

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.11.03

牛病毒性腹泻/黏膜病(1型+2型)、牛传染性鼻气管炎、牛副流感(3型)三联灭活疫苗(E2蛋白+C1株+HB01株)的研制与免疫效果评价

赵卓^{1,2}, 胡义彬¹, 雷莉辉³, 武沛泽², 武春霞²,马岩², 张巨峰², 王力², 江厚生^{1,2*}

(1. 北京生泰尔科技股份有限公司, 北京 102600; 2. 北京华夏兴洋生物科技有限公司, 北京 102600; 3. 北京农业职业学院, 北京 102442)

[收稿日期] 2022-05-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 11-0017-06 [中图分类号] S852.65

[摘要] 采用 CHO 细胞表达牛病毒性腹泻/黏膜病病毒 1 型(BVDV1)E2 蛋白, 采用杆状病毒重组表达牛病毒性腹泻/黏膜病病毒 2 型(BVDV2)E2 蛋白, 采用 MDBK 细胞微载体悬浮培养技术培养牛传染性鼻气管炎病毒(IBRV)和牛副流感病毒 3 型(BPIV3), 收获蛋白表达产物和细胞培养物, 经纯化、灭活后与 605 佐剂混合, 制备牛病毒性腹泻/黏膜病(1型+2型)、牛传染性鼻气管炎、牛副流感(3型)三联灭活疫苗(E2 蛋白+C1 株+HB01 株)。将疫苗免疫健康易感牛进行免疫效果评价, 结果表明该产品免疫效果良好, 免疫牛 IBRV 和 BPIV3 中和抗体效价均可达到 1:77 以上; BVDV1 和 BVDV2 E2 蛋白琼扩抗体效价均可达到 1:32 以上; 免疫牛攻毒保护率均可达到 4/5 以上。

[关键词] 牛病毒性腹泻/黏膜病; 牛传染性鼻气管炎; 牛副流感; 灭活疫苗; 免疫效力

Development and Immune Effect Evaluation of Bovine Viral Diarrhea/Mucosal Disease (Type 1 + Type 2), Infectious Bovine Rhinotracheitis and Bovine Parainfluenza (Type 3) Inactivated Vaccines (E2 Protein + C1 Strain + HB01 Strain)

ZHAO Zhuo^{1,2}, HU Yi-bin¹, LEI Li-hui³, WU Pei-ze², WU Chun-xia², MA Yan²,ZHANG Ju-feng², WANG Li², JIANG Hou-sheng^{1,2*}

(1. Beijing Centre Biology Co., Ltd., Beijing 102600, China; 2. Beijing Centrebio Biology Co., Ltd., Beijing 102600, China;

3. Beijing Vocational College of Agriculture, Beijing 102442, China)

Corresponding author: JIANG Hou-sheng, E-mail: jhs@centreherbs.com

基金项目: 内蒙古自治区科技重大专项-牛腹泻疾病防控关键技术研发与标准化操作规程示范推广(2020ZD0006)

作者简介: 赵卓, 硕士, 高级兽医师, 从事兽用生物制品的研发与注册。

通讯作者: 江厚生。E-mail: jhs@centreherbs.com

Abstract: In this study, CHO cells were used to express bovine viral diarrhea/mucosal disease virus type 1 (BVDV1) E2 protein, baculovirus recombinant was used to express bovine viral diarrhea/mucosal disease virus type 2 (BVDV2) E2 protein, and MDBK cell microcarrier suspension culture technology was used to culture bovine infectious rhinotracheitis virus (IBRV) and bovine parainfluenza virus type 3 (BPIV3). The protein expression products and virus cultures were harvested and mixed with 605 adjuvant after purification and inactivation to prepare inactivated vaccine of bovine viral diarrhea/mucosal disease (type 1 + type 2), infectious bovine rhinotracheitis and bovine parainfluenza (type 3) (E2 protein + C1 strain + HB01 strain). The results showed that the immune effect was good, and the titers of IBRV and BPIV3 neutralizing antibodies of immunized cattle were more than 1:77; The titers of BVDV1 and BVDV2 E2 protein antibody could reach more than 1:32; The protection rate of immunized cattle against virus could reach more than 4/5.

Key words: bovine viral diarrhea/mucosal disease; infectious bovine rhinotracheitis; bovine parainfluenza; inactivated vaccine; immune efficacy

牛病毒性腹泻/黏膜病是由牛病毒性腹泻/黏膜病病毒 (Bovine viral diarrhea virus, BVDV) 引起的传染病, 急性死亡病例剖检以消化道黏膜发炎、糜烂和肠壁淋巴组织坏死为特点, 主要表现为发热、咳嗽、流涎、腹泻和消瘦, 白细胞明显减少。本病的感染率很高, 但一般不表现临床症状, 发病率约 5%, 以 6~18 个月龄居多, 病死率为 90%~100%^[1]。本病常年均可发生, 感染动物包括牛、羊、猪等, 各种年龄的牛均易感, 幼龄牛易感性最高^[2]。

牛副流感是由牛副流感病毒 3 型 (Bovine parainfluenza virus type - 3, BPIV3) 引起的传染病, 是引起幼年和成年牛呼吸道疾病的重要病原。临床感染牛的症状表现变化很大, 从无症状感染到严重的呼吸道疾病。大部分感染 BPIV3 的牛仅表现咳嗽、发热等症状, 而存在应激的牛则表现严重的组织损伤和免疫抑制, 导致细菌继发感染, 表现为严重的肺部和胸腔出血性败血症, 且常混合牛呼吸道其它病毒的感染, 使病情加重。近几年, 在黑龙江、辽宁、新疆、云南、贵州、广西、河北、山东、河南、江西、湖南、福建等地均有牛感染 BPIV3 的报道, 表明该病已经在我国部分省市呈现地区性流行, 有调查研究结果显示牛场总体阳性率为 50% 以上^[3-4]。

牛传染性鼻气管炎是由牛传染性鼻气管炎病毒 (Infectious bovine rhinotracheitis virus, IBRV) 引起

牛的一种急性接触性传染病, 可感染不同物种, 包括牛、山羊和绵羊^[5], 以高热、呼吸困难、鼻炎和上呼吸道炎症为特征。该病在世界各地普遍存在, 主要的经济损失在于延缓肥育牛的生长和增重, 患病奶牛产乳量下降, 继发流产, 其流产率有时高达 50%, 急性发病期牛死亡率可达 10%。文献报道我国大部分地区也存在该病的流行^[6-7]。

控制本病的主要措施在于应用疫苗进行免疫预防接种。我国目前已有牛传染性鼻气管炎灭活疫苗和牛病毒性腹泻/黏膜病 (1 型) 疫苗上市销售, 但尚无牛病毒性腹泻/黏膜病 2 型、牛副流感 3 型相关疫苗产品上市。本研究开展了牛病毒性腹泻/黏膜病 (1 型 + 2 型)、牛传染性鼻气管炎、牛副流感 (3 型) 三联灭活疫苗的实验室制备和免疫效力评价研究。

1 材料

1.1 种毒 IBRV C1 株, 批号: 2020002; BPIV3 HB01 株, 批号 20200211; 重组表达 BVDV2 E2 蛋白杆状病毒, 批号 20200322, 均由北京生泰尔科技股份有限公司提供。

1.2 细胞 MDBK 细胞, 液氮保存, 购自中国兽药药品监察所菌种保藏中心; Sf9 细胞和重组表达 BVDV1 E2 蛋白 CHO 细胞, 由北京生泰尔科技股份有限公司提供。

1.3 试验动物 18~22 g 小鼠 10 只, 购自北京勃

林格威格翰维通生物技术有限公司;2~6 月龄 IBRV 和 BPIV3 中和抗体 $\leq 1:4$ 、BVDV 中和抗体 $\leq 1:4$ 、PCR 检测 IBRV、BPIV3、BVDV 阴性的健康犍牛 50 头,购自河北省涿州市金瑞丰奶牛专业合作社。

1.4 试剂耗材 DMEM 培养基,购自 GBICO 公司;CD CHO 011 培养基,购自甘肃健顺生物科技有限公司;IB905 昆虫细胞全悬浮培养基,购自浙江壹生科生物技术有限公司;胎牛血清,购自兰州民海生物工程有限公司;Taq 聚合酶,购自宝生物工程(大连)有限公司;PCR 引物,由上海生物工程技术有限公司合成;疫苗佐剂(605 佐剂),由北京生泰尔科技股份有限公司提供;微载体(cytodex1),购自 GE Healthcare 公司;葡萄糖测定试剂盒,购自上海荣盛生物药业有限公司。

1.5 仪器设备 搅拌式生物反应器(5 L)、PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪、96 孔细胞培养板、CO₂ 细胞培养箱、倒置生物显微镜,均由北京生泰尔科技股份有限公司提供。

2 方法

2.1 细胞培养

2.1.1 MDBK 细胞悬浮培养 称取 20 g 微载体,用 PBS 洗两遍后,加入 500 mL PBS,121 °C 高压灭菌 30 min。用前弃掉 PBS,加入 2 L DMEM 培养基,进行预热。将消化好的细胞经计数后,接种 3×10^8 数量级的细胞至盛有微载体的生物反应器中,设定培养参数为转速 40~60 r/min,温度 37 °C,pH 值 7.0~7.2,溶氧 50%,氧气、二氧化碳、氮气和空气均设定 0.2~0.6 MPa。每日取样观察细胞生长状态,根据细胞残糖量和溶氧曲线进行换液 1~2 次。

2.1.2 CHO 细胞悬浮培养 将细胞种子悬液转移至摇瓶内,加入适量 CD CHO 011 培养基培养,当细胞密度达到 $7 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ /mL 时,采用生物反应器扩大培养,起始密度控制在 $0.8 \times 10^6 \sim 1.2 \times 10^6$ /mL,控制 pH 为 7.0 左右,转速 100 r/min,培养 22~24 h。

2.1.3 Sf9 细胞悬浮培养 将摇瓶培养生长良好的 Sf9 细胞转移至生物反应器,加入新的培养液,将细胞密度调整至 1×10^5 /mL。维持体系溶氧(DO)25%~35%,26~28 °C 培养 22~24 h。

2.2 制苗抗原制备

2.2.1 IBRV 和 BPIV3 培养和灭活 待 MDBK 细胞铺满整个载体表面时,静置,弃去细胞生长液,加入适量的细胞维持液。将 IBRV 和 BPIV3 毒种用细胞维持液进行 1:100 稀释后,再按细胞维持液加入量的 1/100 接种微载体悬浮培养的 MDBK 细胞,各项参数保持不变,培养 72 h 收获。收获的病毒培养产物冻融 1~2 次后,低速离心或过滤,除去微载体,收集培养液移至灭菌容器内,置 -15 °C 以下保存。取样进行病毒含量测定和无菌检验,并将收获的 IBRV 和 BPIV3 抗原采用终浓度为 0.2% 的甲醛进行灭活。灭活完毕,分别取样进行无菌检验和灭活检验,检验合格后用于疫苗配制。

2.2.2 BVDV1 E2 蛋白制备和灭活 当 CHO 细胞密度达到 $2 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ /mL 时进行流加培养,调节 pH 为 7.00 ± 0.05 ,DO 为 40%,进行蛋白的表达,在细胞活率降至 50% 时收获细胞培养液,离心收取上清,采用亲和树脂进行纯化后,取样进行蛋白纯度、浓度、琼扩效价检测,并采用 BEI 进行灭活。灭活完毕,取样进行无菌检验,检验合格后用于疫苗配制。

2.2.3 BVDV2 E2 蛋白制备和灭活 当反应器中的 Sf9 细胞密度达到 2×10^6 /mL,细胞活率不低于 95% 时,按 1 MOI 接种重组表达 BVDV2 E2 蛋白杆状病毒。接毒后,维持体系溶氧(DO)25%~35%,26~28 °C 培养,逐日取样观察细胞病变,当 75% 以上细胞病变时收获。收获的细胞培养物在 2~8 °C 条件下 4000~10000 r/min 离心,收取上清液采用亲和树脂进行纯化后,取样进行蛋白纯度、浓度、琼扩效价检测,并采用 BEI 进行灭活。灭活完毕,取样进行无菌检验和灭活检验,检验合格后用于疫苗配制。

2.3 半成品检验

2.3.1 无菌检验 将收获的病毒液按现行《中国兽药典》附录^[8]进行检验,应无菌生长。

2.3.2 病毒含量测定 将收获的 IBRV 和 BPIV3 病毒液用细胞维持液作 10 倍系列稀释,取 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 5 个稀释度,每个稀释度分别接种 96 孔板培养的 MDBK 单层细胞,每个稀释度

重复 4 孔,每孔 100 μL ,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、含 5% CO_2 细胞培养箱中继续培养,连续观察 5 d,记录特异性细胞病变,计算 TCID_{50} 。IBRV 病毒含量每毫升应不低于 $10^{8.0}$ TCID_{50} ,BPIV3 病毒含量每毫升应不低于 $10^{8.5}$ TCID_{50} 。

2.3.3 蛋白效价测定 将收获的 BVDV1 E2 蛋白抗原和 BVDV2 E2 蛋白抗原采用琼脂扩散试验法进行效价检测,效价应不低于 1:32。

2.3.4 蛋白纯度检测 取 BVDV1 E2 蛋白抗原和 BVDV2 E2 蛋白抗原经 SDS 凝胶电泳后进行纯度分析检测,均应不低于 75%。

2.3.5 蛋白浓度测定 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行测定,BVDV1 E2 蛋白和 BVDV2 E2 蛋白浓度均应不低于 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.3.6 灭活检验 将灭活后的 IBRV 和 BPIV3 按细胞维持液的 1/10 量接种 MDBK 单层细胞 2 瓶,吸附 1 h 后弃去,补加维持液,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d。收获病毒液冻融 3 次,再按细胞维持液的 1/10 量接种 MDBK 单层细胞 2 瓶,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d,以细胞不出现典型 CPE 判为合格。将 BVDV2 E2 蛋白加入 6 孔细胞培养板内,每个样品做 2 个重复孔,置 26 ~ 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 7 d,用间接免疫荧光方法进行检测,以细胞不出现特异性绿色荧光判为合格。

2.4 疫苗制备和检验

2.4.1 疫苗制备 将检验合格的 IBRV 灭活液、BPIV3 灭活液、BVDV1 E2 蛋白、BVDV2 E2 蛋白与 605 佐剂等比例混合,以 100 ~ 300 r/min 搅拌速度充分混合均匀。

2.4.2 疫苗常规检验 按照现行《中国兽药典》的方法分别进行无菌、黏度、pH 值、甲醛残留检测^[8]。

2.4.3 疫苗安全性检验

2.4.3.1 小鼠安全性检验 背部皮下接种小鼠 10

只,每只 0.3 mL,观察 14 d,记录小白鼠的死亡情况及全身和局部的不良反应。

2.4.3.2 靶动物牛安全性检验 肌肉接种健康易感牛 5 头,每头 4.0 mL,观察 14 d,记录局部和全身不良反应。

2.4.4 疫苗效力检验

2.4.4.1 抗体测定法 将疫苗肌肉接种健康易感牛 5 头,每头 2.0 mL,免疫后 21 d 以相同方式和剂量加强免疫一次,二免后 14 d 采血,分离血清,分别进行 IBRV 和 BPIV3 中和抗体以及 BVDV1 和 BVDV2 E2 蛋白琼扩抗体效价测定。

2.4.4.2 攻毒保护法 将疫苗肌肉接种健康易感牛 20 头,每头 2.0 mL,免疫后 21 d 以相同方式和剂量加强免疫一次,二免后 14 d,其中 5 头免疫牛连同对照牛 5 头,每头接种 IBRV C1 株病毒 10 mL (含 $10^{8.3}$ TCID_{50});5 头免疫牛连同对照牛 5 头,每头接种 BPIV3 HB01 株病毒 10 mL (含 $10^{8.5}$ TCID_{50});5 头免疫牛连同对照牛 5 头,每头接种 BVDV1 强毒 SD 株(病毒含量为 $10^{5.0}$ $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$) 4.0 mL;5 头免疫牛连同对照牛 5 头,每头接种 BVDV2 强毒 XJ 株(病毒含量为 $10^{5.0}$ $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$) 4.0 mL。攻毒后连续观察 14 d,每日测定体温,并于攻毒后第 5 ~ 9 天采集鼻拭子和肛门拭子进行病原检测,考察免疫牛排毒情况。以免疫牛不出现体温升高、不出现临床症状和不排毒作为免疫保护判定标准,统计免疫牛攻毒保护率。

3 结果

3.1 制苗抗原的培养与检验 将收获的抗原分别进行无菌检验、病毒含量测定、蛋白琼扩效价、纯度、浓度以及灭活检验,结果均符合三联苗工艺规程和质量标准规定,见表 1。

表 1 抗原制备各项检验结果

Tab 1 Test results of antigen preparation

检验项目	IBRV	BPIV3	BVDV1 E2 蛋白	BVDV2 E2 蛋白
无菌检验	无菌生长	无菌生长	无菌生长	无菌生长
含量测定	$10^{8.5}$ $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$	$10^{9.3}$ $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$	1:64	1:64
蛋白纯度	-	-	84.3%	81.7%
蛋白浓度	-	-	231 $\mu\text{g}/\text{mL}$	279 $\mu\text{g}/\text{mL}$
灭活检验	完全灭活	完全灭活	完全灭活	完全灭活

3.2 疫苗制备及检验 将检验合格的灭活抗原与 605 佐剂混合,制备成三联灭活疫苗成品,并进行各项检验。结果显示制备的疫苗外观呈淡粉红色透明液体,黏度为 15.3 cP,甲醛残留量为 0.08%,pH 值为 7.2;10 只小鼠经安全性检验均健活;采用靶动物牛进行安全性检验,接种后未出现体温升高、精神不振、食欲减退等全身不良反应,接种后注射部位无红肿和溃烂等局部不良反应。

3.3 疫苗效力检验 采用健康易感牛进行疫苗接种后,分别进行抗体测定和攻毒保护试验。免疫组 IBRV 和 BPIV3 中和抗体均可达到 1:77 以上,BVDV1 和 BVDV2 E2 蛋白琼扩抗体效价 4/5 以上牛达到 1:32 以上,而对照组中和抗体均不超过 1:4,琼扩抗体效价均不超过 1:2;进行攻毒保护试验,免疫牛可达到 4/5 以上保护,对照牛 4/5 以上发病。具体试验结果见表 2。

表 2 疫苗效力试验研究结果

Tab 2 Results of vaccine efficacy trials

检验项目	IBRV	BPIV3	BVDV1	BVDV2
免疫组抗体	1:89,1:128,1:77,1:77,1:89	1:128,1:256,1:177,1:256,1:128	1:32,1:64,1:32,1:32,1:64	1:64,1:32,1:16,1:32,1:64
免疫组保护率	5/5	5/5	5/5	4/5
免疫组发病率	0/5	0/5	0/5	1/5
对照组发病率	5/5	5/5	4/5	5/5
对照组临床症状	发病牛表现为发热,体温超过 40.5℃,精神沉郁,鼻镜潮红,鼻流浆液等症状,攻毒后第 5~7 天 PCR 检测鼻腔拭子 IBRV,呈阳性。	表现为持续发热体温最高 42℃,精神沉郁,食欲减退、鼻流浆液或脓性分泌物等症状,攻毒后第 5~7 天 RT-PCR 检测鼻腔拭子 BPIV3,呈阳性。	表现为体温升高,超过 40℃;不同程度的腹泻;口腔、鼻腔、肛门等出现充血或溃疡;个别牛鼻腔或眼睛有黏性或脓性分泌物;攻毒后第 7~9 天 RT-PCR 检测鼻和肛门拭子 BVDV1,呈阳性。	表现为体温升高,超过 40℃;腹泻,严重时呈水样或血便;口腔、鼻腔、阴道和肛门等有充血或溃疡;个别牛鼻腔或眼睛有黏性分泌物;攻毒后第 7~9 天 RT-PCR 检测鼻和肛门拭子 BVDV2,呈阳性。

4 结论与讨论

目前,国内已有牛传染性鼻气管炎灭活疫苗(C1 株)、牛病毒性腹泻/黏膜病灭活疫苗(1 型, NM01 株)、牛病毒性腹泻/黏膜病、传染性鼻气管炎二联灭活疫苗(NMG 株 + LY 株)等产品获得国家《新兽药注册证书》,并上市销售。国外已有四联疫苗研究和上市的相关报道^[9]。

本研究采用 MDBK 细胞微载体悬浮培养技术培养 IBRV 和 BPIV3,采用 CHO 细胞表达系统表达 BVDV1 E2 蛋白,采用杆状病毒表达系统表达 BVDV2 E2 蛋白,抗原经纯化和灭活后与新型水佐剂混合,成功制备出了牛病毒性腹泻/黏膜病(1 型 + 2 型)、牛传染性鼻气管炎、牛副流感(3 型)三联灭活疫苗,且免疫效果良好。

面对国内外生物技术的迅猛发展,疫苗的类型也由传统的全病毒苗、全菌苗向基因工程疫苗发展;细胞培养也由传统的转瓶培养工艺向生物反应

器纯悬浮培养工艺发展;疫苗佐剂也由传统的矿物油佐剂、铝胶佐剂向新型水佐剂发展。本研究采用这些新技术开展了实验室研究,获得了理想的试验结果。

参考文献:

[1] 吴文学,李秀波,王中杰. 牛病诊疗手册[M]. 中国农业出版社,2018.
Wu W X, Li X B, Wang Z J. Handbook for diagnosis and treatment of bovine disease[M]. China Agricultural Press, 2018.

[2] Terpstra C, Wensvoort G. 牛病毒性腹泻病毒自然感染猪引起类似猪瘟症状[J]. 兽医科学研究,1988,45(2):137-142.
Terpstra C, Wensvoort G. Natural infections of pigs with bovine viral diarrhoea virus associated with signs resembling swine fever [J]. Research Veterinary Science, 1988, 45(2): 137-142.

[3] 王海勇,童钦,王炜,等. 我国牛副流感 3 型病毒血清学调查[J]. 中国预防兽医学报,2014,36(2):154-156.
Wang H H, Tong Q, Wang W, et al. Serological survey of

- antibody against bovine parainfluenza virus type 3 in 12 provinces [J]. *Chinese Journal Preventive Veterinary Medicine*, 2014, 36(2): 154 – 156.
- [4] 霍志云, 童 钦, 胡嘉欣, 等. 北方三省(区)牛副流感 3 型病毒的血清学调查[J]. *动物医学进展*, 2012, 33(9): 124 – 126.
Huo Z Y, Tong Q, Hu J X, *et al.* Serological survey of antibodies against bovine parainfluenza virus type 3 in three region of North China[J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2012, 33(9): 124 – 126.
- [5] 王家驹, 李亚明. 牛传染性鼻气管炎的研究 – IBRV 的分离鉴定[J]. *中国畜禽传染病*, 1994, 76(3): 1 – 3.
Wang J J, Li Y M. Isolation and identification of infectious bovine rhinotracheitis virus[J]. *Infectious Diseases of Livestock and Poultry in China*, 1994, 76(3): 1 – 3.
- [6] 王淑娟, 孙成友, 宋晓晖. 牛传染性鼻气管炎的诊断、流行病学调查及防控[J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2012, 28(9): 95 – 96.
Wang S J, Sun C Y, Song X H. Diagnosis, epidemiological investigation, prevention and control of infectious bovine rhinotracheitis [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Abstracts*, 2012, 28(9): 95 – 96.
- [7] 王永艳, 王仲兵, 郑明学, 等. 牛传染性鼻气管炎的流行与防控[J]. *动物医学进展*, 2010, 31(1): 112 – 115.
Wang Y Y, Wang Z B, Zheng M X, *et al.* Epidemic and control of infectious bovine rhinotracheitis [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2010, 31(1): 112 – 115.
- [8] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2020 年版第三部[S].
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. *Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Volume III, 2020)* [S].
- [9] Xue Wenzhi, Ellis John, Mattick Debra, *et al.* Immunogenicity of a modified – live virus vaccine against bovine viral diarrhea virus types 1 and 2, infectious bovine rhinotracheitis virus, bovine parainfluenza – 3 virus, and bovine respiratory syncytial virus when administered intranasally in youngcalves [J]. *Vaccine*, 2010, 28(22): 3784 – 3792.

(编辑:李文平)