



鸡传染性喉气管炎弱毒株 FJ19 株的关键基因遗传演化分析及作为候选疫苗株的安全性、有效性评价

王晨燕¹, 张巍嘉¹, 柳珊², 李亚杰², 赵丽霞², 刘云涛², 侯博^{1*}

(1. 福建省农业科学院畜牧兽医研究所/福建省畜禽疫病疾病防治工程技术研究中心, 福州 350013;

2. 瑞普(保定)生物药业有限公司, 保定 071030)

摘要: 本研究旨在分析鸡传染性喉气管炎病毒(ILTV)弱毒株 FJ19 株的部分关键抗原基因及毒力基因的遗传演化特点, 评估 FJ19 株对 SPF 鸡的安全性和免疫原性, 为 ILTV FJ19 株弱毒活疫苗的开发提供参考依据。通过将 FJ19 株进行多次尿囊腔途径接种适应后, 对其关键抗原和毒力基因进行测序分析, 点眼或口服接种 14 日龄 SPF 鸡观察其安全性, 并且通过点眼或口服途径免疫 14 日龄 SPF 鸡 21 d 后用 ILTV 强毒株攻毒评价保护效果, 测定免疫持续期等验证 FJ19 株作为弱毒活疫苗的潜力。结果显示: 将 FJ19 株在 10 日龄 SPF 鸡胚以尿囊腔途径接种连续传代适应后, 收获 P0、P1、P2、P3 代病毒液的 EID₅₀ 分别为 10^{5.0}、10^{6.5}、10^{6.9}、10^{6.5}·mL⁻¹。核酸序列分析结果表明: FJ19 株主要免疫原性基因 *gB-gC-gD-UL32* 和毒力相关基因 *gE-gI-TK-ICP4-gG-gH-gK-gL-gM-gN* 与弱毒株 K317、Nobilis Laringovac[®]、LT Blen、Poulvac ILTV[®]、Laryngo Vac 和我国 2009 年分离株 LJS09 株、2012 年分离株 ck/CH/LHLJ/120305 株、2019 年分离强毒株 WF03 的亲缘关系较近。安全性试验显示, FJ19 株以 10^{4.0}EID₅₀·羽⁻¹ 的剂量(10 羽份)点眼接种 14 日龄 SPF 鸡后有 40% 出现轻度眼炎症状, 而口服接种 SPF 鸡未表现出明显的临床症状; 当以 10^{4.0}EID₅₀·羽⁻¹ 的剂量气管途径接种 21 日龄 SPF 鸡时有 30% 鸡出现一过性的呼吸道反应, 未发生严重的 ILTV 感染典型症状。免疫后强毒攻毒结果显示, FJ19 株以 0.2 羽份或 1 羽份的剂量点眼或口服途径免疫 14 日龄 SPF 鸡 21 d 后, 采用 ILTV 强毒株以 10^{4.0}EID₅₀·只⁻¹ 的剂量气管攻毒后, 所有免疫组的鸡均获得了至少 90% 的保护, 未观察到明显的临床症状, 而未免疫攻毒组至少有 90% 的鸡出现了严重的 ILTV 感染典型症状, FJ19 株免疫后的免疫持续期至少可达 6 个月。ILTV FJ19 株采用尿囊腔途径接种可获得高滴度病毒含量, 其主要抗原基因和毒力基因与我国早期分离株和疫苗株相比未发生明显变异, 通过动物试验证实点眼或口服该弱毒株对 14 日龄 SPF 鸡具有良好的安全性和免疫有效性, 且免疫持续期可达 6 个月, 通过口服接种不影响其安全性和免疫有效性。因此, ILTV 弱毒株 FJ19 株不仅适应尿囊腔接种途径收获病毒, 且具备良好的安全性和免疫有效性, 还可适应口服接种途径进行免疫, 是一株理想的具有潜力的弱毒疫苗候选毒株。

关键词: 传染性喉气管炎; 弱毒株; 遗传进化; 安全性; 有效性

中图分类号: S852.659.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2026)02-0994-14

Phylogenetic Analysis of Key Genes and Evaluation of Safety and Efficacy as a Vaccine Candidate Strain for the Attenuated FJ19 Strain of Avian Infectious Laryngotracheitis Virus

WANG Chenyan¹, ZHANG Weijia¹, LIU Shan², LI Yajie², ZHAO Lixia², LIU Yuntao², HOU Bo^{1*}

(1. Fujian Animal Disease Control Technology Development Center, Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China;

收稿日期: 2025-06-16

基金项目: 河北省中央引导地方科技专项项目(246Z2905G); 福建省农业科学院优秀科技创新人才专项(YCZX202508)

作者简介: 王晨燕, 主要从事兽医传染病防控技术研究, E-mail: 15396022617@163.com

* 通信作者: 侯博, 主要从事兽医传染病防控技术研究, E-mail: houbohouwei@126.com

2. Ringpu (Baoding) Biological Pharmaceutical Co. Ltd., Baoding 071030, China)

Abstract: This study aimed to analyze the genetic relatedness of key antigenic and virulence genes in the attenuated FJ19 strain of infectious laryngotracheitis virus (ILTV), and to evaluate its safety and immunogenic efficacy in specific-pathogen-free (SPF) chickens, thereby providing valuable groundwork for the development of an attenuated live vaccine derived from the ILTV FJ19 strain. The ILTV FJ19 strain was adapted through allantoic cavity inoculation in chicken embryos, with sequencing confirming immunogenic and virulence genes. Safety tests were assessed in 14-day-old SPF chickens. Protective efficacy was demonstrated by challenging vaccinated chickens (ocular/oral routes at 14 days) with virulent ILTV strain at 21 days post-vaccination (dpv). Vaccine durability was also determined. After serial passages in 10-day-old SPF chicken embryos via allantoic cavity inoculation, the EID_{50} values of harvested P0, P1, P2, and P3 viral suspensions were $10^{5.0}$, $10^{6.5}$, $10^{6.9}$, and $10^{6.5} \cdot mL^{-1}$, respectively. Genetic and phylogenetic analysis revealed: key immunogenic genes (*gB*, *gC*, *gD*, *UL32*) and virulence-associated genes (*gE*, *gI*, *TK*, *ICP4*, *gG*, *gH*, *gK*, *gL*, *gM*, *gN*) of FJ19 strain clustered closely with attenuated strains K317, Nobilis Laringovac®, LT Blen, Poulvac ILT®, Laryngo Vac and Chinese virulent isolates LJS09 (2009), ck/CH/LHLJ/120305 (2012), WF03 (2019). Safety assessment demonstrated: Ocular inoculation ($10^{4.0}$ EID_{50} per bird) caused mild conjunctivitis in 40% of 14-day SPF chickens, while oral administration showed no symptoms. Intratracheal challenge ($10^{4.0}$ EID_{50} per bird) of FJ19 strain in 21-day-old SPF chickens caused transient respiratory reactions in a minority (30%), with no severe ILTV-specific symptoms. Efficacy evaluation confirmed: Immunization (0.2 or 1 dose via ocular/oral routes) provided at least 90% protection against intratracheal challenge with virulent WF03 ($10^{4.0}$ EID_{50} per bird) at 21 dpv, with no clinical signs in immunized groups. However, at least 90% of unimmunized virus-challenged chickens developed characteristic severe ILTV infection symptoms. Vaccine-induced immunity persisted for ≥ 6 months. The results demonstrated that: The ILTV strain FJ19 achieves high-titer cultivation via allantoic cavity inoculation. Its major antigenic and virulence genes show no significant variation compared to early Chinese isolates and vaccine strains. The FJ19 strain demonstrated excellent safety and immunogenicity in 14-day-old SPF chickens, immunity duration reached 6 months, with oral administration maintaining safety and efficacy. Thus, adaptation to allantoic cavity inoculation of FJ19 strain yielded a virus suspension with optimal safety and immunogenicity, the attenuated ILTV FJ19 strain represents an ideal candidate for oral attenuated live vaccine development.

Keywords: infectious laryngotracheitis; attenuated strain; phylogenetic analysis; safety; efficacy

* **Corresponding author:** HOU Bo, E-mail: houbohouwei@126.com

传染性喉气管炎病毒(infectious laryngotracheitis virus, ILTV)属于疱疹病毒科、 α 疱疹病毒亚科传染性喉气管炎病毒属。ILTV感染鸡后引起传染性喉气管炎(infectious laryngotracheitis, ILT),主要危害成年鸡和产蛋鸡,造成死亡或产蛋下降,世界上许多国家都有该病的发病报道。ILTV是一种双链DNA病毒,基因组大小约155 kb,与其他疱疹病毒一样,该基因组包括长独特区、短独特区以及两端

的反向重复序列等结构,编码大量糖蛋白以及与毒力和病毒复制相关的蛋白。

ILTV最早于1925年在美国被首次发现,1959年我国首次在贵阳市发现该病毒。2019年4月开始山东省多个地区发生了多起商品肉鸡、地方品种肉鸡等感染ILTV的病例,临床主要表现为严重的咳血、呼吸困难以及呼吸道粘膜出血和充血^[1]。近年来仍不断有养殖场发生ILTV感染的报道^[1-4],国内

不同地区分离获得的 ILTV 分离株基因遗传进化存在差异。2018—2021 年,山东部分地区的商品肉鸡场分离获得 23 株 ILTV 分离株,*gB* 同源性分析显示与常用的 ILTV 疫苗株遗传关系相对较近^[5]。湖北省某肉鸡养殖场分离获得的 ILTV 毒株 *gJ* 蛋白存在 T441P 点突变,可导致 6 周龄鸡死亡^[6]。2021 年贵州省分离的 ILTV GZNY202112 株 *TK* 以及 *gD* 基因遗传进化分析显示与澳大利亚原产疫苗株 CSW-1、V1-99 亲缘关系最近^[7]。对 ILTV BT 临床分株进行了 *TK*、*ICP4*、*gB*、*UL32* 基因序列分析表明该毒株与国内其他流行毒株相似性大于 97%,属于同一进化分支,与美国强毒株 1874C5 和国内标准强毒株 WG 株差异较大,但与 K317、Serva、Laeyngo 和 LTBlén 等弱毒疫苗株保持一致^[8]。

ILT 临床防控选用弱毒活疫苗接种可达到良好的免疫效果,主要是可激发良好的细胞免疫。ILTV 弱毒疫苗株的选育主要通过两种途径获得,一是将强毒株通过连续鸡胚传代或组织培养进行毒力致弱,二是从自然感染的亚临床症状鸡群分离获得自然弱毒株。通过鸡胚或细胞传代致弱方式获得制备疫苗用弱毒株存在着毒株毒力返强等不确定性,而自然弱毒株具有毒性低、副作用小、免疫原性好等优点。SA2 株是从澳大利亚分离到的一株自然弱毒株,已被开发制备为 SA2 株活疫苗,于 1965 年开始在澳大利亚广泛应用,获得满意结果,是目前国际上公认较好的疫苗用毒株^[9]。当前我国唯一生产的 ILTV 活疫苗 K317 株是通过致弱获得,该疫苗在推广使用时,不得用于 5 周龄以下的鸡,且具有明显的副作用,并且疫苗生产时经绒毛尿囊膜(chorioallantoic membrane, CAM)途径接种鸡胚导致疫苗生产效率不高。为应对当前我国肉鸡和小日龄鸡的 ILTV 感染,开发具有自主知识产权的、适应尿囊腔接种生产的无毒力返强的、高效安全、可饮水免疫的新型 ILT 疫苗是预防和控制 ILTV 感染和 ILT 暴发的重要手段。本研究对分离鉴定的自然弱毒株 FJ19 株通过繁殖性能测定、抗原基因和毒力基因遗传演化分析,安全性、点眼和口服接种的免疫有效性、与 K317 疫苗有效性比较等方面,综合评估 FJ19 毒株作为弱毒疫苗候选毒株的潜力。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

含 1% 庆大霉素的胰蛋白磷酸盐肉汤(TPB),

购自 Sigma 公司;1-5TM 2×High Fidelity master Mix 购自 MCLAB 公司;DNA 胶回收试剂盒购自 Thermo Fisher 公司,平末端载体 pClone007 试剂盒购自擎科生物科技有限公司;DNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司;荧光定量 PCR 试剂和病毒 DNA 提取试剂盒(磁珠法)购自南京诺维赞生物科技股份有限公司;SPF 种蛋购自济南斯帕法斯家禽有限公司,SPF 鸡用 SPF 种蛋自行孵化和饲养;引物、探针合成以及基因测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 试验病毒毒株

ILTV 强毒株 WF03 株(专利号:ZL202110385416.X)^[10]和 ILTV 天然弱毒株 FJ19 株(鸡胚绒毛尿囊膜接种)均由福建省农业科学院畜牧兽医研究所鉴定和保存。ILTV 强毒株王岗株(WG)(国家兽医微生物菌(毒)种保藏中心,保藏编号:CVCC AV195)由瑞普(保定)生物药业有限公司保存。WF03 株、王岗株、FJ19 株的无菌检验、外源病毒检验、支原体检验均符合中华人民共和国兽药典三部(2020 年版)的质量标准。K317 毒株为商品化市售疫苗。FJ19 株的每羽份病毒含量暂定为 10³ EID₅₀/羽份。弱毒株接种或强毒株攻毒后,当动物出现咳血、张口呼吸(严重喘气)、严重眼炎中的任一临床症状,则判定为 ILTV 感染发病;对出现的死亡鸡随时解剖,观察喉头、气管等有血凝块或黄色酪状物栓塞时判定该只鸡为 ILTV 感染发病。

1.3 ILTV 弱毒 FJ19 株尿囊腔途径接种的适应、扩繁与 ILTV 病毒 EID₅₀测定

将保存的原始 ILTV 弱毒 FJ19 株病毒液(采用鸡胚绒毛尿囊膜接种途径获得)以 TPB 连续 10 倍稀释,取 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释度采用鸡胚尿囊腔途径接种 10 日龄 SPF 鸡胚,每个稀释度接种 6 枚,接种量为 0.2 mL·胚⁻¹,继续孵化 7 d,每日检查鸡胚存活情况,弃去 24 h 内死亡鸡胚,7 d 后对存活鸡胚和死亡鸡胚检查绒毛尿囊膜,绒毛尿囊膜出现灰白色病斑则判定为阳性。取最高稀释度的阳性绒毛尿囊膜以 1:5 的比例加入预冷的 PBS 进行研磨,反复冻融 3 次,12 000 r·min⁻¹,4 °C 离心 10 min,取上清病毒液采用同样方式继续传代 4 次以适应尿囊腔途径接种,将第 5 次收获的阳性病毒液记为 FJ19 株 P0 代。

采用尿囊腔途径以一定倍数稀释后接种 10 日龄 SPF 鸡胚,7 d 后收获绒毛尿囊膜并按照上述方

法制备病毒液,依次传代制备不同代次的病毒液,分别记为P1代、P2代、P3代等,并按照中华人民共和国兽药典三部(2020年版)进行无外源病毒、无支原体、无菌检验。

所有待测EID₅₀的ILTV病毒液以TPB连续稀释成10^{-3.6}、10^{-4.2}、10^{-4.8}、10^{-5.4}和10^{-6.0}5个稀释度,从高稀释度到低稀释度经CAM接种病毒液,每个稀释度接种6枚胚,每胚接种0.2 mL,置37℃继续孵化7 d,每天检查鸡胚存活情况并作记录。同时取6个SPF鸡胚以同样方式接种TPB作为阴性对照。弃去接种后24 h内的死亡鸡胚,每个稀释度应至少有4个鸡胚存活,阴性对照鸡胚在接种后第2~7日不应该有死亡出现,试验才有效。接种24 h后死亡的鸡胚判定感染阳性,接种第7日后对所有存活鸡胚进行检查,当鸡胚绒毛尿囊膜有明显增厚出现白色病斑,判为感染阳性。采用Reed-Muench法计算鸡胚半数感染量EID₅₀,重复测定3次,至少2次测定

试验成立,结果才有效。

1.4 ILTV FJ19株的主要免疫原基因和毒力基因的扩增与测序

将100 mL ILTV FJ19株P1代病毒液以45 000 r·min⁻¹,4℃离心4.5 h,弃去上清后将沉淀物使用DNA提取试剂盒按照说明书提取基因组DNA后,采用表1中的引物分别对免疫原性基因*gB*、*UL32*、*gD*、*gC*和参与毒力形成的基因*TK*、*ICP4*、*gG*、*gE*、*gI*、*gH*、*gL*、*gK*、*gM*、*gN*进行PCR扩增。反应体系:1-5™ 2×High Fidelity master Mix 25 μL,上、下游引物各1 μL,DNA模板2 μL,ddH₂O 21 μL;反应条件:98℃ 2 min;98℃ 10 s,56℃ 15 s,72℃ 30 s,共30个循环;72℃ 5 min。扩增结束后,将PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳,将目的条带切胶并利用DNA胶回收试剂盒回收PCR产物。

表1 PCR扩增使用的引物名称和序列

Table 1 Primers name and sequence of this study used

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Prime Sequence	产物长度/bp Size
<i>gK</i>	F: GCATACACAACGGTTGAGAC; R: GGAATCTACTCGCCAGGACG	2 216
<i>gG</i>	F: CTGACCGCTAGCCCATACAG; R: TCCAGTGCAAGTTCGTCTC	1 416
<i>gE</i>	F: CAGTATCGGACACGGACTGG; R: CGGGTTGACTGGAAACGGTA	1 894
<i>gC</i>	F: AGACTGTCGCCTCGAACTG; R: TTGGTCAAACTGCAAAGCG	1 983
<i>gL</i>	F: ACTGTAACAGCGTCTCACC; R: TACCGGAGACAGAAGAGGGG	1 377
<i>gN</i>	F: ATTGCAAGGAATCGAGGCCA; R: TACTTCTTCGCCTCCTCCGA	692
<i>gM</i>	F: CCCCACAACCATCGACAGAA; R: GCTGAGATCGCATCCGTACA	1 722
<i>gD</i>	F: TACCGCTGGCCAAAGTACAG; R: TAGTCTGTTCGAGGCGGAGA	1 850
<i>gB</i>	F: GACAGTCGATGCTTCTATGCC; R: ATGCAATCCTACATCGCCGT ^[22]	2 799
<i>gH</i>	F: TGCTTCTTTGACGGAGCCAT; R: CCGAGACGGCAAGTTCTCTT	2 617
<i>gI</i>	F: CCTCCAGAAGACTCGGAGGA; R: CCGGAACGTTTCTGGGATCA	1 789
<i>TK</i>	F: CATGACTACAATTTTGCCC; R: ACGAACCCATATCAGCATT ^[22]	1 251
<i>UL32</i>	F: GGTATGAGATGTAGCGATGG; R: GGTAGTTTGTAGTTTATGCATCGGTA ^[22]	2 023
<i>ICP4</i> ₁	F: TGCTTTTCTTGCAGCGTCTA; R: TCTTGTCTCAGAACGTGCCC	2 244
<i>ICP4</i> ₂	F: CGTGAGTGAGGAAGGGG; R: GGTACAGACGGGTCGGT ^[22]	2 668
<i>ICP4</i> ₃	F: GGCATCCCGTACTCTTCGAG; R: TCACTCGGGTCTTGTCTG	1 272

将回收到的PCR产物连接到平末端载体pClone007中转化感受态细胞DH5α后涂布含氨苄抗生素的平板,每个基因均筛选5个克隆子(菌液)送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.5 病毒FJ19株关键抗原基因和毒力基因遗传演化分析

从NCBI下载ILTV国内外主要分离株和疫苗株的基因组序列(表2),使用DNASar软件和

Geneious 软件对参考毒株和分离毒株的免疫原性基因 *gB*、*UL32*、*gC*、*gD* 和毒力相关基因 *TK*、*ICP4*、*gG*、*gE*、*gI*、*gH*、*gL*、*gK*、*gM*、*gN* 进行分析和串联拼接,对拼接后的序列采用 MEGA7 软件中的 ClustalW 算法对所有序列进行多重序列比对后,以邻接(Neighbor-Joining, NJ)法中重复数 1 000 计算 bootstrap 值构建免疫原性基因 *gB-gC-gD-UL32* 和毒力相关基因 *gE-gI-TK-ICP4-gG-gH-gK-gL-gM-*

gN 的进化树,重点关注 ILTV FJ19 病毒基因序列与国内外的弱毒株 A20(NCBI 登录号: JN596963)、K317(NCBI 登录号: JX458824)、LT Blen(NCBI 登录号: JQ083493)、Laryngo Vac(NCBI 登录号: JQ083494)、Poulvac ILT®(NCBI 登录号: KP677882)、Rus/Ck/Tatarstan/2009/1643(NCBI 登录号: MF405079)、Nobilis Laringovac®(NCBI 登录号: KP677881)之间的遗传进化的亲缘关系。

表 2 ILTV 参考毒株信息

Table 2 ILTV reference strain information

菌株名 Strain name	GenBank 登陆号 GenBank accession No.	国家 Country	年 Year
VFAR-043	MG775218	秘鲁 Peru	2014
USDA reference	JN542534	美国 USA	2012
LJS09	JX458822	中国 China	2009
WG	JX458823	中国 China	2012
CSW-1	JX646899	澳大利亚 Australia	1970
30678/14/Ko	MH937565	韩国 South Korea	2014
ACC78/	JN804826	澳大利亚 Australia	2011
4787/80	KP677885	意大利 Italy	1980
193435/07	KP677883	意大利 Italy	2007
A489	KY423284	美国 USA	2017
27_CSW-1/V1-99	MF156852	澳大利亚 Australia	2016
J2	MF417808	美国 USA	2017
Rus/Ck/Penza/2013/2701	MF405080	俄罗斯 Russia	2013
ILTV. 319/19	MK895002	澳大利亚 Australia	2019
ck/CH/LHLJ/120305	MT876619	中国 China	2012
40798/10/Ko	MH937566	韩国 South Korea	2010
7b	MN335811	澳大利亚 Australia	2016
CAN/QC-2236832	OL354140	加拿大 Canada	2019
CAN/QC-2301711	OK646550	加拿大 Canada	2020
CAN/ON-2462242	OK624781	加拿大 Canada	1987
CAN/ON-2462241	OK573459	加拿大 Canada	2021
live attenuated strain			
A20	JN596963	澳大利亚 Australia	2011
K317	JX458824	中国 China	2012
LT Blen	JQ083493	美国 USA	2011
Laryngo Vac	JQ083494	美国 USA	2011
Poulvac ILT(R)	KP677882	意大利 Italy	2015
Rus/Ck/Tatarstan/2009/1643	MF405079	俄罗斯 Russia	2017
Nobilis Laringovac(R)	KP677881	意大利 Italy	2015

1.6 病毒FJ19株对SPF鸡的安全性评价

将测定过EID₅₀的FJ19株P0代病毒液以10羽份、1羽份和0.2羽份的剂量采用点眼和口服途径分别接种14日龄SPF鸡,每个剂量每个途径各接种10只鸡,同时另取10羽鸡不接种作为空白对照。另取21日龄SPF鸡10只,每只鸡经气管接种10羽份(0.2 mL)的FJ19株的病毒液,同时另取10只鸡不接种作为空白对照。每日对所有鸡进行观察两次,共观察14 d,每天记录每只鸡的临床表现和发病情况。

1.7 病毒FJ19株不同剂量免疫的排毒检测

将测定过EID₅₀的FJ19株P0代病毒液以10羽份、1羽份、0.2羽份的剂量以点眼途径和口服途径免疫14日龄SPF鸡,每个剂量每个途径各免疫5只鸡,同时另取10羽鸡不免疫作为空白对照。免疫后的第1、3、5、8、11和14天每只鸡采集口咽拭子和泄殖腔拭子,放入含2 mL PBS的5 mL离心管中,−70℃保存,采集的不同拭子按照中华人民共和国行业标准(NY/T 556—2020,鸡传染性喉气管炎诊断技术)进行样品前处理和核酸提取,用荧光定量PCR方法检测ILTV FJ19株的免疫后排毒情况,根据标准曲线计算每个样品的拷贝数。

1.8 病毒FJ19株与商品化K317疫苗的免疫有效性比较

将商品化的K317疫苗和FJ19株病毒液按照《中国兽药典三部(2020版)》推荐的点眼免疫途径分别免疫14日龄SPF鸡20羽,免疫剂量为0.2羽份·鸡^{−1}。免疫21 d后,取免疫K317疫苗和FJ19株的鸡各10羽和未免疫鸡10羽,采用气管攻毒方式以王岗株攻毒(每鸡0.2 mL病毒液含ILTV病毒10^{4.0}EID₅₀);另取免疫K317疫苗和FJ19株的鸡各10羽和未免疫鸡10羽,采用气管攻毒方式以WF03株攻毒(每鸡0.2 mL病毒液含ILTV病毒10^{4.0}EID₅₀),同时以未免疫不攻毒的10羽鸡作为阴性对照。攻毒后,每日对所有鸡进行观察两次,共观察14 d,每天记录每只鸡的发病情况。

1.9 病毒FJ19株口服和点眼免疫的免疫保护效果比较

参照中华人民共和国兽药典(2020版)K317毒株质量标准所规定的每羽份病毒含量,将FJ19株免疫14日龄SPF鸡,以0.2羽份·鸡^{−1}的剂量通过点眼和口服途径各免疫10羽,以1羽份·鸡^{−1}的剂量通过点眼和口服途径各免疫10羽。免疫21 d后,连同未免疫的鸡10羽,以气管攻毒方式进行WF03株攻

毒(每鸡0.2 mL病毒液含ILTV病毒10^{4.0}EID₅₀),另取未免疫不攻毒的10羽鸡作为阴性对照。在攻毒后的第1、3、5、8、11和14天每组随机采集5只鸡(攻毒对照10只鸡全部采集)的口咽拭子和泄殖腔拭子,用荧光定量PCR方法检测ILTV排毒情况,同时每日对所有鸡进行观察两次,共观察14 d,每天记录每羽鸡的发病情况。

1.10 病毒FJ19株的免疫持续期测定

将70羽14日龄SPF鸡分为2组,其中一组30羽,以点眼方式接种FJ19、接种剂量均为每羽鸡10^{3.0}EID₅₀;另一组40羽,不免疫接种。免疫接种后4、5和6月时,两组分别取10羽鸡以强毒株ILTV WF03株进行气管攻毒,攻毒剂量0.2 mL·羽^{−1},病毒含量为10^{4.0}EID₅₀,攻毒后每日对所有鸡进行观察两次,共观察14 d,每天记录每羽鸡的发病情况。最后一次攻毒后的第4、8、11和14天采集口咽拭子,用荧光定量PCR方法检测ILTV排毒情况。

1.11 ILTV荧光定量PCR的检测

利用2.3中构建并测序正确的gC克隆子扩大培养后提取质粒,测定质粒浓度后以10倍倍比连续稀释,制备不同浓度的标准质粒。利用病毒DNA提取试剂盒(磁珠法)提取病毒DNA,采用标准中ILTV的荧光定量PCR检测引物(gCU771: 5′-CCTTGCGTTTGAATTTTCTGT-3′和gCL873: 5′-TTCGTGGGTAGAGGTCTGT-3′)、探针(gCprobe817: 5′-FAM-CAGCTCGGTGACCCC-ATTCTA-BHQ1-3′)和方法对不同样品中的ILTV进行检测^[11],当样品Ct值≤35,且出现标准的S形扩增曲线,判为阳性;当样品无Ct值或Ct值>38,且无标准扩增曲线,判为阴性;当样品Ct值在“35<Ct值≤38”,且扩增曲线均呈标准的S形曲线,判为可疑,同时以标准质粒稀释后设定ILTV标准曲线。

2 结 果

2.1 FJ19株适应尿囊腔途径接种

经鸡胚绒毛尿囊膜接种收获的FJ19株病毒液经多次克隆、纯化以及尿囊腔接种适应,FJ19株P0代开始已完全适应尿囊腔接种,绒毛尿囊膜产生了明显的灰白色病斑等典型病变(图1),病毒含量测定表明P0、P1、P2、P3代收获的病毒液分别为10^{5.0}EID₅₀·mL^{−1}、10^{6.5}EID₅₀·mL^{−1}、10^{6.9}EID₅₀·mL^{−1}、10^{6.5}EID₅₀·mL^{−1},可作为候选疫苗株,P1代开始已达到工业化疫苗生产的标准,且各代病毒液的纯净

性检验结果符合中华人民共和国兽药典(2020年版)规定。

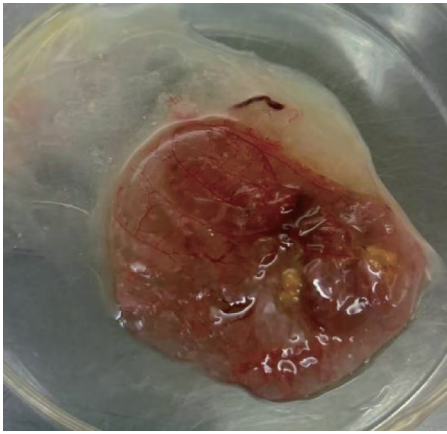


图1 ILTV FJ19株经尿囊腔途径接种10日龄SPF鸡胚后P0代绒毛尿囊膜病变(灰白色病斑)

Fig. 1 P0 ILTV FJ19 allantoic inoculation: Grayish-white CAM pocks in 10-day SPF embryos

2.2 FJ19株的关键免疫原基因和毒力基因的遗传进化分析

对串联的免疫原性基因 *gB-gC-gD-UL32* 的遗传进化分析显示:FJ19株与中国2009年的分离株LJS09株、2012年的分离株ck/CH/LHLJ/120305株、2019年的分离强毒株WF03、疫苗株K317和Nobilis Laringovac®处在一个较大的进化分支上,但

与疫苗株Poultvac ILT®、Laryngo Vac和LT Blen处在同一个分支上且亲缘关系最近(图2A);而与国内早期分离的强毒株王岗株(WG)和弱毒株A20、Rus/Ck/Tatarstan/2009/1643、ILTV. 319/19处在不同分支上,遗传关系最远。通过对FJ19株与参考毒株的基因序列比对显示:*gB*基因与参考毒株的相似性为99.73%~100%,其中与WF03株和王岗株(WG)的相似性分别为99.92%和99.73%;*gC*基因与参考毒株的相似性为99.68%~100.00%,与WF03株和王岗株的相似性均为100%;*gD*基因与参考毒株的相似性为99.08%~100.00%,与WF03株和王岗株的相似性均分别为100%和99.08%;*UL32*基因与参考毒株的相似性为99.89%~100.00%,与WF03株和王岗株的相似性均分别为100%和99.89%。

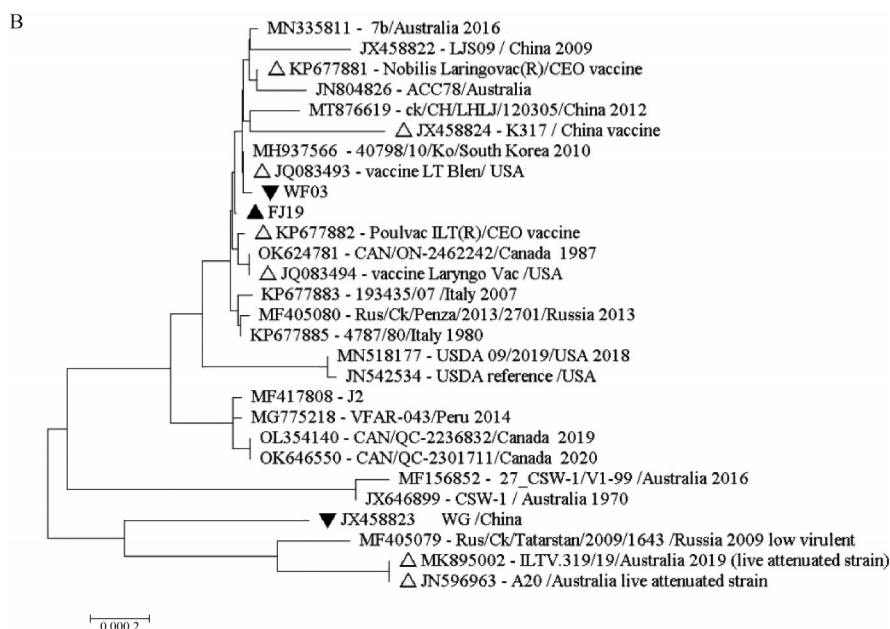
对串联的毒力相关基因 *gE-gI-TK-ICP4-gG-gH-gK-gL-gM-gN* 的遗传进化分析显示:FJ19株与弱毒株K317、Nobilis Laringovac®、LT Blen和强毒株WF03和我国2012年分离株ck/CH/LHLJ/120305、2009年分离株LJS09或澳大利亚2016年分离株7b株的亲缘关系同处在一个较大分支,亲缘关系较近,其次与弱毒株Poultvac ILT®和Laryngo Vac的亲缘关系较近,与强毒株王岗株和澳大利亚弱毒株A20和ILTV. 319/19的亲缘关系最远(图2B)。



(图2 Fig.2)

(转下页 Carried forward)

(续图2 Continued)



通过FJ19株与参考毒株的基因序列比对显示:*gE*基因与参考毒株的相似性为99.47%~100.00%,与WF03株和王岗株的相似性均分别为99.93%和99.87%;*gI*基因与参考毒株的相似性为98.81%~100.00%,与WF03株和王岗株的相似性均分别为100%和98.99%;*TK*基因与参考毒株的相似性为99.63%~100.00%,与WF03株和王岗株的相似性均分别为100%和99.63%;*ICP4*基因与参考毒株的相似性为98.75%~99.98%,与WF03株和王岗株的相似性均分别为99.96%和99.80%;*gG*基因与参考毒株的相似性为98.29%~99.89%,与WF03株和王岗株的相似性均分别为99.89%和98.29%;*gH*基因与参考毒株的相似性为99.59%~100.00%,与WF03株和王岗株的相似性均分别为100%和99.59%;*gK*基因与参考毒株的相似性为99.71%~100.00%,与WF03株和王岗株的相似性均为100%;*gL*基因与参考毒株的相似性为99.44%~100.00%,与WF03株和王岗株的相似性均为100%;*gM*基因与参考毒株的相似性为99.66%~100.00%,与WF03株和王岗株的相似性均分别为100%和99.92%;*gN*基因与参考毒株的相似性为99.44%~100.00%,与WF03株和王岗株的相似性均分别为100%和99.44%。

2.3 FJ19株对14日龄SPF鸡的安全性

将毒株FJ19病毒液以10倍剂量(10^4 EID₅₀)点眼接种14日龄SPF鸡,在接种后第3~7天有4只鸡陆续出现了轻微的眼炎和流泪(图3),3d内均全部恢复,在整个观察期内未出现死亡、咳血、咳嗽、喘气、张口呼吸等ILTV感染的典型呼吸道症状,精神状态正常。气管途径注射接种10羽份病毒液(0.2 mL含 10^4 EID₅₀)的21日龄SPF鸡,未出现死亡和咳血、严重喘气和呼吸困难的临床症状,在接种后第3~5天仅有30%的鸡出现了短暂的一过性轻微的呼吸道反应。口服途径接种不同剂量的鸡和空白对照鸡在整个观察期内均未观察到ILTV感染后的典型临床症状。

2.4 病毒FJ19株不同剂量免疫的排毒检测

通过荧光定量PCR方法对FJ19株以10羽份、1羽份、0.2羽份的剂量经点眼和口服途径免疫14日龄SPF鸡后的口咽拭子和泄殖腔拭子进行检测,结果发现:口咽拭子的病毒量远高于泄殖腔拭子(图4);其次接种剂量越高,排毒高峰出现越早,10羽份和1羽份接种组在接种后1d口咽途径开始出现明显排毒,接种后第3和5天排毒达到高峰,0.2羽份点眼接种在接种后第3和5天排毒达到高峰,而口服接种在接种后第5和8天排毒达到高



图3 ILTV FJ19病毒液以10倍剂量(10^4 EID₅₀)点眼免疫14日龄SPF鸡出现眼炎和流泪的临床表现

Fig. 3 Ocular immunization of 14-day-old SPF chickens with ILTV FJ19 strain (10^4 EID₅₀) via eye-drop route developed clinical conjunctivitis and epiphora

峰(图4)。

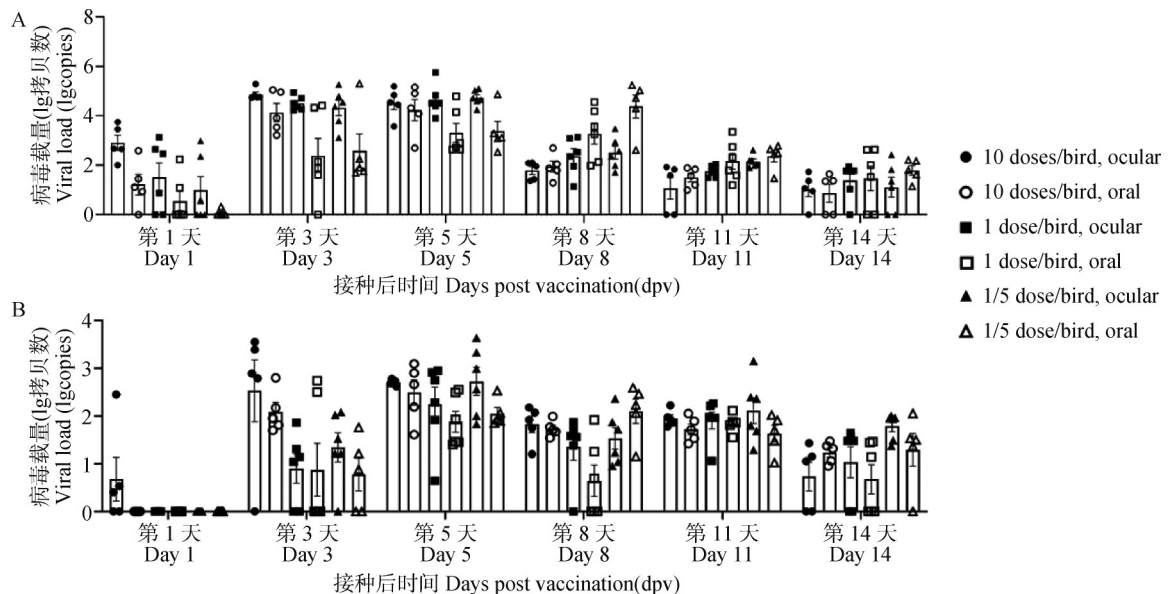
2.5 病毒FJ19株与商品化K317疫苗的免疫原性比较

将病毒FJ19株与商品化K317疫苗点眼免疫14

日龄SPF鸡21 d,采用强毒王岗株和WF03株进行攻毒,结果显示强毒王岗株攻毒对照组发病率为80%,主要临床表现为严重的眼炎、呼吸困难和死亡;而WF03株攻毒对照组发病率90%,主要表现为张口呼吸和死亡,两组攻毒对照组均成立。FJ19株和商品化K317疫苗免疫的鸡经王岗株攻毒后的保护率分别为80%和100%,经WF03株攻毒后的保护率分别为100%和70%(见表3)。

2.6 病毒FJ19株口服和点眼免疫的免疫保护效果比较

病毒FJ19株以0.2羽份或1羽份经点眼或口服途径免疫14日龄SPF鸡21 d后,WF03株攻毒结果显示:攻毒对照组发病率90%,主要表现为死亡、咳血和严重的张口呼吸等特异性的ILTV感染症状(其中3只鸡出现死亡),而0.2羽份和1羽份剂量的点眼或口服组的攻毒保护率均达100%,未观察到明显的特异性临床症状。对攻毒后的强毒排毒检测结果显示:强毒株主要以口咽途径排毒,排毒量较高,泄殖腔排毒量很低(数据未展示);而0.2羽份和1羽份经点眼或口服途径免疫的鸡基本不排毒(表4)。



A. 口咽拭子; B. 泄殖腔拭子

A. Oropharyngeal swabs; B. Cloacal swabs

图4 不同剂量FJ19株病毒液经点眼和口服途径免疫14日龄SPF鸡后的排毒检测结果

Fig. 4 Viral shedding detection in 14-day-old SPF chickens immunized with variable doses of ILTV FJ19 strain suspension via ocular or oral routes

2.7 FJ19株的免疫持续期

以1羽份点眼接种14日龄SPF鸡在免疫后4、5

和6月时以WF03强毒株攻毒,结果显示:未免疫未攻毒鸡未观察到可见的特异性临床症状,未免疫的

表3 病毒FJ19株与商品化K317疫苗免疫后采用强毒王岗(WG)株和WF03株攻毒免疫保护结果

Table 3 Protective efficacy of immunization with FJ19 strain and commercial K317 vaccine against challenge with virulent WG and WF03 strains

组别 Groups	免疫毒株和剂量 Immunizing strain and dose	攻毒毒株 Challenge strain	发病率/% Incidence rate	保护率/% Protection rate of vaccination
G1	No vaccine	WF03	90	—
G2	FJ19, 0.2 dose/bird	WF03	0	100 (10/10)
G3	K317, 0.2 dose/bird	WF03	30	70 (7/10)
G4	No vaccine	WG	80	—
G5	FJ19, 0.2 dose/bird	WG	20	80 (8/10)
G6	K317, 0.2 dose/bird	WG	0	100 (10/10)
G7	No vaccine	No challenge	0	—

表4 病毒FJ19株免疫14日龄SPF鸡21 d后经WF03强毒株攻毒后的排毒检测结果

Table 4 Viral shedding detection in 14-day-old SPF chickens challenged with virulent WF03 strain at 21 days post-immunization with FJ19 strain

攻毒后时间 Days post challenge	免疫剂量 Immunizing dose	实时PCR Ct值 Ct values of real-time PCR									
		点眼途径 Ocular routes						口服途径 Oral routes			
第1天 Day 1	1 dose/bird	N ^a	35.8 ^b	35.2	N	36.8	36.4	N	N	N	N
	0.2 dose/bird	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	No Vaccine ^c	22.91	24.86	25.16	26.09	25.97	27.12	25.53	26.4	25.17	25.61
第3天 Day 3	1 dose/bird	N	34.74	N	N	N	N	37.69	33.07	N	N
	0.2 dose/bird	N	36.19	N	N	N	N	36.23	N	N	N
	No vaccine	25.45	25.67	25.22	25.1	22.82	24.46	24.46	24.78	22.85	24.67
第5天 Day 5	1 dose/bird	N	33.47	N	N	N	N	36.93	36.15	N	N
	0.2 dose/bird	N	37.11	N	N	N	N	32.76	N	N	N
	No vaccine	29.89	33.79	32.56	32.9	31.57	30.75	31.86	26.37	29.60	31.27
第8天 Day 8	1 dose/bird	N	N	N	N	N	N	37.90	N	N	N
	0.2 dose/bird	N	31.18	37.2	N	N	N	N	N	N	N
	No vaccine	N	36.84	37.48	34.99	36.06	N	N	— ^d	—	—
第11天 Day 11	1 dose/bird	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	0.2 dose/bird	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	No vaccine	N	N	N	N	N	N	N	—	—	—
第14天 Day 14	1 dose/bird	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	0.2 dose/bird	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
	No vaccine	N	N	N	N	N	N	N	—	—	—

^a. 未检测到Ct值; ^b. Ct值; ^c. 攻毒对照组Ct值不分点眼或口服方式接种; ^d. 死亡禽类, 未进行检测

^a. No detectable Ct value; ^b. Ct value; ^c. Ct values do not differ between ocular and oral administration; ^d. Dead poultry with no testing conducted.

鸡在攻毒后的观察期内的发病率分别为90% (9/10), 100% (10/10)、80% (8/10), 表现为咳血和张口呼吸等特异性临床症状, 未见死亡; 而免疫的鸡在攻毒后的观察期内发病率分别为0% (0/10), 0% (0/10)、10% (1/10)。采用荧光定量PCR检测口咽拭子排毒结果显示: 免疫鸡除攻毒后发病的鸡具有

较高的排毒量外, 其余鸡均未有明显排毒。对免疫后6个月的免疫攻毒鸡和攻毒对照鸡进行荧光定量PCR检测显示在攻毒4 d后免疫鸡和攻毒对照鸡的口咽拭子荧光定量平均Ct值分别为37.27和22.61, 其阳性率分别为1/10和10/10。因此, FJ19株免疫14日龄的SPF鸡, 其免疫持续不少于6个月。

3 讨论

近年来,我国多地养殖场陆续报告鸡传染性喉气管炎病毒(ILTV)感染病例,涉及肉鸡和蛋鸡多个品种,其不论是严重感染还是温和型感染都给生产带来了严重的威胁和损失。疫苗接种和生物安全管理被认为是控制ILT的有效策略。K317弱毒株是目前我国动物生物制品企业生产ILTV弱毒活疫苗的唯一毒株,主要通过绒毛尿囊膜途径接种SPF鸡胚后收获绒毛尿囊膜研磨,经一系列生产工艺制备成冻干疫苗。该疫苗在临床使用时具有明显的副作用,比如较为严重的眼炎,且不得用于5周龄以下的鸡。此外,在生产工艺中采用鸡胚绒毛尿囊膜接种易出现鸡胚使用率不高和疫苗生产效率低下等问题。因此急需对小日龄鸡安全性高、有效性好、免疫持续期长,使用方便(可饮水免疫),生产工艺相对简单和培养滴度高的新的ILTV弱毒活疫苗株。

为解决K317大规模生产效率问题,疫苗企业不断尝试用鸡胚尿囊腔接种法生产弱毒苗,有报道称采用尿囊腔接种和采用鸡胚绒毛尿囊膜接种二者收获的病毒含量差异不显著,均符合弱毒活疫苗的质量标准要求^[12]。本研究将前期分离、纯化获得的FJ19株在10日龄SPF鸡胚以尿囊腔途径接种连续传代适应后,收获P1、P2和P3代病毒液的EID₅₀分别为 $10^{6.5} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $10^{6.9} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $10^{6.5} \cdot \text{mL}^{-1}$,已达到工业化生产制备疫苗的条件,证明FJ19株已经完全适应尿囊腔途径接种鸡胚,且具有足够的病毒滴度,因此该结果为FJ19株的大规模化和高效生产奠定了坚实基础。

糖蛋白gB、gC和gD以及UL32是ILTV重要的保护性抗原,可以诱导中和抗体和细胞免疫反应,并且还可以增强先天性和特异性免疫反应,是重要的免疫原蛋白^[5,10-11,13-16]。FJ19株的免疫原性基因gB-gC-gD-UL32的遗传进化分析显示与疫苗株Poultvac ILT[®]、Laryngo Vac和LT Blen处在同一个分支上且亲缘关系最近(图2A),与中国2009年的分离株LJS09株、2019年的分离强毒株WF03、疫苗株K317和Nobilis Laringovac[®]处在一个较大的进化分支上,而与国内早期分离的强毒株王岗株(WG)和弱毒株A20、ILTV. 319/19处在不同分支上,遗传关系最远。糖蛋白gE/gI对于ILTV病毒在细胞间扩散具有显著的作用^[16]。TK基因是

ILTV的主要毒力基因^[17],缺失TK可以使ILTV致病力减弱但仍具有免疫原性^[18],ICP4基因参与激活病毒早/晚期基因的表达,与病毒毒力存在关联^[19],糖蛋白gC是ILTV主要的表面抗原蛋白^[20],糖蛋白gG也是ILTV的毒力因子^[21],此外还有报道糖蛋白gD、gB、gH、gL、gK、gM、gN等参与了疱疹病毒致病性的形成^[22-25]。因此,对串联的毒力相关基因gE-gI-TK-ICP4-gG-gH-gK-gL-gM-gN的遗传进化分析显示:FJ19弱毒株与疫苗株K317、Nobilis Laringovac[®]、LT Blen、强毒株WF03和2009年分离株LJS09或澳大利亚2016年分离株7b株的亲缘关系同处在一个较大分支,亲缘关系较近,其次与弱毒株Poultvac ILT[®]和Laryngo Vac的亲缘关系较近,与强毒株王岗株和澳大利亚弱毒株A20和ILTV. 319/19的亲缘关系最远(图2B)。因此表明弱毒FJ19株与当前我国分离的ILTV强毒株和国内外使用的商品化活疫苗毒株的亲缘关系较近,无显著的基因突变或变异。

安全性是ILTV疫苗株首要考虑的问题。商品化的K317疫苗经1羽份点眼免疫35日龄的SPF鸡,可出现典型的眼炎等临床症状,有报道将K317株喉头气管注射接种8周龄SPF鸡后($10^{4.2} \text{EID}_{50} \cdot \text{羽}^{-1}$),未出现死亡,但部分鸡在感染7d后出现呼吸困难,发病鸡剖检可见喉头分泌物增多,气管有黏液^[2]。本研究将FJ19弱毒株通过10羽份剂量点眼接种14日龄SPF鸡,仅有40%鸡出现了轻微的眼炎或流泪;通过气管注射途径接种21日龄SPF鸡,未出现死亡、咳血、严重喘气和呼吸困难等严重的临床症状,仅在接种后3~5d有30%的鸡出现一过性轻微的呼吸道反应。SA2株是从澳大利亚分离到的ILTV自然弱毒株,是目前国际上公认较好的疫苗株^[9],该疫苗株经绒毛尿囊膜培养获得的病毒液通过气管注射接种55日龄SPF鸡(约 $10^{4.0} \text{EID}_{50} \cdot \text{羽}^{-1}$),结果有20%的鸡出现死亡^[26]。因此,与ILTV疫苗株K317株和SA2株相比,FJ19株在SPF鸡表现出良好的安全性。

ILTV疫苗的有效性至关重要。作为国际上公认较好的疫苗株SA2株^[9],其具有良好的有效性。SA2株经绒毛尿囊膜培养获得的病毒液点眼免疫(大于 $10^{7.0} \text{EID}_{50} \cdot \text{羽}^{-1}$)7和15日龄雏鸡,36日龄时用王岗株(WG)强毒株攻毒可100%获得保护,对照组鸡100%发病;同样用SA2株点眼免疫1月龄以上鸡,WG株攻毒后同样可获得100%保护,对照

组100%发病,其中死亡率为40%^[26]。由于鸡点眼免疫鸡胚源性(chicken embryo origin, CEO)ILTV疫苗会出现不良反应,而通过口服方式同时接种CEO疫苗和chIL-2不仅显著减轻疫苗对鸡的副作用,还能减少组织(特别是气管和结膜)中的病毒载量^[27]。英特威商品化的疫苗Nobilis BioTrach(鸡胚源)可饮水免疫,在免疫接种后4~5 d即可对鸡群产生保护力。将ILTV A20弱毒疫苗通过饮水途径大规模免疫肉鸡群后,拭子中的ILTV基因拷贝数在免疫7天后最高^[28]。本研究中将0.2羽份弱毒株FJ19株点眼接种14日龄SPF鸡,21 d后采用WG株或WF03株强毒株攻毒的免疫保护率分别达到80%和100%,同样14日龄SPF鸡采用0.2羽份口服接种可达到与点眼接种同样的免疫保护力。通过荧光定量PCR方法对攻毒的WF03强毒株排毒检测表明,点眼或口服免疫均可以有效阻止ILTV强毒的复制和排毒,攻毒后第11天不论采用何种接种方式均未在口咽和泄殖腔拭子中检测到核酸。结果表明与商品化K317疫苗株相比(每羽份大于 $10^{2.7}$ EID₅₀),FJ19株弱毒株具有良好的有效性,接种后可有效阻止ILTV强毒株的复制和排毒,显示其作为疫苗候选株的潜力。

目前,市场上ILTV的基因工程疫苗已推广使用,ILTV重组病毒载体活疫苗虽无潜伏感染、无毒力返强等优点,但免疫效力与ILT减毒活疫苗相比还有待提高,这主要是由于对ILT免疫保护依靠T细胞免疫^[29],攻毒结果显示鸡胚源性(CEO)ILTV弱毒苗免疫组(点眼免疫)的气管黏膜上皮保持完整,强毒株病毒可被迅速清除,组织源性(tissue culture origin, TCO)弱毒苗(点眼免疫)和rHVT-LT(胚内免疫)免疫组病毒清除受限,气管上皮完整性中度破坏^[30]。同样,采用威多妙喉痘(Vectormune® FP-LT)^[31]或FPV-LT(Vectormune®)疫苗^[32]免疫鸡群,强毒株攻毒后仅能提供部分保护,而鸡胚源性ILTV疫苗不论是临床症状减轻还是病毒复制载量下降方面,均显示单次免疫的效果最佳^[33]。FJ19株是鸡胚源性ILTV弱毒株,经点眼或口服途径免疫,对强毒攻击均具有优秀的保护效果,疫苗免疫后可以清除强毒并且阻止强毒株的复制,同时在免疫后4、5和6月采用强毒攻毒,仍然表现出良好的保护效果。因此,相比基因工程疫苗而言,弱毒FJ19株作为传统弱毒疫苗仍然具有良好的应用前景。

4 结 论

ILTV FJ19弱毒株经尿囊腔途径接种适应鸡胚后,EID₅₀显著提升,达到了疫苗产业化生产质量要求,经点眼或口服途径接种14日龄SPF鸡和气管注射21日龄SPF鸡证明FJ19株具有足够的安全性,并用强毒株攻毒显示出FJ19株具有优秀的免疫保护效果,可以阻止气管中强毒株的复制和排毒,并且在免疫后6个月强毒攻毒仍然具有良好的保护效果。综上所述,FJ19株可作为ILTV弱毒疫苗候选毒株,具有良好的安全性和有效性,可以通过口服(饮水)途径接种,在产业化生产中可适应尿囊腔途径接种且具有高滴度的EID₅₀,未来将按照我国新兽药注册管理办法等规章制度进一步完善实验室研究,开展更多相关临床试验进行验证FJ19株作为弱毒疫苗毒株的潜力。

参考文献(References):

- [1] 秦春芝,徐怀英,周 萌,等. 肉鸡传染性喉气管炎的发生和诊断及其PCR诊断方法的建立[J]. 家禽科学,2020(8):6-10.
QIN C Z, XU H Y, ZHOU M, et al. Diagnosis of infectious laryngotracheitis in broilers and establishment of PCR diagnostic methods[J]. *Poultry Science*, 2020 (8):6-10. (in Chinese)
- [2] 孔聪聪,赵 妍,张晓敏,等. 一株鸡传染性喉气管炎病毒的分离鉴定及TK基因分析[J]. 中国预防兽医学报,2012,34(12):955-958.
KONG C C, ZHAO Y, ZHANG X M, et al. Isolation, identification and TK gene analysis of an infectious laryngotracheitis virus strain [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2012, 34 (12) : 955-958. (in Chinese)
- [3] 李玉燕,巩新民,祝永华,等. 某种鸡场传染性喉气管炎病毒的分离与鉴定[J]. 中国兽医杂志,2020,56(7):50-51.
LI Y Y, GONG X M, ZHU Y H, et al. Isolation and identification of infectious laryngotracheitis virus in a breeding chicken farm [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2020, 56(7):50-51. (in Chinese)
- [4] 高晓磊,朱秀同,刘思桐,等. 一株鸡传染性喉气管炎病毒的分离鉴定[J]. 今日畜牧兽医. 2019,35(4):17-18.
GAO X L, ZHU X T, LIU S T, et al. Isolation and identification of a strain of avian infectious

- laryngotracheitis virus [J]. *Today Animal Husbandry and Veterinary*, 2019, 35(4):17-18. (in Chinese)
- [5] 秦卓明, 马秀丽, 亓丽红, 等. 2018~2021 年传染性喉气管炎在山东商品肉鸡中的发生和防控[J]. *家禽科学*, 2022(12):3-9.
- QIN Z M, MA X L, QI L H, et al. Occurrence and prevention of infectious laryngotracheitis in commercial broilers in Shandong from 2018 to 2021 [J]. *Poultry Science*, 2022(12):3-9. (in Chinese)
- [6] YI C, LI G, MU Y, et al. Isolation, identification, molecular and pathogenicity characteristics of an infectious laryngotracheitis virus from Hubei province, China[J]. *Poult Sci*, 2024, 103(2):103271.
- [7] 孙 芸, 温贵兰, 徐 飞, 等. 鸡传染性喉气管炎病毒 GZNY202112 的分离鉴定及其 TK、gD 基因的遗传进化分析[J]. *中国兽医科学*, 2023, 53(10):1270-1278.
- SUN Y, WEN G L, XU F, et al. Isolation and identification of ILTV strain GZNY202112 with genetic evolution analysis of TK and gD genes [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2023, 53(10):1270-1278. (in Chinese)
- [8] 高 昕, 罗园园, 杨慧明, 等. 1 株鸡传染性喉气管炎病毒的基因组特征与致病性[J]. *畜牧兽医学报*, 2022, 53(4):1298-1302.
- GAO X, LUO Y Y, YANG H M, et al. Genomic characteristics and pathogenicity of a strain of an avian infectious laryngotracheitis virus [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2022, 53(4):1298-1302. (in Chinese)
- [9] 张文生, 李富桂, 齐秀芬. 对鸡传染性喉气管炎 SA 2 株的初探[J]. *中国畜禽传染病*, 1993(1):51-53.
- ZHANG W S, LI F G, QI X F. Preliminary study on SA2 strain of infectious laryngotracheitis virus [J]. *Chinese Journal of Animal and Poultry Infectious Diseases*, 1993(1):51-53. (in Chinese)
- [10] 张 翼, 王晨燕, 杨 骁, 等. 鸡传染性喉气管炎病毒 WF03 株关键抗原基因和毒力基因的遗传演化与致病性分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2023, 54(8):3435-3444.
- ZHANG Y, WANG C Y, YANG X, et al. Phylogenetic analysis and pathogenicity of an avian infectious laryngotracheitis virus strain WF03 [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2023, 54(8):3435-3444. (in Chinese)
- [11] NY/T 556—2020 鸡传染性喉气管炎诊断技术[S]. 2021.
- NY/T 556—2020. Diagnostic techniques for avian infectious laryngotracheitis[S]. 2021. (in Chinese)
- [12] 靖 宁, 蒲 臻, 罗国喜. 鸡传染性喉气管炎弱毒疫苗生产工艺改进试验[J]. *现代畜牧兽医*, 2007(8):49.
- JING N, PU Z, LUO G X. Process improvement experiment for attenuated ILTV vaccine production [J]. *Modern Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2007(8):49.
- [13] 徐美玉, 赵 焯, 朱发江, 等. 表达 ILTV gB 和 UL32 基因的重组鸡痘病毒疫苗安全性及稳定性分析[J]. *中国兽医杂志*, 2015, 51(2):6-8.
- XU M Y, ZHAO Y, ZHU F J, et al. Safety and stability analysis of recombinant fowlpox virus vaccine expressing ILTV gB and UL32 genes [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2015, 51(2):6-8. (in Chinese)
- [14] LAZEAR E, WHITBECK J C, PONCE-DE-LEON M, et al. Antibody-induced conformational changes in herpes simplex virus glycoprotein gD reveal new targets for virus neutralization [J]. *J Virol*, 2012, 86(3):1563-1576.
- [15] ZHAO W, SPATZ S, ZHANG Z, et al. Newcastle disease virus (NDV) recombinants expressing infectious laryngotracheitis virus (ILTV) glycoproteins gB and gD protect chickens against ILTV and NDV challenges [J]. *J Virol*, 2014, 88(15):8397-8406.
- [16] DEVLIN J M, BROWNING G F, GILKERSON J R. A glycoprotein I- and glycoprotein E-deficient mutant of infectious laryngotracheitis virus exhibits impaired cell-to-cell spread in cultured cells [J]. *Arch Virol*, 2006, 151(7):1281-1289.
- [17] HAN M G, KWEON C H, MO I P, et al. Pathogenicity and vaccine efficacy of a thymidine kinase gene deleted infectious laryngotracheitis virus expressing the green fluorescent protein gene [J]. *Arch Virol*, 2002, 147(5):1017-1031.
- [18] SCHNITZLEIN W M, WINANS R, ELLSWORTH S, et al. Generation of thymidine kinase-deficient mutants of infectious laryngotracheitis virus [J]. *Virology*, 1995, 209(2):304-314.
- [19] JOHNSON M A, TYACK S G, PRIDEAUX C, et al. Nucleotide sequence of infectious laryngotracheitis virus (gallid herpesvirus 1) ICP4 gene [J]. *Virus Res*, 1995, 35(2):193-204.
- [20] PAVLOVA S P, VEITS J, BLOHM U, et al. *In vitro* and *in vivo* characterization of glycoprotein C-deleted infectious laryngotracheitis virus [J]. *J Gen Virol*, 2010, 91(4):847-857.

- [21] DEVLIN J M, BROWNING G F, HARTLEY C A, et al. Glycoprotein G is a virulence factor in infectious laryngotracheitis virus[J]. *J Gen Virol*, 2006, 87(10): 2839-2847.
- [22] CHOULJENKO D V, JAMBUNATHAN N, CHOULJENKO V N, et al. Herpes simplex virus 1 UL37 protein tyrosine residues conserved among all alphaherpesviruses are required for interactions with glycoprotein K, cytoplasmic virion envelopment, and infectious virus production[J]. *J Virol*, 2016, 90(22): 10351-10361.
- [23] MÖHL B S, CHEN J, PARK S J, et al. Epstein-barr virus fusion with epithelial cells triggered by gB Is restricted by a gL glycosylation site[J]. *J Virol*, 2017, 91(23):e01255-17.
- [24] VALLBRACHT M, REHWALDT S, KLUPP B G, et al. Functional relevance of the N-terminal domain of pseudorabies virus envelope glycoprotein H and its interaction with glycoprotein L[J]. *J Virol*, 2017, 91(9):e00061-17.
- [25] EL K I, LIPPE R. Herpes simplex virus 1 gN partners with gM to modulate the viral fusion machinery[J]. *J Virol*, 2015, 89(4):2313-2323.
- [26] 朱庆虎, 黄骏明, 郭连喜, 等. 鸡传染性喉气管炎病毒 SA₂ 疫苗株免疫效力的研究[J]. 中国预防兽医学报, 1999(2):62-64.
ZHU Q H, HUANG J M, GUO L X, et al. Study on immunogenicity of infectious laryngotracheitis virus SA₂ vaccine strain [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 1999(2):62-64. (in Chinese)
- [27] HAO X, LI J, WANG J, et al. Co-administration of chicken IL-2 alleviates clinical signs and replication of the ILTV chicken embryo origin vaccine by pre-activating natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes[J]. *J Virol*, 2023, 97(11):e0132223.
- [28] ASSEN A M, STILLMAN M, ALFIREVICH S, et al. Assessment of A20 infectious laryngotracheitis vaccine take in meat chickens using swab and dust samples following mass vaccination in drinking water [J]. *Vet Microbiol*, 2020, 251:108903.
- [29] 张文生, 李富桂, 张海, 等. 用淋巴细胞转移试验监测鸡传染性喉气管炎弱毒疫苗的细胞免疫效果[J]. 中国畜禽传染病, 1994(2):54-56.
ZHANG W S, LI F G, ZHANG H, et al. Monitoring cellular immune response to ILT attenuated vaccine by lymphocyte transfer test [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 1994 (2) : 54-56. (in Chinese)
- [30] MAEKAWA D, WHANG P, RIBLET S M, et al. Assessing the infiltration of immune cells in the upper trachea mucosa after infectious laryngotracheitis virus (ILTV) vaccination and challenge[J]. *Avian Pathol*, 2021, 50(6):540-556.
- [31] 冯健, 曹永长. 传染性喉气管炎新型基因载体疫苗对 SPF 鸡的免疫保护效果分析[J]. 中国家禽, 2016, 38(8):64-66.
FENG J, CAO Y C. Protective efficacy of novel ILT vectored vaccine in SPF chickens [J]. *China Poultry*, 2016, 38(8):64-66. (in Chinese)
- [32] PALOMINO-TAPIA V A, ZAVALA G, CHENG S, et al. Long-term protection against a virulent field isolate of infectious laryngotracheitis virus induced by inactivated, recombinant, and modified live virus vaccines in commercial layers[J]. *Avian Pathol*, 2019, 48(3):209-220.
- [33] VAGNOZZI A, ZAVALA G, RIBLET S M, et al. Protection induced by commercially available live-attenuated and recombinant viral vector vaccines against infectious laryngotracheitis virus in broiler chickens[J]. *Avian Pathol*, 2012, 41(1):21-31.

(编辑 白永平)