



CHICK
PROGRAM

总第21期/2015年5月

禽传染性支气管炎疫苗开发所面临的发展与挑战

Faruku Bande,^{1,2} Siti Suri Arshad,¹ Mohd Hair Bejo,^{1,3}
HassanMoeini,⁴ and Abdul Rahman Omar^{1,3}

禽传染性支气管炎 (IB) 是一种分布广泛的家禽疾病, 对家禽业造成了巨大的经济影响。新的 IBV 基因型不断出现和不同 IBV 基因型之间缺乏交叉保护是 IBV 疫苗防控中的主要难点。虽然减毒 IB 活疫苗可有效诱导保护性免疫反应, 但毒力返强的潜在风险, 母源抗体的中和效应, 重组以及突变的发生使得人们使用弱毒疫苗时存在担忧。另一方面, 灭活疫苗诱导的免疫反应较弱, 可能需要多剂量注射和/或佐剂的使用, 存在潜在的安全风险, 增加了经济负担。因此, 需要寻求其他替代 IB 疫苗。DNA 重组技术的进步使试验性 IB 疫苗显示出与减毒活疫苗类似的抗体水平和 T 细胞反应。同时也增强了重组 DNA 疫苗针对多个血清型的能力, 通过载体、纳米佐剂及胚内疫苗免疫方法的应用, 其免疫效果得到了改善。尽管大多数 IB 重组 DNA 疫苗尚未获得许可, 该类型的疫苗可能有望通过诱导多个 IBV 血清型的交叉保护掌控未来疫苗市场。

1. 背景

禽传染性支气管炎 (IB) 是一种重要的家禽疾病, 侵害鸡的呼吸道、肾脏和生殖系统, 造成经济损失。虽然 IB 首次发现于美国的 North Dakota [1], 流行病学调查显示, 在世界不同地区存在多种 IBV 血清型。目前, 大多数国家都存在经典和变异 IBV 血清型, 从而使 IB 的控制和预防成为全球挑战 [2、3]。该疾病可造成产蛋下降, 增重缓慢, 发病率高, 从而造成巨大的经济损失。青年鸡感染后死亡率高, 尤其是在其他并发症如病毒和细菌感染存在的情况下 [4]。

接种疫苗被认为是控制 IBV 感染最有效的方法 [5]。然而, 这种方法一直受到若干因素的限制: 包括新 IBV 血清型的出现 (目前有超过 50 种的突变株), 这些血清型之间很少或没有交叉保护 [6]。重要的是, 一些原本有效的 IBV 株疫苗可能对新的变异株没有效果, 因此需要开发新的疫苗 [5]。直到最近, 大多数 IBV 疫苗仍然是基于经典毒株或变异株的减毒活疫苗或灭活疫苗。这些疫苗所使用的毒株来自美国, 如 M41, Ma5、Ark、Conn, 和荷兰, 例如, H52 和 H120, 以及欧洲, 如 793/B, CR88, D274。然而研究表明, 包含这些毒株的疫苗的免疫应答往往较差, 特别是对当地的毒株。IB 减毒活疫苗也被证明有助于新的致病性 IBV 突变株的出现 [7、8]。值得注意的是, 最初在中国出现的 QX-like 毒株的地理分布和组织嗜性发生了变化, 在亚洲 [9], 俄罗斯 [10]



CHICK PROGRAM

和欧洲[11-14]等地广泛传播，给家禽饲养者造成巨大的经济损失。本文旨在描述与IBV疫苗相关的发展和挑战。并对病毒引起的免疫应答的某些方面进行了讨论。

2. 综述

2.1 病原学和基因组特征

禽传染性支气管炎病毒 (IBV), 与火鸡冠状病毒和白鲸冠状病毒共同属于Nidovirales病毒目, 冠状病毒科的Gammacoronavirus。虽然抗原性上有所不同, 冠状病毒科的成员, 如SARS和MERS, 都具有冠状病毒的共同结构蛋白组成。冠状病毒的基因组是由单链有囊膜的RNA组成, 大小为27-32kb, 是最大的RNA病毒[15]。尤其是IBV, 其病毒粒子平均直径为80-120nm, 表面有长约20nm的高度糖基化的杆状纤突。IBV基因组中有四个编码不同结构蛋白的基因。纤突蛋白(S), 小包膜蛋白(E), 基质糖蛋白(M), 和核蛋白(N)。结构蛋白基因之间为基因编码的非结构辅助蛋白, 顺序从5'端到3'端依次UTR-1a/1ab-S-3a-3b-E-M-5a-5b-N-3-UTR-poly(a)。

结构蛋白基因中, S1和N蛋白含有与宿主免疫应答相关的抗原表位(图1)。

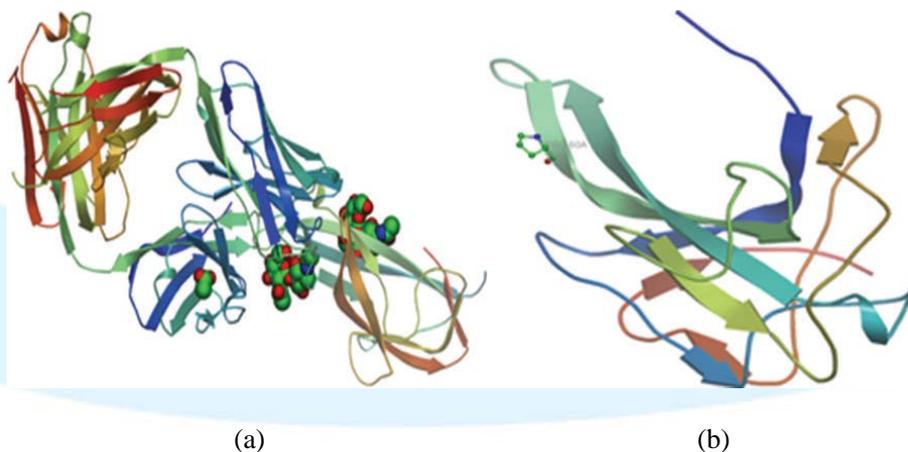


图1: 禽传染性支气管炎病毒Massachusetts 株S1糖蛋白(a)和核蛋白(b)蛋白质三维结构预测。使用网上SWISS 同源结构分析绘制结构。<http://swissmodel.expasy.org/>。



CHICK PROGRAM

2.2 糖蛋白

S蛋白为高度糖基化的跨膜蛋白, 包含1160个氨基酸, 大小为150-200kDa。它包含一个裂解信号序列, 一个跨膜域和一个短的C端尾部[17]。IBV S蛋白由3400个核苷酸构成, 转译后裂解为氨基端的S1 (520个氨基酸残基) 和羧基端的S2 (625个氨基酸残基)。两个糖基化蛋白 (S1和S2) 固定在S2羧基端的疏水区域附近, 可通过弗林蛋白或高尔基氏复合体相关酶裂解[18、19]。通常, S1糖蛋白在受体结合时发挥作用, 而S2则辅助病毒融合[20]。两种S糖蛋白基因中, S1基因是重要的免疫原性组成部分, 包含中和抗体的抗原表位[21、22]。它还通过病毒-细胞和细胞-细胞间相互作用决定了受体结合[20]。

2.3 非结构基因编码的3a、3b、5a和5b蛋白

IBV基因组具有两个小的非结构蛋白基因, 3和5, 分别表达三个(3a、3b和3c[E])和两个(5a和5b)蛋白。与I和II型冠状病毒相比, IBV的3a、3b 5a和5b蛋白显示出独特的序列特征[23]。虽然这些小蛋白质的特定功能仍是未知的, 但这些基因被认为与病毒毒力有关[23、24]。使用反向遗传学研究5a-ns片段的功能发现, ns蛋白和病毒毒力之间可能存在联系, 然而, 它们对病毒复制的贡献可能不那么大[25]。

2.4 基质蛋白

冠状病毒基质蛋白(M蛋白)略微突出于表面, 大小在220-262个氨基酸之间, 在N端区域发生糖基化[26]。虽然2群冠状病毒的成员为O-糖基化, IBV和1群冠状病毒为N端低聚糖分子糖基化[27]。M蛋白糖基化的作用还不清楚, 然而, 以MHV为模型进行研究发现, 与感染含有O-糖基化M蛋白的MHV的细胞相比, 感染含有N-糖基化M蛋白的MHV可以诱导更好的干扰素反应, 而感染含有未糖基化M蛋白的MHV的细胞所诱导的干扰素反应相当低[28、29]。

2.5 核衣壳蛋白

在病毒复制中, N蛋白与M蛋白、N蛋白与nsp3a蛋白之间存在直接作用。同样, 因为S片段与M片段之间的相互作用, N蛋白与S蛋白之间存在间接作用[30]。核蛋白与基因组gRNA功能性结合, 形成螺旋核糖核蛋白复合物(RNPC), 从而协助复制过程中病毒基因组的转录、复制、翻译和包装[32]。由于在羧基端存在CTL抗原诱导表位, 冠状病毒N蛋白还可以在诱导细胞毒性T淋巴细胞反应中发挥作用[33、34]。此外, 在核衣壳蛋白N端区域已经发现了新的B细胞线性表位肽[35]。

2.6 小包膜蛋白

IBV小包膜“E”蛋白是由高度疏水N端跨膜区和C端胞质区组成的。这种蛋白质被认为与病毒囊膜形成、组装、出芽、离子通道活动和细胞凋亡有关[36、37]。



CHICK PROGRAM

2.7 血清型和毒株的变化

目前,在不同的国家分布着多种经典和突变IBV毒株[38]。如系统进化树所示,这些毒株的亲缘关系或近或远(图2)。仅5%S1蛋白氨基酸组成的变化就可能导导致变异株的出现,并导致密切相关的血清型之间的交叉保护的变化。因此,在设计新的控制策略时必须考虑到IBV-S1序列的性质[39、40]。尽管IBV首次发现于美国,经典的M41血清型和荷兰H120血清型是最广泛使用的疫苗病毒株[3]。然而,世界动物卫生组织(OIE)建议,不同地理区域IBV血清型的分布也不同,应根据当地情况选择疫苗。例如,M41、Arkansas和Connecticut在美国很普遍,而4/91(793/B, CR88)和D274主要发现于欧洲[41、42]。最近,中国出现的QX突变株造成了欧洲,亚洲,中东,和非洲的疫情,显示出QX-like基因型毒株的地理分布转移和重要性。地理分布的变化确实是IBV控制计划所面临的一个挑战。预计由于病毒RNA的突变和重组,其他血清型毒株将继续出现,并造成病毒选择压力[3, 43]。其他一些突变株在特定国家和/或地区很常见,但并未确定其在全球的分布情况[44]。



图2: 显示经典(粉红色)和突变(蓝色)IBV毒株S1-糖蛋白关系的Neighbour-joining系统进化树。

使用1000-bootstrap方法对进化树进行可靠性评估,分支置信度在91.7-100%之间,两个群之间的成对比较相似度为82%。使用Geneious软件R8版本进行系统发育分析。



**CHICK
PROGRAM**

2.8 RNA突变和重组

突变和重组现象是冠状病毒基因组的重要特征之一[45]。与大多数RNA病毒一样,突变和重组是改变或形成冠状病毒病毒基因组的两个重要因素。因此,由于这些重要的基因事件的发生,病毒亚群可能会发生进化[16, 43, 46]。尽管很难确定IBV基因组是如何进化的,有三个主要的理论假设,如下:(i)RNA聚合酶校对机制的缺乏可能导致RNA基因组中的错误,进而导致突变,尤其是S1基因(核苷酸插入、缺失或点突变)。(ii)疫苗,特别是减毒活疫苗的使用,或存在多个不同IBV血清型共同感染,会导致重组的发生,有利于新的IBV突变株的出现[47]。同一冠状病毒毒株的不同基因突变体之间的混合已被证明可以产生准种病毒[48, 49]。在S1基因高变区的突变可能影响病毒亚群,并导致具有不同致病性和毒力的新病毒株的出现[43, 46]。研究发现,编码非结构蛋白2, 3和16,以及S1糖蛋白的基因区域重组的程度最高[50]。同样实验证明,在其他免疫抑制病毒,如马立克氏病病毒、鸡传染性贫血病毒和传染性法氏囊病毒存在的情况下对IBV进行传代,会影响IBV的演化[51]。

3. 传染性支气管炎病毒的宿主免疫反应

3.1 被动免疫

母源抗体(MDAs)是传染性病原早期预防的重要组成部分。研究显示MDAs可以持续存在数天至数周,这取决于病毒株的不同。大约有97%的含有MDAs的鸡只可以在1日龄抵抗IBV的感染。然而,这种保护在7日龄时可能下降到< 30%,因此该种保护持续的时间有限[52]。曾经也报道过转移性抗体可以诱导CD8+ T淋巴细胞,保护鸡只抵抗IBV的致命感染,代表了被动免疫在IBV感染中的作用[52]。

3.2 先天免疫

先天免疫反应非常重要,它是机体的第一道防线。该应答依赖于病原相关分子模式(PAMPs),通过识别树突状细胞,巨噬细胞,淋巴细胞等免疫细胞,以及若干非免疫细胞,如内皮细胞、粘膜细胞和成纤维细胞表面的特定的模式识别受体(PRRs)。重要的是,I型干扰素反应的特点是分泌鸡干扰素 α 和干扰素 β ,通过激活巨噬细胞和自然杀伤细胞,进而诱导适应性免疫反应,对病毒复制进行高效和快速的应答。II型干扰素反应的特点是分泌干扰素 γ ,主要激活自然杀伤细胞,树突细胞和CD4+ CD8+ T淋巴细胞。这将进一步加强白细胞粘附,使NK细胞活化,提高抗原呈递细胞(巨噬细胞和树突状细胞)的表面抗原表达,随后引起MHC-I类分子的表达和适应性反应的发展[53]。

具体来说, toll样受体(TLRs),如TLR4、TLR5, TLR15和TLR16在病毒感染过程中参与了先天免疫识别[54]。与SARS病毒和鼠肝炎病毒(MHV)一样,在IBV感染过程中已经观察到TLR4的显著上调,表明它在冠状病毒感染中的作用与宿主物种无关[55]。



CHICK PROGRAM

IBV感染中, 先天免疫反应与病毒感染早期, 气管、肺和肾中I型干扰素的分泌有关[56]。然而这种反应取决于IBV的毒性以及毒株的宿主适应性[57]。鸡I型干扰素在抑制病毒复制中扮演了重要角色, 可能是通过TLRs分子与模式识别受体(PPRs)相互作用, 其在检测病毒进入细胞和连接先天和适应性免疫应答中十分关键[58-60]。通过TLRs表达的变化证明了上述观点, 尤其是IBV感染后观察到气管、肺、肾中TLR2, TLR3, TLR7的表达发生了变化[61]。

寡核苷酸(CpG ODNs)的合成会导致干扰素 γ 、白介素1- β 、IL-6、IL-8及寡核苷酸合成酶的表达显著增加[62]。同样, 转录分析和细胞因子分析表明, IL-1, MIP-1和IFN信号通路可能是IBV疫苗接种后, 连接先天免疫和适应性免疫系统的一座桥梁[63]。IBV引起的抗病毒反应机制很复杂。然而, 我们认为JAK-STAT途径的参与, 以及与免疫应答相关的基因, 如STAT1, MYD88, IRF1, NFKB2表达的上调, 对宿主免疫反应十分关键, 而病毒蛋白质合成有关基因, 如e1F 1表达的上调, 则有助于病毒逃避免疫防御系统[64]。

3.3 体液免疫

体液免疫反应与病毒复制相关, 并已被证明与IBV特异性抗体滴度有关。已经证明接种IBV疫苗后在血清、气管拭子和泪腺分泌物中存在抗体反应[6]。研究表明, 全身免疫抗体(IgM和IgG)和粘膜抗体(IgA)是有效清除病毒的必不可少的因素[65]。此外, 粘膜反应的主要免疫球蛋白分子IgA, 在病毒进入机体的气管粘膜或其他粘膜所诱导的抗体反应中起作用[66]。值得注意的是, IgM在感染后5天(dpi)出现, 在8-10天达到高峰, 在感染后18天消失, 局部免疫与IgG的水平以及清除病毒相关[56]。

3.4 细胞介导的免疫反应

N基因特异性蛋白反应与CTLs的诱导有关, CTLs负责清除IBV感染细胞[67]。CTLs反应在第10天达到峰值, 与临床症状的减轻和肺中的病毒清除相关联[68]。据报道接种S1基因特异性IBV疫苗后CD4+和CD8+ T细胞显著增加; 因此S1基因在细胞介导的免疫反应中扮演重要角色[69]。病毒的清除可能与IBV早期感染中颗粒酶的表达增加有关, 随后激活NK细胞, 直接或靶向清除IBV感染细胞[70]。

3.5 粘膜免疫应答

尽管黏膜免疫学研究取得了一定进展, 大部分禽类粘膜免疫反应尚未了解。IBV在哈德氏腺(HG)、结膜的复制会影响粘膜免疫反应的发展, 表现为分泌/产生特异性IgA。该反应进一步与头部相关淋巴组织(HALTs)的淋巴扩张和随后的CTL反应诱导相关[71]。鸡群点眼接种重组核衣壳蛋白(rN)和重组S1蛋白(rS)的IBV疫苗(通过滴眼)可以诱导显著的细胞介导免疫反应, 而且并不需要疫苗加强免疫和佐剂。尽管只接种H120减毒活疫苗的阳性对照鸡群的粘膜IgA的水平更高, 鸡群接种这种疫苗被证明可以抵抗IBV致死性毒株的感染。[72]。



**CHICK
PROGRAM**

4 传染性支气管炎病毒疫苗

4.1 减毒活疫苗

减毒IB活疫苗是第一代用于控制野外IBV感染的IBV疫苗。这些疫苗已经商业化，可以通过饮水或喷雾在1日龄或1周龄内进行免疫。由于减毒活疫苗的免疫持续时间很短，需要在首次免疫2-3周后，使用相同毒株或其它毒株组合进行加强免疫接种[73]。尽管在世界不同地区已经使用对当地造成影响的一些毒株开发减毒活疫苗，大多数商用减毒活疫苗还是来源于Massachusetts M41血清型毒株和荷兰H52、H120毒株[74-76]。

活疫苗通常用于肉鸡，以及用于种鸡的加强免疫。然而，不同国家批准使用的IBV疫苗株种类可能存在差异。这应该是根据本地或本区域流行病学数据确定的。比如，在美国，M41，H120，Arkansas，Delaware，Florida和JMK衍生的疫苗使用频繁。在澳大利亚，使用B和C株；在英国/欧洲使用的疫苗株包括M41，4/91，CR88。在荷兰，通常使用D274和D1466疫苗[74]。由于物流和经济原因，一些商用减毒IBV活疫苗会结合其他病毒疫苗。如鸡新城疫病毒、马立克氏病病毒，传染性法氏囊病病毒（IBDV）。然而目前尚不清楚这些组合是否会影响结合抗原的免疫反应[77]。一些商用减毒活疫苗的例子包括：Mass血清型的Nobilis IB-Ma5（英国默沙东）；同样被认为是Mass血清型的源于荷兰H120毒株的AviPro IBH120疫苗（德国罗曼）；Nobilis 4-91（英国默沙东）；欧洲Gallivac CR88株（美国梅里亚）。以及针对最近流行的QX-like IBV毒株的减毒活疫苗POULVAC IB QX（法国辉瑞）。

减毒活疫苗存在一些局限，包括毒力返强、组织损伤和MDA的干扰。活疫苗造成的组织损伤可能导致病理疾患或继发性细菌感染，尤其是在1日龄雏鸡[78]。证据表明，尽管通过连续传代52次或120次，努力降低H52疫苗和H120IBV疫苗的病毒毒力，这些疫苗仍然可能造成气管的严重病理反应并引起疫情爆发[79、80]。使用IBV减毒活疫苗的另一个局限是存在疫苗株与野毒株重组的可能，导致新IBV血清型的出现[7，75，81]。在一项研究中，已经证明H120减毒活疫苗接种会促进肉鸡中的病毒传播，所以可能会帮助病毒传播和持续存在[82]。为了减少疫苗毒力返强造成的相关问题，研究人员探索利用反向遗传技术构建疫苗病毒，对宿主不存在潜在致病性，但具有复制和诱导免疫反应的能力。该方法已在含有毒力M41毒株的S1基因的Beaudette IBV病毒株中获得证明[83、84]。

4.2 灭活疫苗

灭活疫苗可以单独或结合IBV减毒活疫苗使用[85]。这些疫苗通常用于13-18周龄蛋鸡和种鸡的注射免疫。由于灭活疫苗不能复制，因此不大可能恢复毒力，导致病理反应。然而与减毒活疫苗相比，灭活疫苗只能诱导短时间的抗体产生，并不能诱导T细胞介导的免疫反应[86]。因此在大多数情况下，灭活疫苗需要与减毒活疫苗联合使用，大剂量的佐剂，和/或进行多次免



CHICK PROGRAM

疫。这可能增加疫苗开发和营销的相关成本,从而限制了该疫苗的应用[5]。灭活疫苗需要进行注射,这在大型家禽养殖场中实行起来十分困难或根本行不通。同样,注射部位的反应问题也可能导致胴体的废弃或价值的降低[87]。

4.3 重组疫苗

4.3.1 病毒载体疫苗

使用病毒载体表达目的基因已经被广泛研究。值得注意的是,腺病毒载体能够在细胞中持续存在,不会造成病理反应,而且可转导不同类型的组织细胞,不受靶细胞是否为分裂细胞所限,可以持续释放抗原。还可以使用载体疫苗包装和表达不同的免疫原性蛋白亚单位,而不需要使用整个病毒[88]。已经开发了试验性IBV重组载体疫苗。结果显示这些疫苗可以显著增加免疫反应,预防IB的发生[69]。

虽然病毒载体疫苗的发展似乎可以提供有效的免疫反应,并减少在IBV减毒活疫苗中出现的RNA突变的相关问题[89],这种技术确实存在局限性,包括之前进行的免疫或母源抗体会干扰活载体本身,减少抗原递呈细胞对抗原的摄取,从而降低基因表达以及特异性免疫应答[90]。在宿主系统中缺乏适当的蛋白质折叠、糖基化和转译修饰,可能改变构象表位的排列,影响疫苗的免疫原性和有效性。目前在设计和选择重组IBV疫苗时需要特别关注这些因素[91]。最近的研究显示,使用含有IBV-S1糖蛋白的重组腺病毒疫苗可以诱导显著的抗体反应,在使用同源毒株Vic S(血清型B)或异源毒株N1/62(血清型C)进行攻毒后,可以对气管病变达到90-100%的保护[69]。

使用载体共同表达不同的蛋白质抗原和编码佐剂的基因可以增强免疫反应。从这一观点来看,Shi等人[92]表明表达IBV-S1基因和鸡干扰素 γ 基因的禽痘病毒疫苗[rFPV-IFN γ S1]可以增强体液和细胞免疫反应,保护鸡只抵抗同源和异源毒株LX4, LHLJ04XI和LHB IBV毒株的攻毒。表达IBV-S1基因与鸡IL-18的重组鸡痘病毒载体疫苗可以显著增加抗体滴度以及CD4+和CD8+反应。同样,表达IBV-S1基因与鸡IL-18的重组鸡痘病毒载体疫苗(rFPV-S1/IL18)可以诱导100%(20/20)的保护,而免疫仅表达S1基因的载体疫苗的鸡群只有75%(15/20)的保护[93]。

研究显示,当小鼠口服免疫腺病毒载体时已存在的母源抗体中和载体的效应下降[94]。有趣的是,腺病毒载体疫苗被证明有望用于家禽口服疫苗。口服免疫在家禽药物中有以下几个优点:简化操作,降低注射操作相关应激。虽然口服载体疫苗可以诱导足够的转基因特异性抗体反应,在达到理想的T细胞反应方面还需要改进。为了避免体内现有免疫对载体疫苗的影响,研究者尝试对载体疫苗进行改造和修饰:如提高疫苗剂量,使用纳米颗粒包被,使用双载体(例如痘病毒载体和腺病毒载体),和/或交换腺病毒的hexon基因。取得了一定的成功,但在其他感染模型中存在毒性[88]。

慢病毒载体在兽医疫苗中获得了应用,但以慢病毒为载体的IB疫苗还很少见[95]。总的来说,只有同时比较研究有助于了



**CHICK
PROGRAM**

解一个载体相对于其他载体的优势。

4.3.2 亚单位和多肽疫苗

这种技术需要使用一段或一部分病毒蛋白诱导特异性免疫反应。亚单位疫苗来自病原体蛋白质或多糖，多肽疫苗是由病原体多肽或一部分编码抗原表位的基因组得来的[95]。S1和N基因上的表位分别被用于诱导中和抗体和CTL反应[22]。例如，一项研究表明，对应于S20-S255位氨基酸的人工合成肽可以与多种IBV毒株的多克隆抗体发生反应，从而显示了其成为广泛应用的IB疫苗的潜质[96]。这些疫苗的19-69位以及250位氨基酸序列位于受体结合区，其N端在病毒侵入的过程中发挥作用[97]。

虽然其研究仍处于实验阶段，合成肽疫苗已被证明在IBV的控制中很有前景，一些研究人员致力于研发多抗原表位多肽疫苗，可用于预防多种血清型的IBV毒株。最近，一项研究开发了基于IBV S1和N蛋白基因多个抗原表位的疫苗。表达和免疫分析研究显示，设计的合成肽疫苗可以诱导产生显著的体液和细胞免疫反应，在致死性IBV毒株攻毒后可以达到80%以上的保护。另一方面，一个由乳酸菌系统表达的疫苗可以口服免疫，这种方法也被报道可以诱导粘膜免疫反应[99、100]。

4.3.3 质粒DNA疫苗

与含有活载体的重组载体疫苗不同，DNA疫苗使用的是含有编码目的免疫原性蛋白基因的质粒[101]。到目前为止，仍然没有获得许可的商业化家禽DNA疫苗；然而，这种技术已经获得了相当大的关注，几个产品处于不同的研发或试验阶段[102]。已经研发出了一种命名为pDKArkS1-DP的DNA疫苗，基于Arkansas IBV血清型的S1基因。通过胚内注射进行疫苗接种，随后在2周后免疫减毒活疫苗，可以诱导显著的免疫应答，临床症状的预防率为100%。另一方面，仅进行DNA疫苗胚内接种或减毒活疫苗单独接种的鸡群在IBV毒株攻毒后的保护率 \leq 80% [103]。

除了胚内免疫DNA疫苗，还评估了其他新的接种方法的效果。例如，肌肉注射根据S1，S2和N区域设计的脂质体多表位DNA疫苗，可以诱导CD4⁺，CD3⁺、CD8⁺和CD3⁺细胞数量的增加，80%的免疫鸡只获得了保护性免疫反应。表位疫苗的优点包括：可以在一个很小的递呈系统中包含多个免疫原，针对性的诱导抗体和CTL反应[104]。

研究发现，分别编码IBV核蛋白或S1糖蛋白的DNA疫苗在联合表达IL-2[105]或鸡粒细胞-巨噬细胞刺激因子(GM-CSF)[106]时可以增强疫苗诱导的免疫反应。已经报道在这两种情况下，体液和细胞介导的免疫反应显著增加。然而，S1基因编码DNA疫苗诱导了更好的免疫反应和95%的保护率，略高于N基因编码质粒。在另一项研究中研发了一种编码S1，N，M蛋白的多价IBV DNA疫苗[98、107]。当使用阳离子脂质体载体时，每个特定基因的IBV-DNA疫苗的疗效和保护能力被证明获得了提高。通过灭活疫苗加强免疫也获得了类似的结果[107]。



CHICK PROGRAM

DNA疫苗在给药途径上有一定的局限性,因为大多数DNA疫苗都是通过肌注免疫,从而造成大型商业化家禽养殖场的应用存在困难[108]。然而,可以通过在孵化厂内胚内免疫DNA疫苗或通过饮水免疫,或将疫苗制成气雾疫苗来克服DNA疫苗免疫途径所面临的问题[103]。将DNA疫苗制成纳米颗粒可以协助保护疫苗免受酶的降解,并增强其在粘膜表面诱导粘膜免疫的有效性[71]。由于DNA疫苗可以在母源抗体存在的情况下使用,其在家禽中可以用来免疫雏鸡,保护雏鸡抵抗IBV感染。DNA疫苗的其他优点包括:同时诱导抗体和T细胞免疫反应,安全,能够表达多种蛋白,热稳定性和生产成本低。可以在短时间内生产,从而应对新出现的病毒威胁。此外,可以进行细胞因子佐剂修饰,帮助它们在控制家禽传染病的选择中获得优势[109]。

4.4 反向遗传技术疫苗

反向基因疫苗包含了操纵一个或多个病毒基因的新技术。最近,这种技术已经被用来修饰IBV候选疫苗[24、110、111]。例如,最近构建了分别使用致病性M41或4/91毒株的S1基因替代BeauR-IBV毒株S1抗原基因的一种重组疫苗[112、113]。这些变化使得疫苗可以诱导保护性免疫反应,而且新的BeauR毒株没有致病性[113、114]。同样,Zhou等人[84]已经构建了一个改造的H120病毒株(R-H120),在鸡胚内传代5次后仍然保留了一些生物活性。有趣的是,已报道使用这种疫苗毒株可以诱导高水平的血凝抑制(HI)抗体滴度,而且可以产生类似于完整的H120免疫组的保护水平。反向遗传技术疫苗可以消除减毒活疫苗的毒力返强问题,因而充满发展前景。虽然研发此类疫苗非常困难,但其可能克服机体先前存在的免疫中和作用的优点,肯定会带来IBV反向遗传减毒活疫苗的彻底变革。但是这些新一代疫苗是否会增加或减少变异和病毒选择压力需要进一步的研究。图3总结了IB疫苗相关的主要局限。

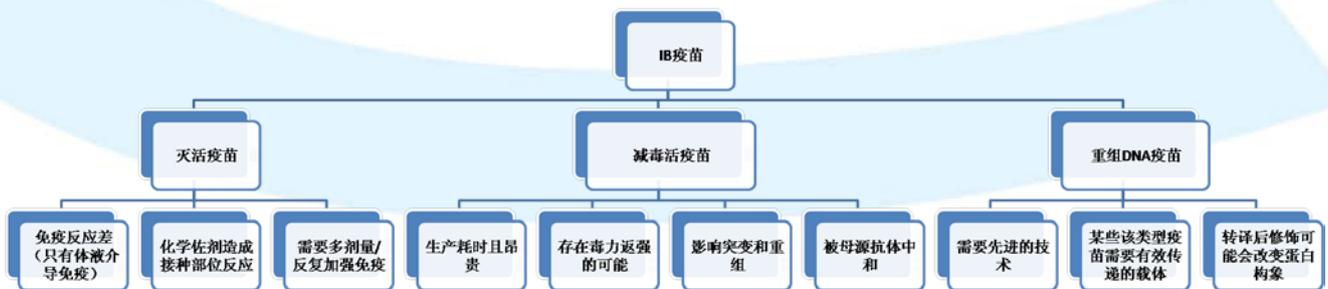


图3 IB主要疫苗的总结以及疫苗类型相关主要局限



**CHICK
PROGRAM**

5 表达和递呈系统

5.1 疫苗表达系统

在重组或亚单位疫苗中, 需要考虑是否存在疫苗相关抗原的转译后修饰。然而由于细菌、酵母、哺乳动物、杆状病毒和植物表达系统所表达蛋白方式的不同, 我们需要详尽的免疫显型抗原的化学和生物学信息, 来指导选择合适的表达系统[91]。不同的表达系统已经被用来生产重组蛋白抗原。尝试使用牛痘病毒作为载体的IBV疫苗, 未能产生足够的抗原来诱导老鼠产生显著的抗体反应[115]。牛痘载体疫苗被牛痘病毒自身的安全问题所限制, 而且它在禽类细胞中的复制能力很差[116]。在另一项研究中, 开发了一个表达韩国肾型KM91毒株S1糖蛋白的杆状病毒载体。在同源毒株攻毒后, 免疫KM91疫苗的鸡的肾脏保护率为50%[89]。同样, 使用来源于花椰菜花叶病毒(CaMV) (35)的启动子基因控制转基因土豆表达了IBV基因的S1糖蛋白。这一成功可能有助于设计用于家禽口服的IB食用疫苗[117]。

改良的“BacMam”病毒表面展示技术, 是利用杆状病毒载体的改良策略, 最近用于IBV-M41血清型S1糖蛋白的表达。疫苗后续试验显示该疫苗可以诱导显著的体液和细胞介导的免疫反应。攻毒后大约83%的鸡只获得保护, 与商业灭活疫苗免疫鸡只的89%的保护率相当[118]。

5.2 递呈系统

用于疫苗接种的免疫途径和递呈方法可能会影响所诱导的疫苗免疫反应、抗原表达, 以及合成反应中MHC分子的类型。通过口服免疫或鼻腔喷雾, IB减毒活疫苗获得了广泛的应用。灭活DNA疫苗和多肽疫苗常用的免疫途径是注射。目前对重组蛋白, 质粒DNA和多肽疫苗的递呈方法进行了一些改进。例如, 使用致弱的鼠伤寒沙门氏菌株口服递呈表达IBVS1和/或N蛋白的DNA疫苗。有趣的是, 在口腔和鼻腔免疫后, 体液免疫和黏膜免疫反应均显著增加。免疫鸡可以抵抗同源毒株的攻毒[119]。使用乳酸菌系统递呈IBV疫苗的方法也获得了成功, 这种方法可以有效诱导黏膜免疫反应(99、100)。

病毒样颗粒(VLP)是疫苗研发的一个新的焦点。该技术利用活病毒的免疫原性, 而没有保留其潜在的致病能力[120]。目前已经研发了利用IBV-M和IBV-S-基因的VLP IBV疫苗。与使用H120减毒活病毒疫苗相比, 候选疫苗免疫的老鼠表现出高水平的细胞介导免疫反应。同样, 已经研发了使用禽流感H5N1病毒M1蛋白、IBV-S1蛋白融合蛋白“NA / S1”以及H5N1禽流感NA蛋白的细胞质和跨膜区的嵌合疫苗。嵌合疫苗可以在小鼠和鸡中诱导显著的S1特异性抗体, 以及在鸡只中诱导中和抗体, 并增加免疫小鼠的IL-4分泌[121]。这些发现显示, VLP疫苗有作为候选创新疫苗的巨大潜力, 其应用可以为新的IBV疫苗提供一个递呈系统[120]。



**CHICK
PROGRAM**

6 . 结论

尽管花费大量的金钱来控制IB, 经典和新出现的血清型病毒的爆发仍然不断出现, 新IBV基因型不断出现, 而且缺乏交叉保护性免疫力, 加快了新型IBV疫苗研发的速度。虽然减毒活疫苗在野外仍然十分常见, 对其进行改良, 例如通过反向遗传技术, 将有助于减少毒力返强的影响。病毒载体疫苗有可能促进高效的蛋白质抗原产生, 以及诱导有效的免疫反应。然而, 与减毒活疫苗一样, 载体疫苗使用中最需要考虑的是母源抗体的中和作用, 因为父母代种鸡场会进行常规的疫苗免疫。毫无疑问, 新一代疫苗, 如重组载体DNA疫苗, 质粒DNA疫苗, 和多抗原表位疫苗, 可能是未来的替代疫苗。这些疫苗有可能提供多种抗原, 从而针对多种血清型产生广泛的抗体和细胞介导的免疫反应。重要的是, 质粒DNA疫苗的使用可以避免先前存在的免疫中和效应, 而且可以通过不同的免疫途径如粘膜和胚内免疫, 以及使用新颖的递呈方法, 如纳米颗粒和VLP, 来增强其作用效果。在任何情况下, 未来的IBV疫苗必须可以针对不同的IBV血清型诱导广泛的保护, 克服母源抗体, 符合国际安全法规, 操作更简便和成本低廉, 从而获得家禽业更广泛的接受。