

口蹄疫病毒 VP1 T、B 细胞表位与大肠杆菌肠毒素融合蛋白的免疫保护性研究

庄娟¹, 尤永进², 陈波², 饶忠², 潘洁²

(1. 淮阴师范学院生物系, 淮阴 223300; 2. 上海农业科学院畜牧兽医研究所, 上海 201106)

摘要: 作者对 O 型口蹄疫病毒(FMDV)VP1 双拷贝 T 细胞表位(aa 21-40)、B 细胞表位(aa 141-160)融合蛋白 2020-2020VP1 及其与肠毒素大肠杆菌肠毒素融合后蛋白 2020-B-2020 和 2020-B-2020-STI 进行了免疫分析。动物试验表明,用 2020-2020VP1、2020-B-2020 和 2020-B-2020-STI 3 种融合蛋白分别免疫动物,免疫动物血清中均可产生针对 FMDV 的抗体。免疫豚鼠在低浓度 FMDV 刺激下能够产生特异性 T 淋巴细胞增殖反应,说明 3 种融合蛋白都能诱导机体产生 FMDV 特异性细胞及体液免疫反应。2020-B-2020 和 2020-B-2020-STI 融合蛋白免疫雌鼠能够抵抗大肠杆菌强毒株攻击,免疫保护率如下:2020-B-2020 60%/1.5MLD, 2020-B-2020-STI 100%/1.5MLD。2020-B-2020-STI 免疫血清中具有 STI 中和抗体,且融合蛋白不具 STI 毒性。ELISA 结果显示,2020-B-2020 和 2020-B-2020-STI 能与霍乱毒素(cholera toxin)CTB 抗体特异性结合。结果表明,2020-B-2020-STI 具有开发成为口蹄疫及肠毒素大肠杆菌疫苗的应用价值。

关键词: 口蹄疫病毒;VP1;细胞表位;肠毒素大肠杆菌;LTB;STI;免疫应答

中图分类号:S852.659.6

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2009)03-0388-06

Study on the Immune Protective Effect of the Fusion Protein Including Two Copies of T-cell and B-cell Epitopes of Food-and-mouth Disease Virus VP1 and Enterotoxins of *Escherichia coli*

ZHUANG Juan¹, YOU Yong-jin², CHEN Bo², RAO Zhong², PAN Jie²

(1. Huaiyin Teachers College, Huaiyin 223300, China;

2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine,

Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China)

Abstract: In this study, the fusion proteins including two copies of T-cell epitope(aa21-40) and B-cell epitope(aa141-160) of VP1 of food-and-mouth disease virus typed O and labile enterotoxin B subunit (LTB) and/not stable enterotoxin I (STI) of *Escherichia coli* were analyzed as candidate vaccine against FMDV and *E. coli*. The proteins 2020-2020VP1, 2020-B-2020 and 2020-B-2020-STI were used to vaccinate guinea pigs, rabbits and 6-8 weeks old BALB/c mice, then the immune responses were observed. The fusion proteins could induce proliferation of spleen T cells in vaccinated guinea pigs, and could elicit FMDV neutralizing antibody. It could be concluded that the three fusion proteins could activate FMDV-special cellular and humoral immune-response simultaneously. At the same time, the fusion proteins 2020-B-2020 and 2020-B-2020-STI could protect mice from challenge of enterotoxigenic *E. coli* C83902 and the protecting-rate were 60%/1.5 MLD and 100%/1.5 MLD respectively. The fusion protein including STI enterotoxin could in-

收稿日期:2008-04-15

作者简介:庄娟(1977-),女,讲师,江苏通州人,主要从事细胞生物学研究,E-mail:dajiangsky@163.com

duce neutralizing antibody for STI toxin in rabbits, moreover, the fusion protein had no STI toxicity. The fusion proteins 2020-B-2020 and 2020-B-2020-STI could be recognized specially by CTB antibody in ELISA. So that, it can be concluded that the fusion protein 2020-B-2020-STI is potent to be efficient FMDV and ETEC vaccine.

Key words: FMDV; VP1; cell epitopes; enterotoxigenic *Escherichia coli*; LTB; STI; immune responses

口蹄疫病毒 (Food-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的口蹄疫 (Food-and-mouth disease, FMD) 与产肠毒素大肠杆菌 (Enterotoxigenic *Escherichia coli*, ETEC) 引起的幼畜腹泻均为危害畜牧业发展的主要疾病。FMDV 结构蛋白包括 VP1、VP2、VP3 和 VP4。一般认为 VP1 起着重要的抗原作用, 其 21-40 肽能促进机体产生细胞免疫反应^[1], 而 141-160 肽能引起机体的体液免疫反应^[2]。产肠毒素大肠杆菌产生的肠毒素分为耐热性肠毒素 B 亚单位 (heat-stable enterotoxin, ST) 和热敏性肠毒素 (heat-labile enterotoxin, LT) 2 种。耐热性肠毒素对热稳定, 可分为 STI 与 STII 2 种亚型, 相对分子质量较小, 免疫原性弱, 与大分子偶联可产生免疫原性^[3-4]; 热敏性肠毒素对热敏感, 由 A、B 2 个亚单位组成, 其中 A 是毒素的活性部分, B 是免疫的主要受体结合区, 其本身没有毒性^[5-6]。

作者运用基因工程技术, 表达了 3 种融合蛋白: 2020-2020VP1, 含有 O 型口蹄疫病毒 VP1 双拷贝 21-40 与 141-160 表位肽; 2020-B-2020 是 2020-2020VP1 与肠毒素大肠杆菌热敏性肠毒素 B 亚单位 (LTB) 的融合蛋白; 2020-B-2020-STI 是 2020-2020VP1 与 STI 及 LTB 的融合蛋白^[7-9]。作者拟对 3 种融合蛋白的免疫原性进行分析和比较, 以期为预防口蹄疫与幼畜腹泻疾病生产安全高效的基因工程疫苗提供试验依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株及融合蛋白

产肠毒素大肠杆菌强毒株 C83902 (K88ac, ST⁺, LT⁺) 为实验室保存; C83916 (ST⁺) 购自中国兽药药品监察所; 融合蛋白 2020-2020VP1^[7]、2020-B-2020^[8] 和 2020-B-2020-STI^[9], 作者实验室表达并保存。

1.2 ELISA 检测融合蛋白 LTB 反应原性

取 2020-B-2020-STI 及 2020-B-2020 纯化蛋白各 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 包被 ELISA 板, 设立 FMDV 2020-

2020VP1 纯化蛋白对照, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h 后加入 CTB 抗体 (Calbiochem) 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h。二抗蛋白 A/G 浓度为 1 : 6 000, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min, TMB 显色 15 min 后加入 2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸终止液, 在 450 nm 下读取 $OD_{450 \text{ nm}}$ 值。

1.3 STI 生物毒性检测

融合蛋白 2020-B-2020-STI 的 STI 生物毒性检测: 采用乳鼠灌胃试验检测 STI 生物毒性。新生 BALB/c 乳鼠 (1~3 日龄), 购自第二军医大学实验动物中心, 随机分 3 组, 每组 5 只, 分别以 1、2 μg 纯化的 2020-B-2020-STI 及 PBS 灌胃, 25 $^{\circ}\text{C}$ 放置 4 h 后取出肠段, 称量肠质量和去肠鼠体质量, 计算肠质量/去肠鼠体质量 (G/C) 的比值, $G/C \geq 0.090$ 为 STI 毒性阳性, $G/C \leq 0.083$ 为 STI 毒性阴性^[6]。

1.4 动物免疫

实验动物购自第二军医大学实验动物中心, 动物试验均在上海农业科学院进行。

6 只家兔分为 3 组, 每组 2 只, 分别肌内免疫 2020-2020VP1、2020-B-2020 和 2020-B-2020-STI。3 周后二免。二免后 3 周采集血清进行乳鼠灌胃中和试验、FMDV 细胞中和试验及乳鼠保护试验。

8 只豚鼠分为 4 组, 每组 2 只, 试验组肌内注射免疫 2020-2020VP1、2020-B-2020 和 2020-B-2020-STI。3 周后二免。对照组 2 只不免疫。二免后 4 周提取淋巴细胞进行 T 淋巴细胞增殖试验。

40 只 6~8 周龄 BALB/c 雌鼠分 4 组, 每组 10 只, 腹腔注射免疫。试验组分别注射 2020-2020VP1、2020-B-2020 和 2020-B-2020-STI, 3 周后二免。对照组 10 只不免疫。二免后 3 周进行肠毒素强毒株 C83902 攻毒试验。

1.5 融合蛋白的 LTB/STI 免疫原性检测

1.5.1 攻毒试验 取过夜培养的大肠杆菌强毒株 C83902 培养物腹腔注射 6~8 周龄 BALB/c 雌鼠, 观察死亡情况, 测定 C83902 培养物毒性。选用最小致死量 (MLD) 和 1.5MLD 的 C83902 培养物剂量腹腔注射免疫组及对照组雌鼠。

1.5.2 STI中和试验 取C83916 24 h培养物上清给乳鼠灌胃,测定1个鼠活性单位的STI肠毒素量,与等量2020-2020VP1、2020-B-2020和2020-B-2020-STI免疫兔血清混合,37℃中和1 h,设立健康兔血清对照。采用乳鼠灌胃试验测定中和物STI生物毒性。 $G/C \geq 0.09$ 为中和结果阴性, $G/C \leq 0.083$ 为中和结果阳性,进而评价免疫兔血清中和抗体的中和效果。

1.6 融合蛋白的2020-2020免疫原性检测

1.6.1 T淋巴细胞增殖试验 用不同稀释度的FMDV抗原刺激免疫组二免后4周的豚鼠,提取脾脏淋巴细胞,设立培养液阴性对照孔。37℃、5%CO₂、饱和湿度条件下培养72 h。加入终浓度为0.2 mg·mL⁻¹与50 μmol·L⁻¹ XTT/PMS,继续培养。测定各孔OD_{630 nm}值。

1.6.2 细胞中和试验 对照组健康兔血清购自上

海鼎国。采用固定血清-稀释病毒方法测定免疫组兔血清的中和抗体效价^[10],血清中和抗体滴度=试验组LD₅₀/对照组LD₅₀。判定标准:滴度大于50为阳性,10~50为可疑,小于10为阴性。

1.6.3 乳鼠保护试验 2~3日龄乳鼠皮下注射免疫组及对照组兔血清,24 h后FMDV攻击,72 h后观察保护情况。

2 结果

2.1 ELISA检测

肠毒素大肠杆菌LTB与霍乱毒素(cholera toxin)CTB抗原性相似,两者的抗血清有交叉中和作用。经CTB抗体检测,2020-2020VP1融合蛋白与CTB抗体无特异识别,2020-B-2020-STI及2020-B-2020融合蛋白能够被CTB抗体识别(表1),证明融合蛋白中LTB能够被LTB抗体识别。

表1 2020-B-2020-STI、2020-B-2020 LTB反应原性的ELISA检测

Table 1 ELISA detection results of the fusion proteins 2020-B-2020-STI and 2020-B-2020

| 包被量/(μg·mL ⁻¹) | 2020-B-2020-STI | | 2020-B-2020 | | FMDV 2020-2020VP1 | | | |
|----------------------------|-----------------|---------|-------------|-------|-------------------|-------|-------|-------|
| | 2 | 2 | 2 | 2 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| Coating amount | 2 | 2 | 2 | 2 | 5 | 10 | 15 | 20 |
| OD _{450 nm} 平均值 | 1.312 5 | 1.387 5 | 0.064 | 0.078 | 0.078 | 0.076 | 0.068 | 0.068 |

2.2 融合蛋白的STI生物毒性检测

1、2 μg 2020-B-2020-STI免疫动物没有发现任何生理异常,表明该融合蛋白对动物没有生物毒性,肠质量/去肠鼠体质量值分别为0.056 3和0.057 4,与PBS组的0.063 4差异不显著,表明融合蛋白未残留STI生物毒性。

2.3 大肠杆菌强毒株攻毒保护试验

选用1和1.5 MLD剂量的C83902菌液腹腔

注射雌鼠,对照组鼠全部死亡;免疫2020-2020VP1组小鼠全部死亡,而2020-B-2020和2020-B-2020-STI免疫获得较好的保护(表2)。1.5MLD免疫剂量下,2020-B-2020免疫组保护率为60%,而2020-B-2020-STI免疫组保护率为100%。

2.4 STI毒性中和试验

健康兔血清及2020-2020VP1、2020-B-2020和2020-B-2020-STI免疫兔血清分别与1个鼠活性单

表2 攻毒保护试验

Table 2 Protection of immunized mice from lethal dose of ETEC

| 注射剂量 Challenge dose | 对照组存活情况 Control | 免疫组存活情况 Survivors/Number of mice in immunized group | | |
|------------------------|--------------------|--|-------------|-----------------|
| | | Survivors/Number of mice in immunized group | | |
| | | 2020-2020VP1 | 2020-B-2020 | 2020-B-2020-STI |
| 1 MLD | 0/5 | 0/5 | 5/5 | 5/5 |
| 1.5 MLD | 0/5 | 0/5 | 3/5 | 5/5 |

位STI量等体积混合,感作后进行乳鼠试验,结果见表3,2020-B-2020-STI免疫组乳鼠G/C值 ≤ 0.083 ,而健康兔血清、2020-2020VP1和2020-B-

2020免疫组乳鼠G/C值 ≥ 0.09 ,说明只有2020-B-2020-STI能够诱发兔体产生STI肠毒素中和抗体。

表 3 免疫兔血清对 STI 毒素的中和作用

Table 3 Neutralization of STI by sera of immunized rabbits

| 处理组 Treatment | 乳鼠数 Number of sucking mice | G/C 平均值 Average value |
|----------------------------|----------------------------|-----------------------|
| STI+健康兔血清 | 5 | 0.091 5 |
| STI+2020-2020VP1 免疫组兔血清 | 5 | 0.091 0 |
| STI+2020-B-2020 免疫组兔血清 | 5 | 0.091 3 |
| STI+2020-B-2020-STI 免疫组兔血清 | 5 | 0.068 8 |

2.5 T 淋巴细胞增殖试验

二免后 4 周豚鼠 T 淋巴细胞增殖试验结果表明, 2020-2020VP1、2020-B-2020 和 2020-B-2020-STI 免疫组豚鼠在 1/50、1/100 及 1/200 稀释度的 FMDV 抗原刺激下有明显的增殖反应, 而对对照组豚鼠淋巴细胞在 FMDV 抗原刺激下无明显增殖。说明构建的 3 种融合蛋白均可以诱导豚鼠产生有效的抗 FMDV 细胞免疫反应。

2.6 抗 FMDV 细胞中和试验

细胞中和试验结果表明: 健康兔血清中和后 FMDV LD_{50} 为 $10^{-4.833} \cdot 10 \mu L^{-1}$, 2020-2020VP1、2020-B-2020 和 2020-B-2020-STI 免疫组兔血清中和后病毒 LD_{50} 分别为 $10^{-2.833} \cdot 10 \mu L^{-1}$ 、 $10^{-2667} \cdot 10 \mu L^{-1}$ 和 $10^{-1.833} \cdot 10 \mu L^{-1}$, 中和效价分别为 100、

146 和 1 000, 说明构建的融合蛋白均能诱发兔体产生有效的体液免疫反应, 产生的抗体能够中和 FMDV 对 BHK-21 细胞的毒性。

2.7 乳鼠保护试验

乳鼠保护试验结果显示, 对照组动物在 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ FMDV 攻击下全部死亡, 在 10^{-6} 病毒攻击下有半数死亡, 说明健康兔血清对乳鼠没有保护作用; 2020-2020VP1、2020-B-2020 和 2020-B-2020-STI 免疫兔血清保护乳鼠在 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 病毒攻击下全部存活, 在 10^{-4} FMDV 攻击下分别有 75%、75% 和 100% 的保护率(表 4), 说明免疫兔血清对乳鼠有较好的保护作用, 证明融合蛋白能够诱导兔体产生抗 FMDV 中和抗体。

表 4 免疫兔血清对乳鼠的保护能力

Table 4 Protection of sera of vaccinated rabbits for sucking mice from FMDV challenge

| 血清 Serum | 只数 Number of mice | FMDV 稀释度 Dilution of FMDV | 72 h 存活数 Number of survivors after 72 hours |
|--|-------------------|---------------------------|---|
| 健康兔血清 Sera of control rabbit | 4 | 10^{-3} | 0 |
| | 4 | 10^{-4} | 0 |
| | 4 | 10^{-5} | 0 |
| | 4 | 10^{-6} | 2 |
| 2020-2020VP1 免疫兔血清 Sera of 2020-2020VP1 vaccinated rabbit | 4 | 10^{-3} | 0 |
| | 4 | 10^{-4} | 3 |
| | 4 | 10^{-5} | 4 |
| | 4 | 10^{-6} | 4 |
| 2020-B-2020 免疫兔血清 Sera of 2020-B-2020 vaccinated rabbit | 4 | 10^{-3} | 1 |
| | 4 | 10^{-4} | 3 |
| | 4 | 10^{-5} | 4 |
| | 4 | 10^{-6} | 4 |
| 2020-B-2020-STI 免疫兔血清 Sera of 2020-B-2020-STI vaccinated rabbit | 4 | 10^{-3} | 1 |
| | 4 | 10^{-4} | 4 |
| | 4 | 10^{-5} | 4 |
| | 4 | 10^{-6} | 4 |

3 讨论

VP1 是 FMDV 的主要抗原蛋白,其中的 21-40 肽是一重要 T 细胞表位,141-160 肽则是一主要 B 细胞表位,并且将不同的表位串联起来会增强其免疫效果,因此作者构建的融合蛋白中带有双拷贝 21-40 表位肽和 141-160 表位肽,但中间没有任何连接肽段。因为蛋白质空间构象的关系,这种直接相连 2020-2020 可能会对其免疫原性产生一定的影响。试验证明,融合蛋白 2020-2020VP1、2020-B-2020 和 2020-B-2020-STI 能诱导豚鼠产生有效的抗 FMDV 细胞免疫反应,并能诱发兔体产生有效的体液免疫反应,产生的抗体能够中和 FMDV 对 BHK-21 细胞的毒性,同时能够对乳鼠产生较好的保护作用。比较试验数据发现,融合蛋白 2020-2020VP1、2020-B-2020 和 2020-B-2020-STI 免疫兔所产生抗体的中和效价分别为 100、146 和 1 000,乳鼠保护率也相应增加,说明肠毒素大肠杆菌 LTB 插入到双拷贝 VP1 21-40-141-160 肽中可以有效地增强其免疫活性,肠毒素大肠杆菌 STI 接入后,融合蛋白的免疫活性进一步增强,这可能是因为融合蛋白的相对分子质量增加、融合蛋白中 2020 和 LTB、STI 物种差别大或融合蛋白空间构象更有利于抗原决定簇发挥作用。

大肠杆菌热敏性肠毒素 LTB 是免疫的主要受体结合区,耐热性肠毒素 STI 相对分子质量较小,免疫原性弱,与大分子偶联可产生免疫原性。作者表达的融合蛋白把 LTB 或/和 STI 与 FMDV VP121-40-141-160 肽相连,结果表明,融合蛋白 2020-B-2020 和 2020-B-2020-STI 中 LTB 能够被 CTB 抗体所识别,免疫动物血清中的抗体可以对乳鼠产生抵抗大肠杆菌强毒株的保护作用,由于 STI 的接入和蛋白相对分子质量较大的缘故,2020-B-2020-STI 免疫血清的保护作用优于 2020-B-2020。融合蛋白 2020-B-2020-STI 免疫血清可以中和 C83916 培养物,说明免疫血清中具有 STI 抗体。乳鼠灌胃试验表明,融合蛋白 2020-B-2020-STI 不具 STI 毒性。

肠毒素大肠杆菌引起的幼畜腹泻与口蹄疫均为危害畜牧业发展的重要疾病,目前易感动物均要用疫苗进行免疫防治^[11],基因工程疫苗是疫苗研究的热点。国内外学者通过基因工程技术表达了系列带有 T 细胞表位或/与 B 细胞表位的融合蛋白^[1,12-14]。

对于肠毒素大肠杆菌,目前国内外所作的研究主要是研究 LTB-STI 及与定居因子融合表达产物的免疫活性^[4,6,15-18]。把口蹄疫病毒与肠毒素大肠杆菌的相关免疫位点基因融合表达,制备抗 FMDV/EPEC 双重功能的疫苗为本文的创新之处,作者表达出 2020-2020VP1、2020-B-2020 和 2020-B-2020-STI 融合蛋白,对它们的免疫原性进行了比较分析。试验结果表明,2020-B-2020 和 2020-B-2020-STI 融合蛋白可以同时诱导机体产生较好的抗 FMDV 及 EPEC 免疫应答反应,特别是融合蛋白 2020-B-2020-STI,具有开发成为 FMDV 与 EPEC 基因工程疫苗的应用价值。

参考文献:

- [1] COLLEN T, DIMARCHI R, DOEL T R. A T cell epitope in VP1 of food-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle [J]. *J Immunol*, 1991, 146: 749-755.
- [2] STROHMAIER K, FRANZE R, ADAM K H. Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein [J]. *Virology*, 1982, 59: 295.
- [3] KLIPSTEIN F A, ENGERT R F, HOUGHTEN R A. Protection in rabbits immunized with a vaccine of *Escherichia coli* heat-labile toxin cross-linked to the heat-stable B subunit [J]. *Infect Immun*, 1983, 40: 888-893.
- [4] CLEMENTS J D. Construction of a nontoxic fusion peptide for immunization against *Escherichia coli* strains that produce heat-labile and heat-stable enterotoxins [J]. *Infect Immun*, 1990, 58(5): 1159-1166.
- [5] GILL D M, CLEMENTS J D, ROBERTSON D C, et al. Subunit number and arrangement in *Escherichia coli* heat labile enterotoxin [J]. *Infect Immun*, 1981, 33: 677-682.
- [6] GUZMAN-VERDUZCO L M, KUPERSZTOCH Y M. Fusion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin and heat-labile enterotoxin B subunit [J]. *J Bacteriol*, 1987, 169: 5201-5208.
- [7] 庄娟,曹祥荣,陈波,等. O 型口蹄疫病毒 VP1 T 细胞与 B 细胞表位基因双拷贝串联表达产物的免疫应答 [J]. 中国预防兽医学报, 2005, 27(6): 494-497.
- [8] 庄娟, 尤永进, 陈波, 等. O 型口蹄疫病毒 VP1 T 细胞、B 细胞表位双拷贝基因与大肠杆菌 LTB 基因融合表达产物的免疫应答 [J]. 安徽农业科学, 2007,

- 33:10622-10623.
- [9] 庄 娟, 尤永进, 陈 波, 等. O 型口蹄疫病毒 VP1 T 细胞、B 细胞表位双拷贝基因与大肠杆菌 LTb、STI 肠毒素基因融合表达产物的免疫应答[J]. 遗传, 2006, 5: 557-562.
- [10] 徐宜为. 免疫检测技术[M]. 北京: 科学出版社, 1991.
- [11] 蒙学莲, 房永祥, 窦永喜, 等. 猪 IFN- γ 和 IL-4 重组质粒对口蹄疫疫苗的免疫佐剂效应研究[J]. 畜牧兽医学报, 2008, 39 (9): 1240-1244.
- [12] BROWN F. New approaches to vaccination against food-and-mouth disease [J]. *Vaccine*, 1992, 10: 1022-1026.
- [13] DU Y J, JIANG P, LI Y F, et al. Immune responses of two recombinant adenoviruses expressing VP1 antigens of FMDV fused with porcine granulocyte macrophage colony-stimulating factor[J]. *Vaccine*, 2007, 5: 8209-8219.
- [14] 杨志军, 林焱, 李金光, 等. 含 T 细胞表位和 B 细胞表位的抗 O 型 FMDV 基因工程疫苗诱导豚鼠产生免疫反应 [J]. 复旦学报(自然科学版), 2000, 5: 564-567.
- [15] 张金波, 祝建波, 彭晓明, 等. 产肠毒素大肠杆菌 K88-STII-LTA2/LTB 融合基因在烟草中的表达 [J]. 西北农业学报, 2007, 16(5): 135-140, 154.
- [16] 许崇波, 卫广森, 冯书章, 等. 大肠杆菌耐热性肠毒素 I 融合基因的构建及其免疫原性研究[J]. 畜牧兽医学报, 1997, 28(4): 330-335.
- [17] CARDENAS L, CLEMENTS J D. Development of mucosal protection against the heat-stable enterotoxin (ST) of *Escherichia coli* by oral immunization with a genetic fusion delivered by a bacterial vector [J]. *Infect Immun*, 1993, 61(11): 4629-4636.
- [18] MCKENZIE R, BOURGEOIS A L, FRECH S A, et al. Transcutaneous immunization with the heat-labile toxin (LT) of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC): Protective efficacy in a double-blind, placebo-controlled challenge study[J]. *Vaccine*, 2007(25): 3684-3691.

动物疫情速递

以色列发生新城疫

2009 年 3 月 3 日, 以色列 MOSHE CHAIMOVITZ 博士向 OIE 报告了新城疫疫情。疫情始于 2009 年 3 月 2 日, 于 3 月 3 日确诊。病原是新城疫病毒, 疫区位于中央区佩塔提克瓦分区 RAMOT HASHAVIM 村, 易感动物为家禽, 涉及 10 万只(2 群分别为 58、45 日龄), 病例 200 例, 死亡 100 例, 销毁 1 万只(剩余鸡拟在 3 月 6 日前销毁)。此次疫情属临床发病, 依靠怀疑、临床检查、实验室检测和尸检作出诊断, 以色列南方家禽疾病实验室(国家实验室)2009 年 3 月 3 日的病原分离、血凝抑制试验结果为阳性, Kimron 兽医研究所禽病和鱼病实验室(国家实验室)PCR 结果为阳性。感染来源尚不清楚。以色列已采取国内限制移运措施, 目前在疫点周围 10 km 半径范围内开展了监测, 并禁止 3 km 半径范围内引进禽类, 即将实施扑杀、筛检、紧急免疫和染疫场区消毒。以色列上一次发生新城疫是 2008 年 6 月。

以色列发生猪瘟

2009 年 3 月 4 日, 以色列 MOSHE CHAIMOVITZ 博士向 OIE 报告了猪瘟疫情。疫情始于 2009 年 2 月 15 日, 于 3 月 2 日确诊。此次疫情属临床发病, 依靠怀疑、临床检查、实验室检测和尸检作出诊断, 病原是猪瘟病毒, 疫区位于北部区 ACCO 地区 FASSUTA 村, 易感动物是猪和野生动物, 涉病猪有 500 只, 病例 70 例, 死亡 20 例, 销毁 1 例; 另在 FASSUTA 村周围 4 km 半径范围内发现 11 头死亡野猪, 毒物学检测阴性, 抗原检测显示猪瘟病毒和牛病毒性腹泻病毒阳性, Kimron 兽医研究所用 PCR 证实饲养猪体内也有猪瘟病毒。德国 Hanover 兽医大学(OIE 参考实验室)的相关试验尚在进行中。感染来源不清楚, 可能来自接触野生动物和污染物。以色列已采取检疫、国内限制移运措施, 即将实施控制野生动物、筛检、紧急免疫、染疫场区消毒和改良扑杀。这是以色列首次发生猪瘟。

(摘自 OIE 网站)