



CHICK  
PROGRAM

总第22期/2015年7月

## 通过特异性实时荧光定量PCR检测羽毛毛囊中rHVT-F基因载量， 作为1日龄免疫SPF雏鸡诱导的NDV特异性体液免疫指标

本研究的目的是寻找一种可靠的分子学方法来检测重组火鸡疱疹病毒载体新城疫疫苗 (rHVT-F) 的应答情况，以及作为检测缺乏母源抗体 (MDA) 的鸡体内新城疫病毒 (NDV) 特异性免疫反应的有效预测工具。我们研发了一种特异性检测rHVT-F基因含量的实时定量聚合酶链反应 (real-time qPCR)。该方法适用于1日龄无特定病原体 (SPF) 鸡单剂量免疫rHVT-F疫苗后6周内采集的各种组织样本的检测。在所检测组织中，免疫后第1周发现rHVT-F疫苗主要存在于法氏囊 (BF) 和肺中，从第9天开始逐步减少。随后，可观察到羽毛毛囊 (FF) 中的基因载量逐渐增加，并在第2周达到峰值，高于其他组织近 $10^3$ 倍。重要的是，在羽毛囊中的rHVT-F基因载量似乎与血细胞凝集抑制 (HI) 试验检测到的NDV特异性体液免疫水平和ELISA方法检测到的NDV特异性IgG、IgM和IgA水平高度相关。这是第一次对无MDA鸡羽毛毛囊中的rHVT-F疫苗含量进行量化并研究其与ND特异性免疫反应关系的研究。我们的数据表明，应用实时qPCR对田间鸡只的羽毛囊样本进行检测，可以用于确认rHVT-F疫苗的使用和应答情况，并且其中一项重要优点就是如此采样的方法不会骚扰到鸡群。

### 概述

除生物安全之外，疫苗接种和早期预警系统仍然是预防大多数病毒性传染病最经济的手段。多年以来，在新型疫苗技术研发方面进行了相当多的科学研究，当前对于将病毒DNA和RNA载体作为插入外源基因的载体方面的认识显示，在抗原递呈和兽用疫苗研发方面存在很多潜在方法。在DNA载体中，(i) 基因组大 (ii) 存在病毒复制所必需的基因片段，允许大量的外源DNA的插入而不干扰其生物学特性，和 (iii) 可通过有效方法来操纵基因，是使用火鸡疱疹病毒作为疫苗载体的优点。火鸡疱疹病毒 (HVT)，按国际病毒分类委员会最近的分类命名为Meleagrid疱疹病毒1型，是Mardivirus属的一个成员，而马立克氏病病毒 (MDV; Gallid疱疹病毒2型) 是一种高传染性的细胞相关 $\alpha$ -疱疹病毒 (血清1型)，可以导致家禽的淋巴组织增生和免疫抑制疾病。HVT对鸡没有致瘤作用，已经作为活疫苗在免疫接种程序中使用了很长一段时间，可以单独或与其他MDV疫苗株联合使用 (如Rispeps或SB-1)，用于预防控制马立克氏病。已经研究出了特异性针对HVT的实时定量聚合酶链反应 (real-time qPCR)，用于监测胚内或1日龄SPF鸡使用HVT疫苗进行MD免疫后，在血液、白细胞、脾脏、羽毛毛囊、肺和尘埃中的HVT基因组载量。



## CHICK PROGRAM

根据以往综述文献中描述的其具有价值的特性, HVT, 主要FC126突变株, 已经被广泛和成功的应用于预防鸡新城疫、传染性法氏囊病病毒、禽流感和传染性喉气管炎的重组二价载体 (rHVT) 疫苗。这一成功主要是由于 (i) 其安全性, (2) 早期免疫的可能性, 可以进行胚内免疫或1日龄免疫, 而且对接种雏鸡的孵化率和生存没有不利影响, (3) 使用细胞结合型疫苗免疫时对母源抗体 (MDA) 干扰的敏感性低和 (iv) 针对病原体可以诱导长期存在的保护性免疫。在ND疫苗接种中, rHVT ND疫苗包含和表达保护基因, 通常为鸡新城疫病毒 (NDV) 的F基因 (rHVT-F) 和/或HN糖蛋白 (rHVT-HN或rHVT-F / HN)。在诱发主动免疫反应时, rHVT-F疫苗对MDA干扰的敏感性要低于ND减毒活疫苗。除此之外, 使用HVT特异性PCR进行检测发现, 脾脏中的rHVT-F基因可以长期持久存在: 1日龄皮下免疫rHVT-F疫苗的商品蛋鸡在单次接种后72周仍能检测到其存在。

已经证明了表达无毒力NDV D26/76毒株F基因的商品化细胞结合型冻存rHVT重组疫苗在SPF鸡、商品蛋鸡和肉鸡进行胚内免疫时的免疫效果。这种保护性免疫可以在商品蛋鸡1日龄单次接种rHVT-F疫苗后至少持续72周。由于这种rHVT-F疫苗是细胞结合型的, 疫苗存储、操作、或疫苗苏醒不当、以及错误的疫苗接种程序、设备和技术会严重降低疫苗滴度, 导致疫苗接种失效。可以在重组疫苗注射前测定单剂量疫苗的病毒空斑形成单位 (PFU) 来证明在野外条件下的疫苗接种适当, 这显然是非常有用的, 但是它在常规基础上可能不切实际。通过在个体或群体水平上检测病毒或/和诱导的抗体反应可以有效的评估疫苗病毒吸收情况, 是一种非常适当的检查疫苗接种是否有效的方法。在这种方式下, 我们需要一个敏感和特异的方法来检测rHVT-F疫苗, 检测靶器官中的rHVT-F疫苗动态变化, 以及了解它与NDV特异性体液免疫反应之间的关系。本研究的目标是开发一种针对rHVT-F疫苗的实时qPCR测定方法以及将其应用于 (i) 检测试验环境中1日龄SPF鸡不同的组织样本中基因载量随时间的变化情况, (2) 将测定的免疫基因载量的变化与NDV特异性体液抗体反应进行比较, (3) 确定更具有相关性的组织, 可以快速和容易的确定rHVT-F疫苗吸收情况, 为rHVT-F疫苗质量评估提供有价值的NDV特异性免疫反应预测。

### 材料和方法

**鸡** 鸡胚孵化出的SPF白来航鸡由罗曼Valo提供 (Cuxhaven, 德国)。孵化后, 所有鸡只均饲养于生物安全三级隔离器中, 动物试验在兽医和农药研究所生物安全和生物伦理委员会授权和监督下根据欧洲和国家法规进行。

**疫苗** 表达无毒力NDV D26/76毒株F基因的商品化细胞结合型冻存rHVT重组疫苗 (Sato et al ., 1987; rHVT-F, VectormuneR ND) 由Ceva-Biomune (美国, KS Lenexa; GenBank序列号M24692) 生产。NDV的F基因被插入到HVT FC126株基因组UL45和UL46开放阅读框之间的非编码区, 在Pec启动子的控制下, 由一个巨细胞病毒增强子和 $\beta$ -actin启动子组成。使用100  $\mu$  l相应疫苗稀释剂 (美国Ceva-Biomune) 稀释疫苗, 将获得的4000 PFU的单剂量疫苗在1日龄时进行颈部皮下手动接种。



## CHICK PROGRAM

**试验设计** 进行了8个独立的试验。每一个试验中, 1日龄SPF鸡被分为两组: 第一组接种rHVT-F疫苗, 而第二组不进行任何处理, 作为未接种疫苗的空白对照组。在3个重复试验中, 在5-37日龄每隔2到3天(设计I), 或在5个重复试验中, 从1到6周龄每周(设计II) 分别从每组中选取5至10只鸡进行人道处死, 采取脾、法氏囊(BF)、肺、三个富含组织的主羽毛囊、血液、血清和外周血淋巴细胞(PBL;表1)。因为鸡被处死后要采集组织样本, 在每个试验每个采样时间点会对鸡只按顺序进行。

表1 1日龄SPF鸡免疫rHVT-F疫苗的组织采样试验设计

日龄	试验组								合计	
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	脾、BF、FF、血清	肺
5	5*/5*					5/5			10/10	5/5*
7	5*/5*			5/5		5/5			15/15	10/10*
9	5*/5*			5/5		5/5			15/15	10/10*
12	5*/5*			5/5		5/5			15/15	10/10*
14	5*/5*	5*/5*	5/5	5/5	5/5	5/5		8/5	38/35	28/25*
16	5*/5*			5/5		5/5			15/15	10/10*
19	5*/5*			5/5		5/5			15/15	10/10*
21	5*/5*	5*/5*	5/5	5/5	5/5	5/5		8/5	38/35	28/25*
23	5*/5*			5/5		5/5			15/15	10/10*
26	5*/5*			5/5		5/5			15/15	10/10*
28	5*/5*	5*/5*	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	8/5	43/40	33/30*
30	5*/5*			5/5		5/5			15/15	10/10*
33				5/5		5/5			10/10	10/10*
35		5*/5*	5/5	5/5	5/5	4/5	5/5	8/5	37/35	32/30*
37				5/5		3/5			8/10	8/10*
42		5*/5*	5/5		5/5		5/5	8/5	28/25	23/20*
合计	60/60	25/25	25/25	70/70	25/25	72/75	15/15	40/25	332/325	247/235*

数字代表免疫组/空白对照组中用于单个试验的不同时间点的鸡只数量

\*没有肺组织



## CHICK PROGRAM

### NDV特异性体液抗体免疫反应的测定

如之前所述，使用HI试验测定NDV特异性体液抗体免疫反应，使用ELISA方法测定NDV特异性 IgG、IgM和IgA (Rauw et al ., 2009 b, 2014)。

### DNA提取

直接使用含有肝素(100U/毫升血, Sigma, 圣路易斯, 密苏里州, 美国), EDTA(1.5毫克/毫升血液)或阿氏液(v/v; Sigma)的Eppendorf管收集血液。根据前面描述分离血清, 血浆和PBL (Rauw et al ., 2009), 使用RPMI培养基将PBL稀释到 $2.5 \times 10^7$ 细胞/毫升。将采集的脾、法氏囊和肺组织样本置于Ambion RNALater固定缓冲液中(美国应用生物系统公司, Foster市, CA)。羽毛毛囊被放在Ambion RNALater固定液中, 随后切下0.5厘米的根部部分。所有样本都保存在 $-80^{\circ}\text{C}$ , 直到进行下一步试验。遵循制造商的建议, 使用QIAamp PBL DNA血液迷你试剂盒(Qiagen, Hilden, 德国)从全血和PBL中提取DNA, 使用QIAamp循环核酸试剂盒(Qiagen)从血清和血浆中提取DNA。从Ambion RNALater固定样品中切下大约10毫克的脾脏和25毫克的肺、法氏囊和羽毛囊(FF), 验证重量, 转移到无菌Eppendorf管, 根据制造商的建议使用QIAamp DNA迷你试剂盒(Qiagen)进行DNA提取。对于羽毛囊(FF)来说, 要专门从富含组织的部分提取样本。

### 实时qPCR

通过rHVT-F特异性实时qPCR检测单个鸡体内对于rHVT-F疫苗的吸收和基因组载量。特异性针对rHVT-F疫苗的TaqMan实时qPCR方法在Pec启动子和NDV F基因的连接区设计了引物。上游引物位于Pec启动子上, 与双链DNA基因组(dsDNA)的正链互补, 而下游引物位于F基因并且与负链互补。探针位于Pec启动子的3'端延伸到F基因序列的连接区, 与正链互补(表2)。因此, 野生型HVT和供体NDV分离株均缺乏重组疫苗连接区特定序列, 因此不会发生正向引物和探针的退火, 从而使关键的DNA聚合酶和核酸外切酶无法激活。使用TaqMan通用PCR Mastermix(应用生物系统公司), 终浓度为450 nM的引物和150 nM TaqMan探针, 反应总体积为25  $\mu\text{l}$ , 包含5  $\mu\text{l}$ 纯化的DNA。

使用Applied Biosystems 7500实时PCR仪进行扩增和荧光检测。在 $95^{\circ}\text{C}$ 初始变性10分钟, 进行40个循环,  $95^{\circ}\text{C}$  15秒,  $60^{\circ}\text{C}$ 结合退火/延伸1分钟。在退火/延伸阶段终点进行荧光检测。

根据由rHVT-F疫苗病毒总DNA稀释(10倍系列)绘制的标准曲线确定每次检测组织样品中rHVT-F疫苗的病毒滴度, 阴性样本来自于SPF鸡的血清, 脾脏, 法氏囊、肺和羽毛囊提取的DNA。进行多次标准曲线重复确定了实时qPCR中血清(n = 10)、脾(n = 15)、法氏囊(BF)(n = 8)、肺(n = 6)和FF(n = 16)的rHVT-F最低检测阈值。根据SPF鸡重复样品和标准曲线的结果, 检测最低限(定义为在重复的标准曲线分析中阳性率>75%的稀释倍数)确定为每毫升血清, 每 $2.5 \times 10^7$ PBL, 每10毫克脾, 每25毫克的其他器官中病毒含量为2.50PFU。PCR效率约为97.86%( $R^2 = 0.9946$ ), 没有观察到阈值效应。组织样品分析结果表



## CHICK PROGRAM

示为每毫升液体、 $2.5 \times 10^7$  PBL、每10毫克的脾脏和25毫克的法氏囊,肺和FF中的疫苗滴度。低于2.50 PFU检测阈值的病毒滴度的实际值也被包含在统计分析中,而设置病毒滴度为0.01 PFU病毒为不可检测。在这两种情况下,均认为该样品为rHVT-F检测阴性。

此外,通过禽  $\beta$ -actin来验证样品质量和DNA提取步骤的正确性。 $\beta$ -actin扩增高于其灵敏度阈值( $Ct \beta$ -actin < 45)的样本结果被认为是有效的。

表2 针对rHVT-F疫苗的实时定量PCR的引物

目的基因	序列	作用
Pec 启动子	TCTGACTGACCGGTCATCTA	上游引物
NDV-F基因	TTCGGACGGTCAGCATCA	下游引物
Pec 启动子 NDV-F 基因	FAM - AATGGGCTCCAGATCTTCTACCAGGATCC - TAMRA	Taqman探 针

上游引物位于Pec启动子上,与双链DNA基因组(dsDNA)的正链互补,而下游引物位于F基因并且与负链互补。探针位于Pec启动子的3'端延伸到F基因序列的连接区,与正链互补

### 统计分析

为了检验rHVT-F免疫组与阴性对照组之间是否存在显著差异,使用统计分析系统(SAS)中的广义线性模型(GLM)进行了方差分析。对所有变量(试验,疫苗接种和日龄)和两两之间都进行了检测。因为试验效果不显著,将八个试验的数据汇集在一起,以实现有意义的统计分析,在构建最终模型时只保留了重要变量(疫苗接种和日龄)。因此,使用GLM模型检测了rHVT-F免疫组和空白对照组之间不同日龄的NDV特异性体液抗体免疫反应(HI滴定度、IgG、IgM和IgA)和在不同的组织中(脾、法氏囊、肺和FF)的rHVT-F基因组载量。将基因组载量的PFU滴度转化为 $\log_{10}$ 形式,以便更好的符合GLM模型。使用Tukey-Kramer方法进行了两两比较来解释数据的不平衡性。使用R<sup>2</sup>值评估模型的适合度。疫苗接种的效果如下:显著 $P \leq 0.05$ (\*);高度显著, $P \leq 0.01$ (\* \*),极显著 $P \leq 0.001$ (\* \* \*)。

与此同时,使用SAS的Spearman rank ( $r_s$ )相关程序对组织中rHVT-F基因组载量( $\log_{10}$ 转换后)与NDV特异性体液抗体反应两两之间的相关系数进行了评估。由于GLM分析的试验效果不显著,将所有数据汇集在一起进行分析。常见的 $r_s$ 分析指南:数值低于0.40表示相关性弱;0.40 -0.70中度;0.70及以上为相关性强。

所有计算和统计分析都使用SAS 9.2软件进行。



## CHICK PROGRAM

### 结果

#### 组织分布和rHVT-F疫苗病毒基因组载量

所有试验中的各组的每份脾、BF、肺、FF, PBL和血清样本的内源性 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)扩增均显示出了阳性的扩增信号和可比的Ct值,说明DNA质量合格, DNA提取过程无误。所有使用EDTA和阿氏液收集的全血样品和75%的肝素化全血样品中 $\beta$ -actin呈阳性。血浆样品仍为 $\beta$ -actin阴性,因此在进一步实时qPCR分析时排除。

正如预期的那样,所有未接种疫苗的空白对照组鸡的样本rHVT-F特异性实时qPCR检测结果为阴性。在接种疫苗的鸡中,5日龄就可以在脾脏, BF, 肺和FF中检测到rHVT-F疫苗(表3)。没有办法对5日龄之前器官的DNA进行分析,因为这时脾、BF和肺非常小,FF样本还不是很发达,全部为绒毛。结果显示rHVT-F组脾脏的PCR阳性率在6周的测试周期内在13-67%的范围内波动,而在9日龄,法氏囊、脾脏和羽毛囊中的阳性率就达到100%。随后rHVT-F免疫组只有不到58%的法氏囊和40%至86%的肺样本是阳性的,而在整个试验周期中93%到100%的免疫鸡的羽毛囊始终可以检测到rHVT-F基因。通过qPCR估算,10毫克脾脏中的rHVT-F平均滴度保持在42 PFU以下。法氏囊( $10^{2.83} \pm 10^{3.07}$ PFU/25mg)和肺( $10^{4.69} \pm 10^{5.16}$ PFU/25mg)在7日龄达到最大水平,而FF( $10^{5.41} \pm 10^{5.50}$ PFU/25mg)在12-14日龄达到峰值。在达到初始峰值后,法氏囊和肺的平均滴度逐渐下降到阈值水平,而羽毛囊在30日龄时仍高于 $10^4$  PFU/ 25 mg,随后发生更大的波动。在整个试验观察期间,从2周龄开始,均在FF中观察到了最高的病毒载量,而脾中的rHVT-F滴度最低。rs相关系数显示,这4个器官的rHVT-F疫苗载量之间存在很强的关联性( $r > 0.700$ )(表4)。在一部分试验中14日龄前的全血和PBL数据丢失,主要是由于全血样品的DNA提取方法存在问题,以及需要收集大量样本来分离PBL和血清分别用于病毒学和血清学分析。然而,有限的数据显示,PBL中的rHVT-F滴度始终在5 PFU /  $2.5 \times 10^7$  PBL以下,在14日龄达到峰值,阳性率为80%,随后在接下来几周观察中减少到30%。不管使用何种抗凝剂,全血以及血清在整个试验过程中始终为阴性(数据未显示)。



## CHICK PROGRAM

表3 1日龄SPF鸡免疫rHVT-F疫苗后各组织的病毒载量

日龄 (天)	器官			
	脾	法氏囊	肺	羽毛毛囊
5	3.83 ± 8.58*** 2/10	21.94 ± 37.20*** 4/10	10 <sup>2.97</sup> ± 10 <sup>3.28</sup> *** 4/5	3.17 ± 9.60* 1/10
7	18.62 ± 25.72*** 9/15	10 <sup>2.83</sup> ± 10 <sup>3.07</sup> *** 14/15	10 <sup>4.69</sup> ± 10 <sup>5.16</sup> *** 9/10	10 <sup>3.10</sup> ± 10 <sup>3.06</sup> *** 14/15
9	6.50 ± 10.79*** 7/15	56.97 ± 64.33*** 15/15	10 <sup>2.28</sup> ± 10 <sup>2.23</sup> *** 10/10	10 <sup>4.69</sup> ± 10 <sup>3.22</sup> *** 15/15
12	3.50 ± 6.94*** 5/15	10.36 ± 24.19*** 4/15	42.71 ± 44.45*** 8/10	10 <sup>5.41</sup> ± 10 <sup>5.50</sup> *** 15/15
14	23.13 ± 68.97*** 19/38	11.91 ± 24.84*** 22/38	10 <sup>2.13</sup> ± 10 <sup>2.31</sup> *** 24/28	10 <sup>5.43</sup> ± 10 <sup>5.57</sup> *** 38/38
16	16.03 ± 29.58*** 6/15	1.40 ± 1.93*** 2/15	25.09 ± 21.59*** 7/10	10 <sup>4.84</sup> ± 10 <sup>5.14</sup> *** 15/15
19	15.12 ± 33.83*** 4/15	0.81 ± 2.15** 1/15	10 <sup>2.01</sup> ± 10 <sup>2.40</sup> *** 7/10	10 <sup>4.78</sup> ± 10 <sup>4.83</sup> *** 15/15
21	41.87 ± 10 <sup>2.21</sup> *** 21/38	7.85 ± 16.03*** 17/38	62.17 ± 10 <sup>2.02</sup> *** 19/28	10 <sup>4.63</sup> ± 10 <sup>4.94</sup> *** 38/38
23	2.61 ± 5.69*** 3/15	14.65 ± 54.47*** 1/15	12.42 ± 31.14*** 4/10	10 <sup>4.48</sup> ± 10 <sup>4.73</sup> *** 15/15
26	5.51 ± 17.51** 2/15	0.64 ± 1.19*** 1/15	2.48 ± 4.44** 4/10	10 <sup>4.10</sup> ± 10 <sup>4.35</sup> *** 14/15
28	28.37 ± 54.01*** 30/43	6.01 ± 15.98*** 19/43	40.65 ± 87.81*** 25/33	10 <sup>3.74</sup> ± 10 <sup>4.37</sup> *** 43/43
30	7.58 ± 21.58*** 3/15	1.57 ± 4.16*** 2/15	9.97 ± 15.23*** 5/10	10 <sup>4.09</sup> ± 10 <sup>4.60</sup> *** 15/15
33	6.37 ± 10.96*** 3/10	0.68 ± 0.92*** 0/10	6.07 ± 4.77*** 7/10	10 <sup>2.85</sup> ± 10 <sup>3.22</sup> *** 10/10
35	29.83 ± 60.17*** 24/37	2.15 ± 3.72*** 11/37	54.47 ± 10 <sup>2.10</sup> *** 17/32	10 <sup>3.89</sup> ± 10 <sup>4.45</sup> *** 36/37
37	8.81 ± 20.75** 2/8	0.88 ± 1.15*** 1/8	10.81 ± 11.85** 5/8	10 <sup>1.14</sup> ± 10 <sup>1.13</sup> *** 8/8
42	24.07 ± 39.91*** 19/28	2.05 ± 3.40*** 9/28	16.30 ± 17.01*** 18/23	10 <sup>3.66</sup> ± 10 <sup>4.13</sup> *** 24/28



# 鸡计划

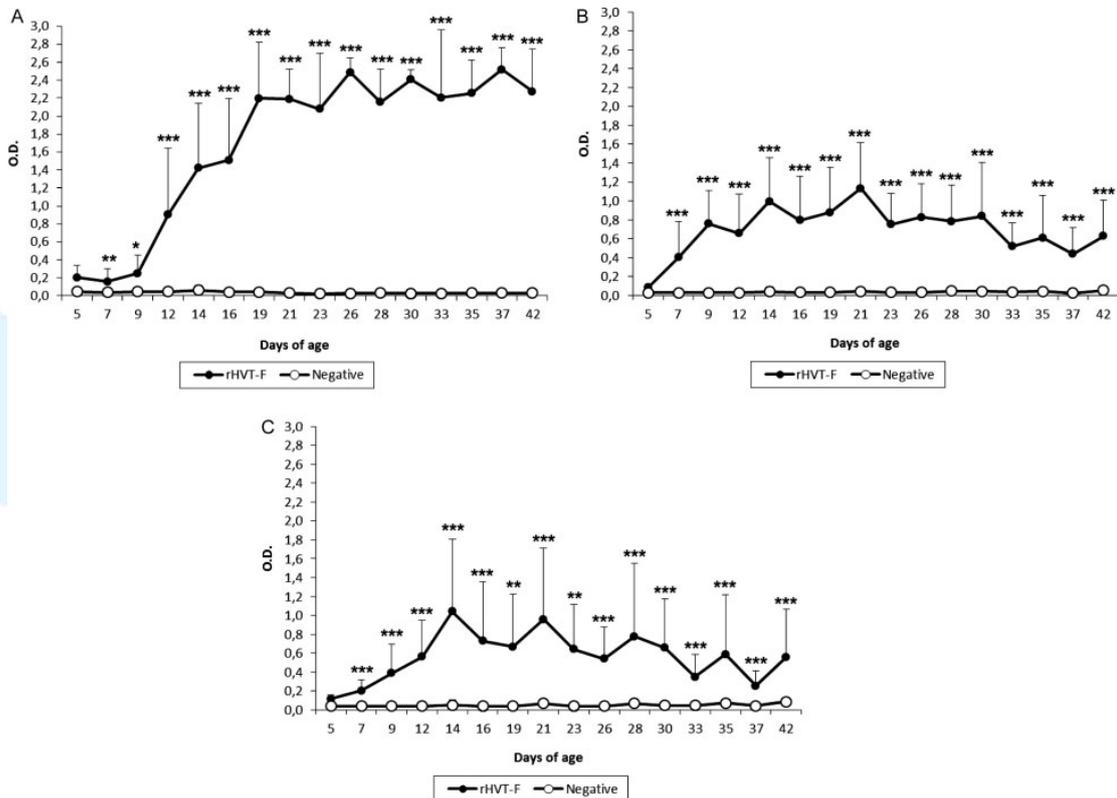
## CHICK PROGRAM

数据表示为每个时间点平均rHVT-ND滴度±SD (PFU/10mg脾脏, PFU/25mg 法氏囊、肺和羽毛毛囊) 以及rHVT-F检测阳性率(阳性数/总检测鸡只数)。将八个试验组的数据汇总在一起, 以便进行有意义的数据分析, 检测下限设定为2.50PFU每10mg脾脏或者每25mg其他器官。(\*), (\*\*) 和 (\*\*\*) 分别代表rHVT-F免疫组与阴性对照组之间的差异显著 ( $P \leq 0.05$ ), 非常显著 ( $P \leq 0.01$ ) 和极显著 ( $P \leq 0.001$ )。

### 体液抗体免疫反应

1日龄SPF鸡接种rHVT-F疫苗后, 使用自制的ELISA Ig检测可以对下面三种免疫球蛋白进行检测和动力学追踪。NDV特异性IgG、IgM IgA首次出现于7日龄(图1)。IgM和IgA的水平在7日龄后要非常显著的高于阴性对照组 ( $P \leq 0.001$ ), 其次是IgG在12日龄以后高于阴性对照组。在6周的观察期内免疫鸡的IgG/M/A水平显著高于空白对照组 ( $P \leq 0.01$ )。这三种免疫球蛋白之间存在很强的关联性, 其中IgA和IgM之间的关联性更强(表4)。

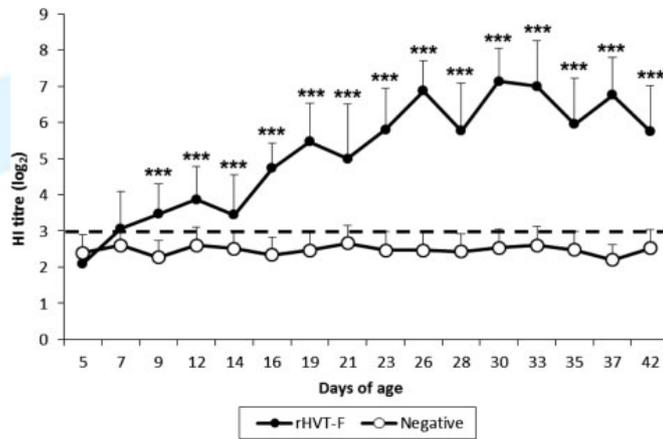
40%的免疫鸡在7日龄出现了HI抗体检测阳性。rHVT-F组的平均HI滴度在9日龄时非常显著的高于阴性对照组 ( $P \leq 0.001$ ), 并且一直持续到整个观测期结束(图2), 从3周龄开始HI水平停滞在6.0和7.0之间。HI滴度和ELISA-IgG的光密度值之间存在很强的关联性 ( $r_s = 0.768$ ) (表4), 这种相关性非常显著 ( $P \leq 0.001$ )。





## CHICK PROGRAM

**图1** 1日龄免疫rHVT-F疫苗的SPF鸡血清的NDV特异性IgG(A), IgM(B)和IgA(C)抗体滴度。数据表示为某一日龄ELISA测定的平均吸光度值±标准差。血清稀释100<sup>-1</sup>倍后测定Ig反应。由于没有达到试验效果,我们将8个独立试验的数据进行合并以实现有意义的统计分析。每个时间点每组鸡的数量显示在表1中。(\*), (\* \*)和(\* \*\* \*)分别表明rHVT-F组与阴性对照组相比差异显著(P≤0.05), 非常显著(P≤0.01), 极显著(P≤0.001)。



**图2** 1日龄免疫rHVT-F疫苗的SPF鸡的HI抗体滴度。血清的HI滴度为能够抑制四血凝单位NDV LaSota病毒血凝作用的最大稀释倍数, 最小稀释倍数为3 log<sub>2</sub>。HI几何平均滴度表示为Log<sub>2</sub>的倒数。数据表示为某一日龄血清滴度±标准差。由于没有达到试验效果,我们将8个独立试验的数据进行合并以实现有意义的统计分析。每个时间点每组鸡的数量显示在表1中。(\*), (\* \*)和(\* \*\* \*)分别表明rHVT-F组与阴性对照组相比差异显著(P≤0.05), 非常显著(P≤0.01), 极显著(P≤0.001)。

### 疫苗载量和体液抗体免疫反应之间的相关性

在脾, BF, 肺和FF四种器官中进行rHVT-F检测时, 结果显示最后一种组织 (FF) 在整个观测期内rHVT-F疫苗载量和NDV特异性体液抗体免疫反应之间的相关性更强(表4)。整个观察期内我们检测到羽毛囊样品rHVT-F基因组载量与个体ELISA抗体水平(无论何种抗体)之间存在很强(rs≥0.700)和高度显著(P≤0.001)的关联性, 而其他三种器官的病毒滴度与ELISA抗体水平中度相关(0.400≤rs < 0.700)。羽毛囊中的疫苗载量与HI滴度中度相关 (r = 0.656), 但高于脾、BF和肺的病毒滴度与HI结果的关联性。



## CHICK PROGRAM

表4 1日龄SPF鸡免疫rHVT-F疫苗后各器官的病毒载量与血清学检测结果之间的

斯皮尔曼秩相关系数( $r_s$ )和p值

变量	IgG	IgM	IgA	HI	脾	法氏囊	肺	羽毛囊
IgG	1.000	0.750	0.721	0.768	0.669	0.585	0.634	0.761
		≤0.0001	≤0.0001	≤0.0001	≤0.0001	≤0.0001	≤0.0001	≤0.0001
IgM		1.000	0.914	0.684	0.650	0.670	0.692	0.828
			≤0.0001	≤0.0001	≤0.0001	≤0.0001	≤0.0001	≤0.0001
IgA			1.000	0.670	0.611	0.623	0.672	0.797
				≤0.0001	≤0.0001	≤0.0001	≤0.0001	≤0.0001
HI				1.000	0.544	0.462	0.548	0.656
					≤0.0001	≤0.0001	≤0.0001	≤0.0001
脾					1.000	0.745	0.755	0.740
						≤0.0001	≤0.0001	≤0.0001
法氏囊						1.000	0.802	0.733
							≤0.0001	≤0.0001
肺							1.000	0.800
								≤0.0001
羽毛囊								1.000

$r_s$ 常规解释如下: 0.400以下为关联性弱, 0.400-0.700为中等, 0.700以上为关联性强。

### 讨论

我们首先研发和应用了一种特异性针对疫苗的实时qPCR, 并且通过在不同的阴性样本DNA基质中添加PFU滴定的梯度稀释疫苗DNA, 绘制和评估了rHVT-F标准曲线复制分析的性能。无论是何种组织样品基质, 效率为97%,  $R_2$ 值 > 0.99, 为这一PFU量化方法提供了良好的信心。此外, 试验证明该方法能够敏感准确地量化疫苗, 检测范围为 $2.50 \times 10^6$ 到 $2.50$  PFU。

对1日龄SPF鸡进行了具有统计学意义的rHVT-F疫苗免疫, 来评估各种组织中的病毒载量并比较其与NDV特异性体液抗体反应之间的关联性。八个独立的试验提供了一致性的数据, 可以进行有意义的统计分析和推断。正如之前研究中免疫HVT疫苗



## CHICK PROGRAM

后对MD进行检测一样，通过实时qPCR分析脾、肺、FF、PBL和全血中提取的DNA的疫苗载量(Islam et al., 2006; Abdul-Careem et al., 2008a, b; Gimeno et al., 2008, 2011a, b; Haq et al., 2010; Cortes et al., 2011)。此外，由于田间采集十分便利，我们也采集了血清和血浆也进行了检测，对法氏囊也进行了检测，其淋巴组织参与了雏鸡的体液抗体反应。在本研究中，组织中的病毒载量表示为rHVT-F PFU数/加入的器官重量，而之前的报道为HVT基因组拷贝数/加入的DNA总量 (Abdul-Careem et al., 2008b; Haq et al., 2010)，或者每 $1 \times 10^6$ 个细胞的DNA拷贝数 (Islam et al., 2006)或Ct比值(Gimeno et al., 2008, 2011a, b; Cortes et al., 2011)。因此无法与之前这些报道的结果进行直接定量比较。

不同组织中检测到的rHVT-F疫苗动态变化不同，这可能与之前文章中所说的HVT的复制和循环周期有关(Schat & Nair, 2008)。疫苗接种后的第一个星期，rHVT-F疫苗主要在法氏囊和肺中检测到。该结果显示这些器官是主要的HVT复制位点。与MDV一样，HVT在细胞之间的传播需要感染和未感染细胞之间的紧密接触，最常见的是淋巴细胞，尽管上皮细胞也可以参与这个过程(Schat & Nair, 2008)。法氏囊和肺中快速的rHVT-F DNA早期增殖之后，从9日龄开始逐步下降，标志着潜伏期的开始，而羽毛囊中的病毒滴度增加。目前尚未阐明HVT潜伏感染细胞的表型，但可能是主要组织相容性复合体II型阳性T淋巴细胞(活化T细胞)，B细胞很少会感染HVT(Schat & Nair, 2008)。通过阳性PBL的检测结果表明，继淋巴器官之后，羽毛囊中检测到的rHVT-F基因组载量与感染T淋巴细胞逐渐进入血液循环的趋势一致，随后从那里蔓延感染至周边部位包括羽毛组织。羽毛囊中rHVT-F基因组的时间积累模式与其他文献中报道的HVT免疫后的结果相一致(Abdul-Careem et al., 2008 b)，在5-7日龄就可以对rHVT-F基因进行量化，并在第2周达到峰值，比其他组织中的病毒载量高近 $10^3$ 倍。因此FF是一种非常合适的检测rHVT-F的组织样品，从而对疫苗吸收情况进行监测。之前研究发现，羽毛囊中的HVT检测模式与CD8+ T细胞渗透到羽毛根部和表达ChIFN  $\gamma$  有关，ChIFN  $\gamma$  可以表示这一部位诱导的宿主免疫应答 (Abdul-Careem et al., 2008 b)。5日龄时可以对脾脏中的rHVT-F疫苗进行量化，这与之前1日龄雏鸡接种HVT的MD免疫研究中观察到的结果一致(Abdul-Careem et al., 2008)。我们的研究证实了脾脏样本的阳性检出率存在波动，但没有明显减少的趋势(Palya et al., 2014)。本研究中的阳性率较低，这可能是由于我们所使用的实时qPCR的阈值较严格，这样可以避免产生PFU标准曲线的误差。从Ct值定量上看，在整个研究期间可以在55 - 95%的脾脏样本中检测到病毒，这与之前的研究一致(Palya et al., 2014)。我们的研究显示，其中有43%的样本的病毒滴度值低于2.50 PFU的检测阈值，因此在这里显示为rHVT-F检测阴性。PBL中所检测到的rHVT-F滴度水平很低，无法满足监控rHVT-F疫苗接种的要求。然而，结果表明在外周血中感染的淋巴细胞处于不断循环与个体变异中。我们的试验证实全血DNA中的HVT水平较低(Gimeno et al., 2008; Cortes et al., 2011)。DNA提取和/或qPCR方法可能对血液基质敏感，血红蛋白是一种强大的PCR抑制剂，我们观察到一些样品中用来作为对照的 $\beta$ -actin结果也为阴性。



## CHICK PROGRAM

与MDV(Baigent et al., 2005; Abdul-Careem et al., 2006)和HVT(Islam et al., 2006; Abdul-Careem et al., 2008a, b; Gimeno et al., 2008, 2011a, b; Haq et al., 2010; Cortes et al., 2011)中发现的一样,在我们精密的试验规范中,我们认为免疫鸡只接种了相同剂量的rHVT-F疫苗,但不同鸡只组织中的基因组水平差异很大。鸡只之间rHVT-F检测的高度可变性可能是由于SPF白来亨鸡的种群特点,这可能显示rHVT-F疫苗接种要考虑到鸡只的遗传变异性(Schat & Nair, 2008)。

从rHVT-F疫苗接种后第7天开始检测到了NDV特异性体液抗体反应,时间与检测到法氏囊和肺的rHVT-F基因组的升高相一致,其中法氏囊是体液免疫诱导的主要淋巴器官(Schat & Nair, 2008)。有趣的是,尽管rHVT-F结构中只包含NDV的F基因,并没有表达NDV的HN蛋白,接种疫苗的鸡只中仍能产生HI抗体。F抗体诱导的位阻可能与NDV粒子表面的F蛋白发生结合,干扰了HN糖蛋白的血凝活性,这可以解释在接种rHVT-F的鸡血清中观察到的HI滴度(Kumar et al., 2011)。然而,HI抗体检测结果和ELISA-IgG结果之间强烈的关联性说明,HI滴度可以作为一个很好的检测rHVT-F疫苗接种引起的特异性体液抗体应答反应的血清学方法。血清NDV特异性IgA检测结果表明,接种rHVT-F疫苗可以诱导局部抗体介导的免疫反应,因此我们开始进一步的研究来评估呼吸道和消化道的IgA水平。此外,在整个6周的检测期间,能够在rHVT-F接种鸡血清中持续检测到IgA和IgM,而且两种抗体之间存在很强的关联性,这可能表明rHVT-F疫苗可以产生连续的抗原刺激,从而确保强劲而持久的ND免疫力(Palya et al., 2014)。最后,羽毛囊中的rHVT-F疫苗载量与(1)可以产生抗原刺激的淋巴器官中的病毒载量,以及(2)NDV特异性体液抗体反应强烈相关,可能会使它成为一个ND保护力的良好指标。

本研究中开发的实时qPCR建立了监测和量化试验接种鸡的器官中rHVT-F载量的方法。根据本研究的结果,主羽毛囊是用于确认单个鸡只rHVT-F疫苗接种和NDV特异性诱导体液免疫的最合适的样品。能够在羽毛囊中检测rHVT-F的分析方法非常有用,因为羽毛富含病毒DNA,而且可以很容易地通过一种非损伤性方式来定期采样,使我们能够在个体层面上研究rHVT-F的时间发展变化。我们认为9到21日龄之间适合进行羽毛囊的采样和进行rHVT-F基因组的量化。基于其与体液抗体反应之间强烈的关联性,气囊中高水平的rHVT-F滴度与更好的免疫反应有关,因此可以很好的预测单剂量rHVT-F疫苗接种后的ND保护力。目前我们已经开始进行进一步的研究来评估不同接种剂量对羽毛囊中基因组载量的影响,以及对NDV特异性体液抗体反应的影响。免疫质量的控制和确保rHVT疫苗的吸收是非常重要的,就像商品化rHVT-VP2 IBD疫苗中一样(Lemiere et al., 2012),我们的实时qPCR分析也可以用来评估田间条件下羽毛囊样本的rHVT-F疫苗载量。尽管MDA似乎并不会干扰rHVT-F疫苗诱导产生主动免疫反应,但还需要在田间条件下以商品鸡进行研究来确认数据和结论的有效性。