

本刊被中国内刊协会评选为 2013 年度全国优秀内刊

华派[®]
HUAPAI

2014 年第 4 期 总第 5 期
<http://www.schpzy.com/index.aspx>
E-mail: huapaisw@163.com
内部交流 免费赠阅

华派生物

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

华派生物 2014 年上半年销售工作会议完美落幕



华溢于表 派源于质
猪喘气病疫苗研究进展

猪瘟活疫苗（兔源）外源病毒检测与控制

集先进生物科技 铸百年疫苗品质

——专访四川省华派生物制药有限公司总经理龚文波

圆环康

猪圆环病毒2型灭活疫苗 (ZJ/C株)
Porcine Circovirus Type 2 Vaccine,
Inactivated (Strain ZJ/C)

批准文号：兽药生字 (2014) 221011088



- ✓ 生产毒株 (ZJ/C) 为国内广泛流行的强毒株，针对性更强
- ✓ 高效抗原浓缩纯化，抗原含量更高 ($\geq 10^{8.3} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$)
- ✓ β -PL灭活剂，安全、高效、灭活彻底、无残留
- ✓ HPVVG进口新型佐剂，应激反应更小
- ✓ 起效快 (3周产生保护力)，免疫力强大
- ✓ 临床效果显著，经济效益可观 (投入产出比为1:5.8)

用了圆环康 猪群真健康



华派® HUAPAI

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

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

华溢于表 派源于质

文 | 向丕元

四川省华派生物制药有限公司成立于2008年，当时为什么取名“华派”二字？笔者对其探究了一段时间，至今琢磨有余，感慨有加。

四川省华派生物制药有限公司是四川精华集团的独资子公司，是一家专业从事兽用生物制品研发、生产、销售和服务的民营企业。2012-2013年精华集团又投资1.8亿元对华派生物改扩建，2013年底华派生物新厂区在悄无声息的决策和执行中建成投产，并先后一次性通过国家农业部组织的静态、动态验收。

今天的新华派，全凭集团公司董事长、总裁谢建勇先生对这个行业的深厚感情和执着追求。2003年他创建了国内首家民营兽用生物制品生产企业——精华生物，其生产的禽流感疫苗曾一度占领全国市场近半壁江山；2008年成立了华派生物，问及“华派”二字的寓意，听起来似乎比较简单，即精华集团派生出来的又一企业；备受业内人士关注和期待的新华派再次展示了谢董事长的倾心之作，新厂区建筑面积3.1万平方米，建成了4个生产车间15条生产线（含2条悬浮培养生产线），配套建设了质检研发中心、行政办公中心、动物疫病监测诊断中心和实验动物中心。配备了一流的生产和检验设备，年生产能力达130亿头（羽）份。

新的厂房、新的设备、新的管理模式和新的团队使华派生物华丽转身，就像精华集团董事长谢建勇先生一样，时刻透视出的那种胆略魄力、沉稳求进和志在必得溢于言表，更像蓄势待发的火山，随时有可能喷薄而出。

华派生物除常规产品外，目前已取得了猪圆环病毒2型灭活苗（ZJ/C株），鸡新、支、流三联灭活疫苗（La Sota株+M41株+WD株），鸡新、支、减三联灭活疫苗（La Sota株+M41株+HE02株），鸡新、支、减、流四联灭活疫苗（La Sota株+M41株+HSH23株+WD株），鸭病毒性肝炎弱毒活疫苗（CH60株），兔瘟、巴二联灭活疫苗（LQ株+C51-17株）6个新兽药证书并将陆续推向市场；在研开发的产品近20个。

公司坚守“诚信为先，质量为本”的经营理念，以“集先进生物科技，铸百年疫苗品质”为奋斗目标。随着华派生物产品的不断丰富上市，也随着管理体系的日渐规范和完善，华派生物这一大手笔终将在行业内自成一体，自成一派。这种气派，毋庸置疑是以品质为支撑。华派人展示在世人面前的，不仅追求量的提升，更求质的跨越。

我们越来越领会到“华派”的深刻寓意，“华溢于表，派源于质”是对华派生物的最好诠释，也是公司发展的内在要求，更是华派人追求的永恒目标。我们坚信，有谢建勇先生的亲自领导和运筹帷幄，华派生物必将凝聚华夏智慧，展现大师气派！也必将在中华大地，彰显气派，引领动保行业持续发展。

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
汪开毓 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

编委会主任：谢建勇
编委会副主任：何康林

编辑部

主编：龚文波
副主编：方鹏飞 林琳 徐静
执行主编：向丕元
责任编辑：王娟 张莉 潘华柱
美编：袁勇
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
电子邮箱：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
四川省畜牧科学研究院猪育种科基地
新希望六和股份有限公司成都中心
华西希望特驱农牧有限公司
成都凤凰华侨农牧科技发展有限公司
四川蓝雁畜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
简阳市瑞益农业发展有限公司
四川茂华养殖有限公司
青神县联合生态生猪养殖协会



2014年第4期 总第5期
内部交流 免费赠阅

免责声明

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

版权所有·侵权必究

凡受赠本公司刊物，如有缺页、倒页、脱页，由《华派生物》杂志编辑部负责退换。
本刊赠阅以下读者：（1）国内各地区有影响力的畜禽养殖企业（业主）；（2）国内各地区代理商、经销商；（3）企业内部员工；（4）合作伙伴（友好往来）单位。



铸百年疫苗品质
集先进生物科技

精制高效

猪瘟活疫苗 (细胞源)

Classical Swine Fever Vaccine, Live (Tissue culture origin)

批准文号: 兽药生字 (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 ≥ 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.schpzy.com



P11 华派生物 2014 年上半年销售工作会议完美落幕

6月5-8日，华派生物2014年上半年销售工作会议在简阳召开，精华集团董事长、总裁谢建勇先生莅临会议并作重要指示。

卷首语 Editoria

01 华溢于表 派源于质

图片新闻 News Pictures

- 06 华派生物积极参加2014四川畜牧暨饲料·动物保健品展览会
- 08 精华集团2014年上半年工作总结暨下半年工作部署大会召开
- 11 华派生物2014年上半年销售工作会议完美落幕

高管视角 Executive Perspective

- 14 集先进生物科技 铸百年疫苗品质——专访四川省华派生物制药有限公司总经理龚文波

技术交流 Technical Exchange

- 18 猪喘气病疫苗研究进展

- 24 猪肺炎支原体强毒株的分离和鉴定
- 29 猪肺炎支原体生长状态与滴度的关系
- 33 猪瘟活疫苗(兔源)外源病毒检测与控制

团队风采 Team Sketch

- 38 如何取得客户的信任

七彩生活 Colorful Life

- 41 别让心态毁了自己
- 42 圣贤之道就是不断完善自己

行业资讯 Stockbreeding Information

- 44 全国猪业形势分析座谈会在渝召开
- 45 农业部与联合国粮农组织联合开展“中国非洲猪瘟防范项目”
- 46 中国生猪市场难以安慰的价格问题
- 47 我们坚信未来畜牧业会沿着稳定健康的轨道前进

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





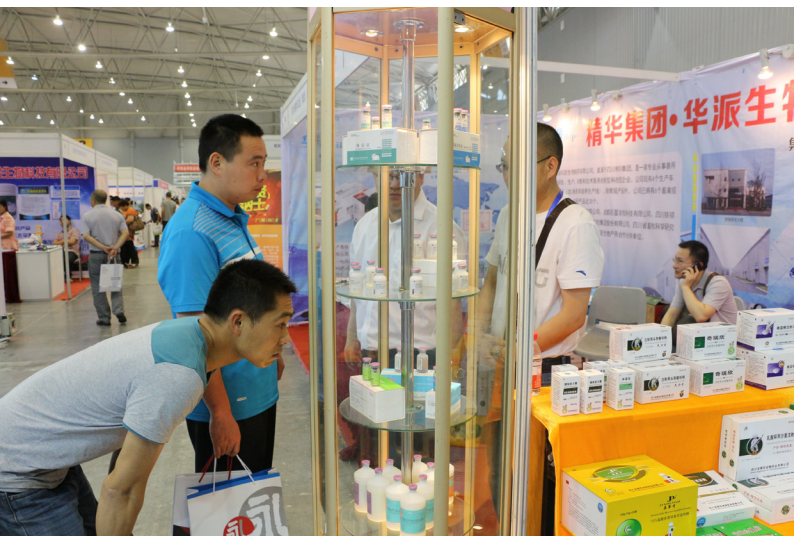
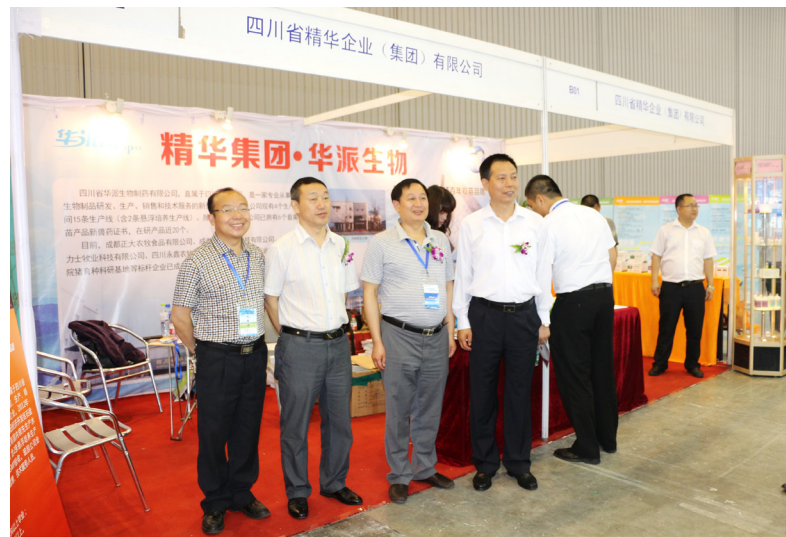
华派生物积极参加 2014 四川畜牧暨 饲料·动物保健品展览会

文 | 向丕元 图 | 本刊编辑部

5月26-27日，华派生物公司参加了2014四川畜牧暨饲料·动物保健品展览会，并受到部、省行业领导的肯定和好评。

精华集团作为四川省动物保健品协会的副会长单位，受2014四川畜牧暨饲料·动物保健品展览会组委会的邀请，提前预订了2个国际标准展位，积极组织直属企业四川省华派生物制药有限公司、四川省精华动物药业有限公司和四川省精华饲料发展有限公司参展、参会。

华派生物公司对这次展览会非常重视，落实专人策划、设计和筹备。5月26-27日，公司派人赶赴成都世纪城新国际会展中心提前布展。5月28日上午9时，2014四川畜牧暨饲料·动物保健品展览会正式拉开帷幕，华派生物公司总经理龚文波先生按照组委会安排，代表精华集团前往主席台就



位参加了开幕式。开幕式后，部、省行业领导专程前往我公司展位检查和指导，并对我公司布展情况给予了肯定和好评。

展览会上，华派生物对现有猪用疫苗（猪瘟、伪狂、蓝耳）和即将上市的猪圆环病毒 2 型灭活疫苗（ZJ/C 株），鸡新、支、流三联灭活疫苗（La Sota 株 + M41 株 + WD 株），鸡新、支、减三联灭活疫苗（La Sota 株 + M41 株 + HE02 株），鸡新、支、减、流四联灭活疫苗（La Sota 株 + M41 株 + HSH23 株 + WD 株），鸭病毒性肝炎弱毒活疫苗（CH60 株），兔瘟、巴二联灭活疫苗（LQ 株 + C51-17 株）等产品进行了实物展示。展会期间，共接待前来参观、咨

询的养殖业主、技术人员和业内人士 200 多人，发放产品宣传资料近 200 套、《华派生物》内刊 100 余册。

通过这次疫苗新产品的展示、养殖客户间的交流和互动、产品宣传资料和《华派生物》内刊的发放等参展活动，对于公司产品的宣传推广、企业形象的塑造和企业品牌战略的推进都将产生积极的影响和作用。

精华集团 2014 年上半年工作总结暨 下半年工作部署大会召开

文 | 向丕元 图 | 本刊编辑部





2014年6月8日下午，精华集团召开2014年上半年工作总结暨下半年工作部署大会，华派生物、精华房产、精华动物药业和鑫源建筑各分公司中层以上领导、华派生物研发中心全体人员和华派生物、精华动物药业销售业务员共150余人参加了会议。

会议首先由华派生物制药有限公司总经理龚文波、精华房地产开发有限公司常务副总经理杨进平、精华动物药业有限公司总经理何康林和鑫源建筑工程有限公司总工程师李泽良分别就2014年上半年的工作进行了全面总结，并对2014年下半年的工作任务进行了安排部署。

精华集团董事长、总裁谢建勇在会上作了重要指示。

谢总说，今年上半年整个集团发展基本上按照既定的目标一一实现，各分公司的工作也较为顺利，各项工作稳步推进，重点工作都落实的比较良好，但各分公司存在的困难和问题还是比较多。希望大家认真回顾总结，对照年初下达的目标，凝心聚力，迎难而上，再创佳绩。

6月8日下午，精华集团召开2014年上半年工作总结暨下半年工作部署大会，精华集团董事长、总裁谢建勇在会上作了重要指示。





会上，谢总对华派生物提出了更高要求，他说，随着华派生物新厂的建成、验收和投产，我们有了基础，有了平台，可面临的困难和问题不少。华派生物下半年的主要工作，首先要把产品文号的报批工作作为第一要务抓紧抓好，要确定专人跟踪落实。生产技术部门要潜心研究，摸索、优化各种产品的生产工艺，加强管理和质量控制，人机磨合要达到最佳状态。研发团队由三个研发组组成，包括细胞研究与毒株制备研发组、生产工艺研发组、质量检验以及产品复核研发组。销售工作是拉动公司发展的决定性因素。要明确销售思路，制定销售方案。全国划分五大销售片区，各片区经理要切实负起责任，督促、指导各片区工作。

谢总强调，未来的市场竞争激烈，产品质量要求更高。公司决定，每个产品将按两条线生产，一条

是全国各分销商经营的网络化渠道产品（又细分红钻和蓝钻产品），另一条是总代理商、地区级代理商经营的规模场专用产品（简称金钻产品）。他要求，懂生产的要懂技术，懂技术的更要懂生产。各部门要加强沟通和学习，要走出去看，请进来学，虚心地听、虚心地学，学习别人的管理和生产。所有生产技术人员要分班组进行讨论，分析各产品的生产环节和关键控制点，形成寻找问题、发现问题、正视问题和纠正问题的良好氛围和习惯。要加强生产现场的管理，节约能源，保障生产设备正常运行。

谢总希望，华派员工要团结一心，拧成一股绳，克服一切困难，全力以赴投入到生产工作中，要凭借华派生物这个一流的平台，打造一流的团队，生产一流的产品。



华派生物 2014 年上半年销售工作会议 完美落幕

文 | 张莉 图 | 本刊编辑部

2014年6月8日，为期4天的华派生物2014年上半年销售工作会议完美落幕。来自全国19个省区的大区经理、销售区域经理和技术服务经理共30余人参加了会议，精华集团董事长、总裁谢建勇先生莅临会议并作重要指示，会议由销售副总监曾谊主持。

6月5日，谢董事长首先听取了公司财务部作的销售财务报表和财务数据分析，接着四川、广西、广东、河南、山东等省区19位销售区域经理对

6月5-8日，华派生物2014年上半年销售工作会议在简阳召开，精华集团董事长、总裁谢建勇先生莅临会议并作重要指示。

2014年上半年的销售情况、销售中遇到的困难、下半年的工作计划以及对公司发展的建议等分别做了详细的总结和汇报。谢董事长指出，一个产品要占领市场不是一件容易的事，在产品投放市场前，要对产品的包装、规格、价格和使用方法制定详细的营销方案，针对不同的产品、不同的市场，要因地制宜，制定差异化的市场营销方案。

6月6日上午，中国兽医药品监察所郎洪武研究员为全体华派公司技术人员和销售人员做了“国内外疫苗研究情况和疫苗生产工艺发展趋势”的专题培训，他指出，动物疫苗生产工艺的变革马上就会到来，传统的生产工艺和生产方式将很快被取代，市场需要质量越来越高的产品。谢董事长十分赞同郎洪武研究员的观点，他说，听了郎研究员的讲座受益匪浅，华派是一个新企业，我们要在种毒的筛选、细胞的制作、工艺的优化等方面分别成立研发团队，在生产中进一步提高产品质量，力争和国际一流产品品质媲美。下午，针对全国不同的市场，华派生物销售团队分组进行了讨论，按每个省，每个区域制定“一对一”的个性化营销模式。

6月7日上午，针对华派生物即将上市的“圆环康”，谢董事长主持了产品营销方案的讨论，大家各抒己见，畅所欲言。下午，谢董事长从“做好产品上市前的铺垫工作”、





“准确找出产品的特色和个性化”、“制定特定营销方案”、“技术营销的策划”、“打开市场突破口”、“设立市场开发奖”、“团队整合、有归属感”、“年终优质客户评定”等八个方面做了近3个小时的演讲，引起了销售人员的强烈反响。

6月8日上午，谢董事长对2014年下半年的销售工作做了人员安排和市场布置。

此次华派生物销售工作会议，是谢建勇董事长首次全程参加，各区域销售经理纷纷表示，有谢董事长的规划和亲自指导，我们更加坚定信心，并将积极投身于销售的“战斗”之中，华派生物的明天一定会更加美好！

（作者简介：张莉，本科，技术服务部经理）



集先进生物科技 铸百年疫苗品质

——专访四川省华派生物制药有限公司总经理龚文波

文 | 向丕元 图 | 本刊编辑部



人物档案 龚文波

- ◆ 1986.7-2008.12 中牧股份成都药械厂，历任技术服务部经理、研究所所长、副厂长，分管产品开发和生产。
- ◆ 2008.12-2010.1 任中牧农业连锁有限公司四川分公司总经理，主持全面工作。
- ◆ 2010.2 至今任四川省华派生物制药有限公司总经理，主持全面工作。
- ◆ 他主研完成的“猪细小病毒病灭活疫苗研制”项目获四川省人民政府 2007 年度科学技术进步二等奖；“猪伪狂犬病基因缺失活疫苗（HB-98 株）研究”项目获 2007 年中国农业发展集团总公司科技成果二等奖；“抗小鹅瘟血清”项目获四川省人民政府 2008 年度科学技术进步三等奖。

在当前猪价行情起伏不定，养殖企业或业主信心受挫以及国家强制免疫政策出现调整，部分疫苗品种可能即将退出政府采购计划的情况下，生猪养殖结构必将重新洗牌，养殖模式的变革也会日趋推进。而全社会对动物源性食品兽药残留问题的关注度有增无减，政府对畜产品安全的管控更加严格。国内兽用生物制品企业目前已近百家，疫苗市场白热化竞争，如何应对国家政策的调整和复杂多变的市场环境，占领未来市场的一席之地，笔者专门采访了四川省华派生物制药有限公司总经理龚文波先生。

“

龚文波先生作为四川省华派生物制药有限公司总经理，对于同类企业与日俱增，疫苗市场白热化竞争，如何应对国家政策的调整和复杂多变的市场环境，占领未来市场的一席之地有其独特的见解。

”

发展 华派生物一个永恒的话题

《华派生物》：华派生物已成立5年了，经历了旧厂到新厂的变迁，在国内兽用生物制品行业也初试锋芒，小有斩获。请简单介绍一下公司发展的基本情况。

龚文波：四川省华派生物制药有限公司，直属四川精华企业集团，是一家集兽用生物制品研发、生产、销售和技术服务于一体新型科技型企业。公司成立于2008年，2012-2013年公司投资1.8亿元，在四川简阳经济开发区石盘食品医药产业园建成了具有国内领先生产水平的4个生产车间15条生产线（含2条悬浮培养生产线），并先后一次性通过国家农业部组织的兽药GMP静态、动态验收，年生产能力达130亿头（羽）份。

公司拥有一流的自动化设备，所有设备实现了人机界面，采用PLC（可编程逻辑控制器），触摸屏控制；气动技术、光电技术、变频技术与计算机技术融为一体；技术参数可以任意设定，控制精度高；具有故障诊断与故障报警功能和远程控制功能。先进的生产设备为生产优质的疫苗产品打下了坚实基础。

华派生物为了长足发展，先后与中国兽医药品监察所、中国农业大学、中国农科院北京畜牧兽医研究所、中国农科院哈尔滨兽医研究所、中国农科院兰

州兽医研究所、中国农科院上海兽医研究所、哈尔滨动物生物制品国家工程研究中心、广东农科院动物卫生研究所、浙江大学、河南农业大学、四川农业大学、四川省畜牧科学研究院等一大批知名大专院校与科研单位签订了战略合作协议，目前正在独立研发或共同研发申报的新产品近二十种。

除常规生产产品外，已获得了猪圆环病毒2型灭活疫苗（ZJ/C株），鸡新、支、流三联灭活疫苗，鸡新、支、减三联灭活疫苗，鸡新、支、减、流四联灭活疫苗，鸭肝炎弱毒活疫苗，兔瘟、巴二联灭活疫苗6个新兽药证书，这些产品正在陆续推向市场。

华派生物秉承“诚信为先，质量为本”的企业理念，公司生产的猪瘟疫苗最为齐全，包括精制高效猪瘟活疫苗（细胞源）、集团专用猪瘟活疫苗（兔源：脾淋）、种猪专用猪瘟活疫苗（兔源：纯脾）和猪瘟耐热保护剂活疫苗（细胞源）；公司生产的伪狂犬病活疫苗（Bartha K61）、猪繁殖与呼吸综合征活疫苗（CH-1R）独具特色；猪圆环病毒2型灭活疫苗（ZJ/C株）更是华派生物的又一倾力之作。

公司在全国建立了比较完备的销售网络体系，目前，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等标杆企业已成为华派生物产用合作伙伴单位。

公司产品质量稳定，迄今为止，无论是政府招标采购还是市场网络销售的疫苗产品，均实现了产品质量零投诉。

经营 品质是品牌的最有力支撑

《华派生物》：华派生物是怎样认识和重视产品质量的？

龚文波：华派生物视产品质量为企业的生命，一直在追求产品品质上下功夫。我们严格按照 GMP 要求和产品规程生产；认真讨论确定每个产品质量控制的关键点，实施产品质量全程监控；严格检验，确保无杂菌、无支原体、低内毒素、无外源病毒污染；保证产品质量稳定，减少批间差异；坚持企业内控标准高于国家标准，达到欧洲标准；严格遵守国家批签发制度，不合格产品绝不出厂。我们深信，品质是品牌的最有力支撑，华派人一直在坚守着持续有效的产品质量控制，一直在捍卫高品质上用心尽力。

我们正在与成都正大、巨星农牧、铁骑力士、四川省动物疫病预防控制中心等企业 and 单位合作，创建猪用疫苗质量评价体系。特别在外源病毒污染控制上，我们摸索出了一套科学有效的检测方法，甚至敢于对外宣称，谁在我们的产品中检出了外源病毒，公司将给予重奖，我们的执著和追求不言而喻。

《华派生物》：华派生物的研发实力如何？后续上市产品有哪些？

龚文波：华派生物从长计议，自诞生之日起就着手新产品研究与开发工作，一方面和国内科研院所大专院校合作研发新产品，另一方面成立了华派生物产品研发中心，拥有二十余名专业博士、硕士研究生组成的研发团队。

五年来，华派生物在病毒疫苗、细菌疫苗、诊断试剂、单克隆抗体的研究方面均取得了骄人的成绩，猪流行性腹泻 - 传染性胃肠炎二联耐热保护剂活疫苗、猪支原体灭活疫苗、猪细小病毒灭活疫苗、副猪嗜血杆菌三价灭活疫苗、猪链球菌 - 传染性胸膜肺炎二联灭活疫苗、猪流感二价灭活疫苗、鸭浆膜炎 - 大肠杆菌二联灭活疫苗、猪支原体 ELISA 诊断试剂盒等将陆续投放市场，为规模化养殖场疫病防控提供更全面而有力的武器。

目标 卓越动物疫苗解决方案提供商

《华派生物》：在当前市场不景气的情况下如何抓住机遇，挑战市场？

龚文波：中国的养殖生产技术和发达国家相比还有相当大的差距，动物疫病也很复杂。除市场行情风险外，动物疫病风险对规模化养殖的威胁也日趋严峻。近年来，规模化养殖逐渐替代传统的散养模式，疫病也越来越多，越来越复杂，高致病性禽流感、高致病性猪蓝耳病、猪流行性腹泻、猪圆环病毒病等时而流行和肆虐，给规模养殖场带来了惨痛的损失。不管在何种市场行情条件下，规模养殖场都应该加强饲养管理、提高生产技术、做好基础免疫、减少疫病风险、提高生产成绩，这也是养殖场自己能够做到的、减少风险的最有效措施。

华派生物作为一个成长性企业，将在当今激烈的市场竞争中不失时机地抢抓机遇，千方百计根据市场需求丰富产品，千方百计提高产品品质，千方百计搞好技术服务，力创公司与广大养殖企业和业主间的产用战略联盟，达到共建、共享、共赢的目标。

我们坚信，华派生物倡导的“集先进生物科技，铸百年疫苗品质”将是我们永恒的追求，我们一定能以更优质的产品、更有效的解决方案、更完善的售后服务呈献社会，共筑美好梦想！

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





猪喘气病疫苗研究进展

文 | 杜德燕 方鹏飞 徐静 张洪 邱文英

摘要：猪喘气病给养猪业造成了重大经济损失，疫苗免疫接种是预防猪喘气病的有效办法。国内对于猪喘气病的疫苗的研究起步早，以免疫弱毒苗为主，免疫保护力良好，但不便于推广，占国内市场主力军的是国外的灭活苗。但研究者们对其研究并没局限常规疫苗，基因工程苗也很受研究者欢迎，本文除了介绍疫苗研究进展外，还将对喘气病疫苗免疫接种方式的研究进行了概述，并对猪喘气病疫苗未来研究进行展望。

关键词：猪喘气病 疫苗 免疫接种

猪喘气病又名猪支原体肺炎或猪霉形体肺炎（Mycoplasmal pneumonia of swine, MPS）、猪地方性流行性肺炎（Enzootic pneumonia of pigs），是由猪肺炎支原体（Mycoplasma hyopneumoniae, Mhp）引起的一种接触性、顽固性、慢性呼吸道传染病，以咳嗽、喘气和生长缓慢为主要症状，以发病的广泛性和长期性为主要流行特点，是猪的呼吸道疾病综合症（PRDC）的主要病原，在世界范围内广泛流行，给养猪业造成了巨大的经济损失。Pointon 等 1985 年通过试验发现，与感染猪喘气病的母猪接触的体重从

50kg 到 85kg 的猪生长率降低 12.7%，感染的猪体重从 8kg 到 85kg 生长速率降低 15.9%，在体重 10kg 到 25kg 增长中饲料转化率下降 13.8%。

Mhp 是一种顽固性慢性致病病原微生物，药物治疗可以抑制、减轻症状，而不能阻止病原在肺部定居，停药后容易复发，如果药物镇压过强，则会影响到气管上皮细胞的正常生理功能，所以该病一旦在猪场流行，就很难根除，因此通过疫苗控制 Mhp 是目前最有效的预防手段。猪喘气病的疫苗从组织苗着手研究，到目前世界上研究应用的猪喘气病疫苗以灭活苗为主，也有少数弱毒苗和基因工程苗，同时其佐剂也随之不断的改进。

1 常规疫苗

1.1 国外疫苗研究进展

上世纪 70 年代早期 Lam 和 Switzer 用捣碎的肺组织细胞和弗氏不完全佐剂混合，对 8 周龄小猪接种免疫，每 7 天免疫一次，共免三次，并与同龄未免疫接种的对照小猪放养一起饲养，攻毒后剖解，结果 83.3% 的对照猪有肺部病变；而免疫接种猪仅有 23% 出现肺部病变。而 70 年代后期 Farrington 报道，肺组织细胞核油佐剂混合，得到 75% 的预防效果，Goodwin 和 Whittlestone 的试验证实了此报道。Holmgren 用猪肺炎霉形体做鼻腔接种无病猪，收集痰液、气管和支气管的洗涤液。在接种后 2 周内，支气管内分泌物中，用间接血球凝集检出抗体，8 ~ 9 周达到高峰，持续到第 13 周。

组织苗不便于推广，研制灭活苗成为研究的目标，Kristensen 等将猪肺炎支原体直接进行热灭活，用弗氏完全佐剂进行乳化，免疫自然感染的猪，可产生体液和细胞免疫。Ross 等最先研究 Mhp 的全细胞灭活苗，将全细胞、培养液上清液、冻融的菌液盐水提取物、生理盐水洗涤的培养细胞，均用 0.15% 的福尔马林处理，用弗氏不完全佐剂乳化后，肌肉注射于试验猪，发现除冻融的菌液盐水提取物外，都具保护力，其中全细胞灭活苗有非常好的免疫效果，而冻融

的菌液盐水提取物仅提供可变的保护，并在某些情况下，经免疫接种的猪呈现肺损害的增强。1984 年国际专利局 PCT 公布了一项发明专利，用猪肺炎支原体质膜来做疫苗，不含其它细胞组分，通过皮下或肌肉注射，能有效地保护仔猪和怀孕母猪不受 Mhp 的感染。

目前国内市场进口苗有：美国辉瑞的全菌体灭活苗“瑞倍适 (RespiSure)”、德国勃林格殷格翰的猪喘气病疫苗，富道公司、英特威公司、梅里亚公司等也有生产销售。

1.2 国内疫苗研究进展

目前，国内自主研发上市的喘气病疫苗还只有弱毒苗，主要为两家研究机构研制的，一个是中国兽医药品监察所用猪肺炎支原体兔化弱毒株做种子研制成疫苗，从 50 年代起，将支原体菌株在兔体内连传 700 多代，终将一株强毒株猪肺炎支原体减毒致弱，培育出一株毒力低，免疫原性好的疫苗制造株，以该菌株生产出三种类型的疫苗，即：大兔肺组织冻干苗，乳兔肌肉冻干弱毒疫苗及鸡胚卵黄囊冻干弱毒疫苗。这类组织苗含有较多杂蛋白或需采用浓缩手段才能达到所需抗原滴度。另一个是江苏省农科院畜牧兽医研究所从人工感染强毒猪肺炎支原体的病猪肺中分离了 168 号菌株，用江苏 II 号培养基经传 300 多次次历时 13 年，3 次克隆培养，毒力减弱后，制成冻干苗，平均攻毒保护率为 84.04%，60 天康复率为 95.35%。

国内使用传统方法生产的猪喘气病疫苗存在很多问题：1) 由于 Mhp 生长缓慢，菌数滴度不高（大多数在 $10^7 \sim 10^8$ CCU/ml），造成活疫苗生产周期长，成本较高；2) Mhp 在培养传代过程中，容易发生抗原性改变，造成免疫效果不好；3) 国内的猪喘气病疫苗通过胸腔注射，容易引起不良反应，在推广应用时遇到很大的阻力。不过现在国内对猪支原体肺炎 (MPS) 疫苗的研究重点都放在了灭活苗上，潘延铤等人制备了灭活苗，颈部肌肉注射，可使免疫猪的肺炎减少率达到 75% 以上，免疫期可达 6 个月以上，其简洁方便的接种方式，也有利于猪喘气病疫苗的广



“

传统的制苗方法生产猪喘气病疫苗遇到了很多困难，而基因工程苗在其他病原微生物疫苗上的成功使用，启发了研究者借助生物技术手段。

”

泛应用，我们公司也正在与他们合作生产肌肉注射的喘气病疫苗。

1.3 华派生物猪喘气病疫苗研究进展

华派生物采用国际流行的猪肺炎支原体强毒标准株 J 株为菌种，进行喘气病疫苗的生产研究。我们不断摸索菌种的培养工艺，改进方案，从 500ml 到 10000ml 瓶，再到 1000L 反应器，滴度也从 10^7 CCU 增加到 10^{10} CCU。在疫苗制造方面，我们不断地完善灭活条件，选用进口佐剂，优化乳化参数，使得猪对该疫苗的应激反应降低到最小程度。华派生物已基本掌握猪喘气病疫苗的生产工艺和检测手段，目前已处于注册阶段，可望不久的将来推向市场。

2 基因工程苗

传统的制苗方法生产猪喘气病疫苗遇到了很多困难，而基因工程苗在其他病原微生物疫苗上的成功使用，启发了研究者借助生物技术手段，通过大量表达 Mhp 主要抗原蛋白来生产有效的猪喘气病疫苗，但由于 Mhp 和大多数支原体一样存在密码子与通用密码子的差异问题，即其它支原体通用密码子 UGA

为终止密码，而在肺炎支原体中则编码为色氨酸，这使得肺炎支原体抗原蛋白在其他生物中的表达变得困难。尽管如此，仍有部分研究获得了成功。

2.1 粘附因子疫苗

致病菌（J 菌株）和非致病菌之间的基因组比较已揭示在表面蛋白质包括纤毛粘附素中的变异，所述纤毛粘附素被认为是猪肺炎支原体菌株之间的相对致病性质的决定因素。目前已阐明的猪肺炎支原体的粘附因子共有 4 种，即 P97（232 株）、Mhp1（P5722 株）、P116（232 株）和一个分子量从 70—85kDa 的蛋白（J 株—F3 抗原）。

P97 是最早也是目前被研究得最多的一个粘附素和毒力因子，对于不同的猪肺炎支原体都是保守的，无毒力的 Mph 是缺乏 P97 的，所以 P97 粘附素被认为是开发抗 Mph 的有效疫苗，Okamba 等设计了复制缺陷型腺病毒 rAdP97c，表达了 P97 粘附素的 C 末端（P97c），通过鼻内和肌肉注射小鼠，均在其的血清和支气管肺泡灌洗液里产生了高水平的 IgG 抗体，所以 rAdP97c 疫苗可以作为抗 Mhp 的一种新型亚单位疫苗。Hsu 等发现 P97R1（也叫 R1 亚基因）是

P97 的重复, 具有纤毛和抗体结合位点, 也区别于 P97 其它位点, 具有独立的免疫原性效果, 其主要作用是 Mhp 粘附于猪呼吸道的粘毛时, 产生抗 P97R1 粘膜免疫应答。

2.2 核苷酸还原酶 (NrdF) 的 R2 亚基重组疫苗

NrdF 是同源于原核 R2 亚基的核苷酸还原酶, 试验发现, 一个含有 NrdF 的 C 末端的 11kDa 蛋白免疫已经感染的猪, 可显著地降低其肺损伤。将该核酸片段克隆到致弱的沙门氏菌 (SL3261) 中表达 NrdF, 口服免疫小鼠, 其肺部产生了特异性显著的抗 NrdF 的 IgA 抗体, 而 IgG、IgM、IgA 无显著水平的提高, 在小鼠内通过真核特定地表达 NrdF 而诱发 IFN- γ 和细胞介导的免疫, 对猪进行类似的试验, 肺损伤降低的同时, 日增重量提高了。

2.3 DNA 疫苗

DNA 疫苗是一种新近发展的疫苗, 它可以在许多情况下同时诱导体液和细胞免疫。Schaller 等从 1985 年开始研究, 并在 1990 年申请专利, 通过随机克隆 Mhp 约 300bp 左右的 DNA 片段来构建融合表达质粒, 此融合蛋白包含在 λ 噬菌体的 PL 启动子的控制下噬菌体 MS2 聚合酶的 N 末端, 产生了 Mhp 表面特定的抗原决定簇, 最后得到 5 个抗原敏感性很好的 DNA 片段, 从而得到了猪肺炎支原体表面抗原的疫苗。从这开始, 对猪喘气病的 DNA 疫苗的研究就没间断过, 如 2003 年, Chen 等利用哺乳动物表达载体 pcDNA3 和 Mhp 热休克蛋白的基因抗原 P65 的 C 端部分 P42 基因构建了 DNA 疫苗 pcDNA3/P42, 可诱导产生 Th1 和 Th2 免疫应答, 其中 P42 是热休克蛋白的基因, 可产生额外的免疫刺激作用, 使 DNA 疫苗的免疫原型更高。同年, Minion 等将结核杆菌的 ESAT - 6 基因和 Mhp 表面抗原 P71 基因融合克隆到 DNA 疫苗载体, 能提高 Mhp 抗原基因的特异性 I 型免疫反应 (细胞免疫反应)。由 P36, P46, NrdF 和 P97 或 P97R1 组成的不同蛋白原性的多价

DNA 疫苗免疫小鼠也能产生抗 Mhp 的抗体。但有研究发现, 肌肉注射只能触发强的 Th1 免疫应答, 其中只有 P46 引发了体液免疫, 而皮下注射可同时触发体液和 Th1 免疫。

DNA 疫苗在小型实验动物中, 并不能产生长久的持续免疫效力, 而大动物试验中免疫反应并不太强, 而且 DNA 疫苗在体内易降解, 必须要有更好的佐剂或抗原呈递系统使其能有效地作用于靶位点。

3 喘气病疫苗的接种方式研究

疫苗的注射途径直接影响着动物免疫应答的触发, 一般的疫苗普遍为肌肉注射, 但是由于 Mhp 具有组织专一性, 只附着于猪气管壁上, 感染猪呼吸道, 不会感染其他组织, 为了让疫苗能尽快达到靶部位起到免疫效果, 研究者们研究了多种可代替的免疫途径。Etheridge 等发现静脉内、皮下或腹膜内给予活疫苗时, Mhp 只能产生不完全保护。其他的免疫途径如气雾剂型疫苗、口服胶囊、皮内注射、肺内注射, 虽然在试验和田间条件下这些疫苗能有效地减少肺组织的损伤和临床症状, 其中气雾和口服疫苗因可以大量快速接种、减低劳动力、能提高呼吸道的粘膜免疫而得到了更多的关注, 但有些免疫途径还是不成功, 并且成本上也没有降低, 需要进一步地考虑实际的应用性。由于无法预测仔猪在何时会感染 Mhp, 而疫苗必须在仔猪感染 Mhp 前就要进行免疫, 这时诱发的免疫保护效果好, 保护时间长, 所以仔猪一出生就应尽早进行预防接种。另外早期免疫接种要考虑到母源抗体是否会对疫苗产生不良影响。当然选择高质量的疫苗和制定合理的免疫程序对免疫效果也至关重要。

4 展望

猪喘气病给我国的畜牧业造成了非常严重的经济损失, 找到一种能有效预防和控制该疾病的方法已

是当务之急。然而疫苗的研制存在着病原体培养十分困难、疫苗生产成本高、免疫效果不够理想等问题。因此,研制高效、安全、廉价的疫苗将有助于对该病的防治,有利于我国畜牧业的发展。我们应致力于:在现有基础上继续研究开发弱毒疫苗,改进现有的生产工艺及免疫接种方式;加大基础科研的投入,继续研究和发现 Mhp 各种毒力基因,揭示其致病机理,并研制相应的基因工程苗和致病阻断剂;发展高效的灭活苗和相应的免疫增强佐剂,尽快实现规模化生产并推广应用,全面提高喘气病免疫水平,是今后几年研究工作的重中之重。

参考文献:

- [1] Thacker E L, Holtkamp D J, Khan A S ,et al. Plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone efficacy in reducing disease associated with Mycoplasma hyopneumoniae and porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection[J]. J Anim Sci, 2006,84, 733-742 .
- [2] Villarreal I, Meyns T, Dewulf J,et al. The effect of vaccination on the transmission of Mycoplasma hyopneumoniae in pigs under field conditions[J]. Vet J ,2011, 188, 48-52.
- [3] Pointon A M, Byrt D,Heap P. Effect of enzootic pneumonia of pigs on growth performance[J]. Aust Vet J, 1985 ,62, 13-18.
- [4] 张百祥. 美国猪霉形体性肺炎研究概况(综述)[J]. 中国畜牧兽医杂志, 1984(4): 26-29.
- [5] Lam K M, Switzer W P. Mycoplasmal pneumonia of swine: active and passive immunizations[J]. Am J Vet Res, 1971,32, 1737-1741.
- [6] Switzer W P, Farrington D O. Newer developments in understanding mycoplasmal pneumonia of swine[J]. Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc, 1976, 418-421.
- [7] Goodwin R F, Whittlestone P. Enzootic pneumonia of pigs: immunization attempts inoculating Mycoplasma suipneumoniae antigen by various routes and with different adjuvants[J]. Br Vet J ,1973,129, 456-464 .
- [8] Holmgren, N. Swine enzootic pneumonia: immunologic studies in infected sow-herds[J]. Res Vet Sci , 1974,17, 145-153.
- [9] Kristensen B, Paroz P, Nicolet J, et al. Cell-mediated and humoral immune response in swine after vaccination and natural infection with Mycoplasma hyopneumoniae[J]. Am J Vet Res, 1981,42, 784-788.
- [10] Ross R F, Zimmermann-Erickson B J ,Young T F. Characteristics of protective activity of Mycoplasma hyopneumoniae vaccine[J]. Am J Vet Res, 1984,45, 1899-1905.
- [11] 丁庆猷. 猪喘气病弱毒疫苗及其应用方法 [J]. 种植与养殖, 2000(11),26.
- [12] 丁庆猷, 王桂敏, 李继庚, 等. 猪喘气病弱毒疫苗的研究——乳兔肌肉苗的研制 [J]. 中国兽药杂志, 1990,5(3),1-5.
- [13] 金洪效, 储静华, 毛洪先, 等. 猪喘气病弱毒菌株免疫研究 [J]. 中国兽医科技, 1989(1),3-6.
- [14] 潘延钵, 张海玲, 赵卓, 等. 猪支原体肺炎灭活疫苗的免疫效果研究 [J]. 中国兽药杂志, 2009,43(8), 22-24.
- [15] Inamine J M, Ho K C, Loechel S, et al. Evidence that UGA is read as a tryptophan codon rather than as a stop codon by Mycoplasma pneumoniae, Mycoplasma genitalium, and Mycoplasma gallisepticum[J]. J Bacteriol ,1990,172, 504-506.
- [16] Djordjevic S P, Cordwell S J, Djordjevic M A, et al. Proteolytic processing of the Mycoplasma hyopneumoniae cilium adhesin[J]. Infect Immun, 2004,72, 2791-2802.
- [17] Daylor S D , Gelrp N V. Serum and mucosal

antibody responses and protection in pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containing a denatured membrane antigen pool and adjuvant[J]. *Aust Vet J*, 1997, 75, 504–511.

[18] Wilton J L, Scarman A L, Walker M J, et al. Reiterated repeat region variability in the ciliary adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. *Microbiology*, 1998, 144 (7), 1931–1943.

[19] Okamba F R, Moreau E, Cheikh Saad Bouh K, et al. Immune responses induced by replication-defective adenovirus expressing the C-terminal portion of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, 14, 767–774.

[20] Hsu T, Minion F C. Molecular analysis of the P97 cilium adhesin operon of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. *Gene*, 1998, 214, 13–23.

[21] Hsu T, Artiushin S, Minion F C. Cloning and functional analysis of the P97 swine cilium adhesin gene of *Mycoplasma hyopneumoniae*[J]. *J Bacteriol*, 1997, 179, 1317–1323.

[22] Minion F C, Adams C, Hsu T, R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia[J]. *Infect Immun*, 2000, 68, 3056–3060.

[23] Thacker E L, Thacker B J, Kuhn M, et al. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs[J]. *Am J Vet Res*, 2000, 61, 1384–1389.

[24] Fagan P K, Djordjevic S P, Chin J, et al. Oral immunization of mice with attenuated *Salmonella typhimurium aroA* expressing a recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* antigen (NrdF) [J]. *Infect Immun*, 1997, 65, 2502–2507.

[25] Chen A Y, Fry S R, Forbes-Faulkner J, et al. Comparative immunogenicity of *M. hyopneumoniae* NrdF encoded in different expression systems delivered

orally via attenuated *S. typhimurium aroA* in mice. *Vet Microbiol*[J], 2006, 114, 252–259.

[26] Fagan P K, Walker M J, Chin J, Eamens G J, et al. Oral immunization of swine with attenuated *Salmonella typhimurium aroA* SL3261 expressing a recombinant antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* (NrdF) primes the immune system for a NrdF specific secretory IgA response in the lungs[J]. *Microb Pathog*, 2001, 30, 101–110.

[27] Klinkert M Q, Herrmann R, Schaller H. Surface proteins of *Mycoplasma hyopneumoniae* identified from an *Escherichia coli* expression plasmid library. *Infect Immun*, 1985, 49, 329–335.

[28] Chen Y L, Wang S N, Yang W J, et al. Expression and immunogenicity of *Mycoplasma hyopneumoniae* heat shock protein antigen P42 by DNA vaccination. *Infect Immun*[J], 2003, 71, 1155–116.

[29] Minion F C, Menon S A, Mahairas G G, et al. Enhanced murine antigen-specific gamma interferon and immunoglobulin G2a responses by using mycobacterial ESAT-6 sequences in DNA vaccines. *Infect Immun*[J], 2003, 71, 2239–2243.

[30] Chen A Y, Fry S R, Daggard G E, et al. Evaluation of immune response to recombinant potential protective antigens of *Mycoplasma hyopneumoniae* delivered as cocktail DNA and/or recombinant protein vaccines in mice[J]. *Vaccine*, 2008, 26, 4372–4378.

[31] Etheridge J R, Lloyd L C. A method for assessing induced resistance to enzootic pneumonia of pigs[J]. *Res Vet Sci*, 1982, 33, 188–191.

(作者简介: 杜德燕, 硕士, 执业兽医师, 从事兽用生物制品的研究与开发。)



猪肺炎支原体强毒株的分离和鉴定

文 | 张洪 杜德燕 方鹏飞

摘要: 从 15 份疑似猪支原体肺炎病料中分离得到 1 株猪肺炎支原体, 对其进行培养并传代, 同时进行染色镜检、PCR 鉴定、序列分析和动物回归试验。分离株接种健康仔猪后, 该猪出现典型的猪支原体肺炎临床症状和病变, 证明该分离株为猪肺炎支原体。

关键词: 猪肺炎支原体、分离、动物回归试验

猪肺炎支原体 (*Mycoplasma hyopneumoniae*) 是猪支原体肺炎 (*Mycoplasma pneumoniae* of Swine, MPS) 又称猪喘气病或猪地方性流行性肺炎的病原。该菌是一种介于细菌和病毒之间的原核微生物。猪喘气病是一种高传染性、接触性、高发病率和低死亡率的慢性呼吸道传染病, 而且很容易继发其他病原的感染, 诱导形成慢性肺炎^[1]。该病流行范围广泛, 而且难以治愈, 严重影响养猪业的发展, 是世界上最主要的猪病之一, 国内外已对猪肺炎支原体进行了大量的研究^[2-3]。本研究从猪支原体肺炎典型临床病例病料中分离、培养并鉴定获得了 1 株猪肺炎支原体强毒株, 同时进行了部分基因序列测序分析, 为后续猪肺炎支原体研究提供材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 发病猪病料 猪支原体肺炎典型临床病例采集自四川省部分地区猪场。

1.1.2 培养基 改良 A26 培养基由四川省华派生物制药有限公司研发配制。

1.1.3 主要试剂 2×Taq PCR MasterMix、Maker III 购自 TIANGEN 生物科技公司；猪肺炎支原体 ELISA 抗体检测试剂盒，购自 IDEXX 公司；猪圆环病毒 ELISA 抗体检测试剂盒，购自 Biocheck；猪瘟 ELISA 抗体检测试剂盒、猪繁殖与呼吸综合征 ELISA 抗体检测试剂盒，购自 LSI 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株分离 参考刘茂军等的方法，无菌采取猪支原体肺炎典型临床病例猪肺，进行无细胞分离培养^[4]。

1.2.2 染色镜检 取培养物进行涂片，用革兰氏染色液和瑞氏染色液进行染色观察。

1.2.3 CCU（颜色变化单位）的测定 参照王继春介绍的方法^[5]，取菌种依次 1:10 递减稀释，稀释至 10^{-11} ，并设本培养基作对照，置 37℃ 恒温箱中培养。每日观察一次，至 21d。

1.2.4 PCR 鉴定 根据 Genbank 中公布的猪肺炎支原体基因组序列设计一对特异性引物，并提交给 Invitrogen 合成，引物序列为：P1：5'-TTACAGCGGGAAGACC-3'，P2 5'-CGGCGAGAACTGGATA-3'。将经培养传代试验和染色镜检试验鉴定证明为猪肺炎支原体的培养物按文献方法^[6]提取基因组 DNA，进行 PCR 扩增，扩增结束后取上述产物 5ul 在 1% 琼脂糖凝胶电泳上进行电泳检测。

1.2.5 测序分析 PCR 产物送往 Invitrogen 进行测序，测序结果与 GenBank 中已发表的 4 个国际主要代表株相应的序列进行比较分析。用于比较的参考毒株名称及其在 GenBank 中的登陆号为：J(NCO07295)、168 (NC017509)、232 (NC006360)、7448 (NC007332)。

1.2.6 菌株的致病性试验 从健康的长白二元杂交猪中筛选出猪肺炎支原体、猪圆环、猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征四种疾病抗原及抗体阴性的试验猪。将经培养传代试验、染色镜检试验和测序检测鉴定证明为猪肺炎支原体的新鲜培养物按合适剂量以气管注射方式接种 3 头（编号 1，2,3）试验猪，同时设 2 头（编号 4，5）气管注射 A26 培养基作为对照。攻毒后按常规饲养，饲料中无抗生素。攻毒后逐日观察至 25d 剖检试验猪，根据 55 分评分法^[7-8]对试验猪的肺部病变进行评分。

1.2.7 攻毒猪病变肺中支原体的再分离 同 1.2.1 的方法从攻毒猪病变肺

中进行猪肺炎支原体的再分离和鉴定。

2 结果与分析

2.1 猪肺炎支原体分离与形态观察

从 15 份疑似猪支原体肺炎临床猪肺病料中分离培养，获得 1 株猪肺炎支原体。分离株接种 A26 培养基培养后培养基变黄，pH 值下降；培养物涂片，经过瑞氏染色，可观察到具有特征性的多形态菌体，有点状、环状、球状和两极状，无杂菌污染。连续传代至 20 代，培养特性和病原形态稳定。

2.2 CCU 测定结果

将培养传代至第五代的培养物依次 1:10 递减稀释，稀释至 10^{-11} 共 11 个梯度，观察颜色变化单位，观察至 21d 时 CCU 达到 1×10^9 。

2.3 PCR 鉴定结果

由图 1 可见，培养传代培养物和攻毒后再分离培养的培养物 PCR 扩增结果与猪肺炎支原体 J 株 PCR 的扩增结果大小一致，并与预期片段 427bp 大小一致。

1. Maker III; 2. 培养传代培养物; 3. 攻毒后再分离培养的培养物; 4. J 株

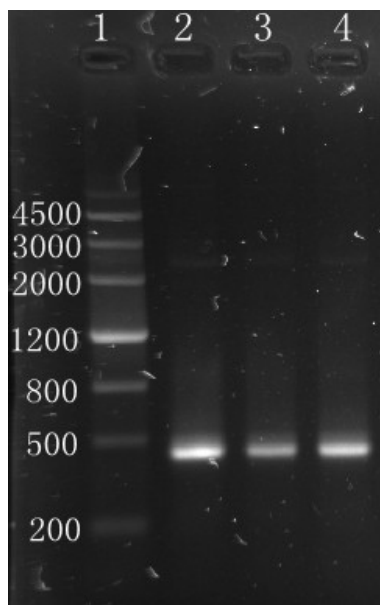


图 1 PCR 鉴定扩增结果

2.4 序列分析

测序结果经 NCBI-Blast 和 DNASTar 比对分析，目的序列与 J 株序列（基因号：NC007295）比对发现在第 8 个碱基处多一个 G 碱基；与 168 株序列（基因号：NC017509）反向互补，并在第 8 个碱基处多一个 G 碱基，在第 382 个碱基处不一致；与 232 株序列（基因号：NC006360）比对，也在第 8 个碱基处多一个 G 碱基，在第 27、171、350 个碱基处不一致；与 7448 株序

列（基因号：NC007332）比对，在第 8 个碱基处多一个 G 碱基，在第 381 个碱基处不一致。

```
TTACAGCGGGGAAGACCACAAAAACCGGGTGAACTCGGCTTG
AATTAGTAGCTGATAACATCCGAATTATCCGGGAAATTGCACTAAA
AGTCAAAGAAAGTGGCTTTAGTGGAATAAGTATTATTGTTGCTAAT
CCTGTTGATATAATTACAAGGGCTTACCGGGATGCATCTGGATTTT
CCGATCAAAAAGTTATCGGTAGTGGAAGTGTTTTAGATACAGCAAG
GCTTCAATTTGCAATCGCAAAAAGAGCAAAAAGTATCGCCTAATTTCG
GTTTCAGGCCTACGTGATGGGTGAACATGGTGATTCATCTTTTGTTC
CTTATTCAAATATTAATAATTGCCGGTGAATGTTTCTGTGCTTATTC
TAAACTAACCGGAATTGATAGCTCAAATTACGAAAAAGAACTTGAA
TATCCAGTTTCTCGCCG
```

2.5 动物回归实验结果

长白二元杂交猪气管内注射适宜剂量的分离株新鲜培养物后猪出现咳嗽、喘气等临床症状。注射后 15d、25d 采血检测抗体，15d、25d 时检测实验组都为抗体阳性，对照组为抗体阴性；25 d 剖检攻毒猪，结果可见肺脏的尖叶、心叶、中间叶或膈叶前缘有不同程度的特征性病变，呈“肉样”或“虾肉样”。临床症状及病变评分见表 1。

表 1 分离株动物回归实验肺部病变评分

编号	1	2	3	4	5
临床症状	咳嗽、喘气 毛色较差	喘气 毛色较差	咳嗽、喘气 毛色较差	无 生长良好	无 生长良好
病变评分	25	27	30	0	0

2.6 攻毒猪病变肺中支原体的再分离

将攻毒病变猪肺按 1.2.1 的方法再分离。传代培养后显示 pH 值下降；涂片染色镜检具有特征性的多形态菌体，有点状、环状、球状和两极状，无杂菌污染；PCR 鉴定结果见图 1。

3 小结与讨论

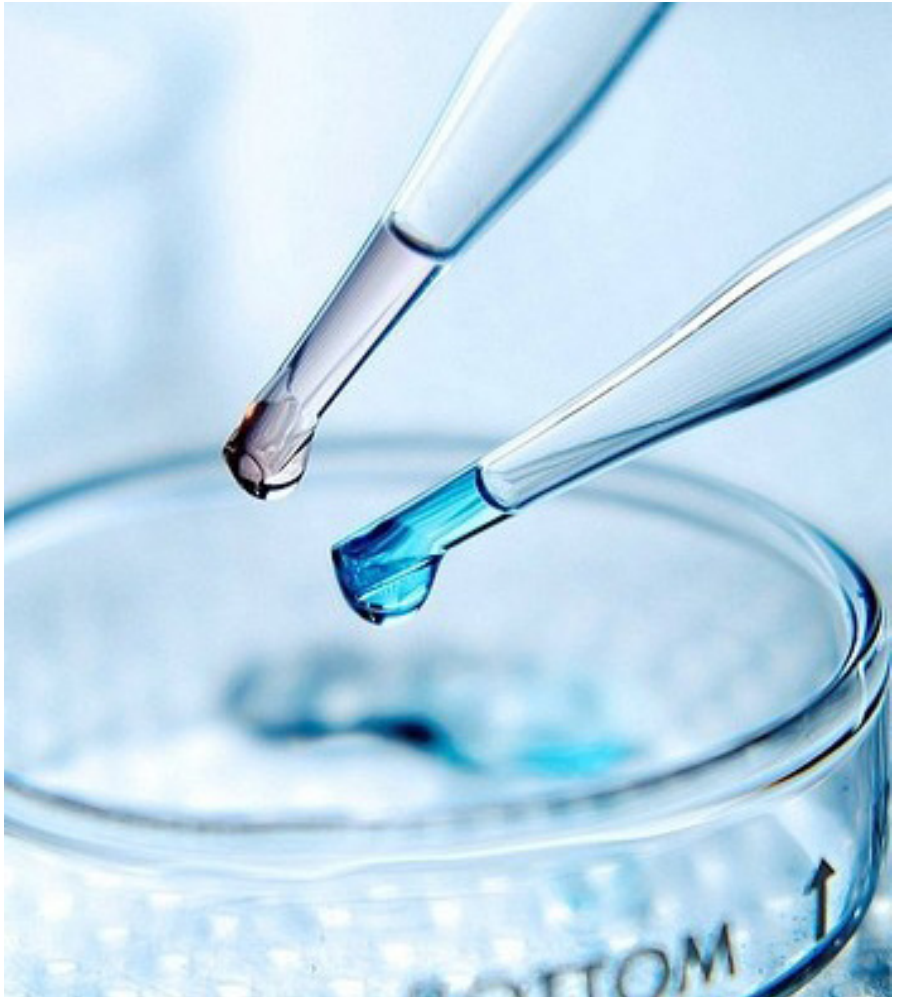
猪支原体肺炎是由猪肺炎支原体引起的慢性、接触性呼吸道疾病，猪肺炎支原体在自然界中长期存在，感染猪只久治难愈^[9-10]，给养猪业带来了很大的危害。1973 年，国内上海畜牧兽医研究所首次以病猪的肺组织通过猪肺埋块细胞培养法分离到一株致病性猪肺炎支原体，此后广东、广西等 8 个省、自治区亦相继分离到猪肺炎支原体^[11-12]。从 15 份猪支原体肺炎临床病料中分离到猪肺炎支原体，分离物经培养传代、染色镜检、PCR

鉴定及测序分析, 证明为猪肺炎支原体。分离株攻毒健康猪出现典型的猪支原体肺炎临床症状和病变, 并从病变肺中分离到了该菌株, 说明分离的菌株不仅为猪肺炎支原体, 而且该分离株对猪具有一定的毒力。此分离株为猪支原体肺炎病原的研究提供了条件。

参考文献:

- [1] 毕丁仁, 王桂枝. 动物霉形体及研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998:9.
- [2] Kobisch M, Blanchard B, Le Potier MF. Mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection[J]. Vet Res. 1993;24(1):67-77.
- [3] Thacker E L, Halbur P G, Ross R F, et al. Mycoplasma hyopneumoniae potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia [J]. J Clin Microbiol, 1999,37(3): 620-627.
- [4] 刘茂军, 邵国青, 周勇岐, 等. 一株猪肺炎支原体强毒株的分离和鉴定 [J]. 江苏农业学报, 2009, 25(2): 308-310.
- [5] 王继春, 邵国青, 何家惠, 等. 猪肺炎支原体 168 无细胞弱毒疫苗株的变色单位测定试验 [J]. 畜牧与兽医, 2001, 33(6):22-23.
- [6] 沈青春, 谭青松, 王琴, 等. PCR 方法测定猪肺炎支原体培养物菌数 [J]. 中国预防兽医学报, 2006, 28(1): 55-57.
- [7] Goodwin R F. Field trials with a formalinized vaccine against enzootic pneumonia of pigs[J]. Br Ver J. 1973, 129:456-470.
- [8] Barile M F, Chandler D K, Yoshida H, et al. Hamster challenge potency assay for evaluation of Mycoplasma pneumoniae vaccines [J]. Infect. Immun. 1988, 56(9):2450.
- [9] 张锋钢, 沈志强, 高云英, 等. 猪肺炎支原体的分离及 PCR 鉴定 [J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(4):21-22.
- [10] 邵国青, 刘茂军, 孙佩元, 等. 猪气喘病人工发病模型的建立 [J]. 微生物与感染, 2007, 2(4): 215-218.
- [11] 熊焰, 石谦, 邓均华, 等. 猪肺炎支原体 MY-99 株的致病性 [J]. 中国兽医学报, 2006,26(3):259-261.
- [12] 蔡宝祥主编. 家畜传染病学 (第四版) [M]. 北京, 中国农业出版社, 2001.

(作者简介: 张洪, 硕士, 生产技术部一车间副主任。原第一作者姜来生硕士对此项目做了大量研究工作, 现已离职, 借此致谢。此文发表于《四川畜牧兽医》2013 年第 5 期)



猪肺炎支原体生长状态与滴度的关系

文 | 杜德燕 张洪 方鹏飞 徐静

摘要：本试验将猪肺炎支原体在不同容积的玻璃瓶中进行培养，对各自生长过程中不同时间点的颜色变化单位（CCU）和 pH 进行测定，分析不同培养瓶的容积对猪肺炎支原体培养滴度的影响。结果显示，与小瓶培养的猪肺炎支原体相比，万瓶的生长速度慢、CCU 低、收获菌种的 pH 范围较广，为大规模猪肺炎支原体培养和疫苗生产提供参考。

关键词：猪肺炎支原体 颜色变化单位 pH 疫苗

猪支原体肺炎（*Mycoplasma pneumoniae* of swine, MPS）又称喘气病或猪地方性肺炎（*Enzootic pneumonia of swine*, EPS），是由猪肺炎支原体（*Mycoplasma hyopneumoniae*, Mhp）引起的一种猪

接触性慢性呼吸道传染病，普遍存在于世界各地。测定支原体的颜色变化单位（color changing units, CCU）是定量研究支原体的实验方法之一，其原理是猪肺炎支原体生长分解培养基中的葡萄糖产酸，使培养基 pH 由 7.8 左右降至 6.7 左右（一般 6.7 以下就不适宜 Mhp 生存），从而通过酚红指示剂使培养基颜色由红变为黄。在对 Mhp 的大规模培养和疫苗生产中，常常需要测定培养物中菌体数，以确定最佳收获或往下继代的时间，故 CCU 计数方法是测定支原体菌体滴度高的一种常规方法。本试验观察猪肺炎支原体在各容积玻璃瓶中的生长状态，测定各时间点的 CCU 和 pH，从而为下一步配苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基 猪肺炎支原体 J 株由中国兽医药品监察所提供，A26 培养基配方按《兽用生物制品规程》（2000 版）配制，用于 CCU 计数的 A26 培养基中的猪血清为经间接血凝方法测定为猪肺炎支原体阴性的健康猪血清。

1.2 不同容积的培养瓶在不同时间点的 pH 与滴度的测定 猪肺炎支原体 J 株复壮后，传 2 代，第 3 代分别扩大培养到 10ml 管制瓶、500ml 盐水瓶、10000ml 转瓶，每隔 12 小时取一次样，再以 1: 9 比例接种做 CCU 试验，并测其 pH。

1.3 CCU 的测定 各时间点所取菌种以无菌操作法依次 10 倍系列稀释，稀释度达到 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} …… 10^{-11} ，共 11 支 10ml 安瓿瓶，再设 A26 培养基做空白对照一瓶，具体方法见《兽用生物制品规程》（2000 版），置 37℃ 恒温箱内静止培养。每日观察记录培养基颜色变化和浊度的变化，对培养基颜色变黄的稀释管，再进行瑞氏染色、镜检，观察有无杂菌及菌体形态，直至 30d，最后发生颜色变化的小管稀释即为该培养物的 CCU 滴度。

1.4 CCU 的计算 为了使试验结果更为准确，计算 1ml 菌液所含支原体的量为 $x \times 10^x$ CCU/ml，x 为测定 CCU 时接种菌液量的倍数（菌液量以 0.1ml

为基数），y 为倍比稀释达到变色孔时的稀释倍数之平均值，最后换算为以 10 为底的幂。

2 结果与分析

猪肺炎支原体在不同容量的培养瓶中生长状态见图 1，图中各容量的培养瓶中支原体的生长状态以整个生长过程中各自的 pH 和 CCU 变化表现出来。

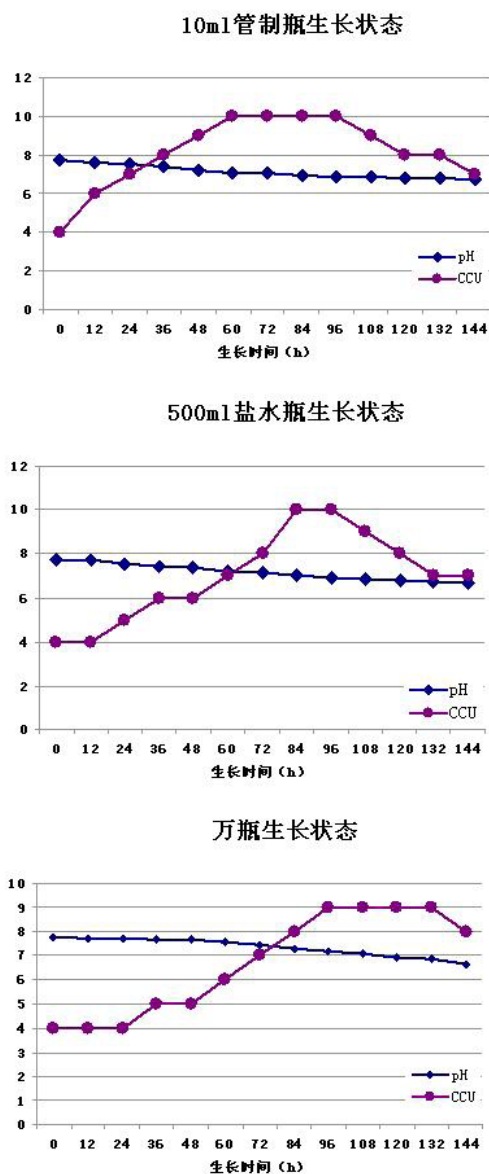


图 1 不同生长环境与时间的 CCU 滴度变化



“

目前 CCU 计数方法以其比较直观,测定的培养物是活菌数,结果更具代表性,在法定规程里做为标准测定支原体滴度的方法,其在检测疫苗的活菌数中具有不可替代的作用。

”

从图 1 可以看出,肺炎支原体生长很缓慢,前面 12h 几乎不会有任何变化,长至平台期需要 3 天,不过小容量瓶的生长速度明显比大容量瓶的生长速度要快,从图可以看出 10ml 瓶的生长速度比万瓶要快近两天。随着猪肺炎支原体的生长,其 pH 逐渐下降,且与时间基本上能成线性关系,但不同容积的培养基 pH 的变化速度仍存在差异,10ml 瓶的 pH 在 CCU 峰值之前变化较大,在到达峰值后,pH 几乎不再变化;500ml 瓶的 pH 一直处于缓慢变化状态,直到支原体不再生长;万瓶的 pH 在 CCU 出现峰值前很长一段时间变化并不明显,但其 pH 一旦开始变化,速度就较快。

猪肺炎支原体的 CCU 会出现一个峰值,不同容积的培养瓶到达峰值的时间不同,峰值期长短也不同,但 pH 在 7.1 ~ 6.9 之间 CCU 肯定处于峰值平台期,对于万瓶 CCU 峰值平台期的 pH 范围更广,介于 7.2 ~ 6.8 之间,但万瓶的 CCU 只能达到 9,其它两种瓶的 CCU 都能达到 10。到达 CCU 峰值时间最短的是 10ml 瓶,60h 就能达到峰值,其次是 500ml 瓶,最长的是万瓶,要 96h 才能达到峰值。除了 10ml 瓶以外,在峰值之前并不是一直都处于增加的状态,而

是缓慢的,会出现个 CCU 平台,CCU 平台一般处在第二天,随着培养瓶容量的增大,pH 和 CCU 开始变化的时间也会随之推后。当 pH 到 6.8 以下,其 CCU 就开始逐渐下降。

3 讨论

目前常用于培养物的菌数测定的方法主要包括三种,一种是 CCU 计数,其次是 CFU(菌落形成单位)计数方法,还有一种是紫外检测法。紫外检测法是检测核酸,容易将培养基添加物的核酸成分也包括在其中,如果污染微生物,也会被检测到其中。CFU 计数法中,培养基暴露时间长、易污染、加样时不易掌握、计数难保证精确性,且支原体菌落小,难辨别,测定其含量较为困难。故支原体的 CCU 测定仍是测定支原体含量的经典方法,广泛运用于支原体的培养检验,活疫苗的保存条件检测,各种佐剂或抗生素对支原体的影响实验以及各种动物攻毒试验等。本研究对这些领域的研究具有重要的参考价值。虽然沈青春等 PCR 方法测定猪肺炎支原体培养物菌数,Calus 等用 ATP 法比较了其于 CCU 的差异,发现 ATP 法有明显的优势,但这两种方法用于 Mhp 的 CCU 测

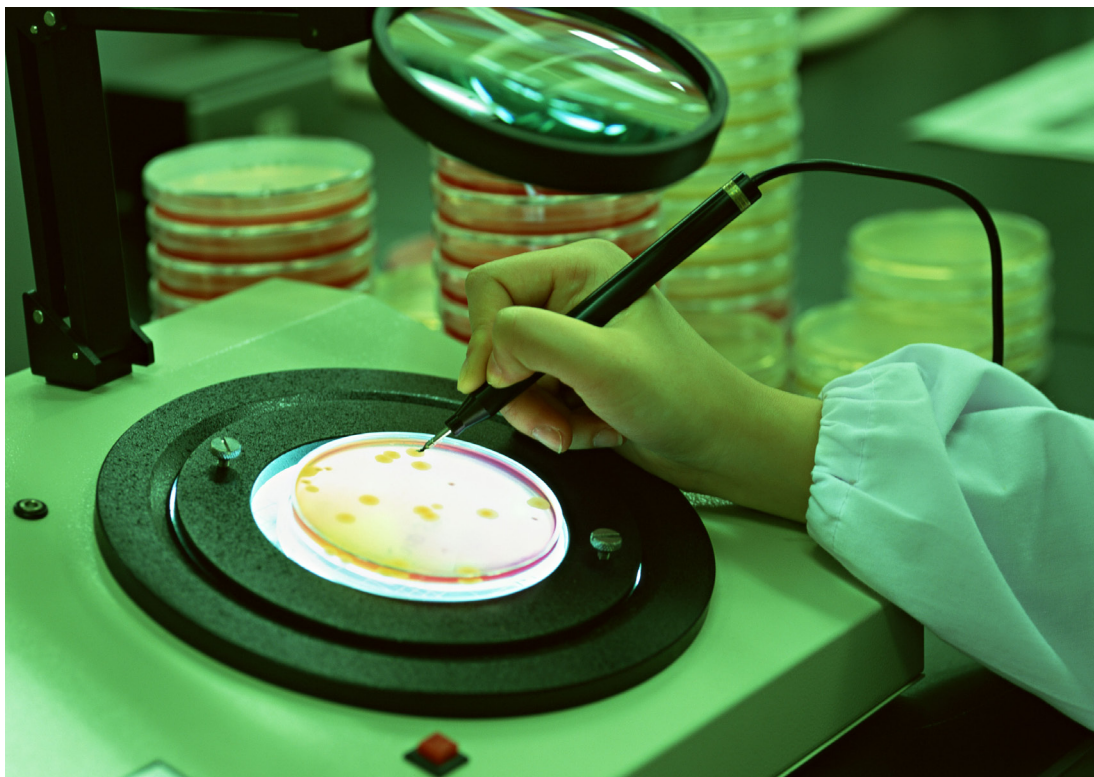
定目前尚未成熟，不能用于 Mhp 疫苗生产中做为测定其含量的标准方法。然而，目前 CCU 计数方法以其比较直观，测定的培养物是活菌数，结果更具代表性，在法定规程里做为标准测定支原体滴度的方法，其在检测疫苗的活菌数中具有不可替代的作用。

在对 Mhp 的大规模培养和疫苗生产过程中，需要测定培养物中菌体数，以确定最佳收获或继续往下传代时间，CCU 是定量研究猪肺炎支原体的经典实验方法，因此，本实验对不同体积的容器培养 Mhp 过程中各自的 pH 和 CCU 的变化进行了测定比较分析，以确定不同体积的容器的最佳收获时间。**结果显示小容量瓶培养的 Mhp，其 CCU 比万瓶培养的 Mhp 要高，而在 Mhp 疫苗大生产中，万瓶培养 Mhp 是避免不了的生产用选择容器，所以提高万瓶培养 Mhp 的 CCU，是目前必须解决的生产难题。此外，试验发现同一个稀释度的小瓶 CCU 比万瓶 CCU 要快 1 ~ 2d，正如在培养过程中小瓶的生长速度比万瓶快一样。通过本试验，对于各容量的容器培养的 Mhp 的生长速度有了初步的了解，收获菌种的 pH 在 7.1 ~ 6.9 之间最佳，因为 pH 范围已经确定，而此时可以收获的菌液的颜色也因 pH 的确定而确定，只是收获时间因培养容器的不同而不同，所以在培养中要认真观察，把握时机，此次试验也为以后 Mhp 的大规模培养提供了参考依据。**

参考文献:

- [1] 毕丁仁, 王桂枝. 动物霉形体及研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 53—61.
- [2] 韦艳娜, 熊祺琰, 刘茂军, 等. 不同因素对猪肺炎支原体颜色变化单位测定的影响 [J]. 中国药理学杂志, 2012, 46(8):8—10.
- [3] 《兽用生物制品规程》(2000 版). 农业部兽用生物制品规程委员会编. 418—422.438.
- [4] 沈青春, 覃青松, 王琴, 等. PCR 方法测定猪肺炎支原体培养物菌数 [J]. 中国预防兽医杂志, 2006, 28(1):55 — 57.
- [5] 叶元康, 林特夫, 黄谷良. 解脲支原体的微量菌落形成单位和颜色变化单位的测定 [J]. 蚌埠医学院学报, 1986, 11(4):252 — 254.
- [6] Calus D, Maes D, Vranckx K, et al. Validation of ATP luminometry for rapid and accurate titration of Mycoplasma hyopneumoniae in Friis medium and a comparison with the color changing units assay [J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 83:335 — 340.

(作者简介: 杜德燕, 硕士, 执业兽医师, 从事兽用生物制品的研究与开发。此文发表于《四川畜牧兽医》2013 年第 6 期)



猪瘟活疫苗（兔源）外源病毒检测与控制

文 | 汪媛 严成

引言

病毒性活疫苗作为一个生物体，携带外源病毒的情况已不是新鲜事。含有外源病毒污染的疫苗，不仅影响疫苗免疫效果的表达，而且免疫接种过程悄然成为了疫病传播的推手。因此，对动物疫苗特别是活疫苗质量的评价除抗原含量与抗体水平两大常规指标外，外源病毒污染的检测也日益受到人们的高度重视并列入兽用生物制品生产企业的必检项目。兽用活疫苗的生产，由于使用的生物活性原材料及生产过程

等环节均容易引起兽用病毒性活疫苗污染外源病毒，因此，确保活疫苗无外源病毒污染既是行业管理的要求，也是生产企业追求的目标。在疫苗质量检测过程中，将疫苗经适当方法处理后接种不同的培养基质，通过荧光抗体染色、观察病变、红细胞吸附试验等手段即可检出污染的外源病毒。

《中华人民共和国兽药典》（二〇一〇年版三部）猪瘟活疫苗（兔源）产品的外源病毒检测主要有以下几个项目：荧光抗体染色、致细胞病变、红

细胞吸附试验以及家兔的检验。该方法中荧光抗体法可特异性的检测牛病毒性腹泻病毒（BVDV）、猪细小病毒（PPV）两种外源病毒；而致细胞病变、红细胞吸附方法可广谱性检测出所有致细胞病变、产生红细胞吸附的外源病毒，如：猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）、伪狂犬病毒（PRV）、流感病毒、细小病毒等；家兔检验主要排除生产原材料可能带入的兔瘟病毒；通过这些检验项目的全面把关，基本可以全面检出除本病毒以外的所有其它外源病毒。外源病毒检测周期长，试验中需要准备的器材和材料较多，过程比较复杂，对每一个细节都要相当的注意，否则前功尽弃。

1. 仪器、试剂的准备

1.1 仪器及设备

恒温培养箱、CO₂培养箱、-70℃低温冰箱以及普通冰箱、低速离心机、倒置荧光显微镜、水浴锅。

1.2 试剂

细胞消化液（按现行兽药典附录配制）；DMEM、MEM干粉加适当灭菌双蒸水过滤分装备用；PBS液（PH7.2）按分子克隆实验指南配制；新生牛血清：使用前经56℃灭活，用ELISA方法检测

BVDV、CSFV（猪瘟病毒）抗体、HI（血凝抑制试验）方法检测PPV抗体，三者皆阴性的血清备用；红细胞：0.4%豚鼠红细胞、0.4%鸡红细胞，参照现行兽药典附录制备；姬姆萨染色试剂：将姬姆萨原液稀释10倍后使用，现配现用。

1.3 检验器具

75cm²细胞培养瓶、25cm²细胞培养瓶、吸管、96孔细胞培养板、6孔细胞培养板、记号笔等。

1.4 阳性对照用毒种：牛病毒性腹泻病毒（BVDV）Oregon CV24V株、猪细小病毒（PPV）SC1株。

1.5 样品：猪瘟活疫苗（兔源）。

2. 检验步骤

2.1 样品的处理：取样品3瓶，稀释成10头份/ml，混匀，经适当处理后接种细胞。

2.2 细胞的选择：非洲绿猴肾细胞（Vero）、牛肾细胞（MDBK）系、靶动物传代细胞系、猪睾丸细胞（ST）系。

2.3 样品的接种、培养和继代

2.3.1 用于红细胞吸附、致细胞病变、猪瘟和牛病毒腹泻病毒荧光抗体检测：将Vero、ST、MDBK细胞传至75cm²细胞培养瓶，待长成致密单层后，



弃营养液，PBS洗2遍，加经过离心处理的上清液1ml，37℃吸附1h，弃样品，加维持液，培养5天，然后冻融3次。再接种致密单层的Vero、ST、MDBK细胞2ml，吸附后，弃样品，加维持液，培养5天，冻融3次；再接种致密单层的Vero、ST、MDBK细胞2ml，吸附后，弃样品，加维持液，培养7天。

2.3.2 用于猪细小病毒荧光抗体检测：将ST细胞分散加至75cm²细胞培养瓶，然后加入1ml经处理的样品，培养5天，然后冻融3次。ST细胞分散至75cm²细胞培养瓶，然后加入盲传1代的样品2ml，培养5天，然后冻融3次。ST细胞分散加至96孔细胞培养板，然后加入盲传2代的样品，每孔0.10ml，培养7天。

2.4 检查方法

2.4.1 荧光抗体检测

将第一次继代细胞培养物接种长满MDBK细胞单层96孔细胞培养板20孔，以及专用于检测猪细小病毒样品采用同步接种96孔细胞培养板20孔，置培养箱中培养7天。阳性对照：BVDV阳性对照在样品接种后第3天接种长满单层的MDBK细胞96孔板4孔；PPV阳性对照在样品接种后第4天同步接种ST

细胞96孔板4孔，继续培养，与样品同步进行间接免疫荧光抗体染色。

2.4.2 致细胞病变试验

将最后一次继代培养至7天的ST细胞、Vero细胞取出。弃营养液，固定后自然干燥，加入姬姆萨染色液染色，弃染液，自来水冲洗，自然干燥，光学显微镜下观察有无包涵体、巨细胞或其他外源病毒引起的细胞病变。

2.4.3 红细胞吸附试验

将最后一次继代培养至7天的ST细胞、Vero细胞取出。弃营养液，用PBS洗涤细胞3次，加1ml0.4%的豚鼠红细胞和鸡红细胞的等量混合悬液。分别在2~8℃和20~25℃放置30min，用PBS洗涤3次，在显微镜下观察红细胞吸附现象。

2.4.4 家兔试验

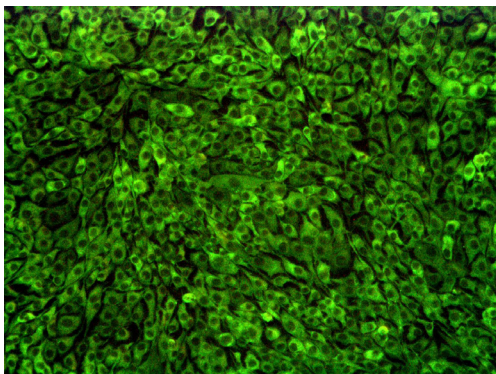
兔病毒性出血症抗体阴性的1.5~2.0Kg的家兔4只，每只皮下注射10头份/ml疫苗，观察14天。

3. 结果

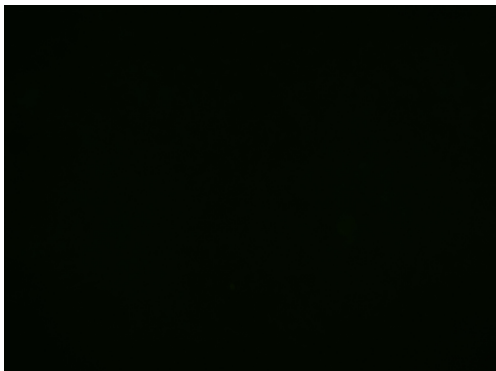
3.1 荧光抗体检测：产品经BVDV、PPV间接免疫荧光染色无BVDV特异性胞浆内黄绿色荧光和PPV特异性胞核内黄绿色荧光。



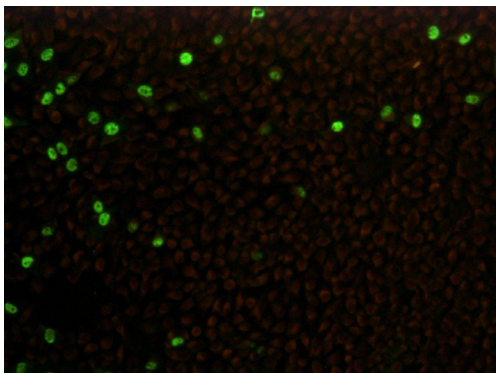
猪瘟活疫苗(兔源)产品 BVDV 间接荧光染色(阴性)



BVDV 间接荧光染色阳性对照

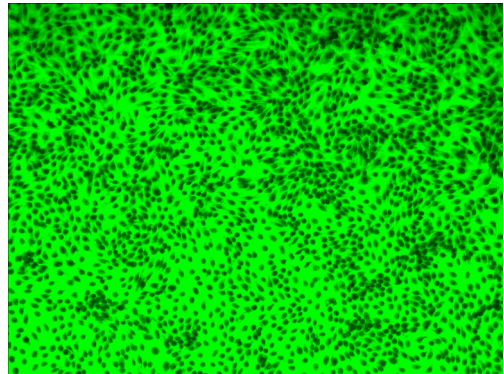


猪瘟活疫苗(兔源)产品 PPV 间接荧光染色(阴性)

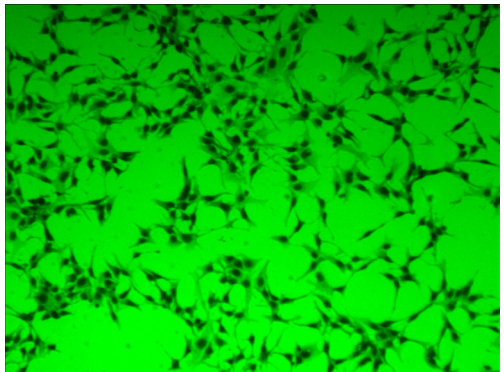


PPV 间接荧光染色阳性对照

3.2 致细胞病变试验：产品经致细胞病变试验姬姆萨染色后置显微镜下观察单层细胞，无包涵体、巨细胞或其他病毒引起的 CPE（致细胞病变）。

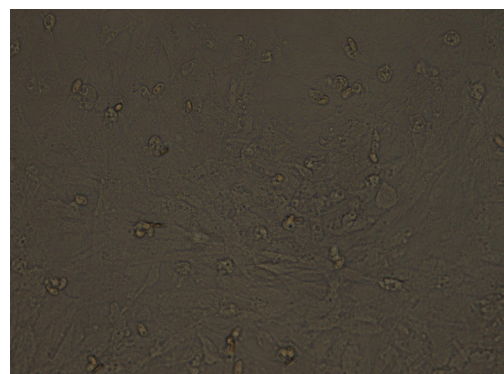


猪瘟活疫苗(兔源)产品致细胞病变试验姬姆萨染色(阴性)

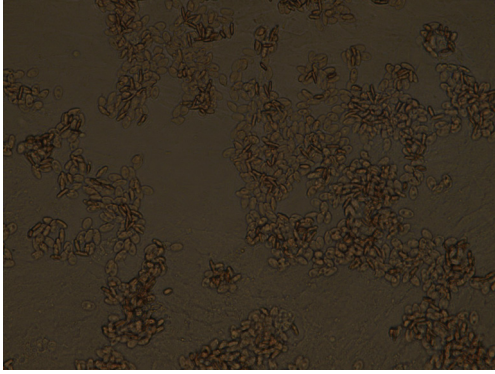


致细胞病变阳性对照

3.3 红细胞吸附试验：产品经红细胞吸附后镜检无外源病毒所致的红细胞吸附现象。



猪瘟活疫苗(兔源)产品红细胞吸附试验(阴性)



红细胞吸附试验阳性对照

3.4 家兔试验：家兔注射产品后观察 14 天，4/4 健活。

4. 分析与讨论

整个试验主要有以下注意的关键点：

4.1 样品的处理：猪瘟活疫苗（兔源）产品允许有菌生长，需要经过除菌才能接种到细胞上。疫苗中的动物组织成分以及配苗保护剂等对细胞也有损伤，都需要进行适当的处理。

4.2 细胞的培养：整个试验会用到 MDBK、VERO、ST 细胞，样品接种细胞后要培养 5 天，第一次继代需要 5 天，第二次继代需要 7 天。细胞的状态直接影响整个试验。细胞维持时间较长就需要培养状态良好，血清、MEM 营养液的使用以及细胞复苏、培养、传代的操作都需要做好，才能使试验顺利进行。

4.3 阳性对照的繁殖：BVDV、PPV 病毒的繁殖至关重要，只有阳性对照成立，试验结果才有意义。

4.4 荧光抗体试剂盒的选择：选用的是牛病毒性腹泻和猪细小病毒间接免疫荧光抗体试剂盒，试验步骤要严格按试剂盒上的说明书来操作。

4.5 致细胞病变试验：细胞需先进行固定后再进行染色，姬姆萨染色液用原液经稀释后现配现用，染色后在显微镜下观察有无包涵体、巨细胞或其他外源病毒引起的细胞病变。

4.6 红细胞吸附试验：需配制 0.4% 的豚鼠红细胞和鸡红细胞的等量混合悬液，红细胞吸附试验结果不容易观察，需要特别仔细，并对比对照组。



4.7 家兔的检验：需用血凝抑制试验方法选出兔病毒性出血症抗体阴性的 1.5 ~ 2.0Kg 的家兔，这是新药典新增的检验项目。

华派公司对外源病毒的污染检验和控制非常严格。要求从原辅材料、生产过程、半成品、成品等环节实行全程监控，确保出厂的活疫苗产品绝无外源病毒污染。近年来，公司生产上市的猪瘟活疫苗系列产品、伪狂犬病活疫苗（Bartha-K61 株）以及猪繁殖与呼吸综合征活疫苗（CH-1R 株）等产品经行业主管部门和有关养殖集团多次抽检，均从未检出过有外源病毒的污染，这充分印证了公司外源病毒污染的检测把控工作扎实有效。

（作者简介：汪媛，本科，质管部）



对于销售人员来说，能够获取客户的信任，就是成功的开始。解决初次见面的信任危机问题，建立信任的氛围，缓和客户的戒备心理，才能最终取得好的沟通效果。

如何取得客户的信任

文 | 吴海生

动物疫苗是一种特殊商品，其销售人员接触的圈子和人群是有限的。对于销售人员来说，能够获取客户的信任，就是我们成功销售的开始。那么，要解决初次见面的信任危机问题，不管是销售人员还是销

售经理都得共同努力，建立信任的氛围，缓和客户的戒备心理，让客户们觉得我们既不会浪费他的时间，更不会欺骗他们。我就如何获取客户的信任浅谈如下，供业内人士参考。

一、坚守诚信

诚是做人之本，信是处世之道。我们可以少说真话，但绝不可说假话，这是疫苗营销的基本法则。作为销售人员，在开发客户过程中，特别是与第一次打交道的客户交往时，客户往往不会一接触就对你产生好感。我们首先要做的就是真诚待人，这是我们获取信任的前提和基础。在信任产生前，我们所做的一切，客户都会抱着半信半疑的态度对待。此时，我们要开诚布公的与客户交谈，不要令对方对你谈话的真实性及所表达的真正含义有所怀疑。同时，真实的展现公司的实力和形象，不能有半点虚假和欺骗。决不能夸大其词，而且我们一旦承诺就代表公司，就一定要兑现。销售疫苗首先是销售我们自己，只有让客户首先信任我们的人品，才能信任我们的公司，乃至信任我们的产品。

二、注意细节

细节决定成败。我们在和客户面谈时，要注意同客户的目光接触，注意语气、语调和语速。在整个沟通、交流中，要保持良好的坐姿，面带微笑，语气柔和而坚定。需要特别提出的是，一定要注意掌握谈话中的停顿，这不但有利于你组织语言，还可帮助你让对方参与到你的谈话当中。要切忌就某些技术问题或观点讨论时与客户发生争执。人都是感情动物，会受到感情和情绪的影响，通过与客户建立感情来施加影响，无疑比一般的说教更为有效。在拉近与客户的距离方面，见面、道别时的握手也是不错的一种方法，与客户产生身体上的接触，无疑更能让客户放松下来，倾听我们的建议和意见。

三、强化专业

专业的人才能做专业的事。无论是技术人员还是销售人员，要取得客户的信任，就应该拥有足够的专业素养。没有人喜欢和什么都不懂的人谈话。特别

是对于销售人员，和客户打交道的时候，更应该表现出自己的专业性来。这里不仅仅指的是对自己产品的了解，而且应该对行业、业务流程、客户的实际情况了如指掌。每个人都会只对自己有用的信息感兴趣。客户关心的是我们能够给他们带来什么样的好处，给他们带来什么样的利益。而这些，只有我们加强了自身的学习提升，练就了我们与客户接触交流的能力，并对客户的业务有了深入的了解，才能有的放矢。

四、理解客户

有人说，先做朋友后做生意；但又有人说，没有永远的敌人，只有永远的利益。如果我们能给客户带来效益，客户就会敞开大门来欢迎我们。帮助客户成功，也就会让我们自己成功。不用多谈什么大道理，用实际的例子来说话。真心实意对待客户，客户自然也会真心实意来对待你。要站在客户的角度考虑问题，善于把握客户心理，做到换位思考，总有一天我们会感动客户。

五、坚持原则

销售是一件既痛苦又快乐的事情。我们总是在不断的刻意追求与客户的共同话语并达成共识。但在任何时候，我们不要放弃公司的原则。君子当有所为有所不为。灵活的态度，加上坚定的原则，才能让客户信服。无原则的让步，只会让客户感觉到混乱，反而会失去信任。

（作者简介：吴海生，大专，执业兽医师，山东省区域销售经理）

蓝经灵

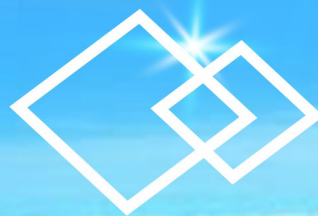
猪繁殖与呼吸综合征活疫苗 (经典蓝耳株 CH-1R)

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

批准文号:兽药生字(2011)221011063



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



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

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



文 | 刘欢

如果你认为现在的企业待遇不能让你满意，那么你需要提醒自己，千万别因为激愤和满腹牢骚而不去努力成长，不论遇到什么事情，强大的自己才会有力量取得自己应得、想得到的价值！

别让心态毁了自己

很多人刚入职时，怀抱自己的理想，希望自己能在事业的舞台上施展才华，也希望自己能在人生的长河中留下辉煌的一笔，于是乎，意气风发，干劲十足。但若感到自己为企业做了重大贡献却没有人重视时，或者只得到口头重视但却得不到实惠的时候，他们就会愤怒、懊恼、牢骚满腹……最终，决定不再那么努力，让自己的所做去匹配自己的所得。付出就应该有回报，这似乎也是有道理的。但这恰恰是最不明智的。

有这么个故事：一棵苹果树结果了。第一年，它结了10个苹果，9个被摘走，自己得到1个。对此，苹果树愤愤不平，于是自断筋骨，拒绝成长。第二年，它结了5个苹果，4个被拿走，自己得到1个。“哈哈，去年我得到了10%，今年得到20%！翻了一番。”此时，这棵苹果树心理平衡了。

就如职场中人，如果太看重回报，像苹果树那样“自断筋骨”，用自己所做去匹配所得，在公司得过且过、怨天尤人、不思进取，几年后他们会发现，那些原本属于他的激情和才华早已飘远，自己仍旧活在自己的愤怒、懊恼、闹骚中，一事无成。他们没有发现，他们已经停止了成长，他们没有明白成长才是对自己最好的回报！

其实，得到多少果子不是最重要的，最重要的是苹果树自身的成长。等苹果树长大成熟、硕果累累的时候，那些曾阻碍它成长的力量都会消失。如果你认为现在的企业待遇不能让你满意，那么你需要提醒自己，千万别因为激愤和满腹牢骚而不去努力成长，不论遇到什么事情，都要做棵永远成长的苹果树。强大的自己才会有力量取得自己应得、想得到的价值！

（作者简介：刘欢，本科，供应部）



文 | 本刊编辑部

一个人最难战胜的，就是自己。即使你自制力再强，也有被自己打败的时候。所以真正强大的人，不是向外显现力量，而是能放下身段，放低自己，不断从外界汲取力量。

圣贤之道就是不断完善自己

曾国藩年轻时是个愤青，“自负本领甚大，每见人家不是”。三十岁时意识到自身的不足，立志学做圣人，他的方法就是写日记，不过他的日记与一般人不同，很像今天的微博。

曾国藩日记的篇幅都不长，几十字，一二百字，写的内容多是生活的白描：从早晨起床开始，吃的什么饭，和谁说的什么话，甚至晚上做了什么梦，都一一记录下来，然后回忆自己一天的言行，发现其中哪点不符合圣人要求，就加以自责，做深刻自省。更关键的是，曾国藩写日记不光自己看，还让别人看。虽然那时没有互联网，可以将自己的所思所想发布到网上，与粉丝们互动，但曾国藩有他的办法，他把日记抄录数份，然后在朋友圈子里传阅，朋友们会在后边加批注，谈自己的感想，或批评，或鼓励，就像现在粉丝们的跟帖一样。

比如，有一次，好友倭仁在他的日记后批语道：“我辈既如此学，便须努力向前，完养精神，将一切思维、闲应酬、闲言语扫除净尽，专心一意，钻进里面，安身立命，务要另换一个人出来，方是功夫进步。愿共勉之。”曾国藩看到后的反应是，“为之悚然汗出”，然后感叹说，不如此“安得此药石之言”。还有一次，他在日记中抱怨骆秉章对他很冷淡，他的弟弟曾国华评论说：“兄之面色，每予人以难堪。”这让他如醍醐灌顶，想起自己素来自负，对这位前辈加上级汇报工作或说话总是不容置疑，于是一下子警醒过来。

日记通常都是非常私密的东西，通常都会严加保密，不让外人知晓，可曾国藩为什么如此开放呢？原来他在日记中虽然能够毫不留情地剖析自己，做到狠斗私字一闪念，但自己的缺点、错误或是陋习改正起来却非常困难，总是改了犯，犯了改，改了再犯。例如，他曾在日记中立誓“夜不出门”，但还是经常“仆仆于道”。道光二十二年（1842年）十月二十四、二十五两天，京城刮起大风，他仍然“无事出门”，回来深切



自责：“如此大风，不能安坐，何浮躁至是！”十二月十六日，菜市场要杀人，别人邀他去看热闹，他“欣然乐从”。

内修效果不理想使曾国藩认识到，光靠自我反思、自我监督是不行的。于是他把日记公开，让众多的眼睛看着自己，并且通过亲人朋友的“跟帖”、点评，点醒和提示自己，形成强大的外在监督力量。用他的话说就是：“势必有所激，有所逼，才能有所成。”完全靠自己监督自己，往往靠不住，人都是在外界的压力之下，才能做出真正的改变。

曾国藩天资并不聪慧，但却成为“内圣外王”式的人物，成为清朝的“中兴之臣”，与他注重自我修养，使自己不断完善是分不开的。而在其漫长的一生中，写这种类似“微博”的日记，并公之于亲人朋友，成为他最重要的自修方式。

一个人最难战胜的，就是自己。即使你自制力再强，也有被自己打败的时候。所以真正强大的人，不是向外显现力量，而是能放下身段，放低自己，不断从外界汲取力量。这，正是曾国藩最智慧的地方。

（本刊编辑部摘自《佛缘网站》）



全国猪业形势分析座谈会在渝召开

7月8日，由中国畜牧业协会主办的全国猪业形势分析座谈会在重庆市农业委员会召开，中国畜牧业协会常务副会长、全国畜牧总站站长李希荣出席座谈会，重庆市委农工委副书记郭忠亮致辞。

中国畜牧业协会、全国畜牧总站、农业部畜牧业司畜牧处、重庆市农业委员会、重庆畜牧总站领导和专家及河北、广东、湖北、湖南、江西、四川、山东、河南、重庆等生猪大省著名养猪企业负责人出席座谈会。会议代表就当前生猪生产和市场运行情况、本轮“猪周期”为何如此之长的深层次原因、下半年全国猪业走势、如何保障今后养猪业健康发展等问题开展了深入交流和广泛探讨。

与会代表指出，本轮生猪业低迷时间之所以如此长，主要有以下三个原因：一是目前能繁母猪、生猪存栏量仍旧处于高位，产能过剩，市场仍供大于求；二是部分经营资本进入养猪业，导致养猪群体呈现规模化比例增长；三是因整顿“餐桌浪费”，公款消费明显减少，民间婚丧嫁娶大排场消费明显降低，猪肉消费回到更加理性阶段。

与会代表认为，生猪产业经过本轮长时低迷期将会出现以下几个现象：一是部分效率低、成本高、抗风险能力弱的养猪企业、种猪企业将被淘汰，与养猪业相关的企业扩张将会放缓，金融资本进入养猪业会得到抑制，部分经受住考验、成本控制低、而又真想涉入养猪业的企业将会坚持到最后；二是养殖相关

产业（如饲料、动保、相关机械业）赢利将会下降，那种打着服务生猪产业旗号、实则进行“伪”服务者将逐步淡出市场，可能催生真正的系统性养殖服务。三是目前全国能繁母猪存栏量和生猪存栏量已出现下降，其中6月份下降幅度较大，尤其是原种猪存栏量首次出现下降，尽管已经低于去年同期水平，但是存量仍就较高。预判认为，明年养猪形势才会有明显好转。

与会代表认为，生猪产业健康发展应遵循“市场调节、政府调控、自然淘汰”原则，并提出四点建议，一是生猪养殖企业应通过协会联合起来，建立利益共同体，摆脱无序竞争，通过合作社参股等形式，延长产业链，打破大型加工企业的垄断；二是国家层面应建立完善的生物安全体系，通过科技投入，解决应用和管理关键问题；三是养猪企业应强化育种工作，形成有自主知识产权的优良品种群体；四是科学规划生猪产业，建立合理的退出和扶持机制。

（本刊编辑部摘自《中国畜牧兽医信息网》）

农业部与联合国粮农组织联合开展 “中国非洲猪瘟防范项目”

7月4日，农业部与联合国粮农组织（FAO）驻华代表处在北京联合举办“中国非洲猪瘟防范项目（ASF-TCP）启动会”，共同研究推动中国非洲猪瘟防范工作。农业部兽医局副局长王功民、FAO驻华代表米西卡（Misika）先生出席会议并致辞。

非洲猪瘟是世界动物卫生组织（OIE）法典规定的法定通报动物疫病，死亡率可达100%，该病一旦发生，难以有效根除，防范成本高，社会影响大。近年来，该病出现了从非洲老疫区向东半球长距离传播的趋势，与我接壤的俄罗斯等国不断有疫情暴发，对我国边境动物疫病防控工作带来巨大威胁。为有效防范该病传入风险，提高应急防控能力，我部与FAO研究启动了非洲猪瘟防范项目，拟通过项目实施，利用FAO技术和专家资源，加强与周边国家联防联控机制建设，加强实验室诊断技术研究储备，完善非洲猪瘟防控技术规范 and 应急预案，提升综合防控能力。

来自FAO跨境动物疫病应急中心中国办公室，农业部国际合作司，中国动物疫病预防控制中心、中国兽医药品监察所、中国动物卫生与流行病学中心，以及北京、内蒙古、新疆、辽宁、吉林、黑龙江、湖南等省份的专家代表出席了会议。



（潘华柱摘自《农业部网站》）

中国生猪市场难以安慰的价格问题

价格问题被看做是无法解决，无法平衡的一个问题，而且在中国市场上“暴涨暴跌”的现象经常出现，这就是“无形的手”与“有形的手”双剑合璧的效果吗？有人说归根结底是供求的关系，这是这简单的四个字被人为的灌入了太多的因素。

生猪价格一直是我们的一个死穴。我们每年会想出各种办法对生猪价格进行调控，可是它还是会暴涨暴跌，每年都有损失惨重的养殖户。“过山车”“温水煮青蛙”“猪周期怪圈”每年还是会如期而至。是我们的方法不对，还是本身行业已经出了问题？

今年的玉米价格是一个热点，因为太高了嘛。为什么玉米报告说玉米是一个丰收年，还有企业根本买不到好的玉米作饲料？收储的玉米那么多，为何不放出来平衡一下物价。农民、贸易商、加工企业、消费者的利益都在受着煎熬。

生猪价格、粮食价格，玉米价格，豆粕价格，每一位的“价格”都在处于一种病态，他们需要一剂良药来医治。



(本刊编辑部摘自《华夏养猪网》)



我们坚信未来畜牧业会沿着稳定健康的轨道前进



现阶段，我国畜牧业正处在由传统向现代加速转型的进程中，呈现出一些新的特征，但是近两年出现了一些新问题需要正视，未来我国畜牧业的发展仍是机遇与挑战并存。

一、近两年畜牧业发展出现的新问题

1、猪禽生产能力过剩

在年初生猪的周期性波动中，能繁母猪的存栏量达到5000万头左右，母猪的平均产仔数在14~15头，生产能力低下，下一步要努力提高母猪的生产能力，适当控制母猪产能的扩张，高度重视疫病防控。关于家禽，受速生鸡、H7N9事件的深度影响，黄羽和白羽肉鸡产业受到了前所未有的重创，去年饲料产量没有增长主要是因为禽料下降较多的缘故。即使如此，家禽业生产能力仍然过剩。去年进口100多万套白羽祖代种鸡，不但造成资源的浪费，而且给企业带来包袱。应该引起相关从业者的认真思考。

2、畜产品消费结构和总量发生深刻的变化

国八条出台后，对畜产品消费产生了直接影响，将逐渐挤出过去存在的那部分浪费型和过度型消费泡沫，回归到正常的消费状态，由此我们需要重新测算更科学、理性的畜产品消费数量。

3、牛羊肉价格升高，供求矛盾凸现

随着居民生活水平的提高，牛羊肉消费势头急剧上升，由原来少数民族地区消费发展为全国性消费，由季节性消费发展为常年消费，刚性需求增长迅速。但受资源的限制，牛羊肉产业的发展速度远达不到消费增长的需求。而在发达国家，羊肉是作为高档产品消费。我们要千方百计保障穆斯林民众的消费需求，同时需要科学地研究食物营养结构和消费结构，引导居民多消费禽肉，少消费资源浪费型的牛羊肉类。

二、未来我国畜牧业发展面临的主要挑战

1、保障畜产品有效供给的压力不断增大

随着人口的增加和城镇化步伐的加快，对畜产品需求总量会不断增长，满足畜产品有效供给的压力越来越大，为此我们必须保障畜产品自给，只是个别年份少数品种适当来源进口，这将是今后相当长时期畜牧业发展承担的重要任务。

2、保障畜产品质量安全的压力加大

随着人们消费意识的转变，对畜产品质量要求越来越高，与现实产品质量的差距越来越大。另外，不少消费者不完全了解食品安全的概念，对此我们既要提高畜产品的质量，同时也要注重普及食品安全的

知识。

3、土地资源的约束

作为现代畜牧业发展的基本标志之一，规模化发展速度非常快，但是符合规模化发展的土地条件越来越少，包括南方，由于新农村建设，不少地方出台了限养和禁养的规定，未来不仅面临谁来养的问题，更要解决在哪养的问题。

4、饲料原料资源不容乐观

(1) 蛋白原料基本依赖进口。大豆长期依靠进口，将来豆油会受到棕榈油的严峻挑战，大豆油脂加工企业赢利困难，会不断推高豆粕价格。

(2) 国内玉米基本满足需求。目前处于紧平衡状态，但长远看，国内玉米的生产有可能会落后于消费需求的增长，缺口可能会拉大。我们必须研究玉米的替代产品，如小麦、高粱和大麦。如何积极发展节粮型畜牧业，如何提高饲料转化率，是未来畜牧业和饲料工业共同面对的命题。

5、畜牧业发展中的环境保护问题

今年，《畜禽规模养殖污染防治条例》正式实施，对今后畜牧业的发展明确提出了刚性要求，畜禽养殖企业必须加大环保投入，控制和消除畜牧业的环境污染。

6、畜产品市场的异常波动

三鹿奶粉、速生鸡、H7N9 等几次突发事件，造成畜牧产品市场的大起大落，今后还可能会有此类事件发生，要有长期面临和应对的准备。

7、疫病防控形势严峻

当规模化发展速度不断加快，病毒变异的速度也在加快，而疫苗研发的速度往往不及病毒变异的速度，无论科研、生产和政府部门都要长期关注这一问题。另外，除了十分重视重大疫病的防控外，还必须注重一般疫病的防控。

三、对畜牧业的未来充满信心

中国饲料工业协会十分重视饲料的生产和安全，提出目前饲料工业的总体发展思路是“筑牢安全防线，转变发展方式，提升增长质量”。《2014 年畜牧业工作要点》提出，2014 年继续坚持“稳生猪、保家禽、促牛羊”的方针。经过多年的实践，我国已经具有发展现代畜牧业的良好基础，特别是规模化发展以后行业在疫病防控、市场波动、安全生产等方面都具备了应对的能力和丰富的经验。未来人们对畜产品的消费需求不可抑制，畜牧业仍是农业和农村经济发展中最具活力的增长点和朝阳产业，关键是在畜牧业生产过程中要提高饲料、养殖、防控的科技含量，努力向社会提供安全、营养、美味的畜产品。在此我们坚信未来畜牧业会沿着稳定健康的轨道前进。

(本刊编辑部摘自《华夏养猪网》)

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)

批准文号：兽药生字（2014）221016028



- ✓ 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 27290977
网址：www.schpzy.com



伪安清

伪狂犬病活疫苗

Pseudorabies Vaccine, Living (Strain Bartha k-61)
批准文号: 兽药生字 (2010) 221017018

铸
百年疫苗品质
集先进生物科技



- 免疫原性好: gE基因自然缺失
- 病毒含量高于国家标准: $10^{5.3}$ - $10^{5.6}$ TCID₅₀/头份
- 纯化毒种: 蚀斑克隆, 有效去除毒力基因
- 安全方便: 哺乳仔猪可滴鼻接种

净化伪狂犬病的利器!



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

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