芩黄口服液止咳平喘作用研究

高富红,郭亚楠
(国家兽用药品工程技术研究中心,河南洛阳　471003)

[收稿日期]2013-06-23　[文献标识码]A　[文章编号]1002-1280(2013)09-0033-02　[中图分类号]S853.74

[摘　要]　为了研究芩黄口服液在止咳平喘方面的疗效,选用组胺喷雾法、氨水引咳法,观察对豚鼠引喘潜伏期、小鼠咳嗽次数的影响。结果显示,芩黄口服液能明显延长组胺诱发豚鼠出现哮喘反应的潜伏期;能明显的抑制氨水引起的小鼠咳嗽。芩黄口服液具有平喘、止咳作用。

[关键词]　芩黄口服液;止咳;平喘

Studies of Qinhuang Oral Liquid on Relieving Cough and Asthma

GAO Fu-hong, GUO Ya-nan
(*National Research Center for Veterinary Medicine*, *Luoyang*, *Henan* 471003, *China*)

Abstract: To investigate the effects of qinhuang oral liquid on relieving cough and asthma, histamine spray test was performed to observe asthma incubation in guinea pigs, and ammonia water caused cough test was performed to observe cough frequency in mice. The results showed qinhuang oral liquid could prolong asthma incubation caused by histamine and reduce cough frequency caused by ammonia water. qinhuang oral liquid could relieve cough and asthma.

Key words: qinhuang oral liquid; antitussive; antiasthmatic

芩黄口服液由黄芩、板蓝根、甘草、山豆根、麻黄、桔梗六味中药组成,其中甘草、麻黄具有祛痰、止咳、宣肺平喘的作用,加入黄芩对治疗高热、肺炎、流行性感冒等呼吸道疾病效果明显,再加入清热解毒的板蓝根、山豆根及清热化痰的桔梗,药效更佳[1-3],临床用于鸡传染性支气管炎的预防及辅助性治疗,对鸡传染性支气管炎能起到良好的防治效果[4]。试验旨在研究该药物在平喘、止咳等方面的作用,为芩黄口服液的临床应用提供理论上的依据。

1　材　料

1.1　*药物*　芩黄口服液,批号20051201,规格100 mL:213 g生药,洛阳惠中兽药有限公司;麻杏石甘颗粒,批号20090311,每100 g相当于原生药240 g,市售;磷酸组胺注射液,上海禾丰制药有限公司;氨水,莱阳市双双化工有限公司。

1.2　*动物*　健康未交配的昆明种小鼠,体重20±2 g,雌雄各半。试验前观察一周,挑选健康活泼的小鼠用于试验。豚鼠,体重200±20 g,雌雄各半。试验前观察一周,挑选健康活泼的豚鼠用于试验。

2　方　法

2.1　*平喘作用实验*　选用符合标准的豚鼠50只(喷雾后150 s内不出现喘者弃用),雌雄各半,随机分为5组,每组10只。药物组分别灌服芩黄口服液6.4、3.2、1.6 mL/kg·bw(分别相当于13.64、6.82、3.41 g生药/kg·bw),1次/d,连续3 d,药物对照组灌服麻杏石甘颗粒6.4 g/kg,1次/d,连续3 d;空白对照组灌服纯化水6.4 mL/kg·bw。末次

作者简介:高富红,硕士,从事新兽药研发工作。E-mail:dkxgfh@yahoo.com.cn

给药 30 min 后,将受试动物放入喷雾箱中,喷入 1 mg/mL的组胺溶液 1 mL,记录喷雾开始到豚鼠出现引喘的时间(s)为潜伏期,并计算延长率。

引喘潜伏期延长率(%) =(给药后潜伏期 - 给药前潜伏期)×100%/给药前潜伏期

2.2　止咳作用实验　采用氨水引咳法,取小鼠 50 只,雌雄各半,随机分成 5 组,每组 10 只,药物组分别灌服芩黄口服液 10.4、5.2、2.6 mL/kg · bw(分别相当于 22.12、11.06、5.53 g 生药/kg · bw),1 次/d,连续 3 d;药物对照组灌服麻杏石甘颗粒 10.4 g/kg, 1 次/d,连续 3 d;空白对照组灌服纯化水10.4 mL/kg · bw。于末次给药 30 min 后,将动物置于 500 mL 烧杯中,内放吸有 10 mL 20% 的氨水棉球,观察记录小鼠 2 min 内咳嗽次数(小鼠咳嗽,以小鼠腹肌收缩或缩胸,同时张大嘴为指标),并做统计分析。

2.3　统计学方法　试验数据用 SPSS11.0 分析软件进行统计学处理,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。显著性用 P 表示,其中 $0.01 < P < 0.05$ 表示差异显著,$P < 0.01$ 表示差异极显著。

3　结 果

3.1　平喘作用实验结果

结果见表 1,芩黄口服液高剂量组、中剂量组豚鼠引喘出现潜伏期明显长于空白对照组(高、中剂量组:$P < 0.01$),低剂量组引喘出现潜伏期与空白对照组比较有一定延长趋势,但统计学未见显著性差异($P > 0.05$)。且芩黄口服液高、中剂量组豚鼠引喘出现潜伏期与药物对照组麻杏石甘颗粒比较,无显著性差异($P > 0.05$)。高剂量组延长率与药物对照组麻杏石甘颗粒比较,无显著性差异($P > 0.05$)。

表 1　芩黄口服液平喘作用的实验观察($\bar{x} \pm s$,n = 10)

组别	剂量	引喘潜伏期/s		延长率/%
		给药前	给药后	
低剂量组	1.6 mL/kg	45.74 ± 7.82	54.78 ± 8.83	20.09 ± 6.04
中剂量组	3.2 mL/kg	44.78 ± 7.02	75.52 ± 12.70	68.88 ± 13.95
高剂量组	6.4 mL/kg	45.74 ± 6.86	93.26 ± 15.21	105.72 ± 30.19
空白对照组	6.4 mL/kg	45.00 ± 5.73	45.45 ± 5.18	1.20 ± 3.17
药物对照组	6.4 g/kg	43.84 ± 6.15	84.20 ± 12.55	92.57 ± 17.03

3.2　止咳作用实验结果

结果见表 2,在氨水引咳法实验中,以咳嗽次数为指标,芩黄口服液高剂量、中剂量组及低剂量组同空白对照组间均有显著性差异(高、中剂量组:$P < 0.01$,低剂量组 $P < 0.05$),高、中剂量组同药物对照组麻杏石甘颗粒组间无明显差异($P > 0.05$)。

表 2　芩黄口服液对氨水致咳小鼠的影响($\bar{x} \pm s$,n = 10)

组别	剂量	动物数/只	咳嗽次数/次
低剂量组	2.6 mL/kg	10	45.2 ± 9.2
中剂量组	5.2 mL/kg	10	36.1 ± 11.8
高剂量组	10.4 mL/kg	10	26.2 ± 8.3
空白对照组	10.4 mL/kg	10	54.1 ± 7.6
药物对照组	10.4 g/kg	10	31.0 ± 12.1

4　结 论

芩黄口服液组方配伍沿用传统复方制剂,由麻杏甘石汤和普济消毒饮加减而来:麻杏石甘汤中甘草与麻黄配伍可增强麻黄平喘的功效,还能协调诸药;普济消毒饮由黄芩、黄连、桔梗、生甘草、连翘、板蓝根、马勃、牛蒡子、薄荷等组方而成,可治疗恶寒发热、风热疫毒、咽喉不利等病症。试验表明,芩黄口服液综合以上两个传统组方优势,对组胺诱发豚鼠出现哮喘反应的潜伏期有明显的延长作用,且能明显抑制氨水引起的小鼠咳嗽,具有止咳平喘的功效。

参考文献:

[1]　吴雪荣. 麻黄药理作用研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2010,8(5): 173.

[2]　王 琳. 桔梗的性能特点及证治机理研究[A], 第四届全国临床中药学学术研讨会论文摘要集[C]; 2011 年.

[3]　刘兴金, 马随营, 张晓会, 等. 芩黄颗粒/口服液:专治禽传染性支气管炎[J]. 新药动态, 2009, 09: 18.

[4]　刘兴金, 张晓会, 李兴国, 等. 芩黄颗粒对人工感染鸡传染性支气管炎的预防试验[J]. 国外畜牧学, 2009, 29(5): 72 - 73.

(责任编辑:陈 希)

IFA 和 IPMA 方法测定猪瘟兔化弱毒病毒含量

李晶梅,朱　薇,秦红刚,靖志强,廖园园,于义娟,
肖　敏,袁　刚,谢红玲*,漆世华,温文生
(武汉中博生物股份有限公司,武汉　430070)

[收稿日期]2013-06-26　[文献标识码]A　[文章编号]1002-1280(2013)10-0035-04　[中图分类号]S852.651

[摘　要]　使用间接免疫荧光方法(IFA)和过氧化物酶单层试验(IPMA)测定猪瘟兔化弱毒的病毒含量($TCID_{50}$)。两种方法都使用韩国 JBT 公司猪瘟单抗作为一抗,此单抗的稀释倍数最高为 300 倍。Trueblue 过氧化物酶底物显色的、感染猪瘟兔化弱毒的阳性细胞呈现蓝色,易于辨识,所以确定 Trueblue 为 IPMA 方法中的酶作用底物。建立的的 IFA 和 IPMA 方法与兔体反应热法进行了比较,证明两者存在一定平行关系,但 IFA 和 IPMA 比兔体反应热法检测结果的数值低 1 个数量级左右。基于以上结果,$TCID_{50}$方法可作为猪瘟疫苗效力检验的候选方法。

[关键词]　猪瘟兔化弱毒;$TCID_{50}$;过氧化物酶单层试验;间接免疫荧光方法

IFA and IPMA for HCLV Titer Detection

LI Jing-mei, ZHU Wei, QIN Hong-gang, JING Zhi-qiang, LIAO Yuan-yuan, YU Yi-juan, XIAO Min, YUAN Gang, XIE Hong-ling*, QI Shi-hua, WEN Wen-sheng
(*Wuhan Chopper Biology Co Ltd*, *Wuhan* 430070, *China*)

Abstract: Indirect immunofluorescent assay (IFA) and immunoperoxidase monolayer assay (IPMA) were used to titrate the tissue culture infectious $dose_{50}$ ($TCID_{50}$) of hog cholera lapinized virus (HCLV) vaccine. Optimized antibody dilution and peroxidase substrate. JBT corporation's CSFV mAbs used was no more than 300 times dilution. Positive cells incubated with TrueBlue peroxidase substrate showed blue, and easy to distinguish. IFA and IPMA can titer $TCID_{50}$ of finished and semi-finished products of HCLV vaccine. There were some parallel relationship between RID and $TCID_{50}$. RID was about one order of magnitude than $TCID_{50}$. Based on the research, $TCID_{50}$ will be used as candidate efficacy method.

Key words: hog cholera lapinized virus; $TCID_{50}$; IPMA; IFA

猪瘟病毒(CSFV)C 株,又名猪瘟兔化弱毒株(HCLV),由其制备的猪瘟兔化弱毒活疫苗是广泛使用的主流猪瘟疫苗。兔体感染量(RID)和猪体半数保护量(PD_{50})是评价疫苗效力的指标。动物的饲养状况、健康状况等个体差异也会对检验结果产生影响。$TCID_{50}$是病毒含量的测定方法之一,病毒在细胞内繁殖引起细胞病变(CPE),通过 CPE 的判定,计算病毒含量。CSFV 不引起 CPE,所以 CSFV 病毒含量测定要结合免疫荧光方法(FA)、间接免疫荧光方法(IFA)或过氧化物酶单层试验(IPMA)等免疫学方法进行判定。结合 IFA 和 IPMA 的 CSFV $TCID_{50}$的效价测定方法见于很多报道[1-3]。由于各文献并未对方法中的操作进行标准化,所以在实际应用中各反应条件均需逐一优化。本研究

作者简介:李晶梅,硕士,从事兽用疫苗研究。
通讯作者:谢红玲。E-mail:13419546263@163.com

参考前人方法并结合自身经验,优化反应条件,建立了结合 IFA 和 IPMA 的 HCLV $TCID_{50}$的效价测定方法。方法使用的细胞为易于培养的 ST 传代细胞;猪瘟抗体选择的是可以商品化购得的猪瘟单抗;筛选的过氧化物酶底物 TrueBlue 的显色效果优于 DAB、AEC。现将方法和条件优化试验报告如下。

1　材料和方法

1.1　材料

1.1.1　细胞和毒种　ST 细胞、猪瘟兔化弱毒株、猪瘟半成品疫苗和猪瘟成品疫苗(细胞源,犊牛睾丸细胞)由本公司保存。

1.1.2　主要试剂　猪瘟单抗为韩国 JBT 公司产品,MEM 培养基为 Gibco 公司产品,新生牛血清(NBS)为金源康公司产品,羊抗鼠 IgG - FITC 为 Thermo 公司产品,HRP - SPA 为 Sigma 公司产品,TrueBlue 过氧化物酶底物为 KPL 公司产品,AEC 和 DAB 过氧化物酶底物为武汉博士德公司产品,细胞培养液为含 8% NBS 的 MEM,病毒培养液为含 2% NBS 的 MEM。

1.1.3　实验动物　大耳白兔,武汉生物制品研究所提供。

1.2　方法

1.2.1　猪瘟病毒感染 ST 细胞　-70 ℃保存的 HCLV 湿毒室温水浴使其解冻,备用。取密度为 1.0×10^5 ~ 3.0×10^5 个细胞/mL 的 ST 细胞悬液,接种到 96 孔细胞培养板,每孔 100 μL ,37 ℃,5% CO_2 贴壁培养 16 ~ 24 h,待细胞长满单层,弃去细胞培养液,加入病毒培养液 100 μL,接种病毒培养液适当稀释的 HCLV 100 μL,继续培养 72 ~ 96 h,备用。

1.2.2　建立 IFA 检测方法

1.2.2.1　操作步骤　弃掉 1.2.1 项中 96 孔板内的病毒培养液,PBS 洗细胞 2 次,80% 冷丙酮固定细胞培养板 10 ~ 20 min,PBS 洗细胞 2 次,加入一抗(猪瘟单抗),37 ℃孵育 1 h,PBS 洗细胞 4 次,加入二抗(羊抗鼠 IgG - FITC),37 ℃孵育 1 h,PBS 洗细胞 4 次,双蒸水洗细胞 1 次,倒置荧光显微镜观察。

1.2.2.2　抗体稀释度优化　100 倍、300 倍、1000 倍稀释的一抗用于 IFA 操作,按照 1.2.2.1 项方法从上述三个稀释倍数中选出一抗的最适稀释度。二抗为常用商品化试剂,无需优化使用浓度,即羊抗鼠 IgG - FITC 按说明书建议的 100 倍稀释使用。

1.2.3　建立 IPMA 检测方法

1.2.3.1　操作步骤　弃掉 1.2.1 项中 96 孔板内的病毒培养液,PBS 洗细胞 2 次,80% 冷丙酮固定细胞培养板 10 ~ 20 min,PBS 洗细胞 2 次,加入一抗(猪瘟单抗),37 ℃孵育 1 h,PBS 洗细胞 4 次,加入二抗(HRP - SPA),37 ℃孵育 1 h,PBS 洗细胞 4 次,双蒸水洗细胞 1 次,加过氧化物酶底物,37 ℃孵育 10 ~ 60 min,弃去底物,双蒸水洗细胞 1 次,倒置显微镜观察。

1.2.3.2　抗体稀释度优化　100 倍、300 倍、1000 倍稀释的一抗用于 IPMA 操作,按照 1.2.3.1 项方法从上述三个稀释倍数中选出一抗的最适稀释度。二抗为常用商品化试剂,无需优化使用浓度,即 HRP - SPA 按说明书建议的 8000 倍稀释使用。

1.2.3.3　底物选择　按照 1.2.3.1 项方法对使用的过氧化物酶底物种类进行优化,从 AEC、DAB 和 TrueBlue 中选择辨识度最高的显色底物。

1.2.4　IFA 方法或 IPMA 方法测定细胞源猪瘟疫苗半成品和成品的病毒含量　-20 ℃保存的疫苗半成品室温水浴使其解冻;成品苗测定前以疫苗稀释液复溶至冻干前体积。使用 96 孔细胞培养板,选择 10^{-1}到 10^{-6}六个稀释度,每稀释度重复 6 孔,每孔加 100 μL,并设不接毒对照 6 孔。按 1.2.1、1.2.2、1.2.3 项方法接毒和检测。观察到阳性信号的孔记为阳性,否则为阴性。Reech - Muench 法计算并换算出样品的病毒含量($TCID_{50}$/mL)。

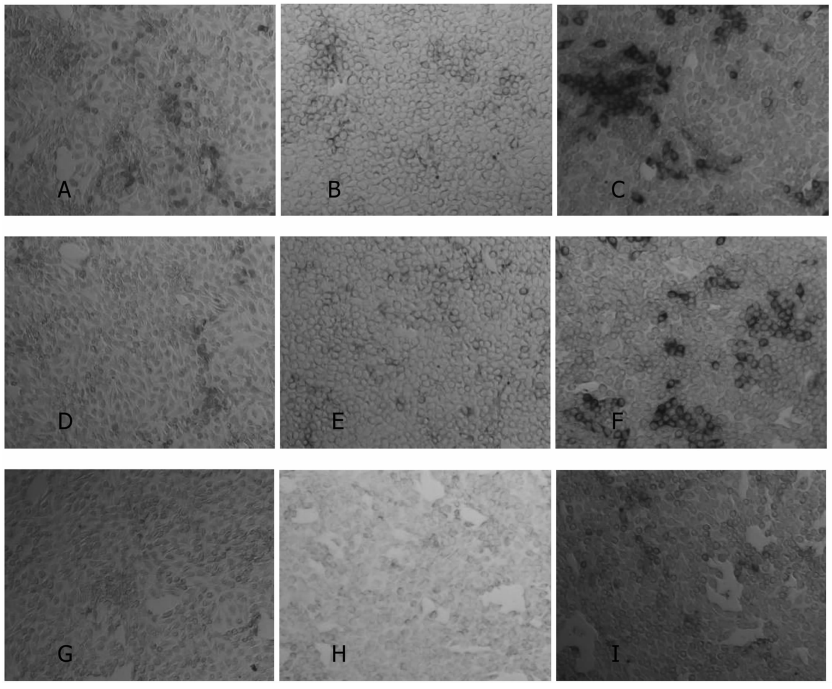
1.2.5　细胞源猪瘟疫苗半成品和成品的 RID 测定　1.2.4 项中的半成品和成品疫苗以《中华人民共和国兽药典》上的方法测定 RID[4],并与 $TCID_{50}$测定结果比较。每个样品测定 20 万倍、50 万倍、100 万倍、200 万倍四个稀释度。

2　结　果

2.1　IFA 方法优化条件　倒置荧光显微镜下观察,100 倍、300 倍、1000 倍稀释的一抗用于检测,阴性细胞无任何背景。阳性细胞以 100 倍、300 倍稀释的一抗检测,荧光信号明显;以 1000 倍稀释的一抗检测,荧光信号较弱,因此,一抗稀释倍数最高确定为 300 倍。96 孔病毒培养板以 80% 丙酮固定,经过一抗、二抗各 1 h 的孵育,可见光下观察,孔内细胞脱落少,可以很好的避免漏检。

2.2　IPMA 方法优化条件　从图可以看出, 100 倍稀释一抗后 AEC、DAB、TrueBlue 都有很好的显色

效果(图 1A、B、C),一抗二抗相同的情况下,Trueblue 显示蓝色,与粉色 AEC 和棕色 DAB 比较更易辨识;1000 倍稀释一抗后 AEC、DAB 显色孔中几乎无法辨识出阳性信号,TrueBlue 显色孔仍可辨识(图 1G、H、I);而 300 倍稀释一抗后 TrueBlue 显色,结果辨识度好,又不需要高浓度单抗(图 1F)。综合以上结果,最终选用使用 300 倍稀释一抗,TrueBlue 显色。96 孔病毒培养板以 80% 丙酮固定,经过一抗、二抗各 1 h 的孵育,显色液 10~60 min 孵育,孔内细胞脱落少(图 1),可以很好的避免漏检。

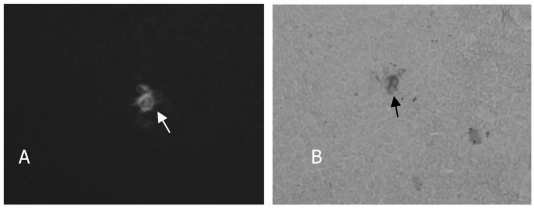


A. 一抗 100 倍稀释 AEC 显色;B. 一抗 100 倍稀释 DAB 显色;C. 一抗 100 倍稀释 TrueBlue 显色;D. 一抗 300 倍稀释 AEC 显色;E. 一抗 300 倍稀释 DAB 显色;F. 一抗 300 倍稀释 TrueBlue 显色;G. 一抗 1000 倍稀释 AEC 显色;H. 一抗 1000 倍稀释 DAB 显色;I. 一抗 1000 倍稀释 TrueBlue 显色

图 1　IPMA 不同一抗稀释倍数、不同底物显色结果

2.3　IFA 方法和 IPMA 方法测定 HCLV 病毒含量　用确定的 IFA 方法测定 HCLV 病毒含量。本次操作,可观察到阳性信号的最高稀释度孔为 10^{-4} 稀释度,阳性信号强烈(图 2A)。少量甚至单个细胞胞浆显示的荧光信号也清晰可见(图 2A 箭头所指)。

用确定的 IPMA 方法测定 HCLV 病毒含量。本次操作,可观察到阳性信号的最高稀释度孔为 10^{-4} 稀释度,阳性信号强烈,少量甚至单个细胞胞浆蓝色着染也清晰可见(图 2B 箭头所指)。



A. IFA;B. IPMA

图 2　IFA、IPMA 可检测到阳性信号的最高病毒稀释度

2.4　IFA、IPMA 法与兔热法测定猪瘟兔化弱毒病毒含量比较　以疫苗稀释液复溶的猪瘟成品疫苗,存在冻干保护剂,操作 IFA、IPMA 前观察,10^{-1} 稀释度孔细胞状态略差于对照孔细胞,IFA 和 IPMA 操作后,细胞脱落 20%~80%。操作 IFA、IPMA 前后,10^{-2} 稀释度孔细胞状态与对照孔细胞无差异。

同一样品 IFA、IPMA 方法各三次重复测定,结果无显著差异。说明 IFA、IPMA 方法测定结果重复性较好。测定的病毒含量 $TCID_{50}$ 数值与兔体反应热方法测定的 RID 数值,差异较大,但有一定的平行关系。RID 结果数值高于 $TCID_{50}$ 结果数值 1 个滴度左右。详细结果见表 1。

3　讨 论

前人将 IFA、IPMA 两种免疫学方法分别应用到 CSFV 检测中,解决了 CSFV 无 CPE、无法直接判定细胞是否感染的难题。以此为基础,还开发了结合 IFA 和 IPMA 的猪瘟病毒 $TCID_{50}$ 测定方法,方法

表 1　IFA、IPMA 及兔体反应热方法测定病毒含量比较

被检样品	IFA(TCID$_{50}$/mL)	IPMA(TCID$_{50}$/mL)	RID(RID/mL)
半成品 1	$10^{5.3\pm0.26}$($10^{5.0}$ ~ $10^{5.5}$) *	$10^{5.25\pm0.25}$($10^{5.0}$ ~ $10^{5.5}$) *	2×10^{6}
半成品 2	$10^{5.4\pm0.14}$($10^{5.25}$ ~ $10^{5.5}$) *	$10^{5.33\pm0.14}$($10^{5.25}$ ~ $10^{5.5}$) *	2×10^{6}
成品 1	$10^{4.4\pm0.13}$($10^{4.25}$ ~ $10^{4.5}$) *	$10^{4.3\pm0.26}$($10^{4.0}$ ~ $10^{4.5}$) *	0.5×10^{6}
成品 2	/	$10^{4.5}$	1×10^{6}
成品 3	/	$10^{4.33}$	0.5×10^{6}
成品 4	/	$10^{4.0}$	0.2×10^{6}
成品 5	/	$10^{3.67}$	0.5×10^{6}

注:* 为三次重复测定,平均数 ± 标准差,括号中的数值为数据范围。

的具体操作步骤和应用见于很多报道[1-3,5]。本文使用商品化猪瘟单抗、优化的检测条件,对猪瘟疫苗病毒含量进行测定,以期作为 RID 和 PD$_{50}$的补充方法加强猪瘟疫苗的质控。

本研究筛选的 IPMA 底物显示蓝色有很好的辨识度,同一样品 IPMA 方法和 IFA 方法测定的 TCID$_{50}$结果也相近,加之 IPMA 操作无需昂贵的荧光显微镜,所以 IPMA 测定方法非常适合应用到 HCLV 定量中。

将优化的 IFA、IPMA 方法用于测定某批次(细胞源)猪瘟疫苗成品、半成品的疫苗效价。猪瘟疫苗半成品为含有猪瘟病毒的细胞培养液,在检测前无需特殊处理。猪瘟成品疫苗是半成品中加入冻干保护剂冻干后的制品,测定前以疫苗稀释液复溶至冻干前体积。10^{-1}稀释的猪瘟成品疫苗由于保护剂浓度高,使得细胞状态略差于对照孔细胞。10^{-2}稀释的猪瘟成品疫苗,虽然存在少量冻干保护剂,但不对细胞状态造成影响。

《中华人民共和国兽药典》将 RID 和 PD$_{50}$作为评定猪瘟疫苗效力的方法[4]。实际操作中受实验动物质量的影响,有时检测结果不能够完全反应疫苗效价。而 IFA、IPMA 方法简单,受外界因素影响小,结果稳定。方法可以应用到猪瘟疫苗半成品和成品检验中作为 RID 和 PD$_{50}$的辅助方法控制疫苗质量。从本研究的少量数据分析,IFA、IPMA 方法与兔热法测定的病毒含量存在差异,兔热法测定数值更高。但是不同方法测定结果(RID、PD$_{50}$ 和 TCID$_{50}$)的对应关系在文献中有不同于本研究的结果,各研究结果也存在差异[1-3,6],可能是 RID、PD$_{50}$测定时实验动物个体差异,IFA、IPMA 测定时细胞状态不同或检测用抗体敏感度不同引起。现有文献中不同方法测定结果之间的平行关系数据相对较少,还不足以得出准确结论,有必要深入系统研究,以期筛选出一种简单准确的方法用于猪瘟疫苗效价。

参考文献:

[1] 中国兽医药品监察所. 一种猪瘟兔化弱毒活疫苗效力检验方法:中国,101915837[P]. 2010 - 12 - 15.

[2] 洛阳普莱柯生物工程有限公司. 一种猪瘟活疫苗效力检验方法:中国,101846683[P]. 2010 - 09 - 29.

[3] 北京华威特生物科技有限公司. 猪瘟活疫苗的制备方法及其产品:中国,102294029[P]. 2011 - 12 - 28.

[4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 二〇一〇年版[S].

[5] 邹兴启, 赵启祖, 范运峰, 等. 猪瘟病毒 C 株全长 cDNA 感染性克隆的构建及病毒拯救[J]. 中国农业科学,2011,44(2):409 - 416.

[6] 姚华伟. 猪瘟兔化弱毒疫苗效检替代方法及疫苗中牛病毒性腹泻毒检测方法的研究[D]. 重庆:西南大学,2011.

(责任编辑:侯向辉)