

本刊被中国内刊协会评选为 2014 年度全国优秀内刊

华派®  
HUAPAI

2015 年第 8 期 总第 15 期



扫描进入华派生物官网



扫描进入华派生物微信

# 华派生物

(禽兔版)

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

P06/【图片新闻】

## 国家禽流感参考实验室主任陈化兰莅临华派生物指导工作

：四川省华派生物制药有限公司

：福州华康牧业有限公司

：农财宝典、海峡畜牧兽医网、福建畜牧兽医杂志

立：福州畜牧行业协会

福州养猪业协会

泉州养猪行业同业

厦门市养猪协会

武夷山养猪协会

南平养猪合作

永安生猪产销协会

福建隆平农牧集团

南平农业发

福建华康生物技术有限公司

福建隆平种猪开发有限公司

福州华康生物技术有限公司

福州华康生物技术有限公司

有

营

限



华派生物猪支原体肺炎灭活疫苗“支肺通”在福建隆重上市

康大集团领导一行考察华派生物

华派生物新产品亮相第三届四川农博会

破译华派自信密码



# 派力优

鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感(H9亚型)  
三联灭活疫苗 (La Sota株+M41株+WD株)

Newcastle Disease, Infectious Bronchitis and Avian Influenza  
(H9 subtype) Vaccine, Inactivated  
(La Sota Strain+M41 Strain+WD Strain)

- ✓ 优势毒株，交叉保护好
- ✓ 精制浓缩，抗原含量高
- ✓ 注射方便，免疫吸收快
- ✓ 进口佐剂，免疫应激小
- ✓ 超强保护，免疫效果好



# 破译华派自信密码

文 | 向丕元

自信，是发自内心的自我肯定与相信，是对自己能够达到某种目标的乐观与充分估计。自信无论是在人际交往还是工作生活中都非常重要。只有自己相信自己，他人才会相信你，进而帮助你。

美国作家爱默生说：“自信是成功的第一秘诀。”可以说，拥有自信就拥有了无限机会。人的自信是来自内心的，而不是外在的。表面的自信随时可能变迁，只有内在的自信是永恒存在的。自信是人们成长与成才不可缺少的一种重要心理素质。

人的自信除了自身拥有的客观优势和实力支撑外，主要来源于自己认为选择正确而坚定走下去的精神，来源于为自己设定的目标而付诸实践的行动力，来源于自己的勇于表达和实现既定目标的豪迈激情。当然还来源于别人对自己的赏识、评价和鼓励。

而企业自信则主要来自企业领导人对发展方向的正确把握和目标设定，来自企业领导人拥有的各方资源和个人魅力，来自于企业的坚强实力和勇于拼搏的战斗团队，更来自于企业产品品质的不断提升和服务优化。

产品品质是确定企业自信内在的永恒因素。华派生物非常重视产品质量的稳定和提升，对每一个环节都做到细致入微。华派人勇于向全社会郑重承诺所有疫苗绝无外源病毒污染、抗原含量高于国家标准、批次间差异甚微，而华派的产品也毫无疑问地受到了广大客商的一致赞誉和肯定。

青岛康大集团副董事长、康大食品有限公司总经理亲

眼目睹了崭新漂亮的华派生物后感慨坦言：“真是百闻不如一见！华派的硬件是一流的，华派的管理也是很好的。通过对华派产品的使用，无论从产品品质，还是技术服务上都是值得信赖的。我们将继续推用华派产品，希望华派生物继续保持产品质量的稳定，并把猪用、鸡用的优势疫苗产品首推给康大，建立起更广泛的战略合作关系，实现强强联合，以期共同发展，共同壮大。”

上海晶牧生物科技有限公司总经理胡凤祥一行考察华派后，直率表达了来自最基层的声音：“华派疫苗能用！好用！还将继续用！”

江西南昌和健动保中心总经理丁童东一行考察华派生物后直言：“亲眼目睹了华派生物的生产厂区和先进的设施设备，让人感到如雷贯耳的震撼，华派的硬件在国内也算是数一数二的，能够荣幸地参观华派、认识华派、了解华派，真让我们不虚此行，学习了不少东西。希望华派生物注重产品品质，坚持品质取胜，加强彼此间的联合和协作，共同把华派生物打造成为江西动物疫苗的第一品牌。”他们认为，华派生物的硬件是一流的，更拥有优秀管理团队和文化底蕴的支撑，华派生物的发展绝对是行业未来的一匹黑马。

客户对华派疫苗简单、务实、直接的评价，让华派人感到无比欣慰和自信，同时也感到了责任的重大。只有一如既往的品质支撑和良好的客户口碑，华派企业本身才能自信满满。华派人也只有充满自信，华派生物才能走得更加稳健、持久而坚实。

## 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 程安春 王红宁  
崔保安 岳 华 姜北宇  
章振华 张焕容 贾仁勇  
朱德康 高 荣 黄 勇  
杨晓农 黄 伟 王泽洲  
林 华 陈 舜 渔 讯

编委会主任：谢建勇

## 编辑部

主 编：龚文波

副 主 编：方鹏飞

执行主编：何信群

责任编辑：张 莉 李 妍 李金海 郝伟伟  
杜德燕 罗 璇 余 谦

编 审：向丕元

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：Http://www.huapaisw.com/

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

新希望六和股份有限公司

华西希望特驱农牧有限公司

成都丰丰食品有限公司

乐山嘉源农牧发展有限公司

广西春茂集团



2015年第8期 总第15期

内部交流 免费赠阅



扫描进入华派生物官网



扫描进入华派生物微信

## 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。



# 派力健

鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征  
三联灭活疫苗 (La Sota株+M41株+HE02株)

Newcastle Disease, Infectious Bronchitis and  
Egg Drop Syndrome Vaccine, Inactivated  
(Strain La Sota+ Strain M41 + Strain He02)

- ✓ 优选毒株
- ✓ 高效浓缩
- ✓ 彻底灭活
- ✓ 抗原纯化
- ✓ 进口佐剂
- ✓ 国际工艺



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 27282289  
网址: www.huapaisw.com



## P<sub>20</sub> 华派生物猪支原体肺炎灭活疫苗“支肺通”在福建隆重上市

12月11日,由四川省华派生物制药有限公司主办,福州华康牧业有限公司承办的2015华康之友冬季养猪技术论坛暨华派生物(福建)“支肺通”上市产品发布会在福州罗源世纪金源大饭店隆重举行。

### 卷首语 Editoria

01 破译华派自信密码

### 图片新闻 News Pictures

- 06 国家禽流感参考实验室主任陈化兰蒞临华派生物指导工作
- 08 “支肺通”在山东上市“三联四防”受追捧
- 10 江西南昌和健动保中心考察华派生物
- 11 江苏客人到华派生物参观考察
- 12 康大集团领导一行考察华派生物
- 14 华派生物新产品亮相第三届四川农博会
- 16 人人关注消防 共建平安企业  
——华派生物举行消防知识普及专题讲座
- 18 上海晶牧生物科技有限公司组团考察华派生物

### 封面故事 Cover Story

- 20 华派生物猪支原体肺炎灭活疫苗“支肺通”在福建隆重上市

### 技术交流 Technical Exchange

- 24 病毒样颗粒兽用疫苗的研发及应用
- 28 禽网状内皮增生症病毒 RT-PCR 方法的建立
- 31 禽苗检验中血凝试验(HA)与血凝抑制试验(HI)的影响因素
- 33 鸭源巴氏杆菌的分离鉴定

38 一例疑似兔支气管波氏杆菌的诊断报告

42 禽流感遗传变异因素及核酸疫苗概述

### 专家论坛 Expert Forum

45 兔病毒性出血症相关知识问答

### 本刊特稿 Special Topics

48 兽用疫苗的生产原则

### 建言献策 Advice & Suggestions

54 兽用疫苗企业面临着的销售问题——服务体系的建立

### 七彩生活 Colorful Life

56 人生,挺得住才精彩

### 行业资讯 Stockbreeding Information

- 58 2016元旦起,高致病性禽流感疫苗种毒全面启用Re-8
- 59 农业部兽医局负责人就《兽药产品批准文号管理办法》答记者问
- 62 2015年7月中国内地口蹄疫、高致病性禽流感和H7N9流感监测情况



# 派力加

鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征、禽流感（H9亚型）  
四联灭活疫苗（La Sota株+M41株+HSH23株+WD株）

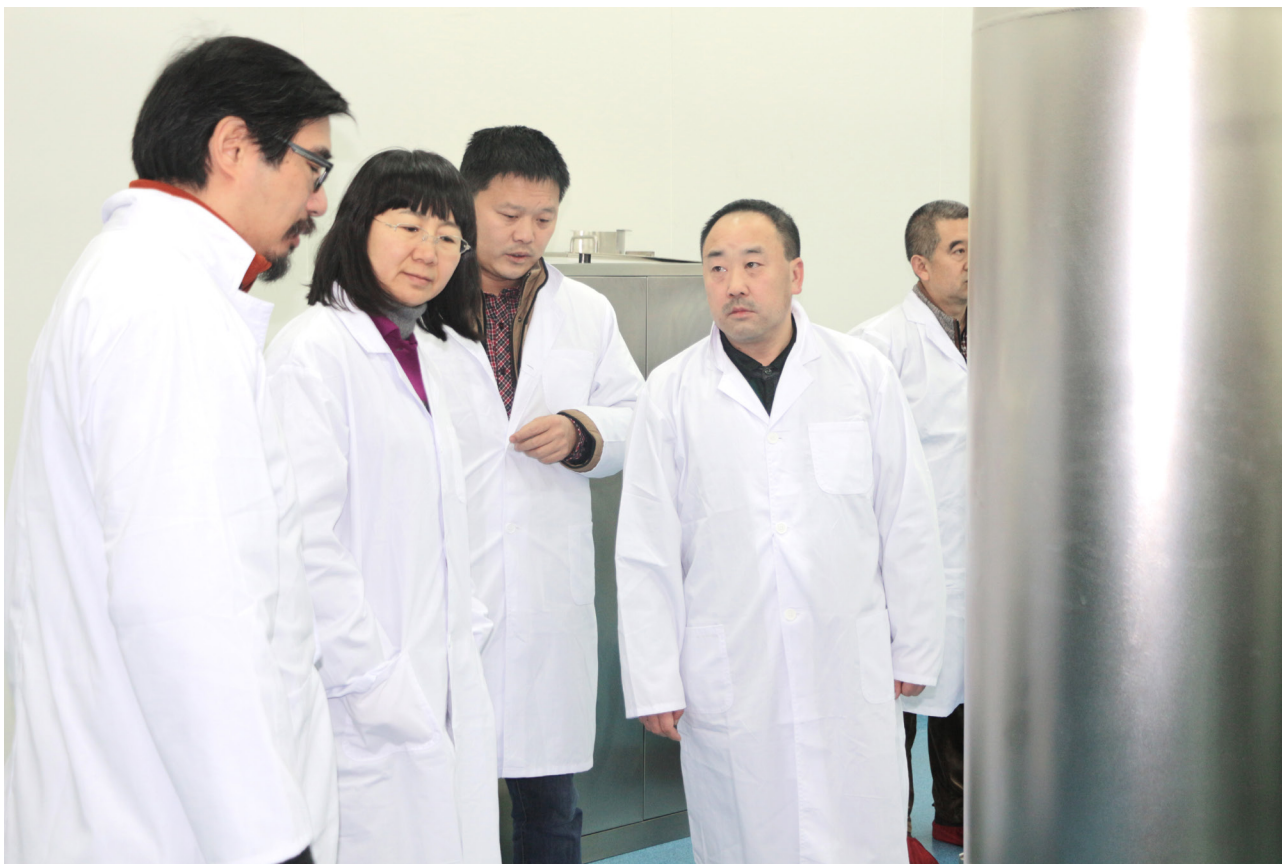
Newcastle Disease, Infectious Bronchitis, Egg Drop Syndrome  
disease and Avian Influenza Vaccine (Strain La Sota +Strain  
M41 +Strain HSH23 +StrainWD )

- ✓ 优选毒株效果好
- ✓ 浓缩抗原免疫强
- ✓ 进口佐剂吸收快
- ✓ 产前一针安全高
- ✓ 省钱方便应激小



# 国家禽流感参考实验室主任陈化兰 莅临华派生物指导工作

文 | 李妍 图 | 蒲泽斌



1 2月17日，联合国教科文组织2016年“世界杰出女科学家成就奖”得主、中国农科院哈尔滨兽医研究所农业部动物流感重点开放实验室主任、国家禽流感参考实验室主任陈化兰研究员莅临华派生物考察指导。精华集团董事长、总裁谢建勇和华派生物总经理龚文波等陪同参观考察。

精华集团董事长谢建勇带领陈主任参观了核酸疫苗生产车间和中央监控大厅。车间负责人向陈主任详细介绍了

核酸疫苗生产线的布局、工艺流程，陈主任边看边饶有兴致地逐一了解特色专用仪器设备的用途，并对工艺技术进行了深入的探讨和交流。

陈主任在交流中指出，华派生物核酸疫苗生产线的现代化程度、软硬件设施、生产规模均处于行业的领先地位。核酸疫苗作为新型基因工程疫苗具有安全、高效、稳定、产量高等显著优点，是行业未来发展的趋势。华派生物把核酸疫苗生产线这个平台打造好，未来不仅能生产各种各





样的核酸疫苗产品，而且将成为其它厂家建设核酸疫苗生产线参照的标准。

目前国内尚未建立核酸疫苗质量标准。陈主任希望华派生物加快前进的步伐，率先树立起核酸疫苗生产与质量控制的标杆，引领我国兽用生物制品行业的发展。

（李妍，博士，研发中心专业从事动物疫苗研发工作）





## “支肺通”在山东上市 “三联四防”受追捧

文 & 图 | 本刊编辑部



2015年10月26日，来自山东省的华派生物战略合作伙伴和规模化猪场客户近300人齐聚潍坊，共同见证华派生物的新产品猪肺炎支原体灭活疫苗——“支肺通”在山东隆重上市。华派生物在国内首次推出的“三联四防”疫苗联合免疫方案受到养殖户热烈欢迎。菏泽宏兴原种猪繁育有限公司和潍坊乔兴农业发展有限公司作为赞助企业参加上述活动。

华派生物副总经理伏刚先生代表公司致辞并宣布“支

肺通”在山东正式上市。华派生物研发中心李妍博士分享了“国内外支原体疫苗的现状和华派支肺通的特点及应用”，华派生物诊断中心主任李金海博士作了“当前圆环病毒疫苗的正确选择和应用及圆环康的特点”的报告，华派生物技术服务经理张莉老师主讲了“华派生物‘三联四防’防控方案及使用中的注意事项”，他们的精彩演讲得到了现场与会者的阵阵掌声。

在下午的交流会上，华派生物特邀山东农业大学的朱





瑞良教授主讲了“猪场疫病防控理念及疫病控制的关键”、菏泽宏兴原种猪繁育有限公司郝有彪董事长分享了“养猪业今后的发展趋势”、山东农科院畜牧兽医研究所陈智博士作了“猪病的诊断”、成都安迪斯生物技术有限公司营销总监廖伟先生介绍了“安迪斯移动实验室监测平台”，专家们丰富的内容和生动的演讲得到了与会者的认可。

会议还举行了大型联合促销订货活动，经销商和规模化猪场客户踊跃下单，超过了会议预期效果。

在答谢晚宴上，精彩的文艺节目和现场抽奖活动同样令人激动，一次又一次把晚宴推向高潮。

华派生物将继续致力于打造中国动物疫苗第一品牌，努力做好产品的研发和质量以及销售和技术服务工作，为养殖事业保驾护航。

# 江西南昌和健动保中心考察华派生物

文 & 图 | 本刊编辑部

1 1月23日，江西南昌和健动保中心总经理丁童东、副总经理黄健平一行考察华派生物。

考察组一行先后在华派生物副总经理蒋林的带领下参观了生产车间中央监控大厅和核酸疫苗生产线。华派生物技术服务总监向丕元向客人们介绍了公司发展的基本情况，特别就公司研发实力、产品质量管控、质量检测、技术服务和企业文化方面做了详细讲解。

随后，宾主双方进行了座谈交流。座谈会上，丁童东总经理首先对和健动保的发展历程作了简单介绍。和健动保始建于2007年，是一家专做动物疫苗的贸易企业，经过近年来和健团队的不懈努力，已经发展成为江西具有较大影响力的动物疫苗供应商，今年的销售额可望达到5000万元。丁总接着说，今天亲眼目睹了华派生物的生产厂区和先进的设施设备，让人感到如雷贯耳的震撼，华派的硬件在国内也算是数一数二的，能够荣幸地参观华派、认识华派、了解华派，真让我们不虚此行，学习了不少东西。丁总最后表露了心声，希望华派生物注重产品品质，坚持品质取胜，加强彼此间的联合和协作，共同把华派生物打造成为江西动物疫苗的第一品牌。

黄健平副总经理表现出直爽的个性，就像一家人一样



进行了直截了当的深入交流。他认为，华派生物的硬件是一流的，拥有优秀的管理团队和文化底蕴支撑，华派生物的发展绝对是未来行业的一匹黑马。他说，我们喜欢上“你”，就会甩开膀子干。他强调，关系是我们与客户合作的基础，但并不是最重要的决定因素，最重要的决定因素是品质，靠品质做才能持久，靠关系做只能一时。他还说，我们的合作必定是强强联合，具有发展的无限可能和想象空间。

双方还就江西市场采取什么模式，如何做实做细市场以及双方合作的具体措施进行了深入交流。

华派生物销售副总王娟、曾谊、谢建忠等参加了接待和交流。



# 江苏客人到华派生物参观考察

文 & 图 | 本刊编辑部



1 2月19日，由南京安牧动物保健品有限公司总经理姚宏带队的江苏省规模化养殖场代表一行9人参观考察了华派生物。

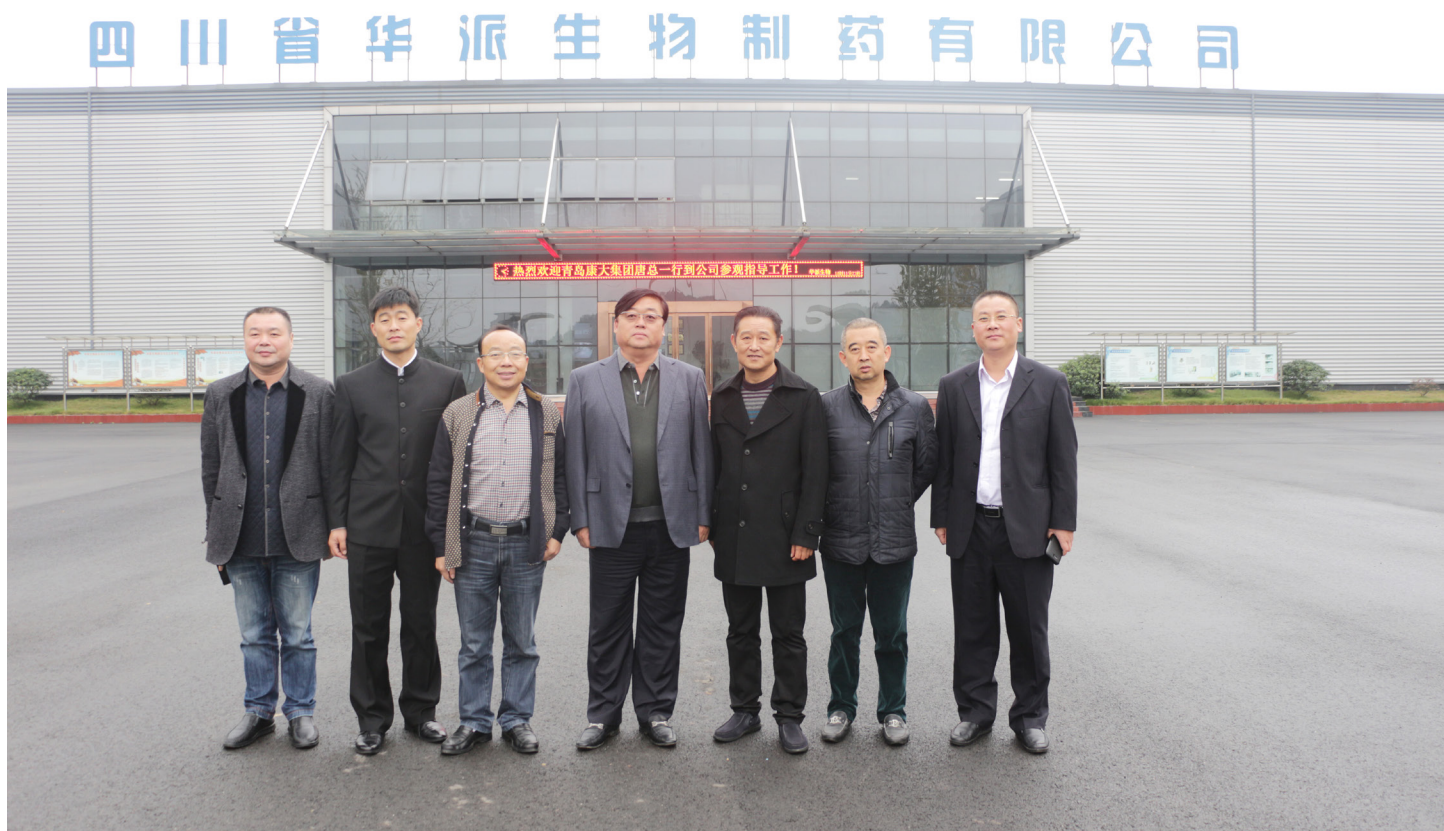
华派生物营销副总监曾谊受公司总经理龚文波委托接待了考察团一行。客人们先后参观了生产主车间的中央监控大厅和国内首条通过 GMP 验收的核酸疫苗生产线，他们对华派生物漂亮的生产厂区和先进的生产设备无不赞不绝口。技术部经理张莉向客人们介绍了公司的研发实力、

质量控制、技术服务等，并就“圆环康”和“支肺通”的产品优势以及“三联四防”免疫新技术做了详细讲解。宾主双方还就猪场仔猪免疫的一些难点和疑点问题进行了广泛深入的交流。

此次前来参观考察的有台资企业“兴泰牧业”公司董事长王志信、“天种牧业”公司技术总监余江海等养殖企业高管，他们都非常看好华派公司的未来，并对华派疫苗产品充满信心。

# 康大集团领导一行考察华派生物

文&图 | 本刊编辑部



1 1月13日，青岛康大集团副董事长、康大食品有限公司总经理唐斌率康大食品有限公司采购经理封旭前来华派生物考察交流。

唐总一行首先在华派生物副总经理蒋林的带领下，参观了生产主车间的监控大厅和核酸疫苗专用生产线。客人们边走边看，不时驻足询问，他们对华派生物的厂区环境，特别是对核酸疫苗生产线表现出浓厚兴趣并给

予充分肯定和赞许。

随后，宾主双方进行了座谈交流，华派生物技术服务总监向丕元向客人们介绍了公司发展的基本情况，特别在公司研发实力、产品质量管控、质量检测、技术服务和企业文化方面向来宾做了详细讲解。

座谈会上，康大集团唐总说，康大集团可以说是国内





养兔行业的佼佼者，尽管我们已经是华派兔用疫苗的使用客户，但到华派生物参观还是第一次，我们亲眼目睹了崭新漂亮的华派，真是百闻不如一见。他认为，华派的硬件是一流的，华派的管理也是很好的。唐总表示，通过对华派产品的使用，无论从产品品质，还是技术服务上都是值得信赖的。我们将继续推用华派产品，希望华派生物继续保持产品质量的稳定，并把猪用、鸡用疫苗的优势产品首推给康大，建立起更广泛的战略合作关系，实现强强联合，

以期共同发展，共同壮大。

座谈会在友好愉快的气氛中结束。华派生物副总经理聂清云、营销副总监李晓军等参加了接待和座谈。

# 华派生物新产品 亮相第三届四川农博会

文 & 图 | 本刊编辑部



1 1月19—23日，华派生物受省科技厅推荐，在成都世纪城国际会展中心参加了四川省人民政府主办的第三届四川农业博览会暨成都国际都市现代农业博览会。

本届农博会以“科技创新引领现代农业发展新常态”为主题，在世纪城新国际会展中心1—9号馆举办，展览面积10万平方米，设置现代农业科技馆、新型农业经营主

体馆、农业合作馆、茶产业合作馆、都市现代农业馆、乡村旅游文化馆、优质农产品体验馆等，这次农博会堪称全国最大规模农业展会。

华派生物参展团队携带了以“圆环康”、“支肺通”、“肝康宁”等新产品和相关宣传资料在“四川现代农业科技馆”亮相。这个展馆是此次农博会的主展厅，展示了一批创新性强、技术水平高、转化应用广、经济价值高、社会效益





好的新品种、新技术、新产品、新成果，充分反映了科技创新支撑引领四川现代农业发展的新成效。

在宽敞明亮的展厅里，华派生物展台格外引人注目，吸引了八方来客。四川卫视记者一进入展厅，我公司展台就吸引了他们的目光，并特意采访了华派生物技术服务总监向丕元。向总对记者介绍说，华派生物这几年的发展非常迅猛，受到了各界人士的广泛关注。公司凭借自身的研

发实力和先进的生产技术，致力于产品与市场的精准对接，致力于为广大养殖客户提供优质、安全、高效的动物疫苗，产品深受用户的喜爱和赞誉，为我国畜牧业的发展作出了巨大贡献。

此次农博会上，华派生物接待参观、咨询人员 800 余人次，发放企业和产品宣传资料 1000 余份，这对华派生物品牌度和产品认知度的提升必将产生积极影响。

# 人人关注消防 共建平安企业

## ——华派生物举行消防知识普及专题讲座

文 | 何信群 图 | 袁勇



为进一步普及全员消防知识，提高全员防控火灾的能力，华派生物在“全国消防日”这一天，

举办了一场消防知识普及专题讲座，特邀“成都明安五进消防知识宣传中心”专职消防宣传服务队的李程教员现场授课，并进行实战演练辅导。公司 200 余人参加了培训。

培训主要从消防知识宣传和逃生自救技巧方面展开。培训中李教员结合实例，通过演讲、播放幻灯片、实物演示等方式，分析了消防事故产生的原因和惨痛教训，还就

火场如何灭火、如何逃生自救等问题进行了生动详细的讲解，并现场示范如何使用灭火器和佩戴防毒面具，针对职工感兴趣的问题进行了互动交流。

李教员强调，人人都要掌握防火灭火知识，提高防灾自救能力，达到“三知”（知道火灾危害、火灾原因、防火措施）、“三会”（会报警、会使用灭火器、会逃生自救），要开展检查消除火灾隐患能力、组织扑救初期火灾能力、组织人员疏散逃生能力和消防宣传教育能力的“四





个能力建设”，构建全社会消防安全的“防火墙”。最后，李教员提醒大家 在日常工作和生活中,不可存在麻痹思想，要警钟长鸣，防患于未然，做好日常防范电器火灾、燃气火灾、车辆火灾等措施，不把隐患留在单位和家里，时刻牢记“人走、灯熄、电停”。

通过生动的消防现场培训、示范和实战演练使得大家对授课内容理解得更加具体和透彻。最后对每位参训人员进行了消防宣传知识问卷调查，进一步加深和巩固了大家

的消防安全知识。培训结束后，职工们纷纷表示此次讲座内容丰富、实用性强，自己的消防知识得到了进一步的普及和提升，今后将更加随时随地重视消防安全，及时排除火灾隐患。要把消防知识、消防安全意识带回家去，推动消防工作社会化进程，营造人人都是“消防员”的社会环境，让火灾安全隐患远离我们。

（作者简介：何信群，硕士，质检研发中心副主任、信息中心主任）

# 上海晶牧生物科技有限公司 组团考察华派生物

文 & 图 | 本刊编辑部



1 1月15日，上海晶牧生物科技有限公司总经理胡凤祥率领所辖区域相关猪场老总和技术人员共12人莅临华派生物参观考察。

考察组一行先后参观了产品展示厅、生产主车间中央监控大厅和核酸疫苗生产线。客人们在听取了技术服务总监向丕元所作“打造中国动物疫苗第一品牌——公司介绍篇”和李妍博士所作“华派支肺通与圆环康的特点及应用”的报告后，宾主双方进行了座谈和交流。向总监和李博士

对客人们提出的相关技术问题作了一一解答。

据悉，上海晶牧生物科技有限公司是一家经行业主管部门GSP验收认证的专业从事动物疫苗经营的贸易公司，年销售额达1000多万元。其总经理胡凤祥在座谈结束时表示，过去听到、看见有关华派生物的宣传不少，今天终于有幸与华派生物零距离接触，总算眼见为实。胡总说，通过今天的参观和交流，使我对华派有了新的认识，一流的厂区和设备、先进的管理、深厚的企业文化无不让我为





之叹服。他还说，前段时间我们在上海地区试用了一些华派猪用疫苗，养猪户反响不错，大家一致认为：华派疫苗能用！好用！还将继续用！上海客户对华派疫苗简单、务实的评价，让我们华派人感到无比欣慰，毕竟这是来自最基层的声音。

华派生物营销副总监李晓军、曾谊等参加了接待和交流。



# Cover Story

## 华派生物猪支原体肺炎灭活疫苗 “支肺通”在福建隆重上市

文&图 | 本刊编辑部

1 2月11日，2015华康之友冬季养猪技术论坛暨华派生物（福建）“支肺通”上市产品发布会在福州罗源世纪金源大饭店隆重举行。发布会由四川省华派生物制药有限公司主办，福州华康牧业有限公司承办。有来自福建省规模猪场的代表约400人出席了此次盛会。

精华集团·华派生物总经理龚文波向大会作了热情洋溢的致辞，并宣布华派生物“支肺通”在福建隆重上市。福建省畜牧兽医学会理事长（原

福建省农业厅副厅长）叶恩发代表福建省行业主管部门致辞并预祝大会圆满成功。此次论坛特邀了国内行业顶尖专家就养猪人关心关注的相关猪病防控问题进行了广泛交流和探讨，引起了与会人员的普遍共鸣和重视。

中国农业大学动物医学院教授、博士生导师、国家生猪产业技术体系岗位专家杨汉春就《猪繁殖与呼吸综合征现状与控制策略》给与会福建养殖户进行了讲解。他认为，蓝耳病的综合防控就是要牢固树立生物安全理念，避免过分依赖或错误使用疫苗。

积极推崇闭群饲养、毒株驯化、多点饲养等方式，结合当今的猪病疫情，建立适合自身猪场的综合防控体系。杨汉春表示，疫苗的选择与使用要科学，因为现在许多蓝耳病的发生是由“高致病性蓝耳病减毒活疫苗”所致，而非大家认为的野毒感染。对于蓝耳病的防控，杨汉春认为，蓝耳病活苗的免疫机理至今仍未得到科学合理的解释，因此，养殖户在使用疫苗时，应针对猪场的具体情况建立策略性防控理念及措施。根据现在的临床和监测分析，蓝耳病病毒在猪场是很难清除掉的，一些猪场在使用减毒活疫苗





后有“转阳”现象，猪蓝耳病已成为许多猪场的“常在性”疾病，在世界范围内，还将伴随养猪业 30-50 年，养殖户没有必要在生产上刻意使用疫苗控制蓝耳病。

杨汉春表示，由于目前多毒株的共存已加大了蓝耳病的控制难度。猪场首先要做到稳定控制，保障生产平稳，而且一定要致力于蓝耳病的净化工作并保持阴性，同时也要学习美国的区域净化方案。杨汉春强调，实施生物安全措施，才是目前养殖户防控蓝耳病科学、有效、经济的方法。

中国兽医药品监察所研究员王琴在会上作了“我国猪瘟免疫检测及综合防控”的报告。







她表示，通过抗体水平的监测来制定合理、有效的免疫程序是提高群体免疫水平的有效技术保障，也是评价疫苗免疫效果的重要指标。猪瘟抗体检测技术已成为猪瘟诊断、血清学调查、流行病学研究和疫苗免疫效果评价的重要手段。她说，虽然猪瘟在我国的免疫率高达90%以上，但在临床上由于种猪带毒、母源抗体的影响、免疫程序不科学、疫苗冷链运输不完善、免疫抑制病的混合感染等因素常常导致免疫失败，要具体问题具体分析。她同时强调，种母猪免疫合格率应达到90-95%，种公猪和后备母猪应达到100%，才能确保种猪免受猪瘟的侵扰。

福建省农业科学院畜牧兽医研究所副所长、福建省生猪产业技术体系岗位专家周伦江博士作了题为《福建省猪病流行特点》的报告。他介绍，通过对受检病样的分析，种猪场猪瘟免疫合格率几乎都是90-95%。近年蓝耳病阳性率也在逐渐走低，目前福建省已控制在10%以内，但他同时也表示，蓝耳病的抗体水平高并不一定说明猪群稳定，检测出的抗体水平高低与猪群的稳定性关系需要做综合分析。

精华集团·华派生物研发中心李妍博士在会上分享了《国内外猪支原体肺炎疫苗的现状和华派“支肺通”的特点及应用》，就如何选择灭活疫

苗进行了详细讲解。她表示，疫苗毒株、抗原含量、灭活剂、佐剂、免疫副反应、保护效果这6个因素是衡量灭活疫苗好坏的重要指标。

本次会议华派生物的产品除了新上市的产品“支肺通”外，猪圆环病毒2型灭活疫苗“圆环康”作为目前国内唯一可稀释猪瘟疫苗的产品，也引起了广大养殖户和经销商的极大关注。李妍博士表示，华派“圆环康”之所以能稀释猪瘟细胞苗，与其使用医用级灭活剂、新一代水质佐剂及先进的纯化浓缩技术有关。

针对华派疫苗产品及使用方法，华派生物技术服务经理张莉还给与会





养殖户推荐了《华派疫苗仔猪“三联四防”免疫方案》。张莉通过临床试验数据详细讲解了“三联四防”的意义、具体方案及操作方法，也对部分猪场客户使用的经验、疫苗使用中存在的问题和误区进行了分享。

据悉，华派疫苗联合免疫方案推出的重要意义在于减少免疫次数和应激、降低劳动强度、提高免疫效果、增加经济效益。这一方案与广大养猪户的想法不谋而合，与会人员倍感兴趣和一致赞同。

最后，福州华康牧业总经理林观谊回顾4年来公司走过的历程。他表示，公司仍将一如既往致力于

为猪的健康养殖和生产提供更加科学的解决方案。他还对一路走来华派生物的支持、客户的信赖、公司团队的精诚团结和辛勤工作一一表示感谢。

当晚，华派生物与华康牧业还举办了“有你、有我、有未来”的主题答谢宴会，精彩的演出、丰盛的宴席、丰富的奖品、热闹的气氛一浪高过一浪，让嘉宾们度过了一个开心难忘之夜。

有朋自远方来，不亦乐乎。短暂的相聚，热烈的交流，增进了了解，增加了友谊，大家共话当今，筑梦未来。与会嘉宾身同感受，大会论坛内

容丰富，华派产品值得信赖，联合免疫实用可控，获益匪浅。

大会得到了福州畜牧业协会、福州养猪业协会、福建丰泽农牧集团、厦门国寿种猪开发有限公司、福州正阳饲料公司等组织和企业单位的大力支持，农财宝典新牧网、海峡畜牧兽医网、福建畜牧兽医杂志社等媒体单位记者参会并宣传。

华派生物技术服务总监向丕元、营销副总监曾谊、李晓军等参加了上述活动，并与参会人员进行了积极、广泛交流。

# 病毒样颗粒兽用疫苗的研发及应用

文 | 于作

病毒样颗粒 (VLPs) 是指由某种病毒的一个或多个结构蛋白自动组装而成的空壳结构, 没有病毒核酸, 不能自主复制, 在形态上与天然病毒粒子相似。VLPs 表面可以重复且高密度的展示自身抗原表位, 更容易被抗原递呈细胞 (APC) 识别、加工和递呈, 从而引发机体产生强有力的体液免疫和细胞免疫应答。此外, 由于 VLPs 不含有任何病毒遗传物质, 因此不具有感染性, 与灭活疫苗和弱毒疫苗相比具有更好的安全性。因此, VLPs 对于多种疾病来说是一种理想的疫苗开发形式。

## 1 VLPs 的免疫原性

通常情况下常规亚单位疫苗的免疫原性比较差, 主要是因为靶蛋白无法正确折叠或无法充分递呈给免疫系统, 而 VLPs 代表了一类特别的亚单位疫苗, 具有较强的免疫原性。VLPs 表面可以重复且高密度的展示自身抗原表位, 比其它类型的亚单位疫苗更容易的被免疫系统识别, 并且

以更为真实的构象被抗原递呈细胞吞噬、加工和递呈, 因此能够刺激机体产生中和抗体。其次, 与其他病毒疫苗相比, VLPs 不含有下调免疫应答的特定病毒蛋白, 不会降低免疫应答反应。VLPs 模仿了病毒粒子的真实结构, 通常就意味着与其它亚单位疫苗相比, 低剂量的抗原就可以有效的刺激产生和全病毒一样的保护反应, 不但可以刺激 B 细胞介导的体液免疫反应, 还可以高效率的刺激 CD4 淋巴细胞增殖反应和 CTL 反应, VLPs 疫苗的这些特征可能是它具有高效率的主要原因。

## 2 VLPs 的免疫机制

VLPs 大小一般在 20 ~ 150 nm 之间, 具有佐剂效应, 即在没有任何佐剂的情况下就可诱导较强的免疫应答, 主要是因为其能够被树突状细胞 (DCs) 以吞噬、渗透及 TLR 受体介导等方式直接摄取, 经过加工处理后可以被 MHC II 类分子递呈, 促进 DCs 细胞的成熟和



迁移，使其细胞表面分子如 CD40、CD80、CD86 及 MHC I 和 II 类分子表达水平明显上调，同时促进 DCs 细胞分泌 IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$  等细胞因子，这个过程对激活固有免疫系统是十分重要的。其次，外源的 VLPs 也能通过 MHC I 类途径进行递呈，从而活化 CD8+ T 细胞，实现 CD8+ 细胞介导的保护性免疫反应，这对于清除细胞内的病原体如病毒等至关重要。VLPs 对于 DCs 细胞的靶向特性对于 VLPs 疫苗来说非常有利，因为 DCs 被认为是连接固有免疫应答和适应性免疫应答的桥梁。另外，VLPs 仍然保留了受体结合区，还可以通过受体进入细胞。

### 3 VLPs 疫苗的研发思路

#### 3.1 目的基因的选择

目的基因的选择要根据病毒 VLPs 的组成特性而定，因为有的病毒 VLPs 由多个衣壳蛋白组成（BTV、AHSV），有的病毒 VLPs 含有囊膜结构（NDV、AIV、RVFV），有的病毒 VLPs 仅由单一的衣壳蛋白组装而成（PPV、PCV2、RHDV）。一般目的基因的选择应包括参与组装 VLPs 的所有病毒蛋白的编码序列。

#### 3.2 插入抗原表位大小的选择

VLPs 除了能够诱导机体产生针对同源病毒的免疫应答反应外，还能够作为载体将外源性抗原表位以融合表达的形式展示在 VLPs 表面，形成嵌合 VLPs 疫苗，诱导机体同时产生针对同源病毒和外源病毒的免疫应答反应。此外，嵌合的外源抗原表位以重复且高密度的形式展示在 VLPs 表面，相比其自身免疫原性而言，能够诱导更强的体液免疫和细胞免疫。然而，嵌合型 VLPs 由于空间构象的位阻效应和兼容性等原因，其所能容纳外源性表位的大小具有一定的限制，因此在构建嵌合 VLPs 疫苗时应根据 VLPs 载体的特性选择插入的抗原表位大小。然而，嵌合型 VLPs 最大的局限性在于颗粒所能容纳的外源性表位较小，不能够插入递呈一些大的抗原表位，并且插入位置非常重要，不能影响到 VLPs 的形成，否则没有意义。

### 3.3 表达系统的选择

目前利用大肠杆菌、酵母、哺乳动物细胞和杆状病毒/昆虫细胞等表达系统制备 VLPs 均有报道，这些表达系统均有各自的优缺点（表 1），要根据靶抗原的生物学特性以及生产条件、成本等情况进行选择。

表 1：不同表达系统的特点

表达系统	优势	劣势
大肠杆菌 ( <i>Escherichia coli</i> )	表达水平高 低成本 简单的培养条件 生产迅速 转化操作简单 蛋白表达可以通过多个参数进行优化 容易形成二硫键	蛋白折叠性较差（包括细菌蛋白） 易形成包涵体 低效的体外折叠可能抵消优势 与真核生物不同密码子体系 很少的翻译后修饰 内毒素
酿酒酵母 ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	表达水平较高 分泌蛋白或细胞表达的良好选择 低成本 简单的培养条件 拥有大多数真核生物的翻译后修饰 有效的蛋白折叠 无内毒素	比毕赤酵母的表达水平低 分泌能力可能低于毕赤酵母 糖基化与哺乳动物细胞不同 过糖基化 N-端糖基链结构具有致敏性
毕赤酵母 ( <i>Pichia pastoris</i> )	表达水平高 低成本 简单的培养条件 生产迅速 分泌蛋白或细胞内表达的良好选择 蛋白分泌高效且允许简单纯化 广泛的翻译后修饰 N-端糖基化能力 优于酿酒酵母 无内毒素	使用甲醇作为诱导剂具有一定危害 糖基化仍然不同于哺乳动物细胞
杆状病毒感染后的昆虫细胞	表达水平高（特别是细胞内蛋白） 较快的生长速度 有效的细胞折叠 广泛的翻译后修饰 糖基化与哺乳动物细胞类似 相对容易地酶促的去糖基化（对于蛋白结构测定有利） 无内毒素	培养基昂贵 需要大量的病毒 亲肽的分泌通路低效 糖基化仍然不同于哺乳动物细胞 病毒感染会导致细胞裂解和潜在的表达蛋白降解
哺乳动物细胞	较高的表达水平 细胞的悬浮培养特性可大规模生产 有效的蛋白折叠 适合分泌蛋白 充分的翻译后修饰 无内毒素	培养基昂贵 复杂的生长条件

目前大部分动物病毒 VLPs 采用杆状病毒 / 昆虫细胞表达系统制备, 主要是因为其表达水平高、能够翻译后修饰加工及构建重组杆状病毒载体较简单。其方法为将线性化的多角体杆状病毒 DNA 与含有抗原基因的重组转移载体共转染 Sf 细胞使其发生同源重组, 产生重组的杆状病毒, 重组杆状病毒在感染的昆虫细胞内大量增殖并表达抗原蛋白, 这些抗原蛋白能在昆虫细胞质内自动组装成 VLPs (图 1)。

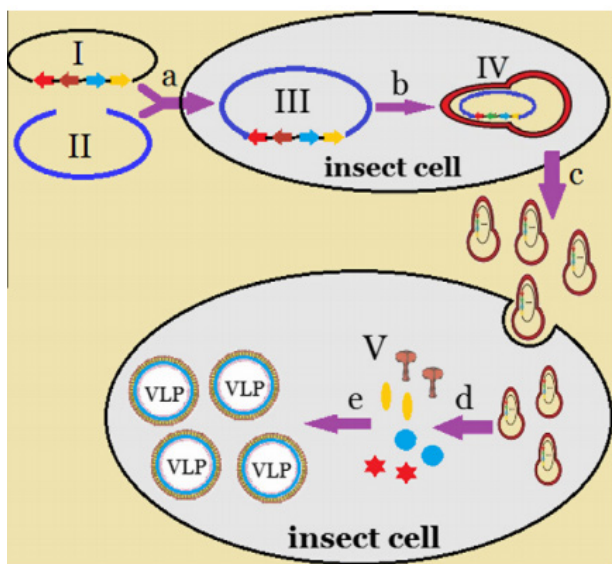


图 1: 杆状病毒 / 昆虫细胞表达系统制备 VLPs 的过程<sup>[1]</sup>

(I) 重组转移载体; (II) 线性化的多角体杆状病毒 DNA;  
(III) 重组杆状病毒 DNA; (IV) 重组杆状病毒; (V) 目的蛋白

### 3.4 VLPs 的纯化

在细胞内表达的病毒蛋白自动组装成 VLPs 后, 经过超声或高压均质破碎释放后, 一般通过蔗糖或氯化铯密度梯度离心法对 VLPs 进行纯化。在此过程中溶液的 pH、离子强度及温度等因素均会影响 VLPs 的稳定性, 因此要对相关参数进行摸索优化。

## 4 VLPs 兽用疫苗

一些动物病毒的衣壳蛋白或囊膜成分在表达过程中能够自动组装形成 VLPs, 如猪细小病毒病 (PPV)、猪圆

环病毒 (PCV)、兔瘟病毒 (RHDV)、口蹄疫病毒 (FMDV)、新城疫病毒 (NDV)、禽流感病毒 (AIV)、裂谷热病毒 (RVFV)、蓝舌病毒 (BTV)、非洲马瘟病毒 (AHSV) 等, 这些 VLPs 与真实的病毒粒子结构相似, 免疫动物后能够诱导机体产生特异性中和抗体, 具有良好的免疫保护效果。

目前使用的 RHDV 灭活疫苗存在着成本高、易散毒和动物福利等缺点, 而 VLPs 疫苗能很好的解决这些问题。RHDV VLPs 是由单一的结构蛋白 VP60 自动组装而成, 与 RHDV 灭活疫苗相比, RHDV VLPs 疫苗具有安全、高效、成本低等优点, 作为候选疫苗具有巨大的应用前景。Boga 等用酿酒酵母表达 VP60 蛋白, 能形成与天然 RHDV 非常相似的 VLPs, 不加佐剂只需一次皮下免疫就能够提供完全保护<sup>[2]</sup>。严维巍等用毕赤酵母表达 VP60 蛋白, 也能形成与天然 RHDV 相似的 VLPs, 并具有血凝性, 可以凝集人的“O”型红细胞<sup>[3]</sup>。Laurent 和刘怀然等用杆状病毒 / 昆虫细胞系统表达 VP60 蛋白, 也能得到与 RHDV 病毒粒子相似的 VLPs, 肌肉接种家兔后能够产生良好的免疫保护效果<sup>[4,5]</sup>。

钱平等构建的 PCV2 (CSFV) VLPs 嵌合疫苗是将猪瘟病毒 B 细胞表位展示到 PCV2 VLPs 上, 免疫小鼠后, 可诱导机体产生特异性体液免疫, 能够同时产生针对 CSFV 和 PCV2 的特异性抗体水平<sup>[6]</sup>。

## 5 VLPs 兽用疫苗在应用中存在的问题

VLPs 保留了天然病毒颗粒的空间构象和诱导中和抗体的抗原表位, 免疫原性强, 具有安全、高效的特点, 在兽用疫苗应用中具有广阔的发展前景。然而, VLPs 疫苗本身也存在一些不足。首先, VLPs 疫苗仅对保守的特异性抗原表位有效, 对变异的抗原不能产生强烈持续的免疫反应。其次, 由于杆状病毒颗粒和 VLPs 大小相近, 用杆状病毒表达系统制备的 VLPs 疫苗存在子代杆状病毒污染, 很难将二者分离。最后, 已存在的 VLPs 抗体和母源抗体能够干扰 VLPs 疫苗的免疫原性, 进而导致免疫失败。





## 6 展望

VLPs 疫苗较传统疫苗具有不可比拟的优势,已在疾病预防和治疗方面显示出了巨大潜力,人用 VLPs 疫苗方面已有乙肝病毒 (HBV) 和人乳头瘤病毒 (HPV) VLPs 疫苗获得了美国 FDA 生产许可执照,而兽用 VLPs 疫苗虽然没有取得执照,但是其发展势头迅猛,到目前为止,已经有多种兽用 VLPs 疫苗在动物模型中取得了成功,相信在不久的将来兽用 VLPs 疫苗就会走向市场,生物制药产业也将迎来一场新的革命。

## 参考文献

[1] Fuxiao Liu, Shengqiang Ge, et al. Virus-like particles: potential veterinary vaccine immunogens. *Research in Veterinary Science*, 2012,93(2): 553-559.

[2] Boga, J. A., et al. A single dose immunization with rabbit haemorrhagic disease virus major cap-

sid protein produced in *Saccharomyces cerevisiae* induces protection. *J Gen Virol*,1997,78(9): 2315-2318.

[3] 严维巍等. 兔出血症病毒衣壳蛋白基因在毕赤酵母中的表达 [J]. *生物工程学报*, 2005,21(1):136-139.

[4] Laurent, S., et al. Recombinant rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in baculovirus self-assembles into viruslike particles and induces protection. *J Virol*, 1997,68, 6794-6798.

[5] 刘怀然等. 兔出血症病毒 VP60 基因在昆虫细胞中形成病毒样颗粒及其特性 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 8:448-454.

[6] 钱平, 李祥敏等. 一种猪圆环病毒 cap 蛋白嵌合猪瘟病毒 B 细胞表位的重组病毒及应用. 2015.

(作者简介: 于作, 博士, 研发中心专业从事兽用生物制品的研究与开发)



# 禽网状内皮增生症病毒 RT-PCR 方法的建立

文 | 曾光志 罗彪 李金海 方鹏飞

**摘要：**为了快速、准确检测禽网状内皮组织增生症病毒 (REV), 根据 GenBank 中登录的 REV 参考毒株 env 基因序列, 设计合成 1 对引物, 通过对反应体系和反应条件的优化, 建立了检测 REV 的一步法 RT-PCR 方法。试验结果表明, 建立的 RT-PCR 方法, 能扩增 REV 病毒 852bp 的特异性片段, 而对其他 6 种禽病病原的扩增结果均为阴性; 敏感性测定结果表明, 该方法可检测出 10 pg 的 REV 模板。该方法的建立为临床样品和禽苗半成品及成品的快速检测奠定了基础。

**关键词：**禽网状内皮组织增生症病毒; RT-PCR; 检测

禽网状内皮组织增生症 (Reticuloendotheliosis, RE) 是由反转录病毒科的网状内皮组织增殖病病毒群 (Reticuloendotheliosis virus group) 引起的鸡、鸭、火鸡和其他禽类的一组肿瘤性综合征。禽网状内皮组织增生症病毒 (REV) 以水平传播和垂直传播的立体感染方式在鸡群和其它鸡群中传播, 其感染不仅能引起肿瘤, 还可引起鸡胸腺、法氏囊等免疫器官萎缩, 使鸡的免疫功能下降, 诱

发鸡群的免疫抑制状态, 导致不同程度的继发、二重感染和多重感染; 并减弱鸡群对疫苗的免疫力; 加剧某些疾病的临床表现等<sup>[1]</sup>, 给养禽业造成巨大的经济损失。

在兽用生物制品生产企业的实际生产中, 疫苗中 REV 的污染和传播也是引起 REV 感染和流行的重要原因<sup>[2]</sup>。因此, 为了确保生物制品安全有效, 任何一种生物制品都不允许存在与产品无关的外源病毒。由于其具有免疫抑制性, 国内近年来出现因疫苗如新城疫疫苗、禽痘弱毒疫苗中污染禽网状内皮组织增生症病毒而导致鸡群免疫失败的案例。这就要求严格控制生产检验原材料质量、加强对菌、毒种和细胞库的质量控制, 进一步完善标准方法, 提高检验水平, 确保产品的纯净。本试验旨在建立检测禽网状内皮组织增生症病毒的一步法 RT-PCR, 用于临床样品和兽用生物制品的快速检测。

## 1 材料与方法

1.1 病毒与病料 禽网状内皮增生病毒-T 株 (CVCC AV108) 购自中国兽医微生物菌种保藏管理中心; H9



亚型禽流感病毒 (AIV H9)、新城疫病毒 (NDV)、鸭肝炎病毒 (DHV)、传染性法氏囊病毒 (IBDV)、减蛋综合征病毒 (EDSV)、禽白血病病毒 (ALV), 由华派生物质检研发中心保存; 病料由四川农业大学禽病研究室惠赠。

1.2 主要试剂 病毒核酸 DNA/RNA 提取试剂盒, 由本公司自主研发。DL 2000 Marker、RT-PCR 一步法反应试剂盒等, 购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 引物设计与合成 根据 GenBank 中登录的 REV 参考株 env 基因序列, 设计合成了 1 对引物, 由英维捷基(上海)贸易有限公司合成, 用 DEPC 水溶解并配成  $10\ \mu\text{M}$  溶液 -  $20^\circ\text{C}$  保存备用。

1.4 病毒核酸提取 将病毒液、病料处理液各  $100\ \mu\text{L}$  置  $1.5\text{mL}$  灭菌离心管中, 加入裂解液  $600\ \mu\text{L}$ , 充分颠倒混匀, 室温静置  $3\sim 5\text{min}$ ; 将液体吸入吸附柱中,  $12000\text{rpm}$  离心  $30\text{s}$ ; 弃去收集管中的液体, 加入  $600\ \mu\text{L}$  洗液,  $12000\text{rpm}$  离心  $30\text{s}$ , 弃去收集管中的液体; 共洗涤 2 次,  $12000\text{rpm}$  空柱离心  $2\text{min}$ , 以去除残留的洗液; 将吸附柱移入新的  $1.5\text{mL}$  离心管中, 打开管盖, 向柱中央加入洗脱液  $50\ \mu\text{L}$ , 室温静置  $1\sim 2\text{min}$ ;  $12000\text{rpm}$  离心  $30\text{s}$ , 获得病毒核酸。

1.5 RT-PCR 方法的建立 以 Primescript one step RT-PCR kit ver.2 试剂盒为基础, 对引物浓度、退火温度和反应体系进行优化。

1.6 敏感性试验 提取 REV 病毒液总 RNA, 用紫外分光光度计测定其含量,  $10\times$  系列稀释后作为模板, 用建立的 RT-PCR 方法扩增。

1.7 特异性试验 分别提取 H9 亚型禽流感病毒 (AIV H9)、新城疫病毒 (NDV)、鸭肝炎病毒 (DHV)、传染性腔上囊病毒 (IBDV)、减蛋综合征病毒 (EDSV)、禽白血病病毒 (ALV) 的总 RNA, 用建立的 RT-PCR 扩增, 评价其特异性。

1.8 临床样品检测 采用建立的 RT-PCR 检测方法, 对 5 份病料进行检测。

## 2 结果及分析

2.1 RT-PCR 反应条件的优化 优化后的 RT-PCR 反应体系为: Enzyme Mix  $1\ \mu\text{L}$ ,  $2\times$  Buffer  $12.5\ \mu\text{L}$ , 上、下游引物 ( $10\ \mu\text{M}$ ) 各  $1\ \mu\text{L}$ , RNase Free dH<sub>2</sub>O  $6.5\ \mu\text{L}$ , RNA 模板  $3\ \mu\text{L}$ ; 反应程序:  $50^\circ\text{C}$   $30\text{min}$ ,  $94^\circ\text{C}$   $2\text{min}$ , 1 个循环;  $94^\circ\text{C}$   $30\text{s}$ 、 $58^\circ\text{C}$   $30\text{s}$ 、 $72^\circ\text{C}$   $40\text{s}$ , 35 个循环;  $72^\circ\text{C}$  延伸  $5\text{min}$ 。

2.2 特异性试验 电泳结果显示, 建立的 RT-PCR 方法对 REV 标准毒株和阳性样品均能扩增出  $852\text{bp}$  的目的片段, 与预期大小一致; 其他病毒均未扩增出目的片段(图 1), 说明本研究建立的 RT-PCR 方法特异性强。

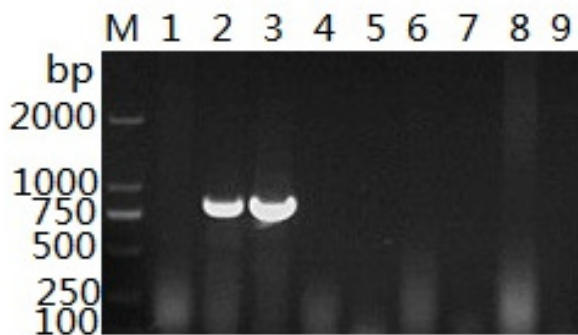


图 1 RT-PCR 的特异性试验

注 M. D2000 Marker; 1, 阴性对照; 2, REV; 3, 病料; 4, ALV; 5, AIV(H9); 6, NDV; 7, IBDV; 8, EDSV; 9, DHV。

2.3 敏感性试验 用紫外分光光度法测定的模板 RNA 质量浓度为  $10\ \mu\text{g/mL}$ 。将提取的 RNA 依次做 10 倍梯度稀释, 每个稀释度取  $3\ \mu\text{L}$  作为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 结果显示 RT-PCR 扩增的敏感性为  $10\text{pg}$  (图 2)。

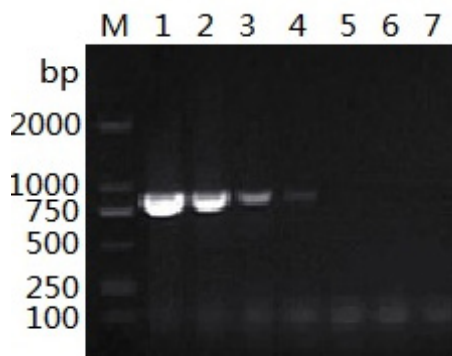


图 2 RT-PCR 的敏感性试验

注 M. D2000 Marker; 1, 10ng; 2, 1ng; 3, 100pg; 4, 10pg; 5, 1pg; 6, 100fg; 7, 阴性对照。

2.4 临床样品的检测 对 5 份四川某鸡场采集的疑似病料，用建立的 RT-PCR 进行检测，结果有 3 份病料能扩增出目的条带。经过 3 次重复操作，结果一致，表明本研究建立的 RT-PCR 方法稳定可靠。

### 3 讨论

禽网状内皮组织增生症 (RE) 是危害养禽业的一种重要的致瘤性和免疫抑制性疾病，侵害机体的免疫系统，使机体的抵抗力下降，从而导致其他疾病的并发感染，造成高淘汰率和高死亡率，使疫病的诊断和防控难度加大。另外，REV 可以整合到马立克病毒 (MDV) 和鸡痘病毒 (Fowlpoxvirus, FPV) 基因组中，从而导致商品化疫苗受到污染<sup>[3]</sup>，并可用做将外源基因插入到鸡和哺乳动物细胞内的表达载体<sup>[4]</sup>。因此加强 REV 的检测技术的研究对预防和控制本病具有重要的现实意义。传统的检测方法，如细胞培养法、免疫荧光 (IFA) 耗时较长；酶联免疫吸附试验 (ELISA)，其敏感性低，检测成本较高。而新型的 RT-PCR 检测技术具有准确、快速、特异性好和敏感性高的特点，可以检测出带毒而未出现临床症状的鸡只，确定早期感染，进行大批量检测。

本试验建立的一步法 RT-PCR 方法，只能扩增出禽

网状内皮组织增生病毒的特异性条带，而对禽的其他常见病原 (AIV H9、NDV、EDSV、DHV、ALV、IBDV) 均无扩增条带，表明其具有良好的特异性；该方法最低可检测出 10pg 的 RNA 量，具有较高敏感性。本研究在临床应用上也取得了良好的效果，整个检测过程只需 3 ~ 4h，是一种快速、准确鉴别 REV 感染的好方法，具有良好的应用前景。REV 属逆转录病毒科的 C 型病毒，含单股 RNA。病毒复制时，其 RNA 逆转录形成该基因组的 DNA 拷贝，而后整合到细胞 DNA 中；病毒复制的最后阶段是病毒粒子从细胞上出芽。对 REV 的检测既有 RT-PCR 方法，也有 PCR 方法的报道，本研究设计的引物只能采用 RT-PCR 方法，采用 PCR 方法扩增效果不理想。

### 参考文献：

- [1] Grimes T M, Bag μ st T J, Dimmock C K. Experimental infection of chickens with an Australian strain of reticuloendotheliosis virus. 1. Clinical, pathological and hematological effects[J]. Avian Pathol, 1979, 8: 57~68.
- [2] 庄金秋、毕研俐、梅建国，等. 应用 PCR 法检测禽源生物制品中禽网状内皮组织增生症病毒 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39 ( 7 ) :36-39.
- [3] C μ i Z, S μ n S, Zhang Z, et al. Simultaneous endemic infections with subgroup J avian leukosis virus and reticuloendotheliosis virus in commercial and local breeds of chickens[J]. Avian Pathol, 2009, 38 ( 6 ) :443-448.
- [4] 吴俊铭、任晓峰、邓小芸，等. 禽网状内皮组织增生症诊断与防制研究进展 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2011, 5:12-13.

( 作者简介：曾光志，硕士，研发中心专业从事兽用生物制品的研究与开发 )



# 禽苗检验中血凝试验（HA）与血凝抑制试验（HI）的影响因素

文 | 郝伟伟

**摘要：**血凝试验（HA）与血凝抑制试验（HI）是实验室常用的检测方法，本文从试验材料、反应温度及结果判定等方面对结果的影响进行分析和讨论，以期对试验操作人员提供帮助，提高试验的准确性。

**关键词：**血凝试验；血凝抑制试验；影响因素

血凝试验（HA）与血凝抑制试验（HI）是利用某些病毒具有凝集红细胞的特性，而且这种特性可以被特异性的抗血清所抑制的原理，用于已知病毒检测血清抗体水平，或已知血清鉴定未知病毒，是一种兽医实验室常用的血清学诊断技术。HA 和 HI 具有特异性好，操作简单，可批量试验，对试验环境要求不高等优点。但在实际操作中，因为是微量试验，易受到各种因素的影响，试验操作必须规范、标准，避免造成检测数据不准确。

我们公司生产鸡新城疫活疫苗，鸡新城疫、传染性支气管炎、禽流感（H9 亚型）三联灭活疫苗，鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征三联灭活疫苗，鸡新城疫、传染性支气管炎、减蛋综合征、禽流感（H9 亚型）四连灭活疫苗，在半成品和成品检验中，都需要用到血凝试验（HA）与血凝抑制试验（HI），HA 及 HI 的结果直接关系到疫苗的质量。现就试验中容易出现的问题进行讨论：

## 1 试验材料

**1.1 血凝板** 一般选用 V 型医用血凝板，图像清晰，

易于判定。实验室采用的是一次性 V 型血凝板，无需清洗，使用之前观察血凝板有无污物、破损、褶皱，以免试验过程中影响结果。

**1.2 移液器及吸头** 使用移液器之前应检查量程是否与移加的液体量相匹配，刻度是否准确，吸头是否牢固；安装吸头时，观察吸头表面是否光洁平滑，形状规则，与移液器上的吸头套密封完好；安装时不可以用反复撞击的方法来达到上紧的目的；加样完成后将量程调制最大值；平时做好移液器的检验校正与保养<sup>[1]</sup>。为保证结果准确性，实验室采用一次性吸头，且尽可能保证每次试验中使用的吸头为同一批次生产。

**1.3 稀释液** 最常用的稀释液是 PBS，要求无菌、无杂质。一般选择 pH7.0~ pH7.2 的稀释液，pH 高于 7.8，凝集的红细胞洗脱会加快；pH 低于 5.8，红细胞易自凝<sup>[2]</sup>。

## 1.4 1% 鸡红细胞的配制、使用及保存

### 1.4.1 1% 鸡红细胞的配制

**1.4.1.1 采血** 不同个体的鸡红细胞对病毒的敏感性不同，一般对新城疫病毒的 HA 效价可能会相差 1~2 个滴度。所以配制鸡红细胞一般要选择 3~4 只成年公鸡采血，因为未成年公鸡的红细胞较脆弱，易溶血。

**1.4.1.2 洗涤** 洗涤和配制鸡红细胞的溶液选择 0.1M PBS，可以更好的保持细胞形态，盐离子浓度过高，细胞失水萎缩；盐离子浓度过低，细胞吸水涨破。洗涤鸡红细胞时，以 1500~2000rpm 转速离心 10min，将血浆和白

细胞充分洗去，最后一次离心为 15min，尽可能将红细胞压实，准确读取红细胞体积<sup>[3]</sup>。

1.4.1.3 配制红细胞 红细胞浓度对 HA 及 HI 结果影响也比较大，一般来说，如果鸡红细胞浓度增大，HA 效价降低，而 HI 效价上升<sup>[4]</sup>。为准确配制 1% 鸡红细胞，先将红细胞以一定倍数稀释，经计算后再吸取配制 1% 鸡红细胞所需体积。

1.4.2 1% 鸡红细胞的保存及使用 配制好的 1% 鸡红细胞可于 4℃ 放置，但时间不宜过久。使用前，观察上层溶液是否发生溶血现象，若上层溶液无色透明或略微红色则可继续使用。使用时先将红细胞轻轻摇匀，取出所需要的量于加样槽中；样品较多时，一定时间后也需轻轻摇动加样槽，以免红细胞沉积，影响结果。同一次试验中，不能更换红细胞，以免因红细胞的不同而影响结果判定。

### 1.5 待测样品的准备

1.5.1 待测抗原 待测抗原要求无菌、新鲜，若为冷冻抗原，应先彻底融化。测定前，应将样品摇匀。测定时，每个样品做 2~3 个平行，保证样品测定精确。

1.5.2 4 单位抗原 4 单位抗原是在测得标准抗原 HA 效价的基础上配制的。标准抗原应小量分装，以免因反复冻融引起效价下降或常规条件下反复开启造成污染。标准抗原存放时间过久，导致血凝价下降，故每次试验时，都应测定抗原 HA 效价，以保证所配 4 单位抗原准确。配制好的 4 单位抗原要经校准后能做 HI 试验。4 单位抗原要现用现配，配好的抗原液室温下放置一般不得超过 4h。进行加样前，要混合均匀。

1.5.3 待测抗体 待检血清溶血时，血清中有游离红细胞，试验中会自行沉积，影响读数效果。待检血清混浊或有絮状沉淀时，说明被细菌污染，会破坏红细胞或血清中抗体蛋白活性，影响其沉淀或凝集，从而导致试验失败<sup>[5]</sup>。

## 2 试验温度

一般选择室温下进行。低于 15℃，结果出现慢，一般

要超过 40min 才能观察结果；低于 4℃，易出血红细胞自凝现象；当试验温度超过 30℃ 时，结果出现较快，15min 即可读数，但时间过长红细胞便会洗脱，无法观察结果<sup>[6]</sup>。

## 3 结果判定

试验过程中应设立阴性及阳性对照，当阴阳性对照结果成立时，方能进行结果判定，否则结果无效。判定结果时，将血凝板倾斜 45°，白色背景下观察，鸡红细胞呈泪滴样流淌，边缘光滑整齐，在 HA 试验中为未凝集，HI 试验中为 100% 凝集抑制；红细胞呈片状凝集，均匀铺于孔底，边缘有时不整齐或皱缩，在 HA 试验中为 100% 凝集，HI 试验中为未抑制。使鸡红细胞 100% 凝集的病毒的最高稀释倍数为病毒的 HA 效价，使 4 单位抗原 100% 抑制的血清的最高稀释倍数为血清的 HI 抗体效价。

### 参考文献：

- [1] 杨萍. 血凝抑制试验 (HI) 影响因素探讨 [J]. 吉林农业, 2011.07:64
- [2] 高琳, 杨文亮. 不同鸡新城疫疫苗免疫效果对比试验 [J]. 现代畜牧兽医, 2013, 11:52-56
- [3] 楚电峰, 刘相娥, 王红, 等. 微量血凝和血凝抑制试验常见问题探究 [J]. 中国动物检疫, 2008, 25(4):43-44
- [4] 陶景莲. 新城疫血凝和血凝抑制试验 (HA/HI) 中红细胞浓度对结果的影响 [J]. 上海畜牧兽医通讯, 2012, 3:51
- [5] 袁王俊, 张维瑞.  $\beta$ -微量法血凝和血凝抑制试验失败的原因分析及解决方法 [J]. 兽医卫生检验, 2004, 4:31
- [6] 蒋作强, 车跃光. 血凝试验和血凝抑制试验的影响因素及应对措施 [J]. 安徽农学通报, 2012, 18(02):24

(作者简介: 郝伟伟, 硕士, 研发中心禽病组成员)



# 鸭源巴氏杆菌的分离鉴定

文 | 谭晓婷 朱冬梅 杜德燕 邹智坤 方鹏飞

**摘要:** 对某养鸭场送检的病死鸭进行病理剖检、细菌分离, 经生化鉴定及荚膜抗原 PCR 分型确定病原为多杀性巴氏杆菌 A 型。将分离菌株的 DNA 序列测序并与 GenBank 已发表的巴氏杆菌的 DNA 序列进行比较, 与巴氏杆菌标准菌株 ATCC 43137 (登录号 CP008918) 的序列同源性高达 100%。将分离菌株人工感染鸭进行动物回归试验, 死亡鸭均分离到与原分离菌株形态特征、培养特性一致的细菌。

**关键词:** 鸭; 巴氏杆菌; 分离鉴定

鸭巴氏杆菌病, 又称鸭霍乱、鸭出血性败血症, 是由多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*, Pm) 引起鸭的一种急性、接触性、败血性传染病, 是目前危害养鸭业的主要疫病之一。本病无明显季节性, 在我国北方地区, 以春、秋季多发, 南方一地区以秋、冬季多发。气温较高、多雨潮湿、天气骤变及饲养管理不当等多种因素, 可以促

使本病的发生和流行。病鸭、带菌鸭以及其他病禽是本病的传播源。30 日龄内雏鸭发病率和死亡率较高, 成年鸭发病率和死亡率较低<sup>[1]</sup>。

目前, 禽霍乱的发生有上升的趋势, 加之该病病程短促, 发病率和死亡率都较高, 给养禽业造成巨大的经济损失。因此, 加强对多杀性巴氏杆菌的研究, 对控制禽霍乱的发生, 保护和促进养鸭业的健康发展具有重要意义。本研究通过病原分离、染色镜检、生化试验、PCR 检测、同源性分析和动物回归试验, 确定从病鸭中分离到 A 型多杀性巴氏杆菌。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料

某鸭场送检的病死鸭, 剖检发现全身浆膜、黏膜出血, 肝表面有针尖大小、密集的灰白色坏死灶, 心脏外膜出血,

肠道出血，病鸭死前拉绿色稀粪。

### 1.2 主要试剂

胰蛋白大豆琼脂 (Tryptic soy agar, TSA) 培养基、胰蛋白大豆肉汤 (Tryptic soy broth, TSB) 培养基购自碧迪医疗器械（上海）有限公司；

麦康凯培养基、革兰氏染液、微量生化鉴定管购自杭州微生物试剂有限公司；

犊牛血清购自杭州四季青生物有限公司；

2× Taq masterMix 购自天根生化科技（北京）有限公司。

### 1.3 主要设备

BIO-RAD PCR 仪、凝胶成像分析仪、COCI 显微镜、恒温隔水式培养箱

### 1.4 细菌的分离纯化

用酒精棉球灼烧肺脏、肝脏表面消毒后，剪取肺脏、肝脏深层组织接种 TSA 固体培养基中。接种划线后，置于 37℃ 隔水式恒温培养箱中培养 16h。进行菌落形态特征观察。在纯化传代培养 16h 的 TSA 培养基中挑优势菌落接种于麦康凯培养基，将不能在麦康凯培养基上生长的细菌进行革兰氏染色镜检。

### 1.5 细菌的染色镜检

挑取上述纯培养菌落涂片，进行革兰氏染色镜检，观

察细菌形态特征。

### 1.6 生化鉴定

将纯化后的细菌按常规方法接种于葡萄糖、蔗糖、果糖、甘露糖、甘露醇、半乳糖、山梨醇、肌醇、麦芽糖、乳糖、鼠李糖、糊精、硝酸盐、硫化氢等生化反应管中，并进行甲基红试验和 VP 试验，置 37℃ 温箱培养 24–48h，定时检查反应结果。

### 1.7 PCR 鉴定

用煮沸法提取 3 个疑似菌基因组 DNA 为模板，参考 KM Town send<sup>[2]</sup> 多重 PCR 引物设计，对该菌株进行荚膜分型。本试验的引物设计见表 1。

表 1 多杀性巴氏杆菌多重 PCR 分型引物

Table 1 The PM primers design of multiplex PCR

Serogrou	Name	Sequence (5'—3')	Amplimer size( bp )
A	CAPA-FWD	TGCCAAAATCGCAGTCAG	1044
	CAPA-REV	TTGCCATCATTGTCAGTG	
B	CAPA-FWD	CATTATCCAAGCTCCACC	760
	CAPA-REV	GCCCGAGAGTTTCAATCC	
D	CAPA-FWD	TTACAAAAGAAAGACTAGGAGCCCC	657
	CAPA-REV	CATCTACCCACTCAACCATATCAG	
E	CAPA-FWD	TCCGCAGAAAATTATTGACTC	511
	CAPA-REV	GCTTGCTGCTTGATTTTGTC	
F	CAPA-FWD	AATCGGAGAACGCAGAAATCAG	851
	CAPA-REV	TTCCGCCGTCAATTACTCTG	





反应总体系为 50  $\mu$ l: 上游引物 1  $\mu$ l, 下游引物 1  $\mu$ l, 模板 2  $\mu$ l, 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 25  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 21  $\mu$ l, 总体积 50  $\mu$ l;

反应程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 5min; 95  $^{\circ}$ C 30s、54 $^{\circ}$ C 30s、72 $^{\circ}$ C 60s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。取 6  $\mu$ l PCR 产物与加到浓度为 1% 的琼脂糖凝胶的点样孔中, 80V 电泳 30min 后置于凝胶成像系统内观察条带。

### 1.8 PCR 产物测序及同源性比对

将 PCR 产物送英维捷基(上海)贸易公司测序。将测序结果与 GenBank 发表的序列进行比较。

### 1.9 动物回归试验

将分离菌株的培养物用 TSB 进行倍比稀释, 用 TSA 进行菌落计数, 取 20 日龄健康肉鸭 12 只, 随机分为 3 组, 分别注射不同个数活菌, 并设 4 只阴性对照鸭。逐日观察发病死亡情况, 剖检观察组织病变, 并进行细菌分离。

## 2 结果

### 2.1 细菌的分离纯化

疑似菌落在 TSA 培养基上均出现灰白色、湿润、光滑的均一菌落; 麦康凯培养基上不生长。经革兰氏染色显示为阴性短杆菌, 成对或散在排列, 瑞氏染色可见明显的两极着色。

### 2.2 细菌的生化鉴定

分离细菌均可分解葡萄糖、蔗糖、半乳糖、山梨醇和甘露醇, 不分解乳糖、麦芽糖、阿拉伯糖, 硝酸盐还原、吲哚和硫化氢阳性, MR、VP 和甲基红为阴性。

### 2.3 PCR 鉴定结果

根据 KM Town send 的研究合成引物。将疑似菌落进行 PCR 鉴定, PCR 产物经 80V、30min 电泳后, 在凝胶成像仪中观察结果。经 PCR 鉴定为巴氏杆菌血清 A 型, 疑似菌落的 PCR 产物出现了与阳性对照一样大小的条带, 均为 1044bp (图 1)。

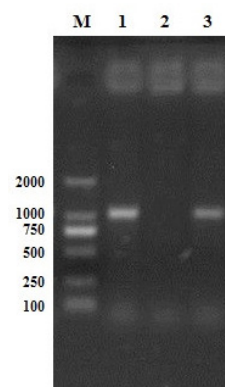


图 1 巴氏杆菌分离株的 PCR 鉴定结果

M: Marker  $\square$ ; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照 3: 分离株

Fig.1 Amplification results of PM PCR

M:Marker  $\square$ ; 1:Positive control; 2:Negative control;3:PCR products of isolates

### 2.4 测序结果及序列分析

分离菌株经 PCR 检测后扩增到一条长度为 1044bp 的片段, 将 PCR 扩增产物进行测序, 测序结果见图 2, 将目的片段序列与 GenBank 已发表的 Pm 序列进行比较, 与巴氏杆菌标准菌株 ATCC 43137 (登录号 CP008918) 的序列同源性高达 100%, 与中国分离的另外两株巴氏杆菌登录号为 KP036621、AF067175 的序列同源性也高达 100%, 结合革兰氏染色两极浓染特征及生化鉴定结果, 确定该菌为多杀性巴氏杆菌。

```

tgcaaaatcgagtcagttattttatcccaatcattaaacggcttagtgaaaaaatcaacaatatt 70
attgaataataaaaaatatattogttattgtttctacatgttgataagaatcatcttacacacgatca 140
aaaaagaataactagcctttctatcataaacatcaagtgatattttactaaataatgatattctatata 210
cacagtgtaataagatttaataaaaactgaggcgctttaaagtaataattactaaataaagtcagttaaatcta 280
aattgtgaatacatctattttgataatcatgacagccttattogttaaaaaatgacagctatgcttatatga 350
aaaaatatgatgtcgccatgaattttctcagcattaaacacatgattggatcgagaaaaatcaatgcgcattcc 420
accattttaaaaagctcattaaaaacttatttttaagtgaacatgacttaaaaaagtatgaattgtgaaggggca 490
tcacaaggtatgttttatgacgtatgcgctagcgcgatgacttctgacgattattaaagaagtcattccatc 560
cctgcagtcgaattgatagtggtgcccagaataataacactgaggatatttgggtcccaatttgcaattttaat 630
cttagaaaaaagaaacggccatgtattttaataaaacatcgaccctgacttatatgcttggggaacgaaaa 700
ttacaatggcaaatgaacaaattgaagtgcaaaaagaggagaaaaatataacctgttaacaagtctatta 770
ttaatagtataactctataaaacacttgcaattttattaaaaataaaatccataatatttcagttataaa 840
taagggtataaaaatgaagaaaattacaattgctggggctggctatgttggtttatccaatgcagttatta 910
ttagctcaacaccacaaatgtgatcttattagatattgatcaaaataaagttgatttaataataataaaa 980
aatcgcccatcagataaagaatacgaagattttcttcaaaaataaactcactgacaaatgatggc 1044

```

图 2 分离株基因序列测序结果

Fig.2 Nucleotide sequence of Pm

## 2.5 动物回归试验结果

活菌平板计数菌液细菌数为  $4.0 \times 10^4$  CFU/mL。将分离菌株的培养物进行倍比稀释，分别以 40、80、120 个菌感染实验鸭，逐日观察发病死亡情况可见：注射 40 个活菌组在感染后 96h 内有 3 只鸭子死亡，注射 80 个活菌组在感染 48h 内全部死亡，注射 120 个活菌组在感染 48h 内全部死亡，对照组全部健活。详见表 2。

表 2 不同稀释度多杀性巴氏杆菌致死雏鸭数

Table 2 Duck caused death by different dilution of

*Pasteurellamultocida*

组别	40 个菌	80 个菌	120 个菌	阴性对照
致死雏鸭比例	3/4	4/4	4/4	0/4

人工感染雏鸭后，雏鸭发病潜伏期较短，主要临床症状表现为精神沉郁、采食量下降、羽毛粗乱，呼吸快，腹泻，呼吸困难，张口摇头等症状，之后各组开始出现死亡，对照组雏鸭未见异常表现。剖检病变均为典型的禽霍乱症状：肝脏有密集黄色或白色的针尖状坏死灶；心内外膜、肺脏、肾脏出血，胸腺、法氏囊轻微出血；脾脏轻微肿胀；肠壁出血，而空白对照组无明显变化。并且从试验鸭肝脏中分离到与原分离菌株染色形态、培养特性完全一致的细菌。



图 3 心外膜有块状出血

Fig.3 Heart coeonae massive hemorrhage



图 4 胆囊肿大；肝脏上有灰白色坏死点

Fig.4 Gallbladder enlargement ; white necrosis point cover densely of liver.



图 5 气管环出血

Fig.5 Trachea bleeding

## 3 讨论

多杀性巴氏杆菌是一种革兰氏阴性、无鞭毛、不运动、不形成芽孢的小球杆菌，单个或成对存在，偶尔可见链状或丝状排列。瑞氏染色时，呈典型的两极浓染，并且新分离的菌株有荚膜。多杀性巴氏杆菌主要以荚膜抗原和菌体抗原区分血清型。根据不同菌株的荚膜抗原抽提物吸附于红细胞上，做间接血凝试验，目前已发现 6 个血清群 (A、B、C、D、E 和 F)。TownsendKM 等研究表明，A、B、D、E、F 菌株的生物合成位点的基因分别是 *hyaD*–*hyaC*、*bcbD*、*dcfF*、*ecbJ*、*fcfD* 等，由此建立了荚膜



分型 PCR。该方法也得到国内研究者的证实。传统的荚膜分型技术比较繁琐,由于体外培养荚膜会消失,所以需要先回归动物,再重新分离细菌制备荚膜抗原进行间接血凝实验;TwonsendKM<sup>[2]</sup>等建立的荚膜 PCR 分型技术已经基本替代了传统方法。

做好饲养管理工作,严格执行定期消毒卫生制度,加强禽群的管理,可以在一定程度上预防禽霍乱的爆发。在本病严重发生地区,应加强环境卫生,坚持定期检疫,早发现早治疗,降低损失。一旦发病,应及早隔离治疗,全面消毒,并应全群进行预防性投药,以控制发病。发现病禽、死禽及时检出,以免被同群禽啄食,扩大传染。病死家禽全部烧毁或深埋,禽舍、场地和用具彻底消毒。多种药物对禽霍乱均有治疗作用,实际疗效一定程度上取决于治疗是否及时和药物是否恰当,长期使用某一种药物会产生抗药性,影响疗效,因此,应结合药敏试验来选择药物。对于产蛋鸭或即将产蛋的鸭,避免使用磺胺药,以免影响产蛋。一般连续用药不应少于 5d,之后可改换另一种药物,防止复发。由于多杀性巴氏杆菌具有复杂的抗原性,因此,

在制备灭活苗时,应选用与流行病原菌同一血清型的菌株作为生产菌株,或用多个血清型菌株制备多价苗以达到较好的免疫效果<sup>[3]</sup>。

#### 参考文献:

[1] 贺英,储岳峰,赵萍,等.多杀性巴氏杆菌的分离和 PCR 鉴定[J].江西农业大学学报,2008,30(4):702-705.

[2] Townsend K M, Boyce J D, Chung J Y, et al. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap loci and development of a multiplex capsular PCR typing system[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(3): 924-929.

[3] 宋晓娜,鸭源巴氏杆菌的分离鉴定及致病性研究[M].山东农业大学,2012.

(作者简介:谭晓婷,硕士,研发中心细菌疫苗组成员)



# 一例疑似兔支气管波氏杆菌的诊断报告

文 | 杜德燕

**摘要:** 今年10月从四川某兔场送来病死兔病料，经病理解剖，用HA试验和PCR方法进行病毒检测，同时通过鉴别培养、PCR检测和序列比对进行细菌鉴定，最终确诊该病料有波氏杆菌和大肠杆菌混合感染，综合剖解病变，其主要致病病原为兔支气管波氏杆菌。

**关键词:** 兔；病毒检测；细菌分离

## 1 流行情况

2015年10月四川某兔场免疫某公司兔瘟疫苗后，个别哺乳母兔鼻腔有大量黄色或淡粉色液体流出，用氧氟沙星等抗生素治疗无效，从发病到死亡时间约4-6小时，全兔场发病率约为5%，病死率为100%。

## 2 剖解病变

将死亡时间较短，肉色较新鲜，乳汁没凝固且较多的哺乳母兔进行剖解。剖解病变如下：心脏外膜有纤维素性渗出；心耳严重出血呈黑色；肺出血严重，严重部位肺出现实变；气管有大量血液蓄积；肝脏肿大伴随明显充血和出血，部分病兔肝脏呈“槟榔肝”；肾脏肿大且红白相间；脾脏有少量出血点；肠系膜淋巴结正常，见图1——图5。

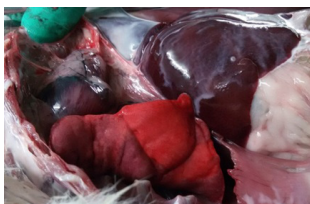


图1 纤维素性渗出、心肝肺出血



图2 肾脏肿大，红白相间



图3 气管出血充血

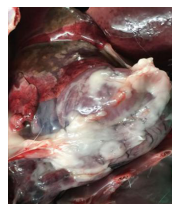


图4 心纤维素性渗出、肺实变

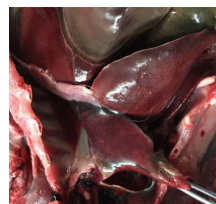


图5 槟榔肝



3 实验室诊断

3.1 兔病毒性出血症检测

3.1.1 血凝效价检测

剪取 2 只的兔子主要病变组织并捣碎，离心取上清，用 PBS 做 2 倍倍比稀释，再加 1% 的“O”型血人红细胞测 HA 血凝价。由血凝试验结果可知，1 号和 3 号兔子的肝的 HA 血凝价均为 2<sup>6</sup>，1 号兔肾的 HA 血凝价为 2<sup>4</sup>，3 号兔肾的 HA 血凝价为 2<sup>5</sup>，两只兔的肺和心的血凝价均为阴性，见表 1 和图 6。

表 1 各组织的 HA 血凝价结果

编号	1 号兔子				3 号兔子			
器官	肝	肺	心	肾	肝	肺	心	肾
HA 血凝价	2 <sup>6</sup>	2 <sup>0</sup>	2 <sup>0</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>6</sup>	2 <sup>0</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>5</sup>

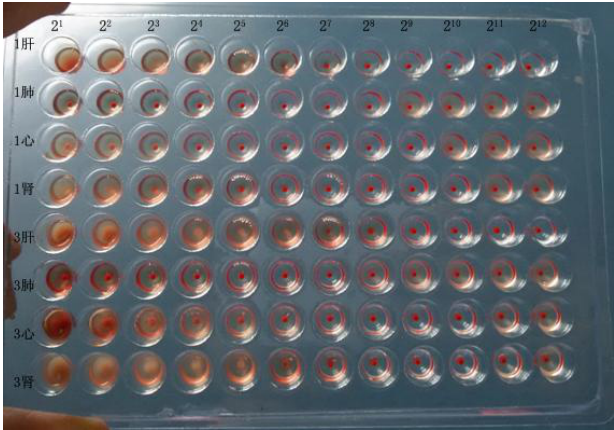


图 6 各组织 HA 血凝价

3.1.2 兔出血症病毒 RT-PCR 检测

对 1 号兔血凝试验为阳性和 3 号兔的病变组织悬液提取总 RNA，用 RT-PCR 进行兔瘟检测，RT-PCR 结果均为阴性，各组织并未检测到兔出血症病毒，见图 7。

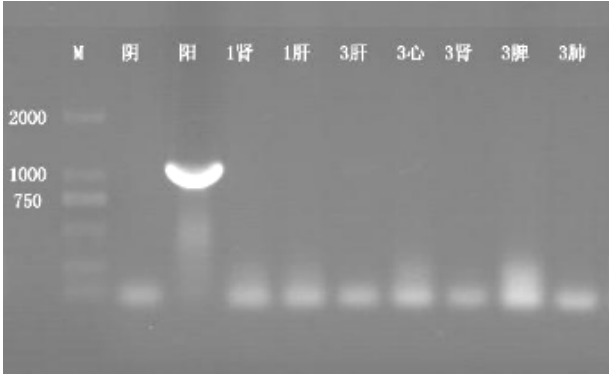


图 7 兔瘟的 RT-PCR 检测结果

3.2 细菌分离

用接种环无菌挑取病变组织，划线接种于营养培养基和鉴别培养基，37℃培养过夜，观察菌落形态并记录培养特性。细菌培养分离结果如下：1号兔子的病变组织在平皿上均有细菌生长，在麦康凯培养基上菌落大小不均一，但均呈红色菌落，见图8-10。



图8 兔肺麦康凯平板



图9 兔肝麦康凯平板



图10 兔心麦康凯平板

对特征典型性菌落进行革兰氏染色镜检，肺部主要是革兰氏阴性长杆菌，也有两极浓染的革兰氏阴性短杆菌；肝脏细菌主要为两极浓染的革兰氏阴性杆菌，见图11-12。

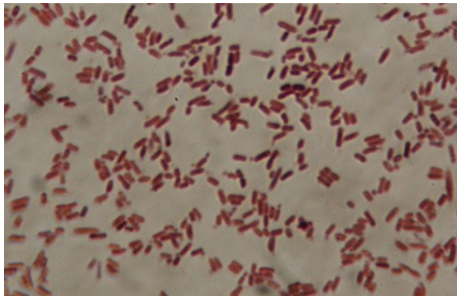


图11 肺部菌落革兰氏染色（10×100）

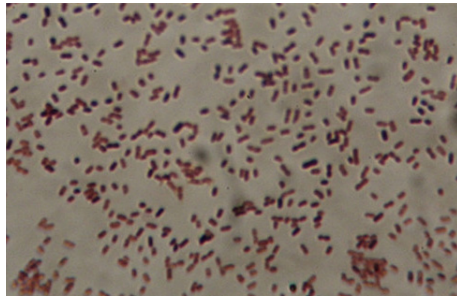


图12. 肝麦康凯上菌落革兰氏染色（10×100）

综合培养特性和镜检特性，革兰氏阴性长杆菌疑似大肠杆菌，革兰氏阴性两极浓染细菌疑似为波氏杆菌。为进一步确诊，用大肠杆菌、波氏杆菌、巴氏杆菌的16SrRNA引物对特征性菌落进行PCR检测，引物序列见表2。

表2 PCR 引物序列

引物名称	引物序列	产物长度
大肠杆菌 16SrRNA	5' -GGGAGGAAGGGAGTAAAGT-3'	687bp
	5' -CTGGCAACAAAGGATAAGG-3'	
波氏杆菌 16SrRNA	5' -GTGGCGAACGGGTGAGTA-3'	1411bp
	5' -CCGATACGGCTACCTTGTTA-3'	
巴氏杆菌 16SrRNA	5' -GGGAATCTGGCTTATGGA-3'	693bp
	5' -CGTTTACAGCGTGGACTA-3'	



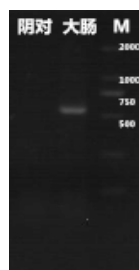


图 13 大肠杆菌的 PCR 检测结果

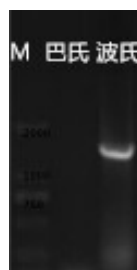


图 14 波氏杆菌的 PCR 检测结果

PCR 检测结果为大肠杆菌阳性，巴氏杆菌阴性，波氏杆菌阳性，PCR 检测结果见图 13、14。由于各引物均是根据 16SrRNA 设计，因此需将 PCR 产物进行测序。测序结果显示大肠杆菌序列与在 GenBank 中公布的登陆号为 KR822241 的大肠杆菌的 16SrRNA 基因序列同源性达 99%，波氏杆菌的序列与在 GenBank 中公布的的登录号为 E06073 的波氏杆菌的 16SrRNA 基因序列同源性达 99%。

#### 4 检测结果

通过综合分析细菌的鉴别培养、镜检、PCR 检测和测序结果，确诊该病料有波氏杆菌和大肠杆菌混合感染，综合剖解病变，其主要致病病原为兔支气管败血波氏杆菌，建议做好兔舍的消毒，用相应疫苗紧急接种，选用敏感抗生素治疗并对发病兔进行隔离。

（作者介绍：杜德燕，硕士，执业兽医师，主要从事动物细菌性疫苗的研发和动物细菌性疾病的诊断工作）



# 禽流感遗传变异因素及核酸疫苗概述

文 | 罗璇

禽流感自第一次被意大利报道以来，目前普遍存在于世界上许多国家和地区。禽流感病毒引起禽类的感染，该病在临床上所表现可能有中轻度的呼吸系统疾病、产蛋下降和严重的致死性疾病，其严重程度取决于病毒的毒力以及被感染禽的种类、日龄和有无其他病原体混合感染等因素。高致病性禽流感（HPAI）多以突然发病和高死亡率为主要特征，常常导致感染鸡群的全群覆没，从而引起人们的极大关注，已被国际兽医局列为 A 类烈性传染病。1997 年香港禽流感病毒首次突破种属障碍直接感染 18 人并造成 6 人死亡，因此认识禽流感病毒具有全新的公共卫生学意义，它不仅对养禽业、并随时有可能对人类和其它哺乳动物构成威胁。

## 一、禽流感病毒的基本特征

### 1.1 禽流感病毒的分类

禽流感的病原体为禽流感病毒，该病毒属于正粘病毒科（Orthomyxoviridae）流感病毒属（influenza virus）。根据流感病毒核蛋白（Nucleoprotein, NP）和

基质蛋白（Matrix protein, M）的不同，将其分为 A、B、C 三型，所有的禽流感病毒都属于型禽流感病毒。

根据流感病毒血凝素（HA）和神经氨酸酶（NA）抗原性的差异，又可将其分为不同的亚型。目前，A 型流感病毒有 15 种特异的 HA 亚型和 9 种特异的 NA 亚型。

国际兽医局根据对能够引起家禽疾病的程度将禽流感病毒分为高致病性禽流感病毒和低致病性禽流感病毒两大类。其中高致病性禽流感病毒主要包括 H5 亚型和 H7 亚型的部分毒株（以 H5N1 和 H7N7 为代表）。

### 1.2 禽流感的遗传变异

#### 1.2.1 抗原性变异

抗原性变异是 A 型流感病毒常见的一种自然变异，在实验室用抗体可筛选到抗原性变异株，变异率最高的是 HA，其次是 NA。这两种抗原的变异可独立发生，有时是一种，有时两个同时发生变异。根据抗原性变异的程度可分为抗原漂移和抗原转变。

（1）抗原漂移（antigene drift）：抗原漂移是由编码 HA、NA 蛋白的基因发生点突变引起的小幅度变异，它



可引起致病性更强病毒的出现。由于聚合酶缺乏校正功能,病毒基因组复制时很容易出错。流感病毒 HA 基因在每个复制周期每个核苷酸的突变率为  $2 \times 10^{-3}$ , 即病毒每复制一代, HA 基因上大约有一个碱基发生变异。

(2) 抗原转变 (antigene shift): 抗原转变是由于变异幅度较大, 导致新的病毒亚型出现。变异及抗原的数量和幅度大小, 直接影响流行的规模。当细胞内发生片段重组, 它有可能产生 256 种遗传学上不同的毒力各异的子代病毒。不同型病毒感染同一宿主有可能引起病毒重组甚至产生新型病毒。

### 1.2.2 致病性变异

#### (1) 条件致死性突变

是指在某种条件下不能增殖, 但在另一种条件下却能增殖并产生子代的病毒变种。这种变异可在一个或几个不同基因组片段上的任何一点发生突变或损伤, 使其生物学特性发生改变。

#### (2) 新宿主适应变种和自然跨宿主变异

禽流感病毒在某种培养系统, 如小鼠中连续传代后, 其增殖滴度和致病性均可逐渐升高, 出现对新宿主的适应性变异或在自然情况下多次跨宿主过程中, 病毒滴度和致病性均可发生改变。

### 1.3 HA 的功能和特性

(1) 识别靶细胞上受体并与受体结合。A 型流感病毒的细胞受体是位于细胞膜上的唾液酸糖脂或唾液酸糖蛋白, 由于不同物种细胞表面蛋白受体结构不同, 因此的结构决定了病毒所能感染的宿主范围。HA 上的受体结合位点呈袋状, 位于头部末端, 每个单体具有一个。构成这一袋状位点的氨基酸很保守。形成受体结合位点表面的氨基酸侧链按一定的规则排列, 使之能与细胞受体直接接触。

(2) 禽流感病毒的毒力取决于 HA 蛋白。流感病毒感染的第一步是靠吸附于细胞膜上的病毒受体, 然后被蛋白酶水解变为 HA1 和 HA2, HA2 氨基端的作用使病毒脱壳。

故 HA 的裂解性是流感病毒毒力的决定因素。通过对许多株禽流感病毒 HA 的核苷酸序列和氨基酸序列的分析、比较, 发现裂解位点的氨基酸序列决定病毒的毒力。高致病性禽流感裂解位点有 6 个连续的碱性氨基酸, 而低致病性禽流感有 2 个碱性氨基酸。而人类流感病毒一般为 1 个碱性氨基酸。

(3) 宿主细胞膜融合活性。HA2 N 端含有与副粘病毒相似的融合序列: N-Gly-Leu-Phe-Ala-Ile-Gly-Phe-Ile-Glu-Gly-Gly。禽流感病毒通过其血凝素头部的受体结合位点与宿主细胞上受体结合后, 发生内吞, 形成吞噬体。吞噬体内的 PH 为 5.0。在此条件下, 机构发生改变, 带有融合序列的 HA2 N 端就裸露出来并与细胞质膜发生融合。病毒基因组从而释放入细胞质, 病毒复制开始。

(4) 诱导保护性中和抗体的产生: 可诱导机体产生中和抗体, 为 AIV 的最重要的保护性抗原。HA 上抗体结合位点至少有 4 个, A-D 甚至还有 E。它不仅可诱导特异性抗体的产生, 而且可刺激机体产生细胞毒性 T 淋巴细胞反应。

(5) 禽流感病毒感染的宿主范围主要取决于宿主与病毒之间的关系, 病毒的不同基因节段在决定病毒致病性方面有不同的作用, 其中起主要作用的是 HA 蛋白。

(6) HA 的变异性很强, 是病毒发生抗原变异的主要原因; 而且各亚型之间无交叉保护性, 每种疫苗只能产生对相同亚型病毒攻击的保护力。此外, HA 蛋白还可与含唾液酸的受体结合, 凝集红细胞。

## 二、禽流感核酸疫苗的研究现状

目前能够用于人的禽流感疫苗主要有灭活疫苗和减毒疫苗, 并且大多经过基因工程的修饰。主要策略是通过各个病毒亚型之间基因片段的重组以增强疫苗的安全性、免疫原性或对不同亚型禽流感病毒的适应性。但此类疫苗仍有一些难以克服的缺点, 如安全性和免疫原性不能兼顾,

免疫原性增强则导致不良反应增大，安全性增强则对免疫次数和免疫佐剂的依赖也增强，以及制备周期长、过程复杂、运输和保存的条件要求高，在有突发疫情出现时很难及时提供足够的疫苗以控制疫情发展。

核酸疫苗其基本原理是将编码抗原蛋白的基因置于适当的真核启动子之下，构建成真核表达载体直接导入动物机体细胞表达。核酸疫苗免疫后，（1）可能进入至体细胞从而由体细胞内部合成抗原蛋白，通过 MHC-Ⅰ 类分子呈递给免疫系统；（2）可能进入至抗原提呈细胞从而直接由被转染的抗原提呈细胞表达；（3）可能由抗原提呈细胞吞噬被转染的体细胞进而将抗原提呈给免疫系统。与传统疫苗相比核酸疫苗的免疫过程与病毒自然感染更相似，可同时诱导体液免疫和相应的细胞免疫，具有安全性好、方便联合免疫、容易大量制备、方便保存与运输等优点。因此有学者认为，想要开发禽流感病毒多价疫苗，核酸疫苗是最具潜力的研究方向。针对高致病性禽流感病毒和低致病性禽流感病毒，均已有研究构建了以、为主要表达抗原的核酸疫苗，并且所构建的核酸疫苗免疫鸡后能保护鸡免受相对应禽流感病毒的攻击。还有研究针对相对较保守的蛋白序列分析出了所谓“多抗原肽”（multiple antigen peptide, MAP），以编码此肽段的 DNA 序列构建核酸疫苗，在配以适当佐剂的情况下免疫动物，能够使之抵抗不同毒株禽流感病毒的攻击。另一种策略是构建核酸疫苗使之能够同时表达更多种类的蛋白，或使用多种核酸疫苗同时免疫动物，这类方法也可以使动物在免疫之后抵抗不同种类的病毒攻击。相对于传统疫苗，核酸疫苗的这些特点以及新技术的发展使得它能更有效地设计，更方便地制备与贮存运输，更好地实现多价性，从而能更快地应对新出现的禽流感病毒。

### 三、禽流感核酸疫苗的免疫途径

不同免疫途径能够对疫苗的免疫过程起到巨大的影响。对于核酸疫苗而言，传统的肌肉注射免疫方法一直存

在免疫效价低的问题，往往需要反复免疫才能使机体产生免疫应答。这是由于经由注射进入体内的核酸只有很少量能够进入细胞得到表达，并且质粒经由何种细胞表达抗原也会对免疫应答的强度有大的影响。有研究表明使用特定材料包被质粒形成微粒用于注射，可以降低质粒的降解并提高质粒转染进入抗原提呈细胞的机会。基因枪和电穿孔法也是近年来新出现的注射方法。基因枪能够将转染目标锁定为特定的细胞如抗原提呈细胞，但要求质粒制备为胶体金颗粒，且单次注射量微小，免疫一次需要多次多点注射。电穿孔法在注射后使用电压促进细胞吸收质粒，电压刺激产生的局部炎症反应也有助于提高免疫应答，这种方法已在许多动物实验中被证明有效。最近又有研究提出了一种新奇的注射方式，即利用高分子薄膜缓释技术接种核酸疫苗，这种方法将质粒植入高分子材料组成的薄膜，薄膜贴到皮肤上后，其上的微型针头能够深入皮肤约 0.5mm，随着薄膜分解质粒逐渐释放进入生物体。

（作者简介：罗璇，硕士，研发中心病毒组成员）







## 兔病毒性出血症相关知识问答

文 | 渔汛

### 1 为什么得过兔瘟的兔场最容易重新暴发此病？

**答：**这是由兔瘟病毒本身的传播特点所决定的。大家知道，病毒，是一类不具备细胞结构，但具有遗传、变异、进化能力，体积非常微小，结构极其简单的微生物，它具有一个明显的特征，那就是病毒有高度的寄生性，完全依赖宿主细胞的能量和代谢系统才能够显示生命活性。通过寄生，获取生命活动所需的物质和能量，离开宿主细胞，它只是一个具有稳定结构的大化学分子，如同没有生命活性的蛋白质一样，可制成蛋白质结晶，是一个非生命体。只有遇到宿主细胞它才会通过吸附、进入、复制、装配、释放子代病毒而显示典型的生命体特征。所以，病毒是介于生物与非生物之间的一种原始的生命体。既然病毒不象细菌在自然界以生命体的形式存在，而是以化学结构式存在，所以也不存在活与死的问题，对病毒的消毒，只有想方设法破坏它的化学结构，使其失去活性。但是，试验证明，一般的消毒液和消毒方法都很难破坏兔瘟病毒的化学结构，

尤其是它耐高温及低温的能力也让人超乎想象。有人做过试验，在  $-8 \sim 20^{\circ}\text{C}$  温度区间可保存 560 天，仍有致病性。反复冻融处理也破坏不了它的化学结构。所以，要想在得过兔瘟的兔场彻底消灭兔瘟病毒是很难很难的。只有通过及时接种疫苗，提高兔子的免疫力，才是预防此病最好的方法。另外，由于兔瘟病毒在外界以化学结构形式存在，又十分不易破坏，因而它常借助于风和尘埃感染过往的人员与车辆，使之成为带毒者，所以兔商往往是传播本病的高危人群。因此，你所在的兔场无论是否得过兔瘟，都不要存在侥幸心理，务必接种兔瘟疫苗进行预防。

### 2 为什么说 40 日龄是兔瘟疫苗接种的最佳时段？

**答：**初生仔兔之所以不得此病，是因为它体内有母源抗体（当然，也有人认为还有其它原因）。仔兔获得母源抗体有两个途径，一是出生前从胎盘获得，二是出生后从母乳中获得。30 日龄前母源抗体水平最高，对仔兔能产生

有效的保护。从 35 日龄以后，母源抗体明显下降，35 日龄时的母源抗体水平已经下降到  $2.5\text{Log}2$ ，此滴度的抗体水平兔子保护率只有 50%。40 日龄时已经完全失去保护力。有实验表明，如果在仔兔 30 日龄前注射兔瘟疫苗，其抗体效价不但不升，反而下降，这是因为打进去的疫苗被母源抗体中和，不但起不到免疫的作用，反而消耗了仔兔体内大量的母源抗体，使仔兔失去了保护。如果在仔兔 35 日龄时免疫，产生的抗体较低，有效的保护时间也只有两周。而在 40 日龄后免疫，抗体峰值明显提高，最高可达  $5.5\text{Log}2$ 。保护时间可达 5 周。50 日龄以后免疫抗体峰值更高，保护时间也更长。但是，仔兔 40 日龄以后已经处在高危阶段，也有过不少 40 日龄发生兔瘟的报导。所以专家认为 40 日龄是接种兔瘟疫苗的最佳阶段，建议初免放在 40 日龄，过 20 天后再加强一次免疫，便可确保防住此病。

### 3 为什么在 60 日龄还要再加强免疫一次？

答：第一次接种疫苗为首免，第二次及以后再接种同一种疫苗叫复免或加强免疫。首免产生抗体的时间一般都较长且滴度低，注射疫苗后 25--30 天才能检测到抗体。抗体维持的时间也较短，最长 3-4 个月。而复免由于兔体内已有免疫记忆细胞的存在，当机体再次受到同一种抗原刺激时，记忆细胞很快激活，抗体会很快产生，且抗体水平及维持时间都较首免要高和长。因此，为确保万无一失，在 60 日龄时再加强一次免疫是非常必要的，而且成年兔一定要每半年免疫一次。

### 4 首免和加强免疫到底打多少兔瘟疫苗最为合适？

答：江苏农科院兔病研究室薛家宾等人曾对这个问题做过专门实验。他们分别选 35、40、45 三种日龄的新西兰兔各 30 只，每个日龄兔随机分为 5 组，对照组注射生理盐水，其余 4 个试验组分别注射 1 毫升、2 毫升、3 毫升、4 毫升 4 种剂量。然后观察免疫后 1-7 周内的抗体水平。

结果表明，注射 2 毫升、3 毫升、4 毫升 3 种剂量的试验组其抗体水平均明显高于注射 1 毫升的试验组。而注射 2 毫升、3 毫升、4 毫升 3 种剂量的抗体水平它们之间没有显著差异，因此，他们认为无论从降低成本还是从方便临床操作上考虑，注射 2 毫升兔瘟疫苗是最合适的。

### 5 如果兔场发生了兔瘟疫情，在给兔群紧急免疫时，疫苗是否要加倍？如果要加倍，加倍多少最为合适？

答：如果发生疫情前你的兔场没有注射过疫苗，证明你的兔群正处在高危区；假如已经打过疫苗仍然出现了疫情，证明你之前的免疫是失败的，你的兔群也是处在高危区。所以，无论你之前打与未打疫苗，只要发生了疫情，你的兔群都是十分危险的，全群紧急接种疫苗是必须的。紧急接种一定要加倍，每只兔打 4 毫升就可以了。千万不要超过这个量了，因为打的过多反而引起不良反应，如免疫麻痹等。

### 6 出现疫情时，打了疫苗后反而死的更多是什么原因？

答：这种情况在全国各地都有发生。原因有很多，但最主要的原因那就是在注射疫苗时没有做到一兔一针，发生了交叉感染。病毒与细菌不同，血行传染在所有传染途径中是最快的。许多兔场由于怕麻烦，打疫苗时一个针头扎到底，结果本是健康的兔子也被人为传染了。这种教训一定要深刻记取，切不可贪图省事。另外，针头在消毒时一定要先用强碱浸泡，然后再高温消毒。消毒一定要彻底，千万不要马虎从事。

### 7 孕兔可不可以注射兔瘟疫苗？

答：孕兔已经是成年兔了，其体内已经有相应的抗体。再打疫苗多属于加强免疫，或者说是巩固免疫。因为无论是疫苗还是药物都会引起母兔的应激反应，对胎儿的发育多少都有些影响，所以，我们主张在孕期尽量避开这些刺激。



## 8 日常免疫时，什么时间注射疫苗最好？

答：最佳的时间是在上午喂完第一遍料之后。以下几种情况最好避开：1、天气突变；2、正值空腹饥饿之时；3、天气炎热；4、兔场正发生其他疫情；5、各种应激反应之时。

## 9 兔瘟疫苗能否与抗菌素同用？

答：从道理上讲，抗菌素对兔瘟疫苗没有任何影响（其它疫苗也一样，因为现在生产的兔瘟疫苗都是灭活疫苗，不是活着的弱毒疫苗，所以抗菌素对这些疫苗的效果不产生直接的影响），但过量的抗菌素可明显抑制免疫细胞的生成，尤其是B淋巴细胞，而B淋巴细胞又恰恰是产生抗体的细胞。所以，在打疫苗时尽量避开与抗菌素同用，等兔子身体状况恢复正常后再打疫苗也不迟。必须切记，非健康状况的兔子不得注射疫苗。

## 10 给兔子注射疫苗后，怎样看出疫苗已经发生了效果？

答：严格的说，除了实验室检验，疫苗是否产生效果用肉眼是观察不出来的，我们只能通过兔子的临床反应大概进行判断。由于兔瘟疫苗是一种外来的生物体，注射之后会产生不适的热源反应，引起兔子食欲下降和体温升高继而出现精神萎靡等等反应。所以，如果注射疫苗后，兔子出现上述情况，应视为疫苗发生了作用。如果没有上述反应，则是不正常现象，应对疫苗进行必要的检验。

## 11 兔场发生疫情，紧急接种疫苗后，大概多长时间能控制疫情？

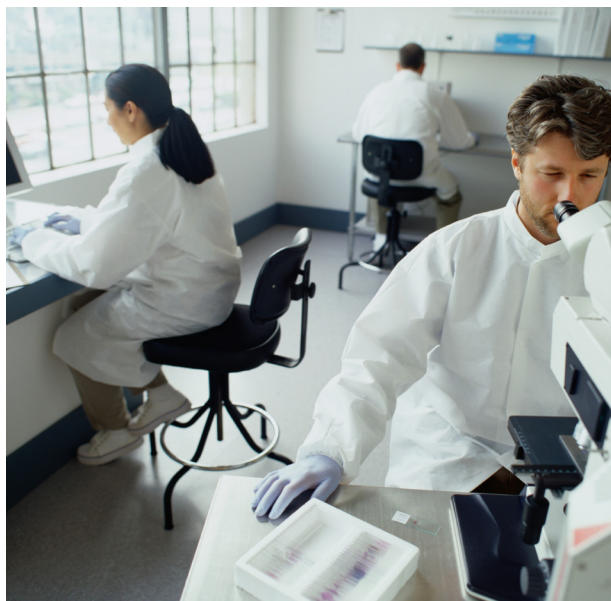
答：疫苗注射到兔子体内后最先发生作用的是刺激机体产生的干扰素。经测定，疫苗注射后4小时就能产生高滴度的内源性干扰素。干扰素（IFN）是一种广谱抗病毒生物活性物质，并不直接杀伤或抑制病毒，主要是通过细胞表面受体作用使细胞产生抗病毒蛋白，从而抑制病毒的复制；同时还可增强自然杀伤细胞（NK细胞）、巨噬细

胞和T淋巴细胞的活力，从而起到免疫调节作用，并增强抗病毒能力。所以，在注射完疫苗后大概4天就可以控制住疫情不再向深度发展，一周后见到显著效果。如果不是这样，说明疫苗没有起到效果，应赶紧采取补救措施重新注射有效的疫苗。

## 12 什么是非典型兔瘟，它的特点是什么？

答：非典型兔瘟又叫慢性兔瘟，是该病发展的一个新动向，特别值得我们广大养殖场（户）注意。近年来该病明显出现了早龄化、非典型性和散发型特点。首先，发病年龄呈多元化趋势，尤其是刚断乳的仔兔也有发生，最早在40日龄左右。其次，临床症状和解剖特点也并非与典型性的兔瘟完全相符，其主要特征是精神沉郁，食欲减退，渐进性死亡，浑身瘫软。剖检特征均表现胸腺肿大出血，其他如肺部和气管出血、肝脏变性、肾脏肿大出血、直肠内有胶冻样黏液和肛门有淡黄色黏液等症，有的具有1~2条症状，有的多条，并不统一。另外，兔瘟很少大面积流行，多为散发型和局部性。

（作者简介：渔汛，中国农科院饲料研究所家兔课题组首席专家）



# Exclusive 本刊特稿

## 兽用疫苗的生产原则

文 | 国际兽医局 译 | 杜德燕 李妍

为了维持动物健康和顺利实施动物健康计划必须要有纯净、安全、有效的疫苗。使用优质的疫苗免疫动物也是控制多种动物疾病的主要手段。在某些情况下，疫苗还是国家控制或根除疾病计划中不可或缺的部分。

本文介绍的兽用疫苗生产的通用要求和程序，与已发布的兽用疫苗生产指导标准一致。各个国家指导生产出纯净、安全、高效疫苗的方法各不相同，这是基于其地方的需求，但基本的标准和生产质控必须一致，才能确保生产出高品质的疫苗保障动物的健康。

由于各种疾病的发病机制和流行病学各不相同，免疫接种作为控制手段的作用和效果也因病而异。有些疫苗可能非常有效，诱导的免疫应答不仅能有效地控制疾病的临床症状，还能预防感染，减少病原增殖或使病原凋亡。而有些疫苗只能预防临床疾病，不能防止感染或防止带毒传播。有些疫苗免疫接种可能完全无效，或者只能降低疾病的严重程度。因此疫苗免疫是否作为控制动物疾病的策略，需要透彻的认识病原的特性、流行病学和现有不同疫苗的特点与效果。随着公众对动物福利的日益关注，使用兽用疫苗控制动物疾病也愈发受到重视。无论在何种情况下，疫苗必须有稳定的良好的质量才能保证它的免疫效果。

所有的药物、疫苗生产都需要进行前期研发，而所有的临床前研究旨在阐明产品的安全性和功效。这些研究都必须根据国际参考标准开展，如临床前研究参考《药品非临床研究质量管理规范》(GLP)，临床试验参考《药物临床试验质量管理规范》(GCP)。

疫苗上市前，需请求主管机关按照当地的产品营销批准条件对其进行评估，符合条件后，方可授予证书或上市许可证。对于生产用原辅料、生产环节、生产过程质量控制、成品上市前的质量控制等均需记录于上市许可证档案中，这些是作为产



品质量，安全性和效力的必检项目。

当主管机构授予疫苗上市许可证后，疫苗产品需在经国家认证的有相关设施设备和生产质控人员的生产基地进行生产。有相关经验的政府监察人员将定期对生产基地进行检查。

质量保证是生产出纯净、安全和高效的疫苗所不可或缺的部分。本文概述了关键的检验点，在章节 1.1.8 中描述了推荐的兽用疫苗生产场地，章节 1.1.9 将介绍疫苗的质量控制。这是一个逐步渐进的过程，可通过风险分析和逐步的完善来遵循这些章节中所描述的全部标准。

## 疫苗的生产

### 1. 质量保证

质量保证是一个广泛的概念，它涵盖了影响产品质量的单个或整体的因素。它是指由主管部门建立的一套控制方法，以保证生产的疫苗符合预期用途的质量，这包括疫苗整个生产过程的控制、改进和检查、质量检验、疫苗有效性 and 安全性检验等方面。这是一个逐步渐进的过程，可通过风险分析和逐步完善来遵守这些章节中所描述的标准。质量保证、药品生产质量管理规范（GMP）、质量风险管理和质量控制这些基本概念都是相互关联的。章节 1.1.9 将做更完整的描述。

### 2. 生产设备

用于疫苗生产的设施设备必须能保证产品在整个生产过程中的纯净性，能保护生产人员的健康，并保证无任何致病性病原的污染。

针对每种疫苗的生产，都应有详尽的生产计划，描述生产过程中的每个环节。该生产计划需包含详细的标准操作规程（SOP），生产工艺流程图及其说明。疫苗厂的每个房间均有独立而明显的功能标识，并应详细说明每个房间的功能和涉及的微生物。设备设施的消毒、监控、其他



防止污染的操作以及生产过程中的失误均应记录在案。当生产新的产品，或换用不同菌毒种，或对生产工艺进行了其他改进时，都应对生产计划进行更新。章节 1.1.8 将更详细的讲解用于疫苗生产的设施要求。

### 3. 生产记录的填写和保存

需建立详细生产工艺、质量标准、一系列的标准操作规程和其他文件材料，以用于对每个产品的生产与检验。

原材料的标准与要求应清晰，并准确地记录在案。

准备兽用疫苗生产所需相关文件的指导大纲是由主管部门所颁布。该文件是用于定义产品，并建立产品特定的规范和标准。它们必须与生产流程及其说明（或生产计划和标准操作规程）一起保存，作为疫苗生产始终坚持的方法，并按此方法生产每批次产品（每个产品一个主批记录）。

生产者应建立记录保存体系以追溯疫苗生产准备的每个环节。保存的记录应注明每个关键生产步骤的日期、操作人姓名、某个环节添加或去掉的成分及其质量，在准备过程中原料质量的多或少。并附上每批产品所进行的所有检验的详细记录。产品的所有相关记录应至少保留至产品标注的有效期 2 年之后，或符合主管部门的要求。章节 1.1.8 中将详细描述生产现场所需文件的相关信息。

### 4. 产品

由于疫苗产品各不相同，生产中涉及大量不同的生产环节及不同的生物制造特性，必须持续地监测每个生产阶段。至关重要的是要遵守已验证的生产工艺和过程质量控制进行产品生产。

生产规程、标准操作规程或其他适当的文件中应描述所有产品所用生产原料的规格和来源。生产规程必须由主管机关批准。所有没经过无菌处理的动物原料都应按照章节 1.1.7 中介绍的无菌无微生物污染的检验方法对外源细菌，真菌，支原体，病毒进行严格检验。生产商应实施相关措施避免动物原料污染传染性海绵状脑病病原。

管理部门不鼓励使用防腐剂，尤其是抗生素来控制生产过程中的杂菌污染，而是提倡使用严格的无菌操作技术，来确保疫苗的纯净性。然而，有时会允许在多剂量容器中使用防腐剂，以保证产品在使用过程中的无菌。管理部门通常限制在产品生产过程中添加任何抗生素，如细胞培养液或其他培养基、胚胎接种物、收获的皮肤或其他组织。有的还禁止在气雾免疫或非肠道途径免疫的疫苗中添加青霉素或链霉素。若在不允许添加抗生素的疫苗中使用了抗生素，应保证其对接种动物无不良影响，不会导致免疫动物发生食品安全问题。

关于疫苗生产所需的原辅材料、细胞库和种子库系统的详细要求将在章节 1.1.8 中描述。

### 5. 工艺验证

任何新产品在获得上市许可之前，生产厂家应在其生产设施上连续生产三批产品，以评估生产工艺的稳定性。该生产过程必须在前期的非临床研究中经证实是安全有效的，并能代表今后的生产工艺。

这三批产品应按照生产规程、质量标准的要求，按标准操作规程或其它生产文件进行生产，这种生产被称之为试生产。有些国家的主管机构要求，试生产的每批生产量应至少为正式投产后平均每批生产量的三分之一。

疫苗制造商应按照生产规程或其他生产文件对试生产的每批产品的纯度、安全性和效力进行检测。所用的标准和检测方法在美国联邦法规第 9 章第 113 部分、欧盟指导 2001/82/EC 的附录、欧洲药典及本册《陆生动物手册》中都有介绍。在授予产品许可证前，连续三批试生产的产品必须有令人满意的检测结果。之后的每批产品也必须按同样的方法检验合格后方可上市销售。

### 6. 稳定性试验

稳定性试验是通过持续稳定的程序来监测产品的稳定性，这对控制疫苗的批间质量是非常重要的。更多信息参



见章节 1.1.9。

主管机关在授权上市许可前应考虑存储条件对产品质量的影响,如光、温度和容器的黏附性等。所有疫苗均在某种程度上对热敏感,其中部分疫苗特别敏感,因此开发能耐受恶劣储藏环境的耐热疫苗已引起越来越多研究者的关注。在本《陆生动物手册》中,耐热(见术语表)被定义为活疫苗放置于热环境中仍能保持一定的感染力,即存储温度高于 8°C 时疫苗能延迟热降解。疫苗仍能在有效期内诱发保护性免疫反应。在后期的定义中耐热也适用于灭活疫苗。

## 7. 疫苗的安全性和有效性检验

所有的实验程序和检验应符合国际标准,如《药品非临床研究质量管理规范》(GLP),参见章节 1.1.9。同样,动物试验应遵守《药物临床试验质量管理规范》(GCP)。疫苗制造商需在申请兽药许可证或销售授权时提交下述检验的结果。

### 7.1 安全性检验

#### 7.1.1. 靶动物安全检验

兽药注册国际协调局颁布了关于活疫苗或灭活疫苗的靶动物安全性检验相关指导意见。(http://www.vichsec.org/guidelines/biologicals/bio-safety/target-animal-safety.html) 活疫苗需进行大剂量免疫安全性检验,以验证是否有残留毒力引起发病症状或病变。而灭活疫苗一般不需要做过量免疫的安全性试验。

若疫苗只需一次免疫或只需做初级免疫,则只要做一次剂量的安全性检验。而对于重复单剂量免疫或需进行二次免疫的疫苗,应以多次免疫剂量的总和进行安全性检验。

疫苗研发阶段的所有关于安全性试验的记录必须归档,作为申报档案的一部分。研发及申报过程中的安全性试验应包括单剂量的安检、活疫苗超剂量安检和某些在实际运用中需多次免疫的疫苗进行重复单剂量的安检。活疫苗还应进行致病力增强检测和下面将提到的对环境

及接触动物的风险评估。疫苗的安全性检验应在每种靶动物上进行。

对于灭活的病毒或细菌疫苗,需先进行安全性检验,证实注射局部或全身无不良反应后方可进行宿主动物的攻毒效力检验。若想进一步明确证实疫苗产品的安全性还可进行临床安全性检验(参见下面的讨论)。生物技术衍生出的疫苗及 rDNA 活疫苗的评价标准请参照下面的讨论。

#### 7.1.2 毒性补充试验

对于活疫苗若有残留毒力或连续体内传代使毒力返强,则可能会由免疫动物传染给接触动物导致疫病发生。兽药注册国际协调局发布的试验指南“GL 41”中阐述了动物疫苗在靶动物中的毒性返强的检测方法。

(http://www.vichsec.org/guidelines/biologicals/bio-safety/target-animal-safety.html)

所有活疫苗必须通过体内传代检验毒力。原则上是将疫苗的种毒免疫靶动物在体内进行连续传代,按自然感染途径进行接种,很有可能导致毒力返强,也可按该疫苗推荐的免疫途径进行接种。从器官或分泌物中分离出疫苗微生物再直接接种至下一代动物体内,如此连续的进行传代,经过至少 4 次传代,使用 5 批动物,再对分离物按照种毒的检验方法进行全面的检测。当致弱的病原不能进行体内连续 5 次传代时,管理机构会考虑是否进行体外传代。通过这样方式的传代,疫苗微生物的毒力应保持在可接受的范围内。

#### 7.1.3 环境的风险评估

每种活疫苗接种后,必须检测其是否会扩散到接触的靶动物和非靶动物,是否会长期存在于环境,以评估疫苗对环境的风险,同时考虑其是否会危及人类健康。有些情况下该评估可与毒力返强试验一起进行。如果是人畜共患病的活疫苗,还需评估它对人类的风险。环境风险评估及其它评估对于通过生物技术或重组 DNA 技术制造的疫苗尤为重要,关于此类产品的更多评估信息会在其他章节进行介绍。

## 7.2 效力检验

### 7.2.1. 实验室效力检验

兽用疫苗的攻毒——效力检验应在健康易感的（通常为最年轻的），疫苗产品推荐免疫的靶动物上进行，并且数据要有统计学意义。数据应该体现出按瓶签推荐的免疫程序免疫后，疫苗在每个靶动物身上的效力，包括疫苗的起始免疫保护和免疫保护持续期。试验应在可控的环境下进行，尽量使用血清阴性的动物。若已有充分的相关试验证明血清学达到某种抗体水平能保护强毒的攻击，此时最好选择血清学方法检测疫苗效力，而不需做攻毒实验，这符合实验动物的代替、减少和优化（以下简称“三R原则”）的原则，值得提倡。

效力检验是指对由生产规程或生产工艺其它文件中指定的种子批生产出来的最终成品进行免疫效果的检测，必须指明在规定的贮藏期内成品的每头份最小抗原剂量。每头份抗原剂量在一定范围内是合格的，而效力检验时成品的每头份抗原剂量必须等于或低于规定的最小免疫剂量。虽然准确的攻毒方法和判定保护的标准会随免疫材料而变化，但仍需要尽量统一。

为进一步确认实验室的效力检验结果或评价无法做攻毒保护实验的疫苗的免疫效力可进行临床效力检验。然而在临床生产上很难获得差异显著的数据来确认疫苗的效力。开展临床检验是很复杂的，必须设立合理的对照来保证数据的有效性。甚至当设计合理时，因存在无法控制的外界因素，也可能无法确定临床效力检验的结果。如存在以下一些问题：攻毒剂量变化差异；非免疫对照组的疫病发生率；其它病原感染导致发生相似的疫病。因此要评价某些疫苗的效力同时需要实验室的效力检验和临床效力检验的数据，且临床效力检验与疫苗效果的监测密切相关。

### 7.2.2 干扰试验

当同一厂家推荐同一动物在两周内免疫两种不同疫苗时，应考虑两种疫苗间的相互干扰。必须对这种联合免疫的安全性和效力进行研究。

### 7.2.3 临床试验（安全检验和效力检验）

#### 7.2.3.1 适用于所有疫苗

所有的兽用疫苗应进行安全性检验，并且若条件允许，在获得新兽药证书前，兽用疫苗应按照《药物临床试验质量管理规范》进行临床效力检验。临床试验是评价疫苗在正常使用情况下的效力，及有无意料之外的应激反应，如产品研发过程中未观察到的动物死亡率。在临床条件下有许多不可控制因素，因此难以获得好的效力检验数据，但临床实验中疫苗安全性检验的数据是可信的。应在不同的地理位置，使用合适数量的易感靶动物进行临床检验。使用的动物应代表疫苗产品推荐的所有年龄段和饲养条件；必须设置未接种疫苗的对照组。应对一个或多个生产批次/系列的疫苗产品进行检验，还需建立临床观察方法和记录方法的相关草案。

#### 7.2.3.2 关于 rDNA 活疫苗的补充要求

批准 rDNA 的活疫苗微生物（第二和第三类）进行临床检验或总经销或兽药注册可能会对人类和动物的环境质量造成显著的影响。在批准授权前，疫苗制造商应对其进行风险评估，以评估该疫苗对人类和动物环境的影响。例如美国所进行的风险评估程序可作为一般风险评估的模式，被其他国家参考采用，欧盟已经采取了类似的模式，它按如下方式进行：

进行风险评估应该包含以下信息：

- 一）拟议行动的目的和要求；
- 二）可参考的替代方案；
- 三）政府机构，组织和咨询人员的名单；
- 四）受影响的环境和潜在的环境后果。

讨论的主题应包括：

- 一）疫苗微生物的特性；
- 二）危及人类健康的风险；
- 三）危害靶动物和非靶动物健康的风险；
- 四）环境中的持续性及疫苗毒力的增强。

若主管部门对重组疫苗进行风险评估后认为其释放入



环境中不会造成显著的影响，应将最终结果发布通知，并告知公众，公众可对评论风险评估和研究结果进行审查。如果没有反驳该结果的实质性意见，主管部门可授权临床试验或授予许可证 / 总经销。

若拟议的行动有生态或公共卫生意义，风险评估的准备和评估结果还应包含一次或多次的公开会议。告知公众该会议的日程安排，并邀请有兴趣的公众与疫苗生产商、政府工作人员一起进行专题报告。这些会议的文字记录应成为公共记录的一部分。

若在风险评估的准备过程中，主管部门推断拟议的行动可能会对环境产生显著的影响，则应准备环境影响报告书（EIS）。该报告书需对因此造成的环境影响提供全面而公平的讨论，并向决策者和公众告知其它无影响或影响最小的合理的替代方案。环境文件包含于美国联邦法规 [CFR] 标题 40 第 1508 部分。欧盟在欧盟指令 2001/18 / EC 的指导下发布了兽用重组活载体疫苗的指导原则，参见

[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/10/WC500004590.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004590.pdf)

## 8. 在线更新产品

生产程序变更前，相应的生产工艺或制造过程的其他文件都应进行变更。制造商应进行内部评审以评估所有生产环节中的变更，执行主管机关也应对其进行审查，再予以批准。

当一个重要的生产工序发生变更时，修订版本中需要补充相应的数据来证实疫苗的纯洁性、安全性、效力、功效和稳定性。国家的监管系统应在国家级实验室对该疫苗成品进行验证检测，修订版应由主管机关对修订后的疫苗产品进行全面的检测。

（本文译自 OIE 《Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2015》，未完待续……）



## 兽用疫苗企业面临着的销售问题——服务体系的建立

文 | 董振波

面对当前的市场格局和竞争，我们不再以“酒香不怕巷子深”为销售而开脱，再好的产品没有好的推广方案不足以应对市场的压力。这个道理其实所有的企业管理者都明白，所以各个企业使出各种手段加大销售，采用促销、让利、电商等等来吸引眼球，但这不足以支撑长远的市场销售和适应企业的未来发展，这只是下策。即使电商会成为未来的销售平台之一，但绝对不是唯一，更何况兽用生物制品现在还只是一个设想而不是已经到了电商的时代。真正的销售方案是公司市场体系和运营模式的建立，这其中的重要因素是服务体系的建立，谁先建立了服务体系谁将引领未来市场。

服务，当前的企业都在提，也在做，但许多客户并不认可，认为当前的服务多数只停留在形式，仅仅做个简单的访问和检测，而检测有的企业还是依托于当地的科研机构，搞得科研机构也呈现商业化色彩，甚至成了部分企业的代言人，这有可能失去公正和信任，将简单的问题复杂化。市场上的现状常常是某些企业和科研机构留给客户的一张冰冷的，看不懂的，只对样品负责的检测报告。这样的服务，其意义何在？

服务是一个体系，是从现场到实验室，再从实验室到现场的一个系统工程，服务不在于证明什么，而在

于能给客户解决什么！某些服务只是局限于证明我没问题，别人都是问题，这本身不是服务，而是赤裸裸的销售手段。

一些人将研究销售方案偏向于销售技巧的培训，热衷于如何忽悠客户，夸大产品的效果，脱离了生物制品的作用范畴，导致客户出了问题就想方设法地推脱责任，因为没有达到预期效果客户会要求索赔。为什么客户要求索赔？即使不是你的问题也会让你索赔！我想是因为当前的市场还没有建立健全完善的服务体系，没有人能帮他解决问题，他没有办法，只好转嫁损失。管理不善找饲料，饲料找不着找兽药，兽药不行就推给疫苗企业。加上某些基层兽医口头承诺包治百病，但缺乏知识和设施，解决不了的问题便信口一说是蓝耳、是圆环等等，尽力推卸责任，因此疫苗企业往往变成了最终的问题焦点。其实客户的要求很简单，只是谁能提供一个解决问题的方案，最终是要解决问题，降低损失。

疫苗企业是严格按照国家行业规范要求实施生产的，技术实力和设备也是行业中最完善的，加之生物制品企业成为问题的焦点，理所应当要担负起服务工作，这个道理很简单，但为什么许多企业不愿意做？因为服务是有成本的，所以现有的服务包含了太多的附加条件。



服务需要大量的人力、物力和资金的投入。当前的情况下服务是不能产生直接效益的，也不可能像国外服务是收费的那样，由专业的服务公司来做。所以我们的服务很苍白，也很单一。就拿检测来说，目前我们有多少企业在市场上建立了实验室和检测机构？有的企业与当地的大专院校、农科院形成松散式的合作，不愿意自己建立，这其中的原因认为自己的检测没有权威性和可信性，客户不认可，这样的问题也确实存在。但为什么会有这样的问题呢？其主要原因是提供的检测不是为了指导生产，而是划清责任。服务体系不光是实验室检测报告，而要通过实验室检测、数据分析、比对，制定解决方案，最终解决客户实际问题。见过很多次客户给我拿出检测报告，一看我头都大了，可想而知客户的心理感受。如猪瘟抗体出水平低，蓝耳阳性，伪狂犬也都感染等等，没有任何的分析和指导。很少有人针对防控方案去调整来解决问题，而成了竞争对手进入的机会，更有甚者视乎对问题幸灾乐祸，而不是去帮客户解决问题，而是觉得更换自己的疫苗机会来了。但所有的疫苗换一遍，其结果呢？问题并没有得到解决。疫苗不是不能更换，疫苗是可以更换的，但更换的前提一定不是在这个节点找突破口。

只有建立完善的服务体系，为客户提供科学有效的管理和防控方案，才能为养殖企业提供切实有效的帮助。我们的服务包含了基础科学、

应用科学和实践经验三方面的知识，但很多从业人员往往不具备。搞研发的不懂养猪，养猪的不懂检测，缺少综合性的分析，所以很难从根本上解决问题。再有一些猪场的技术人员不去学习，凭经验，墨守陈规，头痛医头脚痛医脚。一些实验室的人不懂养猪，只是通过检测的结果不负责任地下结论，养殖企业迷信检测结果，殊不知检测结果只是表象的一个佐证。抗体水平高不一定表明猪场没问题，抗体水平不好也不一定表明猪场就有问题。

所以真正的服务体系的建立是如何地做好猪场与实验室的衔接，彻底帮助养殖企业真正地解决问题。仅仅运用各种营销手段的销售而没有服务体系支撑的前提下，这样的企业必将最终退出市场，当前的成绩将是昙花一现。

好多人认为畜牧行业的电商时代到来了，我们来看看家电行业的电商，无论你在任何地方买的产品都可享受厂家的售后服务。电商的目的是去掉了高额的房租成本，而不是降低了服务质量，更不是减少人员。但是我們来看看畜牧行业，在没有服务体系下就要走电商模式，出发点是降低运营成本，减少人员开销，不是给客户实惠而是降低服务质量。可以预测畜牧行业的电商会来的，但不是现在。河南是最早做畜牧行业电商的，我认为电话营销就是最初的电商，当初生意很好，一个靠打电话的女孩一个月就可以拿一两万元的工资，试问现在还

有多少人会买电话营销的产品？可能你看到 0371 开头的电话你都不想接。默沙东已经向京东提出上诉，并已经声明京东上的所有默沙东产品均是假货。降低客户成本的最好办法就是改变运营模式，把原来的层层代理改为扁平化销售，减少中间环节从而降低养殖企业的使用成本。再有就是提高生产技术，降低生产成本。

我们应该清醒地认识到，兽用疫苗企业只有在服务上加大投入，为客户解决实际问题，这才是出路，也才能树立企业的形象和品牌。国货不是质量差，而是服务体系没有跟上，仅仅不停地用销售手段来扩大市场，无序的竞争其实并没有给我们自身带来更大的效益，而是降低了我们的形象。

四川省华派生物制药有限公司是一个成长性企业，从建厂到生产以及销售、服务，一切都是高起点，高要求。公司的研发实力、品质管控都让人震撼和信服。我们作为一线的销售人员，一定要为客户做好服务，千方百计为客户提供解决问题的方案。这个过程中会遇到许多困难和问题，需要大家的努力和认可，更需要大家给以指导、帮助和支持。

（作者简介：董振波，大学本科，河南省区销售经理）





文 | 职业经理人网

生活本身就充满了坎坷，  
生命本来就充满了磨难，  
一帆风顺的人生根本就不会存在，  
那些期望生活一直顺风顺水的人不是疯子就是傻子。

## 人生，挺得住才精彩

清代的大学问家、大政治家、大军事家曾国藩有一句名言：打脱牙和血吞。大概的意思就是在生活面前，在困难和挫折面前要能挺得住，站直了，别趴下，既要能忍又要能挺，惟有如此，方可成就大业。曾国藩就是凭着这种信念和坚忍的毅力一路走来，从穷山僻壤的乡村走到了京城，从一个翰林院学士做到了统帅三军的钦差大臣和太子太保，受万人景仰和爱戴，为家族争来了诸多的荣耀，封侯封爵，被许多人学习和追随。毛泽东也曾说：独服文正公。可见其在近现代史的地位是多么的重要。

综观曾国藩的奋斗史和发家史，也可以看出一些不和谐的音符，曾国藩也曾因兵败几次都想自杀；也曾因压力过大，跑回湖南老家再也不愿出来；也曾因心力憔悴，几次都想放弃已几欲成功的事业，但是他最终还是凭着自己立下的这个座右铭而坚强地挺过来了，并不懈奋斗，取得了最后的胜利，成就了书写史册的霸业，留下了永远传诵的史话。

仔细思考，也的确是这个样子，看看那些成功人士，那些被称为什么家的人，哪一个人的背后没有一番艰苦奋斗的血泪史？哪一个不是能忍能挺才有了今天的成就？成功的道路各不相同，但是成功的规律都是相同的，一帆风顺的爆发户时代早已成了历史，现代的生存和成功需要考验的是我们的意志品质，更需要考验我们打脱牙和血吞的精神和气概！

再回过头来看看我们自己，看看我们周边的人，有多少人在唉声叹气，踟躇不前，又有多少人因为压力过大而失去了本能够属于自己的成就和荣誉？我们或许会因为生命坎坷而苦恼；或许会因为生活困难而退缩；更或许会因为前景暗淡而惆怅，但是太阳依然会升起，路还是要走下去，生命还要延续。

生活本身就充满了坎坷，生命本来就充满了磨难，一帆风顺的人生根本就不会存在，那些期望生活一直顺风顺水的人不是疯子就是傻子。正是因为有了困难，我们才有了超越困难的勇气，才会不断克服困难，解决问题，也才从中感受到生活给予我们的无限乐趣。如果真没有了困难和磨难，真的什么事情都可以毫不费力，什么东西都触手可及的话，那么这个世界还会有创造吗？还会有新的事物出现吗？所以在一定意义上，顺利代表着妥协和倒退！



困难面前人的表现是各不相同的，“打脱牙和血吞”代表的是一种积极的人生态度，它包含着卧薪尝胆的忍耐和不屈不挠的奋斗精神，忍耐不是懦弱，更不是自甘堕落，而是在遇到困难的时候，多一些努力，多一些思考，在努力中等待时机，在时机到来的时候有能力抓住，这才是“打脱牙和血吞”的真实内涵。

人的一生是要经历很多磨难的，风雨中历练过的人生才是值得回味和骄傲的，没有超越的人生是不完整的，不求名垂史册，但求实现自我。不惧怕困难，也要耐得住寂寞和不公，在遭遇不公时，要有一种“打脱牙和血吞”的耐力，你忍住了，或许机会就来了，你没有忍住，你就把很可能到手的机会拱手让给了别人。

只要在职场混的人都或多或少地遇到一些不平事，或多或少地遭遇一些困难和不理解，但是这个世界就是一个竞争决定生存的世界，是一个实力者占主导地位的世界，没有实力，没有过硬的本领，遭到别人的白眼，遭到不公正的待遇，更应该认真对待，不可感情用事。激化矛盾，最后吃亏的肯定还是自己。或者走人，或者被请走，这都是我们不愿意看到的事情。

明白了做人的道理，明白了事情的发展规律和世界的生存规则，我们就需要耐心一点，努力一点，以“打脱牙和血吞”的挺劲对待生活和工作，对待人际关系。总有一天你会发现，自己的生活已经悄悄改变了！

人生，挺得住，才精彩！



政策

# 2016 元旦起，高致病性禽流感疫苗种毒全面启用 Re-8

## 高致病性禽流感疫苗种毒全面启用 Re-8

根据我国高致病性禽流感流行情况，农业部对高致病性禽流感疫苗种毒调整，2016 元旦起生产的高致病性禽流感疫苗全面启用 Re-8：H5 亚型二价灭活疫苗（Re-6 株 + Re-8 株）取代原（Re-6 株 + Re-7 株）；基因重组疫苗（Re-6 株 + Re-7 株 + Re-8 株）取代（H5N1 亚型，Re-6 株）。

2015 年 11 月 12 日农业部已公布了制定得重组禽流感病毒 H5 亚型二价灭活疫苗（Re-6 株 + Re-8 株）和重组禽流感病毒 H5 亚型三价灭活疫苗（Re-6 株 + Re-7 株 + Re-8 株）2 种兽药产品制造及检验试行规程、质量标准等内容，本次的公布了新毒株疫苗的全面投入使用时间为 2016 年 1 月 1 日。

### 农业部办公厅关于调整高致病性禽流感疫苗种毒的通知

#### 农办医（2015）51 号

为提高疫苗与流行毒株的匹配性，更好地防控禽流感，经研究，我部决定调整高致病性禽流感疫苗生产种毒。现就有关事项通知如下。

### 一、疫苗品种

调整后，疫苗为重组禽流感病毒 H5 亚型二价灭活疫苗（Re-6 株 + Re-8 株）和重组禽流感病毒 H5 亚型三价灭活疫苗（Re-6 株 + Re-7 株 + Re-8 株），用于预防 H5 亚型禽流感病毒引起的禽流感。

### 二、种毒发放和备案

2015 年 12 月 18 日前，国家禽流感参考实验室组织完成 Re-8 株种毒发放工作，并将 5 支 Re-8 株种毒送国家微生物菌毒种保藏中心备案，同时提供种毒鉴定报告。国家微生物菌毒种保藏中心要严格按照国家有关规定做好保藏工作。

### 三、疫苗的生产和检验

高致病性禽流感疫苗生产企业领取种毒后，要按照兽药管理有关规定及我部发布的产品生产检验规程、质量标准组织生产和检验活动，并向中国兽医药品监察所送 3 批重组禽流感病毒 H5 亚型三价灭活疫苗（Re-6 株 + Re-7 株 + Re-8 株）样品进行效力检验。企业自检和中国兽医药品监察所的检验同步进行。经中国兽医药品监察所检验合格后，方可进行批签发。

### 四、疫苗停产和使用

自 2016 年 1 月 1 日起，除生产专供出口产品外，各疫苗生产企业停止生产重组禽流感病毒 H5 亚型二价灭活疫苗（Re-6 株 + Re-7 株）和重组禽流感病毒灭活疫苗（H5N1 亚型，Re-6 株），之前生产的产品，可在产品有效期内继续销售使用。

### 五、兽药产品批准文号

各生产企业尽快按照《兽药产品批准文号管理办法》有关规定申报兽药产品批准文号。

农业部办公厅

2015 年 12 月 10 日

（本刊编辑部摘编自农业部兽医局网站）



# 农业部兽医局负责人就《兽药产品批准文号管理办法》答记者问

## 8 问 8 答

2016 年 5 月 1 日，农业部将施行修订后的《兽药产品批准文号管理办法》（农业部令〔2015〕第 4 号，以下简称《办法》）。日前，记者就这部规章修订和施行有关问题，采访了农业部兽医局负责人。

### 一问：为什么要对《办法》进行修订？

答：现行《办法》是 2005 年 1 月 1 日施行的。该《办法》实施以来对保证兽药质量、促进养殖业健康发展等都起到了积极作用。但从促进兽药产业转型升级，更好地保障养殖业发展和兽医公共卫生的需要看，《办法》有关内容已不适应当前工作需要，有必要予以修改完善。

**一是取得兽药产品批准文号的门槛较低。**按照现行《办法》，兽药生产企业只需提供三批样品，经检验合格，即可取得兽药文号。由于申请条件较低，仿制生产兽药国家标准产品非常容易。目前，我国 1756 家化学药品（含中兽药）生产企业，大多数都申报了大量的兽药文号，一方面导致兽药产品同质化严重，市场无序竞争；另一方面导致企业缺乏技术研究和产品创新的动力，同类产品生物等效性差。

**二是企业提交虚假样品的行为难以监管。**现行《办法》规定，企业自行提交检验样品。出于节约生产成本、确保样品质量等原因，有的企业甚至通过市场购买或委托生产的方式，提交不是本企业生产的样品。对此，兽医部门难以审查样品的真实性，企业弄虚作假行为很难有效控制。

**三是兽药文号相关违法行为处理规定有待完善。**《兽药管理条例》和《办法》对兽药文号的相关违法行为都作

出了规定，但对撤销及注销兽药文号的具体情形、撤销兽药文号后再申报的要求、发现兽药文号违法行为的处理程序等，还需要进一步明确。

### 二问：这次《办法》修订的主要内容有哪些？

答：《办法》修订的主要内容涉及五个方面：

**一是增加兽药文号申报资料要求。**在原来提交申报资料基础上，要求企业提交兽药生产工艺、配方以及知识产权转让合同或授权书等资料。

**二是实行比对试验管理制度。**对申请非技术转让或非本企业研制的非生物制品类兽药文号的，逐步实行比对试验管理，比对试验结果作为核发兽药文号的主要依据。实行比对试验管理的兽药品种目录及比对试验要求由农业部制定，开展比对试验的检验机构名单由农业部公布。

**三是实行现场核查和抽样制度。**对申请非本企业研制的生物制品类兽药文号，以及非本企业研制或非转让的非生物制品类兽药文号，实行现场核查和抽样管理，并规定了现场核查程序、内容和要求，具体由省级兽医管理部门负责组织实施。为鼓励企业自主创新，对申请自主研制并获得《新兽药注册证书》以及转让知识产权的兽药文号，仅要求提交样品资料以考察样品的真实性，不实行现场核查抽样。

**四是细化兽药文号违法行为处罚规定。**对改变组方添加其他成分、产品主要成分含量高于或低于相应标准等违法情形，明确按照《兽药管理条例》的规定予以撤销兽药文号，与 2014 年我部第 2071 号公告对兽药违法行为从

重处罚的情形保持一致，便于执法工作开展。三年内被撤销兽药文号的或者连续 2 次复核检验结果不符合规定的，对其再申请兽药文号进行限制。

**五是简化兽药文号编制格式。**删除了兽药文号编制格式中“年号”的规定，便于管理兽药文号，也有利于企业节约生产成本。

### **三问：《办法》设立了比对试验制度。什么是比对试验？设立这项制度主要出于什么考虑？**

**答：**通俗地讲，比对试验就是申报兽药与原研兽药进行比对，以判断其差异。比对试验主要包括生物等效性试验和休药期试验。其中生物等效性试验主要有血药浓度法和临床疗效验证两种。原则上生物等效性试验优先采用血药浓度法，不能采用血药浓度法的，进行临床疗效验证。开展比对试验的目的是确保申报兽药与原研兽药的一致性。在强调申报兽药与原研兽药之间具有药学等效性（活性成分相同、含量相同、剂型相同、质量标准相同）的基础上，通过生物等效性试验和休药期试验等比对试验，判断两产品中活性成分吸收进入体内的速度和程度是否相当、药物代谢及药物 / 代谢物的消除是否等同，以判断两产品有效性和安全性的差异，保障两产品兽药的一致性。

### **四问：比对试验的产品采取目录管理是出于什么考虑？此前企业已获得产品批准文号的怎么办？**

**答：**比对试验是我国兽药管理一项新的制度，尚处于探索起步阶段。按照积极稳妥、突出重点、不断完善的原则，《办法》规定实行比对试验的产品按照目录管理。这样可根据工作进展情况，统筹比对试验的品种和数量，有序推

进工作的落实。《办法》规定列入目录需做比对试验的兽药品种，且发布前已获得兽药产品批准文号的，应当在规定期限内按照要求补充比对试验并提供相关材料，未在规定期限内通过审查的，将依法撤销该产品批准文号。

### **五问：实施比对试验的单位有没有条件要求？符合比对试验条件的单位能否做自己的产品？**

**答：**为配合《办法》的有效实施，我局已起草了兽药临床试验管理规范（简称兽药 GCP）和兽药非临床管理规范（简称兽药 GLP），近日可发布执行。符合兽药 GCP 或兽药 GLP 规定条件的研究单位、企业和专业公司等，按照兽药 GCP 或 GLP 规范完成的有关比对试验资料，可用于兽药批准文号申请。为了确保比对试验的公平、公正，目前暂不接受企业自己完成的比对试验数据。

### **六问：对比对试验的样品有什么规定？**

**答：**确保样品真实性是这次修订《办法》要重点解决的一个问题，特别是对做比对试验样品的抽取，要求更加严格。《办法》规定，对现场抽样的产品若已列入比对试验品种目录的，抽取三批样品中，有一批必须在线抽取，而且规定应当用在线抽取的样品做比对试验，以确保样品的真实性。

### **七问：《办法》对注销和撤销产品批准文号的情形进行了细化，具体内容有哪些？**

**答：**补充、完善产品批准文号的注销和撤销情形，也是这次修订《办法》的重点内容之一。针对实践中存在的问题，依据《兽药管理条例》规定，《办法》对注销文号





主要规定以下三种情形：**一是**兽药生产许可证有效期届满未申请延续或者申请后未获得批准的；**二是**兽药生产企业停止生产超过 6 个月或者关闭的；**三是**核发兽药产品批准文号所依据的兽药国家标准被废止的。对撤销文号主要规定以下四种情形：**一是**改变组方添加其他成分的；**二是**除生物制品以及未规定上限的中药类产品外，主要成分含量在兽药国家标准 150% 以上，或主要成分含量在兽药国家标准 120% 以上且累计 2 批次的；**三是**主要成分含量在兽药国家标准 50% 以下，或主要成分含量在兽药国家标准 80% 以下且累计 2 批次以上的；**四是**其他药效不确定、不良反应大以及可能对养殖业、人体健康造成危害或者存在潜在风险的情形。

#### 八问：新《办法》于 2016 年 5 月 1 日起开始施行，如何贯彻落实？

答：《办法》颁布后，我们将组织做好以下工作：**一是**宣传解读好政策，全面提高相关方面对《办法》的认识和理解。**二是**及时出台《办法》实施的配套规定以及新旧办法衔接规定。**三是**加强对各级畜牧兽医管理部门的培训指导。**四是**密切关注《办法》贯彻落实情况，对《办法》实施过程中发现的情况和问题及时予以研究处理。

（本刊编辑部摘编自中国畜牧兽医信息网）

# 2015 年 7 月中国内地口蹄疫、高致病性禽流感 and H7N9 流感监测情况

2015 年 7 月，全国口蹄疫、高致病性禽流感 and H7N9 流感监测情况如下：

一、2015 年 7 月份全国口蹄疫监测情况本月，全国共对 657 个种畜场、5932 个商品代饲养场（户）、6800 个散养户、44 个交易市场、366 个屠宰场、29 个其他场所的牲畜进行了监测，共检测各类动物口蹄疫样品 42.3759 万份，其中免疫血清学样品 35.8943 万份，免疫合格 30.9847 万份，免疫合格率为 86.32%；检测病原学样品 6.4816 万份，没有检出阳性样品。

## （一）血清学监测

### （1）O 型口蹄疫

检测 O 型免疫血清样品 25.6629 万份，免疫合格 22.1547 万份，免疫合格率 86.33%。其中：猪血清样品 14.2184 万份，免疫合格 12.1667 万份，免疫合格率 85.57%；牛血清样品 5.1011 万份，免疫合格 4.5686 万份，免疫合格率 89.56%；羊血清样品 6.3319 万份，免疫合格 5.4089 万份，免疫合格率 85.42%；其他动物血清样品 115 份，免疫合格 105 份，免疫合格率 91.3%。

### （2）亚洲 I 型口蹄疫

检测亚洲 I 型免疫血清样品 6.8596 万份，免疫合格 5.9433 万份，免疫合格率为 86.64%。其中：猪血清样品 195 份，免疫合格 180 份，免疫合格率 92.31%；牛血清样品 3.1044 万份，免疫合格 2.7471 万份，免疫合格率 88.49%；羊血清样品 3.7307 万份，免疫合格 3.1737 万份，免疫合格率 85.07%；其他动物血清样品 50 份，免疫合格 45 份，免疫合格率 90%。

### （3）A 型口蹄疫

检测 A 型免疫血清样品 3.3718 万份，免疫合格 2.8867 万份，免疫合格率为 85.61%。其中：牛血清样品 2.7529 万份，免疫合格 2.4248 万份，免疫合格率 88.08%。羊血清样品 6159 份，免疫合格 4589 份，免疫合格率 74.51%；其他动物血清样品 30 份，免疫合格 30 份，免疫合格率 100%。

## （二）病原学监测

检测病原学样品 6.4816 万份，其中检测猪样品 2.9717 万份，牛样品 1.9504 万份，羊样品 1.5595 万份，均未检出阳性样品。

二、2015 年 7 月份全国高致病性禽流感监测情况全国共对 728 个种畜禽场、4600 个商品代饲养场户、2867 个散养户、536 个交易市场、30 个野鸟栖息地和 81 个其它场所的禽和猪进行了 H5 亚型禽流感监测，共检测各类动物禽流感样品 34.8191 万份，其中免疫血清样品 28.1849 万份，免疫合格 25.8859 万份，免疫合格率为 91.84%；检测病原学样品 6.6342 万份，没有检出阳性样品。

## （一）对家禽监测情况

### 1. 监测场点

全国共对 679 个种禽场、4477 个商品代饲养场（户）、2846 个散养户、502 个交易市场、63 个其他场所进行了监测。

### 2. 血清学监测

检测免疫血清样品 28.1117 万份，免疫合格 25.8271 万份，免疫合格率为 91.8%，其中：免疫鸡血



清样品 25.6863 万份，免疫合格 23.7425 万份，免疫合格率为 92.43%；免疫鸭血清样品 1.9894 万份，免疫合格 1.7082 万份，免疫合格率 85.87%；免疫鹅血清样品 4360 份，免疫合格 3764 份，免疫合格率 86.33%。

### 3. 病原学监测

检测家禽病原学样品 5.9624 万份，没有检出阳性样品。

### (二) 对猪监测情况

#### 1. 监测场点

全国共对 44 个种猪场、101 个商品代饲养场（户）、13 个散养户、1 个交易市场和 6 个其他场所进行了监测。

#### 2. 血清学监测

没有检测猪血清学样品。

### 3. 病原学监测

检测猪病原学样品 4691 份，没有检出阳性样品。

### (三) 对野鸟监测情况

#### 1. 监测场点

30 个野鸟栖息地。

#### 2. 血清学监测

没有检测血清学样品。

#### 3. 病原学监测

本月检测病原学样品 810 份，没有检出阳性样品。

### (四) 对其它鸟类监测情况

#### 1. 监测场点

全国共对 5 个种禽场、22 个商品代饲养场户、8 个散养户、33 个交易市场、12 个其他场所进行了监测。



## 2. 血清学监测

检测免疫血清样品 732 份, 免疫合格 588 份, 免疫合格率为 80.33%。

## 3. 病原学监测

共检测病原学样品 1217 份, 没有检出阳性样品。

三、2015 年 7 月份全国 H7N9 流感监测情况本月, 农业部组织各地进行了 H7N9 流感专项监测。全国对 455 个活禽交易市场、1329 个家禽养殖场户、247 个种禽场、640 个散养户、8 个野鸟栖息地、22 个其他场点的动物和环境进行了 H7N9 流感监测。共检测样品 8.8450 万份, 其中检测血清学样品 6.0690 万份, 检出 H7 亚型禽流感阳性样品 144 份, 阳性率 0.24%; 检测病原学样品 2.7760 万份, 没有检出 H7N9 病原学阳性样品。

### (一) 对家禽监测情况

#### 1. 监测场点

423 个活禽交易市场、240 个种禽场、1309 个家禽养殖场(户)、590 个散养户和 10 个其他场所。

#### 2. 血清学监测

检测血清学样品 5.9355 万份, 其中鸡样品 4.9606 万份, 检出 H7 亚型禽流感阳性样品 93 份, 阳性率 0.19%; 鸭样品 8348 份, 检出 H7 亚型禽流感阳性样品 51 份, 阳性率 0.61%; 鹅样品 1401 份, 没有检出 H7 亚型禽流感阳性样品。在 144 份阳性样品中, 活禽交易市场样品 17 份, 分别来自上海市鸡样品 14 份、河南省鸡样品 3 份; 养禽场样品 127 份, 来自 3 个省的 9 个养禽场, 具体为黑龙江省鸡样品 63 份, 江苏省鸡样品 5 份、鸭样品 50 份, 河南省鸡样品 8 份、鸭样品 1 份。

## 3. 病原学监测

检测家禽病原学样品 2.5461 万份, 其中鸡样品 2.1086 万份, 鸭样品 3686 份, 鹅样品 689 份, 没有检出 H7N9 病原学阳性样品。

### (二) 对野禽监测情况

#### 1. 监测场点

8 个野鸟栖息地。

#### 2. 血清学监测

没有检测血清学样品。

#### 3. 病原学监测

检测病原学样品 245 份, 没有检出阳性样品。

### (三) 对猪监测情况

#### 1. 监测场点

11 个商品猪场。

#### 2. 血清学监测

检测猪血清学样品 10 份, 没有检出阳性样品。

#### 3. 病原学监测

检测猪病原学样品 200 份, 没有检出阳性样品。

### (四) 对其它鸟类监测情况

#### 1. 监测场点

32 个活禽交易市场、9 个家禽养殖场、7 个种禽场、50 个散养户、12 个其他场所。

#### 2. 血清学监测

检测血清学样品 1325 份, 没有检出阳性样品。

#### 3. 病原学监测

检测病原学样品 1854 份, 没有检出阳性样品。

(本刊编辑部摘编自中国兽医发布网站)



# 肝康宁

鸭病毒性肝炎弱毒活疫苗 (CH60株)  
Duck Viral Hepatitis Vaccine,  
Live (Strain CH60)



- ✓ 抗原含量高，免疫原性好
- ✓ 安全性高，副反应小
- ✓ 免疫后仅需一周产生高保护率
- ✓ 免疫接种方便，保存简单



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 27282289  
网址：www.huapaisw.com

# 兔病毒性出血症、多杀性巴氏杆菌病 二联灭活疫苗(LQ株+C51-17株)

Rabbits Haemorrhagic Disease and Pasteurella  
Multocida Vaccine, Inactivated  
(Strain LQ+Strain C51-17)



- ✓ 有效保护超强毒株的攻击，提供更佳免疫保护
- ✓ 抗原含量高，免疫应激小
- ✓ 免疫保护快，维持时间长
- ✓ 质量稳定，常温可保存
- ✓ 含细胞因子免疫增强剂，提高巴氏杆菌免疫保护



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 27282289  
网址：www.huapaisw.com