

doi:

共免疫对跳蚤叮咬引起的猫过敏性皮炎保护效果评价

赵 兵¹, 温良海¹, 刘正伟², 王 瀚¹, 张爱国¹, 李慧敏¹, 李延鹏², 陈瑞爱^{1,2*}

(1. 华南农业大学兽医学院, 广州 510642; 2. 广东温氏大华农生物科技有限公司, 广东新兴 527400)

[收稿日期] 2017-03-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 03-0000-00 [中图分类号] S852.55

[摘 要] 为评价共免疫 rFSA1 和 pVAX-FSA1 对于猫跳蚤过敏性皮炎(FAD)的预防免疫保护效果, 用人工合成的跳蚤唾液抗原(FSA1)基因, 分别构建原核表达质粒 pET28a-FSA1 和真核表达质粒 pVAX1-FSA1。pET28a-FSA1 转化 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 诱导表达纯化 FSA1, 获得 rFSA1。12 月龄以上猫共免疫 rFSA1+pVAX-FSA1, 第 14 天实施二免后, 进行跳蚤叮咬, 连续 4 轮, 跳蚤叮咬结束后, 统计皮炎评分。结果显示, 第 4 轮攻跳蚤后共免疫 rFSA1+pVAX-FSA1 组的猫皮炎评分远远低于 FAD 对照组, 说明共免疫 rFSA1+pVAX-FSA1 能抑制 FAD 症状, 对跳蚤叮咬猫引起的过敏性皮炎有显著保护效果, 可以作为预防猫跳蚤过敏性皮炎的良好办法。

[关键词] 共免疫; 跳蚤过敏性皮炎; 跳蚤唾液抗原

Evaluation of Protective Effect on Flea Allergy Dermatitis in Cats by Co-immunization of DNA and Protein

ZHAO Bing¹, WEN Liang-hai¹, LIU Zheng-wei¹, WANG Han¹, ZHANG Ai-guo¹, LI Hui-min¹,

LI Yan-peng², CHEN Rui-ai^{1,2*}

(1. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Guangdong Wen's Dahua Agricultural Biotechnology Co., LTD., Xinxing, Guangzhou 527400, China)

Corresponding author: CHEN Rui-ai, E-mail: chensa727@126.com

Abstract: This study evaluated the protective effect of immunoprophylaxis on flea allergy dermatitis in cats by co-immunization rFSA1 and pVAX-FSA1. The prokaryotic expression plasmids pET28a-FSA1 and eukaryotic expression plasmids pVAX1-FSA1 were constructed, respectively. PET28a-FSA1 was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) competent cells to induce expression and purification of FSA1 to obtain rFSA1. More than 12 months old cats were immunized with rFSA1+pVAX-FSA1, and received a second immunization after 2 weeks. After immunized, cats were challenged by fleas and sum of cat dermatitis scores were accounted for four times. The results showed that the co-immunization group dermatitis scores were very significantly lower than FAD control group at 4th flea challenge. It indicated that co-immunization of rFSA1+pVAX-FSA1 could inhibit the symptoms of FAD, and had a significant protective effect to FAD. It could be used as a good way of anti-flea allergic diseases.

Key words: co-immunization; flea allergy dermatitis; flea salivary antigen 1

作者简介: 赵 兵, 硕士研究生, 从事免疫抑制病的研究。

通讯作者: 陈瑞爱。E-mail: chensa727@126.com

猫桎首蚤分布很广,寄生于动物体表,以吸血为生,是对犬猫造成严重危害的蚤类。跳蚤过敏性皮炎(Flea allergy dermatitis, FAD)是由跳蚤叮咬吸血时引起动物的皮炎、剧烈瘙痒以及抓挠导致的二次感染的过敏性皮肤病^[1]。因此,对猫桎首蚤的防控及其导致的过敏性皮炎的防治显得尤为重要。

人们针对跳蚤叮咬引起犬猫过敏性皮炎的防治方法有多种。首先利用杀虫剂,宠物香波等进行动物除蚤,然后采用药浴、涂抹激素类药物等对症治疗,虽能取得一定的疗效,但是这种方法存在疗效差、激素类药物副作用大等缺点,而且当跳蚤侵扰时不能阻止跳蚤过敏性皮炎再次发生^[2]。也有人尝试免疫脱敏疗法,该方法通过反复接种过敏原,提高患病动物对变应原的耐受性,当动物再次接触过敏原时,机体会大大减少炎症介质的释放,从而减轻过敏性皮炎的发病程度,但该方法缺点是疗程长,可能会造成动物皮肤损伤甚至导致过敏性休克,效率也不稳定,重复性低^[3-4]。

研究表明过敏性疾病的发生与 Th1 向 Th2 漂移,Th2 处于优势地位有关^[5]。调节性 T 细胞可以通过细胞因子网络影响 Th1、Th2 的平衡^[6],对防止自身免疫性疾病发生,限制慢性炎症等具有重要作用^[7]。共免疫 rFSA1 和与之编码相匹配的质粒可以诱导一群诱导性调节性 T 细胞(induced Treg, iTreg),能够改善鼠和猫 FAD 的症状^[8-9]。研究评价了共免疫对猫 FAD 的预防保护效果,旨在了解共免疫是否能够有效预防过敏性疾病。

1 材料与方法

1.1 猫和跳蚤 45 只年龄大于 12 个月、体重超过 2 kg 的同一品种家猫购自北京市兴隆实验动物养殖厂,猫桎首蚤由中国疾病预防控制中心提供。

1.2 试剂与仪器 pET28a 载体,pVAX1 载体购自淼灵生物科技(武汉)有限公司,*E.coli* DH5 α ,*E.coli* BL21(DE3)感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司,限制性内切酶 EcoR I、Xho I、Xba I,DNA 连接酶,DL2000 DNA Marker,DL15000 DNA Marker 蛋白质分子质量标准,质粒抽提试剂盒等均购自宝生物工程(大连)有限公司;BCA 蛋白浓度

测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;脂质体转染试剂购自北京雷根生物技术有限公司;Ni-NTA 亲和层析柱填料购自北京诺博莱德科技有限公司;Biosafe150-96 超声波细胞破碎仪购自赛飞(中国)有限公司;NanoDrop[®] Lite 紫外分光光度计购自北京兰博康斯科技有限公司;诺普星购自诺华动物保健(上海)有限公司;鲎试剂购自湛江博康海洋生物有限公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.3 FSA1 基因与引物的设计合成 FSA1 基因与引物均由上海生工生物工程有限公司合成。参照 Genbank 数据库发表的 FSA1 基因序列(登录号为 AF102502),设计扩增 FSA1 基因的引物 P1、P2 和 P3,核酸序列如下 P1: 5'-CGGGAATTCATG-GAAGATATTTGG-3'; P2: 5'-CGGCTCGAGTTATT-TATTTTTTGG-3'; P3: 5'-GCCTCTAGATTATT-TATTTTTTGG-3'。P1 为上游引物带有 EcoR I 酶切位点,P2、P3 为下游引物分别带有 Xho I、Xba I 酶切位点。

1.4 FSA1 基因的克隆

1.4.1 原核表达质粒的构建及鉴定 以人工合成的 FSA1 基因为模板,以 P1、P2 为引物,PCR 扩增基因片段,克隆至原核表达载体 pET28a,并转化 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞,涂布于 LB 卡那抗性平板,挑取单菌落,EcoR I、Xho I 双酶切并测序鉴定,将鉴定正确的原核表达质粒命名为 pET28a-FSA1,重组菌命名为 BL-FSA1。

1.4.2 真核表达质粒的构建及鉴定 以 P1、P3 为引物,PCR 扩增基因片段,克隆至真核表达载体 pVAX1,并转化 *E.coli* DH5 α 感受态细胞,涂布于 LB 卡那抗性平板,挑取单菌落,EcoR I、Xba I 双酶切并测序鉴定,将鉴定正确的重组菌命名为 DH-FSA1。鉴定成功的 pVAX1-FSA1 参照脂质体转染试剂盒说明书转染 BHK 细胞,72 h 后收集细胞,提取细胞总 RNA,RT-PCR 鉴定 pVAX1-FSA1 在真核细胞中的表达。

1.5 共免疫疫苗的制备

1.5.1 rFSA1 蛋白制备与纯化 将重组菌 BL-FSA1 接种于含有卡那霉素的 LB 液中培养,待

OD600 值达到 0.6~0.8 时,将菌液分为 4 组,其中 3 组分别以 0.1 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L IPTG 浓度诱导,另一组不诱导作为对照,用 SDS-PAGE 法分析 4 h 后重组蛋白表达量。收集诱导表达的菌体,冰浴条件下进行超声波破碎,以 10000 r/min 离心包涵体 15 min,取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析。

收集包涵体,用 8 mol/L 脲过夜搅拌溶解包涵体,离心取上清液,通过 Ni-NTA 亲和层析柱分离目的蛋白,洗脱液(8 mol/L 脲、300 mmol/L KCl、50 mmol/L KH₂PO₄、500 mmol/L 咪唑、pH8.0)洗脱目的蛋白 FSA1,重组蛋白:0.5 mol/L 精氨酸以 1:20 (V:V)比例稀释复性,置于透析袋中透析 36 h,每 12 h 更换一次透析液(PBS)。利用曲拉通去除内毒素,将 10%曲拉通 X-114 按 1:4 体积比与 rFSA1/PBS 混匀,冰浴 10 min,然后 37 ℃水浴 15 min,10000 r/min 离心 15 min,吸出上层液,重复以上步骤 3 次,按照鲎试剂使用说明书检测溶液内毒素。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度后,于-70 ℃保存。

1.5.2 真核表达质粒 pVAX1-FSA1 的制备 将重组菌 DH-FSA1 接种于含有卡那霉素的 LB 液中,37 ℃过夜培养,按照文献^[7]所述方法制备质粒 pVAX1

-FSA1。去除质粒溶液内毒素并检测内毒素含量。用紫外分光光度计测定浓度,于-70 ℃保存。

1.6 免疫效力评价 45 只猫随机分为 5 组。共免疫组每只免疫 500 μg rFSA1 蛋白+500μg pVAX1-FSA1 质粒,载体对照组每只免疫 500 μg rFSA1 蛋白+500 μg pVAX1 空载体;蛋白对照组每只免疫 500 μg BSA 蛋白+500 μg pVAX1-FSA1 质粒,于腿部肌肉注射。二免后 14 d 开始攻跳蚤,每只猫每轮攻 100 只跳蚤(新羽化未吸血的成蚤),每次攻跳蚤 48 h 后,饲喂诺普星(有效成分:烯啶虫胺)除蚤,间隔 12 d 后开始下一轮攻蚤,总共攻四轮(攻 4 轮跳蚤后猫 FAD 皮炎评分能达到最高值,额外的轮数并不会增加皮炎评分分值)^[6]。FAD 对照组不免疫,采用相同的步骤攻四轮跳蚤和饲喂除蚤药,空白对照组既不免疫也不攻跳蚤,但是饲喂诺普星作为阴性对照。由专业的兽医人员给猫皮炎症状打分,评价共免疫对猫 FAD 的保护效果。本次实验在跳蚤活跃季节夏、秋季实施,所有猫饲养在铁笼里,笼具长 90 cm、宽 63 cm、高 82 cm,每日打扫猫的排泄物,给予干净的水和猫粮,以提供舒适的环境。空白对照组猫在隔壁笼舍饲养,所有笼舍通风良好。猫实验分组情况见表 1。

表 1 猫实验免疫分组

Tab 1 Dividing cats into five groups

组别 Groups	数量 Amounts	免疫用品 Immune supplies	免疫程序 Immune procedures	攻跳蚤 Challenge fleas	评分 Dermatitis scores
共免疫组	10	rFSA1+pVAX1-FSA1	连续 2 次肌肉注射,每次间隔 14 d,每次蛋白和质粒各注射 500 μg	二免后第 14 天攻跳蚤,每只猫攻 100 只跳蚤,攻跳蚤 48 h 后饲喂诺普星,每 14 d 一轮,攻 4 轮	每次攻跳蚤后第 3 天给猫皮炎症状评分
载体对照组	10	rFSA1+pVAX1			
蛋白对照组	10	BSA+pVAX1-FSA1			
FAD 对照组	10	-	-		
空白对照组	5	-	-	同时饲喂诺普星	同时皮炎评分

“-”代表不操作
"-" on behalf of not operating

FAD 症状主要包括丘疹、结痂、脱毛。每种皮损评分从 0 分至 3 分:0 分-没有发病症状;1 分-发病程度轻微;2 分-中等程度的发病;3 分-发病程度严重。各种皮损计分标准:丘疹 1~3 个计 1 分,4~

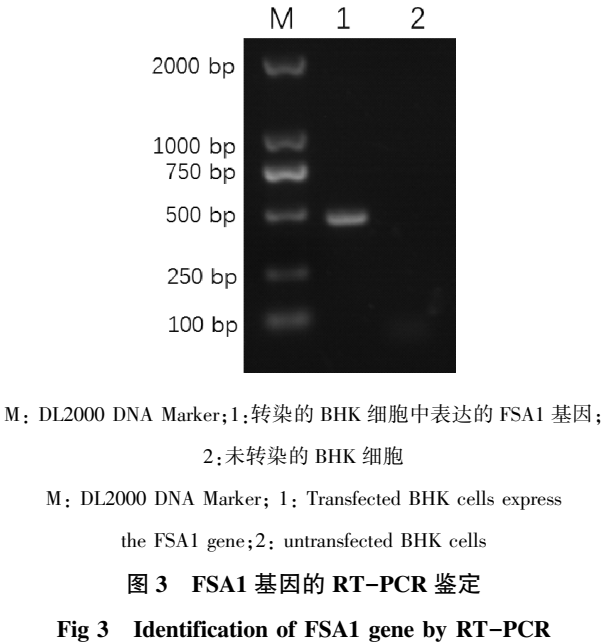
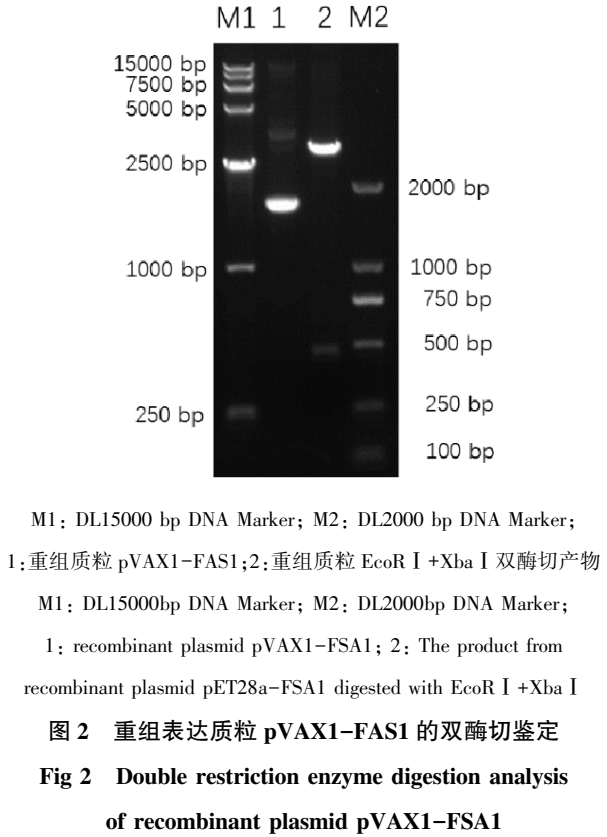
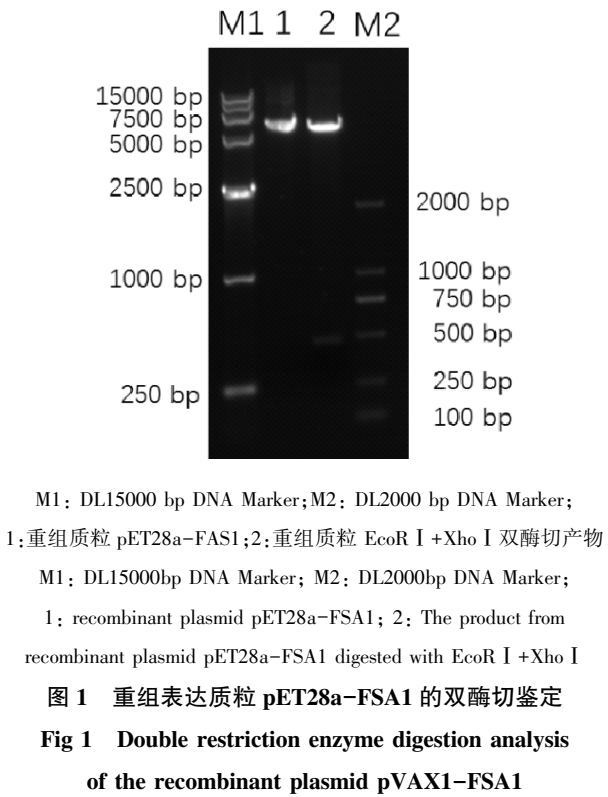
6 个计 2 分,7 个及以上计 3 分;脱毛面积大于或等于 1 cm² 且小于 4 cm² 计 1 分,大于或等于 4 cm² 且小于 9 cm² 计 2 分,大于或等于 9 cm² 计 3 分;结痂 1 个计 1 分,2 个计 2 分,3 个及以上计 3 分。有 3

个部位的症状需要被观察:(1)颈背部,从头顶到尾部的区域;(2)胸腔侧:从近肘部的胸腔到最后一根肋骨出的区域;(3)跳蚤三角区,动物下腹部和两条后肢根部组成的一个三角区。

关于皮炎计分标准是依据文献^[9]所述方法进一步细化得出的量化计分标准,有助于方便、准确评估 FAD 发病程度。

2 结 果

2.1 FSA1 基因的克隆及鉴定结果 FSA1 基因与原核表达载体 pET28a 连接后构建 pET28a-FSA1,质粒经 EcoR I +Xho I 双酶切可产生 5400 bp 左右的空载体条带和一条 480 bp 的目的条带(图 1);FSA1 基因与真核表达载体 pVAX1 连接构建 pVAX1-FSA1,质粒经 EcoR I +Xba I 双酶切可产生 3000 bp 左右的空载体条带和一条 480 bp 的目的条带(图 2)。pET28a-FSA1 与 pVAX1-FSA1 测序鉴定结果与预期相符。将 pVAX1-FSA1 转染 BHK 细胞,采用 RT-PCR 法测定重组质粒在 BHK 细胞中的表达,结果表明重组质粒 pVAX1-FSA1 转染后能在 BHK 细胞中稳定表达(图 3)。



2.2 共免疫疫苗的制备

2.2.1 蛋白制备 重组菌 BL-FSA1 经 IPTG 诱导后用 SDS - PAGE 检测,结果表明在 37 ℃、0.1 mmol/L IPTG 的条件下诱导 4 h 能大量表达重

组蛋白 rFSA1, 更高浓度的 IPTG 并不会增加目的蛋白的表达量(图 4)。

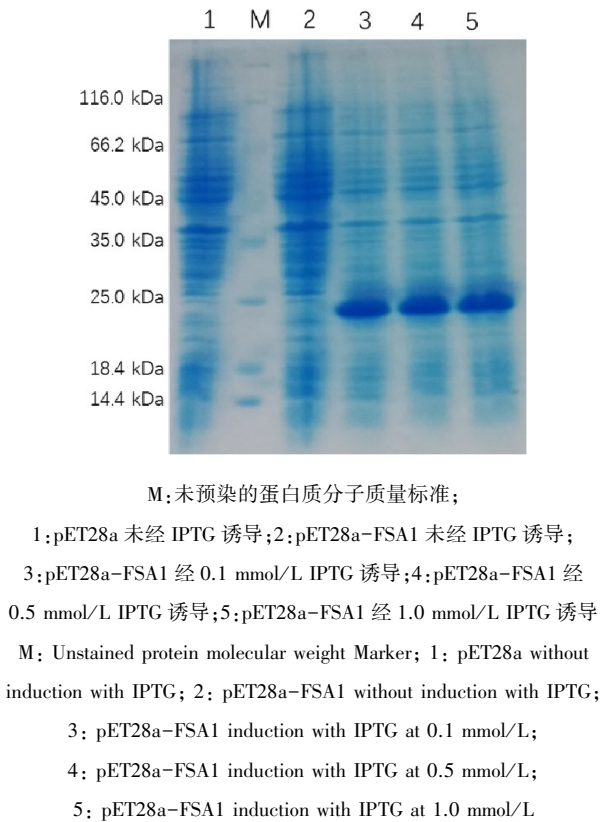


图 4 FSA1 基因诱导表达 IPTG 浓度的优化

Fig 4 Determination of induction IPTG concertration for FSA1 gene

收集裂解菌离心后的上清液和沉淀分别进行 SDS-PAGE, 可溶性分析表明 rFSA1 主要以包涵体形式存在; 重组蛋白溶液通过曲拉通去除内毒素后, 经鲎试剂检测内毒素含量 < 1.25 EU/mL; 重组蛋白溶液经 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定浓度为 0.5 mg/mL。

2.2.2 质粒制备 将按照文献^[10]中方法提取的质粒通过曲拉通去内毒素后, 鲎试剂检测其内毒素含量 < 1.25 EU/mL, 质粒溶液经紫外分光光度计测定浓度为 1.5 mg/mL。

2.3 皮炎评分结果 对各组猫每次攻跳蚤后第 3 天给猫进行 FAD 症状打分, 计算丘疹、脱毛、结痂各种皮炎总分。随着各组攻跳蚤的次数增多, 猫出现多处丘疹, 结痂, 脱毛等临床病症, 引起了严重的过敏性皮炎。FAD 对照组 (5.5 分) 在第 4 次攻跳蚤后皮炎评分达到最高值, 它与载体对照组 (5.7 分) 和蛋白对照组 (5.3 分) 得分接近。共免疫组第 4 次攻跳蚤后皮炎评分为 1.9 分, 与 FAD 对照组、载体对照组和蛋白对照组相比分值明显减小 (图 5)。以上结果说明对照组 rFSA1+pVAX1 和 BSA+pVAX1-FSA1 对猫 FAD 没有影响或影响较小。而共免疫 rFSA1+pVAX1-FSA1 能显著抑制猫 FAD, 因此可以成为预防猫 FAD 的候选疫苗。图 6 为猫 FAD 发病的典型症状。

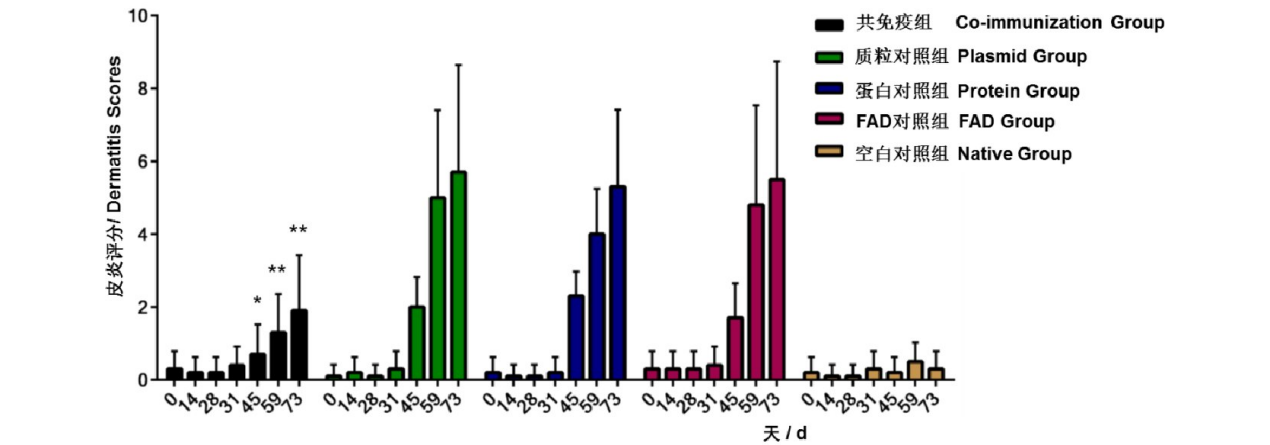


图 5 各组实验猫皮炎总评分

Fig 5 The total dermatology scores of five groups



图 6 猫 FAD 的典型症状

Fig 6 Typical symptoms of FAD in cats

3 讨论

调节性 T 细胞是一类具有调节其他免疫细胞功能的 T 细胞亚群。调节性 T 细胞有多种免疫调节机制,其中最重要的一种是通过分泌细胞因子发挥调节作用。研究人员发现共免疫可以诱导机体产生一群 CD4+CD25-Foxp3+Treg,这群 iTreg 具有对特异性抗原的反应性,分泌 IL-10 和 TGF- β 等抑制性细胞因子,抑制炎症 T 细胞^[8]。靳津在治疗猫 FAD 的实验中进一步证明了共免疫可以减弱猫对跳蚤提取物皮试反应、减少组织中肥大细胞的聚集和抑制 T 细胞增殖,这与机体中过敏相关细胞因子 IL-5 的分泌减少,抑制性细胞因子 IL-10 的分泌增加有关,从而改善了跳蚤过敏性皮炎的症状^[9]。除了细胞因子途径以外,Treg 还可以通过细胞溶解、代谢阻断、调节树突状细胞的成熟或功能发挥抑制作用。但目前尚不清楚共免疫诱导的 iTreg 调节免疫抑制是否有多种机制共同作用。据此我们推测,本研究利用共免疫预防保护猫 FAD 具有上述类似的抑制机理。

在观察猫 FAD 发病情况时,我们发现即使在相同的环境下诱导 FAD,猫 FAD 的发病程度也会存在差异。为了说明本实验猫的发病程度,将 FAD 对照组皮炎评分分值划为 4 个档次:0 分为不发病;1-3 分为发病轻微;4-6 分为中度发病;6-9 分为严重发病。FAD 对照组在攻完 4 轮跳蚤后有 6 只猫严重发病,有 1 只中度发病,有 2 只发病轻微,甚至还有 1 只没有任何症状。我们认为 FAD 组猫发病程度差异较大与猫对跳蚤的敏感性存在个体差异有关,即有的猫被少量跳蚤叮咬就能引起剧烈瘙

痒,产生明显的病症,但有的猫即使感染了大量跳蚤只表现出轻微病症甚至不发病。因此,人为诱导猫 FAD 发病是存在个体差异的,这与 Wilkerson M. J.诱导犬 FAD 的发病程度存在差异的情况类似^[11]。

本文提出的攻跳蚤和皮炎评分方法是由 Wilkerson M J 等^[11]建立并用于评价犬 FAD 发病程度,后来靳津等^[9]将这种方法优化后用于评价共免疫对猫 FAD 的治疗效果。在本研究中,我们按照同样的方法成功诱导了猫 FAD 并进行皮炎评分,通过四轮攻跳蚤后皮炎评分能达到最高值,该模型可以对共免疫预防猫 FAD 的效果进行客观评定。靳津通过建立猫 FAD 模型后,利用共免疫治疗猫 FAD,皮炎评分迅速下降,取得了显著治疗效果。在我们的试验中通过预先共免疫,再进行诱导猫 FAD,皮炎评分只是略微增加,远远小于 FAD 对照组的皮炎评分,证明了共免疫重组蛋白 rFSA1+质粒 pVAX1-FSA1 对猫 FAD 具有显著的预防保护效果。为了排除其他 DNA 和蛋白质组合诱导非特异性免疫抑制的可能性,我们增加了免疫 rFSA1+pVAX1、BSA+pVAX1-FSA1 的猫作为载体对照组和蛋白对照组,结果表明免疫非相关组合 rFSA1+pVAX1、BSA+pVAX1-FSA1 对猫 FAD 没有保护效果,只有共免疫 rFSA1+pVAX1-FSA1 才能对猫 FAD 起到保护作用,体现了该候选疫苗的特异性。然而共免疫组(1.9 分)与空白对照组(0.4 分)相比,仍有轻微的皮炎症状。对此,我们猜测可能与本研究的免疫方式或免疫剂量有关,在本研究中,我们是每 14 d 免疫一次,共免疫 2 次,每次 500 μ g

BSA+500 μg pVAX1-FSA1 于腿部肌肉注射,下一步,我们计划通过改进免疫方式、免疫剂量以期得到更好的保护效果。

本实验室首创利用共免疫生物制剂预防跳蚤过敏性皮炎,经实验证明能取得较好的预防效果,具有操作方便、疗程短的优点,且无副作用,是一个安全性高、具有抗原特异性的方法。总的来说,实验结果已表明了共免疫预防猫 FAD 的潜能,作为候选疫苗具有良好的开发应用前景。但如何提高共免疫的预防保护效果需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 麻 毅,姜志宽,韩招久.跳蚤的危害及防治研究进展[J].中华卫生杀虫药械,2004,10(6):385-388.
- Ma Y, Jiang Z K, Han Z J. Harm of fleas and its control development[J]. Chinese Journal of Hygienic Insecticides of Equipments, 2004, 10(6): 385-388.
- [2] 林德贵.犬猫皮肤病[A].第十一届全国养犬学术研讨会论文集[C].南昌:公安部南昌警犬基地.2005.
- Lin D G. Skin disease in cats and dogs[C]//Proceedings of the 11th National Kennel Symposium. Nanchang: Ministry of Public Security Nanchang Police Dog Base. 2005.
- [3] 早崎峰夫,王振杰.犬过敏性皮炎的自制蚤变应原脱敏疗法[J].国外兽医学(畜禽疾病),1995,16(1):20-23.
- Zaoqi F F, Wang Z J. The desensitization therapy for home-made fleas allergen on allergic dermatitis in dogs[J]. Progress In Veterinary Medicine, 1995, 16(1): 20-23.
- [4] 魏 琼.脱敏疗法的机制研究[J].大家健康,2013,(17):206.
- Wei Q. The mechanism study of desensitization therapy[J]. For Our Health, 2013, (17): 206.
- [5] 姚金晶,陈宜涛. Th1/Th2 平衡调节与疾病发生的研究进展[J].生物磁学,2009,9(13):2597-2600.
- Yao J J, Chen Y T. Advances of regulation Th1/Th2 type cytokines balance in human diseases[J]. Biomagnetism, 2009, 9(13): 2597-2600.
- [6] 肖玲莉,杨 毅. Th1/Th2 免疫应答失衡及其影响因素[J].国际儿科学杂志,2006,33(6):399-402.
- Xiao L L, Yang Y. The development of Th1/Th2 immune response disequilibrium and the influential factors[J]. International Journal of Pediatrics, 2006, 33(6): 399-402.
- [7] 程爱荣,程 焱,孙保亮.调节性 T 细胞及其免疫抑制机制[J].中国临床神经科学,2014,22(4):438-444.
- Cheng A R, Cheng Y, Sun B L. Regulatory T cells and its mechanism of immunosuppression[J]. Chinese Journal of Clinical Neurosciences, 2014, 22(4): 438-444.
- [8] Jin H, Kang Y, Zhao L, et al. Induction of adaptive T regulatory cells that suppress the allergic response by coimmunization of DNA and protein Vaccines [J]. The Journal of Immunology, 2008, 180: 5360-5372.
- [9] Jin J, Ding Z, Meng F X, et al. An immunotherapeutic treatment against flea allergy dermatitis in cats by co-immunization of DNA and protein vaccines[J]. Vaccine, 2010, 28(8): 1997-2004.
- [10] 谢振华,史小军,蔡国平.用于哺乳动物细胞转染的高纯度质粒 DNA 的制备[J].生物技术通讯,2007,18(5):803-805.
- Xie Z H, Shi X J, Cai G P. The preparation of highly purified plasmid DNA for mammalian cell transfections[J]. Letters In Biotechnology, 2007, 18(5): 803-805.
- [11] Wilkerson Melinda J, Bagladi-Swanson Mary, Wheeler David W, et al. The immunopathogenesis of flea allergy dermatitis in dogs, an experimental study[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2004, 99(3/4): 179-192.

(编辑:李文平)