

用大肠杆菌表达 FMDV NSP 3ABC 鉴别感染与注苗动物 ELISA 方法的建立

曹轶梅, 卢曾军, 刘在新*, 谢庆阁

(中国农业科学院兰州兽医研究所农业部畜禽病毒学重点实验室, 兰州 730046)

摘要: 用大肠杆菌表达的 FMDV NSP 3ABC 经纯化复性后作为抗原, 建立了鉴别感染动物与注苗动物的间接 ELISA 方法。用该方法检测了大量的牛血清样品, 确定了 3ABC-I-ELISA 判定标准。3ABC-I-ELISA 以 $(OD_{\text{样品}} - OD_{\text{阴性}}) \div (OD_{\text{阳性}} - OD_{\text{阴性}})$ 来计算待测样品效价。当效价小于 0.2 为阴性, 介于 0.2~0.3 之间为可疑, 大于 0.3 为阳性。根据此判定标准所测试感染动物血清都为阳性, 敏感性达 100%; 97.06% 疫苗注射动物血清为阴性; 98.39% 的非免疫健康牛(未感染也未注射疫苗牛)血清为阴性。研究证实感染牛在 1 年以后仍能检测到 3ABC 抗体。这说明 3ABC-I-ELISA 能够鉴别 FMDV 感染动物和注苗动物, 可作为大面积疫情监测的方法应用。

关键词: FMDV 3ABC; 间接 ELISA; 感染; 注苗; 鉴别

中图分类号: S854.4⁺ 3; S855.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)04-0381-06

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是一种高度接触性传染病,对国际贸易具有深远的影响,被 OIE 列为 A 类传染病之首。FMD 控制和消灭策略包括疫苗免疫和屠宰可疑畜群。在免疫接种的群体,大多数动物血清 FMDV 结构蛋白抗体均为阳性,因此,一些基于结构蛋白的诊断方法很难确定感染口蹄疫病毒与否。只有将感染动物和隐性带毒动物与疫苗免疫动物加以区分才能为 FMD 的控制和消灭提供科学的依据。最近的研究表明, FMDV 的某些非结构蛋白可以用来作为鉴别感染动物和疫苗免疫动物的诊断抗原,尤其是非结构蛋白 3ABC,作为鉴别诊断的抗原可信度最高,牛在感染 1 年以后仍可检测到 3ABC 抗体,而灭活疫苗免疫动物只能产生结构蛋白抗体。因此,检测非结构蛋白抗体为区分注苗动物和感染动物提供了美好前景。最早用 3D 蛋白(又称为病毒感染相关抗原, VIAA)作为鉴别感染动物与注苗动物的抗原,由于在成熟的病毒粒子内存在少量的 3D 蛋白,因此 VIAA 也是疫苗的有效成分之一,注苗动物体内也会有 VIAA 抗体存在。不少研究表明 3D 抗原无法区分感染动物和

注苗动物。近年来有许多利用其它非结构蛋白进行 FMD 鉴别诊断的报道, Bergmann 等建立了包括 3ABC 聚蛋白在内的非结构蛋白的酶联免疫转印试验,能鉴别感染牛和注苗牛,且具有很高的特异性和敏感性^[1]。Lubroth 和 Brown 用天然 FMDV NSP 2C 和 3ABC 放射免疫沉淀试验(RIP)能够鉴别牛和猪的隐性感染和免疫^[2]。Rodriguez 等的研究表明只有感染猪产生 3ABC 抗体,而灭活疫苗免疫猪不产生^[3]。总之,众多的研究结果证实 3ABC 抗体是确定 FMDV 感染的最主要的血清学标志之一^[4-9]。

因为免疫印迹和 RIP 都不适合于普查大量的血清,有必要建立一种简单、低廉、高特异、高敏感、能区分感染动物和注苗动物的检测方法。本研究应用大肠杆菌表达的 FMDV NSP 3ABC 抗原,建立了鉴别 FMDV 感染动物与注苗动物的间接 ELISA 方法。

1 材料与方法

1.1 质粒和试剂

pTriEx-3ABC 重组表达质粒由本实验室构建并保存^[10]。0.05 mol/L pH9.6 Na₂CO₃/NaHCO₃ 包被缓冲液,邻苯二胺(OPD),兔抗牛 IgG/HRP 酶结合物(二抗)均购自 Sigma 公司。Ceditest FM-DV-NS 检测试剂盒购自荷兰,96 孔酶标板为 Costar 产品。FMDV 146S 标准抗原为中国农业科学院

收稿日期: 2004-02-26

基金项目: 国家重大基础研究“973”(G1999011901); “十五”国家科技攻关(2002BA514A-18-1)

作者简介: 曹轶梅(1976),女,甘肃会宁人,硕士,研究实习员,从事病毒分子生物学研究

* 通讯作者: 刘在新, Tel: 0931-8342587; E-mail: liuke@public.lz.gs.cn

兰州兽医研究所制造。

1.2 血清样品

标准对照血清: 阳性血清为牛攻毒后, 第 12 个月采血分离的血清, 经 Ceditest FMDV-NS 试剂盒检测 3ABC 抗体效价为 1: 512; 阴性血清为非免疫健康牛血清, 经 FMDV 146S 抗原液相阻断 ELISA 检测为阴性, 且经 Ceditest FMDV-NS 试剂盒检测其 3ABC 抗体亦为阴性。

试验牛血清包括以下几类: (1) 未进行任何 FMD 疫苗免疫的健康牛血清 374 份; (2) 接种灭活疫苗后第 21 天所采的牛血清 35 份; (3) 灭活疫苗免疫 2~3 次以上牛血清 379 份; (4) 试验感染牛血清 68 份, 为用 O 型 FMDV 攻毒后的 5 头牛, 每月采血 1 次, 其中的 3 头牛连续采血 12 个月, 2 头牛连续采血 16 个月。用于上述试验的牛来自无 FMD 区, 在试验前无结构蛋白抗体。所有试验均在中国农业科学院兰州兽医研究所农业部畜禽病毒学重点实验室进行。

对比试验用牛血清包括: (1) O 型 FMDV 试验性人工感染牛血清 40 份, 编号为 1~40; (2) 灭活疫苗免疫牛血清 35 份, 来源海南省; (3) 非免疫临床健康牛血清 60 份, 来源海南省。

1.3 3ABC 融合蛋白的表达、纯化及复性

3ABC 融合蛋白的表达、纯化及复性过程参见文献[11]。

1.4 3ABC 间接 ELISA 最佳工作条件的确定

1.4.1 二抗工作浓度的确定 用直接 ELISA 方阵滴定法进行, 即用不同倍数稀释的牛标准阳性血清包被 ELISA 板, 4 °C 过夜。加入不同倍数稀释的兔抗牛 IgG/HRP 酶结合物, 37 °C 结合 1 h, 加底物显色, 测定 OD₄₉₂ 值。

1.4.2 抗原浓度的确定 用不同浓度复性后的 3ABC 蛋白包被 ELISA 板, 4 °C 过夜。用不同倍数稀释的阳性血清与之感作 1 h, 以方阵法确定抗原浓度。

1.5 3ABC 间接 ELISA 操作流程

操作步骤如下: ①包被: 以包被缓冲液(0.05 mol/L pH9.6 Na₂CO₃/NaHCO₃) 稀释纯化复性后的 3ABC 蛋白至工作浓度, 加入 96 孔酶标板, 每孔 50 μL, 4 °C 过夜。以加终浓度 0.05% Tween-20 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBST) 洗涤 2 次, 拍干。②封闭: 每孔加入 50 μL 封闭液(为含 5% 蔗糖, 10% 马血清的 PBST), 37 °C 封闭 40 min。洗涤 3

次, 拍干。③与待检血清结合: 将待检血清样品、阳性和阴性对照血清用血清稀释液(含 5% 脱脂奶粉, 1% 大肠杆菌裂解物的封闭液) 稀释至最佳浓度, 每孔 50 μL, 每个样本加 2 孔, 37 °C 结合 1 h。PBST 洗涤 5 次, 拍干。④与酶结合物反应: 兔抗牛 IgG/HRP 用 PBST 稀释至工作浓度, 每孔加入 50 μL, 37 °C 结合 1 h。洗涤 5 次, 拍干。⑤加底物显色: 每孔加入 50 μL H₂O₂/OPD, 37 °C 避光 15 min。⑥终止: 每孔加入 1.25 mol/L H₂SO₄, 终止反应。⑦于酶标仪测定 492 nm OD 值。⑧结果计算: 计算每个样品 OD 平均值, 根据公式(OD 样品 - OD 阴性) ÷ (OD 阳性 - OD 阴性) 计算每个样品抗体效价。

1.6 判定标准的确定

先用 Ceditest FMDV-NS 试剂盒检测 374 份健康牛血清, 挑选出符合条件的血清(即为阴性的血清), 用 3ABC 间接 ELISA 来测其 OD 值以确定它的判定标准。根据血清样品抗体效价 = (OD 样品 - OD 阴性) ÷ (OD 阳性 - OD 阴性) 来确定每份样品的 3ABC 抗体效价。根据测得的健康牛血清(阴性血清)的平均 OD 值和标准差(SD) 来确定 FMDV 3ABC 间接 ELISA 抗体测定方法的判定标准: 以(阴性血清平均 OD 值 + SD) 作为待测样品 OD 值, 根据上述公式算得效价为阴性血清最高效价(上限); 以(阴性血清平均 OD 值 + 2SD) 作为待测样品 OD 值, 算得效价为阳性血清最低效价(下限); 介于二者之间的判为可疑。

1.7 方法的敏感性与特异性确定

用 Ceditest FMDV-NS 检测试剂盒检测所有的试验牛血清, 挑选符合条件的血清(即健康牛与免疫牛血清为阴性、感染牛血清为阳性的血清) 进行检测, 以确定 3ABC 间接 ELISA 的特异性与敏感性。

1.8 本方法与国外同类试剂盒的对比试验

用 FMD-3ABC bo-ov (Bommeli/ Intervet) 检测对比试验用牛血清 135 份, 其中包括试验感染牛血清 40 份、灭活疫苗免疫牛血清 35 份, 非免疫临床健康牛血清 60 份, 操作按试剂盒说明书进行。将检测结果与 FMD 3ABC-IFELISA 检测结果进行比较。

2 结果与分析

2.1 3ABC 融合蛋白的纯化

融合蛋白经离子亲和层析纯化后, 通过 SDS-PAGE 分析, 只有 1 条约 59.1 ku 的蛋白带, 与

3ABC 融合蛋白大小完全一致,经薄层扫描纯度达 90% 以上。按文献[11]所述方法复性后用作抗原。

2.2 3ABC 抗原和二抗的最佳工作浓度

通过方阵法确定了抗原的工作浓度和二抗的最佳稀释倍数分别为 1:500 和 1:1500。

2.3 3ABC 间接 ELISA 的优化

选择 2 种用 Ceditest FMDV-NS 检测试剂盒检测为 3ABC 抗体强阳性和弱阳性(效价分别为 1:5120 和 1:320) 和阴性血清来确定血清的最佳稀释度。在尽可能降低假阳性和假阴性,且能区分阳性和阴性血清的条件下,确定待检血清最佳稀释度

为 1:100(如图 1)。

利用大肠杆菌表达蛋白作抗原进行间接 ELISA 必然会出现非特异性反应,因此在建立方法的过程中,使用了许多阻断剂,如脱脂奶粉和大肠杆菌裂解物。通过试验发现,5% 脱脂奶粉能有效降低背景值,消除非特异性反应,但仍有 10% 左右已知阴性血清为阳性,为了解决这个问题,向血清稀释液中加入大肠杆菌裂解物,浓度从 1%~3%。结果表明,1% 大肠杆菌裂解物能较好地消除假阳性反应,而不影响真阳性血清的反应(如图 2)。

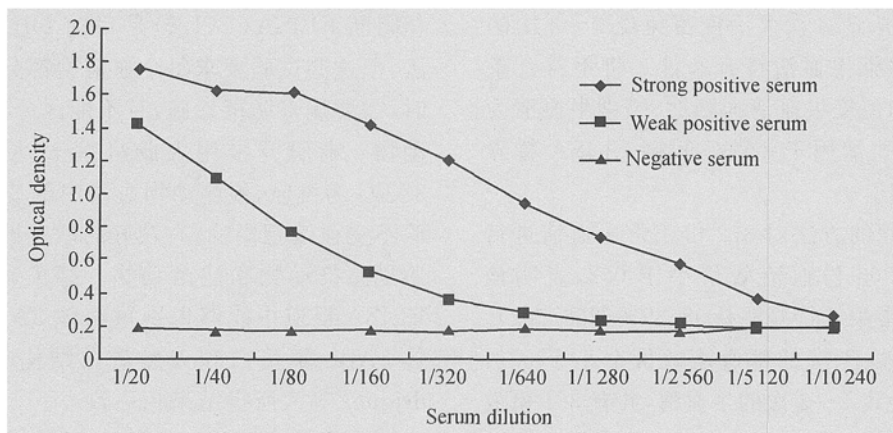


图 1 对照血清滴度曲线

Fig. 1 Titre curves of control sera

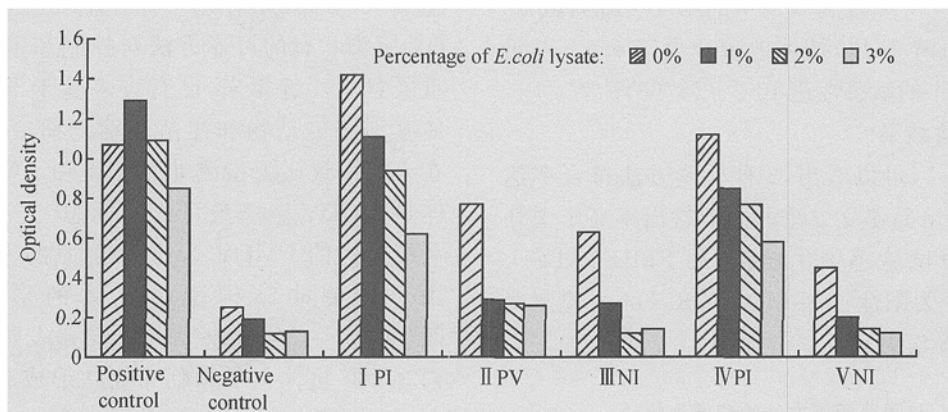


图 2 大肠杆菌裂解物浓度对假阳性反应的阻断作用

Fig. 2 Blocking effect of different amount of *E. coli* bacterial lysate on false positive reactions

Examples of sera from naive(NI), vaccinated(PV) or infected(PI) bovine

2.4 判定标准确定

用 Ceditest FMDV-NS 试剂盒检测 374 份健康牛血清,有 372 份为阴性。再用 3ABC 间接 ELISA 来测这 372 份健康牛血清,根据测得的 OD 值来确定该

ELISA 方法的判定标准。所测 372 份健康牛血清平均 OD 值为 0.299 8, SD 为 0.097 6, 不同 ELISA 板上标准阳性血清平均 OD 值(OD 阳性)为 1.188 5, 标准阴性血清平均 OD 值(OD 阴性)为 0.201 2。以(平均

OD 值+ SD) 作为待测样品 OD 值(OD 样品), 根据上述公式算得值为阴性血清的最高效价(上限); 以(平均 OD 值+ 2SD) 作为待测样品 OD 值(OD 样品), 算得值为阳性血清的最低效价(下限)。通过计算得到阴性血清效价上限为 0.2, 阳性血清效价下限为 0.3。由此确定本方法的判定标准为: 检测样本血清 3ABC 抗体效价小于 0.2 为阴性, 介于 0.2~ 0.3 之间为可疑, 大于 0.3 为阳性。

2.5 敏感性与特异性测定结果

用 Ceditest FMDV-NS 检测试剂盒检测的试验牛血清, 共有 372 份健康牛血清、35 份灭活疫苗免疫 1 次的牛血清、373 份灭活疫苗免疫 2~ 3 次的牛血清和 68 份感染牛血清符合条件。将不符合条件的血清(正常和免疫牛血清为阳性、感染牛血清为阴性)剔除, 其它血清用于 3ABC 间接 ELISA 特异性、敏感性的确定。

用本试验建立的方法对 372 份正常牛血清进行测定, 结果其中 366 份血清效价小于 0.2, 表明该 ELISA 方法对正常牛的特异性是 98.39% (366/372)。35 份灭活疫苗免疫 1 次的牛血清效价全小于 0.2, 373 份灭活疫苗免疫 2~ 3 次的牛血清, 共有 361 份效价小于 0.2, 表明该 ELISA 对免疫牛的特异性是 97.06% [(35+ 361)/(35+ 373)], 同时说明注射灭活疫苗不引起 3ABC 抗体升高。5 头试验性感染牛, 其中 3 头牛的第 1~ 12 月和 2 头牛的第 1~ 16 月共 68 份血清, 所测血清 3ABC 抗体效价全大于 0.3。说明本方法对感染牛的敏感性达 100% (68/68)。

2.6 对比试验结果

结果见表 1, 可以看出, 2 种检测方法符合率达 93% 以上。本试验建立方法的阳性检出率高于国外试剂盒。40 份试验感染牛血清, 用 FMD 3ABC-I-ELISA 检测全为阳性, 而 FMD-3ABC bo-ov 检测试剂盒检测, 有 8 份为阴性。

表 1 与国外同类方法检测结果比较

Table 1 Comparison of results with foreign kit

血清来源 Origin of sera	FMD-3ABC bo-ov	FMD 3ABC-I-ELISA
灭活疫苗免疫 Vaccinated	33 ^a /35	32 ^a /35
非免疫临床健康 Naive	59 ^a /60	59 ^a /60
试验感染 Experimentally infected	32 ^b /40	40 ^b /40

a: 表示阴性数; b: 表示阳性数

a, b mean the number of negative and positive animals respectively

3 讨论

准确的诊断对 FMD 控制和消灭至关重要。FMD 感染康复动物可带毒达数月甚至数年。控制 FMD 所面临的一个主要问题是鉴别注苗动物和康复动物及病毒携带动物。病毒携带动物在传播疾病方面的作用尚不大清楚, 但已有资料表明, 它们有可能间歇地分泌病毒, 产生新的遗传变异株, 从而引起新一起疫病。从康复动物咽/食道分离病毒是鉴定病毒携带动物最特异的技术, 但该技术敏感性低, 且消耗大量的人力、物力。病毒中和试验(VNT)和液相阻断 ELISA(LPBE)是目前 OIE 推荐使用的方法, 但这些试验要求每个血清型都分开检测, 操作费时, 需要病毒防范设施, 且不能区分注苗动物和康复动物。本研究采用大肠杆菌表达的 FMDV NSP 3ABC 为抗原, 检测动物血清中的 3ABC 抗体, 该试验不受血清型影响, 有较好的敏感性和特异性, 可以鉴别感染动物和注苗动物。感染动物血清抗体在 ELISA 反应中能够识别重组体 3ABC, 这表明重组体 3ABC 聚蛋白和天然蛋白结构相近。这和 Rodriguez 等人所得结果相一致^[3]。

在大多数 FMD 流行区都广泛应用商业疫苗, 紧急免疫接种能降低疾病向邻近未使用疫苗区传播。考虑到 FMDV 在反刍动物体内可建立持续性感染^[12~14], 因此研究一种评估无症状畜群中 FMDV 感染状态的可靠方法对控制和消灭 FMD 具有重要意义。近年来, 已有许多基于 FMDV NSP 抗体鉴别感染动物和注苗动物的研究^[2~4, 7, 15, 16]。现在人们一致认为检测非结构蛋白 3ABC 和 3AB 抗体是 FMDV 感染最可靠的标志^[4~9]。以各种表达系统表达的 FMDV NSP 为抗原的 ELISA 方法已用于估测非结构蛋白抗体的形成和持续时间^[1, 4, 17, 18]。Mackay 等人的研究表明, 感染动物体内 3ABC 抗体水平和临床症状形成有关。例如, 所有试验感染的有临床损伤的动物, 1 个月就能检测到 3ABC 抗体, 1 年后 3ABC 抗体仍为阳性, 而亚临床感染动物 3ABC 抗体形成慢, 感染后 2 个月仅有 80% 动物表现血清阳性。这些研究结果表明, 3ABC 抗体检测是测试无症状感染畜群内病毒活力最好的方法^[18]。

本试验中, 动物感染 FMDV 后, 1 个月就能检测到 3ABC 抗体, 16 个月后 3ABC 抗体还为阳性。在 3ABC-I-ELISA 检测中, 所有感染动物血清都为

阳性,敏感性为 100%。97.06% 免疫动物血清为阴性,98.39% 正常动物血清为阴性,这说明试验具有较高的敏感性和特异性。通过与国外检测试剂盒比较,进一步验证了上述结论。总之,本研究为 FMD 鉴别诊断提供了实际可行的方法。该方法具有较高的敏感性和特异性,可用于活畜进出口调运、疫区净化检疫和群体无症状感染评价,区分感染和注苗动物。

参考文献:

- [1] Bergmann I E, Malirat E V, Neitzert E, et al. Improvement of a serodiagnostic strategy for foot-and-mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot assay[J]. *Arch Virol*, 2000, 145: 473~ 489.
- [2] Lubroth J, Brown F. Identification of native foot-and-mouth disease virus nonstructural protein 2C as a serological indicator to differentiate infected from vaccinated animals[J]. *Res Vet Sci*, 1995, 59: 70~ 78.
- [3] Rodriguez A, Dopazo J, Saiz J C, et al. Immunogenicity of nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus: differences between infected and vaccinated swine[J]. *Arch Virol*, 1994, 136: 123~ 131.
- [4] Sorensen K J, Madsen K G, Madsen E S, et al. Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the nonstructural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus[J]. *Arch Virol*, 1998, 143: 1 461~ 1 476.
- [5] Diego D M, Brocchi E, Mackay D, et al. The nonstructural polyprotein 3ABC of foot-and-mouth virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle[J]. *Arch Virol*, 1997, 142: 2 021~ 2 033.
- [6] Malirat V, Neitzert E, Bergmann I E, et al. Detection of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus by means of an indirect ELISA test using bioengineered nonstructural polyprotein 3ABC[J]. *Vet Q*, 1998, 20 (Suppl 2): S24~ S26.
- [7] Mackay D K J, Forsyth M A, Davies P R, et al. Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant nonstructural proteins in ELISA[J]. *Vaccine*, 1997, 16: 446~ 459.
- [8] Lubroth J, Lopez A, Ramalho A K, et al. Cattle response to foot-and-mouth disease virus nonstructure proteins as antigens within vaccines produced using different concentrations[J]. *Vet Q*, 1998, 20 (Suppl 2): S13~ S17.
- [9] Brocchi E, De Diego M I, Berlinzani A, et al. Diagnostic potential of Mab-based ELISA's for antibodies to nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus to differentiate infection from vaccination[J]. *Vet Q*, 1998, 20(Suppl 2): S20~ S24.
- [10] 曹轶梅,刘在新,卢曾军,等.口蹄疫病毒非结构蛋白基因 3ABC 在大肠杆菌中的表达[J]. *畜牧兽医学报*, 2004, 35(1): 115~ 118.
- [11] 曹轶梅,卢曾军,刘在新,等.大肠埃希氏菌表达 FMDV 3AB 非结构蛋白的纯化复性与活性检测[J]. *中国兽医科技*, 2003, 33(8): 22~ 25.
- [12] Kitching R P. The application of biotechnology to the control of foot-and-mouth disease virus[J]. *Br Vet J*, 1992, 148: 375~ 388.
- [13] Salt J S. The carrier state in foot and mouth disease — an immunological review[J]. *Br Vet J*, 1993, 149: 207~ 223.
- [14] Woodbuy E L. A review of the possible mechanisms for the persistence of foot-and-mouth disease virus[J]. *Epidemiol Infect*, 1995, 114: 1~ 13.
- [15] Villinger F, Mueller H K, Bruckner L, et al. Antibodies to foot-and-mouth disease virus infection associated (VIA) antigen: use of a bioengineered VIA protein as antigen in an ELISA[J]. *Vet Microbiol*, 1989, 20: 235~ 246.
- [16] Silberstein E, Kaplan G, Taboga O, et al. Foot-and-mouth disease virus-infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3AB1 nonstructural protein[J]. *Arch Virol*, 1997, 142: 795~ 805.
- [17] Mezencio J M, Babcock G D, Meyer R F, et al. Differentiating foot-and-mouth disease virus-infected from vaccinated animals with baculovirus-expressed specific proteins[J]. *Vet Q*, 1998, 20, (Suppl 2): S11~ S13.
- [18] Mackay D K J, Forsyth M A, Davies P R, et al. Antibody to the nonstructural proteins of foot-and-mouth disease virus in vaccinated animals exposed to infection[J]. *Vet Q*, 1998, 20(Suppl 2): S9~ S11.

Development of a Differentiating ELISA Based on 3ABC of Foot-and-mouth Disease Virus Expressed in *E. coli*

CAO Yrmei, LU Zeng-jun, LIU Zaixin*, XIE Qingge

(Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences,
Lanzhou 730046, China)

Abstract: An indirect enzyme-linked immunosorbent assay for differentiating infected animals from vaccinated animals was established by using foot-and-mouth disease virus (FMDV) nonstructural protein (NSP) 3ABC antigen, which was expressed in *E. coli*. Serial experiments were performed using sera from cattle. A formula $\{value = (OD_{sam} - OD_{neg}) \div (OD_{pos} - OD_{neg})\}$ was developed to calculate sample values, critical values were determined by optical density (OD) of naive cattle sera, and values below 0.2 were considered as negative, values between 0.2 and 0.3 as ambiguous and values above 0.3 as positive. The sensitivity of the assay was 100%, as all the experimental post-infection sera gave values greater than 0.3. In contrast, 97.06% of sera from vaccinated animals were negative. A high degree of specificity was also confirmed by the finding that 98.39% of sera from naive animals gave negative results. The 3ABC specific antibodies were detectable at least 1 year post-infection. The described 3ABC-ELISA can differentiate infected from vaccinated animals and can perform in large scale serological surveys.

Key words: FMDV 3ABC; ELISA; infection; vaccination; differentiation

* Corresponding author

(上接 P375)

10. 猪繁殖与呼吸综合征病毒分子流行病学研究进展(杨汉春 中国农业大学教授)
11. 猪圆环病毒研究进展(周继勇 浙江大学教授)
12. 非典型猪瘟及其控制(宁宜宝 中国兽药药品监察所研究员)
13. 猪瘟流行状况与分子流行病学研究进展(涂长春 中国军事医学科学院军事兽医研究所研究员)
14. 规模化猪场疫病控制的经验(陈健雄 全国机械化养猪协会会长)

(三)论坛

1. 养猪经济管理论坛:探讨猪场技术管理存在问题及解决方案,由正大集团中国区总裁姚民朴主持。
2. 人才与就业论坛:成功之道——选人、育人、用人、留人

来自全国各院校 100 多名即将毕业的硕士、博士生将在此论坛上与行业内的用人单位和成功人士进行直接对话,人才与就业论坛将搭建一个展示自我、展示实力的舞台。

(四)养猪科技展览会由中国畜牧兽医学会养猪学分会具体组织。有意参展的企事业单位请与养猪学分会联系。

电 话:010-64719434 转 801、803 或 804 010-84715449 转 801、803 或 804

传 真:010-64719434 转 810 E-mail: chinapig@263.net

五 参会须知

参会费用请登陆中国畜牧兽医网站 www.caav.org.cn

六 联系方式:

地址:北京农展馆南路 9 号博雅园 1-106 中国畜牧兽医学会 邮编:100026

网址: www.caav.org.cn E-mail: caav@caav.org.cn; c06@cast.org.cn

开户行:北京农行朝阳支行营业部 开户单位:中国畜牧兽医学会 帐号:041601040003564

1. 会务联系人:孙丽波 石娟 电话:010-85959006 85959009 85959010(fax) E-mail: caav@caav.org.cn

2. 宣传广告联系人:颜海燕 张高霞 郭自干 张保密 马贵东

电话:010-62111186 68918761 62110970 传真:010-62111196 E-mail: aid129@163.com

附件:参会回执和预定房间回执请到学会网站下载

中国畜牧兽医学会
二〇〇五年二月二日