

# 广东畜牧兽医科技

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

双月刊 1976年3月创刊

第44卷第2期(总第204期)

2019年4月18日出版

ISSN 1005-8567  
中国标准连续出版物号 CN 44-1243/S

主管单位:广东省农业科学院

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

主 编:蒋宗勇

责任编辑:黄 琳 马新燕 康桦华 吕晓慧  
张洁华 王片片

编委主任:蒋宗勇

编 委(排名不分先后):

蒋宗勇 顾万军 曹俊明 廖 明  
曾振灵 毕英佐 徐志宏 舒鼎铭  
王贵平 王政富 熊惠军 吴玄光  
刘清神

特邀编委:

陈 峰 林旭堃 李 岩 陈瑞爱  
罗满林 向 华 王 华

编辑出版:《广东畜牧兽医科技》编辑部

地址:广州市天河区五山大丰一街1号(510640)

电话:020-87576452

传真:020-87576452

网址: <http://www.gdaav.org>

E-mail: [gdxmsyjkj@163.com](mailto:gdxmsyjkj@163.com)

印刷单位:广州市德艺彩印有限公司

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

定价:10.00元

广告发布登记通知书编号:440000100115

本刊声明:凡向本刊所投稿件,一经刊用,稿件的复制权、发行权、信息网络传播权、汇编权等权利即转让给本刊。本刊一次性支付作者著作权使用报酬(包括印刷版式、光盘版和网络版各种使用方式的报酬)。如作者不同意转让版权,请于来稿时声明。

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

## 目 录

市场监管总局 农业农村部 工业和信息化部

“关于在加工流通环节开展非洲猪瘟病毒检测的公告” ..... 农村农业部(1)

### ·行业动态·

抗非洲猪瘟疫苗与药物研究进展 ..... 楚品品,谢乐新,等(2)

实现“五有”上级和行业充分肯定——原省农业厅接管畜禽屠宰行业管理后的工作回顾

..... 罗建民(7)

### ·专题综述·

川芎嗪药理作用及在畜牧生产中应用研究进展 ..... 邝智祥,李娟,等(10)

我国非常规饲料原料在养猪生产中应用 ..... 马新燕,李剑豪,等(13)

加强兽医专业教学定位,提高兽医人才培养质量 ..... 石达友,吴玄光,等(21)

### ·畜牧技术·

哺乳仔猪早期诱料操作 ..... 迂斌,张运强,等(24)

### ·兽医临床·

猪肺炎支原体感染的诊断与病理学观察 ..... 卢围,陶政,等(26)

大食蚊兽功能失调性子官出血的诊断与治疗 ..... 张天佑,马祥(28)

一例大肠杆菌和低致病性禽流感合并感染蛋鸡的诊治 ..... 张强,宋志勇(31)

### ·试验研究·

鹅细小病毒灭活苗佐剂筛选研究 ..... 刘佳佳,苏晓娜,等(33)

玉竹多糖的提取与脱蛋白的工艺研究 ..... 温馨园,温馨,等(36)

荧光RT-LAMP法检测猪流行性腹泻病毒方法的建立 ..... 邵建宏,曾俊霞,等(42)

低蛋白饲料对断奶仔猪生长性能、消化酶表达及氮排放的影响 ..... 田志梅,马现永,等(46)

### ·信息之窗·

欢迎订阅本刊 ..... (35)

# GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in March 1976(Bimonthly)

APR.2019 Volume 44, Number 2 (Total No.204)

---

## Main Content

- State Administration for Market Regulation Ministry of Agriculture and Rural Affairs Ministry of Industry and Information Technology  
"Announcement on Detection of African Swine Fever Virus in Processing and Circulation Links" .....  
..... Ministry of Agriculture and Rural Affairs (1)
- Advances in Studies of Vaccines and antiviral drugs against African Swine Fever ..... CHU Pinpin, XIE Lexin, et al (2)
- Review on the Regulation of Livestock and Poultry Slaughtering Industry after the Acceptance of the Former Provincial Agricultural  
Department ..... LUO Jianmin (7)
- Pharmacological action of Ligustrazine and its application in animal production ..... KUANG Zhixiang, LI Juan, et al (10)
- Application of unconventional feed ingredients in pig production in China ..... MA Xinyan, LI Jianhao, et al (13)
- Strengthening the Teaching Position of Veterinary Specialty and Improving the Quality of Veterinary Talents Training  
..... SHI Dayou, WU Xuanguang, et al (21)
- Early trapping of suckling piglets ..... YU Bin, ZHANG Yunqiang, et al (24)
- Diagnosis and pathological observation of Mycoplasma pneumoniae infection ..... LU Wei, TAO Zheng, et al (26)
- Diagnosis and treatment of dysfunctional bleeding from uterine of anteaters ..... ZHANG Tianyou, MA Xiang (28)
- Diagnosis and treatment of a case of co-infection of Escherichia coli and low pathogenic avian influenza in hens  
..... ZHANG Qiang, SONG Zhiyong (31)
- Study on adjuvant screening of inactivated goose parvovirus vaccine ..... LIU Jiajia, SU Xiaona, et al (33)
- Technologies of Extraction and Deproteinization of Polygonatum odoratum Polysaccharides ... WEN Xinyuan, WEN Xin, et al (36)
- Establishment of Fluorescent Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for detecting Porcine Epidemic  
Diarrhea Virus (PEDV) ..... SHAO Jianhong, ZENG Junxia, et al (42)
- Effects of Low Protein Diet on Growth Performance, Digestive Enzyme Expression and Nitrogen Emission of Weaned Piglets  
..... TIAN Zhimei, MA Xianyong, et al (46)



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

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

Chief Editor: Jiang Zongyong

Editor Add: No. 1 Dafeng one Street, Guangzhou P.R. China

Post Code: 510640

Tel: (020)87576452

Fax: (020)87576452

E-mail: gdxmsykj@163.com

## 市场监管总局 农业农村部 工业和信息化部 “关于在加工流通环节开展非洲猪瘟病毒检测的公告”

来源:农业农村部 发布时间:2019-04-03

为进一步加强非洲猪瘟防控,严防染疫生猪产品进入食品加工流通环节,维护人民群众切身利益,保障生猪产业健康发展,按照国务院非洲猪瘟疫情防控工作部署,现就非洲猪瘟疫情防控应急响应期间在加工流通环节开展非洲猪瘟病毒检测有关事项公告如下:

一、猪肉制品加工企业、生猪产品经营者(含餐饮服务提供者)必须严格落实进货查验和记录制度,加强对采购生猪产品的管控和溯源管理,确保购进的生猪产品来自定点屠宰厂(场)。严禁采购经营来自非定点屠宰厂(场)或者来源不明的生猪产品。

二、猪肉制品加工企业、生猪产品经营者采购生猪产品应当批批查验其动物检疫合格证明、肉品品质检验合格证明以及非洲猪瘟病毒检测结果(报告),确保购进的生猪产品不带非洲猪瘟病毒;采购的进口生猪产品应附有合法的入境货物检验检疫合格证明。不得采购没有非洲猪瘟病毒检测结果(报告)及未经检疫或者检疫不合格的生猪产品,确保猪肉制品和经营的生猪产品不含非洲猪瘟病毒。

三、猪肉制品加工企业应当参照《农业农村部办公厅关于非洲猪瘟病毒检测试剂盒有关事宜的通知》(农办牧〔2019〕3号)和农业农村部第119号公告的要求,使用农业农村部批准或者经中国动物疫病预防控制中心比对符合要求的检测方法及检测试剂,对生猪产品原料开展非洲猪瘟病毒核酸检测并做好记录。

生猪产品原料来自本企业(或集团)自有屠宰厂(场)且非洲猪瘟病毒核酸检测结果为阴性的,可以不再检测。

猪肉制品加工企业暂时不具备非洲猪瘟病毒核酸检测条件的,可以委托具有非洲猪瘟病毒检测资质的检测单位开展非洲猪瘟病毒检测工作。

四、猪肉制品加工企业在生猪产品原料中检出

非洲猪瘟病毒核酸阳性的,应当立即封存阳性样品的同批次原料并报告所在地市场监管、畜牧兽医部门,并将阳性样品送至具有非洲猪瘟病毒检测资质的单位复检。复检为阳性的,企业要在当地市场监管、畜牧兽医部门监督下,按规定对同批次生猪产品原料进行无害化处理,对相关场所进行彻底清洗消毒。

五、省级市场监管部门组织对本辖区企业加工的猪肉制品抽样,委托具有非洲猪瘟病毒检测资质的检测单位或省级动物疫病预防控制机构进行检测。检测结果为非洲猪瘟病毒阳性的,由国家非洲猪瘟参考实验室复检。复检为阳性的,按照省级畜牧兽医部门、市场监管部门的规定做好阳性产品处置和溯源调查工作。检测结果和处置调查信息按规定报农业农村部、市场监管总局。

六、各级市场监管部门要加强对食用农产品集中交易市场、销售企业和餐饮企业的监督检查,对“两证”不全、来源不明、无法提供非洲猪瘟病毒检测合格报告的生猪产品进行重点排查,发现可疑的生猪产品及时实施抽检(实验室检测工作按照第五条执行),防止带病生猪产品流入市场。

七、各级市场监管部门、畜牧兽医部门要加强对非洲猪瘟病毒核酸阳性产品的溯源调查,对负有责任的养殖厂(场)、屠宰厂(场)、猪肉制品加工企业、生猪产品经营者从严惩处。

八、各级工业和信息化部门要指导猪肉制品加工企业严格内部管理,健全记录制度,强化诚信建设,主动履行食品质量安全主体责任,加大非洲猪瘟防控力度。

九、各地要落实属地管理责任,加强组织领导,加大投入支持力度,为加工流通环节非洲猪瘟防控和检测工作提供保障。市场监管总局、农业农村部、工业和信息化部将适时组织对本公告落实情况进行检查。

十、本公告所称生猪产品是指猪肉、猪内脏、猪

## 抗非洲猪瘟疫苗与药物研究进展

楚晶晶<sup>1</sup>, 谢乐新<sup>2</sup>, 蒋智勇<sup>1</sup>, 李艳<sup>1</sup>, 勾红潮<sup>1</sup>, 宋帅<sup>1</sup>,

杨冬霞<sup>1</sup>, 卞志标<sup>1</sup>, 蔡汝健<sup>1</sup>, 李春玲<sup>1\*</sup>

- (1. 广东省农业科学院动物卫生研究所, 广东省畜禽疫病防治重点实验室, 农业农村部兽用药物与诊断技术广东科学观测实验站, 广东 广州 510640;  
2. 广东省动物防疫物质储备中心, 广东 广州 510000)

**摘要:**非洲猪瘟是由非洲猪瘟病毒引起猪的烈性传染病, 急性感染时可引起高达100%的致死率, 一旦暴发, 往往给受灾国家和地区养猪业造成不可估量的损失和影响。自1921年在肯尼亚被首次报道以来, 已有数十个国家和地区发生该病, 我国于2018年8月首次发布非洲猪瘟疫情公告。为了预防和控制非洲猪瘟, 近百年来, 国内外学者相继开展了抗非洲猪瘟疫苗和药物研究, 取得了一些进展, 本文对抗非洲猪瘟疫苗与药物已有研究进行概述, 以期为未来非洲猪瘟疫苗与药物的开发提供参考。

**关键词:**非洲猪瘟; 病毒; 疫苗; 药物

**中图分类号:**S852.4 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2019)02-0002-05

非洲猪瘟(African swine fever, ASF)是由非洲猪瘟病毒(African swine fever virus, ASFV)引起的一种高度接触性传染病, 可引起不同程度临床症状和不同时间的感染病程, 从长期带毒的隐性感染到死亡高达100%。强毒株感染后, 引起高烧, 严重抑郁, 厌食, 皮肤变红, 淤血, 紫绀和不协调等临床症状<sup>[1]</sup>, 伴有外周血血小板和淋巴细胞减少<sup>[2-3]</sup>, 此外有研究发现还可引起噬血细胞综合征(Hemophagocytic lymphohistiocytosis, HLH)<sup>[4]</sup>。

非洲猪瘟被世界动物卫生组织(OIE)列为必须报告的动物疫病, 我国也将其列为一类动物疫病。至今缺乏有效的疫苗和药物用于预防、控制和治疗该病, 一旦暴发, 往往给受灾国家和地区的养猪业造成严重的影响。随着科学技术的不断发展, 对非洲猪瘟的认识不断深入, 对非洲猪瘟疫苗和抗病毒药物研究也取得了进展, 现就该方面做概述, 以期为未来更有效抗非洲猪瘟疫苗与药物的研发

提供参考。

### 1 非洲猪瘟分子病毒学与流行病学概述

非洲猪瘟病毒是DNA病毒目、非洲猪瘟病毒科、非洲猪瘟病毒属的唯一成员, 是一个复杂的二十面体DNA病毒, 其基因组包括一个由两个可变的末端和一个125 kb左右的中心保守区域组成的线性双链DNA分子, 不同病毒株基因组大小不同, 约为170~193 kb, 编码150~167个开放阅读框<sup>[5-7]</sup>, 其中大部分阅读框来于预测, 未得到证实<sup>[8]</sup>。ASFV基因组大且复杂, 又存在可变区, 使其在流行过程中表现出明显的遗传多样性, 根据其B646L基因编码的vp72蛋白的C端序列, 目前可分为24个基因型, 根据B602L基因中央可变区(Central Variable Region, CVR)串联重复序列, I73R和I329L基因间隔序列以及EP402R和MGF505-2R基因间隔序列分析, 可做进一步基因分型<sup>[9-12]</sup>。

收稿日期:2018-12-11

作者简介:楚晶晶(1990-), 女, 河南人, 助理研究员, 硕士研究生, 从事微生物相关研究。E-mail:931671302@qq.com;

谢乐新(并列第一作者)(1973-), 男, 广东乐昌人, 高级兽医师, 主要从事兽医疫苗及临床研究。

\*通讯作者:李春玲(1965-), 女, 河南人, 研究员, 从事兽医相关研究。E-mail:lclclare@163.com

非洲猪瘟于1921年在肯尼亚第一次被报道,当时该病从非洲野猪传播给家猪,引起了一种死亡率为100%的疾病。1957年之前该病只存在于非洲,此后传入葡萄牙,在1960~1995年间,蔓延至西班牙、意大利、法国、比利时等欧洲国家以及巴西、多米尼加共和国、古巴等美洲国家。2007年传入高加索地区的格鲁吉亚共和国,进而影响到周边包括亚美尼亚,阿塞拜疆和俄罗斯等国家,2012年进入乌克兰,2013年进入白俄罗斯<sup>[13-14]</sup>。我国也未能幸免,受到非洲猪瘟病毒的影响,出现疫情。2018年8月3日,农业农村部根据中国动物卫生与流行病学中心(国家外来动物疫病研究中心)的确认,正式发布了发生在辽宁省沈阳市沈北新区的非洲猪瘟疫情通告<sup>[15-16]</sup>。疫情出现后,各相关部门立刻采取封锁、扑杀、无害处理、消毒等措施,以控制疫情的蔓延。

## 2 疫苗

对于传染病的防治,疫苗无疑发挥着极大的功效,有效合理疫苗的设计往往离不开对病原体特性、感染和免疫机制的深入了解。随着非洲猪瘟病毒保护性抗原、引起的保护性反应以及对宿主感染反应的调节机制等认知的不断加深,很大程度上推动了合理有效疫苗的开发。一般抗病毒疫苗可分为灭活疫苗、减毒活疫苗和亚单位疫苗。

### 2.1 灭活疫苗

研究人员采用各种物理与化学方法将ASFV灭活,使其不具有感染力,仍保留抗原性。灭活ASFV制备的疫苗,免疫动物后当机体受到强毒的攻击时,无法提供有效保护<sup>[17]</sup>。佐剂的加入一定程度提高了灭活疫苗的效力,但即使是最新的佐剂Polygen™和Emulsigen®-D与灭活苗的联合应用也只是能在实验动物体内检测到ASFV特异性抗体,并未观察到免疫保护作用<sup>[18]</sup>。由此看来,灭活疫苗对于非洲猪瘟的防控效果并不理想。

### 2.2 减毒活疫苗

减毒活疫苗(Live Attenuated Vaccines, LAVs)可以引起强烈且持久的免疫应答。随着对ASF认识的不断加深,以及CRISPR-Cas9技术等新基因编辑技术的出现,使得ASF减毒活疫苗的研究成了热点。

ASFV的减毒株最初是通过在细胞中连续传代的方式获得。实验证明,ASFV传代致弱株免疫的实验猪,在受到同源亲代强毒株感染时,产生一定的保

护<sup>[19-20]</sup>,但是对非同源毒株感染,却很难提供保护<sup>[21]</sup>。也有研究提出,即使是相似的毒株,也可能保护失败;而明显不同的毒株,反而会产生保护<sup>[22]</sup>,同源与否的界限并非那么明显。除传代致弱外,有类天然弱毒的毒株,如属于基因I型的天然致弱毒株OURT88/3,其不仅对I型其他毒株引起一定保护,对属于其他型的毒株也可以提供一定保护。由此可见,此类疫苗对毒株的保护性机制可能存在其他相关性,与同源或者同型无关。此外,此类疫苗存在一定毒性,免疫后会引起一定副作用,包括瘀斑,坏死灶,关节肿胀和肺炎等,出现ASF的慢性临床症状,甚至是再次流行。这种固有缺陷以及引起再次流行的风险等安全问题一定程度上限制了应用<sup>[23]</sup>。

ASFV另一种减毒方法是通过基因工程手段从基因水平进行编辑,删除相关基因获得在各个方面影响ASFV致病性、复制或者调节机体免疫反应等的突变株,从而达到减毒目的。随着ASFV对宿主细胞的吸附、在细胞内的复制与表达、对宿主免疫系统的调控等相关基因和蛋白不断被鉴定,为此类疫苗的设计与开发提供了坚实的基础。这类减毒疫苗会更安全,效力也会更好。比如删除属于多基因家族MGF360和505的Benin 97/1株(BeninDMGF)能够引起机体对亲本毒株攻毒的保护<sup>[24]</sup>。研究表明这类基因改造的疫苗可以提供更广泛的免疫保护,比如缺失了CD2v/EP402R基因的BA71(I型分离株)不仅可以对亲本株产生免疫保护,而且对同属I型的E75株,以及来自II型的Georgia07株都能产生保护作用<sup>[25]</sup>;缺失A224L, A238L, A276R等基因(病毒与细胞相互作用相关)的NH/P68株,同样对同型和不同型的毒株表现出了不同程度的保护<sup>[26]</sup>。ASFV相关蛋白越来越多的得到发掘与认知,单个基因缺失以及多个基因联合缺失,以及CRISPR-Cas9等新的基因编辑技术的加入,使得ASF基因编辑疫苗的开发更可靠而且更有效。

### 2.3 亚单位疫苗

除以病毒整体作为疫苗外,以特定抗原为核心,配以合适的递送系统的ASFV亚单位疫苗也得到了广泛研究,尤其ASFV中可引起中和抗体的关键蛋白如p30, p54和p72等得到确认。研究表明p30和p54中和抗体在抗欧洲株E75感染时提供部分保护<sup>[27]</sup>,也有研究表明不论杆状病毒重组表达的p30和p54还是p30, p54, p22和p72都不能保护机体免受ASFV强毒株的攻击<sup>[28]</sup>。还有研究表明杆状病毒重组表达的

EP402R/CD2v 蛋白对于同源 ASFV 毒株的攻击能提供一定水平的保护<sup>[29]</sup>;人腺病毒 Ad5 载体重组表达 p32、p54、p72 和 pp62, 机体免疫后获得了良好的抗原特异性 CTL 反应;他们随后又将 7 个 ASFV 抗原基因 (A151R、B119L、B602L、EP402R $\Delta$ PRR、B438L 和 K205R-A104R) 重组入复制缺陷型腺病毒载体, 发现免疫后能够诱导强烈体液免疫反应和细胞免疫应答<sup>[30]</sup>。亚单位疫苗的设计往往多基于两个或者更多个 ASFV 抗原, 才能引起足够的免疫保护, 因此对 ASFV 能够引起全面保护的蛋白的鉴定显得十分重要, 此外还需要合适的传递系统。

### 3 抗病毒药物

在没有有效疫苗的情况下, 抗病毒药物的应用就显得十分有效, 对于在病毒暴发后早期控制病毒传播十分有用。一方面可以延长受感染猪的存活时间, 使其有更多时间产生有效的免疫; 另一方面, 用在疫区周围以隔离疫区, 为周围可能受到感染的地区提供足够的时间来制定防控对策。此外, 抗病毒药物与疫苗的联合使用或许可以引起更有效的免疫反应。

ASFV 感染宿主后, 通过粘附宿主细胞, 然后内化进入细胞, 在细胞内进行脱壳、蛋白合成、复制、装配和释放等一系列复制过程, 产生子代病毒, 任何可影响病毒复制过程的物质都有可能成为抗 ASFV 的药物。

ASFV 复制的第一步是先粘附细胞, 研究发现, 多糖硫酸酯可通过所带负电荷与 ASFV 被膜上氨基酸链所带正电荷相互作用, 抑制 ASFV 对细胞的粘附, 进而影响病毒复制<sup>[31]</sup>。

ASFV 粘附细胞后, 通过内吞作用和胞饮作用进入细胞内。研究表明, 在抑制网格蛋白介导的内吞作用药物(如氯丙嗪、pitsop2 和 dynasore)和抑制胞饮作用的药物(如阿米洛利(EIPA)、IPA-3(P21 激活激酶抑制剂)、细胞松弛素 D)存在情况下, 大幅度降低了细胞对 ASFV 的吸收<sup>[32]</sup>。胆固醇也参与内吞作用, 甲基  $\beta$ -环糊精能够移除质膜上的胆固醇, 实验证明其也能够抑制 ASFV 的复制<sup>[33]</sup>, 此外, 研究证明, 胆固醇还参与 ASFV 内化后在核内体中的运输过程<sup>[34]</sup>, 以胆固醇为靶点开发抗 ASFV 药物, 或许可以多位点抑制 ASFV 的复制。

ASFV 进入细胞后, 利用其囊膜和内吞泡膜的融

合机制将病毒释放到细胞液中, 研究表明, 一类被称为亲脂融合抑制子(Rigid amphipathic fusion inhibitors, RAFIs)的类似于磷脂的融合抑制剂, aUY11 和 cm1UY11, 可以通过生物物理作用干扰 ASFV 囊膜和内体膜的融合, 有效的抑制了 ASFV 体外对绿猴肾细胞和猪肺泡巨噬细胞的感染<sup>[35]</sup>。ASFV 完成融合后, 脱壳释放 DNA, 这一过程与内体里的酸性环境关系密切, 也与细胞的泛素-蛋白酶系统(Ubiquitin-proteasome system, UPS)相关, 研究表明氯化铵, 金刚烷胺, 氯喹和甲胺等干扰内体酸化的物质, MG132、硼替佐米和乳胞素等蛋白酶体(proteasome)抑制剂均在一定程度上抑制了 ASFV 的复制<sup>[36-37]</sup>。

ASFV 脱壳后病毒核心转移到细胞核周围, 先合成早期蛋白, 为后续 DNA 复制提供所需 DNA 聚合酶等关键材料。研究发现病毒 II 型 DNA 拓扑异构酶与细菌 DNA 螺旋酶和拓扑异构酶 IV 相似, 细菌拓扑异构酶抑制剂氟喹诺酮类药物同样可干扰 ASFV 拓扑异构酶 II 来干扰病毒的复制<sup>[38]</sup>。DNA 复制所需蛋白合成后 DNA 开始复制, 先形成中间体, 中间体的成熟及后续病毒颗粒的装配在一个称为“病毒工厂”的结构中完成。研究证明, 来自植物次级代谢的多酚植物抗毒素类物质白藜芦醇、氧化白藜芦醇<sup>[39]</sup>和类黄酮类物质芹菜素(Apigenin)<sup>[40]</sup>可抑制 ASFV 特定蛋白的合成和“病毒工厂”的形成以抑制 ASFV 的复制。此外, 最新研究还发现, 染料木黄酮在体外试验中也可通过干扰 ASFV DNA 的合成而抑制 ASFV 的复制<sup>[41]</sup>。

ASFV 实现成功感染, 除要完成自身的增殖外, 还必须克服宿主的防御机制, 如细胞凋亡和炎症等免疫反应。研究表明, ASFV 会与细胞染色体中组蛋白去乙酰化酶(Histone deacetylases enzymes, HDACs)相互作用, 改变宿主细胞核染色质表观遗传状态, 进而控制细胞基因表达来为己所用, 而组蛋白去乙酰化酶抑制剂苯丁酸钠等可干扰这一过程, 同样可抑制 ASFV 的复制<sup>[42]</sup>。

越来越多研究发现多种化合物都有强的抗 ASFV 作用, 尤其植物源物质, 由于其副作用小以及易获得, 在抗 ASFV 方面有很好的应用前景。但是, 对于抗 ASFV 药物的研究多属于体外研究, 其有效性和安全性仍需要活体动物实验进一步验证。

#### 4 展望

2018年8月首例非洲猪瘟在我国发生以来,虽然相关部门已经采取了多种措施进行防控,但是依然无法阻止非洲猪瘟病毒的传播,不断有地区出现非洲猪瘟疫情,有效防控疫苗和抗病毒药物的开发迫在眉睫。非洲猪瘟基因组较大,基因型多,对其了解和认知还有很多空白,严重阻碍了有效疫苗的开发,虽然各种疫苗都有设计与研究,但均存在一定的局限性,安全性和稳定性也有待考察。对于抗病毒药物的研究,抗病毒效果多限于体外研究,缺乏进一步的体内验证。

总体而言,不管是有效疫苗的研制,还是抗病毒药物的开发都有赖于对ASFV特性以及感染机制等的深入了解,随着越来越多ASFV各种蛋白和免疫机制不断得到鉴定和阐释,必定会有高效疫苗和药物得到开发和利用。

#### 参考文献

- [1] BLOME S, GABRIEL C, BEER M. Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar [J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 122-130.
- [2] KARALYAN Z, ZAKARYAN H, ARZUMANYAN H, et al. Pathology of porcine peripheral white blood cells during infection with African swine fever virus [J]. *BMC veterinary research*, 2012, 8(1): 18.
- [3] ZAKARYAN H, KARALOVA E, VOSKANYAN H, et al. Evaluation of hemostaseological status of pigs experimentally infected with African swine fever virus [J]. *Veterinary Microbiology*, 2014, 174(1-2): 223-228.
- [4] KARALYAN Z R, KARALYAN N Y, TER-POGOSSYAN Z R, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis in acute African swine fever clinic [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2017, 187: 64-68.
- [5] PORTUGAL R, COELHO J, HOPER D, et al. Related strains of African swine fever virus with different virulence: genome comparison and analysis [J]. *Journal of General Virology*, 2015, 96(Pt\_2): 408-419.
- [6] DIXON L K, CHAPMAN D A G, NETHERTON C L, et al. African swine fever virus replication and genomics [J]. *Virus Research*, 2013, 173(1): 3-14.
- [7] 欧云文, 阎传忠, 张杰, 等. 非洲猪瘟病毒的分子病原学及致病机理研究进展 [J]. *中国畜牧兽医*, 2017(07): 2139-2146.
- [8] BORCA M V, O DONNELL V, HOLINKA L G, et al. The L83L ORF of African swine fever virus strain Georgia encodes for a non-essential gene that interacts with the host protein IL-1 $\beta$  [J]. *Virus Research*, 2018, 249: 116-123.
- [9] ALKHAMIS M A, GALLARDO C, JURADO C, et al. Phylodynamics and evolutionary epidemiology of African swine fever p72-CVR genes in Eurasia and Africa [J]. *PLOS ONE*, 2018, 13(2): e192565.
- [10] QUEMBO C J, JORI F, VOSLOO W, et al. Genetic characterization of African swine fever virus isolates from soft ticks at the wildlife / domestic interface in Mozambique and identification of a novel genotype [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2018, 65(2): 420-431.
- [11] SANNA G, DEI GIUDICI S, BACCIU D, et al. Improved Strategy for Molecular Characterization of African Swine Fever Viruses from Sardinia, Based on Analysis of p30, CD2V and I73R/I329L Variable Regions [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2017, 64(4): 1280-1286.
- [12] SIMULUNDU E, SINKALA Y, CHAMBARO H M, et al. Genetic characterisation of African swine fever virus from 2017 outbreaks in Zambia: Identification of p72 genotype II variants in domestic pigs [J]. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 2018, 85(1).
- [13] SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J M, MUR L, GOMEZ-VILLAMANDOS J C, et al. An Update on the Epidemiology and Pathology of African Swine Fever [J]. *Journal of Comparative Pathology*, 2015, 152(1): 9-21.
- [14] 欧云文, 马小元, 王俊, 等. 非洲猪瘟分子病原学及分子流行病学研究进展 [J]. *中国兽医学报*, 2018(02): 416-420.
- [15] GE S, LI J, FAN X, et al. Molecular Characterization of African Swine Fever Virus, China, 2018 [J]. *Emerging infectious diseases*, 2018, 24(11): 2131-2133.
- [16] 陈腾, 张守峰, 周鑫韬, 等. 我国首次非洲猪瘟疫情的发现和流行分析 [J]. *中国兽医学报*, 2018(09): 1831-1832.
- [17] FORMA A J, C W R, WILKINSON P J. The Immunological Response of Pigs and Guinea Pigs to Antigens of African Swine Fever Virus [J]. *Archives of Virology*, 1982, 74: 91-100.
- [18] Blome S, Gabriel C, Beer M. Modern adjuvants do not enhance the efficacy of an inactivated African swine fever virus vaccine preparation [J]. *Vaccine*, 2014, 32(31): 3879-3882.
- [19] LEITÃO A, CARTAXEIRO C, COELHO R, et al. The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response [J]. *The Journal of general virology*, 2001, 82(Pt 3): 513.
- [20] MULUMBA MFUMU L K, GOATLEY L C, SAEGERMAN C, et al. Immunization of African Indigenous Pigs with Attenuated Genotype I African Swine Fever Virus OURT88 / 3 Induces Protection Against Challenge with Virulent Strains of Genotype I [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2016, 63 (5): e323-e327.
- [21] MACKESON C E F. Immunological responses of pigs to partially attenuated ASF virus and their resistance to virulent homologous and heterologous viruses [J]. *Musical Association Proceedings*, 1981: 126-139.
- [22] KING K, CHAPMAN D, ARGILAGUET J M, et al. Protection of

- European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunisation [J]. *Vaccine*, 2011, 29(28): 4593-4600.
- [23] ARIAS M, TORRE A D L, DIXON L, et al. Approaches and Perspectives for Development of African Swine Fever Virus Vaccines[J]. *Vaccines*, 2017, 5(4).
- [24] SÁNCHEZ-CORDÓN P J, JABBAR T, BERREZAIE M, et al. Evaluation of protection induced by immunisation of domestic pigs with deletion mutant African swine fever virus BeninΔMGF by different doses and routes [J]. *Vaccine*, 2018, 36(5): 707-715.
- [25] JENSON J S, CHILDSTONE A, TAKAMATSU H, et al. The cellular immune recognition of proteins expressed by an African swine fever virus random genomic library [J]. *J Immunol Methods*, 2000, 242(1-2): 33-42.
- [26] GALLARDO C, SÁNCHEZ E G, PÉREZ-NÚÑEZ D, et al. African swine fever virus (ASFV) protection mediated by NH/P68 and NH/P68 recombinant live-attenuated viruses [J]. *Vaccine*, 2018, 36(19): 2694-2704.
- [27] BARDERAS M G, RODRÍGUEZ F, GÓMEZ-PUERTAS P, et al. Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins [J]. *Archives of Virology*, 2001, 146(9): 1681-1691.
- [28] NEILAN J G, ZSAK L, LU Z, et al. Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection [J]. *Virology*, 2004, 319(2): 337-342.
- [29] RUIZ-GONZALVO F, RODRÍGUEZ F, ESCRIBANO J M. Functional and Immunological Properties of the Baculovirus-Expressed Hemagglutinin of African Swine Fever Virus [J]. *Virology*, 1996, 218(1): 285-289.
- [30] LOKHANDWALA S, WAGHELA S D, BRAY J, et al. Adenovirus-vectored novel African Swine Fever Virus antigens elicit robust immune responses in swine [J]. *Plos One*, 2017, 12(5).
- [31] GARCÍA-VILLALÓN D, GIL-FERNÁNDEZ C. Antiviral activity of sulfated polysaccharides against African swine fever virus [J]. *Antiviral research*, 1991, 15(2): 139.
- [32] ANDRÉS G. African Swine Fever Virus Gets Undressed: New Insights on the Entry Pathway [J]. *Journal of virology*, 2017, 91(4).
- [33] HERNÁEZ B, ALONSO C. Dynamin- and Clathrin-Dependent Endocytosis in African Swine Fever Virus Entry [J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(4): 2100-2109.
- [34] ZAKARYAN H, REVILLA Y. African swine fever virus: current state and future perspectives in vaccine and antiviral research [J]. *Veterinary Microbiology*, 2016, 185: 15-19.
- [35] HAKOBYAN A, GALINDO I, NAÑEZ A, et al. Rigid amphipathic fusion inhibitors demonstrate antiviral activity against African swine fever virus [J]. *Journal of General Virology*, 2018, 99(1): 148-156.
- [36] CUESTA-GEIJO M A, INMACULADA G, BRUNO H, et al. Endosomal maturation, Rab7 GTPase and phosphoinositides in African swine fever virus entry [J]. *Plos One*, 2012, 7(11): e48853.
- [37] BARRADO-GIL L, GALINDO I, MARTÍNEZ-ALONSO D, et al. The ubiquitin-proteasome system is required for African swine fever replication [J]. *PLOS ONE*, 2017, 12(12): e189741.
- [38] FREITAS F B, FROUCO G, MARTINS C, et al. In vitro inhibition of African swine fever virus-topoisomerase II disrupts viral replication [J]. *Antiviral Research*, 2016, 134: 34-41.
- [39] GALINDO I, HERNÁEZ B, BERNÁ J, et al. Comparative inhibitory activity of the stilbenes resveratrol and oxyresveratrol on African swine fever virus replication [J]. *Antiviral Research*, 2011, 91(1): 57-63.
- [40] HAKOBYAN A, ARABYAN E, AVETISYAN A, et al. Apigenin inhibits African swine fever virus infection in vitro [J]. *Archives of Virology*, 2016, 161(12): 3445-3453.
- [41] ARABYAN E, HAKOBYAN A, KOTSINYAN A, et al. Genistein inhibits African swine fever virus replication in vitro by disrupting viral DNA synthesis [J]. *Antiviral Research*, 2018, 156: 128-137.
- [42] FROUCO G, FREITAS F B, MARTINS C, et al. Sodium phenyl butyrate abrogates African swine fever virus replication by disrupting the virus-induced hypoacetylation status of histone H3K9/K14 [J]. *Virus Res*, 2017, 242: 24-29.

上接第1页

板油、猪血、猪骨等来源于生猪的可食用产品。猪肉制品加工企业是指以生猪产品为原料加工食品的生产企业。

十一、本公告自发布之日起实施。其中猪肉制

品加工企业开展非洲猪瘟病毒检测从2019年5月1日起执行。

特此公告。



## 实现“五有”上级和行业充分肯定 ——原省农业厅接管畜禽屠宰行业管理后的工作回顾

罗建民

(广东省农业农村厅,广东 广州 510500)

中图分类号:S8-1 文献标识码:D 文章编号:1005-8567(2019)02-0007-03

十八大后,按照机构改革要求,参照国务院做法,我省的生猪屠宰管理职能由省经信委划转省农业厅。2014年11月18日,省编办以粤机编办发[2014]168号“广东省机构编制委员会办公室关于设立省农业厅畜禽屠宰管理处等事项的函”,同意在省畜牧兽医局兽医处加挂“畜禽屠宰管理处”牌子,增加行政编制1名。2014年12月9日,广东省农业厅党组成员郑惠典副厅长带领人事处王绍瑾、邓春廷,畜牧兽医局罗一心、罗建民、李明到省经信委交接屠管工作。

2014年12月本人被任命为省畜牧兽医局综合处调研员,从兽医处转岗综合处(厅畜禽屠宰管理处)专职分管全省畜禽屠宰管理工作。此时的综合处(厅畜禽屠宰管理处)在岗工作人员有罗一心、罗建民、李明、罗琴、郑鹭洁5位同志(于秋楠任命为综合处副处长后一直在畜牧处工作),郑惠典为厅党组分管畜禽屠宰等畜牧兽医工作的副厅长兼省畜牧兽医局局长,罗展光为省畜牧兽医局分管副局长。2017年5月,郑鹭洁调离省农业厅到汕头市人事局上班。2018年5月7日,省农业厅副厅长、省畜牧兽医局局长郑惠典主持会议,研究从原省动物卫生监督总所转任省畜牧兽医局工作的10名同志的工作安排,其中罗晶璐、焦颖2位安排在综合处(畜禽屠宰管理处),罗晶璐到位,焦颖则被抽调到产权办上班。2018年10月,广东省农业厅、广东省畜牧兽医局牌子被摘下,挂上新组建的省农业农村厅牌子。2018年的机构改革,省畜牧兽医局和属下综合处(厅畜禽屠宰管理处)均被撤消。省农业农村厅“三定”全部完成前,全省的畜

禽屠宰管理工作,由原综合处(厅畜禽屠宰管理处)继续负责过渡期内的业务工作。直到2018年12月24日,省农业农村厅党组任免了新设立的处室工作人员,前后5年,整整4周年多点时间。

2018年12月12日,省委办公厅、省政府办公厅以粤办发[2018]76号印发《广东省农业农村厅职能配置、内设机构和人员编制规定》,设立兽医与屠宰管理处;12月21日和24日,省农业农村厅党组分别任免了新设立的处室工作人员。意想不到的是,没有编随事走,人随事走,2018年6月之前原省农业厅屠管处在岗的罗一心、罗建民、李明、罗琴等4位同志全部被安排到其他处室工作。

省农业厅、省畜牧兽医局接手屠管工作后,始终致力于维护屠宰行业持续健康发展,确保肉品有效供应,确保广大人民群众吃的放心。我省的屠宰行业结构布局逐步优化,屠宰企业审核清理加快推进,标准化建设扎实开展,场厂对接、产加销融合模式逐渐兴起,市民菜篮子丰盛,确保了肉品质量和有效供应。

在省委省政府高度重视下,我们对农业部和厅党组的工作部署抓落实抓执行并根据本省实际开创性工作,按照农业部和厅领导的说法,我们的工作实现了“五有”,即:“制度建设有章法,工作布局有条理,监管难点有突破,监管手段有亮点,发展规划有思路”。概括起来主要有以下十方面工作:

一是屠宰监管实现了平稳过渡,全省没有出现瞎折腾乱折腾现象。面对原省经信部门屠宰管理人员已分流或退休、工作交接时大量屠宰管理资

收稿日期:2019-01-18

作者简介:罗建民(1961-),男,广东梅州人,从事畜牧行业管理工作。E-mail: 1216286008@qq.com

料缺失,本厅屠宰管理人员缺乏、业务全新、经费很少,全省职能划转质量低、法规制度严重滞后、历史遗留问题多等巨大挑战,在厅、局的高度重视和正确领导下,在农业部兽医局和屠宰技术中心的大力支持指导帮助下,在厅局有关处室单位的支持配合下,在各级农牧管理部门、屠宰企业、省肉类协会的共同努力下,全处同志发扬务实干事、勇于担当的作风,团结一心,群策群力,依法行政,开拓创新,主动作为,加班加点,扎实推进畜禽屠宰管理和综合协调各项工作,确定了屠管处工作总体思路:依法依规、公平公正办事,依法治理屠宰行业。以稳定为总基调,先易后难,稳中求进,继续执行现行有效的法规政策,承前启后,继往开来,开拓创新,努力打造“放心肉”工程体系机制。确定工作目标:维护公平竞争环境,促进产业健康发展;切实加强行业监管,保障肉品质量安全。确定重点工作:推进职能划转,建设队伍;制订政策,建立制度;开展生猪屠宰专项整治,生猪定点屠宰场资格审核清理,病害猪无害化处理,屠宰行业监测报表信息统计等。

省、市、县三级农牧部门有力有序承接了屠宰监管职责,全省屠宰监管工作在人员不到位的情况下实现了平稳过渡,确保行业健康发展和肉品安全。

二是屠宰监管长效机制日臻完善。省委、省政府将“推进屠宰企业产加销融合发展和标准化建设”列入全省推进农业供给侧结构性改革的重点工作,省政府出台《广东省人民政府关于深化屠宰行业改革完善屠宰管理体制机制的意见》(粤府函【2017】364号)。明确了屠宰监管和行业发展思路,出台或建立了畜禽屠宰属地管理责任、生猪屠宰资格审核清理、病害猪无害化处理、“瘦肉精”监管、定点屠宰厂备案管理、代宰协议、屠宰证章标志管理以及《广东省家禽屠宰厂设置指导意见》《广东省农业农村厅关于生猪屠宰标准化企业评估认定管理的办法》等一系列规范屠宰监管和促进行业发展的重要文件制度,为依法、有序推进畜禽屠宰管理工作提供了制度保障。组织制订的《广东省畜禽屠宰监管工作手册》《广东省畜禽屠宰管理工作资料汇编》,为各地开展屠宰监管工作提供指引,受到市县各级屠宰主管部门和企业的充分肯定和好

评。协助珠海市政府制订《珠海经济特区牛羊定点屠宰管理办法》并助推该市出台本省第一部牛羊屠宰法规。参与《生猪屠宰管理条例》等法规和规章制度的修订、研讨,各级管理部门和屠宰企业深入研究和广泛讨论征求《生猪屠宰管理条例》(修订草案)意见,我省提出的合理化建议受到国务院法制办的重视,专程前来广东调研听取各方意见并采纳了很多建议。2018年8月《广东省牛羊屠宰管理办法》经厅党组会通过报省政府审查。

三是屠宰质量安全监管取得新成效。组织开展生猪屠宰监管“扫雷行动”“扫黑除恶”和市际交叉互查,始终保持对屠宰违法行为的高压严打态势。同时,狠抓屠宰环节“瘦肉精”监督检查,屠宰环节“瘦肉精”抽检合格率达99.99%以上,做到“真检、真报、真处理、真溯源”。2018年12月,在屠宰领域“扫黑除恶”及生猪屠宰监管“扫雷行动”、打击生猪屠宰领域违法行为做好非洲猪瘟防控专项行动的基础上,“行动迅速,雷厉风行”,在全国率先举农业系统之力,采取八项措施,牵头组织在全省开展屠宰与兽药质量安全专项行动,重点查处牲畜注水注胶注药或注入其他物质等违法行为。全国首创实施《规范生猪屠宰活动告知书》《规范生猪屠宰活动承诺书》《广东省生猪定点屠宰企业接受委托屠宰协议书》,受到农业部充分肯定和兄弟省借鉴。总结推广五华、大埔、博罗、海丰、陆河等地党委政府高度重视生猪定点屠宰和肉品安全工作经验,调研总结佛山三水、清远万安“集中屠宰,分销配送”经验做法。

四是屠宰行业治理能力有了新提升。屠宰行业结构布局逐步优化,全省生猪定点屠宰厂从2009年的1778家压减到目前1032家,压缩了41.8%;2018年已明确调整规划目标的广州、东莞、韶关、清远、潮州、河源、江门、汕头、揭阳、云浮等10市新规划屠宰企业共231家,比原有屠宰厂点压减323家,减幅达62%。珠三角屠宰布局进一步优化,全省13个地市完成了生猪定点屠宰资格审核清理工作;省级层面培训肉检员并发证2000多人,为湛江、茂名、深圳、广州、佛山、东莞、中山、江门、云浮、阳江、潮州等地培训一批业务精英,各级屠宰主管部门培训监管队伍及行业从业人员近万人次,屠宰从业人员素质稳步提高;依法处理韶关

XX实业有限公司屠宰厂不服省农业厅给予韶关市政府《关于同意韶关市XX联合屠宰有限公司生猪定点屠宰厂备案的函》行政复议和广州中院的一审官司(省政府维持省农业厅决定,一审后XX公司主动撤诉)。

五是家禽集中屠宰生鲜上市工作全国领先,为防止人感染禽流感做出贡献。省政府出台《广东省家禽经营管理办法》,省农业厅、商务厅、卫计委配套出台3个规范。全省21个地级以上市全面实施家禽集中屠宰生鲜上市,引导做好家禽集中屠宰场和代宰区规划建设,家禽产品安全有效供给,各项工作稳步有序推进。先后有福建、浙江、山东、海南、辽宁、湖北、贵州、西藏前来参观考察。

六是部门协调配合上新台阶。省农业厅、省公安厅、省食品药品监督管理局先后联合出台《关于打击私屠滥宰等危害肉品质量安全违法犯罪活动的通知》(粤农〔2015〕132号),《关于印发全省开展屠宰领域扫黑除恶专项斗争和畜禽屠宰监管“扫雷行动”方案的通知》(粤农〔2018〕87号),省农业厅、财政厅出台《关于进一步加强生猪定点屠宰厂(场)病害猪无害化处理管理工作的通知》(粤农〔2015〕61号),省农业农村厅、财政厅联合印发《2018-2022年屠宰环节病害猪无害化处理补贴实施方案》;成立了广东省畜禽屠宰标准化建设专家委员会,省农科院、华南农业大学、华南理工大学等单位紧密配合;省肉类协会主动配合支持省农业厅畜禽屠宰管理工作。

七是屠宰环节采取各种实招硬招严控非洲猪瘟,经验做法受到农业农村部充分肯定,农民日报专题报道。厅《农业信息》刊发了“广东屠宰环节采取七大实招硬招严控非洲猪瘟”并被省委办公厅采用,11月22日农民日报刊发“广东九大实招严密防控非洲猪瘟”。组织专家编写出台全国首个《防控非洲猪瘟消毒杀蟑流程与用药指引》,采取组织省肉协和30个代表性骨干企业联合发出倡议及召开专题会议,号召全省生猪定点屠宰企业在防控非洲猪瘟时共同严把“三关”,狠抓“五落实”制度到位等一系列管用有效措施。出台关于印发《广东省打击生猪屠宰领域违法行为做好非洲猪瘟防控专项行动方案》的通知(粤农农函〔2018〕173号)。通过一系列管用有效措施,为广东坚守139天没有发

生非洲猪瘟做出重要贡献。

八是生猪屠宰统计监测工作有新突破。建立健全了省、市、县及屠宰企业四级监测系统,非洲猪瘟防控期间的日报制度有声有色。全国率先及时收集、汇总、分析和制作发布周报、月报、日报,为引导生产、保障供给、平抑物价提供了决策参考。我省的屠宰统计信息工作由落后走向正常、走向前列,并得到农业部的充分肯定。

九是每月及时总结编印《畜禽屠宰管理工作纵览》,每年年初编印上年全省屠宰管理工作文件资料汇编,留下一份份珍贵历史资料。此外,《在十九大精神统领下加快建立畜禽养殖保护区》《试论猪肉是特殊商品》《从调研情况看屠宰企业与猪价肉价关系》《如果屠宰厂发生非洲猪瘟会有什么影响?》等文章为推动行业改革和健康发展引起共鸣和思考。

十是站好最后一班岗,认真做好机构改革期间过渡期的屠宰管理工作。10月12号省委机构改革工作会议确定撤销省畜牧兽医局和厅党组决定撤销综合处(厅畜禽屠宰管理处)后,在近2个半月的机构改革过渡期,我们坚守岗位、履职尽责。出台了《广东省生猪屠宰标准化企业评估认定管理的办法》,举办了全省生猪标准化建设培训班和全省屠宰年度工作总结交流会,及时部署开展打击屠宰环节注水专项行动,做好非洲猪瘟影响下与黑龙江的产销对接等一系列工作,特别是在广东连续发生二起非洲猪瘟疫情,我省屠宰行业和养猪业面临危难之际,屠宰厂和肉品供应乱成一团的时候,从多角度全方位关注其对行业和社会的影响与危害,及时写出《关于生猪产区和猪肉销区如何对接 确保猪肉供应和稳定养猪业屠宰业的建议》引起重视和广泛关注,助推农业农村部及时调整活猪禁运政策。同时,为未来的新机构和新人接管屠管工作开好局、起好步,维护行业的有序健康发展,提出了开展“深调研 大协作 真作为”活动的建议,受到部局领导的充分肯定。

总之,在过渡时期,我们做到了管理干部队伍思想不乱,工作不断,干劲不减,队伍不散,为我们这五年的工作划上圆满的句号。

五年来,厅畜禽屠宰管理处把党的方针政策同本行业本部门实际相结合,坚持依法行政、执政

# 川芎嗪药理作用及在畜牧生产中应用研究进展

邝智祥<sup>1</sup>, 李娟<sup>2</sup>, 王俐智<sup>1</sup>, 张秋生<sup>1</sup>, 吴波良<sup>1</sup>, 邓学龙<sup>1</sup>, 黄群<sup>1</sup>, 李瑞清<sup>1\*</sup>

(1. 广东爱健康生物科技有限公司 广东 清远 511800;

2. 成都市农林科学院, 畜牧研究所, 四川 成都 611130)

**摘要:**川芎嗪是中药川芎的有效成分之一, 具有扩张血管、介导细胞增殖及凋亡、改善组织微循环, 调节免疫、抗脂质过氧化等作用。本文对川芎嗪的药理研究和畜牧生产中应用进行综述, 为其进一步在动物生产中应用提供理论参考。

**关键词:**川芎嗪; 功能; 临床应用

**中图分类号:**S816.7 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2019)02-0010-03

在中国, 中医活血化瘀法及其方药治疗肿瘤有悠久的历史, 而川芎嗪作为活血化瘀类中药川芎的提取物, 关于其在肿瘤防治中的研究报导, 自上个世纪八十年代以来陆续出现并日益受到人们的关注。川芎嗪(Tetramethylpyrazine, TMP)是从中药川芎中分离提纯出来的一种吡嗪类生物碱, 其化学结构为四甲基吡嗪, 分子式为 $C_8H_{12}N_2$ , 有扩张血管、抗血栓、改善脑供血等药理活性, 临床上主要用于缺血性脑血管疾病的治疗<sup>[1]</sup>。药理作用包括阻滞平滑肌的钙通道、抑制血小板聚集及激活等。川芎嗪具有扩张血管、增加动脉血流、抑制血小板聚集和降低血小板活性等作用, 在体内具有吸收完全和分布广泛的特点; 在畜牧生产上有抗氧化、提高免疫力等作用, 具有广阔的应用前景。本文主要对川芎嗪的药理研究进展及在畜牧生产中的应用进行综述。

## 1 药理作用

### 1.1 扩张血管

川芎嗪具有扩张血管, 抑制血小板粘附聚集和血栓形成的作用。高宗桂<sup>[2]</sup>发现, 川芎嗪对缺血性中风大鼠发生了明确的药理学干预作用, 减小

脑梗塞的面积, 减轻脑水肿和血脑屏障损伤程度, 改善大鼠神经行为异常, 对神经具有一定的保护作用。黄文东等<sup>[3]</sup>发现, 丹参素、川芎嗪联合应用对心血管的效应有协同作用。陈懿等<sup>[4]</sup>研究发现, 川芎嗪增强大鼠局灶性脑缺血后血管内皮生长因子VEGF的表达, 是其抗脑缺血的作用机制之一。姚俐等<sup>[5]</sup>研究表明, 川芎嗪对于临床癫痫全身阵挛强直性发作效果明显。对于失神性癫痫发作、颞叶癫痫发作有效。李东哲<sup>[6]</sup>研究表明, 川芎嗪可抑制急性脊髓损伤后的血管内皮细胞凋亡, 可显著提高急性脊髓损伤后的微血管密度, 川芎嗪可以减少脊髓损伤后的金属蛋白酶MMP-2和MMP-9的表达。

### 1.2 介导细胞增殖及凋亡

杨雯等<sup>[7]</sup>研究表明, 川芎嗪在Caco-2细胞模型的转运方式为被动转运, 且受到P-gp的外排作用, 并对P-gp的表达有抑制作用。冯全服<sup>[8]</sup>研究发现, 川芎嗪能显著诱导HepG2细胞凋亡, 呈量效、时效相关, 对HepG2增殖抑制呈剂量依赖性和时间依赖性,  $IC_{50}$ 剂量低, 抑制作用显著, 川芎嗪能通过Caspase依赖性线粒体介导的细胞凋亡途径抑制HepG2细胞增殖。郑文龙等<sup>[9]</sup>研究表明, 黄芪

收稿日期: 2018-11-15

项目来源: 清远市2017年农业“三品”工程精准扶贫项目

作者简介: 邝智祥(1981-), 男, 汉, 广东清远人, 硕士, 畜牧师, 主要从事优质鸡育种与生产工作。E-mail: 88631608@qq.com

\*通信作者: 李瑞清(1970-), 男, 汉, 广东清远人, 硕士, 工商管理硕士, 主要从事企业投资管理。E-mail: lrq13927637777@163.com

及川芎嗪治疗组的内毒素 ETx 较常规治疗组明显下降。胡家才等<sup>[10]</sup>研究发现,川芎嗪对肺癌 A549 细胞的增殖有抑制作用,其机制可能与川芎嗪能够改变 A549 细胞周期分布,下调肺癌 A549 细胞 Bcl-2 表达,改变 Bcl-2/Bax 比例,促进肿瘤细胞凋亡等有关。洪昆达<sup>[11]</sup>研究表明,川芎嗪能促进软骨细胞增殖,其作用机制可能通过上调软骨细胞周期正向调节因子 CyclinD1、CDK4 表达,下调负向调节因子 p21 表达,加速软骨细胞周期关键限制点 G1/S 期的切换,促进软骨细胞周期的进程。

### 1.3 改善组织微循环

张雪霞等<sup>[12]</sup>研究发现,川芎嗪注射液可以下调 TNF- $\alpha$  的表达,减轻梗阻性黄疸大鼠肾缺血再灌注损伤。

### 1.4 调节免疫

洪昆达<sup>[11]</sup>表示,川芎嗪关节腔注射治疗能有效缓解瘀血阻络型膝骨性关节炎患者的临床症状,能降低关节液中 IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MMP-3 的含量,是治疗膝骨性关节炎的有效方法之一。

### 1.5 调节脂质代谢、抗脂质过氧化

鹿中华等<sup>[13]</sup>表示,川芎嗪通过稳定  $\Delta\psi_m$ 、维持 ATP 酶正常活性,从而起到减轻肝细胞线粒体损伤的作用。谭妍等<sup>[14]</sup>研究表明,川芎嗪的肝脏代谢涉及多酶介导的 I 相和 II 相代谢。蔡莉莉等<sup>[15]</sup>研究发现,在常规治疗基础上加用丹参川芎嗪注射液治疗老年冠心病 UAP 患者临床疗效显著,与其可显著降低患者血清 hs-CRP 水平,并有效改善血流动力学及血脂代谢状况等有关。

### 1.6 其他作用

冯彬彬等<sup>[16]</sup>表示,阿魏酸可以延长川芎嗪在大鼠体内的作用时间,延胡索乙素能加快并增加川芎嗪在大鼠体内的吸收。肖衍宇等<sup>[17]</sup>研究发现,冰片和维拉帕米均提高了磷酸川芎嗪的生物利用度,冰片促进磷酸川芎嗪生物利用度增加的机制之一。韩辉等<sup>[18]</sup>研究表明,人参川芎嗪注射液通过提高血清中 SOD 的活性,降低血清中 MDA 及脑组织中 Glu 的含量,对局灶性脑缺血损伤起到较好的干预作用。刘静<sup>[19]</sup>研究发现,丹参川芎嗪注射液能够降低慢性肺源性心脏病患者 D—二聚体、N 端脑钠肽前体及肌钙蛋白 I 的血浆水平。

## 2 在畜牧生产中的应用

王自力等<sup>[20]</sup>研究了川芎嗪对 LPS 致伤奶牛子宫内膜上皮细胞的 TLR4 和 BNBD4 mRNA 表达量的影响,结果表明:LPS 可刺激奶牛子宫内膜上皮细胞 TLR4 及 BNBD4 mRNA 的表达量升高,川芎嗪可抑制 LPS 诱导子宫内膜上皮细胞 TLR4 的表达,并能促进 BNBD4 的表达。提示川芎嗪可干预 LPS 诱导的奶牛子宫内膜上皮细胞炎症反应,并促进其分泌  $\beta$ -防御素起到改善子宫内膜炎的作用。张志刚等<sup>[21]</sup>和李冬冬等<sup>[22]</sup>探讨了川芎嗪对猪卵母细胞体外成熟效果的影响,以期提高猪卵母细胞体外成熟率。试验结果表明:以卵丘扩散和第一极体排出率分别作为猪卵母细胞体外成熟的判断标准,川芎嗪对猪卵母细胞体外成熟具有一定的促进作用,且川芎嗪能影响猪卵母细胞体外成熟中一氧化氮生成量。在夏季,川芎嗪对热应激所致猪睾丸细胞内活性氧水平有拮抗作用、抗氧化功能<sup>[23]</sup>。李美珍等<sup>[24]</sup>研究不同剂量盐酸川芎嗪(0、0.08、0.10、0.12 mmol/L)对猪冷冻精液精子畸形率和顶体完整率的影响,结果表明,不同浓度的盐酸川芎嗪均能显著降低冻后精子的畸形率,显著提高冻后精子的顶体完整率,其中 0.12 mmol/L 盐酸川芎嗪效果最好。郭书辰<sup>[25]</sup>研究了盐酸川芎嗪(Ligusticum chuanqiong Hort, LH)对鸡传染性法氏囊病的作用效果及机制,结果表明,LH 可以显著促进 IB 雏鸡的免疫器官的发育;LH 可以提高 IB 感染鸡的抗体水平,促进机体的体液免疫水平;LH 可上调 IFN- $\beta$  的表达量、IFN- $\gamma$  的表达量,同时还可以提高 T 淋巴细胞指数以及周血 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 的比值,改善 IB 雏鸡的细胞免疫;LH 可以降低组织中病毒复制所需蛋白 VP1 的表达量、促进 TLR3 的表达,有效抑制病毒的增殖,提高先天性免疫功能。研究显示,川芎嗪在畜牧生产中具有广泛的应用空间,对生产具有有益功效。

## 3 小结

中草药制剂是确保动物性食品安全和人体健康的理想饲料添加剂,其具有纯天然、无药物残、留无抗药性等优点,已越来越受到人们的重视。川芎嗪从中药川芎中分离提纯出来的一种吡嗪类生物碱,在动物生产上应用具有有益效果,但还处

于研究开发阶段,后期可进一步深入研究其在畜禽生产上的应用效果,探讨其对畜禽免疫力和抗氧化性能的影响,有望成为新型的畜禽保健品。

## 参考文献

- [1] 郑春燕. COX-2介导川芎嗪抑制肺癌 A549 细胞侵袭转移的作用研究[D]. 博士学位论文. 济南: 山东大学, 2012.
- [2] 高宗桂. 川芎嗪干预大鼠缺血性中风作用及其机制的研究[D]. 博士学位论文. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [3] 黄文东, 杨永飞, 陈建文, 等. 丹参素与川芎嗪对心血管系统的协同作用[J]. 中国药理学通报, 2013(03): 432-436.
- [4] 陈懿, 王国佐, 葛金文, 等. 川芎嗪对局灶性脑缺血大鼠血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008(06): 329-331.
- [5] 姚俐, 谢炜, 梁一超, 等. 川芎嗪抗小鼠实验性癫痫的研究[J]. 数理医药学杂志, 2013(03): 309-311.
- [6] 李东哲. 川芎嗪对大鼠急性脊髓损伤后微血管及胶原成分的影响[D]. 博士学位论文. 长沙: 中南大学, 2014.
- [7] 杨雯, 周惠芬, 杨洁红, 等. 川芎嗪在 Caco-2 细胞单层模型的转运特征及对 P-糖蛋白表达的影响[J]. 中草药, 2013(05): 581-585.
- [8] 冯全服. 从线粒体途径研究川芎嗪诱导 HepG2 细胞凋亡效应机制[D]. 博士学位论文. 南京: 南京中医药大学, 2015.
- [9] 郑文龙, 楼正家, 李廷谦, 等. 黄芪和川芎嗪对慢性阻塞性肺疾病血瘀证血浆内皮素-1 及内毒素水平的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008(03): 142-145.
- [10] 胡家才, 李清泉. 川芎嗪对肺癌 A549 细胞增殖与凋亡的影响及其机制[J]. 武汉大学学报(医学版), 2010(01): 19-21.
- [11] 洪昆达. 川芎嗪治疗膝骨性关节炎的临床观察及对兔关节软骨细胞增殖与凋亡的影响[D]. 博士学位论文. 福州: 福建中医药大学, 2013.
- [12] 张雪霞, 李毅, 周文英. 川芎嗪注射液对梗阻性黄疸肾缺血再灌注损伤大鼠肾功能及血清 TNF- $\alpha$  的影响[J]. 中国中药科技, 2016(06): 677-679.
- [13] 鹿中华, 王锦权, 陶晓根, 等. 川芎嗪对脓毒症大鼠肝细胞线粒体保护作用的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008(02): 85-88.
- [14] 谭妍, 庄笑梅, 沈国林, 等. 川芎嗪的肝微粒体代谢动力学及代谢表型研究[J]. 药学报, 2014(03): 374-379.
- [15] 蔡莉莉, 李敬会, 徐剑刚, 等. 丹参川芎嗪注射液对老年 UAP 患者血流变学、hs-CRP 及脂代谢的影响[J]. 实用药物与临床, 2014(03): 267-270.
- [16] 冯彬彬, 张建海, 张继芬, 等. 不同配伍对川芎嗪体内药代动力学影响[J]. 中国中药杂志, 2012(09): 1311-1314.
- [17] 肖衍宇, 陈志鹏, 平其能, 等. 冰片对川芎嗪促吸收作用的研究[J]. 药学报, 2009(08): 915-921.
- [18] 韩辉, 吴丽敏, 汪瀚, 等. 人参川芎嗪注射液对局灶性脑缺血大鼠血清 SOD 活性、MDA 含量及脑组织氨基酸含量的影响[J]. 成都中医药大学学报, 2009(01): 76-78.
- [19] 刘静. 丹参川芎嗪注射液对慢性肺源性心脏病患者 D-二聚体、N 端脑钠肽前体及肌钙蛋白 I 的影响[D]. 硕士学位论文. 泰安: 泰山医学院, 2014.
- [20] 王自力, 蒋会会, 张翥, 等. 川芎嗪对 LPS 致伤奶牛子宫内膜上皮细胞的 TLR4 和 BNBD4 mRNA 表达的影响[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(12): 32-35.
- [21] 张志刚, 李冬冬, 沈月娥, 等. 川芎嗪和小檗碱对猪卵母细胞体外成熟效果的影响[J]. 北京农学院学报, 2007(03): 28-31.
- [22] 李冬冬, 赵菊, 张志刚, 等. 小檗碱和川芎嗪对猪卵母细胞体外成熟中一氧化氮生成量的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2008(05): 11-14.
- [23] 李美珍, 杨宝卫, 黄明光, 等. 中药提取物川芎嗪及葛根素在猪精液冷冻中的应用效果初报[J]. 广东农业科学, 2012, 39(23): 82-83, 87.
- [24] 张晓峰, 刘迪, 李垚. 川芎嗪对热应激所致猪睾丸细胞内活性氧水平的影响[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(08): 32-33.
- [25] 郭书辰. 盐酸川芎嗪对鸡传染性法氏囊病的作用及机制[D]. 硕士学位论文. 晋中: 山西农业大学, 2013.

# 我国非常规饲料原料在养猪生产中应用

马新燕, 李剑豪\*, 黄琳, 王刚\*

(广东省农业科学院动物科学研究所, 农业部华南动物营养与饲料重点实验室, 畜禽育种国家重点实验室, 广东省畜禽育种与营养研究重点实验室, 广东广州 510640)

**摘要:**基于我国养殖业使用的常规饲料原料供不应求的现状, 本文着重从非常规饲料原料种类及营养特性、非常规饲料原料在养猪生产中的应用现状及存在的问题和未来的研究方向进行综述。非常规饲料原料的使用将是资源的最大化利用, 不仅提高畜牧生产效益, 而且利于环境的保护, 助力绿色养殖, 实现双赢。

**关键词:**非常规饲料原料; 猪; 应用

**中图分类号:**S816.4 **文献标识码:**B **文章编号:**1005-8567(2019)02-0013-08

猪肉是人们生活中重要的食品, 市场的需求促进我国养猪业迅速发展。养猪生产中, 能量、蛋白质原料占饲料配方的90%以上, 一般采用玉米、豆粕等这些常规饲料原料配制。然而, 我国常规饲料原料不能满足养殖业的需求, 结合学者们的研究, 立足国情, 笔者从非常规饲料原料种类及营养特性、非常规饲料原料在我国养猪生产中的应用及未来的发展趋势进行阐述与分析, 以期对养猪生产中原料的选择提供理论参考。

## 1 非常规饲料原料种类及营养特性

非常规饲料原料是一个相对的概念, 主要指人们对其营养成分了解较少或者在畜禽饲料配方中应用较少的一类饲料原料。本文主要介绍非常规植物饼粕类、糟渣类、农业生产副产物、海洋植物类、中草药等非常规饲料原料在养猪生产中的应用。

### 2.1 非常规植物粕(饼)类

非常规植物饼(粕)类是相对于饲料中常用的大豆粕来说的, 饲料中不常用的植物饼粕类, 主要有菜籽粕、棉籽粕、棕榈粕、芝麻饼、花生饼、葵花籽饼、茶籽粕等。

菜籽粕是一种植物蛋白饲料原料, 其富含蛋

白质(粗蛋白含量35%~40%)、碳水化合物(20%~25%)、矿物质(如钙0.61%, 磷0.95%)、多种维生素等, 消化能10.46~12.55 kJ/kg<sup>[1]</sup>。但菜籽粕含有单宁、硫甙等抗营养因子, 导致其在畜禽饲料中应用较少, 研究发现采用微生物发酵法可有效降解硫甙等抗营养因子, 将大分子菜籽蛋白酶解成低分子肽, 提高蛋白质的利用率<sup>[2]</sup>。

棉籽粕是以棉籽榨油后的副产品, 粗蛋白含量约40%, 粗脂肪约1%, 蛋氨酸和胱氨酸含量丰富, 赖氨酸含量不足, 精氨酸含量过高, 还含有棉酚、植酸、单宁、非淀粉多糖等抗营养因子, 因此在饲料中使用棉籽粕要先进行脱毒处理, 再合理添加赖氨酸, 还要考虑与含精氨酸少的饲料配伍<sup>[3]</sup>。

棕榈粕是油棕树上的棕果经机械榨取棕榈油后的副产物, 粗蛋白质含量为14%~17%, 富含氨基酸和矿物质, 且适口性好, 因其数量大、价格低而受到广大养殖者的关注<sup>[4]</sup>。芝麻饼(粕)是芝麻榨油后的副产物, 蛋白含量约为20%, 最高可达到50%, 可作为优质的蛋白质来源, 粗脂肪含量约10%, 氨基酸含量丰富, 其中蛋氨酸含量高出豆粕中含量约40%, 但赖氨酸(0.91%)不足豆粕中含量的一半, 钙和磷含量比菜籽粕高3~5倍<sup>[5]</sup>。花生粕是花生经油脂提取后

收稿日期:2018-12-17

项目来源:高品质猪肉评价技术研究及杂交组合筛选(201707020007)

作者简介:马新燕(1985-), 女, 硕士, 助理研究员, E-mail: dk051maxy@163.com

\*通讯作者:李剑豪(1963-), 男, 推广研究员, 研究方向为动物生产与繁殖育种。E-mail: jianhao63@sina.com;

王刚(1968-), 男, 高级兽医师, E-mail: wgw92004@yahoo.com.cn

的副产物,蛋白质含量达50%~70%(干物质基础),且氨基酸含量种类齐全,其中精氨酸、天冬氨酸和谷氨酸含量较多,赖氨酸(1.17%)和蛋氨酸(0.37%)含量较少<sup>[6]</sup>。葵花籽粕是一种粗饲料,粗纤维含量有时高达20%,粗蛋白质含量不高(约28%~32%),尤其赖氨酸含量不足(约1%),B族维生素含量高于豆粕,富含矿物质,含有抗营养因子主要是少量的绿原酸(0.7%~0.82%),但蛋氨酸和氯化胆碱能够部分抵消绿原酸的负面影响,因此,如用作饲料原料,对动物生产性能影响不大<sup>[7]</sup>。茶籽粕一般含有粗蛋白10%~20%,其中10种氨基酸为畜禽的必需氨基酸,粗脂肪0.5%~7%,粗纤维15%~25%、糖类物质10~20%,消化能8~10MJ/kg<sup>[8]</sup>。茶籽粕含有较高质量浓度的茶皂素、单宁、生物碱和黄酮等抗营养因子,通常采用理化法、微生物发酵等方式进行处理,降低有毒有害成分,提高利用率,为开发新型饲料资源提供可能<sup>[8]</sup>。

## 2.2 糟渣类

糟渣类来自于发酵生产副产物,即主要指各种原料生产酒类等食品的副产物,如木薯酒精糟、DDGS、豆渣、果渣、醋糟、酱糟等。

木薯酒精糟是由木薯生产酒精的副产物,主要由木薯皮和内部薄壁组织组成。据我国产业情报网报道,我国每年用木薯生产酒精产生的干木薯酒精糟(含15%水分)约为450万吨,如得不到合理利用将严重污染环境。木薯酒精具有良好的营养价值,粗蛋白、粗纤维、粗脂肪含量分别可达21.9%、11.4%、5.87%,并含有大量的钙、磷等矿物元素<sup>[9]</sup>。

DDGS是以玉米、大米、小麦、高粱等谷物为原料经过发酵处理制得乙醇后的副产物。DDGS营养丰富,不同原料得到的DDGS营养成分存在差异。学者检测发现,DDGS的总能22.7 kJ/kg,高于玉米高(18.8 kJ/kg),但能量消化率76.8%低于比玉米(90.4%),优质的DDGS蛋白质含量为30%~40%,接近或略高于豆粕蛋白质,粗脂肪含量为8.4%~9.7%,且多为不饱和脂肪酸,粗纤维多为不可溶性纤维,还含有B组维生素,应用于养猪生产中需添加外源酶类以提高其利用率<sup>[10-11]</sup>。

豆渣是做豆奶、豆腐等豆制品的副产物,营养成分较高,含有约28%粗蛋白质,约6%粗纤维,可作为优质的畜禽饲料<sup>[12]</sup>,但豆渣含抗营养因子—胰蛋白酶抑制素、致甲状腺肿素、凝血素,故使用

前需要经过热处理或发酵处理以消除抗营养因子对畜禽的生长的影响。

果渣是水果经过榨汁、生产罐头等过程得到的副产物,每加工1000 kg水果,可得干果渣120~165 kg,我国是水果生产和消费大国,因此果渣种类多且量丰富。果渣中粗蛋白含量为3%~20%,不同种类的果渣含量区别较大,其中苹果渣和柑橘皮粗蛋白含量较高,均为20%左右,粗纤维含量平均为15%左右,富含维生素、果酸和果糖,有利于畜禽消化道中微生物利用<sup>[13]</sup>,因此可大量用于生长育肥猪的饲料,但其含有的果胶和单宁影响仔猪消化,故不宜大量用于仔猪饲料。

醋糟和酱糟分别是工业生产醋和酱油的副产物,我国每年有数万吨的这些副产物直接以废弃物形式丢弃,造成很大的资源浪费和环境污染。然而,这些糟渣风干物含粗蛋白为10%~31%,粗纤维13%~28%<sup>[14]</sup>,它们对于畜禽来说可能营养价值不够,但对于反刍动物而言是良好的饲料来源,可以考虑用这些糟渣饲料来减少玉米、豆粕等常规饲料原料的用量,降低饲料成本。酱糟含有较多的食盐,饲喂时注意不可单一饲喂,且要把握好量,以免引起食盐中毒。

## 2.3 农业生产副产物

农业生产副产物主要指农业生产或农产品加工过程中所产生的副产物,直接排放到环境中则成为农业废弃物如,生产食用菌所用培养基—菌康,粮食作物加工过程中的副产物淘米水、米糠、麦麸,玉米加工的副产物,制糖加工副产品如甜菜渣、甘蔗渣,等等。

菌糠指培育食用菌采用的栽培料,食用菌采收后,大量菌康即被闲置。菌糠经由食用菌的分解和转化,不仅纤维素大幅降低,而且含有大量的菌体蛋白,丰富的糖类、有机酸、生物活性物质等,营养价值得到了大幅度的改善。其中,不同的栽培料及栽种不同品种的食用菌,得到的菌康所含营养物质存在差异,其中蛋白质含量6.7%~14.0%,粗脂肪0.5%~4.5%,粗纤维6.9%~23.5%,钙1.8%~3.1%,磷0.07%~0.41%<sup>[15]</sup>。菌康中含有植酸、氰苷、皂苷、草酸、总多酚、单宁等抗营养因子,国内主要采用多次栽种、加热、化学钝化以及酶水解和微生物发酵等方法来处理。



米制品加工废水以淘米水为主,其中的固体物质主要是谷壳、糊粉层、糠粃、糠粉等。目前,我国主要采用送往污水处理厂的方式来解决这些废水,综合开发利用的途径较少。其实,淘米水营养丰富,蛋白质含量可达20%,还含有脂肪、碳水化合物、B族维生素、矿物质等。不同种类的米及不同的加工方式,其产生的加工废水的营养成分存在差异。

米糠是稻谷加工过程中所产生的副产品,由种皮、果皮、外胚乳和糊粉层组成。普通米糠含粗蛋白14.5%、粗纤维10.05%,还富含脂肪、水溶性多糖、维生素及各种矿物质,其中脂肪主要为不饱和脂肪酸,必需脂肪酸含量高达47%,还含70多种抗氧化成分<sup>[16-17]</sup>。米糠中含有抗营养因子胰蛋白酶会造成动物对蛋白质消化不良,可通过加热去除。米糠作为饲料原料,对缓和当前饲料资源紧缺的局面和解决成本问题具有重要意义。

麦麸是小麦制粉过程中提取小麦粉和胚芽后的主要加工副产品,主要包含粗蛋白质(含量与米糠相近),但其质量较差,粗纤维含量10%左右,40%可在肠道内转化为短链脂肪酸被利用;还含有矿物质和维生素(维生素A、D偏少,B族维生素和维生素E含量较高),能值较低,是一种中低档能量饲料<sup>[18]</sup>。麦麸中还含有丰富的非淀粉多糖和膳食纤维,有利于畜禽肠道健康。我国麦麸年产量在0.26亿吨以上,主要用于饲料原料、酿酒等。实际养殖生产应用中,常采用酶解、发酵等处理,以改进其营养的利用率。

玉米深加工过程中产生的玉米蛋白粉、玉米皮、玉米胚芽粕及DDGS等副产品营养丰富,蛋白质含量较高,其中玉米蛋白粉蛋白含量(60%左右)最高,玉米皮蛋白含量较低,且富含维生素和矿物质,可作为畜禽的饲料资源<sup>[19]</sup>。畜禽生产中常采用被微生物发酵的玉米加工副产品,以提高和改善其营养价值,促进畜禽的消化吸收。玉米加工副产品在渔业饲料中应用广泛,在其他饲料中使用也在逐步推广。

甜菜粕,俗称“甜菜渣”,是由甜菜加工制糖过程中的副产品,蛋白水平较低,纤维含量较高,富含甜菜碱和果胶。甜菜碱是甲基供体,与胆碱和蛋氨酸有着类似的营养作用,有调节脂代谢、改善母猪生产性能等功能<sup>[20]</sup>。果胶具有增稠、胶凝等作用,很多产业都有应用。甜菜粕中还含有多种

抗营养因子,如易引起酸中毒的草酸,可导致先天性甲状腺肿的硫葡萄糖苷,少量的硝酸盐、植物性雌激素和玉米赤霉烯酮等。生产中,通过青贮等处理方式,降低其中的有害成分,提高养分利用率。寻找简单、高效和高回报的应用方式是甜菜粕应用的主要发展方向。

甘蔗渣是甘蔗在制糖厂经过榨汁之后的副产物,主要成分是纤维素,直接作为饲料原料的价值较低,一般需经过物理处理(高温蒸煮、高压裂解、机械剪碎)、化学处理(酸或碱)或微生物处理后,改善其适口性和营养价值,然后运用于动物生产中。

#### 2.4 海洋植物类

海藻类植物是海洋中分布最广的生物,主要包括海藻、紫菜、海青菜、海带草、海谷菜、海更菜等,富含蛋白质、脂肪、维生素、矿物质以及具有特殊功能的多糖等营养成分。海藻是海洋中低等自养生物,据统计,全球海藻年产量多达 $5 \times 10^5$ 吨。海藻富含蛋白质、氨基酸、多糖和 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸(PUFA)、维生素、矿物质等<sup>[21]</sup>,这些营养物质具有重要的营养功能。

#### 2.5 中草药

我国具有丰富的中草药资源,品种多样。中草药中的活性成分具有防病治病功效,并且副作用小,不会引起抗药性。目前,常用的中草药添加剂有黄芪、甘草、鱼腥草、杜仲等。其中,杜仲含有多种活性成分,如绿原酸、黄酮类等,传统医学研究表明,其具有抗氧化性、提高免疫力、抗肿瘤等多种功效<sup>[22]</sup>。近年来,中草药添加剂凭借自身的优良品质,已经频频跻身于养殖业的饲料之中。

### 3 非常规饲料原料在养猪生产中应用

#### 3.1 非常规植物饼(粕)类在养猪生产中应用

菜籽饼(粕)在畜禽饲料中的适宜用量主要取决于其中毒素的含量,一般仔猪、生长育肥猪、母猪饲料中添加量分别为4%~5%、5%~8%、3%以下<sup>[23]</sup>。双低菜籽饼添加量为20%时,猪的甲状腺和肝功能未受到显著性伤害<sup>[24]</sup>。菜籽饼中抗营养因子可通过微生物发酵去除,微生物发酵可有效降解菜籽饼中硫苷及其代谢产物,改善营养价值,现成为研究热点,并取得不错效果<sup>[25-26]</sup>。猪饲料中用固态发酵菜籽饼等能等氮替代日粮中豆粕,生长阶段替代30%豆粕、

肥阶段替代50%豆粕对猪的生长性能均无不良影响,并且可以改善猪的生长发育<sup>[27]</sup>。动物日粮中用发酵菜籽饼替代部分豆粕是行之有效的,但最适替代比例有待进一步研究。生长育肥猪饲料中,采用水热法处理的菜籽粕与葵花籽粕作为蛋白质原料,发现对猪的生长和日粮消化率没有负面影响,并且对肠道健康有积极的影响<sup>[28]</sup>。

棉籽粕是替代豆粕的一种良好的蛋白质原料。刘耕等研究表明15~35 kg生长猪日粮中分别用20%、40%脱酚棉籽粕蛋白替代豆粕,猪的生长性能和血清生化指标没有受到明显不良的影响,因此处理过棉籽粕的在养猪生产中应用是可行的<sup>[29]</sup>。仔猪分别饲喂蛋白源由豆粕、棉籽粕组成的日粮,发现与豆粕相比,棉籽粕显著降低平均日增重并增加了饲料增重比<sup>[30]</sup>。

棕榈粕常与酶制剂联合使用来解决其中的抗营养因子的问题,多应用于家禽生产,可促进家禽的生长发育,在养猪生产中也有少量研究,但鲜见在反刍动物中应用报道。棕榈粕饲料中添加甘露糖聚酶,可提高蛋鸡的能量利用率,改善其饲料转化率和生长速度<sup>[31]</sup>。在含5%棕榈仁粕的日粮中添加复合酶,可提高其生长性能,提高消化能和营养物质的利用率<sup>[32]</sup>。

花生饼(粕)易于感染黄曲霉,而产生黄曲霉毒素,因此要注意保存,使用之前进行检测,避免黄曲霉毒素对动物的毒害。在30~70 kg的生长猪饲料中,用8%发酵花生粕替代豆粕,生长猪的日增重显著提高了7.8%,且无任何不良影响;还显著提高了日粮蛋白质、钙和磷的消化率。育肥猪饲料中,用超微粉碎花生壳替代10%的玉米粉,猪的生长性能不受影响,且肉品质能得到提高<sup>[34]</sup>。这些研究说明花生粕、花生壳等花生加工副产物均可应用于养猪生产。

茶籽粕在提供能量方面具有优势,其中的多糖,可提高免疫力、抗氧化、抗衰老、降血糖、抗肿瘤等,具有一定的保健作用<sup>[35]</sup>。生长猪日粮中添加18%的茶籽粕,结果显示猪对粗蛋白质表观消化率和消化能显著降低<sup>[36]</sup>。茶籽粕添加到犊牛饲料,可提高其免疫力,但会降低其采食量,进而影响其增重<sup>[37]</sup>。茶籽粕虽具有一定的营养价值,但前人的研究发现其对动物的生长存在负面影响,

需要进一步研究是其中的何种成分影响了动物的生长,并采取有效的处理方法进行改善,以期为非常规饲料原料的开发利用提供依据。

葵花粕因是粗饲料,故通常用于反刍动物饲料,在畜禽生产中使用较少,但研究发现玉米和葵花籽粕为基础的日粮适当添加合成氨基酸后,可使肥育猪的生长性能达到玉米+豆粕日粮的效果<sup>[7]</sup>。

芝麻饼(粕)中的芝麻蛋白具有良好风味,多用于肉类制品、谷物烘焙制品、植物蛋白饮料及冷食、调味品和休闲食品等食品加工行业<sup>[38]</sup>,在畜牧生产中的应用需要进一步研究。

## 3.2 糟渣类在养猪生产中应用

### 3.2.1 木薯酒糟

生长猪饲料中使用2%~6%发酵木薯酒精糟,能提高猪只对饲料中养分的消化率及饲料转化效率<sup>[9]</sup>。肥育猪饲料中添加10%的风干发酵木薯酒精糟,不影响猪的生产性能,却可以在一定程度上降低饲养成本,进而提高生产效益<sup>[39]</sup>。同时,蒋建生等<sup>[40]</sup>研究发现,使用发酵木薯酒精糟替代部分全价饲料,可减少H<sub>2</sub>S、NH<sub>3</sub>的排放,改善养殖环境。因此,合理地将木薯酒精糟应用于猪饲料,可降低饲料成本,提高生产效益。

### 3.2.2 DDGS

研究发现,在断奶后21天的仔猪和生产育肥猪饲料中添加10%~30%的DDGS,不会影响其生产性能<sup>[41-42]</sup>;添加超过30%,导致生长育肥猪的ADG和ADFI降低<sup>[43]</sup>。邬苏晓等<sup>[44]</sup>发现,梅花猪饲料中添加40%的发酵啤酒糟,可有效地提高猪只的增重,提高饲料报酬,节约饲料成本。随着添加量的增加,生长育肥猪的胴体品质将受到不利影响,如屠宰率、背肌大理石花纹、眼肌面积和无脂瘦肉率将降低<sup>[43, 45]</sup>;PUFA浓度增加,背脂内外碘价增加,导致猪肉不易加工和储存<sup>[46]</sup>。为避免DDGS的添加造成的高碘价肉,可添加维生素E和CLA等添加剂,并在屠宰前21 d停用DDGS<sup>[47]</sup>。在妊娠期和哺乳期的母猪饲料中,将代谢能和赖氨酸配平后,添加20%~30%的DDGS,母猪繁殖性能及断奶仔猪的生长未受到不利的影响<sup>[48-50]</sup>。综合考虑,结合DDGS的品质、猪的不同品种及不同生长阶段的差异,可采用30%以下的DDGS代替猪饲料中常规的饲料原料,如玉米、豆粕,并适当添

加植酸酶、纤维素消化酶、维生素E和CLA等添加剂来提高DDGS中营养物质的利用率,解决因添加DDGS对猪胴体品质带来的不利影响。因此,合理的利用DDGS,不仅减少环境污染,而且将会很好地缓解常规饲料原料的压力,降低养猪生产成本,提高经济效益。

### 3.2.3 其他糟渣类

豆渣中含有的抗营养因子会导致猪只腹泻,影响生产性能,但发酵处理后可有效降解抗营养物质,并获得富含益生菌代谢产物,适口性和营养物质消化率都可得到改善,具有较好的饲用效果<sup>[51]</sup>。在中、大猪阶段,固体发酵豆渣分别替代11.8%、18.3%的颗粒饲料可降低料肉比6.30%,每千克增重饲料成本优化0.27元,生猪育肥饲料成本可优化17.55元/头,具有较好的经济效益和社会效益<sup>[52]</sup>。

苹果渣主要被应用于反刍动物生产,干苹果渣富含纤维,可减少母猪的便秘,改善幼龄猪的肠道健康。给断奶仔猪饲喂6%发酵苹果渣,其表观消化率、生产性能和免疫力均显著提高,大肠杆菌数量减少,肠道内环境得到改善,断奶应急得以缓解,腹泻率降低<sup>[53]</sup>。猪日粮中添加20%的葡萄渣,可提高饲料的利用率,使每千克增重消耗的饲料单位减少11.3%~15.3%,浓缩饲料消耗减少13%~30%<sup>[13]</sup>。

酱渣和醋渣粗纤维含量高,蛋白含量较低,一般作发酵处理,提高其营养价值,前人多进行在反刍动物和家禽上的利用研究,鲜见利用于养猪生产的研究。酱渣与其他糟渣混合经乳酸菌等发酵制成的微生态发酵饲料,在蛋鸡日粮中添加2.5%~5.0%,不会降低产蛋性能,并可降低饲料成本<sup>[54]</sup>。育肥羊生产中,使用醋糟可提高生产水平,降低饲料及养殖成本<sup>[55]</sup>。利用套算法评价醋糟和发酵醋糟在蛋鸡上的营养价值,发现醋糟和发酵醋糟的均可替代20%的基础饲粮<sup>[56]</sup>。

## 3.3 农业生产副产物在养猪生产中应用

### 3.3.1 生产食用菌所用培养基

大量的研究表明,菌康应用在养猪生产中获得诸多益处。张兴等<sup>[57]</sup>研究发现,灵芝和猴头菇菌康可改善猪肝脏蛋白质的合成,促进红细胞生产,进而提高猪只免疫力。大沙二元杂交猪日粮中添加灵芝

和猴头菇菌康可降低肌肉失水率,提高肌肉中蛋氨酸、 $\alpha$ -亚麻油酸和谷氨酸含量,改善猪肉品质<sup>[58]</sup>。

蒋明琴等<sup>[59]</sup>表示,肥育猪饲料中用平菇菌的菌糠代替部分精料,对猪只的增重、饲料转化效率、瘦肉率没有不良影响。此外,菌康还可作为发酵床,降低猪舍垫料成本,促进菌牧循环。猪舍发酵床铺垫含45%的金针菇菌渣、杏鲍菇菌康,辅以枯草芽孢杆菌,可提高猪只的舒适度,降低常规垫料产生氨气、硫化氢等臭气浓度,改善了猪的生存环境,从而促进猪只生长<sup>[60]</sup>。菌康中含有的不同活性成分,无论在猪饲料中,还是在垫料中,均充分体现了其功效。可见,合理的利用菌康不仅有利于创造和谐的生态环境,而且可为养猪业创造良好的经济效益。

### 3.3.2 粮食作物加工过程中的副产物

已有学者尝试提取加工废水中沉淀物,再加入专用浓缩饲料,制成液体饲料饲喂生长育肥猪。付晓茹<sup>[61]</sup>研究表明,采用米制品加工废水沉淀物制成的液体饲料,饲喂15 kg以上的生长育肥猪,屠宰后猪肉红润,卖相好,口感好;饲养过程中降低了饲料成本,增加收益350~500元/头,同时采用管道输送液体饲料降低了人工成本,提高了养猪收益。目前查阅的国内文献中,对米制品加工废水在养殖中应用的研究较少,尚未见其在母猪或仔猪饲养中的研究成果。

养猪生产中适量搭配米糠粕可降低饲养成本,提高养殖效益。猪饲料中添加25%以内米糠,其饲用价值相当于玉米,用量超过30%,其饲用价值降低,猪开始挑食,食欲下降,皮肤松弛,降低生长育肥猪的肉品质<sup>[16]</sup>。

麦麸主要用于猪出栏前的饲料,用来调节饲料能量,起限饲作用,有助于提高猪肉品质。另外,麦麸有轻泻作用,还常用于妊娠期母猪饲料以防治便秘。育肥猪日粮中麦麸使用量不宜超过10%,否则会降低猪的生长速度和饲料转化效率<sup>[62]</sup>。仔猪饲粮中,麦麸纤维占总纤维的10%时,仔猪对饲粮中干物质、有机物表观消化率显著降低,而粗蛋白质和磷表观消化率极显著提高;在生长阶段,麦麸纤维占总纤维20%时,猪对饲料中干物质、有机物、粗纤维表观消化率极显著降低<sup>[63]</sup>。因此,麦麸在猪饲料中使用要根据猪的性别及不同生长阶段,适量添加。

玉米加工副产物常被制成发酵饲料投入畜牧生产中,发酵后的玉米加工副产物在适口性和营养价值方面均获得改善,利用率提高,其中的微生物发酵蛋白还可以改善畜禽动物的生长性能和健康状况。32日龄断奶仔猪饲用乳酸菌发酵饲料,可改善仔猪的生长性能,减少了腹泻现象<sup>[64]</sup>。育肥猪日粮中添加20%发酵饲料,显著提高了猪群采食量及日增质量,还可改善猪只健康状况,明显降低使用兽药的费用<sup>[65]</sup>。

### 3.3.3 制糖加工副产物

甜菜粕因纤维含量较高,目前比较普遍在反刍动物生产中的应用,但在单胃动物中应用研究还有待深入。由于母猪特殊的生理需求,在孕期需要纤维来降低日粮能量浓度,增加母猪饱腹感,因此学者们多关注甜菜粕在母猪饲料中应用效果。母猪饲料中添加不超过15%的甜菜粕,可提高窝产活仔数和窝产健仔数<sup>[66]</sup>。怀孕母猪饲料中添加了8%的甜菜粕,可明显改善母猪的生产性能,初使乳中油脂含量增加29%<sup>[67]</sup>。Eklund等评价了甜菜粕等纤维原料在生长猪中的标准回肠氨基酸消化率,结果发现甜菜粕的各项指标均低于麦麸和苜蓿粕30%~61%不等,氨基酸消化率低可能由于甜菜粕中的果胶含量较高<sup>[68]</sup>。

甘蔗渣适口性差,营养价值低,极少被直接用作饲料,虽然人们尝试采用各种方法处理甘蔗渣,但处理过的甘蔗渣依然很少用于单胃动物,主要用于牛羊等反刍动物。甘蔗渣中的含有大量的纤维素,纤维素分解产物是葡萄糖,推测可采用生物处理的方法,联合提取工艺,获得其中的葡萄糖,制成饲料添加剂如甜味剂等,添加到断奶仔猪的饲料发挥其诱食的作用。

### 3.4 海洋类植物在养猪生产中应用

学者们已通过研究证明,海藻可作为畜禽饲料中优质的添加剂,提高生产性能、改善畜产品品质。海藻中的多糖能改善猪的免疫功能和肠道健康,提高其生长性能。生长育肥猪饲料中添加0.5%~5.0%的海藻,可增强猪的免疫功能和抗菌、抗病毒能力,提高其生长性能,改善猪肉品质<sup>[21]</sup>。海藻中的藻多糖可替代抗生素添加到断奶仔猪饲料中,减少断奶应激,进而提高生产性能<sup>[69]</sup>。海藻种类不同,其营养物质含量不同,具有较高的营养价值和益生功能,

可在一定程度上代替抗生素,改善动物机体的免疫功能,提高生产性能。但,海藻不宜过量添加,因为其中含有的砷等矿物元素危害动物健康。海藻在畜牧养殖及人类的保健品应用领域较多,海藻类植物中的其它如紫菜、海青菜、海带草等在畜牧养殖中的研究较为鲜见。

### 3.5 中草药在养猪生产中应用

研究表明,在产前母猪饲料中添加由黄芪、党参、柴胡提取物配置的中草药添加剂,可提高母猪产活仔数;仔猪通过母乳获得中草药中免疫活性因子,使自身免疫力得以提高,从而提高了整个猪场哺乳期和保育期仔猪的成活率<sup>[70]</sup>。保育猪饲料中添加黄芪、板蓝根等中草药,育成猪饲料中添加黄芪、鱼腥草等中草药,研究结果显示,保育猪和育成猪的日增重、饲料转化率均得以提高<sup>[22]</sup>。李玉文等<sup>[71]</sup>在猪饲料中添加0.5%~1.5%的杜仲,提高了猪只平均日增重、降低料肉比,并有增加采食量的趋势,其中添加量为1%的经济效益最佳。这可能与杜仲含有特殊活性成分有关,促进胆汁分泌,并具有抗菌消炎效果,增强猪食欲,提高猪免疫力,促进生产性能提高。可见,中草药在养猪生产中具有重要的实用价值,尤其抗菌消炎功效,在无抗养殖的道路上具有深远的研究意义。

## 4 小结

综上,我国丰富的非常规饲料原料已逐步应用到养猪生产中,并取得了良好的效果如可提高生产性能、改善肉品质等,可见缓解养猪中常规饲料原料的紧张局面,非常规饲料原料是良好的选择。尽管如此,非常规饲料原料尚有许多未知需进一步探究:一是非常规饲料原料的成分尚不完全明确,需采用有效检测方法进行分析,明确所含各成分,合理利用有利于猪生长的成分;采取措施去除或分离抗营养因子或其它有毒成分,更好地应用于生产;二是非常规饲料原料对猪的作用机制尚不清楚,虽有不少研究表明可以提高养猪生产性能,但笔者认为评价指标还应考虑与消化吸收相关的指标,甚至分子指标等,因此其作用机理有待进一步深入研究;三是非常规饲料原料的加工工艺及质量标准需进一步改进和提高;四是各种非常规饲料原料在不同品种、不同性别、不同生长阶段养

猪生产的适宜添加量需进一步研究并明确,在保证猪只健康的前提下,提高猪场的经济效益;五是非常规饲料原料对猪的猪肉品质和环境改善作用有待进一步研究。我国非常规饲料原料在养猪生产中已得到初步的应用,如何高效、最经济合理地利用需继续深入研究,因此非常规饲料原料尚有较大的应用研究的空间。

### 参考文献:

- 王月,朱宝,蒋金金,等.菜籽饼粕饲用价值及其品质改良的研究进展[J].分子植物育种,2015,13(4):929-936.
- [1] 陈君.菜籽饼脱毒方法的研究进展[J].畜牧与饲料科学,2010,31(3):32-34.
- [2] 李玉鹏,年芳,李爱科,等.近红外反射光谱技术评定棉籽粕营养价值和蛋鸡代谢能[J].动物营养学报,2016,28(7):2013-2023.
- [3] SULABO R C, JU W S, STEIN H H. Amino acid digestibility and concentration of digestible and metabolizable energy in copra meal, palm kernel expellers, and palm kernel meal fed to growing pigs[J]. Journal of Animal Science, 2013, 91(3): 1391-1399.
- [4] 文芬,张森,邵雪梅,等.芝麻饼粕中蛋白质的提取及其应用研究现状[J].食品研究与开发,2018,39(14):220-224.
- [5] 梅娜,周文明,胡晓玉,等.花生粕营养成分分析[J].西北农业学报,2007,16(3):96-99.
- [6] 伦志国.蛋白饲料原料葵花籽粕的应用[J].饲料广角,2017(04):46-47.
- [7] 王建枫,程晓建.油茶籽粕饲料资源的开发与利用[J].饲料研究,2015(10):65-68.
- [8] 刘中华,李强,冯志,等.发酵木薯酒精糟对生产猪生产性能及营养物质消化的影响[J].饲料工业,2017,38(10):26-30.
- [9] LI S, LIU W, RAUSCH K D, et al. Comparison of protein concentrate, protein isolate and wet sieving processes for enriching DDGS protein [J]. Journal of the American Oil Chemists' Society, 2014, 91(5): 867-874.
- [10] JUNG B, BATAL A B, WARD N E, et al. Vitamin composition of new-generation corn distillers dried grains with solubles [J]. The Journal of Applied Poultry Research, 2013, 22(1): 71-74.
- [11] 张改红.探讨发酵豆渣在猪养殖中的应用[J].生命科学与农业科学,2013(8):192.
- [12] 李建国.果渣作为饲料资源的开发与利用[J].畜牧与饲料科学,2005(6):10-12.
- [13] 杨在宾,李在勇.非常规饲料资源的特性及应用进展[J].饲料工业,2008,29(7):1-4.
- [14] 徐荣,李新化,方热军.菌糠的营养特性及其养猪生产中的应用[J].湖南饲料,2018(2):39-40.
- [15] 刘靖,张石蕊.米糠的营养价值及其开发利用[J].湖南饲料,2010(3):12-17.
- [16] 陈清婵,王劲松.米糠饮料的开发与研究进展[J].食品科技,2012,37(9):156-165.
- [17] 李浩,宋泽和,范志勇.麦麸的主要营养特性及其在畜禽饲料中的应用[J].中国饲料,2018(3):66-69.
- [18] 典姣姣,田青,董贞,等.玉米加工副产品发酵生产蛋白饲料的研究概况[J].饲料研究,2015(3):10-13.
- [19] 杨或渊,张晋辉,范元芳,等.甜菜粕的营养价值及在畜禽生产中的应用[J].中国畜牧杂志,2017,53(4):3-7.
- [20] MAKKAR H P S, TRAN G, HEUZ V, et al. Seaweeds for livestock diets: a review [J]. Animal Feed Science and Technology, 2016, 212: 1-17.
- [21] 刘慧,刘仲华,张盛.杜仲中活性成分的研究进展[J].农产品加工(学刊),2011(8):12-18.
- [22] 宋志坤.常用饼粕类饲料的营养及饲喂[J].现代畜牧科技,2017(1):37.
- [23] 蔡一鸣,刘镜,张洁,等.双低菜籽饼对生长猪甲状腺和肝功能的影响[J].贵州农业科学,2010,38(2):136-137.
- [24] 付敏,何军,余冰,等.发酵菜籽饼在生长猪上的营养价值评定[J].动物营养学报,2014,26(7):1916-1924.
- [25] WANG X S, JIN Q Z, WANG T, et al. Screening of glucosinolate-degrading strains and its application in improving the quality of rapeseed meal [J]. Annals of Microbiology, 2012, 62(3): 1013-1020.
- [26] 吴东,钱坤,徐鑫,等.发酵菜籽饼在生长肥育猪日粮中的应用研究[J].粮食与饲料工业,2015(7):56-60.
- [27] WEBER M. Piglets can thrive on sunflower meal [J]. Pig Progress, 2016, 32(4): 28-30.
- [28] 刘耕,李敏,欧阳国强,等.脱酚棉籽蛋白替代豆粕对15~35 kg 杜长大猪生长性能及血清生化指标的影响[J].养猪,2014(6):12-14.
- [29] 宋阳,孙会,韩慧慧,等.极低蛋白日粮不同蛋白源对仔猪生长性能和氮代谢的影响[J].中国畜牧杂志,2016,52(3):26-30.
- [30] 陈权军,邓岳松,罗永发,等.棕榈仁粕日粮添加甘露聚糖对蛋鸡的影响[J].饲料研究,2010(2):9-10.
- [31] 毛宗林.复合酶对饲喂棕榈仁粕的肥育猪生产性能和养分利用率的影响[J].饲料广角,2013(7):43-45.
- [32] 解佑志,曹洪战,宋志芳,等.发酵花生粕对生长猪生产性能和养分消化率的影响[J].畜牧与兽医,2017,49(10):40-42.
- [33] 郭爱红,张号杰.花生副产物在畜牧生产中的综合利用[J].饲料与畜牧,2014(11):13-15.
- [34] 唐华丽,孙桂菊,陈忱.枸杞多糖的化学分析与降血糖作用研究进展[J].食品与机械,2013(6):244-247.
- [35] 李敏,张石蕊,贺喜,等.茶籽饼副产品对猪饲用价值的初步评定[J].饲料工业,2010,31(24):63-64.
- [36] 樊庆山,屠焰,刁其玉,等.含棕榈仁粕、油茶籽粕或茶籽粕饲料对3~5月龄犊牛生长性能、抗氧化能力及免疫性能的影响[J].中国畜牧杂志,2018,54(7):76-81.

- 郑华丽,魏安池,牛新培.芝麻饼粕蛋白应用进展[J].粮食与油脂,2012(8):8-10.
- [38] 周晓容,杨飞云,谢跃伟,等.发酵木薯渣在育肥猪上的应用效果研究[J].饲料工业,2014,35(17):99-101.
- [39] 蒋建生,庞继达,蒋爱国,等.发酵木薯渣饲料替代部分全价饲料养殖肉鸭的效果研究[J].中国农学通报,2014,30(11):16-20.
- [40] SPIEHS M J, WHITNEY M H, SHURSON G C, et al. Odor and gas emissions and nutrient excretion from pigs fed diets containing dried distillers grains with solubles [J]. Applied Engineering in Agriculture, 2012, 28(3): 431-437.
- [41] TRAN H, MORENO R, HINKLE E, et al. Effect of corn distillers dried grains with solubles on growth performance and health status indicators in weanling pigs [J]. Journal of Animal Science, 2012, 90(3): 790-801.
- [42] XU G, BAIDOO S K, JOHNSTON L J, et al. Effects of feeding diets containing increasing content of corn distillers dried grains with solubles to grower-finisher pigs on growth performance, carcass composition, and pork fat quality [J]. Journal of Animal Science, 2010, 88(4): 1398-1410.
- [43] 邬苏晓,王亚斌,黄春梅,等.啤酒糟发酵饲料对梅花猪的饲喂效果分析[J].饲料工业,2018,39(2):43-45.
- [44] WU F, JOHNSTON L J, URRIOLOA P E, et al. Effects of feeding diets containing distillers' dried grains with solubles and wheat middlings with equal predicted dietary net energy on growth performance and carcass composition of growing-finisher pigs [J]. Journal of Animal Science, 2016, 94(1): 144-154.
- [45] CROMWELL G L, AZAIN M J, ADEOLA O, et al. Corn distillers dried grains with solubles in diets for growing-finisher pigs: a cooperative study [J]. Journal of Animal Science, 2011, 89(9): 2801-2811.
- [46] 杨灿,唐小武,宾冬梅,等.干酒糟及其可溶物的营养价值及其在养猪生产上的应用[J].动物营养学报,2017,29(1):8-20.
- [47] WANG L S, SU B C, SHI Z, et al. Dietary supplementation with maize distillers dried grains with solubles during late gestation and lactation: effects on sow and litter performance, and on colostrum and milk composition [J]. Animal Feed Science and Technology, 2013, 179(1/2/3/4): 149-153.
- [48] WANG L, SHI Z, JIA Z, et al. The Effects of dietary supplementation with chromium picolinate throughout gestation on productive performance, Cr concentration, serum parameters, and colostrum composition in sows [J]. Biological Trace Element Research, 2013, 154(1): 55-61.
- [49] GREINER L, NEILL C, ALLEE G L, et al. The feeding of dried distillers' grains with solubles to lactating sows [J]. Journal of Animal Science, 2015, 93(12): 5718-5724.
- [50] 肖勇,胡玉洁.发酵豆渣在生猪养殖中的应用分析[J].南方农业,2017,11(17):84-85.
- [51] 蔡辉益,于继英,刘世杰,等.发酵豆渣替代部分颗粒饲料液体饲喂生长育肥猪效果[J].饲料工业,2018,39(16):1-5.
- [52] 高印.发酵苹果渣对断奶仔猪生产性能、血清指标和肠道微生物与结构的影响[D].西北农林科技大学,2016.
- [53] 彭忠利,郭春华,柏雪,等.微生态发酵饲料对蛋鸡产蛋性能和经济效益的影响[J].中国家禽,2013,35(3):25-28.
- [54] 王芳,上官明军,张变英,等.醋糟对育肥羊生产性能、屠宰性能及肉质特性的影响[J].家畜生态学报,2018,39(6):52-56.
- [55] 杨耀翔,董晓芳,佟建明.醋糟和发酵醋糟在蛋鸡上的营养价值评定[J].动物营养学报,2018,30(6):2352-2358.
- [56] 张兴,左晓红,吴买生,等.灵芝和猴头菇菌糠对大沙杂交猪血液生化及免疫指标的影响[J].中国猪业,2016,11(5):62-66.
- [57] 左晓红,吴买生,张兴,等.灵芝和猴头菇菌糠对大沙杂交猪肉品质的影响[J].猪业科学,2016,33(4):46-48.
- [58] 蒋明琴,李进杰,冯巧婷.平菇菌糠对育肥猪生长性能的影响试验[J].中国畜牧兽医,2009,36(6):194-195.
- [59] 盛清凯,伊惠,王怀中,等.不同菌渣发酵床对猪生产性能、血液指标及臭气的影响[J].西南农业学报,2015,28(6):2774-2778.
- [60] 傅晓如.米制品加工废水沉淀物生产猪液体饲料初探[J].粮食与饲料工业,2017(1):40-42.
- [61] 彭华.麦麸、DDGS和脂肪粉对肥育猪生长性能、胴体品质和脂肪质量的影响[J].中国猪业,2012,11:75.
- [62] 尹佳.不同纤维源对猪生长性能、养分消化率和肉品质的影响[D].硕士学位论文.四川雅安:四川农业大学,2012.
- [63] 何谦,吴同山,李岩,等.发酵饲料对规模化猪场断奶仔猪生产性能的影响[J].畜牧与兽医,2008(6):62-64.
- [64] 张云影,万丽红,吕礼良,等.育肥猪饲喂袋装厌氧固态发酵饲料效果研究[J].现代农业科技,2011(11):331-335.
- [65] 侯丹熹,程宗佳,王勇生,等.不同甜菜粕添加水平对母猪繁殖性能的影响[J].饲料研究,2015,(1):43-44.
- [66] LOISEL F, FARMER C, RAMAEKERS P, et al. Effects of high fiber intake during late pregnancy on sow physiology, colostrum production, and piglet performance [J]. Journal of Animal Science, 2013, 91(11): 5269-5279.
- [67] EKLUND M, RADEMACHER M, SAURE W C, et al. Standardized ileal digestibility of amino acids in alfalfa meal, sugar beet pulp, and wheat bran compared to wheat and protein ingredients for growing pigs [J]. Journal of Animal Science, 2014, 92:1037-1043.
- [68] 韩丽君,符瑞文,李东生,等.海藻作为饲料添加剂在家禽饲养中的效果[J].海洋科学,1998,22(4):3-6.
- [69] 马山,卢少海,田景振.杜仲药效成分和药理学研究概况[J].食品与药品,2013,15(6):449-451.
- [70] 李玉文,赵超,黄军.杜仲皮营养价值分析及其在育肥猪生产中的应用[J].黑龙江畜牧兽医,2017(01下):153-155.
- [71]

# 加强兽医专业教学定位,提高兽医人才培养质量

石达友, 吴玄光, 陈义洲, 苏荣胜, 李少川, 马勇江\*

(华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**当代中国兽医职业的社会地位越来越高, 整个社会对兽医工作也越来越重视, 如何提高兽医专业人才培养质量, 已成为中国高等院校普遍关注的问题。本文主要从加强兽医专业教学定位, 提高兽医人才培养质量方面入手, 探讨了相关做法及经验, 以供中国兽医专业相关高校借鉴, 并力求为中国当代兽医事业的健康稳定发展尽力。

**关键词:**教学定位; 兽医专业; 兽医人才; 培养质量

**中图分类号:**S851.63 **文献标识码:**C **文章编码:**1005-8567(2019)02-0021-03

自2009年中国政府实行执业兽医资格考试以后, 兽医的社会地位更是显著提高, 中国高校兽医专业招生形势越来越好, 兽医专业人才培养质量也不断提高<sup>[1]</sup>。如何结合社会对新时代兽医职业的需要, 继续加强兽医专业教学工作, 提高人才培养质量。本文结合了作者所在单位自2002年以来在加强兽医专业教学定位, 提高人才培养质量等方面的做法进行探讨。

## 1 采取二次分班制强化兽医专业定位

自2002年, 华南农业大学兽医学院在全国率先开设动物医学专业(5年制)小动物疾病防治方向班, 即让兽医专业大学新生入学开始, 对自己大学毕业之后会从事的职业有一个大概的定位。在2002~2007年, 兽医学院每年招生动物医学专业小动物疾病防治方向班1个(简称小动物班), 主要教学计划与培养目标定位在宠物疾病防治方向。同时, 招生4~5个动物医学专业班(简称大动物班), 其主要教学计划与培养目标定位在畜禽疾病防治方向。通过入学即让兽医专业学生比较清楚地认识到大学毕业以后大概会从事的兽医工作岗位, 有助于兽医专业学生更好地做好个人职业规划, 尽早做好兽医专业定位, 从而避免大学期间学习的无目的性与无方向性<sup>[2]</sup>。

同时, 为了更好地让学生做好个人职业规划与兽医专业定位, 兽医学院通过总结动物医学专业(小动物疾病防治方向)开办6年的教学工作经验, 调整了动物医学专业(小动物疾病防治方向)的组建时间。决定从2008级开始, 在大学第4学期末根据学生个人意愿报名与兽医学院组织考核评选, 再最终产生1~2个动物医学专业(小动物疾病防治方向)班。后来根据兽医专业教学课程安排等实际情况, 改到大学第3学期末选拔组建动物医学专业(小动物疾病防治方向)班。

通过以上措施, 大大促进了兽医专业大学生尽早制定个人职业规划, 进行兽医专业定位, 做到学习有计划, 人生有规划。因此, 分设兽医专业大动物班与小动物班两个方向, 有助于尽早开展兽医专业定位教学, 更有利于提高兽医专业人才培养质量。

## 2 合理安排班主任 加强专业引导与服务管理

目前, 在大学一般都有专职的思想政治辅导员老师, 负责大学生的思想政治教育、班团事务、课外活动等众多事务性工作。但专职的政治辅导员绝大部分并不具备兽医专业背景, 针对大学兽医专业是一门应用性很强的学科。为了在平时班级管理工作中更有针对性地加强学生的职业规划定位与兽医专业思想工作, 华南农业大学兽

收稿日期:2019-02-28

作者简介:石达友(1977-), 男, 四川成都人, 博士, 副教授, 研究方向:临床兽医学中兽医。E-mail:shidayou@scau.edu.cn

\*通讯作者:马勇江(1974-), 男, 博士, 副教授。研究方向:动物组织学, 胚胎学。E-mail:mayongjiang@scau.edu.cn

医学院对选择兽医专业本科生班主任工作极其重视。首先,针对每年的2个动物医学专业小动物疾病防治方向的班主任,学院要求班主任是来自临床兽医学科的专任老师,并且优先选择具有丰富小动物临床诊疗经验的老师。而针对余下动物医学专业(大动物班)班主任,则主要选择在预防兽医学科、基础兽医学科的专任老师,并且优先选择在畜禽疾病防控方面具有丰富临床经验的老师。

通过总结多年的兽医专业班主任选配工作经验,发现越是临床经验丰富的老师,在担任班主任工作期间对兽医本科生的兽医专业指导教育意义就越大,使兽医专业本科生为自己定位大学毕业后选择在畜禽临床或者小动物临床工作奠定了坚实的基础。因此,有针对性的班主任选配工作,对兽医专业学生职业定位及人才培养质量的提高均有重要的意义。

### 3 积极发挥兽医专业老师的引导作用

除了在安排兽医本科生班主任工作中注重发挥专业老师的引导作用,在平时课内课外时间,兽医学院也注重发挥全体专业老师的专业教育指导作用。首先,兽医学院学生职业发展中心会定期邀请相关领域专业老师,举办与兽医专业相关的各类基础与应用性学术讲座,并设立院级众多的兽医专业大学生科技创新项目,请相关专业老师担任项目的指导老师<sup>[3]</sup>。让同学们有更多机会全面、深入地认识到兽医专业的应用性,兽医专业与其他相近专业的联系,当代兽医职业主要包括哪些工作岗位等话题,让兽医专业大学生可以更好地结合个人爱好与兴趣,为自己做好职业规划与兽医专业定位,大大提高兽医专业人才培养质量。

### 4 正确引导学生假期积极参加专业实习

在大学,寒假暑假加起来就有3个月左右时间,如何充分利用好寒暑假集中参加与兽医专业相关的课外实习实践活动,对于大学生更直观地了解与认识兽医职业具有非常重要的意义。为此,兽医学院在每年寒暑假来临之前,积极联系与主动邀请广东省各大宠物连锁医院、大型畜禽养殖公司、兽医药品生产企业等相关单位,到兽医学院召开各类形式的宣讲会,积极引导、动员低年级大学生更多地利

用寒暑假到兽医基层单位开展实习实践活动。通过引导大学生参加寒假暑假实习实践活动,让同学们有机会将兽医专业知识学以致用,并且在兽医临床中发现个人不足之处,激励自己在学校更加努力发学习兽医专业知识。

最近几年总结兽医学院学生利用暑假时间参加课外实习实践活动情况发现,在动物医学专业小动物疾病防治方向学生中有70%左右同学有参加1个月以上的实习实践学习,而动物医学专业畜禽疾病防治方向学生中有50%左右同学有参加1个月以上实践学习。实践证明,充分利用好寒暑假二假时间,积极组织引导兽医专业大学生参加专业相关实习实践活动,对于做好学生兽医职业规划与兽医专业定位,提高兽医专业人才培养质量具有重要的意义。

### 5 积极组织学生参加课外专业实践技能大赛

当前,兽医职业领域需求大量具有良好兽医基础理论知识与临床技能熟练的兽医专业人才,但目前中国兽医高等院校主要还是在延续传统的教学思路和方法(通才教育)培养学生,即注重基础理论知识教学,轻兽医临床实践技能教学。针对现实情况,在2010年华南农业大学兽医学院组织创办了“华南兽医杯”兽医临床技能大赛,每年5月份组织广东省具有动物医学专业7所高校在校兽医大学生参加“华南兽医杯”兽医临床技能大赛。比赛内容主要包括执业兽医综合知识、犬护理知识与技能、犬医疗检验与手术操作等比赛项目。截止2019年,“华南兽医杯”兽医临床技能大赛已经成功举办9届,成为广东省小动物诊疗行业最成功的兽医临床技能专业赛事,通过竞赛达到以赛促教、以赛促学、以赛促改的目的,有效地推进了广东省高校兽医专业教学改革与提高兽医专业人才培养质量。

华南农业大学兽医学院作为“华南兽医杯”创办单位,为更好地发挥“华南兽医杯”兽医临床技能大赛对本校兽医专业实践教学工作的推进作用,在每年3月初组织全院学生参加“华南兽医杯”临床技能大赛前期的初赛、半决赛与总决赛。据不完全统计,每年平均有超过300名在校学生参加以理论知识考核、临床实践操作为主的“华南兽医杯”



初赛活动,此举激发了在校学生从事兽医临床工作的兴趣。“华南兽医杯”的成功举办,对于在校大学生进行兽医专业定位与做好个人职业规划,提高兽医专业人才培养质量具有重要的意义。

## 6 合理安排毕业教学生产实习工作

在大学毕业之前的兽医专业临床教学生产实习课程,是兽医专业教学过程中的一个重要实践环节,是进一步验证、巩固、拓展已学的兽医专业知识,提高兽医临床实践技能与培养综合素质的重要途径。兽医学院长期以来一直非常重视教学生产实习工作,特别是针对动物医学专业畜禽疾病防治方向与小动物疾病防治方向的差异性,在实习安排过程中也非常重视分类对待。针对动物医学专业畜禽疾病防治方向的同学,主要强调对畜禽群体疾病防控知识的学习与掌握,因此主要安排到各类大型养殖企业等兽医基层单位,实习3个月时间。针对动物医学专业小动物疾病防治方向的同学,由于学习与掌握兽医临床技能显得更加重要。因此,兽医学院首先对广州市、深圳市等实地考察与调研,最后筛选整体水平靠前的50余家动物(宠物)医院作为小动物疾病防治方向学生的教学实习基地,并开展为期6个月的兽医临床教学实习,促进学生在小动物临床实践综合技能等方面知识的培养与提高。

因此,根据兽医专业不同方向的特殊性,有针对

性地安排学生到不同类型的兽医基层单位,开展不同时间长短的教学生产实习工作,有助于进一步为不同方向兽医专业学生开展兽医专业定位与做好个人职业规划,提高兽医专业人才培养质量。

## 7 小结

兽医专业是一门应用性很强的学科,兽医工作岗位是一个比较重视临床实践技能的职业。如何让兽医专业学生在大学毕业后最快最好地适应兽医工作岗位,特别需要高校教育管理部门做好兽医专业定位的引导教育工作,让兽医专业大学生更早地了解与认识兽医职业,特别是对兽医专业畜禽疾病防治方向兽医岗位与小动物疾病防治方向兽医岗位之间的明显共性与差异性,真正为在校兽医大学生更早地做好兽医专业定位与兽医职业规划,提高中国高校兽医专业人才培养质量,才能更好地为当代中国兽医事业服务。

## 参考文献:

- [1] 孙伟. 新时代兽医工作定位[J]. 中国畜禽种业, 2018(8): 21-22.
- [2] 石达友, 吴玄光, 陈义洲, 等. 小动物医师人才培养实践教学新模式探讨[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017(08): 243-244.
- [3] 王豪举, 张家骅, 魏学良, 等. 综合性大学兽医专业创新人才培养模式探索[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2016, 41(1): 164-168.

## 哺乳仔猪早期诱料操作

迂斌, 张运强, 黄建平

(湖南加农正和生物技术有限公司, 湖南 长沙 410329)

**摘要:**仔猪早期诱料可加快仔猪的认槽和上料速度, 哺乳阶段可养成自主采食教槽料的习惯, 为断奶后上料奠定扎实基础。本文介绍了料槽的制作和人工乳的制备及科学的饲喂方案, 以期使哺乳仔猪早期诱料操作达到最理想的诱料效果。

**关键词:**制作 人工乳; 过渡; 注意事项

**中图分类号:**S815.4 **文献标识码:**C **文章编码:**1005-8567(2019)02-0024-02

哺乳期是仔猪成活率最容易受到影响的一个时期, 为了提高仔猪的成活率, 因此在饲养哺乳仔猪的时候要抓好三大关键点(初生、补料、断奶), 而其中的教槽补料是承接断奶保育的重要时期, 下面将具体介绍。

### 1 早期诱料槽的制作和安装

选择怀孕猪定位栏下料管为原始材料, 先在中间对称切割为2个弧形管, 再将每个弧形管切割为18~25 cm长的小半圆管, 两端焊接、底部焊接钢筋支架, 简易诱料槽即完成制作(图1)。

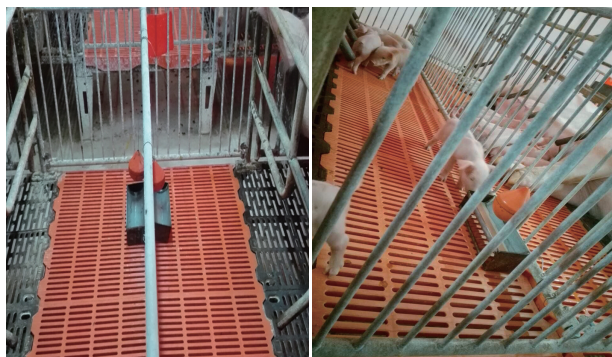


图1 仔猪早期诱料槽

早期诱料槽固定于靠近产栏前端15~20 cm的位置, 一方面可避免仔猪在料槽内拉屎拉尿, 另一

方面可使仔猪尝试模仿母猪吃料和饮水行为。图中吊球不配亦可, 因仔猪日龄较小对晃动的吊球毫无兴趣甚至会畏惧吊球。

### 2 人工乳的制备和保存

奶粉选择上海生产的免疫奶, 选择40℃左右的冷开水(若场内水质不达标, 可考虑使用桶装水)按照比例将温水加至奶粉中, 搅拌均匀, 待无明显奶粉球状物时将人工乳转移至保温瓶中保存, 一定要在4小时内使用。

### 3 人工乳的添加和灌服

#### 3.1 2~4日龄

执行诱料应在仔猪出生后第2天开始, 将自制诱料槽固定于产栏相应位置。奶粉与水的比例为1:2.5制备人工乳, 每个诱料槽定量添加15~20 mL, 每1~1.5 h更换一次。对护理栏仔猪(体重≤1.0 kg)逐头灌服, 上下午各2次, 5~10 ml/次(具体灌服量以灌至仔猪抗拒为准), 连续灌服3天; 正常栏仔猪加料后每栏随机选3~4头仔猪将其口鼻按放至料槽内使其口鼻沾满人工乳, 引导仔猪自己吃, 连续浸泡2天。

#### 3.2 5~7日龄

护理栏仔猪上午第1次、下午第1次全部灌服人工乳, 其余2次让其自己喝(若护理栏已有仔猪

能主动去喝则不必再灌服);未主动舔舐奶粉料的正常栏仔猪,挑选3~5头人工灌服奶粉,上下午各1次,连续灌服3天,灌服完毕将几头仔猪口鼻按至料槽内沾满人工乳。能主动采食的栏,人工乳的使用可根据仔猪采食情况适当加量,单次添加量可增加至30~50 ml。

### 3.3 8~14日龄

开始撤掉早期诱料槽,用白色塑料槽(或铸铁圆盘料槽)诱料,单次添加量可增加至50~80 ml,奶粉与水的比例为1:3.5。随着仔猪日龄的增大,奶粉与水的比例应逐渐缩小,至14日龄,最适比可能为1:5。

## 4 人工乳向教槽料的过渡

### 4.1 15~19日龄

开始进行料种过渡,水料比仍控制在5:1。料的使用由奶粉料向教槽料进行过渡,分5天完成转料(即15日龄奶粉料为4:1,16日龄为3:2,17日

龄为2:3,18日龄为1:4,19日龄全部为饲料)。

### 4.2 19~21日龄

料水比分3天过渡至1:2.5(刚好为制备半干湿料的浓度)。正常情况23天断奶,若配种计划不均衡可提前至21天断奶。断奶后自由采食、多补回头料,白天饲喂4餐,夜间饲喂1餐,断奶至仔猪上市,全部饲喂半干湿料。

## 5 早期诱料注意事项

所有仔猪的人工乳灌服必须安排在仔猪吃完母乳后进行,避免灌饱后仔猪不吃母乳导致的回乳。早期诱料仅为一种辅助手段,主要是锻炼哺乳仔猪的胃肠系统,为断奶打下坚实的基础。毕竟人工乳营养成分不及母乳,故应优先选择母乳的摄入。奶粉与水的最佳比例可能因场而异,建议不同猪场先摸索适合本场的比例再大范围推广。

---

上接第9页

为民理念,管理工作有创新、有突破、有建树、有较大发展,开创行业管理新局面,不少做法和经验得到了农业部的肯定和推广,得到厅党组和行业的充分肯定,基层和群众满意。我们坚持一切从国情、省情出发、从实际出发,既总结省内成功做法又借鉴省外有益经验,既大胆探索又脚踏实地,敢闯敢干,大胆实践。我们坚持问题导向,从企业和群众关心的事情做起,从群众不满意的地方改起,敢于较真碰硬,勇于破难题、闯难关。2019年元月4日,省肉协在广州召开2018年年会和换届大会。会议认为,5年前,屠宰职能确定从商务经信转交农业部门时,省协会、老食品和屠宰企业是心存疑虑心存担忧的,因为大家怕农商两家斗了几十年后,农业接手的人会不会太激进,瞎折腾。5年下

来,事实证明大家的担心是多余的,原省农业厅的领导和屠宰管理处的同志,务实进取,尊重历史,广听意见,做了大量卓有成效的工作,引导行业更加规范发展。

以上所述五年的业务改革和创新情况以及取得的成效,是在厅党组、局领导的正确领导、组织指挥下,在农业部的大力支持指导帮助下,在各级管理部门、科研教学检测单位、协会、媒体、生产经营企业和使用单位的共同努力下取得的。特别值得一提的是原省农业厅接管生猪定点屠宰职能后,省肉协主动配合,在陈子召会长领导下的理事会勇于改革创新,与主管部门紧密合作,秘书长熟悉行业情况,经常为我们建言献策,为提高协会话语权勤勉尽责,做了大量卓有成效工作。

# 猪肺炎支原体感染的诊断与病理学观察

卢围<sup>1,2</sup>, 陶政<sup>1,2</sup>, 王东东<sup>1,2</sup>, 廖承球<sup>1,2</sup>, 潘永飞<sup>1,2</sup>, 宋延华<sup>1,2</sup>

(1. 温氏食品集团股份有限公司, 广东 新兴 527439;

2. 国家生猪种业工程技术研究中心, 广东 新兴 527439)

**摘要:**本研究对9头疑似猪肺炎支原体感染猪进行解剖, 结合临床诊断和PCR检测方法进行确诊, 采用HE染色观察感染猪肺脏的病理学变化。结果显示, 9头疑似猪肺炎支原体感染猪剖检后有8头肺脏呈典型虾肉样病变且PCR检测结果为阳性, 病变肺脏HE染色镜检显示, 发病猪肺泡和细支气管内外大量炎症细胞浸润, 属典型的间质性肺炎和支气管肺炎。

**关键词:**猪肺炎支原体; 诊断; 病理学

**中图分类号:**S858.2 **文献标识码:**C **文章编号:**1005-8567(2019)02-0026-02

猪支原体肺炎(Mycoplasmal pneumonia of swine, MPS)又称猪喘气病, 是由猪肺炎支原体(Mycoplasma hyopneumoniae, Mhp)引起的一种慢性接触性呼吸道传染病<sup>[1]</sup>。MPS常继发或混合感染其它细菌、病毒, 引起猪呼吸道疾病综合征(Porcine respiratory disease complex, PRDC)。患病猪临床主要表现为咳嗽、气喘、生长发育迟缓和饲料转化率低。MPS在世界范围内广泛流行, 被认为是最常发生和造成重大经济损失的猪病之一<sup>[2]</sup>。随着我国集约化养猪业的不断发展, MPS在我国时有发生, 局部地区流行相当严重<sup>[3]</sup>。

对于MPS的诊断, 其流行病学特点、临床症状、病理剖检变化和实验室病原检测均可作为诊断依据。但在实际生产中, 发病往往不具有特异性, 通过临床症状和病理变化难以确诊。因此, 实验室病原检测是MPS诊断的最有效手段。目前, MPS病原诊断方法主要包括病原分离培养<sup>[4-6]</sup>、血清学试验<sup>[7]</sup>和分子生物学检测<sup>[8-9]</sup>。其中, PCR检测不仅可以克服支原体培养难度大、血清学实验易发生交叉反应等缺点, 还具有灵敏性高、特异性强等优点, 在MPS病原诊断方法中逐渐占据主导地位。本试验进一步利用HE染色镜检观察典型病理变化, 探索和丰富了MPS的诊断技术和病变特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

猪肺炎支原体疑似发病猪只9头, 40日龄左右。

#### 1.1.2 主要试剂

细菌基因组DNA提取试剂盒(天根公司), Premix Taq酶和DL2000 Maker(宝生物工程(大连)有限公司), 凝胶回收试剂盒(Gel ExtraCtion Kit), 质粒提取试剂盒(Plasmid Mini Kit I)。

#### 1.1.3 主要仪器

BioRoad PowerPac Universal 核酸电泳仪, BioRoad PowerPac Universal Hood 凝胶成像仪, 组织切片机, 奥林巴斯光学显微镜。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 剖检

剖杀疑似发病猪, 观察肺脏是否存在猪肺炎支原体典型的“虾肉样”病变, 采取病变与健康肺脏界限区域肺脏组织, 用于PCR检测和组织切片制作。

#### 1.2.2 引物设计

使用参考资料所设计的支原体引物<sup>[10]</sup>, 对肺脏组织样品进行PCR检测, 引物序列上游引物为5'-GACCCTTCAAGC TTCACCAAGA-3', 下游引物

收稿日期:2018-11-07

作者简介:卢围(1985-), 男, 安徽广德人, 硕士研究生, 畜牧兽医师, 主要从事猪病研究。E-mail:luwei.0324@163.com

为 5'-TGTGTTAGTGACTTTTGCCACC-3', 目的条带 649 bp。

### 1.2.3 病料PCR检测

取上述病变与健康肺脏界限区域肺脏组织, 剪刀剪碎, 加入适量生理盐水, 采用组织研磨机进行研磨, 然后 5000 r/min 离心 3 min。取离心后的上清液, 采用细菌基因组提取试剂盒(天根公司)按照说明书提取 DNA。以所得 DNA 为模板进行 PCR 检测, 将扩增产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 紫外成像系统拍照, 切割目的条带, 将所获得目的条带进行胶回收处理。

### 1.2.4 质粒的制备与测序比对

将回收纯化后的目的条带连接 PMD-18-T 载体, 16 °C 恒温反应 18 h。常规转染至 300 μL DH5α 大肠埃希菌中, 将转染后的 DH5α 感受态大肠埃希菌涂在添加氨苄的固体 LB 培养基上, 37 °C 恒温培养过夜, 次日采用移液枪头挑取单克隆菌落, 加入含有氨苄的液体 LB 培养基中, 摇床培养(37 °C、200 r/min) 12 h。菌液经 PCR 检测判定转染阴阳性, 将转染阳性的菌液离心处理, 按照说明采用质粒提取试剂盒(Plasmid Mini Kit I)提取质粒。将提取质粒送至华大基因公司进行测序, 并在 GenBank 上进行测序结果比对。

### 1.2.5 切片观察

结合临床症状及 PCR 检测结果, 将确诊为猪肺炎支原体的病变肺脏制作组织切片, HE 染色, 光镜观察。

## 2 结果

### 2.1 剖检结果

剖检结果显示, 9 头疑似发病猪中, 有 8 头猪肺脏都出现不同程度的“虾肉样”病变, 部分发病猪肺脏呈单侧“虾肉样”病变, 部分发病猪只肺脏呈典型的对称“虾肉样”病变, 病变肺脏见图 1 和图 2 所示(图见第 52 页)。

### 2.2 PCR 检测结果

PCR 反应体系与程序 体系(25 μL): Premix Taq 酶 12.5 μL, 上下游引物各 0.5 μL, 分子用水 6.5 μL, DNA 模版 5 μL。扩增条件: 98 °C 变性 10 s, 54 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 共 30 个循环, 然后 72 °C 充分延伸 10 min。PCR 检测结果显示, 9 头疑

似猪肺炎支原体感染猪中有 8 头 PCR 检测结果为阳性, 电泳图见图 3 所示。切割 PCR 检测阳性条带进行纯化回收, 将纯化回收后的目的条带连接载体构建质粒后测序, 经比对, 目的条带皆为猪肺炎支原体。

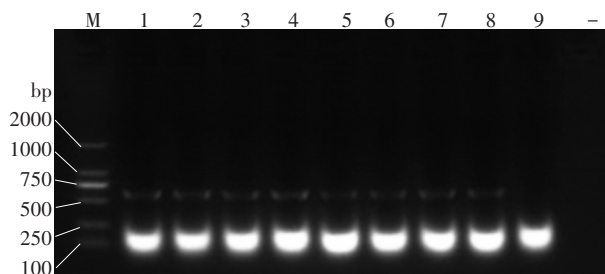


图3 1-8号疑似发病猪只肺脏 PCR 检测猪肺炎支原体为阳性, 9号检测为阴性, 阴性对照组(-)成立, 目的条带 649 bp

### 2.3 病理组织学观察

HE 染色后镜检观察结果见图 4-图 7(图见第 52 页), 病变区域肺泡和细支气管管腔内外充满大量炎症细胞(粒细胞、淋巴细胞和巨噬细胞等炎症细胞弥漫浸润, 细支气管管腔内有上皮细胞脱落), 属典型的间质性肺炎和支气管肺炎。

## 3 讨论

猪支原体肺炎为养猪生产中常见且多发的呼吸系统疾病, 尤其是在饲养密度过大、猪舍通风环境较差和冬春低温季节更易多发, 发病猪生长速度缓慢, 采食量下降, 料肉比增高, 给养猪业造成了严重的经济损失。目前养猪生产中防治本病的方法主要有改善猪舍通风环境, 合理设置饲养密度以及利用疫苗和药物进行防控。猪肺炎支原体的快速诊断可对本病的防治提供重要依据, 病理学观察为探明本病的发病机理有着重要的参考意义。

本研究系统性地从猪肺炎支原体疑似发病猪临床剖检诊断、PCR 检测确诊, 并进一步地利用 HE 染色观察猪肺炎支原体确诊猪肺部的病理学变化。经临床剖检诊断和 PCR 检测确诊, 9 头疑似猪肺炎支原体发病猪只中有 8 头确诊为猪肺炎支原体阳性。病理学观察显示, 病变区域肺泡、细支气管和毛细血管管腔压缩变形, 并充满大量炎症细

# 大食蚁兽功能失调性子宫出血的诊断与治疗

张天佑<sup>1</sup>, 马祥<sup>2\*</sup>

(1. 广州长隆野生动物世界, 广东 广州 511430;

2. 北京爱德士元亨生物科技有限公司, 北京 100301)

**摘要:**通过使用B超、X光机、CT及血液检测手段, 成功诊断与治疗了一例功能失调性子宫出血的食蚁兽病例, 取得了较好的疗效, 并于半年后成功怀孕繁殖成功。

**关键词:**功能失调性子宫出血; 诊断; 治疗

**中图分类号:**S858.9 **文献标识码:**C **文章编码:**1005-8567(2019)02-0028-03

## 1 病历简介

长隆动物世界大边繁殖场兽类检疫班新一区C栋大食蚁兽2#, 母, 年龄20岁, 体状良好, 精神状态良好, 活跃, 每天正常采食量为2.5~4 kg, 已生产过1胎。2016年4月23日早上发现地面有少量暗红色点状的血迹, 后肢无力、喜卧, 废食。下午4点再次发现排出鲜血, 用注射器收集量约10 mL。呼吸每分钟22次, 作对症治疗, 进行止血、止痛、抗感染, 补充能量及维生素治疗。2~5天后有所缓解, 每天仍排暗红色血液约5 mL, 少量暗黑色血块, 采食恢复至0.9kg左右, 精神状态欠佳, 不愿活动。第6天早上发现从阴门处排出大量暗红色血凝块, 约0.035 kg凝固成团的血块, 精神沉郁, 卧箱内不愿活动。徒手采血做常规检测及送检做激素六项检查。第7天早上发现笼箱底大量流动的鲜红色血液, 进行现场会诊决定进行麻醉, 采用CT、X光、B超, 内窥镜仪器设备进行检查诊断, 之后采用药物进行治疗, 并使用地塞米松注射治疗。之后连续8天未见有血流出, 精神活跃, 常在水池及外运动场活动, 采食均在1 kg左右, 发病后第14天早上发现在水池内排4大块暗红色血凝块, 重约0.25 kg。第15天再次麻醉进行宫腔镜检查, 通过补充雌激素, 恢复了子宫功能, 出血症状得到解决。

## 2 临床检查

### 2.1 影像学检查结果

影像学检查结果见图1-图8(图5-7见第52页), 4月28日在停食4小时后进行诱导麻醉, 后上呼吸麻醉机麻醉, 经CT、X光、B超检查发现子宫腔内有大量血凝块, 用B超作腹部扫查, 作纵切、横切及不同位置扫查, 发现大食蚁兽盆腔与人类盆腔相似, 子宫增大, 位置前置, 子宫腔内膜增厚, 有明显暗区, 约为27 mm×15 mm, 附件回声清晰无异常;马上进行清宫术, 利用人类扩宫器进入到子宫, 探测到子宫深度约27 cm, 直径约6.9 cm, 用卵圆钳及刮钳进行初步清理, 最后用吸引器进行了整刮, 清理出约400 mL血凝块及一些内膜, 但因考虑到麻醉时间的关系, 明显感觉右上角无完全清理干净, 有血凝块的存在, 子宫内膜脱落不全。

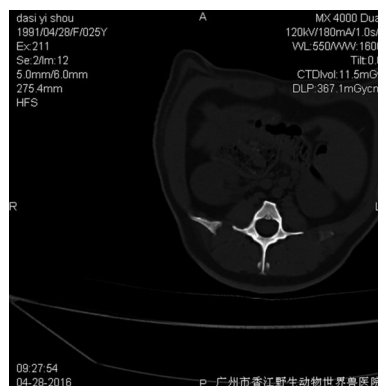


图1 CT图像显示子宫内膜增生不完整

收稿日期:2018-12-11

作者简介:张天佑(1976-), 男, 广东翁源人, 兽医师, 从事野生动物保护医疗工作。E-mail:tigervet@163.com

\*通讯作者:马祥(1980-), 男, 广东南雄人, 硕士, 兽医师。从事动物健康管理工。E-mail: maxiang116@163.com

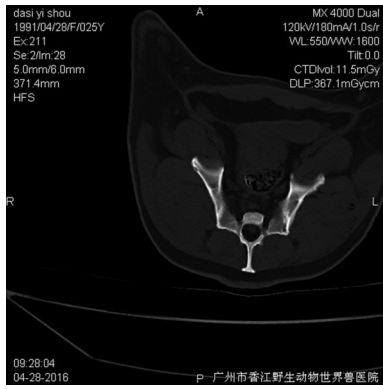


图2 CT图像显示子宫壁增厚



图3 X光检查盆腔未发现异常



图4 B超检查



图8 在阴道取出的血凝块

2.2 粪便潜血检查结果:潜血阴性。

2.3 血液常规结果

由表1可得该动物发病时白细胞指数明显升高,治疗当天仍处于较高水平;淋巴细胞、单核细胞指数无明显变化;中性粒细胞指数明显升高,因此白细胞数量增多主要以中性粒细胞增多为主,中性粒细胞增多原因有急性感染或炎症、急性溶血、广泛性的组织损伤或坏死、急性中毒、急性失血等,红细胞数量与红细胞压积偏低、血红蛋白浓度低提示可能存在贫血或出血<sup>[1-3]</sup>。血红蛋白数量在4月28日当天第二次检查时有下降,提示有出血;血小板在发病时显著降低,提示可能有感染或者骨髓抑制或自体免疫性疾病,会继发凝血疾病。

3 性激素六项检测

由表2得除E2含量远高于正常食蚁兽的检测值外,其他激素含量相对正常。E2浓度升高会引起子宫内膜增生、腺体数量增加,宫颈粘液的量和理化性质也发生改变;E2浓度达到40 pg/mL时,子宫内膜已经增生到一定程度,会发生撤退性出血<sup>[4]</sup>。

表2 性激素六项检测结果

项目	含量	单位
促卵泡素(FSH)	<1.00	IU/mL
促黄体生成激素(LH)	<0.20	pg/mL
泌乳素(PRL)	<1.00	ng/mL
雌二醇(E2)	44.4	pg/mL
孕酮(Prog)	0.18	ng/mL
睾酮(TESTO)	89.51	ng/dL

4 诊断

由于正常雌性食蚁兽的E2平均值是6.3 pg/mL,而患病的食蚁兽的雌激素水平检测值为44.40 pg/mL,远高于正常值。因此诊断为雌激素水平失调造成子宫功能性出血。

表1 血液常规检查结果

日期	白细胞 10 <sup>9</sup> /L	淋巴细胞 10 <sup>9</sup> /L	单核细胞 10 <sup>9</sup> /L	中性粒细胞 10 <sup>9</sup> /L	红细胞 10 <sup>12</sup> /L	血红蛋白 g/L	血小板 10 <sup>9</sup> /L	红细胞压积
参考范围	6.4-10.2	0.9-2.9	0.5-0.9	4.2-7.3	2.6-4.7	13.2-18.7	80-145	34-50
4.28	16.3	1.3	0.9	12.5	2.64	14.7	46	29.7
4.28	12.5	0.9	0.5	9.4	1.8	9.4	33	20.2
5.5	16.1	1.8	0.7	13	2.64	14.6	102	30.9

## 5 治疗

### 5.1 针对性止血

注射止血敏2 mL/次,维生素K1 1 mL/次,肾上腺色素踪2 mL/次;口服K4片4 mg/次,安络血片100mg/次,抗宫炎片6片/次,宫血宁片6片/次。

### 5.2 抗菌消炎

注射头孢曲松3 mg/kg,地塞米松0.01 mg/kg。

### 5.3 激素疗法

口服雌激素“达英-35”1 mg/kg,一天一次,连用5天。

## 6 结果与分析

### 6.1 发病原因分析

引起子宫出血的原因有很多,有全身性因素(搬迁应激)、医源性因素、子宫因素。本次引起子宫出血的原因,是因为生殖激素释放紊乱,导致反馈功能失调、排卵和黄体功能障碍而引起出血。由于黄体功能不足,月经周期中有卵泡发育及排卵,但黄体过早衰退或黄体期孕激素分泌不足会导致子宫内膜分泌不足<sup>[5]</sup>。孕激素水平低下,会导致子宫内膜增生<sup>[6]</sup>。黄体萎缩不全,雌孕激素不能迅速下降,使子宫内膜脱落不全,子宫内膜由于激素水平的失衡不能如期脱落,反而出现不规则的脱落,导致出血期延长,血量增加<sup>[7]</sup>。排卵期出血是因为排卵期激素分泌量出现短暂下降,使子宫内膜失去激素的支持而出现部分子宫内膜脱落引起撤退性出血,当雌激素分泌量足够时,子宫内膜又会被修复而达到止血<sup>[8]</sup>。

### 6.2 对出血的控制

根据血液检测结果显示,血小板数值严重偏低,对于这个病例的出血,采用各种止血药物的效果均不理想,出血时间长及出血量大,导致了动物机体抵抗力急剧下降。对于常规止血效果差的病例,我们应该多考虑机体免疫力的问题,才能更进一步的检查并做出准确诊断。

### 6.3 确诊疾病的性质

本病例进行了全面的系统的检查,包括采用粪便潜血检查、血液检测、激素的检测,B超、X光、CT、内窥镜的检查,最后确诊疾病的性质。

### 6.4 讨论及评估治疗方案

对本病例每天早会进行讨论治疗方案及评估治疗结果,进行3次现场会诊包括了外请专家会诊,对于疑难病例,重点病例多采取会诊或外请专家的方法可以取得明显的效果。

### 6.5 子宫结构与人类相似

通过B超、CT及内窥镜发现大食蚁兽的子宫中单一子宫体结构,验证食蚁兽是单胎生殖动物,这种动物的子宫结构与人类相似。

### 6.6 加强动物观察

在发病的初期,对疾病的诊断是有一定的困难,由于大食蚁兽是在水中排便的特性,一时难以判断出血是在消化道还是生殖道,加强动物观察特别重要。

## 参考文献

- [1] 焦阳. 失血性休克过程中巨噬细胞外泌体促进中性粒细胞坏死的机制研究[D]. 硕士学位论文. 上海: 第二军医大学, 2017.
- [2] 李冬梅, 马建华. 背痛高乳酸血症低钠血症淋巴结肿大[J]. 中国医师进修杂志, 2005, 28(21): 59-60.
- [3] 马清花. 兽医临床上几类常见动物贫血症的特点和鉴别[J]. 现代畜牧科技, 2014(4): 170-170.
- [4] 李美蓉. 更年期和老年期妇女常见病的现代诊断与治疗[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001.
- [5] 黄爽. 补肾活血法治疗肾虚型黄体功能不健性月经失调的临床研究[D]. 硕士学位论文. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [6] 郝梅花, 谢梅青. 无排卵和子宫内膜病变关系的研究进展[J]. 中国计划生育和妇产科, 2014(3): 7-10.
- [7] 王莉. 功血冲剂治疗肝肾阴虚型有排卵性功血的临床研究[D]. 硕士学位论文. 南京: 南京中医药大学, 2006.
- [8] 洪进德. 热球及宫腔镜电切子宫内膜去除术治疗功能失调性子宫出血疗效的meta分析[D]. 硕士学位论文. 济南: 山东大学, 2010.



# 一例大肠杆菌和低致病性禽流感合并感染蛋鸡的诊治

张强<sup>1</sup>, 宋志勇<sup>2\*</sup>

(1. 霍州市畜牧服务中心, 山西 霍州 031400;

2. 山西省畜牧兽医学校, 山西 太原 030024)

**摘要:**大肠杆菌是条件性致病菌, 当机体抵抗力下降时, 常与其它因素一起表现为混合感染, 给疾病诊断与控制带来一定困难, 需要采取综合防控措施才能取得较好效果。

**关键词:**大肠杆菌; 疫病; 混合感染

**中图分类号:**S858.31 **文献标识码:**C **文章编码:**1005-8567(2019)02-0031-02

大肠杆菌是条件性致病菌, 当机体抵抗力强时, 不致病; 当饲养环境改变、饲料不全价、抗体水平低时, 常与其它因素一起表现为混合感染, 给疾病诊断与控制带来一定困难<sup>[1]</sup>, 因此, 生产中对大肠杆菌控制有重要意义。笔者在临床实践中遇到一例大肠杆菌混合感染的鸡群, 通过综合防控措施, 取得了较好效果, 现报道如下, 以供同仁们参考和指导。

## 1 病例

山西省太谷县某养殖户饲养京红蛋鸡 5300 只, 日龄约为 200 天。这批鸡在 90 天时曾发生过滑液囊炎, 使用气囊卫士(主要成份糖萜素, 一种免疫调节剂)和杆菌肽治疗后病情得到控制; 于两个月前做禽流感苗, 1 个月前做新城疫苗。近日来又发病, 出现呼吸道症状, 笔者应邀前去诊治。

## 2 现场诊断

### 2.1 问诊

第一天下午有少量鸡咳嗽, 第二天咳嗽数量明显增多, 咳嗽症状加重, 除能听到咳咕咳咕声, 偶尔也能听到怪怪的尖叫声。

### 2.2 临床诊断

鸡群大多数鸡精神尚可, 采食饮水基本正常; 部分鸡有甩头现象伴有咳嗽, 有的流鼻涕, 有的表现鼻部肿胀, 随机挑选几只鸡手按压鼻部均能挤出淡黄色粘稠鼻涕; 粪便大多呈绿色。鸡舍饲养环境较差, 通风不良, 臭味明显。

### 2.3 剖检变化

对两只死亡鸡进行剖检, 见胸肌均成暗红色; 心包腔内均有明显的乳白色干酪样丝状物; 腹气囊内有明显的淡黄色干酪样丝状物或团块物; 腹腔内充满卵黄样凝固物, 卵泡破裂、出血; 脾肿大是正常脾 2 倍左右; 肾肿大, 明显花斑; 两只鸡气管均出血且气管内均有乳白色粘稠样物; 一只鸡支气管内明显的淡黄色干酪样凝块, 另一只鸡支气管变化不明显。

### 2.4 实验诊断

采取病料进行肉汤增菌培养, 12 小时培养基明显混浊, 细菌革兰氏染色为阴性小杆菌; 禽流感抗体检测, 抗体为 4log<sub>2</sub>。

### 2.5 初步印象

经临床症状、病理剖检、实验室诊断, 初步诊段为大肠杆菌和低致病性禽流感混合感染。

收稿日期: 2019-02-02

作者简介: 张强(1985-6), 男, 山西霍州人, 专科, 从事禽病防治工作。

\*通信作者: 宋志勇, 1988 年毕业于山西农业大学兽医专业, 目前在山西省畜牧兽医学校任教, 从事教学临床实践 30 余年。

E-mail: sxtyszy@163.com

### 3 防治措施

#### 3.1 综合措施

清扫鸡舍、消毒,改善鸡舍饲养小环境;适时通风,保证鸡舍内空气流通;定期洒水,以防鸡舍内空气干燥。

#### 3.2 治疗

所用药物:疫情(主要成份维生素C)、支呼净(甘草)、气囊卫士(糖萜素)。

使用方法:上午疫情600g、支呼净1200g混合饮水;下午气囊卫士1100g混合饮水,尽量在6~8小时饮完。

#### 3.3 免疫

病情控制后两天,对这批鸡进行禽流感饮水免疫。

### 4 效果观察

经过综合防控措施,及时免疫,一周后鸡群恢复健康。

### 5 讨论与体会

#### 5.1 与滑液囊的关系

这批鸡在90天左右患过支原体滑液囊炎,虽经过治疗病情得到控制,但造成免疫功能的低下,使得对其他疾病的抵抗力下降。

#### 5.2 与鸡舍环境的关系

鸡舍饲养环境差,通风不良,极易引发条件性大肠杆菌的繁殖而致病。鸡舍内干燥容易使呼吸道粘膜受损,防防御功能降低,随着尘埃飞扬,大肠杆菌大量繁殖且入侵鸡只呼吸道,引发呼吸道症状。鸡有9个气囊,呼吸道感染常引起气囊炎。鸡横膈膜不发达,呼吸道感染极易引起腹膜炎。

#### 5.3 与抗体的关系

抗体水平高时,机体抵抗力强,可抵抗病原入侵。本群鸡流感抗体水平低下,是引发本鸡场发病的主要原因之一,同时又易混合感染大肠杆菌。

### 5.4 建议

#### 5.4.1 选择优良的鸡苗

好的鸡苗是鸡只健康的前提和保障,购进鸡苗时一定选择好的种鸡厂,优质的鸡苗在饲养过程中省心、省力、省事。

#### 5.4.2 给鸡只提供适宜的饲养环境

保证鸡只生活所需的温度、湿度,通风。鸡的汗腺不发达,环境温度过高,散热障碍,鸡的采食下降,影响鸡的增重和生产性能;温度过低,会消耗鸡只的体能,增加饲料成本;鸡舍空气干燥,呼吸道粘膜受损,增加呼吸道病变,湿度宜保持在50~60%;要适时适度通风,鸡的代谢旺盛,对氧的需求量大,通风不良,会影响鸡的代谢,使鸡的抵抗力下降。

#### 5.4.3 提供全价优质饲料

养殖户目前采用的饲料原料如玉米、豆粕、麸皮等,在保存和使用过程中往往会出现霉菌毒污染的问题,市场上的脱霉剂多数是物理吸附剂,对玉米赤霉毒素、呕吐毒素有吸附率较低,造成饲料霉菌毒素超标,对雏鸡来说影响生长增重,对成年鸡影响生产性能,现有新型菌制解毒脱霉剂,生物吸附、物理吸附、肠内降解共同作用,对常见的霉菌毒素有很好的吸附效果。

#### 5.4.4 制定合理免疫程序

试验表明:禽流感抗体水平在 $5\log_2$ 以上、新城疫抗体水平 $8\log_2$ 在以上,起到完全免疫保护作用<sup>[2]</sup>,而养殖户尤其是小型鸡厂,抗体水平较低,这也是临床上流感、新城疫和大肠杆菌、沙门氏菌、支原体混合感染的主要原因。

### 参考文献:

- [1] 曹军平,程汉.动物微生物与免疫第二版[M].北京:中国林业出版社,2016,1:59-60.
- [2] 李生涛.禽病防治第三版[M].北京:农业出版社,2015,9:27-32.

# 鹅细小病毒灭活苗佐剂筛选研究

刘佳佳, 苏晓娜, 王占新, 覃健萍, 曾凡桂, 鲁俊鹏\*

(温氏食品集团股份有限公司, 广东省畜禽健康养殖与环境控制企业重点实验室,  
广东 新兴 527439)

**摘要:**本研究以纯化后的番鸭源鹅细小病毒(GPV)现地分离株FB株-F7鸭胚培养毒株作为灭活苗研究种毒, 接种12日龄鸭胚, 获得较高滴度的鸭胚病毒液用于灭活疫苗的制备。灭活的病毒液半成品抗原分别用赛比克公司的Montanide ISA 71、Montanide ISA 201、Montanide ISA 763、IMS 1313和复合佐剂5种佐剂制备了鹅细小病毒灭活疫苗, 分别进行了雏番鸭安全性试验及免疫效果对比试验。通过对比不同佐剂小鹅瘟灭活疫苗的安全性及免疫效果, 初步确认复合佐剂为鹅细小病毒FB-F7株灭活苗最佳免疫佐剂。

**关键词:**小鹅瘟; 佐剂; 安全性; 免疫效果

**中图分类号:**S858.33 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2019)02-0033-03

小鹅瘟(Gosling Plague, GP), 又称为鹅细小病毒病(Goose Parvovirus)或Derszy's氏病<sup>[1]</sup>。主要感染30日龄内的雏鹅和雏番鸭, 引起渗出性肠炎、心脏、肝和脾等实质器官病变的急性或亚急性败血性传染病<sup>[2]</sup>。该病致病性强、发病率和致死率高、传播性快。目前, 用于主动免疫的生物制剂主要是弱毒苗, 用于被动免疫的生物制剂主要是抗血清。弱毒疫苗具有免疫剂量小, 免疫原性好等优点, 但雏鹅、鸭用弱毒疫苗容易受母源抗体的干扰, 使其不能发挥作用, 免疫必须是依据母源抗体的水平而确定初免时间。根据上述免疫学基本原理, 本试验采用本地区分离的番鸭源鹅细小病毒强毒制成灭活苗, 并进行了不同佐剂的筛选评估, 通过对比不同佐剂灭活疫苗的安全性及免疫效果, 初步确认复合佐剂为鹅细小病毒灭活苗最佳免疫使用佐剂。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

番鸭源鹅细小病毒FB株鸭胚F3分离株由本实验室分离并储存; 甲醛购自芸荃生物; Montanide

ISA 71、Montanide ISA 201、Montanide ISA 763A、IMS 1313等佐剂由SEPPIC公司提供; 复合佐剂由广州俏灵儿公司提供; 实验用鸭胚购自云城某孵化场。

### 1.2 病毒增殖与纯化

将实验室保存的鹅细小病毒FB株F3接种12日龄的鸭胚进行增殖, 将收集到的F4尿囊液采用有限稀释法对鹅细小病毒FB株进行纯化, 即鹅细小病毒FB株F4尿囊液梯度稀释( $10^{-3}$ - $10^{-8}$ ), 感染12日龄鸭胚, 37℃生化培养箱培养10天, 收集48小时后死亡最大稀释度的鸭胚尿囊液, 以此收集的尿囊液以上述同样的方法接种鸭胚纯化2代, 将纯化后鹅细小病毒FB-F7株作为鹅细小病毒灭活苗的种毒。将此种毒继续接种鸭胚进行病毒液的增殖, 收集尿囊液制备鹅细小病毒的半成品抗原, 测定小鹅瘟FB-F7株种毒ELD<sub>50</sub>以及半成品抗原灭活前ELD<sub>50</sub>。

### 1.3 灭活苗的制备

将鹅细小病毒FB株半成品尿囊液用2‰的甲醛进行灭活, 经检验合格后, 按照不同佐剂灭活疫苗的相关规定方法进行制备与检验, 每个佐剂样

收稿日期:2018-11-11

作者简介:刘佳佳(1988-), 女, 山东人, 硕士, 主要从事禽病防控。E-mail:1255370172@qq.com

\*通讯作者:鲁俊鹏(1980-), 男, 山东人, 博士, 主要从事禽病防控。E-mail: junpenglu@126.com

品制备灭活疫苗 250 ml。具体佐剂信息见表 1。

表 1 试验佐剂信息表

佐剂名称	佐剂类型	配比(佐剂:抗原)	备注
71	油包水	70:30:00	质量比
201	水包油包水	50:50:00	质量比
763	油包水	70:30:00	质量比
1313	水包油	50:50:00	质量比
复合佐剂	油包水	3:02	体积比

### 1.4 鹅细小病毒FB株灭活苗安全性检验

将制备好的各佐剂鹅细小病毒FB株灭活苗接种 1 日龄的雏番鸭进行安全性检验, 每只胸肌注射 1 ml, 观察 2 周, 如鸭只没有异常反应且注射部位未出现炎症反应, 则表明该佐剂鹅细小病毒FB株灭活疫苗对鸭只安全。

### 1.5 雏番鸭免疫效力试验

每个佐剂样品鹅细小病毒FB株灭活疫苗分别以 0.2 ml/只剂量, 胸肌注射 7 日龄雏番鸭 15 只, 于接种后的 1 周、2 周、3 周和 4 周静脉采血 10 只鸭进行鹅细小病毒血清中和抗体效价检测。

### 1.6 中和抗体的检测

按照 2015 版中国兽药典细胞中和抗体测定标准方法进行操作。血清用前 56 °C 灭活 30 分钟, 按照 Reach-Muench 法计算出能保护 50% 细胞孔不出现 CPE 的血清稀释度为该血清的中和抗体效价。

## 2 结果与分析

### 2.1 种毒以及半成品抗原灭活前 ELD<sub>50</sub> 测定

利用 Reed-Muench 法计算鹅细小病毒FB株-F7 种毒以及半成品灭活前 ELD<sub>50</sub>, 结果为均 10<sup>4.5</sup> ELD<sub>50</sub>/0.2 ml。

### 2.2 不同佐剂配置疫苗的物理性状

Montanide ISA 71、Montanide ISA 763 和复合佐剂为油包水性佐剂, 疫苗外观为乳白色, 为均质乳剂, 滴入水中呈乳滴状不会扩散; 201 佐剂为水包油包水性佐剂, 疫苗外观亦为乳白色, 为均质乳剂, 滴入水中呈乳滴状不会扩散; 1313 佐剂水佐剂, 疫苗外观为米黄色, 为均质悬液, 滴入水中能迅速的与水混匀。

### 2.3 不同佐剂配置疫苗安全性试验

本试验制备的 5 种佐剂的鹅细小病毒FB株灭

活苗各接种 1 日龄雏番鸭后, 接种部位剖检均无炎症反应出现, 精神和食欲均正常。试验证明制备的 5 种鹅细小病毒FB株灭活苗安全性均较好。

### 2.4 5 种佐剂鹅细小病毒灭活苗免疫雏番鸭后中和抗体检测结果

5 种佐剂鹅细小病毒FB株灭活苗免疫雏番鸭后中和抗体消长规律结果见图 1, 免疫后 4 周鹅细小病毒中和抗体滴度呈现先下降后上升的趋势, 免疫后 1~2 周鹅细小病毒中和抗体不升反降, 可能与母源抗体下降, 灭活苗抗体还未转阳有关, 免疫 2 周后灭活苗中和抗体开始转阳, 呈上升趋势。复合佐剂、Montanide ISA 71、Montanide ISA 201、IMS 1313 佐剂与抗原对照相比差异显著 ( $P < 0.05$ ), 免疫效果较好; Montanide ISA 763 与抗原对照组相比差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 免疫效果较差。从下图中中和抗体消长曲线结果中还可以看出免疫效果最好的为复合佐剂; 71 佐剂在免疫后 3、4 周中和抗体虽然较高, 但是在免疫后 2 周中和抗体效价较低; 1313 佐剂为水佐剂免疫后 1~2 周表现出较高的中和抗体水平, 随后出现下降趋势。各试验组中和抗体消长曲线见图 1。

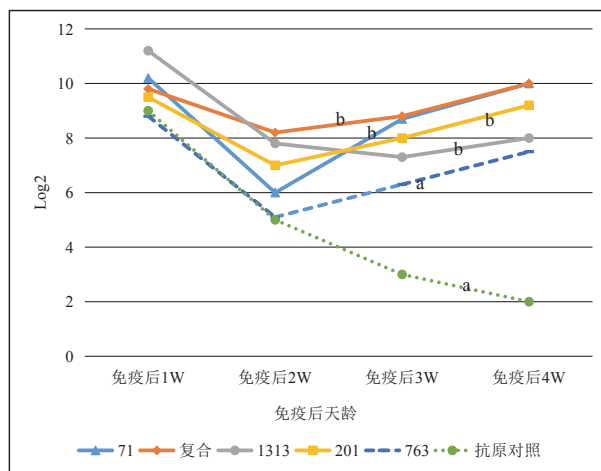


图 1 各试验组中和抗体消长曲线

注: 标有不同字母者表示组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 标有相同字母者表示组间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

鹅细小病毒能够感染鹅、番鸭, 且感染发病日龄较早, 近年来也有文献报道较大日龄的鸭只也

会感染鹅细小病毒。目前,用于主动免疫的生物制剂主要是弱毒苗,用于被动免疫的生物制剂主要是抗血清。然而鹅细小病毒弱毒苗存在毒力返强以及干扰母源抗体的情况,抗血清存在批次不稳定的现象,虽然灭活苗具有安全性好、不干扰母源抗体的优点,但是灭活苗存在抗体升高较慢的现象。很多文献报道佐剂可以提高抗体水平,而且不同的佐剂免疫效果亦不一样<sup>[3-4]</sup>。因此本研究通过不同佐剂鹅细小病毒灭活苗免疫效果对比,旨在寻找安全性好,能显著提高免疫效果的佐剂。本研究通过5种佐剂安全性以及免疫效果对比研究,发现油乳剂复合佐剂免疫效果最好,双向佐剂 Montanide ISA 201,水佐剂 IMS 1313亦具有很好的

免疫效果。本研究为以后免疫佐剂的筛选及免疫程序的制定打下理论基础。

#### 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. 11: 65.
- [2] KISARY J. Derzsy's disease of geese. Virus Infections of Birds (McFerran J B and McNulty M S eds) [J]. Elsevier Science Publishers B. V. 1993. 153-165.
- [3] 张雪花, 张道华, 陆吉虎, 等. 高效佐剂对猪细小病毒和圆环病毒二联灭活疫苗的免疫增强效果[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(2): 361-367.
- [4] 蒋康富, 白娟, 李玉峰, 等. 脑心肌炎病毒灭活疫苗佐剂的筛选及其效力评价[J]. 中国预防兽医学报, 2015, 35(2): 242-246.

## 《广东畜牧兽医科技》(双月刊)

(1976年创刊, 大16开本, 正文52页)

ISSN 1005-8567

CN 44-1243/S

主管单位: 广东省农业科学院

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

定 价: 每期定价 10.00 元, 全年 60.00 元(含平寄邮费)

订阅方式: 本刊实行自办发行。读者可通过邮局直接汇款至本刊编辑部。

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

地 址: 广州市天河区五山大丰一街1号103室《广东畜牧兽医科技》编辑部(邮编: 510640)

电 话: 020-87576452

传 真: 020-87576452

E-mail: gdxmsykj@163.com

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

## 玉竹多糖的提取与脱蛋白的工艺研究

温馨园<sup>1</sup>, 温馨<sup>1</sup>, 王甜<sup>2</sup>, 刘汉清<sup>2</sup>, 李美娣<sup>1</sup>, 涂玉蓉<sup>1</sup>, 江耀伦<sup>1</sup>, 武力<sup>1,2\*</sup>

(1. 广州华农大实验兽药有限公司, 广东省兽用中药与

天然药物工程技术研究中心, 广东 广州 510642;

2. 华南农业大学, 广东 广州 510642)

**摘要:**研究不同提取方法对玉竹提取效果的影响, 以纯化水为提取溶剂, 分别采用溶剂提取法、超声提取法、酶辅助提取法提取玉竹。研究表明:在试验条件下不同提取方法对玉竹的影响效果不同, 其中超声提取法效果最好, 提取率为 20.98 mg/mL。并通过正交实验法对玉竹多糖的超声提取法进行优化。超声提取法的最佳工艺为料液比 1:20, 超声时间 60 min, 超声温度 100 ℃, 提取次数 3 次。试验结果所得玉竹多糖提取率为 35.52%, 并进一步对玉竹多糖进行酶法脱蛋白的纯化试验, 蛋白清楚率达 49.19%。

**关键词:**玉竹; 多糖; 提取工艺; 正交试验; 脱蛋白

**中图分类号:**S816.7 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2019)02-0036-06

玉竹为百合科植物玉竹(*Polygonatum odoratum* (Mill.) Druce)的干燥根茎, 又名尾参、玉参、葳蕤、铃铛菜, 味甘、微寒, 具有滋阴润肺、养胃生津的功能, 用于肺燥干咳, 胃热, 热病伤阴, 虚劳发热等症<sup>[1]</sup>, 玉竹也一直作为一种生津止渴的对健康有益处的功能食品, 在我国已有两千多年的用药历史<sup>[2]</sup>。玉竹中含有甾体皂苷、生物碱、黄酮、强心苷、多糖等多种成分<sup>[3]</sup>, 其中含量较高的玉竹多糖可能是其药理作用的主要有效成分之一。玉竹多糖具有重要的生物活性功能, 如免疫调节、抗缺氧、抗衰老、降血脂、降血糖<sup>[4]</sup>等药理活性。蒋春茂<sup>[5]</sup>等报道了玉竹多糖无论是单独还是协同 PHA 刺激外周血 T 淋巴细胞, 均不同程度地表现出增强 T 淋巴细胞的活性。单颖<sup>[6]</sup>等报道了 3 种不同剂量的玉竹多糖都能提高脾 B 淋巴细胞转化刺激指数; 高剂量的玉竹多糖能够提高脾 T 淋巴细胞转化刺激指数; 玉竹多糖还能够显著提高衰老模型鼠的 CD8<sup>+</sup> 细胞数及降低 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 比值; 高剂量玉竹多糖能够明显得抑制脾淋巴细胞的凋亡。吴国

学<sup>[7]</sup>也研究指出玉竹能提高环磷酰胺造成免疫抑制模型小鼠胸腺、脾脏质量、吞噬指数、吞噬百分率, 促进溶血素、溶血斑形成, 提高淋巴细胞转化率; 与模型组相比可提高免疫抑制小鼠各免疫指数, 比较差异有统计学意义。黄生波<sup>[8]</sup>研究结果表明玉竹多糖能显著增强甲型 H7N9 流感病毒裂解疫苗经粘膜免疫的保护效果, 有望成为一种新型的粘膜佐剂进行更深一步的研究。Kato<sup>[9]</sup>等人的研究认为, 玉竹甲醇提取物能降低链脲佐菌素诱导的高血糖小鼠的血糖。玉竹属药食两用植物, 富含丰富的营养及化学成分, 并具有广泛的营养保健及药理活性的作用, 许多研究已证明植物多糖具有增强免疫、降低血压、抗炎、抗病毒、调节糖脂代谢等多种生理生化作用<sup>[10]</sup>。

传统的多糖提取工艺有水提醇沉法、碱提取法、酸提取法等, 这些方法不但操作流程复杂, 而且提取率低, 生产成本也高, 多糖纯度同样不高, 并且操作的周期过长, 不仅增加了提取工艺的成本和人力的消耗, 而且所得到的多糖品质也有不

收稿日期: 2018-12-23

资助项目: 2017 年天河区科技计划项目(201708YG006)

作者简介: 温馨园(1995-), 女, 本科, 主要从事新兽药开发。E-mail: 993870270@qq.com

\*通讯作者: 武力(1970-), 男, 博士, 高级兽医师。E-mail: 1187131629@qq.com

同程度的损耗。近年来,一些新型的提取方法如酶催化提取法、微波辅助提取法、超声辅助提取法、膜分离技术、超高压提取法等,这些方法与传统方法相比较,具有更加温和的提取条件、多糖纯度高和提取率高等优点,为得到高纯度与优质的多糖提供了更加简便和高效的方法<sup>[1]</sup>。本研究通过比较中药多糖常用的提取方法:水浸提法、超声波法和酶解法对玉竹多糖的提取效果,并采用正交试验对玉竹多糖最佳提取方法进行工艺优化,再以酶法脱蛋白,考察脱蛋白率,以期为玉竹多糖的开发利用提供理论参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 药品与试剂

玉竹,购于佛山万山红中药饮片实业有限公司;无水葡萄糖对照品,批号:110833-200904,中国食品药品检定研究院,纯度为100%;木瓜蛋白酶(源叶生物);水为纯化水;其他化学试剂均为分析纯。

### 1.2 仪器

TU-1901紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),AUW120D十万分之一分析天平(日本岛津),RV 10 Digital V旋转蒸发仪(德国IKA),HWS-24电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司),G-060S超声波清洗机(深圳市歌能清洗设备有限公司),DHG-9070A电热恒温鼓风干燥箱(上海申贤恒温设备厂),DFY-500粉碎机(温岭市林大机械有限公司),LXJ-IIB离心机(上海安亭科学仪器厂)。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 原料处理方法

将干燥的玉竹经粉碎后过24目筛,备用。

#### 1.3.2 对照品溶液的制备

取无水葡萄糖对照品60 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加水使溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取5 mL,置于100 mL量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得(每1 mL含葡萄糖30 μg)。

#### 1.3.3 供试品溶液的制备

精密量取供试品0.1 mL,置10 mL量瓶中,加水使至刻度,摇匀,即得。

#### 1.3.4 测定法

分别精密量取对照品溶液与供试品溶液各1 mL,分别置具塞试管中,精密加入5%苯酚溶液1 mL,摇匀,冲入硫酸5 mL,摇匀,置沸水浴中加热15 min,立即置冰水浴中冷却5 min,取出,放置至室温。同时做空白试验校正,照分光光度法<sup>[1]</sup>,在490 nm波长处分别测定吸收度,计算,即得。

#### 1.3.5 葡萄糖标准曲线的绘制

准确称取105℃下干燥2 h至恒重的葡萄糖0.100 mg,用蒸馏水定容至100 mL,摇匀后吸取100 μL定容至10 mL,即得100 μg/mL的葡萄糖标准溶液。精密吸取葡萄糖标准溶液0.1、0.2、0.4、0.6、0.8和1.0 mL于试管中,加蒸馏水补至1 mL,再分别加入5%的苯酚溶液1.0 mL,摇匀,迅速加入5.0 mL浓硫酸,摇匀后在室温下静置30 min,用分光光度计在490 nm处测其吸光值,做标准曲线。

### 1.4 玉竹多糖提取方法

#### 1.4.1 水浸提法

玉竹药材经粉碎后过24目筛,准确称量玉竹粉末5 g,料液比1:20(g/mL),90℃水浴,提取两小时,提取两次,合并两次提取液,浓缩到原提取液的1/20,三倍量的95%乙醇醇沉,离心后将沉淀定容至100 mL。

#### 1.4.2 超声波提取法

玉竹药材经粉碎后过24目筛,准确称量玉竹粉末5 g,料液比1:25(g/mL),70℃超声35 min,功率360 w,合并两次提取液,浓缩到原体积的1/20,三倍量的95%乙醇醇沉,离心后将沉淀定容至100 mL。

#### 1.4.3 酶解法

玉竹药材经粉碎后过24目筛,准确称量玉竹粉末5 g,料液比1:40(g/mL),酶量占玉竹重的2%,50℃水浴2 h,合并两次提取液,浓缩到原体积的1/20,三倍量的95%乙醇醇沉,离心后将沉淀定容至100 mL。

### 1.5 单因素试验

以纯化水为提取剂,分别就料液比、超声温度、超声时间和浸提次数做单因素实验。

#### 1.5.1 料液比

固定超声温度50℃,超声功率80 W,超声作用时间15 min,超声次数2次,考察不同料液比

(g/mL) 1:10、1:15、1:20、1:25、1:30对玉竹多糖提取率的影响。

### 1.5.2 超声时间

固定超声次数2次,其他条件采用以上选出的结果,考察提取时间15、30、45、60 min对玉竹多糖提取率的影响。

### 1.5.3 超声温度

固定超声作用时间15 min,超声次数2次,采用以上选出的结果,考察超声温度40、70、90、100℃对玉竹多糖提取率的影响。

### 1.5.4 浸提次数

采用以上选出的结果为固定条件,提取4次,测定每一次玉竹多糖的提取率。

## 1.6 正交试验

根据不同提取方法对玉竹多糖提取效率的试验结果,以料液比(A)、超声时间(B)、超声温度(C)、浸提次数(D)为考察因素,每个因素设计3个水平,以多糖含量和提取率作为考察指标,采用L9(3<sup>4</sup>)正交表进行试验(见表1),筛选玉竹多糖最佳提取工艺。

表1 正交实验因素水平表

水平	因素			
	料液比 (A)	超声时间 min (B)	超声温度 ℃ (C)	浸提次数 (D)
1	15	15	40	1
2	20	30	70	2
3	25	60	90	3

## 1.7 酶法脱蛋白

### 1.7.1 玉竹蛋白液的蛋白去除方法

取制备好的多糖溶液,加入一定量的木瓜蛋白酶,配成酶含量0.2%的溶液,pH中性,在60℃水浴条件下酶解2 h,反应后沸水浴灭活5 min,抽滤,除去沉淀物。取上清液待测。

### 1.7.2 考马斯亮蓝染色液的制备

精密称取50 mg考马斯亮蓝G250,用95%乙醇25 mL溶解,再加入85%(W/V)磷酸50 mL,蒸馏水定容至500 mL,浓度为0.01%。

### 1.7.3 蛋白质标准曲线的绘制

精密称取牛血清白蛋白10 mg,如蒸馏水溶解并定容至100 mL容量瓶中,得浓度为0.1 mg/mL<sup>-1</sup>

牛血清白蛋白溶液。精密量取标准溶液0.2、0.4、0.6、0.8和1.0 mL,分别置于试管中,加蒸馏水至1.0 mL,再分别加5 mL考马斯亮蓝染色液,混匀,放置3 min,以蒸馏水经相同处理后为空白对照,用紫外可见分光光度计在595 nm波长处测定,以牛血清白蛋白(BSA)的浓度为横坐标,吸光值为纵坐标,绘制蛋白质标准曲线。

### 1.7.4 样品溶液的测定

精密量取脱蛋白前后的玉竹多糖溶液各1 mL置于试管中,按照“蛋白质标准曲线绘制项下方法”进行操作,紫外-可见分光光度计在595 nm波长处测定,平行三次实验,取平均值,对照“蛋白质标准曲线”计算样品溶液中蛋白质的含量,按下述式计算蛋白质的脱除率与多糖的保留率。

$$\text{蛋白质脱除率}(\%) = \frac{\text{脱蛋白前的含量} - \text{脱蛋白后的含量}}{\text{脱蛋白前的含量}} \times 100\%$$

$$\text{多糖的保留率}(\%) = \frac{\text{脱蛋白后多糖的含量}}{\text{脱蛋白前多糖的含量}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 无水葡萄糖标准曲线的绘制

按1.3.2方法,于490 nm处测得吸光度(A)。以葡萄糖质量浓度(μg/mL)为纵坐标,吸光度(A)为横坐标,绘制吸光度(A)与葡萄糖质量浓度(C)的关系曲线,得回归方程: $y=199.54x+0.1689$ ,  $R^2=0.9994$ (如图1)。结果表明,该检测方法可用于玉竹多糖的准确评价。

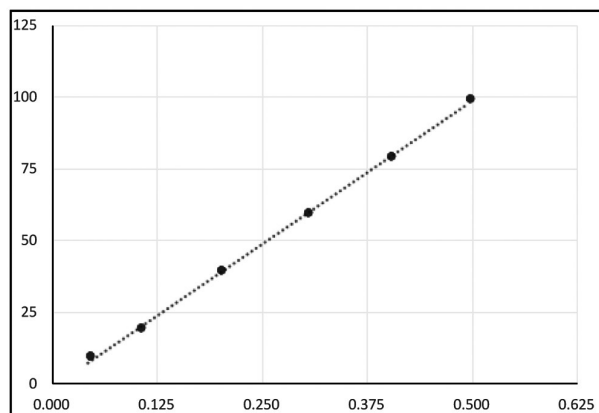


图1 无水葡萄糖标准曲线的绘制

### 2.2 不同提取方法对玉竹多糖提取率的影响

如图2,采用3种不同的提取方法对玉竹多糖



进行提取,并分析各种方法对多糖提取率的影响因素。热水浸提法提取玉竹多糖的条件为时间2 h,料液比1:20,温度90℃,共提取2次,多糖提取率为27.92%,此方法耗时较长,温度要求高,而且多糖提取率不高。用木瓜蛋白酶水解提取玉竹多糖时条件为温度50℃,时间2 h,物料比1:40,加酶量占玉竹重的2%,共提取2次,在此条件下玉竹多糖的提取率为29.96%,而且温度要求低。超声波提取法提取玉竹多糖的条件为时间35min,料液比1:25,温度70℃,功率60W,共提取2次,在此条件下玉竹多糖的提取率为40.35%,此方法耗时短,温度要求低,操作简单,比水提法和酶法辅助提取法的效率都要高出许多。

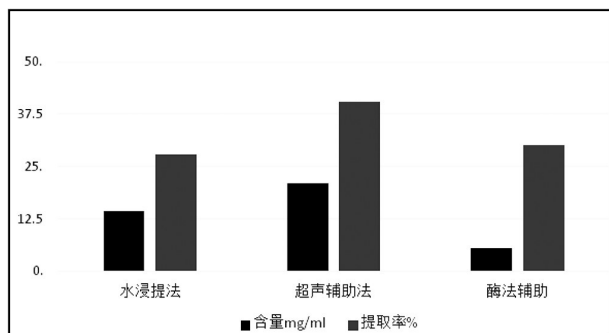


图2 不同提取方法对玉竹多糖提取率的影响

### 2.3 单因素试验

以纯化水为提取剂,选择对超声提取法有影响的料液比、超声时间、超声温度、和超声提取次数这四个因素进行单因素实验。

#### 2.3.1 料液比对玉竹多糖提取率的影响

如图3可知,当料液比为1:10~1:15时,玉竹多糖提取率明显增加,料液比为1:15~1:20时由增

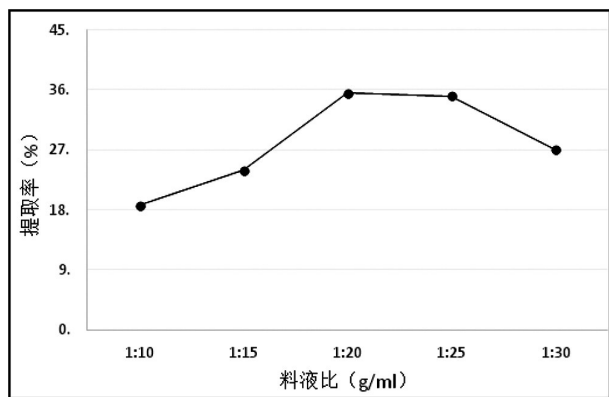


图3 料液比对玉竹多糖提取率的影响

长缓慢到增长逐渐加快,考虑是料液比较低时,多糖在溶剂中已达到饱和的状态,无法溶出更多,当料液比逐渐升高,达到1:20时,提取率可达到最大,料液比为1:25时提取率无明显变化;当料液比1:30时提取率有明显的下降,过大的料液比会增加超声波破碎细胞的阻力,使细胞破碎程度下降,还会使多糖的含量有所稀释,从而降低了多糖的提取率<sup>[12]</sup>。因此,综合以上各因素,选择最佳料液比为1:20。

#### 2.3.2 超声时间对玉竹多糖提取率的影响

如图4可知,当超声时间达到60 min时,提取率最高,考虑是因为时间的增加会使玉竹细胞破碎度逐渐增大,让多糖溶出量逐渐增加,随之提取率也有所提高;反之,超声时间一旦超过60 min,提取率明显降低,超声时间一旦过长,在增大有效成分的介质分子运动速度的同时也让杂质的穿透力增强,溶出也随之增多,使玉竹多糖的提取率也随之降低。并且,超声波具有一定的机械效应、热效应与空化效应,在长时间的超声作用下,机械效应会使大分子的多糖断裂,也会使溶剂快速产生大量的热能,使有效成分有所损耗,从而影响多糖的提取率<sup>[13]</sup>。因此,综合以上因素,超声波作用时间以60 min最佳。

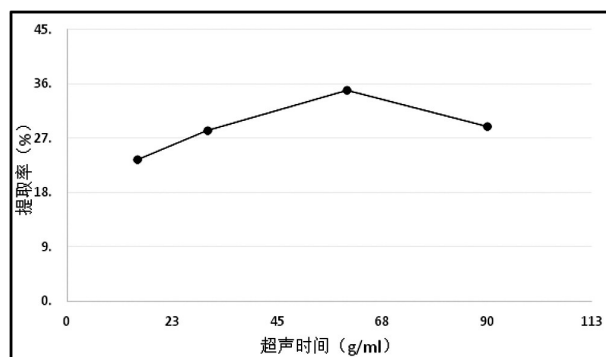


图4 超声时间对玉竹多糖提取率的影响

#### 2.3.3 超声温度对玉竹多糖提取率的影响

如图5可知,超声提取温度越高,玉竹多糖的提取率就越高,当温度为90℃时,提取率达到最高,说明超声提取未达到足够的温度时,超声波还不能使玉竹的细胞壁与整个生物体破裂,让其有效成分充分的溶出,但随着温度的逐渐升高,加速提取溶剂的分子运动,使提取溶剂与有效成分更

加充分的溶合<sup>[14]</sup>。但温度一旦高于90℃,多糖的提取率有明显的下降,考虑是在温度过高的情况下会使大分子的多糖断裂,影响提取率。因此,玉竹多糖的超声提取温度不宜超过90℃。

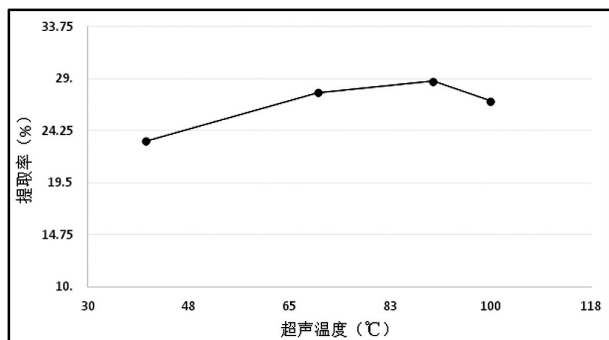


图5 超声温度对玉竹多糖提取率的影响

### 2.3.4 超声提取次数对玉竹多糖提取率的影响

如图6可知,当超声提取次数为3次时,已基本达到提取完全,超过3次提取率明显下降,考虑是超声次数过多会使杂质的穿透力增强,使玉竹多糖的提取率有所降低。因此,提取3次为最佳提取次数。

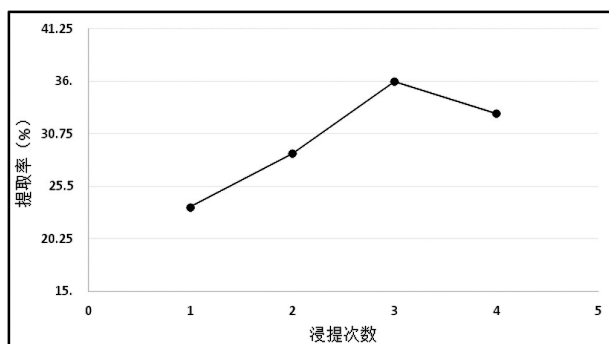


图6 超声提取次数对玉竹多糖提取率的影响

## 2.4 正交试验

选取料液比(A)、超声时间(B)、超声温度(C)、超声提取次数(D)这四个因素作为考察指标。采用L9(3<sup>4</sup>)正交实验设计,提取次数固定为2次,进行优化玉竹多糖的提取工艺条件,正交实验结果详见表2,方差分析结果详见表3。由表2中R值可知,影响玉竹多糖提取率的因素先后顺序是:超声提取次数>料液比>超声作用时间>超声温度。由表3方差分析结果可知,超声提取次数、料液比、超声作用时间对提取率的影响极为显著,超声温度对提取率的影响不显著。由k值大小可知,优化工艺组合为A<sub>2</sub>B<sub>3</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub>。此结果与单因素实验筛选

出的最佳条件组合相同。

表2 正交实验设计与结果分析

试验号	A	B	C	D	提取率(%)
1	1	1	1	1	23.55
2	1	2	2	2	23.85
3	1	3	3	3	35.37
4	2	1	2	3	35.52
5	2	2	3	1	28.05
6	2	3	1	2	32.24
7	3	1	3	2	27.94
8	3	2	1	3	28.26
9	3	3	2	1	25.24
k1	27.589	29.003	28.016	25.613	
k2	31.936	26.719	28.204	28.007	
k3	27.147	30.949	30.452	33.051	
R	4.789	4.23	2.436	7.438	

表3 方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	均方	F值	显著性
A	126.1	2	63.05	56.65	P<0.01
B	80.69	2	40.35	36.25	P<0.01
C	33.06	2	16.53	14.85	
D	259.49	2	129.74	116.57	P<0.01
误差	17.81	16	1.11		

## 2.5 酶法脱蛋白试验

### 2.5.1 牛血清白蛋白标准曲线的绘制

由图7可知,按1.6方法,在595nm处,以蛋白质的浓度(μg/mL)为纵坐标,吸光度(A)为横坐标绘制标准曲线。回归方程为:  $y = 357.55x - 10.308$ ,  $R^2 = 0.9966$ ,结果表明,在0~100 μg/mL质量浓度范围内线性关系良好。

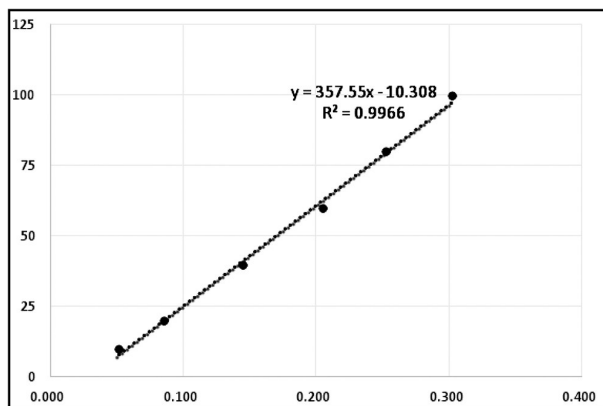


图7 牛血清白蛋白标准曲线的绘制

### 2.5.2 酶法脱蛋白后蛋白质的清除率与多糖的保留率

由图8可知,采用酶法对玉竹多糖液的蛋白质进行脱除,处理后,蛋白清除率为49.19%,多糖保留率为59.34%。

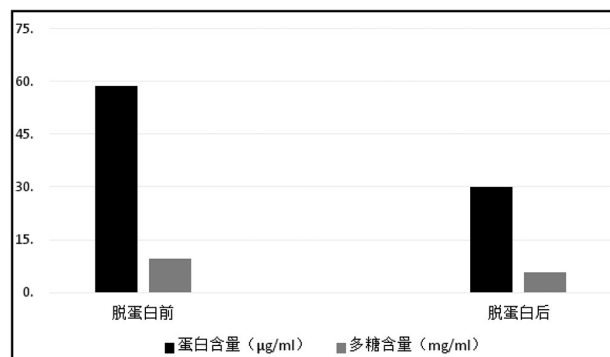


图8 脱蛋白前后蛋白质与多糖的含量对比

## 3 结论

1. 当溶剂为纯化水、料液比为1:20、提取温度为70℃、提取次数为两次的相同条件下,比较了水浸提法、超声辅助水浸提法、酶辅助法提取3种方法对玉竹多糖的提取效果,多糖提取率依次是14.24%、20.98%、5.48%。综合分析,超声辅助水浸提法所得玉竹多糖的得率最高。

2. 采用超声辅助水浸提法,水的来源广泛、价格低廉、使用过程中无毒无害,可以强有力的穿透天然产物的细胞,提取效果好。经过正交实验,提取工艺的优化参数为液料比1:20、超声时间60 min、提取温度100℃、提取次数为3次,在此条件下实验得到玉竹多糖的提取率为35.52%。

3. 运用木瓜蛋白酶来酶解蛋白的主要目的是使其成为相对分子质量较小多肽或者氨基酸,然后醇沉。一般情况下绝大多数的大分子多糖会出现沉淀,而分子质量相对较小的多肽和氨基酸则大部分保留于溶液中,因此,本文采用木瓜蛋白

质酶来酶解蛋白,酶用量为玉竹药材的0.2%,pH中性,在60℃水浴条件下酶解2 h,试验表明,蛋白脱除率达49.19%,多糖保留率为59.34%。

### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国兽药典2015年版二部[S].北京:化学工业出版社,2015:57.
- [2] 林琳,林寿全.黄精与玉竹的生药性状及组织特征比较[J].中草药,1994,25(5):261.
- [3] 梁海霞,李焕德.玉竹的药理活性研究进展[J].中南药学,2008,6:342.
- [4] 丁登峰,向大雄,刘韶,等.玉竹多糖的提取及其对链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠血糖的影响[J].中南药学,2005,3(4):222.
- [5] 蒋春茂,陈晓兰,陆广富,等.不同中药多糖体外对鸡外周血和脾脏淋巴细胞增殖能力的比较[J].江苏农业学报,2015,31(1):106~111.
- [6] 单颖,潘兴瑜,姜东,等.玉竹多糖对衰老模型鼠免疫功能的影响[J].中国老年学杂志,2007,1:27.
- [7] 吴国学.玉竹对小鼠免疫抑制调节作用的研究[J].中国医学创新,2013,10(9):013-014.
- [8] 黄生波.玉竹多糖对H7N9流感病毒裂解疫苗粘膜免疫的佐剂效力研究[D].硕士学位论文.长沙:湖南师范大学,2016.
- [9] KATO A, MIURA T. Hypoglycemic Action of the Rhizoma of *Polygonatum officinale* in Normal and Diabetic Mice [J]. *Planta Medica*, 1994, 60(2):201.
- [10] BEN AKR, BENG A, CHAABEN R, et al. Anti-obesity and lipid lowering effects of *Cymodocea nodosa* sulphated polysaccharide on high cholesterol-fed-rats [J]. *Archives of Physiology & Biochemistry*, 2015, 210-217.
- [11] 刘杨,王诗卉,刘云.3种方法提取的雨声红球藻多糖的理化性质及抗氧化活性比较[J].食品科学,2015,36(06):161-168.
- [12] 范三红,原超,刘艳荣,等.超声波辅助提取南瓜籽油及其脂肪酸组成研究[J].食品科学,2010,31(24):107-110.
- [13] 李桂娟,李冲,姜雪,等.松籽壳多糖超声辅助溶剂法提取及抗氧化性研究[J].食品与机械,2012,28(6):133-137.
- [14] 孟宪军,李冬男,汪艳群,等.五味子多糖超声波提取条件的研究[J].食品工业科技,2010,31(4):313-315.

## 荧光 RT-LAMP 法检测猪流行性腹泻病毒方法的建立

邵建宏<sup>1</sup>, 曾俊霞<sup>2</sup>, 赵福振<sup>1</sup>, 邱民希<sup>2</sup>, 苏子由<sup>2</sup>, 廖秀云<sup>1</sup>, 罗宝正<sup>1\*</sup>

(1. 拱北海关检验检疫技术中心, 广东 珠海 519001;

2. 珠海市安富来生物科技有限公司, 广东 珠海 519085)

**摘要:**猪流行性腹泻病是一种急性传染病,在我国各省均有发生,幼龄猪的发病率和死亡率较高。本研究拟建立一种能够快速检测猪流行性腹泻病毒的荧光 RT-LAMP 方法,为早期诊断和治疗提供技术支持。根据 GenBank 公布的猪流行性腹泻病毒核蛋白基因设计一套特异性 LAMP 引物,使用荧光 PCR 仪对待检样品进行检测,根据扩增结果判断所检测样品是否含有猪流行性腹泻病毒。除已确诊为猪流行性腹泻病的病猪样品外,其余参考样品在本方法中均未出现特异性扩增曲线,检测下限为 102 拷贝的质粒模板,病猪小肠样品的阳性检出率为 100%。本研究建立的方法特异性强、灵敏度高、检测速度快,可广泛应用于猪流行性腹泻的快速筛查及实验室检测。

**关键词:**猪流行性腹泻病毒; 荧光 RT-LAMP; 检测

中图分类号:S852.4<sup>4</sup> 文献标识码:C 文章编码:1005-8567(2019)02-0042-03

## Establishment of Fluorescent Reverse Transcription Loop Mediated Isothermal Amplification for Detecting Porcine Epidemic Diarrhea Virus

SHAO Jian-hong<sup>1</sup>, ZENG Jun-xiang<sup>2</sup>, ZHAO Fu-zhen<sup>1</sup>, Qiu Ming-xi<sup>2</sup>, Su Zi-you<sup>2</sup>, LIAO xiu-yun<sup>1</sup>,

LUO Bao-zheng<sup>1\*</sup>

(1. Technical Center of Inspection & Quarantine of Gongbei Customs; 2. Zhuhai Anforra Biotechnology Co., Ltd. Zhuhai, Guangdong 519001)

**Abstract:** Porcine epidemic diarrhea is an acute infectious disease which can cause high mortality rate in neonatal pigs that occurs sporadically in all provinces of China. The aim would be establish a rapid detection method for PEDV with fluorescent RT-LAMP technology. A group of specific primers were designed based on the nucleocapsid protein gene of the nucleic acid sequences of PEDV provided by GenBank. The quarantine samples with the primers and reaction systems would be tested by the fluorescent PCR device which could display the testing results, and the testers could making a judgment on PEDV of these samples according to the amplification curves of the testing results. None amplification curve appeared in the testing results except all PEDV samples and positive controls. It can also be seen that the inferior limit of the method could be 100 copies of plasmid RNA template. The established method is appropriate for the screening of PEDV in farm and the detection in laboratory because of its stability, sensitivity and veracity.

**Keywords:** Porcine Epidemic Diarrhea Virus; fluorescent RT-LAMP; Detect

收稿日期:2018-12-17

项目来源:珠海进出口服务平台产学研协同创新计划项目(IETP201701001)

作者简介:邵建宏(1983-),男,兽医师,主要从事动物传染病和物种分子生物学检测方向研究。E-mail: 48198965@qq.com

\*通讯作者:罗宝正(1975-),博士,研究员,主要从事动物传染病物种分子生物学检测方向研究。E-mail: bzluo@163.com

猪流行性腹泻(Porcine Epidemic Diarrhea, PED)是由猪流行性腹泻病毒(Porcine Epidemic Diarrhea Virus, PEDV)引起的一种以呕吐、腹泻、脱水为主要病症的急性猪肠道传染病,临床症状与猪传染性胃肠炎(Transmissible Gastroenteritis of Swine, TGE)和猪轮状病毒(Porcine Rotavirus Virus, PoRV)病相似。PED多发于每年天气寒冷的时节,各育龄段的猪均易感染,发病率和死亡率随育龄的增长而下降,1~5日龄的发病率和死亡率可达100%<sup>[1]</sup>。PED于20世纪70年代首发于欧洲东北部<sup>[2]</sup>,80年代初原中国人民解放军兽医大学首次从我国病死猪中分离到猪流行性腹泻病毒<sup>[3]</sup>,半个世纪以来在我国各地均有零星发生,没有消褪更没有根除的迹象。2010年,陈强<sup>[4]</sup>对福建省近20个大型养殖场中存在腹泻症状的5~60日龄进行筛查,发现其中3个养殖场存在猪流行性腹泻病毒阳性病例;2013~2015年倪建强<sup>[5]</sup>对全国44个种猪养殖场进行腹泻病回溯调查,发现3年内曾发生腹泻病的总共24个养殖场中,全部检出猪流行性腹泻病毒阳性病例;2014年常铁城<sup>[6]</sup>对全国11个省42个猪场共165份猪腹泻病样本进行检测,结果显示其中36个猪场的样品存在猪流行性腹泻病毒阳性。上述数据足以表明PED仍为现阶段猪腹泻病的主要传染病,是危害养猪业及其经济利益的重要因素。

PED与TGE、PoR的临床表征相似,均可引起猪腹泻,必须通过实验室检测才能确诊疾病。病毒分离、免疫荧光等经典的诊断方法在病源鉴定上具有权威性和代表性,但步骤冗繁、耗时耗力,在现代集约化养殖的背景下,已无法胜任基数庞大的检测需求,更不适用于流行病学筛查和快速诊断。近年来,荧光PCR法以其操作简便,检测快速、反应灵敏、结果准确的特点,成为常用的分子生物学检测方法,唐金明等<sup>[7]</sup>、吴学敏等<sup>[8]</sup>、Kim等<sup>[9]</sup>,对单重或多重荧光PCR法检测猪流行性腹泻病毒均有所研究,然而荧光PCR设备的购置费用和维护费用都很高,且体积较大,无法脱离实验室等固定场所进行使用。相比之下,荧光LAMP法除具有荧光PCR法具备的所有优点外,由于其反应过程无需频繁升降温,对仪器的温度调节模块要求不高,除使用普通荧光PCR仪外,还可使用体

积小巧、便携的手提式可充电仪器,如OptiGene Limited生产的Gene II系列环介导等温扩增荧光检测系统等。

环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)由日本荣研株式会社Notomi博士于2000年发明<sup>[10]</sup>,作为一项新型核酸扩增技术,LAMP克服了需要反复升降温,耗时耗能的难题。根据LAMP的反应原理,可实现恒温条件下(通常为60~65℃)的快速(通常为60 min)连续扩增,检测过程快速、简便。其次,由于LAMP的反应体系具有内、外、环3组共6条特异性引物,能够显著减少非特异性扩增。再者,LAMP对扩增仪器的选择更具多样性,除使用仪器并根据图形化的荧光曲线读取结果外,还可以使用恒温水浴锅根据显色剂的指示情况进行肉眼判别。随着相关技术的普及,国内外使用荧光LAMP法进行相关分子生物学检测的研究俯拾即是<sup>[11]</sup>,但针对猪流行性腹泻病毒的研究尚未见相关文献的发表。本研究拟建立猪流行性腹泻病毒的荧光RT-LAMP检测方法,为猪流行性腹泻病毒的检测方法提供更广发的选择空间,以进一步提高检测效率。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

猪流行性腹泻小肠样本35份,由珠海市安富来生物科技有限公司提供,其中7份样品经PCR检测阳性之后克隆测序确认;PEDV灭活抗原、TGEV灭活抗原、猪轮状病毒(PoRV)灭活抗原,猪急性腹泻综合征病毒(SADSV)灭活抗原由温氏集团提供;禽传染性支气管炎冠状病毒(IBV)抗原1份,猪繁殖与呼吸综合症病毒(PRRSV)抗原1份,为本实验室保存;PEDV阳性对照1份,为核蛋白基因克隆质粒,由上海旭冠生物科技有限公司合成。

#### 1.1.2 主要试剂

RNA提取试剂盒Mag-Bind Viral DNA/RNA Kit(200),为OMEGA公司产品;RT-LAMP扩增体系试剂盒,为广州双螺旋生物技术有限公司产品。

#### 1.1.3 主要仪器

Q6 Real-Time PCR仪、Veriti 96-Well Thermal Cycler PCR仪、3500基因测序仪,均为美国Applied

Biosystems 公司产品; Alpha Imager HP 凝胶成像分析系统, 为美国 Alpha Innotech 公司产品; SIGMA 3-18 K 小型高速冰冻台式离心机, 为德国 Sartorius 公司产品; NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer 紫外分光光度计, 为美国 NanoDrop Technologies 公司产品。

## 1.2 方法

### 1.2.1 引物设计

根据 GenBank 数据库中猪流行性腹泻病毒的基因序列, 选取其核蛋白基因的一段高度保守区作为扩增对象, 使用分子生物学软件 LAMP designer 1.14 分别设计内、外、环 3 组共 6 条 RT-LAMP 引物, 将设计的引物进行最佳配对筛选, 由上海辉睿生物科技有限公司合成, HPLC 方式进行纯化。合成后的引物(干粉)使用灭菌 DEPC 水分别稀释至浓度为 100 pmol/ $\mu\text{L}$  的溶液, 保存于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。引物序列列表 1。

表 1 猪流行性腹泻病毒 RT-LAMP 引物

引物	序列(5'→3')
FIP	GCCTCCTCTGTTCTGAGAAGCGAGGCAACAACCCAGTCC
BIP	AATAAGTCTCGTAACCACTCCAAGAACGCAGCCACCAGATCATC
F3	TGGCAATGGCAACAACA
B3	CAAAGATTTAAGGGCATCCTTG
LF	CACGATTCTGTGAATTACCACG
LB	ATGACCGTGTTGGAATGAC

### 1.2.2 样品 RNA 模板的提取

按照 RNA 提取试剂盒 Mag-Bind Viral DNA/RNA Kit(200)说明书提取待检样品的 RNA 模板。为获得最佳反应结果, 所获得的 RNA 模板 260/280 比值需介于 1.8~2.0, 浓度需介于 200~500 ng/ $\mu\text{L}$ 。

### 1.2.3 反应体系及反应条件

反应体系为 25  $\mu\text{L}$ : 2 $\times$ Taq 反应液 RM 12.5  $\mu\text{L}$ , 内引物 FIP、BIP 40  $\mu\text{mol/L}$  各 1.0  $\mu\text{L}$ , 外引物 F3、B3 5  $\mu\text{mol/L}$  各 1.0  $\mu\text{L}$ , 环状引物 LF、LR 20  $\mu\text{mol/L}$  各 1.0  $\mu\text{L}$ , Bst DNA 聚合酶 0.8  $\mu\text{L}$ , 逆转录酶 0.2  $\mu\text{L}$ , SYTO-9 荧光染料 0.5  $\mu\text{L}$ , RNA 模版 2  $\mu\text{L}$ , 补 DEPC 水至 25  $\mu\text{L}$ , 加 20  $\mu\text{L}$  石蜡油封存液面以避免体系挥发和产物污染。本研究选用实时荧光法, 故在反应体系中加入 0.5  $\mu\text{L}$  荧光染料。反应条件为: 保温阶段 63  $^{\circ}\text{C}$  30 sec; 循环阶段 63  $^{\circ}\text{C}$  15

sec  $\rightarrow$  63  $^{\circ}\text{C}$  45 sec, 40 个循环; 于 63  $^{\circ}\text{C}$  45 sec 处收集荧光信号; 荧光通道为 FAM。

### 1.2.4 特异性试验

以上述 1.1.1 的 PEDV、TGEV、PoRV、SADSV、PRRSV 和 IBV 共 6 份抗原, 提取的 RNA 为模板, 以 DEPC 水阴性对照, 合成质粒为阳性对照, 使用上述 1.2.3 的反应体系和反应条件进行 RT-LAMP 扩增, 以验证所建立方法的特异性。

### 1.2.5 灵敏度试验

提取上述 1.1.1 的 PEDV 克隆质粒的 RNA 作为模板, 用紫外分光光度计测定其浓度, 根据阿伏伽德罗常数换算成目的基因拷贝数, 以 10 倍梯度稀释作为阳性样品, 以 DEPC 水提取的 RNA 为阴性对照, 对梯度稀释的阳性样品使用上述 1.2.3 的反应体系和反应条件进行 RT-LAMP 扩增, 以验证所建立方法的灵敏度。

### 1.2.6 稳定性试验

取上述 1.2.5 稀释的克隆质粒中浓度为  $10^6$  的质粒作为阳性对照, 间隔 30 天进行两次试验, 每次试验做 20 个重复。计算检测结果之间的差异, 以验证所建立方法的稳定性。

### 1.2.7 病样检测

以上述 1.2.2 提取的 35 份 RNA 为模板, 以 DEPC 水提取的 RNA 为阴性对照, 使用上述 1.2.3 的反应体系和反应条件进行 RT-LAMP 扩增, 以验证所建立方法对实际病样的检测能力。

## 2 结果与分析

### 2.1 特异性试验

根据所建立的 RT-LAMP 检测方法对 PEDV、TGEV、PoRV、SADSV、PRRSV 和 IBV 提取的 RNA 进行扩增, 结果显示: 2 份 PEDV 均出现显著扩增曲线, 其余均未出现扩增曲线, 与预期一致(见图 1, 图见第 52 页)。

### 2.2 灵敏度试验

根据所建立的 RT-LAMP 检测方法对浓度为  $10^1 \sim 10^9$  的 PEDV 克隆质粒进行扩增, 结果显示: 最低检测浓度为  $10^2$  拷贝的质粒 RNA(见图 2, 图见第 52 页)。

### 2.3 稳定性试验

根据所建立的 RT-LAMP 检测方法对稀释浓度

为 $10^6$ 的PEDV克隆质粒进行扩增,结果显示:两次试验的多个检测结果分别高度重叠(见图3、图4,图见第52页)。使用统计学软件SPSS对两次试验获得的Ct值进行分析,可得其批内变异系数分别为1.10%和1.22%,批间变异系数为1.32%。

#### 2.4 样品检测

根据所建立的RT-LAMP检测方法对上述35份样品进行检测,其中7份病样的RNA出现明显的荧光值增长,检测结果阳性,与测序确认结果一致(见图5,图见第52页)。

### 3 讨论

本研究通过荧光RT-LAMP法对所建立的方法进行了特异性、灵敏度、稳定性和实际病样的测试。综合上述检测结果:所建立的方法能够与临床病症高度相似的TGE和PoR以及其他常见疾病进行诊断区分,特异性强;对纯化质粒的检测极限为 $10^2$ 拷贝的数量级,灵敏度高,对痕量样品的检测具有显著实用性;两次批量重复试验的变异系数分别为1.10%和1.22%,批间变异系数为1.32%,稳定性好。当前,LAMP技术尚未全面普及,但其在特异性、便携性和检测效率方面的优点显而易见,在样品前处理时间一致的情况下,相对于PCR法,LAMP法具有6条特异性引物,能够显著降低非特异性反应,并可将时间缩短1/2乃至数倍。因而,该方法适用于实验室的常规检测,也十分适用于无法具备传统实验室条件的养殖场、检疫现场等地的快速筛查。

同时,本研究对7份猪流行性腹泻样品的检测中也发现,所有样品在24分钟以内全部扩增结束。此外,出于对检测结果精确度的要求和结果量化的考虑,本研究选用RT-LAMP的实时荧光法,未尝试RT-LAMP的荧光指示剂法,相对而言,

荧光指示剂法在投入成本、适用环境和便携程度方面都有更突出的优势,同样适用于非实验室环境的快速初筛。上述问题也有待后续研究中进一步补充和拓展。

#### 参考文献

- [1] 李功铨,许平.猪流行性腹泻的特点与防治[J].畜牧兽医科技信息,2013(8):63-63.
- [2] 钱永清,孙智锋,范建敏.猪流行性腹泻(PED)[J].上海畜牧兽医通讯,1993(5):36-37.
- [3] 甘振磊,汤德元,李春燕,等.猪流行性腹泻流行特点及流行现状的研究[J].猪业科学,2010,27(12):24-28.
- [4] 卞志伟.仔猪流行性腹泻流行现状及免疫分析[J].当代畜牧,2015(6Z):45-46.
- [5] 倪建强,原霖,王静,等.2013—2015年我国部分原种猪场猪腹泻病的流行病学调查[J].中国动物检疫,2017,34(4):5-9.
- [6] 常铁城,陈建飞,冯力,等.2014年部分地区猪流行性腹泻病毒流行病学调查[J].中国预防兽医学报,2016,38(4):335-338.
- [7] 唐金明,陈书琨,林庆燕,等.猪流行性腹泻病毒分离鉴定与实时荧光定量RT-PCR检测方法的建立[J].动物医学进展,2014,35(8):31-35.
- [8] 吴学敏,陈如敬,王隆柏,等.猪流行性腹泻病毒RT-PCR检测方法建立及初步应用研究[J].中国农学通报,2012,28(26):59-62.
- [9] KIM S H, KIM I J, PYO H M, et al. Multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus[J]. Journal of Virological Methods, 2007, 146(1): 172-177.
- [10] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic acids research, 2000, 28(12): e63-e63.
- [11] WAKABAYASHI T, YAMASHITA R, KAKITA T, et al. Rapid and sensitive diagnosis of adenoviral keratoconjunctivitis by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method [J]. Current eye research, 2004, 29(4-5): 219-224.

## 低蛋白饲料对断奶仔猪生长性能、 消化酶表达及氮排放的影响

田志梅, 马现永\*, 崔艺燕, 王刚\*

(广东省农业科学院动物科学研究所, 畜禽育种国家重点实验室, 农业部华南动物营养与饲料重点实验室, 广东省畜禽育种与营养研究重点实验室, 广东畜禽肉品质量安全控制与评定工程技术研究中心, 广东广州 510640)

**摘要:**本试验旨在研究低蛋白饲料对断奶仔猪生长性能、消化功能及氮排放的影响, 探究低蛋白饲料在仔猪生产中应用的可行性。试验选用18头三元杂(杜×长×大)28日龄断奶仔猪, 随机分为3组, 每组6个重复, 每个重复1头。3个组为, 对照组为20%粗蛋白(CP)饲料组, 17% CP和14% CP处理组, 试验期25 d。结果表明:与对照组相比, (1)降低饲料蛋白水平降低仔猪ADG及ADFI( $P < 0.05$ ), 14% CP组F/G增加且仔猪终体重(FBW)降低( $P < 0.05$ ), 而17% CP组的F/G及FBW未受显著影响( $P > 0.05$ )。(2)17% CP组十二指肠中肠肽酶、蔗糖酶、麦芽糖酶及葡萄糖酶以及空肠乳糖酶的基因表达丰度提高( $P < 0.05$ ); 14% CP组十二指肠中肠肽酶、乳糖酶及空肠中乳糖酶的基因表达提高( $P < 0.05$ ), 但空肠葡萄糖酶、淀粉酶等基因表达降低( $P < 0.05$ )。(3)14% CP组胰腺及胃粘膜消化酶基因表达丰度降低( $P < 0.05$ ); 而17% CP组胃粘膜胃蛋白酶A基因的表达提高( $P < 0.05$ ), 但胰腺消化酶基因的表达未受显著影响( $P > 0.05$ )。(4)降低饲料蛋白水平降低尿氮排放量及总氮排放量( $P < 0.05$ ), 降低6%粗蛋白水平降低氮摄入量( $P < 0.05$ )。因此, 降低3%的粗蛋白水平的饲料在仔猪生产中是可行的。

**关键词:**低蛋白; 仔猪; 生长性能; 消化; 氮排放

**中图分类号:**S816.4 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2019)02-0046-06

我国是生猪养殖大国, 蛋白饲料资源短缺、人畜争粮等矛盾日益凸显, 2018年中美贸易战进一步导致我国生猪养殖业与饲料工业矛盾的加剧。随着养殖业的快速发展, 氮排放、臭气排放造成的环境污染日益受到重视, 这些污染均与饲料蛋白相关。因此, 从饲料源头出发, 在合理补充氨基酸的条件下降低饲料蛋白水平, 提高饲料利用率, 减少氮排放, 可有效的从根源缓解饲料资源短缺及环境污染的双重压力, 同时提高经济效益, 促进

生猪养殖业的绿色、生态、健康可持续发展。

饲料中蛋白质在动物生长过程中, 不仅提供机体蛋白合成所需的氨基酸, 发挥其营养功能, 同时还调节动物采食、消化吸收、代谢等生理功能, 具有一定的生物学功能<sup>[1, 2]</sup>。消化酶在动物生长、消化吸收功能中起重要的作用, 其表达情况反映动物体内营养物质代谢以及对饲料的利用情况。有研究指出, 动物对营养物质的消化吸收、代谢功能直接影响饲料利用率、氮沉积及氮排放<sup>[2, 3]</sup>。因

收稿日期:2019-01-11

项目来源:省级现代农业产业技术推广体系建设项目(2017LM4164, 2018LM2153);广东省现代农业产业技术体系创新团队项目(2017LM1080, 2018 LM1080);广东省国际科技合作项目(2014A050503049);国家973计划(2013CB127301)

作者简介:田志梅(1985-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 助理研究员, 主要从事动物营养与饲料研究、生态养殖与环境控制研究。

E-mail:382874346@qq.com

\*通讯作者:马现永(1972-), 女, 山东日照人, 博士研究生, 研究员, 主要从事动物营养与饲料研究、生态养殖与环境控制研究。

E-mail:407986619@qq.com;王刚(1968-), 男, 湖北人, 高级兽医师, 从事草食动物营养与繁育研究。E-mail:wanggang@gdaas.cn



此,本试验通过研究低蛋白饲料对仔猪生长性能、消化吸收功能以及氮排放的影响,以此探究低蛋白饲料在仔猪生产中应用的可行性,为生猪的低氮、减排饲养提供理论支撑,促进生猪养殖业的健康发展。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物及设计

选取 18 头 28 日龄断奶仔猪 (BW=9.57 ± 0.64 kg, 杜×长×大三元杂交), 随机分为三组, 每组 6 头。20%粗蛋白 (CP) 水平组 (即对照组) 参照 NRC (2012) 设定, 处理组依据 NRC (2012) 营养标准, 平衡赖氨酸 (Lys)、蛋氨酸 (Met)、苏氨酸 (Thr)、色氨酸 (Trp) 四种必需氨基酸后分别降低 3% CP 和 6% CP, 即 17% CP 组及 14% CP 组, 饲料配方见表 1。

28 日龄断奶仔猪经过 7 天适应期后, 分别饲喂不同粗蛋白水平饲料, 25 天后进行称重、动物屠宰、样品采集。试验期间采取自由采食及饮水方式进行饲养。试验期间每天记录每栏仔猪采食量, 计算平均日采食量。

### 1.2 屠宰及样品采集

仔猪屠宰前进行麻醉后处死, 立即进行组织、脏器等分离并放于冰上。分别取十二指肠、空肠中段, 纵向剖开去除内容物, 用预冷的 PBS 冲洗并用吸水纸吸去表面水分后, 载玻片刮取黏膜并分装到 3 个 1.5 mL 的 EP 管中, 立即放于液氮中, 最终转移到 -80 °C 保存; 取胃黏膜及胰腺组织 (每次切取保证部位一致性) 大约 3 g, 用预冷 PBS 冲洗, 去除组织表面血液并用吸水纸吸去水分, 分装到 3 个 1.5 mL 的 EP 管中, 立即放于液氮中, 最终转移到 -80 °C 保存。

### 1.4 脂肪代谢相关基因表达

用 TRIzol 试剂提取 100 mg 样品 (十二指肠、空肠及胃黏膜, 胰腺) 总 RNA。吸取 RNA (1 μg) 反转录为 cDNA (Takara, Cat. #RR047A)。搜索 GeneBank 中猪的相关基因序列, 使用 primer premier 5.0 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) 设计引物 (如表 2), 利用荧光定量方法检测相关基因表达情况。反应体系 (20 μL): 2 μL cDNA, 10 L SYBR Green mix, 上下游引物各 0.8 L (100 nM), 6.4 μL 的 ddH<sub>2</sub>O。Real-time PCR 条件: 95 °C 预变性

表 1 饲料组成及营养水平 (风干基础, %)

组成 Component	粗蛋白水平 Crude protein levels		
	14% CP	17% CP	20% CP
玉米 Corn	66.5	66.5	63.7
豆粕 Soybean meal	18.8	18.8	19.8
乳清粉 Whey powder	4.3	4.3	4.3
鱼粉 Fish meal	4	4	9
大豆油 Soybean oil	2.6	2.6	0.8
赖氨酸 Lys	0.62	0.62	0.38
甲硫氨酸 Met	0.19	0.19	0.1
苏氨酸 Thr	0.21	0.21	0.09
色氨酸 Trp	0.04	0.04	0.01
磷酸钙钙 Calcium hydrophosphate	0.74	0.74	0
石粉 Limestone	0.7	0.7	0.52
食盐 NaCl	0.3	0.3	0.3
1%预混料 1% premix	1	1	1
合计 Total	100	100	100
消化能 DE (MJ/kg)	14.6	14.6	14.6
粗蛋白 CP	17	17	20
总钙 Total Ca	0.71	0.71	0.69
总磷 Total P	0.55	0.55	0.57
营养水平 Nutrient levels			
精氨酸 Arg	0.91	0.91	1.09
组氨酸 His	0.4	0.4	0.46
异亮氨酸 Ile	0.6	0.6	0.7
亮氨酸 Leu	1.32	1.32	1.49
赖氨酸 Lys	1.23	1.23	1.23
甲硫氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.68	0.68	0.68
苯丙氨酸 Phe	0.69	0.69	0.8
苏氨酸 Thr	0.73	0.73	0.73
色氨酸 Trp	0.2	0.2	0.2
缬氨酸 Val	0.65	0.65	0.77

注: 1%预混料: 维生素 A, 10 800 IU; 维生素 D<sub>3</sub>, 4000 IU; 维生素 E, 40 IU; 维生素 K<sub>3</sub>, 4 mg; 维生素 B<sub>1</sub>, 6 mg; 维生素 B<sub>2</sub>, 12 mg; 维生素 B<sub>6</sub>, 6 mg; 维生素 B<sub>12</sub>, 0.05 mg; 生物素, 0.2 mg; 叶酸, 2 mg; 烟酸, 50 mg; D-泛酸钙, 25 mg; Fe, 100 mg; Cu, 150 mg; Mn, 40 mg; Zn, 100 mg; I, 0.5 mg; Se, 0.3 mg

3 min, 95 °C 变性 15 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 扩增 39 个循环。筛选后利用 β-actin 作为 Real-time PCR 的内参基因。

### 1.5 统计分析

本试验各组数据均以平均值±标准误 (mean±SD) 表示, 利用 Prism 6 (Graphpad Software, Inc) 软件及 Tukey's one-way ANOVA 分析方法进行数据统计分析、

表2 基因荧光定量PCR引物

基因	引物序列(5'→3')	长度(bp)	退火温度(°C)
Aminopeptidase	F:TCATCAATCGGGCTC AGGTC	101	55
	R:TCCGTTTCAGGAAGA GGGTGTT		
Enteropeptidase	F:GCCCTGGGTTGTTG CTCTGTAT	243	55
	R:ATGTCACTGTCCTTT CTCCGTCTG		
Sucrase	F:CGAGCAGATTCTTA GTGATGGAT	189	55
	R:GCATAGTTGTCTCC AAGCCAGT		
Lactase	F:GCTACCACCTAATA CAGTAAACCTCCC	235	55
	R:CCCACAGAAAGTCA TCCCGAAA		
Maltase	F:TGCCTTACCTCTACA CGCTGATGC	113	62
	R:GATTCAGTCCAGCA TTCCGTGCTAT		
Amylase	F:GGCAGCGTTTATT CTCACTCA	252	65
	R:TCTCTTGCTTCTTCC CTGTTCC		
Glucosidase F	F:TGATGAAGTCTGGG TGGGTGTCG	183	65

作图。统计显著性为 $P<0.05$ ，极显著为 $P<0.01$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 饲料蛋白水平对仔猪生长性能的影响

由表3结果可知，饲料降低3%或6%的粗蛋白水平显著降低仔猪ADG及ADFI( $P<0.05$ )，降低6%的粗蛋白水平增加F/G并降低仔猪终体重(FBW)( $P<0.05$ )，而降低3%的粗蛋白水平不影响F/G及FBW( $P>0.05$ )。

表3 饲料蛋白水平对仔猪生长性能的影响

项目	蛋白质水平			P 值
	14%CP	17%CP	20%CP	
初始平均体重(IBW, kg)	9.58	9.57	9.57	< 0.05
平均日增重(ADG, g)	277.3 <sup>c</sup>	395.8 <sup>b</sup>	474.8 <sup>a</sup>	< 0.05
平均日采食量(ADFI, g)	547.3 <sup>c</sup>	684.7 <sup>b</sup>	796.9 <sup>a</sup>	< 0.05
料重比(F/G)	1.97 <sup>a</sup>	1.73 <sup>b</sup>	1.68 <sup>b</sup>	< 0.05
终体重(FBW, kg)	16.51 <sup>b</sup>	19.46 <sup>a</sup>	21.45 <sup>a</sup>	< 0.05

### 2.2 饲料蛋白水平对仔猪胰腺、胃粘膜组织中消化酶表达的影响

图1结果显示，饲料蛋白水平对胰腺中脂肪酶、糜蛋白酶、淀粉酶、羧肽酶、弹性蛋白酶等消化酶基因表达及胃粘膜中蛋白酶A、蛋白酶C基因表达丰度的影响，与20% CP组相比，17% CP的饲料显著降低胰腺中糜蛋白酶(*Chymotrypsin*)基因的表达丰度( $P<0.05$ )，提高胃粘膜胃蛋白酶A(*PepsinogenA*)基因的表达( $P<0.05$ )，不影响胰腺中淀粉酶(*Amylase*)、羧肽酶(*Carboxypeptidase*)、弹性蛋白酶(*Elastase*)及胃粘膜中胃蛋白酶C(*Progastricsin*)基因的表达丰度( $P>0.05$ )；14% CP的饲料显著降低胰腺中脂肪酶、糜蛋白酶、淀粉酶、羧肽酶、弹性蛋白酶以及胃粘膜中胃蛋白酶C等消化酶基因表达丰度( $P<0.05$ )，但不影响胃蛋白酶A的基因表达( $P>0.05$ )。

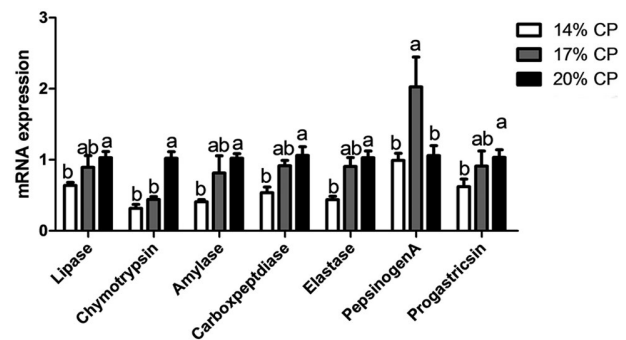


图1 饲料蛋白水平对仔猪胰腺及胃粘膜消化酶基因表达的影响

### 2.3 饲料蛋白水平对仔猪肠道消化酶表达的影响

由图2可知，与20% CP组相比，17% CP显著提高十二指肠中肠肽酶(*Enteropeptidase*)、蔗糖酶(*Sucrase*)、麦芽糖酶(*Maltase*)及葡萄糖酶(*Glucosidase*)等基因的表达丰度( $P<0.05$ )，不影响氨肽酶(*Aminopeptidase*)和淀粉酶(*Amylase*)基因表达丰度( $P>0.05$ )；显著提高空肠乳糖酶(*Lactase*)表达丰度( $P<0.05$ )，不影响其他消化酶表达无显著影响( $P>0.05$ )。而与20% CP组相比，14% CP显著提高十二指肠中肠肽酶、乳糖酶基因表达及空肠中乳糖酶的基因表达( $P<0.05$ )，降低空肠中葡萄糖酶、淀粉酶等基因表达( $P<0.05$ )，不影响小肠中氨肽酶、蔗糖酶及麦芽糖酶的表达( $P>0.05$ )。

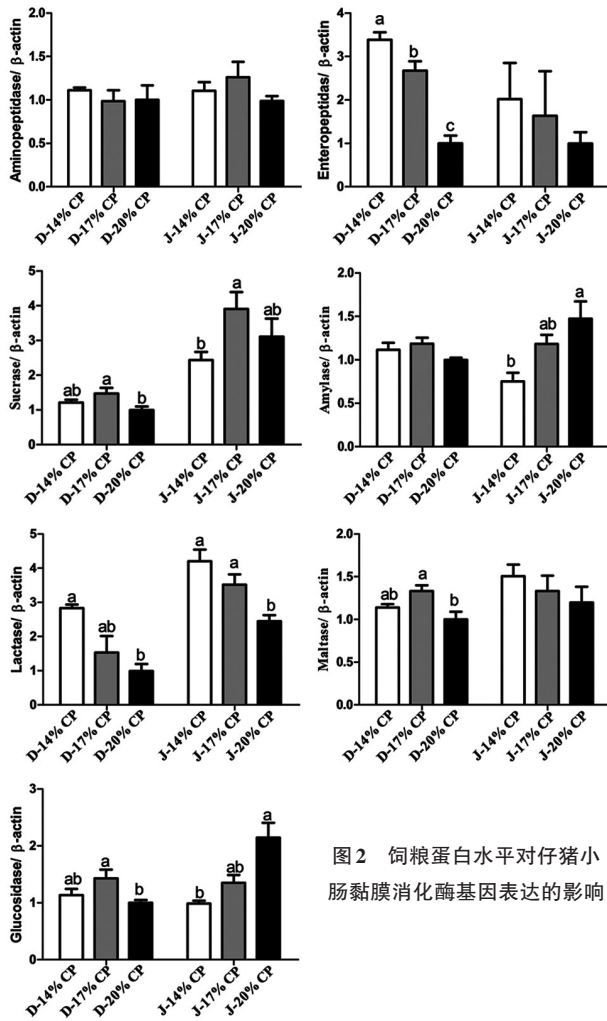


图2 饲料蛋白水平对仔猪小肠黏膜消化酶基因表达的影响

#### 2.4 饲料蛋白水平对仔猪氮排放的影响

由图3所示,与20% CP组相比,14% CP组仔猪氮摄入量显著降低( $P < 0.05$ ),而17% CP的饲料不影响氮摄入量( $P > 0.05$ );14% CP及17% CP饲料组均显著降低尿氮排放量及总氮排放量( $P < 0.05$ ),而对粪氮排放量无显著影响( $P > 0.05$ )。因此,饲料降低3%的粗蛋白水平可减少26.73%的总氮排放量( $P < 0.05$ ),降低6%的粗蛋白水平可减少约47.94%的总氮排放量( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

目前,基于我国经济、环境、政治等背景,减氮、减排是制约生猪养殖业发展也是亟待解决的主要问题。降低饲料蛋白水平可有效减少动物饲养

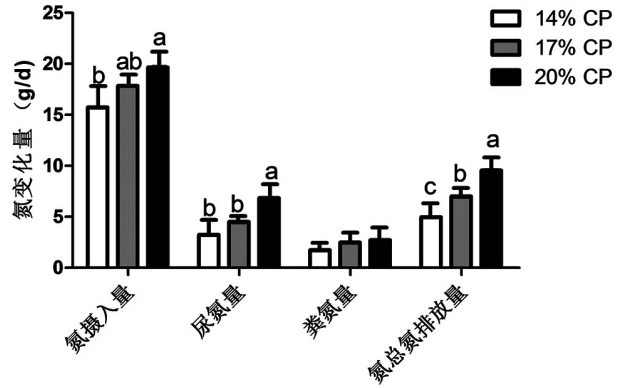


图3 饲料蛋白水平对仔猪氮摄入及排放的影响

的蛋白饲料资源输入,减少粪污、臭气等向环境的输出。因此,降低饲料蛋白水平,促进蛋白利用、转化的最大化,是解决养殖业污染问题,促进畜牧业发展的有效措施。

仔猪健康是影响生猪产业的主要瓶颈之一,而断奶应激是影响仔猪的生长、健康状况的关键问题,本研究发现适当降低饲料的粗蛋白水平(降低3% CP)虽然降低了仔猪ADG与ADFI,但不影响其F/G及FBW,结果揭示了饲料降低3%的CP虽然减少采食量,但可能通过提高氮沉积,因而不影响仔猪生长,降低增重及饲料成本,增加仔猪生产利润,提高经济效益。Le Bellego等研究也指出降低粗蛋白水平不影响仔猪的生长性能<sup>[4]</sup>。但我们发现饲料降低6%的粗蛋白水平,显著降低仔猪ADG、ADFI、F/G及FBW,不利于动物生长。因此,降低3% CP的饲料可以满足仔猪生长所需的蛋白营养,不影响其生长,且达到节约蛋白饲料资源的目的,因此,适当的降低饲料粗蛋白水平不影响仔猪生长,在仔猪生产中是可行的。

胃肠道、胰腺等是影响动物消化吸收的主要器官,也是合成、分泌消化酶的主要场所。营养物质在消化酶的作用下,将大分子物质消化分解为易吸收、利用的小分子物质。小肠粘膜中蔗糖酶、葡聚糖酶、乳糖酶、淀粉酶、麦芽糖酶等酶类参与糖分解代谢,影响糖类物质的消化吸收<sup>[5]</sup>。目前,关于饲料蛋白水平对动物机体消化酶的影响尚存在争议,Bikker等研究指出饲料蛋白水平不影响早期断奶仔猪小肠麦芽糖酶、蔗糖酶等二糖酶及氨肽酶等消化酶活性,其不影响肠道对糖类及蛋白的消化

功能<sup>[6]</sup>。Yue等报道饲料降低4.2% CP不影响断奶仔猪肠道二糖酶的表达,但降低5.9% CP抑制肠道二糖酶的表达<sup>[7]</sup>。而Pinheiro等研究发现降低饲料蛋白水平可有效的增加小肠中乳糖酶、蔗糖酶等糖代谢相关酶类的表达<sup>[8]</sup>。有研究报道,饲料蛋白水平可通过影响胃肠激素<sup>[9]</sup>,进而调节胃肠道的蠕动,消化酶合成、分泌<sup>[10]</sup>;调控胰腺生长,消化酶的合成与分泌<sup>[11-13]</sup>。在平衡动物生长所需的必需氨基酸的前提下,降低饲料蛋白水平改善肠道黏膜完整性,提高其免疫屏障功能,促进肠道健康<sup>[14]</sup>。本试验结果显示:17% CP的饲料显著提高断奶仔猪十二指肠中肠肽酶、蔗糖酶、麦芽糖酶、葡萄糖酶,空肠乳糖酶以及胃粘膜中胃蛋白酶A等消化酶基因的表达,不影响十二指肠氨肽酶、淀粉酶及空肠中肠肽酶、蔗糖酶、麦芽糖酶、葡萄糖酶、氨肽酶、淀粉酶,胰腺中淀粉酶、羧肽酶、弹性蛋白酶及胃粘膜中胃蛋白酶C等消化酶的表达。17% CP饲料增加仔猪小肠及胃粘膜中消化酶的表达,进而促进消化酶合成,提高蛋白质、糖类等营养物质的消化吸收;同时17% CP饲料降低采食量,但不影响其FBW,因此,降低3% CP通过提高营养物质利用率、转化率,促进氮的沉积,进而不影响仔猪生长。然而饲料降低6% CP虽然提高小肠乳糖酶及十二指肠肠肽酶的基因表达,但同时降低空肠中葡萄糖酶、淀粉酶,胰腺中脂肪酶、糜蛋白酶、淀粉酶、羧肽酶、弹性蛋白酶以及胃粘膜中胃蛋白酶C等消化酶的基因表达,不利于营养物质的消化吸收;降低6% CP的饲料降低ADFI、ADG和FBW,说明仔猪对14% CP的饲料不利于营养物质的消化、利用及转化率差,不利于仔猪采食及生长;且生产效果不如20% CP饲料。

因此,饲料CP降低3%不影响动物生长,且提高动物胃肠道、胰腺等消化器官的消化功能,促进饲料转化率,节约氮资源,可应用于仔猪生产实践。

饲料蛋白水平影响动物血浆中尿素氮的含量,及其对饲料蛋白利用率、转化率及氮的排放<sup>[15]</sup>,研究结果表明,低蛋白饲料(14% CP与17% CP)降低仔猪尿氮的排放,不影响粪便中氮的排放,显著减少总氮排放量,降低3% CP减少25%以上的总氮排放量,降低6% CP减少近50%的总氮排放量。饲料在平衡氨基酸的基础上,适当的

降低粗蛋白水平,通过影响肠道中微生物代谢产物的组成及发酵减少氨气的释放和氮的排放<sup>[16]</sup>。降低饲料蛋白水平,增加大肠中微生物对糖类物质的发酵,减少蛋白发酵,因此降低了氨气、尿氮、粪氮的排放<sup>[14]</sup>。也有研究指出,低蛋白饲料可降低猪尿氮、尿氨、粪氮及总氮排放,但不影响粪便中肠杆菌属(*Enterobacteria spp.*)及双歧杆菌属(*Bifidobacteria*)微生物的数量<sup>[17]</sup>。因此,低蛋白饲料影响氮排放的机制还有待进一步研究。

综上所述,饲料在平衡Lys, Met, Thr, Trp四种必须氨基酸基础上降低3%的粗蛋白水平,不影响仔猪生长,同时提高仔猪消化吸收功能及其对饲料的转化率;降低粪污的氮排放。因此,适当降低饲料蛋白水平在仔猪生产中是可行的,不仅节约蛋白质饲料资源并降低饲料成本,提高养殖生产的经济效益,还有效减少生猪养殖业向生态环境的粪污排放。

#### 参考文献:

- [1] PENG X, HU L, LIU Y, et al. Effects of low-protein diets supplemented with indispensable amino acids on growth performance, intestinal morphology and immunological parameters in 13 to 35 kg pigs[J]. *Animal*, 2016, 10(11): 1812-1820.
- [2] 田志梅, 马现永, 王丽, 等. 长期饲喂不同蛋白质水平饲料对猪脂肪代谢相关基因表达的影响[J]. *动物营养学报*, 2017(10): 3761-3772.
- [3] HTOO J K, SAUER W C, ZHANG Y, et al. The effect of feeding low-phytate barley-soybean meal diets differing in protein content to growing pigs on the excretion of phosphorus and nitrogen[J]. *Journal of Animal Science*, 2007, 85(3): 700-705.
- [4] Le BELLEGO L, van MILGEN J, NOBLET J. Effect of high temperature and low-protein diets on the performance of growing-finishing pigs[J]. *Journal of Animal Science*, 2002, 80(3): 691-701.
- [5] COURTOIS P, MEURIS S, SENER A, et al. Invertase, maltase, lactase, and peroxidase activities in duodenum of BB rats[J]. *Endocrine*, 2002, 19(3): 293-300.
- [6] BIKKER P, DIRKZWAGER A, FLEDDERUS J, et al. The effect of dietary protein and fermentable carbohydrates levels on growth performance and intestinal characteristics in newly weaned piglets[J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84(12): 3337-3345.
- [7] YUE L Y, QIAO S Y. Effects of low-protein diets supplemented with crystalline amino acids on performance and intestinal development in piglets over the first 2 weeks after weaning[J]. *Livestock Science*, 2008, 115(2): 144-152.

- [8] PINHEIRO D F, PACHECO P D, ALVARENGA P V, et al. Maternal protein restriction affects gene expression and enzyme activity of intestinal disaccharidases in adult rat offspring [J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2013, 46 (3): 287-292.
- [9] TIAN Z M, MA X Y, YANG X F, et al. Influence of low protein diets on gene expression of digestive enzymes and hormone secretion in the gastrointestinal tract of young weaned piglets [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2016, 17(10): 742-751.
- [10] LERAY V, SEGAIN J P, CHERBUT C, et al. Adaptation to low-protein diet increases inhibition of gastric emptying by CCK [J]. Peptides, 2003, 24(12): 1929-1934.
- [11] GREEN G M, LEVAN V H, LIDDLE R A. Plasma cholecystokinin and pancreatic growth during adaptation to dietary protein [J]. American Journal of Physiology, 1986, 251 (1 Pt 1): G70-G74.
- [12] HARA H, OHYAMA S, HIRA T. Endogenous cholecystokinin plays a role in down - regulation of pancreatic amylase independent of dietary carbohydrate in rats [J]. Regulatory Peptides, 2001, 99(2): 103-110.
- [13] WILLIAMS J A. Intracellular signaling mechanisms activated by cholecystokinin - regulating synthesis and secretion of digestive enzymes in pancreatic acinar cells [J]. Annual Review of Physiology, 2001, 63: 77-97.
- [14] HERMES R G, MOLIST F, YWAZAKI M, et al. Effect of dietary level of protein and fiber on the productive performance and health status of piglets [J]. Journal of Animal Science, 2009, 87(11): 3569-3577.
- [15] HTOO J K, SAUER W C, ZHANG Y, et al. The effect of feeding low-phytate barley-soybean meal diets differing in protein content to growing pigs on the excretion of phosphorus and nitrogen [J]. Journal of Animal Science, 2007, 85(3): 700-705.
- [16] ZERVAS S, ZIJLSTRA R T. Effects of dietary protein and fermentable fiber on nitrogen excretion patterns and plasma urea in grower pigs [J]. Journal of Animal Science, 2002, 80(12): 3247-3256.
- [17] LYNCH M B, SWEENEY T, CALLAN B F J, et al. The effect of high and low dietary crude protein and inulin supplementation on nutrient digestibility, nitrogen excretion, intestinal microflora and manure ammonia emissions from finisher pigs [J]. Animal, 2007, 1(8): 1112-1121.

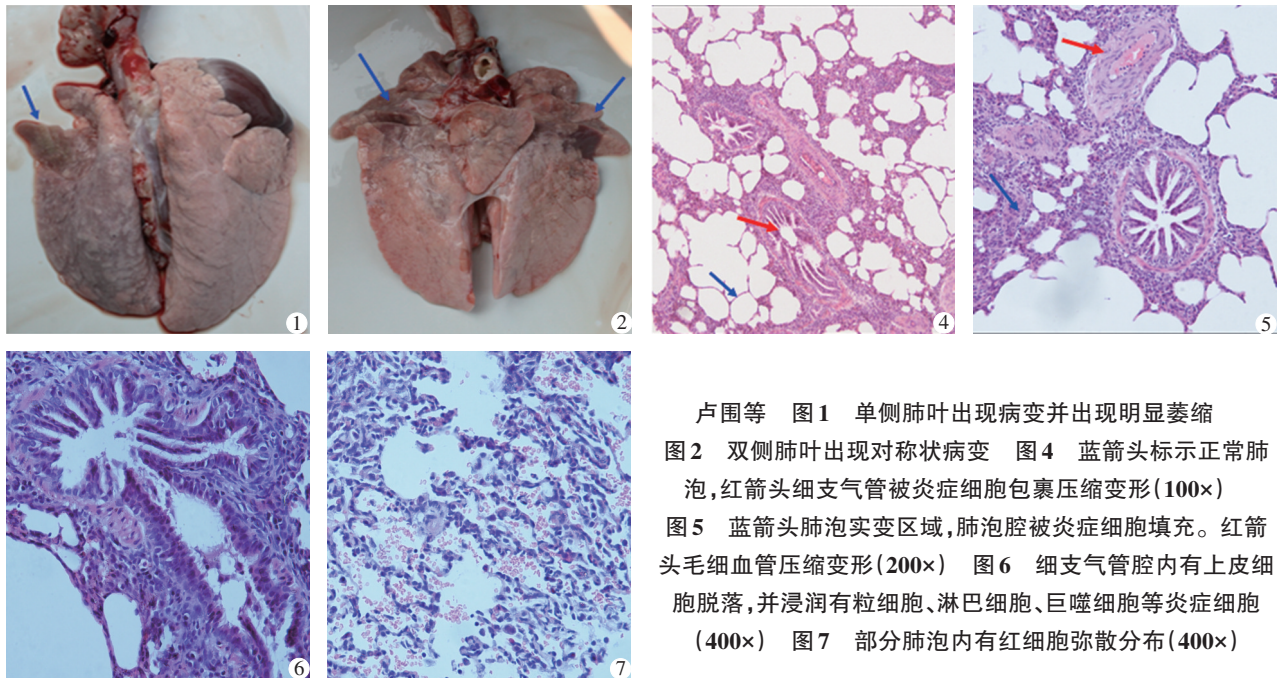
上接第27页

胞,部分肺泡实变区域内有红细胞弥散分布,属典型的间质性肺炎和支气管肺炎。

本研究结果进一步探索和丰富了猪肺炎支原体的诊断技术和病变特征,为猪肺炎支原体的临床诊断和病理学变化研究提供了参考。

### 参考文献

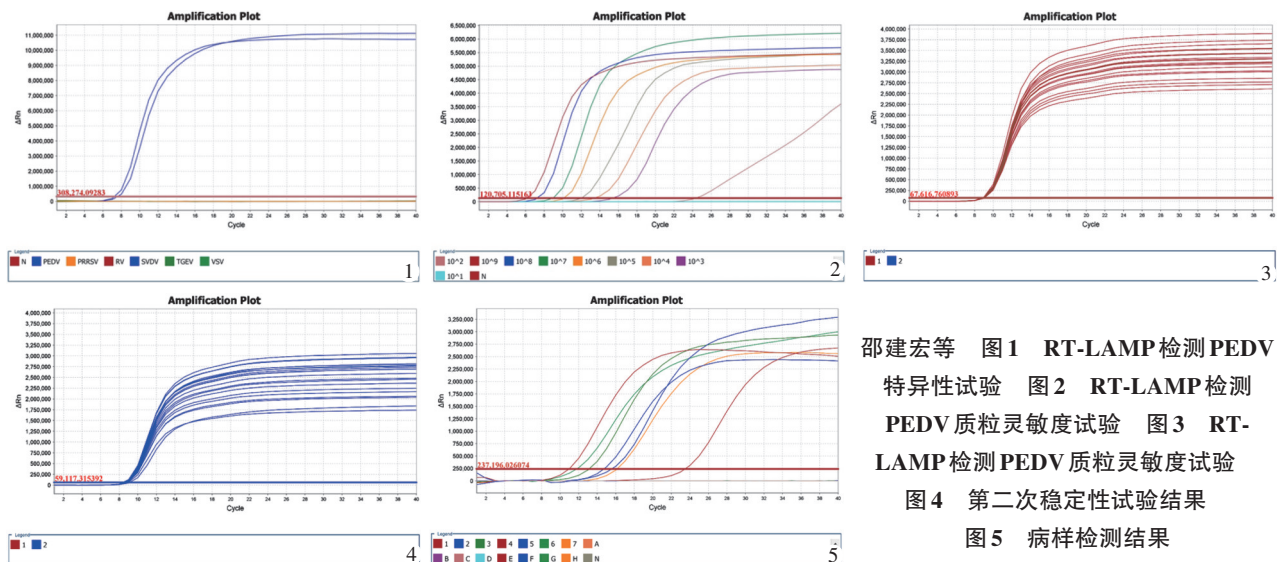
- [1] 李彦明,张映.猪肺炎支原体生物学研究进展[J].动物医学进展,2003,24(3):25-27.
- [2] 斯特劳.猪病学(第八版)[M].赵德明,张中秋,沈建忠,译.北京:中国农业大学出版社,2000.511-517.
- [3] 黄建华.集约化猪场猪气喘病的综合调查及防治措施的探讨[J].国外畜牧学,2001,4:51-53.
- [4] SORENSEN V, AHRENS P, BARFOD K, et al. Mycoplasma hyopneumoniae infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays [J]. Veterinary microbiology, 1997, 54: 23-24.
- [5] 魏晶晶,李聪研,孙亚波,等.猪肺炎支原体S株的分离与鉴定[J].中国兽药杂志,2016,50(2):15-21.
- [6] 车艳杰,于霏,高玉梅,等.猪肺炎支原体DJ-166株的分离鉴定[J].中国兽药杂志,2016,50(3):6-10.
- [7] 肖国生,文心田,吕祖德,等.猪支原体肺炎诊断技术[J].中国兽药杂志,2003,37(7):36-39.
- [8] CAI H Y, DREUMEL T, MCEWEN B, et al. Application and field validation of a PCR assay for the detection of Mycoplasma hyopneumoniae from swine lung tissue samples [J]. Journal of veterinary diagnostic investigation, 2007, 19: 91-95.
- [9] 师丽刚,周飞.猪肺炎支原体PCR检测方法的建立与应用[J].现代畜牧兽医,2016,9:11-15.
- [10] MATSSON J G, BERGSTROM K, WALLGREN P, et al. Detection of Mycoplasma hyopneumoniae in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1995, 33(4): 893-897.



卢围等 图1 单侧肺叶出现病变并出现明显萎缩  
图2 双侧肺叶出现对称状病变 图4 蓝箭头标示正常肺泡,红箭头细支气管被炎症细胞包裹压缩变形(100×)  
图5 蓝箭头肺泡实变区域,肺泡腔被炎症细胞填充。红箭头毛细血管压缩变形(200×) 图6 细支气管腔内有上皮细胞脱落,并浸润有粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞等炎症细胞(400×) 图7 部分肺泡内有红细胞弥散分布(400×)



张天佑等 图5 子宫内窥镜检查发现出血点 图6 子宫内窥镜检查发现出血点 图7 阴道粘膜检查并取出血凝块



邵建宏等 图1 RT-LAMP检测PEDV特异性试验 图2 RT-LAMP检测PEDV质粒灵敏度试验 图3 RT-LAMP检测PEDV质粒灵敏度试验 图4 第二次稳定性试验结果 图5 病样检测结果