

广东畜牧兽医科技

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

双月刊 1976年3月创刊

第45卷第1期(总第209期)

2020年2月18日出版

ISSN 1005-8567
中国标准连续出版物号 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

编辑委员会

编委主任:廖明

编委副主任:蒋宗勇 陈卫东 徐志宏

卢受昇

编委(排名不分先后):

舒鼎铭 张名位 李伟锋 王富华

孙铭飞 魏文康 蒋守群 罗成龙

马现永 王丽 王国霞 孟黎明

李大刚 向华 李春玲 彭新宇

吕殿红 张建峰 刘振兴 黄运茂

黄淑坚 林德锐 陈瑞爱

编辑部

主编:蒋宗勇

副主编:王刚 郑春田

主任:黄琳

副主任:马新燕

责任编辑:康桦华 吕晓慧 张洁华 王片片

岑俏梅

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街一街1号(510640)

电话:020-87576452

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:440100190079

目 录

·行业动态·

畜禽绿色养殖与废弃物资源化利用技术培训会在广东清远成功举办 … 李艳芳,阮栋,等(1)

2019年广东省养鸭市场形势分析与思考 …… 黄得纯,翁婕(4)

2019年生猪市场回顾与未来走势展望 …… 刘国信(7)

·专题综述·

微生物发酵豆粕在养殖生产中的应用研究进展 ……高庚渠、郭杰(10)

马冈鹅的饲养与繁育技术研究进展 …… 董嘉文,梁仕明,等(14)

雏鹅痛风病研究进展 ……徐丽娜,李晓林,等(19)

·畜牧技术·

水帘降温系统在肉猪生产中的应用效果分析 ……刘克俊,黎泰银,等(23)

2018年江门市活禽批发市场H9亚型禽流感病毒监测结果分析 ……陆巧芬,罗嘉轩,等(26)

羊感染布鲁氏菌病的诊断及防控 ……张少琼(29)

·兽医临床·

玉米锦蛇隐孢子虫感染病例分析 ……谢伟骏,萨家祺,等(31)

鸡毒霉形体病的分析 ……夏新萌,范书金,等(35)

不同厂家猪伪狂犬病活疫苗免疫效力的评估 ……姚俊庸,毛晶丹(37)

·试验研究·

高致病性H7N9流感病毒RT-LAMP检测方法的建立 ……黄海超,徐日文,等(39)

猪肺疫、猪丹毒病原RAA检测方法的建立 ……邵建宏,赵福振,等(43)

副鸡嗜血杆菌A、B型攻毒用菌液制备方法的研究 ……邓智昕,欧建安(48)

·信息之窗·

欢迎订阅本刊 …… (28)

GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in March 1976(Bimonthly)

FEB.2020 Volume 45, Number 1 (Total No.209)

Main Content

- The training meeting on the green feeding of livestock and poultry and waste resource utilization technology was successfully held in Qingyuan, Guangdong Province LI Yanfang, RUAN Dong, et al(1)
- Analysis and consideration of duck market in Guangdong province in 2019 HUANG Dechun, WENG Jie(4)
- Review of pig market in 2019 and future trend LIU Guoxin(7)
- Research progress in application of microbial fermented soybean meal in animal production GAO Gengqu, GUO jie(10)
- Research advance on the feeding and reproductive technology in Magang goose DONG Jiawen, LIANG Shiming, et al(14)
- Research advances on gout disease of Gosling XU Lina, LI Xiaolin, et al(19)
- Application of water-curtain cooling system in pig production LIU Kejun, LI Taiyin, et al(23)
- Analysis of monitoring results of H9 subtype avian influenza virus in live poultry wholesale market in Jiangmen in 2018 LU Qiaofen, LUO Jiaxuan, et al(26)
- Diagnosis and control of brucellosis in sheep ZHANG Shaoqiong(29)
- Case analysis of Cryptosporidium infection in *Pantherophis guttatus* XIE Weijun, SA Jiaqi, et al(31)
- Analysis of *Mycoplasma gallisepticum* XIA Xinmeng, FAN Shujin, et al(35)
- Evaluation of immune efficacy of live Pseudorabies Vaccine from different manufacturers YAO Junyong, MAO Jingdan(37)
- Development of RT-LAMP detection for highly pathogenic H7N9 influenza virus HUANG Haichao, XU Riwen, et al(39)
- Establishment of Recombinase - Aid - Amplification for the detection pathogen of swine pasteurellosis and erysipelas Shao Jianhong, Zhao Fuzhen, et al(43)
- Study on the preparation of *Haemophilus paragallinarum* type A and type B solution for attacking virus DENG Zhixin, OU Jianan(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

E-mail: gdxmsykj@163.com

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。

畜禽绿色养殖与废弃物资源化利用技术培训会 在广东清远成功举办

李艳芳¹, 阮栋², 霍星华¹

(1. 广东新南都饲料科技有限公司, 广东广州 510640;

2. 广东省农业科学院动物科学研究所, 广东广州 510640)

中图分类号:S815 文献标识码:D 文章编码:1005-8567(2020)01-0001-03

为贯彻习近平总书记视察广东重要讲话精神, 深入实施乡村振兴战略, 落实“不忘初心, 牢记使命”主题教育, 全面推进畜禽绿色养殖与废弃物资源化利用的可持续发展新格局, 助力清远市乡村振兴, 2019年11月12~13日, 由清远市农业农村局、广东省农业科学院清远分院、清远市农业科技推广服务中心共同举办、广东新南都饲料科技有限公司协办的“广东清远畜禽绿色养殖与废弃物资源化利用技术培训会”在清远成功举办, 为推进清远农业供给侧结构性改革、促进经济社会持续健康发展作出新的更大贡献。培训会由广东省农科院动科所副研究员、新南都常务副总经理王胜林主持, 动科所副所长郑春田、农业局畜牧科科长黄军龙、农推中心副主任罗远芬、广东省农科院清远分院主任曾斌等领导出席会议并分别致辞。会议邀请了动科所马现永研究员、程忠刚高级畜牧师、李家洲教授、苟钟勇副研究员、资环所逢玉万副研究员、石超宏博士出席并做了专题技术报告。报告内容如下:

生态健康养猪技术研究与应用——动科所马现永研究员

1、养殖环境及设施调控技术: 包括养殖温度、湿度、密度、光照、饮水、空气等条件及设施调控。

2、源头减排技术: (1) 在保障猪生产性能的前提下, 日粮蛋白水平降3%, 总氮排放量在各阶段(断奶仔猪、生长猪、育肥猪)均降20%以上。(2) 纳米锌对仔猪生产性能的影响试验中显示300 mg/kg纳米氧化锌与1600 mg/kg普通氧化锌效果相当, 因此使用纳米氧

化锌替代普通氧化锌大大降低肝脏及粪便中的锌含量; 使用纳米硒能提高育肥猪的日增重、降低料肉比、提高肌肉中血红蛋白含量。

3、无抗猪肉生产技术: 添加中草药添加剂、微生物制剂、多糖、谷胱甘肽、大蒜素等可改善猪肠道健康、改善肉品质、改善仔猪肤色及毛况、提高仔猪日增重、降低料重比、降低腹泻率, 提高免疫力, 大大减少抗生素等治疗药物, 降低养殖风险, 减少了环境的压力。

4、发酵饲料技术及应用: 应用发酵饲料(豆渣、果渣、酒糟渣、米糠等), 提高猪的适口性及饲料消化效率, 显著提高猪日增重, 降低日采食量(干物质重)及料重比, 大大节约饲料成本。

5、种养结合低碳循环技术: 推广生物发酵床和“猪-沼-果、猪-沼-林、猪-沼-草、猪-沼-菜”(猪粪尿制作沼气, 沼液和沼渣作为植物肥料种果、育林、种草、种菜等)种养结合、低碳循环生态养殖模式。

黄羽肉鸡抗氧化与抗应激营养调控研究——动科所苟钟勇副研究员

1、降低氧化应激的营养策略: (1) 益禽素100~150克/吨+维生素E 20~40克/吨+南都有机鸡矿1.0公斤/吨。(2) 益禽素200~300克/吨+维生素E 15~20克/吨+南都有机鸡矿1.5公斤/吨。

2、降低高温应激的营养策略: (1) 复合抗应激剂(每吨水里添加): 维生素A: 45克; 维生素D3: 4.5克; 维生素E: 15克; 维生素C: 75克; 赖氨酸: 105克; 蛋氨酸: 135克; 葡萄糖: 1120.5克; 氯化钾: 180克; 碳酸氢钠: 1320克。(2) 每吨饲料中添加: 铬: 3克。(3) 每吨饲

收稿日期: 2019-11-20

作者简介: 李艳芳(1982-), 女, 广东新会人, 硕士研究生, 畜牧师, 主要从事畜禽营养技术推广。E-mail: 522381457@qq.com

料中添加维生素C:200-300克。

3、抗应激的其他营养策略:(1)添加脂肪以提高日粮能量浓度。(2)降低蛋白质、补充氨基酸来缓解应激。(3)饲料中添加1%氯化铵和0.5%的碳酸氢钠,有利于恢复体内酸碱平衡,改善应激下畜禽的生产性能。(4)添加2000克/吨的氯化镁缓解运输应激,可显著提高肉鸡胸肌和腿肌的抗氧化酶活性、并显著降低了肌肉丙二醛含量。(5)饮水中添加200克/吨维生素C,有助于维持肉鸡较高的采食量,从而保证足够的营养供给抵抗应激的不利影响。

替抗防非、抗氧去应、增免疫健康的养殖技术—— 动科所、新南都程忠刚高级畜牧师

1、生猪健康高效的养殖模式:通过无抗低抗、替抗防非、抗氧减应、抗炎技术、减矿增效、减排环保、低氮减排、中药技术、免疫平衡、生物发酵等技术,实现绿色、环保、健康、高效的养殖目的。

2、深入探讨几项具体技术措施:

(1)无抗/替抗养殖技术:①无抗养殖的抗病配方技巧:严控霉菌;增强抗氧化能力;使用低蛋白环保配方;高消化蛋白原料及氨基酸平衡;高消化脂肪及脂肪酸平衡;膳食纤维应用;免疫营养,苏/色氨酸、VC、VE、Se;低热增值;电解质平衡;降低原料各抗营养因子、提升乳化效果。②替抗的功能性添加剂:1)抗炎性:植物精油、中草药、植生素、脂肪酸;2)整肠性:使用益生菌、微生态制剂、活性酵母、酸化剂、肠膜蛋白、短链脂肪酸、核苷酸、麦芽寡糖、谷氨酰胺、酶制剂等;3)替抗添加剂:溶菌酶、抗菌肽、中草药(黄连/姜黄/大蒜)、月桂酸单甘油酯、植物精油、纯卵磷脂的乳化等;4)抗病毒增强免疫力:抗菌肽、干扰素、中草药、黄芪多糖、酵母水解物、 β -葡聚糖、 α -月桂酸单甘油酯等。

(2)降应激/增免疫养殖技术:①降低/缓解应激的手段:1)要严控霉菌;2)日粮科学:平衡氨基酸,降低粗蛋白以降低氨气浓度;3)氨基酸/维生素:赖氨酸,维生素C、E、A、D、 β -胡、叶酸;4)植物提取物:益长素;5)矿物质:小苏打、KCL、硒/锌;6)有机酸:柠檬、乳酸、延胡索酸;7)糖类:葡萄糖、低聚糖(果寡、甘露寡);8)中草药:柴胡/石膏调体温;朱砂/刺五加镇静催眠;马鞭草/车前草祛热降温;9)免疫增强剂:微生物来源;免疫产物-转移/干扰;真菌多糖类。②增强免疫力的手段:1)严控应激;2)营养免疫;3)氨基酸:尤其赖氨酸、结氨酸等;4)维生素:VE、C、K、A及B族;5)真菌

多糖:黄芪、香菇、灵芝多糖;6)植物提取物:益长素、益元素;7)中草药:板蓝根、金银花、黄芪、黄芩、大蒜等;8)严控饲料质量:防氧化霉变、营养不均;9)免疫增强剂:微生物来源;转移因子/白介素/干扰素;化学药物等。

(3)抗氧化/清自由基养殖技术:抗氧化系统组成,通过内、外源抗氧化剂来消除体内多余有害自由基,降低自由基对机体细胞、组织和器官的损伤,并分析说明抗氧化效果评价体系。

(4)非洲猪瘟复养饲料综合技术及非瘟复养成功的关键控制点:非瘟、蓝耳、圆环病毒等常态化交叉存在,低健康度、免疫力低、贫血都会导致弱猪、易感猪,疾病导火索亦是病毒入侵“弱点/切入点”。清除体内自由基+补铁生血防贫血+营养/中药免疫+科学营养配方=替抗防非+健康度+免疫力+提高发病门槛=复养饲料综合技术;而良好的大环境+精细的饲养管理+科学的生物安全制度+各环节的执行力/细节要到位=复养成功关键。

3、新南都公司体内抗氧化调控技术的结晶——益长素、益禽素等在现实生产中的应用效果:益长素在种用动物实验、高产母猪使用益长素的效益评估,益禽素在肉鸡、蛋鸡、肉鸭及蛋鸭的使用效果以及大量畜、禽生产应用证明:益长素及益禽素等,能有效清除动物组织器官、细胞的自由基,提高抗氧化能力,提升动物的健康和生产水平。

病死畜禽无害化处理——动科所李家洲教授 病死动物尸体无害化处理方法:

1、深埋法——是一种常用、可靠、简便易的方法:

(1)首先选择合适地方,应远离居民区、水源、泄洪区、草原及交通要道,避开岩石地区,位于主导风向的下方;(2)其次修建大小合适的掩埋坑,在坑底洒漂白粉或生石灰;(3)接着就是进行掩埋:将用10%漂白粉上清液喷雾经2小时处理过的动物尸体投入坑内,使之侧卧,并将污染的土层和运尸体时的有关污染物如垫草、绳索、饲料、少量的奶和其他物品等一并入坑,先用40厘米厚的土层覆盖尸体,然后再放入未分层的熟石灰或干漂白粉,覆土掩埋;(4)最后平整地面,掩埋场应标志清楚,并得到合理保护。

2、焚烧法——既费钱又费力,只有在不适合用掩埋法处理动物尸体时,主要采用柴堆火化:(1)首先选择远离居民区、建筑物、易燃物品的地方;(2)然

后准备火床,分十字坑法(按十字形挖两条坑)、单坑法(挖一条坑)、双层坑法(挖一条大沟,在沟的底部再挖一条大沟);(3)在坑底堆放干草或木柴,将尸体放在架上,在尸体的周围及上面再放些木柴,然后在两坑交叉处的坑底堆放干草或木柴上倒些柴油,进行焚烧;(4)焚烧结束后,掩埋燃烧后的灰烬,表面撒布、消毒剂,填土高于地面,场地及周围消毒,设立警示牌。

3. 发酵法——是将尸体抛入专门的动物尸体发酵池内,利用生物热的方法将尸体发酵分解,以达到无害化处理的目的:(1)首先选择远离住宅、动物饲养场、草原、水源及交通要道的地方;(2)接下来就是建发酵池,如有条件,可在池上修一小屋;(3)尸体堆积于池内,当堆至距池口1.5米处时,再用另一个池;(4)此池封闭发酵,夏季不少于2个月,冬季不少于3个月,待尸体完全腐败分解后,可以挖出作肥料,两池轮换使用。

4. 化制法——分干化法和湿化法:(1)干化法:高压密闭容器中,直接加热至140℃以上,时间4h以上,压力0.5MPa以上;(2)湿化法:高压密闭容器中,蒸汽加热至135℃以上,时间30分钟以上,压力0.3MPa以上。

华南地区畜禽粪污不同处置模式及除臭技术研究——资环所逢玉万副研究员

1. 通过养鸡场粪污处置模式的发酵罐模式、条垛模式、槽式模式三者比较,建议养鸡场以密闭发酵罐模式为主,负压-槽式发酵模式为辅,不建议采用条垛式半静态堆肥。该模式可有效控制养鸡场臭气,快速、高效的将鸡粪处置为高养分有机肥,基本能够实现环保费用自给自足。

2. 猪场粪污处置模式:

(1)沼气+养鱼:沼气效率低,沼液无害化程度低;冲洗水量难以控制,污染源扩大;鱼塘换水排放时,严重污染河道及周边农田;存在食品安全隐患。

(2)沼气+污水处理:沼气发电效率高,基建成本高及运行费用高;密闭发酵罐购置成本高,电费高;有机肥产量低,品质较高。

(3)原位高床+异位堆肥:猪舍基建成本高,垫料发酵效率低,需持续负压通风保证臭气不上浮;垫料使用后期容易出现死床,渗漏水较多;异位堆肥车间建设及运行费用较高;有机肥产量较高,品质较高。

(4)原位中床+异位发酵床:猪舍基建成本高,设备自动化程度高,养殖环境好;养殖环节运行成本略高;异位堆肥车间建设及运行费用中等;有机肥产量较高,品质较高。

(5)低床漏缝虹吸+异位发酵床:猪舍基建成本高,设备自动化程度中高,养殖环境好;养殖环节运行成本略高降低;异位堆肥车间建设及运行费用中等;有机肥产量较高,品质较高。

3. 采用脱硫废弃物(MDR)治理畜禽粪便堆肥臭气有确切的理论依据和显著效果。而添加了炭颗粒后,炭颗粒既可以吸附氨气,又能提高MDR接触面的pH值,使氨气、磷酸根和镁离子合成MAP(缓释氮磷肥)时效率更高,从而起到了强化的作用,提高了保氮效率;添加除臭菌与炭颗粒组合的处理,硝化菌数优势明显,表明该处理促进了硝化作用,解释了原位保氮除臭的机制。

畜禽废弃物高效清洁利用与高值化产品开发——资环所石超宏助理研究员

1. 畜禽废弃物处理主推技术:

(1)粪污全量还田模式:优点是建设成本低,处理费用也较低,粪污全量收集,养分利用率;不足是贮存周期一般半年以上,需要足够的土地建设氧化塘,施肥期较集中,配套专业搅拌设备、施肥机械、农田施用管网等。

(2)粪便堆肥利用模式:优点是处理较彻底,发酵周期短,提高粪便的附加值;只是好氧堆肥过程易产生大量的臭气。

(3)粪水肥料化利用模式:粪水经氧化塘处理储存后,在农田需肥和灌溉期间,将无害化处理的粪水与灌溉用水按一定比例混合,进行水肥一体化施用。固体部分用于固体发酵生产有机肥或委托第三方处理。

(4)粪污资源化利用模式:优点是集中统一处理,专业化运行,资源化利用效率高;但一次性投资高,能源产品利用难度大,沼液产生量大。

2. 畜禽废弃物生物处理及资源化利用:(1)畜禽废弃物微生物好氧发酵-堆肥技术:推荐用条垛堆肥、槽式堆肥、反应器堆肥、异位发酵床技术、高温生物降解技术等。(2)畜禽废弃物昆虫转化技术:黑水虻取食禽畜粪便等废弃物,广泛应用于鸡粪、猪粪及餐厨垃圾等废弃物处理。

2019年广东省养鸭市场形势分析与思考

黄得纯¹, 翁婕²

(1. 广东佛山科学技术学院, 广东南海 528225;

2. 广东科贸职业学院, 广东广州 510430)

摘要:本文分析了2019年广东省养鸭业市场行情与养殖企业所困惑的问题, 提出产业技术体系建设、环境保护、防疫体系建设、食品安全、市场流通与加工转型升级思路, 为养鸭业持续健康发展提供参考。

关键词:养鸭业; 价格走势; 体系建设; 转型升级

中图分类号:S815 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2020)01-0004-03

2019年受非洲猪瘟疫情影响, 生猪产能骤降, 猪肉供应存在较大缺口, 禽肉成为主要替代品, 供求关系发生变化, 量价齐升。通过对广东省肉鸭与蛋鸭养殖企业、批发市场和屠宰场的调查分析, 统计出近几年各品种肉鸭、雏鸭与鸭蛋的价格走势; 了解广东省养鸭业养什么、养多少、哪里养、怎么养, 分析目前经营模式、育种、环境保护、疫病、食品安全等养殖企业所困惑的问题。如何理清和看待肉鸭业的发展, 突破所遇到的瓶颈, 分析如下:

1 养殖品种数量与区域

广东省养鸭生产中养殖的肉鸭品种主要是快大型的樱桃谷, 其次是番鸭、骡鸭、麻鸭、水鸭和杂交鸭等, 蛋鸭以山麻鸭和绍兴鸭为主; 根据广东省统计局统计数据, 2018年全省鸭的饲养量3.24亿只, 占家禽饲养量的22.12%。茂名、云浮、湛江、肇庆和梅州是鸭的主产区。

2 市场行情分析

2.1 快大型白羽肉雏鸭、肉鸭养殖史上最好行情

由图1可见, 2019年广东省快大型白羽肉雏鸭平均售价5.81元/羽, 创历史新高, 比成本价(2.70

元/羽)高115.19%, 较2015~2018年平均售价3.00元/羽高93.67%; 最高价的11月份平均售价为9.03元/羽, 比成本价高234.44%, 最低价的12月份平均售价只有1.79元/羽, 比成本价低33.70%。由图2可见, 2019年广东省快大型白羽肉鸭平均出栏价为10.24元/kg, 比成本价(8.10元/kg)高26.42%, 最高价的11月份为12.98元/kg, 比成本价高60.25%, 全年最低价格是2月份的7.62元/kg, 比全年平均成本价低5.93%。2019年比2015-2018年的平均出栏价8.75元/kg高17.03%, 但因鸭苗价格高, 疫病多发等, 养殖成本较往年(7.30元/kg)高10.96%; 受限于禁养政策和鱼塘水面面积, 肉鸭养殖量较稳定, 加上本省肉鸭饲养期较长, 肉质较好, 适合加工烧鸭, 较受消费者欢迎, 外省冰鲜、冻鸭产品冲击到了一定比例后增长放缓, 总体供求平衡, 全年价格较高, 多数快大型肉鸭养殖场盈利, 仅有部分生产水平不高且未能规避市场风险者没有盈利。

2.2 半番雏鸭、半番鸭市场全线飘红

半番鸭饲养以粤东、粤西为主, 由图3可见, 2019年广东省半番雏鸭平均售价为8.75元/羽, 比成本价(3.00元/羽)高191.67%, 其中最高价是5月份平均售价为13.81元/羽, 比成本价高360.33%,

收稿日期:2020-01-07

项目支持:佛山科学技术学院岭南学者科研启动项目(CGG07363);广东省现代农业产业技术体系创新团队项目(2019KJ137)

作者简介:黄得纯(1968-), 男, 高级兽医师, 主攻方向为家禽生产技术。E-mail:344217638@qq.com

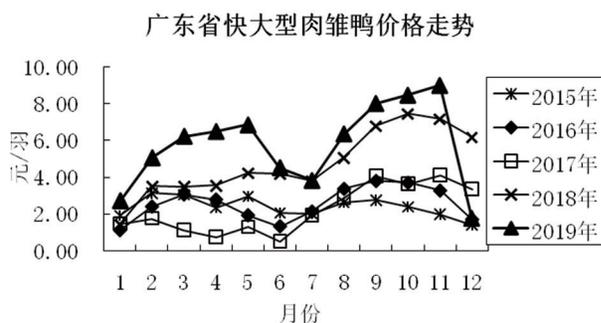


图1 2015年~2019年广东省快大型肉雏鸭价格走势

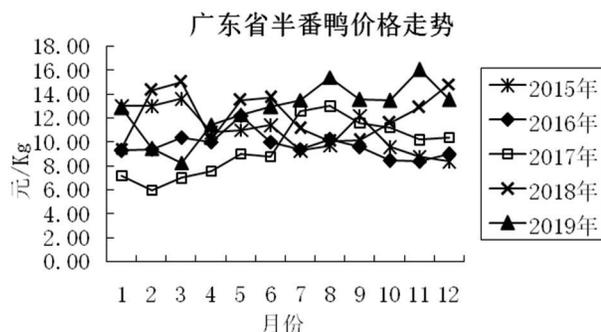


图4 2015年~2019年广东省半番鸭价格走势

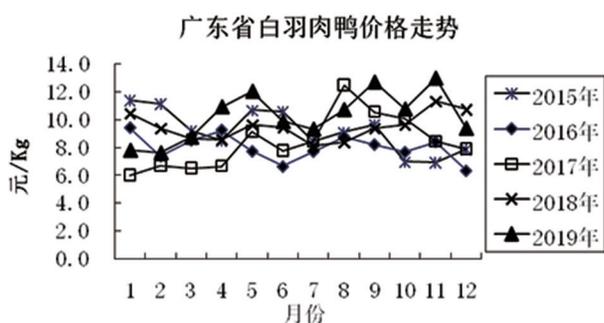


图2 2015年~2019年广东省快大型白羽肉鸭价格走势

2.3 鸭蛋行情走势平稳

广东省蛋鸭养殖以粤西、粤中的江门、惠州等地区为主，由图5可见，2019年鸭蛋全年平均价格为9.79元/kg，较2018年鸭蛋售价11.32元/kg(成本价8.20元/kg)低13.52%，鸭蛋不是猪肉的主要替代品，受非洲猪瘟疫情的影响较小，上年好行情后，市场经过调整，全年行情走势较平稳，大部分时间售价高于成本价，依然有不错的利润。

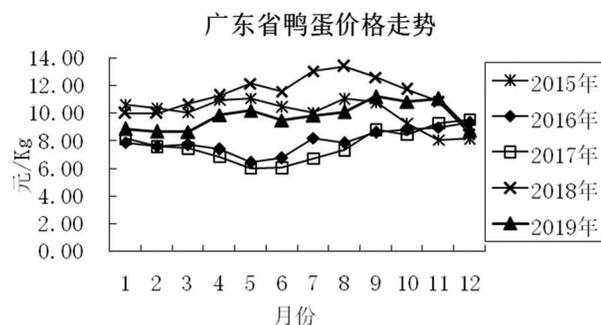


图5 2015年~2019年广东省鸭蛋价格走势

最低是3月份平均售价为4.47元/羽，也比成本价高49%，全年12个月平均售价均高于成本价；持续高价运行，经营效益喜人。由图4可见，2019年广东省半番鸭平均售价12.73元/kg，比全年平均成本价(10.40元/羽)高22.40%，最高价是11月份为16.06元/kg，比全年平均成本价高54.42%，最低价是3月份为8.26元/kg，比全年平均成本价低20.58%。2019年比2015-2018年的平均售价10.68元/kg(成本价9.40元/kg)高19.19%，全年大部分月份持续在成本价上运行，大多数养殖场盈利喜人。

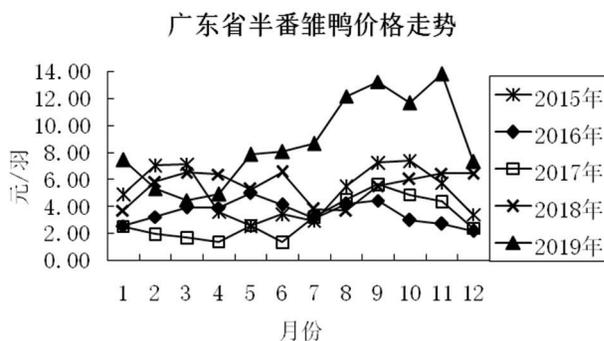


图3 2015年~2019年广东省半番雏鸭价格走势

3 对养鸭业发展的思考

3.1 关于产业技术体系建设

科学技术是第一生产力，科学技术在于提高畜牧业的整体素质和整体生产水平，提高产品科技含量，加快科研成果的转化。广东省水禽产业技术体系针对当前水禽产业发展遇到的困难和技术瓶颈，重点从品种、饲养、饲料、疾病、质量与环境控制等方面开展科学研究及科技示范工作。尽快制定出适合广东省养鸭不同生长阶段的营养标准，推行新型绿色饲料及饲料添加剂，采用科学配方，降低饲料成本；建立肉鸭养殖、深加工、产品质

量标准和质量控制的一系列产业标准。品种是养鸭产业是否有竞争力所在,目前外来品种主导了我国肉鸭种苗市场及生产,给国内肉鸭育种造成了严重的障碍和产业利润流失。因此,各养殖企业要加大育种的投入,引进高技术人才,逐步完善良种繁育体系,根据市场需要,开发研究新品系,番鸭、骡鸭生产推广应用人工授精技术,减少公鸭饲养数量,提高饲料报酬和养殖效益。

3.2 关于环境约束趋紧问题

畜禽养殖污染问题日益凸显,国家推出了《中华人民共和国环境保护法》、《畜禽规模养殖污染防治条例》、《水污染防治行动计划》等保护生态环境的政策措施,各地县级以上人民政府依法制定的禁养和限养政策也纷纷出台。《畜禽养殖业污染物排放标准(GB 18596)》与《地表水环境质量标准V类水质标准(GB 3838)》中控制项目值差异较大,在环境处理问题中出现矛盾和冲突,广东鸭业面临无水可养的情况,为解决土地和水面积紧缺的问题,产业需要调整布局,进行升级;广东省约有池塘、水库37万公顷,大部分养鸭采用鱼塘水面养殖模式,部分养殖场缺乏配套建设粪便污水贮存、处理与利用设施,需尽快实施雨污分流、粪便污水资源化利用,减少污染。养殖企业需探索发展网上饲养、小池饲养、地面平养和笼养。

3.3 关于防疫体系建设

广东省肉鸭业产业化发展还处在初始阶段,分散经营,缺乏大型龙头企业,规模小,资金投入不足,单一经营。部分养殖者在饲养、管理、防疫等方面的技术都相对落后,影响到生产效益。当下鸭流行疾病存在新发疫病多,大多通过消化道感染,主要侵害雏鸭,复杂多变,防控办法少,经济损失严重等特点。目前对养鸭威胁较大的有高致病性禽流感、雏鸭病毒性肝炎、腺病毒、鸭疫里默氏杆菌病、大肠杆菌病、禽出败、呼肠孤病毒、番鸭细小病毒病等。发病引起成活率低,疫病越来越复杂,用于鸭病预防和治疗的各种疫苗和药品等费用增多,导致养殖成本增加,影响经济效益。通过疫病防疫体系建设,对环境控制、免疫预防、疫病监控、疫病扑灭等方面进行综合防制,提高疫病

防控整体水平,有效地防止重大传染病的发生。

3.4 关于食品安全问题

食品安全问题关系人民生命和健康,已成为影响市场竞争秩序的重大问题。部分养殖者在设施、管理、防疫等方面都相对落后,应通过成立专业合作社,或者建立“公司+基地+现代养殖户”,提高经营管理水平,带来过硬的质量保证体系。抓好养鸭生产的安全体系建设,加强饲养管理,通过改进粗放的养殖习惯,对环境控制、免疫预防、疫病监控、疫病扑灭等方面进行综合防制,有效地防止重大传染病的发生;避免违禁饲料添加剂和抗生素的滥用,遵守休药期规定。使生产过程和产品质量均符合国家有关标准和规范的要求,获得具备可追溯性的无公害产品。

3.5 关于市场流通与加工转型升级

减少肉鸭生产、流通、加工、销售链条中间环节,缩短渠道,保持稳定的盈利水平,发挥效益显得越来越重要。2015年1月15日正式实施《广东省家禽经营管理办法》以来,珠江三角洲各地级以上市城区和其他人口密集的地级市城区限制活禽交易,实行活禽集中屠宰、冷链配送、生鲜上市。但目前广东省屠宰量每天达万只以上的加工场仅有7~8家,绝大部分产品以初级加工的鲜品、冷鲜、冻品进入市场,副产品开发严重滞后,配送网络和配送效率仍不完善,配送点分散,从屠宰加工完成到上市一般超过5小时,效率不高,屠宰企业的运营成本加大。随着肉鸭屠宰后再上市的比率上升,集中屠宰、冰鲜鸭产品替代活鸭成为趋势。改变活鸭集市,分散屠宰的经营方式,构建产、加、销一体化的流通体系,需考虑划定屠宰区域,以销定产,建设冰鲜批发市场,集中配送。

基于以上分析,随着我国经济的发展,人们生活水平的提高,肉鸭产品的需求仍将继续增加,畜牧业中肉鸭产品受国外冲击是较小的,肉鸭仍是广东省的优势产品,出口量还会较大幅度地增长。只有健全重大疫病防治体系,加强宏观调控,实施体制创新,培育龙头企业,形成产业化经营;提高饲养管理水平,发挥优势,降低成本。为养鸭业创造良好的大环境,养鸭业才能持续健康发展。

2019年生猪市场回顾与未来走势展望

刘国信

(阳城县畜牧兽医局, 山西 阳城 048100)

摘要:2019年是真正的金猪年。由于非洲猪瘟疫情影响,生猪产能持续下降,导致生猪价格年内一度创下出栏均价40元/公斤以上的罕见高位,并维持较长时间,行业盈利达到历史最好、最高水平。随着一系列稳定生猪生产的扶持政策落实显效,目前全国生猪生产呈现整体趋稳向好态势。预计,2020年猪价仍将在高位区间波动运行,后市或将逐渐震荡回调。

关键词:政策措施; 生猪生产

中图分类号:S815 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2020)01-0007-03

只要是站在风口,猪真的也能飞起来。2018年秋季以来,由于非洲猪瘟疫情影响,生猪产能持续下降,导致猪价在2019年春季触底反弹后全线飘红,进而突破历史罕见高位;入冬以来,已进入猪肉的传统消费旺季,加之冬至已过,气候开启寒冷模式,“灌香肠、制腊肉”相继启动,元旦、春节来临,或将再度推动全国猪价阶段性上行。

业内人士表示,由于非洲猪瘟疫情危害严重,当前生猪复养依然存在一定困难。最近,农业农村部印发《加快生猪生产恢复发展三年行动方案》,随着各项稳定生猪生产的扶持政策显效,目前全国生猪生产整体开始趋稳向好。预计,2020年猪价仍将在高位区间波动运行,后市逐渐震荡回调。

1 猪价创下罕见新高,疫情成为罪魁祸首

业内人士分析认为,2019年猪价之所以暴涨,主要原因是受非洲猪瘟疫情影响,生猪生产受到严重冲击,存栏量短期内大幅度下滑,导致猪源偏紧、产量骤减供求失衡。

数据显示,2018年8月份我国发生非洲猪瘟疫情后,由于消费需求下滑,导致2018年秋季至2019年春节期间的消费旺季,生猪价格旺季不旺,反跌至10元/公斤以下的历史低点。而春节后的3月份,在节后消费淡季里猪价却触底反弹,4、5月份一直在震荡中上行;6月份,全国活猪、猪肉、仔猪行情更是全线飘红,在传统消费淡季里逆势上涨,7、8月份更是一天一个价地往上蹿。短短几个月时间,全国猪价暴涨了两倍多。9月份以后,在中秋、国庆消费需求拉动下,全国生猪供求形势更加紧张,导致猪价持续高位运行。

而“十一”过后,本应回落的猪价反而再度飙升,许多地区出现一天涨2元的势头,导致全国生猪出栏均价在10月中下旬突破40元/公斤的高位,部分地区甚至创下45元/公斤以上的罕见新高。11月中下旬,高贵的生猪价格才显现回落势头,但12月份以来,随着大风降温与雨雪天气增多,加之,中南6省活猪禁调政策实施,生猪行情又震荡前行。

据中国养猪网猪价系统监测,12月22日,全

国外三元生猪出栏均价为33.74元/公斤,内三元生猪出栏均价为32.89元/公斤,土杂猪出栏均价为32.42元/公斤,当日猪粮比为17.12:1。随着活猪价格上涨,猪肉价格也在飙升。国家统计局发布的全国居民消费价格指数(CPI)数据显示,2019年11月份,CPI同比上涨4.5%,涨幅比上月扩大0.7个百分点;虽然11月份猪肉价格有所回落,但结构性矛盾仍比较突出,猪肉价格上涨对CPI涨幅贡献达到58.9%,影响CPI上涨约2.64个百分点。综观2019年的猪价行情,预计,全年每头出栏肥猪盈利根据各场管理水平不同达到2000~2500元左右,行业盈利达到历史最好最高水平。

2 年末行情逐渐启动,生猪价格稳中伴涨

入冬以来,随着气候开启冬季模式,受制于寒潮侵袭雨雪天气增多,生猪运输受到一定影响,生猪出栏有所减少,全国猪市呈现稳中上涨行情。元旦、春节因素的叠加效应,屠宰、加工与流通各环节备货量必然增加,或将推动猪价稳中上行。不过,随着各项调控措施实施,也将在一定程度上压缩后市猪价的上涨空间。

2.1 消费旺季相继到来,后市仍有上涨预期

目前已进入冬季猪肉的传统消费旺季,不少农村还有“杀年猪”的习俗,短期内集中消费需求快速放大,猪价还有阶段性的上涨预期。

2.2 多重因素叠加掣肘,有利支撑猪价上行

根据养殖规律,从能繁母猪配种、产仔到肉猪上市周期约需要十个月时间,2018年10月份生猪基础产能下降,导致2019年6、7月份开始生猪供应减少问题集中显现,而2019年恢复生产的肉猪供应应在2020年第四季度开始;同时,复产过程中因缺种猪而部分商品肉猪留作种用,也会减少肉猪的上市量;而猪价上涨,虽然会刺激补栏热情,但由于仔猪来源有限,决定了未来一段时期供求市场难以平衡,短缺仍将持续。

从生产成本来看,目前在生猪主要生产成本中,仔猪价格与去年同期相比上涨3倍左右,将导致后期出栏生猪成本更高;同时,今后环保政策愈

来愈严,将导致投资建场及用于粪污处理设施的投入增加;2020年开始实施“饲料禁抗”等规定,养殖场户一时难以适应,导致疾病多发难治,发病死亡率上升,用于防治方面等的开支增加,也将对行业带来阵痛,从而进一步推高养殖成本。

2.3 适时投放储备肉,将压缩猪价上涨空间

当前,猪肉价格上涨已经成为影响CPI上行的主要因素,同时超高的猪肉价格也对消费产生了抑制。据悉,为了合理调控市场,避免物价大幅度波动,保障居民消费,国家发改委等部门在9月份三批投放3万吨储备肉的基础上,12月13日、23日又分别向市场投放两轮各4万吨储备肉,从而减轻了市场猪肉供应压力,致使猪肉价格逐步回落,预计两节期间仍会有大量低价储备肉投放市场。同时,进口肉类在近几个月增长明显。海关统计数据显示,2019年1~9月,进口猪肉达到132.57万吨,比2018年同期增幅43.6%,已经超过2018年全年119.3万吨的进口总量,预计2019年全年猪肉及副产品进口量将创历史新高,突破300万吨。这些因素或将在一定程度上压缩后市猪价的上涨空间。

最近,相关人士表示,今后还将密切跟踪市场动态,适时按节奏做好中央储备肉投放工作,并指导产销区建立稳定的购销协作关系,促进区域间产销衔接,畅通肉类供应渠道;运用市场化原则,继续鼓励扩大猪肉进口,确保国内供应;同时,还要加强市场监管,严厉打击囤积居奇、串通涨价等不法行为,重点加强对“炒猪团”的整治力度。

3 各项政策开始显效,生猪生产趋稳向好

2019年生猪行情全线飘红,成为真正的金猪年。但猪价超常规上行,也产生了诸多负面影响。为了防控非洲猪瘟疫情,稳定生猪生产,确保市场供应,多项政策“组合拳”开始显效,目前生猪生产呈现整体趋稳向好的态势。

据悉,为进一步加强非洲猪瘟防控,稳定生猪生产,2019年以来,国务院连续召开多次会议、下发专门文件要求综合施策恢复生猪生产,保障猪

肉供应。为了认真贯彻落实党中央、国务院决策部署,2019年以来,农业农村部把生猪稳产保供放在更加突出的位置,对全国生猪稳产保供作出全面部署。3月印发《稳定生猪生产保障市场供给的意见》,5月至8月多次召开全国生猪稳产保供会议,9月在河北邢台召开生猪生产推进会。随后,相继召开东北和南方片区会,指导东北地区扩群增养,要求南方地区尽快遏制下滑趋势。成立恢复生猪生产协调办公室,加强生产和政策情况调度。会同国家发改委、财政部、自然资源部等多部委密集出台17项扶持生猪产业发展的政策措施,鼓励支持养殖场户增养补栏,多措并举扩大生猪生产,确保市场供应。

据了解,随着一系列恢复生猪生产政策措施的落实显效,2019年11月以来,全国生猪生产出现转折性积极变化,目前生猪存栏已经扭转了持续下滑的局面,生猪生产呈现整体趋稳向好态势,其主要表现在以下几个方面:

(1)生猪存栏和能繁母猪存栏,双双止降回升。据农业农村部定点监测,2019年11月份,生猪存栏环比增长2%,自2018年11月份以来首次回升;能繁母猪存栏环比增长4%,已连续2个月回升。从不同区域看,有18个省份生猪存栏环比增长,比10月多6个;有22个省份能繁母猪存栏环比增长,比10月多5个。其中,东北、西北、黄淮海、华东、华南等地区生猪生产恢复较快。

(2)规模猪场生产恢复势头强劲,加速行业复产。据统计,2019年11月份,全国年出栏5000头以上规模猪场的生猪和能繁母猪存栏环比增幅分别为1.9%和6.1%,均比10月份扩大1.4个百分点,已连续3个月环比增长。

(3)后备母猪销量增长,补栏增养信心进一步增强。对重点种猪企业跟踪监测表明,2019年11月份,二元后备母猪销量环比增长25.9%,同比增

长135%,表明养殖场户补栏增养信心进一步增强。

(4)猪饲料产销量持续增长,表明生猪生产呈现恢复势头。据对全国饲料生产企业全覆盖监测,2019年11月份,猪饲料产量环比增长6.9%。猪饲料是生猪养殖的物质基础,猪饲料产量连续3个月环比增长,也反映出全国生猪生产呈现恢复的良好势头。

最近,农业农村部印发《加快生猪生产恢复发展三年行动方案》,要求各地进一步落实省负总责、总要求和“菜篮子”市长负责制,进一步增强工作责任感紧迫感使命感,把生猪稳产保供作为农业工作的重点任务抓紧抓实抓细,确保三年生猪生产恢复任务目标的实现。要求2019年尽快遏制生猪存栏下滑势头,确保年底前止跌回升,确保2020年元旦春节和全国“两会”期间猪肉市场供应基本稳定;确保2020年年底前产能恢复到接近常年的水平,2021年恢复正常。

当前,许多养猪场户关心的还是春节前和2020年的猪价走势。笔者认为,由于此轮猪价涨幅过大,根据近年“逢节必跌”的经验,临近春节切不可因为猪价上涨就刻意压栏。同时,疫情也是一把双刃剑,目前已进入猪病高发流行期,养殖场户要接受以往教训,加强饲养管理,做好疫情防控。

从供需两端变化形势分析,总体看当前能繁母猪存栏已经回升,生猪存栏下降也基本见底。与此同时,2019年以来进口猪肉持续增加,加之禽肉、牛羊肉等替代品消费增加,将会对后市猪市行情形成一定打压。预计,2020年生猪行情小涨问题不大,大涨的希望渺茫,但依然会维持在利好价位。大家一定要理性对待,既不要跟风抛售,也勿盲目压栏,豪赌后市。建议正常养猪,抓住有利时机适时出栏落袋为安。

微生物发酵豆粕在养殖生产中的应用研究进展

高庚渠, 郭杰

(河南质量工程职业学院国家食品安全检测科研中心, 河南 平顶山 467000)

摘要:随着我国大豆原料的供给形势日益严峻, 饲用蛋白质需求增大, 饲料成本增加, 饲用蛋白不足在一定程度上影响了我国养殖业的发展。豆粕蛋白质含量较高, 营养成分全面均衡, 但豆粕中存在的抗营养因子在一定程度上限制了豆粕的使用范围, 如何更加安全高效的利用豆粕成了养殖业急需解决的问题。微生物发酵豆粕以其优良的性能成了近几年研究的热点。本文就发酵豆粕在养殖业生产中的应用情况作一综述, 以期对养殖业生产及相关研究提供参考。

关键词:微生物发酵豆粕; 饲料; 应用

中图分类号:S816.6 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2020)01-0010-04

近年来, 随着国内养殖规模的不断扩大, 养殖业对蛋白饲料的需求不断增大, 这加剧了蛋白饲料资源短缺, 严重制约了我国养殖业的进一步发展壮大。豆粕是畜禽重要的植物性蛋白源, 其粗蛋白含量高, 并有较平衡的氨基酸组成, 能充分满足畜禽的氨基酸需要^[1]。作为大豆加工副产品, 豆粕中存在的多种抗营养因子如蛋白酶抑制因子、大豆球蛋白、 β -伴大豆球蛋白以及寡糖等影响动物对蛋白质的有效吸收, 也限制了豆粕在饲料中的应用, 尤其是幼龄动物饲料^[2]。如何更加安全、节约、高效的利用豆粕一直是人们关注的热点, 近几年对发酵豆粕的研究表明, 豆粕经过微生物发酵处理后, 抗营养因子有所降解^[3], 本文就发酵豆粕的工艺制作、菌种选择、营养优势及在养殖业生产中的应用作一综述。

1 发酵豆粕的制作工艺

1.1 工艺简介

固态发酵和液态发酵技术是目前主要的技术方法。因环保和经济等因素, 多采用固体发酵制作低品质的发酵豆粕, 而液体发酵得到的发酵产品品质更加优良, 也更加稳定, 但其设备造价更高, 而且会产生一些废液, 对环境造成一定的污染。整体来讲, 固体发酵要优于液体发酵。固体

发酵可分浅层发酵和深层发酵, 这两种发酵方式按生产模式的不同各有优点。浅层发酵的物料厚度一般在5 cm以下, 氧气扩散方便, 非常适合菌落能快速大量繁殖的好氧发酵, 不足之处是物料厚度薄, 占地面积太大而使其生产率低下。深层发酵的物料厚度多在100 cm左右, 甚至有高达200 cm的, 这种模式前期是好氧菌活动频繁、在中后期则兼性厌氧发酵, 这种方法由于物料的占地面积小而大大提高了其生产率^[4], 这两种发酵方式受工艺条件等多种因素的影响较大。

1.2 发酵豆粕菌种的选择

目前发酵豆粕生产中常用的菌种有芽孢杆菌、真菌、酵母菌和乳酸菌等, 不同菌种对豆粕的酵解程度不同, 工业化生产时一般采用复合菌种进行发酵, 在降低豆粕抗营养因子、提高豆粕功能性多肽含量等方面均有很好的效果^[5]。

1.2.1 酵母菌

酵母菌是动物饲料发酵的常用菌种, 因其自身就含有较高的蛋白量, 而且还含有丰富的B族维生素, 氨基酸组成合理, 还能分泌很多水解酶。最主要的是它能够分泌一种生物活性物质, 这种生物活性物质可以促进细胞分裂^[3]。因此家禽饲料中使用了经酵母菌发酵的豆粕可大大提高其生长速度, 增加免疫能力, 提升生产性能。

收稿日期:2019-08-13

作者简介:高庚渠(1979-), 男, 河南平顶山人, 硕士研究生, 讲师, 主要从事动物性食品安全研究。E-mail:gaogengqu@126.com

1.2.2 枯草芽孢杆菌

枯草芽孢杆菌在发酵过程中能够消除豆粕中大部分的抗营养因子,提高豆粕粗蛋白及酸溶蛋白含量,发酵过程中能够产生蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶等一系列消化酶,可有效降解豆粕中抗原蛋白。芽孢杆菌菌种有一种不易致死的芽孢,这种芽孢可以抑制动物肠道中一些有害菌的存活。研究表明,枯草芽孢杆菌发酵的豆粕对促进家畜营养消化吸收、提高饲料转化率、防止家畜腹泻和促进生长有显著作用^[6]。

1.2.3 米曲霉

米曲霉可以产生复合酶,最主要的是蛋白酶,它主要存在于动物的消化道中,在这种酶的作用下,可以将一些不容易消化的大分子蛋白质分解成多肽和氨基酸,并且能降解辅料中一些难吸收的物质,如纤维素、植酸等,还能把原料中各种淀粉降解成许多种低分子糖类以便于更易吸收。除了产生蛋白酶,还产生淀粉酶、糖化酶、纤维素酶、植酸酶等。用这种霉菌来发酵豆粕能提高豆粕的营养价值以及动物对豆粕营养的吸收率。

GAO等^[7-8]利用米曲霉和短乳杆菌发酵豆粕后,发酵豆粕中的植酸和胰蛋白酶抑制因子含量均降低。豆粕中的蛋白质组成被大幅度改变,大、中分子蛋白的含量大大降低,小肽和游离氨基酸的含量则大大提升,并且产生了一部分有益的微生物蛋白;消除了豆粕中的抗营养因子,大大提升了其营养价值。

1.2.4 乳酸菌

乳酸菌在发酵的过程中会产生一些酶类,这些酶类可以在很大程度上降解豆粕中的大分子蛋白质,使其转变为氨基酸、小肽等易吸收物质,大大提高了动物对豆粕中营养物质的吸收和消化,而且乳酸发

酵会产生大量乳酸,提高了豆粕的口感。

2 发酵豆粕的优势

豆粕中的主要抗营养分子是大豆凝血素、致甲状腺肿素、胰蛋白酶抑制剂、脂肪氧化酶、大豆抗原蛋白(致敏因子)、低聚糖、脲酶和植酸等。豆粕在发酵过程中,微生物产生的水解酶能极大地降低豆粕中的这些抗营养因子含量,由此可以提高动物机体对饲料营养成分的吸收率。微生物可以使植酸、低聚糖等非蛋白抗营养因子转化为营养物质^[9],同时生成的大量有益微生物能有效改善动物肠道微生态环境,对提高畜禽肠道免疫力均有明显效果。见表1。

2.1 改善动物肠道功能,提高消化能力

研究表明,豆粕中的抗原蛋白能损伤仔猪的消化道,受损的消化道细胞增强有丝分裂,形成许多不成熟细胞,导致仔猪消化吸收功能下降,生长缓慢^[11]。而发酵豆粕不仅降低了豆粕中的抗原蛋白含量还富含很多大豆肽类,能促进动物肠道分泌大量消化酶,增强动物消化能力。

2.2 增强免疫功能,提高抗病能力

动物的机体健康和免疫与动物肠道微生物菌群的稳定有很大关系,动物发生食物过敏反应时,自身免疫力会大幅度下降,这是因为肠道中的乳酸菌减少,大肠杆菌增加所引起的。张红飞等进行仔猪饲喂试验,发现高活性有益微生物和发酵饲料能够提高仔猪消化吸收能力,提高机体免疫力,促进仔猪健康生长^[12]。陈萱等用发酵豆粕替代普通豆粕饲喂异育银鲫的研究发现,异育银鲫各项非特异性免疫指标都有所改善,血清谷丙转氨酶活性出现下降趋势,说明发酵豆粕对水生动物免疫功能也有一定的促进效果^[13]。

表1 豆粕及发酵豆粕中抗营养因子含量对比^[10]

抗营养因子(mg·g ⁻¹)	豆粕			发酵豆粕		
	测定范围	平均值	中位数	测定范围	平均数	中位数
大豆凝血素	58.9-204.3	129.3±40.0	120.5	ND-158.0	54.7±42.5	50.1
β-伴大豆球蛋白	42.8-185.8	102.2±37.8	94.2	0.1-154.3	37.6±35.8	28.3
胰蛋白酶抑制因子	2.2-61.6	18.4±11.9	15.2	ND-34.1	7.5±7.6	4.9
致甲状腺肿素	6.41-21.65	11.02±3.08	10.45	ND-15.71	1.93±3.27	0.63
脲酶	ND-1.16	0.07±0.18	0.01	ND	ND	ND

注:ND(Not detected)表示未检出

2.3 改善消化状况, 提高生长性能

发酵豆粕代替普通豆粕用作饲料原料能有效提高动物的生产性能, 发酵豆粕中益生菌的免疫调节作用及分泌的各种消化酶是促进动物肠道健康的原因。Dong 等发现在断奶仔猪的饲料中添加发酵豆粕可明显改善猪的小肠梗阻^[14]。发酵豆粕在不降低动物生长性能的情况下甚至能替代部分鱼粉掺入动物的日粮中, 改善饲料口感, 大大降低饲料成本, 在鱼粉中添加一定量的发酵豆粕不会对水产动物的生长性能产生影响。

经微生物发酵后的豆粕具有的优点可归纳如下: (1) 成本低, 相对安全且无化学残留; (2) 能同时去除多种抗营养因子; (3) 不会影响或破坏饲料的营养成分, 而且能使动物更容易吸收营养物质; (4) 微生物代谢产物可以提高饲料的消化率, 如消化酶、蛋白酶等; (5) 调节动物肠道微生态平衡, 增加有益菌数量, 提高家畜消化吸收能力, 促进动物生长; (6) 分解大豆蛋白产生的小肽能促进淋巴细胞的生长从而提高家畜的免疫力; (7) 彻底破坏了豆粕的细胞壁, 释放了豆粕中的营养物质, 极大地减少了饲料在大肠中的异常发酵, 使家畜能够更好的吸收。发酵豆粕与其它蛋白饲料原料特性差别见表 2^[15]。

3 发酵豆粕在养殖生产中的应用研究

3.1 发酵豆粕在猪饲料中的应用

用发酵豆粕替代日常饲喂仔猪的普通豆粕, 对仔猪的日增重和饲料转化效率有明显的提高, 而且饲喂不同菌种发酵的豆粕, 可以达到不同的效果。冷秋仙等分别用 5% 和 10% 的比例替代仔猪口粮的米曲霉发酵豆粕, 仔猪食用后的 6 到 7 天其平均日增重比对照组有了显著的变化^[16]。用枯草芽孢杆菌发酵的豆粕以 5% 的比例替代仔猪饲料时, 也能明显提高其日增重, 同时也能提高其抗病能力和生长性能。而且发酵豆粕制品产生的一些物质可以与仔猪肠道上的大肠杆菌结合达到降低腹泻的目的。Jones 等用发酵豆粕与鱼粉进行保育猪饲喂对比试验, 试验结

果显示, 添加 6% ~ 7.5% 发酵豆粕, 能显著提高保育猪日增重量和饲料转化率, 接近添加 5% ~ 6% 的鱼粉效果, 表明添加适量发酵豆粕可以替代部分鱼粉, 不影响保育猪的生长发育, 可减少动物蛋白饲料使用量, 降低饲料成本^[17]。

3.2 发酵豆粕在反刍动物饲料中的应用

发酵豆粕可使牛羊减少断奶应激, 提高日增重, 增加采食量。奶牛幼年时期饲喂少量发酵豆粕能显著降低其腹泻发生率, 犊牛 4 周龄时的日增重量和采奶量显著提高^[18]。饲喂用益生菌发酵的豆粕对牛有独特的吸引力, 牛的日常采食量能提高 20% ~ 30%, 而且益生菌在牛的肠道中帮助消化吸收营养, 大大提升了饲料的利用率^[19]。张晨研究发现, 使用添加 3% 发酵豆粕的颗粒饲料饲喂育肥羊比常规 TMR 饲料效果要好, 通过添加发酵豆粕和颗粒化处理可以显著提高瘤胃内普雷沃氏菌科的相对丰度^[20]。

3.3 发酵豆粕在禽类饲料中的应用

豆粕是鸡、鸭、鹅等禽类饲料中蛋白质的主要来源, 由于豆粕中存在大量的抗营养因子, 影响禽类的生长, 此时发酵豆粕的作用就会显得尤为重要, 经发酵后的豆粕不仅降解了其本身的大部分抗营养因子, 另含有益生菌、乳酸和未知生长因子等, 发酵豆粕是禽类的理想饲料^[21]。发酵豆粕对提高黄羽肉鸡、白羽肉鸡生产性能、免疫功能和抗氧化性, 提高营养物质消化率都有积极的影响; 日粮中加入发酵豆粕能有效提高蛋鸡生产效率和抗氧化能力, 有利于蛋鸡体质健康; 肉鸭饲喂发酵豆粕能有效提高其生产性能以及肉品质, 有利于提升经济效益^[22]。

3.4 发酵豆粕在水产饲料中的应用

水产动物生理结构特殊, 对饲料蛋白的质量要求很高。作为水产动物饲料主要蛋白质来源的鱼粉近年来供应日益紧张, 价格逐年攀升^[23]。含有高蛋白质的豆粕可替代部分鱼粉用来饲养水产动物, 但豆粕中含有的大量抗营养因子抑制其生长并造成生理异常, 而发酵豆粕能很好地解决这个问题。Sang 等研究表明, 岩鱼鱼料中发酵豆粕是一种很好的豆粕

表 2 发酵豆粕与其它蛋白饲料原料特性比较

原料	抗营养因子	受病原菌污染几率	氧化腐败可能性	含有毒有害物质可能性	动物消化吸收率	市场来源
发酵豆粕	微或无	极小	极少	极小	高	充足
植物蛋白原料	多	较小	较少	有	较低	充足
动物蛋白原料	无	较小	较少	较小	较高	不足

替代品^[23]。幼鱼期鱼料中替代量达10%,生长期鱼料中替代量达40%时,对其生长性能、身体组成、抗氧化酶活性和抗病能力无不良影响。李晓梅等研究表明,用28.6%发酵豆粕替代日粮中等量鱼粉时,试验组对虾成活率和增重率分别比对照组提高11.29%和7.92%,饲料系数比对照组降低19.22%^[24]。综合以往研究结果表明,发酵豆粕能替代部分鱼粉,但还不能完全取代鱼粉,因为鱼粉不仅蛋白质含量高而且氨基酸的含量和比例也很好,而发酵豆粕缺乏水产动物所必须的氨基酸。总体来讲,发酵豆粕在很大程度上缓解了水产养殖中蛋白来源不足的问题。

4 展望

发酵豆粕作为目前应用最多的一种植物性蛋白饲料,是饲料行业的一个主要技术突破口,更加深入及扩展其在畜牧业生产中的应用是未来发展趋势。虽然发酵豆粕技术日渐完善,但仍存在一些问题。由于菌种、发酵工艺等各种客观因素的影响,经发酵后的豆粕无法确认其本身的抗营养因子变化情况。因此,加大对菌种和工艺条件参数的研究仍将是未来发酵饲料原料研究的重点。此外,我国还没有制定与发酵豆粕产品相关的行业标准,所以在市场上很难识别一些掺假的发酵豆粕产品,比如发酵产品中加入一些氨基酸渣、未发酵的豆粕等等,这就需要国家尽快出台并完善生物饲料相关法律法规,引导生物发酵饲料行业健康发展。发酵豆粕在养殖业中的应用还有很大的可持续扩展空间,加大科研院所、生产企业基础研究的投入,对整个生产过程作系统性研究,使发酵豆粕在绿色畜牧业发展中发挥更大的作用。

参考文献:

- [1] 张晓峰,杨建平,潘春梅,等.双酶法酶解豆粕蛋白最佳工艺条件研究[J].黑龙江畜牧兽医,2017(18):184-186.
- [2] 周天骄,谯仕彦,马曦,等.大豆饲料产品中主要抗营养因子含量的检测与分析[J].动物营养学报,2015(1):221-229.
- [3] 杨玉娟,姚怡莎,秦玉昌,等.豆粕与发酵豆粕中主要抗营养因子调查分析[J].中国农业科学,2016,49(3):573-580.
- [4] 董国鹏.发酵豆粕在猪生产中的应用[J].中国畜禽种业,2019,15(04):124.
- [5] 叶耀辉,钟鲁龙,雷松波,等.不同微生物发酵豆粕的差异化研究[J].中国猪业,2019(3):43-46.
- [6] 赵彩艳,王二耀,陈付英.枯草芽孢杆菌发酵豆粕生产益生菌饲料的研究[J].饲料研究,2017(20):28-31.
- [7] GAO Y L, WANG C S, ZHU Q H, et al. Optimization of solid state fermentation with lactobacillus brevis and aspergillusoryzae for trypsin inhibitor degradation in soybean meal [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2013, 12(5):869-876.
- [8] GAO Y L. Solid-state fermentation with aspergillusoryzae using soybean meal as a substrate: degradation of phytate and optimization of fungal biomass growth [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2011, 23(4):677-685.
- [9] 陈雷.北方温度条件下启动豆粕固体发酵技术的研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2016.
- [10] 杨玉娟,姚怡莎,秦玉昌,等.豆粕与发酵豆粕中主要抗营养因子调查分析[J].中国农业科学,2016,49(03):573-580.
- [11] 董国鹏.发酵豆粕在猪生产中的应用[J].中国畜禽种业,2019,15(04):124.
- [12] 张红飞,王海根,卢春光,等.微生物制剂+发酵豆粕饲料在仔猪保育阶段的应用效果[J].上海畜牧兽医通讯,2018(1):40-41.
- [13] 陈萱,梁运祥,陈昌福.发酵豆粕饲料对异育银鲫非特异性免疫功能的影响[J].淡水渔业,2005(02):6-8.
- [14] DONG H K, HEO P S, JANG J C, et al. Effect of different soybean meal type on ileal digestibility of amino acid in weaning pigs[J].Journal of Animal Science & Technology, 2015, 57(1):18.
- [15] 唐翔宇.益生菌发酵豆粕营养分析及应用[D].硕士学位论文.天津:天津科技大学,2008.
- [16] 冷秋仙,向德良.发酵豆粕及其在仔猪生产上的应用[J].猪业科学,2015,32(12):76-77.
- [17] JONES C K, DEROCHEY J M, NELSEN J L, et al. Effects of fermented soybean meal and specialty animal protein sources on nursery pig performance [J].Journal of Animal Science, 2010, 88(5):1725.
- [18] 张建营,秦贵信,鲍男.发酵豆粕对反刍动物的影响研究[J].黑龙江畜牧兽医,2016(7):111-113.
- [19] 杜方均,宗卫阳.发酵豆粕的营养特性及其在畜牧业上的应用[J].当代畜牧,2014(11):78-79.
- [20] 张晨.颗粒型TMR日粮对育肥羊生产性能及其影响机制研究[D].硕士学位论文.泰安:山东农业大学,2018.
- [21] 张连慧,熊小辉,惠菊,等.发酵豆粕及其在动物养殖行业中的应用研究进展[J].中国油脂,2017,42(03):108-112.
- [22] 陈银岳,朱文奇.发酵豆粕在家禽生产中的应用研究进展[J].粮食与油脂,2018,31(11):4-6.
- [23] 黄薇.大豆肽蛋白饲料在水产养殖中的应用研究进展[J].台湾农业探索,2015(02):67-70.
- [24] SANG M L, HAMID M A, KYUNG H C. 饲料中添加发酵豆粕对岩鱼生长性能、身体组成、抗氧化酶活性和抗病性能的影响[J].饲料博览,2016(7):54.
- [25] 李小梅,张家学.不同发酵豆粕替代鱼粉对凡纳滨对虾生长影响的研究[J].饲料工业,2012,32(12):10-13.

马冈鹅的饲养与繁育技术研究进展

董嘉文¹, 梁仕明², 凌祖云², 何启安², 孙敏华^{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, 广东省兽医公共卫生公共实验室, 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. 开平市华昌马冈鹅养殖场, 广东 江门 529353)

摘要:马冈鹅名列广东四大名鹅之首, 其养殖规模约占广东总养鹅量的80%。本文较为系统对马冈鹅的饲养、繁育以及疫病防控技术研究进展进行综述, 希望为马冈鹅产业发展和后续研究提供参考。

关键词:马冈鹅; 饲养; 繁育; 防控

中图分类号:S835 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2020)01-0014-05

Research advance on the feeding and reproductive technology in Magang goose

Dong Jiawen¹, Liang Shiming², Ling Zuyun², He Qi'an², Sun Minhua^{1*}

(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Livestock Disease Prevention, Guangdong Open Laboratory of Veterinary Public Health, Scientific Observation and Experiment Station of Veterinary Drugs and Diagnostic Techniques of Guangdong Province, Ministry of Agriculture, Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, 510640;

2. Kaiping Huachang Magang goose farm, Kaiping, 529353)

Abstract: Magang goose ranks first among the four famous geese in Guangdong, and its breeding scale accounts for about 80% of the total geese in Guangdong. This paper systematically reviewed the research progress of the feeding, reproduction and disease control technology for Magang goose, to provide reference for the industrial development and follow-up research in Magang goose.

Keywords: Magang goose; feeding; breeding; prevention and control

马冈鹅原产于马冈镇, 是江门市农业支柱性产业。马冈鹅是广东省特色品牌, 也是主要养殖品种, 于1925年开始培育, 经过长期的选育, 最终形成了具有“四乌”特点的马冈鹅品种, 在广东省的养殖规模大, 市场需要旺盛。现将马冈鹅的相

关研究进展进行综述, 以期为马冈鹅产业发展提供重要支撑。

1 马冈鹅的地位和特点

广东是鹅的养殖、加工和消费大省, 鹅出栏量

收稿日期: 2019-10-21

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0500800-10, 2017YFD0500804), 广东省科技计划项目(2014A040401049, 2017A040403015, 2018KJYZ007, 2018LM2152), 广东省自然科学基金项目(2018B030315002)

作者简介: 董嘉文(1983-), 女, 广东佛山人, 硕士, 助理研究员, 主要从事禽病的快速诊断和疫苗研究。E-mail: hellendongjiawen@163.com

*通讯作者: 孙敏华(1984-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事禽病的致病机理与疫苗研究。E-mail: smh2002smh@163.com

占到全国的10%左右^[1]。马冈鹅名列广东四大名鹅之首,养殖规模亦居首位,约占全省总养鹅量的80%。江门开平市马冈镇是马冈鹅的主要产地,年产鹅苗400万只以上,占江门市总量的一半以上,年产值近1.2亿元,占该镇农业总产值的一半左右,对当地农业经济发展至关重要^[2,3]。

马冈鹅是1925年由清朝马冈翠山大队荣岭村的梁奕德引入广东高明的三洲黑鬃鹅公鹅与阳江鹅母鹅杂交,培育了优良的鹅品种,再将其与潮州的潮州鹅进行配种,经过长期的选育,最终形成了具有乌头、乌颈、乌背、乌脚(四乌)特点的马冈鹅品种^[3-4]。此外,马冈鹅具有生长快、肉质好、体型大、产蛋多等多个特点^[3-4]。目前马冈鹅已被列为广东省优良家禽品种,所注册的“马冈鹅”品牌入选了广东省十大名牌系列农产品50强^[3]。

2 马冈鹅的孵化和养殖方式

过去马冈鹅饲养范围广,但规模小,以传统的放牧饲养、自然孵化为主^[5]。自1997年成立了马冈鹅发展有限公司后,使用孵化机孵化,改变了马冈鹅的孵化方式^[3]。随着大翻蛋角度(翻蛋角度由常规的90°提高到170°左右)孵化机的应用,辅以温湿度及凉蛋控制技术,使得马冈鹅孵化率有所提高。试验表明,大翻蛋角度孵化机使得马冈鹅孵化率由64.6%提高到66.4%,受精蛋孵化率由81.7%提高到84.2%,弱雏率降低了1.54%^[6],提升了孵化的经济效益。因此,这一技术得到了广泛应用,并且许多机器孵化后,鹅苗孵化出壳不用再上摊床,经济实用。

鹅属于水禽,离水饲养常常被认为是不可行的,因此目前大部分养殖户都采用集中养殖^[5],通常是离水源近,开放或半开放简易棚舍加鱼塘圈养。此外,还有水上棚养、网养、笼养、种鹅小水体养殖等模式。随着环保政策的升级和发展,水禽“减水”、“离水离地”成为了发展趋势;另一方面,鹅体内重金属的含量高低直接受养殖环境和饲料来源的影响,尤其是养殖场土壤的重金属含量^[7]。也有研究表明,在3~6周龄,即马冈鹅生长高峰期间采用舍饲方法养殖,其增重高于传统放牧组^[8]。舍饲的绝对增重最快时期为5~6周龄,放牧组则在6~7周龄,舍饲方法养殖有利于缩短养殖周期,提高饲养效率。然而舍饲也需要为鹅群提供足够活动的运动场,这对鹅生长性

能正常发挥至关重要。研究表明,有运动场和周围树木环绕鹅群的体重和日增重高,无运动场鹅群的生长状况则非常差^[9]。另外,温度和湿度也是重要的影响因素^[9],在养殖过程中加以控制将有利于提高养殖效率。

目前小水体饲养种鹅较多,流水型水沟配种设施比池塘型配种设施可以显著提高种鹅的年产蛋量,但是其受精率、孵化率和健雏率有轻微下降。流水型水沟设施产蛋量的提高可能与活动范围小、消耗的能量等营养物质少有关,而受精率、孵化率和健雏率降低可能与水沟水质控制有关^[10]。

因此通过先进的机器孵化技术,结合有运动场的舍饲技术,同时注重温度和湿度的调控,将有助于尽量大程度地发挥马冈鹅的生长和生产潜能。

3 马冈鹅所需营养

日粮成分及配制方法不合理是制约马冈鹅生产性能的关键因素。当前马冈鹅的饲养方式仍然以“放牧+青饲料+精饲料”为主。养殖户多直接用稻谷等原粮作种鹅的精饲料,也有一部分养殖户采用“稻谷+全价料”饲养方式^[11]。甚至在没有专用鹅料之前,采用鸡料、鸭料、猪料等饲喂。

就肉鹅养殖而言,30~60日龄马冈鹅日粮以11.76 MJ/Kg的能量和15%的蛋白质水平为佳^[12],育肥期(60~80日龄)日粮以11.97 MJ/Kg的能量和14%的蛋白质水平为佳^[13],但在育肥期末(80日龄以上),日粮以11.34 MJ/Kg的能量和13%的蛋白质水平饲养条件下,屠体品质高^[14]。不过,在生长中期蛋白质适当降低也是可行的。28~42日龄马冈鹅使用玉米-大麦-豆粕型日粮试验发现,以11.40 MJ/kg的能量和13%的蛋白配制饲料,对其生长性能最有利^[15]。青饲料是鹅养殖过程中常见添加物,其在增重、改善品质方面发挥着重要作用。研究表明,玉米-豆粕型配合饲料与黑麦草按照9:1配比时,35~70日龄马冈鹅的日增重和饲料报酬较好;继续增高黑麦草比例,日增重和饲料报酬反而降低。这说明少量添加青饲料有利于仔鹅生长^[16]。亦有研究发现,在统糠纤维饲料中添加大豆皮,能够提高47~67日龄马冈鹅的生长性能、屠宰性能、肠道消化酶活性和养分代谢率以及改善肠道组织结构^[17]。进一步研究发现,马冈鹅对纤维代谢能力强,对中性洗涤纤维和粗纤维的代谢率较高,分别达到43.5%和

38.2%^[18]。当日粮纤维水平为7.97%时,肌纤维直径小、密度大、嫩度好,有利于提高马冈鹅肌肉的品质^[19]。

目前种鹅多采用精料饲养,一些研究进行了改进。通过采用4%的复合添加剂预混料和20%的玉米替代原有日粮中的部分稻谷,能够平衡马冈鹅的钙、磷、维生素和微量元素营养需要,使种蛋的受精率和受精蛋出雏率均显著提高^[20]。而用20%~26%的种鹅平衡饲料和74%~80%的能量饲料饲喂种鹅,也能显著提高种鹅的只均产蛋数、蛋重、种蛋受精率和受精蛋出苗率^[21]。综合上述饲养方法,将蛋白控制在13%~15%,同时使日粮纤维水平保持在8%,注重能量的适当调整,有助于提高马冈鹅肉鹅的饲养品质。种鹅采用添加全价料加牧草或者更科学的种鹅饲料将能提高种鹅的生产性能,有助于满足马冈鹅的实际生产需要。

4 马冈鹅繁殖性能

马冈鹅属短日照繁殖类型鹅种,一般在140~150日龄开产。其产蛋季节开始于7月(每天光照时间开始下降之时)至次年3月结束(每天光照时间增加且超过12小时后),可长达8个月左右。其年产蛋34~37枚,高峰期出现在12月到次年1月光照最短之时^[22],平均蛋重148克。研究表明,增加光照时间能刺激公母鹅催乳素的分泌,抑制促黄体素的分泌和公鹅睾酮的水平,从而导致休产并换羽^[22-23]。相反,缩短光照时间将降低催乳素的分泌,促进促黄体素的分泌和公鹅睾酮水平上升并恢复产蛋和繁殖。因此,使鹅每天接触较短的11小时光照,就可以降低催乳素的分泌,并能大大提高母鹅产蛋和公鹅繁殖性能,使母鹅达到高于自然光照鹅产蛋量的80%^[22],这使得反季节鹅生产技术成为了可能。

马冈鹅公鹅的繁殖行为较早,一般在母鹅产蛋前一个月,可维持7~8个月,但对长期共养的母鹅会出现厌伴反应^[24],因此可适当轮换种鹅。公鹅单方求偶的比例可高达60%,其交配行为只发生在水中,每只公鹅平均交配5.5次/天,每次交尾时间平均为14秒^[25],因此强壮的公鹅是保障生产的关键因素之一。开产日龄、连产期长、产蛋期及就巢天数是马冈鹅产蛋量的主要影响因素。研究发现,10~25℃适宜种鹅产蛋,平均温度在16~18℃时的产蛋率最高^[26],这可能与马冈鹅产蛋高峰所处的季节有关。一般而言,

开产早的种鹅产蛋量高,而开产晚的种鹅产蛋量低;连产期长的种鹅产蛋量高,而连产期短的种鹅产蛋量低;此外,马冈鹅母鹅就巢性与产蛋量间呈负相关。因此尽量选择开产早、连产长、就巢次数少、时间短的个体进行留种选育,提高产蛋量^[26-28]。生产实际中,准确监测每只鹅的生产性能对育种至关重要,采用无线射频识别(RFID)技术进行鹅的身份识别、产蛋确认,能够实现鹅行为的精准监测,以提高种鹅生产管理水平,研发鹅产蛋性能选育的新技术^[29]。通过该技术监测发现,马冈鹅产蛋时间点分布于白天(7:00~17:00),一个周期平均产蛋8个,约6%的鹅蛋产蛋序列长达11~12个蛋^[29]。由此,选择产蛋量高的种鹅进行育种,将大大提高马冈鹅的生产性能。

综上,通过光照控制、精准识别和监测技术,能够提高种鹅生产管理水平,选育出高生产性能的种鹅,提高生产成绩。

5 反季节马冈鹅繁殖技术

鹅反季节繁殖,就是通过人为控光、控料和强制换羽等综合技术措施,调整种鹅自然繁殖产蛋周期,使种鹅在非繁殖季节生产。这样一来,可以实现鹅苗和商品肉鹅均衡生产,避开自然繁殖高峰期鹅苗供大于求和冬季育雏存活率低的问题,获得较高的经济效益^[30]。产蛋率、受精率和孵化率是制约种鹅生产性能的关键因素。种鹅公母比例、环境温度是影响马冈鹅生产性能和孵化效果的主要因素^[31]。一般而言,马冈鹅公母鹅比例为1:7,也有1:6或其他配比方案。其种蛋受精率多呈现“两端高(3~5月和10~11月),中间低(5~10月)”的特点。因此反季节生产时需要将水源、舍内环境控制以及抗应激作为调控要点。马冈鹅反季节繁殖技术,首先要在12月中旬至次年2月进行长光照处理(公鹅60天、母鹅75天),处理30天时将公母鹅分开饲养。长光照处理人工补光时间根据具体情况而定,每天光照控制在18~19小时左右。公鹅在接收长光照处理后的30天分开,35天拔毛,长光照延长至60天;母鹅接受长光照处理的55天拔毛,长光照延长至75天。人工强制换羽分整群停料、拔毛和恢复三步。在光照和停料适宜处理后,当鹅体有大量的小毛绒掉下,主副翼羽开始松动,拔下来的毛不带血时,开始逐只拔毛。公鹅长光照处理60天后,61~100天自然光照;母鹅长光照处理75

天后, 76~100天自然光照, 自然光照每天约11~13小时。从开始长光照处理到见蛋大约需要100天。3月底或4月初见蛋后每天光照控制在11小时, 见蛋后20天有蛋孵化。短光照处理避光时间根据具体情况而定^[30]。由于反季节繁殖温度较高, 因此, 添加抗应激添加剂、维生素E和维生素C将有助于降低种鹅热应激和提高繁殖性能, 提高马冈鹅的受精率和产蛋低谷期间的产蛋性能^[32]。此外, 加强肠道免疫调节, 调节反季节生产对肠道微生物生态的区系特征, 使马冈鹅肠道微生物群落特征在不同繁殖阶段将有助于生产性能改善^[33]。

6 马冈鹅育种及资源利用情况

目前饲养的马冈鹅多数是马冈鹅与其它灰鹅杂交为主, 统称马冈杂, 目的是符合当地的消费习惯。这样就间接造成了马冈鹅种质混乱杂样, 营养需求不明确, 致使母鹅的育雏率越来越低, 纯种资源匮乏。此外, 缺乏龙头企业、专业合作社以及行业协会等组织, 联农带农作用不明显, 也阻碍了马冈鹅产业的发展。

低繁殖率、季节性繁殖、高养殖成本是长期困扰马冈鹅规模化养殖的三大难题^[34]。当前, 马冈鹅公鹅常被用来作为父本进行生产。为了提高产蛋率, 黄运茂等采用四川白鹅母鹅与“阳江白沙鹅”公鹅的杂交一代母鹅与马冈鹅公鹅杂交生产商品肉鹅, 在提高产蛋性能的同时也保持了良好的生长性能和屠宰性能^[35]。然而如何保证马冈鹅的纯种资源成为当前一大课题。通过线粒体DNA多样性和系统进化、以及线粒体细胞色素C氧化酶亚基I序列特征作为DNA条形码分析发现, 马冈鹅与狮头鹅之间遗传距离最小^[36-37]; 多个微卫星标记遗传距离分析发现, 马冈鹅和阳江鹅遗传距离较近^[38]。这说明现在的马冈鹅母本来源于狮头鹅, 父本来源于杂交后的阳江鹅。通过分析品种线粒体DNA和微卫星标记的遗传多样性可以获得更准确更具普遍性的结论, 以便进行育种筛选, 保护品种特性。此外, 催乳素基因内含子和催乳素受体外显子基因序列的多态性也可作为产蛋性能的候选基因^[39], 对繁殖性能进行选育。至于提高屠宰性能, 除调整不同生长阶段日粮中苏氨酸的比例外^[40], 还可以针对黑色素受体4基因(MC4R)的两个SNP位点多态性进行选择^[41], 进行品种选育。

7 马冈鹅常见疫病防控

马冈鹅抗病能力相对较强, 但高致病性禽流感、小鹅瘟、浆膜炎、坦布苏病毒病、小鹅痛风、禽出败都是常见疫病, 需要提前预防。

水禽是禽流感病毒的天然宿主, 也是受威胁群体之一。目前水禽中以H5亚型禽流感最为常见。H5亚型禽流感临床表现为高发病率和死亡率高, 尤其是小日龄鹅。该病发病急, 常伴有食欲减退、蓝眼等临床表现, 部分发病鹅有神经症状。因此, 必须进行免疫接种。需要注意的是, 一定要选择与当前流行禽流感毒株抗原相匹配的禽流感疫苗进行接种才能产生良好的保护。过去研究发现, 肉鹅以14日龄首免0.5 mL/只, 21日龄二免接种1 mL/只最佳^[42]。随着发病日龄的提前, 首免日龄可提前至8~10日龄, 15~20日龄再次加强。不过在50日龄和80日龄是禽流感的高风险阶段, 这与实际生产中未及及时补免关系较大。

小鹅瘟通常危害3周龄以下雏鹅, 当注射抗体预防后, 超过1月龄仍可能复发, 且伴有“腊肠样”粪便的典型症状, 不过紧急注射抗体效果较好。该病疫苗效果确实, 因此在1日龄免疫疫苗效果较为理想。

浆膜炎常导致鹅出现“包心包肝”。一般天气骤变时极易发生, 初期常伴有上呼吸道症状, 流鼻水、咳嗽等, 死亡率可达30%以上。目前广东省内主要流行血清1型和2型, 但也有其它血清型的流行。商品化疫苗效果较好, 一般需要两次免疫才能保证效果。

坦布苏病毒病可导致肉鹅出现软脚、翅膀瘫痪, 严重的出现死亡, 种鹅产蛋骤降。近年来, 该病呈流行态势, 但弱毒活疫苗预防效果良好; 灭活疫苗需要至少两次免疫才能达到理想效果。若发生疫病后需要紧急治疗, 则一般以发病初期治疗效果较好; 若出现典型症状再行治疗, 效果通常较差^[43]。

小鹅痛风是由鹅星状病毒引发的, 主要感染3周龄以内的雏鹅, 死亡率可达50%。患病雏鹅可见精神沉郁、怕冷扎堆、关节肿胀变形、跛行、排白色稀便等临床表现^[44]。剖检可见关节、关节腔及内脏器官严重的尿酸盐沉积, 肾脏肿胀, 严重的病例心脏被白色沉积物包裹。该病抗体效果存在争议, 加强种鹅的精细化管理, 避免垂直感染, 使用青草料、益生菌、

有机酸、多维等方法有助于降低该病的发生。

禽出败(禽霍乱)多见于种鹅。当前有活疫苗和灭活疫苗,若未能匹配流行血清型菌株,可能效果欠佳。药物治疗通常存在效果不佳,病情易反复的情况。长期用药又存在药物残留和孵化率降低的隐患,因此急需更新当前的疫苗。

8 结语

马冈鹅在广东养殖量最多,市场潜力巨大。随着舍饲、全自动机器孵化、优良的饲料配方、反季节繁殖、优良性状选育、分子育种以及疫病防控技术的全面提升,目前马冈鹅产业呈现良好发展势头。尽管马冈鹅的相关研究取得了一些进展,但马冈鹅产业仍然存在种鹅饲养、种蛋孵化、商品鹅饲养、饲料加工、肉鹅屠宰加工、食品加工相分离等问题^[45]。

在饲养方面,以舍饲结合运动场的标准化养殖方式结合配方饲料,养殖出肉质上乘的肉鹅;在育种方面,以性状选育和分子育种相结合,在原种保护、利用,反季节繁殖和自动孵化技术的配套下,配合以种源净化和疾病防控方案,培育出高产优质的、适合市场消费习惯的品系,将有助于扩大马冈鹅的影响力。

养鹅业是广东农业农村兴旺的重要产业之一。鹅肉风味独特,市场需求旺盛,并且鹅肝、鹅翅、鹅脚、鹅肠、鹅头、鹅肉、鹅绒的经济价值高,养殖马冈鹅能获得可观的经济收益。但是目前马冈鹅规模化与产业化水平不高,保护种源、加强养殖和繁育技术、提高饲料转化效率和提升疾病防治水平成为了当前的重点。因此,对马冈鹅的提纯、复壮和保种,全面提升饲养和繁育技术,加强屠宰和消费引导成为了当前开平马冈鹅产业园建设的重要任务。这些措施将有助于提高我国鹅业规模化与产业化水平。

参考文献:

- [1] 黄运茂,田允波,唐军.广东省水禽种业的发展现状、存在问题及未来趋势[J].广东饲料,2017,26(09):12-15.
- [2] 黄红球,彭森灿,陈新华,等.江门市马岗鹅产业发展现状与问题分析[J].产业与科技论坛,2014,13(23):35-37.
- [3] 周伯含.江门市马岗镇马岗鹅产业发展研究[D].广州:仲恺农业工程学院,2015.
- [4] 江门日报.马岗鹅经济与文化品牌“双响”[J].水禽世界,2010,1:47-49.

- [5] 黄凤娇,陈新华,周晓粧,等.2014年广东省开平市马冈鹅养殖模式调查与对策建议[J].科技咨询,2015,15:95-96
- [6] 戴子淳,姚家君,任玉成,等.大角度翻蛋孵化机的研制及其在鹅种蛋孵化中的应用[J].中国家禽,2017,39(6):63-66.
- [7] 黄运茂,江丹莉,潘建秋,等.广东省规模化种鹅场养殖水体及鹅体组织重金属含量调查[J].中国家禽,2017,39(13):77-80.
- [8] 吕敏芝,陈鹏,叶润全.不同饲养方式下马岗鹅生长曲线分析[J].畜牧与兽医,2004,36(6):13-14.
- [9] 欧阳宏佳,杨博,陈文俊,等.养殖环境主要因子对肉鹅生长性能的影响[J].畜牧与兽医,2019,51(4):34-38.
- [10] 郭金彪,胡民强,张建华.流水型水沟配种设施对马岗鹅繁殖性能的影响[J].安徽农业科学,2012,40(31):95-96.
- [11] 陈国胜,布登付,杨冬辉,等.种鹅平衡饲料对马岗鹅繁殖性能的影响[J].中国家禽,2016,38(1):53-55.
- [12] 何四旺,冯定远.马岗鹅生长期日粮的能量和蛋白质水平的研究[C].第四届全国饲料营养学术研讨会,2002.
- [13] 何四旺,冯定远.马岗鹅育肥期日粮的能量和蛋白质水平的研究[C].第四届全国饲料营养学术研讨会,2002.
- [14] 何四旺,冯定远.不同能量和蛋白质水平的日粮对马岗鹅屠体品质的影响[C].第四届全国饲料营养学术研讨会,2002.
- [15] 黄俊文,张辉华,梁悦超,等.不同蛋白与能量水平对28-42日龄马岗肉鹅生长性能的影响[J].广东饲料,2018,27(5):24-25.
- [16] 胡民强,李泽月.不同精粗饲料比日粮对马岗鹅生产性能的影响[J].养禽与禽病防治,2010,12:4-7.
- [17] 植石全,蓝文康,郑力维,等.统糠和大豆皮对47-67日龄马岗养分代谢率及肠道消化酶活性[J].动物营养学报,2019,31(1):167-174.
- [18] 吴诗樵,黄正旺,姜涛,等.九个地方鹅种对饲料纤维利用能力的比较分析[J].中国家禽,2016,38(14):27-30.
- [19] 胡民强,朱贞霖.不同日粮纤维水平对马岗鹅肉质的影响[J].贵州农业科学,2012,40(11):165-167.
- [20] 陈国胜,梁勇,杨冬辉,等.复合添加剂预混料对马岗鹅繁殖性能的影响[J].养禽与禽病防治,2010,9:8-10.
- [21] 陈国胜,布登付,杨冬辉,等.种鹅平衡饲料对马岗鹅繁殖性能的影响[J].中国家禽,2016,38(1):53-55.
- [22] 施振旦,黄运茂,吴伟.鹅产蛋周期及其生理学调控机制研究的回顾[J].中国家禽,2008,30(9):1-5.
- [23] 黄运茂,施振旦,李孝伟,等.光照对马岗鹅季节性繁殖活动和内分泌的调控[J].畜牧兽医学报,2008,39(1):29-36.
- [24] 岑兴洪,钟建桥.马岗鹅繁殖性能低下的原因分析及解决办法[J].广东畜牧兽医科技,2010,35(1):19-28.
- [25] 景栋林,陈来,原伟东,等.马冈鹅的繁殖行为规律研究[J].广东农业科学,2010,10:143-145.
- [26] 蔡来长,杨承忠,容振坤,等.马岗鹅产蛋规律的研究[J].中国家禽,2000,22(2):12-13.
- [27] 杨承忠,蔡来长,苏伟岳,等.马岗鹅产蛋量的影响因素探讨

雏鹅痛风病研究进展

徐丽娜, 李晓林, 罗济冠*

(山东信得科技股份有限公司, 山东 青岛 266101)

摘要: 雏鹅痛风病主要由新型鹅星状病毒引起, 临床特征为内脏器官和关节有尿酸盐沉积。耐过鹅体重减轻、生长缓慢, 易继发细菌感染, 给养鹅业造成了巨大的经济损失。文章就近年来对雏鹅痛风病的研究进展进行综述, 为该病的后期研究及防控提供依据。

关键词: 雏鹅痛风病; 新型鹅星状病毒; 病原学; 流行病学; 诊断

中图分类号: S852.65+7 **文献标识码:** A **文章编码:** 1005-8567(2020)01-0019-04

Research Advances on gout disease of Gosling

XU Lina, LI Xiaolin, LUO Jiguan*

(Shandong Sinder Technology Co., Ltd, Qingdao, Shandong 266101)

Abstract: A new type of goose-origin astrovirus (GoAstV) plays a primary role in the etiology of gosling gout disease. The clinical signs of this disease were characterized by urate deposition on visceral organ and leg joint, while the survival gosling grew slowly and were susceptible to bacterial infection, thus causing significant economic loss. This article reviewed the research advances on gosling gout disease in recent years to provide references for further study in this disease.

Keywords: Gosling gout disease; Novel goose astrovirus; Etiology; Epidemiology; Diagnosis

自2016年以来,我国许多鹅场爆发以内脏和关节白色尿酸盐沉积为主要特征的传染性疾病。该病主要侵害3周龄以下雏鹅,死亡率可达50%,耐过雏鹅通常表现为生长发育迟缓。因此,鹅场一旦发生此病,经济损失十分严重。调查发现,该病在使用过不同饲料、不同药物的不同品种鹅群中均有发生,降低饲料中的蛋白含量、减少饲喂量均无效^[1]。目前,该病已在河北、河南、江苏等十余个省份出现。经病原分离鉴定及动物回归试验证明,新型鹅星状病毒为引起雏鹅痛风病的主要致病病原。

1 病原学

星状病毒目前根据病毒物种来源和全长ORF2基因遗传距离分析的双重标准进行基因型划分,

可分为哺乳动物星状病毒属(Mamastroviruses, MAstVs)和禽星状病毒属(Avastroviruses, AAstVs)^[2],其中哺乳类分成33个不同的基因型(MAstV1~MAstV33)^[3],禽类分成7个不同的基因型(AAstV1~AAstV7)^[4]。研究发现,导致雏鹅痛风病的病原是一种新型的鹅星状病毒,该病毒与其他种属星状病毒同源性均小于70%,遗传距离较远。新型鹅星状病毒属于禽星状病毒属,AAstV3成员,无囊膜,单股正链RNA病毒,直径约30 nm^[5-7]。不同鹅源星状病毒基因组长度在7.1~7.4 Kb之间,包含5'、3'端非编码区(UTR)和Poly(A)尾,3个开放阅读框(ORF1a、ORF1b、ORF2),与经典星状病毒基因组结构一致^[5, 8-9]。

星状病毒缺少合适的实验室宿主系统,特别

收稿日期:2019-07-22

作者简介:徐丽娜(1986-),女,山东青岛人,硕士研究生,兽医师,主要从事家禽疫病研究。E-mail:linaxu100@126.com

*通讯作者:罗济冠(1984-),男,硕士,兽医师,研究室主任,主要从事家禽疫病研究。E-mail:luojiguan@126.com

是禽源星状病毒,仍缺乏适宜其增殖的细胞系。鹅星状病毒也是如此,病毒虽可在鹅胚、鹅胚肾细胞中有效增殖^[5, 10],但滴度不高;同时,鹅胚还具有成本高、无SPF鹅胚的缺点。有学者尝试用鸡肝细胞培养病毒,但接毒后无细胞病变^[11]。因此,还需要深入研究鹅星状病毒的培养特性,为研制防治该病的新产品、新方法奠定基础。

根据已发表文献及上传至GenBank鹅星状病毒全基因序列分析可知,我国鹅群感染的星状病毒较为多样,目前至少有2种不同类型的病毒存在于鹅群中。一种是Zhang等从发生肠炎的病鹅中分离到的FLX株^[8],Xu等从病鹅肝、脾、肾分离到的AHDY株^[12],以上2株病毒同源率为100%,但与其他鹅星状病毒同源性较低(<70%)。除FLX、AHDY株外,其他新型鹅星状病毒毒株之间具有高度同源性(>95%),其中Liu等2014~2015年分离自肠炎病料的鹅星状病毒^[9],与2017年以后分离自痛风病料的鹅星状病毒同源性达98%~100%,两者为同一种病毒,却出现了不完全相同的临床症状,可能在2017年之前,感染鹅由于某些原因未表现出痛风的典型临床症状。

星状病毒在外界环境中极其稳定,对苯扎溴铵、酚类、季铵盐类等大多数常用消毒剂具有很强的抵抗力;对热处理稳定,能抵抗60℃10分钟;对酸稳定,部分纯化的TAsTV-2病毒经商业消毒剂处理后仍具有感染的能力,包括10%浓度的漂白剂,但是能被0.3%甲醛、1.5%卫可、90%甲醇完全灭活^[13]。星状病毒可经粪-口途径传播,并在水中持续存在,为其他物种的潜在感染和病毒的跨种传播提供了有利的条件^[14]。因此,针对鹅源星状病毒的感染,需要选择合适的消毒剂对环境进行全面消毒,切断病毒传播途径。

2 流行病学

众多禽类都可以感染星状病毒,包括鸡、火鸡、珍珠鸡、鸭等。水禽中最早发现的星状病毒是鸭星状病毒,于1965年首次在英国报道^[15],此后一直未见其它家养水禽感染星状病毒报道。直到2016年,我国出现鹅场感染星状病毒导致痛风的案例,随后,该病在一年之内迅速传至我国绝大部分养鹅主产区。

金美玲等从安徽、江苏和四川具有典型雏鹅痛

风病症状的鹅场采集了35份样品,全部检出鹅源星状病毒^[16]。Zhang等从江苏、安徽、山东、广东和福建10个鹅场获得49只具有痛风症状的死亡鹅只,其中30份样品均检出鹅源星状病毒^[11]。姜晓宁等从发生雏鹅痛风的鹅场采集病料143份,禽源星状病毒阳性率达96.5%,试验证实该病由新型鹅星状病毒引起^[1]。根据张清水等绘制的鹅新型星状病毒感染鹅群地区分布图,可看出该病已广泛分布于福建、广东、湖南、河南、山东、江苏、安徽等养鹅主产区^[5]。因此,我们推测该病迅速传播与带毒鹅的调运或病原污染存在关系。

本病自然感染的传播途径主要是消化道和呼吸道。病毒具有广泛的组织嗜性,采集死亡雏鹅的肾脏、心脏、大脑、肝脏、脾脏等均可检测到病毒;感染鹅可通过粪便等途径排毒,排毒持续期在12天左右,试验鹅在第15天剖杀时,肝、脾仍能检测到病毒^[5, 17]。研究表明,星状病毒感染禽类后,耐过禽虽然不表现出临床症状,但仍然携带病毒^[13],而感染星状病毒的耐过鹅是否会携带病毒,还需要进一步研究。此外,金美玲等在健康鹅中检测到了星状病毒,说明鹅星状病毒可在健康鹅群中存在,而不表现任何临床症状^[16],是否有其他刺激性因素,使鹅星状病毒由潜伏状态转化为爆发状态,还未可知。

3 临床症状和病理变化

该病主要以雏鹅内脏和关节尿酸盐沉积为特征,最早可在1日龄发病,发病鹅通常表现为精神沉郁、饮食减少、卧地不起、不愿走动,有白色稀粪排出,并混杂多量的灰白色尿酸盐。随着病情发展,病鹅体重减轻,死亡病例逐渐增多,耐过鹅则生长缓慢,易遭受细菌感染;剖检表现为肾脏、心脏、肝脏、输尿管、关节等有大量尿酸盐沉积,部分有类似于小鹅瘟的肠道栓子出现,或可见肾脏苍白、肿胀出血,心脏肥大、胆囊膨大等症状^[1, 5, 11, 18]。

发病雏鹅组织病理学研究可见,肾小管上皮细胞坏死、脱落,管腔内有尿酸盐沉积,肝细胞空泡变性,尿酸盐沉积,血清中尿素含量升高^[1, 5, 10]。

4 诊断方法

引起雏鹅痛风的因素较为复杂,饲喂高蛋白

饲料、维生素 A 缺乏、钙磷比例失调、磺胺类药物中毒、寄生虫感染、饲养管理粗放、遗传因素等都可导致痛风的发生^[19]。因此,由新型鹅星状病毒引起的雏鹅痛风病需要实验室诊断才能确诊。

4.1 临床诊断

根据病因、病史、特征性症状和剖检变化可作出初步诊断。

4.2 实验室诊断

4.2.1 病毒分离

采集患病雏鹅的肝脏、肾脏、脾脏等组织,加入无菌生理盐水或 PBS 进行匀浆处理,反复冻融 3 次后,离心取上清,经 0.22 μm 滤器过滤除菌,获得组织样品处理液。将处理液接种鹅胚或鹅胚肾细胞进行病毒分离。经绒毛尿囊膜或卵黄囊接种 9~13 日龄鹅胚,一般传至第三代时,鹅胚开始出现死亡,死亡鹅胚尿囊膜增厚,胚体出血明显^[1, 5, 10]。样品处理液接种鹅胚肾细胞,传代后可出现明显的细胞病变,细胞变圆、皱缩、脱落,部分细胞出现聚堆现象^[5, 10]。

4.2.2 电镜观察

电镜是早期检测星状病毒的主要方法之一,主要根据其特有的五角或六角星状结构及 28~30 nm 直径等特征来判断^[20]。Yuan 等通过电镜在鹅肝脏超薄切片中发现了直径约 30 nm 的散在病毒颗粒,但是无法清楚的看到星状病毒特有的星状形态^[6],因此,该方法在特异性和灵敏度上有所欠缺,可作为判定星状病毒的辅助手段。

4.2.3 分子生物学诊断

通常用 RT-PCR 检测分离株或直接检测临床样品的方法快速鉴定鹅星状病毒,可通过扩增 ORF1b、ORF2 或 RdRp 基因达到鉴定的目的,回收扩增产物测序并进行序列分析,可用于鹅星状病毒分子分型。Yuan 等建立了 RT-qPCR 检测方法,对新型鹅星状病毒的最小检出量为 52.5 拷贝/μL,比普通 RT-PCR 的病毒检出率高出 7.5%,为新型鹅星状病毒早期快速检测及定量分析提供了新的方法^[21]。

5 防治措施

目前,该病尚无疫苗可以预防,常规抗菌、抗病毒治疗方法均无效。本病的特异性防治以抗体为主,但效果不尽如人意,原因之一可能是该病毒不容易

培养,病毒毒价不高,导致市场上抗体产品效果参差不齐,无效或低效防治病例增多^[22]。因此,在生产中应实行严格的生物安全防护措施,尤其是感染星状病毒的鹅场。鹅群所在区域感染病毒后,要对所有生产设施进行完全的消毒,并限制人员的进出,所有的垃圾和粪肥都应进行无害化处理,地板、墙壁、风扇、喂食器、水线等设施都应充分清洗和消毒^[13]。

参考文献:

- [1] 姜晓宁,田家军,杨晶,等. 导致雏鹅痛风新型鹅星状病毒的分离鉴定[J]. 中国兽药学报, 2018, 38(5):871-877.
- [2] 刘宁. 鸭星状病毒的遗传变异性和抗原性及感染鸭肝脏的转录组分析[D]. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [3] BOSCH A, GUIX S, KRISHNA NK, et al. Nineteen new species in the genus Mamastrovirus in the Astroviridae family [R]. 2010a, ICTV2010, 018a-c.V.A.v4.
- [4] BOSCH A, GUIX S, KRISHNA NK, et al. Three new species in the genus Avastrovirus in the Astroviridae family [R]. 2010b, ICTV2010, 017ab.V.A.v2.
- [5] 张清水. 新发肾致病型鹅星状病毒的分离鉴定及弱毒株选育 [D]. 博士学位论文. 北京: 中国农业大学, 2018.
- [6] YUAN X, MENG K, ZHANG Y, et al. Genome analysis of newly emerging goose - origin nephrotic astrovirus in China reveals it belongs to a novel genetically distinct astrovirus [J]. Infection, Genetics and Evolution, 2019, 67: 1-6.
- [7] JIN M, WANG X, NING K, et al. Genetic characterization of a new astrovirus in goslings suffering from gout [J]. Archives of virology, 2018, 163(10):2865-2869.
- [8] ZHANG Y, WANG F, LIU N, et al. Complete genome sequence of a novel avastrovirus in goose [J]. Archives of virology, 2017, 162(7):2135-2139.
- [9] LIU N, JIANG M, DONG Y, et al. Genetic characterization of a novel group of avastroviruses in geese [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65(4):927-932.
- [10] 徐蓉,陆明青,张莉莉,等. 一株以雏鹅痛风为特征的鹅星状病毒的分离鉴定及生物学特性的研究[C] //中国畜牧兽医学会兽医病理学分会第二十四次学术研讨会、中国病理生理学会动物病理生理学专业委员会第二十三次学术研讨会、中国实验动物学会实验病理生理学专业委员会第三次学术研讨会、中国兽医病理学家第三次学术研讨会论文集, 2018:159.
- [11] ZHANG X, REN D, LI T, et al. An emerging novel goose astrovirus associated with gosling gout disease, China [J]. Emerging Microbes & Infections, 2018, 7(1):152.
- [12] XU R, LU M, ZHANG H, et al. Goose astrovirus strain [12] AHDY, complete Genome. [https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MH410610.1? report=fasta](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MH410610.1?report=fasta)[Z].
- [13] KOCI MD, SCHULTZ - CHERRY S. Avian astroviruses [J].

- Avian Pathology, 2002, 31(3):213-227.
- [14] MENDENHALL IH, SMITH GJ, VIJAYKRISHNA D. Ecological Drivers of Virus Evolution: Astrovirus as a Case Study[J]. Journal of Virology, 2015, 89(14):6978-6981.
- [15] ASPLIN FD. Duck hepatitis: Vaccination against two serological types[J]. The Veterinary record, 1965, 77(50):1529-1530.
- [16] 金美玲, 冯崇伦, 王笑言, 等. 雏鹅痛风相关病原的分子检测和鉴定[C]//中国畜牧兽医学会2018年学术年会禽病学分会第十九次学术研讨会论文集, 2018:118.
- [17] ZHANG Q, CAO Y, WANG J, et al. Isolation and characterization of an astrovirus causing fatal visceral gout in domestic goslings[J]. Emerging Microbes & Infections, 2018, 7(1):71.
- [18] 邵鹭骏, 李阁, 张思旺, 等. 一例鹅痛风病的诊断[J]. 兽医科学, 2019(06):86-87.
- [19] 刘金华, 甘孟侯. 中国禽病学[M]. 第二版. 北京:中国农业出版社, 2016.
- [20] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京:科学出版社, 1997.
- [21] YUAN X, MENG K, ZHANG Y, et al. Establishment and Application of Rapid Diagnosis for Reverse Transcription - Quantitative PCR of Newly Emerging Goose - Origin Nephrotic Astrovirus in China[J]. mSphere, 2018, 3(6):1-5.
- [22] 孙敏华. 广东省水禽主要传染病的流行现状及防控思考[J]. 广东畜牧兽医科技, 2019, 44(1):8-11.

上接第18页

- [J]. 佛山科学技术学院学报(自然科学版), 2001, 19(2):59-62.
- [28] 杨承忠, 蔡来长, 容振坤, 等. 马岗鹅的就巢规律及其与产蛋量的相关研究[J]. 中国家禽, 2001, 23(8):54-55.
- [29] 孙爱东, 秦清明, 尹令, 等. 马岗鹅个体产蛋行为规律的监控记录与分析[J]. 中国家禽, 2015, 37(21):64-67.
- [30] 郭金彪, 胡民强, 张建华, 等. 马岗鹅反季节繁殖控制技术研究[J]. 佛山科学技术学院学报(自然科学版), 2014, 32(4):60-63.
- [31] 潘建秋, 江丹莉, 黄植霞, 等. 反季节生产中马岗鹅与狮头鹅繁殖性能的观察[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2018, 31(2):33-36.
- [32] 欧阳宏佳, 连泽华, 黄运茂, 等. 抗热应激添加剂对反季节生产马岗鹅繁殖性能的影响[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2018, 31(2):14-17.
- [33] 姚学彬. 马岗鹅不同繁殖期的内分泌调控及肠道微生物群落特征[D]. 硕士学位论文. 广州:仲恺农业工程学院, 2018.
- [34] 马铭龙, 刘闯. 马岗鹅育种趋势浅谈[J]. 水禽世界, 2016, 4:41-42.
- [35] 黄运茂, 田允波, 施振旦, 等. 马岗鹅、“阳江白沙鹅”与四川白鹅杂交效果分析[J]. 中国家禽, 2017, 39(5):55-58.
- [36] 何丹林, 李伟民, 方梅霞, 等. 广东省家鹅 mtDNA 多样性及系统进化分析[J]. 广东农业科学, 2009, 8:177-180.
- [37] 唐军, 欧阳宏佳, 王锐, 等. 三个广东地方鹅种的 DNA 条形码研究[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2018, 31(2):24-28.
- [38] 段宝法, 朱文奇, 李慧芳, 等. 广东省四个家鹅群体的遗传变异研究[J]. 中国家禽, 2006, 28(24):89-91.
- [39] 段修军, 徐琪, 乔娜, 等. 全自动扫描和微卫星标记技术分析地方灰鹅遗传多样性[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(1):37-42.
- [40] 徐振强, 肖雄, 梁勇, 等. 马岗鹅和乌鬃鹅的屠宰性能比较[J]. 广东农业科学, 2013, 21:113-116.
- [41] HUANG Y, WANG Y, HE D, et al. Genetic diversity of the melanocortin 4 receptor (MC4R) gene and its association with slaughter traits in the Landes goose[J]. Biochemical Genetics, 2010, 48(11-12):944-953.
- [42] 张济培, 陈建红, 陈响坤, 等. 肉鹅 H5 亚型禽流感疫苗免疫效果的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2006, 33(12):94-97.
- [43] 孙敏华. 广东省水禽主要传染病的流行现状及防控思考[J]. 广东畜牧兽医科技, 2019, 44(1):8-11.
- [44] 马军. 新发雏鹅痛风研究进展[J]. 山东畜牧兽医, 2019, 7:79-80.
- [45] 侯水生. 我国肉鹅产业发展应重视的问题与建议[J]. 水禽世界 2014, 3:6-9.

水帘降温系统在肉猪生产中的应用效果分析

刘克俊¹, 黎泰银^{2*}, 邓红英¹, 陈政谕¹, 吴家荣³

(1. 广西壮族自治区畜牧研究所, 广西南宁 530001;

2. 昭平县凤凰乡水产畜牧兽医站, 广西昭平 546808;

3. 宾阳县农业农村局, 广西宾阳 530400)

摘要: 高温高湿环境会影响肉猪的健康和生长。规模化养猪场推广应用水帘降温系统, 可以加快肉猪的生长速度, 减少疾病的发生, 提高饲料利用率, 全面提高肉猪生产性能。

关键词: 水帘降温系统; 肉猪; 生产性能

中图分类号: S815.4 **文献标识码:** B **文章编码:** 1005-8567(2020)01-0023-03

商品猪规模化养猪生产, 猪群集中, 密度大, 猪只占有空间小, 在高温季节, 栏舍内空气不流通, 外部环境温度升高, 加上猪自身散热导致栏舍内温度比室外温度高。温度过高, 粪便发酵产生的氨气和硫化氢等有害气体更多, 氨气过多会引起红眼症状, 严重者引发猪呼吸系统疾病或者氨中毒, 增加生猪生产用药成本。同时, 肉猪的皮下脂肪较厚, 汗腺不发达, 基本不能通过发汗散热, 只有通过皮肤表面蒸发散热来调节体温, 体内热能散发较慢, 造成对高温的耐受能力差。当舍内温度超过肉猪的适宜温度时, 体内产热与散热失去平衡, 导致肉猪体内产生一系列生理和机能上的不良反应, 造成热应激。高温, 特别是持续高温高湿环境会给肉猪的健康和增重带来相当严重的影响。具体表现为采食量减少明显、抵抗力下降、发病猪增多、淘汰率和死亡率上升, 肉猪生长减缓或停滞, 造成养猪生产成本显著提高等^[1]。

面对炎热季节高温对肉猪生产造成的危害, 规模化养猪场为了解决好猪场夏季热应激的危害和提高生猪养殖的效益, 想出很多办法来降低温度。2012年开始, 广西昭平县凤凰乡的规模养猪

场开始推广猪舍水帘降温系统, 当年两家养猪场使用后产生了明显的效果, 与未使用猪舍水帘降温系统的猪场相比较, 养殖的猪瘦肉比更高, 猪的呼吸系统疾病和热应激发生率更低。2013年又有3户养猪场使用风机水帘降温系统, 到2018年底, 有13户肉猪规模养殖户使用, 总存栏肉猪4610头, 其中800头的2户, 450头的3户, 350头的2户, 280头的2户, 150头4户。越来越多的养殖户使用猪舍水帘降温系统, 受到养殖户的认可。

1 水帘降温系统的工作原理

水帘降温系统由水帘、循环水路、抽风机和温度控制装置组成。水帘用波纹状纤维纸粘结而成, 在制作的原料中添加了不会随水流、气流的作用而分解特殊化学成分, 具有耐腐蚀、使用时间长的特点。在封闭式的猪舍内, 一端的水泵将蓄水池中的水送至喷水管, 把水喷向反水板, 水均匀地从反水板上流下淋湿整个水帘, 水在水槽和水帘间循环, 从而保证空气与完全湿透的水帘表面接触。另一端安装负压风机向外抽风, 猪舍内形成负压区, 舍外空气穿过水帘被吸入舍内, 带着猪舍内的热量经风机排出室外, 从

收稿日期: 2019-11-04

作者简介: 刘克俊(1962-), 男, 广西贺州市人, 大学学历, 高级畜牧师, 主要从事动物营养研究与畜禽技术推广工作。E-mail: 472128498@qq.com

*通讯作者: 黎泰银(1978-)男, 广西贺州市昭平县人, 大专学历, 兽医师, 主要从事养猪技术推广。E-mail: 570775965@qq.com

而达到降温的目的^[1]。

2 水帘降温推广应用效果

使用水帘降温系统,舍内基本保持恒温,空气清新,减少疫病的发生。在猪场推广水帘降温系统,设备有自动控温装置,可以根据猪舍内温度变化,自动开启风机和水帘。安装水帘降温设备的猪舍,当舍内温度高于28℃时,水帘全部运行,四台风机打开抽风,温度低于25~26℃时,系统控制一台或者两台风机工作。在封闭式猪舍的规模化养猪模式中,使用先进的水帘降温系统,猪舍舍内受外界温度影响不大,猪栏内温度保持基本恒定,可以解决养猪过程中夏季高温季节闷热的问题,以及猪场栏舍空气污浊的问题。养猪场使用风机水帘设备,封闭的猪舍空气始终保持流通状态,减少氨味,空气清新,同时控制老鼠进入,减少细菌传播;苍蝇、蚊虫滋生减少,改善了猪舍环境,减少了疫病的发生。

2.1 传统降温与水帘降温效果试验

水帘降温效果试验选择在昭平县凤凰乡一个800头肉猪生产猪场进行试验,使用南宁市某生产厂家生产的水帘降温设备,厂家派人到养猪场负责设备安装,猪场猪舍空间体积1200立方米,安装风机水帘降温设备一套,20平方米的水帘分成2组,每组10

平方米,1.1 kw额定功率的负压风机4台。

2017年9月19日一天测定的同一猪场不开风机水帘温度,采取房顶淋水,栏舍猪群定时淋水措施。

从表1来看,使用水帘降温的猪舍栏内温度比外界温度降低3~7℃,降温效果明显,猪场舍内受外界温度影响不大,猪栏内温度保持基本恒定,猪群自由采食正常,安静。从表2来看,使用传统方法降温效果不明显,栏舍温度降温不大,猪群中只有少数吃料,呼吸快,不安定。

2.2 传统降温和水帘降温对猪生长性能的影响的对比

肉猪饲养生长试验在传统降温和水帘降温生产场同时进行,试验期60天。2017年9~10月试验,两个生长试验的猪都是外三元杂交(杜长大)品种,大小体重在25~35 kg,使用面积大小基本一样,饲养栏舍25 m²,密度和管理条件一致;饲喂相同的饲料,精饲料配方:东北玉米59%、豆粕20%、麦麸13%、鱼粉4%、小猪预混料4%,营养水平消化能3113大卡,粗蛋白15.2%。每头试验猪每天喂2 kg。每天饲喂2次,饲喂时间分别为9:00和17:30。

每天工作先观察猪的精神状况、粪便变化、肛门有无粪便污染等生长情况,并做好猪生长相关

表1 2017年9月18日一天测定的降温效果

测定时间	室外温度	室内水帘端	室内中间	室内抽风机端	猪群动态采食饲料情况	水帘,风机开启情况
上午10点	27	25	26	27	自由采食、安静	水帘10平方 风机2台
中午12点	33	28	27	28	自由采食、安静	水帘20平方 风机4台
下午1点	35	29	29	28	自由采食、安静	水帘20平方 风机4台
下午3:00	36	30	31	31	自由采食、安静	水帘20平方 风机4台
下午6:00	34	28	28	29	自由采食、安静	水帘20平方 风机3台

表2 2017年9月19日传统降温效果

测定时间	室外温度	室内窗口边温度	室内中间温度	室内平均温度	猪群动态采食饲料情况
上午10点	28	27	25	26	自由采食、还算安静
中午12点	33	32	33	32.5	少数吃料,呼吸快,不安定
下午1点	35	35	35	35	基本不吃,呼吸快,不安定
下午3:00	34	34	34	34	基本不吃,呼吸快,不安定
下午6:00	32	32	33	32.5	少数吃料,呼吸快,不安定

表3 传统降温和水帘风机试验效果对照表(kg)

类别	试验总头数	试验组	试验头数	试验前重	试验30天增重	试验60天增重	试验总耗	料肉比	发病头数	死亡头数	成活率%	节约耗料成本	节约兽药死猪成本
传统降温	70	1组	30	1445	1215	1242	6093	2.48:1	6	4	94.30%	节约饲料302 kg, 1062元	560元
		2组	40	2080	1632	1680	8247	2.49:1					
水帘风机	70	3组	30	1486	1728	2269	9632	2.41:1	3	1	98.60%	节约饲料432 kg, 1517元	1400元
		4组	40	2120	1660	1740	8160	2.40:1					

情况记录,试验结束时进行汇总,计算发病率和死亡率。

2.2.1 测定指标与方法

每天重复记录饲料的采食量,记录各重复剩余饲料重量。试验开始前、试验第30天、第60天,早上进行空腹称重和记录,计算各组的平均日采食量、日增重和料重比。

2.2.2 结果与分析

从表3可见,养猪户猪舍使用电扇和顶部喷水降温等传统措施,选择25~35 kg仔猪试验60天,日增重平均为1.43斤,料肉比为2.48:1;而采用水帘降温系统,根据温控直至室内温度在23~25℃范围,到中大猪时室内温度在21℃以下时不使用水帘降温,只使用负压风机抽风,保持空气流通即可;当温度达到21℃以上时,就要同时开启使用水帘降温 and 负压风机抽风,使温度控制在19~20℃,同时湿度要控制在60~80%的范围内,采用水帘降温系统的猪从断奶后仔猪至出栏日增重达1.5斤,料重比为2.43:1,同比减少0.05,而且每头猪平均增重5~10斤左右。试验过程有试验猪发病、死亡,传统降温组发病6例,死亡4头;水帘风机试验组发病3例,死亡1头。可见,水帘降温,生长肉猪料肉比降低,生长速度加快

3 效果及分析

现代规模养猪场安装风机水帘降温设备,是

猪场夏季降温的有效措施,避免炎热的季节给养猪生产造成严重影响,保持猪舍通风换气,空气清新,改善了猪舍环境条件,使肉猪采食量明显增加,增重加快,而肉猪的发病率明显减少,特别是猪的呼吸道疾病明显减少,肉猪肉料比降低0.05。

水帘降温系统易于安装和维护保养,湿帘降温结构简单,运行操作管理方便,无须专业维护人员,简单的保养程序即可,且投资小,见效快,工程进度快,建造成本及运行成本远远低于其它降温方式,系统运行中大量抽入室外新鲜空气,增加空气含氧量,通风降温过程中不断有新空气进入,风量大,鲜风中能形成负压防尘,湿帘蒸发过程中一部分湿润空气进入室内,可增加湿度免干燥。^[2]

在广西,每年受炎热季节影响长达6个月(5~10月份),降低高温影响是养殖商品猪的关键之一,因此,水帘降温系统非常适合。相较于电扇和顶部喷水的传统降温措施,水帘降温系统更适用于规模化生猪养殖生产,按猪场存栏600头肉猪规模计算,耗料减少约3700 kg,节约成本1.3万元,药费和肉猪死亡减少约1.2万元。

参考文献:

- [1] 黄成金,李国友,黄献,等.猪场应用水帘降温的效果观察[J].广西畜牧兽医杂志,20(6):331-335.
- [2] 苗玉涛,李广东,王健诚,等.猪舍降温方式的研究进展[J].北方牧业,2015(23):25.

2018年江门市活禽批发市场 H9亚型禽流感病毒监测结果分析

陆巧芬, 罗嘉轩, 曹建伟, 薛宏恩, 冯开容, 陈修邓
(江门市动物疫病预防控制中心, 广东 江门 529000)

摘要:了解江门市活禽批发市场 H9 亚型禽流感病毒的流行情况, 更好开展禽流感防控工作。采集江门市三个活禽批发市场的禽类和环境样品, 采用荧光 RT-PCR 方法进行 H9 亚型禽流感病毒核酸检测。2325 份样品中检出 435 份 H9 亚型禽流感病毒阳性样品, 阳性率为 18.7%, 禽类样品阳性率为 23.2%, 环境样品阳性率为 12.9%, 差异显著 ($P < 0.001$); 竹丝鸡阳性率最高, 达 47.1%, 其次鸡的阳性率为 31.7%。阳性样品在年初 (1~2 月) 以及年中 (5~6 月) 较高, 从 6 月份开始呈现下降趋势, 年末降到最低值; 不同种类、月份间的样品阳性检出率差异均具有统计学意义 ($P < 0.001$)。奇榜市场阳性率较高为 28.2%, 耙冲市场阳性率为 14.4%, 白沙三鸟市场为 13.0%, 奇榜市场与后两者之间均差异显著 ($P < 0.001$), 而后两个市场之间差异不显著 ($P = 0.432$)。江门市活禽批发市场普遍存在 H9 亚型禽流感病毒的污染, 因此, 有针对性加强监测对 H9 亚型禽流感防控具有重要意义。

关键词: 江门市; 活禽批发市场; H9 亚型禽流感病毒

中图分类号: S851.2 **文献标识码:** B **文章编码:** 1005-8567(2020)01-0026-03

禽流感病毒为甲型流感病毒属, 可感染禽、人、猪、马等动物, 其中 H9N2 亚型流感病毒对禽类呈低致病性, 可引起发病禽严重的呼吸道症状和产蛋性能显著下降, 病死率低于 10%, 但其能直接感染人, 引起人的发病^[1]。活禽批发市场是 H9 亚型禽流感病毒在禽群间以及人禽间传播的重要环节^[2], 对其开展监测可评估病毒的流行水平和态势, 为科学和有针对性防控疫病提供依据。

1 材料与方法

1.1 样品来源

选取江门市区内的奇榜市场、白沙江南蔬菜禽畜批发市场和耙冲市场作为监测点, 每月到三个监测点进行监督采样一至两次, 在奇榜市场和白沙江南蔬菜禽畜批发市场随机抽取 4 个档口、在耙冲市场随机抽取 3 个档口进行采样。对抽取的档

口随机选取 10 只禽进行咽喉和泄殖腔拭子采样并在档口暂养的圈舍采集 5 份环境样品, 拭子采样后放入装有含青霉素及甘油的 PBS 缓冲液的离心管中保存, 相邻档口不重复采集环境样品, 并在每个市场的屠宰车间采集 10 份环境样品。竹丝鸡属于珍禽, 故要求抽样人员将竹丝鸡单列出来, 以便更有针对性地进行分析和结果研判。

1.2 实验室检测

对采集的样品进行混样, 来自同一个档口的禽拭子和环境样品 5 份混成一份进行检测。用磁珠法提取样品中的病毒核酸后先进行通用型禽流感病毒核酸检测, 如为阳性, 则进行 H9 亚型禽流感病毒核酸检测。

所用仪器为西安天隆科技有限公司的 NP968 型核酸自动提取仪、Eppendorf Realplex S 实时荧光定量基因检测系统。核酸提取试剂盒 (磁珠法) 购

收稿日期: 2019-10-29

作者简介: 陆巧芬 (1986-), 女, 广东江门人, 大学本科, 兽医师, 主要从事动物疫病监测诊断工作。E-mail: 457740934@qq.com

自西安天隆科技有限公司,禽流感病毒通用型(AIV-U)核酸检测试剂盒(荧光-PCR法)和禽流感病毒H9亚型(AIV-H9)核酸检测试剂盒(荧光-PCR法)购自广州维伯鑫生物科技股份有限公司。

1.3 统计学分析

通过WPS2019版软件对检测数据进行整理和统计,并用CHITEST函数对各组间的数据进行卡方检验(χ^2 检验),计算 P 值,通过独立性检验值的大小判断不同类型数据的组间是否存在差异以及差异是否显著,检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 总体监测情况

本次研究共采集样品2325份,其中禽拭子1315份,环境拭子1010份,样品种类包括鸡、鸭、鹅、竹丝鸡和白鸽等动物样品以及档口和屠宰车间的环境样品,基本覆盖了活禽批发市场交易的禽群种类及其暂养、屠宰环境,而且除8月份外,每月均进行监测,较能代表和反映江门市区3个活禽批发市场的H9亚型禽流感病毒疫流行情况。

样品的总体情况见表1,可知禽拭子阳性率高于平均水平,并比环境拭子的高出10.3%,独立性检验的 P 值为 2.491×10^{-10} ,其与环境拭子间的差异具有统计学意义($P < 0.001$)

表1 样品的总体情况

类型	采样数	阴性数	阳性数	阳性率
禽拭子	1315	1010	305	23.20%
环境拭子	1010	880	130	12.90%
总计	2325	1890	435	18.70%

2.2 各月份监测情况

不同月份的H9亚型禽流感病毒核酸阳性率存在差异,具体为在年初(1~2月)以及年中(5~6月)阳性率较高,在并从6月份开始至年末呈现下降趋势,10~12月阳性率低于全年平均阳性率,总体独立性检验的 P 值为 1.262×10^{-28} ,各月份间阳性率的差异具有统计学意义($P < 0.001$)(表2)。

2.3 各类型中样品监测情况

不同种类H9亚型禽流感病毒核酸检测阳性率存在差异,鸡的阳性检出率较高,比平均水平分别

高出28.4%和13.0%,而鸭及白鸽群体阳性率较低,总体独立性检验 P 值为 4.651×10^{-40} ,各种类型间阳性率的差异具有统计学意义($P < 0.001$)(表3)。

表2 各月份H9亚型禽流感病毒监测情况

月份	采样数	阴性数	阳性数	阳性率
1月	165	110	55	33.30%
2月	220	175	45	20.50%
3月	320	270	50	15.60%
4月	185	165	20	10.80%
5月	170	130	40	23.50%
6月	365	240	125	34.20%
7月	355	295	60	16.90%
9月	190	160	30	15.80%
10月	150	140	10	6.70%
11月	105	105	0	0.00%
12月	100	100	0	0.00%
总计	2325	1890	435	18.70%

表3 各类型样品H9亚型禽流感病毒监测情况

种类	样品数	阴性数	阳性数	阳性率
黄羽肉鸡	710	485	225	31.70%
鸭	275	255	20	7.30%
鹅	125	105	20	16.00%
竹丝鸡	85	45	40	47.10%
白鸽	120	120	0	0.00%
环境	665	580	85	12.80%
屠宰车间	345	300	45	13.00%
总计	2325	1890	435	18.70%

在三个采样监测点中,显示各监测点间阳性率的总体独立性检验 P 值为 4.813×10^{-17} ,差异具有统计学意义($P < 0.001$),说明不同监测点的禽类的阳性率存在差异。奇榜市场的阳性检出率为28.2%,高于耙冲市场的14.4%及白沙江南蔬菜禽畜批发市场的13.0%。通过进一步分析,奇榜市场与耙冲市场、白沙江南蔬菜禽畜批发市场的独立性检验 P 值分别为 3.982×10^{-10} 和 6.320×10^{-15} ,差异均具有统计学意义($P < 0.001$),而耙冲市场和白沙江南蔬菜禽畜批发市场二者之间的差异不具有统计学意义($P=0.432$),说明奇榜市场的阳性率显著高于耙冲市场和白沙江南蔬菜禽畜批发市场的,而

耙冲市场和白沙江南蔬菜禽畜批发市场的阳性率差异并不显著(表4)。

表4 各监测采样点H9亚型禽流感病毒监测情况

监测	样品数	阴性数	阳性数	阳性率
奇榜市场	815	585	230	28.20%
耙冲市场	625	535	90	14.40%
白沙江南市场	885	770	115	13.00%
总计	2325	1890	435	18.70%

3 讨论

监测结果显示, H9亚型禽流感病毒的流行态势严峻, 具有阳性率高、分布广泛、时间跨度长的特点, 同时其流行还具有明显的地理性、季节性、种群性特征, 具体表现为在奇榜市场污染情况相对严重, 在年初及年中污染情况严重以及在鸡群体中污染情况严重, 监测和防控的重点应放在污

染情况严重、疫病流行风险高的地点、季节和种群, 加大监测采样和清洁消毒力度, 有利于开展疫病流行的预警和风险评估。

科学有效的清洗消毒可有力地降低环境禽流感病毒污染和感染禽群的危害^[3], 市场经营管理方应严格按照《广东省家禽经营管理办法》中的规定, 做到“一天一清洗一消毒, 一周一大扫除, 一月一休市”(即“1110”制度), 确保清洁消毒效果。

参考文献:

- [1] 赵新燕, 陈跃飞, 王晶钰. 2017年中国普通人群H5和H9亚型流感病毒抗体测分析[J]. 物医学进展, 2018, 39(11):125-129.
- [2] 曹蓝, 刘艳慧, 陈艺韵, 等. 广州市禽类交易区休市前后禽流感病毒动态监测[J]. 华疾病控制杂志, 2018, 22(06):648-650.
- [3] 熊颖聪, 丘文清, 黄洪波, 等. 惠州市2017~2018年禽类市场外环境禽流感病毒监测结果分析[J]. 徽预防医学杂志, 2019, 25(03):181-184, 169.

《广东畜牧兽医科技》(双月刊) ISSN 1005-8567
(1976年创刊, 大16开本, 正文52页) 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

投稿邮箱: gdxmsykj@163.com

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

羊感染布鲁氏菌病的诊断及防控

张少琼

(潮州市饶平县动物卫生监督所, 广东 潮州 515700)

摘要:按照《国家布鲁氏菌病防治计划(2016-2020年)》文件要求,对动物布鲁氏菌病的防控,主要以开展流行病学调查和日常监测为主。近几年来饶平县零散养羊户(点)逐渐增加,布鲁氏菌病发生有潜在的可能性。笔者现结合我县的实际情况浅谈几点防控措施,以作参考。

关键词:布鲁氏菌病; 防控

中图分类号:S852.6 **文献标识码:**C **文章编号:**1005-8567(2020)01-0029-02

布鲁氏菌病(以下简称“布病”)是由布鲁氏菌属的小型革兰氏阴性球杆菌引起的慢性、人畜共患传染病,传染源主要是病畜,感染动物可长期带菌,成为对动物和人类最危险的传染源。动物布病主要侵害生殖道,引起子宫、胎膜、关节、睾丸及附睾的炎症;母畜表现胎衣停滞、流产及繁殖障碍,公畜表现为关节炎和睾丸炎。布病严重影响动物蛋白、奶、肉以及皮毛的质量和产量,给养殖业的发展带来障碍。

1 简况

2019年8月,饶平县动物卫生监督所在例行的流行病学调查中发现,我县黄冈镇一奶羊饲养户郑某敏家奶羊近来出现流产、不能站立的症状,经现场察看,病羊表现为流产,不能站立,关节稍肿大。立即对病羊进行布病实验室琥红平板凝集试验检测,所有受检血清均出现明显强烈的凝集现象,初步怀疑为布病阳性。县委县政府及上级主管部门对这一情况高度重视,指示饶平县动物卫生监督所对饲养户郑某敏家的全部42只羊进行抽取血清开展实验室监测。经监测检验,共有28只羊感染布病菌,远超半数以上感染。

2 流行病学调查及实验室检测情况

2.1 实验室检测

8月至9月间,对黄冈、钱东、新圩三镇共11户养羊户抽取羊血样进行实验室检测,结果见表1。

通过上表共检测210只羊,其中只有二户羊只出现阳性,其余养羊户羊只都显示阴性,未有感染。

2.2 来源情况

在进行流行病学调查、监测过程中,同时对养羊户做了询问笔录,经查,这两户羊只感染布病的畜主曾于去年年末及今年年初分别从羊贩子手中购进了来自陕西的羊只,其中郑某敏购进了18只,陈某泉购进了3只,这些羊都未经产地检疫和调运检疫,没有开具检疫证明,也没有出具布病检测报告,运到本地后也未向我县动监部门报告检疫并对布病进行检测。郑某敏购进18只来自陕西的羊只后,约9个月的时间便感染到自养的羊群约10只。而其他养羊户都是自繁自养或是从本地养羊户购进,未感染布病。可以看出,未经产地检疫及调运检疫,未进行布病检测的外购的羊只具有很大的感染布病的风险。

2.3 防控处置情况

针对检测到布病阳性的羊群,根据《布病防治

收稿日期:2019-11-21

作者简介:张少琼(1971-),男,广东潮州人,本科毕业,兽医师,主要从事基层动物疫病防控工作。E-mail:504850987@qq.com

表1 羊布鲁氏菌病实验室检测结果

采样地点	羊主姓名	饲养数	羊来源地	检测数	试验方法	
					琥红平板阳性数	试管凝集阳性数
黄冈镇龙眼城村	郑某敏	42	18只外购,其余自养	42	29	28
黄冈镇龙眼城村	陈某泉	20	3只外购,其余自养	20	3	3
黄冈镇龙眼城村	陈某育	3	本地	3	0	0
黄冈镇大澳村	郑某春	16	本地	15	0	0
黄冈镇城北居委	余某龙	14	本地	14	0	0
黄冈镇山霞村	许某森	20	本地	18	0	0
黄冈镇山霞村	许某芝	18	本地	18	0	0
黄冈镇霞中村	张某斌	8	本地	8	0	0
钱东镇沈厝村	沈某中	16	本地	16	0	0
钱东镇径中村	吕周利	6	本地	6	0	0
新圩镇长彬村	陈某哲	52	本地	50	0	0
合计		215		210	32	31

技术规范》立即进行防控处置:郑某敏饲养的羊群由于超过半数以上感染布病,对其全部羊群进行扑杀、深埋、无害化处理;陈某泉家的羊群因只有从外面购进的3只羊感染布病,其余自养的羊群并未受到感染,所以只对外购的3只羊只进行扑杀、深埋、无害化处理,陈某泉其余自养羊只禁止卖出、转移,一月后再进行复检,复检正常方可继续正常饲养;对其饲养场所及周围环境进行严格消毒。一个月后,对陈某泉家羊群进行复检,未检测到布病阳性羊只。

3 综合防控措施

(1)对于出现羊只布病阳性的饲养户,畜主及其与羊有过接触的家属,于近期不得外出,并配合县疾病预防控制中心做好人间布病检测,排除人被感染的可能性。如果有人出现感染,应积极做进一步的隔离治疗,直到痊愈。

(2)对于出现羊只布病阳性的养羊户,要认真

对饲养场所及周围环境进行全面定期反复消毒,最大限度杀灭布病病菌。对于其他广大饲养户,也要时常进行消毒,保持羊舍环境卫生,改善羊舍的卫生条件及通风透气度,增强羊群的抵抗力。

(3)通过新闻媒介,发放宣传资料,以及在各养羊户采血排查过程中现场讲解等手段,加大对布病防控知识进行宣传,使广大饲养户能充分认识到布病的严重危害性,做好羊群及畜主自身安全防护,防止被布病感染。

(4)严格外地调入报告制度,禁止无证调入,调入调出都应向县动监所报告,出具或开具检疫证明,对购进羊只应当先进行隔离观察,经布病监测为阴性后才可混群,要建立生产养殖档案,对调入调出羊只都要严格做好记录。

(5)继续对全县养羊户进行排查察看,开展布病流行病学调查及实验室检测,确保全县羊属布病得以净化,倡导饲养户自繁自养,杜绝外来引入性感染风险。

玉米锦蛇隐孢子虫感染病例分析

谢伟骏¹, 萨家祺¹, 任浩斌¹, 胡倩雯¹, 张天佑^{2*}

(1. 广州动物园, 广东广州 510010;

2. 广州长隆野生动物世界, 广东广州 511430)

摘要:隐孢子虫病能够引起蛇严重的临床症状如厌食、消瘦和腹部肿胀, 死亡率较高, 对蛇类危害巨大。由于国内对爬行动物疾病诊断手段不足, 导致该病多呈亚临床状态易被忽略。本研究对三例圈养的玉米锦蛇(*Pantherophis guttatus*)感染隐孢子虫病例, 进行临床症状、诊断、治疗、剖检等分析, 为制定蛇隐孢子虫病诊断方法和防控措施提供科学依据。

关键词:隐孢子虫病; 玉米锦蛇; 诊断

中图分类号:S852.7 **文献标识码:**C **文章编号:**1005-8567(2020)01-0031-04

隐孢子虫病是一种人兽共患寄生虫病, 不仅引起畜禽生产能力下降或死亡, 还引起儿童和免疫抑制病人腹泻, 是人类最常见的6种腹泻病之一。世界卫生组织(WHO)已将该病列为艾滋病(AIDS)怀疑指标之一^[1]。目前常见人和畜禽感染隐孢子虫相关报道, 而野生动物感染隐孢子虫报道较少。第一例发现爬行动物感染隐孢子虫的病例发生在巴尔的摩动物园(Baltimore Zoo), 受感染的动物涉及4个不同品种的蛇^[2]。爬行动物主要感染2种隐孢子虫, 分别为 *C.saurophilum* 和 *C.serpentis*。 *C.saurophilum* 主要感染蜥蜴, 寄生于肠道和泄殖腔, 而马达加斯加残趾虎(*Phelsuma madagascarensis grandis*)和豹纹守宫(*Eublepharis macularius*)的感染部位则局限在泄殖腔^[3-4]。 *C.serpentis* 主要感染蛇, 寄生于胃组织^[5], 在8~28周可在粪便中发现卵囊, 通常不表现明显的临床症状, 一旦出现躯体中部肿胀、呕吐、厌食和体重减轻等, 预后不良, 死亡率较高^[6]。近年来, 随着抽屉式饲养箱的广泛应用, 使得观赏性蛇类的养殖密度大幅增加, 加上动物园展示常用混养方式, 因此在缺乏相应检疫措施的情况下, 导致隐孢子虫病的发病率不断升高。本研究对玉米锦蛇感染隐

孢子虫病例进行诊断和治疗, 旨在制定蛇隐孢子虫病诊断和防控措施提供科学依据。

1 发病与转归

1.1 发病动物

三条玉米锦蛇分别为2岁雄性(1号)、1岁雄性(2号)和8月龄雌性(3号), 均为自繁, 发病期无其他病史。

1.2 饲养环境

三条蛇单独饲养在抽屉式饲养箱, 饲养箱长55 cm、宽25 cm、高15 cm。同一房间内还同时饲养64条其他玉米锦蛇。饲养箱内放置木屑作为垫材, 发病后改为食品级木浆吸油纸; 饲养箱温度为28-30℃, 湿度为60%-75%; 箱底部可加热, 无特定光照。

1.3 饲养管理

每7 d 饲喂一次, 饲料为活鼠或解冻的小白鼠。同一饲养地点的个体均未接受隔离检疫。在日常操作中蛇的水盆等用具也未作隔离和消毒。

1.4 临床症状

三条蛇先后在2个月内相继出现腹部反复肿胀的症状, 其中1号患蛇体况较好, 食欲正常, 体重未见明显下降; 2号患蛇历时1个半月食欲废绝,

收稿日期: 2019-07-16

作者简介: 谢伟骏(1990-), 男, 广东罗定人, 从事野生动物临床诊疗工作。E-mail: pk90125@126.com

*通讯作者: 张天佑(1976-), 广东翁源人, 兽医师, 从事野生动物保育及诊疗工作。E-mail: tigervet@163.com

表1 玉米锦蛇病例临床症状

动物个体	厌食	体重丢失	腹部肿胀	拉稀	呕吐/返流	脱水
1号	-	-	++	-	-	-
2号	-	+	+++	-	-	++
3号	+++	+++	+++	+	++	+

注:“-”表示没有发现;“+”表示有但不明显;“++”表示比较明显;“+++”表示非常明显

体重下降明显,有呕吐史;3号患蛇虽有食欲,但体重下降。三个病例均出现明显的临床症状,以厌食、体重下降、腹部肿胀、拉稀、呕吐、脱水等症状为主(表1)。

1.5 疾病转归

1号患蛇在治疗后体况暂时稳定,但病情反复,胃肿胀消退后又重新出现,体重增长缓慢,预后谨慎。2号患蛇在治疗2个月后又出现厌食、体重下降明显等症状,并在1个月后死亡。3号患蛇症状最严重,经过5 d的支持治疗后,开始恢复食欲,但胃部肿胀未见消除,大便不成型,体重未增加,维持治疗1个月后死亡。

2 诊断与治疗

2.1 影像学诊断

2.1.1 X-RAY 检查

对三例患蛇均进行腹部X-RAY检查,图像显示蛇腹部肿胀部位呈现中等密度阴影,密度与腹腔组织接近,未发现其他高密度异物,肿胀部位在蛇体中间靠后1/3处,初诊怀疑在胃或胃附近(图1~2)。

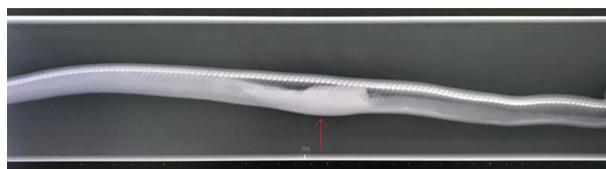


图1 1号患蛇腹部X-RAY影像



图2 2号患蛇腹部X-RAY影像

2.1.2 B超检查

对1号患蛇进行B超检查,图像提示胃粘膜增厚,未见其余异常组织或过多液体(图3)。

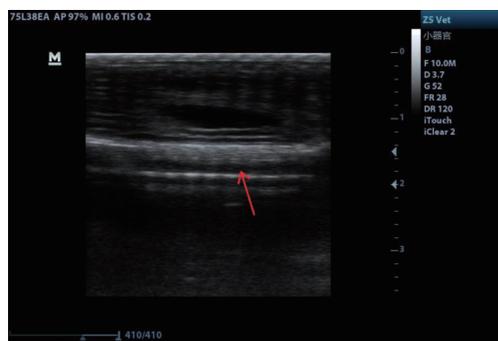


图3 1号患蛇腹部B超检查图像

2.2 血液学检查

2.2.1 红细胞压积(PCV)的测定

采集患蛇的新鲜血液样品,肝素锂抗凝后用毛细管离心,2500 rpm、10 min,离心后测量红细胞层和全血的长度,得出红细胞压积(PCV)数值(表2)。患蛇PCV值均在正常范围内(13%~50%)。

表2 红细胞压积测定值(%)

动物个体	1号	2号	3号
PCV(%)	34	26	24

2.2.2 血细胞镜检

采集患蛇的新鲜血液样品,抹片,自然风干后用DIFF.QUIT进行染色,以油镜观察红细胞、异嗜细胞、淋巴细胞等形态。结果在三个样品的涂片中均出现碱性颗粒增加的异嗜细胞,此外在2号患蛇样品中发现少量细胞质空泡变性的异嗜细胞,提示3条患蛇均存在轻微至中度的炎症反应,其中2号患蛇炎症反应最严重。

2.3 粪便检查

2.3.1 粪便漂浮法

分别将三条患蛇的粪便与饱和盐水混合搅匀后,用60目筛过滤,将过滤后的液体倒入小烧杯中静止10分钟,用接种环蘸取最上层液面到载玻片上直接镜检。镜检结果显示在三条患蛇的粪便中均未见肠道蠕虫虫卵。

2.3.2 粪便抗酸染色法

用棉签分别蘸取三条蛇的粪便样品,直接涂抹于载玻片上,让其自然风干后用火焰固定,之后对其进行抗酸染色。往玻片滴加适量石碳酸复红染液,静置10分钟,清水冲洗;擦干残余水分后滴加3%盐酸酒精脱色30秒,用水冲净,若脱色不完全则重复此步骤直至样品红色消去;最后滴加碱性美蓝复染1分钟,用水冲净,吹干水分后镜检。镜检可见涂片的粪便被染成浅蓝或深蓝色,三份样品均在被染成蓝色的粪便样品中发现大量呈橘红色的隐孢子虫卵囊,卵囊呈不规则圆形,胞质呈无色透明,胞核呈鲜艳的橘红色(图4)。

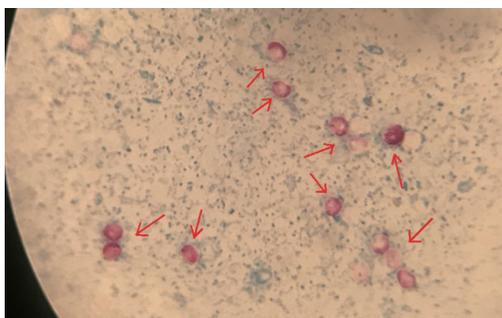


图4 患蛇粪便中的隐孢子虫卵囊

2.4 剖腹探查

为了进一步确定肿胀的性质和部位,遂对体型最大的1号患蛇进行剖腹探查。以舒泰(5 mg/kg)进行诱导麻醉,随后气管插管,异氟烷维持麻醉,手术期间间隔半分钟进行一次人工辅助正压呼吸。术前给予拜有利(10 mg/kg SC)、美洛昔康(0.5 mg/kg SC)预防感染和止痛。从肿胀部位下刀,依次切开鳞片、皮肤、腹壁后,发现肿胀的胃,把肿胀的胃牵引出腹腔,用蘸有温生理盐水的纱布覆盖腹腔,随后把胃切开。切开后发现胃粘膜水肿、胃壁增厚、胃粘膜纵向皱褶增加,但并没有

在胃内发现异物或囊肿。增厚的胃壁和胃粘膜水肿是导致胃肿胀的直接原因。随后内翻缝合胃,用温生理盐水冲洗腹腔后关闭缝合腹腔,外翻缝合皮肤,蛇在术后24小时完全苏醒(图5)。



图5 患蛇腹腔探查

2.5 治疗

对症状严重并有厌食的2号患蛇进行支持疗法,提高饲养温度至28℃,用生理盐水、5%葡萄糖和复方氯化钠按1:1:1比例混合后按剂量25 mL/kg一天分两次分点皮下补液缓脱水症状,同时每2天用胃食管灌食猫用的肉泥流质罐头提供营养和热量。此外,分别对三条患蛇使用剂量为160 mg/kg的螺旋霉素(POSID),连续用药7天后改为一周两次,用于减轻症状,减少隐孢子虫卵囊从消化道中脱落;同时使用剂量为10 mg/kg的拜有利(POSID),用于预防继发感染。

3 剖检及病理观察

分别对死亡的2号和3号患蛇进行剖检,均见胃部明显肿胀,胃粘膜皱褶明显,粘膜水肿,胃内容量减少;肠道粘膜轻度水肿,部分肠道粘膜脱落;其余组织和器官未见明显病变。

取胃部粘膜抹片进行抗酸染色镜检,可见大量隐孢子虫卵囊。

4 讨论

隐孢子虫能感染哺乳动物、鸟类、爬行动物、鱼类等多种动物,但对于大多数温血动物,感染通常是自限性的,当感染发展到一定程度后会自动停止并逐渐康复痊愈,并不需要特殊的治疗,靠动物自身的免疫力能抵御感染。而爬行动物感染后则

会引起严重的临床症状且不能自愈,死亡率较高。蛇感染隐孢子虫不一定表现出明显的临床症状,有部分个体呈现亚临床状态,但仍然可以间歇性地向环境排出具有传染性的隐孢子虫卵囊。报道显示没有临床症状的感染个体仍可以持续向环境排出卵囊达二十年之久^[7]。处于亚临床状态的个体,很难通过临床症状去判断其是否受到隐孢子虫感染,若没有对其进行有效的隔离,则可能将隐孢子虫传染给其他健康的动物个体。因此,对新引进的个体要进行隔离与检疫,及时隔离阳性个体,对原有个体也要定期进行隐孢子虫排查,降低隐孢子虫传播风险。

目前对于隐孢子虫病的诊断方法主要有钡剂造影、胃活检、抗酸染色、免疫荧光染色、血清抗体效价测定和PCR检测等。钡剂造影和胃活检用于观察胃的腔室变窄或阻塞以及胃壁的增厚程度;将粪便或胃灌洗液进行抗酸染色或免疫荧光染色后镜检是最简便快捷的诊断方法,但由于隐孢子虫只有在繁殖阶段才会脱落,故可能造成漏检,所以检查结果有可能出现假阴性,为提高准确率,应进行多次复查;血清ELISA与粪检相结合是判断阳性的最好方法,如果两种检测结果均呈阳性,表明动物被感染,并且已经排出卵囊;如果两种检测结果均呈阴性,则表明动物没有受到感染;如果粪检阳性而免疫荧光抗体阴性,表明动物可能接触了非爬行动物的隐孢子虫,或者动物刚刚受到感染(<六周);如果免疫荧光抗体阳性而粪检阴性,表明动物感染了隐孢子虫但还没到排出卵囊的阶段或排出的卵囊没有到能被检测出来的水平^[8]。随着分子生物学技术的发展,PCR技术已经广泛应用于隐孢子虫感染的检测,极大提高了结果的准确性。

目前尚无商品化药物可以有效清除蛇体内的隐孢子虫。磺胺甲氧苄啶、巴龙霉素和螺旋霉素均只能减轻动物的临床症状,减少或消除卵囊的脱落^[9]。此外必须给予患病动物全面的支持性治疗,如较高的环境温度($\geq 27\text{ }^{\circ}\text{C}$)、皮下补液、定时灌食易消化的流质食物等。根据本研究结果,药物治疗的效果很大程度取决于患病动物的体况和感染程度,若患病动物出现严重的厌食、消瘦、脱水等

症状时大多预后不良,应考虑对动物实施安乐死,降低其他健康动物感染的风险;对于动物园而言,控制和预防是关键,隐孢子虫的检查项目应该列入每个季度的常规体检之中,对于确诊受感染的蛇,应该及时将其与其他健康个体隔离;所有可能被隐孢子虫污染的物品或设备,如饲养箱、水盆等,必须使用4%过氧化氢溶液或高温($60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上持续10 min)进行彻底消毒后再干燥放置至少3天或直接销毁;接触受感染蛇之前应该佩戴一次性手套,避免隐孢子虫污染其他设备和环境。若能逐步隔离或淘汰受感染的患蛇,把隐孢子虫的感染率和发病率控制在较低的水平,将有利于圈养蛇类种群的健康生长。

参考文献:

- [1] 张龙现, 蒋金书. 隐孢子虫和隐孢子虫病研究进展[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2001, 8(3):184-191.
- [2] BROWNSTEIN D G, STRANDBER J D, MONTALI R J, et al. Cryptosporidium in snake with hypertrophic gastritis [J]. veterinary pathology, 1997, 14:606.
- [3] UPTON S J, BARNARD S M. Two new species of coccidia (Apicomplexa, Eimeridae) from madagascar gekkonids [J]. The Journal of Protozool, 1987, 34(4):452-454.
- [4] GRACZYK T K, CRANFIELD M R, BOSTWICK E F. Hyperimmune bovine colostrum treatment of moribund Leopard geckos (Eublepharis macularius) infected with Cryptosporidium sp [J]. Veterinary Research, 1999, 30(4):377-282.
- [5] 王荣军, 茹宝瑞, 张龙现, 等. 爬行动物隐孢子虫的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2007, 23(2):180-183.
- [6] CRANFIELD M R, IALEGGIO D M, NORANBROOK R, et al. Cryptosporidiosis [R]. Proc 7th Avian Exotic Animal Medicine Symposium, Davis, Calif, 1992.
- [7] CRANFIELD M R, GRACZYK T K, WRIGHT K, et al. Cryptosporidiosis [J], Bull Assoc Reptl Amphib Vet, 9(3):15, 1999.
- [8] GRACZYK T K, CRANFIELD M R. Detection of Cryptosporidium-specific immunoglobulins in captive snake by a polyclonal antibody in indirect ELISA [J]. Veterinary Research, 1997, 28(2):131-142.
- [9] GRACZYK T K, CRANFIELD M R, HILL S L. Therapeutical efficacy of Spiramycin and Halofuginone treatment against Cryptosporidium serpentis (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infections in captive snakes [J]. Parasitology research, 1996, 82(2):143-148.

鸡毒霉形体病的分析

夏新萌¹, 范书金², 刘承军²

(1.聊城市动物疫病预防与控制中心, 山东 聊城 252000;

2.聊城市畜牧兽医技术服务中心, 山东 聊城 252000)

摘要:鸡毒霉形体是引起鸡的慢性呼吸道病的主要病原菌之一。一旦感染即给家禽养殖业造成很大损失。本文通过对临床实践过程中病例, 对鸡毒霉形体的生物学特征、致病性和致病机制、病理变化等总结分析, 为家禽养殖者临床预防治疗鸡毒霉形体病提供参考。

关键词:鸡毒霉形体; 致病性; 病理变化

中图分类号:S852.62 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2020)01-0035-02

近年来, 鸡毒霉形体病在鸡的养殖过程中时有发生, 主要引起鸡的慢性呼吸道病, 单独感染时, 没有明显的临床症状, 其常与传染性支气管炎病毒, 新城疫病毒和大肠杆菌等病原协同, 导致患鸡呼吸道症状加剧, 死亡率增高。给养禽业带来了巨大的经济损失, 鸡毒霉形体病的诊断和防控具有重要意义。

1 鸡毒霉形体的生物学特征及培养特性

鸡毒霉形体又称为鸡败血霉形体或鸡败血支原体等, 与其他种属霉形体一样, 无细胞壁, 形态呈高度多态性。普通染色效果不佳, 用狄氏染色时着色较好, 颜色呈蓝色。鸡毒霉形体为兼性需氧或需氧菌, 能够发酵葡萄糖, 不能发酵乳糖, 产酸不产气, 不水解精氨酸。

体外培养时, 20℃可存活1~3d, 而在蛋黄内培养时可存活18周。在固体培养基上, 鸡毒霉形体的菌落可以吸附鸡红细胞, 这个特征常被用来区别致病性霉形体和非致病性霉形体。

目前, 培养霉形体常用的培养基是改良的FM-4培养基以及改良的Fray培养基。液体培养基常加

入pH指示剂, 如酚红等, 液体培养时培养基始终清亮, 通过颜色变化可以大致推测菌体的生长状况。固体培养基是在液体培养基的基础上, 加入了固定比例的优质琼脂, 高压灭菌后制成。培养时, 将一定量的菌液均匀铺满整个平板, 培养时间大致为3~7d, 菌落形成后, 可在显微镜下观察菌落形态。

2 鸡毒霉形体的致病性及致病机制

鸡毒霉形体是明显具有致病性的禽类霉形体, 最常见的感染方式是通过呼吸道感染, 在鸡和火鸡可以导致气囊炎和气管炎。鸡毒霉形体常常和其他病原协同致病, 比如传染性支气管炎病毒、新城疫病毒、某些血清型的大肠杆菌等, 导致更为严重的后果。

鸡毒霉形体的致病性主要体现在, 其自身分泌的神经氨酸酶、溶血素以及过氧化氢、内毒素等物质, 可以引起细胞损伤或死亡。在某些情况下, 有研究表明, 霉形体感染时会使宿主细胞的抗原性发生改变, 甚至引起自身免疫性反应。

鸡毒霉形体侵染宿主时, 借助于细胞膜上一

收稿日期:2019-07-22

项目支持:山东省重点研发计划项目课题(编号2019GNC21411)

作者简介:夏新萌(1988-), 男, 山东聊城人, 大学本科, 兽医师, 主要从事动物疫病防控研究。E-mail:18363514627@163.com

种特殊的结构,吸附在宿主粘膜细胞的表面。相关研究表明,这种结构是一种黏附蛋白因子。鸡毒霉形体在宿主呼吸道上皮细胞上生长繁殖,并且将自身携带的酶类、核酸等物质注入细胞内,同时也利用宿主细胞的营养成分,供给自身生长的需要。另外,鸡毒霉形体可以将自身产生的神经毒素注入细胞。最终,宿主细胞内线粒体发生肿胀,胞浆内呈现出网状结构^[1],糖代谢和分子合成都受到严重影响。最终,细胞发生损伤后变性脱落。

3 鸡毒霉形体病的临床症状及病理变化

鸡毒霉形体感染之后,常常有一段时间的潜伏期,大概1~3周,在感染之后也可能长期没有临床症状。一般出现复合感染,或者其他诱发因素存在的情况下,才会表现出症状。

一般情况下,发生自然感染时,主要呈现出的是呼吸道症状,包括咳嗽、呼吸啰音、打喷嚏等。患病鸡会出现精神萎靡,常常眼睑闭合,眼角有泡沫状分泌物等临床表现。在复合感染时,症状常常会加剧并且伴随着产蛋率和生长率急剧下降。

鸡毒霉形体感染,最为常见的病理变化,主要体现在呼吸道,其次为输卵管、跗关节。在鼻腔和喉头部位,常见到大量粘液或者卡他性渗出物。气囊壁、眶下窦发生肿胀,并伴有粘液甚至干酪样分泌物附着。肺部呈现坏死或者水肿,严重情况下,可见到肺表面出现灰红色或者淡红色细小病灶。实验性地感染鸡可以造成输卵管炎,并且附着有大量干酪样分泌物。在病程较长时,患病鸡还会出现关节炎、滑膜炎,特别是跗关节较为常见,关节外组织发生水肿,关节液增多,腱鞘、滑

液膜以及鞘囊发生炎症并出现单核细胞浸润^[2]。

4 鸡毒霉形体病的诊断和防控

对于鸡毒霉形体的感染,在诊断时,依靠临床症状、组织学病理变化和剖检病变并没有证病意义,在最终确诊时必须依赖于病原微生物的分离、培养和鉴定,并且,在用琼脂培养基培养被认为是阴性的时候,还需要培养3~4周。

分离物的鉴定主要是根据培养基上的菌落形态,结合血清学方法进行鉴定。血清学方法主要是血清平板凝集实验(RSA)、试管凝集(TA)、血凝抑制(HI)、琼脂凝胶沉淀实验等。随着分子生物学技术的发展,分子诊断技术已经得到很好的应用,例如PCR方法已经越来越多的用于鸡毒霉形体的检测。

控制鸡毒霉形体感染的一个重要原则,就是减少病原微生物与宿主接触的机会,降低诱发因素,提高宿主对病原的抵抗力。控制方法最好是采用综合防治的策略,主要包括以下方面:对种鸡群进行药物预防性治疗,对种蛋采用药物或者加热处理,尽量减少纵向传染的几率;饲养时采取小群饲养,孵化时采用小批量孵化,当某一批次发生感染时,可以全群剖杀;严格消毒,防止外界病原带入,鸡胚用泰乐菌素或庆大霉素处理等手段。

参考文献:

- [1] 刘晓文,丁铲,于圣青,等. SPF 鸡人工感染鸡败血霉形体后呼吸系统的病理变化[J]. 中国家禽, 2001, 23(24):13-14.
- [2] 毕丁仁,王桂枝. 动物霉形体及研究方法[M]. 北京:中国农业出版社, 1998.

不同厂家猪伪狂犬病活疫苗免疫效力的评估

姚俊庸¹, 毛晶丹²

(1. 梅州市梅江区动物卫生监督所, 广东 梅州 514031;

2. 滑县动物卫生监督所, 河南 滑县 456400)

摘要:为研究不同厂家的猪伪狂犬病活疫苗免疫效力, 本研究选取5个不同厂家的猪伪狂犬病活疫苗, 在梅州地区某个规模化猪场筛选出50头猪伪狂犬gB、gE抗体阴性的仔猪进行试验, 分别设A、B、C、D、E组共5组, 每组10头, 使用TCID₅₀对疫苗效价测定。结果显示, 所有疫苗病毒效价均已经达到国家标准, 病毒含量合格。按照每个厂家疫苗免疫一组试验猪进行免疫, 免疫后每隔1周采血检测gB、gE抗体。通过连续3个月的跟踪检测, 结果表明, 市场上的国产疫苗效果和进口疫苗效果相差不大, 都能产生较高抗体水平, 并且能维持高抗体达到3个月以上。

关键词:猪伪狂犬病活疫苗; 免疫效力

中图分类号:S852.4 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2020)01-0037-02

伪狂犬病是由伪狂犬病病毒(pseudorabies virus, PRV)引起的多种家畜和野生动物以发热、奇痒(猪除外)及脑脊髓炎为主要症状的一种急性传染病^[1]。猪是伪狂犬病病毒的自然宿主, 该病毒对养猪业危害极大, 可致妊娠母猪流产、死胎或产木乃伊胎; 初生仔猪出现运动失调、神经症状、麻痹、衰竭、死亡等典型症状, 发病仔猪的病死率可高达100%^[2-3]。该病易与其他疫病混合感染, 给养猪业造成较大的损失。通过疫苗免疫和生物安全措施可有效控制伪狂犬病的早期发生, 阻止该病在全场的蔓延, 降低损失^[4]。目前市场上的猪伪狂犬疫苗厂家不同, 国产与进口疫苗价格也有所差别, 本试验旨在随机购买市场上进口和国产疫苗进行效价和抗体持续期的比较, 为广大养殖户提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验疫苗

本试验所用猪伪狂犬病活疫苗有3家是国产疫苗, 由于涉及到公司利益, 命名为A、B、C三个厂家疫苗, 2家为进口疫苗, 命名为D、E两个进口疫苗, 均在市场正规渠道购买。

1.2 试验用猪

选取梅州地区某个规模化猪场, 其母源抗体不再影响的30日龄三元杂仔猪, 且伪狂犬gB、gE抗体检测均为阴性。

1.3 检测抗体试剂盒

检测猪伪狂犬gB、gE抗体试剂盒购自美国IDEXX公司。

1.4 细胞等试验用具

BHK细胞为华南农业大学兽医学院赠送, DMEM细胞培养液购自Hyclone公司。

1.5 疫苗TCID₅₀的测定

将消化成功的BHK细胞, 加到48孔细胞板中, 每孔0.5 ml, 待细胞长满单层后弃掉营养液, 将A、B、C、D、E五个厂家疫苗按瓶签注明头份用DMEM稀释为1头份/ml, 然后作10倍系列稀释, 取10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶4个稀释度, 接种于长满单层的48孔细胞板, 每个稀释度接种6孔, 每孔0.1 ml, 补加维持液0.9 ml, 同时设正常细胞对照2孔, 置37℃、5% CO₂培养箱培养观察5~7天, 根据Reed-Muench法计算TCID₅₀。

1.6 免疫接种

将A、B、C、D、E五个厂家疫苗分别按瓶签注明

收稿日期: 2019-08-28

作者简介: 姚俊庸(1987-), 男, 河南正阳人, 硕士研究生, 兽医师, 主要从事兽医免疫学研究。E-mail: 892696817@qq.com

头份用自带稀释液稀释为1头份/ml,每个厂家疫苗免疫10头猪,颈部肌肉注射1 ml/头。免疫后每隔一周采血一次,检测伪狂犬gB、gE抗体。

2 结果

2.1 疫苗效价的测定

结果显示,所购买的疫苗病毒效价见表1,均已经达到国家标准,现在疫苗的保存条件也更加完善,这些都有效的保证了疫苗的病毒含量。

表1 各厂家疫苗病毒含量的测定

组别	TCID ₅₀ /ml
A	10 ^{6.57}
B	10 ^{5.60}
C	10 ^{5.55}
D	10 ^{5.57}
E	10 ^{6.0}

2.2 抗体水平

免疫后每隔一周采血,检测伪狂犬gB、gE抗体。由于动物数量较多,每个厂家疫苗免疫后抗体取平均值,见表2、表3。

伪狂犬gE抗体从免前到免后98天都是阴性,

见表3、图2,说明在此期间试验猪没有野毒的感染。

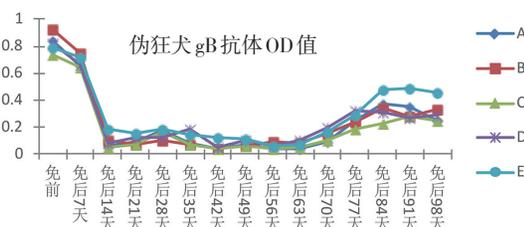


图1 伪狂犬gB抗体OD值

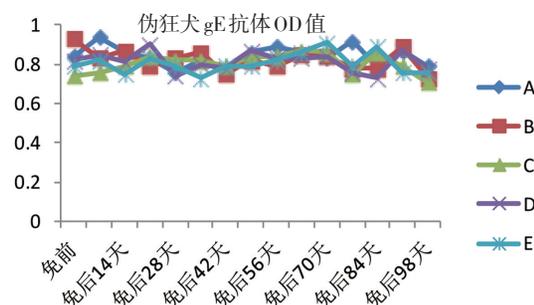


图2 伪狂犬gE抗体OD值

3 讨论

本试验通过购买市场上不同厂家的猪伪狂犬病活疫苗,检测疫苗效价,并跟踪进行免疫抗体

表2 伪狂犬gB抗体OD值(PR-Ab)

组别	免前	免后7天	免后14天	免后21天	免后28天	免后35天	免后42天	免后49天	免后56天	免后63天	免后70天	免后77天	免后84天	免后91天	免后98天
A	0.84	0.65	0.06	0.09	0.18	0.08	0.04	0.07	0.04	0.04	0.09	0.25	0.37	0.35	0.25
B	0.93	0.75	0.1	0.07	0.1	0.07	0.04	0.06	0.09	0.08	0.16	0.24	0.34	0.28	0.33
C	0.74	0.64	0.05	0.07	0.17	0.07	0.04	0.06	0.04	0.05	0.1	0.19	0.23	0.28	0.25
D	0.82	0.66	0.08	0.12	0.12	0.19	0.05	0.1	0.06	0.1	0.2	0.32	0.31	0.27	0.29
E	0.79	0.72	0.19	0.16	0.19	0.15	0.12	0.11	0.06	0.07	0.17	0.29	0.48	0.49	0.46

注:PR-gB(IDEXX)是伪狂犬病抗体, >0.70为阴性, ≤0.60为阳性, 之间为可疑

表3 伪狂犬gE抗体OD值(PR-Ab)

组别	免前	免后7天	免后14天	免后21天	免后28天	免后35天	免后42天	免后49天	免后56天	免后63天	免后70天	免后77天	免后84天	免后91天	免后98天
A	0.84	0.94	0.86	0.83	0.76	0.82	0.76	0.86	0.89	0.86	0.83	0.92	0.79	0.87	0.79
B	0.93	0.83	0.87	0.79	0.83	0.86	0.75	0.82	0.79	0.85	0.84	0.78	0.78	0.89	0.73
C	0.74	0.76	0.79	0.84	0.82	0.82	0.79	0.84	0.84	0.87	0.86	0.75	0.86	0.79	0.71
D	0.82	0.85	0.81	0.9	0.74	0.8	0.78	0.87	0.83	0.83	0.84	0.76	0.73	0.87	0.78
E	0.79	0.82	0.75	0.83	0.79	0.73	0.79	0.79	0.82	0.86	0.91	0.79	0.89	0.76	0.76

注:PR-gE(IDEXX)是伪狂犬病抗体, >0.70为阴性, ≤0.60为阳性, 之间为可疑

高致病性H7N9流感病毒RT-LAMP检测方法的建立

黄海超, 徐日文, 杨素, 陈轩*, 邵建宏, 沙才华, 罗宝正, 赵福振, 廖秀云
(拱北海关技术中心, 广东 珠海 519000)

摘要:2017年2月广东CDC首次报告了一种新的H7N9流感病毒变异株, 该变异株在血凝素(HA)基因的裂解位点发生了插入型突变, 从而成为对禽高致病性的H7N9流感病毒(HP-H7N9)。因此, 急需建立一种快速简便的H7N9流感病毒检测方法。根据HP-H7N9的HA基因序列, 设计一组HP-H7N9特异性的RT-LAMP引物, 在对反应体系进行优化的基础上, 建立了HP-H7N9的RT-LAMP检测方法并进行了特异性试验、敏感性试验。结果显示, 本方法只对HP-H7N9特异性扩增, 而对低致病性H7N9病毒(LP-H7N9)、H7N3流感病毒(H7N3)、H3N2流感病毒(H3N2)、H5N1禽流感病毒(H5N1)、H9亚型禽流感病毒(H9)、新城疫病毒(NDV)、甲型H1N1流感病毒(H1N1)、传染性法氏囊病病毒(IBDV)、鸡传染性支气管炎病毒(IVB)等病原未见扩增。该方法最低能够检测到 2.97×10^5 copies (10^{-6} 稀释度)的阳性质粒, 具有良好的检测灵敏度。本方法操作简便, 对设备需求较低, 试验耗时短, 反应结果可直接肉眼观察判读, 适用于基层兽医站所、养殖场及野外监测点的HP-H7N9的快速筛查和监测。

关键词:高致病性; H7N9; 流感病毒; RT-LAMP; 检测方法

中图分类号:S852.65 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2020)01-0039-04

Development of RT-LAMP detection method for highly pathogenic H7N9 influenza virus

HUANG Haichao, XU Riwen, YANG Su, CHEN Xuan*, SHAO Jianhong,
SHA Caihua, LUO Baozheng, ZHAO Fuzhen, LIAO Xiuyun
(Technical center of Gongbei Customs, Zhuhai 519000, China)

Abstract: In February 2017, Guangdong CDC first reported a new variant of H7N9 influenza virus, which has an insertional mutation at the cleavage site of the hemagglutinin (HA) gene, thus becoming a highly pathogenic H7N9 influenza virus (HP-H7N9) for avian. According to the HA gene sequence of HP-H7N9, a set of HP-H7N9-specific RT-LAMP primers was designed. Based on the optimization of the reaction system, the RT-LAMP detection method of HP-H7N9 was established and the specificity and sensitivity test was carried out. The results showed that this method only specifically amplified HP-H7N9, other RNA samples including low pathogenic H7N9 virus (LP-H7N9), H7N3 influenza virus (H7N3), H3N2 influenza virus (H3N2), H5N1 avian influenza virus (H5N1), H9 subtype avian influenza virus (H9), Newcastle disease virus (NDV), influenza A H1N1 influenza virus (H1N1), infectious bursal disease virus (IBDV) and avian infectious bronchitis virus (IBV) did not give amplification curves. The minimum detection limit for the positive plasmid was 2.97×10^5 copies (10^{-6} dilution), this shows that the method has a good sensitivity. The method is simple in operation, low in equipment demand, short in test time, and the test result can be

收稿日期:2019-10-23

基金项目:海关总署科技项目(2017IK153);拱北海关科技项目(ZH2017-9)

作者简介:黄海超(1993-),男,广东珠海人,助理研究员,主要从事动物检验检疫技术研究。Email:514742430@qq.com

*通信作者:陈轩(1983-),男,高级兽医师,研究方向:动物检疫技术。E-mail:65561977@qq.com

directly observed by eyes, and is suitable for rapid screening and monitoring of HP-H7N9 in grassroots veterinary stations, farms and field monitoring points.

Keywords: Highly pathogenic; H7N9; Influenza virus; RT-LAMP; Detection method

低致病性 H7N9 禽流感病毒自 2013 年出现以来, 已广泛传播并引起了五波人类感染^[1]。2017 年 2 月广东 CDC 报道了两例人类感染 H7N9 流感病例, 首次报告了一种新的 H7N9 流感病毒变异株, 该变异株在血凝素(HA)基因的裂解位点发生了插入型突变^[2-3]。这种插入型突变被认为是对禽高致病性的标志^[4]。鉴于近年来冬春季节人类感染高致病性 H7N9 病毒的风险增加, 为加强对高致病性 H7N9 流感病毒(HP-H7N9)的诊断和监测, 防止该病毒对家禽业和公共卫生造成严重损害, 我们开发了一种快速、敏感、特异的高致病性 H7N9 禽流感病毒 RT-LAMP 检测方法。

1 材料和方法

1.1 病毒

灭活的 HP-H7N9 鸡胚尿囊液(毒株编号为 A/chicken/Guangdong/Q39/2017(H7N9)), 低致病性 H7N9 流感病毒(LP-H7N9)核酸、H7N3 流感病毒(H7N3)核酸、H3N2 流感病毒(H3N2)核酸、H5N1 禽流感病毒(H5N1)核酸、H9 亚型禽流感病毒(H9)核酸、新城疫病毒(NDV)核酸、甲型 H1N1 流感病毒(H1N1)核酸、传染性法氏囊病病毒(IBDV)核酸、鸡传染性支气管炎病毒(IBV)核酸由华南农大兽医学院禽病研究室惠赠, H5 亚型(Re-6 疫苗株)、H5 亚型(Re-8 疫苗株)和 H7 亚型(Re-1 疫苗株)禽流感病毒血凝抑制试验抗原来自哈尔滨维科生物技术开发公司。

1.2 主要试剂

RNA 扩增试剂盒(恒温扩增法)为广州双螺旋基因技术有限公司产品; RNA 纯化试剂 RNAiso Plus、RNase-free Water 为宝生物工程(大连)公司产品; 其它常规试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 主要仪器

Genie II 等温扩增荧光检测系统为英国 OptiGene 公司产品; Sigma 3-18K 小型高速冰冻台式离心机为德国 Sartorius 公司产品; NanoDrop ND-

1000 Spectrophotometer 紫外分光光度计为美国 NanoDrop Technologies 公司产品。

1.4 引物和探针的设计合成

利用 Eiken Chemical 公司的在线软件 PrimerExplore(<http://primerexplorer.jp/e/>), 选取 HA 基因序列进行 RT-LAMP 的引物设计。引物序列如表 1 所示。将序列送华大基因科技有限公司合成, 用 DEPC 处理水溶解, -20 °C 避光保存。扩增目的片段序列如下: ACTTGCCATTTTCAGAACATAGATAGCAGGGCAGTTGGAAAATGTCCGAGATATGTTAAGCAAAGGAGTCTTCTGCTGGCAACAGGATGAAGAATGTTCC TGAGGTTCCAAAGAGAAAACCGACTGCCGAGAGG CCTATTTGGTGCTATAGCGGGTTTCATTGAAAATG GATGGGAAGGCCTAATTGATGGTTGGTATGGTTT CAGACACCAGAATGCACAGGGAGAGGGAACTGC TGCAGATTACAAAAGCACTCAATCGGCAATTGAT CAAATAACAGGGAAATTAACCGGCTTATAGCAA AAACCAACCAACAATTTAAGTTGATAG(注: 方框部分为外引物 F3、B3 对应区域; 阴影部分为内引物 FIP 对应区域; 下划线部分为内引物 BIP 对应区域)

表 1 HP-H7N9 RT-LAMP 引物序列

引物	序列(5'→3')
F3	5'- ACTTGCCATTTTCAGAACATAGA -3'
B3	5'- CTATCAACTTAAATTTGTTGGTTGGT -3'
FIP(F2-F1C)	5'- GCCTCTCGCAGTCCGTT- TCTTCTGCTGGCAACAGG -3'
BIP(B1C-B2)	5'- GCCTAATTGATGGTTGGTATGGTT- ATTGCCGATTGAGTGCTT -3'

注: F3、B3 为外引物; FIP、BIP 为内引物

1.5 病毒 RNA 提取

按照 RNA 纯化试剂说明书进行。

1.6 阳性对照和阴性对照的准备

将扩增目的片段提交华大基因科技有限公司进行基因合成, 制作重组质粒 WHC183645-LAMP330 作为阳性对照。无菌采取 SPF 鸡胚尿囊

液,经检测通用A型流感病毒、IBDV、IBV和NDV等病毒核酸,结果均为阴性,作为阴性对照。

1.7 RT-LAMP反应体系及优化

1.7.1 内外引物浓度组合的优化

内引物(FIP/BIP)终浓度从0.4 μmol/L至1.6 μmol/L以0.4 μmol/L递增,外引物浓度(F3/B3)从0.05 μmol/L至0.2 μmol/L以0.05 μmol/L递增,其它条件完全一致,反应温度为60℃,反应时间为60 min,采用矩阵法进行筛选试验,以确定内外引物的最佳浓度和比例。

1.7.2 反应温度的优化

以优化后的引物浓度为条件,反应温度从58℃为开始,以1℃递增,直到6℃,反应时间为60 min,以确定最佳的一步法RT-LAMP反应温度。

1.8 特异性试验

使用优化确定的反应温度,以优化后的引物浓度配制反应体系,以HP-H7N9、LP-H7N9、H7N3、H3N2、H5N1、H5亚型禽流感病毒(Re-6疫苗株)、H5亚型禽流感病毒(Re-8疫苗株)、H7亚型禽流感病毒(Re-1疫苗株)、H9、H1N1、IBDV、IBV、NDV等病毒核酸作为模板进行RT-LAMP,反应时间为60 min,评价其特异性。同时使用显色法进行特异性评价,配制反应体系并在各反应管管盖内侧中央加1 μl显色液(钙黄绿素荧光染料),加入模板后反应60 min,反应结束后颠倒反应管数次,使反应混合液与显色液充分混匀,观察反应液颜色情况。

1.9 灵敏度试验

阳性质粒测定浓度后,进行10倍梯度稀释至10⁻¹¹的稀释度,对梯度稀释的样品按照优化后的引物浓度和反应温度进行LAMP检测,以评价方法敏感性。

测定HP-H7N9鸡胚尿囊液的血凝效价,将其倍比稀释至2⁻²⁸,提取各稀释度尿囊液的病毒核酸,以稀释度分别为2⁻¹、2⁻⁴、2⁻⁸、2⁻¹²、2⁻¹⁶、2⁻²⁰、2⁻²⁴、2⁻²⁸的尿囊液所提核酸为模版,进行HP-H7N9 RT-LAMP检测,测试能检测到HP-H7N9核酸的尿囊液最高稀释倍数。

2 结果

2.1 引物浓度的优化

实验结果显示,16组内外引物终浓度组合中,除

内引物(FIP/BIP)浓度为0.4 μM的4组未出现扩增曲线外,其余12组引物组合均能产生扩增曲线(见图1,图见第52页)。内引物浓度为1.2 μM和1.6 μM时,扩增曲线进入指数增长期的时间明显早于内引物浓度为0.8 μM的实验组。扩增曲线最早到达峰值平台的内外引物浓度组合为1.2~0.10 μM,扩增曲线荧光峰值最高的内外引物浓度组合为1.6~0.20 μM。基于时间效率及检测成本的考虑,选择1.2~0.1 μM作为HP-H7N9 LAMP反应体系的内引物和外引物终浓度。通过优化确定的反应体系为:反应液RM(2X) 12.5 μL、Bst聚合酶0.8 μL、逆转录酶0.2 μL、内引物(FIP/BIP, 20 μM)各1.5 μL、外引物(F3/B3, 5 μM)各0.5 μL、荧光染料I 0.5 μL、RNA模板5.0 μL、RNase Free dH₂O 2.0 μL,总体积为25 μl。

2.2 RT-LAMP反应温度的优化

用优化的引物浓度,58~65℃条件下均能产生扩增曲线(图2,图见第52页),60℃、63℃、64℃时反应效率和扩增曲线最优(图2中编号为3、6、7的扩增曲线)。综合考虑扩增曲线进入指数增长期的时间和荧光峰值强度,选择60℃作为HP-H7N9 RT-LAMP的最佳反应温度。

2.3 特异性试验

特异性试验中,只有阳性对照和HP-H7N9模板出现扩增曲线,而LP-H7N9、H7N3、H3N2、H5N1、H5亚型禽流感病毒(Re-6疫苗株)、H5亚型禽流感病毒(Re-8疫苗株)、H7亚型禽流感病毒(Re-1疫苗株)、H9、H1N1、IBDV、IBV、NDV和阴性对照均未观察到S型扩增曲线(图3,图见第52页)。显色法试验结果显示只有HP-H7N9模板和阳性对照的反应产物呈绿色,其余模板反应产物皆呈橙色为阴性,表明本方法具有良好的特异性。

2.4 敏感性试验

阳性质粒溶解后浓度为50 ng/μl,换算成拷贝数浓度为5.94×10¹⁰ copies/μl。试验结果表明,本方法最低可检测到阳性质粒的10⁻⁶稀释倍数(5.94×10⁴ copies/μl),换算成拷贝数为2.97×10⁵ copies,结果见图4(图见第52页)。

HP-H7N9鸡胚尿囊液的血凝效价为25。以稀释度分别为2⁻¹、2⁻⁴、2⁻⁸、2⁻¹²、2⁻¹⁶、2⁻²⁰、2⁻²⁴、2⁻²⁸的尿囊液所提核酸为模版,进行HP-H7N9 RT-LAMP检测,能检测到HP-H7N9核酸的尿囊液最低稀释度为2⁻²⁴,

荧光扩增曲线见图5(图见第52页)。

3 讨论

2013年出现的H7N9流感病毒能感染人类并造成严重疾病甚至死亡^[5],由于该病毒对家禽表现为低致病性^[6],在禽群中常无症状传播,因此尽管主管部门和行业采取了诸多措施来预防和控制H7N9病毒对家禽及人类的感染,但病毒的低致病性限制了相关监测和净化行动的效果,使得该病毒能持续在禽鸟中传播和进化。2017年初出现的H7N9变异株在HA裂解位点插入了多个碱基,从而成为对禽高致病性的毒株^[7-8]。为加强对高致病性H7N9流感病毒的监测,开展了高致病性H7N9流感病毒RT-LAMP检测方法的研究。

内外引物的浓度和比例是影响RT-LAMP反应效率的重要因素^[9]。试验结果表明,内引物浓度在1.2 μM和1.6 μM时,扩增反应进入指数增长期的时间显著短于内引物浓度为0.8 μM的时间(图1),即内引物的浓度越高,起始阶段开始的合成反应就越多,反应效率越高;内引物浓度为0.4 μM时未出现扩增曲线。扩增曲线荧光峰值最高的内外引物浓度组合为1.6 μM、0.20 μM。内外引物浓度的最适比例为8:1~16:1,在此范围内都能取得较好的扩增效果。基于时间效率和检测成本的考虑,本方法确定的内外引物最佳浓度分别为1.2 μM、0.1 μM。

本方法只对HP-H7N9进行了特异性扩增,而对LP-H7N9、H7N3流感病毒、H3N2流感病毒、H5N1禽流感病毒、H5亚型禽流感病毒(Re-6疫苗株)、H5亚型禽流感病毒(Re-8疫苗株)、H7亚型禽流感病毒(Re-1疫苗株)、H9亚型禽流感病毒、甲型H1N1流感病毒(H1N1)、IBDV、IBV、NDV、H7亚型禽流感病毒(Re-1疫苗株)等核酸不发生扩增,具有极高的特异性。

本方法最低能够检测到 5.94×10^4 copies/μL的阳性质粒,与HP-H7N9荧光定量RT-PCR检测方法^[10]相比,RT-LAMP检测法的灵敏度相对较低。可能的原因是目的基因片段为330 bp,长度略大,影响RT-LAMP扩增效率。试验所用的HP-H7N9攻毒鸡胚尿囊液的血凝效价为25,提取倍比稀释的各稀释度尿囊液的病毒核酸,进行HP-H7N9 RT-LAMP,能检测

到HP-H7N9核酸的尿囊液最低稀释度为 2^{-24} ,表明本方法的敏感性远高于经典的血清学方法。

本研究基于HP-H7N9的HA基因序列设计了四条特异性引物,成功建立了HP-H7N9的RT-LAMP检测方法。由于本方法不需复杂的变温过程,只需水浴锅即可完成相关检测,并且可肉眼观察钙黄绿素染料荧光显色情况进行结果判定,减少了假阳性结果的干扰。本方法操作简便,对设备需求较低,试验耗时短,反应结果可直接肉眼观察判读,适用于设备条件有限的基层兽医站所、养殖场及野外监测点的HP-H7N9的快速筛查和监测。

参考文献:

- [1] DANIELLE LULIANO A, JANG Y, JONES J, et al. Increase in Human infections with avian influenza A (H7N9) virus during the fifth epidemic -- China, October 2016-February 2017 [R]. Morbidity and Mortality Weekly Report, 2017, 66(9):254-255.
- [2] KE C W, Mok K P C, ZHU W F, et al. Human Infection with Highly Pathogenic Avian Influenza A (H7N9) Virus, China [J]. Emerging Infectious Diseases, 2017, 23(8):1332-1340.
- [3] 李艳华, 高海女, 杨仕贵, 等. H7N9禽流感病毒分子生物学变异的研究进展[J]. 病毒学报, 2018, 34(6):904-910.
- [4] ZHANG F C, BI Y H, WANG J, et al. Human infections with recently - emerging highly pathogenic H7N9 avian influenza in China [J]. The Journal of Infection, 2017, 75:71-75.
- [5] GAO R B, CAO B, HU Y W, et al. Human infection with a novel avian - origin influenza A (H7N9) virus [J]. The New England Journal of Medicine, 2013, 368(20):1888-1897.
- [6] ZHANG Q Y, SHI J Z, DENG G H, et al. H7N9 influenza viruses are transmissible in ferrets by respiratory droplet [J]. Science, 2013, 341(6144): 410-414.
- [7] ZHOU L, TAN Y, KANG M, et al. Preliminary epidemiology of human infections with highly pathogenic avian influenza A (H7N9) virus [J]. Emerging Infectious Diseases, 2017, 23: 1355-1359.
- [8] 刘东, 张竹君, 胡娇, 等. 2013~2017年我国H7N9亚型禽流感病毒在家禽中的流行情况分析[J]. 病毒学报, 2018, 34(6):800-809.
- [9] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop - mediated isothermal amplification of DNA. [J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12):E63. doi:10.1093/nar/28.12.e63
- [10] WANG X R, GU L L, SHI J Z, et al. Development of a real-time RT - PCR method for the detection of newly emerged highly pathogenic H7N9 influenza viruses [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2017, 16(09):: 60345-60347.

猪肺疫、猪丹毒病原 RAA 检测方法的建立

邵建宏, 赵福振, 廖秀云, 陈轩, 黄海超, 沙才华, 罗宝正*
(拱北海关技术中心, 广东 珠海 519001)

摘要:重组酶介导的等温核酸扩增(RAA)技术是一种新的检测技术,本研究分别基于猪丹毒CPS基因序列和猪肺疫KMT基因序列,使用分子生物学软件Oligo 7.0分别设计两套特异性引物、探针,建立猪丹毒、猪肺疫的RAA检测方法,并分别对其特异性、灵敏度和稳定进行测试。结果显示,所建立的两种方法将巴氏杆菌、丹毒杆菌显著区分于大肠杆菌O157、金黄色葡萄球菌、胸膜肺炎放线杆菌、单核细胞增生李斯特菌、支气管败血波氏杆菌、II型猪链球菌等其他猪细菌性传染病病原,单个样品检测时间约20分钟,最低均可检测到100个拷贝数量级的重组质粒DNA。

关键词:猪丹毒; 猪肺疫; 重组酶介导链替换核酸扩增技术; 检测

中图分类号:S852.6 文献标识码:A 文章编码:1005-8567(2020)01-0043-05

Establishment of Recombinase-Aid-Amplification for the detection pathogen of swine pasteurellosis and erysipelas

Shao Jianhong, Zhao Fuzhen, Liao Xiuyun, Chen Xuan, Huang Haichao, Sha Caihua, Luo Baozheng*
(Technology Center of Gongbei Customs District, Guangdong Zhuhai 519015)

Abstract: In order to establish the assay for the detection of these two disease by recombinase-aid amplification, this study designed two groups of specific primers and probes by Primer Express 3.0, based on the polypeptide gene sequence of porcine erysipelas and the KMT gene sequence of swine pasteurellosis which got from the Genbank, then tested the specificity, sensitivity and stability of these primers and probes respectively. The results showed that both of the assay methods could distinguished the Pasteurella and Erysipelas from the *Escherichia coli* O157, *Staphylococcus aureus*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus suis type II* and other pathogens of bacterial infectious diseases that can cause disease in pigs. It took just 20 min to test a single sample, and could detect as low as 100 copies of the order of magnitude of the minimum amount of recombinant plasmid DNA.

Keywords: Swine pasteurellosis; Swine erysipelas; Recombinase-aid amplification (RAA); Assay

猪肺疫(*Swine pasteurellosis*)又称猪巴氏杆菌病,是猪感染某些血清型的多杀伤性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)引起的一种急性热性传染病,一年四季均可发病,但多发于春初秋末气候骤变时期,死亡率高,未死亡的多转为慢性,在中国爆发具有小范围、高频次爆发的特征。猪丹毒(*Swine*

erysipelas)又称猪丹毒丝菌病或猪丹毒杆菌病,是猪感染红斑丹毒丝菌(*Erysipelothrix rhusiopathiae*)引起的急性、热性传染病,也是一种条件性人畜共患病,能够通过伤口感染接触到病猪的人员^[1],对养殖业和饲养员、屠宰员本身造成严重危害。

多杀伤性巴氏杆菌对外界环境和消毒药抵抗力

收稿日期:2019-10-22

基金项目:拱北海关科技项目(项目编号ZH2017-19)

作者简介:邵建宏(1983-),男,广东汕头人,学士,兽医师,主要从事动物分子生物学检测研究。E-mail:48198965@qq.com

*通讯作者:罗宝正(1975-),男,博士,研究员,研究方向:分子生物学。E-mail:bzluo@163.com

不强,在阳光直射下很快死亡,猪粪中的巴氏杆菌在常温下4 d内死亡^[2],但由于血清型复杂、免疫机制不明确,国内外尚缺乏有效疫苗^[3];相比之下,猪丹毒疫苗的接种工作虽已逐见成效^[4],但丹毒丝菌属细菌的抵抗力和生长繁殖能力很强,常大量存在于圈舍的稻草中,在尸体中也能存活数月^[5],近年来,猪丹毒在中国流行较广,在日本、美国、西班牙等地也呈零星暴发或流行性发生,常导致猪的急性死亡。

《供港澳活猪检疫管理办法》中规定,供港澳活猪的检疫项目包括猪瘟、猪丹毒、猪肺疫、猪水疱病、口蹄疫、狂犬病、日本脑炎和其他动物传染病、寄生虫病^[6],但目前仅口蹄疫和猪瘟同时具有分子生物学和免疫学检测方法,农业部行业标准《猪丹毒诊断技术》(NY/T 566-2002)只规定了病原分离和血清培养凝集试验,上述两种方法对生物安全环境的要求较高,不适用于常规实验室检测和现场筛查。此外,猪肺疫、猪丹毒的临床症状与猪瘟、猪链球菌、仔猪副伤寒类似,临床确诊困难^[7]。

综上,建立一种快速、准确、高效的检测方法,对供港澳活猪和大规模流行病学筛查具有重要意义。而重组酶介导的等温核酸扩增(Recombinase-acid Amplification, RAA)技术是一种利用重组酶、单链结合蛋白、DNA聚合酶在恒温条件下进行核酸扩增的技术。具体原理为:重组酶、单链结合蛋白、引物形成复合体扫描双链DNA,在与引物同源的序列处使双链DNA解旋,单链结合蛋白(SSB)防止单链DNA复性,在能量和dNTP存在的情况下,由DNA聚合酶完成链的延伸,5~20 min便可完成扩增。此外,RAA技术还能够完成多重引物扩增,利用不同颜色的荧光标记,在同一个反应里检测到不同的目的基因。上述优势使其有望突破技术、仪器和空间上限制,替代传统得巢式PCR和荧光PCR技术。本研究拟基于RAA技术分别建立猪丹毒、猪肺疫的检测方法。

1 材料与方 法

1.1 动物样品

超市采购猪样本85份:其中淋巴结31份;脾脏14份;肝脏5份;大小肠13份;肌肉组织22份。

1.2 参考菌株

猪肺疫CA株和猪肺疫EO630株为山东华宏生物工程有 限公司 产 品 ; 猪 丹 毒 GC42 株 和 猪 链 球 菌

II型灭活疫苗为广东永顺生物制药股份有限公司产品;大肠杆菌O157:H7株和金黄色葡萄球菌ATCC25923株为广东环凯微生物科技有限公司产品;猪传染性胸膜肺炎灭活疫苗III型为武汉科前动物生物制品有限责任公司产品;单核细胞增生李斯特菌ATCC株为通派(上海)生物科技有限公司产品;猪源支气管败血波氏杆菌833株为西班牙海博莱生物大药厂产品。上述均为本实验室保存。

1.3 主要生物学试剂

DNA提取试剂盒E.Z.N.A.TM Tissue DNA Kit为美国OMEGA公司产品,DNA Marker DL 2000购自宝生物工程(大连)有限公司,RAA恒温核酸快速扩增试剂(荧光型),即RAA扩增试剂,购自杭州众测生物科技有限公司。

1.4 主要仪器

ViiA 7 Real Time PCR System为美国Applied Biosystems公司产品.Alpha Imager HP凝胶成像分析系统为美国Alpha Innotech公司产品.Sigma 3-18 K小型高速冰冻台式离心机为德国Sartorius公司产品.NanoDrop-1000 Spectrophotometer紫外分光光度计为美国NanoDrop Technologies公司产品。

1.5 RAA引物、探针的设计与合成

根据GenBank中公布的猪丹毒CPS基因序列和猪肺疫KMT基因序列,使用生物学软件DNAMAN进行比对,并通过生物学软件Oligo7.0在高度保守区域设计特异性RAA引物、探针,由生工生物(上海)股份有限公司合成。引物、探针序列见表1和表2。

表1 猪肺疫RAA检测方法引物和探针序列

引物	序列
Primer	Sequences
F-Primer	5'-CGCTCTACCGTTAATGGCTTCAATAATGGCCATAA-3'
R-Primer	5'-GGACGTTATTTACTACTCAGCTTATTGTTATTTCG-3'
Probe	CATAAGAAACGTAACCTCAACATGGAAATATTGAFAHA QCAGACTGACA-c3-spacer

表2 猪丹毒RAA检测方法引物和探针序列

引物	序列
Primer	Sequences
F-Primer	5'-CCGAATTTGCTTACCGCTTGAAGGTTAAAGCAGGC-3'
R-Primer	5'-GTCCAAATTGAATAGTTTTTCTATATACATAAGATC-3'
Probe	AGGTCTAGCGCAGATCGAGGCTAAGTACAAFAHAQCT CCAAAAGATAA-C3-spacer

1.6 样品DNA提取

按照DNA提取试剂盒说明书提取样品DNA,并确保所提取的DNA模板260/280比值介于1.8至2.0。

1.7 反应体系和反应程序

以上述1.1和1.2提取的DNA为模板进行RAA检测。反应体系:A Buffer 40.9 μL,上下游引物各2.0 μL(引物浓度10 μmol/L),探针0.6 μL(探针浓度10 μmol/L),DNA模版2.0 μL, B Buffer 2.5 μL;反应程序:预热阶段39℃ 40 s, 1个循环;循环阶段39℃ 30 s(收集荧光信号), 40个循环;荧光通道:FAM。

1.8 RAA方法的特异性试验

以上述1.2的参考菌株提取的DNA为模板,分别使用上述1.7反应体系和反应程序进行RAA检测,验证所建立方法的特异性。

1.9 RAA方法的灵敏度试验

猪肺疫KMT基因序列和猪丹毒CPS基因序列由上海旭冠生物科技有限公司合成克隆质粒。将质粒以10倍梯度进行10次稀释,将稀释后的质粒分别作为质粒灵敏度试验的阳性标准品,对经梯度稀释的阳性标准品分别使用上述1.7反应体系和反应程序进行RAA检测,验证所建立方法的灵敏度。

1.10 样品检测

取上述1.1的动物样品和1.2的参考菌株提取的DNA作为模板,取上述1.9中稀释至10⁵倍的猪肺疫、猪丹毒质粒阳性标准品为模板,分别使用上述1.7的反应体系和反应程序进行RAA检测,以掌握所建立方法对盲样和相关菌株的检测情况。

1.11 RAA方法的稳定性试验

取上述1.9中稀释至10⁵倍的猪肺疫、猪丹毒质粒阳性标准品为模板,分别使用上述1.7的反应体系和反应程序进行2次试验,试验间隔15天,单次试验重复数16个。

1.12 阴性对照

上述1.8~1.11各试验在提取样品或菌株DNA的过程中,分别同时提取DEPC水作为阴性对照,用以验证提取过程是否出现DNA污染。

2 结果

2.1 反应体系和反应程序

经验证,最佳反应体系和反应程序与上述1.3扩增试剂的说明书所述一致,反应体系:A Buffer

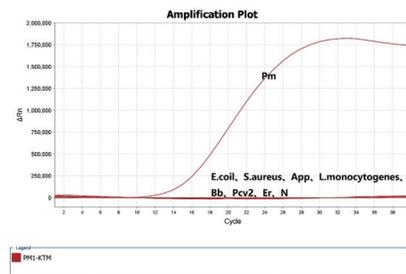
40.9 μL,上下游引物各2.0 μL(引物浓度10 μmol/L),探针0.6 μL(探针浓度10 μmol/L),DNA模版2.0 μL, B Buffer 2.5 μL;反应程序:预热阶段39℃ 40 s, 1个循环;循环阶段39℃ 30 s(收集荧光信号), 40个循环;荧光通道:FAM。

2.2 特异性试验

图1~2可见,所建立的猪肺疫和猪丹毒检测方法分别出现对应的猪肺疫、猪丹毒特异性扩增曲线,对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、胸膜肺炎放线杆菌、单核细胞增生李斯特菌、支气管败血波氏杆菌、II型猪链球菌等其他猪细菌性传染病病原及阴性对照均未出现扩增曲线,且猪肺疫和猪丹毒两者不存在交叉影响。

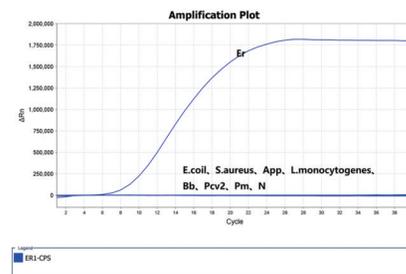
2.3 灵敏度试验

根据质粒质量(2 μg)、质粒大小(2962 bp)、DEPC水体积(100 μL)及阿伏伽德罗常数(6.02×10²³),将充



注:Pm表示猪肺疫CA株;Ecoil表示大肠埃希氏菌;O157表示H7株;S.aureus表示金黄色葡萄球菌ATCC25923株;App表示猪传染性胸膜肺炎灭活疫苗III型;L.monocytogenes表示单核细胞增生李斯特菌ATCC株;Bb表示猪源支气管败血波氏杆菌833株;Pcv2表示猪链球菌II型灭活疫苗;Er表示猪肺疫EO630株;N表示阴性对照

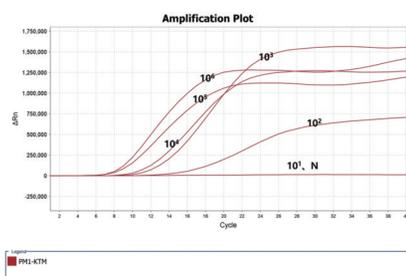
图1 猪肺疫RAA特异性试验结果



注:Er表示猪丹毒GC42株;Ecoil表示大肠埃希氏菌;O157表示H7株;S.aureus表示金黄色葡萄球菌ATCC25923株;App表示猪传染性胸膜肺炎灭活疫苗III型;L.monocytogenes表示单核细胞增生李斯特菌ATCC株;Bb表示猪源支气管败血波氏杆菌833株;Pcv2表示猪链球菌II型灭活疫苗;Pm表示猪肺疫CA株;N表示阴性对照。

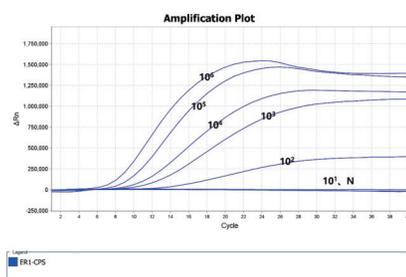
图2 猪丹毒RAA特异性试验结果

分溶解后的质粒干粉换算为拷贝数, 可得其初始拷贝数约为 2.55×10^{10} 。图 3~4 可见, $10^6 \sim 10^1$ 共 6 个梯度的阳性标准品中有 5 个出现扩增曲线, C_t 值均 ≤ 13 , 可检测到的最低拷贝数约 2.55×10^2 , 即为所建立的两方法针对相应质粒的检测灵敏度。



注: N 表示阴性对照

图 3 猪肺疫质粒 RAA 灵敏度试验结果



注: N 表示阴性对照

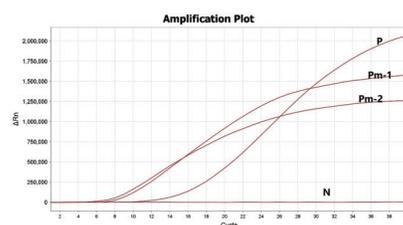
图 4 猪丹毒质粒 RAA 灵敏度试验结果

2.4 样品检测情况

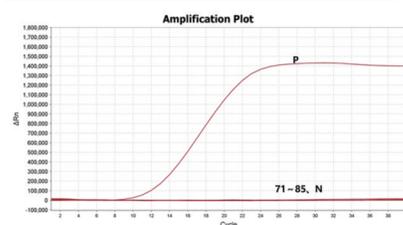
经紫外分光光度计测量, 猪肺疫和猪丹毒阳性标准品初始 DNA 浓度分别为 $2.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 和 $2.3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。本研究样品检测情况表明, 上述 1.1 中 85 份动物样品猪肺疫和猪丹毒检测结果均为阴性。图 5 可和图 6 分别为猪肺疫、猪丹毒两种检测方法对部分样品和菌株的检测情况, 其中, 动物样品均未出现扩增曲线, 相应菌株均出现显著扩增曲线。

2.5 稳定性试验

每次试验开展前使用紫外分光光度计测量阳性标准品初始 DNA 浓度, 其中猪肺疫第 1 次为 $2.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、第 2 次为 $2.1 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 猪丹毒第 1 次为 $2.3 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 、第 2 次为 $2.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。图 7 为猪肺疫两次稳定性试验结果, 图 8 为猪丹毒两次稳定性试验结果, 可见所建立的两个方法在两次试验中检测结果分别一致。



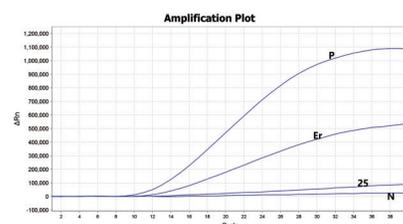
A



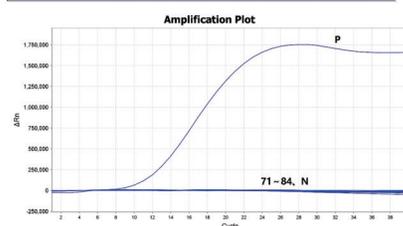
B

注: P 表示稀释浓度为 10^5 的猪肺疫 CA 株质粒; Pm-1 表示猪肺疫 CA 株; Pm-2 表示猪肺疫 E0630 株; 71~85 表示第 71~85 号检测样品; N 表示阴性对照

图 5 猪肺疫 RAA 样品检测结果(部分)



A



B

注: P 表示猪丹毒 GC42 株; 71~85 表示第 71~85 号检测样品; N 表示阴性对照。

图 6 猪丹毒 RAA 样品检测结果(部分)

3 讨论

目前, 国内外已报道的猪肺疫和猪丹毒检测方法分别包括凝集、沉淀、变态反应、补体结合、酶免疫、免疫组化、荧光免疫试验和分子生物学方法, 除分子生物学法外, 其他方法由于缺点明显,

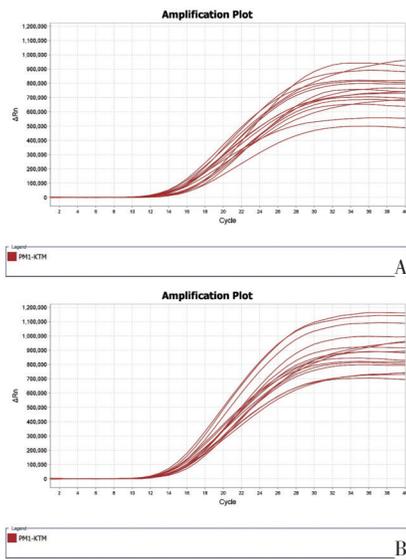


图7 猪肺疫RAA重复性试验结果

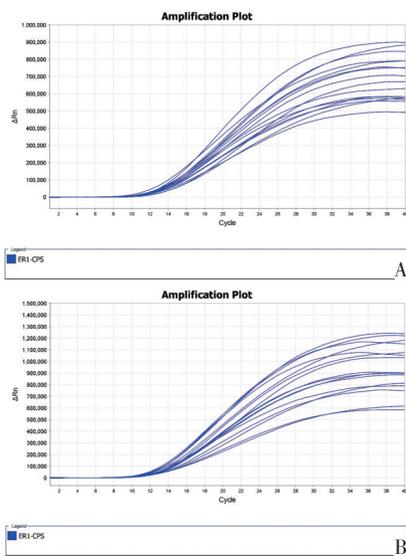


图8 猪丹毒RAA重复性试验结果

未被广泛使用^[8],也有国外研究对细菌培养、荧光PCR、抗体、免疫等四种检测猪丹毒的方法进行比较,认为荧光PCR法和荧光微球免疫法相结合是最适用于猪丹毒的监测和诊断^[9]。

RAA技术的核心优势在于对反应温度、时间和结果判读方式的优化,能够在恒温环境下完成核酸扩增,反应时间仅需10~20 min,反应结果可通过琼脂糖凝胶电泳、实时荧光曲线监控、试纸条(侧流层析试纸条LFD)多种方式进行判读。相比之下,传统PCR和荧光PCR需要体积较大的设备以满足在一定区间

内不断升降温的反应要求,反应时间也因核酸类别和片段大小而异,常为50~150 min。此外,RAA技术也具备荧光PCR技术高灵敏度的特性,从单个模板分子可扩增得到约 10^{12} 数量级的产物。上述特点表明,RAA技术具有便携、高效、高灵敏度、实用性广的特点,尤其适合于大规模的流行病学筛查和现场执法的快速检测。

本研究所建立两种RAA检测方法分别能够准确鉴别出导致猪肺疫的猪多杀性巴氏杆菌核酸和导致猪丹毒的猪丹毒丝菌核酸。通过对方法的特异性、灵敏度、稳定性、盲样检测等一系列验证,证明所建立两种方法对猪多杀性巴氏杆菌和猪丹毒丝菌具有显著特异性,最低检出限均为100个拷贝数量级,同一组样品在不同时间段的检测结果具有高度的相关性和重现性。本研究基于RAA所建立的猪丹毒和猪肺疫检测方法能够满足供港澳活猪及其产品中猪丹毒和猪肺疫的检测,尤其适用于疫病的大规模筛查和快速检测,具有广阔的应用前景。

由于客观条件制约,本研究未能将所建立两种方法在微型RAA仪上进行验证,无法对荧光PCR仪与便携式等温PCR仪的检测结果进行充分对比分析,有待后续进一步研究。

参考文献:

- [1] 段建红,陈寿元. 一家三人同患类丹毒[J]. 皮肤病与性病, 2015, 37(02):116.
- [2] 李晓峰,尹凤阁,靳军阳,等. 猪肺疫病的诊治[J]. 畜牧兽医杂志, 2004(01):53-54.
- [3] 谢波,朱必凤,杨旭夫. 多杀性巴氏杆菌抗原的研究进展[J]. 韶关学院学报, 2010, 31(3):91-94.
- [4] 贺石红. 猪丹毒的检疫与诊治[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2018, 34(05):14-15.
- [5] 冷依伊,任梅滢,蒙正群,等. 丹毒丝菌属荧光定量PCR检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2016, 46(06):763-768.
- [6] 供港澳活禽检验检疫管理办法[J]. 中华人民共和国对外贸易经济合作部文告, 2001年09期.
- [7] 段景斌,翟刚. 猪丹毒与猪肺疫混合感染的综合诊治[J]. 农民致富之友, 2019(09):152.
- [8] 刘俐君,张见,赵小波,等. 猪丹毒检测方法的对比与分析[J]. 中国动物保健, 2015, 17(08):53-54.
- [9] GIMENEZ-LIROLA, LUIS G, XIAO C T, et al. Improving ante mortem diagnosis of Erysipelothrix rhusiopathiae infection by use of oral fluids for bacterial, nucleic acid, and antibody detection [J]. Journal of Microbiological Methods, 2013, 92(2):113-121.

副鸡嗜血杆菌 A、B 型攻毒用菌液制备方法的研究

邓智昕¹, 欧建安²

(1. 肇庆大华农生物药品有限公司, 广东 肇庆 526238;

2. 广东工业大学制药工程, 广东 云浮 527425)

摘要:通过对副鸡嗜血杆菌 A 型、B 型攻毒用菌液的活菌计数及预攻毒效果的比较, 得出使用 A 型菌液攻毒, 菌液制备的较佳条件是: 菌种接种于鸡肉汤琼脂板, 5% 二氧化碳, 37 °C 培养 48 小时后, 挑取典型菌落, 接种鸡肉汤培养基, 摇菌 8 小时后, 按兽药典方法要求进行攻毒。使用 B 型菌液攻毒, 菌液制备的较佳条件是: 菌种接种于鸡肉汤琼脂板, 5% 二氧化碳, 37 °C 培养 16 小时后, 挑取典型菌落, 接种鸡肉汤培养基, 摇菌 6 小时后, 按兽药典方法要求进行攻毒。

关键词:副鸡嗜血杆菌; 培养; 活菌计数; 预攻毒

中图分类号:S852.6 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2020)01-0048-04

副鸡嗜血杆菌分 A、B、C 三个血清型, 是引起鸡传染性鼻炎的病原体, 能引起鸡的呼吸道畸形, 以鼻腔和窦发炎, 喷嚏和脸部肿胀为主要特征。该菌为革兰氏阴性细小杆菌, 毒力菌株往往具有荚膜, 但这种能力在体外传代时容易丧失。鸡是副嗜血杆菌的主要宿主, 各种日龄鸡均可感染, 但 4 周龄以上的鸡易感性增强。育成鸡、产蛋鸡最易感, 慢性病及康复后的带菌鸡是主要的传染来源。通过被污染的饲料和饮水经消化道而感染。本病在寒冷季节多发, 一般秋末和冬季可发生流行, 具有来势猛, 传播快, 发病率高, 死亡率低的特点。目前鸡传染性鼻炎灭活油乳剂苗被认为是预防该病较有效的手段。

一般认为, 副鸡嗜血杆菌存在三种毒力相关抗原^[1], 一种可能是血清型 A、C 菌株培养上清液中分离的脂多糖, 能引起鸡发生中毒症状, 如产蛋下降。这种抗原人为与 HS 共同凝集抗原相似。第二种是从血清型 A、C 菌株分开 ideas 脂多糖, 能引起心包积液。还有一种是含有透明质酸的荚膜, 与引起鼻炎症状有关。也有研究表明, 带有荚膜的细菌在体内增殖期间所释放的毒素与临场症状有关。总而言之, A、C 两型均带有不同程度的致病力, 而 B 型致病与否因菌株而异^[2-6], B 型似乎存在株间的抗原多样性, 株间只存在部分交叉免疫。

1 试验目的

根据《中华人民共和国兽药典》2015 版鸡传染性鼻炎(A 型)灭活疫苗“【效力检验】用 60~90 日龄 SPF 鸡 12 只, 8 只各皮下注射疫苗 0.5 ml(含 1 羽份), 另 4 只作对照。接种 30 日后, 每只鸡各眶下窦内注射副鸡嗜血杆菌培养物 0.2 ml(含至少一个发病剂量), 观察 14 天”, 为使攻毒所需菌液活菌毒力强, 菌液质量稳定, 对 A、B 型攻毒用菌液的制备进行研究。使用同批号样品对制备新鲜的攻毒用菌液进行评定, 临床症状以观察到鼻炎症状为判定指标。

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 动物及菌株

SPF 鸡, 购自新兴禽蛋公司 SPF 鸡蛋, 由肇庆大华农生物药品有限公司实验动物中心孵化, 并养殖到 60 天龄进行试验; 副鸡嗜血杆菌 A、B 型, 购自中国兽药监察所;

2.1.2 培养基

鸡肉汤液体培养基、技术琼脂、鸡血清、辅酶 I

2.1.3 器具

生物安全柜 BSC-1600 II B2, 三洋二氧化碳培

收稿日期: 2019-10-09

作者简介: 邓智昕(1984-), 女, 广东肇庆人, 本科, 执业兽医师, 主要从事禽生物制品研发, 质量监控。E-mail: xiaosansan1@126.com

养箱、摇床、细胞培养锥形瓶、七分管、电动移液器、一次性移液管(1 ml、10 ml)

2.2 方法

2.2.1 使用同一批购自中国兽药监察副鸡嗜血杆菌杆菌,取菌种划线接种于鸡肉汤琼脂平板上,在含5%~10% CO₂环境中37℃培养(A型:24小时,B型:16小时)小时后,挑选数个荧光性极强的典型菌苔(菌落)接种于5日龄鸡胚卵黄囊内,在37℃继续孵育,收集30小时内死亡的鸡胚卵黄液,经纯检合格后,作为试验种子,在-20℃以下保存。

2.2.2 每隔三天,取感染的鸡胚卵黄液,划线接种鸡肉汤琼脂平板,在含5% CO₂条件下,37℃培养(A型:24小时、48小时,B型:16小时),选圆形、光滑、灰白色、半透明的露珠样菌落,用低倍镜以45度折光观察具有较强的荧光的典型菌落3个接种于鸡肉汤培养基20 ml中,置37℃培养,分别于培养4小时、6小时、8小时、10小时、12小时取出菌液,按《中华人民共和国兽药典》2015版三部附录3405活菌计数法进行活菌计数,同时做纯粹检验。

2.2.3 选取同批鸡胚卵黄液菌种进行划线接种制备攻毒菌液。在含5% CO₂条件下,37℃培养(A型:24小时、48小时,B型:16小时),选圆形、光滑、灰白色、半透明的露珠样菌落,用低倍镜以45度折光观察具有较强的荧光的典型菌落3个接种于鸡肉汤培养基50 ml中,A型摇菌8小时,B型摇菌6小时后测定活菌计数及检测纯粹,进行60天龄SPF鸡原液攻毒试验。包括对照组,攻毒共分4组,攻毒组各点眼0.2 ml/只菌液、对照组点眼0.2 ml/只生理盐水。

3 试验结果

3.1 攻毒用菌液纯粹检验结果

攻毒用菌液纯粹检验结果见表1所示。

表1 不同时间摇菌菌液纯粹检验结果

菌液标识	纯粹检验结果
A型菌落生长24小时摇菌菌液	纯粹
A型菌落生长48小时摇菌菌液	纯粹
B型菌落生长16小时摇菌菌液	纯粹

3.2 攻毒用菌液不同培养时间活菌计数

由表2、3可知,副鸡嗜血杆菌A型菌落生长

24、48小时后摇菌,4~8小时为细菌生长对数期、8小时后生长进入稳定期;菌落生长48小时后摇菌菌液的活菌数与生长24小时菌落摇菌菌液的活菌数,就跟踪的时间截点比,48小时的多于24小时。

由表2~4可知,副鸡嗜血杆菌B型菌落较A型生长迅速,4~6小时为B型细菌生长对数期,6小时后生长进入稳定期,相同观察截点活菌数比A型所含活菌数多。

对所得活菌数数据使用对数转换^[7],经统计分析编制如图1所示(图见第52页)。

表2 A型菌落生长24小时后摇菌不同培养时间活菌计数结果

菌液培养时间	活菌数(CFU/ml)			
4小时	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁷
6小时	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁸
8小时	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁹
10小时	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
12小时	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁸	10 ⁹

表3 A型菌落生长48小时后摇菌不同培养时间活菌计数结果

菌液培养时间	活菌数(CFU/ml)			
4小时	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁷
6小时	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁸
8小时	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
10小时	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
12小时	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹

表4 B型菌落生长16小时后摇菌不同培养时间活菌计数结果

菌液培养时间	活菌数(CFU/ml)			
4小时	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁸
6小时	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
8小时	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
10小时	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹
12小时	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹	10 ⁹

从上图可见,副鸡嗜血杆菌A型,无论菌落在鸡肉汤琼脂板上生长24小时还是48小时,其菌液培养期间,均在8小时达到生长稳定期;A型菌落生长24小时所得菌液,在4~8小时为细菌的对数生长期。A型菌落生长48小时所得菌液,4~6小时细菌生长率较6~8小时低。副鸡嗜血杆菌B型,8

小时达生长稳定期,4~6小时生长率较6~8小时生长率快。

考虑到“也有研究表明,带有荚膜的细菌在体内增殖期间所释放的毒素与临床症状有关。”选取A型副鸡嗜血杆菌菌落生长24小时后恒温摇菌8小时,菌落生长48小时后恒温摇菌8小时;B型菌落生长16小时后恒温摇菌6小时,所得菌液作为预攻毒菌液。

3.3 不同菌液预攻毒情况

各试验组攻毒10只60天龄SPF鸡,右侧眶下窦注射菌液0.2 ml/只;对照组4只同天龄SPF鸡,右侧眶下窦注射灭菌PBS液0.2 ml/只,共观察8天。如表5所示结果:(1)同血清型、菌落生长时间相同、摇菌时间相同,实验动物出现鼻炎临床症状严重程度与攻毒菌液所含活菌数成正比;(2)无论是哪个血清型,在攻毒后第一天全体发病,潜伏期短,致病迅速;(3)A型在发病第4、5天后开始进入转归期,B型发病持续期较长,能持续6、7天,第8天转归。

对不同血清型、菌落生长时间不同的试验组数据进行分析,由表6可知,副鸡嗜血杆菌A型菌落生长至48小时进行摇菌攻毒,实验动物出现鼻炎症状严重程度比菌落生长至24小时进行摇菌攻毒试验动物出现的鼻炎症状重;副鸡嗜血杆菌B型菌落生长至16小时进行摇菌攻毒,实验动物出现鼻炎症状严重程度对副鸡嗜血杆菌的严重。

4 讨论

副鸡嗜血杆菌A型在第8~10小时达到生长稳定期,B型菌在第6~8小时后达到生长稳定期;与使用OD600检测副鸡嗜血杆菌生长特性,用TSA及TSB加鸡血清、NAD培养菌体,A型菌在10小时达到高峰,B型在12小时达到高峰^[8],A型菌生长特性相符,B型菌生长高峰相差4小时,可能与培养基有关。

副鸡嗜血杆菌B型较A型致病持续时间更长。菌落培养48小时摇菌所得菌液攻毒比菌落培养24小时摇菌所得菌液攻毒时实验动物临床症状

表5 不同血清型、不同活菌数菌液攻毒结果

血清型	平皿生长	攻毒菌液活菌数(CFU/ml)	出现鼻炎鸡只数							
			1天	2天	3天	4天	5天	6天	7天	8天
A型	24小时	5.9×10 ⁸	10	10	10	10	7	4	2	0
		1.0×10 ⁹	10	10	10	10	7	7	4	1
		7.2×10 ⁸	10	10	10	10	7	7	4	0
	48小时	3.0×10 ⁹	10	10	10	10	10	7	7	7
		1.4×10 ⁹	10	10	10	10	10	7	4	4
		1.9×10 ⁹	10	10	10	10	10	7	7	4
B型	16小时	5.8×10 ⁸	10	10	10	10	10	10	10	4
		3.6×10 ⁸	10	10	10	10	10	10	7	7
对照组		7.3×10 ⁸	10	10	10	10	10	10	10	7
		—	0	0	0	0	0	0	0	0

注:A型菌液摇菌8小时,B型菌液摇菌6小时

表6 不同血清型、菌落生长时间不同攻毒菌液结果比较

血清型	平皿生长	攻毒菌液活菌数(CFU/ml)	出现鼻炎鸡只数							
			1天	2天	3天	4天	5天	6天	7天	8天
A型	24小时	7.7×10 ⁸	10	10	10	10	7	6	3.3	0.3
	48小时	2.1×10 ⁹	10	10	10	10	10	7	6	5
B型	16小时	5.6×10 ⁸	10	10	10	10	10	10	9	6

注:A型菌液摇菌8小时,B型菌液摇菌6小时

持续期长,可能与菌体生长期长,形成更多的带荚膜的菌体有关;但无论是哪个血清型,发病快,菌种潜伏期短,但在没有混合感染的前提下,5天后,肌体相继出现自愈症状,表明该菌毒力不强。

5 结论

传染性鼻炎灭活疫苗攻毒用菌液制备,对于A型菌,可选取将菌种接种到含有鸡血清、NAD的鸡肉汤琼脂平板上,令其在含有5%的CO₂培养箱,37℃培养48小时,按3CFU:50 ml鸡肉汤培养基比例进行上述条件下恒温摇菌8小时后,按兽药典进行攻毒;对于B型菌,可选取将菌种接种到含有鸡血清、NAD的鸡肉汤琼脂平板上,令其在含有5%的CO₂培养箱,37℃培养16小时,按3CFU:50 ml鸡肉汤培养基比例进行上述条件下恒温摇菌6小时后,按兽药典进行攻毒。

参考文献:

[1] CALNEK B W, BARNES H J, BEARD C W, et al. Diseases of

Poultry(10th)[M].

- [2] BLACKALL P J, YAMAMOTO R. Whole-cell protein profiles of *Haemophilus Paragallinarum* as detected by polyacrylamide gel electrophoresis[J]. *Avian Diseases*, 1989, 33:168-173.
- [3] BLACKALL P J, ROGERS D G, YAMAMOTO R. Outer-membrane proteins of *Haemophilus paragallinarum* [J]. *Avian Diseases*, 1990, 34:871-877.
- [4] BLACKALL P J, EAVES L, MORROW C J. Comparison of *Haemophilus paragallinarum* isolates by Restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA [J]. *Veterinary Microbiology*, 1991, 27:39-47.
- [5] 孙惠玲, 苗德园, 王艳平, 等. B型副鸡嗜血杆菌北京株的分离与鉴定[J]. *中国兽医杂志*, 2005, 41(2):28-29.
- [6] MIFLIN J K, HOMER R F, BLACKALL P J, et al. Phenotypic and molecular characterization of V-factor (NAD)-independent *Haemophilus paragallinarum*[J]. *Avian Diseases*, 1995, 39:304-308.
- [7] 张洪, 王文泉, 郭致君, 等. 副鸡嗜血杆菌在疫苗生产中生长特性的研究[C]. 中国畜牧兽医学学会生物制品学分会第九次学术研讨会.
- [8] 乔朋波. 不同血清型副鸡嗜血杆菌差异的比较[D]. 硕士学位论文. 保定:河北农业大学, 2011.

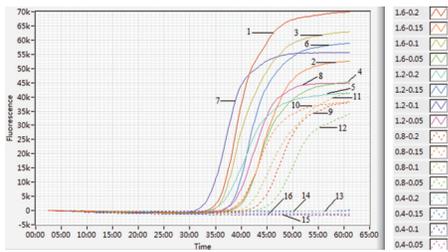
上接第38页

检测试验,结果表明,3个国产疫苗与2个进口疫苗的效价相差不大,国产疫苗已经在大步发展,各个环节也都严格把控,冷链运输也在不断提升,国产疫苗的生产及保存正在逐步完善,抗体跟踪监测结果说明,在免疫后3个多月伪狂犬抗体一直维持较高的水平,但是3个月后抗体水平有明显的衰减趋势(见图1),建议猪场在免疫后3个月进行一次补免,才能在育肥阶段不至于感染伪狂犬病野毒。3个国产疫苗(A、B、C)抗体维持时间与2个进口疫苗(D、E)抗体维持时间差别不大,国产疫苗的抗体持续期

也是有保证的。

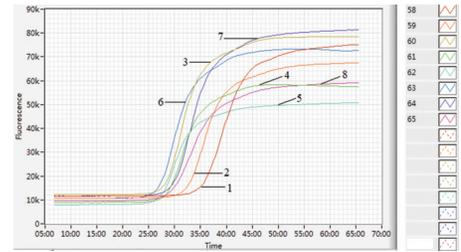
参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 1997: 700-713.
- [2] 邓仕伟, 薛春芳, 汪勇, 等. 我国规模化猪场对猪伪狂犬病的控制[J]. *中国畜牧兽医*, 2007, 34(6):112-115.
- [3] 王隆柏, 庄向生, 魏宏, 等. 福建省规模猪场伪狂犬病流行病学调查与分析[J]. *中国畜牧兽医*, 2008, 35(11):119-121.
- [4] 库旭钢, 许拓, 谭鑫, 等. 规模化猪场伪狂犬病的诊断与防控[J]. *养猪*, 2015(06):105-107.

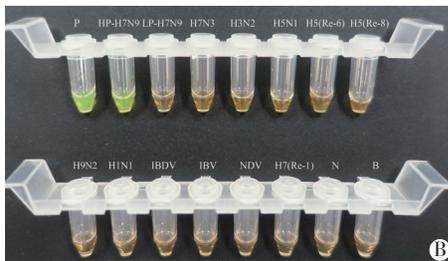
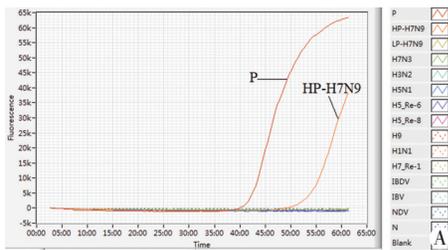


注:内引物和外加引物浓度依次为1:1.6 μM、0.2 μM;2:1.6 μM、0.15 μM;3:1.6 μM、0.1 μM;4:1.6 μM、0.05 μM;5:1.2 μM、0.2 μM;6:1.2 μM、0.15 μM;7:1.2 μM、0.1 μM;8:1.2 μM、0.05 μM;9:0.8 μM、0.2 μM;10:0.8 μM、0.15 μM;11:0.8 μM、0.1 μM;12:0.8 μM、0.05 μM;13:0.4 μM、0.2 μM;14:0.4 μM、0.15 μM;15:0.4 μM、0.1 μM;16:0.4 μM、0.05 μM

黄海超等 图1 引物浓度的优化结果

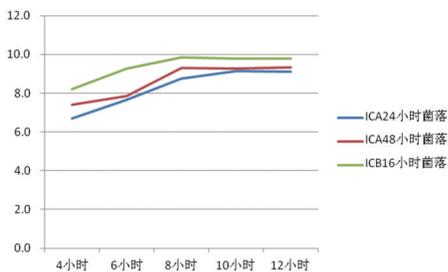


黄海超等 图2 反应温度优化结果

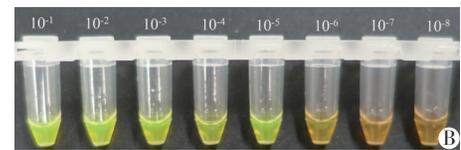
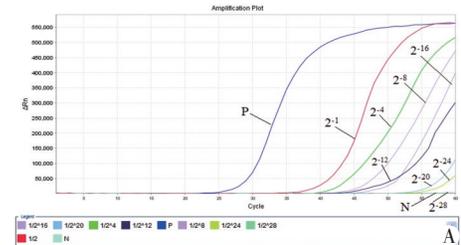


注:A:特异性试验结果;B:特异性试验结果(显色法)

黄海超等 图3 特异性试验结果

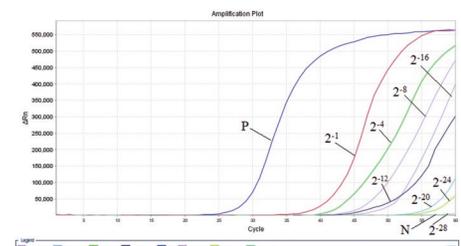


邓智昕等 图1 A、B型菌落不同摇菌时间活菌数曲线图



注:A:阳性质粒模版,扩增曲线1~7所用质粒模板稀释度为10⁻¹~10⁻⁷;B:显色法

黄海超等 图4 灵敏度试验结果



黄海超等 图5 灵敏度试验结果(病毒核酸模版)