(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119816588 A
(43)申请公布日 2025.04.11

(21)申请号 202380030880.4
(22)申请日 2023.04.05
(30)优先权数据
63/327,851 2022.04.06 US
63/404,226 2022.09.07 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.09.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/017527 2023.04.05
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/196374 EN 2023.10.12
(83)生物保藏信息
PTA-127168 2021.11.24
(71)申请人 乔治亚大学研究基金公司
地址 美国乔治亚州
(72)发明人 N·M·弗格森-诺埃尔
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 肖传馨 彭昶
(51)Int.Cl.
C12N 1/20(2006.01)
A61K 39/02(2006.01)

权利要求书2页 说明书45页

(54)发明名称

鸡毒支原体活疫苗

(57)摘要

本发明提供了以专利号PTA-127168保藏于ATCC的鸡毒支原体菌株K6067、以专利号PTA-127282保藏于ATCC的鸡毒支原体菌株K4110及其子代和衍生物,其用作用于预防鸡形目鸟类中的毒力鸡毒支原体感染的疫苗。还提供了用于施用于鸡形目鸟类的组合物和方法。

CN 119816588 A

1.一种分离的鸡毒支原体菌株,其中所述分离的鸡毒支原体菌株包含以专利号PTA-127168保藏于ATCC的K6067鸡毒支原体菌株或其子代或衍生物,或包含以专利号PTA-127282保藏于ATCC的K4110鸡毒支原体菌株及其子代和衍生物。

2.一种以专利号PTA-127168保藏于ATCC的K6067鸡毒支原体菌株的基本上生物学纯的培养物。

3.一种以专利号PTA-127282保藏于ATCC的K4110鸡毒支原体菌株的基本上生物学纯的培养物。

4.一种组合物,其包含根据权利要求1至3中任一项所述的分离的鸡毒支原体。

5.根据权利要求4所述的组合物,其包含水。

6.根据权利要求4或5所述的组合物,其包含药学上可接受的载体。

7.根据权利要求4至6中任一项所述的组合物,其包含佐剂。

8.根据权利要求4至7中任一项所述的组合物,其中所述组合物被配制用于鼻内、眼内、口服、粘膜、肌内、皮下或卵内施用。

9.根据权利要求4至8中任一项所述的组合物,其中所述组合物被配制用于喷雾或雾化。

10.一种疫苗,其包含根据权利要求1至3中任一项所述的分离的鸡毒支原体或根据权利要求4至9中任一项所述的组合物。

11.根据权利要求10所述的疫苗,其中所述疫苗减少家禽中由鸡毒支原体感染诱导的临床体征中的一者或多者。

12.根据权利要求10或11所述的疫苗,其中所述疫苗降低鸡形目鸟类对由鸡毒支原体诱导的疾病的易感性。

13.一种用于鸡形目鸟类的活疫苗,所述疫苗包含:一定量的以专利号PTA-127168保藏于ATCC的K6067鸡毒支原体菌株或其子代或衍生物,或以专利号PTA-127282保藏于ATCC的K4110鸡毒支原体菌株及其子代和衍生物,所述量足以保护所述鸟类免受由鸡毒支原体诱导的疾病,以及药学上可接受的载体。

14.根据权利要求1至3中任一项所述的分离的鸡毒支原体、根据权利要求4至9中任一项所述的组合物或根据权利要求10至13中任一项所述的疫苗,其中所述分离的鸡毒支原体、组合物或疫苗是冻干的、冷冻干燥的、冷冻的或泡腾片。

15.一种试剂盒,其包含根据权利要求1至3中任一项所述的分离的鸡毒支原体、根据权利要求4至9中任一项所述的组合物或根据权利要求10至13中任一项所述的疫苗以及印刷说明书,其中所述试剂盒的内容物包含在包装材料内。

16.一种在鸟类中产生针对鸡毒支原体的免疫应答的方法,所述方法包括将根据权利要求1至3中任一项所述的分离的鸡毒支原体、根据权利要求4至9中任一项所述的组合物或根据权利要求10至13中任一项所述的疫苗施用于所述鸟类。

17.一种用于降低鸟类对由鸡毒支原体诱导的疾病的易感性的方法,所述方法包括将根据权利要求1至3中任一项所述的分离的鸡毒支原体、根据权利要求4至9中任一项所述的组合物或根据权利要求10至13中任一项所述的疫苗施用于所述鸟类。

18.一种用于保护鸟类免受鸡毒支原体感染的方法,所述方法包括将根据权利要求1至3中任一项所述的分离的鸡毒支原体、根据权利要求4至9中任一项所述的组合物或根据权

利要求10至13中任一项所述的疫苗施用于所述鸟类。

19.一种减少鸟类中由鸡毒支原体感染诱导的临床体征中的一者或多者的方法,所述方法包括将有效量的根据权利要求1至3中任一项所述的分离的鸡毒支原体、根据权利要求4至9中任一项所述的组合物或根据权利要求10至13中任一项所述的疫苗施用于所述鸟类。

20.根据权利要求16至19中任一项所述的方法,其中施用是鼻内、眼内、口服、粘膜、肌内、皮下或卵内。

21.根据权利要求16至19中任一项所述的方法,其中通过滴眼剂、通过气雾剂或通过饮用水进行施用。

22.根据权利要求16至21中任一项所述的方法,其中所述鸟类包括鸡形目鸟类。

23.根据权利要求16至22中任一项所述的方法,其中所述鸟类包括鸡或火鸡。

鸡毒支原体活疫苗

[0001] 持续申请数据

[0002] 本申请要求于2022年4月6日提交的美国临时申请序列号63/327,851和于2022年9月7日提交的美国临时申请序列号63/404,226的权益,这些申请中的每一个通过援引并入本文。

背景技术

[0003] 鸡毒支原体(MG)是鸡和火鸡的传染性呼吸道病原体。它是家禽中致病性最强、最具经济意义的支原体病原体。由于兽体废弃或降解、饲料和产蛋效率降低以及药品成本增加而造成的经济损失是使得该疾病成为全球商业家禽生产面临的最昂贵的疾病问题之一的因素。尽管家禽业已经采取了不同的措施(诸如自愿监测计划、用不同抗生素进行治疗和疫苗接种)来控制鸡毒支原体感染并减少家禽业的经济损失,但MG仍然被认为是商业家禽业面临的持久挑战。自愿监测计划可能是有效的,但长寿鸡群(种鸡和蛋鸡)的价值使得扑杀和检疫的正当理由变得困难,特别是在MG广泛流行的地区。对在家禽中使用抗生素的法律限制越来越多,尤其是预防性饲料中使用,以及越来越多的报告表明,对常用来控制MG感染的抗生素产生抗性,这些都降低了用不同抗生素进行治疗的适用性和有效性。因此,疫苗接种成为用于MG控制的越来越有吸引力的选项。目前有三种市售的MG减毒活疫苗(6/85、F菌株和ts-11)。这三种疫苗在安全性和功效方面各有利弊。因此,需要额外的减毒活疫苗来控制家禽中的鸡毒支原体感染。

发明内容

[0004] 本发明包括一种分离的鸡毒支原体菌株,其中分离的鸡毒支原体菌株是以专利号PTA-127168保藏于ATCC的K6067鸡毒支原体菌株或其子代或衍生物。在一些方面,本发明包括一种组合物,其包含分离的鸡毒支原体菌株。在一些方面,组合物可以包括水。在一些方面,组合物可以包括药学上可接受的载体。在一些方面,组合物可以包括佐剂。在一些方面,组合物可被配制用于鼻内、眼内、口服、粘膜、肌内、皮下或卵内施用。在一些方面,组合物可被配制用于喷雾或雾化。

[0005] 本发明包括一种以专利号PTA-127168保藏于ATCC的K6067鸡毒支原体菌株的基本上生物学纯的培养物。在一些方面,本发明包括一种组合物,其包含分离的鸡毒支原体菌株。在一些方面,组合物可以包括水。在一些方面,组合物可以包括药学上可接受的载体。在一些方面,组合物可以包括佐剂。在一些方面,组合物可被配制用于鼻内、眼内、口服、粘膜、肌内、皮下或卵内施用。在一些方面,组合物可被配制用于喷雾或雾化。

[0006] 本发明包括一种疫苗,其包含如本文所述的以专利号PTA-127168保藏于ATCC的分离的鸡毒支原体菌株K6067或其子代或衍生物、如本文所述的以专利号PTA-127168保藏于ATCC的K6067鸡毒支原体菌株的基本上生物学纯的培养物、或如本文所述的组合物。在一些方面,疫苗减少家禽中由鸡毒支原体感染诱导的临床体征中的一者或多者。在一些方面,疫苗降低鸡形目鸟类对由鸡毒支原体诱导的疾病的易感性。

[0007] 本发明包括一种用于鸡形目鸟类的活疫苗,该疫苗包括:一定量的如本文所述的以专利号PTA-127168保藏于ATCC的K6067鸡毒支原体菌株或其子代或衍生物,该量足以保护鸟类免受由鸡毒支原体诱导的疾病,以及药学上可接受的载体。

[0008] 本发明包括一种分离的鸡毒支原体菌株,其中分离的鸡毒支原体菌株是以专利号PTA-127282保藏于ATCC的K4110鸡毒支原体菌株或其子代或衍生物。在一些方面,本发明包括一种组合物,其包含分离的鸡毒支原体菌株。在一些方面,组合物可以包括水。在一些方面,组合物可以包括药学上可接受的载体。在一些方面,组合物可以包括佐剂。在一些方面,组合物可被配制用于鼻内、眼内、口服、粘膜、肌内、皮下或卵内施用。在一些方面,组合物可被配制用于喷雾或雾化。

[0009] 本发明包括一种以专利号PTA-127282保藏于ATCC的K4110鸡毒支原体菌株的基本上生物学纯的培养物。在一些方面,本发明包括一种组合物,其包含分离的鸡毒支原体菌株。在一些方面,组合物可以包括水。在一些方面,组合物可以包括药学上可接受的载体。在一些方面,组合物可以包括佐剂。在一些方面,组合物可被配制用于鼻内、眼内、口服、粘膜、肌内、皮下或卵内施用。在一些方面,组合物可被配制用于喷雾或雾化。

[0010] 本发明包括一种疫苗,其包含如本文所述的以专利号PTA-127282保藏于ATCC的分离的鸡毒支原体菌株K4110或其子代或衍生物、如本文所述的以专利号PTA-127282保藏于ATCC的K4110鸡毒支原体菌株的基本上生物学纯的培养物、或如本文所述的组合物。在一些方面,疫苗减少家禽中由鸡毒支原体感染诱导的临床体征中的一者或多者。在一些方面,疫苗降低鸡形目鸟类对由鸡毒支原体诱导的疾病的易感性。

[0011] 本发明包括一种用于鸡形目鸟类的活疫苗,该疫苗包括:一定量的如本文所述的以专利号PTA-127282保藏于ATCC的K4110鸡毒支原体菌株或其子代或衍生物,该量足以保护鸟类免受由鸡毒支原体诱导的疾病,以及药学上可接受的载体。

[0012] 在一些方面,如本文所述的分离的鸡毒支原体菌株、如本文所述的组合物、或如本文所述的疫苗可以是冻干的、冷冻干燥的、冷冻的或泡腾片。

[0013] 本发明包括一种试剂盒,其包含如本文所述的分离的鸡毒支原体菌株、如本文所述的组合物、或本文所述的疫苗以及印刷说明书,其中该试剂盒的内容物包含在包装材料内。

[0014] 本发明包括一种在鸟类中产生针对鸡毒支原体的免疫应答的方法,该方法包括施用如本文所述的分离的鸡毒支原体菌株、如本文所述的组合物或如本文所述的疫苗。在一些方面,施用是鼻内、眼内、口服、粘膜、肌内、皮下或卵内。在一些方面,通过滴眼剂、通过气雾剂或通过饮用水进行施用。在一些方面,鸟类属于鸡形目。在一些方面,鸟类是鸡或火鸡。

[0015] 本发明包括一种用于降低鸟类对由鸡毒支原体诱导的疾病的易感性的方法,该方法包括将如本文所述的分离的鸡毒支原体菌株、如本文所述的组合物或如本文所述的疫苗施用于鸟类。在一些方面,施用是鼻内、眼内、口服、粘膜、肌内、皮下或卵内。在一些方面,通过滴眼剂、通过气雾剂或通过饮用水进行施用。在一些方面,鸟类属于鸡形目。在一些方面,鸟类是鸡或火鸡。

[0016] 本发明包括一种用于保护鸟类免受鸡毒支原体感染的方法,该方法包括将如本文所述的分离的鸡毒支原体菌株、如本文所述的组合物或如本文所述的疫苗施用于鸟类。在一些方面,施用是鼻内、眼内、口服、粘膜、肌内、皮下或卵内。在一些方面,通过滴眼剂、通过

气雾剂或通过饮用水进行施用。在一些方面,鸟类属于鸡形目。在一些方面,鸟类是鸡或火鸡。

[0017] 本发明包括一种减少鸟类中由鸡毒支原体感染诱导的临床体征中的一者或多者的方法,该方法包括将有效量的如本文所述的分离的鸡毒支原体菌株、如本文所述的组合物或如本文所述的疫苗施用于鸟类。在一些方面,施用是鼻内、眼内、口服、粘膜、肌内、皮下或卵内。在一些方面,通过滴眼剂、通过气雾剂或通过饮用水进行施用。在一些方面,鸟类属于鸡形目。在一些方面,鸟类是鸡或火鸡。

[0018] 如本文所用,“分离的”是指从其原始环境(例如,如果其天然存在,则为自然环境)移出的物质,并因此“通过人的手”从其自然状态改变。

[0019] 术语“和/或”意指所列出的要素中的一个或全部或者所列出的要素中的任何两个或更多个的组合。

[0020] 词语“优选”和“优选地”是指在某些情况下可以提供某些益处的本发明的实施例。然而,在相同或其他情况下,其他实施例也可以是优选的。此外,一个或多个优选实施例的叙述并不意味着其他实施例没有用,并且并不旨在将其他实施例排除在本发明的范围之外。

[0021] 当术语“包含”及其变体出现在说明书和权利要求中时,这些术语不具有限制含义。

[0022] 除非另有说明,否则“一/一个(a/an)”、“该/所述(the)”和“至少一个”可互换使用,并且意指一个或多于一个。

[0023] 同样在本文中,通过端点列举的数字范围包括包含在该范围内的所有数字(例如,1至5包括1、1.5、2、2.75、3、3.80、4、5等)。

[0024] 对于本文公开的包括离散步骤的任何方法,这些步骤可以以任何可行的顺序进行。并且,如果合适,可以同时进行两个或更多个步骤的任意组合。

[0025] 除非另有指示,否则本说明书和权利要求书中所使用的表示组分的数量、分子量等的所有数字应被理解为在所有情况下均被术语“约”修饰。因此,除非另有相反的指示,否则说明书和权利要求书中列出的数字参数是近似值,其可以根据本发明试图获得的所需特性而变化。至少,并且不试图将等同原则限制于权利要求的范围,每个数值参数应至少根据所报告的有效数字的数量并且通过应用普通的舍入技术来解释。

[0026] 尽管阐述本发明的广泛范围的数值范围和参数是近似值,但是具体实例中阐述的数值是尽可能精确地报告的。然而,所有数值固有地含有必然由在其相应测试测量中发现的标准偏差引起的范围。

[0027] 在整个申请的多个地方,通过实例列表提供了指导,这些实例可以以各种组合使用。在每种情况下,所列举的列表仅用作代表性组并且不应被解释为排他性列表。应当理解,特定实例、材料、量和程序应根据本文阐述的本发明的范围和精神来广义地解释。

[0028] 全文中的所有标题都是为了方便读者,并且除非另有说明,否则不应该用于限制标题后文本的含义。

具体实施方式

[0029] 细菌鸡毒支原体是支原体属的成员。它是鸡中慢性呼吸道疾病和各年龄段火鸡、

鸡、猎禽、鸽子和雀形目鸟类中传染性鼻窦炎的病原体。它遍布世界各地,并且感染可能被称为传染性滑膜炎、禽支原体病、传染性鼻窦炎或支原体关节炎。鸡毒支原体在一些蛋内(经卵巢)从受感染的饲养者垂直传播至子代,并经由传染性气雾剂和通过饲料、水和环境的污染以及通过人类活动在病媒(鞋子、设备等)上水平传播。它具有经济重要性,因为感染可能导致产蛋量下降(El-Gazzar,"Mycoplasma gallisepticum Infection in Poultry," Merk Veterinary Manual,2020)。

[0030] 本发明提供了鸡毒支原体(MG)菌株K6067及其子代和衍生物,当作为活制剂施用时,它们具有免疫原性且稳定。本发明还提供了鸡毒支原体(MG)菌株K4110及其子代和衍生物,当作为活制剂施用时,它们具有免疫原性且稳定。本发明的鸡毒支原体制剂对于抑制鸡毒支原体感染是安全且有效的,并且将有助于降低鸟类中鸡毒支原体感染的疾病的发生率和严重程度。

[0031] 鸡毒支原体菌株K6707于2021年11月24日作为PTA-127168保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC®),10801University Boulevard,Manassas,VA 20110-2209,USA。该菌株是根据《国际承认用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约(Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure)》保藏的。作为PTA-127168保藏于ATCC®的鸡毒支原体菌株K6067在本文中也称为鸡毒支原体菌株6067、鸡毒支原体菌株6067、MG菌株K6067、K6067、MG菌株K6067 ATCC PTA-127168、K6067 ATCC PTA-127168、MG菌株K6067 PTA-127168、K6067 PTA-127168和ATCC®PTA-127168。

[0032] 鸡毒支原体菌株K4110于2022年7月20日作为PTA-127282保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC®),10801University Boulevard,Manassas,VA 20110-2209,USA。该菌株是根据《国际承认用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约(Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent Procedure)》保藏的。作为PTA-127282保藏于ATCC®的鸡毒支原体菌株K4110在本文中也称为鸡毒支原体菌株4110、鸡毒支原体菌株4110、MG菌株K4110、K4110、MG菌株K4110 ATCC PTA-127282、K4110 ATCC PTA-127282、MG菌株K4110 PTA-127282、K4110 PTA-127282和ATCC®PTA-127282。

[0033] 本发明包括具有ATCC专利保藏号PTA-127168的分离的鸡毒支原体(MG)菌株K6067。如本文所用,"分离的"是指从其原始环境(例如,如果其天然存在,则为自然环境)移出的物质,并因此"通过人的手"从其自然状态改变。还包括具有ATCC专利保藏号PTA-127168的鸡毒支原体(MG)菌株K6067的生物学纯的培养物。

[0034] 本发明包括具有ATCC专利保藏号PTA-127282的分离的鸡毒支原体(MG)菌株K4110。还包括具有ATCC专利保藏号PTA-127282的鸡毒支原体(MG)菌株K4110的生物学纯的培养物。

[0035] 本发明还包括以ATCC专利保藏号PTA-127168保藏的鸡毒支原体菌株K6067的分离的子代和分离的衍生物,其具有等同或相似的生物学、血清学和/或遗传特征。如本文所用,血清学、生物学和遗传特征可以包括本文所包括的实例中的数据中所描述的特征中的一者或多者。更具体地,作为PTA-127168保藏于ATCC的K6067菌株的子代或衍生物可以保留属于本发明的特别有利的保护特性。作为PTA-127168保藏于ATCC的鸡毒支原体菌株K6067的子

代或衍生物可以通过本领域已知的用于繁殖鸡毒支原体的多种方法中的任一种获得,包括但不限于例如在鸟类中进行体外培养或回传。鸡毒支原体菌株K6067 ATCC PTA-127168的衍生物可以包括保藏的MG K6067菌株的基因修饰版本。此类操作包括但不限于诱变MG菌株,或将编码替代蛋白质或非功能性蛋白质的基因或基因盒、或非编码核苷酸序列引入MG生物体中。

[0036] 本发明还包括以ATCC专利保藏号PTA-127282保藏的鸡毒支原体菌株K4110的分离的子代和分离的衍生物,其具有等同或相似的生物学、血清学和/或遗传特征。如本文所用,血清学、生物学和遗传特征可以包括本文所包括的实例中的数据中所描述的特征中的一者或多者。更具体地,作为PTA-127282保藏于ATCC的K4110菌株的子代或衍生物可以保留属于本发明的特别有利的保护特性。作为PTA-127282保藏于ATCC的鸡毒支原体菌株K4110的子代或衍生物可以通过本领域已知的用于繁殖鸡毒支原体的多种方法中的任一种获得,包括但不限于例如在鸟类中进行体外培养或回传。鸡毒支原体菌株K411 ATCC PTA-127282的衍生物可以包括保藏的MG K4110菌株的基因修饰版本。此类操作包括但不限于诱变MG菌株,或将编码替代蛋白质或非功能性蛋白质的基因或基因盒、或非编码核苷酸序列引入MG生物体中。

[0037] 如本文所述的鸡毒支原体(MG)菌株K6067分离株、MG菌株K4110及其子代和衍生物可以通过常规方法繁殖,包括但不限于本文所包括的实例部分中所描述的方法中的任一种。例如,本发明的鸡毒支原体菌株可以用弗氏改良肉汤和琼脂培养(Ferguson-Noel和Kleven,“Mycoplasma species,”见:Williams SM,Dufour-Zavala L,Jackwood MW,Lee MD,Lupiani B,Reed WM,Spackman E.Woolcock PR编辑A Laboratory Manual for the Isolation,Identification and Characterization of Avian Pathogens.American Association of Avian Pathologists.第63-70页;2016)。

[0038] MG菌株K6067、MG菌株K4110及其子代和衍生物可使用许多已知技术中的任何一种进行鉴定并与其他支原体和其他鸡毒支原体菌株区分开,这些技术包括例如用物种特异性抗体进行的直接免疫荧光、血清板凝集(SPA)测试、血凝抑制测试(HI)、酶联免疫吸附测定(ELISA)和实时定量PCR(qPCR)(Raviv和Kleven,2009,Avian Dis;53:103-107)、全基因组测序和16S-23S rRNA基因间间隔区域(IGSR)的靶向DNA测序(Papazisi等人,2003,Microbiology;149:2307-16)和mgc2细胞粘附素(Hnatow等人,1998,Infect Immun;66:3436-42)。

[0039] 如本文所述的鸡毒支原体(MG)菌株K6067、鸡毒支原体(MG)菌株K4110及其子代和衍生物可以作为减毒MG活疫苗施用于家禽,包括鸡和火鸡。尽管家禽业已经采取了不同的措施(诸如自愿监测计划、疫苗接种和用不同抗生素治疗)来控制鸡毒支原体(MG)感染并减少家禽业的经济损失,但MG仍然被认为是商业家禽业面临的持久挑战。自愿监测计划可能是有效的,但长寿鸡群(种鸡和蛋鸡)的价值使得扑杀和检疫的正当理由变得困难,特别是在MG广泛流行的地区。进一步,欧洲和美国对在家禽中使用抗生素(尤其是预防性饲料中使用)的法律限制越来越多(Veterinary Feed Directive Journal.第80期,第106号,2015),以及越来越多的报告表明,对常用来控制MG感染的抗生素产生抗性(de Jong等人,2021,Avian Pathology:50(2):161-173),这些都降低了这一选项的适用性和有效性。在这些情况下,疫苗接种成为用于MG控制的越来越有吸引力的选项。

[0040] 目前可用的免疫剂包括菌苗、减毒活疫苗和重组疫苗。菌苗有一些优点,因为它们不具有传染性或传播性,并且无法恢复毒力(Sasipreeyajan等人,1987,Avian Dis;31:776-81);菌苗已被证明可减少产蛋量损失、卵巢退化和MG的经蛋传播(Glisson和Kleven,1985,Avian Dis;29:408-15)。然而,菌苗对感染、气管和气囊病变提供的保护非常有限(Talkington和Kleven,1985,Avian Dis;29:998-1003)。肌内注射的人力成本和对鸟类的单独处理可能会造成应激,并且还存在局部疫苗反应的风险。对于MG重组疫苗,有一种市售的以禽痘为载体的MG疫苗,但据报道,该疫苗针对致病性MG菌株引起的呼吸道病变的功效显著低于菌苗和减毒活疫苗(Ferguson-Noel等人,2012,Avian Dis;56:272-275)。最近,开发了一种基于TM-1蛋白的以腺病毒为载体的MG疫苗,但需要进一步研究来调查其功效(Dongchao Zhang等人,2018,Avian Pathology;42(2):213-222)。存在多种基因和毒力因子(Yu等人,2019,Infection and Immunity;87:e00248-19;Papazisi等人,2002,Infect Immun;70:6839-45;以及Indikova等人,2014,Vet Res;45:99),它们在MG致病性和免疫中发挥不同的作用,因此选择一种特定基因来生产足够有效且具有保护性的MG疫苗可能具有挑战性。

[0041] 目前市售的MG减毒活疫苗有6/85、F菌株和ts-11三种。这些疫苗在安全性和功效方面各有利弊;上述理想的MG疫苗应具有免疫原性,同时无毒,同时仍然是负担得起的,并且能够防止暴露后致病性MG菌株的定植(Cummings和Kleven,1986,Avian Dis;30:169-71)。6/85疫苗非常安全(Evans和Hafez,1992,Avian Dis;36:197-201;Ley等人,1997,Avian Dis;41:187-94;以及Zaki等人,2004,Avian Dis;48:642-6),然而,据报道,该疫苗并不十分有效并且定殖较弱(Evans和Hafez,1992,Avian Dis;36:197-201;以及Kleven等人,1998,Avian Dis;42:300-6)。另外,不良的血清学应答可能会给用血清学测定评估已接种疫苗的鸟群的免疫状态带来问题(Throne Steinlage等人,2003,Avian Dis;47:499-505)。

[0042] F菌株是第一种引入家禽业以控制MG感染的活疫苗(Yamamoto和Adler,1958,JInfect Dis;102:143-52),并且它是目前市售的减毒程度最低的MG活疫苗。由于有报道称,F菌株对火鸡具有致病性(Lin和Kleven,1982,Avian Dis;26:360-4)、可传播给未接种疫苗的鸟类(Kleven,1981,Avian Dis;25:1005-18)以及当其在鸟群中循环和回传时有毒力增加的风险(Gharaibeh等人,2011,Avian Dis;55:212-6),因此某些地区(诸如美国明尼苏达州、以色列和日本)不允许使用F菌株。然而,F菌株对于致病性MG菌株的替代(Kleven等人,1990,Avian Dis;34:984-90)以及减少气囊和气管病变(Kleven,1986,Avian Diseases;30No.1:169-171)并减少毒力MG经蛋传播(Glisson和Kleven,1984,Avian Dis;28:406-15)非常有效。与F菌株类似的在已接种疫苗的鸟群的气管中存活终生(Kleven,1998,Poult Sci;77:1146-9)的另一种MG活疫苗是ts-11(Whithear等人,1990,Aust Vet J;67:168-74)。这种疫苗可有效预防呼吸道病变(Abd-el-Motelib和Kleven,1993,Avian Dis;37:981-7)、产蛋量损失(Barbour等人,2000,Poult Sci;79:1730-5)和卵巢退化(Whithear等人,1990,IOM Lett;1:361-362)。尽管ts-11在火鸡中使用是安全的,但它无法在气管中很好地定植以引发保护性免疫(Whithear等人,1990,Aust Vet J;67:159-65;以及Wijesurendra等人,2017,Avian Pathol;1-10;2017)。还报道了ts-11的毒力恢复(Armour等人,2015,Avian Pathol;44:296-304)。最近,开发出了一种GapA+ts-11疫苗ts-

304。虽然疫苗的持久性仍与ts-11类似(Condello等人,2020,Veterinary Microbiology;251:108883),但据报道,其在火鸡中使用是安全且有效的(Kanci等人,2018,Vaccine;36(18):2487-2493)。

[0043] 本发明包括如本文所述的鸡毒支原体分离株及其子代和衍生物的组合物和疫苗。在优选的实施例中,鸡毒支原体分离株是活的。在一些实施例中,鸡毒支原体分离株可被灭活或杀死。本发明的鸡毒支原体菌株及其组合物和疫苗可以储存直至以多种形式中的任一种使用。例如,此类材料可以被冻干或冷冻干燥,并且可以被再水化以供使用。在一些实施例中,鸡毒支原体菌株或其组合物或疫苗可以被冷冻。

[0044] 在一些实施例中,鸡毒支原体分离株或其组合物或疫苗可以被配制为泡腾片。此类泡腾片可以例如包装在轻质铝泡罩中。该片剂可以溶解在水中并例如通过口服、鼻腔或通过气雾剂喷雾施用,由此液滴经由鸟类的粘膜进入。

[0045] 本发明的组合物和疫苗可以包括例如水或培养基。此类组合物和疫苗可以包括一种或多种合适的药学上可接受的载体、稳定剂、防腐剂、稀释剂和/或缓冲剂。合适的稳定剂包括例如SPGA、碳水化合物(诸如山梨醇、甘露醇、淀粉、蔗糖、糊精或葡萄糖)或蛋白质(诸如白蛋白或酪蛋白)。当通过冻干制备干疫苗制剂时,稳定剂特别有利。合适的防腐剂包括例如硫柳汞(thimerosal)、硫柳汞(merthiolate)和庆大霉素。稀释剂包括但不限于水、水性缓冲液(诸如缓冲盐水)、醇和多元醇(诸如甘油)。

[0046] 本发明的组合物或疫苗还可包括一种或多种具有佐剂活性的化合物。用于该目的的合适的化合物或组合物包括氢氧化铝、磷酸铝、氧化铝、植物油、动物油、基于例如矿物油的水包油或油包水乳剂(诸如Bayol F™或Marcol 52™)、完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂、或植物油(诸如维生素E醋酸酯和皂苷)。

[0047] 本发明的组合物或疫苗可以进一步包括一种或多种源自感染家禽的其他病原体的免疫原。此类免疫原可源自例如鸡滑液囊支原体(MS)、马立克氏病病毒(MDV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、新城疫病毒(NDV)、减蛋综合征(EDS)病毒、火鸡鼻气管炎病毒(TRTV)、痘病毒、呼肠孤病毒、鸡细小病毒和禽肾炎病毒(包括但不限于ANV-1和ANV-2)。

[0048] 本发明的组合物和疫苗可以是基本上纯的。如本文所用,“基本上纯的”将意指基本上不含大分子或通常在自然界中发现的其他生物实体的材料。

[0049] 本发明的组合物和疫苗可以施用于对鸡毒支原体感染敏感的多种鸟类物种中的任何鸟类,包括但不限于家禽、鸡形目鸟类和外来鸟类物种。鸡形目鸟类包括但不限于鸡、火鸡、松鸡、鹌鹑和野鸡。如本文所用,家禽包括出于收集蛋或宰杀获取肉类和/或羽毛的目的而饲养的驯化鸟类。这些最典型的是鸡雁类总目(禽)的成员,尤其是鸡形目(包括例如鸡、鹌鹑、火鸡和松鸡)和鸭科(雁形目),通常称为“水禽”(包括例如鸭、鹅和天鹅)。家禽还可以包括其他被宰杀取肉的鸟类,诸如家鸽或鸽子或被认为是猎物的鸟类,例如野鸡。鸡包括但不限于母鸡、公鸡、肉鸡、烤用鸡、蛋鸡、种鸡、配种母鸡的后代和蛋鸡。如本文所用,术语“敏感”意指与不敏感的个体或群体相比,对所涉及的微生物产生有害应答(诸如例如活力降低或无法生长)的可能性或现实,和/或一种或多种表明鸡毒支原体感染的病理状态。

[0050] 本发明的组合物和疫苗可被配制用于通过兽医领域已知的多种途径中的任一种递送,包括但不限于例如粘膜、鼻内、眼内或口服施用。本发明的组合物和疫苗可被配制用于递送至呼吸道粘膜,并且可以以使其立即或最终与鸟类的呼吸道粘膜接触的方式施用。

本发明的组合物或疫苗可以通过任何合适的已知的接种家禽的方法施用,包括但不限于经鼻、经眼、通过滴眼剂、通过注射、在饮用水中、在饲料中、经卵内、经母体、通过呼吸道吸入等。当通过注射施用时,免疫原性组合物或疫苗可以肠胃外施用。肠胃外施用包括例如通过静脉内、皮下、肌内或腹膜内注射的施用。

[0051] 组合物或疫苗可被配制用于通过大量施用技术施用,这些技术诸如通过将疫苗放入饮用水中或通过喷洒或雾化。组合物可通过向个体或鸟群喷洒溶液的方式施用,此类气雾剂递送可能涉及掺入小液体颗粒中的组合物的施用。此类喷雾型颗粒可具有范围介于约10至约100微米之间的液滴尺寸,更优选地,介于约<1至约50微米之间的液滴尺寸。为了生成小颗粒,可以使用常规喷洒装置和气雾剂发生器,诸如市售的用于背负式喷洒、孵化场喷洒和雾化喷洒的喷雾发生器。也可以使用常规装置通过饮用水进行施用。

[0052] 本发明的组合物或疫苗可以在孵化之前或之后施用于家禽。卵内疫苗接种可以在例如约13天、约14天、约15天、约16天、约17天、约18天、约19天、约20天或其任何范围内进行。对于卵内递送,产蛋牲畜或繁殖牲畜可以例如在约6-12周龄时接种疫苗,并在约16-20周龄时加强免疫。此类产蛋牲畜或繁殖牲畜可以在约6周龄、约7周龄、约8周龄、约9周龄、约10周龄、约11周龄或约12周龄时接种疫苗。此外,在一些实施例中,此类产蛋牲畜或繁殖牲畜可以在约前两周龄内接种疫苗。此类产蛋牲畜或繁殖牲畜可以在约16周龄、约17周龄、约18周龄、约19周龄或约20周龄时加强免疫。此类产蛋牲畜或繁殖牲畜的后代可能表现出针对鸡毒支原体的抗体滴度,这可以预防或减轻后代中鸡毒支原体感染的症状

[0053] 家禽可以在各种年龄接受如本文所述的组合物或疫苗。对于孵化后的递送,材料可以在任何合适的年龄递送,包括但不限于约一至三天大、孵化后约一周、孵化后约两周、孵化后约三周、孵化后约四周、孵化后约五周、孵化后约六周或其任何范围。鸡只能接种一次疫苗。或者,如果使用两剂疫苗,则第一剂疫苗在例如当鸡为3天至一周大时给予,随后在另外1-10周后给予。

[0054] 可以在鸡的整个生命周期施用多个剂量的组合物。由于母体免疫力是为肉鸡子代提供保护的主要来源,种鸡通常会接种疫苗,但如果需要的话,肉鸡也可以接种疫苗。

[0055] 可以调整本发明的组合物和疫苗,以包括指定浓度的鸡毒支原体。生物体可以作为颜色变化单位来测量。鸡毒支原体的颜色变化单位,在本文中也称为“ccu”,可以使用已建立的标准方法进行定量,包括例如Rodwell和Whitcomb(在“Methods in Mycoplasmology,”编辑Razin和Tully,1993中)所述的方案。例如,组合物或疫苗可具有约50、约100、约$1x10^2$ ccu/ml、约$2.5x10^2$ ccu/ml、约$5x10^2$ ccu/ml、约$1x10^3$ ccu/ml、约$2.5x10^3$ ccu/ml、约$5x10^3$ ccu/ml、约$1x10^4$ ccu/ml、约$2.5x10^4$ ccu/ml、约$5x10^4$ ccu/ml、约$1x10^5$ ccu/ml、约$2.5x10^5$ ccu/ml、约$5x10^5$ ccu/ml、约$1x10^6$ ccu/ml、约$2.5x10^6$ ccu/ml、约$5x10^6$ ccu/ml、约$1x10^7$ ccu/ml、约$2.5x10^7$ ccu/ml、约$5x10^7$ ccu/ml、$1x10^8$ ccu/ml、约$2.5x10^8$ ccu/ml、约$5x10^8$ ccu/ml、约$1x10^9$ ccu/ml、约$2.5x10^9$ ccu/ml或约$5x10^9$ ccu/ml的浓度,并且可以使用其任何范围(诸如例如约$1x10^5$ ccu/ml至约$1x10^6$ ccu/ml)。在一些应用中,可以将有效量以每只鸟每只眼睛一滴的方式施用于单只鸟。一滴可以为约0.05ml至0.1ml。

[0056] 可以将本发明的鸡毒支原体菌株施用于鸟类,以降低对鸡毒支原体感染的易感性。通过此类施用,材料不会导致表明鸡毒支原体的显著临床体征或病变。因此,本发明的

一个目的是提供免疫材料,这些材料在施用时不会导致表明MS疾病的显著临床体征或病变。另一个目的是提供低毒力的免疫材料。

[0057] 本发明包括一种在家禽中产生抗MG免疫应答的方法,该方法包括施用如本文所述的鸡毒支原体菌株、组合物或疫苗。在一些方面,免疫包括体液免疫和/或细胞免疫。对于体液应答,可以例如通过血清板凝集(SPA)测试(使用例如商业抗原(马萨诸塞州威尔明顿市的查尔斯河实验室国际公司(Charles River Laboratories International,Inc.,Wilmington,MA));血凝抑制(HI)测试;和酶联免疫吸附测定(ELISA)测试(使用例如商业试剂盒(缅因州韦斯特布鲁克市的IDEXX公司(IDEXX,Westbrook,Maine))来测量抗MS抗体。Ferguson-Noel等人更详细地描述了SPA和HI测试程序(Ferguson-Noel,N.和S.H.Kleven Mycoplasma species.见:A Laboratory Manual for the Isolation,Identification and Characterization of Avian Pathogens,第六版S.M.Williams,L.Dufour-Zavala,M.W.Jackwood,M.D.Lee,B.Lupiani,W.M.Reed,E.Spackman和P.R.Woolcock编辑American Association of Avian Pathologists.第63-70页.2016)。在一些方面,免疫包括粘膜免疫。

[0058] 本发明包括一种减少、抑制或预防家禽中的MG感染的方法,该方法包括施用如本文所述的分离的鸡毒支原体菌株、组合物或疫苗。施用如本文所述的分离的鸡毒支原体菌株、组合物或疫苗可导致减少、抑制或预防进一步感染MG的攻击的疾病表现中的一者或多者,包括传染性MG的疾病表现中的一者或多者。此类临床体征和症状可包括例如呼吸窘迫、气管啰音、呼吸困难、咳嗽、打喷嚏、流鼻涕、眼睑肿胀、眼部分泌物、视力受损、结膜炎、眼睛周围出现泡沫、眶下窦眼泡肿胀、鼻窦炎、卡他性鼻窦炎、气管炎、气囊炎、肺炎、腿部问题、发育迟缓、抑郁、体重减轻、食欲不振、生长缓慢、孵化率降低、雏鸡活力降低、羽毛异常、生产力差、饲料效率降低、增重降低、产蛋量下降、加工过程中的废弃和/或死亡率增加中的一者或多者。

[0059] 本发明还提供了一种试剂盒,其包括如本文所述的鸡毒支原体菌株K6067和/或其子代或衍生物。试剂盒可以包括一个或多个装有本发明的鸡毒支原体的容器。鸡毒支原体菌株K6067可以是冻干的。

[0060] 本发明还提供了一种试剂盒,其包括如本文所述的鸡毒支原体菌株K4110和/或其子代或衍生物。该试剂盒可以包括一个或多个装有本发明的鸡毒支原体的容器。鸡毒支原体菌株K4110可以是冻干的。

[0061] 试剂盒可以包括额外的、单独的容器,其中装有其他鸡毒支原体菌株或其他家禽病原体。另外,试剂盒可以包括其他试剂,诸如实践本发明所需的缓冲液和溶液。任选地,与此类容器相关联的可以是通知或印刷说明书。本发明的试剂盒可以包括“包装材料”。如本文所用,术语“包装材料”是指用于容纳试剂盒内容物的一种或多种物理结构。包装材料通过众所周知的方法构造,优选地以提供无菌、无污染的环境。包装材料可以是固体基质或玻璃、塑料、纸、箔等材料。因此,例如,包装可以是用于容纳ccu量的鸡毒支原体菌株K6067或鸡毒支原体菌株K4110的玻璃或塑料小瓶。

[0062] 本发明的示例性实施例包括但不限于以下。

[0063] 1.一种分离的鸡毒支原体菌株,其中所述分离的鸡毒支原体菌株是以专利号PTA-127168保藏于ATCC的K6067鸡毒支原体菌株或其子代或衍生物。

[0064] 2.一种以专利号PTA-127168保藏于ATCC的K6067鸡毒支原体菌株的基本上生物学纯的培养物。

[0065] 3.一种分离的鸡毒支原体菌株,其中所述分离的鸡毒支原体菌株是以专利号PTA-127282保藏于ATCC的K4110鸡毒支原体菌株或其子代或衍生物。

[0066] 4.一种以专利号PTA-127282保藏于ATCC的K4110鸡毒支原体菌株的基本上生物学纯的培养物。

[0067] 5.一种组合物,其包含根据实施例1至4中任一项所述的分离的鸡毒支原体。

[0068] 6.根据实施例5所述的组合物,其包含水。

[0069] 7.根据实施例5所述的组合物,其包含药学上可接受的载体。

[0070] 8.根据实施例5至7中任一项所述的组合物,其包含佐剂。

[0071] 9.根据实施例5至8中任一项所述的组合物,其中所述组合物被配制用于鼻内、眼内、口服、粘膜、肌内、皮下或卵内施用。

[0072] 10.根据实施例5至9中任一项所述的组合物,其中所述组合物被配制用于喷雾或雾化。

[0073] 11.一种疫苗,其包含根据实施例1至4中任一项所述的分离的鸡毒支原体或根据实施例5至10中任一项所述的组合物。

[0074] 12.根据实施例11所述的疫苗,其中所述疫苗减少家禽中由鸡毒支原体感染诱导的临床体征中的一者或多者。

[0075] 13.根据实施例11或12所述的疫苗,其中所述疫苗降低鸡形目鸟类对由鸡毒支原体诱导的疾病的易感性。

[0076] 14.一种用于鸡形目鸟类的活疫苗,所述疫苗包含:一定量的以专利号PTA-127168保藏于ATCC的K6067鸡毒支原体菌株或其子代或衍生物,所述量足以保护所述鸟类免受由鸡毒支原体诱导的疾病,以及药学上可接受的载体。

[0077] 15.一种用于鸡形目鸟类的活疫苗,所述疫苗包含:一定量的以专利号PTA-127282保藏于ATCC的K4110鸡毒支原体菌株或其子代或衍生物,所述量足以保护所述鸟类免受由鸡毒支原体诱导的疾病,以及药学上可接受的载体。

[0078] 16.根据实施例1至15中任一项所述的分离的鸡毒支原体、组合物或疫苗,其中所述分离的鸡毒支原体、组合物或疫苗是冻干的、冷冻干燥的、冷冻的或泡腾片。

[0079] 17.一种试剂盒,其包含根据实施例1至16中任一项所述的分离的鸡毒支原体、组合物或疫苗以及印刷说明书,其中所述试剂盒的内容物包含在包装材料内。

[0080] 18.一种泡腾片,其包含根据实施例1至16中任一项所述的分离的鸡毒支原体、组合物或疫苗。

[0081] 19.一种在鸟类中产生针对鸡毒支原体的免疫应答的方法,所述方法包括将根据实施例1至16中任一项所述的分离的鸡毒支原体、组合物或疫苗施用于所述鸟类。

[0082] 20.一种用于降低鸟类对由鸡毒支原体诱导的疾病的易感性的方法,所述方法包括将根据实施例1至16中任一项所述的分离的鸡毒支原体、组合物或疫苗施用于所述鸟类。

[0083] 21.一种用于保护鸟类免受鸡毒支原体感染的方法,所述方法包括将根据实施例1至16中任一项所述的分离的鸡毒支原体、组合物或疫苗施用于所述鸟类。

[0084] 22.一种减少鸟类中由鸡毒支原体感染诱导的临床体征中的一者或多者的方法,

所述方法包括将有效量的根据实施例1至16中任一项所述的分离的鸡毒支原体、组合物或疫苗施用于所述鸟类。

[0085] 23.根据实施例19至22中任一项所述的方法,其中施用是鼻内、眼内、口服、粘膜、肌内、皮下或卵内。

[0086] 24.根据实施例19至22中任一项所述的方法,其中通过滴眼剂、通过气雾剂或通过饮用水进行施用。

[0087] 25.根据实施例19至24中任一项所述的方法,其中所述鸟类包括鸡形目鸟类。

[0088] 26.根据实施例19至25中任一项所述的方法,其中所述鸟类包括鸡或火鸡。

[0089] 通过以下实例说明了本发明。应当理解,特定实例、材料、量和程序应根据本文阐述的本发明的范围和精神来广义地解释。

[0090] 实例

[0091] 实例1

[0092] 对作为鸡和火鸡中的活疫苗的鸡毒支原体菌株的评估

[0093] 根据病例史和家禽诊断与研究中心(PDRC)分离株库的目标测序结果分析,选出了十个鸡毒支原体(MG)分离株。在火鸡中评估了分离株的安全性,并根据气管的成功定植,同时在尸检时未显示任何临床体征或肉眼病变(试验1和2),选择了两个分离株(K4110A和K6067)。在试验3中,对这两个分离株在鸡中的安全性和功效进行了评估;将SPF鸡在4周龄时通过滴眼剂进行疫苗接种,并在疫苗接种后4周使用R菌株通过气雾剂对鸡进行攻击。与阴性对照相比,接种疫苗候选物的两组均未表现出显著的病变差异,这表明候选物对鸡是安全的。两个接种疫苗的组在攻击后的病变也显著降低,这表明存在有效的疫苗。进行了进一步的研究以确定每个候选物所需的最具保护性的施用途径和剂量。通过滴眼剂施用途径,K6067和K4110A的50%最小保护剂量均为10^4-10^5ccu/mL(试验4和5)。在试验6中未检测到垂直传播。总之,根据研究结果,K6067和K4110A均具有潜在的活疫苗候选物,因为这些初步研究表明它们对火鸡和鸡是安全且有效的。

[0094] 材料和方法

[0095] MG菌株和分离株

[0096] 从家禽诊断和研究中心(佐治亚州雅典市的佐治亚大学)的MG培养物储存库中选出了十种疫苗候选物(表1),其标准包括自然减毒迹象(无病史、临床体征或死亡),以及快速且一致的体外生长速度。将16S-23S rRNA基因间间隔区域(IGSR)的靶向DNA测序结果(Papazisi等人,2003,Microbiology;149:2307-16)和mgc2细胞粘附素(Hnatow等人,1998,Infect Immun;66:3436-42)基因与PDRC MG序列数据库进行比较,以避免与市售疫苗高度相似的分离株(Ferguson等人,2005,Microbiology;151:1883-1893)。用NCBI Blast(Johnson等人,2008,Nucleic Acids Research;36(增刊2):W5-W9)和MegAlign软件(Lasergene软件包,威斯康星州麦迪逊市的DNAStar公司(DNAStar,Inc.,Madison,WI))进行序列分析和比较。对候选物的低(~10p)和高(~50p)传代进行全基因组测序,以评估体外传代后的遗传稳定性,并将全基因组序列与可公开获得的或PDRC支原体实验室全基因组文库中的MG基因组序列进行比较。对于被选择用于全基因组分析的分离株,将DNA在弗氏改良肉汤中生长后提取;将细胞以13,000x g离心3分钟,弃去上清液,并将细胞沉淀物在200μl磷酸盐缓冲盐水(pH=7)中复溶。根据制造商的建议,使用QIAGEN DNEASY®血液和组织

试剂盒(加利福尼亚州巴伦西亚市的凯杰公司(QIAGEN,Valencia,CA))或Promega WIZARD®基因组DNA纯化试剂盒(威斯康星州麦迪逊市的普洛麦格公司(Promega,Madison,Wisconsin))提取基因组DNA。在诺禾致源公司(Novogene)(加利福尼亚州萨克拉门托)进行基于Illumina的测序(加利福尼亚州圣地亚哥市的因美纳公司(Illumina,San Diego,California))。在PATRIC中对分离株进行了全面的基因组分析(包括从头组装和注释)(Wattam等人,2017,Nucleic Acids Res;45:D535-D542)。使用PATRIC中的相似基因组查找器和系统发育树生成器工具将分离株的整个基因组与已建立的疫苗和实验室菌株进行比较。

[0097] 在火鸡中对十种候选物进行初步筛选后,进一步评定了K4110A和K6067在鸡中的安全性和功效(试验3)、每一者最具保护性和有效性的剂量和施用途径(试验4和5)以及每一者的潜在垂直传播(试验6)。使用R-菌株,一种已被充分描述的致病性MG菌株(Rodriguez和Kleven,1980,Avian Dis;24:800-7)作为阳性对照组,对已接种疫苗或未接种疫苗的鸟类进行攻击。气雾剂和滴眼剂途径是用于接种鸟类的两种施用途径;对于前者,使用商用涂料喷雾器(PREVAL®Sprayer Division,纽约州扬克斯市的精密阀门公司(Precision Valve Corporation,Yonkers,NY))将1mL活跃生长的菌株培养物雾化;对于后者,将100μl活跃生长的培养物施用到眼睛中。

[0098] 血清学

[0099] 对血清进行分析以确认体液免疫系统的刺激,使用商业抗原(康涅狄格州北富兰克林市的查尔斯河实验室(Charles River Laboratories,North Franklin,CT))通过血清板凝集(SPA),使用由A5969菌株和鸡红细胞(RBC)制备的抗原进行血凝(HI)测试,并使用商业试剂盒(缅因州韦斯特布鲁克市的IDEXX公司;缅因州斯卡伯勒市的百测公司(Biochek,Scarborough,ME))进行酶联免疫吸附测定(ELISA)来评估抗MG抗体的存在。使用先前描述的程序(Kleven SH,"Mycoplasmosis,"见:Dufour-Zavala L,Swayne DE,Glisson JR,Pearson JE,Reed WM,Jackwood MW.Woolcock PR编辑A Laboratory Manual for the Isolation,Identification and Characterization of Avian Pathogens,第五版.American Association of Avian Pathologists.第59-64页;2008)进行SPA和HI测试,并且评分≥1被认为是SPA阳性,而对于HI,1:20滴度被认为是可疑的,并且≥1:40滴度被认为是阳性。对于ELISA,样品/阳性(S/P)比率≥0.5被认为是阳性。

[0100] 支原体的分离与鉴定

[0101] 从气管、鼻孔后裂口和气囊中取出拭子,并接种在弗氏改良肉汤和琼脂中(Ferguson-Noel和Kleven,"Mycoplasma species,"见:Williams SM,Dufour-Zavala L,Jackwood MW,Lee MD,Lupiani B,Reed WM,Spackman E.Woolcock PR编辑A Laboratory Manual for the Isolation,Identification and Characterization of Avian Pathogens.American Association of Avian Pathologists.第63-70页;2016)。

[0102] 对于试验1和2,还将样品接种在改良PPLO肉汤和琼脂中(Ferguson-Noel和Kleven,"Mycoplasma species,"见:Williams SM,Dufour-Zavala L,Jackwood MW,Lee MD,Lupiani B,Reed WM,Spackman E.Woolcock PR编辑A Laboratory Manual for the Isolation,Identification and Characterization of Avian Pathogens.American Association of Avian Pathologists.第63-70页;2016)在筛查鸟类是否存在支原体时进

行预接种。所有培养物均在37C孵育,如果四周后在肉汤管或琼脂板中未观察到生长,则认为培养物对支原体呈阴性。使用直接免疫荧光鉴定支原体分离株(Talkington和Kleven,1983,Avian Dis;27:422-9)。

[0103] qPCR和定植率计算

[0104] 使用先前描述的方案进行用于特异性检测MG和MS、MM和MI的实时定量PCR(qPCR)程序(Raviv和Kleven,1983,Avian Dis;53:103-7;以及Callison等人,2006,Avian Dis;50:537-44)。进行qPCR,以估计尸检时收集的气管样品中存在的MG的基因组拷贝数。此外,还对R菌株、K4110A和K6067进行了菌株特异性qPCR,以评估这两种疫苗候选物在控制致病性攻击株定植方面的功效。在试验期间采集气管拭子,并在尸检时将个体鸟类的上气管切片收集在10ml无菌PBS中,以用于随后的DNA提取。根据制造商的建议,使用MAG-BIND®血液和组织DNA HDQ 96试剂盒(佐治亚州诺克罗斯市的欧米茄生物技术公司(Omega Bio-tek,Inc.,Norcross,GA))在MAGMAX™ Express-96磁粒子处理器(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))上从200μl的喉洗液和气管拭子中提取基因组DNA。使用Applied Biosystems 7500快速实时PCR系统(赛默飞世尔科技公司)进行实时PCR,并且循环阈值(Ct)值≤39被认为是阳性。为了使测定定量,构建了含有基因组靶标的质粒作为标准DNA对照。用于构建DNA对照的程序和定量的标准曲线已在其他地方详细描述(Raviv等人,2008,Vet Microbiol;129:179-87)。

[0105] 病变的评估

[0106] 使用Kleven描述的评分系统对总气囊病变进行0至4级评分(Kleven等人,1972,Avian Dis;16:915-24;以及Kleven等人,1975,Avian Dis;19:126-35)。通过测量气管粘膜的宽度来在显微镜下评估气管病变。将气管上三分之一部分(距喉部约1英寸)固定在10%中性福尔马林中。在气管横截面的组织学载玻片上的四个等距点处测量气管粘膜厚度(Whithear,1996,Rev.Sci.Tech.Off.Int.Epiz.15:1527-1553)。还记录了任何其他尸检结果。

[0107] 动物护理和使用

[0108] 这些实验中的所有动物程序均经佐治亚州雅典市的佐治亚大学机构动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Georgia,Athens,GA)批准。这些研究中的所有鸟类均被随意提供饲料和水,并用二氧化碳安乐死。

[0109] 统计分析

[0110] 使用单向ANOVA来分析气囊病变和来自鸡的鸡毒支原体分离株。使用Tukey-Kramer高度显著差异测试来分析平均气管粘膜厚度、MG DNA基因组拷贝数log10、SPA评分、S/P比率、HI滴度、受精率和母鸡周产蛋率(Minitab 17统计软件.[计算机软件].宾夕法尼亚州州立大学:Minitab公司(www.minitab.com).2010)。P值≤0.05被认为是显著的。

[0111] 实验设计

[0112] 试验1和2(火鸡安全性1和2)

[0113] 试验1和试验2具有相同的实验设计;每个试验包括5种候选物,两个试验共评估10种疫苗候选物。对于每个试验,从已知不含MG和MS的来源处获取1日龄的42只火鸡幼禽,并将其饲养在2个隔离器中。在2周龄(WOA)时,将火鸡的腿部绑上随机编号

(www.randomlists.com),并随机分配到7个治疗组(7个隔离器),每组6只幼禽。通过气管样品和此时血清中的支原体抗体的培养、定量聚合酶链反应(qPCR)来筛查分布在各治疗组中的十只火鸡中支原体的存在。在3WOA时,通过气雾剂对火鸡接种相应的治疗或不进行接种(阴性对照组)(表2和3)。在5WOA时,对所有鸟类进行尸检并通过总气囊病变评分、血清学、气管组织病理学和气管冲洗液的MG特异性qPCR进行评估。

[0114] 试验3(鸡安全性和功效)

[0115] 从已知不含MG和MS的来源处获取125日龄SPF雏鸡,并饲养在一个铺有松木刨花的圈舍(1.5x3 m^2)中。在3WOA时,将雏鸡随机进行翅膀绑带,并分配到4个治疗组。通过气管样品的培养、MG和鸡滑液囊支原体qPCR以及血清学,筛查十五只鸡(分布在各治疗组中)中支原体的存在。在4WOA时,通过气雾剂对鸡接种相应的治疗(B、C、D、K6067、K4110A或R菌株),或不接种疫苗作为阴性对照组,如下表4所示。B组和C组中的五只鸡未进行接种,并在5WOA时与已接种疫苗的鸟类混养。混养后19天(8WOA),对这10只接触鸟类进行尸检和评估。疫苗接种后4周,将B、C和D组各10只鸡通过气雾剂直接用R菌株攻击。将剩余的已接种疫苗的鸟类与这些鸟类混养在一起,并将10只未接种疫苗的鸟类与未接种疫苗的气雾剂攻击组直接接触(接触攻击)。在10WOA时,对所有鸟类进行尸检并通过总气囊病变评分、血清学、气管组织病理学和气管冲洗液的MG qPCR和菌株特异性qPCR进行评估。

[0116] 试验4(剂量应答1)

[0117] 从已知不含MG和MS的来源处获取84日龄的SPF雏鸡。在2WOA时,将雏鸡进行翅膀绑带,并随机分配到二十四个隔离器中的12个治疗组(表5)。通过气管样品的培养、MG和鸡滑液囊支原体qPCR以及血清学,筛查分布在各治疗组中的十只鸡中支原体的存在。在3WOA时,将C组至G组中的鸡通过滴眼剂接种K6067疫苗,并将H组至L组中的鸡通过气雾剂接种K6067疫苗。如表5所示,各组接受了不同剂量的疫苗候选物。A组和B组未接种疫苗,分别作为阴性对照和仅攻击组。疫苗接种后1周,从所有组中采集鼻孔后裂口和气管拭子,以用于培养和MG qPCR。疫苗接种后2周,对所有八十四只鸡进行放血并用拭子擦拭,以用于MG血清学、培养和MG qPCR。疫苗接种后四周和7WOA时,将B组至L组的鸡通过气雾剂用R菌株攻击。在9WOA时,对所有鸟类进行尸检并通过总气囊病变评分、血清学、鼻孔后裂口和气囊培养、气管组织病理学和气管冲洗液的MG和菌株特异性qPCR进行评估。基于采样和尸检结果计算50最小感染剂量(MID50)和50最小保护剂量(MPD50)(Cottey等人,2001,Current Protocols in Immunology;42:19-11)。

[0118] 试验5(剂量应答2)

[0119] 从已知不含MG和MS的来源处获取79日龄的SPF雏鸡。在3WOA时,将雏鸡进行翅膀绑带,并随机分配到十九个隔离器中的7个治疗组(表6)。通过气管样品的培养、MG和鸡滑液囊支原体qPCR以及血清学,筛查分布在各治疗组中的十只鸡中支原体的存在。在3WOA时,将C组至G组的鸡通过滴眼剂接种不同剂量的疫苗候选物K4110A。A组和B组未接种疫苗,分别作为阴性对照和仅攻击组。疫苗接种后1周,从所有组中采集鼻孔后裂口和气管拭子,以用于培养和MG q-PCR。疫苗接种后2周,对所有七十九只鸡进行放血并用拭子擦拭,以用于MG血清学、培养和MG qPCR。在疫苗接种后4周和7WOA时,将B组至G组的鸡通过气雾剂用R菌株攻击。在9WOA时(攻击后2周),对所有鸟类进行尸检并通过总气囊病变评分、血清学、鼻孔后裂口和气囊培养、气管组织病理学和气管冲洗液的MG和菌株特异性qPCR进行评估。实验设计

和程序的具体日期详见表6。

[0120] 基于采样和尸检结果计算50最小感染剂量(MID50)和50最小保护剂量(MPD50)(Cottey等人,2001,Current Protocols in Immunology;42:19-11)。

[0121] 试验6(垂直传播)

[0122] 获取一百四十四只4周龄的SPF鸡(131只雌性和18只雄性),并饲养在四个铺有松木刨花的圈舍(1.5x3 m^2)中。在19WOA时,将鸡转移到鸡舍,并随机分配到5个组(表7)。在23WOA时,通过气管样品的培养、MG和鸡滑液囊支原体qPCR以及血清学,筛查分布在各治疗组中的十六只鸡中支原体的存在。在25WOA时,通过滴眼剂对鸡接种相应的治疗(K6067、K4110A、F菌株或R菌株),或不进行接种作为阴性对照组。接种后三周,在28WOA时,对来自阴性对照组、A组的五只鸟和B组至E组各10只鸟的鼻孔后裂口拭子进行MG qPCR。从接种前一周(24WOA)开始每天收集蛋,直至31WOA,并保持在4C直至开始孵育。除周一外,平日产的蛋在周六孵化,周六、周日和周一产的蛋在周一孵化。在胚胎发育(DOE)第7天、第9天、第11天、第13天和第15天用亮光检查每组蛋。丢弃未受精卵或早期死亡胚胎(少于7个DOE),在第9、11、13和15个DOE时对任何死亡胚胎的卵黄囊进行采样,并接种到改良弗氏肉汤中进行培养。在18DOE时,对所有剩余的含胚卵进行采样,用于培养。

[0123] 此外,对最后一组蛋的卵黄囊样品进行了HI和ELISA(缅因州韦斯特布鲁克市的IDEXX公司)测定(National Poultry Improvement Plan,“Procedures for preparing egg yolk samples for diagnostic tests,”National Poultry Improvement Plan Program Standards,23-24;2017)。使用NPIP推荐的蛋黄标准程序来制备样品并进行测试(National Poultry Improvement Plan,“Procedures for preparing egg yolk samples for diagnostic tests,”National Poultry Improvement Plan Program Standards,23-24;2017)。HI测试程序如Ferguson-Noel等人所述(Ferguson-Noel和Kleven,“Mycoplasma species,”见:Williams SM,Dufour-Zavala L,Jackwood MW,Lee MD,Lupiani B,Reed WM,Spackman E.Woolcock PR编辑A Laboratory Manual for the Isolation,Identification and Characterization of Avian Pathogens.American Association of Avian Pathologists.第63-70页;2016)。还记录了产蛋期间所有组的产蛋参数,包括受精率和母鸡周产率。所有组的16组蛋的受精率的计算方法是将7个DOE后受精蛋的数量除以孵育蛋的总数乘以100(Lin和Kleven,1982,Avian Dis;26:487-95)。记录21至31WOA期间的产蛋数量,并通过将一周产蛋总数除以母鸡总数乘以100来计算母鸡周产蛋率。

[0124] 在31WOA时,对所有鸟类进行尸检并通过总气囊病变评分、血清学、鼻孔后裂口和气囊培养、气管组织病理学以及气管冲洗液和输卵管拭子的MG qPCR进行评估。

[0125] 结果

[0126] 试验1(火鸡安全性1)

[0127] 在2WOA时进行预接种测试的鸟类对MG、MM和MS抗体均呈阴性,并且通过qPCR,对MG、MS、MM和MI也均呈阴性。当时所有培养物对支原体也均呈阴性。所有接种组均检测到MG抗体;试验1的血清学结果总结于表8中。抗体应答最弱的是E组,该组接种了分离株K6837。唯一没有观察到气囊病变的组是阴性对照组,然而,接种K6067的组(B组)和接种K6837的组(E组)的平均气囊病变评分显诸低于阳性对照组(G组)($P \leq 0.05$)。平均气管粘膜厚度测量值最高的是D组和F组。唯一平均测量值低于阳性对照(R-菌株;G组)的接种组接种了K6067

(B组)和K6837(E组)。qPCR结果表明,除E组(接种K6837)外,所有接种组均感染了MG,并且MG在气管中高水平复制。除了E组(接种K6837)和B组(接种K6067)的2个气囊培养物之外,从所有接种组的培养物(气管和气囊)中回收了支原体(表9)。试验期间没有出现死亡,但观察到的临床体征总结于表10中。B组(接种K6067)和E组(接种K6837)的鸟类未观察到呼吸道临床体征。

[0128] 试验2(火鸡安全性2)

[0129] 在3WOA时进行预接种测试的10只鸟对MG、MM和MS抗体呈阴性,并且通过qPCR,对MG、MS、MI和MM也均呈阴性。所有培养物对支原体也均呈阴性。在所有接种组中均检测到MG抗体,并且抗体应答最弱的是接种K4110A的C组(表11)。这与平均气囊病变评分一致。唯一未观察到气囊病变的组是阴性对照组。然而,接种K4110A的组(C组)和接种K4179的组(B组)的平均气囊病变评分低于阳性对照(G组)。B组的平均气囊病变评分(3.5)与阳性对照组的平均气囊病变评分(3.7)之间差异并不显著(P≤0.05)。平均气管粘膜厚度测量值最高的是B组和F组。任何接种组的平均测量值均高于阳性对照(G组)。qPCR结果表明,所有接种组均感染了MG,并且MG在气管中高水平复制。这些结果还表明,尽管K4110A接种并未导致显著病变(P≤0.05),但鸟类被感染并复制了MG。从接种组的所有培养物中回收了支原体,包括气管和气囊。这些结果总结于表12中。试验期间没有出现死亡,但观察到的临床体征总结于表13中。C组(接种K4110A)和F组(接种K6836A)的鸟类未观察到呼吸道临床体征。

[0130] 试验3(鸡安全性和功效)

[0131] 在2WOA时进行预接种测试的15只鸟对MG和MS抗体呈阴性,并且通过qPCR,对MG和MS也均呈阴性。接种前所有培养物对支原体也均呈阴性。本试验进行了三次尸检,目的是评估疫苗候选物在鸡中的安全性(尸检1)、评估疫苗候选物水平传播的可能性(尸检2)以及评估疫苗候选物在攻击后的功效(尸检3)。

[0132] 尸检1(安全性)。尽管与阳性对照(R菌株)相比,接种疫苗候选物的组中的抗体应答较弱,但在所有接种组中均检测到MG抗体。B组(K6067)和C组(K4110A)的平均SPA评分显著低于D组(R菌株)(P≤0.05)。这些血清学结果的总结示于表14中。接种后14天,除阳性对照组外,所有组均未出现气囊病变,并且这些差异有统计学意义(P≤0.05)。各组之间的平均气管粘膜厚度没有显著差异(P≤0.0.),尽管阳性对照(R菌株)在数值上较高。在接种后14天,从所有接种鸟类的气管中分离出MG,但从疫苗候选物组的气囊中没有分离出MG,与之对比,从R菌株组的气囊中100%分离出了MG。qPCR结果显示,尽管所有分离株都在其组中定植鸟类,但与接种K6067和R菌株的组相比,K4110A中的基因组拷贝数(MCNlog10)显著较低(P≤0.05)。这些结果的总结示于表15中。

[0133] 尸检2(水平传播至接触者)。混养后19天,与已接种疫苗的鸟类直接接触的鸟类的感染水平较低(从气管分离检测到5例K6067中的2例,5例K4110A中的1例)。各组之间的血清学应答(表16)、气囊病变或气管粘膜厚度没有显著差异(表17)。

[0134] 尸检3(功效-气雾剂和接触攻击)。接种疫苗候选物的组在用R-菌株攻击后14天表现出强烈的血清学应答(示于表18中)。如表19所示,疫苗接种组在攻击后还具有显著较低的平均气囊病变评分(P≤0.05)。即使在阴性对照和阳性对照之间,气管测量值也没有显著差异(表21)(P≤0.05);然而,阳性对照产生最高的平均测量值。qPCR结果总结于表20中。qPCR结果显示,与K4110A组相比,K6067组气管中的平均基因组拷贝数log10更高。同样明显

的是,在疫苗接种组的气管中检测到的大多数MG是疫苗菌株,而不是两种疫苗候选物的攻击菌株。两种疫苗似乎都能够防止攻击菌株的定植,其中疫苗接种组中R-菌株特异性qPCR的MCNlog10显著降低(P≤0.05)。对于接触攻击组,未接种疫苗的接触鸟类存在一定程度的R-菌株传播,并且根据分离结果我们可以推断,这些接触鸟类中至少有70%(7/10)感染了R-菌株但通过与攻击鸟类接触而暴露于R-菌株的已接种疫苗的鸟类均未感染攻击菌株(来自R-菌株qPCR结果)。

[0135] 试验4(剂量应答1)

[0136] 在2WOA时进行预接种测试的所有10只鸟对MG和MS抗体呈阴性,并且通过qPCR,对MG和MS也均呈阴性。此时所有培养物对支原体也均呈阴性。4WOA(疫苗接种后1周)时的采样结果的总结示于表22中。E、F和G组的所有培养物(通过滴眼剂的剂量分别为10^3、10^4和10^5CCU/mL)对支原体均呈阳性。在其他组中,D组(通过滴眼剂,10^2CCU/mL)、J组和K组(通过气雾剂,10^5和10^6CCU/mL)各只有一个样品呈阳性。qPCR结果还表明,只有E、F和G组的K6067存在一些MG定殖。

[0137] 6WOA(疫苗接种后3周)时的采样结果示于表23和24中。E、F和G组的所有培养物再次对支原体呈阳性,J和K组各有一个样品呈阳性,并且D组有两个样品呈阳性,其余均呈阴性。还通过对气管拭子进行qPCR来评估MG定植,并且D、E、F和G组显示出一定程度的定植,其中F组(通过滴眼剂,10^4CCU/mL)的定植率为100%。在血清学方面,血清平板凝集(SPA)测试表明D组至G、J和K组中有一些抗体应答,但血凝抑制(HI)和酶联免疫吸附测定(ELISA)测试表明,F组和G组中几乎没有阳性反应。在疫苗接种后6周(用R-菌株攻击后2周),在所有接种组(B至G)中检测到MG抗体(表25和26)。与B组(仅攻击组)相比,E组至G组(均在早期采样中显示气管中的K6067定植)的平均SPA评分较低。除阴性对照组(A组)外,所有组在毒力攻击后均出现一定程度的气囊病变,但D、E、F、G、J、K和L组的平均气囊病变评分低于仅攻击组(B组)。其中,E、F和G组的平均评分显著低于其他疫苗接种组和攻击组(P≤0.05)。与仅攻击组相比,D、E、F、G、J和K组的平均气管粘膜厚度测量值较低,并且E、F和G组的差异显著(P≤0.05)(表27)。

[0138] 表28中总结的qPCR结果表明,所有接种组都被感染,并且MG在气管中复制。E、F和G组(通过滴眼剂接种最高剂量的K6067)的平均定植率显著低于其他组,包括仅攻击组(B组)(P≤0.05)。D、J和K组的平均定植率也低于B组。菌株特异性qPCR结果与MG qPCR和各组相关(表28)。除J组的两只鸟外,在R-菌株攻击后,从接种组的所有鼻孔后裂口培养物中回收了支原体。对于气囊培养物,从通过气雾剂接种疫苗的所有组(H组至L组)的气囊中回收了支原体。对于通过滴眼剂接种疫苗的组,从C、D和G组的所有鸟、E组的三只鸟和F组的五只鸟中分离出支原体(表27)。根据所有剂量和两种施用途径的疫苗接种后1周和3周采样的qPCR和培养结果,计算出K6067的MID50。虽然无法计算qPCR结果的MID50,但通过滴眼剂途径接种疫苗的组的培养结果的MID 50在接种后一周为$10^{3.8}$ccu/mL,并且在接种后三周为$10^{3.53}$CCU/mL。无法根据通过气雾剂途径接种疫苗的组的培养结果计算出MID50(表29)。

[0139] 此外,还根据尸检时记录的气囊评分和气管厚度测量值计算出K6067的MPD50。虽然无法根据通过气雾剂接种疫苗的组的气囊评分和气管厚度测量值计算出MPD50,但通过滴眼剂接种疫苗的组的MPD50根据气囊评分为10^4CCU/mL,并且根据气管厚度测量值为$10^{3.3}$CCU/mL(表30)。

[0140] 试验5(剂量应答2)

[0141] 在2WOA时进行预接种测试的所有10只鸟对MG和MS抗体呈阴性,并且通过qPCR,对MG和MS也均呈阴性。当时所有培养物对支原体也均呈阴性。4WOA(疫苗接种后1周)时的采样结果的总结示于表31中。C组13个培养物中的10个以及D组至G组的所有培养物均对支原体呈阳性。qPCR结果还表明,所有接种K4110A的组中均存在一定程度的MG定植,其中F组和G组(接受最高疫苗剂量的组)的平均基因组拷贝数(MCNlog10)显著高于阴性对照($P<0.05$)。

[0142] 6WOA(疫苗接种后3周)时的采样结果总结于表32和33中。所有接种组的培养物(C组中的2只鸟除外)均对支原体呈阳性。在所有接种组中均检测到一定程度的定植,其中E、F和G组的平均基因组拷贝数(MCNlog10)显著高于阴性对照($P<0.05$)。在血清学方面,与HI和ELISA测试相比,SPA测试发现了更多的阳性样品。C组(接种最低剂量疫苗)的SPA评分显著着低于其他接种组($P<0.05$)。C组的ELISA和HI测试也没有出现阳性结果。

[0143] 在9WOA(疫苗接种后6周和用R-菌株攻击后2周)时,在所有接种组中均观察到血清转化。与B组(仅攻击组)相比,C组至G组的平均SPA评分较低。然而,这些组的s/p比率和HI滴度均高于B组(表34)。除A组(阴性对照)和F组外,所有组都存在一些气囊病变。然而,所有疫苗接种组的平均气囊病变评分显著低于B组(仅攻击对照)($P<0.05$)(表35)。所有疫苗接种组的平均气管粘膜厚度测量值均显著低于仅攻击组(B组)($P<0.05$)。从所有疫苗接种组或攻击组的所有鼻孔后裂口培养物和所有疫苗接种组或攻击组的所有鸟类(D组中的两只鸟和F组中的一只鸟除外)的气囊中分离出支原体。

[0144] MG qPCR和菌株特异性qPCR结果总结于表36中。与疫苗接种组相比,在仅攻击组气管中检测到的R菌株平均基因组拷贝数(MCNlog10)显著更高($P<0.05$)。K4110A特异性qPCR显示,疫苗候选物定植于所有接种K4110A疫苗的组的气管中,尽管C组(最低接种剂量)中疫苗菌株的MCNlog10显著低于其他疫苗接种组。除G组外,在来自疫苗接种组的气囊培养物中未检测到K4110A(表36)。基于所有剂量的疫苗接种后1周和3周的qPCR和培养结果,计算出K4110A的MID50(表37)。虽然未发现培养结果的MID50,但通过滴眼剂途径接种疫苗的组的qPCR结果的MID 50在接种后一周为$10^{5.3}$CCU/mL,并且在接种后三周为$10^{5.2}$CCU/mL。

[0145] K4110A的MPD50也是根据尸检平均气囊评分计算得出的,并且为$10^{3.7}$CCU/mL。(表38)。无法根据疫苗接种组的气管厚度测量值计算出MPD50。

[0146] 试验6(垂直传播)

[0147] 在23WOA时进行预接种测试的所有16只鸟对MG和MS抗体呈阴性,并且通过qPCR,对MG和MS也均呈阴性。当时所有培养物对支原体也均呈阴性。

[0148] 总共检测了4436个蛋,其中没有一个对支原体呈阳性。然而,蛋黄样品的HI和ELISA结果表明抗体转移至胚胎(表39)。虽然C组(K4110A)、D组(F-菌株)和E组(R-菌株)有一些阳性MG ELISA结果,但只有C组和E组MG HI呈阳性。B组卵黄囊样品经HI或ELISA检测均未呈阳性。所有组的16组蛋的受精率和母鸡周产蛋量平均值示于表40中;各组间无显著差异($P<0.05$)。

[0149] 尸检时的血清学结果的总结示于表41中。所有接种组均检测到MG抗体。尽管B组(K6067)HI滴度和ELISA S/P比率显著低于其他接种组,但接种组的SPA评分没有显著差异($P<0.05$)。

[0150] 接种两种疫苗候选物和F菌株的组中的平均气囊病变显著低于E组(R-均株)(表

42)(P<0.05)。最高的平均气管粘膜厚度测量值出现在接种R菌株的E组中。对于气管病变,疫苗候选物(B组和C组)和F菌株接种组(D组)的平均测量值均显著低于阳性对照(E组-R-菌株)(P<0.05)。气管冲洗液样品MG qPCR结果表明,所有接种组均感染MG,并且MG在气管中复制。这些结果表明,与接种F-菌株和R-菌株的组相比,接种两种疫苗候选物的组的气管中MG定植率更高。通过MG q-PCR,所有输卵管拭子均未呈阳性。除了来自C组的一只鸟和来自D组的另一只鸟之外,从所有接种组的所有鼻孔后裂口培养物中回收了支原体(表42)。两个阴性样品均来自q-PCR和气囊培养呈阳性的鸟类。所有疫苗接种组的气囊培养阳性数量均显著低于E组(接种R菌株)。

[0151] 讨论

[0152] 在试验1和试验2中,首先对火鸡施用了十种符合疫苗候选物初始标准的MG分离株。选择从火鸡中回收的分离株以及在火鸡中进行首次安全性试验的理由是,一般来说,与鸡相比,火鸡对MG更敏感,并且受该疾病的影响更严重。这项研究的总体目标是开发一种对火鸡和鸡均有效且安全的MG减毒活疫苗候选物。据认为,具有一定程度自然减毒作用的疫苗候选物比毒力株更有前景。对两项火鸡试验结果(临床体征、气囊和气管病变)的分析导致选择K6067和K4110A进行进一步研究,因为这些分离株显示出(在一定程度上)自然减毒的证据。试验1中还有另一种分离株(K6837),与其他接种组相比,其抗体应答最弱,病变水平也较低。然而,该分离株的接种滴度(10^6CCU/ml)远低于其他分离株的接种滴度(10^8CCU/ml),并且根据qPCR结果,该分离株在火鸡中的定殖效果似乎不如其他MG分离株。尽管K6837满足了体外稳健生长的最低要求,但它是本试验选择的分离株中生长最慢的,并且需要对该分离株进行进一步研究,以确定试验1的结果是由于该分离株的滴度低(定殖率低)造成的还是由于毒力低造成的。

[0153] 试验1的结果表明,尽管K6067接种并未导致显著的病变,但火鸡被感染并复制了MG(生成保护性免疫应答的要求)。研究表明,6/85在气管中的定植效果较差,这可以解释与F-菌株和ts-11相比(16、29)。气囊培养结果还表明,K6067可能不像本试验中的其他MG分离株那样具有侵入性。类似地,在试验(火鸡安全性2)中,K4110A能够感染火鸡,但不会导致严重的临床体征或病变。所有剩余的试验都是在鸡中进行的,但有必要对火鸡进行进一步的研究以调查该家禽物种的功效和其他参数。

[0154] 在试验3中,对选定的两个候选物在鸡中的安全性(包括水平传播的可能性)和功效进行了评定。在本试验的第一部分中,确定了两种疫苗候选物均符合对鸡的安全性要求,因为尽管分离株定植于呼吸系统并生成全身抗体应答,但没有临床体征,通过气雾剂施用K6067或K4110A后也没有气囊病变。在本试验中,与K4110A相比,K6067以更高的水平存在于气管样品中,但这可能是由于K4110A的施用剂量略低(10^7CCU/ml与10^8CCU/ml)。通过将已接种疫苗的鸟类与未接种疫苗的接触者混养来评估安全性的另一个方面-水平传播的风险。有一些证据表明接触者受到了感染,但由于这些鸟类只混养了14天,因此在得出结论之前应更彻底地调查疫苗候选物的传播性。关于疫苗候选物的功效,本试验在用MG R-菌株进行毒力攻击后的结果表明,两种候选物均在鸡中诱导保护性免疫。与通过气雾剂攻击的未接种疫苗的对照鸟类相比,已接种疫苗的鸟类的平均气囊评分显著较低。

[0155] 尽管本试验中各组之间的气管粘膜测量值没有显著差异,但这可能是由于受气雾剂攻击的鸟类和受接触攻击的鸟类的综合数据所致。即使在未接种疫苗的对照组中,受接

触攻击的鸟类也没有出现严重病变。这种攻击方法通常不会导致高病变评分的强力攻击，然而，qPCR结果表明，疫苗候选物能够预防(接触感染)或减少(直接气雾剂攻击)受攻击菌株的感染和定植。应进一步研究这些疫苗候选物的功效(包括与商业疫苗的直接比较)，以确认这些初步结果。然而，试验4和5的结果表明，当通过滴眼剂途径施用时，疫苗候选物具有与商业疫苗相当的最低传染剂量和保护剂量。接种后1周，10^3CCU/ml范围内的滴眼剂剂量足以感染100％(对于K6067)和77％(对于K4110A)的鸟类。这一剂量也足以在毒力攻击后针对气囊和气管病变提供一些保护。F菌株的最小有效剂量计算为$10^{5.5}$CCU/mL(Lin和Kleven,1984,Avian Dis;28:273-7)。K6067的气雾剂施用不太成功;试验中每组中的少量鸟类通过气雾剂施用疫苗时的设备和环境复杂性可能会影响这部分研究。更多的调查(针对更多数量的鸟类)可能表明，气雾剂可能是一种有效的施用途径，但从本试验的结果来看，滴眼剂途径似乎是K6067疫苗接种的首选途径。类似的结果发现，滴眼剂是F菌株的最有效的施用途径(Leigh等人,2018,Poultry Science;97(9):3072-3075;以及Evans等人,2015,Poult Sci;94:1849-52)。滴眼剂疫苗接种组的结果更一致，免疫应答增加(通过血清学测量)。滴眼剂途径获得的更好结果可能是由于多种因素，包括疫苗的单独施用以及鸟群中每只鸟的体积和剂量更加一致。值得注意的是，在剂量应答2(K4110A)菌株特异性PCRS中，不仅对气管样品进行了检测，而且还对气囊培养物进行了检测，并且R-菌株的基因组拷贝数非常高;这可能是由于R-菌株对体外培养的适应。

[0156] 在火鸡和鸡中，两种疫苗候选物均引发了可检测的且一致的血清学应答;尽管血清抗体水平似乎与MG减毒活疫苗的保护作用无关，但有用的是，能够使用广泛可用且价格低廉的血清学测试来监测疫苗接种。

[0157] 垂直传播可能成为支原体疫苗的主要安全性问题，并且F-菌株和ts-11疫苗均已被证明具有通过蛋传播给子代的一定风险(Armour等人,2015,Avian Pathol;44:296-304;以及El Gazzar等人2011,Avian Dis;55:569-74)。在这项研究中，没有发现任何候选物的垂直传播。然而，在接种F菌株或R菌株的组中也未检测到垂直传播。这些结果可能是由于试验中的鸟类数量相对较少以及施用途径(滴眼剂)所致。虽然这种途径更接近地模拟了疫苗可能的现场应用，但在更严峻的攻击(气雾剂)下可能会出现更高的传播率。结果表明，疫苗候选物不太可能具有高垂直传播率，但应考虑增加鸟类的数量和蛋的数量来证实这些结果。检测到蛋黄样品中母体抗体的转移表明存在对MG的一些全身免疫应答。被动母体抗体在MG感染中的作用已被证明是无益的，因为它对MG攻击几乎没有提供保护(Lin和Kleven,1984,Avian Dis;28:79-87)并且由毒力MG引起的胚胎死亡被该抗体阻断(Levisohn等人,1985,Avian Dis;29:188-97)，因此，受感染蛋的孵化率可能会提高，这并不理想。

[0158] 总之，这两种候选物对火鸡和鸡都是安全的，并且可以有效减少毒力攻击菌株的定植，以及减少毒力MG菌株在鸡中的病变和影响。滴眼剂途径被证实是一种有效的施用途径，并且传染性和保护性剂量与其他MG疫苗相对应。垂直传播研究表明，K6067和K4110A都不具有高传播风险。这些结果令人鼓舞，对火鸡中的免疫持续时间、传播性和功效等参数的进一步研究将为这些疫苗提供更多信息。

[0159] 表1.被选中进行初步筛选的疫苗候选物的历史(试验1和2)。

[0160]

编号	K 编号	分离史	试验
1	K6837	火鸡，北卡罗来纳州，2017	试验 1
2	K6813	火鸡，北卡罗来纳州，2017	试验 1
3	K6694	51 WOA 肉种鸡，阿肯色州，2015	试验 1
4	K6524	火鸡种鸡，明尼苏达州，2012	试验 1
5	K6067	19 WOA 火鸡，阿肯色州，2007	试验 1
6	K6836A	火鸡，北卡罗来纳州 2017	试验 2

[0161]

7	K5792A	蛋鸡种鸡，宾夕法尼亚州，2005	试验 2
8	K5058E	火鸡，弗吉尼亚州，2001	试验 2
9	K4179	27 WOA 火鸡种鸡，弗吉尼亚州，1996	试验 2
10	K4110A	73 WOA 火鸡，北卡罗来纳州，1996	试验 2

[0162] WOA＝周龄

[0163] 表2.试验1(火鸡安全性1)。实验设计。

[0164]

组	每个隔离器的鸟类数量	疫苗接种（喷洒）	传代级别	培养的滴度 (CCU/ml)
A	6	否	N/A	N/A
B	6	是/K6067	13P	8.0×10^8
C	6	是/K6524	11P	4.2×10^8
D	6	是/K6694	10P	3.9×10^8
E	6	是/K6837	11P	3.1×10^6
F	6	是/K6813	14P	1.8×10^8
G	6	R-菌株	12P	3.5×10^8

[0165] 表3.试验2(火鸡安全性2)。实验设计。

[0166]

组	每个隔离器的鸟类数量	疫苗接种（喷洒）	传代级别	培养的滴度 (CCU/ml)
A	6	否	N/A	N/A
B	6	是/K4179	7P	8.0×10^8
C	6	是/K4110A	10P	4.2×10^8
D	6	是/K5058E	11P	3.9×10^8
E	6	是/K5792A	12P	3.1×10^6
F	6	是/K6836A	13P	1.8×10^8
G	6	R-菌株	12P	3.5×10^8

[0167] 表4.试验3(鸡安全性和功效)。实验设计。

[0168]

组	每组的鸟类数量	疫苗接种（喷洒）	传代级别	培养的滴度 (CCU/ml)
A	18	否	N/A	N/A
B	38	是/K6067	13P	4.2×10^8

[0169]

C	38	是/K4110A	11P	2.3×10^7
D	31	是/R 菌株	13P	2.8×10^8

[0170] 注:接种后用于攻击B、C、D组的R菌株13P的滴度为2.45×10^9CCU/ml。

[0171] 表5.试验4(剂量应答1)。实验设计。

[0172]

组	每组的鸟类数量	疫苗接种	攻击	疫苗接种的剂量和途径
A	7	否	否	N/A
B	7	否	是/R 12P	N/A
C	7	是/K6067 18P	是/R 12P	10^1 CCU/mL 滴眼剂
D	7	是/K6067 18P	是/R 12P	10^2 CCU/mL 滴眼剂
E	7	是/K6067 18P	是/R 12P	10^3 CCU/mL 滴眼剂
F	7	是/K6067 18P	是/R 12P	10^4 CCU/mL 滴眼剂
G	7	是/K6067 18P	是/R 12P	10^5 CCU/mL 滴眼剂
H	7	是/K6067 18P	是/R 12P	10^3 CCU/mL 气雾剂
I	7	是/K6067 18P	是/R 12P	10^4 CCU/mL 气雾剂
J	7	是/K6067 18P	是/R 12P	10^5 CCU/mL 气雾剂
K	7	是/K6067 18P	是/R 12P	10^6 CCU/mL 气雾剂
L	7	是/K6067 18P	是/R 12P	10^7 CCU/mL 气雾剂

[0173] 注:接种后用于攻击B组至L组的R菌株12P的滴度为1.1x 10^9CCU/ml。

[0174] 表6.试验5(剂量应答2)。实验设计。

[0175]

组	每组的鸟类数量	疫苗接种	攻击	疫苗接种的剂量和途径
A	7	否	否	N/A
B	7	否	是/R 14P	N/A
C	13	是/K4110A 14P	是/R 14P	10^3 CCU/mL 滴眼剂
D	13	是/K4110A 14P	是/R 14P	10^4 CCU/mL 滴眼剂
E	13	是/K4110A 14P	是/R 14P	10^5 CCU/mL 滴眼剂
F	13	是/K4110A 14P	是/R 14P	10^6 CCU/mL 滴眼剂
G	13	是/K4110A 14P	是/R 14P	10^7 CCU/mL 滴眼剂

[0176] 注:接种后用于攻击B组至L组的R菌株12P的滴度为3.5x 10^8CCU/ml。

[0177] 表7.试验6(垂直传输)。实验设计。

[0178]

组	每组的鸟类数量	疫苗接种（喷洒）	传代级别	培养的滴度(CCU/ml)
A	16	否	N/A	N/A
B	32	是/K6067	18P	4.21×10^8
C	32	是/K4110A	14P	9.3×10^8
D	32	是/F 菌株	11P	1.77×10^9
E	32	是/R 菌株	14P	7.95×10^8

[0179] 表8.试验1(火鸡安全性1)。接种K6067、K6524、K6694、K6837、K6813或R菌株后2周，火鸡的MG血清学应答。[A]

[0180]

组	疫苗/攻击	SPA	HI	ELISA
A	无	0/6 [B] (0.0)[C]c	0/6 (0.0)[D]d	0/6 (0.0)[E]a
B	K6067	6/6 (1.7)a	5/6 (1.2)abc	3/6 (0.6)c
C	K6524	6/6 (2.2)a	2/6 (0.4)cd	5/6 (0.8)bc

[0181]

D	K6694	6/6 (2.0)a	6/6 (1.5)ab	6/6 (1.3)a
E	K6837	1/6 (0.2)bc	3/6 (0.7)bcd	0/6 (0.1)a
F	K6813	6/6 (1.2)ab	5/6 (2.0)a	6/6 (1.3)ab
G	R 菌株	6/6 (2.2)a	6/6 (1.8)a	6/6 (1.2)ab

[0182] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0183] [B]阳性样品数/测试样品数(SPA:≥1,HI:≥20,ELISA:≥0.5,气囊评分≥1)

[0184] [C]平均凝集等级(从0到4)

[0185] [D]平均滴度log10

[0186] [E]平均样品/阳性比率

[0187] 表9.试验1(火鸡安全性1)。接种K6067、K6524、K6694、K6837、K6813或R菌株后2周,火鸡气管和气囊的病变评分、气管粘膜厚度、基因组拷贝数log10和MG分离。[A]

[0188]

组	疫苗/攻击	气囊病变评分	气管粘膜厚度	MG 分离		qPCR - MG
				气管	气囊	
A	无	0/6[B] (0.0)[C]c	111.7 ± 20.7[D]c	0/6a	0/6a	0.0[E]b
B	K6067	6/6 (1.5)b	125.2 ± 14.1c	6/6b	4/6b	2.5± 0.2a
C	K6524	6/6 (3.0)a	153.6 ± 31.1bc	6/6b	6/6b	3.7 ± 0.9a
D	K6694	6/6 (3.2)a	215.5 ± 56.9ab	6/6b	6/6b	3.4 ± 0.7a
E	K6837	3/6 (0.5)bc	105.1 ± 27.4c	5/6b	0/6a	1.0 ± 0.7b
F	K6813	6/6 (3.2)a	226.5 ± 39.6a	6/6b	6/6b	3.5 ± 0.7a
G	R 菌株	6/6 (3.7)a	148.0 ± 47.6c	6/6b	6/6b	2.9 ± 1.2a

[0189] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0190] [B]阳性样品数/测试样品数(气囊评分≥1)

[0191] [C]平均评分(宏观评分从0到4)

[0192] [D]各组平均厚度±SD(μm)

[0193] [E]平均(基因组)拷贝数log10±SD

[0194] 表10.试验1(火鸡安全性1)。接种K6067、K6524、K6694、K6837、K6813或R菌株后2周,火鸡的临床体征。

[0195]

组	疫苗/攻击	临床图片
A	无	未观察到呼吸道临床体征
B	K6067	未观察到呼吸道临床体征
C	K6524	啰音和咳嗽
D	K6694	气喘、啰音和咳嗽
E	K6837	未观察到呼吸道临床体征
F	K6813	啰音和咳嗽
G	R 菌株	弱啰音

[0196] 表11.试验2(火鸡安全性2)。接种K4179、K4110A、K5058E、K5792A、K6836A或R菌株后两周,火鸡的MG血清学应答。[A]

[0197]

组	疫苗/攻击	SPA	HI	ELISA
A	无	0/6 [B] (0.0)[C]c	0/6 (0.0)[D]c	0/6 (0.0)[E]c
B	K4179	6/6 (2.3)a	6/6 (1.9)a	6/6 (1.05)ab
C	K4110A	6/6 (2.2)ab	6/6 (1.8)a	2/6 (0.48)bc
D	K5058E	6/6 (1.3)ab	6/6 (1.45)b	3/6 (0.40)bc
E	K5792A	6/6 (1.2)b	6/6 (1.9)a	2/6 (0.73)bc
F	K6836A	6/6 (1.7)ab	6/6 (1.8)a	6/6 (1.59)a
G	R 菌株	6/6 (1.8)ab	6/6 (1.78)a	4/6 (0.91)b

[0198] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0199] [B]阳性样品数/测试样品数(SPA:≥1,HI:≥20,ELISA:≥0.5,气囊评分≥1)

[0200] [C]平均凝集等级(从0到4)。

[0201] [D]平均滴度log10

[0202] [E]平均样品/阳性比率

[0203] 表12.试验2(火鸡安全性2)。接种K4179、K4110A、K5058E、K5792A、K6836A或R菌株后两周,火鸡气管和气囊的病变评分、气管粘膜厚度、MG分离以及qPCR。[A]

[0204]

组	疫苗/攻击	气囊病变评分	气管粘膜厚度	MG 分离		qPCR - MG
				气管	气囊	
A	无	0/6[B] (0.0)[C]c	77.12 ± 16.3[D]c	0/6a	0/6a	0.0[E]c
B	K4179	6/6 (3.5)a	204.05 ± 43.2a	6/6b	6/6b	3.3 ± 0.7a
C	K4110A	6/6 (2.0)b	152.52 ± 37.5ab	6/6b	6/6b	1.8 ± 0.6b
D	K5058E	6/6 (3.8)a	172.57 ± 22ab	6/6b	6/6b	3.4 ± 0.37a
E	K5792A	6/6 (3.7)a	133.49 ± 27.8bc	6/6b	6/6b	1.9 ± 1b
F	K6836A	6/6 (3.7)a	200.59 ± 39.4a	6/6b	6/6b	2.8 ± 0.7ab
G	R 菌株	6/6 (3.7)a	132.11 ± 23.5bc	6/6b	6/6b	2.4 ± 0.5ab

[0205] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0206] [B]阳性样品数/测试样品数(气囊评分≥1)

[0207] [C]平均评分(宏观评分从0到4)

[0208] [D]各组平均厚度±SD(μm)

[0209] [E]平均(基因组)拷贝数log10±SD

[0210] 表13.试验2(火鸡安全性2)。接种K4179、K4110A、K5058E、K5792A、K6836A或R菌株后两周,火鸡的临床体征。

[0211]

组	疫苗/攻击	临床图片
A	无	未观察到呼吸道临床体征
B	K4179	啰音
C	K4110A	未观察到呼吸道临床体征
D	K5058E	气喘、啰音和咳嗽
E	K5792A	喘气、啰音和咳嗽+心脏无力增大
F	K6836A	未观察到呼吸道临床体征
G	R 菌株	弱啰音

[0212] 表14.试验3(鸡安全性和功效)。接种K6067、K4110A或R菌株后14天,鸡的MG血清学应答(尸检1)。[A]

[0213]

组	疫苗/攻击	SPA	HI	ELISA
A	无	0/9 [B] (0.0)[C]c	0/9 (0.0)[D]b	0/9 (0.0)[E]b
B	K6067	10/10 (1.8)b	1/10 (0.1)b	1/10 (0.1)ab
C	K4110A	10/10 (1.5)b	3/10 (0.3)ab	1/10 (0.1)ab
D	R 菌株	11/11 (2.6)a	7/11 (0.9)a	4/11 (1.3)a

[0214] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0215] [B]阳性样品数/测试样品数(SPA:≥1,HI:≥20,ELISA:≥0.5,气囊评分≥1)

[0216] [C]平均凝集等级(从0到4)。

[0217] [D]平均滴度log10

[0218] [E]平均样品/阳性比率

[0219] 表15.试验3(鸡安全性和功效)。接种疫苗候选物或R菌株后14天,鸡的病变评分、MG分离和qPCR(尸检1)。[A]

[0220]

组	疫苗/攻击	气囊病变评分	气管粘膜厚度	MG 分离		qPCR - MG
				气管	气囊	
A	无	0/9[B](0.0)[C]b	74 ± 20.5[D]a	0/9a	0/9a	0.0[E]b
B	K6067	0/10 (0.0)b	88.8 ± 32.1a	10/10b	0/10a	1.5 ± 0.8a
C	K4110A	0/10 (0.0)b	76.9 ± 14.6a	10/10b	0/10a	0.5 ± 0.5b
D	R 菌株	9/11 (2.0)a	136.3 ± 97.4a	11/11b	11/11b	1.9 ± 0.7a

[0221] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0222] [B]阳性样品数/测试样品数(气囊评分≥1)

[0223] [C]平均评分(宏观评分从0到4)

[0224] [D]各组平均厚度±SD(μm)

[0225] [E]平均(基因组)拷贝数log10±SD

[0226] 表16.试验3(鸡安全性和功效)。与疫苗接种组(B组和C组)混养后19天,鸡的MG血清学应答(尸检2)。[A]

[0227]

组	疫苗/攻击	SPA	HI	ELISA
B	K6067	1/5[B] (0.2[C])a	0/5 (0[D])a	0/5 (0[E])a
C	K4110A	1/5 (0.2)a	0/5 (0)a	0/5 (0)a

[0228] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0229] [B]阳性样品数/测试样品数(SPA:≥1,HI:≥20,ELISA:≥0.5,气囊评分≥1)

[0230] [C]平均凝集等级(从0到4)。

[0231] [D]平均滴度log10

[0232] [E]平均样品/阳性比率

[0233] 表17.试验3(鸡安全性和功效)。与疫苗接种组(B组和C组)混养后19天,鸡的病变评分、MG分离和qPCR(尸检2)。[A]

[0234]

组	疫苗/攻击	气囊病变评分	气管粘膜厚度	MG 分离		qPCR - MG
				气管	气囊	
B	K6067	0/5[B] (0.0[C])a	70.9 ± 14.[4D]a	2/5a	0/5a	0.8 ± 1.[3E]a
C	K4110A	0/5 (0.0)a	61 ± 19.4a	1/5a	0/5a	0.1 ± 0.2a

[0235] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0236] [B]阳性样品数/测试样品数(气囊评分≥1;气管MG分离;气囊MG分离)

[0237] [C]平均评分(宏观评分从0到4)

[0238] [D]各组平均厚度±SD(μm)

[0239] [E]平均(基因组)拷贝数log10±SD

[0240] 表18.试验3(鸡安全性和功效)。接种疫苗候选物或R菌株后28天以及用R菌株攻击后14天,鸡的MG血清学应答(尸检3)。[A]

[0241]

组	疫苗	攻击	SPA	HI	ELISA
A	无	无	0/9 [B] (0.0)[C]b	0/9 (0.0)[D]c	0/9 (0.0)[E]c
B-1	K6067	气雾剂	10/10 (3.4)a	9/10 (1.4)ab	5/10 (0.8)bc
B-2	K6067	接触	13/13 (3.4)a	13/13 (1.5)ab	11/13 (0.7)bc
C-1	K4110A	气雾剂	10/10 (3.9)a	10/10 (1.6)a	10/10 (1.8)a
C-2	K4110A	接触	12/13 (3.1)a	12/13 (1.4)ab	12/13 (0.7)bc
D-1	无	气雾剂	10/10 (3.5)a	7/10 (1.1)b	4/10 (0.9)b
D-2	无	接触	1/10 (0.1)a	0/10 (0)c	0/10 (0)c

[0242] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0243] [B]阳性样品数/测试样品数(SPA:≥1,HI:≥20,ELISA:≥0.5,气囊评分≥1)

[0244] [C]平均凝集等级(从0到4)。

[0245] [D]平均滴度log10

[0246] [E]平均样品/阳性比率

[0247] 表19.试验3(鸡安全性和功效)。接种疫苗候选物或R菌株后28天以及用R菌株攻击后14天,鸡的病变评分和MG分离结果(尸检3)。[A]

[0248]

组	疫苗	攻击	气囊病变评分	MG 分离	
				气管	气囊
A	无	无	0/9[B] (0.0)[C]b	0/9c	0/9b
B-1	K6067	气雾剂	1/10 (0.1)b	10/10a	3/10ab
B-2	K6067	接触	0/13 (0)b	13/13a	1/13b
C-1	K4110A	气雾剂	3/10 (0.3)b	10/10a	3/10ab
C-2	K4110A	接触	0/13 (0)b	13/13a	2/13b
D-1	无	气雾剂	8/10 (2.0)a	10/10a	7/10a
D-2	无	接触	2/10 (0.2)b	7/10b	2/10ab

[0249] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0250] [B]阳性样品数/测试样品数(气囊评分≥1;MG分离样品数/测试样品数)

[0251] [C]平均评分(宏观评分从0到4)

[0252] 表20.试验3(鸡安全性和功效)。接种疫苗候选物或R菌株后28天以及用R菌株攻击后14天,鸡的MG、R-菌株特异性、K6067特异性和K4110A特异性qPCR(尸检3)。[A]

[0253]

组	疫苗	攻击(R-菌株)	qPCR – MG	qPCR-K6067	qPCR-K4110A	qPCR-R
A	无	无	0.0[B]b	0.0a	0.0a	0.0bc
B-1	K6067	气雾剂	2.6 ± 0.3a	2.5 ± 0.3b	N/A	0.2 ± 0.4bc
B-2	K6067	接触	2.6 ± 0.4a	2.4 ± 0.4b	N/A	0.0c
C-1	K4110A	气雾剂	2.2 ± 0.9a	N/A	1.5 ± 1.1b	0.9 ± 0.9b
C-2	K4110A	接触	2.1 ± 0.9a	N/A	2.0 ± 1.0 b	0.0c
D-1	无	气雾剂	2.5 ± 1.3a	0.0a	0.0a	2.8 ± 1.3a
D-2	无	接触	0.5 ± 0.8b	0.0a	0.0a	0.4 ± 1.0bc

[0254] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0255] [B]平均(基因组)拷贝数log10±SD

[0256] 表21.试验3(鸡安全性和功效)。接种疫苗候选物或R菌株后28天以及用R菌株攻击或与受R菌株攻击的鸡混养后14天,鸡的气管粘膜厚度(尸检3)。[A]

组	疫苗/攻击	气管粘膜厚度
A	无	82.31 ± 14.64[B]a
B	K6067	80.43 ± 11.86a
C	K4110A	85.53 ± 17.73a
D	R 菌株	123.15 ± 106.44a

[0257]

[0258] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0259] [B]各组平均厚度±SD(μm)

[0260] 表22.试验4(剂量应答1)。接种K6067后7天,鸡的MG分离和qPCR(第1次采样)。[A]

组	接种	MG 分离（鼻孔后裂口）	qPCR – MG（气管）
A	无	0/7[B]b	0.0[C]b
B	无	0/7b	0.0b
C	10^1 CCU/mL 滴眼剂 K6067	0/7b	0.0b
D	10^2 CCU/mL 滴眼剂 K6067	1/7b	0.0b
E	10^3 CCU/mL 滴眼剂 K6067	7/7a	0.16 ± 0.42b
F	10^4 CCU/mL 滴眼剂 K6067	7/7a	0.23 ± 0.62ab
G	10^5 CCU/mL 滴眼剂 K6067	7/7a	0.84 ± 0.92a
H	10^3 CCU/mL 气雾剂 K6067	0/7b	0.0b
I	10^4 CCU/mL 气雾剂 K6067	0/7b	0.0b
J	10^5 CCU/mL 气雾剂 K6067	1/7b	0.0b
K	10^6 CCU/mL 气雾剂 K6067	1/7b	0.0b
L	10^7 CCU/mL 气雾剂 K6067	0/7b	0.0b

[0261]

[0262] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0263] [B]阳性样品数/测试样品数(由于支原体生长而发生颜色变化)

[0264] [C]平均(基因组)拷贝数log10±SD

[0265] 表23.试验4(剂量应答1)。接种K6067后21天,鸡的MG血清学应答(第2次采样)。[A]

[0266]

组	接种	SPA	HI	ELISA
A	无	0/7[B] (0.0)[C]c	0/7 (0.0)[D]a	0/7 (0.0)[E]b
B	无	0/7 (0.0)c	0/7 (0.0)a	0/7 (0.0)b
C	10^1 CCU/mL 滴眼剂 K6067	0/7 (0.0)c	0/7 (0.0)a	0/7 (0.0)b
D	10^2 CCU/mL 滴眼剂 K6067	2/7 (0.5)bc	0/7 (0.0)a	0/7 (0.0)b
E	10^3 CCU/mL 滴眼剂 K6067	6/7 (1.1)ab	0/7 (0.0)a	0/7 (0.1)b
F	10^4 CCU/mL 滴眼剂 K6067	6/7 (1.0)ab	1/7 (0.1)a	0/7 (0.1)b
G	10^5 CCU/mL 滴眼剂 K6067	6/7 (1.4)a	0/7 (0.0)a	2/7 (0.3)a
H	10^3 CCU/mL 气雾剂 K6067	0/7 (0.0)c	0/7 (0.0)a	0/7 (0.0)b
I	10^4 CCU/mL 气雾剂 K6067	0/7 (0.0)c	0/7 (0.0)a	0/7 (0.0)b
J	10^5 CCU/mL 气雾剂 K6067	1/7 (0.1)c	0/7 (0.0)a	0/7 (0.0)b
K	10^6 CCU/mL 气雾剂 K6067	1/7 (0.1)c	0/7 (0.0)a	0/7 (0.0)b
L	10^7 CCU/mL 气雾剂 K6067	0/7 (0.0)c	0/7 (0.0)a	0/7 (0.0)b

[0267]

[0268] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0269] [B]阳性样品数/测试样品数(SPA:≥1,HI:≥20,ELISA:≥0.5,气囊评分≥1)

[0270] [C]平均凝集等级(从0到4)。

[0271] [D]平均滴度log10

[0272] [E]平均样品/阳性比率

[0273] 表24.试验4(剂量应答1)。接种K6067后21天,鸡的MG分离和qPCR(第2次采样)。[A]

[0274]

组	接种	MG 分离（鼻孔后裂口）	qPCR – MG（气管）
A	无	0/7[B]b	0.0[C]c
B	无	0/7b	0.0c
C	10^1 CCU/mL 滴眼剂 K6067	0/7b	0.0c
D	10^2 CCU/mL 滴眼剂 K6067	2/7b	0.32 ± 0.61bc
E	10^3 CCU/mL 滴眼剂 K6067	7/7a	0.45 ± 0.59abc
F	10^4 CCU/mL 滴眼剂 K6067	7/7a	1.00 ± 0.58a
G	10^5 CCU/mL 滴眼剂 K6067	7/7a	0.92 ± 0.66ab
H	10^3 CCU/mL 气雾剂 K6067	0/7b	0.0c
I	10^4 CCU/mL 气雾剂 K6067	0/7b	0.0c
J	10^5 CCU/mL 气雾剂 K6067	0/7b	0.0c
K	10^6 CCU/mL 气雾剂 K6067	1/7b	0.0c
L	10^7 CCU/mL 气雾剂 K6067	0/7b	0.0c

[0275] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0276] [B]阳性样品数/测试样品数(由于支原体生长而发生颜色变化)

[0277] [C]平均(基因组)拷贝数log10±SD

[0278] 表25.试验4(剂量应答1)。接种K6067后6周和用R菌株攻击后2周,鸡的MG血清学应答(尸检)。[A]

[0279]

组	接种	SPA	HI	ELISA
A	无	0/7 [B] (0.0)[C]b	0/7 (0.0)[D]c	0/7 (0.0)[E]d
B	仅 R 菌株	7/7 (2.2)a	7/7 (1.6)ab	7/7 (1.7)abc
C	10^1 CCU/mL 滴眼剂 K6067+ R 菌株	7/7 (2.1)a	7/7 (1.8)a	7/7 (1.8)bcd
D	10^2 CCU/mL 滴眼剂 K6067 + R 菌株	7/7 (2.2)a	7/7 (1.8)ab	7/7 (1.9)abc
E	10^3 CCU/mL 滴眼剂 K6067 + R 菌株	7/7 (2.0)a	7/7 (1.8)a	7/7 (2.3)abc
F	10^4 CCU/mL 滴眼剂 K6067 + R 菌株	7/7 (1.7)a	7/7 (1.9)a	7/7 (2.7)ab
G	10^5 CCU/mL 滴眼剂 K6067 + R 菌株	7/7 (1.8)a	7/7 (1.5)ab	7/7 (2.8)a
H	10^3 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	7/7 (2.0)a	7/7 (1.5)ab	6/7 (1.4)abcd
I	10^4 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	7/7 (1.5)a	7/7 (1.6)ab	7/7 (1.3)abcd
J	10^5 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	4/7 (1.2)a	5/7 (1.2)b	4/7 (0.8)cd
K	10^6 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	7/7 (2.2)a	7/7 (1.6)ab	7/7 (1.2)bcd
L	10^7 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	7/7 (2.0)a	7/7 (1.9)a	7/7 (1.3)abcd

[0280] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0281] [B]阳性样品数/测试样品数(SPA:≥1,HI:≥20,ELISA:≥0.5,气囊评分≥1)

[0282] [C]平均凝集等级(从0到4)。

[0283] [D]平均滴度log10

[0284] [E]平均样品/阳性比率

[0285] 表26.试验4(剂量应答1)。接种K6067后6周和用R菌株攻击后2周的病变评分和MG分离结果(尸检)。[A]

[0286]

组	接种	气囊病变评分	气管粘膜厚度	MG 分离	
				鼻孔后裂口	气囊
A	无	0/7[B] (0.0[C])d	92.4 ± 18.5[D]bc	0/7[E]c	0/7c
B	仅 R 菌株	7/7 (1.9)abd	236.5 ± 101.2abc	7/7a	7/7a
C	10^1 CCU/mL 滴眼剂	7/7 (2.1)ab	296.1 ± 152.1ab	7/7a	7/7a

[0287]

	K6067+ R 菌株				
D	10^2 CCU/mL 滴眼剂 K6067 + R 菌株	3/7 (0.7)abcd	219.9 ± 200.8abc	7/7a	7/7a
E	10^3 CCU/mL 滴眼剂 K6067 + R 菌株	2/7 (0.3)bcd	75.0 ± 18.3bc	7/7a	3/7b
F	10^4 CCU/mL 滴眼剂 K6067 + R 菌株	2/7 (0.3)bcd	66.7 ± 14.6c	7/7a	5/7ab
G	10^5 CCU/mL 滴眼剂 K6067 + R 菌株	1/7 (0.1)cd	80.0 ± 20.2bc	7/7a	7/7a
H	10^3 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	6/7 (2.4)a	248.7 ± 137.5abc	7/7a	7/7a
I	10^4 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	7/7 (1.5)a	257.0 ± 151.6abc	7/7a	7/7a
J	10^5 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	7/7 (2.0)abc	180.2 ± 150.6abc	5/7b	7/7a
K	10^6 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	4/7 (1.0)abcd	195.9 ± 144.6abc	7/7a	7/7a
L	10^7 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	6/7 (2.0)abc	405.5 ± 163.5a	7/7a	7/7a

[0288] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0289] [B]阳性样品数/测试样品数(气囊评分≥1)

[0290] [C]平均评分(宏观评分从0到4)

[0291] [D]各组平均厚度±SD(μm)

[0292] [E]阳性样品数/检测样品数(培养)

[0293] 表27.试验4(剂量应答1)。接种K6067后6周和用R菌株攻击后2周的病变评分和MG分离结果(尸检)。[A]

[0294]

组	接种	气囊病变评分	气管粘膜厚度	MG 分离	
				鼻孔后裂口	气囊
A	无	0/7[B] (0.0[C])d	92.4 ± 18.5[D]bc	0/7[E]c	0/7c
B	仅 R 菌株	7/7 (1.9)abd	236.5 ± 101.2abc	7/7a	7/7a
C	10^1 CCU/mL 滴眼剂 K6067+ R 菌株	7/7 (2.1)ab	296.1 ± 152.1ab	7/7a	7/7a
D	10^2 CCU/mL 滴眼剂 K6067 + R 菌株	3/7 (0.7)abcd	219.9 ± 200.8abc	7/7a	7/7a
E	10^3 CCU/mL 滴眼剂 K6067 + R 菌株	2/7 (0.3)bcd	75.0 ± 18.3bc	7/7a	3/7b
F	10^4 CCU/mL 滴眼剂 K6067 + R 菌株	2/7 (0.3)bcd	66.7 ± 14.6c	7/7a	5/7ab
G	10^5 CCU/mL 滴眼剂 K6067 + R 菌株	1/7 (0.1)cd	80.0 ± 20.2bc	7/7a	7/7a
H	10^3 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	6/7 (2.4)a	248.7 ± 137.5abc	7/7a	7/7a
I	10^4 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	7/7 (1.5)a	257.0 ± 151.6abc	7/7a	7/7a
J	10^5 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	7/7 (2.0)abc	180.2 ± 150.6abc	5/7b	7/7a
K	10^6 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	4/7 (1.0)abcd	195.9 ± 144.6abc	7/7a	7/7a
L	10^7 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	6/7 (2.0)abc	405.5 ± 163.5a	7/7a	7/7a

[0295] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0296] [B]阳性样品数/测试样品数(气囊评分≥1)

[0297] [C]平均评分(宏观评分从0到4)

[0298] [D]各组平均厚度±SD(μm)

[0299] [E]阳性样品数/检测样品数(培养)

[0300] 表28.试验4(剂量应答1)。接种疫苗候选物后6周和用R菌株攻击后2周的MG、R-菌株特异性和K6067特异性基因组拷贝数(尸检)。[A]

[0301]

组	接种	qPCR - MG	qPCR – R 菌株	qPCR – K6067
A	无	0.0[B]f	0.0c	0.0a
B	仅 R 菌株	3.09 ± 0.45ab	3.56 ± 0.47a	0.0a
C	10^1 CCU/mL 滴眼剂 K6067+ R 菌株	3.15 ± 0.62ab	3.41 ± 0.73ab	0.0a
D	10^2 CCU/mL 滴眼剂 K6067 + R 菌株	2.59 ± 1.33abcd	2.62 ± 1.34ab	0.40 ± 1.06a
E	10^3 CCU/mL 滴眼剂 K6067 + R 菌株	0.66 ± 0.65ef	0.06 ± 0.16c	0.19 ± 0.46a
F	10^4 CCU/mL 滴眼剂 K6067 + R 菌株	1.26 ± 0.86def	0.39 ± 0.80c	0.79 ± 0.96a
G	10^5 CCU/mL 滴眼剂 K6067 + R 菌株	1.53 ± 0.75cde	0.43 ± 0.68c	0.85 ± 0.87a
H	10^3 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	3.12 ± 0.44ab	3.42 ± 0.46ab	0.0a
I	10^4 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	3.31 ± 0.92ab	3.44 ± 0.68ab	0.0a
J	10^5 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	1.95 ± 1.25bcde	2.11 ± 1.54b	0.0a
K	10^6 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	2.73 ± 0.66abc	3.06 ± 0.81ab	0.24 ± 0.63a
L	10^7 CCU/mL 气雾剂 K6067 + R 菌株	3.48 ± 0.33a	3.90 ± 0.24a	0.20 ± 0.53a

[0302] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0303] [B]平均(基因组)拷贝数log10±SD

[0304] 表29.试验4(剂量应答1)。基于第1次和第2次采样的qPCR和支原体培养结果，K6067的50％最低感染剂量(MID50)。

[0305]

	参数	定时	MID50	描述
1	C 组至 G 组的 qPCR 结果 [A]	第 1 次采样 [B]	N/A	没有一个组的感染率达到 50%或更高
2	H 组至 L 组的 qPCR 结果 [C]	第 1 次采样	N/A	没有一个组的感染率达到 50%或更高
3	C 组至 G 组的*支原体*培养结果	第 1 次采样	$10^{3.8}$ CCU/mL	E 组和 F 组感染率分别为 38%和 53%
4	H 组至 L 组的*支原体*培养结果	第 1 次采样	N/A	没有一个组的感染率达到 50%或更高
5	C 组至 G 组的 qPCR 结果	第 2 次采样 [D]	N/A	没有一个组的感染率达到 50%或更高
6	H 组至 L 组的 qPCR 结果	第 2 次采样	N/A	没有一个组的感染率达到 50%或更高
7	C 组至 G 组的*支原体*培养结果	第 2 次采样	$10^{3.53}$ CCU/mL	E 组和 F 组感染率分别为 42%和 57%
8	H 组至 L 组的*支原体*培养结果	第 2 次采样	N/A	没有一个组的感染率达到 50%或更高

[0306] [A]滴眼剂接种组

[0307] [B]接种后1周,在4WOA时进行第1次采样。

[0308] [C]气雾剂接种组

[0309] [D]接种后3周,在6WOA时进行第2次采样。

[0310] 表30.试验4(剂量应答1)。根据尸检时气囊病变评分和气管厚度测量值,K6067的50%最小保护剂量(MPD50)。

[0311]

编号	参数	MPD50	描述
1	C 组至 G 组的气囊评分 [A]	10^4	F 组累计受到 50%的保护。
2	H 组至 L 组的气囊评分 [B]	N/A	没有一个组的感染率达到 50%或更高
3	C 组至 G 组的气管厚度测量值 C[C]	$10^{3.3}$ CCU/mL	E 组和 F 组分别受到 47%和 60%的保护
4	H 组至 L 组的气管厚度测量值	N/A	没有一个组的感染率达到 50%或更高

[0312] [A] 滴眼剂接种组

[0313] [B] 气雾剂接种组

[0314] [C]为了比较气管厚度测量值并考虑受影响和未受影响的测量值,将A组(阴性对照)中的最高测量值(118.2μm)视为阈值。

[0315] 表31.试验5(剂量应答2)。接种K4110A后7天,鸡的MG分离和qPCR(第1次采样)。[A]

[0316]

组	接种	MG 分离（鼻孔后裂口）	qPCR – MG（气管）
A	无	0/7[B]c	0.0[C]c
B	无	0/7c	0.0c
C	10^3 CCU/mL 滴眼剂 K4110A	10/13b	0.18 ± 0.65c
D	10^4 CCU/mL 滴眼剂 K4110A	13/13a	0.98 ± 1.42bc
E	10^5 CCU/mL 滴眼剂 K4110A	13/13a	1.23 ± 0.93abc
F	10^6 CCU/mL 滴眼剂 K4110A	13/13a	1.72 ± 1.14ab
G	10^7 CCU/mL 滴眼剂 K4110A	13/13a	2.22 ± 1.01a

[0317] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0318] [B]阳性样品数/测试样品数(由于支原体生长而发生颜色变化)

[0319] [C]平均(基因组)拷贝数log10±SD

[0320] 表32.试验5(剂量应答2)。接种K4110A后21天,鸡的MG血清学应答(第2次采样)。[A]

[0321]

组	接种	SPA	HI	ELISA
A	无	0/7 [B] (0.0)[C]b	0/7 (0.0)[D]b	0/7 (0.0)[E]ab
B	无	0/7 (0.0)b	0/7 (0.0)b	0/7 (0.0)ab
C	10^3 CCU/mL 滴眼剂 K4110A	4/13 (0.3)b	0/13 (0.0)b	0/13 (0.0)b
D	10^4 CCU/mL 滴眼剂 K4110A	13/13 (1.3)a	4/13 (0.4)ab	0/13 (0.0)b
E	10^5 CCU/mL 滴眼剂 K4110A	12/13 (1.7)a	4/13 (0.4)ab	2/13 (0.1)ab
F	10^6 CCU/mL 滴眼剂 K4110A	13/13 (1.4)a	2/13 (0.2)b	0/13 (0.0)ab
G	10^7 CCU/mL 滴眼剂 K4110A	13/13 (1.5)a	10/13 (1.1)a	2/13 (0.2)a

[0322] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0323] [B]阳性样品数/测试样品数(SPA:≥1,HI:≥20,ELISA:≥0.5,气囊评分≥1)

[0324] [C]平均凝集等级(从0到4)。

[0325] [D]平均滴度log10

[0326] [E]平均样品/阳性比率

[0327] 表33.试验5(剂量应答2)。接种K4110A后21天,鸡的MG分离和qPCR(第2次采样)。[A]

[0328]

组	接种	MG 分离（鼻孔后裂口）	qPCR – MG（气管）
A	无	0/7[B]b	0.0[C]c
B	无	0/7b	0.0c
C	10^3 CCU/mL 滴眼剂 K4110A	11/13a	0.53 ± 0.92bc
D	10^4 CCU/mL 滴眼剂 K4110A	13/13a	0.77 ± 1.31bc
E	10^5 CCU/mL 滴眼剂 K4110A	13/13a	1.62 ± 1.18ab
F	10^6 CCU/mL 滴眼剂 K4110A	13/13a	1.33 ± 1.00abc
G	10^7 CCU/mL 滴眼剂 K4110A	13/13a	2.13 ± 0.81a

[0329] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0330] [B]阳性样品数/测试样品数(由于支原体生长而发生颜色变化)

[0331] [C]平均(基因组)拷贝数log10±SD

[0332] 表34.试验5(剂量应答2)。接种K4110A后6周和用R菌株攻击后2周,鸡的MG血清学应答(尸检)。[A]

[0333]

组	接种	SPA	HI	ELISA
A	无	0/7 [B] (0.0)[C]c	0/7 (0.0)[D]c	0/7 (0.0)[E]c
B	仅 R 菌株	7/7 (2.4)a	6/7 (1.3)b	6/7 (0.8)bc
C	10^3 CCU/mL 滴眼剂 K4110A+ R 菌株	12/12 (1.7)ab	12/12 (1.8)a	12/12 (1.7)a
D	10^4 CCU/mL 滴眼剂 K4110A + R 菌株	13/13 (1.5)b	13/13 (1.9)a	13/13 (1.4)ab
E	10^5 CCU/mL 滴眼剂 K4110A + R 菌株	13/13 (1.6)ab	13/13 (1.9)a	13/13 (1.5)ab
F	10^6 CCU/mL 滴眼剂 K4110A + R 菌株	13/13 (1.7)ab	13/13 (1.9)a	13/13 (1.2)ab
G	10^7 CCU/mL 滴眼剂 K4110A + R 菌株	13/13 (1.8)ab	13/13 (2.0)a	13/13 (1.7)a

[0334] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0335] [B]阳性样品数/测试样品数(SPA:≥1,HI:≥20,ELISA:≥0.5,气囊评分≥1)

[0336] [C]平均凝集等级(从0到4)。

[0337] [D]平均滴度log10

[0338] [E]平均样品/阳性比率

[0339] 表35.试验5(剂量应答2)。接种K4110A后6周和用R菌株攻击后2周的病变评分、MG分离和qPCR结果(尸检)。[A]

[0340]

组	接种	气囊病变评分	气管粘膜厚度	MG 分离	
				鼻孔后裂口	气囊
A	无	0/7[B] (0.0[C])c	71.1 ± 11.2[D]b	0/7[E]a	0/7[E]a
B	仅 R 菌株	6/7 (2.0)a	224.1 ± 196.7a	7/7b	7/7b
C	10^3 CCU/mL 滴眼剂 K4110A+ R 菌株	8/12 (0.8)b	76.4 ± 17.9b	12/12b	12/12b
D	10^4 CCU/mL 滴眼剂	3/13 (0.2)bc	73.9 ± 10.5b	13/13b	11/13b

[0341]

E	K4110A + R 菌株 10^5 CCU/mL 滴眼剂 K4110A + R 菌株	4/13 (0.3)bc	66.8 ± 15.7b	13/13b	13/13b
F	10^6 CCU/mL 滴眼剂 K4110A + R 菌株	0/13 (0.0)c	68.9 ± 19.8b	13/13b	12/13b
G	10^7 CCU/mL 滴眼剂 K4110A + R 菌株	3/13 (0.2)bc	68.0 ± 16.1b	13/13b	13/13b

[0342] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0343] [B]阳性样品数/测试样品数(气囊评分≥1)

[0344] [C]平均评分(宏观评分从0到4)

[0345] [D]各组平均厚度±SD(μm)

[0346] [E]阳性样品数/检测样品数(培养)

[0347] 表36.试验5(剂量应答2)。接种K4110A后6周和用R菌株攻击后2周,气管冲洗液和气囊培养物的MG、R-菌株特异性和K4110A特异性qPCR结果(尸检)。[A]

[0348]

		气管冲洗液			气囊培养物	
组	接种	qPCR – MG	qPCR-R 菌株	qPCR-K4110A	qPCR- R 菌株	qPCR-K4110A
A	无	0.0[B]b	0.0c	0.0c	0.0b	0.0a
B	仅 R 菌株	2.69 ± 1.13a	2.56 ± 1.01a	0.0c	1.16 ± 1.98b	0.0a
C	10^3 CCU/mL 滴眼剂 K4110A+ R 菌株	2.27 ± 0.86a	1.31 ± 1.22b	0.89 ± 0.88bc	3.98 ± 0.59a	0.0a
D	10^4 CCU/mL 滴眼剂 K4110A + R 菌株	2.31 ± 0.63a	0.57 ± 0.69bc	1.55 ± 0.71ab	4.62 ± 0.82a	0.0a
E	10^5 CCU/mL 滴眼剂 K4110A + R 菌株	1.83 ± 0.70a	0.53 ± 0.44bc	1.30 ± 0.88ab	4.26 ± 0.52a	0.0a

[0349]

F	10^6 CCU/mL 滴眼剂 K4110A + R 菌株	2.1 ± 1.4a	0.41 ± 0.55c	1.43 ± 0.74ab	4.63 ± 0.74a	0.0a
G	10^7 CCU/mL 滴眼剂 K4110A + R 菌株	2.07 ± 0.57a	0.51 ± 0.43bc	1.76 ± 0.59a	4.32 ± 0.63a	0.06 ± 0.22a

[0350] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0351] [B]平均(基因组)拷贝数log10±SD

[0352] 表37.试验5(剂量应答2)。基于第1次和第2次采样的qPCR和支原体培养结果，K4110A的50%最低感染剂量(MID50)。

[0353]

编号	参数	定时	MID50	描述
1	C 组至 G 组的 qPCR 结果 [A]	第 1 次采样 [B]	$10^{5.3}$ CCU/mL	E 组和 F 组感染率分别为 48%和 55%
2	C 组至 G 组的*支原体*培养结果	第 1 次采样	N/A	没有一个组的感染率低于 50%
3	C 组至 G 组的 qPCR 结果	第 2 次采样 [C]	$10^{5.2}$ CCU/mL	E 组和 F 组感染率分别为 48%和 57%
4	C 组至 G 组的*支原体*培养结果	第 2 次采样	N/A	没有一个组的感染率低于 50%

[0354] [A]滴眼剂接种组

[0355] [B]接种后1周,在4WOA时进行第1次采样。

[0356] [C]接种后3周,在6WOA时进行第2次采样。

[0357] 表38.试验5(剂量应答2)。根据尸检时气囊评分和气管厚度测量值,K4110A的50%最小保护剂量(MPD50)。

[0358]

编号	参数	MPD50	描述
1	C 组至 G 组的气囊评分 [A]	$10^{3.7}$	C 组和 D 组未受影响的气囊率分别为 33%和 56%。
2	C 组至 G 组的气管厚度测量值	N/A	没有一个组的阳性率 [B] 为 50%或更低

[0359] [A]滴眼剂接种组

[0360] [B]为了比较气管厚度测量值并考虑受影响和未受影响的测量值,将A组(阴性对照)中的最高测量值(91.3μm)视为阈值。

[0361] 表39.试验6(垂直传输)。在31WOA时产下的最后一组蛋的MG卵黄抗体;接种疫苗候选物、F-菌株或R-菌株后6周。[A]

[0362]

组	疫苗/攻击	HI	ELISA
A	无	0/7[B] (0.0)[C]b	0/7[B] (0.0)[D]c
B	K6067	0/14 (0.0)b	0/14 (0.3)bc
C	K4110A	6/12 (0.7)a	6/12 (0.7)ab
D	F 菌株	0/12 (0.0)b	4/12 (0.5)abc
E	R 菌株	3/12 (0.3)ab	9/12 (0.9)a

[0363] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0364] [B]阳性样品数/测试样品数(HI:≥20,ELISA:≥0.5)

[0365] [C]平均滴度log10

[0366] [D]平均样品/阳性比率

[0367] 表40.试验6(垂直传输)。受精率和母鸡周产蛋量平均值分别为24-31WOA和21-31WOA [A]。

[0368]

组	接种	受精率 [B]	母鸡周产蛋量平均值 [C]
A	阴性对照	83.7±9[D]ab	89.4±9.1a
B	K6067	77.9±5.7b	88.2±9a
C	K4110A	84.0±4.2ab	84.5±4.8a
D	F 菌株	85.3±5.1a	85.5±3.4a
E	R 菌株	83.5±7.6ab	83.9±6.1a

[0369]

[0370] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0371] [B] 7DOE后的受精蛋数量除以孵化蛋的总数乘以100

[0372] [C]本周产蛋总数除以母鸡总数乘以100

[0373] [D]百分比±SD

[0374] 表41.试验6(垂直传输)。接种后6周时,31WOA鸡的MG血清学应答(尸检)。[A]

[0375]

组	接种	SPA	HI	ELISA
A	阴性对照	0/16[B](0[C])a	0/16(0[D])c	0/16(0[E])c
B	K6067	31/31(3)b	26/31 (1.19)b	27/31 (1.08)b
C	K4110A	32/32 (3.1)b	31/32 (1.73)a	31/32 (2.02)a
D	F 菌株	31/31 (2.8)b	31/31 (1.64)a	31/31 (1.89)a
E	R 菌株	31/31 (3.3)b	31/31 (1.87)a	31/31 (2.27)a

[0376] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0377] [B]阳性样品数/测试样品数(SPA:≥1,HI:≥20,ELISA:≥0.5,气囊评分≥1)

[0378] [C]平均凝集等级(从0到4)。

[0379] [D]平均滴度log10

[0380] [E]平均样品/阳性比率

[0381] 表42.试验6(垂直传输)。接种K6067、K4110A、F-菌株或R-菌株后6周,鸡的病变评分、MG分离和qPCR(尸检)。[A]

[0382]

组	疫苗/攻击	气囊病变评分	气管粘膜厚度	MG 分离		qPCR – MG 气管	qPCR – MG 输卵管
				鼻孔后裂口	气囊		
A	无	2/16[B] (0.1)[C]	61.83 ± 17.03[D]ab	0/16a	0/16b	0.0[E]b	0.0[E]a
B	K6067	2/31 (0.1)	75.40 ± 21.37b	31/31b	4/31b	2.54 ± 1.02b	0.0a
C	K4110A	2/32 (0.1)	107.9 ± 90.94b	31/32b	8/32b	2.57 ± 0.96ab	0.0a
D	F 菌株	4/31 (0.1)	73.63 ± 20.9b	30/31b	6/31b	1.89 ± 1.02b	0.0a
E	R 菌株	10/31 (0.6)	123.96 ± 100.7a	31/31b	19/31a	2.2 ± 1.3a	0.0a

[0383]

[0384] [A]特定时间点不同小写字母的列内数值差异显著(P≤0.05)

[0385] [B]阳性样品数/测试样品数(气囊评分≥1)

[0386] [C]平均评分(宏观评分从0到4)

[0387] [D]各组平均厚度±SD(μm)

[0388] [E]平均(基因组)拷贝数log10±