

鸭瘟弱毒疫苗诱导 IgA、IgM 和 IgG 产生规律的研究

齐雪峰^{1,4}, 程安春^{1,2}, 汪铭书^{1,2}, 杨晓燕^{1,2,3}, 贾仁勇^{1,2}, 陈孝跃¹

(¹四川农业大学动物医学院禽病防治研究中心, 四川雅安 625014; ²动物疫病与人类健康四川省重点实验室, 四川雅安 625014;

³大理学院生命科学与化学学院, 云南大理 671000; ⁴西北农林科技大学动物医学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: 【目的】探讨鸭瘟弱毒疫苗诱导鸭局部黏膜和系统免疫中抗体发生的规律。【方法】将 DPV 弱毒苗 Cha 株经皮下、口服和滴鼻途径免疫 20 日龄樱桃谷鸭后 60 d 内定时随机剖杀 5 只鸭, 采集血清、气管和消化道(食道、十二指肠、空肠和直肠)分泌液, 应用间接 ELISA 检测抗 DPV 的 IgA、IgM 和 IgG 抗体滴度(以 lg 表示)。【结果】所有免疫鸭检测样品中均可检测到 DPV 特异性 IgG、IgM 和 IgA 抗体。血清中抗体滴度由高到低均为 IgG、IgM 和 IgA, 其中 IgM 检出时间最早, IgG 存留时间最长。皮下免疫 DPV 弱毒苗可更早诱导鸭血清中生成特异性 IgG, 且抗体滴度最高; 气管和消化道分泌液中抗体滴度由高到低均为 IgA、IgM 和 IgG, 其中 IgA 和 IgM 检出时间最早, IgA 存留时间最长。口服和滴鼻途径免疫鸭消化道和气管分泌液中 IgA 滴度较皮下免疫鸭高。【结论】不同途径免疫鸭瘟弱毒疫苗均可迅速诱导免疫鸭体液免疫介导的黏膜免疫和系统免疫。以 DPV 特异性 IgA 为主要抗体的黏膜免疫在预防 DPV 强毒早期对鸭消化道和呼吸道等局部黏膜的感染中具有十分重要的作用, 使 DPV 弱毒疫苗快速产生免疫保护的机制从黏膜免疫的角度得到一定程度解释。

关键词: DPV 弱毒苗; 免疫鸭; IgA; IgG; IgM

Induction of IgA, IgM and IgG Antibodies in Ducklings Immunized With Attenuated Duck Plague Virus Vaccine Strain

QI Xue-feng^{1,4}, CHENG An-chun^{1,2}, WANG Ming-shu^{1,2}, YANG Xiao-yan^{1,2,3}, JIA Ren-yong^{1,2}, CHEN Xiao-yue¹

(¹Avian Disease Research Center, College of Veterinary Medicine of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan;

²Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, Ya'an 625014, Sichuan; ³College of Life Science and

Chemistry of Dali University, Dali 671000, Yunnan; ⁴College of Veterinary Medicine of Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, Shaanxi)

Abstract: 【Objective】To study the induction of IgA, IgG and IgM antibodies in local mucosal and systemic immunity of immunized ducklings induced by attenuated duck plague virus (DPV) vaccine strain. 【Method】Twenty-day-old Cherry Valley duckling were vaccinated subcutaneously, orally and nasally with attenuated DPV Cha strain and five vaccinated ducklings were chosen for sampling at each of 10 sampling times between 1 and 60 days post immunization (PI), and DPV-specific antibodies were detected in serum and the secretion from trachea and enteron (oesophagus, duodenum, jejunum and rectum) by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (results were presents as the log₁₀ geometric mean antibody titer ± SD). 【Result】This study indicated that DPV specific IgA, IgG and IgM antibodies could be detected in all tested samples of immunized ducklings. The antibody titers in serum from higher to lower titers was IgG, IgM and IgA, and IgM was produced firstly, while high titers IgG was detected for long-term. The IgG antibody titers in subcutaneously immunized ducklings was higher and detected earlier than those by oral or nasal administration. The antibody titers in secretion from respiratory and digestive tract from higher to lower titers was IgA, IgM and IgG, and specific IgA and IgM were detected earlier than IgG. The IgA antibody titers in orally and nasally immunized

收稿日期: 2007-07-27; 接受日期: 2007-11-16

基金项目: 国家农业科技成果转化资金项目(2006GB2F000249); 国家“十一五”科技支撑计划(2007Z06-017); 教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目(NCET-06-0818); 高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目(706050); 四川省基础研究重大项目(05JY 029-109/05JY029-003/07JY029-016/07JY029-017); 四川省重点建设学科项目(SZD0418)

作者简介: 齐雪峰(1977-), 男, 蒙古族, 内蒙古赤峰人, 博士, 研究方向为家禽黏膜免疫。通讯作者程安春(1965-), 男, 布依族, 贵州长顺人, 教授, 博士, 研究方向为动物传染病学。E-mail: chenganchun@vip.163.com; 汪铭书(1964-), 女, 苗族, 贵州凯里人, 教授, 博士, 研究方向为动物病毒分子生物学。E-mail: mshwang@163.com

ducklings was higher than those by subcutaneous administration. 【Conclusion】 Data presented here indicated that the humoral immune responses of both systemic and mucosal immune system can be stimulated quickly with attenuated DPV vaccine strain by subcutaneous, oral or nasal administration. The DPV specific IgA antibody in respiratory and digestive tract fluids plays a predominant role in protection against virulent DPV infection in surface of local mucosa, which has explained the rapid induction of DPV specific immunity by live vaccine virus to some extent.

Key words: Attenuated duck plague virus strain; Immunized ducklings; IgA; IgG; IgM

0 引言

【研究意义】鸭瘟 (duck plague, DP) 是由疱疹病毒科中的鸭瘟病毒 (duck plague virus, DPV) 引起的常见于鸭、鹅、天鹅等水禽的一种高度致死性传染病。该病在世界各养鸭地区都有分布, 其预防和控制对于水禽养殖业的发展具有重要意义^[1]。自发现本病以来, 对鸭瘟弱毒疫苗的研究和应用做了大量的研究工作, 并且实践证明该疫苗是预防和控制鸭瘟的有效生物制剂。【前人研究进展】现有关于鸭瘟弱毒疫苗免疫发生机理的研究资料主要集中于检测血清中 IgG 含量与免疫保护力的关系, 忽略了特异性黏膜免疫及其它免疫球蛋白在抵抗 DPV 感染中的作用, 难以全面揭示鸭瘟弱毒疫苗免疫保护机理^[2,3]。通常 IgM 和 IgG 都是系统免疫中体液免疫的主要抗体, 其中 IgM 是抗病原微生物感染的先锋抗体, 在抗感染早期发挥着重要作用; IgG 在血液中含有量最高, 是抗感染的主要抗体; IgA 是机体黏膜免疫中体液免疫的主要抗体, 为黏膜抵抗病原微生物和有害物质提供了第一道防线。

【本研究切入点】动物疫病与人类健康四川省重点实验室在成功制备鸭 IgA、IgM 和 IgG 免疫球蛋白及其相应酶标记二抗的基础上, 建立了检测抗 DPV 特异性 IgA、IgM 和 IgG 的间接 ELISA 方法, 利用该法对鸭瘟弱毒疫苗经不同途径免疫鸭后不同时间血液、气管和消化道中抗 DPV 特异性 IgA、IgM 和 IgG 变化规律进行了监测。【拟解决的关键问题】研究鸭瘟弱毒疫苗诱导鸭抗体介导的黏膜免疫和系统免疫产生规律, 进一步为阐明鸭瘟弱毒疫苗免疫机理提供了重要的试验数据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 DPV 弱毒疫苗 DPV CHa 弱毒株, 动物疫病与人类健康四川省重点实验室保存。

1.1.2 试验动物 20 日龄临床健康樱桃谷鸭, 经 ELISA 检测 DPV 抗体为阴性, PCR 检测血液 DPV 阴性。

1.1.3 DPV 抗原 为 DPV 弱毒接种鸭胚成纤维细胞

收获的细胞毒, 经蔗糖密度梯度离心纯化。电镜下可见纯净、多量的完整病毒粒子。

1.1.4 相关免疫球蛋白 鸭 IgA (IgM、IgG)、兔抗鸭 IgA (IgM) 的 IgG, 均为 SDS-PAGE 电泳纯, 由动物疫病与人类健康四川省重点实验室制备。

1.1.5 酶标二抗 HRP 标记兔抗鸭 IgA 的 IgG 型结合物 [摩尔比值 (E/P) 为 1.5, 标记率为 0.68], HRP 标记兔抗鸭 IgM 的 IgG 型结合物 [摩尔比值 (E/P) 为 1.9, 标记率为 0.55] 均为动物疫病与人类健康四川省重点实验室制备; HRP 标记羊抗鸭 IgG 的 IgG 型结合物为美国 KPL 公司产品。

1.1.6 质控血清及分泌物 DPV 阳性血清、消化道和气管分泌物为 DPV CHa 弱毒株免疫小鸭制备, 中和指数均为 2.31~3.33; 阴性血清、消化道和气管分泌物由正常小鸭制备, 中和指数均为 0。

1.1.7 其它试剂 包被液、封闭液、稀释液、底物和终止液为美国 KPL 公司产品, 96 孔酶标板为美国 FALCON 产品。

1.2 方法

1.2.1 试验动物分组及处理 试验鸭随机分成皮下、口服和滴鼻免疫组 and 对照组, 每组 50 只。免疫鸭免疫剂量为每只 0.25 ml DPV Cha 株。对照组鸭每只接种相同剂量无菌生理盐水。各组试验鸭隔离饲养于干净、通风的动物房中, 饲喂全价肉鸭饲料, 自由采食与饮水。免疫组和对照组鸭分别于免疫后第 1、3、6、9、12、15、21、27、36、60 天随机各取 5 只鸭进行采样。

1.2.2 分泌物的采集 参照文献[4]进行。采集气管、食道、十二指肠、空肠和直肠, 剪成 1 cm 长的段, 用 5 ml PBS 充分冲洗; 4℃ 650 r/min 离心 10 min, 8 000 r/min 离心 6 min, 上清于 -20℃ 冷冻保存。

1.2.3 血清的采集 鸭颈静脉采血并分离血清, -20℃ 冻存。

1.2.4 DPV 特异性 IgA、IgM 和 IgG 滴度测定 采用间接 ELISA 对免疫组和对照组鸭血清、气管和消化道分泌物中 DPV 特异性 IgA、IgM 和 IgG 抗体滴度进行测定。分别通过阻断试验、批内 (间) 重复测定试验

及与中和试验的符合率及灵敏度比较，对该法的特异性、重复性和敏感性进行验证。同时为便于不同种类抗体滴度的比较，应用直线回归分析将工作浓度稀释的样本 OD₄₀₅ 值转换成 ELISA 效价。

2 结果与分析

2.1 方法验证试验

质控试验表明优化的间接 ELISA 法具有较高的准确性和特异性，而且重复性好 (CV ≤ 10%)。同时，与中和试验的符合率为 100%，敏感性比中和试验至少要高 1 000 倍。经 SPSS 10.0 软件对数据分析证实，不同样品工作浓度时所测 OD₄₀₅ 值与其 ELISA 效价倒数以 10 为底数的对数之间存在一定的相关性 (R² 为

0.9528~0.9963)，故便于不同种类抗体滴度的比较，检测结果均以 Ig 平均值 (±SD) 表示。

2.2 DPV 弱毒免疫鸭不同时间血清、胆汁、气管和消化道中抗 DPV 特异性 IgA、IgM 和 IgG 滴度及其分布特点

DPV 弱毒疫苗经皮下、口服和滴鼻途径免疫鸭的血清、气管和消化道分泌液中均可检测到抗 DPV 特异性 IgG、IgM 和 IgA，其滴度及其分布详细情况见图 1、图 2。非免疫对照组鸭相应样品中均未检测到抗 DPV 特异性抗体。

从图 1、图 2 可以看出，鸭瘟弱毒疫苗经不同途径免疫鸭后，机体不同部位抗 DPV 的各类特异性抗体的产生时间、滴度、维持时间均存在自身特点：所有

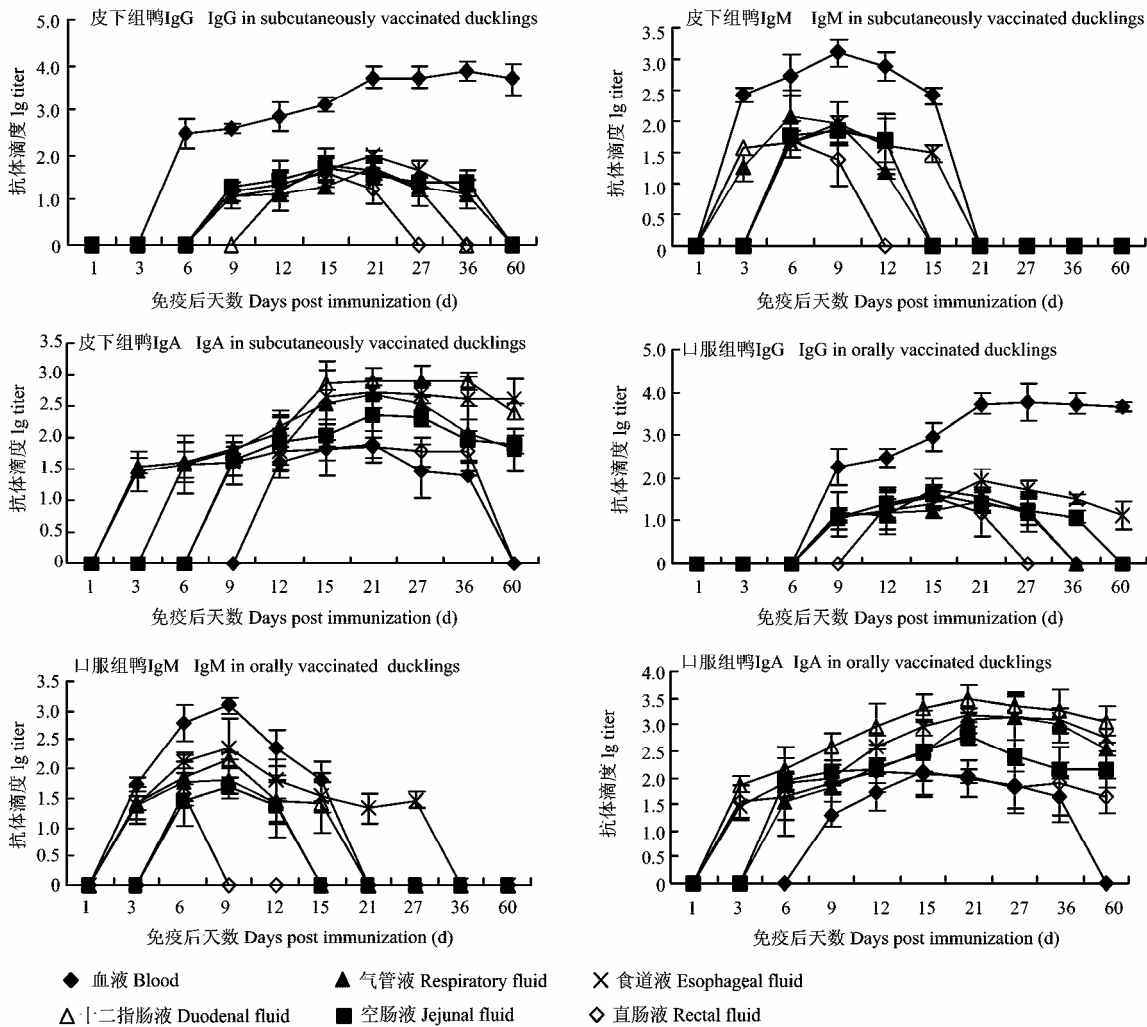


图 1 DPV 弱毒皮下和口服免疫鸭不同时间 DPV 特异性 IgG、IgM 和 IgA 的 ELISA 滴度

Fig. 1 ELISA antibody titer of DPV specific IgG, IgM and IgA of vaccinated ducklings vaccinated with attenuated duck plague virus vaccine strain by subcutaneous or oral administration

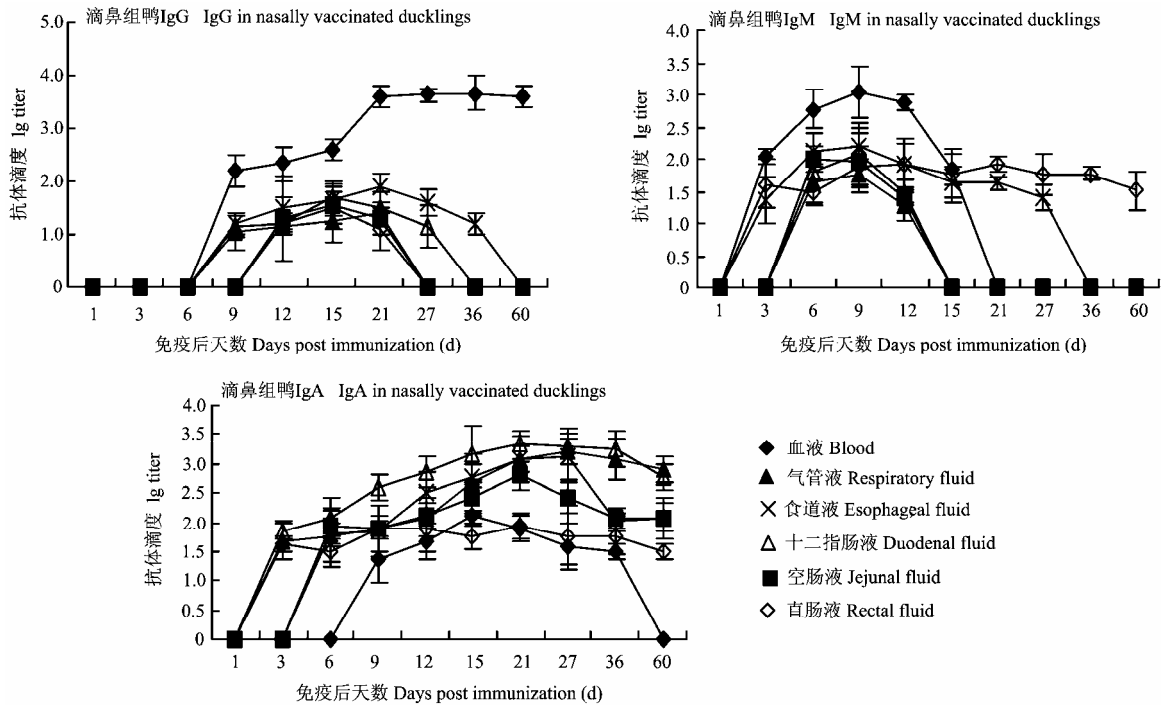


图 2 DPV 弱毒滴鼻免疫鸭不同时间 DPV 特异性 IgG、IgM 和 IgA 的 ELISA 滴度

Fig. 2 ELISA Antibody titer of DPV specific IgG, IgM and IgA of vaccinated ducklings vaccinated with attenuated duck plague virus vaccine strain by nasal administration

途径免疫鸭血清中抗体滴度从高到低依次为 IgG、IgM 和 IgA，其中 IgG 存留时间最长，免疫后第 60 天依然可在血清中检测到高滴度 IgG，而 IgM 检出时间最早（第 3 天）；通过对不同途径免疫鸭血清中各抗体滴度的比较显示：皮下免疫 DPV 弱毒疫苗血清中的 IgG 和 IgM 滴度均较口服和滴鼻免疫鸭高。气管和消化道分泌液中 DPV 特异性 IgA 滴度最高、维持时间最长。分泌液中 IgA 最早于免疫后第 3~9 天检测到，于第 21~27 天达到高峰，其中十二指肠中 IgA 抗体滴度是气管和消化道分泌液中最高的。IgM 最早于免疫后第 3~9 天检出，于第 6~9 天达到滴度高峰后陆续消失，滴度介于 IgG 和 IgA 之间。IgG 检出时间最晚，抗体滴度最低。所有途径免疫鸭中，气管和消化道中 IgA 抗体滴度均以口服和滴鼻免疫鸭为最高。

3 讨论

3.1 DPV 弱毒免疫鸭消化道和气管中的 IgA、IgM 和 IgG 发生规律

临床和实验室证实 DPV 弱毒疫苗是预防控制鸭瘟有效的生物制剂，免疫鸭后 3 d 即有 40% 以上鸭能够抵抗 DPV 强毒的攻击^[1,5,6]。以往对 DPV 弱毒疫苗

免疫效果的评价通常以血清中抗 DPV 特异性 IgG 抗体水平这样一个系统免疫中最容易检测的指标作为主要衡量标准^[2,3,5,6]，忽略了探讨黏膜免疫在鸭抗 DPV 感染中发挥怎样的作用？而黏膜免疫系统（mucosal immunity system, MIS）是存在于动物机体系统免疫之外的、与外界相通腔道黏膜表面的独特免疫系统，它对通过黏膜入侵机体的病原体具有非常强大的防御能力^[7,8]。IgA 是黏膜免疫主要的体液免疫效应因子，在黏膜免疫反应中发挥着非常重要的作用^[7-9]。本文研究表明，DPV 弱毒疫苗经不同途径免疫鸭后均可迅速诱导鸭气管和消化道等局部黏膜产生以 DPV 特异性 IgA 为主要抗体介导的黏膜免疫系统。这对预防自然条件下以消化道和呼吸道为主要传播途径的 DPV 强毒感染发挥着极为重要的作用。

消化道黏膜上皮细胞和淋巴细胞是 DPV 感染鸭的主要靶细胞^[10,11]。通过消化道进入免疫鸭体内的 DPV 弱毒苗直接通过具有抗原递呈功能的肠黏膜上皮细胞（intestinal epithelial cell, IEC）很快激活 MIS 并产生免疫应答，同时 IEC 还可通过产生分泌片并与 DPV 特异性的 IgA 结合形成 SIgA，然后进入肠腔，这是 DPV 弱毒免疫鸭后能够迅速在消化道分泌液中

产生特异的、高滴度 IgA 抗体的主要原因之一。而很多研究显示模仿天然黏膜感应部位与病原体相遇的方式是激发机体黏膜免疫的有效途径^[12-14], 其中口服途径可更迅速地将疫苗递送至鸭消化道黏膜表面, 及时有效的诱导鸭肠道相关淋巴组织 (gut associated lymphoid tissue, GALT) 并产生良好的抗体介导的黏膜免疫应答^[15,16], 本试验结果也显示口服免疫 DPV 弱毒苗鸭消化道中 IgA 抗体滴度为 3 种途径免疫鸭中最高。经呼吸道进入鸭体内的 DPV 弱毒苗则主要通过诱导上呼吸道的支气管相关淋巴样组织 (bronchus associated lymphoid tissue, BALT) 及鼻相关淋巴组织 (nose associated lymphoid tissue, NALT), 在免疫鸭呼吸道分泌液中产生高水平的 DPV 特异性 IgA 抗体。这是 DPV 弱毒滴鼻免疫鸭后能够迅速在气管分泌液中产生 DPV 特异性的、高滴度的 IgA 抗体的原因之一。而 DPV 弱毒疫苗皮下免疫鸭后 8 h 即可通过粪便排出体外并再次通过消化道和呼吸道进入机体是诱导皮下免疫鸭产生黏膜免疫的主要原因^[17,18]。另一方面, 许多试验都证明在黏膜位点的刺激能使局部和黏膜表面远端都产生抗原特异性 IgA, 这种 IgA 产生的内在联系被命名为共同黏膜免疫系统 (common mucosal immunity system, CMIS)^[19,20], 此一理论可以解释本试验中不同途径免疫鸭消化道和气管分泌液中均可检测到 DPV 特异性 IgA。本试验中不同途径免疫鸭十二指肠分泌液 IgA 抗体滴度同期相比都较气管、食道及其它肠道分泌液高的主要原因, 是由于十二指肠 IgA 浆细胞数量最多^[21,22], 且较早接触 DPV 弱毒。说明十二指肠黏膜是免疫鸭消化道和呼吸道黏膜中抵抗 DPV 感染最强的部位。

很多研究显示, 动物机体消化道黏膜固有层是最大的黏膜效应位点, 可分离到大量淋巴细胞, 其中 20%~40% 是 B 细胞, 而 B 细胞中有 70%~80% 分泌 IgA, 15%~20% 分泌 IgM, 分泌 IgG 细胞最少, 黏膜分泌液中的 IgG 主要来源于血清^[23-25], 这一特点在本试验得到很好的验证, 即所有途径免疫鸭消化道分泌液中抗 DPV 特异性抗体滴度从高到低依次为 IgA、IgM 和 IgG, 其中 IgM 检出时间较早、滴度介于 IgG 和 IgA 之间。说明 IgM 是免疫鸭消化道中的先锋抗体, 在免疫鸭早期抵抗 DPV 对消化道黏膜的感染中具有重要作用。IgG 检出时间最晚、滴度最低, 呼吸道亦表现类似特征。而气管和消化道中低含量的 IgG 在一定程度上很好地解释了临床观察到的 DPV 弱毒疫苗经口服免疫可有效避免以 IgG 为主要母源抗体的干扰

而获得更好免疫效果的现象。

3.2 DPV 弱毒免疫鸭血清中的 IgA、IgM 和 IgG 发生规律

疫苗在免疫动物后, 能否在最短时间内激活机体系统免疫功能, 产生抗原特异性 IgM 抗体, 在对疾病的紧急预防中显得尤为重要; 而能刺激机体产生高滴度和维持时间长的抗原特异性 IgG 抗体, 是评价一种疫苗质量的重要标准之一。本试验结果显示, DPV 弱毒苗经不同途径免疫鸭后, 血清中 IgM 检出时间最早 (第 3 天), 并均于第 9 天达到滴度高峰; 随着 IgM 抗体滴度的降低, IgG 抗体滴度逐渐上升并均于第 36 天达到较高水平, 至第 60 天检测结束时依然保持高滴度。血清中 DPV 特异性 IgM 和 IgG 发展规律呈现典型的双峰现象, 说明 IgM 抗体在 DPV 感染早期发挥着重要作用。IgM 滴度下降时, IgG 滴度却上升并维持较长时间, 较好地发挥了免疫接力棒的作用, 而 IgA 在血清中出现时间晚, 滴度较其它两种抗体低, 不是血清中的主要抗体, 因此 IgM 和 IgG 是 DPV 弱毒疫苗诱导免疫鸭系统免疫抵抗 DPV 感染的主要抗体。皮下注射免疫 DPV 弱毒苗较口服和滴鼻途径更为迅速的分布于脾、法氏囊、胸腺等重要免疫器官中, 使免疫器官能较早产生免疫应答^[17,18]。本试验得到与此相似结果, 即皮下免疫鸭血清中 DPV 特异性 IgM 和 IgG 产生时间最早、滴度最高, 提示皮下注射免疫途径可更有效的诱导鸭体液免疫介导的系统免疫。

4 结论

本研究通过对不同途径免疫 DPV 弱毒疫苗鸭血清和局部黏膜分泌液中 DPV 特异性 IgA、IgM 和 IgG 抗体含量的动态检测, 表明 DPV 弱毒疫苗免疫鸭后可迅速诱导鸭抗体介导的黏膜免疫和系统免疫。以特异性 IgA 为主要抗体的黏膜免疫在预防 DPV 强毒早期对鸭消化道和呼吸道等局部黏膜的感染中具有十分重要的作用, 使 DPV 弱毒疫苗快速产生免疫保护的机制从抗体介导的黏膜免疫的角度得到一定程度解释。

References

- [1] Sandhu T S, Shawky S A. Duck virus enteritis (duck plague). In: Saif Y M, Barnes H J, Glisson, J R, eds. *Diseases of Poultry (11th ed)*. Ames: Iowa State University Press, 2003: 354-363.
- [2] Islam M A, Samad M A, Rahman M B, Hossain M T, Akter S. Assessment of immunologic responses in khaki cambell ducks vaccinated against duck plague. *International Journal of Poultry*

- Science*, 2005, 1: 36-38.
- [3] Shawkly S A, Sandhu T S. Inactivated vaccine for protection against duck virus enteritis. *Avian Diseases*, 1997, 41: 461-468.
- [4] Sheela R R, Babu U, Mu J, Elankumaran S, Bautista D A, Rarbourne R B, Heckert R A, Song W. Immune responses against *Salmonella enterica* serovar enteritidis infection in virally immunosuppressed chickens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2003, 7: 670-679.
- [5] Lin W Q, Lam K M, Clark W E. Active and passive immunization of ducks against duck viral enteritis. *Avian Diseases*, 1984, 28: 968-977.
- [6] Lin W Q, Lam K M, Clark W E. Isolation of an apathogenic immunogenic strain of duck enteritis virus from waterfowl in California. *Avian Diseases*, 1984, 28: 641-650.
- [7] Egmond M, Garderen E, Spriel A B. Function of immunoglobulin A in immunity. *Gut*, 2000, 47: 751-752.
- [8] Silver K J, Hutchings A B, Vajdy M, Petzke M M, Neutra M R. Role of immunoglobulin A in protection against reovirus entry into murine Peyer's patches. *Journal of Virology*, 2001, 11: 10870-10879.
- [9] Langford T D, Housley M P, Boes M, Chen J Z, Kagnoff M F, Gillin F D, Eckmann L. Central importance of immunoglobulin A in host defense against *Giardia* spp. *Infection and Immunity*, 2002, 4: 11-18.
- [10] Shawkly S. Target cells for duck enteritis virus in lymphoid organs. *Avian Pathology*, 2000, 29: 609-616.
- [11] Yuan G P, Cheng A C, Wang M S. Electron microscopic studies of the morphogenesis of duck enteritis virus. *Avian Diseases*, 2004, 49: 50-55.
- [12] Bacon A, Makin J, Sizer P J, Jabbal-Gili I, Hinchcliffe M, Illum L, Chatfield S, Roberts M. Carbohydrate biopolymers enhance antibody responses to mucosally delivered vaccine antigens. *Infection and Immunity*, 2000, 10: 5764-5770.
- [13] Fukutome K, Watarai S, Mukamoto M, Kodama H. Intestinal mucosal immune response in chickens following intraocular immunization with liposome-associated *Salmonella enterica* serovar enteritidis antigen. *Developmental and Comparative Immunology*, 2001, 25: 475-484.
- [14] Jayawardane G W L, Spradbrow P B. Mucosal immunity in chickens vaccinated with the V4 strain of Newcastle disease virus. *Veterinary Microbiology*, 1995, 46: 69-77.
- [15] Jimenez J C, Fontaine J, Grzych J M, Eduardo D C, Capron M. Systemic and mucosal responses to oral administration of excretory and secretory antigens from *Giardia intestinalis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2004, 1: 152-160.
- [16] Li T C, Takeda N, Miyamura T. Oral administration of hepatitis E virus-like particles induces a systemic and mucosal immune response in mice. *Vaccine*, 2001, 19: 3476-3484.
- [17] 程安春, 汪铭书, 刘 菲, 宋 涌, 袁桂萍, 韩晓英, 徐 超, 廖永洪, 周伟光, 文 明, 贾仁勇. 鸭瘟病毒弱毒株在免疫雏鸭体内的分布和排毒规律. *中国兽医学报*, 2005, 25: 231-233.
- Cheng A C, Wang M S, Liu F, Song Y, Yuan G P, Han X Y, Xu C, Liao Y H, Zhou W G, Wen M, Jia R Y. Distribution and excretion of duck plague virus attenuated Cha strain in vaccinated ducklings. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2005, 25: 231-233. (in Chinese)
- [18] 程安春, 汪铭书, 刘 菲, 宋 涌, 袁桂萍, 韩晓英, 徐 超, 廖永洪, 周伟光, 文 明, 贾仁勇, 陈孝跃. PCR 在鸭瘟临床诊断和免疫及致病机理研究中的初步应用. *病毒学报*, 2004, 20: 391-397.
- Cheng A C, Wang M S, Liu F, Song Y, Yuan G P, Han X Y, Xu C, Liao Y H, Zhou W G, Wen M, Jia R Y, Chen X Y. The preliminary application of PCR in research of clinical diagnosis and mechanisms of immunity and pathogeny of duck plague virus. *Chinese Journal of Virology*, 2004, 20: 391-397. (in Chinese)
- [19] Chen H M. Recent advances in mucosal vaccine development. *Journal of Controlled Release*, 2000, 67: 117-128.
- [20] Liliehoj H S, Trout J M. Avian gut-associated lymphoid tissues and intestinal immune responses to *Eimeria* parasites. *Clinical and Microbiology Reviews*, 1996, 7: 349-360.
- [21] Haneberg B, Kendall D, Amerongen H M, Apter F M, Kraehenbuhl J P, Neutra M R. Induction of specific immunoglobulin A in the small intestine, colon-rectum, and vagina measured by a new method for collection of secretions from local mucosal surfaces. *Infection and Immunity*, 1994, 62: 15-23.
- [22] Paalangara R, McClure S, McCullagh P. Intestinal exposure to a parasite antigen in utero depresses cellular and cytokine responses of the mucosal immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2003, 93: 91-105.
- [23] Johal S S, Lambert C P, Hammond J, James P D, Borriello S P, Mahida Y R. Colonic IgA producing cells and macrophages are reduced in recurrent and non-recurrent *Clostridium difficile*. *Journal of Clinical Pathology*, 2004, 57: 973-979.
- [24] Woodcock N P, Robertson J, Morgan D R, Ggregg K L, Mitchell C J, MacFie J. Bacterial translocation and immunohistochemical measurement of gut immune function. *Journal of Clinical Pathology*, 2001, 54: 619-623.
- [25] Yun C H, Lillehoj H S, Choi K D. *Eimeria tenella* infection induces local gamma interferon production and intestinal lymphocyte subpopulation changes. *Infection and Immunity*, 2000, 3: 1282-1288.