



**CHICK
PROGRAM**

总第13期/2014年1月

传染性喉气管炎病毒疫苗的最新进展及面临的考验

Mauricio J. C. Coppo a, Amir H. Noormohammadi b, Glenn F. Browning a & Joanne M. Devlin a

在过去的 80 年中，生物安全措施和疫苗已经作为防控传染性喉气管炎（ILT）疫情爆发的手段。尽管有这些控制策略，传染性喉气管炎仍然影响着规模化家禽养殖业的发展。减毒活疫苗，特别是通过鸡胚连续传代获得的疫苗，已经产生了一系列的副作用，包括残留的毒力，传播到易感鸡，潜伏感染状态及后来的病毒活化和排毒，以及在体内连续传代导致的毒力返强等。最近，鸡场中传染性喉气管炎弱毒疫苗之间的重组已被证明导致了新的强毒株的出现，并引起了疾病的广泛传播。为了解决这些问题，新一代的病毒载体重组疫苗被研制出来并在一些国家上市。此外，传染性喉气管炎病毒基因缺失突变株已被提议作为疫苗候选株。本文将详细阐述传染性喉气管炎传统减毒疫苗的流行病学以及新一代疫苗的开发、利用两大方面的最新进展。新一代疫苗及建立一套恰当的免疫学检测筛查方法，被认为在未来 ILT 控制中具有广阔的发展前途。

背景

传染性喉气管炎（ILT）是由传染性喉气管炎病毒（ILTV；禽疱疹病毒 1 型）引起的禽上呼吸道疾病，ILTV 属于 α 疱疹病毒亚科（传染性喉气管炎病毒属）的成员 (Davison, 2010)。该病毒仅水平传播，主要感染结膜和气管粘膜，引起炎症，产生浆液性或粘液分泌物，咳嗽和呼吸困难，以及产蛋量和/或体重降低。通常情况下感染后发病率很高（90–100%），死亡率差异较大（5%–70%），但通常为 10–20% (Guy & García, 2008; Devlin et al., 2011)。在感染的细胞溶解阶段，传染性喉气管炎病毒还会侵入周围神经，并形成潜伏感染 (Williams et al., 1992; Bagust & Johnson, 1995)。应激因素，如产蛋开始或转群可能会重新激活病毒复制和排毒 (Hughes et al., 1989, 1991)。

在 1925 年 May 和 Tittsler 对传染性喉气管炎进行首次描述后不久，通过从泄殖腔接种强毒株实现了对鸡的免疫 (Brandly & Bushnell, 1934)，这被认为是第一个应用于主要禽类病毒性疾病的疫苗 (Guy & García, 2008)。随后，研发出了通过将强毒株在细胞培养物上连续传代致弱的减毒活疫苗 [TCO] (Gelenczei & Marty, 1965) 或鸡胚连续传代致弱的减毒活疫苗 (chicken embryo origin [CEO]) (Samberg & Aronovici, 1969)。这些疫苗目前在全球商品鸡群中广泛应用。



CHICK PROGRAM

近年来又研发出了表达诱导免疫鸡群产生保护性免疫应答的传染性喉气管炎病毒糖蛋白的火鸡疱疹病毒（HVT）或鸡痘病毒（FPV）重组疫苗(Davison et al., 2006; Mebatsion et al., 2008)。现在这些重组疫苗已在一些家禽生产地区商业化使用，许多其它传染性喉气管炎疫苗，包括重组和减毒活疫苗，还在世界各地的实验室中广泛研制(Devlin et al., 2006b; Mundt et al., 2010; Pavlova et al., 2010; García et al., 2012)。

从疫苗和野毒株的全基因组序列分析得到的新的证据表明，鸡群中减毒疫苗之间自发的自然重组可导致传染性喉气管炎病毒新的强毒株出现，并可以引起广泛的疾病(Lee et al., 2012)。这是关于减毒活疫苗之间的重组会导致鸡群中病毒毒力返强的首次报道。这一发现增加了传染性喉气管炎疫苗安全使用的复杂性，并急需将目前正在使用或开发的疱疹病毒活疫苗进行彻底的修正。

本文的目的是对传染性喉气管炎疫苗的现状和研究的进展进行了解。

传染性喉气管炎减毒活疫苗

分子学特征 ILTV抗原性一致，只有一个血清型。因此，一旦鸡群接种了ILTV减毒活疫苗，很难通过血清学实验确定鸡群感染的是疫苗株或是野毒株。通过血清学监测来区分接种疫苗和受野毒感染的动物(DIVA)已被建议作为ILT控制中一种有效的方法(Bagust & Johnson, 1995)，因为这样可以根椐鸡群中病毒的种类(疫苗或野毒)制定控制策略。所以根据毒株之间的基因差异开发出能够帮助区分ILTV疫苗和野毒株的方法是一个重要的目标。

为此，许多研究小组已根据单个基因的序列分析对ILTV分离株进行基因型鉴定。一些研究中使用了聚合酶链式反应以及限制片段长度多态性分析(PCR-RFLP) (Chang et al., 1997; Graham et al., 2000; Garcia & Riblet, 2001; Han & Kim, 2001)。许多最初的研究只对一小部分的病毒基因组进行了研究，因此无法恰当地评估临床毒株之间的差异和相似性。随后，结合多个基因PCR-RFLP结果描述ILTV毒株的特征更加可靠(Creelan et al., 2006; Ojkic et al., 2006; Kirkpatrick et al., 2006b; Oldoni & García, 2007; Neff et al., 2008; Oldoni et al., 2008)。不少于一个研究得出结论认为，多数ILT疫情暴发与使用的疫苗株无关(Kirkpatrick et al., 2006b)；然而，在许多病例中，分离株与疫苗株的限制性片段模式并无特征性区别，因此被认为与疫苗株基因相似或关系密切(Creelan et al., 2006; Ojkic et al., 2006; Oldoni & García, 2007; Neff et al., 2008; Oldoni et al., 2008; Blacker et al., 2011)，这些毒株造成的疫情被称为“疫苗型喉气管炎”(Dufour-Zavala, 2008)。



CHICK PROGRAM

二代测序技术的出现使得可以对不同疫苗株和野毒株的基因组全序列进行测定和比较 (Lee et al., 2011a, b, 2012; Chandra et al., 2012; Spatz et al., 2012)。一个起源于欧洲的减毒疫苗株 (Serva ILTV, Nobilis® ILT; MSD Animal Health, Bendigo, Victoria, Australia) 是第一株完整测序的分离株 (Lee et al., 2011 b)。随后, 四株减毒疫苗的基因组全序列—两株来自于澳大利亚 (SA-2和A20; Pfizer Australia, West Ryde, New South Wales, Australia) (Lee et al., 2011a), 两株来自美国 (LT-BLEN®; [Merical Select, Gainesville, GA, USA] 和 Laryngovac [Fort Dodge Animal Health, Exton, PA, USA]) (Chandra et al., 2012)—也被公布出来。此外, 美国的四株强毒分离株 (Spatz et al., 2012) 和两个澳大利亚分离株 (Lee et al., 2012) 的完整基因组序列最近被公布出来。

对于 ILTV 野毒株 (强毒株) 和疫苗株的完整基因组序列的比较分析可能将有助于阐明疫苗致弱的遗传基础, 进而生产出更安全、有效的疫苗。对于两株澳大利亚 CEO ILT 疫苗 (A20 和 SA-2) 的全基因组序列的比对显示在 ORF B 和 UL15 具有非同义核苷酸变化 (Lee et al., 2011)。这些变化被假定为与 A20 株的进一步致弱有关, 因为 A20 株是通过将 SA-2 株在培养细胞上进一步传代获得的 (Lee et al., 2011)。对于全基因组序列数据的进一步的确定和分析将使得我们对于 ILTV 毒株之间的系统发育关系, 包括疫苗和野毒株之间的关系的理解进一步深化。

流行病学 在澳大利亚, 通过 PCR-RFLP 对 ILTV 毒株基因组 5 个基因区域特征的研究鉴定出了 9 种不同的 ILTV 基因型或种类 (Kirkpatrick et al., 2006b; Blacker et al., 2011)。最初, 野毒株和疫苗株被分为五个不同的群, 大多数 ILT 分离株与疫苗株可以区分开来 (Kirkpatrick et al., 2006b)。随后不久引入了一种来源于欧洲的新疫苗株, 并确定了四个新基因型 (6-9 群)。其中第 7 群对应新引入的疫苗株, 而剩下的其他群 (6、8 和 9 群) 与野毒株相对应 (Blacker et al., 2011)。系统发育分析表明 ILTV 第 7、8 和 9 群可划分为一个大群, 这表明这些群的野毒株与疫苗株之间存在密切的亲缘关系。基因分型数据表明, 最近的疾病暴发是由与疫苗相关的 ILTV 8 群或/和 9 群的毒株引起的 (Blacker et al., 2011)。对疫苗株 (Lee et al., 2011 a, b) 和野毒株 (Lee et al., 2012) 的全基因组序列分析的最新数据显示 8 群和 9 群的产生是由于相互独立的减毒活疫苗 (1 群和 7 群) 之间的自然重组造成的。疫苗使用的环境很有可能推动了重组事件的发生, 包括在大量密集饲养的禽类中使用多种疫苗。这一发现强调了高选择压力条件下使用多个减毒疫苗的风险, 这可能会促进流行毒株之间的重组和毒力及传播能力更强的子代病毒的出现。



CHICK PROGRAM

在美国, 结合四个基因组区域的PCR-RFLP分析可确定9种ILTV基因型(群), 其中两个对应于TCO和CEO疫苗(分别为II群和IV群)。所有其他群都确认为野毒株。许多野毒株也被归为第四群, 因而被认为与CEO疫苗密切相关 (Oldoni & García, 2007)。大多数ILTV分离株被认为与疫苗株存在密切关系 (Oldoni & García, 2007; Oldoni et al., 2008)。在西欧国家的情况类似, 绝大多数(98/104)的ILTV分离株与疫苗株密切相关 (Neff et al., 2008)。意大利最近的一项研究对ILTV野毒株和疫苗株若干基因组区域的PCR-RFLP模式和核苷酸序列进行了分析。ILTV分离株之间在核苷酸水平存在差异但PCR-RFLP分析并没有存在差异, 而且大多数野外分离株被认为是疫苗相关株 (Moreno et al., 2010)。

在秘鲁和巴西, 对受感染细胞的protein-4基因的两个区域的核苷酸序列进行分析可以区分野毒株和CEO疫苗株。导致这些国家疫情爆发的ILTV分离株与疫苗株之间没有相关性, 可能来源于非法进口的非商品禽类 (Chacón & Ferreira, 2009)。这些疫情发生后, 巴西和秘鲁的家禽产业选择使用CEO ILT疫苗(巴西)或重组ILT疫苗(秘鲁)来控制疾病暴发 (Chacón & Ferreira, 2009; Chacón et al., 2010)。尚未报道在这些国家应用不同的疫苗接种策略后ILTV野外分离株的遗传特性。未来的研究应该阐明这些不同的疫苗对于ILTV分离株遗传多样性的影响。

总的来说, ILTV基因分型数据对于野外环境中疫苗毒株逐渐取代野毒的假说提供了支持 (Chang et al., 1997; Graham et al., 2000)。不同地理区域基因型数据的多样性强调了采用适当的控制策略对于ILTV分离株的分子特征的影响, 特别是在使用传统减毒疫苗的地区, 其不能通过血清学实验与野毒株进行区分。在某种ILTV基因型占主导地位的地区, 引入新的具有不同基因型的减毒疫苗可能会增加ILTV重组, 组成更加适应环境、毒力更强或传播更快的毒株, 因为这种做法为重组和自然选择提供了不同的基因库。在这种情况下, 采用重组病毒载体疫苗可能是一个更安全的替代方案, 可以减少新基因数量的产生风险。

传染性喉气管炎重组疫苗

许多ILTV基因已经应用于研制重组病毒载体疫苗或基因缺失株。表1提供了在其中应用的基因及其在病毒复制过程中工作原理的总结。我们目前所了解的这些基因的功能来源于对已知功能的其他 α 疱疹病毒科病毒同源基因的推断, 或通过对于ILTV基因缺失株的鉴定研究获得。



CHICK PROGRAM

表1 重组病毒载体疫苗或基因缺失株疫苗中应用的基因

基因名称	功能
糖蛋白B	病毒侵入、胞膜融合 ^a
糖蛋白C	病毒与宿主细胞膜的粘附 ^b
糖蛋白D	病毒侵入中介 ^c
糖蛋白G	病毒趋化因子结合蛋白 ^d
糖蛋白I	病毒在细胞间的传播 ^e
糖蛋白J	病毒排出 ^f
胸苷激酶	DNA合成 ^g
UL0	病毒基因表达调节，DNA合成或衣壳化 ^h
UL32	病毒基因组分裂和衣壳化 ⁱ
UL47	细胞质中病毒粒子的成熟，核中基因调节或粒子组装 ^j

a Poulsen & Keeler (1997). b Kingsley et al. (1994) and Kingsley & Keeler (1999). c Spear & Longnecker (2003). d Devlin et al. (2006b, 2010). e Devlin et al. (2006a). f Mundt et al. (2011). g Griffin & Boursnell (1990) and Keeler et al. (1991). h Veits et al. (2003). i Lamberti & Weller (1998). j Helferich et al. (2007).

传染性喉气管炎病毒载体疫苗

近年来，新的分子技术被应用于研制表达ILTV免疫原性抗原的重组病毒。这些疫苗的优势在于可提供免疫保护而不存在减毒活疫苗潜伏感染会重新激活并排毒的风险 (Bagust & Johnson, 1995; Davison et al., 2006; Sun et al., 2008)。

目前，表达ILTV基因的重组FPV载体疫苗 (Vectormune® FP-LT; Ceva Animal Health, Lenexa, KS, USA) 已经在北美和南美的部分地区上市。这种疫苗表达ILTV糖蛋白B(gB)和UL-32基因，目前注册为通过1周龄雏鸡翅下刺种或18日龄蛋内接种的疫苗。研究表明，这种疫苗可提供足够的保护，这是通过气管病理变化以及翅下刺种疫苗后ILTV攻毒保护试验来证明的 (Davison et al., 2006)。最近的一项研究表明蛋内免疫接种这种疫苗后对于病毒攻击起到了部分保护作用，攻毒后5-8天气管粘膜上ILTV的复制只有少量减少 (Johnson et al., 2010)。作者推测，这可能是由于载体病毒无法在免疫禽类的气管上进行复制，因此缺乏能够阻止病毒复制的局部免疫反应。在类似的研究中，Guy et al. (2010)发现，蛋内接种该重组疫苗提



CHICK PROGRAM

供的免疫保护在某种程度上弱于由TCO或CEO疫苗分别通过点眼或饮水免疫提供的免疫保护。然而, 该疫苗能够防止死亡, 减少临床症状和病变, 提高增重。此外, 尽管疫苗不能完全防止攻毒毒株的复制, 但它可以减少这种复制的程度和缩短其持续时间 (et al., 2010)。

在中国开发出了共同表达新城疫病毒F基因和HN基因以及ILTV gB基因的FPV载体疫苗。在实验条件下通过翅下刺种免疫时, 这种候选疫苗能够提供针对ILTV感染的与传统减毒疫苗相当的有效的免疫保护 (Sun et al., 2008)。之前, 由同一组研究人员研发的只表达ILTV gB基因的FPV载体ILT疫苗, 已经被证明能够对致死剂量的ILTV攻击提供免疫力。然而, 不能完全阻止ILTV攻毒毒株的复制 (Tong et al., 2001)。最近, 进行了翅下刺种同时表达ILTV gB基因和鸡白细胞介素-18 (IL-18) 或者单纯表达ILTV gB基因的FPV载体候选疫苗引发的免疫反应的检测和对比。攻毒试验表明, 同时表达禽IL-18的重组疫苗可诱导更有效的免疫反应, 这是通过PCR检测攻毒后15天ILTV DNA的表达情况证明的 (Chen et al., 2011)。这表明IL-18可作为一种FPV重组载体ILT疫苗的佐剂, 并突出了Th1型免疫反应在防止ILTV感染和疾病中的重要性。使用IL-18或其他免疫调节因子可能在新型家禽疫苗包括ILT疫苗的研发中发挥重要作用。

一个编码 ILTV 糖蛋白 I (gI) 和糖蛋白 D 的以火鸡疱疹病毒作为载体的重组马立克氏病疫苗 (Innovax® - ILT; Intervet International B.V., Whitehouse Station, NJ, USA) 最近在美国上市 (Mebatsion et al., 2008)。这种疫苗已经注册为 1 日龄雏鸡皮下接种以及 18 日龄鸡胚接种疫苗, 免疫接种 4 周后开始出现免疫力并可持续 60 周 (Intervet International B.V., 2010a, b)。最近的研究表明, 这种重组 HVT 疫苗在蛋内和皮下接种后可在组织内进行复制。然而, ILTV gI 基因在肺脏中的表达水平比脾脏中低 (Gimeno et al., 2011)。作者推测这也许可以解释接种该种疫苗的禽类与传统的减毒 ILT 疫苗的禽类相比保护水平较低 (Guy et al., 2010)。在他们的研究中, Guy et al. (2010) 认为这种 HVT 载体疫苗通过蛋内接种可对接种鸡只提供重要的免疫保护, 但并没有通过传统方法接种的 TCO 或 CEO 疫苗那样有效。

另一种 HVT 载体 ILT 疫苗最近在美国上市 (Vectormune®HVT-LT; Ceva Biomune, Lenexa, KS, 美国)。本产品注册为 1 日龄雏鸡皮下接种以及 18 日龄鸡胚接种疫苗。在本文截稿时还没有描述这个新的重组疫苗的报告。

当FPV载体疫苗和HVT载体疫苗联合使用时, 可观察到比单独应用任一个重组疫苗更强的保护力, 与TCO疫苗所提供的保护力相当 (Guy et al., 2010)。此外, 当在14日龄接种CEO疫苗之前提前接种FPV载体疫苗或HVT载体疫苗或联合接种两种疫苗, 接种CEO疫苗后检测到的病毒明显减少, 表明提前蛋内接种这两种重组疫苗可诱导免疫力以减少CEO病毒复制 (Guy et al., 2010)。这是一个重要的发现, 因为疫苗接种后ILT疫苗的排毒是公认的安全担忧。这种组合性的方法还可提供与单独接种CEO疫苗没有显著区别的保护性免疫力, 这是通过体重和临床症状来判断的。



CHICK PROGRAM

对于这些新型重组疫苗在ILTV攻毒后预防潜伏感染的能力的调查和进一步的研究是十分必要的,尤其考虑到最近的实验研究表明这些重组病毒载体疫苗并不能完全抑制气管中ILTV的复制(Guy et al., 2010; Johnson et al., 2010; Vagnozzi et al., 2012)。野外证据也表明,这些重组病毒载体疫苗不能完全防止高感染性地区的禽类的疾病暴发(Johnson et al., 2010)。这可能是病毒载体ILT疫苗不能在呼吸道组织复制的缺陷造成的。

基因缺失株传染性喉气管炎疫苗

适合ILTV传代的鸡肝癌细胞系的研发和建立(Kawaguchi et al., 1987; Scholz et al., 1993)促进了通过同源重组获得的ILTV 基因缺失突变株的产生。已经进行了缺失UL0或UL47基因或编码胸苷激酶(TK)、糖蛋白C(gC)、G(gG)或J(gJ)基因的ILTV突变体在致病性和功能方面的研究。缺失这些基因会导致病毒毒力降低,这些缺失突变株已被提议作为潜在的候选疫苗(Schnitzlein et al., 1995; Veits et al., 2003; Fuchs et al., 2005; Devlin et al., 2006b; Helferich et al., 2007; Mundt et al., 2010; Pavlova et al., 2010)。

第一个作为候选疫苗的ILTV 基因缺失突变株是一株TK基因缺失突变株。气管内接种显示,该突变体的毒力大幅度降低,与传统的减毒疫苗毒力一致。同时能诱导产生抵抗致死剂量ILTV感染的免疫力(Schnitzlein et al., 1995)。随后, Han et al. (2002)报道了一个不同的TK缺失突变株的产生,其可以表达绿色荧光蛋白作为标记。这一TK缺失突变株可在体外正常生长,气管内接种后致病性降低,并可诱导SPF鸡对于病毒感染的保护力。同样,缺失了独特ILTV UL0基因的突变株通过点眼接种后在禽类体内的毒力也衰减了,并通过病毒感染后大部分免疫禽类的排毒的减少表明其仍具有诱导攻毒保护的能力。ILTV基因组中插入禽流感病毒血凝素基因(H7)(替代UL0)可同时诱导针对同源禽流感病毒和ILT病毒的共同保护作用(Veits et al., 2003)。

一个gJ基因缺失ILTV重组毒株也被报道在体内的毒力减弱,主要表现为SPF鸡实验性气管内接种后临床症状较轻,死亡率相对较低。它还可以诱导针对病毒感染的保护力,主要表现为ILTV感染后完全没有ILTV复制和排出,以及免疫鸡只在攻毒后没有临床表现(Fuchs et al., 2005)。Fuchs等人(2005)报道,这一gJ缺失突变株在鸡胚肾细胞上生长的病毒滴度很低。这可能与gJ基因在ILTV从感染细胞中排出的过程中的作用有关,但相关机制尚未完全清楚(Mundt et al., 2011),这对于大规模商业疫苗生产来说可能是个挑战。最近的报道显示,点眼接种或蛋内接种由Mundt等人在2010年研制的gJ缺失突变株疫苗的肉鸡可通过临床症状减轻以及气管内病毒量的减少证明其可以抵抗病毒感染(García et al., 2012)。而一株gC基因ILTV缺失突变株已被建议作为一个候选疫苗,通过禽类气管内和点眼联合接种证明其毒力已减弱,并能够防止感染



**CHICK
PROGRAM**

病毒的排毒(Pavlova et al., 2010)。

编码富集在于被膜表面的病毒蛋白的UL47基因的缺失也与体内毒力减弱有关，并且该突变可诱导针对病毒攻击的免疫保护。然而已经证明，该缺失突变株不适用于血清学DIVA方法，因为通过基因UL47编码的蛋白质在实验性感染后不能被体液免疫应答所识别(Helferich et al., 2007)。

为评估ILTV gG基因变异缺失株(Devlin et al., 2006b)作为候选疫苗的适用性进行了很多研究(Devlin et al., 2007)。这些研究已经证明这种突变株毒力的衰减及其具有免疫原性，并适用于通过点眼或饮水进行大规模免疫接种(Devlin et al., 2007, 2008; Coppo et al., 2011)。最近的实验研究表明，ILTV 的gG蛋白在体内和体外可作为病毒趋化因子结合蛋白。gG的缺失导致了从体液免疫反应(非保护性)到细胞免疫反应(保护性)的转变(Devlin et al., 2010)。在实验中该缺失突变株已被证实能够减少通过点眼免疫的鸡群中ILTV病毒的传播 (Devlin et al., 2011)。当通过点眼免疫时，这种缺失突变株已经显示出与其他商用减毒疫苗相同的安全性和有效性 (Coppo et al., 2011)。最近的一项研究也显示出通过18日龄鸡胚免疫接种时，这种候选疫苗的病毒复制特征及其安全性和有效性。接种疫苗并不影响体重增加，而且在攻毒保护试验时发现了这种保护力具有剂量依赖性，接种较高剂量突变株的禽类在攻毒保护试验中在体重增加和气管病理学方面显示出更高的保护力(Legione et al., 2012a)。

目前尚不清楚这些重组疫苗或候选疫苗是否会产生潜伏感染，或抑制感染毒株的潜伏感染。这是一个重要的考虑方面，因为它涉及到这些疫苗是否具有替代目前使用疫苗的可能性。

免疫动物和感染动物控制策略的差异

重组和基因缺失传染性喉气管炎疫苗的出现，使得通过血清学实验区分野毒感染和接种疫苗禽类成为可能，从而可以使用DIVA控制策略。这是根除计划的重要考虑因素(Bagust & Johnson, 1995)。血清学监测方法一般是首选的DIVA控制策略，它们在商业实验室中的应用通常会更方便，而分子生物学方法（即PCR-RFLP）通常在参考实验室中用于研究目的。使用血清学筛选方法更容易检测到体液应答中特定蛋白质/抗原（标记蛋白质）的缺乏或存在(Veits et al., 2003; Fuchs et al., 2005; Devlin et al., 2007; Mundt et al., 2010; Pavlova et al., 2010; Shil et al., 2012)。同样，使用分子生物学方法（如PCR）很容易检测出特定遗传标记的存在或不存在，这些分子方法可以在疾病爆发调查和应对中对血清学方法起到补充作用。



CHICK PROGRAM

许多研究显示血清学筛查方法可以检测到针对特定ILTV糖蛋白的抗体, 提供了DIVA方法可以伴随重组疫苗使用的发展潜力的证据(Chang et al., 2002; Fuchs et al., 2005; Johnson et al., 2010; Pavlova et al., 2010; Shil et al., 2012)。已经研制出蛋内接种某种商用FPV载体疫苗或HVT载体ILT疫苗后收集的血清中通过间接免疫荧光实验检测针对gB, gC, gI和gJ蛋白的方法。表达ILTV gB基因的FPV载体ILT疫苗可在一定比例的免疫鸡群中诱导针对ILTV gB蛋白的抗体。此外, 这些鸡只在攻毒后比接种CE0疫苗的鸡只的针对gB蛋白的抗体滴度显著升高。相比之下, 那些接种了表达gI蛋白的HVT载体疫苗的鸡只并未检测到针对ILTV gI蛋白的抗体表达, 而且在攻毒后与免疫CE0疫苗的鸡只相比针对gI蛋白的抗体水平并没有明显的差异(Johnson et al., 2010)。这些结果表明, FPV载体疫苗引起的针对插入ILTV糖蛋白的抗体反应相对强于HVT载体ILT疫苗。然而, 通过ILTV商业酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒均未检测到这两种疫苗的抗体应答。目前尚不清楚这些结果是由于疫苗本身免疫原性低还是用于这项研究的接种途径未能成功将疫苗注射到鸡胚所致。

在接种Fuchs等人在2005年研制的gJ缺陷型突变株ILTV疫苗后, 在免疫鸡只的血清中通过间接免疫荧光实验检测到了针对gC蛋白的特异性抗体, 且未检测到针对gJ蛋白的特异性抗体的存在。同样, 通过间接免疫荧光实验检测针对gJ和gC蛋白的特异性抗体的血清学筛查方法已经被提议来区分野毒感染和疫苗感染。(Pavlova et al., 2010)。使用gG缺失突变株进行免疫的体内实验研究表明, 通过不同的途径接种疫苗后ILTV的抗体水平很低, 这可能是由于gG的免疫调节作用被缺失掉了(Devlin et al., 2006b, 2007, 2008, 2010; Coppo et al., 2011)。尽管在实验中检测到的免疫SPF鸡的抗体水平很低, 最近的一份报告已经指出ELISA方法可以用来在DIVA控制策略中作为判定这种候选疫苗效率的并行方法(Shil et al., 2012)。此外还提出针对这种候选疫苗可将PCR方法与DIVA血清学方法结合使用的可能性, 因为该gG缺失疫苗诱导的体液免疫应答的降低可能会限制血清学筛选工具的应用。

如果接种DIVA疫苗足够长一段时间后, 预计将减少野毒在免疫鸡群中的传播。一旦DIVA检测到的野毒感染的发生率降低, 那么最终就可能将感染来源彻底根除(van Oirschot et al., 1996)。这种策略已被成功地用于荷兰控制猪伪狂犬病病毒计划中, 在密集使用gI缺失突变株疫苗接种计划2年后, 野毒感染的抗体阳性率显著降低(Stegeman et al., 1994a, b)。显然对于ILT来说, 这种策略只有在某一特定的地理区域内通过所有家禽生产者的共同努力才能实现, 同时紧随其后的是各种生物安全措施, 如家禽养殖场延长空舍时间, 限制活鸡和粪便的运输等(Dufour-Zavala, 2008)。这种方法建立在DIVA疫苗免疫鸡群中野毒的传播减少的假设上。在这方面, 在实验条件下唯一一株ILTV缺失突变株的候选疫苗在免疫攻毒实验中发现了ILTV病毒的水平传播(Devlin et al., 2011)。这一战略还需要疫苗可以防止攻毒病毒在DIVA疫苗接种鸡群中的潜伏感染。尚无任何报道ILT重组疫苗具有能够防止攻毒毒株潜伏感染的能力。观察发现一些重组疫苗不能阻止感染病毒在气管内的复制



**CHICK
PROGRAM**

(Johnson et al., 2010; Vagnozzi et al., 2012), 这引发了关于攻毒病毒能够在感染的初始阶段进一步在周围神经系统建立潜伏感染的假说。还需要进一步的实验工作来调查这一假设是否合理。

对在过去的几年中已经使用病毒载体重组疫苗的地区通过DIVA实验进行血清学监测,可能有助于更好地理解新环境下传染性喉气管炎病毒的流行病学特征,以及有助于阐明新的重组疫苗是否确实可以替代野毒或与疫苗相关的传染性喉气管炎病毒株,或防止其传播。

疫苗的安全性, 保护性和接种途径

安全性和保护性 修饰过的活病毒疫苗可以表现出不同水平的毒力残留, 这取决于疫苗株种类和鸡只年龄。疾病临床症状, 气管损伤, 增重减少和死亡率已在许多研究中用于评估疫苗的毒力来衡量其安全性(Guy et al., 1990; Kirkpatrick et al., 2006a; Devlin et al., 2008; Oldoni et al., 2009; Coppo et al., 2011)。通过CEO疫苗的实验证明残余毒力可能会随着在鸡只体内传代而增加(Guy et al., 1991)。

攻毒保护试验已长期用于评估ILT疫苗的效力。然而, 接种途径(气管内, 滴眼, 蛋内), 病毒株和所用剂量, 以及鸡只年龄和品种的差异都会影响攻毒后用来常规评估保护效果的参数。这阻碍了对不同研究中的疫苗进行直接比较(Fulton et al., 2000; Tong et al., 2001; Davison et al., 2006, 2007, 2008; Rodriguez & Garcia, 2008; Rodríguez-Avila et al., 2008; Sun et al., 2008; Johnson et al., 2010; Vagnozzi et al., 2010a, b; Coppo et al., 2011)。来自欧洲和美国的官方监管机构要求接种疫苗的禽类在使用致死剂量的ILTV病毒攻毒后没有严重的临床症状、病理表现和死亡(Anonymous, 2003; European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare, 2007)。然而, 通过这些疫苗效果评估方法都未能提供能够完全控制传染性喉气管炎疾病暴发威胁的禽类商品疫苗。此外, 许多当前使用的ILT疫苗都没有进行体内多次传代后的毒力回归检测。

为了解决其中的一些局限性, 最近已重新调查了疫苗的复制和传播能力, 来试图更好地了解鸡传染性喉气管炎在鸡场爆发的起源(Rodríguez-Avila et al., 2007; Coppo et al., 2012a, b)。在实验条件下已显示出Serva和SA-2疫苗株在复制能力以及在雏鸡接触传播的能力上的差异(Coppo et al., 2012a)。也已经证明了CEO和TCO疫苗之间传播存在差异, 前者的复制和蔓延比后者更迅速(Rodríguez-Avila et al., 2007)。很有可能传染性喉气管炎病毒株在鸡群内或鸡群之间传播更容易导致与疫苗相关ILT毒株的疾病爆发。值得注意的是, 减毒活疫苗株的接种不一定可以防范传染性喉气管炎野外强毒病毒株的感染(Rodríguez-Avila et al., 2008)。这些发现强调了将防止免疫鸡群内攻毒毒株的传播能力(Devlin et al., 2011)



CHICK PROGRAM

作为评估疫苗的有效性和提高ILT疫苗效用的新方法的重要性。

最近的一项实验研究进一步确定了难以达到针对传染性喉气管炎的足够保护的难点。在根据目前的行业惯例将减毒TCO传染性喉气管炎疫苗与传染性支气管炎病毒和新城疫病毒疫苗联合应用时观察到了其保护力的不足 (Vagnozzi et al., 2010a)。在野外环境中对这些实验观察结果进行验证将有利于全面评估其现实意义。

接种途径 疫苗接种的途径是极其重要的。饮水和喷雾免疫通常用于肉鸡家禽养殖企业 (Robertson & Egerton, 1981; Devlin et al., 2008; Guy & Garcia, 2008), 但蛋鸡通过点眼进行免疫接种显示比饮水免疫提供的免疫力更加一致 (Fulton et al., 2000)。有人指出饮水免疫可能会导致同一圈舍或鸡群中接种疫苗的鸡只与易感鸡之间 “地下” 或被忽视的感染循环的形成 (Fulton et al., 2000; Coppo et al., 2012a, b)。最近的一项关于通过点眼或饮水免疫接种CEO ILT疫苗的复制和传播能力差异的研究发现, 在实验条件下不同接种途径会导致病毒复制程度的显著差异, 饮水免疫比点眼免疫导致的病毒在气管内存活的时间更长 (Coppo et al., 2012 b)。这一研究和其他研究均为疫苗株在免疫鸡群和易感鸡之间的频繁传播提供了证据。在鸡群间容易传播的疫苗其毒力返强的可能性会提高, 这是由于疫苗接种后存在多个潜在的体内变异途径以及具有更强传播能力的病毒株的生态选择性。

为避免ILTV疫苗传统接种途径的局限性, 对其他途径接种的疫苗的安全性和有效性进行了研究。最近的研究特别对可以向免疫鸡群提供更广泛的疫苗覆盖率和更一致免疫力的蛋内接种途径进行了评估。蛋内疫苗接种已被广泛用于肉鸡家禽业中马立克氏病的控制 (Bermudez, 2008)。最近, 新城疫病毒和传染性法氏囊病病毒载体疫苗扩大了该技术的应用范围, 该技术的使用可以在每小时同时将多个疫苗免疫超过50000个鸡胚 (Williams & Zedek, 2010)。对于蛋内接种FPV载体或HVT载体ILT疫苗的功效的研究显示这些疫苗可以诱导针对攻毒毒株的局部免疫力, 而且增重影响和临床症状也较轻, 但气管内攻毒病毒的载量并没有减少 (Johnson et al., 2010)。最近, Vagnozzi 等人 (2012) 对于通过蛋内接种或皮下接种免疫的商品化FPV载体疫苗和HVT载体ILT疫苗所提供的保护进行了比较。HVT载体疫苗似乎比FPV载体疫苗在减少ILTV攻毒后临床症状方面更有效, 而FPV载体疫苗通过皮下免疫时似乎比通过蛋内接种提供的保护力更好。然而不管通过何种接种途径, 两种疫苗均可以减轻攻毒后的临床症状, 但是它们都不能减少气管中的病毒载量。作者表明这些疫苗在大量野毒株的攻击下可能无法控制疾病或ILTV毒株的流行 (Vagnozzi et al., 2012)。显然, 需要对这些疫苗进行野外环境中的攻毒保护研究和流行病学分析来与实验中的结果进行联系。



CHICK PROGRAM

到目前为止还没有评估传统传染性喉气管炎弱毒疫苗蛋内接种后的安全性和有效性的研究。然而，最近也出现了探讨关于ILTV gG或gI缺失突变株疫苗经蛋内接种后病毒复制情况及其安全性和保护性的研究(García et al., 2012; Legione et al., 2012b)。与点眼接种相比，18日龄鸡胚接种gJ缺失突变株可达到相同的保护水平，这是通过衡量获保护鸡群的比例、临床症状和攻毒病毒的复制减少等得出的结论(García et al., 2012)。而在相同日龄蛋内接种gG缺失突变株也可以提供保护力，这是通过评估增重情况、气管肉眼病变和显微镜下的病理变化得出的(Legione et al., 2012b)。然而，蛋内接种这两种候选疫苗均无法完全抑制传染性喉气管炎病毒攻毒株在免疫鸡群中的复制。这是关系到免疫鸡群中是否存在潜在的相互之间病毒传播的重要问题。就像已经对蛋内接种病毒载体ILTV疫苗的鸡进行了类似的观察一样，为了更好地了解它用于接种ILT疫苗的局限性，对这种接种途径的进一步研究是必要的。

鸡群免疫力和保护性评估 对传染性喉气管炎免疫接种鸡群的免疫力进行日常评估是一件困难的事情，因为缺乏关于能够保护鸡群免受疾病的抗体水平的血清学评判数据。已经发现细胞免疫与针对传染性喉气管炎病毒的保护力有关，而不是体液免疫或局部免疫应答 (Fahey et al., 1983, 1984; Fahey & York, 1990; Honda et al., 1994a, b)。因此，接种疫苗鸡群血清中抗体浓度可能与保护力不存在必然联系。较早的野外研究发现通过饮水免疫的鸡群比点眼接种鸡群的病毒中和抗体平均滴度低，但两组鸡群均获得了防止病毒侵袭的充分保护力(Hayles et al., 1976)。随后，Sander等人(1997)使用商业试剂盒进行了实验并证明，ELISA抗体平均滴度大于400时可以保护鸡只免受强毒的感染。然而，一些市售的ELISA试剂盒(包括Sander等人使用的)更适用于对传染性喉气管炎病毒抗体进行定性检测，而不是定量血清中的抗体滴度(Bauer et al., 1999; Fulton et al., 2000)。不幸的是，检测与保护力相关性更好的细胞免疫的方法比使用血清学筛选法检测抗体在技术上更困难，而且实施和使用起来更加昂贵，因此，尽管其价值有限，ELISA仍然是唯一被广泛使用的商业用评估鸡群的保护力方法。

通过血清学检测鸡群中ILTV血清抗体阳性率，是评判针对病毒攻击保护力的另一种方法。最近一项对点眼免疫gG缺失突变株疫苗鸡群中鸡只之间野生型攻毒毒株的传播能力的实验研究(Devlin et al., 2011)发现其复制率(即典型感染的情况下二次感染病例的平均数目) <1 ，这意味着每个感染个体产生的新感染的个体小于一(Heffernan et al., 2005)，因此，疫苗接种可以防止免疫鸡群中ILTV攻毒毒株的传播。但是，并没有现场或实验数据表明，为了鸡群获得完全保护力(即复制率 <1)需要最小多少鸡只直接接触到ILT疫苗(通过接种疫苗或间接接触)。在Devlin等人的研究中(2011)是通过理想的点眼途径进行免疫的，这在野外条件下对肉鸡群来说是不切实际的。为评估和优化当前的行业习惯以达到免疫鸡群最佳的保护效力，在新的野外实验中利用常用的接种途径进行研究是必要的。此外，在评估免疫鸡群的免疫状态时，研发出更可靠、与



CHICK PROGRAM

免疫力相关性更好且易于使用的检查方法是很有价值的。抗原特异性淋巴细胞增殖测定法已被发现可用于筛查健康个体血液中的人类疱疹病毒感染(Leroux et al., 1985)，使用类似的方法在鸡群中进行传染性喉气管炎疫苗引起的细胞免疫的常规筛查可能是可行的，需要进行进一步研究。

结论

α -疱疹病毒科病毒如传染性喉气管炎病毒是与其宿主共同进化了数百万年的复杂病原体。最新研究表明，弱毒 ILT 疫苗会发生重组，产生毒性或传播性更强的病毒，给集约化养禽场带来重大损失(Lee et al., 2012)，这给用疫苗接种来控制 ILT 带来了又一层困难。目前，尚不明确重组是偶然事件，还是 ILT 和其他 α 疱疹病毒为了便于传播和在宿主体内繁殖而进化形成的策略。随着第二代测序技术向着成本更低廉且更加实用的方向发展，研究机构获得的过去和现在流行的 ILTV 毒株的全基因组分析数据的增加将有助于阐明这一问题。研究应该深入探寻重组机制，以便更好的解释其起源，如果有可能的话，阻止其发生。对适当的疫苗接种程序和方法进行进一步的流行病学研究也许会有助于实现这种期望。

在过去的 80 年里，在通过疫苗接种控制 ILT 的工作中已投入了相当多的努力和资源。可惜的是，目前为止没有人去计算 ILT 对养禽业的经济影响。在 ILT 疫情爆发的时候使用更有效的新型疫苗的改良防控策略可能会减少生产性能降低或死亡带来的经济影响。深入了解这种影响，最终深入了解各种防控策略，避免或减少经济损失的潜力是制定适当的防控措施的主观依据。可以看到，当前可用的弱毒疫苗已经很好的用于养禽业，但是它们依旧不足以防止 ILT 的周期性爆发。这也许反映了当前（或传统）的评估疫苗安全性和有效性方法的不足，这些方法大多建立在评估疫苗的残余毒力和检测免疫鸡群的临床症状、体重增加和气管病理学等参数，来反映免疫鸡群应对病毒感染能力的基础上。新的（不同的）参数，比如疫苗传播性和疫苗预防攻毒毒株传播的能力也许在未来有关 ILT 的研究中更加恰当，同时需要检测疫苗造成隐性感染和防止或限制 ILTV 野毒株发生隐性感染的能力。实验研究对于模拟发病的现场条件能力有限，所以未来有关疫苗评估和应用的研究需要更加专注于现场条件 and 实践。

新型重组 ILT 疫苗的使用和研发，以及探索更加有效的新的接种方法都旨在避免阻碍长期使用疫苗接种来控制 ILT 感染。然而，现有的实验数据表明，目前可用的商品化重组疫苗不能和传统弱毒疫苗一样提供足够高的保护水平(Guy et al., 2010; Johnson et al., 2010; Vagnozzi et al., 2012)。同样，蛋内接种可能是一种可提供更高和更均一免疫力的疫苗接种途径，尚未证明其可以提供与传统接种途径水平相当的免疫力(Guy et al., 2010; Johnson et al., 2010; Vagnozzi et al., 2012)。需要在 DIVA 方法可行的地方进行大规模群体研究，来更加充分的评估新型重组疫苗的效力，至少在野毒株水平相对较低的



CHICK PROGRAM

地区，这些疫苗的作用似乎更好 (Johnson et al., 2010)。

我们关于 ILTV 病理方面理解的有限增加了研发适当的防控策略的困难。禽类免疫学的新发展也许会使目前知之甚少的病毒与宿主之间相互作用的研究更加深入，更具体的说，先天免疫应答在防控其他疱疹病毒感染的措施中是非常关键的因素 (Paludan et al., 2011)。对 ILTV 先天性免疫应答的理解和测定也许可以在除检测血清中 ILTV 抗体水平之外，提供一个更好的评估群体保护力的办法。关于 ILTV 产生隐性感染和持续感染机制的掌握对于防控是非常关键的，因为饲养期长的鸡只如蛋鸡和种鸡感染后病毒持续传播，这些鸡会作为病毒的储存库。对大量 ILTV 野毒株和疫苗毒株的全基因组测序数据的分析也许可以有助于更好的理解毒力增强和衰减的分子学基础，这对于改良疫苗的研发非常有用。长期看来，更好的理解病毒与宿主之间的相互作用也许会有助于针对宿主蛋白而不是病毒的治疗和防控策略的发展，从而避免病毒快速进化带来的阻碍（如通过重组）。

总之，一个理想的 ILT 疫苗需要兼顾便利性和成本效益，从而在免疫鸡群间达到统一的保护效果。这种疫苗在理想的情况下不会产生隐性感染，而且会防止其他 ILTV 毒株隐性感染的产生。疫苗接种后复制时间短，疫苗毒株在鸡只间传播能力有限，可完全防止攻毒病毒复制的能力也是最佳疫苗的关键特性。最后，一个理想的疫苗将会适用于 DIVA 控制策略和疫病根除计划。很明显，我们还没有达到这一目的，但是最近的 ILT 疫苗的研究进展已经使目标更加接近。不同类型疫苗的联合使用势必会使我们在未来几年后防控该疾病的能力得到加强。