

广东畜牧兽医科技

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

双月刊 1976年3月创刊

第44卷第3期(总第205期)

2019年6月18日出版

中国标准连续出版物号 ISSN 1005-8567
CN 44-1243/S

主管单位:广东省农业科学院

主办单位:广东省农业科学院畜牧研究所

广东省农业科学院动物卫生研究所

广东省畜牧兽医学会

主 编:蒋宗勇

责任编辑:黄 琳 马新燕 康桦华 吕晓慧

张洁华 王片片

编委主任:蒋宗勇

编 委(排名不分先后):

蒋宗勇 顾万军 曹俊明 廖 明

曾振灵 毕英佐 徐志宏 舒鼎铭

王贵平 王政富 熊惠军 吴玄光

刘清神

特邀编委:

陈 峰 林旭埜 李 岩 陈瑞爱

罗满林 向 华 王 华

编辑出版:《广东畜牧兽医科技》编辑部

地址:广州市天河区五山大丰一街1号(510640)

电话:020-87576452

传真:020-87576452

网址: <http://www.gdaav.org>

E-mail: gdxmsykj@163.com

印刷单位:广州市德艺彩印有限公司

发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

发行范围:国内外公开发行

定价:10.00元

广告发布登记通知书编号:440000100115

本刊声明:凡向本刊所投稿件,一经刊用,稿件的复制权、发行权、信息网络传播权、汇编权等权利即转让给本刊。本刊一次性支付作者著作权使用报酬(包括印刷版式、光盘版和网络版各种使用方式的报酬)。如作者不同意转让版权,请于来稿时声明。

目前本刊已加入的数据库有:中国学术期刊(光盘版)、中文科技期刊数据库、万方数据——数字化期刊群。

目 录

·行业动态·

非洲猪瘟流行病学研究进展 陈晶,王晓虎,等(1)

非洲猪瘟流行的背景下猪场生物安全管理 胡斌,何艺平,等(5)

·专题综述·

鸡传染性法氏囊病病毒及疫苗的研究进展 朱思思,李永红(9)

大豆异黄酮在动物养殖中的应用研究进展 吕宁,胡友军,等(14)

关于武宣县开展畜禽粪污综合治理的探讨 李顺芳,翁梅悦,等(21)

·畜牧技术·

畜禽养殖场消毒药的合理使用 李贞明,余苗,等(23)

当前畜禽粪污资源化利用及湛江地区的现状 刘伟超(27)

·兽医临床·

复合丁酸梭菌对断奶仔猪生长性能及腹泻的影响 吴云鹏,池作授,等(32)

犬猫弓形虫病及综合防控措施 胡俊菁,陈珊,等(35)

一例豹纹守宫维生素A缺乏与眼部感染的诊疗 罗声扬,戴溢铨,等(38)

·试验研究·

猪伪狂犬病活疫苗 Bartha-K61 株对流行毒株的免疫效力研究 吴文福,黄秋雪,等(40)

小反刍兽疫病毒、A型口蹄疫病毒和O型口蹄疫病毒多重RT-PCR检测方法的建立

..... 黄元,袁淑英,等(44)

改进HPLC法测定乙酰氨基阿维菌素注射液含量 邓秉钊,潘绮雯,等(48)

·信息之窗·

欢迎订阅本刊 (37)

GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in March 1976(Bimonthly)

JUN.2019 Volume 44, Number 3 (Total No.205)

Main Content

- Advances in epidemiological studies of African Swine Fever CHEN Jing, WANG Xiaohu, et al(1)
- Biosecurity management in pig farms under the background of African Swine Fever epidemic HU Bin, He Yiping, et al(5)
- Research Progress of Infectious Bursal Disease Virus and Vaccine in Chickens ZHU Si Si, LI Yonghong(9)
- Advances in the application of soy isoflavones in animal production LU Ning, HU Youjun, et al(14)
- Discussion on the comprehensive management of livestock and poultry manure in Wuxuan County
..... LI Shunfang, WENG Meiyue, et al(21)
- Rational Use of disinfectants in livestock and poultry farms LI Zhenming, YU Miao, et al(23)
- Resource utilization of livestock and poultry manure in China and the current situation in Zhanjiang..... LIU Weichao(27)
- Effects of Dietary Supplemented with Clostridium Butyricum on Growth Performance and Diarrhea of Weaned Piglets
..... WU Yunpeng, CHI Zuoshou, et al(32)
- Comprehensive prevention and control measures of Canine cat toxoplasmosis HU Junjing, CHEN Shan, et al(35)
- Diagnosis and treatment of vitamin A deficiency and ocular infections in a leopard-grain Guardian
..... LUO Shengyang, DAI Yixin, et al(38)
- Study on the Immune Efficacy of Bartha-K61 Strain of Porcine Pseudorabies Live Vaccine against Epidemic Strains
..... WU Wenfu, HUANG Qiuxue , et al(40)
- Establishment of multiple RT-PCR detection methods for small ruminant virus, type A foot-and-mouth disease virus and type O
foot-and-mouth disease virus HUANG Yuan, YUAN Shuying, et al(44)
- Determination of acetamiprid avermectin injection by improved HPLC method DENG Bingzhen, PAN Yiwen , et al(48)

Sponsored by: Guangdong Association of Animal Husbandry
and Veterinary Medicine, Institute of Animal
Health, Guangdong Academy of Agricultural
Sciences.

Published by: Editor Office Guangdong Journal of Animal
and Veterinary Science.

Chief Editor: Jiang Zongyong

Editor Add: No. 1 Dafeng one Street, Guangzhou P.R. China

Post Code: 510640

Tel: (020)87576452

Fax: (020)87576452

E-mail: gdxmsykj@163.com

非洲猪瘟流行病学研究进展

陈晶¹, 王晓虎¹, 黄元¹, 黄忠¹, 向华¹, 陈金平², 康桦华^{1*}

- (1. 广东省农业科学院动物卫生研究所 广东省畜禽疫病防治研究重点实验室
农业部兽用药物与诊断技术广东科学观测实验站, 广东 广州, 510640;
2. 广东省生物资源应用研究所, 广东 广州 5102)

摘要:非洲猪瘟是一种由非洲猪瘟病毒引起的急性、出血性、接触性、高致病性的传染性疫病。目前针对该病尚未有商品化的疫苗与有效的治疗措施, 该病1921年在肯尼亚首次报道, 其后在世界各地陆续被发现, 2018年8月在中国首次报道后引起巨大的经济和社会损失。本文根据多年来非洲猪瘟病毒流行病学研究的相关资料, 从全球流行趋势, 传染源及传播途径, 临床症状及防控策略等方面进行简要综述, 以期为我国非洲猪瘟的防控提供参考。

关键词:非洲猪瘟; 非洲猪瘟病毒; 流行病学

中图分类号:S851.3 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2019)03-0001-04

Advances in Epidemiological Studies of African Swine Fever

CHEN Jing¹, WANG Xiaohu¹, HUANG Yuan¹,

HUANG Zhong¹, XIANG Hua¹, CHEN Jinping², KANG Huahua^{1*}

- (1. Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Livestock Disease Prevention of Guangdong Province, Scientific Observation and Experiment Station of Veterinary Drugs and Diagnostic Techniques of Guangdong Province, Ministry of Agriculture, P.R.China, Guangzhou 510640, China;
2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: African Swine Fever is an acute, hemorrhagic, highly pathogenic infectious disease caused by African Swine Fever virus. There are no preventive vaccines and treatments for this disease. The disease was in Kenya in 1921. After being reported for the first time, it was discovered all over the world (including China). Based on the relevant data of African swine fever virus epidemiology research for many years, this paper reviews the global epidemic trends, sources of infection and transmission routes, clinical symptoms and prevention and control strategies, in order to provide a basis for the prevention and control of African swine fever in China.

Keywords: African swine fever; African swine fever virus; Epidemiology

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)由非洲猪瘟病毒(African Swine Fever virus, ASFV)引起的一种急性, 热性, 高致死性的传染疾病, 被世界动物卫生组织 OIE 定为 A 类疫病, 在我国被列为一类疫

病^[1]。ASFV 是一个巨大的(大于 200 nm), 有包膜的, 具有线性基因组的二十面体双链 DNA 病毒, 不同的毒株有不同大小的基因组, 一般在 170 kbp~193 kbp 间, 编码 150~200 种蛋白^[2-3], 且基因组末

收稿日期: 2019-02-05

项目来源: 广东省科技计划(2016A020210050, 2016B070701016, 2017A020208034)

作者简介: 陈晶(1982.7-), 女, 重庆, 硕士, 副研究员, 研究方向: 动物病毒学。E-mail: chenjing19827@163.com

*通讯作者: 康桦华(1979.9-), 女, 广东翁源, 博士, 助理研究员, 研究方向: 动物疫病防控。E-mail: 534011491@qq.com

端具有重复序列^[46]。

目前尚无防控非洲猪瘟的有效疫苗。我国长期将非洲猪瘟列为重点防范的外来疫病,直至2018年8月,ASF传入我国并迅速在各省发现,导致生猪发病死亡,给我国养猪业带了巨大损失。本文从全球流行趋势,传染源及传播途径,临床症状及防控策略等方面进行综述,以期为我国非洲猪瘟的防控提供参考。

1 全球流行趋势

1921年非洲猪瘟在肯尼亚被首次报道,ASF在发现之初并没有被认为是一种新的病毒,而被认为是猪瘟病毒的变异^[7]。在随后的研究中科学家发现,这种疾病在肯尼亚东部和南部地区的野生动物,特别是疣猪中已经存在相当长一段时间。在其后30多年间,ASF在中西部地区被陆续发现,但仅限于撒哈拉以南的非洲国家。1957年,非洲猪瘟病毒以安哥拉为跳板,首次在欧洲国家葡萄牙里斯本被发现,迅速被扑灭后,ASFV沉默了两年,1960年同样的基因型再次出现在里斯本,并且很快从欧洲的西南角-伊比利亚半岛蔓延到欧洲的其他国家,如法国(1964年),意大利(1967年,1969年,1983年)^[8-12],马耳他(1978年)^[13],比利时(1985年)^[14-15]和荷兰(1986年)^[16-18],在此期间,美洲部分国家也陆续发现ASFV,例如古巴(1971年,1980年)^[19],巴西(1978年),多米尼加共和国(1978年)^[20]和海地(1979年)^[12]。2007年,非洲猪瘟(ASF)抵达格鲁吉亚的黑海港口^[21],科学家分析,最可能的原因是黑海波蒂港一艘船对受ASF感染的猪肉处理不当。随后,ASF蔓延到邻国亚美尼亚、阿塞拜疆、伊朗等地^[22],直至传播到整个高加索地区和俄罗斯联邦(RF),并逐渐成为地方疫病^[23, 24]。2012年7月及2013年6月非洲猪瘟在乌克兰和白俄罗斯被发现^[25],2014年1月,立陶宛报告了第一例野猪感染ASFV的病例,揭示了非洲猪瘟已经抵达欧盟东部边界,同年2月,ASF在波兰被发现,紧接着是拉脱维亚和爱沙尼亚^[26]。在波兰和波罗的海三国范围内,ASF已经慢慢成为野猪种群中普遍存在的地方病^[27],而家猪中的ASF则得到了有效的控制^[28]。2017~2018年,欧洲的比利时,保加利亚,捷克共和国,匈牙利,摩尔

多瓦和罗马尼亚都陆续有野猪病例或家养猪病例的发现,这是比利时时隔33年后再次发现ASF病例^[29, 30]。2018年8月3日,农业农村部根据中国动物卫生流行病学中心(国家外来动物疫病研究中心)确认,正式发布了发生在沈阳市省北新区的非洲猪瘟疫情通报^[31]。至此,非洲猪瘟首次传入中国^[32]。

2 传染源及传播途径

近年来,随着非洲猪瘟在世界感染范围的扩大,对ASF传染源及传播途径有了深入的研究。ASF流行病学被描述为包括四个个独立的流行病学循环:“森林循环(sylvatic)”、“蜱-猪循环(tick-pig)”、“猪-猪循环(domestic)”和“野猪-栖息地循环”,涉及软蜱,野生非洲猪(主要是疣猪),家猪和感染猪产品^[29]。非洲猪瘟病毒是目前已知的唯一一个虫媒DNA病毒,首次发现是由在疣猪巢穴内生长的一种携带非洲猪瘟病毒的软蜱持续传播所致^[34]。

2.1 森林循环

森林循环是指ASFV在病毒的天然宿主(即疣猪和软蜱)之间循环,而不会引起脊椎动物宿主中发生疾病^[35]。这是ASFV在东非和南非最初的传播方式^[36]。

2.2 蜱-猪传播

在蜱-猪循环中,病毒主要在家猪中传播,蜱作为自然宿主,携带病毒在人类环境中存在^[37]。ASF在撒哈拉以南非洲的部分地区及上个世纪60年代和70年代在伊比利亚半岛流行,主要是这一循环发挥重要作用^[38]。

2.3 猪-猪循环

感染ASFV的家猪、野猪及其肉制品、饲料制品等,由于人类活动由一个地方长距离跨越到另一个地方,是非洲猪瘟在全球流行的主要驱动因素^[39],也是全球绝大多数ASF爆发的循环模式^[40]。ASFV经过感染猪通过血液,粪便,尿液、唾液甚至是通过人类食用感染猪肉直接传播至易感猪,也可能是通过饲料、设备、饲养人的衣服或鞋类传播,或者是通过猪肉制品传播。

2.4 野猪-栖息地循环

这一传播方式是ASF在中欧和东欧流行病学

研究中发现的流行模式, 其主角包括欧亚野猪 (*Sus Scrofa*)、野猪栖息地和它们的尸体^[41], 指野猪之间的直接传播和通过栖息地的间接传播。被 ASFV 感染的野猪尸体对栖息地的污染为 ASFV 感染新的动物提供了可能。这一传播取决于环境、时间、季节和尸体的分解^[42]。这种病毒环境的持久性同时也受到寒冷潮湿的气候的影响^[43]。

3 临床症状

非洲猪瘟病毒能感染野猪及家猪, 引起发热, 全身性出血及高死亡率, 潜伏期一般为 3~19 天, 多为突发高热, 体温可达 40℃ 以上, 皮肤发绀, 部分发病猪只有跛行、便秘或腹泻或便血等症状, 病死猪体表可见大块紫色瘀斑等, 其临床症状与猪瘟 (CSF) 相似。但脾脏极度肿大至 5~10 倍, 严重梗死, 质脆易碎, 是 ASF 与 CSF 的重要鉴别特征。

4 防控策略

截至 2019 年 1 月 16 日, 我国发生了 102 起非洲猪瘟疫情, 其中有 4 起发生在屠宰场, 2 起是野猪或二代野猪疫情, 分布在 24 个省份、74 个地市、84 个区县, 多起疫情间无明显流行病学关联。从疫情的分布看, 全国非洲猪瘟疫情总体呈现点状散发态势, 局部地区存在集中发生的情况。由于目前尚无针对非洲猪瘟的有效疫苗及治疗方案, 预防和控制本病要依靠尽早发现疑似症状、准确迅速的实验室诊断及实施严格的扑灭和卫生防疫措施^[30]。

禁止饲喂泔水, 禁止疫区以及疫区与非疫区间的猪只或猪产品运输; 猪场员工访问其它猪场后不可直接回到自己猪场, 需要至少隔离 48 h^[24]; 对人员、车辆、衣物等进行严格消毒, ASFV 有效的消毒剂包括 0.3% 甲醛、2% 次氯酸钠、2% 氢氧化钠、3% 邻苯基苯酚和碘化合物等, 要彻底清除有机物质 (粪便、饲料等); 妥善处理病死猪尸体; 发现疑似病例立马上报兽医相关部门等, 是目前防控非洲猪瘟有效的措施。

参考文献

- [1] 苏双, 吕雪峰, 李萌. 非洲猪瘟的诊断与防控对策[J]. 兽医导刊, 2011, 11: 30-31.
- [2] DIXON L K, CHAPMAN D A, NETHERTON C L, et al. African swine fever virus replication and genomics [J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 3-14.

- [3] ALONSO C, BORCA M, DIXON L, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Asfarviridae [J]. *The Journal of General Virology*, 2018, 99(5): 613-614.
- [4] SOGO J M, ALMENDRAL J M, TALAVERA A, et al. Terminal and internal inverted repetitions in African swine fever virus DNA [J]. *Virology*, 1984, 133(2): 271-275.
- [5] GONZALEZ A, TALAVERA A, ALMENDRAL J M, et al. Hairpin loop structure of African swine fever virus DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1986, 14(17): 6835-6844.
- [6] TULMAN E R, DELHON G A, KU B K, et al. African swine fever virus [J]. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 2009, 328: 43-87.
- [7] MONTGOMERY R E. On A Form of Swine Fever Occurring in British East Africa (Kenya Colony) 1 [J]. *Journal of Comparative Pathology & Therapeutics*, 1921, 34: 159-191.
- [8] Meeting for consultation and information of the O. I. E. (Office International des Epizooties) on African swine fever: Paris, 19-20 April, 1967. *Bull Off Int Epizoot*, 1967, 67(7): 999-1028.
- [9] QUESADA A. African swine plague. Diagnosis and interventions in the territorial jurisdictions of the Experimental Zooprophyllactic Station of Mezzogiorno [J]. *Acta Medica Veterinaria (Napoli)*, 1969, 15(1): 17-27.
- [10] BONADUCE A. African swine plague. Epizootology, susceptible animals, resistance of the virus [J]. *Acta Medica Veterinaria (Napoli)*, 1969, 15(1): 29-39.
- [11] LOMBARDO A. African swine plague. Spread, losses and preventive measures in Naples [J]. *Acta Medica Veterinaria (Napoli)*, 1969, 15(1): 3-15.
- [12] SWANEY L M, LYBURT F, MEBUS C A, et al. Genome analysis of African swine fever virus isolated in Italy in 1983 [J]. *Veterinary microbiology*, 1987, 14(2): 101-104.
- [13] WILKINSON P J, LAWMAN M J, JOHNSTON R S. African swine fever in Malta 1978 [J]. *The Veterinary Record*, 1980, 106(5): 94-97.
- [14] Veterinary Chief Inspection of Public Health and the Board of the Veterinary Service. African swine fever in Belgium [J]. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde*, 1985, 110(8): 329-330.
- [15] BIRONT P, CASTRYCK F, LEUNEN J. An epizootic of African swine fever in Belgium and its eradication [J]. *The Veterinary Record*, 1987, 120(18): 432-434.
- [16] TERPSTRA C, WENSVOORT G. African swine fever in the Netherlands [J]. *Tijdschrift Voor Diergeneeskunde*, 1986, 111(8): 389-392.
- [17] HESS G. The present epidemiological status of African swine fever [J]. *Tierärztliche Praxis*, 1986, 14(2): 231-235.
- [18] The Veterinary Service Board. African swine fever found in South Holland [J]. *Tijdschr Diergeneeskd*, 1986, 111(8): 407.
- [19] TURY E, RAMOS J R, URQUIAGA R. Pathological anatomic

- experiences in the African swine fever outbreak in Cuba in 1971 [J]. *Acta veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, 1973, 23(4): 389-409.
- [20] MEBUS C A, DARDIRI A H, HAMDY F M, et al. Some characteristics of african swine fever viruses isolated from Brazil and the Dominican Republic [J]. *Proceedings, annual meeting of the United States Animal Health Association*, 1978, 82: 232-236.
- [21] ROWLANDS R J, MICHAUD V, HEATH L, et al. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007 [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2008, 14(12): 1870-1874.
- [22] RAHIMI P, SOHRABI A, ASHRAFIHELAN J, et al. Emergence of African swine fever virus, northwestern Iran [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2010, 16(12): 1946-1948.
- [23] GOGIN A, GERASIMOV V, MALOGOLOVKIN A, et al. African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007-2012 [J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 198-203.
- [24] SANCHEZ-VIZCAINO J M, MUR L, MARTINEZ-LOPEZ B. Martinez-Lopez, African swine fever (ASF): five years around Europe [J]. *Veterinary microbiology*, 2013, 165(1-2): 45-50.
- [25] European Food Safety Authority. Evaluation of possible mitigation measures to prevent introduction and spread of African swine fever virus through wild boar [M]. *European Food Safety Authority Journal*, 2014, 12(3): 3616-3623.
- [26] EFSA AHAW Panel (EFSA Panel on Animal Health and Welfare). Scientific opinion on African swine fever [M]. *European Food Safety Authority Journal*, 2015, 13(7): 4163-4192.
- [27] PEJSAK Z, TRUSZCZYNSKI M, NIEMCZUK K, et al. Epidemiology of African Swine Fever in Poland since the detection of the first case [J]. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2014, 17(4): 665-672.
- [28] EFSA (European Food Safety Authority), CORTINAS A J, GOGIN A, RICHARDSON J, et al. Scientific report on epidemiological analyses on African swine fever in the Baltic countries and Poland [M]. *European Food Safety Authority Journal*, 2017, 15(3): 4732-4773.
- [29] OIE. 2018. World Animal Health Information Database (WAHID). http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary.
- [30] CHENAIS E, DEPNER K, GUBERTI V, et al. Epidemiological considerations on African swine fever in Europe 2014-2018 [J]. *Porcine Health Management*, 2019, 5: 6.
- [31] 王颖, 缪发明, 陈腾, 等. 中国首例非洲猪瘟诊断研究 [J]. *病毒学报*, 2018, 34(6): 817-821.
- [32] ZHOU X, LI N, LUO Y, et al. Emergence of African Swine Fever in China [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(6): 1482-1484.
- [33] COSTARD S, MUR L, LUBROTH J, et al. Epidemiology of African swine fever virus [J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 191-197.
- [34] PLOWRIGHT W, PARKER J, PEIRCE MA. African swine fever virus in ticks (*Ornithodoros moubata*, murray) collected from animal burrows in Tanzania [J]. *Nature*, 1969, 221(5185): 1071-1073.
- [35] PERRY B. Infectious diseases of livestock with special reference to southern Africa [J]. *Australian Veterinary Journal*, 2010, 73(5): 198-198.
- [36] WILKINSON P J. The persistence of African swine fever in Africa and the Mediterranean [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 1984, 2(1-4): 71-82.
- [37] BROWN VR, BEVINS SN. A Review of African Swine Fever and the Potential for Introduction into the United States and the Possibility of Subsequent Establishment in Feral Swine and Native Ticks [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2018, 5: 11.
- [38] BOINAS F S, WILSON A J, HUTCHINGS G H, et al. The Persistence of African Swine Fever Virus in Field - Infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF Endemic Period in Portugal [J]. *Plos One*, 2011, 6(5): e20383.
- [39] CHENAIS E, BOQVIST S, STERNBERG-LEWERIN S, et al. Knowledge, Attitudes and Practices Related to African Swine Fever Within Smallholder Pig Production in Northern Uganda [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(1): 101-115.
- [40] PENRITH M L, VOSLOO W. Review of African swine fever: transmission, spread and control [J]. *Journal of the South African Veterinary Association*, 2009, 80(2): 58-62.
- [41] CHENAIS E, STAHL K, GUBERTI V, et al. Identification of Wild Boar-Habitat Epidemiologic Cycle in African Swine Fever Epizootic [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2018, 24(4): 810-812.
- [42] PROBST C, GLOBIG A, KNOLL B, et al. Behaviour of free ranging wild boar towards their dead fellows: potential implications for the transmission of African swine fever [J]. *Royal Society Open Science*, 2017, 4(5): 170054.
- [43] GALLARDO M C, REOYO A T, FERNANDEZ-PINERO J, et al. African swine fever: a global view of the current challenge [J]. *Porcine Health Manag*, 2015, 1: 21.

非洲猪瘟流行的背景下猪场生物安全管理

胡斌¹, 何艺平², 胡旭进³, 童雄¹, 杜宗亮⁴, 孟繁明¹, 李剑豪¹

(1. 广东省农业科学院动物科学研究所, 畜禽育种国家重点实验室, 广东省动物育种与营养公共实验室, 广东省畜禽育种与营养研究重点实验室, 广东 广州 510640

2. 广州市畜牧研究所, 广东 广州 510545

3. 金华市农业科学研究院, 浙江 金华 321000

4. 清远市龙发种猪有限公司, 广东 英德 513057)

摘要:2018年8月3日, 非洲猪瘟首次在辽宁发现, 并迅速蔓延。该病具有急性、高热、高死亡率等特征, 如何控制甚至净化国内非洲猪瘟, 已成为整个产业亟需解决的问题。中国生猪年出栏量占全球50%以上, 因散户、低生物安全小型猪场的存在以及规模化猪场在生物安全管理上存在的欠缺和漏洞, 我国猪场的生物安全管理水平亟待提高。本文通过介绍非洲猪瘟的传播途径以及国外净化非洲猪瘟成功的案例, 阐述非洲猪瘟的生物安全防疫管理, 以供生猪养殖企业借鉴。在政府部门的科学引导下, 每个猪场都建立完善的生物安全管理体系, 非洲猪瘟必定能在中国得到有效的控制。

关键词:非洲猪瘟; 生物安全; 猪

中图分类号:S851.33 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2019)03-0005-04

Biosecurity Management in Pig Farms Under the Background of African Swine Fever Epidemic

Hu Bin¹, He Yiping², Hu Xunjing³, Tong Xiong¹, Du Zongliang⁴, Meng Fanming¹, Li Jianhao¹

(1. Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences., State Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding, Guangdong Public Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Guangdong Key Laboratory of Animal Breeding and Nutrition. Guangzhou 510640 China;

2. Guangzhou Science Institute of Animal Husbandry, Guangzhou 510545 China

3. Jinhua Institute of Agricultural Sciences;

4. Qingyuan Longfa Pig Breeding Co. Ltd. Guangdong, Qingyuan 513057 China)

Abstract: African swine fever was first detected in Liaoning province on August 3, 2018, and spread rapidly. The disease has the characteristics of acute, high fever and high mortality. How to control or even purify the African swine fever has become an urgent problem for the whole industry. More than 50% of the world's annual yield pig in China, but due to low biosecurity of small pig farms exist, and large-scale pig farms in the biosecurity management also exists deficiencies and loopholes, to improve the level of biosecurity management are necessary. By introducing the transmission of African swine fever and successful cases of purifying African swine fever abroad, this paper expounds the biosecurity epidemic prevention management of African swine fever, which is used for reference by pig

收稿日期:2019-04-02

项目来源:清远市产业技术与研究开发资金(2017A029);广州市科技计划重点项目(201707020007)

作者简介:胡斌(1982-),男,湖南益阳人,博士,研究方向为动物生产管理与繁殖育种。E-mail: husanbo@foxmail.com

通讯作者:李剑豪(1963-),男,推广研究员,研究方向为动物生产管理与繁殖育种。E-mail: jianhao63@sina.com

farms. Under the scientific guidance of government departments, the biosecurity management system is established in every pig farm, African swine fever will be effectively controlled in China.

Keywords: African swine fever; biosecurity; pig

非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒 (African Swine Fever Virus, ASFV) 引起猪的一种急性、热性、高度接触性动物传染病, 以高热和高死亡率为特征。强毒株造成的急性感染, 症状表现为高热、食欲减退、昏睡、虚弱、卧地不起、腹泻和以及妊娠母畜流产。感染猪的死亡通常出现在临床症状出现后的 7~10 天^[1]。自 20 世纪 20 年代在肯尼亚被首次发现直到 1957 年前, 非洲猪瘟 (African Swine Fever, ASF) 的暴发一直局限于非洲, 1957 年葡萄牙报道了此病的发生, 疫情得到了有效的控制和扑灭。在 20 世纪 70 年代和 80 年代, 非洲猪瘟传入多个欧洲和美洲国家, 在欧洲, 包括荷兰、意大利、法国、比利时、马耳他, 在美洲, 包括古巴、多米尼加共和国、海地和巴西。尽管非洲猪瘟危害巨大, 但经过多年的努力, ASF 已经在这些国家得到了净化。直到 2007 年 6 月, ASF 传入高加索地区, 同年 7 月格鲁吉亚, 8 月亚美尼亚, 11 月俄罗斯, 2012 年乌克兰, 2013 年白俄罗斯, 2014 年, 波兰、立陶宛、拉脱维亚和爱沙尼亚相继报道, 2017 年, 意大利、捷克共和国和罗马尼亚等暴发 ASF。在我国, 2018 年 8 月, 于辽宁省沈阳市首次报道了 ASF 疫情, 存栏 383 头, 发病 47 头, 死亡 47 头^[2]。之后河南、江苏、浙江、安徽、黑龙江、内蒙古、吉林、天津、山西、云南、湖南和贵州等 31 个省(直辖市、自治区)报道 ASF 疫情^[3]。

1 病原体

ASFV 是一种虫媒双链 DNA 病毒, 拥有较大的基因组 (170-194 KB), 含有 151 个开放性阅读框 (ORFs), 可以编码 150~200 种蛋白质, 其基因组变异频繁, 表现出明显的遗传多样性。是一种正二十面体对称结构病毒, 病毒直径 200 nm, 其中直径为 70~100 nm 的 DNA 核心位于病毒中间, 直径为 172~191 nm 的二十面体衣壳和含类脂的囊膜包裹着病毒外周。共有 22 个基因型^[5]和一个血清型^[6], 其中血清型又可以根据非洲猪瘟病毒的血细胞吸附特性划分为 8 个血清组。本病病程短, 病死率高, 且无有效疫苗和治

疗药物, 致死率可高达 100%。

在自然条件下 ASFV 比较稳定, 特别是在有机物的环境中, 存活的时间较长。在受污染的栏舍内 ASFV 能保持传染性高达 1 个月, 在未煮熟的肉片、香肠等肉制品中存活 3~6 个月。在常温条件下, ASFV 在在鲜肉和腌肉中存活 140 d, 在带骨肉中可存活 150 d^[7]。所以, ASFV 极具传染性和易传播性, 一旦感染, 对养猪企业造成的危害巨大。

2 传播方式

了解非洲猪瘟病毒的传播途径, 是防止其传播的重要办法。非洲猪瘟病毒的传播主要途径有 4 条^[8], 包括: (1) 森林循环: 疣猪、野猪、软蜱之间的传播; (2) 野猪-栖息地循环: 野猪、野猪制品、栖息地之间的传播。(3) 蜱-猪循环: 家猪、软蜱之间的传播; (4) 家猪循环: 家猪、猪肉制品之间的传播。研究表明, 野猪-栖息地循环、家猪循环两个为国内蔓延的主要方式, 家猪循环的主要传播因素有感染的生猪运输, 以及污染的泔水、肉制品等^[9-10]。同时猪群密度和人口密度对病毒的传播也起到了重要的作用^[11]。

有报道表明, 鸟类也能作为蜱虫的传播途径。葡萄牙暴发 ASF 后, 在对发病猪进行了扑杀的同时, 对猪舍周围蜱虫栖息地进行检查和清除, 最终 ASF 在爆发 5 年后被彻底根除, 证明了蜱虫能长期保持感染的能力^[12]。因此, 确保猪舍没有鸟类动物栖息地, 是有效控制蜱虫的一个基本要求。最新的研究发现, 厩螫蝇 (*Stomoxys calcitrans*) 也能够传播非洲猪瘟^[13-14], 螫蝇采含有 ASFV 病毒的血液后 0~72 h, 在不同部位检测到 ASFV, 这为防控的非洲猪瘟又增加了防控难度。

3 实验室诊断

在实验室病原学检测方面, PCR 方法具有很高的灵敏度和特异性, 包括普通 PCR、荧光定量 PCR、多重 PCR、等温扩增技术^[15], 重组酶聚合酶扩增技术也可以作为检测非洲猪瘟病毒的有效方

法,其敏感度高于等温扩增法^[16];另外血清学检测,包括 ELISA 抗体检测、间接免疫荧光抗体试验等^[17],也可运用于检测。常规的 PCR 分子生物学技术可以在猪感染 ASFV 的早期检测到病毒核酸,这样更简单、高效、成本低,对早期 ASFV 的检测具有重要作用^[18]。

4 国外净化情况

尽管非洲猪瘟危害巨大,很多国家采取了一系列的净化措施和办法,通过多年的努力和探索,也从中积累很多宝贵的经验和教训。西班牙和巴西作为全球第三、第四生猪出栏国家,在非洲猪瘟净化方面有非常成功的经验。西班牙采取了一系列措施,如:将整个西班牙划分为“无疫情监测区”和“感染区”;建设“流动兽医临床团队网络体系”;一旦确认出现 ASF,可对所有感染群全面扑杀,并对周边猪只做样品调查等,从首次发病到彻底根除用了 35 年时间,从实施净化到根除用时 10 年^[19]。巴西从首次发病到根除才用了 7 年,在非洲猪瘟净化上采取了一系列有效措施,如按全国生猪养殖的分布特点、猪肉企业的密集程度等,区分不同风险程度,分地域进行控制和根除;并建立疫情通报系统,接收、处理全国所有兽医的疫情汇报;禁止感染区、风险区内的猪自由移动;彻底清洗、消毒可能受到污染的交通工具、建筑及物品;对有出血症状和繁殖障碍的猪、冷冻猪肉、屠宰场进行检测等。巴西从制定根除计划到彻底根除非洲猪瘟,只用了 4 年时间^[20]。而俄罗斯由于一系列原因,如监测系统不完善、存在大量低生物安全水平的农场等方面,在非洲猪瘟净化上未能获得成果^[21]。

5 生物安全防控

5.1 人员管理

建立双层隔离区,任何进入猪场内的员工必须通过两次隔离。个人在第一层隔离区,隔离 3 天。第一次隔离,采取衣物、手机、皮肤等物件表面样本,送实验室进行 PCR 检测,监测呈 ASFV 阳性的个人,不得进入第二层隔离区。进入第二层隔离区,所有衣物、洗刷用品等都由场内消毒后统一提供,不能穿戴私人衣服及携带私人物品进入猪场,包括衣物、鞋帽、钱包等。如果带入必须用品,如手机等,必须臭氧消毒 24 小时以上,并在消

毒后套上薄膜袋,且只能带入生活区。在第二层隔离区,隔离 3 天,进入猪场前,必须再次通过 PCR 检测,呈阴性才能进入猪场。

5.2 车辆管理

外来车辆不能进入猪场。虽然车辆可以通过清洗、消毒等方式清除传染源,但难免会留下死角,从而增加消毒不彻底带来的风险。如果猪场的饲料加工车间在猪场附近,饲料场与猪场之间必须设立隔离墙,对饲料车间进行隔离分区。场内运输用饲料车,也严禁出隔离区。场内自用车辆必须定期去除杂物、泡沫清洗剂浸泡、高压热水冲洗、消毒、干燥等。如果有条件,进入猪场附近的运输玉米车辆,在消毒后,也必须通过 PCR 检测,呈阴性才能进入饲料车间。

5.3 进出物资管理

猪场工作人员用餐,统一由外面煮熟后配送。不购入新鲜食品、蔬菜等。这样可以避免由于生蔬运输带入污染的危险性。存放饲料的仓库须设立臭氧熏蒸点进行熏蒸消毒,直接运到仓库的饲料要密闭消毒至少 2 h 后进入饲料车间。购入的必须药品通过和员工一样的双层隔离验收才能进入猪场。

5.4 饲料及原料进行风险评估

饲料传播途径具有传播范围广、速度快的特点。猪场应该详细了解饲料的成分及其来源,对供应商进行饲料风险评估,以避免污染的原料进入猪场。评估内容包括原料来源和贮存,饲料生产贮存运输过程中的生物安全风险防范控制。ASFV 在自然条件下十分稳定, OIE 建议使用 60 ℃ 加热 20 min, 或者 56 ℃ 加热 70 min 以达到病毒的灭活效果,有条件的猪场使用饲料原料自行高温制粒,否则对原料进行核酸监测^[22]。

5.5 水源及场内消毒管理

水源,作为一个重要的影响生物安全的因素,往往被很多猪场所忽略。很多猪场的水源来自附件的河流水、地下水等,而水质很多情况下都不能保证其生物安全的达标,所以,猪场使用的水,必须通过消毒等措施。漂白粉作为常用的猪场消毒药,在饮水中加入 0.3~1.5 g/L 计量,可起杀菌作用。同时,三氯异氰尿酸具有高效、广谱、安全等特点,是一种极强的氯化剂和氧化剂,对饮水中细

菌、病毒、真菌、芽孢等都有杀灭作用,对球虫卵囊也有一定杀灭作用(消毒计量为4~6 mg/L)。有必要取猪场用水送检,对水源质量进行评估,如硬度、水中农药残留、酸碱度、重金属残留、是否含有猪群易感染的细菌和病毒等,以确保所用水的安全性^[23]。

氢氧化钠1~2%浓度的水溶液,可以用来对猪场地面、料槽等进行消毒。猪场内猪舍之间的道路,可以铺洒生石灰。10%苯以及苯酚可以用于车辆和相关设备的消毒。

5.6 有害生物管理

根据ASFV的传播途径,应该对猪场内或附近的不利生物,包括野猪、鸟类、野生动物、蚊子、苍蝇、蟑螂等,采取隔离在场外的措施。搜索附近是否有野猪等啮齿类动物,对这些动物进行排查、迁移等。非现代化猪场,通常由木头和石头建成,蟑螂可以隐藏在这些材料中,检测场区是否有蟑螂的存在,并定期喷洒杀蟑螂药物,确保场内无蟑螂的存在,有条件的对场附近区域进行除蟑螂工作。对猪场内部进行大扫除,主干道定期进行消毒工作,注意猪舍环境卫生,必须清除猪舍内部的杂草或死角的垃圾残留,不留消毒死角;定期灭鼠灭蚊蝇,不给老鼠、苍蝇等留有生存的条件。猪场安装防虫网、防鸟网,以防蚊虫和鸟类等进入到栏舍内,切断ASFV的空中传播途径^[24]。

6 小结

我国生猪出栏量庞大,是世界第一,占全球50%以上,随着生产技术的提高,规模化猪场比例越来越高,小散户数量在减少,但是数量依然比较大,2016年,年出栏500头以下的猪场,占生猪产量的60%,这种情况下,低生物安全的猪场是存在的。Cappai S等^[25]根据2011~2016年期间在撒丁岛的家猪爆发ASF数量,利用模型评估,发现生猪的非法贸易、数量、移动、感染的野猪以及猪场的数量为最主要的生物学风险因素。以散户为主的养殖模式,完善的生物安全管理体系将是防控非洲猪瘟首要和有效的手段,这需从猪场建设、饲养管理、人员和物质流动等方面加强管理;同时加强疫病监控,定期对饲料、隔离区、人员携带物品等进行样本的PCR检测,以防控未知的风险;加强一线员工生物安全的培训,提高

人员共同防疫的认识,让生物安全细节能落实到位。西班牙颁布了非洲猪瘟根除计划,采取了一系列防控措施,10年后成功根除了非洲猪瘟;俄罗斯,ASF自2007年起流行11年,依然未能获得明显的效果,而巴西则利用7年的时间根除了非洲猪瘟。这些事例说明净化非洲猪瘟将是一个长期和艰巨的工作,养猪企业要长期生存下去,只有严格执行各项生物安全措施,才能在非洲猪瘟等疫病防控中获得胜利。

参考文献:

- [1] BROWN V R, BEVINS S N. A review of African swine fever and the potential for introduction into the United States and the possibility of subsequent establishment in feral swine and native ticks[J]. *Front in Veterinary Science*, 2018, 5, 11.
- [2] ZHOU X, LI N, LUO Y, et al. Emergence of African Swine Fever in China[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2018, 65(6):1482-1484.
- [3] 罗玉子, 孙元, 王涛, 等. 非洲猪瘟——我国养猪业的重大威胁[J]. *中国农业科学*, 2018, 51(21):4177-4187.
- [4] 戴永强, 闫之春, 王乃东, 等. 非洲猪瘟影响下的猪场生物安全设计[J]. *中国猪业*, 2019, 14(01):35-37.
- [5] CHAPMAN D A G, TCHEREPANOV V, UPTON C, et al. Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates [J]. *Journal of General Virology*, 2008, 89(2):397-408.
- [6] Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences[J]. *Virology*, 2010, 400(1):128-136.
- [7] 王琴, 赵启祖. 加强生物安全措施是养猪场防控非洲猪瘟的关键[J]. *中国兽药杂志*, 2018, 52(12):1-5.
- [8] CHENAIS E, STÅHL K, GUBERTI V, et al. Boar -Habitat Epidemiologic Cycle in African Swine Fever Epizootic [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2018, 24(4): 810-812.
- [9] GUINAT C, GOGIN A, BLOME S, et al. Transmission routes of African swine fever virus to domestic pigs: current knowledge and future research directions [J]. *Veterinary Record*, 2016, 178, 262-267.
- [10] BELLINI S, RUTILI D, GUBERTI V. Preventive measures aimed at minimizing the risk of African swine fever virus spread in pig farming systems[J]. *Acta Vet Scand*, 2016, 58(1):82.
- [11] HUANG Z, LANGEVELDE F, HONER K, et al. Regional level risk factors associated with the occurrence of African swine fever in West and East Africa[J]. *Parasites & Vectors*, 2017, 10(1):16.
- [12] OLESEN A S, HANSEN M F, RASMUSSEN T B, et al. Survival and localization of African swine fever virus in stable flies (*Stomoxys calcitrans*) after feeding on viremic blood using a membrane feeder [J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 222(8):25-29.
- [13] COSTARD S, MUR L, LUBROTH J, et al. Epi-demiology of African swine fever virus[J]. *Virus Research*, 2013, 173: 191-197.

鸡传染性法氏囊病病毒及疫苗的研究进展

朱思思, 李永红

(广东永顺生物制药股份有限公司, 广东广州 511356)

摘要:鸡传染性法氏囊病(IBD)是由传染性法氏囊病病毒(IBDV)引起的急性、高度接触性传染病,主要感染3~6周龄雏鸡。自首次发现以来,它一直是家禽业经济损失的主要原因之一。IBDV具有分段的双链RNA基因组,易发生遗传变异,产生与现有商品化疫苗的抗原性不能完全匹配的流行毒株,从而导致免疫失败。因此迫切需要研发与临床流行毒株相匹配的新型疫苗用于IBD的防控。本文综述了该病毒当前流行病学和疫苗的研究进展,为IBD的防控提供参考。

关键词:传染性法氏囊病; 传染性法氏囊病毒; 疫苗

中图分类号:S855.3 文献标识码:A 文章编码:1005-8567(2019)03-0009-05

Research Progress of Infectious Bursal Disease Virus and Vaccine in Chicken

Zhu si si, Li yong hong

(Guangdong Winsun Bio-pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 511356, China)

Abstract: Infectious bursal disease (IBD) is an acute, highly contagious infectious disease caused by infectious bursal disease virus (IBDV), which main infect 3 to 6 weeks old chicks. Since first been discovered, it is one of the leading cause of financial loss in the poultry industry. IBDV has segmented double-stranded RNA genome, that prone to genetic variation to produce epidemic strains that do not fully match the antigenicity of existing commercial vaccines and leading to immune failure. Therefore, it is urgent to develop new vaccines that match the clinical epidemic strains for the prevention and control of IBD. This article reviews the current epidemiology of the virus and the research progress of vaccine, providing reference for prevention and control of IBD.

Keywords: Infectious bursal disease; Infectious bursal disease virus; vaccines

传染性法氏囊病(IBD)是由一种禽类双链RNA(dsRNA)病毒——传染性法氏囊病病毒(IBDV)引起的疾病。这种病毒通过感染淋巴器官法氏囊(Bursa of Fabricius, BF)组织内未成熟的B淋巴细胞,诱导其凋亡并引起免疫抑制,进而导致接种失败,增加机体对其他病原的易感性,引起继发感染^[1],严重时可致使鸡死亡。一旦饲养地点受

到污染,病毒通过受感染粪便污染的饲料和水在禽类之间进行有效水平传播,然而,没有垂直传播的报道。自从50年前在美国首次发现经典毒株,IBDV病毒已经扩散到整个世界并伴随着复杂的演变,给养鸡业造成严重的经济损失。

1 IBDV基因组

收稿日期:2019-04-08

作者简介:朱思思(1987-),女,江西人,硕士研究生,从事动物疫苗研究。E-mail:zhusisi1987@sina.com

通讯作者:李永红(1966-),男,广东人,硕士研究生,兽医师,从事禽病防控项目研究。E-mail:lyh25f@163.com

像所有双RNA病毒一样,IBDV包含两段双链RNA。片段A包含两个部分重叠的开放阅读框(ORF)。较大的ORF编码多聚蛋白(NH₃-VP2-VP4-VP3-COOH),其经过自催化分解成两种病毒结构蛋白pVP2和VP3,以及丝氨酸(S)蛋白酶VP4^[2]。pVP2产物在病毒复制和衣壳组装过程中被进一步加工成成熟的VP2^[3]。另一个ORF编码非结构的VP5蛋白^[4]。研究表明,在支架蛋白VP3存在的情况下,VP2蛋白形成三聚体构成病毒衣壳表面,每个VP2蛋白氨基酸(aa)构成四个环:PBC(aa 219-224)、PDE(aa 249-254)、PFG(aa 279-284)和PHI(aa 316-324)^[5]。这些环末端的氨基酸经常发生变化,因此基因组的这一区域被称为高变VP2(hvVP2)序列。VP2衣壳表面蛋白决定IBDV的免疫原性,hvVP2氨基酸可直接用于免疫原性的鉴定,VP5参与受感染细胞中病毒的传播^[6]。片段B编码的聚合酶(VP1)介导病毒RNA复制^[7]。VP1晶体结构显示三个结构域:N-末端(aa 1-167),中心聚合酶(aa 168-658)和C-末端(aa 659-878)区域^[8]。

2 流行病学

从历史上看,IBDV进化的主要事件有:1957年经典IBDV的第一次爆发和20世纪80年代发现了抗原的变异,以及20世纪80年代后期在美国和欧洲检测到超强毒株(vvIBDV)。最近的一项全球IBDV分子流行病学研究显示,所有主要家禽产区都存在两种或多种可变致病性毒株,且60%~76%是具有不同程度变异的vvIBDV^[9]。

vvIBDV抗原性虽与经典的IBDV相似,但只有部分减毒的经典疫苗株对其具有保护作用。从经典毒株的脯氨酸到vvIBDV的丙氨酸,VP2蛋白222位氨基酸的突变表明这些病毒之间存在抗原差异,因此,单克隆抗体被用于识别与经典毒株有抗原差异的vvIBDV。此外,有报道从接种过经典IBDV疫苗的鸡中分离出的vvIBDV,其254位置(闭环PDE)上的甘氨酸(G)被一个S残基代替,这表明此氨基酸突变与疫苗接种失败有关^[10]。接种过IBDV活疫苗(Del-E株)的鸡,在被254位含有S残基的毒株攻击,也会发生严重的法氏囊病变,这说明254位含有S残基的毒株能逃逸Del-E株产生的中和抗体^[11]。

IBDV之间的基因重组在进化中起着重要作用。研究报告病毒hvVP2的主要亲水峰A和B结构域(环PBC和PHI)的突变导致大多数多次接种过疫苗的家禽不被保护。近年来,来自不同大陆的IBDV野外分离株在hvVP2的较小亲水峰结构域(环PDE和PFG)处显示出交换。这些区域的单突变或组合突变直接影响IBDV野外分离株的毒力^[9]。研究显示,vvIBDV VP2中第253位(Q253H),第279位(D279N)和第284位(A284T)的氨基酸被替换会导致毒力丧失^[12]。而减毒IBDV毒株的VP2第253(H253Q/N)或249(R249Q)位置处的单个氨基酸突变却会明显增加其毒力^[13]。此外,212(D212N)位置的氨基酸突变在最近分离的vvIBDV株中是常见的,这可能影响VP2的结构并因此影响病毒的抗原性^[9]。

有研究指出在300份IBDV分离株中有三分之一未能与任何已知的在过去二十年中被用于IBDV鉴定的VP2单克隆抗体反应,这充分说明了IBDV的巨大进化^[9]。

3 传统疫苗防控

疫苗接种是控制IBD的最重要措施。雏鸡有两种途径获得IBDV抗体,一是通过种鸡接种疫苗使雏鸡携带母源抗体产生免疫力,在雏鸡的B淋巴细胞最容易受到IBDV感染时,母源抗体将保护雏鸡直到3~4周龄^[6]。二是通过接种如减毒活疫苗或灭活疫苗使雏鸡产生主动免疫。接种减毒活疫苗能诱导鸡群在较短时间内产生主动免疫,但由于受母源抗体的干扰,致使免疫效果千差万别,有时甚至导致免疫失败。中等毒力活疫苗虽能达到更好的免疫效果,但又会引起法氏囊组织损伤,毒力返强、残留毒力导致免疫抑制,以及参与新变异株基因重组等一系列生物安全问题^[14]。此外,由于大多数商品化的IBDV活疫苗都是基于经典毒株研制的,对临床流行的vvIBDV或变异毒株不能够完全保护。与活疫苗相比,灭活疫苗安全性更高,但免疫效果略低,需要反复多次加强免疫,这增加了免疫成本^[14]。

虽然母体免疫和主动免疫接种策略都是有效的,但过去50多年IBDV之间的抗原漂移和抗原变异导致的抗原多样性,致使雏鸡在母源抗体较高时

也有可能感染 IBDV 并引起囊损伤。由于商业化 IBDV 疫苗中可供选择的抗原种类有限,一些国家的养殖户只能通过农场分离这种突破母源抗体的病毒变异株来制备成自家疫苗,再给种鸡接种,使其雏鸡携带该变异株的母源抗体而受到保护。然而自家疫苗从病毒分离、繁殖和灭活乳化都需要大量时间,这使得养殖户难以跟上不断演变的 IBDV 抗原漂移的速度。同时,有研究指出世界范围内都存在的 IBDV 新变异株具有地域性,这使研发具有全球应用价值的 IBD 疫苗难度加大^[15]。

4 新疫苗开发

传统的减毒活疫苗和灭活疫苗多年来没有改变,已经不能完全抵抗不断演变的 IBDV 病毒,因此迫切需要研究与流行毒株相匹配的新型疫苗。

4.1 亚单位疫苗

作为病毒衣壳蛋白,VP2 携带负责诱导保护性体液免疫应答的免疫显性表位,因此一直是亚单位疫苗的研究热点。由于 VP2 上的表位具有构象依赖性,致使虽然真核系统表达的 VP2 亚基比原核系统表达提供了更好的免疫原性,但它们仍旧不是强免疫原。有研究^[6]指出,使用鸡白细胞介素-2 或鸡白细胞介素-18 融合表达的 VP2 蛋白进行免疫,其免疫原性会增强。使用免疫增强剂和优良佐剂也有可能提高 VP2 亚单位疫苗的免疫原性,但当 VP2 作为亚单位表达时所形成的管状结构仍不如病毒衣壳免疫原性强。因此推测病毒衣壳中发现的 VP2 三聚体结构是提高免疫原性的基础。如今,在酵母和大肠杆菌表达系统中产生的 IBDV-VP2 亚单位疫苗已商业化。

利用 IBDV 特异性单克隆抗体制备一种含有多个 IBDV 表位的模拟抗原疫苗是另一种亚单位疫苗。这种模拟抗原可以与佐剂一起配制成疫苗并用于 2 周龄雏鸡的免疫接种,免后 14 天加强免疫后诱导产生的中和抗体可保护雏鸡免受 vvIBDV 的攻击^[6]。这种多表位模拟抗原与亚单位疫苗类似,可在原核系统中表达,生产成本低,有可能被用于替代灭活的 IBDV 疫苗。

4.2 免疫复合物疫苗

将 IBDV 特异性高免血清与疫苗毒株结合制备的 IBDV 免疫复合物(Immune complex, Icx)疫苗,

利用抗体分子的 Fc 片段与抗原递呈细胞的 Fc 受体间的高亲和性,使与抗体结合的抗原更易有效地与递呈细胞结合,该复合物被递呈细胞吞噬和内质化后,即可激活并刺激 B 淋巴细胞分泌抗体,从而引起强烈的体液免疫反应^[14]。有研究称,在体外构成的免疫复合物对机体所刺激的体液免疫反应是自然抗原的 100 倍^[14]。

该复合物不受母源抗体干扰,可用于胚内及 1 日龄雏鸡免疫,且免疫效果优于常规活疫苗;当雏鸡母源抗体降低到一定水平时,IBDV-Icx 中的病毒开始释放复制并产生免疫保护力^[16]。有研究分别用 IBDV-Icx 疫苗和弱毒活疫苗免疫 1 日龄 SPF 雏鸡,免后 9 d 剖检发现,免疫复合物疫苗组鸡法氏囊正常而弱毒活疫苗组鸡法氏囊全部明显萎缩,免后 21 d 和 28 d,复合物疫苗免疫组均 100% 保护^[17]。

另发现鸡胚接种 IBDV-Icx 疫苗后,在脾脏内出现更多的生发中心,大量的病毒被局限在脾脏和粘液样的树突细胞内,减少了病毒在体内其他组织中的复制,降低了对外的排毒量和野毒重组的可能性,从而规避了活疫苗使用可能存在的生物安全风险^[14]。

4.3 活病毒载体疫苗

将目的基因插入活病毒载体基因组复制非必需区,当重组病毒感染宿主时,外源基因能够随病毒载体共同在宿主体内复制、表达外源蛋白,并激发宿主产生免疫应答^[18],活病毒载体疫苗是依据这一原理研制成功的商业化疫苗。禽痘病毒、禽腺病毒、新城疫病毒和火鸡疱疹病毒常被用作基因工程病毒载体来表达 IBDV VP2 表面蛋白。表达的 VP2 蛋白不受母源抗体的影响,不会导致法氏囊损伤,且可用于胚内及 1 日龄雏鸡接种,并避免了活疫苗免疫后可能导致的免疫抑制风险^[19]。

同时可通过在病毒载体中同步插入多个外源基因来制备多价疫苗,从而降低生产成本。但同时免疫多种同病毒载体疫苗可能会产生相互干扰,减少病毒在宿主组织中的复制而影响疫苗功效,这限制了活病毒载体疫苗的广泛应用。

4.4 病毒样颗粒疫苗

使用杆状病毒或酵母表达系统生产的病毒样颗粒(VLP)疫苗,解决了 IBDV 灭活疫苗生产成本高,产量不稳定等问题。VLP 除了缺乏核酸和非结

构病毒蛋白外,在结构上与原生病毒衣壳相同,其VP2具有三聚体结构形式。通过杆状病毒表达的IBDV VLPs含有pVP2和VP3蛋白,与pVP2亚单位和IBDV多聚蛋白相比,这些VLPs具有更好的免疫原性^[6]。当在VP2衣壳蛋白的N端添加组氨酸标签后,毕赤酵母表达体系能表达出23 nm的亚病毒颗粒,通过肌肉注射途径给鸡接种时,能产生对经典IBDV毒株的完全保护;口服接种时,能产生部分保护作用^[6]。当添加佐剂时,口服接种也能达到100%的保护作用,但会造成轻度囊泡损伤。

有研究将一种经典病毒pVP2和变异病毒pVP2与VP3一起表达,形成一种多价VLP,这种疫苗可保护鸡免受两种抗原类型的病毒感染^[20]。这类疫苗在被多种抗原类型的IBDV共同感染的区域有很好的应用前景。

4.5 DNA疫苗

编码免疫原蛋白的裸DNA可以让机体对病原体产生免疫反应。IBD DNA疫苗一般选用编码VP2蛋白或整个病毒多聚蛋白的DNA,但前者比后者效果差^[6]。Li等发现通过肌肉或皮下注射含有编码多聚蛋白的DNA质粒,可诱导机体产生中和抗体并起到保护作用,但通过口服或滴眼免疫则不行,同时脂质体佐剂能有效增强疫苗免疫效果^[21]。

有研究利用编码IBDV多聚蛋白的DNA疫苗免疫1日龄雏鸡,可达到70%~100%的保护,保护率与疫苗免疫量和攻毒毒株有关。有资料显示单独胚内免疫vvIBDV DNA疫苗无法提供对vvIBDV的保护,但1周龄时加强免疫灭活IBD疫苗或VP2鸡痘重组疫苗,则可保护^[6]。总之,针对IBD的DNA疫苗有可能解决与母体抗体干扰和重复接种减毒活疫苗有关的若干问题,但仍处于试验阶段。目前还不清楚它们是否能对不同的IBDV抗原类型提供交叉保护。

5 展望

尽管目前市场上商业化的IBD疫苗产品丰富,但仍存在局限性。开发新型佐剂或许是提高疫苗免疫效果的新方向。白细胞介素、猪乳铁蛋白、热休克蛋白、鸡 β -防御素-1和合成的PAMP模拟物(例如CpG寡脱氧核苷酸)等其他新型佐剂也能改善疫苗免疫效果^[9]。提高疫苗功效的另一方法是

通过靶向特异性免疫隔室(例如抗原呈递细胞)来优化候选疫苗的递送,如微粒和纳米颗粒递送系统。抗原递送通过该类系统具有几个优点,包括防止通过粘膜免疫的酶降解和缓慢受控释放抗原,同时可增加靶向递送和抗原呈递细胞的抗原摄取量^[9]。此外,有报道雷帕霉素的哺乳动物靶标(mTOR)(先天性和适应性免疫的细胞内调节剂)在控制病毒感染中的作用。通过调节自噬机制,mTOR通过向自噬体传递抗原,导致大量肽表位的产生,从而产生免疫反应^[22]。靶向自噬在IBDV干预策略中可能也具有好的应用前景。未来随着免疫学和分子生物学技术的进一步发展,与流行毒株抗原结构相匹配的疫苗研制速度将加快。

参考文献

- [1] MAHGOUB H A. An overview of infectious bursal disease [J]. Archives of virology, 2012, 157: 2047-2057.
- [2] BIRGHAN C, MUNDT E, GORBALENYA A E. A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus [J]. The EMBO Journal, 2000, 19(1):114-123.
- [3] CHEVALIER C, LEPAULT J, ERK I, et al. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids [J]. Journal of Virology, 2002, 76, 2384-2392.
- [4] FAHEY K J, ERNY K, CROOKS J. A conformational immunogen on VP-2 of infectious bursal disease virus that induces virus-neutralizing antibodies that passively protect chickens [J]. Journal of General Virology, 1989, 70(6):1473-1481.
- [5] COULIBALY F, CHEVALIER C, GUTSCHE I, et al. The Birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses [J]. Cell 2005, (120)761-772.
- [6] DARAL J J. Advances in vaccine research against economically important viral diseases of food animals: Infectious bursal disease virus [J]. Veterinary Microbiology, 2017, (206) 121-125.
- [7] PAN J, VAKHARIA V N, TAO Y J. The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology [J]. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, 2007, 104(18):7385-7390.
- [8] CHETTLE N, STUART J C, WYETH P J. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia [J]. The Veterinary record, 1989, 125(10):271-272.
- [9] TAMIRU N A, SILKE R. Infectious bursal disease virus in poultry: current status and future prospects [J]. Veterinary

- Medicine: Research and Reports. 2016,7:9-18.
- [10] NEGASH T, GELAYE E, PETERSEN H, et al. Molecular evidence of very virulent infectious bursal disease viruses in chickens in Ethiopia[J]. Avian Dis. 2012,56(3):605-610.
- [11] JACKWOOD D J, SOMMER - WAGNER S E. Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease Bimavirus (IBDV)[J]. Virology, 2011,409(1):33-37.
- [12] MUNDT E. Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2 [J]. Journal of General Virology, 1999,80(8):2067-2076.
- [13] JACKWOOD D J, SREEDEVI B, LEFEVER L J, et al. Studies on naturally occurring infectious bursal disease viruses suggest that a single amino acid substitution at position 253 in VP2 increases pathogenicity[J]. Virology, 2008,377(1):110-116.
- [14] 杨宵玥, 陈玲, 宋亚芬等. 鸡传染性法氏囊病新型疫苗的研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2018,52(5):79-85.
- [15] MARTIN A M, FALLACARA F, et al. Genetic and antigenic characterization of infectious bursal disease viruses isolated in Italy during the period 2002-2005 [J]. Avian Diseases, 2007, 51:863-872.
- [16] 宋立芹, 蒋桃珍等. 鸡传染性法氏囊病免疫复合物疫苗的安全性和免疫效力试验[J]. 中国兽药杂志, 2004,38(7):9-11.
- [17] 章振华, 李林, 景小冬等. 鸡传染性法氏囊病免疫复合物疫苗对SPF雏鸡的免疫效果[J]. 动物医学进展, 2015,36(10):39-43.
- [18] JACKWOOD M W. Current and future recombinant viral vaccines for poultry[J]. Advances in Veterinary Medicine, 1999, 41:517-522.
- [19] SHEPPARD M. Viral vectors for veterinary vaccines [J]. Advances in Veterinary Medicine, 1999,41:145-161.
- [20] JACKWOOD D J. Multivalent virus - like - particle vaccine protects against classic and variant infectious bursal disease viruses[J]. Avian Diseases, 2013,57,41-50.
- [21] LI J, HUANG Y, LIANG X, et al. Plasmid DNA encoding antigens of infectious bursal disease viruses induce protective immune responses in chickens: factors influencing efficacy [J]. Virus Research, 2003,98,63-74.
- [22] PULESTON D J, SIMON A K. Autophagy in the immune system [J]. Immunology, 2014,141(1):1-8.

上接第8页

- [14] OLESEN A S, LOHSE L, HANSEN M F, et al. Infection of pigs with African swine fever virus via ingestion of stable flies (*Stomoxys calcitrans*) [J]. Transbound Emerg Dis, 2018, 65 (5):1152-1157.
- [15] JAMES H E, EBERT K, MCGONIGLE R, et al. Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification [J]. Journal of Virological Methods, 2010, 164(1/2):68-74.
- [16] WANG J C, WANG J F, GENG Y Y, et al. A recombinase polymerase amplification - based assay for rapid detection of African swine fever virus [J]. Candian Journal Veterinary Research, 2017, 81(4):308-312.
- [17] LOKHANDWALA, S, WAGHELA, SD, BRAY, J, et al. Adenovirus - vectored novel African Swine Fever Virus antigens elicit robust immune responses in swine. PLoS One, 2017, 12 (5), e0177007.
- [18] 庄金秋, 梅建国, 谢金文, 等. 非洲猪瘟病毒实验室检测方法研究进展[J]. 饲料与畜牧, 2017(22):32-36.
- [19] 戈胜强, 孙成友, 吴晓东, 等. 西班牙非洲猪瘟根除计划的经验与借鉴[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(07):1256-1258.
- [20] MOURA J A, MCMANUS C M, BERNAL F E M, et al. An analysis of the 1978 African swine fever outbreak in Brazil and its eradication [J]. Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties, 2010, 29 (3): 549-563.
- [21] 华利忠, 冯志新, 张永强, 等. 以史为鉴, 浅谈中国非洲猪瘟的防控与净化[J/OL]. 中国动物传染病学报:1-12[2019-03-25]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2031.s.20190220.1033.003.html>.
- [22] 王琴, 赵启祖. 加强生物安全措施是养猪场防控非洲猪瘟的关键[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(12):1-5.
- [23] 吕亮, 董晶杰, 张春玲, 等. 防控非洲猪瘟常用消毒药物及操作技术[J]. 兽医导刊, 2019(01):52-53.
- [24] 谭辉, 朱中平, 黄建平, 等. 非洲猪瘟背景下的猪场健康管理[J]. 今日养猪业, 2019(01):88-91.
- [25] CAPPAI S, ROLESU S, COCCOLLONE A, et al. Evaluation of biological and socio-economic factors related to persistence of African swine fever in Sardinia [J]. Preventive Veterinary Medicine, 2018, 152:1-11.

大豆异黄酮在动物养殖中的应用研究进展

吕宁^{1,2}, 胡友军^{1*}, 冉学光¹, 肖静英¹, 赵晓南^{1,2}, 霍星华^{1,2}

(1.广东省农业科学院动物科学研究所, 畜禽育种国家重点实验室, 农业部华南动物营养与饲料重点实验室, 广东省动物育种与营养公共实验室, 广东省畜禽种与营养研究重点实验室, 广东 广州 510640;
2.广东新南都饲料科技有限公司, 广东 广州 510640)

摘要:大豆异黄酮是以3-苯并吡喃酮为母核的多酚混合物, 近年来研究者发现其具有清除自由基, 抑制脂质过氧化, 增强机体抗氧化酶活性等, 可有效提高畜禽抗氧化能力, 有利于动物生产与健康, 因而大豆异黄酮在动物养殖中的应用日益受到关注。随着水产养殖业的迅速发展, 大豆异黄酮作为抗氧化剂在水产动物生产中的运用也受到广泛关注。本文通过对大豆异黄酮结构及其作用机制的分析, 综述了大豆异黄酮在动物中的应用研究, 展望大豆异黄酮在水产饲料应用中可能发挥的积极作用。

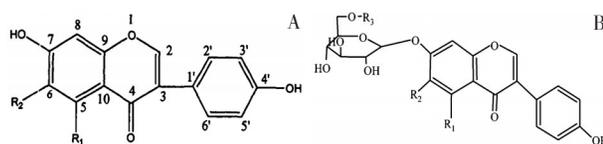
关键词:大豆异黄酮; 抗氧化; 水产动物

中图分类号:S816.4 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2019)03-0014-07

1 大豆异黄酮的结构及性质

大豆异黄酮(ISF)是大豆中一类具有15个碳原子的多酚化合物的总称, 是一类具有广泛营养价值和健康保护作用的非固醇类物质。自然界中大豆异黄酮仅存在于大豆、蚕豆、扁豆等豆科蝶形花亚科的极少数植物中。1931年, 首次分离提取出大豆异黄酮——染料木黄酮, 随后又发现黄豆甙元和大豆黄素。

大豆异黄酮的芳环(A环、B环)(如图1)之间以一个三碳环(C环)相连, B环在碳3位置上和杂化环相连, 并且ISF因其取代基的多样性其种类也较多^[1]。大豆中天然存在的ISF共有12种异构体(如表1), 主要以结合型糖甙形式存在, 占97~98%, 其次为游离型甙元形式存在, 占2~3%。包括大豆黄酮(4, 7-二羟基异黄酮)、金雀异黄酮和大豆黄素(glycitein)3种游离型甙元以及葡萄糖甙、乙酰基葡萄糖甙、丙二酰基葡萄糖甙等9种结合型糖甙^[2]。在加热和碱性(PH 8~13)条件



注: A 游离型甙元; B 结合型甙元

图1 大豆异黄酮的结构式^[5]

表1 大豆异黄酮的结构^[5]

分类	名称	R1	R2	R3
甙元	金雀异黄酮(genistein)	OH	H	
	大豆黄酮(daidzein)	H	H	
	大豆黄素(glycitein)	H	OCH ₃	
葡萄糖甙	染料木甙(genistin)	OH	H	
	大豆甙(daidzin)	H	H	
乙酰基葡萄糖甙	黄豆甙(glycitin)	H	OCH ₃	
	6''-O-acetylgenistin	OH	H	COCH ₃
	6''-O-acetyldaidzin	H	H	COCH ₃
丙二酰基葡萄糖甙	6''-O-acetylglycitin	H	OCH ₃	COCH ₃
	6''-O-malonylgenistin	OH	H	COCH ₂ CH ₃
	6''-O-malonyldaidzin	H	H	COCH ₂ CH ₃
	6''-O-malonylglycitin	H	OCH ₃	COCH ₂ CH ₃

收稿日期:2019-03-05

作者简介:吕宁(1992-), 女, 广西陆川人, 硕士, 主要从事畜禽营养与免疫方向的研究。E-mail: Lvning20@126.com

*通讯作者:胡友军(1972-), 男, 研究员, 主要从事功能性饲料添加剂与营养调控研究。E-mail: hu61368851@163.com

下, 酰基葡萄糖甙可以水解去掉二酰基或乙酰基而转化成葡萄糖甙, 水解程度随着PH值及温度的升高而加大^[3]。葡萄糖甙在强酸、高温或酶存在的条件下, 可水解去掉葡萄糖基而转化为游离型甙元。常温下, ISF呈白色粉末状、无毒、无味、不溶于水, 易于贮存; 可溶于醇、酮类溶剂中, 极易溶于二甲亚砜(MMSO)^[4]。

2 大豆异黄酮对动物消化和生长性能的影响

适宜剂量的大豆异黄酮对动物的生长性能、消化性能是有益。有研究表明: 大豆黄酮能降低母猪整个泌乳期间乳汁中的丙二醛含量, 改善乳成分, 提高仔猪的生长性能^[6]。饲料中添加高剂量(> 500 mg/kg)金雀异黄素会促使其在虹鳟肌肉中累积, 从而改善冷藏期间鱼片的保鲜期; 而纯的大豆黄酮促进大菱鲆幼鱼胃蛋白酶、肠蛋白酶、胃淀粉酶等消化酶活力升高、并促进肠道黏膜绒毛的发育; 但也有研究表明, 金雀异黄素会抑制大西洋鲑鱼的消化功能, 表现为降低麦芽糖酶活力和升高胰蛋白酶活力^[7-8]; 还有研究表明, 低剂量浓度的大豆异黄酮对鱼体的消化性能无负面影响作用^[8-9], 甚至对鱼类的消化吸收有一定的促进作用^[10]。

3 动物对大豆异黄酮的吸收和代谢

有关大豆异黄酮被水产动物摄入体内后的代谢方式、代谢产物以及代谢产物活性的研究少有报道。在畜禽动物中的研究表明, 大豆异黄酮中的游离型甙元可被小肠直接吸收, 而大部结合型甙元需经 β -葡萄糖糖甙酶分解为游离甙元后经血液循环, 部分被动物机体吸收利用, 其余部分随胆汁排入肠腔, 经过肝肠循环和肠内循环后, 大部分大豆异黄酮在肝内与葡萄糖醛酸结合后转化为水溶性物质, 再次被吸收进入血液, 其余以硫酸酯或硫酸葡萄糖酐酸的形式随尿液和粪便排出体外^[11-12]。结肠中的微生物也可将大豆黄酮通过开环反应降解为开环的去氧甲基安哥拉紫檀素, 或部分大豆黄酮及金雀异黄素经某些特定的肠道微生物被去酰基后转化为雌马酚和5-羟基雌马酚(如图2)^[13-14]。雌马酚是大豆异黄酮的二级代谢产物, 在体内较游离甙元等初级代谢产物稳定, 更容易被肠道吸收, 且存留在体内的时间更长^[15]。有研究表明, 雌马酚在体内进一步代谢生成3-羟基雌马酚、6-羟基雌马酚、8-羟基雌马酚等6种代谢产物^[16-17]。而大部分雌马酚在动物体内比较稳定, 并发挥重要的生理功能, 最终由体液循环随尿液、粪便或乳汁排出体外^[18-19]。

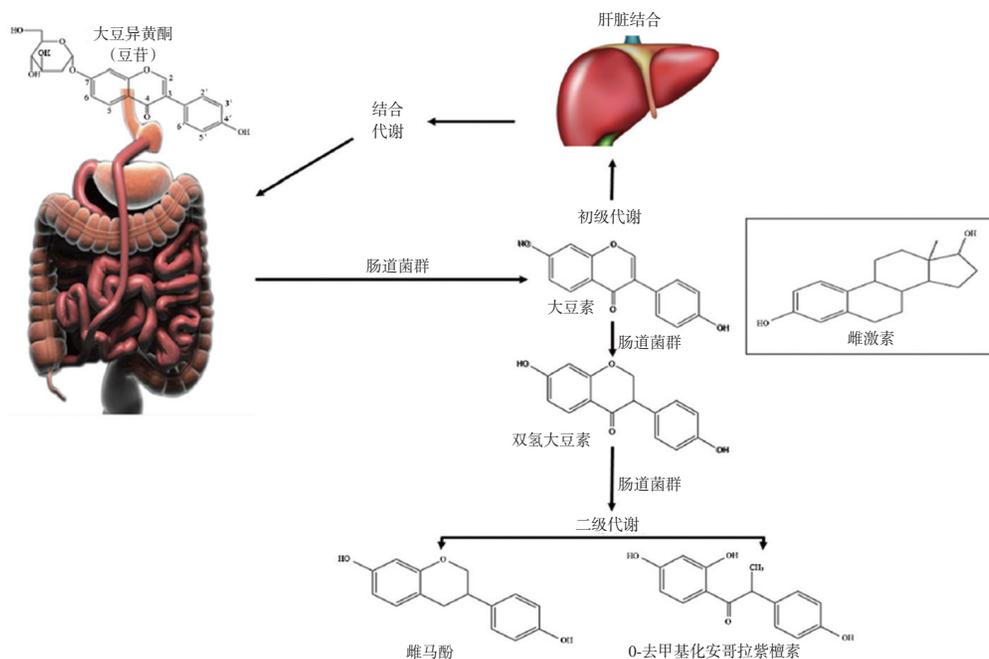


图2 大豆黄酮肠-肝循环代谢图^[20-22]

4 大豆异黄酮在动物养殖中的应用

关于大豆异黄酮对水产动物的作用一直存在争议。部分研究发现,饲料中添加高浓度的大豆异黄酮将导致鱼类的生长性能、存活率和消化能力降低。但也有研究表明,大豆异黄酮对鱼类的生长无显著的负面影响^[9, 23-24],而在鱼类抗氧化、生长与繁殖等方面具一定的促进作用^[10]。在人类和畜禽动物的研究中发现,大豆异黄酮具有调节繁殖性能、调节脂代谢、促生长、抗氧化及增强免疫力等重要的生理功能^[25-28]。由于其重要的生理功能,近几年,大豆异黄酮受到水产饲料业的广泛关注。部分研究表明,大豆异黄酮对水产动物起到增强抗氧化、促进生长发育、提高繁殖性能等作用。作用可能与大豆异黄酮的添加量、种类以及水产动物的品种、生长阶段和饲喂方式有关。

4.1 大豆异黄酮对动物抗氧化功能的影响

4.1.1 清除游离自由基

大豆异黄酮具有的抗氧化能力与其分子的结构密切相关,其分子中包含的多个酚羟基可以成为自由基的供氢体,并与有害金属离子螯合起到增强其与自由基结合的能力,从而起到清除自由基的作用^[29-30]。大豆异黄酮分子结构中羟基的数目和位置不同,其抗氧化活性也有显著差别。目前研究表明,C-4'位置的羟基发挥清除自由基的作用最为显著,C-5位置的羟基次之,而C-7位置羟基抗氧化活性最低,但具有增效作用^[30-31]。大豆异黄酮的代谢产物雌马酚,也可作为氢或电子的受体,能与自由基结合后随机体排出体外,清除自由基,其抗氧化活性要比其亲本化合物大豆黄酮高,因而在畜禽生产中运用于缓解动物的氧化应激^[17, 32-33]。有研究表明,饲喂大豆黄酮可以显著降低大菱鲆幼鱼血清中丙二醛(自由基作用于脂质发生过氧化反应的产物)的含量^[34]。也有研究表明,饲喂大豆异黄酮不仅能降低猪血清、肠道黏膜、骨骼肌等组织中丙二醛的含量,还能降低动物体内总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白水平,对血清脂蛋白、脂质表现出显著的抗氧化作用^[35-37]。

动物体内的金属离子往往在过氧化物分解过程中起催化作用,而大豆异黄酮具有的多酚羟基结构,可以螯合这些金属离子形成金属配合物,该

金属配合物清除自由基的能力更强,因而可以增强大豆异黄酮原有的抗氧化活性^[38]。体外试验表明,大豆黄酮及金雀异黄素可以与铁、锌、铜等金属通过络合反应得到相应的金属配合物,并且验证了该金属配合物抗氧化能力强于大豆异黄酮本身,可作为一类良好的自由基清除剂^[39]。另外,蒋守群等研究表明,金雀异黄素、大豆黄酮等大豆异黄酮均能改善骨骼肌细胞膜的流动性,提高骨骼肌细胞抵抗氧化损伤的能力^[40]。也有研究表明,当金雀异黄素和自由基并存时,金雀异黄素可以率先进入生物膜,降低生物膜内脂质的流动性,阻止自由基在生物膜上的扩散,进一步降低了自由基对机体造成的氧化损伤,即金雀异黄素除能清除自由基外,还能起到阻止自由基进入生物膜的作用^[41]。

4.1.2 提高抗氧化蛋白的活性及表达

大豆异黄酮能提高抗氧化酶蛋白的活性,通过机体内部完善的抗氧化酶防御体系清除自由基。陈伟等研究表明,高剂量的异黄酮能提高猪肌肉中超氧化物歧化酶(SOD)的酶活性,降低丙二醛含量及NADPH氧化酶的活性^[42-43]。在水产动物中,叶继丹等研究表明,大豆黄酮可以显著提高美洲鳎肝脏中SOD和酸性磷酸酶(ACP)的酶活性^[44];胡海滨等研究表明,在日粮中添加5、10和20 mg/kg的大豆黄酮均可显著降低大菱鲆幼鱼血清丙二醛的含量,并显著提高血清中SOD和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活力^[34]。陈效儒针对凡纳滨对虾的研究也表明,在饲料中添加20 mg/kg的大豆异黄酮(daidzein:genistein=1:1)能显著提高凡纳滨对虾血清中一氧化氮合酶(NOS)、SOD、酚氧化酶(PO)的活性^[45]。

大豆异黄酮在增加水产动物体内抗氧化非酶蛋白的含量方面也发挥着重要的作用。韩立明等研究表明,在育肥猪饲料中添加20 mg/kg的大豆异黄酮,能显著提高后背最长肌中金属硫蛋白的含量^[46]。金属硫蛋白是一类低分子量蛋白质,广泛存在于生物体内,具有与金属离子结合和清除自由基的能力,能对抗多种细胞器的应激反应,为细胞提供稳定的氧化还原环境,使细胞免受氧化应激损伤^[47-49]。早期研究表明,金属硫蛋白清除羟基自由基的能力是SOD的1万倍,清除氧自由

基的能力是GSH-Px的25倍^[50]。然而,大豆异黄酮对水产动物中金属硫蛋白的表达方面的研究至今尚未见报道。

4.2 大豆异黄酮对动物生长发育的影响

大豆异黄酮能显著促进动物的生长,并提高饲料转化率^[51-53]。程忠刚等研究表明,大豆黄酮能显著提高肥育猪的日增重,并显著降低料肉比^[54]。Cui等研究表明,大豆异黄酮能抑制脂多糖引起的仔猪空肠黏膜中p38和TLP4通路的激活,对仔猪肠道起抗炎作用,有助于维持仔猪肠道健康,从而提高仔猪的日增重及采食量^[55]。大量研究表明,对不同性别的动物添加大豆异黄酮后表现出的生长作用存在差异。Zanella等在雄性小鼠上的研究发现,金雀异黄素能促进脂肪组织的生长发育^[56]。王国杰等研究结果显示,大豆黄酮可显著提高雄性大鼠的日增重及血清睾酮、雌二醇、生长激素的含量,降低料肉比;而对雌性大鼠的影响表现出相反的结果,并且对去势雄性大鼠无显著影响^[57]。马海田也表明,不同种类的大豆异黄酮对雄性动物的促生长作用与睾丸的内分泌机能有关,其促生长作用机理主要是激活CAMP/PKA通路,促进睾丸间质细胞分泌睾酮,并抑制芳香化酶的活性,减少睾酮向雌二醇的转化^[58]。余祖功对奥利亚罗非鱼(*Oreochromis aureus*)饲喂10 mg/kg大豆黄酮,结果表明大豆黄酮可提高雄鱼的日增重及生长激素、甲状腺激素含量,但对雌鱼无影响^[59]。

目前,利用大豆异黄酮对鱼类生长的研究表明,低浓度的大豆异黄酮对鱼类生长有一定促进作用,高浓度的大豆异黄酮对鱼类生长则具有抑制作用。有研究报道,10 mg/kg大豆异黄酮(daidzein:genistein=1:1)对凡纳滨对虾的具有促生长作用,可能与其通过抑制生长抑素的分泌,来提高生长激素的含量有关^[45]。Pastore等对虹鳟鱼的研究也发现,大豆异黄酮(daidzein, 46.65%; genistein, 46.64%; glycitein, 6.71%)在500和1500 mg/kg添加剂量下不影响虹鳟鱼的繁殖和生长,并且对虹鳟鱼的脂质代谢有积极的效果^[60]。另一方面,有研究报道,高浓度的金雀异黄素能显著抑制罗非鱼生长,其通过抑制罗非鱼胃蛋白酶、胰蛋白酶、肝淀粉酶和肠淀粉酶等主要

消化酶的活性,干扰罗非鱼蛋白质和糖的代谢,从而降低罗非鱼对营养物质的转化和吸收来抑制罗非鱼生长;并通过抑制胰岛素样生长因子轴介导生长激素的促生长作用^[61]。但也有研究表明,无论是高剂量还是低剂量的金雀异黄素对Senegalese sole(比目鱼中的一种)免疫组织和细胞组织及分化都无显著的负面影响^[9]。

大豆异黄酮可能通过提高生长激素和睾酮水平起到促进鱼类生长的作用,但不同种类、不同剂量的大豆异黄酮对不同品种鱼的作用机理有待进一步研究。

4.3 大豆异黄酮对动物繁殖的影响

适量大豆异黄酮能促进生殖系统的发育,提高繁殖能力。大豆异黄酮主要是通过与垂体、下丘脑等处的雌二醇受体结合,影响机体的神经内分泌系统,进而提高血清中睾酮、生长激素和催乳素的浓度,从而提高繁殖性能^[58, 62]。有研究表明,大豆异黄酮能促进泌乳奶牛和母猪垂体中生长激素和催乳素分泌,提高泌乳性能^[63-65]。大豆黄酮也能提高豁眼鹅产蛋初期的蛋重、受精率和蛋品质^[66]。

有关大豆异黄酮对生殖系统的作用机制的研究大多集中于哺乳动物,在鱼类中相对较少。大豆异黄酮对鱼类繁殖性能的影响的主要表现为能提高鱼类血浆卵黄蛋白水平。有研究表明,金雀异黄素能增加鲈鱼血浆中卵黄蛋白原的水平^[67]。在虹鳟鱼发育早期阶段其内源性雌激素缺乏,补充金雀异黄素能诱导虹鳟幼鱼血浆卵黄原蛋白(VTG)水平的升高,促进缓卵母细胞的成熟^[68]。Zhang等研究也表明,适宜浓度的金雀异黄素促进青鳉鱼性激素的合成和释放,但随添加剂量的升高青鳉鱼性激素的合成和释放呈下降的趋势^[69]。Li等研究也表明,随着鲫鱼饲料中大豆黄酮水平的增加,血清中雌激素和VTG的浓度显著增加^[70]。由此表明,大豆异黄酮在促进鱼类生殖系统的发育、提高繁殖性能方面起一定的促进作用。

5 展望

目前,大豆异黄酮已被列为饲料添加剂使用到畜禽饲料中。试验结果表明,适量的大豆异黄酮对畜禽及水产动物的抗氧化、生长和繁殖性能起

一定的促进作用,但高剂量的大豆异黄酮可能会对动物的生产性能产生抑制作用,主要表现为拮抗体内内源激素的分泌,抑制相应组织的发育。大豆异黄酮在水产动物中的研究较少,并且主要研究了大豆黄酮和金雀异黄酮两个种类对水产动物的影响,有关不同种类的大豆异黄酮在不同品种水产动物体内的吸收代谢规律和生长繁殖的调控机理,及抗氧化作用机制尚不清楚。随着畜禽业和水产养殖业的快速发展,对饲料的需求量不断增大,对饲料的安全性及产品功效日益重视。豆粕的来源及产量相对丰富,且氨基酸含量均衡,适口性好;与鱼粉、肉粉等动物蛋白相比,不易被病原菌污染、易储存等优点,因此豆粕成为鱼粉替代品逐渐受到关注。而豆粕中富含大豆异黄酮对动物的抗氧化及健康发育方面起一定的促进作用,因此深入研究大豆异黄酮对动物生长性能的作用机制,并探究不同种类大豆异黄酮在不同动物应用中的适宜的剂量,将对养殖业的安全生产及其经济增效具有重要意义。目前,大豆异黄酮已被列为饲料添加剂使用到畜禽饲料中。试验结果表明,适量的大豆异黄酮对畜禽及水产动物的抗氧化、生长和繁殖性能起一定的促进作用,但高剂量的大豆异黄酮可能会对动物的生产性能产生抑制作用,主要表现为拮抗体内内源激素的分泌,抑制相应组织的发育。大豆异黄酮在水产动物中的研究较少,并且主要研究了大豆黄酮和金雀异黄酮两个种类对水产动物的影响,有关不同种类的大豆异黄酮在不同品种水产动物体内的吸收代谢规律和生长繁殖的调控机理,及抗氧化作用机制尚不清楚。随着水产养殖业的快速发展,对水产饲料的需求量不断增大,对水产饲料的安全性及产品功效日益重视。豆粕的来源及产量相对丰富,且氨基酸含量均衡,适口性好;与鱼粉、肉粉等动物蛋白相比,不易被病原菌污染、易储存等优点,因此豆粕成为鱼粉替代品逐渐受到关注。而豆粕中富含大豆异黄酮对动物的抗氧化及健康发育方面起一定的促进作用,因此,深入研究大豆异黄酮对水产动物生长性能的作用机制,并探究不同种类大豆异黄酮在不同水产动物应用中的适宜添加剂量,将对水产养殖的安全生产及其经济增效具有重要意义。

参考文献

- [1] 李小满. 大豆异黄酮分子结构、生物活性及其市场现状[J]. 中国食品添加剂, 2002, (02): 66-71.
- [2] 孙肖明, 孟宪梅, 宿甲子. 大豆异黄酮在畜禽生产中的应用及安全性研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(08): 2208-2213.
- [3] 陈燕, 严瑛. 国内外大豆异黄酮研究概况探讨[J]. 轻纺工业与技术, 2018, 47(09): 25-26.
- [4] 韩锋, 翟桂香. 大豆异黄酮及其水解研究进展[J]. 大豆通报, 2004, (04): 16-19.
- [5] 郁欢欢. 大豆黄酮、稀土壳糖胺螯合盐及酵母细胞壁在异育银鲫、花鲈饲料中的耐受性评价[D]. 硕士学位论文, 北京: 中国农业科学院, 2014.
- [6] HU Y J, GAO K G, ZHENG C T, et al. Effect of dietary supplementation with glycitein during late pregnancy and lactation on antioxidative indices and performance of primiparous sows1 [J]. Journal of Animal Science, 2015, 93 (5): 2246-2254.
- [7] 郭海燕, 张彦娇, 麦康森, 等. 染料木黄酮对大菱鲆生长、消化酶活力和肠道组织结构的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2014, 44(09): 30-36.
- [8] MAI K, ZHANG Y, CHEN W, et al. Effects of dietary soy isoflavones on feed intake, growth performance and digestibility in juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. Journal of Ocean University of China. 2012, 11(4): 511-516.
- [9] SARASQUETE C, ÚBEDA - MANZANARO M, ORTIZ - DELGADO J B. Effects of the isoflavone genistein in early life stages of the Senegalese sole, *Solea senegalensis*: role of the Survivin and proliferation versus apoptosis pathways [J]. BMC Veterinary Research, 2018, 14(1): 16.
- [10] AND K K, MALISON J A, REED J D. Effect of Genistein on the Growth and Reproductive Function of Male and Female Yellow Perch *Perca flavescens* [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1999, 30(1): 73-79.
- [11] KROON P A, FAULDS C B, RYDEN P, et al. Solubilisation of ferulic acid from plant cell wall materials in a model human gut system [J]. Biochemical Society transactions, 1996, 24 (3) : 384.
- [12] M H S. Identification of isoflavonoid metabolites in humans [D]. Doctoral thesis, Helsinki: University of Helsinki, 2006.
- [13] MUSTAFA S, MUSTAFA S E, ABAS F, et al. Optimization of culture conditions of soymilk for equal production by *Bifidobacterium breve* 15700 and *Bifidobacterium longum* BB536 [J]. Food Chemistry, 2019, 278: 767-772.
- [14] FRANKENFELD C L. Cardiometabolic risk and gut microbial phytoestrogen metabolite phenotypes [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2017, 61(1): 1500900.
- [15] SETCHELL K D R, ZHAO X, SHOAF S E, et al. The

- pharmacokinetics of s(-)-equol administered as SE5-OH tablets to healthy postmenopausal women[J]. *The Journal of Nutrition*, 2009, 139(11): 2037-2043.
- [16] RÜFER C E, KULLING S E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(8): 2926-2931.
- [17] 李燕, 蒋守群, 陈伟. 雌马酚的产生、生物学功能及潜在应用[J]. *动物营养学报*, 2014, 26(11): 3236-3244.
- [18] LEE D, KIM M J, AHN J, et al. Nutrikinetics of isoflavone metabolites after fermented soybean product (cheonggukjang) ingestion in ovariectomized mice [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2017, 61(12): 1700322.
- [19] ITSUMI M, SHIOTA M, TAKEUCHI A, et al. Equol inhibits prostate cancer growth through degradation of androgen receptor by S-phase kinase-associated protein 2[J]. *Cancer Science*, 2016, 107(7): 1022-1028.
- [20] 梁文欧, 赵力超, 方祥, 等. 大豆异黄酮与肠道微生物相互作用研究进展[J]. *食品科学*, 2018: 1-9.
- [21] RAFII F. The role of colonic bacteria in the metabolism of the natural isoflavone daidzin to equol [J]. *Metabolites*, 2015, 5(1): 56-73.
- [22] 李海亮, 邓颖, 王欣, 等. 肠道微生物代谢产物—S-雌马酚与人类健康关系研究进展[J]. *中国微生态学杂志*, 2018, 30(03): 362-367.
- [23] BENNETAU-PELISSERO C, BRETON B B, BENNETAU B, et al. Effect of genistein-enriched diets on the endocrine process of gametogenesis and on reproduction efficiency of the rainbow trout *oncorhynchus mykiss* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2001, 121(2): 173-187.
- [24] POLLACK S J, OTTINGER M A, SULLIVAN C V, et al. The effects of the soy isoflavone genistein on the reproductive development of striped bass [J]. *North American Journal of Aquaculture*, 2003, 65(3): 226-234.
- [25] MESSINA M. A brief historical overview of the past two decades of soy and isoflavone research [J]. *The Journal of Nutrition*, 2010, 140(7): 1350S-1354S.
- [26] NI Y, ZHU Q, ZHOU Z, et al. Effect of Dietary Daidzein on Egg Production, Shell Quality, and Gene Expression of ER- α , GH-R, and IGF-IR in shell glands of laying hens[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2007, 55(17): 6997-7001.
- [27] HELEN W, JAMES D O R, HERMAN A, et al. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F2 - isoprostane concentrations and increases resistance of low density lipoprotein to oxidation humans 1, 2, 3, American [J]. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, 72(2): 395-400.
- [28] 蒋守群, 苟钟勇. 肉鸡抗氧化应激营养调控研究新进展[J]. *中国家禽*, 2015, 37(15): 1-5.
- [29] 荣玉芝, 王正武, 吴金鸿, 等. 两种异黄酮化合物抗氧化活性的理论研究[J]. *食品与药品*, 2012, 14(09): 317-319.
- [30] 刘科梅, 聂挺, 潘栋梁, 等. 4种异黄酮抗氧化活性的构效关系[J]. *食品科学*, 2016, 37(23): 1-6.
- [31] 魏朝良, 于德红, 安利佳. 黄酮类化合物及清除自由基机制的探讨[J]. *中成药*, 2005, (02): 119-121.
- [32] SATHYAMOORTHY N, WANG T T Y. Differential effects of dietary phyto-oestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells[J]. *European Journal of Cancer*. 1997, 33(14): 2384-2389.
- [33] YOUSEFI J A, SUDAGAR M, BAHMANI M, et al. Comparative study of dietary soy phytoestrogens genistein and equol effects on growth parameters and ovarian development in farmed female beluga sturgeon, *Huso huso* [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2014, 40(1): 117-128.
- [34] 胡海滨, 刘金桃, 李彦先, 等. 饲料中大豆黄酮对大菱鲆生长、消化酶活力、抗氧化力及肠道结构的影响[J]. *水产学报*, 2014, 38(09): 1503-1513.
- [35] CLEVELAND B M, MANOR M L. Effects of phytoestrogens on growth - related and lipogenic genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2015, 170: 28-37.
- [36] JIANG Z Y, ZHOU G L, LIN Y C, et al. Effects of soybean isoflavones on in vitro antioxidative capacity of satellite cells of porcine skeletal muscles [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2011, 10(1): 120-125.
- [37] HUANG L, MA X, JIANG Z, et al. Effects of soybean isoflavone on intestinal antioxidant capacity and cytokines in young piglets fed oxidized fish oil [J]. *Journal of Zhejiang University-SCIENCE B*, 2016, 17(12): 965-974.
- [38] 向晖, 潘晓丽, 章从恩, 等. 金属微量元素的配合物在中药中的应用[J]. *中药与临床*, 2013, 4(05): 58-60.
- [39] 李月. 大豆异黄酮苷元—金属络合物的合成、表征及其抗衰老药理学活性的研究[D]. 硕士学位论文, 广州: 华南理工大学, 2016.
- [40] 蒋守群. 大豆异黄酮对岭南黄羽肉鸡生产性能、肉品质的影响和抗氧化作用机制研究[D]. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [41] ARORA A, BYREM T M, NAIR M G, et al. Modulation of liposomal membrane fluidity by flavonoids and isoflavonoids [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2000, 373(1): 102-109.
- [42] CHEN W, MA X, LIN Y, et al. Dietary supplementation with a high dose of daidzein enhances the antioxidant capacity in swine muscle but exerts pro-oxidant function in liver and fat tissues[J]. *Journal of animal science and biotechnology*, 2016, 7(1): 43.
- [43] 陈伟, 林映才, 马现永, 等. 饲料中添加高剂量异黄酮提高了肥育猪骨骼肌中的抗氧化能力[C]// 全国动物生理生化第

- 七届全国代表大会暨第十三次学术交流会, 2014.
- [44] 叶继丹, 陈学豪. 大豆黄素对美洲鳗生长及肝、肠组织中几种代谢酶活性的影响[J]. 集美大学学报(自然科学版), 2008(01): 1-6.
- [45] 陈效儒. 对虾与海参高效免疫激活物质的筛选与评价[D]. 博士学位论文, 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [46] 韩立明, 蒋宗勇, 周桂莲, 等. 大豆异黄酮对肥育猪抗氧化能力和肉质的影响[C]// 全国动物生理生化学术交流会, 2010.
- [47] LING X, WEI H, WANG J, et al. Mammalian metallothionein-2a and oxidative stress [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(9): 1483.
- [48] MENDEZARMENTA M. Brain regional lipid peroxidation and metallothionein levels of developing rats exposed to cadmium and dexamethasone [J]. *Toxicology Letters*, 2003, 144 (2): 151-157.
- [49] 宁凤, 傅俊江, 陈汉春. 金属硫蛋白及其生物学功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(09): 893-899.
- [50] SATO M, BREMNER I. Oxygen free radicals and metallothionein [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1993, 14(3): 325.
- [51] GREINER L L, STAHLY T S, STABEL T J. The effect of dietary soy genistein on pig growth and viral replication during a viral challenge [J]. *Journal of Animal Science*, 2001, 79(5): 1272-1279.
- [52] PAYNE R L, BIDNER T D, SOUTHERN L L, et al. Dietary effects of soy isoflavones on growth and carcass traits of commercial broilers [J]. *Poultry Science*, 2001, 80(8): 1201-1207.
- [53] 林厦菁, 蒋守群, 林哲敏, 等. 大豆异黄酮和抗生素对文昌鸡生长性能、肉品质和血浆抗氧化指标的影响[J]. 华南农业大学学报, 2018, 39(01): 1-6.
- [54] 程忠刚, 林映才, 余德谦, 等. 大豆黄酮对肥育猪生产性能的影响及其作用机制探讨[J]. 动物营养学报, 2005(01): 30-34.
- [55] ZHU C, WU Y, JIANG Z, et al. Dietary soy isoflavone attenuated growth performance and intestinal barrier functions in weaned piglets challenged with lipopolysaccharide [J]. *International Immunopharmacology*, 2015, 28(1): 288-294.
- [56] ZANELLA I, MARRAZZO E, BIASIOTTO G, et al. Soy and the soy isoflavone genistein promote adipose tissue development in male mice on a low - fat diet [J]. *European Journal of Nutrition*, 2015, 54(7): 1095-1107.
- [57] 王国杰, 韩正康, 陈伟华. 大豆黄酮对大鼠肌肉生长和几种内源激素水平的影响[J]. 动物学研究, 1995(01): 23-29.
- [58] 马海田. 异黄酮植物雌激素对动物生长及其吸收机理的研究[D]. 博士学位论文, 南京: 南京农业大学, 2005.
- [59] 余祖功, 夏德全, 吴婷婷. 大豆黄酮对奥利亚罗非鱼生长及相关激素水平、血液生化指标的影响[J]. 中国兽医学报, 2006(02): 183-185.
- [60] PASTORE M R, NEGRATO E, POLTRONIERI C, et al. Effects of dietary soy isoflavones on estrogenic activity, cortisol level, health and growth in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. *Aquaculture Research*, 2018, 49(4): 1469-1479.
- [61] 陈栋. 金雀异黄酮对尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)生长的影响及其机制研究[D]. 博士学位论文, 青岛: 中国海洋大学, 2013.
- [62] 韩正康. 异黄酮植物雌激素——大豆黄酮对雄性动物生长及其有关内分泌的研究[J]. 畜牧与兽医, 1999(01): 3-4.
- [63] 燕富永, 张磊, 刘志强, 等. 优质蛋白及大豆异黄酮对母猪乳质的影响[J]. 中国猪业, 2013, 8(08): 57-59.
- [64] 陈丰, 蒋宗勇, 林映才, 等. 大豆异黄酮对哺乳母猪生产性能及抗氧化性能的影响[J]. 饲料博览, 2010(8): 1-5.
- [65] 朱河水, 王月影, 王艳玲, 等. 大豆黄酮对奶牛泌乳性能及血浆中激素水平的影响[J]. 中国农学通报, 2006(05): 20-22.
- [66] 栾新红, 苏丹, 刘梅, 等. 大豆黄酮对产蛋初期豁眼鹅产蛋性能及蛋品质的影响[J]. 中国饲料, 2013(09): 27-29.
- [67] PINTO P I S, ESTÉVÃO M D, ANDRADE A, et al. Tissue responsiveness to estradiol and genistein in the sea bass liver and scale [J]. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 158: 127-137.
- [68] BENNETAU-PELISSERO C, BRETON B B, BENNETAU B, et al. Effect of Genistein - Enriched Diets on the Endocrine Process of Gametogenesis and on Reproduction Efficiency of the Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2001, 121(2): 173-187.
- [69] ZHANG L, KHAN I A, FORAN C M. Characterization of the estrogenic response to genistein in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2002, 132(2): 203-211.
- [70] LI Y, YU H, XUE M, et al. A tolerance and safety assessment of daidzein in a female fish (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Aquaculture Research*, 2016, 47(4): 1191-1201.

关于武宣县开展畜禽粪污综合治理的探讨

李顺芳, 翁梅悦, 蓝英, 李剑
(武宣县畜牧工作站, 广西 武宣 545900)

摘要:当前农村畜禽养殖多与民居错杂分布, 粪污配套处理设施滞后, 乡村养殖污染严重, 成为乡村振兴战略和生态文明建设的重要障碍。近年来, 武宣县科学引导养殖户通过粪污微生物处理和资源化利用, 有效解决了困扰养殖环节粪污处理问题。笔者就乡村畜禽养殖粪污综合治理进行归纳总结, 为推进乡村振兴战略提供探讨。

关键词: 畜禽粪污; 综合治理

中图分类号: S815 **文献标识码:** C **文章编码:** 1005-8567(2019)03-0021-02

畜禽养殖是农村群众解决生产、改善生活、脱贫致富的重要途径。随着社会经济不断提高, 农村畜禽养殖量迅猛增加, 养殖产生的粪污对农村生态环境的影响也越来越严重。对畜禽粪污进行综合治理与利用, 是推进乡村振兴战略与畜禽养殖业可持续发展的重要措施。

1 基本情况

武宣县地处广西中部, 交通便利, 是来宾市乃至广西的养殖大县, 也是全国生猪调出大县。2018年全县畜禽养殖场(户)达8.91万个, 年饲养生猪81.5万头、牛10.35万头、羊2.75万头、家禽389.62万羽。据调查统计, 全县养殖场户有35%未

配套粪污处理设施, 75%建有沼气池但因养殖过量、雨污不分、淤堵等大多无法正常使用, 65%排泄物没有得到无害化处理和资源化利用。养殖污染已经对当地的水资源造成影响。

2 对策

坚持“源头减量、过程控制、末端利用”原则, 开展粪污综合治理, 推进畜禽粪污资源化利用, 促进畜牧业绿色发展。

2.1 调查

对畜禽养殖场摸底调查, 理清养殖规模和现有配套设施使用、改造需求等情况, 掌握粪污资源化利用能力和潜力(见表1)。

表1 2018年规模场粪污处理设施调查统计表(单位:个、万头、羽)

种类	场数	年饲养量	设施完善场	设施不完善场	无设施场	有改造意向场	无改造意向场
猪	102	62.35	45	48	9	46	11
牛	73	2.14	4	38	31	47	22
羊	116	2.75	11	88	17	25	80
家禽	89	72.25	2	14	73	45	42
合计	380	139.49	62	188	130	163	155

收稿日期:2019-03-25

作者简介:李顺芳(1967-), 男, 广西壮族, 兽医师, 主要从事畜牧兽医工作。E-mail:lishunfang5978@163.com

2.2 加大政策及资金支持力度

《武宣县畜禽禁养区限养区划定方案》实施后,一是通过“以奖代补、先建后补”方式鼓励乡村内养殖场户搬迁到划定养殖区域内建设;二是对短期内没条件搬迁养殖场户,以引导方式加快粪污设施改造;三是创新运营机制,培育第三方畜禽粪污治理企业和社会化服务组织,形成专业化生产、市场化运作的畜禽粪污处理的产业,在资金、税收、用电、用地、技术等方面给予支持。2016年武宣县投入68万元,改造了56个规模养猪场的雨污分离、化粪池、集粪房等设施,2016~2018年多方统筹资金1000多万元建设高架网床1.6平方米,改造栏舍、节水控水设施、应用“微生物+”技术等61个场。

2.3 引导生猪养殖场户推广应用控水和微生物制剂等降污技术

一是大力推广嵌墙式饮水或安装控水器,让饮水滴漏与粪污实现净污分离,达到源头上减量;栏舍不冲水或尽量少冲水,达到过程中控制。二是推广利用微生物技术手段发酵饲料替代部分全价饲料,降低鲜粪残留氮含量,从源头上抑制臭源。三是通过定期喷洒除臭微生物制剂抑制环境腐臭。四是通过清淤、清塘、集中消纳和投放底泥微生物制剂或水质治理微生物,治理乡村公共环境内积存粪污污染。五是通过修建水肥发酵池,投放水肥一体化微生物制剂,将粪污水收集处理发酵成水肥,用于农业生产。

2.4 引导牛羊、家禽养殖场户推广应用微生物技术

一是利用微生物技术对牛羊饲草进行微贮、对家禽饲料进行发酵后饲喂,优化动物胃肠道菌群,提高饲料吸收率和增加机体抗病能力,降低饲料成本及鲜粪残留蛋白质含量,从源头上抑制臭源;二是利用粪便专用微生物与少量玉米粉拌均匀,再与木屑、农作物秸秆等材料拌均匀铺垫在栏舍里作垫料,堆沤发酵5~7天后,即可放入畜禽饲养,以后每10~15天喷洒一次微生物制剂,可有效解决栏舍氨氮异臭气味和尿液、污水外排。

2.5 引进具有畜禽粪污处理科技能力强且处理成功案例影响大的企业到武宣县建立试验示范基地

一是选择对新技术接受程度高、环境相对独立、排污恶臭问题典型、有一定容量粪污消纳池、配套有可种植牧草农地的养殖场作为示范场。二是按每头1.2 kg/d标准饲喂由企业提供的发酵饲料,以保证生猪正常饮水量为准,连喂14 d;对积存粪污进行微生物技术治理,具体按企业治理方案进行;按企业方案对养殖圈舍、粪污消纳系统和周边沟渠等进行微生物制剂除臭消毒。三是14 d试验期满后组织养殖代表观看示范场治理成效,参加技术专家专题讲座和示范养殖场业主经验介绍,推介新粪污处理技术。

2.6 落实养殖场户主体责任

养殖场户建立约束机制,对没有采取相应治污措施、群众反映较大、投诉较多的养殖场户坚决给予强制拆除。

2.7 强化科技支撑

加强绿色高效技术推广和技术培训,推进微生物技术手段在乡村畜禽养殖上的应用,为乡村振兴战略提供根本保障。

3 结语

3.1 畜禽粪污综合治理与利用,是畜牧养殖业持续健康发展的方向

随着社会进步和规模化养殖的不断发展人们对养殖污染控制标准要求越来越高,畜禽粪污是影响产业发展的最大障碍。党的十九大提出的乡村振兴战略已把畜禽粪污综合治理与利用纳入养殖污染治理的重要内容。

3.2 畜禽粪污综合治理与利用,关键在于政府部门的引导

通过政府出台政策,把畜禽粪污综合治理与利用纳入养殖污染治理的重要内容,引导养殖场户主动开展粪污资源化利用。

3.3 畜禽粪污综合治理与利用,关键在于发挥微生物的作用

畜禽养殖场消毒药的合理使用

李贞明, 余苗, 刘志昌, 容庭, 马现永*, 王刚*

(广东省农业科学院动物科学研究所, 农业部华南动物营养与饲料重点实验室, 畜禽育种国家重点实验室, 广东省畜禽育种与营养研究重点实验室, 广东省畜禽肉品质量安全控制与评定工程技术研究中心, 广东广州 510640)

摘要: 畜禽养殖场的消毒是疫病预防的主要方式之一, 旨在消灭外界环境中的病原微生物, 切断传播途径, 保护养殖场不受疫病的危害。但消毒药的使用在实际生产中出现不少问题, 只有科学有效的消毒才会有理想的效果。本文综述了消毒药的种类、影响因素和注意事项, 为畜禽养殖场对消毒药的选择与使用提供科学正确的参考依据。

关键词: 消毒药; 畜禽养殖场; 病原微生物

中图分类号: S815.9 文献标识码: B 文章编号: 1005-8567(2019)03-0023-04

Rational Use of Disinfectants in Livestock And Poultry Farms

LI Zhenming, YU Miao, LIU Zhichang, RONG Ting, MA Xianyong*, WANG Gang*

(Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences; State Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding; Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science in South China, Ministry of Agriculture; Guangdong Public Laboratory of Animal Breeding and Nutrition; Guangdong Engineering Technology Research Center of animal Meat quality and Safety Control and Evaluation, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Sterilization of large-scale farms is one of the main ways to prevent epidemics. The aim is to eliminate pathogenic microorganisms in the external environment, cut off transmission routes, and protect farms from diseases. However, the use of disinfectant has many problems in actual production, and only scientific and effective disinfection will have the desired effect. This paper summarizes the types, influencing factors and matters needing attention of disinfectants, and provides scientific and correct theoretical basis for the selection and use of disinfectants in livestock and poultry farms.

Keywords: disinfectants; livestock and poultry farms; pathogenic microorganism

随着畜牧业快速发展, 畜禽养殖日趋集中化。由于集中化养殖, 畜禽传染病发生的机率也越来越大, 因此, 做好畜禽养殖场的消毒工作尤为重要^[1]。但在实际生产中往往存在消毒药的选用不当, 消毒方式不规范, 消毒效果不理想等现

象^[2]。因此, 选择合适的消毒药, 使用科学规范的消毒方法对达到理想的消毒效果尤为重要。本文综述了消毒药的种类、影响因素和注意事项, 旨在为消毒药在畜禽养殖场中的合理应用提供参考依据。

收稿日期: 2019-03-26

项目来源: “龙发”种猪及高效健康养殖技术的示范推广(2017A004); 规模化猪场疫病智能防控系统研究与示范推广(JHXM2017003)

作者简介: 李贞明(1990-), 男, 山东临沂人, 硕士, 主要从事生态健康养殖研究工作。E-mail: lzm900120@163.com

*通讯作者: 马现永(1972-), 女, 山东日照人, 博士, 研究员, 主要从事动物营养与饲料科学研究工作。E-mail: maxianyong@gdaas.cn; 王刚(1968-), 男, 湖北人, 高级兽医师, 从事草食动物营养与繁育研究。E-mail: wanggang@gdaas.cn

1 消毒药的种类

1.1 酚类

酚类消毒药主要有甲酚磺酸、来苏儿(煤酚皂溶液)、“克辽林”(煤焦油溶液)和复合酚等^[3], 酚类消毒药具有高效广谱的杀菌效果, 可以杀灭细菌、霉菌、病毒和寄生虫等。其杀菌原理是, 酚类消毒药能够使病原微生物的蛋白质变性、沉淀, 也可以通过使氧化酶、脱氢酶以及催化酶等失去活性从而达到杀菌效果^[2]。此类消毒药有刺激性的气味, 对畜禽类的组织有一定的破坏作用, 不适合畜禽体表消毒, 可用于养殖空栏期的环境消毒^[3]。

1.2 醇类

醇类消毒药主要有乙醇、丙醇和丁醇等。主要用于动物的体表消毒。其杀菌原理是, 醇类消毒药可以使病原微生物脱水, 菌体蛋白凝固、变性, 从而达到灭菌的目的^[4]。使用最普遍的是75%的乙醇。

1.3 醛类

醛类消毒药主要有甲醛溶液(福尔马林溶液)、复方戊二醛和聚甲醛等, 醛类消毒药具有范围广和效果强的特点, 可以杀灭细菌、芽孢、真菌和病毒等^[3]。可用于畜禽养殖舍的熏蒸和喷雾消毒。其杀菌原理是, 醛类消毒药可以使病原微生物的蛋白凝固, 溶解病原微生物中的脂类; 也可以通过与病原微生物蛋白质中的氨基结合, 从而使病原微生物蛋白质变性, 从而达到消毒的效果^[4,5]。

1.4 碱类

碱类消毒药主要有氢氧化钠(火碱、烧碱、苛性钠)、苛性钾和氧化钙(生石灰)等。氢氧化钠因具有较强的腐蚀性不宜用于畜禽体表、车辆等金属消毒, 可用于发生疫情的场地表面和木制器具消毒; 生石灰配制成10%~20%的溶液, 可用于畜禽养殖舍表面(墙壁、地面), 养殖场门口或门口消毒池。此类消毒药杀菌原理是, 碱类中的氢氧根离子(OH⁻)能够水解病原微生物体内的糖类、蛋白质和核酸, 破坏酶系统和细胞结构, 影响机体正常代谢, 使菌体失活^[4,6]。因其具有腐蚀性, 所以在消毒后要用大量的清水清洗干净。

1.5 氧化剂类

氧化剂类消毒药主要有过氧化氢、过氧乙酸和

高锰酸钾等。氧化物类消毒药具有高效、迅速和广谱的杀菌的特点^[4]。过氧化氢和过氧乙酸需现配现用, 主要用于畜禽养殖舍环境消毒; 高锰酸钾作为消炎消毒药, 可用于畜禽表面损伤和溃疡处, 也可作为除臭剂和水质净化剂。此类消毒药的杀菌原理是, 氧化物类消毒药可直接作用于菌体蛋白的氨基和羧基等基团上, 破坏菌体的细胞结构; 另外, 氧化物类消毒药通过氧化作用破坏细菌代谢的必需物质, 使病原微生物代谢失衡, 达到杀菌的效果^[3,4]。

1.6 卤素类

卤素类消毒药主要有二氯异氰尿酸粉和二氯异氰尿酸粉等。其具有使用方便、安全及高效广谱的抗菌特点, 主要用于畜禽养殖场环境、器具和车辆等消毒。此类消毒药的杀菌原理是, 通过氧化反应、卤代反应以及分解反应来破坏病原微生物的细胞结构, 使菌体的蛋白质变性, 酶系统紊乱, 从而使病原微生物灭亡^[3]。

1.7 表面活性剂类

表面活性剂类消毒药主要是指季铵盐类, 是合成的有机化合物, 主要有单链和双链季铵盐两类。单链季铵盐主要有苯扎溴铵溶液(如新洁尔灭)、十二烷基二甲基苯氧基溴化铵(如度米芬)和十四烷基二甲基吡啶溴化胺(如消毒净); 双链季铵盐主要有双十烷基二甲基氯化铵(如百毒杀)。表面活性剂类消毒药具有杀菌能力强、性质稳定以及毒性小等特点^[7], 可用于畜禽养殖场中器具及环境的消毒。其杀菌原理一是, 表面活性剂类消毒药降低细菌的表面张力增加了细胞壁和细胞膜的通透性使菌体破裂, 细菌死亡; 二是, 表面活性剂类消毒药高浓度的聚集在细菌的表面, 影响细菌的新陈代谢; 三是, 表面活性剂类消毒药可以穿透细胞进入细胞内部, 变性蛋白质, 灭活脱氢酶、氧化酶及能量代谢的酶系统^[5,8]。

2 消毒药的影响因素

2.1 病原微生物的种类

不同的病原微生物和不同阶段的病原微生物对消毒药的敏感性不同, 所以在消毒之前要确定好消毒对象^[9]。大部分消毒药对细菌均有杀菌能力, 但有部分消毒药对芽孢、病毒的消毒能力就很

弱^[2]。比如,碱类消毒药对芽孢就没有杀伤力;表面活性剂类消毒药对病毒的杀伤力就很弱^[3]。

2.2 浓度与作用时间

消毒药的浓度直接影响着消毒效果,一般来说,消毒药的浓度越大,消毒效果越好。但凡事都有例外,比如,用乙醇消毒,并不是浓度越高越好,75%的乙醇比95%的消毒效果要好,因为95%的乙醇与病源微生物蛋白作用形成了一层保护膜,使乙醇无法渗透进入到病源微生物体内发挥作用^[10]。

消毒药的效果与消毒的时间有着紧密的联系,一般来说,消毒时间越久,消毒效果越好^[1]。每种消毒药都有一定的消毒时间,只要实际消毒时间达到了消毒药所需的作用时间,那么消毒效果会发挥最佳效果^[2]。

2.3 温度

一般情况下,消毒药的效果和温度呈正比例关系,也就是说,温度越高消毒效果越好。经测定,温度每升高10℃,消毒药的效果就提升1~2倍^[10]。但部分消毒药在高温条件下会出现挥发,分解等现象,减弱消毒效果^[11]。因此,在消毒时必须根据消毒药的性质来确定最适的温度。

2.4 环境因素

消毒药的使用也受环境的影响,比如环境中有机物的存在,环境PH的大小等都影响着消毒药的效果。因为大多数消毒药和蛋白质或多或少的都会有一定的亲和力,环境中的有机物过多会引起消毒药与其结合,减弱消毒药的作用效果;而且,环境中存在大量有机物,在一定程度上,对病源微生物起到了机械保护的作用,致使消毒药难以与病源微生物接触^[3, 10]。

环境的PH对部分消毒药起着明显的限制作用,比如,苯甲酸和含碘类消毒药在碱性环境中,杀菌效果减弱;酚类和次氯酸盐消毒药在酸性环境中杀菌效果较强;戊二醛和季胺盐类消毒药在碱性环境中,杀菌效果较强^[1, 12]。

2.5 消毒方法

若要消毒药达到理想的消毒效果,必须科学选择消毒方法,否则事倍功半。消毒方法主要有喷洒、冲洗、浸泡、熏蒸消毒等。根据消毒药自身的特点,选择合适的消毒方法,才能使消毒效果达到

最佳^[3]。

3 消毒药的合理使用

3.1 消毒药的选择

选择消毒药要考虑其应具有广谱的抗菌活性、对人畜无害、对环境无污染、对设备无破坏性以及动物体内不会积累等特点^[5, 13]。在消毒之前要明确消毒对象,是带畜禽消毒,还是环境消毒。带畜禽消毒,需选用对动物体伤害小或者没有伤害的消毒药,比如75%乙醇、过氧乙酸、有机氯制剂等。环境消毒,可选用福尔马林、苛性钠、表面活性剂等消毒药。

3.2 科学的配制及配伍

配制消毒药选用含杂质少的水,杂质多会降低药效,水质硬会分解消毒剂,从而影响其消毒能力^[10]。同时,需按照消毒药的说明书进行配制,根据消毒面积配制一定量的消毒药;消毒药需现配现用,当天用完^[1, 3]。

消毒药科学合理地配伍,可提高消毒药的作用效果。比如,用75%乙醇作为溶剂配制季铵盐类消毒药,其消毒效果优于水做溶剂配制的消毒药;戊二醛和环氧乙烷的配合使用具有协同效应,可提高消毒效果^[9, 10]。

配制消毒药同时需注意配伍禁忌,不可随意配制,否则,消毒药之间可能会发生拮抗反应降低消毒药的效果,甚至有些消毒药同时使用会产生有害气体,对畜禽产生毒害作用。酸类消毒药不宜与碱类消毒药配伍,酚类消毒药一般不宜与碱类、卤素类、氧化物类的消毒药等配伍,表面活性剂类消毒药不能与卤素类、氧化物类配伍等^[10]。

3.3 规范的消毒程序

畜禽养殖场消毒之前,首先,做好卫生工作,清扫养殖场的环境卫生,做到没有卫生死角,保证消毒药能够与病源微生物充分接触,没有消毒死角;其次,按照由上往下、由高到低和由内到外的原则进行消毒;最后,畜禽养殖场的消毒次数及连续性,无疫情的情况下,一月消毒4次,每次更换不同的消毒药,有疫情的情况下,在第一周每天两次,后期每天一次,在重大疫情发生时,要按照规定进行严格消毒^[2, 14]。另外,消毒药需定期更换,否则消毒药的效果会下降,甚至会无效^[2, 15]。

3.4 做好安全防护工作

消毒时需做好防护工作, 比如, 配制生石灰时, 防止石灰粉落入眼中; 漂白粉消毒时, 防止呼吸道炎症; 氢氧化钠消毒时, 防止氢氧化钠接触到皮肤, 灼伤皮肤; 卤素类消毒药, 防止其对皮肤、黏膜具有刺激性; 密封环境中用甲醛和高锰酸钾熏蒸消毒时, 要选用金属容器, 防止火灾^[4, 9]。另外, 消毒后要及时通风、清洗, 清理料槽、水槽等环境中的消毒药。

4 小结

消毒是一项“预防为主”的基本措施。消毒药的选择及消毒工作的实施, 需根据畜禽养殖场的自身需求进行。选用消毒药的过程中, 需明确消毒药的性质, 根据消毒药的说明进行合理的配制, 选用正确的消毒方法, 注意各种因素对消毒药效果的影响, 防止消毒药在使用过程中和使用后对人、畜禽及环境设施等的伤害。在消毒过程中, 畜禽养殖场应逐步建立完善的消毒制度, 消毒制度不可能随意改动, 可根据具体的消毒情况进行合理的改进和完善。完善的消毒制度可使畜禽养殖场在消毒预防方面取得良好的效果, 降低畜禽养殖场的损失。

参考文献:

[1] 康瑞春. 如何正确使用兽用消毒剂[J]. 新农村, 2012, 7

(上): 186.

- [2] 彭国瑞, 彭小兵, 蒋玉文, 等. 兽用消毒药的种类及其在养殖场中的合理使用[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(2): 67-69.
- [3] 冯忠武. 合理选择和安全使用兽用消毒剂[J]. 中国畜牧杂志, 2006, 42(21): 60-61.
- [4] 赵刚. 兽用消毒药分类及使用方法简介[J]. 湖北畜牧兽医, 2014, 5, 35(5): 56-58.
- [5] 王春表, 黄春法, 赵华鑫. 浅谈规模畜禽养殖场消毒预防技术[J]. 畜禽业生产指导, 2007, 8(220): 18-19.
- [6] 齐淑波. 畜禽常用的酸、碱类消毒药及其使用注意事项[J]. 养殖技术顾问, 2014(2): 221.
- [7] 邱梅, 郝智慧, 庞云露, 等. 国内外兽用消毒剂的研究现状与发展趋势[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(6): 43-47, 60.
- [8] 马靓, 李宽阁, 窦春旭. 常用的酚类与表面活性剂类环境消毒药[J]. 养殖技术顾问, 2014(3): 227.
- [9] 李文平, 秦玉明, 侯向辉, 等. 兽用消毒药在畜禽养殖中的合理使用及注意事项[J]. 中国兽药杂志, 2010, 44(8): 57-60.
- [10] 王斌斌, 温黎俊. 规模化养殖场消毒剂的正确选择和使用[J]. 湖北畜牧兽医, 2009(11): 18-19.
- [11] 夏永高, 孙立彬, 李钦, 等. 畜禽饲养场日常消毒应注意的主要问题[J]. 中国家禽, 2006, 28(29): 36-37.
- [12] 张成. 影响消毒药使用效果的因素[J]. 养禽与禽病防治, 2003(4): 16.
- [13] 段渊. 畜禽养殖消毒要点[J]. 四川畜牧兽医, 2015, 1(293): 45.
- [14] 夏让旭. 畜禽消毒药的选择应用及滥用危害[J]. 福建畜牧兽医, 2005, 27(2): 61.
- [15] 曹平. 消毒药在家禽生产中的应用[J]. 中国家禽, 2006, 28(7): 32-35.

上接第23页

节水控量、设施设备仅仅是畜禽粪污综合处理与利用的基本要求, 唯有充分发挥微生物的作用, 才是最终解决养殖污染的技术手段。

3.4 畜禽粪污综合治理与利用, 必须发挥政府资金的扶持作用

畜禽粪污综合治理, 需要投入一定量的资金, 通过政府出台资金扶持政策, 激发畜禽养殖场户、第三方积极参与养殖粪污处理设施设备的改造和

建设, 利于助推粪污资源化利用的进程。

多年的工作实践证实, 改造建设完善好配套的粪污处理设施且在饲料、饮水、栏舍环境、粪污等环节全程使用益生菌, 不但解决乡村畜禽养殖粪污对环境造成的污染, 也为畜禽粪污的资源化利用以及畜禽产品的品质和安全提供了保障, 经济效益、生态效益、社会效益显著。

当前畜禽粪污资源化利用及湛江地区的现状

刘伟超

(湛江市畜牧技术推广站, 广东 湛江 524000)

摘要:养殖业粪污产量大, 利用率低, 因此畜禽粪污资源化利用是养殖水平提升和美丽乡村建设的必由之路。当前粪污资源化利用还存在缺技术、缺装备、缺效益等诸多产业瓶颈, 但是坚持绿色生态的导向, 推进种养结合、循环发展和市场化运作的处理模式, 是可行的处理理念。本文通过了解我国当前粪污资源化利用工作现状, 总结可操作的解决方案和发展建议, 以期为湛江乃至广东省畜禽粪污资源化利用提供借鉴。

关键词: 畜禽粪污; 资源化利用

中图分类号: S815 **文献标识码:** B **文章编码:** 1005-8567(2019)03-0027-05

Resource Utilization of Livestock And Poultry Manure And the Current Situation in Zhanjiang

Liu Weichao

(Zhanjiang Animal Husbandry Technology Extension Station, Zhanjiang, Guangdong, 524000)

Abstract: The production of livestock and poultry wastes is huge; however, its utilization rate is low. Therefore, the resource utilization is the only way to improve the breeding level and build beautiful countryside. At present, there are many industrial bottlenecks in the utilization of live-stock and poultry wastes, such as lack of technology, equipment and efficiency. However, it is a common treatment idea to adhere to the guidance of green ecology, promote the combination of cultivation and cultivation, cyclic development and market-oriented operation. Through understanding the current situation of the utilization of livestock and poultry wastes in China, this paper summarizes the feasible solutions and developed suggestions, in order to provide reference for the utilization of livestock and poultry wastes in Zhanjiang and even in Guangdong Province.

Keywords: Livestock and poultry wastes; Resource utilization

畜禽粪污资源化利用是指在畜禽粪污处理过程中, 通过生产沼气、堆肥、沤肥、沼肥、肥水、商品有机肥、垫料、基质等方式进行合理利用。其基本原则应坚持农牧结合、种养平衡, 指导思想是资源化、减量化和无害化, 实施要点是源头减量、过程控制和末端利用^[1]。畜禽粪污资源化利用是当前养殖业面临的重大课题, 也是建设美丽乡村的迫

切需要。然而, 在实际生产过程中, 由于养殖品种、养殖模式和养殖规模的限制, 综合利用配套技术的短缺或者缺陷, 导致中小养殖企业和养殖户对配套技术方案的接受度低, 利用效果有限。本文就当前畜禽粪污资源化利用中的现状和措施进行总结归纳, 以期能够为湛江畜禽粪污资源化利用提供参考。

收稿日期: 2019-02-15

作者简介: 刘伟超(1982-), 男, 广东阳江人, 本科生, 畜牧师, 主要从事畜禽养殖技术研究。E-mail: 314833435@qq.com

1 畜禽粪污污染严重

1.1 粪污产量大

数据显示,2017年我国全年猪牛羊禽肉产量8431万吨,比上年增长0.8%^[2]。作为全球畜牧业生产大国,粪污产量也不容小觑。据第一次全国污染源普查结果显示,畜禽养殖业粪便产生量2.43亿吨,尿液产生量1.63亿吨。主要水污染物排放量中的化学需氧量1268.26万吨、总氮102.48万吨、总磷16.04万吨、铜2397.23吨、锌4756.94吨,分别占农业污染源排放总量的96%、38%、56%、98%、94%^[3-4]。当前,我国每年畜禽粪污产量约38亿吨^[5],但综合利用率不足60%^[6]。更为严重的是,近14%的粪污直接排入水体和土壤^[5],对生态环境造成了严重污染。据统计,湛江市2016年生猪出栏量约330万头,年末存栏量约188万头;三鸟出栏量7089万只,年末存栏量约2441万只^[7]。在仅计算生猪和三鸟出栏量的情况下,按照生猪排泄粪便平均2.5 kg/(头·日),尿液平均5 kg/(头·日)(平均养殖时间180天计);家禽产粪便120 g/(只·日)(平均养殖时间50天计)进行计算,湛江市每年生猪粪便产生量为148.5万吨,尿液297万吨;禽类粪便42.5万吨^[8]。加之当前湛江地区养猪多采用水冲粪模式,甚至有些小型猪场采用直排模式,其日污水排放量上升至约30 kg/头^[9],污染物的产生量增加了近4倍,对生态造成不可估量的影响。

1.2 疫病传播风险和抗生物污染风险高

当发生动物疫病时,粪污污染物常常作为重要的污染源被忽视。研究表明,在禽流感、新城疫、猪繁殖与呼吸综合征发生时,养殖场周边的苍蝇都可能通过机械传播的方式传播病毒,病毒在苍蝇体内存活时间可高达10天^[10-12]。此外,污水中的细菌和寄生虫卵也不容忽视。养殖场所排放的每毫升污水中平均含33万个大肠杆菌和66万个肠球菌;沉淀池内每升污水中蛔虫卵和毛首线虫卵分别高达193.3个和106个^[9]。粪污和污水不仅会孳生蚊虫,而且还是重要的传染源,为疫病的发生和发展推波助澜。此外,许多药物添加剂随畜禽粪尿排出体外,若未经有效处理就用作肥料,不但

污染环境,也会对人畜产生毒副作用。资料显示,约有30%~90%的抗生素不能完全被动物吸收,随着畜禽粪尿排出体外,导致畜禽粪污成为环境中抗生素污染的重要来源^[13]。即使采用发酵等方式处理,降解效果依然不理想。

1.3 造成空气质量下降

首先在养殖区内二氧化碳、氨气等浓度会出现不同程度超标^[14]。而粪污在微生物的作用下,产生硫化氢、粪臭素、胺类和氨气等有害气体,可达230多种,严重降低养殖场内空气质量,危害人畜的健康^[15-16]。

2 畜禽粪污资源可观

畜禽粪污是“放错了地方的资源”,加以利用后不仅能够产生沼气等清洁能源,还可以加工成有机肥。过去,以畜禽粪便为主的有机肥是农作物、果树等经济作物的主要养分来源之一。随着农牧结合的传统种植模式被化肥使用模式所取代,粪污还田被限制,最终导致土壤的真实肥力不断下降,化肥使用量与产量之间失衡的恶果。研究显示,每年畜禽养殖粪污可提供养分约3463万吨,约占全国氮、磷、钾化肥使用总量的63%^[17],资源总量可观。

3 当前现状及需求

3.1 我国畜禽粪污资源化利用的主要症结

一是缺乏适宜的配套技术,难以适应不同养殖模式、养殖品种和养殖规模的需求;二是缺乏经济的装备设施,投资大;三是缺乏良好的经济效益,处理企业不受益,种植企业不积极^[18]。从目前国内外畜禽养殖废弃物利用的现状来看,其主要处理方式有粪污还田、腐熟堆肥法、沼气发酵法和生物分解法等。其中,堆肥发酵和沼气发酵技术相对比较成熟,是当前粪污资源化利用的主要方式^[19]。粪污收集还田利用在北方较为合适,但广东较少使用,专业化能源利用和异位发酵床是广东省主推的模式。针对不同养殖群体,需要采取不同处理策略。固体粪便肥料化利用,这种模式主要针对家禽养殖,产生的废弃物以固体粪污

为主。粪便垫料回用,主要是奶牛或者肉牛养殖场所采用的粪便资源化利用模式。中小规模养殖户可以采用水肥一体化模式,对粪污无害化后还田^[20]。

3.2 资源化利用的主要障碍

实际上,资源化利用最根本的还是市场。尽管国家进行了引导,但成效尚不显著。尤其是以绿色发展为导向的农业补贴政策未系统化形成,而传统农业所追求的重产轻质,短期效益最大化仍然没能从根本上扭转。在养殖大省,一个重要问题是种养分离^[21]。养殖业和种植业常常是两个单独的主体,二者联系不紧密,信任度不足;产品获得和使用不便等客观原因也是利用不足的原因之一。加之行业内对粪污还田的标准体系不完善,相关制度欠缺,且缺乏相应的技术规范指导^[22],因此在粪污资源化利用的实际操作上仍然存在不少主观和客观的障碍。

3.3 湛江市粪污处理的现状

湛江是农业大市,粪污资源化利用需求大。调查走访发现,生猪粪污资源化利用率低,多数是直排,污染面大。大型养猪场政策执行度高,环保意识到位,粪污集中处理,通过干湿分离、沼气池、氧化塘等多种手段完成。然而在湛江地区4000余户登记在册的养殖企业中,不足千户为规模化企业。小而散的养殖模式造成了处理方式的落后和随意。一般小型养猪场采用水冲粪或水泡粪,用水量大,直排占比超过90%。沼气池多为摆设或者容量不足,氧化塘通常为自家鱼塘,常富营养化。大型养鸡场的粪污处理多制成有机肥,受欢迎程度高,利用度高。鸽粪和鸭粪多用于养鱼,但小型散养户多为自行处理,存在随意堆放等二次污染问题,尤其是在雨季。此外,在有机肥加工过程中,其肥效和氮磷比例等需要平衡和检测,这一方面企业重视程度不足,多依靠经验。尤其是在畜禽粪污还田时应以磷为基准计算耕地养分容量和粪污还田量,氮素不足的部分应补充额外的氮源以满足作物需求^[23]。另外,处理设备个性化程度不高,投入大也是一个突出问题。大型养禽场一般使用履带刮粪板,但一些存在设计缺陷。如

刮粪板缺边易造成粪便外漏,尤其是水线漏水后,水粪外流造成的污染。而集中收集处无封闭式设备,粪污大量堆积,孳生蚊虫,难以清理,二次污染突出。加之处理设备造价高,经济实力不足的企业往往无力负担。湛江当地多数养殖场并没有足够的场地来消纳粪污,即使经过氧化塘处理后用于养鱼也容易出现富营养化。此外,养殖加工的废弃物处理,如下脚料等也是非常棘手的问题。一些企业通过饲养鳄鱼消纳的方式,但总量有限,对水环境污染仍然比较严重。总而言之,湛江市当前畜禽养殖废弃物资源化利用仍然处于发展阶段,亟需开发或引进适用本地的处理技术。

3.4 湛江市粪污处理的需求

目前湛江最迫切的需求有如下五点。一是针对当前养殖模式,养殖栏舍急需改造,符合现代粪污处理模式。比如漏缝地板加刮粪板的设备用于制备沼气或者异位发酵床。二是在当前粗放养殖条件下,急需源头减量。需要从易消化饲料和清理粪污的方法上同时着力。三是设备成本太高,急需能耗低,不添加化学药剂的简易粪污处理设备,方便养殖场使用。四是粪污处理的先进技术和方法,尤其是粪污处理过程中和有机肥制作过程中的臭味控制技术。五是粪污处理前后运输过程中存在的污染问题,急需管道化建设技术。

4 参考措施

4.1 完善制度

遵循法律法规的基础上,完善畜禽养殖污染治理的制度体系,制定可操作的细则。加强环保执法,强化社会监督,对违纪违规养殖户、养殖场依法严格处理,增加违法成本,使得相关从业人员从根本上重视环保工作^[24-25]。将水源、场内设施、处理设施等场地建设要素以及饲料添加剂和兽药等排泄相关物要素纳入源头管理。

4.2 源头减量,合理利用

研究表明,养殖场粪污排放量与饮水设施和清粪方法成显著正相关^[26]。因此从源头上减量首先要在养殖场建立管网系统,实现雨污分流、粪污干湿分离。同时饲喂低蛋白和合成氨基酸饲料,

辅以各类酶制剂有效减少氮磷排放。通过一系列处理,可从源头上减少粪污产量的70%~80%^[27]。在利用模式上也要区别对待,如北方地区利用牛羊粪便堆积晾晒后,将粪便原料、复合发酵菌剂与秸秆粉等辅料预发酵后再进行条垛式好氧发酵。经腐熟晾干后进行后熟发酵制成有机肥。养殖场的污水经固液分离机分离后,上清液经曝气加氧等多级处理后,就近还田利用^[28]。这一方法在北方较为实用,但到南方潮湿多雨的季节就较难实施,需要额外配备设备才能保证晾晒和发酵的效果。因此,南方地区需要结合自身气候特点,在养殖场广泛采用干清粪模式和发酵床模式。通过及时补充菌种,控制水分和温度,在合理通风和搅拌的前提下,制备成物美价廉的有机肥。此外,还应该考虑将不同农作物及蔬菜、果树的营养需要,加入适量的化肥等制成专用型有机无机复合专用肥^[29]。畜禽规模养殖场宜采用干清粪工艺。粪便含水量低的鸡粪和鸽粪可通过发酵床等工艺进行处理。而采用水泡粪工艺的,最好改造为干清粪,通过干湿分离,雨污分离进行处理。

4.3 推进绿色兴牧,种养结合

不搞“一刀切”的懒政行为,按照不同养殖区域划分情况,通过农牧结合加快粪污资源化利用进程。调查显示,湛江市规模以下养殖场所占比重超过80%,分布广泛,点多面广,监管难、治理难。这类养殖场多数证照不齐全,资金实力不足,即不愿意投入较多资金新建粪污处理设备,也无法得到政府财政资金的资助。因此,这类养殖场可采用干湿源头分离、圈舍雨污分流,粪污腐熟发酵后还田的办法。针对大型养殖场制备的沼液体积大、养分含量较低、臭味大的缺陷,有学者建议采用吸附或者鸟粪石结晶的手段将发酵后沼液中的氮磷以缓释肥的形式还田^[30],避免沼液直接还田造成的环境风险。在适养区范围内的养殖场,尽量布局在规模化种植区附近。依据种植区分布规划养殖布局,最大程度减少种养结合过程中的养分损失、粪肥运输及劳动力成本。就近还田的过程中还应该加强粪污科学还田技术指导。以作物营养平衡为核心,通过评估土地氮、磷养分需求总

量和粪肥养分可利用量,对不同土壤类型、不同作物类型及不同种植方式下的施肥结构和技术参数进行分析整理,指导各地开展畜禽粪肥科学还田,并提出符合区域环境特征的养殖污染防治适宜技术^[31]。

4.4 生物利用

利用畜禽粪污养殖蝇蛆、蝇蛹、蚯蚓、水蚕和培育浮游生物等作为蛋白饲料或者养鸡养鱼也是资源化利用的方法之一^[16]。目前研究较多的是畜禽粪污养殖蝇蛆、黑水虻等^[32-34],但各有优缺点。家蝇蛆虫是良好的动物蛋白原料,鲜蛆的粗蛋白含量约19%,干蛆的粗蛋白含量约61%,氨基酸总量中的必需氨基酸百分含量可达43.83%^[32]。黑水虻幼虫粗蛋白质占干重的42%~44%^[33]。家蝇的饲养温度为24~33℃,湿度为50%~80%,如果利用昆虫处理,需要从养殖源头上避免饲喂添加环丙氨嗪的饲料,以避免后期粪污处理中昆虫养殖的失败。昆虫生物利用虽然已经取得了一定进展,但尚未形成标准化操作流程^[32],推广难度大。一个共性的问题是,粪污在生物利用过程中仍然存在不良气味,昆虫产卵盘垫料成本较高,取卵工序繁琐,饲养密度难以精准把控,湿度和温度需要加以控制^[32],管理不善甚至可能通过昆虫传播疾病。

5 展望

粪污处理是当前养殖业面临的重大课题,同时也是一大难题。畜禽粪污资源化利用是治理畜禽养殖污染的根本途径,关乎全面建成小康社会,关乎生态文明建设,关乎广大人民群众切身利益,是重大的民生工程 and 民心工程。湛江市通过政策引导、资金支持、技术引进、示范带动等多方面举措,目前畜禽粪污资源化利用正在扎实推进。通过专业化能源利用、异位发酵床、污水肥料化利用、污水达标排放等多种利用模式,以绿色生态为导向,推进种养结合、循环发展等可复制的低成本处理模式,坚持市场化运作,建立可持续运营的长效机制,最终形成绿色、健康、循环的粪污资源化利用链条,助力美丽乡村建设。

参考文献

- [1] 农业部. 畜禽规模养殖场粪污资源化利用设施建设规范(试行)[Z]. 2018年1月5日.
- [2] 国家统计局. 中国2017年国民经济和社会发展统计公报[Z]. 2018年2月28日.
- [3] http://www.gdagri.gov.cn/zxpt/nyyw/201703/t20170322_583638.html[Z].
- [4] 刘明, 黄荣, 李明, 等. 畜禽粪污处理技术标准现状研究[J]. 标准实践, 2017, (12): 40-45.
- [5] 张绪美. 中国畜禽养殖及其粪便污染特征与发展趋势分析[D]. 南京: 中国科学院南京土壤研究所, 2008.
- [6] 武淑霞. 我国农村畜禽养殖业氮磷排放变化特征及其对农业面源污染的影响[D]. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2005.
- [7] 广东农村统计年鉴编辑委员会. 2017广东农村统计年鉴[M]. 293-300.
- [8] 咎林森, 莫泽山. 集约化养殖场粪污蚯蚓处理效果研究[J]. 中国农学通报, 2007, 23(10): 72-76.
- [9] 聂小想, 郝胜楠. 畜禽粪污生物净化及资源化利用模式探讨[J]. 山东畜牧兽医, 2015, 36: 48-49.
- [10] CHAKRABARTI S, King DJ, Afonso C, et al. Detection and isolation of exotic Newcastle disease virus from field-collected flies [J]. Journal of medical entomology, 2007, 44(5): 840-844.
- [11] SAWABE K, HOSHINO K, ISAWA H, et al. Detection and isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004 [J]. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 2006, 75(2): 327-332.
- [12] ROCHON K, BAKER RB, ALMOND GW, et al. Persistence and Retention of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Stable Flies (Diptera: Muscidae) [J]. Journal of medical entomology, 2015, 52(5): 1117-1123.
- [13] 潘寻, 韩哲, 李浩. 抗生素在畜禽养殖业中的应用、潜在危害及去除[J]. 农业环境与发展, 2012, 29(5): 1-6.
- [14] 席磊, 郭宏伟, 石志芳. 规模鸭场对空气和水环境影响的研究[J]. 湖北农业科学, 2014, 53(13): 3124-3127.
- [15] 黄灿, 李季. 畜禽粪便恶臭的污染及其治理对策的探讨[J]. 家畜生态, 2004(4): 211-213, 217.
- [16] 赵希智, 陈励芳, 朱旭鑫. 规模化畜禽养殖业污染的危害及防治对策[J]. 畜禽生产, 2016, 46(15): 120-123.
- [17] 金继运. 我国肥料资源利用中存在的问题及对策[J]. 中国农技推广, 2005(11): 4-6.
- [18] 中国农业大学农户经济与产业发展研究团队. 畜禽粪污资源产业链中的三大核心共性问题[J]. 北方牧业, 2018(12): 4.
- [19] 曾锦, 徐锐, 梁高飞, 王艳飞, 等. 畜禽养殖废弃物资源化利用技术及推广模式研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2018, 39(08): 56-63.
- [20] 李朝云. 南方猪场粪污资源化利用模式分析[J]. 广东饲料, 2018, 27(07): 15-19.
- [21] 刘杰, 裴占江, 史风梅, 等. 黑龙江省畜禽粪污处理现状、问题及对策[J]. 黑龙江农业科学, 2017(07): 40-44.
- [22] 刘永岗, 杨光辉, 刘瑜, 等. 畜禽养殖废弃物资源化利用模式浅析[J]. 中国沼气, 2018, 36(04): 61-65.
- [23] 宣梦, 许振成, 吴根义, 等. 我国规模化畜禽养殖粪污资源化利用分析[J]. 农业资源与环境学报, 2018, 35(02): 126-132.
- [24] 冷罗生. 面源污染防治立法的现状、困境与出路[J]. 环境保护, 2009, 424(14): 71-73.
- [25] 许文志, 欧阳平, 罗付香, 等. 中国畜禽粪污处理利用现状及对策探讨[J]. 中国农学通报, 2017, 33(23): 106-112.
- [26] 井艳文, 李军, 潘安君. 畜禽养殖业污水控制与粪污资源化利用[J]. 北京水利, 1998(06): 39-43.
- [27] 李俊婷, 徐盛明, 朱华鸿, 等. 规模猪场粪污减量化及好氧发酵技术研究[J]. 浙江畜牧兽医, 2016, 41(02): 12-14.
- [28] 赵希智, 陈励芳, 杜亚宾. 畜禽粪污资源化利用典型技术模式一种养结合畜禽粪污资源化利用技术[J]. 甘肃畜牧兽医, 2017, 47(11): 54-56.
- [29] 孙伟. 辽宁畜禽粪污资源化利用模式分析[J]. 农业科技与装备, 2018(01): 71-72, 74.
- [30] 李恒, 张洛宁, 余依凡, 等. 畜禽粪污沼液氮磷处理技术研究进展[J]. 水处理技术, 2018, 44(08): 17-20.
- [31] 刘晨峰, 郭黎卿, 文宇立, 等. “十二五”畜禽养殖污染减排问题及防治对策[J]. 环境污染与防治, 2015, 37(3): 86-89.
- [32] 吕丰喆. 蝇蛆对粪中养分的转化及蝇蛆对粪中养分利用率的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.
- [33] 刘韶娜, 赵智勇. 黑水虻对畜禽废弃物治理的研究进展[J]. 养猪, 2016, 2: 81-83.
- [34] 吴有松, 周秀丽, 桂永清, 等. 畜禽粪便饲养家蝇的技术分析及应用探讨[J]. 湖北畜牧兽医, 2016, 37(11): 35-36.

复合丁酸梭菌对断奶仔猪生长性能及腹泻的影响

吴云鹏^{1,3}, 池作授³, 李孝伟¹, 温晓鹿², 秦江帆¹, 耿旭³, 张号杰³

(1. 中粮饲料(茂名)有限公司, 广东 茂名 525011;

2. 广东省农业科学院动物科学研究所, 广东 广州 510640;

3. 中粮饲料(佛山)有限公司, 广东 佛山 528000)

摘要:本试验旨在研究饲料中添加丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)对断奶仔猪生长性能及腹泻的影响。试验选取90头体重相近的“杜×长×大”断奶仔猪, 随机分为3组, 每组3个重复(栏), 每个重复10头猪。各组分别饲喂基础饲料(对照组), 在基础饲料基础上添加300 mg/kg 土霉素钙+30 mg/kg 亚甲基水杨酸杆菌肽(抗生素组)、500 mg/kg 丁酸梭菌制剂(丁酸梭菌组)的试验饲料, 试验为期21天。结果表明:1)丁酸梭菌组仔猪ADG显著高于对照组($P < 0.05$), F/G显著低于对照组($P < 0.05$)。与抗生素组相比, 丁酸梭菌组仔猪ADG及F/G无显著差异($P > 0.05$)。各组间仔猪ADFI差异不显著($P > 0.05$)。2)丁酸梭菌组仔猪腹泻率及腹泻指数均显著低于对照组($P < 0.05$)。与抗生素组相比, 丁酸梭菌组仔猪腹泻率及腹泻指数差异不显著($P > 0.05$)。因此, 丁酸梭菌制剂可能在断奶仔猪上具有一定程度替代抗生素的潜力。

关键词:断奶仔猪; 丁酸梭菌; 生长性能; 腹泻率; 抗生素替代品

中图分类号:S816.7 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2019)03-0032-03

由于具有解决断奶仔猪腹泻、生长阻滞等问题的作用, 抗生素的应用推动了畜牧行业的快速发展^[1]。但其不合理使用导致的细菌耐药性、环境污染、食品安全等问题及副作用也越来越受到全社会广泛关注^[2-3]。欧盟已于2006年1月1日起全面禁止畜牧行业中抗生素生长促进剂的使用, 我国饲用抗生素的禁用基本已大势所趋。据悉, 我国可能与2020年全面停止饲用抗生素的使用。因此, 如何在饲用抗生素禁用后维持断奶仔猪肠道健康及提高仔猪免疫力, 是当前重要的研究课题。而由于益生菌制剂具有调节仔猪肠道健康、提高仔猪免疫力的作用^[4], 在畜禽生产中也越来越受到关注。

丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*), 又名酪酸菌, 是我国农业部2009年批准的新一代微生物饲料添加剂。研究表明, 丁酸梭菌能够调节动物肠道菌群平衡, 促进肠道有益菌的增殖, 增强机体免

疫功能^[5-6]。丁酸梭菌的主要代谢产物是乙酸和丁酸, 而丁酸是大肠上皮细胞的主要能量来源, 在维持动物肠道健康和机体能量代谢过程中发挥重要作用^[7-8]。此外, 丁酸梭菌具有耐热, 耐酸及耐受多种抗生素的特点, 是一种具有广泛开发前景的微生物制剂^[9]。但目前有关丁酸梭菌在断奶仔猪上应用的报道并不多。因此, 本试验旨在通过研究饲料中添加复合丁酸梭菌对断奶仔猪生长性能及腹泻的影响, 为丁酸梭菌在动物生产中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用丁酸梭菌制剂, 主要成分含有丁酸梭菌、地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌, 其中丁酸梭菌有效活菌数 $\geq 1 \times 10^8$ CFU/g, 购自湖北某公司。

1.2 试验设计

收稿日期:2019-01-05

作者简介:吴云鹏(1987-), 男, 博士, 畜牧师, 主要从事畜禽动物营养及饲料科学研究工作。Email: fwpf001@126.com

试验采用单因子设计,选取90头平均体重为(10.30±0.30)kg的“杜×长×大”断奶仔猪,随机分为3个处理组,每组3个重复(栏),每个重复10头猪。各组分别饲喂基础饲料(对照组),在基础饲料基础上添加300 mg/kg 土霉素钙+30 mg/kg 亚甲基水杨酸杆菌肽(抗生素组)、500 mg/kg 丁酸梭菌制剂(丁酸梭菌组)的试验饲料,具体分组见表1。配方涉及保密,基础饲料不提供配方组成,基础饲料营养水平见表2。

表1 试验分组饲料表

组别	饲料
对照组	基础饲料
抗生素组	基础饲料+ 300 mg/kg 土霉素钙+ 30 mg/kg 亚甲基水杨酸杆菌肽
丁酸梭菌组	基础饲料+ 500 mg/kg 丁酸梭菌

表2 基础饲料营养水平(88%干物质基础)

营养水平	含量(%)
消化能(MJ/kg)	14.40
粗蛋白质	18.10
钙	0.68
总磷	0.65
可利用磷	0.40
赖氨酸	1.30
蛋氨酸	0.50
苏氨酸	0.82
色氨酸	0.30

注:表中各值为计算值

1.3 饲养管理

试验于2018年7~8月在湛江某猪场进行,试验前对猪舍进行彻底清洗并消毒。试验为期21天,试验期间,仔猪在漏缝地面上饲养,自由采食和饮水。每天定时打扫圈舍。

1.4 测定指标

1.4.1 生长性能

试验全程以重复(栏)为单位记录采食量,分别于试验第1和22天早上08:00对仔猪空腹称重,计算每头仔猪的平均日增重(ADG)、平均日采食量(ADFI)及料肉比(F/G)。

1.4.2 腹泻率和腹泻指数

试验期间每天10:00和16:00分别观察仔猪粪便,按照Marquardt等的方法对粪便进行评分^[10]。0分:粪便条形或粒状;1分:软便,能成型;2分:稠状、不成型、粪水未分离;3分:液体、不成形,粪水分离。粪便评分≥2时,认为仔猪发生腹泻。

腹泻率(%)=Σ(每栏腹泻仔猪头数×腹泻天数)/(每栏仔猪总数×试验天数);

腹泻指数=Σ每栏仔猪腹泻评分之和/(每栏仔猪总数×试验天数)。

1.5 数据统计与分析

试验数据采用SAS 9.2 (SAS Inst., Inc., Cary, NC)进行单因素方差分析和Duncan多重比较,结果以平均值±标准误表示, $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果

2.1 饲料中添加丁酸梭菌对断奶仔猪生长性能的影响

由表3可知,丁酸梭菌组仔猪ADG显著高于对照组($P < 0.05$),F/G显著低于对照组($P < 0.05$)。与抗生素组相比,丁酸梭菌组仔猪ADG及F/G无显著差异($P > 0.05$)。各组间仔猪ADFI差异不显著($P > 0.05$)。

表3 饲料中添加丁酸梭菌对断奶仔猪生长性能的影响

项目	组别		
	对照组	抗生素组	丁酸梭菌组
初重,kg	10.35±0.31	10.30±0.30	10.22±0.24
末重,kg	18.75±0.29 ^b	21.64±0.48 ^a	20.72±0.36 ^a
平均日增重,ADG(kg/d)	0.40±0.03 ^b	0.54±0.04 ^a	0.50±0.04 ^a
平均日采食量,ADFI(kg/d)	0.72±0.05	0.82±0.06	0.78±0.08
料肉比,F/G	1.80±0.05 ^a	1.52±0.04 ^b	1.56±0.06 ^b

注:同行数据肩标不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),相同或无字母表示差异不显著($P > 0.05$)。下表同

2.2 饲料中添加丁酸梭菌对断奶仔猪腹泻率和腹泻指数的影响

从表4可知,试验期间,丁酸梭菌组及抗生素组仔猪腹泻率分别比对照组降低了50.3%及64.4%($P < 0.05$),两组仔猪腹泻指数评分均显著低于对照组($P < 0.05$),现场粪便成条形。与抗生素组相比,丁酸梭菌组仔猪腹泻率及腹泻指数评分差异

不显著($P > 0.05$), 两组仔猪粪便均为正常条形粪便。

表4 饲料中添加丁酸梭菌对断奶仔猪腹泻率和腹泻指数的影响

项目	对照组	抗生素组	丁酸梭菌组
腹泻率, %	5.80±0.52 ^a	2.06±0.44 ^b	2.88±0.82 ^b
腹泻指数	1.92±0.48 ^a	0.46±0.08 ^b	0.53±0.06 ^b

3 讨论

3.1 饲料中添加丁酸梭菌对断奶仔猪生长性能的影响

研究发现, 断奶仔猪饲料添加 250-500 mg/kg (活菌含量 $0.5-1 \times 10^8$ CFU) 丁酸梭菌可改善断奶仔猪肠道结构, 增强仔猪免疫功能^[11-12]。结合前人的试验结果, 本试验饲料中丁酸梭菌添加量定为 500 mg/kg。

仔猪出生时, 消化道是无菌的, 随后仔猪消化道菌群逐渐建立, 但稳定性差, 丁酸梭菌作为饲料添加剂添加到畜禽饲料中, 可改善仔猪肠道菌群平衡和仔猪生长性能^[13]。Liao 等研究表明, 在饲料中添加丁酸梭菌能显著提高肉鸡的生长性能, 降低料重比^[14]。李玉鹏等发现, 断奶仔猪饲料中添加丁酸梭菌后, 仔猪平均日增重提高 7.83%, 料肉比降低 5.26%^[15]。凌欣华等发现, 饲料中添加复合丁酸梭菌后, 仔猪日增重比对照组提高 5.18%, 比抗生素组提高 4.79%, 料肉比比对照组下降 3.08%, 与抗生素组无差异^[16]。此外, 邢帅等发现, 断奶仔猪饲料中添加 500 mg/kg 丁酸梭菌, 可增加仔猪的平均日采食量及日增重, 显著降低仔猪的腹泻率^[17]。本研究结果与此类似, 这表明, 丁酸梭菌可能具有提高断奶仔猪日增重, 降低料肉比的作用, 达到与抗生素相近的效果。可能的原因是, 饲料中添加丁酸梭菌后, 不仅改善仔猪肠道菌群平衡, 同时在仔猪肠道内产生对仔猪健康具有重要生理意义的多种代谢产物, 包括蛋白酶、淀粉酶、乙酸、丁酸等, 从而促进仔猪营养物质消化率的提高^[18-19]。

3.2 饲料中添加丁酸梭菌对断奶仔猪腹泻率和腹泻指数的影响

研究表明, 断奶仔猪饲料中添加 $0.5 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ CFU/kg 丁酸梭菌可显著降低其腹泻率^[11]。凌

欣华等发现, 断奶仔猪饲料中添加 0.05% 的丁酸梭菌制剂, 与空白对照组相比, 腹泻率显著降低, 与达到与抗生素相接近的抗腹泻效果^[9]。此外, 庞敏等在断奶仔猪上的研究表明, 饲料中添加丁酸梭菌可能通过改善仔猪肠绒毛形态、降低粘膜通透性、上调紧密连接蛋白的表达量, 从而达到降低断奶仔猪腹泻率的效果^[20]。本试验结果与此一致, 表明, 可能是丁酸梭菌通过调节肠道菌群, 抑制有害菌繁殖, 促进有益菌的定植, 提高肠道屏障功能, 从而起到防腹泻的效果。

4 结论

综上所述, 饲料中添加 500 mg/kg 丁酸梭菌制剂(含丁酸梭菌、枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌)可能具有缓解仔猪应激, 提高仔猪营养物质消化率及日增重, 减少仔猪腹泻率, 改善并维持肠道菌群平衡及肠道屏障完整性的作用。因此, 丁酸梭菌可能是无抗时代比较有潜力的抗生素替代品之一。

参考文献

- [1] CROMWELL G L. Why and how antibiotics are used in swine production [J]. *Animal Biotechnology*, 2002, 13: 7-27.
- [2] JENSEN H M. Health management with reduced antibiotic use-Experiences of a Danish pig vet [J]. *Animal Biotechnology*, 2006, 17: 189-194.
- [3] GALLOIS M, ROTHKÖTTER H, BAILEY M, et al. Natural alternatives to in-feed antibiotics in pig production: can immunomodulators play a role? [J]. *Animal*, 2009, 3: 1644-1661.
- [4] YANG K, JIANG Z, ZHENG C, et al. Effect of on diarrhea and intestinal barrier function of young piglets challenged with enterotoxigenic K88 [J]. *Journal of Animal Science*, 2014, 92: 1496-1503.
- [5] FANG C, SUN H, WU J, et al. Effects of sodium butyrate on growth performance, hematological and immunological characteristics of weanling piglets [J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2014, 98(4): 680-685.
- [6] LIAO X, MA G, CAI J, et al. Effects of *Clostridium butyricum* on growth performance, antioxidation, and immune function of broilers [J]. *Poultry Science*, 2015, 94(4): 662-667.
- [7] KNUDSEN K, SERENA A, CANIBE N, et al. New insight into butyrate metabolism [J]. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 2003, 62(1): 81-86.
- [8] PUERTOLLANO E, KOLIDA S, YAQOOB P. Biological significance of short-chain fatty acid metabolism by the intestinal microbiome [J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition*

犬猫弓形虫病及综合防控措施

胡俊菁¹, 陈珊², 孙铭飞^{1*}

(1.广东省农业科学院动物卫生研究所, 农业农村部兽用药物与诊断技术广东科学观测实验站, 广东省畜禽疫病防治研究重点实验室, 广东广州 510640;
2.广东永顺生物制药有限公司, 广东广州 510630)

摘要:弓形虫病是一种人兽共患寄生性原虫病, 对免疫缺陷类疾病的患者和免疫抑制病人的影响较大, 对孕妇儿童的危害也很大。犬作为弓形虫的重要中间宿主, 猫作为唯一终末宿主, 是人类感染弓形虫的主要来源。本文从弓形虫的病原及诊断、弓形虫的危害、流行病学及防控措施等方面做详细介绍, 以期引起人类在饲养宠物中对弓形虫感染的重视, 并提供参考。

关键词:弓形虫病; 防控

中图分类号:S853.32 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2019)03-0035-03

弓形虫病是由刚地弓形虫引起的一种人兽共患寄生性血液原虫病, 呈世界性分布, 几乎可以感染包含人类、犬猫在内的所有的温血动物及部分变温动物。近年来, 随着我国居民生活水平的提高, 饲养宠物已然成为一种风尚, 把犬猫作为伴侣动物喂养的人数大幅增加。犬作为弓形虫的重要中间宿主, 猫作为唯一终末宿主, 人类与宠物的亲密接触, 使得犬猫成为了向人类传播弓形虫的主要途径, 具有重要的公共卫生学意义。本文从犬猫弓形虫的病原及诊断、弓形虫的危害、流行病学及防控措施等方面做详细介绍, 以期引起人类在饲养宠物中对弓形虫感染的重视, 并提供参考。

1 病原及诊断

弓形虫属于专性胞内寄生虫, 其发育阶段不同, 虫体的形态也不同, 可分为中间宿主(人、犬、猫等动物)阶段的速殖子、包囊, 及终末宿主(猫科动物)阶段的裂殖体、配子体、卵囊5型。其中速殖子、包囊和卵囊对中间宿主和终末宿主都具有感染能力。有性繁殖只在终末宿主猫科动物体内进行。所以, 在弓形虫病的传播途径中, 猫科动物扮演了极其重要的角色。弓形虫病虽然具有一定的

临床特点, 但确诊主要借助实验室病原学诊断、免疫学诊断或分子生物学诊断方法, 通过检查出病原体或特异性抗原抗体, 方可做出结论。

2 弓形虫的危害

弓形虫是一种机会致病原虫。对于人类, 免疫系统正常的个体一般不发生病症, 但艾滋病人及一些患有免疫缺陷类疾病的患者症状较为明显, 对于免疫抑制人群是主要的致死因素。孕妇感染可发生早产或流产、产死胎或畸形儿、或垂直传播给胎儿等严重病症。通过母体感染的婴儿, 多见神经管畸形, 婴儿出生后表现为小头畸形、脑积水、癫痫发作, 造成智力落后等。有些新生儿出生时无特殊体征, 仅表现为低体重、贫血、黄疸等, 但逐渐出现抽搐、脑膜炎、脑钙化。感染弓形虫的婴儿中, 约有三分之一会发生脉络膜视网膜炎而失明。儿童和老人感染易患急性淋巴结炎、脑膜炎、肺炎、视网膜炎、顽固性高烧等疾病。有研究表明, 弓形虫感染与人类精神分裂症、抑郁症和男女不孕症明显相关。犬猫患弓形虫病时多引起中枢神经系统、视觉、呼吸、胃肠系统病变, 通常为隐性感染, 但也有出现临床症状甚至死亡的病例。

收稿日期:2019-01-30

项目来源:广东省农业科学院学科团队建设项目(201623TD);广东特支计划项目(2015TQ01N407)

作者简介:胡俊菁(1990-), 女, 内蒙古和林格尔县人, 研究实习员, 硕士, 主要从事寄生虫生化代谢研究。E-mail:1417430871@qq.com

3 流行病学

全世界约有30%的人口感染弓形虫,我国居民感染弓形虫的血清阳性率约为10%,在育龄期妇女该病的感染率可达4%~85%。在我国几乎每个省份都有犬猫患弓形虫病的报道,1979年~2017年我国犬类弓形虫感染率为3.94%~46.67%,1986年~2017年我国猫的弓形虫感染率在1.92%~45.00%。犬猫弓形虫的感染率具有地域差异性,例如犬弓形虫感染在北京、甘肃、辽宁和新疆等北方某些地区尤为严重,中南部省份猫弓形虫感染率高于西北、东北等北方地区的感染率。流浪犬、猫感染率要显著高于家养宠物犬、猫。

4 宠物犬猫感染弓形虫的原因分析

4.1 宠物市场混乱,幼犬幼猫来源复杂

宠物市场缺乏严格管理,对于进入宠物市场的动物来源并未严格把控,甚至有道德不良的宠物贩子低价购入病宠来贩卖。且宠物市场的动物多未做弓形虫病血清学检测,为宠物犬猫携带或传染该病埋下了安全隐患。

4.2 流浪犬猫数量增多,增加了弓形虫感染的几率

随着城市流浪犬猫数量的增加,增加了家养宠物感染弓形虫病的风险。由于流浪犬猫接触的动物和环境较为复杂,很可能通过接触感染的犬猫、食用被感染的生肉或其它食物、捕食老鼠等途径感染弓形虫,家养宠物在外出活动时,易被感染。

4.3 对弓形虫病危害认识的缺乏或不足,忽略了驱虫保健工作

大部分宠物主人缺乏对犬猫体内寄生虫病危害的知识,尤其是未意识到猫科动物在弓形虫传播途径中扮演的重要角色,很容易忽视对弓形虫病的防制。

5 综合防控措施

犬猫弓形虫病关乎公共卫生安全,与人类的健康息息相关,对于宠物弓形虫的预防尤为重要。目前对犬猫弓形虫病的防控无特效药物及可推广应用的疫苗,因此,消灭传染源,切断该疾病的传播途径是防控的本病的关键。

5.1 预防措施

5.1.1 加强宠物市场管理,净化养宠环境

加强对宠物市场交易的规范化管理。对入场交易的动物要做好防疫、检疫和消毒工作;尽可能对宠物市场的动物全部进行弓形虫血清学检查,一旦发现阳性感染动物应立即进行驱虫治疗或淘汰,防止感染动物流向社会,造成病原传播和感染人体。

5.1.2 加大宣传力度,普及弓形虫病的防控知识

借助各种传媒大力宣传与弓形虫相关的防控知识,推行科学文明养宠,普及弓形虫病的预防知识,提高宠物饲养人群对该病的认识和防范意识,关爱宠物健康,提高宠物自身抵抗力。定期带爱宠到宠物医院进行体检,注重对宠物的日常保健,保持犬猫的食物、饮水及圈舍的清洁卫生,定期消毒。另外收养流浪犬猫时,应采取适当的驱虫措施,对防控该病的感染可起到一定作用。

5.1.3 提高自我防护意识,不与宠物有过分亲密的接触

弓形虫主要通过消化道感染,也可通过呼吸道、损伤的皮肤和黏膜以及眼等感染。胎盘感染也是一个重要的途径。因此,在与犬猫玩耍时应保持适当的距离,更要小心被其抓伤、咬伤。孕妇应远离犬猫,异常妊娠的孕妇、畸形儿、弱智儿等的弓形虫感染率显著高于正常妊娠的孕妇及正常儿,不孕症妇女中弓形虫感染率有逐年上升趋势。饲养宠物的育龄妇女必须定期做好弓形虫常规检测,建议暂时先不饲养宠物,特别是猫,这样才能更好地预防弓形虫病。由于弓形虫对免疫缺陷类疾病的患者和免疫抑制病人影响较大,因此不建议该类人群饲养宠物,如果实在需要饲养,应更加着重重视预防爱宠感染弓形虫。

5.1.4 及时处理猫粪便,避免含卵囊的猫粪传播疾病

弓形虫的有性繁殖阶段只在其终末宿主猫科动物肠道内发育,因此也只有猫科动物可以排出感染中间宿主的卵囊。从感染猫肠道内排出的新鲜卵囊需要在外界发育1~2天或更长时间,才可以形成具有传染性的孢子化卵囊,所以要每天要及时清除猫砂或猫粪便。主人在清除猫粪便后,应反复消毒洗手,以防手上残留感染性卵囊。

5.1.5 加强对人和动物弓形虫病的调查及研究

弓形虫病是危害极大的人畜共患病,我国是宠物大国,目前对于弓形虫病的研究仍落后于其它发达国家,应注重调查及研究宠物弓形虫病危害。加强对人类和犬猫弓形虫的监测,研发新型治疗药物或疫苗,特别是加大对猫弓形虫疫苗的研究力度,以保障人类和宠物犬猫的健康

5.2 治疗措施

犬、猫弓形虫病的治疗以化学药物为主,治疗应遵循“用药早、疗程足”的原则。目前公认有效的抗弓形虫病药物有乙胺嘧啶、磺胺嘧啶(或黄安吡啶、磺胺二甲氧嘧啶)和螺旋霉素、氯林可霉素等。应注意在弓形虫发病初期及时用药,如用药较晚,虽可使临床症状消失,但不能抑制虫体进入组织形成包囊,使病畜成为带虫者。

参考文献

- [1] 张越,王华琳,丁莹莹,等.我国人群和某些动物弓形虫感染研究进展[J].动物医学进展,2018,39(10):96-101.
- [2] 许凤娟,杨荣,张海云,等.犬猫弓形虫病的流行病学调查与防控[J].中国畜牧兽医文摘,2018(06):267-269.
- [3] 王萌,张念章,朱兴全.猫的弓形虫病研究进展[J].中国动物传染病学报,2018:1-13.
- [4] 孙永泰.犬猫弓形虫病及预防[J].兽医导刊,2018(11):34.
- [5] 李培德,白宇,金俊杰,等.温州市犬弓形虫病流行病学调查[J].畜牧与兽医,2018(03):117-119.
- [6] 夏春芳,高亮,魏斌,等.伊宁市犬猫弓形虫病流行病学调查[J].安徽农业科学,2018(03):71-73.
- [7] 禹海杰,贾艳,祝天龙,等.嘉兴市犬猫弓形虫病血清流行病学调查[J].今日畜牧兽医,2018(11):8-9.
- [8] 侯乐乐,代永联,郝小静,等.饲养犬猫对孕妇有影响的三种疾病及预防措施[J].畜牧兽医科学(电子版),2017(04):63.
- [9] 刘英,梁涛,李永辉,等.弓形虫病的感染特点及其防治措施[J].畜牧兽医杂志,2015(01):83-84.
- [10] 崔会琴.宠物弓形虫的感染及其防控[J].当代畜牧,2014(02):55-56.
- [11] 马明筠,谭革,姜涵,等.犬猫弓形虫病的流行及防控[J].湖北畜牧兽医,2012(08):25-26.
- [12] 卓国荣,丁明星.犬和猫的弓形虫病[J].动物医学进展,2007(S1):118-119.
- [13] 项夫,崔久占.犬猫弓形虫病的防控[J].兽医导刊,2008(07):49-51.
- [14] 刘姝,张常印.犬猫宠物与人的弓形虫病[J].养犬,2006(01):21-22.

《广东畜牧兽医科技》(双月刊)

(1976年创刊,大16开本,正文52页)

ISSN 1005-8567

CN 44-1243/S

主管单位:广东省农业科学院

主办单位:广东省农业科学院畜牧研究所、广东省农业科学院动物卫生研究所、广东省畜牧兽医学会

定 价:每期定价10.00元,全年60.00元(含平寄邮费)

订阅方式:本刊实行自办发行。读者可通过邮局直接汇款至本刊编辑部。

注意事项:汇款时请注明订阅份数、邮政编码、详细收刊地址、单位名称、收件人姓名、电话等相关资料,以免误投。

地 址:广州市天河区五山大丰一街1号103室《广东畜牧兽医科技》编辑部(邮编:510640)

电 话:020-87576452

传 真:020-87576452

E-mail:gdmsykj@163.com

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

一例豹纹守宫维生素A缺乏与眼部感染的诊疗

罗声扬, 戴溢铤, 熊惠军*
(华南农业大学, 广东广州 510000)

摘要:本文主要介绍一例疑似维生素A缺乏引发的幼体豹纹守宫双眼细菌感染的诊断与常规治疗过程。不同于犬猫眼部细菌感染的治疗思路, 通过特殊的处理手法可以有效地治疗该异宠的眼部细菌感染疾病。

关键词:豹纹守宫; 维生素A; 眼部; 感染

中图分类号:S865.3 **文献标识码:**C **文章编码:**1005-8567(2019)03-0038-02

豹纹守宫(*Eublepharis macularius*)自十九世纪七十年代开始被当作观赏性动物饲养, 至今这种爬行动物已经成为了全球范围内人工饲养最多的夜行性蜥蜴。豹纹守宫(以下简称“守宫”)的眼部结构异于其他大部分守宫, 它们长有眼睑, 并习惯通过眨眼或舔舐眼睛来湿润双眼。在人工饲养繁殖的状态下, 豹纹守宫易出现闭、有眼分泌物、眼内有异物等症状, 且常伴随食欲下降的问题, 如不及时治疗, 动物整体精神状态会逐渐变差。爬行类动物的眼球上皮发育与维生素A息息相关, 缺乏维生素A使爬行类动物更容易罹患眼部疾病, 被认为是眼部遭受细菌感染的根本原因。

1 基本情况

本文患病动物为一雄性豹纹守宫, 1岁大, 体重8.6 g, 主人每日喂食2~3条面包虫, 有钙粉供其自由取食, 无维生素补充。主诉该守宫从15 d前蜕皮不畅, 双眼出现少量分泌物, 使用黄霉素眼膏治疗无效, 且双眼分泌物逐渐增加, 没精神, 不好动, 遂就诊。就诊前3 d无食欲, 无强饲。

2 诊断

2.1 临床检查

豹纹守宫为外温动物, 其活动受温度的影响。将守宫置于30℃环境中, 发现其体格严重偏

小, 虽第二性征发育正常, 但全身骨头变软, 四肢有轻度变形, 靠近盆骨处脊柱变形、隆起, 尾末端畸形, 提示有缺钙、发育不良的问题。整体上看, 该守宫双眼紧闭, 正处于蜕皮阶段的中后期, 不喜运动, 步态不稳, 眼球稍内陷, 有轻度脱水。检查双眼发现该守宫眼睑肿胀, 眼睑和眼内皆有淡黄色浑浊分泌物, 左眼分泌物较多、湿润粘稠, 左眼球浑浊; 右眼分泌物较少、干燥, 右眼角膜浑浊(见图1, 图见第51页)。

2.2 眼分泌物细胞学检查

剥离眼眶表面分泌物, 用无菌棉签采集眼内分泌物样本并制作涂片, 进行diff-quick染色。油镜下可见大量杆菌及一些炎症细胞(见图2, 图见第51页)。

3 诊断结果

结合饲养状况调查、问诊与镜检结果, 判断该守宫缺乏维生素D, 导致骨骼发育异常; 同时缺乏维生素A使眼球上皮细胞发育不良, 最终导致眼部细菌感染。

4 治疗

4.1 支持疗法

将该守宫置于33℃恒温的饲养环境中(比正常饲养温度略高2℃), 配有水盆装水供其自由饮

收稿日期: 2018-11-04

作者简介: 罗声扬(1995-), 本科, 硕士在读, 主要从事异宠和外科方向。E-mail: 932441456@qq.com

*通讯作者: 熊惠军(1962-), 教授、博士, 主要从事影像诊断、外科方向。E-mail: hjxiong@scau.edu.cn

水。每天用手填喂裹有维生素 A/D 粉和钙粉的小麦虫或蟋蟀 2~3 只, 以保持基本的营养需求。初期发现动物对填食的适应程度良好, 虽然闭眼无法追捕食物, 但在嘴巴接触到食物的一瞬间会有啃咬的进食动作。动物排便状况良好。

前 3 天每日皮下注射 0.3 ml 的爬行类专用“林格氏液”(以“乳酸林格氏液、0.9% NaCl 溶液和 5% 葡萄糖溶液”以 1:1:1 的浓度配比而成的复合溶液), 以纠正脱水问题。同时, 手动撕去该守宫即将褪去的老皮, 防止因为动物体力不足而导致蜕皮不畅。

4.2 眼部治疗

治疗前 9 天, 用无菌生理盐水冲洗该守宫的双眼, 将分泌物及残留在眼眶内的残皮清理干净, 随后再滴氧氟沙星眼药水 (5 ml:15 mg) 以杀灭细菌, 一天两次。治疗第 3 天右眼正常睁开, 左眼仍有少量分泌物, 再取分泌物制作涂片检查, 视野范围内见部分着色絮状物, 怀疑是破掉的白细胞, 未见杆菌。

治疗第 9 天该守宫活力变好, 双眼表面浑浊物减少, 左眼眼睑消肿, 不再冲洗眼球, 一天只滴一次氧氟沙星眼药水, 以减少刺激, 等待守宫自然恢复。

治疗第 13 天守宫双眼清亮, 能够正常睁开, 非常适应人工喂食, 粪便正常, 故不再用药, 教宠主人人工喂食操作及饲养要点后出院 (见图 3, 图见第 51 页)。

主人反馈守宫回家后第 2 天已开始主动捕食面包虫。

5 讨论

相对于没有眼睑的爬行类动物而言, 带眼睑的爬行类动物更容易罹患眼病, 这可能是眼睑更容易“藏污纳垢”导致的。带眼睑的爬行类动物细菌性眼病的诊治思路跟犬猫的类型, 都是依靠细胞学检查确诊, 然后用抗生素去控制感染。但不同的是, 爬行类动物在罹患眼病时会表现出持续的闭眼症状, 它们的脓性分泌物大多是固态的(白

细胞缺乏某种氧化酶), 会不断地堆积在眼睑内, 使治疗操作变得更加困难。在使用抗生素前, 一定要多次冲洗甚至用细小的棉签剔除眼内异物及分泌物, 才能使抗生素更有效地作用于患处。此外, 笔者发现爬行类动物在罹患外伤、角膜、结膜等有关上皮细胞损伤的疾病时会激活某种特殊反应, 刺激该动物发生蜕皮行为; 只要刺激源未得到控制, 动物会不断重复蜕皮, 有时候身体外会包裹着好几层的旧皮, 这些没有完全蜕下的旧皮又会堆积在眼眶内, 刺激角膜, 造成恶性循环, 但该刺激反应的发生机制尚未明确。

维生素 A 缺乏症是爬行类动物常见的疾病, 最明显的临床异常为鳞状上皮化生, 导致上皮表面变性, 在蜥蜴上临床症状常见食欲不振、生长迟缓、眼周水肿、鳞状上皮化生、皮肤病, 以及整体较差的健康状况等等^[1], 这些症状一同发生时习惯称之为“维生素 A 缺乏综合征”。在眼病的发生进程中, 一旦细胞发生鳞状上皮化生, 它们就不再发挥保护作用, 细菌感染的机会便会增加^[2]。因此, 在怀疑是上皮异常的疾病时, 首先要注意调查维生素 A 的补充情况。如不足, 在治疗时要注意添加, 口服或注射皆可, 通常注射剂量为 1000~2000 IU/kg 体重。

豹纹守宫的眼病通常是因为饲养管理不当造成的, 根本原因是维生素 A 缺乏引起的结膜上皮细胞化生, 使结膜免疫能力下降; 直接原因则是环境中的细菌入侵。因此, 要预防豹纹守宫的眼病, 最好每周在饵料中添加 1~2 次商品用维生素粉, 使用白纸作为垫材, 每 3 天更换一次, 保持饲养环境干净整洁。

参考文献

- [1] 林媵媵、蔡伊婷等译. (MITCHELL M A, TULLY T N, Jr. 著). 野生动物临床入门-外温动物[M]. 出版社 ELSEVIER 出版年 2013.
- [2] DOUGLAS R. Mader. Reptile Medicine and Surgery [M]. St. Louis, Missouri: ELSEVIER Inc, 2006:326-327.

猪伪狂犬病活疫苗 Bartha-K61 株对流行毒株的免疫效力研究

吴文福, 黄秋雪, 侯高伟, 林益坤, 赖月辉, 牛贝贝, 吉艺宽, 李宁
(广东永顺生物制药股份有限公司, 广东广州 511356)

摘要:本研究通过对不同的免疫剂量免疫仔猪和母猪免疫后所产仔猪进行攻毒, 以评估该疫苗对伪狂犬病毒(PRV)流行强毒株的保护效果。取3~4周龄PRV抗体阴性仔猪, 以 $10^{6.0}$ 组织半数感染量(TCID₅₀)、 $10^{6.5}$ TCID₅₀、 $10^{7.0}$ TCID₅₀ 剂量接种猪PRV活疫苗(Bartha-K61株, 传代细胞源), 免后10 d连同条件的对照组和母源抗体阳性组用PRV流行强毒(GD株)攻毒, 检测免疫后的抗体水平, 记录攻毒后的体温、临床症状和病理变化。结果显示:免疫组试验猪在免后7 d PRV-gB抗体均转阳;各种剂量免疫组和母源抗体阳性组试验猪在PRV流行强毒攻击后, 均未出现临床症状和病理变化, 而对照组则出现明显的神经症状, 体温升高, 发病率100%(5/5), 死亡率80%(4/5), 剖检可见肝脏有白色坏死点和脑充血水肿。研究表明高病毒滴度的猪伪狂犬病活疫苗(Bartha-K61株, 传代细胞源)免疫猪后可对PRV流行强毒株提供良好的免疫保护。

关键词:猪伪狂犬病活疫苗; Bartha-K61株(传代细胞源); 伪狂犬病流行毒株; 免疫保护

中图分类号:S852.65 文献标识码:A 文章编码:1005-8567(2019)03-0040-04

伪狂犬病是由伪狂犬病病毒(Pseudorabies virus, PRV)引起的以发热、奇痒、脑脊髓炎为主要特征的一种重要传染病, 目前该病毒仅有一个血清型, 疫苗免疫是预防和控制该病的主要手段。2011年以来, PRV流行毒株出现了某种程度的抗原变异和毒力增强^[1-5], 给防治伪狂犬病带来新的困难, 如何采取有效的措施进行伪狂犬病的防控成为关注的焦点。目前我国伪狂犬病活疫苗毒株以经典株Bartha株为主^[6-7], 有报道称原有的低效价经典毒株疫苗产品对流行毒株不能提供完全的保护^[8-10], 为解决免疫用疫苗免疫效力降低的问题, 广东永顺生物制药股份有限公司成功研制了安全稳定且免疫原性良好的猪伪狂犬病活疫苗(Bartha-K61株, 传代细胞源), 该疫苗是采用猪睾丸(ST)传代细胞制备的弱毒活疫苗, 保证了疫苗纯净无污染、品质稳定均一、病毒含量高、安全性和免疫原性良好等优

点。每头份疫苗病毒含量为 $\geq 10^{6.0}$ 组织半数感染剂量(TCID₅₀) (内控标准为 $\geq 10^{6.5}$ TCID₅₀), 是伪狂犬病活疫苗国家标准的600倍以上, 在现今复杂的疫病环境下具有更良好的免疫效果^[11-12]。本研究对不同的免疫剂量免疫仔猪和母猪免疫后所产仔猪进行了攻毒试验, 以评估该疫苗对PRV流行强毒株的保护力。

1 材料

1.1 疫苗

猪伪狂犬病活疫苗(Bartha-K61株, 传代细胞源)由广东永顺生物制药股份有限公司提供。

1.2 试验用流行毒株

攻毒用伪狂犬病流行强毒GD株由广东永顺生物制药股份有限公司于2014年在广东某猪场分离、鉴定和保存。该毒株gE基因序列与5株

GeneBank 登录的 2014 年后分离的 PRV 同源性为 99.7%~99.9%, 以 $10^{8.0}$ TCID₅₀/头接种 PRV-gB 和 PRV-gE 抗体阴性猪后可观察到典型的伪狂犬病临床症状, 其中 4~5 周龄仔猪发病率 100% (5/5) 死亡率 80% (4/5), 5 月龄猪发病率 100% (5/5) 死亡率 20% (1/5)。

1.3 试验猪

20 头 3~4 周龄健康仔猪, 经猪繁殖与呼吸综合征 (PRRSV)、猪瘟病毒 (CSFV)、猪伪狂犬病病毒 (PRV)、猪细小病毒 (PPV) 和猪圆环病毒 2 型 (PCV2) 抗原检测均为阴性, 且 PRV-gB 和 PRV-gE 抗体阴性; 5 头 3~4 周龄健康仔猪, 为免疫过猪伪狂犬病活疫苗 (Bartha-K61 株, 传代细胞源) 母猪所产仔猪, PRRSV、CSFV、PRV、PPV 和 PCV2 抗原检测均为阴性, 且 PRV-gB 抗体阳性、PRV-gE 抗体阴性, 来源于广东永顺生物制药股份有限公司自繁自养试验动物场。

1.4 引物

设计 PRV gE 基因引物, 上游引物: 5'-AGTCTCGCACACACCGGGTTG-3'; 下游引物: 5'-ATGTCGGAATGCGGGCGGACC-3', 由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.5 主要试剂

PRV-gB、PRV-gE 抗体检测试剂盒, 购自美国爱德士 IDEXX 生物科技公司; 猪伪狂犬病病毒 PCR 检测试剂盒, 购自北京世纪元亨动物防疫技术有限公司; DNA 提取试剂盒、PCR 试剂盒购自天根生化科技有限公司。

2 方法

2.1 试验设计

将 20 头无母源抗体仔猪 (PRV-gB Ab、PRV-gE Ab 阴性) 随机分为第 1~4 组, 每组 5 头, 将 5 头有母

源抗体仔猪 (PRV-gB Ab 阳性、PRV-gE Ab 阴性) 设为第 5 组。第 1~3 组免疫组 (记录为 A、B、C 组) 分别每头颈部肌肉注射 2 mL 剂量 $10^{6.0}$ TCID₅₀、 $10^{6.5}$ TCID₅₀、 $10^{7.0}$ TCID₅₀ 的猪伪狂犬病活疫苗 (Bartha-K61 株, 传代细胞源), 第 4 组为非免疫对照组, 第 5 组为母源抗体阳性组。免疫后 10 日, 用 PRV 流行强毒 GD 株攻击 ($10^{8.0}$ TCID₅₀/mL/头), 攻毒途径为颈部肌肉注射。分组免疫攻毒情况详见表 1, 试验猪母源抗体 (gE Ab) 检测情况见表 2。

表 1 试验猪分组免疫攻毒情况

编号	组别	头数	免疫剂量	攻毒剂量
1	免疫 A 组	5	$10^{6.0}$ TCID ₅₀ /头	$10^{8.0}$ TCID ₅₀ /头
2	免疫 B 组	5	$10^{6.5}$ TCID ₅₀ /头	$10^{8.0}$ TCID ₅₀ /头
3	免疫 C 组	5	$10^{7.0}$ TCID ₅₀ /头	$10^{8.0}$ TCID ₅₀ /头
4	非免疫对照组	5	/	$10^{8.0}$ TCID ₅₀ /头
5	母源抗体阳性组	5	/	$10^{8.0}$ TCID ₅₀ /头

2.2 体温检测及临床观察

攻毒后观察 14 天, 每天观察各组猪的精神食欲情况, 逐日测温并记录临床症状。

2.3 猪血清抗体检测

免疫后 5 d、7 d、10 d 进行试验猪采血, 分离血清用 IDEXX 抗体检测试剂盒检测 PRV-gB、PRV-gE 抗体, 具体操作和结果判定按检测试剂盒说明书进行。PRV-gB 为伪狂犬病疫苗毒抗体, 大于 0.70 为阴性, 小于或等于 0.60 为阳性, 之间为可疑; PRV-gE 为伪狂犬病野毒抗体, 大于 0.70 为阴性, 小于或等于 0.60 为阳性, 之间为可疑。

2.4 发病猪的 PCR 鉴定

将发病猪于临死前或试验结束时采血, 按 DNA 提取试剂盒说明书提取病毒 DNA, 进行 PCR 扩增,

表 2 试验猪母源抗体 (gB Ab) 检测情况

编号	组别	头数	母源抗体 (gB Ab)				
1	免疫 A 组	5	1.01(-)	1.07(-)	1.05(-)	1.03(-)	1.10(-)
2	免疫 B 组	5	1.01(-)	1.05(-)	1.02(-)	1.07(-)	1.10(-)
3	免疫 C 组	5	1.07(-)	1.08(-)	1.08(-)	1.05(-)	1.17(-)
4	非免疫对照组	5	1.04(-)	1.07(-)	1.12(-)	1.05(-)	1.07(-)
5	母源抗体阳性组	5	0.07(+)	0.05(+)	0.05(+)	0.06(+)	0.05(+)

反应程序: 98 °C 5 min; 98 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。取 PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳鉴定。

2.5 伪狂犬病仔猪发病标准

(1) 仔猪出现腹泻、呼吸障碍(咳嗽、喘气等), 至少 2 日体温在 40.5 °C 以上, 同时伴随有轻度神经症状; (2) 仔猪出现明显的神经症状(共济失调、麻痹、四肢乱划、角弓反张等症状)或死亡。符合以上 2 条中的任何 1 条, 即可判为发病。

3 结果

3.1 体温检测及临床观察结果

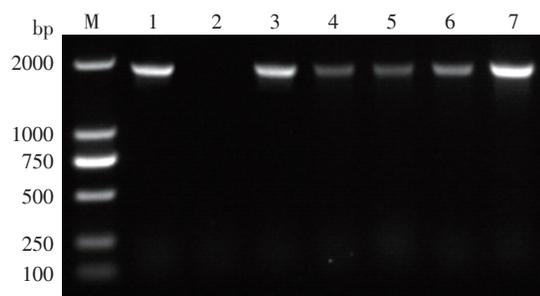
免疫 A、B、C 组试验猪攻毒后精神、食欲、体温均正常; 母源抗体阳性组攻毒后精神、食欲正常, 体温在攻毒后第 2~3 天稍有升高, 但均未达到 40.5 °C, 判定为未发病(见图 1, 图见第 51 页)。观察期结束后, 免疫 A、B、C 组和母源抗体阳性组试验猪均健活, 解剖观察肝脏、脑等组织均无异常。非免疫对照组均出现如共济失调等明显的神经症状, 体温升高, 并有咳嗽等临床症状, 4/5 死亡(见图 2, 图见第 52 页), 剖检可见肝脏有白色坏死点和脑不同程度充血水肿, 见图 3(图见第 52 页)、表 3。

3.2 抗体检测结果

免疫 A、B、C 组试验猪在免疫后 7 d PRV-gB 抗体均转为阳性, 未免疫的母源抗体阳性组仍维持 PRV-gB 抗体阳性, 非免疫对照组 PRV-gB 抗体一直为阴性。所有试验猪在免疫期间 PRV-gE 抗体均为阴性。见图 4(图见第 52 页)。

3.3 PCR 扩增鉴定结果

将发病猪血清进行 PCR 扩增, 与 PRV GD 株病毒液均可扩增出约 1802 bp 的条带, 产物大小与预期结果相符, 见图 5。



注: M: DL 2000 DNA Marker; 1: PRV GD 株病毒液; 2: 阴性对照; 3~7: 发病猪血清样品

图 5 发病猪 PCR 扩增鉴定结果

4 小结与分析

本研究结果显示, 仔猪分别以 $10^{6.0}$ TCID₅₀、 $10^{6.5}$ TCID₅₀、 $10^{7.0}$ TCID₅₀ 剂量免疫猪伪狂犬病活疫苗(Bartha-K61 株, 传代细胞源), 在免后 7 d PRV-gB 抗体均转阳, 免后 10 d 免疫猪可获得坚强的免疫保护力, 能抵抗 PRV 流行强毒 GD 株的攻击, 而非免疫对照组全部(5/5)发病 80%(4/5)死亡, 说明面对毒力增强的流行强毒株, 高病毒滴度的传统的 Bartha-K61 经典毒株疫苗仍起到良好的保护效果。这与其他学者的报道结果一致^[13-14]。

本次试验还对母猪免疫猪伪狂犬病活疫苗(Bartha-K61 株, 传代细胞源)后所产仔猪进行了攻毒, 获得良好的母源抗体水平的仔猪, 受 PRV 强毒感染后, 精神、食欲均无异常, 攻毒后 2~3 d 体温稍有升高但随后迅速恢复正常, 表明高水平母源抗体能够使仔猪有效的抵御 PRV 流行强毒 GD 株的侵袭。

综上所述, 高病毒滴度的猪伪狂犬病活疫苗(Bartha-K61 株, 传代细胞源)能够对 PRV 流行强毒株提供良好的免疫保护, 因此, 我们认为, 高质量的 Bartha-K61 株疫苗仍然是预防和控制当前猪伪狂犬病的理想选择。

表 3 攻毒保护率统计结果

编号	组别	头数	统计指标和保护率							
			临床症状			剖检病理变化			存活数	死亡数
			有	无	保护率	有	无	保护率		
1	免疫 A 组	5	0/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	5/5	0/5
2	免疫 B 组	5	0/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	5/5	0/5
3	免疫 C 组	5	0/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	5/5	0/5
4	非免疫对照组	5	5/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	1/5	4/5
5	母源抗体阳性组	5	0/5	5/5	5/5	0/5	5/5	5/5	5/5	0/5

参考文献

- [1] WU R, BAI C, SUN J, et al. Emergence of virulent pseudorabies virus infection in northern China [J]. Journal of Veterinary Science, 2013, 14(3): 363-5.
- [2] YANG Q Y, SUN Z, TAN F F, et al. Pathogenicity of a currently circulating Chinese variant pseudorabies virus in pigs [J]. World Journal of Virology, 2016, 5(1): 23-30.
- [3] 杨汉春. 2014年猪病流行情况与2015年流行趋势及防控对策[J]. 猪业科学, 2015, (2): 38-40.
- [4] YU T, CHEN F, KU X, et al. Growth characteristics and complete genomic sequence analysis of a novel pseudorabies virus in china [J]. Virus Genes, 2016, 52(4): 474-83.
- [5] YE C, ZHANG Q Z, TIAN Z J, et al. Genomic characterization of emergent pseudorabies virus in China reveals marked sequence divergence: Evidence for the existence of two major genotypes [J]. Virology, 2015, 483: 32-43.
- [6] 杨毅, 李文刚, 饶宝, 等. 猪伪狂犬病疫苗的研究进展 [J]. 江西农业学报, 2010, 22(3): 154-157.
- [7] 李国新, 童光志. 猪伪狂犬病疫苗的研究现状与展望 [J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(9): 858-861.
- [8] AN T Q, PENG J M, TIAN Z J, et al. Pseudorabies virus variant in Bartha - K61 - vaccinated pigs, China, 2012 [J]. Emerging Infectious Diseases, 2013, 19(11): 1749-55.
- [9] GU Z, DONG J, WANG J, et al. A novel inactivated gE/gI deleted pseudorabies virus (PRV) vaccine completely protects pigs from an emerged variant prv challenge [J]. Virus Research, 2014, (14): 371-372.
- [10] WANG C, YUAN J, QIN H, et al. A novel gE - deleted pseudorabies virus (PRV) provides rapid and complete protection from lethal challenge with the prv variant emerging in Bartha-k61- vaccinated swine population in china [J]. Vaccine, 2014, 32(27): 3379-3385.
- [11] 林德锐, 吴文福, 黄秋雪, 等. ST 传代细胞源猪伪狂犬病毒活疫苗 (Bartha-K61 株) 超剂量免疫的安全性实验 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2018, 43(02): 48-51.
- [12] 吴文福, 林德锐, 黄秋雪, 等. 猪伪狂犬病活疫苗 (Bartha-K61 株) 免疫产生期和免疫持续期的研究 [J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(11): 64-68.
- [13] 王继春, 曾容愚, DANIEL T, 等. 猪伪狂犬病活疫苗 (Bartha-K61 株) 对变异株的保护效力 [J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(12): 1-4.
- [14] 周金柱. Bartha-K61 株疫苗对猪伪狂犬病毒变异株的免疫保护及变异株生物学特性的初步研究 [D]. 博士学位论文, 扬州: 扬州大学, 2017.
- and Metabolic Care, 2014, 17(2): 139-144.
- [9] 凌欣华, 李鑫. 复合丁酸梭菌对仔猪腹泻影响的效果试验报告 [J]. 广东饲料, 2016, 25(6): 22-26.
- [10] MARQUARDT R, JIN L, JUNG - WOO K, et al. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic Escherichia coli K88+ infection in neonatal and early weaned piglets [J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 1999, 23: 283-288.
- [11] 胡远亮. 利用分子生物技术研究益生菌对断奶仔猪生长及粪便菌群的影响 [D]. 武汉, 华中农业大学, 2014: 79.
- [12] 郑有秀, 王超, 邹晓庭, 等. 丁酸梭菌对断奶仔猪生长性能、肠道结构和免疫功能的影响 [J]. 动物营养学报, 2018, 30(7): 2683-2689.
- [13] 胡红伟, 张婵娟, 闫凌鹏, 等. 丁酸梭菌作用机理及其在动物生产中的应用 [J]. 饲料博览, 2018(10): 33-38.
- [14] LIAO X, MA J, CAI J, et al. Effects of *Clostridium butyricum* on growth performance, antioxidation, and immune function of broilers [J]. Poultry Science, 2015, 94(4): 662-667.
- [15] 李玉鹏, 李海花, 王柳懿, 等. 丁酸梭菌对断奶仔猪生长性能、肠道屏障功能和血清细胞因子含量的影响 [J]. 动物营养学报, 2017, 29(8): 2961-2968.
- [16] 凌欣华, 李鑫. 复合丁酸梭菌对仔猪生长性能的影响试验 [J]. 现代农业科技, 2016(9): 262.
- [17] 邢帅, 朱琪, 梁冬梅, 等. 丁酸梭菌缓解仔猪应激防御性大肠杆菌病 [J]. 中国饲料, 2018, 7: 54-58.
- [18] ARAKI Y, ANDOH A, FUJIYAMA Y, et al. Oral administration of a product derived from *Clostridium butyricum* in rats [J]. International Journal of Molecular Medicine, 2002, 9(1): 53-57.
- [19] HOSSAIN M, BEGUM M, KIM I. Effect of *Bacillus subtilis*, *Clostridium butyricum* and *Lactobacillus acidophilus* endospores on growth performance, nutrient digestibility, meat quality, relative organ weight, microbial shedding and excreta noxious gas emission in broilers [J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2015, 60(2): 77-86.
- [20] 庞敏, 卢庆萍, 夏冰, 等. 酪酸梭菌对断奶仔猪生长性能、肠道组织形态及肠道通透性的影响 [J]. 动物营养学报, 2016, 28(7): 2113-2121.

上接第34页

小反刍兽疫病毒、A型口蹄疫病毒和O型口蹄疫病毒多重RT-PCR检测方法的建立

黄元¹, 袁淑英¹, 黄武², 廖任如¹, 王晓虎¹, 陈晶¹, 向华^{1*}

(1. 广东省农业科学院动物卫生研究所 广东省兽医公共卫生公共实验室 广东省畜禽疫病防治研究重点实验室 农业部兽用药物与诊断技术广东科学观测实验站, 广东 广州 510640;

2. 广东宏丰农牧有限公司, 广东 英德 510036)

摘要:小反刍兽疫病毒(PPRV)是一种感染小反刍动物的急性接触性传染病,近年来在我国多个省份流行,对我国养羊业造成了巨大危害。口蹄疫病毒(FMDV)A型和O型疫情曾在我国多地暴发,今年仍零星发生。小反刍兽疫和口蹄疫均为A类传染病,也都是水疱性疾病,其临床症状极其相似。为建立一种检测并鉴别小反刍兽疫病毒和口蹄疫病毒的方法,针对小反刍兽疫病毒的F基因和口蹄疫的VP1基因,合成相应的引物,优化反应体系和扩增条件,建立一种同时检测小反刍兽疫病毒和A、O型口蹄疫病毒的方法。对建立的多重RT-PCR方法进行特异性和敏感性试验,结果表明,建立的多重RT-PCR检测方法敏感性强,特异性良好,对小反刍兽疫病毒和A、O型口蹄疫病毒最低检出量分别为PPRV 10^2 copies/ μ L、A型FMDV 10^2 copies/ μ L、O型FMDV 10 copies/ μ L。本方法的建立对临床感染口蹄疫和小反刍兽疫病毒的家畜进行快速检测具有十分重要的意义。

关键词:小反刍兽疫; 口蹄疫; 多重RT-PCR

中图分类号:S852.65 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8567(2019)03-0044-04

小反刍兽疫(peste des petits ruminants, PPR)俗称羊瘟,是由小反刍兽疫病毒(peste des petits ruminants virus, PPRV)引起的一种急性、烈性病毒性传染病,主要感染小反刍动物,以山羊和绵羊最为易感,临床症状主要为发热、口炎、腹泻、肺炎等,具有高发病率和高死亡率。2007年7月,我国西藏发生首例PPR疫情^[1]。2013年11月起,PPR再次传入我国,首先是在新疆暴发,继而甘肃、内蒙、宁夏相继暴发疫情,然后在数月内蔓延至全国大部分省份^[2]。

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的一种急性、热性、高度接触性传染病,可以感

染猪、牛、羊等偶蹄动物,临床表现为发热,唇部、口腔黏膜和蹄部出现水疱性病变。FMD分为7个血清型。A型和O型是FMD在我国流行的主要血清型。近年来,FMD疫情在我国时有发生^[3],对我国的养殖业造成了巨大的损失。

PPR和FMD均为A类动物传染病,临床上都出现明显的口炎性病变,在PPR发病初期易于与FMD混淆。本研究针对这二种病毒的基因序列合成特异性引物,建立了一种能同时检测PPRV和O型、A型FMDV的三重RT-PCR方法。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期:2018-12-09

项目来源:国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD06A17),广东省科技厅项目(2017A040403061),清远市科技计划项目(2017A003)

作者简介:黄元(1980-),男,硕士,副研究员,主要从事动物病毒性传染病的研究。Email:huangyuan62@126.com

*通讯作者:向华(1971-),男,博士,研究员,主要从事动物病毒性传染病的研究。Email:xiangh898@163.com

1.1.1 病毒与核酸

FMDV A型和O型病毒cDNA由中国农业科学院兰州兽医研究所提供。PPRV弱毒株和传染性脓疱病毒(CEV)弱毒株来自市售弱毒疫苗。伪狂犬病毒(PRNV)、H9N2亚型禽流感病毒(AIV)和水疱性口炎病毒(VSV)等病毒由广东省农业科学院动物卫生研究所保存。

1.1.2 临床样品

羊水泡组织样品均采自广东2个羊场。

1.1.3 主要试剂

TakaRa LA Taq DNA聚合酶、pMD19-T质粒和DH5α感受态细胞购自宝生物工程(大连)有限公司;病毒RNA/DNA提取试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒和质粒小量快速抽提试剂盒购自美生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成

参考文献和Genbank序列,针对A、O型FMDV的VP1基因^[4]和PPRV的F基因^[5]设计引物(见表1),由华大基因有限公司合成。

表1 多重PCR引物相关信息

病毒		引物序列(5'-3')	扩增长度
A/FMDVP1	F	CITGCRCTCCCYTACACCGCG	427 bp
	R	CATGTCYTCYTGCACTCTGGCT	
O/FMDVP1	F	AGRTTYGTGAAAGTHAMRCCA	658 bp
	R	CATGTCYTCYTGCACTCTGGTT	
PPRV F	F	ATGCTCTGTGCACTGATAACC	310 bp
	R	TTATGGACAGARGGGACAAG	

1.2.2 单重PCR引物验证

取PPRV按照病毒总核酸快速抽提试剂盒说明书方法提取RNA,并按照反转录试剂盒说明书将病毒RNA反转录为cDNA,然后以cDNA为模板进行单引物单模板PCR扩增。FMDV A型和O型病毒cDNA由中国农业科学院兰州兽医研究所提供。PCR扩增体系为25 μL,分别为Takra LA Taq聚合酶0.5 μL, 10 × LA PCR Buffer II 2.5 μL, dNTP Mixture 4 μL,上游引物和下游引物各0.5 μL,模板cDNA为0.5 μL,剩余用去离子水补足。PCR扩增条件为预变性95 °C 5 min;94 °C 30 s,

54 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30个循环, 72 °C 10 min。PCR扩增产物在2%琼脂糖凝胶中进行点样,80 V电泳30 min后,观察扩增条带。

1.2.3 阳性克隆质粒的构建

将A型、O型FMDV和PPRV扩增得到的目的PCR产物用凝胶回收试剂盒进行回收,并连接到pMD19-T载体上,构建为分别含有上述3种病毒VP1基因片段的阳性克隆质粒。

1.2.4 多重PCR反应体系的优化

将A型、O型FMDV和PPRV3种病毒的cDNA作为模板进行PCR扩增(反应体系为25 μL),分别为Takra LA Taq DNA聚合酶0.5 μL, 10 × Buffer II 2.5 μL, dNTP Mixture 4 μL,引物3 μL(每个引物0.5 μL)模板1.5 μL,(3种质粒各0.5 μL),其余用去离子水补足。PCR扩增条件:预变性95 °C 5 min;94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30个循环, 72 °C 10 min, 4 °C保存。PCR扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶中进行点样,90 V电泳25 min后,观察扩增条带。

然后对多重PCR反应的各引物浓度,退火温度,进行优化,将三重PCR体系终浓度为10 μmol/L的引物依次以0.2 μL增加,从0.2 μL加到1 μL;退火温度范围设置为50 °C~60 °C,筛选出多重PCR的最佳反应条件。

1.2.5 多重PCR特异性试验

采用优化后的多重PCR扩增体系和扩增条件,对羊传染性脓疱病毒(CEV)、伪狂犬病毒(PRNV)、水疱性口炎病毒(VSV)、H9N2亚型禽流感病毒(AIV)、猪细小病毒(PPV)、猪蓝耳病毒(PRRSV)、猪流行性腹泻病毒(PEDV)、猪瘟病毒(HCV)、健康羊组织和PPRV提取病毒总核酸,以及FMDV A型和O型病毒核酸作为模板进行三重RT-PCR和PCR,设置阴性对照,检测三重PCR的特异性。

1.2.6 多重PCR敏感性试验

对3种病毒的阳性克隆质粒用紫外分光光度计测得其浓度,并计算拷贝数,对阳性克隆质粒进行10倍递减梯度稀释,使质粒浓度为10⁸ copies/μL~10¹ copies/μL。分别取相同质粒浓度人为混合作为模板,按照已经优化后的多重PCR反应条件进行扩增,分析多重PCR反应的敏感性。

1.2.7 样品检测

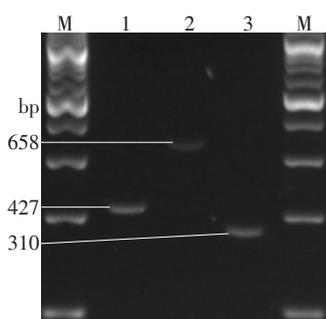
运用多重PCR方法对临床送检的10份样品和

病毒BHK-21细胞培养物进行检测。

2 结果

2.1 单重PCR验证引物特异性

利用不同的引物对,检测不同的引物。通过对A型FMDV、O型FMDV和PPRV的cDNA进行单重PCR检测,以验证引物的特异性。结果显示引物特异性良好,通过以上不同的cDNA作为模板,均能以对应的引物扩增到相应的目的片段(图1)。选取CEV、PRV、VSV、AIV、PPV、PRRSV、PEDV、HCV和健康羊组织核酸样品进行多重PCR扩增,结果均为阴性。

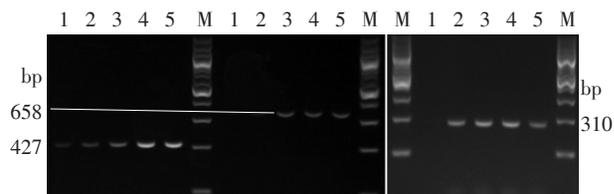


注:M: TaKaRa DNA 200 bp 分子量标准;1: FMDV A型;2: FMDV O型;3: PPRV

图1 FMDV A型、FMDV O型和PPRV扩增结果

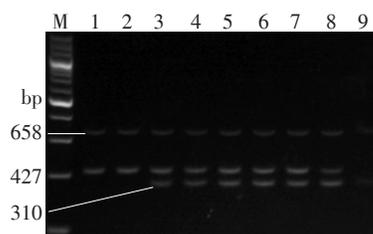
2.2 多重PCR扩增条件的优化

对A型、O型FMDV和PPRV 3对引物浓度和退火温度进行了优化,以各cDNA作为模板,多重PCR反应体系中引物终浓度分别为A/FMDV 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 、O/FMDV 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 、PPRV 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 最佳(图2);退火温度为52.2 $^{\circ}\text{C}$ 最佳(图3)。在此条件下,多重PCR反应条件最佳温度为95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 52.2 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,共进行30个循环,最后72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。



注:M: TaKaRa DNA 200 bp 分子量标准;1: 0.2 $\mu\text{mol/L}$;2: 0.4 $\mu\text{mol/L}$;3: 0.6 $\mu\text{mol/L}$;4: 0.8 $\mu\text{mol/L}$;5: 1.0 $\mu\text{mol/L}$

图2 FMDV A型、FMDV O型和PPRV引物终浓度的优化

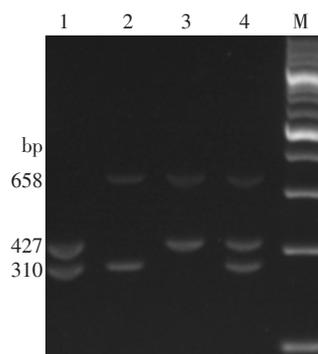


注:M: TaKaRa DNA 200 bp 分子量标准;1: 49.0 $^{\circ}\text{C}$;2: 49.3 $^{\circ}\text{C}$;3: 50.0 $^{\circ}\text{C}$;4: 51.0 $^{\circ}\text{C}$;5: 52.2 $^{\circ}\text{C}$;6: 53.4 $^{\circ}\text{C}$;7: 54.6 $^{\circ}\text{C}$;8: 55.8 $^{\circ}\text{C}$;9: 57.0 $^{\circ}\text{C}$

图3 FMDV O型、FMDV A型和PPRV退火温度的优化

2.3 多重PCR特异性结果分析

利用优化好的多重PCR反应条件,对A型、O型FMDV和PPRV cDNA模板进行人为的随机混合并进行多重PCR扩增,结果含有A型、O型FMDV和PPRV的核酸样品均能扩增出与试验设计相符合的目的条带,且无其他非特异性条带(图4)。选取CEV、PRV、VSV、AIV、PPV、PRRSV、PEDV、HCV和健康羊组织核酸样品进行多重PCR扩增,结果均为阴性。

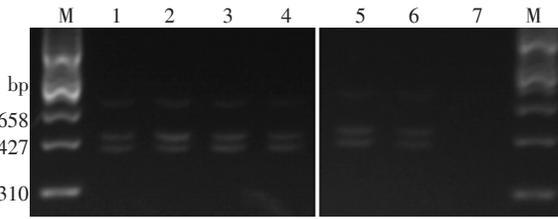


注:M: TaKaRa DNA 200 bp 分子量标准;1: O型FMDV+PPRV;2: O型FMDV + PPRV;3: A型FMDV + A型FMDV;4: O型FMDV + A型FMDV + PPRV

图4 FMDV O型、FMDV A型和PPRV特异性扩增结果

2.4 多重PCR敏感性结果分析

在引物终浓度分别为A型FMDV 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 、O型FMDV 0.6 $\mu\text{mol/L}$ 、PPRV 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 时,该多重PCR能检出的最低拷贝数分别为A型FMDV 10² copies/ μL 、O型FMDV 10 copies/ μL 、PPRV 10² copies/ μL (图5)。



注: M: DNA 标准 100 bp; 1: 10^7 copies/ μL ; 2: 10^6 copies/ μL ; 3: 10^5 copies/ μL ; 4: 10^4 copies/ μL ; 5: 10^3 copies/ μL ; 6: 10^2 copies/ μL ; 7: 10^1 copies/ μL .

图5 多重PCR敏感性扩增结果

2.5 样品检测结果

应用多重 RT-PCR 方法对临床送检的 10 份样品和细胞培养的病毒进行检测, 结果表明, FMDV A 型 O 型病毒和 PPRV 病毒培养物的检测结果均得到相应的阳性条带, 而临床样品均为阴性。

3 讨论

PPR 是严重危害畜牧业生产的疫病之一, 其发病率可达 90%~100%, 死亡率更是高达 50% 以上^[6]。1942 年 PPR 首次发现于西非的科特迪瓦, 而后, PPR 在全球以从西向东的移动趋势传播, 蔓延至中东、伊朗、南亚次大陆、土耳其以及亚洲中部的部分国家^[2]。2014 年以来, PPR 在我国大范围流行, 涉及我国二十多个省份, 给养羊业带来巨大损失。

PPRV 属于不分节段负链 RNA 病毒, 其基因组编码核衣壳蛋白(N)、磷蛋白(P)、基质蛋白(M)、融合蛋白(F)、血细胞凝集素蛋白(H)、聚合酶蛋白(L)及 2 个非结构蛋白(C 和 V)共 8 个不同蛋白。有报道以 N 蛋白^[7]、F 蛋白^[8]或 H 蛋白^[9]的编码基因为靶点设计引物进行 RT-PCR 检测。其中融合蛋白 F 存在保守区段, 表达量也较高。本研究以 F 基因设计引物, 具有较好的特异性与敏感性, 对 pMD18-PPRV-F 质粒的最小检出量达 10 copy/ μL 。FMD 共有 7 种血清型, 其中 O 型和 A 型分别曾在 2010 年和 2012 年在广东暴发并在全国流行, 是当前 FMDV 在我国流行的主要血清型。至今我国仍时有 A 型和 O 型 FMDV 疫情发生。2017 年农业部通报的 FMD 疫情情况显示, 我国口蹄疫主要发生在新疆、西藏、广东^[9]和贵州等地, 以 O 型口蹄疫为主。到 2018 年, 宁夏、河南、甘肃、湖北、安徽、山

西、云南、广西等地也发现了口蹄疫, 不仅感染猪和牛, 羊也偶有发生^[3]。目前 FMD 在猪群中能引起较高的死亡率, 在我国猪病防控中受到重视, 而在牛羊中 FMD 死亡率并不高。然而 FMDV 在牛羊中的存在成为了猪 FMD 的病毒库, 为猪 FMD 的防控增加了难度。同时, FMD 作为 OIE 确定的 A 类动物传染病之首, 关乎国际贸易和国际关系, 因此不可忽视。

PPR 和 FMDV 同为我国一类动物疫病, 都属于能对养殖业造成巨大损失、需要重点防范的口炎性动物疫病。本研究建立的多重 PCR 检测方法能够快速有效地检测出 PPRV 和 A、O 型 FMDV, 具有一定的临床意义, 为 PPRV 和 FMDV 的鉴别诊断提供了重要工具。

参考文献

- [1] 王志亮, 包静月, 吴晓东, 等. 我国首例小反刍兽疫诊断报告[J]. 中国动物检疫, 2007, 24(8): 24-26.
- [2] 刘永宏, 赵丽, 曹胜波, 等. 小反刍兽疫在中国的流行趋势及应对措施[J]. 动物医学进展, 2015, 36(1): 110-113.
- [3] 何继军. 口蹄疫流行、免疫防控与监测[J]. 兽医导刊, 2018, 15: 4-5.
- [4] LE V P, LEE K N, NGUYEN T, et al. Development of one-step multiplex RT-PCR method for simultaneous detection and differentiation of foot-and-mouth disease virus serotypes O, A, and Asia 1 circulating in Vietnam [J]. Journal of Virological Methods, 2011, 175(1): 101-108.
- [5] CHIDAMBARAM M, PARIJA S, TOI P, et al. Evaluation of the utility of conventional polymerase chain reaction for detection and species differentiation in human hookworm infections [J]. Tropical Parasitology, 2017, 7(2): 111-116.
- [6] 向荣, 黄勉, 向华, 等. 小反刍兽疫流行状态及检测方法研究进展[J]. 中国动物检疫, 2017, 34(10): 46-49.
- [7] COUACY-HYMAN E, ROGER F, HURARD C, et al. Rapid and sensitive detection of peste des petits ruminants virus by a polymerase chain reaction assay [J]. Journal of Virological Methods, 2002, 100(1): 17-25.
- [8] 赵文华, 杨仕标, 朱建波, 等. 小反刍兽疫灭活抗原 RT-PCR 检测方法的建立及其相关序列分析[J]. 动物医学进展, 2008, 29(11): 16-19.
- [9] 张玲, 包静月, 李林, 等. RT-PCR 鉴别小反刍兽疫病毒疫苗株与强毒株方法的建立[J]. 动物医学进展, 2010, 31(3): 17-20.
- [10] 陈盛絮, 李冰, 黄伟智, 等. 化州市 2017 年猪 O 型口蹄疫疫情的调查分析及防控对策探讨[J]. 广东畜牧兽医科技, 2018, 43(4): 28-31.

改进 HPLC 法测定乙酰氨基阿维菌素注射液含量

邓秉钊, 潘绮雯, 林海丹

(广东省农产品质量安全中心, 广东 广州 510230)

摘要:采用高效液相色谱法测定乙酰氨基阿维菌素注射液的含量, 在 0.03~1.03 mg/ml 范围内, 峰面积的常用对数与进样量浓度的常用对数呈良好的线性关系, $R^2=0.9991(n=6)$, 平均回收率为 99.57%-99.98%, RSD 在 0.25~0.46% 之间。此方法分析时间短, 样品前处理简便、定量结果准确, 重现性好, 结果满意, 为其质量控制提供依据。

关键词:乙酰氨基阿维菌素; 注射液; 高效液相色谱

中图分类号:S859.79 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2019)03-0048-03

乙酰氨基阿维菌素是高效、广谱、低残留的兽用最新一代驱虫药物, 主要用于防治畜类(特别是产乳期)的虱、螨、蝇等各种内外寄生虫, 应用于奶牛和肉牛时无需休药期。由于其对家畜体内外各种寄生虫的极高活性, 以及在乳品中极低的分配系数, 使其成为第一个可用于各种家畜任何生长期的杀虫剂, 是防治家畜体内外各种寄生虫的首选药剂。目前, 乙酰氨基阿维菌素注射液含量测定方法的依据有农业部批准的 644 号、804 号、942 号三个公告^[1], 但是三个质量标准各有差异, 有必要寻求统一、稳定、简便、快捷的测试方法。本文参考《美国药典》^[2]采用高效液相色谱法^[3]测定乙酰氨基阿维菌素注射液的含量, 以其为该制剂的质量控制提供可靠的依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

乙腈(HPLC)、高氯酸(AR)、甲醇(AR); 1%的乙酰氨基阿维菌素注射液(河北威远动物药业有限公司、浙江海正药业股份有限公司提供)、空白溶剂(河北威远动物药业有限公司提供)、乙酰氨基阿维菌素对准品(中国兽医药品监察所, 批号:K0471411, 97.77%)。

1.2 仪器

高效液相色谱仪 Agilent 1100、紫外分光光度计

UV300、电子天平 Precisa 92SM-202A。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件

流动相: 流动相 A 为 0.1% 高氯酸溶液, 流动相 B 为乙腈; 色谱柱, phenomenex Luna 5u-C8-100A 250×4.60 mm 5 micron; 检测波长, 245 nm; 进样量, 20 μl; 流速, 每分钟 1.5 ml; 按表 1 进行线性梯度洗脱。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间(分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	45	55
15	45	55
25	5	95
30	45	55
35	45	55

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备

取乙酰氨基阿维菌素对照品适量, 精密称定, 用甲醇溶解并定量稀释制成每 1 ml 中约含乙酰氨基阿维菌素 1.00、0.50、0.25、0.12、0.06、0.03 mg。

2.2.2 供试品溶液的制备

取乙酰氨基阿维菌素注射液, 用甲醇定量稀释

制成每1 ml中含乙酰氨基阿维菌素0.50 mg。

2.3 检测波长的确定

取每1 ml中含乙酰氨基阿维菌素0.03 mg的对照品溶液,扫描其吸收谱,由结果可知在245 nm波长处有最大吸收(吸收度为0.324)和较好的灵敏度,因此选择波长为245 nm作为检测波长(见图1)。

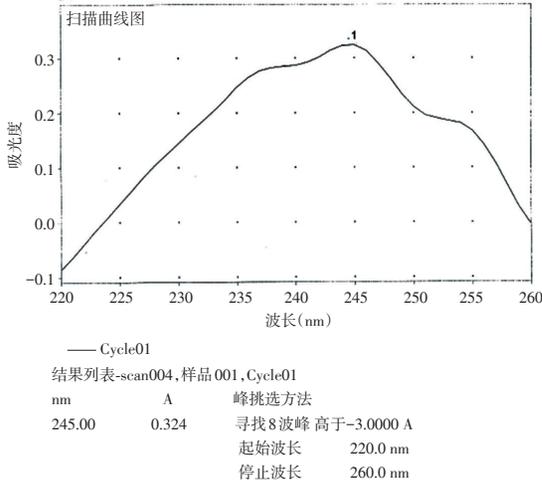


图1 紫外吸收光谱图

2.4 系统适用性试验

取0.5 mg/ml的对照品溶液,按2.1项下的色谱条件进样。理论板数按乙酰氨基阿维菌素B1a峰计算为4695,乙酰氨基阿维菌素B1a和B1b的分离度为3.67(见图2)。

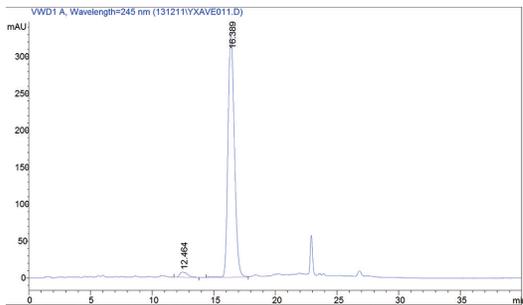


图2 系统适用性试验图

2.5 线性关系

取每1 ml中约含乙酰氨基阿维菌素1.00、0.50、0.25、0.12、0.06、0.03 mg的对照品溶液(实际取样后进

样浓度为每1 ml中含乙酰氨基阿维菌素0.03、0.07、0.13、0.27、0.54、1.03 mg),按2.1项下的色谱条件进样,记录色谱图,以对照品溶液浓度的对数值与相应的峰面积对数值计算线性回归方程。结果表明,在0.03~1.03 mg/ml范围内,峰面积的常用对数与进样量浓度的常用对数呈良好的线性关系,标准曲线如下图,回归方程 $y=25210x-142.12$, $R^2=0.9991$ (见图3)。

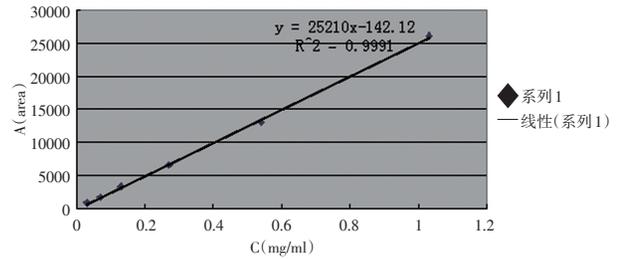


图3 乙酰氨基阿维菌素标准曲线

2.6 最低检出限

按信噪比S/N=3时,最低检测限为0.2 μg/ml。

2.7 精密度试验

取每1 ml中含乙酰氨基阿维菌素0.50 mg的对照品溶液,按2.1项下的色谱条件进样,连续进样6针,测定峰面积。相对标准偏差RSD为0.19%,结果表明本法的精密度良好(见表2)。

表2 精密度试验结果

峰面积	平均值	相对标准偏差(RSD)(%)
12063		
12068		
12111	12094	0.19
12094		
12119		
12109		

2.8 回收率试验

取已知含量的乙酰氨基阿维菌素原料适量,精密称定,用适量甲醇溶解后,加乙酰氨基阿维菌素注射液的空白溶剂制成制剂含量规格的80%、100%、120%三个浓度的样品,各3份,作为模拟样品,再分别稀释至0.40、0.50、0.60 mg/ml,作为进样浓度,按2.1项下的色谱条件进样,测定峰面积,

按照 2.5 项下的线性回归方程计算含量。结果表明回收率在 99.57 ~ 99.75% 之间, 批间 RSD 在 0.25 ~ 0.46% 之间, $n=6$ (见表 3)。

表 3 回收率试验结果

添加量(g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (RSD)(%)	
制剂标示量的 80% 添加量	0.0923	99.68	99.75	0.46
	0.0928	99.40		
	0.0928	99.10		
	0.092	99.92		
	0.0917	100.36		
	0.092	100.07		
制剂标示量的 100% 添加量	0.1092	99.90	99.98	0.30
	0.1097	99.55		
	0.1076	99.80		
	0.1074	100.02		
	0.1084	100.28		
	0.1081	100.35		
制剂标示量的 120% 添加量	0.1343	99.84	99.57	0.25
	0.1350	99.46		
	0.1352	99.70		
	0.1351	99.79		
	0.136	99.38		
	0.1358	99.24		

2.9 样品含量及重复性测定

取乙酰氨基阿维菌素注射液两批次, 分别各进行 6 次平行测定, 按 2.1 项下的色谱条件进样, 测定峰面积, 以外标法计算乙酰氨基阿维菌素的标示含量。结果表明本法的重复性良好, 两批次样品的 RSD 分别为 0.68% 和 0.40% (见表 4)。

2.10 稳定性试验

取每 1 ml 中含乙酰氨基阿维菌素 0.50 mg 的注射液 1 份, 按 2.1 项下的色谱条件进样, 测定峰面积, 分

表 4 含量测定及重复性测定结果

规格	含量(%)	平均值 (%)	相对标准偏差 (RSD)(%)
10 ml:0.1 g(河北威远动物药业有限公司)	109.11	110.03	0.68
	110.67		
	109.6		
	110.32		
	109.49		
	111.01		
50 ml:0.5 g(浙江海正药业股份有限公司)	105.92	105.72	0.4
	105.68		
	106.02		
	104.98		
	105.57		
	106.15		

别在 0、1、4、8、16、32 h 进样, 记录峰面积, 考察样品稳定性。结果显示, 样品在 36 h 内稳定, RSD 在 0.35 ~ 1.28% 之间。

3 小结

由于乙酰氨基阿维菌素注射液性状为略粘稠的油状液体, 所以建议取样后, 另取本品, 同时测定其相对密度, 将供试品量换算成 ml 数, 再作含量计算。

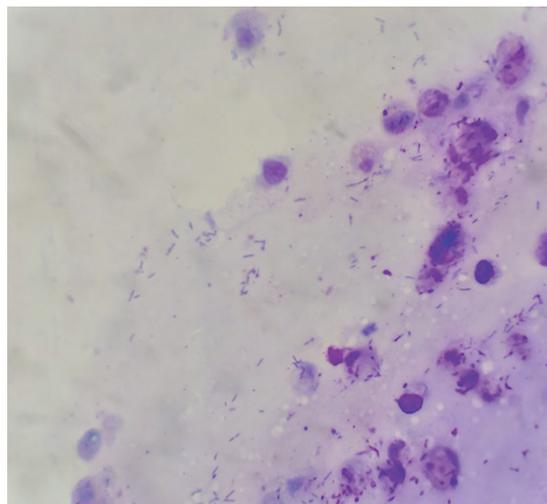
通过本法改良测定乙酰氨基阿维菌素注射液的含量, 灵敏度、稳定性及重现性高, 且干扰少, 回收率高, 结果准确, 方法可靠, 可为其质量控制提供依据。

参考文献:

- [1] 农业部兽药评审中心. 兽药质量标准汇编(2006-2011年)[S]. 北京: 中国农业出版社, 2013.4.
- [2] USP[S]. up34. 2010.
- [3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典(2015年版)一部[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016. 9.



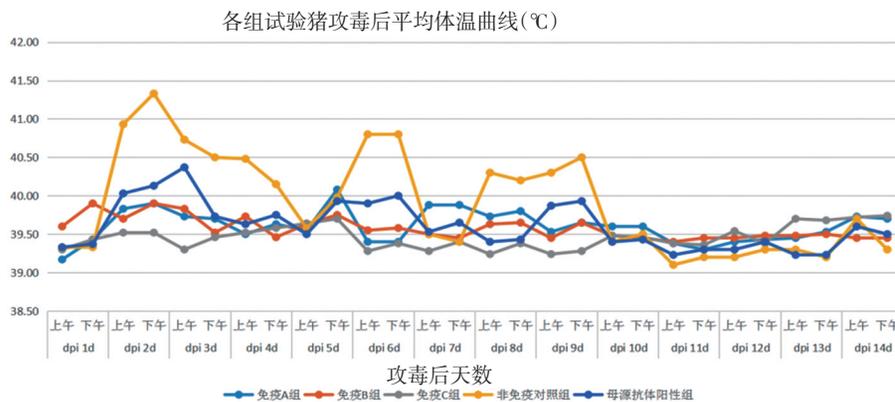
罗声扬等 图1 治疗前图



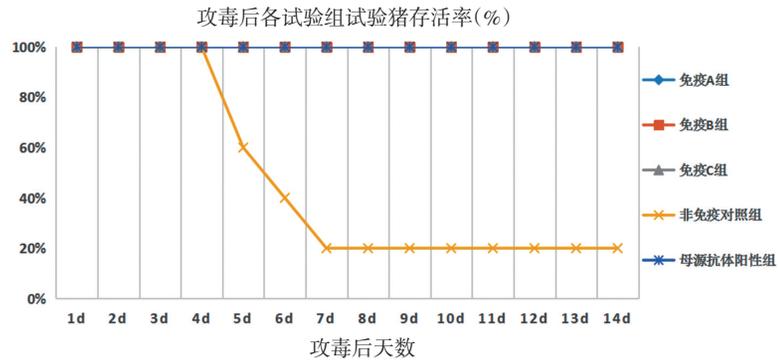
罗声扬等 图2 分泌物图片(100×目镜倍数 diff-quik 染色)



注:A:治疗第3天,动物眼睑肿胀;B:治疗第9天,动物眼睛稍微可以睁开;C:治疗第13天,动物眼睛可以完全睁开,视力良好
罗声扬等 图3 治疗过程图



吴文福等 图1 攻毒前后猪只体温变化曲线

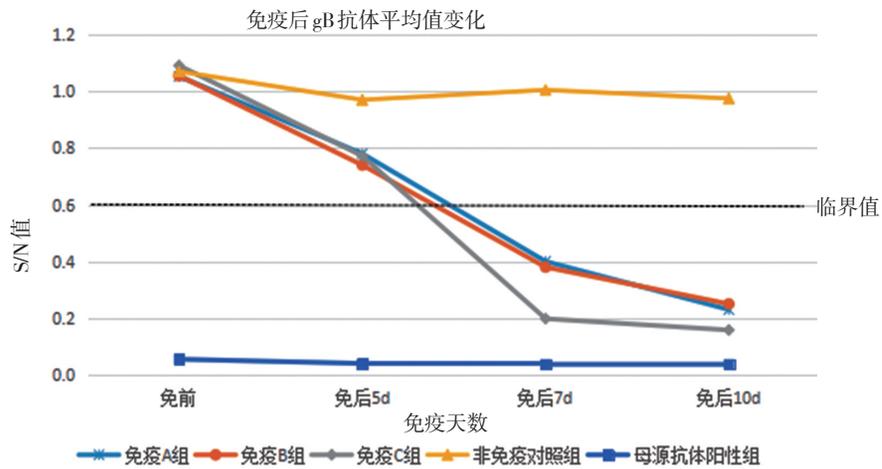


吴文福等 图2 攻毒后各组猪不同时间的存活率



注:A:肝脏有白色坏死点;B:脑充血、水肿

吴文福等 图3 非免疫对照组攻击强毒后病理变化



吴文福等 图4 免疫后PRV-gB抗体产生情况