



猪脾转移因子对 La Sota 株鸡新城疫弱毒疫苗的免疫增强作用

徐磊¹, 杨慧¹, 刘毅发¹, 杨子场¹, 闫丽萍², 苏雅君³, 刘小龙⁴, 宋素泉^{2*}, 张渊魁^{3*}, 黄瑜^{5,6*}

- 1 福建农业职业技术学院, 福建 福州 350119
- 2 南京农业大学动物医学院, 江苏 南京 210095
- 3 兆丰华生物科技(南京)有限公司, 江苏 南京 211102
- 4 派生特(福州)生物科技有限公司, 福建 福州 350500
- 5 福建省农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013
- 6 福建省禽病防治重点实验室, 福建 福州 350013

徐磊, 杨慧, 刘毅发, 杨子场, 闫丽萍, 苏雅君, 刘小龙, 宋素泉, 张渊魁, 黄瑜. 猪脾转移因子对 La Sota 株鸡新城疫弱毒疫苗的免疫增强作用. *微生物学报*, 2022, 62(2): 727–741.

Xu Lei, Yang Hui, Liu Yifa, Yang Ziyang, Yan Liping, Su Yajun, Liu Xiaolong, Song Suquan, Zhang Yuankui, Huang Yu. Immunoenhancement on Newcastle disease virus La Sota strain attenuated vaccine by pig spleen transfer factor. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 727–741.

基金项目: 福建省第七批引才“百人计划”; 福建省科技计划项目(2019N0025, 2021S2003); 江苏省博士后科研资助计划(2019K072); 福建省高层次人才和青年优秀人才访学研修资助计划(闽人社文〔2019〕239号); 福州市科技计划项目(2020-PT-149); 福建省畜禽疫病防控技术重大研发平台项目(2014N2003); 福建省禽病防治重点实验室开放基金课题(KF201902); 福建省家禽产业技术体系建设项目(2019-2022)

Supported by the Seventh Batch of Fujian Province “Hundred Talents Plan” for Talents Introduction, by the Science and Technology Planning Project of Fujian Province (2019N0025, 2021S2003), by the Jiangsu Planned Projects for Postdoctoral Research Funds (2019K072), by the Funding Scheme for Visiting and Studying High Level Talents and Outstanding Young Talents in Fujian Province (Fujian Provincial Department of Human Resources and Social Security Document [2019] 239), by the Science and Technology Planning Project of Fuzhou (2020-PT-149), by the Major Research and Development Platform Project of Animal Disease Prevention and Control Technology in Fujian Province (2014N2003), by the Program of Fujian Provincial Key Laboratory for Avian Diseases Control and Prevention (KF201902) and by the Fujian Poultry Industry Technology System Construction Project (2019-2022)

*Corresponding authors. E-mail: SONG Suquan, suquan.song@njau.edu.cn, ZHANG Yuankui, Zhang.yuankui@qq.com, HUANG Yu, huangyu_815@163.com

Received: 3 July 2021; Revised: 29 September 2021; Published online: 26 October 2021

摘要:【目的】本文旨在研究猪脾转移因子(TF)对新城疫(ND)病毒弱毒疫苗 La Sota 株的免疫增强作用及机理,为兽医临床防控提供理论依据。【方法】以 4 种不同剂量 La Sota 疫苗株分别单独、与 TF 联合免疫 SPF 鸡,14 d 后以 ND 病毒(NDV)参考强毒 F₄₈E₉ 株(10^{4.7} ELD₅₀)进行攻毒,采用蛋白质芯片技术测定鸡外周血 IL-6、IL-10、IL-16 和 IL-21 浓度,并以血凝抑制(HI)试验和荧光定量 RT-PCR 方法分别检测鸡 ND HI 抗体效价和 F₄₈E₉ 株的病毒血症水平。【结果】攻毒保护试验表明,单独免疫 10^{5.17}、10^{4.17}、10^{3.17} 和 10^{2.17} EID₅₀ 剂量时疫苗攻毒保护率分别为 100%、55%、0% 和 0%,半数保护量(PD₅₀)为 12 023 EID₅₀;对应剂量联合免疫时疫苗攻毒保护率分别为 100%、75%、0% 和 0%,PD₅₀ 为 6 918 EID₅₀;对照组(非免疫有攻毒)和空白组(非免疫非攻毒)死亡率分别为 100% 和 0%。对 10^{4.17} EID₅₀ 免疫剂量进一步检测分析表明,免疫后,联合免疫鸡 IL-6、IL-10、IL-21 和 ND HI 抗体效价(log₂x)比单独免疫最多时分别提高了 254.95 pg/mL、62.10 pg/mL、1.51 pg/mL 和 2.6,其中 ND HI 抗体效价差异极显著($P < 0.01$);攻毒后,联合免疫鸡 IL-10、IL-16、IL-21 和病毒血症阳性率比单独免疫最多时分别降低了 428.61 pg/mL、167.81 pg/mL、1.48 pg/mL 和 20%,其中 IL-16、IL-21 差异极显著($P < 0.01$)。【结论】本文结果显示,TF 可提高 La Sota 株弱毒疫苗的免疫保护率及免疫后 IL-6、IL-10、IL-21 介导的免疫应答、ND HI 抗体效价,降低疫苗 PD₅₀ 及攻毒后 IL-16、IL-21 介导的炎症反应、IL-10 介导的免疫应答抑制作用、病毒血症。本文明确了 TF 对 La Sota 株弱毒疫苗具有较好的免疫增强作用,为疫苗免疫佐剂研发和 ND 防控提供参考。

关键词: 猪脾转移因子; 鸡新城疫弱毒 La Sota 株; 鸡新城疫强毒 F₄₈E₉ 株; 免疫保护率; 免疫增强作用

Immunoenhancement on Newcastle disease virus La Sota strain attenuated vaccine by pig spleen transfer factor

XU Lei¹, YANG Hui¹, LIU Yifa¹, YANG Ziyang¹, YAN Liping², SU Yajun³, LIU Xiaolong⁴, SONG Suquan^{2*}, ZHANG Yuankui^{3*}, HUANG Yu^{5,6*}

1 Fujian Vocational College of Agriculture, Fuzhou 350119, Fujian, China

2 College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

3 Zhaofenghua Biotechnology (Nanjing) Co., Ltd., Nanjing 211102, Jiangsu, China

4 Present (Fuzhou) Biotech Company Limited, Fuzhou 350500, Fujian, China

5 Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, Fujian, China

6 Fujian Provincial Key Laboratory for Avian Diseases Control and Prevention, Fuzhou 350013, Fujian, China

Abstract: [Objective] We evaluated the immunoenhancement effect and mechanism of pig spleen transfer factor (TF) on Newcastle disease virus (NDV) La Sota strain attenuated vaccine to provide a theoretical basis for the prevention and control of Newcastle disease (ND). [Methods] We inoculated La Sota strain alone and La Sota combined with TF into specific pathogen free (SPF) chickens at four different doses, and challenged SPF chickens by reference virulent NDV strain F₄₈E₉ (10^{4.7} ELD₅₀) 14 days post vaccination. In addition, we determined the concentrations of IL-6, IL-10, IL-16, and IL-21 in chicken peripheral blood by protein chip technology, the hemagglutination inhibition (HI) antibody titer by HI assay, and the viremia level of F₄₈E₉ by RT-PCR. [Results] The challenge test showed that the

protection rates of vaccination with La Sota strain alone at the doses of $10^{5.17}$, $10^{4.17}$, $10^{3.17}$, and $10^{2.17}$ EID₅₀ were 100%, 55%, 0%, and 0%, respectively, and the median protective dose (PD₅₀) was 12 023 EID₅₀. The protection rates of vaccination with La Sota strain combined with TF at the corresponding doses were 100%, 75%, 0%, and 0%, respectively, and the PD₅₀ was 6 918 EID₅₀. The mortality of control group (non-immunized but challenged) and blank group (non-immunized and non-challenged) were 100% and 0%. Upon vaccination at the dose of $10^{4.17}$ EID₅₀, the IL-6, IL-10, IL-21, and ND HI antibody titer (log₂x) of the chicken exposed to combined vaccination increased at most by 254.95 pg/mL, 62.10 pg/mL, 1.51 pg/mL, and 2.6 ($P<0.01$), respectively, compared with those in the chicken vaccinated with La Sota strain alone. After challenge, the IL-10, IL-16, IL-21, and the viremia levels in the chicken under combined vaccination decreased at most by 428.61 pg/mL, 167.81 pg/mL ($P<0.01$), 1.48 pg/mL ($P<0.01$), and 20%, respectively, compared with those in the chicken vaccinated with La Sota strain alone. **[Conclusion]** TF improves the immune protection rate of NDV attenuated La Sota strain vaccine, the immune response mediated by IL-6, IL-10, and IL-21, and the ND HI antibody titer. In addition, TF reduces the PD₅₀, the inflammatory responses mediated by IL-16 and IL-21, the inhibition of immune response mediated by IL-10, and the viremia after challenge. It is clear that TF has a good immunoenhancement effect on the La Sota strain attenuated vaccine, which will provide a reference for research and development of vaccine adjuvant as well as prevention and control of ND.

Keywords: pig spleen transfer factor; attenuated NDV strain La Sota; virulent NDV strain F₄₈E₉; immune protection rate; immunoenhancement effect

鸡新城疫(Newcastle disease, ND)是由 ND 病毒(ND virus, NDV)强毒株感染鸡引起的一种急性、烈性传染病,给世界养鸡业造成了巨大经济损失^[1]。NDV 属于副黏病毒科、正禽腮腺炎病毒属,只有 1 种血清型,但具有多种基因型,可分为 2 个大的谱系: I 类(Class I)和 II 类(Class II)。Class I NDV 主要为无毒和弱毒型。Class II NDV 主要有 I-IX 共 9 个基因型,且各毒株的毒力差异较大,其中, I 型主要为弱毒; II 型主要为强毒、中强毒和弱毒株; III 型至 IX 型主要为强毒和中等毒力^[1-2], NDV 经典强毒 F₄₈E₉ 株即为基因 IX 型^[3]。我国主要采用不同毒力的 NDV 弱毒疫苗和灭活疫苗防控 ND,其中使用最广泛的 La Sota 弱毒疫苗株为基因 II 型。我国主要流行的 NDV 基因型具有多样性,不同基因型毒株的生物学特性差异明显^[4-5]。基因组较高频率的自身变异、NDV 的多宿主特

性和疫苗的频繁使用等多种因素,导致了 NDV 的不断进化、毒力多样性和抗原性变异,我国个别地区还出现了新基因型^[6-7]。因此,NDV 新型疫苗及其免疫佐剂的研发是将来工作方向^[8-9]。

已有多种免疫佐剂用于增强 NDV 疫苗免疫效果的研究,其中,转移因子(transfer factor, TF)显示出了较好的免疫增效作用^[10-12]。TF 是由 T 淋巴细胞释放的一种细胞因子,由多肽和低聚核苷酸组成,分子量小于 5 kDa,不含蛋白,无种属特异性、无抗原性、无毒副作用,可以提高动物免疫功能和缓解机体免疫抑制^[13-15]。本课题组建立了具有自主知识产权的 TF 制备方法和检验技术^[16-17]。包括本课题组在内的许多学者,在 TF 提高 ND 抗体效价、淋巴细胞转化水平、巨噬细胞吞噬能力、T 淋巴细胞活力等免疫学指标方面开展了深入研究^[18-21],然而在 TF 提高 NDV 疫苗攻毒保护率及其作用机理

方面鲜有报道。

基于此, 为了进一步明确 TF 对 La Sota 株鸡新城疫弱毒疫苗的免疫增强作用及其机理, 本实验对 NDV La Sota 弱毒疫苗株与 TF 联合免疫后 NDV F₄₈E₉ 强毒株攻毒的免疫应答进行研究, 应用蛋白质芯片技术和血凝抑制 (hemagglutination inhibition, HI) 试验研究 La Sota 株感染后鸡外周血细胞因子浓度和 ND HI 抗体效价 ($\log_2 X$) 的动态变化规律, 并采用荧光定量 RT-PCR 方法检测 F₄₈E₉ 株攻毒后鸡病毒血症水平, 以期为 NDV 疫苗免疫机理研究、疫苗免疫佐剂研发和更有效预防 NDV 提供依据。

1 材料与方法

1.1 疫苗与病毒株

NDV La Sota 株弱毒疫苗 ($10^{7.17}$ EID₅₀/羽份) 由兆丰华生物科技(南京)有限公司提供, NDV F₄₈E₉ 株强毒^[3] ($10^{5.0}$ ELD₅₀/mL) 由福建省农业科学院畜牧兽医研究所提供。

1.2 主要试剂及仪器

Chicken Cytokine Array Kit 购自 Ray Biotech 公司, 标准 NDV HI 抗原 (La Sota 株) 购自中国兽药药品监察所, RNA 提取试剂盒购自凯杰生物工程(深圳)有限公司, 反转录试剂盒购自 GE 公司, Taq DNA 聚合酶购自 Promega 公司; Innoscan 300 动态激光共聚焦扫描仪购自 Innopsys 公司, CFX96 型荧光定量 PCR 仪购自 BioRad 公司, 动物饲养隔离器购自苏州市冯氏实验动物设备有限公司。

1.3 TF 制备

按照本课题组已授权发明专利制备猪脾 TF^[16-17]: 以健康猪脾脏为原料, 经匀浆、细胞破碎、分离、灭活、微滤、超滤后精制而成。经检验, 所制备 TF 的 pH 值、多肽含量、核糖含量和脱 E 受体法活力分别为 7.0 mg/mL、3.5 mg/mL、

72.0 μg/mL 和 15%, 细菌内毒素含量小于 10 EU/mL, 在 252 nm 波长处有最大吸收, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 比值为 2.23, 无菌检验、外源病毒检验、支原体检验、蛋白质定性检验、过敏反应检查、异常毒性检查、热原检验和安全检验均合格。

1.4 实验动物

SPF 鸡购自济南斯帕法斯家禽有限公司(许可证号: SCXK(鲁) 2018 0005)。动物实验在派生特(福州)生物科技有限公司实验动物使用许可实验室(许可证号: SYXK(闽) 2019-0006)开展, 并经过了其实验动物管理委员会及实验动物福利伦理委员会的审查, 开展动物实验的技术人员、饲养员均具有福建省实验动物从业人员岗位证书。SPF 鸡攻毒前在正压动物饲养隔离器中饲养, 并给予足够营养的饲料和清洁的饮水; 30 日龄免疫接种, 操作时温和保定, 善良抚慰, 减少应激反应; 44 日龄转至负压动物饲养隔离器中攻毒饲养, 转运输 SPF 鸡时给予舒适的环境, 避免拥挤, 试验结束时对存活鸡采用二氧化碳吸入窒息法进行安乐死。

1.5 TF 对 La Sota 株弱毒疫苗的免疫增强作用分析

选取 200 羽 SPF 鸡随机分为 10 组, 每组 20 羽, 分别为: 单独免疫组 1 与联合免疫组 1 (均点眼免疫 $10^{5.17}$ EID₅₀ La Sota 株弱毒疫苗)、单独免疫组 2 与联合免疫组 2 (均点眼免疫 $10^{4.17}$ EID₅₀ La Sota 株弱毒疫苗)、单独免疫组 3 与联合免疫组 3 (均点眼免疫 $10^{3.17}$ EID₅₀ La Sota 株弱毒疫苗)、单独免疫组 4 与联合免疫组 4 (均点眼免疫 $10^{2.17}$ EID₅₀ La Sota 株弱毒疫苗)、对照组 1 与空白组 1 (均不免疫), 同时, 4 个联合免疫组均肌肉注射 0.2 mL TF。免疫后 14 d, 4 个单独免疫组、4 个联合免疫组与对照组 1 均肌肉注射 0.5 mL (即: $10^{4.7}$ ELD₅₀) NDV F₄₈E₉ 株强毒, 并设立空白组 1 为非免疫非攻毒组, 见表 1。

表 1 实验设计

Table 1 Experimental design

Designation (n)	TF		La Sota strain attenuated vaccine		Virulent strain F _{48E9}	
	Dose/(mL)	Route	Dose/(EID ₅₀)	Route	Dose/(ELD ₅₀)	Route
Single vaccine group 1 (20)	0	/	10 ^{5.17}			
Single vaccine group 2 (20)	0	/	10 ^{4.17}			
Single vaccine group 3 (20)	0	/	10 ^{3.17}			
Single vaccine group 4 (20)	0	/	10 ^{2.17}			
Co-vaccination group 1 (20)			10 ^{5.17}	Eye-drop	10 ^{4.7}	i.m.
Co-vaccination group 2 (20)			10 ^{4.17}			
Co-vaccination group 3 (20)	0.2	i.m.	10 ^{3.17}			
Co-vaccination group 4 (20)			10 ^{2.17}			
Control group 1 (20)	0	/	0	/		
Blank group 1 (20)	0	/	0	/	0	/

“/” means untreated by the item.

每日观察临床症状至攻毒后 14 d, 剖检病死鸡和试验结束时存活鸡, SPF 鸡发病即判为不保护, 统计各剂量组 SPF 鸡的发病率和死亡率, 按 Reed-Muench 法计算半数保护量(median protective dose, PD₅₀)^[22]。

1.6 TF 增强 La Sota 株弱毒疫苗免疫效力的机理分析

选取 240 羽 SPF 鸡随机分为 4 组, 每组 60 羽, 分别为: 单独免疫组、联合免疫组、对照组与空白组, 其免疫及攻毒试验设计分别与单独免疫组 2、联合免疫组 2、对照组 1、空白组 1 一致, 并分别于免疫前 3 d、免疫后 7、14 d 以及攻毒后 1、3、7、14 d 依次抽取各组不重复的 5 羽 SPF 鸡(攻毒后优先抽取临床健康鸡), 经前翅静脉采集、分离血清进行 IL-6、IL-10、IL-16、IL-21 共 4 种细胞因子浓度、ND HI 抗体效价和攻毒后 NDV F_{48E9} 株的病毒血症检测, 并统计各组攻毒后的死亡率、发病率和保护率。

1.6.1 血清中 IL-6、IL-10、IL-16 和 IL-21 含量测定

按照 Chicken Cytokine Array Kit 操作步骤进行, 采用动态激光共聚焦扫描仪读取荧光信号, 建立标准曲线, 计算样品 IL-6、IL-10、IL-16 和 IL-21 浓度。若细胞因子浓度低于阴性对照标准品的荧光信号而不可检出时, 本试验以 0 pg/mL 表示。所得数据用单因素方差分析和最小显著性差法(LSD)分析, $P < 0.05$ 为差异显著。

1.6.2 ND HI 抗体效价测定

ND HI 抗体效价测定按照中华人民共和国出入境检验检疫行业标准《新城疫检疫技术规范》(SN/T 0764-2011)进行^[23], HI 试验测定结果以 $\log_2 x$ 表示。

1.6.3 血清中 NDV F_{48E9} 株强毒的检测

依据课题组已建立的基因 IX 型 NDV 荧光定量 RT-PCR 检测方法^[24], 进行攻毒后血清中 NDV F_{48E9} 株的病毒血症检测, 简述如下。合成特异性引物序列(P1: 5'-AGGACACTGACTACT

TTG-3', P2: 5'-CCGATAATGGCACCTATA-3') 和 TaqMan MGB 探针 5'-CGT-CTCTGCCTCCT TCCTCC-3', 探针 5'端标记的荧光报告基因为 FAM, 3'端标记的荧光淬灭基因为 MGB, 扩增片段 113 bp。提取病毒核酸, 按照下述反应程序完成荧光定量 RT-PCR 检测: 42 °C 反转录 30 min; 92 °C 预变性 10 s, 45 °C 30 s, 72 °C 1 min, 5 个循环; 92 °C 10 s, 60 °C 延伸 30 s (此处收集荧光), 40 个循环。

2 结果与分析

2.1 TF 对 La Sota 株弱毒疫苗的免疫增强作用

2.1.1 临床症状及攻毒保护率

免疫后, 各组鸡 TF 注射部位无局部不良反应, 且临床表现均正常。攻毒后, 单独免疫组 1 和联合免疫组 1 的鸡均无发病和死亡, 即全部鸡判为保护, 保护率为 100%。单独免疫组 2 共有 9 羽鸡于攻毒 2 d 后开始出现 ND 典型临床症状, 则 11 羽鸡判为保护, 即保护率为 55% (11/20); 其中 9 羽发病鸡中, 1 羽鸡于攻毒 10 d 后临床表现恢复正常, 余下 8 羽鸡于攻毒后第 3、4 和 5 天分别死亡 2、3、3 羽, 死亡率为 40% (8/20)。联合免疫组 2 共有 5 羽鸡于攻毒 3 d 后开始出现 ND 典型临床症状, 则 15 羽鸡判为保护, 即保护率为 75% (15/20); 其中 5 羽发病鸡中, 1 羽鸡于攻毒 9 d 后临床表现恢复正常, 余下 4 羽鸡于攻毒后第 4 d 和 5 d 分别死亡 3 羽、1 羽, 死亡率为 20% (4/20)。攻毒后, 单独免疫组 3 和 4、联合免疫组 3 和 4 的全部鸡均于攻毒 2 d 后开始出现 ND 典型临床症状, 即全部鸡判为不保护, 保护率均为 0%; 其中, 联合免疫组 3 和 4 最后病死鸡的日龄相比单独免疫组 3 和 4 分别延迟了 1 d, 单

独免疫组 3、联合免疫组 3、单独免疫组 4 和联合免疫组 4 鸡均全部死亡, 死亡时间分别集中在: 攻毒后 3 d 至 5 d、3 d 至 6 d、3 d 至 4 d、3 d 至 5 d, 即死亡率均为 100%。此外, 攻毒后对照组 1 开始出现临床症状和病死鸡的日龄最早, 分别为攻毒后第 1 天和第 2 天, 20 羽鸡均全部发病并死亡, 死亡时间集中在攻毒后 2 d 至 4 d, 即: 死亡率为 100% (20/20), 保护率为 0% (0/20)。试验中, 空白组 1 鸡均无发病、无死亡(图 1 和图 2)。

2.1.2 剖检变化及 PD₅₀

攻毒后, 各组病死鸡出现全身粘膜和浆膜出血, 心冠脂肪有针尖大小出血点, 脑部点状出血且有炎症, 肾脏出血、肿大, 肌胃角质层下有出血点, 气管和腺胃乳头出血, 腺胃粘膜水肿, 脾脏表面有白色坏死点, 嗦囊充满酸臭味的稀薄液体, 十二指肠弥漫性出血, 空肠与回肠有溃疡, 盲肠扁桃体枣核样坏死, 直肠出血、坏死, 泄殖腔粘膜出血等 ND 典型剖检病变。攻毒后, 单独免疫组 2 与联合免疫组 2 中各有 1 羽病愈鸡, 没有出现 ND 典型剖检病变, 仅十二指肠和腺胃乳头出现少量的出血点, 脾脏表面出现少量的白色坏死点。攻毒后 14 d, 剖检各组免疫保护鸡和空白组 1 鸡, 没有发现上述病变。

统计 NDV La Sota 株弱毒疫苗各不同剂量组的攻毒试验结果并计算 PD₅₀(表 2), 结果显示, 单独免疫组和联合免疫组中疫苗的一个 PD₅₀ 分别为 12 023 EID₅₀ 和 6 918 EID₅₀, 表示该 La Sota 株弱毒疫苗单独接种需要 12 023 EID₅₀ 可以使 50% 的鸡获得攻毒保护, 而与 TF 联合免疫仅需接种 6 918 EID₅₀ 即可使 50% 的鸡获得攻毒保护, 比单独免疫组中疫苗 PD₅₀ 减少了 42.5%。

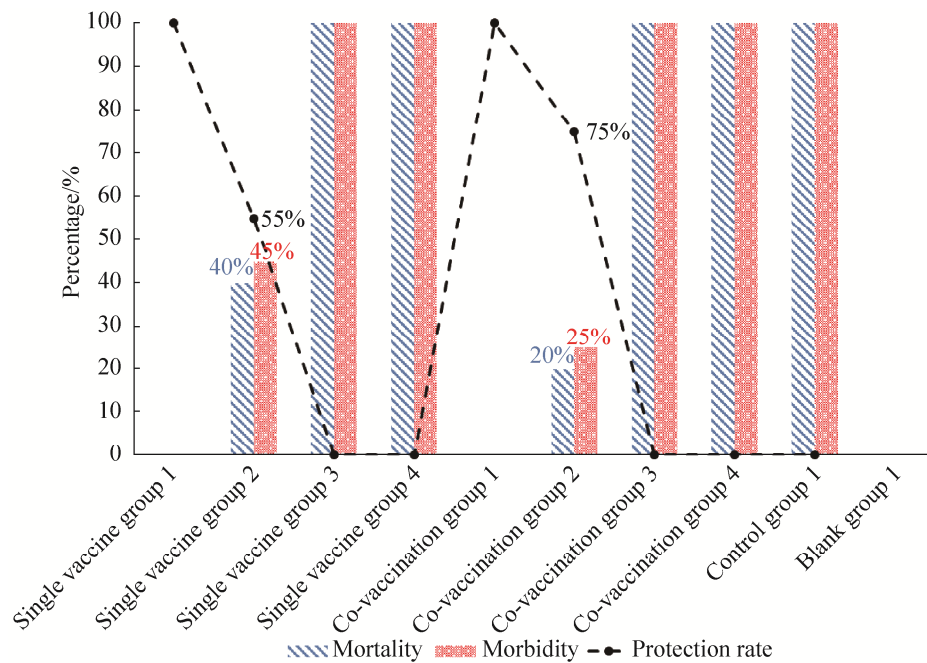


图 1 攻毒后各组的死亡率、发病率和保护率

Figure 1 The mortality, morbidity and protection rate of each group after challenge.

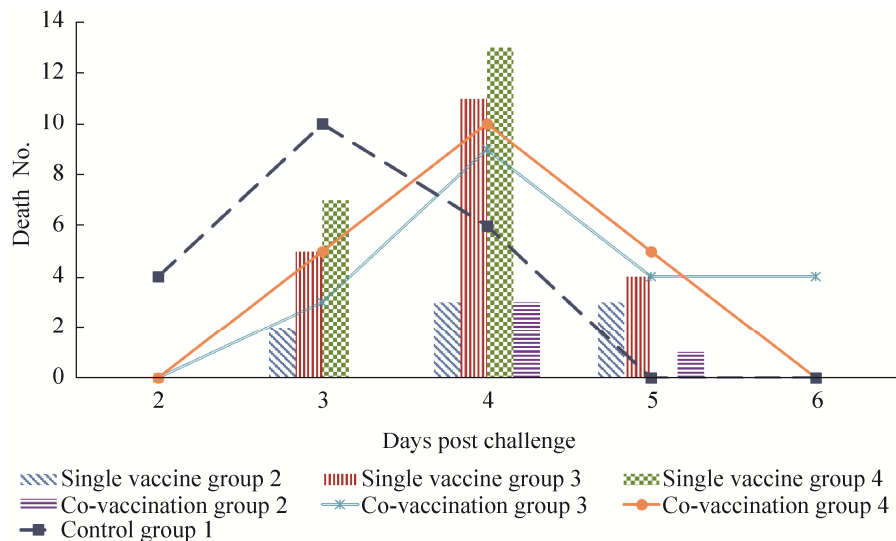


图 2 死亡数量和时间

Figure 2 Death No. and time.

2.2 TF 增强 La Sota 株弱毒疫苗免疫效力的机理

在 TF 增强 La Sota 株弱毒疫苗免疫效力的机理分析中, 单独免疫组、联合免疫组、对照组与空白组各有 60 羽鸡, 其免疫及攻毒试验设计分别与上述免疫增强作用分析中单独免疫组 2(20 羽鸡)、联合免疫组 2(20 羽鸡)、对照组 1(20

羽鸡)、空白组 1(20 羽鸡)一致, 试验结果如下。

2.2.1 攻毒保护结果

统计攻毒后各组的死亡率、发病率和保护率(图 3), 结果显示, 联合免疫组的死亡率、发病率和保护率分别为 25%、25%和 75%, 单独免疫组分别为 45%、45%和 55%, 对照组分别为 100%、100%和 0%, 空白组鸡无发病和死亡。

表 2 各组接种不同剂量 NDV 疫苗的攻毒试验结果

Table 2 Challenge test in each groups immunized with different doses of NDV vaccine

Groups	Inoculation dose		Observational results			Cumulative results		
	NDV vaccines/ EID ₅₀	TF/mL	Morbidity No.	Protection No.	Protection ratio	Morbidity No.	Protection No.	Protection rate/%
Single vaccine group 1	10 ^{5.17}	0	0	20	20/20	0	31	100
Single vaccine group 2	10 ^{4.17}	0	9	11	11/20	9	11	55
Single vaccine group 3	10 ^{3.17}	0	20	0	0/20	29	0	0
Single vaccine group 4	10 ^{2.17}	0	20	0	0/20	49	0	0
Co-vaccination group 1	10 ^{5.17}	0.2	0	20	20/20	0	35	100
Co-vaccination group 2	10 ^{4.17}	0.2	5	15	15/20	5	15	75
Co-vaccination group 3	10 ^{3.17}	0.2	20	0	0/20	25	0	0
Co-vaccination group 4	10 ^{2.17}	0.2	20	0	0/20	45	0	0

Single vaccine groups: distance ratio=(55%-50%)/(55%-0%)=0.09; lg PD₅₀=4.17+0.09×(-1)=4.08. Co-vaccination groups: distance ratio=(75%-50%)/(75%-0%)=0.33; lg PD₅₀=4.17+0.33×(-1)=3.84.

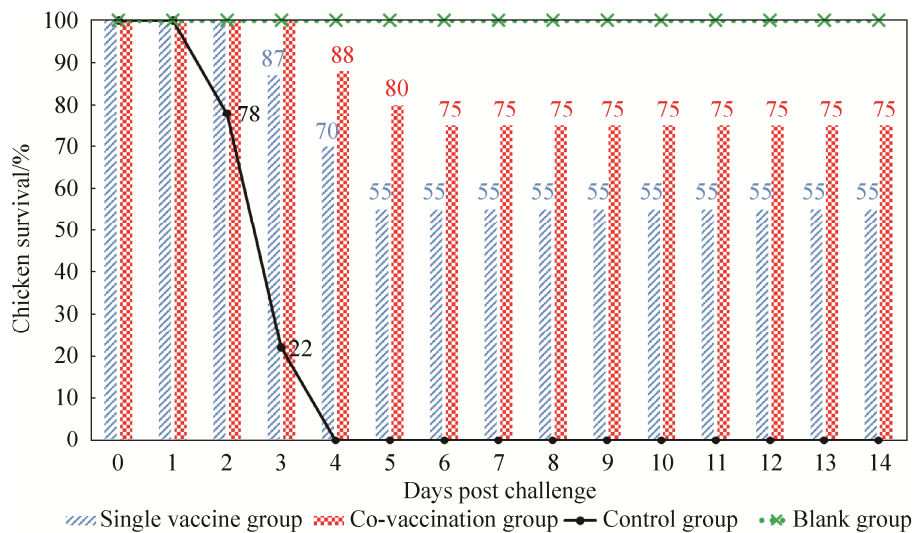


图 3 攻毒后各组试验鸡的存活情况

Figure 3 The survival chickens of each group after challenge.

2.2.2 IL-6 含量的变化

免疫前 IL-6 含量, 各组接近且差异不显著。免疫后, 联合免疫组与单独免疫组明显增加, 分别于攻毒后第 1 天和第 3 天达到峰值(1 178.31 pg/mL 和 956.63 pg/mL), 联合免疫组于免疫后第 7 天、第 14 天和攻毒后 1 d、7 d 高于其余组, 但差异不显著。攻毒后, 对照组明显增加, 于攻毒后第 3 天达到最高值(936.46 pg/mL), 此时对照组 IL-6 含量与联合免疫组、单独免疫组差异不显著, 但均极显著高于空白组($P<0.01$)。试验中, 空白组鸡 IL-6 含量稳定, 均值维持在 157.80 pg/mL 左右, 见图 4。

2.2.3 IL-10 含量的变化

免疫前 IL-10 含量, 各组接近且差异不显著。免疫后尤其是攻毒后, 联合免疫组与单独免疫组

明显增加, 均于攻毒后第 1 天达到峰值, 分别为 1 198.81 pg/mL 和 1 627.41 pg/mL, 联合免疫组于免疫后第 7 天、第 14 天高于其余组, 但差异不显著。攻毒后, 对照组明显增加, 于攻毒后第 1 天达到峰值(1 546.21 pg/mL), 此时对照组 IL-10 含量与联合免疫组、单独免疫组差异不显著, 但均极显著高于空白组($P<0.01$); 攻毒后第 3 天对照组 IL-10 含量(270.38 pg/mL)极显著高于其余组($P<0.01$), 而此时联合免疫组、单独免疫组与空白组差异不显著。试验中, 空白组鸡 IL-10 含量稳定, 均值维持在 15.40 pg/mL 左右, 见图 4。

2.2.4 IL-16 含量的变化

免疫前 IL-16 含量, 各组接近且差异不显著。免疫后第 14 天, 联合免疫组和单独免疫组

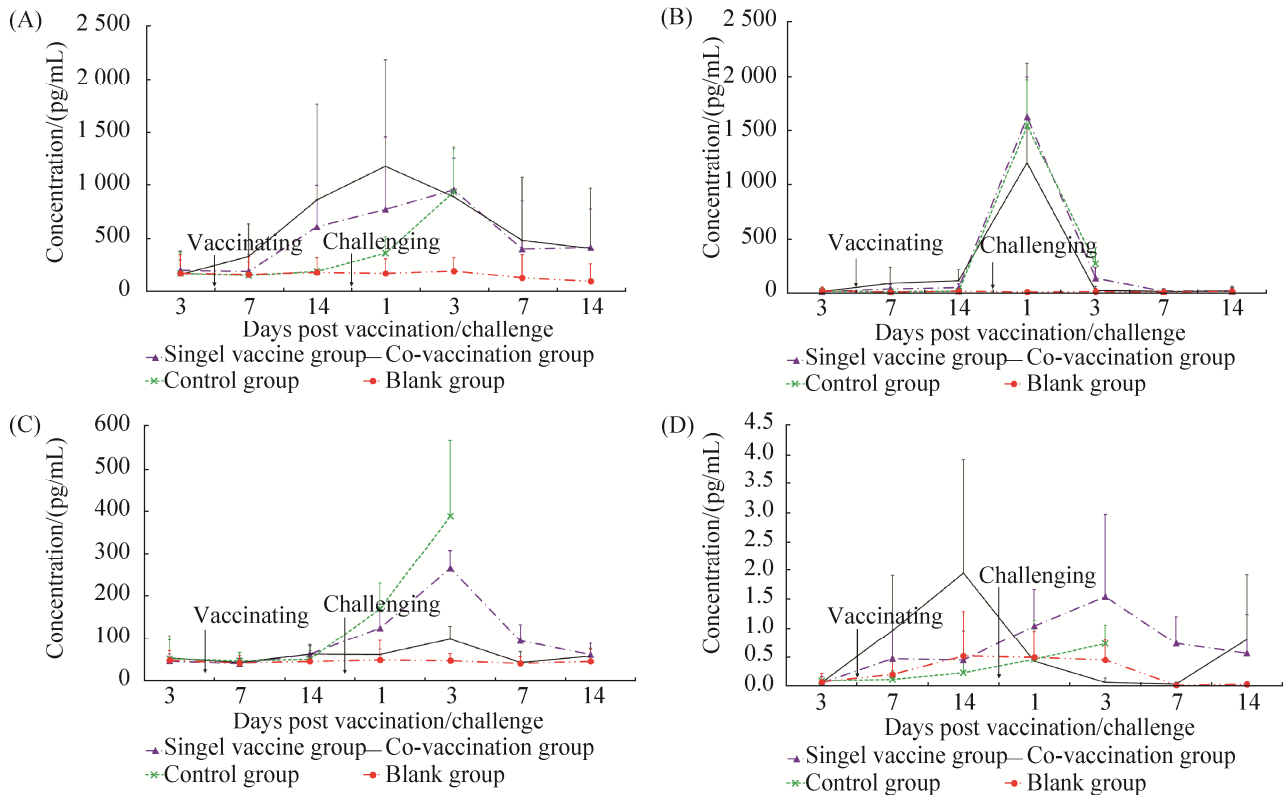


图 4 免疫或攻毒后各组实验鸡外周血 IL-6、IL-10、IL-16 和 IL-21 的变化

Figure 4 Levels of IL-6 (A), IL-10 (B), IL-16 (C) and IL-21 (D) in PBMC after vaccination or challenge. The standard deviation in the figure is the square root of the variance of the cytokine content in the group at each time point, reflecting the degree of dispersion between the cytokine content of individuals within the group at each time point.

IL-16 含量接近且略高于其余组, 但差异不显著。攻毒后, 联合免疫组、单独免疫组与对照组明显增加, 均于攻毒后第 3 天达到最高值, 分别为 97.25 pg/mL、265.06 pg/mL 与 388.39 pg/mL。其中, 攻毒后第 1 天和第 3 天单独免疫组与对照组极显著高于联合免疫组与空白组($P<0.01$), 攻毒后第 7 天单独免疫组显著高于联合免疫组与空白组($P<0.05$)。试验中, 空白组鸡 IL-16 含量稳定, 均值维持在 44.90 pg/mL 左右, 见图 4。

2.2.5 IL-21 含量的变化

免疫前 IL-21 含量, 各组接近且差异不显著。免疫后, 联合免疫组明显增加, 于免疫后第 14 天达到高值(1.94 pg/mL), 且于免疫后第 7 天、第 14 天高于其余组, 但差异不显著。攻毒后, 单独免疫组与对照组明显增加, 均于攻毒后第 3 天达到最高值, 分别为 1.54 pg/mL 与 0.72 pg/mL, 单独免疫组于攻毒后第 1、3 和 7 天均高于其余组, 其中, 攻毒后第 3 天单独免疫组显著高于联合免疫组与空白组($P<0.05$), 攻毒后第 7 天单独免疫组极显著高于联合免疫组与空白组($P<0.01$)。试验中, 空白组鸡 IL-21 含量稳定, 均值维持在 0.24 pg/mL 左右, 见图 4。

2.2.6 ND HI 抗体效价测定结果

免疫前, 各组 ND HI 抗体均不可检出。免疫后 ND HI 抗体效价, 联合免疫组和单独免疫组均明显增加, 均于第 7 天达到峰值, 联合免疫组(7 和 5.2)于第 7 天、14 天均高于单独免疫组(4.4 和 4), 分别提高了 2.6 和 1.2, 并于第 7 天差异极显著($P<0.01$)。攻毒后 ND HI 抗体效价,

表 3 各组的病毒血症占比

Table 3 Proportion of viremia in each group

Groups	Proportion of viremia			
	1 dpc	3 dpc	7 dpc	14 dpc
Single vaccine group	2/5 (40%)	1/5 (20%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
Co-vaccination group	1/5 (20%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)
Control group	5/5 (100%)	5/5 (100%)		
Blank group	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)	0/5 (0%)

“dpc” means days post challenge.

联合免疫组和单独免疫组于第 1 天均明显下降, 分别为 2 和 2.6; 但是, 均于 3 d 后明显增加, 其中, 联合免疫组(4.4、8.4 和 7.3)于第 3 天、7 天和 14 天均高于单独免疫组(3.8、8 和 6.6), 分别提高了 0.6、0.4 和 0.7, 但差异不显著。试验中, 对照组和空白组 ND HI 抗体均不可检出, 见图 5。

2.2.7 血清中 NDV F₄₈E₉ 株强毒的检测结果

攻毒后 NDV F₄₈E₉ 株强毒的病毒血症占比(表 3), 联合免疫组和单独免疫组均下降, 分别于第 3 天和第 7 天后降为 0%。其中于第 1 和 3 天, 联合免疫组(20%和 0%)比单独免疫组(40%和 20%)均减少了 20%。对照组最高, 第 1 和 3 天均达到 100%。而空白组为 0%。

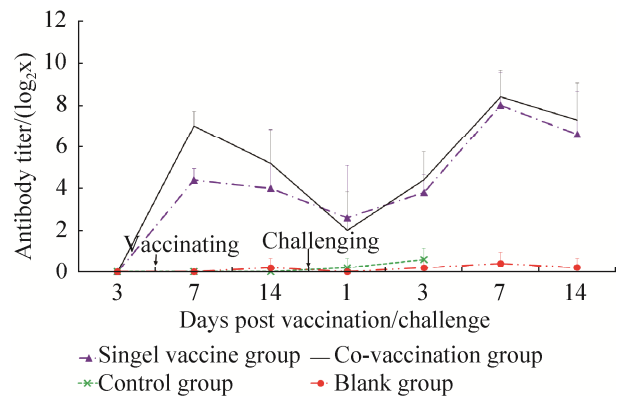


图 5 免疫或攻毒后各组 ND HI 抗体的变化

Figure 5 Levels of ND HI antibody after vaccination or challenge. The standard deviation in the figure is the square root of the variance of the ND HI antibody titer in the group at each time point, reflecting the degree of dispersion between the ND HI antibody titer of individuals within the group at each time point.

3 讨论

NDV 是一种持续进化的病毒, 先后出现了多个基因型。因免疫的日龄、剂量、途径以及攻毒的毒株、剂量、途径等的不同, La Sota 株弱毒疫苗免疫鸡对不同基因型 NDV 强毒株的攻毒保护结果不同^[25-26]。在本研究中, 点眼免疫 $10^{5.17}$ 、 $10^{4.17}$ 、 $10^{3.17}$ 和 $10^{2.17}$ EID₅₀ La Sota 株弱毒疫苗对 $10^{4.7}$ ELD₅₀ NDV F₄₈E₉ 株强毒的攻毒保护率, 单独免疫组分别为 100%、55%、0% 和 0%, 而联合免疫组分别为 100%、75%、0% 和 0%。其中, 免疫 $10^{4.17}$ EID₅₀ La Sota 株弱毒疫苗时与单独免疫组 2 的攻毒保护率(55%)相比, 联合免疫组 2 的攻毒保护率(75%)显著提高, 提高了 20%。结果还显示, 联合免疫组中疫苗 PD₅₀ 为 6 918 EID₅₀, 比单独免疫组中疫苗 PD₅₀(12 023 EID₅₀)减少了 42.5%, 表明与 La Sota 株弱毒疫苗单独免疫相比, 其与 TF 联合免疫时仅需 57.5% 的 NDV 病毒含量即可使免疫鸡获得相同的攻毒保护。这些表明, TF 可增强 La Sota 株弱毒疫苗的攻毒保护率。

20 世纪 80 年代起我国主要以全面免疫 NDV 疫苗防控 ND, 对控制 ND 流行发挥了关键作用。但是, 随后我国 ND 流行病学特点出现了新变化, 如: 非典型性 NDV 越来越普遍、多种基因型并存、免疫失败现象日益严重等^[1,7]。本研究观察攻毒后各组鸡临床表现和剖检变化, 结果显示, 免疫保护鸡均正常, 病死鸡呈现出 ND 典型临床和剖检变化, 单独免疫组 2 与联合免疫组 2 各有 1 羽病愈鸡临床症状典型而剖检病变不典型。其中, 攻毒后对照组 1 开始出现临床症状鸡(第 1 天)和病死鸡(第 2 天)的日龄最早; 相比单独免疫组 2, 联合免疫组 2 开始出现临床症状鸡和病死鸡的日龄推迟 1 d, 而病愈鸡提前 1 d 恢复正常; 相比单独免疫组 3

和 4, 联合免疫组 3 和 4 最后病死鸡日龄分别推迟 1 d。临床症状和剖检变化结果表明, TF 联合 La Sota 株弱毒疫苗联合免疫效果优于单独免疫。

TF 是一种安全的免疫制剂^[12-21], 本研究结果也验证了 TF 的安全性, 肌注后各组鸡临床表现健康。猪脾 TF 的原料为屠宰废弃物, 资源丰富。研究显示, TF 无种属特异性^[13-17], 鸡脾 TF 和猪脾 TF 均可增强鸡体免疫功能和鸡疫苗免疫效果^[18-21], 但鸡脾 TF 作用于鸡的效果会优于猪脾 TF^[10-11]。与此研究结果相似, 来源于鸡法氏囊的囊素与 La Sota 株弱毒疫苗联合免疫时攻毒保护率明显高于猪脾 TF, 而疫苗 PD₅₀ 则明显低于猪脾 TF(本课题组研究将另文报道)。囊素对 La Sota 株弱毒疫苗的免疫增强作用会明显高于猪脾 TF, 这些是否与免疫佐剂来源动物的种间差异有关需要进一步验证, 为疫苗佐剂的研发提供了参考。

在免疫应答和抗感染免疫反应过程中细胞因子发挥着重要作用, IL-6 与 IL-10 均属于 Th2 型细胞因子, 可促进体液免疫应答^[27-29]。IL-16 是 CD4⁺ T 细胞的刺激生长因子和趋化因子, 具有免疫调节作用, 可诱导 IL-2、IL-6 及 GM-CSF 等细胞因子的表达^[30]。IL-21 是由活化的 CD4⁺ T 细胞分泌产生的多功能生物学免疫调节因子, 可促进原始 CD4⁺ T 细胞向 Th1 和 Th17 细胞分化, 在促进机体由先天性免疫向获得性免疫的转变中发挥关键作用^[31]。本研究采用了蛋白质芯片技术测定上述细胞因子含量, 该技术是继以检测 RNA 和 DNA 为基础的基因芯片技术后又一项用于生命科学研究的技术平台, 其首先在载体(如固相支持物)表面固定大量高密度排列的蛋白探针点阵以制备成芯片, 然后将芯片和待检液体样品(体液、细胞和组织提取物)进行孵育反应, 反应后用相应的检测系统(如本

研究采用的动态激光共聚焦扫描仪)进行检测,通过计算机分析并获得相应蛋白质的表达情况,具有特异性强、敏感性高、重复性好、高通量、微型化、自动化等优点,被广泛应用于蛋白质组学研究、新药研发以及疾病临床诊断等多个生命科学领域,并形成了不同技术基础的蛋白质芯片,如:本研究采用的 Ray Biotech 公司基于多重夹心 ELISA 技术的微阵列蛋白质芯片、CIPHERGEN Biosystems 公司基于表面加强激光解吸电离-飞行时间质谱技术的化学型蛋白质芯片、Biochinoup 公司基于椭圆偏光学生物传感技术的光学蛋白质芯片^[32]。

本研究细胞因子检测结果显示,免疫后联合免疫组 IL-6、IL-10 和 IL-21 含量明显增加,并于免疫后 7 d、14 d 高于其余组,但差异不显著。其中,联合免疫组 IL-6 含量高峰值(1 178.31 pg/mL)出现时间(攻毒后 1 d)比单独免疫组和对照组(攻毒后 3 d)提前了 2 d,且峰值更高,比单独免疫组和对照组高峰值(956.63 pg/mL 与 936.46 pg/mL)分别提高了 221.68 pg/mL 与 241.85 pg/mL。而联合免疫组 IL-21 含量于免疫后第 14 天达到高峰值(1.94 pg/mL),比单独免疫组和对照组(攻毒后第 3 天)高峰值(1.54 pg/mL 与 0.72 pg/mL)分别提高了 0.4 pg/mL 与 1.22 pg/mL。而 IL-16 含量没有受 NDV La Sota 弱毒株免疫和 TF 肌注的影响,免疫后各组 IL-16 含量接近。表明 TF 可提高 NDV La Sota 弱毒株免疫后 IL-6、IL-10 和 IL-21 介导的免疫应答。

IL-6、IL-16 和 IL-21 均为促炎性细胞因子。其中,IL-6 可诱导产生急性期蛋白,引发急性期炎症应答反应。IL-16 可诱导炎症部位的 Th1 细胞的迁移、聚集和激活。IL-21 是触发、促进炎症反应并导致组织损伤的关键因子^[27-28,30-31]。在本研究中,攻毒后对照组 IL-6、IL-16 和 IL-21 含量明显增加。其中,IL-6 含量,攻毒后第 3 天

对照组与联合免疫组、单独免疫组差异不显著,但均极显著高于空白组($P<0.01$); IL-16 含量,攻毒后第 1 天和第 3 天单独免疫组与对照组极显著高于联合免疫组与空白组($P<0.01$),攻毒后第 7 天单独免疫组显著高于联合免疫组与空白组($P<0.05$); IL-21 含量,攻毒后第 3 天单独免疫组显著高于联合免疫组与空白组($P<0.05$),攻毒后第 7 天单独免疫组极显著高于联合免疫组与空白组($P<0.01$)。对照组鸡全部死亡前最后一个采血点(攻毒后第 3 天)的 IL-6、IL-16 和 IL-21 含量(936.46 pg/mL、388.39 pg/mL 与 0.72 pg/mL),分别是此时空白组(193.21 pg/mL、46.24 pg/mL 与 0.44 pg/mL)的 4.8 倍、8.4 倍与 1.6 倍。结果表明,IL-6、IL-16 和 IL-21 在 NDV F₄₈E₉ 株强毒诱导的炎症反应过程中发挥重要的作用,与其他学者研究结果一致^[33],TF 可降低 NDV F₄₈E₉ 株强毒攻毒后 IL-16 和 IL-21 介导的炎症反应。

IL-10 是细胞因子合成抑制因子(cytokine synthesis inhibitory factor, CSIF),对免疫应答主要起抑制作用,从而防止过度免疫应答所造成的损害^[29]。在本研究中,攻毒后 IL-10 含量,对照组、单独免疫组与联合免疫组明显增加,于攻毒后第 1 天即达到高峰值,攻毒后第 3 天仍分别达到 270.38 pg/mL、137.78 pg/mL 与 27.43 pg/mL,是空白组 IL-10 含量(15.34 pg/mL)的 17.6 倍、9.0 倍和 1.8 倍,此时对照组 IL-10 含量极显著高于其余组($P<0.01$),而联合免疫组、单独免疫组与空白组差异不显著。结果表明,TF 可降低 NDV F₄₈E₉ 株强毒攻毒后 IL-10 的免疫应答抑制作用,与其他学者研究结果不同^[34],这可能源于本研究采用的研究方法(La Sota 弱毒株免疫后 F₄₈E₉ 强毒株攻毒)不同。此外,IL-10 还是抗炎性细胞因子,可抑制活化的 T 细胞产生 IL-2、IFN- γ 等促炎性细胞因子,对炎症反应具有有限

制作用,在终止炎症反应过程中起重要作用^[29]。相比联合免疫组,攻毒后单独免疫组与对照组具有更高的 IL-10 含量,更有利于抵抗 IL-6、IL-16 和 IL-21 介导的炎症反应,但 IL-10 介导的免疫应答抑制作用会更强,其在 NDV F_{48E9} 株发病机理中的作用有待进一步研究。

ND HI 抗体效价在鸡攻毒保护中发挥重要作用^[35],本研究结果也印证了这一点:攻毒后联合免疫组和单独免疫组存活鸡均有较高的 ND HI 抗体效价,而对照组 ND HI 抗体始终不可检出。有学者研究显示,市售 NDV 弱毒疫苗在免疫 10⁻² 羽份时对部分 NDV 强毒株的攻毒保护率可到 90% 以上,并具有较高的 ND HI 抗体效价^[36]。在本研究中,免疫 10⁻³ 羽份(即:10^{4.17} EID₅₀)后,联合免疫组 ND HI 抗体效价(7 和 5.2)于第 7 天、第 14 天均高于单独免疫组(4.4 和 4),分别提高了 2.6 和 1.2,并于第 7 天差异极显著($P < 0.01$),表明 TF 可提高 NDV La Sota 弱毒株的 ND HI 抗体效价。

NDV F_{48E9} 株强毒攻毒后,不同免疫背景鸡的各部位中病毒载量变化不同^[37-38]。本研究中,攻毒后第 1 天联合免疫组与单独免疫组 NDV F_{48E9} 株的病毒血症占比分别为 20% 与 40%,这与攻毒后第 1 天两组的 ND HI 抗体效价明显下降(分别为 2 和 2.6)是否有关及其机理有待进一步研究。攻毒后第 1 天和第 3 天对比单独免疫组,联合免疫组 NDV F_{48E9} 株的病毒血症占比减少了 20%。结果表明,TF 与 NDV 弱毒疫苗 La Sota 株联合免疫可增强 ND 抗体水平,降低 NDV F_{48E9} 株强毒攻毒鸡的病毒血症。

4 结论

本研究通过攻毒保护试验、细胞因子浓度、ND HI 抗体效价和病毒血症水平测定,解析了 TF 对 La Sota 株 NDV 弱毒疫苗的免疫增强作用

及机理,揭示了 TF 可通过提高 NDV La Sota 弱毒株免疫后 IL-6、IL-10、IL-21 介导的免疫应答和 ND HI 抗体效价,以及通过降低 NDV F_{48E9} 强毒株攻毒后 IL-16、IL-21 介导的炎症反应、IL-10 介导的免疫应答抑制作用和病毒血症,进而提高 La Sota 株弱毒疫苗的免疫保护率和降低疫苗 PD₅₀。

参考文献

- [1] 胡顺林, 刘秀梵. 新城疫病毒的遗传进化. 生命科学, 2016, 28(3): 295–302.
Hu SL, Liu XF. The heredity and evolution of Newcastle disease virus. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2016, 28(3): 295–302. (in Chinese)
- [2] Miller PJ, Decanini EL, Afonso CL. Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infection, Genetics and Evolution*, 2010, 10(1): 26–35.
- [3] Qiu XS, Sun Q, Wu S, Dong L, Hu SL, Meng CC, Wu YT, Liu XF. Entire genome sequence analysis of genotype IX Newcastle disease viruses reveals their early-genotype phylogenetic position and recent-genotype genome size. *Virology Journal*, 2011, 8(1): 117.
- [4] Liu YQ, Sun CX, Chi MM, Wen HL, Zhao L, Song YY, Liu N, Wang ZY. Genetic characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus from China. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019, 75: 103958.
- [5] Dimitrov KM, Afonso CL, Yu QZ, Miller PJ. Newcastle disease vaccines—a solved problem or a continuous challenge? *Veterinary Microbiology*, 2017, 206: 126–136.
- [6] Wei TC, Deng QM, Zhai GS, He CW, Li HQ, Zhang YQ, Zeng RL, Mo ML, Huang T, Wei P. Re-emergence of a genotype VIII virulent Newcastle disease virus isolated from Chinese game fowl after 13 years. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(2): 1077–1084.
- [7] 刘华雷, 王志亮. 新城疫的流行历史与现状. 中国动物检疫, 2015, 32(6): 1–4.
Liu HL, Wang ZL. The history and current status of Newcastle disease. *China Animal Health Inspection*, 2015, 32(6): 1–4. (in Chinese)
- [8] Shahar E, Haddas R, Goldenberg D, Lublin A, Bloch I,

- Bachner HN, Pitcovski J. Newcastle disease virus: is an updated attenuated vaccine needed? *Avian Pathology*, 2018, 47(5): 467–478.
- [9] Ashraf A, Mahboob S, Andleeb R, Ijaz MU, Shah MS. Status updates of Newcastle disease and amelioration effects of medicinal plants against Newcastle disease virus: a review. *Acta Virologica*, 2018, 62(1): 3–15.
- [10] 田澍瑶, 杨雨, 胡玥, 武志伟, 张子卉, 袁艳阳, 李富桂. 15 种免疫增效剂对鸡新城疫免疫效果影响的对比研究. *天津农学院学报*, 2020, 27(1): 50–52, 57. Tian SY, Yang Y, Hu Y, Wu ZW, Zhang ZH, Yuan YY, Li FG. Comparative study of effect on immune efficiency to Newcastle disease with fifteen intensifiers. *Journal of Tianjin Agricultural University*, 2020, 27(1): 50–52, 57. (in Chinese)
- [11] 武志伟, 杨雨, 胡玥, 袁艳阳, 田澍瑶, 李富桂. 不同动物种类转移因子对家禽免疫效果影响的对比性研究. *黑龙江畜牧兽医*, 2020(9): 83–84, 88. Wu ZW, Yang Y, Hu Y, Yuan YY, Tian SY, Li FG. Comparative study of the effect on the immunity to poultry with transfer factors of different animal species. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2020(9): 83–84, 88. (in Chinese)
- [12] Macias AE, Guaní GE. Transfer factor: myths and facts. *Archives of Medical Research*, 2020, 51(7): 613–622.
- [13] Ferreira AO, Polonini HC, Dijkers ECF. Postulated adjuvant therapeutic strategies for COVID-19. *Journal of Personalized Medicine*, 2020, 10(3): 80.
- [14] Viza D, Fudenberg HH, Palareti A, Ablashi D, Vinci CD, Pizza G. Transfer factor: an overlooked potential for the prevention and treatment of infectious diseases. *Folia Biologica*, 2013, 59(2): 53–67.
- [15] Krishnaveni M. A review on transfer factor an immune modulator. *Drug Invention Today*, 2013, 5(2): 153–156.
- [16] 徐磊, 刘友霖. 猪疫苗特异性猪脾脏转移因子的制备方法及应用. 中国: 201310506686.7. 2015-05-13.
- [17] 徐磊. 禽疫苗特异性猪脾脏转移因子的制备方法及应用. 中国: 201310507478.9. 2015.07.08.
- [18] Kempová V, Zařovičová M, Kajanová I, Lenka LJ, Klimko L, Kopáček J, Zelník V. Obstacles and limitations of transfer factor biological activity assay design. *Acta Virologica*, 2020, 64(3): 271–275.
- [19] Ramaekers JC. Enhancement of immune response by transfer factor. USA: WO2012044960.A1. 2015-04-05.
- [20] 徐磊, 陈月香, 刘道泉, 邱艳红, 胡美华, 谭礼宁, 谢兆文, 刘友霖, 刘俊斌, 黄瑜, 朱国强. 猪脾转移因子增强几种重要禽疫苗免疫效果的测试研究. *中国兽医学报*, 2017, 37(10): 1944–1950. Xū L, Chen YX, Liu DQ, Qiu YH, Hu MH, Tan LN, Xie ZW, Liu YL, Liu JB, Huang Y, Zhu GQ. Test study on reinforcing immune efficacy of several important avian vaccine by porcine spleen transfer factor. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(10): 1944–1950. (in Chinese)
- [21] 徐磊, 陈月香, 刘道泉, 邱艳红, 刘俊斌, 刘友霖, 林伯全, 傅光华, 施少华, 黄瑜, 朱国强. 猪脾转移因子增强禽白血病毒 A/B 亚群抗体阳性鸡群免疫水平的研究. *中国预防兽医学报*, 2017, 39(8): 649–653. Xū L, Chen YX, Liu DQ, Qiu YH, Liu JB, Liu YL, Lin BQ, Fu GH, Shi SH, Huang Y, Zhu GQ. Study on reinforcing the immune level of ALV-A/B subgroup antibody positive chicken group by pig spleen transfer factor. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2017, 39(8): 649–653. (in Chinese)
- [22] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典三部 (2015 年版). 北京: 中国农业出版社, 2016.
- [23] 国家质量监督检验检疫总局. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准: 新城疫检验检疫技术规范 SN/T 0764—2011. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [24] 白泉阳, 傅光华, 程龙飞, 傅秋玲, 刘荣昌, 施少华, 陈红梅, 万春和, 林建生, 黄瑜. 鸭源基因 IX 型禽 1 型副黏病毒实时荧光定量 RT-PCR 方法的建立与应用. *中国兽医学报*, 2017, 37(10): 1868–1873. Bai QY, Fu GH, Cheng LF, Fu QL, Liu RC, Shi SH, Chen HM, Wan CH, Lin JS, Huang Y. Establishment and application of RT-PCR assay for detection of genotype IX avian paramyxovirus type 1 in duck. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2017, 37(10): 1868–1873. (in Chinese)
- [25] 王友令, 徐怀英, 李莉, 秦卓明. 新城疫 La Sota 疫苗对不同基因型流行株的免疫保护. *浙江农业学报*, 2009, 21(5): 446–449. Wang YL, Xū HY, Li L, Qin ZM. Immune protection of Newcastle disease La Sota vaccine on different genotypes of Newcastle disease isolates. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2009, 21(5): 446–449. (in Chinese)
- [26] 胡北侠, 杨少华, 许传田, 张琳, 黄艳艳, 张秀美. 新城疫 LaSota 活疫苗对基因 VII 型分离株的免疫保护性试验. *广东畜牧兽医科技*, 2012, 37(3): 34–35. Hu BX, Yang SH, Xū CT, Zhang L, Huang YY, Zhang XM. Immune protection assay of Newcastle disease live vaccine (LaSota strains) against a genotype VII NDV isolate. *Guangdong Journal of Animal and Veterinary Science*, 2012, 37(3): 34–35. (in Chinese)

- [27] Rose JS. Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2018, 10(2): a028415.
- [28] Tanaka T, Narazaki M, Masuda K, Kishimoto T. Regulation of IL-6 in immunity and diseases. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2016, 941: 79–88.
- [29] Bedke T, Muscate F, Soukou SW, Gagliani N, Huber S. IL-10-producing T cells and their dual functions. *Seminars in Immunology*, 2019, 44: 101335.
- [30] Cruikshank W, Little F. Interleukin-16: the ins and outs of regulating T-cell activation. *Critical Reviews in Immunology*, 2008, 28(6): 467–483.
- [31] Gharibi T, Majidi J, Kazemi T, Dehghanzadeh R, Motalebnezhad M, Babaloo Z. Biological effects of IL-21 on different immune cells and its role in autoimmune diseases. *Immunobiology*, 2016, 221(2): 357–367.
- [32] Gupta S, Manubhai KP, Mukherjee S, Srivastava S. Serum profiling for identification of autoantibody signatures in diseases using protein microarrays. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1619: 303–315.
- [33] 曾胜强, 冯泽清, 刘益平, 杨志勤. TLRs 信号通路和促炎症细胞因子基因在鸡胚成纤维细胞感染新城疫病毒过程中的表达分析. *四川农业大学学报*, 2014, 32(4): 436–441.
Zeng SQ, Feng ZQ, Liu YP, Yang ZQ. The induction of TLRs-mediated antiviral signaling pathway and inflammatory cytokine in chicken embryo fibroblasts infected with Newcastle disease virus. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2014, 32(4): 436–441. (in Chinese)
- [34] 余德勇, 董玉兰, 秦卓明, 李晶, 黄迪海, 杨昆鹏, 徐怀英, 陈耀星. 鸡脾转移因子对鸡肠道抗炎因子和致炎因子分泌的影响. *中国兽医杂志*, 2017, 53(2): 3–5.
She DY, Dong YL, Qin ZM, Li J, Huang DH, Yang KP, Xu HY, Chen YX. Effect of chicken spleen transfer factor on secretion of chicken's intestinal anti-inflammatory and pro-inflammatory cytokines. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2017, 53(2): 3–5. (in Chinese)
- [35] 林健, 刘月焕, 韩春华, 马明, 刘永宏, 潘洁. 新城疫疫苗对近年流行毒株的保护作用. *安徽农业科学*, 2009, 37(23): 11021–11022, 11028.
Lin J, Liu YH, Han CH, Ma M, Liu YH, Pan J. Protective efficacy of Newcastle disease vaccine against prevalent strains in recent years. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2009, 37(23): 11021–11022, 11028. (in Chinese)
- [36] 柴华, 宋扬, 李贽, 藏玉婷, 刘鑫莹, 李应鹤, 武啸. 鸡新城疫、禽流感(H9 亚型)、禽腺病毒(I 群, 4 型)三联灭活疫苗(La Sota 株+TJ 株+HY 株)抗体效价与鸡攻毒保护相关性试验. *饲料博览*, 2019(4): 30–32, 36.
Chai H, Song Y, Li Z, Zang YT, Liu XY, Li YH, Wu X. Correlation research of the antibody titer and virus attack protection of Newcastle disease, avian influenza (H9 subtype) and fowl adenovirus inactivated vaccine (strain La Sota+strain TJ+strain HY). *Feed Review*, 2019 (4): 30–32, 36. (in Chinese)
- [37] 毕友坤, 屈阳, 卫巧林, 王文彬, 赵杰, 金忠元, 张淑霞, 王兴龙, 杨增岐, 萧飒. 新城疫病毒强毒株 F₄₈E₉ 致病性细化分型的鉴定. *畜牧与兽医*, 2018, 50(2): 91–96.
Bi YK, Qü Y, Wei QL, Wang WB, Zhao J, Jin ZY, Zhang SX, Wang XL, Yang ZQ, Xiao S. Identification of pathogenic refined classification of the virulent strain F₄₈E₉ of the Newcastle disease virus. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2018, 50(2): 91–96. (in Chinese)
- [38] 石星明, 贺笋, 王玫, 杨桂花, 曾伟伟, 崔红玉, 童光志, 王云峰. 基因修饰的鸡新城疫病毒 HN 基因 DNA 疫苗免疫效力评价. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(10): 1526–1531.
Shi XM, He S, Wang M, Yang GH, Zeng WW, Cui HY, Tong GZ, Wang YF. Evaluation of immune efficacy with gene modified DNA vaccines based on HN gene of Newcastle disease virus. *Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 2009, 40(10): 1526–1531. (in Chinese)

(本文责编 张晓丽)