

双月刊 1976年3月创刊
第38卷第1期 (总第167期)
2013年2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
广东省农业科学院畜牧研究所
广东省农业科学院兽医研究所
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 陈琴芬 舒鼎铭
孙彦伟 王贵平 蔡建平 王致富
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 黄旭钊 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:gdxmsykj@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。

·专题综述·

- 鱼类传染性造血器官坏死病检测方法研究进展.....杨映,陈进会,等(1)
复合佐剂的研究进展.....肖建雄,罗满林(5)
中国奶业面临的机遇与挑战.....王丁棉(8)

·畜牧技术·

- 广东省畜禽遗传资源保护工作的现状与思路.....陈敏锋,陈三有,等(12)
MC4R基因在猪育种中的应用.....杨岸奇,陈斌(14)

·兽医临床·

- 血清冻融次数对猪瘟抗体效价的影响.....钟锦辉,张海明,等(17)
猪瘟活疫苗(细胞源)两种免疫剂量使用效果对比.....
邹建灵,陈峰,等(20)
副猪嗜血杆菌分离鉴定及药敏试验.....黄美玲,袁远华,等(23)

·试验研究·

- 鸡Toll样受体在IBDV免疫中的作用研究.....卢宇,张娣,等(26)
一种适合检测养殖场环境中链球菌的PCR检测方法.....
王秋实,曹冶,等(30)
海南沿海羊栖菜和海带不同提取物的抑菌活性.....符家珠,杨宝,等(34)
4个厂家不同批次猪瘟疫苗免疫效果比较试验.....查云峰,任裕其,等(38)

·华南宠物园地·

- 我国宠物产业发展展望.....邹连生(41)
大生熊虫属缓步动物培养的初步研究.....张明辉,吴定娟,等(44)

·经验交流·

- 2012年生猪市场回顾及2013年形势展望.....虞华,虞丽娜(47)
一例人工驯养食蟹猴巴氏杆菌病的诊治.....陆红玉,冯子云,等(51)

·信息之窗·

- 2012“永顺杯”优秀论文评选启事.....(4)
欢迎订阅本刊.....(19)

# GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

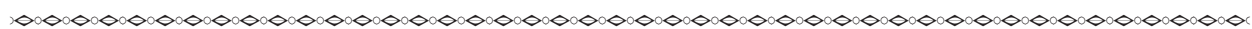
Established in march 1976(Bimonthly)

Feb.2013 Volume 38,Number 1 (Total No.167)

---

## Main Content

- Progress on Diagnostic Method of Fish Infectious Hematopoietic Necrosis of fish* .....  
.....Yang Ying,Chen Jinhui,et al(1)
- Advances in composite adjuvant* .....Xiao Jianxiong, Luo Manlin(5)
- Outlook of genetic resource protection of livestock and poultry*.....  
.....Chen Minfeng,Chen Sanyou,et al(12)
- Application of MC4R Gene in pig breeding*.....Yang Anqi, Chen Bin(14)
- The effect of multiple serum freeze-thaw cycles on the titer of antibody to Classical Swine Fever* ..  
.....ZhongJinhui,ZhangHaiming,et al (17)
- The Immunol efficacy comparison of Classical Swine Fever vaccine,live (tissue culture origin) with two  
kinds of immunizing doses*.....Zou Jianling,Chen Zheng,et al(20)
- Isolation, identification and drug Sensitive test of haemophilus parasuis*.....  
.....Huang Meiling, Yuan Yuanhua,et al(23)
- Effects of chicken Toll-like receptors in immunal response against infectious bursa disease virus* .....  
.....Lu Yu,Zhang Di,Zhang,et al(26)
- The rapid detection assay for the muramidase-released protein of streptococcus suis in the environment  
around the farm*.....Wang Qiushi,Cao Ye, et al(30)
- Comparison of antibacterial activity of different extracts of Hainan coast seichell and kelp*.....  
.....Fu Jiazhu,Yang Bao,et al (34)
- Vaccination results of different batches of live vaccines against Classical Swine Fever produced by four  
veterinary bio-pharmaceuticals* .....Zha Yunfeng,Ren Yuqi,et al (38)
- Outlook of pet industry in China*.....Zou Liansheng(41)
- Preliminary breeding research of macrobiotus tardigrada*.....Zhang Minghui,Wu Dingjuan,et al (44)



Sponsored by:Guangdong Association of Animal Husbandry  
and Veterinary Medicine,Institute of Animal  
Science and Institute of Vererinary Medicine,  
GuangdongAcademyof AgriculturalSciences.

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

Chief Editor:JIANG Zong-yong

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

# 鱼类传染性造血器官坏死病检测方法研究进展

杨映<sup>1,3</sup>, 陈进会<sup>2\*</sup>, 于辉<sup>1</sup>, 李华<sup>1</sup>, 颜其贵<sup>3</sup>

(1. 佛山科学技术学院, 广东 南海 528231; 2. 东莞出入境检验检疫局, 广东 东莞 523072;

3. 四川农业大学, 四川 雅安 625014)

**摘要:** 传染性造血器官坏死病是一种对鱼苗和幼鱼致死率极高的传染性疾病, 为口岸鱼类的一类检疫对象。研究表明该病已在全世界范围内蔓延, 各国学者对该病的预防和控制一直都十分重视。对传染性造血器官坏死病毒的了解和相关的预防措施, 已经在某种程度上预防和制止了该病流行, 但仍然未完全杜绝该病的发生。对该病的预防和控制离不开有效的检测手段, 本文从临床诊断、病毒分离、血清学、分子生物学方面进行阐述, 以期为该病的快速诊断方法研究提供参考。

**关键词:** 传染性造血组织坏死病毒; 检测方法; 研究进展

**中图分类号:** S853.31

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2013)01-0001-04

传染性造血器官坏死病(Infectious Hematopoietic Necrosis, IHN)是由弹状病毒科(Rhabdoviridae)诺拉弹状病毒属(*Novirhabdovirus*)的传染性造血器官坏死病毒(Infectious Hematopoietic Necrosis Virus, IHNV)引起的一种以发病鱼的脾脏和肾脏造血组织坏死为主要特征的急性、系统性疾病。主要危害虹鳟、大鳞大马哈鱼、红大马哈鱼、马苏大马哈鱼、河鳟、枇杷鳟、樱鳟等鲑科鱼类的鱼苗及当年幼鱼<sup>[1-4]</sup>,在2~3周内的死亡率可接近100%。致死率随着鱼种类、大小、病毒的种类以及环境条件的不同发生变化<sup>[5,6]</sup>。该病毒普遍存在于野生鲑鱼和养殖场内的鲑鱼,无脊椎动物也可能是自然界病毒的中间宿主。其传播广,最早流行于北美洲和欧洲一些国家,目前包括我国在内的全球很多地区都有流行<sup>[7,8]</sup>,对世界水产养殖业造成了巨大的经济损失。

IHNV的代表株是WRAC株(ATCC编码为VR-1392),其病毒粒子形态为弹状,直径80~90 nm,长度为160~180 nm,有囊膜,对热、酸、乙醚不稳定。该病毒为RNA病毒,遗传物质是不分节段的单股负链RNA<sup>[9]</sup>。在对IHNV长期的研究中,随着越来越深入地了解该病毒,已经在某种程度上能够预防和控制该病的流行,但生产中该病仍然时有发生。本文综合阐述了IHNV的临床诊断和实验室检

测技术的研究,为及早发现和诊断该病提供参考。

## 1 临床和病理诊断

患IHN的病鱼典型症状为厌食嗜睡、异常游动、眼突出、体色发黑、腹部积水,肛门处有不透明或棕褐色的假管型黏液粪便,鱼鳃苍白,鳍基部出血,在头部之后的侧线上方可以观察到皮下出血。该病爆发初期,稚鱼和幼鱼的死亡率突然升高,受感染的鱼时常有昏睡症状,游动缓慢或停止活动,少数则狂躁不安。对新鲜病料进行解剖可观察到肝脏、脾脏、肾脏、肠道等充血,鳃及内脏颜色变淡,腹腔内积有血样液体,胃内有乳白色液体,肠内充盈黄色液体<sup>[10]</sup>。垂死鱼特征性坏死发生于前肾和脾,在骨骼肌上也可看到病灶性出血,病灶样坏死存在于肝和胰腺组织,肠粘膜下层则有嗜酸性粒细胞浸润。垂死的鱼肾窦充血,最终肾脏衰竭而致死。显微镜检结果表明,肾脏、造血组织、胰腺、肠道和肾上腺皮质出现退化和坏死。常见病理变化是在肾脏中存在坏死的造血细胞,并引起肝、脾组织的细胞堵塞,而在某些胰腺组织中可看到变性和出血<sup>[11]</sup>。不同鱼类之间的病理变化差异明显,情况复杂,因此临床和病理诊断只能初步判断,确诊需要进一步的实验室检测。

## 2 病毒分离鉴定

细胞培养研究鱼类病毒可以减少隐性感染几

收稿日期:2012-12-05

\*:通讯作者

基金项目:2011年东莞市科技计划资助项目(2011108102047)

率和个体差异引起的误差,使试验结果更加准确。利用合适的鱼类细胞系分离增殖病毒,再通过抗体中和试验确认有无病毒是检测 IHNV 的典型方法。目前有多株细胞系可用于该病毒分离,常用的有 RTG-2、EPC、CHSE、FHM 等, IHNV 能在这些细胞系中生长,并引起特征性的细胞病变(CPE)<sup>[12,13]</sup>。传统的血清中和实验对于滴度较低的病毒感染很灵敏,但比较费时费力,通常在病毒感染很严重后才能出现阳性结果,不能满足快速检测的需要。

### 3 血清学诊断方法

#### 3.1 琼脂扩散试验(AGP)

可溶性抗原与相应抗体在半固体琼脂凝胶内扩散,二者相遇,在比例合适处形成白色沉淀。有单向琼脂扩散试验和双向琼脂扩散试验两种。琼扩试验操作简单,不需特殊仪器,费用低。但由于特异性和敏感性差,现在的诊断已很少采用。

#### 3.2 荧光抗体试验(FAT)

荧光抗体检测传染性造血器官坏死病毒是一种灵敏性高、特异性好的诊断方法,而且操作简单。冰冻组织切片或触片的直接荧光抗体试验被许多国家和地区作为法定的病毒诊断方法。Lapatra 等<sup>[14]</sup>采用了荧光抗体试验检测 IHNV 病毒,对不同地区不同年龄段的大马哈鱼进行了试验,认为其敏感性和特异性均非常好,且能在较短的时间内得到准确的诊断结果。

#### 3.3 酶联免疫吸附试验(ELISA)

常用的 ELISA 测定方法主要有 3 类:双抗体夹心法、间接法和竞争法测定抗原。Dixon 等<sup>[15]</sup>最早在 1984 年报道了用直接法测定细胞培养的 IHNV,可在 2 h 内获得结果。Daniel 等<sup>[16]</sup>应用双抗体夹心间接法对四种 IHNV 进行了检测,该方法对任何类型的 IHNV 检测均有效,整个试验可在 1 天内得到结果。赵志壮等<sup>[17]</sup>建立了双抗体夹心间接法,此方法的测定步骤中增加了 BALB/C 鼠抗血清做第二抗体,虽测定时间比直接法稍长,但酶标抗体可直接购买,免去了制备和鉴定标抗的复杂过程,在得到高效价的抗血清后,可对 IHNV 提供快速准确的诊断。

### 4 分子生物学诊断方法

随着科学技术的发展,分子生物学技术在诊断鱼病方面的作用越来越大,并显示出强大的生命力,成为在诊断 IHNV 方法上最准确最可靠的方

法,同时也是最有发展前景的诊断技术。

#### 4.1 普通反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术

目前,应用 RT-PCR 检测水产动物病毒的技术已经非常成熟,许多实验室都将该方法作为病毒检测的主要手段<sup>[18]</sup>。Chiou 等<sup>[19]</sup>根据 IHNV 的 N 蛋白基因设计一对引物,建立 RT-PCR 检测方法,该方法可对在福尔马林浸泡保存 2 年的组织样品进行准确检测。Bruchhof 等<sup>[20]</sup>根据病毒性出血败血症病毒(Viral Haemorrhagic Septicemia Virus, VHSV)和 IHNV 的 G 蛋白基因分别设计一对引物,对 RTG-2 细胞分离培养的两种纯病毒进行 RT-PCR 检测。该方法具有高度的特异性和敏感性,可在 8 h 内对 VHSV 和 IHNV 进行鉴别诊断。

#### 4.2 其它反转录聚合酶链式反应技术

巢式 PCR(Nested PCR)通过两轮 PCR 反应,使用两套引物扩增特异性的 DNA 片断。第二对引物的功能是特异性的扩增位于首轮 PCR 产物内的一段 DNA 片断。第一轮扩增中,外引物用以产生扩增产物,此产物在内引物的存在下进行第二轮扩增,从而提高反应的特异性。Alonso 等<sup>[21]</sup>根据 IHNV 的 G 蛋白基因设计了两对引物,对高滴度感染 IPNV 的细胞中的少量 IHNV 也能检测出来。试验证明该方法可检出比 IPNV 滴度低 1 000 倍的 IHNV 混合病毒液,因此该方法更加适合检测有 IPNV 干扰的样品。

荧光定量 PCR 技术<sup>[22]</sup>以其灵敏度高、特异性好,快速、准确等优点,在病原体的定性和定量检测等方面得到广泛应用。岳志芹等<sup>[23]</sup>选取 IHNV 的 N 蛋白基因保守序列,利用软件设计一对特异性引物和探针,建立了实时定量 RT-PCR 检测法。该方法检测灵敏度高,特异性试验中与鲤春血症病毒(SVCV)、病毒性出血性败血症病毒(VHSV)、传染性肝脏坏死病毒(IPNV)、草鱼呼肠孤病毒(GCRV)、流行性造血器官坏死病毒(EHNV)、EPC 细胞系、牙鲆的核酸均无反应,特异性强,且可以进行定量分析,在鱼病的快速检测上具有重要意义。Liu 等<sup>[24]</sup>建立了多重荧光定量 RT-PCR,根据 SVCV、IHNV 和 VHSV 区别较大的基因序列设计了三对引物,能特异性地检测出这三种病毒并进行区分,对 PFRV、IPBV 以及 GCRV 的检测均为阴性,这种检测手段同时适应于诊断和研究。

### 4.3 环介导等温扩增技术(LAMP)

PCR方法虽然灵敏度高、特异性好,是目前最精准的基因诊断方法,但是操作相对复杂,对仪器和人员要求较高,不适合基层或现场快速诊断。2000年日本学者Notomi公布了“环介导等温扩增反应”(Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP)检测技术<sup>[25]</sup>。该方法不仅特异性高,而且比PCR、Real-time PCR检测时间更短,1 h内在恒温条件下完成反应,对仪器的要求也不高,简便快捷,适合基层快速诊断,是一种非常有发展潜力的分子生物学诊断方法<sup>[26]</sup>。Gunimaladevi等<sup>[27]</sup>建立了诊断虹鳟鱼传染性造血器官坏死病的RT-LAMP检测法。根据IHNV的G蛋白基因,设计了两对外引物和两对内引物,在63℃条件下反应1个小时即可得到结果,实验结果证明该方法比传统的巢式PCR的灵敏度高10倍。

### 4.4 其它分子生物学诊断手段

Gonzalez等<sup>[28]</sup>应用一种由生物素和碱性磷酸酶标记的探针针对IHNV的病毒RNA进行斑点杂交检测。该方法可检测到4 pg的RNA,除了操作简单之外还能在6 h内得到诊断结果。刘斌等<sup>[29]</sup>采用原位杂交技术对组织切片中不同细胞,不同部位靶基因进行精确定位,检测IHNV,结果表明该方法特异性强、灵敏度高,是一种很好的水生动物病毒定位检测方法。吴斌等<sup>[30]</sup>利用IHNV的核蛋白基因,通过巢式PCR扩增出一条323 bp的片段, DIG标记为探针,建立了测定IHNV在病鱼体各组织中分布情况的原位杂交方法。原位杂交技术能确定IHNV在病鱼体内不同组织的分布情况。

传染性造血器官坏死病一旦爆发,将会给渔业生产带来重大的经济损失。通过简单实用的检测方法对IHNV进行确诊与监控,是防控该病恶化、蔓延的重要措施。至今,科研工作者们已经研究出多种针对该病的检测方法,但每一种方法都有一定的优点和不足。传统的方法虽然准确度较高,但操作繁琐费时,且敏感度较低;核酸检测方法能在较短的时间内较准确的检测出病原,但需要专业的技术人员和价格昂贵的精密仪器,都不适应基层实验室和渔场应用要求。LAMP方法除了高特异性、高灵敏度外,操作十分简单,对仪器设备要求低,简便快捷,适合基层快速诊断应用。

### 参考文献:

- [1] Follett J E, Thomas J B, Hauck A K. Infectious hematopoietic necrosis virus in moribund and dead juvenile chum, Oncorhynchus keta (Walbaum) and chinook, O. tshawytscha (Walbaum), salmon and spawning adult salmon at an Alaskan hatchery[J]. J Fish Dis, 1987 (10): 309-313.
- [2] Woo P T K, Bruno D W. Fish Disease and Disorders Volume 3: Viral, Bacterial and Fungal Infections[M]. New York: CAB International, 1999: 57-121.
- [3] Wolf K. Fish Viruses and Fish Viral Diseases[M]. New York: Cornell University Press, 1988.
- [4] Kent M L, Traxler G S, Kieser D, et al. Survey of salmonid pathogens in ocean caught fishes in British Columbia, Canada[J]. J Aquat Anim Health, 1998 (10): 211-219.
- [5] Wingfield W H, Nims L, Fryer J L, et al. Specificity of the sockeye salmon virus (Oregon strain) and its cytopathic effect in salmonid cell lines[M]. // Snieszko S F. A symposium on diseases of fish and shellfish. Washington, DC: Am Fish Soc Spec Publ, 1970: 319-325.
- [6] Chen M F, Aikens C M, Fryer J L, et al. Virulence of four isolates of infectious necrosis virus in salmonid fishes and comparative replication in salmonid fish cell lines[J]. Calif Fish Game, 1990, 76: 167-145.
- [7] Sanot, Nishimura, Okamoto, et al. Studies on viral diseases of Japanese fishes. VI. Infectious hematopoietic necrosis (IHN) of salmonids in the mainland of Japan[J]. J Tokyo Univ Fish, 1977, 63, 81-85.
- [8] 牛鲁祺, 赵志壮. 东北地区虹鳟 IHN 和 IPN 流行病学的初步研究[J]. 水产学报, 1988, 12 (4): 327-332.
- [9] Wolf K. Fish Viruses and Fish Viral Disease[M]. New York: Cornell University Press, 1989 (2): 476-493.
- [10] GB/T 15805.1, 淡水鱼类检疫方法第一部分[S].
- [11] 王光玉, 曲径, 徐仲, 等. 传染性造血组织坏死病病毒(IHNV)的危害, 检疫及防治[J]. 中国动物检疫, 2006, 23 (10): 34-35.
- [12] 世界动物卫生组织(OIE). 水生动物疫病诊断手册[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 45.
- [13] 赵志壮, 牛鲁祺. 中国本溪虹鳟一株弹状病毒的分离及初步研究[J]. 水生生物学报, 1994 (4): 348-353.
- [14] Lapatra S E, Roberti K A, Rohovec J S, et al. Fluorescent Antibody Test for the Rapid Diagnosis of Infectious Hematopoietic Necrosis[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1989, 1 (1): 29-36.
- [15] Dixon P R, Hill B J. Rapid detection of fish rhabdoviruses by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Aquaculture, 1984, 42: 1-12.
- [16] Medina D, Chang P, Bradley T, et al. Diagnosis of infectious hematopoietic necrosis in Atlantic Salmo salar by enzyme linked immunosorbent assay[J]. Dis

- Aquat Org, 1992(13):147-150.
- [17] 赵志壮, 牛鲁祺. 应用 ELISA 方法快速检测 IHNV-B 病毒[J]. 水产学报, 1993, 17(1):60-63.
- [18] 荆晓艳, 黄健, 张士瑾. 核酸检测技术在水产动物病毒感染诊断中的应用[J]. 动物医学进展, 2008, 29(9):95-99.
- [19] Chiou P P, Drolet B S, Leong J C. Polymerase Chain Amplification of Infectious Hematopoietic Necrosis Virus RNA Extracted from Fixed and Embedded Fish Tissue[J]. Journal of Aquatic Animal Health, 1995, 7(1):9-15.
- [20] Bruchhof B, Marquardt O, Enzmann P J. Differential diagnosis of fish pathogenic rhabdoviruses by reverse transcriptase-dependent polymerase chain reaction[J]. Journal of Virological Methods, 1995, 55:111-119.
- [21] Alonso M, Rodriguez S, Prieto S. Nested PCR improves detection of infectious hematopoietic necrosis virus in cells coinfecting with infectious pancreatic necrosis virus[J]. Journal of Virological Methods, 1999, 81:1-9.
- [22] Heid C A, Stevens J, Livak K J, et al. Real time quantitative PCR[J]. Genome Res, 1996(6):986-994.
- [23] 岳志芹, 刘蕊, 梁成珠, 等. 实时定量 RT-PCR 检测鱼类传染性造血器官坏死病毒方法的建立与应用[J]. 水生生物学报, 2008, 32(1):91-95.
- [24] Liu Z X, Teng Y, Liu H, et al. Simultaneous detection of three fish rhabdoviruses using multiplex real-time quantitative RT-PCR assay[J]. ScienceDirect, 2008, 149:103-109.
- [25] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12):63.
- [26] 赵飞, 邹为民. LAMP 法在水产动物病原快速检测中的应用[J]. 南方水产, 2007, 3(2):17-21.
- [27] Gunimaladevi I, Kono T, LaPatra S E, et al. A loop mediated isothermal amplification (LAMP) method for detection of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Arch Virol, 2005, 150(5):899-909.
- [28] Gonzalez M P, Sanchez X, Ganga M A, et al. Detection of the infectious hematopoietic necrosis virus directly from infected fish tissues by dot blot hybridization with a non-radioactive probe[J]. Journal of Virological Methods, 1997, 65:273-279.
- [29] 刘斌, 李海龙, 韩英, 等. 原位杂交技术在水产动物育种与疾病诊断中的应用[J]. 水产学杂志, 2011(2):53-56.
- [30] 吴斌, 孙铭英, 肇慧君. 应用原位杂交技术检测感染斑马鱼体内的传染性造血器官坏死病毒[J]. 中国科技信息, 2011(7):218-217.

## 2013“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 2013 年度“永顺杯”优秀论文。本刊将组织评委会专家进行评审,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 2014 年第 1 期公布。

1、**评选范围:**本刊 2013 年度 1-6 期发表的文章。

2、**评选数量:**优秀论文 16 篇,分设一等奖 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 20000 元,由广东永顺生物制药股份有限公司赞助。其中一等奖奖金 2000 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

2013 年 1 月 18 日

# 复合佐剂的研究进展

肖建雄, 罗满林\*

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 不断开发新型免疫佐剂, 尤其是复合佐剂, 是目前疫苗佐剂的主要发展趋势。根据疫苗生产应用的需要, 将单一佐剂复合搭配使用, 既可发挥各个佐剂的优点, 又有互相促进的作用, 达到明显增强免疫效果的目的。为适应生产和市场的需求, 复合佐剂对动物机体应无副作用, 安全有效。本文对复合免疫佐剂的研究现状和应用前景进行了综述, 以期对开发研制高效、低毒的复合免疫佐剂提供参考。

**关键词:** 复合佐剂; 疫苗; 研究

**中图分类号:** S852.5

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2013)01-0005-03

佐剂(Adjuvants)是一类非特异性免疫增强剂, 临床上常在疫苗免疫前单独接种或与疫苗混合后同时接种, 用以增强动物机体对抗原物质的免疫应答反应或改变其免疫应答类型, 特别是在二次免疫(二免)后, 其免疫的增强作用更加明显。实践证明, 疫苗与佐剂的联合应用, 不仅可以显著提高疫苗的免疫效果, 还可以减低动物机体的免疫耐受性。自1925年法国免疫学家拉蒙(Gaston Ramon)首次发现在疫苗中加入某些物质可以特异性地增强机体的免疫反应以后, 许多国家都积极地进行了这方面的研究<sup>[1-5]</sup>。目前我国常用的佐剂有铝盐、油乳、蜂胶、多糖、微生物、氟氏(FA)佐剂、 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )、白细胞介素(Interleukins, ILs)、免疫刺激复合物(ISCOMs)、糖苷及复方中药佐剂等, 新型免疫佐剂有核酸、CpG、补体、纳米、脂质体(LIP)等。

对免疫佐剂的不断深入研究发现, 选择合适的佐剂成为免疫效果增强的关键。研究表明, 单独使用抗原或仅应用某一种佐剂, 对改善抗原的反应强度、免疫力维持时间、免疫耐受等作用有限, 而使用复合佐剂的疫苗比使用单一佐剂的疫苗, 可以诱导更强的免疫反应, 因此, 将不同类型佐剂配合研制复合免疫佐剂成为佐剂发展的新趋势。目前已开发的多种复合佐剂, 如中西药复合佐剂, CpG-ODN和氢氧化铝复合佐剂等, 且其中有相当一部分通过动物试验, 证明复方佐剂比单一佐剂的免疫增强效果更好。在此着重对近年来复合免

疫佐剂的研究概况进行综述。

## 1 复合佐剂的研究概况

### 1.1 复合中药佐剂

大量研究资料证明, 中药复方可作为佐剂, 具有调节各种免疫细胞活性、细胞因子和抗体水平的作用, 能促进特异性免疫活性细胞产生、免疫器官发育、红细胞免疫作用等功能, 从而增强疫苗的免疫效果。复方中药作为免疫增强剂, 无论是单独使用或与疫苗的联合使用, 都能够显著提高抗体效价。曹国文等<sup>[6]</sup>以枸杞子、菟丝子等多味中药研制而成的免疫增强剂中药复方, 拌料饲喂鸡传染性法氏囊强毒(IBDV)攻毒后的鸡, 试验证明, 复方中药能显著增强机体的免疫抵抗力; 陈德坤等<sup>[7]</sup>以黄芪、党参及淫羊藿等中药的提取物制成为复合佐剂, 研究其对新城疫II系疫苗的佐剂效应, 结果表明, 疫苗与复合佐剂的联合应用可显著提高免疫鸡的抗体效价及维持时间; 肖琛闻等<sup>[8]</sup>将玉屏风散、四君子汤以及两者之合方玉风君子汤用于鸭疫里氏杆菌灭活苗中, 比较其免疫佐剂效果, 结果表明在免疫后3周, 合方组能够显著提高鸭抗鸭疫里氏杆菌的抗体水平, 且对鸭生长没有任何负面影响。

### 1.2 西药复合佐剂

氢氧化锌[Zn(OH)<sub>2</sub>]是一种无机纳米粒子, 是不溶于水的两性化合物, 可吸附蛋白抗原, 并具有较强的免疫佐剂效应。低分子量透明质酸(Low molecular weight hyaluronic acid, LHA)是一个内源性危险信号分子, 可作为免疫刺激剂。施建

收稿日期: 2012-10-10

\*: 通讯作者

东等<sup>[9]</sup>在甲肝、乙肝混合抗原中加入不同配比的氢氧化锌和低分子量透明质酸制成复合佐剂,经皮下免疫 ICR 小鼠,结果表明 LHA 与氢氧化锌按一定剂量配比混合后,甲肝、乙肝混合抗原能诱导体液免疫应答,且在一定剂量、范围和时间,诱导的免疫增强效应及抗体持续时间优于铝盐佐剂。也有相关研究表明硫酸乙酰肝素与氢氧化锌联合佐剂能有效诱导小鼠增强对 HBsAg 的特异性反应,诱导小鼠增强对重组 HCV 抗原多肽表位疫苗的体液免疫应答<sup>[10,11]</sup>。

目前对维生素 E 和硒的研究很多,维生素 E 能够促进免疫球蛋白(Ig)的合成,从而提高机体的抗病能力。在猪瘟兔化弱毒苗的免疫佐剂效果研究中,分别以亚硒酸钠免疫佐剂和含硒和维生素 E 的复合佐剂进行试验,结果单独添加亚硒酸钠免疫佐剂,或添加维生素 E 和亚硒酸钠的免疫效果明显优于不添加亚硒酸钠的免疫佐剂组。

### 1.3 中西药复合佐剂

中药与西药联用,具有相互协同、相互促进,减低副作用等优点。如中西药复合佐剂作为免疫增强剂在防治仔猪白痢上已有报道<sup>[12]</sup>。

黄芪多糖能有效地提高巨噬细胞活性,促进 T 细胞、B 细胞、NK 细胞等免疫细胞的功能,还有调节血糖、延缓细胞衰老等作用。黄芪、灵芝、麦饭石、甘草等中药和黄芪多糖、玉米花粉多糖、银耳多糖等植物性多糖均被证明有促进和调节免疫功能的功效<sup>[13]</sup>。黄芪多糖与其它药物配伍,可显著提高抗应激反应能力。拟胸腺素药物和左旋咪唑可抑制 T 细胞分泌可溶性免疫抑制因子(SIRS),从而加强抗原递呈细胞(APC)的抗原递呈作用,增强细胞免疫应答。在吕殿红等的研究中,以具有补益功能的黄芪等结合维生素 E 和左旋咪唑(Levamisol, LMS)配制成两组复方免疫增强剂,研究其对鸡免疫抗体的影响。结果表明中西药联合使用具有免疫促进作用,可充分发挥各自的优势<sup>[14]</sup>。

### 1.4 复合黏膜免疫佐剂

黏膜免疫是机体防卫消化道和呼吸道及泌尿生殖道感染的第一道防线,因其极其重要而受到特别关注。目前已开发出多种黏膜佐剂,如大肠埃希菌不耐热肠毒素(LT)、霍乱毒素(CT)、细胞因子、脂质体(LIP)、胞壁酰二肽(MDP)、植物血凝素和微胶囊等<sup>[15]</sup>,但由于存在黏膜屏障,单纯可溶性的抗原经黏膜免疫很难激发黏膜免疫应答,必须

辅以合适的黏膜佐剂。

CpG DNA 是一些具有免疫激活功能,以未甲基化的 CpG 基序为核心的 DNA 序列,它包括了人工合成含 CpG 基序的 CpG 寡核苷酸(ODN)和自然界中低等生物的基因组 DNA。非甲基化的 CpG ODN 作为一种信号分子,可通过特定的 Toll 样受体 9 (TLR9)介导的信号级联反应,诱导并增强天然免疫和获得性免疫效果<sup>[16]</sup>。CpG ODN 在体内不稳定且半衰期较短,若与其他佐剂协同应用,不但能促进 APC 对 CpG 的摄取,还可增强其在体内的稳定性,从而更好地发挥 CpG 免疫激活作用。南京农业大学以 CpG DNA 和胆酸钠按质量比为 5:2 混合或配合制成复合佐剂,用于禽流感灭活抗原的鼻腔免疫,实验证明复合佐剂配合禽流感灭活抗原能够有效提高黏膜局部免疫和全身体液免疫力,为禽流感的预防提供了一条较理想的免疫途径<sup>[17]</sup>。

### 1.5 其他复合免疫佐剂

ISCOM(Immunostimulating complex)即免疫刺激复合物。它是一种有较高免疫活性的脂质小体,大小为 30~40 nm,每个 ISCOM 约含 10~12 个抗原蛋白分子。具有疏水性长尾的抗原能够与 ISCOM 相结合形成较大的抗原聚集体,表现很强的免疫激发作用。ISCOM 能活化免疫系统的所有 3 种抗原特异性淋巴细胞<sup>[18]</sup>,可以迅速激活机体的细胞免疫应答和体液免疫应答。能诱导产生高效价抗体,且持续时间长。诱导的特异性抗体多为 IgG1、IgG2a、IgG2b 及 IgG3,提高 MHC I 分子在 APC 中的表达,诱导产生 IL221、IL222 及 IFN2 $\gamma$ 。

铝盐佐剂,主要激活 Th2 型(Th2 型主要产生 IgG1、IL-4、IL-5 等)免疫应答,产生很好的免疫反应,尤其在二次免疫中免疫增强效果更加明显。人工合成的含 CpG 基序的寡核苷酸,主要诱导 Th1 型为主的细胞免疫应答。研究报道将 Al(OH)<sub>3</sub> 佐剂与 CpG ODN 佐剂制成复合佐剂,可产生协同效应,增强疫苗免疫效果<sup>[19-21]</sup>。

聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)、明胶是目前广泛应用于缓释微球制剂的载体材料,具有安全、无毒副作用,生物相容性好,引起机体持续的免疫应答,可在体内降解等优点。据报道,PLGA 能有效降低接种疫苗的次数<sup>[22]</sup>,因此生物可降解微球作为疫苗佐剂也备受关注。高飞艳等<sup>[23]</sup>对生物可降解微球作为 HPV-E7 蛋白免疫佐剂的研究中,以不同的佐剂免疫 C57BL/6 小鼠,结果生物可降解微球



佐剂组比铝盐佐剂组和胞壁酰二肽组产生抗体水平明显升高, 并预测微球佐剂可诱导较强的体液免疫。目前有关微球的研究主要集中在处方及制备工艺的优化方面, 这也为复合免疫佐剂的研究提供了一种新方向。

## 2 研究前景与展望

理想的佐剂要求广谱、安全、高效, 同时便于生产和使用, 价格低廉。目前可使用的佐剂种类很多, 但除了引起所需要免疫刺激作用外, 它们自身也存在一定局限性, 如 ISCOM 只有与那些含疏水基团很多的抗原或免疫原才能形成复合体; 油佐剂存在黏滞性、稳定性及注射局部反应等问题; FCA、MDP、LPS 具有很强的副作用; CpG-DNA 可引起 TNF 敏感的小鼠直接致死, 引发自身免疫性疾病, 诱导促炎性因子的产生; 多数细胞因子活性易受内环境的影响。在临床使用中, 某些佐剂也存在诸多问题, 引起接种动物局部炎症、肉芽肿或无菌性脓肿, 接种动物出现不适、发热、佐剂性关节炎等全身反应。此外生产工艺、制剂稳定性、价格、保存方法等因素, 也不同程度地限制了各种佐剂的使用。

虽然人们对复合佐剂的研究很多, 效果也是确实的, 但在免疫增强效应方面, 不同复合佐剂的免疫佐剂效果不同, 同一复合佐剂与不同抗原的最佳剂量、配比也不同, 这样为复合佐剂提供了巨大的研究空间, 势必促进复合佐剂的研究不断走向深入, 应用前景更加广阔。

### 参考文献:

- [1] Moser C, Jon D, Martin T, et al. A recombinant classical swinefever virus stably expresses marker gene [J]. *J Virol*, 1998, 72(6): 5318-5322.
- [2] William E P. *Fundamental immunology* [M]. 4th ed. New York: Lippincott Raven, 1988: 1387-1427.
- [3] Cooper P D, McComb C, Steele E J. The adjuvant activity of Algamulin, a new vaccine adjuvant [J]. *Vaccine*, 1991, 9(6): 408-415.
- [4] Dotsika E, Karagouni E, Sundquist B, et al. Influence of quillaja saponaria triterpenoid content on the immunomodulatory capacity of Epstein Barr virus ISCOMs [J]. *Scand J Immunol*, 1997, 45(3): 261-265.
- [5] Jun-ling Sun, Yuan-liang Hu, De-yun Wang, et al. Immunologic enhancement of compound Chinese herbal medicinal ingredients and their efficacy comparison with compound Chinese herbal medicines [J]. *Vaccine*, 2006, 24(13): 2343-2348.
- [6] 曹国文, 陈春林, 戴荣国, 等. 中药免疫增强剂抗鸡传染性法氏囊病毒感染试验 [J]. *中兽医医药杂志*, 2007, 26(6): 39-40.
- [7] 陈德坤, 李俊生, 党岩, 等. 中药佐剂对提高新城疫 II 系疫苗免疫效果试验 [J]. *中国兽医科技*, 1998, 28(11): 23-24.
- [8] 肖琛闻, 鲍国连, 韦强, 等. 中药方剂对鸭疫里氏杆菌疫苗的免疫佐剂作用 [J]. *畜牧与兽医*, 2010, 42(4): 76-78.
- [9] 施建东, 胡凝珠, 赵蕊蕊, 等. 氢氧化锌与低分子量透明质酸复合佐剂对甲肝乙肝联合抗原的体液免疫增强作用 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2012, 25(1): 29-31, 35.
- [10] Evangelista M, Zigmond S, Boone C. Formins signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments [J]. *J Cell Sci*, 2003, 116(Pt13): 2603-2611.
- [11] Tsuboi S, Takada H, Hara T, et al. FBP17 mediates a common molecular step in the formation of podosomes and phagocytic cups in macrophages [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(13): 8548-8556.
- [12] 赵四喜, 樊斌堂. 中西药与免疫佐剂对仔猪白痢的影响 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 1994(4): 19-21.
- [13] 王刚, 张毓金, 黄忠, 等. 复方免疫增强剂对鸡新城疫和传染性腔上囊病疫苗免疫效果的影响 [J]. *中国兽医科技*, 2000, 30(10): 21-22.
- [14] 吕殿红, 王刚. 复方免疫增强剂对鸡新城疫和传染性腔上囊病疫苗免疫效果的影响 [J]. *中国兽医科技*, 2000, 30(10): 21-22.
- [15] Krieg A M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects [J]. *Annual Rev Immunol*, 2002, 20: 709-760.
- [16] 张小飞, 杨倩. 复合黏膜免疫佐剂对鸡小肠细胞免疫的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(1): 85-90.
- [17] 南京农业大学. 用于禽流感灭活抗原的鼻腔免疫复合佐剂 [P]. 中国: 200710024385. 5, 2007-12-12.
- [18] Brewer J M, Alexander J. Cytokines and the mechanisms of action of vaccine adjuvants [J]. *Cytokines Cell Mol Ther*, 1997, 3(2): 33-46.
- [19] 祁淑红, 杨桂梅, 谢匡成, 等. Al(OH)<sub>3</sub> 和 CpG ODN 免疫佐剂对丙型肝炎病毒多表位抗原 PCX3 疫苗免疫效果的影响 [J]. *复旦学报*, 2009, 48(5): 661-667.
- [20] Weeratna R D, Brazolo Millan C L, McCluskie M J, et al. Priming of immune response to hepatitis B surface antigen in young mice immunized in the presence of maternally derived antibodies [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2001, 30(3): 241-247.
- [21] Davis H L, Weeratna R, Waldschmidt T J, et al. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen [J]. *J Immunol*, 1998, 160(2): 870-876.
- [22] Clawson C, Huang CT, Futalan D, et al. Delivery of a peptide via poly acid nanoparticles enhances its dendritic cell stimulatory capacity [J]. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2007(6): 651-661.
- [23] 高飞艳, 刘会玲, 杨燕, 等. 生物可降解微球作为 HPV-E7 蛋白免疫佐剂的研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2011, 11(12): 2211-2214.

# 中国奶业面临的机遇与挑战

王丁棉

(广州市奶业管理办公室, 广东 广州 510405)

中图分类号: S8-1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)01-0008-04

由于奶业对人类营养需求的贡献及对社会经济发展的强劲拉动效应,在许多国家得到高度重视,甚至已把它列为农牧业的一个支柱产业来发展。中国奶业产业化发展起初较迟,但大有后来者居上之势。近20年来,全球的奶业发展已明显放缓了速度,而中国则在这一时期创造了一个辉煌的高速发展时期。中国的改革开放,也带来了中国奶业的蓬勃发展,时至2005年,中国贫奶国的帽子已被摘掉并一跃成为全球第三个产奶大国。

在全球经济一体化的发展背景下,中国的牛奶市场已基本不存在任何商业“国界”,巨大容量和非常活跃的奶业市场,吸引了众多跨国公司、外资和洋品牌云集中国市场。三聚氰胺事件后,中国的乳品行业发生了信用危机,“洋奶粉”、“洋牛奶”趁虚而入瓜分市场,国内企业的婴幼儿奶粉市场已经失守,市场的主动权与定价权已丢失,中国的乳品行业遭到了前所未有的市场竞争压力与挑战,在危机、压力、挑战面前,中国乳品行业今后的路该怎么走?如何突破目前困局?这是中国奶业值得深思的问题。

## 1 中国奶业发展基本状况

### 1.1 中国奶业发展的三个阶段(发展三段论)

**1.1.1 放任自由发展阶段** 中国奶业,在上世纪末之前,基本上是处在放任自行发展的状态。据中国奶业统计资料记载,1949年新中国成立之年,全国的牛奶总产量仅有20万吨,奶牛存栏约为12万头,人年均占奶量仅有0.3公斤。之后,经过半个世纪的发展,至1999年,全国牛奶总产量已有30多倍的增长,达到717.6万吨,人年均占奶量已提至5.7公斤。

**1.1.2 产业化高速发展阶段** 中国奶业走产业化发展是在2002年之后近10年的事情,其标志

是农业部已从官方将奶业视为一个独立的专门的产业并相继有专门的产业配套政策或发展规划出台。但就整个行业的发展速度而言进行时段划分的话,应将从1990年至2010年这20年的期间划分为一个“快速发展时期”。这一时期或发展阶段每年的奶业增长率分别是:牛奶12.68%,奶牛9.39%。其中1998年至2008年10年间发展最快,1998年的牛奶总产量662.9万吨,奶牛存栏426.5万头,人年均占奶量5.3公斤;2008年的牛奶总产量3555.8万吨,奶牛存栏1233.5万头,人年均占奶量27公斤。这10年年均牛奶产量增长率17.4%,年均奶牛存栏增长率9.98%。

**1.1.3 缓慢发展阶段** 自2008年9月发生了三聚氰胺事件后至今这4年,中国奶业的发展速度有明显放缓。2012年全年的牛奶生产总量估计会有3825万吨,奶牛存栏为1420万头,人年均占奶量约为27.3公斤;这4年是危机事件后的市场恢复期,牛奶总产量的年均增长率只有1.29%,2008年为0.87%,2009年为-0.98%,2010年为1.56%,2011年为2.1%,2012年为1.5%;奶牛存栏的年均增长率为4%;4年来的人年均占奶量几乎没有发生变化,仅稍微提升了0.3公斤。2012年全球的总奶量约为7.49亿吨,人年均占奶量约为107公斤,中国人口占全球人口21%,而牛奶总产量仅占全球的5%,人年均占奶量也只有全球水平的25.5%。

### 1.2 中国奶牛养殖业已经失去成本优势

中国虽是第三个产奶大国,但它还不是一个奶业强国。中国的奶牛养殖规模程度偏低,100头存栏以上的规模牧场仅占1/3;年单产奶水平较低,约为5吨;机械化程度不高和社会化服务体系不健全。北京、上海及一些大型牧场的年

单产水平虽已突破 8 吨,但饲养成本偏高,实际利润偏低,中国的奶牛养殖成本优势已不存在,奶收购价格已大大高出全球平均价格。2012 年全球的牛奶收购平均价格,按《荷斯坦》对欧美亚洲等 20 个国家 2012 年 6~10 月份的奶价调查,每公斤为 3.24 元(折合为人民币)。中国的奶源价格,根据北京东方戴瑞乳业信息咨询公司对全国 28 个省 28 个规模牧场的定点跟踪调查,每公斤为 3.90 元(6 月份的平均奶价每公斤为 3.85 元,7 月份为 3.83 元,8 月份为 3.83 元,9 月份为 3.91 元,10 月份为 4.06 元),6~10 月份奶收购价虽提升了 0.21 元/公斤,但它的涨价率也有 5.5%;若按中国农业部提供的 750 个养殖户定点监测的数据,1~9 月份平均奶价每公斤只有 2.98 元。若将全国的大牧场及广东牧场的高奶价与全国非规模牧场的奶价进行平均计算,2012 年中国的平均奶价应该在每公斤 3.40~3.50 元。这个价位在全球排列中已进入前五甲之榜,日本为价高首位(7.20 元),韩国排行第二(5.70 元),挪威列榜第三(4.90 元),中国紧跟其后排列第四。由于奶源生产供给存在缺口,中国近二、三年来每年还得从国外进口 60 万~90 万吨的奶粉及其它奶制品弥补。

### 1.3 中国乳品加工概况

在乳品加工方面,中国的乳品加工工艺和生产设备均不落后于欧美发达国家。目前全国拥有 726 家乳品加工企业,其中有 120 多家取得婴幼儿配方奶粉生产资格。全国的乳品加工业生产总值在 1998 年时为 83.33 亿元人民币,至 2009 年,是年的乳品加工业生产总值已提升至 1 668.11 亿元人民币,年均增长率高达 31.31%。2011 年全国乳品加工业总产值为 2 361.3 亿元,预计 2012 年将会突破 2 400 亿元,当然,这其中还包含通胀因素。由于市场竞争激烈和原料涨价造成产品成本上升,亏损的企业已接近 40%。

### 1.4 中国的牛奶消费市场状况

中国的牛奶消费已在逐年提高,饮奶群体也在逐年扩大。但在乳产品消费选择上,近三、四年来有倾向洋品牌的趋势,消费者对洋奶粉“情有独钟”,故洋奶粉进口剧增,国内使用还原奶粉的企业更是越来越依赖进口奶粉,销售渠道上的代购、

网购洋奶粉的生意十分活跃且在不断扩大。国内乳品企业对消费者所持有的“不懂得、不信任、不敢买”这三不政策感到很无奈。

## 2 中国奶业存在的问题与危机

中国奶业在近十多年来的超常规快速发展当中,曾发生和带来许多问题,包括质量安全问题、产业结构调整未到位、乳品企业只注重市场而轻视牧场等。目前存在的问题与危机,可以说是多方面的,例如:优质牧草与奶牛养殖业同步发展问题,奶业体制与发展方向和牧场经营模式问题,奶牛疾病防控与消费引导及市场培育问题,乳企自建牧场与社会专业化分工养殖问题,牧场社会化服务体系建设问题,市场竞争秩序问题,消费者的消费选择与消费引导问题,与国际品牌同场竞争的市场风险问题,奶业平台上市融资问题,贴牌生产(代加工)流行成风问题,行业利润下滑与经营效益差等方面问题。这些问题,每一个都有可能成为中国奶业发展的危机风险点或诱因。就危机分析来看,目前最大的风险危机是来自行业的信用危机,即消费者对乳品行业及国产奶制品的不信任;其次是奶粉市场及定价权的丢失。

## 3 中国奶业所面临的十二大挑战

随着中国的国民经济发展和人民生活水平的提高,市场对牛奶的需求将越来越多,人们对牛奶的质量安全要求也会越来越高。这对中国奶业界来说,既是一个机遇也是一个挑战,更添加一份压力。要将上文提及的问题较好地化解掉,这需要智慧和勇气。中国奶业发展由于基础仍薄弱,加之当前所面临的行业信任危机及洋奶粉夹击和一些深层次问题的困扰,它所面临的挑战是严峻的。中国奶业所面临的挑战归纳起来有如下几个方面:

### 3.1 观念挑战

包括奶农传统的奶牛养殖观念与现代养殖观念的挑战和乳品企业纷纷借“洋道”行走“曲线”救市的观念等。

### 3.2 价格挑战

新鲜牛奶与还原奶同价销售,彰显不出巴氏鲜奶的“英雄本色”;牛奶的卖价不如水价。

### 3.3 奶源质量挑战

上海光明乳业当家人郭本恒总裁说过:“中国乳品工业水平已达世界最高水平,而唯一的差

距就在奶源”。奶源质量是中国奶业发展的一块“心疾”。

### 3.4 质量标准挑战

奶源蛋白指标 2.8%、菌落总数 200 万 /mL, 汞含量没有具体指标。有人对此评议, 是全球最低标准, 笔者认为不为过。

### 3.5 养殖规模挑战

从原来平均 5~6 头的养殖模式, 向 100~300 头的家庭规模牧场转变, 奶农户遇到资金缺乏, 融资困难。

### 3.6 单产和需求挑战

未来几年市场年牛奶需求量超 7 000 万吨, 奶源缺口如何解决? 目前平均产奶水平为 5 吨 / 头左右, 在此基础上如何提高 1~2 吨, 养殖技术水平能否跟得上或相适应?

### 3.7 疫病挑战

结核病、布鲁氏菌病、流行热, 甚至是口蹄疫等奶牛疫病时有发生, 给牛群健康带来巨大威胁。虽然已使用相关疫苗, 但一些地方牧场仍无法有效控制疫病; 奶牛的健康状况, 也会影响奶源的质量与安全。

### 3.8 低效率与高成本挑战

国内 1 000 头规模牧场, 配置员工 30~50 人, 人均养殖 20~30 头, 而国外的人均养殖水平超过 100 头。效率与效益低下, 而饲料成本及养殖人工工资在不断上涨。

### 3.9 环保挑战

即使是中国现有的 1 420 万头奶牛, 一年产下的近 2.3 亿吨的粪尿及超亿吨的污水, 这本身就是一大污染源。而目前我国大部分牧场“三废”治理尚难达到环保要求, 若要达标, 需要高额投入。是花钱去治理还是任其污染下去?

### 3.10 优质牧草有效供应挑战

中国的养殖业与种植业未能同步发展, 历来重养轻种, 本土牧草与饲料资源未能最大限度地利用。2011 年中国的苜蓿草总产量大约有 30 万吨, 而进口总量则达 27.6 万吨, 比例几乎接近 1:1。虽即如此, 每头成母牛一年的苜蓿草平均采食量也只有 80 公斤。我国北方的草原与新西兰和澳洲的草原有天壤之别, 要在草原上推行大规模放养奶牛不可行。加拿大、美国、巴西乃至欧盟多

国, 他们依赖足够的土地种植牧草使饲料供应有保障。中国人多地少, 在未来 5~10 年内奶牛存栏可能就会翻一番, 届时一年所需的牧草饲料将达到 4 亿~5 亿吨, 量如此大的牧草市场需求如何解决? 这本身就是一个极大的挑战。

### 3.11 规模化挑战

目前中国奶牛养殖大约有 65%~70% 的奶牛分散饲养, 平均每户养殖规模不足 10 头。要发展成每场(户)100 头以上的家庭牧场, 难度相当大。

### 3.12 规避风险与提高效益挑战

现在这种经营与发展模式, 仅是发展阶段的一种过渡形式, 它还不是中国奶业发展的最好模式。因养殖技术不高, 产奶量不高, 养殖成本高而难有多大的提高或突破。

## 4 发展机遇

关于中国奶业如何发展? 向来对中国奶业较为关注和颇有研究的北京普天盛道企业策划公司的雷永军先生认为“中国乳业最大的发展机会在于模式创新。液态奶最大的挑战在于奶源及其质量的控制; 奶粉最大的挑战是定价权和市场话语权的收复”。雷先生的观点笔者非常认同。以下的几个焦点问题还是很值得提出来一并讨论。比如说, 乳品企业是否有必要做大做强, 重点发展北方奶源主产区并施以政策倾斜有无必要, 巴氏鲜奶发展为什么会受到冷落而常温奶则席卷全国市场? 还有, 就中国奶业目前存在的行业失和、奶农失利、养殖规模失控, 以及一些大型企业的发展宗旨及目标基本上都寄托在“国家政策支持、广告效应和上市融资”这三大稻草上等。这些问题, 若不有效化解, 行业的危机有可能从中而萌发。危机还蕴涵着机遇, 有“危”就必有“机”。中国奶业虽然存在着这样那样的问题乃至是风险与危机, 但它同样是蕴藏着乃至释放出许许多多的发展机遇。这些发展机遇的基础或载体主要体现在如下几个方面:

### 4.1 社会环境

(1) 政局稳定, 受到国家的产业政策支持, 政策利好, 有利于奶业行业发展。(2) 人们的饮奶习惯已基本形成, 每年还拥有 1 500 万左右的新生婴儿出生, “饮奶一族”队伍越来越壮大。

### 4.2 行业发展前景远大

国家发改委与工信部在 2012 年初发布的《食

品工业“十二五”发展规划》中提出的目标显示,至2015年中国的原料奶产量要达到5 000万吨,即在“十二五”期间中国的总产奶量需要增长33.4%。若到了2020年中国全面实现小康社会之时,中国的原料奶生产总量将翻一番。

#### 4.3 市场需求空间大

中国是最具潜质的牛奶消费市场。目前的人年均牛奶消费量连世界人均水平的1/3还不到,离每人每天1斤奶的“梦目标”距离更远。拥有市场空间,就存发展动力。

#### 4.4 市场环境好

中国政府此前已对奶业行业的不良秩序实施整顿,生产经营规模过小过散的中小企业已被清场出局,市场准入与行业准入的门槛已经抬高。市场秩序经过整肃与净化后,已开始趋向良性运行。

#### 4.5 奶业投资环境宽松

上游的养殖业不设规模存栏上限,乳品加工也不设生产规模上限。

#### 4.6 交通网络越发完善与发达

城镇化速度在加速,中国的牛奶市场将会由此得到扩充与延伸,三、四线市场即将受到开启。

#### 4.7 牛奶消费有强大的动力

在中共十八大会议上,党向全国人民许下承诺,要提高人民的健康水平和到2020年中国的国民收入要翻一番。因此,人民的生活水平及其购买力将有大幅提升,随之会对牛奶的消费有较大的拉动。

#### 4.8 政府对乳品行业实行严管政策

对犯错企业将会列入“黑名单”予以公示,迫使乳品企业更加守法经营,行业的氛围将会越来越“温和”,商机、生机盎然,更有利于行业的发展。

### 5 在挑战与机遇面前中国乳品行业的一些应对策略

国内外的奶业环境对中国奶业发展的影响,既有压力也有动力,所带来的发展机遇与挑战是两者并存的。问题是,在这样的情景下,中国的乳品行业该以一种什么姿态和采取一些什么对策来加以应对?笔者认为,应该抓住或针对中国奶业发展中最重要的一些问题,提出相应的解决思路与办法。总体上要采取逆市而动,顺势而进的发展决

策。目前当务之急是要确实妥善地解决好消费者对国内奶业行业、国内乳品企业的不信任这一“头号难题”。

就乳品企业而言,千万不能再出现牛奶质量安全事件来激怒消费者的神经,须诚心地接受各方面的食品安全监督,少说实干,老老实实地做好自己的产品质量保证,以诚恳及质量保证来赢回消费者的信任。其次是从源头上提高我国的奶牛养殖水平,规范使用药物、添加物,保证饲料质量,以及家庭规模牧场养殖方式转变等问题。第三是中国奶业发展,要克服急功近利的思想,特别是一些大型企业,不能一味追求或行走“假大空”,讲究发展速度而不重视发展质量,动辄开办万头牧场等这些短视行为或经营宗旨。第四,国内的企业,应该有“内忧外患”的意识,不能指望仅依靠跑到国外去投资办厂抢奶源和100%原装进口等做法来逃避国内的行业危机。连中国自己的企业都看不到中国奶业,那怎怪得消费者对此失去信心。一个产品、一个企业、一个行业,如果失去了消费者的信心与信任,一切都枉然。有越来越多的企业走出国门,实施曲线救市的做法,有利也有弊,利弊需权衡,敬请深思和慎行。第五、要解决好种养结合与平衡发展的问题。中国的可耕地土地资源很少,这一环境条件就决定了中国的奶牛养殖业必须实行布局合理化发展。只有这样,才能有效地解决牧草饲料的有效供应而不使其它地区的饲料资源被浪费。只有这样,中国奶业才能走向可持续发展。第六,是要解决好思想认识与重视程度的问题。关键在于有没有发现问题,发现了问题后愿不愿意去解决,有没有解决办法。在现实生活中,有些企业乃至是行业的决策者,他们都不大愿意面对处理发展中存在的问题。连面对困难挑战的勇气都没有,更谈不上解决这些问题的信心与决心。正因为这样,一些问题被长期隐蔽和积累起来,到了一定的容量就会被引爆,三聚氰胺事件便是一个典型的个案。希望中国奶业不要再次有类似事件发生。我相信,经过全行业的努力,中国奶业将会更健康发展,中国奶业的发展明天会更好。

# 广东省畜禽遗传资源保护工作的现状与思路

陈敏锋<sup>1</sup>, 陈三有<sup>2</sup>, 吴同山<sup>1</sup>

(1. 东莞市畜牧科学研究所, 广东 东莞 523086; 2. 广东省畜牧技术推广总站,

广东 广州 510500)

中图分类号: S813.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)01-0012-02

根据《中华人民共和国畜牧法》、《畜禽遗传资源保种场保护区和基因库管理办法》、《国家级畜禽遗传资源保护名录》的有关规定,2008年7月7日,农业部公告1058号公布了第一批国家级畜禽遗传资源基因库6个、保护区16个、保种场97个。其中广东省有6个品种、5个场,即:清远麻鸡、惠阳胡须鸡、狮头鹅、乌鬃鹅、大花白猪、蓝塘猪,占第一批保种场的5%。2011年5月13日,农业部公告1587号公布了第二批国家级畜禽遗传资源保护区6个、保种场12个。其中广东省有2个品种、3个场,即粤东黑猪(潮州市绿岛生态农业有限公司、蕉岭县泰农黑猪发展有限公司)、雷琼黄牛(湛江市麻章区畜牧技术推广站),占第二批保种场的25%。109个国家级保种场中,广东8个场,占了7%。按全国省级平均来说,广东的畜禽遗传资源保护场数量位居全国的前列。针对以上两个公告,农业部近几年不但加大对保种工作的财政投入,而且每年至少举办一次技术培训班,促进了畜禽品种保护工作的顺利开展,广东畜禽遗传资源保护工作受益匪浅。顺应行业发展和保护资源的需要,2009年6月2日,广东省农业厅第5号公告公布了17个畜禽品种为广东省畜禽遗传资源保护品种:4个猪品种(大花白猪、广东小耳花猪、蓝塘猪、粤东黑猪),6个鸡品种(清远麻鸡、三黄(惠阳)胡须鸡、杏花鸡、中山沙栏鸡、阳山鸡、怀乡鸡),1个鸭品种(中山麻鸭),4个鹅品种(狮头鹅、清远乌鬃鹅、阳江鹅、马岗鹅),1个羊品种(雷州山羊)和1个牛品种(雷琼黄牛),进一步理顺了广东畜禽遗传资源保护工作。

对于广东省的畜禽遗传资源保护工作,仍需继续努力,为此,提出如下几点建议。

## 1 成立省级畜禽遗传资源委员会

广东省各级畜牧行政主管部门,历来十分重视畜禽遗传资源的保护与开发利用工作,并得到各有关企业、科研、教学和技术推广部门的积极响应。1976年9月,广东省畜禽资源编辑组编辑出版了《广东省畜禽资源汇编》,收集了23个地方猪种、6个地方牛种、1个地方羊种、11个地方家禽种。1987年7月,广东省畜牧局编辑出版了《广东省家畜家禽品种志》,该书不但对全省的畜禽品种作了详细的介绍,而且还包含了非常珍贵的考古资料照片和畜禽品种彩色照片。老一辈畜牧科技工作者的辛勤劳动为我国的资源保护工作奠定了强有力的基础。

据2007年农业部统一部署开展的“广东省畜禽遗传资源调查”的初步资料显示,广东省大多数地方畜禽品种都得到一定程度的保护与开发利用,取得了较为显著的经济效益和社会效益。经过多年的探索与发展,广东省已初步建立起政府规划,企业承担,教学、科研与技术推广部门积极参与的畜禽遗传资源保护体系,有力地促进畜禽遗传资源保护工作的持续有序开展;同时,坚持“保以致用,以用促保”的原则,始终把畜禽遗传资源的保护与开发利用紧密结合起来,鼓励、支持各有关企业在开展畜禽遗传资源保护的同时,积极开展畜禽遗传资源的开发利用工作,并从资金、信息和市场上给予大力支持。

1987年后的20多年来,畜禽遗传资源保护工作在省畜牧技术推广总站的指导下也在不断发展,但大部分是依靠华南农业大学的专家教授进行指导,省一级没有专门的象国家畜禽遗传资源委员会一样的组织。根据广东畜禽遗传资源的实

际情况,建议成立广东省畜禽遗传资源委员会,负责对保种工作的技术指导、保种项目的评审、品种资源的调查、开发利用工作的研究和指导等,以促进广东省畜禽遗传资源保护工作的健康开展。

## 2 有针对性地加大政府财政投入

根据《中华人民共和国畜牧法》第九条规定:“国家建立畜禽遗传资源保护制度。各级人民政府应当采取措施,加强畜禽遗传资源保护,畜禽遗传资源保护经费列入财政预算。畜禽遗传资源保护以国家为主,鼓励和支持有关单位、个人依法发展畜禽遗传资源保护事业。”但到目前为止,广东省财政用于畜禽遗传资源保护工作的经费少之又少。国家级的畜禽遗传资源保种场保护经费一是依靠自身力量,二是农业部支持的保种经费,相对好很多;省一级的畜禽遗传资源保种场保护经费基本上都是依靠自己,因此,也使得个别畜禽品种得不到有效的保护,甚至濒临灭绝。经费严重不足问题已极大地制约了广东省畜禽遗传资源保护工作的开展。

因此,建议尽快把畜禽遗传资源保护经费列入各级财政专项预算,加强国家扶持力度,以促进广东省畜禽遗传资源保护工作的顺利开展。

## 3 规范保种场日常管理工作

据了解,国家级的几个畜禽遗传资源保护场,在日常管理方面相对完善,各种记录、档案资料相对齐全。但其余的资源保种场,有的场地有限甚至还没有独立的场地;有的全为农户饲养没有一点系谱资料;有的畜禽数量足够,但品种特征不突出、杂交个体性状明显;还有的有场地、有数量但没有专人管理,选育、管理混乱。这些都亟待解决。

作为省级及以上的畜禽资源保种场,省级畜禽遗传资源委员会可以制定具有实用性强、可操作性强的日常管理措施,规范保种场的工作。具体内容可以包括:畜禽的选育种方案制定与实施(包括系谱档案资料的整理、场内测定等)、饲料配方、饲养模式、免疫程序、药物使用和配伍、体内外驱虫、兽医防疫等技术,细化到分娩舍产仔记录、用药记录、种畜禽生产记录等,省级畜禽遗传资源委员会可以一年进行1~2次的检查,只有这样,才能逐步规范管理,使各级的资源保种场走上健康发展的道路。

## 4 因地制宜开展产品开发工作

地方畜禽品种如果完全按照自然规律让其自

生自灭,在当今的社会风气下,估计很快就会灭绝。但如果不进行适度开发,保种场的经济效益又难有保障,保种的积极性也不会高。因此,应该在保种规模符合国家要求的前提下,适度进行开发,如杂交利用、精品产品的自销等,在这方面,清远麻鸡的市场开发比较好。

每个地区,都有不同的消费群体,处于人群中约15%的高收入阶层,无论在饮食、服饰、住行等方面,消费需求明显不同于其他阶层。随着生活水平的不断提高,在饮食方面,吃鸡由肉多的快大鸡转变为吃土生土长的土鸡,猪肉消费也由喜欢吃瘦肉多的瘦肉型猪转变为吃味道鲜美、口感好、饲养时间长的地方猪。也就是说,主要针对这一阶层的消费者开设品牌肉专卖店,有一定的销售市场。根据不同地区的市场行情,在比一般猪肉价格高出10%~30%的情况下,这类猪肉销售一般不存在问题。各地应运而生的土猪肉、土鸡专卖店就是很好的证明,壹号土猪的营销策略,更值得畜禽遗传资源保种场的经营者们借鉴和学习。

逢年过节时,城市人都往乡下跑,除了访亲探友、呼吸乡下的新鲜空气、放松身心外,主要还是想吃没有污染的乡下的土鸡、土猪、土菜等,有时吃完,还要带回一些新鲜的猪肉、鸡等;河源本地的蓝塘猪等,客人都是一头一头的买,吃不完的打包带走,这些说明地方品种猪、鸡、鸭、鹅、羊等都有一定的市场,农副产品丰富的地区,饲养这些畜禽应该会获得丰厚的利润。

但是,开发也不能随便开发,有的乱配种,最后把原有的血缘都搞乱了;有的只追求经济效益,保种的群体都没有了,这些都得不偿失,因此,要有个开发的度。

## 5 条件成熟时建立区域性基因库

同一种畜禽,为了节约保种经费,充分利用资源,条件成熟时可以建立比较集中的区域性基因库或保种场。以猪为例,至少两个保种模式可以尝试:一是活体基因库,参考家禽活体基因库的做法,将环境条件、气候条件相似的省内几个市区的地方品种猪收集起来,在相对比较接近以前条件的地方由财政出资建一个资源保护场进行集中保种。根据保种规模的要求,每个品种公猪的数量不变,母猪数量可以相对减少。可以进行适当开发,特别是专门

(下转第16页)

# MC4R 基因在猪育种中的应用

杨岸奇, 陈 斌\*

(湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

**摘要:** 生长速度、背膘厚及肉质等性状在猪育种中占有重要地位, 这些性状都受到 MC4R 基因的影响。MC4R 基因的 298 位编码 Asp 的密码子 GAU 的 G→A 的变异构成了该基因的多态性, 不同猪种的基因型频率都不一样。根据分子数量遗传学的原理, 通过 QTL 定位分析该基因的效应指导猪育种工作。

**关键词:** MC4R 基因; QTL; 猪; 育种

**中图分类号:** S828.2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2013)01-0014-03

MC4R (melanocortin-4 receptor, 黑素皮质素受体-4) 化学成分为肽类物质, 由下丘脑腹内侧核分泌<sup>[1]</sup>, 是黑素皮质素受体家族的主要成员之一。它的主要作用是通过与脑分泌的天然内源配体  $\alpha$ -促黑激素 ( $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH) 结合, 从而达到抑制体重增加的效果<sup>[2]</sup>。这种生物学特性是由 MC4R 基因导致的, 它深刻影响着家畜的背膘厚、日增重和采食量等生长性状<sup>[3-6]</sup>。因此猪 MC4R 基因的研究必将成为猪育种的重要发展方向之一。

## 1 MC4R 基因结构

1993 年, Gantz 等<sup>[7]</sup>最先克隆出人的 MC4R 基因, 观察到该基因只有一个外显子, 并用荧光标记原位杂交法成功将其定位, 至此拉开了研究 MC4R 基因的序幕。MC4R 是黑素皮质素受体的重要分支, 而黑素皮质素受体又属于 G-蛋白偶联受体的家族成员之一。MC4R 具有 7 个跨膜结构域。MC4R 由氨基酸按照特定的空间构型与构象连接而成, 不同物种所分泌的 MC4R 的氨基酸残基数目不尽相同, 大致在 330 个左右。Gantz 的研究表明, 人类 MC4R 基因的外显子是由 996 个碱基对构成的。

## 2 MC4R 在各类动物中的研究进展

MC4R 由于与动物的肥胖关系密切, 而受到许多科学家的关注和研究。从遗传学角度来看, MC4R 引起的肥胖是因为基因突变而导致的单倍体不足或者是显性负性效应, 或者是由于二者的协同作用导致的。

科学家分析了猪、牛、鼠等物种的序列, 观察各物种的 MC4R 基因的位置, 并比较了各物种 MC4R 基因的同源性。

### 2.1 家禽中 MC4R 基因的研究

王婕等<sup>[8]</sup>对北京鸭的 MC4R 作了深入研究, 发现北京鸭的 MC4R 基因长度为 996 bp, 可以编码 332 个氨基酸。该基因的起始密码子和终止密码子分别为 ATG、TAG。通过对比发现 MC4R 基因与鹅、人、鸡、小鼠的同源性分别为 97%、80%、95%、78%, 以及该基因所编码的氨基酸序列的相似性分别为 99%、87%、85%和 98%。

研究人员通过对不同品种的鸡的 MC4R 基因分析, 发现不同的鸡的 MC4R 基因的片段有所不同, 在各位点碱基变异的量也会有差异, 并且根据显著性检验发现鸡的净重、胴体重及腿部肌肉重量, 在变异型的鸡中显著高于野生型或者杂合类型, 但是胸肌重量和腹部脂肪重量的差异不明显<sup>[9]</sup>。李国辉<sup>[10]</sup>等采用了 DNA 测序和 PCR-SSCP 等方法, 将黄鸡群的 MC4R 基因的多态性进行了测定。发现该基因片段存在两种突变, 一种是碱基 G 替换成 C, 位于 662 位; 另一种是一个 C 碱基嵌入 733~734 之间。这两种突变的位置是该基因的两处多态位点。

### 2.2 几种常见哺乳动物 MC4R 基因的研究

贺宝军<sup>[11]</sup>等通过构造犬类动物的 MC4R 基因的质粒合成其重组蛋白, 其结果表明被双酶切鉴定的质粒 pET-30a(+)-MC4R 构造是基本正确的。经过基因测序发现各种动物的同源性高达 99%。实现了



人工控制下获得犬类的 MC4R 单克隆抗体, 促进了对研究犬类动物 MC4R 的研究。刘洪俞<sup>[12]</sup>等在对西门塔尔牛、日本和牛、皖南牛和广丰牛的研究过程中发现, MC4R 基因上的 C→G 突变显著影响了牛的体斜长以及胸围, 同时也提供了一个研究生生长发育的分子辅助标记位点。

### 3 MC4R 在猪育种中的直接应用

#### 3.1 各类猪种的 MC4R 基因与生长性状相关研究

猪的 MC4R 基因的 298 位存在编码 Asp 的密码子 GAU, 该位点还存在突变 G→A 从而变成 AAU, 变成了编码 Asn 的密码子, 这一突变是猪 MC4R 的基因位点多态性的基础<sup>[5]</sup>。MC4R 基因通过 PCR 扩增后, 扩增片段长度为 226 bp, 再通过 Taq I 限制性内切酶的处理会有三种结果。根据这三种结果可以将 MC4R 基因简单定义: (1) 如果处理后片段为 150 bp 和 70 bp 且 298 位编码天冬氨酸 (GAU), 定义该基因为 AA; (2) 如果处理后片段长度为 226 bp、156 bp 和 70 bp, 定义为 AB; (3) 如果检测不到酶切位点, 切片段长度仍然为 226 bp, 则定义为 BB 基因型。在藏猪的研究过程中, 强巴央宗<sup>[13]</sup>等发现 MC4R 的 Asp298Asn 突变的频率相当低, 藏猪中未发生突变的基因 A 与基因型频率 AA 分别为 93% 与 96%, 藏猪有生长速度缓慢和脂肪沉淀能力强的特点, 但是结合藏猪恶劣的生活环境来分析, 对于 MC4R 是如何影响藏猪生长发育性能的具体机理还有待进一步研究。李庆岗<sup>[14]</sup>等在对淮猪的 MC4R 基因与背膘厚进行相关分析时发现, BB 基因型淮猪的生长速度显著慢于 AA 基因型淮猪 ( $P < 0.01$ ), 且 AA 基因型淮猪的背膘厚也显著低于 BB 基因型淮猪 ( $P < 0.05$ ), 而 AB 基因型的这些性状都是处于二者之间, 说明淮猪中 MC4R 基因型 AA 占优势, A 基因对 B 呈不完全显性。肖石军<sup>[15]</sup>等分析了东乡花猪、上高两头乌猪、玉山黑猪等中国地方猪种及长白、大白、杜洛克等国外猪种的 MC4R 基因与猪生长发育性状的关系, 其研究结果表明长白、杜洛克等猪的 A 基因为优势等位基因, 而在大白猪等品种中 B 基因的频率非常高。通过卡方检验发现 A 与 B 两种基因频率符合哈代—温伯平衡。同时, 根据统计所有数据来看, AA 基因型猪生长速度与背膘厚显著高于 BB 基因型猪。

#### 3.2 利用 MC4R 基因指导生长性状的育种

MC4R 基因影响着猪肉品质、生长速度及背膘厚

等性状, 这些性状又是重要的经济性性状, 因此将 MC4R 基因的研究成果来指导生长性状的选育具有重大实际意义, 也将是未来猪育种的一个发展趋势。如今, 我国的商品种猪以杜洛克、长白、大白猪为主, 近些年的研究成果表明杜洛克、长白及大白猪的生长性状遗传力大致范围分别为 0.29~0.48、0.23~0.31 和 0.182~0.346<sup>[16~18]</sup>。在遗传学飞速发展的这些年, 科学家提出了一个新的概念 QTL (quantitative trait loci, 数量性状基因座), 它泛指影响数量性状的基因。这一概念的提出, 将数量遗传学和分子遗传学有机结合起来, 为动物遗传育种提供了新的研究方法。通过将数量性状剖析成各个数量基因, 通过定位数量性状的所有基因, 分析数量性状的控制性状的机理<sup>[19,20]</sup>。猪的肉品质性状、生长速度及背膘厚都是数量性状, 而 MC4R 基因属于这些性状的 QTL 的一部分, 因此利用分子数量遗传学原理进行猪育种是可行的。要使 MC4R 基因能具体的实现育种指导, 我们就必须估计出 MC4R 基因效应, 这一 QTL 定位过程分为如下几步: (1) 选取合适的遗传标记和遗传位点。猪的多态性是 298 编码 Asp 密码子突变引起的, 因此可以将此位点作为标记位点; (2) 选取合适的猪群体, 选用曾祖代车间的纯种大白和长白猪作为标记对象; (3) 两个品种的猪进行杂交或者两个品种内的品系之间杂交, 获得 F<sub>2</sub> 个体; (4) 观测后代的数量性状表型以及遗传标记, 计算 MC4R 的基因效应的实际大小<sup>[21,22]</sup>。MC4R 的基因效应的实际大小就是育种工作者在育种过程参考的重要指标, 根据实际情况和需要来控制 MC4R 基因型在整个群体内部所占频率。

### 4 展望

猪遗传育种只有将分子遗传与数量遗传有机结合起来才能在本质上提高猪的潜能。研究发现, 猪的品种不同, MC4R 基因的作用也是不一样的, 若瘦肉率控制在一定的范围从而保证肉的口感鲜美, 因此必须控制 MC4R 基因型在总体所占的频率。

#### 参考文献:

- [1] Yeo G S, Farooqi I S, Challis B G, et al. The role of melanocortin signalling in the control of body weight: evidence from human and murine genetic models[J]. *Q J M*, 2000, 93(1): 7-11.
- [2] Sinha P S, Schiøth H B, Tatro J B. Roles of the melanocortin-4 receptor in antipyretic and hyperthermic

- actions of centrally administered alpha-MSH[J]. *Brain Res*, 2004, 1001(1-2):150-159.
- [3] Houston R D, Cameron N D, Rance K A. A melanocortin-4 receptor (MC4R) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected large white pig populations[J]. *Anim Genet*, 2004, 35:386-391.
- [4] Jokubka R, Maak S, Kerziene S, et al. Association of a melanocortin-4 receptor (MC4R) polymorphism with performance traits in Lithuanian White pigs[J]. *J Anim Breed Genet*, 2006, 123:17-23.
- [5] Kim K S, Larsen N, Short T, et al. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits[J]. *Mamm Genome*, 2000(11):131-132.
- [6] Zhang C L, Wang Y H, Chen H, et al. Association between variants in the 5'-untranslated region of the bovine MC4R gene and two growth traits in Nanyang cattle[J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36:1839-1843.
- [7] Gant z I, M i w a H, K o n d a Y, et al. Molecular cloning, expression, and gene localization of a fourth melanocortin receptor[J]. *Biol Chem*, 1993, 268(20):15174-15179.
- [8] 王婕, 刘小林, 吴艳, 等. 北京鸭 MC4R 基因的克隆及其组织表达的差异[J]. *西北农业学报*, 2011, 20(1):29-34.
- [9] Qiu Xuemei, Li Ning, Deng Xuemei, et al. The single nucleotide polymorphisms of chicken melanocortin-4 receptor (MC4R) gene and their association analysis with carcass traits[J]. *Science in China Series C: Life Sciences*, 2006, 49(6):560-566.
- [10] 李国辉, 王金玉, 陶勇, 等. 京海黄鸡 MC4R 基因新突变位点的分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 27(2):28-30.
- [11] 贺宝军, 巴彩凤, 王光川, 等. 犬 MC4R 基因原核表达质粒的构建与表达[J]. *中国生物制品学杂志*, 2011, 24(5):551-553.
- [12] 刘洪瑜, 王恒, 任春环, 等. 牛 MC4R 基因多态性与体尺性状的相关分析[J]. *中国兽医学报*, 2012, 32(9):1309-1311.
- [13] 强巴央宗, 张浩, 凌遥, 等. 藏猪黑素皮质激素受体-4 基因 Taq I 多态性分析[J]. *中国畜牧杂志*, 2007, 43(23):1-3.
- [14] 李庆岗, 陶立, 季香, 等. MC4R 基因在淮猪中的多态性及其与生长性状和背膘厚的相关性[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(3):999-1000.
- [15] 肖石军, 颜琰, 任军, 等. MC4R 基因主效位点在中外猪种中的遗传多样性及其与生长肥育性状的相关性分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(9):841-845.
- [16] 施启顺, 柳小春, 何俊, 等. MTDFREML 法估算杜洛克猪遗传参数[J]. *猪业科学*, 2006(7):52-55.
- [17] 周立平. 长白猪主要性能测定及遗传参数估计研究[J]. *湖南农业科学*, 2011(7):122-124.
- [18] 陈斌, 柳小春, 施启顺, 等. 用基于 Gibbs 抽样的贝叶斯方法估计大白猪遗传评估中主选性状的遗传参数[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2007(4):447-449.
- [19] 李宁. 动物基因组研究计划及其对动物育种的影响[J]. *遗传*, 1997, 19(增刊):7-10.
- [20] 吴常信. 分子数量遗传学与动物育种[J]. *遗传*, 1997, 19(增刊):1-3.
- [21] 张青峰. 分子数量遗传学的发展[J]. *现代农业科技*, 2007(2):112-114.
- [22] 申慧芳, 王钦德. 数量性状基因座与动物育种[J]. *山西农业大学学报*, 2001(3):310-312.

(上接第 13 页)

为高等院校、科研机构、医院等提供对方需要的实验用猪素材(如终生不注射疫苗的、饲料不加添加剂的、SPF 猪等,既可以让它们得到质量保证、符合要求的猪,也能充分利用高等院校科研经费充裕的条件来互补),也可以通过不同地方品种猪的杂交培育新的品种或提高(虽然不一定有理想的结果,但现在没办法做到,各个品种、各个场都是独立的)。二是依靠现代科学技术,对各个不同的地方品种猪的公猪精液、体组织等进行保存,以后利用克隆技术培养需要的猪只,即使活体猪消失了,资源还在保留,全国有一个这样的机构或单位就可以了,这种方式可以与上面几种方式同时进行。

## 6 避免走入误区

### 6.1 保种工作过分追求生产性能的提高

列入到地方品种保护名录的畜禽,除了肉质、

口感等优于引进品种的共同特点外,都是有其特性的。如繁殖力强的大花白猪,性状突出的三皇胡须鸡、清远麻鸡,高度耐近交的蓝塘猪等,繁殖性能、体型大小等基本上比较一致,但集中饲养后,由于饲料、环境等比以前优越,畜禽的成活率、生产性能(如母猪年提供上市头数、生长速度、繁殖性能等)都比以前有明显提高,这种提高也可能是各种生活条件好起来后生产性能充分发挥的结果。选育保种过程中,尽量要保持畜禽的各项生产性能稳定,而不是一味的选育提高。

### 6.2 重视数据而忽视现场实际工作的检查

个别畜禽资源保种场,为了尽量拿到上级的保种资金或项目经费,只重视表面的工作。最突出的就是数据夸大,真正到现场检查的时候,很多与事实不符。因此,上级单位或畜禽品种资源委员会要定期进行实地检查,不能只看数据。

## 血清冻融次数对猪瘟抗体效价的影响

钟锦辉, 张海明, 段晓冬, 沈丹, 朱建翠, 邝惠仪  
(广州市动物卫生监督所, 广东 广州 510440)

**摘要:** 为研究反复冻融是否对猪瘟抗体效价产生影响, 选取了60份不同抗体水平的猪瘟抗体阳性血清, 每份血清分装6管作不同冻融处理。对不同冻融处理的血清进行物理性状观察和ELISA检测, 并采用随机化区组设计资料秩和检验方法对检测OD值进行比较分析。结果发现不同次数冻融处理的血清物理性状观察无明显差异, ELISA检测OD值无统计学差异, 表明短期内可完成ELISA检测的血清可直接于4℃冷藏保存或-20℃冻存, 多次冻融不会造成血清猪瘟抗体效价的显著降低。

**关键词:** 冻融处理; 猪瘟抗体; ELISA; OD值; 秩和检验

**中图分类号:** S852.5

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2013)01-0017-03

## The effect of multiple serum freeze-thaw cycles on the titer of antibody to Classical Swine

ZhongJinhui, ZhangHaiming, DuanXiaodong, ShenDan, ZhuJiancui, KuangHuiyi  
(Guangzhou Animal Health Inspection Institute, Guangzhou 510440, China)

**Abstract:** To investigate the effect of freeze-thaw treatments on titer of antibody to Classical swine fever (CSF), 60 CSF positive sera were selected and each serum was divided into 6 equal parts for different freeze-thaw treatments. The physical properties of all sera were observed and the ELISA tests were conducted. The ELISA OD values were analyzed with the method of randomized block design data rank sum test. The data shown that freeze-thaw cycle frequency has no effects on physical properties and ELISA OD values of sera significantly. Therefore, we demonstrated that the sera can be directly stored at -20℃ if the tests can not be finished in a short period of time.

**Key words:** Freeze-thaw treatment, Classical swine fever antibody, ELISA, OD value, rank sum test

血清学试验是兽医传染病学诊断和流行病学调查的一个重要方法,也是目前进行疫苗免疫效果评价的主要方法之一。由于我国动物疫情较为复杂,按照目前我国的动物疫病血清学检测操作,每份血清往往需要进行多种动物疫病的检测。但在大部分情况下,由于检测量的原因和人员、仪器等因素的限制,在实际工作中需要对同一份血清进行4℃冷藏或者-20℃冷冻保存一段时间后,再取出进行另一个项目的检测。另外,样品复检、科学研究需要或者血清在保存期间由于停电等均可能造成血清的反复冻融。酶联免疫吸附试验(ELISA)由于其准确性高、操作相对简单和便于大批量检测等优

点,是目前应用最为广泛和最为重要的血清学方法之一。在此,为评价动物血清在4℃冷藏保存和-20℃冷冻保存后反复冻融是否对血清学检测结果存在影响,我们设计进行了本试验。选取60份猪瘟血清,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)方法对猪瘟抗体进行检测,观察4℃短期保存和反复冻融条件下对抗体检测结果的影响,以期今后的实际工作提供一定指导。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试剂

猪瘟抗体检测试剂盒由美国爱德士(IDEXX)生物科技有限公司提供,批号为99-43220 Z261。其

余试剂由本实验室配制。

## 1.2 血清

选取本实验室保存的 60 份猪瘟疫抗体阳性血清,均来自广州市内不同猪场同一时期内采集的猪血清,分离血清后直接置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷冻保存一周。其中高水平效价抗体(阻断率 60%以上)、中等水平效价抗体(阻断率 40%~50%)、低水平效价抗体(阻断率 10%~30%)血清各 20 份。所选血清无腐败、溶血和血脂等情况。

## 1.3 方法

**1.3.1 血清分组和冻融方式** 将以上每份试验血清平均分装成 6 份,每份  $60\text{ }\mu\text{L}$ 。其中 1 份冻融 1 次后  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存 18 d,其他 5 份分别作 2、5、10、15 和 20 次冻融,每份冻融完成后放在  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  待用。当上述 5 组样品均已完成冻融次数,则一起从  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  中取出并在室温下融解后再与  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  保存的样品一起进行检测。冷冻方式为将待冻融血清样品直接放入  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱 4 h 以上,以保证冻结完全;融化方式为直接将冷冻的血清样品取出后放置室温 2 h 左右以保证完全融化。反复冻融按以上步骤重复。

**1.3.2 检测方法** 检测操作按照试剂盒说明书进行,并保证所有样品在同一环境条件下、由同一人同时进行检测。

**1.3.3 统计分析** 采用 Excel2010 和 SPSS18.0 统计分析软件包进行数据的录入、转换和分析,并应用随机化区组设计资料的秩和检验方法对不同次数冻融结果 OD 值的差异进行比较分析。

## 2 结果

### 2.1 冻融次数对血清外观的影响

试验血清在保存和反复冻融过程中颜色、浑浊度和其他物理性状,从肉眼观察没有变化,不同次数冻融处理组之间也没有区别。

### 2.2 冻融次数对血清 OD 值的影响

在反复冻融过程中,一份血清的 eppendorf 管出现破裂,因此导致该血清不足以进行 ELISA 试验,因此在接下来的统计分析中只对剩下的 59 个份血清的检测结果进行比较分析。试验中同一区组的血清(即由同一份血清分装的不同次数冻融的 6 份血清)都在同一个 ELISA 反应板中,因此不需要进行板间误差校正。

对上述不同冻融组的血清样品应用猪瘟疫抗体 ELISA 进行抗体检测,各组平均 OD 值见表 1,表中用均值±标准差来表示 OD 值。

表 1 不同处理组血清猪瘟疫抗体(OD 值)测定结果

处理组	N	均值	方差	OD 值
1 次冻融后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏	59	0.568	0.231	$0.568\pm 0.480$
2 次冻融	59	0.567	0.232	$0.567\pm 0.481$
5 次冻融	59	0.564	0.227	$0.564\pm 0.477$
10 次冻融	59	0.570	0.235	$0.570\pm 0.484$
15 次冻融	59	0.564	0.226	$0.564\pm 0.475$
20 次冻融	59	0.577	0.235	$0.577\pm 0.485$

我们对冻融次数对样品的影响进行定量的分析:根据假设检验的前提条件要求,采用随机化区组设计资料的秩和检验方法对不同冻融组样本检测结果 OD 值进行比较分析。用 Friedman 检验,得  $\chi^2=8.387$ ,  $df=5$ ,  $P=0.136>0.05$ ,可见不同处理组样本检测结果 OD 值没有统计学差异,即猪血清在 1 次冻融后  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏和分别作 2、5、10、15、20 次冻融,检测其猪瘟疫抗体(以 OD 值表示)结果之间的差异没有统计学意义。

## 3 讨论

猪瘟疫是影响我国养猪业的最重要的传染病之一,不仅是我国的一类动物传染病,也被世界卫生组织列为必须要通报的法定传染病之一<sup>[1]</sup>。鉴于其对我国养猪业的危害和所造成的巨大的经济损失,我国将其纳入国家强制性免疫的动物传染病之一。目前对猪瘟疫疫苗进行免疫效果评价的检测方法主要有正向间接血凝试验和 ELISA 方法,由于其操作简单、结果准确性和重复性高和可进行大规模检测等优点,是对猪瘟疫疫苗进行免疫效果评价最重要的检测方法之一<sup>[2,3]</sup>。

为了解血清样品冻融次数对 ELISA 检测结果和抗体效价的影响,本实验将猪血清分装后进行多次冻融,结果表明,冻融次数对血清抗体效价的影响没有统计学意义,与王文英等<sup>[4]</sup>研究结果一致。另外,我们还对 1 次冻融后  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏保存 18 d 的样品检测结果与多次冻融样品检测结果进行比较分析,发现无论是结果判定还是抗体效价,1 次冻融后  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冷藏保存与多次冻融样品的结果没有差异或差异无统计学意义,与顾珩等<sup>[5]</sup>研究结果一致。

在本试验中, 所选取的样品均为淡黄色清亮无血脂、无溶血的血清, 并且整个实验过程中冻融次数在 20 次以内, 整个试验持续时间为 20 d 左右, 所以无论是 1 次冻融后 4 ℃ 冷藏保存的还是多次冻融的血清样品, 在外观及物理性状方面变化不明显, 这跟董秀华等<sup>[6]</sup>报道的冻融次数对血清浊度、颜色等有影响不太一致, 可能是由于所选择的血清样品不同而导致的。

本实验由同一人应用同一种方法在相同条件下、同时、同地进行不同处理组的血清样品 OD 值的检测, 能较好的排除人为、环境等因素对试验结果的影响。另外, 由于试验中同一区组的血清都在同一个 ELISA 反应板中, 所以没有必要像吴海伟等<sup>[7]</sup>用 ELISA 法研究血吸虫抗体水平时 OD 值标准化的方法进行板间误差的校正。

综上所述, 本次实验用血清学检测中最常用的 ELISA 方法作为模式方法, 在微量保存血清的情况时, 认为在猪瘟抗体检测过程中, 在 3 w 内可以完成的 ELISA 检测血清样品可直接放置于 -20 ℃ 冻存, 冻存血清样品不必担心因反复冻融而导

致抗体效价的降低。另外, 在实际工作中如果遇到没有冷冻条件的情况下, 在保证血清样品无污染、无腐败的情况下, 可以将待检血清放置于 4 ℃ 冷藏, 3 w 内对检测抗体效价并无太大影响。

#### 参考文献:

- [1] 甘孟侯, 杨汉春. 中国猪病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 149-168.
- [2] 王治方, 郭成留, 张清华, 等. 两种不同方法对猪瘟免疫效果评估对比试验[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(9): 99-100.
- [3] 孙海燕, 王在时, 戴志红, 等. 猪瘟抗体检测技术的研究现状及发展趋势[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(5): 40-43.
- [4] 王文英, 俞年生, 陈卫国, 张建民. 血清冻融次数对抗体效价影响的观察. 中国卫生检验杂志, 1993, 3(1): 22-23.
- [5] 顾珩, 路凤, 金玉龙, 等. 血清标本存放时间和存放方式对嗜肺军团菌抗体测定结果的影响[J]. 环境卫生学杂志, 2011, 1(1): 40-42.
- [6] 董秀华, 李峰. 血清冻融次数对乙型肝炎 OD 值影响的观察[J]. 中国城乡企业卫生, 2008(3): 40.
- [7] 吴海伟, 罗建平, 吴观陵. 用 ELISA 法研究血吸虫抗体水平时 OD 值标准化的方法. 寄生虫与医学昆虫学报, 1995, 2(3): 140-142.

## 《广东畜牧兽医科技》(双月刊)

ISSN 1005-8567

CN 44-1243/S

(1976 年创刊, 大 16 开本, 正文 52 页)

主管单位: 广东省农业科学院

主办单位: 广东省畜牧兽医学会、广东省农科院畜牧研究所、广东省农科院兽医研究所

订 价: 每期定价 5.5 元, 全年 33.00 元(含平寄邮费)。

订阅方式: 本刊实行自办发行。读者可通过邮局直接汇款至本刊编辑部。

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

地 址: 广州市先烈东路 135 号《广东畜牧兽医科技》编辑部 (邮编: 510500)

电 话: 020-37245052、37288167 E-mail: gdxmsy@163.com、gdxmsykj@163.com

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

# 猪瘟活疫苗(细胞源)两种免疫剂量的使用效果对比

邹建灵<sup>1</sup>, 陈 峥<sup>2</sup>, 杨傲冰<sup>2</sup>

(1. 惠州市动物卫生监督所, 广东 惠州 516001; 2. 广东永顺生物制药股份有限公司, 广东 广州 511356)

**摘要:** 根据基层实际情况, 选取2种免疫剂量(1头份和6头份)的政府采购猪瘟活疫苗(细胞源), 接种6个场的试验猪。比较免疫后不同时间的抗体合格率, 结果显示2种免疫剂量的政府采购猪瘟活疫苗在一免后(40-50日龄)抗体水平较低, 二免后(81日龄)抗体水平显著提高, 均达到全群保护的合格率, 且2种免疫剂量无差别。1头份免疫剂量能获得良好的免疫效果。

**关键词:** 猪瘟疫苗; 免疫效果; 免疫剂量

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)01-0020-03

## The Immunual efficacy comparison of Classical Swine Fever vaccine,live (tissue culture origin) with two kinds of immunizing doses

Zhou jianling<sup>1</sup>, Chen zheng<sup>2</sup>, Yang aobing<sup>2</sup>

(1.Huizhou City Animal Health Authority,Huizhou 516001,China; 2.Guangdong Winsun Bio-Pharmaceutical Co.,Ltd. Guangzhou 511356,China)

**Abstract:** In accordance with the actual situation ,pigs from six pig farms were inoculated with two kinds of immune doses,one dose and six doses, of Classical Swine Fever Vaccine,Live(Tissue Culture Origin) from the government procurement bank. Antibody levels at different times after inoculation were Compared. The data showed that the antibody level was low after the first immunization(40~50day-old ).After the second inoculation (81day-old),the antibody levels significantly arised,all the pigs reached protection titer and there were no difference in the two kinds of immune doses groups.

**Key words:** Classical swine fever vaccine;immune efficacy;immunizing dose

猪瘟(CSF)是国家强制免疫的动物传染性之一,是基层动物防疫机构春、季集中免疫重点。近年来,惠州市动物卫生监督所在抗体监测中发现猪瘟抗体合格率有下降的趋势。在调查走访中,发现个别养殖户随意增加免疫剂量。针对基层的猪瘟疫苗免疫剂量问题,我们进行政府采购猪瘟活疫苗(细胞源)1头份和6头份免疫剂量的免疫试验,比较其不同时间的抗体合格率。报告如下,供同行参考。

### 1 方法与材料

#### 1.1 试验疫苗

广东永顺生物制药股份有限公司政府采购专用猪瘟活疫苗(细胞源)批号:2012004。

#### 1.2 试验方法

**1.2.1 试验选场和分组** 本次试验在养猪较为集中的惠州博罗县的3个乡镇进行。选择存栏在50头母猪以上,管理较规范且猪群外表健康的6个场/户进行本次试验。每个场选择20-30日龄仔猪各2窝,每窝为一组(10头左右)。每个场的各组仔猪分别免疫猪瘟疫苗1头份和6头份(表1)。试验猪群的饲养由各场养殖人员负责,饲养条件相同。

**1.2.2 试验步骤** 试验猪在20-30日龄时采血,接着进行首次猪瘟疫苗免疫;首免后21日进行第二次采血;首免后30日进行第二次免疫;二免后21日进行第三次采血(表2)。

表1 试验猪分组情况

场名	免疫1头份组	免疫6头份组
1号猪场	A	B
2号猪场	C	D
3号猪场	E	F
4号猪场	G	H
5号猪场	J	I
6号猪场	L	K

表2 试验猪免疫接种和采血时间

仔猪日龄	实验阶段
20-30日龄	第一次采血(首免前)
20-30日龄(采血后当天)	第一次免疫(一免)
41-50日龄(免疫后21天)	第二次采血(一免后)
60-70日龄	第二次免疫(二免)
81日(免疫后21日)	第三次采血(二免后)

### 1.3 抗体检测方法

本次试验采用韩国JBT试剂盒对血清进行猪瘟抗体检测,检测步骤严格按照说明书进行。样品阻断率=(阴性对照平均OD<sub>450</sub>值-样品OD<sub>450</sub>)/阴性对照平均OD<sub>450</sub>×100%。被检样品的阻断率大于或等于40%,该样品为猪瘟抗体阳性;样品阻断率小于或等于30%,该样品为阴性(无猪瘟抗体存在);样品阻断率在30%~40%,该样品为可疑。

## 2 结果与分析

### 2.1 试验样品数量

共采血清3次,前2次实验采血清样品均为110份,第三次因有一猪场已经将猪只变卖只有82份血清。

**2.2 各组的抗体合格率、阻断值和离散度** 各个试验阶段的抗体合格率、抗体阻断值和抗体离散度结果汇总(表3)。

### 2.3 试验数据分析

**2.3.1 免疫1头份剂量的猪群在首免前、一免后和二免后的抗体合格率均值、阻断率均值和离散度均值(表4)。**从表4可以看出,免疫了1头份剂量猪瘟疫苗的组别在一免后抗体的合格率无明显变化;阻断值下降了10个单位,属于轻微下降;离散度基本无变化。二免后抗体合格率显著上升达到98%,阻断值上升了40个单位;离散度下降明显下降到0.13,远小于0.3水平。

表3 各场试验组的抗体合格率、阻断值和离散度

分组	实验阶段	抗体合格率	平均值 (抗体阻断值)	抗体离散度
A组 (1头份)	首免前	100%	95.9	0.23
	一免后	100%	89.56	0.17
	二免后	90%	69	0.27
B组 (6头份)	首免前	100%	85.14	0.31
	一免后	100%	77.71	0.33
	二免后	100%	77.7	0.09
C组 (1头份)	首免前	66.7%	50.11	0.66
	一免后	77.8%	50.22	0.28
	二免后	100%	93.1	0.04
D组 (6头份)	首免前	75%	54	0.43
	一免后	88.9%	54	0.21
	二免后	87.5%	80.4	0.25
E组 (1头份)	首免前	100%	84	0.04
	一免后	30%	35	0.30
	二免后	100%	86.3	0.16
F组 (6头份)	首免前	100%	83	0.06
	一免后	90%	52	0.14
	二免后	100%	87.7	0.07
G组 (1头份)	首免前	18.1%	33	0.53
	一免后	81.9%	49	0.21
	二免后(变卖)	--	--	--
H组 (6头份)	首免前	92%	75	0.28
	一免后	100%	52	0.12
	二免后(变卖)	--	--	--
J组 (1头份)	首免前	100%	62	0.12
	一免后	0%	26	0.28
	二免后	100%	81	0.17
I组 (6头份)	首免前	50%	36	0.30
	一免后	80%	45	0.24
	二免后	100%	90.7	0.09
L组 (1头份)	首免前	90%	69	0.23
	一免后	45.4%	42	0.20
	二免后	100%	85	0.13
K组 (6头份)	首免前	33.3%	29	0.57
	一免后	0%	12	0.63
	二免后	100%	91.1	0.05

**2.3.2 免疫6头份剂量的猪群在首免前、一免后和二免后的抗体合格率均值、阻断值均值和离散度均值(表5)。**从表5可以看出:免疫了6头份猪瘟疫苗的组别在一免后抗体合格率明显下降,从93%下降到71%;抗体阻断值从71.4下降到50.6;离散度变化不明显。二免后抗体合格率上升达到98%;阻断值达到82.4;离散度下降到了0.14,远小于0.3。

表 4 免疫 1 头份剂量的抗体平均合格率、阻断值和离散度

试验阶段	合格率均值	阻断值均值	离散度均值
首免前	61%	54.7	0.35
一免后	62%	46.8	0.31
二免后	98%	86.1	0.13

表 5 免疫 6 头份剂量的抗体平均合格率、阻断值和离散度

试验阶段	合格率均值	阻断值均值	离散度均值
首免前	93%	71.4	0.24
一免后	71%	50.6	0.21
二免后	98%	82.4	0.14

2.3.3 免疫 1 头份、6 头份两个剂量组别的显著性检验 (T 检验)。免疫 1 头份和 6 头份两个剂量的猪群在首免前、一免后和二免后的检测数据, 通过双侧显著性检验 (T 检验) 对比分析, 结果 1 头份和 6 头份两个免疫剂量在首免前、一免后和二免后的合格率、阻断率和离散度 P 值均大于 0.05, 差异均不显著。说明这两种免疫剂量的免疫效果无明显差异。

### 3 讨论

3.1 无论是 1 头份免疫剂量还是 6 头份免疫剂量, 在一免后 (40-50 日龄) 抗体合格率只有 60%~70%, 而且抗体阻断值下降明显。一免后的合格率较低, 可能与母源抗体干扰有关<sup>[1-2]</sup>。母源抗体高, 一免后抗体合格率和阻断值反而下降明显。在基层防疫中, 有条件的猪场应通过对母源抗体的监测来制定最佳的首免时间。

3.2 二免后, 两种免疫剂量的抗体合格率、抗体阻断值均显著上升, 到达理想状态; 离散度显著下降。表明免疫效果均一。建议在基层防疫中应普及猪瘟疫苗的 2 次免疫。

3.3 从结果数据分析得出: 1 头份免疫剂量与 6 头份免疫剂量免疫效果几乎无差别, 所以在基层防疫中不建议随意加大免疫剂量。加大免疫剂量不会产生更好的免疫效果反而会引起副反应的增加。建议在基层防疫中免疫 1~2 头份即可。

3.4 政府采购动物疫苗是惠民政策的一部分, 采购的疫苗质量是经过层层严格把关的。惠州市近年也加大对基层冷链系统建设投入, 加强对基层防疫员的培训, 极大地减少了由于疫苗保存和人员操作造成的免疫失败。

3.5 在抗体监测中, 个别乡镇出现免疫合格率不高的现象或与采血的时间段不合理有关。应按农业部有关动物疫病强制免疫计划的要求, 免疫 21 天后, 进行免疫效果监测。

3.6 猪瘟疫苗与其他疫苗同时免疫会对猪瘟抗体产生影响<sup>[3-6]</sup>。基层防疫中, 防疫员应避免一次性给猪只免疫多种疫苗, 这样不但会对猪瘟抗体产生负面影响而且会增加副反应发生的机率。

### 参考文献:

[1] 王美君, 侯艳红, 倪娇, 等. 猪瘟免疫失败的原因及其防控对策 [J]. 中国畜牧兽医, 2011 (2): 217-219.

[2] 龚冬仙, 周灯荣. 规模猪场猪瘟免疫抗体的监测结果与启示 [J]. 浙江畜牧兽医, 2002 (3): 27-28.

[3] 罗冬生, 郑姝妹, 王珏, 等. 不同疫苗对猪瘟及猪口蹄疫抗体效价的影响 [J]. 湖南畜牧兽医, 2009 (2): 17-19.

[4] 何英俊. 猪繁殖与呼吸综合征对猪瘟免疫效果的影响 [J]. 养猪, 2002 (3): 32-33.

[5] 任宇澜, 于厚军, 蒋文生, 等. 猪口蹄疫、猪瘟、高致病性猪蓝耳病三种疫苗不同组合同时分点免疫效果观察与分析 [J]. 中国动物检疫, 2011 (5): 67-71.

[6] 王剑峰, 杨宗照, 谷艺. 同时注射猪瘟和蓝耳病疫苗对猪瘟抗体效价的影响试验 [J]. 浙江畜牧兽医, 2007 (1): 32-33.

## 统计局: 2012 年国内猪肉市场产量 5335 万吨

1 月 18 日, 国家统计局发布经济数据显示, 2012 年全年全国粮食总产量达到 58957 万吨, 全年猪牛羊禽肉产量 8221 万吨, 比上年增长 5.4%, 其中猪肉产量 5335 万吨, 增长 5.6%。

详细数据如下:

全年全国粮食总产量达到 58957 万吨, 比上年增加 1836 万吨, 增长 3.2%, 连续九年增产。

其中, 夏粮产量 12995 万吨, 比上年增长 2.8%; 早稻产量 3329 万吨, 增长 1.6%; 秋粮产量 42633 万吨, 增长 3.5%。

全年棉花产量 684 万吨, 比上年增长 3.8%; 油料产量 3476 万吨, 增长 5.1%; 糖料产量 13493 万吨, 增长 7.8%。

全年猪牛羊禽肉产量 8221 万吨, 比上年增长 5.4%, 其中猪肉产量 5335 万吨, 增长 5.6%。

生猪存栏 47492 万头, 比上年增长 1.6%; 生猪出栏 69628 万头, 比上年增长 5.2%。

全年禽蛋产量 2861 万吨, 比上年增长 1.8%; 牛奶 3744 万吨, 增长 2.3%。(信息来源: 国家统计局网站)



## 副猪嗜血杆菌分离鉴定及药敏试验

黄美玲<sup>1</sup>, 袁远华<sup>2</sup>, 黄淑坚<sup>2</sup>

(1. 湛江市动物疫苗供应站, 广东 湛江 524000; 2. 佛山科学技术学院动物医学系, 广东 佛山 528231)

**摘要:** 本研究从采自佛山市某猪场送检的病死猪心脏、肝脏和肺脏等病料, 分离出一株疑似副猪嗜血杆菌(HPS)的细菌。经形态学观察、培养特性鉴定、生化试验、PCR检测, 显示该细菌为HPS。药敏试验显示该分离株对四环素、氧氟沙星等高敏; 对苯唑西林和磺胺甲噁唑耐药性, 动物致病性试验表明HPS分离株具有较强致病性。

**关键词:** 副猪嗜血杆菌; 分离鉴定; PCR; 药敏试验

中图分类号: S852.61\*2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)01-0023-03

## Isolation, identification and drug sensitive test of haemophilus parasuis

Huang Meiling<sup>1</sup>, Yuan Yuanhua<sup>2</sup>, Huang Shujian<sup>2</sup>

(1. Zhanjiang City Animal Vaccine Supply Station, Zhanjiang 524000, China; 2. College of Life Science, Foshan University, Foshan 528231, China)

**Abstract:** T1 strain of *Haemophilus parasuis*(HPS) was isolated from the heart, liver and lung samples of sick swine which were suspected to be infected with HPS in Foshan, Guangdong province. The T1 strain is identified based on morphologic, cultural, biochemical characteristics and PCR detection of HPS. Drug sensitive test showed that the HPS isolate was highly sensitive to tetracycline and ofloxacin, but was strong drug resistant to oxacillin and sulfamethoxazole. And animal pathogenicity test indicated that the T1 was highly virulence.

**Key words:** *Haemophilus parasuis*; Isolation and identification; PCR; Drug sensitive test

副猪嗜血杆菌病(*Haemophilus parasuis* disease, HPSD)即革拉瑟氏病(Glasser's disease)<sup>[1]</sup>, 又称纤维素性浆膜炎和关节炎, 其病原菌为副猪嗜血杆菌(*Haemophilus parasuis*, HPS), 属巴氏杆菌科嗜血杆菌属, NAD依赖型, 兼性厌氧, 革兰氏阴性细小杆菌, 非溶血性, V因子依赖性, 形态多变, 可见荚膜, 无芽胞, 是一种条件性致病菌, 广泛存在于猪的呼吸道中<sup>[2]</sup>。副猪嗜血杆菌主要引起猪的纤维素性多发性浆膜炎和关节炎, 甚至脑炎。其发病率一般在10%~15%, 严重时病死率可达50%。从2周龄到4月龄的猪均可感染发病, 5~8周龄的断奶后和保育阶段猪多发<sup>[3]</sup>。主要临床症状表现为发热、咳嗽、呼吸困难、消瘦、腹部膨大、腹水、跛行和共济失调等。近几年来, 我国由副猪嗜血杆菌引起猪多发性浆膜炎和关节炎的报道屡见不鲜, 尤其是当蓝

耳病、圆环病毒病等发生后, 在高密度饲养和突发呼吸道疾病综合征的情况下, 该病的临床表现和危害更为严重, 造成更大的经济损失。2011年9月下旬, 佛山市某猪场1月龄小猪出现HPS感染疑似症状, 并出现死亡病例。通过细菌分离、染色镜检、培养特性观察、生化试验、PCR检测、药敏试验和动物致病性试验, 从疑似患副猪嗜血杆菌病的猪肺脏及心血、心包液、胸腔积液等病料中分离到1株HPS。现报道如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 病料** 采集广东佛山市某猪场送检病猪心血、心包积液、肺脏、肝脏和关节液。

**1.1.2 主要试剂及培养基** 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、新生小牛血清, 购于广州健阳生物科技有

限公司;生化发酵管、药敏纸片购于杭州天和微生物试剂有限公司;普通营养肉汤、含V因子和小牛血清的营养肉汤、麦康凯培养基、普通营养琼脂培养基、鲜血琼脂平板、含V因子普通营养琼脂培养基等,按《兽医微生物学实验指导》<sup>[4]</sup>介绍的方法制备;dNTPs、Taq DNA聚合酶、10×Buffer、DNA Marker DL2000购于TaKaRa公司。参照Oliveira等<sup>[5]</sup>发表的HPS 16SrRNA基因设计了一对检测引物,P1:5'-GTGATGAGGAAGGGTGGTGT-3',P2:5'-GG-CTTCGTCACCTCTGT-3'。由上海英骏生物技术有限公司合成,预期扩增片段大小为822 bp。

## 1.2 方法

**1.2.1 细菌的分离与纯化** 采集病猪的心血、心包液、腹水、肺、肝、关节液等病料,首先划线接种于巧克力琼脂平板,37℃厌氧培养48 h,然后挑取单个菌落进一步纯化培养。

**1.2.2 革兰氏染色镜检** 挑取纯培养物,进行革兰氏涂片染色镜检,观察染色特性和菌体形态。

**1.2.3 培养特性观察** 挑取纯培养物,分别接种于鲜血琼脂培养基、麦康凯培养基、普通琼脂培养基和含V因子普通营养琼脂培养基,于37℃恒温培养24~48 h后,观察菌落生长情况。挑选可疑菌落进行革兰氏染色镜检,检查细菌形态与染色性质是否符合副猪嗜血杆菌的特性。

**1.2.4 V因子(NAD)依赖试验** 挑取纯培养物,分别接种于普通营养肉汤与含有V因子和小牛血清营养肉汤中,另做空白对照。37℃恒温振荡培养24 h后观察并记录试验结果。

**1.2.5 卫星现象试验(CAMP)** 用无菌棉签蘸取可疑菌的单菌落的肉汤培养物,均匀涂布于普通营养琼脂平板上,再挑取金黄色葡萄球菌在上述平板中划一横线,37℃培养24~48 h,观察其是否在葡萄球菌周围长出“卫星现象”。

**1.2.6 生化试验** 用可疑菌纯培养物,按照常规方法进行生化试验<sup>[6]</sup>,37℃恒温箱培养24 h后观察并记录试验结果<sup>[7]</sup>。

**1.2.7 PCR鉴定** 取过夜培养的疑似副猪嗜血杆菌菌液,作为PCR模板。在25μL反应体系中加入10×Buffer 2.5μL,dNTPs 2.0μL,P1(25pmol/L)1.0μL,P2(25pmol/L)1.0μL,rTaq酶0.2μL,DNA模板2.0μL,ddH<sub>2</sub>O 16.3μL,瞬时离心混匀。然后在PCR仪中运行以下程序:94℃预变性

5min;94℃变性30s,56℃退火40s,72℃延伸40s,运行30个循环;最后72℃延伸10min。同时设定空白阴性对照。PCR结束后,取5μL PCR产物于1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.2.8 药敏试验** 无菌操作下将可疑菌纯培养物均匀涂布在巧克力琼脂培养基上,待干后,再分区平贴上各种药敏纸片,37℃厌氧培养24~48 h后观察和测量抑菌圈直径,并记录结果。

**1.2.9 致病性试验** 将8只10日龄健康小鼠随机分为两组(每组4只),一组将纯化的可疑菌制成的细菌悬液,腹腔接种4只健康小鼠,每只0.2 mL;同时,另一组每只腹腔注射0.2 mL无菌的生理盐水作为对照组。接种后每组隔离饲养,观察和记录发病及死亡情况,并对病死小鼠进行解剖和细菌分离鉴定。

## 2 结果

### 2.1 菌落形态及镜检特性

病料接种在巧克力培养基,经37℃培养24 h后,长成白色半透明细小露珠状菌落,边缘整齐、光滑、圆形隆起,菌落直径约0.5~1.0 mm,具反光特性。挑取单个菌落染色镜检,可见革兰氏阴性细小杆菌,有荚膜,无芽胞,具多形性,从短杆状到细丝状。其中以短杆状为主,多单个排列。

### 2.2 培养特性

培养物在麦康凯培养基和普通营养琼脂培养基上不生长;在鲜血平板上长成细小、针尖状、半透明菌落;在含V因子普通琼脂培养基上长成白色半透明细小露珠状菌落,边缘整齐、光滑、圆形隆起,菌落直径约0.5~1.0 mm。

### 2.3 V因子依赖性试验结果

在不含V因子的营养肉汤中,分离菌虽然生长不良,但肉汤也有轻微的浑浊(对比阴性对照管);而在含V因子和小牛血清的营养肉汤中,分离菌生长良好,肉汤均匀浑浊,表明分离菌对V因子具有依赖性。

### 2.4 CAMP试验结果

在金黄色葡萄球菌和分离菌划线交界处看到长满了针尖大小、圆形隆起、灰白色、闪光透明的菌落,且在两种菌的交界处溶血力增强,说明金黄色葡萄球菌可增大其溶血圈,CAMP试验结果呈阳性。

### 2.5 生化试验

分离菌的生化特性表现为氧化酶试验和氨基酸对照试验呈阴性,接触酶试验呈阳性,能发酵蔗糖、棉子糖、麦芽糖、木胶糖、葡萄糖和半乳糖等;不发酵阿拉伯糖、肌醇、甘醇以及枸橼酸盐等。这些特性与副猪嗜血杆菌(HPS)的生化特性基本一致(见表1)。

表1 分离菌的生化试验结果

生化项目	结果	生化项目	结果
蔗糖	+	肌醇	-
阿拉伯糖	-	甘醇	-
棉子糖	+	葡萄糖磷酸	+
麦芽糖	+	胨基质	-
木胶糖	+	硫化氢	-
葡萄糖	+	苯丙氨酸	-
鼠李糖	-	赖氨酸	-
半乳糖	+	吲哚	-
接触酶	+	枸橼酸盐	-
氧化酶	-	脲酶	-
氨基酸对照	-	鸟氨酸	-

1):“+”为产酸不产气,“-”为不产酸不产气。

## 2.6 PCR 鉴定

PCR 扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳分析,在约 822 bp 处出现目的条带,与预期结果相符(见图1)。



图1 PCR 实验结果

M. DNA Marker DL 2 000; 1. 待检菌株; 2. 阴性对照

## 2.7 药敏试验

分离菌药敏试验结果显示,该菌对环丙沙星、林可霉素、氧氟沙星、氯霉素、红霉素、四环素、阿

莫西林和庆大霉素高敏;对阿米卡星、氨苄西林、新霉素、诺氟沙星和氨苄青霉素中敏;对苯唑西林和磺胺甲噁唑耐药(见表2)。判定标准:抑菌圈直径 $\geq 15$  mm 者为高度敏感;抑菌圈直径 10~15 mm 者为中度敏感;抑菌圈直径 $\leq 10$  mm 者为低度敏感;无菌圈者为耐药。

表2 分离菌株的药敏试验结果

药物名称	抑菌环直径(mm)	药物名称	抑菌环直径(mm)
林可霉素	17.5	苯唑西林	-
氨苄青霉素	12.6	新霉素	11.8
氧氟沙星	23.8	四环素	22.1
氯霉素	22.4	庆大霉素	17.6
红霉素	21.7	诺氟沙星	12.7
环丙沙星	25.3	阿莫西林	18.8
氨苄西林	11.8	磺胺甲噁唑	-
卡那霉素	10.1	阿米卡星	13.1

## 2.8 致病性试验

动物试验中试验组的 4 只小鼠均于 24 h 内死亡,其肺出血水肿;肝和小肠坏死。从肺、脏、脾和心中采病料涂片、染色、镜检均可见与上述分离菌相同形态的细菌。对照组的 4 只小鼠没有出现死亡,精神状态良好。表明该菌对小鼠具有较强毒力。

## 3 讨论

副猪嗜血杆菌(HPS)引起的疾病一年四季均可发生,常作为猪高致病性蓝耳病和猪圆环病毒病的继发感染而存在。本病例是否存在原发性病毒感染,仍需做进一步检测。

## 参考文献:

- [1] Oliveira S, Pijoan C. Haemophilus parasuis: new trends on diagnosis, epidemiology and control[J]. Vet Microbiol, 2004, 99(1): 1-12.
- [2] Biberstein E L, White D C. A proposal for the establishment of two new Haemophilus species[J]. J Med Microbiol, 1969(2): 75-78.
- [3] 李俐睿, 王印, 宋勇, 等. 副猪嗜血杆菌的分离鉴定和药敏试验[J]. 动物医学进展, 2011, 32(8): 115-118.
- [4] 姚火春. 兽医微生物学实验指导[M]. 第2版. 北京: 中国农业出版社, 2002: 19-21.
- [5] Oliveira S, Galina L, Pijoan C. Development of a PCR test to diagnose Haemophilus parasuis infections[J]. J Vet Diagn Invest, 2001, 13(6): 495-501.
- [6] 王世若. 兽医微生物学及免疫学[M]. 长春: 吉林科学技术出版社, 1989: 47-50.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 200-419.

# 鸡 Toll 样受体在 IBDV 免疫中的作用研究

卢宇, 张娣, 张金秋, 邓碧华, 吕芳, 侯继波\*

(江苏省农科院国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为了揭示鸡先天性免疫反应在 IBDV 疫苗过程中的作用, 将 40 只 14 日海兰褐蛋鸡随机分成两组, 实验组接种 IBDV 活疫苗, 对照组注射生理盐水, 隔离饲养。于免疫前和免疫后 12h、24h、48h、72h、130h 各取脾脏和法氏囊分离淋巴细胞并提取总 RNA, 用实时荧光定量检测方法检测各组中 chTLR3、chTLR7、chTLR21 表达的动态变化。结果显示, 在免疫后 36h, 鸡法氏囊和脾脏中 chTLR3 表达变化最显著, 在免疫后 48h, 鸡脾脏和法氏囊中 chTLR21 表达变化也较为明显。提示 chTLR3 在鸡对 IBDV 的免疫应答中起主要作用。

**关键词:** 鸡传染性法氏囊; TOLL 样受体

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)01-0026-04

## Effects of chicken Toll-like receptors in immunal response against infectious bursa disease virus

Lu Yu,Zhang Di,Zhang Jinqu,Deng Bihua,Lv Fang, Hou Jibo\*

(National Research Center of Veterinary Biological Engineering and Technology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014,China)

**Abstract:** To investigate the functions of Toll-like receptors on immune response against infectious Bursa disease virus (IBDV), forty 14-day-old HY-Line Brown chickens were randomly divided into two groups: control group, 10 chickens, experimental group, 30 chickens. Experimental group were vaccinated by the virulent IBDV, and the control group were injected with 0.9% physiological saline, and reared isolately. Five chickens were sacrificed at the designed time points, then total mRNA were extracted from lymphocytes, which separated from bursa of fabricius and spleen. The expression level of chTLR3, chTLR7, chTLR21 mRNA in bursa of fabricius and spleen lymphocytes were measured by SYBGreen I real time fluorescent quantitative PCR. The results showed that the expression level of chTLR3 mRNA in bursa of fabricius and spleen had the most significant changes at 36 hours after vaccination. After 48 hours, the expression level of chTLR21 mRNA also changed significantly in the bursa of fabricius and spleen. It demonstrated that chTLR3 was an important immune response factor against IBDV.

**Key words:** IBDV; Toll-like receptor

研究发现<sup>[1-2]</sup>, TLR2、3、4、5、7、9 能识别不同的微生物成分, TLR2 识别 PGN 和类脂蛋白, TLR4 识别细菌脂多糖 (LPS), TLR9 主要识别细菌 CpG DNA, 在鸡体内虽然不存在 TLR9 但是存在与其功能相似的 TLR21。TLR3 能识别 dsRNA, 而 IBDV 也为 dsRNA, 则 TLR3 能够对其进行识别。TLR5 是鞭毛蛋白的受体, TLR1 和 TLR6 有协助 TLR2 识别脂多肽<sup>[3]</sup>,

TLR7 除与 TLR8 主要识别 ssRNA 外, 还可以识别一些人工合成的具有抗病毒和抗肿瘤作用的小分子化合物<sup>[4]</sup>, 如某些鸟苷酸衍生物等, 从而在介导抗病毒免疫应答和药物靶向治疗中发挥重要作用。本文在前期研究的基础上, 深入探讨 IBDV 免疫鸡后, 免疫组织器官中 TLR3、7 和 21 的表达变化, 以期揭示先天性免疫在 IBDV 免疫过

收稿日期: 2013-01-07

\*: 通讯作者

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303046); 江苏省农业自主创新基金项目(CX(11)2048)

程中的作用,为新型疫苗构建和佐剂研究提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试验动物** 14日龄海兰褐蛋鸡40只,体重为180~200g,购自山东省农业科学院无特定病原鸡实验种鸡场。

**1.1.2 主要试剂** 淋巴细胞分离液(中国医学科学院生物工程研究所);鼠源MMV反转录酶(Invitrogen公司);Rnase inhibitor、Premix Ex Taq-TM(宝生物工程(大连)有限公司产品);1640培养基、小牛血清(Invitrogen公司)。

**1.1.3 主要仪器** 水平离心机(TDZ5-WS);Lightcycler480实时荧光定量PCR仪;PCR仪(Biometra);生物安全柜(Tanon EPS-100型);电泳凝胶成像系统(UVP Bioimaging Systems)

### 1.2 方法

**1.2.1 鸡外周血淋巴细胞的分离**<sup>[5]</sup> 无菌抽取静脉血2mL于含有肝素的无菌试管中,摇匀,加入2mL的Hanks液进行倍比稀释,混匀;用吸管吸取稀释血清液沿着管壁缓缓加到含有2mL淋巴细胞分离液的试管中(血液:Hanks液:淋巴细胞分离液的比例是1:1:1)沿着管壁流下的稀释血清液叠加在分离液之上,并与分离液形成明显的界面;经水平式离心管2000rpm 20min小心取出试管;用平口吸管小心吸中层呈白色雾状的淋巴细胞层,用Hanks液洗涤两次,每次1500rpm离心10min;弃上清液,加RPMI-1640培养液1mL混匀,取少许进行细胞计数及活力测定;最后将淋巴细胞悬液用RPMI-1640培养液配成相应比例的细胞浓度备用。

**1.2.2 总RNA提取** 取200 $\mu$ L样品加入1000 $\mu$ L Trizol总RNA分离试剂,充分混匀;室温静置10min;加入200 $\mu$ L预冷的氯仿温和混匀,禁止剧烈震荡;室温静置10min;4 $^{\circ}$ C 12000rpm离心10min;将上层无色液相转移至另一个离心管中,加入等体积(500~600 $\mu$ L)的异丙醇,温和地混匀;室温静置5~10min;4 $^{\circ}$ C 12000rpm离心10min,弃上清;75%的乙醇洗涤沉淀两次(乙醇量不少于Trizol量),4 $^{\circ}$ C 7500rpm离心5min,弃液相,与空气中充分干燥(切忌不能太湿也不能太干);加入10~30 $\mu$ L无RNase水充分水

解RNA,立即用于反转录。

**1.2.3 引物的设计与合成** 参照GenBank上已登录的鸡的TLRs mRNA基因序列(序列号如表1)设计引物,目的基因片段长度约为100bp左右,引物序列如(表1):

表1 引物序列

序列号	引物名称	引物序列
L08165.1	$\beta$ -actin	F:5'-CTGCGCTCGTTTGTGAC-3' R:5'-CTTTTGCTCTGGGCTTC-3'
NM_001011691.3	TLR3	F:5'-GCAACACTTCATTGAATAGCCTTGAT-3' R:5'-TTCAGTATAAGGCCAACAGATTCCA-3'
NM_001011688.1	TLR7	F:5'-GGCTGTGAATGAATGGGTGAT-3' R:5'-GAATGCTCTGGGAAAGGTTGT-3'
NM_001030558.1	TLR21	F:5'-AGGAGGAGAAGCAACCACAGGGAG-3' R:5'-TGGGTATTTGGAATGAGAAAGGCC-3'

## 2 结果

### 2.1 chTLR3、chTLR7、chTLR21 mRNA 表达量结果与分析

试验采用相对比较Ct法( $Q_r=2^{-\Delta\Delta Ct}$ )分析,首先计算出每个时间点每只雏鸡样品中目的基因与内参基因的Ct差值( $\Delta Ct=\Delta Ct_{目的基因}-\Delta Ct_{内参基因}$ ),然后计算每个时间点样品 $\Delta Ct$ 平均值,选取免疫前样品为对照,以免疫后时间点样品Ct差值减去免疫前对照组Ct差值即为比较的Ct( $\Delta\Delta Ct$ ),即 $\Delta\Delta Ct=(\Delta Ct_{目的基因}-\Delta Ct_{内参基因})_{实验组}-(\Delta Ct_{目的基因}-\Delta Ct_{内参基因})_{对照组}$ 。结果见表2、表3和表4。

表2 TLR3 Cp值检测结果

时间	chTLR3Mean Cp值	内参基因Mean Cp值	$\Delta Ct$	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
0h	22.32	20.94	1.38	0	1
12h	19.56	20.76	-1.2	-2.58	5.979397
24h	19.31	22.54	-3.23	-4.61	24.42015
36h	18.28	21.84	-3.56	-4.94	30.69645
48h	20.06	22.49	-2.43	-3.81	14.02569
72h	24.32	25.65	-1.33	-2.71	6.543216
130h	24.42	25.31	-0.89	-2.27	4.823231

### 2.2 IBDV 感染鸡法氏囊中 chTLR3、chTLR7、chTLR21 mRNA 表达量分析结果

由图1可见在法氏囊中,免疫后12h三种基

表 3 TLR7 Cp 值检测结果

时间	chTLR3Mean Cp 值	内参基因 Mean Cp 值	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	2- $\Delta\Delta$ Ct
0h	25.23	22.34	2.89	0	1
12h	26.22	24.58	1.64	-1.25	2.298416
24h	28.32	26.33	1.99	-0.9	1.820659
36h	18.26	18.2	0.06	-2.83	6.580732
48h	27.15	26.58	0.57	-2.32	4.686098
72h	19.46	18.67	0.79	-2.1	4.047622
130h	21.32	16.16	5.16	2.27	0.22062

表 4 chTLR21 Cp 值检测结果

时间	chTLR3Mean Cp 值	内参基因 Mean Cp 值	$\Delta$ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	2- $\Delta\Delta$ Ct
0h	23.32	20.77	2.55	0	1
12h	25.31	21.63	3.68	1.13	0.46452
24h	24.97	22.54	2.43	-0.12	1.084832
36h	22.65	21.49	1.16	-1.39	2.568115
48h	21.79	22.72	-0.93	-3.48	10.60497
72h	22.37	21.94	0.43	-2.12	4.214399
130h	21.45	21.77	-0.32	-2.87	7.010526

因的 mRNA 表达均有上升, 在 36h chTLR3、chTLR7 mRNA 的表达量达到峰值, 但是 chTLR3 mRNA 表达变化最为显著, chTLR21 mRNA 在 48h 表达量达到峰值, 但是这三种受体中变化最为显著的是 chTLR3。

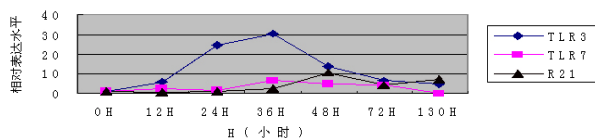


图 1 免疫后法氏囊中 chTLR3、chTLR7、chTLR21 mRNA 表达动态变化

### 2.3 IBDV 感染鸡脾脏中 chTLR3、chTLR7、chTLR21 mRNA 表达量分析结果

脾脏中三种 mRNA 检测结果显示(图 2), 在免疫后三种受体的表达量逐渐上升, 在 36h TLR3 变化最显著, chTLR21 在 48h 变化较为显著, 然而三种受体相比较, chTLR3 变化最为显著。

### 3 讨论

本研究中, 应用 real-time PCR 对 14 日龄海兰褐蛋鸡 chTLR3、chTLR7、chTLR21 mRNA 进行检测。结果显示, 在法氏囊中, 免疫后 12h 三种基因

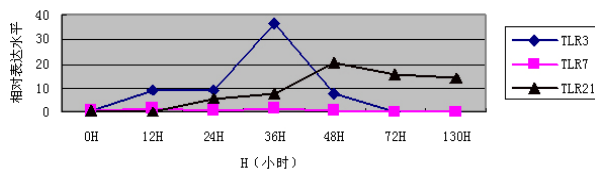


图 2 免疫后脾脏中 chTLR3、chTLR7、chTLR21 mRNA 表达动态变化

的 mRNA 表达均有上升, 在 36h chTLR3、chTLR7 mRNA 的表达量达到峰值, 但是 chTLR3 mRNA 表达变化最为显著, chTLR21 mRNA 在 48h 时表达量达到峰值, 但是这三种受体中变化最为显著的是 chTLR3。在法氏囊病毒感染中这三种 mRNA 表达均受到影响, 进一步说明这三种受体在抗法氏囊病毒感染中起作用。chTLR3 与 chTLR7 在 36h 以后逐渐下降, 在 130 h 达到最低, 但是表达量均高于起始水平。脾脏中三种 mRNA 检测结果显示, 在免疫后三种受体的表达量逐渐上升, 在 36h TLR3 变化最显著, chTLR21 在 48h 时变化较为显著, 然而三种受体相比较, chTLR3 变化最为显著。说明 chTLR3 在法氏囊感染过程中起到抗感染作用, 在抗病毒感染过程中 chTLR21 变化也较为显著, 说明 chTLR21 在病毒感染过程中也起一定作用。而 TLR7 变化较为稳定, 变化幅度较小。由于 TLR7 具有识别 ssSSRNA 的特性, 而 IBDV 属于 dsRNA, TLR7 对其不能识别, 故在病毒感染过程中表达不发生变化。

目前, 对鸡 TLRs 识别 PAMPs 及在抗特异性病原体感染中的作用研究的极少。有限的报道仅见于<sup>[6]</sup>鸡 TLR4 抗沙门氏菌感染过程中的作用及对 LPS 的识别, 对其他 TLRs 是否与哺乳动物的 TLRs 识别相同或相似的 PAMPs 尚未见具体实验研究报告。从生物信息学的比较研究结果来看<sup>[7-8]</sup>, 鸡 TLRs 的配体或所识别的 PAMPs 在理论上应和哺乳动物的 TLRs 相同或相似。IBDV 是一种双链 RNA 病毒(dsRNA) 在哺乳动物是由 TLR3 行使主要识别功能的, 迄今也未见 TLR7 识别 dsRNA 的报道<sup>[9-10]</sup>。本研究表明, 在给鸡接种鸡传染性法氏囊病毒后, 脾脏和法氏囊淋巴细胞 TLR3 mRNA 表达显著上调, 提示鸡 TLR3 在识别 IBDV 并产生固有免疫反应及激发适应性免疫过程中可能发挥一定作用。法氏囊中 TLR21 mRNA 表达变化也较为显著, TLR21 在激发免疫反应过程中可能也发挥一定作用。

结合本实验结果及相关文献,作者作出如下推测:卵生动物和哺乳动物在对病原体的识别和功能上是相同的;TLR3 不是唯一识别 dsRNA 的受体,其他 TLRs 家族成员也有类似功能;在病毒感染中,可能有几种 TLRs 共同参与免疫反应,本研究中 TLR21 表达发生变化,可能与此有关。

#### 参考文献:

- [1] Chuang T, Levitch R J. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1518:157-161.
- [2] Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, et al. TLR6: a novel member of an expanding toll-like receptor family[J]. *Gene*, 1999, 231:59-65.
- [3] Muzio M, Mantovani A. Toll-like receptors[J]. *Microbes Infect*, 2000(2):251-255.
- [4] Jurk M, Heil F, Vollmer J, et al. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848[J]. *Nat Immunol*, 2002, 3(6):499.
- [5] 卢宇, 王凯民, 郭振环, 等. 硫酸化淫羊藿多糖对鸡外周血淋巴细胞 IL-2 和 IFN 的 mRNA 表达的影响[J]. *江苏农业学报*, 2009, 25(5):1073-1077.
- [6] Andrew G, Bowie, Ismar R. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses[J]. *Mol Immunol*, 2005:859-867.
- [7] Crozat K, Beutler B. TLR7; A new sensor of viral infection[J]. *PNAS*, 2004:6835-6836.
- [8] Vercammen E, Staal J, Beyaert R. Sensing of viral infection and activation of innate immunity by toll-like receptor 3, *Clin Microbiol Rev*, 2008, 21(1):13-25.
- [9] 宗玉霞, 卢宇, 郑其升, 等. 不同结构对囊素样肽的免疫活性影响[J]. *中国兽医学报*, 2012, 32(11):1689-1693.
- [10] 弓莉, 覃宗华, 顾为望, 等. 传染性腔上囊炎疫苗免疫鸡 TLR7 基因表达的动态变化[J]. *中国兽医科学*, 2007, 37(6):486-489.

## 广东召集专家座谈商讨动物疫情分析与预警

2013年1月18日上午,省动物卫生监督总所(省动物疫病预防控制中心)在广州召开2012年度广东省动物疫情分析与预警座谈会,华南农业大学、省农科院动物卫生研究所、佛山科学技术学院、广东省出入境检验检疫局、韶关学院等单位的10位动物疫病防控专家,以及广州、河源、惠州、韶关、云浮、肇庆市动物卫生(防疫)监督所,江门、茂名市动物疫病预防控制中心有关领导出席了会议。省动物卫生监督总所屈源泉所长、孙彦伟副所长、林乃锋副调研员,以及有关技术骨干参加了座谈会。

座谈会由屈源泉所长主持。他首先向百忙之中出席座谈会的各位专家表示欢迎和感谢,希望大家畅所欲言,知无不言,言无不尽,根据掌握的动物疫病发生和发展实际情况,分析当前和今后我省动物疫情的流行趋势及防控对策,为我省动物疫病防控与疫情预警工作建言献策。

专家们认为,2012年我省动物疫病防控工作取得了显著成效,随着针对性更强的疫苗毒株的使用,高致病性禽流感、口蹄疫、流行性腹泻等主要动物疫病疫情总体比较平稳。但是,专家们指出,我省动物疫病防控形势依然不容乐观,防控难度不断加大,突出表现在:饲养管理不到位,药物滥用,饲料霉菌毒素污染严重,免疫抑制性疾病的流行,病毒污染面广、病毒变异快,导致动物群体健康水平下降,免疫力下降,细菌耐药严重,病毒病细菌病混合感染严重,猪丹毒、猪伪狂犬病等旧病危害加剧等。为此,与会专家们提出了以下有针对性的防控意见和建议:引导养殖户从以疫苗免疫和药物预防为主向以重视畜禽饲养管理,增强畜禽抵抗力,落实消毒隔离措施,规范合理使用疫苗、药物的防控措施和兽医理念的转变。(信息来源:广东省动物卫生监督总所)

# 一种适合检测养殖场环境中链球菌的 PCR 检测方法

王秋实, 曹冶, 谢晶, 赵素君, 于吉锋, 罗丹丹, 叶勇刚, 李兴玉, 李江凌, 魏甬, 廖党金\*  
(四川省畜牧科学研究院, 成都 610066)

**摘要:** 根据溶菌酶释放蛋白的编码序列特点设计引物, 以建立养殖场环境中链球菌的 PCR 快速检测方法。结果在链球菌参考株都扩增到 885 bp 特异性目的片段, 而肠毒素性大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等均不能检出; 10 倍系列稀释结果显示, 本方法敏感性可达到检测单个菌株; 对处理环境样品时, 能检测到  $4 \times 10^3$  CFU/g 的环境链球菌。该方法具有简单、快速、准确的特点, 大大缩短了检测环境中致病性猪链球菌的时间。

**关键词:** 溶菌酶释放蛋白; 链球菌; 快速检测

中图分类号: S852.61\*1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)01-0030-04

## The rapid detection assay for the muramidase-released protein of streptococcus suis in the environment around the farm

Wang Qiushi, Cao Ye, Xie Jing, Zhao Sujun, Yu Jifeng, Luo Dandan, Ye Yonggang, Li Xingyu, Li Jiangling, Wei Yong, Liao Dangjin\*  
(Sichuan Academy of Animal Science, Chengdu 610066, China)

**Abstract:** A rapid PCR detection method of Streptococcus pollution in the environment around the farm was established based on the unique nucleotides sequence of the Muramidase-Released Protein (MRP). A 885bp fragment is detected in the positive Streptococcus suis strains, negative in the Enterotoxigenic E.coli, Salmonella, Staphylococcus aureus etc. The sensitivity of this method can achieve a single germ in 10-fold dilution.  $4 \times 10^3$  CFU/g Streptococcus of the environment sample can be detected using this method. This method is simple, rapid, accurate, and greatly shorten the time of the detection of Streptococcus suis in the environment.

**Key words:** Muramidase-Released Protein(MRP); Streptococcus suis.; Rapid detection

随着养殖业的快速发展, 规模化、集约化的养殖场增加, 畜禽的粪便和污水排放量剧增, 环境污染问题越来越突出, 一些致病性微生物如猪链球菌、沙门氏菌等混迹其间, 对人畜健康造成极大的影响<sup>[1]</sup>。因此, 需要对养殖场环境病原微生物进行实时监测, 以防止动物疫病的暴发与蔓延。

猪链球菌病属国家规定的二类动物疫病, 是一种人畜共患传染病, 表现为急性出血性败血症、心内膜炎、脑膜炎、关节炎、哺乳仔猪下痢和孕猪流产等, 猪链球菌病主要由猪链球菌引起。用兰氏(Lance field)血清学分类, 可将链球菌分成 A、B、C、D、E、F、G、H、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U 等 19 个血清型。引起猪链球菌病的病原多为 C 群的兽疫链球菌类马链球菌, D 群的猪链球菌, 以及 E、L、S、R 等群

链球菌<sup>[2]</sup>。

目前, 对于猪链球菌病检测主要采用对病料进行病原培养分离, 配合血清型鉴定来诊断猪链球菌病<sup>[3]</sup>, 但是该方法耗时费力, 所以生产实践中, 广大基层兽医工作者亟需快速检测鉴定技术, 为尽早防治该疾病提供宝贵时间。为此, 我们进行了致病性猪链球菌快速检测技术的研究。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料与菌株

1.1.1 试验用菌株 致病性猪链球菌 S 群 CVCC608, R 群 CVCC606、CVCC1941, E 群 CVCC595, A 群 CVCC593, D 群 CVCC572、CVCC1924, C 群 CVCC-559, 均购自中国兽医药品监察所。

肠毒素性大肠杆菌 CVCC196、CVCC197、CVCC-

收稿日期: 2012-11-05

\*: 通讯作者

基金项目: 四川生猪现代产业技术体系岗位专家、四川省财政基础科研经费专项、国家支撑计划项目(2012BAD12B03)、四川省支撑计划项目(2010NZ0106)



200、CVCC211、CVCC215,沙门氏菌 CVCC504,金黄色葡萄球菌 CVCC3055、CVCC3056,肠致病性大肠杆菌 CVCC251,肠侵袭性大肠杆菌 CVCC2042,肠出血性大肠杆菌 CVCC245,均购至中国兽医药品监察所。

**1.1.2 标准样品** 经灭菌处理,放置 36 小时以上的土壤粪便混合物,经 PCR 快速检测无猪链球菌阳性结果,作为无菌环境杂质样品基础。

**1.1.3 主要试剂及培养基** 2×PCR mix、DL2000 DNA Marker、DNA Marker III、氯仿、异戊醇、琼脂糖等,链球菌培养基、缓冲马丁肉汤培养基购自 TIANGEN 公司;其他试剂均为分析纯。

**1.1.4 引物** 根据马清霞等<sup>[4]</sup>的研究资料,针对链球菌溶菌酶释放蛋白 MRP 基因设计合成 1 对引物,上游引物序列为:5'-ATCAGAATCACCCTTTGG-3',下游引物序列为:5'-TCATACCCAGTAAATACACG-3',预期扩增的目的片段大小为 885 bp,由生工生物工程(上海)有限公司合成。

## 1.2 PCR 反应体系及条件

采用 25 μL 反应体系,即 2×PCR mix 12.5 μL,模板 1 μL,上下游引物各 1 μL,用 ddH<sub>2</sub>O 补足至 25 μL。PCR 反应参数:94℃ 5min;94℃ 30sec,55℃ 30sec,72℃ 1min,共 35 个循环;72℃ 10min。PCR 产物经 1.0%琼脂糖电泳检测。

## 1.3 菌液 PCR 前处理方法

以致病性猪链球菌 R 群 CVCC1941 新鲜菌液为代表,取该菌液 5 mL,分成 6 组,第一组提取 DNA,第二组不处理,第三组 100℃ 煮沸 1 min,第四组 100℃ 煮沸 3 min,第五组 100℃ 煮沸 5 min,第六组 100℃ 煮沸 10 min,以此样品为模板,PCR 产物经 1.0%琼脂糖电泳检测。

## 1.4 特异性试验

取致病性猪链球菌 S 群 CVCC608,R 群 CVCC606、CVCC1941,E 群 CVCC595,A 群 CVCC593,D 群 CVCC572、CVCC1924,C 群 CVCC559 和肠毒素性大肠杆菌 CVCC196、CVCC197、CVCC200、CVCC211、CVCC215,沙门氏菌 CVCC504,金黄色葡萄球菌 CVCC3055、CVCC3056,肠致病性大肠杆菌 CVCC251,肠侵袭性大肠杆菌 CVCC2042,肠出血性大肠杆菌 CVCC245 的 DNA 作为模板,进行 PCR 扩增。

## 1.5 敏感性试验

以致病性猪链球菌 R 群 CVCC1941 新鲜菌液为代表,对菌液进行平板计数,计算链球菌浓度。进行 10 倍系列稀释,取其 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、

10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 和 10<sup>-7</sup> 稀释度各 5 mL,做为 DNA 模板进行 PCR 敏感性检测。

## 1.6 样品前处理

在使用特异性引物 PCR 反应前,进行简单处理,去除环境中样品中混杂的不溶于水的固体杂质,以及大部分水溶性的多糖和矿物质。

取标准样品 1 g,20 mL 双蒸水溶解,涡旋震荡混匀,铜网简单过滤后收集到 50 mL 无菌离心管中;收集的过滤液使用双层中速定量滤纸过滤,收集过滤液于 50 mL 无菌离心管中;9 000 r/min 离心 4 min,弃上清,用 10 mL 0.1M 的 PBS 悬浮沉淀,重复 2 次,最后用 30 μL PBS 悬浮沉淀,进行 PCR 分析。

## 1.7 样品前处理方法敏感性试验

以空白阴性样品为对照,将致病性猪链球菌 R 群 CVCC1941 新鲜菌液计数后,进行 10 倍系列稀释,取其 10<sup>0</sup>、10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup> 和 10<sup>-7</sup> 稀释度各 1 mL 加入 1 g 样品中,进行前处理,并做 PCR 敏感性检测。同时,使用病原菌分离培养血清型鉴定法作对照。

## 2 结果

### 2.1 特异性引物 PCR 结果

采用致病性猪链球菌 S 群 CVCC608,R 群 CVCC606、CVCC1941,E 群 CVCC595,A 群 CVCC593,D 群 CVCC572、CVCC1924,C 群 CVCC559 的 DNA 为模板,进行 PCR,经 1%琼脂糖电泳检测发现,均可检测到 885 bp 的特异性条带,结果如图 1 所示,这说明该方法能完全检出以上链球菌。

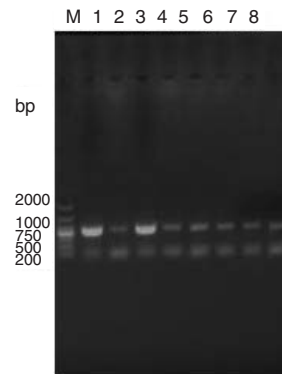


图 1 特异性引物 PCR 检验

泳道 1-8: 分别为链球菌标准阳性株 CVCC608、CVCC606、CVCC1941、CVCC595、CVCC593、CVCC572、CVCC1924、CVCC559 PCR 扩增电泳检测结果;泳道 M: DNA marker

### 2.2 菌液前处理

以致病性猪链球菌 R 群 CVCC1941 新鲜菌液

为代表,取该菌液 5 mL,分成 6 组,分别是提取 DNA、不处理、100 °C 煮沸 1 min、100 °C 煮沸 3 min、100 °C 煮沸 5 min 和 100 °C 煮沸 10 min。以此为模板,进行 PCR 检测。结果发现,全部都能扩增出目的片段,如图 2 所示。这说明,链球菌的 PCR 检测不需进行 DNA 提取,可以直接进行 PCR 快速诊断。

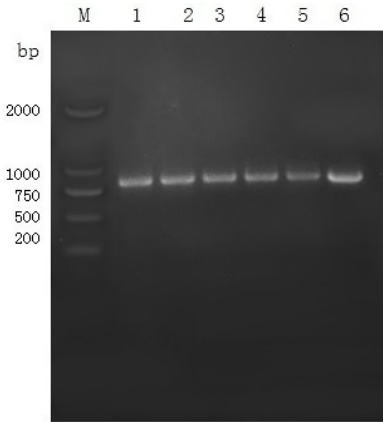


图 2 链球菌菌液前处理有效性检验

泳道 M: DNA marker; 泳道 1: 以链球菌 CVCC1941 菌液 DNA 为模板; 泳道 2-6: 以链球菌 CVCC1941 菌液为模板。泳道 2: 未处理; 泳道 3: 菌液煮沸 1 min; 泳道 4: 菌液煮沸 3 min; 泳道 5: 菌液煮沸 5 min; 泳道 6: 菌液煮沸 10 min。

### 2.3 特异性检验

取致病性猪链球菌 S 群 CVCC608, R 群 CVCC606、CVCC1941, E 群 CVCC595, A 群 CVCC593, D 群 CVCC572、CVCC1924, C 群 CVCC559 和肠毒素性大肠杆菌 CVCC196、CVCC197、CVCC200、CVCC211、CVCC215, 沙门氏菌 CVCC504, 金黄色葡萄球菌 CVCC3055、CVCC3056, 肠致病性大肠杆菌 CVCC251, 肠侵袭性大肠杆菌 CVCC2042, 肠出血性大肠杆菌 CVCC245 的 DNA 作为模板, 进行 PCR 检测。结果见图 3。除了链球菌以外, 其它病原微生物均不能检出。这说明该方法能较好地地区分链球菌, 具有较高的特异性。

### 2.4 敏感性检验

取致病性猪链球菌 R 群 CVCC1941 新鲜菌液为代表, 对菌液进行平板计数, 起始浓度为  $8 \times 10^6$  CFU/mL。进行 10 倍系列稀释, 取其  $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$  和  $10^{-9}$  稀释度各 1  $\mu$ L 为模板进行 PCR 敏感性检测。结果如图 3 所示, 在  $10^{-4}$  稀释度时, 菌液浓度达到了  $8 \times 10^2$  CFU/mL, 即 0.8 CFU/ $\mu$ L, 还可以检测到链球菌, 在以下浓度就不能检测到链球菌。

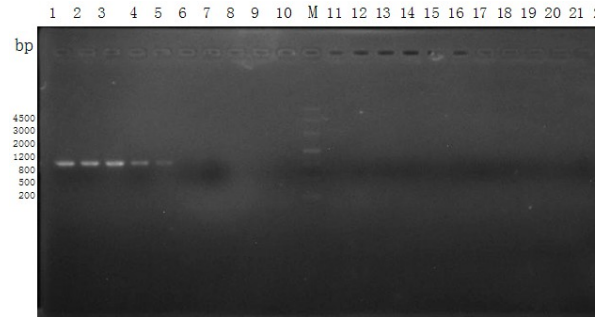


图 3 特异性及敏感性检验

泳道 1-10: 为 10 倍梯度稀释的链球菌阳性株 CVCC1941 检测结果, 泳道 1: 原菌液 ( $8 \times 10^6$  CFU/mL); 泳道 11-15: 肠毒素性大肠杆菌 CVCC196、CVCC197、CVCC200、CVCC211、CVCC215; 泳道 16: 沙门氏菌 CVCC504; 泳道 17-18: 金黄色葡萄球菌 CVCC3055 CVCC3056; 泳道 19: 肠致病性大肠杆菌 CVCC251; 泳道 20: 肠侵袭性大肠杆菌 CVCC2042; 泳道 21: 肠出血性大肠杆菌 CVCC245; 泳道 M: DNA marker。

### 2.5 前处理敏感性

取致病性猪链球菌 R 群 CVCC1941 新鲜菌液为代表, 对菌液进行平板计数, 起始浓度为  $8 \times 10^6$  CFU/mL。进行 10 倍系列稀释, 取其  $10^0$ 、 $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  和  $10^{-7}$  稀释度各 1 mL 加入 1 g 样品中, 进行前处理, 然后进行 PCR 检测。结果如图 4 所示, 可以发现, 在  $10^{-3}$  稀释度时, 样品中链球菌浓度达到了  $4 \times 10^3$  CFU/g 时, 还可以检测到链球菌, 当浓度进一步下降时, 就不能检测到了。这说明经过前处理, 本方法能检测到  $4 \times 10^3$  CFU/g 的环境链球菌。

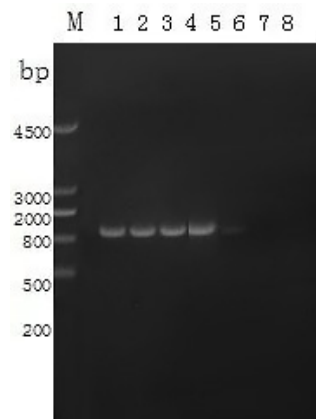


图 4 环境样品前处理敏感性检验

泳道 M: DNA marker; 泳道 1-8: 10 倍系列稀释的链球菌标准阳性株 CVCC1941 菌液 1 mL 加入到 1g 样品中, 经前处理后检测的结果; 其中泳道 1 为原菌液 ( $8 \times 10^6$  CFU/mL)。

### 2.6 PCR 检测法与传统的培养法的比对

在采用 PCR 法进行环境中链球菌检测的同时, 我们用传统的使用病原菌分离培养血清型鉴定法作

对照,验证了检测的符合率。共用 30 个环境样品,其中 PCR 法检测阳性数为 3 个样品,而培养法检测阳性数也为 3 个样品。符合率达到 100%(图 5)。

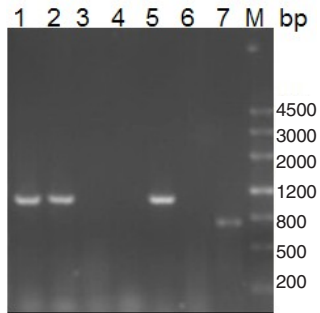


图 5 环境样品 PCR 法前检验结果  
泳道 M: DNA marker; 泳道 1-7: 环境样品。

### 3 讨论

链球菌是引起人和动物细菌性感染的主要病原菌之一,由此所致的疾病复杂而多样,对人类健康和畜牧业生产带来巨大威胁<sup>[5,6]</sup>。国内外对链球菌的检测大多依靠传统的生化鉴定方法。该方法虽然比较准确,但耗时费力,鉴定时间长,易受细菌生理条件和抗生素使用限制。由于链球菌分离培养需求比较苛刻,常导致培养假阴性,很难满足临床要求<sup>[7,8]</sup>。PCR 技术以其敏感性强、特异性好、检测时间短等特点被广泛应用于许多病原菌的快速鉴定,本次建立的链球菌 PCR 检测方法,克服了链球菌传统培养法在临床应用上的不足。

溶菌酶释放蛋白(Muramidase-Released Protein, MRP)和胞外蛋白因子(Extra-cellular protein factor, EF)被认为是链球菌的两种重要毒力因子,从病畜体内分离的菌株大多含有这两种分子,而从大多数健康家畜体内分离的菌株没有这两种大分子<sup>[9,10]</sup>。本研究参照文献,针对链球菌溶菌酶释放蛋白(Muramidase-Released Protein, MRP)基因合成一对引物,不需提取链球菌基因组 DNA,而直接利用稀释菌液或菌落为模板进行 PCR 扩增,简化了细菌常规 PCR 需提取 DNA 的繁杂步骤,节省了病原检测时间。应用该方法对受试链球菌标准阳株进行扩增,均获得与预期大小一致的 885 bp 特异性目的片段,而对 11 株非链球菌的扩增结果均呈阴性;敏感性可达到单个菌株。表明该方法能用于环境中链球菌的快速检测。

养殖场环境中实际的检测样品主要为粪便,发酵床,以及养殖环境周围的土壤。三种样品都能部分溶于水,经过涡旋震荡,能形成较均匀混合液。链

球菌直径为 0.6~1.0  $\mu\text{m}$ ,中速和快速定量滤纸的孔径为 30.0~120.0  $\mu\text{m}$ ,溶液中的链球菌能顺利通过滤纸,而混合液中的固体杂质被滞留在滤纸上,达到去除混合液中的大颗粒沉淀的目的。

用本办法处理环境样品时,能检测到  $4 \times 10^3$  CFU/g 的环境链球菌,这可能是由于环境样品的复杂组成造成的。在链球菌的前处理过程中,我们用适量水去溶解链球菌等可溶性物质,经过离心过滤等过程,浓缩到 30  $\mu\text{L}$  PBS 中。再取 1  $\mu\text{L}$  作为模板,进行 PCR 检测。前处理过程涉及到对细菌混合液的多次过滤、浓缩过程,这些过程中的操作会造成部分链球菌损失。最后用水去溶解链球菌 DNA 时,依然会有部分水溶性矿物质、糖分等杂质,溶入最后的菌体 DNA 溶液中。这些成分会进入 PCR 反应体系,影响 PCR 反应效率,导致部分 PCR 出现假阴性的结果,影响到链球菌的检测的准确性。

### 参考文献:

- [1] Werthelm H F, Nghia H D, Taylor W, et al. Streptococcus suis: An Emerging Human Pathogen[J]. Clin Infect Dis, 2009, 48(5):617-625.
- [2] 丁晓刚, 薛小平, 田淑琴, 等. 我国人-猪链球菌病研究进展[J]. 特别关注, 2006(9):19-21.
- [3] 洪伟彬, 黄育浩, 姜艳华. 猪链球菌检测及分型方法研究进展[J]. 广东畜牧兽医科技, 2010, 35(4):9-12.
- [4] 马清霞, 何孔旺, 陆承平. 猪链球菌 2 型及其毒力因子检测多重 PCR 的建立与应用[J]. 中国兽医学报, 2006, 26(1):28-31.
- [5] Fittipaldi N, Fuller T E, Teel J F, et al. Serotype distribution and production of muramidase-released protein, extracellular factor and suilysin by field strains of Streptococcus suis isolated in the United States[J]. Veterinary microbiology, 2009, 139(3-4):310-7.
- [6] Arradas T C, Luque I, DeAndr S D. Epidemiological relationship of human and swine Streptococcus suis isolates[J]. Journal of veterinary medicine. B, Infectious diseases and veterinary public health, 2001, 48(5):347-55.
- [7] 欧瑜, 陆承平. 检测猪链球菌 2 型毒力相关蛋白的 ELISA 法的建立[J]. 南京农业大学学报, 2001(2):94-97.
- [8] 罗隆泽, 王鑫, 崔志刚, 等. 四川资阳地区健康猪 2 型猪链球菌分离与分子生物学特征分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2009(9):842-845.
- [9] Henk J Wisselink, Hilde E Smitha, Norbert Stockhofe, et al. Distribution of capsular types and production of muramidase-released protein(MRP) and extracellular factor (EF) of Streptococcus suis strains isolated from diseased pigs in seven European countries[J]. Vete Microbiol, 2000, 74(3):237-248.
- [10] 曾巧英, 陆承平. 猪链球菌 2 型溶菌酶释放蛋白的粘附作用[J]. 南京农业大学学报, 2002, 25(4):67-71.

# 海南沿海羊栖菜和海带不同提取物的抑菌活性

符家珠<sup>1</sup>, 杨宝<sup>2</sup>, 刁晓平<sup>2,3</sup>, 何娇<sup>2</sup>

(1. 海南省农林科技学校, 海南五指山 572200; 2. 海南大学农学院, 海口 570228;

3. 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室, 海口 570228)

**摘要:** 本实验以金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* Rosenbach)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*) 2种需氧型细菌作为供试细菌, 用圆形纸片法对羊栖菜和海带的无菌水、乙醚和乙醇提取物进行抑菌试验。结果表明: 采用水提法、95%乙醇浸提法和乙醚索氏提取法均能从羊栖菜和海带中提取出活性物质, 提取回收率依次为水提法>乙醇提法>乙醚提法; 比较对羊栖菜和海带3种不同提取方法得出: 乙醇提取物对两种菌体的抑菌活性相对水提取物和乙醚提取物较好, 且乙醇提取物乙酸乙酯相对水相抑菌活性较好; 比较羊栖菜和海带乙醇提取物乙酸乙酯相的MIC得出: 海带对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的MIC相对羊栖菜较低, 抑菌效果较好。

**关键词:** 羊栖菜; 海带; 海藻提取物; 抑菌活性

**中图分类号:** S851.347.34

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2013)01-0034-04

## Comparison of antibacterial activity of different extracts of Hainan coast seichell and kelp

Fu Jiazhu<sup>1</sup>, Yang Bao<sup>2</sup>, Diao Xiaoping<sup>2,3</sup>, He Jiao<sup>2</sup>

(1. Hainan Agriculture and Forestry Science and Technology School, Wuzhishan, 572200, China; 2. College of Agriculture, Hainan University, Haikou, 570228, China; 3. tropical Hainan Province, Key Laboratory of sustainable use of biological resources, Haikou, 570228, China)

**Abstract:** The antibacterial activity of water extracts and ethanol extracts and aether extracts from Seichell (*Sargassum fusiforme*) and Kelp (*Laminaria japonica* Aresch) were studied by Double-Disc method. Two bacterial, *Staphylococcus aureus* Rosenbach, *Escherichia coli* were used. The results showed that the three methods can extract the active substance from the two brown algae. The rate of water extraction was higher than the other two. Ethanol extracts has better antibacterial activities than water extracts and aether extracts, and ethyl acetate phase has better bacteriostatic effect than water phase. Ethyl acetate phase of ethanol extracts of *Laminaria japonica* Aresch has better inhibition effect on, lower MIC, *Staphylococcus aureus* Rosenbach and *Escherichia coli*.

**Key words:** *Sargassum fusiforme*; *Laminaria japonica* Aresch; seaweed extracts; antibacterial activity

海藻是海洋生物资源的重要组成部分, 它主要由蓝藻(真枝藻、微囊藻、螺旋藻等)、绿藻(石莼、礁膜、松藻等)、红藻(如紫菜、石花菜、江篱、琼枝等)和褐藻(如海带、裙带菜、马尾藻等)4大藻类组成, 据估计, 世界海洋中约有8000余种海藻。我国海岸线长, 海藻产量大, 人工养殖海带数位居世界第一。

羊栖菜(*Sargassum fusiforme* (Hary.) Sei-

chell)属褐藻门马尾藻科, 别名小叶海藻、虎首菜、鹿角尖、海菜芽、羊奶子、海大麦等, 是一种重要的药食两用海藻。近代临床研究表明羊栖菜在疾病防治方面具有提高免疫力、预防脑血栓、心肌梗死、抗辐射、缓解焦躁不安情绪和改善贫血等多种功能<sup>[1]</sup>。

海带(*Laminaria japonica* Aresch)属褐藻门布科, 为大叶藻科植物, 因其生长在海水中, 且

柔韧似带而得名。海带营养价值高,且具有一定的药用价值。其性味咸寒,具有软坚散结、消肿利水、润下消痰等功能<sup>[2]</sup>。

国内外关于海藻及其提取物的报道较多。研究表明,从海藻中可得到多种具有抗肿瘤、抗氧化、抗细菌、抗真菌、抗病毒活性的物质<sup>[3,4]</sup>。近年来随着研究人员对大量海藻活性物质的分离、纯化,大量活性物质被发现,且对其性质和成分鉴定的研究日益深入,提取方式、抑菌效果亦倍受关注,可以预见,海藻及其提取物的相关研究有着广阔的发展前景。但是对羊栖菜和海带的研究还鲜有报道。

本实验以金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌 2 种细菌作为供试细菌,用圆形纸片法对羊栖菜和海带的水、乙醚和乙醇提取物进行抑菌试验。研究羊栖菜和海带对两种致病菌的体外抑菌效果,以期为进一步寻找新型饲料添加剂,促进畜牧业的发展提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 海藻种类** 羊栖菜、海带两种海藻均为炮制好的中药材。生产厂家:海南寿南山参业有限公司,生产批号:110307。

**1.1.2 供试菌株** 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* Rosenbach);大肠埃希菌(*Escherichia coli*)。菌种来源于海南大学材料与化工学院生物工程实验室。

### 1.2 提取方法<sup>[5-6]</sup>

将羊栖菜和海带放入烘干箱中,65℃,烘干 1~2 h,充分烘干后用粉碎机粉碎成粉末,备用。分别用水煎煮法<sup>[7]</sup>、浸泡法和索氏提取法提取水提取物、乙醇提取物水相和乙酸乙酯相、乙醚提取物,然后配置成 0.1 g/mL 溶液备用。

### 1.3 抑菌实验

**1.3.1 菌悬液制备** (1)活化菌种:取少量供试细菌(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌)接种于 30 mL 液体培养基,37℃,180 r/min,恒温摇床培养 18 h。(2)对数期菌悬液配制:运用 0.5 麦氏比浊法将菌悬液配置成  $1.5 \times 10^8$  个/mL,稀释至  $10^6$  后,4℃保存备用。

**1.3.2 药敏试验** (1)圆形纸片法<sup>[8]</sup>:实验组设一

个无菌蒸馏水阴性对照、氨苄西林阳性对照和各个提取物组。取 50  $\mu$ L 菌液,均匀涂布于琼脂平板上。用无菌镊子将充分吸收提取物并挥发干的含药纸片紧贴于培养基表面,各纸片中心相距应大于 24 mm,纸片距平板内缘应大于 15 mm,37℃培养 18~24 h 后观察结果,测量抑菌圈。每个样品设 2 个平行样,结果取平均值。(2)试管稀释法<sup>[9]</sup>取无菌试管 8 支,将药物依次稀释成 1/10、1/20、1/40、1/80、1/160、1/320、1/640,第 8 管不加药物为对照组管;分别加入备用菌悬液,混匀,37℃培养 18~24 h,观察结果。结果判定以肉眼观察,以能抑制细菌生长的最低药物浓度作为该药的最小抑菌浓度(MIC)<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 羊栖菜和海带的提取回收率

由表 1 可看出,三种不同的提取方法所得到的粗提物质量不同,两种海藻不同提取法的提取率依次为水提法>乙醇提法>乙醚提法。

表 1 三种不同方法的提取率比较

海藻种类	提取方法	生药重量(g)	提取物重量(g)	回收率(%)
羊栖菜	水提法	30.0	3.29	10.97
	乙醇提法	30.0	0.78	2.60
	乙醚提法	30.0	0.43	1.43
海带	水提法	30.0	6.23	20.77
	乙醇提法	30.0	0.93	3.10
	乙醚提法	30.0	0.51	1.70

### 2.2 羊栖菜和海带提取物抑菌结果

抗菌药物敏感度的判定标准为:抑菌圈直径 $\geq 15$  mm 为高度敏感,10~15 mm 为中度敏感,<10 mm 为耐药<sup>[11]</sup>。药片直径为 6 mm。

由表 2 可知,羊栖菜水提物和乙醚提取物对两种菌均无抑菌效果;乙醇提取物水相对大肠杆菌产生抑菌圈达 10 mm,为中度敏感,对金黄色葡萄球菌产生抑菌圈达 7 mm,为耐药;乙醇提取物乙酸乙酯相在对两种菌的药敏试验中均产生了抑菌圈,其中对金黄色葡萄球菌抑菌圈达 13 mm,对大肠埃希菌抑菌圈达 12 mm,均为中度敏感。

海带水提物和乙醚提取物对两种供试细菌均无抑菌效果;乙醇提取物水相仅对金黄色葡萄球

菌产生抑菌圈,但效果不明显;乙醇提取物乙酸乙酯相在对两种菌的药敏试验中均产生了抑菌圈,其中对大肠埃希菌抑菌圈达 17 mm,对金黄色葡萄球菌抑菌圈达 16 mm,均为高度敏感。

表 2 羊栖菜和海带提取物抑菌结果

药物	提取法	金黄色葡萄球菌		大肠杆菌	
		抑菌圈直径(mm)	敏感度	抑菌圈直径(mm)	敏感度
羊栖菜	水提物	6	耐药	6	耐药
	乙醚粗提物	6	耐药	6	耐药
	乙醇水相	7	耐药	10	中敏
	乙醇乙酸乙酯相	13	中敏	12	中敏
海带	水提物	6	耐药	6	耐药
	乙醚粗提物	6	耐药	6	耐药
	乙醇水提物	7	耐药	6	耐药
	乙醇乙酸乙酯相	16	高敏	17	高敏
阴性对照	无菌水	6	耐药	6	耐药
药物对照	氨苄西林	30	高敏	14	中敏

### 2.3 羊栖菜和海带乙醇提取物乙酸乙酯相最小抑菌浓度(MIC)

由表 3 可知:羊栖菜乙醇提取物乙酸乙酯相对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度均为 1/80;海带乙醇提取物乙酸乙酯相对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度均为 1/160。

表 3 羊栖菜和海带的乙醇提取物乙酸乙酯相最小抑菌浓度(MIC)

测试海藻	测试菌	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
羊栖菜	大肠埃希菌	- <sup>1)</sup>	-	-	-	+	+	+
	金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	+	+	+
海带	大肠埃希菌	-	-	-	-	-	+	+
	金黄色葡萄球菌	-	-	-	-	-	+	+

1):“-”表示生长受到抑制,“+”表示生长正常。

### 2.4 讨论

随着畜牧业规模化、集约化的发展,抗生素长期滥用造成的病原菌抗药性日趋增强,中药成为替代抗生素解决抗药性和药残的重要方案,

越来越受到重视。大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌是威胁畜牧业及水产养殖业发展的主要致病菌。本文以不同方法提取羊栖菜和海带有效成份,通过对这两种细菌的体外抑菌试验,初步证实这两种海藻有望作为非抗生素的饲料添加剂应用于畜牧业。

本实验采用乙醇和乙醚两种不同方法对羊栖菜和海带进行提取,可以看出,不同提取方法所得到的实验结果有明显的差异。在对这两种物质提取实验中,乙醇提取率均高于乙醚的提取率;林雄平<sup>[12]</sup>等在对羊栖菜乙醇和乙醚提取物的抗菌活性比较时,结果表明,乙醇提取法提取回收率较高,且乙醇提取物的抗菌活性较好,本实验也得出相一致的结果。

在抑菌活性方面,两种物质的水提物和乙醚提取物对两种供试细菌均没有抑菌效果,有研究表明,这是由于粗提取物中一些有效抗菌物质之间相互作用或者为其他的基团所屏蔽,或是粗提取物中的一些活性物质相互拮抗,通过 TLC 分离后,抗菌活性才会体现出来<sup>[5-6]</sup>。

由于不同藻类所含活性物质不同,不同提取方法所得到的物质也不同。相比乙醚提取物,乙醇提取物的抑菌活性较好。经乙酸乙酯萃取分相后,乙醇提取物水相抑菌活性较差,而乙酸乙酯相抑菌活性均较好。羊栖菜乙醇提取物乙酸乙酯相在对两种菌的药敏试验中均产生了抑菌圈,其中对金黄色葡萄球菌和大肠埃希菌抑菌均为中度敏感。海带乙醇提取物乙酸乙酯相在对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌均为高度敏感。应用比滤纸法准确的试管稀释法,进一步证实了这一结论。

## 3 结论

3.1 采用水提法、95%乙醇浸提取法和乙醚索氏提取法均能从羊栖菜和海带中提取出活性物质,提取回收率依次为水提法>乙醇提法>乙醚提法。

3.2 比较对羊栖菜和海带三种不同提取方法得出:乙醇提取物对两种菌体的抑菌活性相对水提物和乙醚提取物较好,且乙醇提取物乙酸乙酯相对水相抑菌活性更好。

3.3 比较羊栖菜和海带乙醇提取物乙酸乙酯相的 MIC 得出:海带对大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌的 MIC 相对羊栖菜较低,抑菌效果更好。

**参考文献:**

- [1] 李波, 许时婴. 羊栖菜的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2003, 24(3): 23-25.
- [2] 袁强. 海带的保健作用[J]. 中国检验检疫, 2006(4): 62-64.
- [3] 刘新, 孔雯, 邵长伦, 等. 中药复方海藻制剂水煎液水相化学组成分析[J]. 中国海洋药物, 2010, 29(2): 27-30.
- [4] 杨建东, 孔曼, 黄希芬, 等. 应用海藻酸钠微球联合碘化油经导管肝动脉化疗栓塞治疗肝癌[J]. 中国介入影像与治疗学, 2010, 7(3): 225-227.
- [5] 罗先群, 王广新. 海南沿海二种海藻抗菌生物活性物质的提取及抑菌活性的研究[J]. 中国食品添加剂, 2008(5): 111-118.
- [6] 徐年军, 范晓, 韩丽君, 等. 海藻乙醇提取物抗菌活性的研究[J]. 海洋与湖沼, 2002, 33(3): 265-270.
- [7] 徐淑萍, 罗燕梅. 新型煎药机的设想[J]. 甘肃科技, 2002, 18(5): 64-64.
- [8] 张卓然, 黄敏. 医学微生物实验学[M]. 第三版. 北京科学出版社, 2008: 28-29.
- [9] 袁婷, 钟学稳. 常见中草药体外抑菌实验[J]. 畜牧兽医科技信息, 2009(9): 23-25.
- [10] 喻华英. 7味中草药及配伍方剂提取物对3株大肠杆菌体外抑菌实验[J]. 中兽医医药杂志, 2008(4): 32-33.
- [11] 黄荣奇. 马尾松松针挥发油抗心律失常作用极其对心肌单相动作电位的影响[D]. 成都中医药大学硕士论文集, 2006: 27-281.
- [12] 林雄平, 郑怡, 陈晓清, 等. 羊栖菜提取物抗动植物病原菌活性及化学成分初步分析[J]. 热带海洋学报, 2009, 28(2): 77-80.

## 母猪的发情鉴定与适时配种技术

### 初情期与适配年龄

(1) **初情期:** 一般二杂母猪 6~8 月龄, 本地母猪 3~4 月龄为初情期, 小母猪第一次发情因未达到体成熟, 配种后往往不能受孕, 一般在第二个或第三个发情期正常受胎, 也就是第一次发情后 1~1.5 个月后才能配种。影响初情期的因素有品种、营养、管理方法等。

(2) **适配年龄:** 适宜配种年龄和体重: 一般瘦肉型母猪 8~9 月龄配种, 母猪体重达 90 公斤; 外种及外二杂母猪体重达 110 公斤左右配种。

### 发情症状

(1) **发情周期:** 正常母猪从一次发情开始到下一次发情开始的间隔时间为 18~22 天, 平均 21 天, 叫发情周期。发情周期分为发情前期、发情期、发情后期和休情期四个阶段。发情持续时间: 一般瘦肉型母猪 2~3 天, 地方母猪 3~5 天。

(2) **发情症状:** 发情前期: 阴户逐步变红肿胀, 阴道流出水样黏液, 母猪不安、减食、东张西望、早起晚睡、爬跨, 手压背部无静立反应, 喜欢接近公猪但不接受配种。发情期(适配期): 母猪接受性要求(配种)的时期。母猪阴户肿胀皱缩, 黏液变淡呈淡白色; 母猪有瞪眼、翘尾、竖耳、排尿、背部僵硬、发呆等外部表现; 接受公猪爬跨, 手压背部和骑背静立不动, 卵泡发育成熟并排卵, 是配种的适宜时期。发情后期: 阴户肿胀逐渐消失, 性欲减退, 拒绝交配。休情期: 母猪本次发情结束到下次发情开始这段时间。

### 发情鉴别

(1) 养成用公猪辅助鉴定习惯。(2) 每天进行 2 次发情检查。(3) 用一头性欲旺盛的公猪(作试情公猪)缓缓通过母猪旁。(4) 当公母猪鼻与鼻接触时, 立即对母猪施压背测试及观察母猪发情征候。(5) 鉴定到发情后至施行配种前的间隔时间内, 母猪不要与公猪接触。

### 母猪的适时配种配种准备

母猪后臀部用温水冲洗干净, 然后用 1%新洁尔灭溶液消毒一遍。配种所用公猪尿道出口部也要进行消毒, 防止阴道炎与子宫炎的发生。

### 适时配种

应在检查到母猪稳定发情后 12~18 小时开始配种, 间隔 12 小时再配一次。

### 注意事项

后备母猪与经产母猪发情到排卵的时间有所不同, 后备母猪为 24~38 小时, 经产母猪 36~48 小时, 稳定发情时间长短也不一样, 后备母猪为 1~2 天, 经产母猪为 2~3 天, 因此两者适时配种时也有所不同。另外母猪断奶后, 早期发情(断奶后 3~4 天)和迟发情(断奶后 5 天以上), 母猪的发情与排卵持续时间也不同, 相应的其最适配种时间也应有所不同。(信息来源: 中国畜牧兽医报)

## 4 个厂家不同批次猪瘟疫苗免疫效果比较试验

查云峰<sup>1</sup>, 任裕其<sup>1</sup>, 田云<sup>1</sup>, 陈劲冲<sup>2</sup>, 万美梅<sup>1</sup>, 王福广<sup>1</sup>, 焦颖<sup>1</sup>, 薛念波<sup>1</sup>, 孙彦伟<sup>1\*</sup>

(1. 广东省动物卫生监督总所, 广东 广州 510230; 2. 江门鸿利畜牧养殖有限公司, 广东 新会 529000)

**摘要:** 在同一条件下对4个厂家生产的8个批次的猪瘟疫苗进行了免疫效果评价试验, 并与猪瘟疫苗免疫效果进行比较。结果发现4个厂家生产的猪瘟疫苗二次免疫效果较好, 但部分厂家存在批间差异、质量不稳定现象。猪瘟疫苗免疫效果优于猪瘟疫苗。

**关键词:** 猪瘟疫苗; 免疫; 抗体; 比较

中图分类号: S852.52

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)01-0038-03

## Vaccination results of different batches of live vaccines against Classical Swine Fever produced by four veterinary bio-pharmaceuticals

Zha Yunfeng<sup>1</sup>, Ren Yuqi<sup>1</sup>, Tian Yun<sup>1</sup>, Chen Jingchong<sup>2</sup>, Wan Meimei<sup>1</sup>, Wang Fuguang<sup>1</sup>, Jiaoying<sup>1</sup>, Xue Nianbo<sup>1</sup>, Sun Yanwei<sup>1\*</sup>

(1. Guangdong Animal Health Supervision Institute, Guangzhou 510230, China ;2. Jiangmen Hongli Livestock Company Ltd. Jiangmen 529000, China)

**Abstract:** In order to investigate the vaccination results of different live vaccines against classical swine fever (CSF) produced by different veterinary bio-pharmaceuticals, 4 vaccines (2 batches each) manufactured using primary bull testicular (BT) cell culture and one vaccine produced using swine testicular (ST) cell line culture were used for the experiments in selected swine farms. Our results showed that the effective antibody titers against CSF virus were high in pigs after two vaccinations with BT cell-originated live vaccines. But the vaccination results of BT cell-originated live vaccines manufactured by 3 veterinary bio-pharmaceuticals showed difference antibody titers between two batches each. It suggested that the qualities of vaccines was unstable in 3 bio-pharmaceuticals. The vaccination results revealed by the titers and durations of specific antibody, of ST cell-originated live CSF vaccines is, as the whole, more effective than those of four BT cell-originated live CSF vaccines.

**Key words:** Classical swine fever vaccine; Immunization; Antibody; Comparison

猪瘟疫 (Classical Swine Fever, CSF) 是由黄病毒科瘟病毒属的猪瘟疫病毒引起的一种急性、热性、接触性传染病<sup>[1]</sup>。当前, 该病主要在南美和亚洲地区流行, 养猪业发达的国家, 为了猪肉制品的生物安全, 采取的是发现疑似病例立即扑杀的措施<sup>[2]</sup>。我国由于长期贯彻预防为主的思想, 采取广泛接种猪瘟疫弱毒疫苗 (HCLV) 的防控措施, 本病在我国已经得到有效控制。但该病仍在局部区域散发存在, 并造成较大的经济损失<sup>[3]</sup>。《国家中长期动物疫病防治规划 (2012-2020 年)》将猪瘟疫列为优先防治的 5 种重大动物疫病之一。目

前, 控制猪瘟疫仍实施猪瘟疫活疫苗强制免疫措施。

2011 年我们进行的猪瘟疫疫苗免疫试验发现个别厂家生产的猪瘟疫弱毒活疫苗免疫效果不佳<sup>[4]</sup>, 为进一步了解 2012 年政府招标的猪瘟疫活疫苗的免疫效果, 我们于 5~11 月在江门某猪场, 在同一条件下对 4 个厂家生产各 2 批次的猪瘟疫原代细胞苗进行了免疫效果评价试验, 并与猪瘟疫传代细胞苗的免疫效果进行比较。现将试验情况报告如下:

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 试验动物 江门某猪场 30 日龄健康仔猪



135头。

**1.1.2 受试疫苗** 随机抽取2012年政府招标的4个厂家生产的各2个批次的猪瘟细胞源活疫苗(牛皋丸原代细胞,下称“猪瘟原代细胞苗”)。A公司批号为2011031、2011032;B公司批号为1112167、1109118;C公司批号为110919、110939;D公司批号为110810、110811。采用双盲方式进行编号,末次编码为1~8;随机抽取猪瘟传代细胞苗(猪皋丸传代细胞系,下称“猪瘟传代细胞苗”),编码为9,批号为2011108。

**1.1.3 试剂** 猪瘟抗体阻断ELISA检测试剂盒,由美国IDEXX公司生产。

## 1.2 方法

**1.2.1 猪群分组** 135头健康仔猪,先检测母源抗体,按阴阳性比例相对平均进行分组,分为9组,每组15头。

**1.2.2 免疫程序** 每组选用1个批号的猪瘟疫苗进行免疫。34天龄进行第一次接种,65天龄进行第二次接种,接种剂量均为1头份,耳后颈部肌肉注射。

**1.2.3 采血** 免疫前采血一次,免疫后28d进行第2次采血,以后每隔20d左右采血一次,直至试验结束,共采血7次。每次采血3~5 mL/头,分离血清。

**1.2.4 抗体检测和判断标准** 按照IDEXX公司猪瘟抗体阻断ELISA试剂盒的操作说明书进行检测。阻断率大于或等于40%判定为阳性;阻断率小于或等于30%判定为阴性;阻断率在30%~40%之间,判为可疑。

## 2 结果与分析

### 2.1 4个厂家的猪瘟原代细胞苗二次免疫总体效果较好,抗体持续期长

免疫前,试验组猪只猪瘟母源抗体水平基本一致。4个厂家猪瘟原代细胞苗一次免疫后28d,免疫抗体合格率在50%~68.97%之间,4个厂家的疫苗一次免疫抗体合格率均低于70%。二次免疫后20d,猪群抗体水平明显上升,抗体合格率在62.07%~79.31%之间。二次免疫后100d,猪群抗体维持在较高水平,抗体合格率在71.43%~96.55%之间。4个厂家疫苗免疫抗体合格率均在70%以上,其中A最高,为96.55%;B次之,为86.21%;C和D稍低,为71.43%和72.41%。免疫后猪瘟抗体变化情况如图1所示。猪瘟原代细胞苗

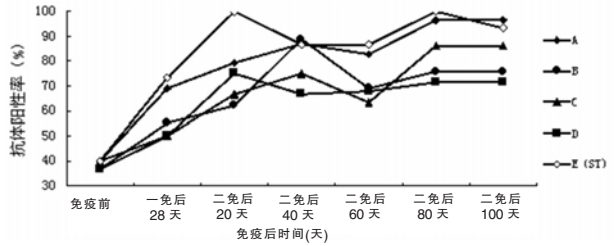


图1 不同厂家猪瘟疫苗免疫后抗体合格率变化曲线

两次免疫后,抗体持续期长,可以维持到出栏。

### 2.2 部分厂家猪瘟活疫苗存在批间差异、质量不稳定现象

8个批次的猪瘟原代细胞苗一次免疫后28d,抗体合格率在26.7%~73.33%之间,其中4个批次的疫苗抗体合格率超过70%,3个批次低于40%。二次免疫后20d,抗体合格率在42.9%~86.7%之间,其中有5个组抗体合格率超过70%,3个低于70%。二次免疫后100d,抗体合格率在50%~100%之间,其中有7个组抗体合格率超过70%,1个低于70%。B、C和D公司的疫苗二免后5次抗体合格率存在较大差异,B公司2个组分别为67.12%、70.66%,C公司2个组分别为50%、87.14%,D公司2个组分别为58.57%、78.67%。B、C和D公司的不同批次的疫苗存在批间差异、质量不稳定现象。具体结果如表1所示。

### 2.3 猪瘟传代细胞源活疫苗免疫效果较好

猪瘟传代细胞苗一次免疫后28d,猪群抗体合格率达到73.33%;二次免疫后抗体一直维持在较高水平,抗体合格率均在80%以上。免疫二次至试验结束,猪瘟传代细胞苗平均抗体合格率为93%、抗体阻断率为72%,而猪瘟原代细胞苗平均抗体合格率为75.85%、抗体阻断率为58.5%。与2011年免疫试验结果基本一致,猪瘟传代细胞苗免疫效果优于猪瘟原代细胞苗。猪瘟传代细胞苗免疫后抗体整齐度较好,阻断率较高,免疫效果优于猪瘟原代细胞苗。猪瘟疫苗免疫后抗体阻断率如图2所示。

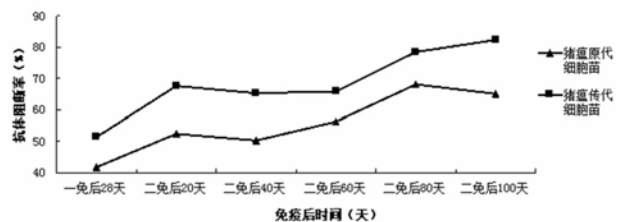


图2 猪瘟疫苗免疫后抗体阻断率变化曲线

表1 猪瘟疫苗免疫效果检测结果统计

项目		34天	65天	85天	110天	130天	150天	170天	二免后5次样品 平均合格率(%)
		免疫前 合格率(%)	一免后28天 合格率(%)	二免后20天 合格率(%)	二免后40天 合格率(%)	二免后60天 合格率(%)	二免后80天 合格率(%)	二免后100天 合格率(%)	
A苗	1	40(6/15)	64.3(9/14)	71.4(10/14)	71.4(10/14)	78.6(11/14)	92.9(13/14)	92.9(13/14)	81.42(57/70)
	2	40(6/15)	73.3(11/15)	86.7(13/15)	73.3(11/15)	86.7(13/15)	100(15/25)	100(15/25)	89.3(67/75)
B苗	3	40(6/15)	35.7(5/14)	42.9(6/14)	50(7/14)	57.1(8/14)	71.4(10/14)	71.4(10/14)	58.57(41/70)
	4	33.3(5/15)	73.3(11/15)	80(12/15)	73.3(11/15)	80(12/15)	80(12/15)	80(12/15)	78.67(59/75)
C苗	5	40(6/15)	26.7(4/15)	73.3(11/15)	46.7(7/15)	60(9/15)	78.6(11/14)	78.6(11/14)	67.12(49/73)
	6	40(6/15)	73.3(11/15)	60(9/15)	40(6/15)	66.7(10/15)	93.3(14/15)	93.3(14/15)	70.66(53/75)
D苗	7	33.3(5/15)	28.57(4/14)	64.3(9/14)	28.57(4/14)	50(7/14)	57.1(8/14)	50(7/14)	50(35/70)
	8	40(6/15)	71.4(10/14)	85.7(12/14)	85.7(12/14)	85.7(12/14)	85.7(12/14)	92.9(13/14)	87.14(61/70)
E苗	9	40(6/15)	73.3(11/15)	100(15/15)	86.7(13/15)	80(12/15)	100(15/15)	93.3(14/15)	92(69/75)

### 3 讨论

#### 3.1 猪瘟疫苗的质量问题

猪瘟兔化弱毒(HCLV)疫苗是世界上免疫效果最好的毒株之一。猪瘟弱毒疫苗的广泛应用,对于控制猪瘟的流行起到了关键作用。近期的研究也证实猪瘟兔化弱毒(HCLV)仍然能保护不同基因亚群野毒的攻击。用不同剂量的猪瘟疫苗免疫猪,证实免疫剂量与保护水平密切相关<sup>[5]</sup>。剂量不足时,攻毒后不能阻止强毒在体内复制和带毒。试验结果说明,疫苗抗原含量的高低直接影响到疫苗的使用效果。无论是基础免疫还是二次免疫,不同抗原含量的疫苗免疫效果存在差别。疫苗抗原含量高,免疫效果较理想,抗原含量低的疫苗,首次免疫效果不理想,不能突破母源抗体的干扰。疫苗抗原含量高的疫苗能突破母源抗体的干扰,免疫效果优于低效价的疫苗。猪瘟原代细胞苗由于其生产工艺的不稳定性,疫苗效力标准检测方法落后,造成批间存在一定差异。不少专家质疑,目前政府采购的猪瘟疫苗有效抗原含量不足,导致免疫效果不佳<sup>[6]</sup>。我们试验结果也证实我省采购的疫苗存在批间差异、质量不稳定的现象。疫苗本身的质量直接影响疫苗的免疫效果,运输过程对疫苗质量的影响也不能排除。因此必须加强对疫苗质量的监督,疫苗生产企业要对产品进行严格检验,确保其质量,减少疫苗批间差异,以保证猪瘟的实际免疫效果,减少疫病的发生与流行。

#### 3.2 预防控制措施

猪瘟的免疫接种工作一直能被广大养殖户所接受,部分小规模猪场和散养户单靠每年春秋

两季实施免疫注射,造成免疫周期过长、免疫抗体无法达到有效的保护水平。猪瘟疫苗之所以会出现免疫效果不理想的状态,除疫苗因素外,还与养殖户的管理理念有一定关系。特别是部分猪场存在猪蓝耳病或猪圆环病毒病等免疫抑制性疾病,造成免疫效果不佳。建议养殖场通过免疫抗体监测来了解疫苗免疫效果、确定合理的免疫时间和制定适合本场的猪瘟免疫程序。根据疫苗试验结果,我们认为首先必须加强宣传,猪瘟必须实施常年免疫,按免疫程序落实二次免疫的观念。其次是在试验中,猪瘟活疫苗免疫剂量均为1头份,在生产实际中可适当加大免疫剂量至1.5~2头份为宜,但不能盲目加大。再次不同厂家疫苗一经使用后,尽量不要随意改换品种,以免造成免疫紊乱、影响免疫效果评价。此外要加强饲养管理,提高猪群健康水平,减少免疫抑制疾病的干扰,增强猪群抵抗力。

#### 参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京:科学出版社, 1997:652-664.
- [2] 谢文强. 猪瘟活疫苗生产工艺改进现状[J]. 广东畜牧兽医科技. 2012, 37(4):5-7.
- [3] 夏军,凡坤. 规模化猪场常见疾病免疫抗体监测及分析[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2011, 5:7-9.
- [4] 孙彦伟,查云峰,田云,等. 三个厂家猪瘟活疫苗免疫效果比较试验[J]. 广东畜牧兽医科技, 2012, 37(2):29-32.
- [5] 冯寿华,牛建强,张晓东. 不同厂家的高效猪瘟细胞苗评价[J]. 畜禽业, 2011, 261(1):13-15.
- [6] 虞德屏,杜根成,龚建培,等. 猪瘟疫苗抗原含量与免疫效果相关性试验[J]. 养猪, 2012(5):3-4.

# 我国宠物产业发展展望

邹连生

(佛山市雷米高动物营养保健科技有限公司, 广东 佛山 528234)

中图分类号: S81

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)01-0041-03

我国宠物行业近30年的发展,经历了从1990年左右开始的种子萌芽期、1999年开始的小苗初长期和正在经历着的发展成长期(2009年…),并将持续30年以上的高增长。本文重点分析国内外宠物经济的发展情况,并指出未来我国宠物产业的业务核心将主要集中在上游产品供应和下游宠物服务提供方面。

## 1 我国宠物行业发展潜力原因分析

### 1.1 经济总量大,人均低,潜力很大

我国是全球第二大经济体,2011年,经济总量约等于美国的40%(美国是11.46万亿美元,我国是5.89万亿美元),但是人均只有它的9%(美国人均47132美元,我国是4238美元)。宠物经济占GDP的比例还很低,目前只有0.2%左右。日本为2%,欧洲为4%~5%(其中德国为7%),北美为6%,澳大利亚为6%[资料来源:2012宠物饲料(食品)国际研讨会]。从GDP的占比上分析,如果我们达到世界平均水平,那么就有10倍成长空间。

我国的宠物消费,尚无明确的统计数据,消费额估计在100亿人民币左右。全国有10000~12000家专业宠物店,按每家店平均40~50万/年的营业售额算,大约为60亿,加上活体销售、宠物交易市场、兼营店、网上销售,合计约100亿人民币。那么宠物(犬猫)行业的产值,为商品和劳务的总和,约为200亿人民币。其增长速度约为每年20%~40%。宠物行业(含花鸟水族和小宠类)的产值约为400亿人民币,与一些杂志的预测接近。

### 1.2 宠物数量将持续增长

我国的宠物犬猫数量,处于明显增长阶段。主要得益于潜在消费者数量的增长。

据统计,2001年北京市养犬登记不足10万只,而2010年全市登记犬只总数已达95万余只,

而且以每年10万只的速度继续攀升。此外,还有大量未登记的隐匿犬,估计约占一半的比重,故北京宠物犬的总数量预计在200万只左右。我国是典型的“狗黑户”国家,上户口的狗只所占比例很小,北京算是占比较高的地区了。目前上海家庭已拥有100万只以上宠物犬;沈阳的宠物犬数已超过20万只。有统计数字显示,现在一个中型城市宠物犬的数量为10万只左右,大型城市则达到20万只。据笔者调查分析,中大城市,大约平均10户居民,有一户养有宠物犬或猫,这个比例每年还在增长。从近年的统计数量来看,宠物犬的数量每年以10%~20%的速度增长。犬只的增长对宠物消费市场的推动作用尤为显著。

宠物犬猫数量增长的主要原因有<sup>[1]</sup>:(1)我国计划生育政策规定只生育一个孩子和人口老龄化,导致家庭结构变化,空巢家庭、丁克家庭,独生子女,需要动物做伴的需要明显增加;(2)我国社会转型,人际关系变化,养宠物来减压和排遣孤独;(3)部分人把养宠当成时髦和身份的象征;(4)经济的发展,休闲消费升级的需求,宠物正好满足了此类需求。

### 1.3 潜在消费者转变为现实消费者的潜力巨大

在享受商品化服务的犬猫,比例还是比较小,比如使用成品粮的比例较低。据笔者调查估测,北京:猫用商品粮的比例在60%左右,犬为20%左右,而上海、广州、深圳均应不足20%,其余地区在10%左右或小于5%。台湾地区宠物使用成品粮的比例约60%,美国约80%[资料来源:2012宠物饲料(食品)国际研讨会]。只要这些犬猫主人,消费观念转变,潜在的消费者很快就转变为现实消费者。市场增量因消费者的增加,将会有明显的增长。另一方面,消费者愿意为他们的宠物花更多的钱,这包含

着两方面的含义:一是主人可支配收入多了,二是主人们慢慢形成了把宠物当家庭成员看,开始“溺爱”自己的宠物了,就象家长溺爱小孩一样。宠物消费支出逐步成为饲养宠物家庭的正常消费支出的一部分。因为只有从内心真正开始认识到宠物就是你的孩子或者你的朋友的时候,很多观念和做法才能彻底改变。这个过程正在进行中,需要各厂家和媒体对消费者多做引导工作,消费者也就逐步成熟起来。一个成熟的市场,必然是由成熟的消费者构成的。

通过上述三方面分析,可以判断,我国宠物产业消费潜力巨大。

## 2 宠物产业的发展方向

结合美国等宠物经济发达国家宠物产业发展过程和我国现阶段宠物产业特点,未来我国宠物产业的业务核心将主要集中在上游产品供应和下游宠物服务提供方面。

### 2.1 上游产品

我国宠物产品制造业已初具规模,宠物食品工厂和品牌已经开始崛起。诸多宠物用品制造商,经过近20年的出口加工的专业积累,随着国际市场的变化和国内市场的发展,现已开始大力发展国内市场。宠物食品、用品是目前和未来宠物产业的主要消费项目。60%~70%的产业产值,来源于制造业<sup>[2]</sup>。

**2.1.1 常规产品** 即宠物日常需求的东西,需求量大,重复消费,那么,这类产品的制造发展,将是规模化和品牌化的。世界宠物食品大约一半的市场,被马氏公司和雀巢公司占领,就很能说明问题<sup>[3]</sup>。市场发展成长的必然,就是向品牌化方向发展,这是市场的自然选择,这也是消费者的自然选择。

**2.1.2 特色新颖产品** 宠物消费是情感型消费,永远有新颖的东西打动宠物主人的心,促使其积极消费。故宠物产业市场,一定要在创新方面下功夫。而创新的一切,来源于对消费者的了解(了解宠物比宠物主人更重要)。因此特色新颖产品将会异军突起。

**2.1.3 服务配套产品** 为了满足宠物需求,产生的零零星星的创新,将向专业化方向发展,这也是满足宠物服务专业化方向发展的需求,如医疗服务产品、美容服务产品,必须想到了细处,落到了实处,满足特定需求,专业制造。

### 2.2 下游服务

下游服务方面主要包括医疗、美容护理、俱乐部(血统)等方面。

**2.2.1 以宠物医疗和/或宠物美容为主体的综合性宠物服务连锁是发展方向** 医疗和美容服务的需求增长,不言而喻。越来越多的宠物主人把宠物当家庭成员看;宠物的生活条件和保健环境越来越好,寿命也会越来越长,因而,医疗方面的可能性会增加;现代快节奏的生活,宠物主人也无法自己照顾护理宠物,由专业的人员在专业的场所服务是必然的选择。

连锁,是一种服务标准化、品牌化、规模化的道路,也是商业发展的普遍选择,是市场需求、资本和人才共同作用的结果。国内宠物医疗和美容连锁发展已暂露头角,也将跟随国际发展潮流,势不可挡。

**2.2.2 大卖场形式的连锁发展也是一种趋势** 通过大的卖场(超市模式)为基础,综合利用超市卖场这个资源,以齐全的商品(超过5000种,甚至上万种商品)为纽带,给宠物提供综合服务(如医疗、美容护理、寄养等)。线上网络销售产品,门店作仓库发货或客户自提货,线下现场产品销售加上为宠物服务。美国的PetSmart和国内的乐宠LeePet,及以后的爱狗大仓,都会以类似形式的发展。

**2.2.3 建立大型的专家型高端高水平的医院** 每个城市,将出现至少一家高水平医院,与人类的医院结构类似。由于行业的特殊性,一个大城市,可能只会容纳两到三家这类型的医院。在北京、青岛、大连等地已经出现,这些医院依托高等学府,组织一群专家,提供这种高水平的专业服务。

**2.2.4 时尚与特色、消费体验的单体店(美容+用品店)** 通过店主的精心打理,给予宠物消费良好的感觉,店面内涵具有时尚要素,产品和服务有特色,打造一个宠物主人愿意常来的地方,因宠而聚的地方,这样的单体店会有好的发展,并获得良好的经营成果。

**2.2.5 社区型医疗及用品店,发展的核心是有稳定的社区客户** 做宠物的私人兽医服务是社区型宠物医院未来的发展方向,私人兽医服务的主要内容包括:建立一套完整的客户资料、宠物全期的饲养管理方案,包括训练方案;随时提醒主人应该

注意的事项,保健、驱虫、防疫都要提前通知;也可提供上门服务;提供专业的转诊服务,与医德良好、设备齐全的规模型宠物医院建立良好的相互转诊关系,让自己的患宠的“大病”得到及时的转诊检查或治疗。

**2.2.6 血统认证和俱乐部** 培育纯种犬是未来发展的趋势,并将进入千万百姓家,这也是国外的趋势。虽然我国目前是串串狗的大国,这是特定发展阶段的特定产物,发达国家的纯种犬运动必将逐渐深入我国。国内每年都在各大城市举办大大小小的纯种犬比赛,越来越多的宠物主在购买宠物时会向犬舍索要宠物的纯种血统认证。因此,专业的犬种鉴定、DNA 化验、芯片植入以及血统证书的颁发在未来也将成为宠物市场发展的热点之一。

**2.2.7 其它** 政府、协会及媒体这三者是行业发展永远离不开的,动物相关立法和政府科学管理是必须的,养宠者自律和他律,才能建立宠物市场和谐快速发展的环境。行业协会、媒体组织(含网络),就在这个自律与他律中建立桥梁,协调、沟通、教化、采集引进国际先进经验等等。

#### 参考文献:

- [1] 邹连生,曾凡坤.我国宠物饲料的开发与展望[J].饲料工业,1999(12):44-45.
- [2] Jennifer L, Kvanme D V M. Petfood Technology[M]. WATT Publishing Co, 2003:514-521.
- [3] 苏艳娜,孙鹤.国际宠物食品市场与中国宠物食品产业发展展望[J].世界农业,2004(2):29-31.

## 冬季养殖山羊应注意什么

冬季饲养山羊任务繁重,饲养技术难度大,稍不注意,往往造成山羊大批死亡。其中保膘、保畜、保胎又是饲养中的中心任务。一般冬季养羊要注意抓好以下四个技术要点:

### 一、合理放牧饲养

冬季放牧一般应选择避风向阳、地势高燥、水源较好的阳坡低凹处。初冬,一部分牧草还未枯死。这时要抓紧放牧,迟放早归,注意抓住晴天中午暖和的时间放牧,让山羊尽量多采食一些青草,但不要让山羊吃到霜冻的草和喝冰水,这段时间若山羊不能吃饱,回栏后要进行补饲,到了深冬季节,应将山羊收回进行舍饲。

### 二、精心舍饲

冬季气候寒冷,山羊体热消耗大,加上绝大部分母羊处于妊娠阶段,所以要特别注意加强饲养管理,除保证山羊青干草和秸秆类饲料外,还要补给山羊黄豆、玉米、麦麸等精饲料,并注意栏内干燥保暖。为了增加羊的运动,应让羊在栏内设置的土堆或木制高台上吃草,晴天还应让羊外出运动,以增强体质,提高冬活力。

### 三、抓好保胎和冬配

冬季绝大多数母羊处于妊娠期,所以必须注意抓好保胎工作,公母羊要分开饲养,放牧时不要让妊娠母羊吃到霜冻和有冰雪的草,防止因打架、冲撞、挤压、跌倒而引起流产。多给母羊喂精饲料和加盐后的温水,并注意抓好空怀母羊的配种工作,以增加经济效益。

### 四、抓好栏舍卫生和抓好疫病防治

山羊厌潮湿,怕贼风。所以冬季栏舍要避风,干燥,要随时保证山羊体表清洁卫生,同时要抓好山羊防病灭病工作,经常对粪便进行生物熟处理,搞好山羊疾病的防止治和驱虫工作,特别要抓好羊痢疾,大肠杆菌病,羊链球菌病以及感冒等病的防治,并经常用驱虫药对山羊进行预防性驱虫,确保羊体健壮,抵抗寒冬侵袭。(信息来源:中国畜牧兽医信息网)

# 大生熊虫属缓步动物培养的初步研究

张明辉, 吴定娟, 陈汝能, 吴丹, 周堪伟, 刘清神\*  
(华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 由于缓步动物具有惊人的抗逆性, 是良好的科学研究模式动物。本文在国内首次对在广东采集的大生熊虫属缓步动物进行了活体培养, 并观察讨论了其活动、蜕皮、包囊、孵化等现象。

**关键词:** 缓步动物; 抗逆性; 培养; 苔藓提取液

**中图分类号:** S852.73<sup>9</sup>

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2013)01-0044-03

## 1 介绍

缓步动物是一种微小的水生无脊椎后生动物, 俗称“水熊”, 是一个独立的门, 即缓步动物门(Phylum Tardigrada), 与节肢动物具有较近的亲缘关系。缓步动物门含3个纲, 即异缓步纲(Heterotardigrada)、真缓步纲(Eutardigrada)和中缓步纲(Mesotardigrada), 5个目, 13科, 约70属, 近1 000种。缓步动物身体两侧对称, 具有4对附肢, 其末端一般具爪, 成体通常长250~500 μm, 个别种类体长超过1 000 μm; 具有完善的消化系统和生殖系统, 无循环系统和呼吸系统(其充满液体的体腔起着循环和呼吸作用); 神经系统由头端背侧的叶状脑与具有一对融合神经节的腹神经索组成; 多数种类身体无色透明, 个别种类体色呈淡黄色; 一生中随着个体长大, 会发生周期性的蜕皮。陆生缓步动物主要生活在潮湿的土壤、落叶、苔藓、地衣、地钱及有花植物上。由于其具有“隐生”的功能和惊人的抗逆性, 在生物材料保存技术、航天领域和作为科学研究的模式动物等方面具有重要的学术价值和应用前景<sup>[1,2]</sup>。

自从Keilin<sup>[3]</sup>首次将缓步动物的休眠状态定义为隐生, 并将其划分为低湿隐生、低温隐生、高压隐生、低氧隐生4种形式后。学术界普遍认为缓步动物具有以下5种休眠形式: 低湿隐生、低温隐生、高压隐生、低氧隐生和包囊。而在隐身的状态下, 缓步动物显出惊人的抗逆性, 如抗强氧化性<sup>[4]</sup>、抗低温<sup>[5]</sup>、抗高压<sup>[6]</sup>、抗高辐射<sup>[7]</sup>等。

自1773年发现开始, 就有不同的博物学家对缓步动物进行分类学和习性上的研究, 尽管曾一度进入研究的冷淡期, 但后来尤其是发现其惊人的抗逆性后的近十年, 研究进行得如火如荼并将其送上了太空<sup>[8]</sup>。在我国最早的相关文章是杨潼的《熊虫》<sup>[1]</sup>。后来国内的一些学者也相继开始相关的研究, 但主要是在分类学方面, 而对其培养的报道极少<sup>[8]</sup>。本文结合中外报道的提取和培养方法<sup>[7,9,10]</sup>, 对自广东采集的缓步动物进行了初步培养研究。

## 2 材料和方法

### 2.1 培养基的制作

将3×6的凝血板分割成18个培养穴, 分别加入2%的琼脂溶液(经高压锅在121.5℃ 20 min消毒)0.5 cm厚。凝固30 min后, 用移液枪加入0.2 mL农夫山泉矿泉水。完成后, 置于密封的箱子中, 并将箱子存放于0~5℃的冰箱中备用。

### 2.2 虫体的采集

于华南农业大学动物医院楼顶用信封采集若干苔藓。将采到的部分苔藓在500 mL烧杯中用隔夜自来水浸泡, 多余的苔藓放在信封中, 并存放在干凉的地方。浸泡10~12 h后用大镊子夹着大块的苔藓在烧杯中不停抖动, 使苔藓表面尽量朝向烧杯底, 让尽量多的虫体离开苔藓进入水中, 最后让烧杯中的物质沉淀24 h。用细胶管将上清液吸走, 烧杯底部剩余少量水分。接着用40目筛网将沉淀物过滤到另一烧杯, 并多次用水冲洗网上

收稿日期: 2012-10-09

\*: 通讯作者

基金项目: 华南农业大学大学生科技创新项目(2010); 华南农业大学2010年教育教学改革与研究项目(JG10124)

的沉淀物,尽量让虫体透过筛网。过筛后的悬液静置沉淀 12~24 h。用吸管吸取一定量的沉淀物放到小培养皿上,在解剖镜下检视。将观察到的虫体放到有琼脂层的培养穴中。每个虫体一个培养穴,并标明采集日期和序号。

处理完的较大块的苔藓则置于直径为 20 cm 的培养皿中,并用适量的水浸泡,并放在光照恒温培养箱中,为后面的培养提供适量的苔藓水。

### 2.3 培养

向每一有虫体的培养穴中放进 3~4 片苔藓叶片,以供氧气,并将培养穴放进直径为 20 cm 的大培养皿中,加上盖子。接着将大培养皿放进  $25 \pm 1$  °C 的恒温箱中,并在恒温箱中放一个 100 w 的电灯泡,为虫体提供 12h/12h (L/D) 的光周期。同时在恒温箱中放置一个直径为 5 cm 的培养皿,并向其中加入适量的水,以维持恒温箱中的湿度。放上湿度计和温度计,记录其中的湿度。

每星期用解剖镜观察 2~3 次,每两次观察时间间隔为 1~2 天。记录它们的活力、身体变化、蜕皮现象、产卵现象、食物藻类的多少,以及一些特殊的行为现象。而且每星期用倒置显微镜观察 (40 倍) 拍照和根据《THE PHYLUM TARDIGRADA》<sup>[1]</sup> 进行初步分类。在正式培养中,共用了 7 个培养穴进行培养,存活得最长的有将近两个月,短的有一个星期。

本次鉴定缓步动物的种类在倒置显微镜下进行,这是国内首次对其进行活体分类。将虫体放至载玻片和盖玻片之间,利用显微镜灯的热量将两玻片间的水逐渐蒸发使盖玻片适当地压紧虫体,以防其四周爬动而影响对分类特征的观察,在适当的时候在盖玻片的边缘补上水份,防止过大的压力将虫体压破。如发现培养穴中有较多杂质时,在解剖镜下放进 0.4 mL 新鲜的矿泉水,吸出 0.3 mL 水,同时吸出其中的渣滓。每周用吸管从装有苔藓的大培养皿中吸取一些没明显黑色杂质的苔藓水,每一培养穴 2~3 滴,琼脂块每两个星期更换 1 次。

## 3 结果与讨论

按照《THE PHYLUM TARDIGRADA》分类检索顺序观察,结果如下:没有侧须;腿有双爪并且主枝和副枝没有分开而是和在一起;前 3 对腿的双爪正常发育;每一条腿的两对双爪的大小和形状一样,并且腿的中间面互相对称,爪序为 2-1-1-2;整条口管都没有弯曲;副枝大概着生在主枝的中

间,爪的基部有小月面;在口管的腹面,有一根加固板棒(前腹板)。根据以上特征,判断所采集和培养的水熊虫属于真缓步纲 (Eutardigrada)、近爪目 (Parachela Schuster)、大生熊虫科 (Macrob-iotidae)、大生熊虫属 (Macrobiotus) (图 1~图 2)。这与《中国土壤动物检索图鉴》的分类检索方法有些出入,但是得出的结果是一样的。



图 1 大生熊虫属虫体外形 (体长 553  $\mu\text{m}$ )



图 2 口器的结构

在正式培养期间观察到蜕皮的现象,在显微镜下,可以看到旧皮的爪和旧皮中的新爪,也看到新的口器重新形成。而且因蜕皮期间口器、外皮、爪的重新形成时虫体较不透明,不能进行分类 (图 3~图 4)。在培养的开始几天,虫体显得较为活跃,经常爬动,后来则不大活跃,呈蜷缩状,用解剖针碰后才慢慢动起来。同时活动也有规律,早上较为活跃,晚上则相对平静。但在解剖镜和显微镜下观察,虫体显得特别活跃。培养期间,发现有 3 个培养穴中分别有较小的幼虫虫体。还观察到有 3 个虫体内部缩成桶状,呈现深黑色,外有旧皮包裹着。

虫体开始培养时较为活跃,很可能是一种对新环境的应激反应,而后来活动较为迟钝缓慢,应



图3 蜕皮期形态

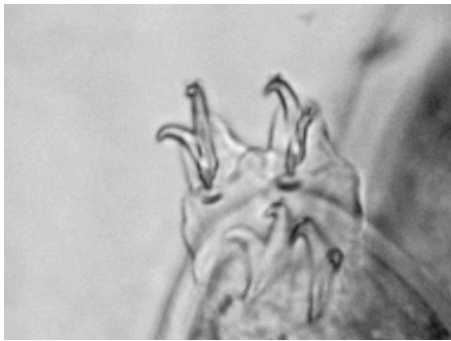


图4 蜕皮期的爪(其中分别有新旧的爪)

该是一种适应的表现,同时也可能与能量不足有关,因为培养期间没有专门提供藻类作为食物。在显微镜和解剖镜下观察时较为活跃,这可能与仪器发出的强烈光照的影响有关,所以观察频率不能过高,要在对其生活干扰最小的前提下进行观察<sup>[9]</sup>。观察到有虫体以旧皮包裹自身,很可能是一种形成包囊的现象<sup>[13]</sup>,同时可能反映出培养基的环境变得恶劣,曾试过将其移到新的培养基也没发现有好转的情况。

对于培养基的情况,培养期间霉菌的繁殖不太明显。在预实验中没有用苔藓水,培养基在一周内出现较多的霉菌,虫体的活性也下降得很快。Altiero 等<sup>[10]</sup>提到为了减少霉菌的繁殖而是用到抗生素,但效果不太好。有资料显示苔藓的分泌物可起到抗霉菌的作用<sup>[14]</sup>。本研究培养期间,将苔藓提取液加入到培养基中,培养穴中的苔藓长出根,同时发现有小的球状藻类,但没有出现长霉现象,表明了苔藓提取液作为一种天然的抗生素,对水熊虫培养环境的稳定性有重要作用,也说明了为何水熊虫喜欢在苔藓中生活的原因,由此也可以看出水熊虫具有较强的抗逆性。在培养期间发现了较小的水熊虫幼体,可能是由培养的水熊虫产

卵孵化,或是卵通过苔藓液进入到培养穴中孵化而成;同时还发现到在死亡的水熊虫虫体内有别的生物破体而出,表明水熊虫可能存在被寄生现象,导致虫体死亡,这种现象未见报道,需在今后的实验中进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 杨潼. 熊虫[J]. 生物学通报, 1996, 31(9):15-16.
- [2] 陈玉祥, 肖欣. 缓步动物应用前景初探[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(5):6049-6052.
- [3] Keilin. The problem of anabiosis or latent life: history and current concepts[J]. ProcR SocLondB, 1959 (150):149-191.
- [4] Angela M Rizzo, Manuela Negrone, Tiziana Altiero, et al. Antioxidant defences in hydrated and desiccated states of the tardigrade *Paramacrobiotus richtersi* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2010 (156):115-121.
- [5] Hengherr S, Worland M R, Reuner A, et al. Freeze tolerance, supercooling points and ice formation: comparative studies on the subzero temperature survival of limno-terrestrial tardigrades[J]. Experimental Biology, 2009(212):802-807.
- [6] Ono F, Minami K, Saigusa M, et al. Life of *Artemia* under very high pressure[J]. Journal of Physics and Chemistry of Solids, 2010(71):1127-1130.
- [7] Jönsson K I. Radiation tolerance in tardigrades: Evidence and implications[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2008(151):533.
- [8] Rebecchi Lorena, Altiero, Tiziana, et al. Tardigrade Resistance to Space Effects: First Results of Experiments on the LIFE-TARSE Mission on FOTON-M3 (September 2007) [J]. Astrobiology, 2009, 9(6):581-591.
- [9] 王立志, 李晓晨. 温度对小斑熊虫 *Milnesium tardigradum* Doyè re (缓步动物门, 小斑熊虫科) 食量和食物消化率的影响[J]. 四川动物, 2006, 25(1):103-105.
- [10] Altiero T, Bertolani R, Rebecchi L. Hatching phenology and resting eggs in tardigrades[J]. Journal of Zoology. 2010, 283(3):290-296.
- [11] Ramazzotti G, Maucci W. The Phylum Tardigrada [J]. Memorie dell' Istituto Italiano di Idrobiologia, Pallanza, 1983, 41:1-1014.
- [12] 尹文英等. 中国土壤动物检索图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 1998:127-129.
- [13] 苏丽娜, 李晓晨. 缓步动物休眠现象研究进展[J]. 四川动物, 2006, 25(1):191-195.
- [14] 车未艾. 苔藓植物提取液的经济价值[J]. 生物学通报, 2006, 41(1):13-14.



# 2012年生猪市场回顾及2013年形势展望

虞华<sup>1</sup>, 虞丽娜<sup>2</sup>

(1. 国家统计局盐城调查队, 江苏 盐城 224005; 2. 江苏省盐城邮政局, 江苏 盐城 224005)

**摘要:** “猪粮安天下”、“民以食为天”。在我国, 猪肉安全与粮食安全一样, 始终是关系农村经济发展和社会安定的根本问题。养猪业在我国是一个充满竞争的行业, 同时也是一个比较特殊的行业。它不像其它产业能说停就停, 赔钱也得把猪养大; 养猪的分散性又决定了其不能形成垄断效应。作为世界养猪大国, 分析生猪的市场规律, 研究其价格走势, 无论对于生猪养殖业还是整体宏观经济来说, 都有着非同寻常的意义。为避免猪价的大起大落, 生猪养殖政策应从生产、市场两方面构建和完善产销稳定发展的长效机制。

**关键词:** 养猪业; 生猪价格; 价格走势; 宏观调控

**中图分类号:** S8-1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2013)01-0047-04

2000年以来,我国已先后经历了三次猪肉价格波动周期,分别是2002年7月-2005年11月、2005年12月-2009年5月和2009年6月-2012年8月。我国的猪肉价格运行周期一般为40个月。价格高峰和低谷通常间隔1年半左右,包括补栏母猪到生猪供应上市需要“8个月配种、4个月妊娠、1个月哺乳、5个月育肥”共18个月的生产周期。2011年四季度以来,生猪价格持续走低,2012年7月全国生猪出场价回落到本轮价格周期波动的最低点,为13.38元/公斤,多数生猪养殖户处于不盈利甚至亏损状态。为了缓解生猪过度下跌的局面,5月11日国家发展改革委等六部门联合发布了《缓解生猪市场价格周期性波动调控预案》。经过调控,2012年四季度生猪价格出现小幅回升,特别是12月中旬以来,生猪及猪肉突然出现了一次“意外加速上涨”行情,掀起了一个“小高潮”,生猪价格由12月初时每公斤14.67元一路“小跑”至12月25日的每公斤15.41元,部分地区生猪价格突破了16元/公斤。受生猪上涨行情推动,猪肉也随之接连涨价,12月25日全国猪肉平均零售价已达到24.84元/公斤,比12月初时每公斤23.26元上涨了6.8%。初步判断猪价已进入周期性的调整阶段,2013年二季度猪肉价格将进入周期性的上涨阶段。

2012年底的中央经济工作会议提出的六大目标任务中,虽然没有像前两年将“稳物价”明确

作为主要任务之一,但其在2013年宏观经济调控中的作用依然不容忽视。价格政策方面仍把保持物价总水平基本稳定作为宏观调控的重要任务。估计2013年农产品价格并不会失控。总体看,2013年猪价呈季节性波动、震荡向上趋势,两头略高,中间略低。

## 1 2012年生猪市场回顾

2012年以来,特别是春节以后,国内猪肉消费需求大幅下降,生猪行情一直低迷不振。虽是季节性规律,但2012年跌幅明显较往年大。终端消费持续低迷不振,而饲料价格却在节节攀升,养殖户面临着饲养成本大幅上涨、主要畜产品价格持续下跌的双重压力。与此同时,轮储、放储和猪肉进口量增加对生猪市场的冲击也较大。8月7日,国家发改委宣布决定进一步加大生猪市场调控力度,启动新一轮冷冻猪肉收储工作,为低迷的猪价注入一剂强心针,生猪行情的阶段性底部特征出现。12月中旬随着冷空气到来,猪价又重拾涨势,开始逐日攀涨。整体来看,2012年生猪价格处于下降态势,全国生猪收购均价在每公斤13.1~17.1元区间。

### 1.1 生猪出栏量稳步增加

虽然年中猪价保持在低位徘徊,规模养殖户并未出现恐慌性缩减养殖量或淘汰母猪等情况,只是减少补栏量,降低养殖规模的增长速度,等待市场回暖,有的甚至还在逆市场周期而动,饲养规

模不压反扩,等待下一轮上涨周期的出现。由于补栏量大于出栏量,使三季度生猪存栏量比二季度仍有小幅增长。国家统计局公布的数据显示,2012 年前三季度全国生猪出栏量和猪肉产量分别为 4.93 亿头和 3754 万吨,同比分别增加 5.1%和 5.2%。三季度末全国生猪存栏量比二季度末增加 2.85%。

### 1.2 生猪存栏、能繁母猪仍居历史较高水平

2011 年下半年生猪价格增长较快,养猪户大都赚了一笔钱,这也吸引了不少养殖户从 2011 年 11 月至 12 月开始大规模养殖,加之猪病形势较为平稳,成活率较高,使 2012 年生猪市场供应量持续增加。根据国家统计局数据显示,2012 年前三季度生猪存栏 46822 万头,同比增长 1.9%。2012 年 11 月 12 日,农业部公布了 2012 年 10 月份 4000 个监测点生猪存栏信息,10 月份生猪存栏较上月增长 0.1%,同比增长 0.8%,其中能繁母猪存栏较上月增长 0.3%,同比增长 4.2%。从生猪生产关键要素来看,全国能繁母猪仍保持较高水平,如不发生重大疫情,能保证后期生猪生产发展动能。2010 年以来各月全国生猪及能繁母猪存栏数比较见图 1、图 2。

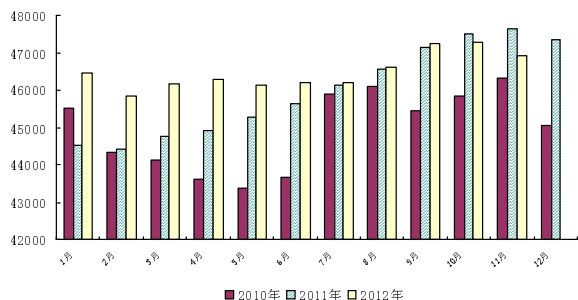


图 1 2010 年以来各月全国生猪存栏数比较(万头)

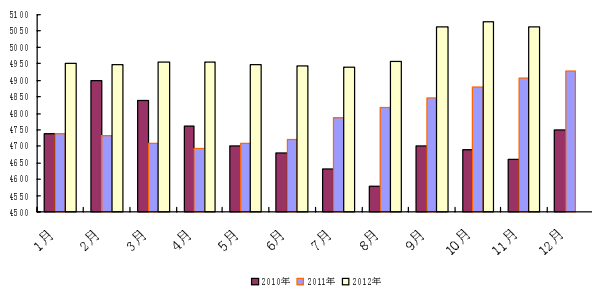


图 2 2010 年以来各月全国能繁母猪存栏数比较(万头)

### 1.3 猪价探底回升

2012 年春节后,受生猪生产周期性波动影响,生猪价格“跌跌不休”。自 2011 年 9 月至 2012 年 7 月,全国生猪出栏价已由高峰时的每公斤 19

元左右下跌至 13 元左右,降幅已经超过了 30%,猪价已基本跌回到 2011 年初的水平。7 月 25 日,全国生猪出场平均价格跌至年内最低价,每公斤仅为 13.17 元。7 月底,猪价开始止跌回升,9 月 25 日,全国生猪出场平均价格回升至每公斤 13.74 元。12 月 25 日,全国生猪出场平均价格已回升至每公斤 15.41 元。2012 年全国肥猪出栏价格平均为 14.44 元/公斤,比 2011 年的 16.59 元下降 13%;价格最高点出现在 1 月份,均价为 16.9 元/公斤。见图 3。

按理说,生猪价跌了,肉价也应该跟着同步下降。可价格调查监测资料显示:直接影响 CPI 的猪肉零售价与生猪出栏价的联动性并不完全一致。肉价随着猪价下调的同时,猪肉零售价格依然坚挺。全国猪肉零售价格由去年 9 月高峰时的每公斤 28.79 元下降至 7 月 25 日的 23.98 元,降幅仅为 17%。2012 年 9 月 25 日,全国猪肉平均价格回升至每公斤 24.17 元,12 月 25 日,全国猪肉平均价格回升至每公斤 24.84 元。2012 年全国猪肉价格平均为 24.93 元/公斤,仅比 2011 年的 25.03 元下降 0.4%;肉价最高点也在 1 月份,均价为 27.25 元/公斤。

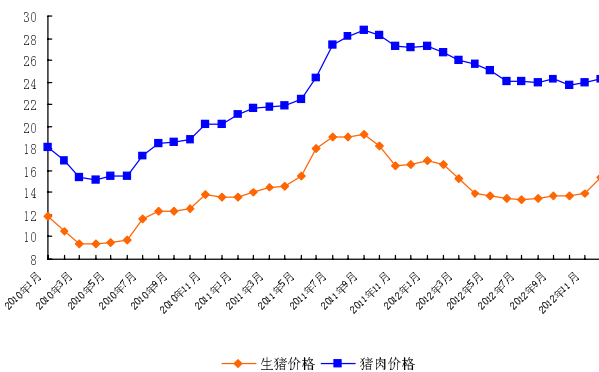


图 3 2010 年以来全国生猪、猪肉价格走势图(元/kg)

### 1.4 饲料原料等养殖成本大幅上涨

2012 年初以来,国内玉米、饲用小麦、豆粕价格逐月走高,作为生猪养殖主要饲料的豆粕价格也“豆你玩”。6 月 25 日,主要饲料原料玉米价格达到最高点 2.673 元/公斤,比年初上涨了 16%,同比上涨 13%;9 月 10 日,豆粕价格达到最高点 4.698 元/公斤,比年初上涨 41%,同比上涨 38%。可喜的是 9 月中旬原料价格开始出现回落,11 月底,主要饲料原料玉米价格回落至 2.288 元/公斤,豆粕回落至 3.879 元/公斤。2012 年全国玉米价格平均

为 2.41 元 / 公斤, 比 2011 年的 2.22 元上涨 8.6%; 价格最高点出现在 6 月份, 均价达 2.58 元 / 公斤。2012 年全国豆粕价格平均为 3.83 元 / 公斤, 比 2011 年的 2.83 元上涨 35.3%; 价格最高点出现在 9 月份, 均价达 4.58 元 / 公斤。见图 4。

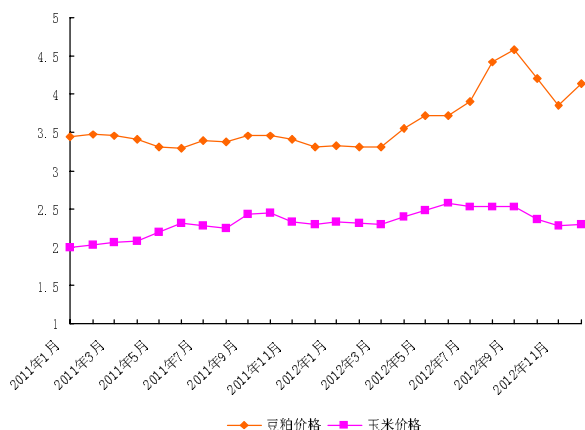


图 4 2011 年以来全国豆粕、玉米价格走势 (元/kg)

### 1.5 养殖收益下降

2012 年以来饲料用粮价格持续上涨增加了养殖成本, 令养殖收益下降, 养殖业也从 2011 年的盈利高峰跌入亏损的困境。4 月初猪粮比跌破了 6:1 的盈亏平衡点, 标志着生猪养殖已经步入亏损区间。另外, 油价上涨、雇工工资提高、水电费以及防疫费用增加等均推高养殖成本。7 月底全国平均猪粮比价已跌至 5.17:1, 同比下跌 3.2 个百分点, 10 月底全国平均猪粮比价虽已回升至 5.98:1, 仍低于盈亏平衡点。2012 年全国猪粮比价平均为 6.03:1, 比 2011 年的 7.44:1 下跌 1.41 个百分点, 其中有 7 个月份 (4-10 月) 低于盈亏平衡点。见图 5。

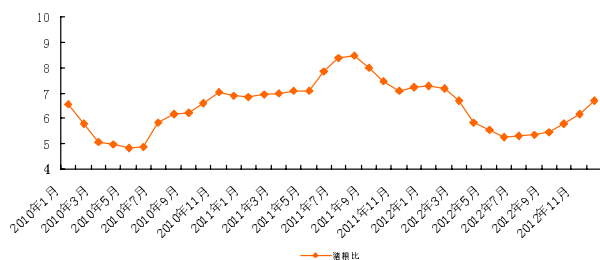


图 5 2010 年以来全国猪粮比走势图

## 2 2013 年猪价整体走势预测

在当前母猪存栏量、社会养猪积极性以及新型养殖技术推广等因素的作用下, 如果不发生大的疫情和自然灾害, 从养殖周期看, 2013 年上半

年猪价仍处下跌周期内, 当然并不排除节日期间的短暂回调。2012 年底全国生猪均价已突破 15.5 元 / 公斤, 2013 年春节在 2 月初, 估计全国猪价春节前将继续保持上涨态势, 2 月初有望挑战 16 元 / 公斤。春节后回落直至二季度末, 三季度起生猪价格有望反弹。总体表现为: 季节性波动、震荡向上, 两头略高, 中间略低。

根据历史周期推算, 预计 2013 年的二季度猪价将震荡回落探底, 但估计不会出现 2010 年上半年深度下跌局面, 波动幅度也将远小于 2011 年。从各个层面分析, 悲观预测 2012 年生猪全年均价在 14.5 元 / 公斤以上, 不会低于 2012 年。生猪养殖行业总体仍处微利状态。考虑到大型规模养殖企业当前正处于加速扩张期, 未来 2-3 年将保持 50% 以上的扩张速度, 预计 2013 年四个季度大型生猪养殖企业的盈利增速将是逐季上升的走势。但 2013 年猪价走势究竟如何还是要看供求关系和生猪疫病防治效果。

### 2.1 从市场供给分析, 2013 年上半年生猪市场供给仍较充足

农业部数据显示, 2012 年 11 月底, 生猪存栏同比虽下降 0.9%, 但存栏量仍达 46 903 万头, 比农业部调控目标高出 5 903 万头; 母猪存栏同比增加 3.4%, 突破 5 000 万头, 达到 5 063 万头, 母猪生猪存栏比重为 10.8%, 处于较高水平。农业部历史数据说明, 2011 年下半年到 2012 年年初, 母猪的存栏量呈现趋势性上涨态势, 2012 年 2 月份以后, 母猪存栏量稳定在 4 950 万头左右。由于母猪的存栏将直接影响到未来 10-12 个月生猪的出栏量, 预计 2013 年 2 月份之前, 生猪市场供给总体将呈稳步增加态势, 由于惜售因素等作用, 生猪出栏量增速缓慢。

### 2.2 从市场需求分析, 猪肉消费受季节因素影响较大

由于国内居民饮食习惯等因素, 猪肉占肉类消费比重在 60% 以上, 远高于禽肉和牛羊肉。随着居民收入不断提高及城镇人口数量增加, 猪肉需求亦呈稳步增长趋势, 不会明显上升或下降。虽然生猪供给短缺与下一轮生猪供给形成因果关系, 但与生猪供应过剩相比, 供给短缺对市场价格直接影响的程度更深。根据 2006 年以来的猪肉价格数据测算, 当生猪供给过剩时, 猪肉价格通常最多

下跌 40%，而当供给短缺时，价格上涨最高时达 80%。我国猪肉季节性消费特点是，冬季消费量较多，夏季消费量较少。根据调查显示，3、4、10、11 月为平季，约占 32%；5、6、7、8 月份为猪肉消费淡季，约占全年消费总量的 27%；1、2、9、12 月为旺季，占 41%。如果不考虑生猪价格的趋势波动和循环波动，每年的 4 月和 10 月基本上是全年的价格低点。每年的 1 月和 12 月是高点。

从整体生猪供应来看，2013 年春节前生猪出栏相对较为集中，由于原料短期内难以出现大幅下跌局面，所以，在高成本、高风险之下，养殖户一定要见机行事，该出栏时就出栏！

### 3 不断完善生猪产销稳定发展长效机制

价格的频繁波动是生猪养殖业的大忌，生猪养殖户对瞬息变化的价格难以把握，不能科学和有计划性地安排生产，直接影响到生猪养殖业的持续、稳定、健康发展。养猪业在我国是一个充满竞争的行业，同时也是一个比较特殊的行业。它不像其它产业能说停就停，赔钱也得把猪养大；养猪的分散性又决定了其不能形成垄断效应；目前养猪业的主体仍是弱势群体农民。因此，生猪养殖过程还不能完全市场化。为避免猪价的大起大落，生猪养殖政策应从生产、市场两方面构建和完善产销稳定发展的长效机制。

#### 3.1 转变“重生产、轻流通”观念，建立和完善稳定生猪生产和流通的长效机制

一是要积极探索有利于生猪生产稳定发展的调节机制。国家生猪收储政策应借鉴粮改经验，建立类似粮食收储机制，实行生猪保护价。当猪价下跌至盈亏线以下，采取保护价收购。当供应不足导致价格上涨时，养殖户可以获得更多收益。当猪肉价格高于政府支持价时，国家可将这笔钱拿来补贴城镇居民。二是加快建立现代化肉类批发市场和购销体系，积极引导企业特别是国有企业参与肉类营销体系建设。国际经验表明，小流通只能带动小生产，大流通才能带动大生产，现代流通则带动现代生产。随着我国经济发展转入过剩经济状态之后，情况就变了，流通逐渐成为先导环节，流通带动生产，只要产品能够销售出去，生产不成问题。在解决“猪周期”的问

题上，应当有全面和长远的考虑，统筹兼顾，制定科学的发展规划，并一以贯之地实施。不能等市场供求出了问题就关注，一旦市场平稳后就撒手不管。三是不断完善收储预案。“冻储”等措施确实能在短期内起到抑制猪价下滑、稳定生猪市场的作用。但其副作用也不容忽视，因受存储期的限制，一旦某个时段集中上市，势必对供需市场造成压力。因此应不断完善市场生猪销售体制，及时引导生猪行业按照市场自然规律，自行调节进入正常运行轨道，才是长远之计。

#### 3.2 建立稳定的持续的财政保障支持体系

一是建立持续的能繁母猪补贴政策。由于生猪产业链中能繁母猪是生猪产业健康发展的基础，加大对能繁母猪的财政补贴力度十分重要。从过去的实践可以看出，只要国家实行了这一政策，养殖户就像吃了颗定心丸，就有了养殖信心和积极性。保费的补贴标准也要提高，要能基本涵盖一头能繁母猪的价值。二是扩大免费防疫的范围。三是国家应设立专项资金，定向扶持种猪基地建设。四是设立养殖业贴息贷款。现在还没有针对养殖业的贴息或低息贷款，商业贷款利率高还贷时间短，而生猪生产周期长、风险大，利润没有保障，养殖户不敢使用。国家应设立专门针对养殖户的中小额贴息贷款。

#### 3.3 强化行业组织管理能力，鼓励农户参与合作组织

龙头企业具有养殖规模大、生产条件好、管理服务体系健全、抗风险能力强、自我调节能力强等优势，在猪周期变短变缓过程中，受市场冲击小。而与之合作的养殖农户风险小，虽然利润不算很高，但比较稳定，不会大起大落，甚至亏本。因此，对于资金短缺、技术缺乏、养猪积极性高的农户，政府应积极提倡“企业+养殖户”、“公司+农户”合作组织模式，鼓励支持养殖农户参与合作组织，引导加强龙头养殖企业与养殖户结对。通过龙头养殖企业的扶持，发展壮大，增强抵御市场风险能力。同时，政府和有关部门，积极培育和扶持一批大型龙头养殖企业，在政策上、资金上给以倾斜，使之与农户、生产基地紧密联结，提高生猪生产效率，发挥龙头企业效应。

# 一例人工驯养食蟹猴巴氏杆菌病的诊治

陆红玉, 冯子云, 唐俏玉, 苏伟, 卢锐钊, 姚天贵  
(广州从化市华珍动物养殖场, 广东 广州 510900)

中图分类号: S852.61\*2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2013)01-0051-02

巴氏杆菌病是一种多种畜、禽及野生动物都可感染的传染病。国内人工驯养食蟹猴发生巴氏杆菌病鲜有报道。2012年3月,某灵长类实验动物食蟹猴养殖场,发现部分食蟹猴出现精神沉郁、活动异常、摄食减少等表现。发病急,个别来不及治疗迅速死亡。通过了解病史、分析临床表现、观察病理解剖变化、细菌分离与鉴定,诊断为巴氏杆菌病。

## 1 发病情况、临床症状及病理变化

### 1.1 发病情况及临床症状

2012年3月7日,部分2~3周岁的年轻食蟹猴精神沉郁、被毛粗乱、喜卧打堆、体弱无力;食欲不振,有的甚至食欲废绝;呼吸急促,偶有咳嗽和喘气,流清涕,眼分泌物增多;个别发病猴体温高达40℃;皮肤有出血点。短短3d该猴群发病率为50%~80%,死亡率为0.6%。

### 1.2 病理变化

将3只死亡食蟹猴进行剖检,发现腋下和腹部皮下有不同程度的淤血与出血;胸腔及心包有较多淡红色浑浊积液;心内膜与心外膜可见大量出血斑点;肺脏呈花斑状,尖叶、心叶及隔叶表面与切面均可见大小不等紫红色、灰红色实变区;肝、脾脏肿大,表面有出血点;肾脏质地较软,切面结构不清;胃肠黏膜有不同程度的淤血与水肿,局部出血;肠系膜淋巴结出血,肿大;胰腺出血、水肿。

## 2 实验室检查与结果

### 2.1 涂片镜检

取病死猴心血、肝、脾、肺等器官病变组织进行触片,作瑞氏染色、美兰染色和革兰染色,镜检观察<sup>[1]</sup>。

### 2.2 细菌分离培养

将病料接种于血清肉汤中,37℃培养14~16h后观察结果;无菌取心血、肝、脾、肺器官组织病料接种血液琼脂培养基,37℃培养18~24h,观察菌落生长情况。选取上述培养的可疑单个菌落,作瑞氏染色、美兰染色和革兰氏染色;可疑菌落接种血平板培养基进行纯培养,接种麦康凯培养基观察是否生长<sup>[1]</sup>。

### 2.3 培养特性观察

接种病料于血清肉汤培养14~16h后呈轻微混浊,管底生成黏稠沉淀物,培养液上层形成菌环;在血平板培养基上生长良好,见湿润、圆形、微隆起、水滴样的淡灰白色小菌落,菌落周围无溶血现象。在麦康凯培养基上不生长。纯培养单个菌落瑞氏染色、美兰染色,镜检均见菌体两端钝圆,两极浓染的短杆菌;革兰染色呈两极着色的阴性球杆菌。与用病料直接涂片镜检的结果一致。

### 2.4 生化试验

取纯培养物,接种微量生化管,置37℃培养24或48h后观察结果。生化反应结果见表1。

表1 微量生化管

项目	结果	项目	结果
葡萄糖	- <sup>D</sup>	氧化酶	+
乳糖	-	硫化氢	+(48h)
山梨醇	-	硝酸盐还原	+
脲酶	-	甘露醇	-
赖氨酸	-	侧金盏花醇	-
吲哚	-	木胶糖	-
触酶	+	棉子糖	-
鸟氨酸	-	枸橼酸盐	-
蔗糖	-	苯丙氨酸	-

1): “+”为阳性结果;“-”为阴性结果

### 3 药敏试验

采用纸片扩散法。吸取适量菌液,涂布于血平板上,用氨苄西林钠、氧氟沙星、环丙沙星等 11 种药物进行药敏试验,于 37℃ 培养 24 h 后测定抑菌圈直径的大小。根据标准( $d \geq 14$  为中高度敏感, $10 \leq d \leq 13$  为低敏感, $0 \leq d \leq 9$  为耐药)。结果分离菌对氨苄西林钠、氧氟沙星、环丙沙星、头孢氨苄、先锋 V、先锋 VI、阿米卡星呈中高度敏感;而对复方新诺明、庆大霉素、青霉素、氟哌酸呈耐药(表 2)。

表 2 抗生素药敏结果

抗生素	直径(mm)
氨苄西林钠	21
氧氟沙星	18
环丙沙星	19
头孢氨苄	23
先锋 V	20
先锋 VI	20
阿米卡星	25
复方新诺明	0
庆大霉素	0
青霉素	0
氟哌酸	0

### 4 小鼠接种试验

将培养 24 h 的含菌血清肉汤,用灭菌生理盐水进行 5 倍稀释后,接种健康青年小鼠(18~22

g)4 只,0.3 mL/只,腹腔注射;另 2 只健康小鼠作对照,注射无菌生理盐水。小鼠于接种后 8~48 h 内死亡,对照组正常。剖检见死亡小鼠多脏器出血,呈现典型败血症变化。取小鼠的肝、脾等涂片染色镜检,做细菌分离培养,菌落形态和镜检结果都与病料的检测结果相似。

### 5 诊断

根据病猴的临床表现、剖检变化和分离菌的鉴定结果,诊断为巴氏杆菌病。

### 6 防治

6.1 隔离病猴,每只肌肉注射敏感药物氨苄西林钠 5 万~10 万 IU,1 次/d,疗程 5~7 d。将抗生素拌进颗粒料后饲喂,按体重大小添加氧氟沙星粉每只 0.1~0.2 g 和氨苄西林钠粉每只 0.15~0.3 g,连续饲喂 7 d。

6.2 将含氯的强力消毒灵粉配成 1:800 溶液对猴舍和猴活动场所进行消毒,栏舍进出口消毒池每天更换有效消毒药,全场猴栏舍外围环境撒生石灰粉消毒;尽量杜绝工作人员串岗跨栋走动。

6.3 加强饲养管理,投喂适口、易消化的饲料,5 d 后疫情得到控制,7 d 时发病食蟹猴痊愈。

### 参考文献:

[1] 倪语星,尚红.临床医学微生物学与检验[M].第 4 版.北京:人民卫生出版社,2009:186-188.

## 夏季养猪场六大降温设备介绍

- 1、负压风机** 一般在密闭的配种、怀孕、分娩舍使用。通过风机的运转,带动舍内空气产生气流,可将舍内的热量、有害气体、粉尘等排出舍外并将舍外的新鲜空气带入。注意猪舍长度与安装风机的数量关系。
  - 2、湿纸帘** 湿纸帘主要是通过水的蒸发带走通过湿纸帘空气的热量。在密闭的猪舍内使用,且需要与负压风机配合,合理的使用负压风机与湿纸帘可有效降低猪舍内的温度 3℃ 左右。
  - 3、喷头** 在舍内安装雾化喷头,通过雾化水的蒸发来迅速降低舍内的温度,一般在温度高峰期间歇性使用。需要配合风扇或风机来使用,缺点是降温维持时间短,长时间使用会导致舍内湿度过大。一般可降低 4~5℃。也可以在屋顶安装喷头,长时间使用效果也良好,但所需水量比较大,用水紧张的猪场使用困难。
  - 4、工业风扇** 在敞开式猪舍多使用风扇来进行降温,风扇的风量大,降温效果明显,但时由于长时间运转,很容易导致转头磨损,同时其所能影响的区域小。与负压风机相比,若达到相同效果,所需功率大,正逐步被负压风机所取代。
  - 5、泡沫板** 在舍内安装泡沫板天花来达到隔热的目的,各类猪舍内均可使用,效果良好。
  - 6、水泵、胶管** 在气温高时,也可采取冲洗猪身、地面与栏底来达到降温目的,只是所需水量比较大,可能对环保造成一定压力。
- 从长远来看,在猪舍周围种树,不失为一个既经济,效果又好的方法。(信息来源:广东养猪网)

# 《广东畜牧兽医科技》征稿启事

《广东畜牧兽医科技》杂志是国内外公开发行的农业科学类学术期刊,统一刊号为 ISSN1005-8567/CN44-1243/S,双月刊,大 16 开本。办刊宗旨是展示畜牧业生产业绩和畜牧兽医科研成果,传递最新科技信息,服务生产,促进学科发展。主要栏目有牧业论坛、专题综述、畜牧技术、兽医临床、试验研究、华南宠物园地、经验交流、信息之窗等。

## 1 征稿要求

本刊主要刊登畜牧兽医领域的原创性研究论文和临床生产经验,择优刊登阐述新观点、新方法、新概念的综述及专论。文稿内容应具有科学性、先进性、实用性,要求主题明确、文字精炼、数据准确、文理通顺。

## 2 文稿书写格式

**2.1 文稿书写顺序** 题目、作者(署名)、作者单位及所在地和邮编,摘要、关键词,中图分类号、文献标识码,正文、结论和参考文献。对于综述和研究类文章,需增加英文的题目、作者(拼音)、作者单位及所在地、摘要和关键词。

**2.2 题目** 文章标题应与内容贴切,一般不超过 20 字。必要时可加副标题。

**2.3 作者署名及单位** 书写格式参照以下范例。请在文末附第一作者及通讯作者的简介(包括姓名、性别、出生年月、学历或职称、主攻方向、通讯地址、联系电话及电子邮箱);获得基金资助研究所产生的论文需注明基金项目名称及编号。例:

彭礼繁<sup>1</sup>,罗光彬<sup>1</sup>,李东全<sup>1</sup>,陈自洪<sup>2</sup>,石德顺<sup>2</sup>

(1. 沈阳农业大学动物胚胎工程实验室,辽宁 沈阳 110161; 2. 广西大学动物繁殖研究所,广西 南宁 530005)

**2.4 摘要** 摘要须充分反映论文的研究目的、方法、结果和结论,用第三人称方式书写(不使用“本文”、“作者”、“笔者”等作为主语),不分段,不用图、表、公式和参考文献的序号。英文摘要应与中文摘要保持实质性内容的一致性。

**2.5 关键词** 一般选用 3~8 个能反映论文主要内容的单词或术语。

**2.6 标题序号** 要简明扼要、层次分明,要求用阿拉伯数字连续编号,如“1”、“1.1”、“1.1.1”等。各层次标题的序号均左顶格书写。

**2.7 图表** 图和表应具有自明性,切忌与文字表述重复。图表应简洁、规范、清晰、大小适中。表格一律用三线开放表,图和表的序号一律用阿拉伯数字编排,如图 1、图 2、表 1、表 2 等。

**2.8 计量单位** 采用国家法定计量单位。

**2.9 参考文献** 采用顺序编码制。在论文中按引用文献出现的先后顺序用阿拉伯数字连续编序(上标形式)。文后参考文献按文章中引用的顺序排列,著录参考格式如下:

**期刊:** [1] 孙勇,赵永成,王继先,等. 环境镉暴露时人胎盘组织金属硫蛋白表达及其意义[J]. 中国自然医学杂志, 2005, 7(3):185-198.

**专著:** [2] 殷震,刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京:科学出版社, 1997. 1148-1150.

**学位论文:** [3] 刘伟. 汉字不同视觉识别方式的理论和实证研究[D]. 北京:北京师范大学心理系, 1998.

**论文集:** [4] 辛希孟. 信息技术与信息服务国际研讨会论文集:A 集[C]. 北京:中国社会科学出版社, 1994.

**文献类型标识:** M- 专著, C- 论文集, N- 报纸文章, J- 期刊文章, D- 学位论文, R- 报告, S- 标准, P- 专利; 对于不属于上述的文献类型, 采用字母“Z”标识。

## 3 声明和约定

**3.1** 来稿一经刊用,将按规定支付稿酬(第一作者收,含著作权使用费),并赠送样刊 2 本。

**3.2** 本刊已加入“中国学术期刊(光盘版)”、“中文科技期刊数据库”和“万方数据-数字化期刊群”,如不同意将文章编入上述数据库,请在来稿时声明。

**3.3** 来稿文责自负。编辑部对来稿有权作技术性或文字性修改,不同意删改的稿件请在来稿时声明。

**3.4** 请勿一稿多投,若 6 个月后未接到刊用通知者可改投他刊。来稿一律不退,请作者自留底稿。

**3.5** 来稿时请注明作者详细地址、邮政编码和联系电话,以便联系。

地 址:广州市先烈东路 135 号《广东畜牧兽医科技》编辑部

邮 编:510500

电 话:020-37288167

传 真:020-37245052

E-mail:gdxmsykj@163.com