



## 应对日益严峻的挑战：中国禽传染性支气管炎研究

黄梦姣 张芸 薛春宜 曹永长\*

中山大学生命科学学院 广东 广州 510275

**摘要：**自 1937 年禽传染性支气管炎病毒在美国被首次分离以来，该病毒的传播给世界养禽业带来了严重的经济损失。中国地域辽阔、气候多样，国内该病毒的流行情况十分复杂。本文就传染性支气管炎在国内的病原分离、分子流行病学、检测技术、疫苗及综合防控技术等方面的研究与实践进行总结。目前，该病毒在中国多种类型毒株并存，优势流行毒株为 QX 基因型毒株。除广泛使用的 H120 等 Mass 血清型疫苗外，4/91 血清型疫苗和 LDT3-A 株疫苗也被逐步使用，多采用弱毒疫苗和灭活疫苗联合免疫的方法有效控制了其对养禽业造成的经济损失。

**关键词：**禽传染性支气管炎，中国，分子流行病学，免疫程序，中药治疗

## To meet the growing challenge: research of avian infectious bronchitis in China

HUANG Meng-Jiao ZHANG Yun XUE Chun-Yi CAO Yong-Chang\*

School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou, Guangdong 510275, China

**Abstract:** Since first isolated in America in 1937, avian infectious bronchitis virus causes serious economic loss to the poultry industry worldwide. Because of vast territory and climate diversity, the domestic epidemic situation of infectious bronchitis virus is very complex. The research and practice of isolation of pathogen, molecular epidemiology, detecting techniques, vaccine and integrated preventing & controlling techniques of infectious bronchitis in China is reviewed in this paper. At present, a variety of strains coexist in China, and the dominant epidemic strains are QX genotype. Moreover, the widely used vaccine belongs to Mass serotype such as H120, but 4/91 serotype vaccine and LDT3-A vaccine have also been used gradually. The combination immunization of attenuated live vaccine and inactivated vaccine can effectively control the economic loss of the poultry industry.

**Keywords:** Avian infectious bronchitis, China, Molecular epidemiology, Immune procedure, Treatment by Chinese herbs

### 1 禽传染性支气管炎病毒

禽传染性支气管炎(Avian infectious bronchitis, IB)是由禽传染性支气管炎病毒(Avian infectious

bronchitis virus, IBV)引起的一种急性、高度接触性传染病。该病毒广泛流行于世界各地，是严重危害世界养禽业的重大传染病之一<sup>[1]</sup>。禽传染性支气

\*Corresponding author: E-mail: caoych@mail.sysu.edu.cn

Received: 12-11-2018; Accepted: 03-04-2019; Published online: 15-05-2019

\*通信作者: E-mail: caoych@mail.sysu.edu.cn

收稿日期: 2018-11-12; 接受日期: 2019-04-03; 网络首发日期: 2019-05-15

管炎病毒可感染所有日龄的鸡,主要感染呼吸道上皮细胞和消化道相关组织以及其它组织如肾、输卵管和睾丸等<sup>[2]</sup>,导致鸡只生长迟缓、发病死亡。肉鸡感染后,其饲料报酬降低、品质下降。此外,蛋雏鸡感染还会造成生殖系统永久非可逆损伤,表现为无产蛋高峰、产蛋数量与质量下降。中国地域辽阔,气候环境差异显著,是世界养禽大国且饲养品种繁多。因此,IBV在中国的流行情况极为复杂,中国禽传染性支气管炎研究具有其自身特色。

禽传染性支气管炎病毒(IBV)为有囊膜、不分节段的单股正链RNA病毒,属于冠状病毒科 $\gamma$ 冠状病毒属。病毒基因组大小约为27.6 kb,其结构为:5'-UTR-1a/1ab-S-3a-3b-E-M-5a-5b-N-3'UTR。IBV侵入宿主细胞后,从基因组5'端翻译成复制酶,通过不连续转录机制生成6条亚基因组(即mRNA 1-6)。这6条亚基因组分别编码15种非结构蛋白(nsp2-16),4种主要结构蛋白如纤突蛋白(S)、小膜蛋白(E)、膜蛋白(M)、核衣壳蛋白(N)以及4种附属蛋白3a、3b、5a和5b。S蛋白为主要抗原性蛋白,参与病毒与宿主细胞融合<sup>[3]</sup>,与病毒的组织嗜性<sup>[4]</sup>以及致病性<sup>[5]</sup>密切相关。病毒侵入细胞后,S蛋白被蛋白酶切割成N端的S1亚基和C端的S2亚基。其中,S1蛋白介导病毒与宿主细胞结合<sup>[4]</sup>,可刺激机体产生中和抗体<sup>[5-7]</sup>。同时,S1亚基是决定IBV血清型特异性抗原决定簇的主要蛋白<sup>[8]</sup>。此外,S1基因序列因突变或重组可能造成新基因型的产生,从而造成传统疫苗程序的失败<sup>[2]</sup>。因此IBV的S1基因序列特征及进化规律常被用于IBV的分子流行病学分析<sup>[9]</sup>。

IBV基因组容易发生点突变、缺失、插入及毒株间的同源重组,导致基因变异株不断被分离。此外,IBV血清型众多,全世界报道的已有30多种<sup>[10-11]</sup>。随着IBV的持续变异,新的血清型也不断涌现。在中国,IBV流行毒株随不同时间和地区呈现较大差异。根据不同标准将IBV毒株分为血清型、基因型及保护型等,而不同血清型、基

因型间不产生交叉保护或者交叉保护很弱的特点,使得疫苗免疫程序不断受到挑战。因此,尽管该病被报道超过60年,如今对它的防控仍然不完全<sup>[12]</sup>。长期的流行病学监控,进而选择针对本地区流行毒株的疫苗,以及高效IBV疫苗的研发对IB的防控具有重要意义。

## 2 中国IBV毒株分离与鉴定

中国首例IB在1972年出现于广东省<sup>[13]</sup>。早期根据IBV的组织嗜性,将毒株分为嗜肾型、嗜输卵管型、嗜腺胃型及嗜肠型等。在中国,首例嗜肾型IBV于1990年在广西分得<sup>[14]</sup>。1995年于山东胶东,分离到嗜输卵管型的IBV变异株<sup>[15]</sup>。1996年在山东青岛地区发病鸡群中分离的毒株即QX株,为嗜腺胃型IBV代表株<sup>[16]</sup>。嗜肠型IBV毒株则最早在1998年于辽宁省分离得到<sup>[17]</sup>。随着分子生物学技术的发展,之后分离毒株多以基因型分类。目前国内QX型(GI-19)毒株为优势流行毒株,其次4/91型(GI-13)毒株也一直被分离。而TW型(GI-7)毒株起源于中国台湾,因其独特海岛地理原因,前期也只在中国台湾地区流行,但自21世纪以来该毒株在大陆也开始被分离到,之后不断有基因重组株被分离。

养禽业的全球化扩大了IBV传播范围。QX型(GI-19)毒株最早于1996年从中国青岛地区分离,并于1999年在中国新疆病鸡群中分离到代表毒株LX4株<sup>[18]</sup>,该毒株可能源于韩国株的变异。韩国于20世纪90年代初期出现KM91株并开始在韩国流行<sup>[9]</sup>。不久后中国开始分离到与韩国株K069-01相似的毒株CK/CH/LTJ/95I株(1995年分离于天津)等<sup>[19]</sup>,且与中国山东分离到的QX型毒株关系较近<sup>[20]</sup>。考虑到中国山东与韩国的地理距离,猜测QX型(GI-19)毒株可能来源于韩国,并在中国不断进化形成QX型(GI-19),成为国内的优势流行毒株并流行于周边国家甚至欧洲。在2001年,东欧发现与QX型(GI-19)相似的毒株<sup>[21]</sup>。随后英国等西欧国家也开始有类似QX型(GI-19)毒株的

报道<sup>[22-23]</sup>。目前该基因型毒株在全球范围内已成为优势流行毒株<sup>[24-30]</sup>。

793/B(4/91)型(GI-13)毒株最早于 1991 年在欧洲出现, 随后迅速传播到世界各地<sup>[31]</sup>。国内部分学者认为 2000 年前后中国已出现 4/91 型(GI-13)毒株。1996 年于北京分离到的 A2 株为 2000–2010 年间的流行毒株<sup>[32]</sup>。气管环交叉中和试验及 4/91 疫苗对该毒株的免疫保护实验结果显示其为类 4/91 型(GI-13)毒株<sup>[33]</sup>。在 2008 年对 A2 株的全基因组测序分析结果表明, 其全基因组与 Mass 株相距较远<sup>[32]</sup>。此外, 对 S 基因进行系统进化树分析发现, A2 株属于 QX 型(GI-19)<sup>[34-37]</sup>。国内首次报道的真正意义上的类 4/91 型(GI-13)毒株应是 2003 年从山东省发病鸡场分离到的 TA03 株, 血清型鉴定和 S1 基因序列分析均证明其为 793/B(4/91)型 IBV, 命名为 TA03 株<sup>[38]</sup>。自此, 4/91 型(GI-13)毒株开始在中国不断被分离, 成为国内广泛存在的 IBV 毒株类型<sup>[39]</sup>。

1958 年中国台湾发生 IB 疫情, 因其地理因素影响, IBV 分子进化与大陆及周边国家有很大的差异。中国台湾地区分离的 IBV 毒株被分为两个基因型: TW-I 型和 TW-II 型<sup>[40-41]</sup>。1990 年之前分离的多为 TW-II 型, 通常表现为呼吸道症状; 1990 年后 TW-I 型出现并广泛传播, 通常表现为致肾病变型<sup>[42]</sup>。在大陆地区, TW 型 IBV 分离株主要是 TW-I 型, TW-II 型 IBV 分离较少<sup>[40-41]</sup>。

IBV 基因组易发生突变和重组, 从而导致抗原漂移和转换。Yang 等于 2005 年完成了四川致肾病变型分离株 SAIBK 株的全基因组测序和分析<sup>[43]</sup>, 表明该毒株源于 YX10 株(GI-19)、YN 株(GI-19)以及 Mass 型(GI-1)毒株重组。Feng 等分离出由 YX10 株(GI-19)和 4/91 株(GI-13)重组而来的 CK/CH/GD/QY16 (QY16)株<sup>[44]</sup>。Liu 等分别于 2011 年从 H120 免疫的鸡场中分离到由 ck/CH/LDL/09/022 株(GI-19)和 4/91 类毒株(GI-13)重组的 ck/CH/LZJ/111113 变异株<sup>[45]</sup>, Zhang 等 2014 年从 H120 免疫的鸡场中分离到由 4/91 类毒株(GI-13)

和 H120 毒株(GI-1)多重重组的变异株 ck/CH/LHLJ/140906<sup>[46]</sup>, 且该变异株为新的血清型毒株。Xu 等对 2016–2017 年分离得到的 IBV 毒株进行分析后得到 I2217-2/16 等 7 株 IBV 变异株, 并发现 QX 型(GI-19)、TW-I 型(GI-7)以及 4/91 型(GI-13)间毒株的重组是造成新变异株出现的主要原因<sup>[47]</sup>。3 种不同 IBV 基因型/血清型毒株 LDL/150434 I、LDL/150434 II 和 LDL/150434 III 在一只鸡的气管样本中检测到; 分离株 LDL/150434 I 为 H120 疫苗株的再分离; LDL/150434 II 是 H120 与 ck/CH/LDT3/03 样病毒重组事件的新变种; LDL/150434 III 与 2009 年以来在中国大陆流行的 nr TW I 型(GI-7)毒株存在遗传相关性, 但存在明显差异<sup>[48]</sup>。由重组而产生的变异株不断涌现, 给 IBV 的监测和防控带来极大挑战。此外, Han 等分别从中国不同省份病鸡群中分离得到基因型为 Arkansas (Ark)型(GI-9)的毒株 I0712/11 和 I0108/17。研究表明中国 Ark 型分离株来源于 Jilin 疫苗株, 且自传入中国以来通过点突变独立进化; 中国分离到的 Ark 病毒有可能是由于美国 ArkDPI11 样毒株的引种, 该预测需进一步检测证实<sup>[49]</sup>。

### 3 IBV 分子流行病学研究

IBV 血清型、基因型众多, 流行范围广, 持续的流行病学监控对 IB 的防控具有重要意义。目前美国的优势流行毒株为 Arkansas 株(GI-9)及其持续进化形成的 Ark-like 株(GI-9)<sup>[50]</sup>, 其他的流行毒株包括 Delaware 型(GIV)、Conn 型(GI-1)和 Mass 型(GI-1)<sup>[20]</sup>。澳大利亚 IBV 分离株根据 S1 基因序列、基因组 3'端以及血清学反应被分为亚群 1 (经典株)、亚群 2 和亚群 3(新毒株)。亚群 1 包括澳大利亚首次分离的 IBV 毒株 Australia/N1/62 和疫苗株 Australia/VicS/62<sup>[51]</sup>; 亚群 2 从 1988 年开始出现, 包括 Australia/subgroup 2/N1/88、Australia/subgroup 2/Q3/88 和 Australia/subgroup 2/V18/9 株<sup>[52]</sup>; 亚群 3 从 2002 年开始出现, 来源于亚群 1 和亚群 2 的毒株重组<sup>[52-53]</sup>, 包括 Australia/subgroup 3/N1/03 和

Australia/subgroup 3/N2/04 等。欧洲早期的 IBV 毒株包括 Mass 型毒株、英国的 B/D274/84 株和 E/D3896/84 株以及新西兰的 D207/79 株和 D1466/79 株<sup>[54]</sup>。1991 年 793/B 毒株(GI-13)在欧洲出现,随后传播至亚洲、中东、南美等多地。Italy-02 株(GI-21)几乎存在于欧洲各个国家,但自 2004 年开始 Italy-02 株(GI-21)开始在欧洲减少(除西班牙以外),而 QX 型(GI-19)开始在欧洲广泛流行<sup>[30]</sup>。此外, QX 型(GI-19)也在中国周边国家流行。韩国在 2003–2006 年间的分离毒株显示其主要流行 3 种基因群: Korea(K)-I、K-II 和 K-III (LDL)<sup>[55]</sup>; K-II 被划入 LX4 群(GI-19)。日本基本存在 4 个基因群: Japan(JP)-I、JP-II、JP-III 和 JP-IV; Japan(JP)-I、JP-II 和 JP-IV 为日本独立的基因型, JP-III 被划入 LX4 群(GI-19)<sup>[56-58]</sup>。

中国地域辽阔,各地气候环境存在较大差异,南北方饲养品种和饲养模式都不一样,因此 IBV 在不同时间和不同地区的流行特点也不同。在 2007 年之前,我国 IBV 的基因型往往被分到 7–9 个基因型,此时 IBV 多为地方性流行,并没有全国性的优势流行毒株。Han 等对中国在 1995–2009 年间分离的 220 个分离株 S1 基因进行遗传进化分析,将 IBV 分为 9 个基因群: LX4 (GI-19) (54.1%)、LSC/99I (GI-22) (12.3%)、Mass (GI-1) (8.6%)、LDT3/03、LDL/97I (GI-16)、BJ、LHLJ/95I、N1/62 和 4/91 (GI-13)型,以及不属于上述基因型的变异重组株<sup>[59]</sup>。Liu 等于 2005 年对国内在 1995–2004 年分离的 26 株 IBV 与中国 26 株参考株及 5 个其它毒株进行比较分析后,将 IBV 分为 8 个基因型。基因 I 型为 QX 型(GI-19); 20 世纪 90 年代分离的 6 株 IBV 属于基因 II 型; 4 株分离株属于基因 III 型,且与韩国株显示较近的关系; Mass 型(GI-1)和 TW 型(GI-7)为独立的 2 个基因型; HN99 和 CK/CH/LHN/00I 两株分离株可能是疫苗的再分离株,被划为基因 VI 型; 另 4 株组成与其他基因型距离较远的基因 VII 型<sup>[19]</sup>。表明 IBV 基因的变化不仅来源于野毒株自然变异,也来源于活疫苗的引

用,各基因型毒株如 QX 型、LSC/99I 型、LDL/97I 型和 Mass 型在国内流行<sup>[19]</sup>。

到了 2008 年, QX 型(GI-19)在我国开始成为流行毒株。LX4 株(GI-19)于 1999 年被首次分离以来,到 2009 年其 S1 基因发生了轻微的变化<sup>[59]</sup>。国内很多地方的免疫鸡群发生由该型病毒引起的腺胃或肾脏病变,并迅速传播到欧洲,该毒株对应的欧洲原型株 L-1148 最早发现于 2003 年<sup>[60]</sup>。Li 等对中国广西 1985–2008 年间 26 株 IBV 进行了血清型和基因型的变异研究。根据对 S1 高变区 I (HVR I)的序列分析,将 26 株分离株与已发表的 18 株 IBV 分为 5 个基因型: LX4 (GI-19)、4/91 (GI-13)、JP、Gray (GI-3)和 Mass (GI-1); 且 LX4 型(GI-19)为当时广西地区的流行毒株<sup>[61]</sup>。Liu 等在 2008 年对国内 37 株 IBV 分离株进行分析,表明 LX4 型(GI-19)为当前流行毒株<sup>[62]</sup>。Zou 等对 2008–2010 年间从四川分离到的 19 株 IBV 毒株进行序列分析表明,除 TW-I 型(GI-7)和 Mass 型(GI-1)等, LX4 型(GI-19)为最主要基因型<sup>[63]</sup>。根据 2011–2012 年间对中国西南地区分离到的 19 株野生毒株的序列分析,将这些毒株分为 3 个群: QX 型(GI-19)、SAIBK 型(GI-22)、TW97/4 型(GI-7),且都为嗜肾型 IBV<sup>[64]</sup>。在 2012–2016 年间分离到 24 株 IBV,被分为 4 个基因型: QX (GI-19) (37.5%)、TW (GI-7) (16.7%)、Mass (GI-1) (8.3%)和 J2 (GI-16, 即 LDL/97I 类毒株) (4.2%)<sup>[65]</sup>。2016 年到 2017 年 12 月期间的流行病学调查表明:当时我国 QX 型(GI-19)分离株的数量依然最多;此外, 4/91 型(GI-13)、类 LDT3 型、Mass 型(GI-1)、TW-I 型(GI-7)也广泛存在<sup>[47]</sup>。

对 1995–2005 年间分离的 110 株 LX4 型 IBV 毒株进行的起源和进化研究发现,基因重组可能是 LX4 型(GI-19) IBV 毒株出现的原因。其中大部分新产生毒株因为不能适应鸡只在 2005 年中期消失,而适应鸡只的 LX4 型(GI-19)毒株开始在 2005 年后不断进化,成为在国内快速传播和流行的毒株<sup>[66]</sup>。此外, Zhao 等对中国 1994–2014 年间

107 株 IBV 毒株的全基因组以及 1 022 个 S 基因的序列进行分析, 发现 IBV 基因大约平均以每年每个位点  $10^{-5}$  的频率发生碱基的替换, 且 QX 型(GI-19)随着时间推移所占比例越来越大<sup>[67]</sup>。

在华南地区, 李林林等对 2004–2008 年的 IBV 毒株 S1 基因进行系统进化分析后发现, 分离株主要聚类于 QX 型(GI-19)、4/91 型(GI-13)和 HN08 型(GI-22, 即北方地区所称的 LSC/99I 型, 四川等中部地区所称的 SAIBK 型), 与疫苗毒株之间的进化关系较远<sup>[34]</sup>。Ji 等在 2008–2009 年间对 IBV 进行流行病学调查发现绝大部分 IBV 分离株属于 A2 分支(GI-19)和 HN08 分支(GI-22)<sup>[36]</sup>。2011–2012 年间和 2013–2015 年间流行病学分析显示 QX 型仍为优势流行毒株<sup>[39,68]</sup>; 此外, TW I 型逐渐成为优势基因型<sup>[39,69]</sup>。以上研究表明, 在华南地区不同基因型的 IBV 毒株共同存在且一直处于进化阶段。

国外对 QX 基因型毒株的流行也进行了全面和大规模研究。Franzo 等采用贝叶斯系统动力学方法重建 QX 基因型(GI-19)的流行病学模式和种群历史来了解这种病毒的国际传播动态。该分析基于 1993–2015 年间从 18 个国家收集的 807 株 S1 片段序列, 证明该基因型早在首次鉴定前就起源于中国; 经过长时间的局部传播, 它开始以连续的浪潮向其他欧洲、亚洲和中东国家传播; 此外, 欧洲内部蔓延的速度要比洲际间快, 这可能反映了这些国家之间更密切的地理和经济关系; 对当地即意大利境内 QX 毒株进行环流重建发现, 不同地点之间显示出更为复杂的连接网络, 这证明在家禽高度密集的地区, 对 IBV 传播的控制更为困难<sup>[70]</sup>。

目前我国存在的 IBV 毒株中, QX 型(GI-19)毒株数量上仍占据优势, 预测该毒株流行趋势在近几年不会衰减。TW 型(GI-7)在国内也逐渐开始流行, 且数量呈每年递增趋势, 对该基因型的监测也应值得关注。4/91 型(GI-13)毒株在我国也广泛存在, 该基因型毒株的分离比例处于较为稳定的状态, 且易与其他毒株发生重组<sup>[44-46]</sup>, 与 4/91 型毒株联合的多价活疫苗应斟酌后使用。

#### 4 IBV 检测技术研究

IBV 临床症状与多种呼吸道疾病相似, 临床中常与新城疫病毒等混合感染<sup>[71]</sup>, IB 的确诊需依靠实验室检测技术, 其诊断方法主要包括病毒的分离与鉴定、血清学方法和分子生物学方法。

病毒的分离主要为鸡胚传代, 通过检查尿囊液是否对红细胞有凝集性, 判断有无流感病毒和新城疫病毒的污染, 同时做侏儒胚实验和 NDV 干扰实验来鉴定样品中是否含 IBV 病毒。

血清学方法主要为 ELISA 检测方法。ELISA 检测方法简便快速且敏感性好而被广泛应用于 IBV 的抗原抗体检测, OIE 也将其确定为标准方法。本实验室分别用 H120 和 M41 制备病毒样颗粒作为包被抗原, 建立了间接 ELISA 抗体检测方法。用该方法分别检测新城疫病毒、H1N1 和 H5N1 流感病毒的阳性血清, 结果均为阴性; 而且该检测方法对 IBV 病毒血清的检测结果显示批内重复实验和批间重复实验的变异系数均值(CV%)均小于 8%, 说明该方法特异性较强, 同时具有良好的重复性。

分子生物学技术包括 RT-PCR、RT-LAMP 以及 qRT-PCR 等。RT-PCR 的方法一般是根据 IBV 某基因的保守区域设计引物, 检验能否逆转录扩增出目的基因判别是否含有 IB 病毒, 是一种较为常用的方法。RT-PCR 常与 RFLP 即限制性酶切多态性分析技术联合使用, 研究表明 RFLP 分型结果与血清型能较好符合<sup>[72-73]</sup>。RT-LAMP 即逆转录环介导等温扩增技术, 因能恒温扩增、用时较短且能肉眼观察鉴定而被广泛用于田间试验。本实验室对 IBV 的 1a 基因保守区域设计 LAMP 引物及简并引物建立 RT-LAMP 方法, 既保证了种间特异性, 又保证了种内特异性。与一步法 RT-PCR 同步实验进行比较发现, RT-LAMP 灵敏性更高且更为特异, 适用于田间和简易实验室检测。qRT-PCR 即荧光定量 RT-PCR 多用于检测病毒拷贝数。Okino 等建立了一种基于 SYBR Green I RT-qPCR 对 S1 基因

高变区熔解温度分析的方法,快速检测不同基因型 IBV 毒株并鉴定其是否为 Mass 基因型。该方法可快速鉴定尿囊液甚至是组织中 Mass 基因型毒株<sup>[74]</sup>。

## 5 IBV 疫苗开发

IBV 血清型复杂,且不同血清型间交叉保护效果弱。目前市场上使用的 IBV 疫苗主要是减毒活疫苗和灭活疫苗,随着分子生物学技术的日益发展,新型基因工程疫苗的研制也成为研究热点,主要包括核酸疫苗、活病毒载体疫苗以及亚单位疫苗等。

IBV 减毒活疫苗能刺激机体产生良好的黏膜免疫、体液免疫和细胞免疫<sup>[75]</sup>,临床上获得了广泛应用。减毒活疫苗适用于群体免疫,常用于种鸡和蛋鸡的首免以及肉鸡的免疫,具有使用方便、生产成本低等特点。目前国内常用活疫苗有 H120、H52、Ma5、M41、28/86、W93 等 Mass 血清型以及 2011 年中国农业部批准的新型减毒活疫苗 LDT3-A 株和 2017 年批准的 4/91 型疫苗 NNA 株。

H120 和 H52 是我国引进的荷兰株疫苗,对我国流行的多数血清型 IBV 有较好的免疫效果,因此成为国内使用最广的两种疫苗。H120 常与新城疫病毒 La Sota 株制成二联苗用于初生雏鸡,不同品种均可使用。H52 毒力较 H120 强,只适用于接种 1 月龄以上的鸡,专供后备蛋鸡和种鸡的加强免疫接种,也常与新城疫病毒 La Sota 株制成二联苗。Ma5 株毒力弱,可用于 1 日龄以上育雏鸡和产蛋鸡。M41 毒力较强,在实践中主要用于育成鸡复免用,同时常与新城疫病毒、禽流感病毒、传染性法式囊病毒或减蛋综合症病毒制成三联或四联灭活苗。28/86 株毒力低,对肾型病变保护率较高,可用于任何日龄的鸡。W93 为我国自主研发的 Mass 血清型疫苗<sup>[76]</sup>。Liu 等于 2003 年从广东水鸭中分离到一株典型肾型 IBV 毒株 t/CH/LDT3/03<sup>[77]</sup>,并于 2011 年获得以此毒株研制的减毒活疫苗 LDT3-A 的注册证书。目前,LDT3-A 株疫苗是国内与 QX

关系最近的商品化疫苗株。2017 年 12 月刚获得注册证书的 NNA 株为类 4/91 型疫苗。4/91 型减毒活疫苗在 2017 年前虽然尚未得到官方批准使用,但在生产中的应用已经十分普遍,可用来预防鸡群发生深层肌肉病变和产蛋率下降。

针对临床上广为流行的 QX 型毒株,国内目前没有商品化的活疫苗。Karimi 等对 H120 和 Ma5 疫苗早期对抗 QX 毒株的疗效进行了观察,结果表明 H120 和 Ma5 均不能诱导对 QX 早期攻毒的适当交叉保护,建议采用其他形式和不同基因型的疫苗免疫 1 日龄雏鸡<sup>[78]</sup>。为了更好地防控该病的发生,国内学者通过不同方法尝试制备安全有效的 QX 型弱毒苗候选株,对雏鸡进行安全性和有效性试验,均得到良好的保护效果<sup>[11,79-80]</sup>。Feng 等采用传统的鸡胚传代获得 QX 型 YX10 株的致弱毒株 YX10p90 株,该毒株不引起 7 日龄 SPF 鸡的发病和死亡,对 QX 型毒株 YX10p5 可产生几乎完全的保护<sup>[11]</sup>。此外,Zhao 等也采用鸡胚传代获得 QX 型 YN 株的致弱毒株 aYN 株,致弱株相较于亲本株致病力更弱,能诱导机体产生更高的抗体滴度<sup>[80]</sup>,Yan 等又通过在鸡胚中连续传代 130 代制备减毒 QX 型 IBV 株 SZ130,并对其安全性进行了检测,所有 SZ130 株免疫组均无临床症状或严重病变,组织病毒复制率降低,纤毛摆动停滞减轻<sup>[81]</sup>。Xia 等采用在鸡胚肾细胞(CEK)中将 QX 型毒株 Sczy3 传至 100 代得到 SczyC100 株,该毒株经过致病性和毒力回归测试表明可用于 1 日龄 SPF 鸡,SczyC100 与 H120 和 4/91 对 QX 型和 TW-I 型毒株的攻毒保护表明,Sczy3C100 有效降低发病率、死亡率、组织损伤和鸡气管病毒载量<sup>[82]</sup>。本实验室利用极限稀释法获得一株 QX 型毒株 ZYY 的致弱毒株 ZYYR,对其致病力、安全性、遗传稳定性等进行了一系列评估。极限稀释法利用高稀释度将病毒粒子稀释,使单个病毒粒子进入单枚鸡胚内,从而在这种压力选择下筛选出最适合在鸡胚内生长的单一的、稳定遗传的、高滴度的病毒粒子。该方法可快速筛选出可能的疫苗候选株,大大缩短

了弱毒株的培育时间。致弱毒株 ZYYR 以  $10^{6.5}$  EID<sub>50</sub>/羽接种 1 日龄 SPF 鸡, 发现不引起死亡和病变。对 QX 型强毒株 HSJ 株和 Mass 型经典强毒 M41 株均具有攻毒保护<sup>[79]</sup>。

2016 年对一株自然重组的 TW-I 型 CH/LDL/140520 毒株的血清型、抗原性、致病性的研究表明, 已有的疫苗株或减毒株对此株 IBV 无完全气管保护力<sup>[83]</sup>。针对 TW (GI-7) 型毒株在国内的流行趋势, 对 TW-I 型毒株是否产生免疫保护应成为疫苗研究新的判断标准。

IB 灭活疫苗是由完整的 IBV 颗粒经理化方法灭活后制备的疫苗, 安全性好且易于保存, 主要在种鸡、蛋鸡开产时使用。灭活疫苗单独使用不能提供良好的免疫保护能力, 因此常用在活疫苗之后用来加强免疫。IBV 往往与新城疫病毒、禽流感病毒等组成多联灭活苗。

核酸疫苗由编码能引起保护性免疫反应的 IBV 抗原的基因片段和载体构建而成, 在构建多价疫苗方面具有突出的优势, 如 Yang 等构建的 IBV 多价 DNA 疫苗<sup>[84]</sup>。活病毒载体疫苗是利用分子生物学遗传工程技术将保护性抗原基因整合进病毒载体基因组中, 构建成表达 IBV 抗原的重组活载体疫苗。

亚单位疫苗是指通过选取病原微生物的主要免疫原性蛋白基因, 利用不同的表达系统如大肠杆菌、杆状病毒和酵母在体外进行高效表达, 然后提取目的蛋白用来制备成亚单位疫苗。目前有关 IBV 基因工程亚单位疫苗的研究报道主要围绕 IBV 的主要免疫原性蛋白 S1 蛋白和 N 蛋白开展研究<sup>[85-89]</sup>。这些研究显示, S1 基因和 N 基因均能够在体外得到高效表达, 但是存在着部分或完全不能糖基化和磷酸化等问题, 制备的疫苗需要经过多次加强免疫后才具有免疫保护作用, 并且攻毒保护水平并不高, 作为商品化疫苗的应用前景不够理想。在大肠杆菌中表达具有 IBV 多抗原表位的多肽, 并通过肌肉注射方式免疫 SPF 鸡的攻毒实验结果表明, 该多肽疫苗可对免疫鸡提供 80% 的保护

率<sup>[90]</sup>。利用杆状病毒表面展示技术表达 S1 蛋白的免疫试验结果表明, 疫苗可以刺激机体产生体液免疫和细胞免疫, 可对免疫鸡提供 83% 的保护<sup>[91]</sup>。本实验室根据前期研究的发现, 即 H3N2 流感病毒 HA 蛋白的跨膜区具有独特的结构, 若将该跨膜区替换到 H1、H5 或 H9 亚型的 HA 蛋白上能提高相应 HA 蛋白的稳定性和免疫原性, 利用昆虫杆状病毒表达系统分别表达 IBV S1 蛋白、S1-H3 (TM) 融合蛋白和 S1-HA2 融合蛋白, 结果表明, 用这些重组蛋白免疫 SPF 鸡, 与灭活疫苗组和 rS1 蛋白组相比, 融合蛋白(rS1-H3 (TM)和 rS1-HA2)能诱导机体产生更高的 IgG 抗体, 能更有效地活化 T 淋巴细胞, 且攻毒保护效果良好。此外, 增加 rS1-HA2 亚单位疫苗的免疫剂量可以提高试验鸡的抗体滴度和攻毒保护效力, 而且该疫苗安全性好<sup>[92]</sup>。

病毒样颗粒(Virus-like particles, VLPs)是含有病毒的一个或多个结构蛋白的空心颗粒, 没有病毒核酸, 不能自主复制。VLPs 作为一种新型基因工程疫苗, 与传统疫苗相比具有免疫原性强、不依赖于鸡胚、安全性高等许多优势。本实验室利用杆状病毒表达系统将表达 IBV-H120 毒株 M 蛋白及 S 蛋白的杆毒感染昆虫细胞后, 可自主组装成 IBV-VLPs; 将该 VLPs 分别在 SPF BALB/c 小鼠和 SPF 鸡上进行免疫实验, 产生的 IgG 抗体水平与灭活疫苗组相当; 在细胞免疫方面, VLP 实验组的免疫效果显著优于灭活疫苗组<sup>[93]</sup>。将表达 IBV-H120 S1 蛋白及流感病毒 H5N1 NA 跨膜区(含胞内区)的融合蛋白 NA/S1 的重组杆状病毒 r-NA/S1 和表达流感病毒 H5N1 M1 蛋白的重组杆状病毒 r-M1 一起感染昆虫细胞 SF9, 获得由 M1 和融合蛋白 NA/S1 包装而成的嵌合 VLP-M1-NA/S1, 动物免疫保护试验表明该 VLPs 相对于灭活疫苗, 能在 SPF 鸡中引发更高的中和抗体水平, 在小鼠中引发更高的 IL-4 水平<sup>[94]</sup>。

通过反向遗传学操作进行疫苗制备也在被尝试。有研究报道, IBV 辅助蛋白缺失株相较于野毒株在体内外实验中均毒力降低<sup>[95]</sup>, 且 IBV 辅助蛋白

缺失株相较于野毒株对 I 型干扰素更为敏感<sup>[96]</sup>。van Beurden 等通过一种新的基于靶向 RNA 重组的反向遗传学系统来操作 IBV 株 H52 的基因组<sup>[97]</sup>, 拯救出的 3ab 或 5ab 基因缺失的重组减毒株可预防鸡传染性支气管炎<sup>[98]</sup>。重组(r) rIBV-D3ab、rIBV-D5ab、rIBV-D3ab5ab 株与重组野生型毒株 rH52 具有相同的病毒效价, 与 rH52 和野生型 H52 相比, rIBV-d3ab、rIBV-d5ab 和 rIBV-d3ab5ab 在感染 1 日龄鸡时, 气管纤毛摆动停滞被减轻。

此外, 研究者也尝试加入不同佐剂来提高 IBV 疫苗免疫效力。黄芪多糖由黄芪中提取, 可作为免疫促进剂或调节剂。国内学者尝试将黄芪多糖作为 DNA 疫苗的佐剂, 结果表明使用黄芪多糖作为佐剂可剂量依赖性提高 IBV 特异性抗体滴度, 诱导淋巴细胞增殖以及 IL-1b、IL-2、IL-8、TNF- $\alpha$  的 mRNA 上调<sup>[99]</sup>。体外实验表明, 经黄芪多糖处理后, 感染 CEK 细胞的 IBV 滴度明显降低, 且呈剂量依赖性<sup>[100]</sup>。此外, 国外有研究报道采用壳聚糖纳米颗粒通过离子交联法包裹灭活 IBV 疫苗可诱导黏膜免疫应答, 提供有效攻毒保护<sup>[101]</sup>。国内学者也做出用季胺化壳聚糖纳米颗粒作为黏膜佐剂制备 NDV 和 IBV 联合减毒活疫苗的尝试<sup>[102]</sup>。

目前对 IBV 疫苗研制的报道虽然不少, 但符合市场需求的仍然为减毒活疫苗和灭活疫苗。活疫苗存在毒力返强、易与野生毒株发生重组以及疫苗研制速度跟不上毒株变异速度的问题, 不能从根本上防控该病; 灭活疫苗单独使用达不到足够的保护效果。该病的防控将是一个持久战, 安全有效的弱毒疫苗亟待开发, 如何提高研制速度从而及时有效控制当时的优势流行毒株显得尤为重要。

同时, IBV 灭活疫苗单独使用不能提供足够的免疫保护, 其机制尚不清楚。研究宿主与病毒的相互作用机制, 制备广谱高抗原性的亚单位疫苗的研制也许会成为突破口。其次, 禽类对 IBV 疫苗应答的水平和持续时间取决于许多因素, 包括禽类的年龄、母体抗体(MDA)水平、禽类的免疫能力、攻毒毒株的毒性和类型以及疫苗接种和攻毒之间的

间隔, 当然还有疫苗的免疫原性。对疫苗进行评估时所有因素都应该被考虑, 应建立全面系统的疫苗评估体系。

## 6 IBV 免疫程序研究

目前国内对 IB 的防控除采取严格的生物安全措施外, 主要通过疫苗免疫接种来预防和控制该病, 但不合理的免疫程序导致免疫失败的情况时有发生。目前, 为有效防治 IBV 的发生, 国内多将弱毒疫苗滴鼻和灭活疫苗注射结合起来使用。如在种鸡和蛋鸡开产前, 接种鸡传染性支气管炎油剂灭活苗可使整个产蛋期都获得抗体保护, 同时在产蛋期每间隔 8-10 周接种弱毒疫苗进行局部加强免疫, 对鸡传染性支气管炎的发生有较好的预防作用。

使用活疫苗时要注意疫苗在常温环境中毒力下降快, 疫苗稀释后必须在 30 min 内滴完<sup>[103]</sup>。活疫苗免疫最好采用滴鼻或点眼的免疫方法, 有利于局部抗体的产生。有研究指出, 用 Ma5+IBV 变异株组合疫苗免疫, 能有效保护 QX 株对鸡群的感染<sup>[60]</sup>。本实验室设置不同免疫程序对 SPF 鸡进行免疫, 结果表明相较于单独 H120 二免、单独 IBV 变异株二免的免疫程序, 使用 IBV 变异株/H120 二价活疫苗免疫 SPF 鸡, 攻毒后内脏和气管中病毒平均拷贝数最低, 泄殖腔拭子拷贝数较低, 其总拷贝数最低, 保护效果最好。因此, 不同基因型 IBV 活疫苗组合使用可以显著提高对鸡只的免疫效果。Karimi 等设置两种免疫程序, 第 1 天和第 14 天(滴眼)分别接种 H120 和 793/B 疫苗, 第 1 天和第 14 天分别接种 H120+793/B (滴眼)和 793/B 疫苗, 结果表明对 1 日龄鸡使用 793/B 型 IBV 疫苗对 QX 基因型的保护作用增强<sup>[104]</sup>。

此外, IBV 灭活疫苗因免疫后引起机体体液免疫反应低下, 攻毒保护效果不佳, 一般不单独使用。本实验室在研究灭活疫苗的免疫效果与抗原量的相关性时, 采用超速离心浓缩病毒以制备不同抗原含量的 IBV 灭活疫苗免疫 SPF 鸡, 发现攻毒保护



率和抗体滴度与抗原量呈正相关。因此,在适当程度下增大灭活疫苗的使用量可提高保护效果。

总而言之,疫苗免疫应严格按照免疫程序,同时建议采用不同基因型疫苗株组合免疫,以使疫苗免疫达到最佳效果。此外,我们发现增加灭活疫苗使用量可提高免疫保护效果。

## 7 IBV 综合防控措施

传染性支气管炎为病毒性疾病,发生后无特效药物治疗,采取综合防控措施对于减少或消除 IB 的发生十分重要。养殖场应适时接种疫苗,免疫接种前制定详细的免疫计划,应严格按照最合适的免疫程序进行免疫,并长期对鸡群进行 IBV 监测。IBV 的防控更重要的是从源头上阻断传染源,坚持全进全出的饲养模式;健全生物安全管理体系;改善饲养环境,注意控制鸡舍内温度、湿度,注意通风换气,及时清理鸡舍内的粪便、废料等,防止有害气体浓度过大刺激呼吸道;供给营养丰富均衡的饲料,并在日粮中适当增加维生素、矿物质和其他营养物质的含量,以提高机体对疾病的抵御能力;建立健全鸡场的卫生消毒制度,定期对鸡场、鸡舍、鸡笼、器具等进行消毒并且带鸡消毒。对发病鸡群注意保暖、通风换气、带鸡消毒、适当增加多维用量、适度使用抗生素控制继发感染等可有效减少发病鸡死亡。

鸡群发生 IBV 感染后国外往往不进行治疗,但是,因为中药能够调节、促进机体的免疫功能,具有非特异性抗病原微生物作用,残毒较低或无残毒,不易产生抗药性,且中药治疗成本较低,临床治疗效果较好,因此我国的兽医工作者运用中兽医理论结合现代疫病疗法,对中药防治鸡传染性支气管炎进行了大量的研究工作。赵玉玲采用由荆芥、防风、薄荷、羌活、独活、柴胡、前胡、甘草、桔梗、川芎、枳壳、茯苓等组成的荆防败毒散对自然发生传染性支气管炎的病鸡进行治疗,高剂量组用药 48 h 后,病情能得到有效控制,治疗 5 d 后鸡群康复,治愈率达 93%<sup>[105]</sup>。王萌等于 IBV 症状出现

24 h 后,治疗组连续 5 d 给予由板蓝根、大青叶、黄芩、连翘、鱼腥草等 11 味中药制成的水煎液,实验结果表明,随药物剂量的增大,可诱导 IFN $\alpha$  和 IFN $\beta$  持续产生,降低发病率,提高治愈率<sup>[106]</sup>。杨明凡等应用由黄芩、连翘、金银花、板蓝根、玄参、大青叶等组成的复方中药制剂防治鸡传染性支气管炎,采用攻毒前 5 d 在饲料中添加中药复方制剂和攻强毒后 2 d 开始在饲料中添加该复方制剂,预防率可达 100%,治愈率达 93.3%<sup>[107]</sup>。此外,给发病鸡口服中药“肾肺消”,治愈率高达 96%,并且口服黄芪、红花、板蓝根等中药能够有效预防和治疗 T 株<sup>[108]</sup>。

在我国,中药被广泛地应用于鸡肾型传染性支气管炎的治疗。此外,国内也常将中药治疗结合常规西医治疗以起到标本兼治的效果,可以有效减少养鸡业的损失。

## 8 结语

禽传染性支气管炎病毒血清型众多、流行时间长,其不同基因型毒株同时存在的情况下,新的变异株不断出现,为该病的防控带来了严峻挑战,对该病的防控将是一场持久战。加强流行病学监测、了解病毒流行规律是控制该病的基础。采用 2 种不同血清型弱毒活疫苗组合免疫可以增加免疫保护谱,对多种流行毒株具有保护作用,但同时要考虑疫苗株重组的风险。在加强生物安全措施的前提下,采用科学的免疫程序可以有效控制传染性支气管炎的流行,减少经济损失。

## REFERENCES

- [1] de Wit JJ, Cook JKA, van der Heijden HM. Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures[J]. *Avian Pathology*, 2011, 40(3): 223-235
- [2] Cavanagh D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus[J]. *Veterinary Research*, 2007, 38(2): 281-297
- [3] Cavanagh D, Davis PJ, Darbyshire JH, et al. Coronavirus IBV: virus retaining spike glycopolyptide S2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination-inhibiting antibody, or induce chicken tracheal protection[J]. *Journal of General Virology*, 1986, 67: 1435-1442
- [4] Casais R, Dove B, Cavanagh D, et al. Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene

- demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism[J]. *Journal of Virology*, 2003, 77(16): 9084-9089
- [5] Cavanagh D, Darbyshire JH, Davis P, et al. Induction of humoral neutralising and haemagglutination-inhibiting antibody by the spike protein of avian infectious bronchitis virus[J]. *Avian Pathology*, 1984, 13(3): 573-583
- [6] Cavanagh D, Davis PJ, Pappin DJC. Coronavirus IBV glycopolypeptides: locational studies using proteases and saponin, a membrane permeabilizer[J]. *Virus Research*, 1986, 4(2): 145-156
- [7] Cavanagh D, Davis PJ, Pappin DJC, et al. Coronavirus IBV: partial amino terminal sequencing of spike polypeptide S2 identifies the sequence Arg-Arg-Phe-Arg-Arg at the cleavage site of the spike precursor propolypeptide of IBV strains Beaudette and M41[J]. *Virus Research*, 1986, 4(2): 133-143
- [8] Cavanagh D, Davis PJ, Mockett APA. Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes[J]. *Virus Research*, 1988, 11(2): 141-150
- [9] Lee SK, Sung HW, Kwon HM. S1 glycoprotein gene analysis of infectious bronchitis viruses isolated in Korea[J]. *Archives of Virology*, 2004, 149(3): 481-494
- [10] Cowen BS, Hitchner SB. Serotyping of avian infectious bronchitis viruses by the virus-neutralization test[J]. *Avian Diseases*, 1975, 19(3): 583-595
- [11] Feng KY, Xue Y, Wang JL, et al. Development and efficacy of a novel live-attenuated QX-like nephropathogenic infectious bronchitis virus vaccine in China[J]. *Vaccine*, 2015, 33(9): 1113-1120
- [12] Cook JKA, Jackwood M, Jones RC. The long view: 40 years of infectious bronchitis research[J]. *Avian Pathology*, 2012, 41(3): 239-250
- [13] Xin CA, Chen TJ. The research of chicken infectious bronchitis — I. Isolation and identification of chicken infectious bronchitis virus in Guangzhou[J]. *Journal of South China Agricultural College*, 1982, 3(1): 90-98 (in Chinese)  
辛朝安, 陈天杰. 鸡传染性支气管炎的研究——I. 广州地区鸡传染性支气管炎病毒的分离与鉴定[J]. *华南农学院学报*, 1982, 3(1): 90-98
- [14] Li KR, Liang MF, Wei P, et al. Isolation and identification of avian infectious bronchitis virus nephrotic strain[J]. *Journal of Guangxi Agricultural College*, 1990, 9(1): 45-54 (in Chinese)  
李康然, 梁梅芳, 韦平, 等. 鸡传染性支气管炎病毒肾致病株的分离和鉴定[J]. *广西农学院学报*, 1990, 9(1): 45-54
- [15] Du YZ, Fan GC, Zhu WG, et al. Isolation and identification of the variant strain of infectious bronchitis virus in layers[J]. *China Animal Infectious Disease*, 1995(6): 1-4 (in Chinese)  
杜元钊, 范根成, 朱万光, 等. 产蛋鸡传染性支气管炎病毒变异株的分离鉴定[J]. *中国畜禽传染病*, 1995(6): 1-4
- [16] Wang YD, Zhang ZC, Wang YL, et al. A preliminary report on the study of glandular stomach type infectious bronchitis of chickens[J]. *Chinese Journal of Animal Quarantine*, 1997, 14(3): 6-8 (in Chinese)  
王玉东, 张子春, 王永玲, 等. 鸡腺胃型传染性支气管炎研究初报[J]. *中国动物检疫*, 1997, 14(3): 6-8
- [17] Rong JG, Kang LJ, Gu SL, et al. Isolation and identification of a proventriculus disease avian infectious bronchitis virus[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 1999(2): 124-127 (in Chinese)  
荣骏弓, 康丽娟, 谷守林, 等. 腺胃病变型鸡传染性支气管炎病毒的分离鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 1999(2): 124-127
- [18] He XY, Liu SW, Wang W, et al. Biological properties of an avian infectious bronchitis virus isolated from China[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2002, 24(5): 349-353 (in Chinese)  
贺秀媛, 刘胜旺, 王玮, 等. 我国鸡传染性支气管炎病毒地方分离株生物学特性的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2002, 24(5): 349-353
- [19] Liu SW, Zhang QX, Chen JD, et al. Genetic diversity of avian infectious bronchitis coronavirus strains isolated in China between 1995 and 2004[J]. *Archives of Virology*, 2006, 151(6): 1133-1148
- [20] Jackwood MW. Review of infectious bronchitis virus around the world[J]. *Avian Diseases*, 2012, 56(4): 634-641
- [21] Bochkov YA, Batchenko GV, Shcherbakova LO, et al. Molecular epidemiology of avian infectious bronchitis in Russia[J]. *Avian Pathology*, 2006, 35(5): 379-393
- [22] Benyeda Z, Mató T, Süveges T, et al. Comparison of the pathogenicity of QX-like, M41 and 793/B infectious bronchitis strains from different pathological conditions[J]. *Avian Pathology*, 2009, 38(6): 449-456
- [23] Benyeda Z, Szeredi L, Mató T, et al. Comparative histopathology and immunohistochemistry of QX-like, Massachusetts and 793/B serotypes of infectious bronchitis virus infection in chickens[J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2010, 143(4): 276-283
- [24] Abro SH, Renström LH, Ullman K, et al. Emergence of novel strains of avian infectious bronchitis virus in Sweden[J]. *Veterinary Microbiology*, 2012, 155(2/4): 237-246
- [25] Beato MS, De Battisti C, Terregino C, et al. Evidence of circulation of a Chinese strain of infectious bronchitis virus (QXIBV) in Italy[J]. *The Veterinary Record*, 2005, 156(22): 720
- [26] de Wit JJ, Nieuwenhuisen-van WJ, Hoogkamer A, et al. Induction of cystic oviducts and protection against early challenge with infectious bronchitis virus serotype D388 (genotype QX) by maternally derived antibodies and by early vaccination[J]. *Avian Pathology*, 2011, 40(5): 463-471
- [27] Gough RE, Cox WJ, de B Welchman D, et al. Chinese QX strain of infectious bronchitis virus isolated in the UK[J]. *The Veterinary Record*, 2008, 162(3): 99-100
- [28] Monne I, Cattoli G, Jones R, et al. QX genotypes of infectious bronchitis virus circulating in Europe[J]. *The Veterinary Record*, 2008, 163(20): 606-607
- [29] Valastro V, Monne I, Fasolato M, et al. QX-type infectious bronchitis virus in commercial flocks in the UK[J]. *The Veterinary Record*, 2010, 167(22): 865-866
- [30] Worthington KJ, Currie RJW, Jones RC. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006[J]. *Avian Pathology*, 2008, 37(3): 247-257
- [31] Cook JK, Orbell SJ, Woods MA, et al. A survey of the presence of a new infectious bronchitis virus designated 4/91 (793B)[J]. *The Veterinary Record*, 1996, 138(8): 178-180

- [32] Liu XL, Su JL, Zhao JX, et al. Complete genome sequence analysis of a predominant infectious bronchitis virus (IBV) strain in China[J]. *Virus Genes*, 2009, 38(1): 56-65
- [33] Zhao JX, Qin ZM. Studies on the isolated strain of IBV which was similar to 4/91[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2002, 24(5): 360-363 (in Chinese)  
赵继勋, 秦卓明. 一株类 4/91 病毒的初步研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2002, 24(5): 360-363
- [34] Li LL, Xue CY, Chen F, et al. Isolation and genetic analysis revealed no predominant new strains of avian infectious bronchitis virus circulating in South China during 2004-2008[J]. *Veterinary Microbiology*, 2010, 143(2/4): 145-154
- [35] Luo HB, Qin JP, Chen F, et al. Phylogenetic analysis of the S1 glycoprotein gene of infectious bronchitis viruses isolated in China during 2009-2010[J]. *Virus Genes*, 2012, 44(1): 19-23
- [36] Ji J, Xie JW, Chen F, et al. Phylogenetic distribution and predominant genotype of the avian infectious bronchitis virus in China during 2008-2009[J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 184
- [37] Xie Q, Ji J, Xie J, et al. Epidemiology and immunoprotection of nephropathogenic avian infectious bronchitis virus in southern China[J]. *Virology Journal*, 2011, 8: 484
- [38] Yang JH, Diao YX, Yu SY, et al. Isolation and sequence analysis of S1 gene of avian infectious bronchitis virus A field strain[J]. *Virologica Sinica*, 2005, 20(3): 283-287 (in Chinese)  
杨杰华, 刁有祥, 于申业, 等. 鸡传染性支气管炎病毒变异株的分离及其 S1 基因序列分析[J]. *中国病毒学*, 2005, 20(3): 283-287
- [39] Feng KY, Wang F, Xue Y, et al. Epidemiology and characterization of avian infectious bronchitis virus strains circulating in southern China during the period from 2013-2015[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 6576
- [40] Wang CH, Tsai CT. Genetic grouping for the isolates of avian infectious bronchitis virus in Taiwan[J]. *Archives of Virology*, 1996, 141(9): 1677-1688
- [41] Wang CH, Huang YC. Relationship between serotypes and genotypes based on the hypervariable region of the S1 gene of infectious bronchitis virus[J]. *Archives of Virology*, 2000, 145(2): 291-300
- [42] Huang YP, Wang CH. Development of attenuated vaccines from Taiwanese infectious bronchitis virus strains[J]. *Vaccine*, 2006, 24(6): 785-791
- [43] Yang JT, Ma BC. Complete genome sequence of a nephropathogenic infectious bronchitis virus strain isolated in China[J]. *Genome Announcements*, 2013, 1(5): e00815-13
- [44] Feng KY, Chen T, Zhang X, et al. Molecular characteristic and pathogenicity analysis of a virulent recombinant avian infectious bronchitis virus isolated in China[J]. *Poultry Science*, 2018, 97(10): 3519-3531
- [45] Liu XL, Ma HJ, Xu QQ, et al. Characterization of a recombinant coronavirus infectious bronchitis virus with distinct S1 subunits of spike and nucleocapsid genes and a 3' untranslated region[J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 162(2/4): 429-436
- [46] Zhang TT, Han ZX, Xu QQ, et al. Serotype shift of a 793/B genotype infectious bronchitis coronavirus by natural recombination[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2015, 32: 377-387
- [47] Xu LW, Han ZX, Jiang L, et al. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus in China in recent years[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2018, 66: 82-94
- [48] Han ZX, Gao MY, Chen YQ, et al. Genetics, antigenicity and virulence properties of three infectious bronchitis viruses isolated from a single tracheal sample in a chicken with respiratory problems[J]. *Virus Research*, 2018, 257: 82-93
- [49] Han ZX, Jiang L, Zhao WJ, et al. Isolation and characteristics of the arkansas-type infectious bronchitis virus in China[J]. *Avian Diseases*, 2018, 62(1): 18-27
- [50] Jackwood MW, Hilt DA, Lee CW, et al. Data from 11 years of molecular typing infectious bronchitis virus field isolates[J]. *Avian Diseases*, 2005, 49(4): 614-618
- [51] Cumming RB. The control of avian infectious bronchitis/nephrosis in Australia[J]. *Australian Veterinary Journal*, 1969, 45(4): 200-203
- [52] Ignjatovic J, Gould G, Sapats S. Isolation of a variant infectious bronchitis virus in Australia that further illustrates diversity among emerging strains[J]. *Archives of Virology*, 2006, 151(8): 1567-1585
- [53] Mardani K, Noormohammadi AH, Ignjatovic J, et al. Naturally occurring recombination between distant strains of infectious bronchitis virus[J]. *Archives of Virology*, 2010, 155(10): 1581-1586
- [54] Cavanagh D, Davis PJ. Evolution of avian coronavirus IBV: sequence of the matrix glycoprotein gene and intergenic region of several serotypes[J]. *Journal of General Virology*, 1988, 69: 621-629
- [55] Lee EK, Jeon WJ, Lee YJ, et al. Genetic diversity of avian infectious bronchitis virus isolates in Korea between 2003 and 2006[J]. *Avian Diseases*, 2008, 52(2): 332-337
- [56] Mase M, Kawanishi N, Ootani Y, et al. A novel genotype of avian infectious bronchitis virus isolated in Japan in 2009[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2010, 72(10): 1265-1268
- [57] Mase M, Tsukamoto K, Imai K, et al. Phylogenetic analysis of avian infectious bronchitis virus strains isolated in Japan[J]. *Archives of Virology*, 2004, 149(10): 2069-2078
- [58] Ariyoshi R, Kawai T, Honda T, et al. Classification of IBV S1 genotypes by direct reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and relationship between serotypes and genotypes of strains isolated between 1998 and 2008 in Japan[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2010, 72(6): 687-692
- [59] Han ZX, Sun CY, Yan BL, et al. A 15-year analysis of molecular epidemiology of avian infectious bronchitis coronavirus in China[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2011, 11(1): 190-200
- [60] Terregino C, Toffan A, Beato MS, et al. Pathogenicity of a QX strain of infectious bronchitis virus in specific pathogen free and commercial broiler chickens, and evaluation of protection induced by a vaccination programme based on the Ma5 and 4/91 serotypes[J]. *Avian Pathology*, 2008, 37(5): 487-493
- [61] Li M, Wang XY, Wei P, et al. Serotype and genotype diversity of infectious bronchitis viruses isolated during 1985-2008 in Guangxi, China[J]. *Archives of Virology*, 2012, 157(3): 467-474
- [62] Liu S, Zhang X, Wang Y, et al. Molecular characterization and pathogenicity of infectious bronchitis coronaviruses: complicated evolution and epidemiology in china caused by cocirculation of multiple types of infectious bronchitis coronaviruses[J]. *Intervirology*, 2009, 52(4): 223-234

- [63] Zou NL, Zhao FF, Wang YP, et al. Genetic analysis revealed LX4 genotype strains of avian infectious bronchitis virus became predominant in recent years in Sichuan area, China[J]. *Virus Genes*, 2010, 41(2): 202-209
- [64] Zhang ZK, Zhou YS, Wang HN, et al. Molecular detection and Smoothing spline clustering of the IBV strains detected in China during 2011-2012[J]. *Virus Research*, 2016, 211: 145-150
- [65] Xia J, He X, Yao KC, et al. Phylogenetic and antigenic analysis of avian infectious bronchitis virus in southwestern China, 2012-2016[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2016, 45: 11-19
- [66] Zhao WJ, Gao MY, Xu QQ, et al. Origin and evolution of LX4 genotype infectious bronchitis coronavirus in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 198: 9-16
- [67] Zhao Y, Zhang H, Zhao J, et al. Evolution of infectious bronchitis virus in China over the past two decades[J]. *Journal of General Virology*, 2016, 97(7): 1566-1574
- [68] Feng KY, Xue Y, Wang F, et al. Analysis of S1 gene of avian infectious bronchitis virus isolated in southern China during 2011-2012[J]. *Virus Genes*, 2014, 49(2): 292-303
- [69] Zhang XR, Wu YT. Epidemic dynamics and its prevention and control measures of avian infectious bronchitis[J]. *China Poultry*, 2016, 38(16): 1-5 (in Chinese)  
张小荣, 吴艳涛. 禽传染性支气管炎流行动态与防控对策[J]. *中国家禽*, 2016, 38(16): 1-5
- [70] Franzo G, Massi P, Tucciarone CM, et al. Think globally, act locally: Phylodynamic reconstruction of infectious bronchitis virus (IBV) QX genotype (GI-19 lineage) reveals different population dynamics and spreading patterns when evaluated on different epidemiological scales[J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e184401
- [71] Saba SA, Mardani K. Molecular detection of infectious bronchitis and Newcastle disease viruses in broiler chickens with respiratory signs using Duplex RT-PCR[J]. *Veterinary Research Forum*, 2014, 5(4): 319-323
- [72] Lin Z, Kato A, Kudou Y, et al. A new typing method for the avian infectious bronchitis virus using polymerase chain reaction and restriction enzyme fragment length polymorphism[J]. *Archives of Virology*, 1991, 116(1/4): 19-31
- [73] Mo ML, Li KR, Wei P. Diagnosis of IBV and typing of the S1 glycoprotein gene by using RT-PCR and RFLP analysis[J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2001, 23(4): 277-282 (in Chinese)  
磨美兰, 李康然, 韦平. RT-PCR 及 RFLP 分析技术对鸡传染性支气管炎病毒的诊断和 S1 基因分型的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2001, 23(4): 277-282
- [74] Okino CH, de Fátima Silva Montassier M, de Oliveira AP, et al. Rapid detection and differentiation of avian infectious bronchitis virus: an application of Mass genotype by melting temperature analysis in RT-qPCR using SYBR Green I[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2018, 80(4): 725-730
- [75] Guo XS, Rosa AJM, Chen DG, et al. Molecular mechanisms of primary and secondary mucosal immunity using avian infectious bronchitis virus as a model system[J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2008, 121(3/4): 332-343
- [76] Liu SW. Epidemiology and analysis of avian infectious bronchitis in China[J]. *China Poultry*, 2010, 32(16): 5-9 (in Chinese)  
刘胜旺. 我国鸡传染性支气管炎流行现状及原因分析[J]. *中国家禽*, 2010, 32(16): 5-9
- [77] Liu SW, Chen JF, Chen JD, et al. Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (*Pavo cristatus*) and teal (*Anas*)[J]. *Journal of General Virology*, 2005, 86: 719-725
- [78] Karimi V, Ghalyanchilangeroudi A, Hashemzadeh M, et al. Efficacy of H120 and Ma5 avian infectious bronchitis vaccines in early challenge against QX strain[J]. *VirusDisease*, 2018, 29(1): 123-126
- [79] Zhang Y, Huang SJ, Zeng YY, et al. Rapid development and evaluation of a live-attenuated QX-like infectious bronchitis virus vaccine[J]. *Vaccine*, 2018, 36(29): 4245-4254
- [80] Zhao Y, Cheng JL, Liu XY, et al. Safety and efficacy of an attenuated Chinese QX-like infectious bronchitis virus strain as a candidate vaccine[J]. *Veterinary Microbiology*, 2015, 180(1/2): 49-58
- [81] Yan SH, Zhao J, Xie DQ, et al. Attenuation, safety, and efficacy of a QX-like infectious bronchitis virus serotype vaccine[J]. *Vaccine*, 2018, 36(14): 1880-1886
- [82] Xia J, He X, Du LJ, et al. Preparation and protective efficacy of a chicken embryo kidney cell-attenuation GI-19/QX-like avian infectious bronchitis virus vaccine[J]. *Vaccine*, 2018, 36(28): 4087-4094
- [83] Gao MY, Wang QL, Zhao WJ, et al. Serotype, antigenicity, and pathogenicity of a naturally recombinant TW I genotype infectious bronchitis coronavirus in China[J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 191: 1-8
- [84] Yang T, Wang HN, Wang X, et al. Multivalent DNA vaccine enhanced protection efficacy against infectious bronchitis virus in chickens[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2009, 71(12): 1585-1590
- [85] Song CS, Lee YJ, Lee CW, et al. Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus[J]. *Journal of General Virology*, 1998, 79: 719-723
- [86] Kapczynski DR, Hilt DA, Shapiro D, et al. Protection of chickens from infectious bronchitis by in ovo and intramuscular vaccination with a DNA vaccine expressing the S1 glycoprotein[J]. *Avian Diseases*, 2003, 47(2): 272-285
- [87] Huang YD, Zheng Q, Li XK, et al. Cloning of spike protein S1 gene of avian infectious bronchitis virus H strain and its expression in *Pichia pastoris*[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2003, 19(2): 144-148 (in Chinese)  
黄亚东, 郑青, 李校堃, 等. 鸡传染性支气管炎病毒 H 株纤突蛋白 S1 基因的克隆及其在毕赤酵母中表达[J]. *病毒学报*, 2003, 19(2): 144-148
- [88] Zhou JY, Ding HM, Cheng LQ, et al. Cloning of nucleocapsid protein gene of infectious bronchitis virus and expression in *E. coli*[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002, 18(4): 450-455 (in Chinese)  
周继勇, 丁红梅, 程丽琴, 等. 传染性支气管炎病毒核衣壳蛋白基因克隆及在 *E. coli* 中的表达[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, 18(4): 450-455
- [89] Zhang SX, He XY, Cui BA, et al. Expression of avian infectious

- bronchitis virus HN99 strain nucleocapsid protein gene in *E. coli* and immunological activity detection of expressed product[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2007, 35(4): 32-36,40 (in Chinese)
- 张淑霞, 贺秀媛, 崔保安, 等. 鸡传染性支气管炎病毒 HN99 株 N 基因在大肠杆菌中的表达及产物免疫活性检测[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(4): 32-36,40
- [90] Yang T, Wang HN, Wang X, et al. The protective immune response against infectious bronchitis virus induced by multi-epitope based peptide vaccines[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2009, 73(7): 1500-1504
- [91] Zhang J, Chen XW, Tong TZ, et al. BacMam virus-based surface display of the infectious bronchitis virus (IBV) S1 glycoprotein confers strong protection against virulent IBV challenge in chickens[J]. Vaccine, 2014, 32(6): 664-670
- [92] Yin LJ, Zeng YY, Wang W, et al. Immunogenicity and protective efficacy of recombinant fusion proteins containing spike protein of infectious bronchitis virus and hemagglutinin of H3N2 influenza virus in chickens[J]. Virus Research, 2016, 223: 206-212
- [93] Liu GM, Lv LS, Yin LJ, et al. Assembly and immunogenicity of coronavirus-like particles carrying infectious bronchitis virus M and S proteins[J]. Vaccine, 2013, 31(47): 5524-5530
- [94] Lv LS, Li XM, Liu GM, et al. Production and immunogenicity of chimeric virus-like particles containing the spike glycoprotein of infectious bronchitis virus[J]. Journal of Veterinary Science, 2014, 15(2): 209-216
- [95] Laconi A, van Beurden SJ, Berends AJ, et al. Deletion of accessory genes 3a, 3b, 5a or 5b from avian coronavirus infectious bronchitis virus induces an attenuated phenotype both *in vitro* and *in vivo*[J]. Journal of General Virology, 2018, 99: 1381-1390
- [96] Kint J, Dickhout A, Kutter J, et al. Infectious bronchitis coronavirus inhibits STAT1 signaling and requires accessory proteins for resistance to type I interferon activity[J]. Journal of Virology, 2015, 89(23): 12047-12057
- [97] van Beurden SJ, Berends AJ, Krämer-Kühl A, et al. A reverse genetics system for avian coronavirus infectious bronchitis virus based on targeted RNA recombination[J]. Virology Journal, 2017, 14: 109
- [98] van Beurden SJ, Berends AJ, Krämer-Kühl A, et al. Recombinant live attenuated avian coronavirus vaccines with deletions in the accessory genes 3ab and/or 5ab protect against infectious bronchitis in chickens[J]. Vaccine, 2018, 36(8): 1085-1092
- [99] Zhang PJ, Wang J, Wang WX, et al. Astragalus polysaccharides enhance the immune response to avian infectious bronchitis virus vaccination in chickens[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 111: 81-85
- [100] Zhang PJ, Liu XF, Liu HY, et al. Astragalus polysaccharides inhibit avian infectious bronchitis virus infection by regulating viral replication[J]. Microbial Pathogenesis, 2018, 114: 124-128
- [101] Lopes PD, Okino CH, Fernando FS, et al. Inactivated infectious bronchitis virus vaccine encapsulated in chitosan nanoparticles induces mucosal immune responses and effective protection against challenge[J]. Vaccine, 2018, 36(19): 2630-2636
- [102] Zhao K, Li SS, Li W, et al. Quaternized chitosan nanoparticles loaded with the combined attenuated live vaccine against Newcastle disease and infectious bronchitis elicit immune response in chicken after intranasal administration[J]. Drug Delivery, 2017, 24(1): 1574-1586
- [103] Zhou YP, Wang HW. The key points and notice for improving eye and nose immunity of the vaccine[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2017(8): 126-127 (in Chinese)
- 周艳萍, 王洪伟. 疫苗点眼、滴鼻免疫改进的要点及注意事项[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(8): 126-127
- [104] Karimi V, Mohammadi P, Ghalyanchilangeroudi A, et al. Including 793/B type avian infectious bronchitis vaccine in 1-day-old chicken increased the protection against QX genotype[J]. Tropical Animal Health and Production, 2019, 51(3): 629-635
- [105] Zhao YL. Study on the treatment of infectious bronchitis in chickens by liquid preparation of jingya anti-sepsis powder[J]. China Animal Husbandry and Veterinary Abstract, 2013, 29(5): 199,190 (in Chinese)
- 赵玉玲. 荆防败毒散液体制剂治疗鸡传染性支气管炎的试验[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2013, 29(5): 199,190
- [106] Wang M, Yan ZT, Ye DH, et al. Prevention and treatment experimentation of self-made Chinese herbal compound in chicken IBV-M41 challenged[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2011, 39(12): 8-14 (in Chinese)
- 王萌, 严作廷, 叶得河, 等. 自拟中药方剂对鸡传染性支气管炎的防治效果[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2011, 39(12): 8-14
- [107] Yang MF, Zhang F, Tang ZW, et al. Study on prevention and treatment of avian infectious bronchitis with compound Chinese medicine preparation[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(23): 7172,7174 (in Chinese)
- 杨明凡, 张锋, 唐湛伟, 等. 复方中药制剂防治禽传染性支气管炎研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(23): 7172,7174
- [108] Zhou WR, Li YQ, Fan L. Advances in research of Chinese herbal feed additives[J]. Livestock and Poultry Industry, 2000(1): 34-37 (in Chinese)
- 周维仁, 李优琴, 樊磊. 中草药饲料添加剂及其研究进展[J]. 畜禽业, 2000(1): 34-37