

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.09.04

一种鸡抗猪丁型冠状病毒阳性血清的制备方法

李晶梅, 张飞雁, 王焕君, 柏娇, 于义娟, 王碧群, 朱薇, 郑良益,
李婷婷, 冯钊, 石宝兰, 漆世华, 谢红玲*

(国药集团动物保健股份有限公司, 武汉 430075)

[收稿日期] 2022-03-18 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 09-0022-07 [中图分类号] S852.65

[摘要] 为研究用鸡制备猪丁型冠状病毒(PDCoV)阳性血清,将PDCoV用二乙烯亚胺(BEI)灭活,加矿物油佐剂乳化制成疫苗,多次免疫SPF鸡,采集血清,检测血清中和效价并用间接免疫荧光法(IFA)检测PDCoV。结果显示,血清中和效价随免疫次数增加逐渐增高,4免后14d的中和效价平均值为1314;制备的阳性血清可用于IFA检测PDCoV,其不与猪瘟病毒(CSFV)、猪繁殖与呼吸障碍综合症病毒(PRRSV)、猪伪狂犬病毒(PRV)、猪圆环病毒2型(PCV2)、猪细小病毒(PPV)、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)反应,特异性良好。本研究用鸡成功制备PDCoV阳性血清,为利用鸡制备其他猪病阳性血清奠定基础。

[关键词] 猪丁型冠状病毒;阳性血清;中和效价;IFA

Preparation of Positive Porcine Deltacoronavirus Serum by Chicken

LI Jing - mei, ZHANG Fei - yan, WANG Huan - jun, BAI Jiao, YU Yi - juan, WANG Bi - qun, ZHU Wei,
ZHENG Liang - yi, LI Ting - ting, FENG Zhao, SHI Bao - Lan, QI Shi - hua, XIE Hong - ling*

(Sinopharm Animal Health Corporation Ltd., Wuhan 430075, China)

Corresponding author: XIE Hong - ling, E - mail: 13419546263@163.com

Abstract: In this study, we immunized SPF chickens with the vaccines of porcine delta coronavirus (PDCoV) in order to investigate the possibility of preparing the sera against PDCoV by chickens. The binary ethylenimine (BEI) inactivated PDCoV and mineral oil adjuvants were emulsified to prepare vaccine. The SPF chickens were immunized with the vaccines for many times. Sera from immunized chickens was collected. The serum neutralization test and indirect immunofluorescence assay (IFA) were used to detect the antibodies of PDCoV. Neutralizing antibody titer of sera gradually increases due to the increase of immunization times, and the average neutralization titer at 14 days after the fourth immunization was 1314. The serum could be used to the detection of PDCoV by IFA, and the serum showed no cross - reaction with classical swine fever virus (CSFV), porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), porcine pseudorabies virus (PRV), porcine circovirus

作者简介: 李晶梅, 硕士, 从事兽用生物制品研究。

通讯作者: 谢红玲。E - mail: 13419546263@163.com

type 2(PCV2), porcine parvovirus (PPV), transmissible gastroenteritis virus (TGEV), porcine epidemic diarrhea virus(PEDV). In this study, PDCoV positive sera were successfully prepared by chickens, which could lay the foundation for the preparation of other pathogen of swine positive sera by chickens.

Key words: porcine delta coronavirus; positive serum; neutralizing antibody titer; IFA

阳性血清是免疫学方法鉴定病原体的重要生物材料,可应用阳性血清建立中和实验、琼扩、血凝、ELISA、胶体金等方法鉴定病原体并诊断疫病^[1]。阳性血清还是兽用生物制品质量控制所需的重要生物材料。用阳性血清中和毒种、活疫苗中的活病毒,再接种生物组织,从而对毒种、活疫苗做鉴别检验和外源病毒检验,监控疫苗产品质量。猪病种类多,仅病毒病就包括猪瘟、猪繁殖与呼吸障碍综合症、猪伪狂犬、猪圆环、猪口蹄疫、猪传染性胃肠炎、猪流行性腹泻等,针对不同疫病需制备相应的阳性血清用于疫苗质量控制。

虽然科研人员常用猪^[2-4]、羊^[5-6]、兔^[7-9]制备猪病阳性血清,但赵华娥用鸡制备猪流感阳性血清也获得了成功^[10],并且用鸡制备鸡病阳性血清^[11-13]有诸多成功经验可供借鉴。本研究尝试用 SPF 鸡制备猪丁型冠状病毒(PDCoV)阳性血清,为鸡制备猪病阳性血清积累经验。

1 材料和方法

1.1 毒种、细胞 猪丁型冠状病毒(PDCoV)、PK1 细胞,由国药集团动物保健股份有限公司保存。

1.2 实验动物 3~4 周龄 SPF 鸡,购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司。

1.3 主要试剂 DMEM 培养基、胎牛血清,为 BI 公司产品;胰液素(3.75 mg/mL)、BEA、FITC 标记的兔抗鸡抗体,为 SIGMA 公司产品;胰酶,为 Solarbio 公司产品;注射用白油,为道达尔公司产品;司本-80,吐温-80,购自上海浩鼎贸易有限公司。

1.4 疫苗制备

1.4.1 PDCoV 抗原制备 用细胞生长液(DMEM 培养基+7%胎牛血清+终浓度 100 单位双抗)将 PK1 细胞培养至单层。换病毒维持液(DMEM 培养基+终浓度 10 μg/mL 胰酶、1%胰液素、100 单位

双抗),接种 PDCoV,当出现 80% 细胞病变时,收集细胞培养上清,超滤浓缩至原体积的 1/10,加入终浓度 5 mmol/L 的二乙烯亚胺(BEI, BEA 加 NaOH 环化获得)37 °C 灭活 24 h,无菌检验、灭活检验合格后备用。

1.4.2 水相制备 取 PDCoV 抗原 96 份,向其中加入灭菌吐温-80 4 份,充分搅拌,直到吐温-80 完全溶解。

1.4.3 油相制备 取注射用白油 94 份,向其中加司本-80 6 份,加热、搅拌至混合均匀,高压灭菌。

1.4.4 疫苗制备 水相与油相 1:2 混合,在剪切机中以 10000 r/min 乳化 10 min,制备成油包水型疫苗。

1.4.5 检验 参考《中华人民共和国兽药典》2020 年版三部附录^[14]方法对疫苗的外观、剂型、黏度、稳定性、纯净性(无菌)进行检验,检验合格备用。

1.5 免疫、采血 疫苗免疫 3~4 周龄 SPF 鸡 10 只,0.5 mL/只。每间隔 2 周或适当时长加强免疫一次,剂量同首次免疫。颈背部皮下、胸部肌肉、腿部肌肉交替接种疫苗。收集免疫前的鸡血清,一免、二免、三免…后 14 d 或适当时长的每只鸡的血清,作为被检血清。

1.6 检测 按 1.7 项方法分别检测被检血清中和效价,计算鸡血清中和抗体的几何平均值。选择中和效价较高的血清混合,作为阳性血清;免疫前的鸡血清混合,作为阴性血清。按 1.8 项的 IFA 方法将血清用于检测 PDCoV;检测阳性血清对猪传染性胃肠炎、猪流行性腹泻中和效价;IFA 方法检测阳性血清与猪瘟、猪繁殖与呼吸障碍综合症、猪伪狂犬、猪圆环、猪细小、猪传染性胃肠炎、猪流行性腹泻是否存在特异性结合。

1.7 中和效价测定 参考《中华人民共和国兽药典》2020 年版三部中和试验法^[14]建立如下 PDCoV

中和效价测定方法。

1.7.1 准备中和用病毒 将 PDCoV 用病毒维持液稀释至 100 TCID₅₀/0.1 mL。

1.7.2 准备被检样品 用 DMEM 培养基将阴性血清、被检血清 4 倍系列稀释。将适宜稀释度的血清分别与 1.7.1 项 100 TCID₅₀/0.1 mL 的 PDCoV 等体积混合,37 °C 中和 1 h。

1.7.3 稀释中和用病毒 将 1.7.1 项 PDCoV 用维持液做 10 倍系列稀释,即 10⁰、10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 稀释待用。

1.7.4 测定 96 孔板中长成单层的 PK1 细胞,弃去细胞生长液。各孔加入 0.1 mL DMEM 培养基,弃去。1.7.2 项各稀释度被检样品接种 PK1 细胞,每个稀释度接种 6 孔,0.2 mL/孔;1.7.3 项各稀释度的中和用病毒接种 PK1 细胞,每个稀释度接种 6 孔,0.1 mL/孔;同时设置正常 PK1 细胞对照 6 孔,加入维持液,0.1 mL/孔。37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 1 h,弃去孔内溶液,加入维持液 0.1 mL/孔。37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 3 d 判定结果。

1.7.5 判定结果 中和用病毒为 30~300 TCID₅₀/0.1 mL,正常细胞对照健活,试验成立。记录各稀释度无细胞病变孔数,按 Reed - Muench 法计算其半数保护量(PD₅₀),计算各时间点 PD₅₀的几何平均数,PD₅₀几何平均数的对数为平均中和效价。

1.8 IFA 检测 PDCoV

1.8.1 准备细胞 96 孔板中长成单层的 PK1 细胞,弃去细胞生长液。各孔加入 0.1 mL DMEM 培养基,弃去。

1.8.2 接毒 将 PDCoV 用病毒维持液稀释至 50 TCID₅₀/0.1 mL,接种 1.8.1 的细胞,0.1 mL/孔。同时设置正常 PK1 细胞对照,加入维持液,0.1 mL/孔。37 °C、5% CO₂ 培养箱孵育 1 h,弃去孔内溶液,加入维持液 0.1 mL/孔。37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 3 d 用于 IFA 检测。

1.8.3 IFA 检测 阴性、阳性血清用 PBS 做 10 倍系列稀释,阴性血清 10⁻¹、10⁻²,阳性血清 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 稀释待用。1.8.2 项中培养 3 d 的 96 孔板,80% 丙酮固定,PDCoV 感染孔、正常 PK1

细胞孔分别加入稀释的阴性、阳性血清,0.1 mL/孔,37 °C 孵育 1 h,PBS 洗 3 次,加 FITC 标记的兔抗鸡抗体,37 °C 孵育 1 h,PBS 洗 3 次,荧光显微镜下用蓝色激发光(波长 490 nm)观察。有完整的细胞形态并发出特异性绿色荧光的视为 IFA 阳性孔。

2 结果与分析

2.1 抗原制备及检测 用 PK1 细胞扩繁 PDCoV 抗原约 1 L,经测定其病毒含量为 10^{8.3} TCID₅₀/mL。将 PDCoV 抗原超滤浓缩至 100 mL,加入 0.2 mol/L 的 BEI 2.5 mL,37 °C 灭活 24 h,加入 1 mol/L 的 Na₂S₂O₃ 溶液 0.5 mL 中和 BEI。将灭活后的抗原接种 PK1 细胞并盲传 1 代,未见细胞病变,判定抗原灭活完全;将灭活后的抗原做无菌检验,各培养基均无菌生长,说明超滤浓缩可保证无菌。

2.2 疫苗制备及检验 100 mL 水相与 200 mL 油相混合,乳化后获得 300 mL 疫苗。疫苗外观为乳白色乳剂,剂型为油包水型、粘度为 65.8 cP、稳定性为 10 mL 疫苗经 3000 r/min 离心 15 min 未见分层且管底无水相;将疫苗做无菌检验,各培养基均无菌生长。说明疫苗质量合格,可用于免疫实验鸡。

2.3 免疫、采血 结合中和效价检测结果确定免疫时间、免疫次数、采血时间,实际免疫程序见表 1。每次免疫后 14 d 采血,四免后 35 d、四免后 52 d、五免后 44 d 采血。

表 1 免疫程序

Tab 1 Immunization procedure

免疫次数	接种时间	接种部位
一次免疫	/	颈背部皮下
二次免疫	一免后 14 d	胸部肌肉
三次免疫	二免后 14 d	腿部肌肉
四次免疫	三免后 14 d	颈背部皮下
五次免疫	四免后 52 d	胸部肌肉

2.4 血清中和效价 表 2 结果显示,免疫前血清(阴性血清)有“中和效价”,平均为 14.32,分析是因为血清中和了维持液中的胰酶、胰液素使 PDCoV 失去感染细胞的能力产生了“中和效价”。免疫前血清最高 PD₅₀ 为 2.5 log₄,说明 PD₅₀ > 2.5 log₄ 的免疫

后血清为特异性中和。血清中和效价随免疫次数增加逐渐增高,四免 14 d 血清平均中和效价高于

1000,五免后未见显著增加。四免、五免 14 d 效价达到高峰后下降。

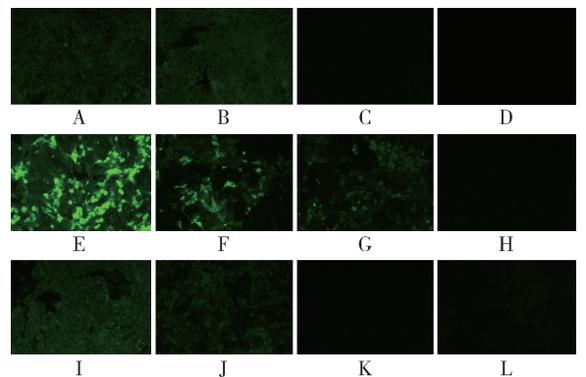
表 2 血清中和效价

Tab 2 neutralization titer of the sera

样品名称	PD ₅₀ (log4)	几何平均数(log4)	平均中和效价
免疫前(阴性血清)	2.5,2.5,2.25,2,1.75,1.75,1.75,1.6,1.6,1.5	1.92	14.32
一免 14 d	2.75,2.5,2.5,2.5,2.4,1.75,1.6,1.6,1.5,1.5	2.06	17.39
二免 14 d	3.75,3.5,3.5,3.4,3.25,3,3,2.75,2.6	3.18	81.57
三免 14 d	4.88,4.64,4.5,4.5,4.16,4.16,3.5,3.4,3.25,3.25	4.02	264.66
四免 14 d	6,5.88,5.5,5.16,5,4.88,4.88,4.75,4.75	5.18	1314.23
四免 35 d	5.88,5.25,5.16,4.88,4.16,4.4,4.16,4,3.75,3.5	4.51	522.03
四免 52 d	4.64,4.5,4.75,6.6,4.4,4.25,4,3.6,3.5	4.47	491.90
五免 14 d	6,4,5.6,5.5,5.25,5,5,4.75,4.25,4	5.08	1149.40
五免 44 d	4.75,4.75,4.64,4.6,4.5,4.25,4,3.75,3.6	4.32	396.48

2.5 IFA 检测 PDCoV 四免 14 d 效价为 4.88 log₄ ~ 5.16 log₄ 的 5 份血清混合作为阳性血清用于 IFA 检测 PDCoV。阴性血清与 PDCoV、PK1 细胞有非特异性反应,10⁻¹有淡绿色荧光(图 1A、B),但 10⁻²无可见荧光(图 1C、D)。PDCoV 与 PK1 细胞用 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴稀释的阳性血清检测,PDCoV 明显比 PK1 细胞更亮(图 1E、F、G、I、J、K),PDCoV 是特异性荧光,判为阳性孔;PDCoV 与 PK1 细胞用 10⁻⁵稀释的阳性血清检测,均无特异性荧光(图 1H、L)。鉴于 10⁻³阳性血清检测 PDCoV 可见明亮的特异性绿色荧光并完整展现细胞形态,将其定为本批血清 IFA 检测 PDCoV 的最适稀释度。

2.6 特异性检验 PDCoV 阳性血清对猪传染性胃肠炎、猪流行性腹泻中和效价,均低于最低检测值(<1:16)。IFA 检测,PDCoV 阳性血清对猪瘟病毒(CSFV)感染的 ST 细胞、猪繁殖与呼吸障碍综合症病毒(PRRSV)感染的 Marc145 细胞、猪伪狂犬病毒(PRV)感染的 ST 细胞、猪圆环病毒 2 型(PCV2)感染的 PK15 细胞、猪细小病毒(PPV)感染的 IBRS-2 细胞、猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)感染的 ST 细胞、猪流行性腹泻病毒(PEDV)感染的 Vero 细胞无特异性反应(图 2)。



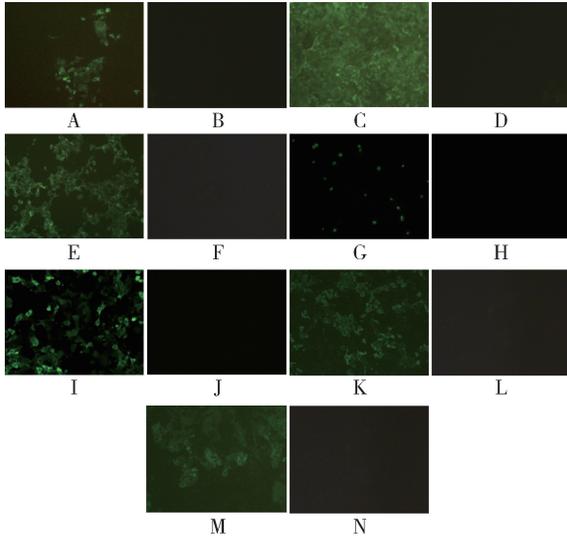
A、B:PDCoV、PK1 细胞,阴性血清 10⁻¹稀释;C、D:PDCoV、PK1 细胞,阴性血清 10⁻²稀释;E~H:PDCoV,阳性血清 10⁻²~10⁻⁵稀释;I~L:PK1 细胞,阳性血清 10⁻²~10⁻⁵稀释

图 1 IFA 检测 PDCoV (100 ×)

Fig 1 Detection of PDCoV infection by IFA (100 ×)

3 讨论与结论

3.1 PDCoV 阳性血清的应用 PDCoV 感染可引起仔猪呕吐、腹泻等症状^[15-16],严重影响猪群的生长发育。PDCoV 阳性血清可在 ELISA、IHC、IFA 等检测方法中应用^[17-19],从而建立猪丁型冠状病毒病的诊断方法。



A: CSFV - CSFV 单抗; B: CSFV - PDCoV 阳性血清;
 C: PRRSV - PRRSV 单抗; D: PRRSV - PDCoV 阳性血清;
 E: PRV - PRV 单抗; F: PRV - PDCoV 阳性血清;
 G: PCV2 - PCV2 单抗; H: PCV2 - PDCoV 阳性血清;
 I: PPV - PPV 单抗; J: PPV - PDCoV 阳性血清; K: TGEV - TGEV 单抗;
 L: TGEV - PDCoV 阳性血清; M: PEDV - PEDV 单抗;
 N: PEDV - PDCoV 阳性血清

A: CSFV - McAb of CSFV; B: CSFV - positive serum of PDCoV;
 C: PRRSV - McAb of PRRSV; D: PRRSV - positive serum of PDCoV;
 E: PRV - McAb of PRV; F: PRV - positive serum of PDCoV;
 G: PCV2 - McAb of PCV2; H: PCV2 - positive serum of PDCoV;
 I: PPV - McAb of PPV; J: PPV - positive serum of PDCoV;
 K: TGEV - McAb of TGEV; L: TGEV - positive serum of PDCoV;
 M: PEDV - McAb of PEDV; N: PEDV - positive serum of PDCoV

图 2 IF A 检测 PDCoV 阳性血清的特异性 (100 ×)

Fig 2 Specificity of PDCoV positive serum detected by IF A (100 ×)

阳性血清还可用于毒种和活疫苗的鉴别检验、纯净性检验,从而进行疫苗的质量控制。PDCoV 在无胰酶、胰液素时,在 ST、Vero、PK15 等细胞上不产生细胞病变^[20-21],根据 2020 版兽药典,具有此特性的 PDCoV 毒种做外源病毒检验可不进行中和,但仍需制备阳性血清用于毒种鉴别检验^[14]。

3.2 用鸡制备猪病阳性血清的优势和可行性

①用猪制备猪病阳性血清,需筛选抗原、抗体阴性猪,鸡不感染猪病毒病,血清中不含各种猪病的抗体,还有供应充足、来源稳定的商品化 SPF 鸡可用;

②鸡属于小型实验动物,饲养于隔离器中便于控制疫病感染,饲养管理比猪、羊更有优势;③矿物油佐剂制备的油包水型疫苗免疫动物后产生比其他佐剂疫苗更高的抗体^[22-24],但哺乳动物对矿物油副反应大^[22,25-26],鸡可耐受矿物油佐剂,可使用油包水型疫苗免疫^[14],从而获得高效价抗体。

3.3 技术经验总结分析 BEI 属于烷化剂类灭活剂,这类灭活剂能破坏病毒核酸芯髓,使病毒完全丧失感染力,而又不损害其蛋白衣壳,保留其保护性抗原^[27],因而比甲醛灭活制备的疫苗免疫原性更好,抗体效价更高。所以免疫用的 PDCoV 疫苗的抗原使用了 BEI 灭活。

PDCoV 抗体效价在 4 次免疫后达到高峰,随后下降较快,加免后效价再次达到高峰。分析原因,可能是鸡非 PDCoV 的自然宿主,不能快速产生特异性抗体且效价下降较快。

3.4 成果及展望 本研究用 SPF 鸡制备出 PDCoV 阳性血清,最高平均中和效价大于 1000。1000 倍稀释的阳性血清用于 IF A 检测 PDCoV,感染 PDCoV 的细胞荧光显微镜下显示特异性亮绿色荧光。阳性血清不与 PDCoV 外的主要猪病病原体反应,特异性良好。所以,制备的 PDCoV 阳性血清可用于中和法、IF A 鉴别检验 PDCoV,为疫苗研发奠定基础。本研究为制备方法的前期研究,阳性血清保存条件、保存期等尚需深入研究。

猪病疫苗是生物制品企业的主要产品,企业对各种猪病阳性血清均有需求。猪病阳性血清属于标准品,与疫苗、诊断制品相比,其用量少、经济价值低,暂无稳定、批量供应各类猪病阳性血清的生产企业。如需使用,多为生物制品企业自行制备,或研究机构少量提供。所以,如能建立通用、简易、可操作性强、质量稳定的猪病阳性血清制备方法,将降低猪用疫苗生产企业质控成本、提高质控质量。用鸡制备 PDCoV 阳性血清方法成立,用鸡制备其他猪病的阳性血清也有成功的可能,可对不同疫病做针对性、细致研究,以期将鸡应用于更多猪病血清的制备。

参考文献:

- [1] 全国动物卫生标准化技术委员会. 动物卫生国家标准选编 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.
- National Technical Standardization Committee of Animal Health. National Standards of Animal Health. [S]. Beijing: Standards Press of China, 2019.
- [2] 周伟, 刘凡, 贾杏林, 等. 猪附红细胞体阳性血清的制备研究[J]. 湖南畜牧兽医, 2014, 183(5): 19-21.
- Zhou W, Liu F, Jia X L, et al. Preparation of Eperythrozoon positive sera[J]. Hunan Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2014, 183(5): 19-21.
- [3] 戴志红, 蒋卉, 关孚时, 等. 猪瘟病毒阴性和阳性血清(细胞中和试验)参考品的制备[J]. 中国预防兽医学报, 2013, 35(12): 997-1001.
- Dai Z H, Jiang H, Guan F S, et al. Preparation of reference negative and positive sera against classical swine fever virus for the neutralization tests in cells[J]. Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine, 2013, 35(12): 997-1001.
- [4] 吴华伟, 陈晓春, 李俊平, 等. 一种猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清及其制备方法: 中国, CN112079921A [P]. 2020-12-15.
- Wu H W, Chen X C, Li J P, et al. A porcine reproductive and respiratory syndrome virus positive serum and its preparation method: China, CN112079921A [P]. 2020-12-15.
- [5] 郑良益, 舒银辉, 漆世华, 等. 一种伪狂犬病标准阳性血清的制备及其冻干保存方法: 中国, CN103864931B [P]. 2014-03-31.
- Zheng L Y, Shu Y H, Qi S H, et al. Preparation of pseudorabies positive standard serum and its cryopreservation method: China, CN103864931B [P]. 2014-03-31.
- [6] 李翠, 赵启祖, 王在时, 等. 一种伪狂犬病病毒抗血清及其制备方法: 中国, CN108484757A [P]. 2018-09-04.
- Li C, Zhao Q Z, Wang Z S, et al. A pseudorabies virus anti-serum and its preparation method: China, CN108484757A [P]. 2018-09-04.
- [7] 唐丽, 夏雨婷, 贾杏林, 等. 兔抗猪附红细胞体阳性血清的制备研究[J]. 湖南畜牧兽医, 2014, 179: 13-14.
- Tang L, Xia Y T, Jia X L, et al. Preparation of anti-Eperythrozoon positive serum in rabbits [J]. Hunan Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2014, 179: 13-14.
- [8] 王玉玲, 赖道华, 潘晶晶, 等. 几种猪繁殖与呼吸综合征病毒阳性血清制备方法的比较[J]. 福建畜牧兽医, 2020, 42(4): 14-16.
- Wang Y L, Lai D H, Pan J J, et al. Comparison of several preparation methods of porcine reproductive and respiratory syndrome virus positive serum [J]. Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2020, 42(4): 14-16.
- [9] 黄玉婷. 一种猪肺炎支原体阳性血清的制备方法[J]. 福建畜牧兽医, 2021, 43(4): 5-7.
- Huang Y T. The preparation of *Mycoplasma hyopneumoniae* antiserum [J]. Fujian Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2021, 43(4): 5-7.
- [10] 赵华娥, 詹先强. 一种猪流感阳性血清的制备方法: 中国, CN105777898A [P]. 2016-07-20.
- Zhao H E, Zan X Q. A preparation method of swine influenza virus positive serum: China, CN105777898A [P]. 2016-07-20.
- [11] 罗乃杰, 赖汉漳, 刘玲, 等. I 群 4 型禽腺病毒感染鸡阳性血清的制备及其在 IFA 中的应用[J]. 家禽科学, 2021, 8: 45-48.
- Luo N J, Lai H Z, Liu L, et al. Preparation of chicken anti-serotype 4 fowl adenovirus group I polyclonal antibody and its application in IFA [J]. Poultry Science, 2021, 8: 45-48.
- [12] 李翠, 关孚时, 戴志红, 等. 鸡新城疫血凝抑制试验用阳性血清国家标准品的研制[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(1): 10-13.
- Li C, Guan F S, Dai Z H, et al. Preparation and characterization of the national standard for newcastle disease hemagglutination inhibition test positive serum, chicken [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2013, 47(1): 10-13.
- [13] 孙苹, 陈倩, 胡序明, 等. 鸡产蛋下降综合症病毒快速纯化及其多抗血清制备[J]. 中国兽药杂志, 2014, 48(10): 1-5.
- Sun P, Chen Q, Hu X M, et al. Rapid purification of egg drop syndrome-76 virus and parathion of its polyclonal antibodies [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2014, 48(10): 1-5.
- [14] 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]. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2020 edition, the third Volume [S]. Beijing: China Agriculture Press, 2020.
- [15] 刘怀东, 孙森, 赵炜, 等. 猪丁型冠状病毒的分离鉴定与基因分析[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(5): 18-23.
- Liu H D, Sun M, Zhao W, et al. Isolation, identification and genetic analysis of porcine deltacoronavirus [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(5): 18-23.
- [16] 秦毅斌, 何莘萍, 卢冰霞, 等. 猪丁型冠状病毒 CH/GX/1468B/2017 的分离鉴定及全基因组序列分析[J]. 中国畜牧

- 兽医, 2019, 46(7): 1907-1916.
- Qin Y B, He P P, Lu B X, *et al.* Isolation, identification and complete genome sequence analysis of porcine deltacoronavirus strain CH/GX/1468B/2017 [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2019, 46(7): 1907-1916.
- [17] 钱炳旭, 白雪雁, 张成成, 等. 猪德尔塔冠状病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立及初步应用 [J]. *中国兽医学报*, 2021, 41(7): 1234-1241.
- Qian B X, Bai X Y, Zhang C C, *et al.* Establishment and preliminary application of indirect ELISA for detection of porcine deltacoronavirus antibody [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2021, 41(7): 1234-1241.
- [18] Chen Q, Gauger P, Stafne M, *et al.* Pathogenicity and pathogenesis of a United States Porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets [J]. *Virology*, 2015, 482: 51-59.
- [19] Okda F, Lawson S, Liu X, *et al.* Development of monoclonal antibodies and serological assays including indirect ELISA and fluorescent microsphere immunoassays for diagnosis of Porcine deltacoronavirus [J]. *BMC Vet Res*, 2016, 12(95): 1-12.
- [20] Hu H, Jung K, Vlasova A N, *et al.* Isolation and characterization of porcine deltacoronavirus from pigs with diarrhea in the United States [J]. *J Clin Microbiol*. 2015, 53(5): 1537-1548.
- [21] 陈建飞, 王潇博, 焦贺勋, 等. 国内首株猪德尔塔冠状病毒的分离鉴定 [J]. *中国预防兽医学报*, 2016, 38(03): 171-174.
- Chen J F, Wang X B, Jiao H X, *et al.* Isolation and identification of the first porcine deltacoronavirus strain in China [J]. *Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*, 2016, 38(03): 171-174.
- [22] 罗添添, 岳华, 汤承. 副猪嗜血杆菌灭活疫苗佐剂的筛选 [J]. *四川畜牧兽医*, 2010(11): 26-28.
- Luo T T, Yue H, Tang C. Screening adjuvant for the inactivated vaccine of haemophilus parasuis [J]. *Sichuan Animal and Veterinary Sciences*, 2010(11): 26-28.
- [23] 田宇杰, 嵇辛勤, 章丽娇, 等. 鸭坦布苏病毒病-H9 亚型禽流感二联灭活疫苗免疫佐剂筛选 [J]. *动物医学进展*, 2021, 42(5): 26-29.
- Tian Y J, Ji X Q, Zhang L J, *et al.* Screening of duck tembusu virus-H9 subtype avian influenza virus inactivated vaccine adjuvant [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2021, 42(5): 26-29.
- [24] 刘宇卓, 李嘉萍, 李银, 等. 不同佐剂制备的鸡坦布苏病毒灭活疫苗免疫效果比较 [J]. *江西农业学报*, 2016, 28(10): 60-63.
- Liu Y Z, Li J P, Li Y, *et al.* Comparison of immune effect of chicken tembusu virus inactivated vaccine with different adjuvants [J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2016, 28(10): 60-63.
- [25] 刘元杰, 张媛, 王秀丽, 等. 新型动物疫苗佐剂的研究进展 [J]. *中国兽药杂志*, 2021, 55(2): 74-80.
- Liu Y J, Zhang Y, Wang X L, *et al.* Research progress of new animal vaccine adjuvants [J]. *Chinese Journal of Veterinary Drug*, 2021, 55(2): 74-80.
- [26] 潘杰. 猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (YZ 株) 的研制及免疫效力评价 [D]. 扬州: 扬州大学, 2017.
- Pan J. Preparation and immune efficacy of inactivated vaccine (YZ strain) against porcine circovirus 2 infection [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2017.
- [27] 徐守振, 尹燕博, 王新. 动物疫苗中常用抗原灭活剂的研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(9): 162-167.
- Xu S Z, Yin Y B, Wang X. Research progress on routine inactivants in veterinary vaccines [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2010, 37(9): 162-167.

(编辑:李文平)