

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.01.02

# 一株鸡传染性喉气管炎病毒流行毒株的 鉴定与致病性分析

王静文,张敏,陈玲,杨承槐,蒋桃珍\*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2022-01-10 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 01-0012-07 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 为评价一株鸡传染性喉气管炎病毒流行毒株在疫苗效力评价中的应用表现,对制备的一株强毒株进行了系统鉴定,包括性状、纯净性、真空度、病毒含量、特异性等,尤其重点关注不同病毒含量对不同日龄鸡只的致病力情况。结果显示,本研究制备的鸡传染性喉气管炎病毒冻干物性状良好,无细菌、支原体和外源病毒污染,可被特异性血清完全中和,病毒含量稳定在  $10^{5.1}$  EID<sub>50</sub>/0.2mL。该毒株致病力表现稳定,100 EID<sub>50</sub>可使 80% 鸡只发病或死亡,可作为一株良好的检验用强毒,为后续疫苗评价奠定基础。

**[关键词]** 鸡传染性喉气管炎;疫苗;效力检验;检验用强毒

## Preliminary Research and Virulence Assessment on One Virulent Strain of Infectious Laryngotracheitis Virus

WANG Jing-wen, ZHANG Min, CHEN Ling, YANG Cheng-huai, JIANG Tao-zhen\*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: JIANG Tao-zhen, E-mail: taozhen\_jiang@163.com

**Abstract:** In order to evaluate the performance of a prevalent strain of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) in the potency test for vaccine, a comprehensive identification of one freeze-drying virulent ILTV culture was conducted in terms of characteristics, purity, vacuum degree, viral loads, and specificity, with the focus on the assessment of virulence for chicken of various age post challenge. Results showed that this virulent strain has a good characteristic and purity, free from mycoplasma and exogenous virus contamination. It could be neutralized by specific serum and virus titers could reach  $10^{5.1}$  EID<sub>50</sub>/0.2mL. At least 80% of unvaccinated control chicken died or showed severe clinical signs of ILT and notable macroscopic lesions at the dose of 100 EID<sub>50</sub>. Studies suggest that this prepared culture could be a good candidate as an appropriate challenge virus strain.

**Key words:** chicken infectious laryngotracheitis; vaccine; potency test; challenge virus

作者简介:王静文,助理研究员,从事兽用生物制品检验工作。

通讯作者:蒋桃珍。E-mail:taozhen\_jiang@163.com

传染性喉气管炎 (Infectious Laryngotracheitis, ILT) 是由传染性喉气管炎病毒 (Infectious Laryngotracheitis Virus, ILTV) 引起的一种鸡的急性、高度接触性呼吸道传染病,以呼吸困难、气喘、咳出血样渗出物为临床特征,病理剖检常见气管与喉头黏膜细胞肿胀、糜烂和出血,严重影响鸡群的生长和发育以及生产性能<sup>[1]</sup>。该病 1925 年最早发生于美国<sup>[2]</sup>,我国最早报道见于贵州省。该病以往多发于蛋鸡和种鸡,近些年随着我国养鸡业蓬勃发展,商品肉鸡中亦普遍发病。弱毒疫苗虽然存在着毒力返强、潜伏感染等诸多缺点,目前仍是防控 ILT 的主力军,主要包括鸡胚源和组织细胞源两种<sup>[3-5]</sup>。

检验用强毒在活疫苗评价试验中的重要性不言而喻<sup>[6]</sup>。美国药典规定,攻毒后观察 10 日,至少 80% 攻毒对照鸡应出现死亡或严重临床症状<sup>[7-8]</sup>;欧洲药典规定,攻毒后观察 7 日,至少 90% 攻毒对照鸡应出现死亡或严重临床症状<sup>[9]</sup>。《中国兽用生物制品规程》(2000 年版)中界定的鸡传染性喉气管炎病毒强毒株的标准为 5 只攻毒至少 3 只出现严重眼炎、咳嗽、喘气等临床症状;《中国兽药典》中写明,按照  $10^{4.0} \text{EID}_{50}/\text{只}$  的攻毒剂量,10 日内 4 只攻毒对照鸡应至少 3 只出现眼炎和呼吸道症状;《兽药质量标准》(2017 年版)生物制品卷中指出,喉囊内接种 ILTV 王岗株  $10^{4.2} \text{EID}_{50}/\text{只}$ ,10 只攻毒对照鸡至少 7 只发病<sup>[10]</sup>。然而,目前库存王岗株毒力普遍偏弱,不能有效满足 ILT 活疫苗评价需求,因此亟需一株毒力更强、更稳定的 ILTV 强毒株。

本研究对一株 ILTV 流行毒株冻干物进行了系统鉴定,包括纯净性、病毒含量、特异性、真空度等,重点关注其作为检验用强毒在致病力方面的表现,为 ILT 疫苗的效力评价奠定基础。

## 1 材料

1.1 毒株 鸡传染性喉气管炎病毒江苏株 (ILTV JS 株) 由哈尔滨兽医研究所刘胜旺研究员馈赠提供。

1.2 试剂 生理盐水、5% 蔗糖牛奶、无菌培养基、支原体培养基购自北京中海生物有限公司;外源病毒检测试剂盒购自 IDEXX 公司;冻干保护剂 (主要成分蔗糖、明胶、水解乳蛋白等)、胰蛋白胍磷酸盐

肉汤 (TPB)、ILT 阳性血清由实验室制备保存。

1.3 实验动物 SPF 鸡胚、SPF 鸡均购自北京勃林格殷格翰维通生物技术有限公司。

## 2 方法

2.1 毒种繁殖 将 ILTV JS 株用 TPB 溶液 10 倍稀释后,经绒毛尿囊膜接种 10 日龄 SPF 鸡胚 50 枚,0.2 mL/枚,37 °C 孵育 120 h。无菌剪取出现增厚及痘斑的绒毛尿囊膜,高速匀浆研磨后加入 10 倍体积的 TPB 溶液。无菌检验合格后作为冻干用毒液,置于 -70 °C 保存。

2.2 毒种冻干与封口 将待冻干病毒液分为两批,一批与 5% 蔗糖脱脂牛奶等量混合;另一批与自制冻干保护剂按照 2 : 1 比例混合,无菌分装于安瓿瓶后立即置于冻干机内按常规程序进行冻干,随后抽真空、火焰烧熔封口。将冻干毒种置于 -70 °C 保存待检。

2.3 性状观察 肉眼观察冻干培养物在安瓿瓶内的状态,轻轻振荡观察是否易与瓶壁脱离,以及加入稀释液后的溶解情况。

2.4 无菌与支原体检验 随机抽取 10 支冻干培养物,按照《中国兽药典》附录 3306 和附录 3308 进行无菌检验和支原体检验。

2.5 病毒含量测定 随机抽取 3 支冻干培养物,用 TPB 溶液复溶至原体积后进行 10 倍系列稀释,取  $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  四个稀释度各经绒毛尿囊膜接种 5 枚 10 日龄 SPF 鸡胚,每枚 0.2 mL,同时设 TPB 溶液对照组。置 37 °C 孵育 120 h。到期后,打开鸡胚外壳,观察记录绒毛尿囊膜出现灰白色痘斑或增厚的鸡胚数,按照 Reed - Muench 法进行病毒含量计算。冻干后 24 个月,再次随机抽取各 3 支冻干培养物,按上述方法进行病毒含量测定。

2.6 特异性检验 随机抽取 1 支冻干培养物,用灭菌生理盐水稀释至  $200 \text{EID}_{50}/0.1 \text{mL}$ 。取 1.5 mL 与等体积的 ILT 阳性血清混合,室温作用 1 h (期间振摇 1 次),经绒毛尿囊膜途径接种 10 枚 10 日龄 SPF 鸡胚,每胚 0.2 mL,同时设置病毒对照组和生理盐水对照组。置于 37 °C 孵育,24 h 内死亡鸡胚弃去不计,观察记录 24 ~ 120 h 鸡胚存活和出现痘斑发育情况。

2.7 外源病毒检验 随机抽取 1 支冻干培养物,用生理盐水作 10 倍稀释后,点眼滴鼻加肌肉注射 21 日龄的 SPF 鸡 20 只,每只 0.2 mL。21 d 后,按上述途径重复接种一次。第二次接种后 21 d,采集所有鸡血清,按照《中国兽药典》附录 3305 检测所有相关病毒。

2.8 致病力试验 随机抽取 1 支冻干培养物,用生理盐水分别稀释至 100 EID<sub>50</sub>/0.2 mL 和 1000 EID<sub>50</sub>/0.2 mL,每个稀释度分别气管内接种 21 日龄、35 日龄、49 日龄 SPF 鸡各 10 只,每只 0.2 mL。同时,每个日龄组设生理盐水对照鸡 10 只。接种后连续观察 14 d,记录死亡数和出现精神沉郁、张口呼吸、结膜炎等症状,并于接种后第 3 天和第 5 天采集咽拭子,于 1 mL TPB 溶液静置后,抽提病毒组 DNA,用 TK 基因特异性引物(Forward 5'-3':TCCGAGT-TCGAGAACGATGAC, Reverse 5'-3':GAGTGGGTGC-CTATCTACGAG)进行 PCR 扩增,检测病毒分离情况。扩增条件和程序如下:95 ℃ 预变性 5 min,进入循环扩增:94 ℃ 40 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,循环 30 次后 72 ℃ 再延伸 10 min。

### 3 结果与分析

3.1 性状观察 冻干培养物为海绵状团块,较易与瓶壁脱离,加生理盐水振摇 1 min 内溶解。

3.2 无菌检验与支原体检验 冻干毒种按照《中国兽药典》进行无菌检验和支原体检验,结果均符合规定。

3.3 真空度测定 使用高频火花真空测定器对冻干毒种进行测定,出现白色、粉色或紫色辉光的判为合格。本冻干培养物真空度测定合格率为 96%。24 个月后随机抽取 5 支,真空度检验 5/5 合格。

3.4 病毒含量测定 使用蔗糖牛奶作为保护剂的冻干毒对鸡胚的半数感染量分别为 10<sup>4.9</sup>、10<sup>5.0</sup> 和 10<sup>4.8</sup> EID<sub>50</sub>/0.2 mL,符合要求;使用自配冻干保护剂的冻干毒对鸡胚的半数感染量分别为 10<sup>5.3</sup>、10<sup>5.1</sup> 和 10<sup>5.1</sup> EID<sub>50</sub>/0.2 mL,符合要求,且略优于蔗糖牛奶的保护效果。24 个月后,使用蔗糖牛奶作为保护剂的冻干毒对鸡胚的半数感染量分别为 10<sup>4.5</sup>、10<sup>4.5</sup> 和 10<sup>4.0</sup> EID<sub>50</sub>/0.2 mL;使用自配冻干保护剂的冻干毒对

鸡胚半数感染量分别为 10<sup>5.0</sup>、10<sup>5.0</sup> 和 10<sup>5.1</sup> EID<sub>50</sub>/0.2 mL,自配保护剂的保护效果较蔗糖牛奶稳定。

3.5 特异性检验 该病毒可被 ILT 阳性血清完全中和,特异性良好。

3.6 外源病毒检验 血清抗体检测结果表明无以下病毒的污染,具体结果见表 1。

表 1 外源病毒检验结果

相关病原	检验方法	结果判定
鸡传染性支气管炎病毒	ELISA	-
鸡新城疫病毒	HI	-
鸡减蛋综合征病毒	HI	-
禽流感病毒(H5/H7/H9)	HI	-
禽呼肠孤病毒	ELISA	-
禽网状内皮组织增生症病毒	ELISA	-
禽白血病毒(Ab/J)	ELISA	-
禽脑脊髓炎病毒	ELISA	-
鸡传染性法氏囊病病毒	ELISA	-
鸡传染性贫血病毒	ELISA	-
鸡痘病毒	临床观察	-

“-”为阴性

3.7 致病力试验 该冻干毒在 100 EID<sub>50</sub> 和 1000 EID<sub>50</sub> 均可引起不同日龄(21 日龄、35 日龄和 49 日龄) SPF 鸡发病或死亡,且 100 EID<sub>50</sub> 即可引起至少 80% 的发病率(具体见表 2 和表 3),接种鸡在接种后第 3 天,可从咽拭子中检测到病毒核酸(图 1),并出现精神沉郁、张口呼吸、结膜炎等临床症状。自第 10 天逐渐减轻直至消失,剖检死亡鸡只喉头和气管内可见干酪样分泌物或出血(图 2)。

表 2 不同日龄鸡只接种不同病毒含量病毒的发病率与死亡率

攻毒剂量	21 日龄	35 日龄	49 日龄
100 EID <sub>50</sub>	8/10(1/10)	10/10(9/10)	10/10(7/10)
1000 EID <sub>50</sub>	7/10(5/10)	10/10(9/10)	10/10(6/10)

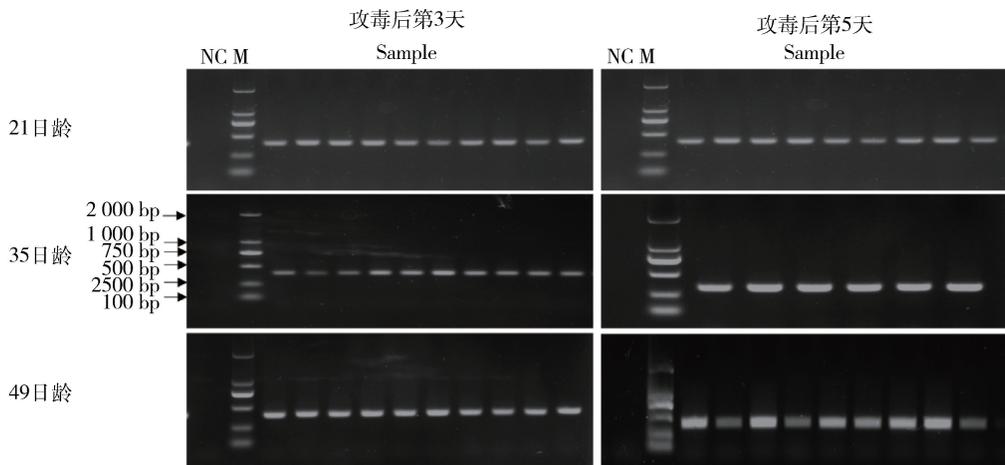
括号前的数为发病率,括号内的数为死亡率

表 3 不同日龄鸡只在不同攻毒剂量下的发病或死亡记录

Tab 3 Record of Clinical signs or death of chickens of various age with various challenge

攻毒后观察天数	21 日龄		35 日龄		49 日龄	
	100 EID <sub>50</sub>	1000 EID <sub>50</sub>	100 EID <sub>50</sub>	1000 EID <sub>50</sub>	100 EID <sub>50</sub>	1000 EID <sub>50</sub>
1 d	/	/	/	/	/	/
2 d	/	/	/	1 F	/	/
3 d	3 F	1 F	4 F	5 F	2 F	2 F
4 d	4 F	1 S+1 F	7 F	4 S+5 F	1 S+5 F	1 S+5 F
5 d	1 S+6 F	6 F	4 S+6 F	5 S+1 F	2 S+7 F	2 S+6 F
6 d	5 F	2 S+1 F	3 S+3 F	1 F	3 S+3 F	3 S+3 F
7 d	5 F	2 S+1 F	2 F	1 F	1 S+1 F	2 F
8 d	5 F	1 F	1 S+1 F	1 F	2 F	2 F
9 d	/	/	1 S+1 F	/	/	/
10 d	/	/	/	/	/	/
11 d	/	/	/	/	/	/
12 d	/	/	/	/	/	/
13 d	/	/	/	/	/	/
14 d	/	/	/	/	/	/

“S”表示死亡;“F”表示发病;出现流鼻涕、结膜炎、呼吸困难等临床表征;“/”表示临床正常



NC:阴性对照; M:DL-2000 分子质量标准; Sample:咽拭子 PCR 扩增结果

NC: Negative control; M: DL-2000 Marker; Sample: PCR products of swab extraction

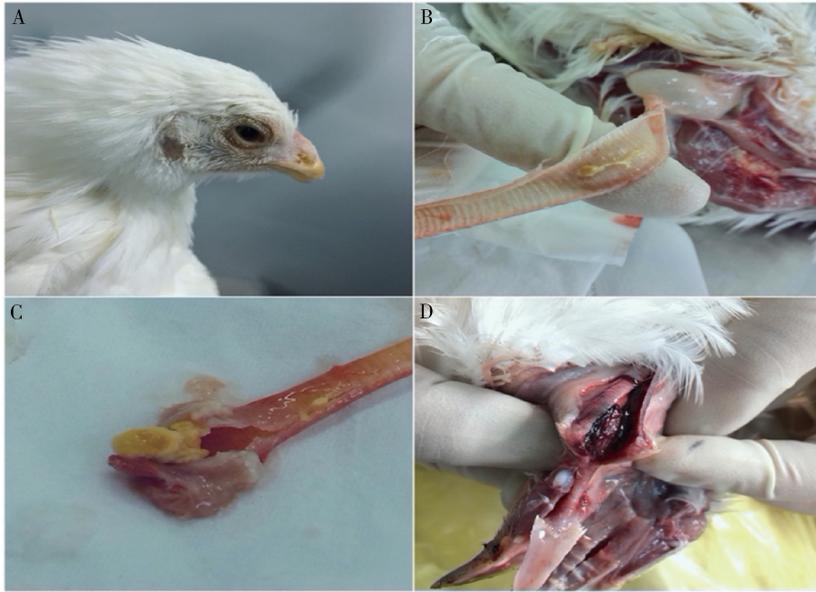
图 1 100 EID<sub>50</sub> 攻毒后病毒 PCR 检测结果

Fig 1 Virus isolation by PCR post challenge

#### 4 讨论

本研究所用原始毒株分离于江苏某鸡场病鸡喉头气管,经接种鸡胚绒毛尿囊膜所得<sup>[11]</sup>。在该毒株的制备繁殖与冻干中,经本实验室摸索探究,将病毒稀释液由生理盐水更换为 TPB 溶液,可有效

提升病毒含量;而将冻干保护剂由蔗糖牛奶换作自配保护剂,也减少了冻干损失,同样有助于病毒含量的稳定。早在 1955 年, Ginsberg 就将 TPB 溶液应用于 HeLa 细胞的培养中, Watcharee Saisongkornh 的研究也表明 TPB 溶液可有效提升猫立克次体在



A: 临床可见眼炎 结膜炎; B: 气管内干酪样物质; C: 喉头黄色干酪样物质; D: 气管喉头充血出血

A: Ophthalmitis, conjunctivitis; B: Cheesy secretions in trachea;

C: Cheesy exudates in larynx; D: Congestion and hemorrhage in respiratory tract

图 2 临床症状及剖检结果

Fig 2 Clinical symptoms and pathological examinations

哺乳细胞系中的复制能力, 这些应用多以 5% ~ 10% 的比例添加于细胞培养液中<sup>[12-13]</sup>。而在该病毒的鸡胚法扩繁, 尤其是前几代的繁育中, 直接使用 TPB 溶液作为接种和收获病毒的稀释液, 提升了病毒含量。在其他禽类病毒如传染性法氏囊病毒的繁殖培育中, TPB 溶液的使用也有类似报道<sup>[14-16]</sup>。

而不同微生物因自身结构、培养方法等差异对保护剂的种类配比要求也不一样。张云浦、王栋、孙中成等人对某些禽类疫苗如新城疫、传染性支气管炎、马立克、鸡痘等耐热冻干保护剂都有过不同的研究报道<sup>[17-19]</sup>。本试验中采用的保护剂成分与上述报道亦有相似之处, 如应用水解明胶可去除杂质蛋白, 防止有效活性物质随水蒸气升华分散, 保证骨架支撑, 促成更好的成品状态; 一定比例的蔗糖可降低渗透压差, 防止结晶, 也能更好维持抗原性; 水解乳蛋白和酪蛋白酶促水解物富含丰富氨基酸, 保护或提供所需营养物质; 谷氨酸盐作为表面活性剂, 降低冻结和脱水过程中张力引起的变形,

并在复水过程中对活性组分起到润湿作用; 此外还有磷酸二氢钾、磷酸氢钠等 pH 调节剂的加入<sup>[20]</sup>。从保存期结果可以看出, 自配保护剂组与常规 5% 蔗糖牛奶组对比, 同样在 -20 °C 以下存放 24 个月, 前者毒价表现明显更稳定, 这对于检验用强毒而言十分关键。

在前期试验中, 我们采用库存王岗株毒株对 35 日龄 SPF 鸡的攻毒试验结果显示,  $10^4$  EID<sub>50</sub> 剂量攻毒组, 4/10 出现张口呼吸症状, 2/10 死亡;  $10^{4.5}$  EID<sub>50</sub> 剂量攻毒组, 7/10 出现张口呼吸, 3/10 死亡, 且结膜炎表现不是很突出, 可见以 10000 EID<sub>50</sub> 剂量接种也不能保证 75% 的发病率。本实验室制备的冻干培养物针对不同日龄的鸡只以 100 EID<sub>50</sub> 剂量攻毒即可导致 80% 的发病率, 表现出稳定的致病力。从 35 日龄鸡只攻毒结果可看出, 与库存毒株王岗株相比, 更小的接种剂量可引起更高的发病率和致死率, 且结膜炎临床表现较为明显, 更易于观察。下一步, 拟在同样的条件和剂量下, 将本冻干物与王岗株一同作为攻毒对照, 进行更加直接的

比对和记录,并拟建立和制定更为详细的打分规则,使得攻毒对照更为直观:如将呼吸频率分为 0(正常呼吸)、1(张口呼吸)、2(伸颈呼吸);结膜炎分为 0(正常)、1(肿胀和眼睑部分闭合)、2(完全闭眼);精神沉郁分为 0(正常行为)、1(轻微沉郁)、2(严重抑郁无精神);死亡直接记为 3 分等,同时引入不同时间点体重的测定,以更加立体、全面、细致地评价二者毒株差异<sup>[21]</sup>。

此外,在病毒分离检测预试验中,我们发现采用棉拭子途径分离检测病毒的敏感性不低于病死鸡喉头组织粘膜匀浆沉淀,甚至比喉头组织上清液敏感性要高,并且 PCR 检测出病毒阳性的时间与临床上出现症状的时间基本一致:一般是从攻毒后第 3 天开始出现症状,第 5 天分离率最高,至 10 d 以后基本恢复。因此,在实际应用中,建议使用 100 EID<sub>50</sub> 剂量进行气管内攻毒,并于攻毒后第 3 天和第 5 天采集咽拭子以作效力评价。

本试验制备的鸡传染性喉气管炎病毒流行株冻干毒可有效应用于疫苗评价,为方便获取稳定大量表达,后期拟进行该毒株的细胞适应化研究,以进一步做好评价支持。

## 参考文献:

- [1] OIE Terrestrial Manual 2019 [M].
- [2] May H G, Tittler R P. Tracheo laryngotracheitis in poultry[J]. Journal of the American Veterinary Medical Association, 1925, 67: 229 - 231.
- [3] 秦卓明, 黄海海, 徐怀英. 中国传染性喉气管炎的发生和流行暨美国防控经验[J]. 家禽科学, 2020(08): 49 - 55.  
Qin Z M, Huang D H, Xu H Y. The occurrence and epidemic of infectious laryngotracheitis in China and the experience of American prevention and control [J]. Poultry Science, 2020 (08): 49 - 55.
- [4] Rodríguez - Avila A, Oldoni I, Riblet S, *et al.* Evaluation of the protection elicited by direct and indirect exposure to live attenuated infectious laryngotracheitis virus vaccines against a recent challenge strain from the United States [J]. Avian Pathology, 2008, 37(3): 287 - 292.
- [5] Maekawa D, Riblet S M, Whang P, *et al.* Activation of cytotoxic lymphocytes and presence of regulatory T cells in the trachea of non - vaccinated and vaccinated chickens as a recall to an infectious laryngotracheitis virus ( ILTV ) challenge [ J ]. Vaccines, 2021, 9(865): 1 - 15.
- [6] Coppo M J, Hartley C A, Devin J M. Immune responses to infectious laryngotracheitis virus [ J ]. Developmental & Comparative Immunology, 2013, 41(3): 454 - 462.
- [7] Mauricio J C, Amir H N, Glenn F B, *et al.* Challenges and recent advancements in infectious laryngotracheitis virus vaccines [J]. Avian Pathology, 2013, 42(3): 195 - 205.
- [8] Danielle M K, Ann S P, Darrel W T, *et al.* Comparison of the pathogenicity of the USDA challenge virus strain to a field strain of infectious laryngotracheitis virus[J]. Biologicals, 2015(43): 232 - 237.
- [9] Hitchner W, Veits J, Helferich D, *et al.* Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus [J]. Vet Res, 2007, 38(2): 261 - 279.
- [10] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(三部) 2015 年版[S].  
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Commission. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia (Part3) 2015 edition [S].
- [11] 赵妍, 孔聪聪, 张晓敏, 等. 鸡传染性喉气管炎病毒江苏株的分离与初步鉴定[J]. 中国动物传染病学报, 2012, 20(1): 22 - 26.  
Zhao Y, Kong C C, Zhang X M, *et al.* Isolation and identification of infectious laryngotracheitis virus from Jiangsu Province [J]. Chinese Journal of Animal Infectious Diseases, 2012, 20(1): 22 - 26.
- [12] Ginsberg H S, Gold E, Jordan W S. Tryptose phosphate broth as supplementary factor for maintenance of HeLa Cell tissue cultures [J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1955, 89(1): 66 - 71.
- [13] Saisongkroh W, Karkouri K E, Patrice J Y, *et al.* Tryptose phosphate broth improves *Rickettsia felis* replication in mammalian cells[J]. Immunol Med Microbiol, 2012(64): 111 - 114.
- [14] Rosenberger J K, Gelb J. Response to several avian respiratory viruses as affected by infectious bursal disease virus [J]. Avian Disease, 1977, 22(1): 95 - 105.
- [15] Gelb J, Eidson C S, Kleven S H. Interferon production in embryonating chicken eggs following inoculation with infectious bursal disease virus [J]. Avian Disease, 1979, 23(2): 534 - 538.
- [16] Denny F W, Ginsberg H S. Intracellular localization of type 4 adenovirus I cellular fractionation studies [J]. The Journal of Experimental Medicine, 1959, 109(1): 69 - 83.

- [17] 孙中成, 韩玉玲. 鸡新城疫耐热冻干保护剂活疫苗试验[J]. 中国兽药杂志, 2001, 35(5): 36.  
Sun Z C, Han Y L. Studies on Thermo-tolerant free-dried vaccine of New Castle Disease Virus [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2001, 35(5): 36.
- [18] 王栋, 刘业兵, 张万林, 等. 鸡马立克氏病火鸡疱疹病毒(耐热保护剂)活疫苗的研究[J]. 中国兽药杂志, 2002, 36(7): 27-29.  
Wang D, Liu Y B, Zhang W L, *et al.* Study on Thermo-tolerant free-dried vaccine of Turkey Herpesvirus [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2002, 36(7): 27-29.
- [19] 张云浦, 冯丽秋, 刘玉才, 等. 兽用冻干疫苗耐热保护剂的研究-鸡传染性法氏囊病弱毒(B87)冻干活疫苗耐热保护剂的试验[J]. 中国兽药杂志, 2001, 35(2): 7-10.  
Zhang Y P, Feng L Q, Liu Y C, *et al.* Studies on the hyophilized heat-resisting of vaccines for animals - Studying on the hyophilized heat-resisting protective of avian infectious bursal disease virus (IBDV) (B87) vaccine [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2001, 35(2): 7-10.
- [20] 赵成龙, 王素春, 庄青叶, 等. 兽医生物制品中常用灭活剂和冻干保护剂研究进展[J]. 中国动物检疫, 2021, 38(8): 69-74.  
Zhao C L, Wang S C, Zhuang Q Y, *et al.* Research progress on inactivators and lyoprotectants commonly used in veterinary biological products [J]. Chinese Journal of Animal Health Inspection, 2021, 38(8): 69-74.
- [21] Kirkpatrick N C, Mahmoudian A, Colson C A, *et al.* Relationship between mortality, clinical signs and tracheal pathology in infectious laryngotracheitis [J]. Avian Pathology, 2006(35): 449-453.

(编辑:李文平)