

# 广东畜牧兽医科技

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

双月刊 1976年3月创刊

第40卷第5期(总第183期)

2015年10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 屈源泉 廖 明 曾振灵

毕英佐 徐志宏 舒鼎铭 孙彦伟

王贵平 张健骝 王政富 刘彩霞

熊惠军 吴玄光 刘清神

特邀编委:

陈 峰 谢志刚 林旭埜 李 岩

陈瑞爱 罗满林 向 华 王 华

编辑出版:《广东畜牧兽医科技》编辑部

地 址:广州市先烈东路135号(510500)

电 话:020-37245052 37288167

传 真:020-37245052

网 址:http://www.gdaav.org

E-mail:gdmsykj@163.com

印刷单位:广州市人杰彩印厂

发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

发行范围:国内外公开发行

每期定价:5.50元

广告经营许可证号:440000100037



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

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

## 目 录

### ·专题综述·

- 2015年前三季度我国禽蛋生产形势分析及后期走势研判.....虞 华, 彭 莉, 等(1)  
猪繁殖与呼吸综合征病毒反向遗传操作系统的构建及应用综述.....倪能能(4)  
流行性腹泻疫苗预防研究进展.....马 锐, 黄小波, 等(9)

### ·畜牧技术·

- 现代化装备下母猪的饲养管理关键点初探.....霍星华, 吴 洁, 等(12)  
胍基乙酸在育肥猪饲养中的应用.....胡金良, 陈宝玉, 等(15)

### ·兽医临床·

- 2012-2013年广东猪流行性腹泻流行情况调查报告.....田 云, 焦 颖, 等(18)  
猪瘟抗体检测试纸条与ELISA试剂盒的检测结果比对试验.....  
.....郝立新, 肖 雪, 等(22)  
一株兔病毒性出血症病毒的分离鉴定.....于新友, 李天芝, 等(25)

### ·试验研究·

- 胚胎培养液中能量底物对猪体细胞克隆胚胎体外培养的影响.....  
.....周 荣, 罗绿花, 等(28)  
超声提取芒果叶中总黄酮的工艺研究.....宋浩铭, 容 庭, 等(32)  
鸭坦布苏病毒一步RT-PCR检测方法的建立与初步应用.....  
.....祖立闯, 李 娇, 等(37)

### ·华南宠物园地·

- 狂犬病病毒RT-PCR检测方法的建立.....周 萍, 吴晓薇, 等(41)  
犬瘟热的呼吸系统病理变化分析.....夏新萌, 李成蒙, 等(47)

### ·经验交流·

- 广东一奶牛场临床乳房炎致病菌分离及其药敏试验.....周淑贞, 辜质纯, 等(48)  
四例山羊放线菌病的诊断与治疗.....翟少伦, 吕殿红, 等(51)

### ·信息之窗·

- 2015“永顺杯”优秀论文评选启事.....(31)  
广东韶关11月1日起试行生鲜鸡政策.....(46)

# GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

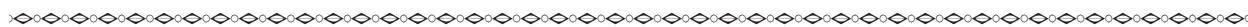
Established in march 1976(Bimonthly)

OCT.2015 Volume 40, Number 5 (Total No.183)

---

## Main Content

- Current Egg Production in First three Quarters, 2015 and its Later Trends .....Yu Hua,Pengli,et al (1)
- Overview of Reverse Genetic Operation of PRRSV ..... Ni Nengneng(4)
- Progression of Porcine Epidemic Diarrhea Vaccine Research ..... Ma Rui,Huang Xiaobo,et al(9)
- Key Points of Feeding Management on Sow Production With Modern Equipment .....  
.....Huo Xinghua,Wu Jie,et al(12)
- Application of Guanidine Acetic Acid in the Feeding of Fattening Pigs ..... Hu Jinliang,Chen Baoyu,et al(15)
- Investigation on Porcine Epidemic Diarrhea in Guangdong from 2012 to 2013 .....  
..... Tian Yun, Jiao Ying, et al(18)
- The Comparison Test of Immune Colloidal gold Strips and ELISA Kits for Swine Fever Antibody Detection  
.....Xi Lixin,Xiao Xue, et al(22)
- Isolation and Identification of a Strain of DY RHDV..... Yu Xinyou,Li Tianzhi, et al(25)
- Effect of Energy Substrates in the Culture Medium on in Vitro Development of Porcine Somatic Cloned  
Embryos..... Zhou Rong,Luo Lvhua, et al(28)
- Ultrasound-assisted Extraction Technology of Flavonoids from Mangifera Indical Leaves.....  
.....Song Haoming,Rong Ting, et al(32)
- One step RT-PCR Detection Method for Duck Tembusu Virus..... Zu Lichuang,Li Jiao, et al(37)
- Method of RT-PCR for Detection of Rabies Virus ..... Zhou Ping, Wu Xiaowei, et al(41)
- Pathological Changes in Respiratory System of Canine with Canine Distemper .....  
.....Xia Xinmeng,Li Chengmeng,et al(47)
- Pathogen Isolation and Drug Sensitive Test from Cows with Clinical Mastitis in one Dairy Farm in Guangdong  
.....Zhou Shuzhen, Gu Zhichun,et al(48)



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

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

Chief Editor:JIANG Zongyong

Vice Chief Editor;SUN Yanwei

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

Post Code: 510500

Tel:(020)37245052 37288167

Fax:(020)37245052

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

# 2015年前三季度我国禽蛋生产形势分析及后期走势研判

虞 华<sup>1</sup>, 彭 莉<sup>2</sup>, 虞丽娜<sup>3</sup>

(1. 国家统计局盐城调查队, 江苏 盐城 224005; 2. 江苏省统计局盐城调查局, 江苏 盐城 224005; 3. 中国邮政集团盐城分公司, 江苏 盐城 224005)

**摘要:** 2015年春节刚过, 鸡蛋价格就进入了下跌的快车道。原本以为这只是“春节消费后遗症”。谁知, 一蹶不振的势头竟持续了半年多。然而到了七八月份, 往年本是鸡蛋消费的淡季, 可蛋价却出现了快速回升的势头。7月下旬广西等地迎来强降雨, 东北、华北地区亦有雨水天气来袭, 鸡蛋运输和收货受阻, 蛋价出现小幅回落。然而全国大部分地区仍处于“蒸煮”天气中, 蛋鸡“歇伏”比例继续上升。同时同期生猪价格快速回升, 鸡蛋替代效应显现。在此影响下, 蛋价仍在上行区间。市场预期即将进入需求旺季, 养殖户惜售造成现货价格不断抬升。后期的“中秋节、国庆节”节日消费预期或将进一步提振双节前的蛋价, 全国鸡蛋平均出场价格“破10”的可能性较大。

**关键词:** 禽蛋价格; 消费乏力; 周期性波动; 有序发展

**中图分类号:** F714.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2015)05-0001-03

## 1 前三季度国内禽蛋市场总体特点

2015年1-8月鸡蛋价格走势基本可以分为2个时期。一是鸡蛋价格延续上年行情并呈现跳水探底期(1月~7月上旬)。今年春节以来, 全国鸡蛋价格跌跌不休, “火箭蛋”风光不再。鸡蛋无论是现货价格还是期货价格都是一蹶不振, 不管是“三月三”、“清明节”, 还是“五一节”、“端午节”, 都没有对鸡蛋价格产生有效的提振。由于鸡蛋销售不畅, 价格持续下跌, 产品库存时间加长, 蛋鸡养殖经历了由盈转亏、亏损逐步加大的过程。2月27日开始, 蛋鸡饲养利润开始由正转负, 5月下旬亏损已经达到22.81元/羽。7月5日鸡蛋出场价格一度跌落至每公斤6元以下, 养鸡户每公斤鸡蛋要亏损0.5元以上。价格监测数据显示: 2015年7月5日全国鸡蛋平均出场价格跌至6元/kg, 较年初下跌2.6元/kg, 跌幅达30.2%, 比去年最高点下跌了45.3%。二是2015年7月中旬起, 随着梅雨天气的结束, 气温逐渐升高, 蛋价也随气温的升高普遍上涨, 鸡蛋价格进入触底反弹期(7月中旬起), 50多天的时间就拉升了46%。

### 1.1 禽蛋价格触底反弹

去年全国鸡蛋价格较好的市场行情刺激了蛋鸡养殖规模的大幅扩张, 供过于求导致了今年初至4月上旬鸡蛋批零价格的明显下行, 4月中旬起鸡蛋收购价格一度出现反弹, 5月上旬起又重

回跌势, 7月上旬起触底反弹。2015年前7个月, 全国鸡蛋出场价格从春节前的8.60元/kg跌至7月5日的6元/kg, 跌幅为30%; 8月25日反弹至8.75元/kg, 50多天拉升了46%。2015年1-8月全国鸡蛋平均出场价格为7.13元/kg, 比2014年1-8月的8.47元/kg低1.34元。其中: 1月均价最高, 达8.20元/kg; 2月为8.16元/kg; 3月为6.95元/kg; 4月为6.53元/kg; 5月为6.49元/kg; 6月最低, 仅6.19元/kg; 7月为6.47元/kg; 8月为8.05元/kg(图1)。全国淘汰鸡出场价格由年初时的10.14元/kg涨至3月25日的10.56元/kg, 涨幅约为4%; 后随蛋价持续回落, 6月20日已回落到7.80元/kg, 比年初下跌了23.1%。7月份随着生猪、鸡蛋价格强势上涨, 直接拉动了淘鸡价格的上行; 且受前期的集中淘汰影响, 目前可供淘鸡数目偏低, 支撑鸡价维持高位。8月5日全国多地淘汰鸡突破“10元”, 均价达到了10.13元/kg, 8月25日均价已达到了11.13元/kg。2015年1-8月全国淘汰鸡平均出场价格为9.48元/kg, 比2014年1-8月的9.37元/kg高0.11元。其中: 1月均价为9.59元/kg; 2月为9.15元/kg; 3月份为10.52元/kg; 4月为9.84元/kg; 5月为9.41元/kg; 6月价最低, 为7.99元/kg; 7月为8.81元/kg; 8月最高, 达10.54元/kg(图2)。

### 1.2 蛋鸡养殖扭亏为盈并进入高盈利区间

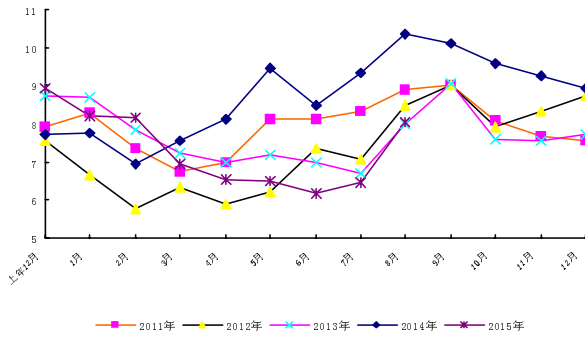


图1 2011年以来全国鸡蛋出场价格走势(元/kg)

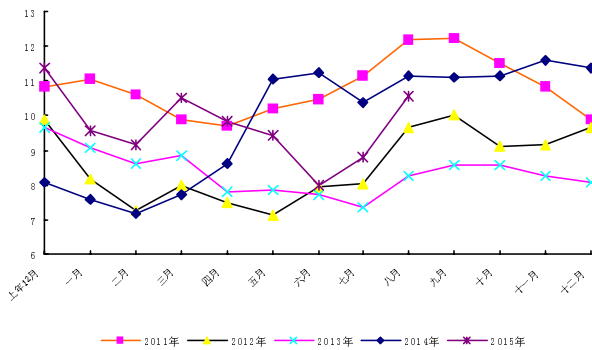


图2 2011年以来全国蛋鸡淘汰鸡出场价格走势(元/kg)

春节过后,由于鸡蛋销售不畅,价格持续下跌,产品存库时间加长,蛋鸡养殖经历了由盈转亏、亏损逐步加大的过程。进入7月份以后,蛋市行情转好,养殖开始扭亏为盈。7月30日养殖户每500g鸡蛋可获得约0.40元左右的收益;8月25日养殖户每500g鸡蛋可获得约1元左右的收益。2015年1-8月全国每500g鸡蛋平均收益约为0.40元左右。

### 1.3 玉米价格震荡走弱,豆粕价格触底反弹

据国家统计局数据,2015年1-7月,全国配合饲料总产量共计8397.84万吨,同比增长2.68%。其中:7月份达1327.19万吨,同比增长4.15%。2015年1-7月,全国混合饲料产量共计3544.86万吨,同比增长1.85%。其中:7月份达520.01万吨,同比增长3.43%。目前,国内玉米供需格局明显供大于求,国家在临储玉米超过1.3亿吨巨大库存的同时,由于进口杂粮冲击南方销区玉米价格,出于对新季玉米临储政策的担忧,贸易商和粮库纷纷提前放粮,地储和轮换粮也集中供应市场;加之临储玉米持续拍卖,深加工企业更大程度上压缩库存,进而缩小了供应缺口。在许多

业内人士看来,今年的临储新政或是国内玉米乃至粮食政策调控的一道分水岭。它不仅关乎粮食生产形势本身,更直接关系到行业、产业和诸多企业的未来发展方向。2015年1-8月份全国玉米价格平均每千克为2.38元,比上年同期的2.40元低0.02元。其中:1月均价最低,为2.32元/kg;2月为2.33元/kg;3月为2.36元/kg;4月为2.40元/kg;5月为2.41元/kg;6月最高,为2.42元/kg;7月为2.41元/kg;8月为2.36元/kg。

8月份USDA报告意外利空,导致芝加哥期货交易所(CBOT)大豆期货重挫约6%,拖累国内连盘豆粕期货,现货价格均下调。但随着猪肉价格的上涨、下游养殖业的回暖以及人民币的贬值等利好因素,预计后期国内豆粕将会反弹。2015年1-8月份全国豆粕价格平均每千克为3.09元,比上年同期的3.89元便宜0.80元。其中:1月均价最高,为3.34元/kg;2月为3.20元/kg;3月为3.24元/kg;4月为3.18元/kg;5月为3.10元/kg;6月最低,为2.82元/kg;7月为2.94元/kg;8月为2.91元/kg(图3)。2015年8月第3周肉鸡配合饲料和蛋鸡配合饲料平均价格分别为3.32元/kg和3.04元/kg,同比分别下降4.3%和4.7%。

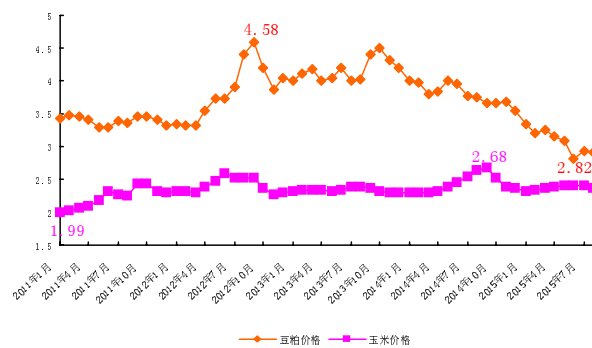


图3 2011年以来全国豆粕、玉米价格走势(元/kg)

### 1.4 补栏积极性受抑,苗鸡价格止涨趋稳

据农业部对全国480个集贸市场畜禽产品价格定点监测,8月份第3周全国商品代蛋雏鸡平均价格为3.13元/只,与前一周比上涨0.6%,比年初下降1.6%,比年内最高价4月份第1周下降2.8%,同比下降3.1%;商品代肉雏鸡平均价格2.77元/只,比前一周下降2.1%,比年内最高价4月份第1周下降3.1%,同比上涨8.6%。7月30日全国主产区肉苗鸡价格为2.07元/羽,比6月初上涨了1倍多;8月25日全国主产区肉苗鸡价格已跌至1.17

元/羽,仅比6月初高些。据芝华蛋鸡存栏数据的统计监测,2015年7月育雏鸡补栏量较2015年6月大幅减少14.87%,同比增加23.4%。从规模方面来看,5万只以下规模蛋鸡养殖户育雏鸡补栏量减少,5万只以上规模蛋鸡养殖户育雏鸡补栏量也减少。从分省来看,其中除湖南、辽宁出现增加,其他各省份都有所减少。育雏鸡补栏减少的原因因为前期鸡蛋价格持续低迷,同时夏季为养殖户补苗淡季,导致育雏鸡补栏量大幅减少。

## 2 鸡蛋价格持续上涨的主要原因

综合分析,消费淡季蛋价出现上涨的主要原因是受供应总量减少、肉蛋比价变化的影响。

### 2.1 鸡蛋供应趋紧

蛋鸡进入“歇伏”期,加之前期持续雨水、闷热天气,蛋鸡的产蛋率明显下滑,产蛋量减少,又不易保存,再加上部分养鸡户前期淘汰老鸡暂未补栏,供应总量出现趋紧。

### 2.2 生产成本增加

夏季鸡舍需要进行降温处理,养殖成本相应增加,养鸡户倾向于高价出售。

### 2.3 肉价上涨,鸡蛋替代效应显现

猪肉价格大幅上涨,肉蛋比价发生变化,部分家庭鸡蛋消费增多,助推了鸡蛋价格的上行。

### 2.4 价格季节性因素影响

鸡蛋价格波动具有明显的规律性,波动明显,通常4月份为鸡蛋全年价格的最低点(图4),7月份开始上涨,高点通常出现在8、9月份。

## 3 后期禽蛋市场价格走势预判

7月份以来鸡蛋价格连续上行,7月30日全国鸡蛋平均出场价格达到7.47元/kg;8月25日全国鸡蛋平均出场价格达到8.75元/kg,其中山东地区均价最高9.28元/kg,河北地区均价最低8.2元/kg。学校开学引起的食堂备货暂告一段落,而中秋节的节前备货还未完全开启,蛋价进入短时的震荡整理期;后市随着中秋节集中备货影响,蛋价或仍有上行空间。但蛋鸡“歇伏”的结束以及新增产蛋鸡的开产,鸡蛋供应回升,蛋价上行空间或有限。同时同期生猪价格快速回升,鸡蛋替代效应显现,在此影响下,蛋价仍在上行区间,市场预期即将进入需求旺季,养殖户惜售造成现货价格不断抬升。鸡蛋期价的上涨更多是受到市场情绪的影响。

短期内鸡蛋市场供给由充裕转为基本平衡。一方面,高温天气抑制蛋鸡产蛋性能,鸡蛋供应有

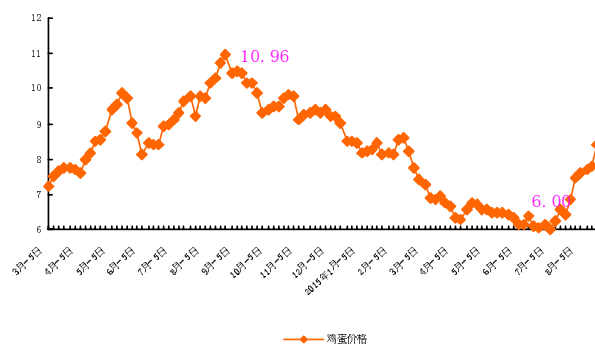


图4 2014年3月以来全国鸡蛋价格(元/kg)变化

一定下降,这有利于缓解供应压力,利好鸡蛋价格走势。进入夏季后,受高温天气影响,蛋鸡产能有所下降。另一方面,高温天气也影响鸡蛋运输、储藏以及消费,短期看鸡蛋价格波动将有所加大。从蛋鸡存栏和补栏数据来看,2015年7月在产蛋鸡存栏量为11.48亿只,较6月增长1.1%,涨幅放缓,同比增加1.6%。从规模方面来看,5万只以下规模蛋鸡养殖户在产蛋鸡存栏量增加,5万只以上规模蛋鸡养殖户在产蛋鸡存栏量减少。在产蛋鸡存栏增加的原因是新增在产蛋鸡量大于淘汰量。根据历史蛋鸡鸡龄结构及存栏数据推算,6月份新增在产量为8931万只,淘汰量为7709万只。

目前影响行情走势的利多因素仍在持续发酵中,后期的“中秋节、国庆节”节日消费预期或将继续提振双节前蛋价,全国鸡蛋平均出场价格“破10”的可能性较大。因为9月中下旬开始,随着上年补栏蛋鸡产蛋高峰期的结束及利好的淘汰鸡价格,淘汰鸡出栏速度将会明显加快,蛋鸡存栏有望回落,鸡蛋产量将会回落,市场供给减少;而在消费段,中秋、国庆双节临近,月饼生产厂商、中高档饭店以及经销商备货增加,以及大中专院校开学带来的团体消费增加,均是鸡蛋消费需求提振的有利因素,蛋价可能仍会出现较为明显的上涨行情。前期提前淘汰蛋鸡,致使目前可供淘鸡数目偏低,淘汰鸡价格得以支撑,后期淘鸡价格或以震荡走势为主,继续上涨空间不应很大。受生猪供应紧缺、价格继续保持强势以及肉鸡供应减少等利好因素的支撑,预计近期肉鸡价格将继续上涨,前期苗价持续高涨刺激种鸡场孵化量增加,鸡苗上市量逐渐增多,苗价一度高位回调,预计后市鸡苗价仍存上涨空间。

值得养鸡户重视的是,土鸡蛋市场零售价格  
(下转第11页)

# 猪繁殖与呼吸综合征病毒反向遗传操作系统的构建及应用综述

倪能能

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 501642)

**摘要:** 本文从猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 反向遗传操作系统的构建及其在病毒基因功能研究、疫苗研制、病毒诊断等方面的应用作一综述。

**关键词:** PRRSV; 反向遗传; 系统构建; 应用

**中图分类号:** S856

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2015)05-0004-05

猪繁殖与呼吸综合征(蓝耳病)是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus, PRRSV)引起的一种致使猪群发生以繁殖障碍和呼吸系统症状为特征的病毒性传染病,严重制约着养猪业的健康发展。世界上许多国家和地区都有本病的流行,有研究表明在2006年引起我国南方多省市猪群“无名高热”的主要病原就是PRRSV。正因如此,猪繁殖与呼吸综合征始终是我国猪病研究的热点所在,更有些学者将猪繁殖与呼吸综合征视为我国养猪业的头号杀手。

反向遗传技术(Reverse Genetic Manipulation, RGM)是上世纪80年代兴起的一种生物技术,近年来在生物科学研究的各个领域已经被广泛应用。所谓反向遗传技术就是以病毒RNA为模板,利用RT-PCR技术,通过构建病毒的cDNA分子克隆,在DNA分子水平上对RNA病毒基因组进行加工和修饰,诸如碱基突变、插入、缺失、互补、置换等,拯救出有感染性的病毒。然后通过观察所拯救出的病毒的表型来判断基因组修饰的效果或某个基因的功能。PRRSV作为一种RNA病毒,其基因的功能、致病机理及与宿主相互作用关系等的研究,也要以反向遗传技术为前提,反向遗传技术也随之成为研究PRRSV最常用且有效的手段。

## 1 反向遗传操作系统的构建

反向遗传操作系统的构建,就是对病毒基因进行体外人工干预,创造满足病毒复制、包装等各种必要条件的过程。建立病毒反向遗传操作系统

主要包括病毒基因组全长cDNA的克隆及改造、构建辅助质粒、测定序列、共转染拯救病毒以及新病毒有关特性的鉴定与应用等内容。

### 1.1 全长cDNA分子的构建

全长cDNA的克隆是反向遗传操作技术的关键性环节,构建感染性克隆的关键在于能否获得忠实性的PRRSV全基因组片段。因此构建感染性分子克隆过程中最重要的,最难解决的问题,就是病毒基因组全长cDNA序列的获得,确保克隆序列的真实性和完整性,尽可能地避免碱基突变。虽然也有报道称不完整的cDNA克隆也可产生感染性的转录本,但大多数RNA病毒的感染性转录本的获得都有赖于全长cDNA的克隆。全长cDNA的构建主要包括分段克隆法、长距离PCR法、体外拼接法。

**1.1.1 分段克隆法构建全长cDNA分子** 这种方法不仅是最常用的方法,而且还能避免长的RNA序列中可能含有的毒性序列对质粒中cDNA的稳定性的影响。分段克隆法基本原理是:首先对病毒基因组进行全基因测序,根据测序结果分析其酶切图谱;然后根据基因组中的单一酶切位点,将全基因组分成若干段,再用高保真DNA Taq聚合酶分别将各段扩增出来;最后将扩增片段逐段克隆到合适的载体中。Nielsen等<sup>[1]</sup>将PRRSV北美株VR-2332的全基因组分为6段,分别克隆后逐段克隆到pBluescript载体上,从而获得了VR-2332的全长cDNA。Ying Fang等<sup>[2]</sup>将北SD01-08株的全基因组分为9段,将RT-PCR得到的相互重叠的9个目的片段克隆到PCR-BluntII-Topo载体上,然后逐段

转入 pACYC177 质粒,最后收获 SD01-08 株的全长 cDNA 克隆。

**1.1.2 长距离 PCR 法获得全长 cDNA 分子** 长距离 PCR 法的基本原理是:将常规的 Taq 酶的高效扩增能力与高保真酶的 3'→5' 强校对能力相结合,从而实现长片段的有效扩增。Gritsum 等<sup>[3,4]</sup>利用此法获得蜚传脑炎病毒的全长 cDNA 克隆。

**1.1.3 体外拼接法构建全长 cDNA 分子** 有些病毒的 RNA 基因组比较大,如冠状病毒,无法用常规载体实现病毒全长 cDNA 分子的克隆。这就要求研究者采用体外拼接法构建病毒的全长 cDNA 分子。首先,根据病毒基因组的单一酶切位点,将全基因分成若干段,分别克隆于载体中,然后用限制性内切酶将各个基因片段从重组质粒中释放出来。最后用连接酶将各个片段依次相连,最终获得病毒基因组完整的全长 cDNA 分子<sup>[5]</sup>。

## 1.2 克隆感染性 PRRSV 全长 cDNA 的影响因素

反向遗传操作中关键性的一步就是构建有感染性的 cDNA 克隆。虽然研究者已对其进行了许多的科学研究,但是对其稳定的生物活性还是无法保证。由于转录产物 RNA 的不均一性、cDNA 克隆中携带点突变、5' 端和 3' 端核苷酸序列冗余或缺失以及 5' 端的帽子结构和 3' 端的 poly(A) 等都会对转录物的感染性产生很大的影响。

**1.2.1 转录产物的不均一性** 在体外转录过程中,会产生很多长短不一的 RNA 片段,在这些片段所组成的类群里,只有小部分是病毒的全长 RNA。当用转录产物转染宿主细胞时,那些不完整的 RNA 片段与完整的 RNA 片段就会竞争性地同宿主细胞结合,因而影响转录产物的对宿主细胞的感染性。

**1.2.2 在构建全长 cDNA 分子和转录过程中产生基因突变** 虽然高保真酶的发现和使用很大程度上提高了聚合酶的保真性,但在逐段拼接,构建全长 cDNA 以及 cDNA 转录为感染性 RNA 的过程中产生基因突变是不可避免的。Schenborn 等<sup>[6]</sup>发现在转录过程中 T7 和 SP6 RNA 聚合酶具有序列依赖性,也就是说启动子序列会附着在序列上,所以这一步的过程中也可能引入基因突变。基因突变的产生往往会使 cDNA 或转录的 RNA 的感染性大大降低甚至消失,但也有的突变会使其感染性增强<sup>[7]</sup>。

**1.2.3 5' 和 3' 端碱基数的影响** 病毒的感染性、

复制、转录以及翻译受基因组 5' 非翻译区 (UTR) 一级序列和高级结构的调控。通常情况下 5' 端多出 1~2 个碱基时会影响转录本的感染性,但有的病毒的转录本多出 10 个碱基时却对其感染性没有影响。在高飞等利用 PRRSV 转录本的感染性克隆 pCBC2,通过 PCR 突变对基因结构进行改造,构建了一系列 5' UTR 序列缺失的全长突变体克隆,其体外转录的 RNA 转录本转染细胞,进行病毒感染性、复制和转录分析。结果表明 5' 端能够耐受一定数目的碱基缺失,并发现这种碱基缺失可以通过突变,填补缺失位点的核苷酸。但是 5' 端的自救能力在碱基缺失较多的情况下会受到限制,其感染性也无法恢复。

相对于 5' 端来说,3' 端多余的碱基序列对转录本的感染性的影响不那么明显。一般在 3' 端多出 1~7 个碱基对转录本的感染性似乎没什么影响,但当碱基数多出太多时会造成转录本感染性的丧失。袁世山等研究发现,PRRSV 3' UTR 的 5' 端可耐受一定数目的核苷酸的插入 (23 nt) 与缺失 (41 nt) 突变,原有结构被保守的茎环结构突变或用异源茎环替换后,导致病毒失去感染性。

**1.2.4 5' 端帽子结构和 3' 端 poly(A) 结构的影响** 通常为了提高转录本的翻译效率或提高转录本的稳定性,进而使转录本获得最佳的感染性,一般可在 5' 端添加帽子结构。可能是因为帽子结构具有较好的保护性,使宿主细胞核酸酶不能消化转录本。

袁海峰等将北美株 PRRSV 全长感染性克隆,经体外转录转染 Marc-145 细胞,实验证明能产生 CPE 的最小 poly(A) 尾长度为 10。推测过少的 poly(A) 尾不能使病毒基因组 RNA 有效地与宿主蛋白 PABP 结合,使基因组 RNA 的翻译起始受到抑制,进而使负链 RNA 的复制和基因组以及亚基因组 RNA 的转录受到抑制,最终不能包装成完整的病毒颗粒,从而使病毒失去感染性;在感染细胞过程中 PRRSV 基因组 poly(A) 尾能被修复。

## 1.3 病毒的拯救

**1.3.1 体外转录法** 体外转录法是 PRRSV 反向遗传操作中常用的方法。自 Meulenberg 建立第一个 PRRSV 反向遗传操作系统后,后继的研究者大多也以体外转录法获得病毒 RNA。在体外转录法中,转录本的产量和完整性直接受启动子选择的

影响。常用的启动子有噬菌体 T7、SP6 启动子等。将获得的全长 cDNA 克隆到含有强启动子的低拷贝忠实质粒的载体上,然后在 RNA 聚合酶系统的作用下,体外转录得到感染性的病毒 RNA (转录本)。张善瑞等<sup>[8]</sup>将 PRRSV HuN4 株的全长 cDNA 克隆于 pBlueScript II-SK(+) 载体中构建了感染性重组质粒 pHuN4。并在病毒 cDNA 5' 末端引入 SP6 启动子序列,便于后期的体外转录获得病毒的转录本,在 3' 末端 Poly(A) 尾引入 Not I 酶切位点,用于重组质粒 pHuN4 线性化,最终获得有感染性的转录本 RNA。

**1.3.2 体内转录法** 将含有全长 cDNA 的载体质粒导入宿主体内后充分利用宿主的 RNA 聚合酶系统,以全长 cDNA 为模板转录出病毒的 RNA (转录本)。Choi 等<sup>[9]</sup>研究证明病毒基因组末端的准确转录对病毒的拯救率有很大的影响。所以,如果采用体内转录法,在构建全长 cDNA 时的模板链上加入准确的终止位点,使体内转录能够正确终止,从而获得精确的且有感染性 RNA 末端。在全长 cDNA 的 3' 端加上终止位点,比较常用的方法是加上丁型肝炎病毒的核酶序列,以其自我剪切功能将非病毒的 RNA 序列切割掉,从而得到准确的 RNA 末端。虽然目前为止将病毒全长 cDNA 用于体内转录出有感染性的 RNA 案例比较少,但是在 PRRSV 的反向遗传研究中确有用体内转录法而获得成功的。Y. W. Huang 等<sup>[10]</sup>在 PRRSV I 型原有的反向遗传系统 pSD01-08-GFP 的基础上优化该系统,将 PRRSV SD01-08 的全长 cDNA 克隆到 CMV 真核启动子的下游,并在基因组两端导入核酶序列。这种优化后的体内转录 PRRSV 反向遗传操作系统的病毒拯救效率是传统的体外转录法的病毒拯救效率的 10~50 倍。另外, Lee 等<sup>[11]</sup>也通过体内转录方式成功的从宿主细胞中转录出 PRRSV 的基因组 RNA。

**1.3.3 转录产物转染细胞和拯救病毒的鉴定** 在使用体外转染法时,以体外转录的有感染性的病毒 RNA 转染宿主细胞;而使用体内转录法时,则通常将含有病毒全长 cDNA 的重组质粒直接转染宿主细胞或注入动物体内以拯救出病毒。常用的转染方法有:(1)阳离子脂质体转染法。其基本原理为带正电的脂质体与核酸带负电的磷酸基团形成复合物,然后脂质体上剩余的电荷与细胞膜上的唾液酸残基的负电荷结合;另一种解释是通过

细胞内吞作用而被带入细胞。但如果 DNA 浓度过高,和脂质体表面电荷,而降低了与细胞的结合能力。(2)阳离子复合物转染法。其基本原理是带正电的聚合物与核酸带负电的磷酸基团形成带正电的复合物后与细胞表面带负电的蛋白多糖相互作用,并通过内吞作用进入细胞。该方法适用于各种类型的裸露 DNA 或 RNA、能转染各种类型的细胞、没有免疫原性等特点,而且对宿主细胞的毒性作用低,是新一代的细胞转染方法。

为了在转染后能及时定性或定量的检测转染物的感染性,通常采用通过观察细胞病变(CPE)或收集细胞上清进行空斑滴定、RT-PCR 法、TCID<sub>50</sub>、LD<sub>50</sub> 等检测。也可用电子显微镜直接观察病毒粒子,证明转染物是否有感染性。为了区分拯救出的病毒和亲代病毒,研究者通常在构建病毒全长 cDNA 时在 cDNA 的特定部位插入一个特异性的限制性酶切位点。拯救出病毒后通过 RT-PCR 等方法验证拯救出的病毒的基因组中是否含有该限制性酶切位点,从而将拯救出的病毒与亲代病毒区分开。FENG 等<sup>[12]</sup>通过沉默突变技术在 PRRSV 的 BJ-SY07 株基因组的编码区 ORF1a 中引入了一个限制性酶切位点 ScaI,成功区分了亲代病毒与拯救出的子代病毒。

## 2 PRRSV 反向遗传技术在病毒基因功能研究中的应用

自反向遗传操作技术建立以来,该技术就开始用于病毒基因功能的研究。经 30 年的发展,反向遗传操作技术在该领域取得了很大的成就。如对单股正链 RNA 病毒的研究表明:病毒 5' UTR 发挥正确的调控作用<sup>[13]</sup>,促使病毒基因组的复制、基因组转录、蛋白质翻译等这些生物学功能的顺利进行。随着拯救技术的成熟,越来越多的研究者开始通过基因缺失、突变,利用反向遗传技术对 PRRSV 的基因功能进行研究。Byungjoon Kwon 等<sup>[14]</sup>通过对 PRRSV 进行反向遗传操作,证明非结构蛋白(NSP3-8)和开放阅读框(ORF5)含病毒的主要毒力位点,另外在 NSP1-3 和 NSP10-12 也可能含有其他的毒力位点。Yue Wang 等<sup>[15]</sup>通过对 NSP2 进行一系列的缺失操作,发现病毒复制的非必需区位于 NSP2 的 13~35 位氨基酸的位点,高变区(324~813)可以承受 100 个或 200 个氨基酸的缺失,但是在 324~726 位只能部分缺失,且最多能



容忍 400 个氨基酸的缺失。袁世山等<sup>[16]</sup>建立了 PRRSV 感染性 cDNA 克隆,并对其结构蛋白编码重叠区域及基因组非编码区(UTR),进行基因组 RNA 序列的替换、缺失以及外援基因的插入等反向遗传操作。通过对突变体 RNA 细胞转染产物的病毒学、基因组 RNA 以及亚基因组 mRNA 合成等分子生物学特性鉴定,结果表明:(1)3'UTR 上游的 4 个碱基对 PRRSV 的复制是非必需的,但下游 RNA 二级结构的保守茎环(Stem-Loop)对病毒复制是至关重要的,并且可以被异型 3'UTR 相关区域替代;(2)5'UTR 末端的 4 个碱基对 PRRSV 复制很重要,不同基因型 5'UTR 难以替代其病毒复制调控功能。Dandan Yu 等<sup>[17]</sup>通过在 PRRSV 编码各结构蛋白的开放阅读框之间逐个插入异源片段,证明人为分离原本相连的基因片段并不影响病毒基因组的稳定性和病毒的抗原特性。这一系列的研究表明,反向遗传技术已经被广泛应用在研究病毒基因组功能领域上。

### 3 PRRSV 反向遗传技术在新型疫苗研究中的应用

传统 PRRSV 疫苗有弱毒苗和灭活苗两种,前者可能出现毒力返强,安全系数不高,后者免疫原性较差,往往达不到免疫保护的效果。所以一种免疫原性好、安全性高的疫苗是防控蓝耳病所迫切需要的武器。PRRSV 的反向遗传技术正好以满足这一要求。与传统的连续细胞传代弱化毒株的方法相比,PRRS 减毒活疫苗在研制方面,运用反向遗传操作技术,可以很容易地根据流行毒株的不同而改变相对应的保护性抗原,并且具有效率高、减毒途径明确、毒力回复率低等优点。

传统疫苗接种动物后往往难以与野毒相区分,这给猪群的免疫监测,流行病学调查等带来了很大的困扰。1999 年 Lorne A<sup>[18]</sup>提出以标记疫苗(Marker Vaccine)来解决这一问题。动物在接种这种疫苗后,只要结合相应的血清学检验方法就能准确区分疫苗毒和野毒。PRRSV 的反向遗传操作是制备标记疫苗的常用方法。其基本策略是通过基因缺失的方法,将疫苗株病毒中的非必需的但是具有免疫原性的抗原基因缺失,制备出标记疫苗。标记疫苗免疫动物,在血清中不能检测到针对缺失抗原的抗体,而野毒感染动物的血清中则可以检测到相应的抗体。通过这个原理,且建立与

之相配套的检测方法,就可以严格地区分标记疫苗免疫的动物和野毒自然感染动物,这是所谓的“阴性”标记疫苗。Marcelo 等在 PRRSV 感染性克隆 FL12 的基础上,将 NSP 的 2 个 B 细胞免疫优势 B 细胞表位基因缺失,构建标记疫苗。免疫动物后通过 peptide-ELISA,能 100%将疫苗免疫和野毒感染区分开。另一种策略是将外源性抗原基因片段插入到 PRRSV 的基因组序列中,在不影响其正常繁殖机能的前提下制备标记疫苗。接种这一标记疫苗的动物,血清中能检测到针对外源基因的相应抗体,而野毒感染的动物血清中则检测不到。这是所谓的“阳性”标记疫苗。也有的研究者将外源基因引入到所缺失的基因位点,从而制备出双标记疫苗。Fang 等<sup>[19]</sup>利用反向遗传技术将位于 NSP2 编码区的编码抗原决定簇 ES4 的基因敲除,换以编码绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)的基因,经在 MARC-145 细胞中培养拯救出重组标记毒株 GFP/ $\Delta$ ES4。接种动物 14 d 后虽未检测出针对缺失表位的抗体,但是检测出高水平的针对 GFP 的抗体。表明标记疫苗可以有效地区分疫苗毒与野毒,为预防接种提供准确参考。

### 4 PRRSV 反向遗传技术在病原诊断上的应用

Suarez 等<sup>[20]</sup>首先建立了具有敏感性和高度特异性的 PRRSV 反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测方法,可直接用于病猪血清、精液、肺泡巨噬细胞以及细胞培养物中的病毒 RNA 的检测,为 PRRSV 的临床检测开创了新思路。因为该检测方法主要依赖于遗传物质而不是传染性病毒,故可以用于死病毒或不完整的病毒粒子和极低密度的靶目标的检测。为了证明 RT-PCR 检测法的特异性和敏感性,Benson 等<sup>[21]</sup>分别用病毒分离、免疫组化技术、血清学检测、RT-PCR 检测等方法检测相同人工感染 PRRSV 胎儿相关组织中的病毒。将各种检测方法进行对比,结果显示各种方法的检测率分别为 48.6%、23.6%、14.9%、93.6%,表明 RT-PCR 检测法在特异性和敏感性上都优于其他方法。但 RT-PCR 过于敏感而易受污染,存在假阳性的风险,在使用这一方法时应特别注意。

随着技术的进步,常规的 RT-PCR 法已难以满足科学研究的要求,各种改进的 RT-PCR 法应运而

生。主要有套式 PCR、复合 RT-PCR、荧光定量 RT-PCR、实时定量 RT-PCR 等,这些技术通常是根 据 PRRSV 基因组中相对保守的序列来设计引物进 而检测病毒。2000 年 Notomi 开发出环介导等温 扩增技术(LAMP),能更加灵敏方便的进行目标片 段的扩增,且对操作人员要求低。用反转录环介导 等温扩增技术(RT-LAMP)对 RNA 病毒的检测,与常 规 RT-PCR 相比,有快速、准确率高等特点。据报 道,其检测效果与实时定量 RT-PCR 相当,甚至优 于后者。反向遗传相关技术有非常大的应用前景, 相信在不久的将来,基于反向遗传相关技术,人们 将开发出鉴别诊断性更高,稳定性和可重复性更 强,操作更加简单方便的诊断技术。

## 5 小结

随着反向遗传操作技术的不断成熟,SD01-08、 HUN4、MN184 等 PRRSV 国内外众多不同毒株的反向 遗传系统都已成功建立,单纯的建立反向遗传操作 系统在反向遗传学研究中已不是非常困难的事。近 年来,更有不少学者创新性的优化了多种病毒的拯 救系统,使在研究中所花费的时间、精力和资金都 有所减少。不可置否,反向遗传操作在病毒致病力、 病毒基因及其编码蛋白的功能、RNA 复制机制和阐 明病毒致病机理及基因治疗、疫苗研制与设计抗病 毒药物等方面的研究,都做出了重大贡献。但任何 事都有其优点和缺点。反向遗传技术通过突变和缺 失等操作,人工地改变基因组,从而拯救出新的病 毒,能针对病毒的流行情况有目的地对病毒基因组 进行改造<sup>[22]</sup>,这难免会使人们担心在某些情况下会 人为地创造出更强的毒株。所以在研究和利用反向 遗传学技术时,必须谨慎利用这一分子生物学工 具,有针对性地对病毒目的基因进行改造和修饰, 使其更好地为人类服务。

## 参考文献:

[1] Nielsen H S, Liu G, Nielsen J, et al. Generation of an Infectious Clone of VR-2332, a Highly Virulent North American-Type Isolate of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus [J]. *Journal of virology*, 2003, (Mar):3702-3711.

[2] Ying Fang, Raymond R, Rowland R, et al. A Full-Length cDNA Infectious Clone of North American Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Expression of Green Fluorescent Protein in the Nsp2

Region[J]. *Journal of virology*, 2006, (Dec):11447-11455.

[3] Gritsum T S, Gould E A. Development and analysis of a tick borne encephalitis infectious clone using a novel and rapid strategy [J]. *Journal of Virological Methods*, 1998, 76:109-120.

[4] Gritsum T S, Gould E A. Infectious transcripts of tickborne encephalitis virus, generated in days by RT-PCR[J]. *Virology*, 1995, 21(2):611-618.

[5] 关洪鑫,李志勇,白银梅,等. 反向遗传技术及其在猪传染性胃肠炎病毒研究中的应用[J]. *中国兽医科学*, 2012, 42(4):435-440.

[6] Schenborn E T, Jr Mierendorf R C. A Novel Transcription Property of SP6 and T7 RNA Polymerases: Dependence on Template Structure [J]. *Nucleic Acids Research*, 1985(3):6223-6236.

[7] Hamilton A J, Baulcombe D C. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants[J]. *Science*, 1999, 286(5441):950-952.

[8] 张善瑞,周艳君,朱建平,等. 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 HuN4 株感染性分子克隆的建立及拯救病毒的鉴定[J]. *中国预防兽医学报*, 2011, 33(7):497-502.

[9] Choi Y J, Yun S I, Kang S Y, et al. Identification of 5' and 3' cis-acting elements of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus: acquisition of novel 5' AU-rich sequences restored replication of a 5'-proximal 7-nucleotide deletion mutant[J]. *J Virol*, 2006(2):723-36.

[10] Huang Y W, Fang Y, Meng X J. Identification and characterization of a porcine monocytic cell line supporting porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) replication and progeny virion production by using an improved DNA-launched PRRSV reverse genetics system[J]. *Virus Res*, 2009(1):1-8.

[11] Lee C, Calvert J G, Welch S K. A DNA-launched reverse genetics system for porcine reproductive and respiratory syndrome virus reveals that homodimerization of the nucleocapsid protein is essential for virus infectivity[J]. *Virology*, 2005, 331:47-62.

[12] Feng Chun Yan, Liu Yue Huan, Yan Jing Hua, et al. An infectious clone of the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus: Topology of glycoprotein 3 (GP3) addressing the intrachain disulfide bonds[J]. *Virology*, 2011(26):2785-2793.

[13] Boyer J C, Haenni A L. Infectious Transcripts and cDNA Clones of RNA Viruses [J]. *Virology*, 1994, 198:415-426.

[14] Byungjoon Kwon, Israrul H, Ansari, et al. Osorio Identification of virulence determinants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus through

(下转第 14 页)

# 流行性腹泻疫苗预防研究进展

马 锐, 黄小波\*, 杨国淋, 滑 翔, 赵玉佳

(四川农业大学动物医学院 人兽共患病研究室与猪病防治研究中心 基因芯片诊断实验室,  
四川 成都 611130)

**摘 要:**猪流行性腹泻是由猪流行性腹泻病毒引起的仔猪和育肥猪的一种急性肠道传染病,其感染率,死亡率高的特点是导致全世界养猪业经济损失的重要原因之一。近年来,对流行性腹泻病毒的研究逐步深入,疫苗成为了预防及控制流行性腹泻的主要措施。本文就流行性腹泻的流行情况、致病机理以及流行性腹泻的疫苗预防研究进行描述,为该病的预防和控制提供参考。

**关键词:**猪流行性腹泻;疫苗;研究进展

**中图分类号:**S852.4

**文献标识码:**A

**文章编号:**1005-8567(2015)05-0009-03

猪流行性腹泻(PED)是一种能引起哺乳仔猪以腹泻与脱水为典型临床特征,且具有高接触传染性的病毒病。哺乳仔猪在感染后会急剧的水样腹泻及呕吐症状,继而严重脱水和死亡,与传染性胃肠炎(TGE)临床症状相似。哺乳仔猪病程较短(5天左右),剖检可见小肠绒毛严重萎缩甚至消失(与TGE相似),死亡率可高达90%;也报道指出,随着该病毒的变异,其死亡率也呈现在逐步升高的趋势。断奶仔猪和保育猪感染后病情稍缓,腹泻。只要护理得当,死亡率可控制在30%以下。育肥猪大多呈隐性感染状态,极少发生死亡,耐过后会自然康复。目前,我国在预防该病的爆发上投入了相当多的财力及物力,伴随着对PEDV的生物特性不断深入研究与新的诊断方法不断产生,相信在不久的将来,能够突破该病可防控性薄弱的这一瓶颈。

## 1 PEDV 致病机理

猪流行性腹泻(Porcine epidemic diarrhea, PED)病原为猪流行性腹泻病毒(PEDV)。该病以产房1-7日龄仔猪淡黄色水样腹泻、严重脱水为主。剖检可见仔猪肠道内胀气、有黄色乳凝块<sup>[1]</sup>。PEDV主要通过粪-口途径传播<sup>[2]</sup>,产房仔猪通过消化道摄入病毒后,主要入侵空肠和回肠部位小肠黏膜上皮细胞,并开始病毒复制。PEDV的感染导致上皮细胞膜表面的双糖酶(乳糖酶、蔗糖酶、麦芽糖酶)、氨肽酶、碱性磷酸酶的活性下降;同时,肠绒毛上皮细胞正常结构破坏并发生细胞破碎,造成肠绒毛萎缩,

肠道表面积减少,从而导致小肠消化不良、吸收不良等机能障碍,诱发仔猪发生腹泻并脱水<sup>[3]</sup>。

## 2 PED 流行情况

PED最早在英国发现,并流行于欧洲。从上世纪八十年代以后,中国、日本、韩国也开始有所报道。2010年至今,该病已广泛流行于中国、韩国、泰国、美国等国<sup>[4]</sup>。由于该病对产房仔猪极高的发病率和致死率,较高的治疗成本及防控成本,以及病毒基因发生变异造成强毒株的出现,对世界养猪业造成了巨大的损失<sup>[5]</sup>。

## 3 PEDV 疫苗研究进展

在欧洲猪爆发PED时期,对怀孕母猪返饲死亡仔猪肠道及其内容物,诱导母猪产生免疫反应保护仔猪,曾有效控制PEDV的进一步流行。但由于返饲时,病毒滴度难以控制,无法确保免疫效果;其他病毒如PRRSV、PCV2等也可能通过返饲感染母猪;对PEDV的非发病猪场或猪群无法进行免疫等缺陷,人们也开始探寻其他方法预防PEDV的感染。

### 3.1 PEDV 灭活苗

1993年,王明等<sup>[6]</sup>将PEDV的沪毒株接种(S株)接种3-9日龄仔猪,待典型发病后,采集发病仔猪小肠组织及内容物,制备出了猪流行性腹泻组织灭活苗,填补了国内无猪流行性腹泻疫苗的空白。1994年,马思奇等<sup>[7]</sup>采用在病毒培养液中加入适量胰酶的培养方法,在Vero细胞上将PEDV CV7777传代至第28代,制备出氢氧化铝灭活苗。通过对仔

猪的后海穴接种,可产生保护性免疫反应。

### 3.2 PEDV 弱毒苗

1998年,佟有恩等<sup>[8]</sup>将已经适应 Vero 细胞的 PEDV CV777 从第 90 代起进行 5 次克隆纯化,减弱了该病毒株的毒力并保持稳定,同时保存了良好的免疫原性,且病毒经过 6 代次返祖传代,病毒毒力未增强,从而制备出了针对流行性腹泻的弱毒疫苗,这是中国首株弱毒疫苗。

Kweon C H 将 KPEDV-9 连续传至 93 代,病毒对新生仔猪无致病力。免疫怀孕母猪,新生仔猪可抵抗野毒株攻毒。Song S D 等将 PEDV DR 弱毒株 13 株分别口服及肌肉注射免疫妊娠母猪,口服免疫组仔猪 IgA 含量高于肌肉注射免疫组;新生仔猪强毒株攻毒显示,口服免疫组相较于肌肉注射免疫组获得了更好的免疫保护;病毒株在猪体内连续 3 次传代毒力不返强。这些研究都为更好地控制 PEDV 奠定了基础<sup>[9]</sup>。

### 3.3 PEDV 基因工程疫苗

鉴于 PEDV 为肠道致病微生物,且主要存在于肠道黏膜表面,因此肠道黏膜表面的分泌型免疫球蛋白 A 对 PED 的预防具有重要作用。灭活疫苗不能诱导该类抗体的产生,口服弱毒苗虽然可以诱导产生一定水平的抗体,但存在毒力返强及散毒的风险。为了研制出更为安全、高效、成本低廉、保存和使用方法简易的猪流行性腹泻疫苗,人们开始利用基因工程手段开发黏膜免疫疫苗,以期达到进一步预防和控制该病的目的<sup>[10]</sup>。

转基因植物疫苗将抗原基因在植物体内表达并积累,动物通过消化道摄入后,刺激肠道黏膜产生免疫反应,分泌特异性抗体。目前,PEDV-S 基因抗原区域已转入烟草、水稻、莴笋中,饲喂动物后发现可诱导产生特异性抗体,噬斑减少试验证明产生的抗体具有中和病毒的能力<sup>[11]</sup>。

韦显凯等利用 RT-PCR 技术把 S 基因克隆入腺病毒表达载体系统中,构建了 3 个重组腺病毒。在小白鼠体内进行免疫特性研究结果显示:3 个重组腺病毒免疫的小白鼠血清均能够检测到一定水平的特异性抗体。该试验探究了 S 蛋白不同片段免疫原性的差异,从而为 PEDV 重组腺病毒疫苗的研究奠定了基础<sup>[12]</sup>。随后,焦茂兴构建了可表达 S 蛋白全蛋白的腺病毒,免疫小鼠后产生的抗体可与 PEDV 病毒粒子发生特异性结合。这些都说明了腺病毒可作为 PEDV 抗原基因递呈载体<sup>[13]</sup>。

干酪乳酸菌作为食品级 DNA 疫苗载体,也广泛应用于 PEDV 口服疫苗的研制。Ge J W 等<sup>[14]</sup>构建了可分泌表达及菌体表面表达 PEDV S 蛋白 COE 区域、COE 区域与大肠杆菌不耐热毒素 LTB 融合蛋白、PEDV N 蛋白、PEDV 纤突蛋白 S1 区域的干酪乳酸菌重组疫苗。对小鼠的免疫试验结果表明:重组疫苗可同时诱导产生体液免疫和黏膜免疫;且 PEDV N 蛋白可加强 S 蛋白的免疫效果。这也为研发 PEDV 双基因口服免疫疫苗奠定了理论基础。

徐丽丽<sup>[15]</sup>构建了可表达 PEDV S 蛋白 COE 区域、SD 区域的减毒沙门氏菌重组疫苗:C501-COE、C501-SD。免疫小鼠可产生显著的体液抗体和黏膜抗体;对发病猪场仔猪口服免疫试验证明其可有效降低仔猪发病率及死亡率。Meng F D 等<sup>[16]</sup>构建了可同时表达 PEDV 和 TGEV S 蛋白的疫苗。通过肌注小鼠,发现小鼠产生了高水平的抗 TGEV 和抗 PEDV 抗体。该研究为开发 PEDV-TGEV 二联核酸疫苗奠定了基础。

### 3.4 多价联合疫苗

就当前养猪业而言,在我国用于预防和控制流行性腹泻的疫苗主要是流行性腹泻-传染性胃肠炎(PED-TGE)二联苗。由于 PEDV 和 TGEV 同属于冠状病毒科,而且致病机理非常相似,并且组织嗜性也相同,因此研制联苗亦是可行的。二联疫苗的特点是毒价高,在后海穴接种后可有效增强免疫保护力。一次成功接种即可达到预期免疫保护力,用于临床生产中省时、省力,且保护率高。PEDV、TGEV、轮状病毒(RV)三联灭活苗同样普遍用于临床预防和控制病毒性腹泻。上海农科院畜牧兽医研究所钱永清等<sup>[17]</sup>采用 PEDV、TGEV 和猪 RV 细胞培养物制备了三联灭活疫苗并用于免疫接种实验。实验结果表明,免疫接种后的妊娠母猪和育肥猪 15 天左右便可以达到较高的免疫水平,免疫有效期超过 6 个月,妊娠母猪所产仔猪可获得高水平的被动免疫保护。三联苗用于试验猪场进行应用,结果表明:仔猪被动免疫保护率达 93%,母猪保护率达 98%。

## 4 展望

PEDV 是引起猪胃肠道疾病的重要病原之一,也是导致养猪业经济损失的重要原因之一。用于预防以及控制 PEDV 的疫苗在近年来的研究中已取得了一定的进展。但是相比于与其他常见猪病病毒疫苗,其研究还处于相对落后的地步。在未来 PEDV 疫苗研究方面还需要加大力度,尤其在 PEDV 的新型

高效疫苗、野毒株和疫苗株的区分以及病毒致弱机制等方面还有待深入的研究。相信随着对流行性腹泻病毒的研究越来越广泛和深入,未来将能够更加有效地预防和控制流行性腹泻疾病。

参考文献:

[1] 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]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Inc, 2013, 25(5): 649-54.

[2] Carvajal A, Lanza I, DIEGO R, et al. Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians Inc, 1995, 7(1): 60-64.

[3] Jung K, Ahn K, Chae C. Decreased activity of brush border membrane-bound digestive enzymes in small intestines from pigs experimentally infected with porcine epidemic diarrhea virus [J]. Research in Veterinary Science, 2006, 81(3): 310-5.

[4] Sun R Q, Cai R J, Chen Y Q, et al. Outbreak of Porcine Epidemic Diarrhea in Suckling Piglets, China [J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(1): 161-163.

[5] Wang J, Zhao P, Guo L, et al. Porcine Epidemic Diarrhea Virus Variants with High Pathogenicity, China [J]. Emerging Infectious Diseases, 2013, 19(12): 2048-2049.

[6] 王明, 马思奇, 周金法, 等. 猪流行性腹泻灭活疫苗的研究 [J]. 中国预防兽医学报, 1993(5): 17-19.

[7] 马思奇, 王明, 周金法, 等. 猪流行性腹泻病毒适应 Vero 细胞培养及以传代细胞毒制备氢氧化铝灭活疫苗免疫效力试验 [J]. 中

国预防兽医学报, 1994(2): 15-19.

[8] 佟有恩, 冯力, 李伟杰, 等. 猪流行性腹泻弱毒株的培育 [J]. 中国预防兽医学报, 1998(6): 329-32.

[9] DS S, JS O, BK K, et al. Oral Efficacy Of Vero Cell Attenuated Porcine Epidemic Diarrhea Virus Dr13 Strain [J]. Research in Veterinary Science, 2007, 82(1): 134-40.

[10] Song D, Park B. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines [J]. Virus Genes, 2012, 44(2): 167-75.

[11] Huy N X, Yang M S, Kim T G. Expression of a cholera toxin B subunit-neutralizing epitope of the porcine epidemic diarrhea virus fusion gene in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) [J]. Molecular Biotechnology, 2010, 48(3): 201-209.

[12] 韦显凯, 侯继波, 姜平. 表达猪流行性腹泻病毒 S 基因片段重组腺病毒的构建与免疫特性 [J]. 中国兽医学报, 2008, 28(10): 1128-1132.

[13] 焦茂兴, 吴锋, 刘德辉, 等. 猪流行性腹泻病毒重组腺病毒疫苗的构建及小鼠免疫试验 [J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(2): 11-15.

[14] Ge J W, Liu D Q, Li Y J. Construction of recombinant lactobacilli expressing the core neutralizing epitope (COE) of porcine epidemic diarrhea virus and a fusion protein consisting of COE and Escherichia coli heat-labile enterotoxin B, and comparison of the immune responses by orogastric immunization [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2012, 58(11): 1258-1267.

[15] 徐丽丽. 猪流行性腹泻病毒重组沙门氏菌的构建及免疫原性分析 [D]. 华中农业大学, 2011.

[16] Meng F, Ren Y, Suo S, et al. Evaluation on the efficacy and immunogenicity of recombinant DNA plasmids expressing spike genes from porcine transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus [J]. Plos One, 2013, 8(3): e57468.

[17] 钱永清, 邹勇. 猪流行性腹泻和猪传染性胃肠炎病及其防控 [J]. 国外畜牧学: 猪与禽, 2007, 27(1): 57-60.

(上接第 3 页)

一直维持在 15~19 元 /kg, 基本未受到良种鸡蛋下跌的影响。近年来, 生态鸡养殖异军突起, 成为畜牧业中的新兴产业。因为生态放养模式比较灵活, 养殖户随市场而动, 肉蛋兼用, 蛋价行情好时就把母鸡留着, 蛋价行情不好时就当土鸡卖。销价也不菲, 批发价大多在 36 元 /kg 以上。

市场价格波动、生产成本上升、动物疫病威胁、质量安全考验、粪污处理压力等 5 个方面被列为我国蛋鸡产业面临的主要挑战。蛋鸡养殖企业应根据需要稳定养殖量, 提升养殖水平, 设施设备

要继续提档升级, 以合作社、公司 + 农户、联社、蛋鸡超市等形式将种鸡饲养、饲料加工、养殖、鸡蛋深加工和贸易有机结合, 提高蛋鸡行业抵抗养殖风险的能力。要想让蛋鸡行业健康发展, 不陷入周而复始的怪圈, 还是需要政府出面引导, 进行宏观调控。地方政府应引导蛋鸡产业适度发展, 提高养殖业的环保准入门槛, 重点支持养殖环境较好的规模企业, 制定适当的养殖计划, 保持市场相对平稳。完善疫病防治和安全生产体系, 搭建蛋鸡产业信息化平台。总体而言, 蛋鸡养殖规模化、集约化、智能化将是发展趋势。

# 现代化装备下母猪的饲养管理关键点初探

霍星华<sup>1,2\*</sup>, 吴洁<sup>2</sup>, 王刚<sup>1</sup>, 杜宗亮<sup>1</sup>, 丁发源<sup>1</sup>, 刘树中<sup>2</sup>, 王军<sup>2</sup>, 胡友军<sup>1</sup>

(1. 广东省农业科学院动物科学研究所, 广东 广州 510640; 2. 广东新南都饲料科技有限公司, 广东 广州 510640)

**摘要:** 自动化猪养殖系统的引入, 造就了养猪产业的升级改造, 缔造了一次产业革命。这场产业革命, 对处在整个生产链条核心的母猪饲养管理关键点的改变是不容忽视的, 特别是母猪的饲养中包括疾病的预防控制、营养摄取等涉及饲养管理关键方面都发生或多或少的变化, 并随着时代的发展不断发生着变迁, 值得每一个现代畜牧从业者的关注、探讨和思考。

**关键词:** 自动化; 母猪; 饲养

**中图分类号:** S815.4

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2015)05-0012-03

养殖业是劳动密集型产业, 投资建造大规模工厂化式养猪生产基地, 使用机器代替人力来实现更高效的生产, 可以降低生产成本, 实现利润最大化。《环境保护法》的出台, 猪场的节能减排设施也成为猪场硬件建设的关键点, 因而全封闭机械自动化养殖系统的投放使用成为必然, 由此引发养猪业的一次产业革命, 缔造了产业的升级改造。那么, 伴随这场产业革命的深化, 猪饲养环节中包括疾病的预防控制、营养摄取、机器维护等涉及饲养管理方面也相应产生新的变化。而这些变化对处在整个生产链条核心的母猪饲养管理关键点是否也产生相应的改变, 本文进行简单探讨。

## 1 母猪自动化饲养系统工作原理简介

目前电子母猪自动饲喂系统分为动态群养系统和静态群养系统两种。国外进入中国市场的生产厂家主要有: 大荷兰人、TEAM、Velos 等<sup>[1]</sup>。近年来, 国内也有厂家开始研发生产, 目前技术比较领先的厂家有: 广东广兴、上海河顺自动化、通威股份(饲管家)3家国内品牌母猪自动化饲养系统。使用这些系统, 不仅可以节省劳动力、提高生产效率及维护饲养员的身体健康, 最重要的是该系统能够满足母猪不同生理状态的特性和复杂性饲喂方式的要求。

目前, 国内推广使用的静态群养模式系统占多数。因这个静态自动化系统主要针对空怀母猪

和妊娠母猪设计, 适合 200~800 头存栏母猪的养殖场, 可以在原有栏舍的地基上进行改造; 不像动态群养模式系统那样要全拆再进行自动化系统与基建配合重建; 且购买、安装成本相对较低, 比较适合国内养殖实际情况而成为主流; 工作原理也相对简单。首先, 该群养系统要求猪栏配备自动投料系统, 同时采用水泡粪工艺; 且要为每头母猪配置一个无线射频耳标, 无线射频耳标可通过系统的传感器识别每头猪, 接下来精确饲喂系统可快速调用如耳标牌号、背膘、妊娠期等相应档案信息。为了保证母猪的理想体型, 每天需要饲料量多少, 饮水量多少, 系统会通过相应的软件正确决定投料量和饮水量<sup>[2]</sup>。其次, 母猪下产床后配种、妊娠检查确定妊娠后(也有猪场统一在配种 30 天左右)进入静态群养栏, 一直到妊娠 107 天再赶上产床。静态模式是在原来传统工艺上解放妊娠检查后的母猪, 精确喂料和使其充分运动。该系统一栋分为多个猪栏, 每个猪栏设置 1 台饲喂站, 饲养约 50 头母猪。栏内设有供母猪休息用的短隔墙<sup>[3]</sup>, 实现采食、休息和排泄明确分区的有序管理。

## 2 现代化装备对母猪饲养的关键点

### 2.1 发情与怀孕鉴定

在养猪产业的发展过程中, 限位栏起到了不可磨灭的作用, 但在使用过程中诸如母猪蹄病、运动量不足造成难产等弊端也越来越突显出来。使

用静态群养系统是其自动化程度较动态模式低,不安装查情适配器,仍然采用人工查情、配种,准确度能符合猪场生产要求。但使用系统不能自动分离特定的猪群,阶段猪群免疫保健,临产猪转分娩舍,病猪隔离护理操作,分离特定猪群需要人工在猪群中鉴别,相对传统限位饲养耗费了同等的人力,同时也不利于不同阶段猪群的阶段性管理,例如返情猪爬跨妊娠前期的猪,不利于受精卵着床、胚胎分化,增大肢蹄病发生概率,影响配种分娩率等繁殖指标。因此一般采用母猪在限位栏中度过30天的初配期,适配母猪配种后21~30天进行B超检查,待人工B超检查确定怀孕后转入静态群养系统。

使用自动母猪饲喂系统时怀孕母猪实行圈养,怀孕母猪不会长时间在限位栏中,给母猪提供了更大的自由活动空间,使每头母猪的活动面积平均达到2.5 m<sup>2</sup>。随着母猪自由活动的增加,健康水平得到了很大的提高,母猪发情周期更有规律,也有利于延长母猪的使用年限。因此病原微生物很难攻击具有强健体质的母猪,这为生产健康的仔猪奠定了良好的基础,降低了母猪返情率和小猪的死亡率。母猪得以回归自然的生活方式——群居的环境下生活,按自己的喜好选择同伴组成和谐的小团体,可以自由进行交流、沟通和游戏,母猪身心健康得以保证,实现了福利化养殖母猪。

## 2.2 内环境参数控制

预防畜禽传染病的前提条件是加强管理。只有提高舍内的环境质量,这样才能保证猪群在良好的环境下生长,提高抗病能力,真正实现健康养殖。因此,使用自动化监测控制系统,在温度、湿度、光照、有害气体、粉尘颗粒等各环境因子在不同时期的灵敏监控,实现母猪舍内主要参数平均值达到:温度20℃、湿度40%~80%、二氧化碳0.2%、氨气26 mg/m<sup>3</sup>、硫化氢10 mg/m<sup>3</sup>、光照14~18 h、粉尘≤1.5 mg/m<sup>3</sup>和消毒等,是当前一个智能化系统在母猪饲养过程的关键因素之一,也是预防疫病发生的关键措施。这极大地解决了养殖场内环境较差且无法调控的现状。

## 2.3 猪机互动的调教

近几年来,由于猪场用工持续紧张,整个自动化系统中的自动输送饲料设备在猪场得到一定程

度的推广和应用,减少了劳动力的同时也提高了生产效率。电子母猪群养饲喂系统也须配套自动输料系统。通过系统软件设定和执行成千上万头母猪的群养精确饲喂方案,自动记录饲喂数据,能够对猪场母猪的生产成绩进行统计分析并改进母猪生产性能。从而避免母猪采食量不足,影响膘情、发情等生产指数,保证每头猪有良好的体况。但是刚开始时,后备母猪是不会自己进饲喂站吃料,需要经过人工训练后才会进入饲喂站从自动饲槽吃料的。因此,猪机互动调教是母猪进入群养系统前非常关键的一课。

训练时,将后备母猪赶到入口一部分,或把饲料撒一些在地上用其气味作引导,一头一头地训练进入饲喂器,从饲槽吃料,再从通道中出来回到大栏中自由活动。据实践经验,一般2~3天的循环调教大部分猪都能学会,极少部分猪最多在7天内也能学会使用饲喂站;另外在训练时可以赶几头在群养系统中生活过的老母猪在栏里面带头,让其他母猪效仿、学习使用<sup>[4]</sup>。群养饲喂系统当母猪群体达到较大数量,且密度合适时不会有很严重的打架现象发生。实际中发现猪栏较大,受攻击母猪有很多地方可逃,不会因为吃料不足打架导致严重受伤。

## 2.4 疾病预防控制

很多人担心母猪出现问题时,由于母猪抵抗力较好,在大群内很难发现。在使用群养系统时,系统会提示采食、体温不正常母猪,技术人员可以根据系统提示找出不正常的猪,可以做到及时隔离治疗。虽然系统能够准确发现单个的异常猪只,但在全封闭的栏舍里疾病一旦发生,将有可能迅速传播开,造成极大的损失,因此疾病的预防始终是关键。首先,按照《兽医卫生防疫制度》对进出人员与设备严格管理和舍内外的环境卫生及消毒工作;对每批母猪实行“全进全出”;严格执行疫苗免疫程序,对所有猪只进行疫苗免疫。再者,有条件的猪场应定期抽取猪群做抗体监测,作为免疫效果的评估依据。特别是对蓝耳病和圆环病毒病的抗体评估,有利于指导全场疫苗免疫时机、掌握仔猪母源抗体的消长规律、及时发现猪群的异常变化等等,是确保猪场生物安全体系牢固的重要手段之一。最后,要对母猪群每一次发生的异常情

况、疾病等重大事件的始末进行详细的文字记录,作为以后有针对性地提前预防控制提供参考。

### 2.5 重视营养

母猪生产性能是猪场经济效益好坏的关键。猪生产有 70%的成本来自于饲料,提供配方合理、营养丰富的饲料是养好母猪,增加健康仔猪产出,减少不必要的粮食消耗的保障之一。而营养是母猪生产性能是否能充分发挥的关键。首先,重视饲料工艺。现代化的养猪生产,饲料的输送靠机器管道,因此要求饲料的流散性要好,不容易粘结成块堵塞管道,饲料生产工艺是关键点。其次,重视饲料营养。营养供给不足,导致后备母猪的生殖器官发育受影响;营养供给失衡,怀孕母猪分娩时产仔过大,产量少,影响经济效益;哺乳母猪处于应激状态,泌乳量减少,使初生仔猪吃不饱吃不好,影响断奶重和免疫力。重视营养,有利于增强肢蹄支撑力,提升产仔数,降低母猪泌乳应激,减少便秘的发生,从而提升生产性能,减少舍内有害气体产生。

现代化装备的猪舍,猪群相对健康程度要高于以人工劳动为主的养殖场,因而,选用绿色无抗易消化饲料是最优之选。这类饲料使用放心的同时,选用的天然原材料,猪也能消化更彻底,吸收更全面的天然营养,达到改善胴体、改善肉质和风味的同时,减少粪排放,最大限度地减少粪污处理

容量和处理装置负荷,减轻环境承载压力。

### 3 结语

机械自动化养殖系统引发养殖产业的一次产业革命,缔造了产业的升级改造。这场产业革命,猪只饲养,特别是母猪的饲养中包括疾病的预防控制、营养摄取等涉及饲养管理关键方面都发生巨大的变化;而且系统化喂料机械在使用过程中,常见有饲喂站皮带、保险的更换、料槽折损等硬件设施的及时更新维护等方面内容,而这些变化对处在整个生产链条核心的母猪饲养管理关键点的改变是不容忽视的,并随着时代的发展不断发生变迁。这些新生事物值得每一个现代养猪人的关注、探讨和思考,从各方面考虑动物需求并满足它,最终达到提升生产效益的目的。

### 参考文献:

[1] 王林云. 生猪健康养殖是一项系统工程[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(10):4-6.

[2] Mason S P, Jarvis S, Lawrence A B. Individual differences responses of pig lets to weanling at different ages[J]. Applied Animal Behavior Science, 2003, 80(2):117-132.

[3] 肖正中, 廖玲玲, 杨厚德, 等. 自动化养猪场规划与设计[J]. 猪业科学, 2012(7):58-60.

(上接第 9 页)

construction of chimeric clones [J]. Virology, 2008, 380:371-378.

[15] Wang Y, Liang Y, Han J, et al. Attenuation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain MN184 using chimeric construction with vaccine sequence[J]. Virology, 2008, 371(2):418-429.

[16] 袁世山, 孙志, 余丹丹, 等. 第七届全国病毒学学术研讨会暨第二届武汉现代病毒学国际研讨会论文集到[C], 2009.

[17] Dandan Yu, Jian Lv, Zhi Sun, et al. Reverse genetic manipulation of the overlapping coding regions for structural proteins of the type II porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. Virology, 2009, (383):22-31.

[18] Lorne A. Babiuk. Broadening the approaches to developing more effective vaccines[J]. Vaccine, 1999(17):1587-1595.

[19] Fang Y, Jane C H, Brown E, et al. Development of genetic markers in the nonstructural protein 2 region of a

US type I porcine reproductive and respiratory syndrome virus: implications for future recombinant marker vaccine development[J]. Journal of General Virology, 2008, 89(12):3086-3096.

[20] Suarez P, Zardoya R, Prieto C, et al. Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse polymerase chain reaction (RT-PCR) [J]. Archives of Virology, 1994, 135(1-2):89-99.

[21] Benson J E, Michael J, Christopher Hennings J, et al. A comparison of virus isolation, immunohistochemistry, fetal serology, and reverse-transcription polymerase chain reaction assay for the identification of PRRSV transplacental infection in the fetus[J]. Vet Diagnose Invest, 2002, 14(1):8-14.

[22] Dongwan Yoo, Siao-Kun W, Welch, et al. Infectious cDNA clones of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and their potential as vaccine vectors[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2004, (102):143-154.



## 胍基乙酸在育肥猪饲养中的应用试验

胡金良<sup>1</sup>, 陈宝玉<sup>2</sup>, 张德福<sup>3</sup>, 陈意伟<sup>4</sup>, 周秀蓉<sup>4\*</sup>

(1. 肇庆市动物卫生监督所, 广东 肇庆 526040; 2. 惠州市裕昌兽药有限公司, 广东 惠州 516000; 3. 北京君德同创农牧科技股份有限公司, 北京 100085; 4. 广东省农业科学院动物卫生研究所, 广东 广州 510640)

**摘要:** 本试验主要探讨胍基乙酸对育肥猪生长性能的影响。选用128头体重为45 kg左右的二元杂交育肥猪为研究对象, 按照体重、胎次、性别、日龄完全一致的原则随机分为3个处理组, 每组7个重复, 每个重复8头猪。分别饲喂基础日粮(对照组)、基础日粮上添加0.1%胍基乙酸(试验I组)、基础日粮添加0.2%胍基乙酸(试验II组)。结果表明: 与对照组相比, 试验I组和试验II组平均日增重分别提高90.75 g/头和53.10 g/头, 日采食量分别提高83.58 g/头和109.44 g/头, 料肉比降低0.32和0.11; 试验I组和试验II组有效提高育肥猪综合体型得分、体长、体高腿臀围、腹围和胸围。由此可见, 在日粮中添加0.1%和0.2%胍基乙酸能有效提高育肥猪日采食量和日增重, 降低料肉比, 改善体型, 增加经济效益。

**关键词:** 胍基乙酸; 生长猪; 生长性能; 体形; 料肉比

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)05-0015-03

## Application of Guanidine Acetic Acid in the Feeding of Fattening Pigs

Hu jinliang<sup>1</sup>, Chen Baoyu<sup>2</sup>, Zhang Defu<sup>3</sup>, Chen Yiwei<sup>4</sup>, Zhou Xiurong<sup>4\*</sup>

(1. Zhaoqing Animal Health Supervision Institute, Zhaoqing 526040, China; 2. Yu Chang Veterinary Drug Co., Ltd. of Huizhou city, Huizhou 516000, China; 3. Beijing Agriculture and Animal Husbandry in the Genesis of Polytron Technologies Inc., Beijing 100085, China; 4. Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The experiment mainly studied the effects of guanidine acetic acid on growth performance of fattening pigs. According to the weight, pregnancy times, gender, age, 128 crossbred pigs about 45 kg were randomly divided into 3 groups (seven repeat/ each group, control group (fed basal diets), group I (basal diet on added 0.1% muscle God TM) and group II (basal diet on added 0.1% muscle God TM), eight pigs/each repeat), respectively. The results showed that, compared with the control group, the average daily weight were increased 90.75g/pig and 53.10g/pig, daily feed intake were increased 83.58g/pig and 109.44g/ pig, feed meat ratio decreased 0.32 and 0.11 in the group I and II test group; it effectively improved the size of comprehensive score, body length, body high leg hip circumference, abdominal circumference and chest circumference of the fattening pigs. Therefore, the data suggested that addition of 0.1% and 0.2% guanidine acetic acid in basal diets could effectively improve the feed intake and daily gain of fattening pigs, and reduce the ratio of feed to meat so as to further increase economic efficiency.

**Key words:** Guanidine acetic acid; Fattening pig; Growth; Application

胍基乙酸又称胍乙酸和 N-咪基甘氨酸(N-Amidinoglycine), 最早是由Weber于1934年从狗和人的尿液中分离得到。近年来, 因动物性蛋白原料的资源紧缺, 应用受限, 若改用缺少动物性蛋白日粮中所含有的生长因子-肌酸的纯植物日

粮, 会使得畜禽生产性能面临下降趋势; 而胍基乙酸作为肌酸的唯一前体物, 在肌酸的生物合成中起主要作用, 但在植物中尚未发现其存在<sup>[1]</sup>。国外很多文献报道, 纯植物日粮中添加胍基乙酸可以有效地转化为肌酸, 对畜禽生产性能和胴体品质

收稿日期: 2015-07-29

\*: 通讯作者

基金项目: 广东省科技计划项目(2012A020602075; 2012NL023)

等方面的提高具有重要作用<sup>[2-5]</sup>。本试验旨在研究胍基乙酸对生长猪生长性能和体型状况的影响。

## 1 试验材料和方法

### 1.1 试验地点和时间

本试验是在广东某猪场进行,试验时间为2015年1月3日至2015年2月6日。试验期为35天。

### 1.2 试验动物及分组

试验分组如下表1所示。

表1 试验设计及分组

组别	添加比例
对照组	基础日粮
试验 I 组	基础日粮 +0.1%胍基乙酸
试验 II 组	基础日粮 +0.2%胍基乙酸

试验选择128头体重为45 kg左右的长大二元杂交猪,按照体重、胎次、性别、日龄完全一致的原则随机分为3个处理组,每组7个重复,每个重复8头猪。分别饲喂基础日粮(对照组)、基础日粮添加0.1%胍基乙酸(试验 I 组)、基础日粮添加0.2%胍基乙酸(试验 II 组)。

### 1.3 实验动物饲养与管理

试验猪只采用圈养方式,自由饮水,每天饲喂2次。饲料配方和营养标准见表2。

### 1.4 测定指标与方法

**1.4.1 生长猪生长性能的测定** 试验期间每日记录料耗量。饲养试验结束时,所有试验猪只禁食(自由饮水)24 h后称重,计算试验猪的平均日采食量、日增重和料肉比。

表2 基础日粮配方和营养标准

原料名称	含量(%)	营养素名称	营养含量(%)
玉米	64.00	粗蛋白(%)	15.73
大豆粕 CP43	22.00	钙(%)	0.72
小麦麸	10.00	总磷(%)	0.50
大猪预混料	4.00	盐(%)	0.41
		赖氨酸(%)	0.79
配比和	100.00	助消化能(MJ)	13.15

**1.4.2 生长猪体型综合评价** 试验第1天、第29天和第41天早上8:00观察猪的体型。从每栏固定选择2~3头进行评定。具体评分方法见表3。其中用皮尺测量体长(cm)、胸围(cm)、腿臀围(cm)、体高(cm)。

### 1.5 数据统计和分析

使用SPSS19.0对数据进行统计分析。首先对数据进行正态性检测,对不符合正态分布的数据,使用对数进行数据转换,直至符合正态分布。然后进行方差分析和Duncan多重比较。所有数据使用“平均数±标准差”的方式表示。

## 2 试验结果

### 2.1 不同处理组对生长猪生长性能的影响

如表4所示,相对于对照组,试验 I 组和试验 II 组平均日增重分别提高90.75 g/头和53.10 g/头;日采食量分别提高83.58 g/头和109.44 g/头;料肉比降低0.32和0.11。由此可见,在日粮中添加不同比例的胍基乙酸能有效提高生长猪日采食量和日增重,降低料肉比,但添加0.1%较添加0.2%胍基乙酸的效果更明显。

### 2.2 不同处理组对生长猪体型的影响

表3 生长猪体型综合评价

分数	骨的判定	体型外观
1(太瘦)	手可摸到皮下的背骨、骨盘,背骨两侧凹陷	尾根四周凹陷,腰部凹陷
2(瘦)	1. 背骨、肋骨稍出力即可摸出 2. 髌骨目视可见	尾根四周凹陷,侧面平坦,腰部凹陷
3(正常)	1. 手出力压3秒内摸不到背骨 2. 背骨周围手摸有弹力	尾根处无凹陷;年青母猪背平
4(肥)	1. 用力压也摸不到背骨及肋骨 2. 背骨压后可明显见到脂肪层 3. 任何年龄下均摸不到髌骨	1. 头部以后之前躯宽厚,随年龄之增加,两肩之间变平,尾根周遭沉积很多脂肪;2. 臀部很大
5.(过肥)	无法看到或摸到髌骨、背骨	1. 身躯呈大圆状 2. 由目视即可见大量脂肪堆积

从表 5 可知, 生长育肥猪日粮中添加不同比例的胍基乙酸能有效改善生长猪体型状况, 增加体长、体高、腿臀围、腹围和胸围。

### 3 讨论

#### 3.1 胍基乙酸对生产性能的影响

胍基乙酸是肌酸的天然前体物, 而肌酸是细胞内能量新陈代谢的重要分子, 是能量暂时存储的场所。它和磷酸肌酸一起组成磷酸原系统, 在三磷酸

腺苷(ATP)供能不足时, 提供 P 供二磷酸腺苷(ADP)重新合成 ATP, 促进肌肉的能量代谢。Young 等通过试验证明: 给猪日粮中添加肌酸能够增加蛋白质的合成代谢, 从而提高动物的生长速度, 加快饲料利用率<sup>[6]</sup>。但 ATP 不能直接由体外补充, 外源肌酸的添加也因其性质不稳定、价格昂贵而受限, 那么用胍基乙酸来补充肌酸是非常好的选择。

另外, 在 Stead L M 等<sup>[7]</sup>的研究中也表明, 日

表 4 胍基乙酸对生长猪生长性能的影响

项目	对照组	试验 I 组	试验 II 组
	0.00%	0.1%	0.2%
初始重(kg/头)	42.42±3.51 <sup>a</sup>	42.48±3.48 <sup>a</sup>	42.49±3.54 <sup>a</sup>
35 天末重(kg/头)	62.43±2.81 <sup>a</sup>	65.68±4.51 <sup>a</sup>	64.37±3.08 <sup>a</sup>
平均日增重(g/头)	572.01±92.29 <sup>a</sup>	662.76±67.29 <sup>a</sup>	625.11±72.71 <sup>a</sup>
日采食量(g/头)	1705.71±121.10 <sup>a</sup>	1789.29±125.49 <sup>a</sup>	1815.15±145.67 <sup>a</sup>
料肉比	3.03±0.45 <sup>a</sup>	2.71±0.45 <sup>a</sup>	2.92±0.20 <sup>a</sup>

注: 同行不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

表 5 不同处理组对生长猪体型的影响

测定指标	对照组	试验 I 组	试验 II 组
第 1 天体型得分	2.43±0.19 <sup>b</sup>	2.14±0.13 <sup>a</sup>	2.39±0.24 <sup>b</sup>
第 29 天体型得分	2.39±0.13 <sup>a</sup>	2.57±0.19 <sup>ab</sup>	2.61±0.20 <sup>b</sup>
第 41 天体型得分	2.21±0.22 <sup>a</sup>	2.43±0.28 <sup>ab</sup>	2.57±0.19 <sup>b</sup>
全期体型得分	2.35±0.21 <sup>a</sup>	2.38±0.17 <sup>ab</sup>	2.52±0.12 <sup>b</sup>
第 1 天体长	83.07±0.21 <sup>a</sup>	81.36±1.21 <sup>a</sup>	82.00±1.68 <sup>a</sup>
第 29 天体长	91.07±1.90 <sup>a</sup>	93.93±5.13 <sup>ab</sup>	96.21±1.04 <sup>a</sup>
第 41 天体长	105.79±2.56 <sup>ab</sup>	111.57±2.37 <sup>ab</sup>	109.07±2.23 <sup>ab</sup>
全期体长	93.31±1.53 <sup>a</sup>	95.62±2.52 <sup>b</sup>	95.76±1.51 <sup>b</sup>
第 1 天体高	52.71±1.15 <sup>a</sup>	52.21±0.49 <sup>a</sup>	52.21±1.04 <sup>a</sup>
第 29 天体高	60.14±0.48 <sup>a</sup>	60.64±0.69 <sup>a</sup>	60.64±0.69 <sup>a</sup>
第 41 天体高	60.14±0.48 <sup>a</sup>	60.64±0.69 <sup>a</sup>	60.64±0.69 <sup>a</sup>
全期体高(cm)	57.67±0.63 <sup>a</sup>	57.83±0.54 <sup>a</sup>	57.83±0.45 <sup>a</sup>
第 1 天腿臀围	73.79±3.23 <sup>a</sup>	74.79±1.98 <sup>a</sup>	74.71±1.11 <sup>a</sup>
第 29 天腿臀围	82.71±3.31 <sup>ba</sup>	85.57±1.97 <sup>Abab</sup>	87.51±2.43 <sup>Bb</sup>
第 41 天腿臀围	90.64±1.70 <sup>a</sup>	92.29±1.98 <sup>a</sup>	92.64±2.38 <sup>a</sup>
全期腿臀围	82.38±1.70 <sup>ba</sup>	84.21±0.88 <sup>Abba</sup>	84.95±1.36 <sup>Bb</sup>
第 1 天胸围	81.14±2.04 <sup>b</sup>	78.36±1.75 <sup>a</sup>	80.07±1.72 <sup>ab</sup>
第 29 天胸围	92.64±1.11 <sup>a</sup>	93.71±1.75 <sup>a</sup>	92.43±1.79 <sup>a</sup>
第 41 天胸围	92.64±1.11 <sup>a</sup>	93.71±1.75 <sup>a</sup>	92.43±1.79 <sup>a</sup>
全期胸围	88.81±1.24 <sup>a</sup>	88.60±1.39 <sup>a</sup>	88.31±1.02 <sup>a</sup>
第 29 天腹围	106.50±3.03 <sup>ba</sup>	107.57±1.84 <sup>Abb</sup>	111.21±2.36 <sup>Bb</sup>
第 41 天腹围	102.07±0.98 <sup>a</sup>	104.03±1.99 <sup>b</sup>	102.29±1.70 <sup>a</sup>
全期腹围	104.29±1.12 <sup>ba</sup>	106.00±1.62 <sup>Abb</sup>	106.75±1.59 <sup>Bb</sup>

注: 同行不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

# 2012-2013年广东猪流行性腹泻流行情况调查报告

田云, 焦颖, 王福广, 查云峰, 孙彦伟\*  
(广东省动物卫生监督总所, 广东 广州 510230)

**摘要:** 为了解广东猪群流行性腹泻 (PED) 的发生状况, 对全省 120 个不同养殖规模的猪场进行了猪群腹泻的流行病学调查和样品采集。共采集 566 份肠道和粪便样品, 采用猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV)-猪流行性腹泻病毒 (PEDV)-猪轮状病毒 (PRoV) 三重荧光 RT-PCR 方法进行病原学检测。结果显示, TGEV、PEDV 和 PRoV 的样品阳性率分别为 0.88%、23.32% 和 16.78%, 造成广东猪群爆发腹泻的主要病原是 PEDV; PEDV 的场阳性率和样品阳性率分别为 35.83% 和 23.32%, PED 已成持续感染的地方流行态势; 从规模看, 以存栏母猪 100 头以下的猪场群内 PED 发病率最高, 为 77.38%, 生物安全措施好的场发病率较低; 从生长阶段 (用途) 看, 以哺乳仔猪的发病率最高, 为 50.33%, 且现有 PED 疫苗的免疫已无法避免 PED 的发生。

**关键词:** 流行病学调查; 猪流行性腹泻; 猪传染性胃肠炎; 猪轮状病毒感染  
中图分类号: S851.31\*3      文献标识码: A      文章编号: 1005-8567(2015)05-0018-04

## Investigation on Porcine Epidemic Diarrhea in Guangdong from 2012 to 2013

Tian Yun, Jiao Ying, Wang Fuguang, Zha Yunfeng, Sun Yanwei\*  
(Guangdong Animal Health Supervision Institute, Guangzhou 510230, China)

**Abstract:** In order to understand the status of porcine epidemic diarrhea in Guangdong pig herds, the epidemiological investigation was conducted in 120 different-scale pig farms and 566 samples of intestinal tracts and feces were also collected from them. All the samples were detected using the multiplex real-time RT-PCR method for porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV)-porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)-porcine rotavirus (PRoV). The results showed that 0.88% samples were TGE positive, 23.32% PED positive and 16.78% PRoV positive. PEDV was the main diarrhea-causing pathogen. 35.83% of pig farms were PED positive and 23.32% of samples were PED positive. PED was endemic in Guangdong. From the view of pig farm's scale, the incidence rate in pig farms where the sow number was less than 100 was the highest and the incidence rate was 77.38%, which showed that the incidence rate was low in pig farms with good bio-safety. From the view of pig growth stage, the incidence rate in the suckling piglets was the highest and the incidence rate was 50.33%. The available PED vaccine could not prevent the occurrence of PED.

**Key words:** Epidemiological investigation; Porcine epidemic diarrhea virus; Porcine transmissible gastroenteritis virus; Porcine rotavirus

猪流行性腹泻 (Porcine Epidemic Diarrhea, PED) 是由猪流行性腹泻病毒 (Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV) 引起的猪的一种急性、高度接触性肠道传染病, 可发生于各种年龄猪, 但以对哺乳仔猪的危害最为严重。临床上以腹泻、呕吐和脱水为主要特征。该病 1971 年在英国首次报道,

1978 年被确定为是由一种冠状病毒引起的疾病<sup>[1]</sup>。

我国于 1980 年首次分离到 PEDV, 以后多地均有 PED 发生的报道, 流行范围不断扩大<sup>[2]</sup>。

为有效防控 PED 的发生, 我国于 1995 年开始用猪流行性腹泻病毒 (PEDV) 和猪传染性胃肠炎病毒 (Porcine transmissible gastroenteritis

收稿日期: 2015-07-16

\*: 通讯作者

基金项目: 广东省科技计划项目 (2012A020200014)

virus, TGEV) 二联灭活苗或弱毒苗进行 PED 与 TGE 的联合预防<sup>[3-4]</sup>, 并取得一定效果。

但是从 2006 年初开始, PEDV 疫苗的免疫效果越来越差, 免疫过的猪群照常爆发 PED<sup>[5]</sup>。从 2010 年起, 全国大部分地区的猪场开始大规模爆发 PED, 同样也波及到广东地区<sup>[6]</sup>。

为弄清广东 PEDV 的感染和分布情况, 2012-2013 年上半年, 笔者采用猪传染性胃肠炎病毒 (Porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、猪轮状病毒 (Porcine rotavirus, PRoV) 三重实时荧光 RT-PCR 方法, 对采自广东 120 个规模猪场 566 份发生腹泻猪的肠道组织或粪便样品进行了 TGEV、PEDV 和 PRoV 病原学检测, 研究分析 PEDV 在猪群中的感染及流行规律, 为猪流行性腹泻的防治提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 组织样品和粪便样品** 2012-2013 年上半年, 在广东省 120 个猪场采集猪肠道组织或粪便样品 566 份。其中 2012 年采集 17 个地区 54 个猪场的腹泻样品 236 份, 2013 年采集 19 个地区 66 个猪场的腹泻样品 330 份。腹泻样品包括粪便和肠道组织, 其中肠道组织采集回肠段。

**1.1.2 主要试剂** 猪传染性胃肠炎病毒 (TGEV)-猪流行性腹泻病毒 (PEDV)-猪轮状病毒 (PRoV) 三重实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒, 购自北京世纪元亨动物防疫技术有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 流行病学调查方法** 通过现场问卷调查方式, 对广东 120 个猪场的腹泻发病情况、死亡情况和免疫情况等进行调查。

**1.2.2 实时荧光 RT-PCR 检测** 根据 TGEV-PEDV-PRoV 三重实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒的操作步骤进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原学检测结果

对 2012 年至 2013 年上半年广东各地采集的 566 份腹泻样品进行 PEDV、TGEV 和 PRoV 检测。结果显示: TGEV、PEDV 和 PRoV 的样品阳性率分别为 0.88%、23.32% 和 16.78%; PEDV 和 PRoV 混合感染率为 1.24% (7/566); 未检测到 PEDV 与 TGEV, PRoV 与 TGEV, 以及 PEDV 与 PRoV 和 TGEV 的混合感染。详细数据见表 1。

2012 年 TGEV、PEDV 和 PRoV 的样品阳性率分别为 0、33.05% 和 17.80%; 场阳性率分别为 0、46.30% 和 35.19%。2013 年 TGEV、PEDV 和 PRoV 的样品阳性率分别为 1.52%、16.36% 和 16.06%; 场阳性率分别为 1.52%、27.27% 和 28.79%。2013 年的 PEDV 的样品阳性率与场阳性率均较 2012 年有大幅下降, PEDV 的样品阳性率下降 16.69%, 场阳性率下降 19.03%; PRoV 的样品阳性率与场阳性率则较 2012 年有轻微下降, 样品阳性率下降 1.74%, 场阳性率下降 6.4%; 而 TGEV 的样品阳性率与场阳性率则较 2012 年有轻度升高, 样品阳性率与场阳性率均升高 1.52%。表明 2013 年 PED 和 PRo 的流行情况和流行范围均小于 2012 年, 而 TGE 的流行情况和流行范围则略高于 2012 年 (图 1)。

### 2.2 分地区 PED 检测结果

2012 年对 17 个地区的样品进行了检测, 结果 12 个地区的样品检测出 PED 病毒核酸, 地区阳性率为 70.59% (12/17); 2013 年对 19 个地区的样品进行了检测, 结果 11 个地区的样品检测出 PED 病毒核酸, 地区阳性率为 57.89% (11/19)。

### 2.3 2012 年不同养殖规模猪场 PED 发生情况调查结果

对 2012 年 25 个 PED 阳性场按母猪存栏少于 100 头、大于等于 100 且小于 500 头、大于等于 500 头 3 个标准进行分析统计。结果 3 种不同规模猪场的 PED 发病率分别为 77.38%、46.10% 和 34.15%, 病

表 1 TGEV、PEDV 和 PRoV 检测结果

年份	检测样品数	检测场数	TGEV				PEDV				PRoV			
			阳性样品数	样品阳性率 (%)	阳性场数	场阳性率 (%)	阳性样品数	样品阳性率 (%)	阳性场数	场阳性率 (%)	阳性样品数	样品阳性率 (%)	阳性场数	场阳性率 (%)
2012	236	54	0	0	0	0	78	33.05	25	46.30	42	17.8	19	35.19
2013	330	66	5	1.52	1	1.52	54	16.36	18	27.27	53	16.06	19	28.79
合计	566	120	5	0.88	1	0.83	132	23.32	43	35.83	95	16.78	38	31.67

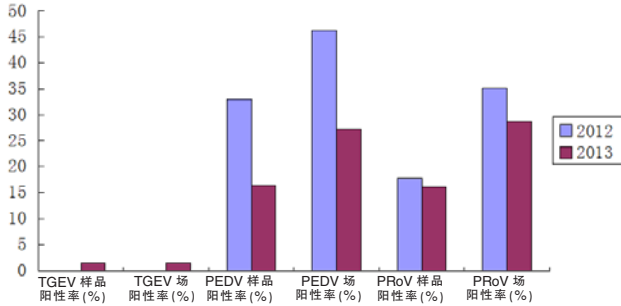


图 1 2012 年、2013 年 TGEV、PEDV 和 PRoV 样品阳性率和场阳性率分布

死亡率分别为 4.62%、44.55%和 48.48%(表 2)。表明 PED 发病率以母猪存栏数少于 100 头的为最高,以母猪存栏数大于等于 500 头的为最低,猪场 PED 发病情况随着猪场的生物安全水平的提高有所下降;但死亡率则以母猪存栏数大于等于 500 头的为最高,以母猪存栏数少于 100 头的为最低,生物安全越高的母猪场的病死率越高。

#### 2.4 2012 年不同年龄段猪群 PED 发生情况调

#### 查结果

对 2012 年 25 个 PED 阳性猪场,按哺乳仔猪、保育仔猪、育成猪和成年种猪调查统计不同年龄段腹泻发病情况。结果哺乳仔猪、保育仔猪、育成猪和成年种猪 PED 的发病率分别为 50.33%、15.28%、0.49%和 0;病死率分别为 50.71%、14.31%、33.33%和 0(表 3)。PED 的发病率由低到高依序为成年种猪、育成猪、保育仔猪和哺乳仔猪,发病率以哺乳仔猪最高;病死率由低到高依序为成年种猪、保育仔猪、育成猪和哺乳仔猪,病死率亦以哺乳仔猪最高。

#### 2.5 2013 年 10 日龄以下仔猪 PED 发生情况与猪场免疫情况的相关性

2012 年 PED 状况调查表明,PED 可发生于各种年龄猪,但以对哺乳仔猪的危害最为严重,尤其是 10 日龄以下仔猪。为进一步了解其对 10 日龄以下仔猪的危害,2013 年主要针对 10 日龄以下仔猪的 PED 发生情况进行了调查。

表 2 2012 年不同养殖规模猪场 PED 发生情况调查结果

类别	存栏母猪<100头					100头≤存栏母猪<500头					存栏母猪≥500头				
	发病猪同群数	发病数	死亡数	发病率 (%)	病死率 (%)	发病猪同群数	发病数	死亡数	发病率 (%)	病死率 (%)	发病猪同群数	发病数	死亡数	发病率 (%)	病死率 (%)
哺乳仔猪	123	85	6	69.11	7.06	1972	909	405	46.10	44.55	8256	4216	2231	51.07	52.92
保育仔猪	45	45	0	100	0	0	0	0	0	0	3933	563	87	14.31	15.45
育成猪	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1830	9	3	0.49	33.33
成年种猪	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合计	168	130	6	77.38	4.62	1972	909	405	46.10	44.55	14019	4788	2321	34.15	48.48

表 3 2012 年不同年龄段猪群 PED 发生情况调查结果

类别	发病猪同群数	发病数	死亡数	发病率 (%)	病死率 (%)
哺乳仔猪	10351	5210	2642	50.33	50.71
保育仔猪	3978	608	87	15.28	14.31
育成猪	1830	9	3	0.49	33.33
成年种猪	0	0	0	0	0
合计	16159	5827	2732	36.06	46.89

2013 年 10 日龄以下仔猪 PED 发生场 18 个,其中 PED 免疫场 10 个,PED 未免疫场 8 个。免疫场 10 日龄以下仔猪 PED 发病率和病死率分别为 72.32%和 60.78%;未免疫场的发病率和病死率分别为 42.77%和 61.21%(表 4)。部分免疫场发病,部分免疫场未发病;部分未免疫场发病,部分未免

疫场未发病,且未免疫场的发病率低于免疫场,PED 发病情况与免疫情况无任何相关性。

### 3 讨论

从 2010 年起,全国大部分地区的猪场开始大规模爆发 PED,同样也波及到广东地区<sup>[6]</sup>,成为严重危害广东养猪业的传染病之一。为弄清广东 PEDV 的分布和感染情况,2012 年、2013 年上半年,笔者对广东 120 个规模猪场 566 份发生腹泻猪的肠道组织或粪便样品进行了 TGEV、PEDV 和 PRoV 病原学检测,研究分析 PEDV 在猪群中的感染及流行规律,为猪流行性腹泻的防治提供科学依据。

经过检测发现,TGEV、PEDV 和 PRoV 的样品阳性率分别为 0.88%、23.32%和 16.78%,PEDV 的样品阳性率最高(23.32%),表明造成广东猪群爆发

表 4 2013 年 10 日龄以下仔猪 PED 发生情况与猪场免疫情况的相关性

年份	发病场数 (个)	免疫场 (个)	未免疫场 (个)	免疫场					未免疫场				
				同群数	发病数	死亡数	发病率 (%)	病死率 (%)	同群数	发病数	死亡数	发病率 (%)	病死率 (%)
2013	18	10	8	885	640	389	72.32	60.78	657	281	172	42.77	61.21

腹泻的主要病原是 PEDV。

2012 年 PEDV 的样品阳性率、场阳性率和地区阳性率分别为 33.05%、46.30% 和 70.59%，2013 年分别为 16.36%、27.27% 和 57.89%。2013 年 PEDV 的样品阳性率、场阳性率和地区阳性率较 2012 年分别下降 16.69%、19.03% 和 12.70%。表明 2013 年 PED 和 PRo 的流行情况和流行范围均小于 2012 年，但是样品阳性率、场阳性率和地区阳性率仍处于较高水平，广东 PED 已成持续感染的地方流行态势。

通过对 2012 年母猪存栏少于 100 头、100-499 头、大于等于 500 头的 3 种不同养殖规模 PED 阳性猪场发病情况的调查，发现发病率以存栏母猪 100 头以下的猪场为最高，以母猪存栏数大于等于 500 头的为最低。表明 PED 发病情况随着猪场的生物安全状况的加强有所下降，PED 的发生与猪场的生物安全状况有一定的相关性。但仔猪死亡率与猪场的生物安全状况未发现有相关性，这可能与规模猪场考虑到 PED 感染猪的治愈成本高，存活率低，加大淘汰比例等因素有关。

对 2012 年 PED 阳性猪场不同年龄猪群 PED 发生情况的分析表明，PED 的发病率和死亡率由低到高依序为成年种猪、育成猪、保育仔猪和哺乳仔猪，发病率以哺乳仔猪最高；病死率由低到高依序为成年种猪、保育仔猪、育成猪和哺乳仔猪，病死率亦以哺乳仔猪最高。哺乳仔猪感染 PED 后，表现为水样腹泻，严重的仔猪脱水、短时间内死亡，死亡率极高。

我国在很长一段时间内通过免疫接种 PEDV、TGEV 和 PRoV 二联疫苗或三联疫苗来预防猪的腹泻，取得了一定的效果。但自 2006 年开始，腹泻灭活苗和弱毒苗广泛使用的猪场也暴发了严重的腹泻<sup>[7]</sup>，给我国的养猪业造成了巨大的损失。此次调查 2013 年未免疫场的发病率低于免疫场，无论是否免疫均无法阻止 PED 的发生，表明 PED 疫苗的免疫已无法避免 PED 的发生。随着 PEDV 从一个国家或地区传播到另一个国家或地区，在长期流行的过程中，病毒为更好地适应所在地区的环境差异，会随所处条件的改变而发生变异<sup>[8,9]</sup>。刘孝珍等<sup>[10]</sup>报道，与经典疫苗毒株 CV777 相比，新分离毒

株 S 基因发生了变异，出现了新的基因型。笔者通过对部分毒株的 S 基因进行分析，亦发现了变异的基因型。此次临床调查发现现有 PED 疫苗的免疫已无法避免 PED 的发生，这可能与 PED 流行毒株不同（经典株或变异株）有关，此外也可能与 PED 疫苗的生产厂家不同，免疫程序不同，生物安全措施不同有关。

综上所述，通过调查，我们认为，造成广东猪群爆发腹泻的主要病原是 PEDV，广东 PED 已成持续感染的地方流行态势，哺乳仔猪发病和死亡较多，且 PED 疫苗的免疫已无法避免 PED 的发生。此次调查明确了 PED 在广东的流行情况、致病情况、免疫效果等，对 PED 的防控起到了积极作用。

#### 参考文献：

- [1] Pensaert M B, Debouck P. A New Coronavirus-like Particle Associated with Diarrhea in Swine [J]. Arch. Virol, 1978, 58:237-243.
- [2] 宣华, 邢德坤, 王殿瀛, 等. 应用猪胎肠单层细胞培养猪流行性腹泻病毒的研究[J]. 中国人民解放军兽医大学学报, 1984, 4(3):202-208.
- [3] 马思齐, 王明, 冯力, 等. 猪传染性胃肠炎与猪流行性腹泻二联氢氧化铝细胞灭活疫苗的研究[J]. 中国畜禽传染病, 1995(6):23-27.
- [4] 佟有恩, 冯力, 李伟杰, 等. 猪传染性胃肠炎与猪流行性腹泻病毒二联弱毒疫苗的研究[J]. 中国预防兽医学报, 1999, 21(6):406-410.
- [5] 施标, 董世娟, 朱于敏, 等. 中国猪流行性腹泻病毒分子流行病学研究进展[J]. 中国农业科学, 2013, 46(20):4362-4369.
- [6] Sun R Q, Cai R J, Chen Y Q, et al. Outbreak of porcine epidemic diarrhea in suckling piglets, China [J]. Emerging Infectious Diseases, 2012, 18(1):161-163.
- [7] Chen J F, Sun D B, Wang C B, et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of membrane protein genes of porcine epidemic diarrhea virus isolates in China [J]. Virus Genes, 2008, 36:355-364.
- [8] Straw B E, Zimmerman J J, Allaire S D, 等. 猪病学[M]. 第 9 版. 赵德明, 张仲秋, 沈建忠, 等. 译. 北京: 中国农业大学出版社, 2008:399-406.
- [9] 甘振磊, 汤德元, 李春燕, 等. 猪流行性腹泻流行特点及流行现状的研究[J]. 猪业科学, 2010, 186(12):24-28.
- [10] 刘孝珍, 陈建飞, 时洪艳, 等. 2011 年猪流行性腹泻病毒的遗传变异分析[J]. 中国预防兽医学报, 2012, 34(3):180-183.

# 猪瘟抗体检测试纸条与 ELISA 试剂盒的检测结果比对试验

郗立新<sup>1</sup>, 肖雪<sup>2</sup>, 刘文福<sup>3</sup>, 颜其贵<sup>1\*</sup>

(1. 四川农业大学动物医学院, 四川 成都 611130; 2. 四川省遂宁市安居区动物卫生监督所, 四川 遂宁 629000; 3. 成都安迪斯生物技术有限责任公司, 四川 成都 610041)

**摘要:** 四川成都某生物技术公司研发了一款检测猪瘟抗体的免疫胶体金试纸条, 为检验此产品, 选取美国产、武汉产 ELISA 试剂盒与其做对比试验, 比较猪瘟抗体检测的特异性、敏感性和符合率。结果表明: 成都产试纸条同批次产品性能稳定, 总符合率与美国产、武汉产 ELISA 试剂盒间差异不显著。

**关键词:** 猪瘟; 抗体; ELISA; 免疫胶体金

**中图分类号:** S852.65\*1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2015)05-0022-03

## The Comparison Test of Immune Colloidal Gold Strips and ELISA Kits for Swine Fever Antibody Detection

Xi Lixin<sup>1</sup>, Xiao Xue<sup>2</sup>, Liu Wenfu<sup>3</sup>, Yan Qigui<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China; 2. Anju District Suining City Animal Health Authority, Suining 629000, China; Chengdu Andisi iotechnology Limited Liability Company, Chengdu 610041, China)

**Abstract:** A immune colloidal gold test strip method has been developed to detect swine fever antibody, and compared with ELISA kits from US and Wuhan by specificity, sensitivity and coincidence rate to determine the method performance. The results showed that the immune colloidal gold test strip method was stable and suitable for mass detection, there was no significant difference compared with ELISA kits in total coincidence rate.

**Key words:** Classical swine fever; antibody; enzyme-linked immunosorbent assay; Immune colloidal gold

猪瘟抗体监测能准确掌握猪群的免疫抗体水平, 它对猪瘟疫苗免疫效果作出评价, 为猪瘟免疫程序的制定提供指导以及对猪瘟流行状态进行评估等均具有重要意义<sup>[1]</sup>。目前, 酶联免疫吸附试验(ELISA)、斑点酶联免疫吸附试验(Dot-ELISA)以及猪瘟抗体免疫金标试纸条均可用于猪瘟抗体的监测<sup>[2]</sup>, 其中以酶联免疫吸附试验最为快速有效而受广大养殖户的青睐。

四川成都某生物技术公司研发了一款检测猪瘟抗体的免疫胶体金试纸条, 为检验此产品, 选取美国产与武汉产的 ELISA 试剂盒做对比, 比较猪瘟抗体检测的特异性、敏感性和符合率。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试验材料

1.1.1 血清采集 在四川省生猪主要养殖区(宜

宾、遂宁、雅安、眉山、绵阳、资阳等)随机采集免疫信息清晰的猪血液样本 104 份, 分离血清, 4℃冰箱储存备用。要求血液样本来源于体质健壮、体重不等、免疫时间、免疫次数不一的猪群。

1.1.2 试验试剂 猪瘟抗体检测免疫胶体金试纸条, 产品批号 20150405; 美国产猪瘟抗体检测 ELISA 试剂盒, 产品批号 3759; 武汉产猪瘟抗体检测 ELISA 试剂盒, 产品批号 141014。

1.1.3 试验仪器 200 μL 8 道排枪, 200 μL 微量移液枪, 10 μL 微量移液枪, 涡旋振荡仪, 37℃恒温培养箱, 酶标仪等。

#### 1.2 试验方法

1.2.1 样品预筛试验 用美国产 ELISA 检测试剂盒测试所收集的猪血清样品, 根据测试结果筛选强、中、弱阳性样品各 10 份, 阴性样品 10 份。



**1.2.2 重复性试验** 选取强、中、弱阳性血清各 1 份,阴性血清 1 份,每份样品用成都产免疫胶体金试纸条测试 6 次,观察结果的可重复性。

**1.2.3 敏感性与特异性试验** 将 30 份阳性和 10 份阴性样品分别用 2 种 ELISA 试剂盒和成都产免疫胶体金试纸条进行猪瘟疫抗体检测(重复检测 3 次)。检测试剂盒均在有效期内,检测操作按盒内说明书进行。各试剂检测对照均成立,检测结果按试剂盒要求判定。分别计算出成都产免疫胶体金试纸条相对于其他 2 种试剂盒的总符合率(包括敏感性和特异性)。参照文献<sup>[3,4]</sup>的方法计算敏感性和特异性。通过对比来评判成都产免疫胶体金试纸条的总符合率。

## 2 试验结果

### 2.1 样品初筛试验结果

按照美国产猪瘟疫抗体检测试剂盒使用说明书进行血清初筛试验,根据阻断率分别为 0.8、0.6、0.4 和小于 0.3 时筛选高值阳性、中值阳性、低值阳性和阴性血清。结果详见表 1。

通过试验,筛选出符合进一步试验的强、中、弱阳性和阴性血清各 10 份。

表 1 美国产试剂盒对猪血清的初筛结果

样品类型	编号
高值阳性(强)	7、8、11、13、14、47、63、69、70、87
中值阳性(中)	2、10、12、42、43、62、65、71、73、81
低值阳性(弱)	3、4、15、28、34、72、80、88、96、103
阴性	17、20、24、27、40、66、68、76、94、102

### 2.2 重复性试验结果

从初筛的 40 份样品中选取强、中、弱阳性血清各 1 份,阴性血清 1 份,按照成都产试纸条使用说明书对每份样品测试 6 次。具体结果见表 2。

结果显示:阳性样品的 CV 均小于成都试纸条要求的 15%,阴性样品均呈阴性(数值均小于 0.01),表明结果间差异不显著。

### 2.3 敏感性、特异性和总符合率

**2.3.1 美国产试剂盒与成都试纸条的结果比较** 对筛选出的 40 份血清样品用美国产试剂盒与成都产试纸条分别进行检测。结果见表 3。

结果显示:成都产试纸条检测结果相对于美国产试剂盒检测结果的敏感性为 83.33%,特异性为 100%,总符合率为 87.5%。敏感性较低可能与成都试纸条的设计原理有关。

**2.3.2 武汉产试剂盒与成都试纸条的结果比较**

表 2 重复性检测结果

类型	检测次数	血凝滴度对应值 <sup>1)</sup>	T/C 值	CV 值
高值阳性	第 1 次检测	1:512	1.097	1.3% <sup>2)</sup>
	第 2 次检测	1:512	1.066	
	第 3 次检测	1:512	1.085	
	第 4 次检测	1:512	1.087	
	第 5 次检测	1:512	1.069	
	第 6 次检测	1:512	1.101	
中值阳性	第 1 次检测	1:256	0.826	1.4%
	第 2 次检测	1:256	0.845	
	第 3 次检测	1:256	0.833	
	第 4 次检测	1:256	0.853	
	第 5 次检测	1:256	0.834	
	第 6 次检测	1:256	0.853	
低值阳性	第 1 次检测	1:128	0.495	2.0%
	第 2 次检测	1:128	0.497	
	第 3 次检测	1:128	0.509	
	第 4 次检测	1:128	0.483	
	第 5 次检测	1:128	0.508	
	第 6 次检测	1:128	0.504	
阴性	第 1 次检测	阴性	-	-
	第 2 次检测	阴性	-	
	第 3 次检测	阴性	-	
	第 4 次检测	阴性	-	
	第 5 次检测	阴性	-	
	第 6 次检测	阴性	-	

1):成都某公司研发的免疫胶体金试纸条,有专用仪器读取层析结果,给出可量化显色指标,使其结果以数字形式呈现;显色量化后可换算成血凝方法的血凝滴度对应值。

2):CV 值小于 20% 则表示差异不显著。

表 3 美国产试剂盒与成都产试纸条检测结果

成都产试纸条	美国产试剂盒		总计
	阳性	阴性	
阳性	25	0	25
阴性	5	10	15
总计	30	10	40

对筛选出的 40 份血清样品用武汉产试剂盒和成都产试纸条检测。结果见表 4。

结果显示:成都试纸条检测结果相对于武汉产试剂盒检测结果的敏感性为 89.28%,特异性 100%,总符合率为 92.5%。

**2.3.3 美国产与武汉产试剂盒间的结果比较** 对筛选出的 40 份血清样品用美国产检测试剂盒与武汉产试剂盒进行检测。结果见表 5。

结果显示:美国产检测试剂盒检测结果相对于武汉产试剂盒检测结果的敏感性为 93.33%,特异性为 80%,总符合率为 90%。

表 4 武汉产试剂盒与成都产试纸条检测结果

成都产试纸条	武汉产试剂盒		总计
	阳性	阴性	
阳性	25	0	25
阴性	3	12	15
总计	28	12	40

2.3.4 特异性、敏感性和总符合率比较:将美国产、武汉产试剂盒和成都产试纸条的敏感性、特异性和总符合率进行对比。结果见表 6。

从表 6 可以看出,成都产试纸条的敏感性不及武汉产试剂盒,但其特异性高于武汉产试剂盒,两者总体符合率间存在差异但差异不显著,表明成都产试纸条可以用来检测猪瘟病毒抗体。由于其操作比 ELISA 方法简单方便,相对与 ELISA 检测更容易为猪场基础人员所掌握。

### 3 小结

重复性检测结果表明:此次检测结果表明 CV 值均低于成都某猪瘟病毒抗体检测试纸条要求的 15%,实际 CV 小于 5%,各数据间存在部分差异但是差异不显著。总符合率比较结果表明:成都某猪瘟病毒抗体检测试纸条结果准确率较高,检测时间短,不需要复杂的仪器设备,可以应用于高通量、快

表 5 武汉产与美国产试剂盒检测结果

武汉产试剂盒	美国产试剂盒		总计
	阳性	阴性	
阳性	28	2	30
阴性	2	8	10
总计	30	10	40

表 6 美国产、武汉产试剂盒和成都产试纸条的敏感性、特异性、总符合率

项目	美国产试剂盒		
	敏感性	特异性	总符合率
武汉产试剂盒	93.33%	80%	90%
成都产试纸条	83.33%	100%	87.5%

速、初步测定猪瘟病毒抗体。

### 参考文献:

- [1] 李文刚,甘孟侯.猪病诊断与防治[M].北京:中国农业大学出版社,2002:198-200.
- [2] 沈绍新,戴爱玲,李晓华,杨小燕.IHA 与 ELISA 检测猪瘟病毒抗体的比较[J].动物医学进展,2009(9):20-23.
- [3] 马超英.4种猪瘟病毒抗体检测方法的比较[J].动物医学进展,2012,10:128-131.
- [4] 邓卫武.商品化试剂盒检测乙肝表面抗体检测结果差异性分析[J].现代医院,2012,S1:38-41.

## 欢迎订阅《现代农业装备》

中国学术期刊网(光盘版)、“万方数据-数字化期刊群”、  
《中文科技期刊数据库》(维普)全文上网和收录

全年订阅 72元

国内统一刊号:CN44-1616/S  
国际标准刊号:ISSN 1673-2154  
广告经营许可证:440000100026

双月刊,大16开,内页80P  
每期定价12元,全年72元

#### 银行汇款

帐户名称:广东省现代农业装备研究所  
开户银行:工商银行石牌支行  
帐号:3602098609000021479

地址:广州市天河区五山路261号广东省现代农业装备研究所 邮编:510630 电话:020-38481797 38481062  
传真:020-38481062 邮箱:xdnyzb2013@163.com(综合) gdnj3127@163.com(论文)



# 一株兔病毒性出血症病毒的分离鉴定

于新友<sup>1</sup>, 李天芝<sup>1</sup>, 莫玲<sup>2</sup>, 王玉茂<sup>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:** 从山东东营某兔场送检的疑似兔病毒性出血症 (Rabbit Hemorrhagic Disease, RHD) 病料中分离到 1 株病毒 (DY 株)。通过血凝性及 RT-PCR 鉴定, 以及毒力和免疫原性测定。结果显示: 分离株 DY 株为兔出血症病毒 (Rabbit Hemorrhagic Disease Virus, RHDV), 对人 O 型红细胞具有高度凝集性, 血凝效价为  $12\log_2$ , RHDV 抗血清可特异性抑制这种凝集作用; RT-PCR 扩增出 RHDV VP60 的 201 bp 基因片段; RHDV DY 株对家兔的  $LD_{50}$  为  $10^{-6.5}/\text{mL}$ , 是一株对家兔具有高致病力的强毒株。取第 5 代 RHDV DY 株制备灭活疫苗免疫试验兔, 免疫后第 14d 攻毒, 对 RHDV 的保护率达 100%。

**关键词:** 兔出血症病毒; 分离; 鉴定

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)05-0025-03

## Isolation and Identification of a Strain of DY RHDV

Yu Xinyou<sup>1</sup>, Li Tianzhi<sup>1</sup>, Mo Ling<sup>2</sup>, Wang Yumao<sup>2</sup>

(1. Shandong Lvdu Bio-Industry Co., Ltd., Binzhou 256600, China; 2. Animal Science and Veterinary Medicine Academy, Binzhou 256600, China)

**Abstract:** A strain of rabbit hemorrhagic disease virus was isolated in a Dongying farm, and was named DY strain. A series of tests such as bacteriological examination, HA, Specificity, virulence and immunogenicity were detected. The results showed that the strain of DY RHDV had high HA activity to human group O red blood cells the value could reach to  $2^{12}$ . The serum against RHDV could restrain this activity.  $LD_{50}$  of RHDV to rabbits was  $10^{-6.5}/\text{mL}$ , the DY RHDV was a virulent strain to rabbits. 1 mL inactivated vaccine made by The fifth generation of RHDV DY strain was used to immunize rabbits. Immune protection rate against RHD was 100% on the fourteenth day after vaccination.

**Key words:** Rabbit hemorrhagic disease virus; Isolation; identification

兔病毒性出血症 (Rabbit Hemorrhagic Disease, RHD) 俗称兔瘟, 是由兔出血症病毒 (Rabbit Hemorrhagic Disease Virus, RHDV) 引起的一种急性、高致死性传染病。该病仅发生于兔, 不对公共卫生安全造成威胁。该病主要发生于青年兔和成年兔, 以呼吸系统出血, 全身实质脏器水肿、出血、瘀血为特征<sup>[1]</sup>。兔通常于感染后 2~3 d 内死亡, 死亡率可达 90% 以上, 是严重危害养兔业的传染病之一<sup>[2]</sup>。1984 年, 该病首次发生在我国江苏江阴地区<sup>[3]</sup>, 随后广泛流行于世界各地<sup>[4-6]</sup>。OIE 将其列为 B 类动物疫病<sup>[7]</sup>, 我国农业部将其列为二类

动物传染病<sup>[8]</sup>。

RHDV 是嵌杯样病毒科兔病毒属, 为单链正义 RNA 病毒, 基因组大小为 7 437 bp。含 2 个开放阅读框架 (ORF), 分别编码 2 个蛋白 (VP10, VP60)<sup>[9]</sup>, 其中衣壳蛋白 VP60 是 RHDV 的主要结构蛋白。

笔者对山东东营某兔场送检的 1 例疑似兔病毒性出血症病兔进行了病毒分离和鉴定, 现报告如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 病料、毒株与试验动物

RHD 疑似病料采自山东东营某兔场的病死兔

收稿日期: 2015-04-20

基金项目: 山东省现代产业技术体系毛皮动物创新团队项目 (SDAIT-18-011-15)

肝脏、脾脏等。兔病毒性出血症病毒 AV34\* 标准毒株,购自中国兽医药品监察所。体重 1.5~2.0 kg 的健康非免疫家兔购自山东滨州散养农户。

## 1.2 试剂

pMD18-T 载体、PCR 相关试剂、DL2000 Marker、多功能 DNA 纯化回收试剂盒、高纯质粒小量制备试剂盒,购自北京百泰克生物科技有限公司产品。AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒,购自爱思进生物技术(杭州)有限公司。改良马丁琼脂、麦康凯琼脂、厌气肉肝汤培养基,由青岛海博生物技术有限公司提供。人 O 型红细胞由滨州市中心血站馈赠。RHDV (AV34\*) 抗血清由本单位自制。

## 1.3 细菌分离培养

无菌采集的死兔肝脏、脾脏病料进行细菌学分离培养。病料分别接种厌气肉肝汤、含 4% 血清及 0.1% 裂解血的改良马丁琼脂平皿和麦康凯琼脂平皿。37 °C 下培养 48 h, 观察记录结果。

## 1.4 病料处理

取病死兔肝脏、脾脏,按 1:5 加入灭菌生理盐水进行研磨,反复冻融 3 次,12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤,-20 °C 保存,备用。

## 1.5 一步法 RT-PCR 快速检测

参照 GenBank 中登录的 RHDV 基因序列 (JF438967), 采用 Primer Premier 5.0 引物设计软件,设计 1 对引物。上游引物:5'-GGAAGCTTGAA TGGCAGCAC-3', 下游引物:5'-TAAAGGGCACGAAC-GACA-3', 扩增 RHDV VP60 基因部分片段 201 bp。按 AxyPrep 体液病毒 DNA/RNA 小量试剂盒说明书提取 RHDV DY 株的 RNA, 分别为模板进行一步法 RT-PCR 扩增。反应条件为 50 °C 30min, 95 °C 2 min, 然后进入 95 °C 20S, 55 °C 20S, 72 °C 20S, 共 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 8 min。

## 1.6 血凝性试验

采用微量法,取 1.4 处理好的样品 25 μL 在 96 孔板上作 2 倍系列稀释,同时设生理盐水对照。每孔加入 25 μL 1% 人 O 型红细胞悬液 (人 O 型血液用生理盐水离心洗涤 3 次, 最后一次 2 000 r/min 离心 5 min, 将沉积红细胞用生理盐水稀释成 1:100 悬液应用), 震荡混合, 置 37 °C 作用 30 min, 观察结果。以红细胞 100% 凝集的最高稀释度作为判定终点。

## 1.7 血凝抑制性试验

采用微量法。取 1.4 处理好的样品先配制成 4 个血凝单位 (即 4HA) RHDV 悬液, 在 96 孔板上每孔加 25 μL 4HA RHDV 悬液, 然后加 RHDV 抗血清 25 μL; 37 °C 作用 15 min (期间振荡 2~3 次) 后, 加入 25 μL 1% 人 O 型红细胞悬液, 37 °C 静置 30 min, 观察结果。同时设立生理盐水对照、RHDV 抗血清对照、4HA RHDV 对照。

## 1.8 毒力鉴定试验

用生理盐水将 1.4 处理的样品做 2 倍稀释, 皮下接种 4 只健康易感试验兔, 每只 1.0 mL, 观察 72 h。采集死亡接种兔的肝脏病料, 重复以上试验, 连续 4 次。取第 5 代 RHDV DY 株肝组织, 用生理盐水作 10 倍系列稀释, 取 10<sup>-5</sup>、10<sup>-6</sup>、10<sup>-7</sup>、10<sup>-8</sup> 等 4 个稀释度, 每个稀释度分别颈部皮下注射 6 只健康易感兔, 1 mL/ 只, 观察 7 d, 并详细记录。

## 1.9 病毒纯净性检测

按《中华人民共和国兽药典》中提供的检验方法对第 5 代 RHDV DY 株病毒进行霉菌、细菌、支原体的检测。

## 1.10 免疫原性试验

取第 5 代 RHDV DY 株病料, 剔除各脏器的脂肪与结缔组织后, 称重, 加生理盐水 (组织与生理盐水的最终比例为 1:19), 研磨, 过滤。按乳剂总量的 0.4% 加入甲醛, 充分混合, 置 37 °C 灭活 48 h。经灭活检验合格后, 取 1.5~2.0 kg 的健康非免疫家兔 4 只, 每只各颈部皮下注射 0.5 mL。另取 4 只不免疫作对照组。接种后 14 d, 各皮下注射 1:10 稀释的强毒 1 mL, 观察 10 d。

## 2 结果

### 2.1 细菌分离

37 °C 培养 48 h 后, 厌气肉肝汤、含 4% 血清及 0.1% 裂解全血的改良马丁琼脂平皿和麦康凯琼脂平皿, 均无细菌生长。

### 2.2 PCR 检测

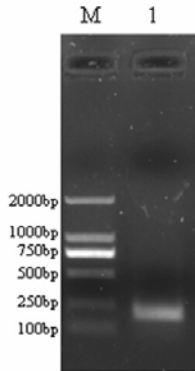
1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 结果在 201 bp 出现一条特异性条带 (图 1)。

### 2.3 血凝性和血凝抑制试验结果

待检病料的处理液能凝集人 O 型红细胞, 血凝价为 12 log<sub>2</sub>; 其血凝性能被 RHDV (AV34\*) 抗血清抑制。

### 2.4 毒力鉴定试验结果

致病性试验结果表明: RHDV DY 株连续传代 4 次均对家兔具有高致病性, 攻毒家兔均 100% 死



M: DL2000 MarKer 1: RHDV DY 株一步 RT-PCR 扩增结果

图 1 一步 RT-PCR 扩增结果

亡。死亡兔尸体僵直,鼻孔出血。解剖观察气管环状潮红、出血,呈现“红气管”特征,内有白色或淡红色、带血的泡沫状黏液;肝、脾、肾、心等实质脏器瘀血、肿大和出血;有的肝脏肿大,略带土黄色;小肠黏膜充血、出血;膀胱内有积尿。证明 RHDV DY 株为强毒株。半数致死量测定结果显示:  $10^{-5}$  兔死亡 4 只,  $10^{-6}$  兔死亡 3 只,  $10^{-7}$  兔死亡 1 只。Reed-Muench 法计算 RHDV DY 株对家兔的  $LD_{50}$  为  $10^{-6.5}/mL$ 。

### 2.5 纯净性检测结果

第 5 代 RHDV DY 株病毒液无霉菌、细菌、支原体生长,具有良好的纯净性。

### 2.6 免疫原性测定结果

免疫组家兔全部健活,其免疫保护率为 100%;对照组家兔全部死亡。死亡兔表现典型 RHD 症状及剖检特征,表明 RHDV DY 株具有较好的免疫原性。

## 3 小结与讨论

3.1 一步法 RT-PCR 方法,操作简单,能在 3 h 内检出 RHDV, 可实现对 RHD 疑似病料的快速诊断。

分离的 DY 株病毒能凝集人的 O 型血红细胞,血凝价为  $12 \log_2$ ,并可被 RHDV 抗血清抑制。据王云锋等报道,当血凝滴度在  $6 \log_2$  以上时,则可判为 RHD 阳性<sup>[10]</sup>。人工发病实验,复制出典型的病例,进一步确认为强毒感染。因此,我们认为该病料为 RHDV 感染。

3.2 以此病毒分离株制备的 RHD 灭活疫苗具备良好的免疫原性,其免疫保护率为 100%。本试验所分离的 RHDV DY 株为研制安全、高效的 RHD 疫苗奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] 殷震,刘景华. 动物病毒学第 2 版[M]. 北京:科学出版社, 1997:525-530.
- [2] 刘光清,张玉颖,云涛,等. 兔病毒性出血症病毒基因组 3' 端非编码区的分子克隆及生物信息学分析[J]. 西北农林科技大学学报, 2006, 34(3):16-25.
- [3] 杜念兴,徐为燕,刘胜江. 一种新病毒—兔出血症病毒的鉴定初报[J]. 病毒学报, 1986, 2(2):146-152.
- [4] Mitro S, Krauss H. Rabbit hemorrhagic disease: a review with special reference to its epizootiology[J]. Eur J Epidemiol, 1993, 9(1):70-78
- [5] Nowotny N, Ros Bascunana C, Ballagi-Pordany A, et al. Phylogenetic analysis of rabbit haemorrhagic disease and European brown hare Syndrome viruses by comparison of sequences from the capsid protein gene [J]. Arch Virol, 1997, 142(4):657-673.
- [6] Ohlinger V F, Hass B, Meyers G, et al. Identification and characterization of the virus causing rabbit hemorrhagic disease[J]. J Viral, 1990, 64(7):3331-3336.
- [7] 杨龙圣,薛家宾,王芳,等. 兔出血症发病概况及疫苗研究进展[J]. 江苏农业科学, 2007(2):144-147.
- [8] 刘胜江,薛华平,蒲伯清,等. 兔的一种新病毒病—兔病毒性出血症[J]. 畜牧与兽医, 1984(6):253-255.
- [9] 隋慧. 兔出血症病毒主要结构蛋白基因的克隆、原核表达及其免疫原性鉴定[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(5):76-78.
- [10] 王云峰. 家兔疾病诊疗技术[M]. 北京:中国农业出版社, 1999.

## 欧盟要求慎用抗生素兽药

欧盟委员会 9 月 11 日公布《关于谨慎使用抗菌类兽药的指南》,旨在预防滥用和误用抗生素兽药,致使病菌耐药性增加、抗感染药物无效。

欧盟委员会强调,抗生素药物在治疗感染性疾病方面发挥着至关重要的作用,但耐药性病原体的出现给人类和动物健康都带来了严重威胁。由于抗生素耐药性能够通过直接或间接接触在人类和动物之间传播,因此不管是欧盟内部还是全球范围内,都应加强人类用药和兽药行业之间协作,共同对抗生素耐药性问题。

欧盟委员会在当天发布的公报中指出,仅在欧洲,抗生素耐药性每年造成约 2.5 万例死亡,并带来超过 15 亿欧元的医疗保健费用和生产力损失。(信息来源:新华社)

# 胚胎培养液中能量底物对猪体细胞克隆胚胎体外培养的影响

周 荣<sup>1</sup>, 罗绿花<sup>1</sup>, 石俊松<sup>1</sup>, 李紫聪<sup>2</sup>, 王青来<sup>1</sup>, 蔡更元<sup>1</sup>, 吴珍芳<sup>1,2\*</sup>

( 1. 广东温氏食品集团股份有限公司, 国家生猪种业工程技术研究中心, 广东 云浮 527439;  
2. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642 )

**摘 要:** 如何根据猪胚胎发育的不同阶段合理使用不同成分的培养液, 建立高效的体细胞克隆胚胎体外培养体系。本研究把所获得的猪体细胞克隆胚胎用不同的培养液培养, 比较体外囊胚发育力和囊胚细胞数。结果表明: PZM-3 比 NCSU-23 更适用于克隆胚胎的培养; 培养前 4d 使用 PZM-3, 后 2d 更换含有葡萄糖的 NCSU-23, 可以提高胚胎的囊胚细胞数。说明胚胎在不同发育阶段对能量底物的需求不同, 合理利用可以有效提高胚胎发育力。

**关键词:** 猪; 体细胞核移植; 培养液; 能量底物

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)05-0028-04

## Effect of Energy Substrates in the Culture Medium on in Vitro Development of Porcine Somatic Cloned Embryos

Zhou Rong<sup>1</sup>, Luo Lvhua<sup>1</sup>, Shi Junsong<sup>1</sup>, Li Zicong<sup>2</sup>, Wang Qinlai<sup>1</sup>, Cai Gengyuan<sup>1</sup>, Wu Zhenfang<sup>1,2\*</sup>

( 1. Guangdong Wen's Food Group Co., Ltd, Notional Engineering Research Center for Breeding Swine Industry, Yunfu 527439, China; 2. South China Agricultural University, College of Animal Science, Guangzhou 510642, China )

**Abstract:** Using the culture medium reasonably according to the different stages of the pig embryonic development, An efficient system of somatic cell cloned embryos in vitro culture was established. In this study, the porcine SCNT embryos were cultured with different culture medium, then compare the blastocyst formation rate and cell number per blastocyst. Results showed that compared to NCSU-23, PZM-3 was better for the porcine SCNT embryos. The first 4d using PZM-3, then changed NCSU-23 containing glucose for another 2d, could improve the cell number of the blastocysts. The results showed that the demands for energy substrates were different depending on the developmental stage in pig embryos, rational using can improve the development of the embryos.

**Key words:** Pigsomatic cell nuclear transfer; culture medium; energy substrates

哺乳动物胚胎的体外培养对于体外受精、体细胞克隆、孤雌激活和单精注射等研究有很重要的作用。虽然体外培养也取得了一些成绩, 但体外培养条件仍然不能跟体内相比, 只能是不断改进不断优化<sup>[1]</sup>。其中, 胚胎培养液作为胚胎的营养物质来源, 对于其发育是至关重要的。在早期胚胎发育的不同阶段, 对能量底物的要求是不同的<sup>[2]</sup>。在猪中, 成功用于猪胚胎体外培养的培养液有 NCSU-23、NCSU-37、PZM-3、G2 等<sup>[3,4]</sup>。其中 NCSU-23 和 PZM 应用最广泛, NCSU-23 是为满足猪胚胎的新陈代谢和营养需求而设计的, PZM-3 是基于猪

输卵管液体组成, 再另外添加氨基酸<sup>[5]</sup>。已有相关研究表明<sup>[6,7]</sup>, PZM-3 比 NCSU-23 更支持胚胎发育至囊胚阶段。也有研究表明<sup>[8]</sup>, 丙酮酸 / 乳酸 (P/L) 是猪胚胎很重要的能量物质, 特别是早期胚胎发育, 而葡萄糖 (G) 对于胚胎的后期发育更加必要。所以很多研究进行了在后期更换 G 的实验, 但大都是以 NCSU-23 为基础培养液来研究的<sup>[8,9]</sup>。本研究首先探讨了在本实验室的培养体系下, 对比了 NCSU-23 和 PZM-3 对克隆胚胎发育的影响。然后试验以 PZM-3 为基础, 在后期更换含有 G 的胚胎培养液对胚胎发育的影响, 为猪胚胎的体外培养

收稿日期: 2015-06-01

\*: 通讯作者

基金项目: 创建肉鸡、肉猪种业国家工程技术研究中心能力建设(2012B07081006);

广东省家畜分子与细胞工程育种技术研究团队(2011A020102003)

提供参考方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

实验研究所用试剂未经特殊说明均购自SIGMA公司。胎牛血清(GIBCO),生理盐水(紫光古汉集团衡阳制药有限公司);细胞培养相关耗材为Corning公司产品;卵母细胞成熟及细胞、胚胎培养耗材为NUNC公司产品。洗卵液为DPBS+PVA液,操作液为无钙的H-NCSU-23,卵母细胞成熟培养液为添加体积分数10%猪卵泡液的TCM-199液。胚胎培养液有4种,分别为NCSU-23、PZM-3、(去掉P/L后)PZM+G、PZM-3+G培养液。

### 1.2 方法

**1.2.1 卵母细胞收集及体外成熟培养** 猪卵巢采自广州天河屠宰场。用剪刀去除输卵管等组织后将卵巢置于含抗生素的37℃生理盐水中,用保温瓶3h内运回实验室。用含抗生素的生理盐水冲洗3~5次后,用配有18G针头的10mL注射器抽取直径为2~6mm的卵泡,卵泡液置于37℃水浴保温的50mL离心管中。静置15~20min后去上清,洗卵液稀释后在体视显微镜下用自制捡卵针捡取胞质完整及包裹3层以上卵丘细胞的卵丘-卵母细胞复合体(Cumulus oocyte complexes, COCs)。用洗卵液冲洗3次,再用成熟培养液冲洗2次,然后放入已在二氧化碳培养箱内平衡4h以上的成熟培养液中。在39℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养42~44h。

**1.2.2 供体细胞培养** 采集莱芜猪耳样,经含有双抗的生理盐水冲洗,保存到含双抗的DMEM培养液中,用冰盒带回实验室。耳样在实验室制成细胞悬液,培养细胞,冷冻保存。在做核移植操作前1~2w,将供体细胞复苏培养。将传代至5~6代的成纤维细胞培养至100%汇合,再接触抑制2d后,常规消化,离心洗涤,最后用操作液将细胞沉淀重悬,用作核供体。

**1.2.3 体细胞核移植** 将成熟培养42~44h后的卵母细胞与1mg/mL透明质酸酶混合,用移液枪反复吹打除去卵丘细胞,以胞质均匀、第一极体排出为成熟标志挑选出成熟的卵母细胞,放到操作液滴中备用。采用盲吸去核法构建体细胞克隆胚胎:在显微操作仪用固定针将卵母细胞固定,去核针拨动使极体处于5点钟位置,用去核针把卵母细胞内的极体及附近1/3胞质去除并将体细胞注进透明带

内,使其与胞质紧密贴近。将构建好的重构胚恢复30min后做融合激活:先用融合激活液(0.25mmol/L Mannitol, 0.1mmol/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.1mmol/L MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.5mmol/L HEPES, 0.01% PVA(w/v))洗涤3~5次,再移到已铺满融合激活液的融合槽中,调整重构胚的位置使供体细胞与卵母细胞膜的接触面与电场方向垂直,进行电融合激活。电融合仪为BLS-150B,设置参数为:场强为80V, 80μs, 2DC,一次可同时操作15个左右卵母细胞。经过胚胎培养液PZM洗涤3遍后转移到添加5μg/mL CB+10μg/mL CHX的胚胎培养液PZM中辅助激活处理4h,再在体视镜下判定融合。

**1.2.4 囊胚细胞染色计数** 取出第6d的囊胚(图1),在含有3.7%多聚甲醛的DPBS中洗涤2遍后固定10min,将固定好的囊胚转移到含10μg/mL的Hoechst33342的DPBS中避光染色5min。将好的囊胚用操作液洗3遍,转移到载玻片上,尽量少带液体,用矿物油在载玻片的四角点四个柱,再轻轻压盖玻片(图2)。然后在Olympus荧光显微镜下紫外光激发下观察拍照(图3),细胞计数。

### 1.2.5 实验设计

实验一:对比不同培养液NCSU-23和PZM-3对SCNT胚胎体外发育的影响。将融合激活后的克隆胚胎用相应的胚胎培养液洗3遍后,放到已预平衡2h以上的PZM-3胚胎培养液四孔板中,每孔培养30~40个,在39℃,5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。培养第2d观察记录卵裂率和第6d观察囊胚形成率,并进行囊胚细胞染色计数。实验重复进行3次。

实验二:以应用效果较好的PZM-3为胚胎培养液,研究在培养第4d添加G对胚胎发育的影响。将融合激活后的克隆胚胎用PZM-3液洗3遍



图1 SCNT囊胚



图2 压片囊胚

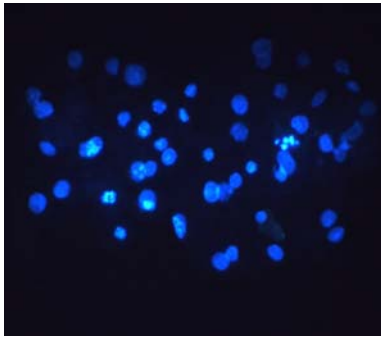


图3 囊胚染色计数

后,放到已预平衡 2 h 以上的 PZM-3 胚胎培养液四孔板中,每孔培养 30~40 个,在 39℃,5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养。在第 4 d 分别用 PZM+G、PZM-3+G、NCSU-23 洗 3 遍后,放到已预平衡 2 h 以上的相对应的胚胎培养液四孔板再培养 2 d。培养第 2 d 观察记录卵裂率和第 6 d 观察囊胚形成率,并进行囊胚细胞染色计数。实验重复进行 3 次。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同培养液 NCSU-23 和 PZM-3 对 SCNT 胚胎体外发育的影响

在同样的培养条件下,PZM-3 培养的胚胎卵裂率为 84.25%,囊胚率为 20%,细胞数为 32.2。NCSU-23 培养的胚胎卵裂率为 60.95%,囊胚率为 10.48%,细胞数为 22.67,两者之间的卵裂率、囊胚率差异显著 ( $P < 0.05$ ),但总细胞数之间的差异不显著 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 以应用效果较好的 PZM-3 为胚胎培养液,在培养第 4 天添加 G 对胚胎发育的影响

表 2 结果显示:在培养第 4 d 换成含有 G 的培养液后,(PZM-3 和 PZM+G)组与其他组相比,卵裂率和囊胚率显著降低 ( $P < 0.05$ ),囊胚细胞数与 PZM-3 对照组及 (PZM-3 和 NCSU-23)组之间差异显

表 1 NCSU-23 和 PZM-3 对 SCNT 胚胎体外发育的影响

培养液类别	培养个数	卵裂数(率%)	囊胚数(率%)	细胞数
PZM-3	105	82(84.25%) <sup>a</sup>	21(20%) <sup>a</sup>	32.2 <sup>a</sup>
NCSU-23	105	64(60.95%) <sup>b</sup>	11(10.48%) <sup>b</sup>	22.67 <sup>a</sup>

注:同列肩标相同小写字母者表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ),肩标不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ ),下同。

表 2 培养第 4d 换 G 对 SCNT 胚胎体外发育的影响

培养液类别	培养个数	卵裂数(率%)	囊胚数(率%)	囊胚细胞数
PZM-3	140	108(77.14%) <sup>a</sup>	22(15.71%) <sup>a</sup>	35.86 <sup>a</sup>
PZM-3 和 PZM-3+G	142	115(80.99%) <sup>a</sup>	24(16.9%) <sup>a</sup>	34.52 <sup>a,b</sup>
PZM-3 和 PZM+G	142	106(75.71%) <sup>a</sup>	5(3.57%) <sup>b</sup>	27.6 <sup>b</sup>
PZM-3 和 NCSU-23	140	122(87.14%) <sup>a</sup>	25(17.86%) <sup>a</sup>	37.46 <sup>a</sup>

著 ( $P < 0.05$ ),但与 (PZM-3 和 PZM-3+G)组之间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。(PZM-3 和 NCSU-23)组囊胚率为 17.86%,囊胚细胞数为 37.46,与另外两组相比,虽然没有统计学上的差异,但有相对有更好的趋势。

## 3 讨论

Yoshika 等<sup>[6]</sup>研究出 PZM-3 培养液,与 NCSU-23 相比,体内受精胚的囊胚率和细胞数都得到了提高;Im 等<sup>[7]</sup>研究发现 PZM-3 培养效果优于 NCSU-23;而潘登科等<sup>[4]</sup>发现在低氧环境时,NCSU-23 的培养效果与 PZM-3 无明显差异,但是 PZM-3 有更高的趋势。本研究采用 SCNT 胚胎,结果显示在低氧环境下,PZM-3 培养的胚胎与 NCSU-23 相比,可显著提高胚胎的卵裂率、囊胚率,但总细胞数之间差异不显著(但明显有更高的趋势)。说明 PZM-3 比 NCSU-23 更适合 SCNT 胚胎,可能是因为 PZM-3 以丙酮酸/乳酸做为能量底物,在胚胎发育的早期阶段更加有利。Flood MR 等<sup>[10]</sup>指出 8-细胞之前的胚胎不容易代谢葡萄糖,但在致密的桑椹胚和囊胚阶段可被大量利用,早期的糖酵解代谢产物有毒。所以理论上在胚胎发育早期用丙酮酸/乳酸作为能量底物,后期用葡萄糖可能更有利于猪胚胎的体外发育。

Kikuchi 等<sup>[8]</sup>以 NCSU-37 作为基础培养液,前 2 d 用丙酮酸/乳酸,后 4 d 用葡萄糖替代,显著提高了 IVF 胚的囊胚率和细胞数。Kim 等<sup>[9]</sup>用丙酮酸/乳酸直接替代葡萄糖用来培养 IVF 胚,可增加囊胚率和细胞数,也说明了丙酮酸/乳酸对早期胚胎发育的重要性。本研究中采用 SCNT 胚胎,前 4 d 用 PZM-3,后 2 d 直接另外添加 5.5 mM 葡



葡萄糖(PZM-3和PZM-3+G),两组之间没有差异。可能是因为两种能量物质都存在,胚胎代谢时没有优先利用而显示不出添加效果。Mihiro<sup>[3]</sup>利用孤雌胚胎,在48 h换液也得到了类似的结果。(PZM-3和PZM+G)组去掉原有的丙酮酸/乳酸,用葡萄糖替代,囊胚率显著降低,说明单纯改变葡萄糖浓度不可行,还应该考虑整个培养液组成体系的稳定性。本研究最后将NCSU-23和PZM-3两种常用培养液都用上,前4 d用PZM后2 d用NCSU-23(PZM-3和NCSU-23组),卵裂率和囊胚率之间没有差异,但是细胞数有所提高。结果体现出了葡萄糖的作用,可能是因为2种培养液都是猪常用的培养液,只是根据代谢需要不同,做了优化分配,从而提高了胚胎体外发育力。所以对于克隆胚胎的体外培养,可用此培养方法得到更多优质囊胚。

#### 参考文献:

- [1] Vajta G, Zhang Y, Machaty Z, et al. Somatic cell nuclear transfer in pig: recent achievements and further possibilities. *Reproduction, Fertility and Development*[J], 2007, 19: 403-423
- [2] Swain J E, Bormann C L, Krisher RL, et al. Development and viability of in vitro derived porcine blastocysts cultured in NCSU23 and G1.2/G2.2 sequential medium. *Theriogenology*[J]. 2001, 56: 459-469.
- [3] Mihiro S, Jibak L, Takashi M, et al. Demands for carbohydrates as major energy substrates depend on the preimplantation developmental stage in pig embryos: Differential use of fructose by parthenogenetic diploids before and after the 4-cell stage in the pig. *Journal of Reproduction and Development*[J]. 2015, 61: 106-1115.
- [4] 潘登科, 刘吉, 冯书堂, 等. 氧分压、培养基及生长因子对猪体细胞克隆胚胎体外发育的影响[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(4): 1186-1191.
- [5] Wang H F, Nelida R O, Jean M F, et al. Effects of culture media and inhibitors on biology of porcine early embryonic development in vitro [J]. *Livestock Science*, 2009: 102-107.
- [6] Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, et al. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium[J]. *Biol Reprod*, 2002; 66: 112-119.
- [7] Im G S, Lai L, Liu Z, et al. In vitro development of preimplantation porcine nuclear transfer embryos cultured in different media and gas atmospheres[J]. *Theriogenology*, 2004, 61: 1125-1135.
- [8] Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, et al. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified in vitro system[J]. *Biol Reprod*, 2002, 66: 1033-1041.
- [9] Kim H S, Lee G S, Hyuna S W, et al. Improved in vitro development of porcine embryos with different energy substrates and serum[J]. *Theriogenology*, 2004, 61: 1381-1393.
- [10] Flood M R, Wiebold J L. Glucose metabolism by preimplantation pig embryos[J]. *J Reprod Fertil*, 1988, 84: 7-12.

## 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

## 超声提取芒果叶中总黄酮的工艺研究

宋浩铭<sup>1</sup>, 容庭<sup>1,2</sup>, 刘志昌<sup>1,2</sup>, 李书宏<sup>1,2</sup>, 何伟灵<sup>1</sup>, 彭广辉<sup>1,2</sup>, 王刚<sup>1,2</sup>

(1. 广州五丰动物保健品有限公司, 广东 广州 510640; 2. 广东省农科院动物科学研究所 / 畜禽育种国家重点实验室 / 广东省动物育种与营养公共实验室 / 广东省畜禽育种与营养研究重点实验室, 广东 广州 510640)

**摘要:** 试验以广东粤西芒果叶为研究对象, 优化选择芒果叶中总黄酮的超声提取工艺。选择提取温度、超声功率和提取时间为自变量, 以芒果叶中总黄酮提取率为响应值, 采用响应曲面法分析优选最佳提取工艺。结果表明, 芒果叶中总黄酮提取的最佳工艺条件为: 提取温度 65℃, 超声波功率 90W, 提取时间 48min。在此条件下, 验证试验得到芒果叶中总黄酮的提取率为 5.26 ± 0.04%。优化选择提取工艺稳定、可行。

**关键词:** 芒果叶; 总黄酮; 超声提取; 响应曲面法

中图分类号: S853.73<sup>+</sup>1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2015)05-0032-05

## Ultrasound-assisted Extraction Technology of Flavonoids from *Mangifera Indica* Leaves

Song Haoming<sup>1</sup>, Rong Ting<sup>1,2</sup>, Liu Zhichang<sup>1,2</sup>, Li Shuhong<sup>1,2</sup>, He Weiling<sup>1</sup>, Peng Guanghui<sup>1,2</sup>, Wang Gang<sup>1,2</sup>

(1. Guangzhou Wufeng Animal Health Products Co. Ltd., Guangzhou 510640, China; 2. Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences / State Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding / Guangdong Public Laboratory of Animal Breeding and Nutrition / Guangdong Key Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** The experiment was conducted to optimize the ultrasound-assisted extraction of total flavonoids from Mango leaves. The parameters, including extraction temperature, ultrasound power and extraction time, on the yield of total flavonoids were optimized with response surface methodology. The results showed that, the optimal extraction conditions were as follows: extraction time 48 min, extraction temperature 65 °C and ultrasound power 90W. Under the optimized conditions, the extraction rate of flavonoids was 5.26%. These results indicated that the optimized process conditions were stable and practicable in manufacture.

**Key words:** *Mangifera indica* leaves; response surface analysis; ultrasound - assisted extraction; total flavonoids

芒果叶为漆树科植物芒果(*Mangifera indica*L.)的叶<sup>[1]</sup>。我国芒果主要分布在海南、广西、广东、云南、台湾和福建,在热带、亚热带地区著名出口水果中占有重要地位。芒果叶性味酸、甘、凉、平,具有平喘止咳祛痰、抗炎、镇痛,保肝利胆,抗脂质过氧化,抗菌抗病毒,抗肿瘤等作用,对中枢神经系统和心血管系统等疾病也都有明显疗效。还具有行气疏滞、祛瘀除积的功能<sup>[2,3]</sup>。芒果叶中含繁多复杂的化学成份,其中黄酮类化合物颇为丰富。研究证实,黄酮类化合物具有抗氧化、抗肿

瘤形成、抑制肿瘤生长及治疗心血管疾病等特殊功效,已成为新药研发的热点。黄酮类化合物传统的提取方法有煎煮法、回流提取法、索氏提取法等方法,但存在耗时、耗料、提取率低、有效成分易破坏等诸多缺点。超声波提取法不仅弥补传统方法中存在的缺点,且超声波产生的各种效应能够在不改变有效成分结构基础上,缩短提取时间,节约溶剂,提高提取率<sup>[4,5]</sup>。因此,本试验采用超声波提取法提取广东粤西芒果叶中总黄酮类化合物,运用响应曲面法分析各种提取因素,优化各提取条

收稿日期: 2015-07-07

基金项目: 广东省科技计划农业攻关项目(2012B020305010)

件,得出最佳工艺参数,为芒果叶中总黄酮类化合物的提取提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

芒果叶,采自广东茂名,经挑选、清洗,65℃烘干备用;芦丁标准品,购于国药集团化学试剂公司;乙醇,购于天津市大茂化学试剂厂。电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9140A型)、高速中药粉碎机(DF-20型)、数控超声波清洗器(KQ3200DE型)、循环水式真空泵(SHZ-0(III)型)、可见分光光度计(UV-1750型)、电子天平(AB-135S型)、电子天平(AL207型)、旋转蒸发器(RE-52A型)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 芦丁标准曲线的制作** 采用  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  显色法,以芦丁标准品为标准物,在420~700 nm 波长范围进行标准物全波长扫描,得出在510 nm 波长处吸光度有最大吸收值,故选用此波长测定芒果叶总黄酮的含量<sup>[6,7]</sup>;以芦丁样品浓度-吸光值作图,做线性回归,得芦丁浓度C和吸光值A的标准曲线线性回归方程: $A=11.515C+0.0366$  ( $R^2=0.99652$ ),其中A为吸光度,C为芦丁浓度(mg/mL)。

**1.2.2 芒果叶中总黄酮的提取与测定** 将已干燥的芒果叶粉碎,过100~120目筛,收集备用。称取3 g 粉末,置于250 mL 的圆底烧瓶,加入一定体积和浓度的乙醇,在不同超声功率与温度下超声提取一定时间。提取1次后,先常压蒸馏,大约蒸出1/3的溶剂;再减压蒸馏至近干,即得产品<sup>[6]</sup>。产品移置25 mL 容量瓶中,用体积分数60%乙醇定容,摇匀,放置15 min。参照  $\text{NaNO}_2\text{-Al}(\text{NO}_3)_3\text{-NaOH}$  显色法,在510 nm 处测定其吸光值,并根据标准曲线线性回归方程计算总黄酮量,计算提取率。计算公式为:

总黄酮提取率 (%) = 总黄酮质量 / 芒果叶重量 × 100%

**1.2.3 响应曲面法实验设计** <sup>[8,9]</sup> 在单因素试验的基础上,用Box-Behnken 响应面设计,以总黄酮提取率(Y)为响应值,选取提取温度(A)、超声功率(B)及提取时间(C)3个因素,采用三因素三水平的响应面分析法,试验因素与水平设计见表1。

**1.2.4 数据处理** 利用软件Design Expert8.0.6 软件中Box-behnken 进行处理与显著性分析。

## 2 结果与分析

表1 响应曲面试验因素水平表

因素	水平		
	-1	0	1
A、提取温度(℃)	50	60	70
B、超声功率(W)	60	90	120
C、提取时间(min)	30	45	60

### 2.1 响应曲面试验结果与方差分析

响应曲面试验设计方案与结果见表2。利用Design-Expert8.0.6 软件对试验数据进行二次多元回归拟合,得到芒果叶总黄酮提取率(Y)对温度(A)、超声功率(B)及提取时间(C)的二次多元回归方程: $Y=5.29-0.0025A-0.030B+0.020C+0.037AB+0.013 AC+0.012BC-0.22A^2-0.20B^2-0.063C^2$ 。模型方差分析结果如表3所示。

表2 响应曲面试验设计方案与结果

组别	A 温度(℃)	B 超声功率(W)	C 时间(min)	提取率(%)
1	60	90	45	5.25
2	60	60	30	5.03
3	60	120	60	5.06
4	60	90	45	5.28
5	60	90	45	5.31
6	50	90	30	5.04
7	70	90	60	5.00
8	70	120	45	4.89
9	50	120	45	4.83
10	60	60	60	5.13
11	60	90	45	5.30
12	50	90	60	4.97
13	50	60	45	4.93
14	60	90	45	5.33
15	60	120	30	4.91
16	70	90	30	5.02
17	70	60	45	4.84

由表3可知,模型P值=0.0006 ( $P<0.01$ ),表明该模型高度显著,芒果叶总黄酮的提取率差异高度显著 ( $P<0.01$ )。模型失拟(Lack of Fit)项 的差异不显著 ( $P=0.0562, P>0.05$ )。回归模型的相关系数  $R^2=0.9553$ ,表明该模型拟合度良好,模型调整确定系数  $R^2_{Adj}=0.8979$ ,表明该模型能够解释95.53%的响应值的变化。用该模型来分析和

表 3 响应曲面回归模型方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.45	9	0.049	16.63	0.0006	** <sup>1)</sup>
A	5.000E-005	1	5.000E-005	0.017	0.9005	
B	7.200E-003	1	7.200E-003	2.42	0.1637	
C	3.200E-003	1	3.200E-003	1.08	0.3341	
AB	5.625E-003	1	5.625E-003	1.89	0.2115	
AC	6.250E-004	1	6.250E-004	0.21	0.6606	
BC	6.250E-004	1	6.250E-004	0.21	0.6606	
A <sup>2</sup>	0.21	1	0.21	70.56	<0.0001	***
B <sup>2</sup>	0.17	1	0.17	55.64	0.0001	**
C <sup>2</sup>	0.017	1	0.017	5.66	0.0489	*
残差	0.021	7	2.974E-003	--	--	
失拟项	0.017	3	5.700E-003	6.13	0.0562	
纯误差	3.720E-003	4	9.300E-004	--	--	
总和	0.47	16				

1): \*\*\*P 值小于 0.0001, 为差异极显著; \*\*P 值小于 0.01, 为差异高度显著; \*P 值小于 0.05, 为差异显著。

预测超声提取芒果叶中总黄酮的效果是可行的。从方差分析结果可看出, 二次项 A<sup>2</sup>、B<sup>2</sup>、C<sup>2</sup> 对芒果叶总黄酮的提取率的影响是显著的, 一次项 A、B、C 及交互项 AB、AC、BC 对芒果叶中总黄酮提取率的影响不显著。因此, 各因素对芒果叶中总黄酮提取率的影响主次顺序为: B(超声功率) > C(提取时间) > A(提取温度)。

## 2.2 响应曲面的分析与优化

利用软件 Design Expert 8.0.6 软件对表 3 数据进行二次多元回归拟合, 得到二次回归方程的响应曲面及其等高线图见图 1、图 2 和图 3。3 组图直观反映了各因素对响应值的影响。响应曲面图可反映各因素的交互作用对响应值的影响, 等高线的形状可反映交互作用的强弱, 圆形表示两因素交互作用不显著, 椭圆形则表示两因素交互作用显著。

从图 1 中响应曲面图 1(a) 可知, 当超声功率一定时, 芒果叶中总黄酮提取率随着温度的升高先增大后减小; 当温度一定时, 总黄酮提取率随着超声功率的增大而增大, 随后逐渐下降。从图 1(b) 等高线图可知, 沿超声功率方向峰值移动, 等高线密度大于沿温度方向, 表明超声功率对效应值的贡献更大, 所得结论均与方差分析结果相一致。

从图 2 中响应曲面图 2(a) 可以看出, 在一定提取的时间, 芒果叶中总黄酮提取率随着提取温度增大而增大, 随后逐渐下降; 随着提取时间的由小变大, 总黄酮提取率变化不明显。从图 2(b) 等高线图可知, 沿提取时间方向峰值或提取温度方向峰值移动, 其等高线密度均相似, 较稀疏, 表明两者交互作用对总黄酮提取率的影响不明显。

从图 3 中响应曲面图 3(a) 可看出, 在一定提取的时间, 芒果叶中总黄酮提取率随着提取温度增大而增大, 随后逐渐下降; 随着提取时间的由小变大, 总黄酮提取率变化不明显。从图 3(b) 等高线图可知, 沿超声功率方向峰值移动, 其等高线密度略大于沿提取时间方向, 但两都等高线密度较稀疏, 表明两者交互作用对总黄酮提取率的影响不明显。

## 2.3 条件优化、预测与验证

通过软件求解回归方程, 得出最佳提取工艺条件为: 提取温度 65.49℃、超声波功率 89.56 W、提取时间 48.19 min, 预测提取率为 5.22%。考虑到实际的可操作性, 将优化工艺条件修正为: 温度 65℃、超声波功率 90 W、时间 48 min。在此条件下进行 5 次平行实验, 试验结果见表 4。由此可知, 检测结果与预测值较相近, 得到的最佳优化工艺

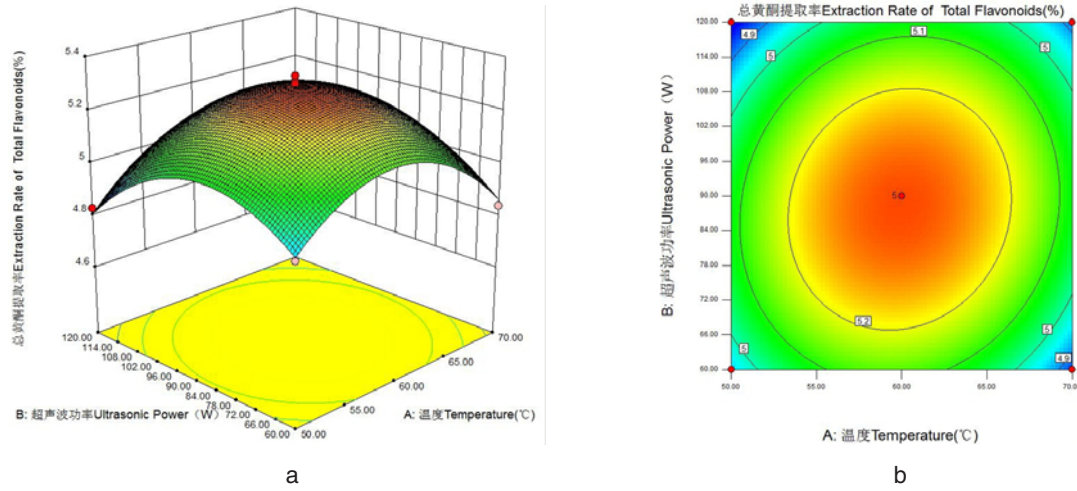


图1 温度与超声功率对芒果叶中总黄酮提取率影响的响应曲面图(a)和等高线图(b)

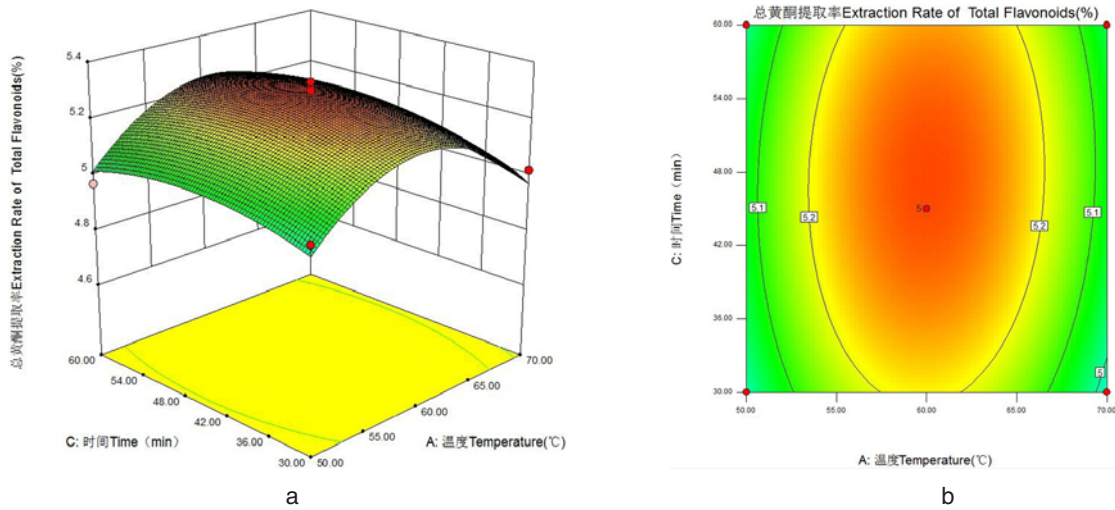


图2 温度与提取时间对芒果叶中总黄酮提取率影响的响应曲面图(a)和等高线图(b)

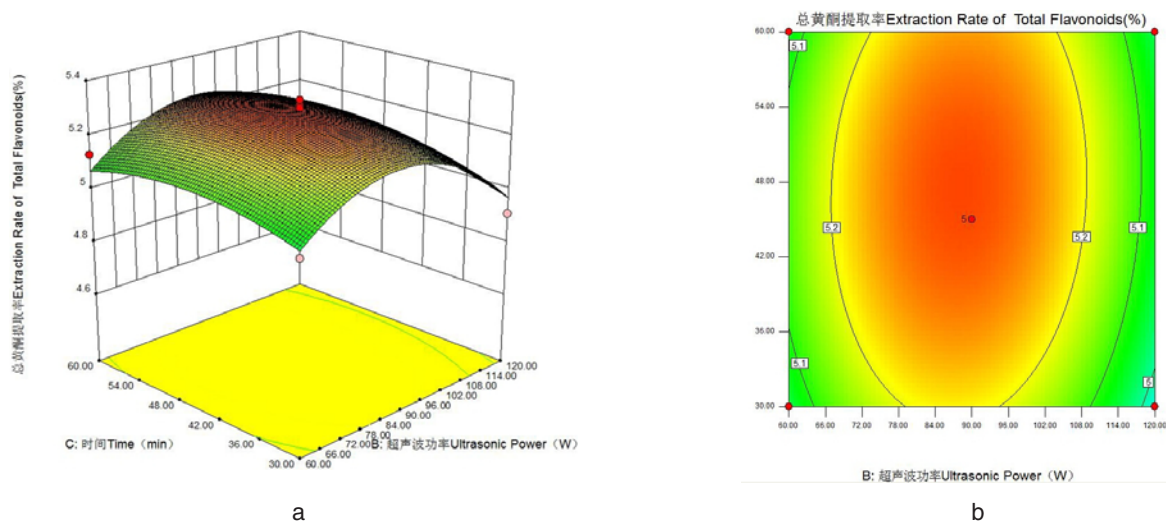


图3 超声波功率与提取时间对芒果叶中总黄酮提取率影响的响应曲面图(a)和等高线图(b)

表 4 验证实验结果

组别	1	2	3	4	5	平均 <sup>1)</sup>
提取率(%)	5.31	5.24	5.28	5.25	5.20	5.26±0.04

1):结果以“平均数±标准差”表示。

可靠,具有一定的使用与参考价值。

### 3 讨论

总黄酮类化合物的传统提取方法有煎煮法、回流提取法、索氏提取法、浸渍法、渗漉法、水蒸汽蒸馏法,但存在耗时、耗料、提取率低、有效成分易破坏等诸多缺点。超声提取法作为一种新型的提取方法,有诸多优点,可大大缩短提取时间、节约溶剂,提高提取率<sup>[4,5]</sup>。超声提取法多见于植物有效成分提取,如张青等、林燕如等和王帅等均采用超声提取法分别提取芒果叶中的芒果苷、芒果叶中的多糖和小花棘豆总黄酮<sup>[10-12]</sup>。目前国内有关超声提取芒果叶中总黄酮类化合物的报道较少。仅见黄锁义等、唐玉莲等、邱贺缓等及谢三都等文献报道<sup>[13-16]</sup>。谢三都等采用4种提取方法提取芒果叶中总黄酮类化合物,发现微波提取法优于水提取法、乙醇回流提取法及索氏提取法。该方法得到的提取率为6.50%,高于本试验采用超声提取法得到的提取率(5.26%),原因可能是芒果叶来源、提取次数、试验方法等不同造成的差异。

本试验采用超声提取法提取芒果叶中的总黄酮化合物,运用响应曲面法分析优化提取工艺条件,得出最佳工艺条件,工艺稳定、可行,这与张青等<sup>[10]</sup>采用的提取与分析方法相一致,结果均高于采用传统提取方法得到的总黄酮化合物提取率。响应曲面优化试验设计中选用的因素与水平越多,试验数据越可靠,最佳因素水平组合越易筛选得到。张青等试验中采用四因素四水平的响应曲面分析法,得出部分组合的交互作用影响差异显著;而本试验采用三因素三水平的响应曲面分析法,得到组合的交互作用影响差异均不显著。但所选出来的最佳因素组合,经验证试验表明,提取得到的总黄酮提取率与预测值较为相近。因此,在单

因素试验的基础上,响应曲面优化试验设计中所选择因素越多,得到的工艺条件越可靠,试验数据越真实。

### 4 结论

芒果叶中总黄酮提取的最佳工艺条件为:提取温度65℃,超声波功率90W,提取时间48min。在此条件下,验证试验得到芒果叶中总黄酮的提取率为5.26±0.04%。提取工艺稳定、可行。

### 参考文献:

- [1] 江苏新医学院. 中药大辞典(上册)[M]. 上海:上海人民出版社, 1977:1040.
- [2] 广西中医学院芒果叶研究小组. 芒果叶治疗慢性气管炎的药理实验及临床疗效观察[J]. 中医教学, 1974(2/3):38.
- [3] 邓家刚, 郑作文, 曾春晖. 芒果苷的药效学实验研究[J]. 中医药学刊, 2002, 20(6):37.
- [4] 吴素仪, 丘泰球, 范晓丹. 超声波在中草药有效成分提取应用中的研究进展[J]. 江苏中医药, 2008, 40(7):93-94.
- [5] 万水昌, 王志祥, 乐龙, 等. 超声提取技术在中药及天然产物提取中的应用[J]. 西北药学杂志, 2008, 23(1):60-62.
- [6] 刘文丽, 于鲁海, 马燕. 紫外分光光度法在黄酮类化合物含量测定中的应用[J]. 新疆中医药, 2006, 24(3):85-86.
- [7] 王宁, 李远志, 徐莉珍, 等. 超声波法提取柿叶总黄酮的工艺研究[J]. 现代食品科技, 2008, 24(7):687-691.
- [8] Zhang Qingan, Zhang Zhiqi, Yue Xuanfeng, et al. Response surface optimization of ultrasound-assisted oil extraction from autoclaved almond powder[J]. Food Chem, 2009, 116(2):513-518.
- [9] 崔恩惠, 方亮, 吴文龙, 等. 响应曲面法优化超声辅助提取黑莓种子油工艺[J]. 食品科学, 2012, 33(4):26-30.
- [10] 张青, 王志祥, 宋立丹, 等. 响应曲面法优化超声提取芒果叶中芒果苷的工艺研究[J]. 西北药学杂志, 2014, 29(3):237-241.
- [11] 林燕如, 陈宜菲, 陈樱. 正交试验优化芒果叶多糖的提取工艺[J]. 韩山师范学院学报, 2014, 25(3):56-60.
- [12] 王帅, 陈根元, 蒋慧小, 等. 花棘豆总黄酮体内抗氧化作用的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(10):133-136.
- [13] 黄锁义, 黎海妮, 唐玉莲. 超声波提取芒果叶总黄酮[J]. 中国现代应用药学杂志, 2006, 23(6):455-456.
- [14] 唐玉莲, 黎海妮, 刘海花, 等. 芒果叶中总黄酮的提取及含量测定[J]. 右江民族医学院学报, 2006, 28(1):8-10.
- [15] 邱贺缓, 林慕喜, 王燕纯. 超声波辅助提取芒果叶总黄酮的工艺研究[J]. 广东农业科学, 2011(3):80-86.
- [16] 谢三都, 郑生煊, 罗晓清. 芒果叶黄酮类化合物提取工艺及抑菌效果的研究[J]. 热带作物学报, 2012, 33(12):2257-2261.

# 鸭坦布苏病毒一步 RT-PCR 检测方法的建立与初步应用

祖立闯<sup>1</sup>, 李 娇<sup>1</sup>, 高 鹏<sup>2</sup>, 王金良<sup>3</sup>, 王文秀<sup>3</sup>, 沈志强<sup>1,3\*</sup>

(1. 山东绿都生物科技有限公司, 山东 滨州 256600; 2. 滨州市科学技术局, 山东 滨州 256600; 3. 山东省滨州畜牧兽医研究院, 山东 滨州 256600)

**摘要:** 为建立一种鸭坦布苏病毒 (DTV) 快速检测方法, 根据 GenBank 上 DTV 基因组序列, 设计 1 对特异性检测引物, 建立了 DTV 一步 RT-PCR 检测方法。该方法检测基因 A 型鸭甲肝病毒、基因 C 型鸭甲肝病毒、新城疫病毒、H<sub>9</sub> 亚型禽流感病毒、鸭瘟病毒、减蛋综合征病毒均为阴性。检测的敏感性达 3.78 pg RNA。DTV 一步 RT-PCR 检测方法特异性好、敏感性高、重复性好, 可用于 DTV 的分子流行病学调查和临床疾病诊断。

**关键词:** 鸭坦布苏病毒; 一步 RT-PCR; 检测方法

**中图分类号:** S858.32

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2015)05-0037-04

## One Step RT-PCR Detection Method for Duck Tembusu Virus

Zu Lichuang<sup>1</sup>, Li Jiao<sup>1</sup>, Gao Peng<sup>2</sup>, Wang Jinliang<sup>3</sup>, Wang Wenxiu<sup>3</sup>, Shen Zhiqiang<sup>1,3\*</sup>

(1. Shandong Lvdu Bio-Sciences and Technology Co.Ltd., Binzhou 256600, China; 2. Binzhou Science and Technology Bureau, Binzhou 256600, China; 3. Shandong Binzhou Anima Science and Veterinary Medicine Academy, Binzhou 256600, China)

**Abstract:** To establish a rapid detection method of duck tembusu virus (DTV), a pair of specific primers was designed based on DTV gene sequence in GenBank. The specificity was certified by checking DHAV-A, DHAV-C, NDV, DEV, EDSV, AIV-H9 with negative results. The sensitivity was 3.78 pg of RNA. The established one step RT-PCR detection method had good specificity, reproducibility, and high sensitivity. It will be used for duck tembusu virus molecular epidemiology investigation and clinical disease diagnosis.

**Key words:** Duck tembusu virus; one step RT-PCR; detection method

鸭坦布苏病毒病 (Duck Tembusu Virus Disease, DTVD) 是危害养鸭业的重要病毒性传染病, 致病原为鸭坦布苏病毒 (Duck Tembusu Virus, DTV)<sup>[1]</sup>。DTVD 最早发现于 2010 年 4 月, 在我国养鸭业比较发达的福建、浙江、江苏、山东、河北等地区都有病鸭感染发病。该病发病率高, 传播迅速。感染发病鸭主要以产蛋急剧下降为临床特征, 伴发出血性卵巢炎等病理变化, 给我国养鸭业带来了严重的经济损失<sup>[2-5]</sup>。由于其他一些病毒感染导致的疾病症状与 DTVD 十分相似, 通过常规的临床症状、病理变

化观察很难给 DTVD 做出诊断。而借助分子生物学 PCR 检测方法可以快速、准确的做出诊断, 是疾病诊断的首选方法<sup>[6]</sup>。本研究建立了一种 DTV 核酸的快速一步 RT-PCR 检测方法。该方法有很好的特异性、敏感性和重复性。现报告如下:

### 1 材料和方法

#### 1.1 病毒与菌株

鸭坦布苏病毒 (DTV)、基因 A 型鸭甲肝病毒 (DHAV-A)、基因 C 型鸭甲肝病毒 (DHAV-C)、新城疫病毒 (NDV)、鸭瘟病毒 (DEV)、减蛋综合征病毒

收稿日期: 2015-07-15

\*: 通讯作者

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金资助项目 (BS2011SW026)

(EDSV)、H<sub>9</sub> 亚型禽流感病毒 (AIV-H<sub>9</sub>)、克隆菌株 DH5 $\alpha$  均由山东省滨州预防兽医学与动物生物技术重点开放实验室保存。

## 1.2 主要试剂

一步法 RT-PCR 检测试剂盒、EcoR I 和 Hind III 内切酶均购自宝生物工程(大连)有限公司;病毒基因组 RNA/DNA 提取试剂盒为 AXYGEN 公司产品;DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。

## 1.3 引物设计与合成

根据 Genbank 中已发表的 DTV 基因组序列 (HQ641390.1), 利用生物学软件设计合成 1 对特异性检测引物, P1: 5'-GGAAGCGAGCACCTACCAC-3'; P2: 5'-TGGAGGGCTCCTTCTGTG-3'。预期扩增片段大小为 348 bp。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

## 1.4 病毒基因组 RNA 的提取

取保存的 DTV 病毒液 200  $\mu$ L, 按照病毒基因组 RNA/DNA 提取试剂盒使用说明书提取病毒基因组 RNA; 利用紫外分光光度计测定病毒基因组 RNA 含量为 3.78 ng/ $\mu$ L。

## 1.5 一步 RT-PCR 反应条件的优化

**1.5.1 最适引物含量的确立** 在一步 RT-PCR 反应体系中分别加入上下游引物 (20 mol/L) 各 0.1  $\mu$ L、0.3  $\mu$ L、0.5  $\mu$ L、0.7  $\mu$ L、0.9  $\mu$ L、1.1  $\mu$ L, 保持其它反应条件不变, 进行一步 RT-PCR 扩增; 对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 确定最佳引物含量。

**1.5.2 最适退火温度的确立** 一步 RT-PCR 反应的退火温度分别选取 52 $^{\circ}$ C、54 $^{\circ}$ C、56 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C; 对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 确定最佳退火温度。

根据上述试验确定的最适引物含量为 10  $\mu$ mol, 最适退火温度为 56 $^{\circ}$ C。确定一步 RT-PCR 反应体系为: 2 $\times$ one Step Buffer 12.5  $\mu$ L、PrimeScript 1 Step Enzyme Mix 0.5  $\mu$ L、上下游引物 P1、P2 (20  $\mu$ mol/ $\mu$ L) 各 0.5  $\mu$ L、RNA 10  $\mu$ L, 加水至 25  $\mu$ L。一步 RT-PCR 反应条件为: 50 $^{\circ}$ C 45 min; 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45s, 56 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min; 4 $^{\circ}$ C 终止反应。

## 1.6 扩增产物的检测及鉴定

按照上述最优 RT-PCR 反应条件进行一步

RT-PCR 反应; 取扩增产物 5  $\mu$ L 进行琼脂糖凝胶电泳, 切下目的条带, 用 DNA 凝胶回收试剂盒回收目的片段; 回收产物与 pMD18-T 克隆载体 4 $^{\circ}$ C 过夜连接; 连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 平皿倒置培养 12 h 后, 挑取单菌落接种液体 LB 增菌培养; 用质粒提取试剂盒提取质粒, 经 EcoR I 和 Hind III 双酶切鉴定得到阳性克隆, 送生工生物工程(上海)有限公司进行测序鉴定。

## 1.7 一步 RT-PCR 特异性试验

分别提取 DTV、DHAV-A、DHAV-C、NDV、AIV-H<sub>9</sub> 的 RNA、DEV、EDSV 的 DNA, 用已建立的方法进行检测。

## 1.8 一步 RT-PCR 敏感性试验

将提取的 DTV 病毒基因组 RNA 利用紫外分光光度计测定病毒基因组含量为 3.78 ng/ $\mu$ L。将 RNA 10 倍梯度稀释, 稀释到 10<sup>-5</sup>; 取原液 RNA (10<sup>0</sup>) 及 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup> 倍稀释的 RNA, 按照前述的反应条件进行一步 RT-PCR 扩增。经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果, 确定其检测的灵敏度。

## 1.9 一步 RT-PCR 重复性试验

用建立的一步 RT-PCR 检测方法, 分别对 DTV、DHAV-A、DHAV-C、NDV、AIV-H<sub>9</sub>、DEV、EDSV 以及 DTV 阳性样品 3 份和阴性样品 3 份重复检测 3 次, 以验证本方法的重复性和稳定性。

## 1.10 临床应用检测

取现地送检病鸭的卵泡膜、肝脏、脾脏组织病料等组织样品共计 15 份, 利用建立的一步 RT-PCR 检测方法检测; 阳性扩增产物全部送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序鉴定, 验证该检测方法的准确性。

## 2 结果与分析

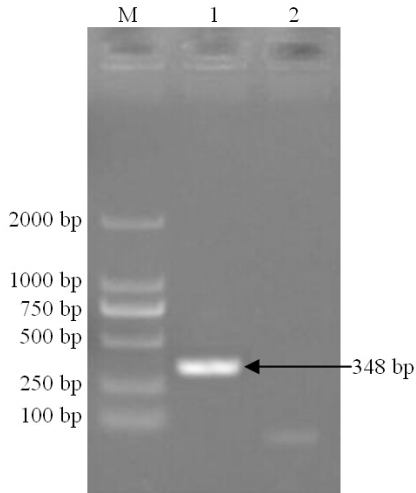
### 2.1 扩增产物的检测及鉴定

RT-PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 在位于 348 bp 处出现特异性扩增条带, 与预期大小相符(图 1)。RT-PCR 扩增产物连接到 pMD18-T 克隆载体上, 利用 EcoR I 和 Hind III 双酶切鉴定提取的重组质粒, 结果如图 2 所示。取双酶切鉴定正确的克隆送生工生物工程(上海)有限公司进行测序, 测序结果均为 DTV 特异性核酸片段。

### 2.2 特异性试验结果

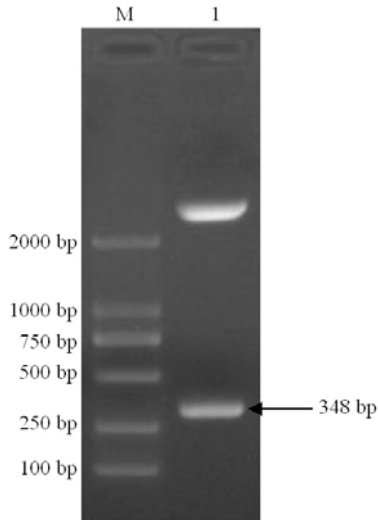
如图 3 所示, DTV 扩增出了 348 bp 的目的基因片段; DHAV-A、DHAV-C、NDV、AIV-H<sub>9</sub>、DEV、EDSV 扩增结果均为阴性。该检测方法有很好的特异性。





M: DL 2000Marker; 1: DTV; 2: 水对照

图 1 一步 RT-PCR 扩增结果



M: DL2000 Marker; 1: RT-PCR 产物连接 T 载体的 EcoR I/Hind III 酶切

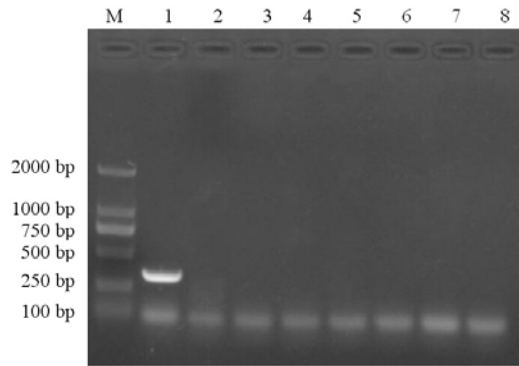
图 2 RT-PCR 扩增产物连接 T 载体的双酶切鉴定

### 2.3 敏感性试验结果

取原液 RNA ( $10^0$ ) 及  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  倍稀释的 RNA 进行一步 RT-PCR 扩增, RNA 模板浓度由高到低分别为 3.78 ng/ $\mu$ L、 $3.78 \times 10^{-1}$  ng/ $\mu$ L、 $3.78 \times 10^{-2}$  ng/ $\mu$ L、 $3.78 \times 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L、 $3.78 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ L、 $3.78 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L, 即模板含量分别为 37.8 ng、3.78 ng、0.378 ng、37.8 pg、3.78 pg、0.378 pg。经 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果如图 4 所示, DTV 最低检出量为 3.78 pg。

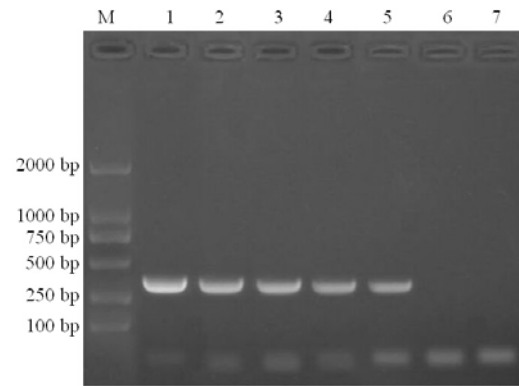
### 2.4 重复性试验结果

经过 3 次重复操作, DTV 及 3 份阳性样品的



M: DL 2000 Marker; 1: DTV; 2: DHAV-A; 3: DHAV-C; 4: NDV; 5: AIV-H9; 6: DEV; 7: EDSV; 8: 水对照

图 3 特异性试验结果



M: DL 2000 Marker; 1: 37.8ng RNA; 2: 3.78ng RNA; 3: 0.378ng RNA; 4: 37.8pg RNA; 5: 3.78pg RNA; 6: 0.378pg RNA; 7: 水对照

图 4 敏感性试验结果

检测结果仍为阳性; DHAV-A、DHAV-C、NDV、AIV-H<sub>9</sub>、DEV、EDSV 及 3 份 DTV 阴性样品的检测结果仍为阴性。说明该检测方法有很好的重复性。

### 2.5 临床应用检测结果

取现地送检病鸭的 15 份病料进行一步 RT-PCR 检测, 检出阳性样品 7 份, 阳性率 46.67%。阳性扩增产物全部送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序鉴定, 测序结果均为 DTV 特异性核酸片段。说明该检测方法有很好的准确性, 可以用于 DTV 的分子流行病学调查和临床疾病诊断。

## 3 讨论

加强 DTV 诊断技术的研究对预防和控制该病具有十分重要的意义。近年来有许多新的检测技术应用到 DTV 的检测中。施少华等<sup>[7]</sup>以制备的 DTV 单克隆抗体致敏乳胶, 建立了检测 DTV 抗原的乳

胶凝集方法,适用于基层应用。董嘉文等<sup>[8]</sup>以 DTV 的 E 基因设计 1 套 LAMP 引物,建立 RT-LAMP 病原检测方法。该方法检测最低 RNA 量为 7.8 copies,具有很好的敏感性和特异性,适用于早期感染的诊断和疫情监测。袁朋等<sup>[9]</sup>设计制备 DTV 竞争模板并以其为定量内标物建立竞争定量 PCR (QC-PCR) 体系。该体系特异性强,灵敏性高,竞争模板和目标模板可在 400 个分子 / μL 的水平上共扩增。临床应用结果表明,建立的体系能够满足简单快速确定病毒含量的要求。

本研究建立的 DTV 一步 RT-PCR 检测方法使用病毒基因组提取试剂盒和一步法 RT-PCR 扩增试剂盒,虽然增加了检测成本,但建立的检测方法更加敏感、特异、准确,操作更加简单,检测更加快速,适用于临床病例的早期快速诊断,也适用于 DTV 的分子流行病学调查和临床疾病诊断。

**参考文献:**

[1] 祖立闯, 苗立中, 王艳, 等. 鸭混合感染病例中鸭坦布苏病毒

的分离鉴定与 E 基因序列分析[J]. 中国兽医学报, 2015, 35 (4):553-557.

[2] 滕巧洪, 颜丕熙, 张旭, 等. 一种新的黄病毒导致蛋鸭产蛋下降及死亡[J]. 中国动物传染病学报, 2010, 18(6):1-4.

[3] Yan P, Zhao Y, Zhang X, et al. An infectious disease of ducks caused by a newly emerged Tembusu virus strain in mainland China[J]. *Virology*, 2011, 417(1):1-8.

[4] Yun T, Zhang D, Ma X, et al. Complete genome sequence of a novel flavivirus, duck tembusu virus, isolated from ducks and geese in china [J]. *J Virol*, 2012, 86 (6):3406-3407.

[5] 周念, 戴怡雪, 丁玲玲, 等. 鸭坦布苏病毒 SC2013 株的分离鉴定[J]. 江苏畜牧兽医杂志, 2015(2):17-19.

[6] 张艳芳, 谢芝勋, 谢丽基, 等. 鸭坦布苏病毒与鸭瘟病毒二重 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 南方农业学报, 2014(2):314-317.

[7] 施少华, 万春和, 傅光华, 等. 检测鸭坦布苏病毒乳胶凝集试验的建立及初步应用[J]. 福建农业学报, 2014, 29(4):306-309.

[8] 董嘉文, 孙敏华, 李林林, 等. 实时荧光技术在鸭坦布苏病毒 RT-LAMP 检测方法中的应用[J]. 广东农业科学, 2015 (1): 109-112.

[9] 袁朋, 王斌, 许传田, 等. 鸭坦布苏病毒竞争定量 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 山东农业科学, 2015, 47(3):113-117.

(上接第 17 页)

粮中添加胍基乙酸会导致甲基需要量的增加。胍基乙酸甲基化形成肌酸所需要的甲基主要来源于 S-腺嘌呤核苷蛋氨酸 (ASM), 而不是和其他甲基化反应的联合<sup>[8]</sup>。因此,在饲料中额外添加蛋氨酸会取得更好的效果。

**3.2 胍基乙酸对体型的影响**

体长、体高、腿臀围、腹围和胸围等数据是衡量上市育肥猪体型的有利指标。从试验中看出,在日粮中添加胍基乙酸可显著改善育肥猪的体型。因磷酸肌酸在脂肪组织中含量甚微,而在肌肉和神经组织中广泛存在,是动物肌肉组织中主要的能量供应物质。额外添加胍基乙酸,促使能量向肌肉组织中转移和分配,减少线粒体的自由基产生,降低肌肉中乳酸和自由基含量,从而改善动物体型,提高肉色肉质。

**参考文献:**

[1] Ringel J, Lemme A, Araujo L F. The effect of supplemental guanidine acetic acid in Brazilian type broiler diets at summer conditions[J]. *Poultry Sci*, 2008, 87:154.

[2] Lemme A, Ringel J, Sterk A, et al. Supplemental guanidino

acetic acid affects energy metabolism of broilers[M]. Proc. XVI Eur. Symp. Poultry Nutrition, Strasbourg, France, 2007:339-342.

[3] Michiels J, Maertens L, Buyse J. Supplementation of guanidinoacetic acid to broiler diets: effects on performance, carcass characteristics, meat quality, and energy metabolism[J]. *Poultry Sci*, 2012, 91:402-412.

[4] Ringel J, Lemme A, Araujo L F. The effect of supplemental guanidine acetic acid in Brazilian type broiler diets at summer conditions[J]. *Poultry Sci*, 2008, 87 (Suppl. 1):154.

[5] 王连生, 石宝明, 张德福, 等. 胍基乙酸对生长育肥猪生产性能、肉品质及血清生化参数的影响[A], 第六次全国饲料营养学术研讨会论文集[C], 2010.

[6] Young J F, Benram H C, Theil P K, et al. In vitro and vivo studies on creatine monohydrate supplementation to duroc and Landrace pigs [J]. *Meat Science*, 2007, 76:342-351.

[7] Stead L M, Brosnan J T, Brosnan M E, et al. Is it time to reevaluate methylation balance in humans[J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 83(1):5-10.

[8] Stead L M, AU K P, Jacobs R L, et al. Methylation demand and homocysteine metabolism: effects of dietary provision of creatine and guanidinoacetate[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001, 281(5):1095-1100.

## 狂犬病病毒 RT-PCR 检测方法的建立

周萍<sup>1</sup>, 吴晓薇<sup>2</sup>, 洪洁心<sup>2</sup>, 刘志玲<sup>2</sup>, 高志强<sup>3</sup>, 郭雪峰<sup>4\*</sup>

(1. 浙江省慈溪市崇寿镇人民政府, 浙江 慈溪 315334; 2. 广东出入境检验检疫技术中心, 广东 广州 510623; 3. 北京检验检疫技术中心, 北京 100000; 4. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 为建立一种检测狂犬病病毒的方法, 根据 Gen Bank 已公布的狂犬病病毒核蛋白 N 基因序列, 设计并合成一对特异性的引物, 以兽用疫苗株 HEP-Flury 为阳性毒株建立了 RT-PCR 检测方法。对建立的 RT-PCR 方法做灵敏度、特异性、重复性及稳定性试验, 结果显示该方法的灵敏度可以达到 20 FFU/mL, 可以将狂犬病病毒与犬瘟热病毒和犬细小病毒区别开来。该方法重复性好, 稳定可靠。

**关键词:** 狂犬病病毒; N 蛋白基因; RT-PCR; 检测方法

**中图分类号:** S852.65<sup>5</sup>

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2015)05-0041-06

## Method of RT-PCR for Detection of Rabies Virus

Zhou Ping<sup>1</sup>, Wu Xiaowei<sup>2</sup>, Hong Jiexing<sup>2</sup>, Liu Zhiling<sup>2</sup>, Gao Zhiqiang<sup>3</sup>, Guo Xiaofeng<sup>4\*</sup>

(1. the People's Government of Zhejiang Cixi City Chongshou district, Cixi 315334, China; 2. Technical Centre of Guangdong Entry -exit Inspection & Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China; 3. Beijing Entry-exit Inspection & Quarantine Bureau, Beijing 100000, China; 4. College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** To establish the method of RT-PCR for detection of Rabies virus, a pair of primers were designed based on nucleoprotein sequences of Rabies virus that published in GenBank. RNA extracted from Rabies virus vaccine HEP-Flury was as standard positive control. The results showed that the method could distinguish Rabies virus from canine distemper virus, canine parvovirus. The sensitivity could attained 20 FFU/mL and the stability was good.

**Key words:** Rabies Virus; Nucleoprotein gene; RT-PCR; detection method

狂犬病是人类最古老的疾病之一,也是当前世界上流行最广、危害最严重的人畜共患病。它是由狂犬病病毒(Rabies Virus, RV)引起的人和多种动物的神经系统性疾病。该病毒能感染几乎所有的温血动物,人感染后几乎 100%死亡。全球每年死于狂犬病人数约有 6 万余人,其中 90%在亚洲。在我国,由于近年城市宠物热不断升温,农村肉狗饲养量逐渐增加,从 1998 年起人狂犬病发病率呈上升趋势,狂犬病死亡率居我国 37 种法定报告传染病首位。

用于狂犬病病毒检测的经典方法为中和试验和免疫荧光试验。中和试验首先由 Webster 和

Dawson 建立,其基础是敏感乳鼠或小鼠。该方法的特点就是特异性较好,但实验操作费力、费时(需 3 周)。荧光抗体试验(FAT)是 WHO 和 OIE 共同推荐的方法,也是我国的国标。该方法自 1950 年建立以来,在全球范围内广泛应用。对于新鲜病料,FAT 可在几小时内得出可靠结果,准确率达 95%。但活体动物唾液或眼分泌物病毒的检测,中和试验和荧光抗体试验均不是最佳方法。本研究旨在建立一种快速、敏感、特异的 RT-PCR 方法,既可用于动物尸体病料也可用于动物活体病料的病毒检测。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

收稿日期:2015-07-28

\*:通讯作者

基金项目:国家质检总局科技计划项目(2012IK005)

**1.1.1 病毒** 狂犬病病毒 Hep-flury 疫苗株、SN10 株、GIN2 株、L16 株、SN 株由华南农业大学兽医微生物教研室保存。犬二联苗(含犬细小病毒、犬瘟热病毒)为英特威公司产品。

**1.1.2 工具酶及抗体** Trizol 购自 Invitrogen 公司。反转录酶 Ace、RNase inhibitor 和 Premix Taq 购自 TAKARA 公司。荧光素标记的抗 N 抗体购自卫生部武汉生物制品研究所。

## 1.2 方法

**1.2.1 引物的设计与合成** 通过比较国内部分狂犬病病毒基因组序列,寻找 N 基因中相对保守的区域,用 primer 5.0 软件设计一对引物,分别命名为 RV1:AGTCTKTATAGTTGAGC 和 RV2 GATGAAATAAGAGTGAGG。其理论扩增长度为 424 bp。

参照刘忠华等<sup>[1]</sup>的报道合成一对引物,用于检测犬细小病毒,理论扩增长度为 585 bp。

CPV1 5'-TGTAAGCTTCCAGGAGACT-3',

CPV2 5'-ATAACTGGAGGCACAAGT-3'

参照王兰萍等<sup>[2]</sup>的报道合成一对引物,用于检测犬瘟热病毒,理论扩增长度为 324 bp。

CDV1 5'-ACTTGCAGGTGTAGCTTTAGG-3',

CDV2 5'-AATAGTTCACGTAAACTCGG-3'

## 1.2.2 RT-PCR 方法的建立

**1.2.2.1 细胞总 RNA 的抽提** 狂犬病 HEP-Flury 疫苗毒的增殖与鉴定参照郭霄峰等<sup>[3]</sup>的方法进行。病毒总 RNA 的抽提按照 Trizol(液体试剂)说明书进行。

**1.2.2.2 狂犬病病毒 N 基因保守序列 cDNA 的合成及 PCR** 以 RV1 为反转录引物,细胞总 RNA 为模板,合成 cDNA。再以 RV1、RV2 为引物,扩增狂犬病病毒的目的片段。其反应程序是:94℃ 预变性 5min;94℃ 40s,50℃ 25s,72℃ 40s 为 1 个循环,运行 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。

**1.2.2.3 PCR 产物的克隆** 参照 OMEGA 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒(E. Z. N. A<sup>®</sup> Gel Extraction Kit I)及 J. 萨姆布鲁克等<sup>[4]</sup>编著的《分子克隆实验指南》方法克隆 PCR 产物。阳性质粒命名为 pMD-RV。

**1.2.2.4 插入片段的序列测定** 将经过 PCR 鉴定的阳性重组质粒,送上海英骏生物有限公司在 3730 自动测定仪进行序列测定。测序结果与 Genbank 上记录的核酸序列进行对比。

**1.2.2.5 PCR 退火温度的优化** 按照以上 PCR 体系加入各试剂进行 PCR,以 HEP-Flury 疫苗株为模板,仅改变退火温度。程序为:预变性 94℃ 5min;变性 94℃ 40s,退火温度分别为 42.7℃、43℃、43.7℃、44.9℃、46.1℃、47.4℃、48.6℃、49.9℃、51.1℃、52.3℃、53℃、53.2℃ 30s,72℃ 45s,运行 30 个循环;最后于 72℃ 延伸 10 min。

**1.2.2.6 PCR 退火时间的摸索** 按照以上的 PCR 体系加入各试剂进行 PCR,仅改变退火时间。分别为 10s、20s、25s、30s、40s、50s。其他条件均不变。观察不同退火时间的 PCR 结果。

**1.2.2.7 延伸时间的摸索** 按照以上 PCR 体系加入各试剂进行 PCR,仅改变延伸时间。分别为 10s、20s、25s、30s、40s、50s。其他条件不改变。观察不同延伸时间的 PCR 结果。

**1.2.2.8 循环次数的摸索** 按照以上 PCR 体系加入各试剂进行 PCR,仅改变循环次数。分别为 22 次、23 次、24 次、25 次、26 次、27 次、28 次、29 次、30 次、31 次、32 次、33 次、34 次、35 次。其他条件不改变。观察不同循环次数的 PCR 结果。

**1.2.2.9 RT-PCR 反应的特异性** 参考文献报导的 PCR 程序,扩增犬细小病毒和犬瘟热病毒的核酸,建立检测这二种病毒的 PCR 方法。同时以狂犬病病毒的引物 RV1、RV2 及优化后的程序扩增犬细小病毒和犬瘟热病毒,以确证引物 RV1、RV2 的特异性和狂犬病病毒 RT-PCR 程序的可行性。再用 RV1、RV2 引物及优化后的程序扩狂犬病病毒 SN10 株、GIN2 株、L16 株和 SN 株。

**1.2.2.10 RT-PCR 反应的敏感性** 疫苗毒株以 10<sup>-1</sup>、10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>……10<sup>-32</sup> 倍比稀释,接种于 BHK-21 细胞。3d 后收取其中一块 96 孔板内的细胞及细胞液;对另一块 96 孔板内的细胞做直接荧光抗体试验,计数荧光斑点数,从而间接得出病毒数。此后再进行 RT-PCR 试验检测最低病毒含量。

**1.2.2.11 RT-PCR 反应的重复性** 按照 1.2.3 的方法抽提 Hep-Flury、SN10、GIN2、L16、SN 株的 RNA 及反转录,以反转录出来的 cDNA 为模板重复扩增 3 次。每次扩增反应时设重组质粒为阳性对照,无模板的为阴性对照。

**1.2.2.12 PCR 反应的稳定性** 将 PCR 反应的各种试剂于 -20℃ 放置 30d、60d、100d、200d、300d,进行 RT-PCR。

**1.2.3 RT-PCR 方法与 FAT 方法的比较** 用疫苗毒 HEP-Flury 株接种 8 只小白鼠,观察 1 个月。采集观察期内死亡小白鼠的海马回及延髓、小脑皮质、延髓,分别做 RT-PCR 及 FAT 检测。未死亡的小白鼠经窒息处死,采相同组织,也做 RT-PCR 及 FAT 检测。比较两者的结果。

**2 结果**

**2.1 病毒的增殖**

疫苗毒接种于 BHK-21 细胞增殖,经荧光抗体染色,在细胞浆内有大量荧光斑点(图 1)。将收取的细胞及细胞液放于 -70℃ 保存,备用于病毒 RNA 的提取。

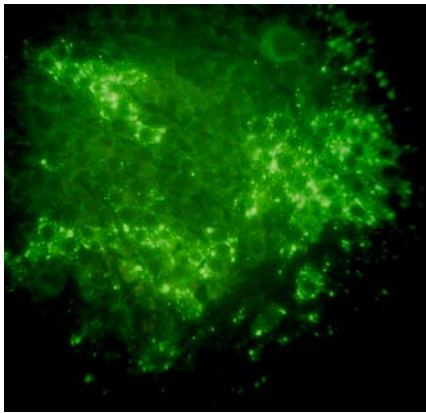
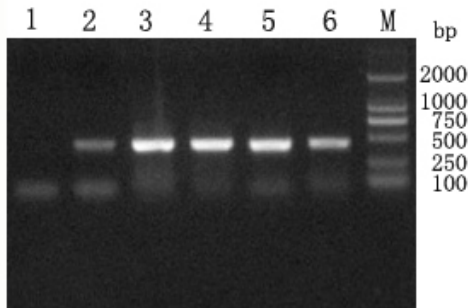


图 1 病毒荧光染色图(200x)

**2.2 目的片段的 PCR 扩增**

以 HEP-Flury、SN10、G1N2、L16、SN 毒株的 cDNA 为模板,用设计的引物(RV1、RV2)进行 PCR 扩增,在 1.0%琼脂糖凝胶进行电泳,分别扩增出约 424 bp 大小的片段(图 2)。

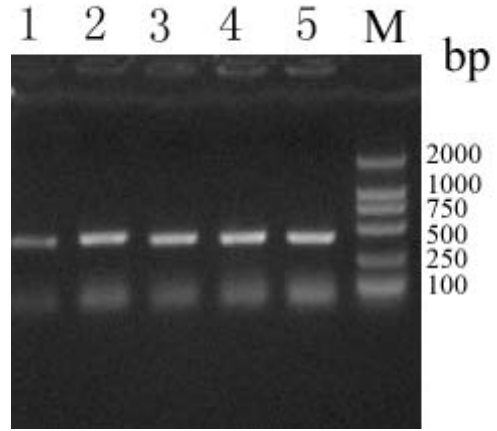


1: 阴性对照;2-6:HEP-Flury、L16、G1N2、SN10、SN;M:DL2000

图 2 狂犬病病毒目的基因片段的 PCR 扩增

**2.3 重组子的 PCR 鉴定**

为了确证 PCR 的准确性,产物克隆于 DH5 α 菌,然后对重组子进行 PCR。结果显示,出现了与理论值大小相符的片段,约为 424 bp(图 3)。



1-5:5 个阳性菌落 PCR 结果;M:DL2000

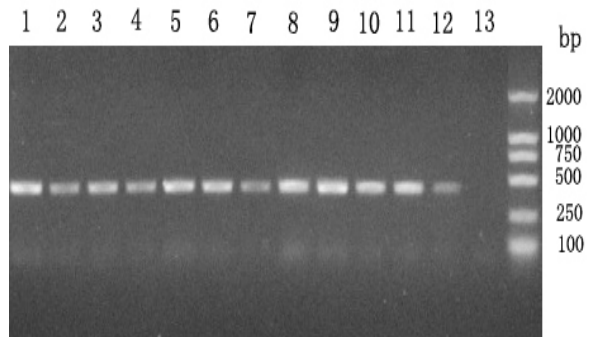
图 3 重组质粒后的菌落 PCR 鉴定结果

**2.4 重组质粒的序列测定**

将 PCR 鉴定为阳性的 3 个重组质粒 pMD-RV 送上海英骏生物有限公司测序。获得的核苷酸序列与已发表在 Genbank 上编号为 DQ099524 和 AB085828 的狂犬病病毒 LEP-Flury 和 HEP-FluryN 基因核苷酸序列进行比较,结果显示经 RT-PCR 扩增和克隆的目的片段与 Genbank 上发表的狂犬病病毒 N 基因核苷酸序列相一致。

**2.5 PCR 反应条件的优化**

**2.5.1 退火温度** 根据电泳结果(图 4),退火温度在 49.9~53℃ 之间是较适宜的退火温度范围。



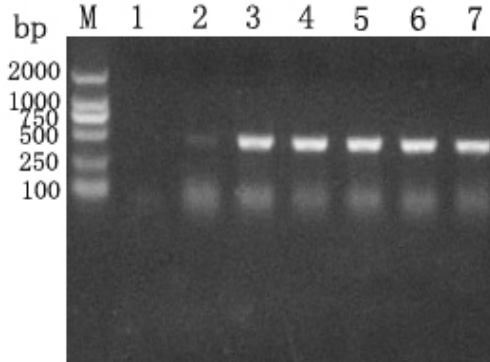
1.: 42.7℃;2:43℃;3:43.7℃;4:44.9℃;5:46.1℃;6:47.4℃;7:48.6℃;8:49.9℃;9:51.1℃;10:52.3℃;11:53℃;12:53.2℃ 13:阴性对照;M:DNA Marker DL2000。

图 4 HEP-Flury 株 PCR 退火温度的测试

2.5.2 退火时间 根据电泳结果(图 5),最佳的退火时间在 25s~40s 之间。

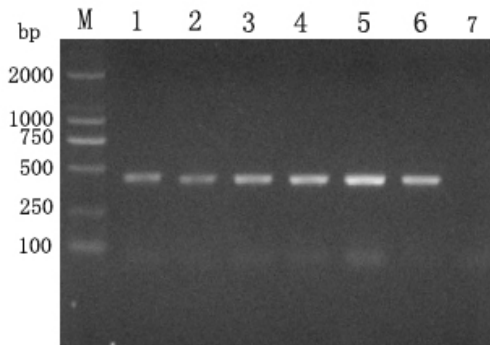
2.5.3 延伸时间 根据电泳结果(图 6),较理想的延伸时间为 40s。

2.5.4 循环次数 根据电泳结果(图 7),最好的循环次数是 29 次、30 次、31 次和 32 次。



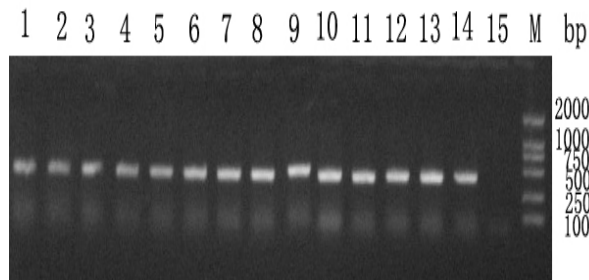
M: DNA Marker DL2000; 1: 阴性对照; 2-7: 退火时间分别为 10s, 20s, 25s, 30s, 40s, 50s。

图 5 PCR 退火时间的摸索



M: DL2000; 1: 10s; 2: 20s; 3: 25s; 4: 30s; 5: 40s; 6: 50s; 7: 阴性对照。

图 6 PCR 延伸时间的摸索



1-14: 循环次数分别代表 22 次, 23 次, 24 次, 25 次, 26 次, 27 次, 28 次, 29 次, 30 次, 31 次, 32 次, 33 次, 34 次, 35 次; 15: 阴性对照; M: DNA Marker DL2000。

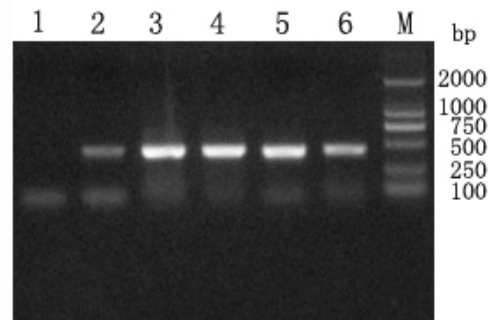
图 7 循环次数的摸索

### 2.6 RT-PCR 的特异性

抽提狂犬病病毒 SN10、G1N2、L16、SN 的 RNA,再反转成 cDNA,以 RV1 和 RV2 为引物进行 PCR 扩增,同时设立 HEP-Flury 株阳性对照,双蒸水阴性对照。结果表明,除阴性对照外,其余各毒株均出现了目的条带(图 8)。为了验证 RV1 和 RV2 引物只特异性扩增狂犬病病毒,本实验还设立了犬细小病毒和犬瘟热病毒对照。图 9 显示,应用 CDV1 和 CDV2 引物,可从含犬瘟热的疫苗中扩增出相应的目的片段,而用 RV1 和 RV2 引物则为阴性。图 10 表明,RV1 和 RV2 引物不能从含犬细小病毒的疫苗中扩增目的片断。表明 RV1 和 RV2 具有较高的特异性。

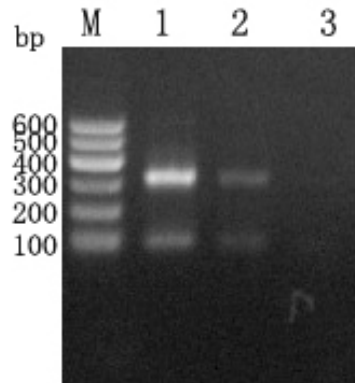
### 2.7 RT-PCR 反应的敏感性

将狂犬病病毒的 RNA 作倍比稀释,再按上述的方法进行检测。结果显示,该 RT-PCR 可检测的最低 RNA 为 20 ng(图 11)。而检测的最少病毒量为  $4.0 \times 10^4$  FFU/mL(图 12)。



1: 阴性对照; 2: HEP-Flury; 3: L16; 4: G1N2; 5: SN10; 6: SN; M: DL2000

图 8 PCR 特异性检测

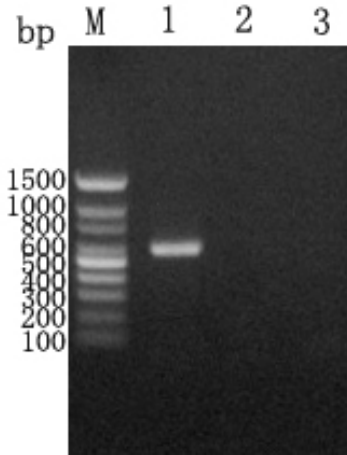


M: Marker I; 1-2: 用犬瘟热病毒特异性引物扩增结果; 3: 用 RV1、RV2 引物扩增结果

图 9 用 CDV、RV 引物检测犬瘟热病毒结果

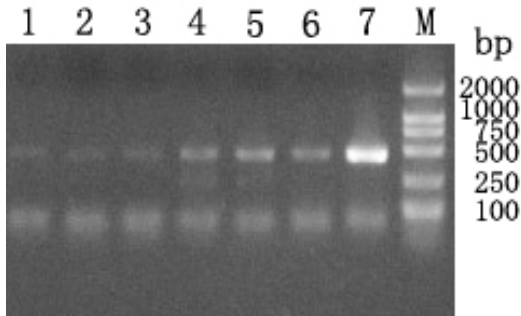
2.8 RT-PCR 方法和 FAT 的比较

8 只乳鼠脑内各注射  $5 \times 10^3$  FFU/mL 的狂犬病



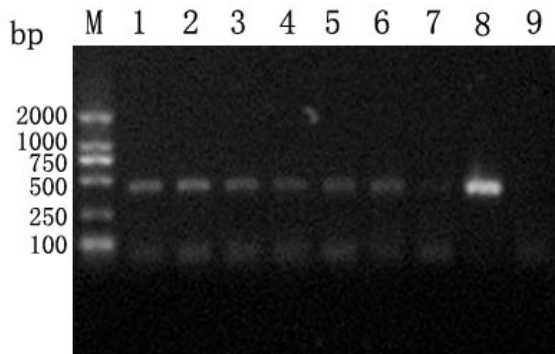
M: Marker III; 1: 用犬细小病毒特异性引物扩增结果; 2: 用 RV1、RV2 引物扩增结果; 3: 空白对照

图 10 用 CPV、RV 引物检测犬细小病毒结果



1: 20ngRNA; 2: 40ngRNA; 3: 60ngRNA; 4: 80ngRNA; 5: 100ngRNA; 6: 200ngRNA; 7: 阳性对照; M: DL2000。

图 11 狂犬病病毒 RNA 的最小检测量



1:  $9.6 \times 10^6$ ; 2:  $4.8 \times 10^6$ ; 3:  $1.2 \times 10^6$ ; 4:  $2 \times 10^5$ ; 5:  $1.2 \times 10^5$ ; 6:  $8.0 \times 10^4$ ; 7:  $4.0 \times 10^4$ ; 8: 阳性对照; 9: 阴性对照; M: DL2000。

图 12 病毒粒子的最低检测量

病毒子, 10d 内死亡。取其海马回、延脑涂片, 做荧光抗体试验, 其中 6 份脑样品能看到荧光斑点(图 13、14)。将此脑组织样品做 RT-PCR 试验, 结果 8 份脑样品均可以扩增出 424bp 左右的目的条带(图 15、16)。结果表明, RT-PCR 检测狂犬病病毒的敏感性比 FAT 高。

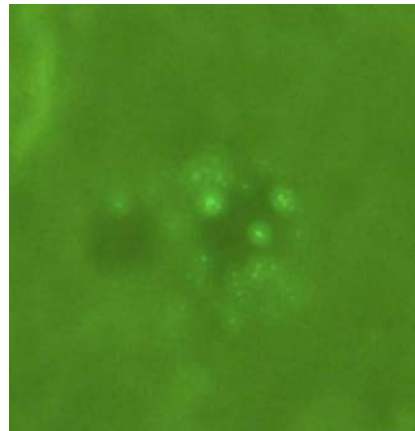


图 13 小鼠延脑荧光抗体染色(200x)

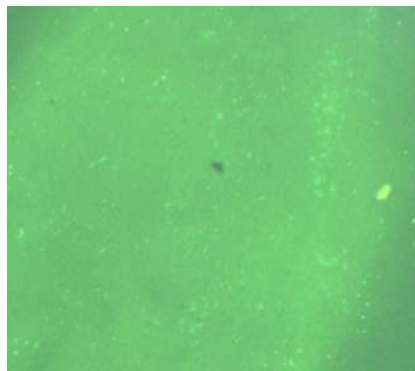
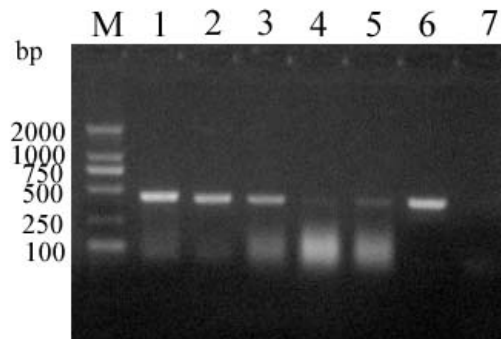
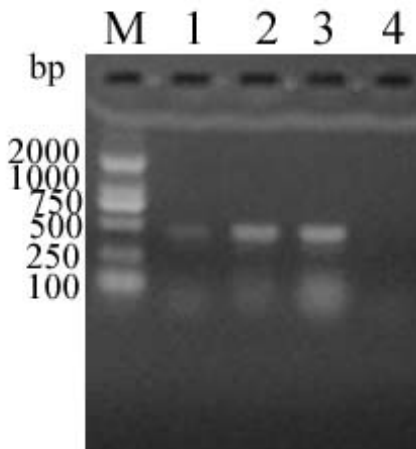


图 14 小鼠海马回荧光抗体染色(100x)



M: DL2000; 1-5: 1 至 5 号乳鼠脑, 6: 阳性对照; 7: 阴性对照。

图 15 乳鼠脑组织 RT-PCR 检测



M: DL2000; 1-3: 6 至 8 号乳鼠脑; 4: 阴性对照。

图 16 乳鼠脑组织 RT-PCR 检测

### 3 小结与讨论

荧光抗体试验(FAT)、小鼠和细胞培养物感染试验<sup>[5]</sup>是目前我国检测动物狂犬病病毒的经典方法,也是 WHO 和 OIE 共同推荐的方法。对于新鲜病料,FAT 可在几小时内得出可靠结果,准确率达 95%。但活体动物唾液或眼分泌物病毒的检测,中和试验和荧光抗体试验均不是最佳方法。Whitby 等<sup>[6]</sup>首次应用 RT-PCR 技术检测鼠脑中的狂犬病病毒。Vazquez-Moron 等根据 N 基因的序列,设计一对引物,也应用 RT-PCR 技术对巴斯德研究所 1981-1991 年收集的 100 份脑组织进行检测,阳性率及符合率均为 100%<sup>[7]</sup>。

用 RT-PCR 方法检测唾液中的狂犬病病毒的研究较少。Nagaraj 等<sup>[8]</sup>报道用 RT-PCR 检测 24 份患

狂犬病病人的唾液样品,共检测到 21 份阳性。通过比较不同狂犬病病毒株的 N 基因序列,我们设计了一对引物,建立了狂犬病病毒的 RT-PCR 检测方法。经研究、比较,该 RT-PCR 方法具特异、敏感、快速的特点。可从 20ng 总 RNA 中扩增出特异的目的条带,可检测的最小病毒量为  $4.0 \times 10^4$  FFU/mL。与 FAT 相比,其敏感性更高。应用该方法,我们还检测了 893 份犬脑组织和唾液样品,发现 14 份狂犬病病毒阳性,阳性率为 1.57%(另文报道)。因此,该 RT-PCR 方法适用于狂犬病的病原流行病学调查。

### 参考文献:

- [1] 刘忠华,钟翎,贺星亮.用 PCR 技术鉴定犬细小病毒弱毒疫苗株[J].中国兽医科技,2003,23(5):1-5.
- [2] 王兰萍,李厚达.犬瘟热病毒 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J].实验动物科学与管理,2002,19(1):1-3.
- [3] 郭霄峰,Fu Z F.狂犬病病毒糖蛋白基因的重排及病毒的拯救[J].华南农业大学学报,2006,27(1):104-106.
- [4] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著.分子克隆实验指南[M].第二版.金冬燕,黎孟枫,等译.北京:科学出版社,1998.
- [5] GB/T 18639-2002,狂犬病诊断技术[S].
- [6] Whitby J E, Heaton P R, Whitby H E, et al. Rapid detection of rabies and rabies-related viruses by RT-PCR and enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Virol Methods, 1997, 69(1-2):63-72.
- [7] Vazquez-Moron S, Avellon A, Echevarria J E. RT-PCR for detection of all seven genotypes of Lyssavirus genus[J]. J Virol Methods, 2006, 135(2):281-287.
- [8] Nagaraj T, Vasanth J P, Desai A, et al. Ante mortem diagnosis of human rabies using saliva samples: comparison of real time and conventional RT-PCR techniques[J]. J Clin Virol, 2006, 36(1):17-23.

## 广东韶关 11 月 1 日起试行生鲜鸡政策

日前,我市(广东韶关市)组织召开家禽“集中屠宰、冷链配送、生鲜上市”工作推进座谈会,通报试点筹备工作进展情况,部署下一阶段工作。

据了解,从 11 月 1 日起,我市在市区“小岛”范围内试行取消活禽宰杀和活禽经营交易,推行家禽“集中屠宰、冷链配送、生鲜上市”工作制度。经过几个月的筹备,目前,家禽集中屠宰点的建设已进入设备安装调试阶段,对试点区域经营生鲜家禽产品的农贸市场及销售档口的改造已经启动。

会议强调,现在离试点启动还剩下不到两个月的时间,筹备工作任务依然艰巨,浈江区政府、各部门要各司其职,主动作为,加强沟通协调,加快工作进度。一是试点区域发出通告,告知广大市民实行试点工作的内容、时间及要求等。向兴隆、中山、风采三家农贸市场的家禽及家禽产品经营户发出告知书,做好宣传讲解工作;二是试点区域内兴隆、中山、风采三家农贸市场管理方要根据改造标准启动市场内生鲜家禽档口的布局规划,设施改造、设备购买等工作;三是浈江区有关部门要做好市场内及周边原活禽屠宰档口鸡笼、宰杀设备等的清理退场工作。(信息来源:韶关日报)



# 犬瘟热的呼吸系统病理变化观察

夏新萌<sup>1</sup>, 李成蒙<sup>2</sup>, 连伟民<sup>3</sup>

(1. 聊城市畜牧兽医局, 山东 聊城 252000; 2. 保康县畜牧兽医局, 湖北 襄樊 441600;  
3. 聊城市畜牧兽医局 山东 聊城 252000)

**摘要:** 通过观察犬瘟热发病症状, 挑选临床上呼吸系统表现较为明显的患犬作为研究对象。剖检后观察内脏各器官的病理变化, 选取肺组织, 经石蜡切片后进行HE染色, 检查组织病理学变化。结果显示肺呈肉样变, 支气管内有泡沫状液体; 肺泡上皮细胞脱落, 肺泡腔内充满炎性产物和血细胞。表明犬瘟热引起的呼吸系统病理变化显著。

**关键词:** 犬瘟热; 呼吸系统; 病理变化

**中图分类号:** S858.292

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2015)05-0047-01

近年来, 伴随着我国宠物市场需求的扩大, 宠物犬、实验用犬、军犬和警犬数量的增加, 犬瘟热患犬的数量不断攀升。犬瘟热是由犬瘟热病毒引起犬的高度接触性传染病, 传染性极强, 死亡率可高达80%以上。笔者以自然感染犬瘟热的病犬为研究对象, 对病犬进行了详细的临床症状和组织病理学观察, 旨在加深对犬瘟热病理学损害的认识, 为犬瘟热的临床诊断、治疗、判定预后提供一定依据。

## 1 临床症状

4只(其中1只金毛犬, 7 kg; 3只中华田园犬, 15~20 kg。患犬来自聊城市某动物医院)病犬体温高达39.5~41℃, 食欲不振, 精神沉郁, 眼鼻流出水样分泌物, 打喷嚏, 腹泻。足枕变硬, 脚垫出现角质化, 呈现典型的硬足垫病。

## 2 临床诊断

通过问诊、视诊、听诊、触诊等基本方法并结合流行病学特点, 对4只病犬做了初步的诊断, 最后采用犬瘟热病毒快速诊断试剂盒确诊为犬瘟热病例(图1)。

## 3 病理学变化

经病犬主人同意, 麻醉后颈动脉放血致死, 解剖观察组织病理变化, 取肺部组织、支气管经石蜡切片后进行HE染色。病理学检查表明犬瘟热造成内部器官广泛性的损伤。可见胃肠道粘膜出血, 肠壁变薄。大脑皮层脑沟变浅, 脑膜充血。心脏明显扩张, 右心肥大, 整个心变圆, 左心室壁变薄。肝肿



图1 犬瘟热胶体金试纸诊断为阳性

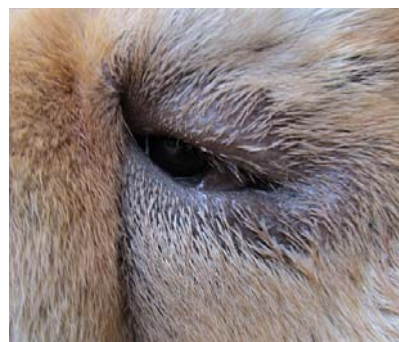


图2 病犬的眼周湿疹

大, 局部有灰白色斑块。肺呈肉样变, 支气管充血(图3), 内有泡沫状液体。肺组织病理学观察可见: 肺泡充血, 上皮细胞增生、脱落, 肺泡腔内充满炎性产物, 肺泡界限不清(图4); 肺支气管上皮细胞变性、坏死, 上皮细胞内可见包涵体。

(下转第52页)

# 广东一奶牛场临床乳房炎致病菌分离及其药敏试验

周淑贞\*, 辜质纯, 林孝崇

(佛山市南海东方澳龙制药有限公司, 广东 佛山 528234)

**摘要:** 为了解广东某牛场奶牛乳房炎的细菌感染情况及其对常用药物的敏感性, 本试验对从8头临床乳房炎患牛采集的8份奶样中分离细菌, 纯化、鉴定后再进行药敏试验。结果表明, 8份奶样中分离出3株大肠杆菌、5株金黄色葡萄球菌和3株链球菌。其中分离得到的大肠杆菌和链球菌对硫酸头孢喹肟最敏感, 金黄色葡萄球菌对复方氨苄西林和阿莫西林同样敏感。本试验可为临床乳房炎治疗用药提供参考。

**关键词:** 奶牛; 乳房炎; 致病菌; 药敏试验

**中图分类号:** S858.23

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2015)05-0048-03

## Pathogen Isolation and Drug Sensitive Test from Cows with Clinical Mastitis in one Dairy Farm in Guangdong

Zhou Shuzhen\*, Gu Zhichun, Lin Xiaochong

(Guangdong Eastern Along Pharmaceutical CO., LTD, Foshan 528234, China)

**Abstract:** In order to observe the prevalence of cattle mastitis pathogens and sensitivity to commonly used drugs 8 clinical mastitis milk samples were purified, pathogen isolated, identified and drug sensitivity tested. The results indicated that three strains of Escherichia coli, 5 strains of Staphylococcus aureus and 3 strains of Streptococcus were isolated. Escherichia coli and Streptococcus were the most sensitive to cefquinome sulfate, Staphylococcus aureus was equally sensitive to Compound Ampicillin and amoxicillin. This study can provide the theory basis for clinical mastitis treatment.

**Key words:** Pathogenic Bacteria, Drug Sensitive, Rational Drug Use

奶牛乳房炎是当今世界上引起奶牛业经济损失最严重的一种疾病, 可造成产乳量的减少和质量低下。其主要原因是致病菌对机体的感染。其中临床型乳房炎检出率最高的病原菌是葡萄球菌、真菌, 其次是肠杆菌和链球菌。说明细菌在奶牛乳房炎的患病过程中致病力较强, 应引起足够的重视<sup>[1]</sup>。为了观察广东某牛场奶牛乳房炎致病菌的流行情况和对常用治疗药物的敏感性, 本试验以致病菌的生长情况和药敏结果为指标, 确定取样牧场最近流行的致病菌中类及其对药物的敏感性, 为临床合理用药提供参考。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 供试药物和样品采集

**1.1.1 供试药物** 氯唑西林+氨苄西林: 称取氯唑西林 0.2 g、氨苄西林 0.075 g; 用无菌水稀释定容, 配成 1024 g/mL (以氯唑西林计算) 储备液, 过滤除菌, 现配现用。

硫酸头孢喹肟: 取原料, 用无菌水稀释定容, 配成 1 024 g/mL 储备液, 过滤除菌, 现配现用。

盐酸林可霉素: 取原料, 用无菌水稀释定容, 配成 1 024 g/mL 储备液, 过滤除菌, 现配现用。

复方阿莫西林: 阿莫西林 0.2 g+舒巴坦钠

收稿日期: 2015-06-12

\*: 通讯作者

0.05 g+泼尼松龙 0.01 g;取原料,用无菌水稀释定容,配成 1 024 g/mL(以阿莫西林计算)储备液,过滤除菌,现配现用。

头孢噻呋钠:取原料,直接用无菌水稀释配成 1 024 g/mL 储备液,过滤除菌,现配现用。

**1.1.2 样品采集** 先用清洁的水冲洗奶牛乳房,干净毛巾擦净,用 0.1%的新洁尔灭或者 75%酒精对乳头及周围进行消毒处理;待酒精挥发后,收集第 3 把后的奶。采集的奶样挤入灭菌试管中,贴好标签,保存在放有冰块的泡沫箱中,24 h 内送实验室进行细菌分离检测。本次采集奶样为 8 头发病奶牛的奶样,编号分别为 467、2131、4703、979、4401、G416、G646、G2106。样品密封,4℃保存,备用。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 增菌培养** 大肠杆菌参照 GB/T 4789.3-2010 标准,分别取奶样 1 mL 于营养肉汤中,37℃培养 16~18 h。编号为 1-8 号菌。

金黄色葡萄球菌参照 GB/T 4789.10-2010 标准,分别取奶样 1 mL 于 7.5%NaCl 肉汤中,37℃培养 18~24 h。编号为 9-16 号菌。

链球菌参照 GB/T 4789.11-2003 标准,分别取奶样 1 mL 于葡萄糖肉浸液肉汤中,37℃培养 24~48 h。编号为 17-24 号菌。

**1.2.2 分离鉴定** 用接种环挑取上述对应的菌液,划线于下列培养基中;培养一定时间后,观察菌落形态;对可疑菌进行镜检,然后进行生化鉴定,最后确定菌株种类。

**1.2.2.1 大肠杆菌分离** 分别取编号 1-8 号菌划线于伊红美蓝培养基上,37℃培养 18~20 h。挑取可疑菌落进行镜检和生化鉴定。

**1.2.2.2 金黄色葡萄球菌分离** 分别取编号 9-16 号菌划线于 BP 培养基上,37℃培养 18~24 h。挑取可疑菌落进行镜检和生化鉴定。

**1.2.2.3 链球菌分离** 分别取编号 17-24 号菌划线于血琼脂培养基上,37℃培养 24~48 h。挑取可疑菌落进行镜检和生化鉴定。

**1.2.3 药敏试验** 对分离纯化得到的细菌分别进行药敏试验。试验参照微量倍比稀释法进行,每个浓度做 3 次重复。

## 1.3 判定标准

**1.3.1 临床型乳房炎特征** 患牛体温升高;乳房红、肿、热、痛症状明显,乳区肿胀、发热,坚硬呈捏粉样;早期乳汁为水样,有细小颗粒或絮状物,尔

后逐渐变为棕黄色液体。

**1.3.2 大肠杆菌判定特征** 可疑菌落为黑色、带金属光泽;革兰氏染色阴性,杆状。

**1.3.3 金黄色葡萄球菌判定特征** 可疑菌落为灰色到黑色、周围有一混浊带、外层有一透明圈;革兰氏染色阳性,葡萄串状的原形或卵圆形球菌。

**1.3.4 链球菌判定特征** 可疑菌落为圆形、微凸、表面光滑、湿润、边缘整齐、半透明细小菌落;革兰氏染色阳性,短链、长链或成对排列的圆形或卵圆形球菌。

**1.3.5 药物敏感性判定标准** 以在小孔内完全抑制细菌生长的最低药物浓度为 MIC。当阳性对照孔(即不含抗生素)内细菌明显生长试验才有意义。当在微量肉汤稀释法出现单一的跳孔时,应记录抑制细菌生长的最高药物浓度。如出现多处跳孔,则不应报告结果,需重复试验。

## 2 实验结果

### 2.1 菌株分离鉴定结果

由表 1 可见,8 个临床奶样经过分离纯化,染色镜检和生化鉴定,共分离出 11 株致病菌。其中大肠杆菌 3 株,金黄色葡萄球菌 5 株,链球菌 3 株。其中从 467 号分离出链球菌,2131 号分离出大肠杆菌,4703 和 919 号同时分离出金黄色葡萄球菌和链球菌,4401 号分离出金黄色葡萄球菌,G646 和 G2106 号同时分离出大肠杆菌和金黄色葡萄球菌,G416 暂时没有分离出致病菌。

表 1 菌株分离鉴定结果

奶样编号	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	链球菌
467			+
2131	+ <sup>1)</sup>		
4703		+	+
919		+	+
4401		+	
G416			
G646	+	+	
G2106	+	+	

1):“+”表示阳性,空白表示阴性。

### 2.2 药敏试验结果

从药敏试验结果可以表明,硫酸头孢喹肟对分离得到的大肠杆菌抑菌浓度最低,浓度范围在 0.03125~0.0625 g/mL;其次为头孢噻呋钠,最小

抑菌浓度为 0.5~1 g/mL。硫酸头孢喹肟和头孢噻吩钠对大肠杆菌的最小抑菌浓度远低于其他抗生素。复方氨苄西林和复方阿莫西林对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为 0.25~1 g/mL;硫酸头孢喹肟对金黄色葡萄球菌的最小抑菌浓度为 1~2 g/mL。硫酸头孢喹肟对链球菌的最小抑菌浓度仅为 0.125~0.250 g/mL, 浓度低于复方阿莫西林和复方氨苄等抗生素。见表 2。

表 2 不同药物对临床分离致病菌的 MIC 结果

药物	大肠杆菌 3 株 (g/mL)	金黄色葡萄球菌 5 株 (g/mL)	链球菌 3 株 (g/mL)
氯唑西林钠+ 氨苄西林钠	128~256	0.25~1	0.5~2
硫酸头孢喹肟	0.03125~0.0625	1~2	0.125~0.250
盐酸林可霉素	256	8~16	256
复方阿莫西林	32~128	0.25~1	0.25~1
头孢噻吩钠	0.5~1	2~4	16~32

硫酸头孢喹肟和头孢噻吩钠主要针对革兰氏阴性菌,对革兰氏阳性菌的最小抑菌浓度比革兰氏阴性菌的高,两者对大肠杆菌的抑菌浓度远低于其他常用的抗生素;硫酸头孢喹肟对 3 种致病菌的抑菌浓度明显好于头孢噻吩钠;盐酸林可霉素对分离得到的致病菌的抑菌浓度则高于其他药物。

### 3 小结与讨论

8 份奶样中分离到大肠杆菌 3 株,金黄色葡萄球菌 4 株和链球菌 3 株。参考药敏结果数据,治疗药物建议选用头孢喹肟为主要成分的注入剂。

奶牛乳房炎是乳腺受到物理、化学、微生物等刺激所发生的一种炎症变化,是一种多因素疾病<sup>[2]</sup>。除了易感牛、病原微生物与环境 3 者之间相互影响外,其复杂性还表现在病原的多样性。由多种非特定的病原微生物引起,如细菌、霉形体、真菌、病毒等。较常见的有 23 种,其中细菌 14 种,霉形体 2 种,真菌、病毒 7 种。覃杰等<sup>[3]</sup>从巴州地区乳房炎奶样中分离细菌并进行药敏试验。结果表明该地区的主要病原菌为金黄色葡萄球菌,检出率 33.6%;大肠杆菌为 25.5%;停乳链球菌为 12.4%;无乳链球菌为 9.4%。深圳地区奶牛临床型乳房炎病原菌的检出率为 82.7%,其中链球菌占 49%;葡

萄球菌占 18.7%;大肠埃希氏菌等占 16.6%。乳房炎的发病多为混合感染。据报道,多种致病菌合并感染的案例占乳房炎发病率 60%以上的比例<sup>[4]</sup>。本试验的 8 个奶样中有 3 个是单独感染,4 个是混合感染,与资料报道的奶牛乳房炎临床发病的致病规律一致。个别奶样没有分离得到致病菌有可能是乳房炎为非致病菌所致,或者是奶样保存不当而造成的。

从药物性质可以看出,复方氨苄西林和复方阿莫西林是主要针对革兰氏阳性菌的治疗,头孢类的抗生素是针对革兰氏阳性菌的治疗,药敏试验结果符合药物本身的性质。硫酸头孢喹肟作为唯一一个动物专用的第四代头孢类药物,其抑菌效果保留了对革兰氏阴性菌的效果外,同时大大提高了对革兰氏阳性菌的抑菌效果,其对金黄色葡萄球菌和链球菌的抑菌浓度均低于头孢噻吩钠,头孢噻吩钠对链球菌的抑菌浓度是硫酸头孢喹肟的 128 倍。在受试药物中,硫酸头孢喹肟对大肠杆菌和链球菌的最小抑菌浓度最低,对金黄色葡萄球菌的抑菌浓度比复方氨苄西林和复方阿莫西林高一个浓度级,抑菌结果与国内王绍琛等<sup>[5]</sup>报道的头孢喹肟对大肠杆菌、葡萄球菌以及链球菌的 MIC 值基本一致,分别为  $\leq 0.031 \sim 0.25$  g/mL,  $1 \sim 2$  g/mL,  $\leq 0.031 \sim 1$  g/mL。鉴于每个牛场的阶段性致病菌的种类不一样,建议定期做致病菌分离鉴定,确定主体致病菌的同时有针对性的选用药物;也可以轮换用药,降低耐药性的发生,做到合理用药。

### 参考文献:

- [1] 黄忍. 奶牛乳房炎研究进展[J]. 山东畜牧兽医, 2009, 30(6): 70-71.
- [2] 百丽欣, 赫满良, 秦建华, 等. 不同药物治疗奶牛乳腺炎效果分析[J]. 青海畜牧兽医杂志, 2010, 40(5): 45-46.
- [3] 覃杰, 龙杰, 陆洪宾, 等. 巴州地区奶牛乳房炎病原菌分离鉴定及药敏试验[J]. 新疆农垦科技, 2014, 37(11): 29-31.
- [4] 陈坤永, 翁良树, 吴慕贞等. 深圳地区奶牛临床型乳房炎病原菌分离鉴定与药敏试验[J]. 中国兽医科技, 1999, 29(9): 36-38.
- [5] 王绍琛, 刘金凤, 廖建维, 等. 头孢喹肟对几种常见动物病原菌的体外抗菌作用[J]. 畜牧与兽医, 2008, 40(5): 26-28.

## 四例山羊放线菌病的诊断与治疗

翟少伦, 吕殿红, 吴大成, 温肖会, 袁洁, 周秀蓉, 贾春玲, 魏文康\*

(广东省农业科学院动物卫生研究所动物疫病诊断中心 广东省畜禽疫病防治研究重点实验室, 广东 广州 510640)

**摘要:** 2014年8月至2015年7月, 在临床服务过程中遇到4例山羊耳下、肩前、腹下等部位出现脓包、肿块为主要特征的病例, 结合流行病学调查、脓汁涂片检查等诊断为山羊放线菌病。对于脓包较大的病例, 手术引流脓汁配合局部消炎有很好的治疗效果; 对于脓包较小的病例, 采用封闭治疗效果较好。

**关键词:** 羊放线菌病; 脓包; 诊断; 治疗

**中图分类号:** S858.27

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-8567(2015)05-0051-02

放线菌病是由放线菌引起的一种渐进性、化脓性、肉芽肿性的亚急性至慢性感染性的人兽共患疾病<sup>[1]</sup>。羊放线菌病的主要病原是牛放线菌和林氏放线杆菌<sup>[2]</sup>。多为散发性, 一般不引起患羊死亡, 主要引起患羊颜面、下颌、乳房出现肿块, 进而化脓、溃烂; 患羊食欲下降, 皮张、羊毛损坏, 生长速度减慢, 经济效益欠佳。2014年8月至2015年7月, 笔者在兽医临床服务过程中遇到4例山羊耳下、肩前、腹下等部位出现脓包、肿块为主要特征的病例, 结合流行病学调查和实验室检测, 确诊为羊放线菌病。对不同发病程度的病羊进行治疗, 收到良好效果。现将山羊放线菌病的诊治情况介绍如下, 供读者参考。

### 1 病例描述

2014年8月至2015年7月, 有来自东莞、惠州、河源等地的羊场畜主向我们反映其羊场里一部分山羊肩前、耳下、腹下等部位出现脓包或肿块情况(见图1), 发病率在1%~5%之间。患羊精神尚佳, 未发烧, 食欲正常。患羊多数是将要出栏的成年羊, 由于脓包原因, 影响销售, 故向我们求助, 寻求病因及治疗方案。

### 2 诊断

结合羊群低的发病率, 体温及健康情况及发病部位, 可以排除羊口疮病、羊链球菌病等, 初步判定为羊放线菌病。参考已发表文献<sup>[3]</sup>中描述的实验步骤, 对羊放线菌病进行诊断。具体方法为:

无菌取1滴脓汁于载玻片上, 加1滴10%氢氧化钠溶液, 混匀后加盖玻片搓压。低倍弱光下镜检, 可见直径3 mm左右的黄色菊花状菌体。

### 3 治疗

#### 3.1 手术疗法

对于脓包大(直径大于3 cm)的病羊, 先把患部被毛剔除, 在患部涂擦鱼石脂软膏, 以促进脓包的成熟。2天后采用外科手术疗法, 在脓肿部的最低位置处横向切开1.5~2 cm的创口, 然后挤压脓肿壁将脓汁挤出, 之后用灭菌生理盐水及2%~3%双氧水反复冲洗3~5次, 最后用碘酒纱布填塞创口。注意创口外留有2厘米左右的纱布, 以便于脓汁的流出。每天更换1次纱布, 并且在创口周围注射恩诺沙星注射液, 防止细菌感染扩散。脓汁排除减少或不排时, 取出纱布, 创口进行一次结节缝合, 同时涂抹碘酊局部消毒。

#### 3.2 封闭疗法

对于脓包小(直径小于3 cm)的病羊, 采用局部封闭疗法, 用青霉素240万IU、链霉素200万IU、0.5%盐酸普鲁卡因6 mL, 在脓包上下左右分4个点注射, 每天2次, 连用4~6天。

### 4 预后

隔离患羊, 单独饲养治疗。采用以上治疗方案, 对4个不同羊场内的患羊进行1周左右的治疗, 结果患羊脓肿部位炎症得到控制, 患羊羊只逐渐恢复健康。

收稿日期: 2015-07-21

\*: 通讯作者

基金项目: 广东省科技厅项目(2014A070713021; 2014B040404061); 广东省农业科学院院长基金项目(2015031)



1.1 肩前出现脓包;1.2、1.3 耳下出现脓包;1.4 腹下出现脓包

图 1 山羊放线菌病临床表现

### 5 预防建议

放线菌在自然界分布广泛,主要以孢子或菌丝状态存在于土壤、空气和水中,尤其是含水量低、有机物丰富、呈中性或微碱性的土壤中数量最多。该病多因身体出现伤口接触放线菌引起。因此,减少羊只身体损伤是预防本病发生的重要措施。解决途径有:减少饲喂粗硬饲料;减少灌木丛林中的放牧;减少公羊间打斗引起的外伤;经常检查羊圈,处理裸露的钉头、锐利的竹条、木条等;定期做好羊圈环境消毒;做好羊口疮、小反刍兽疫、羊痘、口蹄疫等疫苗免疫,减少这些病引起的皮肤或黏膜损伤;增强羊群非特异性免疫力及抵抗力等。

### 参考文献:

[1] 李秀丽,李祥翠,廖万清.放线菌病的研究进展[J].中国真菌学杂志,2008,3(3):189-192.  
 [2] 杨涛.一例肉羊放线菌病的诊治[J].河南畜牧兽医,2015,36(1):44.  
 [3] 罗满林.动物传染病学[M].北京:中国林业出版社,2013:168-169.

(上接第 47 页)



图 3 支气管充血

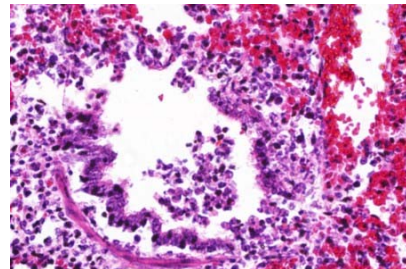


图 4 肺泡充血,肺泡界限不清(x400)

### 4 分析与讨论

犬瘟热初期容易被诊断为一般性感冒而延误最佳治疗时机。当出现咳嗽,流黄色粘液性脓鼻涕,眼结膜炎并流出脓性分泌物,特别是后期表现鼻镜干燥甚至龟裂<sup>[1]</sup>;眼脸干枯甚至闭合,足枕变硬,脚垫出现角质化时,表现其临床特征。

初期病变呈现卡他性肺炎,随病情继续发展,肺呈严重的肉变,局部有大小不等的白色斑块,支气管切面内有大量泡沫状液体。说明犬瘟热病毒对呼吸系统的损伤严重,已有研究证明犬瘟热是一种泛嗜性病毒,病理变化分布广泛,可感染多种细胞

与组织,但亲嗜性最强的是淋巴细胞和上皮细胞<sup>[2]</sup>,这与病例观察到的肺部组织病理变化相吻合。

在病理学观察过程中,呼吸器官受到严重的炎性损伤,在肺泡和细支气管内有巨噬细胞与炎性渗出物,在支气管、细支气管及巨噬细胞内有包涵体。这在此病例中得到验证。

### 参考文献:

[1] 姜聪文,张进隆,叶得河.宠物犬犬瘟热的病理组织学观察[J].中国兽医科学,2008,38(8):77-79.  
 [2] 欧阳俊,余杰.犬瘟热诊断和防制研究进展[J].中国工作犬业,2007(5):18-20.