

表达乙脑病毒 PrM 基因重组伪狂犬病病毒的构建

李自力¹,陈焕春^{1*},徐高原¹,方六荣¹,肖少波¹,王 祥²,何启盖¹

(1. 华中农业大学动物医学院,湖北省预防兽医学重点实验室,武汉 430070;2. 湖北省公安厅,武汉 430034)

摘要: 本研究以乙型脑炎病毒 SA14-14-2 疫苗株基因组 RNA 为模板,采用 RT-PCR 一步法扩增了 PrM 基因的全长 cDNA(558 bp),用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切 PrM 基因的扩增产物,回收目的基因后将其克隆至经同样酶切的伪狂犬病病毒通用转移载体 pPgG-uni 中,获得了转移载体 pPgG-PrM,并对其外源片段进行了测序。序列分析结果表明:与已报道的乙型脑炎病毒 SA14 强毒株和 SA14-14-2 疫苗株的核苷酸序列比较,PrM 基因的同源性为 100%。以伪狂犬病病毒 Ea 株 TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 突变株为载体构建了一株表达乙型脑炎病毒 PrM 基因的重组伪狂犬病病毒 TK⁻/gG⁻/PrM⁺,为进一步开展猪乙型脑炎与伪狂犬病二价基因工程疫苗的研究奠定了基础。

关键词: 乙型脑炎病毒;PrM 基因;重组伪狂犬病病毒

中图分类号:S852.65

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2007)01-0053-06

Construction of Recombinant Virus Strain TK⁻/gG⁻/PrM⁺ Recombinized by Pseudorabies Virus Ea Mutant Strain TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ and PrM Gene of Japanese Encephalitis Virus

LI Zi-li¹, CHEN Huan-chun^{1*}, XU Gao-yuan¹, FANG Liu-rong¹,

XIAO Shao-bo¹, WANG Xiang², HE Qi-gai¹

(1. College of Veterinary Medicine, Huazhong Agricultural University,

Hubei Province's Key Laboratory of Preventive Veterinary, Wuhan 430070, China;

2. Hubei Public Security Department, Wuhan 430034, China)

Abstract: Based on the nucleotide sequence of JEV SA14-14-2 strain, a pair of primers was designed. The PrM gene of JEV was cloned into general transfer vector pPgG-uni. The sequence analysis showed that the PrM genes of SA14 and SA14-14-2 strains had 100% homology. A co-transfection experiment was carried out with the purified pPgG-PrM and the genome of TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ mutant of pseudorabies virus Ea strain in PK-15 cells. By plaque purification and PCR detection, the recombinant virus TK⁻/gG⁻/PrM⁺ was purified. This recombinant virus strain can be used for the study of dual-valence vaccine of JEV and PRV.

Key words: Japanese encephalitis virus; PrM gene; recombinant pseudorabies virus

流行性乙型脑炎(Japanese Encephalitis, JE)(简称乙脑)是由日本乙型脑炎病毒(Japanese Encephalitis virus, JEV)(简称乙脑病毒)引起的一种人与动物共患的蚊媒病毒性疾病。主要流行于东亚和东南亚各国,其年发病率为(10~100)/10万,病

死率高达30%,约50%的幸存者患有永久性神经精神病后遗症^[1]。近年来,其流行范围有不断扩大的趋势^[2,3]。很多动物对乙脑都易感,猪是最主要的传染源,本病造成的主要经济损失是怀孕母猪发生繁殖障碍,给养猪业的持续稳定发展造成了巨大的

收稿日期:2006-04-14

基金项目:教育部重大项目(0113)

作者简介:李自力(1967-),男,副教授,博士,主要从事兽医微生物与免疫学研究

* 通讯作者:陈焕春,E-mail:hzauset@public.wh.hb.cn

危害^[4],因此控制猪的乙脑具有十分重要的意义。

免疫接种是一种最有效的传染病预防措施。我国 JEV 减毒活疫苗株 SA14-14-2 的广泛应用在乙脑控制上起了十分重要的作用。JEV 为一单股正链 RNA 病毒,基因组全长约 11 kb,整个基因组由 5'非编码区、一个几乎跨整个基因组的单一开放阅读框(ORF)和 3'端非编码区构成。ORF 约 10.3 kb,编码 1 个多聚蛋白前体,经切割后形成 3 个结构蛋白和 7 个非结构蛋白,其中结构蛋白 PrM(膜蛋白前体)约为 18.5 ku。JEV 的免疫原性、细胞嗜性等主要由其结构蛋白决定^[5]。本研究以 RT-PCR 法从 JEV SA14-14-2 疫苗株基因组中扩增了 PrM 基因,在此基础上以伪狂犬病病毒(PRV)Ea 株 TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 突变株为载体构建了 JEV PrM 基因重组伪狂犬病病毒 TK⁻/gG⁻/PrM⁺,为进一步研制猪乙型脑炎与伪狂犬病二价基因工程疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒、菌株、细胞、质粒和实验动物

JEV SA14-14-2 疫苗株、地鼠肾细胞 9 代(HK9)、伪狂犬病病毒 Ea 株 TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 突变株和原代地鼠肾(PHK)细胞、PK-15 细胞和 IBRS-2 细胞均由本研究室保存,鸡胚成纤维(CEF)细胞由本研究室自制。大肠杆菌 DH5 α 由本研究室提供,伪狂犬病病毒通用转移载体 pPgG-uni 由本研究室方六荣博士等构建^[6]。6 周龄雌性的 BALB/c 小白鼠购自卫生部生物制品研究所实验动物中心。

1.2 酶及主要试剂

病毒 RNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司,一步法 RT-PCR 试剂盒和 DNA 快速回收试剂盒购自北京原平皓公司,T₄ DNA 连接酶及所用的限制性内切酶等均购自上海宝生物(TaKaRa)公司,Lipofectin Reagent 2000 脂质体转染试剂盒购自 GIBCO 公司,地高辛标记与检测试剂盒购自宝灵曼公司。

1.3 引物的合成

根据已发表的 JEV SA14-14-2 株的核苷酸序列设计了针对 PrM(P1/P2)的特异性引物,上、下游引物分别引入 BamHI 和 EcoRI 酶切位点,同时还合成了扩增 LacZ 基因的引物(P3/P4),均由上海生物工程有限公司合成。

P1: 5' TTGGATCCATGGAAGGCTCAAT-

CATGTG3';

P2: 5' GCGAATTCTAACTGTAAGCCG-GAGCG3'。

P3: 5'GAACTGCCTGAACTACC3' ;

P4: 5'ACTGCAACAACGCTGC3'。

1.4 病毒的增殖与纯化

将 JEV 接入 PHK 细胞,37 °C 吸附 1 h 后,加入适量的 DMEM 细胞生长液,置 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养,每天观察细胞病变,待细胞病变明显时收获病毒,经差速离心法纯化、浓缩,分装后冻存于 -70 °C 备用。

1.5 病毒 RNA 的提取与 JEV PrM 基因的 RT-PCR 扩增

参照试剂盒说明提取病毒 RNA 并进行一步法 RT-PCR。其反应体系为:10 \times 反应缓冲液 5 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 10 μ L,10 mmol/L dNTP 5 μ L,RNA 酶抑制剂 1 μ L,AMV 反转录酶 XL 1 μ L,AMV-optimized Taq 酶 1 μ L,P1、P2 引物各 2 μ L(终浓度为 10 pmol/L),加 DEPC 处理水至 50 μ L。RT-PCR:50 °C 反转录 30 min,94 °C 灭活反转录酶 2 min;然后按 94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 40 s,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min,取扩增产物 3~5 μ L 在 0.8%琼脂糖凝胶上电泳。溴化乙锭染色后观察拍照。

1.6 重组转移载体 pPgG-PrM 的构建及 PrM 基因的序列测定

1.6.1 重组转移载体 pPgG-PrM 的构建 用 BamHI 和 EcoRI 双酶切 PrM 基因的 RT-PCR 产物,回收目的基因,连接到经相同酶切处理的通用转移载体 pPgG-uni 中,构建包含 JEV PrM 基因的重组伪狂犬病病毒的转移载体 pPgG-PrM。其构建流程如图 1 所示。

1.6.2 测序 将构建好的 pPgG-PrM 质粒送上海生工公司对 PrM 基因进行测序。

1.7 表达乙脑病毒 PrM 基因的重组伪狂犬病病毒的构建

1.7.1 PRV 基因组的提取^[7] 待 PK-15 细胞长成单层后,接种 PRV TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 突变株,病变至 80%左右时,收获细胞,离心弃上清,经 PBS(pH7.4)洗涤 1 次离心后收集细胞,加入细胞裂解液,37 °C 作用约 4 h,用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提 2 次,氯仿:异戊醇(24:1)抽提 2 次,取上清用 2 倍体积无水乙醇置 -20 °C 沉淀 30 min,离

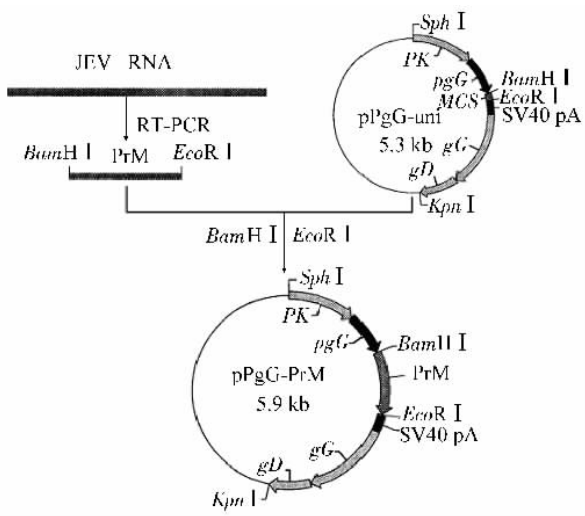


图 1 重组伪狂犬病病毒转移载体 pPgG-PrM 的构建

Fig. 1 The construction of the recombinant transfer vector pPgG-PrM

心(12 000 r/min, 10 min)后用 75%乙醇洗涤沉淀,再加入适量的灭菌水和 RNA 酶, 37 °C 作用过夜。TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 基因组 DNA 用 *EcoR* I 酶切消化后,经乙醇沉淀回收,溶于适量的 TE 缓冲液(pH8.0)中, -20 °C 保存备用。

1.7.2 共转染 利用脂质体介导共转染法按试剂盒说明书在 6 孔细胞培养板上进行。

1.7.3 重组病毒的鉴定^[7] 将已出现细胞病变的共转染物经 2~3 次冻融后,取 30~50 μL 用 DMEM 细胞生长液作 10 倍倍比稀释(10⁻¹~10⁻⁶),再分别将其接种至 6 孔细胞培养板的单层 PK-15 细胞上,置 37 °C、5%CO₂ 培养箱中吸附 1 h,吸弃培养液,用不含钙、镁的灭菌 PBS(pH7.4)洗 3 次后,每孔加入 2 mL 低熔点琼脂糖覆盖,置 4 °C 5 min 后,再置 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养,待出现明显病变后,经中性红染色,挑斑接种于 24 孔细胞培养板的单层 PK-15 细胞上,待细胞出现明显病变后制备模板进行 PCR 扩增。

1.7.4 空斑纯化^[7] 将上述 PCR 阳性孔的细胞毒液反复冻融 3 次后吸取 30~50 μL,10 倍倍比稀释后接种于已长满单层 PK-15 细胞的 6 孔细胞培养板中,以下操作同上。如此空斑纯化 3 次后,要求 24 孔均能扩增出目的基因,且 LacZ 的扩增为阴性(其扩增反应体系为:10×反应缓冲液 5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 1 μL,2 mmol/L dNTP 0.4 μL,20 μmol/L P4 和 P5 各 0.5 μL, *Taq* 酶 0.5 μL,加灭菌水至 50 μL。反应条件:95 °C 模板预变性 5 min;

95 °C 1 min,55 °C 1 min,72 °C 1 min,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min),即获得了纯化的重组病毒。

1.7.5 重组病毒 Southern 印迹检测 以 pPgG-PrM 为模板,采用 PCR 法扩增 PrM 基因片段(其反应体系为:10×反应缓冲液 5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 5 μL,2 mmol/L dNTP 1 μL,10 μmol/L P1 和 P2 各 1 μL, *Taq* 酶 0.5 μL,加灭菌水至 50 μL。反应条件:94 °C 模板预变性 4 min 94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 40 min,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min)。回收该片段后用地高辛标记,提取纯化后的重组病毒和 PRV Ea 株 TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 突变株基因组 DNA,经合适的限制性内切酶消化后电泳,以地高辛标记的 PrM 基因片段作探针进行 Southern 杂交,具体操作按地高辛标记与检测试剂盒说明书进行。

1.7.6 重组病毒 Western 印迹检测^[8] 取重组病毒和亲本株 TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 分别接种 PK-15 细胞,病变后收集细胞处理,进行 12% SDS-PAGE 电泳和 Western blot 检测。

1.7.7 重组病毒在不同细胞上的增殖滴度 分别在 IBRS-2、PK-15、CEF 细胞上测定重组病毒株 TK⁻/gG⁻/PrM⁺ 的 TCID₅₀,比较不同细胞对重组病毒的敏感性,并与载体病毒比较在 IBRS-2 细胞上的增殖滴度。

1.8 重组病毒对 BALB/c 小鼠的安全性及免疫性试验

1.8.1 重组病毒对 BALB/c 小鼠的安全性试验 分别用重组病毒、载体病毒(TK⁻/gG⁻/LacZ⁺)和 PRV 鄂 A 强毒株接种 6 周龄的 BALB/c 小鼠 8 只,每只小白鼠两侧后肢足垫部注射 50 μL,共接种 100 μL(10^{5.0} TCID₅₀),同时设 DMEM 培养液注射空白对照组,连续观察 14 d。

1.8.2 重组病毒对 BALB/c 小鼠的免疫性试验 对上述作安全性试验的小白鼠在接种 14 d 后用 10^{5.0} TCID₅₀ 鄂 A 强毒株攻击,连续观察 14 d。

将小白鼠随机分为 3 组,8 只/组。共免疫 2 次,间隔 4 周。重组病毒和载体病毒接种剂量均为 10^{5.0} TCID₅₀。按本研究室研制的检测猪 JEV 血清抗体 ELISA 试剂盒说明书进行小鼠 JEV 血清抗体效价的测定;参照文献的方法测定免疫小鼠 JEV CTL(细胞毒性 T 细胞)细胞毒活性^[4]。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果

以 JEV 基因组 RNA 为模板,采用 RT-PCR 法进行扩增,经琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,发现有一分子量略大于 500 bp 的条带,与预期结果一致(图 2)。该扩增片段包含有一信号肽序列和 PrM 全基因。



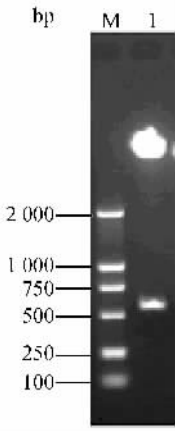
M, Marker DL2000; 1. Amplified products

图 2 JEV PrM 基因的 RT-PCR 扩增

Fig. 2 Amplified products of JEV PrM gene by RT-PCR

2.2 重组病毒转移载体的鉴定

将提取的 pPgG-PrM 质粒进行 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切,通过酶切鉴定筛选获得了阳性重组转移质粒(图 3),并进一步通过 PCR 扩增法进行了鉴定。



M, Marker DL2000; 1. pPgG-PrM digested with *Bam*HI / *Eco*RI

图 3 pPgG-PrM 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pPgG-PrM by restrictive analysis

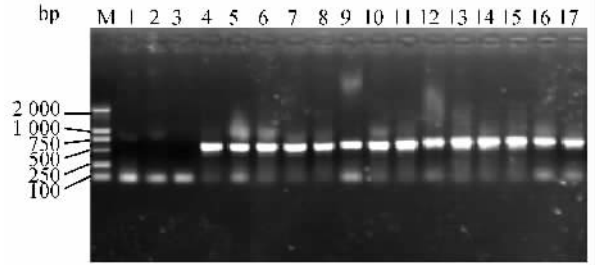
2.3 测序结果

通过对 pPgG-PrM 外源片段测序,结果测得 PrM 基因(含信号肽序列)cDNA 大小为 558 bp,与

已报道的 JEV SA14 强毒株和 SA14-14-2 疫苗株的核苷酸序列相比较^[4],其同源率为 100%。

2.4 重组病毒的鉴定

经 3 次空斑纯化,取重组病毒作模板进行 PCR 扩增,结果均能扩增出大小约 558 bp 的片段,与阳性对照大小一致,而 LacZ 基因的扩增为阴性,即表明获得了纯化的重组病毒,命名为 TK⁻/gG⁻/PrM⁺(图 4)。



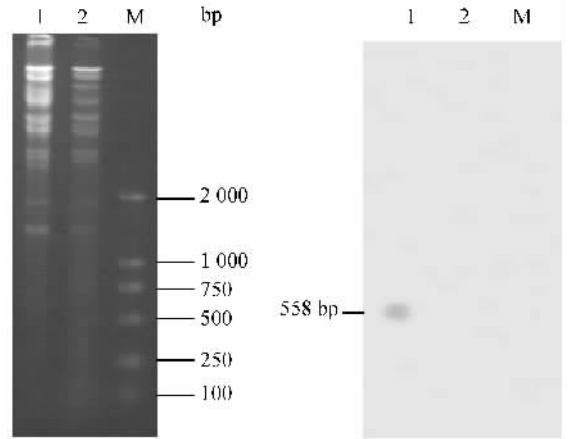
M, Marker DL2000; 1. TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ control; 2. PK-15 cell control; 3. H₂O control; 4. Positive control; 5-17. Samples

图 4 重组病毒的 PCR 鉴定

Fig. 4 Identification of the recombinant virus by PCR

2.5 重组病毒的 Southern 印迹检测

以 PrM 基因的 PCR 产物作探针,用地高辛标记试剂盒进行标记,标记探针与经 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切的重组病毒和载体病毒的基因组杂交。杂交结果显示重组病毒有一条大小约 558 bp 的杂交带,而载体病毒无杂交信号,与预期结果一致(图 5)。



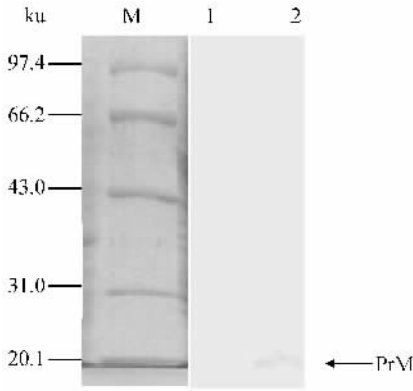
M, Marker DL15000; 1. Genome DNA of TK⁻/gG⁻/PrM⁺ (*Bam*HI / *Eco*RI); 2. Genome DNA of TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ (*Bam*HI / *Eco*RI)

图 5 重组病毒的 Southern 印迹鉴定

Fig. 5 Identification of recombinant virus by Southern blot

2.6 重组病毒表达外源蛋白的 Western blot 检测

用重组病毒接种 PK-15 细胞,待细胞出现 80% 病变后收获细胞,处理后进行 SDS-PAGE 电泳和转膜,用人抗 JEV 的特异性抗血清进行 Western blot 检测,结果表明 PrM 在重组病毒中获得了表达,表达的 PrM 蛋白约 19 ku,与预期结果一致(图 6),从而证实 JEV PrM 基因在伪狂犬病毒中获得了表达,其表达产物具有免疫学活性。



M. Protein molecular weight marker;

1. TK⁻/gG⁻/LacZ⁺; 2. TK⁻/gG⁻/PrM⁺

图 6 重组病毒的 Western 印迹鉴定

Fig. 6 Detection of expressed protein of viruses by Western blot

2.7 重组病毒在不同细胞上的增殖滴度

重组病毒在 IBRS-2、PK-15 和 CEF 上均能增殖,但其增殖滴度存在明显差异。在 IBRS-2 细胞上增殖滴度最高,其 TCID₅₀ 为 10^{-8.4}/mL,在 PK-15 和 CEF 细胞上其 TCID₅₀ 分别为 10^{-8.1}/mL 和 10^{-7.0}/mL,而测得亲本株在 IBRS-2 细胞上的 TCID₅₀ 为 10^{-8.3}/mL,表明重组病毒在 IBRS-2 细胞上的增殖滴度与亲本株相当,证明 JEV PrM 基因的插入不影响重组病毒的增殖。

2.8 重组病毒对 BALB/c 小鼠的安全性及免疫性试验

2.8.1 重组病毒对 BALB/c 小鼠的安全性试验

结果发现,接种重组病毒、载体病毒及空白对照的小白鼠无任何异常,而接种 PRV 鄂 A 强毒株的小白鼠于 1 周内全部死亡。

2.8.2 重组病毒对 BALB/c 小鼠的免疫性试验

结果发现,重组病毒和载体病毒均获得了 100% 保护,可以抵抗 PRV 鄂 A 强毒株的攻击,而空白对照组小白鼠攻毒后于 1 周内均死亡。经两次免疫后 TK⁻/gG⁻/PrM⁺ 产生的抗 JEV 抗体效价在 1 : 40

~1 : 160 (ELISA 抗体效价 ≥ 1 : 40, 判为阳性)。载体病毒和 DMEM 对照组 CTL 活性分别为 11.20% 和 8.68%,重组病毒的 CTL 活性为 28.43%。经统计分析,重组病毒与载体病毒和阴性对照组相比,差异均极显著 ($P < 0.01$)。

3 讨论

与已报道的 JEV SA14 强毒株和 SA14-14-2 疫苗株核苷酸序列比较发现 PrM 基因的同源性均为 100%^[9,10],表明 PrM 基因十分保守。

PrM 蛋白存在于感染细胞内未成熟毒粒中,被切割后形成 M 蛋白,参与病毒囊膜的构成^[11]。Bray 等研究认为 PrM 是病毒诱发保护性免疫的重要协同成分,抗 M 蛋白抗体对 JEV 具有轻度的中和作用^[12]。Atsushi 等用表达 PrM 蛋白的重组痘苗病毒免疫动物能诱导特异性抗体反应,并能抗致死性攻击^[13]。Konishi 等用表达 PrM 蛋白的重组痘苗病毒免疫猪能诱导特异性抗体反应^[11]。一些学者用构建含 JEV 不同基因的重组痘苗病毒免疫小鼠,结果发现不含 PrM 基因的重组病毒免疫动物无血凝抑制抗体,抗同种病毒的攻击能力差^[12,14]。

本研究所选用的载体病毒是 PRV Ea 株 TK⁻/gG⁻/LacZ⁺ 突变株^[7],经动物免疫试验证实其安全有效,因此可作为一个良好的病毒载体^[15]。gG 是 PRV 最强的启动子之一,最早由 van Zijl 等利用该启动子构建了表达猪痘病毒(HCV)囊膜蛋白 E1 的重组 PRV。动物免疫试验结果表明接种猪可同时获得对 PRV 和 HCV 的保护^[16]。本研究的动物试验结果表明该重组病毒免疫小白鼠能诱导抗 JEV 的特异性抗体和特异性细胞免疫应答,同时能抵抗 PRV 强毒的攻击。本研究为研制猪乙型脑炎-伪狂犬病二价基因工程疫苗提供了一个良好的重组病毒株。

参考文献:

- [1] Solomon T. Viral encephalitis in southeast Asia[J]. *Neurological infections and Epidemiology*, 1997, 2: 191~199.
- [2] Tsai T F. New initiatives for the control of Japanese encephalitis by vaccination: Minutes of a WH/CVI meeting[J]. *Vaccine*, 2000, 18: 1~25.
- [3] 俞永新. 流行性乙型脑炎的全球流行动态及控制策略[J]. *中国公共卫生*, 2000, 16: 567

- [4] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 北京:科学出版社, 1997. 998~1 008.
- [5] 白登云,陈伯权,俞永新. 虫媒病毒与虫媒病毒病[M]. 昆明:云南科技出版社,1995.
- [6] 方六荣,陈焕春,肖少波,等. 伪狂犬病毒 gG 缺失通用转移载体的构建[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(4):258~261.
- [7] 周复春. 伪狂犬病毒鄂 A 株基因缺失突变株的构建[D]. 武汉:华中农业大学,1998.
- [8] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 金冬雁,黎孟枫译. 北京:科学出版社,1992.
- [9] Nitayaphan S, Grant J A, Chang G J, *et al.* Nucleotide sequence of the virulent SA-14 strain of Japanese encephalitis and its attenuated vaccine derivative, SA-14-2[J]. *Virology*, 1990, 177(2):541~552.
- [10] 曾明,俞永新,董关木,等. 乙型脑炎病毒减毒活疫苗生产株 SA1-14-2 基因组全序列的测定[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(5):535~539.
- [11] Konishi E, Pincus S, Paoletti E, *et al.* A highly attenuated host range-restricted vaccinia virus strain, NY-VAC, encoding the PrM, E, and NS1, genes of Japanese encephalitis virus prevents JEV viremia in swine [J]. *Virology*, 1992, 190:454~458.
- [12] Bray M, Lai C J. Dengue virus premembrane and membrane proteins elicit a protective immune response[J]. *Virology*, 1991, 185:505~508.
- [13] Atsushi Y, Junko K K, Mami O, *et al.* Induction of protective immunity in animals vaccinated with recombinant vaccinia viruses that express PrM and E glycoproteins of Japanese encephalitis virus[J]. *Journal of Virology*, 1990, 64(6):2 788~2 795.
- [14] Mason P W, Steven P, Fournier M J, *et al.* Japanese encephalitis virus-vaccinia recombinants produce particulate forms of the structural membrane proteins and induce high levels of protection against lethal JEV infection[J]. *Virology*, 1991, 180:294~305.
- [15] 何启盖,方六荣,吴斌,等. 猪伪狂犬病基因缺失疫苗的制备、安全性、免疫原性,保存期测定及区域试验[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(10):1 055~1 063.
- [16] van Zijl M, Wensvoort G, de Kluyver E, *et al.* Live attenuated pseudorabies virus expressing envelope glycoprotein E1 of hog cholera virus protects swine against both pseudorabies and hog cholera[J]. *J Virol*, 1991, 65(5):2 761~2 765.

“免疫:控制禽流感的工具”国际科学大会

2007年3月20—22日“免疫:控制禽流感的工具”将在意大利维罗那召开,会议由OIE、FAO、IZSVe主办,欧盟支持并协助组织。大会的目标:交流关于禽流感免疫和贸易方面的标准、规则和指导方针;回顾在使用疫苗控制和预防禽流感方面的现行方法及近期经验;评估疫苗的需求及其流行病学、社会经济后果;交换现有疫苗的效率和发展以及疫苗与其他预防治疗方法联合应用等方面的科学信息;讨论实施免疫策略的决策过程;支持OIE-FAO的免疫策略。会议地点在维罗那市中心,会议注册费2007年2月16日前为300,00欧元,2007年2月16日后为400,00欧元,学生和陪同人员为75,00欧元。提交摘要截止期为2007年2月1日。更多信息请联系 Alejandra Balmont 女士, Tel: (33) 01 44. 15. 18. 88, Fax: (33) 01 42. 67. 09. 87, E-mail: a. balmont@oie.int。