

CpG ODN 对鸡新城疫 LaSota 活疫苗的免疫增强效应

李 杰, 杨汉春*, 郭 鑫, 陈艳红, 查振林

(中国农业大学农业部预防兽医学重点开放实验室, 北京 100094)

摘 要: 将 3 种不同的未甲基化 CpG ODN 分别与新城疫 LaSota 活疫苗混合后, 经滴鼻和点眼免疫鸡, 通过检测鸡血清中 HI 抗体、外周血 T 淋巴细胞增殖活性、诱导巨噬细胞分泌 NO 含量, 以及刺激外周血淋巴细胞表达 IFN- γ 、IL-6 与 IL-1 β mRNA 量, 分析各 CpG ODN 对新城疫 LaSota 活疫苗免疫效果的影响。结果表明, 经 2 次免疫后, 含 GTCGTT 核心基序的 CpG ODN1 组, 鸡血清平均 HI 抗体效价最高达 8.2log₂、淋巴细胞刺激指数达 9.836、NO 分泌量达 35.833 μ mol/L, 分别比疫苗单独免疫组高出 2 个滴度 ($P < 0.05$)、4.4 ($P < 0.01$)、27.6 μ mol/L ($P < 0.01$); 含 GACGTT 核心基序的 CpG ODN2 组增强作用不明显, 与疫苗单独免疫组无差异; 而 CpG ODN3 的免疫刺激活性由于受其侧翼序列的影响, 作用明显减弱甚至丧失。对细胞因子的影响, CpG ODN3 组 IFN- γ mRNA 表达量稍高于 CpG ODN1 组, 而其余细胞因子均以 CpG ODN1 组表达水平最高 ($P < 0.05$)。由此证明 CpG ODN1 能显著增强鸡对新城疫 LaSota 活疫苗的体液和细胞免疫反应, 可以作为高效的免疫增强剂。

关键词: CpG ODN; 新城疫 LaSota 活疫苗; 免疫刺激活性; 鸡

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)01-0044-06

Immune Enhancement of CpG ODN on LaSota Lived Vaccine against Newcastle Disease in Chickens

LI Jie, YANG Han-chun*, GUO Xin, CHEN Yan-hong, ZHA Zhen-lin

(Key Laboratory of Preventive Veterinary Medicine, Ministry of Agriculture / China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The immune effects of three different unmethylated CpG oligodeoxynucleotides (CpG ODN) on LaSota lived vaccine against Newcastle disease in chickens inoculated by intranasal and eye-drop route were investigated and the CpG ODNs were evaluated for their ability to activate B lymphocytes to induce HI antibody, promote T lymphocytes proliferation, induce macrophage nitric oxide (NO) production, and stimulate mRNA expression of IFN- γ , IL-6 and IL-1 β in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in this study. After two successive immunizations, our results demonstrated that the birds in CpG ODN1- group produced a mean serum HI antibody titer of 8.2log₂, a lymphoproliferative stimulation index (SI) of 9.836 and a NO production of 35.833 μ mol/L. There existed an increment by 2log₂ ($P < 0.05$), 4.4 ($P < 0.01$), 27.6 μ mol/L ($P < 0.01$), respectively, compared with control group (inoculated with LaSota lived vaccine only). CpG ODN2 containing the GACGTT motif in group 2 showed a faint efficacy and there was no difference between this group and control group. However, deviation of flanking bases of CpG ODN3 in group 3 significantly reduced or diminished its stimulatory activity. Meanwhile, it was found that there were remarkable mRNA expression of IFN- γ , IL-6 and IL-1 β in peripheral blood mononuclear cells of CpG ODN1-treated birds ($P < 0.05$), in despite of CpG ODN3 induced a lit-

收稿日期: 2005-02-17

基金项目: 大北农集团科研项目

作者简介: 李 杰 (1972-), 男, 湖南人, 硕士生, 中级兽医师, 主要从事动物微生物学与免疫学研究

* 通讯作者: 杨汉春, 男, 教授, 博士生导师, 主要从事动物分子病毒学与免疫学研究。E-mail: yanghanchun1@cau.edu.cn

the higher level of mRNA expression of IFN- γ than that of CpG ODN1-group. These results indicate that CpG ODN1 is a potent LaSota lived vaccine adjuvant for stimulating both antibody and cell mediated immune responses in chickens.

Key words: CpG ODN; LaSota lived vaccine against Newcastle disease; immunostimulatory activity; chicken

近年来,大量研究显示细菌 DNA 中存在结构特征为 5'-嘌呤-嘌呤-CG-嘧啶-嘧啶-3'的非甲基化 CpG 二核苷酸序列(即 CpG 基序)能激活高等动物的免疫系统,活化 B 淋巴细胞、巨噬细胞(M Φ)、树突状细胞(DC)、自然杀伤细胞(NK)等免疫细胞,诱导天然免疫应答分泌 Ig 和 IL-1 β 、IL-6、IL-12、IL-18、TNF- α 、IFN- α 和 IFN- γ 等多种 Th1 型为主的细胞因子^[1]。体内、体外试验证明人工合成的含 CpG 基序的脱氧寡核苷酸(CpG oligodeoxynucleotide, CpG ODN)与细菌 DNA 中非甲基化的 CpG 一样具有强烈的免疫刺激活性,也能刺激活化多种畜禽的免疫系统^[2]。但 CpG ODN 的免疫刺激作用具有种属特异性,对小鼠免疫细胞有最佳刺激效应的 CpG 基序 GACGTT,对人的白细胞作用很弱,而对人免疫细胞有最佳刺激效应的 CpG 基序是 GTCGTT^[1]。

体外试验已经发现对鸡有最佳刺激效应的 CpG 基序也是 GTCGTT^[1,3],体内试验也证明用大肠杆菌 CpG DNA^[4,5] 与鸡新城疫灭活疫苗同时接种鸡,能提高抗原特异性免疫应答,诱导高水平保护性抗体。然而,CpG ODN 对鸡新城疫活疫苗免疫效果是否具有增强作用,至今未见报道。本研究应用多种 CpG ODN 与 LaSota 活疫苗共同免疫雏鸡,观察其免疫效应,旨在分析 CpG ODN 对新城疫疫苗的免疫增强效应,为 CpG ODN 作为疫苗免疫佐剂提供有价值的理论依据。

1 材料与方法

1.1 CpG 序列(下划线即为 CpG 基序)

CpG-ODN1: 5'-TCGTCGTTTTTGTCGTTTTT = GTCGTT-3',含 3 个 GTCGTT 基序,基序间以 TT 相连,据报道对人和多种哺乳动物有最佳刺激效应; CpG-ODN2: 5'-TCCATGACGTTCCTGACGTT-3',含 2 个 GACGTT 基序,已报道对鼠有最佳刺激效应; CpG-ODN3: 5'-GTCGTTGTCGTTGTCGTTGAGGGGGG-3',含 3 个连续的 GTCGTT 基序,并在 3'端加一 poly (G),自行设计的 CpG ODN;以上序列全链硫代修饰, PAGE 纯化,由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2 主要试剂

RMPI1640 细胞培养液(Hyclone 产品)、Hank's 液、淋巴细胞分离液、MTT(Sigma 产品)、Greiss 试剂(内含 0.5%对氨基苯磺酸,0.05%萘乙二胺,2.5%磷酸)。

1.3 疫苗和毒株

新城疫 LaSota 活疫苗(批号:20030632,500 羽/瓶,购于北京中海动物保健科技公司),新城疫病毒强毒株 F₄₈E₉ 和新城疫 HA 抗原(均购于中国兽医药品监察所)。

1.4 新城疫病毒抗原的制备

将新城疫病毒 F₄₈E₉ 按常规方法进行病毒增殖,即接种 9~10 日龄 SPF 鸡胚,收集 24~48 h 内死亡鸡胚的尿囊液,经蔗糖密度梯度超速离心纯化后再超声裂解,并将裂解产物过滤除菌,小量分装后置 -20 °C 保存备用。细胞培养时以 20 μ g/mL 量添加。

1.5 试验鸡及分组

1 日龄农大褐蛋鸡 150 只(购于中国农业大学昌平实验站种鸡场),未进行任何疫苗免疫。将 1 日龄蛋雏鸡饲养至 21 日龄后检测 HI 抗体效价,然后将 150 只蛋鸡随机编号并分成 5 组进行滴鼻和点眼免疫 LaSota 疫苗:第 1~3 组分别为 CpG ODN1~3 (30 μ g/羽)+LaSota 疫苗(1 头份/羽,后同)联合免疫组,第 4 组为 LaSota 疫苗单独免疫组,第 5 组为空白对照组,每组 30 只。首免后 6 周进行 2 免,免疫方式及剂量均同首免。

1.6 HI 抗体检测

免疫后每周 1 次对全群鸡翅静脉穿刺采血,分离血清,然后参照文献^[6]介绍的 β -微量法检测 HI 抗体效价的动态变化。

1.7 淋巴细胞增殖试验

每次免疫后从第 1 周开始,每 2 周 1 次从各组随机挑选 5 只鸡,无菌心脏采血(EDTA 抗凝),用淋巴细胞分离液分离获得外周血淋巴细胞,然后将其重悬于 RMPI1640 完全培养液(内含 10%犊牛血清,1%谷氨酰胺,100 IU/mL 青霉素,100 μ g/L 链霉素及 5 mol/L 的 2-巯基乙醇),用台盼蓝染色计数

活细胞数(应在95%以上),并调整细胞浓度为 2×10^6 /mL获得外周血淋巴细胞悬液。

将细胞悬液加入96孔平底培养板中,每孔100 μ L,随后加入新城疫病毒抗原做特异性刺激并设培养液做对照,然后置5%CO₂、40℃培养48 h。培养结束前4 h,每孔加入MTT(终浓度5 mg/mL),继续培养4 h。培养结束后,每孔加入10% SDS-0.04 mol/L HCl 100 μ L,吹打混匀,继续置培养箱2 h,取出后置微量振荡器上室温振荡10 min,使紫色结晶完全溶解,用酶联免疫检测仪测定OD_{570 nm}值。第1~4组的刺激指数(Stimulation Index, SI)按如下公式进行计算:SI=(OD_{免疫组} - OD_{培养基对照})/(OD_{空白对照组} - OD_{培养基对照})

1.8 淋巴细胞分泌NO的测定

将1.7制备的细胞悬液加入96孔圆底培养板,每孔200 μ L,随后加入新城疫病毒抗原进行特异性刺激并设培养液做对照,然后置5%CO₂、40℃培养24 h。每孔小心吸取上清液100 μ L于96孔平底培养板并加入等体积的Greiss试剂,室温震荡反应10 min。在酶联免疫检测仪上测定550 nm光密度值,同时用NaNO₂建立标准曲线进行NO含量计算。

1.9 半定量RT-PCR法检测外周血淋巴细胞细胞因子mRNA的表达

将1.7制备的细胞悬液加入12孔培养板,每孔1 mL,同时加入新城疫病毒抗原进行特异性刺激并设培养液做对照,然后置5%CO₂、40℃培养6 h,收获细胞,用TRIzol一步法提取细胞总RNA,然后经RT-PCR扩增 β -actin和IFN- γ 、IL-6及IL-1 β 等细胞因子,所用引物如下:

β -actin:(做内参照)上游5' TGTCCCTGTATGCCTCTG3',下游5' ATCTCCTGCTCGAAATCC3'; IFN- γ :上游5' TGA CT TGCCAGACTTACA ACT-TGTT3',下游5' CATGATATCTTTCACCTTCT-TC ACG3';

IL-6:上游5' ACCATGCACCTCATCCTC3',下游5' GGCTGCTGGACATTTTCT3';

IL-1 β :上游5' ACCCGCTTCATCTTCTAC3',下游5' AATACCTCCACCCCGACA3'。为了满足半定量RT-PCR的分析条件, β -actin和IFN- γ 、IL-6及IL-1 β 均在相同PCR反应参数条件下进行扩增,所用的PCR条件为:94℃预变性4 min;94℃变性30 s,54℃退火30 s,72℃延伸45 s,共33个循环;最后72℃总延伸10 min。预期扩增片段长度分别为

262、353、397和411 bp。PCR产物用2%琼脂糖凝胶进行电泳,然后用AlphaImager™ 2200凝胶电泳成像仪及自带定量分析软件进行鉴定和分析。结果判断以同时扩增的内参照 β -actin的积分光密度值(integrated OD, IOD)为基准,各细胞因子的表达丰度即相对系数按下式计算:

表达丰度(相对系数)=细胞因子IOD值/ β -actin IOD值

1.10 数据处理

将所有数据用SPSS12.0的单因素方差分析并进行Student's *t* 检验。以 $P < 0.05$ 作为差异显著性评判标准。

2 结果

2.1 HI抗体的动态变化

试验鸡3周龄首免、9周龄二免,从首免当天免疫前开始,每周对全群鸡采血进行HI抗体监测,结果如图1。

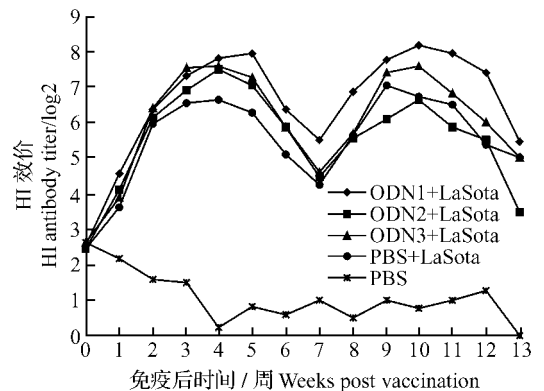


图1 不同CpG ODN对HI抗体滴度的影响

Fig. 1 Effects of different CpG ODN on HI antibody titers in serum

首免后,所有疫苗免疫组鸡特异性HI抗体水平均迅速上升,最终3个ODN免疫组抗体水平均高于疫苗单独免疫组、对照组($P < 0.05$)。而3个ODN免疫组之间,ODN1组HI抗体效价明显高于ODN2和ODN3组($P < 0.05$),但ODN2和ODN3组间差异不显著($P > 0.05$);二免后,所有疫苗免疫组抗体水平迅速回升并在二免后4周达高峰。但ODN1组上升最快,而且抗体高峰持续时间最长,抗体效价比ODN2组以及疫苗单独免疫组高2个滴度($P < 0.01$),比ODN3组也高1.4个滴度($P < 0.05$)。与疫苗单独免疫组相比,ODN2组抗体水平没有显著差异($P > 0.05$);ODN3组抗体水平

显著高于前 2 组($P<0.05$)。

2.2 淋巴细胞增殖反应检测

分别于首免和二免后第 1、3、5 周,用 MTT 比色法检测各组淋巴细胞的增殖活性。结果发现,直到首免后 3 周,各组淋巴细胞增殖应答才表现阳性($SI>2.0$)。虽然在所有试验组中,ODN1 组鸡淋巴细胞的增殖活性最高(如图 2),但是仅在首免后 5 周后,其刺激指数与 ODN2 组和疫苗单独免疫组比较差异显著($P<0.05$),而与 ODN3 组没有差异($P>0.05$);二免后,各组抗原特异性淋巴细胞增殖应答均迅速增强,尤其 ODN1 组在二免 3 周时达到 9.836,比其余各组分别高出 3.7~4.4($P<0.01$),其余各疫苗免疫组间的刺激指数没有差异($P>0.05$),二免后 5 周,各组处理差异与二免 3 周后相似,如图 2。

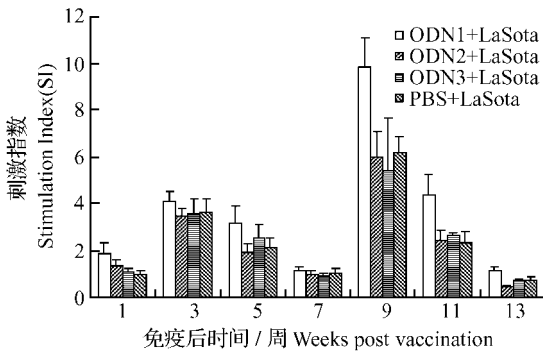


图 2 不同 CpG ODN 对淋巴细胞增殖反应的影响

Fig. 2 Effects of different CpG ODN on lymphocyte proliferation in PBMC

2.3 淋巴细胞分泌 NO 检测

首免后,淋巴细胞活化分泌 NO 能力逐渐增强。所有 ODN 联合免疫组均高于疫苗单独免疫组,

但经检验,只有第 3 周 ODN1 组与疫苗单独免疫组比较,差异显著($P<0.05$),其余各组间及各时段差异均不明显;二免后,尤其从二免第 1 周后,NO 分泌迅速增加,ODN1 组增加最明显($P<0.01$),NO 分泌量高达 35.833 $\mu\text{mol/L}$;疫苗单独免疫组只有 8.125 $\mu\text{mol/L}$;ODN3 组诱导能力很弱,第 5 周时甚至低于疫苗单独免疫组,如图 3。另外,从 2 次免疫后 NO 含量随时间的变化发现,所有 ODN 联合免疫组比疫苗单独免疫组上升快,下降也慢。

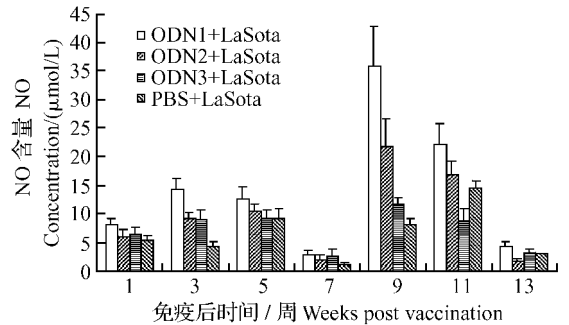


图 3 不同 CpG ODN 对淋巴细胞分泌 NO 的影响

Fig. 3 Effects of different CpG ODN on NO production in PBMC

2.4 半定量 RT-PCR 检测细胞因子 mRNA 的表达

将不同免疫时期收获的外周血淋巴细胞经半定量 RT-PCR 检测各细胞因子 mRNA 表达,结果如表 1。从表 1 可以看出,与 ODN2 组和疫苗单独免疫组比较,ODN1 组和 ODN3 组能显著增强 IFN- γ 和 IL-6 的 mRNA 表达($P<0.05$),同时 ODN1 组其 IL-6 mRNA 表达量高于 ODN3 组,而 ODN3 组其 IFN- γ mRNA 表达量比 ODN1 组稍高,但经检

表 1 不同 CpG ODN 对外周血淋巴细胞细胞因子 mRNA 表达的影响

Table 1 Effects of different CpG ODN on expression of mRNA of cytokines in PBMC

细胞因子	试验组别	第 1 周	第 3 周	第 5 周	第 7 周	第 9 周	第 11 周
Cytokine	Group	1 wpi	3wpi	5wpi	7wpi	9wpi	11wpi
IFN- γ	CpG ODN1+LaSota	0.232±0.053	0.319±0.076	0.062±0.041	0.026±0.016	0.404±0.057	0.304±0.036
	CpG ODN2+LaSota	0.095±0.044	0.173±0.178	0.045±0.041	0.006±0.004	0.208±0.020	0.298±0.019
	CpG ODN3+LaSota	0.253±0.047	0.467±0.139	0.064±0.054	0.034±0.008	0.518±0.013	0.463±0.081
	PBS+LaSota	0.199±0.023	0.233±0.146	0.041±0.028	0.017±0.010	0.287±0.007	0.247±0.110
IL-6	CpG ODN1+LaSota	1.810±0.625	0.635±0.255	0.684±0.235	0.043±0.026	2.020±0.175	1.236±0.160
	CpG ODN2+LaSota	0.681±0.428	0.413±0.352	0.698±0.211	0.029±0.024	1.033±0.338	0.694±0.006
	CpG ODN3+LaSota	1.719±0.793	0.510±0.417	0.538±0.342	0.020±0.007	1.781±0.155	0.843±0.208
	PBS+LaSota	1.073±0.173	0.500±0.297	0.230±0.174	0.023±0.001	1.057±0.178	0.824±0.103
IL-1 β	CpG ODN1+LaSota	2.550±0.199	1.297±0.099	0.696±0.289	1.249±0.577	1.482±0.069	1.228±0.140
	CpG ODN2+LaSota	1.883±0.782	1.078±0.094	0.570±0.019	0.773±0.187	1.104±0.076	1.020±0.002
	CpG ODN3+LaSota	2.044±0.343	1.129±0.083	0.477±0.147	1.170±0.108	1.179±0.514	1.127±0.256
	PBS+LaSota	1.960±0.559	1.081±0.107	0.219±0.162	0.504±0.176	0.879±0.148	1.260±0.107

wpi. Weeks post immunization

验均无差异。对于 IL-1 β , ODN1 组和 ODN3 组的表达量高于 ODN2 组和疫苗单独免疫组 ($P < 0.05$), 但 ODN1 组和 ODN3 组之间以及 ODN2 组与疫苗单独免疫组之间差异不显著。

3 讨论

CpG ODN 作为一种安全、经济、有效的新型疫苗佐剂, 具有其它佐剂无法比拟的优势。已有研究表明 CpG ODN 能诱导 Th1 型应答或调节免疫应答向 Th1 型转换^[7], CpG ODN 具有抗肿瘤和抗病毒的活性, 使之有可能用于感染性疾病和恶性肿瘤的治疗。另外, CpG ODN 还具有一个显著的特性, 就是可作为有效的黏膜免疫佐剂, 通过黏膜进入体内而增强黏膜免疫效应^[8]。本研究首次将人工合成的 3 种不同 CpG ODN 分别与鸡新城疫 LaSota 活疫苗混合后通过滴鼻、点眼方式免疫雏鸡, 观察了 CpG ODN 对活疫苗免疫效果的增强作用。

CpG ODN 能直接刺激 B 细胞, 减少 B 细胞凋亡, 还能使 B 细胞表面 MHC II 类抗原和共刺激因子 B7-1、B7-2 表达量增加, 这一激活过程是一个新的不依赖于 T 细胞途径; 将 CpG ODN 与蛋白抗原混合后, 即可刺激机体产生大量特异性抗体以及 IL-6、IL-10 等细胞因子^[9]。因此, 用 CpG ODN 与新城疫 LaSota 活疫苗联合免疫鸡后, ODN1 组能明显提高 HI 抗体水平; ODN2 组因为 CpG 基序的种属特异性, 对鸡 B 细胞作用很弱; 而对于 ODN3 组, 尽管 CpG 基序与 ODN1 组一样均是 GTCGTT, 但是其侧翼序列的不同减弱甚至丧失了其对 B 细胞的刺激作用。

Sparwasser 等^[10]证明 CpG ODN 可以直接激活单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞等多种抗原递呈细胞 (APC) 分泌多种细胞因子, 如 IL-12、IL-6、TNF- α 、IFN- α 等, 从而起专职 APC 的功能, 作用于 T 细胞受体, 激发 T 细胞增殖, 加强 CTL 反应; 同时激活 APC 分泌细胞因子作用于 NK 细胞, 从而间接活化 NK 细胞分泌 IFN- γ , 所以 ODN1 组诱导 IL-6 和 IFN- γ mRNA 表达水平显著高于 ODN2 组和疫苗单独免疫组。对于 ODN3 组, 由于其 ODN 后加了一个 poly(G), 该结构与细胞表面清道夫受体 (Scavenger receptor, SR) 结合形成四聚体, 使细胞对 CpG ODN 的结合与吞入过程变得更加容易, 从而诱导 NK 细胞等单核细胞系细胞分泌大量的 IFN- γ ^[11], 故该组 IFN- γ mRNA 表达量略高于

ODN1 组; 对于 IL-1 β , 含 GTCGTT 基序的 ODN1 组和 ODN3 组高于含 GACGTT 基序的 ODN2 组和疫苗单独免疫对照组, 但是 ODN1、ODN3 组间以及 ODN2 和疫苗单独免疫组间差异不显著, 由本试验可推测: 影响 IL-1 β mRNA 表达量的主要因素是 CpG 基序的种类而不是其数目。另外, CpG ODN 活化多种 APC 后, 进一步活化 T 细胞, 使得 ODN1 组淋巴细胞增殖指数明显高于其它各组, 尤其在二免后 3 周高达 9.836, 显著高于其它各组。

一氧化氮 (NO) 是新发现的具有广泛生物活性的信息分子, 在免疫调节中起重要作用, 表现在: ①巨噬细胞产生的 NO, 能杀灭微生物和肿瘤细胞, 增强机体非特异性免疫功能; ②NO 对 T 淋巴细胞和巨噬细胞的细胞因子分泌有调节作用; ③影响 T 淋巴细胞增殖^[12]。而 CpG ODN 能活化巨噬细胞分泌大量的 NO, 增强机体的非特异性免疫应答, 能使鸡抵抗致病性沙门氏菌感染^[1]。在本试验中, ODN1 组诱导鸡巨噬细胞分泌 NO 的浓度达 35.833 $\mu\text{mol/L}$, 显著高于其它各组。

本试验结果表明 CpG ODN1 能显著地刺激鸡的天然免疫系统, 活化多种免疫细胞, 不但增强鸡对 LaSota 活疫苗的 Th1/TH2 型特异性体液和细胞免疫应答, 而且还能增强鸡对炎症和肿瘤等的非特异性免疫应答。同时, CpG ODN 对记忆性淋巴细胞的免疫刺激作用远远强于首次刺激。所以 CpG ODN1 可作为鸡新城疫 LaSota 活疫苗的高效免疫增强剂。

参考文献:

- [1] He H, Crippen T L, Farnell M B, *et al.* Identification of CpG oligodeoxynucleotide motifs that stimulate nitric oxide and cytokine production in avian macrophage and peripheral blood mononuclear cells [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2003, 27(6): 621~627.
- [2] Mutwiri G, Pontarollo R, Babiuk S, *et al.* Biological activity of immunostimulatory CpG DNA motifs in domestic animals [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2003, 91(2): 89~103.
- [3] Xie H, Richard B R, Uma S B, *et al.* CpG-induced immunomodulation and intracellular bacterial killing in a chicken macrophage cell line [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2003, 27(6): 823~834.
- [4] 唐泰山, 郭爱珍, 陆承平. 大肠杆菌 DNA 作佐剂的鸡

- 新城疫灭活疫苗的免疫效果[J]. 南京农业大学学报, 2003, 26(2): 76~78.
- [5] 李爱芹, 庄文忠, 任红梅, 等. 大肠杆菌免疫刺激 DNA 的克隆及其对抗体产生的影响[J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24(3): 178~182.
- [6] 傅先强. 养禽场禽病检验手册[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1997. 97~102.
- [7] Kovarik J, Bozzotti P, Love-Homan L, *et al.* CpG oligodeoxynucleotides can circumvent the Th2 polarization of neonatal responses to vaccines but fail to fully redirect Th2 responses established by neonatal priming [J]. *J Immunol*, 1999, 162 (3): 1 611~1 617.
- [8] 孔庆波. CpG ODN——一类潜在的新型免疫佐剂[J]. 动物医学进展, 2002, 23(6): 33~35.
- [9] Yi A K, Peckham D W, Ashman R F, *et al.* CpG DNA rescues B cells from apoptosis by activating NF kappa B and preventing mitochondrial membrane potential disruption via a chloroquine sensitive pathway [J]. *Int Immunol*, 1999, 11(12): 2 015~2 024.
- [10] Sparwasser T, Koch E S, Vabulas R M, *et al.* Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells[J]. *Eur J Immunol*, 1998, 28(6): 2 045~2 054.
- [11] Verthelyi D, Ishii K J, Gursel M, *et al.* Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CpG motifs[J]. *Journal of Immunology*, 2001, 166(4): 2 372~2 377.
- [12] 陈洪亮, 嵇宝山, 李德法, 等. 黄芪多糖对肉鸡脾淋巴细胞转化及信息分子的影响[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(10): 11~13.

动物疫情速递

1. 日本发生新城疫

日本 2005 年 12 月 6 日向 OIE 报告了宫城县新城疫疫情。此次暴发始于 2005 年 11 月 24 日, 2005 年 12 月 1 日确诊。感染养殖场分布在宫城县 Yamamoto 镇和 Kakuda 市。感染动物为鸭, 经临床和实验室检查作出诊断。感染来源未知。日本采取的控制措施: 销毁感染养殖场的疑似鸭; 推荐宫城县所有禽类养殖场进行 ND 免疫; 禽场消毒。现已对感染养殖场 5 km 范围内的商品养殖场进行现场调查。日本上一次向 OIE 报告 ND 疫情是在 2005 年 4 月。

2. 乌克兰发生禽流感

乌克兰于 2005 年 12 月 5 日向 OIE 报告乌国内暴发禽流感。疫情发生于 Crimea 自治共和国的 5 个村庄, 分别是 Dzhankoyskiy 地区的 Pushkino 和 Zavet-Leninskoe、Nizhnegorskiy 地区的 Izobilnoe 和 Yemelyanovka、Sovetskiy 地区的 Nekrasovka。暴发始于 2005 年 11 月 25 日, 于 2005 年 12 月 2 日确认, 采取的诊断手段有临床诊断、剖检和实验室检验。病原为 H5 亚型禽流感病毒(神经氨酸酶类型尚需鉴定)。所用的诊断试验为 PCR 和 HI 试验。样品将送 OIE 高致病性禽流感参考实验室做进一步的确认。疫区疑似动物共计 19 898 只(鸡和鹅), 其中病/死禽 1 941 只, 销毁 2 644 只。感染来源是接触野鸟。采取的控制措施: 控制野生动物聚居地、扑杀、检疫、国内限制移动、筛选、区域化和消毒, 并禁止免疫。

3. 阿根廷发生 Q 热

阿根廷 2005 年 12 月 9 日向 OIE 报告了 Q 热疫情。疫区位于 Buenos Aires 省的 General Rodriguez, 此次疫情于 2005 年 11 月 10 日确认, 未发现临床病例。病例是在对公山羊传染病的一次监测中发现的。在疫情涉及的养殖场, 178 头被检动物中有 24 头呈血清学阳性, 但因未有流产病例而没有合适的样品供病原分离。感染的来源仍未知。已采取的控制措施为检疫和限制国内移动。即将采取的措施: ①近期将扑杀阳性动物并销毁尸体; ②扑杀时采取所有疑似动物的血清样品以便确定感染的流行程度; ③进行流行病学调查以追溯、检查接触动物并采样。对感染动物未予治疗。