

双月刊 1976年3月创刊
第36卷第4期 (总第158期)
2011年8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 王贵平 舒鼎铭
孙彦伟 蔡建平 王政富 刘彩霞
熊惠军 吴玄光 刘清神
特邀编委:
陈峰 黄小建 陈小云 郑庆禄
李岩 林旭堃 陈瑞爱

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: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”。作者稿件一经本刊录用,将同时被上述三个数据库收录,进入因特网提供信息服务。作者如不同意,请在投稿时向本刊声明,否则本刊将视为同意收录。凡被本刊刊登的稿件,将一次性支付作者著作权使用报酬。

·专题综述·

- 狮头鹅生产性能的研究概况...唐兴刚,彭新宇,等(3)
玉山黑猪的饲养管理技术...占今舜,张彬(5)
浅谈新城疫在环颈雉中的流行...翁善钢(7)

·畜牧技术·

- 三议猪场管理存在的误区...吴同山,潘德敏(10)
浅谈目前小型猪场存在问题及对策...林益明(12)

·兽医临床·

- 猪场支气管败血波氏杆菌鼻腔带菌和肺部感染调查分析...叶润全,林涵(14)
溶葡萄球菌酶对奶牛子宫内膜炎的临床治疗试验...饶文,曾东平,等(17)
一例海狮阴茎脱位肿胀的诊治...谭信元,黎穗民,等(20)

·试验研究·

- 多重荧光PCR检测水产品致病菌方法的建立与应用研究...许如苏,林志雄,等(22)
3株珍珠鸡源致病性大肠杆菌的分离鉴定及其16S rRNA测定...古飞霞,田云,等(28)
河北省2010年猪繁殖与呼吸综合征病毒的遗传变异分析...王金凤,王占峰,等(32)
槲皮素对禽流感病毒感染试验鸡的防治作用...潘德敏,罗开健(37)
不同吸附剂处理霉变饲料的锦鲤饲喂效果研究...罗佳捷,沈名灿,等(40)

·华南宠物园地·

- 一例犬甲硝唑中毒的诊治报告...黄良宗,梁金华(44)
第三眼睑遮盖术治愈犬角膜穿孔...张媛媛(45)

·经验交流·

- 猪场病毒性腹泻防控实例及体会...张欣,韩辉,等(47)
鸡呼吸道疾病的防控体会...吴群彬,朱燕秋,等(49)
猪群的免疫与保健措施...李中兴(51)

·信息之窗·

- 2011“永顺杯”优秀论文评选启事... (27)
本刊征订启事... (50)

# GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

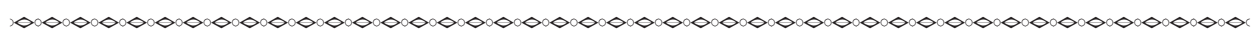
Established in march 1976(Bimonthly)

Aug.2011 Volume 36,Number 4 (Total No.158)

---

## Main Content

- Research progress on production performance of Shitou goose* ..... Tang Xinggong, Peng Xinyu, et al(3)
- Feeding management of Yushan black pig* .....Zhan Jinshun, Zhang Bin (5)
- The epidemiology of Newcastle disease in ring-necked pheasants* .....Weng Shangang(7)
- Three mistakes on management of pig farm* .....Wu Tongshan, Pan Demin(10)
- Some problems found in small pig farms and the solutions*.....Lin Yiming, et al(12)
- Research and analysis of Brodetella bronchiseptica in nasal cavity and lungs*.....Ye Runquan, Lin Han(14)
- Clinical investigations on the therapic effect of lysostaphin on the endometritis in dairy cows*.....  
.....Rao Wen, Zeng Dongping, et al (17)
- The diagnosis and treatment of the dislocation of the penis of one sea lion*.....  
.....Tan Xinyuan, Li Huimin, et al(20)
- Development and application of multiplex real-time PCR for detection of pathogenic bacteria in aquatic products*.....Xu Rusu, Lin Zhixiong, et al (22)
- Isolation and identification of three Escherila coli strains from guinea fowls and the determination of 16S rRNA*.....Gu Feixia, Tian Yun, et al (28)
- Variation analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains isolated from Hebei province in 2010*.....Wang Jinfeng, Wang Zhanfeng, et al(32)
- The role of quercetin against AIV infection in chickens*.....Pan Demin, Luo Kaijian(37)
- Study on detoxification effects of different adsorbents on mould feedstuff fed to fancy carps*.....  
.....Luo Jiajie, Shen Mingcan, et al(40)
- Diagnosis and treatment of the metronidazole poisoning of one dog*.....Huang Liangzong, Liang Jinhua(44)
- Treatment of corneal perforation with third eyelid flap surgery*.....Zhang Yuanyuan(45)
- The prevention and control of viral diarrhea in pig farms*.....Zhang Xin, Han Hui, et al(47)
- Prevention and control on chicken respiratory diseases*.....Wu Qunbin, Zhu Yanqiu, et al(49)



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

# 狮头鹅生产性能的研究概况

唐兴刚, 彭新宇\*, 孙俊颖, 魏光伟

(广东省农业科学院兽医研究所, 广东 广州 510640)

中图分类号: S835

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)04-0003-02

狮头鹅为目前我国民间培育出的体格最大的优良鹅品种,也是世界上的大型鹅之一。原产广东饶平县浮滨乡,多分布于澄海、潮安、汕头市郊。狮头鹅羽毛灰褐色或银灰色,腹部羽毛白色。头大而眼小,头部顶端和两侧具有较大黑肉瘤,肉瘤可随年龄而增大,形似狮头,故称狮头鹅。狮头鹅具有卓越的产肉和产肝等生产性能,是我国南方重要的禽类经济动物。本文总结了狮头鹅各种生产性能目前的研究概况,为以后狮头鹅的进一步研究提供参考。

## 1 产蛋性能

狮头鹅的产蛋季节为9月至翌年4月。其就巢性强而使产蛋不连续,在产蛋季节狮头鹅的产蛋一般分为三个产蛋期。第一产蛋期为9月开产至11月中旬;第二产蛋期为11月中旬至翌年1月下旬;第三产蛋期为1月下旬至产蛋结束。第一个产蛋年度平均产蛋量为24个,平均蛋重为176.3 g,蛋壳乳白色,蛋形指数为1.48。两岁以上母鹅,平均年产蛋量为28个,平均蛋重217.2 g,蛋形指数为1.53。在改善饲料条件及不让母鹅孵蛋的情况下,个体平均产蛋量可达35~40个。母鹅可产蛋5~6年,盛产期在2~4岁。

王思庆等<sup>[1]</sup>通过对狮头鹅产蛋遗传性能分析,认为狮头鹅产蛋量表型性状为高遗传力性状,能稳定遗传给后代,且各个家系中产蛋量存在相对高产家系。因此狮头鹅低繁殖力的缺点是可以依据产蛋量表型性状用家系育种法选育出狮头鹅高产品系来克服的。

黄松波<sup>[2]</sup>通过对3群狮头鹅三个产蛋期的产蛋情况进行分析,提出对第一产蛋期就巢体产的

鹅只醒抱后要及时追加营养,保证产蛋高峰期最高程度的发挥。另外,第二产蛋期的12月份由于日照时间短,气温低,可以提高狮头鹅产蛋性能的发挥。

## 2 产肉性能

狮头鹅作为我国大型肉用鹅之一,其产肉性能关系到养殖户的经济利益及狮头鹅产业的发展情况。叶昌辉等<sup>[3]</sup>用Logistic模型、Compertz模型和Bertalanffy模型拟合了狮头鹅12周龄前的体重、体斜长、胸深、龙骨长、骨盆宽和胫长等指标的生长曲线,发现Logistic模型的拟合度比Compertz模型和Bertalanffy模型的高,而它们之间的差异不显著。通过拟合生长曲线发现狮头鹅体重增长缓慢期在3周龄前,快速增长期在3~8周龄,8周龄后减慢,到12周龄时基本达到成年体重。因此,在肉用狮头鹅生产中,应尽量利用3~8周龄这一生长快速阶段。另外,研究还发现5周龄后公鹅生长速度明显快于母鹅,因此要注意5周龄后公、母鹅因生长速度不一致所需要的营养差异。快速增长期结束前应注意饲料中矿物质的含量,特别是钙、磷的含量,以满足骨骼生长发育的需要。刘思扬<sup>[4]</sup>利用冬闲田种植黑麦草饲喂狮头鹅,发现黑麦草能提高肉鹅生长速度、提高肉鹅屠宰率、提高饲料转化率及提高养鹅的经济效益。

## 3 繁殖性能

鹅的繁殖性能低下主要表现在性器官发育迟缓,产蛋能力,雄性不育率高等方面。因此,除去需要科学的饲养管理技术外,严格选种、控制光照、

收稿日期: 2011-03-29

\*: 通讯作者

基金项目: 广东省农业攻关项目(2008B020600007)

杂交改良及人工受精技术的运用都可以提高鹅的繁殖性能。

### 3.1 严格选种

叶昌辉等<sup>[3]</sup>研究发现狮头鹅在 12 周龄达到成年体重时, 体重与 2~11 周龄的体重呈显著的正相关。因此在选育狮头鹅时, 可用 2 周龄以后的体重来推测成年鹅的体重, 以利于早期选育。

生产上一般在 3 月下旬至 4 月上旬选留后备种鹅。选择后备种鹅可根据外貌来进行。公鹅一般要求特征显著, 身体健康。具体要求有: 头大额宽, 眼睛有神, 脖颈粗而不过长, 身体结实略呈方形, 两脚相距较宽, 腿部肌肉丰满, 双脚粗且有力, 腹部紧凑, 羽毛有光泽, 全身各部位比例适当, 鹅体无损伤部位。母鹅要求头颈大小适中, 肉垂显著, 胸深腰阔, 两脚距离宽, 腹部饱满但不下垂, 羽毛细腻而有光泽, 全身各部位比例适当, 鹅体无损伤部位。

### 3.2 反季节生产

根据广东鹅季节性繁殖的研究结果可知, 光照对鹅的繁殖活动影响很大。长时间光照可抑制鹅繁殖活动, 缩短光照能促进鹅繁殖活动。因此可以采用在冬季自然光照时间较短时延长日照, 在自然光照时间长的夏季缩短日照的办法, 即创造一个与自然光照变化相反的人工光照程序, 逆转鹅的繁殖季节, 即反季节生产<sup>[5]</sup>。在控制光照的同时, 控制温度、强制换羽及调整留种时间可以使鹅的反季节繁殖收到更好的效果<sup>[6]</sup>。应用反季节生产技术可以克服种鹅繁殖活动的季节性制约, 使雏鹅和肉鹅能够在全年各个月份供应市场。使整个养鹅业和鹅产品销售加工的各生产环节, 如肉鹅生产者、肉鹅贩运者和批发商甚至肉鹅加工商都可获得良好的经济收益。该技术在生产中的推广应用也可极大地促进广东省养鹅业的规模化发展<sup>[7]</sup>。

### 3.3 人工受精

这种方法不是让公、母鹅自由交配, 而是用人工的方法, 采集公鹅的精液, 并在 0.5 h 内, 把精液适当稀释后再输送到母鹅的阴道内, 让其受精。人工受精技术以其可以降低饲养成本、减少性疾病的传染、促进品种改良、提高经济效益, 提高种

蛋受精率和孵化率, 被养鹅单位作为提高鹅繁殖能力的主要手段<sup>[8]</sup>。马江耀等<sup>[9]</sup>对比了人工受精组合自然配种组的种蛋受精率和受精蛋孵化率, 结果显示人工授精组的种蛋受精率达到 87.5%, 比自然配种组提高了 25.1%; 人工授精组的受精蛋孵化率达到 90.0%, 比自然配种组提高了 1.0%。

## 4 其他生产性能

狮头鹅作为一种经济动物, 除去肉用价值外, 还具有产鹅羽绒、产肝等性能。狮头鹅的羽绒产量高、绒朵大、弹性好、保温性能强、吸水性小, 耐磨性比鸡绒要长一倍, 长达 25 年以上。因此, 用狮头鹅羽绒加工成的羽绒被等羽绒制品具有轻、薄、暖、美的特点。生产鹅肥肝是提高养鹅经济效益的另一个重要经营手段。鹅肥肝是通过填饲适宜品种的鹅进行生产的。但因为狮头鹅的繁殖性能比其他品种稍差, 因此引进其他繁殖性较强的鹅种与狮头鹅杂交, 选育繁殖性好、鹅肝个体大的新品种, 可提高鹅肥肝的产量。例如, 汕头市白沙禽畜研究所培育成功的“SB21 肉用鹅配套系”就是一个很好的产鹅肥肝的品种<sup>[10]</sup>。

### 参考文献:

- [1] 王思庆, 林庆添, 林祯平, 等. 狮头鹅产蛋性状遗传性能分析[J]. 水禽世界, 2008, (5): 39-41.
- [2] 黄松波. 狮头鹅不同产蛋期产蛋情况分析[J]. 中国禽业导刊, 2007, (14): 30.
- [3] 叶昌辉, 钟日聪. 狮头鹅生长发育模型的研究. 石河子大学学报(自然科学版), 2005, 23(6): 694-697.
- [4] 刘思扬. 肉用狮头鹅技术产量指标测试初报[J]. 广东畜牧兽医科技, 2000, 25(3): 30-32.
- [5] 施振旦, 孙爱东, 黄运茂, 等. 广东鹅种的反季节繁殖光照调控原理和技术[J]. 中国家禽, 2007, 29(19): 40-42.
- [6] 丁春华, 杨波, 王雷. 鹅反季节繁殖技术的研究与应用[J]. 水禽世界, 2008, (1): 52-54.
- [7] 孙爱东, 梁少东, 施振旦. 广东省鹅反季节繁殖和生产经济效益分析[J]. 中国家禽, 2005, 27(4): 17-19.
- [8] 陶勇, 任善茂, 董晓君. 鹅人工授精的优点及注意事项[J]. 当代畜牧, 2006, (10): 29-30.
- [9] 马江耀, 陈进胜, 卢金伦. 狮头鹅人工授精技术及其应用研究[J]. 广东畜牧兽医科技, 2010, 35(1): 16-18.
- [10] 庄友初, 林祯平. 狮头鹅的产业化前景[J]. 养禽与禽病防治, 2006, (2): 36-37.



# 玉山黑猪的饲养管理技术

古今舜, 张彬\*

(湖南农业大学动物科技学院, 湖南长沙 410218)

**摘要:**玉山黑猪有2000多年的养殖历史,是江西省唯一成为国家级地方保护的猪品种。它具有早熟易肥、母性好、产子多,肉质细嫩、鲜美、抗氧化能力强等优点,在规模化养殖以及肉产品加工上具有广阔的前景。

**关键词:**玉山黑猪;饲养管理;特点

**中图分类号:** S815

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2011)04-0005-02

玉山黑猪养殖可以追溯到2000多年前。1995年,江西省种畜种禽鉴定委员会正式将其命名为“玉山黑猪”。一般玉山黑猪的中心产区位于江西省玉山县,但周边县市如广丰、上饶等地也有分布。

玉山黑猪具有早熟易肥、母性好、产子多;肉质细嫩、鲜美,鲜肉中谷氨酸与亚麻酸含量较高等特点,使其成为中国地方猪品种中的佼佼者。2006年,玉山黑猪被列入国家级畜禽遗传资源保护名录,成为国家级地方保护的猪品种之一。

## 1 黑猪的特点

### 1.1 体型特征

玉山黑猪毛色全黑,有狮头型和马脸型两种头型。狮头型头大,额宽,且有较深的皱纹,嘴筒短略上翘,躯干背腰不平,腹下垂,体短,体型较小,耳中等大,下垂,四肢关节结实;马脸型头中等大,躯干背腰平直,体长。黑猪尾长13~25 cm,肋骨对数为13~14对,乳头多为7对。

### 1.2 肉质性能

玉山黑猪的肉质性能较好,具有肉色鲜红、保水力强、不饱和脂肪酸含量高等优点。邹志恒等<sup>[1]</sup>对玉山黑猪肉质特性的研究发现,该猪肉肉色鲜红(CR-10型色差仪评分是3.42),大理石纹丰富(美制比色板评分是3.90),抗氧化能力强(肌肉中丙二醛MDA和超氧化物歧酶SOD的含量较高,分别为0.39 nmol/mg,19.72 U/mg),肌肉保水能力强(水浴损失仅为30.32%);赖氨酸和蛋氨酸含

量高(分别占7.36%、2.55%),多不饱和脂肪酸,特别是亚油酸含量比较高(占6.48%);刘龙芳等<sup>[2]</sup>利用纯玉山黑猪与其他品种猪的猪肉品质对比发现玉山猪肉24 h(2.99%)、96 h(5.14%)的贮存损失率和剪切力(1.56 kg),均显著低于其他品种猪;不饱和脂肪酸C14、C16、C18的含量分别为1.32%、24.96%、14.42%,均显著高于其他品种猪。

### 1.3 肥育性能

玉山黑猪具有早期沉积脂肪的特点,玉山原种猪场屠宰测定发现2月龄猪的板油比率为5%左右,4月龄达到8%左右。陈珍等<sup>[3]</sup>对60日龄内玉山黑猪小肠形态学发育的研究结果发现,玉山黑猪在哺乳早期(0~20 d),小肠形态及其功能成熟迅速,四段小肠的小肠绒毛形态、杯状细胞数量的变化符合正常的生长规律。断奶后(45~60 d),四段小肠绒毛形态和杯状细胞数量虽然变化差异显著,消化能力显著下降,但各项指标很快就恢复到断奶前的水平,对仔猪的生长影响不大。因此,可以看出玉山黑猪在仔猪断奶后生长较快,断奶应激影响要小一点,仔猪在断奶阶段环境适应力比较强,成活率会比较高。

### 1.4 繁殖性能

相对于其他品种,玉山黑猪的性成熟较早。一般母猪3~4月龄左右开始发情,公猪则在3月龄出现性欲。母猪性周期19 d左右,一般持续期3~4 d,发情症状比较明显。一般母猪7月龄,体重50 kg适配;公猪8月龄,体重55 kg适配。

## 1.5 其他特点

玉山黑猪的适应性较强,比较耐粗饲料,在饲养过程中可以大量喂大豆、南瓜、红薯、苦麦菜等饲料,减少精饲料的用量,适合农户散养。玉山黑猪的产仔率比较高,一般达到12头/胎,断奶仔猪成活率高,平均达10头/窝左右,断奶日龄在45 d左右。

## 2 玉山黑猪的饲养管理

### 2.1 场址的选择

在猪场的建设当中,场址的选择非常重要。猪场场址的选择必须根据猪场生产特点、生产规模、饲养管理方式及生产集约化程度等方面的实际情况,对地势、地形、土质、水源,以及居民点的位置、交通、电力、物质供应及当地气候条件等进行全面考虑<sup>[4]</sup>。

一般来讲,猪场应该建在地势较高,水源充足,土壤透气好、易渗水,用电方便的地方,而且距国道、省道不少于2 km,距居民点不少于1 km,必须远离其他的畜禽场。这样可以降低疫病的传播,有利于降低养殖成本,防止环境的污染。

### 2.2 生产管理

**2.2.1 种公猪的管理** 一般来讲,玉山黑猪公猪在8月龄左右,体重在55 kg左右适合初配。过肥或者过瘦都会影响种猪的配种。种公猪可以利用4~5年左右。

俗话说:“母猪好,好一窝;公猪好,好一坡”。因此,种公猪的饲养好坏,是猪场生产发展的关键。种公猪在饲养当中要注意以下几点:①提供新鲜、营养充足的饲料:成年种公猪每日投料3 kg左右,日喂2次,早上7:30左右,下午4:30左右。②合理运动:运动可增强种公猪体质,提高种公猪的性欲和精子活力,每天早饲后和傍晚各运动1次,一次运动时间为1 h左右。③适时配种:一般公猪每天配种一次,连续4~5 d后要休息1~2 d,并根据猪的品种、体重、配种(采精)次数增减料量。配种期应补饲适量的胡萝卜或优质青绿饲料,配种或采精后应加喂鸡蛋2~3枚。④栏舍管理:种公猪舍要求干净卫生、干燥、温暖、无贼风,舍内温度要求保持在18~20℃。舍内设置自动饮水器,便于公猪自由饮水。

**2.2.2 母猪生产管理** 玉山黑猪母猪的妊娠期为113 d左右。在母猪分娩期前一周,应该将母猪转入产房。在母猪进产房之前要对其进行彻底的消毒。

仔猪接生的时候注意以下几点:①迅速用消毒的毛巾将仔猪身上以及口腔内的粘液清除。②将仔猪的脐带血向内挤回,并在离脐部约3 cm处用细绳绑紧脐带后剪断,再用碘酒进行消毒,后立即放入保温箱。③仔猪生产完之后,立即进行第1次哺乳。在泌乳期间要根据仔猪的强弱进行仔猪乳头的固定,原则是强壮的固定在母猪的后排奶头上,弱小的固定在前排的奶头上。

**2.2.3 母猪产后管理** 母猪在生产当中,应激大,可能会引起母猪便秘,而且产后比较虚弱,需要充足的营养来恢复体力。因此我们可以在母猪产后10 h,给每头母猪喂 $MgSO_4$  10~15 g、麦麸100~250 g、豆粕100 g、红糖150 g,煮沸3~5 min后凉至40℃左右饲喂。母猪产后还需要限料,一般产后第1~2 d只喂1 kg饲料,第3~4 d喂2~2.25 kg饲料,第10天后不限量,在此期间让母猪充足饮水。哺乳母猪的最大采食量的计算为: $2\text{ kg}+(0.4\sim 0.5\text{ kg})\times\text{仔猪头数}$ 。

哺乳母猪在哺乳期间,每天泌乳次数达20多次。母猪在泌乳期间通常会表现能量和蛋白质的负平衡,因此,要满足哺乳母猪的能量与蛋白质需要,日粮要提供约63 MJ消化能和需摄取790 g左右的蛋白质。除此之外,日粮要提供足够的钙和磷,还有各种维生素<sup>[5]</sup>。可以提供一些干净的青绿饲料给母猪,如青菜叶等,既可以补充水分,也可以提供一部分维生素,降低母猪便秘的发生。要注意保护泌乳母猪的乳房和乳头,还要保持母猪乳房干净,避免仔猪吃了被污染乳头的乳汁而发病。

**2.2.4 仔猪的管理** 仔猪饲养的好坏直接影响猪场的发展,一般将仔猪分为哺乳和断奶两个阶段。哺乳仔猪由母体内环境生长发育转为外界环境生长发育,这个时期的仔猪生长发育快,代谢机能旺盛,但消化器官不发达,体温调节能力差,抗病力差。因此必须提供一个温暖的小气候环境。一般刚出生的小猪的最适温度为30~32℃。随着日龄增加,温度要求将有所下降,到30日龄时,产房环境温度可控制在22℃左右。要及早吃到初乳,因为初乳含有丰富的营养物质和免疫抗体,可以增强仔猪体质和抗病能力,提高对环境的适应能力。而且初乳中的镁盐具有倾泻作用,可促进胎粪的排出。但母乳中的铁含量不足,需对仔猪进行补铁<sup>[6]</sup>。

(下转第9页)

# 浅谈新城疫在环颈雉中的流行

翁善钢

(外高桥出入境检验检疫局, 上海 200137)

**摘要:**新城疫是世界上重要的一种禽病, 不仅家禽易感, 环颈雉等鸟类也易感。各个年龄段的环颈雉对新城疫都易感, 但感染后的症状以及死亡率等往往不一致。本文通过现有的相关文献资料对新城疫在环颈雉中的流行情况做一介绍。

**关键词:**环颈雉; 新城疫; 流行情况

**中图分类号:** S852.659.5

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2011)04-0007-03

## 1 引言

环颈雉 (ring-necked pheasant, *Phasianus colchicus*) 俗称雉鸡、山鸡、野鸡等, 是一种重要的经济禽类, 是目前特禽养殖业养殖数量最多的种类之一。山鸡具有较高的经济价值, 肉质细嫩鲜美, 野味浓, 其蛋白质含量高。公山鸡的羽毛艳丽, 具有观赏价值, 标本可以提供给教学、科研和展览用, 还可以作为高雅贵重的装饰品。与中国不同的是在欧洲, 环颈雉是一种重要的用于野外打猎的鸟类。很多养殖场将繁殖好的环颈雉放归山林中, 因此在野外生活的环颈雉越来越多, 数目很难统计。Parrott 等根据英国乡村联合会的一项调查研究称在 2000-2001 年大约有 3000 万只环颈雉被放入山林中, 其中约有 1100 万只被打猎的游客射杀<sup>[1]</sup>。Turner 等<sup>[2]</sup>报道被放归山林的环颈雉只有 30.5% 被射杀。

新城疫 (Newcastle disease, ND) 被认为是世界上最重要的禽病之一。新城疫病毒感染不仅能够造成很高的死亡率和严重的经济损失, 更为重要的是新城疫是国际动物卫生组织 (OIE) 陆生动物疾病目录上的重要疾病之一。一个国家发生新城疫后, 其他国家就会采取限制禽以及禽肉制品进口的措施, 这对有疫情的国家来说损失是巨大的。新城疫病毒 (NDV) 属于副黏病毒科禽腮腺炎病毒属 (Avulavirus) 的禽副黏病毒 I 型 (APMV-1)。新城疫病毒是单链负股 RNA 病毒, 有包膜。病毒颗粒具多形性, 有圆形、椭圆形和长杆状等。成熟的病毒粒子直径 100~400 nm。包膜为双层结构膜, 由宿主细胞外膜的脂类与病毒糖蛋白结合衍生而

来。包膜表面有长 12~15 nm 的刺突, 具有血凝素、神经氨酸酶和溶血素。Kaleta 等<sup>[3]</sup>报道通过自然或者人工感染 NDV 试验显示, 几乎所有受试的鸟都对 NDV 易感, 其中易感性较高的是属于鸵鸟目和鸡形目的鸟类, 而环颈雉属于鸡形目雉科。最近几年世界各地鸟群中 NDV 的流行情况也证实了这一试验的结果<sup>[4]</sup>。几乎所有年龄段的环颈雉都对 NDV 易感, 感染后往往会导致死亡。

## 2 环颈雉感染 NDV 后的症状和病变

同其他鸟一样, 环颈雉感染 NDV 后会有不同的临床症状和表现。这往往取决于宿主自身、环境、毒株强弱等多方面因素。Muller 等<sup>[5]</sup>通过人工感染试验记录了一系列临床症状, 但没有哪一症状可以被认为是 ND 所特有的, 因此确诊需要采用病毒分离以及分子生物学的诊断方法。NDV 强毒株感染环颈雉后主要临床症状有精神沉郁或紧张, 动作不协调, 食欲废绝, 白色或绿色的水样粪便, 产蛋障碍, 甩头等<sup>[6-12]</sup>。关于呼吸症状的报道不太统一, 有报道称有严重的呼吸困难<sup>[8,11]</sup>, 也有报道称没有<sup>[5,9]</sup>。丹麦环颈雉爆发的一次 ND 疫情死亡率在 22% 到 77% 之间<sup>[11]</sup>。而在英国 2005 年报道的一次疫情, 死亡率却不到 3%。有报道称未免疫过疫苗的环颈雉经人工感染 NDV 后死亡率可达 100%<sup>[5,12]</sup>。日本也曾报道过在 NDV 流行时造成环颈雉较高的死亡率。Gera1 等<sup>[10]</sup>报道称病毒的剂量的多少和死亡率高低并不呈正比。人工感染强毒株 NDV 后, 环颈雉的主要病理变化有面部水肿, 粘膜下出血, 腺胃出血, 肾病变, 脾脏病变, 肠出血性溃疡的和不同程度的肠炎, 气管炎等<sup>[9-12]</sup>。



### 3 新城疫在环颈雉中的流行情况

20 世纪 40 年代的一些文献<sup>[13,14]</sup>介绍了鸟类中的 ND 的情况,这些也许可以作为最早确认环颈雉有 NDV 的资料。Beer 认为英国野外生活的环颈雉中最早爆发 ND 是在 1963 年<sup>[15]</sup>。早期有关于环颈雉感染 NDV 报道的时候往往也正是家养禽类中流行 NDV 的时候,因此当时经常有关于 NDV 是否由环颈雉传给家禽的争论。很清楚的事实是当爆发 ND 的时候,ND 在鸡群中普遍存在而环颈雉也受到了影响。例如,1970 年的时候英国埃塞克斯 (Essex) 的家禽中 ND 大流行,NDV 也从有临床症状的环颈雉上分离到了<sup>[9]</sup>。环颈雉很多病毒性疾病(例如传染性喉气管炎,鸡痘病毒,传染性法氏囊病等)的发生往往是被家养的鸡或者野鸟传染的<sup>[16]</sup>。野鸟在传播 NDV 给环颈雉的过程中的重要作用在丹麦发生的一起疫情中很好地体现出来。当时发病的环颈雉并没有同病死家禽有过接触,因此病毒肯定是迁徙的野禽带入的<sup>[1]</sup>。此外,感染了鸽 I 型副黏病毒 (PPMV-1) 的鸽子被认为是导致鸽子放养地区的环颈雉患病的一个重要来源。因为 PPMV-1 与 NDV 具有一定的同源性<sup>[6]</sup>。也有报道指出,在环颈雉生活地区的养鸡场使用 NDV 活疫苗免疫也是环颈雉携带 NDV 的一个重要原因<sup>[17]</sup>。

自从 1994 年开始欧盟国家就一直有有关 ND 在环颈雉中的流行报道。1994 年, Capua 等报道进口到意大利的环颈雉上分离到了 PPMV-1<sup>[18]</sup>。1996 年大约 12 000 只自由生活的环颈雉感染了较为典型的 NDV 毒株,进一步的研究显示该毒株同 1995-1997 期间导致斯勘德纳维亚地区和英国的家禽爆发 ND 的毒株十分相似<sup>[6,11]</sup>。最近的两次疫情(2005 年分别在英国和法国爆发)被认为在流行病学上具有联系。英国受感染的环颈雉属于同一个狩猎场,其中有不少环颈雉在发病前是从法国引进的。两国分离到的病毒采用 RT-PCR 技术以及基因测序的方法显示具有同源性<sup>[19]</sup>。环颈雉对各种类型的 NDV 毒株都易感,但大多数情况下易受到当时家禽或野鸟群中流行的 NDV 毒株感染。

### 4 讨论

没有免疫过疫苗的环颈雉对 ND 是很易感的,通常患病的环颈雉还会表现出一些症状。然而不同的环颈雉往往症状不同,这给及时诊断带来了

一定的难度。环颈雉进行人工集约化饲养以后,相关的各种疾病也日益增多。而环颈雉及其禽肉产品在长途运输过程中也很容易将疾病从一个地方传到另一个地方。免疫过疫苗的环颈雉在感染 NDV 后往往不表现任何临床症状,成为隐性的带毒或排毒者<sup>[18]</sup>。无论是在野外条件还是人工饲养环境下环颈雉的活动范围都不是很大,因此环颈雉将病毒传播到较远的距离的可能性并不大。在长途运输禽类及其制品的时候如果不采取严格的检验检疫措施就很有可能将 NDV 传播出去。上文介绍的发生在法国和英国的例子正好说明了这一点。在国内,环颈雉是否有 ND 发生,迄今似乎尚未见正式报道。但各个环颈雉的养殖场应该做好疾病的预防工作,一旦爆发后果不堪设想。

### 参考文献:

- [1] Parrott D, Moore N, Browne S, et al. Provision of bag statistics for huntable birds[Z]. Defra Project CR0281, 2003. 23-25.
- [2] Turner C, Sage R. Fate of released pheasants [J]. The Game Conservancy Trust Review, 2003, 35:74-75.
- [3] Kaleta E F, Baldauf C. Newcastle disease in free-living and pet birds[M]. Newcastle Disease. Kluwer Academic Publishers, Boston, 1988:197-246.
- [4] Alexander D J. Newcastle disease [J]. British Poultry Science, 2001, (42): 5-22.
- [5] Muller H, Nostitz D, Gurk W. Zur Klinik und Pathologie der Newcastle Disease bei Fasanen (Phasianus colchicus) [J]. Monatshefte für Veterinärmedizin, 1990, (45):467-469.
- [6] Alexander D J, Manvell R J, Lowings J P, et al. Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies [J]. Avian Pathology, 1997, 26:399-418.
- [7] Alexander D J, Manvell R J, Frost K M, et al. Newcastle disease outbreak in pheasants in Great Britain in May 1996 [J]. Veterinary Record, 1997, 140:20-22.
- [8] Al-Hilly J N A, Khalil H H, Zakoo F I, et al. An outbreak of Newcastle disease in a pheasant ock in Iraq [J]. Avian Pathology, 1980, (9):583-585.
- [9] Borland E D. Newcastle disease in pheasants, partridges and wild birds in East Anglia 1970-1971 [J]. Veterinary Record, 1972, 90:481-482.
- [10] Giral M F, Lautie R, Bodin G. Study of the experimental infection of game birds (pheasant, red legged partridge and common partridge) with Newcastle disease virus [J]. Revue de Médecine Vétérinaire, 1976, 127:1537-1574.



- [11] Jørgensen P H, Renstrom L, Manvell, R J, et al. The occurrence of Newcastle disease in Denmark and Sweden 1995-1996[A]. Characterisation of avian paramyxovirus 1 isolates[C]. XIth International Congress of the World Veterinary Poultry Association, Budapest, 1997, 239.
- [12] Lage M, Catelli G, Rampin T, et al. Comparative remarks on the pathogenicity of a velogenic strain of NDV towards *ve* species of *galli.ormes*[J]. *Atti della Societa Italiane delle Scienze Veterinarie*, 1974, (28):746-750.
- [13] Brandly C A, Moses H E, Jones E E, et al. Epizootiology of Newcastle disease in poultry[J]. *American Journal of Veterinary Research*, 1946, (7):243-249.
- [14] Levine P P, Fabricant J, Mitchell, G B. Newcastle disease in ringnecked pheasants[J]. *Cornell Veterinarian*, 1947, 37:265-267.
- [15] Beer V. Newcastle disease in pheasants in Britain [Z]. *Wildlife Diseases—Proceedings of the Third International Wildlife Disease Conference*, 1976, 423-429.
- [16] Lister S A. Current disease problems of game birds in England and Wales state[J]. *The Veterinary Journal*, 1989, (43):66-74.
- [17] Gough R E, Cox W J, Alexander D J. Examination of sera from game birds for antibodies against avian viruses[J]. *Veterinary Record*, 1990, 127:110-111.
- [18] Capua I, Manvell R J, Antonucci D, et al. Isolation of the pigeon PMV 1 variant of Newcastle disease virus from imported pheasants (*Phasianus colchicus*) [J]. *Zentralblatt für Veterinärmedizin B*, 1994, 41:675-678.
- [19] Aldous E W, Manvell R J, Cox W J, et al. An outbreak of Newcastle disease in pheasants (*Phasianus colchicus*) in South East England in 2005[J]. *Veterinary Record*, 2007, 235:112-114.

(上接第 6 页)

仔猪断奶一周内要控制采食量,实行少喂多添的原则。一般每天饲喂 4~6 次左右,后逐渐过渡到自由采食,在此期间饲喂乳猪料<sup>[7]</sup>。断奶后 20 d 左右,将乳猪料换到仔猪料,在换料的时候切记不可一次性换掉,要渐进式地换料,否则会引起猪的应激,一般有 7 天左右的过渡期。第 1~2 d 为 75%的乳猪料 +25%的仔猪料,第 3~4 d 为 50%的乳猪料 +50%的仔猪料,第 5~6 d 为 25%的乳猪料 +75%的仔猪料,第 7 d 就可以直接喂仔猪料。

在饲养管理当中,要保持猪舍的卫生,要及时消毒,避免仔猪腹泻的发生。一般是在新生仔猪的饮水中加促菌生等制剂,有利于仔猪肠道菌群的平衡;断奶仔猪则在饮水中加入利高霉素等药物来预防下痢的发生<sup>[8]</sup>。

### 3 小结

随着经济的发展,人们的生活质量要求越来越高,对动物肉产品的要求也越来越高。玉山黑猪肉质鲜美、必需氨基酸和对人体有益的不饱和脂肪酸(亚油酸等)含量较高,正好适合人们的需求。

玉山黑猪肉抗氧化能力强,不饱和脂肪酸的含量较高,在动物产品加工、贮存过程中不易被氧化,有利于延长肉产品的保质时间,增加经济效益。

刘龙芳等<sup>[2]</sup>以玉山黑猪为母本与外来纯种公猪杂交,其杂种后代不但提高了生长速度和饲料报酬,而且保持了玉山黑猪的优良肉质特性,说明玉山黑猪的肉质性状具有较高的遗传力。可以利用玉山黑猪来进行杂交或形成新的品系配套,提高玉山黑猪的利用价值。

随着人们对玉山黑猪的深入了解,笔者相信,玉山黑猪的养殖以及肉产品的开发具有广阔的发展前景。

### 参考文献:

- [1] 邹志恒,谢金防,韦启鹏,等.玉山黑猪肉质特性研究[J]. *猪业科学*, 2009, (12):92-95.
- [2] 刘龙芳,李小光,郑小明.玉山黑猪肉质评价与利用研究[J]. *养猪*, 2005, (1):49-51.
- [3] 陈珍,周作红,管远红,等.60 日龄内玉山黑猪小肠形态学发育的研究[J]. *江西农业大学报*, 2008, 30:297-301.
- [4] 雷浩兵,李诗兵.猪场场址选址应考虑的因素[J]. *中国猪业*, 2008, (1):30.
- [5] 何伟,韩秀权,王振华.哺乳母猪饲养管理的技术要点[J]. *养猪*, 2008, (6):79.
- [6] 周洪海,范业敏.哺乳仔猪的饲养管理[J]. *养殖技术顾问*, 2011, (1):31.
- [7] 张玺,冯志华.断奶仔猪的饲养管理[J]. *国外畜牧学—猪与禽*, 2010, 30(1):91-93.
- [8] 朱建忠.浅谈新生仔猪腹泻的防治[J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2011, 27(1)94-95.

## 三议猪场管理存在的误区

吴同山<sup>1</sup>, 潘德敏<sup>2</sup>

(1. 东莞市畜牧科学研究所, 广东 东莞 523086; 2. 广东省农业干部学校, 广东 广州 510500)

中图分类号: S815.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)04-0010-02

针对猪场生产管理过程中出现的问题和一些管理上的误区,笔者曾于2005年8月在《养猪》杂志上发表“猪场生产存在的一些误区”,2007年10月又在《广东畜牧兽医科技》杂志上发表“再议当前猪场生产管理存在的一些误区”两篇文章,近四年来,根据了解到的猪场生产实际,对现在存在的一些管理误区再作阐述。

### 1 过分强调专业人才养猪

现在的猪场老板,知道了养猪离不开好的技术和管理的道理,多注重技术和人才,因此,在物色人员时,非常强调人才,特别是学畜牧、兽医、饲料营养等方面的人才。规模大的,要求至少有本科学历,规模小的,最少都要中专以上(包括一线的饲养员)。技术人员招进来以后,由于猪场的条件(如限制外出、住宿等)、收入等实际情况影响,大多稳定不下来,经常发生跳槽的情况,因此,猪场出现比较缺人的时期就到处招聘。一批员工走了,又招一批,周而复始,使猪场人员很不稳定,很大程度地影响了生产。

由于猪场大多比较偏僻,出入不方便,加上管理要求的特殊性,猪场只有在硬件(住宿条件、娱乐设施、收入等)、软件(饮食、以人性化管理)等方面下功夫,才能从根本上留住人才,使员工队伍稳定。由于社会的发展,年轻人基本上都是喜欢比较热闹的生活,一般不愿意呆在猪场(工资收入不是最主要的),包括学习畜牧、兽医、饲料营养等专业的学生。因此,猪场招聘时,一般负责技术的可以找1~2个专业技术人员,其余的包括各条生产线饲养员,都可以找35~50岁的人(最好是夫妻),若条件合适的话,将会更加稳定。对新聘用的员工,不能光强调技术,主要观察该员工的责任心和细心程度,做得久了,技术也就有了。

### 2 过分依赖脱霉剂

由于近几年天气变化异常,以及人为收割、加工储存方法不当的影响,饲料原料(如玉米、麸皮)经常出现发霉或变质的现象,特别是采购时不注意或采购回来后储存时间过长时。大多数猪场都是通过饲料加工时添加各类脱霉剂,认为这样就可以消除霉菌毒素,不会对猪只造成影响。其实,脱霉剂的作用大多是吸附霉菌毒素,而不是降解霉菌毒素,饲喂后同样会影响猪只生长。

对饲料的控制,归根结底最终还是保证质量,脱霉剂只是辅助手段。首先是采购,坚持“一分价钱一分货”的原则,不要贪便宜,低价钱不可能买到高质量的产品,更不能太大意,监管不到位,花高价钱买了质量差的产品;其次是根据生产存栏情况进货,存货期一般不要超过15d,成品料在猪舍内不超过7d,最好3d内喂完,特别是多雨潮湿的时候,更应该注意;另外,粉碎玉米时最好在粉碎前加一个吸尘器,将玉米里的杂质、尘埃进行吸附。如果发现饲料发霉变质,舍不得丢掉,坚持喂猪,将会影响生产,可能造成不堪设想的后果。

### 3 忽视大门口消毒和管理

近两年来,不正常气候的变化诱导猪场疾病的发生没有了可循的规律性。特别是某些传染病,一年四季都可能发病,并且不像以前那样,比较温和,死亡率低,现在一发生就不可收拾,并且死亡率高。这些疾病的爆发,除了和饲料营养、防疫、引种等有关外,很大程度上还是猪场大门口管理不严而人为将病毒原带了进来。外来车辆、人员(特别是推销各种产品的人员随意进出猪场,小规模猪场表现尤为突出),没有严格消毒而获准入场;夜间特别是后半夜销售肉猪的,由于饲养员起床

不及时,买猪人员乘机到猪舍内巡一巡;拉过病死猪的车辆简单消毒即进场等。借助这些传播媒介,病原乘虚而入,猪只自然而然就发起病来,并且还难以找到原因。

其实,除了引种,猪场最关键的管理重点就在大门口,这是绝大部分病原的入口。猪场大门口要设置完善的消毒装置,最好是自动喷雾消毒,可上下左右对车辆进行消毒;条件较差需进行人工消毒的话,门口消毒池要够长,至少一个大车轮能完全转一圈,消毒水深不要少于10 cm,以保证整个车轮能得到消毒。门卫最好是上了年纪的,比较稳重,责任心比较强的人员,这样消毒工作能得到落实。外来人员特别是销售人员,最好在大门口洽谈业务,如果进场,消毒后到办公区就可以了,生产区绝对不许进入,因为他们工作性质的需要,肯定经常到不同的猪场,很容易交叉传播猪病;外来不是拉猪的车辆(包括饲料车),在大门口也要消毒才能进场;外来拉猪的车,特别是猪病高发期,在进行整车消毒的同时,一定要等销售人员到场才让买猪人员进去,并且不能到处走动,卖完猪后,出猪台及附近要严格消毒,与车辆、买猪人员有接触的饲养员,工作服要换洗,不能敷衍了事。

#### 4 日常操作规程变化无常

这是一个老生常谈的话题,也是猪场特别是中小规模猪场容易犯的错误,以前主要是强调防疫,未设置相对固定的程序。现在,母猪分娩时打吊针、饲料中添加酸化剂、驱虫等操作,一部分猪场未能长期坚持,特别是母猪分娩时打吊针。母猪分娩时无力而需要营养、需要维生素的道理大家都懂,但有的不坚持,从而使得母猪产程过长,有的场母猪产程普遍超过4 h,多数5~6 h,因而导致难产多、死胎多。

免疫程序、母猪分娩打吊针、饲料中添加酸化剂等,都是根据猪只需要而制定的正常的操作规程,如果要使猪场正常生产,千万不要经常变化。

#### 5 咨询时隐瞒问题细节

很多猪场遇到问题,经常会咨询专家,以求最好的解决方法,但一部分猪场反映问题时不全面,甚至隐瞒一些细节,如输精后母猪子宫炎比较多,反映的情况是卫生消毒工作到位、操作方法正确、产房生产正常,找不出原因时归结为隐形子宫炎。但到现场看时,才发现母猪产程过长、人工助产的多,并且,工人之间为了减少自己的责任,在母猪

产4~5 h后胎衣没下来前,为了确认产道内还有没有仔猪,就用输精管往母猪阴道内插,遇到阻力,说明还有仔猪没出来,没有阻力的话说明正常,如此操作,极易发生子宫炎。有的是技术人员反映问题,特别是防疫方面,疫苗注射的次数、时间、剂量,为了减轻自己的责任,经常不说实话,猪只发病时专家也找不出具体的原因,只能要求他们根据检验结果补注疫苗。

无论是场主还是技术人员,既然找专家教授,肯定是想解决问题,这样的话,反映情况时要实事求是,既不要夸大其词,也不要隐瞒事实,解决问题才会有效。

#### 6 冲洗猪栏不顾时机

尽管水泡粪、发酵床养猪技术已经推广一段时间了,但大部分的猪场特别是南方的猪场,大多数还是采用水冲粪的方式养猪,特别是肉猪。猪场老板检查工人工作的好坏,一般是看猪舍干不干净、饲料有没有浪费、猪只正常不正常。猪舍不干净,粪尿多、猪身脏,就认为工人偷懒,劈头盖脸地骂一顿,或采取经济处罚的方法教训工人。工人为了少挨骂,凡是知道老板要来,不论多早多冷、什么天气,肯定会把猪栏猪身冲洗得干干净净,以迎接老板的检查。殊不知,猪舍湿度大,猪身会出现红点;冷天一早冲猪身,猪只容易患找不到原因的感冒、咳嗽,因此,冲洗猪栏的时机把握不好,效果往往适得其反。

天气炎热时,猪栏可以常冲洗,一起到清洁卫生的作用,二也可以在一定程度上达到降温的效果。秋冬季节,早晚温差大,一早一晚最好不要冲洗。上午10时后、下午4时前冲洗比较合适,这段时间气温较高,冲洗后地面、猪身也容易干,对猪只各方面的影响不大。如果不是特别脏、没有喂料或猪只躺卧的地方,能两天冲一次就不要一天冲一次。作为管理者,不能看到工人有空闲就认为是偷懒,主要应看猪只健康状况、生长速度和饲料报酬,他能把猪养好就行了。

#### 7 稀释精液随意性强

比如:一个存栏20多头母猪的个体猪场,该场未饲养公猪,主要靠从别的猪场购买公猪精液配种,但母猪返情的多,产仔数少。经了解,问题主要出在精液稀释方面:饲养公猪的老板将采出来的精液,直接加入没有预热、未量温度的5%葡萄

(下转第16页)



# 浅谈目前小型猪场存在问题及对策

林益明

(广东省遂溪县职业技术学校, 广东 湛江 524300)

中图分类号: S815.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)04-0012-02

笔者从2010年3月起,对广西贵港、玉林、博白,广东粤西,海南等地12个中、小规模猪场进行了调查,主要针对有可能影响生猪生长性能和经济效益的猪场防疫措施和饲养管理技术。发现大部分中型规模猪场(300~350左右头母猪)的饲养管理、饲料加工、卫生防疫、生猪销售、人员管理等各项工作,均有一套比较严密的管理制度,猪群长势良好,生产性能稳定。而一些小规模(200头母猪以下)猪场,在养猪生产过程中却存在着猪场防疫措施不严、饲养管理技术落后、技术力量不足、缺少严格的生产管理责任而造成猪群疫病多,严重影响生猪生长性能和经济效益的问题,实在令人担忧。

## 1 主要存在问题

### 1.1 猪场防疫措施不严

**1.1.1 消毒** 猪场入口处虽然建有车辆消毒池,生产区入口处设有紫外线灯消毒更衣室,但大部分消毒池内的消毒药水浓度偏低(雨后不加药)、水量不足(天晴不加水),有的长期不更换甚至有部分干涸。更衣室内紫外线灯安装不合理或使用不当。生产区栏舍运动场、工具及走道长期使用单一消毒药,而且消毒制度不健全,发挥不了消毒作用。

**1.1.2 隔离** 大部分个体经营的养猪场,既没有围墙也没将生产区与生活区分开。猪场普遍养猫、养狗、养三鸟或其它动物,场内住饲养人员。猪场虽设门卫,但制度不健全、管理不严,非生产人员可随意进生产区,更有甚者让生猪屠宰人员购猪时进入猪舍。新购进的种猪(猪苗)未进行隔离观察,直接进入猪栏合群饲养。

**1.1.3 检疫** 猪场未能做到定期或有目的地对本场猪群进行血清学检查,甚至许多猪场建场多年从未检查过。有的猪场为了得到较好质量的种猪,往往从多个猪场引进公、母猪,而且几乎不作任何检疫。有些场主见猪苗或后备母猪价钱便宜,

贪图方便,大量购进,对供种猪场的发病情况也不作最基本的调查。引入前不做检疫,引入后也不进行隔离和检查。容易把疫病传入猪场。

**1.1.4 疫苗** 未根据本场的具体情况制定免疫程序。如疫苗使用的时间间隔随意、疫苗接种剂量不足、疫苗使用的对象不当(如公猪接种高致病性猪繁殖与呼吸综合征弱毒苗,而仔猪接种高致病性猪繁殖与呼吸综合征灭活苗)等。

**1.1.5 环境** 一些猪场及养猪户饲养条件差,场地狭窄,栏舍间距太小,空隙地未进行绿化,猪舍设施不完善、不规范,舍内通风不良。加上防疫卫生措施不健全或不到位,造成猪场环境恶劣,猪群生长受阻,甚至造成一些疫病持续存在。

### 1.2 饲养管理技术落后

**1.2.1 猪群质量** 大多数猪场饲养的母猪“杂、乱、差”的问题比较突出,种猪质量差。另外,有些猪场受低价仔猪效益的驱使,购进质量较差的仔猪进行育肥,严重制约着猪场的发展。

**1.2.2 饲料选择** 有部分养猪场自配预混料,自购饲料原料自行配制各类配合饲料。由于自购,各种原料的质量、来源、保质期难保证,加上对饲料营养知识缺乏,配合比例失调,部分微量元素、维生素额外增加,导致饲料营养不均衡,母猪生产性能下降,仔猪抗病力差,肉猪生长发育迟缓,无形中增加养猪的生产成本。

**1.2.3 饲养密度** 猪群(特别是仔猪)的密度饲养较高,合理组群(公母分开,强弱、大小分开)工作并未引起足够的重视,给疫病防控增加难度。

**1.2.4 饲养管理** 母猪限喂技术没有做好,限喂次数及喂精料量没有很好控制,母猪出现膘情不一,导致不发情或屡配不孕。调查发现,不少饲养员未能掌握好配种时间和妊娠母猪即将分娩的特征。仔猪断奶后多窝合群饲养,未合理组群。饲



养密过大,猪只发育不均,甚至出现僵猪。仔猪断奶后缺乏及时调教,未养成“三定”习惯,造成猪体粘满猪粪,卫生状况较差。

### 1.3 技术力量不足

相当部分猪场没有畜牧、兽医专业技术人员。防疫治病技术无专人负责,随意性较大。有的猪场虽然有专业技术人员,但数量不足,且流动性大、经常更换,技术措施难于落实。饲养员队伍由于种种原因,养猪工人大部分来自农村,文化水平较低,对现代养猪技术知识掌握甚少,生产实践中对各种数据未记录或记录不全,因而影响新技术、新工艺的推广应用。

### 1.4 缺少严格的生产管理责任制

多数猪场的饲养人员是猪场老板的亲属或临工,实行的是按月计酬,未实行联产计酬或承包经营,报酬与饲养好坏不直接挂钩,饲养员的积极性得不到发挥,影响生产效率。

### 1.5 猪群疫病多

1.5.1 猪群中猪瘟、猪口蹄疫抗体水平偏低,检测出猪繁殖与呼吸综合征病毒、猪圆环病毒、猪伪狂犬病病毒、猪附红细胞体、衣原体、猪弓形体等阳性猪。

1.5.2 猪群中出现猪气喘病、猪传染性萎缩性鼻炎、猪钩端螺旋体病的临床症状。

1.5.3 个别猪场中小猪脐疝现象严重。

1.5.4 母猪肢蹄病(裂蹄、蹄冠炎、跛行)严重。

1.5.5 母猪产道疾病(子宫内膜炎、阴道炎)严重。

1.5.6 母猪无乳综合症普遍存在。

1.5.7 皮肤寄生虫(疥螨)、皮炎普遍存在。

## 2 对策

### 2.1 加强技术培训,提高经营者专业技术知识水平

大力开展技术培训,通过请进来、走出去的办法,举办各种学习班、技术讲座、技术研讨会、岗前培训的形式,对饲养员、技术员、养猪管理人员进行饲养技术、饲料营养、疾病防控、兽医法律法规等全程培训。

### 2.2 加强技术合作,发挥专业公司在养猪生产中的作用

目前各饲料集团(厂)、兽药厂、兽药饲料经营部均设立技术服务中心(部),配备专业技术人员并服务于客户。各猪场可借助他们的技术力量,开展技术合作,进行饲养管理、疫病防治、饲料营养、加工配制等方面的技术咨询和交流,必要时可请他们

进行现场指导,弥补猪场技术力量的不足。

### 2.3 确立生物安全观念

加强猪场的栏舍消毒,减少病原体滋生。加强猪群的疫苗接种工作,提高猪只的抗体水平。加强猪场管理,提高生物安全水平。

### 2.4 规范引种程序,各猪场应根据本场的实际制定引种(外购猪苗)规范

购进种猪和猪苗时对相关疫病进行严格检疫,更不能从多个猪场购进种猪(猪苗),以杜绝把外地疫病引进本场。

### 2.5 适时调整养殖规模,努力实现自繁自养

猪场自繁自养,可实现仔猪培育和肥猪生产的效益互补,回避市场风险,减少外购仔猪带来疫病的弊端。

### 2.6 科学配制饲料

加强预混料原料、饲料原料的质量监控。严格按营养标准加工配制各类猪的饲料,条件较差、技术力量较为薄弱的猪场应选用优质的商品预混料来自行加工配合饲料,确保满足猪群的营养需要。

### 2.7 正确选用疫苗和制定合理的免疫程序

目前猪场需免疫预防的疾病达十多种。因此,各猪场应根据本场的实际情况,制定合理的免疫程序。安排好各种疫苗的免疫间隔时间、免疫方式和免疫剂量等,以取得最佳免疫效果。

### 2.8 加强相关疫病监测

目前,猪场的疫病非常复杂,各种疾病常常混合感染和交叉感染,有的临床症状并不典型,有的疾病的症状非常相似,很难凭经验作出正确的判断,必须借助血清学检测及病原检测等工作,方能作出正确诊断。剔除带病的猪只,从源头上控制疫病的蔓延。

### 2.9 创造猪群优良生长环境

猪场不论大小,兽医工作的重点是防病。在思想上应明确,猪群的安全不是个体而是全场,所采取的一切技术措施必须从群体出发。可通过猪场栏舍、设施的配套改造,场内的种树绿化,改善舍内的通风环境,冬季要保暖,夏季要防暑,给予适宜的光照和做好卫生消毒工作,尽可能减少对猪群的各种应激,为猪群创造安全、舒适的生长环境,提高猪群的抗病力。

## 3 小结

通过对12个中、小规模猪场进行了调查发现,绝大部分猪场在养猪生产和养殖技术方面都取得了长足的发展,但还存在急需解决的问题。

# 猪场支气管败血波氏杆菌鼻腔带菌和肺部感染调查分析

叶润全, 林 涵

(佛山科学技术学院, 广东 佛山 528231)

**摘要:** 对珠三角三个曾发生萎缩性鼻炎, 现已临床控制两年以上的大型猪场的健康母猪、乳猪和保育猪鼻腔取样 81 份, 分离支气管败血波氏杆菌, 结果 21 份阳性; 对珠三角地区 16 个猪场送检病猪, 取有炎症病变的肺 184 份, 分离波氏杆菌, 结果 13 份阳性。

**关键词:** 支气管败血波氏杆菌; 分离; 调查

**中图分类号:** S855.1\*2

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2011)04-0014-03

## Research and analysis of *Brodetella bronchiseptica* in nasal cavity and lungs

Ye Runquan, Lin Han

(Foshan Science and Technology College, Foshan 528231, China)

**Abstract:** 81 samples were collected from nasal cavities of healthy sows, piglets or nursing pigs from three large scale pig farms suffered from Atrophic Rhinitis before and controlled effectively more than two years in Pearl River Delta. *Brodetella bronchiseptica* was isolated from 21 samples. 184 lungs of diseased pigs were collected from 16 pig farms in Pearl River Delta also and 13 *Brodetella bronchiseptica* strains were isolated from them.

**Key words:** *Brodetella bronchiseptica*; Isolation; Investigation

我国猪群曾普遍发生萎缩性鼻炎, 现已基本控制, 但疫场是否还存在波氏杆菌? 什么情况下可能重新流行? 针对这一情况, 对曾经发生萎缩性鼻炎现已控制的猪场, 进行猪群带菌情况的调查, 有一定临床意义, 为疫后猪群的综合防疫提供参考。

同时, 有关研究认为, 支气管败血波氏杆菌是引起猪肺炎的原因之一<sup>[1,2]</sup>。我省猪群肺炎是常见疾病, 该菌在肺炎病因中是否起到一定的作用, 影响危害有多大, 针对这一问题, 对肺炎病猪肺部波氏杆菌感染情况进行调查, 对探讨猪群呼吸道疾病问题, 同样具有参考价值。

本试验通过临床健康猪群鼻腔拭子取黏液, 以及对肺炎病猪肺部取病料, 进行支气管败血波氏杆菌分离鉴定, 并对结果进行综合分析, 了解和分析猪群带菌情况, 关注该菌对猪肺炎的致病影响。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 鼻拭子样品 用于鼻腔带菌调查。采自 A、B、

C 三个规模化猪场母猪、哺乳仔猪(产后 2~4 周)、保育猪(4~8 周龄)的鼻腔分泌物共 81 份, 4℃保存, 采样后 1 天内检测。A、B、C 三个猪场年产商品猪 2 万~4 万头, 曾发生过萎缩性鼻炎, 采取综合措施控制, 已 2~3 年未出现临床病例, 生产情况正常。

1.1.2 病肺组织 用于肺部感染情况调查。采自猪场送检猪只有明显肺炎病变的肺部病料, 共 184 份, 4℃保存, 采样后 1 d 内检测。

#### 1.2 方法

1.2.1 细菌分离 将鼻拭子或待检病肺组织涂抹在改良麦康凯培养基上<sup>[3]</sup>, 37℃培养 24~48 h, 选择乳白色、奶油状、中等大小, 符合波氏杆菌特征的菌落。

1.2.2 细菌鉴定 按常规方法, 对可疑菌落进行培养特性、菌体形态、生化特性鉴定。

### 2 结果

#### 2.1 菌株分离鉴定结果

从 265 份鼻拭子样品和病肺组织中, 共分离

出 34 株可疑菌株,经培养特性、菌体形态、生化特征(糖发酵、尿素酶试验、柠檬酸盐利用试验)鉴定,符合支气管败血波氏杆菌特性。

## 2.2 临床健康猪群鼻腔分泌物细菌分离结果

采自 A、B、C 三个猪场母猪、乳猪、保育猪的鼻腔分泌物 81 份,21 分离结果阳性,见表 1。

## 2.3 肺炎病变猪肺部感染细菌分离结果

从 184 份肺炎病料中分离到 13 株波氏杆菌,见表 2 和表 3。

表 1 A、B、C 三个猪场猪群鼻腔波氏杆菌带菌情况

项目	受检例数	阳性例数	阳性率(%)	
母猪	A 场	8	1	12.5
	B 场	5	1	20.0
	C 场	0	0	0
	小计	13	2	15.4
哺乳猪	A 场	12	4	33.3
	B 场	10	4	40.0
	C 场	26	6	23.1
	小计	48	14	29.2
保育猪	A 场	11	2	18.1
	B 场	9	3	33.3
	C 场	0	0	0
	小计	20	5	25.0
合计	A 场	31	7	22.6
	B 场	24	8	33.3
	C 场	26	6	23.1

## 3 分析与讨论

我国猪群在上世纪 80、90 年代曾广泛流行萎缩性鼻炎,尽管现在已经临床上控制,但是猪群中是否普遍存在这一带菌现象,值得进一步的探讨,仍需加强综合防疫工作,以防疫情反复。

### 3.1 关于疫病流行控制后猪群隐性感染波氏杆菌的情况

A、B、C 三个猪场均发生过萎缩性鼻炎,通过采取母猪免疫、消毒、灭鼠、药物预防、营养和环境控制等综合措施,已 2 年以上未出现临床病例,生产情况正常,表明已有效控制了萎缩性鼻炎的发生和流行。

但表 1 显示,A、B、C 三场波氏杆菌带菌率均超 20%,说明这三个场对该病有效控制的同时,未能彻底清除病原,未能达到净化的目的。波氏杆菌有较强的自营生活能力,在环境中能较长时间存活,另外波氏杆菌主要匿藏在成年猪的鼻腔中,免疫和药物处理的方法很难根除净化,再有鼠类的带

表 2 猪场送检猪肺部波氏杆菌分离情况

猪场	受检例数	阳性例数	阳性率(%)
东莞 1 场	13	3	23.1
东莞 2 场	8	1	12.5
东莞 3 场	9	2	22.2
惠州 1 场	15	0	0
惠州 2 场	17	1	5.9
惠州 3 场	14	0	0
惠州 4 场	15	0	0
三水 1 场	9	1	11.1
增城 1 场	8	0	0
新会 1 场	15	2	13.3
开平 1 场	5	1	20.0
江门 1 场	19	1	5.2
潮阳 1 场	8	1	12.5
海南 1 场	10	0	0
清远 1 场	17	0	0
湛江 1 场	2	0	0
合计	184	13	7.1

表 3 送检猪场检出波氏杆菌阳性率

受检猪场数	阳性猪场数	阴性猪场数	阳性率(%)
16	9	7	56.3

菌宿主作用,猪场的疫源性将维持较长的时间<sup>[1]</sup>。

表 1 显示,哺乳猪的阳性检出率最高,保育猪其次,母猪最低;哺乳仔猪早期感染主要是由母猪带菌造成的,所以,控制母子传播、控制仔猪早期感染发病,是综合预防控制的关键,也是长期的工作。

### 3.2 关于带菌与发病的关系

3 个猪场波氏杆菌带菌率都比较高,但为什么没有出现临床病例呢?而且母猪接种萎缩性鼻炎疫苗这项措施均已停止了一年以上,对乳猪早期的被动免疫保护作用基本消失。

笔者认为,营养水平的提高和环境控制,在带菌猪场控制临床病例的发生中,起到关键的作用。通常而言,萎缩性鼻炎是病原因素为主、营养因素为辅的疾病,波氏杆菌产生的类坏死毒素影响乳猪的钙磷代谢,从而影响骨骼发育和生长速度,表现为临床病例。当营养水平低下的情况下,临床病例显得更为明显,上世纪 80、90 年代的情况正是如此;而当营养水平较高,能完全满足仔猪生长需要的情况下,波氏杆菌产生的类坏死毒素影响乳猪的钙磷代谢、影响骨骼发育和生长速度的致病



作用,可能被对冲,从而临床病例的表现不明显,甚至不显现,这是其一;波氏杆菌的致病力相对较弱,一般在鼻腔粘膜感染引起较轻的鼻炎,当冷、热、潮湿和空气浑浊等不良环境因素的共同作用下,波氏杆菌引起的鼻炎明显加强,致病作用显著,从而出现临床病例,如能有效地控制环境,避免不良因素的协同致病作用,则能有效控制临床病例的发生,这是其二。猪萎缩性鼻炎是条件性传染病,控制发病条件是关键<sup>[4]</sup>,近年猪场在满足营养、调控环境、保障生理健康等方面明显加强,对抑制该病的发生起到积极的作用。

### 3.3 关于波氏杆菌与肺炎的关系

从调查的 16 个猪场中有 9 个阳性场(表 3),病肺组织波氏杆菌分离率为 5.2%~23.1%(表 2),说明比较多的猪场部分肺炎病例中波氏杆菌是其病因之一。

波氏杆菌主要在鼻腔寄居,引起鼻炎,当种种原因引起呼吸道抵抗力低下的时候,波氏杆菌可以下行感染引起肺炎<sup>[1]</sup>,也就是发生继发性肺炎。

呼吸道感染、肺炎是当前养猪业最常见的疾病问题之一。病原性的、环境性的、饲养管理性的诸多因素,使病情更为复杂。波氏杆菌在猪肺炎的成因中起到什么样的作用?值得关注和探讨。

### 参考文献:

- [1] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 第五版. 北京:中国农业出版社, 2006:261.
- [2] 齐铁英. 我国部分地区猪传染性萎缩性鼻炎病原的调查[J]. 中国兽医科技, 1995, 25(4):15-16.
- [3] 余柏荣. 支气管败血波氏杆菌的鉴别培养基[J]. 佛山兽医专科学校学报, 1988, 12(2):14-15.
- [4] 裴洁, 何华, 赵战勤, 等. 支气管败血波氏杆菌的研究进展[J]. 畜牧兽医科技信息, 2006, (2):1-3.

(上接第 11 页)

糖溶液中进行搅拌,此后直到配种,都没有检查精子的活力、活率。因此,采精的随意性、精液稀释的随意性直接影响了生产。

精液的采集、精液稀释、保存等都有严格的要求,一点都不能马虎。从稀释方面来说,无论饲养公猪多少,精液的稀释都要求将稀释液温度先预热到与精液温度相差 1℃内,相差太大对精子都有应激,都会影响精子的活率甚至导致精子死亡,稀释后、配种前,最少要检查两次活力、活率,以保证输精的效果。

## 8 在场内食用外购的猪肉

由于用量少、杀一头猪吃不划算等所谓的原因,小规模猪场的老板、员工在外面买猪肉回场煮食的现象还是比较多,这也是小规模猪场猪病经常发生的一个主要原因。

从防疫角度来说,无论猪场规模大小,都不能买猪肉回场内煮食。可以通过自己饲养鸡、鸭、鱼等来满足工人的肉食需要,如果想吃猪肉,老板又不想损失太大,可以不定期地把自己场内生长速度慢、没有其他疾病的肉猪屠宰自食,但病、死猪不要吃,以免影响大家的身体健康。

## 9 公猪饲养不规范

公猪的饲养方面,除了饲喂公猪料外,公猪长

期没有补充鸡蛋或鸭蛋、鱼肝油等辅助营养物质,公猪的采精量少、精子活力差,经常不够用,对正常生产非常不利。

一般来说,利用人工授精方式进行配种,虽然不像规模化猪场那样按 1:100 的比例配备公猪,中小规模猪场饲养公猪数量可以按每 60~100 头母猪 1 头公猪来搭配。关键在于公猪要养好、管理好,及时淘汰效率低的公猪,才能提供质量高、数量多的精液,也才能真正通过猪人工授精技术使猪场达到节约成本、提高效益的目的。

## 10 母猪年老不淘汰

中小规模猪场,为了节约引进后备种猪的费用,生产母猪 8 胎以上还继续使用的现象非常多,有的猪场老板或工人甚至炫耀:我们的猪养得好,10 胎的还能胎产 10 头以上的仔猪。殊不知,仔猪是产下来了,外表也看不出有什么毛病,但就是难养,肥育阶段生长速度慢、饲料报酬低、正常体重出栏时间长。如果卖猪苗给其他人,除非市场行情特别好、猪苗紧缺,否则,长期合作的机会将越来越少。

规模化猪场母猪一般使用不超过 8 胎,有的甚至 6 胎以后的母猪就一刀切地淘汰。及时更新公母猪,可以使整个生产保持比较高的水平。因此,无论规模大小,母猪 8 胎左右都要考虑淘汰。



## 溶葡萄球菌酶对奶牛子宫内膜炎的临床治疗试验

饶文<sup>1</sup>, 曾东平<sup>2</sup>, 刘宇<sup>2</sup>

(1. 广州市天河区动物防疫监督所, 广东 广州 510520; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 溶葡萄球菌酶是从 *Staphylococcus simulans* 培养物中提取的一种肽链内切酶, 在较低浓度下能迅速裂解葡萄球菌细胞壁而呈现较强的杀菌活性且不易产生耐药性。为探讨溶葡萄球菌酶在防治奶牛子宫内膜炎上的应用, 本试验选择 140 头患子宫内膜炎的奶牛, 通过子宫内灌注给药的方式, 每次分别灌注 400 U、800 U 和 1 600 U 溶葡萄球菌酶, 连续给药 3 次, 并以 10% 土霉素注射液为对照, 进行临床治疗试验。结果显示, 溶葡萄球菌酶高、中、低剂量的治愈率分别为 90.0%、73.3% 和 36.7%, 对照药物治愈率为 70.0%; 在繁殖性能方面, 高、中剂量组的奶牛情期内受孕率和总受孕率等明显高于低剂量组。表明溶葡萄球菌酶是一种治疗奶牛子宫内膜炎效果良好的生物类药物。

**关键词:** 溶葡萄球菌酶; 子宫内膜炎; 奶牛; 治疗效果

中图分类号: S858.23

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)04-0017-03

## Clinical investigations on the therapeutic effect of lysostaphin on the endometritis in dairy cows

Rao Wen<sup>1</sup>, Zeng Dongping<sup>2</sup>, Liu Yu<sup>2</sup>

(1. Guangzhou Tianhe district Veterinary Station of Epidemic Prevention & Supervision, Guangzhou 510520, China; 2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Lysostaphin is a zinc-binding metalloenzyme first extracted from *Staphylococcus simulans* cultures. Lysostaphin acts as bactericidal antimicrobials by lysing staphylococcal cells at relatively low concentrations with good tolerance. 140 dairy cows suffered from endometritis were used for the study of lysostaphin on the therapy of endometritis in dairy cows by uterine infusion with 10% oxytetracycline as control. The recovery rates of experimental groups treated with 400, 800 and 1600U lysostaphin for 3 times were 90%, 73.3% and 36.7% respectively and the recovery rate was 70.0% in control group. Rates of pregnancy in estrus and total pregnancy of dairy cows treated with high and middle dosage were significantly higher than that of the group with 400U. It indicated that lysostaphin was a kind of biological drugs which could be used to treat cow endometritis efficiently.

**Key words:** Lysostaphin; Endometritis; Dairy cows; Therapeutical effect

奶牛子宫内膜炎(endometritis)主要是由于分娩或产后初期子宫内膜感染病原微生物而引起的繁殖障碍性疾病, 发病率较高, 常造成奶牛屡配不孕、长期不孕而致淘汰, 严重影响奶牛生产。其主要致病菌为葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌等<sup>[1,2]</sup>。传统的治疗方法一直依赖于抗菌药物或防腐消毒液子宫内灌注, 但往往由于耐药性产生而导致治疗效果不确实或失败, 且存在药物残留等问题<sup>[3-5]</sup>。溶葡萄球菌酶是从 *Staphylococcus simulans* 培养物中发现的一种肽链内切酶, 通过裂解葡萄球菌细胞壁肽聚糖中的甘氨酸五肽键桥, 从而破坏细胞壁的完

整性并使菌体溶解, 在较低浓度下能迅速地裂解葡萄球菌细胞壁, 抗菌作用快、杀菌活性强、不易诱导耐药菌株。本实验在某大型奶牛场选择临床子宫内膜炎病例, 应用重组溶葡萄球菌酶制剂进行了临床治疗并取得较好的效果。

### 1 材料与方法

#### 1.1 试验药品

溶葡萄球菌酶, 冻干粉剂, 含量为每瓶 400 U, 批号 20060427, 由上海高科联合生物技术研发有限公司提供。使用时用灭菌生理盐水稀释后做子宫内灌注。对照药物为 10% 土霉素注射液, 100 mL/

瓶,批号 20060328,市售,由正规 GMP 兽药厂生产。

## 1.2 试验动物

在广州市郊区某大型奶牛场选择分娩后 1 个月左右的患病奶牛, 出产房后均不作抗生素类药物处理, 观察其恶露排出情况, 按方法 1.3 进行疑似病例诊断后, 选择 140 头患病奶牛, 随机分为 5 组。分组与处理见表 1。

## 1.3 子宫内膜炎病例诊断

**1.3.1 临床观察** 所有疑似奶牛子宫内膜炎病例, 均表现为阴道排出灰白色或黄褐色的稀薄脓液, 并在阴门外粘有结痂; 阴道检查可见阴道黏膜充血, 子宫颈肿胀、松弛张开; 直肠检查时子宫角表现增大, 子宫复原或未复原, 收缩反应微弱, 缺乏弹性; 子宫壁增厚; 较严重病例可见子宫内蓄积炎性分泌物并有轻微波动感。

**1.3.2 病原菌的分离与鉴定** 所有疑似奶牛子宫内膜炎病例按 20% 的比例随机抽样, 共无菌采取 30 头奶牛子宫内分泌物。先进行涂片染色镜检、厌氧增菌培养、有氧增菌培养和细菌鉴定试验等。(G<sup>+</sup> 菌进行触酶试验和血浆凝固酶试验、G<sup>-</sup> 菌进行氧化酶试验)。

**1.3.3 病原菌鉴定结果** 经以上分离培养鉴定后, 随机抽检的 30 头疑似患病牛分泌物中分离的主要致病菌为主: 金黄色葡萄球菌 (23/30)、非溶血性链球菌 (15/30)、溶血性链球菌 (11/30) 和大肠杆菌 (14/30)。其中革兰氏阳性菌检出率较高, 达到 77.78%。表明以上疑似病牛均患有子宫内膜炎。

## 1.4 试验给药

按表 1 分组进行治疗处理, 在给药过程中严格执行清洗与消毒防护措施。所有子宫内投药导管均为一次性使用, 禁止重复或组内交叉使用。

## 1.5 治疗效果的判定

判定指标如下: (1) 治愈 (完全恢复): 阴道黏液呈透明液体、无异味, 其它临床症状消失, 发情周期恢复正常, 经过正常配种后确定为已怀孕; (2) 有效 (明显好转): 奶牛子宫明显软化, 收缩感强, 其它症状减轻; (3) 无效 (无明显好转): 与治疗前比较无明显变化; (4) 产后至初配日的间隔时间 (天); (5) 痊愈后受胎率: 对治疗后判为痊愈的牛进行输精配种, 统计情期内受胎率和总受胎率。

统计学处理: 用统计学卡方 (t 检验) 方法比较不同剂量组与对照组间的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 临床治疗效果

由表 2 可见, 溶葡萄球菌酶高、中剂量的治愈率和有效率分别达到 90.0%、73.3% 和 96.7%、83.3%, 明显高于低剂量 (36.7% 和 53.3%) 并呈极显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 对照药物土霉素注射液灌注的治疗效果 (治愈率和有效率分别为 70.0% 和 80.0%), 与中剂量溶葡萄球菌酶治疗效果相当。

### 2.2 对治愈牛繁殖性能的影响

从表 3 可见, 各试验组奶牛的产后至初次配种间隔天数在溶葡萄球菌酶的高、中剂量和土霉素注

表 1 试验分组及处理

编号	组别	数量	处 理
1	高剂量组	30	按每次 4 瓶用量 (1 600 U/ 次), 用 100 mL 灭菌生理盐水稀释后用灭菌导管进行子宫内灌注。每间隔 1 天使用一次, 连用 3 次。
2	中剂量组	30	按每次 2 瓶用量 (800 U/ 次), 使用方法同上。
3	低剂量组	30	按每次 1 瓶量 (400 U/ 次), 使用方法同上。
4	土霉素注射液组	30	每次子宫内灌注量为 50 mL。先用灭菌生理盐水稀释至 100 mL 后进行灌注。每间隔 1 天使用一次, 连用 3 次。
5	空白对照组	20	不进行治疗, 观察是否恢复或症状减轻。

表 2 重组溶葡萄球菌酶对奶牛子宫内膜炎的临床治疗效果

组号	组别	数量 (头)	治愈率 (%)	有效率 (%)	无效率 (%)
1	高剂量组	30	90.0** (27/30)	96.7** (29/30)	3.3 (1/30)
2	中剂量组	30	73.3** (22/30)	83.3** (25/30)	16.7 (5/30)
3	低剂量组	30	36.7 (11/30)	53.3 (16/30)	46.7 (14/30)
4	土霉素组	30	70.0 (21/30)	80.0 (24/30)	20.0 (6/30)
5	对照组 <sup>1)</sup>	20	10 (2/20)	25.0 (5/20)	75.0 (15/20)

1): 对照组 10 天观察期内, 仅 2 头自愈, 另 3 头出现好转。

表 3 重组溶葡萄球菌酶对子宫内膜炎治愈牛的繁殖影响

编号	组别	试验头数	治愈头数	产后至初配间隔天数	治愈牛情期内受胎率(%)	总受胎率(%)
1	高剂量组	30	27	81.4	88.9(24/27)	83.3(25/30)
2	中剂量组	30	22	82.7	77.3(17/22)	73.3(22/30)
3	低剂量组	30	11	87.0	63.6(7/11)	30.0(9/30)
4	土霉素组	30	21	81.6	85.7(18/21)	76.7(23/30)
5	对照组	20	2	105.7	50.0(1/2)	10.0(2/20)

射液灌注组(平均在 81.4~82.7 天之间),均明显低于空白对照组(平均为 105.7 天),而治愈牛的情期内受胎率和总受胎率等指标均明显高于低剂量和空白对照组。

### 3 讨论

在奶牛实际生产中,子宫内膜炎一般是使用抗菌药或防腐消毒药进行灌注治疗<sup>[3-6]</sup>,但长期应用易导致耐药性产生,且多次大剂量抗生素的冲洗会引起牛奶中的抗生素残留超标,导致更大的经济损失。因此,寻求良好的抗菌药物显得非常重要。

溶葡萄球菌酶是一种肽链内切酶,其抗菌作用机制完全不同于抗菌药物,在较低的药物浓度下能迅速地裂解葡萄球菌细胞壁,杀菌强、不易诱导耐药菌株产生,无药物残留等问题。关于溶菌酶类制剂治疗奶牛子宫内膜炎试验已有相关报道<sup>[7-9]</sup>,杨为荣等对 36 例临床病例进行观察,溶菌酶对奶牛子宫内膜炎的总治愈率、治疗后子宫恢复程度均明显好于抗生素组,治愈率在 82.35% 以上,治愈牛产后至初配平均天数也较短。

本次试验结果表明,溶葡萄球菌酶高、中剂量和土霉素组在治愈率、有效率以及产后至初配间隔时间、情期内受胎率和总受胎率等方面均明显高于对照组,其中高剂量(每次 1 600 U)的综合效果最好,中剂量(每次 800 U)与土霉素注射液组相当。

综合以上结果,表明溶葡萄球菌酶是一种可取代抗生素治疗子宫内膜炎的新型生物类药物。在治疗奶牛子宫内膜炎时,可按以下治疗方案:按溶葡萄球菌酶每次 800~1 600 U,用适量灭菌生理盐水稀释后用灭菌导管进行子宫内灌注,每隔 1 天使用一次,连用 3 次为一疗程。

#### 参考文献:

- [1] Rebbun W C, 等著. 赵德明, 等译. 奶牛疾病学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1999: 427-432.
- [2] 杨克礼, 潘玲, 章孝荣. 奶牛子宫内膜炎病原菌分离试验[J]. 中国奶牛, 2006, (8): 39-41.

- [3] 佟恒敏, 郭世宁, 张秀英, 等. 宫炎清防治奶牛子宫内膜炎的效果观察[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2002, (6): 31-32.
- [4] 赵世华, 陈伟, 宋爱军, 等. 鱼腥草子宫灌注液对奶牛子宫内膜炎的临床效果观察[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, 31(9): 197-199.
- [5] 陶金忠, 杨国林, 赵兴绪, 等. 盐酸环丙沙星在奶牛患子宫内膜炎时乳汁中的药动学及残留[J]. 甘肃农业大学学报, 2004, (3): 273-276.
- [6] 张义冉, 汪恩强, 秦建华. 三种栓剂治疗奶牛子宫内膜炎的疗效比较[J]. 黑龙江畜牧兽医(科技版), 2010, (6): 133-134.
- [7] 杨为荣, 傅小平, 吕俊, 等. 溶菌酶治疗奶牛产后子宫内膜炎试验[J]. 乳业科学技术, 2001, (4): 44-45.
- [8] 吴金海, 李德生, 汪志, 等. 复合溶菌酶剂治疗奶牛子宫内膜炎的试验效果[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2004, (12): 43-44.
- [9] 章伟建. 溶菌酶对奶牛子宫内膜炎主要病原的体外药敏试验[J]. 中国饲料, 2010, (15): 18-21.

### 如何鉴别“瘦肉精”猪肉?

“瘦肉精”泛指能够降低脂肪、促进瘦肉生长的一类药物。在我国,“瘦肉精”一般指的是盐酸克伦特罗,现在还泛指盐酸克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇等  $\beta_2$ -兴奋剂。

如果人食用含有“瘦肉精”残留的动物性产品(如内脏等),残留量达到一定程度,就会出现毒副作用,甚至出现急性中毒症状。常见不良反应有肌肉震颤、心慌、战栗、头疼、恶心、呕吐等症状,特别是对高血压、心脏病、甲亢和前列腺肥大等疾病患者有一定危害。长期食用含有瘦肉精的猪肉和内脏会引起人体心血管系统和神经系统的疾病,表现为心肌收缩加强,心率加快;血管壁弹性降低,血压升高,微循环血管膨胀,压迫刺激周围的神经,引起头痛头晕内脏横纹肌和平滑肌兴奋性增强,表现呕吐和腹泻,发生机体内代谢紊乱。

如何鉴别“瘦肉精”猪及其产品?一是可以通过看猪肉皮下脂肪层的厚度判断是否大量使用瘦肉精。一般情况下,“瘦肉精”猪因吃药生长,其皮下脂肪层明显较薄,通常不足 1 厘米;正常猪在皮层和瘦肉之间会有一层脂肪,肥膘约为 1 厘米至 2 厘米。

二是可以通过看猪肉的颜色判断。喂过“瘦肉精”的猪瘦肉外观特别鲜红,纤维比较疏松;切成二三指宽的猪肉比较软,不能立于案板上;瘦肉与脂肪间有黄色液体流出,脂肪特别薄;一般健康的瘦猪肉是淡红色,肉质弹性好,瘦肉与脂肪间没有任何液体流出。(来源:人民日报)



# 一例海狮阴茎脱垂的诊治

谭信元, 黎穗民, 赖文凤, 蓝荣彬  
(深圳野生动物园有限公司, 广东 深圳 518055)

中图分类号: S857.17

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)04-0020-02

## 1 发病情况

2009年11月22日, 我园一只12岁的雄性非澳海狮(呼名: 贝德鲁)因发情, 未能给其寻找合适雌性海狮进行合笼, 性情烦躁, 不愿表演。第二天发现其阴茎出现肿胀, 阴茎不能回缩复位, 经口服抗生素, 给阴茎进行消毒清洗, 涂抹药膏, 并帮助其按摩复位, 经过一个月的护理后治愈。

## 2 临床症状

阴茎勃起肿大, 呈吊坠状, 龟头与阴茎分节明显, 长度约10 cm。龟头边缘肿大, 有泡状凸起, 成盘状, 中间内陷; 阴茎红肿, 直径约4 cm, 有淤血。根部狭小, 使得阴茎不能回缩到腹部(如图1)。



图 1

## 3 护理治疗

### 3.1 加强饲养管理

3.1.1 每天更换水源, 并对水源进行严格消毒, 防止因水质污染导致阴茎感染。控制海狮下水的时间及次数。每次从水下上来, 及时给其阴茎冲洗消毒并上药。

3.1.2 对饲料进行精挑细选, 投喂可口的食物, 利于药物的投喂。

### 3.2 治疗原则

以抗菌消炎、消除水肿、按摩复位为治疗原则。

3.2.1 抗感染治疗 先后应用头孢拉定、恩诺沙

星、利君沙进行口服治疗, 控制感染。

3.2.2 清洗消毒、抗炎消肿 前期应用0.1%的高锰酸钾溶液进行浸泡擦洗后, 阴茎淤血有所减轻, 龟头泡状凸起消失, 根部有所缩小, 但阴茎及龟头未见明显消肿(如图2)。后期应用10%洁尔阴洗液进行浸泡擦洗后, 再用999皮炎平软膏对阴茎肿胀部位进行涂抹, 减轻异常感觉, 消除肿胀。用药后该海狮的阴茎根部开始缩回腹部, 根部和阴茎部分已近完全内陷, 龟头变得红润, 比前期明显缩小(如图3)。



图 2



图 3

3.2.3 按摩复位 每天6~8次对阴茎消毒清洗, 搽好999皮炎平后, 用手指对其进行按摩, 用食指和拇指捻住阴茎不断往里推塞, 直至完全推



塞回体内,未见有往外翻的现象。

### 3.3 护理效果

经过近一个月的治疗,该海狮生殖器的病变逐渐好转,阴茎及龟头逐渐消肿,根部可以缩回腹部,并且于12月31日,见其阴茎可以自由伸缩,未有红肿等异常症状(如图4)。

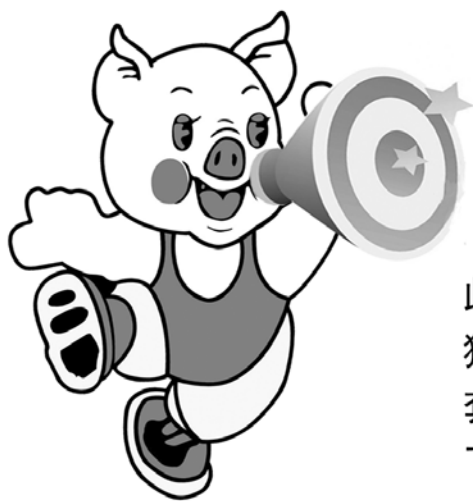


图4

## 4 讨论

4.1 阴茎脱垂在临床上较为少见。多因阴茎受外力损伤,或性兴奋刺激,配种过度等引起。发生本病应及早复位,如脱出时间太长可发生水肿、损伤甚至坏死。海狮的活动及排泄都在生活池中进行,因此水质较差,污染严重。海狮发情阴茎勃起时,阴茎受到感染,使得阴茎炎性肿胀,超过了阴茎口的宽度,使得阴茎不能回缩。因此,在护理期间要保持水质的清洁,经常对周边环境进行消毒。海狮每次下水上岸后都要对其生殖器进行消毒或搽药膏。同时控制海狮的下水次数,以保持药效。

4.2 口服抗生素,防止海狮生殖器发生感染,同时阶段性更换用药,防止耐药性的产生。后期使用999皮炎平,因其具有抗炎、抗过敏、促进局部循环、止痛及止痒等作用,能显著的减弱或消除炎症部位的红、肿、热、痛等症状。



为中国养猪开拓健康之路

## 猪病简单了

长久以来,猪病成为制约养猪业发展的难题,为此,我公司针对目前猪场存在常规药物不能解决的猪混合感染、高热和其他疑难杂症问题,研制了一套治疗方案(口服+注射),已经在大中型猪场进行了多年实验,取得了令人满意的效果。猪发病早期注射3针,预防用口服药即可。

面向全国招聘销售副总、业务经理

诚征乡镇,县级代理

山东启发药业有限公司

联系人: 杜经理 13854921522 电话: 0539-2191319

短信发送(资料): 13426253859 客服QQ: 1399960906

●广告●

## 多重荧光 PCR 检测水产品致病菌方法的建立与应用研究

许如苏<sup>1</sup>, 林志雄<sup>2</sup>, 林彩华<sup>1</sup>, 陈冠武<sup>1</sup>, 蔡颖<sup>1</sup>, 陈其生<sup>1</sup>, 杨奇志<sup>3</sup>

(1. 汕头出入境检验检疫局, 广东 汕头 5150312; 2. 广东出入境检验检疫局, 广东 广州 510623; 3. 罗氏诊断产品有限公司广州办事处, 广东 广州 510095)

**摘要:** 根据沙门氏菌 *invA* 基因、副溶血性弧菌 *toxR* 基因和大肠杆菌 *O*<sub>157</sub>: H<sub>7</sub> RFBE 基因的保守序列, 设计引物和探针, 通过优化反应体系, 测定其灵敏度和特异性, 建立了可同时检测上述三种致病菌的多重实时荧光 PCR 方法。该方法对纯菌的检测灵敏度均低于 10 cfu/PCR 反应体系。人工染菌样品经 6 h 增菌, 检测的灵敏度可低于 10 cfu/25 g; 对 48 株标准 / 参考菌株的检测结果, 只有目的菌株呈阳性反应; 而定量检测批内和批间的变异系数均小于 2%。应用本法检测人工染菌样品和进出口水产品样品, 结果与 SN 标准方法检测结果一致。本法可在 8 h 内完成对水产品中上述三种致病菌的定性或定量检测, 可适用于进出口水产品的快速检验。

**关键词:** 沙门氏菌; 副溶血性弧菌; 大肠杆菌 *O*<sub>157</sub>: H<sub>7</sub>; 多重实时荧光 PCR

中图分类号: S852.69

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)04-0022-06

## Development and application of multiplex real-time PCR for detection of pathogenic bacteria in aquatic products

Xu Rusu<sup>1</sup>, Lin Zhixiong<sup>2</sup>, Lin Caihua<sup>1</sup>, Chen Guanwu<sup>1</sup>, Cai Ying<sup>1</sup>, Chen Qisheng<sup>1</sup>, Yang Qizhi<sup>3</sup>

(1. Shantou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shantou 515031, China; 2. Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China; 3. Guangzhou Representative Office, Roche Diagnostics Limited Company, Guangzhou 510095, China)

**Abstract:** A multiplex real-time PCR method was developed for the simultaneous detection of *Salmonella* spp, *Vibrio parahaemolyticus* and *Escherichia Coli O*<sub>157</sub>: H<sub>7</sub> based on the primers and probes designed based on the conserved domains of *invA* gene for *Salmonella* spp, *toxR* gene for *Vibrio parahaemolyticus* and RFBE gene for *Escherichia Coli O*<sub>157</sub>: H<sub>7</sub>. The developed multiplex real-time PCR method could detect less than 10cfu per PCR reaction for all the pathogenic bacteria above in pure cultured broth and less than 10cfu per 25g for 6h-cultured artificially inoculated samples. Only target strains of 48 reference/standard strains were detected positive in the specificity testing. The intra- and inter-assay coefficients of variation were less than 2%. The method was applied to samples artificially contaminated with these pathogenic bacteria and samples collected from aquatic products for entry and exit. The detection results were consistent with those of SN reference methods. It took less than 8h to detect these three pathogenic bacteria qualitatively or quantitatively in samples of aquatic products, and it could be applied to the quick detection of these three pathogenic bacteria in aquatic products for entry and exit.

**Key words:** *Salmonella* spp; *Vibrioparahaemolyticus*; *EscherichiaColiO*<sub>157</sub>: H<sub>7</sub>; MultiplexReal-TimePCR

沙门氏菌、副溶血性弧菌和大肠杆菌 *O*<sub>157</sub>: H<sub>7</sub> 是重要的食源性致病菌, 主要通过污染的动物源性食品感染人类, 导致食物中毒、肠伤寒、尿毒症等, 严重时可导致死亡<sup>[1]</sup>。因此, 这三种致病菌备受关注, 是我国乃至世界多数发达国家对进出境动物源性产品必须检验的致病菌。目前, 国内外检测这三种致病菌方法很多, 虽然有多种快速检测

方法如免疫磁珠富集法<sup>[2]</sup>、酶联免疫吸附法<sup>[3-4]</sup>、自动酶联免疫荧光检测系统 (VIDAS)<sup>[5]</sup>、快速酶促反应显色培养基法<sup>[6]</sup>、DNA 探针技术<sup>[7]</sup>、聚合酶链式反应 (PCR) 技术<sup>[8-10]</sup>等, 但这些方法都不能同时具备快速、灵敏、特异、经济、简便等优点而未得到推广。事实上, 目前检验检疫部门对这几种致病菌的检验仍普遍停留在传统的细菌分离培养上。由于

细菌分离培养程序复杂,所用试剂繁多,检验周期长,不能适应当今货物快速通关验放的需要。因此,有必要研究并应用快速、灵敏、特异、经济、简便的检验方法。

基于 Taqman 探针的实时荧光 PCR (Real-time PCR) 技术是近年发展起来的新技术,它不仅具有快速、灵敏、操作简便等优点,而且由于该法采用引物和探针的“双保险”,因此特异性更强,可避免 PCR 技术带来的假阳性反应。由于实时荧光 PCR 不但可以检测单个病原,而且能实现任意两种甚至多种病原的同时检测,因此更经济也更快速。故实时荧光 PCR 已成为检测领域越来越受重视的一种检测手段。本研究参照相关文献<sup>[11~14]</sup>,选择沙门氏菌的 *invA* 基因、副溶血性弧菌的 *toxR* 和大肠杆菌 *O*<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 的 RFBE 基因的保守序列分别设计引物和探针,建立可同时检测这三种致病菌的多重实时荧光 PCR 方法。该法不但可定性,还可定量,将其应用于进出口水产品等动物源性食品的检验,可望解决传统分离培养方法中存在的费时费力等诸多问题,也可望解决其他快速检测方法中试剂成本高昂的问题,达到快速、经济的目的。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 菌株** 试验用的 48 株标准 / 参考菌株分别来自中国菌种保藏中心、美国 MBL 公司和本实验室。

**1.1.2 主要仪器** LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪, miniVIDAS 全自动免疫分析仪, 高速离心机, 系列微量加样器, 水浴锅, 恒温培养箱, 生物安全柜, 超净工作台等。

**1.1.3 主要试剂** LightCycler 480 Probes Master 2x conc. 购自 Roche 公司。miniVIDAS 免疫分析试剂盒购自千江有限公司, 试验用培养基购自北京陆桥公司, 沙门氏菌、副溶血性弧菌和大肠杆菌 *O*<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 单重荧光 PCR 检测试剂盒由深圳太太基因工程有限公司提供。

### 1.2 方 法

**1.2.1 致病菌常规检测** 沙门氏菌—SN 0170-1992 出口食品沙门氏菌属 (包括亚利桑那菌) 检验方法。副溶血性弧菌—SN 0173-1992 出口食品副溶血性弧菌检验方法。大肠杆菌 *O*<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>—SN/T 0973-2000 进出口肉及肉制品中肠出血性大肠杆

菌 *O*<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 的检验方法。

**1.2.2 miniVIDAS 快速初筛** 致病菌的 miniVIDAS 快速初筛方法按试剂盒提供的方法进行。

**1.2.3 沙门氏菌、副溶血性弧菌和大肠杆菌 *O*<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 单重荧光 PCR 检测** 按深圳太太基因工程有限公司提供的相应试剂盒检测方法进行。

**1.2.4 模板 DNA 的提取** 参照许一平<sup>[15]</sup>方法进行。

**1.2.5 引物和探针的设计与合成标记** 根据 GenBank 公布的沙门氏菌 *invA* 基因序列、副溶血性弧菌 *toxR* 基因序列和大肠杆菌 *O*<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> RFBE 基因序列, 遵循荧光 PCR 引物和探针设计的原则, 应用 Primer Express 和 Primer Primer 5.0 软件进行分析, 设计引物和探针, 再通过 GenBank 中 Blast 检测引物和探针的特异性。引物和探针的合成标记由上海超世生物科技有限公司完成。引物探针信息如下:

沙门氏菌上游引物: TGCGGTACTGTTAATTACCACGC;

下游引物: GGCATCGGCTTCAATCAAGA;

探针: CY5-TGGCATTATCGATCAGTACCAGCCGTC-BHQ3;

副溶血性弧菌上游引物: CATTTCGCGTGGCAAACATC;

下游引物: GCGACCTTCTCTGAAATATTAATTGT;

探针: HEX-CGCACAAGGCTCGACGGCTGA-BHQ1;

大肠杆菌 *O*<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>

上游引物: TGGCATGACGTTATAGGCTACAAT,

下游引物: AGCTTGTTCTAACTGGGCTAATCTCT;

探针: FAM-ATAGGATGACA AATATCTGCGCTGCT-BHQ1

### 1.2.6 单重实时荧光 PCR 方法的建立

**1.2.6.1 反应条件及参数的优化** 根据罗氏公司推荐的条件, 设定预反应条件。选择最大二阶求导法自动求出 CP 值 (循环阈值)。将模板作 10× 系列稀释, 按设定的反应条件和反应参数进行试验。根据试验结果, 选择可检出的模板 10× 浓度为反应模板, 分别以 2.0 μM、1.0 μM 和 0.5 μM 三种引物浓度, 和 1.5 μM、0.5 μM 和 0.25 μM 三种探针浓度进行组合优选, 最后再优化反应参数, 根据试验结果确定最佳反应条件和反应参数。

**1.2.6.2 特异性检测** 以鼠伤寒沙门氏菌、副溶血性弧菌、大肠杆菌 *O*<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 和志贺氏菌等 48 株标准和参考菌株提取的 DNA 为模板, 分别对上述三种菌进行实时荧光 PCR 试验以检测试验的特异性。

**1.2.6.3 灵敏度试验及标准曲线的建立** 将标准



菌株过夜增菌培养,按 1.2.4 提取 DNA 模板,同时用菌落总数计数方法测定菌浓度。将 DNA 模板作  $10\times$  系列稀释,分别进行实时荧光 PCR 试验。至少选取 5 个适当 DNA 浓度或拷贝数,以其对应的初始菌浓度或拷贝数对数值与 CP 值制作标准曲线(由仪器配套软件自动生成)。

**1.2.6.4 重复性试验** 以  $10^3\sim 10^5$  cfu/mL 菌浓度的 DNA 模板进行重复性试验,每个菌浓度进行 3 次试验,每次试验重复 3 次,计算批间和批内 CP 值的变异系数。

**1.2.7 多重荧光 PCR 方法的建立** 在上述建立的单重实时荧光 PCR 方法的基础上,组建多重实时荧光 PCR 方法,并进一步优化多重荧光 PCR 的反应条件和参数,同时测定多重荧光 PCR 的特异性、灵敏度和重复性。从而,建立可同时检测上述三种致病菌的多重荧光 PCR 方法。

**1.2.8 多重荧光 PCR 方法的应用**

**1.2.8.1 对人工染菌样品的检测** 取经 SN 标准检验证实为沙门氏菌、副溶血性弧菌和大肠杆菌  $O_{157}:H_7$  均为阴性的水产品样品 25 g,用 3% Na-ClBPW 制成 1:10 匀浆,分别加入含上述 3 种致病菌  $10^0\sim 10^4$  cfu/mL 的混合菌液,同时设未染菌样品对照。将染菌样品混匀后置  $(36\pm 1)^\circ\text{C}$  培养,分别于 0、6、24 h 取上清提取 DNA,进行多重荧光 PCR 检测,同时用 SN 标准进行比对。沙门氏菌和大肠杆菌  $O_{157}:H_7$  增加 miniVIDAS 快速初筛法比对。

**1.2.8.2 对水产样品的检测** 用多重荧光 PCR 方法同时检测出入境水产品中的沙门氏菌、副溶血性弧菌和大肠杆菌  $O_{157}:H_7$ ,并与 SN 方法进行比较。

## 2 结果

### 2.1 多重实时荧光 PCR 方法的建立

**2.1.1 反应条件和反应参数的确定** 经过反复试验,多重实时荧光 PCR 的最佳反应条件为:反应总体积  $20\mu\text{L}$ ,内含 Probes Master 2x conc  $10\mu\text{L}$ ,上下游引物各  $1.0\mu\text{M}$ ,探针  $0.5\mu\text{M}$ ,模板  $2\mu\text{L}$ 。反应参数为: $95^\circ\text{C}$  5min; $95^\circ\text{C}$  10s, $60^\circ\text{C}$ , 30s(检测荧光信号),45 个循环。

**2.1.2 特异性试验结果** 以 48 标准/参考菌株测试多重实时荧光 PCR 反应的特异性,结果只有相对应的菌株出现阳性反应,其他非对应菌株均为阴性反应。说明本方法具有高度特异性(见表 1)。

表 1 三种致病菌实时荧光 PCR 特异性试验结果

菌名	试验菌株数	沙门氏菌反应阳性数	副溶血性弧菌反应阳性数	大肠杆菌 $O_{157}:H_7$ 反应阳性数
沙门氏菌	12	12	0	0
副溶血性弧菌	8	0	8	0
大肠杆菌 $O_{157}:H_7$	4	0	0	4
其他细菌	24	0	0	0
小结	48	12	8	4

**2.1.3 对纯菌检测的灵敏度和标准曲线制作** 三种致病菌的多重实时荧光 PCR 试验的灵敏度均低于 10 cfu/反应体系。当沙门氏菌菌浓度处于  $10^3\sim 10^7$  cfu/mL,副溶血性弧菌和大肠杆菌  $O_{157}:H_7$  菌浓度处于  $10^2\sim 10^7$  cfu/mL 时,初始菌浓度对数值与 CP 值呈良好的线性关系(见图 1~图 6)。

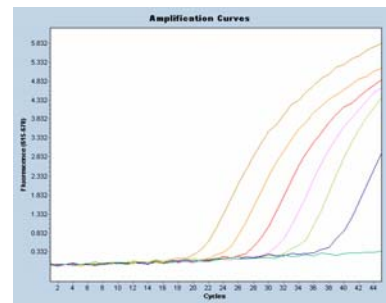


图 1 沙门氏菌灵敏度扩增曲线  
从左到右分别为  $10^7\sim 10^2$ cfu/mL

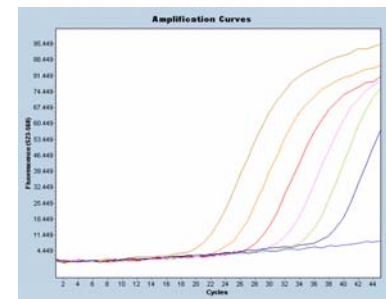


图 2 副溶血性弧菌灵敏度扩增曲线  
从左到右分别为  $10^7\sim 10^2$ cfu/mL

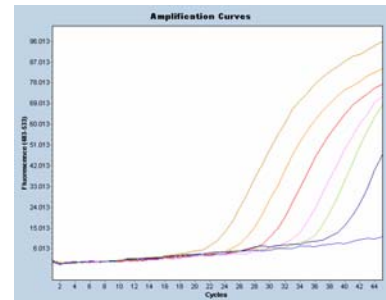


图 3  $O_{157}:H_7$  灵敏度扩增曲线  
从左到右分别为  $10^7\sim 10^2$ cfu/mL



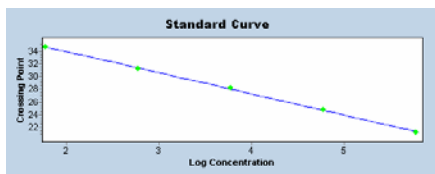


图 4 沙门氏菌标准曲线

误差(error)为 0.0159  
扩增效率(efficiency)为 1.978

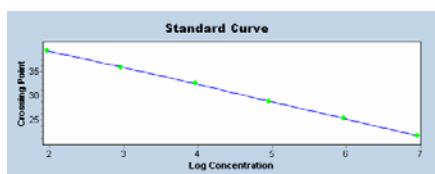


图 5 副溶血性弧菌标准曲线

误差(error)为 0.0104  
扩增效率(efficiency)为 1.915

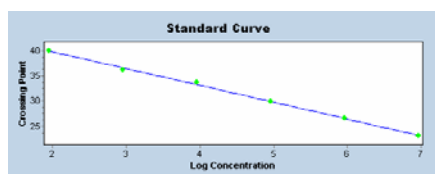


图 6 O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 标准曲线

误差(error)为 0.0319  
扩增效率(efficiency)为 1.980

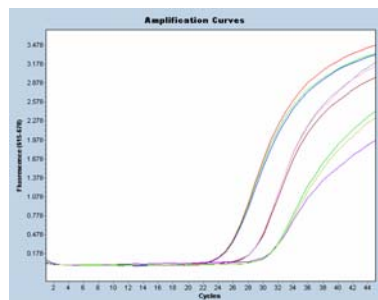


图 7 重复试验扩展曲线

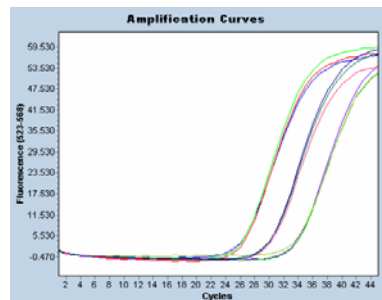


图 8 重复试验扩增曲线

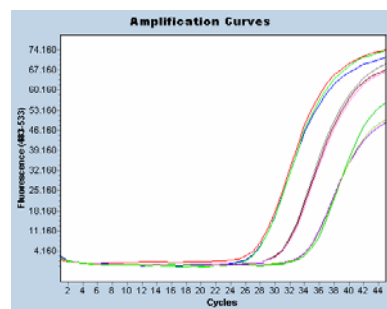


图 9 O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 重复试验扩增曲线

2.1.4 重复性试验结果 从表 2 可看出三种致病菌的多重实时荧光 PCR 方法具有良好的可重复性,其批内和批间 CP 值的变异系数均小于 2%。扩增曲线图见图 7~图 9。

表 2 重复性试验结果

菌浓度 (cfu/mL)	试验方法	批内变异系数	批间变异系数
10 <sup>5</sup>	沙门氏菌实时荧光 PCR	0.06%~0.28%	0.85%
	副溶血性弧菌实时荧光 PCR	0.08%~0.15%	0.35%
	大肠杆菌 O <sub>157</sub> :H <sub>7</sub> 实时荧光 PCR	0.07%~0.50%	0.59%
10 <sup>4</sup>	沙门氏菌实时荧光 PCR	0.06%~0.70%	0.78%
	副溶血性弧菌实时荧光 PCR	0.11%~0.23%	0.49%
	大肠杆菌 O <sub>157</sub> :H <sub>7</sub> 实时荧光 PCR	0.11%~0.29%	0.75%
10 <sup>3</sup>	沙门氏菌实时荧光 PCR	0.75%~1.51%	1.1%
	副溶血性弧菌实时荧光 PCR	0.28%~0.39%	0.98%
	大肠杆菌 O <sub>157</sub> :H <sub>7</sub> 实时荧光 PCR	0.35%~1.37%	1.35%

## 2.2 多重荧光 PCR 方法的应用

2.2.1 对人工染菌样品的检测 当染菌量高于 1 cfu/g 时,多重实时荧光 PCR 的检测方法与 SN 标准检测结果一致,但检测时间由 5~7 d 缩短

为 8 h;沙门氏菌和大肠杆菌 O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 多重荧光 PCR 的检测方法与 VIDAS 也一致,但检测时间由 2 d 缩短为 8 h。然而,当染菌量低于 1 cfu/g 时,多重实时荧光 PCR、SN 标准和 VIDAS 的检测结果出现波动,即有的样品呈阳性,有的样品呈阴性,且三种方法检测结果不完全一致,但多重实时荧光 PCR 方法的阳性率最高,VIDAS 的阳性率最低(见表 3)。

25 g 样品人工污染个位数混合菌, (36 ± 1) °C 培养 6 h 后提取 DNA, 均可检测到 CP 值,并有明显的扩增曲线。说明本方法对染菌样品的检测灵敏度低于 10 cfu/25g,相当敏感。

2.2.2 对进出口水产样品的检测 应用本法对 256 份水产品样品进行沙门氏菌、副溶血性弧菌和大肠杆菌 O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 三种致病菌同步检测, 检出沙门氏菌 1 份,副溶血性弧菌 3 份。其中 100 份样品

表 3 人工染菌样品多重实时荧光 PCR、VIDAS 和 SN 标准检测结果比较

染菌量 (cfu/g)	菌名	染菌样品 0h 培养 检测结果		染菌样品 6h 培养 检测结果		染菌样品 24h 培养 检测结果		染菌样品 SN 检测结果
		荧光 PCR	VIDAS	荧光 PCR	VIDAS	荧光 PCR	VIDAS	
7600	沙门氏菌	+	-	+	-	+	+	+
760		+	-	+	-	+	+	+
76		+	-	+	-	+	+	+
7.6		-	-	+	-	+	+	+
0.76		-	-	* <sup>b</sup>	-	*	*	*
7500	大肠杆菌 O <sub>157</sub> :H <sub>7</sub>	+	-	+	-	+	+	+
750		+	-	+	-	+	+	+
75		+	-	+	-	+	+	+
7.5		-	-	+	-	+	+	+
0.75		-	-	*	-	*	*	*
6700	副溶血性 弧菌	+	ND	+	ND	+	ND	+
670		+	ND	+	ND	+	ND	+
67		+	ND	+	ND	+	ND	+
6.7		-	ND	+	ND	+	ND	+
0.67		-	ND	*	ND	*	ND	*

1): “\*”表示染菌量低于 1cfu/g 时,检测结果有波动,表现为有的样品呈阳性,有的样品呈阴性。

ND 表示未采用 VIDAS 进行检测。

同时采用相应的 SN 标准进行比对,结果一致;另抽取 30 份样品同时采用深圳太太基因公司生产的沙门氏菌、副溶血性弧菌和大肠杆菌 O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> 单重荧光 PCR 试剂盒进行比对,结果也一致。

### 3 讨论

**3.1** 对染菌样品的检验结果表明,与 miniVIDAS 快速初筛方法和 SN 标准方法相比,多重荧光 PCR 方法不但检测所需时间短,而且因采用多重反应,减少了试剂用量和工作量,节省了检测成本;与单重荧光 PCR 相比,多重荧光 PCR 方法更经济,更省力。因此,具有广泛的应用前景。

**3.2** 本研究发现,使用 LightCycler 480 荧光定量 PCR 仪进行多重荧光 PCR 试验,虽然临近波长荧光素如 Fam 和 Hex 标记的探针在多重荧光 PCR 试验中对检测结果可产生一定的相互干扰,但这种干扰对定性检测结果判定影响不大。而采用颜色补偿试验可有效解决定量检测中的这种相互干扰。研究还发现,多重荧光 PCR 的检测灵敏度与单重荧光 PCR 的检测灵敏度无明显差异。

**3.3** 基于 Taqman 探针的实时荧光 PCR (Real Time PCR) 技术因采用引物和探针的“双保险”,一般不存在假阳性反应问题。然而,由于细菌的血清

型和生化型较多,如引物和探针设计时,选用的靶基因和保守片段不是高度保守,即保守片段不能覆盖所有血清型或生化型,则所建立的方法可能出现假阴性反应,从而导致漏检。如选择 TDH 为副溶血性弧菌靶基因时,就可能漏检一部分副溶血性弧菌。因此,建立荧光 PCR 方法的关键在于靶基因的选择。

**3.4** 本法可通过选用 5 个适当菌浓度 (10<sup>3</sup>~10<sup>7</sup> cfu/mL) DNA 制作标准曲线,进行定量检测。标准曲线制作后可储存于电脑中,检测时,只需做一个标准点予以校准即可直接由软件读出被检菌的菌浓度,非常方便。

**3.5** 本研究发现采用标准菌株培养后提取的 DNA 纯度较高,性质稳定,4 ℃ 保存半年以上 DNA 浓度仍变化不大,完全可作为试验的阳性对照乃至作为标准品使用。而应用 PCR 扩增产物生产的阳性质粒,由于片段短,浓度高,很容易在操作过程产生气溶胶而污染环境,继而影响试验结果。而且一旦发生污染,很难清除。

**3.6** 随着人们对食品安全意识的提高,各国对食品安全的要求也越来越高,对进出口动物源性食品的检验更是要求苛刻,往往需同时检测多种致

病菌,费时又费力,无形中增加了产品的成本。因此,寻求省时省力又经济的检验方法成了当务之急。本法的建立实现了同时快速检验多种致病菌的目标,更为今后建立不同组合和更多致病菌的同步检测打下了良好基础。

#### 参考文献:

- [1] 吴永宁. 现代食品安全科学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 336-337.
- [2] 袁辉, 李荣辉, 杨梦. 应用免疫磁珠富集法江西省首次检出肠初学性大肠杆菌 O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub>[J]. 疾病监测, 2004, 19(4): 133-134.
- [3] 黎兆滚, 陈博文, 冯维占, 等. 用 ELISA 法快速检测沙门氏菌[J]. 中国进出境动植物检, 1997, (3): 34.
- [4] 赵志军, 刘秀梅. 大肠杆菌 O<sub>157</sub> 多克隆抗体及食品中双抗 ELISA 测定方法的研究[J]. 卫生研究, 2003, 32(6): 606-609.
- [5] 张艳红, 吴延功, 杜元钊, 等. 沙门氏菌快速检测方法研究进展[J]. 动物医学进展, 2001, (2): 39-41.
- [6] 田刚, 王金良, 刘晓兰. β-半乳糖苷酶用于定量肠杆菌测定的探讨[J]. 江西医学检验, 1999, 17(2): 116.
- [7] Fitts R, Diamond M, Hamilton C. DNA-DNA hybridization assay for detection of Salmonella spp. In foods[J]. Applied environment microbiology, 1983, 46(5): 1146-1151.
- [8] Maurer J J, Schmidt D, Petrosoko P, et al. Development of primers to O-antigen biosynthesis genes for spec-

- ific detection of Escherichia coli O<sub>157</sub> by PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(7): 2954.
- [9] Bej A K, Mahbubani M H, Boyee M J, et al. Detection of Samonella spp in oysters by PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(1): 368-373.
- [10] 封幼玲, 陈太基, 王为云, 等. 应用 PCR 技术快速检测食品中副溶血性弧菌[J]. 中国卫生检验杂志, 1997, (4): 241-242.
- [11] Blackstone G M, Nordstrom J L, Vickery M. Detection of pathogenic Vibrio parahaemolyticus in oyster enrichments by real time PCR[J]. J Microbiol Meth, 2003, 53: 149-155.
- [12] Chen S, Yee A, Griffiths M. The evaluation of a fluorescent polymerase chain reaction assay for the detection of Samonella species in food commodities[J]. International Journal of Food Microbiology, 1997, 35: 239-250.
- [13] Jothikumar N, Griffiths M W. Rapid Detection of Escherichia coli O<sub>157</sub>:H<sub>7</sub> with Multiplex Real-Time PCR Assays[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 3169-3171.
- [14] Kim Y B, Okuda J, Matsumoto C, et al. Identification of vibrio parahaemolyticus strains at the species level by PCR targeted to the toxR gene[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(4): 1173-1177.
- [15] 许一平. 多重 PCR 检测沙门氏菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2006, (6): 39.

## 2011“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 2011 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 2012 年第 1 期公布。

1、**评选范围:** 本刊 2011 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

二〇一一年一月十四日



### 3株珍珠鸡源致病性大肠杆菌的分离鉴定及其16S rRNA测定

古飞霞<sup>1</sup>, 田云<sup>2</sup>, 胡婉怡<sup>1</sup>, 刘容珍<sup>1</sup>

(1. 仲恺农业工程学院生命科学学院, 广东 广州 510225; 2. 广东省动物防疫监督总所, 广东 广州 510230)

**摘要:** 对来源于广东省珍禽养殖场的3株珍珠鸡源大肠杆菌进行了形态特征、培养特性、生化特性、药敏特性和致病性鉴定, 同时对16S rRNA序列进行比较分析。结果发现3株分离菌均对珍珠鸡有较强致病性, 但是3株细菌对乳糖、棉子糖、蔗糖、赖氨酸的利用存在差异, 对庆大霉素、青霉素、红霉素、环丙沙星、四环素、利福平和氟哌酸等药物的敏感性存在较大差别。3个16S rRNA序列之间有11个位点的不同, 经DNASTAR软件分析后发现, 它们均位于不同的分支中。

**关键词:** 珍珠鸡; 大肠杆菌; 鉴定; 16S rRNA

中图分类号: S852.61\*2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)04-0028-04

### Isolation and identification of three *Escherichia coli* strains from guinea fowls and the determination of 16S rRNA

Gu Feixia<sup>1</sup>, Tian Yun<sup>2</sup>, Hu Wanyi<sup>1</sup>, Liu Rongzhen<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China; 2. Guangdong Institute of Animal Health Supervision, Guangzhou 510230, China)

**Abstract:** The morphological character, cultural character, biochemical characteristic, drug sensitivity and pathogenicity of three *Escherichia coli* strains isolated from guinea-fowl farms of Guangdong province were detected and the 16S rRNA of these strains were compared. The results showed that three strains were pathogenic to guinea fowls. The fermentation to lactose, raffinose, sucrose and lysine were different. The sensitivity to gentamicin, penicillin, erythrocin, ciprofloxacin, tetracycline, rifampicin and orfloxacin were different also. Eleven different nucleotide acid sites were found on three 16S rRNAs. Three 16S rRNAs were clustered into three different branches.

**Key words:** Guinea-fowl; *Escherichia coli*; Identification; 16S rRNA

由致病性大肠杆菌引起的珍珠鸡源大肠杆菌病, 是珍珠鸡规模化养殖生产中的常见病和多发病, 是造成珍珠鸡后备期死亡率高和产蛋期淘汰率高的主要原因之一。临床常见的珍珠鸡大肠杆菌病以急性暴发疫情或顽固性散发形式发生, 病变以肠炎、肝周炎、心包炎、气囊炎、腹膜炎为主。分离到的珍珠鸡源大肠杆菌的病原特性差别较大, 个别菌株用常规方法不容易确诊, 因此有必要对2009-2010年在广东省惠州、江门等地珍珠鸡场分离到的3株大肠杆菌病分离株A、B、C进行常规鉴定和16S rRNA系列比较。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

分离自广东省珍禽养殖场临床发病死亡的珍珠鸡肝脏。A菌株从以卵黄破裂为主要症状的190 d珍珠鸡卵泡分离; B菌株从发生败血症的20 d珍珠鸡肝脏分离; C菌株从患顽固性腹泻、淘汰率高的280 d珍珠鸡泄殖腔分离。用麦康凯和XLD琼脂(木糖-赖氨酸-脱氧胆盐琼脂)培养基进行分离, 挑单个菌落进行纯化培养一代后, 经普通肉汤37℃振荡培养24 h, 用平板菌落计数法检测细菌浓度(CFU/mL), 分装小管保存

备检。

### 1.2 培养特性检测

普通营养琼脂、麦康凯琼脂、XLD琼脂、SS培养基、沙门氏菌显色培养基、伊红美蓝培养基,以及常规生化检测试剂管均购于广东环凯微生物科技有限公司。将3株细菌接种上述培养基,比较菌落形态及显色反应。

### 1.3 细菌生化鉴定

使用VITEK的革兰氏阴性菌鉴定卡(GNI),采用VITEK32全自动微生物分析系统检测,对主要差异的项目再用常规生化管检测进行确认。

### 1.4 药物敏感性检测

参照美国临床和实验室标准协会CLSI标准<sup>[1]</sup>,采用圆纸片扩散试验法。将待检菌稀释至 $10^8$  CFU/mL,取100  $\mu$ L在直径9 cm普通琼脂平板上涂布,放入药敏纸片(杭州天和微生物试剂有限公司生产),37  $^{\circ}$ C培养24 h后,测量抑菌圈直径,按药敏纸片说明书判断敏感(S)、中介(I)和不敏感(R)。

### 1.5 动物回归试验

隔离饲养的5 d、15 d、28 d健康珍珠鸡。每次攻毒试验取10只同日龄珍珠鸡,肌肉注射接种定量细菌,同时设接种肉汤空白对照10只。分笼隔离饲养,观察14 d,并用麦康凯琼脂平板对死亡珍珠鸡的肝组织进行细菌回归分离。

**1.6 细菌16S rRNA序列测定** 用DEPC水将麦康凯琼脂平板上的细菌洗脱下来,煮沸裂解10 min后,10 000 rpm离心5 min,取上清用于PCR

扩增。测序引物:

正向:5'-GGTACCTGTGTTACGACTT-3';

反向:5'-TACACCTCATCCAGACAGGGTC-3'<sup>[2]</sup>。

PCR反应条件为:94 $^{\circ}$ C 5min;94 $^{\circ}$ C 30s,54 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 2min,30个循环;72 $^{\circ}$ C 10min。电泳后,切胶回收1.6 k左右的片段,连接pMD18-T载体,通用引物测序。序列经DNA Star软件的MegAlign 5.01与GenBank中的4个大肠杆菌CU928161.2(strain S88),U00096.2(str. K-12 substr. MG1655),AB269763.1(strain AE1-2)和CP000243.1(strain UTI89)的16S rRNA序列进行比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株的形态及培养特性比较

B、C菌株在培养基上生长情况较相似,只有菌落周围培养基颜色呈现不同。A株与B、C菌株差别较大,呈现G-单个小杆菌,两极着色,在麦康凯、XLD、SS培养基上生长与B和C株比较呈现截然不同的颜色。见表1。

### 2.2 生化鉴定结果

3株菌对乳糖、棉子糖、蔗糖、赖氨酸的利用存在差异,见表2。A株不利用乳糖和蔗糖,致使常用的培养基不容易将它鉴别;B株不利用赖氨酸,发酵乳糖、蔗糖;C株不发酵蔗糖,发酵乳糖,利用赖氨酸。

### 2.3 药物敏感性检测结果比较

3株菌对临床常用的药物如庆大霉素、青霉素、红霉素、环丙沙星、四环素、利福平、氟哌酸的药敏性存在较大差别。见表3。

表1 3株致病性珍珠鸡大肠杆菌的形态与培养特性

菌株	革兰氏染色、镜检	普通琼脂	麦康凯	伊红美蓝	XLD	SS	沙门氏菌显色培养基
A	红色短小杆菌,单个,两极着色	凸起、光滑、白色菌落。	圆形凸起、光滑、黄色小菌落。培养基色变淡呈橙色。	凸起、光滑、蓝紫色菌落,有光泽。培养基紫黑色。	凸起,菌落初呈白色后呈透明,培养基红色变深。	圆形凸起、光滑、黄白色菌落。培养基浅黄色。	蓝绿色
B	红色短小杆菌,单个。	凸起、光滑、白色菌落。	圆形凸起、光滑、桃红色菌落,或圆心深红色。培养基变桃红色	凸起、光滑、菌落黑色,菌落及培养基表面有金属光泽。	圆形凸起、光滑、黄色菌落。培养基黄色。	圆形凸起、光滑、桃红色菌。培养基粉红色。	绿色
C	红色短小杆菌,单个或两个排列。	凸起、光滑、白色菌落。	圆形凸起、光滑、桃红色菌落,或圆心深红色,菌落周围呈桃红色云雾状。培养基变深红色。	凸起、光滑、菌落黑色且有金属光泽。培养基色紫黑色。	圆形凸起、光滑、黄色菌落。培养基黄色。	圆形凸起、光滑、桃红色菌。培养基橙红色。	绿色

表2 3株致病性珍珠鸡大肠杆菌的生化反应结果

项目	A	B	C
三氯新	-	-	-
葡萄糖氧化	+	+	+
阳性生长控制	+	+	+
乙酰氨	-	-	-
七叶树苷	-	-	-
植尿尿蓝母	-	-	-
尿素	-	-	-
枸橼酸盐	-	-	-
丙二氨酸	-	-	-
苯丙氨酸	-	-	-
多粘菌素B	-	-	-
乳糖	-	+	+
麦芽糖	+	+	+
甘露醇	+	+	+
木糖	+	+	+
棉子糖	-	+	+
山梨糖	+	+	+
蔗糖	-	+	-
肌醇	-	-	-
侧金盏花醇	-	-	-
香豆酸	+	+	+
硫化氢	-	-	-
β-半乳糖	+	+	+
鼠李糖	+	+	+
阿拉伯糖	+	+	+
葡萄糖发酵	+	+	+
精氨酸	-	-	-
赖氨酸	+	-	+
鸟氨酸	+	+	+
氧化酶	-	-	-

#### 2.4 动物回归试验结果

3例珍珠鸡源大肠杆菌分离株对珍珠鸡均有致病性。攻毒12h后珍珠鸡精神沉郁,羽毛松乱无光泽,食欲下降或废食,水样腹泻,拉白色和绿色稀粪,消瘦,死亡。攻毒后36~48h后病死剖检均见心包积液明显增多、心包膜增厚,肝表面有少量纤维素性渗出物披覆,个别见气囊膜混浊。在攻毒后24h至10d都能从肝脏分离到攻毒的菌株。

A菌株对5d珍珠鸡肌肉注射 $25 \times 10^7$ 个菌/只,能在96h内使6/10珍珠鸡死亡;B菌株对

15d珍珠鸡肌肉注射 $5 \times 10^7$ 个菌/只,96h内使6/10珍珠鸡死亡;C菌株对28d珍珠鸡肌肉注射 $15 \times 10^7$ 个菌/只,96h内使5/10珍珠鸡死亡。结果表明:这3株大肠杆菌均对珍珠鸡有较强的致病性。

#### 2.5 3株珍珠鸡大肠杆菌的16S比较结果

经测序后发现,3株细菌的16S rRNA片段大小均为1503bp。经比对发现3个序列之间有11个位点不同,分别是第291、487、1037、1238、1247、1258、1261、1301、1418、1422和1431位。见表4。

表3 3株珍珠鸡源致病性大肠杆菌药物敏感试验结果

药品	A	B	C
菌必治	S <sup>D</sup>	S	S
庆大霉素	R	I	S
阿米卡星	S	S	S
呋喃妥因	S	I	I
卡那霉素	S	S	S
头孢拉定	S	S	S
妥布霉素	I	I	S
氧哌嗪青霉素	I	S	R
先锋v	S	S	S
头孢呋肟	S	S	S
先锋噻肟	S	S	S
氯霉素	S	S	S
链霉素	I	I	I
氧氟沙星	S	S	I
复达欣	S	S	S
红霉素	R	I	I
青霉素	R	I	R
环丙沙星	S	R	R
四环素	R	R	S
利福平	I	R	R
氟哌酸	I	R	R

1):S:敏感;I:中介;R:不敏感

将3株细菌的16S rRNA与Genbank中4株细菌(Escherichia coli AE1-2,UTI89,MG1655,S88)的16S rRNA用DNASTAR软件分析后,发现7株细菌的相似性在99.3%~99.9%之间。表明经过长期的进化,大肠杆菌的16S rRNA在相对保守的情况下,也存在着一定程度变异,A(1-16srrna)与B(2-16srrna)的相似性为99.5%,A(1-16srrna)



与C(3-16srna)的相似性为99.4%,B(2-16srna)与C(3-16srna)的相似性为99.6%。见图1。

表4 3株珍珠鸡源致病性大肠杆菌16S rRNA差异比较

菌株	位点	碱基	位点	碱基	位点	碱基	位点	碱基
A		C/TGGTC		T/ATTC		C/AAAG		A/GGTG
B	291	C/TGGTC	487	C/ATTC	1037	T/AAAG	1238	T/GGTG
C		T/TGGTC		C/ATTC		C/AAAG		T/GGTG
A		G/TTACC		T/AC		T/AGCT		T/AAGG
B	1247	G/TTACC	1258	A/AC	1261	A/AGCT	1301	G/AAGG
C		A/TTACC		A/AC		A/AGCT		G/AAGG
A		A/AAG		C/AGC		G/CTTC		
B	1418	G/AAG	1422	C/AGC	1434	G/CTTC		
C		A/AAG		A/AGC		T/CTTC		

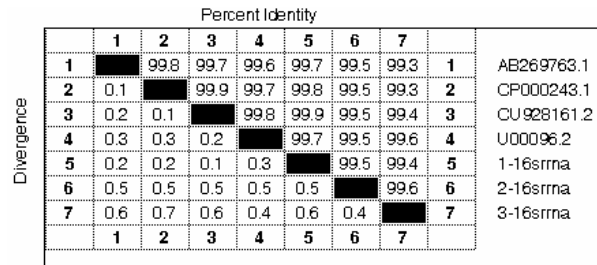


图1 3株细菌的相似性分析

注:图中1-16srna为A株,2-16srna为B株,3-16srna为C株。

对分离菌株的16S rRNA经DNASTAR软件分析后发现,A、B、C均位于不同的分支中,A与AE1-2,UTI89处于同一分支中,关系较近,C的进化关系相对较远(见图2)。

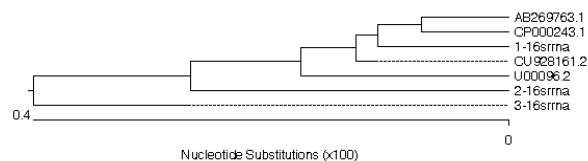


图2 3株细菌的进化关系

注:图中1-16srna为A株,2-16srna为B株,3-16srna为C株。

### 3 讨论

3.1 由于实施了集约化层笼饲养及人工授精技术,对驯化时间较短的珍珠鸡产生很大的应激,产蛋期珍珠鸡群经常爆发急性大肠杆菌病,致使

产蛋率下降和死淘率上升<sup>[3]</sup>。在大肠杆菌病的诊断中,通常是选择麦康凯或SS琼脂平板上呈桃红色的乳糖发酵阳性菌落作为大肠杆菌的候诊病原,而将呈白色或黄白色的菌落当作是沙门氏菌、志贺氏菌或其他菌,因此,临床上容易出现误诊或漏诊。研究表明,不同的致病性大肠杆菌生物学特性存在差异,对乳糖、蔗糖、棉子糖、赖氨酸的利用不同而产生不同的反应效果。生产中,珍珠鸡源大肠杆菌病呈现不同的临床症状和特征,特别是药敏特性的差别,给临床防治带来困难。

3.2 16S rRNA可以作为细菌群落结构分析最常用的系统进化标记分子。在常规的细菌鉴定过程中,由于大肠杆菌的菌株多,生化指标变化较大,在生化鉴定中容易产生误差或分歧<sup>[4]</sup>,必须依靠16S rRNA序列分析才能得到正确的鉴定结果。

3.3 虽然,目前对大肠杆菌的研究已经比较深入,但是对于珍珠鸡源大肠杆菌的研究仍然比较少,仅见于病例报道<sup>[5-6]</sup>,深入研究较少。它们之间是否存在着一定的差别,仍然值得探讨。我们对3株致病性珍珠鸡源大肠杆菌进行了比较分析,发现A菌株的生化指标与B、C菌株有明显的不同,这是否是珍珠鸡源大肠杆菌所特有的特征,是否是适应不同群体的结果,值得今后探讨。

### 参考文献:

- [1] Jeffrey L, Watts Thomas R, Shryock Michael Apley, et al. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals[M]. Approved Standard-Third Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI). 2008: 13-89.
- [2] 吕俊超,李轩,韩茵,等. 养殖大菱鲆中牙鲆肠弧菌的分离鉴定及组织病理学[J]. 水产学报, 2009, 33(2): 311-317.
- [3] 古飞霞,郑坚. 笼养珍珠鸡产蛋期高死淘率的原因分析[J]. 中国家禽, 2009, 15(31): 52-53.
- [4] 师福山,赵德明. 禽大肠杆菌的分离与16S rRNA的鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(2): 111-113.
- [5] 周海洋. 珍珠鸡源大肠杆菌病的诊断与防治[J]. 吉林畜牧兽医, 2006, (6): 47.
- [6] 吴建忠,李伯铿,刘容珍. 珍珠鸡源大肠杆菌敏感性药物筛选研究[J]. 中国畜牧兽医, 2009, 36(10): 151-152.

# 河北省 2010 年猪繁殖与呼吸综合征病毒的遗传变异分析

王金凤<sup>1</sup>, 王占峰<sup>3</sup>, 韩庆安<sup>2</sup>, 孙继国<sup>1\*</sup>

(1. 河北农业大学动物科技学院, 河北 保定 071001; 2. 河北省动物疫病预防控制中心, 河北 保定 071000; 3. 北京海淀中海动物保健科技公司, 北京 100086)

**摘要:** 为了解 2010 年河北省猪繁殖与呼吸综合征病毒变异趋势, 用 RT-PCR 方法对 2010 年河北省发病猪场的病料进行 PRRSV Nsp2 和 ORF5 基因扩增、克隆和测序, 利用 DNASTar 软件对所测序列进行分析。结果显示, 扩增的 Nsp2 基因氨基酸序列相似性为 91.4%~98.8%, 与 GenBank 中参考毒株的氨基酸序列相似性为 61.4%~99.4%; 扩增的 ORF5 基因氨基酸序列相似性为 95%~99.5%, 与 VR-2332 和 MLV 的相似性分别为 84.6%~88.6% 和 84.1%~87.6%; 从 2010 年的病料中扩增的 6 个 PRRSV Nsp2 基因均在第 481 位和 533~561 位共缺失 30 个氨基酸; ORF5 氨基酸序列进化树分析表明, 这 6 个样本株均属于美洲型, 属于同一个基因亚群, 与 SY0608、JXA1、HUN4、WUH1、HB-3(cz) 的遗传关系较近, 而与 VR-2332、CC-1、MLV 株遗传关系较远。结果表明, 危害河北省规模猪场的 PRRSV 发生了较大的变异, 2010 年的毒株仍属高致病性 PRRSV。

**关键词:** 猪繁殖与呼吸综合征病毒; Nsp2 基因; ORF5 基因; 变异分析

中图分类号: S856

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)04-0032-05

## Variation analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains isolated from Hebei province in 2010

Wang Jinfeng<sup>1</sup>, Wang Zhanfeng<sup>3</sup>, Han Qingan<sup>2</sup>, Sun Jiguo<sup>1\*</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. Animal Disease Prevention and Control Center of Hebei, Baoding 071000, China; 3. Beijing Haidian Zhonghai Animal Health Science Technology Company, Beijing 100086, China)

**Abstract:** To investigate the variation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Hebei province, samples collected from six intensive pig farms suffered from PRRSV in 2010 were used for RT-PCR. The ORF5 and Nsp2 genes were subjected to PCR amplification, cloning and sequencing. Sequence analysis showed that the amplified Nsp2 genes of samples shared 91.4%~98.8% amino acid homology and shared 61.4%~99.4% amino acid homology with reference strains by analysis with software DNASTar. The amplified ORF5 genes shared 95%~99.5% amino acid homology to each other and shared 84.6%~88.6% amino acid homology with reference strains VR-2332 and 84.1%~87.6% amino acid homology with reference strain MLV. The results showed the six Nsp2 genes amplified from samples collected from 2010 exhibited 30 amino acid deletion (amino acid 482 and amino acid 533 to 561). Phylogenetic analyses showed the six PRRS viruses belonged to North American genotype and could be clustered into the same subgroup. These viruses were closely related to strains SY0608, JXA1, HUN4, WUH1 and HB-3 (cz), but far from strains VR-2332, CC-1 and MLV. The results suggested that porcine reproductive and respiratory syndrome virus collected from intensive pig farms in Hebei province had experienced great variation and the PRRS viruses isolated in 2010 were still highly pathogenic.

**Key words:** Highly pathogenic PRRSV; Nsp2 gene; ORF5 gene; Variation analysis

猪繁殖与呼吸综合征 (PRRS) 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 引起的以母猪发热、流产, 断奶前后仔猪死亡率升高, 不同年龄猪呼吸障碍等为临床特征的疾病, 它能引起免疫抑制、继发感染及其他疾病的免疫失败等。我国 1996 年首次报道

本病, 关于该病发生、流行以及研究的报告, 日趋增多<sup>[1-5]</sup>。因而掌握 PRRSV 的生物学特性, 尤其是变异较大的 NSP2 和 ORF5 基因, 可以从分子水平反映 PRRSV 基因组的变异趋势, 从而为筛选优势流行毒株, 制备预防河北省 PRRS 的疫苗奠定基础。

收稿日期: 2011-04-21

\*: 通讯作者

PRRSV 基因组为单股正链 RNA, 大小为 15 kb, 含有 9 个开放阅读框 (ORF)。ORF2~7 编码 6 种结构蛋白, ORF1 编码 12 个非结构蛋白 (NSP1~12), 其中对 NSP2 功能研究较多。NSP2 在不同基因型之间变异很大, 美洲型和欧洲型毒株的氨基酸序列相似性仅有 32%, 同一基因型各毒株间差异也较大, 具有种特异性, 可能与细胞或组织的嗜性有关。ORF5 在 PRRSV 结构蛋白编码区中的变异较大, 其编码的糖基化囊膜蛋白 GP5, 又称 E 蛋白, 普遍认为, PRRSV 的 GP5 蛋白包含一段信号肽序列 (翻译后被移走)、一个外区、一个三次跨膜区及一个内区。该蛋白含有 2~4 个糖基化位点; 研究资料显示, 主要囊膜糖蛋白的糖基化位点数同毒株的致病性相关。GP5 蛋白表面有 6 个抗原决定簇, 具有较好的免疫原性, 能诱导机体产生特异性中和抗体, 其中一个血清型特异的线性决定簇能在体外中和病毒感染<sup>[6]</sup>。此外, GP5 蛋白还具有诱导细胞凋亡、参与病毒粒子结合病毒受体的过程等作用。欧、美型毒株 GP5 推导氨基酸的相似性为 52%~55%, 而同型毒株 GP5 推导氨基酸的相似性在 88%~99% 之间。许多学者根据 ORF5 基因的变异情况分析病毒的遗传演化规律。因而, 根据 NSP2 和 ORF5 基因监测 PRRSV 的遗传进化将很有意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 病料

病料 (肺、脾、淋巴结等) 来源于 2010 年 6 个 PRRSV 感染严重的规模猪场。

### 1.2 主要试剂

TRIZOL 总 RNA 提取试剂、Marker 等均购自天根生化科技 (北京) 有限公司; Taq DNA 聚合酶、M-MLV 均购自全式金生物公司; pMD<sup>TM</sup>19-T vector, Top10 菌株均购自大连宝生物公司。

### 1.3 NSP2 和 ORF5 基因的提取、克隆和鉴定

**1.3.1 引物的设计** 根据 JXA1、BJ-4、HB-1、HB-2 以及 CH-1a 毒株的核苷酸序列, 运用 Primer 5 软件设计扩增部分 NSP2 基因和 ORF5 基因全序列, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成 (见表 1)。

**1.3.2 病毒总 RNA 的提取** 将研磨好的病料离心, 取上清液 250  $\mu$ L, 加入 750  $\mu$ L TRIZOL, 剧烈震荡, 室温放置 5 min; 加入 250  $\mu$ L 氯仿, 震荡, 室温放置 10 min; 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min, 取上清 550  $\mu$ L 转入到 1.5 mL Eppendorf 管中, 加入等体积异丙醇颠倒混匀, 室温沉淀 15 min; 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 20 min; 弃上清, 用 75% 的乙醇 1 mL 洗

涤沉淀, 干燥 20~30 min, 用 10  $\mu$ L 溶解液溶解 RNA 沉淀, 溶解后于 -20  $^{\circ}$ C 储存备用。

表 1 NSP2 和 ORF5 基因引物设计

片段	引物	预期长度	实际长度
NSP2	P1 5'-CTTAAAGACCAGATGGAGGAGG-3'	486bp	486bp
	P2 5'-CTGTGAGGACGCAGACAAATC-3'		
ORF5	P1 5'-GGCGAATTCAGTATGTTGGGAAATGCTT-3'	677bp	603bp
	P2 5'-GGCAAGCTTCACTGGCGTATAGGTAATGG-3'		

**1.3.3 NSP2 和 ORF5 基因的扩增** 将提取的 RNA 进行 RT-PCR。反转录体系为: RI 0.5  $\mu$ L, M-MLV1  $\mu$ L, RNA10  $\mu$ L, 5  $\times$  RTbuffer 4  $\mu$ L, dNTP 4  $\mu$ L。反转录条件: 42 $^{\circ}$ C 30min, 85 $^{\circ}$ C 5min。PCR 条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 45s, 49~55 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 31 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 体系为: 蒸馏水 16  $\mu$ L, 10 $\times$ buffer 2.5  $\mu$ L, dNTP 2  $\mu$ L, 引物 (25 pmol/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, TaqDNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L, 模板 3  $\mu$ L。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

**1.3.4 NSP2 和 ORF5 基因的克隆及序列分析** 将回收的 NSP2 和 ORF5 基因的 PCR 产物与 pMDTM19-T 载体连接, 将重组载体命名为 pMD-NSP2、pMD-E, 然后转化 Top10 感受态细胞, 提取质粒进行 PCR 鉴定。阳性菌液送上海生物工程技术有限公司测序。利用 DNASTar 分析软件对测序结果与国内外流行毒株序列进行比较。

## 2 结果

### 2.1 NSP2 和 ORF5 基因的扩增及克隆

扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 片段大小与预期结果相符。分别将各段回收产物克隆到 pMDTM19-T 中, 将含重组质粒的阳性菌液分别测序。结果表明, 扩增得到的片段为 PRRSV NSP2 基因和 ORF5 基因 (见图 1)。

### 2.2 PRRSV NSP2 基因的序列分析

经序列测定, 扩增的 2010 年 6 份 PRRSV 样本的 NSP2 部分基因序列长度为 486 bp, 均在第 481 位和 533~561 位缺失 30 个氨基酸 (图 2), 与高致病性 PRRSV 的缺失相同。基因序列分析表明, 扩增的 NSP2 基因核苷酸相似性为 96.1%~99.2%, 与参考毒株的核苷酸序列相似性为 72%~99.2%; 氨基酸序列相似性为 91.4%~98.8%, 与参考毒株的氨基酸序列相似性为 61.7%~99.4% (见表 2)。



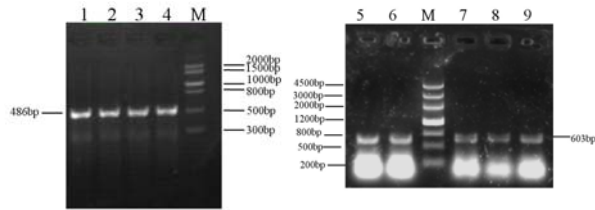


图 1 RT-PCR 扩增 PRRSV 样品 NSP2、ORF5 基因结果  
M. Marker V、III; 1~4. NSP2 基因片段 5~9. ORF5 基因片段

### 2.3 PRRSV ORF5 基因的序列分析

本试验扩增的 HB0101、HB0102、HB0201、HB0301、HB0401、HB0501 的 ORF5 基因核苷酸序列全长均为 603 bp, 编码 200 个氨基酸。序列分析表明, 6 个 ORF5 基因氨基酸序列相似性为 93.5%~99.5%, 与参考毒株 HB-1、HB-2 和 HB-3 相似性分别为 91.5%~93% 87.6%~90.0%和 92.5%~96%, 与参考毒株 JXA1、HUN4、WUH1、SY0608 相似性分别为 95.5%~98%、96%

~98.5%、96%~98.5%、95.5%~99%, 与美洲标准株 VR-2332 和疫苗株 MLV 相似性分别为 84.6%~88.6% 和 84.1%~87.6%(见表 3)。ORF5 基因编码氨基酸的系统进化树分析表明, HB0101、HB0102、HB0301、HB0401、HB0501 均与 JXA1、HUN4、WUH1、SY0608、HB-1、HB-3 遗传关系较近, 而与 VR-2332、MLV 株遗传关系均较远(见图 3)。

### 2.4 ORF5 基因糖基化位点、毒力和主要抗原表位的变异分析

本试验得到的 6 个 ORF5 基因均存在 4~5 个潜在的糖基化位点(经 Gene Runner 软件分析), 除 HB0201 为 5 个外, 其余为 4 个, 分别是第 30、34、35、44 和 51 位氨基酸, 2 个在高变区, 2 个在保守区。

有研究结果显示, PRRSV 在猪体内连续传代的过程中, GP5 蛋白可发生多位点氨基酸置换。美洲型毒株第 13 位氨基酸由 R 变为 Q 及第 151 位

表 2 NSP2 基因核苷酸和氨基酸序列与国内外毒株的相似性比较

毒株	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
1	***	98.2	91.4	95.1	96.3	95.7	61.7	82.1	88.9	73.5	90.7	66	65.4	92	92	93.2	91.4	HB0101
2	96.9	***	98.1	95.1	95.7	95.7	64.2	85.8	93.8	74.7	97.5	68.5	67.9	98.8	98.8	99.4	98.1	HB0102
3	96.1	99.2	***	93.2	93.8	93.8	64.2	84.6	93.2	75.3	95.7	68.5	67.9	98.1	96.9	97.5	97.5	HB0201
4	97.5	97.3	96.5	***	98.8	96.3	63	84	90.7	74.1	92.6	67.3	66.7	93.8	93.8	95.1	93.2	HB0301
5	97.7	97.1	96.3	99.4	***	97.5	63	84	91.4	74.1	93.2	67.3	66.7	94.4	94.4	95.7	93.8	HB0401
6	97.7	97.1	96.3	97.7	97.9	***	64.2	78.4	91.4	74.1	93.2	63.6	63.6	94.4	94.4	95.7	93.8	HB0501
7	72.2	73.7	73.3	72.6	72.4	74.9	***	73.4	69.3	68.3	67.3	98.4	99	65.4	64.2	64.2	64.8	CC-1
8	85	86.6	86.2	85	84.8	86	81.1	***	87	85	85.2	75.5	75	86.4	85.2	85.2	85.8	CH-1a
9	88.5	90.5	90.1	88.9	88.7	89.9	77.6	91.8	***	77.8	92.6	68.8	69.3	94.4	93.8	94.4	93.8	HB-1(sh)
10	74.1	75.3	75.7	74.1	73.9	75.9	78.1	91.9	86.9	***	72.8	70	69.4	74.1	73.5	73.5	73.5	HB-2(sh)
11	95.5	98.6	97.7	95.9	95.7	95.7	72.4	85.2	89.5	73.9	***	67.9	67.3	96.3	96.3	96.9	95.7	HB-3(cz)
12	72	73.5	73	72.4	72.2	74.7	99.5	82.1	77.4	77.8	72.4	***	99.5	69.8	68.5	68.5	69.1	VR-2332
13	72	73.5	73	72.4	72.2	74.7	99.7	81.9	77.6	77.6	72.4	99.8	***	69.1	67.9	67.9	68.5	MLV
14	96.5	99.6	99.2	96.9	96.7	96.7	74.1	86.4	90.5	74.9	98.1	73.9	73.9	***	97.5	98.1	98.1	JXA1
15	95.9	99	98.1	96.3	96.1	96.1	73	86	89.9	74.9	97.9	72.8	72.8	98.6	***	98.1	98.1	HUN4
16	96.5	99.6	98.8	96.9	96.7	96.7	73.5	86.2	90.7	74.7	98.6	73.3	73.3	99.2	98.6	***	97.5	SY0608
17	95.3	98.4	97.9	95.7	95.5	95.5	73.3	86	89.9	75.1	96.9	73	73	98.4	97.7	97.9	***	WUH1

注: 右上部分为氨基酸相似性比较结果, 左下部分为核苷酸序列相似性比较结果。

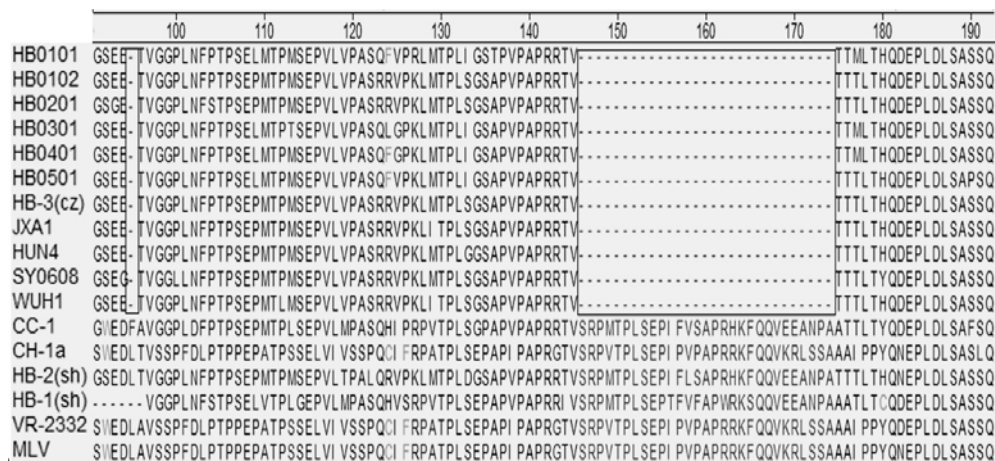


图 2 PRRSV NSP2 基因推导的氨基酸序列的比较

表 3 ORF5 基因核苷酸和氨基酸序列与国内外毒株的相似性比较

毒株号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
1	***	98	95	99.5	99.5	99.5	87.1	92	93	90	96	88.6	87.6	98	98.5	98.5	99	HB0101
2	99.2	***	93.5	98	98	98	85.6	90.5	92	89.6	94.5	87.1	86.1	96.5	97	97	97.5	HB0102
3	97.8	97	***	95	95	95	83.6	89.6	91.5	87.6	92.5	84.6	84.1	95.5	96	96	95.5	HB0201
4	99.7	98.8	97.8	***	99.5	99.5	87.1	92	93	90	96	88.6	87.6	98	98.5	98.5	99	HB0301
5	99.8	99	98	99.8	***	99.5	87.1	92	93	90	96	88.6	87.6	98	98.5	98.5	99	HB0401
6	99.8	99	98	99.8	100	***	87.1	92	93	90	96	88.6	87.6	98	98.5	98.5	99	HB0501
7	88.9	88.1	87.2	88.6	88.7	88.7	***	90.5	87.1	88.6	87.6	97.5	98.5	86.1	86.6	86.6	87.1	CC-1
8	94.9	94	94	94.5	94.7	94.7	91.7	***	93	94.5	93.5	91	90	92.5	93	93	92.5	CH-1a
9	96.4	95.5	95.9	96	96.2	96.2	88.7	95.2	***	92	95.5	88.1	87.6	93.5	94	94	93.5	HB-1(sh)
10	92.7	92.5	91.4	92.4	92.5	92.5	89.2	95.7	92.9	***	92	88.1	88.1	90.5	91	91	90.5	HB-2(sh)
11	97.8	97	96.7	97.5	97.7	97.7	88.9	95.7	97.5	93.5	***	89.1	88.1	95.5	96	96	95.5	HB-3(cz)
12	89.6	88.7	87.9	89.2	89.4	89.4	99	92	89.4	88.9	89.6	***	98.5	87.6	88.1	88.1	88.6	VR2332
13	89.2	88.4	87.6	88.9	89.1	89.1	99.3	91.7	89.1	88.9	89.2	99.7	***	86.6	87.1	87.1	87.6	MLV
14	98.8	98	98.3	98.8	99	99	88.6	95.4	96.8	92.5	98	89.2	88.9	***	99	99	98.5	JXA1
15	99	98.2	98.5	99	99.2	99.2	88.7	95.5	97	92.7	98.2	89.4	89.1	99.8	***	99.5	99	HUN4
16	98	97.2	97.3	98	98.2	98.2	88.4	94.4	95.9	91.7	97	89.1	88.7	98.7	98.8	***	99	WUH1
17	99.2	98.3	98.3	99.2	99.3	99.3	88.6	95	96.5	92.2	97.7	89.2	88.9	99.3	99.5	98.3	***	SY0608

注: 右上部分为氨基酸相似性比较结果, 左下部分为核苷酸序列相似性比较结果。

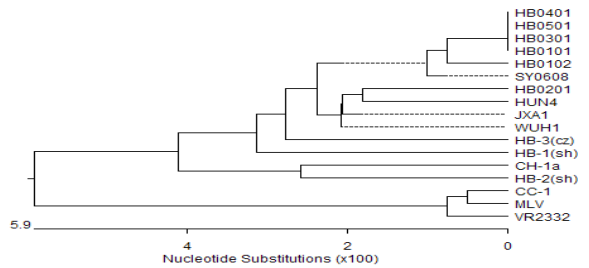


图 3 PRRSV 样本和参考株 ORF5 氨基酸的系统进化树

由 R 变为 G, 可能与疫苗株毒力致弱有关<sup>[8]</sup>。与北美型标准株 VR-2332 相比, 本试验的这 2 个位点中, 第 13 处均未发生变异, 但 HB0201 的第 151 位已突变为赖氨酸(K) (见图 4), 可能导致了该毒株毒力增强。对 ORF5 基因的 RT-PCR 产物用内切酶 Mlu I 进行 RFLP 分析, 可区分疫苗株和其他北美毒株, 这是由于疫苗株第 137 位氨基酸为 A, 而其他野毒株的第 137 位均为 S<sup>[7]</sup>。本试验获得的 ORF5 氨基酸序列中第 137 位氨基酸均为 Ser, 表明所获得的 6 个毒株均为野毒株。

目前已确定的美洲株的表位有 3 个, 2 个为非中和表位 (27~30 和 180~197), 1 个为中和表位 (37~45), 其中 2 个重要的抗原相关区域: 27~41、180~197。本试验 ORF5 氨基酸序列分析表明, 在非中和表位 29 位点处, 除 HB0201 为 Val 外, 其余均为 Ala (与经典株 VR-2332 和疫苗株 MLV 相同); 在 180~197 位点中, 第 185 位点均为 Ala, 与国内分离的高致病性 PRRSV 毒株 SY0608、JXA1、HUN4、WUH1 相同, 而 VR-2332、MLV、CC-1、CH-1a、HB-2(sh) 株均为 Val; 第 189 位点均为 Leu, 而 CC-1、VR-2332、MLV 株则为 Ile。HB0102 第 194 位点突变

为 Gly。在中和表位 (37~45) 中, 第 39 位点均为 Ile, 而 VR-2332、MLV、CC-1 株为 Leu, CH-1a、HB-2 (sh) 株则为 Phe; 其它位点均相同 (见图 4)。

### 3 讨论

自 2006 年我国高致病性 PRRS 的爆发以来, 各学者对 PRRSV 研究逐步深入, 尤其是在对其遗传变异、毒力及致病性等方面做了大量的工作。由于 PRRSV 存在高突变率和潜在的重组问题使 PRRSV 非常易于变异<sup>[8]</sup>。2010 年 PRRSV 样本的 NSP2 基因与国内报道的 PRRSV 基因缺失株比较结果显示, NSP2 基因均在第 481 位和 533~561 位缺失 30 个氨基酸, 因而危害 2010 年河北省规模猪场的 PRRSV 仍属高致病性毒株。

本试验从推导编码 GP5 蛋白的氨基酸序列中发现, 与毒力相关的第 13 位和第 151 位氨基酸处, 与北美型标准株 VR-2332 相比, 在第 13 位均未发生变化, 第 151 位除 HB0201 为 K 外, 其余均为 R (与 SY0608、JXA1、HUN4、WUH1、HB-3 相同), 表明 HB0201 毒力有可能增强; 在区分疫苗株的 137 位氨基酸处, 6 个毒株均由 Ala 变为 Ser, 表明本试验所获得的 2010 年 6 个毒株源自野毒株。在与抗原表位相关的第 29、39、185、189、194 位氨基酸处, 6 个毒株均发生了变化, 说明所获得的 6 个毒株 GP5 蛋白氨基酸序列中的抗原表位已经发生变异。ORF5 氨基酸序列分析和进化树结果表明, 本试验扩增的 2010 年 6 份 PRRSV 样品均为美洲型, 属于第 2 亚群, 与 SY0608、JXA1、HUN4、WUH1、HB-3 株遗传关系最近, 其次为 HB-1、HB-2。

研究表明, PRRSV 的基因序列变异与其诱导的

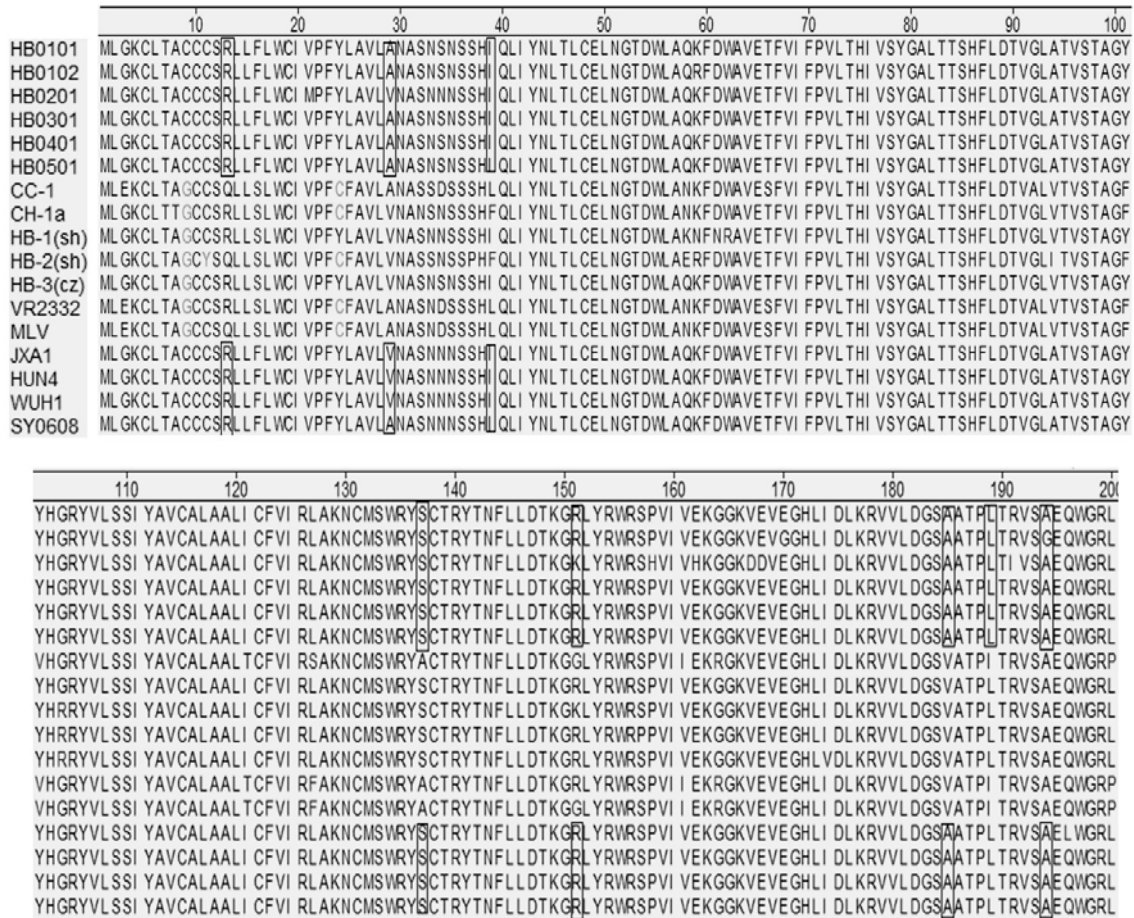


图 4 PRRSV ORF5 基因推导的氨基酸序列的比较

抗体应答有相关性<sup>[9-11]</sup>,因此,这不得不让我们考虑我国现有猪繁殖与呼吸综合征疫苗是否能有效防控现有的或将来发生的 PRRS? 因而需要在流行病学、免疫学、致病机制等方面开展更加深入的研究。

参考文献:

[1] Han J, Wang Y, Faaberg K S. Complete genome analysis of RFL P 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Virus Research*, 2006, 122(122):175-182.

[2] Chen J, Liu T, Thu C G, et al. Genetic variation of Chinese PRRSV strains based on ORF5 sequence [J]. *Biochem Genet*, 2006, 44(9-10):425-435.

[3] 任向阳, 王川庆, 陈陆, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒地方株的分离与鉴定 [J]. *动物医学进展*, 2007, 28(3):16-19.

[4] 黄伟坚, 卢桂娟, 陈 樱, 等. 南方三省猪繁殖与呼吸综合征病毒分子流行病学调查研究 [J]. *中国预防兽医学报*, 2007, 29(2):150-154.

[5] 毛君婷, 史开志, 周碧君, 等. 贵州省猪繁殖与呼吸综合征病毒分子流行病学调查 [J]. *中国兽医学报*, 2010, 30(2):162-165.

[6] 韩银涛, 苏柏光. 猪繁殖与呼吸综合征病毒生物学特性 [J]. *畜牧兽医杂志*, 2008, 27(1):33-36.

[7] Han J, Wang Y, Taaberg K S, et al. Complete genome analysis of RFLP 184 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Virus Res*, 2006, 122(1/2):175-182.

[8] Allende R, Laegreid W W, Kutish G F, et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: description of persistence in individual pigs upon experimental infection [J]. *J Virol*, 2000, 74(22):10834-10837.

[9] Yoshii M, Ka Ku Y, Mura Kami Y, et al. Genetic variation and geographic distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan [J]. *Arch Virol*, 2005, 150(11):2313-2324.

[10] Nielsen H S, Liu G, Nielsen J, et al. Generation of an infectious clone of VR-2332, a highly virulent North American type isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *J Virol*, 2003, 77(6):3702-3711.

[11] Kwon B, Ansari I H, Osorio F A, et al. Infectious clone derived viruses from virulent and vaccine strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus mimic biological properties of their parental viruses in a pregnant sow model [J]. *Vaccine*, 2006, 24(49/50):7071-7080.



## 槲皮素对禽流感病毒感染试验鸡的防治作用

潘德敏<sup>1</sup>, 罗开健<sup>2\*</sup>

(1. 广东省农业干部学校, 广东 广州 510500; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 为验证槲皮素对禽流感人工感染鸡的防治效果, 将中药槲皮素人工灌喂试验鸡, 观察试验鸡的临床症状及死亡情况, 并统计各组鸡的死亡率。第一次试验以盐酸金刚烷胺为药物对照, 测试槲素 I 溶液、槲皮素 II 溶液及槲皮素复方溶液对禽流感人工感染鸡的药效。第二次试验再以第一次实验效果最好的槲皮素不同浓度溶液进行对照实验。结果表明: 灌喂槲皮素后, 感染鸡发病时间明显延迟, 死亡率有所降低, 表明槲皮素对禽流感感染有一定的防治作用。第一次试验以槲皮素复方溶液的效果最好。第二次试验槲皮素复方溶液分 100mg/kg、400mg/kg、1600mg/kg 三个浓度灌喂, 其中以 400mg/kg 浓度最为合适。

**关键词:** 槲皮素; 禽流感; 防治

**中图分类号:** S854

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2011)04-0037-03

## The role of quercetin against AIV infection in chickens

Pan Demin<sup>1</sup>, Luo Kaijian<sup>2\*</sup>

(1. Guang Dong Agricultural Administrative School, Guangzhou 510500, China; 2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** The role of quercetin for chickens against artificial infection of AIV was studied in this study. The clinical symptom of chickens was observed and the death rate was calculated after the chickens were fed with quercetion and infected with AIV. In the first experiment the role of quercetin I, quercetin II and quercetin complex for chickens against AIV infection was determined with amatantadine group as the control. In the second experiment the best quercetin with different concentration was used. The results showed that the AIV onset of infected chickens was delayed and the death rate was lower than that of control group. Quercetin had some effect on preventing AIV infection. In the first experiment, the effect of Querce Tin complex was the best. In the secondary experiment Querce Tin complex solution with different concentrations (100mg/kg, 400mg/kg or 1600mg/kg) was applied and the results showed that the concentration of 400mg/kg was the most suitable concentration.

**Key words:** Quercetin; Avian influenza; Prevention

禽流感(Avian Influenza, AI)又称为真性鸡瘟(Flowl Plague),是由A型流感病毒引起的一种发生于多种家禽和野禽的病毒性传染病<sup>[1]</sup>。据报道,人类流感病毒的变异可能与禽流感病毒(Avian Influenza Virus, AIV)有一定的关系<sup>[3,4]</sup>,并且由于AIV表面抗原(HA和NA)不断变异使得不同亚型的AIV之间的交叉保护作用不完全<sup>[1,2]</sup>,这就影响了疫苗的预防作用。早在上世纪60年代,就有人发现盐酸金刚烷胺(Amatantadine)对流感有一定的预防和保护作用<sup>[5]</sup>,但该药在禽体内残留较严重,且容易引起流感病毒耐药毒株的出现<sup>[6]</sup>,所以目前在家禽中不准许使用。

槲皮素(Quercetin; 3,3',4',5',5,7-Pentahydroxyflavone)是一种具有多种生物活性的黄酮类化合物。约有100多种中草药含有槲皮素。从上世纪初直到最近,国内外学者对槲皮素的提取、纯制、结构测定、理化性质、衍生物合成、药理与临床作用等进行大量的研究工作,发现其有多种药理活性。由于槲皮素毒副作用小,越来越显示出重要的临床应用价值<sup>[7]</sup>。据报道,槲皮素具有祛痰、止咳、平喘、抗炎、抗过敏、解痉、强心、降血压、扩张冠脉、降血脂、抗心律失常、抗血小板聚集、抗氧化、抗肿瘤等药理作用;在免疫调节作用方面,槲皮素能显著促进脾淋巴细胞增值及转化,增强

收稿日期: 2011-05-05

\*: 通讯作者

细胞免疫功能<sup>[8,9]</sup>。在上世纪 70 年代,我国某些地区在鸡慢性气管炎的防治过程中,将槲皮素制成片剂,应用于临床并取得良好的效果。上世纪 90 年代初以来,有关槲皮素的抗肿瘤和抗血小板聚集等作用的研究,取得了可喜进展和满意的结果;同时槲皮素新的衍生物研究也引人注目<sup>[10]</sup>。

本研究以广东中医药大学提供的槲皮素类黄酮用于防治 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 禽流感病毒人工感染试验鸡,以探讨该药物对防治禽流感的效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 毒株:**H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 亚型禽流感病毒(A/Goose/GD/2/96, 对 28 天龄石岐杂黄鸡 LD<sub>50</sub> 为 10<sup>-5.4</sup>×0.2 mL),由华南农业大学兽医学院禽病教研室保存提供,攻毒前先用 10 天龄非免疫鸡胚复壮。

**1.1.2 禽流感 H<sub>9</sub>、H<sub>7</sub>、H<sub>5</sub> 抗原及新城疫 (ND) 抗原,**由华南农业大学兽医学院禽病教研室提供。

**1.1.3 试验药物:**槲皮素 I 溶液、槲皮素 II 溶液及槲皮素复方溶液,均由广东中医药大学提供。槲皮素 I 溶液、槲皮素 II 溶液是不同分子结构的单体纯溶液;槲皮素复方溶液为前两种单体及其它助剂的混合液。槲皮素 I 溶液、槲皮素 II 溶液、槲皮素复方溶液中有效成分比为 4:4:1。金刚烷胺,东北制药总厂生产,由华南农业大学实验兽药厂提供。

**1.1.4 试验鸡:**从广东省农业科学院畜牧研究所种鸡场购进 1 日龄健康岭南黄雏鸡,隔离饲养至试验天龄并用禽流感 HI 及 AGP 试验检验禽流感抗体为阴性后使用。

**1.1.5 9~11 天龄鸡胚,**从佛山市墟岗畜牧发展总公司购进。

### 1.2 方法

**1.2.1 试验前试验鸡禽流感抗体测定** 随机抽取 10 只鸡,心脏采血,静置待血清析出后,采用 HI 试验和 AGP 试验,检测 H<sub>5</sub> 禽流感抗体。

**1.2.2 预攻毒试验** 随机抽取 5 只鸡,肌注 AIV 鸡胚尿囊液,每只鸡攻毒量为 10<sup>-4</sup>×0.2 mL。观察鸡发病情况,以确定攻毒浓度是否合适。

本文涉及的 H<sub>5</sub> 亚型禽流感病毒所有操作及鸡只接种试验均在华南农业大学生物安全三级实验室中进行。

**1.2.3 第一次试验** 将 90 只 60 天龄试验鸡分为 A、B、C、D、E、F 六组,每组为 15 只。A、B、C 组人工灌喂槲皮素,每天 2 次,连用 5 d。A 组按 100

mg/kg 鸡体重灌喂槲皮素 I 溶液,B 组按 100 mg/kg 灌喂槲皮素 II 溶液,C 组按 400 mg/kg 灌喂槲皮素复方溶液。D 组按 50 mg/kg 水在饮水中投放盐酸金刚烷胺,自由饮用,连用 5 d。E 组为攻毒对照组,不给药,攻毒。F 组为空白对照组,不给药不攻毒。

各组鸡隔离饲养,用药组与攻毒组在用药后 24 h 经肌肉注射禽流感 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 病毒 10<sup>-4</sup>×0.2 mL/只,攻毒后 14 d 内观察各组鸡的发病及死亡情况。

如有鸡死亡,按照常规方法<sup>[11,12]</sup>,剖检病死鸡,观察病理变化,并取得病料进行禽流感病毒分离鉴定;统计各组药物对禽流感的防治效果。

**1.2.4 第二次试验** 将 120 只 35 天龄试验鸡分为 A、B、C、D、E、F 六组,每组为 20 只。A、B、C 组在攻毒前 24 h,分别人工灌喂槲皮素复方制剂 100 mg/kg 体重、400 mg/kg 体重和 1 600 mg/kg 体重,每天 2 次,连用 5 d。D 组在攻毒前 24 h 按 50 mg/kg 水在饮水中投放盐酸金刚烷胺,自由饮用,连用 5 d。E 组为攻毒对照组,不给药,攻毒。F 组为空白对照组,不给药不攻毒。

各组鸡隔离饲养,用药组与攻毒组在用药后 24 h 经肌肉注射禽流感 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 病毒 10<sup>-4</sup>×0.2 mL/只,攻毒 14 d 内观察各组鸡的发病及死亡情况。如有鸡只死亡,则进行剖检,收集病料进行病毒分离鉴定;统计各组药物对禽流感的防治效果。

## 2 结果

### 2.1 第一次试验结果

**2.1.1 临床症状观察** E 组(攻毒对照组):于 2 d 开始出现症状:精神沉郁,采食减少,羽毛蓬乱;3 d 后陆续出现典型的禽流感症状:张口呼吸,呼吸困难,肿头流泪,站立不稳,后肢无力,卧地,后期见劈叉、歪头等严重神经症状。死亡集中在攻毒后 3~8 d。A、B、C、D 各组:3 d 开始出现症状,精神沉郁,采食量减少甚至废绝,4 d 出现死亡,神经症状及呼吸困难症状相对 E 组有所减轻。攻毒后 5~11 d 陆续有鸡死亡。F 组(空白对照组)正常。

**2.1.2 剖检及病毒分离结果** 解剖病死鸡,见气管内有大量粘液,粘膜出血;脑膜出血;腺胃乳头出血;胰腺出血,有灰白色坏死点;脾脏、肾脏肿大。病料中分离到禽流感 H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> 病毒,证实鸡只死于禽流感感染。

**2.1.3 死亡统计** A 组试验结束时,共死亡 7 只,存活率为 53.3%。B 组共死亡 8 只,存活率为

46.7%。C组共死亡6只,存活率为60%。D组共死亡5只,存活率为66.7%。E组共死亡9只,存活率为40%。F组空白对照鸡正常(见表1)。

**2.1.4 药物防治结果** 从表1看出,三种槲皮素对禽流感人工感染鸡均有一定的保护作用,A、B、C三组的存活率均优于E组(攻毒对照组),其中以槲皮素复方溶液的效果最佳,因此,将其作为第二次试验的试验药物。

**2.2 第二次试验结果**

**2.2.1 临床症状观察** E组(攻毒对照组):2d开始出现症状,3d出现典型的禽流感症状(症状与2.1.1相同),试验鸡陆续出现死亡,6d出现死亡高峰。C组:2d开始出现症状,6d出现死亡高峰,8d全部死亡。A组、B组、D组:3d开始出现症状,4d出现死亡,神经症状及呼吸困难症状相对E组有所减轻。死亡高峰主要出现在6d。F组:正常。

表1 三种槲皮素及金刚烷胺对H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> AIV的防治作用

组别	试验鸡数(只)	攻毒后每组每天死亡数														存活数(只)	存活率(%)	X <sup>2</sup> 检验(与E组比较)
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d			
A	15	0	0	0	0	2	0	1	2	1	1	0	0	0	0	8	53.3	X <sup>2</sup> =0.13 <sup>1)</sup> 差异不显著
B	15	0	0	0	0	3	1	2	1	0	0	1	0	0	0	7	46.7	X <sup>2</sup> =0 差异不显著
C	15	0	0	0	0	1	2	1	1	0	0	1	0	0	0	9	60.0	X <sup>2</sup> =0.53 差异不显著
D	15	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	10	66.7	X <sup>2</sup> =1.2 差异不显著
E	15	0	0	1	1	2	3	0	2	0	0	0	0	0	0	6	40.0	
F	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	100	X <sup>2</sup> =10.16 差异显著

1):当X<sup>2</sup>≥3.84时,则差异显著。

表2 不同浓度的槲皮素复方制剂及金刚烷胺对H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> AIV的防治作用

组别	试验鸡数(只)	攻毒后每天死亡数记录														存活数(只)	存活率(%)	X <sup>2</sup> 检验(与E组比较)
		1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d	8d	9d	10d	11d	12d	13d	14d			
A	20	0	0	0	0	1	4	6	3	2	0	0	0	0	0	4	20	X <sup>2</sup> =0.15 <sup>1)</sup> 差异不显著
B	20	0	0	0	0	1	4	5	2	1	1	0	0	0	0	6	30	X <sup>2</sup> =1.41 差异不显著
C	20	0	0	0	1	2	7	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	X <sup>2</sup> =0.53 差异不显著
D	20	0	0	0	0	1	3	4	0	0	0	0	0	0	0	12	60	X <sup>2</sup> =8.9 差异不显著
E	20	0	0	0	1	1	9	7	0	0	0	0	0	0	0	2	10	
F	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	100	X <sup>2</sup> =22.19 差异显著

1):当X<sup>2</sup>≥3.84时,则差异显著。

**2.2.2 病毒分离结果** 解剖病死鸡,见气管内有大量粘液,粘膜出血;脑膜出血;腺胃乳头出血;胰腺出血,有灰白色坏死点;脾脏、肾脏肿大。病料中分离到禽流感H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>病毒,证实死于禽流感感染。

**2.2.3 死亡率统计** 至试验结束时,A组共死亡16只,存活率为20%;B组共死亡14只,存活率为30%;C组共死亡20只,存活率为0%;D组共死亡8只,存活率为60%;E组共死亡18只,存活率为10%;F组鸡只表现正常,未见死亡。(见表2)。

**2.2.4 药物防治效果** 从表2看出,金刚烷胺保护作用最好,B组(槲皮素复方制剂400mg/kg体重组)次之,存活率优于E组,但与E组差异不显著。

**3 小结与讨论**

**3.1 试验一**表明,槲皮素及其黄酮对延缓H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>禽流感发病、减轻症状有一定的作用,对禽流感感染

鸡有一定的保护作用。用药组试验鸡的存活率均优于攻毒对照组,其中以槲皮素复合溶液保护效果最好,仅次于金刚烷胺。

**3.2 试验二**以槲皮素复合溶液三个不同浓度进行试验,其中槲皮素复合溶液400mg/kg浓度的效果最好,100mg/kg浓度的效果次之,均对禽流感感染鸡有一定的保护作用,试验鸡存活率都比攻毒对照组要高。

**3.3 灌喂**1600mg/kg浓度槲皮素复合溶液组的死亡率为100%。高浓度组死亡率最高的原因可能为中药浓度过高,灌药时应激过大,或者与药物存在毒性反应有关。

**3.4 根据**两次试验结果,槲皮素对禽流感人工感染发病鸡有一定的防治效果,在两次试验中试验

(下转第46页)

## 不同吸附剂处理霉变饲料的锦鲤饲喂效果研究

罗佳捷<sup>1</sup>, 沈名灿<sup>1,2</sup>, 张彬<sup>1\*</sup>, 王洁<sup>3</sup>, 杨永生<sup>1</sup>

(1. 湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2. 丰瑞饲料有限公司, 江苏 连云港 222345; 3. 长沙市动物防疫监督站, 湖南 长沙 410013)

**摘要:** 为探讨不同吸附剂对霉变饲料的脱毒效果, 将脱霉素、葡配甘露寡糖(EMG)分别与黄曲霉毒素 B<sub>1</sub>(AFB<sub>1</sub>)及呕吐毒素(DON)按不同配比加入锦鲤的基础日粮, 分两组饲喂 360 条锦鲤, 40 天后测定锦鲤血清谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性、总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)水平及肝脏与体重比。结果表明: 各组锦鲤血清中 TP 和 ALB 浓度均无显著( $P > 0.05$ )变化; 脱霉素显著( $P < 0.05$ )抑制了高浓度 DON 条件下锦鲤的肝脏与体重比; AFB<sub>1</sub>显著( $P < 0.05$ )提高了 AST、ALT 活性, 高剂量 DON 显著( $P < 0.05$ )提高了 AST 活性; 两种吸附剂均能在一定程度上抑制 AST、ALT 活性升高, 且 EMG 的效果要优于脱霉素。这表明脱霉素和 EMG 能有效缓解 AFB<sub>1</sub> 和 DON 导致的锦鲤肝功能损伤。

**关键词:** 吸附剂; 霉菌毒素; 锦鲤; 脱毒; 肝功能

中图分类号: S856.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)04-0040-04

## Study on detoxification effects of different adsorbents on mould feedstuff fed to fancy carps

Luo Jiajie<sup>1</sup>, Shen Mingcan<sup>1,2</sup>, Zhang Bin<sup>1</sup>, Wang Jie<sup>3</sup>, Yang Yongsheng<sup>1</sup>

(1. College of Animal Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2. Fengrui Feed Co., Ltd. Lianyungang 222345, China; 3. Changsha Animal Epidemic Prevention and Supervision Station, Changsha 410013, China)

**Abstract:** This study was designed to research the detoxification effects of different adsorbents on mould feedstuff fed to fancy carps. 360 fancy carps were used in these two experiments. Detoxifier or EMG was added in basal diet with AFB<sub>1</sub> and DON with different ratio. The activity of ALT and AST, the levels of TP and ALB, and the ratio of liver weight and body weight were determined at 40th day. The results showed that the levels of TP and ALB were not changed significantly in all groups( $P > 0.05$ ). Detoxifier inhibited the weight gain of liver in condition of DON in high level( $P < 0.05$ ). AFB<sub>1</sub> increased the activity of AST and ALT significantly( $P < 0.05$ ) and DON in high level increased the activity of AST significantly( $P < 0.05$ ). The two adsorbents inhibited the increased activity of AST and ALT to some extent and the effect of EMG was better than that of detoxifier. The results showed that both EMG and detoxifier could attenuate the liver function disorder caused by AFB<sub>1</sub> and DON in fancy carps.

**Key words:** Adsorbent; Mycotoxin; Fancy carp; Detoxification; Liver function

霉菌毒素(Mycotoxins)是由产毒霉菌(mycotoxigenic moulds)在谷物的生长、收获以及储藏阶段或在饲料加工过程中所产生的次生代谢产物<sup>[1]</sup>。霉菌毒素能导致动物发生生物学上具有毒害性的改变,这给动物生产造成了极大的危害<sup>[2-3]</sup>。霉菌毒素危害动物的分子作用机理包括:抑制蛋白质合成<sup>[4-5]</sup>、抑制 DNA 和 RNA 合成<sup>[6-7]</sup>、改变细胞膜结构并诱导细胞程序性死亡<sup>[8-9]</sup>。目前,对饲料行业和养殖业危害较大的霉菌毒素包括黄曲霉毒素(AF)、玉

米赤霉烯酮(F-2 毒素)、赭曲霉毒素(OT)、烟曲霉毒素(FUM)、呕吐毒素(DON)和 T-2 毒素等。

霉菌毒素的巨大危害性促使人们不断地研究削弱其影响的手段,并取得了一定进展,使用吸附剂便是其中比较常用且有效的一种。理想的霉菌毒素吸附剂要稳定性好、需要量低、无毒、能与不同种类的霉菌毒素结合且不会破坏饲料中的维生素、矿物质及其它营养成分<sup>[10]</sup>。目前,研究和使用的吸附剂种类包括:铝硅酸盐类、甘露聚糖类、聚



乙烯吡咯烷酮 (polyvinylpolypyrrolidone, PVPP) 及纳米材料等<sup>[11-15]</sup>。本研究通过将脱霉素、EMG 两种吸附剂与 AFB<sub>1</sub>、DON 按不同配比加入锦鲤的日粮中来观察其血清生化指标和肝脏发育的变化情况, 以检测吸附剂在实际生产中的应用效果, 为其在畜牧生产中的安全应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验动物

试验用锦鲤来自南京小小水族馆。选用 700 尾来源于同一亲本、均重为 24 g 的健康锦鲤鱼苗作为试验材料。将鱼运回后, 用 5 mg/L 的高锰酸钾溶液消毒 10 min, 之后将鱼放在水族箱中暂养 1 周。

### 1.2 试验用水及水质条件

采用自来水, 使用之前先曝气 3 天。整个试验期间水温均保持在 18~25 °C, 溶解氧含量为 (7.35±0.36) mg/L, pH 值为 7.03±0.40, 氨氮含量为 (0.39±0.28) mg/L, 总的水硬度为 (1.51±0.16) mg/L, 钙含量为 (25.80±0.20) mg/L, 亚硝酸盐为 (0.11±0.07) mg/L, 硝酸盐为 (0.11±0.01) mg/L。

### 1.3 试验日粮

自行配制试验日粮。基础日粮为南通正大有限公司水产部提供的粉料, 试验前经检测分析含 AFB<sub>1</sub> 24 μg/kg。将此粉料过 40 目筛后, 用手工充分混匀, 用小型绞肉机制成 Φ2~4 mm 的软颗粒状饲料后晒干或自然晾干。

### 1.4 试验设计及分组

试验 1: 用单因子随机化设计, 从 700 尾锦鲤中随机挑选出体质健壮、规格整齐的鱼苗 150 尾, 随机分成 5 个处理组, 每组 3 个重复, 每个重复 10 尾, 再随机分配至各水族箱 (0.2m×0.35m×0.45m) 中。第 1 组为对照组, 饲喂基础日粮, 2~5 组分别在基础日粮中添加 0.5% 脱霉素、100 μg/kg AFB<sub>1</sub>、100 μg/kg AFB<sub>1</sub>+0.5% 脱霉素和 100 μg/kg AFB<sub>1</sub>+0.5%EGM。试验 1 分组及处理见表 1。

试验 2: 采用单因子随机化设计, 从 700 尾锦鲤中随机挑选出体质健壮、规格整齐的鱼苗 210 尾, 随机分成 7 个处理组, 每组 3 个重复, 每个重复 10 尾, 之后随机分配至各水族箱 (0.2m×0.35m×0.45m) 中。A 组为对照组, 饲喂基础日粮, B-G 组分别在基础日粮中添加 0.5% 脱霉素、1mg/kg DON、10mg/kgDON、1mg/kgDON+0.5% 脱霉素、10mg/kgDON+0.5% 脱霉素和 10mg/kg DON+0.5%EGM。试验 2 分组及处理见表 2。

表 1 试验 1 分组及处理

组别	处 理	数量(尾)
1	基础日粮	3×10
2	基础日粮+0.5%脱霉素	3×10
3	基础日粮+100 μg/kg AFB <sub>1</sub>	3×10
4	基础日粮+100 μg/kg AFB <sub>1</sub> +0.5%脱霉素	3×10
5	基础日粮+100 μg/kg AFB <sub>1</sub> +0.5%EGM	3×10

表 2 试验 2 分组及处理

组别	处 理	数量(尾)
A	基础日粮	3×10
B	基础日粮+0.5%脱霉素	3×10
C	基础日粮+1 mg/kgDON	3×10
D	基础日粮+10 mg/kgDON	3×10
E	基础日粮+1 mg/kg DON+0.5%脱霉素	3×10
F	基础日粮+10 mg/kg DON+0.5%脱霉素	3×10
G	基础日粮+10 mg/kg DON+0.5%EGM	3×10

### 1.5 饲养管理

试验场地配备相应的供、排水系统和小型气泵 (15W) 等设备。饲养周期为 40 d, 第 1 周的投饲量为每缸 10 条鱼 0.7 g, 第 2 周开始调整为 1.0 g, 每天投喂 3 次。每天进行排污和换水以保证良好水质, 随机抽查水质 3 次/周, 全天用小型气泵自动充气以增加水中溶氧。

### 1.6 测定指标

试验结束前一天停止喂料, 结束当天尾静脉采血, 解剖并取肝脏。将采集的血样分离血清之后, 于全自动血液生化分析仪上按说明操作检测血清 ALT、AST 活性和 TP、ALB 水平; 解剖前对所有锦鲤活体称重, 将鱼解剖后, 分离肝脏, 并进行称重, 计算器官重与体重的比值。因为试验 1 和 2 中各有 1 条锦鲤在饲养过程中死亡, 所以最后各重复中取锦鲤数目为 9 (n=9)。

### 1.7 数据统计分析

采用 SAS8.2 统计软件 (GLM 过程) 对试验数据进行方差分析, 用 Duncan 统计方法对锦鲤的血清生化指标和肝脏等数据进行多重比较以检验组间差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 AFB<sub>1</sub> 和霉菌毒素吸附剂对锦鲤血清生化指标的影响

不同处理对血清 TP 和 ALB 的水平没有显著影响 ( $P>0.05$ )。而各处理组之间 AST 和 ALT 的活性差异比较显著。相比对照组, 第 2 组锦鲤 AST 和 ALT 的活性有所降低, 但在统计学上没有达到显

著水平 ( $P>0.05$ ); 第 3 组锦鲤两种酶的活性均显著升高 ( $P<0.05$ ); 第 4、5 组锦鲤两种酶的活性相比第 3 组有所下降, 其中 ALT 活性的下降达到显著水平 ( $P<0.05$ ), 但这两组之间的差异不显著 ( $P>0.05$ )。见表 3。

表 3 AFB<sub>1</sub> 和不同吸附剂对锦鲤血清学生化指标的影响 (n=9)

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	TP	ALB
1	6.33±0.28 <sup>ABD</sup>	5.33±0.25 <sup>A</sup>	23.00±1.09 <sup>A</sup>	5.00±0.23 <sup>A</sup>
2	3.33±0.52 <sup>A</sup>	2.67±0.12 <sup>A</sup>	22.67±0.98 <sup>A</sup>	5.33±0.14 <sup>A</sup>
3	12.67±1.05 <sup>C</sup>	109.00±7.23 <sup>C</sup>	22.00±1.43 <sup>A</sup>	5.00±0.41 <sup>A</sup>
4	8.67±0.76 <sup>AB</sup>	71.33±6.08 <sup>BC</sup>	22.00±0.89 <sup>A</sup>	6.00±0.18 <sup>A</sup>
5	8.00±0.43 <sup>AB</sup>	44.67±3.56 <sup>BC</sup>	22.33±0.76 <sup>A</sup>	5.67±0.32 <sup>A</sup>

1): 同列数字肩标字母不同表示差异显著 ( $P<0.05$ ), 字母相同表示差异不显著 ( $P>0.05$ ), 下表同。

## 2.2 AFB<sub>1</sub> 和不同吸附剂对锦鲤肝脏重量的影响

各处理组锦鲤的肝脏与活重比没有明显差异 ( $P>0.05$ ); 第 1 组由于经检验含有一定量的 AFB<sub>1</sub>, 所以肝脏与活重比也较高; 第 4、5 组锦鲤的肝脏与活重比要略低于第 3 组, 但差异不显著 ( $P>0.05$ )。见表 4。

表 4 AFB<sub>1</sub> 和不同吸附剂对锦鲤肝脏重量的影响 (n=9)  
单位: g/g 活体重

组别	肝脏重量
1	0.0256±0.0031 <sup>A</sup>
2	0.0251±0.0025 <sup>A</sup>
3	0.0238±0.0042 <sup>A</sup>
4	0.0232±0.0023 <sup>A</sup>
5	0.0229±0.0028 <sup>A</sup>

## 2.3 DON 和不同吸附剂对锦鲤血清学生化指标的影响

不同处理对血清 TP 和 ALB 的水平没有显著影响 ( $P>0.05$ ); 与 A 组相比, B 组两种酶的活性有所降低, 但在统计学上没有达到显著水平 ( $P>0.05$ ); D 组 AST 的活性显著升高 ( $P<0.05$ ); F、G 组 AST 活性与 D 组相比无显著差异 ( $P>0.05$ ), 但 G 组 ALT 活性显著降低 ( $P<0.05$ )。见表 5。

## 2.4 DON 和不同吸附剂对锦鲤肝脏重量的影响

随着 DON 浓度的升高, 锦鲤肝脏与活重比有升高的趋势, 但差异不显著 ( $P>0.05$ )。由于基础日粮中含有一定量的 AFB<sub>1</sub>, 所以 A 组锦鲤肝脏与活重比也较高; 在 DON 浓度为 10 mg/kg 时, 脱霉素使肝脏与活重比显著降低 ( $P<0.05$ )。(见表 6)。

表 5 DON 和不同吸附剂对锦鲤血清学生化指标的影响 (n=9)

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	TP	ALB
A	6.33±0.82 <sup>A</sup>	5.33±0.36 <sup>A</sup>	23.00±1.23 <sup>A</sup>	5.00±0.42 <sup>A</sup>
B	3.33±0.24 <sup>A</sup>	2.67±0.19 <sup>A</sup>	22.67±1.08 <sup>A</sup>	5.33±0.48 <sup>A</sup>
C	8.00±0.79 <sup>A</sup>	5.33±0.35 <sup>A</sup>	22.33±1.32 <sup>A</sup>	5.00±0.29 <sup>A</sup>
D	4.00±0.36 <sup>A</sup>	100.33±8.56 <sup>B</sup>	22.00±0.96 <sup>A</sup>	5.00±0.31 <sup>A</sup>
E	5.33±0.41 <sup>A</sup>	2.67±0.28 <sup>A</sup>	19.33±0.97 <sup>A</sup>	5.00±0.30 <sup>A</sup>
F	5.33±0.38 <sup>A</sup>	100.33±9.30 <sup>B</sup>	22.33±1.29 <sup>A</sup>	5.33±0.49 <sup>A</sup>
G	0.33±0.09 <sup>B</sup>	90.67±8.10 <sup>B</sup>	22.00±1.02 <sup>A</sup>	5.00±0.46 <sup>A</sup>

表 6 DON 和不同吸附剂对锦鲤肝脏重量的影响 (n=9)  
单位: g/g 活体重

组别	肝脏重
A	0.0256±0.0026 <sup>A</sup>
B	0.0251±0.0031 <sup>A</sup>
C	0.0221±0.0019 <sup>A</sup>
D	0.0228±0.0021 <sup>A</sup>
E	0.0232±0.0032 <sup>A</sup>
F	0.0196±0.0025 <sup>B</sup>
G	0.0267±0.0029 <sup>A</sup>

## 3 讨论

### 3.1 AFB<sub>1</sub> 和霉菌毒素吸附剂对锦鲤血清学生化指标和肝脏重的影响

AFB<sub>1</sub> 的主要毒理学效应是致畸、致癌和致突变作用。动物对 AFB<sub>1</sub> 较敏感, 高剂量 AFB<sub>1</sub> 能导致动物急性死亡; 低剂量、长时间的摄入也能引发慢性中毒, 影响动物的生长、繁殖, 使病死率增加以及造成肝坏死、贫血、免疫抑制和抗氧化能力降低等<sup>[16]</sup>。曹红等<sup>[17]</sup>研究发现, 在肉鸡饲料中添加 4% 的 AFB<sub>1</sub> 解毒酶, 能有效的保护肉仔鸡肝脏, 减轻或基本消除 AFB<sub>1</sub> 对肉仔鸡组织器官的不良影响, 并能在一定程度上提高肉仔鸡的平均采食量和日增重; 王彦军<sup>[13]</sup>在被 AFB<sub>1</sub> 污染的肉鸡日粮中添加一定量的 PVPP, 结果添加组比未添加组肉鸡肝脏的重量要显著减轻, AST 活性显著降低; 赵虎<sup>[18]</sup>将 AFB<sub>1</sub> 添加到肉鸭日粮中, 结果发现中毒肉鸭血清生化指标明显变差, 肝脏受损严重, 肝细胞出现颗粒变性, 但同时添加了纳米硒的日粮组的肉鸭血液和肝脏中各功能指标都有一定的优势, 这说明纳米硒对 AFB<sub>1</sub> 有一定的解毒趋势。

本研究中, 锦鲤血清 TP、ALB 水平和肝脏与活重比受日粮组成变化的影响不大, 而血清酶 ALT、AST 受 AFB<sub>1</sub> 的影响很大, 活性显著升高。由此可以推测, AFB<sub>1</sub> 使锦鲤发生了急性或慢性的肝中毒, 对

其肝功能造成了一定损伤。而吸附剂的添加能有效抑制 AFB<sub>1</sub> 导致的 AST 和 ALT 活性的升高, 其中, 对 ALT 活性的升高的抑制达到显著水平。这说明脱毒素和 EMG 能对锦鲤的肝功能起到一定的保护作用。

### 3.2 DON 和不同吸附剂对锦鲤血清学生化指标和肝脏重的影响

在所有的霉菌毒素中, DON 最容易与其它毒素发生毒理学互作效应<sup>[19]</sup>。由于目前建议的镰刀菌毒素的安全限量值仅限于单一毒素, 忽视了受污染饲料中的多种 DON 间存在着潜在的加性效应/协同效应对毒素毒性的放大作用, 甚至被认为是“微量”水平的 DON 也可能对动物的健康和生产性能产生严重的负面影响。王慧容<sup>[20]</sup>在肉鸡霉变饲料中添加三种不同吸附剂: 酯化葡甘露聚糖、水合铝硅酸盐和复合霉菌毒素吸附剂, 结果发现, 这三种吸附剂的添加都有效地抑制了肉鸡血清中 AST 活性的升高; 徐雪梅<sup>[21]</sup>在肉鸡霉变日粮中分别添加不同剂量的复合脱毒剂, 结果发现添加了复合脱毒剂的处理组肉鸡的血清学生化指标及肝功能指标要明显优于未添加脱毒剂的处理组。

在本试验中, 锦鲤血清 TP 和 ALB 水平受日粮组成变化的影响很小; 不同的日粮组成对锦鲤肝脏与活重比的影响不显著, 但脱毒素能显著减小高浓度 DON 条件下的肝脏与活重比, 说明脱毒素对抑制霉菌毒素引起的锦鲤肝脏变性肥大有一定的作用。高浓度的 DON 对 AST 活性的增加效果非常明显, 但低浓度的 DON 对 AST 和 ALT 活性的影响不显著, 这表明 DON 对锦鲤产生肝毒性具有剂量依赖性。吸附剂的添加可在一定程度上降低 DON 导致的 AST 和 ALT 活性的增加, 特别是对低浓度 DON 的作用效果很好。而当 DON 浓度较高时, 吸附剂对 AST 活性的作用很弱, 但 EMG 可显著抑制 ALT 活性的升高。这说明脱毒素和 EMG 能在一定程度上对抗 DON, 保护锦鲤的肝功能。

## 4 结论

从 AST 和 ALT 活性的变化及肝脏与活重比可以看出, 霉菌毒素对锦鲤的肝功能存在一定的损害性, 并且这种伤害是呈剂量依赖性的, 而吸附剂能在一定程度上减弱霉菌毒素导致的锦鲤肝功能损伤, 且在本研究中, EMG 的效果要优于脱毒素。目前, 关于霉菌毒素及其吸附剂在水产养殖中的应用和研究还很少, 那么, 不同的霉菌毒素及其吸附剂对其它水生动物的影响如何, 霉菌毒素对水生动物其它组织的影响及其机理怎样, 还需进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Palmgren M, Lee S. Separation of mycotoxin-containing sources in grain dust and determination of their mycotoxin potential. *Environ [J]. Health Perspect*, 1986, 66:105-108.
- [2] Chulze S, Ramirez K, Farnoehi M, et al. Fusarium and fumonisin occurrence in Argentinian corn at different ear maturity stages [J]. *Agric Food Chem*, 1996, 44:2797-2801.
- [3] Viquez O, Castell M, Shelby R. Occurrence of fumonisin B1 in maize grown in Costa Rica [J]. *Agric. Food Chem*, 1996, 44:2789-2791.
- [4] 赵青, 何敏, 邓衍柏, 等. 呕吐毒素不同给药方式对猪血常规指标的影响 [J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(4):47-50.
- [5] 庄振宏, 郑传琦, 汪世华. 黄曲霉毒素 B1 胁迫相关小鼠肝脏线粒体蛋白的初步研究 [J]. *中国农学通报*, 2010, 26(6):17-21.
- [6] 钱利纯, 尹兆正. 玉米赤霉烯酮对畜禽的毒害作用研究进展 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2005, (9):78-80.
- [7] Lioi M, Santoro A, Barbieri R. Ochratoxin A and Zearalenone: a comparative study on genotoxic effects and cell death induced in bovine lymphocytes [J]. *Mutation Research*, 2004, 557:19-27.
- [8] 梁梓森, 许利娜, 马勇江, 等. 玉米赤霉烯酮对小鼠胸腺细胞凋亡的影响 [J]. *中国畜牧杂志*, 2009, 45(7):88-90.
- [9] 马勇江, 许利娜, 李玉谷, 等. 玉米赤霉烯酮对小鼠脾淋巴细胞凋亡的影响 [J]. *家畜生态学报*, 2009, 30(1):52-56.
- [10] 涂华荣. 霉菌毒素吸附剂的研究 [J]. *饲料研究*, 2004, (7):11-12.
- [11] 李娟娟, 苏晓鸥. 不同吸附剂对黄曲霉毒素 B1 吸附效果的研究 [J]. *中国畜牧兽医*, 2009, 36(8):5-10.
- [12] 侯然然. 酵母细胞壁中葡甘露寡糖的提取及其霉菌毒素吸附效果 [D]. 北京: 中国农业科学院. 2007:5-7.
- [13] 王彦军. 添加聚乙烯基吡咯烷酮对肉鸡生长性能的影响 [D]. 北京: 中国农业大学. 2006:13-17.
- [14] 王钟翊, 李前勇, 张德志. 纳米硒对大豆日粮中黄曲霉毒素 B1 拮抗作用的研究 [J]. *粮食与饲料工业*, 2009, (9):38-41.
- [15] 林璋. 纳米氧化锌及其复合体的防霉和霉菌毒素吸附研究 [D]. 厦门: 厦门大学. 2009:13-14.
- [16] 王荣梅, 苏荣胜, 潘家强, 等. 黄曲霉毒素对动物免疫及抗氧化能力的影响 [J]. *饲料研究*, 2010, 2:54-56.
- [17] 曹红, 尹逊慧, 陈善林, 等. 黄曲霉毒素解毒酶对岭南黄肉仔鸡日粮中黄曲霉毒素 B1 解毒效果的研究 [J]. *动物营养学报*, 2010, 22(2):424-430.
- [18] 赵虎. 纳米硒对肉鸭日粮中黄曲霉毒素解毒效果的研究 [D]. 重庆: 西南大学. 2009:9-13.
- [19] Speijers G, Speijers M. Combined toxic effects of mycotoxins [J]. *Toxicol Lett*, 2004, 153(1):91-98.
- [20] 王慧容. 三种霉菌毒素吸附剂对复合霉菌毒素中毒肉鸡解毒效果的研究 [D]. 武汉: 武汉工业学院. 2008: II-III.
- [21] 徐雪梅. 葡甘露聚糖复合吸附剂对肉鸡饲料中霉菌毒素混合污染的脱毒研究 [D]. 武汉: 华中农业大学. 2008: I-II.



# 一例犬甲硝唑中毒的诊治报告

黄良宗<sup>1</sup>, 梁金华<sup>2</sup>

(1. 佛山科学技术学院动物医学系, 广东 佛山 528231; 2. 肇庆市动物防疫监督所, 广东 肇庆 526040)

**摘要:** 本文报道了一例犬甲硝唑中毒病例的诊治过程。过量甲硝唑对犬神经系统和消化系统造成严重损伤, 血液生化指标天冬氨酸转氨酶 (AST) 和丙氨酸转氨酶 (ALT) 明显升高。及时停用甲硝唑并采用肝泰乐和维生素 C 等药物治疗, 病犬得到成功救治。

**关键词:** 犬; 甲硝唑; 中毒

**中图分类号:** S858.292

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2011)04-0044-01

甲硝唑是目前常用的抗厌氧菌的药物, 其口服吸收好, 体内分布广泛, 可进入唾液、乳腺、肝脓液的脓液中, 也可进入脑脊液。医学报道甲硝唑的不良不良反应主要表现在消化道、神经系统、泌尿道、过敏反应、流产、胎儿畸形等方面<sup>[1]</sup>。本病例中发现犬甲硝唑中毒主要表现出消化系统和神经系统的不良不良反应, 现报告如下:

## 1 发病情况及临床症状

吉娃娃犬, 雄性, 2岁, 体重 5 kg。2010年5月4日畜主喂服甲硝唑(0.2 g/片)一次2片, 3次/d, 治疗该犬腹泻。用药两天后, 该犬基本康复。为巩固疗效, 畜主按相同剂量继续投喂两天, 5月6日晚上发现该犬呕吐, 5月7日该犬表现呼吸急速, 食欲废绝, 呕吐, 后肢无法站立, 肌肉震颤。5月8日送到本校动物医院治疗时体温 37.8 °C, 厌食, 多饮, 侧卧在地, 四肢伸直呈划水状, 头部不自主地晃动, 偶尔前肢能短暂站立, 但后肢无力。腹部触诊敏感, 抽血进行生化检测, 结果见表 1。根据临床症状及用药情况, 诊断为甲硝唑中毒。

表 1 血液生化检测结果

项目	结果	单位	参考值
天冬氨酸转氨酶 (AST)	91	U/L	6~60
丙氨酸转氨酶 (ALT)	310	U/L	20~123
碱性磷酸酶 (ALP)	82	U/L	37~219
总胆红素 (T BILD)	4.5	μmol/L	1.7~10.3
直接胆红素 (D BILD)	0.3	μmol/L	0~5.1
间接胆红素 (I BILD)	4.2	μmol/L	1.7~5.1
尿素 (Urea)	5.29	mmol/L	2.5~9.6
肌酐 (CREAT)	87.1	μmol/L	44.2~114.9

## 2 治疗

停止使用甲硝唑, 每天静脉注射 5%葡萄糖 100 mL、维生素 C 400 mg、肝泰乐 100 mg, 连续治疗 5 d, 5月9日至5月11日的治疗期间, 该犬体温保持在 38.3~38.7 °C, 食欲废绝, 多饮, 四肢慢慢可弯曲, 尚不能站立, 头可以自由转动。5月12日有食欲, 但还是无法站立, 5月13日能站立, 食欲好, 基本恢复正常。

## 3 讨论

甲硝唑中毒可根据甲硝唑的用药剂量、疗程, 是否出现消化道、神经系统症状, 停药后是否好转来进行诊断。甲硝唑治疗犬厌氧菌感染的常规用量为口服 10~20 mg/kg, 每日 2~3 次<sup>[2]</sup>, 本病例中该犬口服甲硝唑的剂量为正常的 4 倍, 在连续用药 4 d 后表现出消化道和神经系统的症状, 停药后对症治疗 5 d 恢复正常。

甲硝唑不良反应, 以消化道症状最为常见, 包括呕吐、腹部疼痛, 食欲减退等, 本病例中也出现了上述症状。甲硝唑引起严重的消化系统不良反应还有中毒性肝炎、黄疸性肝炎、肝坏死等<sup>[3]</sup>。本病例中血液生化检测结果显示天冬氨酸转氨酶和丙氨酸转氨酶均明显升高, 提示过量甲硝唑可能导致严重肝脏损伤。神经系统的不良不良反应也很明显, 该犬出现四肢划水状、抽搐、肌肉无力等神经症状。这是因为甲硝唑属于咪唑衍生物, 易透过血脑屏障, 用量偏大可使脑内 5-羟色胺和去甲肾上腺素的活性高, 导致精神兴奋及惊厥等不良不良反应<sup>[4]</sup>。

由于甲硝唑中毒没有特异性的解毒药, 一般采用对症治疗, 出现神经症状时可以静注安定

(下转第 52 页)



# 第三眼睑遮盖术治愈犬角膜穿孔

张媛媛

(河源市动物疫病预防控制中心, 广东 河源 517000)

中图分类号: S858.292

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)04-0045-02

角膜穿孔是犬由于外伤、感染等因素作用下造成的角膜部分或全层的损伤, 并由此引发角膜水肿、溃疡、肉芽增生、晶状体脱出等病变。第三眼睑遮盖术是将犬第三眼睑与上眼睑用缝线连接在一起, 拉扯第三眼睑来遮盖角膜穿孔部位, 利用眼睛本身的营养供给, 达到角膜愈合的效果。临床上使用第三眼睑遮盖术治疗角膜穿孔、增生, 效果确实。现将笔者接诊的一例典型病例报告如下。

## 1 病例情况

患犬是一只4岁的京巴犬, 雌性, 6.5 kg, 已绝育。主诉: 该犬和家里的另一只犬打架后, 左眼内流出大量眼水, 之后出现眼结膜潮红, 少量脓性分泌物, 但是并未发现有穿孔。主人曾用氧氟沙星滴眼液治疗患犬, 患犬眼部的脓性分泌物减少, 但发现眼角膜上有一个小白点, 并且逐渐扩大, 形成一个大约有5 mm直径的溃疡斑。主人继续使用氧氟沙星滴眼液, 但是没有任何好转, 并且逐渐恶化, 发展为溃疡, 之后出现红色肉芽增生。

## 2 临床检查

临床检查表现为: 体温 38.6 °C, 呼吸 18 次/min, 心跳 85 次/min, 精神状态良好, 排泄正常, 没有其他异常反应。左眼羞明流泪, 有脓性分泌物, 角膜中间部位有一块直径约 5 mm 的红色增生物, 突出角膜表面。角膜有大量新生血管。患犬左眼敏感, 经常用前爪抓挠患眼。



图1 肉芽增生的眼角膜

全血生化和血常规检查, 指标均未见异常。

根据病史和临床症状, 诊断为外伤性角膜穿孔并发增生。遂决定采用第三眼睑遮盖术来治疗。

## 3 手术方法

**3.1 麻醉** 阿托品 (0.02 mg/Kg 体重) 皮下注射, 15 min 后, 舒泰 (0.05 mg/Kg 体重) 肌肉注射。待患犬进入麻醉状态后进入手术室。

**3.2 保定** 患眼周围剃毛, 清洗干净, 俯卧保定, 抬高头部。

**3.3 消毒** 聚维酮碘消毒后用酒精脱碘, 反复 3 次。

**3.4 术式** 7# 缝合线沿着第三眼睑 T 软骨内侧缘分别做三个纽扣缝合, 与上眼睑连接, 之后穿过一段已消毒的输液管, 拉紧缝合线, 使第三眼睑覆盖住眼球表面, 但又不至于过紧, 单独打结。见图 1 至图 4 所示。

## 4 术后

术后局部涂抹抗生素眼膏, 防止继发感染。佩戴伊丽莎白头套, 防止患犬抓伤眼睛。

一个月后, 拆除缝合线, 角膜基本愈合, 增生物明显消失, 角膜新生血管基本消失 (见图 5)。

以相同的方法继续施行第三眼睑遮盖术, 一个月后拆除缝合线。角膜已经完全愈合, 角膜新生血管全部消失。患眼和右眼外观状态基本一样 (见图 6)。视力未受任何影响。

之后, 患眼使用贝复舒滴眼液, 每天 4 次。



图2 拉扯第三眼睑预定缝合部位

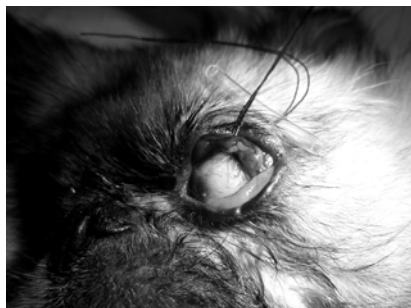


图3 第三眼睑和上眼睑的纽扣缝合



图4 缝合固定之后



图5 一个月后角膜基本愈合



图6 两个月后角膜恢复正常状态

### 5 体会

对于京巴、西施、巴哥等眼球突出的犬种,很容易伤到眼睛,主人一旦发现犬只的眼睛受伤,要尽快去医院检查。简单的角膜损伤只需要坚持用贝复舒滴眼液,一般可以很快恢复。当角膜受损严重的时候,需要施行第三眼睑遮盖术来修复损伤的角膜。一般情况下的角膜损伤,通过该手术便可痊愈。

术后需要每天多次使用抗生素软膏,防止继发感染。若术后患眼有大量脓性分泌物,且使用抗生素后无效,需要尽快拆除缝合线,改用其他方法来修复眼角膜,比如结膜瓣遮盖术、角膜生物补片等。

此手术往往需要每过一个月施行一次,拆除缝合线后观察角膜恢复情况,若恢复不理想需要继续遮盖直到角膜完全愈合。

(上接第 39 页)

鸡的死亡率比起攻毒对照组有所降低,尽管统计学上差异不显著,但该药物对延缓试验鸡的死亡有一定的效果。

### 参考文献:

[1] 卡尔尼,主编.高福,刘文军,主译.禽病学[M].第九版.北京:北京农业大学出版社,1991:455-471.  
 [2] 甘孟侯.禽流感[M].北京:北京农业大学出版社,1995:1-134.  
 [3] Nerome K,Kanegae Y,Schortridge K F,et al.Genetic analysis of porcine H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> viruses originating in southern China[J].Journal of General Virology,1995,76:631-624.  
 [4] Subbaraok K,Klimov A,Katz J,et al.Characterization of an avian influenza A(H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness[J].Science,1998,279:393-396.  
 [5] Davies W L,Grunert R R,Hatt R F.Antiviral activity

of ladamantanamine (amantadine) [J].Science,1964,144:862-863.  
 [6] Wainright P O,Perdue M L,Brugh M,et al.Amantadine resistance among hemagglutinin subtype 5 strains of avian influenza virus[J].Avian Diseases,1991,35:31-39.  
 [7] 宋玉乔,姚凌云,曹蔚,等.槲皮素的药理作用研究近况[J].西北药学杂志,2002,17(1):40-42.  
 [8] 丁献义,彭慧敏,韩玉蓉.槲皮素对免疫功能及DNA合成影响[J].中药药理与临床,1996,24(4):24-26.  
 [9] 孟德胜,汪仕良.槲皮素的抗癌作用[J].中草药,1998,10(2):186-188.  
 [10] 鲍廷铮,王庆伦,廖志辉.槲皮素的研究近况[J].江西中医学院学报,1998,10(2):90-91.  
 [11] 陈百伦,张泽纪,陈伟斌.禽流感的研究I.鸡A型流感病毒的分离与血清学初步鉴定[J].中国兽医杂志,1994,20(10):6-7.  
 [12] 蔡宝祥.动物传染病诊断学[M].南京:江苏科学技术出版社,1991:548-551.  
 [13] 黄楨详,洪涛,刘崇柏.医学病毒学基础及试验技术[M].北京:科学出版社,1994:120-123.

# 猪场病毒性腹泻防控实例及体会

张欣, 韩辉, 崔敏

(烟台龙大养殖有限公司, 山东 莱阳 265209)

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)04-0047-02

病毒性腹泻可分为两类,一类是季节性腹泻,主要由猪传染性胃肠炎(TGE)病毒和猪流行性腹泻(PED)病毒引起;另一类是非季节性腹泻,主要由轮状病毒(RA)引起。病毒性腹泻主要以腹泻、脱水、生长发育猪生长缓慢和饲料转化率降低为特征,且临床症状相似,难以区分,在乳仔猪具有高致死率,大龄猪只能耐过。2011年年初,本公司下属猪场种猪群虽然接种TGE-PED灭活疫苗,但是部分猪场仍出现腹泻病情,首先育肥猪群出现零星腹泻,随后保育阶段,逐渐蔓延至种猪群和哺乳仔猪。损失主要集中在哺乳仔猪,个别猪场哺乳仔猪腹泻死亡率达到35%,为此本文结合实际生产中病毒性腹泻防控措施与各位同仁交流,以期共同进步。

## 1 临床症状

### 1.1 哺乳仔猪

常整窝发病。发病小猪厌食,部分处于发病初期仔猪有短暂的呕吐现象。腹泻呈黄色水样,腹泻物粘满全身。部分仔猪喜躺卧于母猪身上,可能与肠炎引起的腹痛有关。

### 1.2 生长育成猪

一旦感染后,传播迅速。食欲减退或废绝,精神沉郁,若无继发感染,一般体温正常或偏低。呈急剧、持续水样性腹泻,常呈喷射状,有时含有少量未消化的饲料。急剧腹泻后,呈现渴感、脱水,明显消瘦,病程持续7 d左右。

### 1.3 哺乳母猪

发病迅速,症状轻重不一。有的出现体温升高,厌食或食欲废绝,灰色水样腹泻。高度衰弱。乳房萎缩,泌乳减少或完全无乳。

### 1.4 其他猪群

发病症状与生长猪群类似,症状轻微。

## 2 剖检病变

剖检15头腹泻哺乳仔猪,可见病死猪消瘦,脱水;胃肠道空虚,小肠内充满黄色泡沫性液体,肠壁变薄且呈透明状,个别猪肠道内含有未消化的凝乳块,肠系膜内的乳糜管中没有乳糜,腹泻仔猪应用抗生素和抗寄生虫药物治疗无效。

## 3 防控措施

### 3.1 疫苗预防

**3.1.1 种猪群** 目前商品化疫苗仅有传染性胃肠炎和流行性腹泻二联灭活疫苗,推荐的免疫程序采用后海穴(即尾根与肛门中间凹陷的小窝部位)注射。种猪群10月份全群免疫1次,11月份加强免疫1次,免疫剂量为4 mL/头。大多数情况下,基本可以保证母猪不发病(2胎以下的母猪虽时有发病,但发病率也比较低,症状轻微。),其所产小猪也基本可以维持到保育阶段不发病或轻微发病。如果能够采购到TGE-PED-RA弱毒疫苗,种猪群每年10月份开始口服免疫,11月份进行第二次口服免疫,从临床应用来看,效果比较确实。

**3.1.2 商品猪群** 通过免疫效果来看,仅仅1~2次的灭活疫苗免疫,仍有部分商品猪群出现腹泻。

### 3.2 加强管理

(1)坚持自繁自养,减少引种次数。(2)冬季特别要注意提高饲料中能量饲料的供应。(3)产房全进全出、彻底清洗与消毒、干燥。(4)做好舍内保温工作。

### 3.3 隔离治疗

(1)猪场一旦发病,要果断采取隔离措施,防止人员串舍,防止病猪粪便运输造成污染。(2)发病猪及时补充口服补液盐,防止脱水。(3)防止继发感染。



### 3.4 药物治疗方案

(1)干扰素疗法:注射干扰素可增强机体对病毒的抑制作用。(2)腹泻哺乳母猪:10%葡萄糖 500 mL,生理盐水 500 mL+氯化钾注射液 10 mL,5%碳酸氢钠注射液 150 mL,西咪替丁注射液 10 mL,ATP 注射液 10 mL,50%葡萄糖 100 mL,静滴,产后 7 天内腹泻哺乳母猪输液末期添加缩宫素 20 单位,一天一次。同时在哺乳母猪口服蒙脱石 5 g/头·次,辅助治疗,直到腹泻停止。(3)哺乳仔猪:50%葡萄糖 2 mL、生理盐水 5 mL、氯化钾 1 mL、阿托品 0.3 mL、庆大霉素或环丙沙星 3 mL,灌服,同时每天用蒙脱石,按照 2 g/头灌服。为防止因饥饿导致仔猪死亡,需口服人工乳。(4)生长育肥猪:饮水中添加 0.5%的柠檬酸和口服补液盐,饲料中添加抗生素或蒙脱石,防止脱水和继发感染。

## 4 防控体会

现阶段,对于季节性爆发的病毒性肠炎,仍不能把希望完全寄予疫苗,毕竟灭活疫苗的免疫保护率较低;对于非季节性病毒性腹泻在未有疫苗的情况下仍需要采用综合防控措施。关键在于疾病爆发后采取的措施是否得当和快速有效。

### 4.1 哺乳仔猪

病毒性肠炎主要危害是哺乳仔猪,当哺乳母猪发病后导致无乳及感染仔猪,或仔猪腹泻感染母猪,导致产房内腹泻循环进行,哺乳仔猪主要因为饥饿和脱水死亡。笔者给出生 3 日龄内的仔猪进行口服 0.2 头份 TGE-PED-RA 弱毒疫苗进行预防,有效减少腹泻造成的损失,即使出现腹泻,仔猪死亡率降低。张学煌等<sup>[1]</sup>采用思密达对小猪腹泻进行辅助治疗,临床治愈率可提高 3.29%。笔者按照“防脱水、保护肠黏膜、抗菌消炎,母子同治”原则,对其治疗方案进行改进,通过小猪灌服蒙脱石和补液,哺乳母猪饲料中添加蒙脱石及静脉输液,缩短发病时间,加速发病小猪痊愈。在临床过程中,笔者发现当仔猪出现呕吐或腹泻后,如果未及时发现对哺乳母猪采取措施,腹泻治疗效果将大打折扣。

方案中蒙脱石具层纹状结构及非均匀性电荷分布,对消化道内病毒、细菌及其产生的毒素有吸附作用,并对肠道黏膜具覆盖能力,提高黏膜屏障的防御功能,而思密达主要成分是蒙脱石,与本方案中使用的蒙脱石来自于同一生产厂家;哺乳母

猪静脉输液方案作用是补充能量、缓解酸中毒、强心、恢复胃动力、促进乳汁分泌。

### 4.2 保育仔猪

冷和平等<sup>[2]</sup>曾介绍保育舍病毒性肠炎爆发阶段饮水中添加柠檬酸防治的经验。经猪场验证,效果确实。对于保育舍发病猪群,饮水中添加 0.5%柠檬酸,保证 pH 值 3~4,一般 3~4 d 后腹泻症状即可停止,猪群采食量恢复正常,生长速度几乎不受影响。在防治腹泻方面,柠檬酸在保育阶段的应用值得推广。

### 4.3 育肥猪

单纯的病毒性肠炎爆发对育肥猪生产的影响有限。除个别猪因抵抗力较差可能死亡外,一般发病猪群一周左右均可耐过,发病阶段因生长速度放慢对生产造成的损失,也大都可在病愈后采食量增加,生长速度加快的过程中得到补偿。因此,中大猪病毒性肠炎的爆发,亦无须花太多的人力和物力以应对。育肥猪饮水中添加 0.5%柠檬酸、广谱抗生素(恩诺沙星等)及口服补液盐,可有效预防继发感染和脱水;适当限饲或饲料中添加 0.1%的蒙脱石,可加快病猪的康复并减少腹泻对肠道黏膜的损伤。

### 4.4 种猪

空怀母猪、后备母猪和公猪爆发病毒性肠炎后,发病耐过猪对病毒性肠炎产生坚强的免疫力,有利于猪场对病毒性肠炎的防控。当猪场出现病毒性腹泻爆发而怀孕母猪未感染时,对预产期 2 周之前的妊娠母猪采用发病猪只粪便或肠内容物进行“返饲”<sup>[3]</sup>,让其自然感染后耐过;对于预产期 2 周之内的母猪尽可能保证不发病,才能有效提高哺乳仔猪的成活率。

总之,上述方法的应用需要结合猪场实际情况进行,只要措施得当,快速有效执行,病毒性腹泻引起的损失将会降至最低。

### 参考文献:

- [1] 张学煌,侯月娥,冷和平. 思密达对小猪腹泻症状辅助治疗效果的临床观察和对照试验[J]. 养猪,2010,(6):73-75.
- [2] 冷和平,曾俊霞,邱江,等. 猪场病毒性肠炎综合防制的经验[J]. 中国猪业,2010,(3):33-34.
- [3] Straw B E, Zimmerman J J 等主编,赵德明,张仲秋,沈建忠主译. 猪病学[M]. 第九版. 北京:中国农业大学出版社,2008,561-561.



# 鸡呼吸道疾病的防控体会

吴群彬<sup>1</sup>, 朱燕秋<sup>2</sup>, 王锐彬<sup>1</sup>

(1. 汕头市白沙禽畜原种研究所, 广东 汕头 515800; 2. 东莞市动物疫病预防控制中心, 广东 东莞 523086)

中图分类号: S858.31

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)04-0049-02

近几年来,业内人士纷纷把注意力放在防控禽流感等重大动物疫病上,而对于较常见、多发的呼吸道疾病往往被忽视。单纯的呼吸道疾病感染会造成种鸡产蛋率下降、受精率下降、孵化率和雏鸡品质下降等,如并发感染,则可同时抑制机体免疫系统,降低机体自身免疫力,造成鸡群发病率、死亡率剧增,往往给养鸡生产带来更为严重的损失。因此,鸡场生产者应高度重视预防呼吸道疾病的发生。

## 1 病原特点

引起鸡呼吸道疾病的病原有多种,病毒引起的有传染性支气管炎(IB)、传染性喉气管炎(ILT)、慢性鸡新城疫(ND)等;非病毒引起的,主要有由鸡毒支原体感染引起的慢性呼吸道病,亦称鸡败血性霉形体病(CRD),有由鸡嗜血杆菌引起的传染性鼻炎(IC),有由曲霉菌引起的霉菌性肺炎等。鸡呼吸道疾病一年四季均可发病,尤以冬春季气候变化异常时较易发生。鸡体对外门户的呼吸道系统易受环境条件变化,各种应激等诱发感染,并且大多数发病呈并发感染,具有发病症状不明显、病程长、易反复、传播迅速等特点。

## 2 发病原因

### 2.1 饲养环境变化

目前很多养鸡场都是在传统粗放的基础上形成一套固有的饲养管理模式。随着养鸡时间的延长、饲养规模的扩大、饲养密度的增加等,导致了环境循环恶化,使养鸡区存在大量的高密度、高毒力、高耐药性的有害病菌,时刻威胁着鸡群的健康。一旦鸡群受刺激,如各种应激气温变化等情况下,病菌会乘虚而入,感染鸡体引起发病。

### 2.2 饲养管理粗放

在传统的饲养管理模式下,各种管理措施得不到加强,卫生防疫措施得不到完善;饲养人员及生产工具的串用与无序管理,病死鸡与鸡粪的无污染处理设施不配套,使鸡群面临着很大的威胁。

### 2.3 饲料营养缺失

饲料配合配比不当或粉碎搅拌不均,甚至原料受潮发霉或饲料存放不当等导致饲料营养缺失或产生毒素。

### 2.4 鸡舍通风不良

在简陋封闭式鸡舍中,如果在冬春季,只重视保温而忽视通风透气的重要性,使鸡舍内氨气、硫化氢等有害气体超标;在开放式鸡舍,虽然采取了防寒保暖措施,但易受天气异常、气温多变的影响,使鸡体不断受到刺激,严重损害呼吸系统粘膜及上皮组织等的防御能力。

### 2.5 防疫措施不完善

免疫接种的失败或诊断治疗措施的失当,使鸡体免疫力下降,导致疾病的发生。

## 3 综合防治措施

### 3.1 加强日常卫生消毒管理

空舍在进鸡前要做全面彻底的消毒;饲养期间可用0.1%百毒杀喷雾消毒;在治疗本病期间,加强消毒的环节必不可少,除了发病鸡舍需要特别消毒之外,健康的鸡舍也要加强带鸡消毒,以减少被传染的机会;应避免病鸡舍和健康鸡舍人员的互相串舍,进出鸡舍人员要进行严格消毒。

### 3.2 正确选用全价配合饲料

首先要保证原料新鲜卫生、质量可靠,其次饲料存放应不受潮、不受晒、不变质,确保供给鸡群营养均衡全面的饲料,才能保障鸡只健康。

### 3.3 解决好保暖和通风的关系,适当调整饲养密度

以平养计,育雏期为15~20只/m<sup>2</sup>,育成期为5~10只/m<sup>2</sup>。注意调整舍内温湿度至适宜水平,及时清除舍内有害气体的浓度。舍内NH<sub>3</sub>浓度不能超过20 mL/L,CO<sub>2</sub>浓度不能超过0.35%。根据天气变化情况,笼养鸡要做好通风机和保温升降帘的调节量,注意防止贼风、穿堂风侵袭鸡群。平养要加厚垫料,防止垫料受潮。

### 3.4 设法降低应激因素的影响

尽量减少对鸡只的各种应激, 在无法避免的情况下, 可投药预防疾病的发生。

3.4.1 若遇转季、气温骤变、断喙、鸡群转栏及饲料改变等情况, 可应用 0.1%土霉素、0.25%红霉素、0.03%奇特霉素 3~5 d。

3.4.2 在鸡群分栏时, 由于应激和环境的变化造成鸡群对原虫等寄生虫的抵抗力下降, 故需在 10、40、100 日龄的鸡只, 在给予预防抗球虫、原虫药的同时, 可以适当使用抗菌素药。推荐使用 0.05%~0.08% 球快灵与 0.4%禽菌灵。

3.4.3 鸡群产蛋前或产蛋高峰期后, 适当补充 0.04%复合多维, 并添加 0.05%~0.1%阿莫西林或 0.01%~0.02%环丙沙星等抗菌素, 防止感染。

3.4.4 若鸡群出现食欲、精神、粪便等异常, 可及早应用 0.025%氟苯尼考, 0.4%~0.6%四味穿心莲或 0.005%~0.01%谷氨酸恩诺沙星与 0.5%清瘟败毒散等药物进行治疗。

### 3.5 制订科学的免疫程序

目前, 对于预防病毒性呼吸道病如 IB、ILT、ND 等, 最有效的手段是根据实际制订适当的免疫程序, 按时对鸡群进行接种冻干灭活苗或油乳剂灭活疫苗, 并采用正确的接种操作方法。对鸡群要做好局部和全身免疫接种, 一般 IB 在 6 日龄, ND 可于 8~10 日龄采用 ND-IB 二联苗, ILT 在 25 日龄分别做单倍量免疫。首免最好采用点眼滴鼻作局部免疫接种, 这样可增强机体对呼吸道系统的保护作用。

### 3.6 查明病因, 对症治疗

对呼吸道疾病, 应及早查明病因。依据鸡群发

病日龄、临床症状、组织病变作初步诊断, 进一步检验需作鸡胚接种, 琼脂凝胶免疫扩散等试验。明确是由病毒引起的还是由细菌引起的, 按照该病特点, 采取相应的措施, 做好治疗工作。

3.6.1 对于 CRD、IC 等由细菌或支原体引起的呼吸道病, 除应用疫苗进行接种外, 采用投喂抗菌药物, 见效快, 效果好。对呼吸道病较为有效的药物有阿莫西林、泰乐菌素、罗红霉素、环丙沙星、强力霉素、复方敌菌净、磺胺类药等, 以及一些中草药制剂也有一定效果。但应注意经常更换用药或联合配伍用药, 最好先做药敏试验。且疗程和药量要充足。

3.6.2 对于病毒引起的疾病, 则以控制病毒和预防并发感染为主, 此时可选用抗病毒药物, 如 0.1%病毒唑、0.01%金刚烷胺等和一些中草药剂。同时应考虑使用抗菌素预防并发感染和对症治疗。

## 4 体会

鸡呼吸道病是一种综合的条件性疾病, 受饲养环境、管理条件、卫生防疫等因素的影响。发病鸡群病程长, 治疗后易复发, 很难根治, 治疗恢复后往往留下后遗症, 给饲养过程带来一定的困难。因此, 一个鸡场乃至一个养殖小区, 要想预防和控制住鸡呼吸道病, 就必须认真采取一系列综合措施。一方面要采取加强饲养管理, 搞好环境卫生, 合理免疫接种, 必要时投予一定抗菌药物等措施, 以提高机体对本病的抗病能力; 另一方面要采取有效的卫生消毒措施, 常抓不懈, 以净化大小饲养环境; 再次, 必须认真制订一套完善的饲养管理制度, 并坚持执行, 以降低或杜绝此病的发生, 减少经济损失。

# 《广东畜牧兽医科技》(双月刊)

(1976 年创刊, 大 16 开本, 正文 52 页)

主管单位: 广东省农业科学院

主办单位: 广东省畜牧兽医学会、广东省农科院畜牧研究所、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

# 猪群的免疫与保健措施

李中兴

(广东省湛江农垦畜牧有限公司幸福分公司, 广东 湛江 524261)

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2011)04-0051-02

为使猪群健康成长,减少患病的几率,应做好猪群的免疫接种与药物保健措施,以提高猪只抗体水平,增强猪群自身抗病能力,达到防控疾病的目的。从而保护猪群健康。笔者就此方面阐述自己的体会,供参考。

## 1 猪群的免疫接种

猪群的免疫,主要是病毒性疾病的免疫。如猪瘟、猪口蹄疫、猪伪狂犬病、猪蓝耳病、猪细小病毒、猪乙型脑炎、猪病毒性腹泻等。其它细菌性、原虫性等疾病,只要做好保健措施,就可以解决。避免过多的免疫接种,导致猪只免疫麻痹,影响其它疫苗的免疫效果。

### 1.1 猪瘟

猪瘟一直以来对猪群危害最大,必须高度重视。具体免疫如下:①生产母猪:断奶前肌注猪瘟活疫苗1头份/头。②种公猪:一年免疫2次,每半年为1次,每次肌注猪瘟活疫苗1头份/头。③后备种猪:前期按育肥猪免疫程序,到配种前1周肌注猪瘟活疫苗1头份/头。④育肥猪:无猪瘟污染的猪场:25~30天龄肌注猪瘟活疫苗0.5~1头份/头;55~60天龄肌注猪瘟活疫苗1头份/头。猪瘟污染猪场或疑有母猪带毒猪场:采用0~35~70免疫模式。即:零时免疫,在仔猪未吃初乳前1~1.5h肌注猪瘟活疫苗0.5头份/头,35天龄时肌注猪瘟活疫苗1头份/头,70天龄时肌注猪瘟活疫苗1头份/头。

### 1.2 猪口蹄疫

猪口蹄疫,近年来时有发生,除了做好生物安全工作,加强饲养管理外,合理的免疫措施也是防控本病的关键。①生产母猪:分别在配种前和分娩前一个月各肌注猪口蹄疫0型合成肽苗3~4mL/头,保证产后乳汁内的母源抗体达到较高水

平,确保哺乳和保育仔猪对口蹄疫病毒有较强的抵抗力。②种公猪:每4个月肌注猪口蹄疫0型合成肽苗3~4mL/头。③后备种猪:在配种前间隔30天免疫2次,每次肌注猪口蹄疫0型合成肽苗3~4mL/头。④仔猪:在60~70天龄时肌注猪口蹄疫0型合成肽苗1~2mL/头、105~115天龄肌注2mL/头、商品猪在出栏前25~30天肌注2mL/头,可保护其在运输途中或屠宰场时不发病。

### 1.3 猪伪狂犬病

经检测后确认已净化猪伪狂犬病或猪伪狂犬病阴性的猪场,就可以不接种该疫苗,否则就按如下程序使用。①母猪首免在产前3~8周间隔3周接种2次,每次2mL/头,以后每胎在3~8周接种1次,2mL/头即可,母猪免疫过猪伪狂犬病活疫苗所产的仔猪,在8~12周龄时接种2mL/头,即可以保护其到育肥出栏。②种公猪:每4个月接种1次猪伪狂犬病活疫苗2mL/头。

### 1.4 猪蓝耳病

猪蓝耳病阴性场不必注射该疫苗。如果猪场为猪蓝耳病阳性场,为防控此病,应按计划使用疫苗。①种猪群:每年免疫3次(每4个月1次),每次肌注猪蓝耳病活疫苗2mL/头。②后备种猪:配种前免疫2次,于配种前4周和6~8周分别免疫,每次肌注猪蓝耳病活疫苗2mL/头。③仔猪:在28天龄左右肌注猪蓝耳病活疫苗2mL/头。

### 1.5 猪圆环病毒病

有效的免疫接种是预防和控制猪圆环病毒病的主要措施。若猪场商品猪病因复杂,死残率高(约15%),建议在仔猪阶段使用猪圆环病毒2型杆状病毒载体灭活疫苗,猪群健康状况将会有所好转,具体做法如下:仔猪在14天龄时肌注1mL/头。其他猪群可不免疫。



### 1.6 猪细小病毒病

猪细小病毒病,主要危害种猪,建议对种猪群进行免疫,一般免疫3次即可。①后备母猪:于配种前2个月间隔30d接种2次,每次肌注猪细小病毒弱毒苗1头份/头,第3次则在第2胎配种前接种1头份,经检测抗体合格后,以后就不再接种。②种公猪:于配种前2个月间隔30d接种2次,每次肌注猪细小病毒弱毒苗1头份/头,第3次于6个月后接种1头份,经检测抗体合格后,也不再接种。

### 1.7 猪乙型脑炎

猪乙型脑炎,于每年3~4月份(或蚊虫出现前20d)接种种猪群1次,每次1头份/头,其他猪群可不免疫。

### 1.8 猪病毒性腹泻

为预防仔猪病毒性腹泻,于每年10月至翌年3月在母猪产前45d及15d各注射猪传染性胃肠炎与猪流行性腹泻(或轮状病毒)二联灭活苗4mL/头,可使其仔猪免受病毒性腹泻的困扰。

## 2 保健措施

在做好猪群免疫接种的同时,再加强猪群的药物保健工作,可有效预防病原混合感染或继发感染,猪群健康自然有保障。

### 2.1 仔猪保健

①仔猪1~3天龄肌注富来血1~2mL/头,可预防因仔猪贫血引发其它相关疾病。②仔猪3~5天龄灌服百球净1mL/头,可预防仔猪因患球虫病而引起的拉稀。③仔猪7~10天龄肌注头孢噻呋注射液0.1mL/头,可预防仔猪在哺乳期

间感染猪大肠杆菌、猪链球菌、巴氏杆菌等细菌性疾病。④仔猪在断奶当天或1周内肌注泰拉霉素注射液0.2mL/头,可防治仔猪应激及猪呼吸道综合症等疾病。并能提高猪只成活率及生长速度。⑤仔猪在65~70天龄时,进行驱虫,用虫力黑500g/t饲料进行混饲,连用1周,减少猪只患寄生虫的机会,降低料肉比。⑥为了使仔猪一直保持健康到育肥出栏,以后每月定期加保健药物1次,连周1周,选用药物为替米考星400g/t+盐酸多西环素200g/t饲料进行混饲。

### 2.2 种猪群保健

①母猪于产前20d左右进行驱虫,选用虫力黑1000g/t饲料进行混饲,连用1周,可确保母猪及仔猪在哺乳期间不感染寄生虫及其引发的疾病。②母猪产前、产后1周加保健药物,如80%支原净125g/t+阿莫西林200g/t+金霉素300g/t混饲,可预防母猪患子宫炎、乳房炎、无乳综合症,同时还可提高母乳质量,使仔猪在哺乳期间免受病原感染。③种公猪:每季度实施1次驱虫计划和2个月1次药物保健,分别用药物拌料1周进行混饲(驱虫药物选用虫力黑1000g/t饲料、药物保健选用2%纽弗罗2000g+泰乐菌素250g/t饲料),确保种公猪常年精力充沛、性欲旺盛,免受病菌感染。

### 2.3 饲料保质

根据饲料质量好坏,及时添加霉菌毒素吸附剂(如霉卫宝1~5kg/t),避免饲料受霉菌感染,并根据实际情况,适当提高饲料中蛋白质含量(0.5%~1%),保证猪群健康成长。

(上接第44页)

肌肉注射氯丙嗪,肝损伤可使用肝泰乐、维生素C保肝,肝泰乐又称葡萄糖醛酸内酯,能与肝内的毒物结合形成无毒的或低毒的物质经尿排出,保护肝脏药物很多,目前尚无特效药。肝脏在药物代谢中起重要作用,大多数保肝药物在肝内经生物转化而排出体外。如果应用过多的保肝药物,就会增加肝脏的负担,使肝功能损害进一步加重。所以保肝药物不可滥用。一般的病例应以维生素类药物为主,病情重的可用白蛋白或新鲜血等。值得提醒的是出现呕吐症状是机体的保护反应,一般不建议使用654-2或胃复安进行止吐处理。本病例提示临床上使用甲硝唑应注意使用的剂量及疗程,

此外甲硝唑70%从肝脏代谢,30%经肾脏代谢,肝肾有损伤易导致甲硝唑在体内发生蓄积而中毒<sup>[5]</sup>,因此对有肝病、肾病的犬及老龄犬一定要慎用或减少剂量,以减少中毒事件的发生。

### 参考文献:

- [1] 刘洁. 甲硝唑的副作用[J]. 中国综合临床, 2001, 17(3): 170-172.
- [2] 董军. 犬猫用药速查手册[M]. 中国农业出版社, 2007: 35.
- [3] 蒋克春. 甲硝唑的毒副作用及应用注意事项[J]. 航空军医, 2003, 31(4): 183-184.
- [4] 邱美珍. 甲硝唑致神经系统不良反应1例[J]. 中国药师, 2006, 9(3): 257.
- [5] 彭建新. 甲硝唑不良反应99例文献分析[J]. 中国医师, 2008, 11(1): 96-98.