



EGGS
PROGRAM

总第13期/2014年2月

鸡胚源性毒株是埃及杂交肉鸡中 传染性喉气管炎病毒爆发的根源

Awad A. Shehata • Mohammad Y. Halami • Hesham H. Sultan • Alaa G. Abd El-Razik • Thomas W. Vahlenkamp

摘要: 在埃及，尽管在鸡群中进行了疫苗接种，传染性喉气管炎病毒（ILT）仍然持续引起呼吸系统的疾病。目前使用的鸡传染性喉气管炎弱毒活疫苗提供了良好的免疫保护，但如果其广泛地在鸡群之间传播，也可能诱发潜伏感染甚至临床疾病。我们从杂交肉鸡中分离到了四株传染性喉气管炎病毒野毒株，分别命名为ILT - Behera2007、ILT - Giza2007、ILT - Behera2009和ILT - Behera2010。根据气管内接种指数、气管损伤评分和鸡胚致死率指数得出的致病性分析显示，ILT - Behera2007、ILT - Behera2009和ILT - Behera2010分离株为高致病性毒株，而ILT - Giza2007则无致病性。系统发育分析表明，ILT - Behera2007，ILT - Behera2009和ILT - Behera2010为鸡胚源（CEO）疫苗相关株，而ILT - Giza2007是一株组织源疫苗相关株。这些结果表明，鸡胚源喉气管炎疫苗病毒的毒力在鸡群中连续传代后可能会增强，从而造成易感鸡群疾病的严重爆发。

背景

鸡传染性喉气管炎（ILT）是鸡的一种严重的呼吸系统疾病。急性型的特点是呼吸困难，咳出血液或血样粘液，眶窦肿胀，发病率高达100%，死亡率差异较大，并引起蛋鸡产蛋量下降。传染性喉气管炎的慢性病例与其他呼吸道感染的症状很类似。该疾病是由禽疱疹病毒1型病毒（GaHV-1）引起的，其属于疱疹病毒科， α 疱疹病毒亚科，传染性喉气管炎病毒属。ILT的基因组为155 kb大小的线性双股DNA。在埃及，传染性喉气管炎首次报道于1982年，当时开罗和吉萨地区的几个农场的蛋鸡出现了急性暴发，随后病毒迅速蔓延到邻近的其他地区。重复的病毒分离和调查研究证明，蛋鸡和肉鸡群中该病以临床和亚临床形式存在并广泛传播。在传染性喉气管炎的预防方面，组织源性（TCO）和鸡胚源性（CEO）改良活疫苗均已商品化使用。大多数疫苗是有效的，但其中许多疫苗存在相当大的残留毒力，这种毒力可能会在动物传代过程中进一步增强。与其他疱疹病毒一样，传染性喉气管炎病毒疫苗株和强毒株的感染可以在禽类的三叉神经节形成潜伏感染，尽管在潜伏感染状态下很难检测到临床症状，这些病毒可以在鸡群中持续存在，并且可以在应激因素如产蛋开始或转群刺激下被



EGGS PROGRAM

重新激活。毒力返强的疫苗株已造成了ILTV的多次爆发。本研究的目的是通过气管内接种指数（ITPI）、气管损伤评分（TLS）和鸡胚致死率指数（MICE）来评估四株埃及杂交商品肉鸡中传染性喉气管炎病毒分离株的致病性，并与两株具有代表性的CEO和TCO疫苗进行致病性和部分核苷酸序列的比较。

材料及方法

鸡群信息

在本研究中，对布哈拉和吉萨地区2007-2010年期间的四个ILT疑似爆发病例进行了调查（表1）。很明显，大多数被调查农场的卫生措施和生物安全都差强人意。在每个农场收集5-10只禽类的气管，进行汇总并且贴上标签，储存在-20℃直到进行病毒分离处理。

表1: ILT爆发鸡场信息

| 鸡场序号 | 地点 | 鸡场容量 | 日龄/周 | 死亡率 (%) ^a | 免疫程序 | 临床症状及病变 |
|------|-----|---------|------|----------------------|-----------------|---------------|
| 1 | 布哈拉 | 9, 000 | 5 | 12.5 | ND, IBD, MD, IB | 呼吸症状、咳血、气管内瘀血 |
| 2 | 吉萨 | 20, 000 | 6 | 4.4 | ND, IBD, MD, IB | 呼吸症状、气管堵塞 |
| 3 | 布哈拉 | 12, 000 | 4.5 | 9 | ND, IBD, MD, IB | 呼吸症状、咳血、气管内瘀血 |
| 4 | 布哈拉 | 5, 000 | 6 | 5 | ND, IBD, MD, IB | 呼吸症状、咳血、气管内瘀血 |

ND: 新城疫; IBD: 传染性法氏囊病; MD: 马立克病; IB: 传染性支气管炎

a: 疾病爆发后7天内的累计死亡率

通过鸡胚进行病毒分离

将每毫升中含1,000 IU青霉素和1毫克链霉素的PBS溶液（PH值7.2）与气管匀浆液进行混合，通过绒毛尿囊膜途径（CAM）接种到10日龄无特定病原体（SPF）鸡胚中。每天照蛋观察，并记录接种后7天内的胚胎死亡率。接种24小时内的死亡被认为是非特异性的，将其丢弃，而在接种后2-7天内死亡的鸡胚和7天后仍然存活的鸡胚，则进行了绒毛尿囊膜痘斑病变检查。通过快速血凝试验（HA）检测了羊膜尿囊液（AAFS）中是否存在对10%鸡红细胞的凝集作用。将存在痘斑的绒毛尿囊膜进行匀浆，3000rpm离心15分钟，使用ILT抗血清和鸡腱鞘炎抗血清（Intervet B.V. Boxmeer, 荷兰）分别作为阳性和阴性血清，通过琼脂凝胶免疫扩散试验（AGID）进行检测。使用SPF鸡胚对鸡传染性喉气管炎野毒株和疫苗株的最小感染量进行了检测，疫苗株包括商品化CEO鸡传染性喉气管炎活疫苗（Intervet B.V. Boxmeer, 荷兰）和TCO疫苗（先灵葆雅动物保健）。



EGGS PROGRAM

鸡胚致死率指数（MICE）

使用10日龄SPF鸡胚对ILTV野毒株和疫苗株（CEO和TCO）的致病性进行评价。鸡胚（10个/分离株）经尿囊腔接种100 μ l适当稀释的病毒，并在37℃继续孵育。每天进行一次观察，计算接种后7日内死亡鸡胚数。24小时内发生的所有死亡被认为是非特异性的。MICE的计算方法是：将7日内死亡鸡胚累计数除以7日内存活鸡胚累计数。

ILTV分离株的致病性

在50日龄杂交肉鸡（每组30只）中进行了四株野毒株和两株ILTV疫苗株（CEO和TCO）的致病性检测。鸡只接种了MD，ND，IBD和IB疫苗。在50日龄时，通过直接微量气管灌注法使鸡感染ILT病毒（表2）。

表2：50日龄杂交肉鸡ILTV野毒株致病性研究的实验方案

| 组别 (30只/组) | 攻毒毒株 | | |
|---------------|----------------|--------------------------|---------------------|
| | 名称 | 剂量（EID ₅₀ /只） | 致病性评价 |
| 1 | ILT-Behera2007 | 10 ³ | 1、ITPI ^a |
| 2 | ILT-Giza2007 | 10 ³ | 2、TLS |
| 3 | ILT-Behera2009 | 10 ³ | 3、ELISA和AGID血清阳性率 |
| 4 | ILT-Behera2010 | 10 ^{3.4} | 4、病毒重新分离 |
| 5 | CEO 疫苗 | 10 ^{3.2} | |
| 6 | TCO疫苗 | 10 ³ | |
| 7 | 对照 | AAF | |

AAF：羊膜尿囊液； TLS：气管损伤评分

a：根据Guy等人所述方法进行ITPI气管内接种指数的计算。

对14天内每只鸡表现出的临床症状每日进行评分，标准如下：

0，正常；1，呼吸道症状；

2，死亡。通过将分数总和除以鸡的总数量来确定指数

气管内接种指数（ITPI）

通过计算ITPI来评估这四个野毒株的致病性，对14天内每只鸡表现出的临床症状每日进行评分，标准如下（0=正常；1=呼吸道症状；2=死亡）。通过将分数总和除以鸡的总数量来计算指数

血清阳性率

根据制造商的建议同时使用AGID试验和商品化ILTV-ELISA试剂盒（Synbiotic 公司，圣地亚哥，CA，USA）来评估血清样品阳性率（每组20份血清样品）。根据Beard所描述的方法进行AGID试验，其中ILTV抗原是感染后5日的鸡胚绒毛尿囊膜以及1/10稀释的ILTV-CEO疫苗。将具有痘斑病变的绒毛尿囊膜匀浆，3000rpm离心15分钟，随后将上清液作为抗原。每个板均包含阳性和阴性血清对照。平板37℃孵育24小时后，检查特定的沉淀线，并在48小时后重新检查并最终读数。



EGGS PROGRAM

病理组织学检查

感染病毒后5-7天内死亡的实验组鸡只的气管被固定在10 %中性福尔马林缓冲液中，并制成石蜡切片。切片用苏木精和曙红进行染色，并按照Guy等人描述的方法进行TLS评价：0 =正常假复层柱状上皮；1 =正常上皮，固有层有非常轻微的淋巴细胞浸润；2 =轻度变化：粘膜增厚，轻度水肿，轻度充血和轻度淋巴细胞、异嗜细胞和单核细胞炎性浸润；3 =中度变化：上皮中度脱落，粘液腺减少，明显充血，淋巴细胞中度浸润和大量具有核内包涵体的合胞体形成；4 =严重变化：严重水肿，上皮细胞严重脱落，大量核内包涵体形成，严重出血，严重的淋巴细胞炎性浸润。

结果

ILT病毒分离

将所有分离株接种到SPF鸡胚后均出现了痘斑病变，其特征为不透明的边缘隆起和灰色的中心区域坏死。接种野毒株的鸡胚绒毛尿囊膜出现了水肿和出血。胚胎在接种后2-7天内出现死亡，且生长发育迟缓。采用抗ILT标准阳性血清对收获的绒毛尿囊膜进行AGID检测，结果均呈阳性。这样从1-4号农场分离到了4株野毒株，并分别命名为ILT - Behera2007，ILT - Giza2007，ILTBhehera2009和ILT - Behera2010。

ILT病毒的致病性

通过10日龄SPF鸡胚对野毒株以及ILTV疫苗（CEO和TCO）疫苗的致病性进行了评价。野毒株ILT - Behera -2007，ILT - Giza2007，ILT - Behera2009和ILT - Behera -2010的MICE指数分别为0.4，0.04，0.44，和0.45，而CEO和TCO疫苗分别为0.12和0.02。在另一方面，在易感商品杂交肉鸡中进行了传染性喉气管炎病毒分离株的致病性实验。气管内接种ILT- Behera2007，ILT - Behera -2009和ILT - Behera2010野毒株的鸡表现出咳嗽、打喷嚏、喘气和流泪，并表现出较高的ITPI。接种后第5天开始出现死亡。死亡鸡只的大体病变特征有：气管黏膜出现带血粘液或脓性粘液分泌物。气管内接种CEO疫苗的鸡只仅表现出轻微的呼吸道症状，包括咳嗽和打喷嚏。然而，气管内接种TCO疫苗、ILT-Giza2007以及正常鸡胚尿囊液AAF的鸡在观察期内均未出现发病和死亡。接种后第4天从气管拭子中重新分离到了传染性喉气管炎病毒。此外，在AGID和ELISA检测中接种ILTV分离株或疫苗株的鸡表现为血清阳性（表3）。气管内接种ILT- Behera2007，ILT - Behera2009和ILT - Behera2010分离株的鸡的组织病理变化表现为气管上皮细胞脱落，出血及炎症细胞浸润。野毒株攻毒组鸡的TLS数值较高（表3）。



EGGS PROGRAM

表3：50日龄杂交肉鸡ILTV野毒株与不同来源疫苗株致病性比较研究

| 组别 (30只/组) | 攻毒毒株 | 攻毒后8天内观察情况 | | ITPI ^a | 血清阳性率 | | TLS ^b |
|---------------|----------------|-----------------|---------|-------------------|-------------|--------------|------------------|
| | | 发病率 (%) | 死亡率 (%) | | AGID阳性/总检测数 | ELISA阳性/总检测数 | |
| 1 | ILT-Behera2007 | 80 | 13.3 | 0.44 | 14/20 | 20/20 | 4 |
| 2 | ILT-Giza2007 | 0 | 0 | 0 | 11/20 | 20/20 | 0 |
| 3 | ILT-Behera2009 | 70 | 11 | 0.4 | 12/20 | 20/20 | 4 |
| 4 | ILT-Behera2010 | 80 ^a | 15 | 0.44 | 10/20 | 20/20 | 4 |
| 5 | CEO 疫苗 | 13.3 | 0.03 | 0.08 | 13/20 | 20/20 | 2.4 |
| 6 | TCO疫苗 | 0 | 0 | 0 | 9/20 | 20/20 | 1.5 |
| 7 | 对照 | 0 | 0 | 0 | 0/20 | 0/20 | 0 |

a：根据 Guy等人所述方法进行ITPI气管内接种指数的计算。对14天内每只鸡表现出的临床症状每日进行评分，标准如下：0，正常；1，呼吸道症状；2，死亡。通过将分数总和除以鸡的总数量来确定指数。最终表现为平均数。

b：TLS：气管损伤评分值以平均数的形式表现出来

讨论

本研究对四株2007-2010年期间从杂交肉鸡场分离得到的传染性喉气管炎病毒株进行了研究。这些ILTV毒株根据以下标准被归类为致病毒株：（1）病毒可引起特征性的临床症状，易感禽类气管内接种该病毒后死亡并出现病变。Guy等人报道，传染性喉气管炎疫苗株的ITPI从0.0-0.14不等，而传染性喉气管炎病毒强毒株的ITPI则为0.2-0.82。（2）这些病毒株可引起鸡胚死亡。MICE在0.16以下的传染性喉气管炎病毒为低致病性或无致病性毒株，而这些超过0.27的毒株为高致病性毒株。（3）气管内接种病毒后可引起气管严重的病理组织学变化。表现为气管上皮脱落、出血以及炎性细胞浸润，可能在某些上皮细胞内检测到核内包涵体。（4）病毒TK基因的252位为蛋氨酸。低致病力毒株在该位置为苏氨酸。根据临床症状、死亡率、ITPI、MICE以及TLS的研究表明，ILT - Behera2007，ILT - Behera2009和ILT - Behera2010分离株为杂交肉鸡的高致病性毒株（表2）。ILT - Behera2007，ILT - Behera2009和ILT - Behera2010分离株具有相同的ITPI（0.4），MICE（0.4）和TLS（4.0），这表明这些爆发是由相同毒力型毒株引起的。而ILT - Giza2007的致病性研究结果表明，该毒株为非致病性毒株。2号养鸡场发生的死亡可能是由于呼吸道同时感染了其他病原体。可以排除新城疫和禽流感等具有血凝性的病毒，这是因为尿囊液的HA测试呈阴性。为了获得关于埃及农场中流行的病毒尤其是临床爆发病例中特定病毒的起源，传染性喉气管炎病毒株之间的分子特征和变异研究对于流行病学研究来说是必要的。传染性喉气管炎病毒的分子特性的研究方法有很多，其中包括病毒基因组的RFLP分析。多个基因PCR产物的限制性片段长度多态性分析（PCR-RFLP）可以区分野毒株和疫苗株。ICP4基因在感染的早期阶段起到调控基因表达的作用，常用于流行病学研究，以了解爆发病例中病毒的起源。对于埃及分离株的序列分析表明，ILT -



EGGS PROGRAM

Behera2007，ILT - Behera2009和ILT - Behera2010分离株为CEO疫苗相关病毒株。这些毒株在进化树中显示出与Nobilis-ILT CEO疫苗株以及EU 104900 CEO疫苗株存在密切的关系。ILT- Giza2007与EU104908 TC0疫苗处于同一群。该CEO和TC0疫苗均已在埃及注册使用。传染性喉气管炎病毒减毒活疫苗或类疫苗毒株可诱发易感鸟类的严重疾病。ILTV潜伏感染可能会通过特定的应激因素，包括转群或开始产蛋被重新激活，从而导致鸡传染性喉气管炎病毒释放到环境中去。在管理条件、卫生和生物安全水平欠佳的情况下，会持续存在对环境的污染以及病原体的传播，在这些鸡群中，传染性喉气管炎病毒的高爆发率可能会导致毒力的返强。疫苗毒在鸡群之间传播和随之而来的毒力返强的可能性，伴随着饮水免疫导致的不均匀的保护力，可能会导致免疫不良鸡群中ILT疫情发生的风险较高。正是由于这些原因，大多数传染性喉气管炎疫苗生产商建议通过滴眼进行疫苗接种。病毒在气管粘膜上的复制取决于免疫接种途径。与通过滴眼接种CEO疫苗相比，可观察到通过饮水接种疫苗的鸡只体内病毒的复制发生了延迟。然而，接种疫苗后禽与禽之间的传播方式与接种途径无关。另外，在同一鸡群中使用多个减毒疱疹病毒疫苗应该被视为潜在的危险因素。例如Lee等人表明，不同减毒疫苗株之间的独立的重组事件导致了重组病毒的出现，该重组病毒随后成为了引起澳大利亚商品鸡群普遍疾病暴发的主要毒株。

总的来说，四个埃及传染性喉气管炎病毒分离株与目前埃及使用的疫苗株之间的同源关系较近，其中三株ILTV分离株的致病性分析表明，易感鸡群中疫苗衍生株的流行可能会导致选择压力下某些病毒株毒力返强以及致病性的增加。