

共表达传染性支气管炎病毒 S1 基因和鸡干扰素- γ 基因的重组鸡痘病毒部分生物学特性测定

王云峰^{1,2}, 石星明², 王 玫², 刘胜旺², 童光志^{2*}, 崔红玉², 木古丽²
徐灵龙², 何 来², 贺 笋², 葛俊伟¹, 李一经¹

(1. 东北农业大学动物医学学院, 哈尔滨 150030;

2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室禽传染病研究室, 哈尔滨 150001)

摘要: 将共表达传染性支气管炎病毒 S1 基因和鸡干扰素- γ 基因的重组鸡痘病毒(rFPV-IFN γ S1)接种 4 周龄 SPF 鸡, 免疫 3 周后用异源病毒 LSC99I 株攻击, 考察重组疫苗对异源病毒攻击的保护作用。结果显示, 疫苗接种后, 免疫鸡血清中很快出现抗体; 外周血中 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞的百分含量略高于非免疫对照组, 但这种差异并不显著。LSC99I 株 IB 病毒攻击后的保护率结果表明, 免疫组的发病率为 50% (5/10), 死亡率为 20% (2/10), 非免疫对照组的发病率为 100% (10/10), 死亡率为 50% (5/10); 另外免疫鸡的病理损伤程度与非免疫对照组相比, 二者差异不明显, 在排毒时间和排毒量上也没有明显变化。体重分析结果显示, 攻毒前免疫组与对照组相比, 体重均没有显著变化, 但攻毒后免疫组鸡体重增长的幅度要高于非免疫对照组。从以上结果可以说明, 重组疫苗虽然能在动物体内很好地表达, 但不能对实验动物产生很好的保护作用, 而鸡干扰素- γ 基因能在动物体内表达并发挥其免疫调节作用, 减轻了重组疫苗对体重增长的影响。

关键词: 传染性支气管炎; 重组鸡痘病毒; 干扰素- γ ; S1 蛋白

中图分类号: S852.4; S858.315.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)10-1077-06

Partial Biological Character Detection of Fowlpox Virus Recombinant Co-expressing the IBV-S1 Gene and the Chicken IFN γ Gene

WANG Yun-feng^{1,2}, SHI Xing-ming², WANG Mei², LIU Sheng-wang², TONG Guang-zhi^{2*},
CUI Hong-yu², MU Gu-li², XU Ling-long², HE Lai², HE Sun², GE Jun-wei¹, LI Yi-jing¹

(1. *College of Veterinary Medicine, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China*; 2. *Division of Avian Infectious Diseases, National Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150001, China*)

Abstract: Four-week old SPF chickens were inoculated with fowlpox virus vaccine co-expressing gene S1 of infectious bronchitis virus (IBV) and the chicken interferon- γ gene(rFPV-IFN γ S1). SPF chickens were challenged with a heterologous IBV strain LSC99I to investigate protective efficacy of the recombinant virus to heterologous virus after three weeks post-inoculation. The results showed that chickens immunized with rFPV-IFN γ S1 developed IBV specific antibodies in serum one week after immunization, the ratio of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte in chicken's peripheral blood of immunized group was a little higher than that of the non-vaccinated group, but the difference was inapparent. Morbidity and mortality of immunized group were 50% (5/10) and 20% respectively after challenge with LSC99I compared with 100% (10/10) and 50% (5/10) of

收稿日期: 2006-11-08

作者简介: 王云峰(1967-), 男, 江苏东台人, 研究员, 博士, 主要从事病毒载体疫苗研究, Tel: 0451-85935058, E-mail: yfwang@hvri.ac.cn

* 通讯作者: 童光志, E-mail: gztong@hvri.ac.cn

non-vaccinated group, chickens in immunized group had slighter pathological changes when compared to that of non-vaccinated group, but the difference was indistinctive. The length and titer of virus shedding for two groups showed no significant difference. Bodyweight analysis indicated that chickens in both groups showed inapparent weight change before challenge; after challenge, chickens in immunized group had a higher weight gain than chickens in non-vaccinated group. In conclusion, rFPV-IFN γ S1 cannot protect chickens against the challenge of heterologous IBV strain LSC99I although it can produce IBV-specific antibodies in chickens, chicken IFN- γ is well expressed *in vivo* and play a role in immunomodulatory which can alleviate the effect of recombinant virus immunization on chicken bodyweight gain.

Key words: infectious bronchitis; recombinant fowlpox virus; interferon- γ ; S1 protein

传染性支气管炎(Infectious bronchitis, IB)是由鸡传染性支气管炎病毒(Infectious bronchitis virus, IBV)引起的鸡的一种急性、高度接触性传染病,给世界养禽业造成了严重的经济损失。长期以来,通常采用弱毒活疫苗对 IB 进行预防控制,取得了一定的效果。但弱毒疫苗在使用过程中存在毒力容易返强的隐患^[1]。由于 IBV 具有高度的变异性,病毒基因组 RNA 的点突变、缺失和插入突变以及不同毒株(包括疫苗毒株)基因组间的同源重组均可导致新的变异株产生^[2]。灭活疫苗的使用有助于解决上述问题,但灭活疫苗副作用大,免疫后能够造成较严重的和较长时间的局部反应,况且灭活疫苗对冠状病毒感染的免疫效果不确实^[3,4]。病毒活载体疫苗接种动物体后,既能产生有效的体液免疫,能诱导细胞免疫,可以模拟弱毒活疫苗的免疫作用^[5],为上述问题的解决提供了一项有效的措施。据此,本研究小组利用鸡痘病毒作为载体成功表达了传染性支气管炎病毒 S1 基因,初步的免疫试验证明重组疫苗具有良好的免疫效果^[6]。

干扰素是一种重要的细胞因子,它具有抗病毒、抗肿瘤活性,以及免疫调节作用,在基因工程疫苗构建中得到了广泛应用^[7],尤其是鸡 II 型干扰素。鸡 II 型干扰素(又称干扰素- γ , ChIFN γ)是由抗原或有丝分裂原激活的 T 细胞所合成、分泌的一种细胞因子,具有促进 MHC II 类抗原表达、增强 APC 细胞与 T 细胞的相互作用、增强 T 细胞辅助抗体产生和细胞毒性 T 细胞产生等诸多免疫调节活性,是十分重要的免疫调节因子,具有较强的佐剂效应。目前,已有利用干扰素的这一生物学特性将其开发为佐剂的报道^[8]。另外,干扰素还可以有效地抑制由于鸡痘疫苗免疫接种造成的增重减轻效应^[9],这对缓解鸡痘病毒载体的残留毒性和副作用具有重要意义。

为了更好地发挥重组鸡痘病毒疫苗的优势,降低毒副作用,笔者将 ChIFN γ 基因插入鸡痘病毒载体中,构建了共表达传染性支气管炎病毒 S1 基因和鸡干扰素- γ 基因的重组鸡痘病毒 rFPV-IFN γ S1。

本研究构建的重组病毒对同源传染性支气管炎病毒能产生坚强、可靠的保护力,而对于不同地区的地方分离株保护效果如何尚缺乏试验依据。张庆霞^[10]在利用分子流行病学手段分析我国主要 IBV 分离株 S1 基因系统发育进化关系时发现,我国分离到的地方分离株由于地域的不同,其 S1 基因的亲缘关系也不一样,已经形成了独立的进化群,这将为国内传染性支气管炎病毒的防控提供一定的借鉴。本研究攻毒所用的 LSC99I 毒株与 S1 基因来源毒株 LX4 株来源于不同的地区,虽然二者在致病型上都属于肾型,但二者在 S1 基因的进化关系较远,二者分属不同的基因群,其中 LX4 毒株的 S1 基因属于 I 群,而 LSC99I 毒株的 S1 基因属于 IV 群^[10],这对于检验重组疫苗的应用范围,确定重组疫苗对异源毒株的保护效果具有重要的理论意义和实践意义。

1 材料与方法

1.1 试验用 SPF 鸡

试验用 SPF 来航鸡及 SPF 鸡胚均由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心提供,试验鸡试验期间饲养于负压隔离器中。

1.2 攻毒所用病毒和疫苗

LSC99I 毒株为四川分离株,对鸡胚的致病力为 $10^{6.4}$ EID₅₀/mL,致病型为肾型,由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所刘胜旺研究员分离和鉴定;rFPV-IFN γ S1 是一株共表达传染性支气管炎病毒 S1 基因和鸡干扰素- γ 基因的重组鸡痘病毒^[11],试验前

加入一定比例的明胶-蔗糖保护剂,制成冻干疫苗(哈尔滨维科生物技术开发公司试生产,批号为 050310)。

1.3 试验设计

取 20 只 4 周龄 SPF 鸡随机分为 2 组,每组 10 只。其中的 1 组免疫接种重组鸡痘疫苗,免疫剂量为 1 000 PFU/羽;另外 1 组作为非免疫对照,另笼饲养。免疫后 3 周,用 LSC99I 株 IBV 通过滴鼻途径攻毒,攻毒剂量为 $10^{4.4}$ EID₅₀/羽。

1.4 检测指标

1.4.1 组织病理学检查 在疫苗接种后的 6 和 10 d 分别从各试验组中随机剖杀 2 只鸡,采集肝脏、肾脏、脾脏、肺脏、气管和腺胃,观察其病理组织变化。各组织病变程度的判定标准:“++++”,“+++”,“++”,“+”和“-”。典型病变如下。

1.4.1.1 肾:间质局灶性淋巴细胞减少,肾实质坏死,肾小球毛细血管扩张,间质充血,细尿管空泡变性,上皮细胞坏死,肾小球坏死,间质性肾炎病变,输尿管上皮空泡变性。

1.4.1.2 肺:瘀血,浆液渗出,局灶性淋巴细胞减少(多在三级支气管黏膜下),细支气管(二级)空泡变性,固有层水肿,淋巴细胞减少,少数上皮坏死脱落。

1.4.1.3 气管:固有层淋巴细胞减少,黏膜下水肿,上皮空泡变性、坏死、脱落。

1.4.1.4 腺胃:黏膜固有层淋巴细胞减少,小叶内灶状坏死,淋巴细胞减少。

1.4.1.5 肝:脂肪变性,间质灶状淋巴细胞减少。

1.4.1.6 脾:红髓增生,骨髓结构紊乱,滤泡增生,与周围难以分辨。

1.4.2 IBV 抗体的检测 采用 IDEXX 公司的 IBV ELISA 检测试剂盒提供的检测方法检测血清抗体滴度。

1.4.3 外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞百分比含量的检测 从各组鸡中随机选取 4 只,采用 SouthernBiotech 公司的 FITC 标记的兔抗鸡 CD4⁺、CD8⁺ 表面标记蛋白单克隆抗体检测 T 淋巴细胞亚类的变化^[12]。

1.4.4 体重检测 所有鸡分别在免疫前、免疫后 10 d、攻毒前和攻毒后 10 d 称量体重。应用 STATISTICA 软件用 *t* 检验方法和 GLM 方法比较数据间的差异。

1.4.5 攻毒后实验动物排毒情况检测 从各组鸡中随机选取 4 只,分别在攻毒后的 3、6、10 和 13 d 采集喉拭子,进行病毒分离^[15]并判定阳性率。

2 结果与分析

2.1 病理组织学变化

在疫苗接种后 3 周,用 IBV LSC99I 株病毒攻击,结果(表 1)显示,非免疫对照组和免疫组的肾脏、肝脏、腺胃、气管和肺脏都有不同程度的损伤,对照组的损伤程度略重于免疫组,但二者差异并不明显。

表 1 IBV LSC99I 株攻毒后病理组织学变化

Table 1 Histopathologic changes after challenge with the IBV LSC99I strain

组别 Groups	攻毒后时间/d Days post challenge	肾脏 Kidney	肝脏 Liver	脾脏 Spleen	腺胃 Glandular stomach	气管 Trachea	肺脏 Lung
rFPV-IFN γ S1	6	+	++	-	+	++	+
	10	+	+	-	-	+	+
对照 Control	6	++	++	+	++	++	++
	10	+	+	+	+	+	+

- . 表示病理组织学变化阴性;+ . 表示病理组织学变化阳性

- . Shows no histopathologic change was found; + . Shows histopathologic change occurred

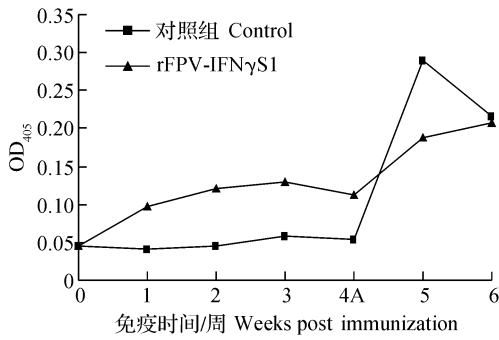
2.2 攻毒前后抗 IBV 抗体变化

在疫苗免疫后 1 周,即可从免疫组鸡血清中检测到 IBV 抗体,攻毒前有一个小的回落,而对照组一直到攻毒前均未能检测到抗体;攻毒后 1 周,免疫组与对照组的抗体水平明显提高,对照组抗体水

平略高于免疫组(图 1)。

2.3 外周血 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞的动态变化

图 2 和图 3 的结果显示,免疫后,免疫组和对照组 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞均呈上升趋势,其中免疫组的 T 淋巴细胞数量略高于非免疫对照组。攻

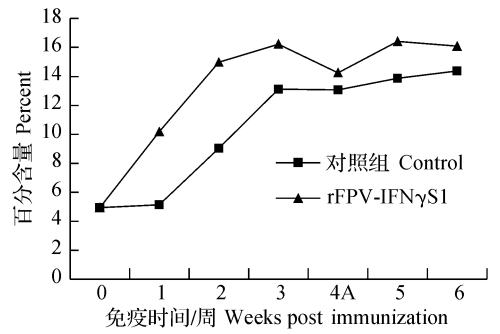


A. 攻毒时间

A. The time of virus challenge

图 1 重组疫苗免疫后血清抗体的检测

Fig. 1 The serum antibody response in chickens after immunization with recombinant vaccine



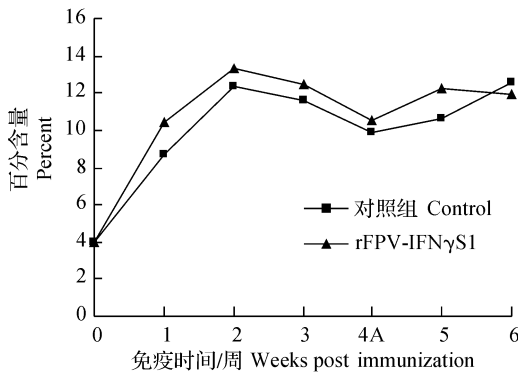
A. 攻毒时间

A. The time of virus challenge

图 3 外周血 CD8⁺ T 淋巴细胞亚类动态变化

Fig. 3 Dynamics of CD8⁺ T lymphocytes in peripheral blood of chickens

毒前,免疫组 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞水平有一个小的回落;攻毒后 CD4⁺、CD8⁺ T 淋巴细胞都略有上升。



A. 攻毒时间

A. The time of virus challenge

图 2 外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞亚类动态变化

Fig. 2 Dynamics of CD4⁺ T lymphocytes in peripheral blood of chickens

2.4 鸡体重变化

本研究小组初步进行的免疫试验结果表明, S-FPV-017 疫苗毒免疫组、rFPV-IBVS1 疫苗免疫组与空白对照组的体重数据差异显著,而含有干扰素基因的免疫组与对照组在整个试验过程中均没有显著差异^[13],说明鸡 IFN- γ 基因在动物体内发挥了免疫调节作用,减轻了鸡痘病毒载体对接种鸡增重的抑制作用。本次研究结果表明,免疫组和非免疫组的体重在攻毒前和攻毒后都没有显著差异 ($P > 0.05$),与上述试验结果相符(表 2)。

2.5 免疫鸡的攻毒保护效果

在受到 IBV 攻击之后 4~10 d 鸡只陆续发病,并有死亡。非免疫对照鸡发病率和死亡率分别为 100%(10/10)和 50%(5/10),而免疫组的发病率和死亡率分别为 50%(5/10)和 20%(2/10)。

2.6 病毒分离结果

从病毒分离结果(表 3)看,免疫组的阳性检出率为 80%(4/5),而对照组的阳性检出率为 100%(5/5);免疫组的排毒时间与非免疫对照组排毒时间相当。

表 2 鸡免疫后体重检测结果

Table 2 Results of weight after immunization

g

组别 Groups	免疫前 Before immunization	免疫后 10 d 10 days after immunization	攻毒前 Before challenge	攻毒后 10 d 10 days after challenge
rFPV-IFN γ S1	113.33±23.76	235.90±18.79	425.30±40.47	645.28±81.84
对照组 Control	152.22±14.59	228.10±36.98	403.10±51.69	595.57±78.84

表 3 IBV LSC99I 株攻毒后病毒分离结果

Table 3 Virus isolation results of different groups after challenge with IBV LSC99I strain

组别 Groups	攻毒后 3 d 3 days post challenge	攻毒后 6 d 6 days post challenge	攻毒后 10 d 10 days post challenge	攻毒后 13 d 13 days post challenge
rFPV-IFN γ S1	4/5	3/5	1/5	0/5
对照组 Control	4/5	5/5	1/5	0/5

3 讨论

S1 蛋白是 IBV 的主要免疫原蛋白,含有能诱导机体产生中和抗体、血清型特异性抗体和血凝抑制抗体的抗原决定簇,其作用主要表现为刺激机体产生中和抗体^[14],决定病毒的组织嗜性,在病毒吸附细胞的过程中发挥重要作用,并在血清学分类中有重要意义。近年来,S1 基因是重组疫苗研究的主要对象。

鸡痘病毒疫苗株被广泛用做构建基因工程疫苗的载体病毒,尽管毒副作用较小,但对接种鸡的体重增长仍有轻度的抑制作用。研究人员尝试过多种方法来降低重组鸡痘病毒的毒副作用,其中之一就是在疫苗中引入具有免疫调节作用的细胞因子,如干扰素。鸡 IFN- γ 具有免疫调节活性,还能增加体重和减少应激等^[7]。

本研究将 IBV S1 基因及鸡 IFN- γ 基因同时插入鸡痘病毒载体中,获得共表达 IBV S1 基因和鸡 IFN- γ 基因的重组鸡痘病毒。动物攻毒试验结果表明,在发病率保护水平上,重组疫苗对异源毒株攻击的发病率为 50%(5/10),而同源毒株的发病率为 25%(4/16)^[15],差异显著($P < 0.05$);在死亡率保护水平上,重组疫苗对异源毒株的死亡率为 20%(2/10),略高于同源毒株的 6.25%(1/16)^[12]。由此可以认为,重组疫苗对异源 LSC99I 株的攻击可以产生一定的保护,一定程度上抑制了病毒的复制(疫苗免疫鸡的病毒分离率低于非免疫对照鸡),但是这种保护还不够坚强、可靠,重组疫苗不能使免疫鸡完全抵抗 IBV 异源毒株的攻击;但体重检测结果显示,该疫苗能减轻鸡痘病毒载体对接种鸡体重增长的抑制作用,这说明鸡 IFN- γ 基因可以在机体内得到表达,并发挥了免疫调节作用。

机体中 T 淋巴细胞各亚群在诱导机体的细胞免疫应答反应方面发挥重大作用,当有抗原刺激时,即可出现各类功能性 T 淋巴细胞数量及免疫活性

的改变,从而对机体产生一定的保护作用。Seon 等^[16]对 IBV 的细胞免疫作了探讨,在 IBV 刺激的 T 细胞中,分别去除 CD8⁺和 CD4⁺细胞后移植至雏鸡体内后攻毒,观察各自的免疫保护情况。结果表明,去除 CD4⁺细胞后的雏鸡能抵抗 IBV G 株的感染,并使肺、肾中检出的病毒减少,而去除 CD8⁺细胞试验组与对照组一样不能提供保护,肺和肾组织中可分离到病毒,从而证实在 IBV 急性感染中,CD8⁺细胞对鸡具有保护作用。在本研究中,重组疫苗免疫后,从 CD4⁺及 CD8⁺T 淋巴细胞的变化曲线图可以看出,攻毒前后,免疫组 CD4⁺及 CD8⁺T 淋巴细胞水平略高于非免疫对照组,说明该疫苗免疫后可以刺激机体产生细胞免疫和体液免疫,但当有外来病原攻击,特别是异源毒株的攻击时,这种免疫尚不能使鸡产生完全的保护作用,说明传染性支气管炎重组鸡痘病毒基因工程疫苗对异源毒株的免疫保护作用是有限的,传染性支气管炎疫苗的使用过程中需要对疾病的流行情况和流行特征进行调查,以提高免疫预防的针对性。

IBV 血清型众多,对不同血清型的 IBV 株的 S1 蛋白的氨基酸序列分析及多种不同病毒株制备的疫苗交叉保护试验的结果表明^[17],IBV 各种血清型与其临床表现型之间没有特定的对应关系;不同的血清型之间无特定的免疫交叉保护关系。梁眷衡^[18]等报道,用常规的弱毒疫苗可以对现地分离的不同血清型的 IBV 提供有效的保护作用。并且,肾型病毒株与某些呼吸型病毒株之间可有较好的交叉保护,而同属呼吸道型的病毒株之间则可能不存在交叉保护作用,或交叉保护作用很差,这可能是由于毒株的起源不同造成的,或者是由于主要保护性抗原基因差异造成的。本研究中攻毒用的 IBV LSC99I 毒株为四川地区分离株,与 S1 基因的来源毒株 LX4 株具有相同的致病型,均为肾型,但从遗传学的角度上考虑,这 2 个毒株的遗传关系较远,这可能会成为影响传染性支气管炎重组鸡痘病毒疫苗免疫

效果的因素之一。从攻毒后的免疫保护结果上可以看到,免疫鸡不能有效地抵抗 LSC99I 株的攻击,发病率和死亡率与同源毒株攻击的结果差异显著,这意味着为了进一步提高重组疫苗的免疫效果,扩大疫苗的保护范围,需要通过改进设计思路,保证目的基因的高效表达,刺激机体产生高水平的细胞免疫应答和体液免疫应答。

参考文献:

- [1] Farsang A, Ros C, Renstrom L, *et al.* Molecular epidemiology infectious bronchitis virus in Sweden indicating the involvement of a vaccine strain[J]. *Avian Pathol*, 2002, 31(3): 229~236.
- [2] Cavanagh D, Davis P J, Cook J K A. Infectious bronchitis virus; evidence for recombination with the Mass serotype[J]. *Avian Pathol*, 1992c, 21: 401~408.
- [3] Yang Z Y, Kong W P, Huang Y, *et al.* A DNA vaccine induces SARS coronavirus neutralization and protective immunity in mice [J]. *Nature*, 2004, 428: 561~564.
- [4] Stohlman S A, Kyuwa S, Cohen M, *et al.* Mouse hepatitis virus nucleocapsid protein-specific cytotoxic T lymphocytes are L^d restricted and specific for the carboxy terminus [J]. *Virology*, 1992, 189(1): 217~224.
- [5] Webster D P, Dunachie S, Vuola J M, *et al.* Enhanced T cell-mediated protection against malaria in human challenges by using the recombinant poxviruses FP9 and modified vaccinia virus Ankara [J]. *PNAS*, 2005, 102(13): 4 836~4 842.
- [6] 田占成. 鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因重组鸡痘病毒的构建及其免疫保护效力的研究[D]. 内蒙古: 内蒙古农业大学, 2004.
- [7] Karaca K, Sharma J M, Winslow B J, *et al.* Recombinant fowlpox virus coexpressing chicken type I interferon and Newcastle disease virus HN and F genes; influence of IFN on protective efficacy and humoral response of chicken following in ovo or posthatch administration of recombinant virus [J]. *Vaccine*, 1998, 16(16): 1 496~1 503.
- [8] Lambrecht B, Gonze M, Morales D, *et al.* Comparison of biological activities of natural and recombinant chicken interferon-gamma [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1999, 70: 257~267.
- [9] Rautenschlein S, Sharma J M, Winslow B J, *et al.* Embryo vaccination of turkeys against Newcastle disease infection with recombinant fowlpox virus constructs containing interferons as adjuvants [J]. *Vaccine*, 1999, 18(5-6): 426~433.
- [10] 张庆霞. 中国 1995~2004 年鸡传染性支气管炎病毒分子流行病学研究[D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2006.
- [11] 孙永科, 田占成, 王云峰, 等. 鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因和鸡 II 型干扰素基因在重组鸡痘病毒中的共表达[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(8): 800~806.
- [12] Collissona E W, Peia J, Dzielawa J, *et al.* Cytotoxic T lymphocytes are critical in the control of infectious bronchitis virus in poultry [J]. *Developmental and Comparative Immunology*, 2000, 24: 187~200.
- [13] 孙永科. 表达鸡 II 型干扰素基因和鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因重组鸡痘病毒的构建及免疫效力的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004.
- [14] Ignjatovic J, Galli L. The S glycoprotein but not the N or M protein of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens [J]. *Arch Virol*, 1994, 138(1~2): 117~134.
- [15] 田占成, 孙永科, 王云峰, 等. 表达鸡传染性支气管炎病毒 S1 基因重组鸡痘病毒对 SPF 鸡的免疫保护作用[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(6): 580~586.
- [16] Seon C S, Jeong Y L, Won C L, *et al.* Induction of protective immunity in chickens vaccinated with infectious bronchitis virus S1 glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus [J]. *Avian Dis*, 1998, 42: 92~100.
- [17] 康佐文, 杨增歧, 赵余放, 等. 鸡传染性支气管炎地方毒株血清型的研究[J]. *中国兽医科技*, 2000, 30(5): 8~10.
- [18] 梁眷衡, 魏光伟, 尹烨华, 等. 国内外主要鸡传染性支气管炎弱毒疫苗与广东 N IB 野毒株交互免疫试验[J]. *中国兽医科技*, 2000, 26(5): 14~15.