

双月刊 1976年3月创刊  
第40卷第2期 (总第180期)  
2015年04月18日出版  
中国标准连续出版物号 ISSN 1005-8567  
CN 44-1243/S

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

主 编:蒋宗勇  
副 主 编:孙彦伟  
责任编辑:孙彦伟 岑俏梅  
编委主任:蒋宗勇

编 委(排名不分先后):  
蒋宗勇 余业东 王 浩 顾万军  
曹俊明 辛朝安 屈源泉 廖 明  
曾振灵 毕英佐 徐志宏 舒鼎铭  
孙彦伟 王贵平 张健骊 王政富  
刘彩霞 熊惠军 吴玄光 刘清神

特邀编委:  
陈 峰 谢志刚 林旭桢 李 岩  
陈瑞爱 罗满林 向 华 王 华

编辑出版:《广东畜牧兽医科技》编辑部  
地 址:广州市先烈东路135号(510500)  
电 话:020-37245052 37288167  
传 真:020-37245052  
网 址:http://www.gdaav.org  
E-mail:gdmsyjkj@163.com  
印刷单位:广州市人杰彩印厂  
发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部  
发行范围:国内外公开发行  
每期定价:5.50元  
广告经营许可证号:440000100037

本刊声明:凡向本刊所投稿件,一经刊用,稿件的复制权、发行权、信息网络传播权、汇编权等权利即转让给本刊。本刊将一次性支付作者著作权使用报酬(包括印刷版式、光盘版和网络版各种使用方式的报酬)。如作者不同意转让版权,请于来稿时声明。

目前本刊已加入的数据库有:中国学术期刊(光盘版)、中文科技期刊数据库、万方数据——数字化期刊群。

## 目 录

### ·专题综述·

- 基于共词分析的兽医分子生物学领域研究热点分析及初步展望.....岳 阳, 孙 静, 等(1)  
猪圆环病毒2型分子生物学检测方法的研究进展.....于新友, 李天芝, 等(5)  
特种野猪种质特性及营养需求研究简况.....李华磊, 吴高奇, 等(9)

### ·畜牧技术·

- 猪价连续两年逢“年”下跌 无序扩张或是低迷推手——2015年1季度我国生猪生产现状及后期走势分析.....虞 华, 原娟娟, 等(11)  
浅议饲料营养对种鸡产蛋后期生产性能的影响.....郝春光(15)

### ·兽医临床·

- 一例犊牛支原体肺炎的诊断.....卢受昇, 孙彦伟, 等(17)  
蛋鸡重组禽流感H<sub>5</sub>亚型灭活疫苗强化免疫试验.....李桂喜, 严 平, 等(20)  
2005-2014年新疆生产建设兵团第三师牛羊布鲁氏菌血清学检测与分析.....郑朝锋, 袁 超(22)

### ·试验研究·

- 鸡贫血病毒广州株VP3和VP1基因的克隆与序列分析.....沈海燕, 张建峰, 等(25)  
癸氧喹酯干混悬剂防治人工感染鸡球虫病的效果试验.....李美娣, 陈宝妮, 等(29)  
肌内注射后氟苯尼考在肉鸡体内生理药动学模型血流图模拟设计.....李亚男, 杨 帆, 等(32)  
鉴别猪流行性腹泻疫苗毒株与野毒株巢式PCR检测方法的建立及初步应用.....刘 琪, 冯晓声, 等(36)

### ·华南宠物园地·

- 透析管膀胱背侧韧带固定术在犬腹膜透析上的应用试验..郭魏彬, 蔡卓珂, 等(39)  
一例犬蠕形螨的诊断及治疗.....聂立欣(42)  
犬胚胎冷冻保存研究进展综述.....胡敏华, 倪庆纯, 等(44)

### ·经验交流·

- 视频监控对生猪质量流程化管理的促进作用.....张 鹏(48)  
杂交狼尾草及其在养鹅中的应用经验.....刘思扬, 林澄丰, 等(50)

### ·信息之窗·

- 2015“永顺杯”优秀论文评选启事.....(16)  
欢迎订阅本刊.....(19)  
生鲜家禽加工经营卫生规范.....(53)  
活禽市场建设指南.....(55)

# GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in march 1976(Bimonthly)

Apr.2015 Volume 40, Number 2 (Total No.180)

---

## Main Content

- Interpretation and Preliminary Outlook of the Research Focus in Veterinary Molecular Biology Based on the Co-word Analysis..... Yue Yang, Sun Jing,et al (1)
- Research Progress on Molecular Diagonosis of *Porcine Circovirus 2* ..... Yu Xinyou,Li Tianzhi,et al (5)
- Research Progress on Germplasm Resources and Nutrient Requirements of Special Wild Boars.....  
.....Li hualei, Wu gaoqi, et al (9)
- Current Situation and Trends of Pork Industry in the 1st Quarter,2015 ..... Yu Hua,Yuan Juanjuan,et al(11)
- Diagnosis of Calf *Mycoplasma Bovis* ..... Lu Shousheng, Sun Yanwei,et al(17)
- Immunization Programs Evaluation of Recombinant *Avian Influenza* H<sub>5</sub> Subtype Inactivated Vaccine for Laying Hens ..... Li Guixi, Yan Ping, et al(20)
- Serological Survey on Bovine and Ovine *Brucellosis* in the Third Division of Xinjiang Production and Construction Corps from 2005 to 2014 .....Zheng Chaofeng, Yuan Chao(22)
- Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of VP3 and VP1 Gene Sequences of Three CAV Isolates from Guangzhou..... Shen Haiyan, Zhang Jianfeng, et al(25)
- The Efficacy of Decoquinate for Prevention Against the Coccidiosis in Chickens .....  
.....Li Meidi, Chen Baoni,et al(29)
- Rheogram of a Physiologically Based Pharmacokinetics Model for Florfenicol in Broiler Chickens after Intramuscular Administration ..... Li Yanan, Yang Fan,et al(32)
- Nested RT-PCR Assay for Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus••Liu Qi, Feng Xiaosheng,et al(36)
- Application of Dialysis Tube Bladder Dorsal Ligament Syndesmopexy in Canine Peritoneal Dialysis.....  
..... Guo Weibin,Cai Zhuoke,et al(39)
- A Case of *Demodex Canis* .....Nie Lixin(42)
- Progress in Cryopreservation of Canine Embryos.....Hu Minhua, Ni Qingchun,et al(44)
- Application of Video Monitoring in Pork Processing .....Zhang Peng(48)
- Application of Cross-fertilized Chinese Pennisetum Herb in Goose Production.....  
.....Liu Siyang,Lin Chengfeng,et al(50)



Sponsored by:Guangdong Association of Animal Husbandry  
and Veterinary Medicine,Institute of Animal  
Science and Institute of Animal Health,  
Guangdong Academy of Agricultural Sciences.

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

Chief Editor:JIANG Zongyong

Vice Chief Editor;SUN Yanwei

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

Post Code: 510500

Tel:(020)37245052 37288167

Fax:(020)37245052

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

# 基于共词分析的兽医分子生物学领域 研究热点分析及初步展望

岳 阳<sup>1</sup>, 孙 静<sup>2</sup>, 石达友<sup>1\*</sup>, 姚德昌<sup>3</sup>

(1. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642; 2. 华南农业大学理学院, 广东 广州 510642;  
3. 同济大学污染控制与资源化研究国家重点实验室, 上海 200092)

**摘 要:** 在选择国内近十年兽医分子生物学研究领域的高频关键词基础上, 借助共词分析法, 利用 pajek 软件对 CNKI 收录的 1 242 篇论文的关键词进行共词分析和可视化展示, 探索兽医分子生物学领域的研究热点和进展, 将兽医分子生物学研究领域划分为六大区域: 病毒基因与蛋白质体系研究、克隆技术研究、病毒的序列分析研究、分子生物学与相关基础学科基础理论研究、高传染性病毒疫苗研究及新城疫病毒研究。再根据分析结果和相关研究文献, 对各个区域主要研究内容进行分析和探讨, 并针对我国分子生物学领域的研究提出一些展望。

**关键词:** 分子生物学; 共词分析; 热点研究; 知识图谱

中图分类号: S852

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)02-0001-04

## Interpretation and Preliminary Outlook of the Research Focus in Veterinary Molecular Biology Based on the Co-word Analysis

Yue Yang<sup>1</sup>, Sun Jing<sup>2</sup>, Shi Dayou<sup>1</sup>, Yao Dechang<sup>3</sup>

(1. South China Agricultural University College of Veterinary Medicine, Guang Zhou 510642, China; 2. South China Agricultural University College of Sciences, Guang Zhou 510642, China; State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

**Abstract:** The present research use pajek(a software)to select the words used in high frequency in the field of veterinary molecular biology in China to practice the co-word analysis based on 1242 papers in CNKI, giving a visualization presentation and illustrating the hits and progress in this field. Based on the co-word analysis,the veterinary molecular biology is divided into 6 aspects: viral gene and protein system, cloning technology, sequence analysis of the virus, basic research in molecular biology and related basic science, development of vaccine on highly contagious virus and research on Newcastle disease virus.Based on the results of co-word analysis and related research literature, various aspects of the field has been analysed and discussed and some prospects for the study of molecular biology in China are proposed.

**Key words:** Molecular biology,co-word analysis,research focus,knowledge map

二十世纪 50 年代中脱氧核糖核酸双螺旋结构的确定和蛋白质晶体结构的阐明,确立了蛋白质和核酸是所有生命活动的主要物质基础,开辟了分子水平上研究生命现象的新学科——分子生物学。生物的世代遗传由一种生物大分子核酸负责,而生命活动则主要依赖于另一类生物大分子蛋白质功能的实现。分子生物学已成为当代生物学的主流,分子生物学的兴起对自然科学和人类生活的全面影响,成为当代自然科学中的带头学科<sup>[1]</sup>。兽医人

士在从事分子生物学研究时如何把握学科研究方向,捕捉研究热点,是一个十分现实而重要的课题。

共词分析法是一种基于文献内容的研究方法,主要通过研究文献关键词之间的共现关系来分析该领域的研究内容与结构。其基本思路是:文章的关键词代表文章的主题内容,如果两个关键词出现在同一篇文章中,即发生共现关系,则认为这两个关键词代表的概念是属于同一研究范围的,其共现的次数越多,表明这两类关键词的联系

越紧密,越能代表该研究领域的主要概念、理论或方法。本文借助大型社会网络分析软件 pajek 绘制兽医分子生物学领域共现知识图谱,对我国近十年来该领域的研究热点和进展情况进行分析。

## 1 数据来源与研究方法

### 1.1 数据来源

本文抓取的数据来自于 CNKI 上 2004-2014 年收录的核心期刊上发表的文章。进入 CNKI 中国学术期刊网络出版总库,在“畜牧与动物医学”学科领域内进行关键词检索,检索到文献 1 475 篇。在 1 475 篇文献中,将重复发表文献、会议通知、影评、人物介绍、没有作者或关键词等非研究性文章 233 篇去除,共得到有效文献 1 242 篇,抽取其中的关键词共 3 774 个。

### 1.2 数据处理

为了突出反映研究热点,首先对出现的 3 774 个关键词进行词频统计,得出其中 205 个高频关键词(出现次数不少于 5),见表 1。这 205 个高频关键词很大程度上表征了兽医分子生物学领域近 10 年的研究范围。

表 1 兽医分子生物学近 10 年文献高频关键词(部分)

序号	关键字段	出现频次	序号	关键字段	出现频次
1	克隆	62	21	生物学特性	14
2	分子生物学	47	22	鉴定	14
3	新城疫病毒	33	23	猪繁殖与呼吸综合征病毒	14
4	序列分析	31	24	RT-PCR	14
5	鸡	30	25	病毒基因	13
6	猪	30	26	编码蛋白	13
7	分离	25	27	基因工程疫苗	13
8	禽流感病毒	24	28	PCR	13
9	结构蛋白	23	29	猪瘟病毒	13
10	病毒基因组	23	30	核衣壳蛋白	12
11	致病性	22	31	分子生物学特性	12
12	原核表达	20	32	基因组	12
13	口蹄疫病毒	19	33	非结构蛋白	12
14	DNA	18	34	基因表达	11
15	分离鉴定	18	35	核衣壳	11
16	基因组结构	18	36	犬细小病毒	11
17	基因克隆	17	37	诊断	11
18	表达	17	38	猪圆环病毒 2 型	11
19	分离株	16	39	奶牛	10
20	分子生物学诊断	15	40	F 基因	10

将 1 242 篇文献的关键词进行初步处理后编写程序,计算词频共现关系。具体思路如下:以所收集文献的关键词为顶点,两个关键词在文献中共现的次数为两个顶点之间边的权值。共得到 3 774 个不同节点,其中共有 3 636 个节点是孤立节点或小群体节点,与其他关键节点联系不密切,将其视为噪音去除后得到 138 个中心节点。将共现关系读入 pajek 软件后得到共现关系。

对关键词进一步筛选,发现“衣壳蛋白”、“核衣壳”、“核衣壳蛋白”、“衣壳”同属高频关键词,在知识图谱中关系也比较密切,但是其含义缺乏对热点研究的代表性,可以将其合并为衣壳蛋白。同理,可将“猪瘟病毒”、“瘟病毒属”、“黄病毒科”合并为黄病毒科,将“北京农业大学”、“美洲型”、“弓形虫”、“基因芯片”、“鸡”、“猪囊尾蚴”、“肝片吸虫”等不具有代表性的分支删除,得到图 1 的结果。

## 2 结果与分析

从图 1 中可以看出,在关键节点所构成的空间中,可以区分出六个核心区域,分别是病毒基因与蛋白质体系研究、克隆技术研究、病毒的序列分析研究、分子生物学与相关基础学科基础理论研究、高传染性病毒疫苗研究和新城疫病毒研究。下面分别对这 6 个研究区域进行解读。

### 2.1 病毒基因与蛋白质体系研究

基因所携带的遗传信息,经转录、翻译等步骤指导合成具有特定氨基酸顺序的蛋白质,而蛋白质对基因表达起调控作用。由图 1 很直观地发现蛋白质和基因之间有着千丝万缕的联系,蛋白质与基因错综复杂的关系一直是一大热点,在这一大热点中又细分出许多细小的研究热点。具体如下所述:

**2.1.1 病毒的结构基因组学研究** 领域关键词有基因组结构、病毒基因、病毒基因组、基因工程疫苗。

随着基因组计划完成和基因组数据库的日益完善,关于病毒基因组结构的研究也日趋成为国内外兽医学者一大研究热点。病毒基因组结构研究不仅解释病毒基因乃至其致病性的奥秘,也为制备新型的基因工程疫苗提供依据。基因组计划的圆满完成和 cDNA 文库的完善等为病毒结构基因组研究提供了基础,其次表达、纯化及结构测定等技术的发展与设备的改进也为这一过程自动化提供了良好的条件。由此可见,在各项基础设施和研究基础日趋完备的前提下,将结构基因组学运用到病毒研究中具有重大意义,因此在日后的兽

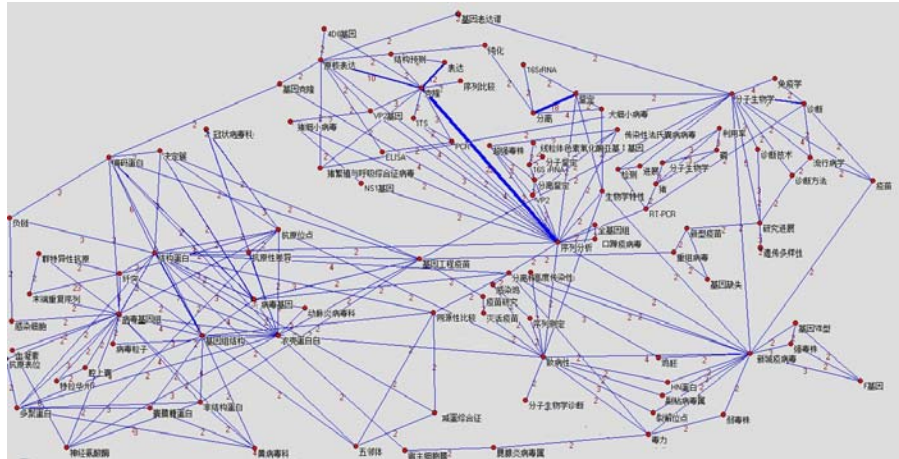


图 1 pajek 知识地图

医分子生物学领域研究中, 关于病毒的结构基因组学研究继续成为热点是无疑的。

**2.1.2 病毒的蛋白质组学研究** 领域关键词有病毒基因、病毒基因组、编码蛋白、核衣壳蛋白、结构蛋白、非结构蛋白、囊膜蛋白。

传统的对单个蛋白质进行研究的方式已无法满足后基因组时代的要求。蛋白质组研究的开展不仅是生命科学研究进入后基因组时代的里程碑, 也是后基因组时代生命科学研究的核心内容之一<sup>[1,2]</sup>。而今随着关于病毒基因组学的发展, 将蛋白质组运用到病毒的研究也是一重要内容。随着国内外学者在兽医分子生物学方面的研究不断深入, 在结构蛋白、非结构蛋白同病毒关系的研究方面取得了重要进展。目前研究发现, 结构蛋白可构成病毒粒子的衣壳粒, 与病毒的致病性和宿主选择等密切相关<sup>[2]</sup>; 而非结构蛋白作为病毒粒子在宿主内繁殖时合成的早期蛋白对晚期结构蛋白合成的调控、病毒的核酸复制过程中起着重要的作用<sup>[3]</sup>。通过研究病毒的蛋白质体系揭示病毒的致病机理和新型疫苗的开发具有十分重要的意义。

**2.1.3 对病毒表面抗原的研究** 领域关键词有抗原位点、抗原表位、血清型、群特异性抗原、抗原性差异、决定簇。

关于表面抗原的研究对相关病毒的研究具有重大意义。目前学者们通过研究病毒的表面抗原不仅将其用于不同病毒的分类, 还将其用于相同病毒不同血清型的分类, 更甚至用于确切的临床分型。与此同时, 研究病毒表面抗原在促进病毒发病机理的研究前提下, 也为疫苗研制提供依据。

综上所述, 病毒基因与蛋白质体系研究将从多个角度多个方向推动兽医工作者对致病病毒的研究, 从而达到了解其致病性并制定合理的预防和治疗方案。因此, 病毒基因与蛋白质体系研究在兽医分子生物学领域研究是一大热点。

## 2.2 克隆技术研究

领域关键词: 克隆、原核表达、ELISA、PCR、序列分析、序列比较。

随着科学技术的进步和分子生物学的发展, 对生物的克隆已经不是什么天方夜谭了。在兽医领域的分子生物学研究中, 克隆技术也占据一席之地。克隆是重组 DNA 技术的核心部分, 基因的序列分析手段为克隆提供了依据, 而 PCR 等技术成为基因克隆重要手段。克隆的基因通过原核表达来研究其表现型及作用; ELISA 也是其一重要检测手段。基因克隆技术更是广泛地应用于兽医研究及生产工作中: 研究基因或其片段在生物体中作用、研发生产优良品种转基因动物、生物性制造药物原料、保护濒危的动物物种等等。由此可见克隆技术在当今社会发展中举足轻重, 所以克隆技术作为分子生物学的一项核心技术, 将继续在兽医领域分子生物学研究上, 不仅过去十年是热点, 未来的几十年内依然是热点。

## 2.3 病毒的序列分析研究

领域关键词: 序列分析、全基因组、口蹄疫病毒、新城疫病毒、猪细小病毒、鸡传染性法氏囊病毒、猪繁殖与呼吸综合征病毒、强毒株、vp2、vp3 基因、RT-PCR、PCR、生物学特性。

随着分子生物学技术的发展, 序列分析技术业

已成熟,并反过来推动分子生物学领域的发展。序列分析不仅在克隆技术中得到重要应用,且已成为关于病毒研究的一种重要手段,并成为近10年来兽医领域分子生物学研究中的另一大热点。而PCR技术则是对病毒序列分析研究的重要技术。通过图1我们可以清楚地看到,病毒序列分析的研究重点则在新城疫、猪细小病毒等在生产中经常出现的高致病性病毒上。由此可见,作为致病病毒研究重要依托手段的病毒序列分析依然会成为未来的研究热点,将在病毒研究方向上继续发挥重要作用。

#### 2.4 分子生物学与相关基础学科基础理论研究

领域关键词:分子生物学、疫苗、诊断、诊断技术、诊断方法、检测、鉴定、进展、研究进展、流行病学、免疫学。

纵观学术核心刊物,以及浏览专业网站,当前我国兽医领域分子生物学与相关基础学科基础理论研究,主要集中在对疾病的鉴定、诊断、检测以及疫苗研发上。在兽医领域,随着分子生物学不断发展,其与免疫学、流行病学的联系日益紧密,并在疾病鉴定、诊断、检测研究上达到互相融通的地步。由此可见,兽医领域分子生物学科的研究内容不断与时俱进,影响范围广泛,发展前景广阔。

#### 2.5 病毒疫苗研究

领域关键词:致病性、高度传染性、毒力、病毒基因、分离株、弱毒株、序列测定、序列分析、裂解位点、重组病毒、疫苗研究、灭活疫苗、新型疫苗。

通过高传染性病毒致病性研究来研发有效的疫苗一直是兽医领域分子生物学的一大热点。通过对高度传染性病毒毒株进行分离,研究病毒致病性及其毒力,进而对相关疫苗进行研发。传统的疫苗研发更多的是灭活苗、减毒活疫苗,但两者均存在着免疫效果不确实、非特异性反应强、保护期短等缺点,新型疫苗的研制越来越多地受到关注。通过对致病病毒基因序列测定分析,采用现代生物学技术依病毒基因特点制造出新型疫苗。疫苗的研发一直是分子生物学研究的一大热点,而目前新型疫苗的出现更引起了国内外学者的重视。

#### 2.6 新城疫病毒研究

领域关键词:新城疫病毒、生物学特性、F基因、基因VII型、强毒株、弱毒株、HN蛋白、裂解位点。

新城疫是一种严重威胁世界养禽业的重大疫病,而新城疫病毒在兽医领域分子生物学的研究更是重中之重。目前通过对新城疫的强毒株和弱毒株

研究,发现其变异与F基因和HN蛋白有直接关系,使得新的基因型不断出现,而决定其毒力强弱主要是F基因<sup>[4-5]</sup>。新城疫尚无有效治疗药物,只能依靠严格消毒、隔离和用灭活苗和活苗疫苗接种来预防。由此可见关于新城疫的研究依然是兽医工作者的一大难关。将分子生物学运用在研究中更好地剖析新城疫病毒将继续成为热点,关于F基因和HN蛋白的研究也将是研究者关于新城疫的一大突破口。

### 3 结论与展望

本文采用共词分析法,利于聚类分析和图谱分析,对2004-2014这10年间有关兽医分子生物学领域CNKI收录的1242篇论文进行热点分析。从分析结果来看,主要围绕理论研究和临床研究两条主线交织展开。具体领域包括:病毒基因与蛋白质体系、克隆技术、病毒的序列分析、分子生物学与相关基础学科基础理论研究、高传染性病毒疫苗研究、新城疫病毒研究等6大领域。

综上所述,分子生物学作为一门新兴学科,在兽医研究工作中占据极其重要地位。我们可以清楚地发现,关于兽医分子生物学领域已有从关于基因、蛋白质等单纯理论体系研究向兽医产业生产、疾病防治、疫苗研发等贴近生产、生活方面发展。本文通过基于关键词共现分析,剖析行业研究领域的热点与演进态势,为全面把握兽医分子生物学领域研究现状、学术热点及其发展趋势,以及为探究兽医分子生物学领域的科学规律提供参考。

#### 参考文献:

- [1] 曾嵘,夏其昌.蛋白质组学研究进展与趋势[M].北京:中国科学院,2002:166-169.
- [2] Bloom M E, Martin D A, Qie L L, et al. Expression of Aleutian Mink Disease Parvovirus Capsid Protein in Defined Segments: Localization of Immunoreactive Sites and Neutralizing Epitopes to Specific Regions[J]. J. Virol, 1997, 71(2):705-714.
- [3] Storgard T, Christensen J, Aasted B, et al. Cis-acting Sequences in the Aleutian Mink Disease Parvovirus Late Promoter Important for Transcription: Comparison to the Canine Parvovirus and Minute Virus of Mice[J]. J. Virol, 1993, 67(4):1887-1895.
- [4] 殷震,刘景华.动物病毒学[M].第2版.北京:科学技术出版社,1997:739-741.
- [5] Collinsms, Strong I, Alexanderdj. Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease virus termed "pigeon PMV21 viruses" [J]. Archives of Virology, 1994, 34(324):403-411.

# 猪圆环病毒 2 型分子生物学检测方法的研究进展

于新友<sup>1</sup>, 李天芝<sup>1</sup>, 王金良<sup>2</sup>, 李峰<sup>2</sup>, 沈志强<sup>1,2</sup>

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

**摘要:** 本文综述了猪圆环病毒 2 型分子生物学检测方法, 主要包括常规 PCR、套式 PCR、多重 PCR、PCR-RFLP、荧光定量 PCR 和环介导等温扩增等 6 种方法, 对猪圆环病毒 2 型的监测与相关疾病的诊断有一定的参考价值。

**关键词:** 猪圆环病毒 2 型; 分子生物学; 检测方法  
**中图分类号:** S852.659.2 **文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2015)02-0005-04

猪圆环病毒依据其致病性和基因组差异分为无致病性的猪圆环病毒 1 型(Porcine Circovirus 1, PCV1) 和有致病性的猪圆环病毒 2 型(Porcine Circovirus 2, PCV2)。PCV2 是引起仔猪断奶后多系统衰竭综合征 (post-weaning multisystem wasting syndrome, PMWS)<sup>[1]</sup> 的主要病原, 此外, PCV2 还与猪呼吸道综合征 (porcine respiratory disease complex, PRDC)、猪皮炎与肾炎综合征 (porcine dermatitis and nephropathy syndrome, PDNS) 和繁殖障碍以及肠炎等疾病有关。它是一种免疫抑制性疾病, 给世界养猪业造成严重的经济损失。2000 年, 我国首次报道了 PCV2 感染, 目前, PCV2 感染在我国猪群中普遍存在。当猪感染 PCV2 与其它病原时, 临床上表现为不同的综合征。

PCV2 的传统检测方法有病毒分离、免疫荧光法和免疫组化法、ELISA 等。这些方法均有很多缺点: 如耗时长、检测敏感性较低及准确性差等, 尤其不能检测亚临床感染的猪。分子生物学检测方法以检测快速、灵敏度高、特异性好等特点已经广泛应用于细菌和病毒病的检测, 并展示良好的应用前景。目前实验室用于 PCV2 检测的分子生物学方法主要有 6 种, 分别是常规 PCR 方法、套式 PCR 方法、多重 PCR 方法、PCR-RFLP 方法、荧光定量 PCR 方法和环介导等温扩增方法等。笔者就这些方法的研究进展进行综述, 为 PCV2 的监测与相关

疾病的诊断提供参考。

## 1 常规 PCR 方法

PCR 方法是一种分子生物学方法, 根据目的基因序列设计引物, 采用特定的试剂和仪器, 体外大量扩增 DNA 片段, 达到显示特定病原核酸存在的目的。它是一种简单、快速的检测方法。

谢俊良等建立了检测 PCV2 的 PCR 方法, 扩增出特异性条带的最低 DNA 含量为  $10^{-9}$  ng/mL (约 100 个 PCV2 病毒)。用该方法对陕西和甘肃的 103 份疑似 PCV2 感染猪病料进行检测, 结果阳性病料 68 份, 阳性率为 66%。唐万寿等<sup>[2]</sup>参照国内外已发表的 PCV2 ORF1 的基因序列及其相关的 PCR 检测方法设计 1 对引物, 扩增目的片段为 493 bp。通过对 PCR 检测方法的特异性、敏感性、重复性试验, 建立了一种 PCV2 的 PCR 检测方法。应用此方法对临床样品进行了检测, 阳性检出率达 51.18%。蒋成砚等<sup>[3]</sup>根据 GenBank 中 PCV2 的序列设计 1 对特异性引物, 用 PCR 方法扩增 PCV2 基因保守区序列, 并对 PCR 扩增程序进行优化。结果表明: 该法具有快速、敏感、特异等优点, 可用于 PCV2 的检测和流行病学调查等。对 178 份临床病料进行检测, 结果有 83 份阳性样品, 阳性率为 46.6%。李英等<sup>[4]</sup>采用针对 PCV2 ORF2 设计的特异性引物, 对某猪场出现的 PMWS 典型症状的病猪材料进行 PCR 检测, 从 10 头发病猪的组织样品中检测到 PCV2 阳性 7 头。

收稿日期: 2014-12-11

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系生猪产业创新团队项目 (SDAIT-06-011-14)

## 2 套式 PCR 方法

套式 PCR 方法是设计内外 2 种引物, 同时扩增 2 次。该方法能节省模板, 且敏感性较高。吕艳丽等<sup>[5]</sup>设计合成了 PCV2 特异性引物和 PCV1 通用引物, 建立了能够区分 PCV1 和 PCV2 的检测方法。Kim 等<sup>[6]</sup>建立了能同时检测 PCV1 和 PCV2 的多重套式 PCR 方法, 并与常规的多重 PCR 相比较, 分别对 60 份样品进行检测, 结果传统的多重 PCR 仅检测出 18 份 (30%) PCV2 阳性, 而新建立的方法则检测出 30 份 (50%) 阳性, 其中 18 份只是 PCV2 阳性, 1 份只是 PCV1 阳性, 20 份是 PCV1 和 PCV2 双阳性。王贵平等建立了 PCV2 套式 PCR 检测方法, 用序列分析、酶切等对该法进行了鉴定。采用该法对华南地区采自 287 个猪场的 1 560 份样品进行检测, 检出阳性样品 983 份, 阳性率为 63%。赵浩军等<sup>[7]</sup>参照已经发表的 PCV2 基因序列, 设计 2 对特异性引物, 建立了 PCV2 套式 PCR 检测方法, 外引物扩增的目的基因大小是 647 bp, 内引物扩增的目的基因大小是 219 bp, 外引物检测的灵敏度为  $10^{-5}$  mg/mL DNA 的量。该法的检测灵敏度比常规 PCR 高 1 000 倍。对河北、山东等 10 省的 899 份临床病料检测结果显示, 阳性病料 329 份, 阳性率为 36.6%。

## 3 多重 PCR 方法

多重 PCR 是一种特殊的 PCR 技术。它在同一 PCR 体系中, 加入多对引物, 同时检测 2 种或 2 种以上的病毒 DNA。它具有快速、灵敏度高、效率高、特异性强等优点而在临床病料的检测上被大量应用。

王林等<sup>[8]</sup>参考 GenBank 上已发表的猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) Nsp2 基因序列和 PCV2 ORF1 基因序列, 分别设计并合成了可用于检测 PRRSV 和 PCV2 的 2 对引物, 扩增目的片段大小分别为 421 bp 和 714 bp。在建立了用于检测 PRRSV 和 PCV2 的单项 PCR 检测方法并优化单项 PCR 条件的基础上, 建立了针对 2 种病毒的二重 PCR 检测方法。通过检测 143 份临床病料对二重 PCR 方法和单项 PCR/RT-PCR 方法进行了对比验证。结果显示, 两者的总符合率在 92.6% 以上, 表明该二重 PCR 检测方法可以用于临床病料的检测。胡慧等<sup>[9]</sup>设计合成了 3 对特异引物, 分别建立了猪伪狂犬病病毒 (PRV), 猪细小病毒 (PPV) 和 PCV2 的单项 PCR 诊断方法; 通过对扩增条件的筛选, 建立了

PRV, PPV, PCV2 的复合 PCR 诊断方法。利用 1 次 PCR 反应, 即可同时扩增 PRV 的 355 bp, PPV 的 195 bp 和 PCV2 487 bp 的特异性片段, 而猪瘟病毒 (CSFV)、PRRSV、PK15 细胞扩增结果均为阴性。对 PRV、PPV、PCV2 的最低检出量分别为 100 fg、1 pg 和 10 pg 的 DNA。胡军勇等<sup>[10]</sup>建立了一种针对 PCV2 和猪肺炎支原体 (Mhp) 的双重 PCR 检测方法。对 PRV、PPV、沙门氏菌、大肠杆菌、猪链球菌、副猪嗜血杆菌、巴氏杆菌、支气管败血波氏杆菌基因组模板进行 PCR 特异性检测, 没有任何非特异性扩增。该方法能够检测到的 PCV2 和 Mhp 模板的最低浓度分别为 130 和 180 fg/mL。王隆柏等<sup>[11]</sup>建立猪群常见 CSFV、PRRSV、PRV、PCV2 和 PPV 的 5 种疾病的多重 PCR 诊断方法。该法特异性好, 对猪流感病毒 (SIV)、日本乙型脑炎病毒 (JEV)、猪链球菌 2 型 (SS2)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 核酸的检测结果为阴性。能检测到的 CSFV、PRRSV、PRV、PCV2 和 PPV 核酸浓度分别为 220、1.6、72、400 和 370 pg。付朋飞等<sup>[12]</sup>建立了能够同时检测猪博卡病毒 (PBoV) 和 PCV2 的双重 PCR 方法。该方法可以同时扩增出 PBoV 的 209 bp 和 PCV2 的 476 bp 特异性片段, 而对 PRV、PPV、沙门氏菌、大肠埃希氏菌 DNA 模板扩增结果均为阴性。对 PBoV 和 PCV2 的最低检出量均为 100 拷贝 /  $\mu$ L。单重 PCR 与双重 PCR 检测符合率为 100%, 结果表明, 所建立的双重 PCR 特异性强、重复性好、敏感性高, 为 PBoV 和 PCV2 的快速检测提供了有效的技术支持。

## 4 PCR-RFLP 方法

PCR-RFLP 方法通过设计保守引物, PCR 扩增这些基因序列片段, 然后用限制性内切酶酶切, 再通过凝胶电泳呈现不同的条带, 从而检测 PCV2 病毒。也可以通过酶切片段的差异来鉴定不同的基因型。

Hamel 等根据 GenBank 登录的 PCV2 全基因序列设计引物, 建立了检测 PCV2 的 PCR-RFLP 检测方法。该法对 PCV1 和 PCV2 PCR 均能扩增出 438 bp 的目的基因, 再通过对 PCR 产物的 RFLP 酶切分析, 即可鉴定出 PCV2。Fenaux 等<sup>[13]</sup>通过 PCR 方法扩增 PCV2 目的基因, 再利用限制性酶 NcoI 对 PCR 产物酶切鉴定。电泳结果显示: PCV2 的 PCR 产物可被切成 168 bp 和 75 bp 两个片段, 而 PCV1 的 PCR 产物则仍显示为 243 bp 的片段,



不能被切开,从而可以区分 PCV1 和 PCV2。王新等建立了 PCV2 PCR-RFLP 检测方法。通过对 PK-15 细胞、IBRS-2 细胞、PMWS 和 PDNS 疑似病料进行了 PCV2 检测,结果从 PMWS 病料和 PDNS 病料中均检测到 PCV2。

## 5 荧光定量 PCR 方法

荧光定量 PCR 技术是指采用 SYBR Green I 荧光染料或荧光探针通过连续监测荧光信号强弱的变化来测定特异性产物的量,不需要分离 PCR 产物,即能准确定量起始模板数。与常规 PCR 相比,它具有特异性更强、有效解决 PCR 污染问题、自动化程度高等优点。

张丽丽等<sup>[14]</sup>建立了一种检测 PCV2 TaqMan 荧光定量 PCR。对该方法进行特异性、敏感性和重复性试验,结果显示,该方法可特异地检测 PCV2,而与 PCV1 等不发生交叉反应,检测灵敏度可达  $1 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ,比常规 PCR 高 100 倍。3 次重复检测的变异系数均小于 5%。用建立的荧光定量 PCR 和常规 PCR 分别对 94 份临床样品进行检测,荧光定量 PCR 的阳性检出率为 51.06%,而常规 PCR 的阳性检出率仅为 38.30%。郑敏等建立了 PCV2 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法,对临床确诊 PCV2 的病料和 30 份临床疑似感染 PCV2 的病料进行检测。该法检测灵敏度可达  $4.5 \times 10^3$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ,比常规 PCR 检测方法高 10 倍。对 30 份疑似感染 PCV2 病料的检测表明,TaqMan 荧光定量 PCR 和普通 PCR 检测阳性率分别为 66.7%和 56.7%,两者符合率 90%。对 PRV、CSFV、PRRSV 的检测结果均为阴性。曾思遥等<sup>[15]</sup>建立了 PCV2 的 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法。该法特异性强,对 PRV、PRRSV、CSFV 等猪常见病原的检测结果均为阴性。与普通 PCR 方法相比,其敏感性高出 100 倍,可达 100 拷贝/ $\mu\text{L}$ 。董林等<sup>[16]</sup>建立了检测 PCV2 的特异性荧光定量 PCR 方法。该法 Ct 值与标准品模板在  $3.21 \times 10^0 \sim 4.16 \times 10^8$  拷贝/ $\mu\text{L}$  范围内呈良好的线性关系,相关系数为 0.9988,斜率为 -3.286。该方法与 PCV1、PRV、PRRSV、PPV、CSFV、大肠杆菌基因组均无交叉反应。敏感性为  $3.21 \times 10^0$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ,比常规 PCR 高 1 000 倍。批间和批内重复试验变异系数均小于 3.00%。对临床采集的 PCV2 疑似阳性病料检测结果表明,所建立的荧光定量 PCR 阳性检测率为 58.94%,显著高于普通 PCR 检测率。

李鹏等<sup>[17]</sup>根据 PCV2 ORF1 设计 1 对特异性引物,建立了 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法。该法灵敏度可达  $10 \sim 100$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ,比常规 PCR 检测方法灵敏度高 10 倍,而与 PRRSV、PRV、CSFV 和 PPV 没有交叉反应。与常规 PCR 相比,该法具有较高的灵敏度和特异性。敖艳华等<sup>[18]</sup>建立了检测 PCV2 的荧光定量 PCR 方法。该法检测灵敏度可达  $1.0 \times 10^2$  拷贝/ $\mu\text{L}$ ,线性范围为  $10^1 \sim 10^9$ ,达 9 个数量级,并且具有很好的特异性。分别测定 3 种不同浓度即  $1.0 \times 10^8$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 、 $1.0 \times 10^6$  拷贝/ $\mu\text{L}$ 、 $1.0 \times 10^4$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的标准品的 Ct 值,测得的 Ct 值分别为 12.77、19.72 和 26.89;变异系数分别为 0.25%、0.10%和 0.13%,均小于 1%。

## 6 环介导等温扩增技术

2000 年,日本学者 Notomi 等发明了一种环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)技术,扩增反应在恒定的温度下进行,反应结束后即可直观判断扩增结果。该法操作简单、检测速度快、敏感性好、特异性高,尤其适合基层部门现场应用。

Chen 等建立了一种快速、简单的 PCV2 LAMP 检测方法,应用针对 PCV2 Cap 基因的 4 对特异性引物在  $64^\circ\text{C}$  60min 内可以对 PCV2 进行准确的检测,比普通 PCR 灵敏度高,且与 PCV1、PRV、PPV 以及 PRRSV 均无交叉性,体现了较好的特异性。何逸民等<sup>[19]</sup>建立了针对 PCV2 Cap 基因的 LAMP 检测方法,在  $63^\circ\text{C}$  1 h 内能够成功地检测 PCV2 基因。其检测敏感性达到 10 个拷贝的 DNA 分子。建立的 PCV2 LAMP 检测方法 with PCR 方法符合率为 94%。申世川等<sup>[20]</sup>建立了基于 ORF2 基因的 PCV2 LAMP 检测方法,在 BstDNA 聚合酶的作用下对靶序列进行等温核酸扩增。所建立方法在  $61^\circ\text{C}$  反应 1 h 能够成功的检测出 PCV2 基因组 DNA,结果可经电泳检测及肉眼观察。敏感性和特异性试验表明,检测敏感度可以达到 0.5 pg 的 DNA 分子。所建立 LAMP 方法的阳性检出率与国标 PCR 的阳性检出率符合率为 100%。余波等根据 GenBank 中的 PCV2 ORF2 基因序列,设计合成 2 对引物,通过对 LAMP 扩增条件的优化,敏感性、特异性试验,成功建立了 PCV2 LAMP 诊断方法。敏感性结果显示,建立的 LAMP 诊断方法最低核酸检测量为 0.30 pg/L,而 PCR 诊断方法最低核酸检测量为 30 pg/L。特异性

结果显示, PCV1、PPV、PRV、PRRSV 和 CSFV 均无扩增条带。通过对 95 份样本的检测结果表明, 该法与 PCR 检测结果符合率为 95.8%。整个扩增反应可在 30 min 内完成, 结果肉眼可见。杨泽晓等<sup>[21]</sup>建立了快速检测 PCV2 的 LAMP 方法, 在 64°C 45 min 条件下可扩增出大于 1 345 bp 的特异性梯状 DNA 条带, 检测限度可达 10 拷贝 /  $\mu$ L。用它对 PCV1、PPV、PRV、PRRSV 和 CSFV 的核酸进行扩增, 但结果均为阴性。用建立的 LAMP 方法进行的样品检测结果显示, 6 株受检 PCV2 毒株的检出率为 100%, 60 份临床样品 PCV2 的阳性率为 20% (12/60), 与 PCR 方法平行检测的结果相一致。

## 7 小结与展望

国内外学者进行了大量研究, 相继研制出很多 PCV2 的分子生物学检测方法, 但这些方法各有利弊。常规 PCR 方法、套式 PCR 方法和多重 PCR 方法具有特异性强、敏感性高、检出率高等特点, 但不能准确地定量、容易污染, 且敏感性有限, 很难对处于亚临床感染状态的病猪进行早期诊断。荧光定量 PCR 技术弥补了常规 PCR 方法的缺点, 但由于需要价格昂贵的仪器与试剂, 限制了其在基层兽医部门的广泛应用。LAMP 方法检测快速、简便, 适合在基层兽医和养殖场进行推广使用, 对指导 PCV2 的防控具有重要的意义。但 LAMP 的反应产物开盖后, 易形成气溶胶, 污染实验室。如果试剂、移液器、吸头、超净台等受到污染, 将会出现假阳性。因此, 单独使用任何一种方法都很难解决所有的问题, 不同的单位可根据具体的条件来选择合适的诊断方法。相信随着分子生物学的发展, 在不久的将来会研制出更加有效的 PCV2 检测方法, 为 PCV2 相关疾病的防控提供技术保障。

## 参考文献:

[1] Clark E G. Post weaning multisystemic wasting syndrome[J]. Proceeding of the American Association of Swine Practitioners, 1997, 28: 499-501.  
 [2] 唐万寿, 王学艳, 王晶钰, 等. 猪圆环病毒 2 型 PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 动物医学进展, 2008, 29(6): 54-57.  
 [3] 蒋成砚, 谢昆, 田婷. 猪圆环病毒 2 型 PCR 检测方法的建立及其应用[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012(12): 83-85.  
 [4] 李英. 猪圆环病毒 2 型感染的 PCR 检测[J]. 中国动物检疫, 2012, 29(9): 52-53.

[5] 吕艳丽, 杨汉春, 郭鑫, 等. 猪圆环病毒 2 型分离株基因组序列测定与分析[J]. 中国预防兽医学报, 2002, 24 (增刊): 63-66.  
 [6] Kim J, Hand U, Choic, et al. Differentiation of porcine circovirus PCV-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction[J]. J Virol Methods, 2001, 98(1): 25-31.  
 [7] 赵浩军, 范伟兴, 姜平, 等. 应用套式 PCR 方法检测猪圆环病毒 2 型[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(12): 40-42.  
 [8] 王林, 吴发兴, 吴美芹, 等. PRRSV 和 PCV-2 二重 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. 动物医学进展, 2010, 31(6): 1-5.  
 [9] 胡慧, 贾艳艳, 杨春华, 等. 多重 PCR 检测猪伪狂犬病毒、猪细小病毒和猪圆环病毒 2 型的研究[J]. 河南农业大学学报, 2010, 44(4): 421-424.  
 [10] 胡军勇, 张倩, 王丹丹, 等. 猪肺炎支原体和猪圆环病毒 2 型双重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(11): 1760-1766.  
 [11] 王隆柏, 张志刚, 苏永裕, 等. 5 种猪病多重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(2): 21-25.  
 [12] 付朋飞, 乔涵, 潘鑫龙, 等. 猪博卡病毒和猪圆环病毒 2 型双重 PCR 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2014, 36(9): 708-711.  
 [13] Fenaux M, Halbur P G, Gill M, et al. Genetic characterization of type 2 porcine circovirus (PCV-2) from pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome in different geographic regions of North America and development of a differential PCR-restriction fragment length polymorphism assay to detect and differentiate between infections with PCV-1 and PCV-2[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(7): 2494-2503.  
 [14] 张丽丽, 张志, 任夫波, 等. 猪圆环病毒 2 型 TaqMan 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医科学, 2010, 40(10): 1048-1051.  
 [15] 曾思遥, 张淑琼, 余绍华, 等. 猪圆环病毒 2 型 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(6): 41-46.  
 [16] 董林, 王艳萍, 魏凤, 等. 猪圆环病毒 2 型 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(10): 1509-1526.  
 [17] 李鹏, 郭军庆, 金前跃, 等. 猪圆环病毒 2 型荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 华北农学报, 2014, 29(2): 66-70.  
 [18] 敖艳华, 穆光慧, 郭沈涛, 等. 荧光定量 PCR 检测 2 型猪圆环病毒方法的建立[J]. 广东畜牧兽医科技, 2014, 39(1): 28-31.  
 [19] 何逸民, 邹国秋, 张得玉, 等. 猪圆环病毒 2 型环介导等温扩增(LAMP)检测方法的研究[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(12): 7-10.  
 [20] 申世川, 王一成, 袁秀芳, 等. 猪圆环病毒 2 型 LAMP 检测方法的建立[J]. 浙江农业学报, 2013, 25(1): 21-26.  
 [21] 杨泽晓, 侯义宏, 曾辉, 等. 猪圆环病毒 2 型 LAMP 检测方法的建立与应用[J]. 中国兽医科学, 2014, 44(2): 152-158.

# 特种野猪种质特性及营养需求研究简况

李华磊<sup>1</sup>, 吴高奇<sup>1</sup>, 王 华<sup>2</sup>

(1. 铜仁市畜牧技术推广站, 贵州 铜仁 554300; 2. 铜仁市思南县畜牧技术推广站, 贵州 铜仁 565100)

**摘要:** 特种野猪是野猪和家猪杂交, 经选育驯化的一类野猪。本文就特种野猪的来源、外貌、生长发育、胴体性能、肉品质和营养需要等方面进行了简要介绍。

**关键词:** 特种野猪; 种质特性; 营养需要

**中图分类号:** S858.99

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2015)02-0009-02

特种野猪是家猪和野猪杂交培育的后代。近年来, 随着人们消费习惯和营养观念的转变, 特种野猪以其瘦肉率高、肉味鲜美、耐粗饲、抗病力强等特点, 日益受到人们的青睐。同时由于野猪和家猪具有遗传多样性, 特种野猪存在较大的变异特性<sup>[1]</sup>, 被不少学者用于研究识别和定位猪的胴体和肉质特性相关的数量性状基因位点的模型动物<sup>[2,3]</sup>。正由于特种野猪区别于家猪、野猪的独特优势和经济价值, 市场前景好, 发展势头强劲。

本文主要综述国内外研究者对特种野猪种质特性和营养需要方面的研究进展, 以期为开展特种野猪资源利用、品种选育和饲料营养提供依据, 为特种野猪产业链延伸提供理论参考。

## 1 特种野猪种质特性

### 1.1 来源

家猪历史可追溯到约 9 000 年前, 可能由欧洲和亚洲野猪驯化而来<sup>[4]</sup>。Larson 等<sup>[5]</sup>认为欧亚大陆存有几个家猪驯化中心, 现代家猪主要源于欧洲野猪, 而非近东野猪。相较于家猪, 野猪存在较高胴体脂肪和较大的眼肌面积, 肉色偏暗, 肉质较硬<sup>[6]</sup>。由于野猪缓慢的生长速度, 养殖户试图用野猪与家猪杂交生产特种野猪, 为人类提供新型的肉类蛋白。

在生产中, 特种野猪选育基本采用正交模式, 以纯种野猪做父本, 家猪作母本杂交。具体杂交模式见图 1 所示。特种野猪 F1 代含 50% 野猪血统, 特种野猪 F2 代含 75% 野猪血统, 特种野猪 F3 代含 82.5% 野猪血统<sup>[7]</sup>。

### 1.2 外貌特征

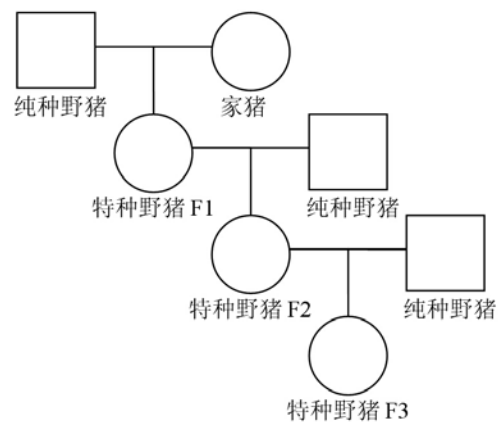


图 1 特种野猪选育模式<sup>[7]</sup>

特种野猪是人工驯化改良后的野猪品种, 生物特性介于野猪和家猪之间, 与含野猪血缘比例多少相关。相较于家猪, 特种野猪耳小、尾短、嘴较尖、颈部鬃毛长, 比纯种野猪温顺。特种野猪仔猪出生时身上有纵向深棕褐色带状条纹, 长大后体呈黑色或黄褐色。公猪肩宽阔; 胸深、宽窄适中; 背腰平直, 胸腹紧凑; 尻部稍倾斜; 腿部肌肉特别发达; 四肢结实; 体质健壮。母猪肩胛结构良好, 倾斜度适中, 肌肉发达, 比公猪颈略细长。

### 1.3 生长性能

特种野猪生产速度快于纯种野猪, 但比三元杂交猪慢。张树敏等<sup>[8]</sup>研究发现特种野猪的生长速度与野猪血统比例有关, F1 代特种野猪比 F2 代特种野猪生长速度快, 这可能归因于野猪遗传基因占优势的特种野猪消化器官发育与野猪相近<sup>[9]</sup>。特

收稿日期: 2015-01-28

基金项目: 贵州省科技支撑计划项目资金资助(黔科合 NY[2013]3070 号)

种野猪消化道容积较小且采食量不高,因而生长率低<sup>[9]</sup>。李万贵等<sup>[10]</sup>利用 Gompertz 模型拟合特种野猪 0-9 月龄的生长曲线,发现饲养阶段可分为 0-3 月龄、4-8 月龄及 9 月龄至屠宰 3 个阶段。其中,特种野猪的体重和体高以 3 月龄增长速度最快<sup>[11]</sup>。总之,特种野猪生长速度异于其他猪种,需特别注意营养供给,提高采食量,充分发挥特种野猪的生产潜能。

#### 1.4 胴体性能和肌肉品质

特种野猪具有较高的体重,且性情温顺,适合圈养<sup>[1]</sup>。陈迪等<sup>[12]</sup>研究了我国不同野猪血统的长白山特种野猪,发现其屠宰率为 69%~74%,瘦肉率为 47%~55%。吴高奇等<sup>[13]</sup>对含 75%野猪血统的特种野猪的屠宰性能进行了研究,发现特种野猪屠宰率和胴体瘦肉率分为 70.42%和 67%。因此,F3 野猪屠宰率和瘦肉率均高于我国一般地方品种,可作为商品猪育肥。

Müller 等<sup>[1]</sup>用野猪与皮特兰猪杂交,与家猪相比,F1 和 F2 代产肉率低、脂肪含量高,并认为野猪脂肪率和眼肌面积与野猪血统成正相关。Razmaite 等<sup>[14]</sup>研究认为野猪血统高的特种野猪腿肌率降低,这可能是由于相关数量性状基因与 2、3、4 和 8 号染色体相关<sup>[15]</sup>。与家猪和野猪肉质特性相比,野猪血统高的特种野猪肉质鲜美、营养丰富,有望成为了人类新型肉类产品。

Müller 等<sup>[1]</sup>研究认为野猪和皮特兰猪杂交后代的肉质检测可基于肉质 pH<sub>45</sub> 和 PSE (pale, soft, exudative, 苍白、柔软、渗出性)。特种野猪肌肉 pH<sub>45</sub> 与中国地方品种和外三元猪相近,不属于 PSE 肉<sup>[16]</sup>。Klimienė 和 Klimas<sup>[17]</sup>研究发现与纯种立陶宛白猪相比,野猪与立陶宛白猪杂交后代肉色更暗、更红。毛同辉等<sup>[16]</sup>研究发现 75%特种野猪肉色评分值为 3.16,属于中国地方猪种肉色评分值范围区间,肉色良好,符合消费者需求。Kasprzyk 等<sup>[18]</sup>研究,6 位参与试验的人对风味(强度、满意度)、味道(强度、满意度、多汁、嫩度)进行感官评分,结果发现普诺斯卡猪及与野猪杂交后代的评分高于纯种野猪。同样约克夏与野猪杂交后的特种野猪肉质的嫩度、味道、总体满意度高于野猪,味道与纯种约克夏猪评分相等<sup>[6]</sup>。

## 2 特种野猪营养需求

目前特种野猪的营养需求研究主要集中在断

奶后的保育阶段,研究领域大多限于含 50%及以上野猪血统的特种野猪的能量、蛋白质和部分矿物质需求,氨基酸和维生素需求的研究较少。

何若刚等<sup>[19,20]</sup>研究认为,含 16%~18%粗蛋白和 13.17~13.6 MJ/kg 消化能的日粮,显著提高了 50 日龄 50%野猪血统的特种野猪的生长性能和养分表现消化率,且显著提高其瘦肉率及肌肉嫩度。郭洪杞等<sup>[21]</sup>也认为 18%粗蛋白饲料成本低,对 3 月龄杂种野猪生产性能最佳。曾其恒<sup>[22]</sup>试验表明钙磷比 1.25:1 对含 50%野猪血统的 42 日龄特种野猪骨骼生长和矿化效果最好。文启荣等<sup>[23]</sup>试验表明含 81.25%野猪血统的特种野猪 20~60 kg 阶段消化能为 14.4 MJ/kg、可消化蛋白 12.9%,60~80 kg 阶段消化能 14.4 MJ/kg、可消化蛋白 11.6%最有利于生产。郭新怀等<sup>[24]</sup>在杂种野猪日粮中添加 0.3 mg/kg 有机硒显著提高肌肉品质,增加了血清中谷胱甘肽过氧化物酶活力、血清硒含量和肝脏硒含量。以上研究结果表明:断奶后保育期特种野猪适宜的饲料能量和蛋白水平分别为 13.17~13.6 MJ/kg 和 16%~18%,钙磷比为 1.25:1。

## 3 小结

综上所述,特种野猪尤其是高比例野猪血统的野猪可为人类提供较好肌肉品质和独特风味特性的肉类,具有独特优势和经济价值,是调整山区农业收入的好项目。但我国目前还未建立完善的特种野猪配套体系,良种化体系的建立仍是解决特种野猪发展的首要问题。除此之外,不同野猪血统比例的特种野猪营养需要的数据资料库远不够完善,需要制定不同比例野猪血统的特种野猪的营养需要量,以降低饲料成本,增加养殖效益。

## 参考文献:

- [1] Müller E, Moser G, Bartenschlager H, et al. Trait values of growth, carcass and meat quality in wild boar, Meishan and Pietrain pigs as well as their crossbreed generations[J]. Journal of animal breeding and genetics, 2000, 117: 189-202.
- [2] Andersson-Eklund L, Uhlhorn H, Lundeheim N, et al. Mapping quantitative trait loci for principal components of bone measurements and osteochondrosis scores in a wild boar × Large White intercross [J]. Genetical research, 2000, 75 (02) : 223-230.

(下转第 14 页)

# 猪价连续两年逢“年”下跌 无序扩张或是低迷推手

## ——2015年1季度我国生猪生产现状及后期走势分析

虞华<sup>1</sup>, 原娟娟<sup>2</sup>, 彭莉<sup>3</sup>

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

**摘要:** 2015年的春节行情让赌“节前效应”的养猪人期望再次落空。往年冬至临近时,“腌肉大军”就忙活起来,猪肉价格开始上涨。但今年“腊肉行情”对肉价的刺激并不明显,春节前多地猪肉价格出现大幅跳水,行业内预想的利好因素成为“利空”。猪肉价格不涨,对于市民们过节来说是个好事,但养猪户们可是叫苦不迭:“本想指望春节前这个旺季行情好点,弥补一下之前的亏损,现在卖1头猪要亏损200元左右”。而春节后的回暖行情能否持续还不确定。综合分析,资本无序扩张导致生猪供应量过大、猪肉市场终端消费需求疲软是生猪价格下跌的主要原因。

**关键词:** 生猪价格; 猪粮比价; 压缩产能; 周期性波动

**中图分类号:** S828

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2015)02-0011-04

2015年的春节行情让赌“节前效应”的养猪人期望再次落空。春节前后原本是猪肉消费的旺季,但是2015春节期间生猪价格依然不旺,局部地区甚至出现暴跌。按照往年的规律,进入农历腊月之后,随着猪肉消费量增加,价格也应该一路上涨,到农历小年之后达到最高峰。但最近两年市场行情却一直很反常,摊贩们普遍反映今年春节猪肉价格“又没涨起来”。猪肉价格不涨,对于市民们过来说是个好事,但养猪户们可是叫苦不迭:“本想指望春节前这个旺季行情好点,弥补一下之前的亏损,现在卖1头猪要亏损200元左右”。

### 1 一季度国内生猪市场情况

往年冬至临近时,腌肉大军就忙活起来,猪肉价格开始上涨。但今年“腊肉行情”对肉价的刺激并不明显,春节前多地猪肉价格出现大幅跳水,行业内论证的利好因素成为“利空”。价格监测数据显示:2015年2月15日全国生猪平均出场价格已经跌破12元/kg,较2月初下跌0.79元/kg,仅为11.94元/kg,跌幅达6.2%。据农业部监测,2月15日全国农产品批发市场猪肉平均价格为18.05元/kg,较2月初下跌0.33元/kg,跌幅为1.8%。而春节后的行情能否回暖还不确定,虽然各地生猪市场交易量在逐步恢复,但养猪户年后出栏意愿积极性不高,市场交易行情偏淡,交易总量

只有春节前的40%左右,加之消费需求疲软,供求双方相制衡,出栏总体价格稳中有降,部分地区涨跌调整。

#### 1.1 猪价持续下跌近半年,肉价抗跌依然比较强

和前几年一样,直接影响CPI的猪肉零售价与生猪出栏价的联动性并不完全一致。随着猪价持续走低,猪肉零售价格依然保持一定的抗跌性。2015年开年以来,全国生猪出栏价从年初的13元/kg跌至2月28日的11.96元/kg,跌幅为8%。如果与上年12月初的价格比较,跌幅接近14%。与此同时,全国猪肉批发价格由年初时的19.11元/kg下降至2月28日的18.17元/kg,降幅约为4.9%。与上年12月初的价格比较,跌幅为5.8%。肉、猪价格差从年初的6.11元/kg扩大到2月28日的6.21元/kg,屠宰场和猪贩的利润未见减少(图1、图2)。

#### 1.2 猪粮比价从“蓝色区域”跌入“黄色区域”

猪价的持续下跌,使得养猪亏损日益加重。1月25日前猪粮比价还在5.5:1以上,1月30日已跌破5.5:1,跌为5.49:1,从“蓝色区域”跌入“黄色区域”,步入介于“5:1-5.5:1”之间的中度亏损时代;2月15日已跌到了5.12:1,春节后回升至5.2:1。价格监测资料显示:2015年1-2月全国平均猪粮比价为5.4:1,比2014年同期的5.6:1

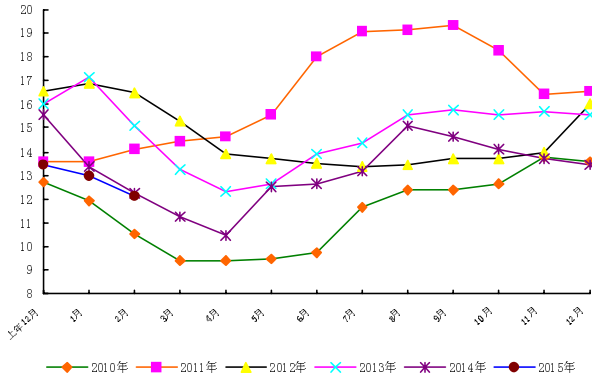


图1 2010年以来全国生猪价格走势(元/kg)

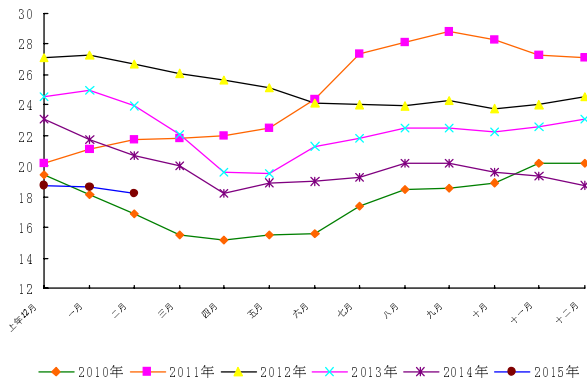


图2 2010年以来全国猪肉价格走势(元/kg)

下降0.2个点,低3.6%。其中:1月份比价为5.58:1;2月份比价为5.21:1。见图3。

### 1.3 能繁母猪存栏同比降幅不断扩大,去产能化明显

国家统计局统计调查数据显示,2014年12月底生猪存栏46583万头,同比减少1.7%。农业部公布的2015年1月份4000个监测点生猪存栏信息显示,1月生猪存栏较上月减少3.8%,比2014年同月下降7.4%(图4)。其中,能繁母猪存栏较上月减少2.3%,较2014年同月减少14.7%,已经连续11个月低于《生猪调控预案》中下降5%的预警值。

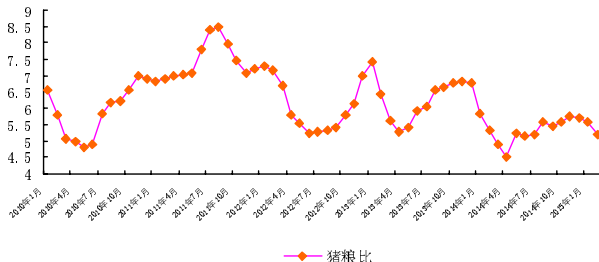


图3 2010年以来猪粮比价变化

能繁母猪存栏量自2013年9月份以来已连续17个月下滑,降至近5年的最低点(图5)。

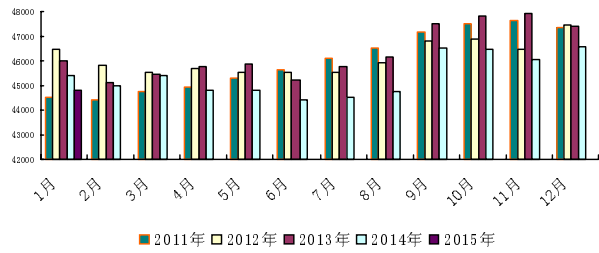


图4 2011年以来各月全国生猪存栏数比较(万头)

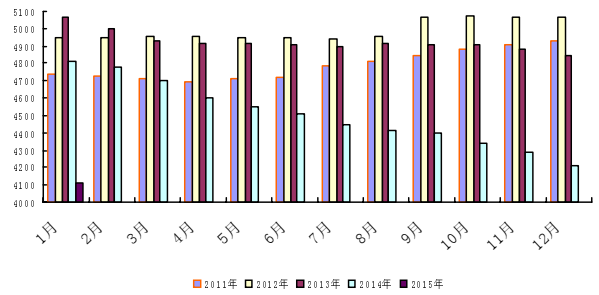


图5 2011年以来各月全国能繁母猪存栏数比较(万头)

### 1.4 玉米价格基本趋稳,豆粕价格继续下行

2015年1月全国玉米价格平均为2.32元/kg,比2014年同月的2.29元/kg高0.03元;2月平均为2.33元/kg,比2014年同月的2.29元/kg高0.04元。2015年1月全国豆粕价格平均为3.34元/kg,比2014年同月的3.99元/kg低0.65元;2月平均为3.20元/kg,比2014年同月的3.98元/kg低0.78元(图6)。2015年2月第2周育肥猪配合饲料平均价格为3.29元/kg,同比下降1.2%。

## 2 猪价春节消费旺季期间下跌的原因分析

综合分析,资本无序扩张导致生猪供应量过大、猪肉市场终端消费需求疲软是生猪价格下跌的主要原因。

### 2.1 资本无序扩张导致生猪供应量过大

2014年11月,温氏集团在公开场合宣布,当年温氏生猪出栏预计达到1200万头,而2013年,该公司生猪出栏则为1013万头。同月,雏鹰农牧对吉林子公司增资1.5亿元,投产之后,该公司的生猪产能将由目前的360万头提高到760万头。据悉,牧原股份如果扩张项目全部达产,产能将超过600万头。上述大型养殖企业动辄饲养生

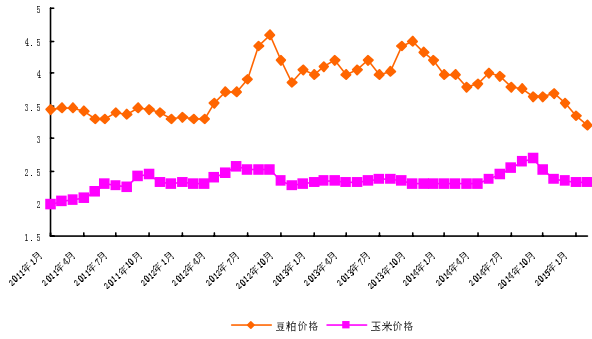


图6 2011年以来全国豆粕、玉米价格走势(元/kg)

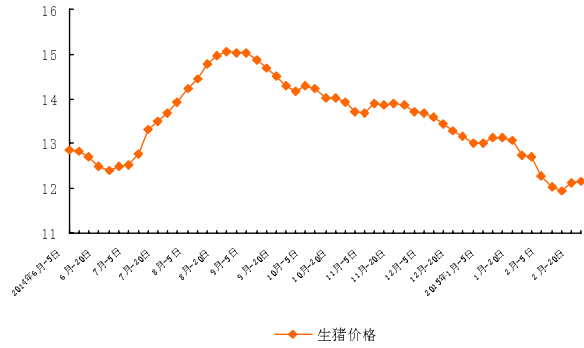


图8 2014年6月以来全国生猪价格变化(元/kg)

猪上千万头,少则数百万头,从而导致生猪供应量逐年递增。国家统计局生猪统计调查数据显示,2011-2014年,全国生猪出栏量从66 170万头猛增到73 510万头,其中一季度生猪出栏量从2011年的19 294万头增加到2014年的21 096万头,增加了1 802万头,折算猪肉供应量达140 140万千克(图7)。

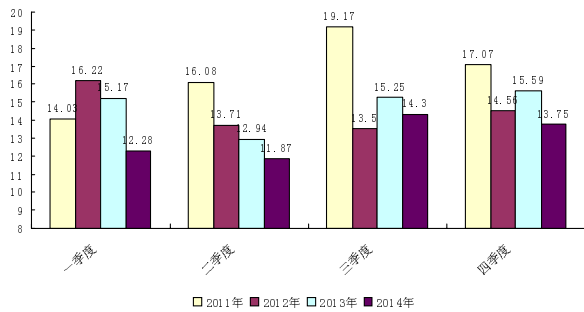


图9 2011年以来各季度全国生猪出栏价格比较(元/kg)

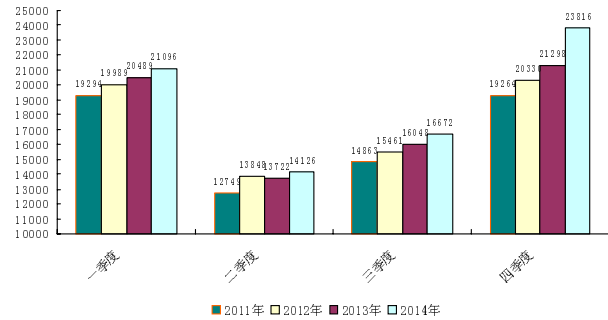


图7 2011年以来各季度全国生猪出栏数比较(万头)

## 2.2 养猪户“打堆出栏”

2015年元旦后生猪价格又开始滑落,养猪户等价的心理逐步被击碎,部分养猪户“打堆出栏”生猪,造成短时间内生猪出栏量猛增,提高了春节期间市场猪肉供应量,散养户的恐慌性抛售加剧了生猪价格下滑(图8)。价格调查监测资料显示:2011-2014年,每年一季度全国生猪出栏价格分别为14.03元/kg、16.22元/kg、15.17元/kg和12.28元/kg(图9)。

## 2.3 “八项规定”拦洪削峰作用明显

随着中央反腐和“八项规定”精神贯彻的进一步深入,发放福利和公款大吃大喝现象大幅减少。2015年春节期间单位以福利形式发放猪后臀、肉包、火腿、香肠、腊肉等食物的情况基本绝迹,拦洪

削峰作用明显,猪肉集团购买需求极大受限。

## 2.4 节前囤积猪肉现象明显减少

随着居民饮食结构的调整,人们的生活习惯也在不断变化,市场对牛羊肉的需求量上升,对猪肉制品的消费需求在下降。节前囤积猪肉的现象近些年明显改观,由于各大商场超市一般初二就开始营业,购买猪肉也比较方便,所以现在很少有家庭一次性购买大量猪肉储存。加之暖冬天气有利于蛋、鱼上市量增加,价格普遍下跌。在比价效应下,居民选择替代消费现象增多。另一方面,暖冬天气抑制了腌制腊肉、香肠的需求。

## 2.5 屠宰场“压价逼量”

目前我国猪肉生产和消费两端高度依赖于中间的屠宰企业,致使其拥有话语权。一旦出现需求不旺、生猪过剩,屠宰场就会利用养殖户“打堆出栏”、“追涨杀跌”的心理“压价逼量”。屠宰企业的盈利高峰期便是养殖户的低谷期。2014年12月初到2015年春节前,生猪价格降幅为13%,而猪肉批发价格降幅为5%,这之间的8%差额便是屠宰场多攫取的利润。

## 3 后期猪价整体走势研判

对生猪价格此轮低迷行情,养猪户何时才能

走出阴影?业内人士分析认为,低迷的行情可能还会持续一段时间。猪价短期内想大涨也难,因为过了春节就是消费淡季,低迷的持续时间会有3-6个月。春节后猪价可能会稍有回升,这只是很短暂的,与集中消费有关。元宵节过后,猪价进入低谷,5月初猪价有所松动,6月初快速回升,一直到8月份达到15元/kg左右,从而新周期的拐点显现,行情逐渐回升至冬至达16元/kg左右,期间不乏有短期回落震荡。生猪价格总体是下半年稳中有升,全年或高于2014年。

根据相关数据的分析,预计上半年生猪价格形势依然严峻,养猪业的格局也将会发生改变。在经过一场“寒冬”后,很多养猪场会倒闭,行业会经历

“洗牌”。小型养殖场和不少散养户因为管理跟不上,不能降低固定成本,因而会被市场淘汰。大养殖场规模大,成本会被摊薄,就能实现薄利多销。按照市场规律,当生猪出栏价格跌到8~10元/kg时,且持续时间长达2个月以上,养猪行业就会彻底进入“寒冬”,很多养猪场顶不住了会被淘汰。这种情况下,产能落后的母猪也会被大量宰杀,母猪和仔猪的数量自然会下降。当能繁母猪存栏比达到较合理的区间时,市场供需达到平衡,生猪出栏价格才会上涨。建议广大生猪养殖户根据市场价格变动情况,多注重自身的生产调节,加快淘汰一部分超龄母猪,促进养殖结构调整,降低肉猪上市体重,避免出现肉猪养得越重、亏损越大的局面。



(上接第10页)

[3] Nii M, Hayashi T, Tani F, et al. Quantitative trait loci mapping for fatty acid composition traits in perirenal and back fat using a Japanese wild boar × Large White intercross [J]. *Animal genetics*, 2006, 37 (4): 342-347.

[4] Giuffra E, Kijas J M H, Amarger V, et al. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression [J]. *Genetics*, 2000, 154(4): 1785-1791.

[5] Larson G, Dobney K, Albarella U, et al. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication [J]. *Science*, 2005, 307(5715): 1618-1621.

[6] Sales J, Kotrba R. Meat from wild boar (*Sus scrofa* L.): A review [J]. *Meat science*, 2013, 94(2): 187-201.

[7] 赵必迁, 彭大才, 李文和, 等. 特种野猪营养需求的研究进展 [J]. *养猪*, 2013(5): 22-24.

[8] 张树敏, 李娜, 金鑫, 等. 长白山野猪不同杂交组合生长性能和胴体品质的研究 [J]. *中国畜牧杂志*, 2007(11): 5-9.

[9] 张华琦, 刘榜兵, 罗刚. 特种野猪的消化道结构与消化力测定 [J]. *饲料工业*, 2013(19): 50-52.

[10] 李万贵, 张依裕, 潘兰兵. 特种野猪的生长曲线拟合 [J]. *贵州农业科学*, 2014(3): 109-112.

[11] 韩春梅, 贺荣, 龚慧婷, 等. 新疆野猪与家猪杂交子一代生长发育的研究 [J]. *塔里木大学学报*, 2008(2): 11-14.

[12] 陈迪, 王海军, 任东波. 长白山特种野猪生长发育及胴体品质测定 [J]. *吉林畜牧兽医*, 2010(3): 5-9.

[13] 吴高奇, 龙真权, 毛同辉, 等. 特种野猪屠宰性能测定 [J]. *贵州畜牧兽医*, 2010, 34(3): 5-6.

[14] Razmaitė V, Kerzienė S, Jatkauskienė V. Body and carcass measurements and organ weights of Lithuanian indi-

genous pigs and their wild boar hybrids [J]. *Animal science papers and reports*, 2009, 27: 331-342.

[15] Andersson-Eklund L, Marklund L, Lundström K, et al. Mapping quantitative trait loci for carcass and meat quality traits in a wild boar × Large White intercross [J]. *Journal of animal science*, 1998, 76: 694-700.

[16] 毛同辉, 吴高奇, 龙真权, 等. 特种野猪的肉质特性研究 [J]. *贵州农业科学*, 2010, 38(3): 124-126.

[17] Klimienė A, Klimas R. The influence of the wild boar on the biological and performance traits of domestic pigs [J]. *Polish journal of natural sciences*, 2010, 25: 123-131.

[18] Kasprzyk A, Stasiak A, Babicz M. Meat quality and ultrastructure of muscle tissue from fatteners of Wild Boar, Pulawska and its crossbreed Pulawska × (Hamshire × Wild Boar) [J]. *Archiv tierzucht*, 2010, 53(2): 184-193.

[19] 何若钢, 冯誉龄, 李秀宝, 等. 不同能量和蛋白水平对生长期特种野猪屠宰性能的影响 [J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2009(4): 112-113.

[20] 何若钢, 齐俊勇, 李秀宝, 等. 不同日粮能量和蛋白水平对特种野猪的表现消化率和生长性能的影响 [J]. *畜牧与兽医*, 2009, 41(9): 5-8.

[21] 郭洪杞, 向素芬, 罗杰. 不同配合饲料饲喂特种野猪效果研究 [J]. *饲料工业*, 2007, 304(19): 42-43.

[22] 曾其恒. 不同磷水平与钙磷比例对特种野猪生产性能、胴体品质、血液指标的影响研究 [D]. 广西大学, 2008.

[23] 文启荣, 史伟珍, 毛勇, 等. 特种野猪肥育对比试验报告 [J]. *甘肃畜牧兽医*, 2005, 35(1): 14-16.

[24] 郭新怀, 许宗运, 张增玉, 等. 有机硒对杂种野猪生产性能及肉质品质的影响 [J]. *中国畜牧杂志*, 2008, 44(15): 32-34.



# 浅议饲料营养对种鸡产蛋后期生产性能的影响

郝春光

(河北飞龙家禽育种有限公司, 河北 石家庄 050091)

**摘要:** 目前, 困扰管理者的主要难题是种鸡生产性能下降, 尤其在产蛋后期更为明显。大多数人从管理上寻找原因, 而忽视饲料营养的上下波动给种鸡带来的巨大影响。

**关键词:** 能量; 蛋白; 赖氨酸; 免疫力

**中图分类号:** S816.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2015)02-0015-02

近来养殖者普遍重视种鸡的饲养管理工作, 但饲料营养方面还存在许多欠缺之处, 致使种鸡群普遍存在“产蛋后期生产性能较差”这一主要问题, 即产蛋率和受精率下降过快, 羽毛提前脱落、蛋壳质量变差、蛋重较小, 甚至一些种鸡场高峰期的产蛋情况也不理想。为此, 从种鸡的饲料营养状况方面分析原因, 并提供解决方案, 供同行参考。

## 1 保证饲料质量和能量进食量

应随时跟踪饲料水分, 尤其是玉米的水分, 新玉米一般含高达 15%~20% 的水分。高水分不仅影响营养浓度, 而且容易发生霉变, 特别是在早春期间。一般情况下, 正常玉米比新玉米低 3% 的水分, 如果配方中玉米占 60% 的比例, 使用新玉米时, 饲料中净水分会增加 1.8%。按饲料代谢能为 2 800 Kcal 来计算, 大约差 50 Kcal 的能量。如果高峰料量为 165 g 的话, 就会相差 2.9 g 饲料。由此可见, 要定期检测饲料水分, 如果饲料中的玉米发生变化时(新旧替换), 在生产中应根据现用料量, 结合饲料中水分的变化, 及时增加或减少相应的料量, 确保鸡只进食到足够的能量, 从而达到高产、稳产的目的。

## 2 控制蛋白质和赖氨酸的进食量

过多饲喂蛋白质和赖氨酸, 首先会影响受精率。如种鸡在 64 周龄, 饲料中蛋白质含量分别为 16%、14%、12%、10% 时, 经验发现相应的受精率分别为 91.6%、93.3%、95.1%、95.4%。所以饲喂过多的蛋白质反而会降低受精率。其次, 进食过多的赖氨酸会造成鸡只胸肌过分增大, 导致整群鸡体重超标, 那么维持需要的能量就会增加。在产蛋期, 饲

料中的营养成分 70% 用于维持需要, 30% 用于产蛋需要。若体重由 3 435 g 增加到 3 735 g 时, 维持能量需要就会由 336 Kcal 增加到 366 Kcal, 即体重增加了 300 g, 能量需要增加 30 Kcal。这样体重变大的鸡群, 如果相应能量供给不能相应提高, 势必影响后期的产蛋率下降过快, 且发生羽毛提前脱落的现象。

## 3 公鸡采用单独饲料, 提高受精率

在母鸡刚开产时公鸡就应采用单独饲料, 不要晚于这个时候。如果能单独饲喂公鸡料, 到 40 周龄时会看到很好的效果。此时公鸡体况良好: 胸肌匀称、不过大, 睾丸萎缩速度慢, 精子活力强(由内卵黄膜精子穿孔数确定)。通过对比和测定饲喂公鸡料不仅可以提高受精率, 还可以提高孵化率。

## 4 防止羽毛提前脱落

羽毛的生长和脱落, 可直接反应鸡群的营养状况。饲料营养充足的鸡群, 在性成熟之前羽毛丰满、有光泽。饲料中蛋白含量不足、质量差, 如含硫氨基酸、维生素等缺乏时, 开产前羽毛残缺不全、缺乏光泽, 产蛋后期羽毛很容易脱落。饲料中烟酸缺乏, 羽毛生长不丰满, 干燥粗糙无光泽、分布不当、易脱落。另外, 育成期限饲程度大、高峰料量太低、高峰后减料过快, 这些原因均能影响到能量的供应量, 使鸡群营养不良, 引起机体早衰, 到产蛋期导致羽毛提前脱落。鸡群羽毛脱落后还会影响到种蛋的孵化率, 通常情况是羽毛脱落越多的鸡群, 所产种蛋的孵化率越低。因此, 应适当提高饲料中蛋白和能量水平, 尤其是含硫氨基酸的水平, 以保证采食量下降时鸡只能获取足够的营养, 防

止产蛋期羽毛提前脱落。

## 5 确保肠道健康

当鸡群消化道出现问题时,鸡群一般表现消化不良、拉稀、球虫病及坏死性肠炎等症状。在长期消化不良的情况下进入产蛋期后,产蛋高峰上不去,或持续时间短,产蛋率下降快,羽毛脱落较多等症状。影响肠道健康的主要原因有3大类:饲料、传染病和水质。其中最重要的因素为饲料因素,包括原料质量控制、饲料混合及储存条件。当饲料或原料保管不善时,就会被真菌污染,真菌代谢产生的毒素会蓄积在饲料中,这样鸡只肠道粘膜受到破坏、肠壁变薄、肠道脆性增加,最终导致鸡群发生水样下痢。另外,如果使用劣质原料将破坏鸡只肠道内环境、损坏肠粘膜、引起肠炎。

## 6 提高鸡群免疫力

足够和平衡的营养供给是确保免疫效果的重要保障。在实际生产中,如果存在饲料营养不全面的情况,鸡群会始终处于亚健康状态,从而抑制免疫应答,进行免疫接种后,不能建立良好的免疫应答,导致免疫失败。所以应提倡采用营养调控的方

法,为免疫系统提供养分,促进免疫系统发育,改善激素平衡,减轻疾病伤害,甚至直接调节免疫系统。如氨基酸是形成免疫细胞的基础;铁和生物素对免疫细胞功能作用很大;抗氧化剂能预防或消除炎症;粗纤维能稳定微生物菌群,促进家禽健康生长。此外,一些功能性营养素也广泛应用于饲料生产中。例:酵母硒、酵母细胞壁以及酵母葡聚糖等营养素均具有调节家禽免疫功能的作用,能够提高免疫器官的相对重量和淋巴细胞的增殖活性,显著提高疫苗免疫的抗体水平,在球虫感染时可降低肠道损伤,促进肠道粘膜的免疫反应。

在配置饲料时采用优质的原料可以避免鸡群发生免疫抑制。种鸡在有充足的能量和氨基酸供给的基础上,添加维生素和微量元素可以在一定程度上提高雏鸡质量,尤其在产蛋早期。实验证明,在种鸡料中额外添加维生素可以提高雏鸡的成活率,添加 $VD_3$ 能够明显减少佝偻病和胫骨软骨发育不良症状。当饲料中钙和磷不平衡时,添加 $VD_3$ 可以提高钙和磷的吸收。

## 2015“永顺杯”优秀论文评选启事

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

1、**评选范围:**本刊2015年度1-6期发表的文章。

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

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

## 欢迎广大畜牧兽医工作者踊跃投稿

《广东畜牧兽医科技》编辑部

2015年1月24日

## 一例犊牛支原体肺炎的诊断

卢受昇, 孙彦伟, 高慧敏, 邓国东, 钟柳艳, 余希尧  
(广东省动物卫生监督总所, 广东 广州 510230)

**摘要:**近年来, 广东地区草食动物养殖得到了较快的发展, 多地从北方新引进犊牛饲养, 部分新引进犊牛出现了呼吸道疾病综合征。某牛场从山东引进 81 头犊牛后, 部分犊牛出现发烧, 咳嗽、呼吸困难, 跛行, 拉稀等症状; 死亡率达 22.2%。经病原分离、PCR 检测、16SrRNA 基因序列测定, 诊断为犊牛支原体肺炎。证实了广东有该病存在, 需引起关注。

**关键词:** 牛支原体; 肺炎; PCR; 16SrRNA; 诊断

**中图分类号:** S858.23

**文献标识码:** B

**文章编号:** 1005-8567(2015)02-0017-03

## Diagnosis of Calf Mycoplasma Bovis

Lu Shousheng, Sun Yanwei, Gao Huiming, Deng Goudong, Zhong Liuyan, Yu Xiyao  
(Guangdong Provincial Institute of Animal Health Supervision, Guangzhou 510230, China)

**Abstract:** In recent years, herbivorous animal raising was developing rapidly in Guangdong Province. Some calves introduced from northern China were appeared to suffer from bovine respiratory disease syndrome after long-distance transport. Some calves introduced from Shandong province in May 2014 had a fever, showed symptoms of coughing, difficulty breathing, diarrhea with bloody stool, later developed arthritis. The mortality rate was 22.2%. It was diagnosed mycoplasma bovis infection through pathogen isolation, PCR determination, 16SrRNA gene sequencing. It should be concerned that Guangdong province had confirmed the existence of this disease.

**Key words:** Mycoplasma bovis; Pneumonia; PCR; 16SrRNA; Diagnosis

牛支原体肺炎(Mycoplasma bovis Pneumonia)是导致我国近年犊牛运输综合征的重要病原之一。在北繁南养模式下, 经长途运输的牛, 容易引发该病。随着牛、羊肉价格的高企, 以及广东省扶持草食动物发展政策的出台, 广东省养牛业得到了较快的发展, 出现了从各地引进牛只饲养的小高潮。随着引进牛只的增多, 陆续出现了由于长途运输导致的牛呼吸道疾病综合征疑似病例。2014年5月初, 某牛场从山东购进架子牛 81 头, 体重大的 250~300 kg, 小的 150~200 kg。购进后 3 d 就死亡 1 头, 20 d 后, 购进的牛只出现牛呼吸道疾病综合征。表现为发烧(41℃)、咳嗽、呼吸困难, 脓性鼻液; 流涎、拉稀, 后期血粪; 消瘦, 关节肿大。发病率 60%左右, 药物治疗的效果不明显。剖检病变为心胞积液、心胞膜与肺粘连; 肺有坏死性

病灶, 表面有多量纤维素性白色渗出物; 肝、脾肿大。至 2 个月后就诊时, 先后死亡 18 头。从病料中分离到牛支原体和溶血性曼氏杆菌(另文发表)。现将支原体肺炎诊断情况介绍如下, 供读者参考。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 病料** 心、肝、脾、肺、肾、淋巴结, 采自某牛场新购进 3 月龄病死黄牛。

**1.1.2 主要仪器与试剂** PPL0 肉汤粉、酵母粉购自美国 BD 公司, 葡萄糖、精氨酸购自 Sigma 公司, 马血清购自广州蕊特生物技术有限公司。PCR 预混试剂 Premix Exq 宝生物工程(大连)有限公司产品。PPL0 液体培养基的配制: 将葡萄糖 2.5 g, PPL0 肉汤粉 10.5 g, 酵母粉 2.5 g, 溶于 400 mL 超纯水中, 116℃灭菌 30 min 后, 添加马血清 50

mL, 10%精氨酸 5 mL, MEM 50mL, 8 万 IU/mL 青霉素溶液 5 mL, 1%酚红溶液 0.5 mL。

## 1.2 方法

**1.2.1 病原分离** 无菌操作采集心、肝、脾、肺、肾和淋巴结等内脏组织,按 1:5 加 PBS 研磨,3 000 r/m,离心 15 min,上清经 0.22 μm 细菌过滤器过滤后,接种于 PPL0 液体培养基,37 °C 培养 72 h。

**1.2.2 PCR 及 16SrRNA 序列的测定** 引物采用细菌 16SrRNA 通用引物 P1:5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'、P2:5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3',扩增长度约为 1 500 bp;特异性引物<sup>[1]</sup> P3:5'-TATTATT TTTGCATGAAAGTAATAT-3',P4:5'-CGTCAAGGTAGCAT CATTTC-3',扩增长度约为 310 bp;牛支原体特异性引物<sup>[2]</sup>P5:5'-TTTTAGCTCTTTTGAACAAAT-3',P6:5'-GGCTCTCATTAGAATGTC-3',扩增长度约为 1 900 bp。上述引物均由生工生物(上海)有限公司合成。PCR 扩增采用 50 μL 体系, Premix EX 25 μL、上下游引物各 1 μL、去离子水 20 μL、菌液 3 μL;反应程序为 95°C 30s,53 °C 30s,72°C 90s,30 个循环;72 °C 延伸 8 min。产物电泳回收后,送上海立菲生物技术有限公司进行测序。

## 2 结果

### 2.1 病原培养

PPL0 液体培养基由红色变为微黄色,液体澄清。进而进行 PCR 鉴定。

### 2.2 PCR 结果

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,可见 1 500 bp 左右的特异条带(图 1),与预期大小相符。

### 2.3 序列分析

测序结果提交 GenBank(收录号为:KM576849),将所得菌株的 16SrRNA 基因序列在 NCBI 上用 BLAST 进行同源性比较,结果与国内发表的 3 株牛支原体序列 *Mycoplasma bovis* CQ-W70 株(序列号 CP005933.1)、HB0801 株(序列号 CP002058.1)

和 Hubei-1 株(序列号 CP002513)的相似性达 100%。从 GenBank 数据库中选取不同种的牛支原体参考株 5 株(序列号分别为:NR-102850、AY526874、AF332757、AF332754 和 AY526883),无乳支原体 1 株(序列号 AF332743)。将其 16SrRNA 基因序列,用软件 MEGA 5.05 进行多序列匹配排列,以 Neighbor-Joining 方式进行同源性比较,并绘制进化树。结果发现各菌株间 16SrRNA 基因序列间差异极小,差异不超过 0.1%,即使与无乳支原体的相似性也达到 99.99%。这也说明在用 16SrRNA 基因序列对牛支原体肺炎鉴定时,还要用特异性的 PCR 方法与无乳支原体加以区分。见图 2。

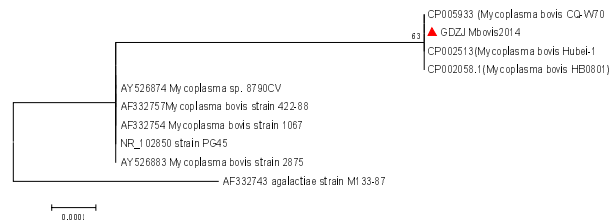


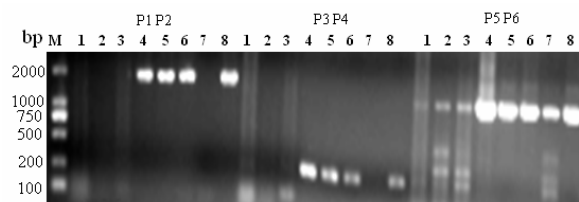
图 2 16SrDNA 序列基因进化树

## 3 讨论

**3.1 结合临床症状与剖检病变,PCR 检测结果及 16SrRNA 的序列测定,本病例诊断为牛肺炎支原体。**

在对牛肺炎支原体的 PCR 诊断时,因牛支原体 16SrRNA 序列与无乳支原体序列也有较高的同源性,同时还需应用牛支原体特异性引物如 P3、P4、P5、P6 扩增出预定长度的片段,才可加以对比确认。另有报道<sup>[3]</sup>uvrC 基因或 DNA 聚合酶 III 基因可作为牛支原体 PCR 鉴定的靶基因。该基因较保守,可特异性地区分牛支原体及牛无乳支原体。肺脏及鼻拭子可作为诊断样品。

**3.2 随着广东省草食动物业的兴起和犊牛的大量引进,经长途运输犊牛的牛支原体肺炎的发病风险在增大,需引起广大养殖户和有关部门的关注。2008 年辛九庆<sup>[4]</sup>、石磊<sup>[5]</sup>等报道湖北等地首先发现犊牛支原体肺炎病例,其后我国华中、西南、西北地区也有运输引起的牛肺炎相关病例的报道<sup>[6]</sup>,该病成为危害我国当前北繁南养肉牛饲养模式的重要疫病。根据以上报道结合本次病例,该病的典型特征总结如下:从外地新引进犊牛,多数在 2 w 左右发病,发病率 20%~80%;死亡率 5%~60%,在得**



M 为 DNA Marker DL2000;1-8 为样品

图 1 PCR 扩增结果

不到及时治疗的情况下,死亡率可达 50%以上。肉牛发病初期体温升高,可达 42 ℃左右,咳嗽、气喘,食欲下降、消瘦,有的继发关节炎,腹泻,粪水样带血。剖检胸腔、心包积液,纤维蛋白性渗出,胸膜与膈膜粘连,肺脏有多量干酪样或化脓性坏死灶。

**3.3 对该病的防控,关键是减少长途运输过程中的应激,减少肉牛运输综合征的发生。首先要选健康的牛,在运输前可选用维生素 C 和维生素 E 及刺五加等中草药进行抗应激。为了防止继发感染可用长效抗生素预防性用药。到达牛场后要注意过渡期的饲养管理,切忌暴饮暴食。一旦发病,尽早治疗。除考虑支原体敏感的泰乐菌素、氟苯尼考、支原净、四环素、替米考星或壮观霉素等药物外,还可用头孢噻呋钠等。用药疗程和剂量要足够,一般需 2 w 以上。同时要考虑引起牛呼吸道综合征**

的其他几种细菌性病原,主要包括:溶血曼氏杆菌、多杀性巴氏杆菌、昏睡嗜血杆菌的防治。

#### 参考文献:

- [1] 李知新,王进香,闫小芹,等.宁夏牛支原体肺炎 RT-PCR 方法的诊断[J].中国动物检疫,2012,29(1):44-45.
- [2] Rifatbegovic M, Assuncao P, Poveda J B, et al. Isolation of *Mycoplasma bovis* from the respiratory tract of cattle in Bosnia and Herzegovina [J]. *Veterinary Record*, 2007, 160: 484-485.
- [3] 胡长敏,郭爱珍.牛支原体病的流行特点与防控措施[J].兽医导刊,2011(11):41-43.
- [4] 辛九庆,李媛,郭丹,等.国内首次从患肺炎的犊牛肺脏中分离到牛支原体[J].中国预防兽医学报,2008,30(9):661-664.
- [5] 石磊,龚瑞,尹争艳,等.肉牛传染性牛支原体肺炎流行的诊断[J].华中农业大学学报,2008,27(5):629-633.
- [6] 冉智光,谢建华,骆璐,等.我国部分地区牛支原体肺炎和关节炎的病原体诊断[J].中国预防兽医学报,2010,32(1):40-43.

## 《广东畜牧兽医科技》(双月刊)

(1976年创刊,大16开本,正文52页)

ISSN 1005-8567

CN 44-1243/S

主管单位:广东省农业科学院

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

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

# 蛋鸡重组禽流感 H<sub>5</sub> 亚型灭活疫苗强化免疫试验

李桂喜<sup>1</sup>, 严平<sup>1</sup>, 梁磊<sup>1</sup>, 董松岭<sup>2</sup>, 刘方舟<sup>3</sup>

( 1. 河南省商丘市动物疫病预防控制中心, 河南 商丘 476100; 2. 河南省商丘市种鸡场, 河南 商丘 476000; 3. 河南省商丘市质量技术监督检验测试中心, 河南 商丘 476000 )

**摘要:** 为了使商品蛋鸡 H<sub>5</sub> 亚型禽流感免疫抗体在产蛋期全程保持较高水平, 对免疫程序进行优化, 采用标准和强化两种程序进行免疫, 比较二者间抗体水平差异。结果表明, 强化免疫组 Re-4 株血球凝集 (HI) 抗体较标准免疫组平均高出 2.44 Log<sub>2</sub>, 且抗体水平离散度平均降低 0.42 Log<sub>2</sub>; 强化免疫组 Re-6 株 HI 抗体较标准免疫组平均高出 2.45 Log<sub>2</sub>, 且抗体水平离散度平均低 1.02 Log<sub>2</sub>。这一强化免疫程序可保证蛋鸡在产蛋全期维持高且均一的 HI 水平。

**关键词:** 重组禽流感 H<sub>5</sub> 亚型灭活疫苗; 强化免疫程序; HI 抗体

中图分类号: S852.5

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2015)02-0020-02

## Immunization Programs Evaluation of Recombinant Avian Influenza H<sub>5</sub> Subtype Inactivated Vaccine for Laying Hens

Li Guixi<sup>1</sup>, Yan Ping<sup>1</sup>, Liang Lei<sup>1</sup>, Dong Songling<sup>2</sup>, Liu Fangzhou<sup>3</sup>

( 1. Henan Province Shangqiu center for animal disease control and prevention, Shangqiu 476100, China; 2. Henan Province Shangqiu breeding chicken farm, Shangqiu 476000, China; 3. Henan Province Shangqiu center for quality and technical supervision and testing, Shangqiu 476000, China )

**Abstract:** In order to remain high H<sub>5</sub> avian influenza antibody level in commercial layer herds in whole egg laying period, two immunization programs were compared, using ordinary and strengthened procedures. The antibody levels of the the two groups were compared. The results showed that the Re-4 antibody of the strengthened immune group was 2.44 Log<sub>2</sub> higher than the normal immune group, and the antibody dispersion was reduced 0.42 Log<sub>2</sub>; at the same time, Re-6 antibody of the strengthened group was 2.45 Log<sub>2</sub> higher than the normal immune group, and the antibody dispersion was reduced 1.02 Log<sub>2</sub>. The strengthened immune program can ensure the hen herds in whole laying period to maintain high and homogeneous immune level.

**Key words:** Recombinant avian influenza H<sub>5</sub> subtype inactivated vaccine; the strengthen immunization program; HI antibody

当前使用的 H<sub>5</sub> 亚型禽流感重组灭活疫苗, 在标准免疫程序下可达到较高免疫合格率, 但平均血球凝集 (HI) 抗体水平有时仍不够高, 且离散度偏大。为了提升商丘地区商品蛋鸡产蛋期 H<sub>5</sub> 亚型禽流感免疫抗体水平, 有效预防高致病性禽流感的发生, 进行强化免疫程序的优化试验。

### 1 材料与与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 试验用鸡群 随机选本市二级、三级监测网点单批次规模在 2 000 羽以上商品代蛋用鸡群。

1.1.2 试验用疫苗 采用政府招标采购重组禽

流感 H<sub>5</sub> 亚型二价 (Re-4 株 + Re-6 株) 灭活疫苗。

1.1.3 H<sub>5</sub> 亚型禽流感 HI 抗原和阳性血清 购自哈尔滨维科生物技术开发公司。

#### 1.2 方法

1.2.1 微量 HI 试验方法 依据国标 GB/T 18936-2003 进行<sup>[1]</sup>。

1.2.2 试验分组 试验分 2 小组, 即标准免疫组和强化免疫组。

1.2.2.1 标准免疫程序 按照《高致病性禽流感免疫技术规范》<sup>[2]</sup> 推荐的生产蛋鸡和肉种鸡免疫程序: 雏鸡在 2 周龄首次免疫, 接种剂量 0.3 mL;

5 周龄时二免, 接种剂量 0.5 mL; 120 日龄左右三免, 接种剂量 0.5 mL; 以后间隔 5 个月龄免疫一次, 接种剂量 0.5 mL。

**1.2.2.2 强化免疫程序** 雏鸡在 2 周龄首次免疫, 接种剂量 0.4 mL; 5 周龄时二免, 接种剂量 0.6 mL; 9 周龄时强化免疫, 接种剂量 0.8 mL; 120 日龄左右再加强免疫, 接种剂量 1 mL; 以后间隔 3 个月加强免疫一次, 接种剂量 1 mL。

**1.2.3 疫苗免疫途径** 8 周龄前采用颈背侧皮下接种, 120 日龄后用胸肌、腿肌或皮下接种。

**1.2.4 抗体检测时间** 开产后, 于每次免疫后 21-90 d 采集血清样品进行微量 HI 试验。

**1.2.5 数据处理** 检测结果先通过 EXCEL 进行 F 检验 (方差齐性检验), 再通过 T 检验来检验两组数据间的显著性差异。

**2 结果**

**2.1 RE-4 抗体差异**

随机抽检标准免疫组 18 个鸡群 (C1-C18), 共计 278 份血清, 产蛋期禽流感 H<sub>5</sub> (Re-4) HI 抗体平均值 7.38 Log<sub>2</sub>, 离散度 0.94; 随机抽检强化免疫组 9 个鸡群 (Q1-Q9), 共计 126 份样品, 结果 HI 抗体平均值为 9.82 Log<sub>2</sub>, 离散度为 0.52。强化免疫组 HI 抗体平均值较标准免疫组高 2.44 Log<sub>2</sub>, 离散度小 0.42, 两组差异显著。详见表 1。

**2.2 Re-6 抗体差异**

随机抽检标准免疫组 7 个鸡群 (C1-C7), 共计血清样品 136 份, HI 抗体平均值 7.3 Log<sub>2</sub>, 离散度 1.48。随机抽检强化免疫组 22 个鸡群

(Q1-Q22), 共计血清样品 452 份, HI 抗体平均值 9.75 Log<sub>2</sub>, 离散度 0.46。强化免疫组 HI 抗体平均值较标准免疫组高 2.45 Log<sub>2</sub>, 离散度降低 1.02, 两组差异显著。详见表 2。

**3 小结与讨论**

强化免疫组 Re-4 株 HI 抗体较标准免疫组平均高出 2.44 Log<sub>2</sub>, 且抗体水平离散度平均降低 0.42 Log<sub>2</sub>; 强化免疫组 Re-6 株 HI 抗体较标准免疫组平均高出 2.45 Log<sub>2</sub>, 且抗体水平离散度平均降低 1.02 Log<sub>2</sub>。这一强化免疫程序可保证蛋鸡在产蛋全期维持高且均一的 HI 水平。

标准免疫组的 Re-4 抗体平均值为 7.29 Log<sub>2</sub>, 与马国红<sup>[3]</sup>用重组禽流感病毒灭活疫苗 (H<sub>5</sub>N<sub>1</sub>, Re-5 株 + Re-4 株) 进行 3 次免疫, Re-4 抗体 (180 日龄) 为 7.25 ± 1.22 Log<sub>2</sub> 的结果一致。标准免疫组中有 2 群鸡 HI 抗体为 5.75 Log<sub>2</sub> 和 5.4 Log<sub>2</sub>, 也与马国红的报道一致。免疫 3 个月后抗体下降较快, 离散度加大, 个别鸡的抗体低于 5 Log<sub>2</sub>。

商品蛋鸡实行强化免疫程序, 适当加大疫苗免疫剂量可刺激机体产生较高的抗体水平, 有效抵抗野毒攻击; 免疫频次的增加, 可产生再次应答, 抗体滴度产生叠加效应, 使产蛋期免疫抗体水平始终保持在抗感染水平以上。

**参考文献:**

[1] GB/T 18936-2003, 高致病性禽流感诊断技术[s].  
 [2] NY/T 769-2004, 高致病性禽流感免疫技术规范[s].  
 [3] 马国红. 蛋鸡免疫重组禽流感病毒 H<sub>5</sub> 亚型二价灭活疫苗抗体消长规律的研究[J]. 中国动物保健, 2010(7): 13-15.

表 1 Re-4 株不同免疫程序 HI 免疫抗体水平

组别	样品数量	HI 抗体效价分布 (Log <sub>2</sub> )										HI 平均值 <sup>*)</sup> (Log <sub>2</sub> )	离散度 <sup>**2)</sup> (S)		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			11	
标准免疫组	278				2	19	28	94	76	48	11		7.38	0.94	
强化免疫组	126									8	24	80	14	9.82	0.52

1): 经 t 检验, P 值为 0.00000000512, < 0.05 (α=0.05), 差异性显著。2): 经 t 检验, P 值为 0.000320, < 0.05 (α=0.05), 差异性显著。

表 2 Re-6 株不同免疫程序 HI 免疫抗体水平

组别	样品数量	HI 抗体效价分布 (Log <sub>2</sub> )										HI 平均值 <sup>*)</sup> (Log <sub>2</sub> )	离散度 <sup>**2)</sup> (S)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10			
标准免疫组	136		1	2	8	6	20	24	30	24	21		7.30	1.48
强化免疫组	452								3	19	57	373	9.75	0.46

1): 经 t 检验, P 值为 0.00098, < 0.05 (α=0.05), 差异性显著。2): 经 t 检验, P 值为 0.00205, < 0.05 (α=0.05), 差异性显著。

# 2005-2014年新疆生产建设兵团第三师 牛羊布鲁氏菌病血清学检测与分析

郑朝锋, 袁超

(新疆生产建设兵团第三师畜牧兽医工作站, 新疆 图木舒克 843901)

**摘要:** 布鲁氏菌病是由布鲁氏菌属细菌引起的一种人畜共患传染病。新疆生产建设兵团第三师图木舒克市地处布鲁氏菌病高发区, 2005-2014年每年均开展了布鲁氏菌病检测工作。本文对该区近10年牛、羊布鲁氏菌病的血清学监测结果进行汇总, 分析牛、羊布鲁氏菌病的感染动态, 指出近几年布鲁氏菌病防控工作中存在的问题, 为下一步采取有效措施提供参考。

**关键词:** 布鲁氏菌病; 检测; 分析

中图分类号: S855.1\*2

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2015)02-0022-03

## Serological Survey on Bovine and Ovine Brucellosis in the Third Division of Xinjiang Production and Construction Corps from 2005 to 2014

Zheng Chaofeng, Yuan Chao

(Animal Husbandry and Veterinary Station, the Third Division of Xinjiang Production and Construction corps, Tumushuke 843901, China)

**Abstract:** Brucellosis is a kind of zoonosis caused by the bacteria belonging to the genus Brucella. The third Division of Xinjiang Production and Construction corps is located in Tumuchouq, the high incidence areas of Brucellosis in China. In this article the serological supervision results on Brucellosis in cattle and sheep in Tumuchouq from 2005 to 2014 were analyzed to master the epidemiological dynamics. Besides, the shortcomings encountered during the prevention and control of Brucellosis were also described and the effective measures for prevention and control of Brucellosis were suggested.

**Key words:** Brucellosis; Survey; Analysis

布鲁氏菌病是由布鲁氏菌引起的一种重要的人兽共患传染病, 在我国被列为二类动物疫病, 也是国家中长期动物疫病防治规划中优先防治的病种之一<sup>[1-3]</sup>。从1978年开始, 新疆生产建设兵团第三师按照兵团统一制定的“三免、四停、五检免”的综合防控措施, 畜间布鲁氏菌病的发生逐年减少, 畜间布鲁氏菌病达到了国家稳定控制标准<sup>[4]</sup>。近年来, 由于养殖业的持续发展, 加上人员、畜禽流动日趋频繁, 给布鲁氏菌病的传播和扩散带来了可乘之机。畜间布鲁氏菌病阳性率又有所回升, 且出现人间布鲁氏菌病感染病例。我们通过对兵

团第三师近10年的血清学监测, 掌握了牛羊布鲁氏菌病的流行动态, 为下一步采取有效防控措施提供参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 血清样品** 新疆生产建设兵团第三师图木舒克市2005-2014年采集的牛羊血清样品。

**1.1.2 诊断试剂** 布鲁氏菌病虎红平板凝集试验用试剂: 2005-2011年布病虎红平板凝集试验与试管凝集试验用抗原、标准阴性血清、标准阳性血清, 由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供。



2012-2014 年布病虎红平板凝集试验与试管凝集试验用抗原、标准阴性血清、标准阳性血清,由青岛易邦生物工程有限公司提供。

## 1.2 方法

**1.2.1 血清学检测** 按照国家标准动物布鲁氏菌病诊断技术(GB/T 18646-2002)进行,先采用虎红平板凝集试验初筛,阳性血清样品再采用试管凝集试验复检。

**1.2.1.1 虎红平板凝集试验** 整个操作在玻璃板上进行。先在玻璃板上标记待检血清号,然后滴加相应血清 0.03 mL,在待检血清旁再滴加抗原 0.03 mL,用牙签搅动血清和抗原,使之混匀并铺开直径约 1.5 cm,4 min 后肉眼观察凝集现象。同时设定阴阳性对照进行质控。

**1.2.1.2 试管凝集试验** 每份待检血清做 4 个滴度。牛血清按照 1:25、1:50、1:100 和 1:200 的稀释度稀释;羊血清按照 1:12.5、1:25、1:50 和 1:100 的稀释度稀释。然后,每管血清中分别加入 0.5 mL 的 20 倍稀释的抗原,振荡混匀。同时设定阳性血清对照、阴性血清对照和抗原对照。用保鲜膜封存后,置于 37 °C 恒温培养箱培养 24 h,取出观察结果。

用 40 倍稀释的抗原分别配制 100%、75%、50%、25%、0% 的 5 管比浊管(对应的判定标准为-、+、++、+++、++++),作为结果判定时比照。

## 2 检测结果及分析

### 2.1 检测结果

2005-2014 年该区共对 203 424 头牲畜进行布鲁氏菌病检测,共检出阳性 267 头,总阳性率为 0.13%。其中检测牛 46 468 头,阳性 26 头,阳性率

为 0.056%;检测羊 156 956 只,阳性 241 只,阳性率为 0.15%。具体结果见表 1。

根据每年的牛、羊布鲁氏菌病阳性率,绘制布鲁氏菌病感染趋势图(图 1)。牛布鲁氏菌病感染阳性率除 2006 年达到 0.38%外,其它年份阳性率均在 0.2%以下,其中 2005 年、2007 年、2008 年、2011 年、2012 年均未检出阳性;羊布鲁氏菌病感染阳性率在 2005 年曾达到最大值 0.73%(与当时检测样本数很少有关),2006-2012 年阳性率均在 0.2%以下,其中 2012 年阳性率为零。但在 2013 年、2014 年,牛、羊阳性率出现反弹,最高达到 0.49%。

### 2.2 结果分析

10 年间牛的布鲁氏菌病阳性率一直维持在较低水平,但羊的阳性率相对维持在较高水平;羊阳性率(0.15%)明显高于牛阳性率(0.056%)。牛的布鲁氏菌病阳性检出率低,与图木舒克地区牛养殖模式有关,主要以散养为主。

该区畜间布鲁氏菌病出现反弹,其主要表现形式是以小范围、点状发生为主。2013 年和 2014 年,牛、羊布鲁氏菌病检出阳性率比往年高,与该区畜牧业相关政策有关。2013 年开始调整农业产业结构,大力推进畜牧业发展。2013 年和 2014 年从疆内外购进羊只近 15 万只,而检出的布鲁氏菌病阳性畜部分来自外购畜。调查结果表明引进牲畜时没有严格进行检疫、隔离就进行混养是造成该病阳性率上升的主要原因;还有就是多年来对奶牛布鲁氏菌病检疫工作基本到位,但是对于羊的布鲁氏菌病检疫不够重视,在人发生了布鲁氏菌病后才开始重视羊的检疫工作,这也是导致羊

表 1 2005-2014 年牛羊布鲁氏菌病检测结果统计

年份	牛			羊			小计		
	检测数(份)	阳性数 <sup>1)</sup> (份)	阳性率(%)	检测数(份)	阳性数(份)	阳性率(%)	检测数(份)	阳性数(份)	阳性率(%)
2005	213	0	0	545	4	0.73	758	4	0.53
2006	1864	7	0.38	7433	6	0.081	9297	13	0.14
2007	2613	0	0	18001	2	0.011	20614	2	0.009
2008	3144	0	0	24929	3	0.012	28073	3	0.011
2009	1834	1	0.055	10806	7	0.065	12640	8	0.063
2010	6337	2	0.031	7898	9	0.11	14235	11	0.077
2011	9850	0	0	10877	6	0.055	20727	6	0.029
2012	7319	0	0	6580	0	0	13899	0	0
2013	4923	5	0.10	20334	99	0.49	25257	104	0.41
2014	8371	11	0.13	49553	105	0.21	57924	116	0.20
合计	46468	26	0.056	156956	241	0.15	203424	267	0.13

1):表中阳性数为试管凝集试验复检阳性。

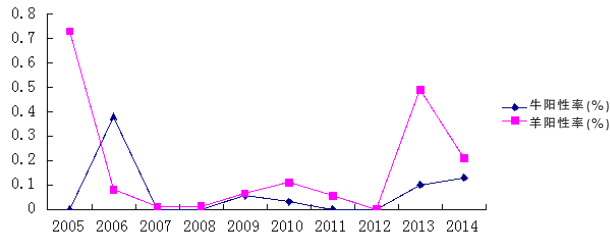


图1 2005-2014年牛羊布鲁氏菌病感染趋势

布鲁氏菌病阳性率偏高的原因。

### 3 布鲁氏菌病防控中存在的问题

#### 3.1 养殖场规模小而分散,不利于布鲁氏菌病的防控

该区地处新疆喀什地区,是少数民族聚居区,以维吾尔族为主,近年来该区政府大力发展畜牧业,养羊大户和规模养羊场逐年增多,但由于养羊户和养羊场主受传统养殖思想观念的影响,饲养管理水平不高,防疫水平低下,存在疫情隐患。

#### 3.2 防疫队伍力量不足且素质偏低

开展动物布鲁氏菌病净化工作人员多为基层动物卫生防疫员,很大部分文化程度偏低,待遇不高,影响工作积极性,而且人员少,工作量大,难以保质保量完成既定目标任务。

#### 3.3 养殖户的防疫意识淡薄

部分养殖户的防疫意识和报检意识淡薄,疫病的传播途径无法切断,存在较大疫情隐患。突出表现在三个方面:一是调入、调出牲畜不按规定报检,引进牲畜来历不明,在健康状况不确定的情况下未作隔离就混群饲养,容易引入传染源;二是母牛配种方式多样,特别是饲养规模小的养殖户,既有人工授精,也有自养公牛或借用公牛配种,对精液来源及安全性没有严格把关;三是小散养户大多采用人工挤奶方式,人员健康状况未明,挤奶前没有做好清洁消毒措施,存在疫病传播风险。

#### 3.4 检出的阳性牲畜扑杀处理不彻底

因牲畜自身经济价值大于国家规定的扑杀补偿费用,检出的布鲁氏菌病阳性牲畜扑杀无害化处理存在很大阻力。存在着对检出阳性畜转移、转卖等现象。

## 4 防控建议

#### 4.1 继续开展布鲁氏菌病监测工作

该区布鲁氏菌病防控工作已取得一定成果,但鉴于布鲁氏菌病流行形势,完成布鲁氏菌病净

化工作不是短期就能够实现的。因此,必须继续落实财政资金保障,进一步加大监测力度,通过科学检测方法,及时扑杀阳性牲畜,达到净化目的。

#### 4.2 继续加强检疫

在我国,由于活畜禽调运造成疫病传播和扩散的教训很多,经调查该区布鲁氏菌病疫情反弹也与活畜长距离调运直接相关。故应当继续落实限制动物从高风险区(场、群)向低风险区(场、群)移动的防控策略,促进各地全面开展无疫区、生物安全隔离区、无特定病原场(群)评估认证。但在目前情况下,我们只能加大对引入易感动物的检疫工作,特别是奶牛、羊等从外地引入的动物检疫监管,严厉打击私屠滥宰、不经检疫自由买卖畜禽产品的违法行为。

#### 4.3 严格执行疫情报告制度

进一步规范动物疫情的报告制度,把布鲁氏菌病疫情报告工作纳入该区动物防疫工作目标管理考核内容之一。

#### 4.4 加强与卫生部门紧密配合

畜牧兽医行政部门与卫生部门应就畜间或人间布鲁氏菌病监测情况开展交流,并及时通报监测结果,形成人间与畜间联防联控的工作机制。

#### 4.5 强化宣传培训,不断提升防控意识和从业者的个人防护能力

对牲畜养殖场(户)加大布鲁氏菌病相关知识的宣传,并要求畜牧兽医技术人员在动物疫病的诊疗、孕畜的生产等方面做好个人防护,不断提升从业人员的防护水平。同时,加大人工授精技术的推广,减少布鲁氏菌病传播和扩散的机会<sup>[5-7]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 吴清民. 兽医传染病学[M]. 北京:中国农业大学出版社, 2002: 187-193.
- [2] 葛慎锋, 王虹, 刘建文, 等. 动物布鲁氏菌病的流行态势与防控策略[J]. 中国兽医杂志, 2012, 48(6): 90-92.
- [3] 邓永强, 阳爱国, 郭莉, 等. 四川奶牛结核病和布鲁氏菌病的净化示范[J]. 中国动物检疫, 2014, 31(8): 55-57.
- [4] 陈彪, 王涛, 李爱巧, 等. 乌鲁木齐市动物布鲁氏菌病流行病学调查[J]. 中国动物检疫, 2013, 30(3): 28-30.
- [5] 吴清民. 动物布鲁氏菌病新型防控技术及研究进展[J]. 兽医导刊, 2011(9): 46-47.
- [6] 穆淑宝, 张洪安, 张守波. 布鲁氏菌病及其防控技术[J]. 中国畜牧兽医文摘, 2012(3): 98-99.
- [7] 王国栋, 刘书梅. 牛布鲁氏菌病防控研究进展[J]. 现代农业科技, 2013, 17: 273-274.

# 鸡贫血病毒广州株 VP3 和 VP1 基因的克隆与序列分析

沈海燕<sup>1</sup>, 张建峰<sup>1</sup>, 刘志成<sup>1</sup>, 周恒<sup>1,2</sup>, 郭翠丽<sup>1,2</sup>, 郭鹏举<sup>1</sup>, 张春红<sup>1\*</sup>

(1. 广东省农业科学院动物卫生研究所, 广东省兽医公共卫生公共实验室, 广东省畜禽疫病防治重点实验室, 广东 广州 510640; 2. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 采用 PCR 方法成功克隆了 3 株鸡贫血病病毒 (CAV) 广州株 VP3 和 VP1 的部分基因, 并进行了核苷酸序列测定。序列分析表明, 3 株 CAV 广州株与国内外其他 21 株 CAV 毒株的核苷酸序列相似性在 89.5%~100.0% 之间; 推导氨基酸序列的相似性在 84.8%~98.2% 之间。系统发育进化树分析显示, 3 株 CAV 广州株和中国 TJBD40、SD22、SD24 株都同处于一个分支上, 而与马来西亚的 SMSC-1 株、日本的 G6 株以及澳大利亚的 CAU269/7 株的亲缘关系较远。

**关键词:** 鸡贫血病病毒; 核苷酸序列; 分子进化树  
中图分类号: S854.43 文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)02-0025-04

## Cloning and Nucleotide Sequence Analysis of VP3 and VP1 Gene Sequences of Three CAV Isolates from Guangzhou

Shen Haiyan<sup>1</sup>, Zhang Jianfeng<sup>1</sup>, Liu Zhicheng<sup>1</sup>, Zhou Heng<sup>2</sup>, Guo Cuili<sup>2</sup>, Guo Pengju<sup>1</sup>, Zhang Chunhong<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Open Laboratory of Veterinary Public Health, Guangdong Provincial Key Laboratory of Livestock Disease Prevention, Guangzhou 510640, China; 2. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** The partial VP3 and VP1 genes of three CAV isolates from Guangzhou were cloned through PCR and sequenced. Sequence comparison revealed 89.5% to 100.0% similarities at nucleotides level and 84.8% to 98.2% similarities at amino acids level among the three CAV isolates from Guangzhou and other twenty-one CAV genomic sequences from GenBank. Phylogenetic tree analysis showed that the three CAV isolates from Guangzhou were genetically close to TJBD40, SD22, and SD24 isolated from China, but they were far away from Malaysia SMSC-1 isolate, Japan G6 isolate and Australian CAU269/7 isolate.

**Key words:** Chicken infectious anemia virus; nucleotide sequences; phylogenetic tree

鸡传染性贫血病 (chicken infectious anemia, CIA) 是由鸡贫血病毒 (chicken anemia virus, CAV) 引起的损害鸡的造血器官和淋巴器官组织的免疫抑制病。病鸡容易继发病毒、细菌和真菌感染<sup>[1]</sup>。本病以垂直传播为主, 水平传播一般不引起发病。成年鸡感染 CAV 后常呈亚临床带毒状态, 对养鸡业构成潜在的巨大威胁。我国自从崔现兰等<sup>[2]</sup>1992 年首次报道该病以来, 广西、安徽、

山东<sup>[3-5]</sup>等地也陆续报道了鸡群中该病的流行。

CAV 是圆环病毒科的单股环状 DNA 病毒, 其基因组可编码 3 种蛋白质, VP1、VP2 和 VP3。其中, VP1 是 CAV 的衣壳蛋白和主要免疫原蛋白<sup>[6]</sup>; VP2 是非结构蛋白, 在刺激机体产生中和抗体方面起到辅助作用, 在病毒子的组装过程中充当一个折叠蛋白, 但病毒装配为成熟粒子后逐渐消失<sup>[7]</sup>; VP3 是 CAV 的另一种非结构蛋白, 能够诱导癌变

收稿日期: 2015-01-15

\*: 通讯作者

基金项目: 国家科技计划项目 (2014DFA31730), 广东省科技计划项目 (2011B050700007, 2012B050500013), 广东省农业科学院院长基金 (201114)

的细胞发生凋亡<sup>[8]</sup>。从毒株的抗原性来看,CAV 均属于同一个血清型,但 CAV 分离株之间毒力不同,基因组序列也存在差异。本研究利用 PCR 技术,对广州地区的 3 株 CAV 毒株进行扩增,测定其 VP3 和 VP1 基因的部分序列,并与 GenBank 收录的 CAV 毒株序列进行比较与分析。

### 1 材料与方法

#### 1.1 病料

2014 年 5 月从广州地区 3 个鸡场采集疑似感染 CAV 的病鸡的胸腺、脾、法氏囊等组织。

#### 1.2 病毒 DNA 的提取

采集的疑似组织病料加 5 倍体积含青、链霉素的 0.01 mol/L (pH7.2) PBS 研磨,反复冻融 3 次,5 000 r/min 离心 10 min,收集上清经 0.22 μm 微型滤菌器过滤除菌,收集滤液,按照 Takara 公司的 MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit Ver4.0 试剂盒的操作步骤提取病毒 DNA。

#### 1.3 PCR 扩增

根据 NCBI GenBank 收录的 CAV CAU269/7 毒株 (GenBank 号:AF227982) 的 VP3 和 VP1 基因序列设计了 1 对引物:P1 5'-CTCACCAAGAAGAT-CTC-3';P2 5'-GGCTGAAGGATCCCCTATTC-3',预期扩增片段为 1 027 bp。采用 25 μL 的 PCR 反应体系,在 0.2 mL PCR 反应管内分别加入 10×PCR Buffer 2.5 μL,dNTPs (2.5mM) 2.0 μL,P1 和 P2 引物 (100 pmol/μL) 各 1.0 μL,5U/μL Ex-Taq DNA 聚合酶 0.25 μL,DNA 模板 2.0 μL,去离子水 16.25 μL.PCR 反应程序为:94℃ 5 min;94℃ 3min、52℃ 40s、72℃ 10s,循环扩增 35 次;最后 72℃ 延伸 10 min。

#### 1.4 PCR 扩增产物的克隆

在 1.0%琼脂糖凝胶上进行 PCR 产物电泳,将目的片段进行切胶回收和纯化,然后将纯化回收的 PCR 产物连接到 pMD-18T 载体上,转化 Top 10 感受态细菌。挑取在含有氨苄青霉素 (浓度为 100 μg/L) 的选择培养基上长出的菌落,37℃ 培养,然后使用 OMEGA 公司的质粒 DNA 小量纯化试剂盒提取质粒。

#### 1.5 序列测定、拼接与分析

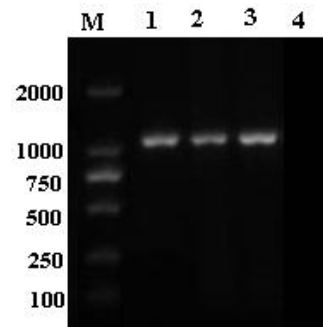
将 1.4 获得的质粒送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,每个片段至少进行 3 次测

序,以确保序列的可靠性。用 DNA Star 5.0 软件进行序列的拼接,最后获得完整的目的基因序列,并与 GenBank 上其他 CAV 毒株的基因序列进行相似性比较。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增结果

广州 3 个场疑似组织病料的 PCR 产物在 1.0%琼脂糖中电泳 20 min,可见清晰的与预期大小一致的约 1 027 bp 的特异性条带(见图 1)。分别标记为 CAV-1、CAV-2、CAV-3。



M: DL2000; 1: CAV-1; 2: CAV-2; 3: CAV-3; 4: 阴性对照

图 1 CAV 广州株 PCR 产物电泳结果

### 2.2 CAV 毒株核苷酸序列的相似性分析

对 3 株 CAV 广州株的部分基因进行了核苷酸序列测定,发现 CAV-2 和 CAV-3 的核苷酸序列完全相同,CAV-1 与 CAV-2 和 CAV-3 的相似性为 99.6%。将 3 株 CAV 广州株的序列与 GenBank 收录的 21 个 CAV 毒株的序列进行比较,发现 24 株 CAV 毒株核苷酸序列的相似性介于 89.5%~100.0%之间(见图 2)。CAV-1 与日本的 TR20 株、澳大利亚的 CAU269-7 和 704 株的核苷酸序列相似性均为 89.5%;CAV-2 和 CAV-3 与日本的 TR20 株、

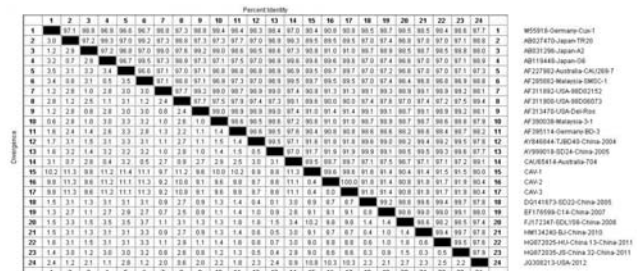


图 2 CAV 广州株基因组核苷酸序列相似性比较

马来西亚 SMSC-1 株的核苷酸序列相似性均为 89.5%;CAV-1 与中国的 SD24 株的核苷酸序列相似性为 91.7%;CAV-2 和 CAV-3 与中国的 TJBD40 株的核苷酸序列相似性为 91.9%。

2.3 CAV 广州株与其他毒株氨基酸序列的比较

3 株 CAV 广州株推导的氨基酸序列与国内外其他 21 株 CAV 毒株比较, 相似性在 84.8%~98.2%之间(见图 3)。3 株 CAV 广州株的 VP3 氨基酸序列与中国的 JS-China 32、BJ、SDLY08、C14、SD22、SD24、HU-China 13 株、以及美国的 CL37、98D02152、Del-Ros 株、日本的 A2 和马来西亚 SMSC-1、3-1 株只有 1 个差异 (aa1H→L); 与德国 BD-3 株和日本 TR20 株在氨基酸 (aa)1 位 (H→L)

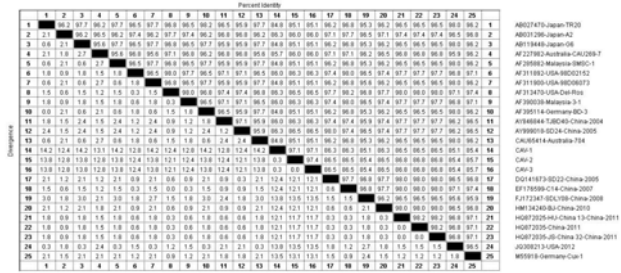


图 3 CAV 广州株推导氨基酸序列相似性比较

和 64 位 (S→N) 有 2 个差异; 与中国的 TJBD40 株在 aa1 位 (H→L)、aa64 位 (S→N) 和 aa100 位 (S→N), 与德国 Cux-1 株 aa1 位 (H→L)、aa113 位 (R→K) 和 aa115 位 (C→R) 有 3 个差异(图 4)。

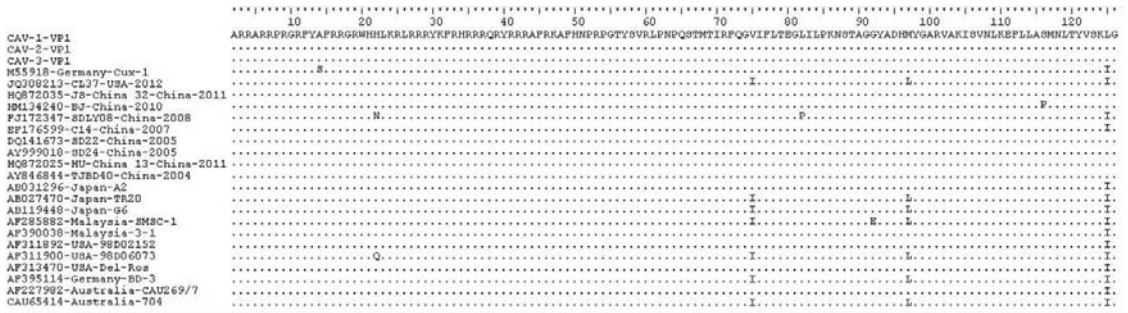


图 4 CAV 广州株与参考毒株 VP3 氨基酸序列分析

3 株 CAV 广州株 VP1 氨基酸序列与中国的 BJ 在 aa116 位 (S→P) 有 1 个差异, 与 SDLY08 在 aa22 位 (H→N) 和 aa82 位 (L→P) 有 2 个差异, 与其他国家毒株的氨基酸差异比较大。CAV-1、CAV-2 和 CAV-3 株 VP1 氨基酸序列中的第 125 位为 L, 而中国的 SDLY08 和 C14, 日本的 A2、G6 和 TR20 株, 马来西亚的 SMSC-1 和 3-1 株, 美国的 CL37、

98D06073、98D02152 和 Del-Ros 株, 德国 BD-3 株、澳大利亚的 CAU269/7 和 704 株的第 125 位氨基酸均为 I(见图 5)。

2.4 CAV 毒株的遗传进化关系分析

将 3 株 CAV 广州株的基因序列与 GenBank 收录的 21 个 CAV 毒株序列进行多重序列的比较, 用 Mega 4.0 软件, 根据最大可能性法, 绘制了分子

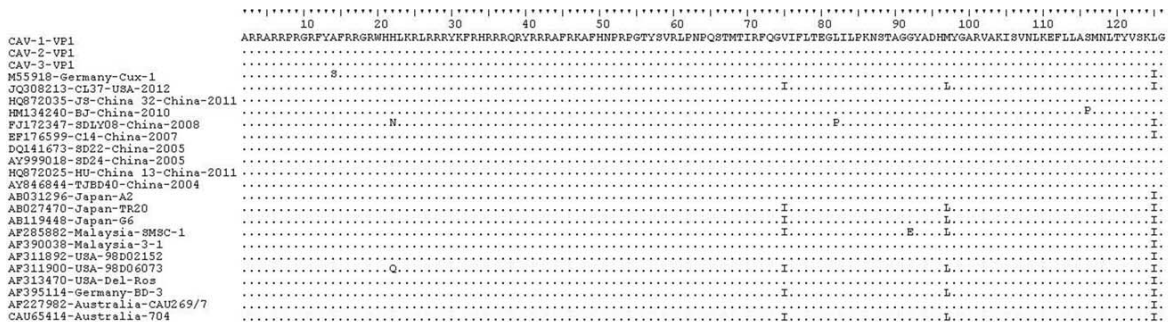


图 5 CAV 广州株与参考毒株 VP1 氨基酸序列分析

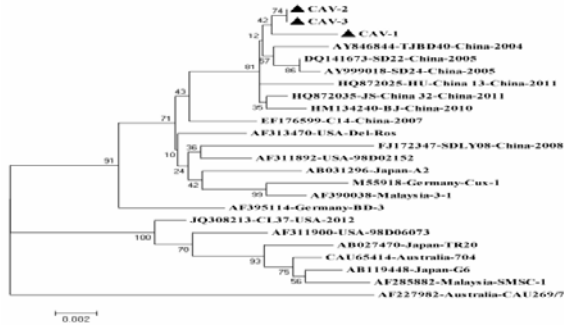


图 6 CAV 广州株的进化树

进化树(见图 6)进行分析。结果显示,3 株 CAV 广州株、中国的 TJBD40、SD22、SD24、HU-China 13、JS-China 32、BJ、C14、SDLY08, 以及美国的 De1-Ros 和 98D02152、日本的 A2、马来西亚的 3-1 与德国的 Cux-1 株同处于一个大的分支上;我国不同年份分离的 CAV 毒株序列不都在一个分支中,在遗传进化关系上不存在明显的规律。

### 3 小结与讨论

我国目前已有文献报道了部分地区 CAV 野毒株的序列测定与分析<sup>[9-12]</sup>。本文利用 PCR 技术对 3 株 CAV 广州株的 VP3 和 VP1 的部分基因进行扩增、克隆及测序,并进行比较分析,为广东地区的鸡场防控和净化该病提供技术支持。

本研究中测定分析的 3 株 CAV 毒株是来自发病鸡的临床病料样本经研磨处理、提取病毒 DNA,然后测序获得的,未在细胞上进行分离和培养传代,比较客观地反映了 CAV 在鸡体内存在的真实情况和 CAV 毒株的遗传基因特性,而且避免了细胞培养适应过程中可能发生的基因变异。CAV-2 和 CAV-3 的核苷酸序列完全相同,CAV-1 与 CAV-2 和 CAV-3 的相似性为 99.6%。从病料来源上看,这 3 株 CAV 来自距离较近的 3 个鸡场的发病鸡,由此可推测 3 个鸡场的流行毒株极为相似。3 株 CAV 广州株 VP1 氨基酸序列与国内外其它毒株的氨基酸序列差异较大,分析可能是因为 VP1 是 CAV 病毒子表面的衣壳蛋白,也是病毒蛋白中构成中和性抗原位点的组成部分,它的变异与宿主免疫反

应的选择压力有关。

CAV 是危害养禽业的主要病原,可经水平传播和垂直传播,感染后的死亡率在 15%以下,容易被忽视。但鸡群感染该病毒后,引起的免疫抑制导致鸡群对其它病原易感性增加,对疫苗的免疫应答能力低下,最终导致混合感染或继发感染,造成严重的经济损失。因此,加强对 CAV 的检测,及时掌握该病的流行现状,有利于 CAV 的防控,降低其给养禽业带来的危害。

### 参考文献:

- [1] Fussels W. Poultry industry strategies for control of immunosuppressive diseases[J]. *Poult Sci*, 1998, 77 (8): 1193-1196.
- [2] 崔现兰, 辛贵香, 吴冬来. 鸡传染性贫血病毒的鉴定[J]. *中国畜禽传染病*, 1992 (6): 3-5.
- [3] 王莉莉, 艾武, 吴荫伟, 等. 山东省鸡传染性贫血流行病学调查[J]. *山东家禽*, 2002 (8): 8-9.
- [4] 蒋玲艳, 李莉萍, 韦平, 等. 广西鸡传染性贫血流行病学的研究[J]. *广西畜牧兽医*, 2004, 20 (2): 52-54.
- [5] 胡晓苗, 张丹俊, 赵瑞宏, 等. 安徽鸡传染性贫血感染的血清学调查[J]. *中国兽医杂志*, 2011, 47 (12): 47-48.
- [6] Noteborn M H M, Kranenburg O, Zantema A, et al. Translation of chicken anemia virus (CIAV) genome and synthesis of its 52 Kda protein[J]. *Gene*, 1992, 118 (2): 267-271.
- [7] Peters M A, Crabb B S, Washington E A, et al. Site-directed mutagenesis of the VP2 gene of Chicken anemia virus affects virus replication, cytopathology and host-cell MHC class I expression[J]. *J Gen Virol*, 2006, 87: 823-831.
- [8] Noteborn M H, Todd D, Verschuereen C A, et al. A single chicken anemia virus protein induces apoptosis[J]. *J Virol*, 1994, 68 (1): 346-351.
- [9] 李延鹏, 崔治中. 一株鸡传染性贫血病毒野毒株致病性及其全基因组序列比较[J]. *微生物学报*, 2007, 47 (5): 894-898.
- [10] 何成强, 丁乃峥, 李只鹏, 等. 鸡贫血病毒哈尔滨分离株全基因克隆和序列分析[J]. *微生物学报*, 2002, 42 (4): 436-441.
- [11] 梁智选, 杨汉春. 我国部分地区鸡贫血病毒全基因组核苷酸序列的比较与分析[J]. *中国预防兽医学报*, 2008, 30 (2): 127-131.
- [12] 邓显文, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 鸡传染性贫血病毒广西株全基因组的克隆与序列分析[J]. *动物医学进展*, 2011, 32 (4): 19-22.

# 癸氧喹酯干混悬剂防治人工感染鸡球虫病的效果试验

李美娣, 陈宝妮, 武力\*, 涂玉蓉, 陈素珍, 王昌库  
(广州华农大实验兽药有限公司, 广东 广州 510642)

**摘要:** 通过对14日龄岭南黄鸡人工感染柔嫩艾美耳球虫卵囊, 测定国家四类新兽药癸氧喹酯干混悬剂的抗球虫作用。研究表明, 新兽药癸氧喹酯干混悬剂按照推荐剂量0.25g/L (15mg/L) 饮水给药对鸡球虫病表现出高效的抗球虫活性, 具有良好的预防鸡球虫病效果, 达到100%的保护率, 抗球虫指数高达202.2。

**关键词:** 癸氧喹酯; 干混悬剂; 鸡球虫病; 抗球虫活性

**中图分类号:** S854.5

**文献标识码:** B

**文章编号:** 1005-8567(2015)02-0029-03

## The Efficacy of Decoquinate for Prevention Against the Coccidiosis in Chickens

Li Meidi, Chen Baoni, Wu Li\*, Tu Yurong, Chen Suzhen, Wang Changku  
(Guangzhou Huanongda Experimental Veterinary Drug Co., LTD., Guangzhou, 510642, China)

**Abstract:** The efficacy of decoquinate on prevention against the Coccidiosis in chickens was tested in this study by infecting the Eimeria oocysts to 14-day-old chicken. The results showed that the effect of 6% decoquinate suspension drinking water (15 mg/L) could prevent the coccidiosis in chickens, chicken survival rate was 100%, and the ACI was 202.

**Key words:** Decoquinate; Prevention; Coccidiosis; Anti-coccidiostat

癸氧喹酯是新型的喹酯类抗球虫药物, 不溶于水, 具有高效的化学活性和低的毒性, 它对艾美耳属的7种球虫引起的鸡球虫病具有良好的效果。自从2004年进入中国市场以来, 在我国各地区球虫均保持着较高的敏感性。目前, 获得批准的制剂主要有6%预混剂、3%溶液, 但预混剂只能通过拌料给药, 而溶液剂中添加的有机溶剂较多, 对适口性有较大的影响。为提供适口性较好的饮水给药方式, 研制出癸氧喹酯干混悬剂国家四类新兽药。为评价其对靶动物鸡的有效性, 本研究根据农业部兽药评审委员会编著的《实验临床试验技术规范》和《兽药临床试验管理规范》, 以及《兽用化学药物制剂研究基本技术指导原则》, 开展其对靶动物鸡的实验室临床试验。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 供试药物 癸氧喹酯干混悬剂: 广州某实

验兽药有限公司研制, 含量6%, 规格25g/袋, 批号为12030201。癸氧喹酯溶液: 青岛康地恩动物药业有限公司生产, 含量3%, 100mL/瓶, 生产批号2012052701。

1.1.2 供试鸡 从广东省农业科学院畜牧研究所种鸡场购进1日龄无球虫感染的健康岭南黄鸡苗350羽, 隔离饲养于经严格消毒的铁丝笼上, 并铺垫干净报纸, 红外线灯保温。饲喂不含任何抗球虫药物的全价配合饲料, 饮用新鲜洁净自来水。

1.1.3 供试卵囊 供试卵囊为孢子化柔嫩艾美耳球虫卵囊, 浙江株, 由华南农业大学兽医学院寄生虫学教研室保存。试验前经感染无球虫鸡繁殖复壮。

#### 1.2 方法

1.2.1 预试验 将上述7日龄供试鸡50只, 随机分成5组, 每组10只。除第1组(健康对照组)外, 其余各组每只鸡经口感染孢子化柔嫩艾美耳

球虫卵囊,感染剂量分别为  $0.5 \times 10^5$  个、 $1.0 \times 10^5$  个、 $1.5 \times 10^5$  个、 $2.0 \times 10^5$  个。

感染后 5 d 开始,观察各组鸡 24 h 内排出的粪便。结果显示,第 1、2 组粪便正常,鸡只精神健康、无死亡。第 3 组鸡只精神沉郁,血便较多,记为 +3 分,有 3 只鸡死亡;剖检可见盲肠肿大、充满血液。第 4 组鸡只精神严重沉郁,血便较多,记为 +4 分,有 5 只鸡死亡;剖检可见盲肠充满血样内容物。因此,选择  $1.5 \times 10^5$  个作为感染剂量。

**1.2.2 试验分组及处理** 将上述 14 日龄供试鸡随机分成 6 组,每组 50 只。除第 1 组(健康对照组)外,其余各组每只鸡经口感染孢子化鸡球虫卵囊  $1.5 \times 10^5$  个。第 2 组为感染对照组,第 3-5 组分别为癸氧喹酯干混悬剂低、中、高剂量组,第 6 组为癸氧喹酯溶液对照组。具体处理情况如表 1 所示。

表 1 试验分组及处理情况

组别	数量(只)	处 理
1	50	健康对照:不感染不给药。
2	50	感染对照:感染不给药。
3	50	癸氧喹酯干混悬剂:7.5mg/L 混饮,于感染后 1d 开始给药,连用 7d。
4	50	癸氧喹酯干混悬剂:15mg/L 混饮,于感染后 1d 开始给药,连用 7d。
5	50	癸氧喹酯干混悬剂:30mg/L 混饮,于感染后 1d 开始给药,连用 7d。
6	50	癸氧喹酯溶液:15mg/L 混饮,于感染后 1d 开始给药,连用 7d。

**1.2.3 观察项目和疗效判定标准** 感染后连续观察 7 d,记录下列项目,评价不同药物的抗球虫疗效。

**1.2.3.1 症状观察及平均血便记分** 试验开始后对每组鸡精神状态、皮毛色泽、食欲、粪便形态颜色等进行观察。感染后 5 d 开始,观察各组鸡 24 h 内排出的粪便。

分为 5 个等级进行血便记分,计算每组鸡的平均血便记分并进行分析。

- 0 分:粪便成形,不带血液。
- 1 分:25%的粪便带血。
- 2 分:50%的粪便带血。
- 3 分:75%的粪便带血。
- 4 分:100%的粪便带血。

**1.2.3.2 增重情况** 于 14 日龄和 21 日龄时分别

对每组鸡进行逐组称重(称重前停料 2~3 h),计算出各组鸡平均增重和相对增重率。

$$\text{相对增重率}(\%) = \frac{\text{用药组或感染不给药组平均增重}}{\text{不感染不给药组平均增重}} \times 100\%$$

**1.2.3.3 接种后各组鸡死亡情况** 整个试验过程中,记录各组鸡死亡情况,并对死鸡进行剖检,确定鸡只死因(观察鸡只的盲肠是否肿胀、出血,其内容物是否含有鸡球虫卵囊),判定是否由鸡球虫病致死。计算各组鸡死亡率和成活率。

**1.2.3.4 盲肠病变记分** 于感染后 7 d,每组剖杀 5 只鸡,观察每只鸡盲肠病变情况,分为 5 个等级进行病变记分。

0 分,肠壁光滑,无肉眼可见病变;

+1 分,肠道充血或增厚,有少量散在出血点;

+2 分,肠道增厚,有少量出血和渗出,有较多稀疏的病变,如多处肠区被感染和由柔嫩艾美耳球虫感染引起的盲肠出血;

+3 分,肠道弥漫性出血,有融合性大面积病变,一些肠壁增厚;

+4 分,肠道极度肿胀,严重出血或有肠芯,病变广泛融合,肠壁增厚,死于球虫病者,病变记分为 +4 分。

**1.2.3.5 病变值和卵囊值** 由病变记分  $\times 10$  得出病变值。对剖检的每对盲肠进行漂洗,计算每对盲肠所含球虫卵囊数,再根据表 2 换算成卵囊值。

表 2 卵囊数与卵囊值的转换

卵囊数 ( $\times 10^6$ )	0~0.1	0.11~1.0	1.1~1.9	2.0~5.9	6.0~10.9	$\geq 11.0$
卵囊值	0	1	10	20	30	40

**1.2.3.6 饲料报酬** 在整个试验过程中,记录各组鸡耗料情况,于感染后 7 d 称量每组鸡的总耗料情况,评价各组饲料报酬。

**1.2.3.7 抗球虫指数(ACI)** 按照以上各项指标,计算抗球虫指数。

抗球虫指数 = (相对增重率 + 存活率)  $\times$  100 - (病变值 + 卵囊值)

评价标准:ACI > 180,为高效抗球虫药物。160 < ACI < 180,为中效抗球虫药物。120 < ACI < 160,为低效抗球虫药物。ACI < 120,为无效抗球虫药物。



## 2 结果与分析

### 2.1 症状观察与血便记分

在感染后 5 d 的 24 h 内,详细观察各组鸡临床症状,并进行血便记分。具体结果如表 3。

在感染后 5 d 的 24 h 内,感染对照组鸡只陆续排出棕红色的稀粪,鸡群趴在笼上,精神沉郁,饮水量和采食量均出现明显下降;健康对照组、癸氧喹酯干混悬剂推荐剂量组和高剂量组和癸氧喹酯溶液组鸡群健康活泼,精神良好,饮食欲正常,粪便成形正常,可见白色的尿酸盐沉积,无血便或稀便出现。

表 3 感染后 5 d 的 24 h 内各组鸡临床症状及平均血便记分

组别	临床症状	平均血便记分(分)
1	鸡群精神状态良好,饮食欲正常。	0
2	鸡群精神沉郁;食欲下降,饮水量减少;粪便变软,陆续排出棕红色粪便,100%粪便带血;死鸡 1 只,剖检判定为鸡球虫致死。	4
3	鸡群精神沉郁;食欲下降,饮水量减少;粪便变软,陆续排出棕红色粪便;死鸡 1 只。	4
4	鸡群精神状态良好,饮食欲正常,粪便成形,无血便出现。	0
5	鸡群精神状态良好,饮食欲正常,粪便成形,无血便出现。	0
6	鸡群精神状态良好,饮食欲正常,粪便成形,无血便出现。	0

### 2.2 增重情况

于感染后 7 d 对各组鸡进行逐组称重后,计算各组平均增重和相对增重率。各组鸡增重情况如表 4 所示。结果表明,癸氧喹酯干混悬剂按照推荐剂量添加,对鸡只的增重有促进作用。

### 2.3 接种后各组鸡死亡情况

感染后 5 d,感染对照组和癸氧喹酯干混悬剂低剂量组分别死亡 3 只鸡和 1 只鸡,剖检可见盲肠高度肿胀、充血,内容物为新鲜血液,确定为球虫病致死。其余各组鸡未出现死亡,保护率达 100%。这说明,癸氧喹酯在球虫生活史的早期即开始发挥作用,能有效保护肠道免受球虫的侵害,且药效持续时间长,对鸡群具有充分的保护作用。

### 2.4 盲肠病变记分及盲肠卵囊计数

感染后 7 d,各组剖杀 5 只鸡,观察盲肠病变情况并记分,计算病变值。然后对盲肠进行漂洗,根据麦克马斯特氏法(McMaster's method)计算

表 4 各组鸡增重情况

项目组别	供试鸡(只)	平均始重(g)	平均末重(g)	平均增重(g)	相对增重率(%)
1	50	292.5	494.6	202.1	100.0
2	50	276.2	420.0	143.8	71.2
3	50	288.9	429.8	140.9	69.7
4	50	279.8	486.3	206.5	102.2
5	50	283.3	482.8	199.5	98.7
6	50	280.2	479.3	199.1	98.5

每对盲肠卵囊数,并换算成卵囊值。具体结果如表 5 所示。

### 2.5 饲料报酬

于试验结束后,计算各组总耗料情况;根据总增重计算出料肉比,评价饲料报酬。详细结果如表 6 所示。

从表 6 可以看出,感染对照组鸡在感染球虫后,食欲不振,生长发育受到极大影响,料肉比达到 2.16:1。而在感染后 1 d 即按照推荐剂量使用癸氧喹酯干混悬剂和癸氧喹酯溶液后,鸡群增重明显,料肉比较低。这说明,按照推荐剂量使用癸氧喹酯干混悬剂后,在避免鸡群免受球虫危害的同时,还能大大提高饲料转化率,具有明显的促生长作用。

表 5 各组鸡盲肠病变平均记分和卵囊数

组别	盲肠病变		盲肠卵囊	
	平均记分	病变值	卵囊数( $\times 10^6$ )	卵囊值
1	0	0	0	0
2	2.8	2.8	3.6	20
3	1.7	17	2.8	20
4	0	0	0	0
5	0	0	0.1	0
6	0	0	0	0

表 6 各组饲料报酬

组别	总耗料(kg)	总增重(kg)	料肉比
1	20.0	10.1	1.98
2	15.3	7.2	2.13
3	14.3	7.0	2.04
4	19.5	10.3	1.89
5	18.8	10.0	1.88
6	18.9	10.0	1.89

(下转第 47 页)

## 肌内注射后氟苯尼考在肉鸡体内 生理药动学模型血流图模拟设计

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

**摘要:** 根据氟苯尼考在肉鸡体内的药动学特征及肉鸡的生理学、解剖学特点, 设计了一个包含氟苯尼考及氟苯尼考胺两部分在内的生理药动学模型血流图。模拟肌内注射给药后药物的吸收、分布、肝脏代谢及肝肠循环等过程。为氟苯尼考及氟苯尼考胺在肉鸡体内 PBPK 模型的最终建立提供了思考路径。

**关键词:** 氟苯尼考; 氟苯尼考胺; 生理药动学模型; 肉鸡; 血流图

**中图分类号:** S854.5      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1005-8567(2015)02-0032-04

## Rheogram of a Physiologically Based Pharmacokinetics Model for Florfenicol in Broiler Chickens after Intramuscular Administration

Li Yanan, Yang Fan\*, Wang Dan, Sun Lingling, Bai Jingying  
(College of Animal Science and Technology, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

**Abstract:** The rheogram of a physiologically based pharmacokinetics model for florfenicol and florfenicol amine was designed successfully in broiler chickens based on the pharmacokinetics characteristics of florfenicol and the anatomical and physiological features in broiler chickens. This model could be used to simulate the absorption, distribution, hepatic metabolism, and enterohepatic circulation of florfenicol in broiler chickens after intramuscular injection. The successful design of this rheogram has laid a good foundation for predicting the residues of florfenicol and florfenicol amine in broiler chickens after intramuscular administration.

**Key words:** Florfenicol; Florfenicol Amine; Physiologically Based Pharmacokinetics Model; Broiler Chickens; Rheogram

氟苯尼考(Florfenicol)是一种新型的动物专用酰胺醇类广谱抗菌药<sup>[1]</sup>,临床上广泛用于治疗敏感菌所致的细菌性疾病<sup>[2]</sup>,效果显著。与早期的酰胺醇类药物相比,氟苯尼考结构中不含抑制骨髓造血机能的有关基团,降低了该类药物治疗和人体的毒性。但如果消费者长期摄入残留有氟苯尼考的动物组织的话,仍会造成严重的不良反应:如过敏反应、免疫毒性、胚胎毒性<sup>[3]</sup>等或引发细菌耐药性<sup>[4]</sup>。因此有效预测动物使用氟苯尼考后各可食性组织中的药物浓度,对于保证动物性食品安全来讲意义重大。我国农业部规定的氟

苯尼考的残留标示物是其代谢物——氟苯尼考胺,其残留靶组织及最高残留限量(MRL)在不同动物体内有所不同,其中肉鸡体内的残留靶组织分别是肌肉、皮脂、肝脏和肾脏,MRL则分别是100、200、2500和750 μg/kg。

生理药动学(Physiologically Based Pharmacokinetics, PBPK)模型是一种模拟机体循环系统的血液流向,将各器官或组织相互联结起来而建立的整体模型<sup>[5]</sup>。该模型中包含了各组织的体积和血流速率常数、药物在各组织中的组织-血浆分配系数、肝脏和肾脏中药物的清除率等,能够

收稿日期:2014-12-01

\*:通讯作者

基金项目:河南科技大学SRTP项目(2014267)

从机理上预测药物在动物体内的吸收、分布、代谢和排泄 (ADME) 过程。因此,可用于预测兽药等外源物质在动物各组织中的浓度。

目前,PBPK 模型在兽药残留预测中的应用尚处在初期阶段,相关研究较少,另外因 PBPK 模型涉及到 ADME 等多个过程,模型中包含众多组织模块,模型结构较为复杂,因此如何设计科学合理的血流图是实现建模的基础和前提<sup>[6]</sup>。本文在对氟苯尼考及肉鸡生理学和解剖学参数等资料分析的基础上,拟设计氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺在肉鸡体内 PBPK 模型的血流图,为成功建立氟苯尼考及氟苯尼考胺在肉鸡体内的 PBPK 模型奠定基础。

## 1 方法

### 1.1 PBPK 模型参数的收集

**1.1.1 肉鸡的生理学和解剖学参数** 目前,家禽体内的 PBPK 模型研究较少,涉及到的动物种属包括肉鸡<sup>[5,7]</sup>、蛋鸡<sup>[8-10]</sup>、火鸡<sup>[7,11]</sup>、雉鸡<sup>[7]</sup>、鹌鹑<sup>[7]</sup>等几种。Cortright 等<sup>[7]</sup>屠宰了 10 只平均体重为 2.668 kg 的肉鸡,分离各组织器官后称重,最终计算得到各器官占体重的百分数见表 1。而 Wideman 等<sup>[12]</sup>的试验结果显示肉鸡的心脏全血输出量 (CO) 为 (11.3 ~ 17.6) L/kg/h。PBPK 模型建模过程中,为了和模型中的另一重要参数 (组织 - 血浆分配系数) 相匹配,通常需要将全血输出量转化为血浆输出量 ( $Q_{tot}$ ),公式如下:  $Q_{tot} = CO \times bw^{0.74} \times (1 - PCV)$ , 其中 pcv 为血细胞压积,肉鸡体内其数值为 0.33; bw 为体重。PBPK 模型的组织器官中血流速率常数常以心输出量的百分数来表示。肉鸡中的具体数值见表 1<sup>[7]</sup>。

**1.1.2 氟苯尼考的药动力学参数** 肌内注射后,氟苯尼考在肉鸡体内吸收迅速,吸收半衰期 ( $t_{1/2ka}$ ) 仅为 31.50 min,吸收速率常数 (Ka) 为  $0.02 \text{ min}^{-1}$ ,达峰时间 (Tmax) 为 100.41 min<sup>[13]</sup>;另外其吸收较完全,生物利用度 (F) 高达 96.58%<sup>[13]</sup>。给药后,氟苯尼考在肉鸡体内广泛分布,其表观分布容积 (Vd) 高达

6.47 L/kg<sup>[13]</sup>,与猪体内的数值<sup>[14]</sup> (7.80 L/kg) 相当。氟苯尼考在肝药酶作用下会发生代谢,它首先转化为其单氯丙二醇和乙醇形式的代谢物,前者直接转化为氟苯尼考胺,后者则经氟苯尼考草氨酸形式最终转化为氟苯尼考胺<sup>[15]</sup>。我国规定氟苯尼考的残留标示物为氟苯尼考胺。因氟苯尼考代谢为氟苯尼考胺的过程较为复杂,涉及到几种不同的中间代谢产物,较难建立详细的代谢模型预测氟苯尼考胺的生成过程,因此参考 Yang 等<sup>[16]</sup>的方法,采用一步代谢 (假设氟苯尼考仅经一步代谢成氟苯尼考胺) 的方式来模拟氟苯尼考胺的生成。

**1.1.3 氟苯尼考及氟苯尼考胺的组织 - 血浆分配系数** 在 PBPK 模型中,组织 - 血浆分配系数是一类较重要的参数,其数值大小与药物的理化性质及各组织的成分构成有关。目前,其计算方法可总结为体内计算法、体外计算法及模型优化法 3 种,其中应用最多且结果最准确的当属体内计算法。体内计算法又可分为 2 种:稳态浓度法<sup>[16]</sup>和面积法<sup>[17]</sup>。前者是通过单次或多次给药以后,使动物体内的药物浓度达到稳态,之后屠宰动物获得组织和血浆中的稳态药物浓度。对于非消除性组织而言,其数值即等于组织稳态浓度除以血浆稳态浓度;而对于消除性组织而言,还要加上消除性组织对药物的固有清除率。而面积法与稳态浓度法类似,只不过要将稳态浓度换为药时曲线下面积。我们前期曾建立过氟苯尼考在鲫鱼体内的 PBPK 模型<sup>[18]</sup>,其中氟苯尼考的组织 - 血浆分配系数即是采用面积法计算得到,肾脏、肝脏、肠及肌肉中对应的数值分别为 0.9、1.3、0.52 和 0.9。而氟苯尼考胺的组织 - 血浆分配系数则可以通过参数优化的方法获得。

**1.1.4 其他参数** 在 PBPK 模型中,除了以上参数外,还需要定义给药方案参数 (包括给药剂量、给药间隔等) 及计算机模拟参数 (包括最大步长、最小步长、积分步长、通信间隔、计算机算法及模

表 1 肉鸡的生理学和解剖学参数

参数	静脉	动脉	肺脏	皮脂	心脏	肌肉	肝脏	肾脏	胃肠道内容物	其他
重量 (体重百分数)	1.2	0.6	0.85	8.36	0.67	64.22	3.54	0.92	7.81 <sup>a)</sup>	11.83 <sup>b)</sup>
血流量 (心输出量百分数)	100 <sup>c)</sup>	100 <sup>c)</sup>	100 <sup>c)</sup>	1.5	5.78	35	7.05 <sup>d)</sup>	9.96	NA	40.71 <sup>e)</sup>

1): a: 胃肠道内容物指嗦囊、肌胃、腺胃和肠道中所有内容物; b: 其他组织的重量由 100 减去另 9 个组织 (或组织内容物) 之和得到; c: 静脉、动脉和肺脏中的血流量均等于心输出量; d: 肝脏的血流量为门静脉和肝动脉之和; e: 其他组织的血流量由 100 减去皮脂、心脏、肌肉、肝脏和肾脏之和得到; NA: 代表 Not applicable (不适用)。

拟终止条件等)。

### 1.2 模型的假设

任何模型的构建都是建立在一定的假设基础之上的, PBPK 模型也不例外<sup>[6]</sup>。氟苯尼考分子量适中、脂溶性较强, 在动物体内的分布速率主要取决于组织的血流速率常数, 因此这里假设氟苯尼考在肉鸡体内的分布属于血流限速型。与之对应的是膜限速型, 目前仅见托拉菌素在羊体内的分布更接近于膜限速型, 这与托拉菌素的自身性质有关: 托拉菌素分子量高达 806.23, 且其水溶性极强, 无法轻松通过脂质双分子层生物膜完成其转运过程, 因此在其分布过程中跨膜转运为限速步骤。除血流限速这一假设以外, 为简化模型结构还需作如下假设: (1) 氟苯尼考肌内注射后, 迅速且完全自注射部位吸收进入血液循环 (吸收过程中无时滞, 生物利用度为 100%); (2) 随血液循环转运到肝脏的氟苯尼考会发生“一步代谢”, 转化为氟苯尼考胺, 且该过程服从一级速率; (3) 氟苯尼考及氟苯尼考胺在组织和血液间的分配瞬间达到平衡, 此平衡取决于药物在组织和血液间的分配行为, 与时间无关; (4) 组织中的氟苯尼考和氟苯尼考胺的浓度与从组织中流出的血液 (静脉血) 中的浓度的比值 (分配系数) 为恒定值; (5) 氟苯尼考和氟苯尼考胺的血浆和组织蛋白结合率均为 0, 即体内的氟苯尼考和氟苯尼考胺均仅以游离的分子形式存在, 可自由转运; (6) 氟苯尼考胺通过肾脏排泄清除, 且该过程均服从一级速率; (7) 氟苯尼考在肉鸡体内存在肝肠循环; (8) 该 PBPK 模型的氟苯尼考胺部分仅包括 4 个残留靶组织, 其他组织器官均并入虚拟的其他室。

## 2 结果与分析

利用收集的参数资料和模型的假设条件, 根据生理学和解剖学知识, 将各组织器官借助于血流连接成整体的 PBPK 模型。图 1 为氟苯尼考及氟苯尼考胺在肉鸡体内 PBPK 模型的结构图。该结构模型包括两部分——原形药物和代谢物, 每部分又均包括多个主要组织器官, 各组织间通过血流相互联系起来。氟苯尼考肌内注射后全部进入到注射部位, 之后自注射部位迅速完全吸收进入静脉血, 吸收速率常数为  $K_a$ , 然后随血液循环分布到各组织器官, 其中到达肝脏的药物会发生代谢, 代谢速率常数为  $K_M$ , 除代谢部分之外, 肝脏中氟苯尼考

还会随胆汁汇集到胆囊 (速率为  $K_{liver}$ ), 并进入肠道 (速率为  $K_{gb}$ ), 且最终自肠道全部重吸收 (速率为  $K_{ra}$ ), 完成肝肠循环。该血流图通过肝脏代谢将氟苯尼考和氟苯尼考胺两部分连接起来, 氟苯尼考胺部分与氟苯尼考相似, 但氟苯尼考胺的清除由肾脏排泄完成<sup>[15]</sup>, 肾清除率以  $Cl_{re}$  表示。

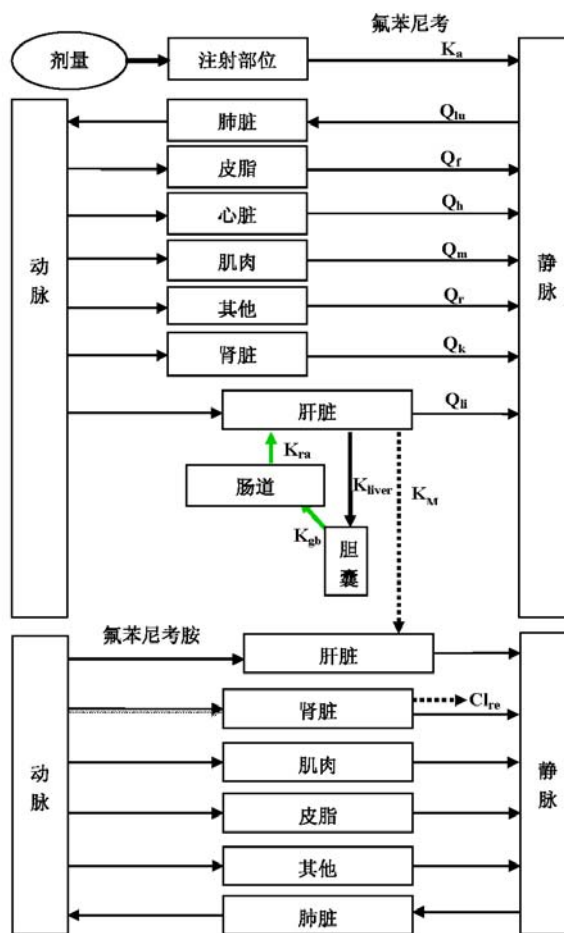


图 1 肌内注射后氟苯尼考原形药物及氟苯尼考胺的 PBPK 模型血流图

笔者<sup>[18]</sup>前期曾建立过氟苯尼考在鲫鱼体内的 PBPK 模型, 并利用不同给药途径间的模型外推预测了单次肌内注射和灌胃给药后氟苯尼考在鲫鱼血浆、肌肉、肾脏、肝脏、胆汁和腮内的浓度。本文所建模型与前述模型有些区别: (1) 鱼的血液循环是通过腮将静脉血和动脉血连接起来的, 家禽是通过肺部将静脉血和动脉血连接起来的; (2) 本文所建模型结构考虑了氟苯尼考的代谢情况, 能够用于预测氟苯尼考胺的浓度的研究。本模型结构未考虑肉鸡的体重变化, 因为在我国氟苯尼考作

为治疗使用时一般连用 3~5 天, 体重变化较小。本研究最终目的在于预测氟苯尼考在肉鸡中的残留, 因此一定要包括残留靶组织和残留标示物。我国规定氟苯尼考的残留标示物为氟苯尼考胺, 但欧盟和美国规定的残留标示物却是氟苯尼考 + 氟苯尼考胺。因此本研究为了扩大该模型的应用范围, 并未将氟苯尼考部分精简。

Cortright 等<sup>[7]</sup>曾建立过咪达唑仑在肉鸡体内的 PBPK 模型, 并将肉鸡模型外推到火鸡、雉鸡和鹌鹑。相较于本文所建模型, Cortright 等所建模型因无吸收相(静脉注射给药), 模型结构较简单, 且模型中也未包含肝肠循环等机理部分。MacLachlan<sup>[8]</sup>建立过相对复杂的 PBPK 模型, 并在模型中加入体重变化模块, 来预测肉鸡和蛋鸡长期在外源化合物暴露下可食性组织及鸡蛋中异物的残留情况。在我国, 氟苯尼考作为治疗使用时一般连用 3~5 天, 因此在如此短的时间内, 本文并未考虑肉鸡的体重变化。Hekman 等<sup>[10]</sup>则建立了 PBPK 模型来模拟鸡蛋的形成过程, 并利用该模型预测了氨苯磺胺、磺胺喹噁啉和乙胺嘧啶三种兽药在蛋清和蛋黄中的残留消除情况。与鸡肉等相比, 鸡蛋也是一种常见的动物性食品, 且其形成的生理过程要比鸡肉等复杂, 兽药在蛋白和蛋黄中沉积的速度又不一样, 因此 Hekman 等所建的这个 PBPK 模型尚有优化空间。

### 3 结论

本文针对氟苯尼考的药动学特征及肉鸡的生理学和解剖学特点, 建立了一个包括氟苯尼考和氟苯尼考胺两部分在内的 PBPK 模型的结构图, 包含了主要的可食性组织、主要的代谢和排泄器官以及肌内注射吸收模块和肝肠循环模块。本研究设计的血流结构图为氟苯尼考及氟苯尼考胺在肉鸡体内 PBPK 模型的最终建立提供了思考路径。

#### 参考文献:

- [1] 谢恺舟, 姚宜林, 徐东, 等. 高效液相色谱荧光检测法同时检测鸡蛋中氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺残留[J]. 中国兽医杂志, 2011, 47(8): 74-77.
- [2] 刘澜, 田玲, 冯华兵, 等. 氟苯尼考肺靶向明胶微球制备方法的试验[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(11): 71-74.
- [3] 孙雷, 张骊, 徐倩, 等. 氟苯尼考的毒性及残留检测方法研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2009, 43(6): 49-52.
- [4] Yang F, Liu H W, Li M, et al. Use of a Monte Carlo analysis within a physiologically based pharmacokinetic model to predict doxycycline residue withdrawal time in edible tissues in swine[J]. Food Addit Con-

- tam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2012, 29(1): 73-84.
- [5] 鲍杰, 罗显阳, 朱理想, 等. 土霉素在鸡体内的生理房室模型研究[J]. 中国家禽, 2010, 32(22): 25-27.
- [6] 罗显阳, 蔡芳芹, 远立国, 等. 环丙沙星在大鼠体内的生理药动学模型的血流图设计[J]. 中国农业科学, 2010, 43(18): 3857-3861.
- [7] Cortright K A, Wetzlich S E, Craigmill A L. A PBPK model for midazolam in four avian species[J]. J Vet Pharmacol Ther, 2009, 32(6): 552-565.
- [8] MacLachlan D J. Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for residues of lipophilic pesticides in poultry[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2010, 27(3): 302-314.
- [9] MacLachlan D J. Influence of physiological status on residues of lipophilic xenobiotics in livestock[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2009, 26(5): 692-712.
- [10] Hekman P, Schefferlie G J. Kinetic modelling and residue depletion of drugs in eggs[J]. Br Poult Sci, 2011, 52(3): 376-380.
- [11] Pollet R A, Glatz C E, Dyer D C. The pharmacokinetics of chlortetracycline orally administered to turkeys: influence of citric acid and Pasteurella multocida infection[J]. J Pharmacokinet Biopharm, 1985, 13(3): 243-264.
- [12] Wideman R J, Maynard P, Bottje W G. Venous blood pressure in broilers during acute inhalation of five percent carbon dioxide or unilateral pulmonary artery occlusion[J]. Poult Sci, 1999, 78(10): 1443-1451.
- [13] Afifi N A, Abo E K. Tissue concentrations and pharmacokinetics of florfenicol in broiler chickens[J]. Br Poult Sci, 1997, 38(4): 425-428.
- [14] 刘雅红, 丁煊中, 冯淇辉, 等. 氟苯尼考在猪的群体药动学[J]. 中国兽医杂志, 2003, 39(10): 32-35.
- [15] Anadon A, Martinez M A, Martinez M, et al. Plasma and tissue depletion of florfenicol and florfenicol-amine in chickens[J]. J Agric Food Chem, 2008, 56(22): 11049-11056.
- [16] Yang B, Huang L, Wang Y, et al. Residue depletion and tissue-plasma correlation of methyl-3-quinoline-2-carboxylic acid after dietary administration of olaquinox in pigs[J]. J Agric Food Chem, 2010, 58(2): 937-942.
- [17] Yang F, Huang X H, Li G H, et al. Estimating tulathromycin withdrawal time in pigs using a physiologically based pharmacokinetics model[J]. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2013, 30(7): 1255-1263.
- [18] Yang F, Sun N, Sun Y X, et al. A physiologically based pharmacokinetics model for florfenicol in crucian carp and oral-to-intramuscular extrapolation[J]. J Vet Pharmacol Ther, 2013, 36(2): 192-200.

# 鉴别猪流行性腹泻疫苗毒株与野毒株巢式 PCR 检测方法的建立及初步应用

刘琪, 冯晓声, 周如月, 贾爱卿\*, 王贵平  
(广东海大畜牧兽医研究院, 广东 广州 511400)

**摘要:** 根据 GenBank 中猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 的基因序列分别设计两对引物, 在完成最佳条件筛选、特异性、敏感性试验的基础上, 建立一种快速区分 PEDV 疫苗毒株与野毒株的巢式 PCR 检测方法。建立的 PCR 快速检测方法能分别对 PEDV 疫苗毒株和野毒株扩增出特异性片段, 片段大小分别为 774 bp、150 bp。该方法对传染性胃肠炎病毒 (TGEV)、轮状病毒 (PoRV)、猪瘟病毒 (HCV)、伪狂犬病病毒 (PRV) 则不能扩增出特异性片段。该方法具有快速、灵敏、特异、通用等特点, 可用于实验室的快速诊断、分子流行病学的调查和野毒株的分离鉴定。

**关键词:** PEDV; 野毒株; 疫苗毒株; 巢式 PCR

**中图分类号:** S854.4

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2015)02-0036-03

## Nested RT-PCR Assay for Detection of Porcine Epidemic Diarrhea Virus

Liu Qi, Feng Xiaosheng, Zhou Ruyue, Jia Aiqing\*, Wang Guiping  
(Guangdong Haid Institute of Animal Husbandry & Veterinary, Guangzhou 511400, China)

**Abstract:** We created a nested PCR to detect and distinguish the wild PEDV strain and vaccine strain quickly, according to the sequence of ORF3 gene of PEDV published in GenBank, two pairs of primers were designed and synthesized. The specificity and sensibility of the nested PCR were validated by PEDV detection for piglet diarrhea in Guangdong province area. The results showed the nested PCR could amplify the specificity fragments of wild strain and vaccine strain, 774bp and 150bp respectively, the specificity fragments of TGEV, PoRV, HCV, PRV were negative. The nested PCR can be used for lab diagnosis, molecular epidemiology investigation and wild PEDV detection.

**Key words:** PEDV; wild strain; vaccine strain; nested PCR

猪流行性腹泻 (Porcine Epidemic Diarrhea, PED) 是由冠状病毒科猪流行性腹泻病毒 (Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 引起的, 以呕吐、水样腹泻、脱水和仔猪高致死率为特征的消化道传染病。该病多发生于冬春季节, 但近年来发病的季节性不突出, 表现为一年四季均有发生。1971 年该病首次报道于荷兰, 随后许多国家相继报道<sup>[1]</sup>, 我国于 1976 年发现本病<sup>[2]</sup>。目前该病已成为亚洲多数国家的常见传染病之一<sup>[3]</sup>, 给

生猪养殖造成了巨大的经济损失<sup>[4,5]</sup>。2013 年 5 月, PEDV 首次在美国爆发, 并很快蔓延至全国 14 个州<sup>[6]</sup>, 给美国养猪业带来了沉重的打击。

目前暴发的仔猪流行性腹泻是由 PEDV 变异株引起的, 对其 S 基因序列分析发现其与韩国毒株相似性高。临床病料病毒分离鉴定发现 PEDV 疫苗毒株与野毒株共存<sup>[7]</sup>。传统的 PEDV 疫苗毒株在其 ORF3 基因片段上存在着 49 个碱基的缺失。本研究针对这一特性, 分别在其 ORF3 基因片段上设

收稿日期: 2015-01-19

\*: 通讯作者

基金项目: 南沙区科技计划项目(2014KF01); 广州市产学研协同创新重大专项(156100070)

计了两对引物, 建立一种能快速鉴别诊断 PEDV 疫苗毒株与野毒株的检测方法。这对于临床病例确诊、指导合理用药尤为重要, 同时可为实验室的病原学检测提供一定的技术支持。

## 1 材料与方 法

### 1.1 病毒株、细胞及菌株

PEDV 活疫苗(毒株 CV777)购自上海海利生物技术股份有限公司; PEDV 野毒株由本实验室分离自广东某猪场; 感染 PEDV 7 天内小猪的小肠组织由本实验室保存。

Vero 细胞、DH5 $\alpha$  感受态、传染性胃肠炎病毒(TGEV)、轮状病毒(PoRV)、猪瘟病毒(HCV)、伪狂犬病毒(PRV)均由本实验室提供。

### 1.2 主要试剂及仪器

RNA 和 DNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司; 凝胶回收及质粒提取试剂盒均购自广州速研生物科技有限公司; nuclease Inhibitor、AMV reversease、dNTPs、rTaq 酶、DL2000 DNA Maker 和 pMD18-T 载体等均购自 TAKARA 公司。

### 1.3 引物

根据 GenBank 中 PEDV 的 ORF3 基因序列, 设计和筛选出 2 对引物, 用于建立巢式 PCR 检测方法。引物可分别扩增 PEDV 疫苗毒株和野毒株, 片段大小分别为 774 bp 和 150 bp 的特异性片段。引物由 Invitrogen(上海)公司合成。引物序列见表 1。

表 1 PEDV 疫苗毒株和野毒株鉴别诊断 PCR 引物序列

引物名称	引物序列	片段大小
ORF3U1	5' -CCTAGACTTCAACCTTACGA-3'	774bp
ORF3L1	5' -CAGGAAAAAGAGTACCAAAA-3'	
ORF3U2	5' -ACTGTGGTGCACTTTTAGAT-3'	150bp
ORF3L2	5' -AGCTGCTTTACCATTGAGAA-3'	

### 1.4 病毒 RNA 的提取

取接种 PEDV, 细胞病变达 85% 以上的培养细胞, 经反复冻融 3 次后, 收集病毒悬液。取 200  $\mu$  L 病毒悬液, 按照 RNA 提取试剂盒说明进行相关操作, 同时提取不接种病毒的细胞悬液 RNA, 作为阴性对照模板。

### 1.5 PCR 反应条件及反应体系

以上述 PEDV RNA 为模板进行反转录。反转录体系为 10  $\mu$  L: 5  $\times$  RT Buffer 2  $\mu$  L, dNTPs (2.5

mmol/L) 1  $\mu$  L, MgCl<sub>2</sub> (25mmol/L) 1  $\mu$  L, ORF3L1 (10 mmol) 1  $\mu$  L, RNase Inhibitor 0.2  $\mu$  L, RT Ace (100 U/uL) 0.3  $\mu$  L, 模板 RNA 2  $\mu$  L, 然后再加 DEPC 水调整至 10  $\mu$  L。在 42 $^{\circ}$ C 下反应 50min, 获得 cDNA。再以 cDNA 为模板, 先以外套引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50  $\mu$  L: 10  $\times$  PCR Buffer 5  $\mu$  L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4  $\mu$  L, 引物 ORF3U1、ORF3L1 各 (10 mmol) 1  $\mu$  L, Taq 酶 (5U/uL) 1  $\mu$  L, 模板 cDNA 2  $\mu$  L, 然后加 ddH<sub>2</sub>O 调整至 50  $\mu$  L。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 35 个循环 (ORF3U1 和 ORF3L1 为外侧引物, 扩增 774 bp 的片段)。然后再以外套 PCR 的产物为模板, 进行内套 PCR 扩增。内套 PCR 反应体系与外套一致。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 变性 45s, 59 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45s, 30 个循环 (ORF3U2 和 ORF3L2 为内侧引物, 扩增 150 bp 的片段); 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。PCR 扩增后的产物, 用 1% 琼脂糖凝胶在 120V 电压下电泳 22 min, 观察结果。

### 1.6 PCR 产物的克隆和序列测定

将扩增的 PCR 产物切胶后, 按照 OMEGA 凝胶回收试剂盒的说明书进行纯化回收, 分别克隆至 pMD18-T 载体中, 转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 选取阳性克隆重组质粒送 Invitrogen 公司进行序列测定。

### 1.7 特异性试验

分别以猪传染性胃肠炎病毒(TGEV)、轮状病毒(PoRV)、猪瘟病毒(HCV)、伪狂犬病毒(PRV)为模板进行巢式 PCR 扩增, 以检测该方法的特异性。

### 1.8 敏感性试验

用 Nanodrop 2000 测定阳性重组质粒浓度; 以重组质粒为模板, 按照 1:10 依次倍比稀释 9 个梯度样品作为 PCR 扩增的模板, 以检测该方法的敏感性。

### 1.9 临床应用

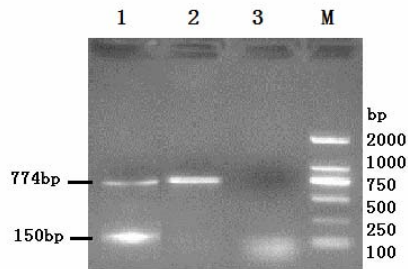
应用建立的巢式 PCR 快速检测方法分别对来自广东各地的 23 份样品进行 PCR 检测, 并与胶体金快速检测方法进行比较。

## 2 结果

### 2.1 巢式 PCR 扩增

该方法能对 PEDV 野毒株扩增出大小为 774 bp 和 150 bp 的两条片段, 而对疫苗毒株 CV777 只能扩增出一条 774 bp 的片段。这些均与目的片

段大小一致,证实该方法能有效地鉴别 PEDV 野毒株和疫苗毒株。见图 1。



1: PEDV 野毒株; 2: PEDV 疫苗毒株; 3: 细胞对照; M: Marker DL2000

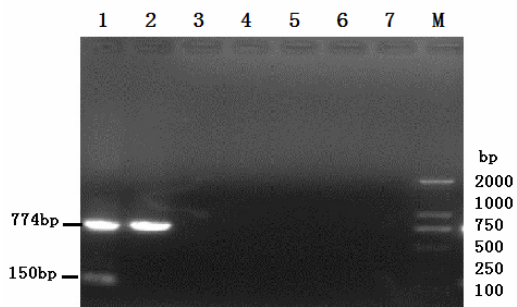
图 1 RT-PCR 扩增结果

## 2.2 PCR 产物克隆和序列测定

对成功克隆重组的质粒送 Invitrogen 公司进行序列测定,测序结果进行 BLAST 分析,与已报道的 PEDV ORF3 序列的相似性在 99.8%~100%之间,证实所扩增的片段为 PEDV ORF3 基因。

## 2.3 特异性试验

分别先对传染性胃肠炎病毒(TGEV)、轮状病毒(PoRV)、猪瘟病毒(HCV)进行反转录,然后再分别以 3 种反转录产物以及伪狂犬病毒(PRV)作为模板进行 PCR 试验。扩增结果显示(图 2)。以上 4 种病毒均不能得到有效扩增,阴性对照也没有出现任何条带。证实该方法具有特异性,不会在临床应用引起非特异性扩增。



M: DL 2000 Marker; 1: PEDV 野毒株; 2: 疫苗毒株 CV777; 3: TGEV; 4: PoRV; 5: HCV; 6: PRV; 7: 阴性对照

图 2 特异性试验结果

## 2.4 敏感性试验

试验测得质粒浓度为  $5.16 \times 10^{10}$  拷贝数/mL。对不同浓度的质粒 DNA 用已建立的 PCR 方法进行扩增。扩增结果见图 3。最终确定该 PCR 方法对 PEDV 质粒 DNA 的最低检出量为 0.002 pg/ $\mu$ L。

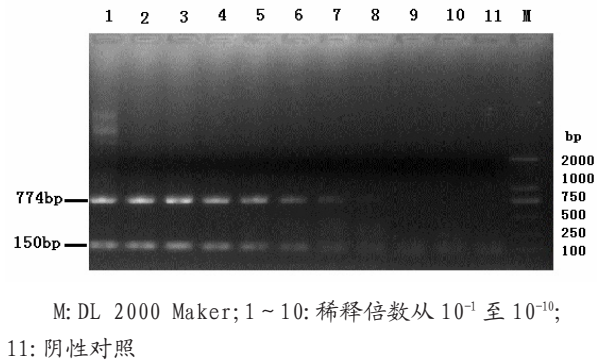


图 3 敏感性试验结果

## 2.5 临床应用

用该巢式 PCR 对临床 23 份腹泻样本进行检测,并与胶体金检测方法进行比对。结果显示巢式 PCR 检出率为 69.57% (16/23), 胶体金检出率为 65.22% (15/23)。其中两法均为阳性的 15 份,两法均为阴性的 7 份;仅有 1 份,巢式 PCR 为阳性,而胶体金为阴性。

## 3 小结

本文通过对 PCR 反应条件的优化,成功建立了鉴别诊断 PEDV 野毒株和疫苗毒株的巢式 PCR 方法,特异性和敏感性较高。该方法可用于 PED 的临床快速诊断。

## 参考文献:

- [1] BE 斯特劳, SD 阿莱尔, WL 蒙加林, 等. 赵德明, 张中秋, 沈建忠, 等译. 猪病学[M]. 第 8 版. 北京: 中国农业大学出版社, 2000: 181-187.
- [2] 程庆华, 牛小迎, 叶成玉. 青海地区猪流行性腹泻病调查[J]. 青海畜牧兽医杂志, 1992, 22(3): 22-23.
- [3] Pensaert M. Porcine epidemic diarrhea now enzootic in Asia [C]. Pig Progress, Enteric Diseases Special III, 2005, 20-21.
- [4] 杨汉春. 2012 年猪病流行情况与 2013 年流行趋势与防控对策[B]. 猪业科学, 2013(2): 58-59.
- [5] 陈刚, 李伟, 张阳, 等. 猪流行性腹泻的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21(1): 28-32.
- [6] Stevenson G W, Hoang H, Schwartz K J, et al. Emergence of porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences[J]. Vet Diagn Invest, 2013, 25: 649-654.
- [7] 王福军, 林晴, 许先明, 等. 近期暴发仔猪流行性腹泻的探讨[B]. 福建畜牧兽医, 2013, 35(1): 38-40.
- [8] Kimo, Cholc, Kim B, et al. Detection and differentiation of porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus in clinical sample by multiplex RT-PCR[J]. Vet Res, 2000, 146(22): 637-640.



# 透析管膀胱背侧韧带固定术在犬腹膜透析上的应用试验

郭魏彬, 蔡卓珂, 汤永豪, 余源武, 李嘉琪, 陈义洲\*

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**为探讨腹膜透析管膀胱背侧韧带固定术在腹膜透析中的应用效果,用5只实验犬进行实验研究。结果显示60%实验犬持续透析天数达到7d,平均透析液回收率为85.3%,透析期间透析管位置未发生明显变化;100%的实验犬出现透析液滞留,40%出现透析管堵塞,20%出现皮下水肿,20%出现尿频等并发症。实验结果表明腹膜透析管膀胱背侧韧带固定术有较好的透析效果,值得在临床上推广使用。实验结果表明腹膜透析管膀胱背侧韧带固定术作为一种腹膜透析时透析管的埋置方法,对透析液的回收有较好的效果。

**关键词:**腹膜透析;犬;膀胱背侧韧带;透析管;固定术

**中图分类号:**S857.12

**文献标识码:**B

**文章编号:**1005-8567(2015)02-0039-03

腹膜透析是肾脏替代疗法的一种形式。其原理是通过半透膜的扩散作用清除血液中多余的肌酐、尿素、水份以及毒物等。在兽医临床上腹膜透析可以用于多种疾病的治疗和控制,如急性肾功能衰竭、急性毒物或药物中毒(如乙二醇、巴比妥类、乙醇等中毒的急救),慢性肾衰竭的控制,低温、高热、体液超负荷等的治疗。但由于进行腹膜透析时需要在全身麻醉的条件下进行透析管的埋置。这对需透析的病患而言存在较高的风险,同时在腹膜透析过程中透析管可能会对内脏造成损伤,如出现腹膜炎,埋管部位渗漏、感染、引流不畅等并发症<sup>[1]</sup>,这影响了腹膜透析在兽医临床上的广泛应用。因此在进行腹膜透析时,透析管留置的方法直接影响腹膜透析的应用及透析效果。目前兽医临床上常用的方法有套管针技术、盲插植管法、腹壁切开配合大网膜切除植管法、内窥镜直视下植管法等。这些方法各有优缺点,如盲插法植管容易造成内脏的损伤,腹壁切开配合大网膜切除植管法需进行全身麻醉,手术切口较大等<sup>[2]</sup>。为探索更加适应小动物临床使用的置管方法,本文对透析管膀胱背侧韧带固定术在腹膜透析中的应用效果进行观察,以初步确定其效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

健康成年家犬5只,雌性3只,雄性2只,体

重范围8~12kg,均已绝育或去势,年龄1~2岁;正常免疫;饲喂同一品牌犬粮,自由饮水。

腹膜透析管(Tenckhoff,2cuff),常规外科手术器械及耗材,乳酸林格氏液,50%葡萄糖溶液,肝素,氨苄西林等。

### 1.2 实验方法

实验犬仰卧保定,全身麻醉,术前腹部剃毛,常规外科手术消毒。脐后1/3处腹中线常规切开腹壁,切口约4cm,显露膀胱并将其牵拉出腹腔。术前将腹膜透析管用生理盐水浸泡,并轻轻捻压涤纶套,让盐水充分浸湿。根据透析管上两个袖套的距离定位腹壁出口与皮肤出口的距离后,分别在腹壁和皮肤上切开造口,用止血钳夹住透析管将其引入新造的皮肤切口并通过皮下隧道引入腹壁切口,将透析管牵拉至腹腔内。在两侧膀胱侧韧带系膜处分别戳开一个小洞,并使透析导管穿过两侧膀胱侧韧带的系膜,使导管附着于膀胱背侧,由膀胱侧韧带固定,且第一个袖套应位于腹直肌中间。将带着导管的膀胱还纳回腹腔正常位置,对腹直肌的袖套进行荷包缝合,同时确保没有肠系膜或其它组织包裹在导管出口。进行引流通畅实验以确保所放置的透析管能正常进行引流。常规关闭腹壁肌肉层,再次进行引流通畅实验并确定第二个涤纶套要在皮下隧道内。确认无皮下出血或渗出后,依次缝合皮下组织以及皮肤,导管在皮

收稿日期:2015-01-26

\*:通讯作者

基金项目:2012年广东省级大学生创新创业训练计划(1056412106)

肤出口处用丝线固定在皮肤上,连接透析管外接头,对伤口进行消毒包扎<sup>[3]</sup>。

透析液采用 1.5%的葡萄糖乳酸林格氏液。配置方法为将 15mL 50%葡萄糖加入到 500 mL 乳酸林格氏液中,透析前均加温至 38~39 ℃。所有实验犬均在埋管后 24 h 后开始用间歇性腹膜透析法进行腹膜透析,即第一天透析按照 20 mL/kg 透析液量进行透析,之后按照 40 mL/kg 剂量进行透析。每天透析 3 次,每次腹腔内停留 45 min。记录每次输入透析液的量以及透析液的回收量。透析时间持续 7 d,观察透析的顺畅情况及透析管可持续透析的天数。透析过程注意无菌操作,术后 3 d 消炎,每天定时护理检查伤口情况,记录并发症以及患犬状态。从埋管手术当天开始,每天拍摄实验犬腹部正侧位 X 线片,以检测透析管的位置变动情况。

## 2 结果

### 2.1 透析管可持续透析时间

应用在膀胱背侧放置透析管的方法进行腹膜透析的 5 只实验犬均取得良好的透析效果。60%实验犬持续透析天数达到 7 d,其中持续时间最短的实验犬持续透析时间为 4 d,见表 1。

### 2.2 透析液回收率

透析液的回收量 / 输入透析液的量 × 100%即

表 1 实验犬透析管可持续透析时间

实验犬编号	持续透析时间(d)	平均持续透析时间(d)
1	7	
2	4	
3	5	6
4	7	
5	7	

为透析液回收率。试验中发现所有实验犬在透析时均不能达到 100%的回收率,均出现透析液的滞留(透析液滞留定义为透析液回收率低于 90%)。透析液回收率最低时仅为 30.0%,最高时可达 96.30%,所有实验犬平均透析液回收率达 85%。见表 2。滞留在腹腔内的透析液 24 h 后进行 B 超检查发现已经完全吸收。

### 2.3 透析期间透析管位置变化

通过 X 光片观察透析管位置变化,所有实验犬均没有出现透析管折弯现象。40%实验犬透析管末端与放置时的位置相比出现转向,末端向头侧延伸进入前腹腔,这部分实验犬的透析持续时间均小于 7 d,透析液回收率普遍较低;60%实验犬的透析管位置无明显变动,其末端仅向尾侧延伸少许进入直肠膀胱隐窝,这部分实验犬透析持续天数均达到 7 d,透析液回收率也普遍较高。见表 3,图 1。

表 2 透析液回收率

实验犬编号	透析液回收率(%)							平均透析液回收率(%)	透析液回收率范围
	1d	2d	3d	4d	5d	6d	7d		
1	89.0	85.0	90.3	84.8	88.0	90.0	85.8	87.8	78.2%~96.3%
2	89.0	87.5	87.5	51.2				78.8	45.2%~91.1%
3	90.1	89.4	90.5	87.6	49.5			81.4	30.0%~93.3%
4	95.0	96.7	92.6	89.4	87.0	85.9	85.0	90.2	79.4%~95.5%
5	84.0	88.2	87.0	84.8	88.0	90.0	85.8	86.8	75.2%~96.2%
总平均								85.0	45.2%~96.3%

表 3 透析管位置变化

实验犬编号	透析管位置变化	透析持续天数	平均透析液回收率
1	透析管位置正常,末端向前延伸入腹腔少许	7	87.85%
2	透析管位置基本正常,后期末端向前延伸入腹腔较多	4	78.81%
3	透析管位置基本正常,后期末端向前延伸入腹腔较多	5	81.42%
4	透析管位置正常,末端刚好穿过韧带少许,稍向后	7	90.23%
5	透析管位置正常,末端刚好穿过韧带少许	7	86.83%

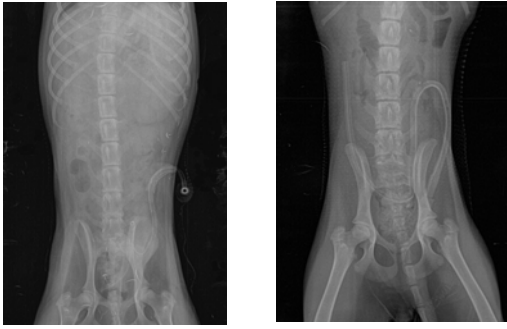


图1 左为透析管末端于直肠膀胱隐窝内,右为透析管末端进入腹腔中

#### 2.4 透析期间出现的并发症

在进行腹膜透析时与埋管相关的常见并发症包括皮下渗漏、水肿,透析管堵塞,透析液滞留,内脏损伤,腹膜炎等。本试验的埋管方式也出现了一些常见的并发症,其中100%的实验犬出现透析液滞留,40%出现透析管堵塞,20%出现皮下水肿,20%出现尿频。其它身体状况及整体状态均正常,精神、食欲、二便均良好,体外导管的放置均不影响其活动。

### 3 讨论

在腹膜透析中透析管植入的方法最为重要。不同植管方法对透析液流出的顺畅程度的影响有所不同,因此透析管植入的方法是决定腹膜透析能否持续进行的关键环节。常见的腹膜透析管的埋管方法有急性腹膜透析时进行的重复穿刺腹膜透析技术和套管针技术;慢性腹膜透析时的盲插植管法、腹壁切开配合大网膜切除植管法、内窥镜直视下植管法等<sup>[2]</sup>。不同的植管方法透析管可持续透析时间各不相同,在对犬腹膜透析的回顾性研究中发现,用盲插法植管的犬透析可持续时间仅为3 d左右,而腹壁切开配合大网膜切除植管法的犬可持续透析时间平均为10 d<sup>[2,4]</sup>。本实验应用在膀胱背侧放置透析管的方法进行腹膜透析的5只犬均取得良好的透析结果,60%实验犬持续透析天数达到7 d或以上,其中持续时间最短的实验犬透析时间为4 d,表明腹膜透析管膀胱背侧韧带固定术可维持较长的持续透析时间,与腹壁切开配合大网膜切除植管法相当,但却不需要切除大网膜,不但缩短了植管的时间,而且保存了大网膜的功能。

研究表明,无论是盲插法植管还是腹壁切开配合大网膜切除植管法,均不同程度的出现皮下渗漏、水肿,透析管堵塞,透析液滞留等并发症。其中盲插植管法中100%的猫发生透析液滞留或透析管阻塞,62.5%发生皮下渗漏;而腹壁切开配合大网膜切除植管法的猫中58.3%发生了透析液滞留或者透析管阻塞,50%出现了皮下渗漏<sup>[5,6]</sup>。本实验中也出现以上的并发症,100%的实验犬出现透析液滞留,较腹壁切开配合大网膜切除植管法高,但透析液滞留的量并不多,平均回收率达到85%。20%发生皮下渗漏,明显优于盲插植管法和腹壁切开配合大网膜切除植管法。

透析液滞留主要原因为透析管堵塞,而造成堵塞的原因为网膜陷入、包埋导管或纤维素于透析管内积滞所致,可通过在透析液中添加(250~1 000)U/L的肝素,防止纤维蛋白积累在腹膜透析导管中<sup>[3]</sup>,或是将透析管固定在膀胱颈部的侧韧带,同时将穿出侧韧带的透析管末端留至刚好穿过韧带少许,以此避免透析管与大网膜接触。而皮下渗漏可以通过将初步交换量调整为10 mL/kg或以下,在埋管24 h后再开始透析,将体外透析管固定好防止动物自损和导管的移动,最好的手术技能和良好的术后护理也可以减少透析液渗漏的风险<sup>[7,8]</sup>。为减少尿频的发生,可将透析管往膀胱颈部的侧韧带固定,以减少透析管对膀胱的刺激。

腹膜透析持续的时间与透析期间透析管在腹腔内的移位密切相关,因此保持透析管位置的相对固定显得尤为重要。腹膜透析管膀胱背侧韧带固定术是将透析管埋置于直肠膀胱隐窝,并利用两侧膀胱侧韧带将透析管固定,能避免导管的大幅度位移,从而避免了折弯而引起的阻塞,保证了透析的效果。实验中60%实验犬的透析管位置无明显变动,其末端仅向尾侧延伸少许进入直肠膀胱隐窝,获得较好的透析效果。由于在直肠膀胱隐窝内没有大网膜分布,因此不需要摘除大网膜,缩短手术了时间,对于需进行透析治疗的危重病患而言,越短的麻醉和手术时间其麻醉风险就越低,对病患的恢复更加有利。由于保留了大网膜,因此可以通过大网膜在透析中半透膜的作用,增强透析效果及速度;另外由于大网膜中含有吞噬细胞,

(下转第43页)

# 一例犬蠕形螨的诊断及治疗

聂立欣

(肇庆市农业学校, 广东 肇庆 526070)

中图分类号: S858.292

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2015)02-0032-02

犬螨虫病又叫犬疥癣,俗称“癞皮病”,主要由犬疥螨、犬耳痒螨或蠕形螨寄生所致,其中由蠕形螨引起的螨虫病称为犬蠕形螨病,也称犬毛囊虫病或犬脂螨病。犬蠕形螨多寄生在犬的眼、耳、唇以及前腿内侧无毛处,形成与周围界限明显的红斑。主要表现为患部脱毛、皮肤肥厚发红。它们除了直接损伤宿主外,在寄生过程中还可以传播某些细菌性、病毒性疾病。犬患病后如果治疗不及时或不彻底,往往会长期不愈,病原扩散,在犬群中造成该病的流行。笔者接诊1例由蠕形螨引起的犬疥癣病,现将诊治情况介绍如下,供同行参考。

## 1 发病情况

2014年10月,犬主苏某带1只金毛犬前来就诊。患犬约5个月大,公犬,体重30 kg。主诉该犬平时负责在建筑工地看门,生活环境较差,未经常给予洗澡。病犬2 w前耳朵发红,进而出现红疹,经常抓挠耳朵。

## 2 检查情况

### 2.1 临床检查

病犬体温正常,精神状态较差。检查内耳廓时,有异样的臭味,令人恶心;内耳廓表面有大量凸凹不平的湿疹和渗出物。右前肢掌侧出现被毛脱落,怀疑是长期抓耳引起感染(见图1、图2)。皮肤其他部位未发现明显异常。

### 2.2 显微镜检查

用载玻片边缘刮取内耳廓皮肤及其渗出物,制作涂片,显微镜下观察,发现多条活的蠕形螨。见图3、图4。

## 3 诊断

根据临床症状和显微镜检查结果,诊断该犬患蠕形螨病。



图1 内耳廓表面有湿疹和渗出物



图2 右前肢掌侧出现被毛脱落

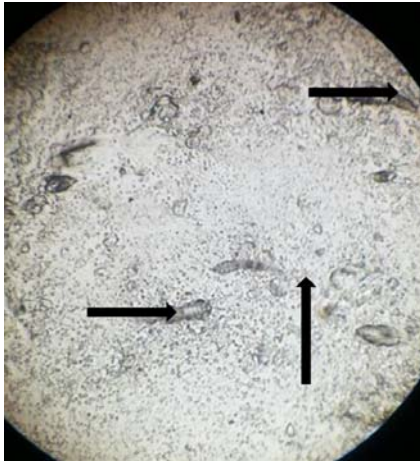
## 4 治疗

### 4.1 对因治疗

按0.03 mL/Kg体重皮下注射伊维菌素注射液(规格为5 mL:50 mg),每周1次,连用4 w。

### 4.2 预防继发感染和抗过敏

皮下注射林可霉素(10 mg/Kg体重)和地塞米松注射液(0.5 mg/Kg体重),每天1次,连用3 d。按10 mL双甲脒(规格为10 mL:1.25 g)加4 L水药浴1次。注意不要让犬喝到药水,以免中毒。



(箭头所示) 10x10 倍

图3 视野中发现3条蠕动的虫体



10x40 倍

图4 高倍镜下蠕形螨的形态

### 4.3 隔离及环境消毒

因为该工地上还饲养其他犬，为了避免交叉感染，建议畜主将病犬与其他犬隔离，并对其生活的环境用1%氢氧化钠消毒，并注意个人卫生。

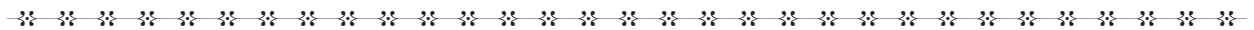
### 5 治疗效果

经过1个月治疗，病犬耳部恢复正常，无异味，食欲和精神状态良好。再次镜检，未发现虫体。

### 6 体会

6.1 本病应及早发现，及早治疗，坚持治疗，才能获得良好的效果。

6.2 对犬要有爱心，对犬的健康要多关心，注意保持犬的清洁与卫生，保证其营养平衡，提高犬的抵抗力。



(上接第41页)

有重要的防御功能，理论上可以降低透析时造成的腹腔感染发生率；同时大网膜还能避免透析管对脏器摩擦造成的损伤，防止脏器粘连。因此透析管膀胱背侧韧带固定术作为一种腹膜透析时透析管的埋置方法，值得在临床上进行推广使用。

### 参考文献：

[1] 施振声译. 小动物临床手册[M]. 第四版. 北京: 中国农业出版社, 2005:23-29.

[2] Patricia Dorval, Søren R Boysen. Management of acute renal failure in cats using peritoneal dialysis: A retrospective study of six cases[J]. Journal of Feline Medicine and Surgery, 2009, 11(2):107-115.

[3] 陈香美. 实用腹膜透析操作教程[M]. 第一版. 北京: 人民军医出版社, 2003:23-29.

[4] Nicole F. Beckel, Therese E. O' Toole, Elizabeth A. Rozanski, et al. Peritoneal dialysis in the management of acute renal failure in 5 dogs with leptospirosis[J]. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care, 2005, 15(3):201-205.

[5] Cooper R L, Labato M A. Peritoneal Dialysis in Cats with Acute Kidney Injury: 22 Cases (2001-2006) [J]. J Vet Intern Med, 2011, 25:14-19.

[6] Rachel L. Cooper, Mary Anna Labato. Peritoneal Dialysis in Veterinary Medicine [J]. Vet Clin Small Anim, 2011, 41:91-113.

[7] DiBartola S P. Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice[M]. 3rd edition. London: Saunders Elsevier, 2006:635-649.

[8] McCormick B B, Bargman J M. Non-infectious complication of peritoneal dialysis: implications for patient and technique survival[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18:3023-3025.

# 犬胚胎冷冻保存研究进展综述

胡敏华, 倪庆纯, 刘运忠

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

**摘要:** 对胚胎进行冷冻保存是保存物种遗传资源, 保持生物多样性的一个重要手段。冷冻胚胎可保种, 还便于运输, 有利于进行地区和国际间的交流。Beagle犬作为生物医药行业重要的基础支撑条件之一, 相比其它实验动物, 其冷冻保种技术仍未广泛应用。目前有关Beagle犬胚胎冷冻的研究报道较少。本文从犬胚胎着床前发育、卵母细胞/胚胎冷冻保存及胚胎移植方面进行综述, 旨在为Beagle犬胚胎冷冻提供参考。

**关键词:** 犬; 胚胎冷冻; 胚胎移植

**中图分类号:** S814.6

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2015)02-0044-04

Beagle犬体型适中, 遗传性疾病少, 遗传性能稳定, 在研究工作中能够得到重复性好的结果, 且对环境的适应力、抗病力较强, 被公认为理想的实验动物, 广泛应用于医药研究等生物学领域, 试验犬的使用量逐年增加。国内Beagle犬的生产繁殖基地保种方式主要为活体保种, 采用自然交配法进行生产繁殖。这不仅要求饲养大量的公犬, 而且在育种时要考虑避免近亲繁殖, 要求各支血缘的育种数量要增加。因此, 探索犬的精液以及胚胎冷冻技术, 成为保存犬品种资源的一种安全、经济的重要途径。而且通过冷冻保存胚胎的方法可以建立冷冻胚胎库, 实现优良品种的长期保存, 挽救濒危动物物种; 节约在自然条件下保种所需饲养动物的大量人力、物力、经费以及饲养场地和空间; 预防群体内的遗传变异, 漂移和遗传污染; 防止疾病的传播等<sup>[1]</sup>。

胚胎冷冻保存技术可大体划分为传统冷冻法和玻璃化冷冻法两类。1971年, Whittingham等<sup>[2]</sup>首次报道成功冷冻小鼠胚胎。其后, 牛<sup>[3]</sup>、兔<sup>[4]</sup>、绵羊<sup>[5]</sup>、山羊<sup>[6]</sup>、大鼠<sup>[7]</sup>、人<sup>[8]</sup>的胚胎冷冻保存也相继获得成功。1985年, Rall等<sup>[9]</sup>首次报道用玻璃化冷冻法对小鼠8细胞胚胎进行冷冻保存并取得成功。此后, 玻璃化冷冻法经众多研究者的不断改进<sup>[10-15]</sup>, 在技术上日趋成熟。

胚胎冷冻保存是否成功取决于胚胎对冷冻以及解冻过程中所产生的物理和化学变化的承受能力。对于犬来说, 胚胎冷冻保存的最大技术障碍莫

过于其细胞质里面含有大量脂肪颗粒, 这些脂肪颗粒与猪和牛的胚胎类似, 但不同的是犬的脂肪颗粒浓度要高很多。直到2011年, 才有移植犬冷冻胚胎并成功分娩的报道<sup>[16]</sup>。Beagle犬作为世界上公认的实验用犬, 但其保育种研究相对滞后于经济动物, 而且当前国外引种存在一定的困难, 因此, 保存、保护国内的稀有实验动物资源变得尤为重要。本文总结了前人研究成果, 以期能为Beagle犬的保种工作提供参考。

## 1 着床前胚胎的体内发育

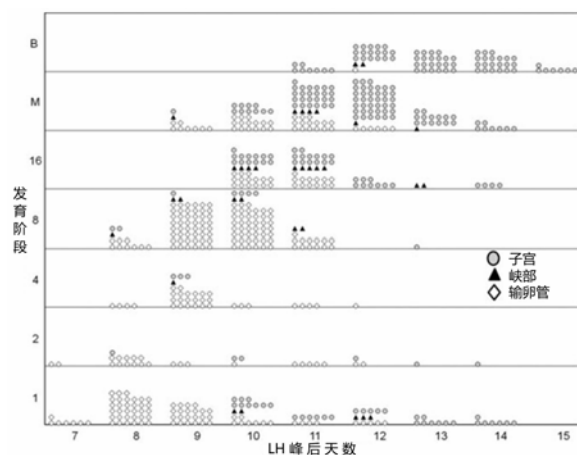
犬是非季节性单次发情动物, 其生殖生理与其它哺乳动物较为不同。在犬排卵前几天, 血浆中的孕酮水平开始提高, 且排卵前黄体化在犬中比较典型。犬排出的卵母细胞处于GV期, 需在输卵管完成减数分裂过程。因此, 在着床前, 犬卵母细胞以及胚胎需要在生殖道内停留比较长的时间。而相对于其它一些家用动物, 犬胚胎早期发育机制(如卵母细胞成熟, 受精以及胚胎发生)至今仍未完全阐明<sup>[17]</sup>。据文献报道<sup>[18, 19]</sup>, 黄体素(Luteinizing hormone, LH)峰值6~10 d后受精卵发育至2-细胞阶段, LH峰值6~10 d后转移至子宫, 但从排卵后至着床前胚胎发育各阶段时间点仍需探讨<sup>[20]</sup>。正是由于犬类这些特殊的特点, 使得犬的保种育种、转基因等研究远远滞后于其它动物。

Abe等<sup>[21]</sup>总结了拉布拉多猎犬胚胎获取时间点(见图1)。由图1可看出, 16-细胞与桑葚胚在LH峰值(>2 ng/mL)10 d后开始从输卵管迁移到

收稿日期: 2014-11-14

基金项目: 国家科技支撑计划(2013BAK11B02); 广州市科研条件建设项目(穗科信字[2011]233-16)。

子宫内,并且这一过程极可能在24 h内完成。到LH峰值12 d后,基本上所有胚胎都迁移至子宫。大部分胚胎在LH峰值9~10 d后发育至8-细胞胚胎,11~12 d后发育至桑葚胚,12~13 d后发育至囊胚。与Abe等学者结果不同,Tsutsui等<sup>[22]</sup>的研究表明,在孕酮峰值9~10 d后(大致与LH峰等同)可回收到囊胚,这表明犬胚胎着床前发育可能与犬品种及育种差异相关。研究人员需根据研究对象制定适合的取卵时间。



LH峰值7-15 d(人工授精2-10 d)后,从80只母犬中回收到474枚胚胎

注: B=囊胚; M=桑葚胚

图1 犬胚胎在生殖道中发育时间位置点

## 2 卵母细胞/胚胎的冷冻保存

早于1971年,就已有小鼠胚胎成功冷冻的报道,但有关犬类的生殖细胞冷冻报道,最早由Ishijima等<sup>[23]</sup>在2006进行尝试。Ishijima等对犬卵巢进行冷冻,复苏后将其移植到NOD-SCID小鼠卵巢囊上,希望以此来保存犬卵巢的内分泌以及排卵功能。结果发现冷冻后的犬卵巢组织紧紧地附着在鼠卵巢上,虽然没有发现有囊状卵泡的形成,但检测到有细胞增殖的现象。由于此项技术复杂繁琐,并没有太多的研究人员采用。

目前世界上只有少数几篇关于犬卵母细胞/胚胎冷冻保存的文献报道。但也有成功利用冷冻胚胎移植后分娩的案例。由于犬卵母细胞与猪的类似,都富含脂类,因此,猪卵母细胞/胚胎冷冻保存技术可为犬类提供技术依据。将犬卵巢获取的卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus Oocyte Com-

plexes, COCs)在基于二甲基亚砜(DAP213)或乙二醇(E30S)的冷冻保护剂中冷冻,以cryotube或cryotop作为冷冻载体,复苏后其形态正常率差异不显著<sup>[24]</sup>,但以DAP213为冷冻液, cryotop作为冷冻载体组的细胞质膜完整率(80%)要明显高于以E30S为冷冻液, cryotop为冷冻载体(65.6%)及以DAP213为冷冻液, cryotube为冷冻载体(67.3%)组<sup>[25]</sup>。

Abe等<sup>[16]</sup>利用E30S为冷冻液, cryotop为冷冻载体分析了犬1-细胞到囊胚阶段冷冻保存效果。结果表明,超过80%的1-细胞至桑葚胚在复苏后仍保持正常形态,但大部分囊胚复苏后形态发生异常。经检测,形态正常的1-16细胞、桑葚胚以及囊胚冷冻保存复苏后存活率分别为90%~100%、50%以及40%。Guaitolini等<sup>[26]</sup>利用甘油或乙二醇作为冷冻保护剂,用程序降温法对51枚囊胚进行冷冻并分析复苏后的囊胚腔的再膨胀率、存活率以及体外发育能力,结果发现两种冷冻保护剂对复苏后囊胚各项指标差异均不显著,并且发现复苏后6 d,囊胚仍然存活。这些结果表明犬着床前胚胎的冷冻保存效果与胚胎的分化程度相关。提示我们需要进行胚胎冷冻时,尽量选择早期胚胎进行冷冻。另一方面,犬卵母细胞冷冻保存效果还可能与其富含脂类相关。因为在猪中,学者们发现将猪卵母细胞/胚胎中的脂肪粒去掉后,可提高复苏后的存活率<sup>[27,28]</sup>,但目前世界上并没有在犬上进行此项研究。为了探索适合犬卵母细胞/胚胎冷冻保存技术,有必要进行相关的研究工作。

Boutelle等<sup>[29]</sup>利用cryotop法对普通家犬与墨西哥灰狼卵母细胞进行玻璃化冷冻,并测定新鲜获得与冷冻后卵母细胞活率的变化。结果发现在普通家犬中,新鲜获得的与冷冻后卵母细胞活力分别为65.7%、61.0%,差异不显著;而对29枚墨西哥灰狼卵母细胞进行冷冻复苏后,仍保持正常形态的有21枚(72.4%),仍然存活的有12枚(41.4%),各个体间差异不显著。这是首次利用玻璃化冷冻技术对濒临灭绝动物墨西哥灰狼卵母细胞进行的冷冻试验研究,但该文作者建议,虽然此法可行,但应用前最好先解决墨西哥灰狼胚胎体外生产技术。

## 3 胚胎移植

对于冷冻胚胎,鉴定其效果的最佳方法是通

过胚胎移植,判断其是否仍具有着床功能。犬卵母细胞以及胚胎的体外培养技术体系尚未建立,到目前为止,通过体外受精,培养至囊胚阶段的报道只有1例,且结果并没有表明其仍然存活。可知犬胚胎体外培养技术的困难程度<sup>[30]</sup>。因此目前成功进行移植并分娩的案例大部分取用新鲜胚胎,而冷冻胚复苏后亦不经培养而直接进行移植。

胚胎移植分为手术法以及非手术法。鉴于犬类独特的子宫颈及阴道形态,手术法较为常用。手术法移植中,从小鼠等动物的移植经验看,需要根据胚胎的发育阶段而移植到受体犬的不同部位。通常情况下,1-4细胞胚胎移植到输卵管,而4-细胞以上胚胎移植到子宫角较为合适。但也有文献报道移植1-4细胞胚胎移植到子宫内成功分娩的报道<sup>[31]</sup>。到目前为止,犬胚胎不同发育阶段移植部位对受孕率及分娩率的分析比较并未见报道,因此关于犬胚胎移植方面有待进一步研究。采用新鲜胚胎进行手术移植的文献报道只有6篇,而这些文献报道总共移植了57只受体,却只获得45只幼犬<sup>[22,31-35]</sup>。而克隆犬的胚胎移植亦是采用手术法进行,目前只有韩国首尔国立大学获得成功<sup>[36]</sup>。虽然在犬中,手术法胚胎移植技术较为常用并已获得成功,如能开发非手术移植技术,会大大增加其临床应用及消除场地的限制。直到2011年,Abe等人利用膀胱镜及导尿管经子宫颈将4-细胞至桑葚胚移植进子宫,成功分娩7只幼犬。对其进行微卫星基因型鉴定,证实这些幼犬均来自于供体胚胎<sup>[16]</sup>。此结果表明在一定条件下,非手术法移植确实可行,研究人员可根据自身实验条件选择适当的移植方法。

#### 4 结语

犬冷冻胚胎复苏后,存活率较高,表明犬胚胎冷冻技术已获得初步成功,但成功分娩率仍极低。从移植后至出生过程中的影响因素仍未得到阐明。目前国内外有关犬卵母细胞体外成熟培养、体外受精、胚胎体外培养以及胚胎冷冻保存技术与猪牛羊等相关技术存在一定的差距,有必要增加科研投入,以缩小差距。

#### 参考文献:

[1] Suzuki H. Cryopreservation of canine embryos and resulting pregnancies [J]. *Reprod Domest Anim*, 2012, 47 (Suppl 6): 141-143.  
[2] Whittingham D G, Leibo S P, Mazur P. Survival of mouse

embryos frozen to 21968C and 22698C [J]. *Science*, 1972, 178: 411-414.  
[3] Wilmut I, Rowson L E. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos [J]. *Vet Rec*, 1973, 92 (26): 686-690.  
[4] Whittingham D G, Adams C E. Low temperature preservation of rabbit embryos [J]. *J Rerod Fertil*, 1976, 47 (2): 269-274.  
[5] Willadsen S M, Polge C, Rowson L E, et al. Deep freezing of sheep embryos [J]. *J Reprod Fertil*, 1976, 46 (1): 151-154.  
[6] Bilton R J, Moore N W. In vitro culture, storage and transfer of goat embryos [J]. *Aust J Biol Sci*, 1976, 29 (1-2): 125-129.  
[7] Kasai M, Niwa K, Iritani A. Survival of rat embryos after freezing [J]. *J Reprod Fertil*, 1982, 66 (1): 367-370.  
[8] Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo [J]. *Nature*, 1983, 305 (5936): 707-709.  
[9] Rall W F, Fahy G M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification [J]. *Nature*, 1985, 313 (6003): 573-575.  
[10] Behbahanian A, Eimani H, Zeinali B, et al. In vitro maturation, fertilization and embryo culture of oocytes obtained from vitrified auto-transplanted mouse ovary [J]. *Int J Fertil Steril*, 2013, 6 (4): 278-285.  
[11] Morato R, Mogas T. New device for the vitrification and in-straw warming of in vitro produced bovine embryos [J]. *Cryobiology*, 2014, 68 (2): 288-293.  
[12] Shibao Y, Fujiwara K, Kawasaki Y, et al. The effect of a novel cryoprotective agent, carboxylated epsilon-poly-L-lysine, on the developmental ability of re-vitrified mouse embryos at the pronuclear stage [J]. *Cryobiology*, 2014, 68 (2): 200-204.  
[13] Levron J, Leibovitz O, Brengauz M, et al. Cryopreservation of day 2-3 embryos by vitrification yields better outcome than slow freezing [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2014, 30 (3): 202-204.  
[14] Lim J G, Heo Y T, Lee S E, et al. A new modified cut standard straw vitrification technique reduces the apoptosis of mouse blastocysts and generates more live mouse offspring [J]. *Cryo Letters*, 2013, 34 (6): 598-607.  
[15] Larman M G, Gardner D K. Ultrarapid vitrification of mouse oocytes and embryos [J]. *Methods Mol Biol*, 2014, 1092: 153-165.  
[16] Abe Y, Suwa Y, Asano T, et al. Cryopreservation of canine embryos [J]. *Biol Reprod*, 2011, 84 (2): 363-368.  
[17] Reynaud K, Fontbonne A, Marseloo N, et al. In vitro canine oocyte maturation, fertilization and early embryogenesis: a review [J]. *Theriogenology*, 2006, 66: 1685-1693.  
[18] Concannon P W, Lein D H. Hormonal and clinical correlates of ovarian cycles, ovulation, pseudopregnan-



- cy and pregnancy in dogs [M]. Philadelphia:WB Saunders Company, 1989:1269-1282.
- [19] Johnston S V, Root Kustritz M V, Olson P N S. Canine pregnancy [M]. Philadelphia:WB Saunders Company, 2001: 66-104.
- [20] Senger P L. Early embryogenesis and maternal recognition of pregnancy [M]. Pullman:Current Conceptions Inc, 2003:284-303.
- [21] Abe Y, Suwa Y, Ueta Y Y, et al. Preimplantation development in labrador retrievers [J]. J Reprod Dev, 2008, 54:135-147.
- [22] Tsutsui T, Hori T, Okazaki H, et al. Transfer of canine embryos at various developmental stages recovered by hysterectomy or surgical uterine flushing [J]. J Vet Med Sci, 2001, 63(4):401-405.
- [23] Ishijima T, Kobayashi Y, Lee D S, et al. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification [J]. J Reprod Dev, 2006, 52(2):293-299.
- [24] Abe Y, Lee D S, Kim S K, et al. Vitrification of canine oocytes [J]. J Mamm. Ova Res, 2008, 25:32-36.
- [25] Abe Y, Asano T, Ali M, et al. Vitrification of canine cumulus oocyte complexes in DAP213 with a cryotop holder [J]. Reprod Med Biol, 2010(9):115-120.
- [26] Guaitolini C R, Taffarel M O, Teixeira N S, et al. Viability of frozen-thawed canine blastocysts cultured in vitro for up to 6 days [Z]. 7th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Whistler, Canada:2012.
- [27] Hara K, Abe Y, Kumada N, et al. Extrusion of removal of lipid from the cytoplasm of porcine oocytes at the germinal vesicle stage: centrifugation under hypotonic conditions influences vitrification [J]. Cryobiology, 2005, 50:216-222.
- [28] Ushijima H, Yoshioka H, Esaki R, et al. Improved survival of vitrified in vivo-derived porcine embryos [J]. J Reprod Dev, 2004, 50(4):481-486.
- [29] Boutelle S, Lenahan K, Krisher R, et al. Vitrification of oocytes from endangered Mexican gray wolves (*Canis lupus baileyi*) [J]. Theriogenology, 2011, 75(4): 647-654.
- [30] Otoi T, Murakami M, Fujii M, et al. Development of canine oocytes matured and fertilised in vitro [J]. Vet Rec, 2000, 146(2):52-53.
- [31] Tsutsui T, Hori T, Endo S, et al. Intrauterine transfer of early canine embryos [J]. Theriogenology. 2006, 66(6-7):1703-1705.
- [32] Kim Y J, Kim B J, You I J. Embryo transfer with frozen embryos in the dog [J]. J vet Clin, 2002, 19:73-79.
- [33] Tsutsui T, Hori T, Kawakami E. Intratubal transplantation of early canine embryos [J]. J Reprod Fertil Suppl, 2001, 57:309-314.
- [34] Tsutsui T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs [J]. J Reprod Fertil Suppl, 1989, 39:269-275.
- [35] Kinney G M, Pennycook J W, Schriver M D, et al. Surgical collection and transfer of canine embryos [J]. Biol Reprod, 1979, 20:96.
- [36] Kim M J, Oh H J, Park J E, et al. Duration of gestation in pregnant dogs carrying cloned fetuses [J]. Theriogenology, 2013, 79(2):257-260.



(上接第 31 页)

## 2.6 抗球虫指数

利用计算公式:抗球虫指数 (ACI)=(相对增重率 + 保护率) × 100 - (病变值 + 卵囊值), 计算出各组抗球虫指数。详细结果如表 7 所示。

从表 7 可以看出, 在感染后 1 d 按照推荐剂量使用癸氧喹酯干混悬剂进行饮水给药, 抗球虫指数高达 202.2, 表现出高效的抗球虫活性。

## 3 小结与讨论

试验结果表明, 人工感染鸡球虫后, 按照推荐剂量使用癸氧喹酯干混悬剂进行饮水给药, 对感染鸡群具有较好的保护效果, 抗球虫指数高达 202.2, 同时还具有较好的促进增重的效果, 提高

表 7 各组抗球虫指数 (ACI)

组别	ACI
1	200.0
2	117.2
3	130.7
4	202.2
5	198.7
6	198.5

饲料转化率。

癸氧喹酯干混悬剂与癸氧喹酯溶液的抗球虫效果一致, 但癸氧喹酯溶液酒精味较浓, 对鸡只的饮水量有一定的影响。

# 视频监控对生猪质量流程化管理的促进作用

张 鹏

( 东莞市动物卫生监督所, 广东 东莞 523007 )

**摘 要:** 使用现有的视频监控技术, 建立出一套使用视频监控对生猪质量安全流程管理的方法。

**关键词:** 视频监控; 流程管理

**中图分类号:** S815.9

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2015)02-0048-02

## 1 前言

东莞地区消费的生猪 85% 是依靠外省市调入, 东莞基地养殖场多达 5 000 多家, 非常零散, 来源复杂, 质量参差不齐, 肉食品质量安全存在隐患。该地区年检疫生猪 400 万头, 冻肉 20 万吨, 家禽 1 亿羽。动物卫生检疫和检测是肉食安全监控的第一道屏障, 东莞市 32 个镇街屠宰场日屠宰上万头猪, 检疫检测人员严重不足, 生猪质量安全监管压力大。

根据《动物防疫法》和《生猪屠宰管理条例》规定, 生猪实行定点屠宰, 集中检疫。生猪定点屠宰场, 是生猪批发商和猪贩的聚集地, 肉品检疫检测工作的发生地, 放心肉的出场地, 是动物卫生监督管理的关键一环。目前, 东莞市 32 个镇街, 均设有生猪定点屠宰场, 与周边城市相比, 分布较零散, 人员多且复杂, 在该地区动物卫生监督人员相当有限的情况下, 成为了监控的重点、难点。民以食为先, 食品安全与市民幸福感紧密相连。为加快生猪质量安全监控的科学化和规范化管理步伐, 东莞地区立足实际, 开拓创新, 适时提出了建设动物卫生远程视频监控系统的管理模式。视频监控建立后, 多次举办了市民和记者“体验日”活动, 让市民了解了动物卫生监督的日常工作情况和监管手段, 市民对肉品的质量安全更加放心。同时, 远程视频监控为动物卫生监督工作带来了新的宣传契机, 成为展现动物卫生监督工作队伍形象的窗口。

整个系统由屠宰场接入点、分所监控室、市级监控中心组成, 形成了“金字塔”式的管理模式。金字塔最底端, 是镇街屠场接入点, 根据面积和生产线布局的不同, 镇街生猪定点屠宰场安装数量不等的摄像头; 中间层是由分所对屠宰场进行监管, 能初步、快速地对异常情况采取相应措施; 金字塔的顶层, 就是市级监控中心, 摄像头信号通过光纤收发器, 汇聚在市级统一的监控平台。该平台可以

实时监控屠宰场, 对可能发生的异常情况进行分析和应急指挥处理。

## 2 视频监控特点

本视频监控系统有以下 6 个特点: 一是数据保密。市监控中心采用点对点的专用光纤与各镇街接入点进行连接, 不接入互联网, 确保了数据传输的保密性。二是实时监控。通过与镇街接入点联网, 监控中心显示器可以实时查看实时图像, 并能够点播图像的显示、缩放、图像抓帧, 实现对该地区生猪屠宰场实时监控。三是高清晰。在屠宰场接入点安装的高清摄像头, 具有高倍光学、数字放大功能。在监控显示器上, 达到生猪的体毛都清晰可见的效果。四是夜视功能。该地区生猪屠宰一般均在下半夜零点至凌晨 5 点进行。本系统接入的摄像头, 均采用红外线摄像头, 可在无光的环境下, 会自动开启红外灯, 在晚间能达到清晰的夜视效果。五是镜头的拉伸和旋转功能。通过监控平台的客户端和数字电视墙服务器软件, 可以对接入点的摄像头进行转动及变倍等操作, 达到远距离物体实现近距离观看的效果。六是存储功能。从生猪进场, 到合格肉品出场上市, 需要经过多个监管环节, 任何一个环节出错均会导致不合格猪肉流入市场。市监控中心平台, 具有的全程录像, 智能存档和远程下载回放功能, 可以实现事前预防, 事后追踪的效果, 实现科学的无缝隙监控。

## 3 动物卫生监督功能

在该市现有人力物力资源有限的情况下, 本监控系统可缓解人手不足, 有效提升动物卫生监督效能。

### 3.1 规范检疫检测流程

动物卫生监督机构依照法定的标准和程序, 对动物和动物产品实施检疫检测, 经检疫检测为不合格的肉品, 严格进行无害化处理。由于检疫检测工作量较大, 检疫检测人员可能出现马虎应付,

重复检测和抽样滥竽充数的情况。为防止此类事情发生,市监督人员对各屠宰场进行巡查监督和指导,但该地区现有屠宰场 32 个,即使市级监督人员全部出动,一个晚上也只能连续奔赴 3 至 5 个镇街进行现场监督指导。视频监控建立后,市监控中心的值班人员,可透过监控中心显示器,监督和指导分所人员,按检疫规程开展标准化操作。

### 3.2 为执法查处提供证据,防止捣乱检测进程

正常情况下,屠场检测人员需对入场待宰生猪喷淋冷水,刺激其排尿,再抽取尿样进行“瘦肉精”等违禁药物残留项目检测。有猪贩了解到检测流程后,往往提前给生猪喷淋冷水,阻挠生猪尿样的采集。本监控建立后,有助于检测人员随时了解待宰栏生猪的动向,防止阻挠检测行为的发生;防止暴力抗法和偷窃不合格肉品流入市场。近年来,有些镇街曾多次发生猪贩不听从检疫员指挥,直接冲卡进入屠场,甚至围攻检疫人员等恶性事件。有些镇街曾经发生过猪贩企图盗用病害肉品的案件。监控的建立,从主观意识方面来说,对不法分子起到了很好的震慑作用;从执法角度来说,实现了有效取证,为对不法分子的处罚提供了有力的证据。

### 3.3 科学远程应急处理

一旦发生异常情况,镇街检疫员可以直接向市监控中心工作人员上报。接到报告后,工作人员可以远程调度观察,并及时上报主管领导,快速作出应急处理。这样可大大缩短时间,有助于更好更快地预防和控制重大动物疫情的发生与传播。

## 4 流程管理

视频监控可以对视频图像进行截图和录像保存,同时也要求镇街视频监控的工作人员对视频图像截图和录像。为更好地使视频监控与检疫检测工作相结合,使监控工作更加清晰化和明确责任,需要建立视频监控的流程管理。动物远程视频监控流程管理包括:

### 4.1 查证验物

对每一天每一猪车进入屠宰场大门时,检疫员收取检验合格证明,查看生猪健康的情况时进行截图,确保不遗漏任何一辆进入屠宰场的运猪车。东莞地区相关动物卫生监督部门要求镇街每天的进猪时间为 7:00-19:00。当超过这个时间段进猪,都视为超时进猪,这时要对超时进场的车辆进行截图,截图要清楚,看清该车的车牌号码,以便对该情况进行记录分析。

### 4.2 车辆消毒

运猪车进入屠宰场后,需要经过立体消毒通道,用消毒药对猪车进行自动喷散和消毒处理。这时要对消毒车辆进行截图。

### 4.3 违禁药物残留检测

对进入屠宰场的生猪都要实行“天天检、车车检、批批检”的抽检制度。对每一天,每一车,每一批生猪的抽检都要进行截图。检疫员到待宰仓对每一栏的生猪按照比例进行抽检。这时可以对每一个编号猪栏的生猪进行查看,查看检疫员是否对每一个猪仓的生猪都有进行抽检,抽检是否严格按照抽检比例等。

### 4.4 定期巡查

招照相关规定,生猪进入屠宰场后,每隔 2-3 h,检疫员要对待宰仓进行巡查,查看生猪健康情况。这时可以对检疫员进入每一栏的待宰仓查看生猪的情况进行截图,看是否都对每栏生猪进行查看,确保无异常的情况。

### 4.5 同步检疫

在凌晨时段,屠宰场屠宰时,检疫员对生猪进行同步检疫的流程(头蹄及体表检疫、内脏检疫、胴体检疫、切除三腺、总检)进行截图。同步检疫的截图,要保证有检疫员在场工作,截取的是最能体现检疫员工作流程、工作效果和行业特殊性的图片,并且查看是否在同步检疫时有异常情况发生。

### 4.6 特殊情况

一旦发现动物疫情和发生抗拒执法等突发事件,镇街检疫员要及时通知分所领导并截图或录像,保存电子文档,然后向市监控中心工作人员上报。

### 4.7 设备维护

镇街视频监控的工作人员每天都要打开视频监控的客户端软件,对本镇屠宰场监控的每个镜头的情况进行查看,确保镜头图像画面正常。如果设备出现问题,及时联系厂家维修人员或报告市监控中心的工作人员进行处理。

## 5 结语

民以食为天,食以安为先。远程视频监控具有创新性、科学性和实用性。通过实施本项目的建设和管理,有力地促进东莞地区生猪质量安全建设步伐,让市民在市场对猪肉买得放心,吃得舒心。

### 参考文献:

- [1] 丁静, 阎海滨, 刘振军. 浅谈动物卫生监督执法办案的关键环节[J]. 现代畜牧兽医, 2010(4): 58-59.
- [2] 王健诚. 导入 ISO/IEC17020 标准提高动物卫生监督体系质量管理水平[J]. 中国动物检疫, 2011, 28(1): 37-39.

# 杂交狼尾草及其在养鹅中的应用经验

刘思扬<sup>1</sup>, 林澄丰<sup>1</sup>, 刘继鹏<sup>1</sup>, 余晓青<sup>2</sup>, 陈进胜<sup>2</sup>

(1. 饶平县浮滨丰乐狮头鹅饲养有限公司, 广东 潮州 515700; 2. 饶平县畜牧兽医站, 广东 潮州 515700)

中图分类号: S812.4

文献标识码: B

文章编号: 1005-8567(2015)02-0050-03

杂交狼尾草 (*Pennisetum americanum* × *P. purpureum*) 是以美洲狼尾草为母本, 象草为父本的种间杂交第一代牧草品种。上世纪 90 年代初, 原饶平县畜牧局从广东省农业科学院畜牧研究所引进后, 一直在牛、羊、兔、鱼等养殖业中广泛应用。预计全县目前保留的种植面积在 1 200~1 400 亩。2011 年春, 某狮头鹅饲养有限公司引进 120 个草头进行茎秆栽种, 老根移植, 并在当年夏季开始利用杂交狼尾草饲养饶平狮头鹅。现就观察到的杂交狼尾草特征、特性及采用的栽培技术, 利用方法等介绍如下:

## 1 杂交狼尾草的性状

### 1.1 植物学特征

杂交狼尾草是多年生禾本科狼尾草属草本植物, 植株高大, 最高可达 4m 以上。

**1.1.1 根** 根深密集, 须根发达, 根系扩展范围很广, 主要集中在 20~30 cm 的土层里; 100~120 天龄的茎节可长出 1 条或数条气根。

**1.1.2 茎** 茎秆圆形, 丛生, 直立, 直径 0.7~1.8 cm, 一般每株能分蘖出 30~60 条, 每条有 20~35 个茎节, 每个茎节约 10~14 cm, 并有一个侧芽和一张叶片。

**1.1.3 叶** 互生, 长条形, 叶片长 50~70 cm, 宽 1.5~3.5 cm; 植株经短期多次收割后, 再生叶片变得狭窄; 叶片边缘及叶面均有绒毛, 而叶鞘外面则无绒毛(象草有); 叶色比象草淡而质地却比象草厚且柔软。

**1.1.4 穗** 在一定天龄、气候、土质条件下能抽穗。通常在每年 11 月至整个冬季在分蘖后抽穗。穗为圆锥状花序, 黄褐色, 长 15~25 cm, 穗径 1.5~3 cm; 小穗披针形。种子有壳无实, 不发芽。

### 1.2 生物学特征

**1.2.1 抗寒力强** 在广东潮州地区, 杂交狼尾草能自然越冬, 并能耐过短期轻霜。在日平均气温 15℃ 以上开始生长, 25~30℃ 时生长最快, 气温低于 8℃ 时生长停滞。

**1.2.2 抗干旱又耐潮湿** 在长时间干旱或短期水浸的情况下, 仍能生长而不死亡。在饶平地区, 至今尚未发现因受浸而死亡的现象。

**1.2.3 抗倒伏能力强** 杂交狼尾草根系发达, 有良好的抗倒伏能力。在多雨或大风季节, 能将植株牢牢地固定在土壤中。

**1.2.4 抗病力强** 20 多年来, 尚未发现有明显的病虫害。偶尔有极零星叶片出现星状或块状的黑褐斑(锈病), 也未引起扩散。

**1.2.5 对肥料需求量大** 杂交狼尾草根发达, 生物产量大, 因而需充足的肥料, 特别是氮素肥料更要保持充足供应。若在缺锌的土壤中种植, 易发生叶片变白, 应及时补充微量元素锌。杂交狼尾草在各种土壤中均能生长, 但以土层较厚的沙壤土最佳。

### 1.3 产量

根据原饶平县畜牧局测割结果, 在同一地段面积(亩)、同日种植测割, 植株同为 110~120 cm 高度, 测割次数相同(全年共 9 次)的情况下, 杂交狼尾草年产量为 15 226 kg, 而象草只有 13 905 kg。

### 1.4 营养成分

杂交狼尾草的母本是美洲狼尾草(又称御谷、珍珠粟), 有的国家(如印度)曾把它作为谷类作物利用。因此, 杂交狼尾草的营养价值自然比其单纯父本(象草)更高。杂交狼尾草茎细叶多, 质地比象草柔软可口。草茎比为 1:0.84, 而象草则为 1:1.01。杂交狼尾草的营养成分如表 1<sup>[1]</sup>。

表 1 杂交狼尾草营养成分

营养成分	GE(MJ/kg)	CP(%)	EE(%)	CF(%)	NDF(%)	ADF(%)	ASH(%)	Ca(%)	P(%)
含量	15.96±0.07	9.77±0.22	3.65±0.34	37.23±0.06	64.53±0.11	40.23±4.34	10.12±0.85	0.08±0	0.14±0.02

## 2 杂交狼尾草栽培技术

### 2.1 栽培季节

全年均可种植,一般以春、夏两季种植的成活率较高,生长速度也快。

### 2.2 整地与施肥

在农业用地上种植时,应先将土地平整、机耕,土深约 20cm;起畦,畦宽 140~160 cm,畦间留沟 25 cm,然后施下基肥。基肥可选用磷肥,每亩 30 kg;也可用鸡、鹅、鸭杂粪做基肥,每亩 1 500~2 000 kg。

### 2.3 取种

杂交狼尾草取种有两种方法:一是取其带根的草头,通常每个草头有很多分枝,可将各分枝分别剥开来逐条做移植用;二是取其气根的茎秆,将每条茎分段(一段是每二个草节为一段)切断,逐段种植。

### 2.4 插植

按株行距 40 cm×40 cm 的规格,将草种直立插入土壤中。采用草根插植的,应使根部入土;采用茎段插植的,则应有一个带气根的草节入土。

利用果树园或池塘堤岸种植的,应先打穴,在穴中撒下土杂肥,然后逐穴种植,再埋上沙土。

### 2.5 田间管理

草种植后,应逐株浇水,保持土壤湿润,促使其早分蘖,少死亡。还要经常查苗补苗,并及时除杂草,施肥料,促进快分蘖。

### 2.6 收割

草种植后 40 天内,虽有分枝长出,但生长仍很缓慢,植株一般高度只有 20~30 cm,这时应进行第一次收割。收割时,刀具应尽量贴近地面。割后,锄松土壤,再添氮肥,浇水后,植株便能正常生长。

杂交狼尾草最适宜的收割高度依饲养动物品种不同而有所差异。作为饲喂草食动物牛、羊、兔时,每隔 25~30 天收割 1 次,植株收割高度为 110~130 cm。若用于喂鹅,则每 20~25 天收割一次,植株高度 60~80 cm 较佳。通常每年可收割 10 次以上。

### 2.7 剥枝

杂交狼尾草植株长到一定时期后,便可长出 20~30 条相隔甚密的茎秆。这些茎秆极为纤细,生长速度也慢,影响其产量,这时必须及时进行剥离、分枝。剥枝的作法是先割去地面上茎秆,然后逐株剥去弱小的草头,每株只保留 10~15 条就可以了。如此反复剥枝、管理、收割,则可保持这个多年生优质牧草品种长期得到利用。

## 3 杂交狼尾草养鹅技术

### 3.1 狮头鹅草饲的消化机制

利用优质牧草饲喂狮头鹅,能增进其生长发育。其原因除了牧草本身含有丰富的营养物质外,更重要的是由鹅的消化生理所决定的。从生理学的角度看,鹅没有嗉囊,而有纺锤形的食管扩大部,可以承装较多草料。鹅的喙呈扁平状,边缘粗糙并具有很许多细小的角质齿,当我们把牧草抛在水中让鹅啄食时,水经过喙边缘的缝隙流出,草料则截留在口腔中,喙缘的粗糙突起还有截断草料的功用。鹅的肌胃特别发达,可容纳较多砂粒,能对坚韧的草料进行机械性磨碎。鹅肌胃收缩力比鸭大 0.5 倍,比鸡大 1 倍,能有效地裂解植物细胞壁,促进草料的消化。鹅的消化道比体长长 10 倍。鹅的盲肠体积很大,内中的有益微生物能对牧草所含的纤维素进行充分的分解,对牧草组织纤维消化率可达 45%~50%。鹅肠的运动逆蠕动着较明显,肠的内容物很易返回肌胃,进行第二次磨碎、消化。通过上述的消化过程,使牧草所含的营养成分最后在大肠中得到很好的吸收。

### 3.2 杂交狼尾草饲养狮头鹅的方法

杂交狼尾草养鹅一般采用青喂法。在饲养过程中,应按鹅的生长阶段、生产性能不同灵活应用。饶平某狮头鹅饲养有限公司的草饲方法如表 2。

养鹅业常用的几种优质牧草见图 1。

### 参考文献:

- [1] 孙亚波,边革. 杂交狼尾草营养价值评价研究[J]. 现代畜牧兽医, 2013(9):53-55.

表 2 杂交狼尾草养鹅方法

生长阶段	草株高度 (cm)	切断长度 (cm)	草饲方法
幼雏			出壳后 10 天内的幼雏不宜饲喂
雏鹅	中雏	2-4	按草与料 2:1 比例拌匀, 倒进食槽中让其自由采食, 每天 5-6 次。中雏室应放置水槽。
	大雏	15-20	除正常投喂精料外, 每天补投青草 2 次, 让鹅采食。杂交狼尾草用量为每 100 只大雏鹅每天 20kg 左右。
后备种鹅	80-100	全草	后备种鹅投喂杂交狼尾草对增强鹅的体质, 提高种鹅繁殖性能极为重要。草饲的原则是: 限饲初期 (1-7 天) 不给料不给草; 限饲中期 (8-20 天) 不给料只给草; 限饲后期 (21-40 天) 少给料多给草; 补料期多给料少给草。当鹅的体重达到 6kg 以上时, 在保证精料用量的同时, 每只鹅每天投喂的杂交狼尾草应在 0.5kg 以上。
产蛋期种鹅	100-120	全草	饲喂优质牧草可以缩短种鹅体产期。母鹅每个产蛋年可分为四个产蛋期 (俗称“4 科”)。必须保证母鹅的全产蛋年有充足牧草供应。通常草料比为 1:0.4。抢巢期的母鹅应圈养在水边, 并投足杂交狼尾草。



象草 (茎粗硬、叶直立)



杂交狼尾草 (茎稍小、叶柔软)



杂交狼尾草 (末端有穗)



黑麦草 (茎叶小、十分柔软)

图 1 三种养鹅用的优质牧草

# 生鲜家禽加工经营卫生规范

## (DBS 44/ 004-2014)

### 1 范围

本标准规定了生鲜家禽加工经营过程中的加工场所选址与厂区环境、厂房与车间、设施与设备、卫生管理、检疫、加工过程食品安全控制、产品检验、贮存和运输、经营管理、产品召回管理、培训、管理制度和人员、记录和文件管理的基本要求和和管理准则。

本标准适用于广东省内生鲜家禽的加工经营过程。

### 2 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

**2.1 家禽** 指人工养殖的用于生产消费用肉、蛋的鸡、鸭、鹅、鹌鹑、鸽子等活禽类,不包括展示、观赏或试验用禽类。

**2.2 家禽胴体** 指家禽经放血、脱毛、去内脏后的整个躯体。

**2.3 家禽分割体** 指家禽胴体的分割部分(禽肉、禽翅、禽腿等)及禽的副产品(禽头、禽脖、禽内脏、禽脚、禽爪等)。

**2.4 生鲜家禽** 指对严格执行检疫制度屠宰后的家禽胴体迅速进行冷却处理,使家禽胴体中心温度降为0℃~4℃,然后进行分割(或不分割)、修整、包装,并在后续的贮存、流通和零售过程中始终保持在0℃~4℃范围内的家禽产品。

### 3 加工场所选址与厂区环境

**3.1 选址** 按照《食品安全国家标准 食品生产通用卫生规范》(GB14881)及《动物防疫条件审查办法》(农业部令2010第7号)有关规定执行,并符合以下要求。

**3.1.1** 符合当地政府的畜禽屠宰专项规划,并符合城乡规划、土地使用、动物防疫条件和环境保护要求。

**3.1.2** 应在地势较高、干燥、水源充足、交通方便、无有害气体和粉尘及其它污染物、便于污水治理排放的地区。应当远离人口密集区。

**3.2 厂区环境** 按照GB14881有关规定执行,并符合以下要求。

**3.2.1** 厂区周围建有围墙。

**3.2.2** 厂区应设有待宰区、可疑病禽观察区、隔离区、屠宰间和无害化处理设施;可疑病禽观察区、隔离区的位置不应与健康动物造成传染风险。

**3.2.3** 厂区应分设活禽进厂、成品出厂的专用门或通道。

**3.2.4** 厂区应设有废弃物、垃圾暂存或处理设施,废弃物应及时清除或处理,避免对环境造成污染。

**3.2.5** 厂区无害化处理设施、锅炉房、储煤场所、污水及污物处理设施应与屠宰、分割、肉制品加工车间和储存库相隔一定的距离,并位于主风向的下风处。锅炉房应设有消烟除尘设施。

**3.2.6** 厂区内禁止饲养与屠宰加工无关的动物。

**3.2.7** 厂区应分开设置活禽、生鲜家禽、病禽运输车辆和工具清洗、消毒的专门区域及相关设施,避免交叉污染。

### 4 厂房与车间

按照GB14881有关规定执行,并符合以下要求。

**4.1** 设独立的屠宰、冷却、内脏处理、整理包装间以及贮存生鲜家禽的冷库。

**4.2** 屠宰间面积充足,应保证操作符合要求,应留有足够的空间以便于实施宰后检验。应设立检验、检疫场所,配有相应的检验设施和办公用具。

**4.3** 整理包装车间温度保持在18℃以下,贮存生鲜家禽的冷库温度保持在0℃~4℃,并配有自动控温装置。

**4.4** 各加工场所根据清洁要求程度,应分为一般作业区、准清洁作业区和清洁作业区(如表1),各区之间应视清洁度的需要适当分隔,防止交叉污染。

表1 各加工场所洁净度的区分

加工场所	洁净度区分	
活禽验收、屠宰、外包装、仓库等场所	一般作业区	
分割、冷却、内脏处理、整理、检疫等场所	准清洁作业区	管制
消毒、内包装等场所	清洁作业区	作业区

**4.5** 按《公共场所卫生检验方法第3部分:空气微生物》(GB/T18204.3-2013)中的自然沉降法测定,准清洁作业区和清洁作业区空气中的细菌总数宜参照表2规定执行。

表2 各作业区空气中的细菌总数要求

作业区	每平皿菌落数/(cfu/皿)
清洁作业区	≤ 30
准清洁作业区	≤ 50

### 5 设施与设备

按照GB14881有关规定执行,并符合以下要求。

**5.1** 配备与加工能力相适应的屠宰、冷却、冷藏等设备设施。

**5.2** 配备生鲜家禽运输专用车辆以及病禽专用运输工具。

**5.3** 生产用水及制冰用水应符合《生活饮用水卫生标准》(GB5749)规定。

### 6 卫生管理

按照GB14881有关规定执行,并符合以下要求。

**6.1** 应制定质量管理手册和卫生标准操作规范(SSOP),并接受监督,鼓励建立并实施危害分析与关键控制点(HACCP)体系。

**6.2** 应配备经上岗培训的兽医卫生检验、检疫人员。

**6.3** 生产加工人员应持有健康证明,上岗前应进行相应的动物防疫及食品安全知识培训。不同卫生要求的区域或岗位的人员应穿戴不同颜色或标志的工作服、帽,以便区别,当天的工作服应当天清洗。不同加工区域的人员不应串岗。

**6.4** 活家禽验收、屠宰等接触活家禽岗位的工作人员应做好个人防护,防护用品包括防水围裙、口罩、手套、长筒胶鞋、工作帽等,佩戴口罩应盖住鼻孔,当天使用的个人防护用品应当天清洗消毒。

**6.5** 应有处理粪便、垫料、污水等废弃物的设施,并保持良好运行。家禽病害肉尸及其产品的处理应按照《病害动物和病害动物产品生物安全处理规程》(GB16548)执行,污水处理应按照《肉类加工工业水污染物排放标准》(GB13457)执行。

### 7 检疫

按照国家和省的有关家禽屠宰检疫的规定执行。

### 8 加工过程的食品安全控制

按照GB14881有关规定执行,并符合以下要求。

#### 8.1 屠宰过程卫生要求

应按照《肉鸡屠宰操作规程》(GB/T 19478-2004)中5.1-5.7中的要求进行屠宰操作,屠宰过程应符合下列要求:

**8.1.1** 浸烫水采用流动生产用水或经常换水,浸烫时水量应充足。

**8.1.2** 脱毛后去除禽体残毛、黄皮、脚皮和趾壳等,并用清水

冲洗,确保胴体干净。

**8.1.3** 内脏摘除时应完整去除嗦囊和食道,被嗦囊内内容物、胆汁和粪便等污染的胴体应从生产线摘下单独清洗、处理。

**8.1.4** 摘除内脏后,应用水冲洗胴体腔内、体表、以及设备、工具上留有的污物,冲洗用水应有一定的压力,便于快速冲去污物。

## **8.2 冷却过程温度要求**

**8.2.1** 应采用适当的方式,使胴体中心温度在屠宰后2小时内冷却至0℃~4℃。应采用探针式食品中心温度计等测定冷却后胴体的中心温度。

**8.2.2** 采用水冷却方式的,冷却水应保持清洁。

## **8.3 消毒过程卫生要求**

**8.3.1** 屠宰后的家禽胴体如需要可采用合适的方式进行消毒,降低胴体表面的微生物水平。

**8.3.2** 采用化学方法消毒的,使用的消毒剂应符合食品安全要求,并设有消毒液自动添加控制装置,合理控制消毒液浓度和消毒时间。

**8.3.3** 胴体经消毒后,应及时冲洗并沥干。

## **8.4 包装过程卫生要求**

**8.4.1** 生鲜家禽产品的标识应当符合有关规定,至少标明以下内容:产品的品名、产地、生产者、生产日期、保质期等内容。

**8.4.2** 企业应依据《鲜、冻禽产品》(GB16869)开展科学试验,提出产品保质期。

**8.4.3** 内包装车间应配备金属探测装备,金属探测器定期进行灵敏度校对、检修和维护,确保金属探测器正常运行。

**8.4.4** 内包装材料应符合相关食品安全要求,包装材料应设立专用的贮存库,且内外包装分开存放。

## **8.5 无害化处理**

**8.5.1** 经宰前、宰后检验发现的患有可疑传染病、寄生虫病或中毒性疾病的肉尸及其组织应使用专门车辆、容器及时运送,并按GB16548的规定处理。

**8.5.2** 其他需要无害化处理的动物和动物组织应在严格的监督下,并在专用的设施中进行无害化处理。

**8.5.3** 应制定相应的防护措施,防止无害化处理过程中造成的交叉污染和环境污染。

**8.5.4** 应做好无害化处理记录。

**8.5.5** 对加工过程中产生的不合格品和废弃物,应在固定地点用有明显标志的专用容器分别收集盛装,并在检验人员监督下及时处理,其容器和运输工具应及时清洗消毒。

## **9 产品检验**

按照GB14881有关规定执行,并符合以下要求。

**9.1** 生鲜家禽应符合GB16869的规定。检验合格的产品,应出具肉品品质检验合格标志。

**9.2** 产品出厂须经检验、检疫,应当附具动物检疫合格证明、检疫标志、肉品品质检验合格标志方可流通。

## **10 贮存和运输**

按照GB14881有关规定执行,并符合以下要求。

### **10.1 冷库要求**

**10.1.1** 冷库温度保持在0℃~4℃以内,配有自动控制温度和湿度的装置以及温度自动记录仪。

**10.1.2** 冷库内的温度、湿度和空气流速维持在合适范围,有效控制冷库门开启,尽量避免温度波动。

**10.1.3** 冷库不得存放有毒有害或有异味的物品,并定期消毒。产品应分类分区存放,并遵循先进先出原则出库。

### **10.2 运输**

**10.2.1** 运输工具应密闭、内表面光滑、易于清洗、消毒,配有

制冷和控温设施以及温度自动记录仪。

**10.2.2** 运输过程中温度保持在0℃~4℃以内。

**10.2.3** 前往加工厂运载或正在运载生鲜家禽的运输工具不应驶经任何禽流感或其他疫病管制地区。

**10.2.4** 运输车辆应保持清洁,不应存有异物、污物或其他有碍食品安全的物品,冷藏车制冷装置和温度计应保持良好工作状态,使用后车厢及装卸工具应及时清洗消毒。

## **11 经营管理**

### **11.1 经营场所卫生要求**

**11.1.1** 应有与生鲜家禽产品规模相适应的固定销售场所,并应布局合理;应有与产品品种、数量相适应的冷藏库(柜)等设施,冷藏库(柜)应有温度显示装置或温度计。冷藏库(柜)温度维持在0℃~4℃,保证产品中心温度维持在0℃~4℃。

**11.1.2** 经营场所应有照明、通风、防腐、防尘、防蝇、防鼠、防虫、防渗水和清洗消毒的设施设备。照明设备如安装在销售食品的正上方,应使用防爆型照明设备。

**11.1.3** 与生鲜家禽产品表面接触的设备与用具,应用无毒、无害或无异味、耐腐蚀、不易发霉、表面平滑易清洗和消毒的材质制造。

**11.1.4** 经营场所应进行定期卫生检查和清洁,冷藏库(柜)应当定期维护保养、清洗,温度指示装置应当定期校验。

**11.1.5** 经营场所若同时经营禽蛋类、蔬菜等的,应分开摆放,防止交叉污染。

**11.1.6** 经营场所应按照《商业、服务业经营场所传染性疾病预防措施》(GB19085)的相关规定建立传染性疾病预防措施。

### **11.2 采购与验收**

**11.2.1** 经营生鲜家禽应建立采购索证制度,索取供应商提供的有效证照、产品合格证明等。

**11.2.2** 生鲜家禽经营企业应建立进货和验收记录制度,如实记录产品名称、规格、数量、生产批号、保质期、供货者名称及联系方式、进货日期等信息。

**11.2.3** 实行统一配送经营方式的食品经营企业,可以由企业总部统一查验供货者的证明材料和产品合格证明文件,进行食品进货查验记录。

**11.2.4** 货证不符或标识不清楚的应拒收。

### **11.3 销售**

**11.3.1** 所销售的生鲜家禽产品应经检验、检疫合格并附有动物检疫合格证明、检疫标志、肉品品质检验合格标志,最小销售单元的包装或者标识符合本标准相关要求。

**11.3.2** 生鲜家禽产品应保存在0℃~4℃条件下销售。

**11.3.3** 超过保质期的生鲜家禽产品不得销售。

**11.3.4** 经营活动中产生的废弃物应及时处理销毁。

**11.3.5** 销售人员应经相应的食品安全知识培训,具备基本卫生知识和基本卫生防护技能。应建立销售管理制度,明确销售人员食品安全责任。

## **12 产品召回管理**

按照GB14881有关规定执行,并符合以下要求。

**12.1** 生鲜家禽加工经营企业应建立产品追溯制度,确保能对生鲜家禽的来源、屠宰、运输、贮存、销售各环节进行有效记录和追溯。

**12.2** 经营者发现其经营的生鲜家禽产品不符合食品安全标准,应立即停止经营销售,通知相关生产经营者和消费者。

**12.3** 被召回的生鲜家禽产品,应进行无害化处理或者予以销毁。

## **13 培训、管理制度和人员、记录和文件管理**

按照GB14881有关规定执行。



# 活禽市场建设指南

## 1 范围

本标准规定了活禽市场建设的基本要求、活禽零售市场要求、活禽批发市场要求和市场管理制度建设要求。

本标准适用于本省内的活禽零售市场和活禽批发市场的新建和改造。

## 2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

- GB 5749 生活饮用水卫生标准
- GB 16548 病害动物和病害动物产品生物安全处理规程
- GB/T 17110-2008 商店购物环境与营销设施的要求
- GB 19085 商业、服务业经营场所传染性疾病预防措施
- GB/T 19220-2003 农副产品绿色批发市场
- GB/T 19221-2003 农副产品绿色零售市场
- GB 50016 建筑设计防火规范
- GB 50034 建筑照明设计标准
- GB 50222 建筑内部装修设计防火规范

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

- 3.1 活禽 鸡、鸭、鹅、肉鸽、鹌鹑、鹁鸽和其他人工饲养、可供食用的禽类。
- 3.2 活禽市场 有固定的交易场地、设施,有若干经营者进场经营,对活禽实行集中、公开、现货交易的场所,包括活禽批发市场和活禽零售市场。
- 3.3 活禽批发市场 进行活禽批量集散、价格形成,并具有信息、结算等配套服务功能的活禽市场。包括活禽专业批发市场和有活禽经营的肉菜(农贸)批发市场。
- 3.4 活禽零售市场 直接向消费者销售活禽的活禽市场。包括活禽专业零售市场和肉菜(农贸)市场内活禽经营区或经营档口。
- 3.5 禽废弃物 物理性致死(非正常宰杀)的禽尸体、禽毛、禽粪便及正常宰杀的不可食用部分。
- 3.6 代宰屠宰区 在活禽批发市场内设置的集中宰杀活禽的区域。

## 4 基本要求

- 4.1 市场的选址应符合市场建设规划的相关规定。
- 4.2 市场应设有采光和通风、给水、排水、排污、消防、环境卫生等设施,并建立相关设施维护管理制度。
- 4.3 市场应设有废弃物暂存或处理设施,废弃物应及时清除或处理,避免环境污染。
- 4.4 活禽经营者应持营业执照经营和亮照经营,活禽经营者包括活禽代宰屠宰户。

## 5 活禽零售市场要求

5.1 选址 活禽零售市场的选址应符合下列要求:

- a) 应避开人口密集区;
- b) 场地环境应符合 GB/T 19221-2003 第 4 章的要求;
- c) 便于动物防疫和宰杀废水、禽废弃物的无害化处理;
- d) 交通、卫生、环保、消防、防雷等有关规定。

### 5.2 基础设施要求

5.2.1 市场厅棚 市场厅棚应采用不积水、不吸潮、防腐、耐

酸碱腐蚀的,大跨度、大空间的钢架结构、钢筋混凝土结构或砖混结构,层高应不低于 3m。

5.2.2 市场内墙身 市场内墙壁(含立柱四周)应采用浅色、无毒、抗腐蚀、不渗水、易清洗的材料涂刷或贴面至顶;天花板应用防霉材料覆涂。

5.2.3 地面 市场地面以耐磨、防滑、耐酸碱腐蚀、不渗水、易清洗的材料铺设,地面平整,无裂缝,并向排水沟方向倾斜,坡度比不少于 1%。

### 5.2.4 采光和通风

5.2.4.1 市场要自然采光,并有明朗的灯光设施。供电设施应满足:

a) 应配备符合用电负荷、安全的供电设施,并配备漏电防护装置;

b) 各经营区域应配备带良好接地的符合低压电器使用的电源插座,水禽交易区域使用防水插座;

c) 市场内环境照明供电设施配置应符合 GB 50034 的规定。柜台(操作台)上方灯照度应达到 100 lx,禽肉分割剔骨操作台灯光照度不小于 200 lx。市场内通道应配备照明灯,各出入口应设置应急灯。

5.2.4.2 市场应配置完备的通风系统,有条件的可配置低噪音抽送风机,宜按建筑面积 1000m<sup>2</sup> 安装不低于 2KW,1000m<sup>2</sup> 以上每增加 100m<sup>2</sup> 相应增加功率 300W 的标准配置。

### 5.2.5 给水

5.2.5.1 市场内经营用水应保证足够的水量、水压,经营用水应符合国家 GB 5749 的要求,设施配置应符合国家节约用水的规定。

5.2.5.2 市场内要配置高压水冲洗装置消毒设施,便于冲洗和消毒。

### 5.2.6 排水、排污

5.2.6.1 市场内下水道应采用沉井式暗渠(安管)排水系统,宽度为 20cm 以上,弧底深度 15cm 以上,并设不锈钢防鼠隔离网。

5.2.6.2 污水排放系统应当按环保要求设置过滤处理设施,污水通过隔渣过滤处理后接入城市污水管网,污水排放应符合环境影响评价批复的要求。

### 5.2.7 消防

5.2.7.1 市场建筑消防设施应符合 GB50016 的要求,内部装修应符合 GB50222 的要求。

5.2.7.2 市场应按照 GB/T 17110-2008 第 5.4.3 条的规定标准配置灭火器材。

### 5.2.8 环境卫生

5.2.8.1 市场应设有清洗、消毒、污水污物处理等设施,地面应保持清洁。

5.2.8.2 应配备足够数量、布局合理的禽废弃物收集设施和禽废弃物临时存放设施。禽废弃物临时存放设施应密闭。废弃物应及时清除或处理,避免环境污染。

5.2.8.3 保持营业场所和周围环境的卫生,不得在市场设施上乱搭挂、乱张贴。

## 5.3 活禽经营设施建设要求

### 5.3.1 活禽经营区

5.3.1.1 活禽经营区域应相对独立(封闭或半封闭),与其他农产品经营区域分开;市场内活禽经营区域 25m 范围内不得

设置现场制售食品的加工经营场所。

5.3.1.2 活禽经营区应设置活禽运输车辆和禽笼清洗消毒场所,暂存废弃物等设施。

5.3.1.3 活禽经营区应设置独立的出入口,并设置进出工作人员鞋底消毒设施。

### 5.3.2 活禽经营档口

5.3.2.1 档口摊档台平面要整齐划一,采用不锈钢、釉面砖或抛光砖铺设。摊档台立面贴抛光砖或瓷砖,档台靠通道外侧边沿设挡水设施不低于20cm。

5.3.2.2 档口面积不少于10m<sup>2</sup>,应划分为活禽存放、宰杀、售卖三个区域,并相对独立(封闭或半封闭),活禽存放区域、宰杀加工区域相对封闭,与消费者之间应实施物理隔离。

5.3.2.3 档口应配备独立排风、照明、给排水设施、热水加热设施、清洗水池、操作台以及垃圾收集设施等。

5.3.2.4 档口活禽存放区域应宽敞通风,墙壁、房顶、地面平整牢固,地面四周设下水明渠。应配备冲洗水龙头和消毒设施,便于冲洗消毒;存放活禽应使用不锈钢笼,笼底设置接载禽类粪便的活动设施,并与售卖区域隔开。

## 6 活禽批发市场要求

### 6.1 选址

6.1.1 应远离水源保护区和饮用水取水口,避开居民住宅区、公共场所等人口密集区,距离养殖场3公里以上。

6.1.2 应符合动物防疫的要求,便于宰杀废水、禽废弃物的无害化处理。场地环境应符合GB/T 19220-2003第4章的要求。

### 6.2 基础设施要求

6.2.1 市场厅棚 批发市场的交易厅棚建设应符合GB/T 19220-2003第5.1条的要求。

#### 6.2.2 市场内布局

6.2.2.1 人员和活禽进出市场通道应分离,并分别设置活禽进出口车辆消毒设施及人员进出鞋底消毒设施。

6.2.2.2 活禽批发市场应划分为交易区(如:早禽交易区、水禽交易区、杂禽交易区)、代宰屠宰区、停车场、污物集中区、办公区等区域。交易区应通风良好,水禽交易区与其他交易区要相对隔离。配有冲洗水龙头和消毒设施。

6.2.2.3 交易区、代宰屠宰区和生活区之间应有一定距离的间隔。

6.2.2.4 市场内配备有视频监控系统、广播系统。

#### 6.2.3 地面

6.2.3.1 市场地面以耐磨、防滑、不渗水、易清洗的材料铺设,地面平整,无裂缝,有一定斜度,并向排水沟方向倾斜。

6.2.3.2 水禽交易区应设置离地面15cm以上的棚架。

#### 6.2.4 采光和通风

6.2.4.1 市场内采光设施按第5.2.4.1条的要求执行。

6.2.4.2 市场内窗户的设施应保证空气能够顺畅对流。活禽交易区、宰杀区应配置独立的排风设施,排风机口布局应符合环保要求。

6.2.5 给水 市场内给水设施按第5.2.5条的要求执行。

#### 6.2.6 排水、排污

6.2.6.1 市场内下水道应采用沉井式暗渠排水系统,交易区档前设有排水、排污明渠,并设不锈钢防鼠隔离网。

6.2.6.2 污水排放系统应当按环保要求设置隔渣过滤处理设施,污水排放应符合环境影响评价批复的要求。

6.2.6.3 市场内下水道应定期进行清洗,确保畅通。

6.2.7 消防 市场消防设施应符合GB50016和GB50222的要求配置消防栓、消防水带、干粉灭火器等消防器材。

### 6.2.8 检测

6.2.8.1 市场设有有关禽类疫病检测室。

6.2.8.2 市场应每天进行抽样检测,做好检测记录。

### 6.2.9 环境卫生

6.2.9.1 批发市场的环境卫生应保持地面清洁。

6.2.9.2 活禽交易区应配置统一的废弃物容器、垃圾桶(箱),并设置集中、规范的垃圾房。垃圾房应密闭,有上下水设施,不污染周边环境,每个档口应设置加盖的垃圾桶(箱)。垃圾日产日清,保持交易区场所和周围环境的卫生。无害化处理应符合GB 16548的规定。

6.2.9.3 应设置活禽运输车辆和禽笼清洗消毒场所。

6.2.9.4 应设置一定数量的防鼠、灭鼠设施设备。

## 6.3 代宰屠宰区要求

### 6.3.1 基本要求

6.3.1.1 活禽批发市场内应指定区域为活禽代宰屠宰区。代宰屠宰区应与活禽交易区有一定的距离。

6.3.1.2 配置与宰杀规模相适应的检疫检验室和设备,配备相应的检验人员。

6.3.1.3 应按有关部门的规定和要求配备废弃物、污染物、病死家禽及其不合格产品和污水处理设施、设备。

### 6.3.2 设施和服务

6.3.2.1 应具备相应的屠宰设施设备,如:沥血桶、蒸汽炉或热水炉、烫毛池、脱毛机、家禽宰后处理和检验台(架)等。

6.3.2.2 各功能间地面应采用不渗水、防滑、易清洗、耐腐蚀的材料,其表面应平整无裂缝、无局部积水。

6.3.2.3 各功能间的布局与设施必须满足生产工艺流程和卫生要求,活禽和家禽肉品必须严格分开,避免迂回运输,防止交叉污染。

### 6.4 停车场设施要求

6.4.1 批发市场应设立活禽运输车辆专用停放区,停车场应划分为活禽卸货后和社会车辆停放两个区域。

6.4.2 停车场应专设车辆清洗、消毒区,配备车辆清洗和自动喷淋消毒设置,活禽运输车辆卸货后须通过清洗和消毒才能停到停车场。

## 7 市场管理制度建设要求

7.1 活禽市场应编制《活禽市场管理制度》,内容包括市场经营管理、设施设备管理、质量管理、物价管理、检测管理、环境卫生管理、从业人员卫生管理、服务监督管理和诚信管理等制度。

7.2 活禽市场应建立市场准入、卫生防疫、消毒、无害化处理等制度,卫生防疫、消毒应符合GB 19085的要求。

7.3 活禽市场应每天清洁消毒一次,每周大扫除一次。活禽零售市场应实行活禽当天零存栏管理。

7.4 活禽市场应建立禽流感等疫情的预测预警、防控及溯源制度及突发疫情应急预案。

7.5 活禽市场应按要求建立休市制度,实行活禽暂停交易措施。休市期间,应当按照有关卫生规定,对活禽经营场所、活禽笼具、被杀器具等进行彻底的清洗消毒。

7.6 活禽市场应建立投诉举报制度,定期对消费者进行顾客满意度抽样调查,征询对活禽零售市场、批发市场服务意见,记录在案并制定解决办法。

7.7 活禽市场应在显著位置设置投诉信箱,公布投诉电话。