

双月刊 1976年3月创刊
第37卷第3期 (总第163期)
2012年6月18日出版
ISSN 1005-8567
CN 44-1243/S

主管单位:广东省农业科学院
主办单位:广东省畜牧兽医学会
广东省农业科学院畜牧研究所
广东省农业科学院兽医研究所

主编:蒋宗勇
副主编:孙彦伟
责任编辑:孙彦伟 岑俏梅
编委主任:蒋宗勇
编委(排名不分先后):
蒋宗勇 余业东 王浩 顾万军
曹俊明 辛朝安 屈源泉 廖明
曾振灵 毕英佐 陈琴苓 舒鼎铭
孙彦伟 王贵平 蔡建平 王政富
刘彩霞 熊惠军 吴玄光 刘清神
特邀编委:
陈峰 黄小建 陈小云 郑庆禄
李岩 林旭堃 陈瑞爱

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

本刊声明:本刊已加入“中国学术期刊(光盘版)”、“中文科技期刊数据库”、“万方数据—数字化期刊群”和“教育阅读网”。作者稿件一经本刊录用,将同时被上述数据库收录,进入因特网提供信息服务。作者如不同意,请在投稿时向本刊声明,否则本刊将视为同意收录。凡被本刊刊发的稿件,将一次性支付作者著作权使用报酬。

目 录

·专题综述·

- 施马伦贝格病简介.....郭建红(1)
非洲猪瘟流行病学最新研究进展.....翁善钢(3)
口蹄疫疫苗生产过程质量控制技术的现状与未来.....谢文强(6)
发酵床养猪模式的研究进展.....王 卉, 高凤仙(11)

·畜牧技术·

- 非淀粉多糖复合酶制剂对肉鸡生产性能及养分表观利用率的影响.....赵必迂, 张克英, 等(15)
封开杏花鸡饲养管理技术要点.....莫薛芳, 冯惠贤(20)
浅谈笨鸡围栏生态放养.....张海富(24)

·兽医临床·

- 不同抗球虫药物对球虫的敏感性试验.....李重生, 许锡泉(27)
马链球菌兽疫亚种的保护性抗原 SzP 蛋白的鉴定与评价.....崔健扬(30)
新城疫 LaSota 活疫苗对基因 VII 型分离株的免疫保护性试验.....胡北侠, 杨少华, 等(34)

·试验研究·

- 四个不同厂家高致病性猪蓝耳病活疫苗 (JXA1-R 株) 免疫效果比较试验.....任裕其, 孙彦伟, 等(36)
一株脱氮细菌的分离鉴定及脱氮活性检测.....高存川, 张晓慧, 等(39)
四种不同剂量猪瘟活疫苗 (传代细胞源) 的田间免疫效果对比试验.....陈明凯, 姚文凤, 等(42)

·华南宠物园地·

- 犬淋巴瘤的诊疗体会.....邹晓红, 梁英奇(44)
一例宠物雪貂犬瘟热病毒与细小病毒混合感染的诊治体会.....谭志文, 周性聪(46)

·经验交流·

- 浅谈如何开展兽医流行病学的问卷调查.....陈平洁, 宋长绪, 等(48)
当前豆粕价格陡涨原因分析及后期走势判断.....虞 华, 虞丽娜(51)

·信息之窗·

- 2012“永顺杯”优秀论文评选启事.....(31)
2012年全国执业兽医资格考试须知(广东考区).....(封三前页)

施马伦贝格病简介

郭建红

(汕头出入境检验检疫局, 广东 汕头 515041)

摘要: 施马伦贝格病毒是最近在欧洲发现的新病毒, 主要通过蠓和 / 或蚊子传播。本文介绍了 OIE 最近公布的施马伦贝格病技术资料, 包括病原、流行病学、事件经过、诊断方法以及防控措施等内容。

关键词: 施马伦贝格病; 反刍动物; 虫媒; 新发疫病

中图分类号: S852.65·9.5

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0001-02

“施马伦贝格”病毒是一种新发现的病毒。这种病毒是 2011 年 11 月首先在德国西部的一个靠近荷兰和比利时的小城镇施马伦贝格发现的。随后, 在荷兰、比利时的农场不断地发现这种病毒。牛羊等家畜感染这种病毒后的症状为发热、腹泻、乏力, 对于奶牛来说, 产奶量还会急剧减少。已发现疫情的农场包括: 荷兰 52 个农场, 德国 20 个农场, 比利时 14 个农场。欧洲的几个国家正在对其进行流行病学、免疫学和微生物学调查。本文提供的信息包括, 发现施马伦贝格病毒后第一个月所做的流行病学观察和研究, 以及根据施马伦贝格病毒同属同群的基因类似病毒推测的数据。

据国际传染病学综合报道, 至 2012 年 3 月 19 日止, 欧洲施马伦贝格病发病国家已经增加到 8 个, 已经证实发病的畜群达 2 456 个, 其中牛群 406 个、绵羊群 1 991 个、山羊群 59 个。针对欧洲发生的疫情, 全球已经有俄罗斯、白俄罗斯、美国等 15 个国家对疫区动物、动物产品、精液、胚胎采取限制进口措施。

1 事件经过

第一阶段: 2011 年 11 月, 首次从德国的病奶牛(发热, 奶量减少)样本中分离出施马伦贝格病毒。样本是在 2011 年夏季和秋季采集的。荷兰的奶牛也发现了类似的临床症状(包括腹泻), 2011 年 12 月荷兰确认发现施马伦贝格病毒。

第二阶段: 2012 年 12 月初, 荷兰发现新生羔羊出现先天性畸形, 并从羔羊的脑组织中检测和分离出施马伦贝格病毒。到 2012 年 2 月, 比利时、德国、英国、法国、卢森堡和意大利等国均发现 PCR 阳性的动物死胎和畸形胎儿。

2 病原

暂时命名为“施马伦贝格病毒”的病毒属于布尼病毒科(*Bunyaviridae*)布尼病毒属(*Orthobunyavirus*), 为有脂蛋白囊膜、单股负链 RNA 病毒。施马伦贝格病毒与辛波(Simbu)群病毒有关, 特别是其中的沙门达(Shamonda)病毒, 阿卡班(Akabane)病毒和 Aino 病毒。迄今为止, 基因序列数据表明, 与施马伦贝格病毒最接近的是沙门达病毒。上述分类, 比如与其它辛波群病毒的血清学关系, 尚需通过基因序列数据和调查来确证。只有几种布尼病毒曾经在欧洲有过报道, 如加利福尼亚群的 Tahyna 病毒, 但欧洲从来没有分离出辛波群病毒。

虽然施马伦贝格病毒的准确定位仍有待于确证, 第一次接种实验以及畸形羔羊和小牛犊的诊断数据都有力地证明, 施马伦贝格病毒和报道的临床症状有因果关系。

关于该病毒对理化因素的抵抗力, 了解不多。从布尼病毒属加利福尼亚群推测, 加温 50~60℃ 30 min 以上可被灭活。对普通消毒剂敏感(1%次氯酸钠、2%戊二醛、70%酒精、甲醛)。离开宿主后不能长时间存活。

3 流行病学

3.1 宿主

根据流行病学调查, 施马伦贝格病毒与辛波群基因相近, 家养反刍动物对施马伦贝格病毒易感。施马伦贝格病不太可能是人畜共患病。尚未发现外来反刍动物(骆驼等)、或其它野生反刍动物对施马伦贝格病毒易感。3 头人工感染小牛犊在接种后 3~5 天出现急性感染轻微临床症状, 在接种后 2~5 天出现毒血症轻微临床症状。截止至

2012年2月,尚无绵羊和山羊的数据。

值得注意的是,辛波群的其它病毒会感染野生反刍动物,在马、驴、水牛、鹿、骆驼和猪中发现了阿卡班病毒抗体,也曾从鸟类体内发现辛波群的一些病毒(Mermet病毒、Peaton病毒和Oropouche病毒),而小鼠和仓鼠能人工感染辛波群病毒。

迄今为止尚无与施马伦贝格病毒有关的人类疾病的报道。基因最接近的布尼属病毒不会导致人类疾病。虽然目前尚未完全排除施马伦贝格病毒导致人类疾病的可能,风险评估也推测其不太可能会导致人类疾病。然而,建议公共卫生部门和动物防疫部门在人类疑似感染个案的早期发现方面加强协作,尤其要关注与疑似感染动物密切接触的农民和兽医。

3.2 传染性

施马伦贝格病毒的传播途径仍有待确证。通过最近的流行病学调查以及与布尼属病毒比较推测的结果是,施马伦贝格病毒可能通过携带病毒的昆虫(蠓和/或蚊子)传播。施马伦贝格病毒首先通过带有病毒的昆虫传播给易感动物,这些传播途径和可能传播病毒的昆虫种类尚需进一步研究证实。垂直传播方式已证实是通过胎盘进行传播。胎儿在母体中感染了病毒,出生的时候或是死产,或是头部、颈部出现畸形。在荷兰一些养羊的农场中,这种情况出现比例高达50%。

动物之间或动物与人类之间的直接传染似乎不太可能,但这仍需进一步调查(第一次实验已经开始)。

3.3 病毒来源

传染源:可能是通过携带病毒昆虫传播。病毒分离阳性的材料(截止至2012年2月):已从感染动物和动物胎儿的血液以及感染幼体的大脑中分离出病毒。

PCR阳性的材料(截止至2012年2月):感染胎儿的器官和血液、胎盘、羊水、胎粪、胎尿。这些调查结果仍有待于进一步研究,以确定他们在传播中的作用。

4 诊断

4.1 临床诊断

不同种类动物的临床症状表现不同:成年牛在媒介生物季节表现为轻微的急性感染症状,大部分反刍动物(包括牛、绵羊、山羊和野牛)表现先天性畸形。一些奶牛和奶羊场也曾报告出现腹泻症状。

成年动物(牛)的临床症状:大部分症状不明显,少部分出现发热(40℃以上),精神不振,食欲减退,产奶量减少(减少50%以上),腹泻,关节弯曲,脑积水,气促,僵硬,斜颈,脊柱侧凸。个别在数日内恢复。出现临床症状2~3周后发生导致群体性致畸或死产(犊牛、羔羊、小山羊)。直到2012年2月还不知道准确的致畸率。2011年夏秋季一些绵羊牧场报告急性感染的致畸率超过25%。

4.2 病理变化

新生仔畜致畸:水脑畸形(Hydranencephaly)、中枢神经发育不全、孔洞脑(Porencephaly)、皮下水肿(牛犊)。症状可概述为关节弯曲和积水性无脑综合征(arthrogryposis and hydranencephaly syndrome, AHS)。

4.3 鉴别诊断

成年动物的急性感染鉴别诊断:(1)蓝舌病;(2)鹿流行性出血热;(3)口蹄疫;(4)牛病毒性腹泻、边界病和其它瘟病毒属病毒所致疾病;(5)牛疱疹;(6)裂谷热;(7)牛流行热;(8)中毒。

施马伦贝格病与上述疾病的症状区别不明显,腹泻和奶量减少有一定的诊断意义。

犊牛、羔羊、小山羊的畸形鉴别诊断:中毒、遗传因素、蓝舌病、瘟病毒属病毒所致疾病、其它辛波群病毒(阿卡班病毒)病毒所致疾病。

4.4 实验室诊断

送检的样本包括:①活体动物的急性感染检测样本:EDTA血液,血清。②死产和畸形的犊牛、羔羊、小山羊的检测样本:死尸样本,大脑组织样本(大脑和小脑),其它样本,中枢神经组织,脾,血液。新生仔畜样本:血液、胎便(尤其是初乳前),胎盘和羊水样本。样本应冷藏或冷冻运输。

实验可用的病毒鉴定方法包括:实时聚合酶链反应、病毒的分离培养;血清样本的血清学检验包括:间接荧光免疫试验、中和试验和ELISA。

5 预防和控制

目前没有施马伦贝格病的特效药和疫苗。在媒介生物活跃期控制媒介生物可以减少传染。推迟繁殖可能会减少畸形胎儿数量。

参考资料:

- [1] OIE TECHNICAL FACTSHEET[EB/OL]. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/A_Schmallenberg_virus.pdf, 2012-02-27.

非洲猪瘟流行病学最新研究进展

翁善钢

(外高桥出入境检验检疫局, 上海 200137)

摘要: 非洲猪瘟是最重要的猪病之一。本文对非洲猪瘟的流行病学最新研究进展进行了综述, 同时也介绍了防控以及清除该病的相关措施。文章讨论了以往的非非洲猪瘟疫情所带来的经验教训, 同时指出非洲猪瘟的防控需要全球共同努力。

关键词: 非洲猪瘟; 流行病学; 防控

中图分类号: S852.65¹

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0003-03

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)最早于1921年在非洲的肯尼亚被描述报道。自从那时起, 非洲、欧洲以及美洲的许多国家都受到了该病影响。非洲猪瘟是最复杂以及最具有重要经济意义的病毒性猪病之一, 也是世界动物卫生组织(OIE)需要各成员国及时通报的疾病之一。

该病的病原是非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)。病毒的一些特性导致防控以及清除ASF非常困难。ASFV是一种复杂的有囊膜DNA病毒, 基因组大小为170~190 kbp, 是非洲猪瘟病毒科(*Asfarviridae*), 非洲猪瘟病毒属(*Asfivirus*)的成员。病毒具有高度的基因以及抗原变异性。根据病毒p72蛋白序列的不同可以分为22种不同的基因型^[1]。

1 非洲猪瘟的流行与传播

非洲猪瘟的自然宿主是生活在非洲的野猪, 但不同品系以及日龄的家猪也对ASFV高度易感。病毒也可以感染各种钝缘蜱(*Ornithodoros*)属的软蜱, 且可以在软蜱体内存活5年以上。对于自然宿主, ASFV主要影响单核细胞以及巨噬细胞, 但对于病毒感染的保护机制迄今尚未研究清楚。ASFV感染可以诱导少量针对部分病毒蛋白的中和抗体产生, 但不能对病毒感染提供足够的保护。尽管如此, 抗体的作用仍是很重要的, 因为抗体提供的保护作用可以减少病毒血症, 延缓临床症状的出现, 降低感染引起的负面影响。细胞免疫在针对ASFV感染的免疫保护中也起着重要作用, 特别是具有细胞活性的CD₈⁺淋巴细胞和自然

杀伤细胞。此外, 采用异源性病毒分离株进行人工感染实验表明, 异源病毒还具有一定的交叉保护作用^[2]。

然而, 迄今为止, 研制针对ASFV疫苗的所有尝试均告失败, 换句话说, 现在仍然没有有效的疫苗用于防控ASF。西班牙和葡萄牙曾采用过一种弱毒疫苗, 但使用该疫苗很不安全, 引发了不少问题。有学者认为疫苗所采用的ASFV弱毒株可能是导致伊比利亚半岛地区长期存在(1960-1995年)ASF的重要原因。此外, 各国学者所报道的其他针对ASFV的疫苗, 如基于重组蛋白的亚单位疫苗^[3]、基因缺失苗^[4]、DNA疫苗^[5]等都不能提供真正的保护。

ASFV在有机质环境中, 对外界具有极强的抵抗力。病毒在血液、粪便、血清以及组织中可以存活很长一段时间。病毒在提纯的血液中可以存活12周, 室温下的粪便中存活11天, 在冻肉中可存活1000天以上。病毒极强的抵抗力是各类ASF防控以及清除计划所需要考虑的重要问题, 对病毒污染区域以及材料需要采用合适的消毒剂和方法。

ASF是一种典型的出血性疾病, 疾病的超急性以及急性形式会出现典型的出血性症状。但ASF的慢性以及无症状形式并不出现出血性症状。不同的疾病形式同病毒毒株的毒力以及感染的病毒量和途径等有关。超急性以及急性形式所出现的症状同其他的一些出血性疾病如猪瘟、沙门氏菌病以及猪丹毒等比较相似, 因此需要做实验室诊断进行区分。超急性的ASF在感染4~7天后, 死亡率可高达

100%，出血症状也十分明显。无症状或者慢性 ASF 可以导致病猪成为病毒的携带者，这对该病在流行地区的分布以及扩散起着重要作用。欧洲的野猪对于 ASFV 感染的抵抗力通常要比家猪强。非洲本土的一些野猪，如疣猪 (*Phacochoerus*)、丛林猪 (*Potamochoerus porcus*) 等也能够感染 ASFV，但通常不会表现出临床症状，这也使其成为了 ASF 重要的储藏宿主。ASF 的传播一直存在于疣猪群中，通过软蜱与疣猪之间互相传播。疣猪在 ASF 传播循环中的作用是导致非洲地区 ASF 长期存在的重要原因，也对东非以及南非地区清除 ASF 造成了巨大困难。然而，西部非洲地区，野猪以及软蜱在 ASF 传播的过程中所起的作用相对要低。这些地区 ASF 传播主要是通过生猪运输以及非法生猪以及猪肉产品贸易进行的。

归纳起来，ASF 传播的流行形式主要有 5 种：

第一种是主要存在于东非和南非地区的森林型传播形式。野猪和软蜱是储存宿主，蜱类叮咬家猪以及家猪食用感染 ASFV 的疣猪以及其他野猪的组织是引起家猪发病的主要原因。

第二种形式主要出现在西非。病毒传播主要通过猪与猪肉制品的直接接触，并没有软蜱的参与。此外一些社会经济因素影响到该病的传播，如缺乏兽医卫生服务，养猪业者缺乏正确处理死亡猪的知识等，这也导致该病很容易从一个国家直接传到临近的另一个国家。事实上，高加索以及俄罗斯的一些地区近些年发生的 ASF 疫情的传播也与此类似。

第三种出现在伊比利亚半岛 (1960–1995)。当地的家猪和野猪均受到了 ASFV 感染。ASF 传播主要是通过猪与污染病毒的猪肉的直接接触进行的。*O. erraticus* 属的软蜱对于该病的传播也起着重要作用，因为当地养猪主要采取开放性的散养形式。正如上文已提及的，这类软蜱在离开感染性宿主 1 年之后仍然能够传播病毒，ASFV 在其体内可以存活 5 年之久^[6]。在这种情况下，野猪和软蜱的存在导致 ASFV 的清除工作非常困难。*O. erraticus* 的存在也是 ASF 在被清除之后再次发生的重要原因。1995 年，西班牙和葡萄牙宣布伊比利亚半岛清除了 ASF，但 1999 年，葡萄牙又发生了一起 ASF 疫情^[6]。中非地区的马拉维、莫桑比克以及赞比亚的 ASF 流行的形式也同伊比

利亚地区相似。

第四种形式出现在中南美洲 (1968–1980 年)。ASF 只影响中南美洲的家猪和野猪，软蜱并没有在疾病传播过程中起作用。缺乏作为储藏宿主的软蜱使得中南美洲地区的 ASF 清除工作相对比较容易^[7]。

第五种形式出现在俄罗斯和高加索地区的亚美尼亚、格鲁吉亚、阿塞拜疆三国。ASF 的流行病学循环只涉及到家猪和野猪，没有蜱类的参与。爆发的大多数疫情 (79.8%) 影响的是家猪，与感染 ASFV 的猪及其产品异地运输有关。只有 20.2% 的疫情影响的是野猪，这主要同野猪与家猪接触有关，野猪群中也存在病毒的传播。尽管尚无证据显示蜱类参与了 ASF 在该地区的流行，但该地也存在部分种类的钝缘蜱属软蜱。因此，对于软蜱是否参与了高加索地区 ASF 的流行应该做进一步研究。

了解上述 ASF 传播的各种流行病学形式有助于制定有效的 ASF 防控及清除计划。

2 非洲猪瘟的分布

自从 1921 年在非洲的肯尼亚首次报道 ASF 以来，很多撒哈拉以南的非洲国家都受到了 ASF 影响。直到 1957 年葡萄牙首次发生 ASF 疫情，该病的发生一直仅限于非洲地区。1957 年发生在葡萄牙的疫情很快就被控制并清除了，然而 1960 年葡萄牙里斯本附近再次发生了 ASF 疫情。近年来的遗传分析研究显示引起两次疫情的 ASFV 毒株并不具有同源性，因此很有可能是通过不同的方式进入葡萄牙的^[8]。在首次爆发 ASF 疫情后，ASFV 很快传到了伊比利亚半岛各地 (葡萄牙和西班牙)，直到 1995 年 ASF 在该地区一直呈地方性流行。

上世纪 70 年代和 80 年代，ASFV 一度传播到了世界各地，在欧洲，受影响的国家包括荷兰、意大利、法国和比利时等。美洲地区的多米尼加、巴西等国也受到了严重影响^[9]。ASFV 进入这些国家的主要原因是给家猪饲喂了含有病毒污染的猪肉制品。这些猪肉产品往往是通过空港或者海港非法入境的。一旦家猪群中存在 ASFV 感染，病猪以及猪肉产品就成为了病毒扩散的首要来源。西班牙的研究显示，如果采取合适的防控措施，作为病毒携带者的猪事实上在病毒扩散过程中的作用并不大^[10]。由于上述地区各国采取了多项有效措施，

病毒被清除了。但现在 ASF 仍然在意大利的撒丁岛和非洲地区(尤其是南部非洲地区)流行。

上世纪 90 年代至本世纪初,ASF 的流行与分布发生了变化。ASFV 传播到了以往没有 ASF 的国家和地区。如西非地区,首次发现 ASFV 的国家与时间如下:科特迪瓦(1996)、尼日利亚(1997)、多哥(1997)、加纳(1999)、布基纳法索(2003)、乍得(2010)。ASFV 也传播到了马达加斯加(1998)和毛里求斯(2007)两个国家。尤为重要的是,2007 年 ASF 再次传到了欧洲大陆,所不同的是,这次传到了高加索地区的格鲁吉亚(2007)。

流行病学的变化是由多种因素造成的。其中,最为重要的是过去 15 年里非洲 ASFV 流行范围逐渐扩大,进入不少原先没有疫情的国家。这也意味着目前在整个世界传播的 ASFV 数量在不断增加,受感染的猪以及污染病毒的猪肉制品也不断增加。第二个因素是全球化。如今交通运输的发展导致动物及其产品能够在较短的时间内往来于世界各地。这也为病原微生物传入新的地区创造了条件。第三个因素是全球经济危机。全球经济危机导致很多小规模的生产者采用泔水或者一些下脚料饲喂动物。这三个因素加上 ASFV 对外界的高度抵抗力,缺乏疫苗,感染后无症状的动物大量存在,导致 ASF 流行区域逐步增加。

3 非洲猪瘟在高加索三国以及俄罗斯的现状

2007 年 4 月份,曾在莫桑比克、马达加斯加以及赞比亚流行的 ASFV p72 基因 II 型毒株通过格鲁吉亚进入了欧洲大陆^[11]。自从那时起,高加索和俄罗斯地区所分离到的 ASFV 毒株的 p72、p54 以及 CVR 基因具有相似的序列。这也说明,2007 年抵达格鲁吉亚的病毒只有一种,其他地区的疫情都是由首次出现的病毒发生扩散引起的^[8]。ASFV 被认为是通过停靠在 Poti 港的一艘国际货轮带入的。当时该船携带有污染 ASFV 的泔水,泔水被饲喂给了港口附近的猪群^[12]。ASFV 被传入格鲁吉亚之后,很快扩散到了邻近的亚美尼亚、阿塞拜疆以及俄罗斯。

根据 OIE 的相关信息,自从 ASFV 首次传入格鲁吉亚以来,OIE 发布了关于该地区 ASFV 疫情的通报共 273 次,死亡的猪超过 76 000 头。ASFV 对俄罗斯造成的经济损失高达 250 亿~300 亿卢

布(约 8 亿~10 亿美元)。ASF 在俄罗斯各地呈地方性流行的概率将非常高。这主要由下列因素造成,包括野猪中 ASFV 感染率较高,俄罗斯国内非法的生猪以及猪肉制品运输比较普遍,相对其他欧洲国家,俄罗斯国内的兽医卫生水平较差,养猪场的管理以及饲养条件也比较差。ASFV 传入高加索和俄罗斯之后,一直呈现出超急性的形式,未出现慢性感染的形式,病毒的平均潜伏期为 4.3 天。上述因素加上缺乏有效地全国性的防控措施造成防控并清除 ASFV 在俄罗斯显得比较困难。这大大加剧了疫情从俄罗斯传入临近国家的风险,尤其是同俄罗斯具有密切经济和社会联系的其它前苏联国家。

俄罗斯兽医官近日预测 ASF 将传播到该国的北部和西北部地区。俄罗斯 2009 年 10 月、2010 年 12 月以及 2011 年 4 月发生的 ASF 疫情直接靠近了欧洲边境。与爱沙尼亚、芬兰以及挪威的距离在 150 公里以内。这几次疫情直接增加了疫情传入欧盟的风险,欧盟各国对此也高度关注。尽管欧盟各国加强了对来自疫区的生猪以及猪肉制品的检验检疫,但历史上的很多例子表明通过交通工具传入 ASF 的风险很难控制。欧盟各国正在加紧对风险作出准确的评估,以便采取有效的措施进行应对。

4 非洲猪瘟的防控

一旦有 ASF 疫情进入,采取实验室诊断方法尽早作出诊断非常重要。现在已有多种用于检测病毒、病毒抗原或者病毒 DNA 的检测方法,之前检测抗体的方法也已有报道。抗体以及抗原检测同时进行对于疾病的正确诊断以及对疫情准确评估具有重要作用^[13]。因为没有疫苗,ASF 的清除显得相当困难,但也不是不可能,需要较长的一段时间努力。成功的清除计划需要农民、兽医以及政府部门的共同参与。例如欧盟在 1985-1995 年期间实施的一个 ASFV 清除计划,共投入 720 万美元。这一计划开展过程中,养猪业者能够及时了解最新的疫病流行情况;对于生猪以及猪肉产品的运输严格监控;禁止使用泔水等下脚料饲喂猪;及时检测、发现、淘汰感染病毒的猪;加强猪场的生物安全措施;对养猪业者给予一定的补偿^[14]。对于经济条件较为落后的撒哈拉以南非洲地区的国家而

(下转第 23 页)

口蹄疫疫苗生产质量控制技术的现状与未来

谢文强

(金宇保灵生物药品有限公司, 内蒙古 呼和浩特 010030)

摘要: 本文描述了口蹄疫病疫苗生产质量控制技术的现状与未来, 并提出我国口蹄疫疫苗生产过程存在的问题及改进方向。

关键词: 口蹄疫疫苗; 生产; 质量控制

中图分类号: S855.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0006-05

口蹄疫(FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-mouth disease virus, FMDV)引起的一种急性、热性、高度接触性和可快速远距离传播的动物疫病。FMDV属微核糖核酸病毒科(*picornaviridae*)口蹄疫病毒属(*Aphthavirus*)。FMD有O、A、C、SAT1、SAT2、SAT3、Asia I型7个血清型。每一个血清型又包含若干个血清亚型。该病毒不仅在各血清型之间没有交叉免疫性, 同血清型的各亚型之间也仅有部分交叉免疫性^[1]。该病主要症状是口腔黏膜、蹄部皮肤发生水泡及糜烂。通常流行于猪、牛、羊等偶蹄目动物。FMD被世界动物卫生组织(OIE)确定为法定必报传染病, 各国对FMD控制政策的选择依赖于自身的FMD状况及其传入的危险性。许多国家的FMD呈地方性流行或大流行趋势, 全部采用扑杀政策是不现实的。采用疫苗免疫接种来控制疫病的流行则更有效。在我国该病的预防免疫主要依靠灭活疫苗。

FMD灭活疫苗的研制始于20世纪30年代末, Gchimidt(1919年)和Waldmann等(1937年)将FMDV接种于健康牛舌上皮内, 待其发病, 采取水泡皮和水疱液, 加入氢氧化铝凝胶进行吸附, 随后用甲醛灭活, 获得了具有很高免疫效力的疫苗。但是牛舌上皮来源受限制, 不适应工业化生产, 而且病牛本身存在传播疫病的风险, 所以不适合大规模生产疫苗。Frenkel(1947年)发现利用“活的”牛舌上皮碎片可在体外生产病毒, 并制成了疫苗。随着体外细胞培养技术的问世, 培育成功了一个幼地鼠肾细胞系(BHK21-C13细胞系), 是生产FMDV的更好宿主系统。当前, 大多数FMD灭活苗都是用

BHK-21细胞贴壁或悬浮培养方式生产病毒抗原, 用二乙烯亚胺(binary ethyleneimine, BEI)灭活病毒, 物理或化学方法纯化病毒抗原, 用矿物油佐剂乳化制成的油乳剂疫苗。

1 FMD疫苗生产抗原含量控制方法的现状与未来

1.1 抗原含量控制新技术的应用及发展

FMDV培养的悬液中含有四种不同结构的粒子, 其一为感染性的完整病毒粒子, 直径 23 ± 2 nm, 沉降系数146S; 其二直径21 nm, 沉降系数75S的空衣壳; 其三为直径7~8 nm, 沉降系数12S的衣壳降解蛋白(壳微体); 第4种颗粒沉降系数小于4.5S, 称为病毒感染相关抗原, 简称VIA抗原。口蹄疫病毒的免疫原性主要取决于完整病毒粒子(146S)的含量, 75S颗粒、12S亚单位粒子也具有一定的免疫原性。因此病毒LD₅₀或者TCID₅₀值不能直接反应146S或者75S粒子数量。据研究报告, 原因可能是与体内细胞免疫调节以及吞噬作用相关。在过去, FMD灭活疫苗生产过程中抗原的检测方法是传统的病毒感染力测定, 包括乳鼠半数致死量(LD₅₀)、细胞培养物半数感染量(TCID₅₀)以及蚀斑形成单位(PFU)。这些方法都是病毒一定稀释度的致死力或感染力, 不是病毒粒子的数量。只有对FMDV的有效抗原含量精确定量才能保证疫苗的效力。上个世纪70年代, 荷兰口蹄疫学家Barteling采用CsCl₂梯度离心方法定量FMDV 146S抗原^[2], 能检测出病毒粒子的质量大小。后来改进方法, 用蔗糖替代CsCl₂, 蔗糖梯度离心法一直沿用至今, 是OIE推荐的抗原含量

检测方法。蔗糖梯度离心方法能准确定量146S抗原,目前我国FMD疫苗生产只有少数企业拥有此项技术,将来完全替代30年多来一直使用的LD₅₀和TCID₅₀检测方法。然而,这种物理方法需要专业化的标准操作,要求纯化的抗原,存在实验过程复杂,实验周期长,配置设备投资大,同时不能检测多种样品等缺点,而且完整病毒粒子当受蛋白水解酶作用而裂解时不能准确检测,病毒蛋白259 nm吸光度值包含了部分RNA残片,需校正才能使用数据。所以疫苗生产中,该方法不适用于在线检测。

随着单克隆抗体技术的广泛应用,国外研究机构或疫苗厂家在抗原定量方面采用单抗技术路线,建立了ELISA快速定量146S抗原方法。巴西泛美口蹄疫中心Alonso等^[3]用口蹄疫O、A、C型抗原CsCl₂梯度离心纯化口蹄疫病毒146S抗原,免疫Balb/C系小鼠,筛选出抗完整病毒粒子146S的特异性的连续构象型表位的单克隆抗体(mAbs)。将制备的口蹄疫O、A、C型三价苗免疫牛,进行同源攻击毒试验。用间接夹心ELISA方法测定疫苗的抗原含量即ELISA 50%滴度(T₅₀)与攻毒产生的百分保护比(EPP),与泛蹄保护指数(PG)对比分析,得出T₅₀与百分保护比之间有线性相关性的结论,并得出85%保护效力的三种血清型毒株146S抗原质量。证明单抗间接夹心ELISA方法适用于配苗抗原的快速定量。英国Pirbright实验室Crowther等^[4]用口蹄疫O型抗原,通过单克隆抗体路线,获得分辨VP1线型表位的单克隆抗体,间接夹心ELISA方法从病毒裂解液中捕获146S及75S,根据OD值,按统计学方法计算出抗原含量。此单克隆抗体虽然不能检测出完整病毒粒子146S抗原,但是不能与裂解的12S反应,能测定有构象型表位的口蹄疫免疫原性VP1蛋白。实验结论认为该方法适用于生产疫苗抗原的在线检测,在病毒复制后的最适当时候收获,可保证VP1蛋白含量,避免被蛋白质水解酶裂解,提高抗原的收获率。加拿大外来动物疫病中心Ming Yang等^[5]获得抗完整病毒粒子146S的单克隆抗体,用双抗体夹心(DAS)ELISA(double antibody sandwich ELISA)方法定量口蹄疫O型、A型抗原,不同的抗原表位能区分146S与12S亚单位。该方法可适用成品疫苗保存期内抗原含量的检测及疫苗生产过程中抗原含量的控制。国内这方面的研究报道甚

少,李乐等^[6]采用蔗糖梯度离心获得的146S抗原质量和ELISA结果(ELISA-OD)进行分析,认为两种数据呈现正相关,而且两者有明显的指数相关特征。口蹄疫146S抗原包括很多抗原位点,多克隆抗体不能准确检测146S抗原,已建立的方法实际上是用ELISA结果来间接地测量146S抗原含量,因此当病毒抗原位点组成有很大的变化时,该方法可能有误差。

FMD疫苗中有效的146S抗原含量直接决定了疫苗效力,因此疫苗生产过程及使用过程中任何对146S抗原有损失的因素都不利于疫苗的效力。要保证疫苗效力达到设计标准的前提是在疫苗的生产过程中抗原含量控制准确,做到科学合理配制疫苗。单克隆抗体ELISA检测方法简单,敏感性高,同时能在线检测多个样品等优点,但是大部分单克隆抗体都与完整病毒粒子146S与亚单位12S位有共同的抗原表位,因此能够获得抗完整病毒粒子中和位点的单克隆抗体是关键。在生产线上能够准确控制抗原含量,保证疫苗质量的同时,根据完整病毒粒子(146S)含量与疫苗攻毒产生的效力-PD₅₀数据进行统计学分析,有望可替代动物攻毒方法,避免生物安全隐患,对动物福利也有积极影响。

1.2 我国口蹄疫疫苗抗原含量控制中存在的问题及改进方向

目前我国FMD免疫使用的大部分都是常规的完整病毒粒子灭活疫苗,其疫苗的效力与完整病毒粒子(146S)含量相关。我国FMD疫苗《规程》规定的抗原含量检测方法有乳鼠LD₅₀法,TCID₅₀法。LD₅₀方法采用乳鼠测定,通过对乳鼠的毒力间接表示病毒抗原含量多少。由于动物本身很难标准化,该方法有一定的实验误差,而且不能精确定量抗原质量。TCID₅₀方法采用病毒对BHK21或者IBRS细胞的感染性来反应抗原含量,虽然比LD₅₀方法误差小,但也是间接测定抗原含量,不能直接定量抗原数量。在不久的将来,有望我国FMD疫苗生产抗原控制方法全部采用蔗糖梯度离心方法,以保证疫苗抗原配比科学合理。国内某口蹄疫生产企业已经掌握蔗糖梯度离心方法定量146S抗原的技术,应用于控制疫苗抗原及效力检验。并用生物反应器悬浮培养病毒,使病毒繁殖滴度及抗原的收获量比原先的单层贴壁培养提高了几倍,能达到抗原的纯粹、稳定和均一性。在此基础上,抗

原定量技术的使用达到抗原的精确控制,保证疫苗效力达到设计标准。

2 FMD 疫苗生产过程病毒灭活方法的现状与未来

2.1 病毒灭活方法的种类及特点

随着科技的迅猛发展,病毒灭活方法也在不断的发展中,新的灭活方法不断出现,到目前已经有几十种方法。常见的方法有:(1)核酸抽取试剂灭活法(nucleic acid extraction reagents):用三唑仑(TRIZOL® LS)等抽取核酸试剂可灭活 α 病毒属、虫媒病毒及纤丝病毒。(2)巴氏方法/热处理灭活法(Pasteurization/Heat treatment):此方法是用热处理病毒,包括有囊膜的、无囊膜的病毒。这种灭活方法安全,主要破坏病毒蛋白质达到灭活。(3)低pH值处理法(Low pH treatment):除非病毒靶蛋白对低pH值有耐受性及病毒成分不纯的以外,此方法能有效灭活有囊膜的病毒。(4)溶剂/去垢剂处理法(Solvent/detergent treatment,SD):溶剂能破坏有囊膜病毒的脂质外膜,而不会破坏蛋白质。因此,去垢剂只能影响脂类外膜及衍生物。阴离子去垢剂能够引起长链脂肪酸的基底酸化,在病毒表面具有亲水性和疏水性的双重作用。(5)亚甲基蓝光化学法(methylene blue,MB,plus light):光敏剂吸收光能后产生的光化学反应产物与病原体的有效成分之间产生氧化还原等作用或产生单线态氧或自由基(超氧游离基阴离子、过氧化氢、羟基等)使病毒结构受到氧化而损伤。(6)紫外线辐射法(ultraviolet radiation):DNA分子吸收约260 nm紫外线,使同一条DNA链上相邻胸腺嘧啶产生共价结合成二聚体,影响DNA复制与转录,引起病毒致死性突变而死亡。(7)电离辐射(ionizing radiation):放射性同位素射线(α 、 β 、 γ)和X射线等共同作用或单独作用于被照射的物体产生电离作用,引起细胞化学平衡的改变而造成DNA的损伤,使病毒畸形和突变。(8)防腐剂/消毒剂(antiseptics/disinfectants):消毒剂能杀死病毒或抑制其生长繁殖,对作用的物体有毒性。防腐剂使病毒蛋白变性,从而改变病毒DNA的活性。(9)核酸内切酶法(endonucleolytic activity):在一定的pH值和离子浓度的作用下,激活病毒本身的RNA内切酶,分解病毒RNA而灭活病毒。(10)流体静压力法(high hydrostatic pressure,HHP,又称流体力学高压法):以一定的压力作

用于病毒的酶类,而改变功能性蛋白质的活性,达到灭活病毒的目的,这种方法还能使病毒的免疫原性得到很好的保护。

2.2 FMDV 的活性与抗原性特点

FMDV由四种结构蛋白VP1、VP2、VP3、VP4形成五聚体单位,构成病毒的空衣壳,成二十面体。完整病毒粒子是空衣壳包裹一个分子的RNA组成,分子量为 6.9×10^6 Ku。四个结构蛋白构成的五聚体用组氨酸聚合成病毒衣壳(75S),组氨酸残基的电离常数约为7.0,所以口蹄疫病毒对酸敏感,pH值低于7.0环境能使病毒结构蛋白受破坏,导致RNA暴露外环境而失去活性。氧化剂如部分醛类和过氧化物、卤族化合物、酸碱类物质都能使病毒结构蛋白破坏或RNA降解而病毒灭活。FMDV粒子的表面抗原位点包括线性和构象位点,线性位点主要与表位的一级结构——氨基酸序列有关,构象位点主要与病毒结构有关。研究表明,FMDV的病毒结构蛋白均参与抗原位点的构成,而且线性位点少,易变;构象位点多,保守。FMD抗原位点多位于空衣壳蛋白的环结构上^[7](如VP1的G-H环)。口蹄疫疫苗抗原灭活时,必须考虑结构蛋白空衣壳(75S)的破坏程度,特别是VP1的G-H环(134~160位残基,重要的抗原中和位点)。由于上述四种结构蛋白都参与抗原位点的构成,并在不同血清型中表现出不同位点。所以灭活抗原应尽可能不破坏病毒的结构蛋白或者是把破坏降到最低程度,而且保证病毒RNA彻底破坏达到灭活目的,以防病毒可能具有感染能力。

2.3 FMDV 灭活方法的历史及现状

最早使用的FMDV抗原灭活剂是被认为“经典”灭活剂的甲醛^[8]。灭活机理是通过病毒蛋白的交联(cross-linking)作用使FMDV失去活性,而不能作用于病毒的RNA。灭活过程不符合一级动力学原理(first order kinetics),所以甲醛的灭活效果不确定。另外,甲醛不仅仅作用于病毒,也作用于培养基的其他成分,如病毒液中的蛋白质和氨基酸等物质,而且越来越多的证据表明,多次FMD的暴发与甲醛灭活苗灭活不彻底有关^[9]。上个世纪80年代后,采用氮丙啶类(Aziridine)为灭活剂。如乙酰乙烯亚胺(acetylenimine,AEI),其灭活曲线为线性,由于主要作用于核酸,所以对抗原的破坏小,但毒性较大^[10],而且用经PEG浓缩的FMD病毒液灭活时也出现灭活动态曲

线拖尾现象。Bahne mann(1975年)^[11]采用二乙炔亚胺(Binary ethyleneimine, BEI)替代了 AEI 作为灭活剂,能达到一级灭活动力学标准,因为毒性小,使抗原灭活更安全。所以从 1980 年至今,口蹄疫病毒一直采用 BEI 灭活^[12]。有研究表明,用 Aziridine 类(包括 AEI 和 BEI)灭活病毒与甲醛相比,不仅毒性大而且灭活的病毒稳定性差。用甲醛灭活的弗氏佐剂苗有效期可达 10 年,而 BEI 灭活的疫苗有效期不超过 2 年。甲醛的灭活稳定性可能与其交联性(cross-linking)有关,不稳定的 SAT2 型用 Aziridine 类灭活后,再经甲醛处理,稳定性明显提高^[13]。灭活安全的速率应该是 0.5~1.0 lg/h, 甲醛灭活速率相对的缓慢,为 0.2~0.3 lg/h。在 BEI 灭活过程中加入适当浓度的甲醛,可使灭活速率提高到 2.5~3.5 lg/h。以这样的速度能实现一个工作日内完成抗原灭活。另外甲醛对病毒的蛋白有固定作用,而且缩短灭活时间有利于减少蛋白质的水解,保护 146S 抗原,提高抗原的收获率。

目前研究的方向是“非化学”的方法或生物学方法,如用核酸内切酶或者是流体静压力及电离辐射等方法灭活病毒。由于化学试剂(BEI 等)作用于整个病毒粒子,在一定程度上破坏病毒粒子完整性,灭活过程中需要的温度也破坏抗原的有效结构,从而影响了疫苗的效力。另外,化学试剂有一定的毒性,在疫苗中的残留灭活剂还会引起免疫动物机体的变态反应。Patil 等^[14]用核酸内切酶的方法灭活口蹄疫 O、A、C 型和 Asia I 型病毒,单价阳离子(K^+ , Cs^+ 或者 NH_4^+ 离子)作用以及 pH 值 8.5 时,激活病毒本身的核酸内切酶,只作用于 RNA,所以不破坏病毒粒子完整性,保护了抗原的免疫原性,这个灭活方法被认为非常有效^[15]。另一种研究较多的方法是流体静压力法。Daniella 等^[16]用 2.5kbar, $-15^{\circ}C$, 1M 尿素作用于 FMDV 01 Campos-Vallé e 毒株,达到完全灭活病毒,且保持了完整的病毒空衣壳结构。通过免疫家兔后产生了很高水平的中和抗体。研究者提出流体静压力方法是一安全、简便、廉价、可重复性的方法,适用于病毒疫苗的生产。Farahnaz 等^[17]用电离辐射法灭活 FMDV O 型 A87/IRN 毒株。证明辐射剂量与病毒浓度呈正相关。 $-20^{\circ}C$ 下,用 40~44kGy 的 γ 射线照射 107.5 TCID₅₀/mL 病毒

含量的 FMDV 获得安全的灭活液,并配制成疫苗免疫豚鼠产生了有保护滴度的抗体,豚鼠效力达到 5.60 PD₅₀/头份。与 BEI 灭活疫苗进行对比试验,结果达到合格的保护力。此类方法局限于实验室的研究,目前还没有文献记载使用于疫苗生产上。

病毒抗原液中的成分是复杂的,例如细胞培养系统中的水解乳蛋白、血清、胰蛋白酶及细胞碎片,中间产物、代谢产物均能影响灭活速率。甲醛灭活机理是蛋白质的交联作用,所以一些非病毒的蛋白质成分一定会影响病毒灭活的质量和效率。而且甲醛对 FMDV 的不同血清型灭活效率也是不同的。尤其是对完整病毒粒子(146S)而言,甲醛灭活过程中造成的损失比 BEI 大,损失程度因血清型而异。pH 值对甲醛的灭活效果也有影响,可能与通过影响病毒本身的活性有关。BEI 主要作用于病毒的 RNA。非病毒蛋白及其他生物活性成分对 BEI 灭活过程中的影响并不清楚。目前已知影响 BEI 灭活的主要因素有 pH 值、病毒悬液渗透压、灭活时的搅拌、抗原含量及灭活温度等。血清型不同对灭活速率无影响,而且病毒含量与 BEI 浓度之间的关系并不十分清楚。关于 BEI 的灭活的影响因素还有待于进一步研究。

无论是哪种方法灭活病毒,都存在一定的优点和缺点。在工业化生产疫苗灭活抗原时,一方面要求方法简单、经济、可控、高效率;另一方面还兼顾灭活剂要安全、毒性小,对有效抗原的破坏少,灭活效果好,使用安全等因素。实际上,很难找到条件都符合的理想灭活剂。所以今后的主要方向是“非化学”的方法,即利用酶技术或物理的方法。此类方法能避免化学试剂带来的不利因素,而且对结构蛋白的破坏程度很低。

2.4 我国 FMD 疫苗抗原灭活方法存在的问题及改进方向

国际上 FMDV 的灭活方法主要依据 2000 年世界动物卫生组织(OIE)推荐使用的 1 mmol/L BEI 两次灭活法。即 20~37 $^{\circ}C$ 灭活 24 h 后再加一次 BEI,再灭活 24 h 的方法。2006 年 OIE 又推荐 3 mmol/L BEI 两次灭活法,以 26 $^{\circ}C$ 灭活 24 h 之后加入第二剂量的 BEI 继续灭活 24 h。其中灭活罐又更换一次,有利于病毒的完全混合,保证灭活彻底^[18]。

我国 FMD 灭活疫苗规程规定,病毒抗原灭活 1

mmol/L, 30°C 28h。与 OIE 规定的灭活方法的差别是灭活温度高出 4 °C, 灭活时间少 20 h, 灭活剂量低 2 mmol/L。Barteling 等认为^[19], 灭活时间持续 40~48 h 是很安全的方法, 能够达到每批抗原彻底灭活的目的。根据笔者相关研究表明, 目前我国规程规定的灭活方法对于 146S 有一定的损失, 而且灭活安全评价方法与国际上也有区别。因此, 我国 FMD 疫苗生产病毒的灭活方法应该与国际上通用方法进行比较研究, 找出不足和应该改进之处, 并建立适合我国生产工艺的灭活方法。目前我国 FMD 疫苗的生产方式已处在产业升级阶段, 如细胞培养方式正在由传统的转瓶方式转为悬浮培养, 而且抗原的下游纯化浓缩工艺也在不断改进, 抗原含量评价方法的趋势是由原来的 LD₅₀ 或 TCID₅₀ 方法转变为 146S 含量检测法, 该方法能准确地测出灭活前后的抗原含量。病毒灭活更安全彻底, 评价方法上符合统计学规律^[20], 将成为 FMD 疫苗抗原灭活不断追求的目标。这些方面的改进能使我国口蹄疫疫苗的安全性和效力得到全面提高, 在 FMDV 防控中发挥更重要的作用。

参考文献:

- [1] Armstrong R M, Samuel A R, Carpenter W C, et al. A comparative study of serological and biochemical methods for strain Differentiation of foot-and-mouth disease type viruses [J]. *Veterinary Microbiology*, 1994, 39:285-259.
- [2] Barteling S J, Melen R H. A simple method for the quantification of 1405 particles of foot-and-mouth disease virus Arch Ges [J]. *Virus Forschung*, 1974, 45: 362-364.
- [3] Alonso A, Darsie G C, Teixeira A C, et al. Application of monoclonal antibodies to quality control of foot-and-mouth disease vaccine [J]. *Vaccine*, 1994, 12 (8): 683-686.
- [4] Crowther J R, Reckziegel P O, Prado J A. Quantification of whole virus particles (146S) of foot-and-mouth disease virus in the presence of virus subunits (12S) using monoclonal antibodies in a sandwich ELISA [J]. *Vaccine*, 1995, 13(12): 1064-1075.
- [5] Ming Yang, Hilary Holland, Alfonso Clavijo. Production of monoclonal antibodies against whole virus particles of foot-and-mouth disease virus serotype 0 and A and their potential use in quantification of intact virus for vaccine manufacture [J]. *Vaccine*, 2008, 26:3377-3382.
- [6] 李乐, 苗海生, 信爱国, 等. ELISA 用于口蹄疫病毒 146S 抗原快速定量的研究 [J]. *中国预防兽医学报*, 2008, 30 (4): 314-317.
- [7] 谢庆阁. 口蹄疫 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 48-129.
- [8] Rweyemamu M M, Umehara O, Giorgi W. Effect of formaldehyde and binary ethyleneimine (BEI) the integrity of foot-and-mouth disease virus capsid [J]. *Rev sci tech of Bpiz*, 1989, 8(3): 747-764.
- [9] King A M Q, Underwood B O, McCahon D, et al. Biochemical Identification of virus causing the outbreaks of Foot-and Mouth disease in the U K [J]. *Nature*, 1981, 93:479.
- [10] Rculiffe H. Inactivation of foot-and-mouth disease virus with ethyleneimine [J]. *Microbiology*, 1973, 28 (5): 747-750.
- [11] Bahnemann H G. Binary ethyleneimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production [J]. *Archviol*, 1975, 47: 47-52.
- [12] Bahnemann H G. Inactivation viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application Binaty ethyleneimine [J]. *vaccine*, 1990, 8: 299-306.
- [13] Simon J, Barteling, Nzaeem I. Cassim, Fmaldehyde enhances BEI-inactivation rates of Foot-and-Mouth Disease (FMD) virus by at least a ten fold Onderstepoort Veterinary Institute [Z]. Private Bag X6, Onderstepoort 0110, Republic of South Africa.
- [14] Patil P K, Suryanarayana V, Pradeep Bist, et al. Integrity of GH-loop of foot-and-mouth disease virus during virus inactivation: detection by epitope specific antibodies [J]. *Vaccine*, 2002, 20: 1163-1168.
- [15] Scodeller E A, Lebendiker M A, Dubra M S, et al. Inactivation of Foot-and-Mouth Disease Virus Vaccine Strains by Activation of Virus-associated Endonuclease [J]. *gen Viro*, 1984, 65: 1567-1573.
- [16] Daniella Ishimaru, Daniel Sá -Carvalho, Jerson L. Silva, Pressure-inactivated FMDV: a potential vaccine [J]. *Vaccine*, 2004, 22: 2334-2339.
- [17] Farahnaz Motamedi, Sedeh Akbar, Khorasani Kamal, et al. Preparation of FMD type A87/IRN inactivated vaccine by gamma irradiation and the immune response on guinea pig [J]. *Indian Microbiol*, 2008, 48: 326-330.
- [18] Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals [Z]. 2009. CHAPTER 2. 1. 5. FOOT AND MOUTH DISEASE. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.01.05_FMD.pdf.
- [19] Barteling S J, Cassim NI. *Dev Biol (Basel)*. 2004; 119: 449-55, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15742659>.
- [20] 卢永干. 我国口蹄疫灭活疫苗生产工艺的技术进步 [C]. 第十一次全国口蹄疫学术研讨会论文集, 大连: 2007: 948-950.

发酵床养猪模式的研究进展

王 卉, 高凤仙*

(湖南农业大学动物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘要:近年来,我国养猪业的规模不断发展扩大,随之而来的粪尿处理问题也成为业内人士关注的焦点。而微生物发酵床养猪可以较好地解决这一问题,并且这种养猪模式已经成为现代养殖业中一种新型模式。本文主要介绍了发酵床的分类与制作工艺流程,并且讨论了发酵床养猪对生长肥育猪生产性能以及肉品质的影响,以期如何达到“低污染、低投入、高产出”的健康养猪模式提供参考。

关键词: 发酵床; 生产性能; 猪肉品质; 猪
中图分类号: S817.3 **文献标识码:** A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0011-04

发酵床养殖是利用微生态原理和生物发酵技术,将木屑、稻壳、秸秆、饲料添加剂(含有多种不同功能的饲料级微生物)和米糠、糖等辅助发酵剂按一定比例混合均匀,在猪圈内自然发酵成微生物发酵床,利用微生物的发酵对猪排泄物进行科学处理,以减少生态环境污染的新型养殖模式^[1]。这种养猪模式以养猪业为主体将多门学科集合于一体,是一种低投入高产出的良性循环养猪模式。近几年,我国对发酵床养猪进行了大量研究,对于其在猪生产性能以及猪肉品质影响方面的报道也有很多,同时也有人对这种新型的养猪模式提出质疑。然而,通过各方面的试验研究可以看出,发酵床养猪无论是对于猪生产性能还是猪肉品质都有一定影响。

1 微生物发酵床的分类

微生物发酵床的种类很多,按照微生物的来源不同以及发酵床所使用的材料不同,发酵床可以分为自然发酵床、林荫落叶垫料发酵床、优势发酵床和土著菌发酵床等。其中,日本的土著菌发酵床是比较典型的发酵床类型。根据王孝远等^[2]等报道,由于垫料位置的不同发酵床可分为地上式、地下式和混合式三种。地上式发酵床的垫料层位于地平面以上;地下式垫料位于地平面以下,床面与地面保持平行,适用于北方地区;混合式垫料部分位于地平面以上,其具体厚度可根据当地的气候环境而定。相比较而言,地上式发酵床比较适用于我国南方水位低的地区,而地下式发酵床比较适用北方地区。微生物发酵床可用于饲养断奶仔

猪、生长育肥猪、繁殖母猪,也可作为繁殖猪舍中的交配场地,以保护种公猪的肢蹄^[2]。

2 微生物发酵床的工艺流程

2.1 菌种的采集与制备

菌种是发酵床养猪技术的核心部分,猪排泄物降解效率的高低和发酵床使用年限的长短均与菌种质量的优劣有最直接的关系。采集菌种的地方有很多,在腐殖质多的地方如阔叶树林或竹林里,都可以采集到有益的土壤菌。发酵床中应用的菌种有枯草芽孢杆菌、放线菌、乳酸菌、酵母菌、双歧杆菌、光合菌等;使用较多的有芽孢杆菌、乳酸菌、酵母菌和放线菌。目前已经研制出了商品化菌种^[3]。Tam等^[4]和Vrijmoed LLP等^[5]研究表明,将商品细菌产品和老化的木屑混合均匀后作垫料效果比较稳定,粪便的降解速度也会加快。朱洪等^[6]将堆肥茶作为微生物接种菌剂,加快了猪排泄物降解速度的前提下扩大了菌种的来源。琉球大学的比嘉照夫教授以乳酸菌、酵母菌、光合菌、放线菌、丝状菌群等有益微生物为主体研制出了一种新型的EM(Effective Microorganisms)菌种原液。迄今为止,这种菌种原液在日本、美国、法国、巴西等国家应用较多,并起到了很好的成效,但在我国应用较少。

2.2 活性剂的制备

发酵床中的活性剂是将从采集到的动植物体内提炼出来的有益物质经过发酵而形成的微生物所需的营养物质,包括天惠绿汁、氨基酸液等^[2,7]。天惠绿汁是经过发酵的植物液,主要成分有酶、纤维

素、叶绿素及乳酸菌、酵母菌等;氨基酸营养液是动物的废弃物等经发酵形成的富含氮素的液体^[3,8,9]。当发酵床中微生物的活性降低的时候,微生物对猪排泄物的降解消化能力就会降低,这样容易产生各种有害气体,也会滋生许多对猪生长不利的有害菌。这时应该在发酵床中喷洒活性剂,增加微生物的活性,使其对排泄物的消化降解能力增强。

2.3 有机垫料的制作

有机垫料是发酵床最主要的组成部分,是将各种物质混合,加入一定比例的水分,经过发酵而成。其主要成分可以为木屑、秸秆、稻壳和花生壳等物质。国外使用的垫料除以上原材料外还有泥炭以及加工过的报纸团^[10,11]。池跃田等^[12]将垫料分为不同的3组:A组为50%锯末+50%稻壳;B组为70%锯末+30%稻壳;C组为30%锯末+30%菌块+40%稻壳,通过比较3组不同垫料组合对生长育肥猪生产性能的影响发现,A组的垫料组合比较适合发酵床养猪。朱洪等^[6]和Oliveira等^[13]的研究也得到相似的结果,同时Oliveira等^[13]提出了垫料选择的原则应是吸水性强、在太阳下易干燥以及来源经济。毕小艳等^[14]分别用50%锯末+50%稻壳的垫料和70%稻壳+30%锯末的垫料进行对比试验得出:用50%锯末+50%稻壳的垫料养猪有降低发酵床中霉菌和大肠杆菌的趋势以及提高枯草芽孢杆菌、酵母菌和放线菌的趋势。相对于其他几种物质,木屑质地比较松软,吸水性比较强,在北方比较普遍,对于北方养殖户而言,木屑是制作猪床垫料的最佳选择。若木屑获取不便,可用玉米秸秆或棉花秸秆代替,但在使用之前一定要进行破碎处理,否则会影响发酵床的吸水性。稻壳也具有与木屑相同的优点,在南方比较常见,所以稻壳多应用于南方养猪地区。芦苇与稻壳具有相似的性质,可以作为稻壳的代替品。就此而言,有机垫料的选择应该因地制宜、就地取材,这样可最大限度地减少饲养成本。

2.4 猪舍的建设

配有微生物发酵床的猪舍需要在原有猪舍的基础上进行改造,改造后的猪舍要求坐北朝南,采光、通风良好,这样可以提高微生物的活性。猪圈的面积可根据猪场的实际大小自行设计,每只猪的占地面积大约为1.3 m²,舍内南面屋顶中部应设有天窗以保证猪舍内采光充分,南北墙底部应设有通风口,空气可形成对流,以便于保持空气清

新和湿度适宜,由此猪舍内部的微生物可以更适宜地生长繁殖,利于发酵^[2]。建设食槽和饮水器时可以考虑在北侧建自动给食槽,南侧建自动饮水器,猪只的来回跑动,不仅有利于发酵床表面垫料的混合,而且可使其得到运动,有助于减少皮下脂肪沉积^[2,7,15]。还需注意的是饲养密度不能过小,小密度饲养使有益微生物的营养源不够,猪排泄物不能得到充分的发酵。同样,密度也绝对不能太大,密度过大会使猪只的活动空间减小,加之微生物不能降解过多的排泄物,从而造成猪圈底部潮湿,容易滋生其它细菌。

2.5 发酵床的准备

目前投入生产应用的发酵床有三种模式:地上式发酵床、地下式发酵床和混合式发酵床(也称半地下式发酵床)。所谓地上式发酵床,就是在地面上砌出一定的高度(一般要求的高度大致为90~100 cm),要求要有一定的深度,再将制备好的垫料填充进去即可。同理,地下式发酵床应下挖一定深度(一般要求60~100 cm)后铺上垫料,要求铺上垫料后与地面平齐。混合式发酵床要求向下挖30~50 cm的深度,而铺上垫料后的高度为60~100 cm。具体发酵床与垫料的高度应视南北方地势不同而进行适当调整。日本的土著菌发酵床垫料厚度为100 cm,可使用10~20年^[7]。香港地区夏季温度较高,Chan等^[16]针对香港的气候特点,在发酵床的排便区加铺5~6 cm厚的木屑,每隔两周添加一次垫料,这样在整个饲养期不用清除垫料,可以节省劳动力。

总体而言,常规的微生物发酵床的工艺流程可用图1简单说明^[17]。

3 发酵床在猪生产中的应用研究

有关发酵床养猪对猪生产性能及肉品质影响的研究和报道较多,但结果却不尽一致,这其中有很多原因。例如,实验用猪品种不同、环境因素不同、猪饲料营养水平不同等,都会对实验结果产生影响。总体而言,发酵床养猪,由于猪的排泄物被分解消化,有害菌的滋生就会减弱甚至不会滋生,相对于普通养猪模式,发酵床养猪使猪的生长环境更加良好,肉猪的生产性能以及肉品质也会有所改善。

3.1 发酵床对肉猪生长性能的影响

周玉刚等^[18]研究表明,与传统养猪模式相比,发酵床养猪中肉猪的瘦肉率增加了4.46%,眼肌

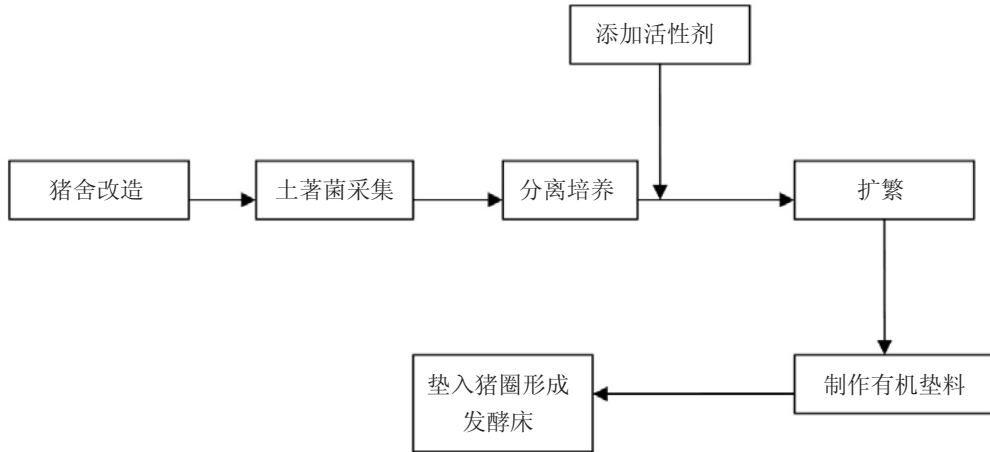


图1 常规微生物发酵床工艺流程图

面积增加了 3.5%，差异均为不显著 ($P \geq 0.05$)；屠宰率、板油率、骨率及皮率等也无明显差异 ($P > 0.05$)；而背膘厚降低了 6.8%，腿臀比例增加了 6.98%，脂率降低了 5.37%，差异均为显著 ($P < 0.05$)。此外，韩薇等^[19]研究表明，微生物发酵床养猪可明显改善断奶后仔猪的生长发育状况，表现为猪只的平均日增重提高了 17.02%，料重比下降 13.19%，差异均为显著 ($P < 0.05$)。王诚等^[20]与齐刚等^[21]的研究也可以证明此结论。

但吴买生等^[22]对微生物发酵床养猪对肉猪生产性能的影响研究表明，全期日增重试验组比对照组提高 4.04%，而全期料肉比试验组比对照组降低 2.09%，差异均不显著 ($P > 0.05$)。而 Philippe 等^[23]的研究也同样表明，发酵床养猪与常规模式养猪，对猪生产性能的影响差异并不显著。

两种不同的研究结果都有科学依据，造成不同结果的原因有很多。例如，猪舍结构的不同会使猪舍的通风、采光条件不同，从而微生物的发酵以及排泄物的分解消化等都会不同，试验结果也会有所不同。又如，试验进行的季节不同也会影响试验结果：冬季气温较低，发酵床可为猪提供天然保暖措施，使猪只更好地生长；夏季气温较高，空气较潮湿，发酵床产生的热量和湿气问题不能及时解决，会造成试验结果不理想。除此之外，南北方气候条件、饲料营养水平、饲养密度以及品种的不同都会对实验结果产生不同的影响。总体而言，微生物发酵床养猪模式对提高肉猪生长性能有一定影响。

3.2 发酵床对肉猪胴体组成的影响

周玉刚等^[18]研究表明，与传统养猪模式相比，

发酵床养猪中肉猪的背膘厚降低了 6.8%，腿臀比例增加了 6.98%，脂率降低了 5.37%，差异均为显著 ($P < 0.05$)；瘦肉率增加了 4.46%，眼肌面积增加了 3.5%，差异均为不显著 ($P \geq 0.05$)；屠宰率、板油率、骨率及皮率等也无明显差异 ($P > 0.05$)。吴买生等^[22]研究显示：屠宰率、膘厚、皮厚、后腿比四个性状，发酵床养猪与传统的养猪模式基本一致，两组之间差异不显著 ($P > 0.05$)；眼肌面积，发酵床猪比传统模式的猪提高 21.75%，两组之间差异显著 ($P < 0.05$)；瘦肉率，发酵床养猪比传统的养猪模式提高 4.85%，两组之间差异不显著 ($P > 0.05$)。Rebecca 等^[24]的研究结果与陈斌等的研究结果相似。

两种研究结果有一致之处，也有相矛盾之处，造成这种矛盾的因素有很多。如屠宰前的饲养管理不当，会使猪只产生应激，屠宰后的胴体品质就会下降。再如，饲养管理中的日粮营养水平不同也会造成胴体品质之间的差异。除此之外，品种以及南北气候差异也会对研究结果产生不同的影响。

3.3 发酵床养猪对猪肉品质的影响

许多学者都对发酵床养猪模式进行了研究，根据他们的研究结果，我们不难看出：与传统养猪模式相比，微生物发酵床养猪对猪肉品质是有一定影响的。周玉刚等^[18]也对两种不同养猪模式的猪肉品质进行了对比研究。结果显示，与传统养猪模式相比，发酵床养猪中猪肉的剪切值降低了 3.35%，差异不显著 ($P > 0.05$)；pH 值提高了 5.58%，肌肉的失水率和滴水损失分别降低 14.62% 和 12.44%，差异均为显著 ($P < 0.05$)；在肉色上，发酵床猪肉的红

度(a*)增加 18.34%, 差异显著($P < 0.05$), 但黄度(b*)和亮度(L*)分别增加了 4.27%和 3.37%, 差异不显著($P > 0.05$)。Patton 等^[25]的研究显示, 发酵床猪比传统模式猪在猪肉大理石纹水平上有显著提高($P < 0.01$)。以上的研究结果均表明, 发酵床养猪有提高肉的保水力和肉色, 改善商品猪肉的食用和感官品质的趋势。

4 小结

发酵床养猪能在一定程度上改善生长育肥猪的生产性能以及猪肉品质。近年来, 发酵床养猪模式受到许多欧美国家的青睐, 我国目前也在大力推广微生物发酵床养猪模式。笔者浅见, 发酵床养猪比较适合北方小规模养殖场, 因北方气温较低, 湿度较小, 在饲养管理得当的情况下发酵床可改善北方养猪在气候上的局限性。南方气温高、湿度大, 加之发酵床自身会产生产热产湿, 这样会给猪的生长环境造成不良影响, 因此发酵床养猪模式要在南方推广, 在技术上需要进一步研究和提高。

参考文献:

- [1] 贺月林, 张丽. 微生物发酵床冬季养猪对育肥猪生长性能的影响[J]. 湖南饲料, 2011, 21(1): 29.
- [2] 王远孝, 李雁钟, 钟翔, 等. 猪用发酵床的研究与应用[J]. 家畜生态学报, 2007, 28(6): 139-140.
- [3] 王连珠, 李奇民, 潘宗海. 微生物发酵床养猪技术研究进展[J]. 中国动物保健, 2008, 8(7): 29-30.
- [4] Tam N F Y, Vrijmoed L L P. Effect of commercial bacterial products on nutrient transformations of pig manure in a pig-on-litter system[J]. *Water management & Research*, 1990, 8(5): 363-373.
- [5] Tam N F Y, Vrijmoed L L P. Effect of the inoculum size of sawdust bedding on pig waste decomposition in a pig-on-litter system[J]. *Water management & Research*, 1993, 11(2): 107-115.
- [6] 朱洪, 常志州, 王世梅. 基于畜禽废弃物管理的发酵床技术研究 II. 接种剂的应用效果研究[J]. 江苏农业科学, 2007(2): 228-232.
- [7] 宋玉林, 贺月林. 微生物发酵床养猪关键控制技术[J]. 现代农业科技, 2011, 11(3): 337-340.
- [8] 李娟. 微生物发酵床生态养猪的关键技术[J]. 当代畜禽养殖业, 2011, 12(5): 34-37.
- [9] 刘波, 朱昌雄. 微生物发酵床零污染养猪技术研究与应用[M]. 中国农业科学技术出版社, 2009: 134-136.
- [10] Corrê a E K, Perdomo C C, Acondino J I F, et al. Environmental condition and performance in growing and finishing swine raised under different types of litter[J]. *Brazilian Journal of Animal Science*, 2000, 14(29): 2072-2079.
- [11] Gentry J G, McGlone J J, Miller M F, et al. Environmental effects on pig performance, meat quality, and muscle characteristics[J]. *Journal of Animal Science*, 2004, 18(82): 209-217.
- [12] 池跃田, 于洪斌, 金玉波, 等. 微生物发酵床养猪不同垫料组合对生长育肥猪生长性能影响的试验[J]. 现代畜牧兽医, 2011(3): 49-50.
- [13] Oliveira P A, Souloumiac D, Robin P, et al. Heat production by fattening pigs in deep-litter or conventional slatted floor systems[J]. *Annales de Zootechnie*, 1999, 48(21): 117-129.
- [14] 毕小艳, 张彬, 李丽立, 等. 猪用发酵床垫料中微生物动态变化及对猪免疫力的影响[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2011.
- [15] 赵汉硅. 自然农业(权治敏, 译)[M]. 延吉: 延边大学出版社, 2004: 97-170.
- [16] Chan D K O, Chaw D, Lo C Y Y. Development of an Environmentally-Friendly and Cost-Effective System for the Treatment of Waste in Pig Farming[J]. 中山大学学报论丛, 1995(3): 11-17.
- [17] 施光发, 甘友保, 朱冠元, 等. 土壤生物发酵床养猪技术[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(3): 59.
- [18] 周玉刚, 闻爱友, 宁康健, 等. 微生物发酵床对育肥猪生产性能及猪肉品质的影响[J]. 安徽科技学院学报, 2011, 25(1): 9-12.
- [19] 韩薇, 刘国庆, 李世江, 等. 发酵床养猪模式对猪生产性能的影响实验[J]. 科学种养, 2010, 7(2): 32-33.
- [20] 王诚, 张印, 王怀忠, 等. 发酵床饲养模式对猪舍环境、生长性能、猪肉品质和血液免疫的影响[J]. 山东农业科学, 2009, 12(11): 110-112.
- [21] 齐刚, 王守山. 微生物发酵床与水泥地面养猪方式对比效果的观察[J]. 现代畜牧兽医, 2011(7): 67-69.
- [22] 吴买生, 唐国其, 陈斌, 等. 发酵床猪舍对育肥猪生长性能及肉品质的影响[J]. 家畜生态学报, 2010, 31(6): 40.
- [23] Philippe F X, Laitat M, Canart B, et al. Comparison of ammonia and greenhouse gas emission during the fattening of pigs, kept either on fully slatted floor or on deep litter[J]. *Livestock Science*, 2007, 111(1-2): 144-152.
- [24] Rebecca Sargent Morrison, Lee J, Johnston, et al. A note on the effects of two versus one feeder locations on the feeding behaviour and growth performance of pigs in a deep_litter, large group housing system[J]. *Applied Animal Behaviour Science*, 2007, 107(23): 157-161.
- [25] Patton B S, Huff-Lonergan E, Honeyman M S, et al. Effects of deep-bedded finishing system on market pig performance, composition and pork quality[J]. *The Animal Consortium*, 2008, 2(3): 459-470.

非淀粉多糖复合酶制剂对肉鸡生产性能及养分表观利用率的影响

赵必迁¹, 张克英², 丁雪梅²

(1. 雅安市农业局, 四川 雅安 625000; 2. 四川农业大学动物营养研究所, 教育部抗病营养研究中心, 四川 雅安 625014)

摘要: 本试验旨在研究非淀粉多糖复合酶制剂对肉鸡生产性能、养分表观利用率的影响。试验采用单因子随机分组试验设计, 选取科宝肉鸡商品代1日龄公雏320只, 随机分成2个处理组, 各处理组8个重复, 每个重复20只。处理1饲喂基础饲料, 处理2饲喂基础饲料+150 g/t NSP复合酶制剂F。1-21 d基础饲料采用玉米-豆粕型饲料, 22-42 d基础饲料采用玉米-豆粕-杂粕型饲料, 低温制粒。结果表明, 在1-21 d肉鸡的玉米-豆粕型饲料中添加NSP酶制剂F对肉鸡生产性能和养分表观利用率无改善作用, 而在高杂粕(3%菜粕、3%棉粕和8% DDGS)的玉米-豆粕-杂粕型肉鸡饲料中添加NSP复合酶制剂F对22-42 d和1-42 d肉鸡生产性能均有改善作用, 在一定程度上改善了22-42 d肉鸡饲料的养分表观利用率。

关键词: NSP复合酶制剂; 肉鸡; 生产性能; 养分表观利用率

中图分类号: S816.7

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0015-05

Effects of a non-starch polysaccharidase enzyme preparation on performance and nutrient apparent utilization in broilers

Zhao Biquan¹, Zhang Keying², Ding Xuemei²

(1. Agricultural Bureau of Ya'an, Ya'an 625000, China; 2. Animal Nutrition Institute of Sichuan Agriculture University, Research Center of Disease Resistance of Ministry of Education, Ya'an 625014, China)

Abstract: The objective of the present study was to investigate the effects of a non-starch enzyme preparation on the production performance and the nutrient apparent utilization of broilers. A single factorial experiment with a randomized design was adopted. Three hundred and twenty 1-day-old Cuba male broilers were randomly assigned to 2 treatments based on body weight with 8 replicate cages of 20 broilers. The broilers in treatment 1 was fed with the basal diet, while the broilers in treatment 2 was fed with the basal diet supplemented with the non-starch (NSP) enzyme preparation F at 150 g/t. In treatment 1, the basal diet was the corn-soybean meal diet for the broilers from 1-day-old to 21-day-old and the basal diet was corn-soybean- DDGS meal diet for the broilers from 22-day-old to 42-day-old. All diets were pellets. The present results showed that addition of enzyme preparation F in the corn-soybean meal diet could not improve the production performance and the nutrient apparent utilization, but addition of enzyme preparation F in the corn-soybean-DDGS meal diet could improve the production performance of the broilers at the stage of 22-42d or 1-42d and the nutrient apparent utilization of the broilers at the stage of 22-42d.

Key words: Non-starch enzyme preparation; Broiler; Production performance; Nutrient apparent utilization

饲料中的植物源性原料含细胞壁, 而抗营养因子——非淀粉多糖(NSP)是细胞壁的主要成分, 但是NSP不能被家禽体内酶类所水解, 而且可溶性的NSP可以使食糜的粘稠度增加, 从而阻碍营养物质和能量的释放, 减少消化酶与食糜的接触机会, 降

低已消化的养分向肠黏膜扩散的速度, 最终阻碍饲料中各种营养成分的消化和吸收^[1-2]。国内外大量的研究表明, 酶制剂能提高家禽的生产性能, 改善动物健康, 提高动物产品品质, 提高饲料利用效率, 从而提高畜牧业经济效益^[3-5]。但针对不断推

收稿日期: 2012-03-05

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT0555)

出的酶制剂新产品和生产中应用的不同饲料原料与饲料类型, 仍需通过试验确定酶制剂使用的最适方案。本试验旨在通过在肉鸡玉米-豆粕-杂粕型饲料中添加 NSP 复合酶制剂, 探讨其对肉鸡生产性能和养分表观利用率的影响。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 酶制剂 试验所使用的酶制剂为某酶制剂公司的 F 复合酶制剂, 呈粉末状, 主要由纤维素酶、木聚糖酶、甘露聚糖酶、果胶酶组成的 NSP 复合酶制剂。

1.1.2 试验动物 选取平均体重接近的 1 日龄科宝肉鸡商品代公雏共 320 只, 购自温江正大畜禽有限公司。

1.2 试验设计

采用单因子完全随机分组试验设计。随机分到 2 个处理组, 各处理组 8 个重复, 每个重复 20 只鸡。处理 1 饲喂基础饲料, 处理 2 饲喂基础饲料+150 g/t 酶 F。

1.3 基础饲料

试验饲料参照 NRC(1994) 肉鸡营养标准结合实际生产情况配制, 采用玉米-豆粕-杂粕型饲料类型, 分为 1-21 d, 22-42 d 两阶段, 饲料于 75

℃ 低温制粒。基础饲料组成及营养水平见表 1。

1.4 饲养管理

试验于 2011 年 6 月 20 日至 2011 年 8 月 5 日在四川农业大学动物营养研究所家禽试验场进行。常规白羽肉鸡商品代饲养管理和常规免疫程序(14d 1.5 倍中毒株法氏囊 B₈₈ 饮水、21d 2 倍新城疫-支气管炎(VH+H₁₂₀) 点眼滴鼻), 全期自由采食, 自由饮水。夏季高温高湿时, 注意通风降温。

1.5 指标测定及方法

1.5.1 生产性能 (1) 体重: 分别在试验第 1 d、21 d、42 d 以重复为单位称重, 计算各重复的阶段总增重。称重前 12 h 断料、不断水。(2) 采食量: 每天记录饲料添给和耗损情况, 第 21 d、42 d 结算饲料采食量, 计算阶段采食量和日采食量。(3) 料重比: 根据增重和饲料采食量计算阶段料重比。

1.5.2 养分利用率 饲料和粪样的能量、干物质、粗蛋白、粗脂肪含量的测定。能值测定采用氧弹式测热法, 干物质测定用烘箱法, 粗蛋白质测定用凯氏半定量定氮法, 粗脂肪测定用索式抽提法。具体测定方法参考文献^[6]。

养分表观利用率 = (食入养分 - 粪中养分) / 食入养分 × 100%。

1.6 代谢试验

生长前期(1-21 d) 试验结束后, 每处理组的各重复中选择体重接近各处理组平均体重的 1 只鸡, 单笼饲喂, 自由采食、自由饮水。粪样收取采用全收粪法, 在代谢笼下放集粪盘, 粪盘上放置塑料布, 粪便随拉随收, 以避免羽毛和皮屑污染, 收集 3 d 排泄物。每天收集的排泄物按 100 g 鲜样中加入 3% H₂SO₄ 10 mL, 混匀并置于 -20 ℃ 冰柜保存。收粪结束后, 将 3 d 粪样解冻, 充分混合后称取样品, 粪样于 60~65 ℃ 烘箱中烘干, 室温自然回潮称至恒重, 待测。

生长后期(22-42 d) 试验结束后, 按 Sibbald 排空强饲法^[7]进行代谢试验。每处理组的各重复中选择体重接近各处理组平均体重的 1 只鸡, 进行肛门缝合集粪技术, 预饲一定时间, 待代谢鸡采食、饮水等状况良好, 开始绝食但保持自由饮水 48 h, 按各处理组平均体重的 3% 强食饲料量, 采用集粪袋收粪法收集 48 h 排泄物, 每天收集排泄物按以上操作固氮, 烘干, 待测。

表 1 基础饲料组成及营养水平(%)

原料	1-21d	22-42d	营养水平 ³⁾	1-21d	22-42d
玉米	55.73	56.89	ME(MJ/Kg)	12.05	12.51
菜籽粕	2.50	3.00	CP(%)	20.98	18.97
棉籽粕	2.50	3.00	Ca(%)	0.89	0.80
豆粕	33.80	22.73	AP(%)	0.42	0.39
DDGS	0.00	8.00	Lys(%)	1.11	0.96
混合油	1.95	3.20	Met(%)	0.51	0.39
磷酸氢钙	1.64	1.35	Met+Cys(%)	0.88	0.72
碳酸钙	0.80	0.80			
L-Lys·HCL	0.00	0.10			
DL-蛋氨酸	0.20	0.10			
50%氯化胆碱	0.20	0.15			
食盐	0.35	0.35			
复合多维 ¹⁾	0.03	0.03			
矿物预混 ²⁾	0.30	0.30			

1): 每 kg 日粮含 V₁: 25000IU, V₂: 5000IU, V₃: 12.5IU, VK₁: 2.5mg, VB₁: 1.0mg, VB₂: 8mg, VB₆: 3.0mg, VB₁₂: 15 μg, 叶酸: 250 μg, 烟酸: 17.5mg, 泛酸钙: 12.5mg。

2): 每 kg 日粮含 Fe: 80mg, Cu: 20mg, Mn: 60mg, Zn: 80mg, Se: 0.3mg, I: 0.4mg, 其中 Fe、Cu、Mn、Zn 分别来源于 FeSO₄·7H₂O、CuSO₄·5H₂O、MnSO₄·H₂O、ZnSO₄·7H₂O, Se 和 I 分别来源于含 Se: 1.0% 的 Na₂SeO₃ 预混料和含 I: 3.8% 的 KI 预混料。

3): 营养水平为计算值。

1.7 数据处理与统计分析

试验数据使用 SPSS13.0 中 Independent-samples T test 方法对数据进行 T 检验, 检验两处理平均数之间的差异显著性, 极显著水平为 0.01, 显著水平为 0.05, 变化趋势的 P 值为 0.05~0.2^[8]。所有数据以平均数±标准差表示。

2 试验结果

2.1 NSP 复合酶制剂对肉鸡生产性能的影响

肉鸡 1-21 d 生产性能见表 2。肉鸡 1-21 d 的阶段增重、平均日采食量、阶段料重比及 21 d 均重在处理组间无显著差异 ($P>0.05$), 也无变化

趋势 ($P>0.2$)。

肉鸡 22-42 d 生产性能见表 3。肉鸡 22-42 d 的阶段增重、平均日采食量、阶段料重比及 42 d 均重在处理组间无显著差异 ($P>0.05$), 但处理 2 的肉鸡 22-42 d 的阶段增重、平均日采食量、及 42 d 均重都表现最大, 而料重比最小。处理 2 的 22-42 d 阶段增重比处理 1 增加 9.99%, 接近显著水平 ($P=0.061$), 处理 2 的 42 d 均重比处理 1 增加 6.46%, 接近显著水平 ($P=0.055$); 处理 2 的 22-42 d 阶段料重比比处理 1 降低 7.63%, 有降低的趋势 ($P=0.096$)。

表 2 NSP 复合酶制剂对肉鸡 1-21 d 生产性能的影响¹⁾

处理组	1d 均重(g/只鸡)	21d 均重(g/只鸡)	平均阶段增重(g)	平均日采食量(g/d)	料重比
处理 1	39.13±0.14	853.58±35.38	814.48±35.35	63.11±2.46	1.64±0.06
处理 2	39.13±0.16	857.36±32.14	818.23±32.15	64.62±3.75	1.67±0.06
P 值	0.961	0.838	0.839	0.411	0.352

1): 应用 t 检验法进行分析。同一列中处理 1 和处理 2 的平均数进行比较, 肩标 * 表示差异显著 ($P<0.05$), ** 表示差异极显著 ($P<0.01$), 不标注表示差异不显著。下同。

表 3 NSP 复合酶制剂对肉鸡 22-42 d 生产性能的影响

处理组	21d 均重(g/只鸡)	42d 均重(g/只鸡)	平均阶段增重(g)	平均日采食量(g/d)	料重比
处理 1	853.58±35.38	2225.32±111.37	1383.16±133.19	143.98±15.75	2.49±0.19
处理 2	857.36±32.14	2369.06±90.69	1521.36±68.94	157.44±23.19	2.30±0.11
P 值	0.838	0.055	0.061	0.343	0.096

肉鸡 1-42 d 生产性能见表 4。处理 2 的 1-42 d 总增重比处理 1 增加 6.27%, 差异达到显著水平 ($P<0.05$); 处理 2 的 1-42 d 平均日采食量比处理 1 增加 2.23%, 有增加的趋势 ($P=0.177$); 处理 2 的 1-42 d 料重比相比处理 1 降低 3.27%, 有降低的趋势 ($P=0.193$)。

表 4 NSP 复合酶制剂对肉鸡 1-42 d 生产性能的影响

处理组	总增重(g)	平均日采食量(g/d)	料重比
处理 1	2186.18±111.52*	109.56±3.21	2.14±0.08
处理 2	2323.31±84.76*	112.00±1.58	2.07±0.08
P 值	0.046	0.177	0.193

2.2 NSP 复合酶制剂对肉鸡饲料的养分表观利用率的影响

肉鸡饲料 1-21 d 养分的表观利用率见表 5。肉鸡饲料 1-21 d 的干物质、粗蛋白、粗脂肪以及能量表观利用率在处理组间无显著差异 ($P>0.05$), 也无变化趋势 ($P>0.2$)。

肉鸡饲料 1-21 d 养分的表观利用率见表 6。肉鸡饲料 22-42 d 的干物质、粗蛋白、粗脂肪以及能量表观利用率在处理组间无显著差异 ($P>0.05$), 但处理 2 的干物质、粗脂肪以及能量表观利用率都表现最大, 且处理 2 的干物质的表观利用率比处理 1 提高 15.64%, 有提高的趋势 ($P=0.170$); 处理 2 的能量表观利用率比处理 1 提高 14.64%, 也有提高的趋势 ($P=0.136$)。

3 讨论

3.1 NSP 复合酶制剂对肉鸡生产性能的影响

试验结果表明: NSP 复合酶制剂 F 对肉鸡 1-21 d 生产性能无显著影响。由于 1-21 d 饲料是玉米-豆粕型, 添加少量的菜粕、棉粕类杂粕 (2.5% 菜粕和 2.5% 棉粕), NSP 复合酶作用底物非淀粉多糖含量少, 可能是添加 NSP 酶作用效果不明显原因。Cowan^[9]认为, 只有食糜粘度超过 10 cps (粘度), 才表现出较大的抗营养作用。Charl-

表 5 NSP 复合酶制剂对肉鸡 1-21 d 的养分表观利用率的影响

处理组	干物质 (%)	粗蛋白 (%)	粗脂肪 (%)	能量 (%)
处理 1	70.57±1.25	58.72±2.48	70.12±7.90	73.70±2.12
处理 2	70.66±4.89	59.15±6.90	70.40±9.73	73.17±5.01
P 值	0.96	0.871	0.951	0.787

表 6 NSP 复合酶制剂对肉鸡 22-42 d 的养分表观利用率的影响

处理组	干物质 (%)	粗蛋白 (%)	粗脂肪 (%)	能量 (%)
处理 1	57.60±10.04	56.57±11.63	74.45±7.45	57.11±8.27
处理 2	66.61±3.64	56.51±4.59	79.19±2.37	65.47±4.23
P 值	0.170	0.993	0.216	0.136

ton^[10]认为由于玉米-豆粕型日粮中 NSP 含量较低,因此添加 NSP 酶与否无关紧要。本试验 1-21 d 饲料为低粘度日粮且营养水平和养分利用率都较高,添加外源酶制剂的改善潜力小,可能是添加 NSP 复合酶制剂无效果的重要原因^[11]。

本试验 22-42 d 基础饲料含较高杂粕(8% DDGS、3%菜粕、3%棉粕)。冯定远^[12]总结杂粕 NSP 含量认为:菜粕含有木聚糖(4%)、粗纤维(8.0%)、果胶(11.0%)和 β-甘露糖(1.1%),棉粕含有粗纤维(12%)、木聚糖(9%)、果胶(4%),DDGS 中木聚糖含量高达 9.1%~18.4%、纤维素含量 6.3%~14.7%,所以 22-42 d 基础饲料含较高的木聚糖、粗纤维等 NSP,对肉鸡生产性能有较大的抑制作用,所以添加 NSP 复合酶制剂对肉鸡生产性能的改善空间较大。本试验结果表明添加 NSP 酶制剂 F 对肉鸡 22-42 d 生产性能无显著差异,但是对肉鸡增重和料重比都有改善趋势,显著提高肉鸡 1-42 d 增重,对 1-42 d 采食量、料重比都有改善趋势,与 Michael^[13]和尹兆正^[14]在高小麦麸肉鸡日粮中添加 NSP 酶制剂试验结果相类似。

NSP 酶提高肉鸡生产性能的主要原因:一是提高采食量;二是提高饲料养分消化利用率;三是一定程度降解饲料中 NSP,减轻或消除 NSP 对生产性能的抗营养影响^[15]。本试验的 NSP 复合酶制剂能提高 22-42 d 以及 1-42 d 肉鸡采食量、提高养分利用率,从而降低料重比,同时降解部分基础饲料中的 NSP,使得肉鸡的 22-42 d 和 1-42 d 的增重接近显著或显著提高水平,这与刘雅正^[16]和习海波^[17]的试验结论相一致。

3.2 NSP 复合酶制剂对肉鸡饲料养分的表观利用率的影响

本试验结果表明:NSP 酶制剂 F 对肉鸡 1-21 d 饲料的养分表观利用率无显著影响。可能是由于肉鸡 1-21 d 基础饲料中 NSP 较少,所以添加 NSP 复合酶制剂对养分的利用率的正效益不易表现出来。Pack^[18]在低能量玉米-豆粕日粮中添加以木聚糖酶和葡聚糖酶为主的复合酶,可以不同程度地提高粗蛋白和氨基酸消化率,提高肉仔鸡回肠内淀粉和脂肪的消化率。Choct^[19]认为在正常营养水平的玉米-豆粕型日粮中添加复合酶无明显效果。

本试验 22-42 d 基础饲料含较高的杂粕,抗营养因子特别是木聚糖、纤维素、果胶、甘露聚糖等 NSP 含量丰富,而 NSP 不能被肉鸡内源消化酶分解^[20];NSP 在消化道形成粘稠食糜,阻碍饲料营养物质与消化液的接触^[1],降低了养分的利用率。Ouhida^[21]在玉米-大麦-小麦日粮中添加葡聚糖酶和阿拉伯木聚糖酶,显著提高了有机物、粗脂肪利用率。王允超^[22]在玉米-豆粕-麸皮型肉鸡日粮中添加 NSP 酶为主的复合酶显著提高能量和粗蛋白的表观消化率。本试验添加 NSP 复合酶制剂 F 虽对养分表观利用率无显著改善作用,但有改善 22-42 d 饲料的干物质、粗脂肪以及能量的表观利用率的趋势。NSP 复合酶制剂通过破坏饲料中的植物细胞壁成分,将被包裹的或被绑定的营养物质释放出来,从而提高饲料中干物质、粗脂肪和能量的表观消化率^[23];NSP 酶还能将构成植物细胞壁的非淀粉多糖物质降解,使之变

成能被动物所吸收的还原糖类, 为动物生长提供能量^[24], 进一步提高能量表观利用率。但是本试验添加 NSP 酶制剂 F 对饲料的养分利用率未达到显著改善效果, 可能是由于代谢试验采用的是单只鸡作为一个重复, 而鸡只对养分利用的个体差异较大, 导致代谢试验结果组内差异较大所致或同时试验日粮设计的营养水平较高, 相应的改善空间有限, 而未达到显著水平。

4 结论

4.1 非淀粉多糖复合酶制剂 F 对采食玉米-豆粕型饲料的肉鸡 1-21 d 的生产性能和养分表观利用率无显著改善作用, 也无改善趋势。

4.2 非淀粉多糖复合酶制剂 F 对采食较高杂粕(3%菜粕、3%棉粕以及 8%DDGS)的玉米-豆粕-杂粕型饲料的肉鸡 22-42 d 生产性能和养分表观利用率有一定改善作用, 对肉鸡 1-42 d 生产性能也有改善作用。

参考文献:

- [1] Jeroch H, Danicke S, Brufau J. The influence of enzyme preparations on the nutritional value of feeds for poultry: a review[J]. *Journal of Animal Feed Science*, 1995(4): 263-285.
- [2] 张华琦, 杨伟春. 非淀粉多糖酶的作用机制及在家禽生产中的应用饲料研究[J]. 2009(11): 45-47.
- [3] 张莹, 冯定远. 新型酶制剂在肉用小鸡日粮中的应用[J]. *广东饲料*, 1997(4): 16-17.
- [4] Bedford M R, Morgan A J. The use of enzymes in poultry diets[J]. *World's Poult Sci*, 1996, 54: 52-61.
- [5] 张铁鹰, 汪徽. 酶在玉米-豆粕日粮中的应用研究进展[J]. *动物营养学报*, 2003, 15(2): 6-10.
- [6] 张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2004: 56-98.
- [7] 由大鹏. 酶制剂对肉仔鸡生产性能、养分代谢、生理生化指标的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- [8] 李慧. 蛋白酶和木聚糖酶对肉鸡生长性能、消化机能及血液指标的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2010.
- [9] Cowan W D. The relevance of intestinal viscosity on performance of practical broiler diets[J]. *Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium*, 1995(7): 116-120.
- [10] Charlton P. Expanding enzyme applications: Higher amino acid and energy values for vegetable proteins[C]. *Proceedings of the 12th Annual Symposium on Biotechnology in the Feed Industry*. Southborough Laics: Nottingham University Press, 1996: 317-326.
- [11] 万伶俐, 王晓阳, 邱玉朗, 等. 不同粗蛋白质水平饲料中添加复合酶对蛋鸡生产性能的影响[J]. *兽药与饲料添加剂*, 2004(6): 23-25.
- [12] 冯定远, 沈水宝. 饲料酶制剂理论与实践的新理论[J]. *饲料工业*, 2005(18): 1-13.
- [13] Michael R, Bedford. Reduced viscosity of intestinal digests and enhanced nutrient digestibility in chickens, given exogenous enzymes[J]. *Enzymes in Poultry and swine nutrition*, 1997: 161-165.
- [14] 尹兆正. 高麸加酶替代玉米饲料对肉仔鸡生长性能的影响[J]. *浙江农业学报*, 2005, 17(4): 191-195.
- [15] 高峰. 非淀粉多糖酶制剂对鸡、猪生长的影响及其作用机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2001.
- [16] 刘雅正. 添加酶制剂对 0~3 周龄肉仔鸡生长性能、养分消化利用及粪便排出量的影响[J]. *饲料工业*, 2008; 29(6): 18-20.
- [17] 习海波. 复合酶制剂在肉鸡中的应用[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [18] Pack, Bedof. Feed enzymes main purveyor sogrhumdiest [J]. *Feedsutsff*, 1998: 18-19.
- [19] Choct M, Hughes R J, Wang J, et al. Increased small intestinal cementation is partly responsible for the anti-nutritive activity of no starch polysaccharides in chickens [J]. *British Poultry Science*, 1996, 37: 609-621.
- [20] 董彬, 郑学玲, 王凤成. 国内外小麦戊聚糖研究进展[J]. *河南农业科学*, 2005(5): 8-10.
- [21] Ouhida, Perez, Gasa, et al. Enzymes (glucanase and arabinoxylanase) and/or sepiolite supplementation and the nutritive value of maize-barley-wheat based diets for broiler chickens [J]. *British Poultry science*, 2000, 41: 617-624.
- [22] 王允超, 岳寿松, 彭虹旒, 等. 在降低代谢能日粮中添加微生物制剂对肉鸡生产性能的影响[J]. *饲料工业*, 2008, 28(4): 49-50.
- [23] 冯定远, 张莹, 余石英, 等. 含有木聚糖酶和 β -葡聚糖酶的酶制剂对猪日粮消化性能的影响[J]. *畜禽业*, 2000(7): 44-45.
- [24] Johnson I T. Gastrointestinal adaptation in response to non-available polysaccharides in the rat [J]. *British Journal Nutrition*, 2001, 155: 497-505.

封开杏花鸡饲养管理技术要点

莫薛芳¹, 冯惠贤²

(1. 广东省封开县科技局, 广东 肇庆 526500; 2. 广东省封开县朗成畜牧服务中心, 广东 肇庆 526500)

中图分类号: S815.7

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0020-04

杏花鸡是封开县的地方优良品种,是广东三大名鸡之一。该品种体形小,体质结实,结构匀称,被毛紧凑,前躯窄,后躯宽,体形似“沙田柚”。外貌特征概括为“三黄三短两细”。由于其无皮下脂肪,骨细皮薄,肌纤维细嫩,素有“玻璃皮,蔗渣骨”的美称。封开杏花鸡有别于其他品种鸡,它具有一定的野性(属放养鸡),耐粗饲,觅食力强,喜欢飞跃,会游泳,小鸡出羽快(出壳2周,已长羽毛),抗病力强等特点。根据杏花鸡的品种特性,在饲养管理方面应抓住以下要点:(1)杏花鸡体质耐寒不耐热,因此育雏保温时间不宜太长,室温不宜太高,鸡舍一定要保持良好的通风透气;(2)成鸡一般在130日龄上市,90日龄前应喂给全价料,90~130日龄可喂给粗料;(3)杏花鸡的野性较大,好动,喜跳跃,需要较大的活动空间;(4)以提高机体抵抗力为疾病防治原则。具体应抓好以下几个环节。

1 鸡场条件

1.1 场址选择

山地、松林、果园、稻田、土坪等。大鸡需要2 m²/只的山地活动场所。鸡场以选用阳光充足(每天光照不少于6 h),地势高燥,排水方便,山地渗透性强,雨后易干的沙质土壤场地为佳。场址需离村庄、工厂1 km以上,交通便利。有良好的水源,以山涧水、石岩水、水井水为宜。

1.2 鸡舍条件

1.2.1 育雏舍 以保温性能好、通风、防雨、防鼠为原则。①地下烟道式:类似北方的火炕床类,利用山上杂柴杂草烧火加热,使温室地面保温,提高成活率。②平房式:须通风良好,应有对流窗,有条件的可安装抽风机。雏鸡育雏前1周分小圆格保温较好,200只/格,1周后把小格拆除,群养。

1.2.2 肉鸡棚 根据广东的气候特性,可采用完

全开放式(敞棚式)鸡舍。鸡舍一般只有端墙或一面无墙。可在鸡舍无墙部加上防风卷帘,保证夏季通风好,冬季保温。此类鸡舍用材少,施工易,造价低,减低了生产成本。杏花鸡品种野性强,容易受惊吓,大群饲养易惊慌失措,相互踩踏,成堆死亡。一般肉鸡棚可建40~50 m²,饲养密度为10~15只/m²。

2 饲养管理

2.1 饲养管理

2.1.1 环境条件

2.1.1.1 温度 合适的温度是育雏成败的关键。在育雏竹围上方安装白炽灯或红外线灯照射增温,进鸡前应预先将温度调至32℃,天气较寒冷时可在围板上盖防风纸,室内可加炭炉提高室温。雏鸡放围饲养后鸡舍内仍应有保温设备,保证体质差的鸡只仍能保温。育雏的适宜温度见表1。

表1 育雏的适宜温度(℃)

周龄	1	2	3	4	5	6
春冬季	31~32	30~31	28~29	27~28	24~26	脱温
夏秋季	30~32	29~31	27~29	26~27	24~26	脱温

2.1.1.2 湿度 由于育雏期要求温度较高,7天龄内雏鸡因蛋黄吸收未完全又需保证足够的湿度。室温太高室内易干燥,在控制合适温度的同时,相对湿度在55%~65%为宜。若育雏舍内的湿度低于40%,可用喷雾方式增加湿度,或在炭炉上加热水盆利用水蒸气增加空气湿度,但不能超过75%,否则高温高湿易引发疾病。若雏鸡发生消化道疾病出现下痢,拉稀等现象时,亦会导至湿度过高,应及时清洁垫料。

2.1.1.3 通风 为保证鸡舍内的通风透气,应在每天早上打开门窗30 min换气,天气寒冷时也不

能为了保温而全部关闭门窗,应确保空气流通。

2.1.1.4 阳光 雏鸡 10 日龄后,可在天气晴朗暖和,有场地条件的情况下让鸡群到室外晒太阳。活动时间应适当,以 2~3 h 为宜,可视情况续渐延长。

2.1.1.5 垫料 在育雏竹围内铺上一层 2 cm 厚木糠、小刨花等,以保持地面松软,清洁、干燥。地下烟道温室可免垫料。

2.1.2 开食 雏鸡出壳后的前 10 d 喂食情况的好坏是雏鸡成活的关键。开食应在出壳后 24~36 h 内进行,选用雏鸡容易看见的用具盛放饲料,务必使雏鸡学会吃食。开食 7 d 内,雏鸡添料应以勤添少放,少食多餐为原则。7 d 后使用正常饲料槽,让其自由采食。

2.1.3 饮水 雏鸡的初次饮水可在开食前进行,

也可在开食时进行。一般在饮水中添加 5%葡萄糖溶液,连续饮用 10 h,可提高雏鸡成活率。饮水应常备不断。如饮水器盛水过深,可放入小石头,避免雏鸡饮水时弄湿身体而导致发病或死亡。

2.1.4 观察 饲养员应每天对雏鸡的采食、饮水、精神状态及粪便颜色和形态进行细致的观察。健康无病鸡食欲旺盛,饮水适度,反应灵敏,活泼好动,其粪便为灰色条形或塔形。一旦发现问题,可参照表 2 结合症状诊断鸡只是否发病或及时向技术人员报告。每批鸡应进行认真详细的登记工作,记录内容包括:健康情况、用药情况、用料数量、免疫程序、鸡只死亡或成活数目等,目的是为日后养鸡总结经验。

2.1.5 脱温 雏鸡 15~20 天龄时全身的羽毛已

表 2 一些常见症状提示的疾病

序号	症状	提示的主要疾病
1	毛松、卷头、缩颈、怕冷	感冒、白痢、法氏囊病
2	病程短突然死亡	大鸡禽出败、小鸡法氏囊病或卡氏白细胞虫病、中毒
3	红色粪便	球虫病、出血性肠炎
4	白色粘性粪便	白痢、痛风、尿酸盐代谢障碍、传染性支气管炎
5	水样稀薄粪便	饮水过多、饲料中镁离子过多、轮状病毒感染,小肠球虫
6	黄绿色带粘液粪便	鸡新城疫、禽流感、禽出败、卡氏白细胞虫病
7	饮水量剧增	长期缺水、热应激、球虫病早期、饲料食盐太多、其他热性病
8	饮水明显减少	环境温度太低、濒死期
9	瘫痪,一脚向前一脚向后	马立克氏病
10	1 月龄内雏鸡瘫痪,头颈震颤	传染性脑脊髓炎、新城疫等
11	扭颈、抬头望天、前冲后退、转圈运动	鸡新城疫、维生素 E 和硒缺乏、维生素 B1 缺乏
12	颈麻痹,平铺地面上	肉毒梭菌毒素中毒
13	冠紫蓝色	败血症、中毒、濒死期、禽流感
14	冠苍白	传染性贫血、卡氏白细胞虫病,白血病、营养缺乏
15	张口伸颈呼吸、有怪叫声	鸡新城疫、传染性喉气管炎、禽流感、传染性支气管炎
16	眼结膜充血	中暑、传染性喉气管炎
17	眼结膜肿胀,眼睑下有干酪样物	大肠杆菌、慢性呼吸道病、传染性喉气管炎、沙门氏菌病、曲霉菌病、维生素 A 缺乏
18	鼻粘性或脓性分泌物	传染性鼻炎
19	眼虹膜褪色、瞳孔缩小	马立克氏病
20	口腔粘膜坏死、有假膜	禽痘、毛滴虫病、念珠菌病
21	口腔内有带血粘液	卡氏白细胞虫病、传染性喉气管炎、急性禽出败、鸡新城疫、禽流感
22	羽毛易脱	肉毒梭菌性中毒、禽出败
23	脚出血	创伤、喙癖、禽流感
24	皮肤出血	维生素 K 缺乏、卡氏白细胞虫病、某些传染病、中毒
25	皮下气肿	阉割、剧烈活动等引起气囊膜破裂
26	皮肤粗糙、眼角、嘴角有痂皮	泛酸缺乏、生物素缺乏、体外寄生虫病
27	皮肤痘痂、痘斑	禽痘

较浓密,鸡只发育良好,体质较好就可脱温。如寒冷天气或炎热天气可推迟或提前脱温。脱温前3 d开始打开门窗,让雏鸡适应外界环境。

2.1.6 防啄癖 放养的杏花鸡一般不需断喙。可在20~30日龄时,开始采取以下措施防止啄癖:(1)分散饲养,减少密度(15~20只/m²)和放牧。(2)减少强光刺激。(3)饲料饮水不能缺。(4)饮水中加入0.05%强力多维或0.5%食盐;饲料中加入适量河沙,每两周用1天。

2.1.7 防应激 封开杏花鸡品种野性大,容易受惊吓,大群饲养时特别严重,应尽量避免。(1)停电、响声突然的应激;(2)转料、转棚舍应激:转料和转棚舍不能同时进行,转棚舍应在转料前或后一个星期进行。(3)人为捉鸡或赶鸡时应激:疫苗注射或鸡只移棚时应选择晚间进行,降低人为应激。可提前2 d连续喂给防应激药,选用0.05%电解多维饮水。在操作时用竹围分成小群后,在熄灯(微弱光)下进行。

2.2 育成期的饲养管理

2.2.1 育成期间的中、大鸡需要较大的活动空间。一般以肉鸡舍周围作为鸡的活动场地,活动场地应为0.5只/m²,两群间距不得少于200 m。小鸡从育雏舍转移至育成舍后,应在新鸡舍内停留48 h后再放出舍外,以免部分鸡不懂得自行回鸡舍内。

2.2.2 根据鸡只白天活动,晚上蛰伏休息的特性,育成鸡可在天气晴朗时放牧于野外,在日落后

才成群赶回鸡舍内。连续坚持3 d人为放牧安排。

2.2.3 肉鸡舍内应保持卫生清洁和通风透气,保证饲料与饮水的正常供给。在舍内外都放置饮水器。

2.2.4 鸡群采用“全进全出”的方式。在上一批鸡转栏后对鸡舍、场地及用具作彻底消毒。具体做法是:在活动场地撒上石灰,并用消特灵、百毒杀等消毒剂对舍内作喷雾消毒,鸡舍内用具用0.1%高锰酸钾溶液清洗。

2.2.5 各阶段喂料量:见表3(以每♀羽日喂料量计)。

3 疫病预防

3.1 疫苗接种

3.1.1 免疫程序 见表4。

3.1.2 注意事项

3.1.2.1 疫苗的运输保管:疫苗的安全运输和保管是保证免疫成功的重要环节之一。在这一过程中,应避免高温和阳光直射。

表3 各阶段喂料量的安排

阶段	日食料量(g)	平均体重		饲喂次数	备注
		日龄	重量(kg)		
1-40日龄	15	40	0.3	自由采食	
41-50日龄	35	50	0.6	过渡分餐	
51-70日龄	42	70	0.9	3次	
71-90日龄	48	90	1.0	3次	
91-120日龄	67	120	1.2	2次	全价料50%+农家料50%
121日龄以上	80	130	1.25-1.3	2次	全价料50%+农家料50%

表4 杏花鸡的一般免疫程序

接种日龄	疫苗	剂量(羽份/只)	接种方法	备注
1	马立克氏病疫苗(CVI988)	1羽份/只	颈部皮下注射	孵化场内接种
5	新支二联苗或ND IV系+传支H ₁₂₀	2羽份/只	点饮	
7-9	鸡痘苗(POX)	1羽份/只	翼膜下刺种	新场地或无鸡痘发病史的鸡场可省略
11	法氏囊苗	1羽份/只	点饮	
14	禽流感H ₅ 灭活苗	0.3 mL/只	颈部皮下注射	
15	新支二联苗	2羽份/只	点饮	
20	法氏囊苗	1羽份/只	点饮	
25	新支流三联灭活苗(ND+IB+AD)	0.25 mL	肌注	
35	禽流感H ₅ 灭活苗	0.5 mL/只	颈部皮下注射	
40	喉气管疫苗(ILT)	1羽份/只	单边滴眼	新场地或无该发病史的鸡场可省略
50	ND I系或ND灭活苗	1羽份/只	肌注	
70	禽霍乱(FC)	1.5羽份/只	肌注	
90	禽流感H ₅ 灭活苗	0.8 mL/只	颈部皮下注射	

3.1.2.2 免疫接种选在鸡群健康状况良好时,免疫前后一星期内不使用抗生素类药物(免疫效果增强),添加强力多维素配合纯中草药清热制剂等保健药物。

3.1.2.3 喂服疫苗方法:先停水 1~2 h 后,再把疫苗稀释为每只鸡 3~5 mL 的份量疫苗稀释液,并要求在 1~2 h 内全部饮完。保证有充足的饮水器具,使 2/3 以上的鸡只同时有饮水位置。饮水器不得置于直射阳光下,如风沙较大时应在室内进行。

3.1.2.4 杜绝鸡群中存在漏免的个体。疫苗注射操作时分小格进行。用竹围或模板把未注射的鸡苗和已注射的鸡苗隔开。

3.2 防病管理

封开杏花鸡抗病力特强。合理的饲养管理,杜

绝病原的入侵,提高机体抵抗力,可以达到很好的防病效果。具体措施包括:(1)外来人员、运输车辆应谢绝进入鸡场,如必要时应在消毒后方可进场。(2)鸡舍每周喷雾消毒 1 次,每 15 d 带鸡消毒 1 次。(3)鸡群每隔 10~15 d 喂清热饮料一次(如穿心莲、板蓝根、鱼腥草等水浸(煎)剂),全天自由饮用。(4)做好灭鼠工作(晚上 8 时前投药灭鼠效果最佳)。于鸡群放牧前清理死鼠,确保安全后再放牧。

3.3 疫病处理

鸡群如发生传染性疾病,应立即采取有效隔离措施,报告当地畜牧兽医站诊断,切勿胡乱用药,以免造成误诊、迟诊。对病死鸡只应高温处理或深埋,不得乱丢、乱放,以免造成人为传播疫病。

(上接第 5 页)

言,ASFV 清除计划的着眼点不应该是立马清除病毒,而是在整个养猪生产的管理以及生物安全水平逐渐提高的基础上清除病毒。

参考文献:

- [1] Boshoff C I, Bastos A D S, Gerber L J, et al. Genetic characterization of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa(1973-1999) [J]. *Vet Microb*, 2007, 121:45-55.
- [2] King K, Chapman D, Argilaguuet J M, et al. Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunization [J]. *Vaccine*, 2011;29:4593-4600.
- [3] Ivanov V, Efremov E E, Novikov B, et al. Vaccination with viral protein-mimicking peptides postpones mortality in domestic pig infected by African swine fever virus [J]. *Mol Med Report*, 2011 (4):395-401.
- [4] Salguero F J, Gil S, Revilla Y, et al. Cytokine mRNA expression and pathological findings in pigs inoculated with African swine fever virus(E-70) deleted on A238L [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2008:124, 107-119.
- [5] Lacasta A, Ballester M, Accensi F, et al. Towards a DNA-vaccine against African swine fever:an ongoing effort [C]. Proceedings of 6th Symposium on Emerging and Re-emerging pig diseases, 2011:23, 66.
- [6] Boinas F S, Wilson A J, Hutchings G H, et al. The persistence of African swine fever virus in field-infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF endemic period in Portugal [J]. *PLoS ONE*, 2011 (6):e20383.
- [7] Lyra T M P. La erradicación de la peste porcina africana en el Brasil, 1978-1984 [J]. *Rev Sci Tech of Int Epiz*, 2006:25, 93-103.
- [8] Gallardo C, Mwaengo D M, et al. Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes [J]. *Vir Gen*, 2009:38, 85-95.
- [9] Costard S, Wieland B, W de Glanville, et al. African swine fever:how can global spread be prevented? [J]. *Phil Trans R Soc B*, 2009:364, 2683-2696.
- [10] Bech-Nielsen, Fernandez S, Martinez-Pereda J F, et al. A case study of an outbreak of African swine fever in Spain [J]. *Br Vet J*, 1995:151, 203-214.
- [11] Rowlands R J, Michaud V, Heath L, et al. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007 [J]. *Emerg Inf Dis*, 2008:14, 1870-1874.
- [12] Beltran-Alcrudo, Lubroth D J, Depner K, et al. African Swine Fever in the Caucasus [J]. *EMPRES watch*, 2008.
- [13] Sa'nchez-Vizcaino J M. Diseases of Swine [M]. 9th edn, Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, 2006:291-298.
- [14] Arias M, Sa'nchez-Vizcaino J M. Trends in Emerging Viral Infections of Swine [M]. 1st edn, Iowa State University Press, Iowa, United States of America, 2002:119-124.

浅谈笨鸡围栏生态放养

张海富

(平遥县畜牧中心, 山西 晋中 031100)

中图分类号: S815.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0024-03

“笨鸡”一词的原义主要是指主要以传统的小规模放养方式人工饲养的一些传统蛋肉兼用型鸡,又叫柴鸡,具有耐粗饲、就巢性强和抗病力强等特性,肉质鲜美。柴鸡蛋在市场上非常畅销,且价格远远高于普通鸡蛋。因区域不同其俗称也有差异。本文所称笨鸡并不是专指某一特定的品种,而是具有相同特点鸡的泛称。笨鸡围栏生态放养就是指充分利用原生态的、绿色无污染的自然环境条件,选择植被良好、交通便利、水电方便的山沟、草坡、空闲林地等非耕地,通过围栏和搭建鸡舍、生态放养笨鸡的一种养鸡模式。

1 笨鸡放养场地的选择

笨鸡放养的核心技术就是充分利用自然作物如草籽、根茎、草叶等和动物性的食源如昆虫、蝇蛆等,以较少的饲料投入获得高质绿色产品。因此所选场地一定要植被茂密,天然昆虫繁多,即要有良好的可循环的动植物生态环境。这就要求:一是小气候要好,如湿度温度要适宜;二是土层较厚,有机质丰富,植被再生能力强。同时要想达到较大的饲养规模,应具备水、电、道路等硬件条件。当然,首先要考虑不能在易发生洪涝和泥石流灾害的地方建场。

2 规划和围栏

一般情况下,每5 000~10 000 m²地可放养笨鸡300~500只,可利用2~3年左右,需要再经过3~5年的植被恢复期才可重复利用。为便于鸡只夜宿和产蛋,每500只鸡要规划修建一个30 m²左右的“休产室”,休产室中央要放置人字形木架以供鸡休息,靠墙位置要设置长、宽、高均为40 cm的产蛋箱50个左右以供鸡只产蛋。休产室要严密坚固,鸡和人进出的门要能关严关牢,通风窗户要加铁丝护网,防止鼠害等天敌进入。因为每天

要给鸡喂水和补食,所以还要修建一个40 m²的补喂鸡舍,这个补喂鸡舍春秋夏三季可做成一个有顶、能防雨、四面敞开的棚场。但冬季为了升温 and 保温,四周要用大棚膜遮盖并加盖草帘,这样,棚内温度就可达到8℃,从而实现冬季产蛋。补喂鸡舍可按每500只鸡100~200 m²配备。休产室和补喂舍要建在场地中央地势较高向阳背风的地方,并要实现水、电、道路的“三通”。

如上所述,因受养殖场地需有恢复植被期不能连续使用的限制,鸡舍建筑以“因陋就简”为好,有条件时,建成彩钢加泡沫塑料板的活动房最好,便于再次利用。

围栏可用高(幅宽)1~2 m(因鸡品种不同而异),网眼为5 cm左右的尼龙网进行圈围。可因地制宜利用自然的树木为桩,以铁丝为上界,下面以土压盖严实。

3 品种选择和引进

要想使笨鸡养殖达到一定规模,扩大种群是关键。选择本地原有笨鸡自繁扩大种群是一种模式。一般每个县都有种鸡孵化场,可通过送蛋代孵的方式进行扩种,因鸡孵化时每批只需用时21 d,所以很快就可达到扩种目的。此外,更方便的办法是从笨鸡种鸡场直接引进。因为笨鸡并非指特定的单一品种,实践证明选择非纯化的杂种鸡效果更好,如高产商品蛋鸡和本地土鸡杂交的鸡种,这些鸡也耐粗饲,产蛋率较高,不易出现抱窝现象。特别是如果养殖方式相同,这些杂交鸡与笨鸡蛋品质几乎没有差异,这就为笨鸡养殖提供了便利,现在有不少种鸡场专门提供这种商品笨鸡。在引种时要注意,如果单纯为了产蛋可选用鉴别雏,其中公雏比例约为5%左右就可。如果淘汰鸡行情好或者仔公鸡有销路也可公母混养。需要特别说

明的是引进鸡雏一般需要预定,养殖户要根据自己的情况早做准备。

4 育雏管理(1-30日龄)

4.1 育雏准备

4.1.1 育雏室的准备 为便于管理和有效控制动物疫病,在笨鸡养殖上要坚持全进全出的养殖模式。根据全进全出的养殖模式,我们可以利用休产室进行育雏而不必专门修建育雏室。具体方法是:将休产室彻底清扫,反复用液体消毒剂消毒,最后密闭,用熏蒸法(目前市场不准销售高锰酸钾,可用商品化的聚甲醛类专用熏蒸药物代替)消毒24 h以上。消毒时将室温提高到25℃以上,可提高消毒效果。为节省燃料可根据每m²育雏25只的标准将休产室用薄板、塑料隔成适当大小的面积。温度是育雏成败的关键,为此,在接雏前一定要试温,要确保室温能恒定在34℃左右。生火炉保温是较经济的办法,但要注意煤气泄露和中毒,建议以火炉为主,辅以能自动定温的电暖气,既经济又省力。

4.1.2 育雏工具的准备 育雏工具主要有温湿度计、饮水壶、料槽、消毒器具、垫料等,温湿度计要分散挂在与育雏床同高度的室内各处。

4.1.3 育雏床的准备 育雏有单层平面和多层平面两种方法。单层平面育雏法便于管理和观察,多层平面育雏虽节省空间,但上下层温度不易控制,且上下层鸡要经常轮换,所以不值得推广。育雏床选用普通笼养蛋鸡用的笼床就可,支在离地90 cm的水平面就可,如笼床网眼较大,前几天可适当用报纸等作为垫料。但7 d后必须将之去除,以利粪便清除。

4.2 育雏管理

4.2.1 雏鸡的饮水 为使雏鸡体内卵黄全部吸收,减少“大肚鸡”,提高雏鸡生长的整齐度,经过长途运输送达的雏鸡不能直接给予饮水,应最少让其休息30 min后才供水,如路途较短,或非炎热季节,给水的时间还可适当推迟到2~3 h后。这样鸡的发育才整齐均匀。前7 d的饮水以用凉开水为宜,如有优质井水也可直接使用。但无论如何,水的温度要与室温相同。水中可加入5%葡萄糖或白糖。为防止鸡白痢,可加入一些专供育雏用的商品名为“开口乐”、“开口笑”(实际成分为氟本尼可、新霉素等)的兽药;为减少应激可用电解多维、鱼肝油等。但一定要注意按说明使用,不能随

意加量。至于饮水用具,用壶和槽均可,用2.5 L的壶以每50只鸡一个为宜,用槽按每只鸡1.5 cm的长度配备。用槽时要注意调整槽的高度以保证雏鸡能够饮到水。除用药和疫苗要控水外,要保证雏鸡全天24 h有足够的清洁饮水任意饮用。

4.2.2 雏鸡的喂食 雏鸡开食要在饮水后2~3 h进行,选用细粒的全价配合雏鸡料即可。喂食的量以料槽中始终有1/2高度的饲料为宜。过少则吃不好,过多则抛洒浪费。为保证雏鸡进食,要保证每天24 h都有料可吃。为保证雏鸡的发育和产能,育雏期全部以全价配合饲料喂食为好。

4.2.3 育雏温度 雏鸡1-3日龄维持在34~35℃,4-7日龄维持在32~33℃,7-10日龄维持在30~31℃,10日龄后每天降温0.5~1℃,直到20℃。30日龄后,如外界气温高于20℃则可以直接停火脱温,如低于20℃,则应用7天时间逐渐停火到完全脱温。

4.2.4 育雏湿度 7日龄内雏鸡的湿度要在50%~70%之间,以利卵黄吸收。可用火上放置开水锅、开口水壶和带鸡消毒的方法提高湿度。

4.2.5 雏鸡的光照 雏鸡光照不宜过强,以每10 m²一只40瓦的灯泡(在2.5 m高处)就可满足要求。为保证雏鸡采食时间,7日龄内可每天补光5~7 h,7-21日龄每天补光3~5 h,21-30日龄根据季节不同每天补光1~2 h。

4.2.6 育雏室通风 在保证温度恒定的前提下,增加通风有利而无害。所以即使是冬季也要选择中午无风时进行通风换气。

4.2.7 卫生要求 要做到水壶或水槽每天清洁消毒1次,料槽每3天清洁1次,粪便天天清。每3天带鸡消毒1次。

5 育成期管理(31-150日龄)

根据品种和场地条件的不同,雏鸡在31~50日龄时就可从育雏床下到平地进行饲养,从下地平养到开产前的这个时期就是育成期。

5.1 饲喂

进入平养后,其饲料应由雏鸡料逐步过渡到育成期用料,具体可参考以下方法:第1周采用3/4雏料加1/4育成料,第2周1/2雏料加1/2育成料,第3周1/4雏料加3/4育成料,第4周以后全部为育成料。除用育成料外,育成后期要不定期补给青草、蚯蚓、蝇蛆等自然动植物饲料。育成

期鸡每天要定时饲喂,一般情况下可每天喂3次。饮水:每50只鸡需用一个普通洗脸盆作为饮水器具,要保证全天24h有清洁饮水。

5.2 饲养密度

以10~12只/m²为宜。

5.3 光照

为促进和提高笨鸡产蛋性能,育成后期应保证一定的光照时间。可根据季节适当补光,使之达到每天12h左右。

5.4 转群

鸡到90日龄时就要放入围栏区进行饲养。转群时应注意以下细节:①转群前6h停止喂食;②从转群前3天到转群后3天饮水中加入电解多维以提高鸡只抗应激能力;③转群时逐一对鸡只检查,淘汰病弱残鸡;④以早上进行转群为宜。⑤转群后前3天休产室要增加光照,加设饮水器具和料槽,以让鸡只顺利过渡。⑥转群后因鸡多量采食青绿多汁饲料,其粪便会变绿和变稀,是正常现象。一般情况不用采取措施。

6 产蛋期管理(151日龄至淘汰)

6.1 饲喂

围栏放养时主要以采食自然动植物饲源为主,在秋夏季节每天上下午各补喂1次即可。每天每只补喂总量为30~70g;早春和冬季补喂量要增加到每天每只100g以上;为保证蛋品品质,补喂日粮要采用绿色无污染的原粮,其中不得添加任何添加剂、药品、激素、人工合成品。只可添加食盐、石粉等。

6.2 饮水

要保证鸡只全天24h能喝到清洁饮水。

6.3 光照

从21周龄开始要保证每天13~14h光照。开产后以每周增加0.5h人工光照的方法使全天总光照时数达到16~17h。人工补光时每10m²用1只25瓦的白炽灯挂在2~2.5m高的地方就可达到要求。

6.4 收蛋

每天上午12点,下午6点左右各收一次蛋。要注意鸡只在蛋箱外产蛋的情况。及时收蛋可避免母鸡抱窝。

7 防疫管理

防疫工作是养殖成败的关键。笨鸡养殖也不

例外。在防疫工作上,一是要封闭,围栏场区和鸡舍要严格禁止无关人员进入,必须进入的车辆和人员要严格消毒。二是要坚持消毒,除前面介绍的育雏消毒外,补喂室和休产室要每周消毒2次。饮水器具要每天清洁和消毒。围栏区视情况可每2周消毒1次。三是按时进行疫苗接种。以下是供参考的免疫程序:

5-7日龄:新支二联冰干疫苗两倍滴鼻;同时颈部皮下注射0.3mL的新城疫油苗;14日龄:法氏囊疫苗饮水;16日龄:高致病性禽流感灭活苗(H₅N₁株)每鸡注射0.5mL;21日龄:新城疫鸡传染性支气管H₁₂₀二联苗2倍滴鼻;28日龄:高致病性禽流感灭活苗(H₅N₁)每鸡注射0.5mL;35日龄:鸡痘苗皮下刺种;75日龄:禽流感灭活苗(H₉)每鸡注射0.5mL;95日龄:新城疫中等毒力活疫苗3倍量注射;110日龄:新支减三联灭活苗每鸡注射0.5mL;126日龄:高致病性禽流感灭活苗(H₅N₁)每鸡注射0.5mL。

8 常用饲料原料的选择与配方推介

玉米、谷物、小麦、小杂粮及其副产品如糠、麸、粕等都可作为笨鸡饲料原料。其中主要的能量饲料有玉米(一般可用40%~65%)、糠麸(一般可用10%);主要的蛋白饲料有粕饼(须熟制)(一般可用15%~25%)。

除上述物品外,还要加食盐(一般要用0.3%左右)、石粉(一般可用2%~5%)、磷酸氢钙(一般可用1%~2%)

此外,松针、桔皮、艾叶、胡萝卜、辣椒等多种植物和饲用作物如苜蓿、豆科野生作物等也可适当添加。

雏鸡料用全价商品配合饲料最好,所以在此不作推介。育成期参考配方:玉米60%,麸皮20%,豆饼18%,食盐0.3%,其它多维氨基酸等添加剂适量;产蛋期参考配方:玉米61.2%,麸皮12%,豆饼25%,食盐0.3%,磷酸氢钙1.5%。

9 其它

因围栏区植被和动物性食物源不同,养殖户可在实践中自己调整配方,同时秋夏季节可在围栏区(特别是有天然池塘处)设置若干黑光灯,通过诱杀昆虫给鸡补充蛋白性饲料,也可通过积粪养殖蝇蛆、蚯蚓等解决蛋白性饲料少的问题。通过这些方法可有效降低饲料成本,增加养殖效益。

不同抗球虫药物对球虫的敏感性试验

李重生, 许锡泉

(广东省农业科学院畜牧研究所, 广东 广州 510640)

摘要:以岭南黄鸡为试验动物, 采集广东省内部分散养户的鸡粪便, 分离球虫卵囊, 分别选取癸氧喹酯、马杜霉素、莫能霉素、解百球、尼卡巴嗪、球痢灵、马杜霉素+尼卡巴嗪、禽安+尼卡巴嗪、球虫散9种药物或组分, 进行抗球虫敏感性试验。结果表明: 混合球虫对尼卡巴嗪和马杜霉素+尼卡巴嗪敏感, 对禽安+尼卡巴嗪、球痢灵、解百球和马杜霉素中度敏感, 对其它药物有抗药性。

关键词: 岭南黄鸡; 球虫; 敏感性

中图分类号: S852.72³

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0027-03

随着集约化养鸡的发展, 鸡球虫病的危害越来越大。我国每年用于防治鸡球虫病的药费达数亿元人民币, 占鸡全部防治费用的近1/3^[1]。在集约化养殖条件下, 鸡球虫病常年流行, 发病率通常为20%~80%, 严重者死亡率为60%~80%。球虫病除引起死亡外, 还可造成饲料报酬下降和生产性能下降等间接经济损失^[2]。自1994年以来, 我国已经报道有18种抗球虫药出现耐药性, 表明球虫耐药性现象十分普遍^[3]。采用穿梭用药和轮换用药等用药方案可降低耐药性的产生速度; 另外, 对于耐药性较严重的部分药物, 给予其足够的休药期, 也有利于其耐药性的恢复。如何确定哪些药物可继续使用, 哪些药物必须进入休药期, 在饲料中添加何种药物效果较好, 这些都给预防用药造成很大困扰。因此, 有必要对目前常使用的抗球虫药进行评估, 以确定其使用效果。

1 试验材料与方法

1.1 试验动物

岭南黄鸡。

1.2 抗球虫药物

癸氧喹酯: 浙江金伯士药业有限公司; 马杜霉素: 浙江升华拜克生物股份有限公司; 莫能霉素和禽安: 美国礼来公司; 解百球和球虫散: 广州凯旭生物科技有限公司; 球净: 佛山市海纳川药业有限公司; 球痢灵: 武汉兴银河精细化工公司。

1.3 球虫卵囊

从广东云浮、江门和高明等地的养殖户中, 收集岭南黄鸡小鸡阶段(1-30日龄)、中鸡阶段(31-50日龄)和大鸡阶段(51日龄-上市)各30个养殖户的鸡粪便, 分别采用饱和盐水漂浮法收

集球虫卵囊, 重铬酸钾法进行孢子化, 孢子化后置冰箱4℃保存。取0.1 mL混合孢子化卵囊, 压片用10×40倍显微镜镜检, 量取卵囊大小和根据卵囊形态确定其含柔嫩艾美尔球虫2 000个, 堆形艾美尔球虫2 000个, 巨型艾美尔球虫3 000个, 毒害艾美尔球虫1 000个^[4]。混合卵囊采用麦克马斯特法进行卵囊计数, 确定攻虫剂量为 0.7×10^5 个/只, 攻虫剂量是根据前3次球虫药敏试验情况初步确定的。

1.4 试验分组及处理

取121只优质1日龄岭南黄鸡, 笼养, 计算整个试验期内所需饲料量, 一次性生产所有不含球虫药的饲料, 其它成分与常规饲料相同。各组饲喂特制饲料至10日龄。将鸡只逐只称重并分成11组, 每组11只。具体分组情况见表1。将各球虫药人工加入特制饲料中并做好标记, 各组喂相应含球虫药物饲料至21日龄实验结束。自由采食和饮水。12日龄时每只鸡用 0.7×10^5 个/mL卵囊人工饲喂1 mL, 攻虫后7 d、8 d和9 d, 每组自粪盘中取5个点采集粪便, 收集粪便, 用麦克马斯特法进行卵囊计数。于攻虫后9 d每组剖杀5只试验鸡, 用于肠道病变计分。

1.5 检测指标

选用抗球虫指数(ACI)、病变积分减少率(RLS)、相对卵囊产量(ROP)和最适抗球虫活性百分率(POAA)等4项指标作为鸡球虫抗药性判定指标。每个单项指标的结果用阴性(-)和阳性(+)表示。根据4项指标的阴阳性数量, 分别判定为无抗药性(4-)、轻度抗药性(3-/1+)、中度抗药性(2-/2+)、完全抗药性(1-/3+或4+)。

表 1 试验分组及处理

组别	分组及处理
1	空白对照组
2	攻毒对照组
3	癸氧喹酯组, 500g/T
4	马杜霉素组, 500g/T
5	莫能霉素组, 500g/T
6	解百球, 500g/T
7	球净, 500g/T
8	球痢灵, 500g/T
9	马杜霉素 + 尼卡巴嗪, 400g/T+240g/T
10	禽安 + 尼卡巴嗪, 400g/T+240g/T
11	球虫散, 1000g/T

ACI=(相对增重 + 存活率)-(卵囊值 + 肠道病变值)。ACI>160 为敏感, 120~159 为部分敏感, <120 为完全耐药。

相对增重=(试验组末重 - 试验组初重)/(空白组试验末重 - 空白组试验初重)×100。

存活率 = 试验末存活鸡数 / 试验初鸡数 × 100。

卵囊值: ROP<1%, 卵囊值为 0; 1%~25% 为 5; 26%~50% 为 10; 51%~75% 为 20; 76%~100% 为 40。

肠道病变值 = 每组平均病变记分 × 10。

ROP= 感染用药组卵囊产量 / 感染不用药组卵囊产量。ROP<15% 为敏感, 其它为耐药。

RLS=(感染不用药对照组平均病变记分 - 感染用药组平均病变记分) / 感染不用药对照组平均病变记分 × 100%。RLS>50% 为敏感。

POAA=(感染用药组 GSR- 感染不用药组 GSR) / (不感染不用药组 GSR- 感染不用药组 GSR): 以 POAA≤50% 判为耐药性, >50% 为敏感。

GSR= 笼末重 / 笼初重 × 100%。

OPG: 每克粪便卵囊数。

2 试验结果

2.1 抗球虫指数

用 ACI 测定各药物的抗球虫指数见表 2。由表 2 可知, 仅第 4、7、8、9、10、11 组敏感; 其它各组为中度敏感。

2.2 病变积分减少率

用病变积分减少率测定的耐药性结果如表 3。由表 3 可知, 球虫卵囊对所有抗球虫药均有耐药性。

2.3 相对卵囊产量(ROP)

用 ROP 测定的耐药性结果如表 4。由表 4 可

表 2 用 ACI 测定球虫耐药性结果

组别	相对增重 (%)	存活率 (%)	病变值	卵囊数 (×10 ⁶)	卵囊值	ACI
1	100	100	7.33	0	0	192.7
2	85.68	100	9.67	11.22	40	136.0
3	89.40	96.67	11	7.68	20	155.1
4	87.59	100	6.17	6.75	20	161.4
5	94.91	100	8.17	14.8	40	146.7
6	95.33	100	5.17	19.57	40	150.2
7	81.65	96.67	5.69	1.06	0	172.6
8	88.44	100	6	5.6	10	172.4
9	87.59	100	6.33	1.96	5	176.3
10	88.34	100	5.95	1.99	5	177.4
11	93.32	100	5.08	6.14	20	168.2

表 3 RLS 测定球虫耐药性结果

组别	十二指肠	空前	空后	盲肠	平均积分	RLS (%)
1	1.13	0.77	0.63	0.4	0.73	24.13
2	1.67	0.87	0.63	0.7	0.97	0
3	1.87	1.1	0.87	0.57	1.1	-13.79
4	1.1	0.6	0.57	0.2	0.62	-36.21
5	1.1	0.73	1.07	0.37	0.82	15.51
6	1.07	0.43	0.23	0.33	0.52	46.55
7	0.93	0.69	0.52	0.14	0.57	41.14
8	1.03	0.87	0.4	0.1	0.6	37.93
9	0.9	0.77	0.6	0.27	0.63	34.48
10	0.90	0.66	0.66	0.17	0.59	38.46
11	1	0.57	0.33	80.13	0.51	47.41

知仅第 7 组球虫药敏感, 其它各组均耐药。

2.4 最适抗球虫百分率(POAA)

由 POAA 测定的球虫耐药性结果见表 5。由表 5 可知, 仅第 5、7、11 组球虫药对球虫有敏感性, 其它各组均耐药。

3 小结与讨论

本试验测定了广东部分区域球虫对目前使用的抗球虫药的敏感性, 从结果看, 仅第 7 组为轻度抗药性, 第 11 组为中度抗药性, 其它各组耐药。

第 7 组主要成分为尼卡巴嗪, 因尼卡巴嗪在炎热的夏季易加重热应激, 广东的饲料厂均在 4-6 月不用或少用尼卡巴嗪, 造成了其事实上每年都有一定的停药期, 有利于其敏感性的恢复。

马杜霉素因其安全剂量小, 兽药厂家基本不采用马杜霉素添加到其兽药产品中, 仅用于饲料厂预混料的添加, 而各饲料厂每年常规球虫药的预防方案中均有一定的休药期, 但不同饲料厂的方案可能有所差异, 而这次是对不同阶段, 不同地区进行采样检测, 这可能是造成其部分耐药的原因。

表 4 用 ROP 测定球虫耐药性结果

组别	6-7d($\times 10^5$)	7-8d($\times 10^5$)	8-9d($\times 10^5$)	总值($\times 10^5$)	ROP
1	0	0	0	0	0
2	8.5	2.14	0.58	11.22	100
3	5.64	1.5	0.54	7.68	68.45
4	4.6	1.56	0.59	6.75	60.16
5	11.37	2.84	0.59	14.8	131.91
6	15.86	2.86	0.85	19.57	174.42
7	0.51	0.33	0.22	1.06	9.45
8	3.47	1.36	0.77	5.6	49.91
9	0.97	0.79	0.2	1.96	17.47
10	0.74	1.08	0.17	1.99	17.74
11	2.88	1.94	1.32	6.14	54.72

表 5 用 POAA 测定球虫耐药性结果

组别	笼初重	笼末重	GSR	POAA
1	5740	15170	2.643	100
2	5720	13800	2.412	0
3	5700	14130	2.479	28.81
4	5760	14020	2.434	9.31
5	5770	14720	2.551	60.16
6	5760	9100	2.146	-36.03
7	4250	14750	2.2561	64.35
8	5740	14080	2.453	17.53
9	5690	13950	2.452	16.97
10	5710	14040	2.459	20.09
11	5730	14530	2.536	53.49

球痢灵主要在小鸡阶段使用,偶尔在中期使用,基本不在大鸡阶段使用。因这次试验采集含有小鸡阶段的部分卵囊,在球痢灵使用较普遍的前提下,预测其小鸡阶段已产生了耐药性,而对所有阶段球虫卵囊进行检测,其结果表现为耐药性。

解百球为中药制剂,在生产中应用较少,从检测结果看,它具有一定的抗球虫特性,表现为部分敏感性。

尼卡巴嗪与马杜霉素或禽安进行复配使用时,降低了尼卡巴嗪的用量,从检测结果看,因用量降低,导致了其抗球虫敏感性的降低,表现为完全抗性,较单用尼卡巴嗪检测效果差。

使用抗球虫药预防球虫病,不仅需要饲料中合理、轮换添加球虫药,降低抗球虫药耐药性产

生速度,还需要对严重耐药的部分抗球虫药物实行严格的休药期。这样可通过球虫耐药株和敏感株间竞争性增殖,经过几个世代,即可恢复球虫株的药物敏感性^[5]。

参考文献:

- [1] 时晓丽. 三种鸡抗球虫药的效力比较试验[J]. 家禽科学, 2010 (7): 9-12.
- [2] 范梅华. 剖析鸡球虫病的流行特点及防控策略[J]. 中国禽业导刊, 2005, 22(24): 20-23.
- [3] 索勋, 李国清. 鸡球虫病学[M]. 北京: 中国农业大出版社, 1998.
- [4] 郭威, 赵永静, 杨拥军, 等. 鸡球虫病流行病学调查报告[J]. 山东畜牧兽医, 2010, 31(9): 83-84.
- [5] 马立龙. 鸡球虫对 4 种抗球虫药物的耐药性及其机理研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2001.

2012“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 2012 年度“永顺杯”优秀论文。本刊将组织评委会专家进行评审,对获奖的优秀论文作者颁发证书及奖金。评选结果将于本刊 2013 年第 1 期公布。

1、**评选范围:** 本刊 2012 年度 1-6 期发表的文章。

2、**评选数量:** 优秀论文 16 篇,分设一等奖 2 篇、二等奖 4 篇、三等奖 10 篇。其中以学术研究类为主,兼顾综述类与实用技术类。

3、**奖金来源:** 总奖金 20000 元,由广东永顺生物制药有限公司赞助。其中一等奖奖金 2000 元/篇;二等奖奖金 1500 元/篇;三等奖奖金 1000 元/篇。

欢迎广大畜牧兽医工作者踊跃投稿

《广东畜牧兽医科技》编辑部

二〇一二年一月十六日

马链球菌兽疫亚种的保护性抗原 SzP 蛋白的鉴定与评价

崔健扬

(东莞市动物卫生监督所长安分所, 广东 东莞 523845)

摘要: 马链球菌兽疫亚种是引起猪链球菌病的主要病原之一。该菌的致病机理尚不清楚, 且缺乏合适的疫苗, 使猪链球菌病很难得到有效的控制。本实验通过构建 SzP 重组表达载体, 纯化重组蛋白, 对其的免疫效力进行了评价。结果表明该蛋白可以诱导高滴度的血清 IgG 抗体, 并且可提供一定的免疫保护效力。进一步研究表明该蛋白是一个重要的体内诱导抗原, 可诱导高水平的 Th1 和 Th2 型免疫应答。揭示了 SzP 蛋白在致病过程中起到重要作用, 为新型疫苗的研制及致病机制的研究奠定了基础。

关键词: 马链球菌兽疫亚种; SzP 蛋白; 新型疫苗

中图分类号: S855.1+1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0030-04

Identification and evaluation of a surface protective antigen, SzP of *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*

Cui Jianyang

(Chang'an Branch of Dongguan Animal Health Supervision Institute, Dongguan 523845, China)

Abstract: *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus* (SEZ) is an important pathogen associated with opportunistic infections of pigs in China. The absence of suitable vaccines or the knowledge of virulence markers could block the step for controlling SEZ infection. M-like protein (SzP) has been identified as an immunogenic protein in the previous study but its protective efficacy was not clear. In the present study, the purified recombinant SzP could elicit a significant humoral antibody response and could confer significant protection against challenge with lethal dose of SEZ in mice model. In addition, the SzP was an in vivo-induced antigen confirmed by the real-time PCR and could induce significant Th1-/Th2-immune responses. Our findings suggested that SzP played an important role in the pathogenesis of SEZ and could be a target for the development of an effective vaccine against SEZ infection.

Key words: *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*; SzP; Vaccine candidate

马链球菌兽疫亚种 (*Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*, SEZ) 属于乳杆菌目, 链球菌科, 链球菌属, 为革兰氏阳性菌。其宿主广泛, 能引起猪、马、绵羊、奶牛等多种动物发病, 在我国主要引起猪链球菌病^[1,2]。猪链球菌病是当今危害养猪业的一种重要细菌性疾病, 严重危害着我国乃至世界养猪业的发展^[3]。

由于对 SEZ 的毒力因子和保护性抗原方面缺乏全面的了解, 使有效控制 SEZ 的感染显得尤为困难^[4]。近期一些 SEZ 菌株的基因组测序让我们对这种新型病菌的发病机制有新的见解, 这有利于我们进行疫苗的研发。在这过程中类 M 蛋白 (SzP) 引起

了研究人员的关注, 因为该蛋白是链球菌发病机制和疫苗开发中的一种多功能蛋白^[5]。

相关研究表明, SzP 是一种具有免疫原性的蛋白, 但是其作为疫苗防御该菌感染的潜能仍不清楚^[6]。本实验通过克隆 SzP 蛋白, 构建其原核表达系统, 并探讨重组蛋白在致病机制中的作用。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

马链球菌兽疫亚种 C55138 株, 购自中国兽医药品监察所; 表达质粒 pET-28a(+) 购自普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司; 大肠杆菌 BL21 购自天根生化 (北京) 科技有限公司。

1.2 主要试剂

细菌 RNA 抽提用 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。抽提的细菌 RNA 中起初基因组 DNA 使用的 DNase I 为 promega 公司产品。反转录试剂盒以及荧光定量 PCR 的 SYBR Green I 为 TOYOBO 公司产品。Taq 酶、BamH I、Sal I 内切酶、T4 连接酶、DNA marker (DL-2000、DL-15000) 均为 TaKaRa 宝生物(大连)有限公司产品。UNIQ-10 柱式离心式 DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司。IPTG、X-gal 均为 Invitrogen 公司产品。融合 His 标签的重组蛋白纯化用 Ni-NTA 树脂购自 Qiagen 公司。

1.3 模板 DNA 的提取

按 Timoney 等^[7]提供的方法提取 DNA, 溶于 TE 缓冲液中, 置于 4 °C 备用。

1.4 引物的设计与合成

按 Timoney 等报道的蛋白基因序列, 通过分析序列获取抗原性较好的片段, 利用 Primer5.0 软件自行设计引物, 两端分别添加 Bam H 和 Sal I 酶切位点及保护性碱基。P1: TTGCTGGATCCGATAG-TTTAGATAGTG; P2: GCTGCTGTCGACTCCTCCTTCTT。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.5 SzP 基因的扩增

以提取的基因组 DNA 为模板, 按下列顺序配制反应试剂。反应体系 25 μ L: 2.5 μ L 的 10 \times Buffer, 2.5 μ L 25 mmol/L MgCl₂, 2.5 μ L 2.5 mmol/L dNTP Mixtrue, 10 μ mol/L 引物各 0.5 μ L, 0.1 μ L 5 U/ μ L 的 Taq DNA 聚合酶, 2 μ L DNA 模板, 加无菌双蒸水至 25 μ L。扩增程序: 95°C 预变性 5min, 95°C 30s, 55°C 30s, 72°C 1min, 30 个循环, 72°C 充分延伸 5min。

1.6 PCR 产物的酶切、纯化和克隆

利用 Bam H+ Sal I 同时酶切 PCR 扩增的产物及 pET-28a(+), 回收 PCR 片段以及载体片段。将回收 PCR 片段与 pET-28a(+), 连接, 转化 BL21 感受态细胞。

1.7 重组质粒的诱导表达及纯化

将重组蛋白的表达菌株接种于添加氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 于 37 °C 摇床培养。从培养好的菌液中取 100 μ L 接种于 10 mL 含相应抗生素的新鲜 LB 液体培养基中, 于 37 °C 振荡培养约 3 h, 至 OD₆₀₀ 达到 0.6~1.0 时, 加 IPTG 至终浓度为 0.8 mmol/L, 继续培养 3 h 后收集菌体。在 AKATA FPLC (GE healthcare, USA) 上利用填充有

Ni-NTA 树脂 (Qiagen GmbH, Germany) 的蛋白纯化层析柱纯化重组蛋白 SzP。

1.8 小鼠的免疫保护性试验

将成功表达并纯化的重组蛋白 SzP 分别与弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂乳化后作为疫苗, 浓度为 200 μ g/mL。同时设置佐剂对照 (即用生理盐水与等量弗氏佐剂乳化后制备) 和空白对照 (只注射生理盐水)^[8]。4 周龄的雌性 BALB/c 小鼠 (约 18 g) 每组 20 只, 免疫方法如下: 首免腹腔注射弗氏完全佐剂乳化的抗原 0.5 mL, 2 周后皮下免疫弗氏不完全佐剂乳化的抗原 0.5 mL。10 天后采血测效价并作为阳性血清。剩余小鼠用于保护力试验, 分别接种相同剂量的 C55138 (2 \times 10⁵ CFU), 连续观察 2 周, 记录小鼠的死亡情况。

1.9 SYBR Green I 实时定量 PCR

以回收的 SzP 和 16S rRNA 扩增产物作为标准品, 测定其浓度, 换算浓度 (ng/ μ L) 至拷贝数/ μ L。将标准品做 10 倍梯度稀释, 稀释的浓度分别为 10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹ 拷贝数/ μ L, 将其作为模板制作标准曲线。25 μ L 反应体系中包括: SzP 和 16SrRNA 上下游引物各 0.5 μ L, 10 \times SYBR Green Real-time PCR Master Mix 12.5 μ L, 双蒸水 11 μ L, cDNA 样品 0.5 μ L。每个样品做 3 个重复。反应扩增条件为: 50°C 2 min, 94°C 预变性 10 min; 紧接着 40 个循环的 94°C 变性 30s; 55°C 退火 30s; 72°C 延伸 45s。整个反应过程中的荧光信号的变化由 ABI Prism 7500 实时荧光定量 PCR 仪检测^[9]。

1.10 Real-time PCR 检测保护性抗原的体内诱导表达

感染小鼠体内细菌的富集方法按照 Zhang 等^[8]描述的方法进行。取培养至对数生长期的细菌作为体外培养细菌。用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂提取体内富集细菌和体外培养细菌的 RNA, 使用 promega 的 DNaseI 去除 DNA, 反转录过程使用 TOYOBO 公司的反转录试剂盒, 操作程序按试剂提供的操作步骤进行。以 1.9 的程序用 ABI Prism 7500 实时荧光定量 PCR 仪检测样品。

2 结果

2.1 重组 SzP 蛋白表达质粒的酶切鉴定

以马链球菌兽疫亚种的基因作为 PCR 模板, PCR 扩增 SzP 蛋白的基因并将其连接到原核表达载体 pET-28a(+). 为了证实外源基因成功插入到表达载体, 使用双酶切鉴定 (图 1), 结果重组表达

质粒酶切产物电泳后均为两条带,包括载体带和 900 bp 左右条带,表明重组质粒构建正确。

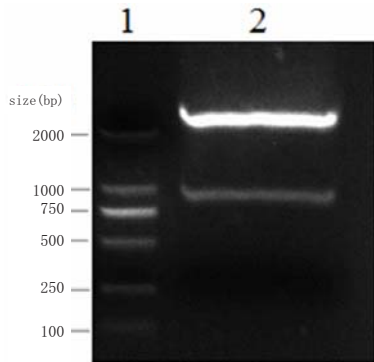


图 1 重组表达质粒 pET-SzP 的双酶切鉴定
1: DNA 标准 DL2000; 2: 重组质粒双酶切

2.2 重组蛋白的纯化

将重组表达的蛋白(融合 His 标签)利用 Ni-NTA 树脂做亲和层析纯化,收集蛋白洗脱液。收集的目的蛋白使用超滤浓缩后,用于后续的试验分析。将纯化的重组表达蛋白用 SEZ 阳性血清做 Western-Blot 分析,结果如图 2 所示,纯化后的蛋白能与 SEZ 阳性血清反应,出现阳性条带,表明重组蛋白具有较强的免疫反应性。可将该蛋白用于 SS2 攻毒保护力评价。

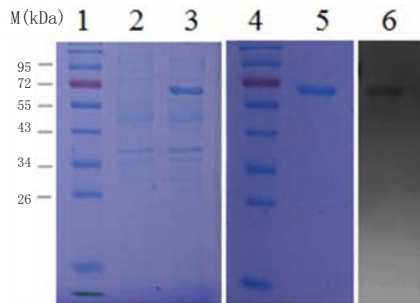


图 2 SzP 的诱导表达及纯化后 SDS-PAGE 分析及 Western-Blot 分析

泳道 1 和 4: 标准蛋白 Marker; 泳道 2-3: 分别为 IPTG 诱导前和诱导后的样品; 泳道 5: 纯化后的样品; 泳道 6: 纯化后的蛋白与阳性血清中和的结果。

2.3 重组蛋白诱导的免疫反应

将纯化的重组蛋白免疫小鼠,二免后第 10 天采血测试效价。结果表明(图 3A) SzP 重组抗原可诱导较高水平的 IgG 抗体。本试验通过使用羊抗鼠 IgG1-HRP、IgG2a-HRP 检测小鼠血清抗体的 IgG1 和 IgG2a 亚类来进一步评价抗原所诱导的免疫类型(图 3B)。小鼠血清中 IgG1 和 IgG2a 的水平可以从一定程度上反映出抗原所诱导的 Th2

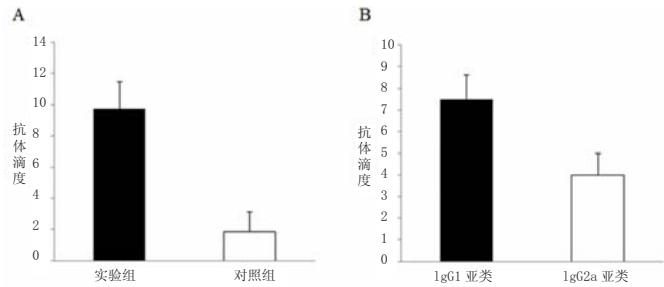


图 3 重组 SzP 蛋白诱导的免疫反应

A: 重组蛋白免疫小鼠后的抗体水平; B: 重组蛋白免疫小鼠后所诱导的免疫类型。

和 Th1 型的免疫类型。结果表明 SzP 可诱导高水平的 Th2 和 Th1 型免疫应答。

2.4 抗原的保护效力

为了评价 SzP 蛋白的保护效力,二免后第 10 天小鼠分别接种相同剂量的 C55138 (2×10^5 CFU) 评价重组蛋白的免疫保护力。结果如图 4 所示,空白对照组的死亡率为 80%,阴性对照组的死亡率为 70%,而实验组小鼠没有出现死亡,表明该蛋白具有较高的保护力。

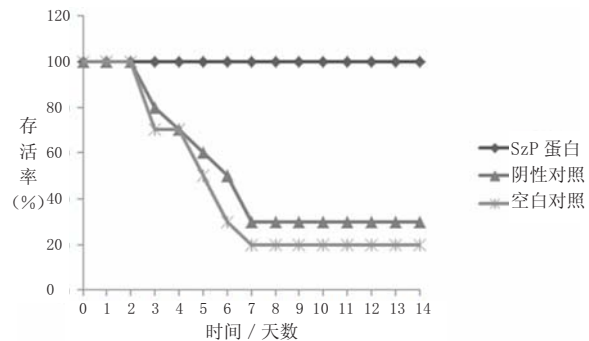


图 4 重组蛋白免疫小鼠后的攻毒保护力

2.5 Real-time PCR 检测保护性抗原的体内诱导表达

为了探讨 SzP 是否在体内诱导增强表达的特性,体内感染细菌的 RNA 和体外培养细菌的 RNA 进行了抽提,比较 SzP 在感染动物后其 RNA 含量是否显著增高。本实验应用 Real-time PCR 技术来研究其体内诱导表达特性。结果表明(图 5),相对于体外培养细菌,SEZ 感染小鼠脾脏分离细菌的 mRNA 均显著上调表达,为体内诱导增强表达的抗原。

3 讨论

保护性抗原 SzP 免疫后可以提供较高的保护效力。本研究对其保护机制进行了分析, SzP 诱导很高的抗体水平,通过检测 IgG1 和 IgG2a 来评价其诱导的免疫类型,发现其可诱导高滴度的

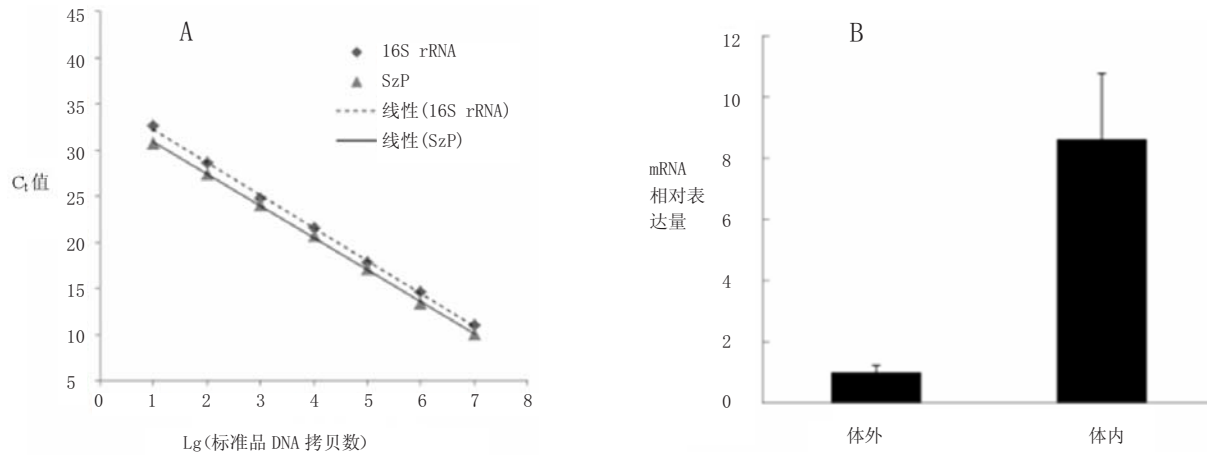


图5 荧光定量 PCR 分析 SzP 体内诱导表达

A: Ct 值与 SzP 模板的线性关系; B: 感染小鼠脾脏富集的细菌相对体外培养细菌的相对表达量

IgG2a 抗体,即诱导高水平的 Th1 型免疫应答。而宿主清除链球菌感染主要依靠调理吞噬作用,而调理吞噬作用主要与 Th1 型免疫应答相关,因此 SzP 可诱导高水平的 Th1 型免疫应答是其提供较高保护力的可能机制。

为了使 Real-time PCR 能准确反应转录水平,需对 RNA 抽提及反转录过程的产物进行检测。以 10 倍稀释的标准品作为模板,绘制 Ct-拷贝数的线性图(图 5A),当 Szp 与 16S rRNA 的引物扩增效率(斜率)基本一致时进行下一步检测和分析^[10]。溶解曲线表明当体外培养或感染动物体内富集细菌的 cDNA 作为模板时,荧光定量 PCR 可获得细菌相关基因特异的荧光信号;而当正常小鼠组织的 RNA 作为模板则不能得到特异的荧光信号。以反转前的 RNA 作为模板也不能获得特异的荧光信号,表明基因组 DNA 已去除。荧光定量 PCR 分析的结果可以反映转录水平的表达差异。

病原菌感染宿主时,面对宿主体内的“恶劣”环境,常常会上调表达某些毒力相关蛋白。因此感染后上调表达可能是某些毒力因子的“特性”之一。本研究使用 Real-time PCR 初步评价了保护性抗原 SzP 在体内诱导表达的特性,发现其体内增强表达,暗示这些蛋白在细菌感染宿主过程中可能发挥重要作用^[11]。

参考文献:

[1] Eyre D W, Kenkre J, Bowler I C J W, et al. Streptococcus equi subspecies zooepidemicus meningitis—a case report and review of the literature[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2010, 29:1459-1463.

[2] Poulin M F, Boivin G. A case of disseminated infection caused by *Streptococcus equi* subspecies zooepidemicus[J]. *Journal canadien des maladies infectieuses et de la microbiologie medicale/AMMI Canada*, 2009(20): 59-61.

[3] Priestnall S, Erles K. *Streptococcus zooepidemicus*: an emerging canine pathogen[J]. *Veterinary journal*, 2011, 188:142-148.

[4] Waller A, Flock M, Smith K, et al. Vaccination of horses against strangles using recombinant antigens from *Streptococcus equi*[J]. *Vaccine*, 2007, 25:3629-3635.

[5] Lin H X, Huang D Y, Wang Y, et al. A novel vaccine against *Streptococcus equi* ssp. zooepidemicus infections: the recombinant swinepox virus expressing M-like protein[J]. *Vaccine*, 2011, 29:7027-7034.

[6] Timoney J F, Qin A, Muthupalani S, et al. Vaccine potential of novel surface exposed and secreted proteins of *Streptococcus equi*[J]. *Vaccine*, 2007, 25: 5583-5590.

[7] Timoney J F, Walker J, Zhou M, et al. Cloning and sequence analysis of a protective M-like protein gene from *Streptococcus equi* subsp.[J]. *zooepidemicus. Infection and immunity*, 1995, 63:1440-1445.

[8] Zhang A, Chen B, Li R, et al. Identification of a surface protective antigen, HP0197 of *Streptococcus suis* serotype 2[J]. *Vaccine*, 2009, 27:5209-5213.

[9] Ogunniyi A D, Giammarinaro P, Paton J C. The genes encoding virulence-associated proteins and the capsule of *Streptococcus pneumoniae* are upregulated and differentially expressed in vivo[J]. *Microbiology*, 2002, 148:2045-2053.

[10] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.

[11] Waller A S. Protecting against *Streptococcus zooepidemicus* opportunism: the challenge of vaccine design[J]. *Veterinary journal*, 2010, 184:128-129.

新城疫 LaSota 活疫苗对基因 VII 型分离株的免疫保护性试验

胡北侠, 杨少华, 许传田, 张琳, 黄艳艳, 张秀美*

(山东省农业科学院畜牧兽医研究所, 山东省畜禽疫病防治与繁育重点实验室, 山东 济南 250100)

摘要: 从山东省发病鸡群分离鉴定了一株新城疫病毒 (NDV), 命名为 SDLY01。经蚀斑纯化后进行毒力测定和序列分析表明分离株 SDLY01 属于基因 VII 型 NDV 强毒。20 只 7 日龄 SPF 鸡免疫新城疫活疫苗 LaSota 后 14 d 分别用 NDV 标准强毒 F48E8 和分离株 SDLY01 攻毒, 同时设同日龄 SPF 鸡为对照组, 未免疫任何疫苗。攻毒后观察 10 d, 免疫组在攻毒后食欲、精神均正常; 对照组在攻毒后 2~4d 发病死亡, 并表现 ND 典型的临床症状和病理变化。攻毒后第 3、5、7、9 d 对免疫组试验鸡取喉头、泄殖腔棉拭进行病毒分离, F48E8 攻毒组病毒分离均为 NDV 阴性, SDLY01 攻毒组第 5 d 病毒分离 NDV 阳性, 第 3、7 和 9 d 病毒分离阴性。本研究结果表明 LaSota 活疫苗对 F48E8 和 SDLY01 均能提供 100% 免疫保护, 但不能完全抑制基因 VII NDV 分离株在体内的复制和排毒。

关键词: 新城疫; 活疫苗; 基因 VII 型; 分离株; 免疫保护

中图分类号: S852.41

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0034-02

Immune protection assay of Newcastle disease live vaccine (LaSota Strain) against a genotype VII NDV isolate

Hu Beixia, Yang Shaohua, Xu Chuantian, Zhang Lin, Huang Yanyan, Zhang Xiumei*

(Institute of Animal Science and Veterinary Medicine, Shandong Academy of Agricultural Science, Shandong Key Lab of Animal Disease Control and Breeding, Jinan 250100, China)

Abstract: A NDV isolate SDLY01 was isolated from the chicken of Shandong Province. SDLY01 was determined as a virulent strain with MDT after plague-purification. Phylogenetic analysis showed SDLY01 isolate belonged to the genotype VII linkage. Twenty seven-day-old SPF chickens were vaccinated with NDV live vaccine (LaSota strain) intranasally and intraocularly. Twenty SPF chickens non-vaccinated were served as control. At 21 days of age, chickens were challenged with virus F48E8 or SDLY01 respectively. The chickens in control group began to show clinical signs of ND and died between 2 and 4 days after challenge. No signs of ND were observed in the immunized chickens. Virus was isolated from tracheal and cloacal swabs collected from chickens challenged with SDLY01 at 5 days post-challenge. No virus was detected from chickens challenged with F48E8. The results showed that LDLY01 could replicated in the vaccinated chickens although LaSota vaccine could protect chickens against the challenge with SDLY01 or F48E8.

Key words: Newcastle disease; Live vaccine; Genotype VII; Isolate; Immune protection

新城疫 (ND) 是危害我国养禽业的一种重要的病毒性传染病, 病原是新城疫病毒 (NDV)。NDV 只有一个血清型, 但是可以分为不同的基因型。疫苗免疫接种是预防该病的主要措施之一, 但免疫鸡群仍然经常发生新城疫的感染和发病。为了明确免疫鸡群发生 NDV 感染的主要原因, 本研究在进行 NDV 分离鉴定的基础上进行了新城疫活疫苗 LaSota 株对分离株的免疫保护试验, 为生产上有

效防控新城疫提供科学的参考论依据。

1 材料和方法

1.1 SPF 鸡和 SPF 鸡胚

SPF 鸡和 SPF 鸡胚购自山东省农业科学院家禽研究所。

1.2 疫苗和病毒

新城疫 LaSota 活疫苗由山东滨州博莱威生物技术有限公司生产, 批号: 2010015, NDV 标准强

收稿日期: 2012-03-10

*: 通讯作者

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201003012); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-42-Z12)

毒 F48E8 购自中国兽药监察所, 本实验室保存。NDV 分离株 SDLY01 于 2010 年分离自山东某商品鸡场, 经毒力测定和序列分析表明此分离株为基因 VII 型 NDV 分离株(另文报道)。

1.3 免疫保护试验

在动物隔离器内进行。40 只 SPF 鸡分为 A、B、C、D 四组, 10 只/组(表 1)。A、B 组 7 日龄时滴鼻点眼免疫 LaSota 活苗(1 羽份/只); C、D 组为对照组, 不免疫任何疫苗。免疫后 14 d 对各组试验鸡采血, 检测 NDV HI 抗体滴度, 同时进行攻毒。A 组和 C 组用 F48E8 攻毒, B 组和 D 组用分离株 SDLY01 攻毒, 攻毒剂量均为 10^5 ELD₅₀, 攻毒方式均为肌肉注射。攻毒后每天观察试验鸡发病、死亡情况, 对死亡鸡及时剖检, 取病变器官组织处理后接种 SPF 鸡胚分离病毒; 攻毒后第 3、5、7、9 d 对各组存活试验鸡采集喉头和泄殖腔棉拭, 进行病毒分离。

表 1 试验鸡分组

组别	试验鸡(只)	免疫疫苗	攻毒毒株	试验鸡死亡(只)
A	10	Lasota 活疫苗	F48E8	0
B	10	Lasota 活疫苗	SDLY01	0
C	10	对照组, 未免疫任何疫苗	F48E8	10
D	10	对照组, 未免疫任何疫苗	SDLY01	10

2 结果

2.1 免疫组 ND 抗体滴度

A、B 两个免疫组免疫后 14d NDV HI 抗体为 $(4\sim 5) \log_2$, C、D 两个对照组 NDV HI 抗体均为阴性。

2.2 攻毒后试验鸡发病情况、临床症状和病理变化

A、B 组在攻毒后 9 d 观察期内, 试验鸡精神、食欲均正常。C、D 两个对照组分别在 F48E8 和 SDLY01 攻毒后 2~4 d 全部发病、死亡。病鸡精神沉郁、食欲废绝, 排黄绿色粪便(图 1-1)。剖检死亡鸡, 发现其气管和腺胃乳头水肿、出血(图 1-5、图 1-6), 盲肠扁桃体枣核样坏死(图 1-4), 脾脏表面有白色坏死点(图 1-3)、肾脏肿大(图 1-2)等典型的新城疫病理变化。从死亡试验鸡气管、肝脏和脾脏等内脏组织均分离到攻毒的 NDV 毒株。

2.3 免疫组攻毒后喉头、泄殖腔排毒情况

A 组试验鸡 F48E8 攻毒后 3、5、7、9 d 采集的喉头和泄殖腔棉拭子病毒分离 NDV 阴性, B 组试验鸡 SDLY01 攻毒后 3、7、9 d 喉头和泄殖腔棉拭子病毒分离 NDV 阴性, 第 5 d 病毒分离 NDV 阳性。

3 小结与讨论

疫苗免疫是目前我国防控新城疫的主要措施



图 1 空白对照组试验鸡攻毒后病理变化

1-1 病鸡排黄、绿色粪便; 1-2 病鸡肾脏肿大; 1-3 病鸡脾脏坏死; 1-4 病鸡盲肠扁桃体枣核样坏死; 1-5 病鸡气管出血; 1-6 病鸡腺胃乳头水肿、出血。

之一, 研究证实新城疫弱毒活疫苗和灭活疫苗均能诱导良好的免疫应答。自 20 世纪 90 年代以来, 随着 ND 疫苗的广泛应用, 在一定程度上控制了 ND 的发生, 但是临床上非典型性 ND 病例仍然不断发生。本研究结果表明目前广泛应用的新城疫 LaSota 株对基因 VII 型 NDV 流行株仍然能提供良好的免疫保护, 与国内相关研究结果基本一致^[1-2]。但这种免疫保护只是从保护鸡群不发病的角度评价, 是不全面的。因为 LaSota 疫苗免疫后并不能完全阻止基因 VII NDV 在体内的复制和排毒, 导致 NDV 强毒在鸡群的循环传播, 在鸡群抵抗力下降时感染发病。

分子流行病学研究结果表明, 我国目前 NDV 流行株的优势基因型为 VII 型, 与广泛应用的疫苗株 LaSota 明显不同^[2]。通过单克隆抗体检测也发现 NDV 主要的免疫保护性抗原 HN 蛋白中和性抗原表位发生变异^[3], 因此新城疫疫苗株与当前流行株之间的基因型和抗原性差异是引起免疫鸡群中感染强毒的主要原因。鉴于此, 扬州大学刘秀梵院士课题组已经成功研制了基因 VII 型 ND 疫苗, 相关试验证明该新型疫苗比 LaSota 疫苗株明显降低 ND 流行株的复制和排毒, 可望对国内 ND 的有效防控提供有力的技术支撑^[2]。但必须强调的是, 完善的生物安全措施是疫病防控工作的重中之重, 只有在此前提下疫苗免疫才能取得良好的预防效果。

参考文献:

- [1] 王友令, 徐怀英, 李莉, 等. 新城疫 LaSota 疫苗对不同基因型流行株的免疫保护[J]. 浙江农业学报, 2009, 21(5): 46-449.
- [2] 刘秀梵, 胡顺林. 我国新城疫病毒的分子流行病学及新疫苗研制[J]. 中国家禽, 2010, 32(21): 1-4.
- [3] 胡北侠, 黄艳艳, 张秀美, 等. 3 株单抗对新城疫病毒 HN 抗原变异的分析[J]. 中国兽医学报, 2008, 28(11): 1251-1253.

四个不同厂家高致病性猪蓝耳病活疫苗 (JXA1-R 株) 免疫效果比较试验

任裕其, 孙彦伟, 查云峰, 田云, 万美梅, 王福广, 焦颖, 薛念波
(广东省动物防疫监督总所, 广东 广州 510230)

摘要: 对广东省 2011 年政府招标的 4 个厂家生产的高致病性猪蓝耳病活疫苗 (JXA1-R 株) 进行免疫效果比较试验。随机选取 115 头 32 天龄, 猪蓝耳病病毒核酸阴性的健康仔猪, 随机分成 4 组, 于免疫前 0 d, 免疫后 28 d、48 d、66 d、86 d、106 d 和 126 d 分别进行采血, 采用法国 LSI 公司猪蓝耳病抗体 ELISA 试剂盒进行抗体检测, 比较 4 个厂家生产疫苗的免疫效果。检测结果表明, 4 个厂家生产的高致病性猪蓝耳病活疫苗 (JXA1-R 株) 免疫效果都比较好, 无明显不良反应, 免疫持续期长, 一次免疫后 126d 抗体阳性率仍在 75% 以上。

关键词: 高致病性猪蓝耳病; 活疫苗; 免疫效果; 比较

中图分类号: S852.5

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0036-03

Vaccination results of four highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome live vaccines manufactured by four different companies

Ren Yuqi, Sun Yanwei, Zha Yunfeng, Tian Yun, Wan Meimei, Wang Fuguang, Jiao Ying, Xue Nianbo
(Guangdong Animal Health Supervision Institute, Guangzhou 510230, china)

Abstract: Vaccination results of four highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome live vaccines manufactured by four different companies were evaluated. One hundred and fifteen 32-day-old and PRRS nucleic acid negative pigs were selected randomly. All of them were divided into four groups for immunization. Blood samples were collected at day 0, 28, 48, 66, 86, 106, 126 postimmunization and detected by using the anti-PRRS antibody ELISA test kit manufactured by LSI company. It showed that the vaccination results of four vaccines were good without any adverse reactions. The immunization could last longer with positive rate over 75% at day 126 post one-time immunization.

Keywords: Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome; Live vaccine; Vaccination results; Comparison

猪蓝耳病是由猪繁殖与呼吸综合征病毒引起的严重危害世界养猪业的传染性疾病之一^[1]。2006 年在我国南方部分地区暴发一种以高热为特征的传染病, 给养猪业造成了极大的损失, 给社会稳定带来了一定的影响。农业部随后组织专家开展流行病学和病原学等科技攻关, 证实疫情主要由猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株引起的^[2,3]。高致病性猪蓝耳病没有特别有效的治疗方法, 免疫预防是目前解决该问题的最有效途径^[4]。

2009 年以来, 广东省开始招标并使用高致病性猪蓝耳病活疫苗 (JXA1-R 株), 为了解 2011 年政府招标的高致病性猪蓝耳病活疫苗 (JXA1-R 株) 的免疫效果, 我们于 2011 年 4-8 月在广东省江门市某猪场, 进行了 4 个厂家生产的高致病性猪蓝耳病活疫苗免疫效果评价试验。现将试验情况报告如下:

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验猪只 江门某猪场 30 日龄健康仔猪 115 头, 经检测, 猪蓝耳病病毒核酸均为阴性。

1.1.2 受试疫苗 广东永顺生物制药有限公司、广东大华农动物保健品股份有限公司、中牧实业股份有限公司和武汉中博股份有限公司等 4 个厂家生产的高致病性猪蓝耳病活疫苗 (JXA1-R 株)。抽取上述 4 个厂家的疫苗采用双盲方式进行编号, 末次编号为 A、B、C、D。

1.1.3 试剂 猪蓝耳病 ELISA 抗体检测试剂盒, 由法国 LSI 公司生产; 猪蓝耳病病毒实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒, 高致病性猪蓝耳病病毒 JXA1-R 株实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒, 均由北京世纪元亨动物防疫技术有限公司生产。

1.2 方法

1.2.1 猪群分组 115 头健康仔猪, 随机分为 4 组, 打耳号, 前三组 (A、B、C) 每组 25 头; 另一组 (D) 40 头, 分为 D1、D2 组, 每组 20 头。

1.2.2 免疫程序 32 日龄分别用 A、B、C、D 苗接种 A、B、C、D 组猪只, 剂量为 1 头份, 耳后颈部肌肉注射。其中 D1 组先接种高致病性猪蓝耳病活疫苗 (JXA1-R 株), 4 天后接种猪瘟活疫苗 (传代细胞源); D2 组先接种猪瘟活疫苗 (传代细胞源), 4 天后接种高致病性猪蓝耳病活疫苗 (JXA1-R 株)。

1.2.3 采血、分离血清 免疫前采血一次, 免疫后 28 d 进行第二次采血, 以后每隔 20 d 左右采血一次, 直至试验结束, 共采血 7 次。每次采血 3~5 mL/头, 分离血清。

1.2.4 猪群状况观察 观察各组猪只对免疫的反应, 包括猪群的精神状态、采食、饮水情况, 以及有无其他异常表现。做好生产记录, 包括异常表现、死亡数和药物使用情况等。

1.2.5 猪蓝耳病病毒核酸检测 按照猪蓝耳病病毒实时荧光 RT-PCR 检测试剂盒说明书, 对免疫

前 0 d, 免疫后 48 d 和免疫后 126 d 血清样品进行猪蓝耳病病毒核酸检测。阳性样品进行 JXA1-R 疫苗株鉴别。

1.2.6 抗体检测和判断标准 按照 LSI 公司猪蓝耳病抗体 ELISA 试剂盒的操作说明书对待检猪血清进行检测。IRPC \leq 20.0 判定为阴性; IRPC $>$ 20.0 判定为阳性。

2 结果与分析

2.1 免疫后猪蓝耳病抗体变化情况

检测发现, 免疫前, A、B、C 和 D 组母源抗体阳性率分别为 60%、56%、56% 和 60%; 免疫后 28 d, A 苗、B 苗、C 苗和 D 苗抗体阳性率分别为 72%、84%、44% 和 90%; 免疫后 48 d, 抗体阳性率分别为 88%、100%、80%、100%。结果见表 1。A 苗、B 苗和 D 苗均能在较短时间内提高猪群免疫抗体水平, C 苗免疫后猪群抗体呈先下降, 后上升趋势, 达到相同免疫抗体水平所需时间要稍长, 抗体总体合格率也比其他疫苗稍低。按照农业部要求, 一次免疫后 28 d, 免疫阳性率大于 70% 为群体免疫合格。按此标准 C 苗免疫效果比其他 3 个厂家的疫苗要差。4 个厂家的疫苗, 一次免疫后 48 d 抗体均达到高峰, 阳性率均在 80% 以上, 结果见图 1。

2.2 猪蓝耳病母源抗体阴性猪免疫后抗体变化情况

经检测, 115 头试验猪中, 猪蓝耳病母源抗体阳性 67 头, 阴性 48 头。每组阴性猪头数分别为 A 组 10 头、B 组 11 头、C 组 11 头、D 组 16 头 (D1、D2 组各 8 头)。一次免疫后 28 d, A、B、C、D 组抗体阳性率分别为 60% (6/10)、72.73% (8/11)、36.36% (4/11)、100% (16/16); 免疫后 48 d, 4 个组抗体阳性率均在 80% 以上, 如图 2 所示。疫苗免疫后, 抗体阴性猪在短时间内就产生了不同水平抗体。D 苗效果最好, A 苗、B 苗次之, C 苗较差。如图 2 所示。

表 1 免疫后猪蓝耳病抗体阳性率变化情况

项目	30 日龄		60 日龄		80 日龄		100 日龄		120 日龄		140 日龄		160 日龄		免疫后 6 次样品 平均阳性率 (%)
	免疫前 阳性率 (%)	一免后 28 d 阳性率 (%)	一免后 28 d 阳性率 (%)	一免后 48 d 阳性率 (%)	一免后 48 d 阳性率 (%)	一免后 66 d 阳性率 (%)	一免后 66 d 阳性率 (%)	一免后 86 d 阳性率 (%)	一免后 86 d 阳性率 (%)	一免后 106 d 阳性率 (%)	一免后 106 d 阳性率 (%)	一免后 126 d 阳性率 (%)	一免后 126 d 阳性率 (%)		
A 组 A 苗	60(15/25)	72(18/25)	88(22/25)	88(22/25)	88(22/25)	88(22/25)	88(22/25)	88(22/25)	84(21/25)	84(21/25)	84(21/25)	84(21/25)	84(21/25)	84(126/150)	
B 组 B 苗	56(14/25)	84(21/25)	100(25/25)	100(25/25)	100(25/25)	100(25/25)	100(25/25)	100(25/25)	100(25/25)	100(25/25)	100(25/25)	96(24/25)	96(24/25)	96.67(145/150)	
C 组 C 苗	56(14/25)	44(11/25)	80(20/25)	80(20/25)	80(20/25)	80(20/25)	80(20/25)	80(20/25)	84(21/25)	84(21/25)	76(19/25)	76(19/25)	74.67(112/150)		
D1 组 D 苗	60(12/20)	90(18/20)	100(20/20)	100(20/20)	100(20/20)	100(20/20)	100(20/20)	100(20/20)	100(20/20)	100(20/20)	95(19/20)	95(19/20)	96.67(116/120)		
D2 组 D 苗	60(12/20)	89.47(17/19)	100(19/19)	100(19/19)	100(19/19)	100(19/19)	100(19/19)	100(19/19)	100(19/19)	100(19/19)	100(18/18)	100(18/18)	98.23(111/113)		

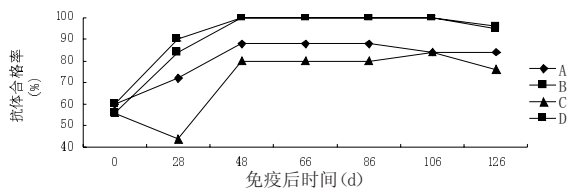


图1 高致病性猪蓝耳病活疫苗(JXA1-R株)免疫后抗体变化曲线

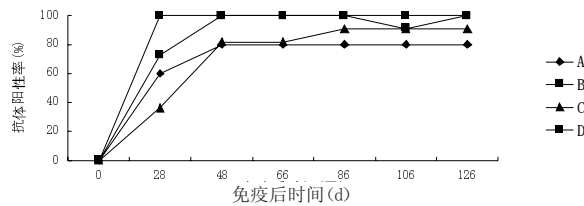


图2 猪蓝耳病母源抗体阴性猪免疫后抗体变化情况

2.3 猪蓝耳病母源抗体阳性猪免疫后抗体变化情况

每组母源抗体阳性猪头数分别为A组15头、B组14头、C组14头、D组24头。一次免疫后28d,4种疫苗抗体阳性率均在70%以上,分别为86.67%(13/15),92.86%(13/14),71.43%(10/12)、83.33%(20/24)。从图3可以看出,抗体阳性猪免疫后,抗体先下降,然后上升。C组抗体下降的幅度最大。试验结果说明,32天龄母源抗体不足以中和疫苗有效抗原,疫苗免疫后能够提高群体免疫抗体水平,母源抗体对疫苗的免疫效果影响不大。

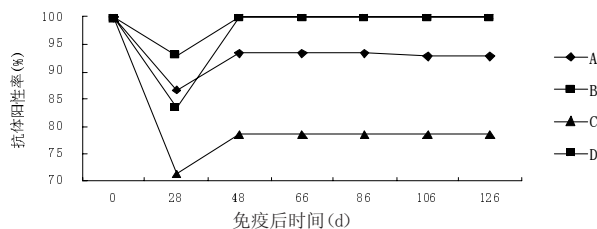


图3 猪蓝耳病母源抗体阳性猪免疫后抗体变化情况

2.4 一次免疫后猪蓝耳病抗体维持时间

4个组一次免疫后126d抗体阳性率均在75%以上,高抗体水平至少维持120d。试验结果说明,32日龄免疫,商品猪从断奶至上市,只需免疫一次。在实际工作中,由于断奶仔猪28日龄左右免疫猪瘟,致使高致病性猪蓝耳病活疫苗

(JXA1-R株)免疫时间大大提前,不少猪场14日龄左右免疫,此时母源抗体维持在较高水平,对免疫效果会有一定影响。

2.5 疫苗毒持续感染时间

对免疫前、免疫后48d和126d的血清样品进行猪蓝耳病病毒核酸检测,结果115头猪3次检测均未检测到猪蓝耳病病毒核酸。检测结果说明高致病性猪蓝耳病(JXA1-R株)活疫苗持续感染时间不超过50d,同时也说明试验过程中没有外源病毒感染。

2.6 高致病性猪蓝耳病活疫苗(JXA1-R株)免疫后无明显不良反应

临床观察发现,4个厂家的疫苗免疫115头32日龄试验猪,猪群均无明显不良反应。整个实验过程中,D2组由于疝气死亡1头,其他无异常死亡情况。

3 讨论

3.1 猪蓝耳病活疫苗(JXA1-R株)的安全性

本次试验免疫的115猪没有不良反应,免疫前、免疫后50d和160d均没有检出猪蓝耳病病毒,疫苗毒未在试验猪群造成长时间持续感染。2009-2010年进行的猪蓝耳病活疫苗(JXA1-R株)推广使用过程中已证实该疫苗免疫效果好,副反应小,安全性良好。

3.2 猪蓝耳病疫苗的选择

目前,我国猪蓝耳病疫苗有2个毒株灭活苗,6个毒株弱毒苗在市场上流通^[5],市面上存在40多个品牌的同类疫苗。不同厂家轮番宣传、推介,养殖户选择难度较大。我们建议猪繁殖与呼吸综合征病毒变异株阳性猪场接种高致病性猪蓝耳病活疫苗;非流行区的阴性猪场使用灭活疫苗;流行区中的阴性猪场,防疫压力很大,要么封闭饲养,要么接种活疫苗。由于目前猪蓝耳病阴性场比较少,同时存在引种风险,高致病性猪蓝耳病活疫苗(JXA1-R株)对其他毒株存在较好的交叉保护作用。为了猪蓝耳病防控和鉴别诊断,总体上推荐使用高致病性猪蓝耳病活疫苗(JXA1-R株)。

3.3 猪蓝耳病免疫程序建议

由于猪蓝耳病活疫苗(JXA1-R株)免疫效果较好,合格率较高,建议非流行猪场肉猪在30~

(下转第47页)

一株脱氮细菌的分离鉴定及脱氮活性检测

高存川, 张晓慧, 徐春厚*

(广东海洋大学动物科学系, 广东 湛江 524088)

摘要: 利用硅胶平板从淤泥中分离到一株脱氮菌 FX7, 该菌株在好氧条件下具有降解亚硝态氮的能力。亚硝态氮初始浓度为 2 500 mg/L 时, 该菌株在 48 h 内亚硝态氮降解率为 45%。通过形态学特征、生理生化特性及 16S rDNA 同源性比较对菌株 FX7 进行鉴定, 初步判断其为假单胞菌 (*Pseudomonas sp.*)。Pb²⁺、Hg²⁺ 和 Cr⁷⁺ 对菌株 FX7 的亚硝态氮降解活性有很强的抑制作用, 而低浓度的 Zn²⁺ 和 Fe³⁺ 对其活性有一定的激活作用。

关键词: 益生菌; 生物脱氮; 分离鉴定

中图分类号: S859.799.9

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0039-03

Isolation and identification of a denitrogenation microorganism and its nitrogen removal activity

Gao Cunchuan, Zhang Xiaohui, Xu Chunhou*

(Animal Science Department, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: A denitrogenation microorganism FX7 was isolated with silicate plate from soil. The experiment results showed that under aerobic conditions the reduction efficiency within 48 hours was up to 45% with initial nitrite nitrogen concentration of 2500 mg/L. On the basis of its physiological and molecular properties, strain FX7 was identified as *Pseudomonas sp.* Though the nitrite nitrogen removal ability of strain FX7 was strongly inhibited by ions Pb²⁺, Hg²⁺ and Cr⁷⁺, the nitrite nitrogen removal ability was activated by ions of Zn²⁺ and Fe³⁺ with low concentration.

Key words: Probiotics; Biological nitrogen removal; Isolation and identification

近十年来,我国的水产养殖业快速发展,产生了巨大的经济效益和社会效益。然而,随着水产养殖集约化程度及养殖密度的提升,导致养殖水体中的氮素超标日趋严重^[1],成为影响养殖业健康可持续发展的重要问题。研究表明,养殖水体中氮素含量超标是水产动物发病的重要原因之一^[2]。目前,微生物脱氮被认为是降低水体中氮素的有效方式,对于解决这一问题具有重要意义,是养殖水体调控的研究热点^[3-4]。本研究通过从沿海滩涂采集活性淤泥,利用硅胶平板分离筛选出脱氮细菌 FX7,并对其脱氮活性进行研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 反硝化培养基 (DM) 酒石酸钾钠 20g, KNO₂ 2g, K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.2g, 微量元素溶液 2mL^[5], 蒸馏水 1L, pH 7.5。115℃灭菌 20min, 备用。

1.1.2 硅胶平板的制备 取 5.5 mL 的浓硫酸 (质量分数为 98%) 加入 155 mL 的蒸馏水中, 取 22.0 mL 的浓盐酸 (质量分数为 37%) 加入 185 mL 的蒸馏水中, 两者混合即为稀酸液; 称取 82.59 g 硅酸钠 (Na₂SiO₃·9H₂O) 加入 500 mL 蒸馏水中, 搅拌溶解即为水玻璃溶液; 分别取 13 mL 水玻璃溶液和 7 mL 稀酸液于小烧杯中, 快速搅匀, 迅速倒入培养皿中, 静置待其凝固。

将凝固后的硅胶板放入水槽中浸泡, 每 30 min 换水一次。用 1% AgNO₃ 溶液检测 Cl⁻ 除去效果, 如有乳白色沉淀则继续浸泡。待 Cl⁻ 除去后, 倒置过夜晾干。向硅胶平板中加入 DM 培养基 2 mL, 置于 37℃ 烘箱至无液体流动, 在紫外灯下照射 30 min^[6]。

1.1.3 营养肉汤培养基 蛋白胨 0.5%, 牛肉膏 0.3%, 酵母提取物 0.1%, 蒸馏水 1 L, pH 7.5。115℃ 高压蒸汽灭菌 20 min。

收稿日期: 2012-03-20

*: 通讯作者

基金项目: 广东省科技计划项目 (2010B020313002)

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的筛选 (1)富集培养:取 1 g 活性淤泥放入盛有 50 mL 反硝化培养基的三角瓶中,置于 30 °C、130 r/min 摇床中培养,在培养过程中检测亚硝态氮的变化情况。(2)分离纯化:取上述富集培养液 0.1 mL 于硅胶平板上涂布,然后挑取单个菌落于 LB 平板上划线进行纯化,筛选出脱氮细菌,并接种于斜面,4 °C 保存。

1.2.2 形态特征 将菌株 FX7 于 DM 平板上划线,获得单菌落,观察其菌落形态;对其进行革兰氏染色,镜检。

1.2.3 生理生化鉴定 依据《常见细菌系统鉴定手册》^[6]进行鉴定。

1.2.4 16S rDNA 的 PCR 扩增和测序 采用一对通用引物即正向引物 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC-AG-3' 和反向引物 1492R:5'-GGTACCTGTACGACTT-3' 进行 16S rDNA 扩增,引物购自上海生工生物技术有限公司。PCR 反应程序:98 °C 预变性 2 min;98 °C 变性 10 s,55 °C 退火 15 s,68 °C 延伸 1.5 min,40 个循环。取 5 μL PCR 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测,紫外灯下观察。扩增产物由上海英俊生物技术有限公司广州分公司完成序列测定。

1.2.5 菌株的脱氮活性测试 将菌株 FX7 接种于营养肉汤中,于 30 °C、130 r/min 摇床中培养 24 h。将活化的菌液按 2% 的接种量接于装有 100 mL 反硝化培养基的 250 mL 三角瓶中培养,定时测定亚硝态氮及菌液的 OD₆₀₀ 值的变化。用 N-(1-萘基)-乙二胺分光光度法^[7]测定亚硝态氮含量。

1.2.6 不同金属离子对脱氮性能的影响 以 DM 培养基为基础,分别加入 Pb²⁺,Hg²⁺,Zn²⁺,Cr⁷⁺,Fe³⁺;分别设置 0.01 mmol/L,0.1 mmol/L,1 mmol/L,10 mmol/L,之后按照 2% 接种量接种活化菌液。30 °C、130 r/min 摇床培养 48 h,定时取样检测亚硝态氮的变化情况。每隔 6 h 检测 1 次,绘制亚硝态氮降解曲线。

2 结果与分析

2.1 菌株 FX7 的鉴定

2.1.1 形态特征 菌株 FX7 的菌落形态为圆形隆起、边缘整齐、表面光滑、有粘稠感。革兰氏染色阴性,着色较浅,短杆状,不形成芽孢(图 1)。

2.1.2 生化鉴定 葡萄糖发酵阴性;D- 棉子糖发酵阴性;D- 木糖发酵阳性;甘露糖发酵阳性;鼠李

糖发酵阴性;海藻糖发酵阴性;L- 阿拉伯糖发酵阴性;乳糖发酵阴性;接触酶试验阳性;硝酸盐还原试验阳性;明胶液化阳性;吡啶试验阴性;淀粉水解阴性;甲基红试验阴性;V-P 试验阴性。依据《常见细菌系统鉴定手册》初步判断菌株 FX7 为假单胞菌(*Pseudomonas sp.*)。



图 1 菌株 FX7 革兰氏染色光镜图(1000×)

2.1.3 16S rDNA 的序列比较 经测序后获得的菌株 FX7 的 16S rDNA 片段长度为 1 386 bp。将测得的序列在 GenBank 数据库中通过 Blast 方法比对。结果显示,菌株 FX7 的 16S rDNA 序列与假单胞菌属的多种细菌都具有较高的相似。用 MEGA4 软件进行序列分析,Neighbor-Joining 法构建系统发育树(图 2),其中与 *Paracoccus taiwanensis* BCRC 17751T(EU103629) 的一致性高达 100%。根据形态特征、生化特性和 16S rDNA 的同源性综合分析,鉴定菌株 FX7 为假单胞菌。

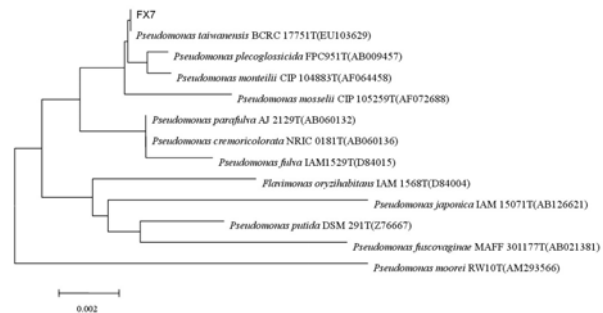


图 2 NJ 法构建菌株 FX7 的 16S rDNA 系统进化树

2.2 菌株 FX7 的脱氮活性测试

由图 3 可知,在好氧条件下,亚硝态氮浓度由 2 500 mg/L 降至 1 375 mg/L,去除率为 45%。从图 3 还可看出,亚硝态氮的减少与细菌的生长呈负相关。

2.3 不同金属离子对 FX7 菌株脱氮活性的影响

不同种类及不同浓度金属离子对 FX7 脱氮活性的影响不同。由图 4、图 5、图 6 可以看出,Pb²⁺与 Hg²⁺、Cr⁷⁺ 对菌株 FX7 的脱氮活性具有很强的抑制作用,随着 Pb²⁺ 浓度的逐渐升高,脱氮活性持续

下降:当 Pb^{2+} 与 Hg^{2+} 达到浓度 10 mmol/L 时,脱氮酶活性几乎完全丧失。相比较而言, Hg^{2+} 毒性最强,当 Hg^{2+} 仅为 1 mmol/L,菌株 FX7 脱氮作用几乎停止。由图 7、图 8 可以看出,当 Zn^{2+} 与 Fe^{3+} 为 0.01~0.1 mmol/L 时,对菌株 FX7 脱氮活性具有促进作用;浓度高于 1 mmol/L 时,转为抑制作用。

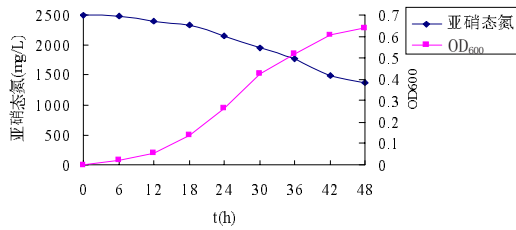


图 3 菌株 FX7 的生长及脱氮活性曲线

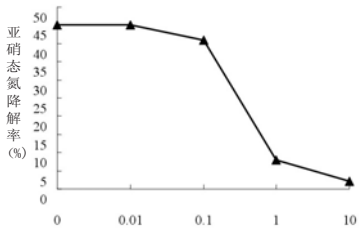


图 4 不同浓度 Pb^{2+} 对 FX7 脱氮活性的影响

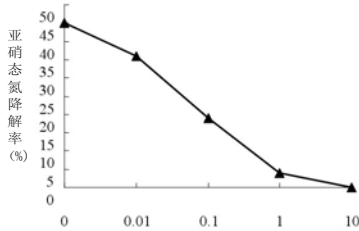


图 5 不同浓度 Hg^{2+} 对 FX7 脱氮活性的影响

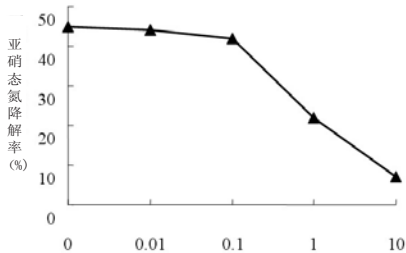


图 6 不同浓度 Cr^{7+} 对 FX7 脱氮活性的影响

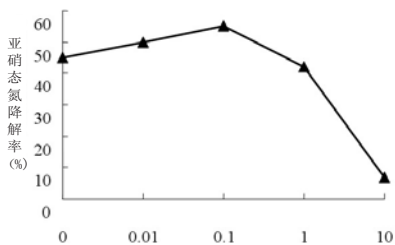


图 7 不同浓度 Zn^{2+} 对 FX7 脱氮活性的影响

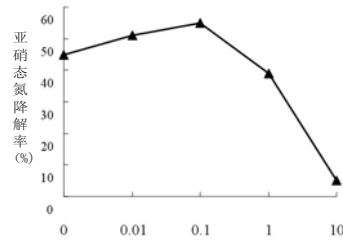


图 8 不同浓度 Fe^{3+} 对 FX7 脱氮活性的影响

3 小结

从沿海滩涂活性淤泥中,利用硅胶平板分离出一株脱氮细菌 FX7。根据其形态特征、生化特性和 16S rDNA 的同源性分析,鉴定该菌株为假单胞菌。本研究结果表明,菌株 FX7 在好氧条件下具有降解亚硝态氮的功能,降解率为 45%,这与已报道的具有脱氮作用的 *Pseudomonas* sp. Y2-1-1, *Paracoccus* sp. F6, *Paracoccus* sp. YF1 等菌株情况相类似^[9-11]。菌株 FX7 在水体生物脱氮中有一定的应用价值。

参考文献:

- [1] Esteban J M, Empanaza. Problems affecting nitrification in commercial RAS with fixed-bed biofilters for salmonids in Chile[J]. *Aquacultural Engineering*, 2009(41):91-96.
- [2] Yanbo Wang, Jianrong Li, Junda Lin. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook[J]. *Aquaculture*, 2008 (281):4-6.
- [3] Willie Jones B, Saliling, Philip W, et al. Wood chips and wheat straw as alternative biofilter media for denitrification reactors treating aquaculture and other waste waters with high nitrate concentrations [J]. *Aquacultural Engineering*, 2007 (37):222-233.
- [4] Manju N J, Deepesh V, Achuthan Cini, et al. Immobilization of nitrifying bacterial consortia on wood particles for bioaugmenting nitrification in shrimp culture systems[J]. *Aquaculture*, 2009(294):65-75.
- [5] Joo H, Hirai M, Shoda M. Characteristics of ammonium removal by heterotrophic nitrification-aerobic denitrification by *alcaligenes faecalis* No. 4[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2005, 100(2):184-191.
- [6] 俞毓馨, 吴国庆, 孟宪庭, 等. 环境工程微生物检验手册[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1990: 107-355.
- [7] 国家环保局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 第 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 271-274.
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 161-163.
- [9] 孔庆鑫, 李君文, 王新为, 等. 一种新的好氧反硝化菌筛选方法的建立及新菌株的发现[J]. *应用与环境生物学报*, 2005, 11(2):222-225.
- [10] 高存川, 谢为天, 徐春厚, 等. 一株好氧反硝化菌的分离及特性研究[J]. *广东农业科学*, 2012, 39(4):103-104.
- [11] 刘燕, 甘莉, 黄哲强, 等. 脱氮副球菌 F1 的反硝化特性研究[J]. *水处理技术*, 2010, 10(36):61-65.

四种不同剂量猪瘟活疫苗(传代细胞源)的田间免疫效果对比试验

陈明凯¹, 姚文凤², 苏伟桐³, 杨傲冰³, 吴文福³, 丁度锐³

(1. 河源广南畜牧发展有限公司, 广东 河源 517100; 2. 河源市动物卫生监督所, 广东 河源 517000; 3. 广东永顺生物制药有限公司, 广东 广州 511356)

中图分类号: S852.5

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0042-02

猪瘟(Classical Swine Fever, CSF)是由猪瘟病毒(CSFV)引起的一种致死率高、危害严重的烈性传染病,对整个养猪行业危害非常大。目前该病没有有效的治疗方法,只有通过疫苗免疫接种来进行预防控制。因此,猪瘟疫苗质量的优劣直接影响到猪场的生产。

猪瘟疫苗在田间的免疫时间,每个养殖场都不大一样,种猪群的免疫时间相对比较固定,但仔猪群的免疫时间就比较难确定,特别是首免的时间。最佳的首免时间是在仔猪群猪瘟母源抗体都为阴性时免疫,但在生产中,这种做法是非常危险的。养殖场只能根据母猪的免疫情况,确定对本场仔猪猪瘟疫苗的首免时间,或多或少都会存在猪瘟母源抗体的干扰。

本文主要针对在养殖场仔猪群无法完全避开猪瘟母源抗体干扰的情况下,对猪瘟疫苗(ST传代细胞源)四种不同免疫剂量的免疫效果进行跟踪,对试验数据进行对比分析,以便得出最适合养殖场使用的免疫剂量。本试验用的仔猪为养殖场同一批健康仔猪,完全按照养殖场的免疫程序进行免疫,在养殖场内完成。现将试验情况报告如下。

1 试验用疫苗与用量

猪瘟活疫苗(ST传代细胞源),由广东永顺生物制药有限公司生产(批号:2011003),剂量分别为0.1头份/头、0.5头份/头、1头份/头和2头份/头。

2 抗体检测方法

采用美国 IDEXX 公司生产的猪瘟抗体 ELISA

试剂盒进行检测。操作方法按试剂盒的使用说明进行。

猪瘟抗体检测试验(阻断 ELISA)成立条件:阴性对照的平均 OD₄₅₀ 值应大于 0.50,阳性对照的阻断率应大于 50%,试验方成立有效。样品阻断率 = (阴性对照平均 OD₄₅₀ 值 - 样品 OD₄₅₀) / 阴性对照平均 OD₄₅₀ × 100%。被检样品的阻断率大于或等于 40%,该样品为猪瘟抗体阳性;样品阻断率小于或等于 30%,该样品为阴性(无猪瘟抗体存在);样品阻断率 30%~40%,该样品为可疑。

3 试验方法

试验组分 4 个免疫剂量组,免疫剂量分别为 0.1 头份/头、0.5 头份/头、1 头份/头和 2 头份/头。每组免疫 20 头仔猪(试验组的 80 头仔猪为猪场同一批 20 日龄健康仔猪)。试验仔猪的免疫程序按原猪场的免疫程序进行,即 20 日龄首免,60 日龄二免。分别在首免前、二免前和二免后 25 d 采血分离血清,用 ELISA 方法检测猪瘟抗体水平。

4 结果

按照拟定的采血检测时间,采用美国 IDEXX-ELISA 试剂盒进行检测,根据检测数据,计算各组的猪瘟抗体阳性率、抗体滴度平均值以及抗体离散度,并对结果进行比较分析。四组猪瘟活疫苗(传代细胞源)免疫试验猪试验数据及分析如下:
4.1 四组试验猪使用猪瘟活疫苗(传代细胞源)首免前、二免前和二免后 25 d 各自的猪瘟抗体阳性率如图 1。

从图 1 的数据可以看出,猪瘟抗体在母源抗

体不高的情况下,免疫后猪瘟抗体会逐渐上升;高母源抗体的情况下,则出现抗体先下降后上升的情况。

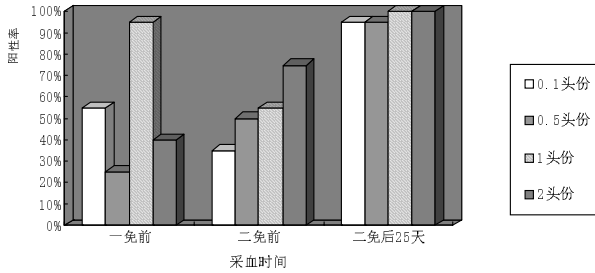


图 1 ST 猪瘟疫苗四种不同剂量免疫效果数据

4.2 四组试验猪使用猪瘟活疫苗（传代细胞源）首免前、二免前和二免后 25 d 这三个时间各自的猪群猪瘟抗体离散度及抗体平均值如图 2。

从图 2 可以看出：母源抗体较低的情况下,免疫猪瘟活疫苗(传代细胞源)的猪群,二免前猪瘟抗体水平呈略为下降或略为上升的趋势,但抗体的离散度在缩小,二免后猪瘟抗体水平快速升高且离散度进一步缩小。母源抗体较高的情况下,免疫猪瘟活疫苗(传代细胞源)的猪群,二免前猪瘟抗体水平下降的较多,且离散度也在增大;但二免后,猪瘟抗体水平也快速上升,同时抗体离散度也大大缩小。

5 小结与分析

从以上 2 组数据来看,0.1 头份和 2 头份的

免疫剂量组,都是在母源抗体偏高的情况下免疫,一免后抗体离散度都在缩小。0.1 头份一免后抗体阳性率有所下降,但 2 头份的确有所上升,这表明,在有母源抗体干扰的情况下,大剂量的疫苗进行免疫,有利于突破母源抗体的干扰。两组免疫组在二免后,抗体离散度和抗体阳性率都能达到理想的效果。0.5 头份免疫组,母源抗体较低,一免后抗体阳性率升高,同时抗体离散度也在缩小,二免后,抗体离散度和抗体阳性率都达到理想的效果。1 头份免疫组,母源抗体极高,一免后,虽然抗体阳性率下降,抗体离散度也有一定幅度的增加,但在二免后,抗体阳性率和离散度在四组中最好。

从四组免疫组的数据来看,在低母源抗体的情况下,也就是比较适合免疫的时机下免疫,随着免疫剂量的增加,抗体阳性率不断升高,抗体离散度也不断缩小。在高母源抗体,如 1 头份免疫组,母源抗体极高的情况下,需要更大的剂量才有可能突破母源抗体的干扰,但在生产中,不建议在母源抗体太高的情况下免疫猪瘟疫苗。四组免疫组在免疫两次免疫猪瘟疫苗后,1 头份的免疫剂量抗体阳性率和离散度是四组中最好。

综上所述,在不同的猪场,猪瘟首免前,母源抗体都不相同,为了达到更好的免疫效果,节约经济成本,猪瘟活疫苗(传代细胞源)最佳的免疫剂量为 1 头份 / 头。

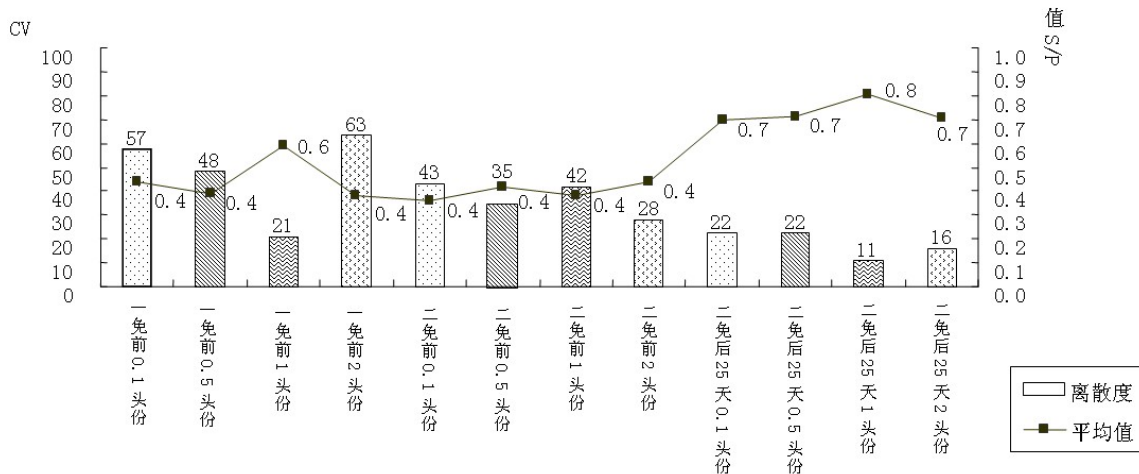


图 2 猪瘟抗体离散度和抗体平均值

犬淋巴瘤肉瘤的诊疗体会

邹晓红¹, 梁英奇²

(1. 广东惠州农校, 广东 惠州 516023; 2. 深圳鹏辉宠物医院, 广东 深圳 518003)

中图分类号: S858.292

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0044-02

犬淋巴瘤(Lymphoma in Dog)是犬肿瘤中最常发生的肿瘤之一,每十万只犬中有6~30只可能会发生淋巴瘤^[1]。淋巴瘤是一种淋巴样恶性肿瘤,主要影响淋巴结和其他脏器如脾脏、肠道、肝脏等。很多品种的犬,从中年到老年犬都可以患本病,多数好发于5-11岁的犬。犬淋巴瘤病因难以确定,主要病因包括:病毒感染、某些致癌物质、遗传倾向^[2]等。

1 临床症状

淋巴瘤的分类常取决于犬的患处解剖部位。类型包括:①多生发中心型淋巴瘤,仅发生于淋巴结及内脏器官,约占犬淋巴瘤的80%~85%。②胃肠道型淋巴瘤,只发生于胃肠道,约占7%。③皮肤型淋巴瘤,约占6%。④纵膈(胸腺)型淋巴瘤,发生于纵膈(胸腺),约占3%。只发生于单一器官的淋巴瘤,在临床上很少见^[3]。

多生发中心型淋巴瘤症状包括:全身体表淋巴结肿大,食欲减退,虚弱,昏睡,消瘦,口渴,多饮多尿,肝肾可能肿大,眼色素变浅,眼球外凸,甚至眼球出血。一些病例可能出现高血钙综合症。胃肠道型淋巴瘤症状包括:昏睡,呕吐和腹泻,迅速消瘦。皮肤型淋巴瘤症状包括:患犬全身皮肤或口腔出现湿疹样斑块或肿瘤结节。

2 典型病例分析

从2007年3月到2011年10月,笔者所在深圳鹏辉宠物医院共诊治过36例犬淋巴瘤。现将3例典型病例报告如下:

病例一:2007年8月,金毛寻回犬,8岁,节育母犬,体重25 kg。主诉:近日,该犬活动量明显减少,食欲减退,体重下降。临床检查:体温39.4℃,精神沉郁,可视粘膜苍白,高度贫血,腹水。血常规检验和血液生化检验结果(见表1、表2)。诊

断:血液涂片,用Diff-Quik(德国LABOKLIN动物诊断实验室产品)染色方法,镜检:100倍镜下极少见到正常白细胞,见大量呈圆型的肿瘤细胞。肿瘤细胞胞核大而明显,核仁清楚可见,有的处于核分裂状态(见图1)。细胞学检查结果为多生发中心型淋巴瘤。因肿瘤细胞波及骨髓,诊断为淋巴白血病。经治疗(治疗方法见3.1和3.2),精神、食欲有所改善,但体温持续偏高,在39.0~39.5℃之间徘徊;贫血症状未见改善,1个月后,终因缺少血小板导致广泛出血而死亡。

病例二:2009年2月,波斯顿犬,2岁,雄性,体重10 kg。主诉:近一周,该犬反复腹泻,粪便呈黑色;偶尔呕吐,但胃纳正常。临床检查:体温38.8℃,可视粘膜颜色正常,体格消瘦,体表淋巴结肿大明显,腹部B超见脾肿大。血常规及血液生化检验结果(见表1、表2)。诊断:直肠指诊,肠粘膜表面粗糙,肠壁增厚,肠腔变窄,触诊到结节;细针抽吸肘后淋巴结,抽取液涂片,用Diff-Quik染色方法,镜检:100倍镜下检出大量淋巴瘤细胞(见图2);血液涂片也检出淋巴瘤细胞(见图3)。诊断结果为胃肠道型淋巴瘤。经治疗(治疗方法见3.1和3.2),最初半个月,腹泻次数减少。之后,病情反复,吸收不良,极度消瘦,存活约2个月。

病例三:2011年2月,大麦町犬,5岁,雄性,体重28 kg。主诉:近2个月来,体重下降,疼痛,视力下降。临床检查:体温39.4℃,双眼球外凸,眼球出血,眼色素变浅(见图4),体表淋巴结肿大(见图5),关节疼痛,四肢跛行。血常规及血液生化检验结果(见表1、表2)。诊断:细针抽取肩前淋巴结,抽取液涂片,用Diff-Quik染色方法,镜检:100倍镜下检出大量淋巴瘤细胞(见图6)。诊断结果为多生发中心型淋巴瘤。经治疗(治疗方法

见 3.1 和 3.2), 最初一个月, 症状有所缓解; 之后, 病情反复, 存活约 3 个月。

表 1 血常规检查结果

检查项目	检查值			正常参考值 ^[4]
	病例一	病例二	病例三	
WBC (10 ⁹ /L)	— ¹⁾	44.65 ²⁾	42.34*	6-17
LYM (10 ⁹ /L)	—	18.86*	19.58*	1-4.8
MON (10 ⁹ /L)	—	2.9*	2.5*	0.2-1.5
NEU (10 ⁹ /L)	—	22.81*	20.26*	3-12
LY% (%)	—	42.2*	46.2*	12-30
MO% (%)	—	6.5*	5.9*	2-4
NE% (%)	—	51.1*	47.9*	62-87
RBC (10 ¹² /L)	2.98*	6.73	5.72	5.5-8.5
HGB (g/dl)	7.8*	16.6	17.3	12-18
HCT (%)	20.78*	44.1	42.5	37-55
MCV (fl)	70	66	62	60-77
PLT (10 ⁹ /L)	15*	222	240	200-500
MPV (fl)	7.5	8.3	6.9	3.9-11.1

1): 表示仪器没法得出数据。2): 表示超出正常参考值范围。下表同。

表 2 血液生化检查结果

检查项目	检查值			正常参考值 ^[4]
	病例一	病例二	病例三	
ALB (g/dl)	3.2	3.8	3.4	2.8-4.0
ALP (U/L)	301*	34	110	20-150
ALT (U/L)	13*	26	121*	15-70
AMY (U/L)	1019	658	950	300-2000
TBIL (mg/dl)	0.4	0.3	0.4	0.1-0.6
BUN (mg/dl)	10	16	18	10-25
CA (mg/dl)	9.5	10.8	12.5*	8.8-11.2
PHOS (mg/dl)	3.6	5.8	6.4*	2.5-5.9
CRE (mg/dl)	0.9	0.9	0.8	0.6-2.0
GLU (mg/dl)	94	123*	128*	60-110
Na ⁺ (mmol/L)	131	148	134	140-155
K ⁺ (mmol/L)	4.4	4.9	4.2	3.5-5.0
TP (g/dl)	6.8	6.7	6.5	5.0-7.1
GLOB (g/dl)	3.6	2.9	3.1	3.0-4.7

3 治疗方法

3.1 减缓症状药物

泼尼松 1~2 mg/kg, 口服, 每天 1 次。

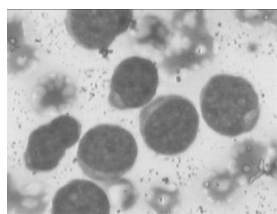


图 1 金毛寻回犬血涂片 (100×)

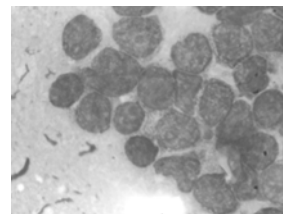


图 2 波斯猫肘后淋巴结抽吸液涂片 (100×)

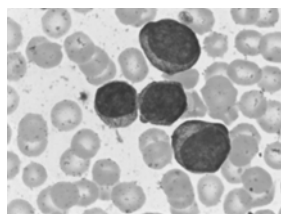


图 3 波斯猫血液涂片 (100×)

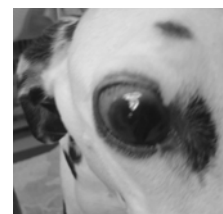


图 4 淋巴瘤患犬眼部症状

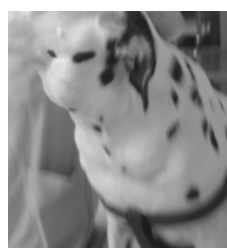


图 5 淋巴瘤患犬体表淋巴结肿大

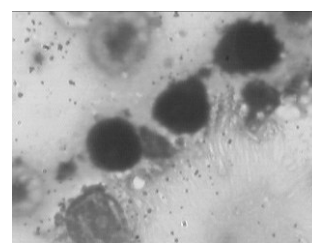


图 6 大麦町犬肩前淋巴结抽吸液涂片 (100×)

3.2 系统化疗

长春新碱 0.7 mg/m² 静脉滴注, 第 1 周、第 3 周和第 8 周给药。

犬体表 m² = (11.2 × 体重 2/3) / 10000。

4 讨论

淋巴瘤占犬恶性肿瘤比例高达 20%, 而活组织细针抽吸技术 (Fine Needle Aspiration) 是一种用于诊断淋巴瘤的简易可行技术, 即使设备和条件一般的诊所也可以诊断出犬只多数恶性肿瘤病例。

临床所见犬淋巴瘤症状多样, 难准确将其分类, 并且淋巴瘤的类型不会影响预后指标。相反, 临床分级有助判定预后, 临床分级越高, 存活时间越短。淋巴瘤分级如下 (世界卫生组织, WHO): 第一期: 仅于一个器官或淋巴结有肿瘤。第二期: 肿瘤涉及某一特定区域之多个淋巴结。第三期: 肿瘤涉及全身之淋巴结。第四期: 肿瘤除涉及

(下转第 50 页)

一例宠物雪貂犬瘟热病毒与细小病毒混合感染的诊治体会

谭志文, 周性聪

(顺德区致爱动物医院, 广东 佛山 528300)

中图分类号: S858.292

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0046-02

随着社会的发展和城市化的推进, 时代潮流在不断变化, 人们的爱好兴趣趋向也不断更新。尤其年轻人喜欢追崇展现自我个性, 所饲养的宠物已经打破传统习惯, 不仅限于犬猫。另类宠物雪貂正成为时髦的饲养宠物。雪貂是食肉类动物, 属于鼬科, 从未免疫接种过相关疫苗的雪貂跟犬科动物一样, 易感染犬瘟热病毒、细小病毒等。犬瘟热由犬瘟热病毒引起犬科、鼬科动物急性、热性、高度接触性传染病, 多以幼犬感染为主, 以呈现双相热型、鼻炎、结膜炎、支气管炎、卡他性肺炎及严重的消化障碍为特征; 犬细小病毒病临床主要特征是剧烈呕吐、腹泻和白细胞显著减少, 出血性肠炎病变, 有的发生心肌炎急性死亡。

2012年3月10日, 笔者接诊了一例灰色雪貂感染犬瘟热病毒和细小病毒的病例。现将该雪貂的临床症状及诊断治疗报道如下。

1 基本情况

灰色雪貂, 5月龄, 雄性, 1.3 kg, 未免疫。2012年3月10日午餐时突然出现呕吐, 咳嗽, 流水样鼻涕, 精神沉郁, 不爱活动。曾口服阿莫西林胶囊 1/4 粒和胃复安片剂 1/2 粒, 当天晚上呕吐次数增多, 呼吸急促, 咳嗽, 四肢无力, 有时站立不稳, 遂送来我院就诊。

2 临床症状

该雪貂身体散有腥臭味, 四肢乏力, 趴地, 体温 40℃, 鼻镜干燥, 呼吸急促, 喘气, 流浓性鼻涕; 目光无神, 眼周有红疹, 眼窝凹陷, 伴有黄色分泌物, 充血; 舌色发紫, 口腔有黏性分泌物, 牙龈苍白; 皮肤弹性减退。肺部听诊有杂音, 呼吸 43 次/min; 心率不齐, 脉搏 140~160 次/min。腹部听诊有肠鸣音, 触诊腹部紧张; 触诊爪垫发硬, 见肛门周围沾有腥臭稀便。

3 诊断方法及结果

采用犬瘟热病毒、犬细小病毒抗原快速检测试纸(上海快灵生物科技有限公司生产)进行检测。该试纸方法: 用生理盐水沾湿的棉签收集犬眼部及结膜分泌物, 鼻液、唾液、粪便并插入稀释液管中搅匀, 取出棉签, 用细吸管吸取稀释混和液滴入试纸样品孔中, 待作用 1~3 min 后判断结果。根据检测线(T)与质控线(C)均呈红色, 表示该雪貂犬瘟热病毒呈(+)、犬细小病毒呈(+)(见图1、图2)。据此可怀疑诊断为犬瘟热病毒和细小病毒的混合感染。



图1 犬瘟热测试结果



图2 细小病毒测试结果

4 治疗过程

采用对症疗法、支持疗法、特异性疗法及非特异性疗法, 以消炎抗感染, 调节电解质, 止咳、退烧、止血为治疗原则。

治疗: (1)犬瘟热病毒、细小病毒单克隆抗体 1 mL, 静脉注射, 1 次/天; (2)静脉注射 0.9%氯化钠注射液 30 mL、氨苄西林钠 0.1 g、病毒灵 0.2 g, 1 次/天; (3)静脉注射复方氯化钠 20 mL、三磷酸腺苷 0.2 mL、V_C 0.2 mL, 乙酰辅酶 A 100 IU, V_{B6} 0.2 mL, 1 次/天; (4)静脉注射 5%葡萄糖注射液 30 mL、

清开灵 0.3 mL, 1 次 / 天; (5) 止血敏 0.3 mL、柴胡注射液 0.3 mL、咳喘停 0.3 mL、复方安基比林 0.3 mL、盐酸旋旄山莨菪碱注射液 0.3 mL、重组犬用 a 干扰素 20 万 IU 各进行肌肉注射, 1 次 / 天。

3 月 11 日, 无呕吐, 未见大便; 咳嗽 / 流鼻涕, 呈脓性; 皮肤弹性增强。继续用药。当天晚上体温 40.5 °C; 咳嗽伴有干呕, 其中呕吐 1 次有水样黏性分泌物; 流鼻涕; 呼吸急促。给予雾化治疗, 注射用恩诺沙星 0.3 mL。坚持用药 3 d 后精神有好转, 体温正常; 大便呈粥状, 黑褐色; 有少许眼分泌物, 鼻涕由脓性变成水样; 仍见少量呕吐。继续按疗程用药。疗程第 4 d, 症状明显好转, 没有呕吐和干呕的症状, 有少量食欲。治疗第 7 d 后, 咳嗽停止, 可以正常饮食, 大便正常, 伴有少量鼻液, 眼边无分泌物。此时以消炎、止咳为主, 饲料混宠康源益生菌, 以调整肠道菌群平衡。半个月后复诊, 雪貂恢复健康如初。随后按免疫程序及时间接种疫苗。

5 体会与小结

宠物雪貂是一种鼬科哺乳动物, 是很有价值的捕鼠者, 性情好静、爱干净、易驯养, 与猫犬智商相当, 不啃咬家具, 适合都市人当宠物饲养, 是近年来受年轻人所追捧的另类宠物。但宠物雪貂同样会受到多种疾病的侵害, 尤其是传染性疾病。根据犬瘟

热和细小病毒病的发生时间与季节, 临床上表现的特征性症状(呈现双相热型, 鼻、眼卡他性脓性分泌物。先呕吐, 后腹泻, 内含血丝并伴有难闻的腥臭味), 结合特异性试纸测试结果, 可疑诊断为犬瘟热病毒与细小病毒混合感染。

5.1 对于两种疾病的混合感染, 应该以特异性疗法为主。宠物雪貂在混合感染中以犬瘟热症状为主。其性情不安, 不适宜大剂量补液, 一旦症状得以控制应由输液改为肌肉注射治疗。

5.2 控制体温是对于治疗犬瘟热的一个重要环节。雪貂一旦发烧体温很难控制, 故物理降温(酒精擦拭、敷冰)对病情的控制很重要。

5.3 治疗第 5 d 细小病毒的呕吐腹泻等症状基本控制, 让其采食极少量易消化的食物(如流质食物), 建议主人饲喂少量食物, 以后每天增加, 直到食欲正常为止饲料混宠康源益生菌, 以调整肠道菌群平衡。

5.4 治疗后期, 改为注射治疗, 同时加强食疗, 丰富的营养和细心照顾对犬瘟热后期的恢复和提高雪貂的抵抗力是很有必要的。

5.5 犬瘟热和细小病毒病都是病毒性传染病, 接种疫苗是最有效的预防措施, 特别在春季病毒流行之前, 给雪貂接种疫苗, 将起到良好的保护作用。

(上接第 38 页)

40 天龄免疫一次即可, 流行猪场可根据具体情况, 14 天龄首免, 35 天龄加强免疫 1 次。免疫剂量为 1~2 周龄仔猪 0.5 头份, 3 周龄以上仔猪 1 头份。建议母猪在产后至配种前免疫。试验中我们发现, 猪瘟疫苗与猪蓝耳病(JXA1-R 株)活疫苗交叉免疫对蓝耳病抗体产生没有影响, 但对猪瘟免疫有一定影响(具体数据见《广东畜牧兽医科技》2012 年第 2 期)。可能是由于猪瘟传代细胞苗和高致病性猪蓝耳病(JXA1-R 株)疫苗均为活疫苗, 短期内同时感染机体, 在机体增殖过程中会相互干扰, 影响猪瘟病毒增殖效率和抗体产生。根据病毒特性和试验结果, 我们认为在生产实际中, 应先免疫高致病性猪蓝耳病活疫苗(JXA1-R 株), 后免疫猪瘟活疫苗, 并适当延长免疫的间隔时间至 1 周以上, 以减少干扰。

(致谢: 本试验得到江门鸿利畜牧养殖有限公司猪场及广东永顺生物制药有限公司、广东大华动物保健品股

份有限公司、中牧实业股份有限公司和武汉中博股份有限公司等 4 个生产厂家的大力支持, 一并致谢!)

参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997, 619-625.
- [2] Tian K, Yu X, Zhao T, et al. Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark[J]. *PLoS ONE* 2, 2007a: e526.
- [3] Tong G Z, Zhou Y J, Hao X F, et al. Highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome [M]. *China Emerg Infect Dis*, 2007, 13(9): 1434-1436.
- [4] Tian Z J, An T Q, Zhou Y J, et al. An attenuated live vaccine based on highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) protects piglets against HP-PRRS[J]. *Vet Microbiol*, 2009b, 138: 34-40.
- [5] 曹斌, 王海燕, 周广生, 等. 不同类型猪蓝耳病疫苗的体液免疫效果比较[J]. 中国动物检疫, 2010, 27(8): 51-52.

浅谈如何开展兽医流行病学的问卷调查

陈平洁¹, 宋长绪², 蔡汝健²

(1. 广东省动物防疫监督总所, 广东 广州 510230; 2. 广东省农业科学院兽医研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 问卷调查是兽医流行病学的一种研究手段。本文在兽医流行病学原理和统计学原理的基础上, 结合国内外利用调查问卷形式开展的兽医流行病学调查, 综述了调查问卷的设计、发放和回收, 并对问卷调查中需注意的问题进行了探讨, 为利用问卷调查的方式开展兽医流行病学研究提供参考。

关键词: 兽医流行病学; 问卷调查; 简介

中图分类号: S851.31³

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0048-03

问卷调查是调查者根据一定的研究目的, 将调查项转换成一系列问题, 以问卷的形式向被调查者了解情况或征询意见。问卷调查广泛应用于社会科学, 如社会学、政治学、经济学、法学和预防医学等领域。近年来, 我国兽医流行病学开始应用问卷的形式调查动物疫病的流行动态。

问卷调查包括问卷设计、问卷发放及回收、数据处理和分析总结五个部分。本文重点探讨调查问卷的设计、发放和回收及其存在的一些问题。

1 问卷设计

1.1 确定调查课题

问卷调查是配合兽医流行病学调查的一种手段。首先要明确调查的主题是什么, 要达到什么样的目的, 调查的对象和范围是什么。按兽医流行病学研究的内容, 调查问卷由浅到深可分为疫病分布调查、病因调查和预测性调查。疫病分布调查就是对过去或现在正在发生的疫病进行畜群间、时间、空间的三间分布调查^[1], 描述疫病发生的时间、地点、畜种、程度和频率等状况; 病因调查是在描述性调查的基础上, 深入开展疫病传播、病因因素等方面的调查, 根据调查的数据做出病因假设, 进行病因推断; 预测性调查是在弄清流行现状的基础上, 找出流行的规律, 对疫病未来的发展趋势做出科学的预报, 对可能发生的疫情及时做出预警, 这也是难度最大的一种调查。在流行病学调查

过程中, 一个课题可能涉及到以上两种或三种类型的内容, 关键是解决课题所提出的问题。

1.2 建立研究假设

研究假设是“对两个(或两个以上)变量之间的特定关系进行预测的命题”。建立假设要依据前人同类研究成果和初步掌握的资料, 经符合逻辑的推理提出假设。这些假设不是凭空想象出来的, 是以一定客观事实为依据的。例如, Tamba 等^[2]在进行猪伪狂犬病(PR)流行病学调查时, 根据意大利北部 PR 血清抗体阳性率和 PR 免疫计划执行情况, 参考 Weigel 等^[3]、Morrison 等^[4]的研究成果, 怀疑猪伪狂犬病的流行与猪的密集程度有关, 提出了猪场周围 6 km 范围的猪只数量、猪群数量是该病流行的危险因素这两个假设。对于病因调查类课题来说, 建立研究假设是整个调查的关键, 要求尽可能全面而科学地将假设的指标纳入问卷。

1.3 编制调查问卷

根据建立的假设指标, 将每个假设转换成一系列问答形式的问题, 完成调查问卷的设计。Tamba 等^[2]围绕假设命题展开问卷的设计, 就猪只的数量划分出 501~5 000、5 000~10 000、>10 000 三个等级范围, 就猪群数划分出 1、2~5、>5 三个等级范围。在转换过程中又牵涉到变量的设计, 依变量的类型可分为连续变量和分类变量。连续变量顾名思义是具体的数字, 分类变量

是定性的,表现为互不相容的类别或属性,如“是”与“否”、种苗的来源“自繁自养”、“购买”和“两种都有”。

调查问卷从结构上分为调查说明、问答部分、编码和结束语四部分。问答部分是调查的核心,它是由一个个问题和答案组成的,在编制问答部分时,应注意以下问题:

1.3.1 问题的排序 问题的排序方式很多,同类性质的问题应放在一起,基本信息问题放在前面,较难的、复杂的及敏感问题放在后面,让被调查者有一个心理适应的过程。

1.3.2 准确反映调查内容 在设计中往往会犯概念不准确的错误,如“贵场的免疫方式是什么?”免疫方式的概念范围较广,包括免疫程序、剂量、注射方式、疫苗来源等,要将这个指标分拆成一组问题来表述。问题的表述要清晰,便于理解。如,“贵猪场是否采用两点式养殖?”两点式、多点式是欧美发达国家的养猪模式,国内较少场采用,自然大多数人就不知所云了。尽量不用模棱两可、容易引起歧义的词语,如:大概、可能、好像等。

1.3.3 可选答案应涵盖所有的可能回答 即要具有“穷尽性”^[5]。问题回答分为开放式、封闭式和混合式三种类型。封闭式答案是调查者预先设计好的,被调查者不能选择答案以外的问题。如:猪只肥育期是否实行全进全出?A. 是 B. 否。开放式答案需由被调查者自己提供答案。设计答案时尽可能是封闭式的,便于数据的分析,当无法估计问题的可能结果、估计不全面或问题的结果较为复杂时,可用开放式。如,养殖场的养殖规模有____头,需被调查者提供具体数据,再转换成分类资料进行分析。混合式答案包含了前两种类型,如养殖场饲养何种动物?A. 猪 B. 牛 C. 羊 D. 鸡 E. 鸭 F. 鹅 G. 其它____,弥补了封闭式答案可能存在的遗漏。

1.3.4 把握好问卷承载的信息量 有的问卷为了获取更多的信息,动辄上百个问题。但问题太多,涉及的范围太广,填写答案需要花费更多的时间,调查对象可能心生厌烦,不愿配合,导致问卷的回收率减低,或者失去耐心,填写应付了事,影响调查问卷的准确性。一个好的问卷应紧扣命题,有所取舍,既能收集到较全面的资料,又短小

精炼。

1.3.5 问题和答案都不能带有倾向性、诱导性 以便获得客观、公正、准确的信息。

1.3.6 注意问卷中内在的逻辑关系 问句应避免问双重问题,如:“贵场是否定期开展新城疫和高致病性禽流感的监测?”就含有新城疫监测和禽流感监测两个问题。除了特意设计的多选题外,单选题的答案之间要互不包含,要有“互斥性”^[5],常见的有:“贵场常用哪种类型的禽流感疫苗?A. 单价苗;B. 多价苗;C. 油苗;D. 冻干苗;E. 多联苗”。这里的答案互相包容,单价苗可以是油苗或冻干苗,多价苗也是如此,让被调查者无法选择。

问卷结构上的另外三个部分是目前兽医流行病学调查中常被忽视的部分。首先是调查说明。说明调查的目的意义,对被调查者的保密承诺,及填写的具体要求。说明部分要简洁易懂,平易近人,提高问卷的回复率。其次是编码。编码部分主要是为方便数据录入和分析而设计的。问题和答案都要编码,编码可以是阿拉伯数字、字母或两者结合使用。第三是结束语。感谢被调查者,还可以询问被调查者对本次调查的看法,对问卷设计的意见等。

2 调查问卷的发放与回收

2.1 调查的筹备工作

在问卷调查立题前要成立调查小组,组织者要统筹协调,落实调查应有的经费开支,编制调查计划,招募调查员、数据处理与分析员、调查报告汇编员,划分工作任务,确定调查范围和调查时限。选拔的调查员要求具备一定的兽医学、兽医流行病学和统计学相关知识,数据处理与分析要求具备较高的统计分析能力,而编制调查报告不但要求有雄厚的专业知识基础,还要有较高的综合分析能力,有条件的可对不同类型的人员分别进行培训。

2.2 确定抽样调查的样品数与抽样

被调查对象涉及抽样的问题,抽样应遵循随机的原则。抽样方法有单纯随机抽样、系统抽样、分层抽样、整群抽样等,各有各的优缺点^[6]。由于兽医流行病学调查的对象源头为各类养殖场、屠宰场、市场,饲养的动物种类、类型、饲养水平等都

不尽相同,简单的随机抽样,可能产生较大的抽样误差。抽样调查时可采用分层抽样、整体抽样等方法,根据实际调查的需要,在层(群)内再进行随机抽样。比如,在猪场开展某种猪病的抽样调查,可以从种猪场、猪苗场、肉猪场等类型进行分层,也可从规模场、散养户进行分层。样品数越大,抽样误差越小,但事实上受人力、财力和时间的制约,样品数应符合统计学原理。样品数 $n \geq \frac{t^2 \sigma^2}{\gamma^2}$, 受置信度、可接受的最大误差值、变异数三因素影响。

2.3 问卷的发放与回收

问卷的发放有邮寄、送发、访问等多种方式。估计被调查者有能力填写并愿意填写的,可采用邮寄、送发的形式;对于文化水平低,填写有困难,或对调查有抵触情绪的,调查员应主动访问,当面填写并回收,确保问卷的回复率。兽医流行病学问卷调查与其他问卷调查不同,它要求了解被调查者的真实身份,不能匿名。有些养殖场不愿提及既往病史,对发病现况也有所避忌。对于官方调查,应根据动物防疫法强调调查的“义务性”,从心理学角度看,人们易顺从“权威”的要求^[7];进行非官方调查时,对于敏感问题还要做出保密承诺^[7],同

时运用一些技巧,让被调查者放下心理包袱,配合调查的开展。

参考文献:

[1] 刘秀梵. 兽医流行病学原理[M]. 第二版. 北京:中国农业出版社, 2000:14.

[2] Tamba M, Calabrese R, Finelli E, et al. Risk factors for Aujeszky's-disease seropositivity of swine herds of a region of northern Italy[J]. *Prev Vet Med*, 2002, 54: 203-212.

[3] Weigel R M, Austin C C, Siegel A M, et al. Risk factors associated with the seroprevalence of pseudorabies virus in Illinois swine herds[J]. *Prev Vet Med*, 1992 (12):1-13.

[4] Morrison R B, Marsh W E, Anderson P L, et al. Factors associated with the seroprevalence of pseudorabies virus in breeding swine from quarantined herds[J]. *J Am Vet Med Assoc*, 1991, 199(5):580-583.

[5] 杨汗东. 调查问卷设计中应把握的几个关键环节[J]. *统计与决策*, 2009(13):21.

[6] 付鹏钰, 胡东生, 顾东风. 阶段整群随机抽样方法在流行病学研究中的运用[J]. *中国卫生统计*, 2010, 27(3):299-300.

[7] 苏为华. 统计调查问卷设计中应注意的几个心理问题[J]. *浙江统计*, 1997(5):18-19.



(上接第 45 页)

全身淋巴结外,肿瘤还涉及肝或脾脏。第五期:血液、骨髓及多处器官均有肿瘤细胞。

病例一属临床第五期,肿瘤细胞已经波及骨髓,导致高度贫血,白细胞、血小板生成数量很少,免疫力低下,最终因缺乏血小板导致广泛出血,存活仅一个月左右。病例二,属临床第四期,肿瘤细胞虽已经波及脾脏,但症状仅限于胃肠道,反复腹泻,营养高度不良,存活两个月左右。病例三,属临床第三期,肿瘤细胞主要波及淋巴结和眼部,存活达 3 个月。

治疗的初始阶级,应用皮质类固醇疗法,可以短暂改善症状,但病情反复后会变得更严重和复杂。其原因之一是皮质类固醇药物会抑制患犬的免疫系统。目前我国犬肿瘤化疗普及率低,由于化疗药物稀缺,笔者仅使用了长春新碱。上述病例接

受化疗后,其存活时间少于 3 个月,疗效并不理想。据国外临床报道,用联合用药方法,可以提高患犬的存活时间,药物包括:泼尼松、阿霉素、长春新碱和环磷酰胺等化疗药,以及阿片类止痛药。

参考文献:

[1] Wallace B Morrison. Incidence and Prevalance. Lymphoma In Dogs And Cats[M]. Teton New Media press, USA, 2005:3-4.

[2] Moulton J E, Harvey J W. Tumors of the lymphoid and hematopoietic tissues. Tumors in domestic animals [M]. 3rd. California press, USA, 1990:231-244.

[3] Morgan RV. 小动物临床手册(施振声主译)[M]. 第四版. 北京:中国农业出版社, 2005:710.

[4] Donald C Plumb. 实验室参考值:犬和猫. Plumb's 兽药手册(沈建中,冯忠武主译)[M]. 第五版. 北京:中国农业出版社, 2009:1197-1200.

当前豆粕价格陡涨原因分析及后期走势判断

虞 华, 虞丽娜

(国家统计局盐城调查队, 江苏 盐城 224005)

中图分类号: S816.42

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2012)03-0051-02

今年清明节后首个交易日(4日5日),大连豆粕期价指数高开高走,收盘上涨144元/吨,收报3379点,4.47%的单日涨幅创下自2010年10月11日以来的纪录。价格调查资料显示:3月份以来,豆粕批发价格也出现了一定幅度的上涨,2012年4月7日豆粕全国平均价格达到3391元/吨(见图1)。其中最高价格地区:江西省抚州市乐安县3560元/吨。最低价格地区:黑龙江绥化市明水县3240元/吨。据了解,期现货市场人士对豆粕价格的中长期走势并不十分看好。截至3月29日,沿海地区豆粕出厂价格普遍回升。环渤海地区普通蛋白豆粕出厂价格为3220~3340元/吨,较之前一周上涨100~120元/吨;华东沿海地区3310~3340元/吨,上涨80元/吨左右;华南沿海地区3360~3400元/吨,上涨80~100元/吨。今年以来,沿海地区豆粕价格整体上涨,涨幅多在360~520元/吨。黑龙江普通蛋白豆粕出厂价格为3250~3260元/吨,局部略升,今年以来大多累计上涨80~110元/吨。

1 近期豆粕价格上涨的原因分析

1.1 供应偏紧

去年国内豆粕现货市场价格一直在低位徘徊,

中间贸易商和油厂的豆粕囤货量都很少。前期国内油厂开工率较低,从而导致近期豆粕现货市场出现了阶段性的供不应求。

1.2 减产预期

年初以来,市场上连续炒作南美大豆产区干旱因素,近期美国农业部调低美国大豆播种面积更助涨了豆粕价格。美国农业部报告显示,2012年度美国大豆种植面积预计为7390万英亩,低于去年的7497.6万英亩和此前市场预测的7550万英亩均值。受此影响,CBOT大豆期价3月末一举突破1400美分/蒲式耳压力位,其他豆类商品期价也大幅上涨。这可能也是导致4月5日国内豆类商品期价大幅走高的直接原因。

1.3 季节因素

通常每年11月份大豆收获后的几个月是豆粕的生产旺季,4~8月是豆粕的生产淡季,而豆粕的需求一般从3月份开始到10月份逐步转旺。在此期间,豆粕的价格容易出现波动。

1.4 比价关系

国内玉米等相关农产品价格的上涨也提振了豆粕价格。玉米和豆粕是农产品板块中相关度较强的两个品种。今年以来,国内玉米价格持续上

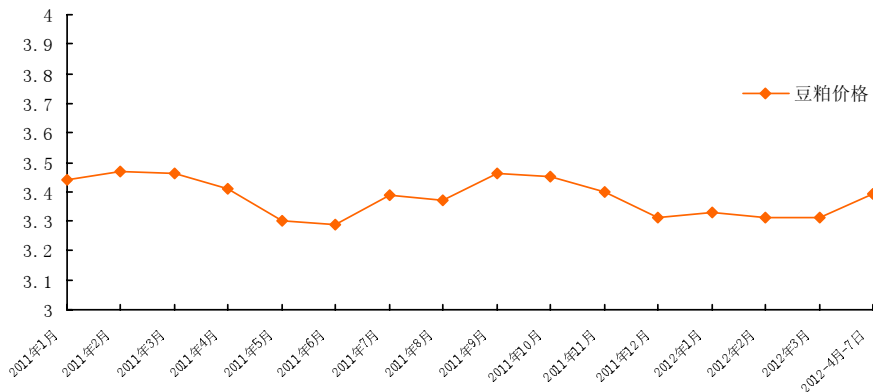


图1 2011年以来全国豆粕价格走势(元/kg)

涨。不仅产区当前玉米价格已接近去年的价格高点,销区玉米价格也不断上涨,广东港口东北优质玉米成交价格已达2 545元/吨。在去年玉米大丰收、饲料消费进入淡季、后期粮源供应充足、深加工工业盈利降低和需求疲软等众多因素促使玉米价格短暂回落后,当前玉米价格又涨到了历史高位水平。玉米近期的强势上涨对豆粕有一定支撑作用,这也是近期豆粕能领涨豆类品种的一个重要因素。

2 豆粕价格后期走势判断

2.1 养殖业景气度有所回升,需求有望增加

春节消费旺季结束后,国内养殖业一直处于需求疲弱状态。但近来随着天气转暖,部分地区生猪疫情有所缓解,仔猪存活率及母猪产仔率均有所回升。据农业部统计数据:3月初我国生猪存栏量45 846万头,同比增长5.5%,能繁母猪存栏4 949万头,同比增长3.3%。预计气温的逐步回升将对4月份生猪补栏产生一定的积极影响,后期饲料需求有望增加。

2.2 大豆进口暂时难以恢复,供给依然偏紧

豆粕是大豆的副产品,每1吨大豆可以制出0.2吨的豆油和0.8吨的豆粕。豆粕的价格与大豆的价格有密切的关系,每年大豆的产量都会影响到豆粕的价格。大豆丰收则豆粕价跌,大豆欠收则豆粕就会涨价。同时,豆油与豆粕之间也存在相互关联,豆油价好,豆粕就会价跌,豆油滞销,豆粕产量就将减少,豆粕价格将上涨。

今年前两个月我国大豆进口量虽然达到844万吨,同比增长13.2%,但现货供给偏紧的局面仍未改变。一是高品质大豆供给有限。由于南美减产和装运延迟,原定3月到港的大豆预计要4月中旬才能抵达。目前国内大豆主要是美国豆源,蛋白含量偏低,降低了油厂压榨动力。二是榨油厂挺价心理明显。2月份以来我国榨油厂整体开工率维持在63%~70%的相对较低水平。较低的开工率和相对偏低的库存提振了油厂的挺价心理。三是今年豆粕未成交订单量较大也是一个重要影响因素。截止到3月中旬,榨油厂仍然有未执行订单191万吨,仍存在加工需求。由此可见,大豆短期供给偏紧的局势难以改观。

2.3 短期走势高位震荡为主

虽然美国农业部报告播种面积预估调降,但据美国农业部测算,目前美国大豆库存仍高于去

年同期水平。而今年中国的大豆进口量估计仍将维持在去年的高水平上。近期豆粕价格大幅上涨,询价的企业虽然开始增多,但愿意大量采购的企业并不多。后期随着油厂压榨利润的回升,开工率也将迅速提高。在国内大豆供应充足、港口进口大豆库存庞大的情况下,预计豆粕市场需求会很快得到满足。综上分析,虽然豆粕上涨势头迅猛,盘中增仓明显,但短期需求疲软,在当前下游的肉蛋禽价格运行稳中有跌之时,豆粕价格维持一枝独秀格局的条件还不具备。因此,国内豆粕市场的供应紧张格局很难长期保持,经过大幅上涨的豆粕价格随时可能出现回调,预计短期高位震荡可能性较大。二季度,油籽库存和消费情况将主导豆类市场走势。在国内库存高企和消费进入淡季的压力下,豆类振荡的概率较大。但二季度政府或放松货币政策,降息、下调存款准备率有可能出台,对豆类价格仍然有一定支撑。因此豆粕二季度价格振荡仍为主基调。

3 豆粕等饲料原料价格暴涨导致饲料跟涨

日前,国内玉米价格接近2 600元/吨,豆粕报出3 400元/吨。两种原料占据了饲料含量的近90%。受成本因素影响,近两个月来猪料价格已两次微涨,每次涨幅约在50元/吨左右。“涨价”对饲料企而言是一把双刃剑,“涨”可能会面临客户流失的压力,“不涨”又不得不面对高成本的压力。从成本分析,目前多数饲料厂已经接近不赚钱的状态,按照目前的原料价格和最终饲料成本,一吨全价料也就赚40~50元。大规模的全价饲料企业人工成本、包装成本之和约为120元/吨,而中小规模饲料厂的成本在此之上,高的甚至达到180~190元/吨。在小中大猪料阶段,玉米的用量约为65%,豆粕用量在20%~25%不等,加上预混料以及一些其他的添加剂,再去去除配方成本和1%的原料加工损耗,品质较好的小猪料的价格约为3 500元/吨,中大猪料价格约为3 300元/吨左右。而一些非品牌的猪料企业,由于采购的玉米等次相对较低,采用的杂粕、DDGS等原料成本相对较低,生产出全价料的成本会低于上述的价格。

由于后市国内豆粕价格市场的供应紧张格局很难长期保持,经过大幅上涨的豆粕价格随时可能出现回调,因此广大饲料生产企业和养殖场应密切关注国际国内大豆和豆粕期货及现货市场行情,控制合适的豆粕仓贮数量。