

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.04.03

狂犬病口服疫苗在实际储运和环境释放中的 消减规律研究

刘 健,白艺兰,桂亚萍,杨显超,夏炉明,龚国华,
陶田谷晟,沈海潇,常晓静,王 建*,赵洪进*

(上海市动物疫病预防控制中心,上海 201103)

[收稿日期] 2022-12-10 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 04-0018-07 [中图分类号] S852.65

[摘 要] 为探索冻干剂、咀嚼剂和喷剂三种剂型的 rAd5- Δ E1/E3-CGS 狂犬病口服疫苗在运输、保存、反复冻融及不同温度下投放时疫苗效价的消减规律,将三种剂型的疫苗经过 2~8℃ 运输 48 h,重新入库的疫苗分别-20℃ 保存 1 年和反复冻融 5 次,再将冻融后疫苗分别于 2~8℃ 保存 4 个月、15℃ 放置 1 个月、25℃ 放置 1 周和 37℃ 放置 3 d,于不同时间点取样检测疫苗效价($\lg$ TCID₅₀/头份)。结果显示,三种口服疫苗经过 2~8℃ 运输 48 h 后,效价分别下降至 6.25、5.75 和 6.25,再经过-20℃ 保存 1 年和反复冻融 5 次后效价分别下降至 5.67、5.33、5.33 和 5.33、5.00、5.67。在 2~8℃ 保存 4 个月,三种剂型口服疫苗效价均能达到 5.00 以上;在 15℃ 放置 1 个月、25℃ 放置 1 周以及在 37℃ 放置 3 d 后,疫苗效价最低分别为 3.75、2.50 和 1.00。研究表明,三种剂型口服疫苗在冷链运输、冷冻保存、反复冻融和低温环境释放条件下具有良好的稳定性,常温环境对咀嚼剂的稳定性影响较小,高温环境会严重降低口服疫苗效价,建议在气温不高于 15℃ 条件下进行 rAd5- Δ E1/E3-CGS 的环境释放。本研究为狂犬病口服疫苗的野外释放提供了数据支撑,也为流浪动物和野生动物的狂犬病疫苗口服免疫提供了技术支持。

[关键词] 狂犬病口服疫苗;rAd5- Δ E1/E3-CGS;疫苗效价;消减规律

Study on the Reduction of Oral Rabies Vaccines in Actual Storage, Transportation and Environmental Release

LIU Jian, BAI Yi-lan, GUI Ya-ping, YANG Xian-chao, XIA Lu-ming, GONG Guo-hua,
TAO Tian-gusheng, SHEN Hai-xiao, CHANG Xiao-jin, WANG Jian*, ZHAO Hong-jin*

(Shanghai Animal Disease Prevention and Control Center, Shanghai 201103, China)

Corresponding authors: WANG Jian, E-mail: jianwhlj@163.com; ZHAO Hong-jin, E-mail: zhaohongjin945@163.com

基金项目:上海市科技兴农重点攻关项目(No. 2020-02-08-00-03-F01460)

作者简介:刘 健,高级兽医师,从事动物病毒学和流行病学研究;白艺兰,助理兽医师,从事动物病毒学研究。二人为共同第一作者。

通讯作者:王 建,E-mail:jianwhlj@163.com;赵洪进,E-mail:zhaohongjin945@163.com

Abstract: To explore the reduction of oral rabies vaccine rAd5 - Δ E1/E3 - CGS in three forms during storage, transportation, repeated freezing and thawing and release at different temperatures, vaccines were transported at 2 ~ 8 °C for 48 hours, and then stored at - 20 °C for 1 year, and repeated freezing and thawing for 5 times respectively. After freezing and thawing, the vaccines were stored at 2 ~ 8 °C for 4 months, at 15 °C for 1 month, at 25 °C for 1 week and at 37 °C for 3 days respectively. The titer of oral vaccines were determined at various time points (lgTCID₅₀/dose). The titer of the oral vaccines after transportation reached 6. 25, 5. 75 and 6. 25, respectively. After stored at - 20 °C for 1 year, and repeated freezing and thawing for 5 times respectively, the titer of the oral vaccines reached 5. 67, 5. 33, 5. 33 and 5. 33, 5. 00, 5. 67. Although the vaccine titer of oral vaccines could reach more than 5. 00 after storage for 4 months at 2 ~ 8 °C, the lowest lgTCID₅₀ was only 3. 75 at 15 °C for 1 month, 2. 50 at 25 °C for 1 week and 1. 00 at 37 °C for 3 days. The three oral vaccines showed good stability under the conditions of cold chain transportation, cryopreservation, repeated freezing and thawing, and low temperature environment release. The normal temperature showed the lowest impact on the stability of chewing agents, but the high temperature seriously reduced the virus titers. It is recommended that the environment temperature should be not higher than 15 °C when the oral vaccine rAd5 - Δ E1/E3 - CGS was released. This study provides data support for the environmental release of oral rabies vaccine, and also provides technical support for the oral immunization of rabies vaccine for stray animals and wild animals.

Key words: oral rabies vaccine; rAd5 - Δ E1/E3 - CGS; vaccine titer; reduction

狂犬病是危害人类健康的最古老疾病之一,由狂犬病病毒引起,人类患者一旦发病,病死率几乎为 100%,是迄今为止人类病死率最高的急性传染病,也是人类尚未能有效控制的疫病之一^[1]。狂犬病疫苗是预防狂犬病唯一有效的方法^[2]。欧洲和北美的许多国家已持续多年无狂犬病发生,得益于采用狂犬病口服疫苗对野生动物进行诱饵口服免疫。在爱沙尼亚、法国、意大利、瑞士、芬兰等国家大规模应用狂犬病口服疫苗后仅几年就使这些国家消除了狂犬病^[3]。对我国 2004 年至 2018 年国内动物狂犬病病例进行回顾性调查时发现,0. 33% (33/10118) 的犬被确诊为狂犬病阳性,阳性犬中 29 只属于流浪犬^[4],因此在我国对流浪犬进行狂犬病免疫可有效减少人狂犬病的发生。由于狂犬病毒的流行面积和宿主范围非常广泛,单靠注射免疫很难消灭狂犬病毒,特别是对于城市的流浪动物,用口服疫苗大面积免疫是消灭犬狂犬病的最有效方法^[5]。

欧美等发达国家从 1978 年就开始大规模应用减毒活疫苗预防动物狂犬病^[6],并明显降低了野生动物狂犬病的发病率,同时也极大减少了被动物致

伤发生的家畜狂犬病和暴露后免疫人数,最终消除了这些国家的人间狂犬病^[7]。早期应用于疫苗的减毒株主要有重组痘病毒 V - RG 株,和一些不同减毒水平的减毒株,如 ERA 株、SADBern 株、SADB19 株和 SAD5/88 株,虽然这些毒株毒力显著减弱,但仍然对小鼠和其他野生动物保留残余毒力,存在传播感染的危害性^[8]。相比之下重组疫苗存在较多的优势,不仅安全可靠,而且可通过口腔、胃肠黏膜进行抗原递呈,较传统注射途径免疫效果好且简便快捷^[9]。表达狂犬病毒糖蛋白重组复制缺陷型人 5 型腺病毒活载体疫苗 rAd5 - Δ E1/E3 - CGS 已被证实能够产生抗狂犬病毒的保护性抗体,是一种安全、可靠、高效的动物狂犬病候选疫苗^[10],但其稳定性受到饵料制备、储运条件、储存时间及投放环境等因素的影响。为探索 rAd5 - Δ E1/E3 - CGS 口服疫苗消减规律,本研究依据饵料制备、储存运输、环境投放等情况设计方案,选取不同剂型疫苗,经储存运输、反复冻融、环境投放不同阶段考察疫苗的效价,并进行统计学分析,为 rAd5 - Δ E1/E3 - CGS 口服疫苗的剂型研制、储备运输、免疫程序提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 疫苗、犬天然诱食剂、口服疫苗佐剂和细胞 rAd5-ΔE1/E3-CGS(农基安证字(2020)第202号)由军事科学院军事医学研究院军事兽医研究所提供;犬天然诱食剂由上海诺伦生物医药技术有限公司提供;口服疫苗佐剂由上海市农业科学院畜牧兽医研究所提供;293A细胞购自商城北纳创联生物科技有限公司。

1.2 主要试剂与仪器 DMEM 细胞培养液(批号:2126865)、0.25% 浓度胰酶消化液(批号:2142303)均购自 GIBCO 公司;胎牛血清(批号:2418)购自 SIGMA 公司;96 孔细胞培养板(批号:25200601)购自美国 Costar 公司。

1.3 口服疫苗制备(见表 1)

1.3.1 rAd5-ΔE1/E3-CGS TCID₅₀ 测定 rAd5-ΔE1/E3-CGS 同步接种 293A 细胞,置 37℃ 含 5% CO₂ 培养箱培养 48~72 h,待 80% 细胞出现聚集、圆缩、脱落等细胞病变,将培养液冻融三次,2 000 r/min 离心 5 min,取上清备用,同时按照 Reed-Muench 法测定 TCID₅₀。

1.3.2 口服疫苗冻干剂制备 将疫苗稀释至 1.0×10⁸ TCID₅₀/mL,加入等体积的脱脂奶溶液(0.1 g/mL),按照 2 mL/头份进行分装,真空、冻干,-20℃ 保存备用,一周以后测定其 TCID₅₀。

1.3.3 口服疫苗咀嚼剂制备 将疫苗稀释至 1.0×10⁸ TCID₅₀/mL,每头份咀嚼剂取 1 mL 病毒液、1 mL 工作浓度佐剂加入到 10 g 犬天然诱食剂中,充分混匀,用模具压制成药型,真空、冻干,-20℃ 保存备用,一周以后测定其 TCID₅₀。

1.3.4 口服疫苗喷剂制备 将疫苗稀释至 1.0×10⁸ TCID₅₀/mL,每头份取 1 mL 病毒液、1 mL 工作浓度佐剂和 1 mL 脱脂奶溶液(0.1 g/mL)充分混匀,真空、冻干,-20℃ 保存备用,一周以后测定其 TCID₅₀。

1.4 运输稳定性试验 三种剂型口服疫苗在野外投放前主要通过低温冷链运输,按照最远距离计算从出库至各区疫控中心,再到各免疫点,最后到达投放点时间不超过 48 h。分别将三种剂型口服疫苗置 2~8℃ 冷藏车内进行 48 h 的运输,期间模拟

表 1 试验用疫苗

Tab 1 Vaccines used in this study				
口服疫苗	批号	lgTCID ₅₀ /头份	数量/头份	储存温度
冻干剂	V20210501	7.67	100	-20℃
咀嚼剂	C20210501	6.75	100	-20℃
喷剂	S20210501	7.50	100	-20℃

10 次开门卸货入库,每次各取 1 头份口服疫苗测定其 TCID₅₀。待口服疫苗返回后入库储存于 -20℃ 备用,分别于入库后第 3、6、9 和 12 个月测定口服疫苗效价。以储存于 -20℃ 未经运输的对应口服疫苗作为对照疫苗。

1.5 反复冻融稳定性试验 将通过运输后重新入库的备用疫苗室温放置 12 h 后,再将其回置 -20℃ 冷冻 12 h,反复 5 次,每次取 1 头份测定其 TCID₅₀,剩余疫苗重新入库于 -20℃ 以下储存。以储存于 -20℃ 未经冻融的疫苗作为对照疫苗。

1.6 不同保存温度下的稳定性试验 将反复冻融后重新入库的备用疫苗分别于 2~8℃ 保存 4 个月,每隔 1 个月取样检测疫苗效价;于 15℃ 放置 1 个月,每周取样检测疫苗效价;于 25℃ 放置 1 周,每天取样检测疫苗效价;于 37℃ 放置 3 d,每 12 h 取样检测疫苗效价。均以各温度下 0 时间点的疫苗作为对照。

1.7 统计学分析 疫苗效价检测结果均采用 lgTCID₅₀/头份,保留小数点后 2 位。用 SPSS statistics 软件进行数据的统计及分析,采用单因素方差分析(*F*)对不同条件下的疫苗进行病毒滴度比较,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 运输稳定性 结果见图 1。三种剂型口服疫苗经过 48 h 运输和开门卸货后,冻干剂效价下降了 1.42,咀嚼剂下降了 1.00,喷剂下降了 1.25,但是三种剂型口服疫苗效价均能达到 5.75 以上。经统计学分析,在不同开门卸货次数条件下,咀嚼剂相比冻干剂效价差异显著,具有统计学意义(*F*_{咀嚼剂}=14.810,*P*<0.05);喷剂相比冻干剂也同样差异显著,具有统计学意义(*F*_{喷剂}=29.133,*P*<0.05)。咀嚼剂、喷剂相对冻干剂效价下降差异显著,具有统计学意义(*F*_{咀嚼剂}=10.529,*F*_{喷剂}=19.803,*P*<0.05)。

运输后入库的口服疫苗于 -20°C 储存 3、6、9、12 个月的效价变化见图 2。运输后 -20°C 储存,冻干剂疫苗效价下降了 0.58,咀嚼剂下降了 0.42,喷剂下降了 0.92,但是均能达到 5.33 以上。经统计学分析,在不同时间点条件下,冻干剂、咀嚼剂和喷剂相对对照疫苗效价均差异不显著,无统计学意义 ($F_{\text{冻干剂}} = 17.488, F_{\text{咀嚼剂}} = 9.418, F_{\text{喷剂}} = 73.846, P > 0.05$);咀嚼剂、喷剂相对冻干剂效价下降差异同样不显著,无统计学意义 ($F_{\text{咀嚼剂}} = 2.293, F_{\text{喷剂}} = 2.293, P > 0.05$)。

2.2 反复冻融稳定性 运输后重新入库的疫苗反复冻融 5 次后其效价变化见图 3。冻融后,冻干剂效价下降了 0.92,咀嚼剂下降了 0.75,喷剂下降了 0.58,但是均能达到 5.00 以上。经统计学分析,冻融后,咀嚼剂、喷剂相对冻干剂效价差异不显著,无统计学意义 ($P > 0.05$);咀嚼剂、喷剂相对冻干剂效价下降差异显著,具有统计学意义 ($F_{\text{咀嚼剂}} = 10.529, F_{\text{喷剂}} = 19.803, P < 0.05$)。

2.3 不同保存温度下疫苗的稳定性 结果见图 4。

2.3.1 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存 4 个月 冻干剂效价下降了 0.33,咀嚼剂下降了 0.67,喷剂下降了 0.67,但是均能达到 5.00 以上。经统计学分析,冻干剂、咀嚼剂相对对照疫苗效价差异不显著,无统计学意义 ($P > 0.05$);但是喷剂相对对照疫苗效价差异显著,有统计学意义 ($F_{\text{喷剂}} = 22.894, P < 0.05$);咀嚼剂、喷剂相对冻干剂效价下降差异不显著,无统计学意义 ($F_{\text{咀嚼剂}} = 0.982, F_{\text{喷剂}} = 1.549, P > 0.05$)。

2.3.2 15°C 保存 1 个月 冻干剂效价下降了 1.58,咀嚼剂下降了 0.75,喷剂下降了 1.34,疫苗效价最低只有 3.75。冻干剂、咀嚼剂和喷剂相对对照疫苗效价差异均不显著,无统计学意义 ($P > 0.05$);咀嚼剂、喷剂相对冻干剂效价下降差异也不显著,无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3.3 25°C 保存 1 周 冻干剂效价下降了 2.66,咀嚼剂下降了 2.50,喷剂下降了 3.34,疫苗效价最低只有 2.50。冻干剂、咀嚼剂和喷剂相对对照疫苗效价差异均不显著,无统计学意义 ($P > 0.05$);咀嚼剂、喷剂相对冻干剂效价下降差异也不显著,无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3.4 37°C 保存 3 d 冻干剂效价下降了 3.66,咀嚼剂下降了 4.00,喷剂下降了 3.67,疫苗效价最低只有 1.00。冻干剂、咀嚼剂和喷剂相对对照疫苗效价差异均不显著,无统计学意义 ($P > 0.05$);咀嚼剂、喷剂相对冻干剂效价下降差异也不显著,无统计学意义 ($P > 0.05$)。

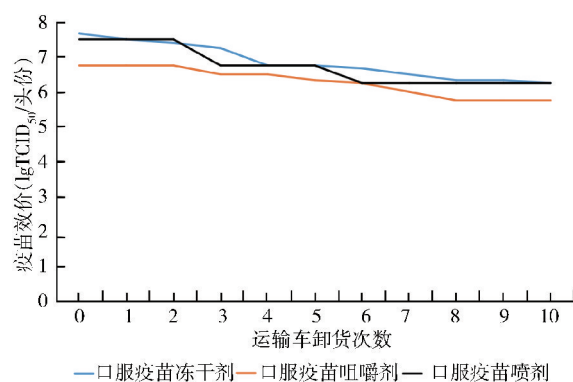


图 1 经过 48 h 运输口服疫苗效价检测结果

Fig 1 Titer determination of oral vaccines after 48 h transportation

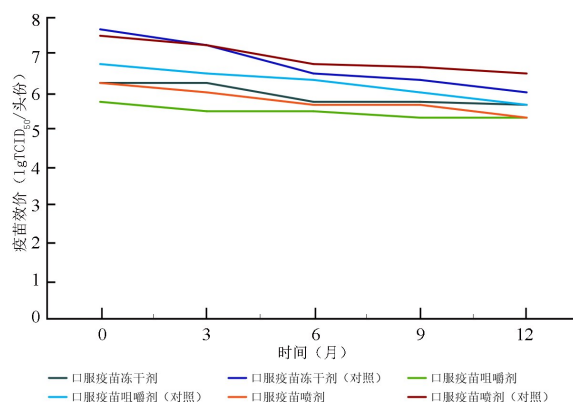


图 2 -20°C 储存 3、6、9 和 12 个月后口服疫苗效价检测结果

Fig 2 Titer determination of oral vaccines preserved at -20°C for 3, 6, 9 and 12 months

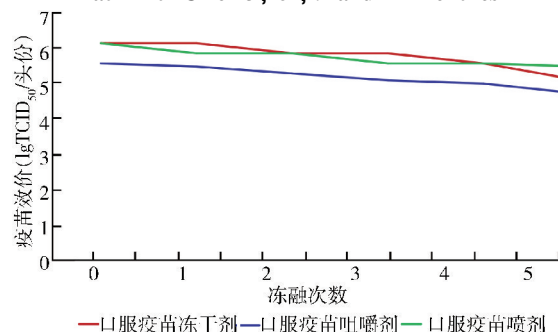


图 3 反复冻融后口服疫苗效价检测结果

Fig 3 Titer determination of oral vaccines after repeated freezing and thawing

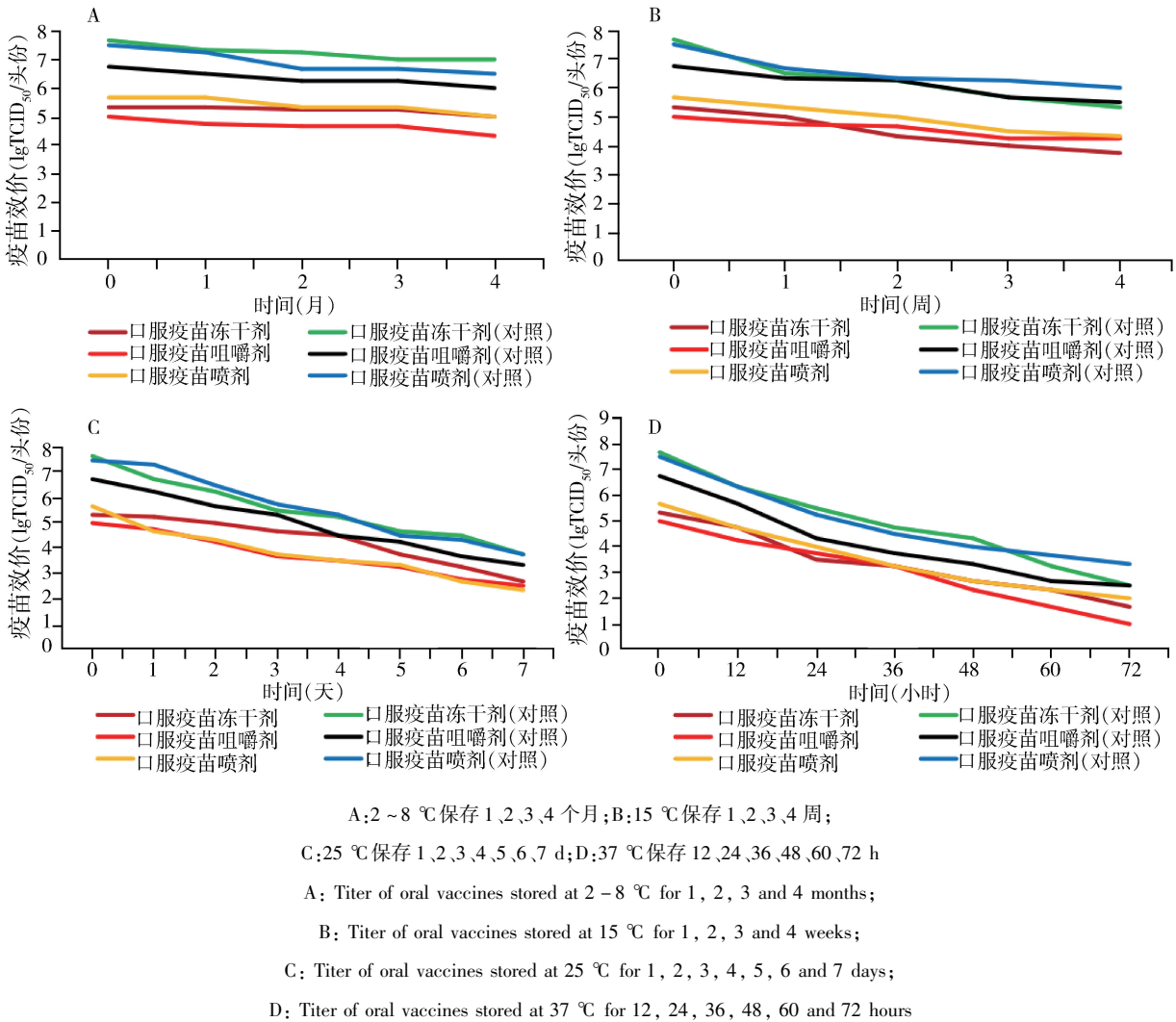


图 4 不同保存温度下口服疫苗效价检测结果

Fig 4 Titer determination of oral vaccines preserved at different temperatures

3 讨 论

腺病毒作为基因传递和表达的有效工具满足了作为重组疫苗载体的诸多条件,目前已经大量的用于疫苗的研发和临床基因治疗领域,其中研究应用最广泛的为人 5 型腺病毒^[11]。rAd5 – ΔE1/E3 – CGS 属于表达狂犬病病毒糖蛋白基因 RABV – G 的重组复制缺陷型人 5 型腺病毒活载体疫苗,不仅可以高效表达狂犬病病毒 G 蛋白,而且其自身的复制缺陷也增加了口服疫苗的安全性^[12],并获得了农业转基因生物安全证书。由于口服疫苗对冷链温度偏移十分敏感,因此在制备、储存、运输、投放过程中的温度和时间控制尤为重要,高温影响疫苗效

价,或导致接种无效;低温可影响疫苗形态,直接影响疫苗的安全性和稳定性,且形态变化多是不可逆的^[13],因此在口服疫苗投放使用前,应当对口服疫苗在实际储运和环境释放中疫苗效价的消减规律进行研究。

狂犬病口服疫苗 rAd5 – ΔE1/E3 – CGS 在被制备成三种剂型后,效价均有所下降,其中咀嚼剂下降最多,达到 1.25,可能与犬天然诱食剂中未添加脱脂奶,冻干后保护能力差有关。在冷链运输和开门卸货后,虽然相对冻干剂,咀嚼剂和喷剂效价差异显著,但是效价下降差异并不显著,疫苗效价仍然保持在最低 5.75 以上,证明冷链运输中三种剂

型口服疫苗均较稳定。运输后储存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 1 年,三种剂型口服疫苗效价下降最高不超过 1.00,最低疫苗效价仍可以达到 5.33 以上,因此通过运输后进入免疫点 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的口服疫苗保存期至少可以达到 1 年。储存于免疫点的口服疫苗投放前会经过反复冻融,冻融 5 次后效价最高下降了 0.92,疫苗效价最低仍可达 5.00,冻干剂、咀嚼剂和喷剂相对对照疫苗效价差异不显著,但是咀嚼剂和喷剂相对冻干剂疫苗效价下降差异显著,说明三种剂型口服疫苗对冻融都具有较强的抵抗力,其中咀嚼剂抵抗冻融的效果最佳,说明野外投放的口服疫苗短暂失温并不影响疫苗的效价。

活疫苗效价的下降值与保存时间呈正比关系,但是保存的温度直接影响疫苗效价的下降率。 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 为口服疫苗的暂存温度,在保存 4 个月后,疫苗效价最多也只下降了 0.67,效价均在 5.00 以上,说明冻干更有利于口服疫苗的保存,从而保证口服疫苗在冷藏情况下短期保存并不影响它的效价。 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 是疫苗野外投放的平均温度,咀嚼剂在保存 2 周后,疫苗效价仍然能够达到 4.67,说明咀嚼剂在野外投放温度不超过 $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的情况下,其投放的有效时间可达 2 周。 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 情况下疫苗效价下降非常快,且温度越高,效价下降越快,差异越不明显,这与 Shrivastava 等人研究结果一致^[14],因此高温季节不建议进行狂犬病口服疫苗的野外投放。

国内流浪犬猫狂犬病口服疫苗免疫尚处于探索阶段,rAd5- $\Delta\text{E1/E3}$ -CGS 已被证明能产生较好的中和抗体^[10],虽然目前病毒滴度还够高,不能满足大规模的临床应用,但梁武等人采用细胞微载体悬浮培养工艺实现了 PCV2 的量产^[15],为优化 rAd5- $\Delta\text{E1/E3}$ -CGS 培养条件、提高病毒滴度、逐步实现其量产提供了研究思路。本研究为狂犬病 rAd5- $\Delta\text{E1/E3}$ -CGS 口服疫苗的野外释放提供了数据支撑,也为流浪动物和野生动物的狂犬病疫苗口服免疫提供了技术支持。

参考文献:

- [1] 胡志鹏,钟江. 狂犬病病毒研究进展[J]. 微生物与感染, 2007, 2(02): 120-124, 127.
Hu Z P, Zhong J. Research progress of rabies virus[J]. Journal of Microbes and Infections, 2007, 2(02): 120-124, 127.
- [2] 赵忠鹏,夏咸柱,扈荣良,等. 表达狂犬病毒糖蛋白抗原的重组犬 2 型腺病毒的构建及鉴定[J]. 微生物学报, 2007, 47(02): 335-339.
Zhao Z P, Xia X Z, Hu R L, *et al.* Construction and identification of recombinant canine adenovirus type 2 expressing exogenous rabies glycoprotein (Rgp) [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2007, 47(02): 335-339.
- [3] Mähl P, Cliquet F, Guiot A L, *et al.* Twenty year experience of the oral rabies vaccine SAG2 in wildlife: a global review[J]. Veterinary research, 2014, 45(1): 77.
- [4] Feng Y, Wang Y Y, Xu W D, *et al.* Animal rabies surveillance, China, 2004-2018[J]. Emerging Infectious Diseases, 2020, 26(12): 2825-2834.
- [5] 秦梅,刘延亭,侯艳红. 口服狂犬病毒疫苗诱饵的研究进展[J]. 中国动物保健, 2016, 18(01): 66-69.
Qin M, Liu Y T, Hou Y H. An overview of oral rabies vaccine bait[J]. Chinese Animal Health, 2016, 18(01): 66-69.
- [6] 郑海发. 口服狂犬病疫苗[J]. 微生物学免疫学进展, 1995, 23(03): 158-162.
Zhen H F. Oral rabies vaccine[J]. Progress in Microbiology Immunology, 1995, 23(03): 158-162.
- [7] 俞永新,石磊泰. 中国狂犬病口服疫苗的研究进展及其应用的紧迫性[J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(11): 973-980.
Yu Y X, Shi L T. Research progress and urgency of application of oral rabies vaccines for dogs in China[J]. Chinese Journal Zoonoses, 2019, 35(11): 973-980.
- [8] 俞永新. 人和动物狂犬病防制研究进展[J]. 中国人兽共患病杂志, 1998, 14(04): 56-60.
Yu Y X. Research progress in the prevention and control of human and animal rabies[J]. Chinese Journal Zoonoses, 1998, 14(04): 56-60.
- [9] 刘晓志,赵会景,郑海洲,等. 口服型狂犬疫苗研究进展[J]. 白求恩军医学院学报, 2010, 8(04): 283-284.
Liu X Z, Zhao H J, Zhen H Z, *et al.* Research progress of oral rabies vaccine[J]. Journal of Bethune Military Medical College, 2010, 8(04): 283-284.

[10] 王 颖, 张守峰, 刘 晔, 等. 狂犬病病毒糖蛋白重组人腺病毒的构建及免疫效果的初步研究[J]. 病毒学报, 2011, 27(05): 442 – 446.

Wang Y, Zhang S F, Liu Y, *et al.* Generation and preliminary immunological efficacy of a recombinant human adenovirus – rabies virus glycoprotein[J]. Chinese Journal of Virology, 2011, 27(05): 442 – 446.

[11] 徐 莉, 李 敏. 腺病毒载体疫苗药理学评价的思考[J]. 中国生物制品学杂志, 2022, 35(06): 763 – 768.

Xu L, Li M. Reflection on pharmaceutic evaluation of adenovirus vector vaccine [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2022, 35(06): 763 – 768.

[12] Wang S C, Sun C L, Zhang S F, *et al.* Glycoprotein from street rabies virus BD06 induces early and robust immune responses when expressed from a non – replicative adenovirus recombinant [J]. Archives of Virology, 2015, 160(09): 2315 – 2323.

[13] 马汝飞, 傅宇婷, 李国良, 等. I 型Ⅲ型脊髓灰质炎减毒活疫苗(人二倍体细胞)实际储运中的稳定性[J]. 中国生物制品学杂志, 2020, 33(08): 855 – 863.

Ma R F, Fu Y T, Li G L, *et al.* Stability of types I and Ⅲ oral live attenuated poliomyelitis vaccine (human diploid cells) in actual storage and transportation environment [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2020, 33(08): 855 – 863.

[14] Shrivastava A, Gupta N, Upadhyay P, *et al.* Caution needed in using oral polio vaccine beyond the cold chain; vaccine vial monitors may be unreliable at high temperatures[J]. The Indian Journal of Medical Research, 2012, 135(4): 520 – 522.

[15] 梁 武, 乔 健, 李亚杰, 等. PK – 15 细胞微载体悬浮培养及 PCV2 增殖工艺研究[J]. 中国兽医杂志, 2019, 55(04): 103 – 106, 110.

Liang W, Qiao J, Li Y J, *et al.* Study on PK15 cell microcarrier suspension culture and proliferation process of porcine circovirus type 2[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2019, 55(04): 103 – 106, 110.

(编 辑:李文平)