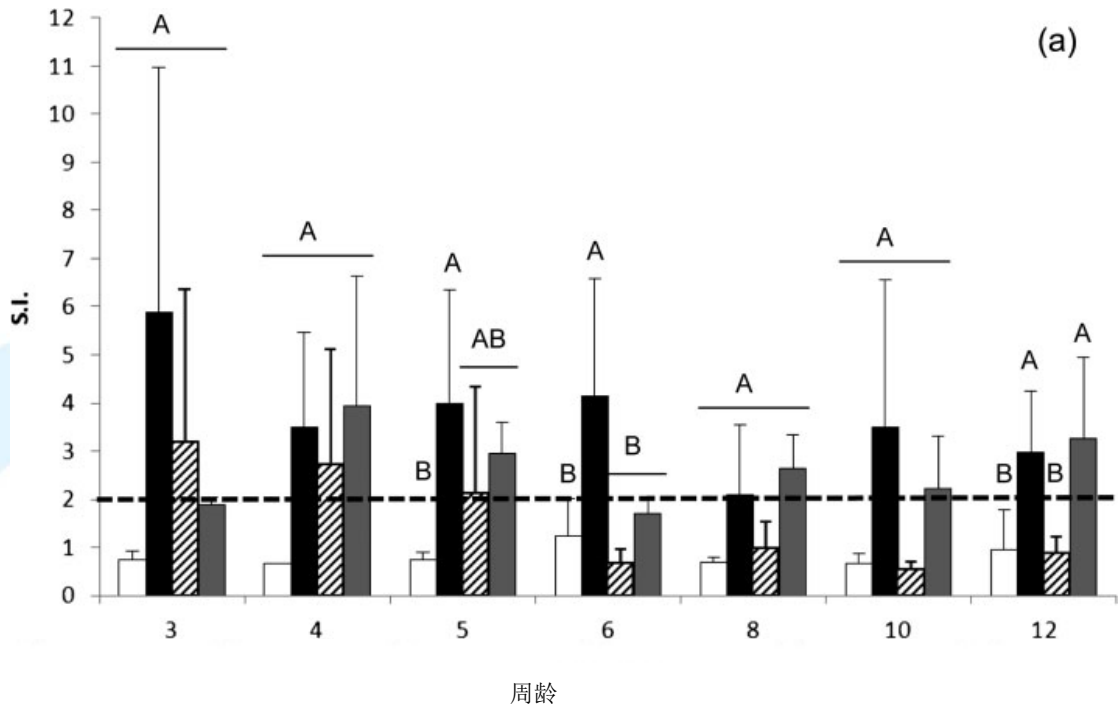
ND灭活/ND活疫苗免疫组可能会诱导更高的局部体液免疫。从3周龄开始，可在3个疫苗接种组的消化道中检测到IgG（图4）。ND灭活/ND活疫苗免疫组的体液免疫水平从4周龄开始显著高于未接种疫苗组，而一周之后，rHVT-ND / ND活疫苗免疫组和rHVT-ND / ND活疫苗-壳聚糖免疫组的体液免疫水平也开始显著高于未接种疫苗组。与rHVT-ND / ND活疫苗免疫组和rHVT-ND / ND活疫苗-壳聚糖免疫组相比，ND灭活/ND活疫苗免疫组在6周龄内可以诱导十二指肠表达更高的IgG水平，但仅在4周龄时差异显著。5周龄时，可以在ND灭活/ND活疫苗免疫组40%的鸡只消化道中检测到NDV特异性IgA和IgM，而包含有rHVT-ND疫苗的两个免疫组始终为阴性（数据未显示）。

从3周龄开始，在所有疫苗接种组的气管中均可以检测到IgG的分泌（图5a）。ND灭活/ND活疫苗免疫组的NDV特异性IgG水平从4周龄开始显著高于未接种疫苗组，而一周之后，在其它两个疫苗免疫组也观测到了相同的差异。与其它两个疫苗免疫组相比，ND灭活/ND活疫苗免疫组在4、5、6周龄时可以诱导气管更高的IgG免疫应答，并在4周龄时差异显著。在5、6周龄时，ND灭活/ND活疫苗免疫组的气管IgG水平显著高于rHVT-ND / ND活疫苗-壳聚糖免疫组，10周龄时显著高于rHVT-ND / ND活疫苗免疫组。ND灭活/ND活疫苗免疫组的气管IgA（图5b）和IgM（图5c）水平在4和5周龄时出现峰值，并且显著高于未接种疫苗组和其他接种组。在实验期间没有检测到肺洗液中的免疫球蛋白（数据未显示）。

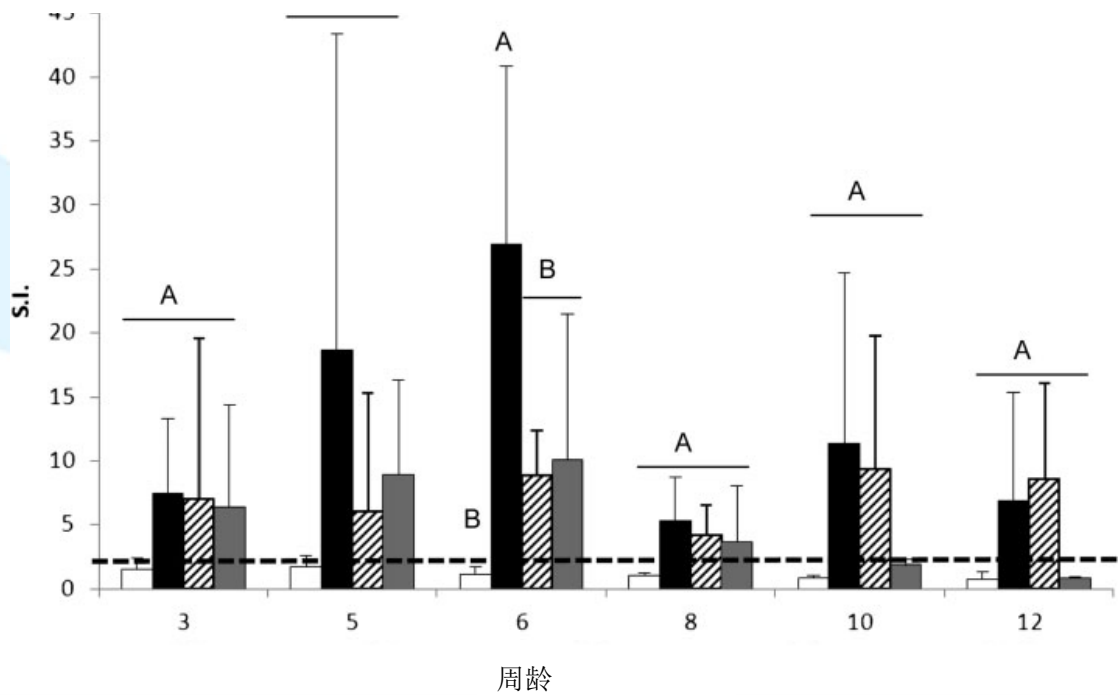


鸡计划

CHICK PROGRAM



阴性对照
 rHVT ND/ND 活疫苗
 rHVT ND/ND 活疫苗-壳聚糖组
 ND 灭活/ 活疫苗组

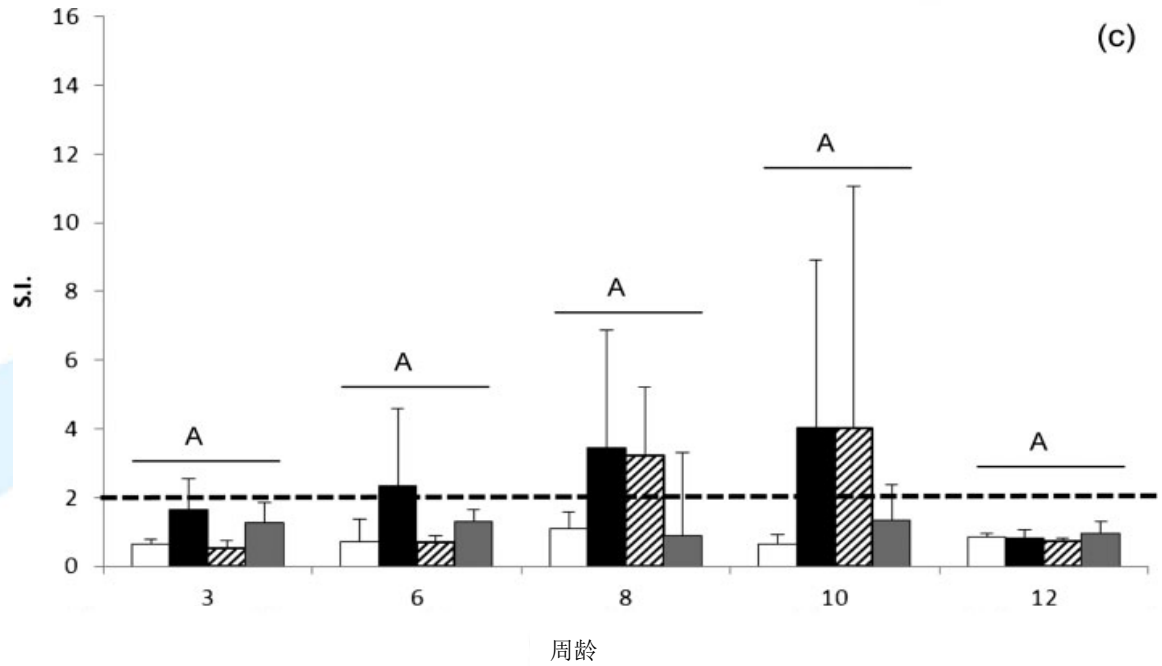


阴性对照
 rHVTND/ND 活疫苗
 rHVT ND/ND 活疫苗-壳聚糖组
 ND 灭活/ 活疫苗组

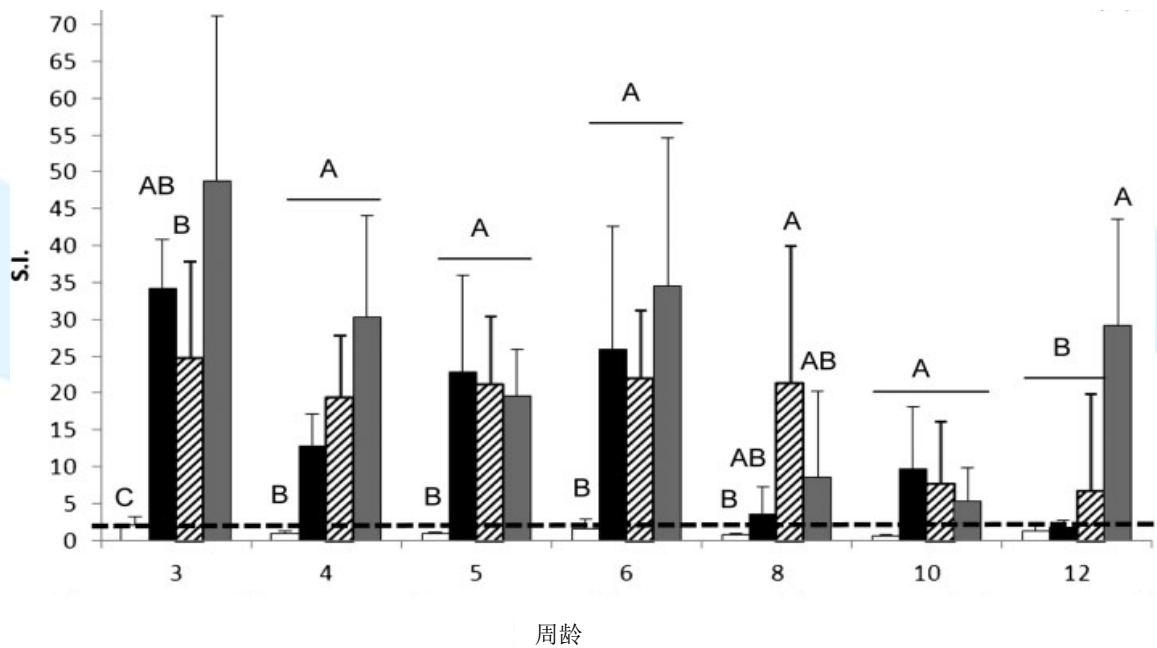


鸡计划

CHICK PROGRAM



阴性对照
 rHVT ND/ND 活疫苗
 rHVT ND/ND 活疫苗-壳聚
 ND 灭活/ 活疫苗组



阴性对照
 rHVT ND/ND 活疫苗
 rHVT ND/ND 活疫苗-壳聚
 ND 灭活/ 活疫苗组



CHICK PROGRAM

图 1. 根据不同的疫苗接种方案, 1 日龄商品蛋鸡接种 ND 活疫苗和 rHVT-ND 疫苗或 ND 灭活疫苗后, 外周血 (1a)、消化道 (1b)、肺 (1c)、脾脏 (1d) 中的 NDV 特异性细胞免疫应答。使用 prot-NDV 抗原刺激淋巴细胞 (1 微克/毫升), 72 小时后收获刺激细胞的上清液。通过 ChIFN γ 捕获 ELISA 法测定 ChIFN γ 的产生情况。在各时间点计算对应的刺激指数的平均值 \pm 标准偏差 (n=5)。在各时间点没有共同大写字母的平均值 \pm 标准偏差表明差异显著 (P<0.05)。S.I., 刺激指数。

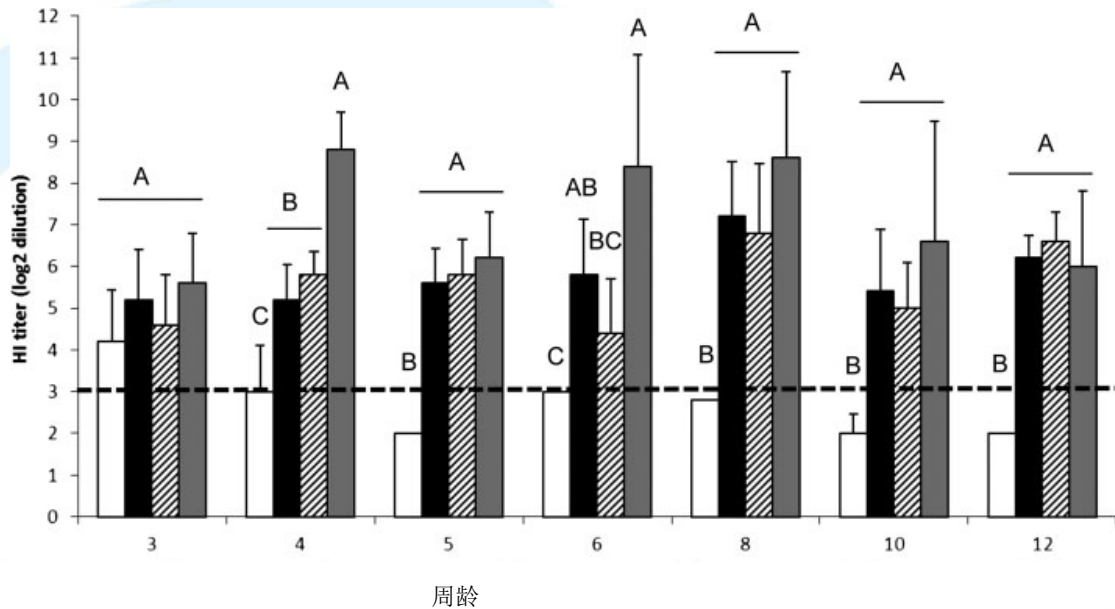
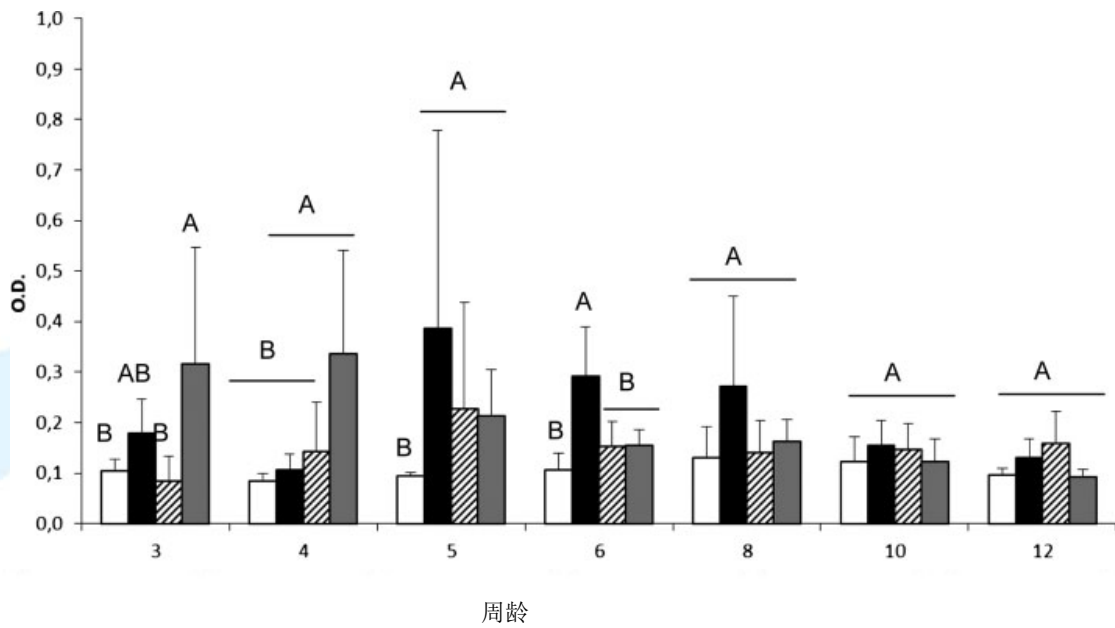


图 2. 根据不同的疫苗接种方案, 1 日龄商品蛋鸡接种 ND 活疫苗和 rHVT-ND 疫苗或 ND 灭活疫苗后的血清 HI 抗体滴度。数值表示某日龄时 HI 抗体滴度的平均值 \pm 标准偏差 (n=5), 即使用 4 个血凝单位 NDVLa Sota 株可引起血凝抑制的最大稀释倍数。HI 平均滴度表示为 log₂ 的倒数, 滴度> 3 log₂ 被认为是阳性 (此临界值用虚线表示)。没有共同大写字母的平均值 \pm 标准偏差表明差异显著 (P<0.05)。



鸡计划

CHICK PROGRAM



□ 阴性对照 ■ rHVT ND/ND 活疫苗 ▨ rHVT ND/ND 活疫苗-壳聚糖组 ■ ND 灭活/ 活疫苗组

图3. 根据不同的疫苗接种方案, 1日龄商品蛋鸡接种ND活疫苗和rHVT-ND疫苗或ND灭活疫苗后, 通过ELISA方法测定的NDV特异性IgM水平。数值表示某日龄时通过ELISA测定的吸光度平均值±标准偏差 (n=5)。血清样品按1: 100稀释。在各时间点没有共同大写字母的平均值±标准差表明差异显著 (P < 0.05)。O.D., 光密度。



鸡计划

CHICK PROGRAM

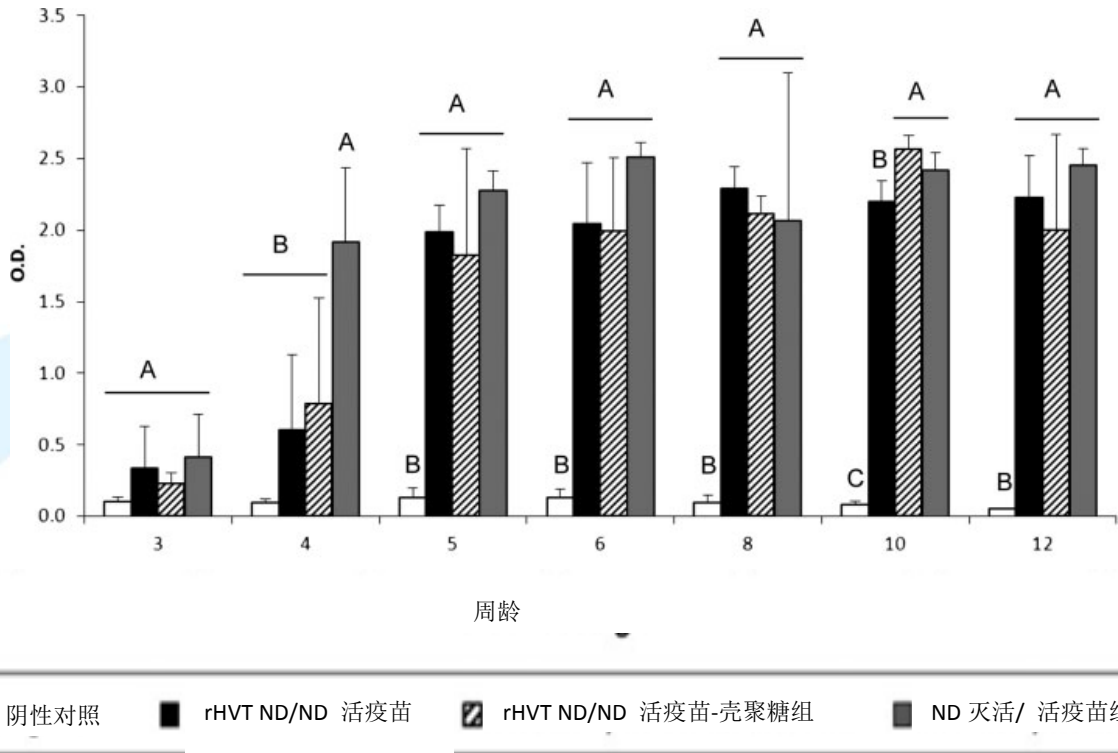
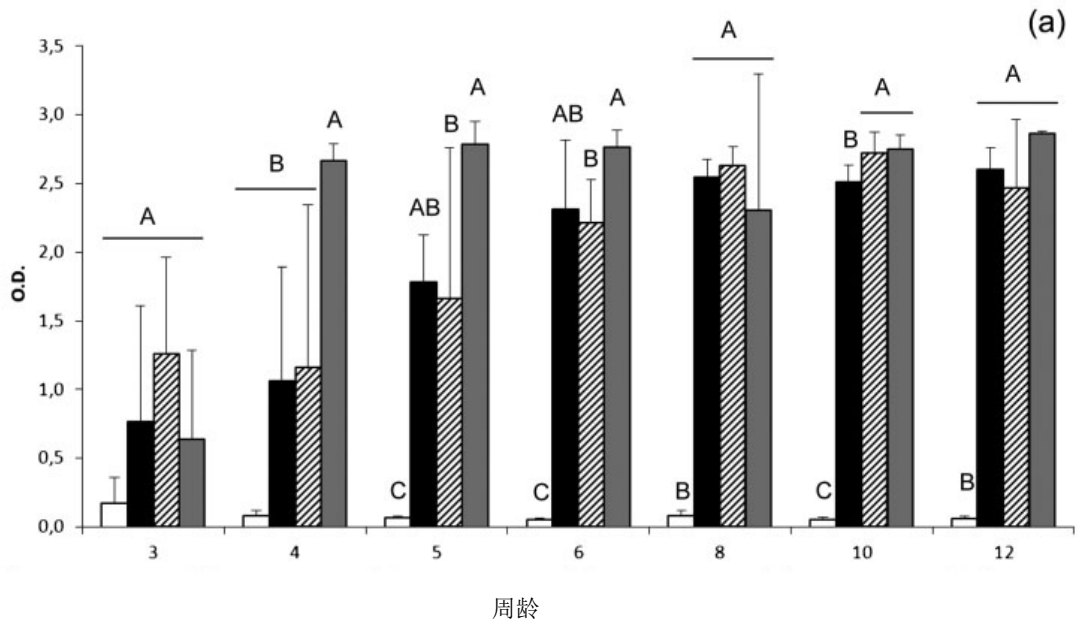


图 4. 根据不同的疫苗接种方案, 1 日龄商品蛋鸡接种 ND 活疫苗和 rHVT-ND 疫苗或 ND 灭活疫苗后, 十二指肠中的 NDV 特异性 IgG 水平。数值表示某日龄时通过 ELISA 测定的吸光度平均值±标准偏差 (n=5)。按 1: 2 对离体十二指肠组织培养物的上清进行稀释, 并检测免疫球蛋白应答。没有共同大写字母的平均值±标准差表明差异显著 (P < 0.05)。O.D., 光密度。

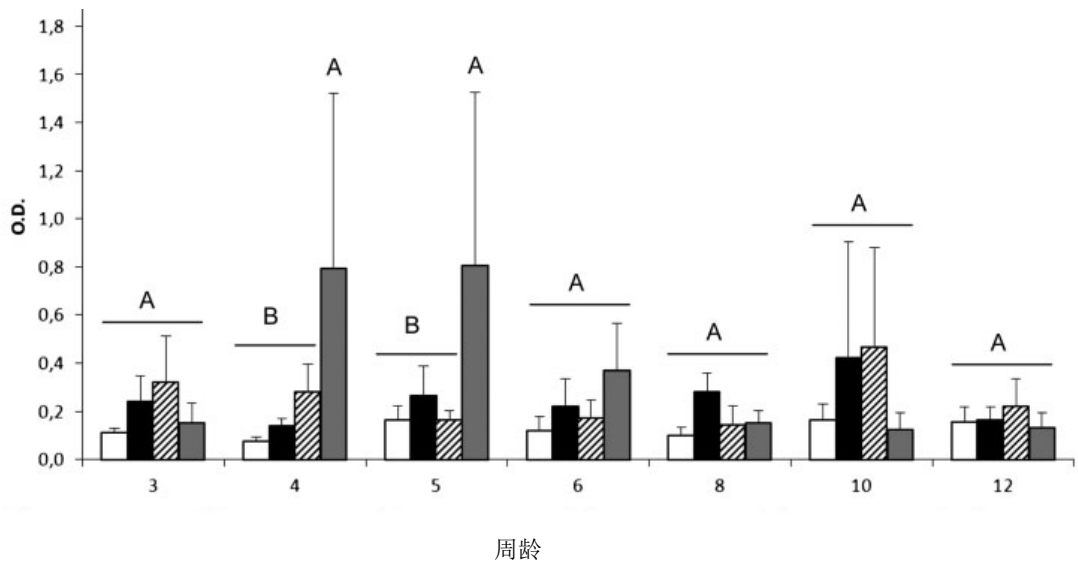


鸡计划

CHICK PROGRAM



阴性对照
 rHVT ND/ND 活疫苗
 rHVT ND/ND 活疫苗-壳聚糖组
 ND 灭活/活疫苗组

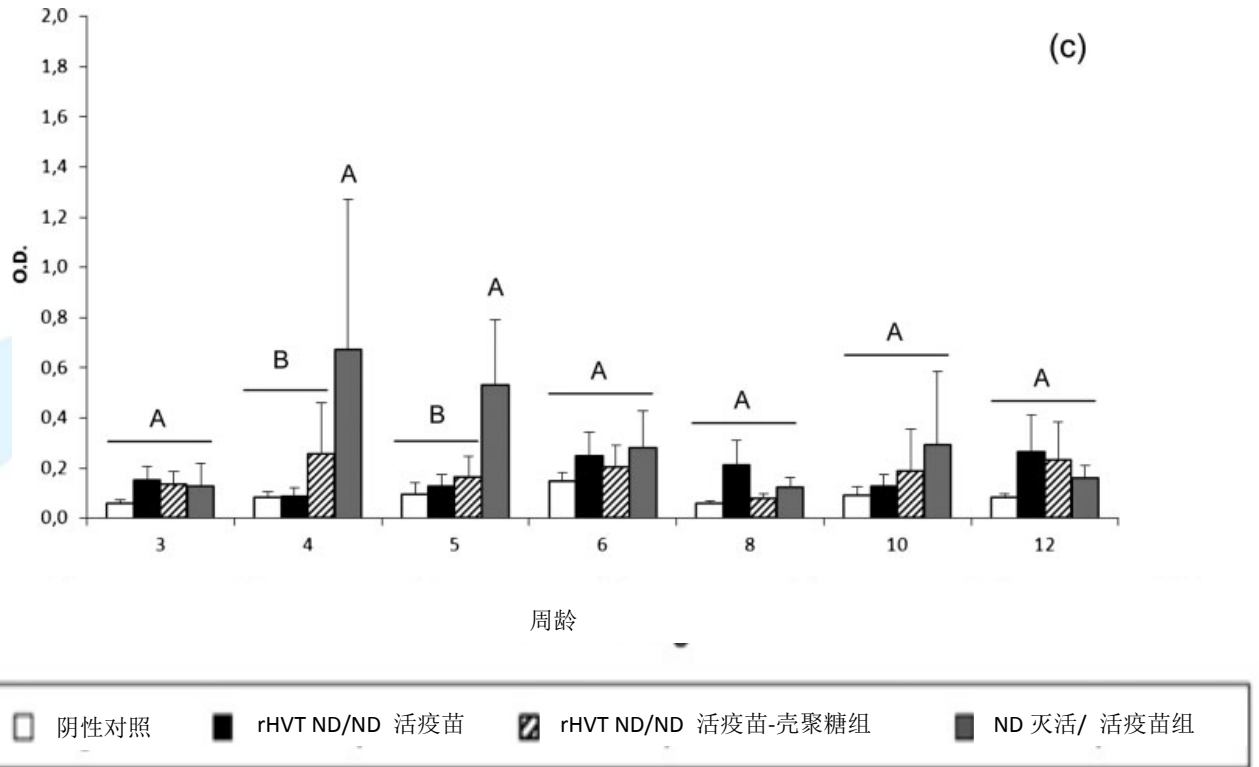


阴性对照
 rHVT ND/ND 活疫苗
 rHVT ND/ND 活疫苗-壳聚糖组
 ND 灭活/活疫苗组



鸡计划

CHICK PROGRAM





CHICK PROGRAM

讨论

在 ND 呈地方性流行的地区，ND 病毒的干扰感染压力很大，野毒株给疫苗的开发造成了很大困难。因此，通过接种疫苗尽快诱导主动免疫应答是很重要的。此外，通常情况下，高水平的被动免疫会对常用 ND 疫苗早期免疫的效力造成很大干扰。此外，在许多国家，由于当地情况或条件的限制，会导致疫苗接种不充分或接种时间错误，从而造成严重后果。因此，人们通常选择采取使用活疫苗，尽可能早的（甚至在 1 日龄）对子代进行频繁的免疫。尽管这些疫苗在最佳接种条件下可以诱导良好的保护，并诱导强烈的体液免疫应答和细胞免疫应答，但它们在 1 日龄使用时仍然会受到 MDA 的影响，显然有必要对疫苗免疫程序进行改进，使之可在 1 日龄大规模应用，并诱导长期的免疫保护，并且进一步减少后期需要的加强免疫频率。在本文中，我们在 1 日龄商品肉鸡中进行了嗜肠道型 ND 弱毒活疫苗的免疫，同时联合免疫 ND 灭活疫苗或 rHVT - ND 疫苗（使用或不使用壳聚糖作为佐剂）。随后对这三种疫苗接种程序的有效性进行了研究。与之前的研究相比，1 日龄同时免疫 ND 灭活疫苗和弱毒活疫苗组在 6 周龄时获得的临床保护有所增强。在 ND 灭活/ND 活疫苗免疫组中，包含有嗜肠道型弱毒活疫苗比包含有嗜气管型弱毒活疫苗的效果更好，在 4 周龄时可提供更好的针对内脏嗜性 NDV 强毒株攻毒的保护力。这种对于最近流行的内脏嗜性 NDV 强毒株的保护能力可能是由于使用了一种嗜肠道型 ND 活疫苗株，已经报道，用这种疫苗对 1 日龄 SPF 鸡进行免疫后，可以在 1 周龄内诱导消化道产生更高水平的体液免疫。然而，ND 灭活/ND 活疫苗免疫程序在 10 周龄时并不能提供 100% 的临床保护，而且只能部分减少攻毒毒株的排毒。与此相反，rHVT -ND / ND 活疫苗免疫组和 rHVT -ND / ND 活疫苗-壳聚糖免疫组可以在 10 周龄时提供针对死亡率和临床症状的完全保护力，并且可以完全抑制泄殖腔排毒，并有效减少攻毒后口咽途径排毒的持续时间。以往的研究表明，在相同的母源抗体水平下，1 日龄商品蛋鸡皮下接种 rHVT - ND 疫苗比胚内接种所提供的保护力更高。事实上，1 日龄皮下接种的雏鸡的免疫一致性似乎比蛋内接种更高，因为如果要疫苗毒株进行最好的复制，疫苗接种的部位是至关重要的。

为了解释所观察到的死亡率，发病率和病毒排毒情况的差异，我们对这三种疫苗接种程序诱导的主动免疫反应曲线进行了分析。因为所有接种组都免疫了相同的活疫苗，ND 灭活/ND 活疫苗免疫组中观察到的较高的全身和局部体液免疫，肯定与 ND 灭活疫苗相关，其可以促进 Th2 细胞介导的免疫应答。IgG 抗体主要从血液转移到气管和十二指肠，而 IgA 和 IgM 是在局部粘膜中产生的，这就可以解释在呼吸道和消化道中 IgG 水平的升高现象。已知灭活疫苗中所使用的水包油乳剂可以在注射部位保存灭活的抗原，并逐步释放，从而引发局部炎症反应，刺激抗原递呈细胞（APC）和淋巴细胞的聚集。抗原吞噬后，APC 从注射部位迁移到二级淋巴器官，与初级 T 和 B 淋巴细胞相互作用。非复制抗原的持续释放可以造成 B 细胞与抗原或长期存在的浆细胞的重复接触，维持较高的抗体水平，从而解释了 ND 灭活/ND 活疫苗免疫组较高的体液免疫水平。在与 ND 活疫苗联合接种的过程中，抗原呈递细胞从注射部位向二级淋巴器官迁移的过程中也会促进局部 IgA 和 IgM 的产生，如在 4 和 5 周龄在气管和



CHICK PROGRAM

十二指肠观察到的那样。这种局部免疫应答是 1 日龄同时免疫 ND 活疫苗诱导的，已知的是 1 日龄接种接下来 1 周内气管和十二指肠中大量复制。

此外，12 周内可以在 rHVT -ND / ND 活疫苗免疫组的外周血和消化道淋巴细胞中持续检测到特异性 ChIFN γ 以及肺的 CMI，表明 rHVT -ND 疫苗促进了 Th1-介导的免疫应答。由于 HVT 造成的病毒血症可以在淋巴细胞中存在至少 30 周，通常认为 rHVT-ND 是通过受感染的外周淋巴细胞在体内循环的，其可以迁移到消化道和呼吸道的淋巴组织中。随后在较长的一段时间内，rHVT -ND 可以向局部免疫系统提供外来抗原。此外，HVT 在淋巴细胞中的复制与细胞密切相关，表明该递呈系统可以诱导较高水平的细胞免疫。这些特性可以解释在 rHVT -ND / ND 活疫苗免疫组的外周血、十二指肠和肺脏中 Th1 介导的 CMI 的水平更高，持续时间也更长，而且 rHVT -ND 疫苗还增强了 1 日龄同时免疫的 ND 活疫苗诱导的细胞免疫应答。在气管中不存在细胞免疫应答可能是由于其中不存在淋巴组织结构 (Kothlow & Kaspers, 2008)，或疫苗抗原在该器官并没有刺激局部免疫反应 (Rauw 等人, 2009a)。令人惊讶的是，之前研究中，将壳聚糖与 ND 活疫苗同时免疫 1 日龄雏鸡时，在脾脏和外周血中检测到了抗原特异性细胞免疫应答 (Rauw et al., 2010b)，而在 rHVT -ND / ND 活疫苗-壳聚糖免疫组中并没有检测到相同的反应。然而我们观察到了外周血中的更快的细胞免疫应答，证实了先前的研究结果 (Rauw 等人, 2010 年)。可以推测，在 1 日龄同时使用能够同样起到促进 Th1 细胞介导的免疫反应作用的第二种疫苗时，该佐剂对于 ND 活疫苗免疫诱导的有益效果尚不明确。

在 10 周龄观察到的保护力的差异表明需要呼吸道和消化道存在细胞免疫，才能有效地减少病毒排出。T 细胞，特别是 CD8+ 细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL)，在哈德氏腺中已被证明对 NDV 的清除必不可少，而不是 B 细胞 (Cannon 与 Russell, 1986; Russell 等, 1997)。CTL 最有可能也参与了呼吸道和消化道的病毒清除，从而解释了 rHVT -ND / ND 活疫苗免疫组比 ND 灭活/ND 活疫苗免疫组的排毒数量更少。

总的来说，与 ND 灭活/ND 活疫苗免疫组相比，通过 ND 活疫苗和 rHVT-ND 疫苗结合的优势，rHVT -ND / ND 活疫苗免疫组的主要优点是能够产生针对死亡和发病以及排毒的更持久的保护力。这项研究还表明，在 ND 病例中，Th1 介导的强烈的免疫反应与体液免疫应答相结合，比 Th2 介导的体液免疫产生的保护更有效。加入壳聚糖佐剂对于 rHVT-ND / ND 活疫苗联合免疫程序并没有明显的好处。鉴于已知 HVT 在免疫鸡只中可长期存在，rHVT-ND / ND 活疫苗联合免疫可以比 ND 灭活/ND 活疫苗联合免疫诱导持续时间更长的保护，更好地保护生长期长的鸡，如蛋鸡。然而，很多情况还需要进行大量的调查、研究以确认。