

双月刊 1976年3月创刊
第40卷第1期 (总第179期)
2015年02月18日出版
ISSN 1005-8567
CN 44-1243/S

主管单位:广东省农业科学院
主办单位:广东省畜牧兽医学会
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

主编:蒋宗勇
副主编:孙彦伟
责任编辑:孙彦伟 岑俏梅
编委主任:蒋宗勇
编委(排名不分先后):
蒋宗勇 余业东 王浩 顾万军
曹俊明 辛朝安 屈源泉 廖明
曾振灵 毕英佐 徐志宏 舒鼎铭
孙彦伟 王贵平 张健骝 王政富
刘彩霞 熊惠军 吴玄光 刘清神
特邀编委:
陈峰 谢志刚 林旭埜 李岩
陈瑞爱 罗满林 向华 王华

编辑出版:《广东畜牧兽医科技》编辑部
地址:广州市先烈东路135号(510500)
电话:020-37245052 37288167
传真:020-37245052
网址:http://www.gdaav.org
E-mail:gdmsykj@163.com
印刷单位:广州市人杰彩印厂
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
每期定价:5.50元
广告经营许可证号:440000100037

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。本刊将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——数字化期刊群和教育阅读网。

目 录

·专题综述·

- 氟苯尼考的药效学及其对禽源致病菌的治疗作用... 李亚男, 杨帆, 等(1)
DNA疫苗研究进展... 黄妙容, 陈瑞爱, 等(5)
副猪嗜血杆菌病诊断方法研究进展... 于新友, 李天芝, 等(8)
加米霉素及其在牛呼吸系统疾病中的应用... 罗显阳(12)

·畜牧技术·

- 散养蛋鸡如何提高养殖效益... 陈永亮, 王海军, 等(16)
肉鸽规模化养殖的现状及对策... 曹永长, 陈新松(18)
2014年我国生猪市场回顾及2015年形势展望... 虞华, 原娟娟, 等(21)

·兽医临床·

- 一例猪繁殖与呼吸综合征病毒与副猪嗜血杆菌混合感染病例的诊断及防治... 裴仇福, 陈瑞爱, 等(24)
手术治愈腹部刀伤水牛1例... 叶志如(28)

·试验研究·

- 鸭坦布苏病毒和产蛋下降综合征病毒二重PCR检测方法的建立... 孙敏华, 李林林, 等(29)
食蟹猴志贺氏菌、沙门氏菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌多重PCR检测方法的建立及初步应用... 陆红玉, 罗彬, 等(34)
猪圆环病毒2型ORF2基因在巴斯德毕赤酵母中的表达... 刘娜, 吴锋, 等(40)

·华南宠物园地·

- 不同年龄段Beagle犬血压测定分析... 胡敏华, 周治东, 等(44)
宠物蛇的饲养入门... 吴乃银, 韦泽欧, 等(47)
两例犬洋葱中毒的诊治... 季珉珉, 许建国, 等(51)

·信息之窗·

- 2015“永顺杯”优秀论文评选启事... (11)
广东省家禽经营管理办法... (53)
《广东省家禽屠宰厂(场)设置指导意见》... (56)
2014“永顺杯”优秀论文评审结果... (中18)

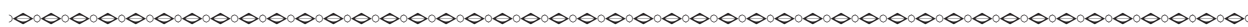
GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in march 1976(Bimonthly)

Feb.2015 Volume 40, Number 1 (Total No.179)

Main Content

- Pharmacodynamics and Treatment of Florfenicol in *Avian Pathogenic Bacterium*
..... Li Yanan, Yang Fan, et al (1)
- Progress of DNA vaccine Research Huang Miaorong, Chen Rui'ai, et al(5)
- Research Progress of Diagnostic Method of *Hemophilus Parasuis* Yu Xinyou, Li Tianzhi, et al(8)
- Gamithromycin and its Treatment in Bovine Respiratory Disease Luo Xianyang(12)
- How to Improve Production of Cage-free Hens Chen Yongliang, Wang Haijun, et al(16)
- Current Situation of Scale Feeding of Meat Pigeon Cao Yongchang, Chen Jinsong(18)
- Situation in 2014 and Trends in 2015 of Pig Industry Yu Hua, Yuan Juanjuan, et al (21)
- Diagnosis and Prevention of Infections of Highly Pathogenic *Porcine Reproductive and Respiratory
Syndrome (PRRS) Mixed with Haemophilus Parasuis Disease* Pei Zhangfu, Chen Rui'ai, et al(24)
- A Case of Curation of Knife Injury in Abdomen of Buffalo Ye Zhiru(28)
- Duplex PCR Assay for the Detection of *Duck Tembusu Virus* and *Egg Drop Syndrome Virus*
..... Sun Minhua, Li Linlin, et al(29)
- Multiple PCR Assay for *Shigella*, *Salmonella* and *Yersinia Enterocolitica* in *Cynomolgus* Monkeys
..... Lu Hongyu, Luo Bin, et al(34)
- Expression of *Porcine Circovirus 2* ORF2 Gene in *Pichia pastoris* Liu Na, Wu Feng, et al(40)
- Analysis of Blood Pressure in Different Age of Beagle Dogs Hu Minhua, Zhou Zhidong, et al(44)
- Feeding of Snake Pets Wu Naiyin, Wei Zeou, et al(47)
- Two Cases of Canine Onion Poisoning Ji Minmin, Xu Jianguo, et al(51)



Sponsored by: Guangdong Association of Animal Husbandry
and Veterinary Medicine, Institute of Animal
Science and 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: SUN Yanwei

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

Post Code: 510500

Tel: (020)37245052 37288167

Fax: (020)37245052

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

氟苯尼考的药效学及其对禽源致病菌的治疗作用

李亚男, 杨帆*, 王丹, 孙玲玲, 白景英
(河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471003)

摘要: 氟苯尼考是一种人工合成的动物专用抗微生物药。它通过与敏感菌的 50S 核糖体亚基结合而抑制细菌蛋白质的合成。体外抑菌试验表明氟苯尼考对多种禽源致病微生物均具有较强的杀灭作用, 因此, 氟苯尼考广泛用于禽类感染性疾病的治疗。本文结合现有文献报道, 对氟苯尼考的药效学特点及其在家禽生产中的应用进行详细介绍。

关键词: 氟苯尼考; 药效学; 应用; 家禽

中图分类号: S859.799.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)01-0001-04

氟苯尼考(Florfenicol)是一种酰胺醇类动物专用广谱抗菌药^[1], 20世纪80年代首先由美国先灵葆雅公司研制而成, 我国于1999年首次批准将其用于畜禽细菌性疾病的治疗。众所周知, 氯霉素作为第一种酰胺醇类药物曾在兽医临床中广泛使用, 但因其结构式中含有对硝基苯基团, 能够引起人和动物的可逆性血细胞减少和不可逆性再生障碍性贫血, 已被我国农业部明令禁止用于所有食品动物^[2]。在氯霉素的分子结构上进行改造(将氯霉素的对硝基苯基换成对甲砒基苯基)获得了甲砒霉素。结构改造之后, 甲砒霉素虽不再产生再生障碍性贫血, 但仍会抑制红细胞、白细胞和血小板的生成, 且随着其在兽医临床中的长期使用, 耐药性也越来越严重。研究人员对甲砒霉素的分子结构进行了进一步改造, 获得了新一代酰胺醇类兽药——氟苯尼考(结构式见图1)。与甲砒霉素相比, 氟苯尼考的抗菌活性明显增强, 且毒副作用显著降低, 目前它已成为畜禽养殖中最常使用的兽药之一。本文结合现有文献报道, 对氟苯尼考的药效学特点及其在家禽生产中的应用进行详细介绍。

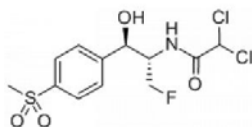


图1 氟苯尼考的结构式

1 抗菌机理

氟苯尼考的抗菌机理与氯霉素和甲砒霉素相同, 均是通过与细菌 70S 核糖体的 50S 亚基上的 A 位紧密结合, 阻碍细菌肽酰基转移酶的转肽反应, 使肽链不能延伸而抑制细菌蛋白质的合成。从抗菌作用性质角度来讲, 氟苯尼考属于速效抑菌药, 因此临床中不宜与 β -内酰胺类速效杀菌药合用。因为合用时细菌在氟苯尼考的作用下, 蛋白质合成迅速受到抑制, 细菌停止生长繁殖, 使 β -内酰胺类药物的杀菌作用减弱; 另外, 因氟苯尼考和大环内酯类及林可胺类药物的作用机理相似, 均竞争细菌的 50S 亚基, 三者间会出现拮抗作用, 因此氟苯尼考也不宜和这两类药物合用。

2 抗菌活性

国内外的研究者针对氟苯尼考对家禽常见的病原微生物的抗菌活性开展了大量实验, 现将已有结果总结如下(表1)。从表中可以看出氟苯尼考对禽源的革兰氏阴性菌(大肠埃希氏菌、沙门氏菌、巴氏杆菌和假单胞菌)的抗菌活性要强于革兰氏阳性菌(金黄色葡萄球菌、凝固酶阴性葡萄球菌、链球菌和肠球菌)。

3 常见制剂

我国最新版(2010年版)兽药典中登载的氟苯尼考制剂种类包括: 预混剂、溶液剂、粉剂和注射液4种。其中, 预混剂以混饲方式给药, 用于治疗猪敏

收稿日期: 2014-11-12

*: 通讯作者

基金项目: 河南科技大学 SRTP 项目(2014267)

表 1 氟苯尼考对禽源常见病原微生物的体外最小抑菌浓度 (MIC) 及最小杀菌浓度 (MBC)

病原微生物种类	分离来源	MIC ($\mu\text{g/mL}$)	MBC ($\mu\text{g/mL}$)	数据来源
大肠埃希氏菌	鸡	1.6	3.2	[3]
	火鸡	0.25~2.0		[4]
沙门氏菌	鸡	0.8	1.6	[3]
	火鸡	0.25~0.5		[4]
巴氏杆菌	鸭	0.4	0.8	[3]
	鸡	0.5		[5]
假单胞菌	火鸡	1.0~4.0		[4]
金黄色葡萄球菌	鸡	8.0	64	[6]
	火鸡	1.0~4.0		[4]
凝固酶阴性葡萄球菌	火鸡	0.25~8.0		[4]
链球菌和肠球菌	火鸡	0.13~64.0		[4]

感菌所致感染, 用量为 1 000~2 000 g 每 1 000 kg 饲料, 连用 7 d; 溶液剂以混饮方式给药, 用于治疗鸡的敏感菌所致感染, 如禽巴氏杆菌病和大肠埃希氏菌感染等, 用量为 100 mg/L 水, 连用 3~5 d; 粉剂以内服方式给药, 用于治疗猪和鸡敏感菌所致感染, 用量为 20~30 mg/kg 体重, 一日 2 次, 连用 3~5 d; 注射剂的适应症和粉剂相同, 以肌肉注射方式给药, 每次用量为 15~20 mg/kg 体重, 连用 2 次, 给药间隔为 48 h。

除了以上 4 种常规制剂品种之外, 兽药开发人员对氟苯尼考的新制剂产品也进行了深入研究。吴小宁^[7]以稳定性、回收率和包封率为指标, 对氟苯尼考脂质体的 6 种不同的制备方法 (薄膜法、冷冻溶解法、反向蒸发法、乳液法、改良反向蒸发法及改良乳液法) 进行了考察, 结果表明改良反向蒸发法制备的脂质体包封率最高, 稳定性也最好, 制得脂质体的平均粒径为 159.61 nm。魏小藏等^[8]优化了氟苯尼考- β -环糊精包合物的处方设计及生产工艺: 氟苯尼考与 β -环糊精包合物投料摩尔比为 1:1、包合温度为 80 °C、包合时间为 5 h。经 β -环糊精包合后, 氟苯尼考在水中的溶解度由 1.41 mg/mL 增加到 9.32 mg/mL。马素英等^[9]以聚乙二醇 6000 (PEG6000) 为载体, 采用熔融法和溶剂熔融法制备了氟苯尼考固体分散体, 使氟苯尼考的溶解度显著增加。刘安刚等^[10]用吐温-80、甘油和乙酸乙酯 (比例为 6:3:1) 成功制备了粒径为 5~70 nm 的氟苯尼考纳米乳。崔淑敏等^[11]以三聚磷酸钠为交联剂, 采用离子交联法制备了氟苯尼考/壳聚糖纳米微球。制得的微球中氟苯尼

考有较大的包封率 (64.5%) 和载药量 (44.0%), 并具有较好的缓释性能 (45.5h 内释放 79.2%)。刘澜等^[12]以明胶为载体, 采用两步法制备了氟苯尼考的肺靶向微球, 制得的微球平均粒径为 10.57 μm , 粒径范围在 5.0~70 μm 的微球数目占总数的 88% 以上, 达到了肺部靶向的设计要求; 微球中平均载药量为 121.2 mg/g, 包封率为 90.31%。戴瑜来等^[13]则以壳聚糖和阿拉伯胶为囊材, 采用复凝聚法制备了氟苯尼考微囊, 制得的微囊形态圆整, 平均粒径为 10~20 μm , 包封率达 71.80%, 载药量达 47.64%。

4 临床试验

4.1 大肠埃希氏菌病

应用氟苯尼考防治家禽大肠埃希氏菌病的报道很多。张凤仙^[14]通过给肉鸡肌肉注射大肠埃希氏菌肉汤培养物制造了肉鸡感染模型, 之后比较了氟苯尼考的 3 种不同制剂产品 (预混剂、可溶性粉和注射液) 的治疗效果。结果表明以上 3 种制剂对大肠埃希氏菌病的有效率分别为 70%、90% 和 93.3%。试验结果提示氟苯尼考可溶性粉和注射液可有效控制肉鸡重症大肠埃希氏菌病, 预混剂可作为预防用药或用于疾病早期治疗。蔡玉梅等^[15]用大肠埃希氏菌混合菌液人工感染 10 日龄海兰白公雏, 待鸡发病后用氟苯尼考可溶性粉进行饮水治疗。结果发现, 高 (6 g/L)、中 (3 g/L)、低 (1.5 g/L) 剂量对鸡大肠埃希氏菌病均有较好的疗效, 用药后症状明显减轻且逐渐恢复, 体重也明显增加。郑雪花等^[16]的结果表明 72 株耐氯霉素临床分离大肠埃希氏菌对氟苯尼考的敏感率为

68.1%,而氟苯尼考高(150 mg/L)、中(100 mg/L)、低(50 mg/L)剂量组对鸡大肠埃希氏菌病的治愈率分别为96.7%、93.3%和90%。谭滇湘等^[17]比较了氟苯尼考混悬剂与常规制剂对鸡大肠埃希氏菌病的疗效,实验结果表明混悬剂的治疗效果与常规制剂相当,但能够减少给药次数。王自然等^[18]的研究则表明氟苯尼考对鸡大肠埃希氏菌病的保护率和治愈率均明显高于硫酸阿米卡星和头孢噻唑钠。

一些氟苯尼考的复方制剂对家禽大肠埃希氏菌感染的治疗效果更好。王丽平等^[19]的实验结果表明:氟苯尼考与甲氧苄啶(TMP)的复方制剂能有效控制鸡大肠埃希氏菌感染,降低感染鸡的发病率和死亡率,并在一定程度上减少成活鸡的体重下降,效果优于单方的氟苯尼考口服液。王春华等^[20]也获得了类似的实验结果:氟苯尼考与TMP配伍应用(最佳配伍比例为5:1)后,抗菌活性极显著增强。

4.2 巴氏杆菌病

缪小群等^[5]比较了内服和肌肉注射后氟苯尼考对鸡多杀性巴氏杆菌感染的治疗效果。结果表明:以20、40和80 mg/kg体重内服氟苯尼考后,治愈率分别为93.3%、100%和100%;相同剂量肌肉注射给药的治愈率则分别为86.7%、100%和100%。张旭等^[21]采用菌落计数法测定了氟苯尼考对禽多杀性巴氏杆菌的体外抗菌后效应(PAE)、抗菌后亚抑菌浓度效应(PA-SME)及亚抑菌浓度效应(SME)。结果显示:氟苯尼考在2~8 μg/mL范围内对禽多杀性巴氏杆菌的PAE为1.31~5.01 h,PA-SME为1.66~24.20 h,SME为0.05~1.31 h;其PAE受药物浓度、细菌接触时间及接种量的影响。袁湛等^[22]比较了不同药物对鸡人工感染巴氏杆菌病的治疗效果,实验结果表明氟苯尼考的疗效优于盐酸环丙沙星和硫酸庆大霉素。在应用氟苯尼考治疗鸡巴氏杆菌病时,以2 mg/kg体重剂量效果最佳。杨文^[23]比较了不同药物对鸡巴氏杆菌病的治疗效果,结果表明氟苯尼考的效果明显优于环丙沙星和庆大霉素。卜仕金等^[24]建立了鸡巴氏杆菌人工感染模型,之后以10、20和30 mg/kg体重剂量进行肌肉注射,每天给药1次,连用5 d,以上3种给药方案对鸡巴氏杆菌病的治愈率分别为93.3%、100%和100%,而感染对照组鸡全部死亡,用药组与感染对照组间疗效差异极显著。

4.3 其他疾病

张永强等^[25]建立了鸡金黄色葡萄球菌疾病模型,观察氟苯尼考的治疗效果,实验结果显示高(混饲,饲料中氟苯尼考含量为1%,下同)、中(0.75%)、低(0.51%)剂量组的死亡率分别为3.33%、6.67%和10%,有效率分别为96.67%、93.33%和90%,治愈率分别为93.33%、90%和80%。刘小燕^[26]比较了不同药物对鸭疫里默氏杆菌感染的治疗效果,实验结果表明氟苯尼考的有效率高达97.7%,明显优于恩诺沙星、庆大霉素和磺胺间甲氧嘧啶。朱明等^[27]的研究则表明氟苯尼考与TMP合用后,能够增强对鸭疫里默氏杆菌感染的治疗作用。欧阳清芳等^[28]用氟苯尼考配合庆大霉素治疗鸭疫里默氏杆菌感染,用药3 d后,病情迅速得到控制。黄庆洲等^[29]的试验结果表明:氟苯尼考与甲砒霉素对实验性鸭疫里默氏杆菌感染治愈率呈显著性差异,但二者的治愈率均显著高于氯霉素。说明氟苯尼考与甲砒霉素对鸭疫里默氏杆菌感染均有显著疗效,而且明显优于氯霉素,并以氟苯尼考的治疗效果最好。

5 氟苯尼考的局限性

虽然氟苯尼考属于广谱抗菌药,对多种禽源致病微生物均具有较好的杀灭作用,但它对鸡毒支原体感染的治疗效果却不太理想。卜仕金等^[30]比较了氟苯尼考与恩诺沙星对肉鸡鸡毒支原体感染的治疗效果,体外抑菌试验表明氟苯尼考对鸡毒支原体标准株的MIC值要远高于恩诺沙星,是恩诺沙星MIC值的64倍;人工感染的治疗试验表明:中(400 mg/kg饲料,混饲)、高(500 mg/kg饲料,混饲)剂量的氟苯尼考及恩诺沙星(100 mg/kg饲料,混饲)均能明显减少感染鸡的气囊损伤程度,但氟苯尼考各用药组都不能减少血清抗体生成,表明氟苯尼考对鸡毒支原体的清除缓慢,且不能彻底杀死体内支原体。

操继跃等^[31]分别对免疫期间的各组鸡连续2 w给予不同剂量的氟苯尼考或黄芪淫羊藿合剂,之后在不同时间采取血样,用血凝抑制试验分别对鸡新城疫(ND)抗体水平和禽流感(AI)抗体水平进行监测。实验结果显示:混饮给药后,小剂量(50 mg/L)氟苯尼考对ND抗体水平影响不显著,而中(150 mg/L)和高(250 mg/L)剂量氟苯尼考对ND抗体产生有显著的抑制作用;氟苯尼考追加给药1 w后,中、高剂量组ND抗体水平又显著降低,

而小剂量组 ND 抗体水平差异不显著。据陈杖榴^[2]的报道,氯霉素和甲砒霉素都具有免疫抑制作用。操继跃等^[31]的研究试验证实,氟苯尼考在高剂量下同样对正常鸡体液免疫产生抑制作用,而使用低治疗量的氟苯尼考(50 mg/L,饮水)不存在免疫抑制作用,故在临床使用中不能随意加大剂量。目前,业界对氟苯尼考免疫抑制作用的产生机理尚不清楚,还有待于进一步的研究。

6 结语

氟苯尼考对禽源多种病原微生物均具有较强杀灭作用,且其毒副作用小,为兽医专用药物,不易产生耐药性。联合药敏试验显示氟苯尼考与 TMP 合用后能够显著增强其抗菌效果,但如与 β -内酰胺类、大环内酯类及林可胺类药物合用时,会产生拮抗作用,因此在联合用药时,一定要注意配伍禁忌。此外,氟苯尼考在治疗支原体感染方面疗效不佳,因此在临床上如果遇到家禽患此类疾病时,不宜选用氟苯尼考,最好使用疗效较好的其它药物。而高剂量氟苯尼考会产生免疫抑制作用,因此在家禽疾病治疗中,不能随意增加剂量。

参考文献:

- [1] 王秀枝. 氟苯尼考在不同动物体内的药动学研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技, 2014, 39(4): 1-3.
- [2] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 第三版. 北京: 中国农业出版社, 2009: 252.
- [3] 胡功政, 苑丽, 刘智明, 等. 氟苯尼考及其与多西环素联合的体外抗菌作用[J]. 中国兽医学报, 2004, 24(4): 379-383.
- [4] Salmon S A, Watts J L. Minimum inhibitory concentration determinations for various antimicrobial agents against 1570 bacterial isolates from turkey poults [J]. Avian Dis, 2000, 44(1): 85-98.
- [5] 缪小群, 宋治萍, 黄显会, 等. 氟苯尼考对鸡多杀性巴氏杆菌感染的疗效试验[J]. 中国兽药杂志, 2006, 40(8): 52-55.
- [6] Choi M, Choi M J, Lee E M, et al. The in vitro antibacterial activity of florfenicol in combination with amoxicillin or cefuroxime against pathogenic bacteria of animal origin[J]. Pak Vet J, 2011, 31(2): 141-144.
- [7] 吴小宁. 氟苯尼考脂质体的制备及药效评价[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [8] 魏小藏, 刘卫, 周小顺, 等. 氟苯尼考- β -环糊精包合物的制备研究[J]. 中南药学, 2006, 4(6): 406-409.
- [9] 马素英, 董若怡, 尚校军, 等. 氟苯尼考 PEG6000 固体分散体的制备与表征[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2010, 36(5): 589-593.
- [10] 刘安刚, 李引乾, 孙娇, 等. 氟苯尼考纳米乳的制备及品质评价[J]. 西北农业学报, 2011, 20(5): 44-49.
- [11] 崔淑敏, 宋美荣, 王娟, 等. 氟苯尼考/壳聚糖纳米微球的制备及其缓释性能[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2010, 40(1): 23-26.
- [12] 刘澜, 田玲, 冯华兵, 等. 氟苯尼考肺靶向明胶微球制备方法的试验[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(11): 71-74.
- [13] 戴瑜来, 许宝青, 刘新轶, 等. 壳聚糖-阿拉伯胶氟苯尼考微囊制备工艺的初探[J]. 浙江农业科学, 2014, 32(3): 425-426, 429.
- [14] 张凤仙. 不同剂型氟苯尼考对实验性鸡大肠杆菌病的疗效[J]. 动物医学进展, 2005, 26(11): 75-77.
- [15] 蔡玉梅, 陈文玫, 吴绍强. 氟苯尼考可溶性粉对鸡大肠杆菌病的疗效试验[J]. 中国家禽, 2002, 24(6): 18.
- [16] 郑雪花, 田勇, 张煜, 等. 氟苯尼考水溶性油剂对人工诱发鸡大肠杆菌病的疗效[J]. 河北北方学院学报(自然科学版), 2007, 23(6): 39-42.
- [17] 谭滇湘, 尹烨华, 陈鲜花. 氟苯尼考混悬剂与常规制剂对鸡大肠杆菌病的疗效比较[J]. 广东畜牧兽医科技, 2005, 30(2): 43-44.
- [18] 王自然, 阮明华. 氟苯尼考琥珀酸钠对人工诱发鸡大肠杆菌病的疗效观察[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(4): 212-214.
- [19] 王丽平, 陈绍峰, 史晓丽, 等. 复方氟苯尼考口服液对人工诱发鸡大肠杆菌病的疗效试验[J]. 动物医学进展, 2003, 24(4): 110-112.
- [20] 王春华, 李慧. 氟苯尼考与三甲氧苄啶水溶性粉对试验性鸡大肠杆菌病的疗效研究[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(9): 207-209.
- [21] 张旭, 王大菊, 伍金娥. 氟苯尼考对禽多杀性巴氏杆菌的抗菌后效应[J]. 华中农业大学学报, 2006, 25(4): 408-410.
- [22] 袁湛, 张培培, 胡振友, 等. 氟苯尼考治疗鸡多杀性巴氏杆菌感染的疗效试验[J]. 现代农村科技, 2010, 15(14): 38-39.
- [23] 杨文. 氟苯尼考治疗鸡巴氏杆菌病的临床观察[J]. 内江科技, 2003, 12(5): 21.
- [24] 卜仕金, 蒋志伟, 郑月华, 等. 氟甲砒霉素对实验性鸡巴氏杆菌病的药效研究[J]. 中国家禽, 1998, 20(12): 13-14.
- [25] 张永强, 罗国群. 氟苯尼考粉对鸡金黄色葡萄球菌病的疗效试验[J]. 畜牧兽医科技信息, 2005, 24(6): 67-68.
- [26] 刘小艳. 氟苯尼考注射液治疗鸭疫里默氏杆菌病的疗效试验[J]. 吉林畜牧兽医, 2004, 14(6): 51.
- [27] 朱明, 王爵新, 梁国余, 等. 复方氟苯尼考对人工诱发鸭疫里默氏杆菌病的疗效观察[J]. 养禽与禽病防治, 2005, 24(7): 20-21.
- [28] 欧阳清芳, 徐思锦, 刘圣林. 以氟苯尼考治疗鸭传染性浆膜炎[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2003, 16(6): 28.
- [29] 黄庆洲, 蒋晓斌, 魏小蓉, 等. 氟甲砒霉素对鸭传染性浆膜炎的药效试验[J]. 养禽与禽病防治, 2003, 16(7): 12-13.
- [30] 卜仕金, 郑月华, 蒋志伟, 等. 氟甲砒霉素(florfenicol)对禽败血支原体病的药效学[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(6): 607-608.
- [31] 操继跃, 周洪波, 卢笑丛, 等. 氟苯尼考和中草药黄芪淫羊藿合剂对鸡体液免疫反应的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2003, 34(4): 412-416.

DNA 疫苗研究进展

黄妙容^{1,2}, 陈瑞爱^{1,2*}, 黄燕花³

(1. 广东大华农动物保健品股份有限公司, 广东 云浮 527400; 2. 农业部动物疫病防控生物技术与制品创制重点实验室, 广东 肇庆 526238; 3. 广东省水电医院, 广东 广州 511340)

摘要: 利用生物技术手段开发新型基因工程疫苗是目前疫苗研究的热点之一。本文介绍了 DNA 疫苗的简史、优缺点、安全性、优化方法等, 旨在为广大科研工作者提供参考。

关键词: DNA 疫苗; 安全性; 优化

中图分类号: S859.797

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)01-0005-03

DNA 疫苗, 又称为核酸疫苗、基因疫苗, 是将编码某种抗原的基因导入动物体内, 使外源基因在活体内表达, 激活机体的免疫系统, 从而诱导特异性的体液免疫和细胞免疫应答^[1,2]。DNA 疫苗表达产物类似于亚单位疫苗, 但由于其在宿主细胞内表达, 可同时诱导机体产生体液免疫和细胞免疫, 并且容易制作成多价疫苗、多联疫苗, 可起到一苗多防的作用。与传统疫苗相比, DNA 疫苗具有制备简单、能产生持久免疫应答、具有交叉保护作用、热稳定性好、便于贮藏和运输等特点。本文主要介绍 DNA 疫苗的发展简史、DNA 疫苗的优缺点、DNA 疫苗的安全性、DNA 疫苗的优化方法等。

1 DNA 疫苗发展简史

1990 年美国威斯康星大学 Wolff 等发现, 将外源性重组质粒通过肌肉注射到小鼠体内后, 质粒能够被肌细胞摄取并在小鼠体内稳定表达^[3]。这是首个关于 DNA 疫苗报道, 之后陆续有研究报道

DNA 片段对于机体的免疫刺激作用。1991 年 Williams 等将包被有 DNA 的微粒导入小鼠肌和鼠肝脏后, 能够在这两种组织中检测到编码基因长达 14 d 的表达^[4]。Tang 等(1992)将人生长激素基因注射到小鼠表皮细胞内后, 小鼠产生了较强的免疫反应^[5]。Ulmer 和 Robinson 等(1993)将含有流感病毒核心蛋白编码基因的重组质粒注入小鼠和雏鸡肌肉中, 结果表明两种动物对流感病毒都产生了免疫保护反应^[6,7]。1994 年 5 月在日内瓦召开专题会议, 会议将 DNA 疫苗定义为基因疫苗或核酸疫苗, 充分肯定了 DNA 疫苗的优点及应用前景, 由此开启了 DNA 疫苗研究的新篇章。

2 DNA 疫苗优缺点

DNA 疫苗相对于传统疫苗来说, 具有诸多优点, 如能诱导各类型的免疫应答。但任何事物都具有两面性, DNA 疫苗亦存在一些问题。表 1 总结了目前 DNA 疫苗研究过程中所表现出来的优劣。

表 1 DNA 疫苗优缺点

优点	缺点
成本低, 易于开发与生产, 具有热稳定性 ^[9] ; 能长时间保持其免疫原性, 体内表达方式使蛋白进行正确的翻译后修饰, 与正常真核生物表达产物构象更接近 ^[10] ; 通过 MHC I 类和 II 类进行抗原呈递, 没有感染风险(亚单位疫苗) ^[11] ; 选择性强, 可根据需要针对特定抗原进行免疫 ^[12] ; 易于保存及运输, 多种质粒混合或串联基因能制成广谱疫苗 ^[13] ; 更安全、稳定及易于操控 ^[14] ; 能诱导体液及细胞免疫反应 ^[15] 。	只限于蛋白免疫原(对非蛋白抗原如细菌多糖类无效) ^[12] ; 可能会产生免疫耐受性, 外源性 DAN 插入到宿主基因组可能产生致癌作用, 引起机体产生抗 DNA 抗体, 导致某些自身免疫性疾病的发生 ^[13] ; 可能会产生相对较差的免疫原性 ^[16] ; 疫苗 DNA 长期在体内表达可能会诱导机体产生免疫耐受, 长远来说, 导致机体免疫功能低下。

收稿日期: 2014-11-17

*: 通讯作者

3 DNA 疫苗安全性

3.1 致癌性

安全性是疫苗研究者首先需要考虑的问题^[17]。外源 DNA 进入机体后,有可能随机整合到宿主染色体中,导致染色体不稳定,从而引起抑癌基因失活,原癌基因激活,导致癌症的发生。Wang 等^[18]应用电穿孔向机体注射的质粒 DNA,结果显示外源 DNA 可与体内基因组 DNA 发生整合。因此,必须加强外源基因的定点整合和非整合性表达研究,从而生产更加安全的 DNA 疫苗。

3.2 免疫耐受

免疫耐受是由质粒编码的抗原蛋白的持续表达而引起。DNA 疫苗在靶组织持续表达免疫性蛋白,使接种动物保持一定强度的免疫应答。这就可能导致机体产生免疫耐受、变态反应、超免疫反应或自身免疫^[19]。因此,应根据实际情况选择适当质粒与抗原进行表达(如条件性表达),及通过动物模型探索出合理的接种程序及剂量,以降低使用 DNA 疫苗所带来的免疫耐受风险。

3.3 抗 DNA 免疫反应

注射 DNA 剂量太大,可能会引起免疫系统自身功能紊乱,产生抗 DNA 抗体,进而导致自身免疫病的发生。但目前大多数的研究数据显示, DNA 免疫实验动物(如小鼠、大鼠、家兔、非人类的灵长目动物)、自身免疫病患者以及健康成人志愿者后并不会产生抗 DNA 的自身抗体。

3.4 环境安全

Palka-Santini 等^[20]研究表明,小鼠经口摄入 DNA 疫苗,被降解后的 DNA 片段通过肠壁和集合淋巴小结到达外周血白细胞、肝脏和脾脏,但尚未有数据表明这些 DNA 片段能够转移至细菌或其他有机体。虽然如此,我们亦要警惕质粒与免疫系统体内的微生物基因组重组,或从宿主体内排出后与环境中的微生物重组而造成扩散,甚至加剧病原微生物的进化速度。

针对目前 DNA 疫苗所存在的安全性问题,科研人员做了大量研究工作,以进一步完善 DNA 疫苗,更好地为人类服务。

4 DNA 疫苗的优化

DNA 疫苗对小动物的免疫效果较好,可诱导机体产生持续的特异性抗体;对大动物而言,其免疫效果并不是很好。因此,提高 DNA 疫苗免疫原性

是目前 DNA 疫苗研发的一个重点方向。

4.1 DNA 序列的选择

在 DNA 疫苗的构建中,一般选择病原体的保护性抗原编码基因作为靶基因序列,诱导保护性免疫应答。使用抗原表位做免疫原,制备多表位基因疫苗,可获得高效的呈递,对于易变异或较多血清型的病原体而言更为有效。

4.2 佐剂优化

白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2)、干扰素、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等细胞因子具有多种生物活性,能够促进细胞生长、分化及调节免疫的功能,也是比较常用的佐剂,可用于增强 DNA 疫苗的免疫原性。Kim 等^[21]通过共注射表达 IL-2 基因的质粒和 HIV env/rev、SIV/pol 蛋白基因的 DNA 疫苗免疫恒河猴,结果显示 IL-2 显著增强了 T 细胞介导的免疫效果。Guo 等^[22]将干扰素基因和弓形虫抗原 DNA 用肌肉注射法免疫小鼠 2 次,实验组与单独注射抗原 DNA 的对照组相比,T 淋巴细胞和 NK 细胞的活性都显著增加,IgG 抗体滴度也得到明显提高。

霍乱毒素也在 DNA 疫苗中作为佐剂而被大量使用。Wan 等^[23]研究表明,将霍乱 A 亚单位(cholera toxin A, CTA)整合到 DNA 疫苗中,不仅没有毒性,还增强了 DNA 疫苗的免疫原性。同时,利用 RNAi 技术表明 CTA 作为佐剂的作用是通过提高 ADP 核糖基转移酶的活性,从而增强白细胞介素-6 的分泌来实现的。但是霍乱毒素作为 DNA 疫苗佐剂的机制还有待进一步研究。

除此之外,Sajadian 等^[24]研究表明,将编码人乳头瘤病毒-16E7 (Human papilloma virus 16, HPV-16E7)DNA 与 Toll-样受体 3 激动剂作为疫苗佐剂制成 DNA 疫苗,可提高 DNA 疫苗的免疫原性,这为提高宫颈癌疫苗治疗效率提供了一定基础数据。Li 等^[25]研究表明,联合使用白细胞介素-21 与 15 作为佐剂制备 DNA 疫苗,能引起特异性细胞及体液免疫应答,显著延长急、慢性鼠弓形虫感染存活时间。Wang 等^[26]研究表明,使用二氧化硅羟化物纳米粒作为佐剂制备 DNA 疫苗,能增强疫苗对乙型肝炎病毒的免疫应答,提供了一个非病毒基因呈递系统 DNA 疫苗的制备思路。Toke 等^[27]研究表明树突细胞的表皮前体细胞-郎格汉斯细胞是抗原呈递的自然介质,这为抗

癌的免疫治疗中,研制靶向树突细胞的 DNA 疫苗提供了更广阔的选择。

4.3 载体优化

目前 DNA 疫苗大多以细菌质粒为载体,这些质粒载体中常含有与克隆筛选有关的序列。这些序列在质粒复制时是必需的,质粒 DNA 在真核生物中可能引起严重的炎症反应。再者,载体中的抗性基因可能在宿主体内水平转移传播。除此之外,抗性基因还会导致免疫后机体的基因表达发生改变,甚至,未甲基化的 CpG 序列也可能导致目的基因沉默。微环 DNA 是传统质粒在大肠杆菌中通过位点特异性重组得到的一种新颖的小环超螺旋表达框,其缺乏抗性标记基因、复制原点等细菌序列,增强了在临床应用上的安全性^[28]。并且,微环作为载体比质粒更长效^[29,30]。

4.4 接种方式优化

DNA 疫苗通过选择优化序列,并与合适的佐剂配伍后导入体内,被肌肉细胞和抗原呈递细胞吞噬,最终由抗原提呈细胞提呈给获得性免疫系统,起到免疫防御作用。注射后的 DNA 疫苗作为细胞外大分子,很少可以进入细胞(体细胞转染)而呈递,因此,需提高质粒在体内转染效率。例如,用基因枪、电脉冲仪等可以显著提高 DNA 质粒进入动物机体的效率,从而使机体的免疫反应强度大增^[31,32]。

4.5 多途径联合免疫

多途径联合免疫可取长补短,取得更好的免疫效果。Fynan 等^[33]比较了甲型流感病毒 DNA 疫苗经不同途径接种的免疫效果和保护率,结果表明无论是小鼠还是鸡,其免疫效果均以多种途径联合免疫为最好。

5 结语

DNA 疫苗是新时代疫苗的发展趋势,其潜在应用性得到广泛认可。但 DNA 疫苗还面临着许多挑战,比如 DNA 疫苗接种的免疫学机理,其引发的体液和细胞免疫效率较低,在理论上的安全性问题等方面,还有待解决,距离应用于临床还有漫长而艰难的道路要走。但随着研究的不断深入,技术的不断完善,这些问题都将会得到解决,DNA 疫苗将成为防控疫病的重要武器,最大限度地造福人类。

参考文献:

- [1] Wolkers M C, Toebes M, Okabe M, et al. Optimizing the efficacy of epitope-directed DNA vaccination [J]. *J Immunol*, 2002, 168(10):4998-5004.
- [2] O'Hagan D T, Singh M, Ulmer J B. Microparticles for the delivery of DNA vaccines [J]. *Immunol Rev*, 2004, 199:191-200.
- [3] Wolff J A, Malone R W, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo [J]. *Science*, 1990, 247(4949 Pt 1):1465-1468.
- [4] Williams R S, Johnston S A, Riedy M. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA coated microprojectile [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1991 (88):2726-2732.
- [5] Tang D C, Devit M, Johnston S A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response [J]. *Nature*, 1992, 356(6365):152-154.
- [6] Robinson H L, Hunt L A, Webster R G. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA [J]. *Vaccine*, 1993, 11(9):957-960.
- [7] Ulmer J B, Donnelly J J, Parker S E. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding aviral protein [J]. *Science*, 1993, 259(5102):1745-1749.
- [8] Khan K H. DNA vaccines: roles against diseases [J]. *Germs*, 2013, 3(1):26-35.
- [9] Sasaki S, Takeshita F, Xin K Q. Adjuvant formulations and delivery systems for DNA vaccines [J]. *Methods*, 2003, 31(3):243-254.
- [10] Alarcon J B, Waime G W, Mcmanus D P. DNA vaccines: technology and application as anti-parasite and anti-microbial agents [J]. *Adv Parasitol*, 1999, 42:343-410.
- [11] Robinson H L, Pertmer T M. DNA vaccines for viral infections: basic studies and applications [J]. *Adv Virus Res*, 2000, 55:1-74.
- [12] Kindt T J, Goldsby R A, Osborne B A. *Vaccines* [M]. Kuby Immunology, New York: W. H. Freeman and Co, 2007, 475-492.
- [13] Khan F A. *Vaccines* [M]. The elements of immunology, India: Chennai Microprint, 2009, 343-359.
- [14] Sun Y, Hu Y H, Liu C S, et al. Construction and analysis of an experimental *Streptococcus iniae* DNA vaccine [J]. *Vaccine*, 2010, 28(23):3905-3912.
- [15] Fowler V L, Barnett P V. Progress in the development of DNA vaccines against foot-and-mouth disease [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2012, 11(4):481-493.

(下转第 20 页)

副猪嗜血杆菌病诊断方法研究进展

于新友¹, 李天芝¹, 苗立中², 李书光², 沈志强^{1,2}

(1. 山东绿都生物科技有限公司, 山东 滨州 256600; 2. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东 滨州 256600)

摘要: 副猪嗜血杆菌病以纤维素性多发性浆膜炎、关节炎和脑膜炎为主要特征, 严重危害仔猪和青年猪的健康。本文对副猪嗜血杆菌病的临床症状、病理学变化、酶联免疫吸附试验、PCR方法及环介导等温扩增等技术的研究进展进行综述, 以期对副猪嗜血杆菌病的早期诊断和及时防治提供一定的指导。

关键词: 副猪嗜血杆菌病; 诊断方法; 进展

中图分类号: S852.61*2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)01-0008-04

副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, Hps)可以引起副猪嗜血杆菌病。患病猪有纤维素性浆膜炎、脑膜炎和多发性关节炎等临床特征。近几年来, 世界各地均有发生副猪嗜血杆菌病的报道, 并且发病率呈上升的趋势, 已经成为一个全球性的重要猪病^[1]。

伴随我国养猪业的快速发展, 该病的流行越来越广泛, 已经成为呼吸道疾病综合症中的重要疾病, 对猪的危害日趋严重, 对养猪业造成了巨大的经济损失。快速、准确地诊断出该病以便采取相应的措施, 是成功防治该病的关键。本文介绍了副猪嗜血杆菌病诊断方法研究的一些新进展。

1 临床症状

根据病程的经过, 大致可分为最急性型、急性型、亚急性型、慢性型和隐性型5种类型, 但所有这些类型可随条件的变动而互相转变, 不能截然区分。最急性型: 可表现为无症状突然死亡。急性型: 多发生于膘肥体壮的猪。病猪体温升高, 最高到42℃, 精神萎靡, 反应慢, 吃得少; 鼻塞, 气喘, 咳嗽, 打喷嚏, 有的出现呈腹式呼吸; 心跳比正常快很多, 耳梢呈紫色; 鼻孔有粘液性及浆液性分泌物, 以2~3声短促咳嗽为特征; 眼睑周围皮下水肿, 眼结膜潮红, 皮肤和可视黏膜苍白, 呈贫血状; 出现跛行或一侧性跛行, 腕关节、跗关节肿大, 共济失调; 临死前侧卧或四肢呈划水样。发

病2~3d后死亡, 也有的病例无明显症状而死亡。急性型病例如果存活可留下后遗症, 即母猪流产, 公猪发生慢性跛行, 仔猪和育肥猪可遗留呼吸道症状和神经症状。亚急性型: 保育猪的发病率很高, 但主要有食欲下降、呼吸困难、发热等不典型症状; 耐过的猪表现为营养不好, 全身发白, 严重的可能死亡。慢性型: 通常由急性型转化而来, 多见于生长和青年猪。主要表现为消瘦虚弱, 被毛粗乱无光, 皮肤苍白, 精神沉郁, 食欲下降, 体温升高, 短促咳嗽, 腹式呼吸, 关节肿大, 卧地不愿起立, 生长发育不良, 甚至衰竭而死亡。隐性感染猪不表现症状, 但同慢性型猪一样为带菌猪, 易传染给其他健康猪。

2 病理变化

剖检病死猪, 可见胸腔出现纤维素性胸膜炎, 腔内存在大量的淡红色液体及纤维素性渗出物凝块; 腹腔内有多量透明黄褐色渗出液, 有的呈胶冻状凝块。心包炎, 心包积液, 心包内有奶酪样或豆腐渣样渗出物, 使外膜与心脏粘连在一起, 形成“绒化心”; 心肌有时有出血点。全身淋巴结肿大, 呈暗红色, 切面呈大理石样花纹; 关节肿大, 关节腔内有浆液性渗出性炎症, 有不等量的黄色或淡红色液体, 有的呈胶冻样。肺脏呈纤维素性胸膜肺炎, 肺呈暗紫红色, 臃胀, 有纤维素性渗出物覆盖在肺表面, 有的肺与胸腔的侧壁粘在一起; 支气管

内有黄白色或淡红色泡沫样渗出物;肺间质灰白色到血样,胶冻样水肿是本病主要特征性病理变化之一。脾脏肿大,呈暗红色。肝脏肿大,表面有灰白色小坏死灶。肾脏肿大,有少量出血点,肾盂有淤泥状物沉积。关节囊内有黏脓性红色渗出物,关节囊壁充血、出血、水肿。

3 试验室检验方法

3.1 酶联免疫吸附试验

酶联免疫吸附检测方法又称为 ELISA 检测方法。该方法操作简单,时间短,具有很高的敏感性,可用于大批量的抗原或抗体样品的检测。王艳等^[2]选用全菌作为包被抗原建立了 Hps 抗体间接 ELISA 方法,具有较好的试验效果。石碧等^[3]提取了 1 株 Hps 细菌的荚膜多糖(CPS),并以其为抗原分别建立了间接 ELISA 和间接血凝试验(IHA)两种抗体诊断技术。两种检测方法均有很好的特异性,但 ELISA 是 IHA 检测方法敏感性的 5~10 倍。冯小明等^[4]将 Hps 菌体超声裂解,取上清作 ELISA 包被抗原,建立了 Hps 抗体间接 ELISA 方法。陈善真等^[5]利用表达纯化的 Hps 外膜蛋白 P5 建立了 Hps 抗体间接 ELISA 检测方法。贾爱卿等^[6]将 Hps 的外膜蛋白 omp P2 基因插入表达载体 pET-32a,转化 BL21 进行诱导表达,以纯化的 omp P2 蛋白作抗原,建立了间接 ELISA 方法。郑念广等^[7]对 Hps 4、5 型耐热蛋白进行 121 °C 高压处理后混合作为抗原,建立了 Hps 间接 ELISA 检测方法。李鹏等^[8]将 Hps P2 蛋白基因亚克隆到原核表达载体 pET-32a 中构建了重组表达质粒 pET-P2,在 IPTG 的诱导下成功表达了可溶性融合蛋白 P2-His;利用纯化融合蛋白为抗原,建立了抗 Hps P2 蛋白抗体的间接 ELISA 方法(P2-ELISA)。李淼等^[9]将重组表达的 Omp P2 纯化后做为抗原,建立了 Hps 间接 ELISA 方法。

3.2 PCR 方法

PCR 方法是实验室常用的分子生物学诊断方法,因其检测的灵敏度高、特异性强、快速、简便等优点,在副猪嗜血杆菌病的诊断上得到了广泛的应用。

3.2.1 普通 PCR 林雪玲等^[10]根据 GenBank 公布的 Hps 基因组序列,设计 3 对引物,提取分离的 Hps 菌株基因组 DNA 作为模板,进行 PCR 扩增,结

果 3 对引物分别扩增出 822 bp、824 bp 和 1.9 kb 的目的条带。该方法适用性强,并且有很高的特异性和敏感性,既能对初代分离培养物中 Hps 进行鉴定,又可直接对病料进行 PCR 检测,适合基层应用。尹秀凤等^[11]以 Hps 疑似自然感染仔猪肺和人工感染发病仔猪组织为病料,做 PCR 检测,同时结合细菌分离培养。结果显示,先对肺脏组织等病料进行细菌分离、培养,再用建立 PCR 法对分离菌进行鉴定,可准确诊断 Hps。周勇岐等^[12]针对 Hps 的 16S rRNA 基因设计引物,以提取的 Hps 基因组 DNA 为模板,建立了 Hps PCR 检测方法。该方法可以有效区分与 Hps 同源性较高的细菌,如:胸膜肺炎放线杆菌和副鸡嗜血杆菌等。张盼锋等^[13]针对 Hps 16S rRNA 基因特异性 PCR 引物序列,合成 1 对 PCR 引物,建立相应的 PCR 检测方法。结果显示可检测出浓度为 2.8×10^3 CFU/mL 的 Hps,表明该方法灵敏度高;对大肠杆菌、链球菌、巴氏杆菌、沙门氏杆菌、金黄色葡萄球菌进行 PCR 扩增均不获得任何条带,表明该方法特异性较强。所以该方法对于临床快速检测 Hps 具有重要意义。万世平等^[14]设计了 1 对针对 Hps 16S rRNA 基因的引物,建立了能特异性检测 Hps 的 PCR 检测方法。对传染性胸膜肺炎放线杆菌、巴氏杆菌、大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌等均无交叉反应,扩增的目的条带的大小为 821 bp。李鹏等^[15]设计了能扩增 Hps OMP P2 基因的 1 080 bp 片段的引物,并证明用该法可有效地鉴定或诊断 Hps。这种 PCR 的敏感性达到了 1 000 个 Hps。刘建奎等^[16]针对 Hps 16S rRNA 序列设计 1 对特异性引物,建立了快速准确鉴定 Hps 的 PCR 方法,临床试验证明该方法具有很好的特异性和敏感性。

3.2.2 实时荧光定量 PCR 方法 实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR)检测是一种新的技术,它是将光谱技术和 PCR 技术相结合的一种核酸定量检测技术,与常规 PCR 方法比有很多优点,如反应时间短,扩增产物不需用琼脂糖凝胶电泳检测,全封闭反应,更高的检测特异性和敏感性。

于江等^[17]建立了 Hps SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法,建立的检测方法不与其它猪源

性病原菌发生交叉反应,有很好的特异性,敏感性是常规 PCR 的 100 倍,批内、批间重复试验变异系数均不大于 2.5%,稳定性好。李军等^[18]建立了一样快速定量检测 Hps 的实时荧光 PCR 方法,特异性强,重复性好,变异系数均小于 2%,检测的最低限度是 50 拷贝/ μL 。苗立中等^[19]建立了 Hps SYBR-Green I 荧光定量 PCR 检测方法。建立了标准曲线,线性关系在 $10^2\sim 10^8$ copies/ μL 非常好;敏感性为 10 copies/ μL ,是常规 PCR 的 100 倍;变异系数均不大于 2.5%,并且对 Hps 检测的特异性很好。李富祥等^[20]根据 Hps 16S rRNA 基因的保守序列设计特异性引物和 TaqMan 探针,建立了 Hps TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法。该方法与巴氏杆菌、沙门氏菌、乳杆菌链球菌、肠球菌、葡萄球菌、猪肺炎支原体等很多细菌无交叉反应;标准品浓度在 $6.92\times 10^8\sim 6.92\times 10^3$ copies/ μL 范围内具有良好的线性关系,最低可检测到 6.92×10^1 copies/ μL 的标准品阳性质粒;批内和批间变异系数均小于 3%。临床样品检测结果表明,该方法具有敏感性高、特异性好、稳定性强和快速的优点,可用于 Hps 感染的早期诊断和流行病学调查以及 Hps 的定量分析。

3.2.3 环介导等温扩增检测技术 环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术是一种核酸等温扩增技术,具有操作简单、成本低、检测效率高等特点,非常适合在现场和基层部门应用。吴诗敏等^[21]根据 Hps 16S rRNA 基因设计引物,使用 Bst 大片段聚合酶,以提取的细菌基因组 DNA 为模板进行等温扩增。结果表明:建立的方法能在 65 min 完成检测全过程,检测到 Hps DNA 的最小量为 0.2 pg,是常规 PCR 的 1 000 倍。朱杰仪等^[22]建立的 Hps 环介导等温扩增方法,显示在 63 °C 时反应的特异性强,检测敏感性是常规 PCR 的 100 倍。车勇良等^[23]建立了 Hps 可视化 LAMP 检测方法,在 55 °C 水浴 1 h 即可对 Hps 基因组 DNA 进行扩增,在反应后的体系中加入 SYBR Green I,即可对结果直接观察做出判断。该方法具有很强的特异性,其对 DNA 核酸的最低检测限为 40 fg,是常规 PCR 检测最低限的 100 倍,显示出较高的敏感性。用建立的 LAMP 方法对 8 株不同血清型 Hps 进行检测,结果

均为阳性。

4 展望

副猪嗜血杆菌病快速敏感的检测技术不仅对于及时采取措施防控疫情蔓延等至关重要,还能及早发现新菌株,找出最危险的病原菌并开发相关疫苗,在防控疫情时掌握主动。用于诊断副猪嗜血杆菌病的方法有很多,其中有适合临床大批量血清检测的 ELISA 方法,ELISA 具有操作步骤简单、敏感性高和特异性好等很多优点。但是 ELISA 方法受自身抗体干扰,易出现假阳性。实时荧光定量敏感性比常规 PCR 高 100 倍,但对操作人员要求高,且仪器价格高,一般的实验室都没有足够的资金购买,试剂的价格又很昂贵,因此不适合大规模推广应用。LAMP 方法检测快速、简便,适合在基层兽医和养殖场进行推广使用,对指导副猪嗜血杆菌病的防控具有重要的意义,但 LAMP 方法灵敏度高易导致假阳性。随着分子生物学的发展,相信一些新型诊断方法终将问世并得以推广应用,使人们能更快速、准确地诊断副猪嗜血杆菌病。

参考文献:

- [1] 李凯年, 逯德山. 副猪嗜血杆菌病防治研究的新进展[J]. 猪业科学, 2007(12): 32-33.
- [2] 王艳, 夏万田, 姜平, 等. 副猪嗜血杆菌间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(3): 5-6.
- [3] 石碧, 崔耀文, 贾凡, 等. 副猪嗜血杆菌血清 5 型间接血凝试验和间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(11): 964-968.
- [4] 冯小明, 储岳峰, 贺英, 等. 副猪嗜血杆菌抗体间接 ELISA 检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医科学, 2009, 39(7): 597-601.
- [5] 陈善真, 李春玲, 贾爱卿, 等. 副猪嗜血杆菌 omp5 基因的克隆、表达及间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国农业科学, 2011, 44(14): 3036-3044.
- [6] 贾爱卿, 李春玲, 王贵平, 等. 副猪嗜血杆菌 omp P2 基因的克隆、表达及间接 ELISA 抗体检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(9): 1266-1269.
- [7] 郑念广, 谭实勇, 何玲, 等. 副猪嗜血杆菌抗体间接 ELISA 检测方法的建立与应用[J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(8): 185-188.
- [8] 李鹏, 姜平, 李军星, 等. 副猪嗜血杆菌重组 P2 蛋白的高效表达及间接 ELISA 方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(4): 480-484.
- [9] 李淼, 李春玲, 叶严锋, 等. 基于重组外膜蛋白 P2 的副猪嗜血杆菌抗体间接 ELISA 方法的建立[J]. 华北农学报, 2011, 26(4): 61-66.

- [10] 林雪玲,黄耿森,洗琼珍,等. 副猪嗜血杆菌分离鉴定与 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 吉林农业大学学报, 2006, 28(3):321-323.
- [11] 尹秀凤,王艳,姜平,等. 猪嗜血杆菌 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医学报, 2007, 27(2):180-183.
- [12] 周勇岐,刘茂军,苏国东,等. 副猪嗜血杆菌 PCR 鉴定方法的建立[J]. 猪业科学, 2007(12):26-27.
- [13] 张盼锋,仇微,刘宇,等. 副猪嗜血杆菌 PCR 快速诊断方法的建立[J]. 广东畜牧兽医科技, 2009, 34(1):33-36.
- [14] 万世平,王建,葛菲菲,等. 副猪嗜血杆菌 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 动物医学进展, 2009, 30(1):9-12.
- [15] 李鹏,李军星,李玉峰,等. 副猪嗜血杆菌 OMP P2 基因 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医学报, 2010, 30(10):1321-1325.
- [16] 刘建奎,杨小燕,魏春华,等. 副猪嗜血杆菌 PCR 检测方法的建立与初步应用[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(17):3794-3796.
- [17] 于江,吴家强,张玉玉,等. 副猪嗜血杆菌荧光定量 PCR 检测技术的建立与应用[J]. 家畜生态学报, 2010, 31(4):77-81.
- [18] 李军,谢宇舟,裨雄标. 副猪嗜血杆菌实时荧光 PCR 快速检测方法的建立和应用[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(6):3607-3609.
- [19] 苗立中,沈志强,韩文瑜,等. 副猪嗜血杆菌荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 动物医学进展, 2012, 33(11):85-89.
- [20] 李富祥,熊和丽,姚俊,等. 副猪嗜血杆菌 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国兽医科学, 2013, 43(12):1268-1273.
- [21] 吴诗敏,陈芳艳,陈瑞爱,等. 副猪嗜血杆菌环介导等温扩增快速检测方法的建立[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(4):28-32.
- [22] 朱杰仪,谭实勇,曾小娜,等. 副猪嗜血杆菌环介导等温扩增检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(2):204-207.
- [23] 车勇良,陈如敬,王隆柏,等. 副猪嗜血杆菌可视化 LAMP 检测方法的建立与应用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2013, 41(12):61-66.

2015“永顺杯”优秀论文评选启事

为促进科学技术的进步与创新,活跃学术气氛,将畜牧兽医科技推向一个新的水平,本刊决定评选 2015 年度“永顺杯”优秀论文。本刊将组织专家组进行评审,对获奖的优秀论文作者颁发证书及奖金。评选结果将于本刊 2016 年第 1 期公布。

1、**评选范围:**本刊 2015 年度 1-6 期发表的文章。

2、**评选数量:**优秀论文 17 篇,分设特等奖 1 篇、一等奖 2 篇、二等奖 4 篇、三等奖 10 篇。其中以学术研究类为主,兼顾综述类与实用技术类。

3、**奖金来源:**总奖金 30000 元,由广东永顺生物制药股份有限公司赞助。其中特等奖奖金 8000 元/篇;一等奖奖金 3000 元/篇;二等奖奖金 1500 元/篇;三等奖奖金 1000 元/篇。

欢迎广大畜牧兽医工作者踊跃投稿

《广东畜牧兽医科技》编辑部

2015 年 1 月 24 日

加米霉素及其在牛呼吸系统疾病中的应用

罗显阳

(郑州市兽药饲料监察所, 河南 郑州 450052)

摘要: 本文综述了加米霉素的药效学、药代动力学、毒理学、不良反应以及残留, 为其临床合理应用提供参考。

关键词: 加米霉素; 牛; 呼吸道疾病; 治疗

中图分类号: S859.796

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)01-0012-04

加米霉素是法国梅里亚国际有限公司(Merial Ltd.)研发的最新动物专用大环内酯类半合成抗生素, 主要用于预防和治疗由溶血性曼氏杆菌、巴氏杆菌和嗜组织菌等病原菌引起的非泌乳牛的呼吸系统疾病。2014年7月, EMA(European Medicines Agency)增加了加米霉素在猪肝脏、肾脏、肌肉、皮肤+脂肪中的最大残留限量(MRL)^[1]。目前已有商品名为 Zactran 的注射液(规格: 150 mg/mL)在欧盟国家批准上市销售^[2]。加米霉素具有动物专用、单次给药、吸收迅速、生物利用度高、低残留、安全高效等优点, 在畜禽养殖生产中具有非常广阔的应用前景。

1 药效学特性

加米霉素(Gamithromycin), 白色或米黄色粉末, 不溶于水, 在高温条件下稳定, 对光不敏感, 重结晶后只有一种构型。化学名(IUPAC)为: 13-[(2, 6-二脱氧-3-C-甲基-3-O-甲基- α -L-吡喃核糖基)氧]-2-乙基-3, 4, 10-三脱氧-3, 5, 8, 10, 12, 14-六甲基-7-丙基-11-[[3, 4, 6-三脱氧-3-(二甲氨基)- β -D-吡喃木糖基]氧]-, (2R, 3S, 4R, 5S, 8R, 10R, 11R, 12S, 13S, 14R)-1-氧杂-7-氮杂环-15-单环^[3], 分子式为 $C_{40}H_{76}N_2O_{12}$, CAS 号为: 145435-72-9, 分子量 777.04。加米霉素的化学结构式见图 1。从结构式可以看到 7 α 位上有一个氮杂环结构, 这一特殊化学结构使得加米霉素在生理 pH 条件下能够被快速吸收, 且在靶组织-肺脏中能够长时间维持有效浓度。

加米霉素的抗菌作用机理与其他大环内酯类药物相同, 主要是与敏感菌的核蛋白体 50s 亚基

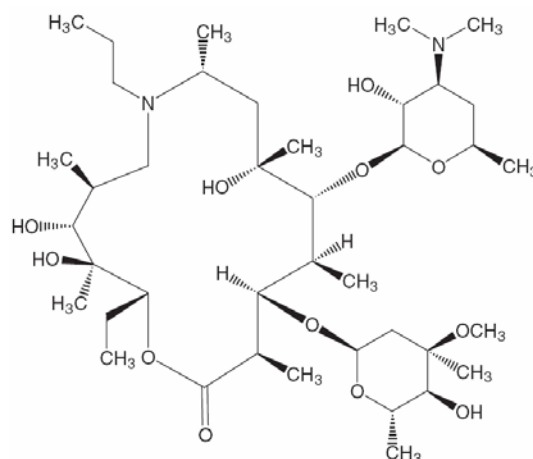


图 1 加米霉素的化学结构式

结合, 使肽链的合成和延长受阻, 从而抑制细菌蛋白质的合成^[4-5]。加米霉素具有抑菌和杀菌作用, 对引起牛呼吸系统疾病的主要病原菌具有很好的抑菌和杀菌效果, 见表 1。

目前, 关于加米霉素防治动物呼吸系统疾病的疗效报道很少, 研究最多的是牛^[6-7]。研究结果显示, 加米霉素对治疗由曼氏杆菌、巴氏杆菌和嗜组织菌等病原菌引起的牛呼吸系统疾病具有很好的疗效。

2 药代动力学

目前, 加米霉素的药代动力学已在大鼠、狗、牛、猪、马驹和肉鸡进行了研究。牛静脉注射(3 mg/kg, bw)和颈部皮下注射(3, 6, 9 mg/kg, bw)加米霉素一次剂量的研究表明^[8]: 药物吸收迅速和完全, 1~3 h 达峰, 达峰浓度较低($<1 \mu\text{g/mL}$), 生物利用度大于 98%, 无性别差异; 体内分布广泛,

表 1 加米霉素对牛呼吸系统疾病病原菌的体外抗菌活性

细菌	MIC ₉₀ ¹⁾ (μg/mL)	MBC ₉₀ ²⁾ (μg/mL)
曼氏杆菌	0.5	1
巴氏杆菌	1	2
嗜组织菌	1	2

1):MIC₉₀ 是指在实验中抑制 90%细菌所需最低浓度。
2):MBC₉₀ 是指在实验中杀灭 90%细菌所需最低浓度。

稳态分布容积(V_{ss})为 25 L/kg;消除缓慢,皮下注射有超长的消除半衰期(>2d)。具体药动学参数见表 2。

牛单次颈部皮下注射加米霉素(6 mg/kg. bw)后,加米霉素在疾病感染部位快速聚集,达峰时间小于 24 h,有很高的达峰浓度(19.0 μg/mL),远大于血浆中的峰浓度(0.265 μg/mL);药时曲线下面积(AUC)比值大于 190,肺部浓度/血浆浓度的比值大于 264,在肺脏有更长的半衰期(>3d);给药 10 d 后,肺组织浓度仍高于 1 000 ng/g,远远高于血浆中的药物浓度;给药 15 d,肺组织浓度仍保持在 700 ng/g 以上,是血浆中药物浓度的 247 倍。见表 3 和 4。以上参数充分表明加米霉素治疗牛呼吸系统疾病是有效的。

猪静脉注射和颈部皮下注射加米霉素(6 mg/kg. bw)的研究结果表明^[9]:药物吸收迅速和完全,达峰时间(40 min)比牛快,达峰浓度较低(0.41 μg/mL),绝对生物利用度大于 100%;分布广泛,稳态分布容积(31.03 L/kg)比牛大;药物消除比牛快,血浆消除半衰期小于 1 d。以上数据表明

表 3 牛单次皮下注射加米霉素(6mg/kg.bw)后的肺脏和血浆药动学参数

参数	单位	肺脏	血浆	比值(肺脏/血浆)
动物个数	头	4	32	/
药时曲线下面积 AUC _{last}	μg*h/mL	1578	8.09	195
药时曲线下面积 AUC _{inf}	μg*h/mL	1607	8.28	194
达峰浓度 C _{max}	μg/mL	19.0	0.265	/
达峰时间 T _{max} * ¹⁾	h	24.0	6.0	
消除半衰期 T _{1/2}	h	90.4	50.5	/

1):T_{max}* 肺脏和血浆样品的第一个采样时间点。

药物可广泛分布到深部组织,这对猪呼吸系统疾病的治疗很有潜在优势。具体药动学参数见表 5。

Berghaus 等^[10]研究了马驹按 6 mg/kg. bw 剂量肌肉注射加米霉素后,药物在血浆和肺组织中的浓度变化过程。研究表明,药物吸收迅速,血浆 1 h 达峰,肺组织在 24h 达峰浓度 8.91 μg/mL,远远大于血浆中药物浓度(0.333 μg/mL);药物消除缓慢,在血浆的消除半衰期为 39.1 h,在肺脏有超长的消除半衰期(70.3 h)。

Watteyn 等^[11]进行了加米霉素(6 mg/kg. bw)在肉鸡体内(静脉注射和皮下注射)的药代动力学研究。结果表明:加米霉素吸收迅速,吸收半衰期为 0.021 h,达峰时间短(<10 min);分布广泛,稳态分布容积为 29.16 L/kg;消除较慢,消除半衰期小于 1 d;绝对生物利用度高(>100%)。

加米霉素在动物体内有低的水浆蛋白结合率,

表 2 牛静脉注射和皮下注射加米霉素注射液(15%, w/v)后的血浆药动学参数

参数(单位)	组别			
	A 组	B 组	C 组	D 组
动物个数	12	4	4	4
给药途径	静脉注射	皮下注射	皮下注射	皮下注射
给药剂量 Dose(mg/kg)	3	3	6	9
药时曲线下面积 AUC _{last} (μg*h/mL)	4.12 ± 0.533	4.38 ± 0.699	9.25 ± 1.10	12.1 ± 1.13
药时曲线下面积 AUC _{inf} (μg*h/mL)	4.28 ± 0.536	4.55 ± 0.690	9.42 ± 1.11	12.2 ± 1.13
达峰浓度 C _{max} (ng/mL)	/	175 ± 2.14	748 ± 560	533 ± 120
达峰时间 T _{max} (h)	/	3.3 ± 3.1	1.0 ± 0	0.69 ± 0.38
消除半衰期 T _{1/2} (h)	44.9 ± 4.67	51.2 ± 6.10	50.8 ± 3.80	58.5 ± 5.50
稳态分布容积 V _{ss} (L/kg)	24.9 ± 2.99	/	/	/
清除率 CL(mL/h/kg)	712 ± 95.7	/	/	/
生物利用度 F(%)	/	106	110	95.4

表 4 牛单次皮下注射加米霉素(6mg/kg.bw)后的肺组织和血浆浓度(范围)

给药后时间(d)	组别	动物个数	肺组织浓度(ng/g)	血浆浓度(ng/mL)	浓度比率(肺/血浆)
1	A组	4	18500(12200-22200)	70.0(68.3-72.1)	265
5	B组	4	4050(2700-5730)	9.89(7.79-13.6)	410
10	C组	4	1190(570-1690)	3.62(2.99-4.62)	329
15	D组	4	707(302-1330)	2.86(2.00-3.41)	247
20	E组	4	224(132-359)	/	/

表 5 猪静脉注射和皮下注射加米霉素(6 mg/kg.bw)后的血浆药动学参数

参数	单位	静脉注射(i. v.)	皮下注射(s. c.)
药时曲线下面积 AUC _{last}	μg·h/mL	3.24±0.56	3.48 ± 1.90
药时曲线下面积 AUC _{inf}	μg·h/mL	3.67±0.75	4.31 ± 1.14
消除速率常数 λ _z	1/h	0.043±0.011	0.037 ± 0.009
消除半衰期 T _{1/2λ_z}	h	16.03	18.76
平均滞留时间 MRT _{inf}	h	18.84±4.94	24.41 ± 9.17
稳态分布容积 V _{ss}	L/kg	31.03±6.68	/
清除率 CL	L/h/kg	1.69±0.33	/
达峰时间 T _{max}	h	/	0.63 ± 0.21
达峰浓度 C _{max}	μg/mL	/	0.41 ± 0.090
绝对生物利用度 F	%	/	117.6

在牛、犬和大鼠的血浆蛋白结合率分别是 26.0%、21.5%和 21.8%。EMA 研究表明,加米霉素在牛(皮下注射 6 mg/kg. bw)、大鼠(口服 100 mg/kg. bw)、狗(口服 10 mg/kg. bw)的代谢是相似的,大部分主要通过粪便以原药形式排泄,分别为 90%、35%、58%。

3 毒性与不良反应

大鼠口服单次剂量显示加米霉素具有低的急性毒性。致死量超过 2 000 mg/kg. bw。对呼吸速率、体温、血压和心率没有影响。但一些动物出现低温、脱毛、流涎和腹泻等现象。

体重 200 kg 牛按每天 0、6、18、30 mg/kg. bw (在第 0、5、10 d 时,3 倍剂量)给药,第 1 d 观察到 18 和 30 mg/kg. bw 剂量组出现疼痛,在第 4 d 疼痛消失。45%的牛注射部位出现肿胀,3~14 d 后,大部分肿胀现象消失,部分持续到 35 d。研究结果显示,在有效的剂量范围内,牛有很好的耐受性。

大鼠按每日 0、1、3、10、100 mg/kg. bw 口服给药,连续 13 w,进行重复剂量毒性研究,结果确定其 NOEL(No Observed Effect Level,最大无作用剂量,也称为未观察到作用剂量)为 10 mg/kg. bw。

小鼠按每日 0、50、100、500 mg/kg. bw 口服给药,进行重复剂量毒性研究,结果确定其 NOEL 为 100 mg/kg. bw。

犬按每日 0、1、3、10、30 mg/kg. bw 口服给药,连续 13 w,进行重复剂量毒性研究,结果确定其 NOEL 为 1 mg/kg. bw。

EMA 研究显示加米霉素无“三致”作用(致癌、致畸、致突变)和神经毒性,无遗传毒性。

4 残留

EMA 对牛皮下注射加米霉素(6 mg/kg. bw)结果表明,注射位点、肝脏和肾脏组织残留浓度较高,肌肉和脂肪等部位的残留浓度较低。肝脏第 10 d 浓度为 2 790 μg/kg,第 35 d 为 175 μg/kg;肾脏第 10 d 浓度为 2 470 μg/kg,第 49 d 为 17.4 μg/kg;在采样时间内,肌肉组织检测不到加米霉素残留;脂肪第 10 d 为 30 μg/kg;注射位点残留浓度最高且时间最长,第 10 d 浓度为 25 563 μg/kg,第 49 d 为 372 μg/kg,第 70 d 仍有 1 头牛为 81 μg/kg。

残留实验表明,加米霉素在牛体内的残留标

示物为其原型,第 49 d 各组织的残留量占总残留量的比值分别是:肝脏 0.10、肾脏 0.27、脂肪 0.71、注射部位 0.29。

基于残留消除研究结果,肝脏和肾脏的最大残留限量(MRL)为 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。肌肉和脂肪有非常低的残留,分别在第 10 d 和第 21 d 检测不到加米霉素(低于定量限)。考虑到酮体组织至少应该有一个 MRL,因此推荐方法定量限(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$)的 2 倍作为脂肪的 MRL(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)^[12]。加米霉素在牛的休药期为 64 d。加米霉素在牛和猪各组织的 MRL 见表 6。加米霉素禁用于奶牛。

表 6 加米霉素在牛和猪各组织的最大残留限量($\mu\text{g}/\text{kg}$)

残留标示物	动物	组织	MRL	其他规定
加米霉素	牛	脂肪	20	禁用于奶牛
		肝脏	200	
		肾脏	100	
	猪	肌肉	100	无
		皮肤 + 脂肪	100	
		肝脏	100	
		肾脏	300	

目前,加米霉素在牛组织的残留检测方法为高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS),检测限和定量限分别是 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

5 结语

加米霉素可单剂量皮下注射给药,用于防治牛的呼吸系统疾病。由于加米霉素具有在靶组织中较高的活性浓度,对呼吸系统疾病病原菌药效迅速且持久,而且具备动物专用、吸收迅速、一次给药全程治疗、超长的消除半衰期、生物利用度高、低残留、安全高效等优点,故加米霉素在畜牧业养殖生产中具有很广阔的应用前景。

临床上治疗由曼氏杆菌、巴氏杆菌和噬组织菌引起的牛呼吸系统疾病时,推荐给药方案为:加米霉素注射液(商品名:Zactran;规格:150 mg/mL),单次给药,颈部皮下注射,最佳给药剂量为 6 mg/kg.bw,每个注射部位最大给药量不超过 10 mL。加米霉素在妊娠母牛、奶牛及其它动物的安全性试验还没有研究,应先进行风险/效益评估,根据兽医的指导用药。为避免交叉耐药性,不要与其他大环内酯类或林可胺类抗生素合用。

参考文献:

- [1] EMA. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use [DB/OL]. EMA/CVMP/417654/2014. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Summary_of_opinion/2014/07/WC500169766.pdf.
- [2] EMA. European Public Assessment Report (EPAR). ZACTRAN. EPAR summary for the public [DB/OL]. EMEA/V/C/129. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/veterinary/000129/WC500068714.pdf.
- [3] 于丽佳. 加米霉素的合成与工艺路线研究[D]. 北京:中国农业科学院, 2012.
- [4] Menninger JR. Functional consequences of binding macrolide to ribosomes[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 1985, 16(Suppl. A):23-34.
- [5] Jain R, Danziger L H. The macrolide antibiotics: a pharmacokinetic and pharmacodynamic overview[J]. Current Pharmaceutical Design, 2004, 10(25):3045-3053.
- [6] Forbes A B, Ramage C, Sales J, et al. Determination of the Duration of Antibacterial Efficacy following Administration of Gamithromycin Using a Bovine Mannheimia haemolytica Challenge Model[J]. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 2011, 55(2):831-835.
- [7] Lechtenberg K, Daniels C S, Royer G C, et al. Field efficacy study of gamithromycin for the control of bovine respiratory disease in cattle at high risk of developing the disease[J]. Intern J Appl Res Vet Med, 2011, 9(2):184-192.
- [8] Huang R A, Letendre L T, Banav N, et al. Pharmacokinetics of gamithromycin in cattle with comparison of plasma and lung tissue concentrations and plasma antibacterial activity[J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2010, 33(3):227-237.
- [9] Wyns H, Meyer E, Plessers E, et al. Pharmacokinetics of gamithromycin after intravenous and subcutaneous administration in pigs[J]. Research in Veterinary Science, 2014, 96(1):160-163.
- [10] Berghaus L J, Giguere S, Sturgill T L, et al. Plasma pharmacokinetics, pulmonary distribution, and in vitro activity of gamithromycin in foals[J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 2012, 35(1):59-66.
- [11] Watteyn A, Plessers E, Wyns H, et al. Pharmacokinetics of gamithromycin after intravenous and subcutaneous administration in broiler chickens[J]. Poultry Science, 2013, 92(6):1516-1522.
- [12] EMA. Committee For Medicinal Products For Veterinary Use[DB/OL]. EMEA/CVMP/567075/2008. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014340.pdf.

散养蛋鸡如何提高养殖效益

陈永亮¹, 王海军¹, 王强²

(1. 徐州生物工程职业技术学院, 江苏 徐州 221006; 2. 徐州市夹河种禽有限公司, 江苏 徐州 221151)

摘要: 为了实现散养蛋鸡经济效益的提高, 应从散养场建设、饲料供给、日常管理、品牌营销、观光型养鸡业开发诸方面充分发挥模式自身的独特优势, 同时做好品种与育雏季节选择、疾病防控、产蛋管理等工作, 以规避野外放养对蛋鸡养殖带来的不利影响。

关键词: 散养模式; 养殖效益; 生产性能; 疾病防控

中图分类号: S831

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)01-0016-02

随着我国经济水平的不断提高, 食品的营养与安全越发受到我国居民的重视。鸡作为人类蛋白产品和肉食品的主要来源, 其生产方式和产品质量受到了消费者的高度关注。蛋鸡散养模式, 是将传统养殖与现代科学技术相结合, 把蛋鸡放养于果园林间、山坡草滩等自然环境之中, 以青草、昆虫、籽实等野生饲料为食物来源, 通过科学的饲养管理和卫生保健措施, 生产优质、健康肉蛋产品的养殖形式^[1]。这一模式有助于提高蛋鸡产品的品质, 节约养殖成本, 通过鸡粪还田等还可实现畜禽养殖与环境保护的和谐统一。区别于传统的蛋鸡放养, 现代的蛋鸡散养模式注重于养殖的规模化和效益的最大化。为了实现散养蛋鸡经济效益的提高, 需立足于模式自身, 从散养场建设、生产性能提高、疾病防控诸方面采取综合措施, 发挥散养这一模式独特优势的同时规避野外放养对蛋鸡养殖带来的不利影响。

1 发挥散养模式优势来提高蛋鸡养殖效益

1.1 降低养殖成本

1.1.1 鸡场建设 在合适的季节, 蛋鸡一般只需经过 2~3 周的育雏, 在体重达 200~300 g 时即可开始放养。因而蛋鸡散养场仅需修建一面积有限的育雏舍, 用于鸡群前几周的舍内供暖育雏, 然后在散养场地内搭建简易鸡舍以满足鸡群在散养过程中的防晒、躲雨、产蛋和栖息之需。甚至为了避免蛋鸡育雏期的患病风险, 普通养殖户如能从某些孵化场直接购进 3 周后“半大鸡”, 则完全可

以无需建造育雏舍及配备相应的育雏设备。如此则可大大降低蛋鸡养殖中的建设成本。

1.1.2 饲料供给 饲料投入作为蛋鸡养殖成本的主要构成方面, 对于养殖效益的提高起到决定性作用。散养蛋鸡“放牧为主, 补饲为辅”的饲喂原则, 在很大程度上降低了饲料的成本投入。养殖生产中需要贯彻这一原则并尝试更多、更好的饲喂技术。如在日粮饲喂的原料选择上, 可因地制宜选择玉米、小麦、根茎、瓜果、草籽、树实等能量饲料, 利用畜禽粪便生产蝇蛆、蚯蚓等高效蛋白质。如在散养蛋鸡的日粮补饲中, 根据放养场地植被情况种植数量足够、类型丰富的牧草, 以降低在能量、蛋白质和维生素等原料购置的成本; 如在散养蛋鸡的日粮补饲中, 提倡在配方科学的基础上饲喂自配料。如此则可根据野外饲料的情况灵活调整补饲日粮的营养水平, 从而既满足蛋鸡日常生活和生产需要, 又不至于营养过剩导致产蛋性能降低。

1.2 提高生产性能

1.2.1 营养饲喂 生产优质、营养、安全的鸡蛋和鸡肉是开展蛋鸡散养模式的主要初衷, 在生产实际中需要采取相应的保障措施来切实提高散养蛋鸡的产品品质。通过放养季节和场地的选择、牧草种植种类和密度的控制等, 保证蛋鸡能够采食足量的野生饲料资源, 提升其所产鸡蛋的蛋黄色泽度、蛋白粘稠度、蛋壳厚度等蛋品指标。在野外可采食饲料不足的情况下, 鸡群除增加补饲的精料量外, 还应给鸡群饲喂胡萝卜、槐叶粉、野菊花粉、水草等物

质,可以提高蛋黄的级别以保证蛋品质量。

1.2.2 日常管理 根据前人的试验发现,母鸡群中混入公鸡有助于母鸡开产日龄的提前和产蛋率的提升,故在蛋鸡散养场内,可按照 200~300:1 的比例饲养一定数量的公鸡,可提高蛋鸡的生产性能。散养会降低蛋鸡的体重^[2],故在蛋鸡产蛋周期末,可以逐步缩小鸡群的放养范围,并增加精料的补饲次数和日补饲量,以提高淘汰蛋鸡的上市体重。

1.2.3 品牌营销 可以结合散养模式开发特色蛋品。诸如将蛋鸡散养于丘陵、山地之中生产山鸡蛋;将蛋鸡放养于银杏林下,通过饲喂银杏叶生产银杏鸡蛋;即使在普通的户外,也可以通过配备简单的音频播放设备来生产音乐鸡蛋。如此则可提高蛋品品质、市场知名度和销售价格。

1.3 开发观光型养鸡业

为改变传统畜禽养殖业负面形象,满足人们回归自然、享受绿色食品的需求。有条件的散养场户可以探索开发观光型蛋鸡养殖业。将不同品种、形态各异的蛋鸡散养于山林、果园、草地等风光秀丽的野外环境之中,搭建小型移动式散养鸡舍或“鸡别墅”,再配套建设散养场地的绿化、道路并建设生态餐厅等相关设施,从而把蛋鸡散养基地转型成为观光型蛋鸡散养家庭农场。在这种管理与经营模式中,消费者可以实地了解散养蛋鸡的生产特性和养殖过程,放心购买绿色鸡蛋和肉制品。这样既可以在农场内品尝健康美食,还能把将其作为土特产带回家或馈赠亲友,从而在很大程度上提高散养蛋鸡产品的销售量和附加值。

2 规避散养模式不足对蛋鸡散养经济效益的影响

2.1 选择合适的品种和育雏季节

野外放养与笼养条件有很大的不同。养殖场户如若开展蛋鸡散养,应首先做好品种和季节育雏选择这两个基础工作。根据养殖的实际需要,散养蛋鸡应选择善于觅食、耐粗饲、抗病力强的品种,仙居鸡、芦花鸡、青脚麻鸡、狼山鸡和绿壳蛋鸡等地方品种应为首选,也可选择诸如农大褐 3 号、苏禽草鸡和粤禽皇鸡等国内培育或杂交鸡种。散养蛋鸡应选择合适的育雏季节,以确保蛋鸡进入产蛋期尤其是产蛋高峰期的时间处于野外环境气候适宜、饲料资源丰富的季节。由此可见,每年的

春季是散养蛋鸡最佳的育雏季节,但进入夏季的育成时需要注意对光照时间的控制,以避免鸡群的性早熟。

2.2 做好疾病防控工作

散养模式下,蛋鸡由于长时间生活于野外环境,接触病原微生物的机会增加,再加上多变的气候条件和各种兽害的存在,鸡群容易发生多种疾病。因而很有必要采取综合措施来做好疾病防控工作,防止因病造成蛋鸡生长发育不良、产蛋性能下降以及死淘率上升等。为此,散养场地应选择于安静、卫生之所,有丰富植被而少有兽害,与外界应有必要的隔离设施;日常管理中做好定期消毒工作,散养场地每月撒洒 1 次生石灰,饮水器和料槽坚持每天清洗、每周消毒;制订科学的用药程序和免疫制度预防散养鸡常见传染病,包括禽流感、新城疫、鸡传染性法氏囊病、鸡传染性支气管炎等病毒性疾病,包括鸡白痢、鸡大肠杆菌病、禽霍乱等细菌性疾病,以及球虫病、蛔虫病、绦虫病等寄生虫病。另外,散养蛋鸡还需解决“啄癖”这一常见现象。主要措施包括:保证日粮中氨基酸、蛋白质、矿物质等营养元素的含量,控制蛋鸡的光照和饲养密度,7~10 日龄进行雏鸡断喙或者适时给鸡佩戴“鸡眼镜”,等等。

2.3 加强产蛋管理

研究发现,散养蛋鸡的蛋重偏小,可能与鸡只活动过度导致不能及时补充水分有关。因此实际放养中,需尽可能地扩大饮水器的布置范围,增加饮水器的数量,给蛋鸡供给足量的饮水。散养蛋鸡的活动范围大,容易产生“窝外蛋”,需开产前 2 周选择光线暗淡之处布置产蛋箱,适当训练调教母鸡学会使用产蛋箱,按照 3~5 只母鸡配备 1 个产蛋位,产蛋位的进出口处以设置可开闭的挡板为宜。产蛋后期需仔细观察鸡群,及时、逐步淘汰低产鸡和停产鸡,以及生长发育不良鸡、病残鸡、弱鸡、就巢性强及换羽的鸡,保证鸡群产蛋率,减少饲料消耗。

参考文献:

- [1] 李林. 蛋鸡生态养殖的发展[J]. 养殖技术顾问, 2009(7): 150-151.
- [2] 杨海明, 刘学, 夏金龙, 等. 散养与笼养对产蛋鸡内脏器官发育、繁殖性状及血清生化指标影响的比较[J]. 动物营养学报, 2013, 25(6): 1353-1358.

肉鸽规模化养殖的现状对策

曹永长¹, 陈靳松²

(1. 中山大学生命科学大学院, 广东 广州 510006; 2. 广东温氏食品集团股份有限公司, 广东 云浮 527400)

摘要: 肉鸽养殖是一种新兴的特种养殖业, 在广东、江浙等地形成了区域特色。但目前存在良种率不高、集约化水平不高、饲养管理水平不高、劳动效率不高以及从业人员专业化水平不高等问题。笔者建议, 从肉鸽品系繁育、种鸽和乳鸽营养需求及饲养标准、疾病控制和保健技术、种蛋孵化技术、生产管理体系、以及流通管理等方面加强研究与推广, 肉鸽规模化养殖产业必将成为推动农业结构调整、促进农民增收的新的经济增长点。

关键词: 肉鸽; 规模化养殖; 现状; 对策

中图分类号: S836

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)01-0018-03

肉鸽的营养价值高, 特别是乳鸽的肉中富含蛋白质、维生素和微量元素, 其中蛋白质含量高达24.5%, 而脂肪含量仅为0.73%。因此, 鸽肉作为一种低脂肪、高蛋白的肉类受越来越多的消费者青睐。肉鸽饲养在我国是一种新兴的特种养殖业, 起步于上世纪80年代, 经过30年的发展, 肉鸽养殖产量和产值快速增长, 在一些地区已经形成区域特色, 成为致富一方的特色产业。

1 肉鸽养殖现状

肉鸽养殖受环境、气温等因素的影响, 在国内饲养区域主要集中在广东、海南、江浙、河南等地, 广东省内的肉鸽养殖以增城为中心向广州、深圳、惠州、江门等地区辐射。据广东省家禽科学研究所不完全统计, 2012年国内种鸽存栏3000万~3500万对, 上市肉鸽4.5亿~5亿只。广东省种鸽存栏1200万~1500万只, 上市肉鸽近2.5亿只。受H₇N₉疫情影响, 近两年省外减栏约40%~50%, 省内减栏近30%。广东省内上市肉鸽有近1/3出口至港澳和省外其它地区, 仅珠三角地区的日均销量就在10万只以上。乳鸽市场相对稳定, 消费的淡旺季明显, 一般每年春节过后到中秋节前为淡季, 价格最低点通常出现在6、7月份; 中秋节后因天气转凉, 北方种鸽产量逐步走低, 加上百姓有秋冬进补的消费习惯和喜庆节日的拉动, 节后经常出现供不应求的局

面, 乳鸽销售、价格逐步攀升。

目前, 国内肉鸽经营有几种模式: 第一种是“公司+基地”模式, 如深圳天翔达牧工贸有限公司、深圳光明集团大宝鸽场、中山食品进出口公司石岐鸽场、肇庆贝来得公司等; 第二种是“公司+基地+农户”模式, 比较典型的如广州市良田鸽业有限公司; 第三种是“农户+协会”模式, 成立协会组织, 建立品牌效应, 对协会内的肉鸽养殖进行保护, 如江门的蓬江区潮连白鸽养殖协会; 第四种就是散养户模式。

肉鸽产品的主要销售形式包括生鲜系列、半成品系列、深加工系列。在深加工方面做得比较成功的有广东唐顺兴、上海立春鸽业、北京优帝集团等。主要产品为鸽的熟食品及利用鸽蛋的蛋清提取加工成化妆品等。在产品品牌方面, 全国尚未有占绝对优势的肉鸽品种, 主要是一些区域品牌, 如广州的良田王鸽、新会的潮莲白王鸽、深圳的天翔鸽、大宝鸽、中山的石岐鸽等。随着百姓对品牌意识的增强, 通过设立乳鸽专营饮食店等方式推广肉鸽产品取得一定成效, 乳鸽的消费也呈现出稳步增长的趋势。

2 肉鸽养殖存在的问题

2.1 良种率不高

我国肉鸽品种资源不少, 但不论是引进品种还是培育品种, 都只是种群扩繁和简单的杂交利

用,没有真正做过选种、育种,没有完整的、规范的系谱资料和饲养标准,所以也就没有形成真正意义上的肉鸽品种。

2.2 规模化、集约化水平不高

肉鸽养殖是一种难进难出的行业。因为肉鸽养殖的投资门槛较高,每投资1 000对种鸽要20万元左右的投资成本,而且,鸽场建成后,种鸽最少可利用4~5年进行生产,即使市场行情不好,也不能轻易停产或转产,否则将损失惨重。很多农户都是从几百对养起,市场行情好的时候一点点扩大规模。目前,数千对规模的鸽场比比皆是。

2.3 饲养管理水平不高

肉鸽的研究现状和生产现状与鸡、鸭、鹅普通家禽比起来还显得非常滞后。具体体现在:饲料营养水平没有标准可以参照,使肉鸽生产潜力得不到充分发挥;疫病防治无章可循,没有专用疫苗和规范免疫程序,例如,目前我国没有专用的鸽新城疫疫苗,大部分鸽场使用鸡源疫苗来预防。

2.4 劳动效率不高

肉鸽养殖的劳动强度不高,但工作量很大,精细化管理的程度决定着成本和利润的高低。目前,劳动效率高的鸽场人均饲养量在1 500~1 800对种鸽。

2.5 从业人员专业水平不高

肉鸽养殖业不如鸡、猪等畜禽行业热门,很多高素质专业人才不愿从事这项事业,或仅将其作为兼职工作。正因为如此,肉鸽养殖的研究水平、生产管理相对滞后。不同鸽场配对上笼率、种鸽产蛋指数、受精率、出苗率等生产指标存在很大差异。在我们走访的鸽场中,种鸽年产蛋窝数在7~12窝不等,受精率在80%~93%之间,出苗率在80%~92%之间。

3 肉鸽规模化养殖对策

畜禽养殖行业发展需解决的关键问题基本围绕着“控制成本、提升产量”这一永恒主题。肉鸽养殖也不例外,只是由于肉鸽行业生产技术水平滞后,需要我们付出更多的时间、精力、财力去探索和完善。笔者认为当前需解决的关键问题主要包括:

3.1 选择合适的品种,建立种鸽繁育体系,培育适销对路的肉鸽品系

不同品种之间生产性能存在一定差异,总体来讲,体型小的种鸽生产性能比较理想,但乳鸽个

体小,售价略低。体型稍大的种鸽生产性能偏低,但乳鸽的市场接受度较高。此外,早期雌雄鉴别技术对品种繁育和肉鸽生产均有重要意义,是肉鸽产业化发展需要解决的关键技术。

3.2 深入研究种鸽、乳鸽营养需求,建立饲养标准

饲料成本在生产成本中所占比例最大。从目前的试验情况来看,我们的饲料成本严重偏高,除了因为饲料浪费较严重外,另一个主要原因是饲料配方随意性大,无标准参照。在饲养流程中需配套人工育肥,才能较大限度地提升行业竞争力。

3.3 加强疾病控制技术研究,确保鸽群健康

目前,肉鸽疾病没有鸡、鸭等禽类复杂,防控体系相对容易建立。影响较大的疫病主要有鸽新城疫、毛滴虫、鹅口疮、鸽痘等。同时,在规模化肉鸽养殖生产中,对鸽群保健方案的摸索和规范十分必要。

3.4 加大对种蛋孵化的研究力度,提高繁殖效率

从目前整个行业的生产成绩来看,孵化成绩尚有较大的提升空间,出苗率、青苗率每提高一个点,所产生的经济效益是非常明显的。鸽子实行“一夫一妻”制,种鸽均是自然交配受精,鸽群的健康状况对受精和出苗有较大的影响,因此鸽群对饲养环境的要求相对较高,喜干燥通风,耐热怕冷,怕应激。要建立一套完整的饲养流程,通过对饲养流程的改进和完善,如配套人工育肥、实行强制换羽等方式,逐步缩短种鸽产蛋周期,提高产量。

3.5 优化生产程序,提高劳动生产效率

人均劳动效率也是提高肉鸽养殖竞争力的关键因素所在。要通过生产流程的优化和自动化设备装备水平的提高进一步提升劳动效率。现阶段喂料、添加保健砂、清洗水杯、垫片等工作环节占用了近一半的工作时间,饲养员没有足够的时间关注并蛋、并仔、调配种鸽等关键生产环节,无法使种鸽的生产潜力得到充分发挥。目前,试验场一个人最多饲养1 500对种鸽,通过生产设备自动化装备水平的提高,减轻饲养人员在喂料、清洁、清粪等环节的劳动投入,专心饲养种鸽,提高人均饲养量至2 000对甚至3 000对,才能发挥竞争优势。

3.6 掌握价格波动规律,加强流通管理

肉鸽销售市场稳固,市场前景看好。肉鸽市场淡旺季明显,中秋节后到春节前通常会供不

应求的局面。如果配套相应的屠宰加工生产线,将淡季产出的乳鸽屠宰后冷藏,待旺季售出,有利于实现利润最大化。

综上所述,我们目前需要解决的关键问题其实就是肉鸽规模化养殖标准技术体系和管理体系的建立。当然,繁育体系也是非常重要的,只是育种不是一朝一夕的事情,需要有专业的人员花大量的时间、精力,还要有强有力的资金支持,才能持续开展下去。除此之外,探索鸽“一夫多妻”制,

或者进行人工授精也可能是我们努力的方向。

肉鸽产业是一项阳光产业,产业的生产力取决于这个产业的市场占有率。乳鸽消费市场稳固、广阔,消费群体不断扩大,消费总量大幅提升。随着我国人民生活水平的提高和大中城市多元化消费格局的形成,优质肉鸽市场渐趋活跃,规模化肉鸽养殖产业必将成为推动农业结构调整、促进农民增收的新的经济增长点。



(上接第 7 页)

[16] Kim D, Hung C F, Wu T C, et al. DNA vaccine with α -galactosylceramide at prime phase enhances anti-tumor immunity after boosting with antigen-expressing dendritic cells[J]. *Vaccine*, 2010, 28(45):7297-7305.

[17] Ferraro B, Morrow M P, Hutnick N A, et al. Clinical applications of DNA vaccines: current progress[J]. *Clin Infect Dis*, 2011, 53(3):296-302.

[18] Wang Z, Troilo P J, Wang X, et al. Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation[J]. *Gene Ther*, 2004, 11(8):711-721.

[19] Lu S, Wang S, Grimes-Serrano J M. Current progress of DNA vaccine studies in humans[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2008, 7(2):175-191.

[20] Palka-Santini M, Schwarz-Herzke B, Hosel M, et al. The gastrointestinal tract as the portal of entry for foreign macromolecules: fate of DNA and proteins[J]. *Mol Genet Genomics*, 2003, 270(3):201-215.

[21] Kim J J, Yang J S, Dang K, et al. Engineering enhancement of immune responses to DNA-based vaccines in a prostate cancer model in rhesus macaques through the use of cytokine gene adjuvants[J]. *Clin Cancer Res*, 2001, 7(3):882s-889s.

[22] Guo Y J, Wu D, Wang K Y, et al. Adjuvant effects of bacillus Calmette-Guerin DNA or CpG-oligonucleotide in the immune response to *Taenia solium* cysticercosis vaccine in porcine[J]. *Scand J Immunol*, 2007, 66(6):619-627.

[23] Wan Y, Ren X, Ren Y, et al. As a genetic adjuvant, CTA improves the immunogenicity of DNA vaccines in an ADP-ribosyltransferase activity- and IL-6-dependent manner[J]. *Vaccine*, 2014, 32(19):2173-2180.

[24] Sajadian A, Tabarraei A, Soleimanjahi H, et al. Compa-

ring the effect of Toll-like receptor agonist adjuvants on the efficiency of a DNA vaccine[J]. *Arch Virol*, 2014, 159(8):1951-1960.

[25] Li Z Y, Chen J, Petersen E, et al. Synergy of mIL-21 and mIL-15 in enhancing DNA vaccine efficacy against acute and chronic *Toxoplasma gondii* infection in mice[J]. *Vaccine*, 2014, 32(25):3058-3065.

[26] Wang J, Zhu R, Gao B, et al. The enhanced immune response of hepatitis B virus DNA vaccine using SiO₂@LDH nanoparticles as an adjuvant[J]. *Biomaterials*, 2014, 35(1):466-478.

[27] Toke E R, Lorincz O, Csiszovszki Z, et al. Exploitation of Langerhans cells for in vivo DNA vaccine delivery into the lymph nodes[J]. *Gene Ther*, 2014, 21(6):566-574.

[28] Stenler S, Blomberg P, Smith C E. Safety and efficacy of DNA vaccines: Plasmids vs minicircles[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2014, 10(5):1306-1308.

[29] Cai Y, Rodriguez S, Hebel H. DNA vaccine manufacture: scale and quality[J]. *Expert Rev vaccines*, 2009(8):1277-1291.

[30] Dietz W M, Skinner N E, Halmilton S E, et al. Minicircle DNA is superior to plasmid DNA in eliciting antigen-specific CD₈⁺T-cell responses[J]. *Mol Ther*, 2013, 21:1526-1535.

[31] Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo[J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(9):867-870.

[32] Sardesai N Y, Weiner D B. Electroporation delivery of DNA vaccines: prospects for success[J]. *Curr Opin Immunol*, 2011, 23(3):421-429.

[33] Fynan E F, Webster R G, Full D H, et al. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90(24):11478-11482.

2014年我国生猪市场回顾及2015年形势展望

虞华¹, 原娟娟², 彭莉³

(1. 国家统计局盐城调查队, 江苏 盐城 224005; 2. 盐城工学院, 江苏 盐城 224000;
3. 江苏省统计局盐城调查局, 江苏 盐城 224005)

摘要:对于生猪养殖户来说, 2014年是困难重重和极具考验的一年。猪价任性, 不按常理出牌, 旺季不旺, 淡季反升, 养殖亏损程度之深历史罕见。本轮猪周期规律反常, 最根本的原因是生猪出栏量整体处于高位, 市场长期处在供大于求的状态。而随着居民肉食品消费多元化, 对猪肉制品需求量也在逐年减少, 供大于求的局面早在2011年底就已形成。2013年夏季南方洪灾导致生猪价格上涨, 很多养猪户却将这次涨价当作新一轮周期上涨阶段的开始, 盲目扩大规模导致生猪供大于求的局面进一步扩大。而2014年下半年能繁母猪存栏量持续下降, 将直接影响到2015年生猪出栏量, 在需求不变的情况下, 供应量减少势必造成价格上涨。

关键词: 生猪价格; 生产现状; 周期性波动; 市场预期

中图分类号: S828

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)01-0021-03

对于生猪养殖户来说, 2014年是困难重重和极具考验的一年。这一年, 充满着变幻莫测的迷茫。猪价任性, 不按常理出牌, 生猪价格提前下跌, 春节前不涨反跌; 旺季不旺, 淡季反升, 这股灰霾整整一年没有散去, 养殖利润快速减少, 生猪养殖持续亏损, 亏损程度之深, 历史罕见。2013年12月中旬以来, 受生猪产能偏高和消费需求下降等因素影响, 生猪及其产品价格开始下跌, 春节过后跌速加剧。2014年4月中旬, 土猪收购价格一度降至9.9元/kg, 为近3年来最低, 猪粮比低至4.2:1, 养殖场户重度亏损, 每出栏1头生猪平均亏损300元以上, 有的场户甚至每头亏损达到500元, 广大养殖场户叫苦不迭。

1 2014年国内生猪市场价格变动总体特点

2014年生猪价格变动经历了6个时期: 下滑探底期(1月~4月中旬)、回升期(4月下旬~5月初)、报复性上涨期(5月上旬~中旬)、弱势震荡调整期(5月下旬~6月底)、稳步上行期(7月~9月上旬)。中秋节之后生猪价格出现意外下滑, 猪价每次逢节必降的走势, 让养殖户都有所麻木, 也更少了些期待, 猪价又进入窄幅调整期(中秋节~年底)。

1.1 2014年猪价低于上年, 各月价格均在上年线下方

2014年全国生猪出场价格平均为13.05元/kg, 比2013年的14.74元/kg低1.69元, 下跌幅度为11.5%。其中: 8月份均价最高, 达14.70元/kg; 4月份均价最低, 仅10.45元/kg(图1)。2014年全国猪肉批发价格平均每千克为19.66元, 比2013年的22.17元便宜2.51元, 下跌幅度为11.3%。其中: 1月份均价最高, 达21.69元/kg; 4月份均价最低, 仅18.24元/kg(图2)。2014年12月份无论是生猪出场价格还是猪肉批发价格都是2011年以来同期最低价位。

1.2 2014年生猪养殖全年亏损

价格监测资料显示: 2014年全国平均猪粮比价为5.36:1, 比2013年的6.31:1下降0.95个点, 低15.1%。其中: 1月份比价最高, 为5.84:1; 4月份比价最低, 仅为4.52:1(图3)。生猪养殖处于中度亏损, 创近3年来的新低, 并呈现出3个特点: 一是猪粮比价下降速度快。生猪养殖由盈利到重度亏损, 仅用了3个多月的时间。二是亏损程度深。1月10日猪粮比跌破盈亏平衡线6:1, 1月20日已经步入介于“5:1-5.5:1”之间的中度亏损时代。3月底国家启动了第一批收储, 未能阻止猪价“跌跌不休”。截止4月29日猪粮比价连续11周低于盈亏平衡点, 已跌至4.55:1。另据调查, 4月份全国大型养殖企业出栏1头商品猪约亏损近300元, 小养殖户甚至每头亏损500元。三是亏损

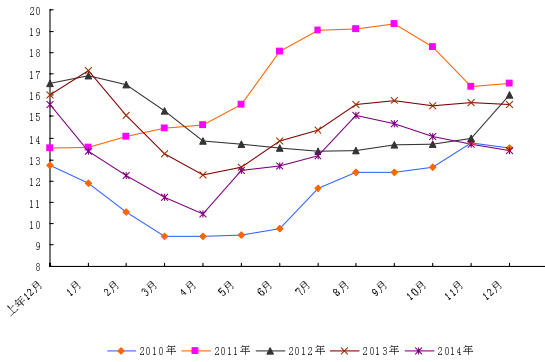


图 1 2010 年以来全国生猪价格走势 (元/kg)

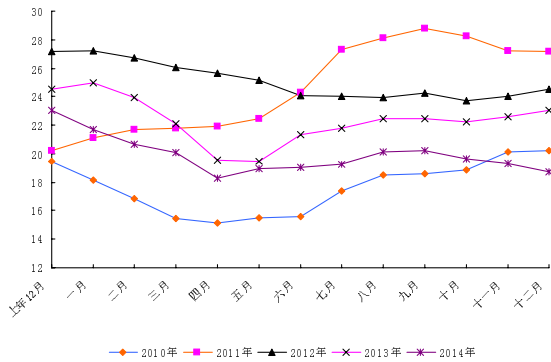


图 2 2010 年以来全国猪肉价格走势 (元/kg)

持续时间长。2014 年全年基本均处于养殖亏损状态,其中 2 个月(3-4 月)重度亏损(猪粮比价 5.0:1 以下),5 个月中度亏损(猪粮比价 5.0-5.5:1),5 个月轻度亏损(猪粮比价 5.5-6.0:1)。

1.3 能繁母猪存栏同比降幅不断扩大,去产能化明显

国家统计局发布的数据显示:2014 年 9 月底,生猪存栏 46 547 万头,同比减少 2.1%。1-9 月份全国生猪出栏 51 894 万头,同比增长 2.9%。前三季度全国猪肉产量 3 972 万吨,同比增长 3.3%。2014 年 12 月 17 日,农业部公布了 2014 年 11 月份 4 000 个监测点生猪存栏信息,11 月底生猪存栏同比下降 7.4%。其中,能繁母猪存栏 11 月份同比下降 12.1%,已经连续 9 个月低于《生猪调控预案》中下降 5%的预警值。能繁母猪存栏 2013 年 9 月份以来连续 15 个月下滑,降至近 5 年的最低点。见图 4、图 5。

1.4 玉米价格冲高回落,豆粕价格止跌企稳

2014 年 4 月以来,作为饲料主要原料的玉米价格持续上涨并屡创历史新高,8 月下旬现货价

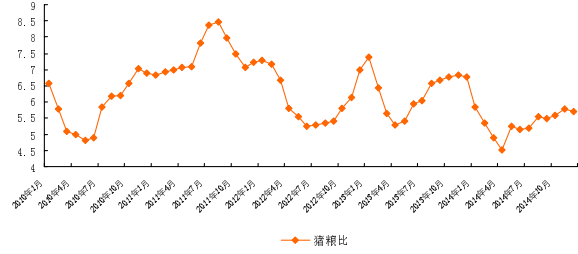


图 3 2010 年以来猪粮比价变化

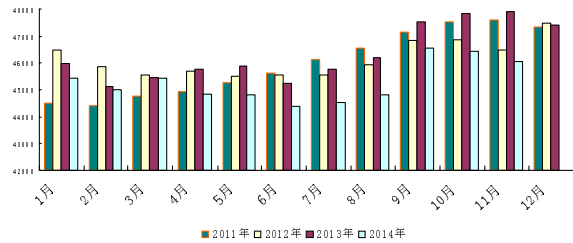


图 4 2011 年以来各月全国生猪存栏数比较 (万头)

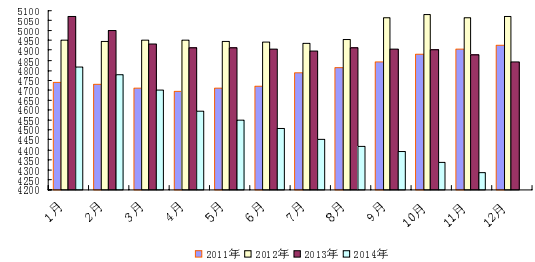


图 5 2011 年以来各月全国能繁母猪存栏数比较 (万头)

格一度达到 2 850 元 /t, 突破 2009 年曾出现的历史最高水平,同比涨幅超过 20%。据分析,多方面原因造成玉米价格稳步上升。国家玉米临储政策的实施,收购的数量和范围不断扩大,造成市场上可供贸易的数量减少;受转基因事件影响,我国进口玉米数量减少;玉米深加工企业担心生产原料不足,不能保证后期生产需要,提前增加库存。虽然随着新季玉米的上市,玉米价格回调幅度较大,但同比涨幅仍达 5%。2014 年全国玉米价格平均为 2.43 元 /kg, 比 2013 年同期的 2.34 元 /kg 高 0.09 元;8 月 30 日达价格高点 2.70 元 /kg, 比 2013 年同日的 2.38 元 /kg 高 0.32 元, 涨幅为 13.4%;11 月 25 日已回落到 2.35 元 /kg, 比 2013 年同日的 2.31 元 /kg 高 0.04 元;年内最高价位与最低价位相差 0.425 元。2014 年全国豆粕价格

平均为 3.80 元 /kg, 比 2013 年同期的 4.17 元 /kg 低 0.37 元; 10 月 30 日为 3.69 元 /kg, 比 2013 年同日的 4.39 元 /kg 低 0.70 元 (图 6)。2014 年 12 月第 2 周全国平均育肥猪配合饲料平均价格为 3.35 元 /kg, 同比持平。

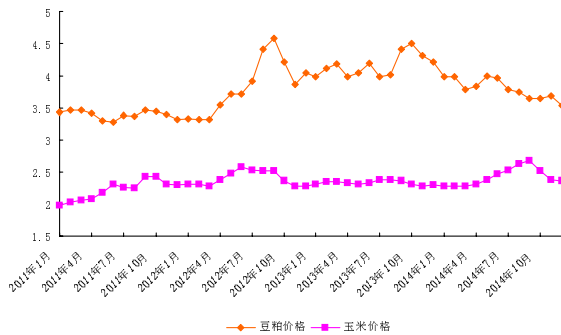


图 6 2011 年以来全国豆粕、玉米价格走势 (元/kg)

2 2014 年猪市持续低迷原因分析

本轮猪周期规律反常, 最根本的原因是生猪出栏量整体处于高位, 市场长期处在供大于求的状态。而随着居民肉食品消费多元化, 对猪肉制品需求量也在逐年减少, 供大于求的局面早在 2011 年底就已形成。2013 年夏季由于受南方洪灾, 生猪调运困难等因素的影响, 6-9 月份生猪价格又开始上涨, 供大于求的现状并没有改变。很多养猪户却将这次涨价当作新一轮周期上涨阶段的开始, 盲目扩大规模导致生猪供大于求的局面进一步扩大, 监测数据显示: 2013 年 6 月底全国生猪存栏 45 250 万头, 同年 9 月底增加到 47 541 万头, 同年 11 月底已增加到 47 922 万头, 5 个月增加了 2 672 万头, 增长了 5.9%。从而导致生猪价格“旺季不旺”, 降价又快又狠。进口冻猪肉也在一定程度冲击了国内生猪市场, 由于美国、欧盟的畜牧业发达程度高, 生猪养殖成本低, 使得进口冻猪肉到岸平均价格仅为 9 元 /kg, 远低于国内猪肉价格, 猪肉加工企业为降低成本大量从国外进口冻猪肉, 导致国内生猪产业的寒冬更加漫长。2014 年终端市场猪肉消费持续疲软, 猪肉消费不如往年, “中央八项规定”实施后, 公款餐饮消费、节日福利发放大为减少, 也抑制了猪价上行 (图 7)。

2014 年的猪价涨跌虽然不能以常理来推测, 然而过去影响猪价涨跌的那些因素依然能起到一



图 7 2014 年 6 月以来全国生猪价格变化

定的效果。受“闰九月”的影响, 2015 年春节比往年来得要晚, 腊肉和香肠制作的时间和猪肉消费旺季的到来也因此往后推迟。冬至当日, 农历时间才进入十一月, 离春节还有两个月时间, 这也是影响猪价迟迟不涨的原因之一。2014 年 12 月下旬大部分地区猪价仍趋于下滑走势, 主要是受猪病影响。据了解, 随着气温的进一步下降, 猪病增加, 不少地区反映腹泻、呼吸道病等现象增加, 导致生猪出栏量增加, 短期内生猪供应大于需求, 成为猪价下滑的主要原因。

2014 年国庆节至 2015 年元旦期间, 生猪价格之所以持续不上涨的阶段性因素是养殖户出栏积极性太高, 导致市场猪源充足, 供求关系进一步失衡, 加上疫情的散发, 猪价只能暂时保持弱势调整。如果从大方面上讲其实还是供求关系的影响。消费、疫病、出栏、压栏等因素都作用于供求关系。

3 2015 年猪价整体走势: 供需度趋紧, 猪价波浪式震荡向上

2015 年猪价或许并不能达到养殖户们心理预期, 但预测应该不会再出现产能过剩问题, 因此, 被 2014 年猪价彻底伤透了心的养殖户们在 2015 年应该能感受到猪价的“温暖”。2014 年遭遇的全国性生猪过剩, 导致“冬至”行情仍然是疲软乏力, 可以说生猪过剩和需求减少共同铸造了猪价低迷期, 所以说未来猪价上涨还需要先解决这两个方面的问题。2014 年底猪价整体维持震荡趋势, 主要还是因为终端消费力度提振有限, 猪源充足所致。应该说消费因素对供求关系的影响还是非常大的。主要是猪肉消费水平难以提升, 大碗酒大碗肉的年代已经终结, 现在是需要补充维生素

(下转第 33 页)

一例猪繁殖与呼吸综合征病毒与副猪嗜血杆菌混合感染病例的诊断及防治

裴伢福^{1,2}, 陈瑞爱^{2,3}, 贺东生³, 张显浩², 唐续², 刘好朋², 胡永浩¹

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 广东大华农动物保健品股份有限公司, 广东 云浮 527400; 3. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 规模化养猪场常出现病毒与细菌混合感染疾病, 严重影响我国养猪业的发展。广东某猪场的猪群发病, 病猪表现为高热、嗜睡、精神沉郁、咳嗽、皮肤发红、眼结膜发炎、腹式呼吸等临床症状, 发病率40%、病死率60%。通过病理剖检、细菌分离鉴定、药敏试验和RT-PCR等实验室检测, 诊断为猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株及副猪嗜血杆菌混合感染。在此基础上提出和实施了相应防治措施, 疫病得到控制。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征病毒; 副猪嗜血杆菌; 混合感染; 诊断; 防治

中图分类号: S852.61

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)01-0024-04

Diagnosis and Prevention of Infections of Highly Pathogenic Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Mixed with *Haemophilus Parasuis* Disease

Pei Zhangfu^{1,2}, Chen Rui'ai^{2,3}, He Dongsheng³, Zhang Xianhao², Tang Xu², Liu Haopeng², Hu Yonghao¹

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Guangdong Dahuanong Animal Health Products Co., Ltd., Yunfu 527400, China; 3. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Currently, multi-infections of bacterial and viral diseases affected China's pig industry seriously. Large number of pigs from a pig farm of Guangdong Province had high incidence and manifestations as hyperthermia, cough, decreased appetite, skin cyanosis, joint swelling and other clinic symptoms. Based on laboratory diagnosis on disease samples, the multi-infections with highly pathogenic PRRS virus, and *Haemophilus parasuis* were confirmed by bacterial isolation, RT-PCR, etc, and corresponsive counter-measures were applied to control this outbreak.

Key words: Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome (HP-PRRS); *Haemophilus parasuis* disease; diagnosis; prevention

广东某猪场饲养母猪800头, 保育猪与生长育肥猪分栋饲养。保育阶段猪呼吸道疾病症状明显, 每批刚转入保育阶段2w的断奶仔猪即有轻微咳喘、呼吸困难等临床症状, 早则35日龄, 晚则55日龄开始发病。发病率约40%, 未治疗病死率高达100%。即使采取治疗措施, 病死率也达到60%以上。整个病程持续2~4w。主要症状表现为眼结膜潮红, 喘气、腹式呼吸, 嗜睡, 厌食, 耳、腹下皮肤呈紫色, 有点状出血; 有些出现关节轻微肿胀、跛行, 双眼肿胀, 腹泻, 精神萎靡等。华南动物疫病检

测中心对猪场发病猪进行实验室诊断并提出了防治措施。现报道如下:

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病料 3头发病保育猪, 来源于广东省某规模化猪场发病仔猪。

1.1.2 主要试剂及培养基 药敏试纸购自杭州天和微生物试剂有限公司; 胰蛋白胨大豆琼脂 TSA、胰蛋白胨大豆肉汤 TSB、胰蛋白胨、酵母提取粉、NAD(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)、新生小牛血清购自

广州威佳科技有限公司;Taq DNA 聚合酶、MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit、PrimeScript OneStep RT-PCR Kit、pMD18-T simple vector、premix EX Taq、DL2000DNA Marker、DH5 α 感受态细胞均购自宝生物工程(大连)有限公司;Gel Extraction Kit 购自 OMEGA 公司;细菌 DNA 抽提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;副猪嗜血杆菌特异性引物由深圳华大基因科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 细菌分离培养及形态学观察 无菌条件下,采取病猪组织(肝、肾、心包液、关节液等)分别接种在 TSA 血平板、巧克力琼脂(含 NAD 和酵母浸膏)平板,37℃培养 18~24 h,然后进行革兰氏染色,在光学显微镜下观察。

1.2.2 药敏试验 挑单菌落接种到 TSB 兔血 NAD 液体培养基中培养至对数生长期,取 100 μ L 菌液涂于巧克力琼脂平板,使用 K-B 法进行药敏试验,根据 NCCLS(2006)的标准判定。

1.2.3 细菌的 PCR 鉴定 根据已报道的检测方法^[1],将分离的细菌抽提 DNA,按照细菌 DNA 抽提试剂盒说明书完成。抽提好细菌 DNA 后,进行 PCR 反应。反应条件为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30s,56℃退火 40s,72℃延伸 40s,运行 30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 完成后,取 5 μ L PCR 产物于 1%的琼脂糖凝胶中电泳,紫外投射仪中观察结果。

1.2.4 猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 检测及序列测定 参照 GenBank 猪繁殖与呼吸综合征病毒全基因序列设计检测引物,对病猪的肺组织进行 RT-PCR。将目的片段胶回收纯化后,克隆入 pMD-18T,送北京华大基因研究中心测序。

2 结果

2.1 病理变化

剖检发现:病猪均出现弥漫性间质性肺炎,肺实变,气管和支气管有血性黏液渗出物;心包膜和胸腔大量积液,心脏有大量出血斑,有明显的“绒毛心”现象;喉头出血;肠系膜淋巴结、腹股沟淋巴结肿大、充血、出血;脾边缘出血梗死;胸腔及腹膜有纤维蛋白渗出。图 1、图 2、图 3。

2.2 细菌分离培养及形态学观察

分离培养得到的细菌经革兰氏染色后镜检,见分离菌形态多样,从单个球杆状到长、细长以及

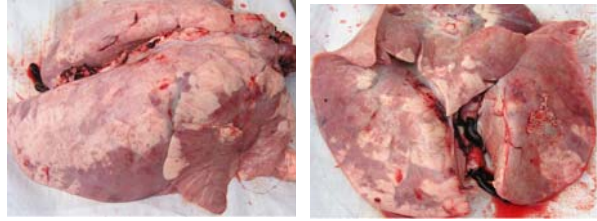


图 1 不同程度的间质性肺炎



图 2 心包膜和胸腔大量积液



图 3 喉头出血,喉气管见黄色分泌物

短丝状,为革兰氏阴性小杆菌。

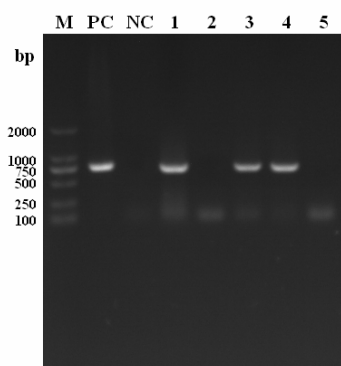
2.3 药敏试验

参照 NCCLS(2006)标准以敏感(S)、中等(I)、

耐药 (R) 3 种形式依抑菌圈大小进行判断。实验结果表明, 分离菌对头孢噻唑、头孢噻吩、环丙沙星、诺氟沙星等高度敏感; 对克林霉素呈中度敏感; 对氨苄西林、土霉素、阿莫西林、红霉素呈低度敏感 (表 1)。

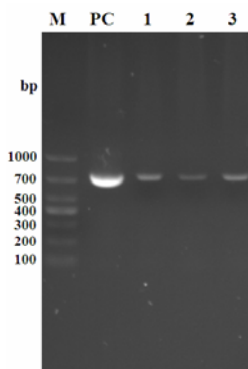
表 1 药敏试验结果

药物名称	纸片含药量 (μg)	判断标准 (mm)			菌株抑菌圈大小 (mm)
		R	I	S	
头孢噻唑	30	≤ 14	15~17	≥ 18	33
头孢噻吩	30	≤ 14	15~17	≥ 18	31
替卡西林 / 棒酸	10+10	≤ 14	15~17	≥ 18	27
环丙沙星	5	≤ 15	16~20	≥ 21	26
诺氟沙星	10	≤ 12	13~16	≥ 17	26
头孢氨苄	30	≤ 14	15~17	≥ 18	25
氨苄西林 / 舒巴坦	10+10	≤ 11	12~14	≥ 15	25
替卡西林	75	≤ 14	15~19	≥ 20	22
克林霉素	2	≤ 14	15~20	≥ 21	19
阿莫西林 / 棒酸 2:1	20+10	≤ 13	14~17	≥ 18	17
庆大霉素	10	≤ 12	13~14	≥ 15	19
林可霉素	10	≤ 14	15~19	≥ 20	14
丁胺卡那霉素	30	≤ 14	15~16	≥ 17	14
红霉素	15	≤ 13	14~22	≥ 23	12
阿莫西林	10	≤ 14	15~17	≥ 18	11
氨苄西林	10	≤ 13	14~16	≥ 17	9
土霉素	30	≤ 12	13~15	≥ 16	8



M: DL2000 DNA Marker; PC: 阳性对照; NC: 阴性对照; 1: 分离菌 a; 2: 分离菌 b; 3: 分离菌 c; 4: 分离菌 d; 5: 分离菌 e

图 4 各分离菌株的 PCR 鉴定



M: DL2000 DNA Marker; PC: PRRSV 变异株阳性对照; 1: 1 号猪肺; 2: 2 号猪肺; 3: 3 号猪肺

图 5 猪繁殖与呼吸综合征病毒 (Nsp2 1594~1680 变异株) RT-PCR 检测结果

2.5 猪繁殖与呼吸综合征病毒 RT-PCR 检测与测序比较

在所采肺脏组织中均扩增出猪繁殖与呼吸综合征病毒特异性目标条带 (如图 5)。测序后将结果用 DNASTar 软件分析发现, NSP2 基因与 2006

2.4 分离菌的 PCR 鉴定

PCR 产物经凝胶电泳后检测的条带大小约为 820 bp, 与预期结果相符, 如图 4。测序结果在 GenBank 中进行 blast 比对, 鉴定分离菌 a、分离菌 c 和分离菌 d 均为副猪嗜血杆菌。

年国内流行的高致病性变异病毒株一致, 且与流行代表毒株 JXA1 株的相似性为 96.5%。说明发病猪感染了猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株。

综合以上实验结果: 副猪嗜血杆菌和繁殖与呼吸综合征病毒变异株均为阳性, 结合临床表现,

判定该猪场本次爆发的疫病是由繁殖与呼吸综合征病毒变异株和副猪嗜血杆菌混合感染导致。

3 防治

根据诊断结果采取了以下防控措施:

3.1 严密封锁猪场, 隔离病猪, 防止疫情扩散

严密封锁猪场; 对发病猪群进行监测, 一旦发现疑似病猪立即隔离饲养; 对发病严重没有治疗价值的猪进行紧急扑杀, 对流产的胎衣、死胎及死猪进行无害化处理; 全场采取严格消毒措施, 防止疫情扩散。

3.2 加强饲养管理, 加强通风换气, 做好清洁消毒工作

改善饲喂条件, 降低饲养密度, 加强通风, 保持猪舍干燥, 减少应激。严格控制饲料的质量, 禁止饲喂霉变饲料。

3.3 病猪治疗

根据诊断, 病猪主要是由繁殖与呼吸综合征病毒变异株和副猪嗜血杆菌混合感染导致, 因此治疗时主要采取抗病毒和抗菌疗法相结合, 同时对症治疗。药敏试验结果显示主要的敏感药物有: 头孢噻唑、头孢噻吩、环丙沙星、诺氟沙星等。治疗时选用诺氟欣全群拌料, 每吨饲料添加诺氟欣 2 500 g; 不吃料的采用肌肉注射赛福纳(头孢噻唑钠), 每千克体重 5 mg, 以控制细菌感染。

3.4 紧急免疫

对后备母猪和妊娠母猪、公猪接种猪繁殖与呼吸综合征活疫苗(JXA1-R 株), 以 21 d 的间隔, 共进行免疫 2 次, 每头猪 1 头份。

此外加入维康乐(每升水中药物有效含量为 1 g), 提高猪的免疫力。

采用上述综合防控措施, 发病率和死亡率均明显下降, 该猪场的病情逐步得到控制。2 个月后疫病基本平息并恢复到发病前的生产水平。

4 讨论

当繁殖与呼吸综合征病毒侵入猪体后, 病毒被机体内的巨噬细胞吞噬。吞噬后的病毒其繁殖能力反而增强, 从而使肺部巨噬细胞的功能下降, 继而病猪出现呼吸道症状。随着病情的发展, 病毒又扩散到局部的淋巴组织和全身的单核细胞与吞噬细胞中, 从而导致机体的免疫力大大下降。副猪嗜血杆菌是猪上呼吸道常在菌, 当猪体的免疫力低下时容易发病^[2]。细菌感染后, 由于未能科学

地用药导致耐药菌株的不断增多、耐药谱日益扩大^[3]。有研究发现, 当猪感染繁殖与呼吸综合征病毒时, 在猪体内很容易检测到副猪嗜血杆菌。副猪嗜血杆菌病有蓝耳病的影子病之称^[4]。

目前猪病的发生基本上都是混合感染, 仅通过流行病学调查、临床剖检等方法却很难分辨, 必须通过实验室检测才能确诊。如主要通过 PCR、RT-PCR^[5]、RT-LAMP^[6]、ELISA^[7]等方法进行实验室诊断, 必要时可做动物回归实验^[8]。

以高致病性繁殖与呼吸综合征为主的重大疫病危害巨大, 要高度重视其综合防控, 尤其要做好平时的免疫接种。在当今的养猪生产过程中, 要加强饲养管理, 定期对圈舍进行彻底清扫和消毒, 饲喂营养全面的饲料, 对小猪采用少食多餐制以增强其体质。定期对猪场进行血清学和病原学监测, 以便制定科学的免疫程序和对带毒猪进行淘汰等。

本次猪场疾病发病快、传播广、感染率高、死亡率高, 综合诊断为混合感染, 根据治疗措施降低了猪的死亡率。所以, 针对混合感染或多重感染, 要根据猪场疫病流行特点、临床症状、病理剖检及实验室检测进行综合诊断。根据诊断结果对症下药, 避免不合理用药(含抗菌药物)而导致更高的死亡率。

参考文献:

- [1] 苏丹萍, 王文豪, 张显浩, 等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征、猪圆环病毒病和副猪嗜血杆菌混合感染的诊断与防控[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 13(6): 186-189.
- [2] 刘正飞, 蔡旭旺, 陈焕春, 等. 副猪嗜血杆菌研究进展[J]. 动物医学进展, 2003, 24(5): 17-19.
- [3] 方泉明, 黄建珍, 黄冬艳, 等. 副猪嗜血杆菌江西株的分离鉴定及药敏试验[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(4): 161-163.
- [4] 谭实勇, 邓瑞林, 罗满林. 猪繁殖与呼吸综合征病毒与副猪嗜血杆菌混合感染的诊治[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(4): 90-92.
- [5] 李琼, 张以芳, 王军. 一起猪瘟与猪繁殖障碍与呼吸综合征混合感染的 RT-PCR 检测方法[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(12): 95-96.
- [6] 赵彦宗, 张显浩, 余小利, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 M 基因 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2009, (32) 12: 53-55.
- [7] 林彦星, 孙彦伟, 刘镇明, 等. 应用原核表达的猪圆环病毒 II 型 Cap 蛋白建立一种间接 ELISA 诊断方法[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(3): 217-221.
- [8] 王福广, 余小利, 苏丹萍, 等. 贺东生. 高致病性猪蓝耳病病毒 YA 株的分离鉴定与动物回归试验[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(5): 3-5.

手术治愈腹部刀伤水牛 1 例

叶志如

(江西广昌县长桥畜牧兽医站, 江西 抚州 344900)

中图分类号: S857.12

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)01-0028-01

外伤是家畜养殖中的普通病,常因饲养管理不当或人为等因素所致。轻者对家畜无大碍,常能自行全愈;重者或处置不当,常致严重感染,造成残疾,影响生产性能,甚者可致家畜死亡,造成经济损失。笔者在兽医工作中曾遇 1 例水牛腹部刀伤致肠管外露患例,经采用手术方法治疗获得全愈。现将治疗情况介绍如下,请同道指正。

1 基本情况

江西广昌县盱江镇赤岸村付某饲养水牛 1 头,3 岁,中等膘情。2010 年 5 月 13 日畜主早晨将牛送到离家稍远地方放牧,下午 5 时左右去放牧地牵牛回家时,发现牛侧卧在地,右则腹部刺有一把尖刀,刀口部位流出血水。牛不吃草料,有痛苦感。畜主心情紧张,自己将刀拔出,刀长约 20 cm。尖刀拔出后即有一团内脏物从刀口挤出暴露在外。畜主立即请兽医诊治。

笔者前往诊治。检查见:牛精神稍差,有痛苦感;患牛右侧腹部倒数第 1~2 根肋骨间下缘近肋软骨处有一长约 5 cm 伤口,伤口及暴露物周围已被流出的血水及污物凝固住。详细检查该暴露物性质、大小,确认是肠管从伤口处挤出,嵌在伤口处,肠管已於血肿胀,呈紫红色,内有气体,长约 23 cm。检查肠管尚无裂口。因已傍晚时分,当时天气昏暗,不具备手术操作条件,需等第二天手术。故只作了全身抗菌消炎,防止感染处理。肌肉注射青霉素 800 万单位,10%磺胺嘧啶钠注射液 50 mL。嘱畜主当晚加强看护。

2 手术治疗

2.1 手术准备

准备用品:准备麻醉药、消毒药、手术刀、手术

钳、手术剪、手套、缝针、缝线等用品。

保定:为减轻患牛腹压,方便手术操作,将患牛左侧卧保定,患侧朝上。

2.2 术部消毒

患部四周剪毛,先用生理盐水清洗伤口周围皮肤及暴露物,将伤口处溃烂的组织、血污等物清除。用碘伏对患牛伤口周围皮肤及暴露物消毒。

2.3 手术方法

清洗消毒后,在伤口周围行局部麻醉。为使露出的肠管易于还入腹腔,减轻皮肤对肠管嵌压,防止手术中肠管破裂,适当扩大伤口,伤口由 5 cm 扩大至 9 cm。伤口扩大后,将暴露的肠管用 2%明矾溶液冲洗 1 次,收敛减轻肿胀;撒上青霉素粉抗感染,小心地、缓慢地将肠管自腹膜伤口处推回腹腔内;然后进行缝合。缝合时先缝腹膜,接着缝合肌肉层,最后缝合皮肤。对缝合伤口用碘伏消毒,撒上青霉素粉。伤口用纱布包扎。

3 药物治疗及术后护理

术前注射破伤风抗毒素 6 000 单位,注射止血敏 15 mL。术后对患牛静脉注射 10%葡萄糖溶液 2 000 mL、Vc 注射液 20 mL;肌肉注射青霉素 800 万单位、10%磺胺嘧啶钠注射液 50 mL,每天 1 次,连续使用 6 d。

每隔 2 d 检查伤口 1 次,并换包扎创口纱布。嘱咐畜主加强患牛的饲养管理,做到术后静养,不喂过饱。

4 治疗效果

15 d 后术部愈合良好。3 个月后回访,该牛已能正常使役。

鸭坦布苏病毒和产蛋下降综合征病毒 二重 PCR 检测方法的建立

孙敏华¹, 李林林¹, 董嘉文¹, 袁建丰¹, 邝瑞欢¹, 胡奇林^{1,2*}

(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, 广东 广州 510640; 2. 福建农业科学院畜牧兽医研究所, 福建 福州 350013)

摘要: 参考 GenBank 上已发表的鸭坦布苏病毒 (DTMUV) NS5 基因序列和产蛋下降综合征病毒 (EDSV) 五邻体 (penton) 基因序列, 分别设计了检测 DTMUV 和 EDSV 的特异性引物, 扩增目的片段大小分别为 242 bp 和 181 bp。通过退火温度及引物浓度的优化, 建立了针对这两种病毒的二重 PCR 检测方法。特异性试验结果表明, 该方法可以同时检测 DTMUV 和 EDSV, 且不与鸭肝炎病毒、鸭瘟病毒、番鸭呼肠弧病毒、小鹅瘟病毒、番鸭细小病毒、H₉ 亚型禽流感病毒、新城疫病毒以及大肠杆菌的核酸发生交叉反应; 敏感性试验表明, 该方法对 DTMUV 的最低检出限为 590 个拷贝, 对 EDSV 的最低检出限为 3 260 个拷贝; 该方法重复性良好, 对不同批次的样品扩增效果良好。通过检测两种病毒感染的阳性病料各 10 份, 结果显示, 该二重 PCR 检测方法对阳性样品的检出率可达 100%。这表明该方法可以用于鸭坦布苏病毒和产蛋下降综合征病毒的检测。

关键词: 鸭坦布苏病毒; 产蛋下降综合征病毒; 二重 PCR

中图分类号: S852.65:9.5

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)01-0029-05

Duplex PCR Assay for the Detection of Duck Tembusu Virus and Egg Drop Syndrome Virus

Sun Minhua¹, Li Linlin¹, Dong Jiawen¹, Yuan Jianfeng¹, Kuang Ruihuan¹, Hu Qilin^{1,2*}

(Guangdong Lab for Animal Diseases/Guangdong Open Laboratory of Public Health, Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China; 2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China)

Abstract: Primers targeting the NS5 gene of Duck Tembusu Virus and the penton gene of Egg Drop Syndrome Virus were designed based on the data from GenBank. The two amplicons were in length of 242 and 181 basepairs. Through optimizing annealing temperature and primers concentration, the duplex PCR method was validated. This method had no cross reaction with the nucleic acid of DHV, DPV, MDRV, GPV, MPV, H9 AIV, NDV and E.coli. The nucleic acid detection limits of this method were 590 copies of DTMUV and 3260 copies of EDSV. In addition, this method had good reproducibility by three repeat tests. It showed 100% detection rate when checking the 10 positive samples. Thus, it was believed that this method could be useful for the detection of DTMUV and EDSV.

Key words: Duck Tembusu Virus; Egg Drop Syndrome Virus; Duplex PCR

鸭坦布苏病毒病 (Duck Tembusu Virus Disease) 是由鸭坦布苏病毒 (Duck Tembusu Virus, DTMUV) 引起的一种急性传染病。该病可导致蛋鸭、种鹅在短时间内出现明显的产蛋下降症状, 且病程

可长达数周^[1-5]。近来, 也有蛋鸡和肉鸭感染的报道^[6,7]。该病病原属于黄病毒科 (Flaviviridae), 黄病毒属 (Flavivirus), 坦布苏病毒 (Tembusu virus)^[1-5]。尽管该病死亡率不高, 但病程长, 潜在

收稿日期: 2014-11-26

*: 通讯作者

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (201003012), 广东省科技计划项目 (2012A020100001, 2012B020306009, 2012B010300030), 广东省农业科学院院长基金项目 (201436, 201412), 广州市科技计划项目 (2014Y2-00003)

危害巨大。鸭坦布苏病毒基因组长约 11 kb, 顺序为 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'^[5], 其中 NS5 非常保守。

产蛋下降综合征 (Egg Drop Syndrome, EDS) 是由禽腺病毒引起的, 导致种蛋禽产蛋量下降的一种传染病。该病毒仅有一个血清型, 主要引起种鸡的产蛋性能下降。其自然宿主还包括鸭和鹅, 并且也有引起鸭产蛋下降, 蛋壳变粗糙、软化和变薄的报道^[8,9]。该病能够垂直传播, 因此准确检测种禽的带毒及发病情况有助于减少由此带来的经济损失。

本研究针对引起蛋种禽产蛋下降常见的鸭坦布苏病毒 (DTMUV) 和产蛋下降综合征病毒 (EDSV), 建立了检测这两种病原的二重 PCR 方法, 为产蛋下降病原的快速诊断提供了物质基础。

1 材料和方法

1.1 病毒

鸭坦布苏病毒 (DTMUV) JM 株、产蛋下降综合征病毒 (EDSV)、鸭瘟病毒、鹅细小病毒、番鸭细小病毒、新城疫病毒、鸭肝炎病毒、番鸭呼肠孤病毒、H₉ 亚型禽流感病毒和大肠杆菌均由广东省农业科学院动物卫生研究所禽病研究室保存。

1.2 试剂

2×Premix ExTaq、dNTP、DNA 分子量标准、pMD18-T 载体、Takara MiniBEST DNA/RNA 提取试剂盒, 胶回收试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; DH5 α 感受态细胞购自天根生化科技有限公司; 其它试剂均为分析纯。

1.3 引物设计与合成

下载 GenBank 中 DTMUV 全基因序列以及 EDSV 五邻体的基因序列, 利用 Oligo 6.0 设计针对它们保守区域的特异性引物 (序列见表 1), 且使 2 对引物的 T_m 值接近。引物由 Invitrogen 公司合成。

1.4 病毒核酸扩增

根据试剂盒说明书分别提取 DTMUV 和 EDSV

核酸, 将 DTMUV 的 RNA 反转录成 cDNA, 然后利用特异性引物分别对基因序列进行扩增。PCR 反应条件为: 94℃ 5min; 94℃ 30sec, 58℃ 30sec, 72℃ 30sec, 30cycles; 72℃ 10min。经琼脂糖凝胶电泳, 胶回收, 与 pMD18-T 载体连接, 转化 DH5 α 后, PCR 鉴定为阳性的菌液, 由 Invitrogen 公司进行序列测定。所获得的质粒分别命名为 pDTV 和 pEDS。

1.5 二重 PCR 方法的建立及反应条件的优化

分别将 DTMUV 和 EDSV 上下游引物 (每条引物终浓度均为 10 μ M) 等体积混合后, 在 20 μ L PCR 反应体系内, 两种病毒的检测引物按 20pmol、40pmol、60pmol 的量进行组合, 每个模板量均为 1 μ L, 筛选二重 PCR 的最佳引物浓度。在最佳引物浓度下, 分别将退火温度设定为 52℃、55℃、58℃、61℃ 和 64℃, 筛选最佳退火温度。

1.6 特异性

将本研究室保存的鸭瘟病毒、鹅细小病毒、番鸭细小病毒、大肠杆菌等基因组 DNA, 以及经典 I 型鸭肝炎病毒、新型鸭肝炎病毒、番鸭呼肠孤病毒、H₉ 亚型禽流感病毒、新城疫病毒 cDNA 进行 PCR 反应, 以验证所建立的方法是否与这些病毒的核酸之间存在交叉反应。

1.7 敏感性和重复性

提取 1.4 中构建好的 pDTV 和 pEDS 质粒, 经 DNA 浓度测定后, 按照质粒拷贝数计算公式。即: 拷贝数 (copies/ μ L) = 6.02×10^{23} (copies/mol) \times 质粒浓度 (g/ μ L) / (碱基数) \times 660 (g/mol)。随后, 将质粒分别用水作 10 的倍比稀释, 取各梯度进行 PCR 灵敏度检测。将 2 个质粒分别进行 10 倍稀释, 稀释度从 10⁻¹~10⁻¹¹, 再取其中 10⁻⁵~10⁻¹¹ 稀释的质粒进行 3 份平行 PCR 扩增, 确定该方法的敏感性和重复性。同时利用单个引物进行 PCR 扩增 (10⁻⁵~10⁻¹⁰ 每个样品浓度梯度进行 2 个重复), 比较二重 PCR 方法与单一 PCR 方法的敏感性差异。

1.8 临床样品检测

将本研究室保存的 DTMUV 和 EDSV 阳性病料的核酸, 进行二重 PCR 验证。

2 结果

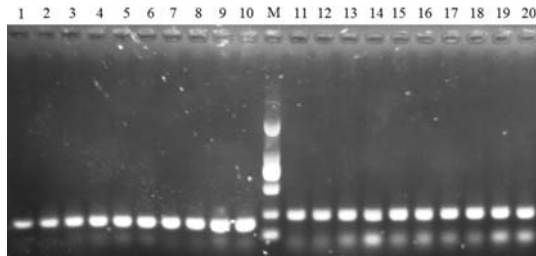
2.1 EDSV 和 DTMUV 的扩增及 PCR 反应条件优化

经 PCR 反应及退火温度优化, 发现所设计的

表 1 二重 PCR 特异性引物

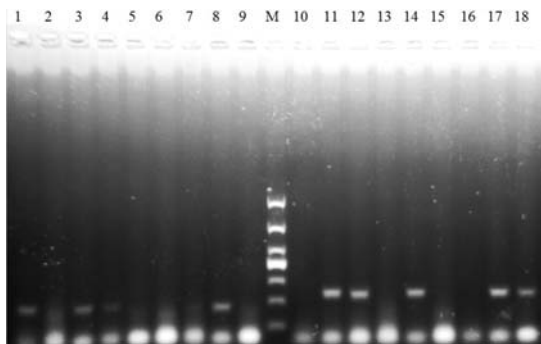
引物名称	引物序列 (5'→3')	片段大小 (bp)
DTMUV-10483-F	TCCCTGCCACCGGATGTTGGATG	242
DTMUV-10702-R	CGTGGGGGCCATTTTGGCTTTGT	
EDS-pen-1146-F	TGAGATCTTATGCAGCCACCGT	181
EDS-pen-1304-R	AGATACGGGGCCAAAGATTTGT	

引物能够扩增两种病毒的核酸, 并且条带单一。EDSV 核酸的扩增随退火温度升高, PCR 效率增高, DTMUV 则受退火温度变化影响较小(图 1)。综合起来, 确定最佳退火温度为 64 °C。当进行引物浓度组合时发现, 只有当 EDSV 和 DTMUV 引物在 20pmol+60pmol 和 60pmol+40pmol 时, 两种模板均得到较好扩增(图 2)。综合 PCR 效率来看, 当 EDSV 上下游引物共加入 60pmol, 而 DTMUV 上下游引物共加入 40pmol 时, 扩增效果最好。



1, 2; 3, 4; 5, 6; 7, 8 和 9, 10 为 EDSV 特异性引物在退火温度 52°C、55°C、58°C、61°C 和 64°C 时的 PCR 结果; 11, 12; 13, 14; 15, 16; 17, 18 和 19, 20 为 DTMUV 特异性引物在退火温度 52°C、55°C、58°C、61°C 和 64°C 时的 PCR 结果。M 为 DL2000。

图 1 EDSV 和 DTMUV 最佳退火温度的筛选

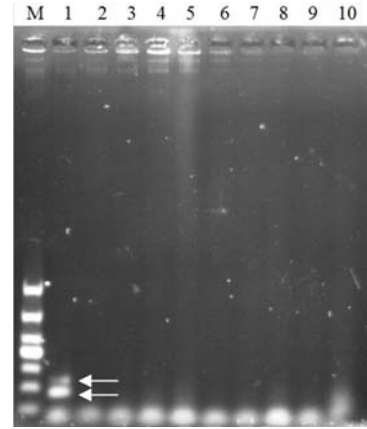


1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 和 9 为 EDSV 和 DTMUV 上下游引物混和物分别在 20pmol+20pmol, 20pmol+40pmol, 20pmol+20pmol, 20pmol+60pmol, 40pmol+20pmol, 40pmol+40pmol, 40pmol+60pmol, 60pmol+20pmol, 60pmol+40pmol, 60pmol+60pmol 时 EDSV 核酸的 PCR 结果; 10-18 为 DTMUV 核酸的 PCR 结果, 引物浓度与 1-9 顺序完全相同。M 为 DL 1000。

图 2 EDSV 和 DTMUV 扩增最佳引物浓度的筛选

2.2 二重 PCR 方法的特异性

在最佳反应条件下, 阳性核酸扩增良好, 而另外 9 种病毒或细菌的核酸均未见扩增(图 3), 说



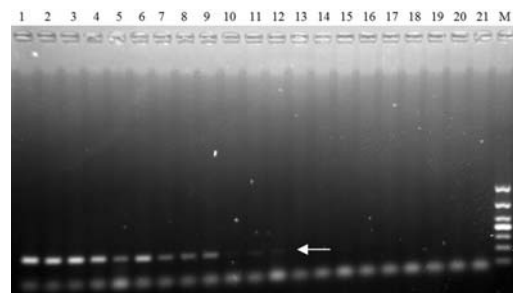
1 为 EDSV 和 DTMUV 阳性对照; 2-9 分别为鸭瘟病毒、鹅细小病毒、番鸭细小病毒、大肠杆菌、经典 I 型鸭肝炎病毒、新型鸭肝炎病毒、番鸭呼肠孤病毒、H₉ 亚型禽流感病毒、新城疫病毒的 PCR 结果。M 为 DL 1000。

图 3 二重 PCR 的特异性

明所建立的方法特异性良好。

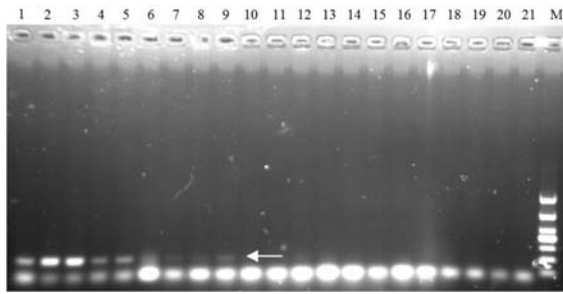
2.3 二重 PCR 方法的敏感性和重复性

经质粒提取后, 测定质粒 pDTV 和 pEDS 的浓度分别为 191 ng/μL 和 99 ng/μL。经计算, pDTV 的拷贝数为 5.9×10^{10} copies/μL, pEDS 的拷贝数为 3.26×10^{10} copies/μL。二重 PCR 方法的敏感性对 DTMUV 的最低检出限为 590 个拷贝, 对 EDSV 的最低检出限为 3 260 个拷贝(图 4、图 5); 该方法重复性良好, 对不同批次的样品扩增效果良好(图 4、图 5、图 6)。单一 PCR 方法扩增 DTMUV 时, 比二重 PCR 方法敏感 10 倍, 而单一 PCR 方法扩增 EDSV 时, 则与二重 PCR 方法敏感度相当(图 6)。进行 3 次重复扩增时发现, 所建立的二重 PCR 方法的重复性良好, 尤其是低浓度样品还可以保持较为一致的扩增结果。



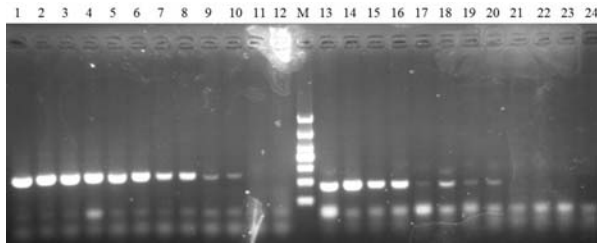
1-3, 4-6, 7-9, 10-12, 13-15, 16-18, 19-21 分别为 5.9×10^5 - 5.9×10^{-1} 拷贝 DNA 的二重 PCR 扩增结果。M 为 DL1000。

图 4 二重 PCR 方法扩增 DTMUV 核酸的敏感性



1-3,4-6,7-9,10-12,13-15,16-18,19-21 分别为 3.26×10^5 - 3.26×10^{-1} 拷贝 DNA 的二重 PCR 扩增结果。M 为 DL1000。

图 5 二重 PCR 方法扩增 EDSV 核酸的敏感性



1, 2; 3, 4; 5, 6; 7, 8; 9, 10 和 11, 12 分别为 DTMOV 引物扩增 5.9×10^5 - 5.9×10^0 个拷贝的 PCR 结果; 13, 14; 15, 16; 17, 18; 19, 20; 21, 22 和 23, 24 分别为 EDSV 引物扩增 3.26×10^5 - 3.26×10^0 个拷贝的 PCR 结果; M 为 DL1000。

图 6 单一 PCR 方法的敏感性

2.4 临床样品的检测

利用优化的二重 PCR 方法, 进行样品的检测。结果表明, 所保存的 10 份阳性样品全部能够检出, 说明该方法可以用于临床样品的检测。

3 小结与讨论

鸭坦布苏病毒和产蛋下降综合征病毒均能感染蛋鸡、鸭和鹅, 并导致产蛋下降^[1-6,8]。由于这两种病毒危害的宿主范围都较广。因此, 快速检测引起产蛋下降的病原具有重要的临床意义。

本研究通过优化 DTMOV 和 EDSV 的引物浓度, PCR 反应的退火温度, 建立了快速检测这两种病原的二重 PCR 方法。经特异性、敏感性和重复性验证, 结果表明所建立的方法不与鸭瘟病毒、鹅细小病毒、番鸭细小病毒、大肠杆菌、鸭肝炎病毒、番鸭呼肠孤病毒、H₉ 亚型禽流感病毒以及新城疫病毒发生交叉反应。该方法对 DTMOV 的最低检出限为 590 个拷贝, 对 EDSV 的最低检出限为 3 260 个拷

贝, 且重复性良好。与单一 PCR 方法相比, 仅扩增 DTMOV 的效果低一个数量级, 而 EDSV 的扩增效果非常好。

由于影响二重 PCR 反应的因素较多, 在接近检出限的时候, 偶尔也会出现检测结果不稳定的情况。本文作者也发现, 通过调整模板的含量可以改善扩增的效果, 使得检出限更低。实际上 DTMOV 在 59 个拷贝时也能扩增, 只是电泳条带比较模糊。因此, 二重 PCR 方法可以媲美单一 PCR 方法, 且具有操作简单、快速, 提高检测效率、缩短检测周期、降低检测成本等优势^[9]。将该方法用于阳性临床样品的检测, 发现其检测结果完全可靠, 证明该方法可以用于临床检测。

由于我国养殖场众多, 散养、混养现象比较常见, 加之疫苗免疫压力下导致的病原变异, 使得许多疾病的临床表现出现相似之处, 因此实验室确诊时通常需要对一个样品进行多个病原或者多个抗体的检测。这个时候多重检测就可以发挥优势, 能够迅速进行检测, 节省人力物力财力。目前已经建立了许多抗原的多重诊断方法, 并且取得了较好的效果^[10,11]。例如, Li 等^[12]建立了能够同时检测 16 种人呼吸道病原的多重 PCR 方法, 其灵敏度已经接近 Luminex xTAG 试剂盒的检测水平。相对而言, 兽医临床实践中, 十几种或者几十种病原或者抗体的检测方法仍然处于研发过程中。从发展趋势来看, xTAG、xMAP 等能够同时进行高通量抗原或者抗体检测的方法无疑是快速诊断的一个重要方向。

参考文献:

- [1] 滕巧洪, 颜丕熙, 张旭, 等. 一种新的黄病毒导致蛋鸭产蛋下降及死亡[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(6): 1-4.
- [2] Su J L, Li S, Hu X D, et al. Duck Egg-Drop Syndrome Caused by BYD Virus, a New Tembusu-Related Flavivirus [J]. PLoS One, 2011, 6(3): e18106.
- [3] Li Linlin, An Hejia, Sun Minhua, et al. Identification and genomic analysis of two duck-origin Tembusu virus strains in southern China [J]. Virus Genes, 2012, 45(1): 105-112.
- [4] 孙敏华, 胡奇林, 董嘉文, 等. 鸭坦布苏病毒江门株的分离鉴定及其 E 基因系统进化分析 [J]. 广东农业科学, 2012(11): 158-160.
- [5] Cao Z Z, Zhang C, Liu Y H, et al. Tembusu Virus in Ducks, China [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17(10): 1873-1875.

- [6] 陈仕龙, 陈少莺, 王劭, 等. 一种引起蛋鸡产蛋下降的新型黄病毒的分离与初步鉴定[J]. 福建农业学报, 2011, 26(2):170-174.
- [7] 赖芳芳, 陈孝明, 张健骝, 等. 肉鸭中黄病毒的分离与鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2013, 40(2):179-182.
- [8] Y. M. Saif 主编. 苏敬良, 高福, 索勋, 主译. 禽病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2012, 307-315.
- [9] 赵红庆, 苑锡铜, 黄留玉. 多重 PCR 技术在病原检测中的应用[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(5):863-865.
- [10] 何玮玲, 张驰, 杨静, 等. 食品中 4 种肉类成分多重 PCR 的快速鉴别方法[J]. 中国农业科学, 2012, 45(9):1873-1880.
- [11] 王林, 吴发兴, 吴美芹, 等. PRRSV 和 PCV-2 二重 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 动物医学进展, 2010, 31(6):1-5.
- [12] Li J, Qi S, Zhang C, et al. A two-tube multiplex reverse transcription PCR assay for simultaneous detection of sixteen human respiratory virus types/subtypes [J]. Biomed Res Int, 2013, 327620:1-7.

(上接第 23 页)

的年代, 所以吃的肉也少很多, 看看自家的菜碗, 看看邻居家的菜碗, 是不是一碗肉要几天才吃完? 随着经济的发展以及生活水平的提高, 大家的消费习惯和饮食结构都在变化。如果猪肉消费持续低迷, 对猪价的影响也是长久的。

长期的低价, 击垮了养猪人压栏的信心, 只要一降价, 很快全国一片, 即便涨价时, 只要有丁点儿的风吹草动, 也会形成一片震荡。如同大战过后, 最先需要建设的却是精神家园。马云说过, 大家都在流血时, 我们的机会便来了。在国家政策没有多大变化情况下, 能繁母猪的存栏量很可能还要下跌一段时间, 猪粮比回到 6 以上之后很可能止跌。但 2014 年下半年能繁母猪存栏量持续下降, 将直接影响到 2015 年生猪出栏量, 到时生猪出栏量降低, 在需求不变的情况下, 供应量减少势必造成价格上涨。如果疫病得到控制, 2015 年元旦后生猪可能会出现打破平衡的断档期, 再加上消费高峰的来临, 新一轮上涨可能会到来。从供需平衡的关系看, 预计 2015 年上半年全国生猪市场供应趋紧, 猪价在季节性下跌时期的表现将相对抗跌, 或出现淡季不淡, 旺季较旺的格局, 价格底部将较 2014 年整体抬升。2015 年生猪平均出场价格将同比上涨 13% 以上, 达到或高于 2013 年 14.74 元 /kg 的水平, 整体猪价呈前低后高格局。生猪养殖效益将在盈亏线以上, 或将达到高点。

畜禽养殖与种植业相比, 不仅面临着自然灾害风险, 还面临着巨大的市场风险, 而且后者的影响更大, 因此, 广大养殖农户和养殖企业早就盼望着生猪养殖保险险种的出台, 许多地方也在努力

尝试。日前, 江苏省政府金融办公室发布文件, 公布了生猪价格指数保险条款费率, 并要求从 12 月 10 日起施行。养殖户参加这一保险后的保险期内, 生猪出栏时如果碰上行情低迷, 当出栏当月猪粮比价平均值低于 5.8:1 时, 投保者就能按保险合同的约定获得赔偿。目前, 保险金额设 600 元 / 头、800 元 / 头和 1000 元 / 头 3 个档次, 保险费率为 5%。保险双方可约定年出栏数量、出栏批次和承保数量, 保险合同在不同价格波动情形下可采用不同的赔偿比例系数。这里涉及的猪粮比价数据以省物价局监测网发布的数据为准, 生猪出栏证明以当地动物卫生监督机构出具的“动物检疫证明”为准。因此, 可有效减少保险公司调查核实的工作量, 防止出现养殖场户虚报损失、理赔扯皮等问题。这一农业政策性保险险种的实施, 有望成为稳定生猪市场和保护养殖户利益的“定海神针”。

对于养殖户来说, 在出场价格不确定的情况下, 降低养猪成本是增加收益的最好办法。媒体介绍的利用秸秆替代玉米作饲料养 1 头猪能增收 200 元的经验值得一试。吉林省松原经济技术开发区兴原乡卡伦村养猪专业合作社负责人郑贵彬率先做出尝试, 在自家猪场尝试用秸秆替代玉米作为饲料。过去饲料中玉米占 80%, 现在将玉米降至占 40%, 另外 40% 用秸秆代替。实验结果证明, 饲养成本降下来了, 却不影响猪的生长和育肥。在目前市场行情下, 每出栏 1 头猪约增收 200 元; 即使按以前猪肉价格最低时计算, 也不至于零利润。按郑贵彬的话说:“这等于是用草换钞票。把秸秆粉碎后, 用生物发酵剂一发酵, 就让它代替粮食, 变成猪肉, 换回钞票”。

食蟹猴志贺氏菌、沙门氏菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌多重 PCR 检测方法的建立及初步应用

陆红玉¹, 罗彬¹, 符明泰¹, 贺东生^{2*}, 王文豪²

(1. 广州从化市华珍动物养殖场, 广东 广州 510900; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 根据志贺氏菌属侵袭性质粒抗原 H (ipaH) 基因、沙门氏菌属特异性基因和小肠结肠炎耶尔森氏菌 (ail) 毒力基因, 分别设计 3 对特异性引物, 通过优化、调整 PCR 条件, 建立了一种能同时检测食蟹猴 3 种致病菌的多重 PCR 检测方法。临床初步应用于检测 137 例食蟹猴肛拭子样品 137 份, 检出志贺氏菌属阳性 12 株, 沙门氏菌属阳性 1 株, 小肠结肠炎耶尔森氏菌阳性 1 株, 与传统细菌培养生化鉴定方法检测结果一致。本试验建立的多重 PCR 方法具有快速、准确、简便、灵敏、稳定性高等优点, 具有较高的实际应用价值, 为食蟹猴腹泻病原菌提供了新的快速检测方法。

关键词: 食蟹猴; 志贺氏菌; 沙门氏菌; 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 多重 PCR; 检测

中图分类号: S855.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)01-0034-06

Multiple PCR Assay for *Shigella*, *Salmonella* and *Yersinia Enterocolitica* in *Cynomolgus* Monkeys

Lu Hongyu¹, Luo Bin¹, Fu Mingtai¹, He Dongsheng^{2*}, Wang Wenhao²

(1. Huazhen Laboratory Animal Breeding Center, Guangzhou 510900, China; 2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: According to *Shigella* invasive plasmid antigen H (ipaH) gene, *Salmonella* specific gene and *Yersinia enterocolitica* (ail) virulence gene, three pairs of specific primers were designed for multiplex PCR detection of three intestinal pathogenic bacteria. In preliminary clinical application, 137 cynomolgus monkey feces samples were checked, with 12 *Shigella* positive, 1 *Salmonella* positive, 1 *Yersinia enterocolitica* positive, positive detection rate of 8.76%, 0.73% and 0.73% respectively, consistent with the traditional bacterial culture and biochemical identification methods. Which set up a multiple PCR method for detection of cynomolgus monkey diarrhea pathogens with rapid, simple, easy, accurate, sensitive, high stable, high value aspects.

Key words: *Cynomolgus* monkeys; multiplex PCR; *Shigella*; *Salmonella*; *Yersinia enterocolitica*; detection

志贺氏菌属 (*Shigella*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) 和小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 是常见重要的人兽共患病病原菌, 是引起灵长类实验动物食蟹猴腹泻的主要因素之一。广西某灵长类实验动物养殖场食蟹猴粪便志贺氏菌的感染率为 3.9%^[1]; 广西某灵长类实验动物养殖场食蟹猴粪便沙门氏菌感染率为 0.72%^[2]; 某灵长类实验动物养殖场实验猕猴肠道耶尔森菌感染率为 0.59%^[3]。快速检测猴粪便中肠道病原菌是及时

有效预防病原菌传播及腹泻疾病发生的重要前提。

实验动物食蟹猴多采取群体饲养, 易被各种易感病原所感染, 从而导致疾病的爆发和流行。常见猴腹泻疾病肠道病原菌主要有志贺氏菌属、沙门氏菌属、小肠结肠炎耶尔森氏菌、致泻性大肠杆菌、变形杆菌等。目前志贺氏菌属、沙门氏菌属和小肠结肠炎耶尔森氏菌的检测方法主要有传统细菌培养与鉴定方法、免疫学方法以及分子生物学方法。国家标准方法中采用常规细菌培养与生化鉴定方法

收稿日期: 2014-12-01

*: 通讯作者

基金项目: 广东省灵长类动物种质资源中心建设(2012B060400005)

对沙门氏菌、志贺氏菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌进行检测,整个过程需要4~5 d。检验步骤繁琐,耗时长,已不能满足临床快速诊断疾病的要求。多重PCR技术可以同时几种病原菌进行检测,具有高灵敏度、高效、低成本等优点。本试验建立了志贺氏菌、沙门氏菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌的多重PCR检测方法,并初步应用于临床样品的检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验阳性菌株和阴性菌株 试验所用阳性菌株志贺氏菌属、沙门氏菌属和小肠结肠炎耶尔森氏菌以及阴性菌株变形杆菌、大肠杆菌、巴氏杆菌、链球菌和金黄色葡萄球菌,均为本场实验室鉴定和保存的菌种。

1.1.2 主要试剂和仪器 细菌DNA小量提取试剂盒购自北京普博欣生物科技有限公司,SS培养基、麦康凯琼脂和营养琼脂均购自广东环凯微生物科技有限公司,诊断血清均购自兰州生物制品研究所,TaKaRaTaq™聚合酶dNTP Mixture、10×PCR Buffer (Tris-HCl、KCl、MgCl₂)、DL2000 DNA Marker均购自宝生物工程(大连)有限公司,VH04-01琼脂糖购自GENE COMPANY LTD,热循环仪为Bio-rad的T100型梯度PCR仪。

1.1.3 食蟹猴肛拭子 用灭菌棉棒沾少量生理盐水后,轻轻插入猴肛门内约3 cm深处,将棉棒360°转1周,轻轻取出,放入灭菌试管中。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养 试验菌株传代培养。自本场实验室取冷藏保存的志贺氏菌属、沙门氏菌属、小肠结肠炎耶尔森氏菌、变形杆菌、大肠杆菌、巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌和链球菌,分别在营养琼脂培养基平板上划线,置于恒温培养箱36℃培养12 h,传代培养2次。挑取传代培养菌落接种于新鲜无菌的营养肉汤培养基中,36℃培养24 h。

1.2.2 菌体DNA模板制备 热裂解法:吸取1 mL

各细菌培养菌液,置于1.5 mL EP管中,12 000 r/min离心5 min,弃上清,收集细菌沉淀;灭菌生理盐水洗涤2次;用0.5 mL灭菌蒸馏水悬浮,水浴中100℃煮沸10 min;12 000 r/min离心5 min,上清液作为DNA模板。

试剂盒法:参照说明书操作程序进行。

1.2.3 多重PCR的引物设计与合成 采用Bise-naen设计的引物,根据志贺氏菌属侵袭性质粒抗原H(ipaH)基因、沙门氏菌属特异性基因和小肠结肠炎耶尔森氏菌(*ail*)毒力基因序列,分别设计3对特异性引物,扩增片段长度分别为620 bp、496 bp和351 bp。确定的引物序列和产物长度见表1。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2.4 多重PCR的优化 多重PCR的条件为:25.0 μL的反应体系中含2.5 μL的LA Taq buffer,2.0 μL dNTPs,各2.0 μL上下游引物,2.0 μL cDNA模板,0.25 μL LA Taq酶。循环参数为预变性95℃,3min;95℃变性45s,52.6℃退火50s,72℃延伸60s,进行34个循环;72℃延伸5min。PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶电泳,100 V恒温30 min后分析。

1.2.5 多重PCR敏感性试验 将试验菌株志贺氏菌属、沙门氏菌属和小肠结肠炎耶尔森菌纯培养肉汤菌液,采用平板计数法测定各纯培养细菌的含量为10⁵ CFU/mL。然后作10倍梯度稀释直至10⁰ CFU/mL,各取1 mL提取DNA。取每个稀释度2 μL的DNA进行PCR扩增,电泳。以出现目的条带的最小稀释浓度为该方法的检测下限,即灵敏度。

1.2.6 多重PCR特异性试验 取试验菌株志贺氏菌属、沙门氏菌属和小肠结肠炎耶尔森菌,大肠杆菌、变形杆菌、巴氏杆菌、金黄色葡萄球菌、链球菌,分别提取DNA模板,分别加入3对引物进行多重PCR扩增,确定多重PCR引物特异性。

1.2.7 多重PCR扩增产物的分析与测序鉴定 用DNA凝胶回收试剂盒将PCR产物纯化回收后,

表1 多重PCR引物及扩增靶基因

细菌名称	目的基因	引物序列(5'-3')	产物(bp)
志贺氏菌属	ipaH基因	上游引物 Sh :GTTCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC	620
		下游引物 Sh' :GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	
沙门氏菌属	属特异性基因	上游引物 Sa :ACTGGCGTTATCCCTTTCTCTGCTG	496
		下游引物 Sa' :ATGTTGTCCTGCCCTGGTAAGAGA	
小肠结肠炎耶尔森氏菌	ail毒力基因	上游引物 Y.e :TAATGTGTACGCTGCGAG	351
		上游引物 Y.e' :GACGTCTTACTTGCACTG	

与 pMD19-T 载体连接, 转化大肠埃希菌 DH5 α 后, 筛选阳性克隆并扩大培养, 提取阳性质粒, 送深圳华大基因科技有限公司测序。将所测定基因序列输入 NCBI 进行 BLAST 同源性比对。

1.2.8 临床样品的检测 肛拭子分别置于通用的增菌 LB 肉汤培养基中, 36 °C 培养 12~18 h。取 1 mL 培养液, 参照热裂解法抽提 DNA 模板。参照已优化好的参数, 进行多重 PCR 检测。同时将肛拭子样品进行常规细菌培养, 即将肛拭子生理盐水浸出液, 按分区划线法, 分别接种 SS 琼脂、麦康凯琼脂, 36 °C 培养 24 h, 选取平板上可疑的目的菌落, 进一步作生化鉴定。

1.2.9 多重 PCR 方法稳定性检验 自 2011-2012 年本场实验室保存的发病期食蟹猴粪便样品细菌分离培养与生化鉴定符合 3 种病原菌的阳性菌株, 随机抽取志贺氏菌属、沙门氏菌属和小肠结肠炎耶尔森氏菌各 20 株, 进行 PCR 反应, 确定该方法的稳定性。

2 结果

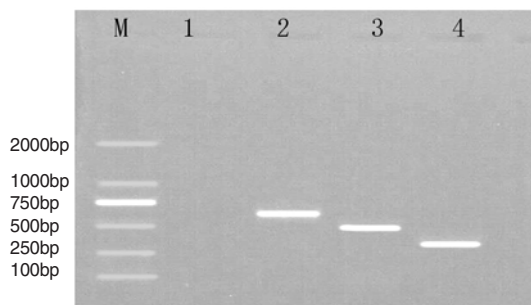
2.1 多重 PCR 扩增

参照已优化好的参数进行 PCR 扩增, 扩增的结果为单一模板出现一条特异性扩增区带。扩增特异性目的条带结果为志贺氏菌属 620 bp、沙门氏菌属 496 bp 和小肠结肠炎耶尔森氏菌 351 bp。特异条带目的片段与预期大小吻合, 结果见图 1。

2.2 DNA 模板的制备

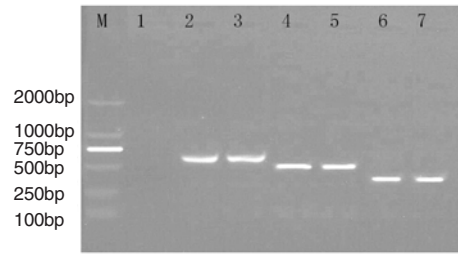
本试验分别采取热裂解法和试剂盒法制备的 DNA 模板, 经 PCR 扩增后, 志贺氏菌属、沙门氏菌属和小肠结肠炎耶尔森氏菌均扩增出特异性目的条带, 结果如图 2 所示。

2.3 多重 PCR 敏感性试验结果



M: DL2000bp DNA marker; 1: Negative control; 2: *Shigella*; 3: *Salmonella*; 4: *Yersinia enterocolitica*

图 1 Sh、Sa 和 Y.e 三种病原菌扩增结果



M: DL2000bp DNA marker; 1: Negative control; 2: Sh 试剂盒法; 3: Sh 热裂解法; 4: Sa 试剂盒法; 5: Sa 热裂解法; 6: Y.e 试剂盒法; 7: Y.e 热裂解法

图 2 Sh、Sa 和 Y.e DNA 模板制备方法的 PCR 产物扩增图谱

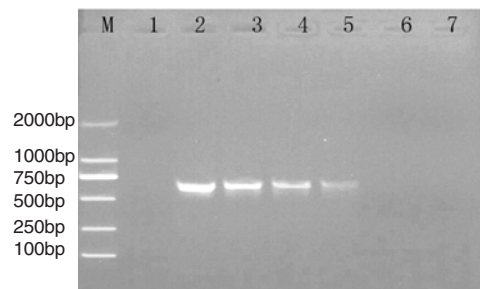
本试验灵敏度试验确定, 志贺氏菌属含菌量起始浓度为 2×10^5 CFU/mL、沙门氏菌属含菌量起始浓度为 1×10^5 CFU/mL 和小肠结肠炎耶尔森氏菌含菌量起始浓度为 1.5×10^5 CFU/mL, 然后分别依次作 10 倍稀释直至 10^0 CFU/mL, 进行 PCR 扩增。灵敏度试验结果: 志贺氏菌属检测下限为 200 CFU/mL, 沙门氏菌属为 100 CFU/mL, 小肠结肠炎耶尔森氏菌为 150 CFU/mL。结果见图 3、图 4、图 5。

2.4 多重 PCR 特异性试验结果

将试验菌株包括志贺氏菌属、沙门氏菌属、小肠结肠炎耶尔森氏菌、大肠杆菌、变形杆菌、巴氏杆菌、链球菌和金黄色葡萄球菌, 进行多重 PCR 扩增, 结果为志贺氏菌属、沙门氏菌属、小肠结肠炎耶尔森氏菌的单一模板出现一条特异性扩增条带, 非阳性对照菌株均未出现条带, 与预期的扩增结果一致。结果如图 6。

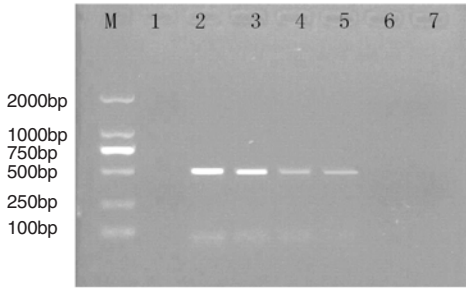
2.5 多重 PCR 反应产物的测序结果

随机抽取试验阳性菌株的志贺氏菌属编号为



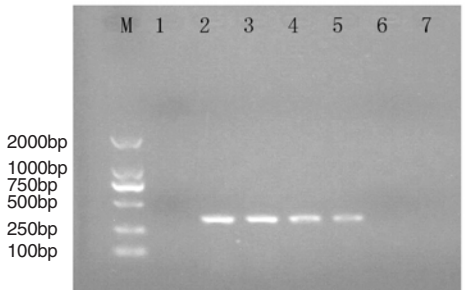
M: DL2000bp DNA marker; 1: Negative control; 2: 2×10^5 CFU/mL; 3: 2×10^4 CFU/mL; 4: 2×10^3 CFU/mL; 5: 2×10^2 CFU/mL; 6: 2×10^1 CFU/mL; 7: 2×10^0 CFU/mL

图 3 志贺氏菌属(Sh)敏感性试验



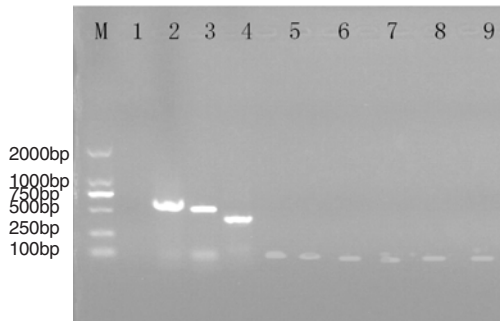
M: DL2000bp DNA marker; 1: Negative control; 2: 1×10^5 CFU/mL; 3: 1×10^4 CFU/mL; 4: 1×10^3 CFU/mL; 5: 1×10^2 CFU/mL; 6: 1×10^1 CFU/mL; 7: 1×10^0 CFU/mL

图4 沙门氏菌属(Sa)敏感性试验



M: DL2000bp DNA marker; 1: Negative control; 2: 1.5×10^5 CFU/mL; 3: 1.5×10^4 CFU/mL; 4: 1.5×10^3 CFU/mL; 5: 1.5×10^2 CFU/mL; 6: 1.5×10^1 CFU/mL; 7: 1.5×10^0 CFU/mL

图5 小肠结肠炎耶尔森氏菌(Ye)敏感性试验



M: DL2000bp DNA marker; 1: Negative control; 2: 志贺氏菌属; 3: 沙门氏菌属; 4: 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 5: 大肠杆菌; 6: 变形杆菌; 7: 巴氏杆菌; 8: 链球菌; 9: 金黄色葡萄球菌

图6 Sh、Sa 和 Ye 特异性试验结果

Sh5、Sh6、Sh10; 沙门氏菌属编号为 Sa74、Sa75、Sa108 和小肠结肠炎耶尔森氏菌编号为 Y. e32、Y. e43、Y. e59 的 PCR 扩增产物, 送深圳华大基因科技有限公司基因测序。序列输入 NCBI (<http://www>。

ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast) 比对, 结果见图 7、图 8、图 9, 可见 PCR 引物均具有很好的特异性。

2.6 临床初步应用多重 PCR 检测结果

随机采集 137 例食蟹猴新鲜粪便样品中, 多重 PCR 方法均检出特异性目的条带, 检测出志贺

50	Sh5	CTGTCGCAATACCTCCGGATTCCGTGACAGGTCGCTGCATGGCTGGAAAA
	Sh6	GTGGCGCATACTCCGGATTGACAGGTCGCTGCATGGCTGGAAAA
	Sh10	TGTCCGCATACTCCGGATTCCGTGACAGGTCGCTGCATGGCTGGAAAA
	Conse	TGTCCGCATACTCCGGATTCCGTGACAGGTCGCTGCATGGCTGGAAAA
100	Sh5	ACTCAGTGCCTCTCGGGAGCTTCGACAGCAGTCTTTCGCTGTGCTGCTG
	Sh6	ACTCAGTGCCTCTCGGGAGCTTCGACAGCAGTCTTTCGCTGTGCTGCTG
	Sh10	ACTCAGTGCCTCTCGGGAGCTTCGACAGCAGTCTTTCGCTGTGCTGCTG
	Conse	ACTCAGTGCCTCTCGGGAGCTTCGACAGCAGTCTTTCGCTGTGCTGCTG
150	Sh5	ATGCCACTGAGAGCTGTGAGGACCGTGTGCGCTCACATGGAACAATCTC
	Sh6	ATGCCACTGAGAGCTGTGAGGACCGTGTGCGCTCACATGGAACAATCTC
	Sh10	ATGCCACTGAGAGCTGTGAGGACCGTGTGCGCTCACATGGAACAATCTC
	Conse	ATGCCACTGAGAGCTGTGAGGACCGTGTGCGCTCACATGGAACAATCTC
200	Sh5	CGGAAAACCTCTCTGGTCCATCAGGCATCAGAAGGCCCTTTTCGATAATGA
	Sh6	CGGAAAACCTCTCTGGTCCATCAGGCATCAGAAGGCCCTTTTCGATAATGA
	Sh10	CGGAAAACCTCTCTGGTCCATCAGGCATCAGAAGGCCCTTTTCGATAATGA
	Conse	CGGAAAACCTCTCTGGTCCATCAGGCATCAGAAGGCCCTTTTCGATAATGA
250	Sh5	TACCGCGCTCTGCTCTCCCTGGGAGGAAATGTCCGCCTCGAAATTC
	Sh6	TACCGCGCTCTGCTCTCCCTGGGAGGAAATGTCCGCCTCGAAATTC
	Sh10	TACCGCGCTCTGCTCTCCCTGGGAGGAAATGTCCGCCTCGAAATTC
	Conse	TACCGCGCTCTGCTCTCCCTGGGAGGAAATGTCCGCCTCGAAATTC
300	Sh5	TGGAGGATATTGCCCGGATAAAGTCAGAACTCTCCATTTTGTGGATGAG
	Sh6	TGGAGGATATTGCCCGGATAAAGTCAGAACTCTCCATTTTGTGGATGAG
	Sh10	TGGAGGATATTGCCCGGATAAAGTCAGAACTCTCCATTTTGTGGATGAG
	Conse	TGGAGGATATTGCCCGGATAAAGTCAGAACTCTCCATTTTGTGGATGAG
350	Sh5	ATAGAAGTCTACCTGGCCTCCAGACCATGCTCGCAGAGAACTTCAGCT
	Sh6	ATAGAAGTCTACCTGGCCTCCAGACCATGCTCGCAGAGAACTTCAGCT
	Sh10	ATAGAAGTCTACCTGGCCTCCAGACCATGCTCGCAGAGAACTTCAGCT
	Conse	ATAGAAGTCTACCTGGCCTCCAGACCATGCTCGCAGAGAACTTCAGCT
400	Sh5	CTCCACTGCCGTGAAGGAAATGCGTTTCTATGGCGTTCGGGAGTGACAG
	Sh6	CTCCACTGCCGTGAAGGAAATGCGTTTCTATGGCGTTCGGGAGTGACAG
	Sh10	CTCCACTGCCGTGAAGGAAATGCGTTTCTATGGCGTTCGGGAGTGACAG
	Conse	CTCCACTGCCGTGAAGGAAATGCGTTTCTATGGCGTTCGGGAGTGACAG
450	Sh5	CAAATGACCTCCGCACTGCCGAAGCCATGGTCAGAAGCCGTGAAGAGAAT
	Sh6	CAAATGACCTCCGCACTGCCGAAGCCATGGTCAGAAGCCGTGAAGAGAAT
	Sh10	CAAATGACCTCCGCACTGCCGAAGCCATGGTCAGAAGCCGTGAAGAGAAT
	Conse	CAAATGACCTCCGCACTGCCGAAGCCATGGTCAGAAGCCGTGAAGAGAAT
500	Sh5	GAATTTACGGACTGGTTCTCCCTCTGGGACCATGGCATGCTGTACTGAA
	Sh6	GAATTTACGGACTGGTTCTCCCTCTGGGACCATGGCATGCTGTACTGAA
	Sh10	GAATTTACGGACTGGTTCTCCCTCTGGGACCATGGCATGCTGTACTGAA
	Conse	GAATTTACGGACTGGTTCTCCCTCTGGGACCATGGCATGCTGTACTGAA
550	Sh5	GCGTACGGAAGCTGACCGCTGGGCGCAGGAGAGAGCAGAAATATGAGA
	Sh6	GCGTACGGAAGCTGACCGCTGGGCGCAGGAGAGAGCAGAAATATGAGA
	Sh10	GCGTACGGAAGCTGACCGCTGGGCGCAGGAGAGAGCAGAAATATGAGA
	Conse	GCGTACGGAAGCTGACCGCTGGGCGCAGGAGAGAGCAGAAATATGAGA
594	Sh5	TGCTGGAGAATGAGTACTCTCAGAGGGTGGTGAACCGGCAAC
	Sh6	TGCTGGAGAATGAGTACTCTCAGAGGGTGGTGAACCGGCAAC
	Sh10	TGCTGGAGAATGAGTACTCTCAGAGGGTGGTGAACCGGCAAC
	Conse	TGCTGGAGAATGAGTACTCTCAGAGGGTGGTGAACCGGCAAC

图7 志贺氏菌属测序序列比对结果

50 Sa74 ACGGTTTATTACCAGGCGTGC GCG-CAGTGC-TCATTGCCGAAGTCTCC
 Sa75 ACGACTTAGTAGCAG—GTCAGCGACCATTTC—TCAACGCCGGTAGTCTCC
 Sa108 -----GAAGTAGGGCATTTCAGCGACAGTAAGTCAACGCCGGAGGTCTCC
 Conse ACG TTAGTAGCAG GTCAGCGACAGT C TCAACGCCGGAGGTCTCC
 100 Sa74 TGCCTCGTCCCCTGTAGCAGCGGACGCGCTTGCTTTTCAGCGACGGGAC
 Sa75 TGCCTCGTCCCCTGTAGCAGCGGACGCGCTTGCTTTTCAGCGACGGGAC
 Sa108 TGCCTCGTCCCCTGTAGCAGCGGACGCGCTTGCTTTTCAGCGACGGGAC
 Conse TGCCTCGTCCCCTGTAGCAGCGGACGCGCTTGCTTTTCAGCGACGGGAC
 150 Sa74 GGTCCGGTGAATATCAGAGTTCTTCGCCACCACCAGCGGGAATCAGCGG
 Sa75 GGTCCGGTGAATATCAGAGTTCTTCGCCACCACCAGCGGGAATCAGCGG
 Sa108 GGTCCGGTGAATATCAGAGTTCTTCGCCACCACCAGCGGGAATCAGCGG
 Conse GGTCCGGTGAATATCAGAGTTCTTCGCCACCACCAGCGGGAATCAGCGG
 200 Sa74 CGTAAAGCTTGTCGGTAAACGCGATTTCTGCTGGCGCTTTTCAGTGA TG
 Sa75 CGTAAAGCTTGTCGGTAAACGCGATTTCTGCTGGCGCTTTTCAGTGA TG
 Sa108 CGTAAAGCTTGTCGGTAAACGCGATTTCTGCTGGCGCTTTTCAGTGA TG
 Conse CGTAAAGCTTGTCGGTAAACGCGATTTCTGCTGGCGCTTTTCAGTGA TG
 250 Sa74 GACAGCGAGGACATGATGGCATCAATTTTCTTCGCTTTTAAAGACGGAAT
 Sa75 GACAGCGAGGACATGATGGCATCAATTTTCTTCGCTTTTAAAGACGGAAT
 Sa108 GACAGCGAGGACATGATGGCATCAATTTTCTTCGCTTTTAAAGACGGAAT
 Conse GACAGCGAGGACATGATGGCATCAATTTTCTTCGCTTTTAAAGACGGAAT
 300 Sa74 CAGCGCATCCAGCGGGTTTTCCACGAACGTACACTGTGTGTGATACGTT
 Sa75 CAGCGCATCCAGCGGGTTTTCCACGAACGTACACTGTGTGTGATACGTT
 Sa108 CAGCGCATCCAGCGGGTTTTCCACGAACGTACACTGTGTGTGATACGTT
 Conse CAGCGCATCCAGCGGGTTTTCCACGAACGTACACTGTGTGTGATACGTT
 350 Sa74 TGCACAGCTCTTTGGCCAGATCGATATCAAAGCCGACCAATTCACCTTGT
 Sa75 TGCACAGCTCTTTGGCCAGATCGATATCAAAGCCGACCAATTCACCTTGT
 Sa108 TGCACAGCTCTTTGGCCAGATCGATATCAAAGCCGACCAATTCACCTTGT
 Conse TGCACAGCTCTTTGGCCAGATCGATATCAAAGCCGACCAATTCACCTTGT
 400 Sa74 GCATTTTTGGATTCAAACGGTGCATGTAGGATCGGTACCGATGCGAAT
 Sa75 GCATTTTTGGATTCAAACGGTGCATGTAGGATCGGTACCGATGCGAAT
 Sa108 GCATTTTTGGATTCAAACGGTGCATGTAGGATCGGTACCGATGCGAAT
 Conse GCATTTTTGGATTCAAACGGTGCATGTAGGATCGGTACCGATGCGAAT
 450 Sa74 CTTTTGTGGAATAGCGGCAATGCTGCGGTAGCGTGGAAAATGCCAGCA
 Sa75 CTTTTGTGGAATAGCGGCAATGCTGCGGTAGCGTGGAAAATGCCAGCA
 Sa108 CTTTTGTGGAATAGCGGCAATGCTGCGGTAGCGTGGAAAATGCCAGCA
 Conse CTTTTGTGGAATAGCGGCAATGCTGCGGTAGCGTGGAAAATGCCAGCA
 476 Sa74 GCAGAGAAAGGGATAAC—GCCAGTAA
 Sa75 GCAGAGAAAGGGAAAACCCGCCAGTAA
 Sa108 GCAGAGAAAGGAAAA-----
 Conse GCAGAGAAAGGGAAA C GCCAGTAA

图 8 沙门氏菌属测序序列比对结果

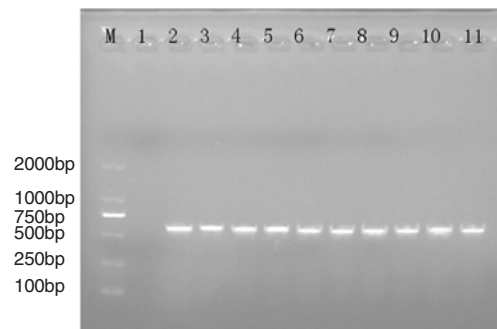
氏菌属共 12 株, 检出率为 8.76%; 沙门氏菌属 1 株, 检出率为 0.73%; 小肠结肠炎耶尔森氏菌 1 株, 检出率为 0.73%。

2.7 多重 PCR 方法稳定性检验结果

随机抽取的阳性志贺氏菌属 20 株、沙门氏菌属 20 株和小肠结肠炎耶尔森氏菌 20 株, 进行

50 Y. e32 TTTCTATTTGGTTATGACAAGCCATGTAAAAGAAAATGGGTATACATTG
 Y. e43 TTTTATTTGGTTTGCACAAGCCATGTAAAAGAAAATGGGTATACATTG
 Y. e59 TTTCTATTTGGTTTGCACAAGCCATGTAAAAGAAAATGGGTATACATTG
 Conse TTTCTATTTGGTTTGCACAAGCCATGTAAAAGAAAATGGGTATACATTG
 100 Y. e32 GATAATGACCCCTAAAGGTTTTAACCTGAAGTACCGTTATGAAGTACGATGA
 Y. e43 GATAATGACCCCTAAAGGTTTTAACCTGAAGTACCGTTATGAAGTACGATGA
 Y. e59 GATAATGACCCCTAAAGGTTTTAACCTGAAGTACCGTTATGAAGTACGATGA
 Conse GATAATGACCCCTAAAGGTTTTAACCTGAAGTACCGTTATGAAGTACGATGA
 150 Y. e32 TAACTGGGAGTAATAGGTTGCTTTGCTTATACCCATCAGGGATACGATT
 Y. e43 TAACTGGGAGTAATAGGTTGCTTTGCTTATACCCATCAGGGATACGATT
 Y. e59 TAACTGGGAGTAATAGGTTGCTTTGCTTATACCCATCAGGGATACGATT
 Conse TAACTGGGAGTAATAGGTTGCTTTGCTTATACCCATCAGGGATACGATT
 200 Y. e32 TCTTCTATGGCAGTAATAAGTTTGGTCACGGTGATCTTGATTACTATTCA
 Y. e43 TCTTCTATGGCAGTAATAAGTTTGGTCACGGTGATCTTGATTACTATTCA
 Y. e59 TCTTCTATGGCAGTAATAAGTTTGGTCACGGTGATCTTGATTACTATTCA
 Conse TCTTCTATGGCAGTAATAAGTTTGGTCACGGTGATCTTGATTACTATTCA
 250 Y. e32 GTAACAATGGGCCATCTTTCCGATTAAACGAATATGTTAGCCTTTATGG
 Y. e43 GTAACAATGGGCCATCTTTCCGATTAAACGAATATGTTAGCCTTTATGG
 Y. e59 GTAACAATGGGCCATCTTTCCGATTAAACGAATATGTTAGCCTTTATGG
 Conse GTAACAATGGGCCATCTTTCCGATTAAACGAATATGTTAGCCTTTATGG
 300 Y. e32 ATTACTGGGTGCTGCTCAGGAAAGGTTAAGTCATCTGTATTGATGGGT
 Y. e43 ATTACTGGGTGCTGCTCAGGAAAGGTTAAGTCATCTGTATTGATGGGT
 Y. e59 ATTACTGGGTGCTGCTCAGGAAAGGTTAAGTCATCTGTATTGATGGGT
 Conse ATTACTGGGTGCTGCTCAGGAAAGGTTAAGTCATCTGTATTGATGGGT
 323 Y. e32 CAGTCAGTGCAGTAAA-----
 Y. e43 CAGTCAGTGCAGGAAA-----
 Y. e59 CAGTCAGTGCAGTAAAGACGTCA
 Conse CAGTCAGTGCAGTAAA

图 9 小肠结肠炎耶尔森氏菌测序序列比对结果



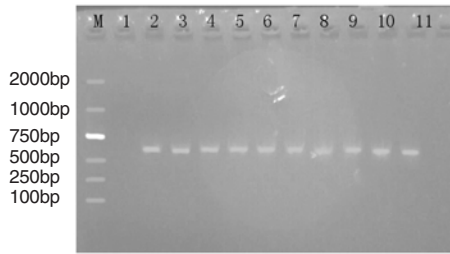
M: DL2000bp DNA marker; 1: Negative control; 2: Sh1; 3: Sh2; 4: Sh3; 5: Sh4; 6: Sh5; 7: Sh6; 8: Sh7; 9: Sh8; 10: Sh9; 11: Sh10

图 10 Sh 阳性菌株扩增结果图谱

PCR 检测, 扩增结果均出现特异性目的条带, 与传统细菌培养生化鉴定的结果相符合。结果如图 10、图 11、图 12、图 13、图 14、图 15 所示。

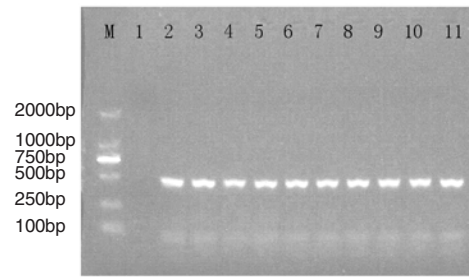
3 小结与讨论

本试验根据志贺氏菌侵袭性质粒抗原 H (ipaH) 基因、沙门氏菌属特异性基因和小肠结肠炎



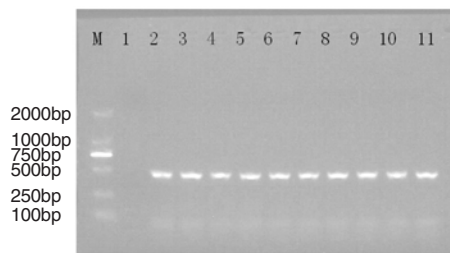
M: DL2000bp DNA marker; 1: Negative control;
2: Sh11; 3: Sh18; 4: Sh22; 5: Sh61; 6: Sh62; 7: Sh72; 8: Sh74;
9: Sh83; 10: Sh92; 11: Sh93

图 11 Sh 阳性菌株扩增结果图谱



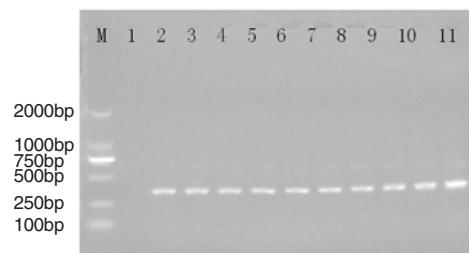
M: DL2000bp DNA marker; 1: Negative control;
2: Sa56; 3: Sa58; 4: Sa60; 5: Sa63; 6: Sa73; 7: Sa74; 8: Sa75;
9: Sa77; 10: Sa81; 11: Sa94

图 12 Sa 阳性菌株扩增结果图谱



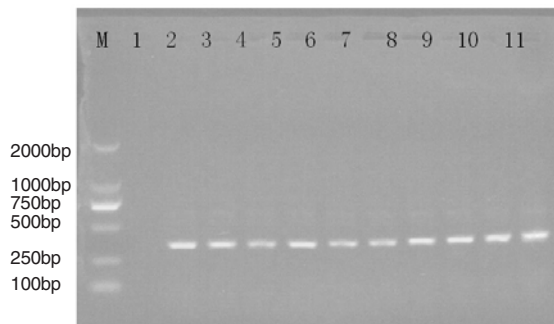
M: DL2000bp DNA marker; 1: Negative control;
2: Sa95; 3: Sa96; 4: Sa97; 5: Sa100; 6: Sa101; 7: Sa102;
8: Sa103; 9: Sa104; 10: Sa108; 11: Sa109

图 13 Sa 阳性菌株扩增结果图谱



M: DL2000bp DNA marker; 1: Negative control; 2: Y.
e4; 3: Y. e5; 4: Y. e6; 5: Y. e8; 6: Y. e20; 7: Y. e21; 8: Y. e22; 9: Y.
e31; 10: Y. e32; 11: Y. e33

图 14 Y.e 阳性菌株扩增结果图谱



M: DL2000bp DNA marker; 1: Negative control; 2: Y.
e34; 3: Y. e48; 4: Y. e49; 5: Y. e50; 6: Y. e53; 7: Y. e58; 8: Y. e
59; 9: Y. e60; 10: Y. e62; 11: Y. e65

图 15 Y.e 阳性菌株扩增结果图谱

耶尔森氏菌(ai1)毒力基因分别设计3对互不干扰的特异性引物,通过对多重PCR退火温度、模板提取方法的优化,得出最佳退火温度为52.6℃。普通热裂解法和试剂盒法抽提出的DNA均可扩增出特异性目的条带。对多重PCR的灵敏性、特异性、稳定性进行了探讨,从而建立了食蟹猴3种病原菌的多重PCR检测方法。该方法特异性强、灵敏度高。

应用本试验建立的多重PCR技术对137例食

蟹猴肛拭子中志贺氏菌属、沙门氏菌属和小肠结肠炎耶尔森氏菌3种病原菌检测发现,137例样品中共检测到12株志贺氏菌、1株沙门氏菌、1株小肠结肠炎耶尔森氏菌。这与传统细菌培养生化鉴定方法检测结果一致。随机抽取细菌培养及生化鉴定为阳性的3种病原菌的试验菌株各20株,用多重PCR方法进行扩增,阳性菌株均出现特异性目的条带,从而说明该方法具有较好的稳定性。

综上所述,本试验建立的多重PCR方法具有快速、准确、简便、灵敏、稳定性高等优点,具有较高的实际应用价值,为食蟹猴腹泻病原菌志贺氏a菌属、沙门氏菌属和小肠结肠炎耶尔森氏菌流行病学调查、感染早期诊断、猴种源引进的隔离检疫、进出口检验检疫等提供了新的快速检测方法。

参考文献:

- [1] 胡传话,符明泰,韦毅,等.广西食蟹猴志贺氏菌感染率、血清型调查及药物敏感试验[J].畜牧与兽医,2002,34:33-34.
- [2] 刘明,韦毅.食蟹猴沙门氏菌带染率及生物学特性的实验观察[J].广西预防医学,2001,7(2):97-98.
- [3] 周勤,玉罕为,曾真,等.实验猕猴肠道耶尔森菌感染状况调查及鉴定[J].动物医学进展,2005,26(4):101-103.

猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因在巴斯德毕赤酵母中的表达

刘 娜¹, 吴 锋², 黄毓茂^{2*}

(1. 肇庆市农业学校, 广东 肇庆 526070; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

摘 要: 为探索猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因 (PCV2 ORF2) 的高效表达, 本实验将 ORF2 基因整合到酵母表达载体 pGAPZ α A 中, 构建重组质粒 pGAPZ α A-ORF2。通过 Avr II 酶切线性化, 经电穿孔法转到毕赤酵母菌 X33 中。经 Zeocin[™] 抗性筛选得到转化子, 在 GAP 强启动子调控下, 通过 SDS-PAGE 分析和 Western blotting 鉴定, 结果证实 Cap 蛋白在酵母载体 pGAPZ α A 中得到成功分泌表达。

关键词: 猪圆环病毒; 巴斯德毕赤酵母; ORF2; 分泌表达

中图分类号: S852.659.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)01-0040-04

Expression of Porcine Circovirus 2 ORF2 Gene in *Pichia pastoris*

Liu Na¹, Wu Feng², Huang Yumao^{2*}

(1. Zhaoqing Agricultural school, Zhaoqing 526070, China; College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order to high-level express of porcine circovirus type 2 ORF2 gene (PCV2 ORF2), the ORF2 gene of pcv2 was cloned into the genome of the pGAPZ α A expression vector to construct the recombinant plasmid pGAPZ α A-ORF2, and the resultant plasmid digested by Avr II was intergraded into the genome of *P. pastoris* expression strain X33 by electroporation. The transformants were selected with zeocin and the results of SDS-PAGE and Western blotting showed that the Cap protein of PCV2 was secretory expressed successfully primed by GAP promoter.

Key words: Porcine circovirus; *Pichia pastoris*; ORF2; Secretion expression

猪圆环病毒病是由猪圆环病毒(PCV)引起的猪的一种多系统功能障碍性疾病,临床上以新生仔猪先天性震颤和断奶仔猪多系统衰弱综合症(PMWS)为主要特征,对国内外的养猪事业造成极大经济损失。PCV有PCV1和PCV2两个血清型,生产中导致疾病的主要是PCV2。猪对PCV2具有较强的易感性,感染猪可自鼻液、粪便等废物中排出病毒,经口腔、呼吸道途径感染不同年龄的猪。最早在加拿大报道^[1],此后欧美等国也相继发现。Brian证实PMWS由PCV2引起^[2],现在已成为严重影响世界养猪业的疾病之一。对该病的防控主要依靠注射疫苗。由于PCV2 ORF2基因编码的Cap蛋白是该病毒的主要结构蛋白,可作为抗原刺激机体产生抗体,明显降低免疫猪的发病率^[3-5]。目前,已商业化的圆环亚单位疫苗免疫保护效果显著,但价格昂

贵,在国内使用率还不高。本试验采用巴斯德毕赤酵母表达系统有生产成本低、表达量高、表达的重组蛋白具有生物活性、不产生有毒副物质的优点,适合用于表达治疗和预防的蛋白。本实验对PCV2 ORF2基因在巴斯德毕赤酵母中的表达进行研究,为研制PCV2基因工程苗提供基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和材料

含PCV2 ORF2基因的酵母表达载体pPICZ α C-ORF2、E. coli DH5 α 由华南农业大学传染病实验室提供;Zeocin[™]抗性、表达载体pGAPZ α A、*Pichia pastoris*受体菌X33购于Invitrogen公司;rTap DNA聚合酶、T4 DNA Ligase、限制性内切酶Xho I、Not I、Avr II购自TaKaRa公司;胶回收试剂盒是PROMEGA公司产品。

收稿日期:2014-11-27

基金项目:广东省现代生猪产业技术体系项目(5500-F10021)

1.2 引物

以刘娜等^[6]《猪圆环病毒 II 型 ORF2 基因在酵母中的表达》中的引物扩增 PCV2 ORF2 基因,引物如下:

上游引物:5'-CCCTCGAGAAGAGAGAGGCTGAAGCTACGTATCCAAGGAG-3'

下游引物:5'-ATAAGAATGCGGCCGCTCATTAAGGGTTAAGTGGGGGG-3'

1.3 重组表达载体 pGAPZ α A-ORF2 的构建

将质粒 pPICZ α A-ORF2 和 pGAPZ α A 分别用 Xho I +Not I 双酶切,双酶切产物回收后连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,得到重组表达载体 pGAPZ α A-ORF2。利用 Xho I +Not I 对 pGAPZ α A-ORF2 表达载体进行双酶切鉴定,再用 Avr II 单酶切后回收,得 pGAPZ α A-ORF2 线性化表达载体。

1.4 酵母转化与重组酵母菌的筛选

将 10 μ g pGAPZ α A-ORF2 线性化表达载体与新鲜制备的 100 μ L 感受态细胞轻轻充分混匀,1.5 kV、200 Ω 电击 5 ms。电击结束后,立即加入 1.0 mL 预冷的 1.0 mol/L 山梨醇。将电转化后恢复抗性的酵母细胞平铺于新鲜 YPDS 平板(含 100 μ g/mL ZeocinTM)上。30 $^{\circ}$ C 温箱平放,检查平板已无流动液体则将平板倒置,培养至单菌落出现。以煮-冻-煮法破裂酵母细胞,制备重组酵母菌液 PCR 模板^[7]。

1.5 pGAPZ α A-ORF2 在酵母中的表达

接种环灭菌后挑取 YPDS 平板(含 100 μ g/mL ZeocinTM)上较大的乳白色单菌落,接种于 2 mL YPDS 液体培养基试管中,29~30 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养,3d 后 3 000 r/min 室温离心 6 min,收集上清于 -70 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

1.6 重组蛋白 SDS-PAGE 分析

直接吸取培养 3 d 的重组酵母上清液作 SDS-PAGE 分析,用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.7 重组蛋白 Western blotting 分析

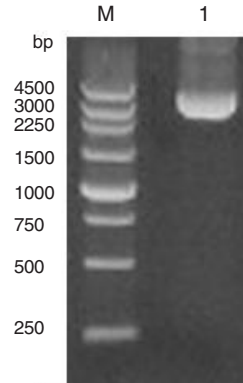
将 SDS-PAGE 电泳产物转移至硝酸纤维素膜上,用 5%脱脂奶粉-TBS 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,用 PCV2 阳性血清 1:100 稀释作为一抗,以 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶标记兔抗猪 IgG 作为二抗,经 DAB-H₂O₂ 显色,观察结果。

2 结果与分析

2.1 pGAPZ α A-ORF2 表达载体的构建与鉴定

构建好重组质粒 pGAPZ α A-ORF2,进行琼脂糖凝胶电泳,如图 1 所示。由图 1 可见,3 000 bp 和 4 500 bp 之间有一条约 3 800 bp 的条带,与预期大小一致。

重组表达载体 pGAPZ α A-ORF2 经过 Xho I +Not I 双酶切,在约 3 100 pb 和 702 pb 处有条带(图 2)。表明 ORF2 已成功插入 pGAPZ α A 中。

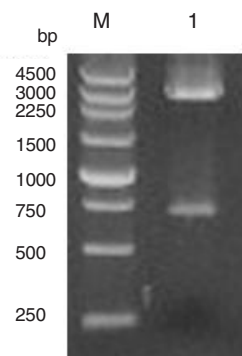


M:DNA Marker DL 250bp ladder;1:构建好的重组质粒 pGAPZ α A-ORF2

图 1 重组表达载体 pGAPZ α A-ORF2 的构建

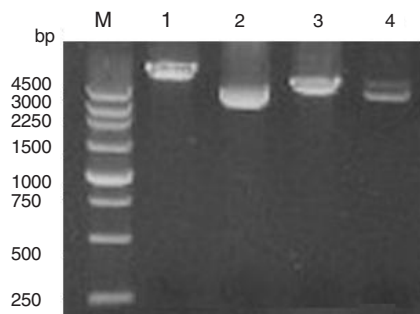
2.2 重组表达载体 pGAPZ α A-ORF2 线性化

重组表达质粒 pGAPZ α A-ORF2、空载体质粒 pGAPZ α A 经 Avr II 单酶切,使之线性化,酶切反应体系置于 37 $^{\circ}$ C 恒温水浴过夜后,以未酶切的 pGAPZ α A-ORF2、pGAPZ α A 的质粒作对照,0.8%琼脂糖凝胶电泳检测结果。与未酶切的质粒相比,酶切的质粒已酶切完全。见图 3。



M:DNA Marker DL 250bp ladder;1:pGAPZ α A-ORF2 双酶切

图 2 重组表达载体 pGAPZ α A-ORF2 酶切鉴定

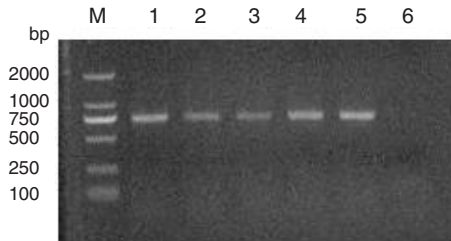


M: DNA Marker DL 250bp ladder; 1: pGAPZ α A-ORF2 单酶切产物; 2: 未单酶切 pGAPZ α A 质粒; 3: pGAPZ α A 单酶切产物; 4: 未单酶切 pGAPZ α A-ORF2

图 3 重组表达质粒 pGAPZ α A-ORF2 单酶切

2.3 重组酵母菌液 PCR 鉴定

同时取相应空载体转化的重组酵母作对照, 经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 重组酵母菌 pGAPZ α A-ORF2-X33 在 750 bp 附近扩增出特异片段, 而空载体转化菌株为阴性。说明经 Z 抗性筛选后的重组酵母菌含有 PCV2 ORF2 基因。见图 4。



M: DNA Marker DL2000; 1-4: pGAPZ α A-ORF2-X33 菌液; 5: pGAPZ α A-ORF2 质粒; 6: pGAPZ α A-X33 菌液

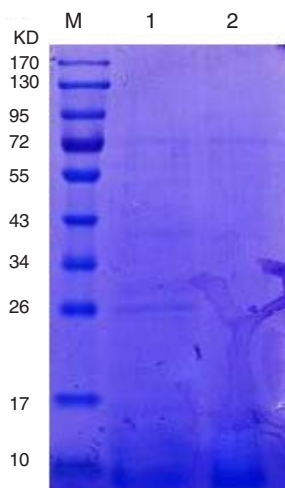
图 4 重组酵母菌液 PCR 鉴定

2.4 重组 Cap 蛋白在酵母菌 X33 中的表达及表达产物鉴定

经 72 h 培养的菌液低速离心后收集上清取部分, 用于 SDS-PAGE, 余下储存于 -80°C 。重组质粒 pGAPZ α A-ORF2 和 pGAPZ α A 空载体作比较, 图 5 中, pGAPZ α A-ORF2 在 26 KD 附近有一条特异带。表明 ORF2 基因已成功表达。

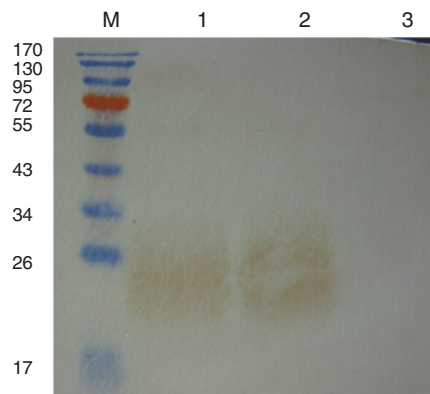
2.5 重组蛋白 Western blotting 结果

在图 6 中 26 KD 附近有一条特异带出现, 显示表达产物具有抗原性。结合 SDS-PAGE 与免疫印迹试验分析, ORF2 基因在 X33 中成功分泌表达。



M: 预染蛋白质分子量标准; 1: pGAPZ α A-ORF2-X33 的表达上清; 2: pGAPZ α A-X33 的表达上清

图 5 重组 Cap 蛋白在 X33 中表达的 SDS-PAGE 分析



M: 预染蛋白质分子量标准; 1, 2: pGAPZ α A-ORF2-X33 的表达上清; 3: pGAPZ α A-X33 的表达上清

图 6 重组 Cap 蛋白 Western blotting 分析

2.6 蛋白浓度测定结果

以蛋白浓度为 X 轴, OD 值为 Y 轴, 制作标准蛋白浓度曲线, 如图 7。SDS-PAGE 凝胶作光密度扫描, 选择 SDS-PAGE 凝胶条带最亮的表达上清测总蛋白量。如表 1。

3 讨论

目前在生产中预防效果好的圆环亚单位疫苗由勃林格生产, 他们以真核表达系统昆虫细胞表达 Cap 蛋白, 表达的蛋白与天然 PCV2 Cap 蛋白非常相似。但操作繁琐, 价格昂贵。本试验同样采用真核表达系统的毕赤酵母表达系统, 以期表达出

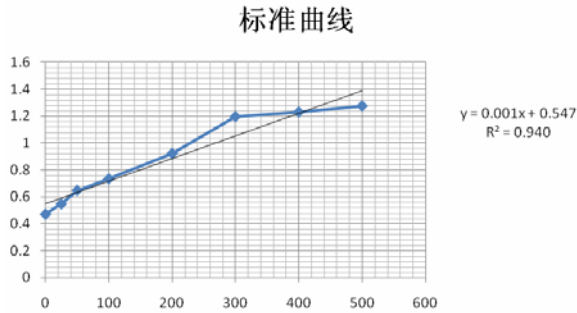


图 7 标准蛋白浓度曲线

表 1 不同重组酵母菌总蛋白表达量和重组蛋白所占百分比

菌株	吸光值 (OD570)	总蛋白 ($\mu\text{g/mL}$)	重组蛋白 (%)	重组蛋白 ($\mu\text{g/mL}$)
pGAPZ α A-ORF2/X33	0.694	147	69.5%	102.2
pGAPZ α A/X33	0	0	0%	0

的蛋白抗原性和天然 PCV2 Cap 蛋白相似。毕赤酵母表达系统成本低廉, 适合规模化生产, 而且具有对表达的蛋白进行适度糖基化、修饰等功能^[8,9], 可使表达产物具有生物学活性。

GAP 强启动子含有组成型启动子 3'-磷酸甘油醛脱氢酶基因的启动子和 α -MF 信号肽序列。一方面, 可使外源蛋白自动表达, 分泌至胞外; 此外, α -MF 信号肽序列在蛋白质分泌到胞外的过程中能被有效切除。pGAPZ α A 具有防止外源基因表达产物对酵母菌的生长可能产生细胞毒性的功能。除目的蛋白外, 毕赤酵母菌自身分泌蛋白极少, 有利于纯化利用^[15]; X33 酵母菌生长迅速, 以 ZeocinTM 筛选阳性转化子, 较易得到重组酵母菌 pGAPZ α A-ORF2-X33。

本实验采用 pGAPZ α A 酵母载体对 PCV2 ORF2 基因进行表达, 与 pPICZ α C 载体相比, 操作更简单, 而且避免甲醇污染, 表达上清不必浓缩, 作 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析, 即可得到与预期相符的条带, 杂蛋白较少。结果表明 Cap 蛋白在 pGAPZ α A 载体中成功分泌表达, 估算重组蛋白为 102.2 $\mu\text{g/mL}$, 并且具有免疫原性。

本试验表达水平比张晓勇等 (表达量为 47 mg/L) 甲醇诱导表达量高^[10], 可能是筛选到的重组

酵母菌拷贝数不同。研究证明拷贝数越多, 表达量不一定越高, 但单拷贝数不如多拷贝数表达量高, 说明重组酵母菌最适拷贝数是影响表达量的关键。

进一步探索重组酵母表达产物 PCV2 Cap 蛋白的稳定性、动物免疫保护效果是下一步研究的重点。

参考文献:

- [1] Clark E G. Post-weaning multisystemic wasting syndrome Proceedings of the American Association of Swine Practitioners[C]. 28th Annual Meeting, Quebec City, Canada, 1997:499-501.
- [2] Brian M M, Francis M, Daniel T, et al. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs [J]. Journal of General Virology 1998(79):2171-2179.
- [3] Fort M, Sibila M, Allepuz A, et al. Porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination of conventional pigs prevents viremia against PCV2 isolates of different genotypes and geographic origins [J]. Vaccine, 2008;26(8):1063-71.
- [4] Opriessnig T, Patterson A R, Madson D M, et al. Comparison of efficacy of commercial one dose and two dose PCV2 vaccines using a mixed PRRSV-PCV2-SIV clinical infection model 2-3-month post vaccination [J]. Vaccine, 2008.
- [5] Opriessnig T, Patterson A R, Elsener J, et al. Influence of maternal antibodies on efficacy of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination to protect pigs from experimental infection with PCV2 [J]. Clin Vaccine Immunol, 2008;15(3):397-401.
- [6] 刘娜, 吴锋, 徐义兵, 等. 猪圆环病毒 II 型 ORF2 基因在酵母中的表达 [J]. 中国畜牧兽医, 2011(9):80-83.
- [7] 刷海, 梁东春, 郭刚, 等. 用于 PCR 实验的毕赤酵母基因组 DNA 制备方法的比较 [J]. 天津医药, 2003, 31(5):270-272.
- [8] Daly R, Hearn M T W. Expression of heterologous proteins in Pichia pastoris: a useful experimental tool in protein engineering and production [J]. Journal of Molecular Recognition, 2005(18):119-138.
- [9] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2000, 24(1):45-66.
- [10] 张晓勇, 郑其升, 魏雪涛, 等. 猪圆环病毒 II 型 ORF2 基因在酵母中的高效分泌表达 [J]. 中国病毒学, 2005, 20(2):125-129.

不同年龄段 Beagle 犬血压测定分析

胡敏华, 周治东, 倪庆纯, 刘运忠*

(广州医药研究总院有限公司, 国家犬类实验动物种子中心, 广东 广州 510240)

摘要: Beagle 犬是国际公认的实验用犬, 常用于制备高血压实验动物模型。与诱发性高血压模型相比, 自发性高血压模型更接近人类高血压疾病生理过程, 如能获得遗传性自发高血压 Beagle 犬模型, 将对人类高血压疾病研究具有重要意义。本文通过对 300 多只不同年龄段 Beagle 犬进行血压测定分析, 结果表明血压总均值为 161 mmHg, 并且随着 Beagle 犬年龄的增长而上升, 为自发性高血压 Beagle 犬的研究提供一定的科研数据。

关键词: Beagle 犬; 高血压; 疾病模型

中图分类号: S858.292

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)01-0044-03

Analysis of Blood Pressure in Different Age of Beagle Dogs

Hu Minhua, Zhou Zhidong, Ni Qingchun, Liu Yunzhong*

(Guangzhou General Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., National Seed Center of Experimental Dogs, Guangzhou 510240, China)

Abstract: The beagle dog is the experimental dog admitted internationally, and it was commonly used in hypertension disease model. Compared to the induction model of hypertension, the spontaneously hypertension model is more similar to the physiological processes of human hypertension, and it will play a crucial role in the human hypertension research if we could generate the inherited spontaneously hypertension Beagle model. More than 300 Beagle dogs were used to analyze the blood pressure at different age. The results showed that the average SBP was 161 mmHg, and rised with age. Which provided the basic research data for the spontaneously hypertension Beagle model.

Key words: Beagle dog; Hypertension; disease model

高血压分为原发性高血压或继发性高血压。约 90%~95% 的病例为“原发性高血压”, 即没有明显病因的高血压。其余 5%~10% 的病例由影响肾脏、血管、心脏或内分泌系统的其它病症引发(继发性高血压)。高血压是心血管疾病如中风、心肌梗塞(心梗), 心衰, 动脉的动脉瘤(如主动脉瘤)及外周动脉疾病的一个主要危险因素, 也是慢性肾病的起因之一。随着高血压患病率的逐年上升, 制备稳定可靠的高血压模型对于探索高血压患病机制、了解高血压对其他脏器的影响有着重要意义。

目前根据模型制作方法的的不同, 高血压实验

动物模型主要包括 3 类: 自发性高血压、诱发性高血压和基因工程高血压动物模型^[1]。其中诱发性高血压模型为科学家们取用最多的研究模型, 有门静脉给药^[2]、门静脉狭窄^[3]、神经源性压迫等。神经源性高血压模型因可高度模拟人高血压的形成过程, 一直是众多学者关注的热点方向^[4,5]。但制作神经源性高血压模型需要对犬进行手术, 实验操作过程复杂, 技术难度较大, 动物术中死亡率较高, 器械要求高。由于显微操作的限制不适宜于小动物造模, 易受人为因素影响, 术后并发症较多, 对实验动物本身的身体条件造成不可逆的伤害, 使得实验结果可靠性降低。且由于麻醉药物的协

收稿日期: 2014-10-27

*: 通讯作者

基金项目: 国家科技支撑计划(2013BAK11B00); 广州市科研条件建设项目(穗科信字[2011]233-16)

同影响,难以准确描述动物心血管系统的变化情况。与诱发性高血压模型相比,自发性高血压模型更接近人类高血压疾病生理过程。如能获得遗传性自发高血压 Beagle 犬模型,将对人类高血压疾病研究具有重要意义!

1 材料和方法

1.1 实验动物与饲养管理

广州医药研究总院有限公司实验动物基地(国家犬类实验动物种子中心)的1岁以上 Beagle 犬311只,生产许可证号 SCXK(粤)(2013-0007)。根据不同年龄段分为六组:1-1.5岁(含)、1.5-2.5岁(含)、2.5-4岁(含)、4-6.0岁(含)、6-8.0岁(含)及8岁以上;不分公母,单笼饲养;每天上下午各饲喂一次,自由饮水。体重为10~15 kg。

1.2 实验方法

采用日本 Sftron 公司生产的 BP98EW V2.31 智能无创血压计进行测量。将 Beagle 犬固定于4孔保定架上,将犬尾根部剃毛,待犬安静后将血压计的袖带绑紧在尾根部,检测犬只安静状态下的血压。每只犬检测3次血压,取3次的平均值为犬的血压检测值。

1.3 数据分析

全部数据采用 SPSS20.0 进行统计分析,差异显著性采用 Duncan's 法进行单因素方差分析。数据用平均数±标准差表示。

2 结果与分析

测定311只1岁以上 Beagle 犬血压后分析得出(见表1),Beagle 犬收缩压在154~165 mmHg 之间,总均161 mmHg;舒张压在94~108 mmHg 之间,总均101 mmHg。收缩压与舒张压均随年龄的增长而增加,其中6岁以上 Beagle 犬收缩压要显著高于1-1.5岁犬($P < 0.05$),但与1.5岁到6岁 Beagle 犬差异不显著;6岁以上 Beagle 犬舒张压要显著高于1-4岁犬($P < 0.05$)。图1为不同年龄段 Beagle 犬收缩压高于181 mmHg 的犬只比例。可以看出,随着年龄的增长,高血压犬只比例有逐渐上升的趋势,与血压测定结果相符。而在人类中,血压亦有随年龄的增长而升高的现象,说明 Beagle 犬血压变化趋势与人类相似,进一步表明 Beagle 犬是研究人类高血压的极好模型之一,也间接表明此实验结果与现实相符,准确度高。

表1 不同年龄段 Beagle 犬血压检测结果

单位:mmHg

年龄段	数量(只)	收缩压(SBP)	平均压(MBP)	舒张压(DBP)
1-1.5(含)	71	154.73±17.00 ^a	112.17±1.89 ^a	94.47±23.07 ^a
1.5-2.5(含)	44	158.61±13.93 ^{ab}	115.93±2.24 ^a	95.57±16.14 ^{ab}
2.5-4(含)	16	159.61±8.18 ^{ab}	115.09±2.85 ^a	95.83±12.76 ^{ab}
4-6(含)	48	162.24±18.26 ^{ab}	122.70±2.34 ^{ab}	103.89±17.06 ^{bc}
6-8(含)	94	164.59±16.77 ^b	128.07±3.35 ^b	105.03±16.31 ^c
8岁以上	38	165.33±17.36 ^b	127.02±2.73 ^b	108.5±17.09 ^c
总均	311	160.96±16.81	121.10±22.98	101.06±18.75

注:数据右上肩有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);相同小写字母表示差异不显著($P > 0.05$)。

3 讨论

测量血压的方法可分为直接法与间接法两种。直接测量法采用一种特殊的小型血压传感器(又称导管顶端压力传感器),它将传感器部分直接装在动脉导管的顶端,使用时可随导管直接插入人体或动物动脉血管内,记录出各段血管的血

压,也可插入心室记录室内血压。从右肘静脉或颈静脉还可以插入右心房、右心室和肺动脉处,分别记录备该部位的血压。直接测量法虽然很准确,但它是侵入性的,并且需要向动脉内插入导管和进行无菌操作,不便于日常多次反复检查。临床上广泛使用的血压计是一种利用压脉带压

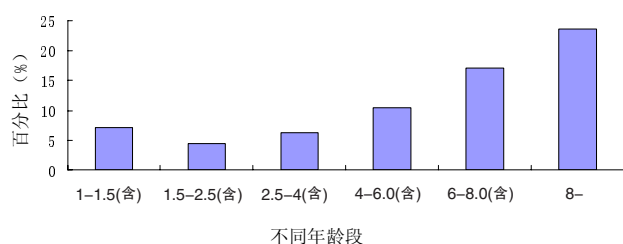


图1 不同年龄段 Beagle 犬收缩压高于 181mmHg 犬只比例

迫血管的间接测量法。由于本实验测量样本数量较大, 采用智能无创血压计对 Beagle 犬血压进行了间接测定。

Vincent 等^[6]采用 Dinamp1846SX 型血压计对 20 只工作犬进行血压测定, 结果表明尾动脉血压一致性好, 测量中犬只配合良好, 易于操作, 血压值重复性好。Bodey 等^[7]采用了与 Vincent 相同的血压仪, 对麻醉状态下犬尾动脉血压进行测定, 进一步证实在实用性上尾动脉优于前肢和后肢动脉, 其结论与 Vincent 相一致。Bodey 等^[8]对清醒犬的血压进行直接、间接测量的比较, 认为对同一只犬取多次测量求平均值可以提高测量结果的准确性; 尾动脉血压值与直接测量值相关性良好, 在临床测量中优于前肢。火焱等^[9]使用袖带血压计选择犬股动脉、臂动脉与尾动脉分别进行测量, 三者之间差异不显著。卢祺炯等^[10]用 BP-98E 无创血压计和 PowerLab 电生理仪同时观察 Beagle 犬在麻醉前后犬血压变化情况, 发现两种血压方法在数值上没有显著性差异, 但无创法测量 Beagle 犬血压更简便、准确、高效、稳定性好、灵敏度高, 适合长期动态观察。根据上述报道, 本实验中利用 BP-98E 无创血压计对 Beagle 犬尾动脉进行多次测量求平均值, 其结果重复性好, 准确度高, 具有较高的可信度, 为科研工作者对高血压疾病的研究提供基础科研数据。

自发高血压犬模型的研究报道较少。1957 年, Katz 等^[11]指出经股大动脉测 1 000 只犬血压值, 自发性高血压只有 9 只, 发生率不足百分之一, 正常血压值在 145 ± 7.5 mm, 150 ± 7.5 mm 以上为高血压犬。本实验结果表明 Beagle 犬总均血

压值为 160.96 ± 16.81 mm, 与 Katz 等的结果稍有差异。究其原因, 主要有: 血压与动物所处的环境、气温、精神状态、饮食、体位、生理状况有一定的关系; 此外, 还受动物个体因素, 诸如心脏收缩、心输出量、血管管腔大小、血管壁等的影响。因此, 在实际测量中, 保定犬时动作要温柔, 在测量前对犬进行抚摸, 让其安静下来, 以消除主观因素对血压所造成的误差。

参考文献:

- [1] Takahashi N, Smithies O. Human genetics, animal models and computer simulations for studying hypertension [J]. Trends Genet, 2004, 20(3): 136-145.
- [2] Jin W, Deng L, Zhang Q, et al. A canine portal hypertension model induced by intra-portal administration of Sephadex microsphere [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2010, 25(4): 778-785.
- [3] Chen Y, Zhang Q, Liao Y, et al. A modified canine model of portal hypertension with hypersplenism [J]. Scand J Gastroenterol. 2009, 44(4): 478-485.
- [4] Dibona G F. Dynamic analysis of patterns of renal sympathetic nerve activity: implications for renal function [J]. Exp Physiol, 2005, 90(2): 159.
- [5] Tharasher T N. Unloading arterial baroreceptors causes neurogenic hypertension [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002, 282(4): 1044.
- [6] Vincent I C, Michell A R, Leahy R A. Noninvasive measurement of arterial blood-pressure in dogs—a potential indicator for the identification of stress [J]. Research In Veterinary Science. 1993, 54(2): 195-201.
- [7] Bodey A R, Young L E, Bartram D H, et al. A comparison of direct and indirect (oscillometric) measurements of arterial blood pressure in anaesthetised dogs, using tail and limb cuffs [J]. Res Vet Sci. 1994, 57(3): 265-269.
- [8] Bodey A R, Michell A R. Epidemiological study of blood pressure in domestic dogs [J]. The Journal of Small Animal Practice. 1996, 37(3): 116-125.
- [9] 火焱, 王志, 武金虎. 犬血压正常值及测量部位研究 [C]. 武汉: 2006.
- [10] 卢祺炯, 夏丽娟, 温磊, 等. 二种方法监测麻醉状态下 Beagle 犬血压动态变化的比较 [J]. 科技创新导报, 2010(29): 255-256.
- [11] Katz J I, Skom J H, Wakerlin G E. Pathogenesis of spontaneous and pyelonephritic hypertension in the dog [J]. Circ Res, 1957, 5(2): 137-143.

宠物蛇的饲养入门

吴乃银, 韦泽欧, 钟智康, 刘清神*

(华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 作为爬宠一族的蛇, 由于其饲养管理方便, 日益受到宠物爱好者的欢迎。但是蛇是一个庞大的家族, 宠物蛇种类很多, 不同的蛇有不同的生活习性。一些爱好者盲目上马, 导致爱宠生长不好, 甚至死亡。本文介绍了宠物蛇的生物学特点以及品种选择、喂食等一般饲养管理方法, 以期对初次接触饲养宠物蛇的读者有所裨益。

关键词: 宠物蛇; 选择; 饲养

中图分类号: S858.99

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)01-0047-04

俗话说“萝卜青菜, 各有所爱”。如今人们对宠物的饲养不仅停留在猫狗之上, 一些奇异宠物也开始盛行, 例如作为爬宠一族的蛇, 也越来越受到宠物爱好者的欢迎。宠物蛇, 一般指人工驯化的非自然状态下的家庭宠物蛇。由于其生活在人工饲养环境条件下, 所以相对野生蛇性情比较温和, 对人的攻击性较小。正如宠物猫狗一样, 多数要从小养起, 这样比较容易和主人建立深厚的感情。宠物蛇的来源有国产的、进口的。不同的蛇的饲养要求也有所不同。

蛇是较为干净的宠物之一, 对起居饮食的要求较为简单。宠物蛇既不会掉毛, 也不会吵闹。如果定时喂养和做好保暖工作, 那么宠物蛇可以活上很多年。

1 蛇类的生物学特点

1.1 头部

蛇头部吻段有两个鼻孔, 但无嗅觉, 只有呼吸功能。头上有一对眼, 没有上下眼睑和瞬膜, 仅有一层透明的膜, 视力较差, 难以看见一米以外的物体。它没有耳壳, 但具有发达的内耳和听骨。蛇的舌不能感知味觉, 但依靠舌的不停伸缩, 分析化学分子传到犁鼻器, 从而产生味觉^[1]。蛇左右下颌骨前段以韧带连接, 方骨可活动。口能大张130°, 舌末端分叉, 伸缩性强。蛇有喜腥而厌芳香气味的习性, 故浓郁芳香气味的雄黄则具有

驱蛇作用。

1.2 躯干

蛇身体细长, 成圆筒形, 四肢退化, 不具肩带和胸骨, 周身有鳞片覆盖。其身体结构可以分为头部、躯干部和尾部。头部小于身躯、较扁, 颈部较身躯细, 尾部长或侧扁或呈短柱状。四肢退化, 依靠肋骨作“S”状运动。

1.3 体表

体表附着细小鳞片, 陆生与树栖的蛇, 其腹面有一列特别大的鳞片, 称为腹鳞, 呈覆瓦状排列, 能做前后运动, 是陆生与树栖种类蛇爬行的主要工具。生活在海洋中的蛇不需要大型的腹鳞, 主要靠侧扁的尾巴摆动来推动身体前进。蛇体生发层细胞分裂形成新的活细胞层和角质层, 酶的作用使旧的表皮角质层与新生的细胞层分离, 常需借助石块树枝等物, 把上下额的表皮磨开, 并逐步向后翻蜕, 这就是蛇的蜕皮。蛇每年蜕皮都需3~8次。成年蛇类一般每年蜕皮3次左右, 少数达到4次; 幼年的蛇类生长速度快, 蜕皮的次数较多, 一般仔蛇和幼蛇每年可蜕皮4~5次或更多, 平均32~45天蜕皮1次; 冬季蛇类既不进食也不蜕皮。影响蛇类蜕皮次数的因素很多, 食物丰富时, 其生长速度较快, 蜕皮次数也多。另外, 蛇类栖息处的湿度及环境与蛇类蜕皮也有密切关系。总之, 蛇类蜕皮与生长是成正比的。

收稿日期: 2014-10-08

*: 通讯作者

2 饲养宠物蛇前的准备

如果要饲养宠物蛇,建议选择体型小的,性格温顺的蛇,对于大型的宠物蛇在家中饲养还是有诸多不便,大型的宠物蛇给家庭带来威胁的几率也更高。在家中一定要准备坚固的笼子,用来放置宠物蛇,千万不能让它逃脱。家中的宠物蛇也不要过多的拿在手中把玩,千万不要激怒它,否则再温顺的宠物蛇也是会反抗的。

2.1 宠物蛇的选择

当你决定准备要养蛇时,就要选择适合初学者的蛇种。作为新手,玉米蛇、王锦蛇、球蟒等是比较适合饲养的。除了蛇品种,你还要考虑是否能提供它所需要的生长环境;了解其成体后的体形、食量等,还有,是否有可靠的食物来源,饲养经费是否能承担起。

2.2 饲养蛇工具的选择

2.2.1 饲养箱 蛇类的饲养箱比较简单,市场上常见的箱子都可以用来饲养,比如玻璃箱、塑胶箱或木制箱。木制箱在空气湿度较高的地方易发霉而滋生细菌。一般饲养箱内都要放水源,所以笔者建议一般比较好的饲养箱情况下,不要优先选择木质箱,当然栖息于潮湿地区的品种则更应避免用木制箱饲养。玻璃箱价格稍高,比较沉重,不容易移动。塑胶箱物美价廉,比较方便,但是质量要选择好的,不要带有奇异味道。最佳选择应是顶部和两边有网的饲养箱,可保持通风舒爽。当然还要确保饲养箱没有可以让蛇逃跑的空隙。

2.2.2 基底 饲养箱的基底原则是采用与蛇产地生境相似的物质。对相对湿度要求较高的蛇种,比如热带雨林的一些蛇种可选择一些较保湿的底材,如树皮,水苔或碎椰壳等。树栖性的蛇类长期攀在树上,对底材要求不高,只需放入一个水盆,再为它提供一些与其生境相似的树枝树皮等。砂石、木屑可作为一些好干燥的沙漠地区的蛇种的基底。当然底材还要尽量选择容易清洁的种类,比如报纸。

2.2.3 盛水器 盛水器除了用来饮水,也可用作蛇蜕皮时的浸泡容器,因为蛇蜕皮时需要一定的湿度才可蜕下。所以,容器要能容纳蛇的整个身体,还要不容易打翻。岩石陶瓷水盆不仅不易打翻,其外围的不平滑表面还有利于蛇蜕皮时的磨擦。

2.3 舒适环境的选择

2.3.1 温度 就像南北方的人对温度的耐受力不同一样,不同蛇种对温度的要求也不一样。不同种类的蛇应选用其合适的加温设备,地栖洞穴型的蛇类可选用远红外线加热灯、陶瓷加热器、加热垫;树栖型的蛇类可用远红外线加热灯、陶瓷加热器。同时,我们要在饲养箱中制造出温差效果,即在饲养箱的一端加温,另一端不加,让其自己选择。日夜的温度应稍有分别,晚间温度降低2~5℃(视其种类而定)。适宜的温度可以保证你的爱宠健康快乐地生长。

2.3.2 躲藏处 隐蔽处对于蛇来说还是非常重要的,胆小怕惊是蛇的天性。所以蛇的躲藏处可选择一般的岩石洞或树皮洞,洞的大小以能够容纳蛇卷起来的身体为宜。细长的蛇种,可放入一些丫叉型的树枝;体型较粗的蛇种,除了粗壮的树干,还可以做一个木架;树栖性的蛇种不需洞穴,可在为其提供的树干旁加一些假叶等就可以了。有些人为了有更好的视觉效果,还会在饲养箱内加入一些植物、假山假树^[2]。但是,这些植物、假山、假树等装饰性物品不要让蛇类受伤,不要给清洁增加不便。这些装饰物不能仅为了迎合主人的眼球而设计,更重要的是考虑你的爱宠生活的舒适性。

3 宠物蛇的挑选

3.1 体表

将几条相同的蛇放在一起做比较,健康的蛇,表皮的颜色都会鲜艳靓丽。用手触摸蛇整个躯体的肌肉会显得结实有力。仔细看看蛇的身体表面有没有受伤的痕迹,鳞片是否翻了起来,蛇身有无伤疤或者溃烂之处,或者表皮有没有腐烂的现象。观察蛇的腹部是否有霉斑,如果有则表示蛇可能携带了某种传染疾病,主人则不应该挑选。

3.2 活力

如果可以的话,尽可能的去挑逗下宠物蛇。如果蛇收到刺激后能做出敏锐的反映,就表示是一条健康的蛇。也可以将蛇轻轻的放在地上,因为蛇有爱蜷缩的本能,它会很快的将身体蜷缩在一起。如果蛇放在地上后,不爱动,也不扭动身体,那么蛇就应该有伤病了。

3.3 完整性

在选择宠物蛇的时候,一定还要检查蛇胆是

否还存在。你可以触摸蛇身,如果体内有圆鼓鼓的东西存在,就表明蛇胆还在。因为蛇胆被取走后,会直接影响蛇的健康,严重的更导致蛇的死亡^[3]。蛇胆作为蛇身体内价值比较高的一部分,有些商家图谋更高利益,会抽取胆汁,这样的蛇买来当然也无法作为你的爱宠饲养。

3.4 健康状态

看嘴巴。掰开蛇的嘴巴,观察它的鼻孔和嘴巴是否有液体或半固体的分泌物,这些分泌物是蛇类患有感冒或口腔炎的表现,往往具有传染性。如果在同一个蛇箱里,有一条蛇的鼻孔或嘴巴有液体或半固体的分泌物,或者常常做打哈欠状,那么此蛇可能已经患病。这种状况下,整只箱子内的蛇都可能被传染,因此购买时需谨慎。

看蛇的排泄物。健康蛇类的排泄物应为半软的块状。如果排泄物是绿色糊状物,那么可能此蛇已患胃肠炎等肠道疾病。

4 宠物蛇的喂食

4.1 喂食

选蛇回家后,先让蛇在饲养箱内静待几天,让它熟悉新的环境。这段期间最好不要打扰它,也不需投喂食物。所选购的食物要保证市场可以购买到,比如小白鼠、青蛙、泥鳅等。一般小中型的蛇类,初生个体可间隔一个星期投喂一次;较大的可间隔7~9日投喂一次;而已达成体的个体,则可间隔8~12日投喂一次。具体的投喂间隔要看蛇的行为。如果蛇不停地伸缩蛇信子,头部到处探索觅食,食物刚投不久就被吃个精光,那么可适当地缩短投喂间隔。夜行性的蛇多数在晚上出来猎食,投喂时则选择在晚上。如果蛇对投喂的老鼠没有兴趣时,要把老鼠取出,隔晚再投喂。食物大小就要视蛇的身型而定。年幼个体不宜投喂过大的食物,最好选择初生幼鼠,食物体积是蛇头部的2~3倍足矣。否则,幼蛇会因消化不良而出现呕吐。蛇吞食时不要去惊扰它,否则会放弃吞食或呕吐。另外不要移动或玩耍刚吃食后的蛇,而是要让蛇静待2~3天,直至蛇把食物消化完。

4.2 如何解决拒食问题

拒食是饲养中普遍发生的问题,出现拒食时不能采取强饲,而是要分析它的原因。出现拒食的

原因很多,常见的是:环境转变、温度不合适、蜕皮前、喂食前触摸、玩弄过度、感染寄生虫、生病等。环境突变令蛇类拒食,我们就要让它在新环境里静待几天,稳定下来再重新投喂。在低温下蛇食欲大减,这也是蛇冬眠的原因之一^[2]。喂食前不应把玩,定期观察身体表面、鳞片。野外捕获的个体常常会长扁虱,多数会躲藏在鳞片之间。这种状况下,我们可以用温水浸泡蛇体,虫子便会浮出,再用医用镊子小心地拔掉剩余的虱子。当然作为宠物饲养,不建议捕捉野生的。一是对大自然生态平衡的破坏;二是有寄生虫;三是野生蛇比较容易受人工环境影响,长期受到惊吓或应激,影响其免疫系统,导致病菌感染暴毙。其实上,对于刚得到的野生蛇,我们很难模拟其生活环境,所以当然还是购买人工驯化的为好。

5 宠物蛇的护理

5.1 蜕皮护理

与大多爬行动物一样,蛇在成长过程中会定期蜕皮。蜕皮时蛇表皮由光滑亮泽开始变得粗糙朦胧,眼睛变得混浊。这时,蛇对周围环境较为敏感,稍具攻击性。所以,在蜕皮前,我们不应搔扰它。蛇蜕皮对环境的空气湿度要求较高,空气干燥时,蛇就会自己泡在水里增加皮肤湿度。灰白污浊的状态大概维持3~4天。等到蛇皮和眼睛变清两三天后,它的旧皮就完全蜕掉了。这时,我们要仔细检查蛇身和蛇蜕,若出现蜕皮不完整,可能是其生病、营养不足或是环境过于干燥。这时,我们就要替其浸泡,然后小心地把皮清除。如只是一点点或浸泡后还是蜕不掉,不要多次浸泡强行替其蜕皮。蛇类下次蜕皮时,新蜕的皮会同旧皮一并蜕掉。若是眼部有似隐形眼镜状的蜕皮,就要把蛇的头部固定,然后用医用镊子轻轻地取出。

5.2 防止攻击

蛇比较胆小,尤其是饲养作宠物的无毒蛇。每种蛇都存在着攻击意识,这是蛇受到惊吓后向敌人发出的一种自我保护。但攻击前必有警告动作:抬起头部拉弓(身体前半部成“S”状)瞄准目标,并张开嘴瞬间攻向目标,有些更会像响尾蛇一样颤动尾部。这时我们不应再骚扰它,应让其镇静安定下来。如果蛇不幸把主人当成食物并咬着不放,我们千万别强行将它拨开。一是自己会比较痛;二是

还会把它的口腔牙齿弄伤。正确的做法是,将被蛇咬着的部位连同蛇体浸于水中,蛇呼吸困难便会把口松开;或用冰块擦拭其鼻尖。不过,蛇除了捕食外,一般并不会主动发起攻击。

6 几种宠物蛇的简介

6.1 加州王蛇

经人工驯化的可分为正常型、白化型、粉红型、黑色型等。加州王蛇的正常型与我国剧毒蛇银环蛇相像,体色黑白环纹相间,大小无差。不同的是加州王蛇是无毒蛇,黑纹比白纹宽许多,白色环纹在腹部有连接的趋势,同时头部为黑白纹相间,而银环蛇头部全部为黑色。加州王蛇是一种入门级的宠物,饲养方法及条件简单。在赏玩时,用双手托住,让其有多个支撑点,这样蛇比较有安全感^[4]。

6.2 翠青蛇

翠青蛇以体色翠绿而得名,属无毒蛇。与竹叶青蛇很相似,主要区别是:翠青蛇头呈椭圆形,略尖,头部鳞片大,和竹叶青的细小鳞片有明显的区别;另外翠青蛇尾细长,眼大,黑色。竹叶青自颈部以后,体侧常有由背鳞缀成的左右各一条白色纵线,或为红白色纵线,或为黄色纵线;尾较短,焦红色,具缠绕性;眼红色,眼与鼻孔之间有颊窝。由于翠青蛇对环境和湿度要求极高,同时食谱很狭窄,所以饲养比较难。一般作为观赏,而不可把玩^[5]。

6.3 球蟒

球蟒原产于非洲的热带森林。因为它在受到惊吓时会将身体蜷缩成球状,因而得名“球蟒”。据说这种蛇在古埃及是饲养在皇宫内用来捕捉老鼠的,所以又称国王蟒、宫廷蟒。球蟒脾气温和,花纹美丽,体型适中,使它成为极受欢迎的宠物蛇种。球蟒对温度的要求较高,喜暖怕冷,25~30℃为其最佳温度。在此温度范围内球蟒摄食、生长正常。当温度低于24℃时,摄食减少,少动。当温度低于15℃时停止摄食,并较易患病。10℃以下就有死亡的可能^[6]。

6.4 玉米蛇

玉米蛇是爬宠市场上最受欢迎的品种之一。千变万化的颜色和花纹是它最为吸引人的地方。玉米蛇大部分都有一个以上的隐性基因,这使得他们拥有高度易变的颜色和样式^[7]。

玉米蛇分布于美国东南部,长80~120 cm,最长达180 cm。喜欢栖息于树林、草丛、农田或农家房屋旁。通常情况下寿命为12~15年。生活环境的温度以21~32℃为宜,湿度75%~80%^[8]。以橘色或灰色为底纹,具有镶黑边的红色或红褐色斑纹。腹部上有深、淡相间的方格状斑纹,尾部腹面呈直条纹状。以鸟类或小型哺乳动物为食。属夜行性蛇类,白天多潜藏与洞穴中。每年3~5月繁殖,5~7月间可产下3~21枚卵,孵化期60天。此种蛇由于性情温和,花纹美丽,容易饲养,而极受欢迎。目前培育的有白化型、脱黄色型、脱红色型及无色型等品种^[9]。

6.5 奶蛇

奶蛇是一种无毒有益的王蛇。奶蛇分布在美国东部和安大略湖的南部一带。它常常出没在谷仓和农家庭院里捕捉老鼠和兔子。它的名字来自于它喜爱牛奶是一种错误传说。奶蛇爱好攻击和吞咽其它有毒和无毒蛇,因此奶蛇对大部分毒液具有免疫力。

奶蛇体长约为40in(1m),身体带有黑边,并有红色、褐色、橄榄色或浅灰色的斑点。雌性一般在地下或潮湿的腐木里生产6~12个白壳蛋。幼年的奶蛇其体色比成年奶蛇鲜艳^[10]。

参考文献:

- [1] 蒋青海. 时尚小宠物养赏大全[M]. 江苏:江苏科学技术出版社, 2002:1-2.
- [2] 张亮. 蛇做宠物你准备好了吗? [J] 生命世界. 2010(12):17-19.
- [3] 舒克. 怎么选择合适的宠物蛇?[ED/OL]. <http://www.boqii.com/article/3754.html>. 2013-10-04/2014-04-21.
- [4] 陈志兵. 夏新. 宠物彩图另类饲养[M] 上海:上海文化出版社, 2008:133-134.
- [5] 陈志兵. 夏新. 宠物彩图另类饲养[M] 上海:上海文化出版社, 2008:126-127.
- [6] 球蟒[ED/OL]. <http://www.58.com/chongwushe/20121022125205.html>. 2012-10-22/2014-04-21.
- [7] 玉米蛇[ED/OL]. <http://www.baike.com/wiki/%E7%8E%89%E7%B1%B3%E8%9B%87>. 2014-08-12.
- [8] 王巍. 宠物大联盟—情趣宠物[M]. 长沙:湖南科学技术出版社, 2011:49.
- [9] 张斌. 两栖爬行小动物[M]. 北京:中国林业出版, 2003:119.
- [10] 奶蛇[ED/OL]. <http://lifestyle.bowenwang.com.cn/animals-milk-snake.html>. 2014-04-21.

两例犬洋葱中毒的诊治

季珉珉¹, 许建国^{1,2}, 蒋晓新², 孟小林¹

(1. 新疆乌鲁木齐市爱欣动物诊所, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 新疆农业职业技术学院, 新疆 昌吉 831100)

摘要:犬在采食一定量的洋葱后可能会出现中毒表现, 即发生溶血性贫血。笔者在2014年9月上旬连续接诊2例犬疑似中毒病例, 经过病情问诊、临床检查、实验室检查后诊断为洋葱中毒。通过抗氧化药物治疗和相应的支持治法, 使患犬得以痊愈。

关键词:犬; 洋葱; 中毒; 治疗

中图分类号: S858.292

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)01-0051-02

洋葱为百合科葱属植物, 通常以食用葱头部分, 在新疆地区称为皮牙子, 为当地人的主要食材。因其具有抗菌消炎、活血化淤、降血脂、降血压、降血糖、防癌抗癌、利尿、预防感冒以及预防心血管疾病等功效^[1], 深受当地人民的喜爱, 也作为长寿食材之一。但犬等动物采食以后, 会出现中毒表现, 主要特征性症状为排红色或红棕色尿液, 俗称血尿。动物洋葱中毒世界各地均有报道, 1998年我国首次报道了犬大葱中毒的病例^[2]。笔者在2014年9月上旬连续接诊2例犬疑似洋葱中毒的病例。

1 发病情况

1.1 病例1:2014年9月6日, 在门诊接诊到1只德国牧羊犬, 体重为12.2 kg, 4月龄, 主诉该犬近日精神不好, 不吃食。

1.2 病例2:2014年9月11日, 在门诊接诊到1只斗牛犬, 体重为10.4 kg, 2岁。宠主反映, 10日中午该犬吃了较多洋葱炒烤肉, 晚上出现呕吐、腹泻等症状, 11日早晨发现尿液颜色较深, 类似于淡淡的酱油颜色。

2 诊断

2.1 临床症状

病犬1临床检查结果: 体温36.8℃, 呼吸26次/min, 心跳101次/min, 精神一般, 牙龈苍白。病犬2临床检查结果: 体温37.2℃, 呼吸25次/min, 心跳112次/min, 精神沉郁, 嘴角有呕吐物粘黏, 可视粘膜苍白, 尿液呈现淡酱油色。

2.2 实验室检查

2.2.1 尿液常规检查 采集病犬的尿液5 mL置

于试管中, 将试剂条插入倾斜的试管中, 作用3~5 s后, 取出试剂条将其放入尿液分析仪中检测。

2.2.2 血常规检查 使用一次性采血器采取病犬的血液, 通过动物血液细胞分析仪进行血常规检查。

2.2.3 肝功能检查 用注射器采集3~5 mL血液(不含抗凝剂), 将其注入微量离心管中, 置37℃恒温箱中作用0.5 h左右, 用离心机2 500 r/min离心10 min, 吸取血清后用生化分析仪进行检测。

2.3 检查结果

2.3.1 尿液检查结果 病例1患犬, 尿色深黄, 尿比重升高, 尿蛋白(+), 尿潜血(++)等异常。

病例2患犬, 尿液颜色为混浊的暗红色, 尿的比重增加到1.080, pH值为7.58, 尿胆原为13.87 μmol/L, 亚硝酸盐(+), 蛋白质(++)等异常。结果见表1。

2.3.2 血常规检查结果 两例病犬都出现红细胞总数下降、白细胞总数上升的现象。结果见表2。

2.3.3 肝功能检查结果 从肝功能检测结果(见表3)可以看出, 血清总蛋白和白蛋白都略有下降, 天门冬氨酸氨基转移酶和丙氨酸氨基转移酶都有所升高, 总胆红素和直接胆红素升高。

根据临床检查, 实验室检测中红细胞总数急剧下降、尿常规有血红蛋白尿以及天门冬氨酸氨基转移酶和丙氨酸氨基转移酶升高, 综合判断2例病犬为洋葱中毒。

3 治疗

两例病犬均使用2.5%亚硒酸钠(2 mg/kg)、

表 1 尿液检查结果

序号	尿比重	pH 值	尿胆原	葡萄糖	酮体	亚硝酸盐	蛋白质	尿胆红素	尿潜血
病犬 1	1.055	6.30	16.65	微量	微量	+	+	++	++
病犬 2	1.080	7.58	13.87	微量	微量	+	++	+++	+++

表 2 血常规检查结果

序号	红细胞总数(L)	白细胞总数(L)
病犬 1	4.3×10^{12}	26.5×10^9
病犬 2	1.3×10^{12}	31.0×10^9
正常值	$5.5-8.5 \times 10^{12}$	$6.0-17.0 \times 10^9$

表 3 肝功能检查结果

序号	总蛋白(g/L)	白蛋白(g/L)	天门冬氨酸氨基 转移酶(U/L)	丙氨酸氨基 转移酶(U/L)	碱性磷酸酶 (ALP)	总胆红素 ($\mu\text{mol/L}$)	直接胆红素 ($\mu\text{mol/L}$)
病犬 1	55.8	20.5	65	88	32	8	1.2
病犬 2	60	24	60	76	45	10	2.5
正常值	54-78	24-38	8-38	4-66	0-80	2-15	2-5

呈粉红色,红细胞总数及血红蛋白量中等减少,白细胞总数增多,尿比重升高异常,综合临床症状诊断为犬洋葱中毒。病例 2 有吃食洋葱的病史、典型的临床症状即排血红蛋白尿,以及实验室检查可以确诊该病。

临床上能引起犬出现血尿症状的疾病比较多,常见于肾炎、血液寄生虫病、膀胱及尿道结石等,所以临床上应注意鉴别诊断。犬肾炎时体温升高,频频排尿,但量很少;肾区敏感,触诊时躲闪,有疼痛感,有时肾脏肿大。随病程延长可发现眼睑、胸腹下等发生浮肿。犬血液寄生虫病可引起持续高热,贫血、溶血、黄疸及血尿等,血涂片染色镜检时可见有虫体或虫卵。犬膀胱及尿道结石时体温正常,有时出现频尿,膀胱敏感性高,疼痛性排尿障碍,鉴别诊断时可通过影像学结果确诊^[3]。

本病治疗的关键是立即停止饲喂含洋葱食物,同时给予大剂量的抗氧化剂,如 2.5%亚硒酸钠 2 mg/kg、维生素 C(2.0 mg/kg)、维生素 E(0.5 mg/kg)等肌肉注射。为促进血红蛋白的排出,可以适当使用一定量的利尿剂(0.5%速尿,0.5 mg/kg)肌肉注射。洋葱中毒时,犬的肝脏和肾脏均受到一定损失,应该注意肝、肾的保护和治疗。对于贫血

0.05%维生素 B₁₂ (10 mg/kg) 和 0.5%速尿(0.5 mg/kg)肌肉注射,并口服维生素 E,3 d 后临床症状基本消失。

4 分析与讨论

根据病例 1 由于宠主对发病前的情况不知情,临床未见典型症状,通过实验室检查发现血浆

严重的病犬,采用输血的治疗方法疗效较好。

洋葱因其具有特殊的营养价值和药理作用,尤其富含维生素 C,深受人们的喜爱,对人类无害,但犬猫等动物采食之后,会引起中毒表现。国外最早的研究报道称,给犬饲喂超过 5 g/kg 体重的洋葱就会出现中毒现象^[4]。也有学者研究发现^[4],按 30 g/kg 体重的剂量每天给犬饲喂 1 次洋葱,连续 3 d,就可导致其发生溶血性贫血。目前国内文献中记载的洋葱中毒采食剂量为 15~20 g/kg^[2,5],而在笔者接诊的 2 病例中,犬平均吃食 5~10 g/kg 左右的洋葱即出现中毒症状,这些说明采食极少量的洋葱也可以引起犬发生洋葱中毒。

参考文献:

- [1] 冯长根,吴悟贤,刘霞,等.洋葱的化学成分及药理作用研究进展[J].上海中医药杂志,2003,37(7):63-65.
- [2] 何英,叶俊华.宠物医生手册[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,2003:341.
- [3] 袁燕,王捍东.1例犬洋葱中毒的诊治[J].畜牧与兽医,2003,35(3):48.
- [4] 唐新叶.犬洋葱中毒机理的研究[D].北京:中国农业大学,2005.
- [5] 夏兆飞,薛琴,张婉,等.犬洋葱大葱中毒[J].中国兽医杂志,2000,26(9):44-46.

广东省家禽经营管理办法

第一章 总则

第一条 为了加强家禽经营管理,预防和控制传染病的发生和传播,保障公众健康和公共卫生安全,根据《中华人民共和国动物防疫法》、《中华人民共和国传染病防治法》、《中华人民共和国农产品质量安全法》、《中华人民共和国食品安全法》和《广东省商品交易市场管理条例》等法律法规,结合本省实际,制定本办法。

第二条 本省城镇内的家禽经营管理,适用本办法。

本办法所称家禽经营,包括人工饲养、可供食用的鸡、鸭、鹅、肉鸽、鹌鹑等活禽的批发、零售、集中屠宰及其生鲜家禽产品的经营等行为。

本办法所称活禽经营市场,是指有固定的交易场地、设施,有若干经营者进场经营,对活禽实行集中、公开、现货交易的场所,包括活禽批发市场和活禽零售市场。

第三条 县级以上人民政府负责本行政区域内家禽经营管理工作的组织领导,根据本地实际情况制定财政支持等政策。

县级以上人民政府商务主管部门会同有关部门依法对家禽经营市场进行规划。

县级以上人民政府畜牧兽医主管部门负责活禽集中屠宰环节的监督管理,动物卫生监督机构负责家禽经营的动物防疫监督。

县级以上人民政府食品药品监督管理部门负责家禽进入批发、零售市场或者生产加工企业后的质量安全监督管理。

县级以上人民政府卫生主管部门负责人感染禽流感疫情的预防、监测和控制。

县级以上人民政府工商行政管理部门负责家禽经营主体的登记管理,依法查处无照经营家禽等违法行为。

县级以上人民政府城市管理行政执法部门负责依法查处占用道路、桥梁、人行天桥、地下通道等公共场所饲养、经营家禽的行为。

县级以上人民政府经济和信息化、公安、财政、环境保护、市容环境卫生、林业、质量技术监督等部门按照各自职责,做好家禽经营管理的相关工作。

第四条 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设活禽经营限制区,区内限制活禽交易。限制区的具体范围由各地级以上市人民政府按照省人民政府有关规定确定,报省人民政府备案,并提前向社会公布。

县级人民政府根据禽流感等疫情防控的需要,可以向上级人民政府申请采取前款规定的措施。

第五条 活禽经营限制区内实行活禽集中屠宰、冷链配送、生鲜上市。

活禽经营限制区内不得新设立活禽批发市场,现有的活禽批发市场应当按照本省活禽经营市场建设标准进行建设改造。

地级以上市人民政府根据当地实际,可以在活禽经营限制区内规划设置1-3个活禽零售市场,规划设置的活禽零售市场应当符合本省活禽经营市场建设标准。

第六条 鼓励活禽经营限制区外的活禽经营市场按照本省活禽经营市场建设标准进行建设改造。

第二章 活禽经营管理

第七条 活禽经营市场的设置应当依据当地政府的经营范围规划,符合动物防疫等相关要求。

活禽经营市场的场地建设与设施配备应当符合有关标准,科学合理分区。活禽经营区域应当与其他农产品经营区域分开,活禽销售区、宰杀区、消费者之间应当实施物理隔离。

第八条 禁止在活禽经营市场外从事活禽经营活动。

进入活禽经营市场交易的活禽,应当附有动物检疫合格证明。

第九条 活禽经营市场开办者应当遵守下列规定:

(一) 确保经营场地建设和设施配备符合有关标准;

(二) 建立完善的经营管理制度,指导和督促经营者建立并执行进货查验、索证索票和进销货台账等制度;

(三) 建立经营者档案,记载经营者基本情况、进货渠道、信用状况等,并指派专人每天对活禽经营情况进行巡查;

(四) 设置活禽安全信息公示栏,及时向消费者公示活禽的检疫与产地等相关信息,进行消费警示和提示,接受社会监督;

(五) 查验进场交易活禽的动物检疫合格证明,防止不合格的活禽进入市场;

(六) 制止将未经宰杀的活禽带出零售市场或者将当天未售完的活禽滞留在零售市场等情形;

(七) 对活禽经营从业人员开展健康防护宣传,落实卫生管理要求和健康防护措施;

(八) 指导和督促活禽经营者进行清洁消毒,实施废弃物和病死禽只无害化处理和休市制度;

(九) 制定本市场的活禽疫病防控应急预案及人感染禽流感防控应急预案。发现活禽染疫或者疑似染疫的,依法向所在地动物卫生监督机构等部门报告,并采取相应控制措施;

(十) 配合有关部门开展人员疫情监测、环境监测、动物疫病监测等工作;

(十一) 法律法规规定的其他义务。

第十条 活禽经营者应当遵守下列规定:

(一) 经营经动物检疫合格的活禽,并在经营地点公示动物检疫合格证明;

(二) 建立并执行进货查验、索证索票和进销货台账等制度。从事活禽批发经营的,还应当记录销售的禽类及禽类产品名称、流向、时间、数量等内容;

(三) 每天收市后对活禽存放、宰杀、销售摊位等场所和笼具、宰杀器具等进行清洁消毒,并配合市场开办者实施废弃物和病死禽只无害化处理;

(四) 根据规定休市;

(五) 不得经营病死禽只;

(六) 配合有关部门开展人员疫情监测、环境监测、动物

疫病监测等工作;

(七)法律法规规定的其他义务。

第十一条 活禽经营从业人员应当按照有关规定接受健康防护知识教育,具备基本健康防护知识。

在进行活禽交易、运输和宰杀过程中,应当按照卫生主管部门的相关要求配备个人防护用品,采取必要的防护措施,并不得在经营档口内食宿。

活禽销售人员和宰杀人员应当有明显的区分标志,不得相互交叉。

第十二条 活禽批发市场内的经营者只能将活禽分销给活禽零售市场的经营者或者运至活禽屠宰厂(场)集中宰杀,其他采购者采购的活禽应当经过宰杀后方能带出市场。

活禽零售市场出售的活禽应当在市场内经过宰杀后方能带出市场。

活禽零售市场收市时,经营者对尚未售出的活禽应当予以宰杀处理,严格执行当日零存栏制度。

第十三条 活禽经营市场应当实行一日一清洁消毒、一周一大扫除、一月一休市制度以及废弃物和病死禽只无害化处理制度。

第十四条 为了保障公众健康和公共卫生安全,根据疫病疫情的预测和预警,以及对季节性发病规律的评估,地级以上市人民政府可以决定本行政区域内的全部或者部分活禽经营市场实行临时性休市。临时性休市的具体区域和时间由地级以上市人民政府卫生主管部门会同农业等有关部门提出,报本级人民政府审定后向社会发布公告。

在休市期间,活禽经营市场应当清空存栏,对经营场所、笼具、宰杀器具等进行清洁消毒。

第十五条 临时性休市期间,不得在活禽经营市场内外进行活禽交易,活禽经屠宰厂(场)集中屠宰后方可销售。

第三章 生鲜家禽产品生产经营管理

第十六条 活禽屠宰厂(场)的设置,应当依据当地政府的规划,符合用地、环保和动物防疫等要求,报地级以上市人民政府农业主管部门备案,并由地级以上市人民政府予以公示。

第十七条 活禽屠宰厂(场)应当建立肉品质量安全管理及可追溯体系,配合动物卫生监督机构开展屠宰检疫相关工作,实施禽肉品质检验、消毒、废弃物和病死禽只无害化处理、产品召回、溯源管理等制度。

活禽屠宰厂(场)出厂的生鲜家禽产品,应当附具动物检疫合格证明、检疫标志、肉品品质检验合格标志;产品标识上应当按照有关规定标明产品的品名、产地、生产者、生产日期、保质期等内容。

第十八条 活禽批发市场的代宰点应当按照有关建设标准设置,并配合动物卫生监督机构开展屠宰检疫相关工作。代宰的生鲜家禽产品应当附有批发市场名称、销售档口、联系电话等追溯标识。

第十九条 县级以上人民政府及有关部门应当支持活禽屠宰厂(场)与信誉好的家禽养殖企业和养殖户建立稳定供应关系,从源头上保证生鲜家禽产品质量安全。

鼓励实行家禽养殖、屠宰、销售一体化经营。

第二十条 生鲜家禽产品的储存、运输和销售等应当符合本省生鲜家禽产品加工经营卫生规范。

配送生鲜家禽产品应当使用符合标准的冷链专用车,所使用的交通工具、装卸工具以及相关工作人员应当按照规定进行消毒。

第二十一条 生鲜家禽产品经营者应当履行下列义务:

(一)有符合相关规定的场所和冷藏设备,确保生鲜家禽产品处于产品所必需的低温环境;

(二)采购符合要求的活禽屠宰厂(场)或者代宰点出厂的合格生鲜家禽产品,建立并执行进货查验、索证索票和进货台账等制度;

(三)所销售的生鲜家禽产品应当附有本办法第十七条第二款或者第十八条规定的标识;

(四)不得销售自宰、超过保质期、腐败变质等不符合有关标准和要求生鲜家禽产品;

(五)保持经营场所卫生整洁;

(六)法律法规规定的其他义务。

第二十二条 各级人民政府及其有关部门不得限制外地经检疫、检验合格的生鲜家禽产品进入本地市场。

第四章 安全风险防范

第二十三条 动物卫生监督机构依法对集中屠宰的家禽实施检疫,指导和督促活禽经营市场、活禽屠宰厂(场)落实病死禽只无害化处理相关工作。

第二十四条 食品药品监督管理部门应当对家禽经营市场开展食品安全监管巡查,指导和督促市场经营者建立并执行进货查验、索证索票和进销货台账等制度。

第二十五条 疾病预防控制机构应当对辖区内活禽经营市场、活禽屠宰厂(场)开展从业人员疫情监测、环境监测等工作。

动物疫病预防控制机构应当对辖区内活禽开展疫病监测。

卫生、畜牧兽医等部门应当建立疫情、疫病信息共享机制。一旦发现疫情或者疫病,应当立即启动应急机制,及时采取有效措施控制疫情或者疫病扩散。

第二十六条【联合执法】 县级以上人民政府应当根据需要组织公安、环境保护、市容环境卫生、农业、林业、商务、卫生、工商行政管理、食品药品监管、城市管理行政执法等部门对本行政区域内的家禽经营活动开展联合执法,依法查处违法行为,防范疫病风险。

第五章 法律责任

第二十七条 违反本办法规定,有下列行为之一的,由工商行政管理部门责令改正,对市场开办者处1万元以上5万元以下的罚款;对活禽经营者处1000元以上3000元以下的罚款:

(一)在活禽经营限制区内的市场违法从事活禽经营的;

(二)在休市期间从事活禽经营的。

违反本办法第八条第一款规定,在活禽经营市场外从事活禽经营活动的,由工商行政管理部门、城市管理行政执法部门根据各自职责,依照无照经营查处的有关规定处理。

第二十八条 违反本办法规定,有下列行为之一的,由市容环境卫生主管部门依照市容和环境卫生管理的有关规定处理:

(一)活禽经营者未落实清洁消毒措施的;

(二)活禽经营市场开办者和活禽屠宰厂(场)未实施废弃物无害化处理制度的。

第二十九条 活禽经营市场开办者违反本办法第九条第二、三、四、五、六项规定的,由食品药品监督管理部门责令改正,给予警告;拒不改正的,处5000元以上2万元以下的罚款。

活禽经营市场开办者违反本办法第九条第八、九、十项规定,不履行病死禽只无害化处理、疫情报告义务或者不配合动物疫病预防控制机构进行动物疫病监测的,由动物卫生监督机构依照《中华人民共和国动物防疫法》有关规定处理。

第三十条 活禽经营者违反本办法第十条第二项规定的,由食品药品监督管理部门责令改正,给予警告;拒不改正或者改正后不符合要求的,处1000元以上1万元以下的罚款。

活禽经营者违反本办法第十条第一、五项规定的,由食品药品监督管理部门依照《中华人民共和国食品安全法》有关规定处理。

活禽经营者违反本办法第十条第六项规定,不配合动物

疫病预防控制机构进行动物疫病监测的,由动物卫生监督机构依照《中华人民共和国动物防疫法》有关规定处理。

第三十一条 活禽屠宰厂(场)违反本办法第十六条规定,未报地级以上市人民政府农业主管部门备案的,由农业主管部门责令限期改正;逾期不改的,处1万元的罚款。

活禽屠宰厂(场)和活禽批发市场的代宰点违反本办法第十七条和第十八条规定的,由动物卫生监督机构、农业主管部门根据各自职责,依照《中华人民共和国动物防疫法》和《中华人民共和国农产品质量安全法》等有关法律法规的规定处理。

第三十二条 生鲜家禽产品经营者违反本办法第二十一条规定的,由食品药品监督管理部门依照《中华人民共和国食品安全法》等有关法律法规的规定处理。

第三十三条 行政机关及其工作人员在家禽经营管理中,滥用职权、玩忽职守、徇私舞弊的,对直接负责的主管人员和其他直接责任人员依法给予处分;涉嫌犯罪的,移送司法机关处理。

第六章 附则

第三十四条 本办法自2015年1月15日起施行。

解读《广东省家禽屠宰厂(场)设置指导意见》基本内容

为积极推进家禽集中屠宰、冷链配送和生鲜上市工作,切实规范家禽屠宰行为,保障家禽产品质量安全,经省法制办审定,12月15日,省农业厅印发了《广东省家禽屠宰厂(场)设置指导意见》(以下简称《意见》)。

1 关于《意见》起草的背景

1.1 目的意义 在全省推进家禽集中屠宰、冷链配送和生鲜上市工作是省委、省政府做出的重要决策,是件与时俱进、改善民生的大事、要事,也是一件重要的民心工程。《意见》作为《广东省家禽经营管理办法》的配套规范,将于2015年1月15日起施行。对家禽屠宰厂(场)在用地环保、防疫条件、设置规划、厂房布局、屠宰流程、检验检疫及监督管理等方面统一了标准,有利于全省各地区家禽屠宰场的规划设置和新建改造,有利于屠宰场的规范化、标准化和现代化建设,更有利于家禽企业的公平竞争、家禽产品的质量保障和行业的规范管理。

1.2 主要依据 《意见》的制定严格遵循《中华人民共和国动物防疫法》、《广东省家禽经营管理办法》(省政府令第206号)规定,同时参照《动物检疫管理办法》(农业部令2010年第6号)、《动物防疫条件审查办法》(农业部令2010年第7号)、《生鲜家禽加工经营卫生规范》(DBS 44/004-2014)、《家禽屠宰质量管理规范》(NY/T 1340-2007)、《肉类加工厂卫生规范》(GB12694-1990)和《生活饮用水卫生标准》(GB5794-2006)等,有理有据,科学规范。

1.3 制定程序 省农业厅通过充分的调研论证,草拟了《意见》(征求意见稿),广泛征求各地级以上市畜牧兽医(农业)部门和省直有关单位意见,并及时向社会公示征求意见,后

经专家认真讨论分析研究形成送审稿,经省法制办2次审查同意后由省农业厅印发实施。

2 关于《意见》的主要内容

2.1 关于适用范围 《意见》适用于推进家禽集中屠宰、冷链配送和生鲜上市区域内的家禽屠宰场设置工作。

2.2 关于屠宰场的选址要求 一方面,家禽屠宰场选址应当符合设区市人民政府的家禽屠宰专项规划,并符合城乡规划、土地使用、动物防疫条件和环境保护要求。另一方面,家禽屠宰场应建在地势较高、干燥、水源充足、交通方便、无有害气体、粉尘及其它污染物、便于污水治理排放的地区,且要远离人口密集区。

2.3 关于家禽屠宰场设置的基本条件 家禽屠宰场除了依法取得动物防疫条件合格证和依法办理污染物排放许可证外,还应在布局规划、厂房分区、屠宰流程、检验检疫、管理制度、质量追溯和无害化处理等方面符合《意见》的要求。

2.4 关于屠宰场的备案管理 新建的家禽屠宰厂(场)要报地级以上市人民政府畜牧兽医主管部门备案,并由地级以上市人民政府公示。对于已经设立的家禽屠宰厂(场),需要按照要求重新进行登记备案,并由地级以上市人民政府予以公示。

根据省政府第206号令,家禽屠宰厂(场)应当建立肉品质量安全管理及可追溯体系,配合动物卫生监督机构开展检验检疫等工作,实施禽肉品质检验、消毒、废弃物和病死禽只无害化处理、产品召回、溯源管理等制度。家禽屠宰厂(场)出产的生鲜家禽产品,应当附具动物检疫合格证明、检疫标志、肉品品质检验合格标志;产品标识上应当按照有关规定标明产品的品名、产地、生产者、生产日期、保质期等内容。

《广东省家禽屠宰厂(场)设置指导意见》

粤农[2014]336号

为切实规范家禽屠宰行为,保障家禽产品质量安全,根据《广东省家禽经营管理办法》(省政府令206号)等有关规定,结合我省实际,制定本《意见》。

一、《意见》适用于推进家禽集中屠宰、冷链配送和生鲜上市区域的家禽屠宰厂(场)设置工作。

二、推进家禽集中屠宰、冷链配送和生鲜上市的设区市,由其畜禽屠宰行业主管部门会同城乡规划、国土、环境保护等部门编制家禽集中屠宰专项规划,报本级人民政府批准后实施。

三、屠宰厂(场)设计和规划原则上参照《生鲜家禽加工经营卫生规范》(DBS 44/004-2014)、《家禽屠宰质量管理规范》(NY/T 1340-2007)、《肉类加工厂卫生规范》(GB12694-1990)执行。

四、家禽屠宰厂(场)的选址要求:

(一)家禽屠宰厂(场)选址应当符合设区市人民政府的家禽屠宰专项规划,并符合城乡规划、土地使用、动物防疫条件和环境保护要求。

(二)屠宰厂(场)选址应在地势较高、干燥、水源充足、交通方便、无有害气体、粉尘及其它污染物、便于污水治理排放的地区,远离人口密集区。

五、家禽屠宰厂(场)的设置条件和建设标准:

(一)依法取得动物防疫条件合格证;

(二)依法办理污染物排放许可证;

(三)有与屠宰规模相适应,水质符合《生活饮用水卫生标准》(GB5794-2006)的充足水源;

(四)工程设计和工艺流程布局合理,厂房和车间应根据生产工艺对清洁程度的要求合理划分作业区(可设立待宰区、屠宰加工区、无害化处理区和储藏区等)。建筑布局总体设计必须遵循健康、病害禽类隔离以及原料、产品、副产品、废弃物的转运互不交叉的原则,采取有效分离或分隔,预防和降低产品受污染的风险;

(五)各区之间应有明显的分区标志,可分为非清洁区、次清洁区和清洁区,设专门通道相连;

(六)屠宰车间内应有良好的通风、排气装置,能够及时排除污染的空气和水蒸气,空气排放符

合卫生标准要求;

(七)有符合国家规定要求的内脏处理间、检验室、冷藏或冷冻间,配备有动物卫生监督工作室;

(八)有符合家禽屠宰工艺要求的挂禽、宰杀、沥血、浸烫、脱毛、净膛、预冷等机械化或半机械化家禽屠宰设备及传输链,以及符合食品安全要求的冷藏运输车等运载工具;

(九)有符合国家规定要求的消毒设施以及符合环境保护要求的污水和污染物处理设施;屠宰场必须设有与生产能力相适应的检验检疫人员,应具备检验检疫工作所需的检验检疫室和相关设备,并有健全的检验检疫制度;

(十)有依法取得健康证明、符合岗位要求的生产加工人员,有经上岗培训的检验检疫人员;

(十一)有符合国家规定要求的病害家禽及其产品无害化处理设施;

(十二)有家禽屠宰管理、产品追溯和质量安全管理等制度。

前款第三项至第十一项所列条件应当与家禽屠宰规模相适应。

六、家禽屠宰厂(场)管理

家禽屠宰厂(场)的设置,应当依据当地政府的规划,符合用地、环保和动物防疫等要求,报地级以上市人民政府畜牧兽医主管部门备案,并由地级以上市人民政府予以公示。

已经设立的家禽屠宰厂(场),未登记备案的,应重新进行登记备案,并由地级以上市人民政府予以公示。

七、法律法规、国家标准和技术规范另有规定的,从其规定。

八、本指《意见》自2015年1月15日起施行,有效期3年。

广东省农业厅
2014年12月15日