

本刊被中国内刊协会评选为2014年度全国优秀内刊

华派®  
HUAPAI

2016年第1期 总第16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

Hua Pai Biological

(猪业版)

P06/【图片新闻】

## 华派生物派员参加第十二届马来西亚国际品牌展

华派生物打造中国动物疫苗第一品牌

华派生物2015年度销售工作总结大会成功召开

“华派大讲堂”二次开讲

猪圆环病毒2型灭活疫苗免疫后仔猪抗体水平的变化

2015年度华派关键词

打造中国动物疫苗第一品牌

# 圆环康

猪圆环病毒2型灭活疫苗 (ZJ/C株)

Porcine Cirovirus 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

- ✓ 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 ( $10^{8.0} \text{TCID}_{50} - 10^{8.3} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ )
- ✓  $\beta$ -PL灭活剂, 安全、高效、灭活彻底, 无残留
- ✓ HPVG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.huapaisw.com//



## 卷首语 | EDITORIA

# 新年致辞

四川省精华企业集团董事长、总裁 谢建勇

尊敬的各位同仁、合作伙伴、社会各界朋友们：

大家好！

随着 2016 年璀璨阳光的到来，我们告别了充满机遇和挑战的 2015 年，迎来了充满梦想和希望的 2016 年。在此，我谨代表精华集团华派生物向各位新老客户及公司全体同仁致以新年的问候与衷心的祝福！

过去的一年，在经济下行的大背景下，公司上下齐心协力、团结一致、攻坚克难，走过了极其忙碌而踏实的一年。回首 2015 年，我们感慨万千，华派人向着既定的目标矢志前行，华派的发展更是超乎我们的想象。

这一年，国内首条动物核酸疫苗生产线在华派生物诞生并通过国家 GMP 验收。这不仅对华派生物的发展具有里程碑意义，而且对动物疫苗行业发展来说，是一个新起点、新标准。这必将引领整个动物疫苗行业的发展，更将加快我国生物制品生产工艺技术迈向世界科技前沿的步伐。

这一年，国内第一个猪支原体肺炎灭活疫苗——“支肺通”的研制成功并隆重上市，河南、广东、山东、福建相继成功举办了新产品上市发布会。其高性价比优势使其刚上市就出现供不应求的喜人局面。

这一年，华派生物在国内首创推出以“圆环康+支肺通”、“圆环康+猪瘟”为核心内容的“三联四防”或“二联三防”联合免疫方案，因其省时、省力、省钱而受到全国各地规模化猪场老板、管理者和兽医的追捧。这标志着华派生物从单

一的产品营销及跟踪服务向防控方案推广迈出了坚实一步，也为战略伙伴合作关系的建立，实现“共创、共享、共赢”的终极目标奠定了良好基础。

这一年，成都正大、成都巨星、温氏集团等众多大型养殖集团、各地经销商、行业主管领导、专家学者纷纷到华派生物参观考察。他们对华派生物的研发实力、质量管控、技术服务更是赞不绝口。

这一年，华派生物及其产品首次出现在印度、马来西亚等国家的展会上，深受当地客商的欢迎和喜爱。这标志着公司的外贸工作已经列上议事日程并在 2015 年迈出了第一步，可以预见未来会走得更远。

2016 年将是我们扬帆启航、超越梦想的关键之年，我们将继续按照“打造中国动物疫苗第一品牌”的总体战略部署，凝心聚力、集思广益、奋力拼搏、开拓创新，向着更高的目标阔步前行。公司将更加努力提升产品品质、提高服务水平、提升企业形象，全力打造一支战之能胜的核心团队，让每一位事业伙伴都迈向新的成功！我们坚信，华派新的一年，必有新的精彩！

最后，再次向一贯关心、支持公司发展的各位领导、各位专家、各位同仁、合作伙伴、社会各界朋友们致以新年的祝福！祝您在新的一年里工作顺利，心想事成，幸福安康！



## 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  
执行主编：何信群  
责任编辑：徐静 李妍 李金海 邱文英 谭晓婷  
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.rancmedia.com)

电 话：028-27400432  
传 真：028-27282488  
网 址：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  
四川永鑫农牧集团股份有限公司  
新希望六和股份有限公司  
华西希望特驱农牧有限公司  
成都凤凰华侨农牧科技发展有限公司  
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  
四川茂华食品有限公司

本刊被中国内刊协会评选为2014年度全国优秀内刊



2016年第1期 总第16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。

# 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



## 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



## P06 华派生物派员参加第十二届马来西亚国际品牌展

2015年12月15日，由精华集团董事长助理谢楠率队的华派生物参展团一行4人参加了12月17日-20日在马来西亚吉隆坡太子世界贸易中心举办的第十二届马来西亚国际品牌展。

### 卷首语 Editorial

01 新年致辞

### 图片新闻 News Pictures

- 06 华派生物派员参加第十二届马来西亚国际品牌展
- 08 华派生物 2015 年度销售工作总结大会成功召开
- 10 华派生物研发中心举行新入职员工英文 PPT 交流汇报会
- 12 “华派大讲堂”二次开讲
- 14 华派生物召开 2015 年度质检研发工作总结会

### 专题 Special Topic

16 2015 年度华派关键词

### 技术交流 Technical Exchange

- 20 丹毒丝菌的分离鉴定
- 25 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的原核表达
- 28 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (CH-1R 株) 微载体悬浮培养工艺的研究
- 32 猪圆环病毒 2 型灭活疫苗免疫后仔猪抗体水平的变化

- 35 猪圆环病毒液的培养、纯化及浓缩工艺的研究
- 40 猪蓝耳病的危害及综合防控办法的探讨

### 本刊特稿 Special Edition

- 44 生物安全及生物防卫：兽医实验室及动物设施管理生物风险的标准

### 七彩生活 Colorful Life

- 56 主动出击
- 58 小球场 大活力
- 59 七绝
- 59 壮酒歌

### 行业资讯 Stockbreeding Information

- 60 猪场切忌大剂量使用猪瘟疫苗，负效应难以估量！
- 62 二维码追溯推动兽药电商发展
- 64 农业部第二届全国动物防疫专家委员会成立



# 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（2015）221017018

集先进生物  
科技  
铸百年疫苗品质



- 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.huapaisw.com///

# 华派生物派员参加 第十二届马来西亚国际品牌展

文 | 黎渊 图 | 张超



2015年12月15日，由精华集团董事长助理谢楠率队的华派生物参展团一行4人参加了12月17日-20日在马来西亚吉隆坡太子世界贸易中心举办的第十二届马来西亚国际品牌展。

该展会创办于1999年，由马来西亚农业部与联邦农业行销局合作主办，是东南亚最大、效果最好的农业盛会。中国目前是马来西亚最大的贸易伙伴国，马来西亚也是我国主要的国外农业出口市场之一。马来西亚国际品牌展为

计划开发东南亚市场的企业搭建了一个很好的平台，是中国企业进入东南亚市场的首选展会，也是开拓东南亚市场最直接有效的途径。

此次参展，华派生物专业大气的展位备受瞩目，吸引了很多相关客户的参观咨询，马来西亚《农牧世界》(Agroworld)杂志记者也专门前来采访和交流。组委会还特意给华派生物安排了产品推荐会，华派生物技术服务总监向丕元向与会人员介绍了公司的基本情况，特别就公



司的研发实力、产品质量控制和高科技前沿产品做了详细的讲解和推荐。

展会上我们有幸结识了许多在当地颇具影响力的代理商和养殖企业集团负责人，通过彼此间的深入交流及合作模式的探讨，让我们掌握了东南亚疫苗市场的第一手信息，及时了解最新的养殖发展动态以及东南亚客户对疫苗产品的选择标准和要求，这对华派生物拓展海外销售渠道具有至关重要的意义。

据悉，马来西亚的养禽量比较大，肉鸡蛋鸡常年存栏量达1亿多只，每天可向市场提供3000多枚商品蛋，其中有近400万枚出口到新加坡。

通过大家的努力，此次参展取得了预期的效果，此举也是华派产品走出国门迈出的第一步。

（作者简介：黎渊，硕士，兽医师，从事禽用疫苗的技术服务与外贸出口工作）

# 华派生物 2015 年度销售工作总结大会 成功召开

文 | 张莉 图 | 蒲泽斌、黄瑜琪

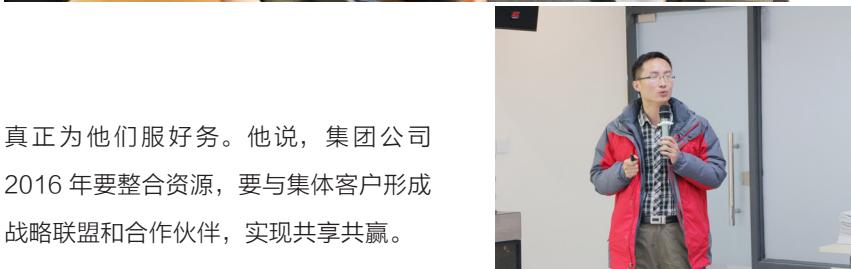


2015年12月27日至29日，华派生物2015年度销售工作总结大会在公司成功召开。华派生物中高层领导、猪苗事业部、禽苗事业部和经济动物疫苗事业部共120余人参加会议，精华集团董事长、总裁谢建勇做重要指示。

全国21省区经理对2015年销售工作中的得失做了认真总结和分享，并对2016年市场做了详细的规划，华派生物研发、生产、质检、销售和技术服务为大家做了相关培训。

精华集团董事长、总裁谢建勇在会议总结时指出，2015年的销售工作取得了可喜的成绩，我们总结过去，是要更好的谋划未来。希望各省区经理们做好2016年的销售可行性报告，要理清思路，明确方向，瞄准目标，拟定好切实可行的新一年销售方案。

谢董事长指出，2016年华派生物销售工作要把重点放在规模化、集团化客户上，要为客户解决疫病防控方案，把大客户的工作开展好，做好新产品试用试验跟踪方案，



真正为他们服好务。他说，集团公司2016年要整合资源，要与集体客户形成战略联盟和合作伙伴，实现共享共赢。

谢董事长还对2016年市场战略做了详细的规划和安排。

(作者简介：张莉，在读硕士，技术服务部经理)



# 华派生物研发中心举行新入职员工英文 PPT 交流汇报会

文 | 朱冬梅 图 | 杜德燕



2015年12月30日，华派生物质检研发中心组织开展了新入职员工英文PPT交流汇报会议，质检、研发部门全体人员参加会议。华派生物总经理龚文波和副总经理方鹏飞发表讲话。会议由质检研发中心副主任邱文英主持。

会议内容由英文PPT讲解和提问答疑两部分组成，涉及到病毒、细菌、细胞悬浮培养、生物技术和小动物疾病等多个方面。于作博士就“病毒样颗粒疫苗”进行专题交流，深入分析免瘟病毒的感染机制及其病毒样颗粒疫苗

的研究进展、数据分析。曾光志硕士详细介绍了“病毒悬浮培养技术”，对影响多种病毒悬浮培养因素作了系统归纳总结，提出解决思路。罗彪硕士就前沿技术“基因打靶分子生物学技术”进行了阐述，提出学习新型生物技术的必要性。谭晓婷硕士详细阐述“细菌菌影技术”，从细菌疫苗的发展方向，图文并茂地向大家展示了菌影在细菌疫苗中的应用优势。朱冬梅硕士对丹毒丝菌的流行特点、优势血清型、临床特征及防治等方面进行全面介绍。邹志坤硕士向大家阐述了益生菌在疾病预防、疫苗佐剂等多方面的重大作用，并指出益生菌的巨大潜在发掘意义。胡洋硕



士从小动物疾病方面详细地介绍了犬瘟热的临床症状，治疗方法和预防等内容。盛泽军硕士阐述了伪狂犬、细小病毒二联灭活苗的研究路线及进展。汇报结束后与会人员针对汇报人讲解内容提出问题，汇报人员均一一解答并与大家进行了深入的探讨。

龚文波总经理要求华派生物质检研发中心在工作交流时，坚持采用英文汇报方式，培养华派“尖子人才”。研发人员在进行研发工作时要有自己的特色，新产品上能听到“华派人自己的声音”，不要人云亦云。

副总经理方鹏飞表示，在竞争激烈的兽药行业中，我们应该随时做好与国际接轨的准备，使用英文 PPT 进行工作汇报，不仅仅是一个很好的交流方式，更是一个相互学习和进步的好机会。方总强调，在研发工作上要有创新，思维要灵活，积极学习生物制品行业新技术、新产品和新动向，达到事半功倍效果，全面推进研发工作。

（作者简介：朱冬梅，硕士，研发中心细菌疫苗组成员）

# “华派大讲堂”二次开讲

文 | 何信群 图 | 蒲泽斌



1月7日上午9时，“华派大讲堂”在华派生物全体中层以上干部、班组长和研究生高唱“我们是精华”的旋律声中拉开帷幕。大讲堂先后由华派公司副总经理王娟、技术服务总监向丕元、营销副总监唐鑫、诊断中心主任李金海和生产技术部一车间副主任张洪主讲。讲座由华派生物总经理助理扶海主持，共50余人聆听了此次讲座。

副总经理王娟作了题为“反馈与指导”的专题讲座。她结合自身工作经验，列举了大量的反馈与指导的实例，

深入浅出地阐述了改进型反馈的途径、及时性反馈的要领、有效指导的过程、定期监督的意义等。鼓励大家通过反馈与指导的科学方法，达到互相帮助，改善沟通，共同进步的目的。

技术服务总监向丕元就企业文化的兴起、企业文化的功能和企业文化的系统结构进行了深入的分析和讲解。他特别阐述了“知识”与“文化”的区别，以及企业文化并不是“企业+文化”粉饰工程的观点。向总还结合华派生物企业实际，提出了努力构建具有本公司特色的企业文



化。他满怀激情地阐释了华派生物“华溢于表、派源于质”的核心价值观及公司取名“华派”的渊源和深刻含义。他最后勉励大家学会学习、学会感恩、学会做人。期望通过华派人的共同努力，实现“华派致远，文化制胜”的目标。

营销副总监唐鑫以“营销体系”为主题进行了专题讲座，讲述 6PS、4CS、4RS、4S 营销体系的演变和创新；从把握市场情报力、接近市场的分销力、影响市场的促销力、渗透市场的推销力、维持市场的服务力五方面讲述了销售成功的秘诀。结合华派生物实际提出了行业营销体系、分级定价、大数据收集、快速反应机制等见解，并保证全力做好华派生物营销体系建设，为客户创造更大价值。

诊断中心主任李金海就“兽医实验室生物安全管理”进行了精彩的讲解。他从实验室生物安全管理的原则和实用性入手，讲述了一级、二级病原微生物实验室的安全管理办法、个人防护、生物安全体系的建立及运行要求。他强调要高度重视、加强管理，配齐设施设备及个人防护装备，

养成良好的兽医实验室操作习惯，建立良好的生物安全管理体系，严格生物安全体系运行和实验室运行流程。

生产技术部一车间副主任张洪就“时间管理”进行专题讲述，以大量的实例阐述了如何克服“忙、盲、茫”的误区，就时间的分类和如何有效管理时间进行了详细阐述，希望大家能减少疲劳战，做好合理的时间安排和有效利用时间，努力提高工作效率，做到有计划的紧张工作和快乐生活。

讲师们生动形象的专题讲解、切身感受和经验的分享、精彩的现场互动使讲座气氛高潮迭起，全天持续近 6 个小时的讲座让大家没有一点倦意。大家一致表示，“华派大讲堂”既是大讲堂，又是大学堂，凡在学校里学不到的东西这里都能学到。可以见得，“华派大讲堂”是华派人共同学习、共同提高和进步的交流平台，希望越办越好！

（作者简介：何信群，硕士，质检研发中心副主任、信息中心主任）

# 华派生物召开 2015年度质检研发工作总结会

文 | 何信群 图 | 本刊编辑部



1月19至20日，华派生物2015年度质检研发工作总结会议在公司召开。质检、研发相关人员共30余人参加会议。会议由质检研发部副主任徐静主持。

质检、研发人员分别对2015年质检研发工作中的经验和不足做了认真总结和分享，并对2016年做了详细的规划。

研发工作总结阶段，各组研发人员分别就负责的研究项目进行了细致的汇报，图文并茂地展示了细菌类、病毒类、亚单位疫苗等疫苗研究进展，分析研究数据，交流研究结果。对菌毒种的毒力、免疫原性等进行系统的介绍；对研发过程中遇到的困难进行了详细的分析，并提出了解决方案。质检工作总结中，每个检验人员针对各自的检验项目和产品进行了统计分析，总结产品质量方面存在的问题，分析原因，为质量改进提供依据，全面真实地反映产品质量。



工作汇报后，与会人员对研发项目的关键环节以及影响产品检验的因素进行了深入、广泛讨论，针对实验室规范化管理献计献策，提出多种思路和办法。与会人员纷纷表示，要加强学习，紧密合作，共同进步，高效完成质检研发任务，使质检研发工作再上新台阶。

（作者简介：何信群，硕士，质检研发中心副主任、信息中心主任）



# 2015 年度华派关键词 HuaPai Key Words      TOP10

2015年对华派生物来说注定是不平凡的一年，笔者总结了这一年里华派关键词，梳理这一年华派生物取得的成绩与发展变化。

## Key Words 1 核酸疫苗

随着国内首条动物核酸疫苗生产线在华派生物建成，在行业内引起广泛关注。有媒体报道说，这是一个新起点、新标志，将引领整个国内动物疫苗行业的发展，也必将促进我国生物制品生产工艺技术迈向世界科技前沿。



## Key Words 2 外贸

华派生物及其产品首次出现在印度、马来西亚这些国家的展会上，深受客商们的欢迎和喜爱。华派生物的外贸工作在2015年迈出了第一步，未来会走得更远。

### Key Words: 支肺通 3

国内第一个猪肺炎支原体灭活疫苗 – 支肺通上市了！在河南、广东、山东、福建成功举办支肺通上市发布会，高性价比的产品供不应求。



### Key Words: 考察 5

2015年，全国各地规模化猪场客户、经销商、行业主管领导、专家学者到华派生物参观考察络绎不绝。谈合作、提建议，但听到的最多的还是赞誉之词。



### Key Words: 圆环康 4

2015这一年，是华派生物的圆环康年，虽然上市时间晚，但圆环康以无以伦比的品质征服了挑剔的客户，取得了骄人的市场占有率和业绩。



### Key Words: 三联四防 6

国内首创圆环康 + 支肺通、支肺通 + 蓝经灵、圆环康 + 猪瘟等猪用疫苗的“三联四防”联合使用，省时、省力、省钱，受到全国各地规模化养殖老板、管理者和兽医的追捧。



## Key Words: 7 华派生物

《华派生物》内刊连续2年获得中国内刊协会优秀内刊奖，2015年改版分为猪业版和禽兔版，出版8期，发行5万余册，受众面10万余人次。



## 证书

四川省华派生物制药有限公司技术中心

经认定，你公司技术中心为四川省企业技术中心



二〇一五年十月

## Key Words: 9 企业技术中心

2015年，华派生物获得了四川省企业技术中心、四川省兽用核酸及亚单位疫苗工程实验室等荣誉，推动了企业高新技术战略和品牌战略的实施。

全新上线

## 三大网络平台 上线啦！



华派生物官网

全面升级 新闻动态 轻松查看



手机微网

学习交流 更加便利



华派生物俱乐部

公众微信号 一键关注 轻松搞定

<http://www.huapaisw.com>

## Key Words: 8 互联网 +

华派生物为了推进国家互联网+战略，2015年将官网、微网和微信平台全新改版上线运行，为关注华派生物发展的客户和朋友们打造一个开放、沟通和交流的平台，微信平台可以直达官网和微网，形成“三网融合”。

## Key Words: 10 预算管理

2015年，华派生物全面启动、运行预算管理，推动科学化、制度化的现代企业管理制度，努力打造中国动物疫苗第一品牌。

华派生物打造中国动物疫苗第一品牌



集先进生物  
科技  
铸百年疫苗品质

# 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(2014)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
- 无支原体感染

无需加量 1 头份轻松搞定！



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.huapaisw.com//



# 丹毒丝菌的分离鉴定

文 | 朱冬梅

**摘要:** 丹毒丝菌是一种兼性厌氧、无芽孢、无鞭毛的革兰氏阳性菌，能感染多种动物和人类。本实验从疑似患有丹毒丝菌病的猪场中分离到 2 株疑似丹毒丝菌，并对其进行革兰氏染色、生化特性试验和 PCR 鉴定，结果证实这 2 株菌均为丹毒丝菌，其中红斑丹毒丝菌 1 株，血清型 13 丹毒丝菌 1 株。

**关键词:** 丹毒丝菌；分离鉴定；血清型分型；

丹毒丝菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) 是一种兼性厌氧、无芽孢、无鞭毛的非抗酸性革兰氏阳性小杆菌，最早是丹毒丝菌属唯一的成员<sup>[1]</sup>。1876 年 Robert Koch 从一只小鼠身上分离到能引起其败血症的细菌，并首次命名为“鼠丹毒败血杆菌”。至今已有一百多年历史。

目前丹毒丝菌属包括四个种，红斑丹毒丝菌（俗称猪丹毒）、扁桃体丹毒丝菌、血清型 13 和血清型 18 丹毒丝菌，遗传学上认为血清型 13 和血清型 18 丹毒丝菌与上述两个物种相差较大<sup>[2]</sup>，故另作分类。

丹毒丝菌能感染多种动物和人类，具有发病急死亡率

高等特点，为临幊上快速诊断增加了困难<sup>[3]</sup>。控制动物感染发病的有效办法包括良好的饲养环境、有效的管理措施、良好的卫生环境和适宜的免疫程序<sup>[4]</sup>。但目前临幊上丹毒丝菌的疫苗种类较少，也没有被广泛使用<sup>[5]</sup>。抗生素虽能有效的治疗丹毒丝菌感染，但因抗生素的滥用，使得丹毒丝菌的耐药菌株日益增加<sup>[6]</sup>。丹毒丝菌的鉴定基于它的革兰氏染色、菌落形态、运动性、溶血性和生物学特性，尤其注意的是它能产生硫化氢 ( $H_2S$ ) 气体<sup>[6]</sup>。本实验用选择培养基对病料进行细菌分离，观察分离菌的生长、菌落形态、菌落颜色等，再进行革兰氏染色镜检和生化特性等实验进行鉴定。为临幊上快速鉴定丹毒丝菌建立一个有效的方法，方便指导临幊用药。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料

病料由某猪场送检。

### 1.2 主要培养基

(1) 选择性脑心琼脂培养基：称取 52g 干粉培养基，

3gTris, 1mLTween-80,0.3g 叠氮钠, 0.02g 结晶紫溶于 1000mLddH<sub>2</sub>O 中, 121℃高压灭菌 15min, 冷却至室温后调节 pH 为 7.6-7.8, 并加入一定量的抗生素及其他化学成分, 4℃保存备用 (使用之前加 10% 灭活新生牛血清)。

(2) 胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 培养基: 称取 TSB 粉末 30g 溶于 1000mLddH<sub>2</sub>O 中, 121℃高压灭菌 15min, 待其降至常温后, 4℃保存备用。

(3) 胰蛋白胨大豆琼脂 (TSA) 培养基: 称取 TSA 粉末 40g 溶于 1000mLddH<sub>2</sub>O 中, 121℃高压灭菌 15min, 待其降至常温后, 4℃保存备用。

(4) TSB 血清培养基: 将 (2) 中的液体培养基中加 10% 灭活新生牛血清。

(5) TSA 血清培养基: 将 (3) 中的固体培养基加热融化。冷却至室温后加 10% 灭活新生牛血清。

TSB、TSA 培养基和脑心琼脂培养基均购于碧迪医疗器械 (上海) 有限公司; 新生牛血清购于浙江天杭生物技术有限公司。其他常规试剂均为国产级分析纯级产品。

### 1.3 酶和常用试剂

dNTP、EasyTaq DNA 聚合酶、1000bp DNA Marker、2000bp DNA Marker 购于大连宝生物生物工程公司。

快速革兰氏染色液, 购于珠海贝索生物技术有限公司。

### 1.4 细菌的分离纯化

无菌采集患败血症、心内膜炎、皮肤疹块、关节炎的病猪的肝脏、脾脏、心脏、脑等的深部组织接种于选择性脑心琼脂培养基中, 分区划线, 置于 37℃温箱中培养 24h, 再挑取符合丹毒丝菌形态特征的表面透明的、光滑的、圆形的、边缘整齐的小菌落接种到 TSA 血清培养基 37℃ 培养 24h 进行纯化后, 进行革兰氏染色及生化试验。

### 1.5 革兰氏染色镜检

从纯化培养的培养基中挑取单个菌落中的少许部分进行革兰氏染色、镜检, 并观察其染色特性及细菌形态。步骤如下:

(1) 涂片固定: 首先取一滴生理盐水于干净的载玻片

上, 然后用接种环挑取少量菌苔与生理盐水混匀, 涂布, 自然风干后用火焰固定。

(2) 染色: 将固定好的菌体用龙胆紫液染色初染 10sec, 清水冲洗, 甩干; 加碘液复染 10sec, 清水冲洗, 甩干; 脱色液脱色 10-20sec, 请说冲洗, 甩干; 最后加沙黄溶液复染 10sec, 清水冲洗, 自然风干。

(3) 油镜观察细菌颜色及形态。

### 1.6 生化鉴定

将纯化后的细菌按常规方法接种于葡萄糖、乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、棉籽糖、木糖、甘露醇、阿拉伯糖、硫化氢等生化反应管中, 置 37℃温箱培养 24-48h, 定时检查反应结果。

### 1.7 PCR 鉴定

对镜检符合丹毒丝菌形态的细菌进行鉴定, 参考 Makino 和 Takeshi<sup>[9] [11]</sup> 的引物设计, 进行丹毒丝菌 PCR 方法进行鉴定, 引物详情见表 1。

表 1 丹毒丝菌鉴定相关引物

Table 1 PCR primer used in identified of *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Species	Primer	sequence	Size of product (bp)
<i>Erysipelothrix</i> sp	MO101	AGATGCCATAGAACTGGTA	407
	MO102	CTGTATCCGCCATAACTA	
<i>E.rhusiopathiae</i>	ER1F	GTTCATCTCTAATGCACTAC	399
	ER1R	TGTTGGACTACTAATCGTTCG	
<i>E. tonsillarum</i>	ER2F	ATGTAATATGATCTGGTGATTG	384
	ER2R	AGGACTGCTGATTGTCTCATG	
<i>Erysipelothrix</i> sp. strain 1	ER3F	TGGAGGACCGAACCGACTG	289
	ER3R	AATTTGGGACCTTAACGGC	
<i>Erysipelothrix</i> sp. strain 2	ER4F	TAAAGCACTAAGATCTGGTGG	387
	ER4R	TCGGACTACTAATTGTCTCAG	

注: *Erysipelothrix* sp (丹毒丝菌属); *E.rhusiopathiae* (红斑丹毒丝菌); *E. tonsillarum* (扁桃体丹毒丝菌); *Erysipelothrix* sp. strain 1 (血清型 13 丹毒丝菌); *Erysipelothrix* sp. strain 2 (血清型 18 丹毒丝菌)

挑取革兰氏染色镜检合格并纯化后的单菌落 3-5 个溶于 100 μL 无菌超纯水中, 混匀后置于沸水浴中 10min,

取出后立刻置于冰上 10min, 12000rpm/min 离心 2min, 取上清作为 PCR 反应模板。

PCR 反应体系：反应总体积为 18  $\mu$ l：上游引物 1  $\mu$ l, 下游引物 1  $\mu$ l, DNA 模板 2  $\mu$ l, 2 $\times$  Taq PCR Master Mix 9  $\mu$ l, ddH<sub>2</sub>O 5  $\mu$ l, 总体积 18  $\mu$ l。

PCR 反应条件：94℃预变性 10min, 然后 94℃变性 1min, 54℃退火 1min, 72℃延伸 1min, 30 个循环, 最后 72℃延伸 10min, 4℃保存。其中退火温度和延伸时间可根据引物及扩增片段大小确定。

电泳：取 4  $\mu$ L PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

### 1.8 PCR 产物测序及同源性比对

将 PCR 产物送金斯瑞(南京)生物科技有限公司测序。将测序结果与 GenBank 发表的序列进行比较。

## 2 结果

### 2.1 细菌的分离纯化

分离菌株在选择性脑心琼脂培养基上培养 24h, 可见淡紫色、圆形、光滑的细小菌落(图 1), 在 TSA 血清琼脂培养基上生长 24h 后, 可见透明的、圆形、光滑的针尖大小的菌落(图 2)。



图 1 分离菌株在选择性琼脂培养基上的形态

Fig.1 The shape of the isolates on the slected agar medium

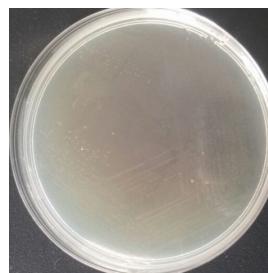


图 2 分离菌株在 TSA 血清琼脂上的形态

Fig.2 The shape of the isolates on the TSA

### 2.2 革兰氏染色镜检

革兰氏染色后, 在油镜下观察细菌形态, 可见紫色、直的或微弯的小杆菌, 呈短链或长丝状排列(图 3)。



图 3 丹毒丝菌革兰氏染色镜检 (10 $\times$ 100)  
Fig.3 Morphology of bacterium after Gram straining

### 2.3 生化鉴定结果

分离细菌均可分解葡萄糖、乳糖、果糖, 不分解蔗糖、麦芽糖、棉籽糖、木糖和阿拉伯糖, 硫化氢反应和硝酸盐还原阳性。

### 2.4 PCR 鉴定结果

将镜检符合丹毒丝菌形态的菌株, 进行 16SrRNA 基因及其 4 个种的特异性基因进行扩增, 结果显示这 2 株细菌全部为丹毒丝菌(图 4), 其中有 1 株为红斑丹毒丝菌(图 5), 1 株为血清型 13 丹毒丝菌(图 6)。

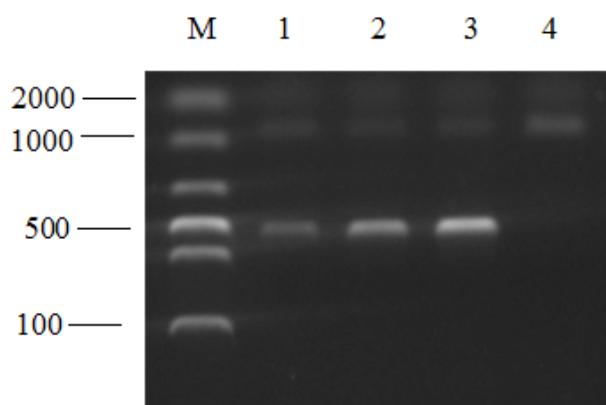


图 4 丹毒丝菌属 16SrRNA PCR 鉴定 (407bp)  
Fig.4 PCR amplification of *Erysipelothrix rhusiopathiae* 16SrRNA (407bp)  
M: DNA marker DL2000 1: 阳性对照; 2: 分离株 1; 3: 分离株 2; 4: 阴性对照

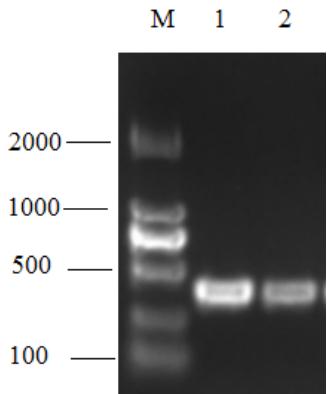


图 5 红斑丹毒丝菌 PCR 鉴定 (399bp)  
Fig.5 PCR amplification of *E.rhusiopathiae* ( 399bp )  
M: DNA marker DL2000 1: 阳性对照 ; 2: 分离株 1;

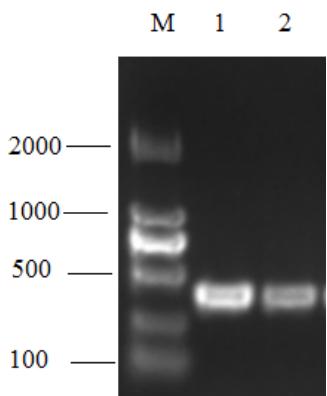


图 6 血清型 13 丹毒丝菌 PCR 鉴定 (289bp)  
Fig.6 PCR amplification of *Erysipelothrix* sp. strain 1(289bp)  
M: DNA marker DL1000 1: 阳性对照 ; 2: 分离株 2;

### 3 讨论

丹毒丝菌能引起羔羊、羊的多发性关节炎，犊牛的皮肤型丹毒疾病，并对鸭和火鸡造成重要的经济损失<sup>[3][4]</sup>。其中丹毒丝菌引起的猪丹毒最为普遍，并能造成巨大的经济损失<sup>[5]</sup>。超过 30 种野生鸟类及至少 50 种野生哺乳动物<sup>[4]</sup>都能作为丹毒丝菌的储存宿主。其中家猪是丹毒丝菌的主要储存宿主，30%–50% 的健康猪的扁桃体和淋巴组织中都有丹毒丝菌<sup>[6]</sup>，带毒猪可以从粪便、尿液、唾液和鼻液向外界排毒，并污染土壤、草垫、水和食物等，间接传播病原<sup>[7]</sup>。患病猪主要表现为 3 种形式，急性、亚急

性和慢性<sup>[3][5][8]</sup>。急性病例表现为突然死亡和败血症，一般在感染 24 小时内，就能快速出现普遍感染和败血症的临床症状。亚急性者通常不表现为患病状态，仅在皮肤上出现红肿的斑块，病变部位可能在几天内就逐渐恢复，严重者可引皮肤坏死或死亡。慢性病例可能在急性和亚急性症状之后出现，通常表现为慢性关节炎（不同程度的僵硬肿胀）和心内膜炎症状。

因其他细菌在丹毒丝菌的选择培养基上均不生长，所以它在临床上的分离鉴定中有一定的使用价值。根据丹毒丝菌的细菌学形态及生长特性，以及革兰氏染色后镜检和丹毒丝菌特异性基因引物的扩增，结果显示分离到的 2 株细菌均为丹毒丝菌，其中 1 株为致病性较强的红斑丹毒丝菌，1 株为血清型 13 丹毒丝菌。扁桃体丹毒丝菌和血清型 18 的菌株均未发现。这暗示着临幊上流行的菌株除了致病性较强的红斑丹毒丝菌外，也存在部分致病性较弱的菌株，扁桃体丹毒丝菌未分离到的原因，可能与它常存在于健康动物的体内有关。此外，用于 PCR 丹毒丝菌分类鉴定的引物设计，具有较高的特异性，能广泛应用于临幊上的分离鉴定中。

### 参考文献：

- [1] Brooke, C.J., Riley, T.V., 1999. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: bacteriology, epidemiology and clinical manifestations of an occupational pathogen. *J. Med. Microbiol.* 48, 789 – 799.
- [2] Takahashi, T., T. Fujisawa, Y. Tamura, S. Suzuki, M. Muramatsu, T. Sawada, Y. Benno, and T. Mitsuoka. 1992. DNA relatedness among *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains representing all twenty-three serovars and *Erysipelothrix tonsillarum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:469 – 473.
- [3] Takahashi, T., T. Fujisawa, Y. Tamura, S. Suzuki, M. Muramatsu, T. Sawada, Y. Benno, and T. Mitsuoka. 1992. DNA relatedness among

Erysipelothrix rhusiopathiae strains representing all twenty-three serovars and *Erysipelothrix tonsillarum*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:469 - 473.

[4] Venditti M, Gelfusa V, Tarasi A, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Erysipelothrix rhusiopathiae* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1990, 34(10): 2038-2040.

[5] Conklin, R.H., Steele, J.H., 1979. *Erysipelothrix infections*. In: Steele, J.H. (Ed.), *CRC Handbook. Series in Zoonoses*, vol. 1 (section A) *CRC Press, Boca Raton, FL*, pp. 327 - 337.

[6] Makino, S., Y. Okada, T. Ishikawa, K. Takahashi, T. Nakamura, M. Ezaki, and T. Morita. 1994. Direct and rapid detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* DNA in animals by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32:1526 - 1531.

[7] Wood, R.L., 1975. *Erysipelothrix infection*. In: Hubbert, W.T., McCullough, W.F., Schnurrenberger, P.R. (Eds.), *Diseases Transmitted from Animals to Man*. 6th ed. *Thomas, Springfield, IL*, pp. 271 - 281.

[8] Wood, R.L., 1992. *Erysipelas*. In: Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D' Allaire, S., Taylor, D.J. (Eds.), *Diseases of Swine*. 7th ed. *Iowa State Univ. Press, Ames, IA*, pp. 475 - 486.

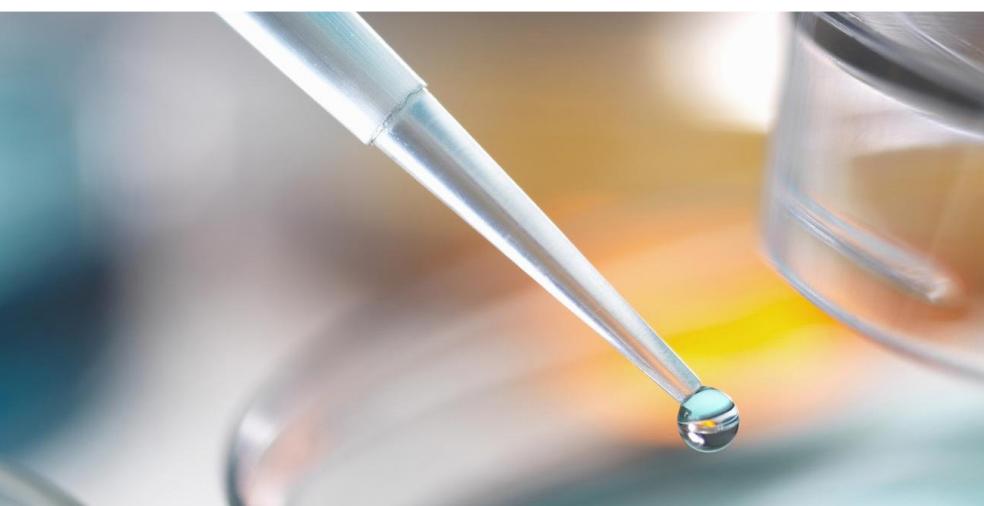
[9] Stephenson, E.H., Berman, D.T., 1978. Isolation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* from tonsils of apparently normal swine by two methods. *Am.J. Vet. Res.* 39, 187 - 188.

[10] Grieco, M.H., Sheldon, C., 1970. *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 174, 523 - 532.

[11] Reboli, A.C., Farrar, W.E., 1992. The genus *Erysipelothrix*. In: Balows, A., Truper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. (Eds.), *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. *Springer-Verlag, New York*, pp. 1629 - 1642.

(作者简介：朱冬梅，硕士，执业兽医师，主要从事家畜  
菌苗的研发及细菌性疾病诊断工作）





# 猪圆环病毒 2 型 Cap 蛋白的原核表达

文 | 张丽燕 邱文英 徐静 方鹏飞

猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 被确认是导致断奶仔猪多系统衰竭综合征 (PMWS) 的主要病原，并与猪皮炎肾病综合征、繁殖障碍、A<sub>2</sub> 型先天性震颤、猪呼吸道综合征、猪增生性及坏死性肺炎等有密切关系。PCV2 病原学及血清学调查表明，该病在许多国家都广泛存在，给全球养猪业造成了巨大的经济损失。

PCV2 基因组包含 11 个阅读框 (ORF)，其中 ORF1、ORF2 为最大的两个 ORF，ORF1 编码 PCV 的复制相关蛋白 (Rep)，猪圆环病毒 1 型 (PCV1) 和 PCV2 的 ORF1 同源性高，可引起两者交叉免疫反应。有学者利用 PCV2 ORF2 多肽或完整蛋白作为诊断抗原建立了区别 PCV1 和 PCV2 的鉴别诊断方法。

本研究利用体外表达系统对 PCV2 ORF2 进行重组表达，获取 PCV2 Cap 蛋白，为之后建立间接 ELISA 方法以及研制 ELISA 诊断试剂盒奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

DH5 $\alpha$  感受态细胞、BL21 (DE3) 表达菌，均由四川省华派生物制药有限公司保存。

PCR 产物回收试剂盒购自天根生化科技有限公司；Bam H I、Xho I 内切酶均购自 Takara 生物公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 目的片段扩增

以 Genbank 登录 PCV2 核酸序列为模板，设计一对引物：P1: 5'-GC GGATCCAATGGCATCTTCAACACCC-3'，P2: 5'-CCGCTCGAGTTAGGGTTAACGTGGGG-3'，P1、P2 分别在引物的 5' 端添加 Bam H I、Xho I 酶切位点。扩增区域剔除了 N 端核定位信号肽，包含 Cap 蛋白主要抗原表位。

取 PCV2 病毒进行 DNA 抽提，通过 PCR 扩增得到目的片段。PCR 反应条件为 94℃ 预变性 5min；94℃ 变性 30s，55℃ 退火 30s；，72℃ 延伸 2 min，30 个循环；72℃ 再延伸 10 min。

#### 1.2.2 重组质粒的构建

使用 PCR 产物回收试剂盒进行 PCR 扩增产物的回收。将回收后的 Cap 扩增产物与 pET-32a (+) 进行 Bam H I、Xho I 的双酶切，酶切后产物使用胶回收试剂盒进行回收。回收后的 Cap 与 pET-32a (+) 在 T4 DNA 连接酶的作用连接过夜。将连接产物转入 DH5 $\alpha$  感

受态细胞中，将菌液涂布于琼脂平板中，37℃倒置培养过夜。挑取菌落进行培养及鉴定。

#### 1.2.3 重组质粒的鉴定

提取质粒后，对重组质粒进行 PCR 鉴定，并将鉴定为阳性的质粒送往上海英淮捷基生物有限公司进行测序。PCR 鉴定及测序结果均为阳性的重组质粒命名为 pET-Cap。将阳性重组质粒转化至 BL21 ( DE3 ) 感受态细胞，进行原核表达。

#### 1.2.4 Cap 重组蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

将阳性重组菌种接种于含 0.1mg/mL 氨苄青霉素的液体 LB 培养基中，置 37℃ 振荡培养过夜；次日按 1% 的量接种于含 0.1mg/mL 氨苄青霉素的液体 LB 培养基中，置 37℃ 振荡培养至 OD600nm 达到 0.6 ~ 1.0 时，加入 IPTG 至终浓度为 1mmol/L，37℃ 诱导表达 5h。取 1mL 诱导后菌液于 12000r/min 离心 1min 收集菌体，用 100 μL PBS 重悬菌体进行制样，制样后进行 SDS-PAGE 电泳，鉴定是否有目的蛋白的存在。

#### 1.2.5 Cap 重组蛋白表达形式的确定

将诱导后的菌体离心重悬后，在冰浴条件下在低频率超声破碎仪中进行破碎，破碎后于 12000r/min 离心 20min，分别取破碎后的总蛋白、上清和沉淀分别进行制样，制样后进行 SDS-PAGE 电泳，分析重组蛋白的表达形式。

#### 1.2.6 Cap 重组蛋白的 Western Blotting 鉴定

诱导后的菌体制样并进行 SDS-PAGE 电泳后，转印至硝酸纤维素膜上，使用猪圆环病毒 2 型阳性血清作为一抗，辣根过氧化物酶标记的兔抗猪 IgG 作为二抗，进行 Western Blotting 鉴定，以确定重组蛋白特异性及反应原性。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增基因片段

以抽提的 PCV2 病毒 DNA 为模板进行 PCR 扩增，扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳可见一条特异性目的条

带，大小约 579bp，与预期结果相符（图 1），测序结果分析表明，与 NCBI 登录的 ORF2 基因有很高的同源性，为 99.5%。

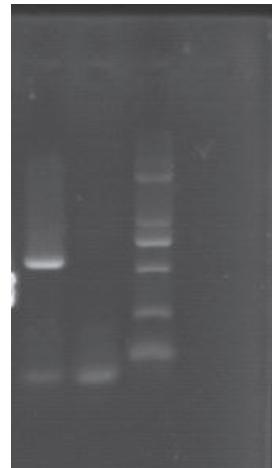


图 1 ORF2 基因 PCR 产物

1: PCR 扩增的 ORF2 基因片段；2: 阴性对照；M: DNA Maker

### 2.2 重组质粒酶切鉴定

构建的重组质粒 pET-32a ( + ) -ORF2 经限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 双酶切鉴定，经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳可见约 579 bp 大小的 DNA 片段，与预期大小一致，说明重组质粒构建成功（图 2）。

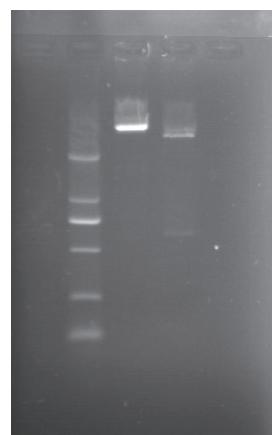


图 2 重组质粒双酶切鉴定结果

1: pET-32a ( + ) -ORF2 重组质粒；2: pET-32a ( + ) -ORF2 双酶切；M: DNA Maker

2.2 重组质粒的诱导表达及 SDS-PAGE 电泳  
将重组质粒进行诱导表达后进行 SDS-PAGE 电泳，结果见图 3。结果表明重组质粒在 45.3KD 处出现一明显蛋白条带，该蛋白条带与重组蛋白的预期大小相符合，说明成功地诱导表达得到重组蛋白。

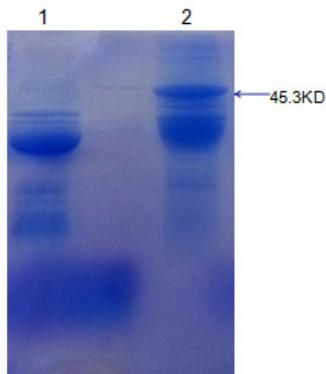


图 3 重组质粒的诱导表达

1: 诱导后的 pET-32a (+) 质粒; 2: 诱导后的重组质粒

### 2.3 重组蛋白表达形式的确定

将诱导破碎后的上清和沉淀分别进行制样，进行 SDS-PAGE 电泳分析，结果见图 4。结果显示虽然破碎后的沉淀存在少量的重组蛋白，但是重组蛋白主要存在于上清中，该结果表明重组蛋白主要以可溶的形式进行表达。

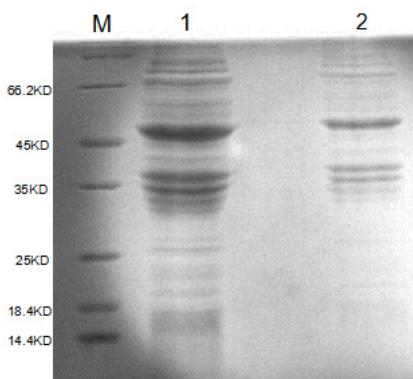


图 4 Cap 重组表达形式的确定  
M: Marker, 1: 上清; 2: 沉淀

### 2.4 重组蛋白的 Western Blotting 鉴定

分别使用猪圆环病毒 2 型阳性血清和兔抗猪 IgG 作为

一抗和二抗对 Cap 重组蛋白进行 Western Blotting 鉴定，结果见图 5。结果显示硝酸纤维素膜上 45KD 出现一明显条带，说明 Cap 重组蛋白可以与猪圆环病毒 2 型阳性血清反应。由此证明 Cap 重组蛋白具有良好的反应原性。

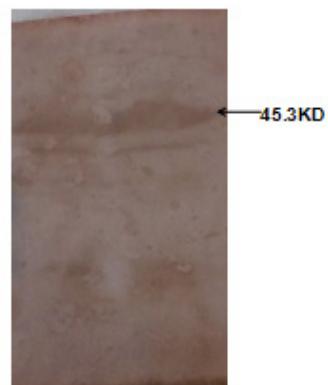
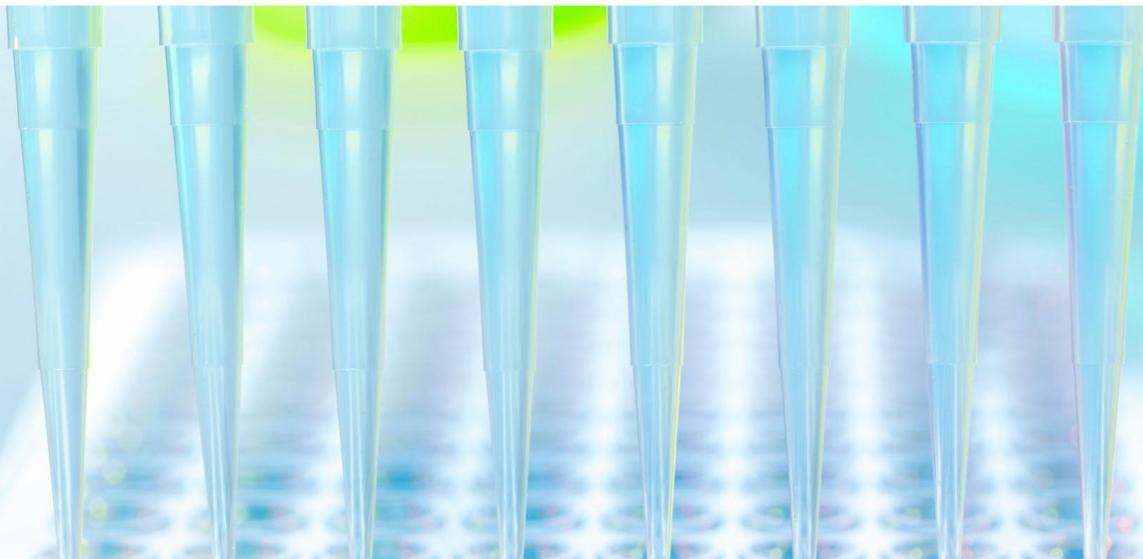


图 5 Cap 重组蛋白 Western Blotting 鉴定

### 3 讨论

研究表明，PCV2 ORF2 所编码蛋白 N 末端 41 个氨基酸是其在核内定位信号，含有大肠杆菌稀有密码子，它的存在能严重影响外源蛋白的表达，ORF2 编码核衣壳蛋白的 65~87、113~147、157~183 氨基酸区域及 C 端的 4 个氨基酸为主要的抗原结构；因此本试验中，我们选择切除了不利于体外表达的核内定位信号肽，而保留其主要的抗原结构域序列，将其插入 pET-32a (+) 表达载体中，构建重组质粒 pET-32a (+) -ORF2，在大肠杆菌中成功诱导表达具有良好生物活性的 rCap 重组蛋白。

（作者简介：张丽燕，硕士，执业兽医师，从事动物疫苗研发及诊断）



# 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (CH-1R 株) 微载体悬浮培养工艺的研究

文 | 曾光志

**摘要:** 通过优化细胞接种密度, 微载体浓度, 病毒接种比例及病毒收获时间, 用微载体悬浮培养 Marc-145 细胞来增殖猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV, CH-1R 株), 以获得高效价的病毒滴度。以  $4.0 \times 10^5/\text{mL}$  细胞密度接种 5g/L 的微载体, 培养 48h 进行换液, 按 1% 培养体积接种 PRRSV, 并于接毒后 40h 进行收毒, 可获得最佳增殖效果。在 7L 反应器中进行 5 批培养试验, 其稳定性和重复性好, PRRSV 的增殖效价均不低于  $10^{7.9}\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 。

**关键词:** Marc-145 细胞; 微载体; 悬浮培养; 猪繁殖与呼吸综合征病毒

猪繁殖与呼吸综合征 (俗称蓝耳病) (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, PRRS) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 引起的猪群发生以繁殖障碍和呼吸系统症状为特征的一种急性、高度传染的病毒性传染病, 给养猪业造成了巨大经济损失<sup>[1]</sup>。疫苗免疫是防控猪繁殖与呼吸综合征病毒的主要方法。我国已成功研制出猪蓝耳病病毒专用新型疫苗, 而提高病毒效价是疫

苗生产中非常重要的一个环节。

目前国内使用 Marc-145 细胞制备猪蓝耳病毒基本采用转瓶技术, 这些技术在规模化生产细胞和病毒时劳动强度高、批间质量差别较大, 比较难于进行标准化生产的质量控制。而应用生物反应器系统和微载体培养 Marc-145 细胞繁殖 PRRSV 具有批间差异小, 病毒效价更高, 细胞产量更高, 便于检测、控制和取样, 生产规模容易放大, 不易染菌等优点。细胞悬浮培养已是当前国际上生物制品生产的主流模式<sup>[2]</sup>, 利用生物反应器微载体悬浮培养 Marc-145 细胞增殖 PRRSV 技术优于传统的转瓶培养技术, 为我国猪蓝耳病疫苗的制备提供品质保障。本试验研究并探讨 PRRSV 在 Marc-145 细胞微载体 Cytodex 1 上的悬浮培养工艺, 为进一步放大培养提供依据。

## 1 材料与方法

1.1 细胞 Marc-145 细胞为华派生物制品有限公司质检研发中心保藏细胞株。

1.2 毒株 PRRSV (CH-1R 株) 为华派生物制品有

限公司质检研发中心保藏毒种。

1.3 试剂 细胞培养基 DMEM 及新生牛血清 均购自 GIBCO 公司, 胰蛋白酶购自 Invitrogen 公司, 用无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  离子的磷酸盐缓冲液配制成 0.25% 浓度的胰蛋白酶溶液, 调整 pH 值至 7.4~7.8, 经无菌 0.22  $\mu\text{m}$  膜过滤除菌, 4℃冷藏备用。

1.4 微载体 Cytodex 1 购自 GE 公司。用无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  离子的磷酸缓冲液室温浸泡至少 3 h 后洗涤 3 次, 经 121℃高压蒸汽灭菌 40 min, 冷却后储于 4℃密封待用。使用前用无血清细胞培养液洗涤 2 次。

1.5 反应器处理 将反应器玻璃罐置通风处, 取少量的硅化液加入到玻璃罐中, 润湿所有可能接触到微载体的容器表面, 将多余的硅化液从器皿中倒出, 用 95% 的乙醇洗涤 3 次, 然后将其晾干, 用注射用水彻底地冲洗。

1.6 生物反应器细胞培养分别用  $3 \times 10^5 / \text{mL}$  和  $4 \times 10^5 / \text{mL}$  浓度的 Marc-145 细胞接种于贝朗 7L 生物反应器中进行微载体培养。培养体积为 5L, 微载体浓度分别为 3g/L、4g/L、5g/L、6g/L, 控制 pH 在 7.2, 温度为 37℃, 溶氧 (DO) 值设为 40%, 搅拌速度为 80~90 rpm /min。培养细胞过程中监测葡萄糖含量, 每天取样检测细胞数量。

1.7 细胞密度的测定 均匀吸取微载体培养样品, 自然沉淀后去除上清, 用 PBS 清洗 3 次, 经 0.25% 胰酶溶液于 37℃消化 10 min 后获得游离细胞, 用细胞计数板进行细胞计数。

### 1.8 病毒增殖与收获

1.8.1 病毒接种 倒置显微镜下观察, 细胞在微载体上已长成致密单层时, 弃去营养液。将 5mL 病毒液加入 3L 微载体细胞悬液中, 混匀后, 室温吸附 60 min, 然后补加维持液至终体积为 5L, 设置温度为 37℃, 搅拌速度为 80~90 rpm/min。

1.8.2 收毒 镜下观察, 微载体上细胞出现病变, 圆缩并有少量脱落, 溶液中可见少量游离的细胞, 病变细胞达 80% 时收毒。收集上清, 并反复冻融三次。

### 1.9 病毒含量测定 将不同时间段收获的病毒液用无

血清 DMEM 细胞培养液作 10 倍系列稀释, 取  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  4 个稀释度, 分别接种至已长成良好单层、弃去细胞培养液的 96 孔 Marc-145 细胞培养板中, 每个稀释度接种 6 孔, 每孔 0.1mL, 同时设正常细胞对照组。每孔补加维持液 0.1mL, 对照孔 0.2mL。置 37℃、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养, 逐日观察接毒后细胞与空白对照细胞形态, 连续观察 3 d, 记录细胞病变孔数。按 Reed-Muench 法计算  $\text{TCID}_{50}$ 。

## 2 结果

### 2.1 不同微载体浓度对 Marc-145 细胞在 Cytodex 1 上生长的影响

分别以 3g/L、4g/L、5g/L、6g/L 的微载体浓度在 7L 生物反应器中进行分批培 Marc-145 细胞, 并在培养 48h 进行换液, 培养至 72h。在微载体浓度为 5g/L 时, Marc-145 细胞在 Cytodex 1 上生长速率快, 形态良好, 无空球且致密生长。

### 2.2 不同细胞接种密度对 Marc-145 细胞在 Cytodex 1 上生长的影响

2.2.1 分别用  $3 \times 10^5 / \text{mL}$  和  $4 \times 10^5 / \text{mL}$  的细胞浓度接种 7L 生物反应器, 观察发现, 在接种 8 h 后, 95% 细胞贴附上微载体, 并开始伸展; 24h 后细胞生长速度加快。随着细胞增殖速度增加, 营养物质的消耗也随之增加, 在培养 48h 进行换液, 以便维持良好的细胞形态及细胞增长速率。

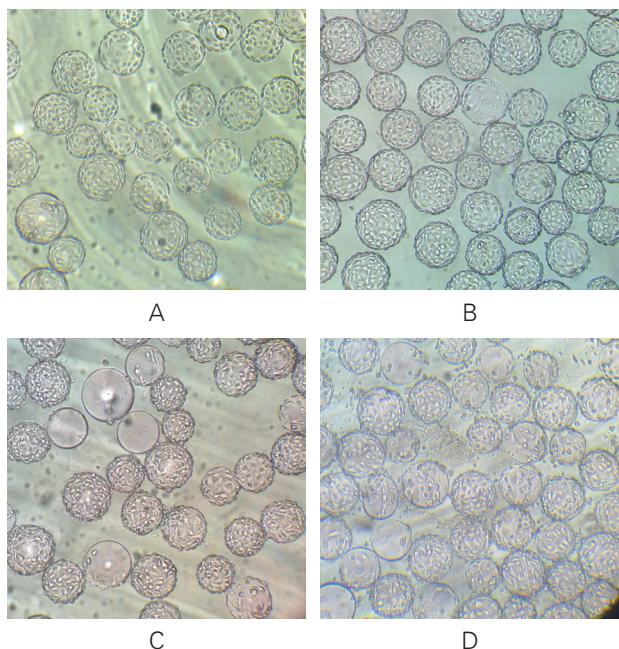
2.2.2 以  $4 \times 10^5 / \text{mL}$  细胞密度接种反应器, 培养至 72h 细胞密度达  $3 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6 / \text{mL}$ , 细胞状态稳定, 利于病毒增殖; 而以接种细胞浓度为  $3 \times 10^5 / \text{mL}$  接种反应器后, 培养至 72h 细胞密度较低, 随着培养时间的增加, 细胞增长速率变缓, 不利于病毒的增殖。

### 2.3 Marc-145 细胞在微载体 Cytodex 1 上增殖 PRRSV

2.3.1 根据已优化的培养工艺, 在 7 L 反应器中完成了 Marc-145 细胞微载体悬浮培养及 PRRSV 增殖的

全过程。Marc-145 细胞在微载体上持续培养及接毒后 40h、50h 的形态如图 1 所示。

2.3.2 Marc-145 细胞以 1ml  $4 \times 10^5$  个的初始密度接种于 7L 生物反应器中, 细胞在微球表面均匀生长, 培养至第 48h 通过换液操作获得较高的生长速率, 表现在其耗碱量和耗氧量持续增加, 说明细胞生长代谢旺盛。培养至 72h 细胞在微载体上生长致密, 即开始按 1% 培养体积接入 PRRSV 进行增殖, 接毒后 40h 获得的病毒效价达到  $10^{8.2}$  TCID<sub>50</sub>/ml。对上述工艺共进行 5 批培养验证, 在 7L 反应器中可获得稳定的细胞生长及病毒增殖效果(表 1), 病毒滴度稳定在  $10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub>/ml 左右, 比转瓶生产效价高。



A: Marc-145 细胞培养 48h; B: Marc-145 细胞培养 72 h; C: Marc-145 细胞接毒后 40 h; D: Marc-145 细胞接毒后 50 h。  
图 1 7L 生物反应器中 Marc-145 细胞微载体悬浮培养及 PRRSV 增殖形态

Fig. 1 Morphology of Marc-145 cells cultured on microcarriers and PRRSV propagation in 7 L biological reactor

表 1 7L 生物反应器中不同批次 Marc-145 细胞密度及 PRRSV 增殖结果

Table 1 Marc-145 cell density and PRRSV titer achieved in 7 L biological reactor in different batches

批次	接毒时细胞密度 ( $\times 10^6 \cdot mL^{-1}$ )	PRRSV 滴度(接毒后 40 h) (TCID <sub>50</sub> · mL <sup>-1</sup> )
I	$3.75 \pm 0.31$	$10^{8.21} \pm 10^{0.12}$
II	$3.62 \pm 0.44$	$10^{8.12} \pm 10^{0.15}$
III	$3.45 \pm 0.38$	$10^{7.97} \pm 10^{0.12}$
IV	$3.80 \pm 0.23$	$10^{8.01} \pm 10^{0.14}$
V	$3.57 \pm 0.33$	$10^{7.93} \pm 10^{0.11}$

#### 2.4 PRRSV 接毒比例和收获时间的确定

不同的接种比例对 PRRSV 增殖效价的影响结果如表 2 所示。过高或过低的接种比例都会使 PRRSV 增殖效价降低, 说明恰当的接毒剂量直接影响病毒增殖效率的高低。接毒比例为 1% 时可以获得最高效价的 PRRSV, 达到  $10^{8.2}$  TCID<sub>50</sub>/ml。此外各批次验结果均显示, 接毒后 40h 的病毒效价均高于接毒后 50 h 的病毒效价, 说明病毒接种后 40 h 可以作为病毒的最佳收获时间。

表 2 不同接种比例对 PRRSV 增殖效价的影响  
Tabel 2 Effects of different Virus inoculation proportion on PRRSV propagation titers

接种比例	PRRSV 效价 (TCID <sub>50</sub> /mL)	
	接种后 40h	接种后 50h
2.0%	$10^{7.6} \pm 10^{0.10}$	$10^{7.1} \pm 10^{0.12}$
1.5%	$10^{7.8} \pm 10^{0.12}$	$10^{7.3} \pm 10^{0.11}$
1.0%	$10^{8.0} \pm 10^{0.11}$	$10^{7.4} \pm 10^{0.10}$
0.5%	$10^{7.4} \pm 10^{0.13}$	$10^{6.9} \pm 10^{0.13}$

### 3 讨论

3.1 在培养初期, Marc-145 细胞与微载体的接触及

黏附效果取决于搅拌速率、细胞密度及微载体浓度，控制合适的微载体与初始细胞量的比例可以达到较好的培养效果。本研究中，Marc-145 细胞初始密度  $1\text{ml } 4 \times 10^5$  个细胞在 5g/L 的 Cytodex 1 微载体上可获得比较均一的细胞分布，细胞贴壁充分，并预留了一定的生长空间，细胞增殖密度和细胞存活率均获得很好的水平。Marc-145 细胞在微载体上长成单层后，为其提供优质的营养液、溶氧及低副产物积累的生长环境是获得高密度培养的关键。在 Marc-145 细胞培养至 48h 进行换液可以去除代谢副产物的积累，防止细胞脱落，有利于细胞生长更加致密，是最佳的培养方式。本研究表明过高或过低的接毒量均不利于 PRRSV 的增殖，其机理可能与 Marc-145 细胞上 PRRS 受体蛋白质表达丰度存在显著相关<sup>[3-4]</sup>，有待进一步研究。

3.2 发达国家技术先进的生物制品公司都采用表面微载体来生产减毒或者灭活的人用或兽用疫苗。随着我国每年用于疾病预防的疫苗品种越来越多，数量也越来越大，面对如此大量的疫苗生产量，用传统转瓶生产很难满足需要。随着国外高品质疫苗的竞争，微载体工艺在兽用疫苗的生产上将有很大的市场。微载体悬浮培养技术是目前动物细胞中日趋成熟的一种技术，生物反应器已成功应用于多种疫苗的生产过程中，如狂犬疫苗<sup>[5]</sup>，猪流行性腹泻疫苗，猪圆环病毒 2 型疫苗等等。本研究对应用 7L 生物反应器培养 Marc-145 细胞增殖 PRRSV 在不同参数下的病毒效价情况进行比较和优化，最终确定参数分别为：以  $4.0 \times 10^5/\text{mL}$  细胞密度接种、5g/L 的微载体浓度、培养 48h 进行换液、以 1% 培养体积接毒、接毒后 40h 进行收毒的培养工艺。本研究利用生物反应器和微载体培养 Marc-145 细胞生产 PRRSV，为后续研究、制备以及大规模工业化生产 PRRSV 疫苗提供了参考依据和基础，具有极大的应用价值和潜力。

### 参考文献：

- [1] Meulenbergh J. PRRSV, the virus [J]. Vet Res, 2000, 31(1): 11-21.
- [2] 张韧, 秦玉明, 陈文庆, 等. 悬浮培养技术在生物制药中的应用和展望 [J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(3): 56-60.
- [3] KIM J K, FAHAD A M, SHANMUKHAP-PA K, et al. Defining the cellular target(s) of porcine reproductive and respiratory syndrome virus blocking monoclonal antibody 7G10[J]. J Virol, 2006, 80(2):689-696.
- [4] DELPUTTE P L, VANDERHEIJDEN N, NAUWYNCK H J, et al. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparinlike receptor on porcine alveolar macrophages[J]. J Virol, 2002, 76(9):4312-4320.
- [5] ROOUROU S, VAN DERARK A, MA-JOUL S, et al. A novel animal-component-free medium for rabies virus production in Vero cells grown on Cytodex 1 microcarriers in a stirred bioreactor[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 85(1):53-63.

(作者简介：曾光志，硕士，主要从事动物疫苗的研发及  
疾病诊断工作)



# 猪圆环病毒 2 型灭活疫苗免疫后仔猪抗体水平的变化

文 | 秦运杰 徐静 罗璇 李金海 严成 罗彪 胡洋

**摘要:** 本试验选用 14 ~ 21 日龄的 PCV2 ELISA 抗体阴性、PCV2 抗原阴性、PRRSV 抗体阴性的仔猪 20, 随机平均分成 2 组, 疫苗免疫组和空白对照组。对疫苗免疫组仔猪接种猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 2 次, 1mL/头/次, 间隔 14d, 空白对照组不免疫。分别于首免后 1 ~ 8w, 每周采血 1 次, 8 ~ 16w, 每两周采血 1 次, 用 ELISA 方法检测抗体水平。结果表明, 疫苗免疫组仔猪在首免后 2w 抗体水平开始上升, 5w 抗体水平到达最高, 之后开始缓慢下降, 直到 16w 仔猪抗体含量还保持较高水平。血清抗体水平在一定程度上可以反应了疫苗的免疫效果, 抗体水平变化对疫苗的临床运用具有一定的参考价值。

**关键词:** 猪圆环病毒 2 型灭活疫苗; ELISA; 检测; 抗体

猪圆环病毒 (Porcine circovirus, PCV) 是目前已发现的最小的动物病毒, 根据其抗原性、致病性及核苷酸

序列可以分为猪圆环病毒 1 型 (PCV1) 和猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 两种血清型。其中 PCV1 无致病性, 但广泛存在于猪体内及猪源传代细胞系中; PCV2 可以引发猪群多种疾病, 如母猪繁殖障碍、猪皮炎肾炎综合征、仔猪先天性震颤和断奶仔猪多系统衰竭综合征 (PMWS) 等, 已成为严重影响我国养猪业发展的病毒性传染病之一。目前还没有特效药物根治本病, 猪场一旦被感染, 消灭本病极为困难。疫苗接种是预防仔猪 PCV2 感染最有效的手段, 疫苗的免疫效果和免疫质量直接影响着仔猪免疫力水平, 而目前检测疫苗的免疫效果主要通过监测免疫猪体内抗体水平的消长规律。ELISA 检测技术由于其具有特异性强、灵敏度高、重复性好、可同时检测多个样品等优点已被广泛应用于猪群病原微生物抗体监测。

## 1 材料和方法

1.1 试验动物 14 ~ 21 日龄的 PCV2 ELISA 抗体阴

性、PCV2 抗原阴性、PRRSV 抗体阴性的仔猪，购于资阳某猪场。

1.2 疫苗 圆环康(猪圆环病毒2型灭活疫苗, ZJ/C株), 批号 2015007, 由四川省华派生物制药有限公司生产。

1.3 试剂与设备 猪圆环病毒2型 ELISA 抗体检测试剂盒 Ingezim Circo IgG 1.1.PCV.K.1 (批号: 160714) 购自西班牙 Ingenasa 公司; BIO-RAD Model 680 酶标仪购于美国 BIO-RAD 公司; Eppendorf 单道可调量程 (10ul, 100ul, 200ul), 8道可调量程 (100ul) 购自德国 Eppendorf 公司。

#### 1.4 试验方法

1.4.1 试验动物分组 试验仔猪随机平均分成2组, 每组10头, 分别为疫苗免疫组和空白对照组。

1.4.2 免疫方法 疫苗免疫组共免疫2次, 首免采用颈部肌肉注射的方式, 1mL/头/次, 间隔14d后以相同的方式进行加强免疫, 空白对照组不接种。

1.4.3 采血 首免后1~8w, 每周采血1次, 8~16w, 每两周采血1次, 分离血清。

1.4.4 ELISA 检测 按照 Ingezim Circo IgG 1.1.PCV.K.1 试剂盒说明书所提供的方法进行检测血清样品的PCV2抗体水平, 用酶标仪检测各孔样品的OD<sub>450</sub>值。

1.4.5 临床观察 在免疫前后2~3d 观察试验仔猪的体温, 采食, 精神等情况; 详细记录在整个试验过程中仔猪的体况, 有无疾病发生, 及相应处理方法等。

#### 1.4.6 结果判定

试验成立对照品需要满足的条件是阴性对照OD<sub>450</sub>平均值小于0.35, 阳性对照OD<sub>450</sub>平均值大于0.70。若血清样品OD<sub>450</sub>值大于阳性Cut off值, PCV2抗体呈阳性; 若血清样品OD<sub>450</sub>值小于阴性Cut off值, PCV2抗体呈阴性; 若血清样品OD<sub>450</sub>值介于阳性对照及阴性对照Cut off值之间, 判定为疑似。血清抗体滴度的计算: Titre=53×(e<sup>3.2x</sup>), 其中, e是自然对数, x是样品OD<sub>450</sub>值/阳性对照OD<sub>450</sub>值。

## 2 结果

2.1 临床观察结果 疫苗免疫注射后, 免疫组仔猪的体温、食欲、精神状态均正常, 未见明显免疫副反应发生; 免疫组有1头仔猪在首免后26d出现发烧不食料现象, 注射青、链霉素后一周恢复正常。

2.2 血清抗体检测结果 用酶标仪测定各个样品的OD<sub>450</sub>值。由阴性对照OD<sub>450</sub>平均值(0.108)和阳性对照OD<sub>450</sub>平均值(1.085)计算出阳性Cut off值是0.358, 阴性Cut off值是0.308, 作为免疫组和对照组各样品判定阳性的依据。参照 Ingezim Circo IgG 1.1.PCV.K.1 说明书计算出免疫组各个血清样品在免疫后的抗体滴度几何平均值并用Excel绘制曲线图, 如图2。

表1 疫苗免疫组和空白对照组在不同时间的阳性率

组别	1w	2w	3w	4w	5w	6w	7w	8w	10w	12w	14w	16w
空白对照组(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
疫苗免疫组(%)	0	0	100	90	100	100	100	100	100	100	100	100

表2 各组不同时间血清样品抗体滴度几何平均值

组别	血清样品抗体滴度几何平均值											
	1w	2w	3w	4w	5w	6w	7w	8w	10w	12w	14w	16w
空白对照组	97	88	87	80	82	79	82	85	78	83	80	77
疫苗免疫组	107	99	702	1060	1783	1714	1676	1653	1660	1590	1496	1480

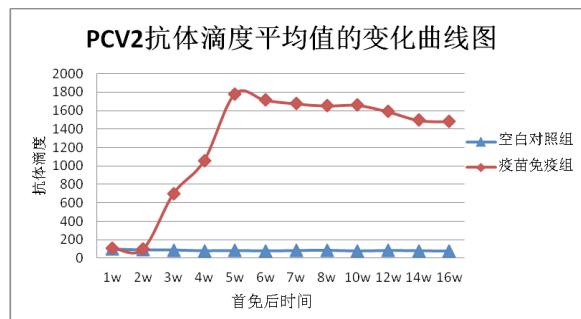


图1 不同时间PCV2抗体滴度平均值的变化曲线图

### 3 分析与讨论

3.1 本试验免疫组仔猪在首免后 14d 进行加强免疫 1 次, 从表 1 可以看出, 免疫组仔猪在首免后 2w 内抗体水平较低, 阳性率均是 0%; 在 3w ( 加强免疫后 7d ) 抗体血清的阳性率是 100%, 而在 4w 抗体血清的阳性率是 90%; 免疫组仔猪的阳性率均是 100%。结果表明猪圆环病毒 2 型灭活疫苗的免疫效果好。

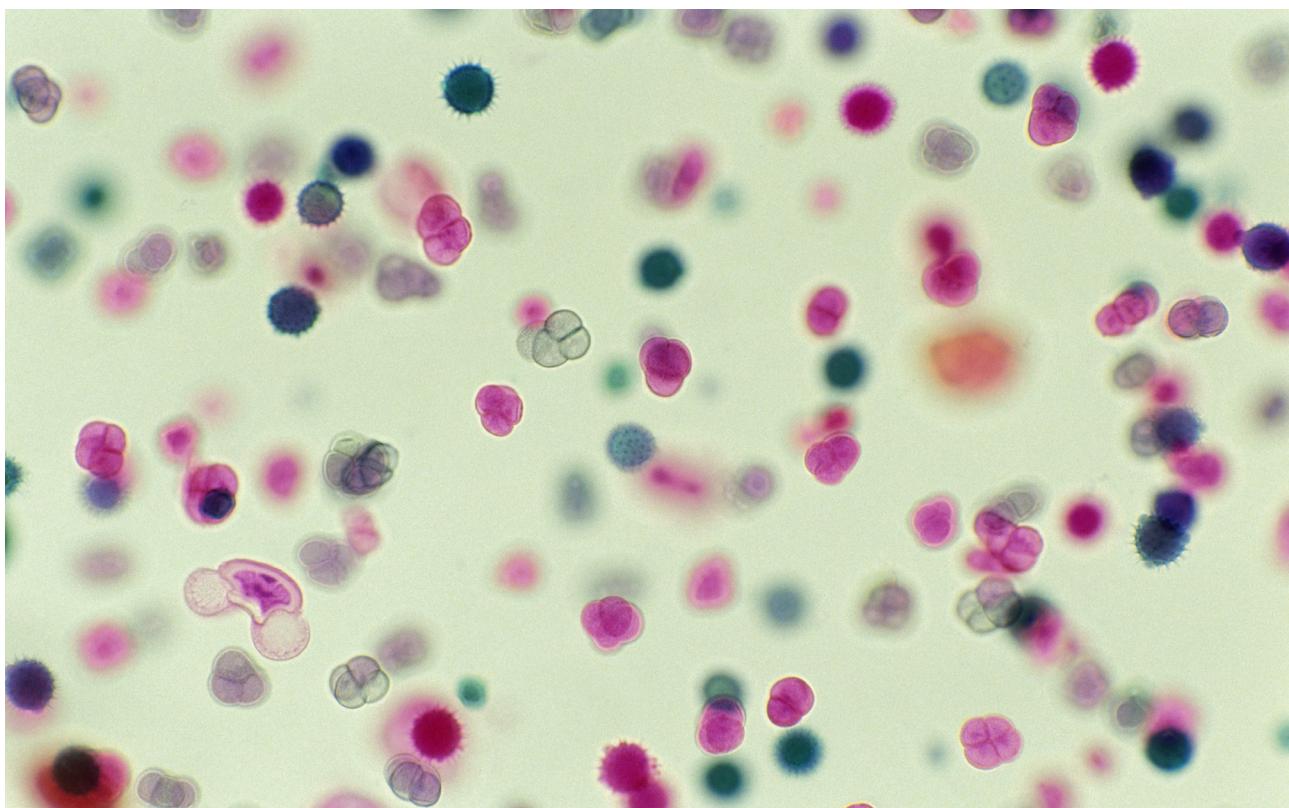
3.2 因在 4w 采血前 2 ~ 3d 免疫组有 1 头仔猪出现发烧现象, 注射青、链霉素后恢复正常, 这可能是导致 4w 抗体阳性率降低的原因。在临床生产上, 饲养管理的好坏、母源抗体的有无、免疫程序是否合理等都能影响仔猪抗体的产生, 规模化猪场应该加强对仔猪的饲养管理, 做好疫苗的免疫工作, 最大程度减少该病的发生。因此实际生产中免疫仔猪抗体水平的消长规律更加复杂, 需要进一步的试验研究。

3.3 抗体滴度是用来衡量某种抗体识别特定抗原决定

部位所需要的最大稀释度, 抗体滴度几何平均值能够真实的反应动物体的抗体水平, 大量的试验证实, 血清抗体水平含量在一定程度上可以反应了疫苗的免疫效果。从图 1 试验结果表明, 免疫组仔猪圆环病毒 2 型抗体滴度在首免后 2w ( 即加强免疫 ) 开始明显上升, 在首免后 5w 达到最高, 之后开始缓慢降低, 在首免后 16w 抗体滴度依然维持在较高水平。说明猪圆环病毒 2 型灭活疫苗 ( ZJ/C 株 ) 能够明显增加非免疫仔猪体内的抗体水平, 这对有效保护仔猪不受 PCV2 感染具有一定的参考意义。

3.4 本试验通过用 ELISA 方法检测免疫 PCV2 灭活疫苗后仔猪体内抗体滴度, 了解 PCV2 抗体水平变化规律, 为评价疫苗的免疫效果和建立良好的免疫程序提供理论依据。

( 作者简介: 秦运杰, 硕士, 主要从事动物疫苗的研发与  
检验 )





# 猪圆环病毒液的培养、纯化及浓缩工艺的研究

文 | 汤磊 陈树林 周俊华 何信群 秦云杰 程玲 吴永霞 李峰 张洪 徐春燕

**摘要:**为了适应规模化生产,对猪圆环病毒2型ZJ/C株的病毒液的增值培养条件及抗原的纯化、浓缩工艺进行筛选。通过对猪圆环病毒2型(ZJ/C株)感染PK15克隆细胞不同接毒量、接毒方式、收获时间及冻融次数进行比较,确定采用同步接毒法,接种量为细胞生长液1%,培养96h,冻融1~2次为猪圆环病毒2型(ZJ/C株)的最佳培养条件;采用3μm,1.2μm,0.65μm不同孔径囊式滤器进行纯化PCV-2病毒液试验,比较离心澄清度及毒价,选定3μm囊式滤器纯化PCV-2病毒液效果最佳;浓缩试验采用聚醚砜材质(PES)的赛多利斯截留分子量大小为30KD、50KD、100KD、300KD(膜胞面积为0.7m<sup>2</sup>)以及聚醚砜材质(PES)的赛多利斯100KD、Hydrosart材质的赛多利斯100KD两种膜胞材质,进行膜胞孔径和材质的选择,结果浓缩首选方案为赛多利斯100KD的Hydrosart膜胞。这样的病毒培养、抗原纯化及浓缩工艺毒价高而稳定,且获得优化的高品质的PCV-2病毒液工艺流程。

猪圆环病毒2型(PCV-2)属于环状病毒科成员,可引起断奶仔猪多系统衰竭综合征(PMWS)、猪皮炎肾病

综合征(PDNS)和母猪繁殖障碍等多种疾病,对世界养猪业造成了严重的经济损失。随着疫苗和诊断试剂的研制和生产,研究获取足量PCV-2抗原的有效方法十分必要,而体外高效价繁殖是制备疫苗的关键,为此,本试验对PCV2(ZJ/C株)在PK15克隆细胞上不同接毒程序、抗原纯化方法以及可以浓缩方案的比较研究,筛选出一套在规模化生产中最佳的PCV-2病毒液、抗原的培养工艺,为疫苗的质量研究奠定基础。

## 1 试验材料

- 1.1 培养介质 PK15克隆细胞(无支原体感染)
- 1.2 种毒 PCV2(ZJ/C株)种毒
- 1.3 试剂 MEM培养基,新生牛血清,胰酶消化液(PK胰酶),PBS溶液D-氨基葡萄糖溶液(促进病毒增殖)。
- 1.4 浓缩系统:聚醚砜材质(PES)的赛多利斯截留分子量大小30KD、50KD、100KD、300KD,(膜胞面积为0.7m<sup>2</sup>);聚醚砜材质(PES)的赛多利斯100KD、Hydrosart材质的赛多利斯100KD两种膜胞材质。

1.5 滤芯: 3 μm、1.2 μm、0.65 μm 囊式滤器

## 2 PCV-2 病毒液培养的方法

2.1 细胞复苏 将无 PCV-1 污染的 PK15 克隆细胞复苏, 加入含 10% 新生牛血清的 MEM 细胞生长液, 置 37°C、5%CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 长成良好的细胞单层。

2.2 细胞扩大培养 将生长良好的细胞单层, 加入含 0.02%EDTA-0.05% 胰酶消化液, 在 37°C 下作用 5-10 分钟, 分散均匀, 制成每毫升  $2 \times 10^5$  个细胞的细胞悬液, 分装于细胞培养瓶中, 置 37°C 培养 48h。

2.3 PCV-2 在 PK15 克隆细胞上接毒量的优化 将扩大培养的细胞加入 0.02%EDTA-0.05% 胰酶消化液, 分散均匀, 用含 8% 无 PCV-1 污染的新牛血清的 MEM 细胞生长液制备成每毫升  $2 \times 10^5$  个细胞的细胞悬液, 按细胞生长液的 1%、2%、3% 比例接种 PCV2(ZJ/C 株) 生产用毒种, 培养 48h 弃营养液, 加入含 3% 的无 PCV-1 污染的新牛血清、1% 的 D- 氨基葡萄糖溶液的细胞维持液继续培养, 同时收获培养液 ( 拟定收获时间为接毒后 84h ) 、冻融细胞培养液, 测定 TCID<sub>50</sub>。

2.4 PCV-2 在 PK15 克隆细胞上接毒时间的优化 将扩大培养的细胞采用同步接毒、生长到 50% 接毒、长满 80% 以上接毒 3 种不同接毒方式, 接毒量按照 2.3 确定的最佳接毒量进行接毒, 其他操作步骤同 2.3。

2.5 PCV-2 在 PK15 克隆细胞上收获时间的优化 接毒时间和接毒量按照 2.3、2.4 确定的最佳方法接毒, 培养 48h 弃营养液, 加入含 3% 的无 PCV-1 污染的新牛血清、1% 的 D- 氨基葡萄糖溶液的细胞维持液继续培养, 培养至 72h、84h、96h、108h、120h, 收获冻融细胞培养液, 测定 TCID<sub>50</sub>。

2.6 PCV-2 在 PK15 克隆细胞上收获冻融次数的优化 接毒方法为 2.3、2.4、2.5 确定的最佳方法进行, 收获细胞时, 分别采用冻融 1 次、2 次、3 次细胞培养液, 测定 TCID<sub>50</sub>, 以其中 TCID<sub>50</sub> 最高最稳定者为最佳冻融

次数。

2.7 病毒含量 (TCID<sub>50</sub>) 测定 将收集的 PCV2 病毒液样品, 用 MEM 维持液作 10 倍系列稀释, 取  $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  个稀释度, 同步接毒 PK15 细胞悬液, 将接毒后的细胞悬液按样品稀释梯度接入 96 孔细胞板, 置 37°C 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 96h, 设空白细胞培养对照。用间接免疫荧光法检测每个稀释度 PCV2 阳性细胞孔数, 按 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>。

### 2.7.1 抗原的纯化方法

2.7.1.1 待纯化抗原液: PCV2 11P F3 混合液, 约 7500ml。

2.7.1.2 采用 3 μm、1.2 μm、0.65 μm 不同孔径囊式滤器进行 PCV-2 病毒液纯化试验, 比较离心澄清度, 并测定 TCID<sub>50</sub>。

### 2.7.2 抗原浓缩的方法

2.7.2.1 病毒液浓缩膜胞孔径的筛选 采用优化的 PCV-2 培养方案进行扩大培养, 用 3.2 纯化方法确定孔径的囊式滤器过滤澄清, 将澄清后的病毒液用赛多利斯 30KD、50KD、100KD、300KD (聚醚砜材质) (膜胞面积均为 0.7 m<sup>2</sup>) 4 种截留分子量大小的膜胞进行浓缩。

2.7.2.1.1 浓缩前样品病毒含量  $10^{6.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml。浓缩前样品体积均为 30L, 按 5 倍体积浓缩, 即透过 24L, 浓缩后剩余 6L。

2.7.2.1.2 超滤时控制系统: P 进口 = 1.5bar、P 回流 = 0.5bar、透过阀全开, P 透过 = 0, 跨膜压为 1bar。

2.7.2.1.3 比较 4 种不同截留分子量的赛多利斯膜胞浓缩后的处理时间、通透量、病毒含量 (TCID<sub>50</sub>)。

2.7.2.2 膜胞材质的选择: ①聚醚砜材质 (PES) 的赛多利斯 100KD (膜胞面积为 0.7 m<sup>2</sup>) ② Hydrosart 材质的赛多利斯 100KD (膜胞面积为 0.6 m<sup>2</sup>)

2.7.2.2.1 浓缩前样品病毒含量  $10^{6.3}$  TCID<sub>50</sub>/ml。浓缩前样品体积均为 30L, 按 5 倍体积浓缩, 即透过 24L, 浓缩后剩余 6L。

2.7.2.2.2 超滤时控制系统：P 进口 =1.5bar、P 回流 =0.5bar、透过阀全开，P 透过 =0，跨膜压为 1bar。

2.7.2.2.3 比较 2 种不同材质的赛多利斯膜胞浓缩后的处理时间、通透量、病毒含量 (TCID<sub>50</sub>)。

### 3 结果

#### 3.1 PCV-2 病毒培养方式的优化

3.1.1 接毒量的优化 试验结果表明 (表 1)，分别在三个不同的万瓶中重复三次的 1%、2%、3% 的不同接毒量对 PCV-2 病毒增值比较发现，3% 接毒量病毒 24~48h 增值较快，而 48~96h 1%、2%、3% 接毒量的病毒增值差异不明显。

表 1 不同接毒量的 PCV-2 病毒 84h 收获的病毒滴度结果

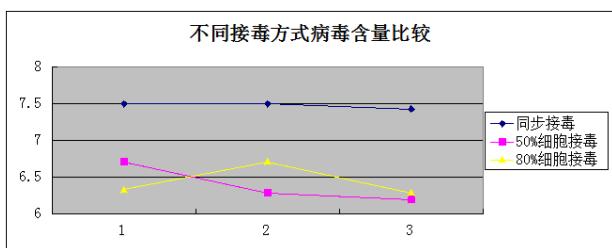
项目 TCID <sub>50</sub>	接毒量的优化								
	1#1%	2#1%	3#1%	1#2%	2#2%	3#2%	1#3%	2#3%	3#3%
1	6.61	6.71	6.80	6.80	6.67	6.80	6.61	6.67	6.71
2	6.80	7.20	6.71	7.20	6.61	6.61	6.80	6.80	6.67
3	6.67	7.00	6.80	7.00	7.00	6.80	6.80	6.71	7.20
均值	6.811		6.832			6.819			

表 1 的差异分析：1 列与 2 列  $P=0.8182>0.05$ ，差异不显著；2 列与 3 列  $P=0.8958>0.05$ ，差异不显著；1 列与 3 列  $P=0.9308>0.05$ ，差异不显著。表明 1%、2%、3% 接毒量的病毒增值差异不明显。在实际生产中，在不影响病毒含量的基础上，选择较低量 1% 的接毒量。

3.1.2 接毒时间的优化 试验结果表明 (表 2)，按不同接毒方式收获 PCV-2 病毒滴度有明显差异。接毒时间采用同步接毒 (培养 48h 更换维持液) 时病毒含量最佳，而 50% 细胞接毒与 80% 以上细胞接毒时，病毒增值后病毒含量测定较同步接毒低。虽然理论上细胞数越多，其所收获的病毒也应该越多，PCV-2 病毒增值也与细胞的生长周期息息相关，但 PK-15 克隆细胞密度并不是决定病毒滴度的决定性因素，与细胞分裂周期、接毒方式有一定的关系。

表 2 不同接毒方式的 PCV-2 病毒 84h 收获的病毒含量结果

项目 TCID <sub>50</sub> 编号	接毒方式的优化		
	同步接毒 (培养 48h 更换维持液)	50% 细胞接毒	80% 以上细胞接毒
1	7.20	6.71	6.33
2	7.5	6.29	6.71
3	7.43	6.20	6.29
均值	7.377	6.400	6.443



结果表明：同步接毒 (培养 48h 更换维持液)，其病毒含量明显优于 50% 细胞和 80% 细胞接毒时的病毒含量。

3.1.3 收获时间的优化 试验结果表明 (表 3)，按最优接毒方式和接毒量接毒后，培养 48h 弃营养液，加入含 3% 的无 PCV-1 污染的新生牛血清、1% 的 D-氨基葡萄糖溶液的细胞维持液继续培养，培养至 72h、84h、96h、108h、120h，收获冻融细胞培养液，病毒含量测定 TCID<sub>50</sub> 结果表明：病毒培养的收获时间为 96h 最佳，病毒含量达到  $10^{7.477}$  TCID<sub>50</sub>/ml，过早或过晚收获病毒增值未达到峰值，培养时间太长，病毒的大量增殖后又会抑制其自身的增殖。

表 3 不同收获时间的 PCV-2 病毒滴度结果

项目 TCID <sub>50</sub>	收获时间的优化				
	72h	84h	96h	108h	120h
1	6.71	7.20	7.50	7.00	5.90
2	6.29	7.00	7.50	6.71	6.00
3	6.33	7.20	7.43	6.61	6.14
均值	6.443	7.133	7.477	6.773	6.013

3.1.4 冻融次数的优化 试验结果表明（表 4），按最优接毒量、接毒时间、接毒方式、在最佳收获时间收获病毒，病毒收获后进行冻融可使病毒释放彻底从而获得更高的毒价，冻融 1-3 次对病毒滴度的影响差异不大，冻融次数增加，病毒滴度略有降低，实际生产选择冻融 1-2 次即可。

表 4 不同冻融次数的 PCV-2 病毒滴度结果

项目 TCID <sub>50</sub>	冻融次数的优化		
	冻融 1 次	冻融 2 次	冻融 3 次
1	7.43	7.43	7.2
2	7.43	7.50	7.15
3	7.20	7.20	6.80
均值	7.353	7.377	7.05

### 3.2 抗原纯化

将 PCV2 11P F3 混合液（约 7500ml），采用 3 μm, 1.2 μm, 0.65 μm 不同孔径囊式滤器进行纯化 PCV-2 病毒液实验，比较离心澄清度、测定 TCID<sub>50</sub>。见图 1、图 2。

图 1 病毒液澄清效果



图 1 表明：PCV2 病毒（澄清过滤前）离心后的样品可以看见明显的细胞沉淀块，3 μm, 1.2 μm, 0.65 μm 澄清过滤后基本上都没有观察到细胞沉淀块。

图 2 澄清前后病毒含量比较

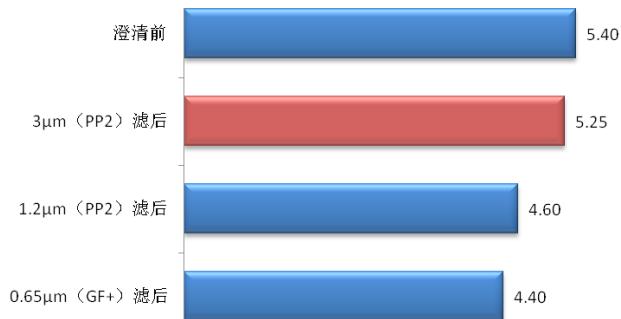


图 2 表明：澄清样品效价均有所降低，孔径越小，效价降低的越多，3 μm 澄清幕后病毒含量降低最少。且澄清效果较好。澄清主要去除病毒中大颗粒物质、细胞碎片及个别聚集后的较大杂蛋白物质。故选定 3 μm 囊式滤器进行 PCV-2 病毒液的纯化。

### 3.3 抗原浓缩

3.3.1 病毒液浓缩膜胞孔径的筛选 采用优化的 PCV-2 培养方案进行扩大培养，用 3.2 纯化方法确定孔径的囊式滤器过滤澄清，将澄清后的病毒液用赛多利斯 30KD、50KD、100KD、300KD（聚醚砜材质）（膜胞面积均为 0.7 m<sup>2</sup>）4 种截留分子量大小的膜胞进行浓缩。浓缩前样品病毒含量 10<sup>6.3</sup> TCID<sub>50</sub>/ml。浓缩前样品体积均为 30L，按 5 倍体积浓缩，即透过 24L，浓缩后剩余 6L。按相同实验样品、超滤系统、及超滤参数进行浓缩，浓缩前样品病毒含量 10<sup>6.3</sup> TCID<sub>50</sub>/ml，浓缩后理论病毒含量为 10<sup>7.2</sup> TCID<sub>50</sub>/ml。浓缩后实际通量、病毒含量见表 6。

表 6 不同孔径膜胞的浓缩前后效价变化情况

膜包孔径	实验次数	处理时间 (min)	平均通量 (LMH)	病毒含量 (TCID <sub>50</sub> /ml)
30KD	1	65	31	6.83
	2	62	33	6.81
	3	68	30	6.79
	均值	65	31.3	6.81
50KD	1	54	38	6.85
	2	52	39	6.84
	3	57	36	6.86
	均值	54	37.7	6.85
100KD	1	32	64	6.9
	2	36	57	6.87
	3	31	66	6.83
	均值	33	62.3	6.87
300KD	1	25	82	5.43
	2	28	73	5.31
	3	22	93	5.45
	均值	25	82.7	5.39

浓缩结果表明：300KD 膜胞进行超滤浓缩时，样品病毒含量下降较明显，推测 300KD 膜胞透过端有病毒透过，不能选择，淘汰。其余孔径膜胞进行浓缩，浓缩时通量  $100KD > 50KD > 30KD$ ，病毒含量随处理时间的增加有所下降，所以选择截留分子量大小为 100KD 膜胞进行超滤浓缩较合理。

3.3.2 膜胞材质的选择：①聚醚砜材质 (PES) 的赛多利斯 100KD (膜胞面积为  $0.7\text{ m}^2$ ) ② Hydrosart 材质的赛多利斯 100KD (膜胞面积为  $0.6\text{ m}^2$ )。浓缩前样品病毒含量  $10^{6.3}\text{ TCID}_{50}/\text{ml}$ 。浓缩前样品体积均为 30L，按 5 倍体积浓缩，即透过 24L，浓缩后剩余 6L。浓缩后实际病毒含量见表 7。

表 7 不同材质浓缩膜胞的浓缩前后效价变化情况

膜包材质	实验次数	处理时间 (min)	平均通量 (LMH)	病毒含量 (TCID <sub>50</sub> /ml)
聚醚砜 (PES)	1	34	60	6.91
	2	37	55	6.85
	3	33	62	6.93
	均值	35	59	6.9
Hydrosart	1	36	63	7.1
	2	39	61	7.13
	3	34	70	7.07
	均值	36	65	7.1

病毒含量结果表明：推测 Hydrosart 膜胞 > 聚醚砜膜胞，且通量 Hydrosart 膜胞 > 聚醚砜膜胞。故选择截留分子量大小为 100KD Hydrosart 膜胞进行 PCV2 病毒液的超滤浓缩。通过对病毒培养工艺、抗原纯化工艺及浓缩工艺的建立和筛选、并且进行不断的优化，从而生产出高品质的 PCV-2 病毒液。

#### 4 结论

PCV-2 病毒培养采用同步接毒法，接种量为细胞生长液 1%，培养 96h，冻融 1-2 次收获病毒液病毒含量结果最高。收获后病毒液采用  $3\mu\text{m}$  囊式滤器纯化、100K (Hydrosart) 膜胞进行超滤浓缩为最佳病毒纯化浓缩工艺。

华派生物采用的 PCV2 病毒超滤浓缩的意义——最大程度降低免疫副反应。具体表现为：

- 1、缩小病毒液体积、提高病毒含量；
- 2、纯化病毒、去除病毒中可能存在的对疫苗免疫后产生副反应物质 (抗生素、灭活剂、内毒素等)；
- 3、调节病毒液酸碱度、置换病毒液中的培养基物质和增殖过程的代谢产物。

(作者简介：汤磊，一车间细胞班班长)



# 猪蓝耳病的危害及综合防控办法的探讨

文 | 董振波

当前蓝耳病毒（PRRSV）对中国乃至世界的养猪业都是一大威胁，在我国每年因蓝耳病毒造成的经济损失达百亿元。中国猪场过度强调追求PSY，实际上每头母猪每年的产肉量才应该是养猪人的主要目标，这其中PRRSV的危害非常严重，它直接导致了每头母猪每年产肉量的减少。这个病已困扰我们十年之久，既有血的教训，也有成功的经验。但是由于商业的炒作和猪场自身的管理防控不到位使其仍然成为影响生猪生产的主要问题之一。在此我和大家做一分享和探讨。

## 一、对蓝耳病的再认识

蓝耳病毒对外界环境抵抗力相对较弱，病毒的稳定性

受PH和温度、湿度的影响比较大。PH6.0时稳定，但在PH小于5或大于7的条件下，其感染力降低95%以上。在4℃下仅存活一个月，37℃存活18h，56℃存活15min以内，干燥可很快使病毒失活。对有机溶剂十分敏感，经氯仿处理后，其感染性可下降99.99%。但在空气中可以保持3周左右的感染力，对常用的消毒剂的抵抗力不强。蓝耳病毒有严格的宿主专一性，对巨噬细胞有专嗜性。病毒的增殖具有抗体依赖性增强（ADE）作用，即在中和抗体水平存在的情况下，在细胞上的复制能力反而得到增强（无序的免疫会加大疫情的发生）。

蓝耳病毒是高度接触性传染病，广泛流行。PRRSV对各种品种、不同年龄和用途的猪均可感染，但以妊娠

母猪和1月龄以内的仔猪最易感。患病猪和带毒猪是本病的重要传染源。主要传播途径是接触感染、空气传播和精液传播，也可通过胎盘垂直传播。猪感染病毒后2~14周均可通过接触将病毒传播给其他易感猪。从病猪的鼻腔、粪便及尿中均可检测到病毒。易感猪与带毒猪直接接触或与污染有PRRSV的运输工具、器械接触均可受到感染。感染猪的流动也是本病的重要传播方式。PRRSV可在感染猪体内存在很长时间。PRRSV可通过血液循环穿过胎盘使胎猪受到感染，从而引起妊娠后期母猪流产等繁殖障碍。

本病的潜伏期差异较大，引入感染后易感猪群发生PRRS的潜伏期，最短为3天，最长为37天。本病的临诊症状变化很大，受免疫状态及饲养管理因素和环境条件的影响。

发病猪群临床表现：A、发病母猪主要表现为精神沉郁、食欲减少或废绝、发热，出现不同程度的呼吸困难，妊娠后期（105~107天），母猪发生流产、早产、死胎、木乃伊胎、弱仔。母猪流产率可达50%~70%，死产率可达35%以上，木乃伊可达25%，部分新生仔猪表现呼吸困难，运动失调及轻瘫等症状，产后1周内死亡率明显增高（40%~80%）。少数母猪表现为产后无乳、胎衣停滞及阴道分泌物增多。B、1月龄仔猪表现出典型的呼吸道症状，呼吸困难，有时呈腹式呼吸，食欲减退或废绝，体温升高到40℃以上，腹泻。被毛粗乱，共济失调，渐进性消瘦，眼睑水肿。少部分仔猪可见耳部、体表皮肤发紫，断奶前仔猪死亡率可达100%，断奶后仔猪的增重降低，日增重可下降75%，死亡率升高25%。耐过猪生长缓慢，易继发其他疾病。C、生长猪和育肥猪症状轻微，有不同程度的呼吸系统症状，少数病例可表现出咳嗽及双耳背面、边缘、腹部及尾部皮肤出现深紫色。感染猪易发生继发感染，并出现相应症状。D、种公猪的发病率较低，主要表现为一般性的临诊症状，但公猪的精液品质下降，精子出现畸形，精液可带毒。

阳性不稳定猪场主要表现：猪群的生产性能下降，生长缓慢，母猪群的繁殖性能下降，猪群免疫功能下降，易继发感染其他细菌性和病毒性疾病。猪群的呼吸道疾病（如支原体感染、副猪的感染，传染性胸膜肺炎、链球菌病、附红细胞体病）发病率上升。

阳性稳定场的表现：感染猪不发病，PRRSV的持续性感染，猪群的血清学抗体阳性，阳性率一般在10%~88%，但生产稳定，对生产基本上没有任何的影响，这就是我们当前养猪的理想状态。

爱荷华州立大学N.Gabier的研究发现：蓝耳病影响生长-育肥阶段，使生长率下降接近20%，其中采食量下降7%、饲料利用率下降15%、每头猪成本增加14美元/87元、育肥期延长25天。据卡美农业咨询机构的统计数据显示，加拿大的205个猪场中，不感染蓝耳病的情况下，平均PSY可以达到27.2，但在受到蓝耳病的中度影响时，可致使PSY下降到24.7，重度影响则下降到23.7，在保育猪（6~25kg）的饲料转化率中则会由正常水平的1.46提高到1.53，甚至1.64，日增重也会由451.7g下降到423.6g，对育肥猪的影响更大，由899.3g下降到810.1g，直接下调了10%。Pedro E.Urriola博士也做了蓝耳病对猪生长速度影响的相关实验（33~127kg体重），证实蓝耳阳性猪的干物质消化率，能量消化率以及氮消化率均存在下降的情况，在感染65~70天的时候分别下降了3.2%、3.9%、5.6%，最终导致体重降低42%、采食量降低30%、饲料转化率降低18%。

蓝耳病毒是由鼠的动脉炎病毒感染了中欧的野猪后产生的变异病毒（伤口感染），这些野猪被引进美国就作为中间宿主将病毒传播至美国，这些病毒在美洲和欧洲内独立变异和进化，大约经过几十年左右的时间，通过家猪和野猪的接触，病毒进入家猪（domestic pigs）群中，形成了后来的两大独立的蓝耳病病毒原型（即通常所说的蓝耳病病毒的两种基本的基因型），即以ATCCVR-2332（VR株）毒株为代表的美洲型（简

称 B 亚群 ) 和以 Lelystadvirus(LV 株 ) 为代表的欧洲型 ( 简称 A 亚群 ) 。毒株之间存在显著的抗原差异性，两者只有很少的交叉反应。 A 亚群：广泛的基因组变异， B 亚群：较为保守。而且两个毒株的差异越大，两者之间不相容的程度就越高。全球的种猪大流通也就传到了我国，我国的猪繁殖与呼吸综合征病毒分离毒株绝大多数属美洲型 ( B 亚群 ) ，但目前在我国发现已经出现了变异，发现了输入性的北美毒株与本地流行株发生自然重组现象，并感染猪发病。蓝耳病毒本身是一个外来疾病，为何会和本地流行毒株出现重组？本地的流行毒株又从何而来？为何只有中国在不断的出现新的毒株，新的基因重组呢？我想这根源是我国不断开发的基因缺失高致病蓝耳活疫苗，人为的基因缺失疫苗的不稳定性必然造成基因重组，不断地产生新的毒株。中国农业大学杨汉春教授说，蓝耳病不同毒株之间的重组是引起蓝耳病病毒变异的分子机制。当前在猪场分离的毒株大部分是疫苗毒，停止或有序使用高致病性蓝耳活疫苗才是有效改善中国蓝耳病毒的第一选择。蓝耳病不同毒株之间的重组是引起蓝耳病病毒变异的分子机制，目前中国有多家疫苗厂提供多个毒株的蓝耳病减毒活疫苗，猪场的蓝耳病疫苗免疫存在一些乱象和误区，如同一个猪场使用两种不同毒株的高致病性活疫苗，随意更换不同毒株的活疫苗。这加大了蓝耳病防控的难度。建议一个猪场仅使用一种经典毒株的弱毒疫苗或灭活疫苗，且建议只做“一次免疫”。即不要反复免疫。猪群稳定后，应停止使用活疫苗。

## 二、生产管理方案

1、坚持自繁自养的原则，建立稳定的种猪群，不轻易引种。如必须引种，首先要搞清所引猪场的疫情，此外，还应进行血清学检测，阴性猪方可引入，坚决禁止引入阳性带毒猪。引种体重一定控制在 45-55 公斤，体重过大的不宜引种，引入后必须建立适当的隔离区，做好隔离驯

化，抗体水平同经产母猪一致方可合群。

2、规模化猪场要彻底实现全进全出，至少要做到产房和保育两个阶段的全进全出。

3、建立健全规模化猪场的生物安全体系。做好消毒非常重要，一方面定期对猪舍和环境进行消毒可防止外面疫病的传入，另一方面通过严格对污物排放消毒处理把猪场内的病原微生物的污染扩散降低到最低限度，可以最大限度地控制和降低 PRRSV 感染猪群的发生率和继发感染机会。

4、做好猪群饲养管理。在猪繁殖与呼吸综合征病毒感染猪场，应做好各阶段猪群的饲养管理，用好料，保证猪群的营养水平，减少霉菌毒素的压力（添加霉菌毒素吸附剂），提高猪群的免疫力和抵抗力。

5、做好其他疫病的免疫接种，控制好其他疫病，特别是猪瘟、猪伪狂犬和猪喘气病的控制。在猪繁殖与呼吸综合征病毒感染猪场，应尽最大努力把猪瘟控制好，否则会造成猪群的高死亡率；同时应竭力推行猪喘气病灭活疫苗的免疫接种（2次），以减轻猪肺炎支原体对肺脏的侵害，从而提高猪群肺脏对呼吸道病原体感染的抵抗力。

6、对于猪群要做好疫病监控，通过对母猪的抗体检测，把问题猪（阳性的母猪）和健康母猪隔离分开饲养，可以达到猪场稳定的效果。

7、闭群时间长的猪场，会面临着双阴的问题，这样的猪场一定要定期监控，当发现抗体水平很低的时候，一定要做好人工驯化，保证猪的抗体水平，以免猪群没有任何抵抗能力而造成巨大的损失。

8、母猪饲料里定期添加大环内酯类药物，以控制病毒的复制和继发感染。

9、确保圈舍的干燥，降低病毒的复制可有效控制病情的恶化。

## 三、防控方案

### （一）母猪的防控方案

蓝耳病，重点是后备母猪的驯化和大群的净化。后备

猪一定要是阴性（抗原）猪，体重在45—55公斤，可以通过三次疫苗免疫，配种前80—90日龄免疫一次蓝耳经典株活疫苗（CH-1R），间隔30天再免疫一次，配种前15天第三次免疫，配种前评估后备母猪的抗体水平是否和经产母猪水平一致，不一致不能配种合群。后备母猪驯化好了，合群后猪群就是稳定的，做好管理即可，如有动荡经产母猪采用蓝耳病活疫苗经典株（CH-1R）接种防控。

## （二）生长猪的防控方案

1、阳性不稳定场，须用弱毒疫苗防控，加强消毒，防止强排毒给猪群的压力。  
2、阳性稳定场，可免可不免，免疫也不要太密集，仔猪免疫一次足矣，饲料中可以添加针对蓝耳病毒有抑制作用的药物联合防控。蓝耳与猪瘟疫苗免疫宜间隔

7—10天。

3、阴性场不建议用疫苗，保持阴性即可。净化并不一定要大量淘汰母猪群，把不健康母猪与健康母猪分群管理，不健康母猪也会逐步稳定。

4、当猪场用某种疫苗后猪场平稳后，不再换苗和不敢不免两种状态是对蓝耳病防控认识的常见误区，实际应该是当猪群稳定后应停止使用疫苗或减少防控次数。当前有些猪场蓝耳的压力不是野毒感染，而是高致病性蓝耳的疫苗毒感染。

（作者简介：董振波，大学本科，河南省区销售经理）





# 生物安全及生物防卫： 兽医实验室及动物设施管理生物风险的标准

文 | OIE《陆生动物手册》 译 | 徐静

## 引言

1.1.0 章节《兽医实验室管理》概括了总的要求和责任，这在兽医实验室管理这一节中阐明，其中与实验室运行相关的生物风险管理是重要方面之一。本章概括了兽医实验室和实验动物设施相关的生物风险管理应遵循的基本原则。该术语与 OIE 风险分析命名一致，包括危害确定、风险评估、风险管理、风险信息交流四部分。在 2.1 章节 OIE 陆生动物健康代码和 OIE 水生动物健康代码的输入风险分析也采用这样的命名。这样，该过程与 OIE 成员国所采用的风险分析过程相一致，并作为风险分析的标准过程。

兽医实验室和动物设施采用风险分析方法管理生物安全和生物防卫的生物风险，这为各成员国根据其实验室特定的环境和考虑的主次制定各国相关的动物保健制度和程序提供了方法。生物风险管理方法以事实为基础、透明的、经济有效的和可持续的方法为各国提供了防止人类和动物群体偶然地或故意地泄漏动物病原或接触病原的机制。该方法可在从拥有先进技术到过度阶段或资源匮乏的所有国家都有用。

风险分析方法朝着广泛的生物风险管理框架方向前进，该方法以科学为基础，针对不同国家和不同实验室环境。该过程可将病原分为不同的风险组别，随后在根据确定的风险类型定制的控制级别的设施中开展相关工作，如果根据生物风险分析

确定该方法满足该国的要求。本章节及管理生物风险相关指导原则：根据评估的生物风险制定风险管理策略为实施风险管理方法提供了框架。兽医实验室及动物设施经常处理生物材料，这些材料可能有传染性病原和毒素，由于不可控制的泄漏到实验室内或实验室外，这些病原和毒素可能引起动物不良反应、危害公共健康、产生经济影响。实验室及动物设施管理人员负责提供管理体系，确保安全处置、保存和运输这些生物材料（生物风险评估体系）。要求生物安全体系不仅预防实验室工作人员偶然接触和感染，而且也防止生物病原和毒素从实验室偶然或故意泄漏和传播到局部和区域内的动物群体、人群及环境中。在兽医实验室和动物设施中处理动物及可能的节肢动物媒介时也应考虑生物安全。通篇所用的“生物材料”包括所有可能的生物风险源，实验室管理都应对此负责。为了将已存在的生物风险及处置特定的生产材料可能引起的生物风险进行分类，实验室管理人员应采用系统的、以事实为依据的方法。

生物风险分析是确定、定性健康、安全、防卫措施的风险，然后实施、评估和沟通控制措施，将这些风险降低到可接受程度这样一个过程。私人企业、金融、工程、能源和健康行业有效地利用风险分析，以定性和控制该行业在运行过程中固有的风险。本章主要关注与生物相关的风险，也包括应在实验室环境中加以控制的，比如辐射、化学物灼伤、液氮损伤等其他的健康和安全顾虑。实验室生物风险管理包括制度、职责、支撑生物风险分析的操作步骤、管理实验室生物风险的生物安全和生物防卫措施。

风险分析原则的其他定义和更进一步地解释以及本章报道与实验室生物风险管理方法在OIE的关于动物及动物产品输入风险分析手册和欧盟委员会关于实验室生物风险管理的标准工作协议中查到。根据本章的概述，进行风险分析的总的指导原则见附录1.1.3.1。在附录1.1.3.2的一个表中提供了要考虑的生物危害类型、要考虑的相关风险及管理策略类型。3.5节的指导原则中有根据一个假定的情况下如何核查工作样品中含某种特定传染性病原。



## A. 实验室生物安全和生物防护背景

正如 1.1.0 章节概括的兽医实验室管理那样，这是有那样设施的成员国的一个标准：在正式公布的、清楚标明实验室服务目的动物健康制度之内来管理这些设施。动物健康制度通常包括明确提出病原诊断或研究必须具备的能力，然后设计和开发适合该目的的实验室能力。实验室能力设计将就是否使用或不使用特定的直接和间接实验室检测方法，这些方法可能涉及到在实验室里处理、培养和保存特定传染性病原或毒素。预计实验室设计这一过程将会列出生物材料清单，包括实验室将会拥有的每一个特定的传染性。

开展生物风险评估就可制定制度和程序，有了这些制度和程序，就可相信实验室的每一个生物材料处理程序仅会对国内动物和人群产生微不足道的的危害。通常在一个国家或辖区内进行生物风险评估，这就会制定国家或辖区的生物风险管理标准或法规，国家或辖区内的所有兽医实验室和动物处理设施都应遵循。负责生物风险分析的单位和实验室可以应用出版发行的技术性文件中有的数据、信息。譬如这些技术性文件：OIE 陆生动物健康代码、水生动物健康代码、陆生动物手册以及其他国际性组织的出版物中的特定章节。

本章的目的是为成员国和实验室提供在制定标准、制度和适合特定环境的程序时可应用的过程。额外的要求是：某国实验室生物风险管理生效时，与其合法利益相关其他成员国必须知道这一过程。尽管本章适用于兽医实验室和动物处理设施，必须注意在国际环境下，影响公共健康的重大问题也受到国际协议的约束。因此，兽医生物风险分析过程产生的结果应支持该国世界卫生组织国际健康条例规定的人畜共患病的义务。对那些正在制定国家标准的国家，本章为他们提供了鉴定和评估动物健康风险和相关的实验室管理策略的指导原则。

实验室生物安全描述了防止生物病原和毒素发生偶然泄漏或突然接触的原则和操作惯例。实验室生物防卫描述的是为了防止损失、被窃、滥用、未经许可的靠近或故意的未经许可的泄漏，在实验室内用实体控制生物病原和毒素。在

陆生手册的词汇表中定义这些及其它名词。

用实验室风险评估确定特定的生物安全和生物防卫措施，需要这些措施来限定和安全处理实验室内或动物设施内的特定生物病原和毒素。将生物病原与特定的生物限制级联系起来的常见措施来自将生物病原和毒素鉴定具有危害以及根据可能引起个体和群体发病将病原分为四个风险组这一理念。不同国家之间采用的风险组分类体系尽管相似，但也不一致，通常包括致病性、传播模式、宿主范围、是否有传播媒介、群体免疫水平、是否有合适的预防或治疗方法、宿主群体的密度及活动范围以及相关的环境因素。

与生物病原风险组分类过程无关，过去制定的生物安全级别定义（即是说实体限制级别）来定性实验室，根据实体设计特征、设施构建、设备、操作程序以及实验室安全处置可能对个人或社区具有不同级别的风险的各种生物病原和毒素的操作规范。世界卫生组织将实验室设施分为：基础级——生物安全一级（BSL，可从事基本的教学和研究），生物安全二级（可从事基本的健康服务、诊断和研究），限制级——生物安全三级（从事特定的诊断、研究），最高的限制级——生物安全四级（从事危害性大的病原的研究）。生物安全水平分类体系受到质疑，因为全球并不采用相同的标准和定义，因此用不同国家大量的分类方法的实验室之间没可比性和代表性。重要的是要注意到将特定生物病原划入不同的风险组一直都不与实验室生物安全级别直接对等；相反，将特定病原与特定的生物安全措施联系在一起是通过评估与存在和处理某个生物病原相关的生物风险以及在特定设施或环境中所使用的相关操作程序而确定的。是某个生物安全和实验室防护措施或多个措施结合在一起，而不是某个指定生物安全级别，来指导实验室以安全保险的方式处理某个生物病原或毒素。在生物风险评估期间确定特定的生物安全和生物防护措施，生物风险评估考虑了实验室组成、设施、将要处理的生物病原或毒素的周围环境。随着时间推移，很大实验室在选择适当的生物风险降低措施时，小看甚至忽略了正式的风险评估的作用，由根据风险类别将生物病原安

排到根据四种生物限制级别确定的实验室设施中。如此操作并不一定会为完备的生物风险管理制定出合适的策略。而且，在某些国家建设和维护高级别的限制实验室的费用是不可行或许被禁止，或则不能提供一种最具有操作性和可行的管理特定生物风险的方法。根据国家或区域的动物健康策略——包括考虑到地方流行性疾病状况、环境、动物运输、贸易协议和地域边界——制定实验室专用的生物风险评价及相关的实验室风险控制措施，更切实际和更为有效。

本章定义了生物风险分析所用到的术语和方法，如果按照这样做就可以为国家、辖区和兽医实验室在制定、实施和保持合适的生物安全和生物防护措施提供切实可行的方法，从而建立起能发挥作用的、高效的生物风险管理体系。

## B. 生物风险分析及生物风险管理

生物风险分析包括确定生物危害物、实验室评估、然后对相关的生物风险进行管理以及生物风险交流沟通。对兽医实验室来说，生物风险分析主要针对动物、人及环境可能接触到故意或无意从实验室泄漏出的生物病原和毒素。实验室生物管理体系最终为实验室管理人员、国家或辖区的官方提供一种结构化的生物风险评估、评审和控制过程。

实验室生物管理体系包括某个特定病原在实验室如何处置、控制和保存的情况下，为确定个特定病原会引起疾病的疾病和经济风险风险、疾病的严重程度、管理和交流沟通疾病和经济风险而需要制定的制度、程序和操作单元。

确保生物风险评估所产生的工作内容的安排有合适的方法是实验室的职责，这些工作内容包括：日程、责任人、需要认定、实施和维护的相关的报告和许可机制。通过制定与设施性质和规模、工作内容及相关生物风险相匹配的风险管理制度而完成。制定制度目的是 a. 保护员工、合作人、参观人员、社区、周围的动物群体和环境防止无意或有意的泄漏或接触到在该设施里储存或处理的生物病原和毒素； b. 通过开展实验室设施和工作内容的风险评估、确定适当的风

险控制措施、实施和监测这些措施的效果，将可能引起病原泄漏或接触的实验室风险降低到可接受的水平； c. 有效地告知员工和相关的股东风险管理的结果和要承担的责任，并与他们交换意见。

成功的生物风险管理要有清楚明确的实验室管理人员所承担责任，实验室管理人员确保与生物风险管理相关的作用、责任和权力明确、记录在案，并与管理、实施、验证实验室生物病原和毒素相关工作的人员交换意见。

实验室管理要确保： a. 提供足够的资源； b. 生物安全和生物防护制度相关事项的优先顺序及沟通； c. 整个实验室的生物安全和生物防护措施的完整性； d. 一个稳固的监测和评价过程，该过程可以抓住改进时机、确定产生不满意情况的根本原因、修订制度和程序防止再发生。在管理实验室风险过程中持续不断地验证和改进实验室有效性是一种完整而有效的生物风险管理体系的重要组成部分。

每个实验室都应任命一个风险管理督导，他应直接向高级的实验室管理人员汇报，有权力制定和实施生物风险管理，负责制定和保持该体系全方面的记录，在实验室或设施内监测该生物风险管理的效果。生物风险管理督导人员应了解实验室设施设备、实验室采用的程序、可能遇到的生物病原和毒素。在较小的实验室，生物风险管理督导可能还要其它作用或职责，通常是质量管理或安全管理人员。任命的生物风险管理督导人员有高级管理人员赋予的权利要求停止不符合实验室生物风险制度和程序的工作。

生物风险分析的重要作用是： a. 生物危害的识别（即是说哪些会引起生物危害）； b. 生物风险评估（即是说生物风险事件可能怎样发生，危害的严重程度如何）； c. 风险管理（意思是预防这些风险以及如何将这些风险降低到可接受的水平）； d. 风险交流沟通（意思是确定、定性和控制风险）； e. 验证并持续该井（意思是在控制生物风险中这些生物安全和生物防护措施是否有效，是否还可进一步改进）。因这些工作内容而设定的组织结构、责任、制度和措施构成了实验室生物管理体系。生物风险管理

体系内的相关条例要求明确且完善是非常重要的。法律要求包括实验室都应遵守的国家、联邦、区域、州、省、市和当地的所有法规。

### 1. 危害确定

风险分析过程的第一步是确定和记录可能的实验室危害。生物危害可能是生物病原、毒素或实验室或动物设施操作中可能引起的危害或伤害。在确定生物危害过程期间，必须鉴定能导致该生物病原具有危害性的特性，同时该病原可能被滥用或被窃。尽管不是本章节的重点，但也应注意实验室必须非常清楚所有可能的危害（任何来源、形势或处置可能引起的危害），而不仅仅是生物病原本身的危害。比如用电安全、人身安全或辐射危害以及与停水、停电、停气、培训不到位、供应商的选择等等引起的问题，这些看来与生物病原和毒素本身没直接联系，但可能引起生物病原或毒素泄漏以及引起其他危害。

实验室风险管理应完整地鉴定和管理包括后面列出的那些所有危害。

#### 1.1 实验室保存的生物材料及涉及到的生物材料库

在生物风险评估过程中，应知道、记录和逐个说明实验室所保存的所有生物材料。实验室工作要用特定病原和毒素以及在使用这些病原和毒素时的技术程序必须清楚。这是生物风险评估的基本点。

#### 1.2 诊断用样品

兽医诊断中心经常收到送来的样品，这些样品可能有各种各样的病原。当不清楚这些样品是否有传染性，诊断样品可能有多种未知病原，一些病原对人危害极大，或对动物群体具有很大的威胁。兽医诊断实验室有责任做好适当的生物安全和生物防护措施，将员工职业风险降到最低，将诊断样品中的病原散播和传播降到最低。实验室所有未知诊断样品一开始都必须认为送来的这样样品有传染性病原或毒素。直到确诊这些样品无传染性病原。兽医实验室采取谨慎非常重要，防止皮肤接触和粘膜途径——特别是吸入和消化道感染。实验室一旦确定了某种特定的病原或毒素，就必须用相

关的生物限制和风险控制方法开展下一步工作。1.3 病原的保存和运输

安全运送标本的要求见 1.1.2 章节——动物来源标本的运送。实验室和动物设施通常都保存活的病原，因此大多数（尽管不是所有）兽医实验室和动物设施都有生物危害。在保存病原和毒素的设备和库存体系中必须清楚阐明突发事故性或未经许可而接触到生物病原和毒素引发的风险。正如前面提到，兽医实验室和动物设施的一个重要的生物防护职责是确定和将病原散播到人群和动物群体（包括家养和野生）的风险降到最低。

#### 1.4 物理的和化学危害

在生物危害确定的演练期间不能忽略实验室日常运行和使用动物时的机械和化学的危害。为了确保生物安全项目足以保护实验室的工作人员，实验室和动物设施应确定存在的风险。比如兽医实验室通常存在的风险有处置玻璃、针头、尖锐器具、热的东西、辐射引起的烧伤液氮引起的灼伤和窒息、不正确或不相容地保存化学物品引起的爆炸、通过呼吸和皮肤接触或多次接触（剂量效应）致突变、致癌和有毒的化学物品。

#### 1.5 实验动物

用实验动物开展工作也是一种实验室的重要危害。实验动物可能产生大量的传染性病原、也可能对饲养员和实验操作人员被咬、抓、踢和其它相关的伤害。有更多关于实验动物设施中的健康和安全信息（Wood & Smith, 1999）

### 2. 生物风险评估

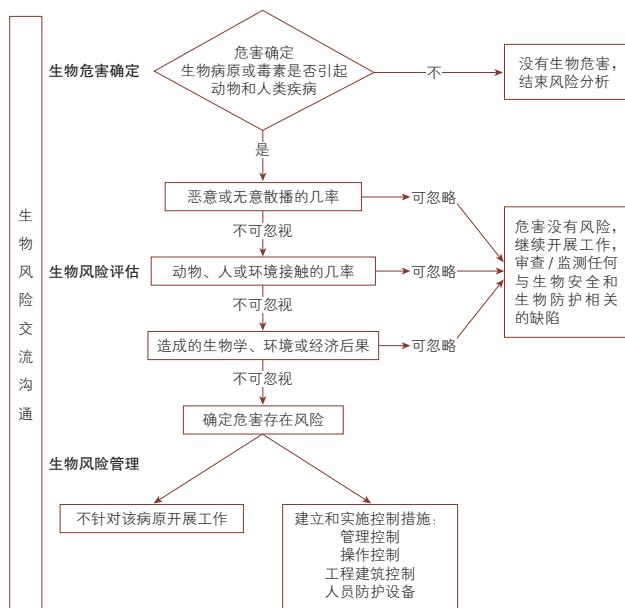
实验室生物风险评估是实验室生物风险管理制度的重要组成部分，管理制度确定了评估的范围、评估内容和时间安排，以便评估过程是积极主动而不是被动响应。在确定生物危害后，生物风险评估过程的下一步是确定生物危害发生的可能性以及造成的后果或伤害的严重性。严重性（伤害）可从散播和接触生物危害引起的相关的生物的、环境的和经济影响考虑。动物病原和毒素相关的伤害的严重性包括人和动物患病、以及地方、国家和区域的经济损失以及国际限制

动物运输和动物及动物产品的贸易。

风险定义为伤害发生的可能性及严重性。生物风险这个词用在伤害的来自生物病原或毒素。生物风险分析过程中关于这一点（见流程图 1），实验室在生物风险管理督导的帮助下，将对设施设备、人员配备、方案、方法和步骤逐个评价，确定在特定环境中如何处置和管理生物风险；除了评估周围环境外，为了确定伤害的可能性和严重性还包括鉴定易感品种和生物病原传播的特点。

全面的生物风险评估包括评价生物安全和生物防护措施。生物安全阐明接触生物材料或突发散播引起的风险，而生物防护产品可能被偷、滥用或故意散播。全面的风险评估包括要考虑所有相关的物品可能被偷或滥用（比如电、电脑、天平，这些东西可能使该设施成为窃贼的目标）。生物安全和生物防护二者都必须考虑以确保实施的风险控制措施不相互冲突，或某个控制措施与其它的不兼容。

生物风险分析过程流程图



注：生物风险管理过程应阐明所有的与特定的危害（生物病原或毒素）相关的实验室过程以及步骤。生物风险评估和生物风险控制计划意味着团队成员每人都应了解实验室各方面、病原的生物学和致病性以及接触和故意散播生物病原或毒素会造成的影响。

生物风险评估用数学模型也行可以定量，也可以定性。

针对这儿讨论的定性的生物风险评估方法，发生的可能性和严重都都是以非数字分值或范围给出，这就可以用定性定义比如低、中和严重或其它非量化的来“量化”生物风险。为了确定生物安全和生物防护控制措施，确定危害发生的可能性和严重性的范围就可帮助实验室定性生物风险，控制方法上有一定得宽裕和全面的经济投入将会降低特定的生物风险。

风险控制措施的资源配置和经济投入应与评估过程中的生物风险成比例。例如，生物风险评估的结果是发生率的分值非常地低（比如通过某些特定的过程，比如废物处理无意从实验室散播病原），但有非常高的严重性分值（比如散播传播性非常高的非地方流行生物病原，同时易感群体有高的发病率或死亡率，失去贸易、造成严重的社会和经济影响）。在这样的情况下，实验室确定在本实验室没有降低生物风险方法或生物安全和生物防护措施足以正确处理这些生物病原。在某国或区域存在同样的情况，在这些地方某病原地方性流行，发生率差不多，但严重性明显更低。该国家正确投入，制定和实施合适生物安全和生物防护措施，降低无意散播的可能性到可接受的程度。在确定特定生物病原或毒素在接触或散播时没伤害的地方，就结束生物风险评估。

### 3. 生物风险管理

在生物风险评估确定存在不可接受的生物风险的实验室，实验室负责做出回应不处置或保存特定的病原（根除危害）；通过用另一种技术步骤（取代法）；或通过确定、实施和保持合适生物安全和生物防护措施。对生物风险评估的回应要求有采取行动的时间点的文件、责任人的安排及相关的报道和许可。以生物风险评估的结果而定（发生的可能性和严重性），为了预防生气危害的散播和接触，实验室管理人员与生物风险管理督导一起确定在实验室和动物设施中哪些生物安全和生物防护措施适合和可行。从实验室接触或散播生物病原的基本途径有：1) 人员表面污染、感染或故意散播；2) 气溶胶；3) 液体和固体废物；4) 设备和材料；5)

样品和试剂；6）用于研究的动物或媒介。

为防止生物病原和毒素未经许可的获取或使用，实验室应额外考虑实验室安保。总之，实验室安保包括：1）机械防护（比如建筑结构、锁门）；2）人员（包括采取措施确保雇员不会造成安全或防护风险）；3）材料控制和登记（比如库存控制和保存记录）；4）信息和信息技术安全防护；5）材料运输途中的安全防护（确保生物材料在运输途中不被窃和转移）。

在无根除或替代的风险控制策略时，用包括管理、操作、工程建设和人员防护设备控制措施来预防接触和突发的或无意的散播。不同的控制方法具有互补性，结合使用可将风险降到合适成都。最基本的生物安全和生物防护项目最终需要实施所用不同类型的控制策略。

1) 管理控制：合格的和合适的员工；培训和验证员工安全处置生物病原和毒素、应用技术程序、使用人员防护设备和设备的能力；健康和安全项目；包括接种疫苗的预防性健康护理；应急措施和计划；突发事件调查计划；当前生物病原和毒素库存及库存管理要求（包括接近、储存、转移、销毁、审计）；废弃物管理制度和安全防护制度（包括设备安全、参观拜访人员的防护和接近病原或毒素的机会）以及信息安全。

2) 操作控制：所有安全和实验室安全防护相关的过程的标准操作程序（包括好的微生物技术）；消毒和去污措施；运输程序；总的实验室安全；标本和试剂的处置和储存措施；废弃物管理措施（包括消毒和灭活）；紧急演习和突发事件的报道、应急和分析方法。

3) 建筑工程控制：设施设备的物理特征包括通风、气流、障碍墙和遮阳以及将不相容的工作内容分隔；设备和设备维护、校正和验证；物理防护比如限制进入、周围的围栏、装有重要控制方案的设施和设备锁、指纹识别器、监测器和探头或生物计数设备。

实验室必须有措施确保与设计、操作和保养相关的改造记录在案，用这些记录来更新以前的生物风险评估，以前

的风险评估可能受到改造的影响。工程建筑控制包括下面几种限制原则：

a) 初级的限制层是将病原或毒素密封在内的包装或I II III 级生物安全柜。必须根据国家或制造商的标准安装和严重生物安全柜，确保能有效运行。I 级生物安全柜提供人员和环境保护。I 级安全柜里的东西不能防止被环境污染。II 级生物安全柜为了保护柜内东西、人员和环境，在安全柜内的上方吹洁净空气，通过高效特别空气滤器抽出。III 级生物安全柜是气密性的，为最高的限制级而设计。III 级生物安全柜的构造（比如绑定的手套、废物箱等）和使用方法可防止与有害的材料和空气直接接触。就感染的动物来说，在专门建造的所有废物被处理和空气通过过滤房间，通过物理限制就可将病原密封。

b) 二级控制层将材料和处理感染材料的人封闭在一个密闭的和可控制的物理环境中，该环境用有效的过滤和排除或灭活病原的处理程序来处理固体物、液体和空气。

c) 四级控制层是用适当的措施物理限制易感品种接触传染病原。

5) PPE: 身体防护（比如衣服），手防护（比如手套），眼睛防护和呼吸防护。

实验室的生物安全应基于建立坚固的好的微生物措施，实验室所有的工作都应遵守这些措施。在针对传染性病原或可能包（可能看起来没有）含传染性病原的样品时，因遵照的基本要求是：

1) 实验室应容易清洁，表面防水，防实验室使用的化学物品。每实验室应有洗手盆，淋浴和洗眼台，这些套件应与实验室存在的化学物品和其它危害相匹配。应建立工作期间和工作结束后清洗和消毒工作区域的程序；2) 应有限制人员进入工作区的措施，比如限制进入，这对高风险病原是必要需求；3) 在实验室都应穿戴基本的人员防护比如长袖实验服、连脚都包裹在内的连体服、一次性手套和安全眼镜等，当离开时应脱掉。根据特别的风险评估而定是否需要戴遮住脸和口鼻呼吸道的面罩；4) 试验进行中应将门关闭，

适当的限制进入、警告或安全标记应清晰可见；5）当压力通风不是基本要求时，为了工作人员的健康应提供适当的通风，或根据风险评估而定；6）在实验室不应储存和吃食物（包括口香糖、糖果、清喉片和止咳糖）和饮料，实验室也不应吸烟或使用化妆品；7）应制定处置任何安全或安防事件引起的危害的应急方案。计划的条款至少应包括有效的消毒剂和器具，用于清洗溅出的液体、移除和消毒污染的防护服、洗手以及清洗和消毒实验台；8）用过的实验室防护镜和其它污染的材料应进行适当的标记和安全存储。需要处理的材料阴影装在牢固的容器中运输防止泼洒。废弃材料在处理前应高压灭菌、焚烧或灭活。可重复利用的材料应采用适当的方法消毒；9）任何突发或偶然事件都应记录，并在风险管理督导的帮助下进行分析，以便不断改进生物风险管理体系；10）工作人员都应进行适当的培训和考核是否能胜任安排的工作。

涉及到生物危害（生物病原或毒素）和实验室或动物设施的程序需要制定适当的生物安全和实验室生物防护措施，在制定时要用到风险评估过程。

#### 4. 风险交流沟通

实验室风险交流沟通时一种连续的危害确定、风险评估和风险管理过程，是偶然事件准备和应急计划不可缺少的一部分。在明白实验室投资人和公众有权力知道对他们自己的健康和动物健康的影响，风险交流是用于告知实验室投资人处理生物危害、以及散播和接触这些危害引起的事件的回应所采用的技术措施和决定。由于处置动物病原和毒素的实验室是一个国家或区域兽医基础设施的重要组成部分，实验室生物风险管理过程彻底、客观、透明和有效的沟通显得非常重要。

为了在实验室和投资人之间就生物风险、生物风险控制措施（生物安全和实验室生物防护措施）、以及对这些生物危害开展工作的利益达成共识而制定有效的风险交流沟通。共识不仅是建立信任，而且有效地对潜在的突发事件进行回应、让可能受到影响的人和单位知道这一决定尤为重要。

为了以清楚明晰的方式提供信息，风险交流应以正式的、措辞针对受众的方法呈现，不管这些受众是制定制定人、疾病控制主管部门、动物饲养人员或公众。有效的风险交流沟通要求在生物风险评估中所使用的技术措辞、科学数据、假设、对假设的验证等综合在一起全面记录。

总之，最初的生物风险交流是针对相关的健康和疾病控制主管部门，以及需要确定：1）生物危害（生物病原或毒素）；2）实验室对这些生物危害开展工作投资人能获得的利益；3）开展和记录生物风险分析的相关资料；4）实验室有适当生物安全和实验室生物防护措施能缓解生物病原或毒素偶发或恶意性散播的相关资料。

在为病原的偶然性或恶意性散播做的准备工作中，实验室也应为这些事件及事件回应的沟通做准备。

在实验室针对这些生物危害开展工作前做的文件记录有（1）记录参与起草、审核、许可和分发实验室资料和官方沟通的每个人的作用和责任；（2）联系人名单应包括姓名、电话号码、邮箱地址和其它信息以适合通知这些单位或个人；（3）偶然性或恶意性散播生物病原或毒素的小概率事件的重大事件应急计划。

联系人名册应包括（1）国家、区域和当地疾病控制主管部门（兽医卫生和公共健康）（所用都适用），（2）安全部门（适合特定的生物威胁病原和风险）；（3）应当知道与人类健康相关的病原、生物风险和存在风险的员工的有责任的医生或职业健康计划部门；（4）投资人及可能受到影响的相关部门，比如运输、装修、废弃物处理厂、门卫、实验室非技术人员、可能受到影响的当地的动物饲养人和行业。

#### 5. 验证、采取正确的行动和不断改进

生物风险管理是一个不间断的过程，在此过程中，定期监测特定的生物安全和实验室生物防护措施，确保这些措施像预期一样起作用。实验室的设施设备、管理措施和程序也应定期复查，确保这些发生的变化不会改变先前制定的风险。应制定定期审查计划和开展审查，以便记录实施的生物

安全和实验室防护措施的效果，确定需要修订和校正的不相符合的方面，确定需要改进的方面。该过程要求实验室验证和记录实施的控制措施（管理、操作、工程建筑和个人防护）能有效降低特定的生物危害的散播和接触。举一简单例子：如果在实验室评估期间，确定散播的风险为物理防护不足引起被窃，采用的生物防控措施是锁住储存的冰箱，实验室管理将验证锁冰箱这一控制措施可降低被偷的风险。加入管理人员发现冰箱钥匙保存在冰箱附近容易取到的钩上，被窃的风险不能有效控制，纠正措施是采取其他的生物防护控制措施，比如实施新的制度和程序来管理冰箱钥匙。

通过用记录制度和程序、员工培训和能力考核、内部和外部审查合适的、正确的预防活动和常规的管理复核以不断提高实验室的效力，这是实验室管理人员的职责。生物风险评估、实施控制措施、验证效果和校正不足的周期也遵循一些运行良好、优质的管理项目中使用的模型。1.1.4 章节兽医检测实验室的质量管理为这一主题提出了总的概要；CEN 关于实验室生物风险管理的工作协议细化了全面的生物风险管理体系的各部分。

### C. 技术指导和评估手段

通过一些出版的兽医卫生和公共健康资源，比如世界卫生组织生物安全手册、中国疾病控制中心微生物学和生物医药实验室生物安全、加拿大生物安全标准及指南、实验室风险管理及医疗服务刚要、实验室生物安全手册等等都可获取某个实验室和动物设施风险控制措施需要的技术指导和细节。联合国粮农组织的实验室规划方法、世界卫生组织和中国疾病控制中心的生物安全手册里的实验室评估核对表都用于记录实验室的能力和监测实验室管理标准与好的实验室规范之间一致性，这些评估方法对外部和内部评估都非常有用。

### D. 结论

兽医实验室的作用是作为成文的国家动物健康策略的不可缺少的部分，保护当地、国家、区域和全球动物群体的

健康和福利、相关的商业贸易以及防止动物来源的生物风险对公共健康的威胁。国家动物健康策略制定生物材料的范围、特别是传染性病原的范围，国家实验室必须有处理这些生物材料和病原的能力。

在兽医实验室和动物设施的环境中，不可避免存在和处理生物材料，这些生物材料可能对动物和人都有生物风险。因此，实验室和动物设施管理人员确保自己的设施内的生物风险界定明确、被了解、被控制和与相应的投资人交流沟通，这是非常重要的。

可能也建议在国家相关条例内来管理这些风险，以便实验室生物风险管理策略在各国之间一致。本章交流的标准用于制定管理实验室相关生物风险的国家标准以及用于在各实验室制定生物风险管理体系。

生物风险分析原则配上全面的生物风险管理体系就可使有责任的人去评估和记录实验室生物安全和生物防护措施，用这些措施提供适当的控制，从而确保足够的生物安全和实验室生物防护。一个全面且能发挥作用的实验室生物风险管理体系将确保实验室遵从当地、国家、区域和国际标准以及满足生物安全和实验室生物防护的要求。



## 附录 1 生物风险分析步骤

### 1. 安排一个团队做风险评估。人员具备的知识和了解:

- i) 病原或毒素的物理和生物学特性 (比如感染剂量、感染途径、易感品种和环境耐受力等等) ;
- ii) 实验室用于处理生物病原或毒素的技术和程序、相关的技术实力和实验室设施设备;
- iii) 实验室生物安全和生物防护措施;
- iv) 风险分析原则和措施;

团队中的一员应起多重作用,也可用来自实验室外的合格的人员做风险分析。风险分析的质量与团队成员的知识水平和了解程度直接相关。

### 2. 界定生物风险分析范围

i) 生物危害确定: 确定目标生物病原或毒素, 对每个相关的生物病原做隔离的生物风险分析。

#### ii) 确定使用生物病原或毒素的实验室环境:

a) 确定针对被评估的生物病原或毒素的技术程序、方法和过程 (比如诊断样品、参考材料、培养、离心、超声波、分装、冻融、归档保存措施、生物病原或毒素的浓度和量、处置的动物等)。这些项确定了与风险评估相关的实验室环境,记录了从实验室环境接触和散播的可能来源。

b) 确定实验室已有的资源,包括管理和技术实力 (比如技术培训、效率项目、质量管理措施、健康和安全管理项目等等)。这些项记录了已有的和潜在的风险控制资源。

c) 确定相关的实验室设备和相关资源 (比如设施设备的安全、直接空气流、高压锅、焚烧炉等等)。这些项记录了已有的和潜在的风险控制资源。

3. 制定和启动风险交流计划。记录和交流风险分析必须清楚和全面。因为风险分析保证决策制定,在预测事件存在不确定性,过程透明客观和清楚呈现十分关键。为了有效地掌握所有相关的信息、调查结果、分析和发现,在风险分析的一开始就编制风险分析报告。

### 4. 确定实验室生物危害接触或散播引起的伤害的严重

性。应确定生物病原或毒素接触和散播可能引起的人类健康、动物健康和经济损失的严重性。注意: 某单个病原, 爱生物病原地方性流行与无该生物病原的国家之间引起的经济损失差异很大。在有发病率、死亡率和经济损失的地方, 必须提供来源和资料背景。例如, 在对一个国家或区域做进出口的风险分析可用作有益的经济数据来源。

5. 在做生物风险评估时, 针对每个实验室的程序涉及到的生物病原或毒素的散播和易感动物和人群的接触的可能性和严重性设定范围 (比如样品接收、尸体剖解、培养、离心、核酸抽提、保存、归档和动物实验等等)。生物风险评估阐明了偶然微生物病原接触和散播。生物安全防卫阐明偷窃、丢失恶意滥用生物病原。

6. 确定实验室有的风险控制措施, 包括已经在实施的和可能实施的生物安全和生物防卫措施。几种不同的控制措施单独用和联合使用经常获得的结果相同, 经济费用相似或差别很大。为了确定降低接触和散播的总的风险的相关效果, 单独或联合评价生物安全和实验室生物防护措施。确定不同控制措施的经济和逻辑可行性以及适当平衡风险与存在和处置生物危害的利益的关系是实验室管理人员与当地、国家和区域疾病控制部门共同的责任。

7. 将风险评估中使用的信息和方法成文。记录必须完整, 包括数据、分析方法、结果、讨论、注释、结论、日期和责任人。当采用相关的科学和实验室数据和信息时 (比如感染剂量、传播途径、工作浓度、环境中的稳定性等等) 应提供参考文献。用到的所有假设应加以确证并提供验证假设的方法。

8. 保持或实施实验室选定的生物风险控制措施 (生物安全和生物防护措施)。

9. 记录完整的风险分析包括生物安全和生物防护措施的实施并向合适的主管部门和投资人交流汇报。有多种记录风险分析的报告格式和模板。在 OIE 关于动物和动物产品输入风险分析和风险交流的七大基本规则中可找到例子。

附录 1.1.3.2 在评价和实施生物风险控制措施时用到的几个要点

用于确定和评估实验室危害的要点	从实验室散播或员工接触的风险确定或风险程度	生物风险控制措施例子
生物病原的流行病学、传播途径包括气溶胶、直接接触、污染物、传播媒介；感染剂量、易感品种和可能的传播成都，宿主体外的病原起源。	传播途径决定了接触或从实验室散播的可能机制。样品来源：来自野生动物的样品可能含有人和动物正常情况下不会遇到的病原。地源性样品。	不同的传播途径需要特定的控制措施：气溶胶：用基本的限制（比如生物安全柜），好的微生物技术（GMT），空气过滤；表面去污：消毒，人员防护包括衣服手套和出实验室淋浴。固体和液体污物：废弃物处理措施（比如高压、化学消毒）实验室退出的污物和材料：去污措施。
可能引起人和动物疾病，对实验室工作人员、公共健康和动物健康危害的严重性。	严重：可能是致死性疾病，通常无治疗或预防措施。人类：较高的个人或社区风险。动物：外源性或地方性流行，受到官方控制就，具有较高的从实验室传播到环境和国家 / 区域的动物群体的风险。	管理、操作和工程建筑控制及个人防护联合使用避免病原散播。要点有：严格的生物限制措施、去污和消毒，用充足的控制措施，好的微生物技术；强制性培训员工和提高员工能力；强制性雇员健康体检计划；强制性实验室安防制度和程序；充足的控制措施，进入许可控制、值日制度，种子和生产用毒登记、闯入检查、应急预案。
	中等：通常有有效的预防和治疗措施，但效果存在差异。人类：个人具有较高的风险，社区风险较低。动物：外源性或地方性，受到官方控制，有中等的从实验室散播的风险。	管理、操作、工程建筑和个人防护联合使用。要点有好的微生物技术比如有效的感染控制程序、去污和消毒，用个人防护和生物安全柜；雇员健康计划（比如接种相关的疫苗，健康体检）；强制性培训提高员工能力，实验室安保制度和程序。限制进入，陪同未经授权的人，种子批管理。
	低：有有效的预防和处理方法 人类：中等的个体风险，低的免疫风险。动物：外源性或地方性，受到官方控制，从实验室传播的风险低。人类：无或低的个体和群体风险。动物：地方性，未受到官方控制。	要点有用好的微生物技术比如去污和消毒，有效的感染控制程序比如用指定的实验服、生物安全柜、基础培训和提高员工能力。废弃物管理，包括消毒实验室废弃物。要点包括用好的微生物规范。
动物群体发病率和死亡率造成的影响，与经济后果相关的影响（比如贸易、食品安全、控制疾病的费用、清群或疫苗接种等），这取决于该病原对国家或区域是外源性还是地方性的。	严重：全国的费用不可接受	管理、操作、工程建筑控制和个人防护联合使用避免生物病原散播。要点有严格的生物限制措施、通过接触途径保证其特有的特征；个人防护、好的微生物规范，去污和消毒，基本的限制体系、强制培训和提高能力，强制性的实验室安保制度和程序；充足的控制措施，限制进入，被授权人员值日，种子批和生产批管理，闯入检查，应急预案。
	中等：经济损失根据不同案例来评估。	管理、操作和建筑工程控制措施和个人防护联合使用。要点有好的微生物技术规范比如去污、消毒，有效的感染控制程序，包括个人防护、生物安全柜的使用，排出的空气和废水控制，强制培训和提高能力，实验室安保：限制进入、陪同未经授权的人员、种子批管理。
	低：经济影响在可管理或目前的水平。	要点有好的微生物技术规范比如去污、消毒，有效的感染控制程序有用实验服和生物安全柜、基本的培训和提高能力。

用于确定和评估实验室危害的要点	从实验室散播或员工接触的风险确定或风险程度	生物风险控制措施例子
在设施内将开展的实验室程序的性质（比如小规模与大规模繁殖相比较，病原的使用与储存）	中等到严重的程序比如抗原或疫苗的生产会产生大量的微生物。实验室程序产生的气溶胶（匀浆、超声、离心）。样品的历史背景：初代分离 / 低代次的病原通常比实验室适用株的毒力更强。	好的微生物技术规范比如去污和消毒，适用有效的控制程序比如使用合适的基本的限制体系将该过程与其他工作区进行机械隔离。员工安全有病原 / 专门的程序培训和医疗监测。应设计限制区域防止密闭体系所有内容物溢出。是否将从该区域粗心大意的散毒纳入考虑之列取决于疾病流行病学和对该国家或区域内动物疾病状况的影响。强制性的实验室安保制度和程序：充足的控制措施、经授权许可的人值日、种子及生产种子批管理，闯入检查，紧急预案。
	低：病原需要媒介或中间宿主，在该国家或区域病原不能自然产生或存活	好的微生物技术比如去污和消毒，有效的感染控制程序包括恰当的实验室设计，用特定的实验服，基本限制体系比如生物安全柜，以及实验室废弃物消毒等等就足以控制。是否考虑不经意从实验室散毒取决于疾病的流行病学和对该国家或区域内动物疾病状况的影响。
与生物病原或毒素相关的动物的使用	当实验动物接种病原时可引起高级别的风险。在风险评估中应考虑下面这些因素： i) 宿主品种与被接种的品种之间的关系 ii) 毒株，接种方式和接种量 iii) 接种途径 iv) 动物饲养环境 v) 试验期间需要采集的样品类型。例如：用动物制备生物试剂，用动物进行诊断，用动物研究致病机理。	好的动物处理和微生物技术比如去污和消毒，感染控制措施，防护衣和适当的设备。员工培训和医疗监测。设计建筑设施减少或防止生物病原或毒素通过污染的空气、试验材料、液体或固体废弃物或动物尸体传播。控制害虫。对大动物房间考虑为基本限制级，对试验动物采用单独的通气笼（IVC），隔离器或类似的基本限制级。安保要点包括防止恶意的释放动物或散播病原作为生物威胁、周围安栅栏，标识、闯入警铃、充足的控制措施。

（作者简介：徐静，博士，研发中心副主任）





文 | 庄万敏

## 主动出击

2015年10月31日，周六，归家途中在厂车上。阳光微熏，坐在汽车的第一排，前方几乎没什么车，芦苇在风中摇曳，美得让我不禁想象，是不是只要我在空中固定，那么我就可以迎风而立博览地球的美貌呢！

——写在开篇

开篇故事的想象很美好！事实呢？唯有主动前进才是获取的办法——是汽车推动着我前进呢。正如我们在工作中取得进步和效率的方法就是主动学习，化被动获取为主动。

曾经看过王鼎钧写的一个名叫“你真傻”的故事。某君想搭乘公共汽车，没有零钱，就在班车过站时向售票员扬一扬手中的百元大钞，意思是：“你有没有零钱找给我？”售票员连忙摇手，迅速关上车门，意思是：“我没有那么多的零钱。”一连好几班车都是如此。朋友对某君说：“你真傻。你应该不容分说，先跨进车门，再让售票员找钱。到时候，售票员自然会把所有的零钱都给你。你上车之前，有没有零钱是你的问题，她不会主动替你解决，你必须把你的问题转变成她的问题。”……这个故事在朋友的建议下陷入无限循环中。

在工作中，我得出的结论也是唯有主动出击才能让自己的工作更加有效率。把工作的问题变成“我”的问题，主动承担更多的“我”的问题，人唯有在处理“我”的问题时才会更加的积极。正如初来华派，峰哥问我对这个行业有什么看法，对华派有什么认识？当时我承认，我对这个行业并不了解，对公司并不熟悉。那时候我想公司肯定会对这些东西进行培训，可是在等待中我并没有得到我想要的结果，公司的培训更是直面主题——工作！那时候我惊呆了，我该怎么办？带着那么多的疑问能做得好我的工作吗？

虽然带着这么多没有解决的问题上岗了，在工作时经常有“无所事事”的时候，这时候我担心的问题更多了：领导是怎么想呢？有的工作没人做也不会让我做，他们不相信我吗？

后来一位长者在和我聊过我的困惑后对我说：你在工作中凡事多想一步是对的，可

是你只多想一步也是不对的，多想三步才可以。这时候我开始思考，先换位思考一下。领导如果把工作交给一个对公司尚不了解的新人，就要冒公司蒙受损失的风险。这样去想，就不难心平气和了。我开始学会调整心态，主动出击，争取早日跳出困境。

首先，我是不是自身能力的确有所欠缺？既然感到自己确有不足，那么就应该抓住时间空档，虚心向老员工学习，认真地当好配角，即便是琐碎不起眼的活儿都不能马虎。

其次，遇到领导的意见和自己的想法有偏差时，我应寻找恰当的时机和上司沟通交流，让对方知道，而且在沟通前应该学习和了解，准备充分。如果沟通无果，也不能陷在等事做的被动状态，而应主动寻找自己力所能及的事情。每个人都有自己的长处和优点，既然有大把空闲时间，何不细心地观察和学习，缩小自己与同事间的差距，熟悉业务流程和岗位技能。

因此，当你没有能够心想事成时，不要浪费时间去等待或者抱怨，学会“主动出击”，说不定能迎来柳暗花明呢。

（作者简介：庄万敏，大学本科，生产技术部一车间）





文 | 胡洋

## 小球场 大活力

当天边那一轮夕阳慢慢消褪失去耀眼光芒的时候，它会变得通红通红似残阳如血，在空中留下“红彤彤的脸庞”，顿时天边彩霞飞扬。夕阳，映照出朵朵绚丽的霞光，散落在华派公司新建运动场上，散落在正呐喊助威的人群中，散落在运动场上拼搏的健儿们。下班后华派也彰显着活力和激情。

2015年10月，当谢总同意员工请求新修运动场之后仅仅数周，在华派宿舍旁迅速新建好了一块篮球场和羽毛球场地。色彩斑斓的塑胶场地，配套齐全的运动器械，不光满足了华派员工追求丰富多彩的业余生活要求，也唤醒大家儿时的运动梦想。

晚饭小憩后，员工三五成群来到运动场，组队在球场上“厮杀”，球场旁不断的加油声，球场上传来充满激情的欢呼声，以及厂区周围的鸟鸣，在夕阳的余晖中构成一篇属于华派的华丽乐章。

“小球场”带来了企业“大活力”，丰富了职工业余文化生活，为提升员工的向心力和凝聚力，增强员工对企业文化的认同感，也极大地鼓舞了职工安心一线工作，确保企业安全生产的积极性。

一个企业有没有活力，关键要看这个企业文化建设是否能够得到重视？职工有没有干劲就要看职工的文化活动是否动起来了。丰富职工文化生活，让他们精神愉快起来，必然会安心一线工作，工作上增添许多干劲，增强企业凝聚力、向心力。相信有了更多活力的华派，能在以后走得更高、更远！



## 七绝

华夏千年今风流  
一派美景大唐羞  
勃勃生机寄予来  
生灵万物别蜃楼

## 壮酒歌

昨夜美酒壮士行，  
金猴舞棒搏击羸，  
亿元银票囊中物，  
旌旗飘飘华派营。

（作者简介：曾谊，营销副总监）



政策

# 猪场切忌大剂量使用猪瘟疫苗，负效应难以估量！

随着猪瘟疫苗市场化的推广，政府采购的猪瘟疫苗逐渐成为鸡肋，打着不放心，丢掉又可惜。面对细胞苗、脾淋苗、市场苗和招标苗，各种名目繁多的产品，成了每个猪场必须面临的选择题。

如何合理选择猪瘟苗？导致猪瘟苗失败的原因是什么？怎样做到猪瘟净化？您的猪场有这样的困惑吗？本期特约哈尔滨兽医研究所仇华吉研究员为大家解答猪瘟防控中遇到的困惑和难题。

## 1、猪场打了猪瘟疫苗，但猪瘟抗体上不来，原因是什么？猪场该怎么办？

答：猪瘟抗体水平上不来原因很多，需要细心寻找原因，综合剖析，逐一排查。可能的原因有：

（1）免疫程序是否科学合理，特别是是否存在母源抗体干扰；

（2）疫苗自身问题（如疫苗抗原量不足）或者疫苗运输和保存不当导致疫苗失效（如果怀疑疫苗质量，可以送实验室检测）；

（3）其它免疫抑制性疾病的发生，如猪蓝耳病和猪圆环病毒感染，甚至蓝耳病活疫苗，它们都会影响猪瘟疫苗的免疫后果；

（4）检测方式是否有问题，抗体检测方法和试剂盒是否正确可靠；

（5）其它原因，如长期滥用抗生素、饲喂发霉饲料、饲料中养分不均衡等。

针对以上几种可能出现的问题，在日常管理中应该做到：

（1）建立严格的生物安全措施。加强饲养管理，切实提高猪群自身的抗病能力。

（2）加强猪瘟的免疫监测，制定合理的免疫程序。

（3）重视疫苗的管理工作。规范使用药物，注意霉菌毒素的危害。

（4）控制免疫抑制性疾病。通过完善免疫程序、改善饲养管理，做好免疫抑制性疾病的预防和控制工作。

## 2、大家都说政府发的猪瘟苗质量不好，这是真的吗？自己购买猪瘟苗怎么选？

答：（1）目前我国猪瘟疫苗生产厂家众多，生产出的产品质量也参差不齐。同时国内许多专家也对不同厂家的猪瘟疫苗进行过检测，也证实确实存在产品抗原含量不足、外源病毒污染的现象。政府采购的猪瘟疫苗中，自然也就有好有坏，加上招标采购疫苗价格奇低，所以这种说法也就不足为奇了。

（2）在选购疫苗时

首先，要到正规的销售渠道购买，不要贪图便宜，从一些不正规的渠道购入疫苗。现在许多疫苗厂家在各地都设有经销商，所以购买时应到当地指定的经销商处购买。

其次，购买时尽量挑选大品牌、口碑好的企业，因为疫苗本身对环境要求比较高，运输、冷链保存中断等均可造成疫苗失效，大品牌的企业在疫苗生产、保存、运输等环节做得相对规范一些。

第三，选择猪瘟疫苗时不要盲目推崇抗原含量，正如药物一样，疫苗含量并非越高越好，达到规程检验要求的疫苗就是合格疫苗，含量过高反而可能会造成副反应。如果有条件最好做个对比试验，通过比较抗体水平的高低和整齐度来判断疫苗的免疫效果。

## 3、以前猪瘟苗标准免体感染量只有几百，现在

## 标准提高到几千，这是为什么？是因为效果不好才提高的吗？

答：猪瘟疫苗目前市场上主要有两类：脾淋苗和细胞苗（原代细胞苗或传代细胞苗）。按照规程要求，脾淋苗每头份应不低于 150 RID（兔体感染剂量）的含毒量，细胞苗每头份应不低于 750 RID 的含毒量，所说的标准提高到几千主要指的是细胞苗。猪瘟疫苗注射猪体后，一部分疫苗要被母源抗体中和，另外一部分才能起到免疫效果，所以选择普通猪瘟细胞苗在仔猪断奶前后（存在母源抗体）免疫时经常加量免疫，一般是 4-6 倍量免疫，在这种情况下市场上有了所谓高效猪瘟疫苗。而有的厂家宣传其高效猪瘟疫苗时兔体感染量会达到几万（是国标的 10 几倍甚至 20 多倍）。因此在一些厂家错误的引导下，进而形成了“注射量多多益善”或“多了比少了好”的错误观点。我个人认为这纯属商业炒作，毫无科学依据，容易造成误导，不仅没必要，反而有害无益。

无论是正常免疫猪瘟疫苗，还是紧急免疫猪瘟疫苗，大剂量使用猪瘟疫苗均是错误的做法，即使免疫后没有产生明显的不良反应，但是后续的负效应是难以估量的。所以，对于猪瘟疫苗，应当按照说明书结合本场实际科学合理地使用。

## 4、很多老师讲到仔猪耐受，到底是怎么回事？怎么避免？

答：（1）应该是仔猪免疫耐受，是指妊娠期间胎儿通过胎盘感染了来自母体的猪瘟病毒而发生先天性感染，这些先天感染的胎儿或死产，或貌似健康但日后注射猪瘟疫苗却不产生免疫应答，还会传播猪瘟。

（2）避免这种问题的出现，就应当净化带毒种猪，可根据临床症状和抗体水平等综合评估猪场带毒情况，坚决淘汰抗原阳性种猪，特别是繁殖母猪。

## 5、听说明年要上市猪瘟－蓝耳二联疫苗，这个产品有理论依据吗？不是说猪瘟和蓝耳不能同时免疫吗？

答：猪瘟和蓝耳病是否可以同时免疫，目前有不同观点。该产品既然能获批上市，说明研发者有相应的实验依据，用户可以参阅他们的实验数据。任何疫苗都需要经过时间和实践的检验。

## 6、什么样的猪场能做猪瘟净化？

答：猪瘟是危害最大、最应受重视的猪病之一。为了防止猪瘟的发生，很多国家根据各自的实际情况采取不同的防控措施，有的成功地根除了猪瘟。他们的经验值得借鉴。用比较敏感特异的方法筛查并淘汰猪瘟阳性猪（尤其是种猪），并坚持下去，一般 2 年左右即可实现净化。

猪瘟净化也是我国兽医界普遍关注的话题。目前种猪场必须净化猪瘟已列入国家中长期动物疫病防治规划，商品猪场也鼓励根据实际情况开展净化。从长远看，净化猪瘟利大于弊。关于什么样的猪场能做猪瘟净化，这完全取决于猪场管理者的决心，无论猪场规模大小，只要采取系统科学的措施，都可以实现净化。鉴于可区分野毒感染和疫苗接种的猪瘟标记疫苗即将问世，净化猪瘟将变得更加切实可行。

（本刊编辑部摘编自新牧网）

# 二维码追溯推动兽药电商发展

在近年来发生的动物产品安全事件中，有很大一部分与兽药产品质量低劣和不规范使用有关。为了规范兽药生产、经营秩序，便于对兽药的追溯管理，提高产品质量，保障动物产品质量安全，今年年初，农业部决定在前期试点的基础上，加快推进兽药产品质量安全追溯工作，利用国家兽药产品追溯系统实施兽药产品电子追溯码(二维码)标识制度，形成功能完善、信息准确、实时在线的兽药产品查询和追溯管理系统。那么，实行统一的“二维码”标识对兽药企业和养殖户将会带来哪些影响呢？

## 为何在兽药领域率先推广“二维码”标识？

根据农业部发布的公告，在2015年12月31日前，实现所有兽医生物制品、兽用原料药和兽用处方药类产品全部赋二维码出厂、上市销售。2016年6月30日前，实现所有兽药产品赋二维码出厂、上市销售。2016年7月1日起，未使用统一的兽药二维码标识和未上传产品信息的兽药不得上市销售。

据了解，在我国食品安全领域，可追溯从肉类、水果和蔬菜类开始兴起，而这个词在畜牧行业真正热起来却是在兽药领域，这是为什么呢？首先，这确实与近两年微信的使用以及二维码的普及有着密不可分的关系。不可否认，长期以来我国兽药行业乱象频出。兽药作为治疗用产品，若任其滥用和残留超标，将会对人类健康产生影响，而不合格药品所产生的影响更是无法估量的。目前兽药市场经营秩序较为混乱，产品鱼龙混杂，质量良莠不齐，假冒伪劣产品屡屡被检，且又不时出现，难以根绝，在损害了正规企业利益的同时，也损害了广大养殖户的利益，而且对食品安全造成严重隐患。由于兽药市场同质化现象严重，

一些兽药企业在研发进程缓慢、研发投入低的同时，却将大量资金和人力投向了营销领域，让人不禁觉得有舍本逐末之嫌。

因此，随着养殖业的快速发展，在这个具有巨大需求的市场中，推广使用二维码标识，实行产品质量可追溯，不仅会对制假售假行为起到很大的震慑作用，而且能够加速企业规范自律和行业洗牌，对促进兽药企业的优胜劣汰、转型升级起到极大的推动作用。届时，市场上的兽药种类将大幅缩减，同质化产品不断减少；由于兽药企业的研发力度加大，更好、更新的产品将会不断开发上市，这将有利于提升兽药企业及产品的公众形象，提升国产兽药的国际竞争力。

## 二维码标识助用户拥有知情权

可以说，二维码追溯系统，是建立在准出管理体系中的一部分，按照“有管理制度、有专门人员、有生产记录、有质量检测、有产品标识”的要求，在逐步建立兽药产品准出管理体系。

其实，二维码追溯系统可以说是用户拥有知情权的一种有效措施。随着食品安全问题的不断发生，消费者对于食品的质量尤其是食品的来源有了更高的诉求，也一直在寻求新的寻根溯源系统。二维码——互联网时代发展的新生代产品，显然已经走进千万家，而在此基础上派生出来的二维码标识，无疑满足了消费者既方便又一目了然追根溯源的需求，进而也保证了其知情权。

据悉，农业部规定兽药产品必须标示电子追溯码，则是从国家层面上确立的兽药质量保证制度。对于用户来说，由于从二维码中可以直接扫描到该产品从原料到出厂销售

的各个环节的数据，提高了对于假劣产品的辨别能力；同时，也使得兽药产品的信息更加透明，用户使用时可以更加便捷地选择适合自己的产品。于兽药企业来讲，这也减少了中间过多讲解产品信息的环节，降低了经营成本，用数据和事例说话，更能赢得用户的认可。

### 加速兽药电商发展进程

从2006年强制实施兽药企业GMP认证，到2010年实行的GSP认证，再到此次的二维码追溯系统，可以看到我国动物疫苗、兽药行业规范程度逐步提升，同时也在无形中对行业进行了一次淘汰和整合。可以预见的是，许多上市企业将在这场变革中抓住机遇，迅速扩大市场份额。然而，在这场变革中受益的不仅仅有大型的兽药企业，真正受益最大的人群是终端消费者。长期以来，我国兽药行业乱象频出，许多终端养殖场在使用兽药的过程中因为信息不对称、缺乏经验和指导购进假冒伪劣产品，造成了本来可以避免的损失。

因此，兽药二维码追溯系统全面实施的消息一公布，立刻在网上引发讨论，而参与讨论的网友更多是一些中小型养殖企业。有网友表示，全国有2000家左右的生产企业，但是有5000家左右的销售公司和代加工企业，这些销售公司和代加工企业有很大一部分是市场在发展中形成的“冗余”，增加了从生产到流通的环节，为问题兽药提供了滋生的空间。随着这部分中间环节的消褪，正规的兽药企业可以通过二维码全面追溯制度进行信息透明化的销售。有业内人士表示，这一制度可能会改变以往兽药行业的经营模式，加速推动兽药电商的发展。

兽药电商和饲料电商已成为近年来的高频热点词汇，

然而制约其发展的主要因素就是产品良莠不齐，消费者无法鉴别真伪。兽药二维码的全面实施，将能有效解决这一问题。随着几大电商巨头在农村开展的“互联网革命”，相信兽药电商也会迅速成为新宠，而二维码可追溯制度则是推动其发展的一股强劲东风。



（本刊编辑部摘编自中国畜牧兽医信息网）

# 农业部第二届全国动物防疫专家委员会成立

1月8日，农业部第二届全国动物防疫专家委员会成立大会在京召开，农业部副部长于康震出席会议。于康震强调，成立全国动物防疫专家委员会是保障“十三五”现代畜牧业可持续发展、适应新时期动物疫病防控形势、进一步提升动物疫病防控科学决策能力的迫切需要。新一届全国动物防疫专家委员会要围绕“十三五”兽医事业发展的目标任务，理清思路、梳理问题、提出对策，当好防控决策的智囊团，成为兽医理论创新的思想库，做好政策解读和舆论引导的专家团，提高国家兽医事务的话语权。

于康震要求，新一届全国动物防疫专家委员会要勇于直言相谏，敢于讲话、主动讲话、敢讲真话；要坚持求真务实，立足中国国情，创出中国特色动物疫病防控之路；要坚持正确方法，在动物防疫工作上把握方向性，突出前瞻性，坚持问题导向，深入调查研究，遵循工作规律；要坚持推陈出新，加大新型兽医技术研发，推进技术与管理创新，推动兽医事业发展与变革；要坚持公正守纪，做到公正性、科学性、建设性，严格遵纪守规。

国家首席兽医师张仲秋主持会议。来自兽医、经济、科技、质检、林业和公共卫生等领域的65名专家委员参加了会议。

## 专家委员会主任委员和副主任委员名单

主任委员：

于康震 农业部副部长

副主任委员：

张仲秋 国家首席兽医师

夏咸柱 中国工程院院士

陈焕春 中国工程院院士

刘秀梵 中国工程院院士

冯忠武 农业部兽医局局长

陈伟生 中国动物疫病预防控制中心主任

## 专家委员会办公室主任和副主任名单

办公室主任：

陈伟生 中国动物疫病预防控制中心主任

办公室副主任：

李长友 农业部兽医局副局长

陈光华 中国兽医药品监察所副局长

黄保续 中国动物卫生与流行病学中心副主任

辛盛鹏 中国动物疫病预防控制中心副主任

## 专家委员会各专家组组长名单

动物传染病专家组组长：

杨汉春 中国农业大学教授

兽医公共卫生专家组组长：

李慧姣 中国兽医药品监察所研究员

兽医流行病学专家组组长：

黄保续 中国动物卫生与流行病学中心研究员

外来动物疫病专家组组长：

王志亮 中国动物卫生与流行病学中心研究员

动物流感专家组组长：

廖明 华南农业大学教授

口蹄疫专家组组长：

刘湘涛 中国农业科学院兰州兽医研究所研究员

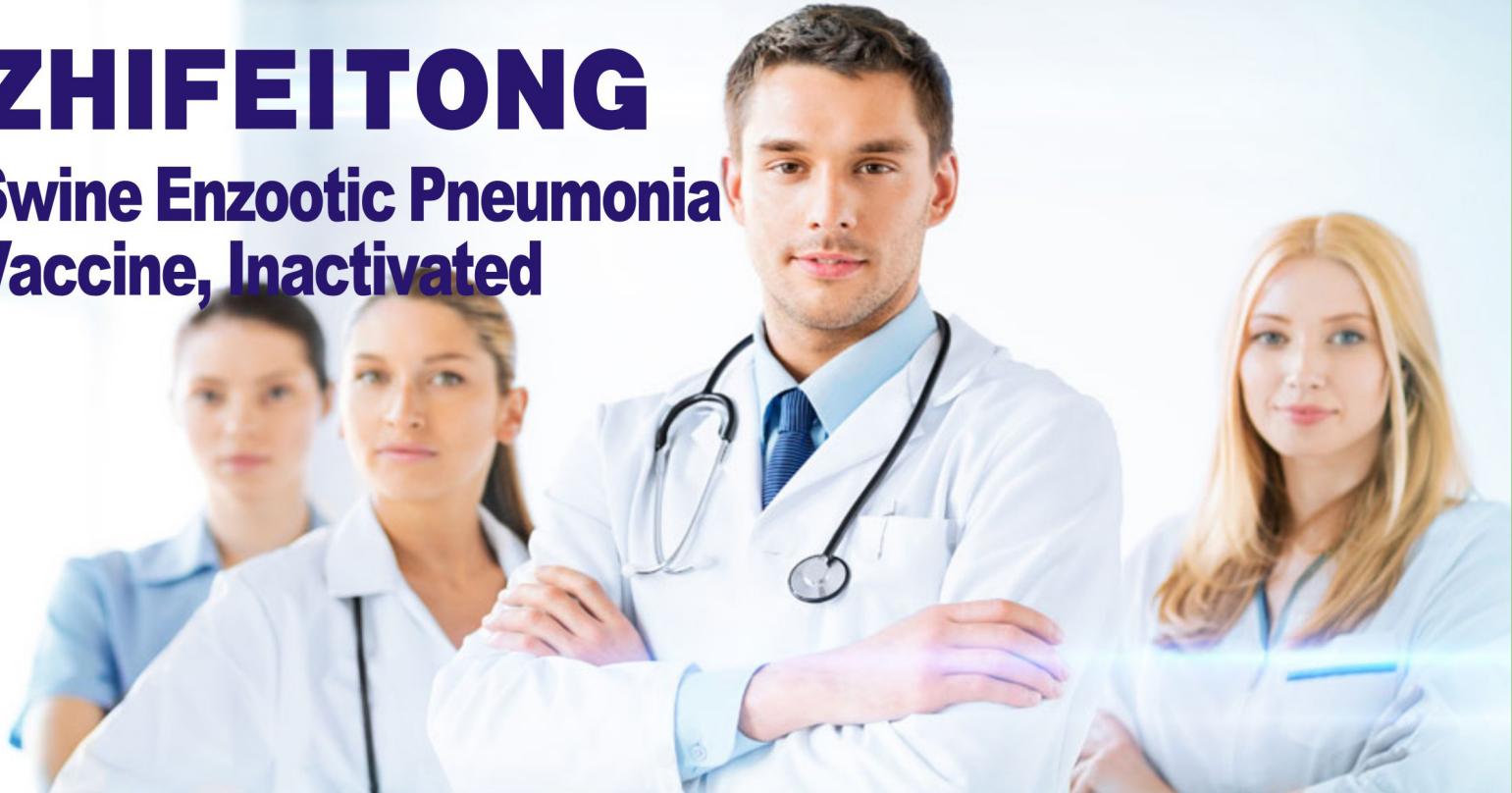
血吸虫病专家组组长：

林矫矫 中国农业科学院上海兽医研究所研究员

(本刊编辑部摘编自农业部官网)

# ZHIFEITONG

Swine Enzootic Pneumonia  
Vaccine, Inactivated



支肺通  
猪支原体肺炎灭活疫苗

## 产品特点：

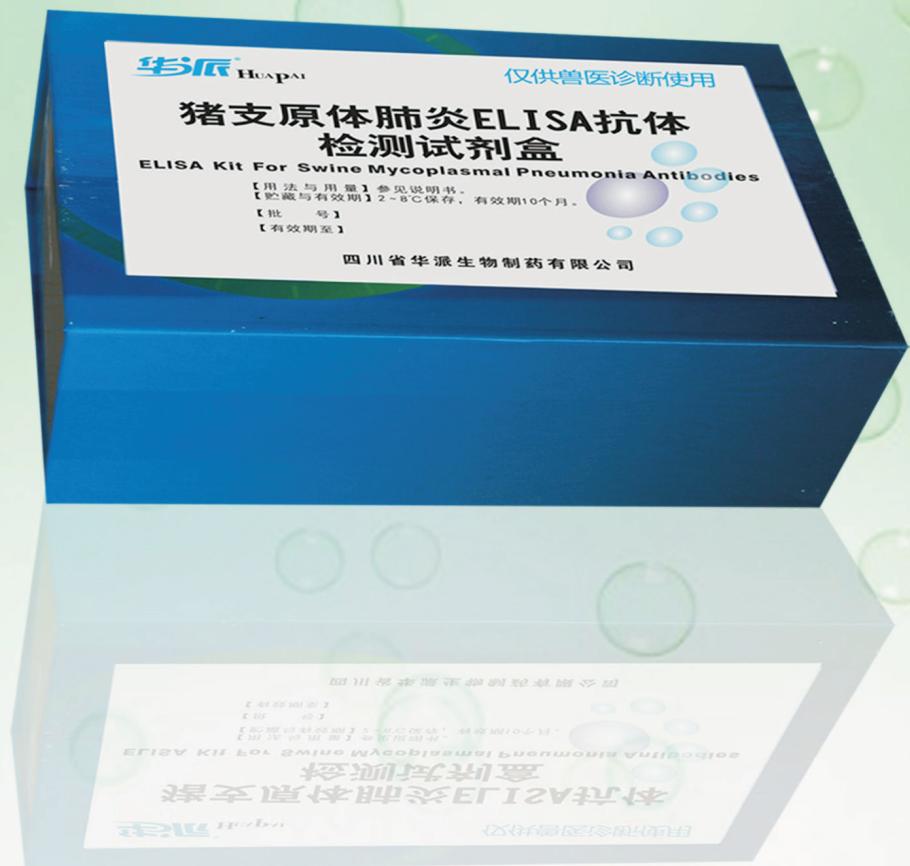
- 国内第一批猪支原体肺炎灭活疫苗
- J 株免疫原性好，攻毒保护能力强
- 精心研制独特培养基，抗原含量高
- 生物反应器大规模培养，灭活前抗原滴度稳定，成品批间差异小
- 抗原经纯化处理，免疫副反应小
- 独特佐剂，专利配方，增强免疫原性，诱导高水平细胞免疫
- 免疫后显著改善生产成绩



# 猪支原体肺炎ELISA抗体 检测试剂盒

仅供兽医诊断使用

- 灵敏度高
- 特异性好
- 高稳定性
- 简单易操作



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

公司地址：四川简阳经济开发区石盘食品医药产业园 邮编：641401  
联系电话：028-27400432 27282489 传真：028-27282488  
网 址：www.huapai.sw.com