

GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in march 1976(Bimonthly)

JUN.2016 Volume 41, Number 3 (Total No.187)

Main Content

Ecological Analysis of H7N9 Influenza Spread in Guangdong and Prevention Strategies	LU Shousheng(1)
Research on the Safety Traceability Information Standard System of Pigs and Porcine Products.....	LIU Kai, XIONG Ruiquan, et al(4)
Monitoring and Analysis on Immunity Efficacy of Swine Japanese Encephalitis in Longmen Buffer Zone of The Specific Equine Disease-free Zone in Conghua,Guangdong	WANG Zheng, ZHANG Yongquan, et al(6)
Killing Effect of Ozone Solution Disinfectant on Porcine Epidemic Diarrhea Virus.....	GUO Tiancheng, KANG Huahua, et al(9)
The Diagnosis and Treatment of Mixed Infection Swine Fever,PRRS and Eperythrozoon	LI Deru, LA Huasong, et al(12)
An Intramedullary Nail Fixation for a Dog with Femoral Fracture.....	RU Wenlan, WU Xuanguang, et al(15)
Isolation and Identification of Streptococcus Suis2 and Virulence Genes Test	LI Min(18)
Cloning and Bioinformatics Analysis of E2 Gene of Classical Swine Fever Virus Isolated from Sichuan Strain	LI Yan, XIE Jing, et al(21)
Determination of the Amount of Cell Inoculation in the Cell Count with MTT Assay Method	ZHUANG Jinqiu, MEI Jianguo, et al(26)
Sequence Analysis of S Gene in Porcine Epidemic Diarrhea Virus.....	LI Min(29)
Metabolic Regularity of New Type Bivalent Refined Yolk of Duck Hepatitis Virus I in SPF Duck Body	SONG Yang, LI Jianhua, et al(32)
Isolation and Identification of Mink Serum Type C of Pseudomonas Aeruginosa.....	DING Guojie, Yang Pengxin, et al(35)
Detection of Foreign Matter in Intestinal of Dog.....	XIE Wenhui, XU Yaoji(38)
Summary of the Medicine for Treatment of Canine Parvovirus Diseases.....	QIU Zhuoxi, RUAN Pengfei, et al(41)
A Case of Pleurisy induced by Foreign Matter in Pig.....	CHEN Weifeng, ZHENG Yan, et al(47)
Effect of Fermentation Bed Fedding on Performance in Cherry Valley Duck	LUO Qiulan, LIANG Zuman, et al(49)

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

Vice Chief Editor:LIN Weijun

Editor Add:135 Xianlie Dong Lu, Guangzhou P.R. China

Post Code: 510500

Tel:(020)38319957 38319211

Fax:(020)38319211

E-mail:gdxmsy@163.com gdxmsykj@163.com

H7N9 流感传播的生态学分析及防控对策

卢受昇

(广东省动物卫生监督总所, 广东 广州 510230)

摘要: 自 2013 年 4 月华东地区发生 H7N9 流感疫情以来, H7N9 流感已连续 4 年冬春季节出现流行, 严重影响公共卫生安全和沉重打击家禽业发展。通过深入分析活禽批发市场、零售市场和养殖场各环节的生态状况, 提出 H7N9 流行传播的模型, 指出活禽市场是控制 H7N9 病毒的关键环节。结合广东生产实际, 从改变病毒生存、传播生态条件着手, 提出相应的防控策略。

关键词: H7N9 流感; 生态学分析; 防控对策

中图分类号: R184.1

文献标识码: A

文献编号: 1005-8567(2016)03-0001-03

Ecological Analysis of H7N9 Influenza Spread in Guangdong and Prevention Strategies

LU Shousheng

(Guangdong Provincial Institute of Animal Health Supervision, Guangzhou 510230, China)

Abstract: Since March 2013, H7N9 influenza viruses emerged in eastern China, has been popular for 4 years. H7N9 influenza seriously affected the public health security and dealt a heavy blow to the poultry industry. Through analysis of the ecological status of live poultry wholesale markets, retail markets and farms, the ecological model of H7N9 is proposed, which suggests that the live poultry market play a key role to the transimission of H7N9 virus. On the base of the models and analysis, some prevention and control strategies were take from the change of virus survival ecological conditions.

Key words: H7N9 influenza; ecological analysis; prevention and control strategies

截至 2016 年 2 月 13 日, 我国内地共有 17 个省报道发生 H7N9 流感病例, 共计发病 724 例, 其中广东 188 例, 其中 2015 年 10 月份以来, 广东新发病例 7 例^[1]。与此同时, 在多个市的家禽中也检出过 H7N9 流感病毒, 可见, H7N9 流感经过近 4 年的流行, 病毒污染面不断扩大, 病毒主要存在于活禽市场, 特别是农贸(肉菜)市场, 也发生了向养殖场扩散的个例^[2], 防控形势愈发严峻。现根据我们掌握的有关情况, 结合我省实际, 从生态学的角度分析 H7N9 传播的条件并提出 H7N9 流感防控策略。

1 当前 H7N9 传播的生态条件分析

1.1 养殖场生态分析

养殖场禽种单一, 品种也较单一。就禽群的日龄组成而言, 我省主要存在 3 种类型的饲养模式: (1) 公司 + 农户型。肉鸡为同日龄, 组成简单, 可做到全场全进全出。(2) 个体户型。肉鸡以 1~3 个日龄批次为主, 组成较简单。(3) 种鸡场及大型肉鸡养殖场(含出口场)。批次较多, 组成较复杂, 具备疫原从大日龄向小日龄家禽传播的自身循环条件, 是各种模式中风险较高的。养殖场生物安全方面: 措施相对较好, 具有一定的消毒隔离设施。病

收稿日期: 2016-04-27

基金项目: 防治 H7N9 亚型禽流感科技攻关(411152028072)

作者简介: 卢受昇(1972-), 男, 博士, 高级兽医师, E-mail: sslu2013@163.com

程方面:一旦病原传入,感染禽只与病毒之间呈现出一个完整的相互作用过程,首先是病毒在感染禽只的体内增殖,并向外排毒,其后随着病程的发展,机体产生抗体,病原逐渐消失,哈兽研和美国农业部在人工感染的实验结果显示这一病程约需 11 d^[3-4]。就大群体病程而言,先由少量受到感染禽只向未感染禽只扩散,群体流行率不断上升至峰值(据惠州供港鸡场病例可达 80%),其后随着群体抗体的产生而下降,在田间由于家禽群体较大,且不可能同时感染,从感染到病毒消除这病程应更长。理论上分析,全进全出模式的养殖场有可能存在自洁的过程。

1.2 活禽批发市场的生态分析

活禽批发市场中,禽种构成多样。广东地区主要批发市场的禽种有鸡、鸭、鹅、鸽、鹌鹑、鹧鸪等,其中鸡又分为快大鸡、中速、土鸡,以及阉鸡、淘汰老母鸡、竹丝鸡(乌鸡)等。但每个档口经营的禽种相对较单一,水禽与旱禽交易有分区。家禽处于高度应急状态。禽只经过长途运输,处于饥渴惊吓状态,机体抵抗力差;禽只存放密度大,利于疫原的传播。家禽在批发市场存留时间短(广东批发市场存留时间以 1~3 d 为主),家禽与病毒在批发市场中不能形成一个相互作用的完整病程,而是一批家禽受感染后很快排毒,又感染下一批家禽,活禽批发市场内可构成病毒循环生态系统,每 1~3 d 1 批,从不间断,故活禽交易市场成为禽流感病毒繁殖、重组、变异的重要场所。同时,市场中存在着大量各种亚型的禽流感病毒,存在同一只家禽同时感染多种亚型禽流感病毒的可能,为不同亚型间禽流感病毒的重组提供了机会,为禽流感病毒贮藏、重组、滋生繁殖提供了良好的生态环境。

1.3 活禽零售市场的生态分析

零售市场除了具有活禽批发市场的生态环境外,还具有禽种繁多混杂等其他有利条件。农贸(肉菜)等活禽零售市场同一档口中有多个品种的鸡同时存在,并与鹌鹑、鸭、鹅、鸽等其他禽种混杂,禽只应激强度大,每批之间没有间断,该生态系统更易于病毒循环增殖。一旦有阳性禽只进入,由于在批发市场感染的鸡只已逐渐进入排毒高峰期,排毒量激增,经过几批次鸡的传代可大量增殖,环境中的病毒浓度可达到或超过感染人的域值。同时,中心城区人口密集、空气质量不高等因素,加大了活禽将病原传染给人类的机率。另外在

一些酒楼食肆活禽现宰场所,亦存在着与零售市场相同的生态环境,也需引起关注。

1.4 野生鸟类等其他生态环境

野鸟对 H7N9 流感病毒的易感性需要进一步研究,现有研究结果表明,较易感动物主要有鸡、鹌鹑、番鸭等,鸽也可感染^[4],鹧鸪、竹丝鸡等珍禽也具有较高的易感性。随着流行时间的延长,宿主范围有可能进一步扩大,不断增加防控难度。据报道,麻雀存在带毒情况^[5],多种雀类和鹦鹉可感染 H7N9 病毒^[6]。由于麻雀作为适应城市化的最好鸟类,很好地融入了人类的居住环境中,家禽批发市场中有饲料,常有大量的鸟类前来觅食,麻雀若感染可成为贮存宿主,可很大程度上削弱休市等措施的作用。

2 H7N9 传播模式分析

养殖场、野鸟、批发市场、零售市场构成的 H7N9 流感传播的生态系统中,活禽交易市场是关键控制点,其是病毒贮存、繁衍和新亚型病毒重组装配的主要场所,批发市场与零售市场可形成病原逐级放大的作用。H7N9 传播、循环生态模式见图 1。

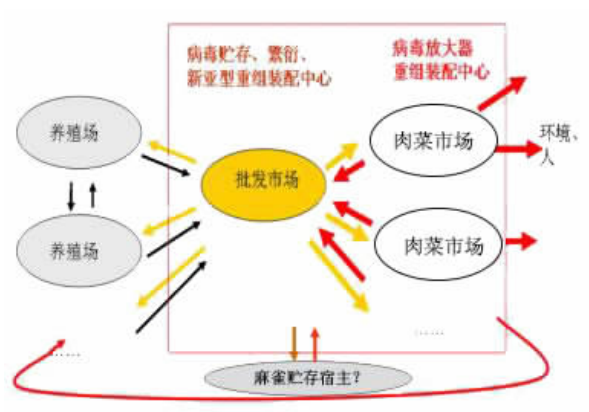


图 1 H7N9 流感病毒生态链示意图

3 H7N9 防控策略

自 2013 年以来,H7N9 流感病毒一到冬春寒冷季节就卷土重来,危害年复一年持续。如何从根本上改变这一状态,我们要分析反思现有防控策略,防控 H7N9 流感既要采取休市等多种临时措施实行紧急防控,更要从深层次剖析这一全新病毒能在我省迅速扩散和造成严重危害的原因,进而从当前我省家禽的生产和经营模式、群众消费习惯和动物疫病防控工作等方面查找不足,变革和调整从生产到消费这一链条中的薄弱环节,彻底

铲除 H7N9 流感病毒存在和传播的生态环境。改变生态条件就是防控 H7N9 的根本,也是最经济、最有效的方式。

3.1 从改变和消除活禽市场病毒滋生的生态条件入手,可有效减少或消除病原

3.1.1 活禽批发市场 活禽批发市场的家禽处于应激状态,各种病毒、细菌污染严重,为禽流感病毒贮藏、重组、滋生繁殖提供了良好的生态环境。绝大多数养殖场的禽只出场时是“干净”的,但在进入交易市场这一环节被污染上病毒。水禽作为禽流感病毒的天然贮存宿主,可携带各种亚型的病毒,在家禽批发市场活禽病毒的增殖、传播和重组中起重要作用。当前活禽批发市场要求水禽与旱禽分区交易,但流感病毒可通过气溶胶较长距离传播,现有的分区距离很难阻止病毒传到旱禽区。水禽在批发市场中逗留时间较长,受市场因素影响,每批水禽售出时间 1~4 d 不等。除了现有的休市、消毒措施外,针对活禽批发市场的防控策略有:(1)建水禽专用批发市场或水禽率先实行全面集中屠宰。最理想的方式是水禽直接进屠宰场,实行冰鲜上市,或建水禽专用的批发市场,与旱禽完全分开。(2)尽量缩短家禽在批发市场的停留时间。水禽要求当日售完,实行过夜零存栏。我省粤西地区湛江等市至今从未检出 H7N9 病原,与设立了水禽专用批发市场,且水禽基本在半天内售罄有很大的关系。

3.1.2 农贸(肉菜)市场 相对于活禽批发市场,农贸(肉菜)市场多种家禽混杂,各种病毒、细菌污染更为严重。可根据《广东省家禽经营管理办法》规定采取相应措施。(1)由于 H7N9 流感病毒只能在活体家禽中繁殖,中心城区划定活禽禁售区,推行冰鲜鸡上市后,可彻底改变这一生态环境,有效消除存在的病毒。(2)乡村与郊区地域宽广,相关硬件配置不足,且市民对冰鲜鸡需要一个较长的适应过程,可推行活禽档每日零存栏为主、休市为辅的销售模式。每天做到了“全进全出”可从很大程度上阻断病毒的循环感染与增殖。(3)由于鸡感染病毒后需一段时间才排毒,缩短存留时间,即在其排毒前即进行屠宰,也可有效切断传播链。此外,倡导“24 h 活鸡保鲜期”的观念,也有利于提高该措施的效果。

3.1.3 现行的“休市”仅可作为一种应急措施 采取日常休市或季节性休市措施,复市后,市场的生

态环境条件又恢复到原先状态,一旦有疫源传入,又会恢复到原有病毒在档口内循环增殖的状态。2014 年春某市实行 2 周的休市措施后,复市 10 d 又检出阳性样品就是很好的例证。同时,大范围统一休市易造成出栏家禽的积压,积压的家禽可能移向其他非休市地区或转入地下交易,存在加大病原扩散的风险。

3.2 转型升级提高养殖场的生物安全措施

当前,我省大部分肉鸡养殖模式属于粗放型,禽舍为开放式或半开放式,因为追求风味和口感,或是追求传统方法养殖,有相当比例是果园或林间放养,与野鸟、虫媒接触机会频繁,生物安全水平较低,防病难,容易感染禽流感等各种病原,在风味与安全方面存在需平衡的矛盾。但种禽场不存在风味方面的限制,可建设现代化的全封闭式禽舍,实行自动送饲料送水,自动通风,自动控制温度、光照和收集处理粪便,营造一个卫生安全的小生态环境。当前少数养殖企业已成功应用了该设施,并取得了很好的效益,值得推广。当前,养殖环节风险较大的是存有较多批次的种鸡场及大型肉鸡养殖场(含出口场)。各饲养场在出售鸡只时,需特别注意收购家禽的车辆及笼具的消毒工作,这些用具与活禽市场直接接触,传入病原的风险很大。2015 年初惠州供港鸡场阳性事件疫原由 10 d 前出售鸡只的用具传入。

3.3 市场以病原学监测为主,养殖场以血清学监测为主

由于当前我省的 H7N9 病原仍主要存在于活禽市场,特别是农贸市场,故病原学监测要以肉菜市场为重点,禽种以鸡以及竹丝鸡、鹌鹑、鹧鸪、鸽为主,此举可提高发现 H7N9 流感病毒的机率,进而采取“扑杀+消毒”的传统消除病毒措施,净化生态环境。由于 H7N9 流感病毒对家禽没有致病性,且不表现任何临床症状,加大了病毒发现的难度,但家禽感染 H7N9 流感病毒后所产生的抗体可存在 3 个月以上,而家禽个体中 H7N9 流感病毒的存活时间不足 2 周,因此,家禽养殖场可以血清学监测为主,既可提高检出率,又能大大节省监测成本。

生猪及其产品安全追溯信息标准体系探索

刘 楷, 熊瑞权, 艾建安

(广东省农科院彩田农业科技信息中心, 广东 广州 510640)

摘 要: 本文以生猪及其产品为对象, 针对广东畜牧产业情况形成规范的流通信息描述, 有助于建设符合省情的猪肉安全生产可追溯体系。

关键词: 生猪; 追溯; 标准

中图分类号: S828

文献标识码: A

文献编号: 1005-8567(2016)03-0004-02

我国由于追溯系统的研究起步较晚, 在一些关键问题上还未进行全面的、系统的、深入的研究, 同时食品安全涉及职能部门较多, 目前还没有形成统一的编码标准体系。此外, 存在的问题是没有结合我国生产应用实际上具体而复杂的国情、地情和信息环境, 在一定程度上造成理论与实际的脱节现象。

为了解决这些问题, 本标准研究建立的生猪追溯信息标准体系针对广东畜牧产业情况形成规范的流通信息描述, 结合目前省内的一些相关研究^[1], 有助于建设符合省情的猪肉安全生产可追溯体系, 促进猪肉产品流通领域的信息资源共享和服务。不仅可以提升猪肉产品的安全性, 提高猪肉加工企业管理以及食品供应链质量安全管理水平, 保证公共安全和消费者知情权, 而且可以提高企业的竞争力, 推动猪肉出口和食品贸易。因此, 本项目研究将具有良好的理论与应用价值。

1 主要研究内容

生猪异地养殖、长途运输、屠宰加工是广东及相关经济发达城市养殖业发展不可逆转的趋势, 但目前广东生猪及其产品没有形成一个统一的质量安全信息标准, 无法满足社会大众知情和监控管理等的信息需求。本研究针对广东生猪产、运、销信息化流程, 通过充分调查研究, 分析比较国内目前畜产品追溯已经颁布的相关标准, 在筛选、确定安全追溯信息关键点的基础上提出生猪及其产

品安全信息标准体系, 为满足社会大众的知情权、实现政府实时监控提供依据。

该标准体系结合当前 EAN·UCC 系统和 RFID 应用的要求, 形成覆盖生猪的饲养、运输、屠宰、分割、加工等各个阶段服务信息的分类与编码标准, 从而使每一个信息在相应的分类体系中都有相应的位置。本项目所制定的标准具有科学性、系统性、可延性、兼容性和综合实用性的特点, 适用于质量安全追溯全程的信息处理和交换, 预期统一的分类与编码将提高生猪及其产品信息在传递中的顺畅度及信息追溯的可操作性, 促进行业和产业的发展。

(1) 分析比较国内目前畜产品追溯已经颁布的相关标准, 在兼容、对接的情况下开展新标准的研究, 使新标准的应用更具代表意义。尤其目前在畜禽及其产品的相关标识方面, 国家相关标准均作了规定, 有着不一样的编码体系, 更需要从有利于广东省生猪及其产品在信息追溯中如何实际操作的角度, 增加标准的可行性。

(2) 在充分调研的基础上, 分析了广东生猪产供销链条从养殖、流通、屠宰、加工各环节影响质量安全的关键因素, 筛选出适合广东实际情况的生猪安全溯源的关键信息指标, 转换为标准中信息追溯的关键点。

(3) 建立结构合理、划分清晰、层次得当的生猪及其产品安全追溯信息标准体系。遵循国家物

收稿日期: 2016-05-25

基金项目: 广东省科技计划项目(2013B040200017), 促进科技服务业发展计划项目审批(粤科规财字[2014]116 号)

作者简介: 刘楷(1978-), 男, 本科, 助理研究员, E-mail: 1052043146@qq.com

品编码中心的 EAN•UCC 系统和 NY/T 1431-2007 《农产品追溯编码导则》,兼容农业部 67 号令免疫耳标编码方法,为基于电子标签和条码为载体的全程溯源系统在信息分类、定义、描述、获取和交换上提供统一的数据规范。

2 研究方法

2.1 抽样调查

主要采用常规抽样和受访者推动抽样(RDS)方法。

常规抽样是通过在被调查市场中选取有代表性的单位,以对其代表性的情况中对总体情况进行估计。

2.2 调研

主要采用现场调研和远程调研方法。通过制定合理的调研表,了解生猪的饲养、运输、屠宰、分割、加工等各个阶段的信息需求和信息流转。

2.3 资料分析

综合分析法:研制编码标准,一方面要与现有国家、行业标准相结合,兼容现有标准,另一方面通过综合比较相关标准、技术法规、文献资料等,经过权衡和取舍,制定合适的编码规则,研制出可符合大部分实际情况的信息标准。

案例分析法:在标准研究过程中,对实际出现的问题进行独立个案分析,了解其产生的原因和带来的关联影响,考虑现有资料中是否存在类似的情况,抓住问题的中心,挑选出最理想、最恰当的解决策略。

集思广益:在标准的研究过程中,广泛收集各个生产环节的专业人员和标准化专业人员的意见。

2.4 编码方法

本研究主要采用 EAN•UCC 编码系统的编码原则,再结合实际情况加以完善。

3 安全追溯信息关键点研究

危害分析和关键控制点 HACCP、良好操作规范 GMP 与 ISO9000 等均对生猪及其产品生产过程的质量安全控制有良好的促进作用,将其管理应用到广东生猪产销链条及追溯的各环节信息进行分析,从生产者、屠宰场、企业等供应链的各环节上筛选和确定生猪质量安全追溯信息关键点,以确保获取的信息在整个供应链中的传递和更新可以确保追溯系统的有效运作。

4 信息标准体系研制

根据生猪及其产品质量安全追溯全过程中相关追溯方及追溯项的信息框架研究(图 1),建立结构合理、划分清晰、层次得当的生猪及其产品安全追溯信息标准体系,遵循国家物品编码中心的 EAN•UCC 系统和 NY/T 1431-2007 《农产品追溯编码导则》,兼容农业部 67 号令免疫耳标编码方法,为基于电子标签和条码为载体的全程溯源系统在信息分类、定义、描述、获取和交换上提供统一的数据规范。

同时,本标准结合广东生猪异地养殖、长途运输、屠宰加工的情况,满足企业信息化应用需求,对标准体系的结构和层次划分进行不断的调整和改进,目的是为了满 足使用者需求,使其在实现标准的使用的时候基本不改变或少改变使用者原来的工作习惯,避免标准推广时出现的与实际脱节的情况。

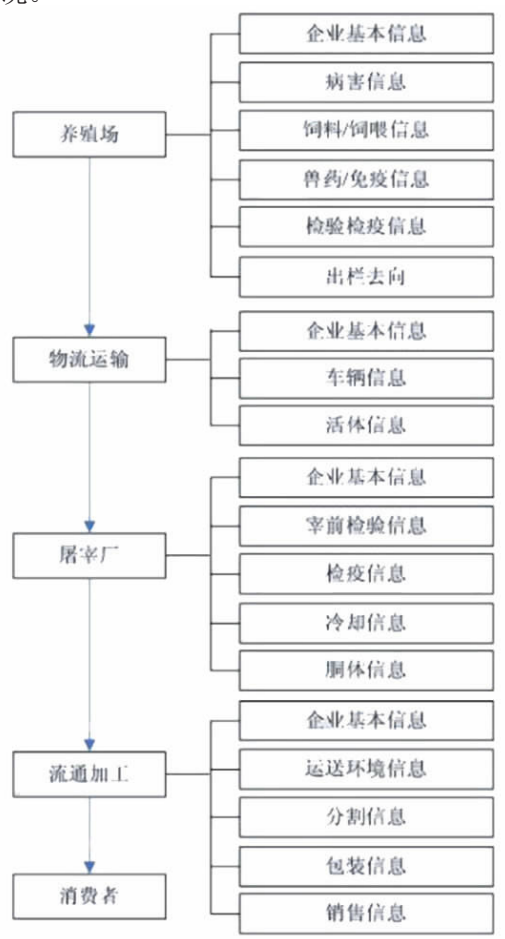


图 1 生猪及其产品质量安全追溯信息框架

参考文献:

- [1] 刘楷. 基于物联网的生猪质量安全追溯服务平台研究[J]. 热带农业工程, 2015, 38(6):6-10.

广东从化无规定马属动物疫病区龙门缓冲区 猪日本脑炎免疫效果监测及分析

王 政, 张永泉, 龚伟宏, 薛培群
(惠州市动物卫生监督所, 广东 惠州 516001)

摘 要: 为了解广东从化无规定马属动物疫病区龙门缓冲区猪日本脑炎的免疫效果, 指导该县日本脑炎的免疫工作, 采用猪乙型脑炎病毒 ELISA 抗体检测试剂盒对从龙门缓冲区已免疫日本脑炎疫苗的 8 个猪场采集的 240 份血清进行了猪日本脑炎抗体的检测与分析。结果显示, 龙门缓冲区猪日本脑炎免疫抗体整体阳性率为 92.92%; 种猪的抗体阳性率水平高于商品肉猪, 但差异不显著; 良好饲养条件下猪群的抗体阳性率水平高于中等饲养条件下的猪群, 但差异不显著。试验说明猪日本脑炎疫苗取得良好的免疫效果, 能产生较强的保护力, 对日本脑炎应坚持疫苗预防为主的防控措施。

关键词: 龙门; 缓冲区; 日本脑炎; 免疫效果

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文献编号: 1005-8567(2016)03-0006-03

Monitoring and Analysis on Immunity Efficacy of Swine Japanese Encephalitis in Longmen Buffer Zone of The Specific Equine Disease-free Zone in Conghua, Guangdong

WANG Zheng, ZHANG Yongquan, GONG Weihong, XUE Peiqun

(Huizhou Animal Health Supervision Institute, Huizhou 516001, China)

Abstract: In order to know about immunity efficacy of swine Japanese encephalitis in Longmen buffer zone of the specific equine disease-free zone of Conghua, Guangdong, and to guide the Japanese encephalitis virus (JEV) vaccine immunization in that county, 240 serum samples from swine, which had been immunized with JEV vaccine, were collected from 8 swine farms for detection of JEV antibodies using ELISA kit used to detect the antibody against swine JEV. The results showed that 92.92% of total positive rate of immune antibody in samples collected from 8 swine farms in Longmen buffer zone; the antibody positive rate of breeding swine was higher than porker's, but the difference was not significant; the antibody positive rate of swine fed under good feeding conditions was higher than those fed under middle feeding conditions, but the difference was not significant. The test showed that JEV vaccine had good immunological efficacy, and could provide strong protection for swine, So we can draw the conclusion that Japanese encephalitis should be prevented by JEV vaccine.

Keywords: Longmen; buffer zone; Japanese encephalitis; immunity efficacy

流行性乙型脑炎 (epidemic type B encephalitis), 又称日本脑炎 (Japanese encephalitis), 简称乙型脑炎, 是由日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 引起的一

种人兽共患的自然疫源性疾病^[1]。多种动物和人可感染此病毒, 马最易感, 其次是人, 其他动物多呈隐性感染, 但可成为传染源。猪感染此病毒后可引起妊娠母猪流产、死胎及木乃伊胎等繁殖障碍

收稿日期: 2016-04-27

作者简介: 王政 (1979-), 男, 硕士, 畜牧师, E-mail: 441300s@gdahsi.org

性疾病,可引起公猪睾丸炎^[2]。日本脑炎是 14 种规定马属动物疫病之一,是广东从化无规定马属动物疫病区的防控对象。惠州市龙门县作为广东无规定马属动物疫病区的缓冲区,对日本脑炎的防控主要采取对辖区内易感动物(主要是猪)实施预防免疫为主的防疫措施。惠州市动物卫生监督所结合本地实际情况适时对龙门县存栏猪群开展日本脑炎免疫效果进行监测,对指导该县日本脑炎的免疫工作,对龙门缓冲区日本脑炎的防控大有裨益。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 血清样品 2015 年 10 月中旬于龙门县 6 个乡镇 8 个猪场采集猪血清样品 240 份,采样猪群均已免疫日本脑炎疫苗。

1.1.2 检测试剂 猪乙型脑炎病毒 ELISA 抗体检测试剂盒,购自武汉科前动物生物制品有限责任公司(批号:150804)。

1.1.3 主要仪器 Thermo Labsystems multi-skan MK3 酶标仪。

1.2 试验方法

试验操作按照试剂说明书进行。试验成立的条件是阳性对照孔平均 OD_{630nm} 值≥1.0,阴性对照孔平均 OD_{630nm} 值<0.2。结果判定:S 为样品 OD_{630nm} 值,P 为阳性对照 OD_{630nm} 值平均值,计算样品 S/P 值,若样品 S/P 值≥0.21,判为猪乙型脑炎病毒抗体阳性,否则判为猪乙型脑炎病毒抗体阴性。

2 结果与分析

2.1 不同猪场猪日本脑炎免疫抗体检测结果

对 8 个猪场的 240 份血清样品进行检测,共检出 223 份血清呈阳性,阳性率为 92.92%,阳性率最高的猪场为 100%,最低的为 73.33%,可见阳

表 1 不同猪场猪日本脑炎免疫抗体检测结果

猪场编号	检测数量 (份)	阳性数 (份)	阴性数 (份)	阳性率 (%)	CV (%)
A	30	30	0	100.00	10.04
B	30	30	0	100.00	
C	30	30	0	100.00	
D	30	29	1	96.67	
E	30	29	1	96.67	
F	30	27	3	90.00	
G	30	26	4	86.67	
H	30	22	8	73.33	
合计	240	223	17	92.92	

性率水平都比较高(表 1)。

2.2 不同乡镇猪日本脑炎免疫抗体检测结果

由表 2 可知,龙江镇、平陵镇的猪日本脑炎免疫抗体阳性率最高、为 100%,最低的是龙华镇、为 81.67%,部分乡镇间阳性率水平存在一定差异,但所有乡镇的猪日本脑炎免疫抗体阳性率均在 80%以上,具有较强的保护力。

表 2 不同乡镇猪日本脑炎免疫抗体检测结果

乡镇	检测数量 (份)	阳性数 (份)	阴性数 (份)	阳性率 (%)	CV (%)
龙江	30	30	0	100.00	8.15
平陵	60	60	0	100.00	
龙潭	30	29	1	96.67	
永汉	30	29	1	96.67	
龙城	30	26	4	86.67	
龙华	60	49	11	81.67	
合计	240	223	17	92.92	

2.3 按种猪与商品肉猪进行分类统计的结果

由表 3 可知,种猪的日本脑炎抗体阳性率(94.44%)高于商品肉猪的阳性率(88.33%),但差异不显著。

表 3 种猪与商品肉猪日本脑炎免疫抗体检测结果

分类	检测数量 (份)	阳性数 (份)	阴性数 (份)	阳性率 (%)
商品肉猪	60	53	7	88.33
种猪	180	170	10	94.44
合计	240	223	17	92.92

2.4 按饲养条件进行分类统计的结果

由表 4 可知,良好饲养条件下猪群的日本脑炎抗体阳性率(95.00%)要高于中等饲养条件下猪群的阳性率(92.22%),但差异不显著。

表 4 不同饲养条件下猪日本脑炎免疫抗体检测结果

饲养条件	检测数量 (份)	阳性数 (份)	阴性数 (份)	阳性率 (%)
良(种猪场)	60	57	3	95.00
中(商品肉猪场)	180	166	14	92.22
合计	240	223	17	92.92

3 讨论

3.1 试验结果显示,龙门县存栏猪群的日本脑炎免疫抗体阳性率水平为 92.92%,不同场之间、不同乡镇之间都维持在较高的阳性率水平,其中有 7 个猪场的阳性率达 86.67%以上,最低的猪场也有 73.33%,所有的乡镇阳性率都在 81.67%以

上。试验结果说明,日本脑炎疫苗免疫猪群的整体免疫效果良好,日本脑炎疫苗免疫能刺激猪群产生较高水平的免疫保护抗体,因此对本病的防控应坚持疫苗预防为主。

3.2 试验结果显示,日本脑炎免疫抗体阳性率水平种猪高于商品肉猪、良好饲养环境下的猪群高于中等条件饲养环境下的猪群,但是差异不显著。这说明只要采取正确的免疫方法,无论是种猪还是商品肉猪,无论在良好饲养环境下还是在中等条件饲养环境下的猪群都能达到较高的免疫抗体阳性率水平,而且无显著差异。

3.3 试验结果显示,龙门缓冲区猪日本脑炎抗体阳性率为92.92%,与广东省农业厅通报的2014年广东从化无规定马属动物疫病区猪日本脑炎免疫抗体合格率为84%^[3],以及黄育浩等^[4]对东莞广东从化无规定马属动物疫病区生物安全通道育肥猪的日本脑炎抗体阳性率为81.88%有一定差异,这可能与监测数量、监测范围以及免疫操作技术、免疫后到抽样检测间隔时间长短、猪群自身健康等因素的不同有关,但检测结果都处于较高的阳性率/合格率水平($\geq 81.88\%$),说明广东从化无规定马属动物疫病区日本脑炎的免疫工作开展比较扎实,取得良好的整体免疫效果,给广东从化无规定马属动物疫病区的马属动物提供了较强的保护屏障。

3.4 日本脑炎属人畜共患的自然疫源性疾,可感染人、马、猪、牛、羊、鸡、鸭、野鸟^[5]。猪感染日本脑炎病毒后病毒血症期维持时间长,血液

中病毒滴度高(可达 $10^{3.5}$ MLD₅₀),因此猪是日本脑炎病毒重要的贮存宿主及传染源,一般以猪-蚊-人的链状方式感染^[6]。科学合理的疫苗免疫接种是防控猪日本脑炎的根本措施和有效手段,龙门县对辖内猪群采取接种日本脑炎疫苗,适时开展有效的监测工作,保障免疫效果,能大大降低猪日本脑炎的流行传播概率,是广东从化无规定马属动物疫病区无疫状态维护的必要防控措施。据统计1990~2007年,龙门县共发生了9例人感染乙脑病例^[7],而猪群免疫日本脑炎可起到切断人群感染日本脑炎传染源的作用。因此龙门县对辖内猪群采取接种日本脑炎疫苗的防疫措施对当地具有重要的公共卫生学意义。

参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京:科学出版社, 1997:633-641.
- [2] 杨培昌,曹兴萍,高自寿. 云南省楚雄州猪乙型脑炎流行情况血清学调查[J]. 动物医学进展, 2008, 29(5):109-112.
- [3] 广东省农业厅. 2014年广东省从化无规定马属动物疫病区工作情况通报[Z]. 广州:广东省农业厅, 2015.
- [4] 黄育浩,殷自兴,谢国怀,等. 广东省东莞市猪乙型脑炎流行病学调查[J]. 动物医学进展, 2012, 33(7):126-128.
- [5] 刘刚. 猪乙型脑炎抗体检测试验[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014, (1):66-67.
- [6] 邓永,徐高原. 猪乙型脑炎研究进展[J]. 养殖与饲料, 2007(6):43-46.
- [7] 肖文芳,龚富强,朱秀兰. 惠州市1990-2007年流行性乙型脑炎流行特征分析[J]. 华南预防医学, 2008, 34(2):45-46.

微纳泡三氧(O₃)水对猪流行性腹泻病毒的杀灭作用

郭天成¹, 康桦华², 王伟芳³, 林万泉⁴, 邝元成⁴

(1. 广东省动物防疫物资储备中心, 广东 广州 510520; 2. 广东省农科院动物卫生研究所 / 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, 广东 广州 510640; 3. 广州市白云区江高镇畜牧兽医站, 广东 广州 510450; 4. 深圳市兰德玛水环境工程科技有限公司, 广东 深圳 518004)

摘要: 为了检验微纳泡三氧(O₃)水(气)农业养殖机产生的臭氧水溶液对猪流行性腹泻病毒的杀灭作用, 用该机器制备不同浓度的臭氧水, 与一定浓度的病毒混合后作用不同时间, 测定臭氧水对病毒的杀灭作用。结果显示, 不同浓度的微纳泡臭氧水溶液与猪流行性腹泻病毒混合作用5 min, 当臭氧浓度为9.0、4.5 mg/mL时, 可100%杀灭猪流行性腹泻病毒; 当臭氧浓度为4.5 mg/mL时, 作用1~5 min, 猪流行性腹泻病毒均100%被杀灭。可见, 采用微纳泡三氧(O₃)水(气)农业养殖机制备的臭氧水, 对猪流行性腹泻病毒有较好的杀灭作用。

关键词: 微纳泡三氧; 臭氧水溶液; 猪腹泻病毒; 杀灭

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文献编号: 1005-8567(2016)03-0009-03

臭氧是一种强氧化剂, 通过破坏病毒的核酸从而使其断裂, 达到杀灭病毒的目的^[1,2]。Thurston-Enriquez 等(2005)的研究表明^[3], 使用臭氧对肠道腺病毒和猫杯状病毒进行消毒, 0.3 mg/L 的臭氧即可有效灭活肠道腺病毒, 0.06 mg/L 的臭氧即可有效灭活猫杯状病毒。另外, 臭氧极易在水体中分解, 无药物残留; 而且臭氧消毒不受空间、地域及温度的限制, 具有高效和广谱的特点, 能显著提高养殖水的水质指标, 减少疾病的发生, 降低养殖动物的死亡率。

猪流行性腹泻(Porcine Epidemic Diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)引起的猪的一种接触性肠道传染病^[4]。猪感染 PEDV 后能引起仔猪的急性肠炎、水样腹泻直至脱水死亡。PED 对猪的危害巨大, 各种年龄的猪均可发病, 对哺乳仔猪的危害最为严重, 给养猪业带来了重大的经济损失, 影响了猪群的健康发展。

根据疾病的流行病学特征, 隔离传染源、阻断传播途径, 灭活病毒, 是控制疫情的有效途径之一。本研究以 PEDV 疫苗毒为材料, 对深圳市兰德玛水环境工程科技有限公司的微纳泡三氧(O₃)水

(气)农业养殖机现场产生的臭氧水进行了 PEDV 病毒灭活试验, 旨在为临床 PEDV 的传播及控制提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

猪流行性腹泻病毒, 由广东省农科院动物卫生研究所保存, 实验中使用的浓度为 1×10^6 TCID₅₀/mL。Vero E6 细胞, 由广东省农业科学院动物卫生研究所保存。本试验用含 5 g/L 硫代硫酸钠和 5%胎牛血清的 DMEM 溶液为中和剂。

微纳泡三氧(O₃)水(气)农业养殖机, 由深圳市兰德玛水环境工程科技有限公司研制和提供, 可制备不同浓度的微纳泡臭氧水溶液。

1.2 试验方法

1.2.1 病毒滴度的测定 采用组织培养半数感染量法(TCID₅₀)。将生长旺盛的 Vero E6 细胞传代于 96 孔细胞培养板上, 培养 24 h, 待其融合度达 75%左右时弃掉培养液, 以 PBS 洗两次, 除去细胞孔中的血清后用于病毒增殖实验。将待测样品分别用无血清的培养基进行 10 倍系列稀释, 将各稀释度的病毒稀释液接种到 96 孔板中, 每孔接种 100 μL, 每个稀释度重复 8 孔细胞, 37℃下 CO₂

收稿日期: 2016-05-31

基金项目: 广东省科技计划项目(2015A020208008)

作者简介: 郭天成(1980-), 男, 大学本科, 经济师, E-mail: teasion@163.com

培养箱中培养。接毒后 48 h 观察细胞病变,用 Reed-Muench 法计算各样本病毒的细胞半数感染量(TCID₅₀)。

1.2.2 稀释中和法去除残留臭氧水试验 本试验用含 5 g/L 硫代硫酸钠和 5 %胎牛血清的 DMEM 溶液为中和剂,参考张伽敏等(2004)的方法^[5],采用稀释中和法来验证其效果。试验用悬液法进行,分 5 组:

- (1)臭氧水 5 mL 加病毒悬液 50 μL,作用 2 min 后,加 5 mL 细胞培养液;
- (2)臭氧水 5 mL 加病毒悬液 50 μL,作用 2 min 后,加 5 mL 中和剂;
- (3)病毒悬液 50 μL 加 5 mL 中和剂,作用 2 min 后,加 5 mL 无菌水;
- (4)臭氧水 5 mL 加 5 mL 中和剂,作用 2 min 后,加 50 μL 病毒悬液;
- (5)病毒悬液 50 μL 加 5 mL 无菌水,作用 2 min 后,加 5 mL 细胞培养液,作为检测病毒滴度的阳性对照;
- (6)中和剂 5 mL 加臭氧水 5 mL 测定对细胞

的影响。
前 5 组测定病毒滴度,第 6 组要求对细胞生长无不良影响,各实验重复 3 次。

1.2.3 不同浓度的臭氧水对病毒的杀灭作用 向每支试管加现制现用的不同浓度臭氧水溶液 5 mL,立即加 50 μL 待用病毒悬液,振摇混匀,作用 5 min 后,加入等体积的中和剂 5 mL,4℃暂存,2 h 内测定病毒滴度。

1.2.4 不同作用时间下臭氧水对病毒的杀灭作用测定 参考张文福等(1998)的方法^[6],向每支试管加现制现用的 4.5 mg/mL 臭氧水溶液 5 mL,立即加 50 μL 待用病毒悬液,振摇混匀,分别作用 1、3、5 min,之后加入等体积中和剂 5 mL,4℃暂存,2 h 内测定病毒滴度。

2 结果与分析

2.1 稀释中和法去除残留臭氧水试验

从表 1 可见,本实验的中和剂完全可以中和臭氧水对猪流行性腹泻病毒的杀灭效果。第 6 组中和剂 5 mL+ 臭氧水 5 mL,细胞生长正常。

表 1 中和剂对臭氧水杀灭猪流行性腹泻病毒作用的中和效果

处理	病毒存活平均对数值 (TCID ₅₀ /mL 的对数值)
(臭氧水 + 病毒液) + 细胞培养液	0
(臭氧水 + 病毒液) + 中和剂	0
(病毒液 + 中和剂) + 无菌水	3.80
(臭氧水 + 中和剂) + 病毒液	3.80
(病毒液 + 无菌水) + 细胞培养液	4.00

注:数据为 3 次试验平均值。臭氧水浓度为 9.0 mg/L,作用时间为 5 min。
含 2%胎牛血清的 DMEM 培养液稀释臭氧水后,直接接种细胞,对其生长无影响。

2.2 不同浓度臭氧水对猪流行性腹泻病毒的杀灭作用

不同浓度的臭氧水与病毒液混合,作用 5 min 后,用中和剂反应,测定 TCID₅₀。结果(表 2)表明,当不加臭氧水时,测得病毒终浓度为

10^{3.9}TCID₅₀/mL;当臭氧浓度为 9.0、4.5 mg/mL 时,未检测到病毒存活;当臭氧浓度为 2.3 mg/mL 时,病毒存活浓度为 10^{1.2}TCID₅₀/mL,即病毒杀灭率为 98.84%;当臭氧浓度为 1.0 mg/mL 时,病毒杀灭率为 98.07%。

表 2 不同浓度臭氧水对猪流行性腹泻病毒的杀灭作用

臭氧浓度 (mg/mL)	病毒存活平均对数值 (TCID ₅₀ /mL 的对数值)	病毒杀灭率 (%)
9.0	0	100
4.5	0	100
2.3	1.2	98.84
1.0	2.0	98.07
0	3.9	0

2.3 不同作用时间下臭氧水对猪流行性腹泻病毒的杀灭作用

在 4.5 mg/mL 臭氧浓度时, 臭氧水与猪流行性腹泻病毒混合作用不同的时间, 用中和剂中和,

然后测定 TCID₅₀。结果(表 3)表明, 在 4.5 mg/ mL 臭氧浓度时, 作用 1、3、5 min, 均能 100% 杀灭猪流行性腹泻病毒。

表 3 不同作用时间下臭氧水对猪流行性腹泻病毒的杀灭作用

作用时间 (min)	病毒存活平均对数值 (TCID ₅₀ /mL 的对数值)	病毒杀灭率 (%)
5	0	100
3	0	100
1	0	100
0	3.9	0

3 结论

(1) 用“微纳泡三氧(O₃)水(气)农业养殖机”制备不同浓度的微纳泡臭氧水溶液, 与猪流行性腹泻病毒混合作用 5 min, 当臭氧浓度为 9.0、4.5 mg/mL 时, 可 100% 杀灭猪流行性腹泻病毒; 当臭氧浓度为 2.3 mg/mL 时, 杀灭率为 98.84%; 当臭氧浓度为 1.0 mg/mL 时, 杀灭率为 98.07%。

(2) 当制备的臭氧水的臭氧浓度为 4.5 mg/mL 时, 作用 1~5 min, 猪流行性腹泻病毒 100% 被杀灭。

综上所述, 采用“微纳泡三氧(O₃)水(气)农业养殖机”制备的微纳泡臭氧水溶液, 对猪流行性腹泻病毒有较好的杀灭作用。

参考文献:

[1] Roy D, Wong P K, Engelbrecht R S, et al.Mechanism of enteroviral inactivation by ozone[J].Appl Environ Microbiol, 1981, 41(3): 718-723.

[2] Shin G A, Sobsey M D. Reduction of Norwalk virus, poliovirus 1, and bacteriophage MS2 by ozone disinfection of water[J].Appl Environ Microbiol, 2003, 69 (7): 3975-3978.

[3] Thurston-Enriquez JA,Haas CN,Jacangelo J,et al.Inactivation of enteric adenovirus and feline calicivirus by ozone.Water Res[J].2005,39(15): 3650-3656.

[4] 张百灵, 陈建飞, 邢雅玲, 等. 猪流行性腹泻病毒(PEDV)与抗病毒天然免疫[J]. 中国生物化学与分子生物学, 2011. 27 (6):516-523.

[5] 张珈敏, 郑从义, 肖庚富, 等. 臭氧水对 SARS 病毒的灭活效果观察[J]. 中国消毒学杂志, 2004, 21 (1): 27-28.

[6] 张文福, 袁庆霞. 臭氧水对水泡性口炎病毒灭活效果的检测[J]. 中国消毒学杂志, 1998, 15 (2): 102-104.

一例猪瘟、蓝耳、附红细胞体病混合感染的诊治

李德如, 赖华松, 李少文

(惠州市惠东县畜牧兽医局, 广东 惠州 516000)

摘要: 通过流行病学、临床症状、病理解剖和实验室诊断等方法, 对一个生产不稳定的猪场进行诊断, 确诊为猪瘟、蓝耳和附红细胞体混合感染。使用针对性的药物, 结合疫苗免疫进行处理, 取得不错的防控效果。

关键词: 猪瘟; 蓝耳; 附红细胞体; 混合感染; 疾病诊治

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文献编号: 1005-8567(2016)03-0012-03

猪瘟是由猪瘟病毒引起的猪的一种急性、热性和高度接触传染的病毒性传染病^[1]。猪繁殖与呼吸综合征, 俗称“猪蓝耳病”, 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒引起的一种猪繁殖和呼吸发生障碍的病毒性传染病^[2]。猪附红细胞体病是由附红细胞体引起的以贫血、黄疸、和发热、消瘦为特征的人畜共患传染病^[3]。

这 3 种疾病经常混合感染, 给养猪业造成巨大的经济损失, 严重制约着养猪业的发展。本文介绍了一例猪瘟、蓝耳、附红细胞体病混合感染病例的诊治情况, 以期为临床提供参考。

1 发病情况

广东省某猪场, 自繁自养 200 多头母猪。2016 年 3 月以来, 猪场生产一直不太稳定, 母猪返情率高, 便秘, 奶水差。哺乳仔猪在产房后期开始咳嗽, 喘气, 死亡率高。保育猪和生长猪采食量降低、发烧, 中大猪急性死亡多。

2 临床症状

产床哺乳仔猪拉稀, 嗜睡, 打堆, 在哺乳中后期开始咳嗽, 喘气, 死亡率高。断奶仔转到保育舍后, 病情更严重, 病猪眼周水肿, 部分猪耳朵发紫。母猪和育肥猪发烧、体温 40.5℃, 便秘, 尿液黄染, 皮肤发红, 眼睛泪斑严重, 结膜黄染, 毛孔针尖处有出血点, 打针后血液凝固不良(图 1)。



图 1 不同生产阶段猪只发病情况

收稿日期: 2016-05-19

作者简介: 李德如(1983-), 男, 硕士, 职业兽医师, E-mail: 112949514@qq.com

3 病理解剖

解剖 4 头病情严重的猪只，解剖症状整体一致。皮肤及粘膜苍白，皮下出血，血液稀薄、色淡、凝固不良。全身淋巴结肿大、发黑，切面周边出血。

肝脏肿大，呈黄棕色。肠粘膜和膀胱内壁有针尖大小的出血点，肺水肿，间质变宽。肾脏表面有针尖大的出血点，切开可见肾乳头出血。脾脏边缘呈锯齿状，胃内膜充血、有溃疡(图 2)。



图 2 发病猪只部分解剖结果

4 实验室诊断

初诊怀疑为猪瘟、蓝耳、附红细胞体感染。为了确诊,选取不同生产阶段的猪只,静脉采血进行实验室检测。结果(表 1)显示,猪场各个生产阶段的猪瘟抗体阳性率仅有 50%(5/10),抗体不均匀,离散度大,哺乳仔猪没有母源抗体保护,而保育猪又检测不出抗体,显然猪瘟抗体不合格。由于该猪场一直没有打蓝耳苗,且测得蓝耳抗体离散度很大,S/P 值过高,判定为蓝耳病感染。另外,抽检伪狂犬野毒抗体全部呈阴性,表明猪场没有受到伪狂犬野毒的感染。所抽检的猪只中,附红体全部呈阳性,说明猪只附红细胞体感染严重。

通过流行病学、临床症状、病理解剖、实验室诊断等综合分析,最终诊断为猪瘟、蓝耳和附红细胞体混合感染。

5 治疗及结果

在料里添加阿梅诺(氨基酸、多维)、替米考星和强力霉素,连用 1 周。对全场发病猪只补打猪瘟脾淋苗(2 头份/头)。停药后选取二栏发病猪试打蓝耳苗(1 头份/头),观察 1 周后,发现临床症

表 1 血清学检测结果

猪只年龄	HC-Ab	PRRS-Ab	PR-gPI	附红体
哺乳仔猪	0.14(-)	0.76(+)	1.00(-)	+++
哺乳仔猪	0.33(±)	3.17(+)	1.00(-)	+++
保育猪	0.09(-)	2.85(+)	1.04(-)	++
保育猪	0.30(-)	0.67(+)	0.90(-)	+++
后备母猪	0.52(+)	1.15(+)	0.85(-)	++++
后备母猪	0.88(+)	0.97(+)	0.92(-)	+++
三胎母猪	0.70(+)	2.69(+)	0.85(-)	+++
三胎母猪	0.67(+)	0.63(+)	0.82(-)	++++
六胎母猪	0.21(-)	0.08(-)	0.87(-)	++++
六胎母猪	0.88(+)	2.47(+)	0.87(-)	++++

状有所缓解,对全场种猪和断奶前仔猪普免蓝耳苗。同时,调整免疫程序,由于商品猪发病时间过早,为此调整商品猪免疫时间。猪瘟由原来的 35、80 d 免疫改为 20、40、70 d 免疫;仔猪 7 d 免疫蓝耳苗,35 d 时加强免疫 1 次;同时加强对栏舍的消毒清洗工作,每天 1 次。

加药 1 星期后,育肥猪死亡率逐渐控制住,急性死亡的猪只基本没有出现。半个月左右,猪群好

转明显,身上出血点和咳嗽明显减少,消瘦毛松的情况大为改善。2个月后再回访,猪场趋于稳定,各生长阶段的猪只都趋于正常。

6 讨论

随着养猪业高度集约化发展,猪群免疫力普遍低下,许多免疫抑制性疾病在猪群中长期存在,以垂直传播与水平传播为特点,使猪体长期带毒。在临床上以免疫抑制、持续性感染和多重感染为特征,导致疾病长期、持续存在,难于根除^[4]。

当猪只感染猪瘟或蓝耳病后,机体免疫系统受损,产生免疫抑制,以致于免疫疫苗时,无法激活免疫系统产生足够的保护力^[5]。当在应激条件下或有病原入侵时,就会继发感染如附红体等其他疾病,导致疾病恶化,防控变难。

当疾病发生时,要早诊断,早治疗,及时采取综合性的防治措施。对于混合感染,要分清主次,抓住原发性疾病和继发性疾病之间的先后关系,重点控制原发病。在针对疾病病原防控的同时,还

要做好营养的补足和环境的消毒等。

总之,猪场疾病的防控是一项系统工程,在平时的生产中要加强饲养管理,搞好圈舍内的环境卫生,消除应激因素;在疾病流行区做好主要病毒性疾病和细菌性疾病的免疫,做好定期消毒,补充均衡营养增强猪体抗病力,只有这样才能控制疾病的发生和减少损失。

参考文献:

- [1] 赵丽华,张凯,张国江,等.应用“复方黄芪多糖III号”注射液治疗猪瘟与蓝耳病混合感染[J].养殖技术顾问,2006,6(6):52.
- [2] 李美娣,武力,陈宝妮,等.联合应用替米考星与中药对解除免疫抑制及净化猪场蓝耳病的作用[J].养猪,2009(3):47-48.
- [3] 宣长和,马春全,林树民,等.猪病混合感染鉴别诊断与防治彩色图谱[M].北京:中国农业大学出版社,2009:72-73.
- [4] 黄庭汝,孙彦伟,宋长绪,等.猪伪狂犬、猪瘟、猪繁殖与呼吸综合征、圆环病毒2型的相关性研究[J].华南农业大学学报,2009,30(2):94-96.
- [5] 李德如,曹学导,吴瑞云.一例猪瘟、蓝耳病和副猪混合感染的治疗[J].广东养猪业,2014(1):70-72.



(上接第3页)

3.4 倡导科学消费观念,实行家禽集中屠宰,冰鲜上市

我国南方地区大部分人习惯于食用现宰现卖的家禽,或出于对非鲜活家禽质量不放心的原因,因此接受冰鲜家禽产品需要一个过程。要通过媒体加强宣传引导,普及科学知识,活禽集中屠宰、冷链配送、生鲜上市,能大大降低家禽受病毒、细菌污染的机率,提升动物源性食品卫生安全水平。同时,可从根本上消除了流感病毒繁衍、重组变异、滋生的场所。只要活禽交易市场这一生态环境存在,流感病毒就会日复一日地进行重组,迟早会不断重组出对人有致病力又具备强传播能力的新病毒,H10N8、H5N6就是很好的例子。因此需要大众消费者改变传统生鲜消费习惯。

参考文献:

- [1] 香港卫生防卫中心禽流感疫情周报第十二期第七号[EB/OL].
http://www.chp.gov.hk/files/pdf/2016_avian_influenza_report_vol12_wk07_chi.pdf,2016-02-16.
- [2] 马汉春,黄礼琪,粤国检等.惠州一批供港活鸡检出H7N9病毒呈阳性13088只活鸡被“无害化处理”,羊城晚报[EB/OL].
http://www.ycwb.com/ePper/ycwb/html/2015-01/03/content_623753.htm?div=-1,2015-01-03.
- [3] Qianyi Zhang, Jianzhong Shi, Guohua Deng, et al. H7N9 Influenza Viruses Are Transmissible in Ferrets by Respiratory Droplet[J]. Science, 2013, 26: 410-414.
- [4] Pantin-Jackwood M J, Miller P J, et al. Role of Poultry in the Spread of Novel H7N9 Influenza Virus in China [J]. Journal of Virology, 2014, 88(10): 5381-5390.
- [5] Zhao B H, Zhang X, Zhu W F, et al. Novel Avian Influenza A (H7N9) Virus in Tree Sparrow, Shanghai, China 2013[J]. Emerging Infectious Diseases, 2014, 20(5): 850-853.
- [6] Jones J C, Sonnberg S, Kocer Z A, et al. Possible Role of Songbirds and Parakeets in Transmission of Influenza A (H7N9) Virus to Humans [J]. Emerging Infectious Diseases, 2014, 20(3): 380-385.

一例犬股骨骨折的手术治疗

余文兰¹, 吴玄光², 梁 柏³, 杨玉澜¹, 熊 金¹, 陈 嘉¹, 马晓莉¹, 刘忠华¹

(1. 华南农业大学实验动物中心, 广东 广州 510642; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 3. 华南农业大学校长办公室, 广东 广州 510642)

摘 要:通过询问病史、术前检查、X 线检查等方法对 1 只 3 月龄阿拉斯加幼犬股骨骨折进行诊断, 并采用髓内针结合钢丝内固定手术进行治疗, 术后经输液、抗感染等综合治疗调养, 犬只病情得到明显改善, 1 个月后基本可以正常行走。

关键词:犬; 骨折; 髓内针; 内固定

中图分类号: S854.4

文献标识码: A

文献编号: 1005-8567(2016)03-0015-03

骨折是指在重大外力作用下, 骨结构的完整性或连续性遭到机械性的断裂^[1]。不同种属动物、不同年龄动物的骨密度不同, 在受到直接或间接暴力作用后均可导致骨折。骨折现象可出现软组织受损、内出血、剧烈疼痛或并发内脏器官损伤。骨折局部组织可见畸形、活动异常、骨擦音或骨擦感。在小动物外科疾病中, 70%~80%为骨骼与关节疾病, 其中以骨折、尤其后肢股骨骨折发病率最高, 约占骨折病例的 30%以上^[2]。X 射线检查对小动物疾病的治疗具有重要的参考价值, 可检测到临床上难以发现的不完全骨折、深部骨折、关节内骨折和小的撕裂性骨折等。即使肉眼明显骨折, X 射线拍片检测也是必要的, X 拍片可以帮助了解骨折类型、骨折具体位置、骨折后的愈合等情况, 有时还可以用于骨折与关节脱位的鉴别诊断, 对于骨折的治疗具有重要意义^[3-4]。在 X 射线的拍摄中应包含正位片和侧位片, 需包含骨折部位临近关节, 可根据需要加拍斜位、切线位等相关部位 X 片。临床中对骨折治疗多采取外固定术, 但对于骨折位靠近关节的情形, 易造成死关节, 采取髓内针及钢丝内固定治疗效果更佳^[5]。2015 年 10 月, 笔者通过询问病史、术前检查、X 线检查等方法对一只阿拉斯加幼犬股骨骨折进行诊断, 应用髓内针内固定进行治疗, 现将诊疗结果报道如下。

1 病例介绍

病犬为 3 月龄阿拉斯加幼犬, 雌性, 体重 12.6 kg。该犬被主人抛起玩耍重摔后造成右后肢当场无法正常站立并惨叫。该犬送至医院, 表现为精神沉郁, 体温 38.9℃, 且可见后肢悬空, 不愿走动, 触摸痛感明显, 有摩擦音。通过 X 射线光片检查, 可见右后腿股骨断裂, 有碎片, 确诊为股骨粉碎性骨折, X 射线光片检查结果如图 1 所示。



图 1 术前 X 光片检查结果

2 手术治疗

根据需要加拍斜位、切线位等相关部位 X 片, 发现骨折位靠近关节。经犬主同意, 决定对该犬进行髓内针结合钢丝内固定手术治疗。

2.1 术前检查

术前对病犬的血常规及肝肾功能部分指标进行检测, 指标结果(表 1)均在正常范围。

收稿日期: 2016-03-26

作者简介: 余文兰(1989-), 女, 硕士, 兽医师, E-mail: 315817345@qq.com

通讯作者: 刘忠华(1970-), 男, 博士, 教授, E-mail: 1003280841@qq.com

表 1 血常规及肝肾功能部分指标检测结果

检测项目	检测结果	参考范围	检测项目	检测结果	参考范围
白细胞(个/μL)	18.5	6~17	谷丙转氨酶(U/L)	66.2	15.0~70.0
红细胞(个/μL)	6.7	5.0~8.5	谷草转氨酶(U/L)	35	10~40
红细胞压积(%)	44	37~55	白蛋白(g/L)	31.0	23.0~35.0
血红蛋白浓度(g/dL)	15	12~18	肌酐(μmol/L)	87	50~180
血小板(个/μL)	446	200~900	尿素(mmol/L)	8	6~11

2.2 麻醉与保定

术前禁食 8 h、禁水 6 h, 术前给予阿托品(4 mg/kg.bw) 皮下注射, 15 min 后采用丙泊酚诱导麻醉, 待犬麻醉后, 术中连接异氟烷呼吸麻醉剂, 实时监测麻醉状态。将犬侧卧保定在手术台上^[2]。

2.3 手术过程

2.3.1 手术器械 手术刀柄、刀片、止血钳、持针钳、组织钳、手术剪、丝线、羊肠线、三菱针、圆针、持骨钳、电钻、骨钻、骨凿、切割机、髓内针和不锈钢丝等。

2.3.2 切口定位 参照 X 射线光片, 对骨折位置进行定位, 在骨折处股骨外侧做合适的切口, 大小 6 cm 左右。

左腿股骨处剃毛, 新洁尔灭清洗, 5%碘伏消毒, 5 min 后酒精脱碘。消毒后用消毒巾包裹趾关节以下部位, 用胶带缠绕固定, 并用手术洞巾对术部进行隔离。沿股骨外轮廓的弯曲和平行股二头肌的前缘切开皮肤及皮下组织, 于股二头肌前缘分离阔筋膜, 向前牵引股外侧肌和阔筋膜, 向后牵引股二头肌, 暴露股骨干, 注意避开动静脉, 见大血管需采取结扎处理, 出现大出血可采取钳夹止血后结扎血管。沿股骨干前后缘分离股直肌和外展肌, 使其充分游离, 检查患部, 清除骨折区的血凝块、挫伤组织和骨碎片, 翘起股骨两断端, 对准并压迫到正常解剖位置。从膝关节滑车处打入髓内针, 使髓内针向股骨头大转子方向打入。翘起股骨两断端, 进行骨折近、远端对抗牵引, 分别向相反方向压迫两断端, 将骨折断端对合后, 再将髓内针顺向打入远端骨髓腔, 使髓内针不遗留在体外, 几乎全部进入髓腔, 直到插入骨髓, 但不能穿出关节面, 只有很少部分遗留在临近关节处的皮下, 使留在骨折断端处的髓内针的长度不影响骨折断端的对合, 用钳剪断滑车处皮肤外翻内针, 用钢锉把髓内针断端磨平, 使髓内针埋在皮下, 采用钢丝将骨折断端固定。接骨完毕后, 甲硝唑清洗创口, 撒

布氨苄西林钠, 间断缝合股二头肌前缘与股外侧直肌后缘, 常规缝合股肌膜、皮下组织和皮肤, 碘伏消毒处理。术后进行 X 光片检查, 固定良好, 结果见图 2。



图 2 术后 X 光片检查结果

2.4 术后护理

术后采用输液治疗, 静脉 0.9%氯化钠配比氨苄西林钠, 甲硝唑, 10%葡萄糖配比 ATP、肌酐、CoA, 5%葡萄糖配比维生素 C、葡萄糖酸钙, 骨肽注射液^[6], 每天 1 次, 连续使用 5 d。

对手术伤口每天进行 2~3 次碘伏涂抹消毒。可佩戴伊丽莎白项圈, 防止患犬舔咬伤口。

术后静养, 5 d 内限制犬只运动, 之后可逐步恢复运动量, 亦可人工对骨折腿部肌肉进行按摩处理, 增加肌肉血液循环, 加快骨骼生长, 促进恢复。日粮可增加维生素 D 和钙、磷的含量, 促进骨骼增长。

该犬只术后经输液、抗感染等综合治疗调养, 病情得到明显改善, 1 个月后基本可以正常行走。

3 讨论

犬骨折以四肢骨多发, 多因外界损伤引起, 即外界直接暴力, 如车辆冲撞、踩踏、轧压、摔碰、锤砸和门挤挫等, 少数病例因奔跑、扭闪、急停等肌肉强烈收缩而造成。另外, 如果犬缺钙, 骨质松脆, 如患佝偻病、骨软症时, 即使外界的作用力不大,

也常能造成病理性骨折^[4]。日常生活中,犬主需要格外注意,外出系好牵引绳,在家不要把爱犬独自放在高处。髓内针固定法在骨折治疗中应用广泛,适用于骨折断端呈锯齿状的横骨折,也适用于斜面不大的锯齿状斜骨折。此法切口小,手术损伤小,并且骨折端供血不受影响。髓内针易于置入与拔出。术后应进行第2次X光检查,以确认手术效果^[7]。在整复和固定骨折断端时,尽量使骨头和骨膜相连,以保证骨折部位血的运输,以便形成的骨痂可以迅速连接骨折断端,最终可促进骨折部位的愈合^[8]。术前检查对于手术参考的重要性应该引起重视,对于动物身体指标异常的个体,应当先通过输液或其他手段将指标调整好后方可进行手术。

参考文献:

- [1] 郝环颖,李纪本,曾健滢,等.犬股骨骨折髓内针内固定实验研究[J].广东畜牧兽医科技,2007,32(4):42-44.
- [2] 侯加法.小动物外科学[M].北京:中国农业出版社,2000.
- [3] 陶鸽,王亨,田志鹏,等.犬肱骨骨折的髓内针固定及术后愈合的影像学观察[J].畜牧与兽医,2011,43(8):103-104.
- [4] 闫海滨,李明峰,闫明,等.犬股骨骨折的诊断与治疗[J].现代畜牧兽医,2010(10):27-30.
- [5] 张敦伟,师志海,胡晓东,等.1例犬股骨远端髓内T型骨折的内固定治疗[J].黑龙江畜牧兽医,2016(12):119-120.
- [6] 白永平,彭广能,钟志军,等.小型犬胫腓骨骨折髓内针内固定术[J].中国兽医杂志,2008,44(2):60-61.
- [7] 徐国庆,D.V.M.犬猫骨折与手术[J].养犬,2011(1):22-26.
- [8] 曹杰,王春璇.实验性犬股骨骨折内固定术[J].中国兽医杂志,2004,40(10):43.

2016 年国家促进畜牧业发展支持政策(摘录部分)

生猪(牛羊)调出大县奖励政策

生猪(牛羊)调出大县奖励资金包括生猪调出大县奖励资金、牛羊调出大县资金和省级统筹奖励资金三个部分。生猪(牛羊)调出大县奖励资金按因素法分配到县,分配因素包括过去三年年均生猪(牛羊)调出量、出栏量和存栏量,因素权重分别为50%、25%、25%,奖励资金对生猪调出大县前500名、牛羊调出大县前100名给予支持。奖励资金由县级人民政府统筹安排用于支持本县生猪(牛羊)生产流通和产业发展,支持范围包括:生猪(牛羊)生产环节的圈舍改造、良种引进、污粪处理、防疫、保险、牛羊饲草料基地建设,以及流通加工环节的冷链物流、仓储、加工设施设备等方面的支出。省级统筹奖励资金按因素法切块到省(区、市),分配因素包括各省(区、市)生猪(牛羊)生产量、消费量等。统筹奖励资金由省级人民政府统筹安排用于支持本省(区、市)生猪(牛羊)生产流通和产业发展。2016年继续实施生猪(牛羊)调出大县奖励政策。

“粮改饲”支持政策

2015年,国家启动实施“粮改饲”试点工作,中央财政投入资金3亿元,在河北、山西、内蒙古、辽宁、吉林、黑龙江、陕西、甘肃、宁夏和青海10省区,选择30个牛羊养殖基础好、玉米种植面积较大的县开展以全株青贮玉米收储为主的粮改饲试点工作。2016年,国家将继续实施粮改饲试点项目,并进一步增加资金投入,扩大实施范围。

畜牧良种补贴政策

从2005年开始,国家实施畜牧良种补贴政策。2015年投入畜牧良种补贴资金12亿元,主要用于对项目省养殖场(户)购买优质种猪(牛)精液或者种公羊、牦牛种公牛给予价格补贴。生猪良种补贴标准为每头能繁母猪40元;肉牛良种补贴标准为每头能繁母牛10元;羊良种补贴标准为每只种公羊800元;牦牛种公牛补贴标准为每头种公牛2000元。奶牛良种补贴标准为荷斯坦牛、娟姗牛、奶水牛每头能繁母牛30元,其他品种每头能繁母牛20元,并开展优质荷斯坦种用胚胎引进补贴试点,每枚补贴标准5000元。2016年国家继续实施畜牧良种补贴政策。

畜牧标准化规模养殖支持政策

2015年,中央财政共投入资金13亿元支持发展畜禽标准化规模养殖。其中,中央财政安排10亿元支持奶牛标准化规模养殖小区(场)建设,安排3亿元支持内蒙古、四川、西藏、甘肃、青海、宁夏、新疆以及新疆生产建设兵团肉牛羊肉标准化规模养殖场(小区)建设。支持资金主要用于养殖场(小区)

(下转第25页)

2 型猪链球菌分离鉴定及毒力基因检测

黎 敏

(佛山市禅城区农产品质量安全监督检测中心, 广东 佛山 528000)

摘 要: 猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) 是一种重要的人畜共患病病原体, 对养猪业和公共卫生构成严重威胁。从广东省某猪场发生急性死亡、伴有神经症状的病猪脑组织样品中分离到 2 株细菌, 经培养特性观察、镜检、生化鉴定和 PCR 检测, 确定为具有强毒力分子特征的 2 型链球菌, 其毒力因子基因型均为: cps2J+/mrp+/sly+/epf+/fbps+/orf+/gapdh+/gdh+。

关键词: 2 型猪链球菌; 分离鉴定; 毒力基因

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文献编号: 1005-8567(2016)03-0018-03

Isolation and Identification of *Streptococcus Suis*2 and Virulence Genes Test

LI Min

(Foshan Chancheng Agricultural Products Quality and Safety Supervision and Testing Center,
Foshan 528000, China)

Abstract: *Streptococcus suis* is an important zoonosis pathogene, which poses a serious threat to pig industry and public sanitation. By culture character observation, microscopic examination, biochemical identification and PCR test, 2 strains from brain tissue samples of diseased pigs which were of acute death with neurological sign in a pig farm in Guangdong Province, are identified as *Streptococcus suis*2 with virulent molecular features, whose virulence genotype are cps2J+/mrp+/sly+/epf+/fbps+/orf2+/gapdh+/gdh+.

Key words: *Streptococcus suis*2; Isolation and Identification; virulence genes

猪链球菌 (*Streptococcus suis*, SS) 是一种重要的人畜共患病病原体, 可引起脑膜炎、化脓性多发性关节炎、心内膜炎、纤维素性胸腹炎、淋巴结脓肿、败血症等, 也可导致生猪从业人员感染和死亡, 该菌对养猪业和公共卫生构成严重威胁^[1]。

猪链球菌以致病菌或共栖菌的方式在动物体内存在, 常造成内源性、条件性及继发性感染^[2]。猪链球菌主要通过呼吸道或受损皮肤和粘膜侵入机体导致感染, 可分为超急性、急性、亚急性及慢性感染。各品种、年龄、性别的猪均易感, 春夏季多发。

按荚膜多糖抗原的不同, 猪链球菌可分成 35 个血清型, 即 1~34 型和同时含有 1 型和 2 型抗

原的 1/2 型, 其中 1 型、2 型、7 型、9 型是猪的主要致病菌, 毒力最强的依次为 2 型、1 型、9 型和 7 型, 世界范围内以 2 型流行最广, 致病性最强。感染人的主要是 2 型^[3], 江苏省(1998 年)、四川(2005 年)等地发生的 SS2 感染人事件引起了人们的高度重视^[4]。

我们从广东一个 400 头母猪规模的猪场保育舍分离到 2 株疑似猪链球菌, 经过细菌形态学观察、生化鉴定和毒力基因检测, 证实为 2 型链球菌, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 病料采集

广东四会一个 400 头母猪规模猪场的保育舍

收稿日期: 2016-05-13

作者简介: 黎敏(1980-), 女, 本科, 兽医师, E-mail: 99193824@qq.com

发生仔猪急性死亡、伴有中枢神经征状,剖检呈全身败血症、脑膜充血、腹腔有纤维素渗出。采集未经抗菌药物治疗的病死猪心脏、肝脏、脾脏、肺脏、脑、淋巴结等病料,用于细菌分离鉴定。

1.2 主要试剂

小牛血清,购于吉泰生物科技有限公司;rTaq

酶、dNTP、DL2000 DNA Markers, 购于 TaKaRa 公司。

1.3 引物设计与合成

参考相关文献^[5],合成 cps2J、cps7H、cps9D、gdh、gadph、orf2、mrp、epf、sly、fbps 等 10 对引物(表 1),由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 1 毒力因子扩增用引物

毒力因子	引物序列(5'→3')	退火温度(℃)	目的片段大小(bp)
cps2J-P2d	TATAAAGTTTGCAACAAGGGCTA	56	387
cps7H- P7u	AGCTCTAACACGAAATAAGGC	56	251
cps9D- P9d	CATCCATTTCACACG	56	507
gdh- Pg2	CCATGGACAGATAA AGATGG	56	688
gadph- Ph2	CCACCGAAGCCAAGAGGT	56	571
orf2- Po2	ATCCAGTTGACACGTGCA	56	858
mrp- Pm1	CAGATGTGGACCGTAGACC	56	318
epf- Pe2	TGGATCAACCACTGGTGTAC	56	626
sly- Ps1	GCAGAAGGGACAACCTGTAGAAG	56	443
fbps- Pf2	CCCGTCTGTTGCCAAGTAA	56	720

1.4 细菌分离培养及鉴定

将无菌采集的病料划线接种于含小牛血清的琼脂培养基,37℃恒温培养 24 h 后观察,挑取单菌落接种于含小牛血清营养肉汤培养基,经 37℃振荡培养过夜后进行镜检及生化试验。

1.5 毒力基因检测

1.5.1 细菌基因组 DNA 抽提 用煮沸法^[6]提取细菌基因组 DNA:7000 r/min 离心过夜培养菌液,密封后置于沸水中煮沸 10 min,冰浴后 4000 r/min 离心取上清液做 PCR 反应的模板。

1.5.2 PCR 反应及电泳检测 PCR 按常规方法进行,并设空白对照。PCR 扩增体系(25 μL)如下: TaKaRaTaq™ DNA 聚合酶 0.25 μL, 10×PCR Buffer (Mg²⁺ Plus)2.5 μL,2.5 mmol/L each dNTP Mixture 2.0 μL, 上、下游引物(20 pmol/μL)0.5 μL。混匀后,在 PCR 仪上执行如下反应程序:94℃ 4 min;94℃ 1 min、56℃ 45 s、72℃ 45 s,35 个循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶(含 EB 0.5 μg/mL)进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 细菌分离鉴定

37℃培养 24 h 后观察,菌落呈针尖大小、灰

白色、半透明、表面光滑、圆形、边缘整齐;涂片镜检结果为革兰氏阳性链状排列的球菌(图 1)。



图 1 涂片镜检结果(1000×)

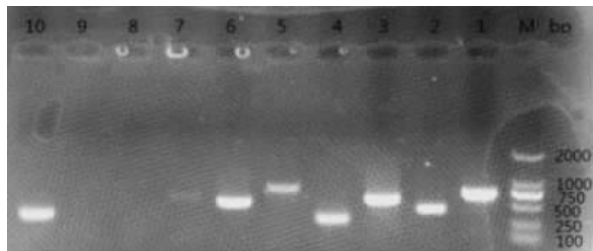
2.2 生化鉴定结果

生化鉴定结果表明,该菌可以发酵葡萄糖、甘露糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖,在高盐培养基、pH 9.5 条件下不生长。

2.3 毒力基因检测结果

经 PCR 检测,2 株细菌均能扩增 cps2J、准确鉴定。此外,还可利用菌体凝集试验进行血清学分型。本次实验采用 PCR 方法检测了 2 型、7 型、9 型荚膜抗原基因,其结果表明,2 株分离菌均为 2 型链球菌。

gdh、mrp、epf、sly、fbps、gadph 和 orf2 基因, cps9D、9cps7H 基因扩增结果呈阴性(图 2)。试验结果确定这 2 株细菌为 2 型猪链球菌。



1. fbps, 2. sly, 3. epf, 4. mrp, 5. orf2, 6. gapdh, 7. gdh, 8. cps9D, 9cps7H, 10. cps2J

M. DL2000 DNA Markers

图 2 分离菌株 PCR 检测结果

3 结论与讨论

猪链球菌主要毒力基因包括荚膜多糖合成酶(cps)、谷氨酸脱氢酶(gdh)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(gapdh)、毒力相关序列(orf2)、溶菌酶释放蛋白(mrp)、胞外因子(epf)、溶血素(sly)、纤粘连蛋白/纤粘连蛋白结合蛋白(fbps), 其中 mrp、epf 和 sly 已被证明是强毒株的标志^[7]。血清型可根据 cps 的差异进行 PCR 区别, gdh 则具有高保守低突变率的特点, 可作为检测猪链球菌的重要抗原^[5]。

特异性强、敏感度高的 PCR 方法可在临床上对猪链球菌进行致病性血清型准确定型, 其中 cps 的抗原性差异决定了猪链球菌的侵袭力, 也是猪链球菌血清分型的依据。Smith 等^[8]通过对大量不同血清型的 cps 基因序列比对, 发现 SS2 的 cps 某些序列存在特异性^[4], 再经过 PCR 检测即可

根据 SS2 的 cps 特异性而准确鉴定。此外, 还可用菌体凝集试验进行血清学分型。本次实验采用 PCR 方法检测了 2 型、7 型、9 型荚膜抗原基因, 结果表明, 2 株分离菌均为 2 型链球菌。

本次分离的 2 株细菌毒力基因型均为: cps2J+/mrp+/sly+/epf+/fbps+/orf2+/gapdh+/gdh+, 临床表现为急性脑膜炎, 发病率达 20%, 同时其具有强毒力分子特征, 给猪场造成严重损失, 应引起养猪业和公共卫生方面的高度重视。

参考文献:

- [1] Staats J J, Feder I, Okwumabua Q, et al. Streptococcus suis: past and present[J]. Vet Res Commun, 1997, 21(6): 381-407.
- [2] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 第 5 版. 北京: 中国农业出版社, 2006: 157-158.
- [3] Beineke A, Bennecke K, Neis C, et al. Comparative evaluation of virulence and pathology of Streptococcus suis serotypes 2 and 9 in experimentally infected growers[J]. Vet Microbiol, 2008, 128(3-4): 423-430.
- [4] 王君玮, 王志亮, 赵永刚, 等. 猪链球菌 2 型四川分离株猪体回归试验[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(5): 508-511.
- [5] 郑升博, 华修国, 陆伟芳, 等. 多重 PCR 方法检测猪链球菌主要致病血清型及其毒力因子[J]. 上海交通大学学报, 2010, 28(1): 53-58.
- [6] Marois C, Bougeard S, Gottschalk M, et al. Multiplex PCR assay for detection of Streptococcus suis species and serotypes 2 and 1/2 in tonsils of and dead pigs[J]. J Clinical Microbiol, 2004, 42(7): 3169-3175.
- [7] Smith H E, Buijs H, Wisselink H J, et al. Selection of virulence-associated determinants of Streptococcus suis serotype 2 by in vivo complementation[J]. Infect Immun, 2001, 69(3): 1961-1966.
- [8] Smith H E, Veenbergen V, van der Velde J, et al. The cps genes of Streptococcus suis serotypes 1, 2, and 9: development of rapid serotype-specific PCR assays[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(10): 3146-52.

猪瘟病毒四川分离株 E2 基因克隆及生物信息学分析

李 琰, 谢 晶, 王秋实, 李江凌, 廖党金, 曹 冶, 李兴玉, 罗丹丹
(四川省畜牧科学研究院, 四川 成都 610066)

摘要: 利用 GenBank 登录的猪瘟病毒 (CSFV) 参考株 (登录号: NC_009089.1) 的 E2 基因序列设计特异性引物, PK-15 细胞培养增殖 CSFV 四川分离株提取 RNA, 采用 RT-PCR 技术扩增 CSFV 疫苗株 E2 基因, 将 PCR 扩增产物克隆入 Pet-32a-BL21 载体构建重组质粒 pPet-32a-E2, 并进行测序鉴定。测序结果显示, 构建的 Pet-32a-E2 质粒含有 1 个开放阅读框 (ORF), 全长 1119 bp, 共编码 373 个氨基酸, 与 GenBank 登录的 CSFV 参考株 NC_009089.1 的 E2 蛋白的核苷酸同源性为 98.8%, 氨基酸同源性为 98.9%; 与石门株兔化弱毒 E2 蛋白株的核苷酸同源性为 94.4%, 氨基酸同源性为 93.9%。对 E2 基因及其编码蛋白进行生物信息学分析, 结果显示, E2 蛋白分子质量为 41.6 ku, 等电点 PI 为 5.72, 是弱酸性蛋白; E2 蛋白不含信号肽序列, 为可溶性蛋白, 有跨膜区, 主要定位于细胞质内。通过生物信息学分析预测, 为后期 CSFV E2 蛋白表达, 开展蛋白功能研究奠定了基础。

关键词: 猪瘟病毒; E2 基因; 生物信息学分析

中图分类号: S852.651

文献标识码: A

文献编号: 1005-8567(2016)03-0021-05

Cloning and Bioinformatics Analysis of E2 Gene of Classical Swine Fever Virus Isolated from Sichuan Strain

LI Yan, XIE Jing, WANG Qiushi, LI Jiangling, LIAO Dangjin, CAO Ye, LI Xingyu, LUO Dandan
(Sichuan Academy of Animal Science, Chengdu 610066, China)

Abstract: According to the referred CSFV strain from GenBank, the primers of E2 gene were designed, and the total RNA was extracted from CSFV isolated in Sichuan Province which was cultured with PK-15 cells. And then, the E2 was amplified by RT-PCR and the products were inserted into the Pet-32a-BL21 vector to construct a new plasmid, Pet-32a-E2, which was confirmed by sequencing. The results indicated that there was an ORF in Pet-32a-E2, with total 1119 base pairs coding 337 amino acids. The nucleotide homologies of the E2 sequences in constructed plasmid were 98.8% and 94.4% compared with the referred CSFV strain NC_009089.1 and the SHIMEN strain respectively, while the amino acids homologies were 98.9% and 93.9%, respectively. The results of the bioinformatics analysis showed that the molecular weight of E2 was 41.6 ku, the isoelectric point was 5.72, and E2 was faintly acid. Moreover, E2 protein didn't contain the signal peptides, and was solvable, with transmembrane domain and mainly in cytoplasm. Based on the bioinformatics analysis and prediction, the foundations for future researches of the function of E2 were carried out.

Key words: classical swine fever virus; E2 gene; bioinformatics analysis

猪瘟 (CSF) 是由猪瘟病毒 (CSFV) 引起的一种严重的猪传染病, 具有高度接触传染性, 流行广泛, 高死亡率, 不同品种、不同年龄的猪都可能发

生。这些特点, 让 CSFV 成为我国养猪业最主要的病源之一。猪瘟被世界动物卫生组织 (OIE) 列入需要申报的动物传染病名录, 我国农业部将其列为

收稿日期: 2016-05-20

基金项目: 四川省畜牧科学研究院基本科研业务费专项 (SASA2013A04); 四川生猪现代产业技术体系疫病控制岗位专项

作者简介: 李琰 (1983-), 女, 硕士, 助理研究员, E-mail: 33259706@qq.com

通讯作者: 王秋实 (1985-), 男, 本科, 助理研究员, E-mail: podleader@163.com

传染病^[1]。该病临床特征为发病猪高热稽留和小血管变性导致组织器官多发性出血、坏死和梗死。当前猪瘟在我国还很普遍,其发病状况呈多样性,典型猪瘟与非典型猪瘟共存,持续感染与隐性感染共存,免疫耐受与带毒综合征共存,给猪瘟的免疫预防和控制本病的发生带来困难^[2]。

CSFV 属于黄病毒科瘟病毒属,是一个长约 12.3~12.5 kb 的单股正链线性 RNA。CSFV 有一个大的开放阅读框,编码 3898 个氨基酸,在病毒自身及宿主细胞编码的蛋白酶水解作用下裂解为 12 种病毒特异性蛋白质,自 N 端到 C 端依次为: Npro、C、Erns (E0)、E1、E2、p7、NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B。只有 Erns、E1、E2 为囊膜结构(糖)蛋白,其他都是非结构蛋白^[2-3]。猪感染 CSFV 后,蛋白 Erns、E2 及非结构蛋白 NS3 会激发猪免疫系统产生相应的抗体。其中,结构蛋白中的 E2 会诱导机体产生中和抗体,并激发免疫应答的主要抗原蛋白。因此,E2 既是研究 CSFV 的新型疫苗的主要基因,也是建立血清学检测方法的首选^[4-5]。本研究对 CSFV 四川分离株的 E2 蛋白基因进行克隆,利用生物信息学分析预测其结构特点,为 CSFV E2 蛋白表达及功能研究做好准备。

1 材料与方法

1.1 试验材料

载体 Pet-32a-BL21 和 DH5 α 感受态细胞由动物遗传育种四川省重点实验室制备保存;PK-15 细胞和 CSFV 四川分离株由四川农业大学生物技术中心提供。

T4 DNA 连接酶和 A-attachment Mix 均购自东洋纺(上海)生物科技有限公司;质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;RT-PCR 试剂盒购自 TIANGEN 公司;DMEM 培养基购自 GIBICO 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计与合成 综合使用引物设计软件 oligo7、primer,在线参考 NCBI Primer-BLAST 设计引物。根据 GenBank 中登录的 CSFV 参考株(登录号:NC_009089.1)的基因序列,设计 1 对扩增引物。引物序列为 P1:5'-AATATGTGTGTGTTAGACCA GATTG-3',P2: 5' -GGGTTGCCACTGTGATCACC-3',引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

1.2.2 病毒培养 按细胞常规培养方法^[6]培养 PK15 细胞,接种 CSFV 四川分离株,培养 72 h 后,弃去上清,收获细胞,提取总 RNA。

1.2.3 CSFV E2 基因扩增 CSFV E2 基因 cDNA 的合成按照 RT-PCR 试剂盒说明书操作。采用上下游引物 P1、P2 进行扩增,PCR 反应体系 25 μ L。

PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s、62 $^{\circ}$ C 退火 45 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 80 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物使用 1%琼脂糖凝胶电泳,分析扩增结果。

1.2.4 CSFV E2 基因克隆及测序 A-attachment Mix 与 RT-PCR 扩增产物以 1:9 混合,在 60 $^{\circ}$ C 条件下进行 A 尾反应。反应结束后,按照 10 μ L 体系、1 μ L 载体、3 μ L 反应产物、1 μ L T4 DNA 连接酶、5 μ L 2 \times Buffer 混匀,16 $^{\circ}$ C 作用 30 min,进行 DH5 α 感受态细胞转化。将转入载体后的感受态细胞,在含有 Amp 50 μ g/mL 的 LB 平板上培养,37 $^{\circ}$ C 温箱培养 12~16 h。挑单个菌落进入 LB 培养管中,进行 PCR 扩增验证。将鉴定为阳性的菌落送上海英俊生物技术有限公司测序。

1.2.5 CSFV E2 基因翻译及生物信息学分析 使用 DNASTar 软件将 CSFV E2 蛋白测基因序结果翻译为氨基酸序列,应用 ProtParam 和 SOPMA 软件在线分析 E2 蛋白的基本理化性质和二级结构;应用在线预测软件 Scansite 对 E2 蛋白磷酸化结合位点和结构域进行预测;应用 Sigfind 软件对氨基酸序列信号肽进行在线预测;应用 TMHMM、PSORT 软件对 E2 蛋白的跨膜区、亚细胞定位进行预测分析^[7-9]。

1.2.6 E2 蛋白系统进化树构建 E2 蛋白的核心功能区在 CSFV 中具有一定的保守性,应用 DNASTar 软件,比对分析测序所得 CSFV E2 蛋白的核心功能区基因编码氨基酸与其他亚种的猪瘟病毒 E2 蛋白氨基酸(表 1)的同源性,绘制系统进化树。

表 1 猪瘟病常见亚种 E2 蛋白

病毒编号	氨基酸长度	病毒编号	氨基酸长度
AY578688 美国	380	AY575657	370
J04358 ALFOR	364	M31768	369
AF092448 石门	374	D49533 日本	364
AY382481 北京大学	373	AF333000 北京大学	369
AY805221 哈尔滨	373	四川分离株	374

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增结果 以 CSFV 四川分离株基因组 RNA 为模板,使用 P1、P2 上下游引物扩增

CSFV E2 基因,电泳结果见图 1。在 1669 bp 处出现特异性条带,与预期结果相符。

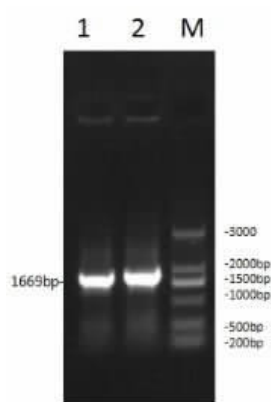


图 1 E2 基因 PCR 扩增结果

E2 基因测序及结果比对分析说明,目的片段包含 E2 基因完整编码区,构建的 Pet-32a-E2 质粒含有 1 个完整的开放阅读框,全长 1119 bp,编码 373 个氨基酸,与 GenBank 登录的 CSFV 参考株 NC_009089.1 的 E2 蛋白的核苷酸同源性为 98.8%,氨基酸同源性为 98.9%;与石门株兔化弱毒 E2 蛋白株的核苷酸同源性为 94.4%,氨基酸同源性为 93.9%。

2.2 E2 蛋白的生物信息学分析

2.2.1 E2 蛋白二级结构 应用 ProtParam 软件预测 E2 蛋白的一级结构。预测结果显示,E2 蛋白分子质量为 41.6 ku,共编码 373 个氨基酸,等电点 PI 为 5.72,是弱酸性蛋白;蛋白不稳定系数为 38.84,属稳定蛋白;蛋白疏水系数为 -0.0124,为可溶性蛋白。优势氨基酸为 Thr (34,9.1%)、Leu (34,9.1%)、Lys (20,5.4%)、Cys (15,4.1%)、Gly (32,8.6%) 及 Asp (22,5.9%)。应用 SOPMA 软件预测 CSFV E2 蛋白的二级结构,对分子内氢键维系的局部空间排列进行分析,结果显示 E2 蛋白中 79 个氨基酸组成 α -螺旋,占 21.18%;118 个氨基酸构成延伸链,占 31.64%;38 个氨基酸构成 β -折叠,占 10.19%;138 个氨基酸构成无规卷曲,占 37.00%。

2.2.2 E2 蛋白磷酸化结合位点和结构域 应用 Scansite 软件在线分析,对蛋白底物结合模序进行预测,结果(图 2)表明,E2 蛋白含有丝/苏氨酸激酶底物模序和 4 个磷酸化结合位点(T87、T145、S249、T332)。蛋白主要的抗原结构域为 A (766~866)、B (690~733)、C (690~800)、D (766~800) 4

个抗原区。

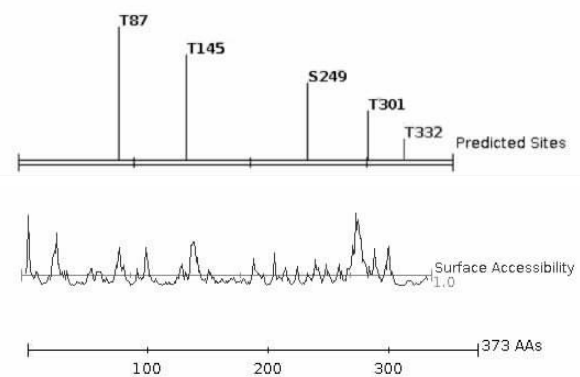


图 2 E2 蛋白底物结合模序预测结果

2.2.3 E2 蛋白信号肽预测 应用在线 Sigfind 软件进行信号肽预测分析,结果显示该蛋白不含信号肽序列。

2.2.4 E2 蛋白跨膜区、亚细胞定位 应用 TMHMM 软件分析,结果显示 E2 蛋白可能是可溶性蛋白,在 -COOH 端可能有跨膜区存在。应用 PSORT II 在线软件预测亚细胞定位,结果显示,E2 蛋白在细胞核、高尔基体、细胞质、线粒体、液泡的分部,分别占 22%、11%、44.4%、22%和 11%,说明 E2 蛋白在细胞中主要存在于细胞质中,介导病毒感染。

2.3 E2 蛋白的系统进化树

猪瘟疫病毒四川分离株 E2 基因编码蛋白与其他亚种猪瘟疫病毒 E2 蛋白的系统进化树见图 3。由图 3 可知,本研究扩增获取的四川分离株 CSFV E2 基因编码蛋白与不同亚种之间的关系,其中与 AY382481、AY805221 株的同源性最接近。

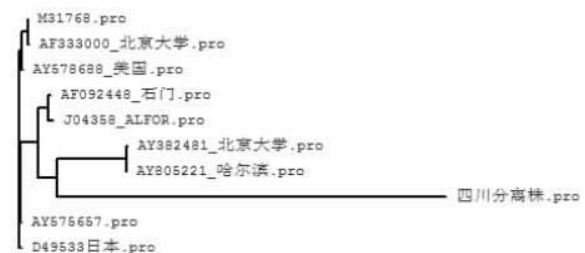


图 3 猪瘟疫病毒四川分离株 E2 基因编码蛋白与其他亚种猪瘟疫病毒 E2 蛋白的系统进化树

3 结论与讨论

CSFV E2 蛋白是猪瘟疫病毒主要保护性抗原蛋白。对该蛋白结构及功能研究表明,其功能发挥主要集中在抗原结构域和糖基化位点上。E2 蛋白具

有 4 个抗原结构域和 5 个潜在糖基化位点, 这些位点决定了猪瘟病毒的易感性。因此, CSFV E2 蛋白在对猪瘟病毒入侵、诱导保护性免疫反应方面发挥十分重要的作用。

猪瘟病毒 E2 蛋白在其 690~866 氨基酸序列之间拥有 4 个抗原区域, 一般称为 A、B、C、D 区。A、D 抗原区处于 B、C 抗原区的 -COOH 端。A 区又可分为 A1、A2、A3 等 3 个抗原亚区。研究表明, 在这 6 个抗原区中, 只有 A1、A2 区为保守区, 其他都是非保守区。抗 A1 亚区的单抗可以分别与抗 B、C 区的单抗起协同中和作用。在 E2 蛋白的 N 端有 6 个半胱氨酸残基 (Cys), 它们决定着抗原的空间结构, 是单抗结合各抗原区所必需的。两个抗原结构靠一个链内疏水序列连接, 这种序列和上述 6 个半胱氨酸残基在瘟病毒中都非常保守, 由此推断 E2 蛋白的空间结构在瘟病毒中也非常保守^[10]。B 抗原区和 C 抗原区, A 抗原区和 D 抗原区可能形成两个独立结构, 而这些结构中都含有构象依赖型的独立中和性表位。这一表位在瘟病毒属的 3 个不同成员中也是高度保守的。

CSFV E2 蛋白是 CSFV 中变异率最高的区域, 也是主要的协同中和性抗原域, 是使机体产生中和抗体的主要区域。这些特点使 CSFV E2 蛋白成为研究 CSFV 新型疫苗的主要对象、CSFV 血清型检测方法的首选抗原。Lin 等^[11]通过缺失分析确定了 E2 蛋白上的另一个线性表位 TAVSPTTLR, 其在 E2 蛋白上的位置位于氨基酸序列 829~837 之间, 并且这一序列在 CSFV 毒株中是极其保守的。但是, 其在 BVDV 和 BDV 毒株中差异极大, 这为设计含有该表位的肽并将其应用于 CSFV 的检测和鉴定提供了重要依据。此外, 研究还确定了与 CSFV 感染猪多克隆 IgG 结合的最小的 E2 抗原区域, 该抗原区域位于 E2 N 端 123 个氨基酸序列内 (氨基酸序列 690~812)。研究表明, 这一区域能消除或减少同其他瘟病毒的交叉反应, 这样就能够有效地用在 CSFV 的血清型检测方面^[12-13]。

本研究通过体外增殖 CSFV 分离株病毒, 利用 RT-PCR 技术获取到了 CSFV 四川分离株的 E2 基因序列, 将 PCR 扩增产物克隆入 Pet-32a-BL21 载体, 获得构建重组质粒。通过基因比对测序, 确定我们成功构建了含有 CSFV E2 基因的重组质粒 pTA2-32a-E2, 通过生物信息学分析, 确定 CSFV 四川分离株病毒体外培养没有出现弱毒株的突

变; CSFV 四川分离株病毒 E2 蛋白与 GenBank 参考株同源性达到 98.8%, 其蛋白结构和分子质量也符合预期。基因进化树分析显示, 与我国常见的登记 CSFV E2 蛋白相似。此外, 本研究对 E2 蛋白进行生物信息学分析发现, CSFV 蛋白以可溶蛋白的形式存在于感染细胞质中, 进一步研究发现其在 -COOH 端有一段跨膜区域, 且无信号肽, 这与其他研究结果一致^[14-15]。

经 E2 蛋白密码子偏爱性分析^[16], 酵母等真核表达系统比原核表达具有更大的优势, 应为 E2 基因体外表达的首选。徐学清^[17]将 CSFV E2 蛋白的 B、C 载体插入到重组质粒中, 在酵母中获得了成功的表达。这些研究为后续的亚单位疫苗或诊断抗原研究打下了坚实的基础。

参考文献:

- [1] 翁善钢. 猪瘟的流行史和现状[J]. 中国猪业, 2011 (3): 36-37.
- [2] 吴金. 猪瘟疫苗的生产研发与应用[J]. 兽医导刊, 2009 (21): 26-26.
- [3] 韩国全, 郭万柱, 林华, 等. 猪瘟病毒四川分离株 E2 基因的分子克隆、原核表达及免疫学活性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37 (3): 65-67.
- [4] 张富强, 李志华, 张念祖. 猪瘟病毒囊膜结构(糖)蛋白 Erns 和 E2 的生物学特性研究[J]. 中国预防兽医学报, 2005, 27 (6): 465-468.
- [5] Gennip H G, Bouma A, van Rijn P A, et al. Experimental non-transmissible marker vaccines for classical swine fever (CSF) by trans-complementation of Erns or E2 of CSFV[J]. Vaccine, 2002, 20 (11-12): 1544-1556.
- [6] 涂长春, 李红卫, 金扩世, 等. 猪瘟病毒石门株特异 cDNA 片段的扩增与序列分析[J]. 病毒学报, 1994, 10: 33-38.
- [7] 李红卫, 涂长春, 金扩世, 等. 猪瘟病毒兔化弱毒株 5' 端调控序列及 P23 基因的扩增与克隆[J]. 中国兽医学报, 1995, 15: 320-323.
- [8] 刘思国, 马刚, 余兴龙, 等. 猪瘟病毒 E2 糖蛋白抗原表位的预测、多肽合成及特性研究[J]. 中国免疫学杂志, 2004, 20 (7): 448-450.
- [9] 余兴龙, 涂长春, 李红卫, 等. 猪瘟病毒 E2 基因真核表达质粒的构建及基因疫苗的研究[J]. 中国病毒学, 2000, 15 (3): 264-271.
- [10] 宁红梅, 葛亚明, 岳锋, 等. 猪瘟病毒囊膜糖蛋白 E2 研究进展[J]. 江苏农业科学, 2010 (6): 341-342.
- [11] Lin M, Lin F, Mallory, et al. Deletions of structural glycoprotein E2 of classical swine fever virus strain Alfort/187 resolve a linear epitope of monoclonal antibody WH303 and the minimal N-terminal domain essential for binding immunoglobulin G antibodies of a pig hyperimmune serum[J]. J Virol, 2000, 74 (24): 619-611, 625.

- [12] Yu M, Wang L F, Shiell B J, et al. Fine mapping of a C-terminal linear epitope highly conserved among the major envelope glycoprotein E2 (gp51 to gp54) of different pestiviruses [J]. Journal of virology, 1996, 222(1):289-292.
- [13] Chen N, Hu H, Zhang Z, et al. Genetic diversity of the envelope glycoprotein E2 of classical swine fever virus; recent isolates branched away from historical and vaccine strains [J]. Vet Microbiol, 2008, 127(3-4):286-299.
- [14] Sanchez O, Barrera M, Rodriguez M P, et al. Classical swine fever virus E2 glycoprotein antigen produced in adenovirally transduced PK-15 cells confers complete protection in pigs upon viral [J]. Vaccine, 2008, 26(7):988-997.
- [15] Tang F, Pan Z, Zhang C. The selection pressure analysis of classical swine fever virus envelope protein genes Erns and E2 [J]. Virus Res, 2008, 131(2):132-135.
- [16] 罗丹丹, 曹治, 谢晶, 等. 猪瘟疫病毒 E2 基因密码子偏爱性分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(12):54-55.
- [17] 徐学清. 猪瘟疫病毒 E2 囊膜糖蛋白主要抗原区基因在巴斯德毕赤酵母中的表达和初步应用 [D]. 南京: 南京农业大学, 2004.

(上接第 17 页)

水电路改造、粪污处理、防疫、挤奶、质量检测等配套设施建设等。2016 年国家继续支持奶牛、肉牛和肉羊的标准化规模养殖。

动物防疫补助政策

我国动物防疫补助政策主要包括 5 个方面: 一是重大动物疫病强制免疫疫苗补助政策。国家对高致病性禽流感、口蹄疫、高致病性猪蓝耳病、猪瘟、小反刍兽疫等动物疫病实行强制免疫政策。强制免疫疫苗由省级财政部门会同省级畜牧兽医行政主管部门统一组织招标采购。上述重大动物疫病强制免疫疫苗经费由中央财政和地方财政按比例分担, 养殖场(户)无需支付疫苗费用。二是动物疫病强制扑杀补助政策。国家对因高致病性禽流感、口蹄疫、高致病性猪蓝耳病、小反刍兽疫发病的动物及同群动物, 布病、结核病阳性奶牛实施强制扑杀。对因上述疫病扑杀畜禽给养殖者造成的损失予以补助, 经费由中央财政、地方财政和养殖场(户)按比例承担。三是基层动物防疫工作补助政策。补助经费主要用于支付村级防疫员从事畜禽强制免疫等基层动物防疫工作的劳务补助。四是养殖环节病死猪无害化处理补助政策。对养殖环节病死猪无害化处理给予每头 80 元的补助, 由中央和地方财政分担, 中央财政对一、二、三类地区分别给予 60 元、50 元、40 元补助, 地方财政分别承担 20 元、30 元、40 元。五是生猪定点屠宰环节病害猪无害化处理补贴政策。对屠宰环节病害猪损失和无害化处理费用予以补贴, 病害猪损失财政补贴标准为每头 800 元, 无害化处理标准为每头 80 元, 补助经费由中央和地方财政共同承担。中央负担部分采取一般转移支付方式定额拨付地方。

种养殖业废弃物资源化利用支持政策

2016 年中央一号文件明确提出继续实施种养殖业废弃物资源化利用。其中第二条是支持养殖业废弃物资源化利用。2015 年, 中央财政安排 1.8 亿元, 在河北、内蒙古、江苏、浙江、山东、河南、湖南、福建、重庆等 9 省(区、市)开展畜禽粪便资源化利用试点项目。资金主要用于对畜禽粪便综合处理利用的主体工程、设备(不包括配套管网及附属设施)及其运行进行补助。通过项目实施, 探索形成能够推广的畜禽粪便等农业农村废弃物综合利用的技术路线和商业化运作模式。2015 年, 中央财政安排 1.4 亿元, 继续实施农业综合开发秸秆养畜项目, 带动全国秸秆饲料化利用 2.2 亿吨。2016 年, 上述项目在调整完善后将继续实施。

农业保险支持政策

目前, 中央财政提供农业保险保费补贴的品种包括种植业、养殖业和森林 3 大类, 共 15 个品种。2015 年, 保监会、财政部、农业部联合下发《关于进一步完善中央财政保费补贴型农业保险产品条款拟定工作的通知》, 推动中央财政保费补贴型农业保险产品创新升级, 在几个方面取得了重大突破。

其中涉及养殖业的主要有三点: 一是扩大保险范围。养殖业保险将疾病、疫病纳入保险范围, 并规定发生高传染性疫病政府实施强制扑杀时, 保险公司应对投保户进行赔偿(赔偿金额可扣除政府扑杀补贴)。二是提高保障水平。要求保险金额覆盖饲养成本, 鼓励开发满足新型经营主体的多层次、高保障产品。三是降低理赔门槛。要求能繁母猪、生猪、奶牛等按头(只)保险的大牲畜保险不得设置绝对免赔。

MTT 法细胞计数中细胞接种量的确定

庄金秋¹, 梅建国^{1,2}, 杨丽梅¹, 莫玲¹, 沈志强¹

(1. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东滨州, 256600;

2. 滨州贝尔凯瑞生物技术有限公司, 山东滨州 256600)

摘要: 在 96 孔细胞培养板中接种不同数量的 CHO 细胞, 经过 48 h 和 120 h 培养后, 采用 MTT 法进行细胞计数, 以观察各孔细胞数量是否超出该法的可检测范围。为确保在经过连续培养 5 d 后各孔细胞数量仍在 MTT 法的测定范围内, 确定出较为合适的细胞接种量非常必要。

关键词: MTT 法; CHO 细胞; 细胞培养; 细胞接种量

中图分类号: Q813.1+1

文献标识码: A

文献编号: 1005-8567(2016)03-0026-03

Determination of the Amount of Cell Inoculation in the Cell Count with MTT Assay Method

ZHUANG Jin qiu¹, MEI Jian guo^{1,2}, YANG Li mei¹, MO Ling¹, SHEN Zhi qiang¹

(1. Shandong Binzhou Animal Science & Veterinary Medicine Academy, Binzhou, 256600, China;

2. Binzhou Bio-carrier Biotechnology Co., Ltd., Binzhou 256600, China)

Abstract: In order to inspecting the detection range of cells, different quantity CHO cells were inoculated into 96-well plate and calculated cell numbers by MTT after 48h and 120h later. It was necessary to determine appropriate inoculum density to ensure the cell count still within the detection range of MTT after continuous culture for five days.

Keywords: MTT assay method; CHO cell; cell culture; amount of cell inoculation

MTT 是一种粉末状化学试剂, 为 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐, 商品名为噻唑蓝, 是一种黄颜色的染料。MTT 法又称 MTT 比色法, 是一种检测细胞存活和生长的方法。其检测原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚(For-mazan)并沉积在细胞中, 而死细胞无此功能。二甲亚砜(DMSO)能溶解细胞中的甲瓚, 用酶标仪测定其光吸收值, 可间接反映活细胞数量。在一定细胞数范围内, MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。该方法已广泛用于一些生物活性因子的活性检测、大规模的抗肿瘤药物筛选、细胞毒性试验以及

肿瘤放射敏感性测定等。但在采用 MTT 法做细胞计数时, 酶标仪的读数有一定的范围, 超过这一范围读数 OD570 值并不准确^[1-3]。而在做单细胞抗体表达量比较时, 如果需连续数天(通常为 120 h)进行抗体表达量测定及细胞计数, 那么随着时间的推移和细胞绝对数量的增加, OD570 值将会超出酶标仪的读数范围, 从而导致测定结果不准确^[4-7]。本试验设计目的正是要解决这一问题。因此, 为使接入 96 孔板中的细胞在经过 120 h 培养后细胞数仍不超过 MTT 法可测定范围, 必须对接入 96 孔板的细胞数进行定量。

1 材料与方法

收稿日期: 2016-04-01

基金项目: 山东省重点研发计划项目(2015GSF121027)

作者简介: 庄金秋(1978-), 女, 兽医硕士, 副研究员, E-mail: zhuangjinqu2003@163.com

1.1 试验材料

CHO 细胞,本院实验室保存,其他主要试剂包括 0.4%台盼兰溶液、MTT (5.0 mg/mL)、培养基 (10%IMDM,不含 MTX)、10%SDS,试验主要仪器包括酶标仪、96 孔细胞培养板、细胞计数板、计数器、盖玻片、移液器等。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养板的制备 (1)取 T25 方瓶 CHO 细胞一瓶,用 Trypsin-EDTA 消化液消化、悬浮后做细胞计数(20×稀释),细胞稀释见表 1,根据表 1 选取细胞稀释总数接近的两组计算标准细胞液浓度。

表 1 细胞稀释情况					
组别	每孔细胞数				细胞总数
1	17	19	19	20	75
2	16	20	12	19	67
3	16	18	11	22	67

标准细胞液浓度 = (67/4+67/4) × 20 × 10⁴/2=3.35×10⁶(cells/mL)。

(2)将上述标准细胞液依次做 3.35×、10×、2×、2×、2.5×稀释,得到的细胞浓度分别为:10⁶、10⁵、5×10⁴、2.5×10⁴、10⁴ cells/mL)。

(3)将 10⁵、5×10⁴、2.5×10⁴、10⁴ cells/mL 各浓度的细胞悬液取 100 μL 分别接入两块 96 孔板中,得到细胞数依次为 10000、5000、2500、1000 共 4 个细胞梯度,每梯度 3 个重复孔。

(4)将接种好细胞的 96 孔板置于 5%CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 48 h 细胞计数 (1)取 T25 方瓶 CHO 细胞一瓶,用 Trypsin-EDTA 消化液消化、悬浮后做细胞计数(10×稀释),细胞稀释见表 2,根据表 2 选取细胞稀释总数接近的两组计算标准细胞液浓度。

表 2 细胞稀释情况记录表					
组别	每孔细胞数				细胞总数
1	33	27	36	42	138
2	36	28	37	31	132
3	37	26	32	26	121

标准细胞液浓度 = (138/4+132/4) × 10 × 10⁴/2=3.375×10⁶(cells/mL)。

(2) 将上述标准细胞悬液依次做 3×、9×、27×、81×、243×及 10×(作内标)稀释,得到的细胞浓度分别为 1.125×10⁶、3.75×10⁵、1.25×10⁵、4.17×10⁴、1.39×10⁴、3.375×10⁵ cells/mL。

(3)取一块 96 孔细胞培养板,将上述浓度梯度的细胞悬液分别接入无细胞孔中(用以绘制标准曲线),每孔 100 μL。并设空白对照 3 孔,每孔 100 μL 培养基。另外,将所有生长 48 h 的细胞去上清,各加 100 μL 培养基。

(4)在所有加样孔中各加 MTT 15 μL,将细胞板置于 5%CO₂ 培养箱中孵育 3 h。

(5)取出孵育好的细胞培养板,在所有加样孔中各加入 100 μL 10%SDS,将细胞板置于 5%CO₂ 培养箱中过夜。

(6)将细胞板置于酶标仪中读取 OD570 值。

1.2.3 120 h 细胞计数 (1)取 T25 方瓶 CHO 细胞一瓶,用 Trypsin-EDTA 消化液消化、悬浮后做细胞计数(20×稀释),细胞稀释见表 3,根据表 3 选取细胞稀释总数接近的两组计算标准细胞液浓度。

表 3 细胞稀释情况记录表					
组别	每孔细胞数				细胞总数
1	19	17	14	23	73
2	9	17	17	12	55
3	16	12	20	18	66

标准细胞液浓度 = (73/4+66/4) × 20 × 10⁴/2=3.475×10⁶(cells/mL)。

(2) 将上述标准细胞悬液依次做 3×、9×、27×、81×、243×及 10×(作内标)稀释,得到的细胞浓度分别为 1.158×10⁶、3.86×10⁵、1.29×10⁵、4.29×10⁴、1.43×10⁴、3.475×10⁵ cells/mL。

(3)~(6)操作方法同 1.2.2 的(3)~(6)。

2 结果与分析

2.1 48 h 细胞计数结果

48 h 细胞计数的 OD570 值与细胞数见表 4,根据细胞数对应的 OD570 值建立 48 h 细胞计数标准曲线与待测样品曲线(图 1),结果能够建立线性方程:y=-0.006+(9.85E-6)x,R²=0.996。

表 4 48 h 细胞计数的 OD570 值与细胞数

组别	标准细胞数或接种细胞数	OD570 值	测得细胞数	误差 (%)
标准曲线	112500	1.101	—	—
	37500	0.370	—	—
	12500	0.111	—	—
	4170	0.039	—	—
	1390	0.005	—	—
内标	33750	0.322	33251	1.5
待测样品	10000	0.605	62019	—
	5000	0.263	27342	—
	2500	0.092	9973	—
	1000	0.086	9303	—

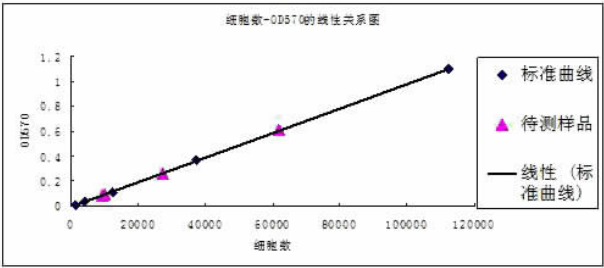


图 1 48 h 细胞计数标准曲线与待测样品曲线

2.2 120 h 细胞计数结果

120 h 细胞计数的 OD570 值与细胞数见表 5, 根据细胞数对应的 OD570 值建立 120 h 细胞计数标准曲线与待测样品曲线(图 2), 结果能够建立线性方程: $y=0.041+(1.3E-5)x$, $R^2=0.996$ 。

表 5 120 h 细胞计数的 OD570 值与细胞数

组别	标准细胞数或接种细胞数	OD570 值	测得细胞数	误差 (%)
标准曲线	115800	1.527	—	—
	38600	0.594	—	—
	12900	0.233	—	—
	4290	0.071	—	—
	1430	0.013	—	—
内标	34750	0.505	35692	—
待测样品	10000	2.142	175539	超过上限115800
	5000	1.399	104459	接近上限115800
	2500	0.563	35944	—
	1000	0.306	18218	—

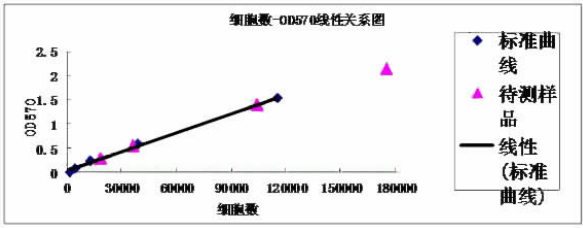


图 2 120 h 细胞计数标准曲线与待测样品曲线

3 讨论

从 48 h 和 120 h MTT 法细胞计数结果来看, 两次做出的标准曲线的相关系数 R^2 均为 0.996, 可见, 代表细胞数的 X 值与代表 OD570 的 Y 值均满足线性相关关系要求^[8-10]。而且, 两条标准曲线设置的内标测量值与真实值非常接近, 可见标准曲线的准确性。因此, 我们可判定两次 MTT 法进行细胞计数的结果是可靠的, 说明各个梯度接种量的培养孔中的细胞经过 48 h 和 120 h 培养后, 运用 MTT 法测得的细胞数与其真实值十分近似。

从实验结果来看, 96 孔板内培养 48 h 后, 所有 4 个梯度接种量的细胞数均未超过 MTT 法的可测范围。而在培养 120 h 后, 接种量为 10000 的细胞数已明显超出范围, 接种量为 5000 的细胞数也十分接近 MTT 法的上限 115800。然而接种量为 2500 的细胞数在 48 h 和 120 h 均在所测范围之内, 因此, 一般来说接种量在 2500~5000 范围内的值均可作为可靠的接种量, 而在本研究中笔者采用 3500 作为适合的接种细胞量。但不同细胞株在特定的培养环境中的生长速度差异较大, 因此选择接种量时, 还应考虑细胞本身以及培养条件等影响因素来综合考查^[11-13]。

参考文献:

[1] 周思朗, 屈艳妮, 张健, 等. SRB 法与 MTT 法细胞计数应用比较[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(17): 2615-2617.

[2] 李红艳, 夏启胜, 徐梅, 等. MTT、MTS、WST-1 在细胞增殖检测中最佳实验条件的研究[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(11): 824-826.

[3] 郑永唐, 贲昆龙. 测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立[J]. 免疫学杂志, 1992, 8(4): 266-269.

[4] 贾熙华, 肖成祖. MTT 比色法在微囊培养动物细胞计数中的应用[J]. 军事医学科学院院刊, 1993, 17(3): 207-211.

[5] 熊建文, 肖化, 张镇西. MTT 法和 CCK-8 法检测细胞活性之测试条件比较[J]. 激光生物学报, 2007, 16(5): 559-562.

猪流行性腹泻病毒 S 基因序列分析

黎 敏

(佛山市禅城区农产品质量安全监督检测中心, 广东 佛山 528000)

摘 要: 根据猪流行性腹泻病毒 S 基因序列设计引物, 应用 RT-PCR 方法从广东省某猪场采集的初生仔猪腹泻样品检测猪流行性腹泻病毒, 并将其克隆测序分析。结果表明, 病料样品中有猪流行性腹泻病毒, S 基因与 KNU-0801、KNU-0901 亲缘关系最近, 处于同一个分支; 与弱毒疫苗株 CV777 的 S 基因亲缘关系较远, 处于另外一个分支。

关键词: 猪流行性腹泻病毒; RT-PCR; S 基因; 序列分析

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文献编号: 1005-8567(2016)03-0029-03

Sequence Analysis of S Gene in Porcine Epidemic Diarrhea Virus

LI Min

(Foshan Chancheng Agricultural Products Quality and Safety Supervision and Testing Center,
Foshan 528000, China)

Abstract: Primers of porcine epidemic diarrhea virus were designed based on the S gene sequence, the intestinal specimens of diarrhea piglets from a pig farm in Guangdong province was tested by RT-PCR to detect porcine epidemic diarrhea virus, and was also cloned, sequenced and analyzed. The result showed that porcine epidemic diarrhea virus exists in the specimens, and S gene is the nearest to KNU-0801 and KNU-0901 which belongs to the same branch, while the S gene in the specimen is distant from the S gene from attenuated vaccine strain CV777, which belongs to different branch.

Key words: porcine epidemic diarrhea virus; RT-PCR; S gene; sequence analysis

猪流行性腹泻 (Porcine Epidemic Diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 引起的一种接触性肠道传染病, 基本特征为: 病猪呕吐、腹泻, 各年龄段的猪均可发生, 哺乳仔猪危害最为严重^[1]。2011 年以来, PED 对我国养猪业造成严重损失, 10 日龄以内的发病仔猪死亡率可高达 80%~100%^[2]。

PEDV 有 4 种结构蛋白: S 蛋白 (spike protein)、sM 蛋白 (small membrane protein)、M 蛋白 (membrane protein) 和 N 蛋白 (Nucleocapsid protein)。其中 S 蛋白是由 1383 个氨基酸组成的纤突糖蛋白, 位于病毒粒子表面^[3], 含有主要的抗原决定簇, 具有很好的免疫原性, 是刺激机体产生保

护性抗体的主要表面抗原, 在机体的抗病毒免疫中起关键作用^[4]。S 蛋白在 PEDV 基因工程疫苗研制、诊断技术研究中备受关注。本试验利用 RT-PCR 方法对采于广东某猪场的初生仔猪严重腹泻样品进行 PEDV 检测, 并对 S 基因序列进行测定分析, 为本病诊断与防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验病料

广东省某猪场初生仔猪发生疑似猪流行性腹泻。采集发病仔猪肠道及肠道内容物, 命名为 GDHZ。

1.2 酶及主要试剂

Trizol 试剂、AMV- 反转录酶购自 TOYOBO 公

收稿日期: 2016-05-10

作者简介: 黎敏 (1980-), 女, 本科, 兽医师, E-mail: 99193824@qq.com

司;Ex Taq DNA 聚合酶、dNTP 和 pMD18-T 载体等购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 胶纯化回收试剂盒、小量质粒纯化试剂盒和 DL2000 DNA Marker 等购自上海华舜生物工程有限公司。

1.3 引物

根据参考文献^[5]设计 PEDV S 基因引物 PS₁、PS₂ 和 PS₃(表 1),预期扩增 3 个相互重叠片段,覆盖 S 基因完整的开放阅读框(ORF)。

表 1 S 基因特异性扩增引物

引物编号	引物序列(5'→3')	位置	退火温度(℃)	目的片段大小(bp)
PS ₁	PS ₁ -F: ATTTGTGGCTTTTCTAATCA	-38~-19nt	56	2107
	PS ₁ -R: GCACCACTAGTGACATTCTT	2050~2069nt		
PS ₂	PS ₂ -F: CTGATTCTGGACAGTTGTTA	2050~2069nt	56	1495
	PS ₂ -R: CCATTAACGCATAAGCCAGC	3499~3518nt		
PS ₃	PS ₃ -F: TGGCTGATCTAGTCTGTGCG	2768~2787nt	56	1441
	PS ₃ -R: CTTGAGACATCTTTGACAA	4189~4208nt		

注:引物位置为猪流行性腹泻病毒 CV777 株 S 基因起始密码子 ATG 前的记为“-”。

1.4 S 基因克隆和序列分析

参照 Trizol 试剂操作说明,从初生仔猪腹泻病料样品中抽提总 RNA,用随机引物进行反转录,合成 cDNA 第一链;然后采用 3 对引物分段扩增 S 基因,琼脂糖凝胶回收目的基因片段,然后将其克隆到 pMD18-T 载体中,最后将重组质粒送上海生工生物科技有限公司进行测序,并用 DNASTAR 软件进行序列分析,用 MEGA5.0 软件绘制系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 S 基因的 RT-PCR 扩增

用 3 对引物进行 RT-PCR 检测,并将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果(图 1)显示扩增的 PS₁、PS₂ 和 PS₃ 片段长度与预期片段大小相符。

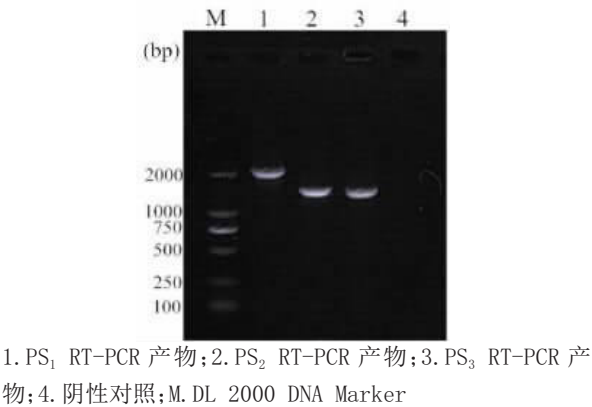


图 1 RT-PCR 产物的 1%琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 重组子鉴定

对 DNA 回收构建的质粒 PCR 产物进行 RT-PCR 扩增,经过电泳鉴定,结果(图 2)显示扩增的相对应的 PS₁、PS₂ 和 PS₃ 片段与预期片段长度相符,表明获得了携带目的基因的重组质粒。

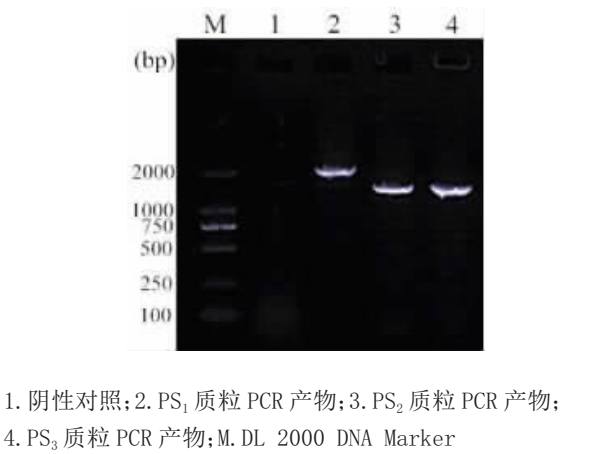


图 2 质粒 PCR 产物的 1%琼脂糖凝胶电泳结果

2.3 序列分析

将测序获得的 S 基因序列(GD-HZ)用 MEGA5.0 软件绘制系统发育进化树,结果(图 3)显示:GDHZ 毒株的 S 基因与 KNU-0801、KNU-0901 的 S 基因位于同一个亚分支上,这表明它们的 S 基因亲缘关系最近;GD-HZ 毒株的 S 基因与 CV777 的 S 基因位于不同的分支上,这表明它们的 S 基因亲缘关系较远。

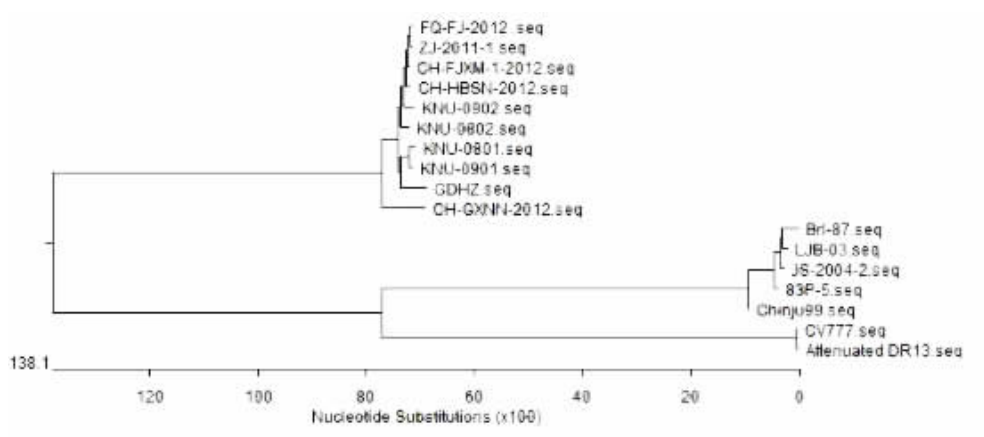


图 3 猪流行性腹泻病毒 S1 基因进化树

3 讨论

PED 在世界分布很广, 是危害养猪业最重要的传染病之一。1971 年英国首先发现 PED, 当时被称为流行性病毒性腹泻 (Epidemic Virus Diarrhoea, EVD)。随后该病在英格兰、比利时等地暴发, 且比利时分离到 1 株该病毒, 命名为 CV777。PED 在我国许多省份和地区都有发生且呈暴发状态。近年来, 国内外学者对诊断 PED 的方法进行深入研究, 发现猪流行性腹泻与猪传染性胃肠炎、猪轮状病毒性腹泻在流行病学、临床症状以及病理变化等方面都十分类似, 难以从临床角度上区别, 因此, 确诊 PEDV 必须结合实验室诊断方法。目前实验室的诊断方法主要有直接免疫荧光抗体检测、病毒分离鉴定、免疫电镜检测等。但这些方法都不适宜用来作早期快速诊断。RT-PCR 检测 PEDV 已得到应用^[6-7], 能快速检测微量病毒, 广泛用于临床病料样品检测, 并适宜用于早期诊断。另外, 猪流行性腹泻病毒、轮状病毒和传染性胃肠炎病毒等腹泻相关病原金标检测快速检测卡已可用于临床快速检测。

2010 年底开始暴发的初生仔猪流行性腹泻对我国大部分省份的养猪业造成严重影响, 免疫猪群的发病情况较未免疫猪群的稍好, 但是很多免疫猪群依然发病。杨敏^[5]将猪流行性腹泻病毒流行毒株进行测序分析发现, 国内流行的 PED 可能存在经典毒株和变异毒株共存的现象。本试验结果显示, 所获得的毒株 GDHZ 的 S 基因序列与 CV777 亲缘关系较远, 而与 KNU-0801、KNU-0901

毒株的亲缘关系较近, 而目前我国市场上销售的 PED 疫苗毒株主要是 CV777 毒株。可见流行毒株与疫苗毒株 CV777 亲缘关系已经有一定差距, 其交叉保护力可能会受影响, 这也在一定程度上解释了实际生产上出现疫苗免疫效果不理想的原因。因此, 针对流行毒株开发研制 PED 新型疫苗已是当务之急。

参考文献:

- [1] 斯特劳 B E, 阿莱尔 S D, 蒙加林 W L, et al. 猪病学[M]. 第 8 版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 181-187.
- [2] Sun R, Cai R, Chen Y, et al. Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea in Suckling Piglets, China [J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(1): 161-163.
- [3] Kang T J, Seo J E, Kim D H, et al. Cloning and sequence analysis of the Korean strain of spike gene of Porcine epidemic diarrhea virus and expression of its neutralizing epitope in plants[J]. Protein Expr Purif, 2005, 41(2): 378-383.
- [4] 姜艳平, 葛俊伟, 汪淼, 等. 猪流行性腹泻病毒 S 基因片段的原核表达及其表达产物的反应原性[J]. 中国兽医科学, 2009(7): 602-607.
- [5] 杨敏. 猪流行性腹泻病毒结构蛋白基因的克隆与特征分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2007.
- [6] Ishikawa A K, Sekiguchi H, Ogino T, et al. Direct and rapid detection of porcine epidemic diarrhea virus by RT-PCR[J]. J Virol Method, 1997, 69: 191-195.
- [7] Kubota S, Sasaki O, Okada N, et al. Detection of porcine epidemic diarrhea virus using polymerase chain reaction and comparison of the nucleocapsid genes among strains of the virus [J]. J Vet Med Sci, 1991, 61(7): 827-830.

鸭肝炎病毒 I 型、新型二价精制卵黄抗体在 SPF 雏鸭体内的代谢规律研究

宋 扬, 李建华, 藏玉婷, 孙德君, 孙晓峰, 武 啸
(哈药集团生物疫苗有限公司研发中心, 黑龙江 哈尔滨 150069)

摘 要: 采用实验室试制的二价抗体接种 5 日龄 SPF 雏鸭, 分别在注射抗体后 24、48、72、96、120、144 和 168 h 进行采血及分离血清。采用鸭胚中和试验, 进行 I 型和新型鸭肝炎病毒抗体效价的测定。结果表明, 抗体注射 24~72 h, 血清中 I 型和新型鸭肝炎病毒抗体效价基本稳定在峰值, 从 96 h 开始缓慢下降但仍在保护效价 (1:32) 以上, 至 144 h 抗体下降至保护效价以下, 即抗体的被动保护期在 5 d 以内。

关键词: 卵黄抗体; 血清效价; 雏鸭; 中和试验

中图分类号: S858.32

文献标识码: A

文献编号: 1005-8567(2016)02-0032-03

Metabolic Regularity of New Type Bivalent Refined Yolk of Duck Hepatitis Virus I in SPF Duck Body

SONG Yang, LI Jianhua, ZANG Yuting, SUN Dejun, SUN Xiaofeng, WU Xiao
(Harbin Pharmaceutical Group Co.Ltd Biological Vaccine, Harbin 150069, China)

Abstract: Egg yolk antibody preparing in labouratory inoculated 5-day-old SPF duck,collecting blood and separating serum after the injection by 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours, respectively. Testing the serum titer of I and new type of duck hepatitis antibody by duck embryo neutralization test. The results showed that serum antibody titer was basically stable at the peak between 24 to 72 h and slowed down from 96 h but still overtopped protecting titer (1:32). The antibody titer dropped below to protecting titer from 144 h, so the passive protection of the antibody was 5 days.

Key words: egg yolk antibody, serum titer, duckling, neutralization test

鸭病毒性肝炎 (Duck viral hepatitis, DVH) 是由鸭肝炎病毒 (Duck hepatitis virus, DHV) 引起的以鸭肝脏为主要病理变化的急性、高度致死性传染病。雏鸭发病率为 100%, 1 周龄雏鸭的病死率可达 95% 以上。患鸭呈现精神沉郁、一头触地、仰脖、全身抽搐、角弓反张等症状; 病变表现为肝脏肿大、出血、变性; 胆囊充盈、胆汁呈褐色后转淡绿色^[1-2]。

1949 年, 美国 Levine 首先分离到鸭肝炎病毒, 并命名为 I 型鸭病毒性肝炎病毒。近年来, 苏敬良、范书才、张大丙、何冉娅、林世堂、Kim M C 和 Tseng 等相继报道了与 DHV-I 无血清学交叉

免疫反应的鸭肝炎病毒, 认为出现了新的血清型, 并将其命名为新型鸭肝炎病毒 (N-DHV)。利用新型鸭肝炎精制卵黄抗体对易感雏鸭进行被动免疫或感染雏鸭早期治疗是防治本病的重要措施^[3]。由于目前对新型鸭肝炎精制卵黄抗体在本动物体内的代谢规律还缺少系统研究, 影响了该卵黄抗体在临床上的正确使用。为此, 本研究采用新型鸭肝炎精制卵黄抗体注射 SPF 雏鸭, 并监测雏鸭注射抗体后 24~192 h 的血清抗体阳性转换率, 通过研究抗体在动物体内的代谢规律, 以期正确使用新型鸭肝炎精制卵黄抗体防治新型鸭肝炎提供理论依据。

收稿日期: 2016-04-29

作者简介: 宋扬 (1983-), 女, 硕士研究生, 中级兽医师, E-mail: xueqiu_022@126.com

表 2 抗体注射雏鸭不同时间血清中新型 DHV 抗体效价测定结果

组别		24h	48h	72h	96h	120h	144h	168h
抗体试验组	1	1:77	1:64	1:57	1:45	1:32	1:13	1:5
	2	1:72	1:57	1:49	1:49	1:37	1:15	1:7
	3	1:81	1:72	1:64	1:49	1:36	1:15	1:7
	4	1:72	1:64	1:59	1:45	1:36	1:15	1:7
	5	1:81	1:77	1:64	1:49	1:32	1:13	1:5
	6	1:77	1:72	1:59	1:42	1:36	1:15	1:7
	7	1:72	1:64	1:57	1:42	1:32	1:12	1:5
	8	1:77	1:72	1:57	1:45	1:36	1:15	1:7
	9	1:72	1:64	1:57	1:42	1:36	1:15	1:7
	10	1:77	1:64	1:59	1:45	1:32	1:13	1:5
	平均值	1:76	1:67	1:58	1:45	1:34	1:14	1:6
对照组	1	1:2.8	1:2.8	1:2.8	1:2.8	1:2.8	1:2.8	1:2.8
	2	1:2.3	1:2.3	1:2.3	1:2.3	1:2.3	1:2.3	1:2.3
	3	1:2.5	1:2.5	1:2.5	1:2.5	1:2.5	1:2.5	1:2.5
	4	1:2.3	1:2.3	1:2.3	1:2.3	1:2.3	1:2.3	1:2.3
	5	1:2.2	1:2.2	1:2.2	1:2.2	1:2.2	1:2.2	1:2.3
	平均值	1:2.2	1:2.2	1:2.2	1:2.2	1:2.2	1:2.2	1:2.2

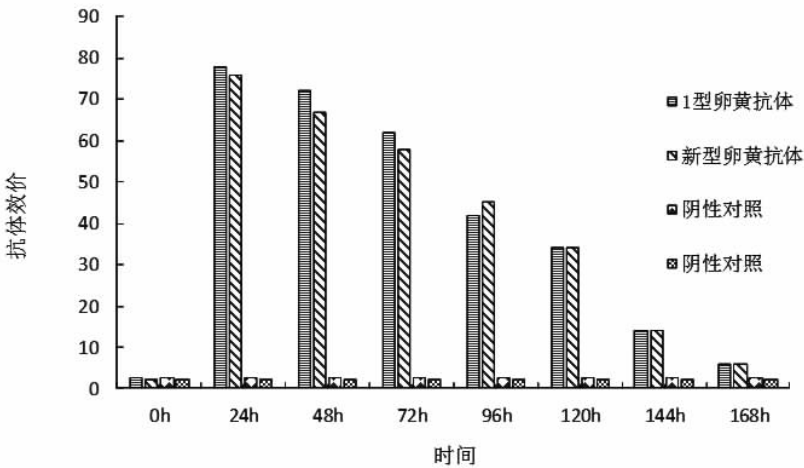


图 1 抗体注射雏鸭不同时间血清中 DHV 抗体效价测定结果

3 结语

鸭肝炎病毒 I 型、新型二价精制卵黄抗体注射 SPF 雏鸭, 抗体在体内的消长规律符合一般抗体半衰期, 抗体有效保护时间一般在 24~120 h 左右, 即抗体的被动保护期在 5 d 以内。

参考文献:

[1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1997.
[2] 白文彬, 于康震. 动物传染病诊断学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002.
[3] 范书才, 李虹, 袁率珍, 等. 新型鸭肝炎病毒的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2009, 10: 770-775.

血清C型水貂绿脓杆菌的分离鉴定

丁国杰, 杨朋欣, 刘可姝, 王 彬, 张春媛

(哈药集团生物疫苗有限公司研发中心, 黑龙江 哈尔滨 150069)

摘 要: 为确诊引起水貂死亡的主要细菌性病原, 对采集的病料进行细菌分离和培养, 分离出3株菌。通过对分离株的形态、生化和培养特性研究, 分子生物学和血清型鉴定, 并对其中一分离菌株生长曲线、毒力和免疫原性进行测定。结果表明, 分离株均为血清C型水貂源绿脓杆菌; 分离株16S rRNA基因序列与已知的绿脓杆菌相应序列同源率为99.7%~99.98%不等; 生长曲线结果表明, C型绿脓杆菌4~14 h为对数生长期; 对小鼠的半数致死量(LD₅₀)为 8.11×10^5 CFU; 制备的单价疫苗对小鼠的免疫原性良好, 攻毒保护率为100%, 对照组小鼠全部死亡。

关键词: 绿脓杆菌; 分离鉴定; 毒力; 免疫原性

中图分类号: S852.61

文献标识码: B

文献编号: 1005-8567(2016)03-0035-03

水貂出血性肺炎(Hemorrhagic pneumonia of mink)是由绿脓杆菌(又称铜绿假单胞菌, *Pseudomonas aeruginosa*)感染引起的一种高度致死性传染病, 多发于每年9~11月份, 该菌可通过患病水貂形成的飞沫及气溶胶传播。其传播快、急性发病、致死率高, 是水貂养殖业的重要疫病, 2001~2010年间, 在辽宁、山东、吉林、黑龙江等省的貂场时有发生^[1-3]。

目前对绿脓杆菌分型常用方法是血清学分型, 国际血清分型系统根据菌体O抗原将其分为20个不同的血清型。日本科学家Homma根据O抗原将绿脓杆菌分为A~N群, 根据此系统研发的试剂盒在国际上广泛应用。我国流行的血清型以B型、C型和G型为主, 其中C型流行率为20%左右^[4-5]。

本研究从某养殖户送检的水貂体内分离获得3株菌, 通过鉴定确认其为血清C型绿脓杆菌。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 病料 无菌采集某貂场疑似患有水貂出血性肺炎的病料7份(每一份都包含肺脏、脾脏、肝脏和肾脏), 标记为1#~7#, 4℃保存备用。

1.1.2 阳性血清及核酸 绿脓杆菌分型用标准血清系列, 购自日本生研株式会社; 绿脓杆菌标准菌株核酸, 由本实验室鉴定和保存。

1.1.3 主要试剂 rTaq、dNTP、DL2000 DNA Marker均购自宝生物工程(大连)有限公司; 琼脂糖购自生工生物工程(上海)有限公司; 微量生化鉴定管购自杭州微生物试剂有限公司; 绿脓素测定所用培养基(PDP)购自北京陆桥生物技术有限责任公司。

1.1.4 试验动物 18~20 g 清洁级昆明小鼠购自哈药集团三精制药有限公司, 隔离器内饲养, 免疫(攻毒)后移入免疫舍(攻毒舍), 投喂配合饲料, 饮用纯化水。

1.2 试验方法

1.2.1 分离株的分离培养 对1#~7#病料均进行以下操作, 用灭菌手术剪将病料剪开一切口, 接菌环沾取切面后划线培养于10%牛血清肉汤琼脂平板, 每一份病料各脏器均进行接种并分区接种在同一平板上, 置37℃培养16~18 h, 挑取疑似单菌落连续传代进行纯化。

1.2.2 分离株的形态、生化和培养特性鉴定 将纯化后的几株分离株划线接种10%牛血清肉汤琼脂平板, 37℃培养16 h后分别进行如下鉴定, 观察菌落形态并挑取若干典型菌落, 进行革兰氏染色; 应用微量生化鉴定管进行生化鉴定; 接种10%牛血清肉汤培养基、绵羊鲜血琼脂平板、PDP, 进行培养特性鉴定。

收稿日期: 2016-05-10

作者简介: 丁国杰(1974-), 女, 汉族, 硕士, 高级兽医师, E-mail: 445298136@qq.com

1.2.3 16S rRNA 基因序列分析 取各分离株菌液 500 μL,沸水煮 10 min,12000 r/min 离心 10 min,取上清作为细菌的模板,用相同的方法制备阳性对照模板;以绿脓杆菌 16S rRNA (GenBank 登录号为 NR_118644.1) 设计引物,上游引物为 5'-GGGGGATCTTCGGACCTC-3';下游引物为 5'-TC-CTTAGAGTGCCCCACCC-3',引物由上海生物工程有限公司合成,目的片段大小为 956 bp。PCR 反应体系为 25 μL:Buffer 2.5 μL、dNTP 2 μL、上下游引物各 1 μL、模板 1 μL、rTaq 0.5 μL、去离子水补齐。反应程序为 95 ℃ 5 min;95 ℃ 1 min、55 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min,35 次循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物以 1%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,产物送上海生物工程公司进行测序,测序结果与 NCBI 相关序列进行同源性比对。

1.2.4 分离株血清型鉴定 将鉴定为阳性的分离株菌液,应用绿脓杆菌分型用标准血清进行血清型检测,操作方法按照说明书进行。判定标准:1 min 内形成凝集块者,且生理盐水空白对照组不凝集者为阳性,其血清型即为对应发生凝集的血清型。

1.2.5 分离株生长曲线测定 将浓度为 1.2×10^{10} CFU/mL 的 B 型菌悬液以 1%接种量接种于 TSB 培养基内,37 ℃、180 r/min 培养 24 h,其中每隔 2 h 测定菌悬液的 OD_{600nm} 值,以培养时间为横坐标、OD_{600nm} 值为纵坐标绘制细菌生长曲线。

1.2.6 分离株对小鼠毒力试验 随机选取一株分离株对小鼠进行 LD₅₀ 测定,采用平板计数法确定注射菌液的活菌浓度为 1.2×10^{10} CFU/mL,选取健康昆明系小鼠 40 只,分成 4 组,每组 10 只,取 $10^{-1} \sim 10^{-4}$ 滴度的菌液,滴鼻接种 0.1 mL/只,观察 7 d,记录各组小鼠死亡情况,按 Reed-Muench 法计算 LD₅₀,对攻毒死亡小鼠及对照小鼠进行剖检,观察病变。

1.2.7 分离株免疫原性测定 将细菌悬液 (1.2×10^{10} CFU/mL),以甲醛溶液灭活(终浓度 0.2%),加入 10%氢氧化铝胶制成疫苗。取 20 只健康小鼠,随机分为免疫组和对照组,10 只/组。疫苗腹腔接种免疫组小鼠,0.3 mL/只,免后 21 d,以 10LD₅₀ 剂量的菌液滴鼻接种免疫组和对照组小鼠,0.2 mL/只。攻毒后观察 7 d,记录免疫保护率。

2 结果与分析

2.1 分离株的分离培养结果

1#~7# 病料经细菌分离培养及纯化发现 3 份

疑似 2#、3#、7#),形态基本符合目标菌落形态,培养基变黄绿色。其他 4 份病料未培养出菌落或菌落形态不符,判为阴性。

2.2 分离株的形态、生化和培养特性鉴定结果

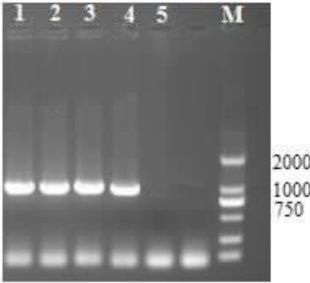
对 3 株分离株进行培养,在 10%牛血清肉汤琼脂平板上生长形态均正常,菌落均为光滑、边缘不整齐的中等大小菌落,为革兰氏染色均呈阴性杆菌。生化鉴定结果见表 1,结果表明生化项目鉴定结果和标准菌株相同,均符合绿脓杆菌标准。3 株分离株培养特性一致,在 10%牛血清肉汤培养基呈黄绿色浑浊;在 10%牛血清肉汤琼脂平板呈黄绿色,菌落形态正常;在绵羊鲜血琼脂培养基上菌落周围出现溶血环;在 PDP 斜面上生长并产绿色素,菌落周围呈浅绿色。

表 1 3 株分离株主要生化指标测定结果

鉴定项目	菌株			鉴定项目	菌株		
	2#	3#	7#		2#	3#	7#
氧化酶	+	+	+	麦芽糖	-	-	-
MAC 培养基生长	+	+	+	乳糖	-	-	-
触媒	+	+	+	葡萄糖	+	+	+
枸橼酸盐	+	+	+	明胶液化	+	+	+
柠檬酸	+	+	+	淀粉	-	-	-
明胶液化	+	+	+	尿素分解	+	+	+
V-P 试验	-	-	-	运动力	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	靛基质	-	-	-
42℃	+	+	+				

2.3 PCR 鉴定结果及序列分析

2.3.1 分离株 16S rRNA 基因片段 PCR 扩增结果 以提取的分离株的 DNA 为模板,在 1000 bp 附近扩增出 1 条特异片段(图 1),与预期结果相符,表明该分离株为 16S rRNA 基因阳性。



M: DL 5000 Marker; 1: 阳性对照; 2: 分离株 2#; 3: 分离株 3#; 4: 分离株 7#; 5: 阴性对照

图 1 各分离株 16S rRNA 基因片段 PCR 扩增结果

2.3.2 16S rRNA 基因片段测序结果 将 2[#]、3[#]、7[#] 分离株测序结果与 NCBI 相关序列进行同源性比对,结果与 NCBI 绿脓杆菌 16S rRNA 序列的同源性分别为 99.82%、99.7% 和 99.98%,表明分离株为绿脓杆菌。

2.4 血清型鉴定结果

将 3 株分离株,应用绿脓杆菌分型用标准血清(日本生研株式会社)检测血清型,血清分型结果表明均为血清 C 型绿脓杆菌。

2.5 分离株生长曲线测定结果

对其中一个血清 C 型分离株 7[#] 进行 24 h 生长曲线检测,结果表明,细菌从 4 h 进入对数生长期,持续至 14 h(图 2)。

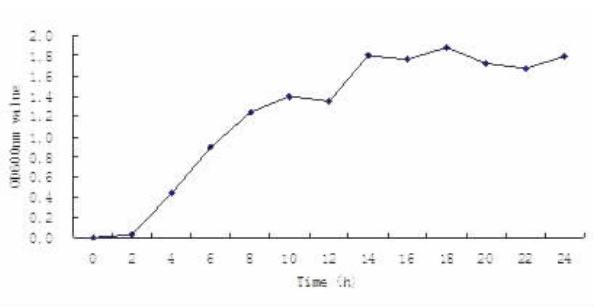


图 2 C 型绿脓杆菌 7[#] 分离株的生长曲线

2.6 分离株对小鼠的毒力试验结果

随机选取一株分离株对小鼠进行 LD₅₀ 测定,结果表明该分离株对小鼠的 LD₅₀ 为 8.11×10^5 CFU(表 2)。分别剖检死亡和健康小鼠,与健康小

鼠相比,攻毒死亡小鼠肺脏呈深紫色,充血淤血(图 3)。以上结果表明分离株对小鼠有较强的毒力。

表 2 血清 C 型 WD013 株 LD₅₀ 结果

菌液 稀释度	接种数量 (只)	接种剂量 (mL)	活菌技术 (CFU/mL)	死亡数量 (只)	LD ₅₀ (CFU)
10 ⁻¹	10	0.1	1.2×10^{10}	10	8.11×10^5
10 ⁻²	10	0.1	1.2×10^{10}	10	
10 ⁻³	10	0.1	1.2×10^{10}	6	
10 ⁻⁴	10	0.1	1.2×10^{10}	0	



图 3 攻毒死亡小鼠(右)与健康小鼠(左)的肺脏剖检

2.7 免疫原性测定结果

将血清 C 型分离株 7[#] 制成疫苗,腹腔接种免疫组小鼠(0.3 mL/只)免后 21 d,以 8.11×10^6 CFU 菌液滴鼻接种免疫组和对照组小鼠,免疫组攻毒保护率为 100%,对照组小鼠全部死亡(表 3),表明 C 型分离株具有良好的免疫原性。

表 3 血清 C 型分离株 7[#] 免疫原性试验结果

组别	数量	接种途径	抗原含量 (CFU/mL)	接种剂量 (mL)	攻毒时间	攻毒途径	攻毒剂量 (CFU/只)	保护率
免疫组	10	腹腔	1.2×10^{10}	0.3	免日	滴鼻	8.11×10^6	10/10
对照组	10	/	/	/	21 日	滴鼻	8.11×10^6	0/10

3 讨论

绿脓杆菌在自然界广泛存在^[6],尤其高温高湿环境中,更利于绿脓杆菌的滋生和繁殖。我国水貂出血性肺炎的死亡率为 6%~54%,以沿海气候潮湿的地区发病较多,全国流行的血清型以 G 型、B 型和 C 型为主,与国外流行的主要血清型相同。细菌生长曲线的测定表明对数生长期为 4~14 h,表明此段时间细菌生长状态良好,提示在 14 h 左右收获的菌液可以保持血清 B 型绿脓杆菌的最佳状态。

戴秀美等^[7]对 2013 年分离出的水貂源绿脓杆菌进行了对小鼠 LD₅₀ 测定,结果为 3.2×10^7

CFU,但没有表明是何种血清型,毒力低于本实验 8.11×10^5 CFU 的结果。这与分离株来源和血清型均具有一定的关系。抽选的血清 C 型菌株 7[#] 具有较好的免疫原性,对小鼠的攻毒保护率达 100%,这可能与攻毒剂量和抗原含量有关,下一步可将研究重点放在对水貂的最佳攻毒剂量以及抗原含量与免疫效力的关系上。

参考文献:

- [1] 白雪,柴秀丽,闫喜军.水貂出血性肺炎流行病学调查及铜绿假单胞菌疫苗研究进展[J].现代农业科技,2011(15):317-318.

(下转第 40 页)

一例犬肠道异物的探讨

谢文辉, 徐耀基

(广州市宠物研究中心, 广东 广州 510405)

摘要: 犬吞食异物的情况在现实中很常见, 特别以中大型犬居多, 而且吞食的异物各种各样。结合临床病例, 介绍了一例犬吞食异物后出现的临床症状, 阐述手术方案及术后护理。建议当发现犬吞食了异物, 应第一时间送检, 不应由犬自行呕吐、排除。

关键词: 犬; 肠道异物; 诊断; 治疗; 术后护理

中图分类号: S829.2

文献标识码: A

文献编号: 1005-8567(2016)03-0038-03

随着饲养伴侣动物的兴起, 宠物吞食异物的情况越来越多, 各种各样奇形怪状的异物在不同病例上都有发现。本文将结合临床病例, 介绍一例犬吞食异物后出现的临床症状^[1], 阐述手术方案及术后护理。

1 病例介绍

罗威纳, 公犬, 未绝育, 1 岁, 39 kg, 体温 39.7℃, 略高, 疫苗接种不完全。主诉: 患犬 1 个多月前与主人一起玩弄石头, 犬把石头吞进, 开始并未出现很大异常, 偶尔出现呕吐, 食欲大小便正常, 便没有带去医院就诊。最近 1 周犬食欲不振, 频繁呕吐(进食、饮水皆呕吐), 拉稀, 弯腰拱背, 时而嚎叫。

2 临床检查

2.1 理学检查

触诊检查发现, 患犬肚腹极度敏感、坚硬, 触诊肠部能触摸到一不规则坚硬物体, 膀胱较多尿液, 直肠空虚, 几乎没有粪便, 给犬进行导尿, 尿黄(图 1)。

2.2 影像学检查

进行 X 光片检查, 对腹部靠后侧进行 X 线仰卧正位与侧卧位的摆位拍摄, 发现肠子中有一高密度物体(石头), 部分肠子存在较多气体(图 2)。

3 手术治疗

根据病史、理学检查和影像学检查结果, 诊断为肠道异物(石头), 手术治疗为宜。



图 1 患犬尿液(偏黄)



图 2 患犬肠中高密度物体(石头)

收稿日期: 2016-04-27

作者简介: 谢文辉(1994-), 男, 全国执业兽医师, E-mail: 2993477396@qq.com

3.1 术前检查

术前进行血常规检查、生化六项检查、影像学检查。血常规(表1)血象显示患犬轻度脱水^[2],生化 ALT 轻微升高(表2),不排除应激反应导致,总体情况患犬目前身体状况尚可,可以进行手术。

表1 血液常规检查结果

指标	检测值	参考值
红细胞 RBC	9.50	5.5~8.5
红细胞压积 HCT	0.83	0.39~0.56
血红蛋白 HGB	197	110~190
白细胞 WBC	16.5	6.00~17.00

表2 生化检验结果

项目和单位	检测值	参考值
总蛋白(TP)g/L	60.5	54.0~82.0
丙氨酸氨基转移酶(ALT)U/L	59.7	4.0~56.0
碱性磷酸酶(ALP)U/L	62.5	≤80.0
血糖(Glu)mol/L	4.20	3.30~6.70
尿素(BUN)mmol/L	7.2	3.0~9.0
肌酐(Cre)μmol/L	92.6	60.0~110.0

3.2 术前用药

患犬进行手术前,应建立好静脉通道(留置针),术前静脉输液0.9%氯化钠250 mL,以改善脱水情况并减少术中及术后的风险和并发症。

3.3 麻醉方案

舒泰配合静灵静脉推注镇静麻醉,初期观察眼球的位置和口腔打开的松软程度控制好麻醉的用量,术中用监护仪时刻监测血氧、血压、心率和心电等,做好麻醉监护。

3.4 手术过程

全身麻醉后,患犬仰卧保定。开口于脐后腹中线,切开腹壁,伸手进腹腔探查,发现肠子异物便牵引至腹壁切口外,分离周边脂肪和网膜(图3)^[3]。在切开肠壁时,应先仔细检查肠子有无病变存在(图4)。用干净无菌的消毒布面垫付在肠子下方,横向切开肠壁全层(图5),取出肠内石头(图6)。之后用酒精棉球消毒切口,用可吸收线先进行结节缝合,然后再进行间断内翻缝合(图7)。用抗生素生理盐水推进肠内并冲洗表面,检查肠管是否存在漏水情况,推注冲洗完毕后若未见肠胃漏水,便可将肠管还纳于腹腔内,并用网膜覆盖表面,缝

合腹壁切口。手术结果表明,取出的异物为石头(图8)。

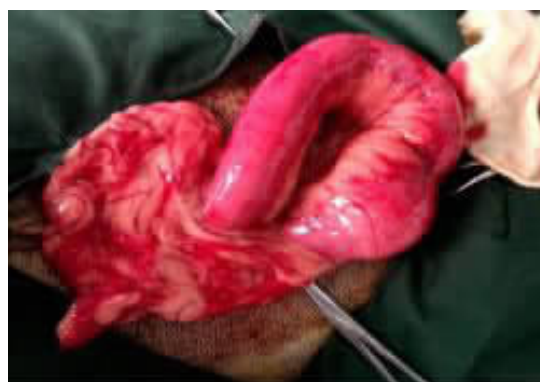


图3 牵引肠子异物至腹壁切口处

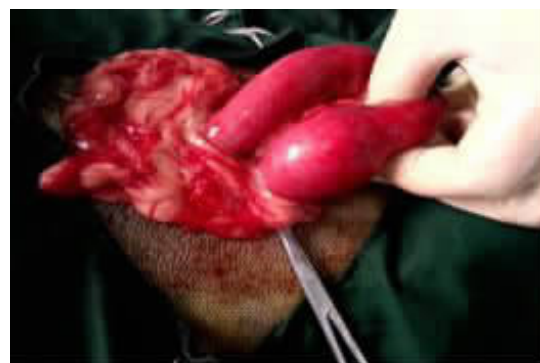


图4 观察肠子表面有无病变存在



图5 横向切开肠壁全



图6 取出肠内异物(石头)



图7 肠子缝合



图8 取出异物为石头

3.5 术后用药

术后输液 0.9%氯化钠 250 mL, 静注氨苄西林钠消炎, 皮下注射止血敏止血, 皮下注射痛立定镇痛^[4]。

4 术后护理与康复情况

术后剪裁手术服包扎好伤口。连续用抗菌素消炎止痛 7 d, 并密切关注犬的大小便情况。术后禁食 36~48 h, 不限制饮水。当患犬出现排粪、肠蠕动的声音恢复正常后方可给予流质、易消化的优质食物。主述术后患犬恢复情况良好, 食欲大小便皆正常, 10 d 后主人在当地自行拆线。

5 讨论

犬吞食异物的情况在现实中很常见, 特别以中大型犬居多, 而且吞食的异物各种各样。本院曾连续接诊好几例金毛猎犬与萨摩犬吞食异物的病例, 异物包括纸巾、木头、鸡蛋壳、皮球、玉米芯。一般患犬在吞食异物后, 异物停留在胃部时, 一般先表现出呕吐的症状, 当异物移向小肠、大肠, 患犬就会表现出呕吐及拉稀、腹痛、精神不振等症状。因此当怀疑犬吞食异物或者出现呕吐拉稀症状时, 一定要尽快带犬到医院检查。对于犬吞食异

物, 我们应着重于预防, 犬可以触及的东西都要收拾好, 出门一定要牵好狗绳, 时刻注意犬是否有舔咬吞食物体的动作, 一经发现要立即阻止并教育犬, 同时, 当发现犬吞食异物, 一定要第一时间送检, 不要抱有由犬自行呕吐、排除的侥幸心理。因病情拖延会继发更严重的问题, 如长期呕吐、胃酸液体倒流反复刺激食道, 导致食道严重受损、溃疡, 出现巨食症; 如长期呕吐、拉稀引起犬的胰腺炎, 并导致脱水、电解质离子紊乱; 如异物长期停留, 导致胃溃疡、胃穿孔、肠道糜烂穿孔继发腹膜炎等。因此当发现犬有吞食异物的情况, 应及时带犬到专业的宠物医院就诊。

参考文献:

- [1] 何英, 叶俊华. 宠物医生手册[M]. 第2版. 辽宁: 辽宁科学技术出版社, 2009.
- [2] 周桂兰, 高得仪. 犬猫疾病实验室检验与诊断手册—附典型病例[M]. 第2版. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [3] 李建基, 王亨. 兽医临床外科诊疗技术及图解[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 139-143.
- [4] 王庆波, 宋华宾. 宠物医师临床药物手册[M]. 金盾出版社, 2010.
- [4] 陆承平. 兽医微生物学[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 2002: 274-275.
- [5] 张传美, 刘海生, 杨海燕, 等. 16种中药对水貂绿脓杆菌的体外抑菌试验[J]. 动物医学进展, 2012, 33(12): 214-216.
- [6] 刘洋, 郑家明, 赵辉, 等. 鸡死胚中绿脓杆菌的分离与鉴定[J]. 辽宁农业科学, 2009(1): 14-17.
- [7] 戴秀美, 张永兵, 惠涌泉, 等. 水貂源绿脓杆菌的分离鉴定及致病性试验[J]. 动物医学进展, 2014, 35(8): 126-129.

(上接第 37 页)

- [2] 刘德福, 赵燕, 刘超. 水貂暴发出血性肺炎的诊治报告[J]. 畜牧兽医杂志, 2003, 22(4): 47-48.
- [3] Zhang Gui-xian, Xiang Fang, Wang Dian-yong, et al. Diagnosis and treatment of hemorrhagic pneumonia of mink[J]. Agr Sci & Technol, 2012, 13(13): 2560-2561.

犬细小病毒病治疗的基本用药总结

丘倬希, 阮鹏飞, 吴晓斌, 张志宏, 谢 东

(江门市动物疫病预防控制中心, 广东 江门 529000)

摘 要: 犬细小病毒是目前在我国犬只之间传染范围广、致死率较高的一种传染性病毒。介绍了犬细小病毒的基本情况和治疗原则, 并归类总结了目前治疗犬细小病毒病比较常用的药物, 以及治疗犬细小病毒病的用药经验, 以期治疗犬细小病毒病提供相关用药参考。

关键词: 细小病毒; 传染; 药物; 用药参考

中图分类号: S858.292

文献标识码: A

文献编号: 1005-8567(2016)03-0041-06

犬细小病毒 (CPV) 是目前在我国犬只之间传染范围广、致死率较高的一种传染性病毒。该病毒可能是由一种具较高遗传相关性的猫泛白细胞减少症病毒 (FPV) 变异而来的。1982年, 徐汉坤等^[1]正式报道了犬细小病毒病在我国的流行。自此, 犬细小病毒病在全国广泛流行, 根据各地报道病例, 珠三角、长三角等人口密集地区, 宠物养殖业发达地区是犬细小病毒病流行高发区域。

经过兽医学界, 尤其小动物医学等领域从业人员多年来的不断探索, 细小病毒病的治疗成功率不断提高, 用药也越来越多样化。笔者归类总结了目前治疗犬细小病毒病比较常用的药物, 再结合笔者在治疗犬细小病毒病时的用药经验, 以期为大家治疗犬细小病毒病提供相关用药参考。

1 犬细小病毒的基本情况

1.1 病原学

CPV 属于细小病毒科 (Parvoviridae) 细小病毒属 (Parvovirus), 病毒粒子无囊膜, 核衣壳为等轴对称的 20 面体, 电镜下呈圆形或六边形, 直径为 21~24 nm。单股 DNA, DNA 量约占整个病毒粒子重量的 25%~34%, 分子质量 $1.4 \times 10^6 \sim 1.7 \times 10^6$, 沉淀系数为 23S~27S。CPV 对外界的抵抗力较强, 对酒精、乙醚、氯仿有抵抗力, 对温度也有一定耐受性。低温长期存放对其感染性并无明显影响。在 4~10℃ 存活 6 个月, 37℃ 存活 2 周, 56℃ 存活 24 h, 65℃ 存

活 30 min, 80℃ 存活 15 min, 室温下保存 3 个月其感染性仅稍微下降, 在粪便中可存活数月至数年。对 CPV 最有效的消毒剂有福尔马林、B-丙内酯、次氯酸钠、氧化剂等。此外, 紫外线也能使其失活。CPV 具有较强的血凝活性, 能凝集恒河猴、猪、仓鼠、猫和马的红细胞, 而不能凝集其他动物的红细胞, 这一特性可作为病毒鉴定的参考指标。经福尔马林灭活后, 其血凝性几乎不变^[2]。

1.2 临床症状

犬细小病毒病主要症状分为肠炎型和心肌型两种。

肠炎型细小病毒病主要由于细小病毒侵害犬消化系统, 造成肠道黏膜损伤, 导致轻微出血。初期病犬精神沉郁, 食欲不振大部分低热, 粪便稀软; 随着病情发展, 出现腹泻、呕吐, 粪便腥臭, 水样或糊样, 初时粪便呈黄色, 后颜色逐渐变深变红。最后病犬多数因贫血、脱水、饮食欲废绝等原因导致死亡。病程发展一般在 3~7 d, 治愈后病犬基本不再复发, 暂时世界范围内已报告发生细小病毒重复感染的病例仅数例。

心肌炎型细小病毒病主要由于细小病毒侵害心肌细胞而导致。病犬发病时间短, 发病速度快, 基本都在 24 h 内死亡, 症状包括呼吸困难、急速, 心律不齐或失常, 心肌炎型细小病毒病大多数都会伴有肠炎型, 粪便带腥臭甚至带血。更有严重者, 病犬死前无任何症状, 突发性心肌梗

塞导致死亡。心肌炎型细小病毒病由于发展速度太快,往往用药治疗尚未能起效便死亡,故本文基本不对此类型用药作讨论。

2 犬细小病毒病的治疗原则

综合各地治疗犬细小病毒的治疗方法,笔者总结关于治疗犬细小病毒病的治疗原则如下:

2.1 特异性治疗

主要使用针对细小病毒的抗病毒药物或生物制品类药物抑制和杀灭病毒。

2.2 控制继发感染

主要用抗生素类药物抑制病犬发病期间由细菌引起的继发性感染。

2.3 止血补血

主要用止血类药物减少由于细小病毒引起的出血,对出血严重或者血容量不足的病犬同时需要补充血容量或促进其造血功能。

2.4 止吐止泻

通过药物控制病犬的呕吐和腹泻,减少因呕吐腹泻导致脱水的机会。

2.5 辅助治疗

由于病犬肠道受损,营养吸收能力较差,需要用辅助类药物补充病犬营养,保证其基本生命活动所需能量。

3 犬细小病毒病的基本用药品种

3.1 抗病毒类药物

3.1.1 细小病毒单克隆抗体 犬细小病毒单克隆抗体可通过淋巴和血液循环系统快速到达病毒感染的组织和细胞,抑制病毒对宿主细胞的侵害及病毒的复制,同时又可参与犬体内的其他抗病毒保护机制,如免疫调理,抗体依赖细胞介导的细胞毒作用和抗体依赖补体介导的细胞毒作用,以进一步激活犬体内的细胞免疫系统,从而发挥出更大的杀灭病毒作用^[3]。

按照目前市面上常用的犬细小病毒单克隆抗体的规格,建议剂量为每次 0.5~1 mL/kg,按使用说明肌肉注射或静脉注射,建议持续注射 3~5 d。注意事项:第一,过量的单克隆抗体会影响病犬体内自身的免疫系统,不建议超量使用;第二,少数病犬会发生过敏,注射时需监测病犬反应。

3.1.2 犬干扰素 犬干扰素 α 是重要的机体抗病毒感染的非特异性物质,犬干扰素 α 与细胞表面受体结合诱导细胞产生多种抗病毒蛋白,抑

制病毒在细胞内繁殖,从而提高免疫功能,包括增强巨噬细胞的吞噬功能、增强淋巴细胞对靶细胞的细胞毒性和 NK 细胞的功能^[4]。

按照常用的犬干扰素规格,建议剂量为每次 20 万~40 万 IU/kg,皮下或肌肉注射,持续 3~5 d,而且建议与单克隆抗体联合使用,可加强治疗效果。

3.1.3 注射用犬高免血清 注射用犬高免血清一般由经过强毒攻毒过后,采集 CPV 抗体效价 $\geq 1:1280$ 的健康犬只的血液,经静止或低温离心析出的血清^[5]。主要能为病犬直接提供特异性抗体杀灭病毒,提高治疗成功率。

按照目前已经市场化批量生产的犬高免血清的规格,建议使用剂量为每次 1 mL/kg,肌肉注射或静脉注射均可。但犬高免血清的过敏率比单克隆抗体的过敏率高,而且对病犬免疫系统影响更大,建议只作辅佐治疗。

3.1.4 利巴韦林 利巴韦林又称病毒唑,是目前使用最普遍、用途最广泛的抗病毒药物。其他抗病毒药物如阿昔洛韦、肌聚胞注射液等效果接近,故本文不对其他抗病毒药作详解。利巴韦林是一种广谱抗病毒药,对多种 DNA 病毒及 RNA 病毒有明显的抑制作用。目前比较认可的作用机制主要是:抑制病毒合成酶,它进入细胞后磷酸化为三氮唑核苷单磷酸,与肌苷、鸟苷相类似,竞争性地抑制肌苷-5'-单磷酸脱氢酶,使肌苷单磷酸不能转化为次黄嘌呤单磷酸,阻断了鸟苷单磷酸的合成,从而抑制多种 RNA 病毒和 DNA 病毒的复制,故抗病毒谱广^[6]。

目前比较常用的是利巴韦林注射液和利巴韦林滴眼液,常用的注射液规格是 1 mL:100 mg,临床上犬治疗剂量建议每次 10 mg/kg,静脉注射效果较好,可持续 3~7 d 给药。另由于利巴韦林主要毒副作用是致红细胞、白细胞及血红蛋白下降,建议使用期间定期作血常规检查,监测病犬贫血情况。

3.1.5 双黄连注射液 双黄连注射液主要由金银花、黄芩、连翘提取物制成,具有良好的抗病毒及抗菌作用。有研究^[7]证明,双黄连既能显著抑制、延缓细胞病变出现,亦可有效抑制流感病毒性肺炎、病毒性心肌炎、胰腺炎的发生与发展。其作用机制是多途径的,有直接灭活病毒的作用,同时对吸附于细胞表面和进入细胞内的病毒

也有抑制作用。

双黄连市面上规格众多,而且质量良莠不齐,在使用中必须谨慎小心。以常见的规格为例,10 mL/瓶的双黄连注射液相当于15 g原生药,按笔者的用药经验,犬用剂量控制在0.1 mL/kg以下,可与5%葡萄糖注射液或葡萄糖氯化钠注射液混合,静脉注射,1~2次/d,效果较好。由于双黄连注射液厂家众多,工艺有别,再加上不同犬种的体质问题,病犬在使用双黄连注射液时应密切留意,观察过敏反应,输液滴速应减慢30%,具体滴速应根据病犬基本情况而定。

3.2 抗生素类药物

笔者建议使用抗生素类药物前先作药敏试验以及过敏试验,以指导临床合理选用抗生素类药物。

3.2.1 喹诺酮类药物 喹诺酮类药物对细菌DNA回旋酶(DNA gyrase)具有选择性抑制作用。喹诺酮类药物分为4代,目前临床应用较多的为第三代,常用药物有诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星、氟罗沙星等。此类药物对多种革兰阴性菌有杀菌作用,广泛用于泌尿生殖系统疾病、胃肠疾病,以及呼吸道、皮肤组织的革兰阴性细菌感染的治疗^[8]。

笔者以目前比较常用的德国拜耳公司生产的拜有利(恩诺沙星注射液)为例,其他喹诺酮类药物可参考此药用法。拜有利规格为100 mL/5 g,建议剂量为2.5 mg/kg,1次/d,静脉注射或肌肉注射,可与地塞米松混用。同时喹诺酮类药物也可与 β -内酰胺类药物合用,因 β -内酰胺类药物可阻碍细胞壁粘肽的合成,造成细胞壁缺损,从而使喹诺酮类易于发挥杀菌作用。

喹诺酮类药物效果较好,但其毒副作用也相对明显,可引起尿道结石,影响软骨发育,心脏毒性作用以及肝脏受损均是主要的毒副作用,因此使用前,必须根据病犬实际情况选择用药,并告知畜主其用药可能引起的不良反应。

3.2.2 β -内酰胺类 β -内酰胺类药物在治疗细小病毒病所引起的继发感染中也是常用的药物之一,其作用机理是干扰敏感细菌细胞壁黏肽的合成,使细菌细胞壁缺损,菌体失去渗透保护屏障,导致细菌肿胀、变形,在自溶酶激活下,细菌破裂溶解而死亡^[9]。

临床上,尤其在治疗细小病毒病时主要使用

的是第一代头孢菌素,主要药物有头孢唑啉、头孢羟氨苄、头孢氨苄、头孢噻吩、头孢匹林、头孢拉定等,其中头孢氨苄、头孢拉定是目前使用范围较广、较常用的头孢菌素。其抗菌谱比青霉素类广、抗菌作用强、过敏反应少、毒性小。笔者以头孢拉定为例,治疗过程中建议剂量为每次25 mg/kg,1~2次/d,静脉注射或肌肉注射效果较好,与氨基糖苷类药物合用有协同作用。头孢菌素主要的不良反应包括过敏反应及肾毒性,注射后应观察至少30 min以上及观察小便情况。

3.2.3 氨基糖苷类 笔者在治疗细小病毒病时较少用氨基糖苷类药物,但有不少同行对氨基糖苷类抗生素的使用表示满意,比较常用的有庆大霉素、阿米卡星等。故笔者通过查阅资料及在治疗过程中尝试,以期能给读者一些用药参考。

氨基糖苷类抗生素对于细菌主要是抑制细菌蛋白质的合成,从而导致细菌死亡,属静止期杀菌药。主要分为3类:一是来源于链霉菌属的链霉素、卡那霉素等;二是来源于小单孢菌的庆大霉素等;三是通过人工合成,的阿米卡星、异帕米星等。氨基糖苷类抗生素对敏感需氧革兰氏阴性菌杀灭效果良好,对泌尿系统和呼吸系统感染时效果良好。庆大霉素其抗菌谱较广,对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有效,肌肉或静脉注射全身吸收迅速,内服难以吸收,但可在肠道保持较高浓度^[10]。

笔者在治疗过程中,主要以庆大霉素与头孢类合用为主,可提高其杀菌效果。建议每次剂量不超过1.5 mg/kg,1次/d,静脉注射或肌肉注射。若病犬呕吐情况得到控制,也可尝试服用庆大霉素胶囊,用量同上。但庆大霉素的耳毒性、肾毒性毒副作用是必须要时刻注意的。正由于庆大霉素毒副作用明显,其用量必须严格控制,有条件的动物医院建议平均一个疗程内要做1~2次的肾功能检查,确保庆大霉素的代谢正常。同时必须观察病犬的听觉情况有否受到影响。

3.3 止血类药物

3.3.1 注射用血凝酶 注射用血凝酶分为进口制剂(如立止血)和国产制剂(如巴曲亭),均含有从巴西矛头蝮蛇蛇毒中提取和精制而成的酶性止血剂,具有类凝血酶和类凝血激酶两种活性成分^[11]。对各种原因导致的脏器出血或创伤性出血有良好的止血效果。其作用机理是在出血部

位具有促进血小板凝集,缩短出血时间,而不在血管内产生凝血作用。其止血作用迅速,止血效果好,安全性高,是治疗细小病毒病,尤其病犬在发病后期出血严重、腹泻番茄样粪便甚至鲜血时紧急止血的第一选择。

临床上,基本使用小剂量立止血作为止血药,建议小型犬或中型犬治疗剂量为静脉注射 1 ku/d,大型犬剂量为注射 2 ku/d。若病情严重或紧急出血,可在常规治疗量基础上再肌肉注射同等剂量的立止血,每 8 h 注射 1 次。立止血除了疗效快、效果好以外,其安全、低毒副作用也是临床使用广泛的主要原因。但较少研究表明立止血可与酚磺乙胺等其他促凝血类药物共同使用,因此,建议立止血尽可能单独使用。

3.3.2 酚磺乙胺 酚磺乙胺亦称止血敏,其主要作用是增加血液中血小板数量,增强血小板凝集度,促进血液凝固,降低毛细血管渗透压。酚磺乙胺既能用于细小病毒病发病前期出血不明显时进行预防性止血,亦能在病程后期作紧急止血用。临床上可与维生素 K 类合用。

常规治疗量建议为 0.025~0.05 g/kg,静脉或肌肉注射,2~3 次/d,视乎病犬出血情况;紧急止血量建议为常规治疗量的两倍,按剂量 1:1 比例与维生素 K₁ 混用,静脉注射,每 8 h 注射 1 次。

酚磺乙胺安全系数高,效果理想,除了细小病毒病的治疗外,在临床上还用于手术前后的预防性出血或创伤性出血。但有研究^[12]表明,酚磺乙胺与碱性药物配伍,其氧化速度明显加快。因此,建议临床上应用酚磺乙胺注射液时,要谨慎与抗生素药物配伍,保证用药安全。

3.3.3 肾上腺素 肾上腺素又称安络血,为肾上腺素的氧化衍生物,能增强毛细血管对损伤的抵抗力,稳定血管及其周围组织中的酸性粘多糖,降低毛细血管的通透性,增强受损毛细血管端的回缩作用,使血块不易从管壁脱落,从而缩短止血时间,但不影响凝血过程^[13]。

临床上,肾上腺素单独使用的止血效果一般,但因其能降低毛细血管的通透性,与酚磺乙胺的降低毛细血管渗透压的作用协同,减少毛细血管出血,起到加速止血效果。临床上建议剂量为 0.5 mg/kg,肌肉或皮下注射,可与酚磺乙胺配伍使用。

3.3.4 维生素 K 维生素 K 是肝脏合成凝血酶原的必需物质,还参与凝血因子 VII、IX、X 的合成。其中常见的维生素 K 主要分为脂溶性的维生素 K₁、维生素 K₂ 和水溶性的维生素 K₃、维生素 K₄,而主要作为防腐剂的维生素 K₅ 则不在本文探讨范围。

维生素 K 主要治疗维生素 K 缺乏导致的出血症以及凝血不良。维生素 K₂ 能由机体肠道微生物合成并被机体吸收利用。而维生素 K₁、K₃ 也需要在肝脏转化为 K₂ 才能被利用。当患畜感染细小病毒导致腹泻严重或由于长时间使用广谱抗生素而影响肠道菌种平衡,均会影响维生素 K 的吸收利用,导致维生素 K 缺乏^[14]。治疗期间使用维生素 K 能促进患畜凝血功能,减少出血。

脂溶性维生素 K,可肌肉、皮下或静脉注射,建议剂量为 1 mg/kg,参照说明书要求剂量不超过 40 mg/d。静脉注射必须注意给药速度,不应超过 1 mg/min,否则容易出现过敏现象。水溶性维生素 K,建议肌肉注射,不建议静脉注射,建议剂量为 1 mg/kg。

维生素 K 对细小病毒感染的患畜只能作辅助止血的功效,可与酚磺乙胺配伍,增强药效。另外,由于维生素 K₁ 和 K₃ 必须在肝脏转化,肝功能不全者慎用,过多剂量会加重肝脏代谢负担。

3.4 止吐止泻类药物

3.4.1 甲氧氯普胺 甲氧氯普胺,亦称胃复安,化学名称为 N-[(2-二乙氨基)乙基]-4-氨基-2-甲氧基-5-氯-苯甲酰胺,为中枢性止吐药和胃肠动力药,能抑制呕吐中枢化学激发区的多巴胺受体,同时可以促进上消化道运动而不刺激胃液、胆汁和胰腺分泌。甲氧氯普胺在治疗细小病毒过程中最重要的作用之一就是作为中枢性止吐药,具有高效的止吐作用,并可促进胃肠道排空,减少胃肠道内容物对胃肠道的刺激。

甲氧氯普胺临床上通常肌肉或静脉注射,建议剂量为 0.5~1 mg/kg,每次不超过 10 mg。需要注意的是,若胃肠道出血严重,使用甲氧氯普胺会使胃肠道动力增加,加剧病情,需根据实际情况使用。

3.4.2 雷尼替丁与西咪替丁 雷尼替丁与西咪替丁同为 H₂ 受体拮抗剂、抑酸剂,能有效抑制组胺、五肽胃泌素和氨甲酰胆碱刺激后引起的胃酸分泌,降低胃酸和胃蛋白酶活性,对于上消化道

出血导致的止吐效果良好。雷尼替丁的效果比西咪替丁高 5~8 倍。雷尼替丁与胃复安的作用机理不同,雷尼替丁作用是抑制胃酸分泌,减少胃酸对消化道的刺激,本身并不具有止吐功能。但减少消化道刺激能使消化道损伤尽快愈合复原,减少继发感染,亦是治疗细小病毒较重要的一环。

雷尼替丁建议静脉注射,剂量为 2~3 mg/kg,每 8~12 h 使用 1 次,亦可皮下注射,剂量参考静注。

3.4.3 阿托品与山莨菪碱 阿托品与山莨菪碱同为阻断 M 胆碱受体的抗胆碱药,作用机制是与 ACh 竞争胆碱能受体,提高胆碱能受体的刺激阈值,起到遮散胆碱能受体的作用。可对抗 ACh 引起的毒蕈碱样 (M) 症状,但不能阻止 ACh 的积蓄,也不能使已聚积的 ACh 分解。其抗 M-胆碱作用表现为松弛多种平滑肌,抑制多种腺体分泌,加速心率和扩大瞳孔。但它对 N-胆碱反应系统和中枢神经系统的作用有限^[15]。阿托品效果较山莨菪碱好,但副作用亦较后者明显,尤其可能因剂量不当引起阿托品化,因此从安全角度考虑,笔者建议优先选用山莨菪碱。

阿托品及山莨菪碱均可皮下、肌肉及静脉给药,皮下注射剂量建议不超过 0.1 mg/kg,肌肉及静脉注射不超过 0.05 mg/kg,给药 2 次/d。需注意的一点是,阿托品及山莨菪碱副作用主要是会致心律失常,瞳孔扩大,严重者会出现中毒,在使用上必须小心谨慎。有条件的动物医院建议用药期间做好心电图监护。

3.4.4 鞣酸蛋白 鞣酸蛋白为口服剂,只在肠道分解释放出鞣酸,使肠道粘膜表层内蛋白质沉淀,形成一层保护膜,从而降低刺激,减轻炎症渗出物,减少肠道蠕动,以达到止泻收敛和保护肠粘膜的效果。鞣酸蛋白并不具有抗菌抗病毒的药效,在细小病毒治疗只是作为一种辅佐药物,多数用于呕吐程度不剧烈但腹泻较严重,尤其肠粘膜损伤较厉害的情况下辅助治疗。

鞣酸蛋白建议口服,直肠给药效果不明显,而且服用鞣酸蛋白会影响胃蛋白酶等消化酶,建议可辅助添加益生菌或酵母菌等药物恢复肠道菌群平衡。常见剂量大概 0.3 g/片,小型犬建议 1 片/次,3 次/d,中大型犬可适量增加药物剂量。

3.5 营养类药物

3.5.1 三磷酸腺苷 三磷酸腺苷 (ATP) 是体内三羧酸循环的最终产物,是组织细胞一切生命活动所需能量的直接来源。ATP 作为能量交换必需的物资,在治疗犬细小病毒中作为营养辅助治疗,能够为患犬能量供给提供保证。常见的三磷酸腺苷类药物以三磷酸腺苷二钠为主,原则上前两者之间的区别主要是后者比前者有两个钠离子,作用效果基本一致,因此本文也以三磷酸腺苷二钠作为主要讨论药物。

临床上使用的三磷酸腺苷二钠注射液常见的规格为 20 mg/2mL,静脉注射效果最佳,肌肉注射亦可。需注意 ATP 在体内数量较固定,注射过量,会造成浪费或引起未知毒副作用,建议剂量控制在 1 mg/kg 内,每天用药总量建议不超过 80 mg。

3.5.2 辅酶 A 辅酶 A (CoA) 是体内乙酰化反应的辅酶,参与体内乙酰化反应,对糖、脂肪和蛋白质的代谢起重要作用,如三羧酸循环、肝糖原积存、乙酰胆碱合成、降低胆固醇量、调节血脂含量及甾体物质合成等。

在治疗细小病毒病的过程中,CoA 在营养支持中能提供机体生命所需的 90% 能量,是体内 70 多种酶反应通路的辅助因子,包括糖类分解、脂肪酸氧化、氨基酸分解、丙酮酸降解、激发三羧酸循环。同时,CoA 支持机体免疫系统对有害物质的解毒、激活白细胞、促进血红蛋白合成、参与抗体合成^[16]。

注射用 CoA 主要规格有 50 单位、100 单位和 200 单位,治疗细小病毒建议静脉注射每次 50~200 单位,2~3 次/d,50~400 单位/d,可与三磷酸腺苷合用,增加效果。

3.5.3 维生素 B₁ 维生素 B₁ 亦称为硫胺素,是糖类代谢必需的营养物质,保证神经系统、消化系统和心血管系统的功能正常运作^[17]。作为机体重要的营养要素,犬只必须通过食物获取维生素 B₁,但是由于禁饮食,患犬容易缺乏各类需外界摄取的营养物质,其中维生素 B₁ 缺乏,会导致四周神经炎及产生糖类物质代谢障碍。因此有必要在治疗细小病毒期间给药以辅助治疗。

犬只对维生素 B₁ 的每日需求量暂不明确,但其毒性低,临床上笔者曾尝试对大型犬只每日给药 100 mg,连用 5 d,未见有明显毒性反应。

且过量维生素 B₁ 会通过肾脏排出, 安全系数高。治疗细小病毒期间, 建议剂量 10 mg/kg, 1~2 次/d, 直至健康饮食为止。维生素 B₁ 切忌与碱性药物配伍, 其在碱性溶液中易变质分解。

3.5.4 维生素 B₁₂ 维生素 B₁₂ 亦称钴胺素, 是唯一含金属元素的维生素。维生素 B₁₂ 主要由胃肠道主动吸收, 在维持正常造血功能与神经系统功能中作用明显。维生素 B₁₂ 能促进叶酸周转利用, 促进 DNA 合成, 保障正常的红细胞生成, 但由于无法进食及不断出血, 容易导致患犬贫血。因此, 维生素 B₁₂ 可作为一种辅助治疗药物, 减轻其贫血情况。

维生素 B₁₂ 可肌肉注射或静脉注射, 25~100 μg/d, 即可补充足够维生素 B₁₂。另有研究^[18]显示, 维生素 B₁₂ 与维生素 B₁ 合用, 有可能会增加过敏反应发生几率, 但笔者在临床治疗上暂未发生, 故需要再作探讨。

3.5.5 维生素 C 维生素 C 又称抗坏血酸, 是市面上最常见、最广泛的一种维生素, 亦是机体每日需求量最大的一种维生素。其抗氧化性及诸多的生理功能, 使其在治疗多方面疾病都成为一种辅助性药物。

维生素 C 可皮下、肌肉、静脉注射及口服, 可根据患犬不同情况予以给药。正常情况下建议剂量 25 mg/kg, 1~3 次/d, 每日剂量建议不超过 1 g。过大剂量长期给药有可能导致停药后会出现坏血症; 尿液中草酸盐增多, 易引发尿道结石; 影响钙、磷吸收, 骨骼发育受影响^[19]。

参考文献:

- [1] 刘志强. 犬细小病毒 CPV₂ 的分离鉴定及其卵黄抗体 IgY₂ 治疗制剂的研制[D]. 新疆: 石河子大学, 2008.
- [2] 李河林, 焦铁军. 犬细小病毒病研究进展[J]. 动物医学进展,

2008, 29(5): 73-77.

- [3] 李河林, 焦铁军, 刘淑红, 等. 犬细小病毒病研究进展[J]. 动物医学进展, 2008(5): 73-77.
- [4] 文翼平, 李英伦, 文心田. 犬细小病毒单克隆抗体对犬细小病毒病的临床应用研究[J]. 中国兽医学报, 2011(11): 1564-1567.
- [5] 林德贵. 注射用重组犬干扰素 α 治疗犬瘟热病犬的临床应用[A]. 中国畜牧兽医学学会兽医外科学分会、中国畜牧兽医学学会小动物医学分会. 全国兽医外科学第 13 次学术研讨会、小动物医学第 1 次学术研讨会暨奶牛疾病第 3 次学术讨论会论文集[C]. 中国畜牧兽医学学会兽医外科学分会、中国畜牧兽医学学会小动物医学分会, 2006.
- [6] 张卫. 病毒唑的临床应用[J]. 新医学, 1990(3): 151-152.
- [7] 李凡, 易世红. 双黄连粉针剂抗病毒作用[J]. 中草药, 2002, 33(1): 52-54.
- [8] 孙慧萍, 蔡力力. 喹诺酮类药物的作用机制及不良反应[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(7): 1014-1016.
- [9] 祖玉梅. B-内酰胺类抗生素的应用与发展现状[J]. 中国实用医药, 2010, 5(30): 246-248.
- [10] 郭家瑞, 王卫国. 庆大霉素研究概述[J]. 海峡药学, 2009, 21(10): 5-8.
- [11] 冯汀兰, 赵宇芳, 韩冬. 巴曲亭外用治疗创伤性出血的应用研究[J]. 中国现代药物应用, 2012, 18: 91-92.
- [12] 文继平, 伍良知. 酚磺乙胺注射液与常用注射抗菌药物的配伍稳定性[J]. 中国现代药物应用, 2007(6): 26-28.
- [13] 杜光, 张程亮. 止血药与临床常用药物的配伍稳定性[J]. 药物与临床, 2012, 9(2): 36-39.
- [14] 杨灵莉. 维生素 K₂ 的合成方法研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2012.
- [15] 吴桂生. 阿托品不良反应 56 例临床分析[J]. 中国现代药物应用, 2010, 11: 118-119.
- [16] 栾贻宏, 路宁, 王基伟, 等. 辅酶 A 的生化功能和应用[J]. 中国生化药物杂志, 2003(3): 159-161.
- [17] 简林凡. 维生素 B₁ 缺乏与防治[J]. 井冈山医学专学报, 2004(3): 68-70.
- [18] 林圣生, 雷招宝. 维生素 B₁₂ 致不良反应 39 例文献分析[J]. 药物流行病学杂志, 2013, 10: 565-567.
- [19] 赵英阶, 杨桂海. 过量使用维生素 C 的危害[J]. 滨州医学院学报, 1995(4): 115.

(上接第 28 页)

- [6] 阎祖炜, 朱欣, 李闻文. MTT 法、CPE 观察法用于药物细胞毒性实验的比较与分析[J]. 实用预防医学, 2007, 14(5): 1552-1554.
- [7] 杨翠云, 刘永定. MTT 方法评价微生物细胞活性的探讨[J]. 水生生物学报, 2009, 33(4): 577-580.
- [8] 李宁, 万文婷, 金林红. CCK-8 法和 MTT 法检测人前列腺癌 PC3 细胞活性的最佳条件比较研究[J]. 贵州大学学报(自然科学版), 2009, 26(3): 18-20.
- [9] 冯春琼, 马文丽, 宋艳斌, 等. 细胞凋亡的 MTT 染色法检测

[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(3): 262-263.

- [10] 李淑艳, 杨秀珍, 杨凤坤, 等. MTT 法检测 CIK 细胞的体外杀瘤活性[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2003, 24(1): 3-5.
- [11] 刘爱旗, 夏璐. CCK-8 法与 MTT 法检测兔成纤维细胞活性的比较研究[J]. 中国医学创新, 2013, 10(2): 12-13.
- [12] 陈冲, 焦宁, 靖景艳, 等. 台盼蓝拒染法、MTT 法、CCK-8 法在研究 As203 细胞毒性作用中的意义[J]. 中国医药导报, 2013, 10(12): 24-26.
- [13] 齐鹏, 肖进, 王楠, 等. MTT 法评价猪口蹄疫合成肽疫苗的细胞免疫应答[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(2): 13-15.

一例猪异物性胸膜炎案例分析

陈炜锋, 郑 妍, 张 蔓, 李继贤, 杨瑞龙, 江丹莉

(潮州市动物卫生监督所, 广东 潮州 521000)

摘 要: 免疫接种是预防、控制疫病的重要环节。因免疫操作或接种方法不当引起的免疫失败常给猪场造成巨大经济损失。通过介绍一例由于免疫操作不当导致猪异物性胸膜炎, 造成大批量仔猪死亡的案例, 分析免疫正确操作的重要性。

关键词: 免疫注射; 疫苗; 异物性胸膜炎

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文献编号: 1005-8567(2016)03-0047-02

在日常监督巡查中, 潮州市动物卫生监督所获悉辖区一猪场出现仔猪异常死亡现象, 随即组织技术人员前往调查。经查, 该猪场存栏量约 1000 头, 比邻海边。由于场主反映该场仔猪存在咳嗽、喘气等呼吸道症状, 遂由疫苗厂家技术人员示范, 对 20 头发病仔猪进行猪支原体肺炎活疫苗(168 株)免疫注射, 经数周观察后未发现异常, 便由场主分批次对 5~7 日龄仔猪进行免疫注射, 共计免疫仔猪 470 头。但随后发现自免仔猪大量死亡, 经开具“齐威特”、“黄金芪”等药物配合诊治后, 仔猪临床症状逐步减轻。据统计, 本次该场共有 200 多头仔猪死亡, 占免疫仔猪头数的 40% 以上, 部分存活仔猪也成为僵猪。

1 临床症状与解剖检查

自免仔猪群体表现为发热 (38.5~39.4℃)、精神沉郁、被毛粗乱、呼吸异常、食欲减退、体型消瘦、生长缓慢, 部分病猪出现腹式呼吸, 胸壁叩诊痛感明显, 胸部听诊有摩擦音, 胸部叩诊呈水平浊音, 间歇性咳嗽, 有时轻度腹泻, 并陆续有死亡病例出现。

选择临床症状明显的病猪 4 头, 进行解剖。解剖猪只右侧肋间发现环形瘢痕, 呈圆形出血点, 疑是针眼 (该注射部位已偏离疫苗说明书要求的部位接近 10~20 cm), 与之对应的肺部是粘连和渗出物最多的部位, 体表其他皮肤黏膜未见明显异常。胸腔中有大量纤维蛋白凝块和混浊液体, 胸膜增厚, 肺的腹侧面萎缩, 呈暗红色。部分病例胸腔

腹侧面肉芽组织大量增生, 心包外膜有纤维性渗出物包附, 心肌触感较软, 其他脏器未见明显病变。

2 结果与分析

经调查, 附近某猪场也使用了该批次疫苗, 未见异常反应, 排除疫苗质量问题。厂家技术人员以正确免疫方式免疫注射后的仔猪未见异常反应, 初步怀疑场方免疫操作存在问题。解剖病猪发现注射部位严重偏移, 进一步印证了操作不当这一结论 (注: 该疫苗需由猪右侧肩胛后缘 2 cm 处肋间隙进针, 肺部内注射接种)。临床解剖肺脏未见实质性病变, 而典型的猪支原体肺炎以两肺的心叶、尖叶和膈叶发生对称性的实变, 中间叶实变, 以及肺部淋巴结肿大、增生为特征, 因此, 可与猪支原体肺炎相鉴别。猪胸膜炎可分为原发性与继发性, 继发性胸膜炎一般伴有其他脏器特征性病理变化。本案例除胸膜和胸腔腹侧面有明细病理变化外, 其他脏器未见明显病变, 考虑为原发性胸膜炎。

综上所述, 这是一例由于免疫注射操作失误导致疫苗误注入胸腔而引起的异物性胸膜炎。

3 建议

3.1 要切实提高防疫员的免疫操作技术, 保证免疫接种效果

随着养猪产业迅猛发展, 疫病控制成为制约其经济效益和发展的重要因素。免疫接种作为预防、控制疫病的重要环节, 不容轻视。免疫操作失

误或接种方法不当通常会引起免疫失败, 甚至造成不良反应或死亡, 最终给养殖造成损失。严格按照免疫规范操作, 尽量减少“飞针”和“空漏”情况, 疫苗注射到所要求的皮下或肌肉等相应部位, 发现漏免猪只应当及时进行补免^[1-2]。在调查过程中, 我们还发现, 养殖场兽医人员在执行免疫操作上还存在很多认识上的误区, 容易造成免疫失败或免疫效果不理想, 增加了养猪成本, 而且不能很好地控制疫病, 给猪场造成巨大的经济损失^[3-5]。

因此, 在使用疫苗尤其是特殊类型的疫苗时, 一定要严格按照使用说明操作, 以免造成不必要的损失, 更要加强前期免疫人员的技术培训, 或由有经验的兽医技术人员现场指导。

3.2 倡导科学诊治与疫病风险评估

在本案例中, 猪场主主观认为仔猪感染支原体病, 并自行选用疫苗是不科学的做法。从最终的临床解剖结果看也能基本排除支原体感染可能。因此, 在各级有关部门加大对动物疫情监测频次

与密度的同时, 驻场兽医人员也应注重疫病的科学诊治, 对症治疗, 才能取得事半功倍的效果。各级兽医主管部门也应提高疫情分析与风险评估能力, 通过科学采样、鼓励养殖场主动送检, 以科学准确的实验室诊断结果及风险评估报告, 指导临床诊治与疫病防控, 降低养殖风险与提高养殖效益。

参考文献:

- [1] 郭小参, 方剑玉, 虞德屏, 等. 当前猪场免疫失败的原因及应对措施[J]. 养猪, 2013, 1: 97-98.
- [2] 张华萍, 王恒, 史明基, 等. 规模化猪场免疫失败原因分析及对策[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2012, 28(1): 101-102.
- [3] 姚旭旺. 规模化猪场免疫失败原因分析与探讨[J]. 北方牧业, 2015, 15: 26.
- [4] 周栋, 陆栋, 张燕. 规模猪场免疫失败的原因分析[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2013, 29(10): 35.
- [5] 王云萍. 动物免疫失败的原因及对策措施[J]. 畜禽业, 2014, 7: 29-30.

《广东畜牧兽医科技》(双月刊)

(1976年创刊, 大16开本, 正文52页)

主管单位: 广东省农业科学院

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

订 价: 每期定价10元, 全年60.00元(含平寄邮费)。

订阅方式: 本刊实行自办发行。读者可通过银行汇款至本刊编辑部。

(1) 开户银行: 农行广州市五山支行;

(2) 收款人全称: 广东省农科院彩田农业科技信息中心;

(3) 帐号: 44-056901040003081

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: 广州市天河区五山金颖路31号《广东畜牧兽医科技》编辑部 (邮编: 510640)

电 话: 020-38319957、020-38319211、020-38319958

E-mail: gdxmsy@163.com、gdxmsykj@163.com

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

发酵床饲养对樱桃谷鸭生产性能的影响

罗秋兰¹, 梁祖满¹, 苏记良¹, 邝哲师², 潘木水², 黄静²

(1. 广东康达尔农牧科技有限公司, 广东 东莞 523130;

2. 广东省农科院蚕业与农产品加工研究所, 广东 广州 510610)

摘要:为研究发酵床对樱桃谷鸭养殖的影响, 选取1500只1日龄樱桃谷鸭苗, 随机分成对照组和发酵床组, 每组3个重复, 每个重复250只樱桃谷鸭。对照组采用传统水养, 发酵床组采用发酵床垫料平养。试验结果表明, 发酵床有增加2、4、7周龄日增重的趋势, 同时有降低采食量和料肉比的趋势 ($P>0.05$); 发酵床提高成活率0.7个百分点 ($P>0.05$), 提高经济效益0.9元/羽。

关键词:发酵床; 樱桃谷鸭; 生产性能; 经济效益

中图分类号: S834

文献标识码: A

文献编号: 1005-8567(2016)03-0049-02

近年来,随着养鸭业的不断发展,养鸭的规模化和工厂化程度不断提高,但疫病频繁、药物残留量和环境污染等问题已经开始制约养鸭业的发展,如何降低成本并且生产绿色安全的肉品成为当前养鸭业面临的重要难题之一^[1]。传统肉鸭养殖主要问题有以下几方面:鸭与粪便直接接触,发病率及死亡率高;生长缓慢,料肉比高;需要大量垫料,同时产生大量粪污。养殖过程中产生的粪便会污染河流、水源^[2]。随着国家对环保的重视程度与日俱增,畜禽养殖压力越来越大。

而发酵床技术是基于控制畜禽粪便排放及污染的一种新型环保型养殖方式,符合国家养禽业可持续发展的需要^[3]。该养殖技术利用锯木屑、稻壳、农作物秸秆、菌糠等农副产品下脚料制作成垫料,铺设在特殊设计的发酵床上,借助有益菌的作用分解发酵粪便中的有机物质,实现无臭味、无污染、零排放、生态环保^[4]。本试验旨在探究生物发酵床对樱桃谷鸭生产性能 and 经济效益的影响,从而为发酵床养殖技术在家禽生产中的推广应用提供依据。

1 材料与方法

试验在广东康达尔农牧科技有限公司的麻涌

试验基地进行。试验时间从2015年7月4日至8月14日,共42 d。

1.1 试验材料

试验动物为1日龄的樱桃谷鸭1500只;鸭日粮为广东康达尔农牧科技有限公司专用肉鸭料(包括小鸭料和肥鸭料);发酵专用益生菌剂由广东省农科院蚕业与农产品加工研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 发酵床制作 发酵床底层为泥土结构,垫料是稻壳和木屑,2:1按一定比例混合均匀,加入配制好的菌液(益生菌剂预先活化)(一吨垫料加菌液25~30 kg),调节物料的含水率至30%~40%,翻动拌匀后堆垛轻微压实。经过前期发酵后,直接将垫料摊开、平铺于地上。

1.2.2 试验设计 将1500只1日龄的樱桃谷鸭随机分为对照组和发酵床组,每组3个重复,每个重复250只。

1.2.3 饲养管理 对照组为传统水养,鸭舍建在鱼塘上,白天活动面积为分隔好的鱼塘水域;发酵床组使用发酵床垫料平养,发酵床垫料厚度35 cm左右,此外沿墙设置了1条半隔离式饮水线以保证饮水质量。各组自由采食和饮水,同一阶段使

收稿日期:2016-04-28

基金项目:广东省产学研合作项目(2013B090600009);东莞市产学研合作项目“华南地区发酵床养禽关键技术研究示范”(2014509112215)

作者简介:罗秋兰(1984-),女,硕士,畜牧师,E-mail:617432691@qq.com

通讯作者:潘木水(1967-),男,硕士,副研究员,E-mail:308134456@qq.com

用相同日粮(1~14日龄为小鸭料,14~42日龄为肥鸭料),免疫接种按常规程序进行。发酵床垫料有板结要及时翻扒。

1.2.4 测定指标 试验期间每天记录耗料量、使用的药物品种与数量,分别在2、4周龄禁食(自由饮水)12 h后称重,并计算试验鸭平均日增重、平均日采食量、料肉比、成活率 and 经济效益。

采用SPSS19.0软件对试验数据进行统计分析,用t检验分析两组间各指标的差异显著性,以 $P<0.05$ 作为差异显著的判断标准。

表1 发酵床对樱桃谷鸭生产性能的影响

处理组	1~2周龄			1~4周龄			1~7周龄		
	采食量 (g/只)	日增重 (g/只)	料肉比	采食量 (g/只)	日增重 (g/只)	料肉比	采食量 (g/只)	日增重 (g/只)	料肉比
对照组	51.30±0.62	38.00±0.58	1.35±0.03	108.73±2.04	58.00±0.95	1.87±0.04	168.67±9.26	73.90±1.49	2.28±0.12
发酵床组	49.47±0.74	38.23±0.46	1.29±0.33	106.00±1.51	59.23±0.79	1.79±0.03	163.33±5.55	75.10±0.81	2.17±0.05

2.2 发酵床对樱桃谷鸭成活率的影响

樱桃谷鸭42日龄成活率,发酵床组为97.90%(±0.32%),对照组为97.20%(±0.25%),成活率提高0.7个百分点($P>0.05$)。这表明发酵床模式下鸭群的健康状态有所提高,有增强抗病力的趋势。

2.3 发酵床对樱桃谷鸭经济效益的影响

由表2可见,不管是饲料,还是药物和人工方面,发酵床养殖均低于传统水养,发酵床养殖42 d的樱桃谷鸭可节约费用0.9元/羽。

表2 发酵床对樱桃谷鸭经济效益的影响(元/羽)

处理组	饲料	药物	人工
对照组	17.8	0.2	0.3
发酵床组	17.1	0.1	0.2

3 结论与讨论

本试验中,发酵床组樱桃谷鸭的采食量和料肉均低于对照组,日增重均高于对照组,说明发酵床模式下平养樱桃谷鸭相比传统水养模式能够降低料肉比,提高饲料转化率,从而提高樱桃谷鸭的生长性能,这跟赵伟等^[4]的研究结果一致。究其原因,可能微生物制剂可以分解粪便,使之产生菌体蛋白,为动物提供更多的有益物质,弥补家禽消化

2 结果与分析

2.1 发酵床对樱桃谷鸭生产性能的影响

从表1可知,发酵床组樱桃谷鸭2、4、7周龄的采食量、日增重均高于对照组,但无显著性差异($P>0.05$)。其中2、4、7周龄发酵床组采食量分别较对照组低3.6%、2.5%、3.2%,日增重分别较对照组高0.6%、2.1%、1.5%。而发酵床组2、4、7周龄的料肉比均低于对照组4.2%、4.5%、4.8%,但差异不显著($P>0.05$)。这表明发酵床组相比传统水养有降低料肉比、提高饲料转化率的趋势。

缺陷,从而促进动物的体况发育,提高生产性能和饲料转化率^[5]。此次试验,两组樱桃谷鸭的生产性能均不显著可能原因是:试验时间段为南方高温季节,而发酵床在养殖过程中是不断分解粪便产生能量的,发酵床产热和夏季的高温这些因素应该对鸭群产生热应激,从而影响鸭群的生产性能,如果在冬季,估计发酵床养殖的效果会大大提升。林勇等^[6]研究表明,夏季发酵床与传统水养两种饲养模式肉鸭总成活率、总出栏重与总采食量在一年四季中最低。本试验结果与该结论相吻合。

成活率是衡量鸭生长健康状态的重要指标之一。发酵床的垫料中有强大的微生物活菌剂,能够有效改善鸭肠道的微生态环境,抑制病原菌的生存及生长^[7],从而减少疾病的发生,让鸭群更加健康,也就保证了全群有较高的成活率,这也解释了发酵床组的成活率高于对照组。

本试验结果表明,使用发酵床平养,对生长性能无不良影响,而且有提高日增重和有降低料肉比的趋势;采用发酵床养殖樱桃谷鸭能提高成活率0.7个百分点,且用药少,节工、节粮,提高经济效益0.9元/羽。

(下转第52页)

农业部关于促进现代畜禽种业发展的意见

我国是畜产品生产和消费大国,畜禽良种是畜牧业发展的基础和关键。为提升畜牧业综合竞争力,保障畜产品供给安全,现就促进现代畜禽种业发展提出如下意见。

一、我国畜禽种业发展的形势

(一) 畜禽种业发展取得积极成效

近年来,农业部和地方各级畜牧兽医部门认真贯彻《畜牧法》及配套法规,启动生猪等主要畜种遗传改良计划,实施良种补贴、良种工程、资源保护等政策,推动畜禽良种繁育体系不断完善,种业基础进一步夯实。一是育种自主创新水平大幅提升。核心育种场良种登记、性能测定等基础性育种工作稳步推进,生猪、奶牛和肉牛等引进品种的本土化选育进程加快;通过引进消化吸收再创新,培育了135个畜禽新品种、配套系,其中国产高产蛋鸡市场占有率达40%以上,打破了对引进品种的依赖。二是商业化育种蓬勃发展。畜禽种业龙头企业不断发展壮大,市场集中度逐步提高,以企业为主体、市场为导向、产学研相结合的商业化育种体系初步建立。三是畜禽遗传资源保护成效显著。原产地保护和异地保护相结合、活体保种和遗传物质保存互为补充的畜禽遗传资源保护体系不断完善,建设了国家级保种场154个、保护区22个和基因库6个。

(二) 畜禽种业发展面临严峻挑战

当前我国畜牧业正处于转型升级的关键时期,畜禽种业长期积累的矛盾和问题愈发凸显。一是部分优良品种核心种源依赖进口,全部白羽肉鸡祖代、大部分优质种牛精液和胚胎从国外引进。二是联合育种机制缺乏,育种企业上下游联合与横向联合的育种机制不健全,育种素材难交流,资源共享难实现。三是种畜禽企业综合实力偏弱,数量多、规模小,技术力量薄弱,科技创新能力和市场竞争力不足,尚未形成市场普遍认可的优势品牌。四是种业市场监管基础薄弱,种畜禽生产经营执法队伍不健全,执法手段单一,质量评价和执法监管滞后。

各地畜牧兽医部门要充分认识促进现代畜禽种业发展的重要性和紧迫性,坚持问题导向和需求导向,加快科技攻关和自主创新,全面提升畜禽种业国际竞争力,为建设畜牧业强国奠定坚实的种业基础。

二、总体要求

(三) 指导思想

全面贯彻创新、协调、绿色、开放、共享的发展理念,落实推进农业供给侧结构性改革的决策部署,以培育自主品牌、打造民族品牌、提升核心种源自给率和扩大良种覆盖面为目标,以市场为导向、企业为主体,坚持高产高效的育种方向,全面实施畜禽遗传改良计划,健全畜禽良种繁育体系,加快优良品种推广,加强地方资源保护与开发,加大扶持力度,强化科技支撑,完善体制机制,鼓励自主创新,提高畜禽种业发展质量效益和竞争力,为现代畜牧业发展

提供有力支撑。

(四) 基本原则

自主育种,有序引进。坚持地方品种原始创新和引进品种消化吸收再创新相结合,加快培育适应市场需求的畜禽新品种和配套系,形成自主品牌,提升畜禽种业的核心竞争力。引导国外优良品种有序引进,提高引种质量。

企业主体,政府引导。坚持市场导向,突出企业主体地位,构建商业化畜禽种业体系。加强政策扶持,发挥财政资金的引导作用,通过金融、保险、土地等政策多渠道支持畜禽种业发展,调动种畜禽企业的积极性。

科技支撑,提质增效。坚持产学研相结合,激发种畜禽企业和科研机构活力,构建畜禽种业科技创新平台。支持开展常规基础性育种,积极应用分子育种等先进技术和前沿技术,降低育种成本,提高育种效率。

突出重点,统筹兼顾。重点突出生猪、奶牛、蛋鸡、肉鸡、肉牛和肉羊等主要畜种,突出生产性能好、适应范围广的主导品种。结合区域特点和资源禀赋,加强水禽、蜜蜂等地方特色品种资源开发利用,满足多元化的市场需求。

(五) 发展目标

主要引进品种本土化选育取得明显进展,地方畜禽遗传资源得到有效保护利用,畜禽育种评价体系基本建立。培育一批市场竞争力强的新品种、配套系和品系,打造一批大型畜禽种业集团和民族品牌。形成以育种企业为主体,产学研相结合、育繁推一体化的种业发展机制。到2025年,主要畜种核心种源自给率达到70%,国家级保护品种有效保护率达到95%以上,基本建成与现代畜牧业相适应的良种繁育体系。

(六) 育种路径

以生产性能测定和遗传评估为基础,坚持常规育种与分子育种相结合。家畜突出本品种选育,充分挖掘地方品种资源优势,培育新品种、配套系,家禽突出商业配套系培育。生猪以杜洛克猪、长白猪、大白猪等品种为主,系统开展本土化选育,打造“华系”种猪品牌;奶牛以荷斯坦牛为主,肉牛以西门塔尔牛、安格斯牛、秦川牛、延边牛等品种为主,重点培育优秀种公牛;肉羊以小尾寒羊、湖羊、杜泊羊、萨福克羊等品种为主,开展本品种持续选育;蛋鸡以配套系培育和持续选育为主,肉鸡以培育黄羽肉鸡配套系和新品种为主,支持开展白羽肉鸡育种攻关。

三、主要任务

(七) 提升育种创新能力

全面实施遗传改良计划,提升自主育种能力。继续开展国家核心育种场遴选,指导企业扎实开展生产性能测定等基础工作。以生猪、奶牛为突破口,支持和鼓励育种企业成立纵向或横向联合育种组织,探索建立家畜联合育种机制。支持建立国家畜禽遗传评估中心,提高遗传评估的

准确性和及时性,指导育种企业合理开展选种选配。建立畜禽全基因组选择技术平台,开展奶牛、生猪、肉牛全基因组选择育种。

(八)完善育种评价机制

依托国家畜禽遗传资源委员会,完善新品种和配套系审定制度,探索开展新品系审定。建立健全种畜禽性能测定体系,坚持场内测定和集中测定相结合,加强第三方测定机构条件能力建设,提高集中测定的权威性和公正性。提升遗传评估中心育种数据分析能力,定期向社会发布遗传评估成绩,推介优良种畜,引导广大养殖场户选良种、用良种。通过种畜拍卖等多种形式,加快建立畜禽良种优质优价机制,引导企业不断提高育种水平。

(九)加快优良种畜推广

结合各地资源条件和养殖基础,明确优势区域主推品种,健全畜禽良种推广体系。支持建设国家良种扩繁推广基地,引导种业企业与规模养殖场户建立紧密的利益联结机制,打造一批国家级育繁推一体化种业企业。支持种公畜站改善基础设施条件,扩大优质种群规模,确保采精种公畜全部具备性能测定成绩。加强基层畜牧技术推广机构建设,完善冷链运输体系,提高人工授精服务站点社会化服务水平,打通良种推广的最后一公里。

(十)强化畜禽遗传资源保护

继续建设一批国家级和省级畜禽遗传资源保种场、保护区和基因库,努力确保列入保护名录的资源得到有效保护。组织实施畜禽地方品种登记,建立国家畜禽遗传资源动态监测预警体系。开展藏区等区域畜禽遗传资源调查,实现畜禽遗传资源调查全覆盖。开展地方畜禽品种种质特性评估与分析,挖掘优良特性和优异基因。完善畜禽遗传资源保护理论和方法,制定国家级、省级保种场个性化保种方案,评估保种效果,提升保种效率。

(十一)培育壮大龙头企业

将畜禽种业纳入现代种业发展基金支持范围,采取股权投资等方式,重点支持育种基础好、创新能力强、市场占有率高的种畜禽企业,整合资源、人才、技术等要素,培育一批大型畜禽种业集团。鼓励种业企业建设现代化育种科研平台,推动企业与科研院校共建高标准实验室、育种

研发中心和良繁基地。以优势品种为基础,以优势种畜禽企业为载体,通过繁育推广、市场推介、产业开发、媒体宣传等形式,打造一批具有国际竞争力的畜禽种业品牌。

(十二)加强种畜禽疫病净化

以核心育种场为重点,加强种用动物健康管理,推动主要动物疫病净化,从生产源头提高畜禽生产健康安全水平。坚持政府政策引导、企业自主参与、多方技术支撑,采取从场入手、分步实施、示范带动、合力推动等方式,开展种畜禽疫病净化。将疫病净化与核心育种场建设、标准化示范创建等相结合,在政策、项目、技术等方面给予支持。积极开展种畜禽场主要动物疫病净化试点、示范,推动种畜禽场主动开展疫病净化,保障种畜禽质量。

四、保障措施

(十三)加大政策扶持

现代畜禽种业是一项系统工程,具有战略性、长期性、公益性。各地要抓紧编制现代畜禽种业发展规划,积极争取将畜禽种业发展经费列入财政预算。落实好现代种业提升工程、良种补贴、种质资源保护等各项扶持政策,加大对生产性能测定和遗传评估等育种基础工作的支持力度。围绕种畜禽企业用地、金融保险等需求,加强政策创设,完善现代畜禽种业发展政策体系。

(十四)强化科技支撑

充分整合国家产业技术体系、科研院所和种畜禽企业等资源,形成科技支撑合力。以新品种培育、遗传物质保存、特色资源开发等为重点,开展联合攻关,研发一批先进实用技术。健全遗传改良计划专家组工作机制,指导企业制定完善育种方案,开展经常性技术服务。开展性能测定、疫病净化等技术培训,提高种畜禽企业良种繁育技术水平。

(十五)依法加强管理

加强种畜禽市场监管,加大执法检查力度,严厉打击无证经营等违法违规行为。加强种畜禽进出口管理,科学评价引进种畜禽的生产性能,防止低水平重复引种。提高种畜禽场准入门槛,提升企业生产经营软硬件水平。继续实施种畜禽质量安全监督检查项目,加大抽检力度,督促企业提高种畜禽质量,营造健康有序的市场环境。

(上接第50页)

参考文献:

- [1] 李雯,舒刚,郑占涛,等.发酵床模式饲养肉鸭效果观察[J].饲料研究.2012(12):78-80.
- [2] 廖晓光,李东生,廖玉英,等.我国肉鸭主要养殖模式及存在的问题[J].现代农业科技,2015(20):234-235.
- [3] 李国.发酵床养禽法技术原理[J].家禽科学,2010,12(4):

20-21.

- [4] 赵伟,刘玮孟,张广勇,等.樱桃谷肉鸭发酵床养殖生产性能及效益分析[J].江苏农业科学,2012,40(10):192-193.
- [5] 刘振钦,高继辉.有机生态菌发酵床养鸡[J].菌物研究,2009,7(3/4):193-194.
- [6] 林勇,王建军,施振旦,等.不同季节与饲养密度条件下发酵床养殖对肉鸭生产性能的影响[J].家畜生态学报,2015,36(3):78-82.
- [7] 吴金山.干撒式发酵床肉鸡饲养技术[J].中国家禽,2009,31(12):46-48.