

本刊被中国内刊协会评选为 2014 年度全国优秀内刊

华派®  
HUAPAI

华派生物 (猪业版)

2015 年第 3 期 总第 10 期

<http://www.schpzy.com/index.aspx>

E-mail: huapaisw@163.com

内部交流 免费赠阅

H u a P a i B i o l o g i c a l

## 农业部对我公司进行兽药 GMP 飞行检查

首 华 派 生 物 制 药 有 限 公 司



应用生物反应器培养猪传染性胃肠炎病毒

三种猪伪狂犬病抗体监测方法比较

猪瘟和猪伪狂犬疫苗混合接种效果评价

猪圆环病毒灭活疫苗稀释猪瘟活疫苗联合免疫效果研究

打造中国动物疫苗第一品牌

猪圆环病毒2型灭活疫苗 (ZJ/C株)

Porcine Circovirus Type 2 Vaccine,  
Inactivated (Strain ZJ/C)

批准文号：兽药生字 (2014) 221011088

中华人民共和国新兽药注册证书证号：(2013)新兽药证字10号

# 圆环康

- ✓ 生产毒株 (ZJ/C) 为国内广泛流行优势毒株,针对性更强
- ✓ 高效抗原浓缩纯化, 抗原含量高而稳定 ( $10^{8.0}TCID_{50}$ - $10^{8.3}TCID_{50}/ml$ )
- ✓  $\beta$ -PL灭活剂, 安全、高效、灭活彻底, 无残留
- ✓ HPVVG进口水质佐剂, 通针性好, 几乎无应激反应
- ✓ 免疫3周后产生坚强保护, 仔猪注射一次即可保护至出栏
- ✓ 生产成绩明显改善, 经济效益可观 (投入产出比为1:9.6)



**用了圆环康 猪群真健康**

**华派**®  
HUAPAI

四川省华派生物制药有限公司

地址：四川简阳经济开发区石盘食品医药产业园

邮编：641423

传真：028-27282488

电话：028-27400432 27290977

网址：www.schpzy.com



卷首语 | EDITORIA

# 为客户创造价值 华派一直在努力

文 | 向丕元

“竞争优势归根结底产生于企业所能为顾客创造的价值。”全球第一战略权威、商业管理界公认的“竞争战略之父”、哈佛商学院终身教授迈克尔·波特 (Michael E.Porter) 曾作出了这样精辟的论断。

在当今技术高度发展、产品趋同严重的形势下，一个企业如果想生存并发展，只有乐于把方便给予客户，把利益给予客户，把有效有价值的服务给予客户，才能塑造出企业独特形象的价值魅力，赢得客户之心。

客户是我们的生存根源，发展之本；我们和客户是互惠互利、共生共赢、共同成长的关系。为客户创造价值也是为自己创造价值，只有为客户创造价值才能赢得尊重，并体现自身价值。

华派生物始终将“为客户创造价值”作为企业发展核心理念。目前，企业正朝着国际化、现代化的方向快速发展。

2012年以来，公司先后投入近3亿元建成了国内一流的动物疫苗生产车间。一期工程于2013年底建成并顺利通过国家农业部的GMP静、动态验收，包括4个生产车间15条生产线，其中含2条细胞悬浮培养生产线；二期工程于2014年建设的核酸疫苗专用生产车间和亚单位疫苗专用生产车间已进入设备安装调试阶段，等待国家农业部的GMP验收。

今年1月底，四川省发展和改革委员会正式下文批复，同意华派生物实施“四川省兽用核酸及亚单位疫苗工程实验室”项目，项目总投资3100万元。该项目的建成和运用，必将对华派生物新产品开发及其产业化生产形成强有力的技术支撑，甚至颠覆传统动物疫苗的生产工艺和历史。

华派生物在创造产品的同时也必将赢得更多的客户，并为客户带来更大价值。

精华集团董事长、华派生物创始人谢建勇先生始终倡导诚信为先，以人为本，注重业绩，勇于创新，谋求企业与员工的共同发展；始终坚持质量标准，以客户成功来衡量企业的成功。通过集团高层的战略研讨和他的深思熟虑，决意在任何环境条件下都要实现华派生物矢志不渝的战略目标——打造中国动物疫苗第一品牌。这一切都是为了提升企业动物保健的真正能力，为客户创造更大价值，为员工创造更多机会，提高人类的生活水准。

华派生物拥有现代化的生产车间和优秀的研发、生产和技术服务团队，以及优化的营销模式，还有丰厚的企业文化底蕴。毋庸置疑，通过华派团队的坚实努力和不懈奋斗，华派人一定能够开拓创新，华派产品一定能与市场与客户精准对接，一定能使客户的价值最大化，实现共创共享共赢的终极目标。



(猪业版)

### 出版发行

主管单位：四川省精华企业（集团）有限公司

主办单位：四川省华派生物制药有限公司

编辑出版：《华派生物》杂志编辑部

### 顾问委员会

顾问：杨汉春 余永健 王红宁  
程安春 徐志文 颜其贵  
王印 黄伟 高荣  
廖党金 王泽洲 丁庆猷  
杨晓农 魏甬 谢晶

编委会主任：谢建勇

### 编辑部

主编：龚文波  
副主编：方鹏飞 林琳  
执行主编：徐静  
责任编辑：李妍 邱文英 张丽燕 秦运杰 严成  
设计制作：四川栋力文化传媒有限公司  
(电话：028-85980340 官网：www.ranmedia.com)

电话：028-27400432  
传真：028-27282488  
网址：www.schpzy.com/index.aspx  
电子信箱：huapaisw@163.com  
通讯地址：四川省简阳经济开发区石盘食品医药产业园  
邮政编码：641423

### 友情支持单位

成都正大农牧食品有限公司  
成都巨星农牧科技有限公司  
四川铁骑力士牧业科技有限公司  
四川优百万畜牧有限公司  
新希望六和股份有限公司成都中心  
华西希望特驱农牧有限公司  
成都凤凰华侨农牧科技发展有限公司  
四川蓝雁集团种猪场  
乐山长益畜牧科技公司  
眉山万家好种猪繁育有限公司  
通威股份四川省春源生态养殖有限责任公司



2015年第3期 总第10期

内部交流 免费赠阅

### ▲ 免责声明

本刊郑重声明：《华派生物》为本公司内部交流刊物。刊载的文章除有特别注明以外仅代表作者个人观点，与公司立场无关。本刊所登文章、图片及部分文字的真实性、完整性、及时性本刊不作任何保证或承诺，仅供读者参考，并请自行核实相关内容。

### ▲ 版权所有·侵权必究

凡受赠本公司刊物，如有缺页、倒页、脱页，由《华派生物》杂志编辑部负责退换。

本刊赠阅以下读者：（1）国内各地区有影响力的畜禽养殖企业（业主）；（2）国内各地区代理商、经销商；（3）企业内部员工；（4）合作伙伴（友好往来）单位。

# 蓝经灵

猪繁殖与呼吸综合征活疫苗 (经典蓝耳株 CH-1R)

Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Vaccine, Live(CH-1R Strain)

批准文号:兽药生字(2011)221011063



- 高度安全不返强
- 超强免疫长保护
- 疫苗纯净低应激
- 稳定品质高含量



**华派**  
HUAPAI

**四川省华派生物制药有限公司**

Sichuan Huapai Bio-pharmaceutical Co.LTD

地址: 四川省简阳经济开发区石盘食品医药产业园 邮编: 641423

电话: 028-27400432 27282289 传真: 028-27282488

网址: www.huapaisw.com



## P14 农业部对我公司进行兽药 GMP 飞行检查

4月8日至9日,四川省兽医药品监察所所长、副所长及四川省农业厅调研员随同农业部兽药GMP专家中监所业务管理处处长、中监所实验动物管理专家对四川省华派生物制药有限公司进行了兽药GMP检查。

### 卷首语 Editoria

01 为客户创造价值 华派一直在努力

### 图片新闻 News Pictures

- 06 山东、新疆客人到华派生物考察指导工作
- 08 2015年重大动物疫病防控暨猪用活疫苗外源病毒检测技术培训开班仪式在华派生物隆重开幕
- 12 华派生物成功举办猪用活疫苗外源病毒和支原体检测技术培训
- 14 农业部对我公司进行兽药GMP飞行检查
- 18 中国兽医药品监察所在四川成都举办执行企业内控质量标准交流座谈会

### 技术交流 Technical Exchange

- 20 应用生物反应器培养猪传染性胃肠炎病毒
- 25 三种猪伪狂犬病抗体监测方法比较
- 30 菌影制备效果的评价及其应用前景
- 32 猪瘟和猪伪狂犬疫苗混合接种效果评价
- 37 猪圆环病毒灭活疫苗稀释猪瘟活疫苗联合免疫效果研究

### 本刊特稿 Special Topics

42 抗原检测方法的开发及优化

### 职场感悟 Workplace Apperception

- 50 开拓、创新——华派生物保持常青之所在
- 51 设备管理是生产的基础

### 七彩生活 Colorful Life

- 52 从对手察觉自己的未来
- 53 开个会 事半功倍

### 行业资讯 Stockbreeding Information

- 55 2015年兽医工作要点
- 57 动物诊疗专项整治行动 严打执业兽医违法从业
- 59 农业部关于2015年第一期兽药质量监督抽检情况的通报
- 61 2015年3月及一季度四川生猪价格和生产监测情况
- 64 猪价趋于震荡小幅上涨 需警惕玉米价格上涨再次蚕食养殖利润



# 伪安清

## 伪狂犬病活疫苗

Pseudorabies Vaccine, Living (Strain Bartha k-61)

批准文号：兽药生字（2010）221017018

铸  
百年疫苗品质  
集先进生物科技



- 免疫原性好:gE基因自然缺失
- 病毒含量高于国家标准: $10^{5.3}$ - $10^{5.6}$ TCID<sub>50</sub>/头份
- 纯化毒种:蚀斑克隆,有效去除毒力基因
- 安全方便:哺乳仔猪可滴鼻接种

### 净化伪狂犬病的利器!



四川省华派生物制药有限公司  
地址：四川简阳经济开发区石盘食品医药产业园  
邮编：641423

传真：028-27282488  
电话：028-27400432 27290977  
网址：www.schpzy.com



# 山东、新疆客人到华派生物 考察指导工作

文 | 张莉 图 | 本刊编辑部

# Investigati



3月28日，石河子大学动物科技学院曲勇刚教授和来自山东、新疆的经销商及规模化猪场代表一行20人到华派生物考察指导工作。公司营销副总监曾谊、技术服务总监向丕元、大区经理李晓军、诊断中心主任李金海博士、技术服务经理张莉、山东省区经理吴海生等相关领导参与了接待。

在交流会上，曾总监对山东、新疆客人的来访表示热烈欢迎，向客人转达了谢建勇董事长和龚文波总经理的亲切问候。华派生物技术服务经理张莉就公司的基本情况向来访客人做了简要介绍，并就相关产品技术和客人进行了热烈的讨论和交流。诊断中心主任李金海博士就华派生物产品研发和质量控

制向客人做了详细的汇报。石河子大学动物科技学院曲勇刚教授表示，百闻不如一见，华派生物是一个优秀的企业，能为养殖户提供优秀的产品，必将为中国动物疫病的防控做出更大的贡献。

交流会结束后，来访客人参观了华派生物的中央监控大厅和即将竣工的核酸及亚单位疫苗专用生产车间。客人们通过此次考察交流，肯定了华派产品质量，增强了和华派合作的信心，他们纷纷表示，华派生物的硬件设施、研发实力、质量监控眼见为实，华派产品值得信赖，并祝愿华派生物明天更美好。

（作者简介：张莉，在读硕士，执业兽医师，技术服务部经理）

ion

# 2015 年重大动物疫病防控 暨猪用活疫苗外源病毒检测技术培训 开班仪式在华派生物隆重开幕

文 | 张莉 图 | 本刊编辑部





# TRAINING

2015年3月29日上午,由四川省动物疫病预防控制中心主办,华派生物承办的2015年重大动物疫病防控暨猪用活疫苗外源病毒检测技术培训开班仪式在华派生物隆重开幕。中国兽医药品监察所、四川省动物疫病预防控制中心、华派生物领导和专家参加开班仪式,来自凉山州、甘孜州、阿坝州、乐山市、眉山市、遂宁市等六市州的动物疫控中心相关人员,以及正大集团、巨星集团、特驱集团、永鑫集团、万家好等规模化猪场技术负责人共计80多人参加开班仪式。

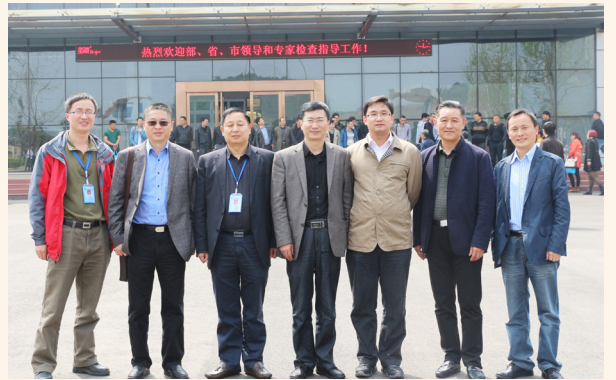
开班仪式上,华派生物总经理龚文波先生代表华派生物致辞,他首先对省、市、州动物疫控中心和规模化猪场的积极支持和参与表示感谢,欢迎大家莅临华派生物指导工作,并对举办此次培训班提出了殷切希望。



省疫控中心对此次重大动物疫病防控暨猪用活疫苗外源病毒检测技术培训非常重视，周明忠主任表示疫苗是疫病防控的关键，疫苗的质量是免疫效果的核心，此次疫苗外源病毒检测技术培训班，是四川省有史以来的首次举办，关注疫苗质量，要用数据说话，让疫苗能看得见、摸得着，*四川以后将加大对政府采购疫苗外源病毒和支原体污染情况的监测力度，敦促各中标企业切实保障疫苗质量，并将政府采购疫苗的支原体和外源病毒抽检结果作为主要评价指标。*

中国兽医药品监察所吴华伟博士就《我国兽用生物制品外源病毒污染现状及质量控制》做了精彩报告。兽用生物制品是一种特殊商品，其内在成份中是否含有对使用对象动物有致病性或潜在致病性危害的微生物，是衡量生物制品质量优劣的重要指标。生产实践中使用了含有外源病毒污染的生物制品，造成的危害和损失可能是非常巨大的。他对疫苗中外源病毒污染的典型案例做了分析，指出目前生物制品细胞污染 PCV1 现象严重，如 PK15、ST 细胞。外企送检细胞中

支原体污染现象严重，如某几家外企在产品复核中先后送检细胞均检出支原体，导致细胞无法用于检测。在细胞或制品中，红细胞吸附性、血凝性以及致细胞病变外源病毒等已知或未知病毒污染增加，检测中发现个别产品或细胞出现 BVDV、PPV、未知病原污染等不合格情况。他在报告中指出，非禽源生物制品外源污染主要病毒为 BVDV、PPV、PCV1/2 及其它牛源病毒（如副流感病毒），其中猪瘟牛睾丸细胞活疫苗污染 BVDV 和 PPV 风险较高，蓝耳病活疫苗污染外



源也有较大风险。其中威胁非禽源活疫苗外源污染的主要风险来自牛血清（未辐照）、细胞（未系统鉴定）和胰酶（尚无行业标准）。此外，目前存在红细胞吸附性或血凝性外源病毒以及致细胞病变等已知或未知病毒污染风险。最后，吴博士讲解了兽用生物制品外源病毒污染质量控制措施和兽用活疫苗外源病毒检验基本方法。

四川省动物疫病预防控制中心陈斌副主任以《当前猪病流行形式和防控策略》为题给培训班学员做了精彩演讲，王泽洲博士就《猪场疫病的监测和分析》做了分享，他们的生动、详实的内容得到与会人员的共鸣。

华派生物向丕元技术服务总监在开幕式上对华派生物基本情况做了详细汇报，华派生物在疫苗质量控制、外源病毒的控制上做了大量工作，首次提出了动物疫苗双效评价体系，并在行业内唯一一家提出在疫苗中检测出外源病毒给予奖励的承诺。

最后，参加培训班开幕式的嘉宾和学员参观了华派生物生产监控大厅和在建的核酸及亚单位疫苗车间，大家对华派生物的基础设施建设、研发实力、质量控制等方面给予高度的赞誉，并对华派生物的发展和未来充满信心。

（作者简介：张莉，在读硕士，执业兽医师，技术服务部经理）

TR  
IN



# 华派生物成功举办猪用活疫苗外源病毒和支原体检测技术培训

文 | 李金海 图 | 本刊编辑部



3月29日下午至3月30日，我公司质检研发部对参加“2015年重大动物疫病防控暨猪用活疫苗外源病毒检测技术培训”的动物疫控中心相关人员和规模化猪场技术负责人进行了猪用活疫苗外源病毒和支原体检测技术的理论授课和实验室实际操作培训。



3月29日下午，公司副总经理方鹏飞主持了理论培训，他阐述了疫苗外源病毒和支原体检测的重要性，以及我公司对疫苗质量的严格监控措施。研发中心副主任徐静博士详细介绍了猪痘细胞苗、猪痘脾淋苗、猪繁殖与呼吸综合征活疫苗、伪狂犬病活疫苗和猪圆环病毒2型灭活疫苗的质量规范、生产工艺流程、关键控制点及相应的技术控制细节。质检部部长严成介绍了支原体的检测方法，展示了我公司疫苗质量检测卓有成效的工作。研发中心副主任邱文英就外源病毒和支原体的分子生物学检测技术进行了详细的介绍。

3月30日，我公司对培训学员进行了实验室检测技术操作培训。在对外源病毒和支原体的核酸提取、扩增和电泳等技术环节进行详细讲解的基础上，先进行操作示范，再由学员自己动手操作实验。此外，对学员感兴趣的细胞消化传代、96孔板培养、病毒滴度（TCID<sub>50</sub>）的测定以及外源病毒间接免疫荧光检测技术也进行了讲解，并对部分项目进行了操作示范。

通过理论学习和实验室实际操作，参训学员们认识到了疫苗外源病毒和支原体检测的重要性，了解和熟悉了外源病毒的实验室检测技术。学员们纷纷表示，此次培训收获很大，对我公司疫苗质量的监控，特别是外源病毒和支原体的检测把控有了深入的了解，大家一致认为，华派生物疫苗外源病毒和支原体的检测已经走在了业界的前列。

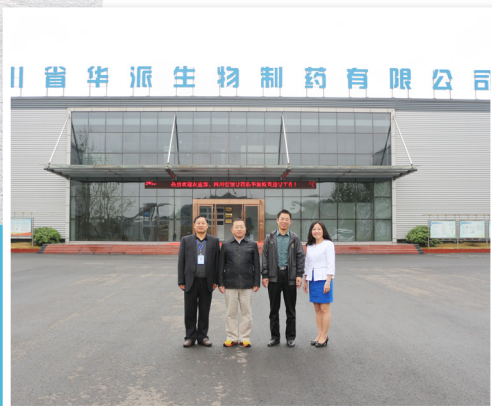
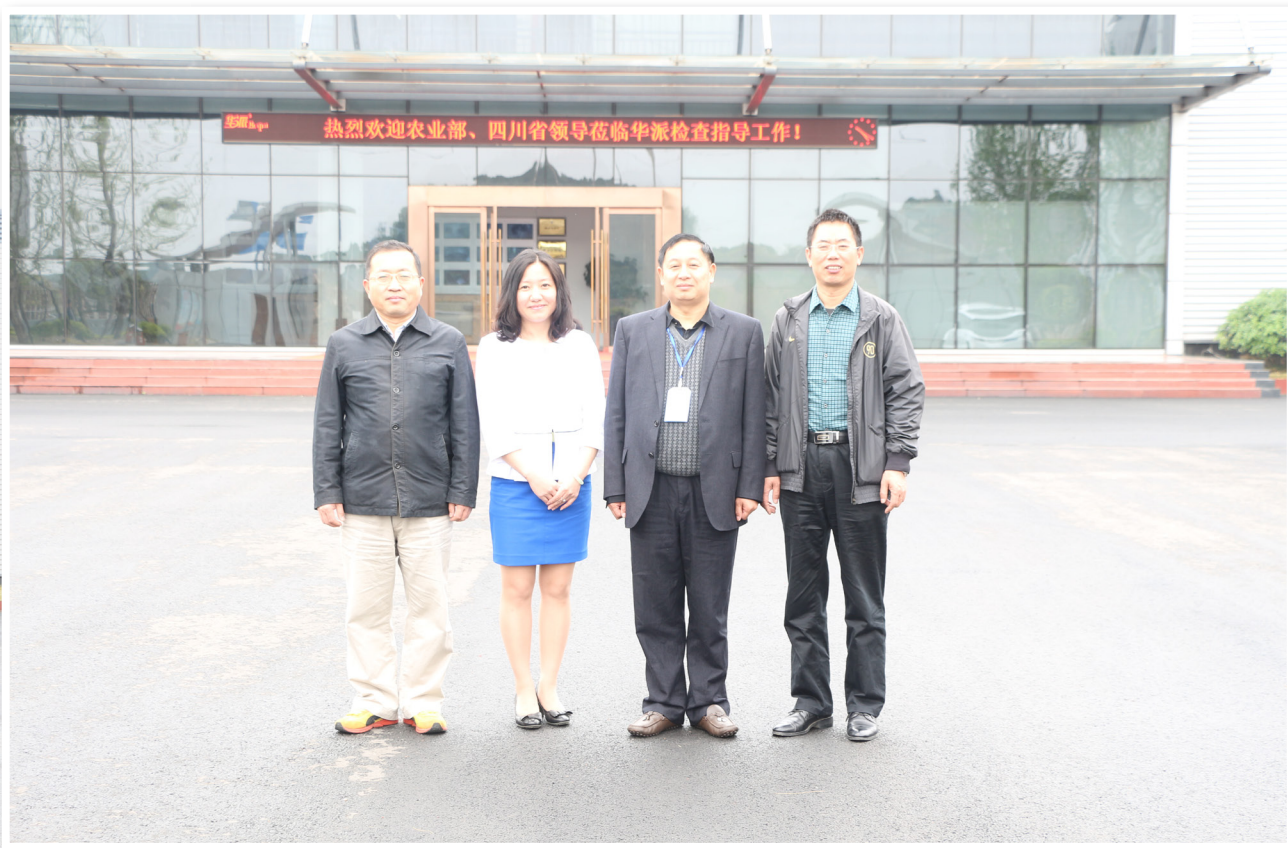
（作者简介：李金海，博士，技术服务副总监，诊断中心主任）

四川省华派生物制药有限公司



# 农业部对我公司进行兽药 GMP 飞行检查

文 | 严成 图 | 本刊编辑部



4月8日至9日，四川省兽医药品监察所葛荣所长、谢青副所长及四川省农业厅戴正瑞调研员随同农业部兽药GMP专家中监所业务管理处夏业才处长、中监所实验动物管理专家程君生研究员对四川省华派生物制药有限公司进行了兽药GMP检查。

本次飞行检查主要进行了疫苗生产检验常规检查以及标签说明书、内控质量标准执行情况、兽用生物制品生产检验用原辅材料质量控制等专项检查。飞检专家组对公司生产车间、质量检验实验室、实验动物房、标签库、批签发档案、批记录、原辅材料质量控制、历年飞检及GMP验收缺陷整改情况等方面进行了深入细致检查，并就我公司内控质量标准执行情况、原辅材料质量控制情况进行详细调研。本次检查中专家组认为我公司生产质量管理符合《兽药管理条例》、《兽药生产质量管理规范》要求，同时也针对检验实验室二氧化碳气瓶放置、标签库标签说明书放置、批记录填写提出了改进要求。

# 四川省华派生物制药有限公司



本次飞行检查，不仅是对我公司兽药 GMP 实施情况的一次全面检查，更是对我公司在兽药 GMP 理论的一次全面学习。通过与农业部专家的交流探讨，公司管理层在国家对行业监管政策与法规、把握质量管理命脉、明晰执行内控质量标准要点及原辅包材质量控制要点等方面获得了更深层次的理解与认识。专家组充分认可公司在兽用生物制品事业的不懈追求与努力、致力于建设铸造百年品质疫苗企业的理念，对我公司建成的规模、已有硬件设施、人员配备、未来的发展规划都给予了积极评价，并且深信只要华派生物 GMP 管理越来越完善。但专家组也语重心长地告诫华派管理层，公司经过几年发展奠定了一定的基础、取得了一



定的发展、建成了很好的平台、有着很好的理念，但一定要苦练内功、不断改进完善企业管理，将理念理解透、理解活，将平台充分利用发挥，把理念、平台的优势转化为文化的优势、实际执行力的优势、企业经营管理水平与生产质量管理水平的优势。

通过本次飞检，四川华派更加清醒地认识到了自身发展中的优势与不足，必将有力推动公司生产质量管理水平的提升，为公司打造百年疫苗品质奠定坚实的基础。

（作者简介：严成，在读硕士，质量管理部部长）

# 中国兽医药品监察所在四川成都举办 执行企业内控质量标准交流座谈会

文 | 严成 图 | 本刊编辑部

**为**促进行业发展，推动我国兽用生物制品企业不断提高生物制品生产质量管理水平，中国兽医药品监察所于2014年6月开始推行批签发审核标准由国家标准向企业内控标准的转换工作，并于2015年1月1日正式实施。为进一步了解企业实施该工作的情况与存在的问题，中国兽医药品监察所组织四川成都四家兽用生物制品企业进行了交流座谈。

本次会议由中国兽医药品监察所业务管理处夏业才处长主持，中监所程君生研究员、四川省兽药监察所葛荣所长、谢青副所长同时出席了该次会议，中牧股份成都药械厂、成都天邦生物制品有限公司、四川华神生物制品有限公司、四川省华派生物制药有限公司的相关人员参加了座谈。

会议中四家企业代表分别介绍了各自企业在开展执行企业内控质量标准工作中的经验和存在的问题，并对该项工作提出了建议。其中四川华派企业代表提出“内控质量标准与国家标准发生较大改变时是否应按《兽药管理条例》规定履行变更注册程序”等疑问进行了探讨，并建议行业内企业应加大内部交流学习力度，以帮助企业互相学习共同提高。根据企业代表的发言夏业才处长针对问题和建议进行详尽的解释和答复。会议中各个企业就内控标准增设国家标准没有而又有利于更全面评价产品质量且企业也在开展用户也在关注的项目展开了热

烈深入的讨论，对此夏业才处长解答认为应根据项目方法的不同加以区分，成熟的被广泛认可的方法可以作为内控标准使用，而不成熟还有争议的方法还需要进行进一步研究论证。

经交流讨论，会议决定以四川华派内控质量标准文件模板作为四川企业备案上报模板，要求华派企业代表将文件复印并提供给其它企业代表。

会议最后，四川兽医药品监察所葛荣所长就四川所在质量监督、GMP管理、培训交流等方面的工作思路进行了介绍，并要求与会企业认真实施企业内控质量标准提高产品质量，抓好兽药GMP管理工作努力提高生产质量管理水平。

本次会议交流探讨热烈、成效显著，消除了四个企业在执行内控质量标准中的诸多疑惑，形成了后期工作中思路、方法的大量共识，定将大大促进我省企业开展好执行企业内控质量标准工作。

（作者简介：严成，在读硕士，质量管理部部长）



简介  
COMPANY  
PROFILE

四川省华派生物制药有限公司，直属于四川省精华企业（集团）有限公司，是一家集兽用生物制品研发、生产、销售和技术服务于一体的高新技术企业。公司先后投资 2.8 亿元，在四川省简阳经济开发区食品医药产业园建成了具有国内领先水平的 15 条生产线（含 2 条细胞悬浮培养生产线），畜禽核酸疫苗专用生产线和亚单位疫苗专用生产线已竣工建成。公司配套建设有质检研发中心、行政办公中心、动物疫病监测诊断中心、实验动物中心、员工宿舍等工作和生活设施。四川省发展和改革委员会批复的“兽用核酸及亚单位疫苗工程实验室”项目也正在建设之中。目前，公司畜禽疫苗产品生产能力达 150 亿头（羽）份。

公司秉承“科技是技术之保障”的发展理念，先后与哈尔滨兽医研究所、兰州兽医研究所、中国农业大学等一大批知名高等院校、科研院所进行深度的战略合作。华派公司坚持走自主研发与联合研发之路，不断创新研制我国动物新型疫苗，特别是与国家禽流感参考实验室、香港格兰柏生物工程公司合作开发研制的禽流感 H5 基因工程疫苗，为全国第一家禽流感 H5 基因工程疫苗生产厂家，填补了国内空白。

## 四川省华派生物制药有限公司 人才需求信息

### 一、细胞毒活疫苗及灭活疫苗车间(本科 10 名)

工作内容：生产技术储备人才

### 二、细菌灭活疫苗车间（本科 10 名）

工作内容：生产技术储备人才

### 三、质量部质量检验员（本科 5 名）

工作内容：负责公司原辅料、包装材料、半成品、成品的质量检验

以上岗位要求动物医学、药学、生物技术等相关专业大学本科以上学历；有较强的责任心和团队精神，具备吃苦耐劳、认真仔细等品质。

### 四、研发人员(硕士 4 名、博士 3 名, 男女各半)

工作内容：兽用生物疫苗的研究开发

岗位要求：畜牧兽医、预防兽医学、生物工程专业硕士以上学历

### 五、车间设备操作人员(高中及中专以上、限男)

工作内容：操作生产线设备

岗位要求：电子、机电机械操作相关专业

联系人：蒋女士

联系电话（传真）：028-27282488

电子邮箱：949760307@qq.com

公司招聘负责人：扶海 13708185121

公司地址：四川省简阳经济开发区食品医药产业园  
(距成都市中心天府广场约 47 公里)



# 应用生物反应器培养猪传染性胃肠炎病毒

文 | 邱文英, 方鹏飞, 胥燕芳, 潘华柱, 徐静, 郝伟伟

**摘要:** 为了大规模生产猪传染性胃肠病毒, 试验采用生物反应器及微载体进行 ST 细胞的培养, 待微载体上的 ST 细胞长满至单层后接种猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV) 病毒。共使用生物反应器培养 3 批 TGEV 病毒, 每批培养过程中分别调节初始细胞密度至  $2.14 \times 10^6$  个 /mL、 $1.83 \times 10^6$  个 /mL 和  $2.02 \times 10^6$  个 /mL, 微载体浓度为 3g/L、6g/L 和 9g/L。试验结果表明应用生物反应器及微载体培养得到的病毒含量均达到  $10^{8.0} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ , 病毒含量远远高于转瓶培养。

**关键词:** 生物反应器; 微载体; 传染性胃肠炎病毒; ST 细胞

## Production of TGEV in Bioreactor

QIU Wen-ying, FANG Peng-fei, XU Yan-fang, PAN Hua-zhu, XU Jing, HAO Wei-wei

**Abstract:** To get the Transmissible gastroenteritis virus(TGEV)in large scale, ST cells were cultured in bioreactor with microcarrier, when the cells on microcarrier grew to monolayer, TGEV were inoculated into cell culture. The bioreactor was used for three times, the cell density

on microcarriers were  $2.14 \times 10^6$ /mL、 $1.83 \times 10^6$ /mL 和  $2.02 \times 10^6$ /mL respectively, concentration of microcarriers were 3g/L、6g/L 和 9g/L respectively. The results show that the titers of TGEV cultured in bioreactor can reach to  $10^{8.0}$ TCID<sub>50</sub>/mL, which is higher than that in roller bottles.

**Keywords:** bioreactor; microcarrier; TGEV; ST cells

猪传染性胃肠炎 (Transmissible gastroenteritis, TGE) 是由猪传染性胃肠炎病毒 (Transmissible gastroenteritis virus, TGEV) 引发的一种高度接触传染性的病毒性疾病, 该病毒为冠状病毒科冠状病毒属成员。猪感染该病毒后主要出现严重呕吐、腹泻和脱水为特征。各年龄阶段的猪均可发病, 尤其 2 周龄内的仔猪最易感。1945 年美国首次报道了猪传染性肠胃炎的发生。近年来我国多个省份对该病均有报道, 给养猪业带来严重危害。

1967 年 Wezel 首次成功的应用 DEAE Sephadex A50 作载体实现兔原代细胞、人二倍体细胞等的悬浮培养, 此后世界各国都陆续投入到细胞的微载体培养研究方面。应用生物反应器系统和微载体培养贴壁细胞具有高比表面积、细胞产量高, 便于监测、控制和取样, 生产规模容易放大, 不易染菌等优点, 工业上广泛应用于人用及兽用疫苗的生产中。试验主要对细胞培养条件、病毒接种量、病毒收获等时间进行优化。试验使用国产 7L 生物反应器, 共培养 3 批 TGEV, 每批收获量为 5L, 其滴度均能达到  $10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub>/mL。7L 生物反应器可作为更大体积生物反应器的种子罐使用, 因此本试验可为 TGEV 更大规模的培养奠定了基础。

## 1 材料与方法

**1.1 种毒** TGEV 由四川省华派生物制药有限公司分离及保存。

**1.2 ST 细胞** 购自中国典型培养物保藏中心。

**1.3 生物反应器及微载体** 7L 生物反应器购自广州齐志生物设备有限公司, 微载体 Cytodex I 购自 GE 公司。

**1.4 血清及试剂** 新生牛血清 (批号:110507), 杭州市四季青生物工程材料研究所, MEM (批号:120908), 宜兴市赛尔生物科技有限公司, 胰酶 (批号:1115814), Gibco 公司。

**1.5 ST 细胞在生物反应器上的培养** 将微载体加入至 7L 生物反应器中 (2012001, 3g/L; 2012002, 6g/L; 2012003, 9g/L), 并将消化后的 ST 细胞加入至反应器中。将细胞培养条件设置为: 培养温度, 37℃; pH 值 7.2; 溶氧为 50 % 空气饱和度; 搅拌速度 40r/min; 培养体积 4L。每批均采用灌流方式进行培养, 根据细胞生长状况调节灌流速度。每日取样使用胰酶进行细胞的消化, 以确定细胞生长密度。

**1.6 TGEV 病毒在生物反应器上的培养** 待微载体上的细胞长满至单层后, 将培养基更换为细胞维持液, 接种 TGEV 病毒毒种, 培养体积为 5L。采用灌流方式进行培养, 细胞开始出现病变后, 每隔 3h 取样进行 TCID<sub>50</sub>/mL 的测定, 细胞病变至 80% 时收获病毒液。

**1.7 TGEV 病毒在转瓶上的培养** 将消化后的 ST 细胞加入至 15L 转瓶中, 放至 37℃ 进行培养。待细胞长满至单层后, 倾弃培养液, 加入 1.2L 细胞培养液, 并加入 TGEV 病毒液。

每隔 3h 取样进行  $TCID_{50}/mL$  的测定，当细胞病变至 80% 时收获病毒液。

**1.8 病毒含量  $TCID_{50}$  的测定** 将样品用培养液作 10 倍系列稀释，取  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  稀释度接种至 ST 单层细胞中。120h 后观察结果，计算病毒的  $TCID_{50}$ 。

## 2 结果

**2.1 ST 细胞在生物反应器上的培养** 经过 72h 的培养，细胞长满至单层。接种细胞至微载体后 6h 细胞贴壁，三次培养细胞的最高密度分别为  $2.14 \times 10^6/mL$ ， $1.83 \times 10^6/mL$ ， $2.02 \times 10^6/mL$ （见图 1）。3 批培养细胞的种子细胞数量不同，但采用相同的参数进行控制，3 批细胞的最大细胞密度及达到最大细胞密度的时间有所不同。这表明细胞种子量对细胞生长及细胞密度有重要的影响，这与王建超和李平忠报道的使用生物反应器进行 Vero 细胞的培养结果一致。

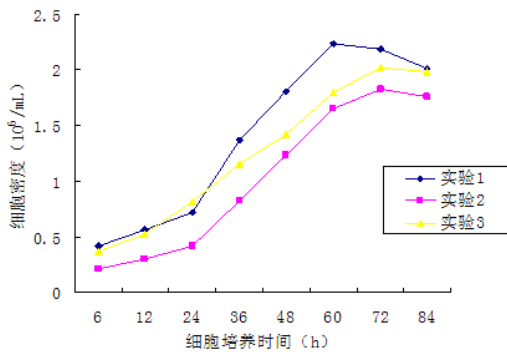
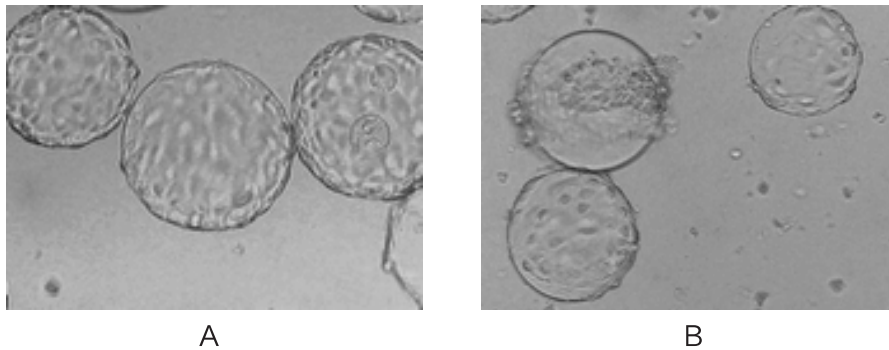


图 1 生物反应器中 ST 细胞生长情况

**2.2 TGEV 病毒在生物反应器上的培养** 3 次使用生物反应器培养 TGEV 的过程中，接种病毒 15h 左右，ST 细胞病变开始出现病变，接种 21~24h 细胞病变至 60%~70%，此时 TGEV 病毒含量达到最高，均大于  $10^{8.0} TCID_{50}/mL$ ，接种病毒 27h 左右后细胞病变达到 80% 左右， $TCID_{50}/mL$  略有下降，但 TGEV 含量仍大于  $10^{8.0} TCID_{50}/mL$ （见图 3）。3 次培养均收获 5L 病毒液。



A

B

图 2 ST 细胞在微载体上的生长及产生 CPE 情况

A: 微载体上长满单层的 ST 细胞; B: 微载体上产生 CPE 的 ST 细胞

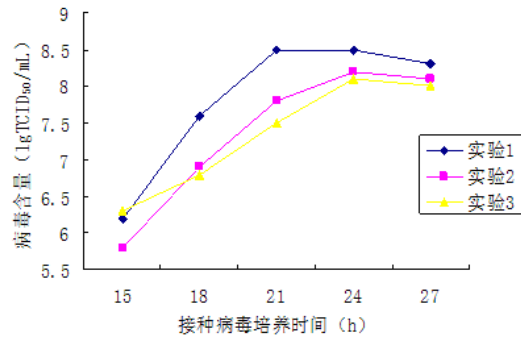
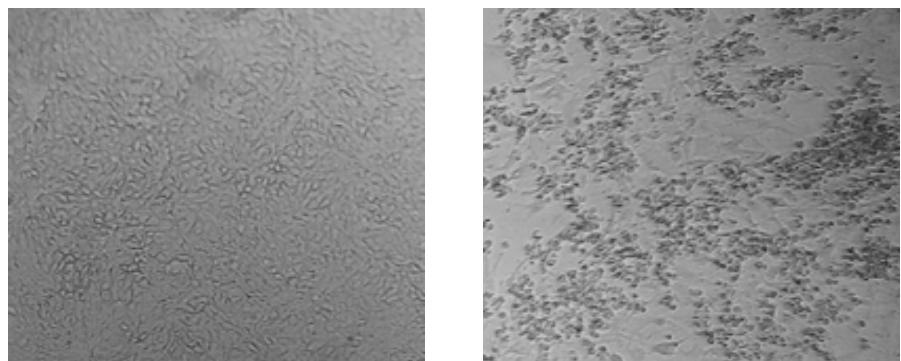


图3 TGEV 增殖曲线图

**2.3 TGEV 病毒在转瓶上的培养** 接种 TGEV 病毒后 12h 时细胞开始出现病变，此时测定病毒含量为  $10^{4.3}$ TCID<sub>50</sub>/mL，21h 左右时细胞病变达到 80% 左右，测定病毒含量为  $10^{6.5}$ TCID<sub>50</sub>/mL，病毒含量最高，24h 后病毒含量开始下降（见图 5）。每个转瓶收获 1.2L 病毒液。



A

B

图4 ST 细胞在转瓶上的生长及产生 CPE 情况

A: 转瓶中长满单层的 ST 细胞; B: 转瓶中产生 CPE 的 ST 细胞

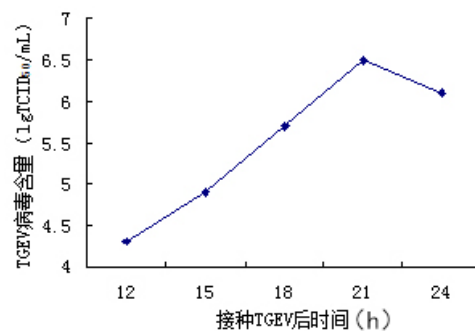


图5 转瓶中 TGEV 的增殖情况

### 3 讨论

60 年代起中国开始出现 TGE 的报道，近些年来有进一步流行的趋势，尤其是冬季和



早春寒冷季节常呈地方性暴发流行，TGEV 仍是现今引起仔猪发病和死亡的主要原因之一，给养猪业造成极大困扰。目前对于 TGEV 仍缺乏有效的临床治疗药物，采用疫苗免疫接种是主要的预防措施。在培养细胞制备弱毒疫苗时，传统方式一般采用转瓶培养 TGEV，但转瓶培养过程中 pH 值、营养液成分随时间而发生变化，这可能是造成病毒含量不能进一步提高的原因。生物反应器能较好地控制温度、溶氧及 pH 值等，使病毒在更加稳定的环境中进行增殖，加之连续进行的灌流培养，使营养物质不断得到补充，代谢废物不断移出，使培养环境相对稳定，因而细胞密度和病毒的产量都大大提高。

正是由于生物反应器较转瓶培养的优越性，生物反应器被广泛应用于人用及兽用疫苗生产中，如狂犬病病毒<sup>[6]</sup>，甲型肝炎病毒，圆环病毒等，均取得了较为理想的结果。本试验使用生物反应器及微载体系统进行 TGEV 病毒的培养，培养的 TGEV 病毒含量明显高于转瓶培养。试验中使用 7L 的生物反应器可一次性生产收获 5L 病毒液，所得 TGEV 病毒抗原约相当于 132 个转瓶培养所得到得抗原。同时，7L 生物反应器可作为更大体积生物反应器的种子罐，因此本试验也为使用更大体积的生物反应器培养 TGEV 病毒奠定了一定基础。

生物反应器通常采用全封闭管道化操作及全自动化监控，这可以有效降低细胞的污染率及人为因素造成的影响，另外生物反应器容积较大，可使终端产品更加均一，结合后期纯化工艺，不但产品产量明显提高，而且产品的质量更加稳定。同时，采用生物反应器用于疫苗生产，可以大大节约生产成本，生产效率更加显著。由于生物反应器的高效性及均一稳定性，无论是人用或兽用疫苗生产企业，生物反应器的大规模应用将成为一种必然趋势。

（作者简介：邱文英，硕士，研发中心副主任）



# 三种猪伪狂犬病抗体监测方法比较

文 | 徐静 郭建宝 邱文英 张丽燕 秦运杰

**摘要：**以伪狂犬病病毒（Pseudorabies Virus, PRV）Bartha-K61 制备的灭活疫苗，接种 PRV 抗体阴性猪，然后以 gB ELISA 抗体检测方法、中和抗体指数法和中和抗体法进行效果监测。结果表明三种方法都能检测到疫苗接种后发生了免疫应答，但以中和指数值和中和抗体值来表示猪群免疫效果更为准确，gB ELISA 抗体阳性率不能作为群体免疫效果指标。根据与报道的中和指数值的比较，中和抗体在 3.3 以上时具有保护作用，gB ELISA S/N 值不大于 0.15 具有保护作用。因此临床采用 IDEXX 公司伪狂犬病 gB ELISA 方法监测伪狂犬病群体免疫效果时，应以 S/N 值不大于 0.15 所占的比例来表示猪群的免疫效果。

**关键词：**伪狂犬病病毒 gB ELISA 中和抗体、中和指数

**前言：**猪伪狂犬病仍是养猪业主要疾病之一，目前常使用 gE 基因缺失的伪狂犬病疫苗接种进行控制。由于市面的伪狂犬病活疫苗都是 gE 基因缺失，并且有配套的试剂盒区分疫苗接种抗体和野毒感染抗体的 ELISA 试剂盒，因此猪场大多采用 gB ELISA 抗体检测方法来评判疫苗接种后的效果。但 ELISA 抗体只反映了疫苗接种后 gB 蛋白的免疫应答，不能真实反映血清对病毒的中和能力。中和抗体方法是评判疫苗接种后效果的金标准，但伪狂犬病中和抗体有两种表示方法：一是直接以  $\log_2$  来表示中和抗体值；另外以中和指数

值来表示，即样品对病毒的中和能力与阴性血清对病毒中和能力的比值。我国伪狂犬病疫苗注册资料中常使用中和指数值来表示疫苗接种后的免疫应答水平。因此本文对临床常用的 ELISA 方法、注册资料中常使用的中和指数法与中和抗体法进行比较，获得最佳的伪狂犬病疫苗抗体监测方法，评判 gB ELISA 方法是否可能用于临床免疫抗体水平监测。

## 1 材料

**1.1 试剂盒名称批号：**伪狂犬病 gB ELISA 抗体检测试剂盒 由美国 IDEXX 公司生产，批号：DK060

**1.2 细胞：**猪睾丸传代细胞，购自 CTCC，F4 由四川省华派生物制药有限公司质管部保存提供。

**1.3 毒种：**PRV Bartha-K61，E20 由四川省华派生物制药有限公司质管部提供。

**1.4 试剂：**MEM 购自 gibcol 公司 批号：1310366；血清购自金源康公司批号：20130325；28VG，由法国赛比克生产，批号：T30641。

## 2 方法

### 2.1 灭活疫苗的制备

**2.1.1** 将长至单层的 ST 细胞 (T-75) 弃营养液，加入 20ml 无血清 MEM，然后接种 100 μl 种毒病毒液，接种后放置 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 条件下每天观察，细胞病变至 80% 收获，同时取样测病毒含量。

**2.1.2 灭活** 按体积比加入 0.1% 的 β-丙内酯，2 ~ 8℃ 灭活 24 小时，每隔 4 小时振摇一次。

**2.1.3 病毒含量测定** 将病毒液用无血清的 MEM 做 10 倍系列稀释，取 10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup> 四个稀释度，接种长至单层的 ST 细胞，100 μl/孔，每个稀释度接种 8 孔，放置 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 条件下培养 5 天，从第 3 天起观察细胞病变，并计数。按 Reed-Munch 法计算 TCID<sub>50</sub>。

**2.1.4 灭活检验** 取长至单层的 ST 细胞一瓶，弃培养液，加 18ml 无血清 MEM，然后接种 2ml 待检样品，放置 37℃ 5%CO<sub>2</sub> 条件下培养 3 天，每天观察细胞病变，若无细胞病变，则冻融后再盲传 2 次，仍无病变，则判定为灭活彻底。

**2.1.5 乳化** 根据测定的病毒含量结果，将灭活的病毒液稀释成 10<sup>7.5</sup>TCID<sub>50</sub>/ml，将稀释后的灭活病毒液按 3 份病毒液 +1 份 28VG，3500rpm 乳化 20min，然后分装。

**2.2 选猪及分组** 用 PRV gB ELISA 试剂盒和中和抗体法选 28-35 日龄，gB ELISA 抗体阴性和伪狂犬病中和抗体 ≤ 2(按 2.5 方法测定) 仔猪 17 头，分别标记。

疫苗接种组编号	未接种疫苗对照组编号
35、37、38、40、41、42、44、46、49、50、88、89	39、43、45、87、90

**2.3 疫苗接种及血清采集** 将 17 头阴性猪随机分为 2 组，疫苗接种组 12 头，未接种疫

苗对照组 5 头，混合饲养。第 1 组在试验的第 0 天 (PI0) 接种伪狂犬病灭活疫苗 1ml/ 头。在首次接种后 14 天 (PI14) 进行第二次接种，1ml/ 头，对照组接种生理盐水。在首免后 14 天 (PI14)、21 天 (PI21)、28 天 (PI28)、35 天 (PI35) 采集血样分离血清备用。

**2.4 血清 ELISA gB 抗体检测** 按厂家使用说明操作并判定结果。

**2.5 中和抗体测定** 取 50  $\mu$ l 血清，在 96 孔微量培养板中进行用不含血清的 MEM 进行 2 倍系列稀释，稀释至  $2^8$ ，然后将 PRV Bartha-K61 病毒稀释成 2000TCID<sub>50</sub>/ml，每孔加入稀释好的病毒 50  $\mu$ l，并设病毒对照、MEM 对照，然后放置 37°C 作用 60min，然后加入细胞悬液 100  $\mu$ l/ 孔，37°C 5%CO<sub>2</sub> 培养箱 4 ~ 5 天，观察细胞病变，以完全抑制细胞病变的血清最高稀释度为该血清的中和抗体效价，中和抗体效价以 log<sub>2</sub> 表示。

**2.6 中和抗体与 ELISA 抗体 S/N 的比较:** 分别计算所用中和抗体为 0、1、2、3、4、5、6 的 ELISA 抗体的 S/N 值的几何平均值，并以此做图。

**2.7 中和指数测定** 将 PRV Bartha-K61 病毒液做  $10^{-1} \sim 10^{-7}$  10 倍系列稀释，每个稀释度各取 0.5ml，分别加入等量的、中和抗体为 0 的血清，37°C 孵育 1h，然后接种长满单层的 ST 细胞，每个稀释度接种 8 孔，接种后 37°C 培养，观察 120h，计算其 TCID<sub>50</sub>。同中和抗体为 0 的血清一样，测中和抗体为 1、2、3、4、5、6 的血清与 10 倍系列稀释的病毒液作用后的 TCID<sub>50</sub>。分别计算中和抗体为 0 的 TCID<sub>50</sub> 与中和抗体为 1、2、3、4、5、6 的 TCID<sub>50</sub> 的比值，即为中和指数。

2.8 将不同中和抗体效价的中和指数与不同中和抗体效价的 ELISA 抗体 S/N 值的几何平均值比较，并以此做图。

### 3 结果

3.1 PI0、PI14、PI21、PI28、PI35、PI42 gB ELISA 抗体阳性率、ELISA S/N 几何平均值及中和抗体几何平均值结果，见表 1。

表 1 接种疫苗后不同时间疫苗接种组和阴性对照组的 ELISA 阳性率、ELISA S/N 值几何平均值、中和抗体几何平均值

时间		PI0	PI14	PI21	PI28	PI35
疫苗接种组	ELISA 阳性率	0%	100%	100%	100%	100%
	ELISA S/N 几何平均	0.936674	0.364642	0.027299	0.101243	0.084013
	S/N $\leq 0.15$ 的比例	0%	0%	100%	100%	100%
	中和抗体几何平均值	0.583*	2.620741	4.229485	4.271203	4.417987
阴性对照组	ELISA 阳性率	0%	0%	0%	0%	0%
	ELISA S/N 几何平均 **	0.935923	1.077135	0.84401	0.830514	0.830635
	中和抗体几何平均值	0.2*	0.2*	0*	0*	0.2*

注: \* 表示中和抗体在 0 ~ 2 之间，因为值中存在 0，不能几何平均，只是算数平均，\*\*S/N < 0.6

时为阳性

在疫苗接种前，ELISA 检测结果都为阴性，中和抗体在 0 ~ 2 之间（数据未显示）。因此将 ELISA 为阴性，中和抗体不高于 2 的猪定为阴性猪的标准。在疫苗接种 14 ~ 35 天，gB ELISA 抗体全都为阳性，中和抗体的几何平均上升到 2.62 ~ 4.42。ELISA S/N 几何平均值从 PI0 的 0.937 下降到 0.027。未接种疫苗对照 gB ELISA 抗体全都为阴性，中和抗体平均值在 0.2，ELISA S/N 几何平均值维持在 0.83 ~ 1.08 之间。

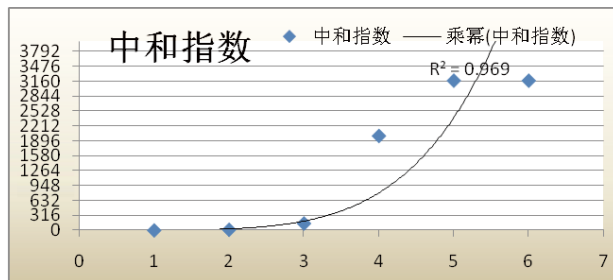
从这结果看出：ELISA 抗体阳性率反映出疫苗接种发生了免疫应答，但不能反映出不同时间免疫应答的强度。ELISA 抗体 S/N 的几何平均值大小反映了疫苗接种后的免疫应答及免疫应答强度。中和抗体也同样反映了疫苗接种后免疫应答及免疫应答强度。

3.2 不同中和抗体值测得的中和指数结果见表 2。从表 2 中结果来看，病毒液测出的病毒含量为  $10^{8.2}$ TCID<sub>50</sub>/ml，中和抗体为 0 和 1 的血清与病毒液中中和后测出的病毒含量为  $10^{7.5}$ TCID<sub>50</sub>，这说明血清本身一些因子对病毒有很低的中和能力。随中和抗体滴度上升，中和抗体指数也上升。

表 2 中和抗体与中和抗体指数测定结果

项目	病毒液	0	1	2	3	4	5	6
TCID <sub>50</sub>	8.2	7.5	7.5	6.33	5.33	4.2	4.0	4.0
中和指数	—	—	1	14.8	147.9	1995	3162	3162

图 1 中和抗体与中和指数关系曲线



从中和抗体与中和指数作图的关系来看， $R^2=0.969$ ，表明用这两种方法来监测免疫应答的结果具有很强的相关关系。当中和指数为 316 时，相交于中和抗体轴的 3.3。

3.3 中和抗体为 0、1、2、3、4、5、6 的 ELISA 抗体的 S/N 值的几何平均值结果见表 3。从表 3 的结果来看，中和抗体在 0、1 时，S/N 值差异不显著；中和抗体在 2、3 时，S/N 值差异不显著；中和抗体在 4、5、6 时 S/N 值差异不显著。从图 2 的中和抗体与 ELISA S/N 的关系曲线来看，二者有较强的相关关系， $R^2=0.8406$ ；中和抗体为 3.3，相交于 S/N 轴的 0.155。从图 3 的中和指数与 ELISA S/N 的几何平均值的比较来看，二者具有较强的相关关系， $R^2=0.8751$ ；中和指数为 316 时，相交于 S/N 轴的 0.145。

表 3 NA 与 gB ELISA S/N 几何平均值的比较

中和抗体	0	1	2	3	4	5	6
S/N	0.882139	0.929283	0.38216	0.308958	0.060813	0.051341	0.085833

图2 中和抗体与ELISA S/N值关系曲线

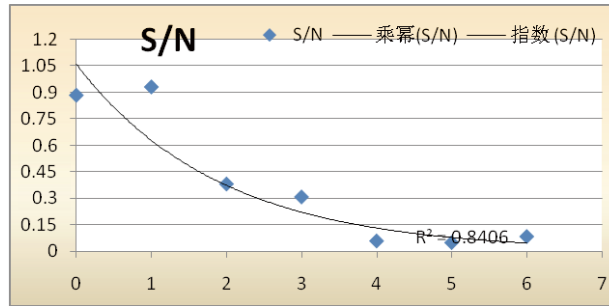
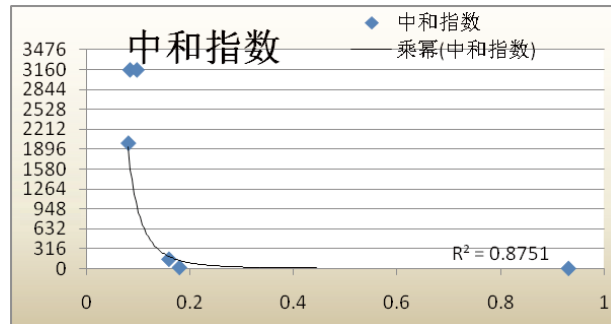


图3 中和指数与ELISA S/N值关系曲线



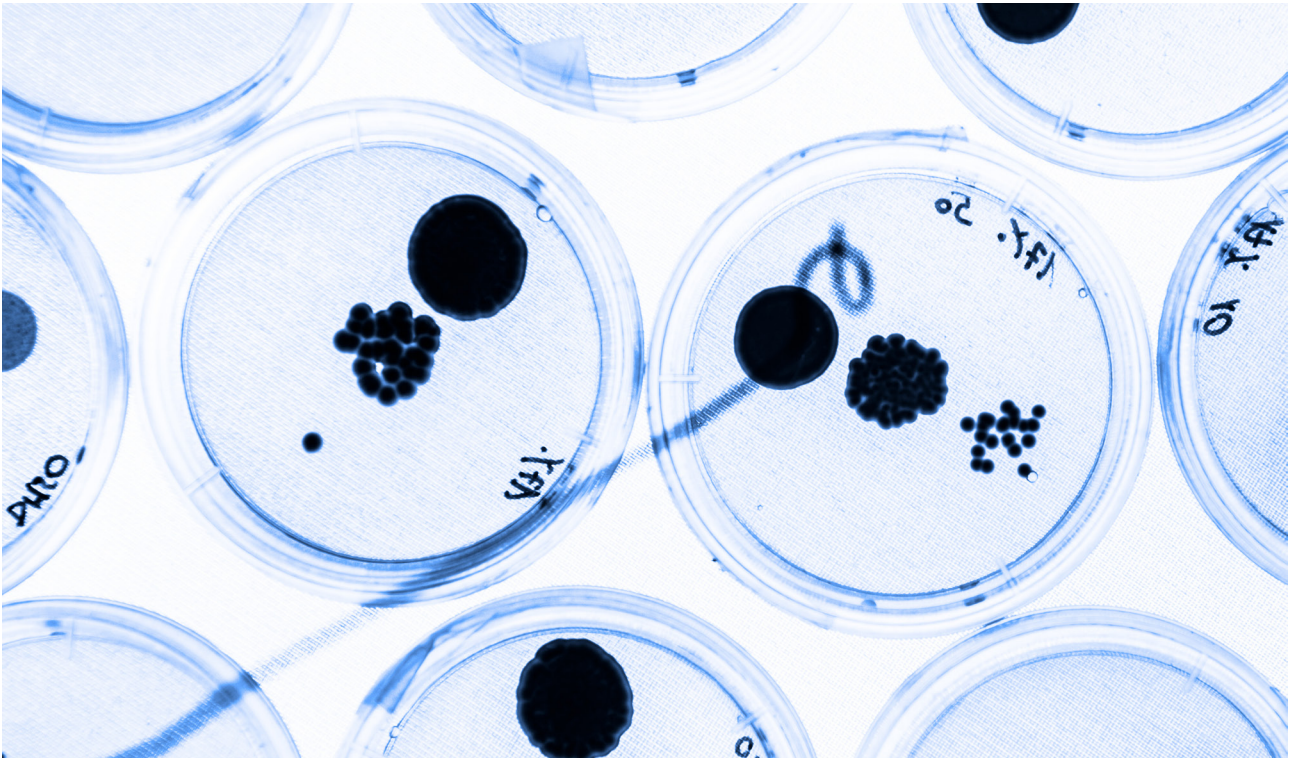
## 4 讨论与结论

4.1 gB ELISA 是临床监测伪狂犬病免疫效果主要手段，监测结果常以阳性所占百分比表示，百分率越高，表示保护效果越好。从本研究的结果来看，疫苗接种后 14 天阳性率能达到 100%，但中和抗体几何平均值为 2.62，中和抗体指数在 130 ~ 140 之间（根据作图获得的结果）。据资料报道，中和指数在 316 时具有保护作用。因此尽管在接种 14 天时阳性率达 100%，但不具有保护作用。因此，不能以 gB ELISA 阳性率百分率来表示免疫保护效果。

4.2 从中和抗体指数与中和抗体关系的比较来看，二者有很强的相关关系，中和抗体指数在 316 时，对应的中和抗体为 3.3，因此可将中和抗体达到 3.3 时定为具有免疫保护作用。

4.3 从中和抗体指数值、中和抗体值与 gB ELISA S/N 值几何平均值的关系来看，二者与 gB ELISA S/N 值几何平均值都有较强的相关关系。中和指数在 316 时，对应的 gB ELISA S/N 值的几何平均值为 0.14 ~ 0.15 之间；中和抗体在 3.3 时，对应的 gB ELISA S/N 值的几何平均值为 0.15 ~ 0.16 之间，因此可将 gB ELISA S/N 值在 0.15 左右时定为具有免疫保护作用。作为群体免疫效果监测时，不应以 ELISA 阳性率来表示免疫效果，而应以 gB ELISA S/N 值在 0.15 以上的比例作为群体免疫效果。

（作者简介：徐静，博士，执业兽医师，研发中心副主任）



# 菌影制备效果的评价及其应用前景

文 | 翟伟

菌影 (Bacterial ghost, BG) 是 PhiX174 噬菌体裂解基因 E 在细菌中表达后形成的一种不含核酸、核糖体及其他组分的空细菌体。E 基因表达过程中保留了细菌的完整形态及表面抗原成分和结构,可有效诱导机体的体液免疫与细胞免疫应答。因此,菌影作为新型疫苗与递送载体具有巨大的优势和应用潜力,正受到越来越多的研究者关注。

## 1 菌影制备效果的评价

菌影制备效果评价非常重要,评价其对质粒的裂解效果,便于筛选优质菌影用于生产实践。目前菌影制备效果的评价方法有经典法和流式细胞仪测定法 2 种。

### 1.1 经典法

经典法操作简单,但耗时费力。每次取样都需测定 660

nm 的菌液浑浊度,并用血球计数板测定总菌数和平板培养观测活菌数。活菌计数时,因菌落形成需要一定时间,故观测结果具有一定的滞后性。细菌生长环境不适时,其繁殖受限,不能在培养基上形成菌落,使测定结果存在偏差。

### 1.2 流式细胞仪法

流式细胞仪法具有实时观测,样品用量少等优点。由于脱极化菌与菌影可被 DiBAC4 (3) 染色,因此可区分化菌与脱极化菌。流式细胞仪测定样品用时不超过 2 min,一次测定可收集多个参数。该方法的缺点是仪器购置与维护费用高。

## 2 菌影的应用前景

### 2.1 菌影作为新型疫苗



菌影含有制备菌所需的抗原成分,可诱导相应的免疫反应,因此菌影可作为疫苗预防疾病。在动物试验中,兔静脉注射菌影达到其体液免疫剂量时未见毒素作用。在  $\text{INF2}\gamma$  (干扰素) 处理的人外周血单核细胞 (PBMC) 中,比较霍乱弧菌菌影和 LPS (脂多糖) 对炎性细胞因子  $\text{TNF2}\alpha$  (干扰素) 的诱导作用时发现菌影诱导  $\text{TNF2}\alpha$  (干扰素) 的水平较 LPS 高 100 ~ 1 000 倍。不用  $\text{INF2}\gamma$  处理时,菌影或 LPS 都可诱导更低水平的  $\text{TNF2}\alpha$ 。

## 2.2 菌影作为 DNA 疫苗载体

DNA 疫苗作为一种新型疫苗,在预防与治疗疾病方面发挥着巨大作用。但 DNA 疫苗的低免疫原性和对质粒剂量的大量需求限制了该技术的发展。用菌影作 DNA 载体,可有效解决上述问题。菌影表达的病原相关分子模式 (PAMP) 可与 APC 的模式识别受体 (PRR) 结合,将 DNA 疫苗特异定位于 APC。树突状细胞 (DC) 为高效的 APC,而菌影可诱导初始 DC 的成熟与活化,进而活化初始 T 细胞,在免疫反应过程中发挥重要作用。

## 2.3 菌影作为药物递送载体

菌影可作为药物递送载体用于装载药物,使药物在患处发挥作用。该方法不但增加了局部药物浓度,同时减少了用药剂量和副作用,菌影还具有使药物作用持久而稳定的缓释作用。因此菌影载体的出现改进了药物或疫苗的递送方式。

## 2.4 菌影作为蛋白质载体

菌影还可运载蛋白质,并同时发挥免疫作用。利用菌影作载体时,需考虑靶点的特性。由于不同菌影的 PAMP 不同,其结合的 PRR 也不同,蛋白质会靶向不同的部位,因此选择菌影作为蛋白质载体时要注意其特异性。

## 2.5 菌影活化 DC (树突状细胞)

菌影可活化 DC (树突状细胞),活化的 DC 可应用于免疫治疗。Susanne Paukner 等研究了细胞粘附和摄入菌影的情况,为菌影疫苗的应用提供了理论基础。

# 3 菌影装载方法

菌影可装载核酸、蛋白质、质粒和药物等不同物质,且装载物质不同,其装载的方法各异。

## 3.1 浸泡法

该法是将菌影与填充物在缓冲液中共同孵育一段时间。如 Thomas Ebensen 等将质粒载入溶血杆菌菌影的方法是将冻干菌影重悬于  $600\mu\text{l}$  HEPES 缓冲液中,添加质粒与  $\text{CaCl}_2$ ,  $24\text{ }^\circ\text{C}$  孵育 10min。以 FITC 标记 (绿色) 线性 DNA, 硫氰酸盐标记 (红色) 菌影。当质粒被装载入菌影后,在所测定的  $0.033\sim 16.5\text{ mg/ml}$  DNA 浓度范围内,装载质粒的量与质粒浓度呈线性关系 ( $k=0.934$ )。流式细胞仪测定结果表明,每个菌影最多可装载 2 000 份质粒。物质装入菌影后可缓慢释放,有利于药物发挥作用。

## 3.2 锚定法

适于蛋白质的装载。将蛋白质编码基因与 S 层编码基因或 MBP 编码基因串联,在菌影裂解前,诱导串联基因表达,蛋白质可被锚定在菌影套膜上或菌影空腔内,菌影产物形成后,可作为该蛋白质的载体发挥作用。

## 3.3 修饰法

将冻干的链酶亲和素菌影溶于生物素标记的抗原溶液中,如果链酶亲和素已锚定在内膜,那么生物素化底物就可结合在相应位点上。

# 4 小结

菌影作为新型疫苗及抗原和药物导向系统在预防及治疗疾病方面具有诱人的应用前景。其独有的天然抗原成分,可诱导机体产生细胞免疫与体液免疫,并将固有免疫与适应性免疫联系起来,使免疫反应具有多效性与复杂性。菌影疫苗对机体无毒,服用安全,制备简单,不会产生耐药菌,贮藏方便,免疫效果好。目前,菌影疫苗研究已在多种菌种间展开,并取得了令人满意的成果。但菌影制备过程中也存在一些问题,如不同菌种裂解诱导后,存在裂解起始点、裂解持续时间和裂解率不同等缺点。此外,菌影免疫量,装载蛋白质抗原量优化等也是今后的研究方向。综上所述,菌影疫苗无论作为载体,还是单纯用于免疫,都有巨大的应用潜力。菌影的研究与应用,必将为人类挑战疾病做出巨大贡献。

(作者简介:翟伟,西北农林科技大学在读硕士)



# 猪瘟和猪伪狂犬疫苗混合接种效果评价

文 | 李金海 郭建宝 汪媛 方鹏飞 徐静 罗璇

**摘要：**为评估猪瘟细胞苗和猪伪狂犬弱毒疫苗混匀接种后的免疫效果，选取 35 日龄猪瘟、伪狂犬病抗原抗体阴性猪 24 头，随机平均分成 4 组。I 组不接种作为阴性对照，II 组和 III 组分别单独免猪瘟和猪伪狂犬弱毒苗，IV 组先将猪瘟和猪伪狂犬弱毒苗混匀后再接种，各免疫组的剂量均为 1 头份。接种后观察，用 ELISA 方法检测接种后 0d、7d、14d、21 d 和 28d 的抗体。各组接种后均无副反应；猪瘟抗体水平单独接种组略高于混合组，二者差异不显著 ( $P>0.05$ )；猪伪狂犬抗体水平单独接种组略低于混合组，二者差异不显著 ( $P>0.05$ )。试验结果表明，猪瘟和猪伪狂犬弱毒疫苗混合后接种，二者无明显干扰作用，不影响免疫效果。

**关键词：**猪瘟；猪伪狂犬病；联合免疫；免疫效果

## Evaluation of Immune Efficacy after Vaccination with the Mixture of HCLV and PRV Attenuated Vaccine

LI Jin-hai, GUO Jian-bao, WANG Yuan, FANG Peng-fei, XU Jin, LUO Xuan

**Abstract:** The purpose of the experiment was to evaluate the interaction between hog cholera lapinized virus (HCLV) and porcine pseudorabies attenuated vaccine (Strain Bartha K-61). The 24 35-day old piglets were randomly divided into 4 groups. Group I was negative control, Group II and III pigs were Vaccinated with 1 dose of HCLV and PRV attenuated vaccine respectively, Group IV were injected with the mixture of two vaccines. The blood samples were collected at 0d、7d、14d、21d and 28d post the vaccination and to detect Immune antibody with ELISA kit. No side effects were observed in the pigs. The antibody level against CSFV of group II was higher than that of group IV, but the difference was not significant ( $P>0.05$ ). The antibody level against PRV of group III was lower than that of group IV, but the difference was not significant ( $P>0.05$ ). The results show that immunization with mixed Vaccine had no obvious interference effect.

**Keywords:** classical swine fever virus; porcine pseudorabies; vaccine combined vaccination; immune efficacy

猪瘟 (CSF) 对养猪生产危害严重, 我国将其列为一类重大动物疫病, 当前主要采取免疫、净化等措施控制该病。2010 年前我国对猪伪狂犬病的控制是非常有效的, 也是最有希望净化的一种疾病, 但 2011 年以来, 很多地区的猪场爆发猪伪狂犬病, 造成了巨大的经济损失, 规模猪场应加大对该病的防控力度, 宜采取免疫和净化相结合的措施控制猪伪狂犬病。目前, 猪场使用疫苗的种类越来越多, 每次接种对猪群都是一个应激, 劳动强度大。为减少对猪群的应激和劳动强度, 希望采取联合接种, 因此有必要评估联合免疫的效果。本研究将猪瘟疫苗和猪伪狂犬病疫苗混匀后接种猪只, 观察其接种后的反应, 监测免疫抗体, 评估其相互间是否有干扰, 旨在为疫苗的联合接种提供参考。

## 1 材料与方法

**1.1.1 供试疫苗** 猪瘟细胞苗, 批号 2015006-2; 伪安清 (猪伪狂犬弱毒苗, Bartha-K61), 批号: 2014004-2, 四川省华派生物制药有限公司生产。

**1.2 试验动物** 选取 35 日龄猪瘟、猪伪狂犬抗原抗体双阴性猪 24 头, 在华派生物动物房标准猪舍饲养。

**1.3 诊断试剂** 猪伪狂犬病毒 gB 抗体检测试剂盒, IDEXX 产品, 批号 GK389, 有效期至 2015.12.18; 猪瘟间接 ELISA 抗体检测试剂盒, 中国兽医药品监察所产品, 批号 KAD1A2803GZ, 有效期至 2015.11.09。

**1.4 试验分组** 将 24 头猪随机分为 4 组, 每组 6 头。I 组, 不接种作阴性对照; II 组, 将猪瘟疫苗稀释成 1 头份 / mL, 每头颈部肌肉注射 1mL; III 组, 将猪伪狂犬疫苗稀释成 1 头份 / mL, 每头颈部肌肉注射 1mL; IV 组, 将猪瘟疫苗和猪伪狂犬疫苗稀释成 2 头份 / mL, 等量混合后, 每头颈部肌肉注射 1mL。

**1.5 免疫反应观察** 注射后至 48h 内观察猪的精神、采食、运动、体温等情况, 对出现异

常反应的猪只进行详细记录，并进行相应处理。

### 1.6 抗体监测

1.6.1 样品采集 分别于接种后 0d、7d、14d、21d 和 28d 前腔静脉采血，分离血清。

1.6.2 猪瘟抗体检测 该试剂盒为间接 ELISA，要求血清稀释倍数为 1:100，450nm 测定 OD 值；判断标准：IE= 样品 OD 值 / 阳性对照 OD 值，IE 值 ≤ 8%，则 CSFV 抗体阴性，IE 值 ≥ 10%，则 CSFV 抗体阳性，8% < IE 值 < 10%，则判为可疑。详细操作步骤按说明书进行。

1.6.3 猪伪狂犬病毒 gB 抗体检测 严格按照试剂盒说明进行检测和结果判定操作。该试剂盒为竞争 ELISA 方法，要求血清稀释倍数为 1:2，650nm 测定 OD 值；判断标准：S/N= 样品 OD 值 / 阴性对照 OD 值，S/N 值 ≤ 0.60，则 PRV 抗体阳性，S/N 值 ≥ 0.70，则 PRV 抗体阴性，0.60 < S/N 值 < 0.70，则判为可疑。

1.7 数据统计与分析 测定相应 OD 值，在对照成立情况下，先分别计算 IE 值和 S/N 值，再用 SPSS19.0 软件的 One-Way ANVOA 方法进行统计学分析。

## 2 结果

2.1 免疫副反应观察 各组猪接种后，体温、食欲、精神状态均正常，未见观察到免疫副反应发生。

2.2 猪瘟抗体检测结果 用猪瘟间接 ELISA 抗体检测试剂盒检测 I 组、II 组和 IV 组猪接种后 0d、7d、14d、21d 和 28d 时的抗体效价，结果见表 1。与 I 组相比，接种后 14d ~ 28d，II 组和 IV 组猪瘟抗体水平均显著升高，免疫组平均 IE 值均远大于 10%。IV 组与 II 组相比，免疫抗体上升得慢一些，抗体水平也略低，但经 SPSS19.0 软件分析，0d ~ 28d 两组的猪瘟抗体水平差异不显著 (P > 0.05)。猪瘟疫苗单独接种组免疫后 14d，抗体阳性率达 100% (6/6)，猪瘟与猪伪狂犬混合免疫组 14d 抗体阳性率 83.33% (5/6)，21d 两组抗体阳性率达 100% (6/6)。

表 1 猪瘟抗体检测结果

组别	各组平均 IE 值 (%)				
	0d	7d	14d	21d	28d
I 组 (空白)	6.3 ± 1.7	7.4 ± 2.0	7.3 ± 1.1	5.5 ± 1.4	4.8 ± 1.1
II 组 (CSFV)	5.9 ± 1.4	6.3 ± 1.2	21.4 ± 5.1	44.3 ± 5.2	45.5 ± 3.7
IV 组 (CSFV+PRV)	6.5 ± 2.2	8.6 ± 4.2	19.0 ± 9.2	37.5 ± 9.2	42.6 ± 9.7

表 2 猪瘟抗体阳性数统计结果

组别	各组抗体阳性数				
	0d	7d	14d	21d	28d
I 组 (空白)	0/6	1/6	0/6	0/6	0/6
II 组 (CSFV)	0/6	0/6	6/6	6/6	6/6
IV 组 (CSFV+PRV)	1/6	1/6	5/6	6/6	6/6

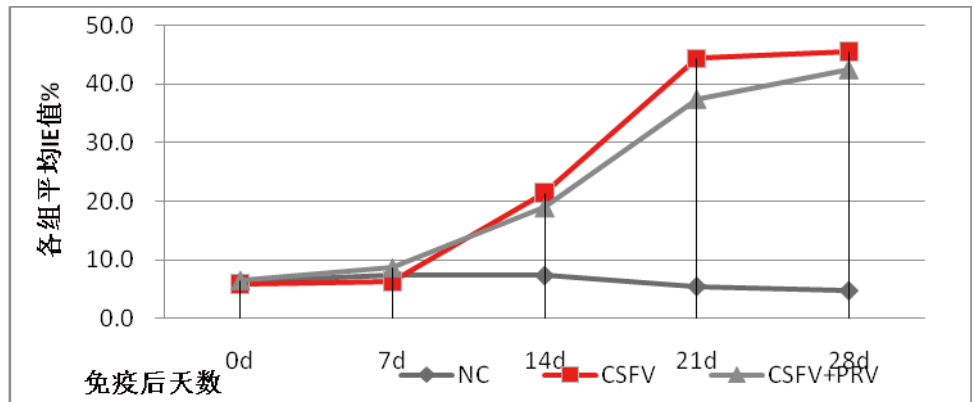


图1 猪瘟免疫抗体水平变化图

**2.3 猪伪狂犬抗体监测结果** 用猪伪狂犬病毒 gB 抗体检测试剂盒检测 I 组、III 组和 IV 组猪接种后 0d、7d、14d、21d 和 28d 时猪伪狂犬抗体效价, 结果见表 3。接种后 7d ~ 28d, IV 组的抗体水平略高于 III 组, 但经 SPSS19.0 软件分析差异不显著 ( $P>0.05$ )。用伪狂犬疫苗免疫后 7 天, 无论是单独免疫还是与猪瘟混合免疫, 抗体的阳性率均达 100% (6/6)。

表 3 猪伪狂犬病毒 gB 抗体检测结果

组别	各组平均 S/N 值				
	0d	7d	14d	21d	28d
I 组 (空白)	1.04 ± 0.02	1.04 ± 0.04	1.00 ± 0.06	0.98 ± 0.04	1.00 ± 0.02
III 组 (PRV)	1.02 ± 0.07	0.47 ± 0.07	0.37 ± 0.13	0.29 ± 0.05	0.19 ± 0.09
IV 组 (CSFV+PRV)	1.05 ± 0.03	0.38 ± 0.13	0.22 ± 0.13	0.22 ± 0.06	0.16 ± 0.02

表 4 猪伪狂犬病毒 gB 抗体阳性数统计结果

组别	各组抗体阳性数				
	0d	7d	14d	21d	28d
I 组 (空白)	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6
III 组 (PRV)	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6
IV 组 (CSFV+PRV)	0/6	6/6	6/6	6/6	6/6

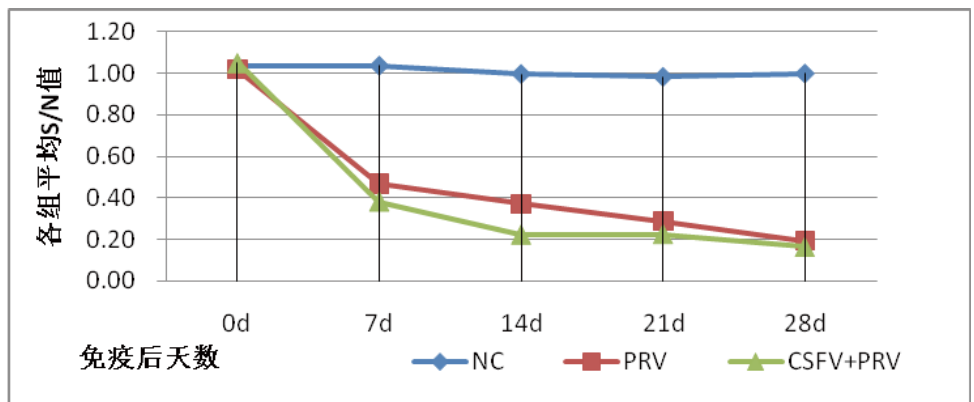


图2 猪伪狂犬免疫抗体 S/N(竞争率)变化图(S/N 值越小, 抗体水平越高)

### 3 讨论

3.1 目前，规模猪场免疫病种和免疫次数比较多，免疫次数增多，增加了工人的劳动强度，对猪的应激也比较大，不利于猪的生产健康。根据当前猪群疫病的流行情况和趋势，猪瘟和猪伪狂犬病都是规模猪场应重点防控的疫病。猪瘟通常 28 ~ 35 日龄首免，60 日龄左右加强免疫；猪伪狂犬疫苗通常 3 日龄滴鼻，45 ~ 60 日龄肌肉接种，或者 35 日龄左右接种一次，因此，猪瘟和猪伪狂犬疫苗可以根据抗体监测的结果，进行联合接种。本次试验结果表明，联合接种后猪的免疫副反应没有增加，猪瘟的抗体水平略低于单独接种组，而伪狂犬的抗体水平略高于单独接种组；经统计分析，联合接种组和单独接种组抗体水平差异不显著。因此，必要时生产中可尝试将两者疫苗混匀后接种。

3.2 本次试验采用猪瘟、猪伪狂犬病抗原抗体双阴性猪进行试验，接种后 14 天猪瘟抗体阳性率即可达 100%，而猪伪狂犬抗体接种后 7 天阳性率为 100%，表明疫苗本身的品质是非常高的。生产实际中，母源抗体和上次接种的残存抗体，对疫苗的免疫效果有一定的干扰，猪群的免疫状况也比较复杂，因此，猪瘟和猪伪狂犬弱毒疫苗混合注射的免疫效果，还需在猪场生产实际中进行进一步的验证。

（作者简介：李金海，博士，技术服务副总监，诊断中心主任）





# 猪圆环病毒灭活疫苗稀释猪瘟活疫苗 联合免疫效果研究

文 | 李金海 郭建宝 汪媛 方鹏飞 徐静 罗璇

**摘要:** 为评价猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 (圆环康) 稀释猪瘟细胞苗的免疫效果, 选 21 日龄猪瘟、圆环病毒抗原抗体阴性猪 24 头, 随机平均分成 4 组。I 组不接种作为阴性对照, II 组和 IV 组先接种圆环康 1mL; 14d 后, III 组单独接种猪瘟 1 头份, II 组单独接种圆环康 1mL, IV 组先用圆环康将猪瘟疫苗稀释成 1 头份 /mL, 再接种 1mL。观察接种后猪只反应, 并分别于圆环康二免后 0d、7d、14d、21 d 和 28d 采血, 用 ELISA 方法监测抗体。疫苗接种后均无明显免疫副反应; 用圆环康稀释猪瘟疫苗组的猪瘟抗体和猪圆环病毒 2 型抗体水平均高于单独接种组, 但差异不显著 ( $P>0.05$ )。试验结果表明, 用圆环康稀释猪瘟疫苗混合接种安全, 对圆环和猪瘟体液免疫应答有一定协同作用。

**关键词:** 猪圆环病毒 2 型疫苗; 猪瘟; 联合免疫; 免疫效果

## Evaluation of Immune Efficacy after Vaccination with the Mixture of PCV2 Inactivated Vaccine and HCLV

LI Jin-hai, GUO Jian-bao, WANG Yuan, FANG Peng-fei, XU Jin, LUO Xuan

**Abstract** In order to evaluate the influence between hog cholera lapinized virus (HCLV) and porcine circovirus type 2 inactivated vaccine, 24 21-day old piglets were randomly divided into 4 groups. Group I was negative control, Group II and IV pigs were firstly Vaccinated with PCV2 vaccine 1 mL at 21 day old; After 14 days, Group II were Vaccinated with PCV2 vaccine 1 mL, Group III were Vaccinated with a dose of HCLV; Group IV were injected with the mixture of two vaccines. The blood samples were collected at 0d、7d、14d、21d and 28d post the second vaccination to detect Immune antibody with ELISA kit. No side effect was observed in All the pigs. The antibody titer against CSFV and PCV2 of mixed inject group was higher than that of the single vaccinated groups, respectively, but the difference was not significant ( $P>0.05$ ). The results show that vaccination with mixed Vaccine(HCLV and PCV2 vaccine) had good safety and synergistic effect on the immune response

**Keywords:** classical swine fever virus; porcine circovirus type 2; vaccine combined vaccination; immune efficacy

猪瘟对养猪生产危害严重，我国将其列为一类重大动物疫病，当前主要采取免疫、净化等措施控制该病。猪圆环病毒2型可引起猪的多种疾病，如断奶仔猪多系统衰弱综合征（PMWS）、猪皮炎和肾病综合征（PDNS）、猪呼吸系统综合征（PRDC）、肠炎、繁殖障碍、新生仔猪的先天性震颤等，其中PMWS、PDNS和PRDC在临床上常见，对养猪业危害较大。越来越多的猪场使用疫苗预防该病。华派公司生产的圆环康疫苗（猪圆环病毒2型灭活疫苗）采用水质佐剂，粘度非常低，可以用来稀释其它疫苗进行联合接种，本试验用圆环康稀释猪瘟疫苗，观察接种反应，监测猪瘟和猪圆环病毒的免疫抗体，评估二者是否有干扰，旨在为疫苗的联合免疫提供参考。

## 1 材料

**1.1 供试疫苗** 猪瘟活疫苗（细胞源），批号2015006-2；圆环康（猪圆环病毒2型灭活疫苗，ZJ/C株），批号2015002，均由四川省华派生物制药有限公司生产。

**1.2 试验动物** 选取21日龄猪瘟、猪圆环病毒2型抗原抗体双阴性猪24头，在华派生物动物房标准猪舍饲养。

**1.3 诊断试剂** 猪瘟间接ELISA抗体检测试剂盒，中国兽医药品监察所产品，批号KAD1A2803GZ，有效期至2015.11.09；猪圆环病毒2型ELISA抗体检测试剂盒，科前生物产品，批号150302，有效期160109。

## 2 方法

**2.1 试验分组** 将24头猪随机分为4组，每组6头。各组接种方案详见表1。

表 1: 试验分组及接种方案

组别	疫苗及剂量		数量 (头)
	一免 (21 日龄)	二免 (首免后 14d)	
I 组 (NC)	/	/	6
II 组 (PCV2)	圆环康, 1mL	圆环康, 1mL	6
III 组 (CSFV)	/	猪瘟细胞苗, 1 头份	6
IV 组 (CSFV+PCV2)	圆环康, 1mL	圆环康稀释猪瘟苗 (1 头份 / mL), 1mL	6

**2.2 免疫反应观察** 接种后至 48h 内观察免疫猪的精神、采食、运动、体温等情况, 对出现异常反应的猪只进行详细记录, 并进行相应处理。

### 2.3 抗体监测

**2.3.1 样品采集** 分别于二免疫后 0d、7d、14d、21d 和 28d 前腔静脉采血, 4000rpm, 10min 分离血清。

**2.3.2 猪瘟抗体检测** 该试剂盒为间接 ELISA, 要求血清稀释倍数为 1:100, 450nm 测定 OD 值; 判断标准:  $IE = \text{样品 OD 值} / \text{阳性对照 OD 值}$ ,  $IE \leq 8\%$ , 则 CSFV 抗体阴性,  $IE \geq 10\%$ , 则 CSFV 抗体阳性,  $8\% < IE < 10\%$ , 则判为可疑。详细操作步骤按说明书进行。

**2.3.3 猪圆环病毒 2 型抗体检测** 用猪圆环病毒 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒检测, 该试剂盒为间接 ELISA, 要求血清稀释倍数为 1:40, 630nm 测定 OD 值; 判断标准:  $S/P = (S - N) / (P - N) = (\text{样品 OD 值} - \text{阴性对照 OD 值}) / (\text{阳性对照 OD 值} - \text{阴性对照 OD 值})$ ,  $S/P \geq 0.16$ , 则 PCV2 抗体阳性,  $S/P < 0.16$ , 则 PCV2 抗体阴性。

**2.4 数据统计与分析** 测定相应 OD 值, 在对照成立情况下, 先分别计算 IE 值和 S/P 值, 再用 SPSS19.0 软件的 One-Way ANVOA 方法进行统计学分析。

## 3 结果

**3.1 免疫副反应观察** 无论是单独接种圆环康和猪瘟疫苗, 还是用圆环康稀释猪瘟疫苗后再接种, 猪的体温、食欲、精神状态均正常, 未见免疫副反应发生。

**3.2 猪瘟抗体检测结果** 用猪瘟间接 ELISA 抗体检测试剂盒检测 I 组、III 组和 IV 组接种后 0d、7d、14d、21d 和 28d 时猪瘟抗体效价, 详见表 2。与 I 组相比, 接种后 14d ~ 28d, III 组和 IV 组猪瘟抗体水平平均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 疫苗接种组平均 IE 值均远大于 10%。IV 组 (联合接种组) 猪瘟抗体水平略高于单独接种组, 经 SPSS19.0 软件分析, 0d ~ 28d, 两组猪瘟抗体水平差异不显著 ( $P > 0.05$ )。猪瘟单独接种组, 用圆环康稀释猪瘟疫苗组, 14d-28d 猪瘟抗体阳性率均为 100% (6/6), 详见表 3。

表 2 猪瘟抗体检测结果

组别	各组平均 IE 值 (%)				
	0d	7d	14d	21d	28d
I 组 (空白)	6.3±1.7	6.4±2.0	7.3±1.1	5.5±1.4	4.8±1.1
III 组 (CSFV)	5.9±1.4	6.3±1.2	21.4±5.1	44.3±5.2	45.5±3.7
IV 组 (PCV2+CSFV)	7.0±1.3	7.8±1.3	24.8±6.7	46.1±6.7	49.6±7.0

表 3 猪瘟抗体阳性数统计结果

组别	各组抗体阳性数				
	0d	7d	14d	21d	28d
I 组 (空白)	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
III II 组 (CSFV)	0/6	0/6	6/6	6/6	6/6
IV 组 (PCV2+CSFV)	0/6	1/6	6/6	6/6	6/6

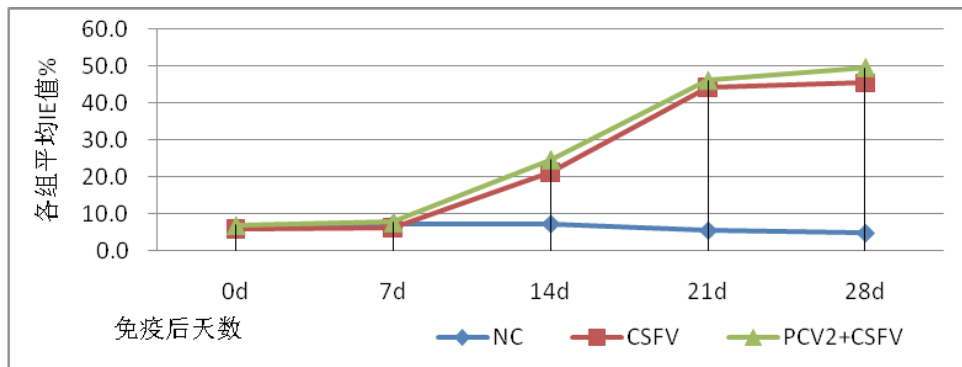


图 1 猪瘟免疫抗体水平变化图

**3.3 猪圆环病毒 2 型抗体检测** 用猪圆环病毒 2 型 ELISA 抗体检测试剂盒检测 I 组、II 组和 IV 组猪二免后 0d、7d、14d、21d 和 28d 的 PCV2 抗体，结果见表 4。二免后 7d III 组和 IV 组的平均 S/P 为阳性，二免后 14d ~ 21d，PCV2 S/P 值快速上升。用圆环康稀释猪瘟组抗体水平总体上略高于圆环康单独接种组，但差异不显著 (P>0.05)；联合接种组抗体的阳性率也高于单独接种组，详见表 5。

表 4 猪圆环病毒 2 型抗体检测结果

组别	各组平均 S/P 值				
	0d	7d	14d	21d	28d
I 组 (空白)	0.09±0.04	0.07±0.04	0.08±0.03	0.09±0.03	0.08±0.03
II 组 (PCV2)	0.12±0.05	0.23±0.14	0.25±0.15	0.55±0.33	0.62±0.38
IV 组 (PCV2+CSFV)	0.11±0.02	0.23±0.09	0.29±0.11	0.62±0.34	0.65±0.41

表 5 猪圆环病毒 2 型抗体阳性数统计结果

组别	各组抗体阳性数				
	0d	7d	14d	21d	28d
I 组 (空白)	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6
II 组 (PCV2)	1/6	4/6	5/6	6/6	6/6
IV 组 (PCV2+CSFV)	0/6	5/6	6/6	6/6	6/6

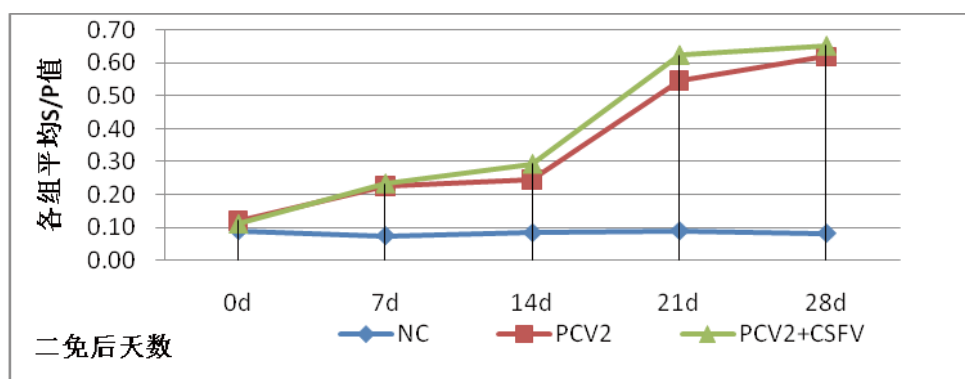


图2 PCV2 免疫抗体水平变化图

## 4 讨论

4.1 猪圆环病毒 2 型是重要的免疫抑制性疾病，可直接导致或参与了多种猪病的发生，给世界养猪业造成了巨大的损失。猪圆环病毒疫苗是控制圆环病毒病的最有效方法之一，它可以减少临床症状、降低死亡率、减少淘汰猪、改善增重、减少疫病的发生和抗生素的使用，目前国外几乎全群接种，国内的接种率也日益提升。有研究表明，用圆环病毒接种 2 次 1mL 的效果优于接种 1 次 2mL 的效果，但增加接种次数，会增加工人的劳动强度，对猪的应激也比较大。通常圆环病毒疫苗首免为 14 日龄，可以在 30 日龄左右加强免疫，猪瘟的首免一般在 28 ~ 35 日龄，因此，可以把猪瘟和猪元活病毒疫苗进行联合接种。本试验先接种 1mL 圆环康，2 周后再和猪瘟疫苗混合接种，免疫抗体监测结果表明，圆环康稀释猪瘟疫苗接种组猪瘟抗体和 PCV2 抗体水平均高于单独接种组 ( $P>0.05$ )，二者有一定的协同作用。

4.2 华派生物圆环康采用  $\beta$  丙内酯 (BPL) 作为灭活剂型，用 BPL 低温灭活后 37℃ 回温 2h 即可全部水解，无残留，此外，圆环康用的佐剂是医用级的水质佐剂，从试验结果看，圆环康不影响猪瘟的免疫效果，推测其也不影响猪瘟疫苗的活性。

4.3 本次试验采用抗原抗体双阴性猪进行试验，得到了理想的免疫效果，生产实际中，母源抗体和上次免疫的残存抗体，对疫苗的免疫效果都有一定的干扰，猪群的免疫状况也比较复杂，因此，用圆环康稀释猪瘟疫苗的接种方法，还需加大样本数量，在猪场生产实际中进行进一步的验证。

(作者简介: 李金海, 博士, 技术服务副总监, 诊断中心主任)

# Exclusive

## 本刊特稿

《陆生生物手册》连载②

## 抗原检测方法的开发及优化

文 | 国际兽医局 译 | 徐静

### 引言

在陆生动物手册的 1.1.5 章节或水生生物手册的 1.1.2 章节中，OIE 验证指南提供了详细的资料和实例来支撑 OIE 验证标准。本指南中的“OIE 验证标准”可参考这些章节。病原的分离鉴定是某种病原感染或致病的确切证据。有很多不同的直接或间接的检测方法。经典的直接病原检测方法有电镜、光学显微镜（比如观察独特组织病理学特征、原位寄生虫鉴定等等）、病原分离、细菌培养和寄生虫消化技术。很多直接的检测方法需要后续方法辅助鉴定这些病原（比如血凝、表达中和、特定的细菌或霉菌菌株等等）。具有代表性的间接的病原和抗原检测方法有酶联免疫吸附试验（ELISA）、免疫荧光或免疫组化试验、Western blotting、微量方法、荧光标记细胞分选（FACS）和生物传感器。通常直接和间接方法结合应用，比如：用直接的方法来分离、富集和提取微生物，然后用间接方法来鉴定病原。

### 选择某种方法时的注意事项

- 有必要高通量？检测方法是否可自动化？
- 该方法用于群体或个体？
- 完成一次需要多长的时间，是否合适？
- 完成这试验需要的文化教育程度？
- 结果解释对技能的要求？
- 该方法在自己实验室应用简捷吗？
- 该方法是否可用于其他实验室？

上面列举的例子从实验室需求来说差别非常大。临床检测方法也许是抗原检测方法。这些方法方便应用，为临床检测而开发，但这些方法也可以用于实验室。当选择最适合的方法时，需要考虑的参数有费用、实验室基础条件、生物安全、技术难易程度、结果解释、完成一次需要时间、批量情况、诊断性能特征、可重复性、再现性等。应用于

不同目的时对这些特征的要求也有差别。

与血清学或抗体检测方法相比,抗原检测方法大大依赖于疾病的临床症状出现的时间、致病机理和在某种组织和/或体液中病原的含量。圆满诊断取决于采样时间、采样点的选择、保存条件和运输途中样品的保全。在某些情况下,逐个样品检验较合适(比如确诊),然而,在其他情况下,混样检验效率更高,检测结果更有效(比如筛查)。如何选择恰当的样品需要对该病有较深的了解和样品材料对检测结果的影响(比如禽流感采集泄殖腔或支气管拭子)。

注:定义:文中直接和间接检测方法,“直接”是指直接检测病原微生物或抗原,比如用显微镜之间检测;“间接”是检测宿主对病原微生物的应答”,比如检测微生物诱导产生的抗体。本文中用于检测疾病的诊断方法中,显微镜是直接观察微生物的方法,然而用试剂推断存在病原是间接方法。

核酸检测方法逐渐取代了传统的抗原检测方法。为了开发和优化核酸检测方法,请参考 OIE 验证指南 3.6.3。尽管很多时候选择核酸检测方法,但并不是所有时候都适用或可行。在大多数情况下,特别是指针病例时,有必要用选择培养基或易感细胞系、鸡胚来培养病原,有利于更进一步的鉴定。尽管基因分型是一重要的选择(特别是分子流行病学调查时),其它病原鉴定方法比如血清学分型、致病型或生物分型也很重要。培养和保存的病原有非常大的价值,也是参考材料的重要来源。

由于 Ag ELISA 的广泛应用,该方法在 OIE 验证指南的抗原检测方法中作为事例。延伸验证 ELISA 中的这些步骤,验证其他抗原检测方法的大多数基本步骤都显而易见。由于抗原抗体检测方法之间的很多概念相似,OIE 验证指南中抗体抗原检测方法经常相互参考。

## A. 抗原检测方法的研发路径

### 1. 抗原检测方法的既定目的

检测方法的既定目的是指导决定备选方法选择和备选方法早期研发的关键因素。在表 1 中给出了 OIE 定义的目的分类,抗原检测体系也许适合某些特定的应用。支撑疾病根除或监测计划要求检测大量的样品,看重诊断方法的敏感性和批处理能力。相反,确诊临床病例不需要检测大

量的样品,但强调诊断方法的特异性和运行一次所需时间短。在开始,应仔细考虑下面表格中提出的那些问题。

表 1 确定抗原检测方法适合既定目的

检测方法的特征	是否适合目的确定						
	1*		2*	3*	4*	5*	6*
	a	b					
诊断方法的敏感性 (DSe)		+++	+++	+++	+++		
诊断方法的特异性 (DSp)		+	+	+	+++		
阳性预测值 (PPV)		+	+	+	+++		
阴性预测值 (NPV)		+++	+++	+++	+++		
批处理能力		+++	+	+	—		
运行一次所需时间		+	+	+	+++		
质量管理能力		+++	+++	+++	+++		
再现性		+++	+++	+++	+++		
重复性		+++	+++	+++	+++		

检测方法的其它特征比如技术难度、结果分析需要的经验与被检疾病有关。NB NAD 检测方法可用于抗原检测,见 OIE 验证指南

符号: :+++ 表示很重要;+ 表示重要 - 表示不重要。

检测方法适合的一些基本目标

1. 用于证明某特定群无感染
2. 为了贸易或运输,确证每头动物或产品不存在某种病原感染
3. 用于从某特定群根除疾病或清除感染
4. 确诊临床病例(包括验证阳性筛查结果)
5. 评估感染的流行率,便于风险分析
6. 确定疫苗接种后每头动物或群体的免疫状态

#### 1.1. 目的 1

表 1 中列出的无某种疾病这一类,假如可检水平的免疫应答表明感染,那么通常选择高敏感性的抗体普查方法。然而,在某些疾病情况下,免疫应答起误导作用,病原检测更为适合(比如支原体或锥虫感染)。

在这样的情况下,抗原检测方法更为有效。抗原普查方法应有高的敏感性。当应用于低流行率的群体时,高敏感性的检测方法假阴性率低,阴性预测值达到最高水平。

由于方法的敏感性和特异性通常负相关，特异性低将导致假阳性率上升。因此，所有普查的阳性结果应进行确证检测，以评价其真实状况。确诊检测方法通常具有很高的特异性，因而低的假阳性率。确诊方法通常更为复杂和需要较高的结果分析技能。

### 1.2. 目的 2

陆生动物手册中为国际贸易提供的检测方法中，大量的疾病都最好是采用病原鉴定方法。尽管在很多情况下，这就必须培养病原或检测核酸，在一些情况下检测抗原也可达到这一目的。为了避免疾病通过贸易传播，最好采用高特异性的检测方法。

### 1.3. 目的 3

如果检测方法用于从某群根除疾病或清除感染，和抗体筛查方法一样，选择中到高敏感性抗原筛查方法。然而，筛查的理论依据轻微有差别，因为该检测可能以群或单元为基准。在刚开始实施根除时，疾病的流行率高，中等敏感性和特异性的方法就可，因为此时假阳性和假阴性率相关性不大，可接受中等水平的误差。取决于疾病的特性和传播速度，批处理能力高和运行一次时间短非常重要。在此时不必确证就可以做出决定。在疾病根除的后期，高的特异性更重要，因为假阴性率成为需要考虑的重要因素。与目的 1 相似，阳性结果需要进行确证检测以评价其真实情况。在这些后期阶段，抗原和 / 或核酸检测方法在检测亚临床病例、排毒和潜伏感染方面非常重要。

### 1.4. 目的 4

尽管在确证临床病例时通常选择高特异性的抗体检测方法，但抗体检测方法也并不是常规的选择，特别是如果免疫应答建立之前就已出现临床症状。一个重要的事例是高致病性禽流感感染，在免疫应答达可检水平之前，就已发生死亡。假如抗原或核酸检测方法运行一次所需要的时间短的话，临床病例确证最好选择这些方法。在这样的情况下，较为理想的是特异性达到最大，假阳性反应最小化。对某些临床病例，比如陆生动物的水泡病，需要几种检测方法以便快速排除其他具有相似临床症状的病原。鉴定可能爆发时，此类检测方法运行一次需要的时间短就极其重要。

### 1.5. 目的 5

为了评价感染流行率和 / 或排毒情况，以便风险分析，比如健康调查、群体健康状况和监测疾病控制措施，也优先选择中等敏感性和特异性的抗原检测方法。总之，这将平衡假阴性和假阳性率，能更为准确评价目标群的真实流行率。然而，如果该方法的敏感性和特异性都已准确确定，可用统计方法来减少假阴性和假阳性引起的误差（参见 OIE 验证指南 3.6.5 统计方法验证）。

### 1.6. 目的 6

没什么抗原检测方法可应用于该目的。

## 2. 方法研发 — 试验

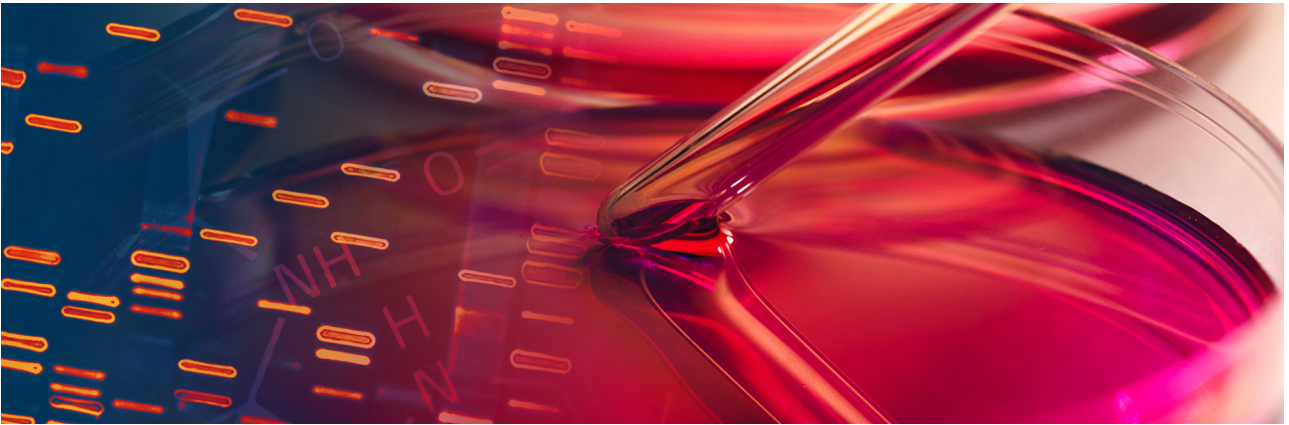
### 2.1. 参考材料、试剂和对照

#### 2.1.1. 检测样品

抗原检测试验所需的样品按陆生动物手册的 1.1.1 章节中的收集、运输和储存要求进行处理。抗原检测方法的样品材料差别很大（比如血、粪便、乳汁、皮肤、精液、唾液、胆汁、水泡以及从感染组织（口咽、气管、生殖道、泄殖腔、咽喉）采集的拭子。最好的样品是容易采集，并且被检成分含量高。在很多情况下选择血液或拭子，但也与所检病原相关，也需要其它组织或体液，比如皮肤、器官比如脑（狂犬病、传染性海绵体脑炎、淋巴器官比如脾脏和淋巴结（猪瘟）、肾、肝、部分呼吸道（禽流感）、消化道（细小病毒）、乳汁、粪便、精液、唾液、肿瘤等等。），如 1.1.1 章所述，通常要求尽量减少样品细菌和霉菌污染。通常不建议用防腐剂和固定剂来保存样品，尽量减少延误，在冷藏条件下将样品送到诊断实验室。在运输和储存期间，应知道病原所要求的物理和化学条件（比如口蹄疫病毒在低 pH 条件下容易死亡，需要等量的甘油磷酸盐缓冲液以保证 pH 值在 7 以上）。如果样品是多份收集在一起的，需要试验验证该方法能达到这一目的（比如该检测方法的敏感性足够高，能检测出 5、10、50 或更多份混在一起样品中仅 1 头感染。

#### 2.1.2. 参考标准

参见 OIE 验证指南 3.6.1 抗体检测方法开发及优化和 3.6.7 的参考样品的选择和应用。



### 2.1.3. 阳性和阴性参考试剂

在抗原检测方法的研发和优化期间，应将该方法检测极限范围内的样品作为对照。应从临床获得或实验室制备这些对照样品（参见 OIE 验证指南 3.6.6 选择和使用参考样品）。从未感染的动物获取阴性样品，当制备这些对照样品时应使用相同的试剂材料。

### 2.1.4. 制备抗体的纯化和粗提抗原

总的来说，用于制备免疫试剂的抗原应尽量保持天然构象，确保递呈的表位与活的病原微生物相似。因此，分离和/或纯化方法应尽可能保持抗原的完整性。对那些比较大的病原，比如痘病毒、细菌和寄生虫，鉴定和选择诱导强烈的免疫应答的抗原，蛋白微量试验非常有用。

### 2.1.5. 间接抗原检测方法所需的单抗和多抗

单抗有检测特异性，在检测属、株或亚株病原特异性表位方面非常有用。正因如此，需要仔细考虑单抗可应用什么样的检测方法以及检测方法所需要的特异性。多抗本身特异性较广。纯化或半纯化多抗通常用于捕获复合抗原，因为多抗比单抗有更高的亲和力。

## 2.2. 方法设计

### 2.2.1. 选择方法

在制定一个恰当的方法设计之前，结合性能要求，需要仔细考虑很多因素。选择某种方法必须考虑既定的应用要求，必须综合试验方法的研发人员、统计人员以及其他相关人员，比如流行病学专家、主管部门等。如果是为了开发一种普查方法（比如爆发后监测期），重点考虑高敏感性、高通量、低成本、技术简便和结果分析不需要很高的技能等。如果目的是开发一种确诊方法（比如临床病例

确证或普查的阳性结果确证），优先考虑的是高特异性、完成一次需要的时间短、技术复杂和结果分析需要更高的技能。

越来越多的强调不同特征性能的检测方法或临床方法，考虑到使用的环境条件和操作人员的技能和结果能力都存在差异，这些方法都有自己的优势和不足。

#### 影响选择某种检测方法的因素

- 该方法是否用于普查或确证？或者二者都可？
- 该方法用于实验室还是现场检测？
- 该方法可用于某种动物或几种动物？是哪些动物？
- 该方法是否可用于将病原分属、血清型还是毒株特异性？
- 该方法用于本国还是世界通用？

ELISA 抗原检测方法和 ELISA 抗体检测方法在概念上相同，只是检测的是抗原，包被的是抗体。根据是否将抗原直接吸附在微孔板上或由吸附在微孔板上的抗体来捕获抗原，和随后的检测步骤，形成不同类型的 ELISA 方法。

并不能说某种 ELISA 就特别适合某些特定的检测目的。要根据试剂和该检测方法的检测极限来选择某种类型的检测方法。由于现在很多检测体系都是高度的抗原特异性，抗体的选择就十分关键。

根据所选择的检测方法来制备检测样品也十分重要。夹心 ELISA 方法中使用捕获的抗体可增强特异性，可降低被检样品中其他成分对结果的影响。对于直接将抗体包被

在固相板上的方法，则需要提取、离心或过滤方法来除掉其他杂质。更重要的是抗原大小、复杂性和是否有相关的试剂，比如捕获抗体（例如夹心 ELISA 方法检测的抗原必须由两个自由的表位）将该 ELISA 方法限制于检测相对较大的抗原或全病原。由于微量板上或磁珠上的抗原-抗体复合物的稳定性将影响该方法的性能特征，免疫试剂的亲合力也起重要作用。实际问题是是否有用作质量控制和结果保证的标准抗原、可重复性、再现性、批处理能力、检测一次所需要的时间、费用、技术复杂性和结果分析所需要的技能。在处理外来病原和人畜共患病原时特别注意生物安全和保障措施。

### 2.3. 试验设计的依据（可行性研究）

在抗体检测方法中使用的试验在抗原检测方法中也需要。

### 2.4. 样品及数据表示

#### 2.4.1. 研发及验证研究时对照样品的选择、保存及使用

研发和验证期间评价和监测方法的敏感性和特异性非常重要。通过选择几个（通常 4-5 个就够了）从阴性到高抗原含量的样品就可评价和监测敏感性和特异性。用这些样品来优化该方法。为了保证试验的连续性，制备和保存样品必须小心和具有一定的远见。每个对照样品需要相对大的量，比如 10ml，分装成 0.1ml/份，冻存在 -80℃。每次试验每个样品取 1 份融化，用后最好废弃。如果不能废弃，则放置在 4℃ 保存不超过 2 周。然而在这样的环境下，样品可能腐败。那么另取一份再做试验。这样保证所有试验的样品都来源相同，冻融次数相同（反复冻融可使抗原降解以及其他微生物繁殖，这应避免）。所有试验用同样来源的样品比使用不同来源的样品可减少误差。该方法另一优点是用同样的样品做试验可产生重复的数据。在试验验证初期阶段完成后，就会有更多的样品作为参考试剂，这些参考试剂是在同一次试验和不同次试验时数据表示及重复性评估的基础。如果已确定了这些试剂的活性也可作为自制的工作标准，这些标准试剂保证了不同批次试验提供精准的数据

#### 2.4.2. 结果分析及表示方法

抗体检测方法所使用的结果分析可用于抗原检测方法

结果分析。

### 2.5. 优化

该阶段的目的是根据试剂、耗材和设备最终确定检测参数，这将固化检测方法和在第二阶段试验验证期间使用这些参数。

### 2.6. 样品中的抑制因子

由于样品存在差异和样品的复杂成分，抗原检测方法比抗体方法更可能受到样品中一些成分的影响。在一些复杂的样品中比如脓液、精液、支气管/鼻腔/泄殖腔拭子经常发现抑制因子，这就影响检测结果。ELISA 抗原检测体系相对能耐受一些抑制因子，请参见 OIE 验证指南 A.2.4 部分中影响试验方法的抑制因子类型。应仔细评价这些参考因子，以确保考虑到所有的抑制因子并加以控制。

#### 优化和标准化

- 该方法能区分有无被检成分的样品（检测极限或敏感性）？
- 该检测方法会与无目标抗原的样品发生交叉反应吗（方法的特异性）？
- 阴性样品的背景值如何？
- 是否已评价了不同抗原浓度的样品的重复性？
- 是否有足够的阳性和阴性样品来完成优化和验证试验？
- 如果样品足够，参考和对照样品是否进行适量的分装和保存，避免因样品引入误差？
- 所有关键试剂是否进行了棋盘试验？
- 是否已确定了每种试剂的最佳浓度/稀释度？
- 是否将参考试剂和工作标准/对照包含到试验中？为获得最可能的结果，是否分析了 OD 值数据？

### 2.7. 校正参考样品和与标准检测方法比较

OIE 验证指南 3.6.1 有该步的相关资料。

## B. 方法验证步骤

### 1. 第 1 阶段 — 方法的性能特征



### 1.1. 可重复性

见 OIE 验证指南 3.6.1

### 1.2. 方法的特异性

特异性定义为检测方法能区分被检样品中目标检测物与其他成分的能力（见 OIE 验证指南 3.6.6 2.1 节）。敏感性越高，假阳性越低。用与目标病原产生相似病变或通常与目标抗原混合存在的病原制备的样品来确定方法的特异性。例如，为了评价 FMD 针对某型（比如 O 血清型）的抗原检测 ELISA 的敏感性，必须检测与该血清型内所有不同株的反应性，从而评价其包容性。同时，也必须评价该方法不与其他血清型比如 A、Asia 1、C、SAT1\2\3 型发生交叉反应。最后，也必要评价是否与引起相似症状的病原比如水泡性口炎、猪水泡病和猪水泡性疱疹有交叉反应。另一个例子是开发来检测禽流感病毒的 ELISA：作为一种普查方法，该方法应检测所有亚型比如（H1-16 和 N1-N9）核蛋白或基质抗原。

#### 检测方法的性能特征

- 是否在同一次试验和不同次试验用从阴性到强阳性样品确定了方法的可重复性?
- 是否确定该方法检测的低限和高限?
- 是否已确定方法的敏感性和特异性?
- 是否已根据客观的定量和定性标准对候选方法与标准方法进行了比较?

然而，应不与引起相似症状的病毒比如新城疫或传染性法氏囊病以及与样品中或固相上的其他非特异性成分发生交叉反应。一些 ELISA 方法也可能因非特异性因子比如塑料表面上非特异性结合二抗而产生假阳性，因此需要用阻断试剂。应多加考虑以消除这些误差。

### 1.3. 方法的敏感性

方法的敏感性也就是被检样品中抗原浓度的下限



(LOD)。通常对样品进行 2 倍系列稀释，每个稀释度 10 个重复这种终点法来确定检测下限。重复数量越多，越能准确确定某个稀释度不能被检出。关于下限和敏感性的更多信息见 OIE 验证标准和验证指南 3.6.5。

普查方法或开发来监测亚临床感染或带毒的方法应有非常高的敏感性。在这些情况下，难以获得适合的样品和难以通过用候选方法和其它不相关的方法检测一组样品确定敏感性。如果有这样的方法，从试验感染动物采取一系列的样品可提供关于该方法检测感染进程中抗原的能力的实时信息。

#### 1.4. 标准方法与候选方法比较

见 OIE 验证指南 3.6.1。

## 2. 第 2 阶段诊断性能特征

见 OIE 验证指南 3.6.1。

### 2.1. 准确确定抗原检测方法的敏感性和特异性的难点

对包括 ELISAs 方法在内的所有抗原检测方法，都应特别注意采样的时间，由于能否检测到抗原与疾病感染的阶段密切相关。抗原 / 病原检测的窗口期比抗体检测的短，因为在很长时间内都可以监测到免疫应答。感染动态比如急性、持续性、亚急性、慢性或带毒状态决定采样时间。例如，在急性病毒感染期间，在出现临床后尽可能早采样。对持续感染、亚急性感染、慢性或带毒状态，宿主与病原之间处于平衡状态，病原含量低，难以检测到。在发病过程期间，随着疾病进程，其他器官系统、不同组织或组织液也可能更适合用于检测目标病原。

#### 诊断性能特征

- 确定阳性和阴性参考群的标准符合规定吗？
- 参考样品能完全代表该方法所针对的目标群吗？
- 获得足够数量的样品是否有难度？如果有，如何解决？

### 2.2. 参考动物群

#### 2.2.1. 已知“感染状态动物”

因阳性和阴性参考样品的组成不同，同一检测方法的

敏感性预测值和特异性预测值不同。理想情况下，参考样品和参考动物的组成应尽可能与检测方法预期所针对的目标群相当。清晰的病例定义十分重要，用一套标准来决定某头或某群动物是否感染。参考状态必须与检测的目的相关。例如，如果某方法目的是用来普查口蹄疫的早期感染（即是说自由放养有水泡的牛），那么用于确定敏感性和特异性的大多数样品应来自目标群。应收集和汇总验证阶段所有动物的相关信息（品种、年龄、性别）和影响敏感性的其它因素的一些信息（比如采样日期、地点、免疫状况、疫苗接种、病史、用于确定动物状况的特征性和替代的检测方法、群内流行率和描述如何定义参考状态）。

阴性参考动物样品指没接触过或感染过相关病原。例如，猪瘟阴性群定义为近年来没确诊病例的某个区域，从这些猪采集的样品符合阴性参考状态。应小心选择阴性参考群，以确保具有代表性和与阳性参考群所匹配（比如品种和饲养环境都匹配）。如果进行免疫接种，这可能干扰抗原的检测（比如接种弱毒活疫苗）。从这些动物采集的样品并不满足阴性参考样品标准。

在此列举了用作评价新方法性能特征的参考标准的类型和局限性。每个参考标准更为详细地描述见 OIE 验证指南 3.6.1 B.2.2.1 章节。用下面四类样品作为确定候选方法的敏感性和特异性时，应仔细考虑这些参考标准的优点及不足。

i) 无可争议的参考标准：宿主存在病原或明确的组织病理学特征。

ii) 混合参考标准：证实未感染或未接触过病原的动物。

iii) 相对参考标准：通过对同一样品用另一检测抗原或核酸的方法的结果相比较确定动物的感染状况，这样的参考动物就是相对参考标准。与抗体检测方法一样，仅当参考方法有文献报道、确定的和可接受的性能特征时，敏感性和特异性的估测值才有用。相对参考标准的不足是这些参考方法有其自己的假阳性和假阴性水平，这会产生误差，会将这些误差带入到新方法的敏感性和特异性的估测值中。一般来说，用已报道的方法来确定参考动物的感染状态是较好的选择，但必须考虑相对参考标准引入的固有偏差。

iv) 辅助参考标准：试验感染或疫苗接种（参见 OIE 验证指南 B.2.3 节），这类标准有很大的局限性。

注：就抗原检测来说，比较检测方法应包括通过分离、培养的病原检测、核酸检测和/或组织病理学、原位杂交技术等。

#### 2.2.2. 样品选择的潜在模型

关于样品选择方法的探讨，见 OIE 验证标准 B.2.5 节和 OIE 验证指南 3.6。

#### 2.3. 阈值确定

清晰描述确定阈值的方法及确定阈值所用的样品十分重要的。强烈建议进行受试者操作特征分析，用其他流行病学检测方法表明新方法的潜在性能。

### 3. 第 3 阶段 — 再现性和放大的重复性评估

抗原检测方法的再现性评估与其它方法的再现性评估相同。因此，读者可参见 OIE 验证标准第 3 节关于再现性分析的细节、参考样品。OIE 提供实验室性能测试指南 (<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/referencelaboratories/proficiency-testing/>)。

### 4. 第 4 阶段 — 项目实施

#### 4.1. 结果分析

见 OIE 验证指南 3.6.1 B.4.1 章节。

### 5. 检测方法的操控性能

#### 5.1. 监测方法

在已确定新检测方法的性能特征后，需要继续监测、维护和改进。不同时间进行检测，继续监测方法的可重复性和再现性十分重要，质控样品必须在预先确定的范围之内。如果没在预先确定的范围之内，那么检测结果无效，必须重做。长时间监测方法的质控性能是测试该方法变化或趋势的重要途径。在该过程中对结果简单分析比如统计学评价平均值、标准差和变异系数是十分有用的，可将结果绘制在质控图上。参与外部质量控制或效率检测项目对发现随机和系统误差十分有用，为检测结果提供可置信度。更多信息见 OIE 验证指南 3.6.1 B.5.1 章节。

#### 5.2. 方法的细微调整—更换耗尽的试剂

检测方法必须经历时间的检验，因为较贵或较便宜的试剂或因为检测成分发生变化。生物试剂批与批之间的差异是引起检测结果差异的主要原因。当必须更换抗体或抗原等试剂时，这些试剂必须按原先的试剂的制备和处理方法进行制备和处理。需要对新的生物试剂（比如对照样品、抗原、捕获或检测抗体、酶结合物、化学试剂或耗材）进行比较评价。OIE 验证指南 3.6.8 章节微调后方法比较中给出了可接受的比较研究总的观点。一个基本原则是避免同时评价多个变量导致问题复杂化，因而一次只能更换一种试剂（见 OIE 验证指南 3.6.1B.5.2 章节）。

#### 5.3. 将方法进行大的改动—调整为另一种类型的 ELISA

实验室诊断的主要难点是跟上传染性病原特性的演变。随时间变化，病原可能改变其抗原特征，出现新的毒株，比如在 2009 年北欧出现蓝舌病毒血清 8 型。若发生改变就有必要进行全面的研发和验证。另一个重大的改变是将该方法用于不同物种的检测，而不是用于刚开始验证时的物种。比如想将在黄牛上验证的 FMD Ag 检测 ELISA 用于不同区域和不同气候条件下的骆驼或水牛。对 OIE 验证指南图 1 中第二阶段的那些群的参考样品进行评价将满足这一要求（见 OIE 验证指南 3.6.1 B.5.3 章节）。

#### 5.4. 提高验证标准的可置信度

由于很多变量影响抗原检测方法的性能，尽可能扩大参考样品的数量是非常有用的，因为误差随样品数量的增加而降低（见 OIE 验证指南 3.6.1 B.5.4 章节）。

（本文译自《OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals》，未完待续。）



# 开拓、创新 ——华派生物保持常青之所在

文 | 徐静

时值初夏，办公室外的绿化换上新的绿装，在微风中摇曳；办公室内盆景长出新叶，露出无限生机；员工们身着夏装，个个春意盎然，精神饱满，神采奕奕，公司内外处处彰显着勃勃生机。

一家经历 20 多年文化沉淀的兽用生物制品企业，成为培养优秀人才的沃土。兽用生物制品高级管理人员、高级工程师群体涌现。理由很简单，他们受到同样的企业文化的熏陶，养成勤奋、踏实、进取、创新、开放、包容的性格和气质，这是由我们企业创始人谢建勇先生所赋予的，他给我们企业注入了灵魂，不管岁月流失人员更迭，我们企业灵魂永在。

四川华派生物制药有限公司是时代的骄子，他健康、高效、务实地发展，追求创新，与时俱进。华派生物公司坚持自己的企业精神和经营理念，努力开拓，必将开创生物制品企业新纪元。

创业难，守业更难，创建品牌企业难上加难。在改革大潮中多少个企业呱呱坠地，又不知多少个企业在市场的风浪中沉没。企业就像浩瀚大海中的一艘船，掌舵人决定航行方向，团队决定着航行的速度和质量。在 20 多年市场经济的大潮中乘风破浪的华派生物有着深厚文化积淀。在目前全国银根紧缩形势下，小额融资企业现跑路大潮，养殖行业出现不景气，规模猪场倒闭，生物制药行业现资源整合、重组，震撼兽用生物制品业界。失败者给我们一个

启示：枕着现有名利入睡、不与时俱进、开拓创新必将折戟。华派生物站在历史的高度，着眼未来、追求创新、与时俱进。从 2009 年只有两条生产线的小厂发展到 2014 年的 15 条生产线；从仅两个常规产品到取得 10 个新兽药证书、14 个生产文号的一流的生物制品企业；从研发 0 投入到投入 2 个多亿的行业佼佼者。

华派生物从战略高度考量，不惜重金聘请邀请国内外知名咨询公司、动物疫病、生物制品等相关领域专家对企业管理人员、生产、服务等一线员工进行培训，极大地提升团队整体素质，加强企业核心竞争力。

华派生物在业界独树一帜，四季常青，迈着健康、坚定的步伐走向未来！

（作者简介：徐静，博士，执业兽医师，研发中心副主任）





# 设备管理是生产的基础

文 | 陈超

生产设备是生产力的重要组成部分和基本要素之一，是从事生产经营的重要工具和手段，是企业生存与发展的重要物质基础。生产设备无论从企业资产比例，还是从管理工作的内容上，以及企业市场竞争能力的体现上，它都占有相当大的比重和十分重要的位置。企业生产过程不只取决于生产工艺过程，而且与生产设备密切相关，生产设备是企业生产得以进行的物质基础。如细胞的培养由培养柜提供符合细胞培养的空间，禽蛋的孵化由孵化机完成加温、加湿、翻蛋的过程，能量转换由泵、压缩机、电机等设备实现，管好用好生产设备，提高设备管理水平对促进企业安、稳、长、满、优生产具有十分重要的意义。

设备管理是安全生产的保障，安全生产是强制性的，是必须无条件服从的，企业的任何生产经营活动都必须建立在安全生产的基础之上。根据有关安全事故的统计，除去人为因素，80% 以上的安全事故是设备不安全因素造成的，特别是一些压力容器，转动设备，电气设备等管理不好则更是事故的隐患，导致设备故障，发生生产停滞的设备事故，因设备维修，操作不当或设备老化，在生产关系中发生意外，造成人员伤亡的人员事故，要确保设备的良好运行，必须进行科学的设备管理，消除事故隐患，杜绝安全事故的发生。

设备管理是稳定生产的保证，工欲善其事，必先利其器，设备的稳定运行，必须建立在具备先进设备及科学的管理水平之上，若疏于管理，设备选型不合理，设备台账不健全，操作维护不规范，设备超负荷或带病运行等，会

使企业生产成本增加，造成极大的浪费，甚至酿成安全事故，给企业带来巨大的经济损失。

设备是提高产品质量，增加产量的一个重要因素，加强设备管理是提高产品质量，增产增收的重要手段。应用现代技术，开展技术创新，确保设备处于良好的运转状态。对于新设备要充分发挥其先进性能，保持高的设备利用率，发现和预防设备故障，采取正对措施予以消除。对于老设备要通过技术改造和更新，改善和提高装备素质，增强设备性能，延长设备使用寿命。生产设备出现故障使生产无法保持连续性、频繁开、停车工艺状况难以稳定，产品质量无法保证。

设备是企业生产力的重要因素，是企业进行各项生产经营活动的物质基础。因此，加强设备管理，提高设备利用率，为企业安、稳、长、满、优生产奠定基础。

（作者简介：陈超，本科，设备动力部）





文 | 本刊编辑部摘自中  
华文本库网

**对手是一面镜子，他让我们更清醒地认识自己；对手是一盏黑暗中的灯，他让我们看清方向。有对手的人便有奋斗目标、作战计划，步步为营，走向成功；没有对手的人就没有壮志雄心，甚至如井底之蛙，目光短浅、夜郎自大。**

## 从对手察觉自己的未来

美国有位叫阿扎洛夫的作家，他的勤奋与努力使他前半生有着辉煌的成就。然而，在他的后半生，由于他在故乡小城里与一个叫马利丁的文坛小丑较上了劲儿，并将其视为竞争对手，从而使他前半生的辉煌与后半生绝缘。

马利丁为抬升身价，得到名利与地位上的双赢，以卑鄙的钻营伎俩不断地在当地报刊上制造一些低劣的花边新闻，并公开向阿扎洛夫叫板。按说以阿扎洛夫的人品和地位，本不该理会这种“跳梁小丑”式的角色。然而，不幸的是，阿扎洛夫被这个小丑激怒了，丧失理智的他与马利丁在小报上展开了长达数年的论战。

结果，马利丁靠着他又得到了名又得到了利，而他却在无端地空耗青春与生命的同时，成了世人耻笑的对象，从此一蹶不振，抑郁而终。

一个人在社会上生存，常常会在竞争中遇到对手。对手是一面镜子，他让我们更清醒地认识自己；对手是一盏黑暗中的灯，他让我们看清方向。有对手的人便有奋斗目标、作战计划，步步为营，走向成功；没有对手的人就没有壮志雄心，甚至如井底之蛙，目光短浅、夜郎自大。

没有对手的人生是孤独的人生，但选错对手的人生则是不幸的人生。一只鼯鼠向狮子挑战，要同它一决雌雄。狮子果断地拒绝了：“如果答应你，你就可以得到曾与狮子比武的殊荣；而我呢，以后所有动物都会耻笑我竟和鼯鼠打架。”

“看一个人的心术，看他的眼神；看一个人的身价，看他的对手；看一个人的底牌，看他的朋友。”小成功靠朋友，大成功靠对手。对手是将你推向成功的另一只手，对手有多强，你就有多强。经济学家说：“百事可乐最大的成功是找了一个成功的对手。”



文 | 本刊编辑部摘自中国经营网

只有不断学习并将学到的优秀理论成果合理地应用到企业的现实中来，才能让企业在如今激烈的市场竞争中不断发展，壮大，并且立于不败之地。

## 开个好会 事半功倍

大约 100 年以前，美国人亨利·马丁·罗伯特将军出版了《罗伯特议事规则》一书，此后的一个世纪以来，人们将此书奉为民主议事的主臬。这本书的伟大之处在于其为开会这件平常事建立了一套完整的流程，让会议不至陷入无序、引起矛盾，还保障了决策的合理性。

可如今大部分公司的真实写照依然是大会开得繁琐，小会开得随意，开会之前稀里糊涂，开会之后也没能明白清楚。下面不如让我们把罗伯特的理论套用到企业的现实中来，梳理出一份适用于企业开会的方法，看看开出一个高效而有趣的会议我们该怎么做。

### 弄清究竟为何开会

开会必须具有目的性，意在通过众人讨论做出某项与公司利益相关的决议，一个不知道为什么而开的会必然以跑题和沉默为主。每个与会者在进入会议室之前，都应该已经想好自己的观点和今天要说的话。“头脑风暴”严格来说并不是有效的会议形式，因为即时的提出想法，很难做出最优的选择。借用开会讨论，激发想象，从无到有创建新的方案，实际上往往是不得以而为之的做法。开会讲求有备而来，每个人构造想法的过程应该在会前完成，开会的任务只有一个——就问题找出最好的解决办法。

因此要有一些会前的工作，议程、需要讨论的内容以及每个人的相关任务，应该有专人负责起草和发送邮件，即便是例会，这么做也能够增强员工们的重视程度。当然，员工也可以在邮件中提出新的问题，让大家尽早形成想法。另外，有一个小技巧可以让员工们对会议更有准备和期待，就是提前透露会议上要决定的事宜和可能将要达到的效果，此举等于对会议进行了提前的预热和炒作。

假如会议只是单纯地布置任务，作用多半不会太积极，因为大家没有获得自己的表达时间和话语权，一味地坐着听命，容易导致情绪低落。如果能够以邮件或私下沟通的形式代替，则会显得更为得体。

### 执行好个人的角色

通常而言，公司里的会议需要有两种角色：引导者和参与者。会议由谁召集，一般就由谁作为引导者，引导者的作用相当于罗伯特所说的主席或主持人，负责穿针引线，调节气氛，引发讨论。

会议伊始，引导者最好能够重申一下会议的目的是什么，需要解决的问题有哪些，

然后说明讨论从哪里开始，再引导着大家逐个说出自己的想法。这么做是让参与者都把状态调整到会议中，也是给予一定的时间去准备发言，不要让大家一下子陷入到“从零开始”的慌乱中来。

在会议进行的过程中，引导者应注意观察谁一直在说，谁在整个会议中不发一语，从而做出平衡。内部会议的核心是讨论，而不是发布和听讲。如果一个问题提出后遭遇了冷场，引导者可以试着将它分解成若干个子问题，代入到现实语境，或者先发表自己的看法，激发讨论。在会议的最后，引导者需要将大家认可的观点重新强调一遍，以便校对与会者对会议精神的理解。

会议的参与者在会前务必结合着会议重点整理一下思路，最好用文字写下草稿，防止到会上发言时由于紧张一下子大脑空白。这样做也方便在会议中保持一个清空的状态听取别人的意见，而不是只想着自己要说的话，强调自己的观点。

如果人手充足，最好在会上设立专门的记录员，将会议要点在会后发送给所有与会人员，一方面用于确认决议，另一方面，这也给了人们重新进行反馈的空间。如果有人在会上没能充分表达自己的想法，并对决议依然持有异议，可以通过邮件再次沟通。但就一个问题反复开会，一般是不必要的做法，坚持一事一议原则，节约会议成本，除非超过 2/3 的人都认为应该对此问题重新讨论，否则尽量不要复议，费时费力。

### 讨论的前提是遵守规则

开会要避免某个人的演讲滔滔不绝，其余的人容易感到被动而无话可说；而所有人随意地发言又容易毫无头绪，拖慢进展的速度。这就需要建立一种会场中的“游戏规则”，罗伯特特意强调的就是会议的“程序正义”。

规则最关键的一点是限制个人的发言时间和次数，可以参考的做法是事先安排发言者的顺序，一轮完成后，再进行探讨。当相同的意见被反复提及，会议的引导者要注意适时地打断，并询问不同的意见。

最后的决定应该获得多数人的支持。当多数人同意某项决议时，少数人的意见应该受到约束，否则会议就没完

没了；但多数人必须尊重少数人的权利，每一个决策相关者都要获得发言权。如果问题十分重大，可以调整决议通过的量化指标，比如从 1/2，调整到 3/4。

对于与会者，表达自己观点的前提是听清了对方的发言，你要确保自己弄懂了别人话中想要表达的意思。很多时候，看法并不矛盾，但表达方式不同就会引起争执。不过，如果意见确实针锋相对，也应尽量直言不讳，毕竟会议是公开的，问题是公共的，不涉及私人好恶。然而要注意方法，最好面向会议的引导者发表看法，因为如果不同意见的持有者面对面讨论则很有可能变成顶撞或争吵，造成情绪失控。

### 时间和场合都不是重要问题

有人说，开会不要超过 20 分钟，建议站着开会，以便迅速做出决议。在这里，并不推荐这类的做法。开会为的就是充分讨论，能尽快当然好，但限制时长没有意义，反而容易走向形式主义，草草了事。不过会议时间绝不是越长越好，联合公司东京总务部长冈本让曾说：“会议时间最好不要超过两小时，两小时是一个人注意力的极限。”这话有理，注意力不在了，会自然没有效果。会议期间，需要有频率地缓解一下压力，进行到一定阶段，可以由引导者引领着大家开开玩笑，聊聊八卦，给大家头脑中紧绷的神经做做按摩。但前提是，一定不要绕得太远，要能够再次拉回到会议中来。

至于开会的场合，其实并不重要，重要的是能不能将大家的注意力集中到会场讨论的问题上来。不过让员工不至于太过紧张而说不出话来确实是有必要的，著名管理学家余世维就经常组织员工在海滩召开会议，大家穿着海滩泳装，放松而惬意。大部分的企业都可以将开会的地点选在附近的咖啡厅，大家以倾斜的角度相对而坐，从心理学的角度讲更能够自在地抒发和倾听。

另外，那些会议上用不到的电子设备，如果能留在办公室就让它休息一下。

# 2015 年兽医工作要点

2015 年, 全国兽医系统的重点是全面贯彻落实党的十八大和十八届三中、四中全会以及中央农村工作会议、全国农业工作会议精神, 按照中央 1 号文件、农业部 1 号文件要求, 紧紧围绕“努力确保不发生区域性重大动物疫情和重大动物产品质量安全事件”的目标任务, 优化体制机制, 加强法治建设, 切实保障养殖业生产安全、动物源性食品安全和公共卫生安全, 为促进农业农村经济又好又快发展做出新贡献。

## 一、严格依法行政

(一) 规范行政执法行为。认真贯彻落实《动物防疫法》《重大动物疫情应急条例》《兽药管理条例》《生猪屠宰管理条例》《病原微生物实验室生物安全管理条例》等法律法规。加强立法研究, 推动兽医法律法规制订与完善工作。全面履行法定职责, 加快推进兽医综合执法。加大执法人员培训力度, 加强行政执法资格考核管理, 有序开展官方兽医资格复核。健全行政执法和刑事司法衔接机制, 防止有案不移、以罚代刑问题发生。贯彻落实《农业行政处罚案件信息公开办法》, 在职责权限范围内主动公开行政处罚案件信息。推行动物检疫痕迹化管理, 严格跨省调运动物检疫监管。开展专项整治活动, 严厉打击出售、贩卖病死畜禽, 转让、伪造或者变造检疫证明、检疫标志、畜禽标识, 私屠滥宰、注水或注入其他物质, 以及制售假劣兽药、违规使用标签说明书, 未经批准采集重大动物疫病病料、从事高致病性病原微生物实验室活动等违法行为。

## 二、加强兽医体系能力建设

(二) 推进信息化建设。实施《兽医卫生信息化技术规范代码规范(试行)》等 4 个技术规范(农办医[2014]61 号)。推动建立兽医卫生信息平台和资源共享机制, 促进各环节监管信息互联互通, 提高动物疫情监测预警、应急指挥管理、动物卫生监督执法、兽用生物制品监管、畜禽屠宰行业管理、执业兽医考试和兽医队伍管理等领域和环节的信息采集、传输、汇总、分析和评估能力, 逐步形成从养殖到屠宰全链条兽医卫生风险追溯监管信息体系。

(三) 完善实验室网络体系。结合本地区实际, 加大区域内各级兽医实验室建设力度, 提升软硬件水平。集成、整合、优化兽医研究机构、高等院校和企业资源, 完善国家参考实验室、重点实验室、专业实验室、大专院校以及大中型企业兽医实验室网络体系, 推动形成分工明确、布局合理的兽医科研、动物疫情监测和流行病学调查实验室网络。

(四) 加强兽医队伍管理。加强官方兽医培训, 强化乡村兽医登记、培训和从业管理, 做好 2015 年执业兽医资格考试工作。整合大专院校、科研院所、动物诊疗机构、企业和合作组织、行业协会等方面资源, 推动构建公益性与服务性相结合的新型兽医服务体系。

(五) 提升风险控制能力。围绕重大动物疫病防控, 加强区域化管理, 推进无规定动物疫病区生物安全隔离区建设。探索实施风险管理措施, 严格限制活体动物从高风险区向低风险区移动, 防止动物疫情传播扩散。

## 三、强化动物疫病防治

(六) 加大优先防治病种防控力度。认真贯彻落实《国

家中长期动物疫病防治规划（2012—2020年）》。实施国家动物疫病监测与流行病学调查计划，科学开展病原学监测，严格疫情报告和举报核查，全面掌握辖区内重点动物疫病流行情况。加快推进马鼻疽马传贫消灭工作。大力强化口蹄疫、禽流感、布病等优先病种防治，继续开展动物疫病强制免疫，切实做好免疫效果评价。继续推动种源正向监测净化。统筹做好生猪腹泻等常见多发病防控。

（七）加强人畜共患病防控。按照人畜同步、分类指导的原则，做好布病防控工作。开展《全国预防控制血吸虫病中长期规划纲要（2004—2015年）》《防治包虫病行动计划（2010—2015年）》终期评估，推进血吸虫病、包虫病达标验收工作，切实巩固和扩大防治成果。指导做好奶牛结核病监测净化工作。

（八）防范外来动物疫病。健全外来动物疫病监测制度和突发疫情应急处置机制，加强非洲猪瘟、疯牛病等外来动物疫病风险监测预警，做好技术储备，推进跨境动物疫病联防联控，促进外来动物疫病防控关口外移。

#### 四、推进病死畜禽无害化处理机制建设

（九）加强病死畜禽无害化处理工作。贯彻落实《国务院办公厅关于建立病死畜禽无害化处理机制的意见》，加快病死畜禽无害化处理机制建设。制定实施病死猪无害化处理监管工作细则，开展病死畜禽无害化处理机制宣传月活动，严格按照标准申报病死猪无害化处理补助经费。

#### 五、促进畜禽屠宰行业发展

（十）推进市县两级屠宰监管职责调整。积极与机构编制等部门沟通协调，加快推进市、县两级职责调整，注重职责交接质量，尽快形成上下贯通的屠宰监管体系。

（十一）加强畜禽屠宰行业管理。加强生猪定点屠宰企业监管，严格落实屠宰企业产品质量安全主体责任，加强屠宰证章标志管理，健全屠宰环节病害猪无害化处理监

管制度，组织做好屠宰环节“瘦肉精”监督抽检。建立统计信息员队伍，进一步完善畜禽屠宰统计监测制度，优化统计样本，及时报送统计信息。及时研究屠宰产业发展新情况新问题，及时预警预判处置行业内存在的各种风险。

#### 六、强化兽医药品和兽医生物制品监管

（十二）加强兽药和兽医生物制品质量监管。做好兽用疫苗生产、供应以及质量监管工作，完善飞行检查、监督抽检、批签发等监管措施，创新抽样机制，扩大经营、使用环节抽样比例。继续实施《兽药质量监督抽检计划》，强化检打联动，严厉打击假劣兽药。贯彻实施从重处罚公告，从重处罚兽药违法行为，及时上报重大案件查处情况。继续实施兽药产品标签说明书规范行动，加大违规标签说明书查处力度。完善国家兽药产品追溯信息系统，实施兽药产品追溯管理。

（十三）规范兽药使用管理。贯彻《兽用处方药和非处方药管理办法》，实施《动物及动物产品兽药残留监控计划》和《动物源细菌耐药性监测计划》，开展兽用抗菌药专项整治，规范兽药经营使用行为。

#### 七、加强兽医卫生宣传

（十四）加大宣传工作力度。建立兽医卫生宣传联络员制度和信息沟通机制。搭建现代化宣传平台，利用各种渠道加强兽医卫生工作好经验、好做法、典型案例和先进事迹的日常宣传。强化突发事件舆论引导，及时回应人民群众对重大动物疫病、重点人畜共患病和动物源性食品安全的关切，掌握话语主动权，努力为兽医卫生事业发展营造更好的舆论环境。

（本刊编辑部摘编自农业部网站）

# 动物诊疗专项整治行动 严打执业兽医违法从业

4月1日农业部发布关于开展动物诊疗专项整治行动的通知。通知要求严厉打击动物诊疗机构、执业兽医和乡村兽医违法从业行为，规范动物诊疗市场秩序，促进动物诊疗行业健康发展。

本次专项行动时间从4月15日起，截止10月15日，为期6个月。针对近两年动物诊疗机构管理以及兽用处方药制度推进过程中反映的突出问题，对城市动物诊疗机构、乡村动物诊疗市场以及兽药经营场所进行专项整治。

检查主要围绕执业兽医的注册和管理以及处方药的管理和使用展开。

针对城市动物诊疗机构重点检查无证营业、无证行医，无害化处理，年度报告制度和诊疗人员的注册与备案等问题。

乡村兽医诊疗机构则重点检查无证营业、无证行医以及兽药使用问题。

兽药经营企业也在检查范围之内，重点监督是否存在擅自聘用执业/非执业兽医坐堂、开处方，以及处方药的管理是否合规。

## 通知原文如下：

### 农业部办公厅关于开展动物诊疗 专项整治行动的通知

根据《中华人民共和国动物防疫法》《动物诊疗机构管理办法》《执业兽医管理办法》《乡村兽医管理办法》《兽用处方药和非处方药管理办法》等法律法规，我部研究制定了全国动物诊疗专项整治行动方案。现将有关事宜通知如下。

#### 一、目标任务

加强动物诊疗活动管理，严厉打击动物诊疗机构、执业兽医和乡村兽医违法从业行为，规范动物诊疗市场秩序，促进动物诊疗行业健康发展。

#### 二、整治时间

2015年4月15日至10月15日（为期6个月）。

#### 三、整治范围和内容

针对近两年动物诊疗机构管理以及兽用处方药制度推进过程中反映的突出问题，对城市动物诊疗机构、乡村动物诊疗市场以及兽药经营场所进行专项整治。

##### （一）城市动物诊疗机构

1. 无证营业、无证行医问题。重点检查动物诊疗机构是否存在未取得《动物诊疗许可证》擅自营业、或者已取得《动物诊疗许可证》但不再具备规定条件的情况；兽医人员是否存在无证行医、超范围从事动物诊疗活动的情况；是否存在使用伪造、变造、受让、租用、借用的动物诊疗许可证、兽医师执业证书或助理兽医师执业证书的情况。

2. 无害化处理问题。重点检查动物诊疗机构是否与专业机构签订医疗废物处置协议、病死动物无害化处理协议，并按规定处理病死动物、动物病理组织、医疗废弃物和诊

疗废水。

3. 年度报告问题。重点检查动物诊疗机构和执业兽医是否按规定报告年度动物诊疗活动情况。

4. 注册与备案问题。重点检查从事动物诊疗活动和动物诊疗辅助活动的人员是否主动向注册机关申请注册或者备案；注册机关是否按照《执业兽医管理办法》有关要求开展兽医注册或者备案审核。

### （二）乡村动物诊疗市场

1. 无证营业、无证行医问题。重点检查在乡村从事动物诊疗活动的单位是否取得《动物诊疗许可证》；在乡村从事动物诊疗活动、使用兽用处方药的兽医从业人员（主要包括个体动物诊疗人员以及动物诊疗机构、畜禽养殖场（养殖小区）、兽药生产企业等单位的兽医技术人员等）是否取得乡村兽医登记证、兽医师执业证书或助理兽医师执业证书。

2. 诊疗活动开展情况。重点检查乡村兽医是否超出《乡村兽医基本用药目录》范围使用兽用处方药，是否如实记录用药情况；是否使用禁止使用的药品和其他化合物；乡村兽医是否有固定的从业场所和必要的兽医器械。

### （三）兽药经营场所

重点检查兽药经营者是否存在擅自聘用执业兽医或非执业兽医坐堂行医、开具处方的行为；是否在经营场所显著位置悬挂或者张贴“兽用处方药必须凭兽医处方购买”的提示语；是否对兽医处方笺或乡村兽医登记证进行查验，并单独建立兽用处方药的购销记录。

## 四、工作步骤

### （一）动员部署阶段（4月15日-5月15日）

各省兽医主管部门按照本通知要求，结合本地区实际，制定具体实施方案。组织开展法律、法规和有关政策规定的宣传、讲解，推进执业兽医注册、乡村兽医登记以及动物诊疗机构许可工作。

### （二）集中整治阶段（5月16日-8月15日）

各地组织开展乡村动物诊疗市场摸底调查，集中开展

城市动物诊疗机构、乡村动物诊疗市场以及兽药经营场所专项检查，集中力量查办一批案件，处理一批违法机构和人员，确保专项行动取得实效。

### （三）深入巩固阶段（8月16日-9月15日）

督促整改落实，巩固工作成效。进一步完善管理制度，健全部门联动、齐抓共管的长效工作机制，加大日常监督执法力度，深入持续打击非法诊疗行为，进一步规范动物诊疗市场秩序。

### （四）重点抽查阶段（9月16日-10月15日）

农业部派出检查组对有关省份进行重点抽查。具体事宜另行通知。

## 五、有关要求

各省（自治区、直辖市）兽医主管部门要切实加强领导，周密部署，明确工作分工，落实具体责任。强化执法人员专题培训，明确执法程序，提高执法水平，保证专项整治工作有序有效开展。采取多种方式广泛宣传，努力为动物诊疗行业发展创造良好的社会氛围。集中曝光非法从事动物诊疗活动的典型案例，营造严厉打击的声势。要不断完善动物诊疗管理制度，推动建立动物诊疗纠纷调处机制和动物诊疗机构管理规范。加快培育地方兽医协会，充分发挥协会在行业自律、兽医维权、会员服务、继续教育、职业道德以及诊疗纠纷处置等方面的作用，积极引导动物诊疗机构依法在兽医公共服务中发挥作用。

专项行动期间，各省、自治区、直辖市兽医主管部门要及时收集汇总本地区专项工作进展、主要成效、重大案件、问题困难等信息，及时报送我部兽医局，并于2015年11月10日前将专项行动工作总结及相关表格（见附件）报送我部兽医局。

（本刊编辑部摘编自农业部网站）

# 农业部关于 2015 年第一期兽药质量监督抽检情况的通报

各省、自治区、直辖市畜牧兽医(农牧、农业)厅(局、委、办)，新疆生产建设兵团畜牧兽医局：

按照我部统一部署，全国 31 个省级兽药监察所和中国兽医药品监察所组织完成了 2014 年第四季度兽药质量监督抽检计划。现将抽检情况通报如下。

## 一、基本情况

2014 年第四季度共完成兽药（不包括兽用生物制品）质量监督抽检 4618 批，合格 4385 批，不合格 233 批（附件 1、附件 2），合格率为 94.9%，比 2014 年第三季度（95.0%）下降 0.1 个百分点，比 2013 年同期（93.1%）提高 1.8 个百分点。其中，兽药监测抽检共抽检 3342 批，合格 3162 批，合格率 94.6%；兽药跟踪抽检共抽检 684 批，合格 666 批，合格率 97.4%；兽药定向抽检共抽检 95 批，合格 87 批，合格率 91.6%；兽药鉴别抽检共抽检 497 批，合格 470 批，合格率 94.6%。

从抽检环节看，生产环节抽检 730 批，合格 710 批，合格率 97.3%，比 2014 年第三季度（95.8%）提高 1.5 个百分点；经营环节抽检 3093 批，合格 2929 批，合格率 94.7%，比 2014 年第三季度（94.6%）提高 0.1 个百分点；使用环节抽检 795 批，合格 746 批，合格率 93.8%，比 2014 年第三季度（95.5%）下降 1.7 个百分点。

从产品类别看，化药类产品共抽检 2104 批，合格 2007 批，合格率 95.4%，比 2014 年第三季度（96.4%）下降 1.0 个百分点；抗生素类产品共抽检 1436 批，合格 1378 批，合格率 96.0%，比 2014 年第三季度（96.2%）下降 0.2 个百分点；中药类产品共抽检 1055 批，合格 977 批，合格

率 92.6%，比 2014 年第三季度（90.1%）提高 2.5 个百分点；其他类产品共抽检 23 批，合格 23 批，合格率 100%。

2014 年第四季度共完成兽用生物制品质量监督抽检 132 批，合格 128 批，不合格 4 批（附件 3），合格率 97.0%。

关于 2014 年第四季度兽药抽检合格产品相关信息，请登录“中国兽药信息网”的“国家兽药基础信息查询系统”查阅。

## 二、重点监控企业

根据重点监控企业划分原则，判定以下 5 家企业为重点监控企业：

（一）四川饲宝动物药业有限公司（全年兽药质量通报产品含量低于 80% 累计 3 批次以上，2014 年第一季度、第三季度、第四季度各 1 批）；

（二）湖南绿亨世源动物药业有限公司（每期兽药质量通报中同一企业被抽检产品少于 50 批且不合格产品累计 5 批次以上的，2014 年第四季度 5 批）；

（三）江西一领药业有限公司（全年兽药质量通报产品含量低于 80% 累计 3 批次以上，2014 年第四季度 3 批）；

（四）四川新辉煌动物药业有限公司（全年兽药质量通报产品含量低于 20% 2 批次以上的，2014 年第一季度和 2014 年第四季度各 1 批）；

（五）大庆市牧源动物药业有限公司（全年兽药质量通报产品含量低于 80% 累计 3 批次以上的，2014 年第二季度、第三季度、第四季度各 1 批）。

## 三、存在的主要问题



从第四季度抽检情况看，鉴别和含量不合格仍然是兽药质量检验不合格的主要项目，部分产品含量较低甚至为0，个别产品含量无法测定；其次是改变组方违法添加其他兽药成分的现象依然存在。

#### 四、工作要求

##### （一）依法从重处罚违法行为

各地要按照农业部公告第2071号规定，对2014年3月3日后生产、符合从重处罚的，依法予以从重处罚。对广西北流市天龙兽药有限公司生产的黄白散等6个产品擅自改变组方添加其他兽药成分的情形，对河南圣达动物药业有限公司等15家企业生产的15个产品擅自改变组方添加其他兽药成分、主要成分含量在国家标准150%以上或50%以下的情形（附件4），我部兽医局将以《兽药监督抽检材料转送单》形式，将有关证据材料转送相关省级兽医行政管理部门组织立案查处，并及时报送案件查处情况；对符合撤销兽药产品批准文号、吊销兽药生产许可证的，应继续实施撤号、吊证处罚。对鉴别检验不合格的，各检验机构要进一步开展检验，确认是否存在改变制剂组方、非法添加其他药物成分等违法行为，为处罚提供技术支持。

##### （二）组织开展查处活动

对被通报的假劣兽药各地要集中力量组织查处，对相关违法企业实施飞行检查，责令生产企业召回销毁假劣兽药，对违法行为依法组织查处。其中，对鉴别、含量不合格且不属于兽药从重处罚规定情形的产品，责令企业对不合格产品停产整改，经企业所在地省级兽医行政管理部门审核整改合格后，方可恢复生产。各省级兽医行政管理部门要及时将查处结果及企业整改结果报我部兽医局。

##### （三）加强兽药质量信息通报

各地要及时将抽检结果信息通报辖区内兽药经营企业、动物饲养场（小区、户）等有关单位，防止养殖户误买、误用假劣兽药，提高兽药安全使用能力和水平，保障养殖环节用药安全。

##### （四）继续强化兽药企业日常监管

各地要加强本辖区兽药生产企业的兽药GMP后续监管，对违反兽药GMP规定的，责令其限期整改。要进一步加强兽药经营企业的兽药GSP后续监管，强化兽药采购源头管理，保障经营市场兽药的合法性。对监管中发现的违法行为要依法及时予以处理。

（本刊编辑部摘编自中国兽药信息网）

# 2015年3月及一季度 四川生猪价格和生​​产监测情况

## 一、价格运行情况

据四川生猪监测预警系统监测，2015年3月我省生猪价格继续走弱，但跌势减缓，饲料原料及配合料小幅震荡，养殖效益持续下滑；一季度除仔猪价格触底连续反弹10周回升外，育肥猪、母猪和猪肉均价呈逐月下降态势，猪粮比一度逼近5.0比1。

表 2015年3月及一季度四川生猪及主要饲料原料均价表（单位：元/kg、元/头、%）

	出栏肉猪	仔猪	后备母猪	猪肉零售	玉米	小麦麸	育肥猪配合料	猪粮比价
3月平均	12.79	16.04	1124	22.30	2.53	2.21	3.55	5.05 : 1
2月平均	13.30	15.41	1125	22.89	2.53	2.22	3.56	5.25
3月环比涨跌 ±	-0.51	0.63	-1.00	-0.59	0.00	-0.01	-0.01	-0.20
3月环比涨跌 %	-3.83	4.09	-0.09	-2.58	0.00	-0.45	-0.28	-3.81
去年3月平均	12.37	17.45	1233	21.40	2.50	2.26	3.51	4.95 : 1
3月同比涨跌 ±	0.42	-1.41	-109	0.90	0.03	-0.05	0.04	0.10
3月同比涨跌 %	3.40	-8.08	-8.84	4.21	1.20	-2.21	1.14	2.02
今年1季度平均	13.27	15.54	1127	22.78	2.54	2.22	3.56	5.22 : 1
去年1季度同期	13.66	18.05	1271	23.37	2.52	2.27	3.54	5.42
1季度同比涨跌 ±	-0.39	-2.51	-144	-0.59	0.02	-0.05	0.02	-0.20
1季度同比涨跌 %	-2.86	-13.91	-11.33	-2.52	0.79	-2.20	0.56	-3.69

肥猪：3月份均价12.79元/公斤，环比下降3.83%，但高于同比3.40%；一季度平均13.27元/公斤，同比下降2.86%。

仔猪：3月份均价16.04元/公斤，环比上涨4.09%，但仍低于同比8.08%；一季度平均15.54元/公斤，同比下降13.91%。

后备母猪：3月份均价1124元/头，环比和同比分别下跌0.09%和8.84%；一季度平均1127元/头，同比下降11.33%。

猪肉：3月份零售均价22.30元/公斤，环比下降2.58%、同比上涨4.21%；一季度平均22.78元/公斤，同比下降2.52%。

玉米：3月份均价2.53元/公斤，环比持平、同比上涨1.20%；一季度平均2.54元/公斤，同比略涨0.79%。

小麦麸：3月份均价2.21元/公斤，环、同比分别下降0.45%和2.21%；一季度平均2.22元/公斤，同比下跌2.20%。

豆粕：3月份均价4.01元/公斤，环、同比分别下滑0.99%和8.24%；一季度平均4.08元/公斤，同比下跌7.27%。

鱼粉：3月份均价11.52元/公斤，环比略降0.35%、同比上涨10.77%；一季度平均11.56元/公斤，同比上涨9.89%。

育肥猪配合料:3月份均价3.55元/公斤,环比略降0.28%,同比上升1.14%;一季度平均3.56元/公斤,同比略涨0.56%。  
 猪粮比:3月份平均5.05比1,环比下降3.81%、同比上升2.02%;一季度平均5.22比1,同比下降3.69%。  
 猪料比:3月份平均为3.60比1,环比下滑3.49%、同比回升2.27%;一季度平均3.72比1,同比下滑3.63%。  
 肉一猪价差:3月份平均为9.51元/公斤,环比略降0.83%、同比上涨5.32%。一季度平均9.51元/公斤,同比降低2.06%。

2015年3月份,受消费需求低迷的影响,我省肥猪、猪肉价格持续微幅下滑,育肥场户和自繁自养户出栏一头育肥猪分别亏损135元和120元以上。但与去年一季度肥猪价逐月陡降不同的是,今年1~3月我省育肥猪均价呈逐月小幅下跌的态势,并于2月下旬结束长达39周的同比下跌,连续4周高于同比;仔猪价格虽仍低于去年同期,并尚处于2011年9月以来的底部,但自今年开年后便一路上扬,且3月涨势进一步增强,仔猪长期低迷触底反弹之势最先确立。

图1 2014年1月~2015年3月出栏肥猪价格走势图

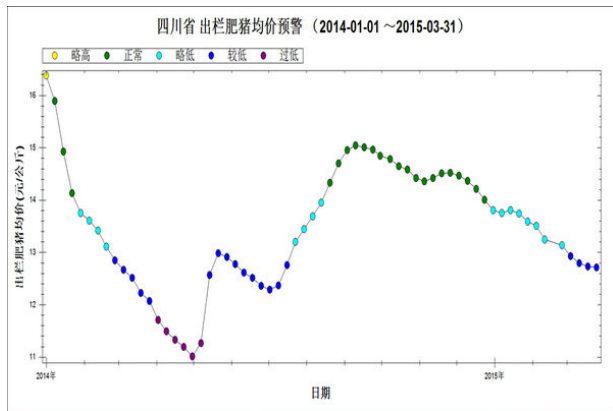


图2 2014年1月~2015年3月猪粮比走势图

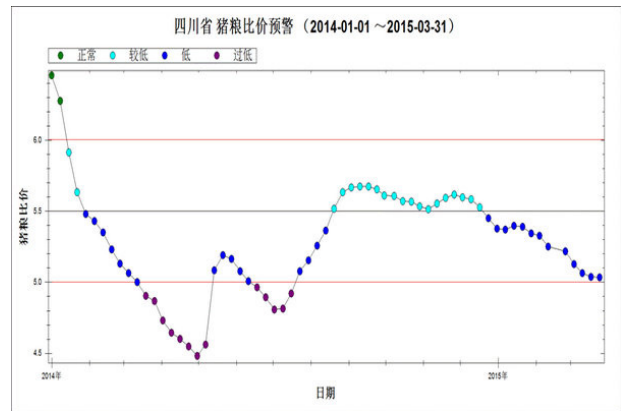


图3 2014年1月~2015年3月仔猪均价走势图

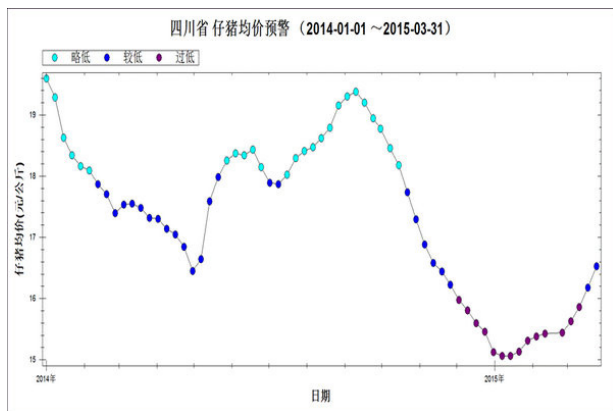


图4 2014年1月~2015年3月后备母猪均价走势图

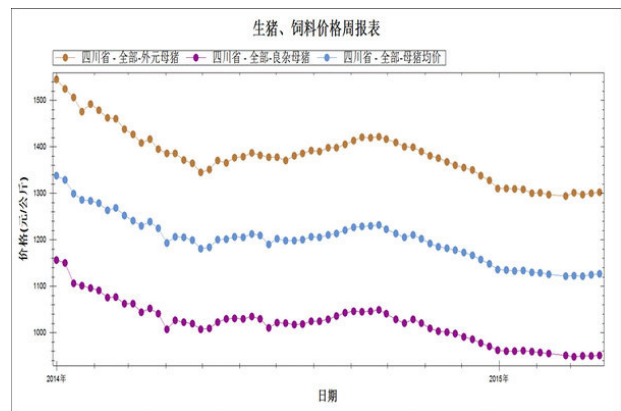




图5 2014年1月~2015年3月猪肉市场零售均价走势图

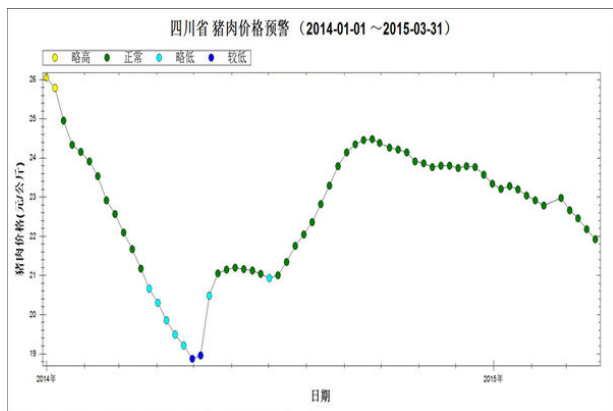
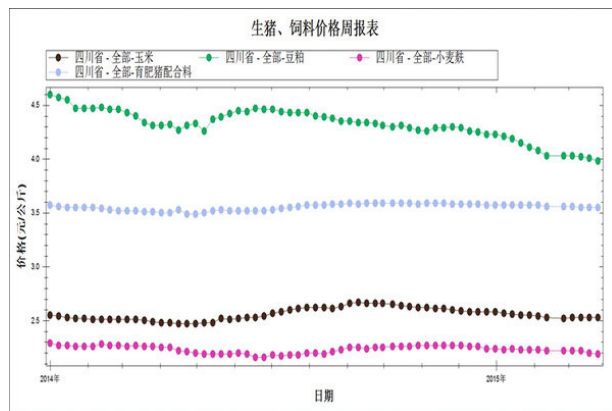


图6 2014年1月~2015年3月饲料原料及育肥猪配合料均价走势图



## 二、监测点生产运行情况

一是生猪存栏连减5个月后首度略增。3月份生猪存栏总量虽然仍低于同比7.40%，但环比增长1.36%。其中：母猪存栏量环比减少1.85%、同比下降17.12%，仔猪和育肥猪存栏量环比分别增长3.31%和1.25%、同比减少1.98%和7.14%。3月末母猪存栏比重为12.55%，处于自2008年监测以来的中高位，但较近几年大幅减少；仔猪存栏比重达到历史第三高位；育肥猪存栏比重则处于相对低位。

一季度，生猪总存栏、母猪存栏、仔猪存栏和育肥猪存栏同比分别减少5.79%、17.15%、2.30%和3.90%。

二是育肥猪出栏量再度回落。3月份监测县育肥猪出栏量环、同比分别减少12.81%和6.56%，一季度育肥猪出栏量较上年第四季度增加2.04%，同比略降0.79%。

经历过元旦、春节两个出栏高峰后，目前我省68个监测县生猪存、出栏量保持相对低位。尤其是规模场除仔猪存栏量环比有所增长外，总存栏、母猪存栏和育肥猪存、出栏环同比都呈下降之势。当前全国猪价已现恢复性上涨，我省猪价也呈企稳之态。

综合1季度生产和价格的走势简析，映证了去年第四季度的预判：一是映证了2015年生猪价格较2014年5月初触底反弹将提前1个月的预判。二是今年1季度生产监测情况映证了价格将提前企稳的预判。在需求进入淡季的时候，生猪价格企稳回升，与母猪、育肥猪存栏量同比较大减少和连续多月价格下降关系密切。不过，是阶段性回抽、还是触底回升，尚待观察数周后才能确立。（以上价格和简析仅供参考）

（本刊编辑部摘编自四川农业厅网站）



铸百年疫苗品质  
集先进生物科技

# 精制高效 猪瘟活疫苗 (细胞源)

Classical Swine Fever Vaccine, Live (Tissue Culture Origin)

批准文号: 兽药生字 (2009) 221011004



- 严格控制外源病毒  
(无PRV, PRRSV, PPV, BVDV, PCV1, PCV2)
- 先进工艺, 特制营养液
- 专为控制“亚临床猪瘟感染”设计制造
- 超高标准: 每头份含RID  $\geq 15000$ 个
- 绝无支原体

无需加量

1 头份轻松搞定!



四川省华派生物制药有限公司  
Sichuan Huapai Bio-pharmaceutical Co., LTD

地址: 四川省简阳市四海食品医药产业园 邮编: 641423

电话: 028-27400432 27282289 传真: 028-27282488

网址: www.huapaisw.com



# 关于举办伪狂犬病活疫苗免疫抗体监测计划及中和抗体监测方法培训的邀请函

## 大型规模养猪场：

伪狂犬病仍是危害养殖场重要疾病之一，疫苗接种是控制该疾病的有效手段，为确保疫苗接种的效果必须进行抗体监测，同时抗体监测也是养殖场制定免疫程序的参考依据。目前不同养殖场采取不同时间和不同接种次数的免疫程序，大多数是根据推荐和 / 或参考其他场的免疫计划。当前，伪狂犬病免疫效果监测普遍采用检测伪狂犬病 gB ELISA 抗体，根据其抗体阳性率来确定保护水平。但我们公司在试验中发现：无母源抗体的仔猪在接种伪狂犬病活疫苗 1 次后，gB ELISA 抗体阳性率和中和抗体水平都持续 28 天左右就开始下降。在这 28 天之内，中和抗体几何平均值始终保持在保护水平下限 (1:12) 左右，但 gB ELISA 抗体阳性率都为 100%。在接种后 42 天时，gB ELISA 抗体阳性率下降到 83.3%，中和抗体几何平均值下降到保护水平 (1:12) 之下。根据中和抗体与 IDEXX gB ELISA 抗体检测方法的 S/N 比较，发现 S/N 值在不大于 0.15 左右时具有保护作用。鉴于目前很多规模猪场发生猪伪狂犬病，怀疑是由于免疫抗体监测所采用的方法不合理，误判了免疫保护效果造成的。因此为确保贵公司 PRV 疫苗的免疫效果和制定合理的免疫程序，特邀贵公司参与 PRV 免疫抗体监测计划及中和抗体测定方法培训。

## 一、时间和地点

时间：初定 2015 年 05 月 ~ 12 月，具体时间根据贵公司免疫计划确定。

地点：贵公司猪场和我公司诊断中心。

## 二、主要内容

### (一) 疫苗接种和采血

1. 贵公司提供免疫计划，我公司根据贵公司提供的免疫计划，确定采血时间，采血时间定在二免前 1 天 (若采用 3 日龄滴鼻和其它接种两次的方法) 和二免后 7 天、14 天、21 天和 28 天。由于要进行中和试验，确保所采集的血样无细菌、霉菌污染，因此采血由贵公司和我公司共同参与，贵公司负责确保试验的连续性，保证纳入试验的猪饲养到试验结束。我公司负责提供一次性注射器、灭菌的 1.5ml 离心管，采样数量 40 ~ 50 头 / 批，每个猪场连续监测 3 批。

### (二) 实验室操作

1. gB ELISA 抗体检测：由贵公司和我公司共同排人参与。
2. 中和抗体测定：由我公司人员操作第一遍，贵公司人员复检一遍。

### 三、参与对象

大型规模养猪场技术总监和检验人员。为保证监测计划具有代表性，拟根据报名参与场的规模、免疫程序和使用不同来源疫苗情况选择 8 ~ 10 家规模猪场。

### 四、费用

gB ELISA 抗体检测试剂盒成本费由贵公司和我公司共同承担，各 50%。中和抗体检测所涉及的一切耗材、细胞、毒种由我公司负责及承担检测费用。贵公司参与人员食宿由贵公司自理。

### 五、其他事项

对规模猪场全面监测感兴趣的场，我公司可以协助进行全面监测和分析，只收取相应的成本费。

### 六、联系方式

联系人：张 莉，18602868066，46035341@qq.com

李金海，13608013161，358884857@qq.com

徐 静，15928406075，461732744@qq.com

公司电话：028-27400432 / 27290977

传 真：028-27282488

附 件：参会回执

四川省华派生物制药有限公司

2015 年 4 月 29 日

### 附件：

#### 关于举办伪狂犬病活疫苗免疫抗体监测计划及中和抗体监测方法培训的邀请函

姓名	单位 / 企业名称	联系方式	贵公司伪狂犬病免疫程序

(此表可复制)

请参会人员于 2015 年 5 月 10 日前将参会回执发四川省华派生物制药有限公司，传真或邮件均可。