

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.7.01

# 免疫塞内卡病毒灭活疫苗后豚鼠、 家兔与猪的血清中和抗体相关性研究

齐志涛,方建国,王娥娥,郝苏云,高艳华,路荣,赵丽霞,  
范秀丽,张燕红,杜宇荣,宋庆庆\*,陈九连\*

(金宇保灵生物药品有限公司,呼和浩特 010100)

[收稿日期] 2021-01-28 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2021)07-0001-07 [中图分类号] S852.4

**[摘要]** 为研究免疫塞内卡病毒(SVA)灭活疫苗后豚鼠、家兔与猪血清中和抗体的相关性,分别用 0.25、0.5、1.0、2.0 mL 的 SVA 灭活疫苗接种豚鼠和家兔,同时以 2.0 mL 的 SVA 灭活疫苗接种猪,分别于免疫前以及免疫后第 7 天、第 14 天、第 21 天、第 28 天采血液,测定各动物血清中 SVA 中和抗体,利用 Microsoft Excel 软件对所得结果进行整理并分析豚鼠与猪血清 SVA 中和抗体、家兔与猪血清 SVA 中和抗体之间的线性关系,进一步采用 IBM SPSS Statistics 19 软件对线性关系的显著性进行分析。结果显示,豚鼠和家兔均可产生 SVA 中和抗体,且免疫剂量越大,免疫动物产生的 SVA 中和抗体滴度越高。猪免疫后产生了 SVA 中和抗体,监测期内随着时间的延长,SVA 中和抗体水平逐渐升高。当家兔和豚鼠免疫剂量为 1.0 mL 时,二者产生的 SVA 中和抗体与猪 SVA 中和抗体呈正相关,相关性分别为 0.990 和 0.998,相关性极显著。研究表明,采用 1.0 mL 的剂量免疫豚鼠或家兔,能间接反应 SVA 灭活疫苗在猪体的 SVA 中和抗体水平。

**[关键词]** 塞内卡病毒;灭活疫苗;效力检验;

## Study on the Correlation of Antibody between Guinea Pigs and Pigs, Rabbits and Pigs after Immunized with SVA Inactivated Vaccine

QI Zhi-tao, FANG Jian-guo, WANG E-e, HAO Su-yun, GAO Yan-hua, LU Rong, ZHAO Li-xia,  
FAN Xiu-li, ZHANG Yan-hong, DU Yu-rong, SONG Qing-qing\*, CHEN Jiu-lian\*

(Jinyu Baoling Biopharmaceutical Co., Ltd., Hohhot 010100, China)

Corresponding authors: SONG Qing-qing, E-mail: songqq@jinyubaoling.com.cn; CHEN Jiu-lian, E-mail: chenjiulian@jinyubaoling.com.cn

**Abstract:** To explore alternative methods for testing the efficacy of inactivated SVA vaccine, guinea pigs and rabbits were immunized with inactivated SVA vaccine at doses of 0.25 mL, 0.5 mL, 1.0 mL and 2.0 mL. At the

**作者简介:** 齐志涛,硕士研究生,从事兽用疫苗研发相关工作;方建国,助理兽医师,从事兽用疫苗研发相关工作。二人为共同第一作者。

**通讯作者:** 宋庆庆, E-mail: songqq@jinyubaoling.com.cn; 陈九连, E-mail: chenjiulian@jinyubaoling.com.cn

same time, pigs were immunized with a dose of 2.0 mL. The serum neutralizing antibody against SVA was determined before vaccination and after vaccination on the 7th, 14th, 21 st and 28th. The results were obtained and preliminary analysis of the linear relationship between guinea pigs, rabbits and pigs SVA serum neutralizing antibodies were made by Microsoft Excel software, further more, the significance of the linear relationship were analyzed by IBM SPSS Statistics 19 software. As the result, SVA neutralizing antibody could be produced by guinea pigs and rabbits after immunized inactivated SVA vaccine, and the higher the immunization dose, the higher the neutralizing antibody titer produce. SVA neutralizing antibodies were produced by pig after immunized inactivated SVA vaccine, and with time, the level of SVA neutralizing antibodies gradually increases. When the dose was 1.0 mL, the correlation of SVA neutralizing antibody between guinea pigs and pig was 0.990, between rabbits and pig was 0.998, the correlation was extremely significant. It was concluded that, the efficacy of the inactivated SVA vaccine on pigs could be indirectly reflected by immunizing guinea pigs or rabbits with 1.0 mL.

**Key words:** Senecavirus; inactivated vaccine; efficacy test

塞内卡病毒 (Senecavirus A, SVA) 是近年来新发的一种猪传染病, 猪感染后发病症状与口蹄疫相似, 典型症状为鼻盘、蹄冠出现肿胀、水疱或破溃<sup>[1]</sup>, 在临床上与口蹄疫难以区分。SVA 在我国不同区域广泛分布, 随着 SVA 在猪群当中的不断传播, 其毒力在逐渐减弱, 造成猪群发生亚临床感染<sup>[2]</sup>, 严重威胁我国养猪业的发展及市场交易。目前我国尚无商品化疫苗用以预防该病的发生与传播, 相关产品还处于研发阶段。在疫苗研发过程中, 产品免疫效力的检验是至关重要、不可或缺的环节, SVA 灭活疫苗的效力检验主要依靠本动物进行。近年来, 受非洲猪瘟的影响, 猪的买卖和运输受限, 造成实验猪的采购比较困难, 导致 SVA 灭活疫苗的研发工作受阻。因此, 为保障疫苗研发工作的顺利进行, 同时也积极响应 3R 原则<sup>[3]</sup>, 本研究选用豚鼠和家兔这两种数量多、价格低、运输便捷的动物, 开展豚鼠、家兔与猪免疫 SVA 灭活疫苗后的血清中和抗体相关性研究, 以期在节约成本、提高效率、保障动物福利的同时, 为兽用疫苗效力检验工作中实验动物替代方法的应用提供支持。

## 1 材料与方 法

1.1 主要实验材料 SVA 灭活疫苗 (悬浮培养, 批号为 2019001)、用于做中和试验的 SVA 病毒液 CH/ZZ/2016 株、PK-15 细胞 (猪肾细胞), 由金宇保

灵生物药品有限公司兽用疫苗国家工程实验室保存。体重 300~500 g 的豚鼠和 1.5~2.0 kg 的家兔各 50 只, 购自呼和浩特某养殖场; 60 日龄以上架子猪 15 头, 购自呼和浩特市和林格尔县某养猪场。

1.2 豚鼠免疫及 SVA 中和抗体检测 将 50 只豚鼠随机分为 5 组, 分别以 0.25 mL、0.5 mL、1.0 mL 和 2.0 mL 的免疫剂量对其中 4 组豚鼠采用腿部肌肉注射方式免疫, 1 组作为对照, 以相同方式注射 2.0 mL 生理盐水。分别于免疫后第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 28 天连同对照组豚鼠一并采血, 分离血清, 以《中华人民共和国兽药典》中的中和试验法<sup>[4]</sup>测定 SVA 中和抗体, 数据呈现形式采用  $\log_2 N$  表示。

1.3 家兔免疫及 SVA 中和抗体检测 将 50 只家兔随机分为 5 组, 分别以 0.25 mL、0.5 mL、1.0 mL 和 2.0 mL 的免疫剂量对其中 4 组家兔采用腿部肌肉注射方式免疫, 1 组作为对照, 以相同方式注射 2.0 mL 生理盐水。分别于免疫后第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 28 天连同对照组家兔一并采血, 以中和试验法<sup>[4]</sup>测定 SVA 中和抗体, 数据呈现形式采用  $\log_2 N$  表示。

1.4 猪免疫及 SVA 中和抗体检测 选取 15 头猪, 将其中 10 头以最佳免疫方法, 即颈部肌肉注射方式免疫 2.0 mL SVA 灭活疫苗, 另外 5 头作为对照, 以相同方式注射 2.0 mL 生理盐水。分别于免疫后第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 28 天连同对照组猪

一并采血,分离血清,以中和试验法<sup>[4]</sup>测定 SVA 中和抗体,数据呈现形式采用  $\log_2 N$  表示。

**1.5 豚鼠 SVA 中和抗体与猪 SVA 中和抗体相关性分析** 分别计算每组豚鼠及猪免疫后第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 28 天的平均中和抗体滴度,利用 Microsoft Excel 软件对所得结果进行整理,初步分析豚鼠、家兔与猪血清中 SVA 中和抗体之间的线性关系,并进一步采用 IBM SPSS Statistics 19 软件对线性关系的显著性进行分析。

**1.6 家兔 SVA 中和抗体与猪 SVA 中和抗体相关性分析** 分别计算每组家兔及猪免疫后第 7 天、第 14 天、第 21 天和第 28 天的平均中和抗体滴度,利用 Microsoft Excel 软件对所得结果进行整理,初步分析豚鼠、家兔与猪血清中 SVA 中和抗体之间的线性关系,并进一步采用 IBM SPSS Statistics 19 软件对线性关系的显著性进行分析。

## 2 结果与分析

**2.1 豚鼠免疫后 SVA 中和抗体检测结果** 对照组豚鼠 SVA 中和抗体滴度为 0,豚鼠免疫后 SVA 中和抗体滴度呈升高趋势,高剂量免疫组豚鼠 SVA 中和抗体滴度高于低剂量免疫组;2.0 mL 免疫组豚鼠 SVA 中和抗体上升速度较其他组快,且 SVA 中和抗体滴度最高,免疫后第 28 d 豚鼠 SVA 平均中和抗体滴度可达  $2^{10.5}$ ,其次为 1.0 mL 免疫组,免疫后第 28 d SVA 平均中和抗体滴度达  $2^{10.3}$ ;0.5 mL 免疫组在免疫后第 28 d 平均中和抗体滴度为  $2^{8.3}$ ;0.25 mL 免疫组平均抗体滴度最低,免疫后第 28 d SVA 平均中和抗体滴度为  $2^{6.3}$ ;对照组 SVA 中和抗体滴度为 0(图 1)。结果表明,豚鼠免疫 SVA 灭活疫苗后,可产生 SVA 中和抗体,且随着免疫剂量的增加和时间的延续,SVA 中和抗体滴度逐渐升高。

**2.2 家兔免疫后 SVA 中和抗体检测结果** 家兔免疫后 SVA 中和抗体变化情况与豚鼠免疫后相似,各组家兔在免疫后 SVA 中和抗体滴度均呈升高趋势,高剂量免疫组家兔 SVA 中和抗体滴度高于低剂量免疫组;2.0 mL 免疫组家兔 SVA 中和抗体滴度高于其他组,在免疫后第 28 d 家兔 SVA 平

均中和抗体滴度达  $2^{10.0}$ ,其次为 1.0 mL 免疫组,免疫后第 28 d 平均中和抗体滴度达  $2^{7.5}$ ;0.5 mL 免疫组在免疫后第 28 d 平均中和抗体滴度为  $2^{7.16}$ ;0.25 mL 免疫组 SVA 平均中和抗体滴度最低,免疫后第 28 d 为  $2^{5.0}$ (图 2)。结果表明,家兔在免疫 SVA 灭活疫苗后,也可产生 SVA 中和抗体,且随着免疫剂量的增加和时间的延续,SVA 中和抗体滴度逐渐升高。

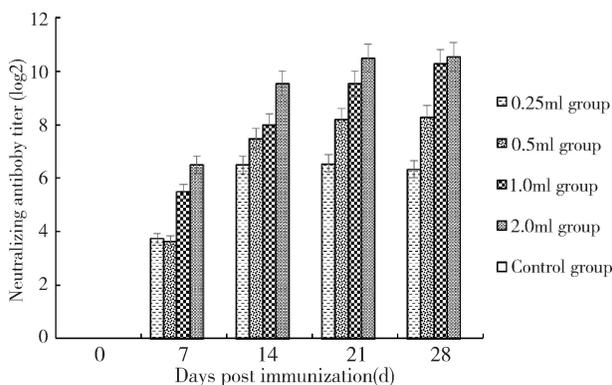


图 1 各组豚鼠 SVA 中和抗体检测结果

Fig 1 Test results of SVA neutralizing antibodies of guinea pigs

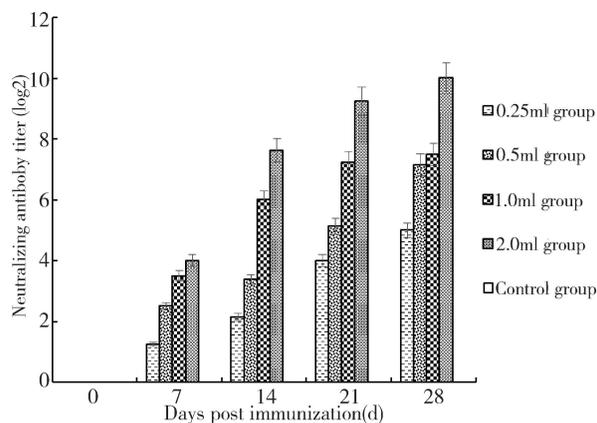


图 2 各组家兔 SVA 中和抗体检测结果

Fig 2 Test results of SVA neutralizing antibody of rabbits

**2.3 猪免疫后 SVA 中和抗体检测结果** 随着时间的推移,免疫猪 SVA 中和抗体滴度逐渐上升,免疫后第 28 d SVA 平均中和抗体滴度可达  $2^{8.0}$ ,对照组中和抗体为 0(图 3)。结果表明,猪免疫 SVA 灭活疫苗后可产生 SVA 中和抗体,且随着免疫时间的延续,SVA 中和抗体滴度逐渐升高。

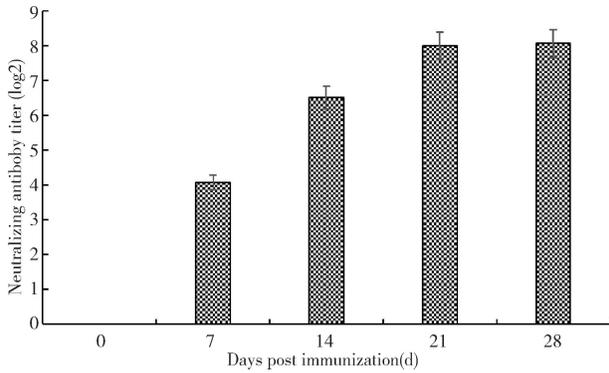


图 3 猪免疫后 SVA 中和抗体检测结果

Fig 2 Test results of SVA neutralizing antibody of pigs

2.4 豚鼠 SVA 中和抗体与猪 SVA 中和抗体相关性分析结果 以猪 SVA 平均中和抗体值为纵坐标,分别以豚鼠 0.25 mL 免疫组、0.5 mL 免疫组、1.0 mL 免疫组及 2.0 mL 免疫组 SVA 平均中和抗体值为横坐标做散点图,绘制猪 SVA 中和抗体与

各免疫组豚鼠 SVA 中和抗体的回归曲线,对二者是否存在关系进行初步判断。图 4 结果显示,各组豚鼠在免疫后 SVA 中和抗体在一定程度上与免疫猪 SVA 中和抗体呈正相关,其中豚鼠 1.0 mL 免疫组 SVA 中和抗体与免疫猪 SVA 中和抗体极显著相关( $R^2 = 0.9942, P < 0.01$ );豚鼠 0.5 mL 免疫组 SVA 中和抗体与猪 SVA 中和抗体显著相关( $R^2 = 0.9833, P < 0.05$ );豚鼠 2.0 mL 免疫组 SVA 中和抗体与猪 SVA 中和抗体显著相关( $R^2 = 0.9818, P < 0.05$ );豚鼠 0.25 mL 免疫组 SVA 中和抗体与猪 SVA 中和抗体相关性不显著( $R^2 = 0.961, P > 0.05$ )。结果表明,豚鼠 SVA 中和抗体与猪 SVA 中和抗体存在线性相关关系,当豚鼠免疫剂量为 1.0 mL 时,可通过线性回归方程( $y = 0.8131x - 0.0971$ )评估该疫苗在猪体的 SVA 血清中和抗体水平及消长规律。

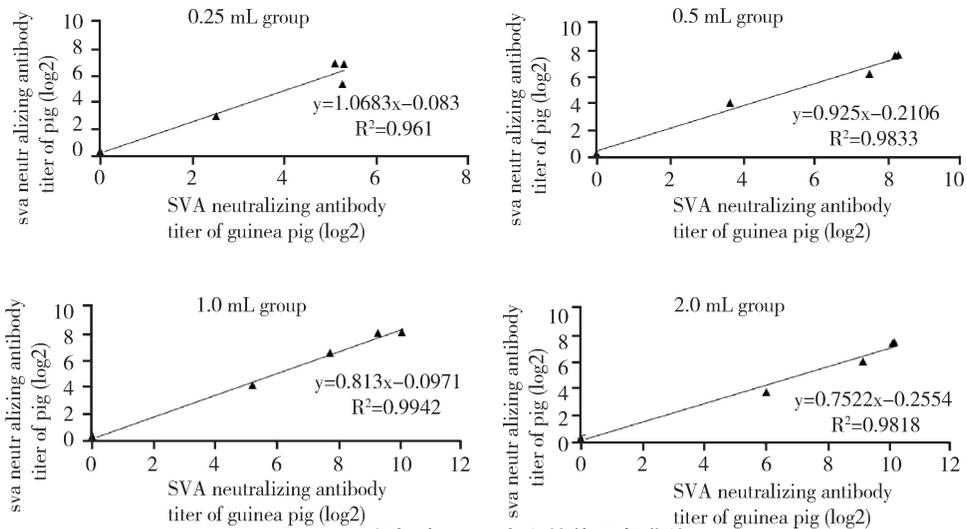


图 4 豚鼠与猪 SVA 中和抗体回归曲线

Fig 4 Regression curve SVA neutralizing antibody between guinea pigs and pigs

利用 IBM SPSS Statistics 19 软件对各组豚鼠与猪 SVA 中和抗体相关性的差异显著性,结果见表 1。各组豚鼠免疫后 SVA 中和抗体效价均与猪的中和抗体效价存在一定相关关系,其中,豚鼠 1.0 mL 免疫组 SVA 中和抗体效价与猪的 SVA 中和抗体效价相关性最显著,相关性为 0.990 ( $P < 0.01$ ),属于极显著相关;豚鼠 2.0 mL 免疫组 SVA 中和抗体效价与猪的 SVA 中和抗体效价相关性为

0.988 ( $P < 0.05$ ),属于显著相关;豚鼠 0.5 mL 免疫组 SVA 中和抗体效价与猪的 SVA 中和抗体效价相关性为 0.973 ( $P < 0.05$ ),也属于显著相关;豚鼠 0.25 mL 免疫组 SVA 中和抗体效价与猪的 SVA 中和抗体效价相关性为 0.913 ( $P > 0.05$ ),无统计学意义。结果表明,豚鼠 1.0 mL 免疫组 SVA 中和抗体与猪 SVA 中和抗体相关性最显著,且这种相关性具有统计学意义。

表 1 豚鼠与猪 SVA 中和抗体相关性分析

Tab 1 Correlation analysis of SVA neutralizing antibody between guinea pigs and pigs

组别	参数	猪免疫组	豚鼠 0.25 mL 组	豚鼠 0.5 mL 组	豚鼠 1.0 mL 组	豚鼠 2.0 mL 组
猪免疫组	Pearson correlation	1.000	0.913	0.973 *	0.990 **	0.988 *
	Significance (bilateral)	—	0.087	0.027	0.010	0.012
豚鼠 0.25 mL 组	Pearson correlation	0.913	1.00	0.981 *	0.874	0.964 *
	Significance (bilateral)	0.087	—	0.019	0.126	0.036
豚鼠 0.5 mL 组	Pearson correlation	0.973 *	0.981 *	1.000	0.952 *	0.997 **
	Significance (bilateral)	0.027	0.019	—	0.048	0.003
豚鼠 1.0 mL 组	Pearson correlation	0.990 **	0.874	0.952 *	1.000	0.971 *
	Significance (bilateral)	0.010	0.126	0.048	—	0.029
豚鼠 2.0 mL 组	Pearson correlation	0.988 *	0.964 *	0.997 **	0.971 *	1.000
	Significance (bilateral)	0.012	0.036	0.003	0.029	—

\* : $P < 0.05$  (双侧) 显著相关; \*\* : $P < 0.01$  (双侧) 极显著相关

\* : $P < 0.05$  (two - sided) correlation is significant; \*\* : $P < 0.01$  (two - sided) correlation is extremely significant

2.5 家兔 SVA 中和抗体与猪 SVA 中和抗体相关性分析结果 以猪 SVA 平均中和抗体值为纵坐标,分别以家兔 0.25 mL 免疫组、0.5 mL 免疫组、1.0 mL 免疫组及 2.0 mL 免疫组 SVA 平均中和抗体值为横坐标做散点图,绘制猪 SVA 中和抗体与各免疫组家兔 SVA 中和抗体的回归曲线,对二者是否存在关系进行初步判断,结果见图 5。各组家兔在免疫后 SVA 中和抗体在一定程度上与免疫猪 SVA 中和抗体呈正相关,其中家兔 1.0 mL 免疫组 SVA 中和抗体与免疫猪 SVA 中和抗体极显

著相关 ( $R^2 = 0.9942, P < 0.01$ );家兔 2.0 mL 免疫组 SVA 中和抗体与猪 SVA 中和抗体极显著相关 ( $R^2 = 0.9885, P < 0.01$ );家兔 0.5 mL 免疫组、0.25 mL 免疫组 SVA 中和抗体与猪 SVA 中和抗体相关性不显著 ( $P > 0.05$ )。结果表明,家兔 SVA 中和抗体与猪 SVA 中和抗体存在线性相关关系,当豚鼠免疫剂量为 1.0 mL 时,可通过线性回归方程 ( $y = 0.813x + 0.0971$ ) 评估该疫苗在猪体的 SVA 中和抗体水平及消长规律。

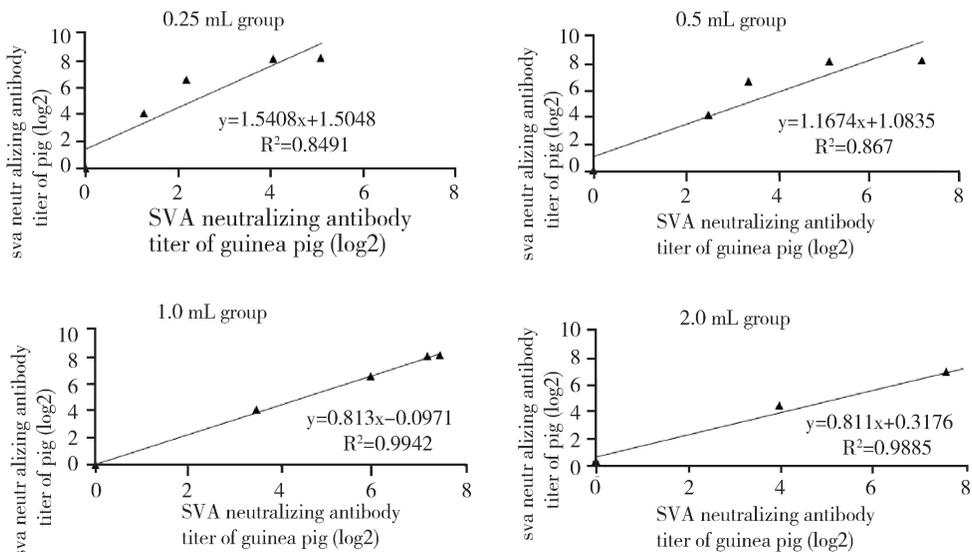


图 5 家兔与猪 SVA 中和抗体回归曲线

Fig 5 Regression curve SVA neutralizing antibody between rabbits and pigs

利用 IBM SPSS Statistics 19 软件对各组家兔与猪 SVA 中和抗体相关性紧密程度进行分析, 结果见表 2。各组家兔免疫后 SVA 中和抗体效价均与猪的中和抗体效价存在一定相关关系, 其中, 家兔 1.0 mL 免疫组 SVA 中和抗体效价与猪的 SVA 中和抗体效价相关性最显著, 相关性为 0.998 ( $P < 0.01$ ), 属于极显著相关; 家兔 2.0 mL 免疫组 SVA 中和抗体效价与猪的 SVA 中和抗体效价相关性为 0.988 ( $P < 0.05$ ), 也属于极显著相关; 家兔 0.5 mL 免疫组 SVA 中和抗体效价与猪的 SVA 中和抗体效价相关性为 0.859 ( $P > 0.05$ ), 无统计学意义, 相关性不显著; 家兔 0.25 mL 免疫组 SVA 中和抗体效价与猪的 SVA 中和抗体效价相关性为 0.920 ( $P > 0.05$ ), 无统计学意义, 相关性不显著。结果表明,

家兔 1.0 mL 免疫组 SVA 中和抗体与猪 SVA 中和抗体相关性最显著, 且这种相关性具有统计学意义。

### 3 讨论与结论

应用动物试验替代方法对兽用疫苗检验逐渐发展为许多研究人员的共识, 一些学者认为, 动物试验替代方法是疫苗检验工作的必然发展趋势<sup>[5]</sup>。理论上讲, 若替代动物对疫苗抗原的血清学反应存在明确的量效关系, 该动物即可成为疫苗效力检验的替代动物<sup>[6]</sup>。疫苗的效力检验不一定必须进行本动物攻毒实验, 替代方法建立的关键在于建立与传统检验方法的平行关系, 并且这种平行关系是稳定的, 不会随着产品批次的变化而发生改变, 进而实现等效替代, 建立质量标准<sup>[6]</sup>。

表 2 家兔与猪 SVA 中和抗体相关性分析

Tab 2 Correlation analysis of SVA neutralizing antibody between rabbits and pigs

组别	参数	猪免疫组	家兔 0.25 mL 组	家兔 0.5 mL 组	家兔 1.0 mL 组	家兔 2.0 mL 组
猪免疫组	Pearson correlation	1.000	0.920	0.859	0.998 **	0.994 **
	Significance (bilateral)	—	0.080	0.141	0.002	0.006
家兔 0.25 mL 组	Pearson correlation	0.920	1.000	0.985 *	0.918	0.927
	Significance (bilateral)	0.080	—	0.015	0.082	0.073
家兔 0.5 mL 组	Pearson correlation	0.859	0.985 *	1.000	0.865	0.883
	Significance (bilateral)	0.141	0.015	—	0.135	0.117
家兔 1.0 mL 组	Pearson correlation	0.998 **	0.918	0.865	1.000	0.999 **
	Significance (bilateral)	0.002	0.082	0.135	—	0.001
家兔 2.0 mL 组	Pearson correlation	0.994 **	0.927	0.883	0.999 **	1.000
	Significance (bilateral)	0.006	0.073	0.117	0.001	—

\* :  $P < 0.05$  (双侧) 显著相关; \*\* :  $P < 0.01$  (双侧) 极显著相关

\* :  $P < 0.05$  (two - sided) correlation is significant; \*\* :  $P < 0.01$  (two - sided) correlation is extremely significant

豚鼠和家兔是常用的试验动物, 具有价格低、数量多、运输便捷等优势。欧洲兽药典列出多种用豚鼠或家兔替代方法<sup>[7]</sup>, 我国关于兽用疫苗效力检验和安全检验的替代方法也在不断进步, 部分疫苗效力检验和安全检验中的本体动物逐渐被豚鼠、兔等实验动物替代<sup>[4]</sup>。比如, 在猪瘟兔化弱毒疫苗的效力检验中, 通过兔体定型热来代替猪体试验; 在猪圆环病毒 2 型灭活苗检验中, 通过免

疫鼠、兔替代本体动物, 从而解决试验动物筛选难的问题<sup>[8]</sup>。

本研究以豚鼠和家兔为试验动物, 以血清学试验评价 SVA 灭活疫苗免疫效力, 发现豚鼠和家兔接种 SVA 灭活疫苗后, 均可产生 SVA 中和抗体, 并且抗体滴度随着免疫剂量的增加而升高, 说明豚鼠与家兔可对该疫苗产生血清学反应, 并且血清学反应存在明显量效关系, 证明了用豚鼠或

家兔替代猪检验 SVA 灭活疫苗效力的可行性。在进一步的统计学分析后发现,豚鼠和家兔在免疫 1.0 mL SVA 灭活疫苗后,产生的 SVA 中和抗体与猪产生的 SVA 中和抗体具有显著的线性关系,并且可获得回归方程。从而推测,可通过免疫豚鼠或家兔间接反应 SVA 灭活疫苗在猪体的中和抗体水平,但具体质量标准的建立还需要进一步研究。

### 参考文献:

- [1] Joshi L R, Fernandes M, Clement T, *et al.* Pathogenesis of Senecavirus A infection in finishing pigs[J]. *J Gen Virol*, 2016, 97(12): 3267 - 3279.
- [2] Zhang Z, Ni B, Zhang L, *et al.* Complete genome sequence of a novel Senecavirus A isolate from an asymptomatic pig in China [J]. *Microbiol Resour Announc*, 2019,8(14):1 - 2.
- [3] 丁晓洁. 动物实验的必要性及其替代方法的辩证分析[J]. *医药前沿*, 2016,6(23):388 - 390.
- Ding X J. The necessity of animal experiments and the dialectical analysis of alternative methods[J]. *Frontiers of Medicine*, 2016, 6(23): 388 - 390.
- [4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 - 三部 [M]. 中国农业出版社, 2015.
- Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. *Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China - Part Three* [M]. China Agriculture Press, 2015.
- [5] 王晓卉,李翠,蒋卉,等. 动物试验替代方法在兽用疫苗检验中的应用概况[J]. *中国兽药杂志*, 2015(4):60 - 64.
- Wang X H, Li H, Jiang Hui, *et al.* Overview of the application of alternative methods of animal experiments in veterinary vaccine testing[J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2015(4): 60 - 64.
- [6] 夏业才,陈光华,丁家波,等. 兽医生物制品学 [M]. 中国农业出版社, 2018:78 - 79.
- Xia Y C, Chen G H, Ding J B, *et al.* *Veterinary Biological Products* [M]. China Agriculture Press, 2018:78 - 79.
- [7] 王兴童,韩凌霞. 兽用疫苗中替代方法的研究进展[J]. *实验动物科学*, 2018,35(1):67 - 71.
- Wang X T, Han L X. Research progress of alternative methods in veterinary vaccines [J]. *Laboratory Animal Science*, 2018, 35(1):67 - 71.
- [8] 王林浩,刘兆霞. 动物试验替代方法在兽用疫苗检验中的应用概况[J]. *现代畜牧科技*, 2020(1):18 - 19.
- Wang L H, Liu Z X. The application of alternative methods of animal experiments in veterinary vaccine testing [J]. *Modern Animal Husbandry Science and Technology*, 2020(1):18 - 19.

(编辑:李文平)