

刘青涛, 卢凤英, 汪爱芬, 等. 耐热保护剂提高鸡新城疫 - 传染性支气管炎二联活疫苗保存效果研究[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(13): 152 - 157. doi: 10. 15889/j. issn. 1002 - 1302. 2021. 13. 030

# 耐热保护剂提高鸡新城疫 - 传染性支气管炎二联活疫苗保存效果研究

刘青涛<sup>1</sup>, 卢凤英<sup>1</sup>, 汪爱芬<sup>2</sup>, 尹秀凤<sup>2</sup>, 朱秀同<sup>3</sup>, 何平有<sup>3</sup>, 赵玉龙<sup>3</sup>, 朱晓玮<sup>2</sup>, 薛家宾<sup>1</sup>, 张小飞<sup>1</sup>

[1. 江苏省农业科学院兽医研究所/农业部兽用生物制品工程技术重点实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014;

2. 兆丰华生物科技(南京)有限公司, 江苏南京 211102; 3. 瑞普(保定)生物药业有限公司, 河北保定 071000]

**摘要:**为提高鸡新城疫 - 传染性支气管炎二联活疫苗的耐热性能, 根据前期研究设计了 3 个耐热保护剂配方, 比较不同配方对疫苗的抗原冻干损失、温度耐受性和保存期的影响。结果显示, 保护剂 TS11、TS37、TS51 所制备疫苗的抗原冻干损失均在 0.5 lg 以下, 相互之间差异不明显。但 TS37 所制备疫苗在 37 ℃ 和 45 ℃ 耐受后的抗原效价下降幅度明显低于 TS11 和 TS51, 这说明 TS37 具有更好的耐热保护效果。另外, 25 ℃、2 ~ 8 ℃ 保存试验显示, 配方 TS37 可使疫苗在室温下至少能保存 1 个月、冷藏条件下至少保存 27 个月而抗原含量和攻毒保护仍能达到质量标准要求。因此, 本试验研制成功针对鸡新城疫 - 传染性支气管炎二联活疫苗的耐热保护剂 TS37, 该保护剂可使疫苗实现 2 ~ 8 ℃ 下长期保存。

**关键词:**耐热保护剂; 鸡新城疫 - 传染性支气管炎二联活疫苗; 保存效果

**中图分类号:**S852.5      **文献标志码:**A      **文章编号:**1002 - 1302(2021)13 - 0152 - 05

鸡新城疫和传染性支气管炎是危害我国养鸡业的主要传染病<sup>[1]</sup>。鸡新城疫 - 传染性支气管炎二联活疫苗(La Sota + H120 株)是目前应用最广的鸡用活疫苗, 在预防鸡新城疫和传染性支气管炎中发挥了重要作用<sup>[2]</sup>。但目前国内该疫苗的生产采用以脱脂奶粉和蔗糖为主要成分的常规冻干保护剂, 疫苗必须在 -15 ℃ 以下冷冻保存<sup>[3]</sup>, 在储存、运输和使用过程中对冷链的要求高, 在临床上常常发生由于达不到冷链要求所导致的疫苗免疫失败<sup>[4]</sup>, 给我国养禽业造成巨大经济损失。而发达国家生产活疫苗普遍采用耐热保护剂技术, 疫苗只需在 2 ~ 8 ℃ 保存, 这方便了疫苗的保存和运输<sup>[5-6]</sup>。

耐热保护剂技术是高品质兽用活疫苗制造的关键工艺技术, 发达国家早在 20 世纪 80 年代就对该技术进行了研究, 并且仅被少数跨国巨头企业掌握, 一直处于保密状态<sup>[7-8]</sup>。虽然我们国家的兽用

生物制品厂也对该技术进行了大量研究, 但是由于技术封锁和起步较晚目前能用于规模化生产的兽用耐热保护剂活疫苗的种类还比较少<sup>[9]</sup>, 特别是能用于鸡新城疫、传染性支气管炎二联活疫苗(La Sota + H120 株)规模化生产的耐热保护剂技术仍然缺乏。为此, 笔者于 2005—2019 年在江苏省农业科学院兽医所和兆丰华生物科技(南京)有限公司针对该疫苗进行了耐热保护剂研究, 对耐热保护剂对疫苗的温度耐受性、保存期和免疫保护效果的影响进行了评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 制苗与检验用毒种 鸡新城疫病毒(La Sota 株)和传染性支气管炎病毒(H120 株)制苗用鸡胚液, 鸡新城疫病毒强毒(CVCC AV1611 株), 鸡传染性支气管炎病毒强毒(M41 株); 均由兆丰华生物科技(南京)有限公司提供。

1.1.2 主要试剂 谷氨酸钠, 购自国药集团化学试剂有限公司; 聚乙烯吡咯烷酮、明胶、蔗糖等, 购自 Sigma 公司。

1.1.3 鸡胚与实验动物 SPF 鸡胚, 购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司; SPF 鸡由 SPF 鸡胚

收稿日期: 2020 - 12 - 14

基金项目: 河北省重点研发计划项目(编号: 21322911D)。

作者简介: 刘青涛(1981—), 男, 山东滨州人, 博士, 副研究员, 主要从事家禽传染病致病机制与免疫防控技术研究。E-mail: taoqingliu2013@163.com。

通信作者: 张小飞, 博士, 研究员, 主要从事畜禽传染病及其防控技术研究。E-mail: xiaofei0804@sina.com。

孵化,在隔离器内饲养至 21 日龄用于试验。

## 1.2 方法

**1.2.1 耐热保护剂疫苗的制备** 在前期筛选的基础上,用谷氨酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、明胶、蔗糖等基质,通过自主开发的“兽用疫苗耐热保护剂配方设计软件”获得 TS11、TS37、TS51 这 3 个保护剂配方。每个配方均有 A、B 这 2 个部分组成,A 部分主要为不耐热基质,过滤除菌;B 部分由耐热基质组成,高压灭菌;A 和 B 按体积比 1:4 混合即为耐热保护剂。耐热保护剂与鸡新城疫病毒 La Sota 株鸡胚液、鸡传染性支气管炎病毒 H120 株鸡胚液按体积比 1:1:1 进行混合,3 mL/瓶,分装至 7 mL 西林瓶,进行冷冻干燥。每个配方均制备 3 批疫苗,对疫苗的抗原冻干损失、温度耐受性和保存期等进行测定。

**1.2.2 冷冻干燥效果检验** 按照《中国兽药典》中质量标准的要求对疫苗的外观、真空度、剩余水分、纯净性、安全性和每羽份抗原含量进行检验和测定。

**1.2.3 温度耐受性评价** 将疫苗置 37 ℃ 7、10、15 d,45 ℃ 3、5 d 后,观察制品的外形并测定疫苗的抗原含量。

**1.2.4 保存期测定** 将疫苗置 25 ℃ 30 d 后进行病毒含量测定,同时用鸡进行效力检验。另外,将疫苗置 2~8 ℃ 条件下保存,分别于 3、6、9、12、18、24、27 个月后取出,进行病毒含量测定;其中保存 24、27 个月的疫苗,用鸡进行效力检验。

**1.2.4.1 鸡新城疫部分鸡效力检验方法** 采用 30 日龄的 SPF 鸡 15 羽,其中 10 羽各滴鼻接种疫苗 0.01 羽份,5 羽作为对照组,接种后 14 d,每羽鸡各肌肉注射鸡新城疫病毒强毒  $10^{4.0}$  ELD<sub>50</sub>,观察 14 d,对照鸡全部发病死亡,免疫鸡至少保护 9 羽,则鸡新城疫部分判为合格。

**1.2.4.2 鸡传染性支气管炎部分鸡效力检验方法** 采用 1~3 日龄 SPF 鸡 10 羽,每羽滴鼻接种疫苗 1 羽份,接种后 10 d,连同对照鸡 10 羽,用 10 倍稀释的鸡传染性支气管炎病毒强毒滴鼻,每羽 1~2 滴,观察 10 d,对照鸡至少发病 8 羽,免疫鸡至少保护 8 羽,则鸡传染性支气管炎部分判为合格。

## 2 结果与分析

### 2.1 冷冻干燥结果

根据《中国兽药典》中质量标准的规定对 3 种耐热保护剂所制备疫苗的各项指标进行测定,由表 1 可知,3 个保护剂配方所制备的 9 批疫苗的外形、剩余水分、真空度、纯净性和安全性检验均合格。由图 1 可知,3 个保护剂配方所制备疫苗的抗原含量均达到质量标准的要求(新城疫抗原 $\geq 6.0$  lg/羽份,传染性支气管炎抗原 $\geq 3.5$  lg/羽份)<sup>[3]</sup>,不同保护剂所制备疫苗的抗原冻干损失差异不明显,说明 3 种保护剂配方对鸡新城疫和传染性支气管炎疫苗抗原均具有良好的冷冻干燥保护效果。

表 1 各保护剂配方所生产疫苗的物理性状和病毒含量测定结果

配方	批次	物理外观	剩余水分	冻干前效价 (lg/羽份)		冻干后效价 (lg/羽份)	
				ND	IB	ND	IB
TS11	1101	疏松、柱形	1.51%	7.00	4.50	6.75	4.22
	1102	疏松、柱形	1.46%	7.17	4.38	7.00	3.83
	1103	疏松、柱形	1.55%	6.83	4.00	6.63	3.75
TS37	3801	疏松、柱形	1.71%	7.00	4.50	6.83	4.17
	3802	疏松、柱形	1.58%	7.17	4.38	7.17	4.00
	3803	疏松、柱形	1.69%	6.83	4.00	6.63	3.83
TS51	5101	疏松、柱形	1.63%	7.00	4.50	6.63	4.00
	5102	疏松、柱形	1.79%	7.17	4.38	6.83	3.83
	5103	疏松、柱形	1.82%	6.83	4.00	6.75	3.83

### 2.2 疫苗的温度耐受性测定结果

为比较 3 个配方对疫苗的耐热保护效果,将各批次疫苗分别置于 37 ℃ 和 45 ℃ 保存,保存一定时间后测定疫苗抗原效价,分析抗原损失情况。由表 2 可知,TS37 所制备的鸡新城疫疫苗在 37 ℃ 保存

7 d 后抗原效价仍然能达到《中国兽药典》中质量标准的要求( $\geq 6.0$  lg/羽份),而 TS11 和 TS51 所制备疫苗在 37 ℃ 保存 7 d 后抗原效价均下降到 6.0 lg/羽份以下;而对于抗原损失的统计分析结果(图 2)显示,TS37 所制备疫苗在 37 ℃ 和 45 ℃ 的抗原损失

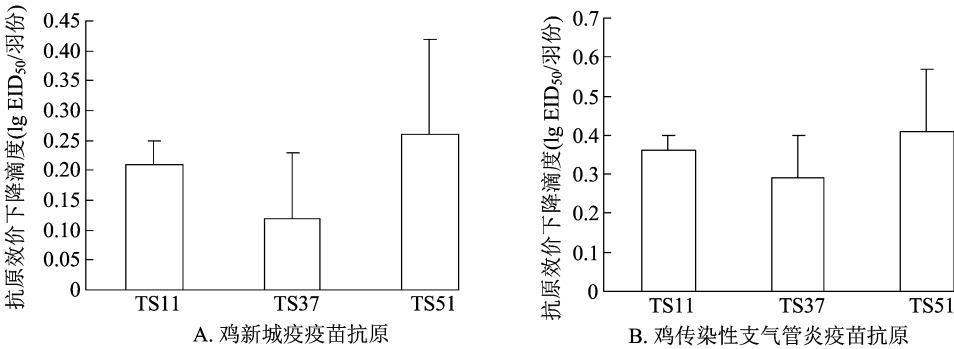


图1 不同保护剂所制备疫苗的抗原冻干损失

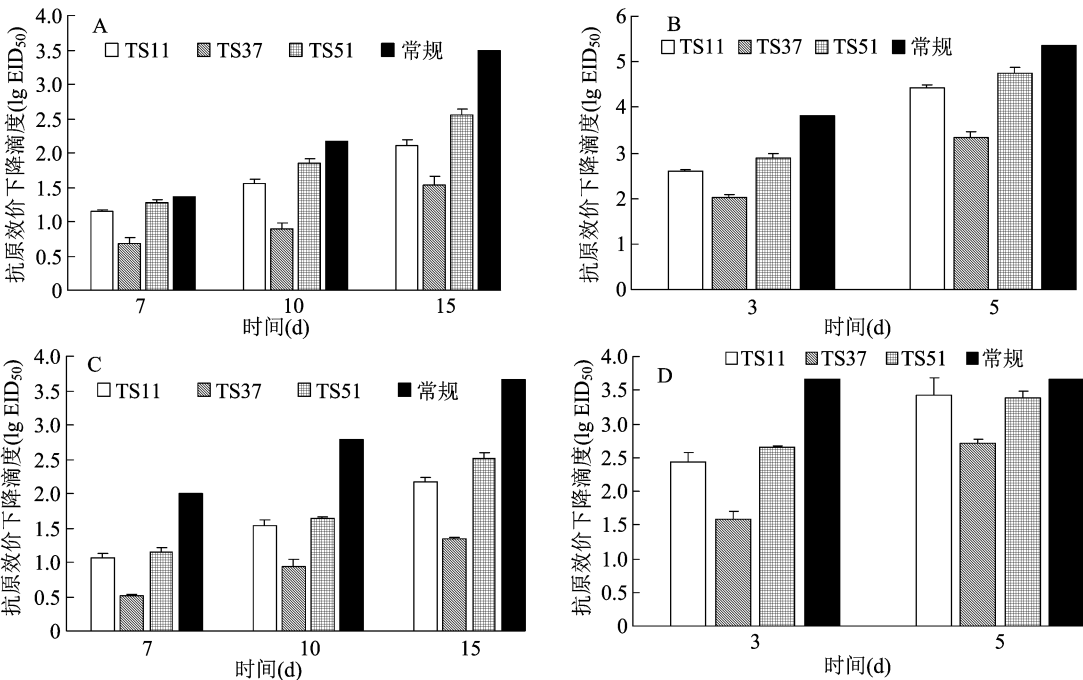
表2 不同耐热保护剂对鸡新城疫疫苗抗原的温度耐受性影响

配方	批次	抗原效价 (lg/羽份)				
		37 ℃			45 ℃	
		7 d	10 d	15 d	3 d	5 d
TS11	1101	5.63	5.22	4.63	4.17	2.38
	1102	5.83	5.50	4.83	4.38	2.50
	1103	5.50	5.00	4.63	4.00	2.17
TS37	3801	6.17	6.00	5.38	4.75	3.38
	3802	6.38	6.17	5.50	5.17	3.83
	3803	6.00	5.78	5.17	4.63	3.38
TS51	5101	5.38	4.83	4.17	3.83	1.75
	5102	5.50	5.00	4.22	4.00	2.17
	5103	5.50	4.83	4.17	3.75	2.00
常规保护剂		5.63	4.83	3.50	3.17	1.63

均显著低于 TS11 和 TS51 所制备疫苗,这说明配方 TS37 对新城疫抗原的耐热保护效果优于 TS11 和 TS51。由图 2、表 3 可知,TS37 所制备鸡传染性支气管炎疫苗在 37 ℃ 和 45 ℃ 的抗原损失均显著低于 TS11 和 TS51 所制备疫苗,这说明配方 TS37 对传染性支气管炎抗原的耐热保护效果也优于 TS11 和 TS51。

2.3 疫苗在 25 ℃ 的保存试验结果

为比较不同耐热保护剂配方在室温条件下对疫苗抗原的保护效果,将疫苗置于 25 ℃ 条件下保存 30 d,然后测定疫苗的抗原效价。结果(图 3)显示,配方 TS37 所制备疫苗在 25 ℃ 保存 30 d 鸡新城疫与传染性支气管炎疫苗抗原的含量均在 6.0 lg/羽份

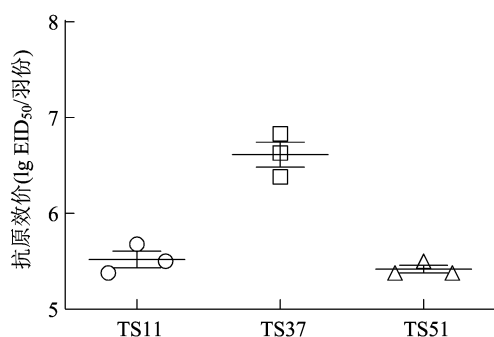


A、B 表示鸡新城疫疫苗抗原在 37、45 ℃ 保存条件下的抗原损失; C、D 表示鸡传染性支气管炎疫苗抗原在 37、45 ℃ 保存条件下的抗原损失

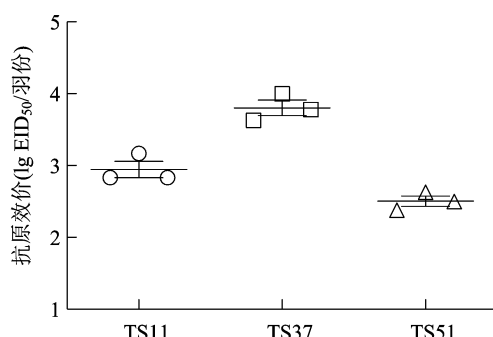
图2 不同保存条件下的疫苗抗原损失

表 3 不同耐热保护剂对鸡传染性支气管炎疫苗抗原的  
温度耐受性影响

配方	批次	抗原效价 (lg/羽份)				
		37 ℃			45 ℃	
		7 d	10 d	15 d	3 d	5 d
TS11	1101	3.17	2.63	2.00	1.63	<0.5
	1102	2.83	2.38	1.63	1.50	<0.5
	1103	2.63	2.17	1.63	1.38	<0.5
TS37	3801	3.63	3.17	2.83	2.50	1.38
	3802	3.50	3.17	2.63	2.38	1.32
	3803	3.32	2.83	2.50	2.38	1.17
TS51	5101	2.83	2.38	1.50	1.38	<0.5
	5102	2.63	2.22	1.22	1.17	<0.5
	5103	2.75	2.17	1.38	1.17	<0.5
常规保护剂		2.17	1.38	<0.5	<0.5	<0.5

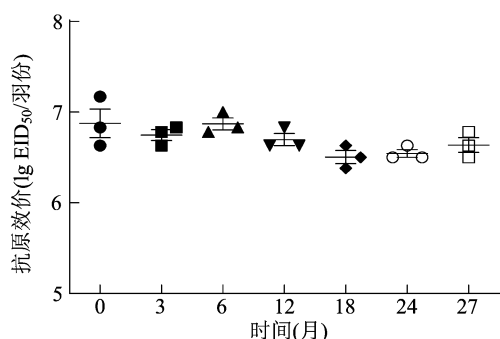


A. 鸡新城疫疫苗抗原测定结果

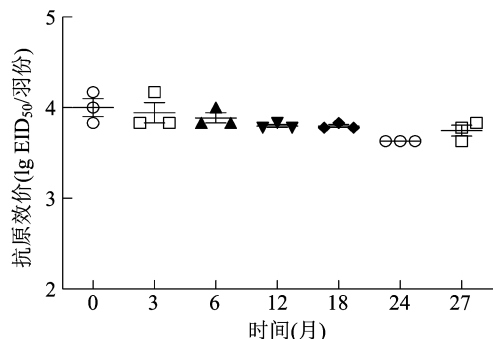


B. 鸡传染性支气管炎疫苗抗原测定结果

图3 疫苗 25 ℃ 保存 30 d 的抗原效价测定结果



A. 鸡新城疫疫苗抗原测定结果



B. 鸡传染性支气管炎疫苗抗原测定结果

图4 在 2~8 ℃ 条件下疫苗的保存期测定

可以保存 27 个月。

## 2.5 疫苗的攻毒保护效果测定

为进一步确定配方 TS37 在 25 ℃ 和 2~8 ℃ 条件下对疫苗的保护效果,对在 25 ℃ 保存 30 d 和 2~8 ℃ 保存 24、27 个月疫苗的免疫保护效果用攻毒试验进行了验证。由表 4 可知,采用 25 ℃ 保存 30 d、2~8 ℃ 保存 24、27 个月的疫苗接种鸡后可保护鸡抵抗新城疫和传染性支气管炎病毒强毒株的攻击。

和 3.5 lg/羽份以上,而配方 TS11 和 TS51 所制备疫苗的 2 种抗原含量均下降至 6.0 lg/羽份和 3.5 lg/羽份以下,这进一步说明配方 TS37 对鸡新城疫与传染性支气管炎疫苗抗原的耐热保护效果优于 TS11 和 TS51。

## 2.4 疫苗在 2~8 ℃ 的保存试验结果

基于疫苗的耐热效果评价结果,对配方 TS37 所冻干疫苗在 2~8 ℃ 条件下的保存期进行了测定。由图 4 可知,疫苗在 2~8 ℃ 条件下保存 12 个月鸡新城疫抗原效价未下降,18 个月后新城疫抗原效价虽然有所下降,但在保存 27 个月后疫苗抗原效价仍然高于 6.0 lg/羽份。而对传染性支气管炎抗原的测定结果显示,疫苗在 2~8 ℃ 条件下保存 27 个月后,抗原效价仍然高于 3.5 lg/羽份。以上结果说明,配方 TS37 所冻干的疫苗在 2~8 ℃ 条件下至少

这进一步说明,采用 TS37 所冻干疫苗在 25 ℃ 至少可以保存 30 d,在 2~8 ℃ 至少可保存 27 个月。

## 3 讨论

疫苗免疫是我国目前进行动物疫病防控的最有效手段,疫苗质量直接关系到我国动物疫病防控的效果<sup>[10]</sup>。但目前我国兽用疫苗企业所用的制造技术在先进性上与发达国家还存在一定差距,特别

表 4 攻毒保护试验结果

批号	保存温度	保存期	攻毒保护率			
			ND		IB	
			试验组	对照组	试验组	对照组
TS3701	25 ℃	30 d	10/10	0/5	9/10	0/10
	2 ~ 8 ℃	24 个月	10/10	0/5	9/10	0/10
	2 ~ 8 ℃	27 个月	10/10	0/5	10/10	1/10
TS3702	25 ℃	30 d	9/10	0/5	9/10	0/10
	2 ~ 8 ℃	24 个月	9/10	0/5	10/10	1/10
	2 ~ 8 ℃	27 个月	10/10	0/5	10/10	0/10
TS3703	25 ℃	30 d	9/10	0/5	10/10	0/10
	2 ~ 8 ℃	24 个月	10/10	0/5	10/10	0/10
	2 ~ 8 ℃	27 个月	10/10	0/5	9/10	0/10

是在兽用活疫苗耐热保护剂技术上差距巨大<sup>[7-9]</sup>。目前能用于规模化生产、推广的耐热保护剂活疫苗的种类并不多,并且主要集中在单苗,耐热保护剂多联活疫苗比较稀缺。对多个疫苗毒株能够同时提供保护的耐热保护剂一直是我国兽用疫苗制造行业难于突破的技术瓶颈。

本试验在前期研究的基础上设计了 3 个耐热保护剂配方,并比较了 3 个配方对鸡新城疫 - 传染性支气管炎二联活疫苗(La Sota + H120 株)的耐热保护效果。研究结果表明,配方 TS11、TS37、TS51 对鸡新城疫、传染性支气管炎抗原均具有良好的冻干保护效果,冻干过程中的抗原损失均比较低。但是配方 TS37 所制备的疫苗在耐受高温后的抗原效价下降滴度要明显低于配方 TS11、TS51,配方 TS37 具有更好的耐热保护性能。另外,在 25 ℃ 保存 30 d TS37 所制备疫苗的抗原效价仍然能达到质量标准的要求,这说明该保护剂配方在室温条件下对疫苗抗原具有很好的保护效果,这避免了疫苗在临床应用过程中的抗原损失,有效保证了疫苗的临床应用效果<sup>[10-11]</sup>。

活疫苗能够快速诱发动物体体的先天性免疫应答和获得性免疫应答<sup>[12-13]</sup>,并且可以选择多种接种途径(汽雾、饮水、滴鼻、点眼、注射等)进行免疫<sup>[14-17]</sup>,因此在动物疫病防控中发挥了不可或缺的作用。但利用常规保护剂生产的传统活疫苗必须在 -15 ℃ 以下保存,对冷链的要求非常严格,这大大限制了活疫苗的应用范围,并且常常由于保存、运输不当导致疫苗的抗原效价下降,从而引起免疫失败和疫病的流行。而本研究通过温度耐受性试验筛选出的配方 TS37 可以使鸡新城疫 - 传染性支气管炎二联活疫苗在 2 ~ 8 ℃ 条件下的保存期达到

27 个月,这降低了疫苗在保存、运输过程中对于冷链的要求,可促进兽用活疫苗的推广利用,降低免疫失败的发生率。另外,本研究中配方 TS37 所制备疫苗在 37 ℃ 保存 7 ~ 10 d,鸡新城疫和传染性支气管炎抗原的效价下降均在 1 lg 之内,因此我们可以把 37 ℃ 保存 7 ~ 10 d 作为疫苗保存期的一个快速测定方法。

综上所述,本研究中的耐热保护剂 TS37 可提高鸡新城疫 - 传染性支气管炎二联活疫苗的耐热性能,延长疫苗在室温条件下的保存期,使疫苗实现 2 ~ 8 ℃ 条件下的长期保存,这减少了疫苗在运输、储存、使用过程中的抗原损失,减少了疫苗免疫失败的发生,具有良好的应用前景。

参考文献:

[1]陈溥言,王川庆,姜 平,等. 家畜传染病学[M]. 6 版. 北京:中国农业出版社,2015:5 - 6.

[2]Ma X,Bi S,Wang Y,et al. Combined adjuvant effect of ginseng stem - leaf saponins and selenium on immune responses to a live bivalent vaccine of Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus in chickens[J]. Poultry Science,2019,98(9):3548 - 3556.

[3]高鸿宾,于康震,张仲秋,等. 中华人民共和国兽药典[M]. 北京:中国农业出版社,2015:81.

[4]Kartoglu U, Miltstien J. Tools and approaches to ensure quality of vaccines throughout the cold chain[J]. Expert Review of Vaccines, 2014,13(7):843 - 854.

[5]李丽琴,赵建增. 疫苗耐热保护剂的核心意义及应用[J]. 今日养猪业,2011(3):22 - 23,25.

[6]Brandau D T, Jones L S, Wiethoff C M, et al. Thermal stability of vaccines[J]. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003, 92(2): 218 - 231.

[7]Matthias D M, Robertson J, Garrison M M, et al. Freezing temperatures in the vaccine cold chain:a systematic literature review

田照辉,徐绍刚,董颖,等. 6 株芽孢杆菌的分离鉴定和生物学特性[J]. 江苏农业科学,2021,49(13):157-161.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2021.13.031

## 6 株芽孢杆菌的分离鉴定和生物学特性

田照辉,徐绍刚,董颖,胡红霞,王巍,东天,孙爱

[北京市水产科学研究所暨国家淡水渔业工程技术研究中心(北京)/渔业生物技术北京市重点实验室,北京 100068]

**摘要:**为了筛选适合渔用微生态制剂的益生菌,从池塘边发酵鱼肉汤中分离芽孢杆菌,结合形态学、生理生化特征、16S rRNA 及 *gyrA*、*gyrB*、*rpoB* 和 *purH* 基因序列比对分析对其进行鉴定,并对其产淀粉酶、产蛋白酶能力及生长情况进行研究。结果表明,分离筛选的 6 株芽孢杆菌分属于 4 个种,1 株为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),1 株为阿氏芽孢杆菌(*B. aryabhattai*),2 株为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*),2 株为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*),6 株菌在 LB 液体培养基中生长良好,均具有产蛋白酶能力,其中 4 株具有产淀粉酶能力。

**关键词:**芽孢杆菌;分离鉴定;生物学特性;产淀粉酶能力;产蛋白酶能力

**中图分类号:** S917.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2021)13-0157-05

一直以来,抗生素和药物残留是食品安全的重要威胁,2018 年农业农村部组织制定了《兽用抗菌药使用减量化行动试点工作方案》,推行减抗行动。微生态制剂能够提高动物的免疫力和生产性能,为绿色饲料添加剂,在水产养殖中,微生态制剂还能有效调控水质,是实现高效绿色养殖模式的有效措施之一<sup>[1]</sup>。

芽孢杆菌是一类重要的微生态制剂,可以形成芽孢,耐高温,具有较强的生存能力。在缺乏营养或不良环境时,芽孢杆菌可以生成芽孢来增强抗逆

性进入消化道,调节肠道菌群,抑制病原菌生长。芽孢杆菌还能促进机体免疫器官及组织的成熟,可以促进淋巴细胞数量增加,从而提高机体的体液免疫、细胞免疫水平,芽孢杆菌在动物、人体的微生态调节中得到了高度重视和广泛应用,是较好的微生态制剂菌种<sup>[2]</sup>。刘文亮等在饲料中添加蜡样芽孢杆菌投喂凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*),发现可以改变凡纳滨对虾的肠道微生物组成,提高其生长速度,增强其抗病能力<sup>[3]</sup>,将蜡样芽孢杆菌添加到凡纳滨对虾养殖水体中,可以提高凡纳滨对虾抗白斑综合征病毒(white spot syndrome virus, WSSV)和感染能力<sup>[4]</sup>。孙盛明等在饲料中添加枯草芽孢杆菌,发现能够提高团头鲂幼鱼的生长性能、抗氧化能力并改变其肠道菌群结构<sup>[5]</sup>。张欢欢等在生

收稿日期:2020-10-16

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-45-32)。

作者简介:田照辉(1973—),女,河北保定人,硕士,副研究员,从事水产健康养殖研究。E-mail: tzhui@126.com。

[J]. Vaccine, 2007, 25(20):3980-3986.

[8] Hansen L, Daoussi R, Vervaeke C, et al. Freeze-drying of live virus vaccines: a review[J]. Vaccine, 2015, 33(42):5507-5519.

[9] 沈咏舟,郑新勇,潘鑫. 我国家禽耐热型弱毒活疫苗的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2003, 31(4):593-595, 601.

[10] 朱云飞,胡信霞,林华,等. 影响兽用疫苗接种效果因素分析与对策[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2015(6):72-74.

[11] 钟声. 兽用疫苗冻干质量缺陷成因及其控制[J]. 江苏农业科学, 2001(5):57-59.

[12] Wang T T, Bournazos S, Ravetch J V. Immunological responses to influenza vaccination: lessons for improving vaccine efficacy[J]. Current Opinion in Immunology, 2018, 53:124-129.

[13] Amanna J J, Slifka M K. Contributions of humoral and cellular immunity to vaccine-induced protection in humans[J]. Virology, 2011, 411(2):206-215.

[14] Chhabra R, Forrester A, Lemiere S, et al. Mucosal, cellular, and humoral immune responses induced by different live infectious bronchitis virus vaccination regimes and protection conferred against infectious bronchitis virus Q1 strain[J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2015, 22(9):1050-1059.

[15] Raj G D, Jones R C. Cross-reactive cellular immune responses in chickens vaccinated with live infectious bronchitis virus vaccine[J]. Avian Pathology, 1997, 26(3):641-649.

[16] Winterfield R W, Seadale E H. Newcastle disease immunization studies I. Viability of Newcastle disease virus administered as a vaccine in the drinking water[J]. American Journal of Veterinary Research, 1956, 17(62):5-11.

[17] Papparella V, Modugno G, Quadri E. Immunization by aerosol with La Sota strain of Newcastle disease virus[J]. Avian Pathology, 1973, 2(3):231-233.