

柯萨奇病毒 A16 型感染性模型的建立及其相关免疫学指标和应用的评价

张 锋, 高 孟, 高丽美, 罗永能*

(浙江省医学科学院病毒病研究所, 杭州 310013)

【摘要】 目的 建立简便和可靠的对柯萨奇病毒 A16 型(coxsackievirus A16, CVA16)敏感的小型啮齿类实验动物模型。**方法** 选取不同日龄长爪沙鼠,腹腔接种 CVA16 后连续观察 14 d,筛选出对病毒敏感的最适接种日龄段;然后比较接种剂量与效应关系,测定其 50% 致死剂量(LD50);并测定感染 3 d 后其血液和主要组织器官中 CVA16 病毒滴度;最后用 CVA16 灭活疫苗在 1 日龄和 11 日龄免疫 2 针沙鼠后,在 14 日龄时用 LD50 剂量病毒攻毒,观察并记录沙鼠体重、症状及死亡率,2 周后眼球采血,应用微量中和试验和 ELISA 分别检测中和抗体效价和总抗体水平。**结果** 长爪沙鼠感染 CVA16 后出现活动减少、后肢无力、麻痹瘫痪、死亡等临床症状,不同日龄沙鼠对 CVA16 感染的易感能力和感染后发病程度不同,7 日龄和 14 日龄沙鼠易感,28 日龄沙鼠不易感染,最敏感和最合适接种日龄为 14 日龄,其 LD50 为 1×104.5 CCID50,感染 3 d 后其血液和主要组织器官中均可检测到高滴度的 CVA16 病毒,免疫两针灭活疫苗的 14 日龄沙鼠用 LD50 剂量攻毒,存活率 87.5%,疫苗免疫诱导沙鼠产生的 CVA16 中和抗体几何平均值(GMT)为 28.14,抗体阳性率为 87.5%。**结论** 长爪沙鼠对 CVA16 敏感并且病毒能在其体内进行有效的复制和繁殖,可作为 CVA16 致病机制研究、疫苗研发及药物评价的可靠小动物模型。

【关键词】 柯萨奇病毒 A16 型;长爪沙鼠;动物模型

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 01-0037-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.01.008

Establishment of an animal model for coxsackievirus A16 infection related immunological evaluation

ZHANG Feng, GAO Meng, GAO Li-mei, LUO Yong-neng*

(Institute of Viral Diseases, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

【Abstract】 Objective To establish a simple and reliable experimental rodent model sensitive to coxsackievirus A16 (CVA16). **Methods** Mongolian gerbils with different age were selected and inoculated intraperitoneally with live CVA16, and the gerbils were observed daily until 14 days postinoculation to screen for the most optimal ages sensitive to the virus. The dose-dependent symptoms were evaluated and the 50% lethal dose (LD50) was determined. The virus titers were measured in blood and various tissues of CVA16-infected Mongolian gerbils 3 days post-infection. Finally, the gerbils were immunized twice with inactivated CVA16 vaccine at day 1 and day 11, respectively, followed by challenge with the virus with a dose of LD50 at day 14. The gerbils were then observed for another 2 weeks to record their body weight, symptom and mortality rate. Their blood samples were collected from the eyes, and CVA16-specific neutralizing antibody

[基金项目] 浙江省科技计划项目(2014C37014, 2016C37102)。

[作者简介] 张锋(1974-),男,高级实验师,研究方向:从事医学病毒学研究。E-mail:13957185700@163.com

[通讯作者] 罗永能(1966-),男,博士,研究员,研究方向:从事医学病毒学研究。E-mail:ynl101@163.com

titers and total antibody titers was checked by microneutralization test and ELISA, respectively. **Results** Various clinical symptoms, such as inactivity, hind limb weakness, paralysis and even death occurred in gerbils following CVA16 infection. 7-day-old and 14-day-old gerbils are susceptible to CVA16 infection whereas 28-day-old gerbils are resistant. The most sensitive and appropriate age is 14-day-old. The 50% lethal dose was determined to be 1×104.5 CCID₅₀. High titers of the virus were confirmed in blood and various tissues of Mongolian gerbils contracted CVA16 3 days post-infection. The survival rate is 87.5% for 14-day-old gerbils preimmunized with two doses of inactivated CVA16 vaccine and challenged with the virus. The geometric mean titers (GMTs) of neutralizing antibody was 28.14, and the seroprevalence was 87.5%. **Conclusions** Mongolian gerbils is sensitive to CVA16 and the virus reproduces actively in Vivo. Thus, it can be used as a reliable small animal model for studies of CVA16 pathogenesis, vaccine development and drug evaluation.

【Key words】 Coxsackievirus A16; Mongolian gerbils; Animal model

柯萨奇病毒 A16 型(coxsackievirus A16, CVA16)属于小 RNA 病毒科肠道病毒属,是引起手足口病(hand foot and mouth disease, HFMD)的主要病原体之一^[1]。手足口病是一种全球性的传染病,世界各地均有不同程度的流行。尤其在亚太地区,近年来疫情呈不断上升的趋势^[2]。由于手足口病另一主要致病原肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)自 2008 年后在大陆及亚太地区多次大规模暴发流行已在易感人群中建立了一定程度的免疫屏障,近几年 CVA16 等其它肠道病毒感染引发的病例已呈大幅上升趋势,国内少数省份已有暴发流行并报告死亡病例^[3]。国内外监测数据也表明 CVA16 引起的 HFMD 有逐年增加趋势,每隔一定时间就出现一次高峰^[3]。

手足口病至今尚无高效、特异的药物,对症和支持治疗是主要的措施。研发疫苗对全面有效地预防控制手足口病的暴发流行有重大意义,最近我国已完成 EV71 灭活疫苗的临床试验^[4]并批准上市。相关实验动物模型的建立和使用是上述疫苗研制过程中至关重要的环节之一,目前国内外研究 CVA16 主要是使用小于 7 日龄的小鼠乳鼠,我们先前的实验和他人报道均发现超过 7 日龄的小鼠乳鼠就不能感染^[5,6]。然而这种小鼠乳鼠模型由于免疫系统发育尚未成熟等原因,在实际使用上有很大限制。因此,我们借鉴 Yao 等^[7]建立肠道病毒 71 型感染长爪沙鼠模型的成功经验,使用 CVA16 YY157 株感染清洁级长爪沙鼠,以期建立比小鼠乳鼠模型更加简便和可依赖的对 CVA16 敏感的小型啮齿类动物模型,用于 CVA16 的发病机制、疫苗研发和抗 CVA16 药物评价。

1 材料和方法

1.1 细胞和病毒

Vero 细胞来源于美国标准生物制品收藏中心

(american type culture collection, ATCC); CVA16 病毒 YY157 株由本研究所保存^[8-10]。用 Vero 细胞培养繁殖 CVA16 YY157 株,并用微量细胞病变法测定病毒的感染性滴度。病毒上清反复冻融 3 次后,低温离心(5000 r/min,离心力 3900 g, 20 min)取上清,0.2 μm 滤膜过滤后, -80℃ 冰箱中保存。

1.2 实验动物

清洁级 Z; ZCLA 长爪沙鼠,由浙江省医学科学院实验动物中心[SCXK(浙)2014-0001]提供,1 日龄,8 只,体重 3~3.5 g; 7 日龄,16 只,体重 6~7 g; 14 日龄,68 只,体重 10~11 g; 21 日龄,16 只,体重 15~17 g; 28 日龄,16 只,体重 20~22 g,动物的饲养和实验在浙江省医学科学院实验动物中心进行[SYXK(浙)2011-0166]。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.3 实验方法

1.3.1 动物实验

选取 7、14、21 和 28 日龄清洁级长爪沙鼠(各日龄 8 只),各组腹腔内分接种病毒量 1×10^5 细胞培养半数感染量(CCID₅₀)/只,每日观察并记录沙鼠的临床症状和存活/死亡情况,连续观察 14 d,筛选出对 CVA16 病毒最敏感和最合适的沙鼠日龄段。取适龄的沙鼠 48 只,随机分成 6 组(每组 8 只),各组腹腔内分别接种 CVA16(1×10^2 、 1×10^3 、 1×10^4 和 1×10^5 CCID₅₀/只)和对照 MEM 液,每日观察并记录沙鼠的症状和存活/死亡情况,连续观察 14 d,最后用 Reed-Muench 法计算出 CVA16 对沙鼠的 LD₅₀ 剂量,并以此为基数确定后续实验所需接种的适宜剂量。

1.3.2 临床症状判定标准

根据临床表现划分 5 个等级:0. 正常;1. 毛发竖起、体重下降和行动不便;2. 后肢无力;3. 单肢麻痹;4. 双肢麻痹;5. 死亡。

1.3.3 感染沙鼠的血液和主要组织器官中 CVA16 病毒滴度测定

选择 14 日龄长爪沙鼠 3 只,腹腔内注射接种 LD₅₀ 剂量(即 1×104.5 CCID₅₀)的 CVA16,感染 3 d 后分别取血液、后肢肌肉、心脏、肝脏、肺、脑和肠道等 7 个组织,称重(除血液外)后加入 10 倍(体积重量比)的 PBS,超声至匀浆后离心,取各上清液用 MEM 培养液作 10 倍梯度稀释至 $10^{-1} \sim 10^{-8}$,分别接种于 Vero 细胞长满单层 96 孔板中,置 5% CO₂ 培养箱中 35℃ 培养 7 d 后,用显微镜观察 CPE 产生与否,用 Reed-Muench 法计算血液和上述各组织提取上清液的 CVA16 滴度。

1.3.4 CVA16 灭活疫苗制备

病毒收获液经离心澄清,按 1:4000 的比例加入福尔马林,37℃ 灭活 3 d;超滤浓缩后,采用 Sephacryl S-400 HR 凝胶过滤层析和 Source 30Q 离子交换层析 2 步层析法纯化 CVA16,进行各项检定及分析合格后,再除菌过滤,2~8℃ 保存,用时加入铝佐剂,稀释成蛋白含量 10 μg/100 μL 的剂量。

1.3.5 CVA16 灭活疫苗对长爪沙鼠的免疫保护

新生 1 日龄的沙鼠腹腔内接种 CVA16 灭活疫苗(蛋白含量 10 μg/100 μL 只),10 d 后加强免疫一次。等沙鼠 14 日龄时,用 LD₅₀ 病毒剂量进行攻毒实验,观察并记录沙鼠体重、症状及死亡率,2 周后眼球采血,用 ELISA 检测血清中抗 CVA16 特异性抗体水平和体外微量中和试验检测其抗血清中和 CVA16 的能力,评价 CVA16 灭活疫苗的免疫原性。

1.3.6 体外微量中和试验检测中和抗体滴度

将沙鼠摘眼球采血,血清采用经典体外微量中和试验检测中和抗体效价。将免疫血清自 1:8 开始进行 2 倍系列稀释后,分别与 100 CCID₅₀ CVA16 等体积混合,接种于 Vero 细胞长满单层 96 孔板中,置 5% CO₂ 培养箱中 35℃ 培养 7 d 后,用显微镜观察 CPE,以能抑制 50% 细胞病变的最高稀释度的倒数作为中和抗体效价,每次试验均设细胞、病毒对照,检测结果以中和效价 $\geq 1:8$ 判为 CVA16 中和抗体阳性。

1.3.7 ELISA 检测血清中 CVA16 特异性抗体水平

将沙鼠血清用 1% BSA 液稀释 100 倍后加入包被 CVA16 抗原的反应孔,100 μL/孔,同时利用 BSA 和阴性血清设立空白对照和阴性对照,37℃ 孵育 1 h 后洗涤 5 次;将 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 进行 1:10000 稀释后加入反应孔,100 μL/孔,37℃ 孵育 30

min 后洗涤 5 次;每孔加入 100 μL OPD 显色液,37℃ 避光反应 15 min 后加入 50 μL 2 M 硫酸终止反应,用酶标仪测定 490 nm 的吸光度值。以阴性对照孔的平均吸光度值的 2.1 倍为阈值判定阳性。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism5 软件分析处理数据,组间比较采用独立样本 Bonferroni's Multiple Comparison Test, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CVA16 病毒感染长爪沙鼠的敏感性试验

长爪沙鼠感染 CVA16 后可出现活动减少、后肢无力、麻痹瘫痪、死亡等临床症状(图 1)。不同日龄长爪沙鼠对 CVA16 感染的敏感性不同并存在明显差异。7 日龄长爪沙鼠在攻毒后第 3 天出现症状,第 8 天全部死亡,存活率为 0;14 日龄长爪沙鼠在攻毒后第 4 天出现临床症状,第 9 天全部死亡,存活率为 0;21 日龄长爪沙鼠也在攻毒后第 4 天出现症状,但临床症状比 7 日龄和 14 日龄鼠轻,第 7 天有部分感染沙鼠死亡,第 8 天感染沙鼠症状开始减轻,存活率为 62.5%;28 日龄长爪沙鼠在攻毒后第 4 天出现轻微临床症状(毛发竖起,轻微肌无力),第 9 天起逐步恢复正常,存活率为 100%(图 2)。7 日龄和 14 日龄沙鼠对 CVA16 感染的敏感性有统计学意义($P < 0.05$),21 日龄和 28 日龄沙鼠感染 CVA16 也会出现临床症状或死亡,但差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。按照长爪沙鼠日龄、临床评分和存活率,确定 14 日龄长爪沙鼠为 CVA16 病毒感染最合适的对象,并用于后续试验。

2.2 CVA16 病毒感染长爪沙鼠的剂量与效应关系

14 日龄长爪沙鼠注射不同剂量病毒,表现的症状与剂量成正相关性($P < 0.0001$)。用 1×10^5 CCID₅₀ 病毒量攻毒,第 3 天出现临床症状,在注射第 8~9 天全部死亡,存活率为 0。随着病毒量减少,出现症状减轻,存活率提高, 1×10^4 CCID₅₀ 病毒量,平均临床评分 2.54,存活率 62.5%; 1×10^3 CCID₅₀ 病毒量,平均临床评分 1.44,存活率 75%; 1×10^2 CCID₅₀ 病毒量,平均临床评分 0.88,存活率 87.5%。 1×10^5 和 1×10^4 CCID₅₀ 病毒量与对照 MEM 液组比较有明显差异($P < 0.05$)。最后用 Reed-Muench 法计算出 CVA16 对沙鼠的 LD₅₀ 剂量为 1×104.5 CCID₅₀ 病毒量,结果见图 3。

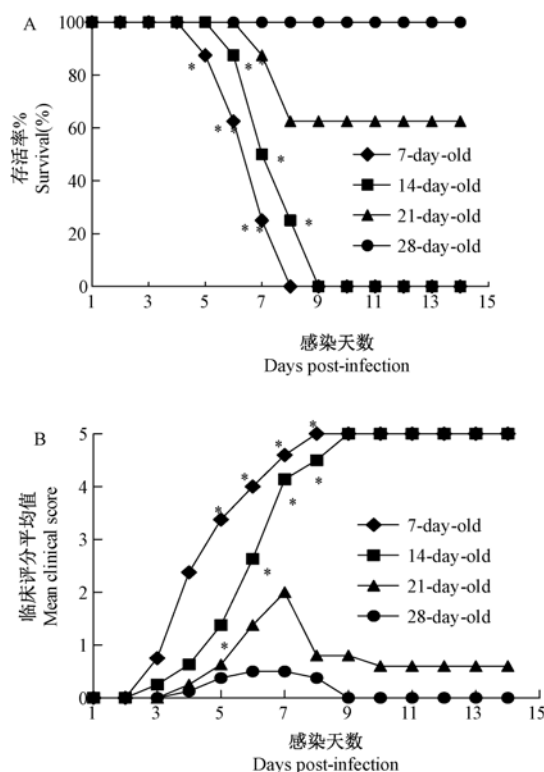


注:(A)正常;(B)病变。

图 1 14 日龄长爪沙鼠感染 CVA16 出现后肢麻痹

Note. (A) normal. (B) paralysis.

Fig.1 Hindlimb paralysis caused by CVA16 infection in 14-day-old Mongolian gerbils

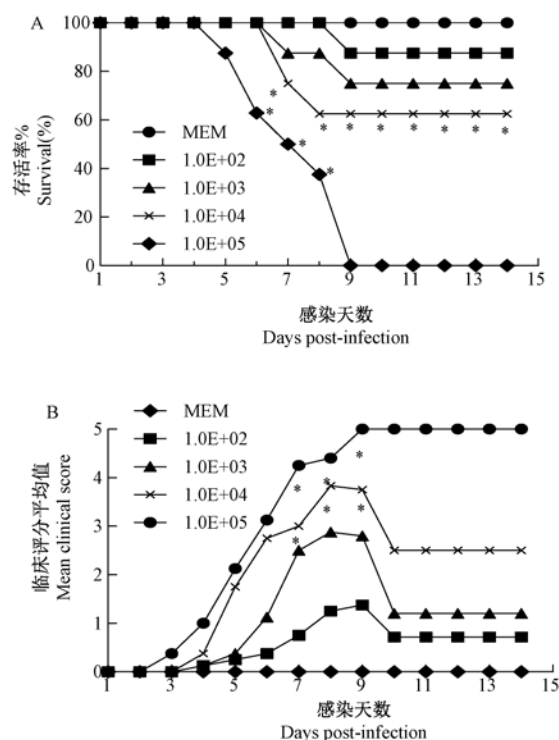


注:组间比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 CVA16 感染长爪沙鼠的敏感性试验($n=8$)

Note. Compared with multiple groups, * $P < 0.05$.

Fig.2 Sensitivity test of CVA16 infection in Mongolian gerbils



注:与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 CVA16 感染沙鼠的剂量与效应关系($n=8$)

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$.

Fig.3 Dose-dependent consequence of CVA16 infection in Mongolian gerbils

2.3 感染沙鼠的血液和主要组织器官中 CVA16 病毒的复制繁殖

根据对 14 日龄长爪沙鼠感染 3 d 后的血液和所选择主要组织器官提取上清液中 CVA16 病毒滴度的测定结果(图 4), CVA16 病毒均有存在, 在后肢肌肉和脑组织中滴度最高(达 6×10^5 CCID₅₀), 表明 CVA16 确实感染了长爪沙鼠并在其体内进行了有效的复制和繁殖。

2.4 CVA16 灭活疫苗对长爪沙鼠的免疫保护作用

免疫两针 CVA16 灭活疫苗的 14 日龄沙鼠用 LD₅₀ 剂量攻毒, 注射第 5 天有 2 只出现临床症状, 一只症状较轻, 另一只第 7 天死亡, 存活率 87.5%。疫苗免疫诱导沙鼠产生的 CVA16 中和抗体几何平均滴度 (GMT) 为 28.14, 特异性抗体阳性率为 87.5%, 而且中和抗体效价高低与 ELISA 测定的总抗体 OD 值完全对应, 呈现正相关性(表 1)。上述结果表明 CVA16 灭活疫苗对长爪沙鼠有显著的免疫保护效果。

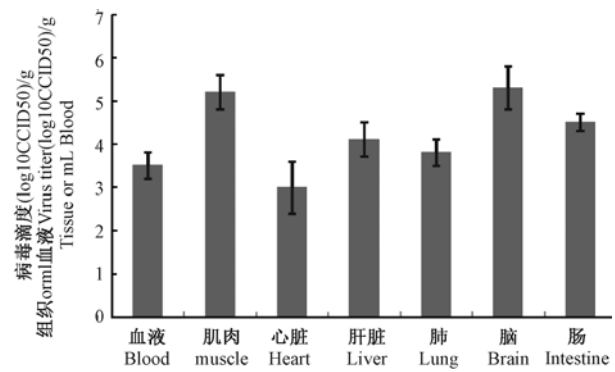


图 4 CAV16 感染 14 日龄长爪沙鼠 3 d 后血液和主要组织中的病毒滴度
Fig. 4 Virus titers in various tissues of CVA16-infected Mongolian gerbils 3 days post-infection

表 1 CVA16 灭活疫苗对长爪沙鼠的免疫原性
Tab. 1 Immunogenicity of inactivated CVA16 vaccine in Mongolian gerbils

血清编号 Serum NO.	中和抗体效价 Neutralizing antibody titers	总抗体 A490 值 The total value of antibody A490
1	1:34.9	1.399
2	1:42.4	1.647
3	1:35.5	1.358
4	1:28.2	1.217
5	1:17.8	0.867
6	1:24.1	1.138
7	1:14.1	0.546

注: GMT 为 28.14;中和抗体效价 $\geq 1:8$ 判断为抗体阳性;以阴性对照 2.1 倍为阈值判定阳性, cutoff 值 0.201。
Note. GMT to 28.14. Neutralizing antibody titer $\geq 1:8$ judged to be antibody positive. To 2.1 times the negative control positive determination, cutoff values for 0.201.

3 讨论

柯萨奇病毒 A16 型是引起手足口病的主要病原体之一,近年来越来越多报道显示 CVA16 除引起轻症外,亦可导致心肌、心包、脑部和肺部等疾病,甚至引发致死性心肌炎、脑干脑炎和肺炎等致死性症状^[1],研发相应疫苗对全面有效地预防控制手足口病的暴发流行有重大意义。动物模型是疫苗临床前研究阶段评价保护效果等关键指标的重要工具,直接影响疫苗评价的准确性。目前常用的动物模型主要是小鼠乳鼠模型和猴体模型,小鼠乳鼠是相对敏感和常用的小动物感染模型,但由于其感染年龄过低,感染周期短,限制了其在疫苗免疫效果评价和药物筛选中的应用;而最为接近人类的猴体动物模型的研究虽然已经取得了一定的进展,但由于存在动物来源困难、饲养环境要求高、运输条件苛

刻、试验费用高等客观原因,极大地限制了该模型的应用和发展。因此,开发建立新的手足口病小动物模型具有实际意义^[7]。

长爪沙鼠属于啮齿目、沙鼠属动物,1935 年由日本人开始驯化和实验动物化,60 年代开始作为实验动物应用于医学研究。其对流行性出血热病毒、幽门螺旋杆菌、寄生虫等多种病原体易感,相比于其他啮齿类实验动物,长爪沙鼠受感染可表现出与人类更相似的病理学特征和临床症状,因此长爪沙鼠作为具有独特生物学特性的“多功能”实验动物,已广泛用于疫苗研制和病原感染等生物医学研究领域^[11-13]。Yao 等^[7]用一株临床分离的 EV71 病毒感染长爪沙鼠,发现 7 到 28 日龄沙鼠感染后展现后肢麻痹、行动迟缓、运动失调和昏睡倦怠等症状并最终致死,另伴有严重的中枢神经系统相关病变,28 至 49 日龄沙鼠对 EV71 敏感度逐渐降低,而 49 日龄以上沙鼠感染 EV71 后没有表现症状但多数产生相应的中和抗体。同时,他们对新生沙鼠腹腔内接种 EV71 灭活疫苗(20 mg/只)并在一周后加强免疫一次,再隔 2 周后即 21 日龄时,用致死剂量(100 倍 LD₅₀)EV71 病毒进行攻毒实验,发现接种 EV71 灭活疫苗对长爪沙鼠具有完全的免疫保护效果^[7]。

CVA16 病毒 YY157 株临床分离后未经小鼠活体驯化传代,前期工作中我们已测定了其基因组核酸全序列(GenBank 序列号 KC507895)、探索了其在 Vero 等^[8,9]细胞中培养与增殖特性并确定了衣壳蛋白 VP1~VP3 的 B 淋巴细胞线性抗原表位^[10]。我们将经过体外细胞培养繁殖并收获的 CVA16 YY157 株病毒通过腹腔注射感染长爪沙鼠,后者出现活动减少、后肢无力、麻痹瘫痪、死亡等临床症状,对 CAV16 感染的敏感性与沙鼠日龄相关即鼠龄越小越敏感;在剂量与效应关系实验结果显示症状和死亡率与剂量成正相关性,其 LD₅₀ 量与小鼠乳鼠模型接近^[5]。先前在成功建立 EV71 H3-TY 株感染小鼠乳鼠模型基础上,我们也曾尝试建立 CAV16 YY157 株感染小鼠乳鼠模型,发现 5 日龄以下乳鼠才能被有效感染并展示类似的表型症状和剂量与效应关系。在本实验中感染 CVA16 使用的是 7 日龄以上长爪沙鼠,并通过腹腔注射途径,不同于小鼠乳鼠模型的颅内注射,不会直接破坏神经系统,更能客观反映病毒感染特征,实验结果也显示应该比小鼠乳鼠模型具有更大实用价值。

在疫苗研发中,疫苗免疫原性和保护效果评价

是疫苗质量的关键指标。与小鼠乳鼠模型(通过免疫怀孕母鼠,对其所产新生乳鼠攻毒)相比,长爪沙鼠模型避免了前者通过母传抗体间接评价疫苗模式带来的相关问题,同时也降低了由于小鼠乳鼠日龄过小给实验带来的不确定性,更能真实反映疫苗免疫保护效果。本文前述的 CVA16 灭活疫苗对的长爪沙鼠免疫保护实验中有 2 只在攻毒后第 5 天出现临床症状,其中 1 只在攻毒后第 7 天死亡,导致存活或免疫保护率不是 100%,很可能与免疫剂量低(10 mg/100 mL/只)和个体差异导致的中和抗体滴度不高有关。但 CVA16 感染长爪沙鼠引发的症状及其灭活疫苗的免疫保护作用均和 EV71 高度类似^[7]。下一步我们将通过分子生物学方法检测相关细胞因子水平等状况。

总之,本实验利用浙江省实验动物中心驯养的 Z;ZCLA 长爪沙鼠建立了简便和可靠的对 CAV16 敏感的又一小型动物模型,其进一步优化、完善了 CVA16 的现有动物模型,可用于 CVA16 病毒致病机制、感染特点的研究和其相关疫苗及药物效果的评价。

参考文献:

- [1] 李兰娟.手足口病[M]. 浙江省科学技术出版社, 2008.
- [2] 王一平,毛群颖,梁争论.柯萨奇 A 组 16 型研究进展[J]. 微生物学免疫学进展,2012,40(3): 62-66.
- [3] Mao Q, Wang Y, Yao X, *et al.* Coxsackievirus A16: Epidemiology, diagnosis, and vaccine [J]. Hum Vaccin Immunother, 2014, 10(2): 360-367.
- [4] Zhu FC, Meng FY, Li JX, *et al.* Efficacy, safety, and immunology of an inactivated alum-adjuvant enterovirus 71 vaccine in children in China: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial [J]. Lancet, 2013, 381(9882): 2024-2032.
- [5] Mao Q, Wang Y, Gao R, *et al.* A neonatal mouse model of coxsackievirus A16 for vaccine evaluation [J]. J Virol, 2012, 86(22): 11967-11976.
- [6] Liu Q, Yan K, Feng Y, *et al.* A virus-like particle vaccine for coxsackievirus A16 potently elicits neutralizing antibodies that protect mice against lethal challenge [J]. Vaccine, 2012, 30(47): 6642-6648.
- [7] Yao PP, Qian L, Xia Y, *et al.* Enterovirus 71-induced neurological disorders in young gerbils, *Meriones unguiculatus*: development and application of a neurological disease model [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51996.
- [8] 张锋,朱莲,陈军,等.柯萨奇病毒 A16 型 YY157 株在 Vero 细胞中培养与增殖特性的研究[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2014, 28(6): 446-448.
- [9] 陈军,朱莲,张锋,等.柯萨奇病毒 YY157 株在不同细胞系中的增殖特性[J]. 国际流行病学传染病学杂志, 2015, 42(2): 103-106.
- [10] 高孟,倪红霞,朱莲,等.柯萨奇病毒 A16 型衣壳蛋白 VP1 ~ VP3 的 B 淋巴细胞线性抗原表位预测与确定[J]. 中华临床感染病杂志, 2015, 80(6): 543-548.
- [11] 翁景清,朱智勇.双价流行性出血热灭活疫苗的研究和应用[J]. 医学研究通讯, 2000, 29(10): 21-22.
- [12] 肖丽,戴方伟,宋晓明,等.长爪沙鼠在病原感染研究中的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(7): 61-67.
- [13] 卢领群,宋晓明,戴方伟,等.长爪沙鼠的生物净化技术[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(4): 62-65.

[收稿日期] 2016-07-04