

广东畜牧兽医科技

GUANGDONG XUMU SHOUYI KEJI

双月刊 1976年3月创刊

第47卷 第2期(总第222期)

2022年4月18日出版

中国标准连续出版物号 $\frac{\text{ISSN } 1005-8567}{\text{CN } 44-1243/S}$

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

编辑委员会

编委主任:廖明

编委副主任:罗成龙 孙铭飞 卢受昇

编委(排名按姓氏笔画):

马现永 王刚 王丽 王贵平

王修启 元文宝 巨向红 邓百川

石达友 卢受昇 卢桂强 田允波

宁章勇 吕殿红 任涛 向华

向荣 江青艳 孙永学 孙铭飞

李加琪 杨琳 吴珍芳 吴银宝

张永亮 张建峰 张细权 张哲

张桂红 陈卫东 陈金顶 陈瑞爱

陈瑶生 林德锐 林鑫 罗成龙

郑春田 赵志辉 聂庆华 徐志宏

郭世宁 唐兆新 黄运茂 黄显会

黄淑坚 黄燕华 曹永长 曹伟胜

曹俊明 彭国良 蒋守群 蒋宗勇

舒鼎铭 曾振灵 简纪常 蔡更元

管武太 廖明 廖新倮 翟少伦

魏文康 翟浩

编辑部

主编:廖明

副主编:王刚 郑春田

主任:马新燕

编辑:康桦华 吕晓慧 张洁华 邢亚琪

王片片 张锦宁 郭婷婷

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

E-mail:gdmsyjkj@163.com

印刷单位:广州市人杰彩印厂

发行单位:《广东畜牧兽医科技》编辑部

发行范围:国内外公开发行

国内定价:10.00元/册

广告发布登记通知书编号:440100190079

目次

·行业动态·

2022年度生猪产业营养与饲料领域发展趋势与建议 王丽,肖昊,等(1)

·试验研究·

白术多糖对雏鹅肝脏免疫功能的保护作用研究 李婉雁,王怡菲,等(6)

新城疫病毒对鸡外周血T淋巴细胞迁移的影响 林楚晓,何静怡,等(14)

日粮中添加发酵木薯渣对蛋鸡生产性能及蛋品质的影响 马旭东,左清清,等(18)

加米霉素注射液的过敏性试验研究 江国亮,付良凯,等(22)

猪伪狂犬病病毒GD株的分离鉴定及致病性研究 侯高伟,赖月辉,等(26)

普鲁士蓝/石墨烯修饰电极检测畜禽饮用水中铅离子的方法和应用 ... 黄俊,汪思钧,等(30)

·专题综述·

2021年黄羽肉鸡营养与饲料技术研究进展 茅沈丽,苟钟勇(37)

新型冠状病毒检测方法研究进展 蔡琳琳,梁健鹏,等(43)

饲用酵母产品及应用研究进展 夏俊良,张永亮,等(51)

猪瘟病毒抗体检测方法的研究进展 张璞,陈建凯,等(58)

·畜牧技术·

鹅星状病毒病研究进展及防控策略 黄培宏,贾汝敏,等(63)

·兽医临床·

牛结核病的诊断与处理 刘腾声,闭璟珊,等(67)

GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in March 1976(Bimonthly)

April 2022 Volume 47, Number 2 (Total No.222)

Contents

- Development trends and suggestions of swine nutrition and feed science in 2022 WANG Li, XIAO Hao, et al(1)
- The protective effect of polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz on the hepatic immune function of goslings
..... Li Wanyan, Wang Yifei, et al(6)
- Effect of Newcastle disease virus on the migration of peripheral blood T lymphocytes of chickens
..... LIN Chuxiao, HE Jingyi, et al(14)
- Effects of dietary supplementation with fermented cassava residues on the performance and egg quality of laying hens
..... MA Xudong, ZUO Qingqing, et al(18)
- Sensitization test of gamithromycin injection JIANG Guoliang, FU Liankai, et al(22)
- Isolation, Identification and Pathogenicity of porcine pseudorabies virus GD strain HOU Gao-wei, LAI Yue-hui, et al(26)
- Technology and application of Pb^{2+} detection in drinking water for livestock and poultry by Prussian blue/graphene modified
electrode HUANG Jun, WANG Shijun, et al(30)
- Research progress in nutrition and feed technology of yellow-feathered chickens in 2021 MAO Shenli, GOU Zhongyong(37)
- Research progress in test technique for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 ... CAI Linlin, LIANG Jianpeng, et al(43)
- Research progress in the application of feed yeast product Xia JunLiang, Zhang YongLiang, et al(51)
- Research progress in the antibody detection of Swine Fever Virus ZHANG Pu, CHEN Jiankai, et al(58)
- Goose astrovirus disease: the research progress, prevention and control strategies HUANG Peihong, JIA Rumin, et al(63)
- A case on diagnosis and treatment of bovine tuberculosis LIU Tengsheng, GUAN Jingshan, et al(67)
-

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: Liao Ming

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

Post Code: 510640

Tel: (020)87576452

E-mail: gdxmsykj@163.com

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。

2022年度生猪产业营养与饲料领域发展趋势与建议

王丽,肖昊,胡胜兰,叶翔杨,易宏波,高开国,杨雪芬,温晓鹿,蒋宗勇*

(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,岭南现代农业科学与技术广东省实验室茂名分中心,广东省畜禽育种与营养研究重点实验室,广东广州510640)

摘要:2021年,生猪产能全面恢复并持续在低位震荡,同时饲料原料供给不足及价格飙升,多重因素给生猪养殖业带来了前所未有的压力。本文总结了生猪营养与饲料领域2021年产业现状,分析了2022年度发展趋势,并从科学研究角度提出本领域相关建议。

关键词: 生猪; 营养与饲料; 发展趋势; 建议

中图分类号:S816 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2022)02-0001-05

Development trends and suggestions of swine nutrition and feed science in 2022

WANG Li, XIAO Hao, HU Shenglan, YE Xiangyang, YI Hongbo, Gao Kaiguo,

Yang Xuefen, Wen Xiaolu, JIANG Zongyong*

(Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science in South China, Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding, Guangdong Key Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Maoming Branch, Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, 510640, China)

Abstract: In 2021, swine production capacity has been fully restored and continues to fluctuate at a low level, while the supply of feed raw materials is insufficient and the price rises a lot, which has brought unprecedented pressure to the swine industry. This paper summarizes the current situation of swine nutrition and feed science, analyzes the development trends in 2022, and puts forward relevant suggestions in this field from the perspective of scientific research.

Keywords: swine; nutrition and feed science; development trend; recommendations

根据国家统计局公布2021全年畜牧业数据显示,2021年全国生猪出栏67128万头,与2020年相比,增长27.4%。2021年末,全国生猪存栏44922

万头,比2020年末增长10.5%,生猪产能已基本恢复到常态水平。从生猪产业营养与饲料领域来看,受新冠疫情影响进口、原料库存紧张供给不

收稿日期:2022-04-01

基金项目:财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系;茂名实验室自主科研项目(2021ZZ003);广东省现代农业产业技术体系生猪创新团队项目(2022KJ126);广州市科技计划项目(202005000003)

作者简介:王丽(1981-),女,研究员,研究方向猪营养与饲料科学。E-mail:wangli1@gdaas.cn

*通讯作者:蒋宗勇(1963-),男,研究员,研究方向动物营养与饲料科学。E-mail:jiangz28@qq.com

足、运输成本提高、限电限产等因素的影响,导致大宗饲料原料价格暴涨,且保持高位运行,因此,提升科技创新能力可为生猪产业节本增效和饲料原料替代提供一定的理论依据和科技支撑。

1 2021年生猪产业营养与饲料领域特点、问题

2021年是饲料“禁抗令”全面施行后的第一年,非洲猪瘟疫情虽然反复频发,但防控措施趋于稳定,生猪存栏稳步上升,带动生猪饲料工业发展恢复,2021年我国生猪价格从6月份到9月份持续下降,降到了成本线以下,猪粮比跌破5:1,第四季度进入猪肉销售旺季,市场价格冲高又回落。在营养与饲料领域表现为以下特点:

1.1 全国产能完全恢复,生猪价格快速下行,国家发布稳价保供政策

从2020年起,按照中共中央、国务院决策部署以及在各地方相关部门的共同努力下,2021年第二季度全国生猪存栏和能繁母猪存栏已完全恢复,10月份全国能繁母猪存栏量4348万头,比4100万头的正常保有量多6%。生猪生产取得了超预期的积极成果,猪肉市场供应相对充裕,猪肉价格出现明显回落。根据农业农村部的数据显示,2021年1月初全国活猪平均价格35.95元/kg,猪肉平均价格52.99元/kg,春节过后持续下降至10月初,全国活猪平均价格11.54元/kg,同比下降66.2%,猪肉平均价格21.05元/kg,同比下降60.4%,降至成本线以下,养殖利润大幅下降。第四季度进入猪肉消费旺季,生猪价格有所回升,全国活猪均价在12月份第1周冲高至18.33元/kg后又逐渐回落,12月第5周活猪均价为16.92元/kg,同比下降49.8%,猪肉平均价格27.87元/kg,同比下降44.8%。

为巩固生猪产能恢复成果,缓解生猪和猪肉市场价格周期性波动,促进产业持续健康发展,6月份国家发展改革委会同财政部、农业农村部、商务部、市场监管总局等部门,联合印发了《完善政府猪肉储备调节机制 做好猪肉市场保供稳价工作预案》,对预警指标和区间、储备分类和规模、储备调节机制等核心内容作了修改完善;8月份农业农村部、国家发展改革委、财政部、生态环境部、商务

部、银保监会提出了《关于促进生猪产业持续健康发展的意见》,明确生猪产业发展的指导思想、工作原则、发展目标,强调落实生猪稳产保供省负总责,突出生猪产能调控的关键措施;9月份农业农村部制定了《生猪产能调控实施方案(暂行)》,提出“十四五”期间,以正常年份全国猪肉产量在5500万吨时的生产数据为参照,设定能繁母猪存栏量调控目标。

1.2 猪饲料量价齐升,养殖企业承压大

非瘟疫情一段时间后,为保障猪肉有效供给,国家和各地政府部门出台了一系列生猪稳产保供扶持政策,生猪产能恢复迅速,同时拉动了猪饲料的生产销售。根据农业农村部畜牧兽医局、中国饲料工业协会公布的数据显示,2021年全国工业饲料总产量29344.3万吨,比上年增长16.1%。其中,猪饲料产量13076.5万吨,比上年增长46.6%。全年育肥猪配合饲料出厂均价为3457元/吨,比上年上涨376元,涨幅达12.2%。饲料价格大幅上涨的主要诱因是大宗饲料原料价格暴涨,受新冠疫情影响进口、原料库存紧张、运输成本提高、限电限产以及自然灾害等因素的影响,玉米、豆粕、麸皮等市场均价分别比上年上涨640元/吨、620元/吨、420元/吨,涨幅分别达29.7%、20.5%、25.6%,大幅抬升饲料配方成本。饲料企业和养殖户为降低生产成本,大规模使用相对价格较低的小麦、稻谷、高粱及进口谷物来替代玉米,一定程度抑制了玉米的饲用消费,全国饲料企业玉米用量比上年下降24.7%。随着饲料原料价格的不断攀升,饲料企业不得不屡屡调价,配合饲料价格也水涨船高。饲料成本让养殖户承受巨大压力,特别是在猪周期下行期内,加剧了猪场的亏损幅度。

1.3 饲料粮食安全备受重视,大力推进玉米豆粕减量替代工作

粮食安全的核心是饲料粮食安全。针对饲料粮供给保障严峻形势,农业农村部畜牧兽医局于3月15日印发通知推进玉米豆粕减量替代,支持开展可利用饲料原料营养价值参数评定,完善国家饲料原料营养价值数据库,优化应用平台系统,推动构建多元化饲料配方结构,推行饲料精准配方和精细加工,提高饲料利用效率,降低饲料中玉米、豆粕占比,为保障饲料粮供需平衡、稳定粮食安全

大局提供有力技术支撑。4月17日,农业农村部正式发布饲料营养价值数据库,制定印发《饲料中玉米豆粕减量替代技术方案》,指导全行业充分发掘利用本土饲料资源,构建适合我国国情的新型日粮配方结构。中国饲料工业协会组织全国34家代表企业联合发出“推进玉米豆粕减量替代,共同维护饲料粮供给安全的倡议”,号召全行业积极参与饲料营养价值数据库建设,积极推广应用减量替代技术方案。10月,中办、国办印发了《粮食节约行动方案》,提出要加强饲料粮减量替代,加快推广低蛋白日粮技术,充分挖掘利用替代资源,降低豆粕添加比例。“饲料中玉米豆粕减量替代技术”列入农业农村部主推技术。2021年,全国养殖业饲料消耗量4.5亿吨,豆粕用量占比15.3%,比上年下降2.4%。其中,全国百万吨以上规模饲料企业生产的饲料中豆粕占比仅为11.8%。

1.4 无抗时代饲料监管政策更加完善,推进饲料行业健康发展

为加快推进促生长药物饲料添加剂替代,鼓励全行业加快研发创制安全、绿色、高效的新型饲料添加剂产品,农业农村部于11月6日印发《直接饲喂微生物和发酵制品生产菌株鉴定及其安全性评价指南》,规定了饲用微生物菌株鉴定和安全性评价的技术要求,指导饲料企业和科研机构规范开展微生物饲料添加剂及酶制剂、生物活性肽、氨基酸等添加剂产品开发和评价,为申请人有针对性的开展菌株评价提供了极大便利,为规范开展技术评审和有效实施监管提供了有力支撑。10月18日,中国饲料工业协会成立质量安全工作委员会和团体标准技术委员会,通过了中国饲料工业协会团体标准管理办法,促进饲料行业健康发展。11月22日,农业农村部决定对“进口饲料和饲料添加剂”等行政许可事项实施全程电子化审批,进一步缩短了审批时限,提高了审批效率。农业农村部制定印发了《全国兽用抗菌药使用减量化行动方案(2021-2025年)》,实施兽用抗菌药全链条监管、使用风险控制、替代产品应用、减量化技术指导服务、减量化激励机制等五大行动,切实提高畜禽养殖场安全、规范、科学使用兽用抗菌药的能力和水平,稳步提升畜禽产品兽药残留合格率,有效遏制动物源细菌耐药趋势。

1.5 生猪产业转型升级仍是热点

2021年2月21日,中共中央、国务院发布中央一号文件,要求深入实施重要农产品保障战略,明确提出“保护生猪基础产能,健全生猪产业平稳有序发展长效机制”,这是历史以来中央文件首次针对生猪产能和发展长效机制提出的明确要求。12月22日,农业农村部印发《“十四五”全国畜牧兽医行业发展规划》,明确提出着力打造生猪万亿级产业,确保猪肉产能维持在5500万吨左右,确保自给率维持在95%左右。《规划》提出实施“生猪稳产保供行动”,以能繁母猪存栏量为核心建立生猪产能调控机制,落实“三抓两保”,即“抓大省、大县、大场,保能繁母猪存栏量和规模猪场数量”,全国能繁母猪保有量要稳定在4300万头左右。5月19日,国务院通过了《生猪屠宰管理条例》,该条例明晰了制度措施,夯实动物疫病防控和质量安全责任,强化了管理手段,完善生猪屠宰环节监管措施,同时加大了惩处力度,落实“处罚到人”,严格生猪屠宰环节的全过程管理,保证生猪产品质量安全,保障人民身体健康。

1.6 新冠疫情下的非洲猪瘟防控保障强化

目前非洲猪瘟病毒已在我国定殖,新冠疫情和非洲猪瘟防控形势仍然复杂严峻,非洲猪瘟防控是长期而且艰巨的工作。2021年4月29日农业农村部组织召开非洲猪瘟防控等工作督导总结视频会议,强调坚持生猪生产恢复和非洲猪瘟等重大动物疫病防控两手抓,采取更加务实过硬的措施,确保非洲猪瘟疫情不反弹,确保其它重大动物疫情保持平稳。12月1日,农业农村部组织召开了全国秋季重大动物疫病防控工作总结会议,贯彻落实中央决策部署,强调各地要进一步提高政治站位,坚持问题导向、目标导向和结果导向,坚持外防输入、内防反弹,坚持人病兽防、关口前移,毫不松懈地抓好非洲猪瘟等重大动物疫病防控。同时为有效控制非洲猪瘟传播,减少肉猪流通,2021年4月1日起,我国开始从试点大区逐步限制生猪调运,全国各地也陆续推出生猪调运新规。近期,上海、江苏、浙江、安徽、山东、河南六省区东部区联防发布了《关于协助东部区实施生猪调运有关措施的函》,规定自12月1日开始,上海、江苏、浙江、安徽、山东、河南六省(直辖市),将会禁止非东部区

30 kg以上生猪进入东部区育肥(种猪、仔猪除外),不再接受东部区外未经“点对点”调运备案的生猪调入东部区屠宰。也就意味着从12月1日起,北方的生猪将无法进入东部地区市场。

2 2022年生猪产业营养与饲料领域发展趋势分析

新冠肺炎疫情进入常态化,2021年生猪生产超预期全面恢复,药物添加剂退出无抗饲料百家齐放,2022年生猪营养与饲料领域发展的趋势如下:

2.1 生猪生产超预期恢复,落实生猪产能调控机制

生猪生产于2021年第二季度全面恢复,自6月份起市场猪肉供应出现阶段性过程,6~9月份生猪价格出现断崖式下降,养殖利润陷入亏损。虽然进入第四季度由于消费需求导致价格小幅上升,但是市场供应相对宽松的基本面没有改变。2022年稳定生猪生产的关键在于适度去产能,防止长时间亏损造成后期产能过度下降,引发生产大起大落。同时应当加强生产和市场监测预警,认真落实生猪产能调控实施方案。规模猪场需要通过运用先进管理方法和新技术挖掘潜力,降低成本,提升效益。

2.2 继续推进饲料精准配方,非粮饲料资源开发备受关注

饲料行业整体暴利时代基本结束,进入微利时代已成为新常态。饲料成本占整体养殖成本的60%以上,是降本增效的关键点。全国动物营养指导委员会全面开展饲料原料营养价值评定,特别是基于净能和可消化氨基酸等重要指标参数和模型建立,建立饲料原料营养价值大数据库,系统评定动物营养需要量等基础性工作,加快推广饲料精准配方技术体系,挖掘利用国内饲料资源,精准营养理论将在规模化养殖场全面推行应用。国家“十四五”重点研发专项,也针对精准营养开展了“猪禽动态营养需求与营养精准供给技术”的研究,助推精准营养理论产学研相结合,为精准营养的应用提供理论支持。我国各地有丰富的豆渣、酒糟、酱油糟、醋糟、薯类淀粉渣、甜菜渣、甘薯渣、苹果渣、柑橘渣、废糖蜜、淀粉废液、酒精废液、味精废液等糟渣、废液类饲料资源,树叶、嫩枝、树籽等林

业饲料资源,以及血粉、肉骨粉、猪毛粉、羽毛粉等动物下脚料可供开发应用。近年来在非粮饲料资源的研究、开发和利用取得了一定的进展,但依然存在利用率不高、有害物质和抗营养因子去除技术有限等问题。因而,未来将重视这些具有地方特色的非常规饲料资源的营养价值评价、质量安全控制、加工处理工艺、饲料配方优化等提质增效关键技术以及应用效果等方面的研究。饲料厂和养殖场将更加关注应用植酸酶及其它酶制剂提高动物对饲料中钙、磷、微量元素、蛋白质等养分的利用率,同时应用低蛋白平衡氨基酸技术,辅以抑制尿素分解的添加剂等从饲料源头上减少氮、磷、重金属和臭气排放,降低后期粪污处理难度。

2.3 新型替抗饲料添加剂研发热度提升,无抗产品研发与推广仍是重点

在2020年7月1日饲料全面禁抗,且非洲猪瘟和新冠疫情依然严峻的新形势下,如何通过饲料营养手段来应对各项挑战,实现生猪健康养殖,如何打造品牌优质猪肉满足居民日益增长的物质文化需求,仍将是2022年生猪产业发展的关注热点。2021年药物饲料添加剂已全面推出,无抗饲料更加深入,抗生素替代品或无抗营养技术将长期成为热点和重点。2022年的研发重点也主要集中在生物型饲料的研发,提高对原材料的精细化处理在内的饲料加工工艺能力,进一步规范生物饲料产业。目前替抗类型的饲料添加剂有酶制剂、微生态制剂、酸化剂、抗菌肽、中草药提取物等,饲料处理方式如发酵、膨化等。围绕调养机体、健康肠胃、改善吸收、强化营养、增强免疫等研究目标,加快集成推广全链条抗菌药减量替代技术规程,进一步推广新型抗菌制剂、生物饲料、酶制剂、植物提取物等综合替抗技术。

3 2022年生猪产业营养与饲料领域发展建议

2022年是非洲猪瘟和新冠病毒防控进入常态化的一年,生猪产能全面恢复。根据生猪营养与饲料领域的特点、问题和发展趋势,建议在2022年重点围绕以下几方面予以关注。

3.1 持续开展饲料营养价值与动物营养需求研究,促进饲料产业数字化智能化进程

应进一步完善动物营养需要动态预测模型、饲

料原料营养物质消化利用率动态预测模型,开展新形势要求下(无抗条件、低蛋白水平等)的有效能(净能)体系、氨基酸平衡模式研究,建立精准精细的动物营养需求参数体系,加快构建完善饲料原料营养价值数据库,推广应用数据库成果。开展饲料配方工艺及原料加工特性研究,促进饲料精准配方、精细加工。开展动物精细阶段饲养、智能化精准饲喂、个体营养策略等研究,促进饲养管理工艺精细精准。开展饲料原料高效调制工艺技术研究,重点开展生物发酵、酶解等新技术、新工艺的研究评价,提高饲料原料利用效率和安全性。饲料企业应当以数据采集、传输、计算、存储、分析、安全和应用的数字技术基础设施为基础,通过数据的计算和分析实现业务模型的创新。将原料营养含量、加工工艺参数、饲料配方和生产成绩等业务问题转化成数据可分析问题实现技术研发数字化转型,有效控制产品质量,提高饲料转化效率。

3.2 建立完善替抗产品评价体系,确保新饲料和新饲料添加剂产品的质量可靠性

目前市面上替抗产品五花八门,多数未经大规模生产验证,如何甄选使用给饲料厂、养殖场带来了极大困扰。为迅速提升我国无抗绿色饲养生产水平,建议农业农村部组织全国高校、科研机构、饲料和养殖企业,对现有替抗产品围绕调控靶标进行系统梳理,初步遴选若干替抗产品及其组合,在大、中、小规模猪场开展大规模生产性验证评估,从中择优在全国进行推广。加快研究生物发酵饲料的营养参数评价指标体系,建立目标产物或指标可量化检测评估的产品质量标准 and 检测技术方法,开展生物发酵菌株和发酵原料的合规性、安全性调查分析,为实施生物饲料产业规范化管理提供技术支撑。

3.3 推进地方非粮饲料资源数据库建设及科研投入力度

开展地方特色饲用资源信息数据库与标准建设,调查地方特色饲用资源的品种、数量、分布、加工工艺等信息;开展地方饲用原料的质量标准研究,建立地方饲用原料理化特性的测定方法体系,检测其营养成分、生物活性成分、抗营养因子、霉菌

毒素、重金属等物质的组成与含量,在应用定向分类基础上建立非粮饲料资源信息数据库和非粮饲料资源高效利用大数据平台。针对特色饲料资源,综合利用热处理、膨化、酶解和生物发酵等加工方法与工艺,降低其中有毒有害物质和粗纤维含量,提高其饲用价值;运用微生物筛选与培育、微生物发酵过程控制等现代生物技术,筛选高效微生物发酵制剂,研究降解抗营养因子及粗纤维综合配套技术,开发发酵饲料和功能性添加剂产品,建立标准化生产技术体系,并推广应用。

3.4 加快推广智能化设施化养殖装备,提升生猪产业竞争力

持续提升规模化、标准化生产水平,鼓励发展多层建筑,重点提升环境控制、粪污处理利用、疫病防控环节设施化程度。推动信息技术与生猪养殖业深度融合,实时准确采集养殖全过程数据,提高饲喂、环境监控、粪污处理、生物安全防控等环节自动化、精准化水平,促进节本增效。以精准饲喂、智能环控、体征监测、行为感知、疫病监控预警、产品采集、粪污处理利用、自动巡检等为重点,研发具有自主知识产权的设施设备、信息平台和应用系统。继续推动饲料生产和生猪养殖“厂场对接”,推进饲料产品散装出厂、自动装卸、封闭储运、自动饲喂,最大限度降低饲料成本。

3.5 加大低蛋白日粮技术推广应用力度

为缓解蛋白质饲料资源短缺,减少大豆进口依赖,国家应采取类似饲料端禁抗和养殖端兽用抗菌药减量的举措,推进低蛋白日粮技术应用。要站在保障粮食安全的高度,适时将国家标准《仔猪、生长育肥猪配合饲料》(GB/T 5915-2020)由推荐性标准提升为强制性标准,或者将该标准的实施情况与饲料企业、规模猪场的各种财政补贴、荣誉称号申报相挂钩。农业农村部可在全国范围启动实施低蛋白日粮技术应用或饲料环保化行动。

致谢:感谢国家生猪产业技术体系营养与饲料研究室全体岗位专家及团队成员,本文是在体系营养与饲料研究室总结基础上整理的,特此感谢。

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.02.02

白术多糖对雏鹅肝脏免疫功能的保护作用研究

李婉雁¹, 王怡菲¹, 李冰心¹, 徐帅鹏¹, 郑敏¹, 曹楠¹, 许丹宁¹, 杨保和², 袁明凤², 田允波^{1*}
(1. 仲恺农业工程学院/动物科技学院/广东省水禽健康养殖重点实验室, 广东 广州 510225;
2. 云南快大多畜牧科技有限公司, 云南 玉溪 653100)

摘要:为研究白术多糖对雏鹅肝脏免疫功能的保护作用, 将40只1日龄马岗鹅幼雏随机分为control组、PAMK组、CTX组和PAMK+CTX组, 每组10只, 预饲3 d后, control组和CTX组饲喂基础饲料, PAMK组和PAMK+CTX组在基础饲料中添加400 mg/kg白术多糖; 20日龄时, CTX组和PAMK+CTX组以40 mg/kg·BW剂量连续三天腿肌注射环磷酰胺, 其余组注射0.5 mL生理盐水, 注射期3天, 第24日龄采样。结果显示:环磷酰胺可导致雏鹅肝脏肿大, 组织结构损伤, 肝细胞DNA损伤及肝功能紊乱; 经白术多糖干预后, 雏鹅肝脏和胆囊指数恢复至正常, 显著降低了血清中AST和ALT的活性($P<0.05$), TNF- α 、IL-10和IL-1 β 含量显著升高($P<0.05$), 肝细胞DNA损伤明显减轻。环磷酰胺对TLR4/NF- κ B信号通路中的TLR4、NF- κ B1、TRAF6和IKK ϵ 蛋白水平有明显的抑制作用($P<0.05$), 并使I κ B α 蛋白水平升高($P<0.05$), 经白术多糖处理后, I κ B α 蛋白水平显著下降($P<0.05$), TRAF6蛋白水平显著升高($P<0.05$), 表明白术多糖可有效解除环磷酰胺对TLR4/NF- κ B通路关键基因的抑制作用。

关键词:白术多糖; 鹅; 肝脏; 环磷酰胺; 免疫功能; TLR4

中图分类号:S853.7 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2022)02-0006-08

The protective effect of polysaccharide of atractylodes macrocephala koidz on the hepatic immune function of goslings

Li Wanyan¹, Wang Yifei¹, Li Bingxin¹, Xu Shuaipeng¹, Zheng Min¹, Cao Nan¹, Xu Danning¹,
Yang Baohe², Yuan Mingfeng², Tian Yunbo^{1*}

(1. Guangdong Province Key Laboratory of Waterfowl Healthy Breeding, College of Animal Science & Technology,
Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;
2. Yunnan Kuaidaduo Animal Husbandry Technology Co., Ltd, Yuxi 653100, China)

Abstract: In order to study the protective effect of polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz (PAMK) on the liver immune function of goslings, 40 1-day-old Magang goslings were randomly divided into control group, PAMK group, CTX group and PAMK+CTX group, 10 in each group. After 3 days of feeding, 400 mg/kg PAMK was added to the diet of control group and PAMK group. At 20 days of age, CTX group and PAMK+CTX group were injected with cyclophosphamide in leg muscle at a dose of 40 mg/kg·BW for three consecutive days, other groups were injected with 0.5 mL of normal saline. The liver index and tissue structure were detected on 24-day-old. The results

收稿日期:2021-11-24

基金项目:广东省基础与应用基础研究基金区域联合基金-青年基金项目(2019A1515110106);广东省重点领域研发计划资助(2020B020222003)

作者简介:李婉雁(1988-),女,广东广州人,博士,讲师,研究方向为动物营养与免疫研究。E-mail:lwanyan88@126.com

*通讯作者:田允波(1965-),男,博士,教授,研究方向为畜禽营养生理。E-mail:tyunbo@126.com

showed that cyclophosphamide could cause liver enlargement, tissue structure damage, hepatocyte DNA damage and liver function disorder in goslings. After the intervention of PAMK, the gosling liver and gallbladder indexes returned to normal, and the serum AST and ALT levels were significantly reduced. The activity of ALT ($P<0.05$), the contents of TNF- α , IL-10 and IL-1 β were significantly increased ($P<0.05$), and the DNA damage of hepatocytes was significantly reduced. Cyclophosphamide significantly inhibited the protein levels of TLR4, NF- κ B1, TRAF6 and IKK ϵ in the TLR4/NF- κ B signaling pathway ($P<0.05$), and increased the protein level of I κ B α ($P<0.05$). After PAMK treatment, the protein level of I κ B α was significantly decreased ($P<0.05$), and the protein level of TRAF6 was significantly increased ($P<0.05$), indicating that PAMK could effectively relieve the inhibitory effect of cyclophosphamide on key genes of TLR4/NF- κ B pathway.

Keywords: Polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz (PAMK); gosling; liver; cyclophosphamide; immune function; TLR4

固有免疫功能是机体抵抗外界有害刺激的第一道防线,除了经典的免疫器官外,肝脏也具有重要的免疫功能,肝窦细胞群可对有害代谢产物、外源性微生物进行清除和处理,募集白细胞,肝细胞也可执行抗原递呈功能,连接固有免疫和适应性免疫,在组织修复、自我免疫耐受、消除炎症等方面发挥重要作用^[1-4]。广东省养鹅及消费数量居全国前列,可为养殖户带来非常可观的经济效益,但环境、疫病、弱雏等因素仍是影响肉鹅业健康发展的重要因素,尤其是雏鹅期,免疫系统发育不完善,更容易引起肝脏的固有免疫失衡,从而引发一系列生产问题,对食品安全也构成隐患^[5]。因此,摸清肝脏免疫功能失衡的病理机制,研发安全、无残留的免疫增强剂,对促进肉鹅健康养殖有重要的生产意义。中医理论认为,免疫功能低下是机体正气不足所致,根据扶正祛邪的用药原则,运用补益类中药能够起到“治未病”的作用,可达到良好的预防效果,真正实现禽产品的无抗化^[6-7]。在补益类中药中,白术因价格适宜、药用价值高,被广泛使用,具有“十药九术”的美称,其有效成分白术多糖(Polysaccharide of *Atractylodes Macrocephala* Koidz, PAMK)也被许多研究人员证实具有良好的免疫调节能力,白术多糖可通过激活NF- κ B依赖性机制活化巨噬细胞,调节巨噬细胞分泌NO、TNF- α 和IFN- γ 的能力,焦艳等实验也证明,白术多糖有激活正常库普弗细胞的作用,可显著提高吞噬功能^[8-9]。在保护肝脏方面,发现白术多糖能够有效减轻小鼠的肝脏脂肪病变,也可以减轻因高脂饲料造成的蛋鸡肝脂肪代谢紊乱,通过调节

抗氧化酶的活性和肝脂质代谢途径中相关基因的表达,从而减轻高脂饮食造成的肝损伤^[10-11]。关于白术多糖护肝作用机制的研究还是个崭新的领域,鉴于肝脏在机体免疫应答中的重要作用,探讨白术多糖对肝脏功能紊乱的调节作用及可能机制将具有非常重要的临床意义。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

实时荧光定量PCR仪(QuantStudio 7 Flex,美国ABI公司);全波长酶标仪(Epoch,美国伯腾仪器有限公司);倒置荧光显微镜(IX73P1F,日本Olympus公司);化学发光成像仪(5200,上海天能科技有限公司);小动物专用吸入麻醉机(KMA-14-SSV-APF,美国Dwyer仪器仪表有限公司)。

白术多糖(CY201216,杨凌慈缘生物技术有限公司);环磷酰胺(cyclophosphamide,CTX)(H32020857,江苏恒瑞医药股份有限公司);鹅ALT、鹅AST-ELISA试剂盒(XY-ELA0841,XY-ELA06100,上海心语生物科技有限公司);PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix(A25778, Thermo Fisher公司);Anti-TRAF6抗体、Anti-NF κ BP105抗体(ab33915, ab32360, Abcam公司);MyD88抗体(AF5195, Affinity公司);Rabbit TLR4 pAb(A5258, Abclonal公司);CometAssay试剂盒(4250-050-K, TREVIGEN公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 实验动物与试验设计

1日龄马岗鹅幼雏40只(购自广东省清远市金

表1 实验动物分组及处理

组别/缩写	数量	饲料处理	药物处理
对照(control)组	10	基础饲料	0.5 mL/只 saline, i.m
白术多糖(PAMK)组	10	400 mg/kg PAMK+基础饲料	0.5 mL/只 saline, i.m
环磷酰胺(CTX)组	10	基础饲料	40 mg/kg·BW CTX, i.m
白术多糖+环磷酰胺(PAMK + CTX)组	10	400 mg/kg PAMK+基础饲料	40 mg/kg·BW CTX, i.m

羽丰鹅业有限公司), 公母各半, 预饲3 d后随机分为4组, 组间体重差异不显著($P>0.05$), 具体见表1。按组处理饲喂至20日龄时, 连续3 d对CTX组和PAMK + CTX组雏鹅腿肌注射40 mg/kg·BW的CTX溶液, control组和PAMK组雏鹅腿肌注射0.5 mL生理盐水。注射后d 5按动物福利保护原则处理雏鹅, 采集并保存待检样品。同时每组取3只雏鹅用于彗星实验(Comet assay)。正试期共24 d, 全程饲养、免疫程序及环境标准均按《马岗鹅肉鹅饲养管理技术规范》(广东省地方标准DB 44/T 1595-2015)执行。

1.2.2 肝脏及胆囊指数计算

按以下公式计算雏鹅的肝脏及胆囊指数:

肝脏(胆囊)指数=肝脏(胆囊)鲜重(g)/雏鹅活重(kg)

1.2.3 肝脏石蜡切片及Masson染色

常规方法制备肝脏石蜡切片, 切片厚度4 μm , Masson染色后, 用Pannoramic Viewer切片扫描软件读片并分析。

1.2.4 肝功能指标测定

雏鹅血清ALT和AST活性、肝组织中TNF- α 、IL-1 β 和IL-10蛋白水平采用ELISA试剂盒进行检测, 严格按照说明书进行操作。

1.2.5 TNF- α 、IL-1 β 和IL-10 mRNA相对表达水平检测

参阅NCBI, 查找TNF- α 、IL-1 β 、IL-10及 β -actin的核苷酸序列, 通过primer 5设计引物, 引物序列和退火温度如表2所示, 引物均由华大基因合成, 用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析各基因mRNA的相对表达水平。

1.2.6 彗星实验

严格按Comet Assay试剂盒说明书操作规程制备肝细胞彗星玻片, 用荧光显微镜观察玻片, 选择图片清晰、细胞数量合适的部位截取彗星图像, 使用CASP软件分析测量DNA迁移的重要参数: Olive

表2 引物序列

基因		碱基序列(5'-3')	退火温度(°C)
TNF- α	F	ATGAACCCCTCCTCCGTACAC	60
	R	AGAGGCCACCACATGATAGC	
IL-1 β	F	AAGTGAGGCTCAACATTGCCG	60
	R	CGGTAGAAGATGAAGCGGGT	
IL-10	F	ATCATGACATGGACCCGGTA	60
	R	ATTGCTCCATGACAGTTGCT	
β -actin	F	GCACCCAGCACGATGAAAAT	60
	R	GACAATGGAGGGTCCGGATT	

尾距(Olive Tail Moment, OTM)、彗星尾长(Tail Length, TL)、彗星尾部DNA含量(Tail DNA%, TDNA%)、彗星尾距(Tail Moment, TM), 评估肝细胞DNA的损伤程度。

1.2.7 肝脏中TLR4/NF κ B通路相关基因蛋白表达水平的检测

(1) 总蛋白的提取及浓度测定

取2 mL离心管加入990 μL IP细胞裂解液和10 μL PMSF。剪取100 mg雏鹅肝脏样品于放入2 mL离心管, 加入一颗钢珠, 于样品研磨仪中, 35 Hz, 4次, 每次15 s, 中间停10 s, 充分研磨肝脏样品。冰上静置15 min, 每隔5 min缓慢摇匀一次。将肝脏匀浆于4 $^{\circ}\text{C}$, 12000 rpm离心20 min。取中间液体转移至新的1.5 mL离心管中。根据BCA试剂盒说明书测定待测样品的蛋白浓度。根据所测蛋白浓度, 用PBS平衡盐溶液将各个蛋白样品调至相同浓度, 以蛋白液:上样缓冲液(4:1)比例加入蛋白上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 恒温金属浴煮沸15 min后于-80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存备用。

(2) 蛋白免疫印迹

将配置好的SDS-PAGE胶组装在Western-Blotting电泳系统中, 加入蛋白电泳缓冲液, 每孔上样量为15 μL (蛋白总量为15 μg), 蛋白marker

上样 5 μL , 80 V 电泳 20 min, 待 marker 达到分离胶, 改用 120 V, 电泳 40 min 至蛋白 marker 达到分离胶底部, 停止电泳。转膜: 小心撬开电泳凝胶板, 裁取目的蛋白部分的分离胶放入预冷的转膜液, 取适量大小的 PVDF 膜, 制备“三明治”。组装湿转系统, 灌满转膜液, 没过“三明治”, 室温 120 V 转膜 60 min。利用 PBST 配制 5% 的脱脂牛奶, 将 PVDF 膜从湿转系统中取出, 并用 PBST 洗 2~3 次, 每次 5 min, 加入适量脱脂奶粉, 室温摇床上封闭 60 min。封闭完成后, 用 PBST 洗封闭后的 PVDF 膜 3 次, 每次 5 min。用 PBST 按说明书参考比例稀释一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。PVDF 膜用 PBST 洗 3 次, 每次 5 min。用 PBST 稀释 HRP 标记的对应种属的二抗, 比例为 1:2000, 室温摇床孵育 60 min。用 PBST 洗 PVDF 膜 3 次, 每次 10 min。按 1:1 的比例将 ECL 发光剂中 A 液和 B 液混匀, 加入 PVDF 膜中, 避光反应 3 min, 用化学发光成像系统对蛋白条带进行曝光、拍照。使用 1.4.1 ImageJ 分析软件分析拍摄图像中目的蛋白的灰度值。以 GAPDH 作为参照蛋白, 以目的蛋白灰度值/GAPDH 的灰度值表示蛋白的相对表达量。

1.3 数据统计与分析

使用 Graphpad Prism 7.0 处理数据, 采用单因素方差分析法中的 Tukey 检验进行多重比较, 表格中数据以“平均值 \pm 标准差”表示, 表格中数据肩部字母及柱状图上方标识字母不同者差异显著 ($P < 0.05$), 相同者表示差异不显著 ($P > 0.05$)。

2 结果

2.1 白术多糖对雏鹅肝脏及胆囊指数的影响

采集肝脏样品时发现, CTX 组雏鹅肝脏肿大、边缘钝圆、表面光滑, 切面微隆突; 胆囊失去弹性, 体积明显萎缩。肝脏及胆囊指数结果显示(表 3), CTX 组雏鹅肝脏指数显著高于其他 3 组 ($P < 0.05$), 胆囊指数显著低于 control 组和 PAMK 组 ($P < 0.05$), 与表观印象相符合。PAMK 组肝脏及胆囊指数均与 control 组无差异 ($P > 0.05$)。白术多糖干预后, 肝脏指数下降至正常水平, 显著低于 CTX 组 ($P < 0.05$), 但胆囊指数与 CTX 组差异不显著 ($P > 0.05$)。PAMK 组雏鹅活重显著高于其他试验组 ($P < 0.05$)。

表 3 各试验组雏鹅肝脏及胆囊指数

组别	雏鹅活重(kg)	肝脏指数(g/kg)	胆囊指数(g/kg)
control 组	1.29 \pm 0.15 ^b	36.62 \pm 2.81 ^b	1.70 \pm 0.08 ^a
PAMK 组	1.50 \pm 0.13 ^a	34.87 \pm 1.44 ^b	1.70 \pm 0.15 ^a
CTX 组	1.13 \pm 0.11 ^b	45.53 \pm 1.83 ^a	1.33 \pm 0.13 ^b
PAMK + CTX 组	1.16 \pm 0.03 ^b	31.73 \pm 2.75 ^b	1.65 \pm 0.13 ^{ab}

注: 肩部字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$), 肩部字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$)

2.2 白术多糖对雏鹅肝组织结构的影响

雏鹅肝脏 Masson 染色结果显示(图 1), control 组和 PAMK 组肝组织结构正常, 汇管区周围纤维厚度适中, 肝细胞排列有序; CTX 组肝细胞损伤明显, 胞浆内容物稀少, 着色变浅, 肝血窦扩张明显, 肝索结构模糊, 汇管区纤维组织增厚、浓染(图 1 中蓝色部分); PAMK + CTX 组肝细胞形态明显恢复, 肝索清晰, 肝血窦大小适中, 但汇管区纤维化程度并未减轻。

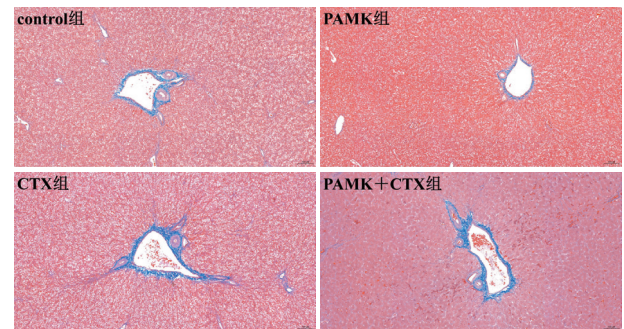


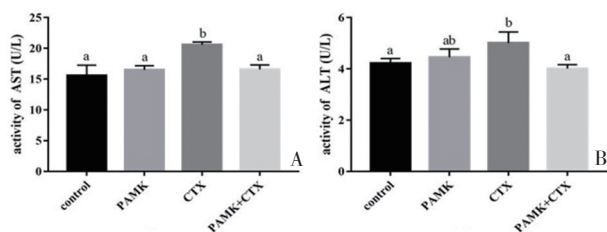
图 1 各试验组雏鹅肝组织结构的变化(Masson 染色 100 \times)

2.3 白术多糖对雏鹅肝功能指标的影响

如图 2 所示, CTX 组雏鹅血清中 AST 和 ALT 的活性相较于 control 组显著升高 ($P < 0.05$), PAMK 组与 control 组无明显差异 ($P > 0.05$); 与 CTX 组相比, PAMK + CTX 组雏鹅血清中 AST 和 ALT 的活性显著降低 ($P < 0.05$), ALT 和 AST 水平与 control 组和 PAMK 组无差异 ($P > 0.05$)。

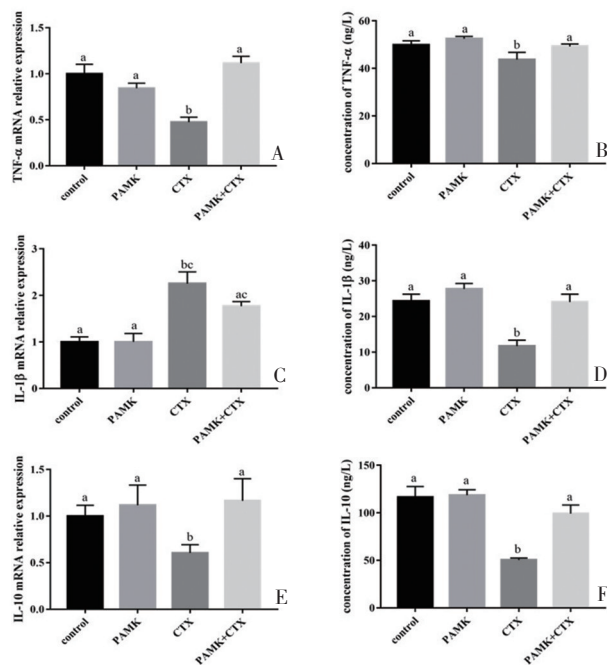
图 3 所示, 在转录水平上, 与 control 相比, CTX 组雏鹅肝脏中的 TNF- α 和 IL-10 的 mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$), IL-1 β 的 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), PAMK 组和 PAMK + CTX 组均无差异 ($P > 0.05$); 与 CTX 组相比, PAMK + CTX 组

雏鹅肝脏中TNF- α 和IL-10的mRNA表达水平显著升高($P<0.05$), IL-1 β 的mRNA表达水平无差异($P>0.05$)。



注: A: AST的活性; B: ALT的活性; 柱状图字母不同表示差异显著($P<0.05$), 相同表示差异不显著($P>0.05$)。下同

图2 各试验组雏鹅血清中AST、ALT的活性变化



注: A: TNF- α mRNA 相对表达水平; B: TNF- α 蛋白含量; C: IL-1 β mRNA 相对表达水平; D: IL-1 β 蛋白含量; E: IL-10 mRNA 相对表达水平; F: IL-10 蛋白含量

图3 各试验组雏鹅肝脏中细胞因子mRNA相对表达水平和蛋白含量的变化

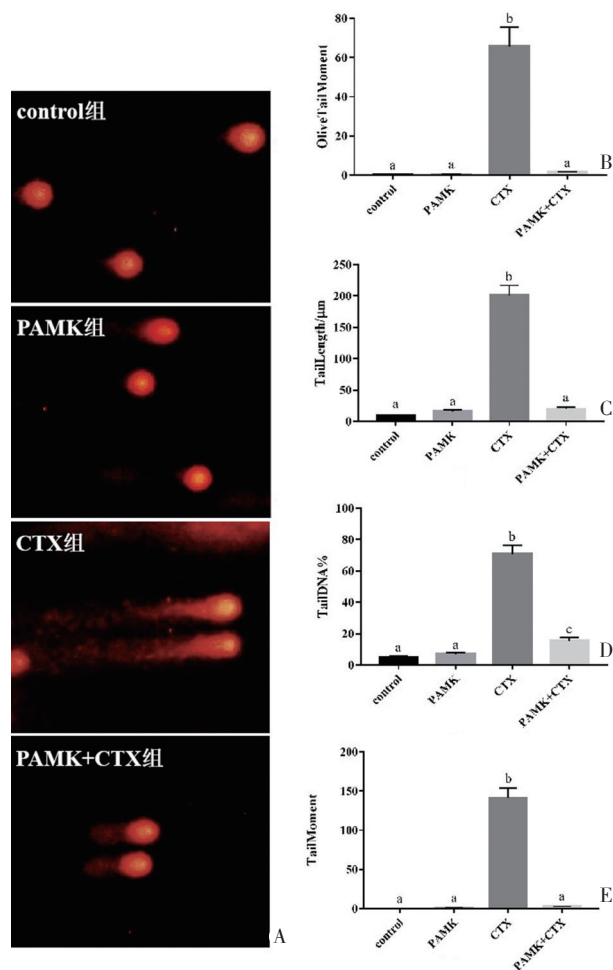
在蛋白水平上, 与control组相比, CTX组雏鹅肝脏中TNF- α 、IL-1 β 和IL-10的蛋白浓度显著降低($P<0.05$), PAMK组未出现明显差异($P>0.05$); 与CTX组相比, PAMK+CTX组雏鹅肝脏中TNF- α 、IL-1 β 和IL-10蛋白浓度显著升高($P<0.05$), 与control组无显著差异($P>0.05$)。环磷酰胺对IL-1 β 的

mRNA转录水平与蛋白分泌的作用效果相反, 而白术多糖能有效调节IL-1 β 的异常变化。

2.4 白术多糖对雏鹅肝细胞DNA损伤的影响

在荧光倒置显微镜下观察各组雏鹅肝细胞(图4A), control组和PAMK组雏鹅肝细胞形态良好, 细胞核完整, 呈圆形, DNA未出现破碎和迁移。CTX组雏鹅肝细胞带有一段很长的彗星状尾部, DNA出现了破碎并迁移, 表明DNA受损严重。而PAMK+CTX组肝细胞彗星状尾部明显变短。

OTM、TL、TDNA%和TM指标结果显示(图4B-4E): 与control组相比, CTX组的4项指标均显著升高($P<0.05$), PAMK组无显著性差异($P>0.05$), PAMK+CTX组中的TDNA%显著升高($P<0.05$), 其余指标无显著性差异($P>0.05$); 与CTX组相比, PAMK+CTX组的4项指标均显著下降($P<0.05$)。



注: A: 彗星实验; B: OTM; C: TL; D: TDNA%; E: TM

图4 各试验组雏鹅肝细胞彗星实验结果

2.5 白术多糖对肝组织 TLR4/NF- κ B 通路中关键基因蛋白水平的影响

如图 5 所示,与 control 组相比,CTX 组雏鹅肝脏中的 TLR4、NF- κ B1、TRAF6 和 IKK ϵ 蛋白水平显著降低($P<0.05$), I κ B α 蛋白水平显著升高($P<0.05$), MyD88 蛋白水平差异不显著($P>0.05$); PAMK 组中所有基因的蛋白水平无显著性差异($P<0.05$); PAMK+CTX 组雏鹅肝脏中 NF- κ B1 和 IKK ϵ 蛋白水平显著降低($P<0.05$), 其余基因蛋白无明显变化趋势($P>0.05$)。与 CTX 组相比, PAMK+CTX

组 TRAF6 蛋白水平显著升高($P<0.05$), I κ B α 蛋白水平显著降低($P<0.05$)。

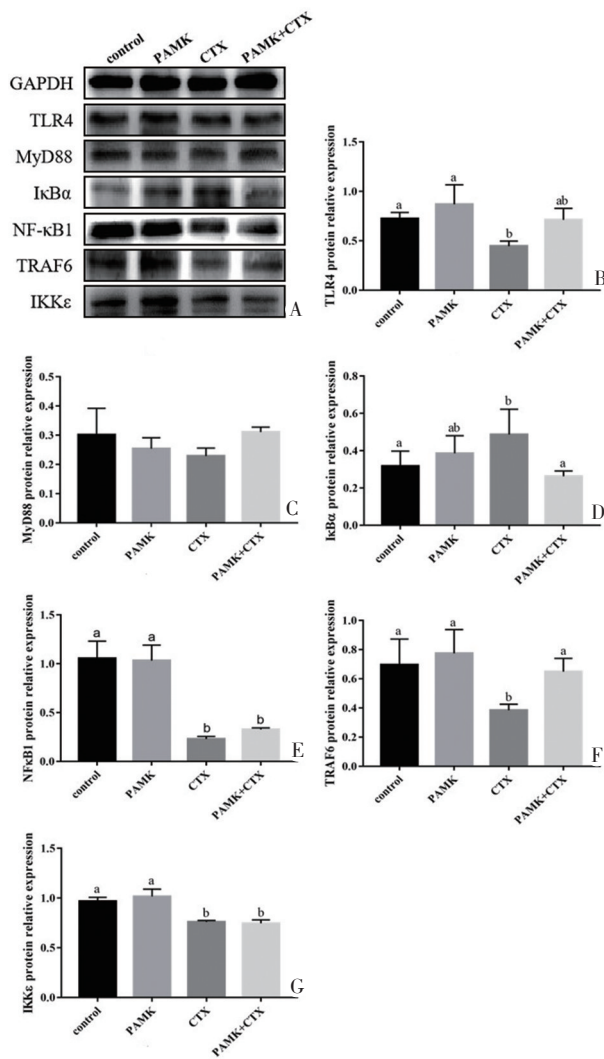
3 讨论

3.1 白术多糖对雏鹅肝脏组织结构和肝功能的保护作用

为模拟饲养环境中雏鹅的免疫力低下,本实验选择环磷酰胺作为诱导剂,建立稳定的免疫抑制雏鹅模型^[12-13]。有研究表明,环磷酰胺能造成肝细胞糖原减少、肝细胞肿大,并出现炎性细胞浸润、肝功能恶化等不良影响,进而导致固有免疫功能严重下降^[14-15]。本研究结果证实,以 40 mg/kg·BW 剂量连续 3 d 给予雏鹅环磷酰胺注射液,可使雏鹅肝脏指数升高,胆囊指数降低,结合表观形态发现,环磷酰胺处理下肝脏指数的增大并不是良性的生长发育,说明环磷酰胺成功诱导了肝脏的病理性肿大和胆囊萎缩,提前饲喂 400 mg/kg 的白术多糖饲料能显著性降低免疫抑制雏鹅肝脏指数、升高胆囊指数。对环磷酰胺造成的雏鹅肝组织结构紊乱及肝细胞病变,饲喂白术多糖后得到明显的改善;前人研究也发现白术多糖的这种调节能力,夏建萍等发现白术多糖可减轻非酒精性脂肪肝大鼠肝脏的脂肪变、炎性细胞浸润及点状坏死的症状,具有明显的防治效果^[16]。张杰等发现白术多糖对缺血再灌注损伤方法造成的大鼠肝细胞病理性凋亡有明显的抑制作用,减少凋亡细胞数量,恢复肝细胞的正常结构,作用效果显著^[17]。AST 和 ALT 是血清中的肝标志性酶,被认为是早期肝损害的有效指标,本实验在环磷酰胺诱导下,AST 和 ALT 活性显著升高,当白术多糖干预后,AST、ALT 指标下降至正常水平,表明肝细胞功能恢复良好^[18]。

3.2 白术多糖对雏鹅肝细胞的保护作用

彗星实验是检验细胞 DNA 损伤程度的常用方法, DNA 损伤越严重,产生的 DNA 碎片越多片段越小,彗星越多,尾部越长,并可通过软件对彗星图片进行定量分析,具有直观、客观的优点^[19]。实验结果显示,环磷酰胺对肝细胞 DNA 可造成严重的损伤,白术多糖可显著降低彗星实验相关指标,显示了良好的拮抗能力,同时单独作用白术多糖并没有对肝细胞 DNA 造成损伤,说明 400 mg/kg 的



注: A: TLR4、MyD88、I κ B α 、NF- κ B1、TRAF6、IKK ϵ 和 GAPDH 的蛋白水平; B: TLR4 的蛋白相对表达水平; C: MyD88 的蛋白相对表达水平; D: I κ B α 的蛋白相对表达水平; E: NF- κ B1 的蛋白相对表达水平; F: TRAF6 的蛋白相对表达水平; G: IKK ϵ 的蛋白相对表达水平

图 5 各试验组雏鹅肝脏 TLR4、MyD88、NF- κ B1、TRAF6、I κ B α 、IKK ϵ 蛋白水平

剂量对雏鹅是安全无害的。

3.3 白术多糖保护雏鹅肝脏免疫功能的可能机制

在肝脏执行固有免疫功能的过程中,肝细胞及肝血窦免疫细胞群表面的TLR4在启动免疫应答及介导炎症反应过程中具有重要的意义,生理条件下也积极参与了清除机体自身有害物质的过程。有研究发现,NF- κ B作为TLR4下游非常重要的转录因子,当TLR4表达上调时,MyD88依赖性和非依赖性信号通路被激活,通过复杂的基因级联作用,进而激活或抑制NF- κ B,指导下游细胞因子的合成^[20-21]。TNF- α 、IL-1 β 、IL-10和TLR4/NF- κ B信号通路是密切相关的级联,对免疫和炎症过程有至关重要的作用^[22]。这3种细胞因子对机体免疫防御能力都起到了重要的调节作用,生理浓度下的TNF- α 是防御病原微生物的重要因子,IL-1 β 作为固有免疫和炎症的中枢介质,在固有免疫的启动、发挥作用过程中主要负责免疫细胞的募集和激活,诱导这些细胞分泌相关促炎因子,参与免疫和炎症的过程^[23]。IL-10对造血细胞具有重要的调节功能,也是限制炎症反应的重要因子,正常体内的IL-10对预防自身免疫性疾病有重要作用^[24]。本实验检测了肝组织中3种细胞因子的mRNA表达水平和蛋白含量,发现在环磷酰胺诱导下,肝组织内的TNF- α 和IL-10在基因和蛋白水平上均被显著抑制,IL-1 β 转录水平升高,而蛋白水平被抑制,说明环磷酰胺对TLR4/NF κ B信号通路密切关联的TNF- α 、IL-1 β 、IL-10有明显的抑制作用,引起肝组织内细胞因子失衡,免疫功能紊乱。白术多糖干预后,这3种细胞因子在基因和蛋白水平上均恢复了正常水平,而单独应用白术多糖也没有对3种细胞因子产生不良影响,因此可以看出,白术多糖对免疫抑制雏鹅肝组织中重要细胞因子的平衡有显著的调节能力,这种调节能力在免疫功能被抑制时表现强大,白术多糖对免疫失衡的调节能力和对正常机体的无害性,是其在临床应用的优势。

在此试验结果的基础上,我们进一步对肝组织中的TLR4/NF κ B信号通路关键基因进行了蛋白水平上的检测,结果发现,环磷酰胺对TLR4、TRAF6、IKK ϵ 、NF- κ B1抑制强烈,IkB α 蛋白高表达,表明环磷酰胺对MyD88依赖和非依赖性途径

都有抑制作用,这与炎性物质激活TLR4信号通路的作用机制完全不同,结合细胞因子的实验结果,我们可以得出环磷酰胺通过抑制TLR4/NF- κ B信号通路减少了TNF- α 、IL-1 β 、IL-10的合成,导致肝组织内固有免疫过程受到了干扰,机体表现出明显的免疫抑制状态,这与因恶劣因素阻碍幼稚免疫器官的发育,引起的免疫功能低下过程接近,也是本研究选择环磷酰胺制备模型的重要依据。在白术多糖的干预下,通路关键基因的蛋白水平大部分恢复至对照组水平,只有IKK ϵ 、NF- κ B1的蛋白水平没有恢复正常,这可能与实验设定的采样时间限制因素有关。在炎症研究中,利用脂多糖活化TLR4/NF- κ B信号通路可引起机体强烈的炎症反应,例如江勇在实验中发现,白术多糖可明显抑制过度活化的TLR4/NF- κ B信号通路,降低TNF- α 、IL-1 β 、IL-6水平,减轻了大鼠的炎症反应^[25]。朱云等在针对癌细胞研究中发现,白术多糖可抑制肝癌细胞体外增殖及侵袭,这种抑制作用具有剂量依赖性,并可能是通过调控Wnt/ β -catenin信号通路而发挥作用^[26]。这些研究结果说明,白术多糖对机体病理进程的调节是趋向于维持机体内环境的稳态,当生理过程被抑制时,可活化被抑制的细胞因子或效应通路基因,当过度刺激时,可抑制过度活跃的细胞因子或基因,从而起到双向调节的作用。

本研究还发现,单独应用白术多糖,对通路基因的蛋白水平都没有不良影响,能够维持通路的稳定性,因此可以认为,白术多糖作用于健康雏鹅肝脏,不会引起不良反应,组织结构观察及肝功能指标的检测也证实了这一结论。上述试验结果在分子层面上初步解释了白术多糖有可能是通过解除环磷酰胺对TLR4/NF- κ B通路关键基因的抑制,恢复通路对下游细胞因子的调控功能,从而发挥保肝护肝作用。

4 结论

本试验结果显示,利用40 mg/kg剂量的环磷酰胺可以成功构建免疫抑制性雏鹅肝损伤模型,400 mg/kg白术多糖对免疫抑制性肝损伤有明显的缓解作用。免疫抑制性肝损伤时,TLR4/NF κ B信号通路及密切关联的下游细胞因子分泌被抑制,白术多

糖通过激活 TLR4/NF κ B 信号通路中的关键节点基因,解除抑制状态,调节下游细胞因子的分泌平衡,进而发挥正向调节作用。

参考文献:

- [1] SAMUEL V T, SHULMAN G I. Nonalcoholic fatty liver disease as a nexus of metabolic and hepatic diseases [J]. *Cell Metabolism*, 2018, 27(1):22-41.
- [2] JENNE C N, KUBES P. Immune surveillance by the liver [J]. *Nature Immunology*, 2013, 14(10):996-1006.
- [3] IGNACIO A, BREDA C N S, CAMARA N O S. Innate lymphoid cells in tissue homeostasis and diseases [J]. *World Journal of Hepatology*, 2017, 9(23):979-989.
- [4] NAGY P T S S G. Organizational principles of the liver [J]. *The Liver: Biology and Pathobiology*, 2020:1-13.
- [5] EMERIC G W R, FRANCOIS Z N, FLORENCE F A, et al. Abusive use of antibiotics in poultry farming in Cameroon and the public health implications [J]. *British Poultry Science*, 2016, 57(4):483-493.
- [6] 吴文斌,安娜,裴小静,等.基于“治未病”探讨证候类中药新药的临床研究[J].*中药药理与临床*, 2017, 33(3):209-211.
- [7] 许荣忠,李雁.试论中医药治疗肿瘤中扶正祛邪与免疫的关系[J].*辽宁中医杂志*, 2018, 45(9):1858-1859.
- [8] JI G Q, CHEN R Q, ZHENG J X. Macrophage activation by polysaccharides from *Atractylodes macrocephala* Koidz through the nuclear factor-kappaB pathway [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2015, 53(4):512-517.
- [9] 焦艳,唐娜,王嫦鹤.白术多糖对小鼠 Kupffer 细胞免疫功能的激活作用[J].*西北药学杂志*, 2013, 28(6):607-610.
- [10] 车财妍,李红山,应豪,等.白术多糖对非酒精性脂肪性肝炎的防治作用研究[J].*中华中医药学刊*, 2017, 35(7):1801-1803.
- [11] MIAO Y F, GAO X N, XU D N, et al. Protective effect of the new prepared *Atractylodes macrocephala* Koidz polysaccharide on fatty liver hemorrhagic syndrome in laying hens [J]. *Poultry Science*, 2021, 100(2):938-948.
- [12] DUGGINA P, KALLA C M, VARIKASUVU S R, et al. Protective effect of centella triterpene saponins against cyclophosphamide - induced immune and hepatic system dysfunction in rats: Its possible mechanisms of action [J]. *Journal of Physiology Biochemistry*, 2015, 71(3):435-454.
- [13] CENGIZ M, KUTLU H M, CENGIZ B P, et al. Escin attenuates oxidative damage, apoptosis and lipid peroxidation in a model of cyclophosphamide - induced liver damage [J]. *Drug and Chemistry Toxicology*, 2020:1-8.
- [14] KIM D W, CHUNG K T. *Ulmus macrocarpa* Hance Reduces Cyclophosphamide-induced Toxicity in Mouse Liver [J]. *Journal of Life Science*, 2021, 2(31):223-228.
- [15] BHAT N, KALTHUR S G, PADMASHALI S, et al. Toxic effects of different doses of cyclophosphamide on liver and kidney tissue in swiss albino mice: A histopathological study [J]. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, 2018, 28(6):711-716.
- [16] 夏建萍,应豪,胡爱荣,等.非酒精性脂肪性肝病肝脏脂肪转运环节的变化及白术多糖的干预作用[J].*中国卫生检验杂志*, 2017, 27(4):461-463.
- [17] 张杰,刘歆农,张培建,等.白术多糖预处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的实验研究[J].*中国现代普通外科进展*, 2013, 16(6):421-425.
- [18] 王昌生,黎雄.血清 ALT、AST、ALP、GGT 与早期糖尿病患者肝损害的相关性分析[J].*中国地方病防治杂志*, 2017, 32(1):104.
- [19] SCHNEIDER G T, SCHLORMANN W. Comet assay: An essential tool in toxicological research [J]. *Archives of Toxicology*, 2016, 90(10):2315-2336.
- [20] MUNOZ I G, COMPTE M, CIENFUEGOS A, et al. Lipopolysaccharide activates Toll - like receptor 4 (TLR4) - mediated NF - kappaB signaling pathway and proinflammatory response in human pericytes [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(4):2457-2468.
- [21] CARBALLO C V, HUE M G, CABALLERO C G, et al. Toll-Like receptors in acute kidney injury [J]. *International Journal of Molecular Science*, 2021, 22(2):816.
- [22] LIU X M, ZHANG X Y, WANG F L, et al. Improvement in cerebral ischemia - reperfusion injury through the TLR4/NF - kappaB pathway after Kudiezi injection in rats [J]. *Life Science*, 2017, 191:132-140.
- [23] 王涛,林琴,刘凤婷,等. IL-1、TNF- α 在免疫性肝损伤过程中对代谢酶 CYP2E1 的调控作用 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(8):1160-1164.
- [24] 王兰,杨瑞宁. IL-9、IL-10 在免疫性肝损伤中的作用及临床意义 [J]. *检验医学与临床*, 2017, 14(20):3011-3014.
- [25] 江勇,朱大侠,刘礼剑.白术多糖通过调控 TLR4/NF- κ B 信号通路对重症急性胰腺炎大鼠肠黏膜免疫屏障的影响 [J]. *中成药*, 2021, 43(3):624-629.
- [26] 朱云,李成,林鑫盛,等.白术多糖对肝癌细胞增殖及侵袭的抑制作用及其机制 [J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(10):1180-1185.

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.02.03

新城疫病毒对鸡外周血T淋巴细胞迁移的影响

林楚晓, 何静怡, 何燕华, 计坚, 罗成龙*

(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, 农业农村部家禽遗传育种重点实验室, 广东省动物育种与营养公共实验室, 广东省畜禽育种与营养研究重点实验室, 广东广州 510640)

摘要:本试验研究新城疫病毒(Newcastle disease virus, NDV)对鸡外周血T淋巴细胞迁移的影响, 为探讨鸡对NDV免疫应答机制提供理论支撑。采用Transwell共培养, 上室为淋巴细胞, 下室为树突状细胞(Dendritic cells, DC), 通过NDV攻毒刺激后, 分别在第0、2、4、6 h收集各个时间点上室淋巴细胞悬液, 用流式细胞法计数得出总T淋巴细胞迁移率, 确定淋巴细胞与树突状细胞迁移共培养时间模型为2 h。进一步分析NDV对野生型(TT)、杂合型(CT)和纯合型(CC)的三种岭南黄羽肉鸡的外周血总T淋巴细胞迁移率的影响。结果表明:树突状细胞攻毒刺激2 h后的淋巴细胞迁移率为45.04%;在攻毒组中, CT基因型鸡淋巴细胞的总T淋巴细胞迁移率最高为60.03%, TT基因型鸡淋巴细胞的总T淋巴细胞迁移率最低为45.40%, 两组间差异显著($P < 0.05$);而CT和CC基因型之间没有差异($P > 0.05$)。综上所述, 淋巴细胞迁移培养时间点为2 h比较适合;NDV攻毒后CT基因型的T淋巴细胞迁移率显著高于TT基因型。

关键词: 鸡; 新城疫病毒; T淋巴细胞; 细胞迁移

中图分类号: S852.65*7 **文献标识码:** A **文章编码:** 1005-8567(2022)02-0014-04

Effect of newcastle disease virus on the migration of peripheral blood T lymphocytes of chickens

LIN Chuxiao, HE Jingyi, HE Yanhua, JI Jian, LUO Chenglong*

(Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, State Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding, Guangdong Key Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The purpose of this experiment was to study the effect of Newcastle Disease Virus (NDV) on the migration of peripheral blood T lymphocytes in different genotypes of Yellow-feathered chickens, and to provide theoretical knowledge for exploring the immune response mechanism of chickens to NDV. Using Transwell co-culture system, the upper chamber and the lower chamber were cultured with lymphocytes and dendritic cells, respectively. After NDV challenging, the lymphocyte suspension was collected at 0, 2, 4, 6 h of each time point. The total T lymphocyte migration rate was obtained by the flow cytometry method and the optimal co-cultivation time was

收稿日期:2022-02-10

基金项目:广东省自然科学基金项目(2018B030311044);金额之光项目(R2020PY-JG008);农业种业共性关键技术创新团队建设--鸡分子育种专题专家(2021KJ106)

作者简介:林楚晓(1992-),女,畜牧助理实验师。E-mail:Chuxiaolin0808@163.com

*通讯作者:罗成龙(1981-),男,研究员,硕士生导师,研究方向为家禽育种。E-mail:chenglongluo@163.com

determined. Then the migration rate of total T lymphocytes in wild-type (*TT*), hybrid-type (*CT*) and homozygotic-type (*CC*) were compared after NDV challenge. The results showed that the migration rate of total T lymphocytes was 45.04% after 2 hours of NDV challenge. In the groups challenged by virus, the migration rate of total T lymphocytes in *CT* genotype was 60.03%, and the total T lymphocytes migration rate in *TT* genotype was 45.40%. There was a significant difference between the two genotypes ($P < 0.05$). However, there was no significant difference between *CT* and *CC* genotype ($P > 0.05$). In conclusion, the time of optimal lymphocytes culture was 2 hours, which was suitable for cell migration. After NDV challenge, the migration rate of total T lymphocytes in *CT* genotype was faster than that of *TT* genotype.

Keywords: chickens; Newcastle disease virus; T lymphocytes; Cell migration

新城疫是由新城疫病毒(Newcastle Disease Virus, NDV)/副粘病毒科副粘病毒亚科腮腺炎病毒属的禽副粘病毒I型引起的一种热性、急性的禽类传染病。新城疫作为我国“一类动物疫病”,多年来都是养鸡业的头号威胁之一,给养鸡业造成了巨大的经济损失。

目前新城疫研究主要集中在病原学和流行病学方面,对宿主特异性免疫的研究仍较少。据报道,不同遗传背景的鸡对新城疫具有明显的抗病差异^[1]。淋巴细胞包括T淋巴细胞和B淋巴细胞等许多具有不同免疫功能的亚群,是机体免疫应答功能的重要细胞成分。树突状细胞是一类多功能抗原提呈细胞,在固有免疫和适应性免疫应答的启动及调控中发挥重要作用。树突状细胞摄取抗原后能刺激T细胞增殖活化,开启机体适应性免疫应答^[2]。多种NDV载体疫苗能诱导机体产生免疫应答,诱导树突状细胞活化,但NDV强毒会诱导树突状细胞凋亡,阻碍抗原递呈,抑制T细胞增殖与活化^[3]。采用Transwell试验研究树突状细胞在NDV刺激CD4⁺T淋巴细胞增殖中的作用,表明NDV病毒抑制T细胞增殖需要依赖树突状细胞和T细胞相互接触^[4]。当前宿主对NDV免疫应答的研究仍主要集中于T淋巴细胞和B淋巴细胞的反应研究,而对于不同基因型鸡淋巴细胞反应鲜见报道^[5-7]。

本研究旨在探索如何建立鸡的外周血淋巴细胞和树突状细胞Transwell共培养模型,并以分析NDV对不同基因型鸡外周血T淋巴细胞迁移的影响,为进一步研究鸡对NDV特异性免疫应答的作用机制奠定基础。

1 试验材料

NDV LaSota株由广东永顺生物制药股份有限公司制备提供;75%乙醇由本实验室配制、ddH₂O配制成(0.01M, pH7.2-7.4)高压灭菌,4℃保存;2.5 mL采血管和采血针购自广州市昊升生物科技有限公司、3 mL巴氏管FALCON购自广州市路祥生物科技有限公司、细胞培养相关耗材购自Thermo公司;Transwell 24孔(含8.0 μm膜)培养板为美国Corning公司、鸡外周血淋巴细胞分离液试剂盒与PBS粉剂均为北京Solarbio公司、澳洲源胎牛血清和RPMI-1640 basic(1X)培养基为美国gibco公司、鼠抗鸡CD3⁺单克隆抗体为美国Southern Biotech公司。倒置显微镜(型号:TH4-200)为OLYMPUS公司,细胞计数仪(型号:TC20™)为美国BIO-RAD公司,流式细胞仪(型号:FACSCalibur)为美国Becton Dickinson公司。

2 实验动物

取200日龄rs15354805位点的野生型(*TT*)、杂合型(*CT*)和纯合型(*CC*)的岭南黄羽肉鸡各3羽,由广东省农业科学院动物科学研究所提供。

3 方法

3.1 外周血淋巴细胞分离

主要操作步骤取如下:(1)一支15 mL离心管,加入3 mL分离液置于22℃复温;(2)分别将不同基因型个体(每种基因型个体都为3个)吸出3 mL血液加于分离液之液面上,22℃400 g/min离心20 min;(3)离心后,用3 mL巴氏管小心吸出分离液上层0.5 cm以上的上清液部分,弃去;(4)用3 mL巴氏管小心吸取分离液层及淋巴细胞层至另

一个新15 mL离心管内;(5)在步骤4中所得离心管中加入10 mL细胞洗涤液混匀;(6)22 ℃ 250 g/min离心10 min;(7)弃去上清;(8)用3 mL巴氏管加入5 mL细胞洗涤液重悬所得细胞;(9)22 ℃ 250 g/min离心10 min;(10)去上清。重复步骤(8)~(10)后取0.5 mL已分离的淋巴细胞进行后续实验;加入10 mL 10%FBS RPMI1640重悬细胞,39 ℃、5%CO₂培养过夜,次日显微镜观察。

3.2 骨髓源树突状细胞分离

参照何静怡(2017)方法,将雏鸡窒息处死后浸泡于75%酒精中;待皮毛完全湿润后,在无菌超净台内,用剪刀和镊子分离出股骨和胫骨,并置于PBS中;去除上皮和肌肉,PBS清洗3~5次;剪去两端软骨,PBS冲洗骨髓至发白为止,收集组织液;组织悬液至15 mL离心管,1400 r/min离心5 min,弃去上清;1 mL红细胞裂解液静置3 min;加入等体积PBS终止反应,1400 r/min离心5 min,弃去上清液;5 mL完全培养基(含GM-CSF和IL-4的10%FBS RPMI1640)重悬沉淀;100 μm细胞筛网过滤悬液;以5×10⁷个/mL接种于12孔板中,39 ℃、5% CO₂培养,隔天换液;显微镜观察和记录^[8]。

3.3 淋巴细胞与树突状细胞共培养

采用野生型(*TT*)鸡外周血淋巴细胞与骨髓源树突状细胞,用24孔含8.0 μm膜的Transwell板共同培养。每孔吸取100 μL浓度为1×10⁷个/mL淋巴细胞接种于上室。每孔吸取600 μL浓度为5×10⁵个/mL树突状细胞接种于下室,然后放置39 ℃、5% CO₂培养箱培养2 h。树突状细胞贴壁后,接种100 μL/孔NDV LaSota株,放置39 ℃、5% CO₂培养箱共培养0、2、4、6 h,然后收集上室和下室淋巴细胞悬液,并用流式细胞仪测定CD3⁺总T淋巴细胞迁移细胞含量,确定适宜的T淋巴细胞迁移时间点。

计算公式如下:

$$\text{细胞迁移率}(\%) = \frac{\text{下室的细胞总数}}{\text{加入上室的细胞总数}} \times 100\%$$

3.4 不同基因型鸡外周血总T淋巴细胞迁移率的测定

参照3.3方法中的细胞共培养模型中确定的T淋巴细胞迁移时间点,分别采取不同基因型(*TT*、

CC、*CT*)鸡外周血淋巴细胞与鸡骨髓源树突状细胞在39 ℃ 5% CO₂共同培养,每个基因型分攻毒组和不攻毒组,重复进行3批次。共培养已确定的时间段后,收集各组上室淋巴细胞悬液,1400 r/min离心5 min弃去上清液;加入300 μL PBS重悬细胞,1400 r/min离心5 min弃去上清液;每管样品1×10⁶个细胞,吸取90 μL淋巴细胞与10 μL鼠抗鸡CD3⁺单克隆抗体、无菌PBS混匀重悬细胞后,避光室温孵育30 min;加入300 μL无菌PBS缓冲液洗涤重悬细胞,1400 r/min离心离心5 min,重复两次洗涤;每管样品使用200 μL无菌PBS缓冲液重悬细胞后转移至流式管中,立刻上机用流式细胞仪测定CD3⁺总T淋巴细胞迁移细胞含量。

3.5 数据统计分析

试验数据采用SAS 9.3(SAS Institute Inc, USA)软件进行数据处理,数据均以平均值和均值标准误(SEM)表示。采用单因素方差分析,Tukey法检验,统计显著性水平为 $P < 0.05$ 。

4 结果

4.1 不同时间段新城疫病毒对鸡淋巴细胞迁移率的影响

本试验采用Transwell板共同培养技术和流式细胞仪评价了NDV感染对不同基因型鸡的CD3⁺总T淋巴细胞迁移率的影响。结果如表1所示。结果表明,接毒NDV后2、4和6 h上室淋巴细胞迁移率分别为45.04%、87.36%和90.56%,接毒后4、6 h上室淋巴细胞迁移率基本迁移完毕。因此选共培养2 h为时间点进行NDV对不同基因型鸡淋巴细胞迁移的影响实验。

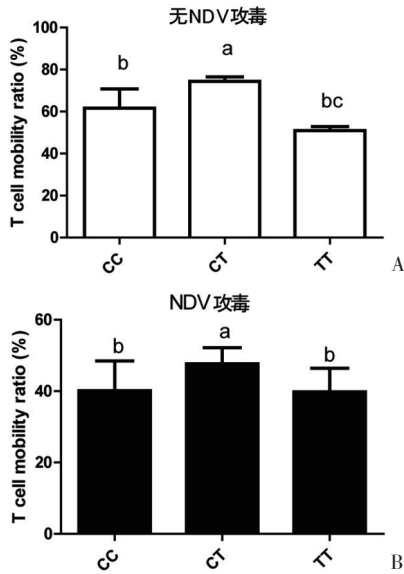
表1 不同时间段新城疫病毒对鸡淋巴细胞迁移率的影响

共培养时间(h)	浓度(个/ml)	体积(ml)	淋巴细胞总数(个)	剩余比例(%)	迁移比例(%)
0	1.25×10 ⁷	0.1	1.25×10 ⁶	100	0
2	6.87×10 ⁶	0.1	6.87×10 ⁵	54.96	45.04
4	1.58×10 ⁶	0.1	1.58×10 ⁵	12.64	87.36
6	1.18×10 ⁶	0.1	1.18×10 ⁵	9.44	90.56

4.2 新城疫病毒对不同基因型鸡淋巴细胞迁移率的影响

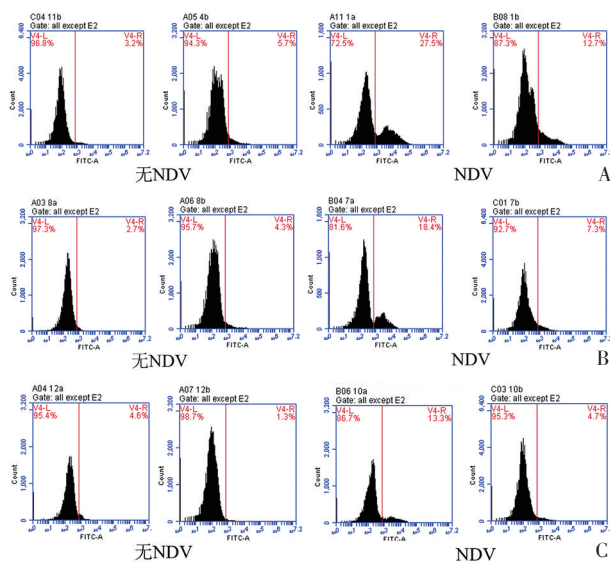
结果表明,与对照组相比,NDV攻毒组

CD3⁺ 总T淋巴细胞迁移率下降, 对T淋巴细胞迁移具有明显的抑制作用。攻毒组中, CT基因型鸡淋巴细胞总T淋巴细胞迁移率最高为60.03%, TT基因型鸡淋巴细胞总T淋巴细胞迁移率最低为45.40%, 两组间差异显著($P < 0.05$); 而CT和CC基因型则无显著差异($P > 0.05$), 见图1和图2。



注:A:无NDV攻毒;B:NDV攻毒

图1 不同基因型T淋巴细胞迁移率



注:A:CC基因型;B:CT基因型;C:TT基因型

图2 不同基因型NDV攻毒组合对照组 Transwell上室与下室总T淋巴细胞数目

5 讨论

淋巴细胞是不均一的细胞群体, 包括许多具有不同免疫功能的亚群; T淋巴细胞和B淋巴细胞是其中最主要的两大群体, 是机体免疫应答功能、对抗外界的感染的重要细胞成分^[8]。树突状细胞(Dendritic Cells, DC)是已知的功能最强的抗原提呈细胞, 它可以通过巨胞饮、吞噬和受体介导的内吞等方式提呈抗原。DCs作为连接天然免疫和获得性免疫的桥梁, 能够对病原发挥调节作用。一些病毒可以通过感染DCs起到逃避机体免疫监视, 促进感染等^[9]。

新城疫病毒(NDV)可严重损害免疫淋巴细胞系统, 能够引起鸡淋巴细胞的坏死, 同时可以诱导淋巴细胞凋亡^[10]。研究报道, NDV通过抑制小鼠细胞因子IL-12的分泌从而抑制树突状细胞抗原递呈, 并抑制T细胞的增殖活性^[3]。本研究发现, NDV对鸡外周血T淋巴细胞迁移具有明显的抑制作用。NDV攻毒后, 杂合型CT基因型鸡总T淋巴细胞迁移率明显高于野生型(TT)。有研究报道, 法尤米鸡相对于来航鸡对NDV的抵抗力更高, 其中几种干扰素刺激基因被认为是树突状细胞针对NDV调节免疫反应的重要基因^[11-12]。而且, 鸡对NDV的抵抗力似乎更多地取决于个体的基因组, 而不是其所在的生态环境^[13]。NDV主要通过巨胞饮作用和网格蛋白介导的内吞作用进入树突状细胞, 诱导Th1反应并降低Th2反应^[14]。干扰素主要由T细胞分泌, 因此本实验结果与以上结果也基本一致, 不同基因型T细胞对NDV免疫反应不一样。因此, 进一步深入研究杂合的CT基因型鸡rs15354805位点的关键调控基因对NDV免疫应答的作用机制, 将有助于其在新城疫抗病育种中的应用价值。

6 结论

在本试验条件下, NDV对鸡外周血T淋巴细胞迁移具有明显的抑制作用, CT基因型黄羽肉鸡总T淋巴细胞迁移率明显高于TT基因型。

参考文献:

[1] LAMONT S J. The chicken major histocompatibility complex and

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.02.04

日粮中添加发酵木薯渣对蛋鸡生产性能及蛋品质的影响

马旭东¹, 左清清¹, 孙海彦², 郑永清¹, 李伯松^{1*}

(1.中国热带农业科学院广州实验站, 广东 广州 510140;

2.中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海南省热带微生物资源重点实验室, 海南 海口 571011)

摘要: 试验旨在探讨发酵木薯渣对海兰褐蛋鸡生产性能及蛋品质的影响。选取39周龄240只健康海兰蛋鸡, 随机分成4组, 每组设5个重复, 每个重复12只。第1组为对照组, 饲喂基础日粮, 第2组、第3组、第4组为试验组, 分别饲喂添加5%、10%、15%发酵木薯渣的试验饲料。试验期28天。结果显示: ①各组平均蛋重差异不显著; 第2组与第1组生产性能指标均无显著差异($P > 0.05$), 随着发酵木薯渣添加比例的提高, 采食量与料蛋比显著提高($P < 0.05$), 产蛋数、产蛋率和总蛋重显著降低($P < 0.05$); ②发酵木薯渣对鸡蛋的蛋形指数无影响, 随着添加比例的提高, 蛋壳厚度显著降低($P < 0.05$), 哈氏单位和蛋黄颜色指数显著提高($P < 0.05$); ③试验期内, 第2组经济效益比第1组增加7.61元。试验表明, 海兰褐蛋鸡日粮中添加5%发酵木薯渣, 可有效改善蛋品质, 提高养殖效益。

关键词: 发酵木薯渣; 蛋鸡; 生产性能; 蛋品质

中图分类号: S816.6 文献标识码: A 文章编码: 1005-8567(2022)02-0018-04

Effects of dietary supplementation with fermented cassava residues on the performance and egg quality of laying hens

MA Xudong¹, ZUO Qingqing¹, SUN Haiyan², ZHENG Yongqing¹, LI Bosong^{1*}

(1.Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences Guangzhou Experimental Station, Guangzhou 510140, China;

2.Hainan Key Laboratory of Tropical Microbe Resources, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: The current study aimed to investigate the effects of dietary supplementation with fermented cassava residue on the performance and egg quality of Hy-Line brown laying hens. A total of 240 healthy Hy-Line laying hens aged 39 weeks were randomly allocated to 4 groups with 5 replicates per group and 12 hens per replicate. The control group was fed with basic diet, while the experimental groups were fed diets with 5%, 10% and 15% fermented cassava residue, respectively. The experiment lasted for 28 days. The results showed as follows: ① The feed intake and feed/egg were significantly increased with the increase of the proportion of fermented cassava residue ($P < 0.05$), while the

收稿日期: 2021-08-27

基金项目: 广州市科技计划项目(201904010201); 财政部和农业农村部; 国家现代农业产业技术体系资助(CARS-11-GDLBS); 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630112020001)

作者简介: 马旭东(1984-), 男, 助理研究员, 研究方向: 畜禽健康养殖、热带作物及副产物饲料化利用。E-mail: mxduanliao@163.com

*通信作者: 李伯松(1982-), 男, 副研究员, 研究方向: 木薯及农业废弃物综合利用。E-mail: 84490477@qq.com

number of egg production, laying rate, and total egg weight were significantly decreased ($P<0.05$). ② The shell thickness were significantly decreased with the increase of the proportion of fermented cassava residue ($P<0.05$), while the haugh unit and yolk color index were significantly increased ($P<0.05$). However, the egg shape index had no difference among the different groups ($P>0.05$). ③ Compared with control group, dietary supplementation with 5% fermented cassava residue increased the economic benefits by 7.61 yuan. Overall, our results indicated that dietary supplementation with 5% fermented cassava residue in Hy-Line brown laying hens increased the egg quality and improved the breeding efficiency.

Keywords: fermented cassava residue; laying hens; production performance; egg quality

木薯渣是木薯淀粉提取后中的下脚料混合物,其主要成分为淀粉、粗纤维和少量蛋白。因鲜木薯渣含水量超过80%,又富含可溶性营养物质,极易霉变腐败不耐贮存,导致利用率较低,造成资源浪费且污染环境^[1]。

随着饲料原料价格的不断升高,养殖业压力剧增,国家提出推进玉米豆粕减量替代工作,以及加大本土可利用饲料资源和非粮饲料原料开发力度,加快生物饲料开发应用的要求。木薯渣富含碳水化合物,但营养不均衡,适口性差,且含有一定的氢氰酸,长期饲喂会影响畜禽的生长和健康,极大限制了其在畜禽饲料中的应用^[2-3]。应用微生物发酵技术处理木薯渣可提高其营养价值并消除抗营养因子,还能产生消化酶和益生菌等,提高了木薯渣的营养价值和适口性^[4]。畜禽饲料中添加适量的发酵木薯渣,既实现了木薯加工副产物资源化利用的问题,也降低了养殖成本。

近年来,发酵木薯渣在畜禽养殖中的应用研究屡见报道。欧肇林等用发酵木薯渣替代玉米饲喂隆林黑猪,对生长性能、血液指标等均无不良影响^[5]。周璐丽等将木薯渣、木薯茎叶和王草混合发酵后饲喂海南黑山羊,提高了平均日增重和干物质采食量^[6]。俸祥仁等用发酵木薯渣饲料饲喂肉鸡可降低养殖成本、提高成活率,且以10%添加量效果最佳^[7]。本试验旨在研究发酵木薯渣替代海兰褐蛋鸡部分全价饲料对生产性能、蛋品质及养殖效益的影响,为发酵木薯渣作为饲料原料在蛋鸡生产上的合理利用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验原料

试验用鲜木薯渣购于阳春市盈发饲料商行,

玉米粉、豆粕、预混料购于广东新南都饲料科技有限公司。木薯渣发酵菌剂由中国热带农业科学院热带生物技术研究提供。鲜木薯渣适当晾晒后,含水量约60%时,将100 g红糖水溶后加入微生物菌剂,喷洒在80 kg木薯渣和20 kg豆粕表面,充分搅拌均匀后密封于单向阀发酵袋中发酵,发酵时间7 d。木薯渣发酵前后营养成分见表1。

表1 木薯渣发酵前后营养成分

	粗蛋白(%)	粗灰分(%)	粗纤维(%)	粗脂肪(%)
发酵前	10.54	3.54	16.34	0.86
发酵后	15.83	3.97	11.82	0.64

1.2 试验动物及设计

选取产蛋率为90%左右,平均体重1.6 kg,健康状况良好的39周龄海兰褐蛋鸡240只,随机分成4组,每组设5个重复,每个重复12只。第1组为对照组,饲喂基础日粮,第2组、第3组、第4组为试验组,分别用发酵木薯渣替代5%、10%、15%的基础日粮,粉料饲喂。试验期28天。

基础日粮参照1994年第9版美国NRC《家禽营养需要》和海兰公司蛋鸡营养标准配制,日粮组成及营养水平见表2。

1.3 饲养管理

试验过程于2019年8月在中国热带农业科学院广州实验站花都基地进行,全阶梯3层叠笼饲养,每日恒定光照16小时,自由采食、饮水,饲养管理条件相同。每天饲喂2次,上午6:30和下午16:30,喂料前称量,周末按照重复分别统计耗料量;每天采蛋2次,上午11:00和下午17:00,捡蛋后按照重复分别进行记数、标记和存放,计算产蛋率。

表2 蛋鸡产蛋期饲料配方及营养水平

原料	含量/%	营养水平	数值
玉米	64.71	代谢能(MJ/kg)	11.30
豆粕	19.20	粗蛋白/%	16.30
棉粕	1.70	赖氨酸/%	0.65
菜粕	2.00	蛋氨酸/%	0.41
鱼粉	1.50	钙/%	3.60
石粉	8.00	有效磷/%	0.30
食盐	0.30		
氯化胆碱	0.09		
磷酸氢钙	1.50		
1.0%预混料	1.00		

注:①复合预混料为每千克饲料提供铜 8.00 mg、铁 60.00 mg、锰 60.60 mg、锌 80.00 mg、硒 0.30 mg、碘 0.48 mg、维生素 E 8.40 mg、维生素 K3 3.45 mg、维生素 B1 0.8 mg、维生素 B2 3.75 mg、泛酸 5.40 mg、烟酸 20.00 mg、叶酸 0.45 mg 和生物素 0.10 mg, 维生素 A 8000 IU 和维生素 D3 2000 IU。②代谢能为计算值, 其余为实测值

1.4 指标测定与方法

1.4.1 生产性能指标的测定

以重复为单位, 试验期每天记录产蛋数量、产蛋重量和投料量, 并计算试验期内每个重复平均日采食量、每个重复平均总蛋重、平均蛋重、产蛋率和料蛋比。计算方式如下:

$$\text{产蛋率} = \text{产蛋数} / \text{鸡只数} \times 100\%$$

$$\text{平均蛋重} = \text{产蛋总重}(\text{g}) \div \text{总产蛋数}$$

$$\text{料蛋比} = \text{耗料总量}(\text{g}) / \text{产蛋总重}(\text{g})$$

1.4.2 蛋品质指标的测定

试验结束前一天, 各组随机抽取 20 枚蛋, 测定蛋形指数、蛋壳厚度、哈氏单位、蛋黄颜色。蛋形指数: 用游标卡尺测量蛋的横径和纵径, 则蛋形指数=横径/纵径。蛋壳厚度、蛋黄颜色、哈氏单位使用全自动蛋品质测定仪(DET-6000, 日本 Nabel)测定。

1.5 数据分析

试验数据以实测值计, 采用 SPSS17.0 统计软件进行方差分析, 并进行 Duncan 多重比较。以 $P < 0.05$ 作为差异显著性判断标准, 结果用“平均数±标准误”表示。

2 试验结果与分析

2.1 发酵木薯渣对蛋鸡生产性能的影响

由表 3 可知, 各组平均蛋重差异不显著($P > 0.05$), 但随着发酵木薯渣添加比例的提高, 有降低的趋势; 日采食量与料蛋比, 第 3 组比第 1、2 组显著提高($P < 0.05$), 第 4 组与相比其余三组显著提高($P < 0.05$); 在产蛋数、平均总蛋重和产蛋率上, 第 3、4 组相比第 1、2 组显著降低($P < 0.05$), 第 3、4 组之间差异不显著($P > 0.05$), 但均有降低趋势。第 2 组与第 1 组的生产性能指标差异均不显著($P > 0.05$), 采食量与料蛋比略高与第 1 组, 产蛋数、产蛋率、平均蛋重和每重复平均总蛋重略低于第 1 组, 但差异均不显著($P > 0.05$), 这说明添加 5% 的发酵木薯渣对海兰褐蛋鸡生产性能无较大影响。随着发酵木薯渣添加比例的提高, 采食量和料蛋比逐渐提高, 产蛋数与产蛋率逐渐降低。第 1 组与第 2 组优于第 3 组和第 4 组, 第 4 组最低。

2.2 发酵木薯渣对蛋品质的影响

由表 4 可知, 海兰褐蛋鸡饲料中添加不同比例的发酵木薯渣, 对鸡蛋的蛋形指数无影响($P > 0.05$), 各组蛋壳厚度、哈氏单位、蛋黄颜色均有显著差异($P < 0.05$), 随着发酵木薯渣添加比例的提高, 蛋壳厚度呈降低趋势, 哈氏单位和蛋黄颜色指数则逐渐增高。

2.3 发酵木薯渣对养殖效益的影响

由表 5 可见, 第 2 组、第 3 组和第 4 组产蛋量均

表3 发酵木薯渣对蛋鸡生产性能的影响

项目	第1组	第2组	第3组	第4组
每重复平均日采食量(g)	1498.17±28.65 ^a	1503.23±23.76 ^a	1544.58±30.37 ^{ab}	1600.12±44.58 ^{abc}
产蛋数(枚)	1541 ^a	1527 ^a	1474 ^{ab}	1452 ^{ab}
每重复平均总蛋重(g)	695.52±46.70 ^a	687.09±44.82 ^a	662.03±45.87 ^{ab}	651.09±54.88 ^{ab}
平均蛋重(g)	63.18±0.62	62.89±1.08	62.87±0.31	62.76±0.48
产蛋率(%)	91.73±0.18 ^a	90.77±0.22 ^a	87.74±0.17 ^{ab}	86.43±0.20 ^{ab}
料蛋比	2.16±0.04 ^a	2.17±0.05 ^a	2.33±0.04 ^{ab}	2.46±0.03 ^{abc}

注:同行数据肩标字母不同表示差异显著($P < 0.05$), 字母相同或无字母表示差异不显著($P > 0.05$)

低于第1组,耗料量均高于第1组,随着发酵木薯渣添加比例的递增,产蛋量呈下降趋势,耗料量则成上升趋势,其中第2组和对照组产蛋量和耗料量差异不大,由于发酵木薯渣与全价料对比,在成本上有较大优势,第2组在试验周期内的养殖效益高于对照组,第3组和第4组则低于第1、2组,第4组收益最低。

表4 发酵木薯渣对蛋品质的影响

组别	第1组	第2组	第3组	第4组
蛋形指数	1.292±0.01	1.295±0.01	1.290±0.01	1.293±0.01
蛋壳厚度 (cm)	0.327±0.005 ^a	0.322±0.004 ^{ab}	0.312±0.008 ^{ac}	0.305±0.009 ^{ad}
哈氏单位	83.97±0.67 ^a	84.56±0.49 ^{ab}	84.81±0.51 ^{ac}	85.45±0.51 ^{ad}
蛋黄颜色	6.04±0.23 ^a	6.29±0.12 ^{ab}	6.46±0.11 ^{ac}	6.59±0.12 ^{ad}

注:同行数据肩标字母不同表示差异显著($P<0.05$),字母相同或无字母表示差异不显著($P>0.05$)

表5 发酵木薯渣对蛋鸡养殖经济效益的影响

项目	第1组	第2组	第3组	第4组
产蛋量/kg	97.35	96.19	92.68	91.15
蛋价/(元/kg)	6.3	6.3	6.3	6.3
收入/元	613.305	605.997	583.884	574.245
耗料量/kg	209.74	210.45	216.24	224.02
料价/(元/kg)	2.7	2.62	2.54	2.46
饲料支出/元	566.3	551.38	549.25	551.09
收益/元	47.01	54.62	34.63	23.16

3 讨论

3.1 发酵木薯渣对蛋鸡生产性能的影响

生物饲料在蛋鸡养殖中的应用越来越广泛^[8]。生物饲料中富含大量益生菌及其代谢产物,可将复杂多糖、脂肪和蛋白质等大分子物质,降解成易被消化、吸收的小分子物质,有利于饲料中营养物质的利用,进而提高饲料转化率和动物生产性能^[9]。崔卫涛等研究发现,在蛋鸡饲料中添加发酵棕榈粕,可提高日产蛋重,降低料蛋比^[10]。孙汝江、朱风华等研究表明,蛋鸡饲料中添加发酵饲料可以提高蛋鸡的产蛋率,降低料蛋比^[11-12]。生产性能是蛋鸡养殖中最关键的指标,与经济效益密切相关。尤其产蛋率是衡量蛋鸡产蛋性能的重要指标,本试验中添加5%的发酵木薯渣,对海兰

褐蛋鸡的产蛋率和料蛋比没有影响,证明了在蛋鸡饲料中添加发酵木薯渣是可行的,与前人研究结果一致,但是,当发酵木薯渣添加比例超过10%,产蛋性能就呈现下降趋势,可能是由于含有发酵木薯渣的试验饲料营养水平平均低于全价饲料,不能达到蛋鸡的常规营养需求。

3.2 发酵木薯渣对蛋品质的影响

蛋形指数、蛋壳厚度、哈氏单位、蛋黄颜色是评价蛋品质的重要指标。本试验中,海兰褐蛋鸡饲料中添加发酵木薯渣,各组蛋形指数无显著差异,蛋壳厚度降低,蛋黄颜色与哈氏单位均显著提高。由于蛋形指数受遗传因素影响较大,饲料中营养成分改变对其影响较小,本试验结果各组蛋形指数无差异,与魏尊研究结果相似^[13]。蛋黄颜色主要取决于饲料中胡萝卜素和类胡萝卜素的含量^[14]。木薯渣经过微生物发酵,维生素含量也有较大提升,胡萝卜素由20 mg/kg提高到93 mg/kg,可能对蛋黄颜色的加深起到一定作用^[15]。哈氏单位是用来衡量鸡蛋的新鲜程度,数值越大,蛋品质越好^[16]。前人研究显示,蛋鸡饲料中添加发酵饲料,可提高哈氏单位,与本试验研究结果一致^[17-18]。蛋壳厚度主要受饲料营养水平、养殖环境条件和健康状况等因素的影响。试验中随着发酵木薯渣添加比例的提高,蛋壳厚度呈下降趋势,与朱风华等研究结果基本一致^[12]。蛋壳厚度的下降有可能是由于试验组饲料中钙磷仍然达不到全价料的适宜比例,同时木薯渣中含有的单宁,也可能阻碍Ca的吸收和利用所造成的^[19]。

3.3 木薯渣发酵饲料对蛋鸡养殖效益的影响

谢景龙等研究发现,海兰褐蛋鸡饲料中添加4%的发酵饲料,试验组与对照组相比可提高收益43.45元/d^[20]。齐红杰等研究发现,海兰褐蛋鸡日粮中添加5%的发酵苹果渣,每千克鸡蛋饲料成本节省了0.58元^[21]。本研究显示,海兰褐蛋鸡饲料中添加5%的发酵木薯渣,在试验期内,养殖收益较全价料组提高了7.61元,与前人研究结果相似。

4 结论

综上,本研究结果显示发酵木薯渣作为饲料原料应用在蛋鸡养殖中是可行的,替代蛋鸡全价

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.02.05

加米霉素注射液的过敏性试验研究

江国亮, 付良凯, 辜质纯, 李成应, 周淑贞*

(佛山市南海东方澳龙制药有限公司, 广东 佛山 528234)

摘要:为科学、客观地评价加米霉素注射液的过敏性反应, 本试验分别选用FMMU豚鼠和SD大鼠进行加米霉素注射液的全身主动过敏性试验和被动皮肤过敏性试验。试验均随机分为阴性对照组、阳性对照组、加米霉素注射液低剂量试验组(6 mg/kg BW)和高剂量试验组(18 mg/kg BW), 在常规饲养条件下按照试验方法进行致敏和激发, 观察各试验组全身主动过敏反应发生程度和被动皮肤过敏反应等级。结果显示, 加米霉素注射液低剂量试验组和高剂量试验组的全身主动过敏反应和被动皮肤过敏反应均为阴性。试验表明加米霉素注射液不引起豚鼠全身主动过敏反应和大鼠被动皮肤过敏反应。

关键词: 加米霉素注射液; 全身主动过敏; 被动皮肤过敏

中图分类号: S859.79*6 文献标识码: A 文章编号: 1005-8567(2022)02-0022-04

Sensitization test of gamithromycin injection

JIANG Guoliang, FU Liankai, GU Zhichun, LI Chengying, ZHOU Shuzhen*

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

Abstract: In order to evaluate the sensitization of gamithromycin injection scientifically, the FMMU guinea pigs and SD rats were used to conduct active systemic anaphylaxis test and passive cutaneous anaphylaxis test of gamithromycin injection respectively. The animals were randomly divided into negative control group, positive control group, low-dose test group (6 mg/kg b.w.) and high-dose test group (18 mg/kg b.w.). Under the conditions of conventional breeding, the active allergic reaction degree of guinea pigs and passive allergic reaction degree of rats in each group were observe after being sensitized and stimulated according to the test method. The results showed that the active systemic anaphylaxis and passive cutaneous anaphylaxis reaction degree of low-dose test group and high-dose test group were negative, which indicated that Gamithromycin injection cause neither active systemic anaphylaxis in guinea pigs, nor passive cutaneous anaphylaxis in rats.

Keywords: Gamithromycin injection; Active systemic anaphylaxis; Passive cutaneous anaphylaxis

我国畜牧养殖行业处于高速发展阶段, 养殖过程中药物的不规范使用导致了细菌耐药性日益增强, 使得疾病治疗与防控难度增加, 因此新型兽用抗生素的开发应用具有巨大的市场需求。加米霉素(Gamithromycin)是一种半合成动物专用15元

环大环内酯类抗生素, 通过发酵和有机合成制备而成, 是近年来兽药行业关注的新型兽医专用药物。加米霉素的作用机理是选择性地与细菌核糖体50S亚基结合, 通过阻断多肽链的延长, 从而抑制细菌蛋白质合成。加米霉素最早由法国梅里亚

收稿日期: 2021-11-25

基金项目: 广东省科技专项基金“大专项+任务清单”项目(2019FSDZX01010304)

作者简介: 江国亮(1989-), 男, 广东广州人, 硕士研究生, 主要从事新兽药研发。E-mail: 718108570@qq.com

*通讯作者: 周淑贞(1980-), 女, 广东佛山人, 高级兽医师, 硕士研究生, 主要从事新兽药研发。E-mail: Little_co@163.com

(Merial)研制,其制剂加米霉素注射液商品名为ZACTRAN,分别于2008、2010和2011年被欧洲药品局(European medicines agency, EMA)、加拿大保健产品与食品管理局(Health products and branch, HPFB)和美国食品与药品管理局(Food and drug administration, FDA)批准用于防治溶血性曼氏杆菌、多杀性巴氏杆菌和睡眠嗜组织菌引起的牛呼吸道疾病(Bovine Respiratory Disease, BRD)。随后在2016年和2017年经欧盟相继批准用于靶动物猪和羊,作用与用途为治疗牛和猪由敏感菌引起的呼吸道疾病及羊的腐蹄病。法国梅里亚加米霉素注射液于2017年经我国农业农村部批准完成进口兽药注册进入中国市场,与此同时,国内多个厂家也对该产品完成研发并取得新兽药证书^[1-2]。加米霉素注射液以6 mg/kg BW剂量注射给药后吸收迅速且完全,可在动物肺组织中迅速聚集,组织中药物浓度远大于血药浓度,在肺脏消除缓慢,药效持久,具有广阔的应用前景^[3-5]。由于注射液为高风险药品,给药后可能引起局部和全身毒性,过敏性研究是注射液安全性评价的重要内容。为科学评价加米霉素注射液的临床前安全性,本研究对豚鼠进行主动过敏性试验(ASA)和对大鼠进行被动皮肤过敏性试验(PCA),以期为临床用药提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验药品与试剂

加米霉素注射液(规格:100 mL:5 g;批号:20210401B,含量:100.4%),由佛山市南海东方澳龙制药有限公司制备和提供;卵清白蛋白(规格:25 g/瓶,批号:C12056067,厂家:上海麦克林生化科技有限公司);0.9%氯化钠注射液(规格:100mL:0.9g,批号:5220050330,厂家:广东利泰制药股份有限公司);伊文斯兰(规格:25 g/瓶,批号:C11891153,厂家:上海麦克林生化科技有限公司)。

1.2 试验动物

FMMU豚鼠(SPF级),24只,雌雄各半,体重300~340 g,购自南方医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号为SCXK(粤)2016-0041;SD大鼠(SPF级),40只,雌雄各半,体重220~240 g,

购自南方医科大学实验动物中心,实验动物生产许可证号为SCXK(粤)2016-0041。

1.3 试验方法

1.3.1 全身主动过敏试验

1.3.1.1 试验分组与剂量选择

取24只健康豚鼠,随机分成4组,每组6只,雌雄各半,分别为阴性对照组(0.9%氯化钠注射液)、阳性对照组(1%卵清白蛋白)、加米霉素注射液低剂量组和加米霉素注射液高剂量组。各剂量设置见表1。

表1 试验分组与给药方案

组别	数量	致敏给药剂量	激发给药剂量
阴性对照	6	0.5 mL/只	1.0 mL/只
阳性对照	6	5 mg/只	10 mg/只
低剂量	6	6 mg/kg BW	12 mg/kg BW
高剂量	6	18 mg/kg BW	36 mg/kg BW

1.3.1.2 主动致敏及激发

为保证致敏和激发时给药体积一致,先将加米霉素注射液按给药剂量稀释至所需的浓度。分别对各组动物进行背部皮下注射相应受试药物致敏,隔日一次,即分别于第1、3、5天致敏,共3次。末次给药后第14日进行激发,即通过静脉注射相应受试药物1.0 mL对各组动物分别进行激发。激发后观察每只动物有无躁动、颤抖、搔鼻、喷嚏、咳嗽、抽搐、呼吸困难、大小便失禁、痉挛、休克及死亡等过敏反应,记录症状的出现及消失时间,观察至3 h。致敏期间每日观察动物的症状。按表2判定过敏反应发生程度,计算发生率。

1.3.2 大鼠被动皮肤过敏试验

1.3.2.1 抗血清的制备

将16只大鼠随机分成4组,雌雄各半,每组4只。分别为阴性对照组(0.9%氯化钠注射液0.5 mL)、阳性对照组(2%卵清白蛋白0.5 mL)、加米霉素注射液低剂量组(6 mg/kg BW,用溶媒稀释至0.5 mL)和高剂量组(18 mg/kg BW,用溶媒稀释至0.5 mL),分别对大鼠进行背部皮下注射相应受试药物,隔日一次,共5次。末次致敏后14日采血,置离心机2000 r/min离心10 min,分离血清,-20℃保存,2周内备用。

表2 全身主动过敏反应症状与评价标准

序号	症状	等级	结果
0	正常	-	阴性
1	躁动	+	弱阴性
2	竖毛	+	弱阴性
3	颤抖	+	弱阴性
4	搔鼻	+	弱阴性
5	喷嚏	++	阳性
6	咳嗽	++	阳性
7	呼吸急促	++	阳性
8	排尿	++	阳性
9	排粪	++	阳性
10	流泪	++	阳性
11	呼吸困难	+++	强阳性
12	哮鸣音	+++	强阳性
13	紫癜	+++	强阳性
14	步态不稳	+++	强阳性
15	跳跃	+++	强阳性
16	喘息	+++	强阳性
17	痉挛	+++	强阳性
18	旋转	+++	强阳性
19	潮式呼吸	+++	强阳性
20	死亡	++++	极强阳性

1.3.2.2 被动致敏和激发

另取健康大鼠24只,随机分为4组,雌雄各半,每组6只。分别设置为阳性对照组、阴性对照组、加米霉素注射液低剂量组和高剂量组。致敏前将4组动物的大鼠背中线两侧,距脊柱1.5 cm处的毛剪光,每侧剪2点,每点间隔1.5~2 cm。将每只大鼠背部从头部沿尾部方向划分为4个区域,并用记号笔作标记,左侧为1:2和1:4稀释度区,右侧为1:8和1:32稀释度区。

取致敏试验时各组所分离的抗体血清,用0.9%氯化钠注射液稀释为不同的倍数(1:2、1:4、1:8、1:32),按不同浓度的抗血清次序,在各组大鼠的剪毛标记处进行皮内注射0.1 mL相应的抗血清,进行被动致敏。

被动致敏后24 h,取相应药物的激发抗原0.5 mL加等量的0.5%伊文思蓝染共1.0 mL,对各组动物进行尾静脉注射激发。激发30 min后将动物处死,剪下背部皮肤,进行蓝斑的测定,测量皮

肤内层的斑点大小。并计算阳性发生率。直径大于5 mm者判定为阳性,不规则斑点的直径为长径与短径之和的平均值。阳性反应率(%)=直径大于5 mm动物数/动物总数×100%。

2 试验结果

2.1 全身主动过敏(ASA)试验

试验结果见表3。阴性对照组、加米霉素注射液低剂量组(6 mg/kg BW)、高剂量组(18 mg/kg BW)豚鼠在致敏14天给药激发后3小时内均未发现明显异常和过敏体征出现,全身主动过敏判断结果均为“-”。阳性对照组豚鼠在致敏14天激发给药后在8分钟内均出现了不同程度的过敏反应症状,表现为搔鼻、呼吸急促、排尿、排粪、步态不稳、跳跃、旋转等过敏反应,最终死亡,全身主动过敏判断结果为“++++”。试验结果表明,加米霉素注射液的豚鼠全身主动过敏性试验结果呈阴性,说明本品不引起过敏性反应。

表3 加米霉素注射液豚鼠全身主动过敏试验结果

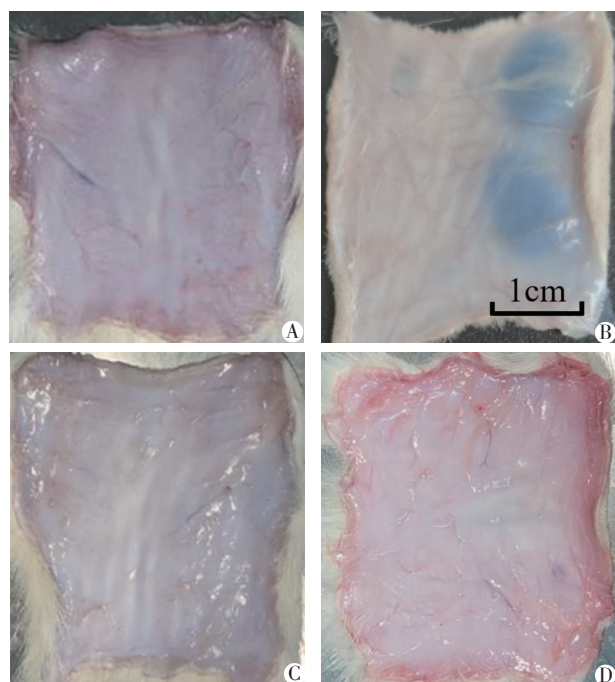
组别	动物数	致敏数	过敏等级	过敏反应结果
阴性对照	6	0	-	阴性
阳性对照	6	6	++++	极强阳性
低剂量	6	0	-	阴性
高剂量	6	0	-	阴性

2.2 被动皮肤过敏(PCA)试验

试验结果见图1和表4。阴性对照组、加米霉素注射液低剂量组(6 mg/kg BW)、高剂量组(18 mg/kg BW)给药激发后,背部未见蓝斑,被动皮肤过敏判定为阴性,而阳性对照组则出现明显的被动皮肤过敏反应,动物背部皮肤在致敏血清的皮内注射部位形成了清晰的圆形蓝色斑点,直径均大于5 mm,被动皮肤过敏判定为阳性。试验结果表明,加米霉素注射液大鼠被动皮肤过敏试验结果呈阴性,说明本品不引起过敏反应。

3 讨论

过敏性又称超敏反应,指机体受同一抗原再刺激后产生的一种表现为组织损伤或生理功能紊乱的特异性免疫反应,是新药研发安全性评价的



注:A:阴性对照;B:阳性对照;C:低剂量组;D:高剂量组

图1 加米霉素注射液大鼠被动皮肤过敏性试验蓝斑检查结果

表4 加米霉素注射液大鼠被动皮肤过敏性试验蓝斑检查结果

动物编号	蓝斑直径			
	阴性对照	阳性对照	低剂量组	高剂量组
1	-	> 5 mm	-	-
2	-	> 5 mm	-	-
3	-	> 5 mm	-	-
4	-	> 5 mm	-	-
5	-	> 5 mm	-	-
6	-	> 5 mm	-	-

注:“-”表示无蓝斑产生

重要内容。过敏性试验是观察动物接触受试物后的全身或局部过敏反应。药物制剂中的成分、降解物质等均有可能引起过敏性的发生,因此药物在临床应用前应研究其制剂在给药部位使用后引起的局部和全身毒性。药物过敏性试验需要根据给药途径进行考虑设计,一般经皮给药进行豚鼠最大化试验、Buehler试验,注射给药进行主动过敏试验和皮肤被动过敏试验,吸入给药进行豚鼠吸入诱导和刺激试验。

有试验报道表明加米霉素注射液安全性好,对豚鼠、新西兰大白兔无刺激性和溶血性作用^[6-7]。相关急性毒性试验表明加米霉素注射液的小鼠皮下注射LD₅₀为1094.2 mg/kg BW,大鼠经口染毒的LD₅₀为2219.14 mg/kg BW,属于低毒性药物^[8-9]。加米霉素注射液按照推荐剂量应用于靶动物猪和牛均具有较好的安全性^[10-13]。

国内外对加米霉素过敏性研究报道较少。本试验根据《化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》进行试验方案设计^[14]。在全身主动过敏试验中,加米霉素注射液在致敏后14日进行激发,试验动物未出现过敏反应,表明加米霉素注射液不引起豚鼠全身主动过敏反应;在被动皮肤过敏试验中试验结果也呈现阴性,表明加米霉素注射液不具备过敏性。张云茜等通过在豚鼠表皮涂敷加米霉素注射液等进行过敏性研究,其结果表明加米霉素注射液对豚鼠皮肤进行致敏和激发后结果呈阴性^[7]。张倩在加米霉素注射液被动皮肤过敏试验和全身主动过敏试验中所用到的动物均为豚鼠,试验动物与本研究有区别,但试验试验结果亦均为阴性^[15]。

4 结论

通过豚鼠全身主动过敏试验和被动皮肤过敏试验,评价加米霉素注射液的过敏性反应,试验表明加米霉素注射液不引起豚鼠全身主动过敏反应,也不引起大鼠被动皮肤过敏反应,说明加米霉素注射液具有较好的安全性。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业农村部. 中华人民共和国农业部公告第2497号[S]. 2017.02.13.
- [2] 中华人民共和国农业农村部. 中华人民共和国农业农村部公告第15号[S]. 2018. 04.20.
- [3] EMA. Zactran: EPAR-Scientific Discussion[EB/OL]. (2008.07.30.) [2021.10.07]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/zactran-epar-scientific-discussion_en.pdf.
- [4] 李小娜,梁小菊,张莹雪,等. 动物专用抗生素-加米霉素的研究进展[J]. 吉林畜牧兽医, 2019(9): 92-93.
- [5] 冯克清. 加米霉素注射液在治疗肉牛和非泌乳奶牛呼吸系统疾病中的应用研究进展[J]. 中国兽药杂志, 2016(8): 66-69.
- [6] 冯言言,冯修光,郑莉,等. 加米霉素注射液皮下注射对家兔刺激性的试验[J]. 中国奶牛, 2018(10):36-38.

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.02.06

猪伪狂犬病病毒GD株的分离鉴定及致病性研究

侯高伟, 赖月辉, 吴文福, 周晓敏, 陈坚, 杨傲冰, 林德锐*
(广东永顺生物制药股份有限公司, 广东广州 511356)

摘要:从广东某猪场病死猪中分离到一株疑似猪伪狂犬病病毒(PRV)的毒株, 该病毒在猪睾丸细胞上出现细胞聚集、脱落、拉网等典型的细胞病变, 在猪睾丸细胞上测得其TCID₅₀值为10^{6.8}/0.1 mL。PCR反应可以扩增出特异性370 bp DNA片段, gE基因测序结果与GenBank中收录的多株国内外PRV毒株进行比对分析, 同源性介于97.6%~99.9%之间。证实分离的病毒株为伪狂犬病病毒, 并命名为PRV GD株。将分离所得的PRV GD株接种小鼠、兔、仔猪和育肥猪, 均能使之发病并出现不同程度死亡, 该毒株表现出较强的致病性。

关键词:猪伪狂犬病病毒(PRV); 分离鉴定; 致病性; gE基因; GD株

中图分类号:S852.65+1 **文献标识码:**A **文章编码:**1005-8567(2022)02-0026-04

Isolation, Identification and Pathogenicity of porcine pseudorabies virus GD strain

HOU Gaowei, LAI Yuehui, WU Wenfu, ZHOU Xiaomin, CHEN Jian, YANG Aobing, LIN Derui*
(Guangdong Winsun Bio-pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou Guangdong, 511356, China)

Abstract: A virus suspected to be porcine pseudorabies virus (PRV) was isolated from dead pigs in Guangdong province. The typical cytopathic effect (CPE) could be observed when the isolated virus was cultured on the swine testicular cells and its tissue culture infectious dose (TCID₅₀) was 10^{6.8}/0.1 mL. A specific 370 bp long DNA fragment could be expanded using polymerase chain reaction (PCR) analysis from the isolated virus DNA. The sequence analysis results showed that the nucleotide identity of gE-gene of PRV GD strain were between 97.6% ~ 99.9% comparing with several domestic and foreign PRV strains published in GenBank. The isolated virus strain was confirmed to be porcine pseudorabies virus and named as PRV GD strain. Inoculation of mice, rabbits, piglets and fattening pigs can cause the disease and death with strong pathogenicity.

Keywords: pseudorabies virus (PRV); isolation and identification; pathogenicity; gE-gene; GD strain

猪伪狂犬病(Pseudorabies, PR)又称奥叶基氏病(Aujeszky's disease, AD), 是由疱疹病毒科中的猪疱疹病毒I型即伪狂犬病毒(Pseudorabies virus, PRV)引起的一种以发热、脑脊髓炎为主要临床症状的急性传染病^[1-2]。猪是该病的天然宿主和传染源, 不同生长阶段的猪均可感染PRV并引起不同的临床症状, 其中新生仔猪和保育猪中枢神经系

统紊乱甚至死亡;妊娠母猪流产、产死胎或木乃伊胎;育肥猪和成年猪出现呼吸道症状^[3-4]。该病给养猪业造成了巨大的经济损失^[5-6]。本研究通过对广东某猪场病死猪脑组织采样, 从中分离到一株病毒, 经试验证实为伪狂犬病病毒, 并进行了一系列动物试验, 研究了该毒株的致病性。

收稿日期:2021-08-02

作者简介:侯高伟(1986-), 男, 本科, 执业兽医师, 主要从事猪病疫苗研发工作。E-mail:915682507@qq.com

*通讯作者:林德锐(1978-), 男, 硕士, 高级兽医师, 主攻方向兽医生物制品生产经营管理。E-mail:linderui@126.com

1 材料

1.1 病料

广东省某猪场病死育肥猪,取脑组织进行研磨,用PBS作1:5倍稀释制成悬液,-70℃反复冻融3次,12000 r/min 4℃离心10 min,取上清液经0.22 μm的一次性滤器过滤后分装,-70℃保存备用。

1.2 细胞

猪睾丸细胞(ST细胞)由广东永顺生物制药股份有限公司提供。

1.3 试验动物

4周龄SPF级昆明小鼠和1.5~3.0 kg新西兰大耳白兔,均来源于广东省医学实验动物中心。4~5周龄健康仔猪和5月龄健康育肥猪,经PRRSV、CSFV、PRV、PPV和PCV2抗原检测均为阴性,且PRV-gB和PRV-gE抗体阴性,来源于广东永顺生物制药股份有限公司自繁自养试验动物场。

1.4 引物合成

根据GenBank中收录的PRV全基因序列设计gB基因引物(gB-F:5'-AGTACTCGCAGGGGCGCAACT-3';gB-R:5'-CGCCGATCTTGGTGTAGGTGT-3',扩增片段大小:370 bp)和gE基因引物(gE-F:5'AGTCTCGCACACACCGGGGTTG 3';gE-R:5'ATGTCGGAATGCGGGCGGACC 3',扩增片段大小:1802 bp),由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.5 主要试剂

DNA提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;PrimeSTAR Max Premix购自Takara公司;PRV-gB、PRV-gE抗体检测试剂盒购自IDEXX公司;伪狂犬病病毒A株购自中国兽医药品监察所。

2 方法

2.1 病毒分离培养

取处理好的脑组织悬液接种已长满单层的ST细胞,37℃孵育1 h,加入含2%新生小牛血清的MEM细胞维持液,置于37℃、含5% CO₂培养箱中继续培养,每日观察并记录细胞病变情况,待出现70%~80%细胞病变时,收集病毒培养液后进行3轮挑斑纯化,纯化后病毒扩繁、冻存备用。

2.2 病毒DNA提取及PCR鉴定

将病毒液按DNA提取试剂盒说明书提取病毒DNA,利用gB-F/gB-R和gE-F/gE-R引物进行PCR扩

增。gB基因PCR反应总体积25 μL:DNA模板2.0 μL,2×GC Buffer II 12.5 μL,上下游引物各1.0 μL,dNTP mixture 2.5 μL,LA Taq酶0.5 μL,ddH₂O补至25 μL。

gB基因PCR程序:95℃5 min;94℃1 min,60℃45 s,72℃1 min,30个循环;72℃10 min。gE基因PCR反应总体积50 μL:PrimeSTAR Max Premix(2×)25 μL,上下游引物各1.5 μL,DNA模板1 μL,ddH₂O补至50 μL。gE基因PCR反应程序:98℃5 min;98℃30 s,55℃30 s,72℃30 s,35个循环;72℃5 min。PCR产物在10 g/L琼脂糖凝胶上电泳鉴定。

2.3 gE基因克隆与序列分析

纯化回收目的片段,克隆至pMD18-T载体中,送生工生物工程(上海)有限公司进行序列测序。利用生物信息软件对本试验分离鉴定的PRV毒株的gE基因序列与GenBank中收录的多株国内外PRV毒株进行序列比对和系统进化树分析。

2.4 病毒TCID₅₀测定

将病毒培养液进行10倍系列稀释(稀释度为10⁻¹~10⁻¹⁰),接种于ST细胞48孔板,每个稀释度6孔,0.1 mL/孔,同时设阴性对照6孔,置于37℃、含5% CO₂培养箱中培养观察7 d,记录细胞病变情况,按Reed-Muench法计算TCID₅₀。

2.5 动物试验

2.5.1 小鼠接种试验

将病毒原液用无菌生理盐水稀释成10^{6.0} TCID₅₀/mL,背部皮下接种昆明小鼠5只,每只0.1 mL,另取5只昆明小鼠背部皮下接种无菌生理盐水作为对照,每只0.1 mL。每天观察并记录两组小鼠的临床症状和死亡情况。

2.5.2 兔接种试验

将病毒原液用无菌生理盐水稀释成10^{6.0} TCID₅₀/mL,腹侧皮下接种5只新西兰大耳白兔,每只0.5 mL,同时用无菌生理盐水于腹侧皮下接种另外5只兔作为健康对照,每只0.5 mL。观察并记录两组兔发病和死亡情况。

2.5.3 本动物回归试验

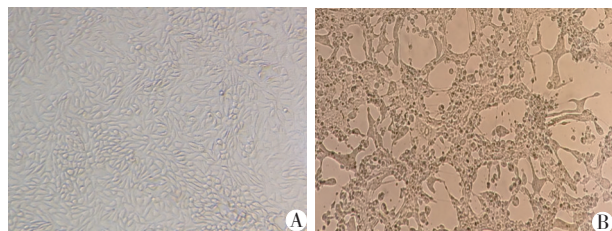
4~5周龄健康仔猪和5月龄健康育肥猪各10头,各自随机分为2组,每组5头。仔猪攻毒组(A组)每头猪接种病毒原液1.0 mL,育肥猪攻毒组(B组)每头猪接种病毒原液2.0 mL,仔猪空白对照组(C组)接种1.0 mL无菌生理盐水,育肥猪空白对照

组(D组)接种 2.0 mL 无菌生理盐水。同等饲养条件下隔离饲养,攻毒后观察 14 天,每天观察各组猪的精神食欲情况,逐日测温并记录临床症状。

3 结果与分析

3.1 病毒分离结果

将处理好的脑组织悬液接种 ST 细胞,在 24~36 h 可见典型的细胞病变,细胞聚集、脱落,成拉网状(见图 1)。将病毒作 3 次挑斑纯化,获得一株纯化病毒,命名为 GD 株。



注:A.正常细胞;B.感染细胞

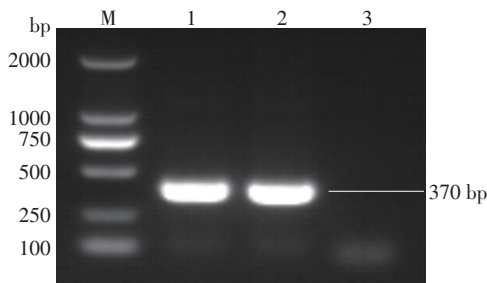
图1 脑组织悬液感染ST细胞所产生的细胞病变

3.2 病毒DNA提取及PCR鉴定

GD株和PRV 闽A株经过PCR扩增,gB基因均可以扩增出 370 bp 左右长的DNA片段,gE基因均可以扩增出 1802 bp 左右长的DNA片段,阴性对照无特异性条带(见图2、图3)。表明GD株和PRV 闽A株具有相同的DNA片段。

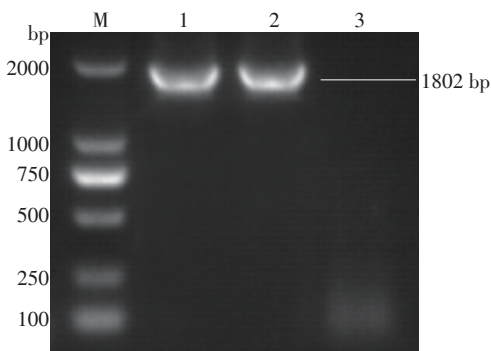
3.3 gE基因序列分析

以分离株病毒提取的DNA为模板,用合成的引物扩增出 1802 bp 左右长的特异性条带,测序结果证明是PRV gE基因序列,与GenBank中收录的多株国内外PRV毒株进行序列比对和系统进化树分析,表明GD株的gE基因和2012年后新分离的



注:M:DL 2000 Marker;1:GD株;2:PRV 闽A株;3:阴性对照

图2 GD株gB基因扩增片段



注:M:DL 2000 Marker;1:GD株;2:PRV 闽A株;3:阴性对照

图3 GD株gE基因扩增片段

PRV 变异株位于相对独立的分支中,同源性为 99.6%~99.9%;而与2012年以前的PRV分离株位于不同的分支上,同源性为 97.6%~99.5%,尤其是与国外分离株(Becker、NiA3等)同源性仅为 97.6%~97.8%(见图4、图5)。

Table showing nucleotide sequence alignment of PRV GD strain with other reference strains. The table lists positions 1-32 and corresponding nucleotide bases for various strains including PRV-GD-G09, Becker-gE-2003, Ea-gE-1990, etc.

图4 PRV GD株与其他参考毒株gE基因的核苷酸同源性对比分析

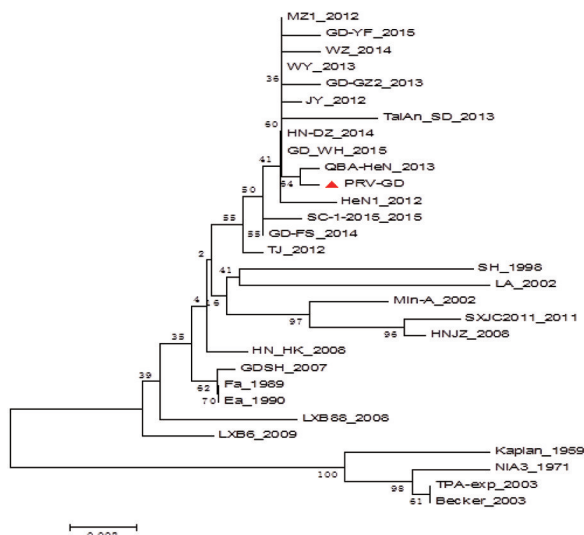


图5 PRV GD株基于gE基因的系统进化树

3.4 病毒TCID₅₀测定结果

利用 Reed-Muench 法对分离毒株进行 TCID₅₀ 测定, PRV GD 分离毒株病毒含量为 10^{6.8} TCID₅₀/0.1 mL。

3.5 动物试验结果

3.5.1 小鼠接种试验结果

接种 PRV GD 株 24 h 后, 小鼠表现为狂躁不安, 36 h 后小鼠不断啃咬接种部位并出现死亡, 96 h 内小鼠全部死亡。对照小鼠均正常。

3.5.2 兔接种试验结果

接种 PRV GD 株 24~48 h, 临床症状表现为接种部位奇痒, 试验兔不断撕咬接种部位, 直至接种部位掉毛、破损、出血, 最后四肢麻痹而死亡。对照兔均无异常反应。

3.5.3 本动物回归试验结果

接种病毒原液 (10^{7.8} TCID₅₀/mL, 1.0 mL/头) 的 A 组仔猪全部 (5/5) 发病, 80% (4/5) 死亡; 接种病毒原液 (10^{7.8} TCID₅₀/mL, 2.0 mL/头) 的 B 组育肥猪全部 (5/5) 发病, 20% (1/5) 死亡。A 组仔猪攻毒后第 2 d 开始出现体温升高, 精神逐渐沉郁, 食欲逐渐减退至废绝, 攻毒后第 4 d 仔猪出现转圈、犬坐、共济失调等明显伪狂犬病神经症状, 第 6~8 d 死亡 4 头, 剩余 1 头未死亡, 但精神状态不佳且体温维持在 40℃ 以上。B 组育肥猪攻毒后第 2 d 体温开始升高, 精神、食欲不佳, 临床主要表现为呼吸系统症状, 鼻涕、唾液增多, 无明显神经症状, 攻毒后第 8 d 死亡 1 头, 濒死前呼吸困难, 其余耐过猪在攻毒后第 10 d 体温逐渐恢复正常。死亡猪剖检可见肝脏有白色坏死灶, 脑组织不同程度充血水肿, 膀胱黏膜有散在的针尖状出血点。C 组和 D 组空白对照猪均表现正常 (见图 6、图 7)。

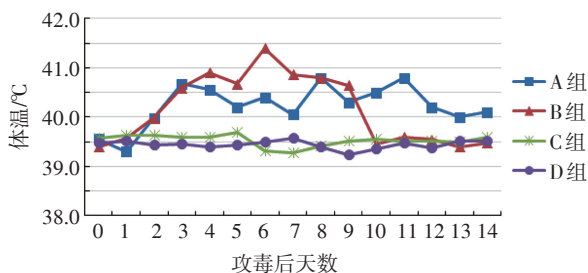
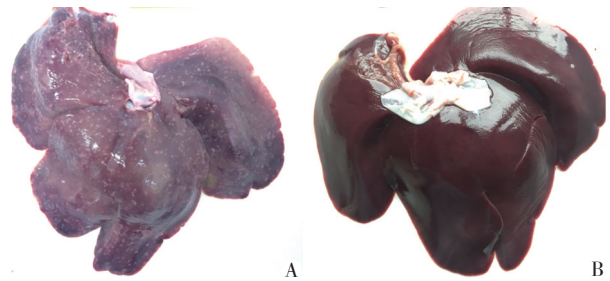


图6 攻毒后各组试验猪平均体温曲线



注:A:攻毒组试验猪肝脏;B:空白组试验猪肝脏

图7 攻毒组和空白组试验猪剖检

4 讨论与结论

从广东某猪场病死育肥猪中分离到一株病毒, 该毒株接种猪睾丸细胞 (ST 细胞) 出现典型的细胞病变, 经 PCR 鉴定、gE 基因序列分析证实为伪狂犬病病毒, 并将该病毒命名为 PRV GD 株。通过该毒株的分离鉴定、致病性实验, 证实该场猪的死亡是由伪狂犬病病毒引起, 说明该猪场存在猪伪狂犬病。根据邓仕伟等统计可知, 伪狂犬病在我国已涉及包括香港、台湾在内的 31 个省区流行。广东珠三角地区多个猪场近年也发生过类似的疾病, 表明猪伪狂犬病对广东的养猪业是一大隐患, 尤其是冬春两季, 发病率和死亡率均较高, 因此有必要加强早期预防, 及时做好疫苗免疫接种^[7-10]。

本试验对 PRV GD 株进行了致病性研究, 小鼠和兔接种试验表明该毒株能引起小鼠和兔出现典型的伪狂犬病临床症状并死亡。本动物回归试验表明该毒株对猪致病性强、致死率高, 尤其是对仔猪, 这些结果均表明 PRV GD 株为 PRV 强毒株。

综上所述, 防控猪伪狂犬病不仅要重视平时的疫苗免疫接种, 而且还要加强新毒株的分离和研究以针对性地进行疫苗研制开发。PRV GD 株是于田间分离所得的强毒株, 某种程度上具有一定的临床流行毒株的代表性, 可以为以后 PR 新型疫苗如基因缺失疫苗的研制及免疫效果评价的研究提供一定的参考价值。

参考文献:

- [1] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1997: 780-781.
- [2] 赵德明, 张仲秋, 沈建忠, 等译. 猪病学[M]. 第9版. 北京: 中国农业大学出版社, 2009: 465-476.

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.02.07

普鲁士蓝/石墨烯修饰电极检测 畜禽饮用水中铅离子的方法和应用

黄俊¹, 汪思钧³, 罗宇杭¹, 张琬玦¹, 张建峰², 李智丽^{1*}, 张春红^{2*}

(1. 佛山科学技术学院生命科学与工程学院, 广东 佛山 528225;

2. 广东省农业科学院动物卫生研究所, 农业农村部兽药与诊断学科群广东实验站,
广东省畜禽疫病防治研究重点实验室, 广东 广州 510640;

3. 中华人民共和国笋岗海关, 广东 深圳 518000)

摘要:为监测畜禽饮用水中铅离子的含量,对畜禽养殖场的饮用水质量进行评价,本文建立了一种基于普鲁士蓝/石墨烯修饰电极的检测畜禽饮用水中铅离子的方法。采用电化学沉淀法使石墨烯表面附着普鲁士蓝纳米颗粒,并对制备的修饰电极使用差分脉冲伏安法进行化学性质分析,以及检测铅离子在所制备的电极表面的灵敏度、稳定性和检出限,评估了试验所制备的修饰电极检测畜禽饮用水中铅离子的可靠性。结果表明,在pH 4.5的磷酸盐缓冲液(0.10 mol/L)中,铅离子在 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-9}$ 浓度范围内与电流值呈现一次方函数关系,最低检测限为 2.5×10^{-9} mol/L。综上所述,基于普鲁士蓝/石墨烯修饰电极的线性范围宽,检出限低,稳定性好,抗干扰能力强,灵敏度高,适用于畜禽饮用水中铅离子的检测。

关键词: 石墨烯; 普鲁士蓝; 修饰电极; 铅离子; 差分脉冲伏安法

中图分类号:S815 文献标识码:A 文章编码:1005-8567(2022)02-0030-07

Technology and application of Pb²⁺ detection in drinking water for livestock and poultry by Prussian blue/graphene modified electrode

HUANG Jun¹, WANG Sijun³, LUO Yuhang¹, ZHANG Wandu¹, ZHANG Jianfeng², LI Zhili^{1*}, ZHANG Chunhong^{2*}

(1. School of Life Science and Engineering, Foshan University, Guangdong Foshan, 528225, China;

2. Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Guangzhou, 510642, China;

3. Sungang Customs, People's Republic of China, Guangdong Shenzhen, 518000, China)

Abstract: In order to monitor the content of lead ions in drinking water and evaluate the quality of drinking water in livestock and poultry farms, a method based on Prussian blue/graphene modified electrode was established. Prussian blue nanoparticles were attached to the surface of graphene by electrochemical precipitation. The chemical properties of the prepared modified electrode were analyzed by differential pulse voltammetry. Moreover, the sensitivity, stability and detection limit of lead ions on the surface of the prepared electrode were analyzed. Finally, the reliability of the modified electrode prepared in the experiment to detect lead ions in drinking water of livestock and

收稿日期:2022-03-29

基金项目:广东省教育厅青年创新人才项目(2017KQNCX212)

作者简介:黄俊(1995-),男,硕士,主要从事兽医传染病及精准检测研究工作。E-mail: 18819268962@163.com

*通讯作者:李智丽(1983-),女,副教授,博士,主要从事兽医传染病及精准检测研究工作。E-mail: pinganzhili@163.com;张春红(1969-),女,高级兽医师,主要从事兽医传染病的研究。E-mail: 13660450420@139.com

poultry was evaluated. Results showed that in the phosphate buffer (0.10 mol/L, pH=4.5), the lead ion had a linear function relationship with the current value, which was in the range of 1×10^{-9} to 1×10^{-4} , and the detection limit was 2.5×10^{-9} mol/L. In conclusion, the method of modified electrode based on Prussian blue/graphene has a wide linear range, low detection limit, good stability, strong anti-interference ability and high sensitivity, indicating that the method is suitable for the detection of lead ions in drinking water of livestock and poultry.

Keywords: Graphene; Prussian blue; Modified electrode; Pb^{2+} ; Differential pulse voltammetry

铅(Pb^{2+})是一种对畜禽及人体危害极大的有毒重金属,可通过皮肤、呼吸器官和消化系统进入血液,可引起神经系统、生殖系统、心血管系统损伤和发育障碍。 Pb^{2+} 还具有难以降解,积蓄性和慢性毒性等特性。因此,为保证畜禽产品质量,发展无公害食品,推动畜牧业绿色发展,饮用水中 Pb^{2+} 离子的检测已成为对无公害畜禽产品进行准确评价的一个重要条件^[1-2]。同时,畜禽饮用水中 Pb^{2+} 的检测,也引起了公共卫生关注^[3]。那么,开发用于常规有效监测 Pb^{2+} 离子的分析技术,对畜禽养殖场的环境质量和饮用水质量进行评价,确保饮用水质量,对维护畜禽产品质量安全具有重要意义。

目前,测定 Pb^{2+} 离子含量的方法有电化学分析方法、分光光度法、原子吸收光谱法、色谱法等方法^[4-8]。其中,电化学分析方法在分析速度、灵敏度、操作过程、试剂种类、实验仪器等方面都有较明显的优势,因此普遍应用于食品中 Pb^{2+} 离子的检测。传统的电化学的分析技术包括原子吸收光谱(atomic absorption spectrometry, AAS)、原子发射光谱(atomic emission spectrometry, AES)、电感耦合等离子体(inductively coupled plasma, ICP)、质谱(mass spectrometry, MS)、阳极溶出伏安法(anodic stripping voltammetry, ASV)和X射线荧光光谱法,但是这些检测方法因其样品处理过程复杂,所需仪器昂贵,从而导致其难以作为现场检测方法^[9]。

为研发出一种常规有效监测 Pb^{2+} 离子的分析技术,维护饮用水质量,保证畜禽产品质量和安全,基于新材料和电化学传感器的不断发展,开发快速、可靠的利用电化学检测痕量 Pb^{2+} 离子的检测方法显得十分必要^[2, 10-12]。因此,本研究将普鲁士蓝/石墨烯修饰在电极上,使其既可以作为电化学反应的媒介体,又能起到信号放大的作用,提高传感器的灵敏度^[13-16]。此外,通过差分脉冲伏安法(Differential Pulse Voltammetry, DPV)和循环

伏安法(Cyclic Voltammetry, CV)分析修饰电极的化学性质,建立了基于普鲁士蓝/石墨烯修饰电极的畜禽饮用水中 Pb^{2+} 离子现场检测方法。该方法具有良好的灵敏度、稳定性、重现性和抗干扰性,且能满足现场检测畜禽饮用水中 Pb^{2+} 离子的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品

样品分别来源于不同地区2家养猪场和2家养鸡场的饮用水。

1.1.2 主要试剂和仪器

乙酸、乙酸铅、浓硝酸、无水乙醇、过氧化氢、无水乙酸钠、亚铁氰化钾、三氯化铁、氯化钾和氧化石墨烯分散液均购自上海麦克林生化有限公司、纳米氧化铝($\Phi=0.05 \mu\text{m}$)购自北京德科岛金科技有限公司。

从上海辰华仪器有限公司采购CHI620DE电化学分析仪、铂丝电极、Ag/AgCl电极、玻碳电极(GCE, $\Phi=3\text{mm}$);KQ3200de数控超声波清洗机购自昆明超声波仪器有限公司;Millipore超纯水仪购自上海赫恩实业有限公司;参比电极为Ag/AgCl电极,工作电极为石墨烯修饰电极,铂丝电极为对电。

1.1.3 溶液配置

0.1 mol/L KCl溶液:用天平称取7.35 g的KCl溶解于1000 mL超纯水中;0.1 mol/L的铁氰化钾:用天平称取32.9 g的铁氰化钾溶解于1000 mL超纯水中;0.1 mol/L的氯化铁:用天平称取4.06 g的 FeCl_3 于烧杯中,加少量水溶解,然后转移至250 mL容量瓶,用蒸馏水稀释至刻度;0.1 mol/L PBS:分别准确称取氯化钠8.0 g、磷酸二氢钾0.24 g、磷酸氢二钠1.44 g、氯化钾0.2 g于500 mL容量瓶中用玻璃棒搅拌溶解,溶解后移至1000 mL的容量瓶中。

1.2 方法

1.2.1 玻碳电极的清洗

将玻碳电极用纳米氧化铝粉悬浮液在人造麂皮磨料上以8字法抛光呈镜面状态,用双蒸水洗去表面污物,再用双蒸水超声清洗20 min并干燥,之后在无水乙醇中清洗10 min,最后在双蒸水中超声清洗10 min,置于室温条件下干燥后备用。

1.2.2 石墨烯所修饰电极(GO/GCE)的制备

用移液枪吸取15.0 μL 分散的氧化石墨烯液滴添到电极表面,并在26~28 $^{\circ}\text{C}$ 环境下干燥后,使用0.5~1.5 V电压在0.1 mol/L KCl溶液中以100 mV/s的扫描速度进行扫描,扫描完成后取出并清洗,即可制备得到石墨烯修饰玻碳电极(GO/GCE)。

1.2.3 修饰电极(PB/GO/GCE)的制备

将GO/GCE置于含有0.1 mol/L三氯化铁、0.1 mol/L铁氰化钾及0.1 mol/L氯化钾的混合溶液中,设定扫描电压为0~1V,扫描速度为0.05 V/s,圈数为30圈,用循环伏安法扫描合成,将普鲁士蓝沉积在电极表面,取出并清洗,得到普鲁士蓝/石墨烯修饰玻碳电极(PB/GO/GCE)。

1.2.4 不同pH值及不同扫速对 Pb^{2+} 检测的影响

本实验中使用的铅盐为乙酸铅,是弱碱性金属离子,在不同的pH环境下,重金属盐的溶解度与导电性不同。为寻找最佳pH,本实验测定pH分别为3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0的0.1 mol/L的PBS溶液,测定浓度为0.01 mol/L的铅盐溶液,用相同的扫描速度在相同的电势范围内,并绘制曲线。

在最佳pH的0.1 mol/L PBS缓冲溶液中,采用0.01 V/s, 0.03 V/s, 0.07 V/s, 0.1 V/s, 0.13 V/s, 0.17 V/s, 0.2 V/s进行扫描,并绘制曲线。

1.2.5 不同电极化学性能及不同扫描方法的对比

分别将裸玻碳电极,石墨烯修饰电极和普鲁士蓝/石墨烯复合材料修饰电极作为工作电极,在最佳pH的0.1 mol/L PBS缓冲溶液中,采用循环伏安法,以相同的最佳扫描速度在相同电势范围内扫描,考察这三组电极的电化学特性。

将普鲁士蓝/石墨烯复合材料修饰电极作为工作电极在最佳pH的0.1 mol/L PBS缓冲溶液中,采用最佳扫速对0.01 mol/L Pb^{2+} 进行扫描,分别采用循环伏安法和差分脉冲伏安法进行对比测定。

1.2.6 敏感性实验、干扰实验、稳定性实验及重复性实验

在最佳pH的0.1 mol/L PBS缓冲溶液中,最佳扫速时,通过10倍稀释法制备 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} mol/L的乙酸铅溶液,通过差分脉冲伏安法测试并绘制标准曲线。

为了研究一些无机离子对 Pb^{2+} 测定的干扰,选取浓度为 Pb^{2+} 浓度100倍的 Na^{+} 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 NO_3^{-} 、 Cl^{-} 和浓度为 Pb^{2+} 10倍的 Al^{3+} 、 SO_4^{2-} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 进行了干扰测试。

将制备好的工作电极置于密封袋中,在4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存,放置7天,每隔2天对其进行测试并记录电流响应,与初始曲线相比较。

如果同一批次的CV存在显著差异,则应在两个样品中计算变异系数(如果同一批次的CV存在显著差异)。采用同样方法制备5根电极,对同一样品进行重复性测定,计算批间变异系数(CV%)并分析结果有无明显差异。

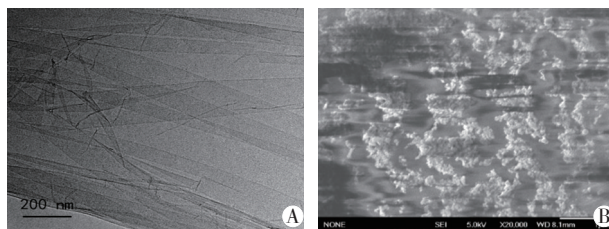
1.2.7 样品预处理

在同一养殖场的不同水源处收集畜禽饮用水,并收集不同地区的4个畜禽养殖场,收集完成后将同一养殖场的饮用水混合后分装至5 mL的离心管并室温保存。

2 结果

2.1 石墨烯修饰电极和普鲁士蓝/石墨烯复合材料修饰电极的表征

由于石墨烯层之间的 π - π 堆积作用,石墨烯被制成薄片,大量褶皱分布在层状结构上(图1A)。同时,石墨烯电极表面有许多沉积颗粒附着,表明石墨烯修饰后的电极表面上含有一层普鲁士蓝且被成功表征(图1B)。



注:A:石墨烯修饰的电极扫描电镜图;B:普鲁士蓝/石墨烯复合材料修饰的扫描电镜图

图1 石墨烯和普鲁士蓝复合材料修饰电极的扫描电镜图

2.2 还原态石墨烯修饰电极(GO/GCE)的制备

对石墨烯电极进行表征, 可见在-0.8 V电压处出现还原峰电流急剧增加, 随着还原时间的推移扫描圈数的增加, 氧化态石墨烯的大量含氧基团被还原(见图2), 该过程快速且不可逆。

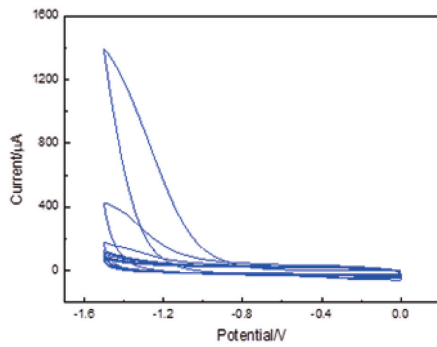


图2 电化学沉积石墨烯的循环伏安图

2.3 普鲁士蓝/石墨烯复合材料修饰电极(PB/GO/GCE)的制备

对普鲁士蓝/石墨烯复合材料电极进行表征, 如图3所示, 分别在0.23 V和0.85 V附近出现了氧化还原峰, 分别提示其完成了普鲁士蓝和普鲁士白, 普鲁士蓝和柏林绿之间相互转化。随着扫描圈数增多和电流传导的增强, 表明合成效果良好。

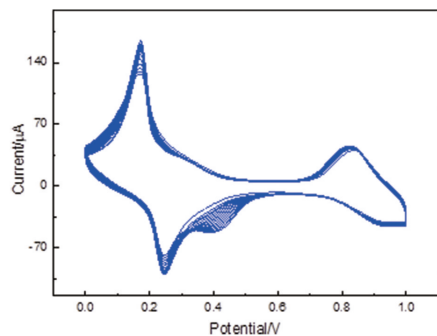
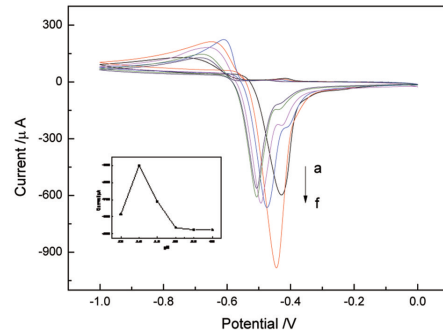


图3 电化学沉积普鲁士蓝/石墨烯的循环伏安图

2.4 不同pH值及不同扫描速率对Pb²⁺检测的影响

如图4所示, 当pH值在3.5~6.0时, 氧化峰电位逐渐负移, 峰值电流先升高, 最高值是在pH值为4.5的溶液中, 最后电流值下降。因此, 选择pH值为4.5的0.10 mol/L PBS溶液内对铅离子有很好

的检测效果。



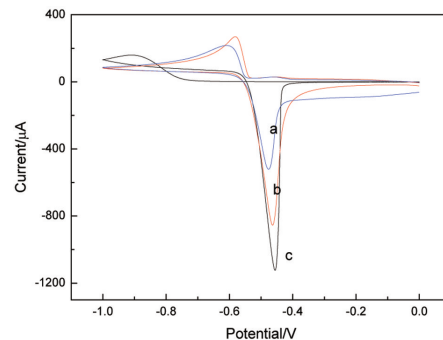
注: a~f依次为pH 6, 5.5, 5, 4.5, 4, 3.5

图4 pH值的优化

在0.01 V/s到0.2 V/s范围内, 扫速对检测效果影响不大, 虽然适当快速的扫速有利于检测, 但过快的扫速会影响实验的准确性, 因此本实验最终选择速度为0.1 V/s。

2.5 不同电极对Pb²⁺检测的影响

由图5可以看出石墨烯修饰电极对铅离子具有很好的电催化活性, 且在一定程度上提高了灵敏度。



注: a: 裸玻碳电极; b: 石墨烯修饰电极; c: 普鲁士蓝/石墨烯修饰电极

图5 不同电极在扫描铅盐时电性曲线

2.6 循环伏安法和差分脉冲伏安法对Pb²⁺检测的影响

本研究在pH 4.5, 0.1 mol/L PBS溶液中, 采用扫速0.1 V/s对0.01 mol/L Pb²⁺扫描效果进行对比, 结果如图6所示, DPV扫描时效果要明显高于CV。

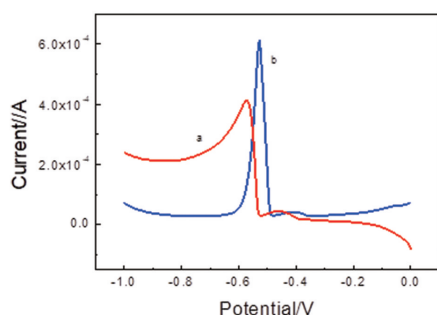
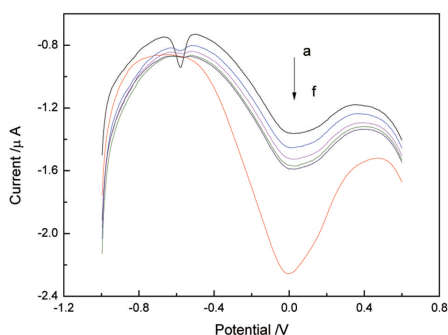


图6 不同扫描方法下的铅盐电性曲线

2.7 铅离子标准曲线的绘制, 以及干扰因素、普鲁士蓝/石墨烯修饰电极的稳定性和重复性研究

在最优的实验条件下(pH 4.5, 扫速0.1 V/s), 通过差分脉冲伏安法测定曲线, 结果如图7所示, 响应电流随着铅离子浓度的增加而逐渐增加, 峰电流也逐渐增大。在线性范围为 $1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-4}$ mol/L, 相关系数 r 为0.9990, 在S/N为3时检出限为 2.5×10^{-9} mol/L。



注: a~f 依次为 10^{-9} mol/L ~ 10^{-4} mol/L

图7 不同铅离子浓度的扫描曲线

无机离子干扰测量结果表明, 常见离子和有机物不干扰检测。

在相同的实验条件下, 测量放置5天的PB/GO/GCE。结果显示电流响应减少值小于10%, 表明所制备的电极具有良好的稳定性。

为验证修饰电极的重复性, 对2份待检样品结果进行分析, 无明显差异, 变异系数(CV%)在5%以内, 对同一样品采用5根电极检测分析, 变异系数(CV%)在5%以内, 表示普鲁士蓝/石墨烯复合材料修饰电极重复性较好。

2.8 样品分析

对4份畜禽饮用水样品分别采用无火焰原子吸收法和差分脉冲伏安法进行检测, 结果表明, 测量值均符合国际限量规定, 同时采用加标回收试验验证, 加标平均回收率为96.8%~103.6%(见表1)。

表1 样品中铅离子含量的测定结果($n=5$)

样品	原子吸收法	本法	RSD(%)
1	2.51×10^{-4}	3.56×10^{-4}	1.9
2	2.40×10^{-4}	3.06×10^{-4}	1.7
3	6.75×10^{-4}	7.24×10^{-4}	1.6
4	3.63×10^{-4}	4.11×10^{-4}	2.1

3 讨论

饮用水作为动物生存的基本需求之一, 其对畜禽等动物而言, 饮用水中铅离子是否超标将直接影响畜禽产品的质量符合我国食品安全的要求。此外, 畜禽在生长过程中对饮水的需求量, 以及保证饮用水质量, 对畜禽健康生长极为重要。在中国许多地区, 畜禽养殖场环境无污染认证的必要检查项目均包括畜禽饮用水的检查。因此, 确保畜禽养殖场的饮用水质量对维护畜禽产品的质量和安全具有重要意义^[17]。

现有研究表明, 如果畜禽饮用水中的重金属铅含量超过一定水平, 不仅会损害动物的健康生长, 还会在动物体内中积累, 使畜产品中的铅超标, 最终通过食物链在人体内积累, 从而危害人类健康^[18]。因此, 在制定畜禽饮用水标准时应严格控制畜禽饮水中铅的质量指标, 以保证动物健康与畜产品的安全。那么, 建立快速、敏感性高、特异性及重复性好的检测畜禽饮用水中铅离子的检测方法, 将为监控畜禽饮水中铅的含量提供有效的技术支持。

本研究建立的基于普鲁士蓝/石墨烯修饰电极检测畜禽饮用水中铅离子的方法, 是利用电化学沉淀普鲁士蓝纳米粒子在石墨烯的表面研究铅离子在修饰电极上的电化学行为, 铅离子富集过程也是其还原过程, 其中富集电位、时间、扫描速度及pH值是离子富集过程中的重要影响因

素^[2, 12, 19], 本研究逐一优化反应条件, 在 pH 4.5 的 0.10 mol/L 磷酸盐缓冲液中, 扫速为 0.1 V/s 时, 可得出铅离子最低的检出限为 2.5×10^{-9} mol/L。黄柱进等用石墨烯修饰玻碳电极, 采用线性伏安法检测铅离子, 检测限为 3.6×10^{-7} mol/L^[12]。Priya 等采用石墨烯, 羧甲基纤维素和磺达肝素纳米复合修饰玻碳电极检测铅离子, 检测限为 1.7×10^{-8} mol/L^[11]。本研究采用普鲁士蓝/石墨烯修饰电极检测铅离子, 对铅离子的检测限为 2.5×10^{-9} mol/L, 结果表明本研究检测方法优于前人的检测方法。分析原因可能与电极的修饰材料相关。对电极修饰材料的研究中, Li 等发现石墨烯的巨大共轭结构使其成为出色的电子或能量受体, 进一步研究发现石墨烯充当负载基底不仅可以增加金属离子在修饰电极表面的富集程度, 还可以显著提高电子传递速率, 增强电催化活性, 同时普鲁士蓝具有优良的电化学可逆性和优良的催化性, 二者具有协同作用, 进一步增强电流传输^[9, 20]。

建立一种快速、稳定、灵敏的检测铅及其他金属的检测办法, 将成为今后研究的热点。今后对以 Pb^{2+} 为代表的重金属检测技术研究中, 研究热点将集中于更灵敏的材料, 如石墨烯、纳米金等; 更高效的交叉学科检测技术, 尤其体现在采用光学, 电磁学和生物学多学科交叉互补, 多组分检测技术; 智能化与实用化结合, 可视化技术和多维技术的从实验室到现场的实际应用。本研究使用普鲁士蓝/石墨烯纳米复合材料检测畜禽饮用水中铅离子的方法不仅能为畜禽养殖提供一种常规有效监测铅离子的分析技术, 进而为畜、禽场的环境质量与饮用水质量进行评价, 还为今后相关材料的研究使用提供了良好的基础。

4 小结

本研究基于普鲁士蓝/石墨烯纳米复合材料的协同优势, 将制备的复合电极应用于检测畜禽养殖场饮用水, 对临床采集的 4 家养殖场的饮用水进行检测, 同时与 GB/T5750.6-2006《生活饮用水标准检验方法金属指标》中无火焰原子吸收法的结果进行对照, 表明本研究所构建的普鲁士蓝/石墨烯修饰电极对铅离子具有较高灵敏度、稳定性好、较低的检出限和较宽的线性范围。

参考文献:

- [1] 魏振宏, 陈虹, 孙丰全. ICP-MS 测定无公害畜禽饮用水中铅、汞、砷和镉[J]. 光谱实验室, 2010, 27(4): 1403-1405.
- [2] 杜平. 谷氨酸-纳米金-石墨烯修饰的离子液体碳糊电极测定水样中铅的研究[J]. 冶金分析, 2014, 34(5): 10-14.
- [3] PRIYADARSHINIE, PRADHAN N. Gold nanoparticles as efficient sensors in colorimetric detection of toxic metal ions: A review[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, 238: 888-902.
- [4] 何卫东, 窦文超, 赵广英. 多重增敏环保型痕量铅电化学传感器研制[J]. 食品科学, 2015, 36(02): 168-173.
- [5] 杨舫, 窦文超, 赵广英. 基于羟磷灰石电化学传感器快速检测茶叶中痕量铅[J]. 中国食品学报, 2014, 14(1): 244-250.
- [6] 徐守霞, 王斌. 双硫脲法测定蔬菜中铅残留的研究[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(14): 109-110.
- [7] 董喆, 李梦怡, 张会亮. 原子吸收法测定泡菜中铅含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(3): 1011-1017.
- [8] 卢玉曦, 栾锋, 刘惠涛. 双水杨醛邻苯二胺柱前衍生-高效液相色谱法测定茶叶中的 Pb^{2+} [J]. 色谱, 2017, 35(8): 843-847.
- [9] DOLATI S, RAMEZANI M, ABNOUS K, et al. Recent nucleic acid based biosensors for Pb^{2+} detection [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017, 246: 864-878.
- [10] FENGQIN L, ZHIGANG Y, XIANDA H, et al. Electrochemical aptamer - based sensors for food and water analysis: A review[J]. Anal Chim Acta, 2019, 1051: 1-23.
- [11] PRIYA T, DHANALAKSHMI N, KARTHIKEYAN V, et al. Highly selective simultaneous trace determination of Cd^{2+} and Pb^{2+} using porous graphene/carboxymethyl cellulose/fondaparinux nanocomposite modified electrode [J]. Journal of Electroanalytical Chemistry, 2019, 833: 543-551.
- [12] 黄柱进, 刘雅琼, 陈明明, 等. 石墨烯修饰玻碳电极测定铅离子的研究[J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2013, 47(4): 514-518.
- [13] AADUMITRACHIOALE A, TERTIS M, SUCIU M, et al. A novel immunosensing platform for serotonin detection in complex real samples based on graphene oxide and chitosan [J]. Electrochim ACTA, 2019, 311: 50-61.
- [14] MUNIANDY S, THE S J, APPATURI J N, et al. A reduced graphene oxide - titanium dioxide nanocomposite based electrochemical aptasensor for rapid and sensitive detection of *Salmonella enterica* [J]. Bioelectrochemistry, 2019, 127: 136-144.
- [15] KAUR A, SINGH R C. Unveiling the tunneling phenomena in graphene - graphene homo - junctions for emerging device applications[J]. Journal of Physics: Condensed Matter, 2019, 31(47): 475303.

- [16] MEHDI B, HESHMATOLLAH A, MARYAN F, et al. Anovel electrochemical sensor based on a glassy carbon electrode modified with dendrimer functionalized magnetic graphene oxide for simultaneous determination of trace Pb (II) and Cd (II) [J]. *Electrochimica Acta*, 2019, 312:80-88.
- [17] 石奥, 直俊强, 王全红, 等. 北京市部分畜禽场环境质量监测及评价[J]. *贵州农业科学*, 2016, 44(8):68-71.
- [18] 丁在亮, 刘发全, 刘红云, 等. 浅议畜禽饮水中微生物和重金属等质量指标及其质量控制[J]. *安徽农业科学*, 2006(7):14-15.
- [19] ZAKARIA M, CHIKYOW T. Recent advances in Prussian blue and Prussian blue analogues: synthesis and thermal treatments [J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2017, 352:328-345.
- [20] 张乐华, 张华阳, 李冲, 等. 普鲁士蓝/PDDA-石墨烯复合膜修饰电极的制备及应用于过氧化氢无酶传感器[J]. *传感技术学报*, 2014, 27(4), 438-445.

上接第21页

饲料5%, 对海兰褐蛋鸡产蛋率和料蛋比没有影响, 添加比例升高, 则会引起产蛋性能下降; 木薯渣生物饲料对比全价料, 在成本上有较大的优势, 添加5%的发酵木薯渣可以降低原料成本, 提高养殖效益; 同时, 可以提升鸡蛋的哈氏单位和蛋黄颜色, 有效改善蛋品质。

参考文献:

- [1] 刘维, 励飞, 聂勇. 木薯渣饲用价值及研究现状[J]. *饲料博览*, 2019(3):34-37.
- [2] FERRARO V, PICCIRILLO C, TOMLINS K, et al. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and yam (*Dioscorea* spp) crops and their derived foodstuffs: safety, security and nutritional value[J]. *Critical reviews in food science and nutrition*, 2016, 56(16): 2714-2727.
- [3] FERRAZ L V, GUIM A, VERAS R M L, et al. Cassava dreg as replacement of corn in goat kid diet [J]. *Tropical animal health and production*, 2018, 50(2):309-315.
- [4] PARDEEP K S, SUREKHA D, JOGINDER S D. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2018, 5(1):1-15.
- [5] 欧肇林. 发酵木薯渣对隆林黑猪生长性能血液生化指标、胴体品质及肉质的影响[D]. 硕士学位论文. 南宁: 广西大学, 2016.
- [6] 周璐丽, 周汉林, 王定发, 等. 日粮添加发酵木薯副产物饲喂海南黑山羊的试验效果[J]. *家畜生态学报*, 2018, 39(3):63-69.
- [7] 俸详仁, 崔艳莉, 庞继达, 等. 微生物发酵木薯渣饲料在肉鸡养殖中的应用[J]. *广东农业科学*, 2013, 16(1):111-112.
- [8] 李易红, 封伟杰, 管秀界, 等. 无抗发酵饲料在蛋鸡生产中的应用进展[J]. *中国家禽*, 2019, 41(5):45-48.
- [9] 宁艳春, 陈希海, 杜宝军, 等. 微生物发酵饲料的技术调研及关键技术分析[J]. *饲料博览*, 2019(1):27-30.
- [10] 崔卫涛, 况世昌, 李钢平, 等. 生物发酵饲料对蛋鸡生产性能和鸡蛋品质的影响[J]. *畜牧与饲料科学*, 2018, 39(10):39-42.
- [11] 孙汝江, 吕月琴, 高明芳, 等. 微生物发酵饲料在蛋鸡生产中的应用研究[J]. *中国饲料*, 2012(4):12-14.
- [12] 朱风华, 陈甫, 徐进栋, 等. 乳酸菌发酵饲料对蛋鸡生产性能及蛋品质的影响[J]. *饲料研究*, 2015(6):48-52.
- [13] 魏尊, 张谦. 棉粕源复合发酵饲料对产蛋鸡消化率和蛋品质的影响[J]. *饲料研究*, 2017(9):26-30.
- [14] 曲湘勇, 中岛隆. 天然着色剂提高蛋黄色泽度的比较研究[J]. *中国畜牧杂志*, 1999, 35(2):29-31.
- [15] 郝静, 刘钢, 左福元. 木薯渣的饲用价值及应用[J]. *饲料研究*, 2007(11):64-66.
- [16] 李小利. 哈氏单位是检验鸡蛋品质的重要指标[J]. *检验检疫学刊*, 2013(2):48-49.
- [17] 崔闯飞, 王晶, 齐广海, 等. 枯草芽胞杆菌对产蛋后期蛋鸡生产性能和蛋壳品质的影响[J]. *动物营养学报*, 2018, 30(4):1481-1488.
- [18] 黄竹, 姜丹, 王丽娟, 等. 发酵饲料对海兰褐蛋鸡生产性能及蛋品质的影响[J]. *畜牧与饲料科学*, 2019, 40(10):14-18.
- [19] 丁小青, 侯艳彬, 姚垒, 等. 生物发酵饲料对仙居鸡产蛋性能、蛋品质及血清生化指标的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2020, 56(9):113-118.
- [20] 谢景龙, 吴川川, 赵燕慧, 等. 混菌发酵饲料替代日粮对蛋鸡生产性能及蛋品质的影响[J]. *饲料研究*, 2021, 44(1):46-48.
- [21] 齐红杰. 发酵苹果渣对蛋鸡生产性能及经济效益的影响[J]. *现代畜牧科技*, 2020(6):5-7.

2021年黄羽肉鸡营养与饲料技术研究进展

茅沈丽, 苟钟勇*

(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, 农业农村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, 广东广州510640)

摘要:2021年黄羽肉鸡营养与饲料相关研究依然是热点,有大量文献报道。本文从国外地方品种肉鸡营养与饲料研究和技术发展动态、国内黄羽肉鸡营养参数研究、国内黄羽肉鸡饲料资源开发与利用研究、国内黄羽肉鸡营养代谢、营养与免疫、肉品质营养调控等多方面展开综述,最后提出研究中存在的问题与相关发展建议,以期为黄羽肉鸡生产提供技术支撑和指导服务。

关键词:黄羽肉鸡; 营养参数; 饲料资源; 营养调控; 营养与免疫; 肉品质
中图分类号:S816 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2022)02-0036-06

Research progress in nutrition and feed technology of yellow-feathered chickens in 2021

MAO Shenli, GOU Zhongyong*

(*Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, State Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding, Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Key Laboratory of Animal Breeding and Nutrition, Guangzhou 510640, China*)

Abstract: In 2021, it is still a hot spot on the research of the nutrition and feed of yellow-feathered chickens and a large number of relevant literatures have been reported. Research and technology developments of nutrition and feed of Yellow-feathered chickens in abroad are presented in this review. Besides, studies on nutritional parameters, development and utilization of feed resources, nutrition metabolism, nutrition and immunity, and nutrition regulation of meat quality of Chinese Yellow-feathered chickens are also reviewed here. Finally, the relevant problems in those researches and development suggestions are put forward by the authors. It hopes that this review can provide technical support and guidance service for production of Yellow-feathered chickens.

Keywords: Yellow-feathered chicken; nutritional parameters; feed resource; nutritional regulation; nutrition and immunity; meat quality

2021年国内外公开发表有关黄羽肉鸡营养与饲料相关研究的中、英文文献近百篇,其中约1/3的文章是广东省农业科学院动物科学研究所黄羽

肉鸡营养与饲料研究团队发表。黄羽肉鸡肉质鲜美,深受消费者喜爱。黄羽肉鸡养殖数量在肉鸡养殖中占有重要的比重,特别是在中国,2021年黄

收稿日期:2022-04-04

基金项目:广东省重点领域研发计划项目(2020B0202090004);财政部和农业农村部:国家现代农业产业技术体系(CARS-41);国家重点研发专项(2021YFD300404);国家自然科学基金青年基金(31802104);广东省自然科学基金项目(2021A1515012412、2021A1515010830);广东省农业科学院科技计划项目(202106TD、R2019PY-QF008)

作者简介:茅沈丽(1975-),女,江苏启东人,硕士,助理研究员,研究方向:黄羽肉鸡营养与饲料。E-mail: maoshenli9292@163.com

*通讯作者:苟钟勇(1982-),男,博士,副研究员,研究方向:黄羽肉鸡营养与饲料。E-mail: yozhgo917@163.com

羽肉鸡年出栏40亿只左右,占整个肉鸡年出栏量的45%左右。与白羽肉鸡相比,黄羽肉鸡存在品种众多、营养与饲料技术研究滞后甚至缺乏、黄羽肉鸡饲料效率低等问题,因此,面对饲料资源特别是蛋白饲料资源短缺、消费者随生活水平的提高对鸡肉肉质要求的提高等产业现状,必须加大对黄羽肉鸡精准营养、饲料资源开发利用技术、肉品质调控与改良等多方面的研究,最终实现黄羽肉鸡产业的健康、可持续发展。

1 国外地方品种黄羽肉鸡营养与饲料研究和 技术发展动态

2021年,国外关于地方品种优质肉鸡营养与饲料方面的研究英文文献报道较少,查阅到8篇相关的研究报告,主要集中在饲料资源的开发利用和鸡的肠道健康调控领域。Auza等研究发现日粮中添加3.75%~15.0%的黑水虻幼虫粉等量替代鱼粉对印尼本地鸡内脏器官和消化道器官指数无负面影响,其中11.25%黑水虻幼虫粉替代组显著提高了肉鸡心脏和小肠重量指数^[1]。Sani等研究表明,厨余垃圾干粉是一种很好的能量来源,可部分替代肉鸡日粮中的玉米,添加高达20%的厨余垃圾干粉对肉鸡生长性能、营养物质消化率和胴体性状均无负面影响^[2]。大青叶嫩叶中粗蛋白含量可达28.2%,是一种很好的家禽饲料来源;姜黄中的活性物质姜黄素和精油可促进胆汁分泌,增加畜禽食欲进而提高畜禽增重^[3]。相关研究发现,添加10%的大青叶嫩叶粉替代部分豆粕同时添加2.5%的姜黄粉提高了印尼本地鸡的生产性能、提高了肉鸡对饲料粗蛋白和粗纤维的消化率^[3-5]。Prayogi等和Sitindaon等研究发现棕榈仁粕经发酵后添加到饲料中可提高肉鸡对营养物质的利用率^[6-7]。Nidamanuri等研究表明,在尼科巴里鸡(印度品种)日粮中添加酵母培养物可改善因夏季较高环境温度带来的空肠绒毛坏死等负面影响^[8]。

2 国内优质肉鸡营养与饲料研究最新进展

2.1 黄羽肉鸡营养参数研究

在黄羽肉鸡的营养需要研究方面,国内学者主要研究了不同品种、不同生长阶段代谢能(ME)和粗蛋白质(CP)的需要量^[9-11]、赖氨酸^[12]、精氨

酸^[13]、苏氨酸^[14]、异亮氨酸^[15]的需要量,矿物元素钙^[16,17]、非植酸磷^[18]、锰^[19]的需要量,以及维生素B1的需要量^[20]。

能量和蛋白质是饲料中最主要也是最重要的两大营养素,通常占饲料成本的90%以上。因此,饲料能量和蛋白的正确供给是决定饲养效益的关键因素。通过试验和相关研究确定黄羽肉鸡的能量和蛋白需要是黄羽肉鸡营养与饲料最基本和至关重要的一部分,因此,黄羽肉鸡的能量和蛋白研究在此作重点分析和讨论。研究发现,以生长性能结果作为评价指标,北京油鸡新配套系母鸡0~6周龄饲料适宜ME和CP水平分别为12.12 MJ/kg (2897 kcal/kg)和19%,每日ME和CP需要分别为0.22 MJ (53.6 kcal)和3.52 g,能蛋比为63.8 MJ/g (15.2 kcal/g)^[9];10~16周龄饲料适宜ME和CP水平分别为11.51 MJ/kg (2751 kcal/kg)和15%,每日ME和CP需要分别为0.98 MJ (235 kcal)和12.8 g,能蛋比为76.7 MJ/g (18.3 kcal/g)^[10]。黄羽肉鸡跟一般动物的生长发育规律类似,前期蛋白沉积需求较多,后期脂肪沉积较多,因此,除能量之外的营养素需要(饲料浓度)一般随日龄、周龄阶段增加而降低,北京油鸡新配套系母鸡后期适宜的饲料CP水平(15%)低于前期(19%),符合畜禽营养需要参数的一般规律(为控制体重,以限饲方式喂饲的动物除外)。尽管适宜的饲料能量水平一般会随着动物日龄的增加而升高,但能量需要通常和蛋白、赖氨酸等氨基酸需要之间维持一个适宜的比值,从而使蛋白、氨基酸等营养物质能最佳地被代谢利用,因此,从北京油鸡上的研究结果来看,尽管后期适宜的能量水平11.51 MJ/kg (2751 kcal/kg)低于前期12.12 MJ/kg (2897 kcal/kg),这主要与后期蛋白需要比较低有关,后期的能蛋比实际是高于前期的,且后期的每日能量需要也远远高于前期,从某种意义上讲,畜禽的每日营养需要参数比饲料浓度需要参数更重要,因此,综合来分析,此研究结果也能解释肉鸡后期脂肪沉积高于前期的一般规律。当然,由于黄羽肉鸡特别是慢速型黄羽肉鸡生长周期较长,同时受消费者对肉质需求和冰鲜鸡上市的影响,在生产上,黄羽肉鸡后期往往采取限制能量、限饲等办法控制其体内脂肪的过度沉积,以满足消费者的需求和节约饲料成本。

吴琼等研究发现:0~12周龄麒麟母鸡的饲料能量需要为11.60 MJ/kg (2772 kcal/kg), 低于北京油鸡0~6周龄的能量需要12.12 MJ/kg(2897 kcal/kg), 与北京油鸡10~16周龄的能量需要11.51 MJ/kg (2751 kcal/kg)接近, 0~12周龄麒麟母鸡每日能量需要为0.50 MJ/kg(235 kcal)^[11]。由此可见, 不同品种、不同生长阶段黄羽肉鸡的能量需要差异较大。

黄羽肉鸡乃至所有动物的氨基酸营养与蛋白营养密不可分, 互相影响。王薇薇等研究提出了黄羽肉鸡低蛋白质饲料的氨基酸平衡模型, 快速型岭南黄羽肉鸡22~42日龄, 饲料氨基酸平衡模式为:赖氨酸:蛋氨酸:苏氨酸:色氨酸:异亮氨酸=100:55.6:97.2:25.0:95.8; 43~63日龄, 饲料氨基酸平衡模式为:赖氨酸:蛋氨酸:苏氨酸:色氨酸:异亮氨酸=100:37.3:85.3:22.7:85.3, 相应的CP水平可降低至13%, 低蛋白质饲料氨基酸平衡模型对63日龄黄羽肉鸡的肉品质无显著负面影响, 此研究结果可为黄羽肉鸡生产中低蛋白饲料技术的应用提供参考^[21]。

2.2 黄羽肉鸡饲料资源开发与利用研究

张赛等在慢速型黄羽肉鸡上进行了三种蛋白饲料原料棉粕、菜粕和豆粕的ME评定, 不但给出三种蛋白原料的ME值, 还给出了重要的氮校正ME值(MEn), 豆粕、棉粕和菜粕的总能代谢率分别为58.1%、40.9%、38.5%, ME分别为10.62、7.94和7.22 MJ/kg (2538、1898和1726 kcal/kg), MEn分别为9.57、6.86和6.15 MJ/kg (2287、1640和1470 kcal/kg), 此能量参数能够为慢速型黄羽肉鸡日粮配制提供参考^[22]。

余亲平等发现大麦虫粉能改善黄羽肉鸡先天肠道发育^[23]。Zhang等发现黑水虻幼虫粉有利于雏鸡防御禽传染性支气管炎病毒的感染^[24]。梁天柱等研究了发酵饲料原料对广西三黄鸡生长性能、屠宰性能、肉品质、养分利用率和经济效益等指标的影响, 表明10%添加量效果最佳^[25-26]。刘晓烜等发现饲料中添加发酵中药渣可以减少文昌鸡肝细胞损伤, 促进肝脏的营养代谢, 以1.5%的添加量最佳^[27]。刘松柏等研究稻谷替代玉米对黄羽肉鸡生长性能的影响, 表明稻谷在黄羽肉鸡小鸡饲料替代玉米15%, 在中大鸡饲料替代30%玉米对肉鸡生长性能无显著负面影响^[28]。赵丹阳等研究

了饲料中添加膨化亚麻籽对北京油鸡肌肉中n-3多不饱和脂肪酸沉积量的影响, 发现亚麻籽是否经过膨化对鸡肉中n-3 PUFA的沉积量没有显著影响, 考虑到成本问题, 不建议使用膨化亚麻籽作为生产富含n-3PUFA鸡肉的油鸡饲料原料^[29]。石庆珍等发现, 饲料中添加香茅草粉能提高文昌鸡生长性能, 促生长作用优于抗生素^[30]。曼志勋等的研究表明, 银杏叶能够改善北京油鸡屠宰性能和蛋品质^[31]。

2.3 黄羽肉鸡营养代谢相关研究

王一冰等的研究表明:相较于单独添加斑螫黄质, 饲料中阿朴酯或天然叶黄素与斑螫黄复配均可上调叶黄素沉积效应基因BCO1相对表达量, 促进着色, 天然叶黄素可以替代阿朴酯用于黄羽肉鸡皮肤着色^[32]。全瑞旺等研究发现, 植酸酶在麒麟鸡的低磷饲料中, 对料肉增重比、胫骨抗压强度的影响差异显著, 其植酸酶的适宜添加水平为1200 U/kg^[33]。宫晓玮等在330日龄的北京油鸡日粮中添加0.20%地顶孢霉培养物, 研究发现地顶孢霉培养物虽未能提高北京油鸡的生长性能, 但能够改善其内脏器官的生长发育, 并提高机体的抗氧化能力^[34]。黄雅莉等的研究显示在日粮中添加火麻油和茶多酚可以提高三黄鸡总增重、平均日增重、屠宰率和腿肌率, 还可以降低料重比和腹脂率, 能很好地改善三黄鸡生长性能和屠宰性能, 添加的适宜比例分别为2%和300 mg/kg^[35]。杨灿等和樊祥宇等研究发现姜黄素可通过增强胸肌抗氧化能力, 促进胸肌生长, 进而提高湘黄鸡的平均日增重;姜黄素可以降低肝脏脂肪酸合成酶和氨基环丙烷羧酸合酶基因的mRNA相对表达量, 从而提高中速型黄羽肉鸡的抗氧化能力, 调节肝脏脂肪代谢, 降低腹脂沉积^[36-37]。

2.4 黄羽肉鸡营养与免疫研究

叶金玲等研究表明, 在快大型岭南黄羽肉鸡基础饲料中添加牛樟芝多糖, 可通过抑制脂多糖(LPS)诱导的托样受体4/核转录因子NF- κ B表达, 抑制炎症反应的发生, 提高机体抗氧化能力, 有效缓解LPS诱导的生长抑制、氧化损伤和肠道结构损伤, 且效果优于抗生素, 建议添加量为100 mg/kg^[38]。陈思等研究发现, 饲料中添加博落回和三丁酸甘油酯能够替代亚甲基水杨酸杆菌肽, 提高黄羽肉鸡的生长性能, 改

善空肠肠道形态,增强免疫性能,二者联用的效果优于单独添加^[39]。韦晓芳等研究发现,在不同养殖方式下,饲料中添加丁酸梭菌对不同日龄广西黄鸡的生长性能未产生显著影响,但有提高平均日增重以及降低料重比的趋势,可以促进广西黄鸡肠道形态的发育,提高盲肠菌群的相对丰度,且笼养转散养后,盲肠菌群的相对丰度可以得到进一步的提升^[40]。谢童等研究发现饲料添加复合乳酸菌制剂可以提高黄羽肉鸡免疫器官指数,降低胃肠道pH,改善肠道黏膜形态并调节盲肠微生物平衡,从而降低肉鸡料重比,提高饲料转化效率,且以0.3%添加水平效果较好^[41]。唐明红等的研究表明在黄羽肉鸡饲料中添加过氧化氢酶(CAT),能改善肉鸡生长性能,提高机体的抗氧化能力,改善肉鸡的肠道形态,CAT在黄羽肉鸡饲料中的最适添加量为200 U/kg^[42]。Zhou等的研究发现,表皮生长因子初提物,可改善仙居鸡的生长性能、抗氧化能力和免疫力^[43]。Liu等的研究表明,海藻多糖可通过调节NF- κ B信号通路改善肉鸡法氏囊热应激损伤^[44]。Shi等研究发现 α -脂蛋白酸和绿原酸可以缓解三黄鸡因镉中毒引起的肝组织损伤^[45]。

2.5 黄羽肉鸡的肉品质营养调控研究

随着市场供求关系的变化和人民生活水平的提高,消费者不仅要求鸡肉安全卫生、营养价值高,还要求肉质和风味好。因此,不断提高鸡肉品质也是学者们关注的重点。李贞明等研究发现,饲料中添加柑橘提取物,可提高胸肌抗氧化能力,改善肉品质,缓解运输应激对黄羽肉鸡的影响^[46]。Fan等研究发现,在日粮中添加盐酸吡格列酮和L-肌昔,可以提高黄羽肉鸡肌肉脂肪含量,延长货架期^[47]。王一冰等的研究表明,饲料添加纳米铜、灵芝孢子粉和大豆异黄酮对清远麻鸡生长性能、抗氧化能力、肌肉品质、肌肉感官评定及风味物质含量的具有改善作用;复合维生素能提高林下养殖模式下清远麻鸡肌肉品质与谷氨酸、肌昔酸及肌肉脂肪等风味物质含量^[48-49]。

3 存在问题与发展建议

近几年来,饲料原料供应紧张和价格不断上涨,为研发高效低成本饲料,应加强对本地饲料资源的开发利用,并进行有效性和安全性评估。同时,由于黄羽肉鸡是地方品种鸡,品种繁多,不同

品种的黄羽肉鸡的营养需要量相差较大,对不同品种黄羽肉鸡营养需要量,还需进行更为精准的研究。

为保障我国黄羽肉鸡产业健康可持续发展、降低对环境的污染,营养与饲料研究应从肠道健康调控技术、低蛋白日粮、替抗添加剂组合、原料霉菌解毒处理等方面形成系统的无抗技术。

参考文献:

- [1] AUZA F A, PURWANTI S, SYAMSU J A, et al. The relative weight of internal organs and digestive tract in native chickens age 12 weeks that are given various levels of BSF larvae meal (*Hermetia illucens* L) in the ration [J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, 788(1):012064.
- [2] SANI U M, AL-JUGIFI W I, JABER B T, et al. Growth response, nutrient digestibility and carcass characteristics of broiler chickens fed dried kitchen waste meal as a partial replacement for corn [J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, 761(1):012094.
- [3] KAMARUDDIN R N, LAHAY N, NADIR M, et al. The effect of soybean meal substitution with *Indigofera zollingeriana* leaves and turmeric as phytobiotics in digestibility of crude protein and crude fiber of native chickens [J]. IOP Conference Series Earth and Environmental Science, 2021, 788(1):012080.
- [4] SUPRIADI, LAHAY N, NADIR M, et al. The effect of soybean meal substitution with *Indigofera zollingeriana* and addition of turmeric as phytobiotic on performance of native chicken [J]. IOP Conference Series Earth and Environmental Science, 2021, 788(1):012083.
- [5] MUHAMMAD L N, DARYATMO, NADIR M, et al. The effect of soybean meal substitution with *Indigofera* leaves and turmeric on carcass weight of Indonesian native chickens [J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, 788(1):012081.
- [6] PRAYOGI G, TAFSIN M, WAHYUNI T H. Protein digestibility and metabolizable energy of palm kernel cake fermented by *Starbio* on chicken [J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, 782(2):022096.
- [7] SITINDAON S H, HANAFI N D, TAFSIN M, et al. The effect of palm kernel meal (PKM) fermentation by different level and time using *Aspergillus Niger* to nutrition composition and digestibility on the sensi Agrinak-1 Chicken [J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2021, 782(2):022097.
- [8] NIDAMANURI A L, PRINCE L, MAHAPATRA R K, et al. Effect on physiological and production parameters upon supplementation of fermented yeast culture to Nicobari chickens

- during and post summer[J]. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2021, 106(2):284-295.
- [9] 耿爱莲, 王海宏, 张帆, 等. 饲料代谢能和粗蛋白质水平对1~6周龄北京油鸡新配套系生长性能和血清生化指标的影响[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(8):4395-4404.
- [10] 耿爱莲, 张帆, 王海宏, 等. 北京油鸡新配套系母鸡10~16周龄饲料适宜代谢能和粗蛋白质水平研究[J]. *中国家禽*, 2021, 43(5):55-61.
- [11] 吴琼, 杨讯业, 牛志力, 等. 饲料能量水平对麒麟鸡生长性能, 营养物质表观消化率及肝脏健康的影响[J]. *饲料研究*, 2021, 44(19):40-44.
- [12] 常彬, 耿爱莲, 张帆, 等. 饲料赖氨酸水平对10~16周龄北京油鸡新配套系母鸡生产性能, 屠宰性能和肉品质的影响[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(12):6824-6832.
- [13] 范秋丽, 叶金玲, 林楚晓, 等. 饲料精氨酸水平对91~120日龄清远麻鸡生长性能, 抗氧化能力, 免疫功能和肉品质的影响[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(7):3821-3832.
- [14] 林厦菁, 席鹏彬, 王一冰, 等. 饲料苏氨酸水平对1~21日龄黄羽肉鸡生长性能, 胴体品质, 脂肪代谢和免疫功能的影响[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(4):2013-2023.
- [15] 蒋守群, 王一冰, 林厦菁, 等. 不同饲养阶段快大型黄羽肉鸡异亮氨酸需要量研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(1):124-134.
- [16] 张倩倩, 张帆, 赵向红, 等. 饲料钙和有效磷水平对0~6周龄北京油鸡新配套系生长性能和血清生化指标的影响[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(11):6184-6192.
- [17] WANG Y B, WANG W W, FAN Q L, et al. Effects and interaction of dietary calcium and non-phytate phosphorus for slow-growing yellow-feathered broilers during the starter phase[J]. *Animal*, 2021, 15(5):100201.
- [18] WANG Y, WANG W, LI L, et al. Effects and interaction of dietary calcium and Non-phytate phosphorus for slow-growing yellow-feathered broilers between 56 and 84 days of age[J]. *Poultry Science*, 2021, 100(5):101024.
- [19] WANG Y, GOU Z, LIN X, et al. Optimal Level of Supplemental Manganese for Yellow-Feathered Broilers during the Growth Phase[J]. *Animals*, 2021, 11(5):1389-1399.
- [20] 阮栋, 周桂莲, 陈芳, 等. 1~63日龄快速型黄羽肉鸡硫胺素需要量研究[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(12):6757-6770.
- [21] 王薇薇, 蒋守群, 林厦菁, 等. 22~42日龄和43~63日龄快大型黄羽肉鸡低蛋白质饲料氨基酸平衡模型研究[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(6):3198-3209.
- [22] 张赛, 苟钟勇, 蒋守群. 80日龄慢速型黄羽肉鸡常规蛋白饲料原料代谢能评定[J]. *饲料研究*, 2021, 44(15):55-58.
- [23] 余亲平, 张翠萍, 黄静宇, 等. 日龄和饲料添加大麦虫粉对黄羽肉鸡肠道结构, 紧密连接蛋白和防御肽mRNA表达的影响[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(1):237-253.
- [24] ZHANG Y, YANG C Y, LI C, et al. Black Soldier Fly (*Hermetia illucens* L.) Larval Diet Improves CD8+ Lymphocytes Proliferation to Eliminate Chicken Coronavirus at an Early Infection Stage[J]. *Veterinary Microbiology*, 2021, 260:109151.
- [25] 梁天柱, 梁光哲, 梁志东, 等. 发酵饲料对广西三黄鸡生长性能, 屠宰性能和肉品质的影响[J]. *饲料研究*, 2021, 44(4):26-30.
- [26] 梁天柱, 梁明振, 王铎, 等. 添加发酵饲料原料对三黄鸡的生长性能, 养分利用率, 血液生化指标及经济效益的影响[J]. *饲料工业*, 2021, 42(8):23-29.
- [27] 刘晓, 孙楠, 王闫宇, 等. 发酵中药渣对文昌鸡脂类代谢的影响[J]. *畜禽业*, 2021, 32(10):8-9.
- [28] 刘松柏, 谭会泽, 温志芬, 等. 稻谷替代玉米在黄羽肉鸡饲料中的应用效果评估[J]. *粮食与饲料工业*, 2021, (2):32-35.
- [29] 赵丹阳, 李香月, 姚婷, 等. 膨化亚麻籽对北京油鸡生长性能, 屠宰性能, 血浆生化指标, 抗氧化能力和肌肉n-3多不饱和脂肪酸沉积量的影响[J]. *动物营养学报*, 2022, 34(1):274-284.
- [30] 石庆珍, 宋冠中, 郁树乾. 香茅草粉替代抗生素对文昌鸡生长性能的影响[J]. *畜牧与饲料科学*, 2021, 42(5):23-27.
- [31] 晏志勋, 初芹, 曾另超, 等. 饲料添加银杏叶对北京油鸡屠宰性能和蛋品质的影响[J]. *饲料研究*, 2021, 44(1):39-41.
- [32] 王一冰, 张盛, 李辉, 等. 天然叶黄素替代阿朴酯对黄羽肉鸡不同部位皮肤着色的影响[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(8):4405-4414.
- [33] 全瑞旺, 梁翠萍, 王润莲, 等. 低磷饲料中添加植酸酶对1~21日龄麒麟鸡生长性能, 体尺性状及胫骨特性的影响[J]. *家禽科学*, 2021, (3):16-20.
- [34] 宫晓玮, 张建伟, 安柯颖, 等. 地顶孢霉培养物对北京油鸡生长性能, 脏器指数及血液抗氧化能力的影响[J]. *中国兽医杂志*, 2021, 57(3):31-35.
- [35] 黄雅莉, 蓝铄师, 侯小露, 等. 火麻油和茶多酚对三黄鸡生长性能和屠宰性能的影响[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2021, (16):105-108.
- [36] 杨灿, 张玉婷, 唐小武, 等. 姜黄素对湘黄鸡生长性能, 血清生化指标和抗氧化能力的影响[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(12):6749-6756.
- [37] 樊祥宇, 张富群, 黄泰来, 等. 姜黄素对中型黄羽肉鸡生长性能, 腹脂沉积, 抗氧化能力, 肝脏脂肪代谢相关酶活性及基因表达的影响[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(10):5581-5590.
- [38] 叶金玲, 范秋丽, 林厦菁, 等. 牛樟芝多糖对脂多糖刺激黄羽肉鸡生长性能和空肠黏膜完整性的影响[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(10):5601-5616.
- [39] 陈思, 杜红方, 陈书琴, 等. 博落回和三丁酸甘油酯对黄羽肉鸡生长性能及肠道形态的影响[J]. *中国畜牧杂志*, 2021, 57(7):224-229.
- [40] 韦晓芳, 沈水宝, 吴克宁, 等. 不同养殖方式下饲料中添加丁酸梭菌对广西黄鸡生长性能, 肠道形态与盲肠微生物区系的影响[J]. *动物营养学报*, 2021, 33(7):3842-3852.
- [41] 谢童, 董涛, 王伟唯, 等. 复合乳酸菌制剂对黄羽肉鸡生长性

- 能,胃肠道pH,肠道形态和盲肠微生物的影响[J]. 动物营养学报, 2022, 34(1):254-263.
- [42] 唐明红. 过氧化氢酶对黄羽肉鸡生长性能,肠道形态以及抗氧化能力的影响[J]. 动物营养学报, 2021, 33(7):4153-4161.
- [43] LU J. Effects of Dietary Supplementation of gEGF on the Growth Performance and Immunity of Broilers [J]. *Animals*, 2021, 11(5):1394.
- [44] LIU W C, OU B H, LIANG Z L, et al. Algae - derived polysaccharides supplementation ameliorates heat stress-induced impairment of bursa of Fabricius via modulating NF- κ B signaling pathway in broilers[J]. *Poultry Science*, 2021, 100(8):101139.
- [45] SHI J, CHANG X, ZOU H, et al. Protective Effects of α -Lipoic Acid and Chlorogenic Acid on Cadmium-Induced Liver Injury in Three-Yellow Chickens[J]. *Animals*, 2021, 11(6):1606.
- [46] 李贞明, 余苗, 马现永, 等. 柑橘提取物对快速型黄羽肉鸡运输应激后体重损失, 屠宰性能, 抗氧化能力和肉品质的影响[J]. 动物营养学报, 2021, 33(10):5591-5600.
- [47] ZHANG F, JIN C, WANG X, et al. Dietary supplementation with pioglitazone hydrochloride and L-carnosine improves the growth performance, muscle fatty acid profiles and shelf life of yellow-feathered broiler chickens[J]. *Animal Nutrition*, 2021, 7(1):168-175.
- [48] 王一冰, 邝智祥, 张盛, 等. 3种添加剂对91~115日龄清远麻鸡生长性能, 抗氧化性能和肉品质的影响[J]. 中国畜牧兽医, 2021, 48(8):2787-2796.
- [49] 王一冰, 严霞, 孙建新, 等. 复合维生素对林下养殖模式下清远麻鸡肌肉品质与谷氨酸, 肌苷酸及肌内脂肪含量的影响[J]. 饲料工业, 2021, 42(1):48-52.

上接第17页

- disease. *Revue Scientifique Et Technique*, 1998, 17(1):128-142.
- [2] 丁佳欣, 钱晶. 新城疫病毒样颗粒对树突状细胞成熟的影响[J]. 中国兽医学报, 2017, 37(8):1485-1489.
- [3] 南福龙. 新城疫病毒调节树突状细胞IL-12表达及其抑制抗原递呈机制的研究[D]. 博士学位论文. 吉林: 吉林大学, 2021.
- [4] 王欣. 新城疫病毒感染树突状细胞引起T淋巴细胞增殖抑制的初步研究[D]. 硕士学位论文. 杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- [5] MUNIR S, SHARMA J M, KAPUR V. Transcriptional response of avian cells to infection with Newcastle disease virus. *Virus Research*, 2005, 107(1):103-108.
- [6] SAWANT P M, VERMA P C, SUBUDHI P K, et al. Immunomodulation of bivalent Newcastle disease DNA vaccine induced immune response by co-delivery of chicken IFN- γ and IL-4 genes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2011, 144(1-2):36-44.
- [7] KAPCZYNSKI D R, AFONSO C L, MILLER P J. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Developmental And Comparative Immunology*, 2013, 41(3):447-453.
- [8] 何静怡, 罗成龙. 鸡骨髓源树突状细胞体外转化培养[J]. 广东畜牧兽医科技, 2017, 42(1):34-36.
- [9] 栾维民. 鸡外周免疫器官中淋巴细胞发育的研究[D]. 博士学位论文. 长春: 吉林农业大学, 2008.
- [10] 刘胜旺. 人工感染新城疫病毒对雏鸡淋巴功能的影响[J]. 中国畜禽传染病, 1998, 20(3):141.
- [11] 曹雪涛. 树突状细胞的基础与临床研究新进展[J]. 中国免疫学杂志, 1998, 14(3):161-168.
- [12] ZHANG J, KAISER M G, DEIST M S, et al. Transcriptome analysis in spleen reveals differential regulation of response to Newcastle disease virus in two chicken lines [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8:1278.
- [13] TUDEKA C K, ANING G K, NAAZIE A, et al. Response of three local chicken ecotypes of Ghana to lentogenic and velogenic Newcastle disease virus challenge. *Tropical Animal Health Production*, 2022, 54:134.
- [14] TAN L, ZHANG Y, QIAO C, et al. NDV entry into dendritic cells through macropinocytosis and suppression of T lymphocyte proliferation[J]. *Virology*, 2018, 518:126-135.

新型冠状病毒检测方法研究进展

蔡琳琳, 梁健鹏, 陈礼斌, 向斌, 任涛*

(华南农业大学兽医学院、华南农业大学兽医学院、农业农村部兽用疫苗创制重点实验室、人兽共患病防控剂国家地方联合工程实验室、广东省动物源性人兽共患病预防与控制重点实验室, 广东 广州 510640)

摘要:新型冠状病毒(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)传播能力强, 易感动物种类多。目前, 已出现多种变异株, 可能存在逃脱现有疫苗保护的风险。认识人与动物界及其与疾病传播的相关性仍然是许多新兴的人畜共患病的关键控制点。本文简述了SARS-CoV-2的结构和突变毒株类型, 并阐述了目前针对SARS-CoV-2的一系列检测手段的技术原理、特点, 以及其应用现状, 总结各方法的优缺点, 最后提出完善常规疫病监测系统的建议, 阐明对畜牧生物安全防控的重要意义。

关键词: SARS-CoV-2; COVID-19; qRT-PCR; IAT; 免疫检测; 生物安全
中图分类号: S851.3 **文献标识码:** A **文章编码:** 1005-8567(2022)02-0043-08

Research progress in test technique for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

CAI Linlin, LIANG Jianpeng, CHEN Libin, XIANG Bin, REN Tao*

(Veterinary medicine college of South China Agricultural University, Guangdong, Guangzhou 510640)

Abstract: There are many kinds of susceptible animals for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), which has a strong transmission capacity. At this stage, a variety of mutants of SARS-CoV-2 have appeared, which may be at risk of evading the protection of existing vaccines. Understanding the human-animal interface and its relevance to disease transmission remains a critical control point for many emerging zoonoses. In this paper, the structure and mutant strains of SARS-CoV-2 were briefly described. Further, the technical principles, characteristics and application status of a series of detection methods for SARS-CoV-2 were described. Meanwhile, the advantages and disadvantages of each method were summarized in this paper. And finally, some suggestions were put forward to improve the routine disease monitoring system, after that, the importance of livestock husbandry biosecurity prevention and control were clarified step by step.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; qRT-PCR; IAT; Immunodetection; Biosecurity

1 背景

2019年12月31日一起不明病因肺炎病例经世

界卫生组织(World Health Organization, WHO)正名为新型冠状病毒肺炎(Coronavirus disease 2019, COVID-19), 眼下已成为全球性重大公共卫生事

收稿日期:2021-10-21

基金项目:2020佛山市“新型冠状病毒感染的肺炎”应急科技攻关专项(NO.2020001000151)

第一作者:蔡琳琳(1996-), 女, 硕士研究生, 兽医专业。E-mail:598325141@qq.com

*通讯作者:任涛(1968-), 男, 教授, 博士生导师, 主要研究新城疫病毒、禽流感病毒等动物病毒分子生物学。E-mail:rentao6868@126.com

件^[1]。截止至2021年11月17日全球COVID-19感染病例累计255 057 190例,死亡病例达5 129 234例,现存患者19 353 531例,其中重症病例占0.40%。COVID-19对人群普遍感染,引起人与人的聚集性传播和暴发性感染,有明显症状感染者主要表现出体温升高、呼吸急促、干咳、肌肉酸痛或疲劳等症状,或有嗅觉、味觉丧失,后期逐渐出现呼吸困难,进而表现为急性呼吸窘迫综合征等^[2-4]。

新型冠状病毒(Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)是COVID-19的病原体,属于 β 属冠状病毒(Coronavirus, CoV),也是目前已知的第7种人类CoV。 α 属的人类CoV NL63和229E与 β 属的人类CoV OC43和HKU1能引起普通感冒症状, β 属的严重急性呼吸综合征冠状病毒(Severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)(2003年)、中东呼吸综合征冠状病毒(Middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)(2012年)以及SARS-CoV-2均能引起严重的急性呼吸道疾病。SARS-CoV-2的4个结构蛋白基因分别为刺突糖蛋白S(Spike)、囊膜蛋白E(Envelope)、膜蛋白M(Membrane)和核蛋白N(Nucleocapsid)^[1, 5]。与其他 β 属CoV不同的是,SARS-CoV-2的S蛋白表面暴露的受体结合结构域(Receptor binding domain, RBD)结构呈现一种更加活跃的开放构象,与人细胞受体血管紧张素转化酶2(Angiotensin-converting enzyme 2, ACE 2)亲和力更高,病毒融合性更强^[6-7]。同期受到外界压力选择后,与最早分离毒株相比,S基因片段发生了明显变异的现象,存在1 274个氨基酸位点发生2 145种包括突变或缺失的变异。目前,根据全球共享数据库(Global initiative on sharing all influenza data, GISAID)中的数据,WHO将重点关注的流行突变体命名为Alpha、Beta、Gamma和Delta,并将可能存在免疫逃逸、诊断逃逸、治疗逃逸的突变体命名为Lambda和Mu^[8]。

2020年3月,中国香港COVID-19确诊患者家庭中的2只狗SARS-CoV-2核酸检测阳性,从其鼻及口腔拭子中分离出活病毒^[9]。4月,美国纽约动物园同单元的老虎和狮子均为SARS-CoV-2核酸阳性,提示该病毒能在猫科动物间有效传播^[10]。同

期,在荷兰养殖场也发现由感染人群引起的水貂COVID-19感染病例。实验研究已经成功地证明,在实验环境下,SARS-CoV-2在猫、雪貂、仓鼠、蝙蝠和非人类灵长类动物中感染和传播,而狗、猪和家禽对SARS-CoV-2的敏感性有限^[11]。动物COVID-19疫情的感染源基本上是来自被污染的物料、水源或感染人群,这警示着我们需要严格把控野生动物、家养畜禽的生物安全隔离,切断SARS-CoV-2传播途径^[12]。

目前,我国境内COVID-19疫情得到了有效遏制,但境外的感染人数呈波动上升态势,持续的低流量境外输入病例,使得我国枢纽地区和口岸城市防止输入的压力在不断加大,局部地区出现社会活动聚集性感染,其源头均与输入病例相关联。因此疫病防控措施容不得一丝松懈。病毒的适应性进化使得发现传染源和切断传播途径的任务变得更为棘手,为进一步加强我国对COVID-19的防控,不仅需要落实“早发现、早报告、早隔离、早治疗”的方针,更离不开高效灵敏的诊断技术的支持。与此同时,进一步提高灵敏度和真阳性率的SARS-CoV-2检测方法对进出口岸等特殊场所现场检疫、临床确诊、实验室鉴定工作具有重大意义,是否将SARS-CoV-2作为常态化检测也逐步纳入考量。SARS-CoV-2检测方法众多,各有优缺点。本文从病原学检测、核酸检测、免疫检测和医学影像生物学等方面对其加以阶段性概述,以期启发更高效、便捷检测方法的开发。

2 病原学检测

病原学检测需要严格的实验室环境及一定技术的操作员,尽管难以负荷大规模疫情下的检测需求量,但实验室鉴定病原体的金标准仍是病毒培养、分离与鉴定。Liu等采用冷冻电子断层扫描获取到灭活后的SARS-CoV-2超微结构信息,观察到病毒粒子包膜周围的峰构象在膜融合前后分别以较大的棍状结构和细长的钉状结构存在,为SARS-CoV-2的鉴别诊断提供了影像基础,并完成全基因组高通量测序^[13]。Zhu等从患者的支气管肺泡灌洗液样品上清中首次分离出该病毒,接种人呼吸道上皮细胞4 d后可观察到细胞病变,而接

种非洲绿猴肾细胞系 Vero E6 和人肝细胞系 Huh-7 的则需要 4~6 d 才能看见特异性细胞病变现象^[14]。Eymieux 等获取的鼻拭子样品接种 Vero-81 细胞系,利用 Vero-81 细胞的免疫荧光信号量化其感染细胞的数量,在 Vero 细胞中 SARS-CoV-2 的复制周期约为 8 h^[15]。

3 核酸检测

核酸检测以鼻咽拭子、口咽拭子、痰液和支气管肺灌洗液等为主要采集标本,是实现“早发现”和“早诊断”最重要的手段和措施,也是临床上无创诊断 COVID-19 的金标准。目前主要建立的 SARS-CoV-2 特异性 RNA 检测的靶基因是基因组开放性读码框 ORF1ab 基因、N 基因,部分检测产品增加 S、E 和 M 基因的保守域为检测指标。因为 SARS-CoV-2 是单股正链 RNA 病毒,其 RNA 依赖性的 RNA 聚合酶(RNA dependent RNA polymerase, RdRp)基因的检测也在标准化检测中渐渐步入公众视野,为核酸检测结果的可靠性提供前提保障。

3.1 全基因组测序技术

高通量测序技术是一种以获取细菌、真菌、病毒和寄生虫等多种病原体全基因组信息来研究其转录组的无需培养、无偏好性病原检测技术。COVID-19 暴发后,我国研究员率先完成 SARS-CoV-2 测序工作并共享了全基因组序列信息^[16-17]。Lam 等人利用宏基因组测序技术从中国南部穿山甲采集的样品中鉴定出 SARS-CoV-2 相关病毒^[18]。Ren 等人用 mNGS 分析得出部分蝙蝠 CoV 分离株与 SARS-CoV-2 核酸序列具有高度相似性^[19]。这些发现都为病毒溯源提供了线索。NVIDIA 公司的 Parabricks 软件可通过基因组分析工具包将基因组信息数据分析过程从数天缩短至数小时,不仅提高测序工作效率,还为解析疾病的传播方式和鉴别感染人群争取了时间^[20]。刘天罡等联合团队开发了一项创新性测序技术纳米孔靶向测序,利用实时监测核酸通过蛋白纳米孔时产生的电流变化,解析电流信号来确定碱基序列,将检测范围扩大到近 10 kb 的区域,多基因、多位点捕获并读取病毒核酸序列,可在 6~10 h 内同时检测多种与 COVID-19 症状相似的呼吸道病毒^[21]。

以上的病原宏基因组测序工作虽然在临床应用中可操作性不大,但对病毒溯源有着深远的工作意义^[22]。

3.2 聚合酶链式反应

3.2.1 实时荧光聚合酶链式反应(Quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)

qRT-PCR 因其高特异性与敏感度,且检测成本低,作为应对新发传染性的大面积检测的首选标准化检测方法,也是目前临床实验室核酸检测的主要手段。在最佳条件下,一般可以在 3 h 内获取检测结果。qRT-PCR 通过荧光基团和猝灭基团对 PCR 反应体系中的目标模板进行相对或绝对定量分析,但检测中操作需十分谨慎,要防止交叉污染。

我国《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版)》(以下简称新冠诊疗方案)中明确要求若同一份核酸检测标本中双靶标特异性 qRT-PCR 检测结果均为阳性的则为 COVID-19 确诊病例;若单靶标阳性患者的重复采样的核酸检测结果为阳性的亦为确诊病例^[23]。Corman 团队在没有可用的病毒分离物或原始患者标本的情况下,针对 SARS-CoV-2 的 RdRp、E 和 N 基因分别设计引物和探针,基于 qRT-PCR 反应得到 E 基因最低检测限为 3.2 copies/反应,除 SARS-CoV 外,未与其他人类 CoV 和呼吸道疾病有交叉反应,该基因设计可用于不明肺炎流行早期,并被建议以 E 基因作为第一道检测筛选线,而 RdRp 基因探针能特异捕捉 SARS-CoV-2,可以用 RdRp 基因检测作为加强验证^[24]。Okamoto 等针对 SARS-CoV-2 的 N 基因独特区域设计了基于 qRT-PCR 技术的 N1、N2 引物探针集,相较于 LightMix 模块化 SARS 和武汉 CoV N 基因(LM S & W-N)商品试剂盒,前者具有更高的灵敏性与特异性^[25-26]。

3.2.2 数字聚合酶链式反应(Digital polymerase chain reaction, DIG-PCR)

DIG-PCR 由美国研究员 Vogelstein B 于 1999 年提出,通过稀释样本,分成数百个或数百万个独立的纳升级反应池,每个反应池包含一个或多个拷贝的模板,进行同时 PCR 扩增,然后读取各个反应池的荧光信号,再采用终点定量的方法和泊松分布的统计学

方法进行分析,该方法可得到扩增产物信息,是一项可靠的绝对定量测量方法^[27-28]。中国计量科学研究所的团队成功研发应用于SARS-CoV-2的高灵敏DIG-PCR检测法。程京院士团队开发的全新微流控芯片能够在90 min内一次性检测出包括SARS-CoV-2在内的6种常见的呼吸道病毒,可有效分鉴出流感病毒、肺炎支原体感染等其他已知病毒性肺炎^[29]。于祥春等人开发一种新型试剂盒可以实现一次单孔完成三基因的检测^[30]。

尽管如此,与qRT-PCR相比,DIG-PCR单次检测成本高,高昂的设备及耗材费用在很大程度上限制了DIG-PCR技术的适用范围。基因组测序和各种普通或实时PCR技术都要在专业仪器和操作员的支持下,反观等温技术,检测环境条件易满足,降低送检过程被污染的风险,在保证检测的时效性和灵敏度的同时有着较低检测成本,COVID-19的初步诊断更趋向于采取这种快速的现场筛查方法。

3.3 等温扩增技术 (Isothermal amplification technologies, IAT)

恒温反应,即不需要热循环,其优秀的易用性、特异性及敏感性成为替代传统普通PCR的潜力,也是COVID-19的新型分子诊断工具的代表之一。不需要专员,在社区医院、卫生站等小规模诊所就可以操作,出具检测结果报告快,缩短了诊断周期,有效阻缓疫病的传播。有许多IAT技术已通过审查,被广泛应用于护理中心。IAT技术采用高效且灵敏的聚合酶,如环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)采用的嗜热性硬脂芽孢杆菌DNA聚合酶;重组酶聚合酶恒温扩增(Recombinase polymerase amplification, RPA)采用的枯草芽孢杆菌的DNA聚合酶;嗜热链置换扩增技术(Thermophilic strand displacement amplification, SDA)采用BsoB I和exo-Bca耐热的DNA聚合酶^[31];解旋酶依赖性扩增(Helicase-dependent amplification, HAD)采用Bst聚合酶或Klenow聚合酶^[32]。其中发展较为成熟的LAMP和RPA被率先运用于COVID-19的筛查中。

3.3.1 环介导等温扩增技术(LAMP)

LAMP由Notomi T等人于2000年发明的一种

基于单链环状结构,通过具有链置换活性聚合酶和一套引物集,高度选择性放大目标序列的核酸扩增技术。该方法能在约60~65℃下恒温1 h,实现目标基因的 10^9 倍放大,对于新发传染性疾病的快速判别十分有利,但该方法要求设计4~6条引物对来识别6~8段目标基因区域,非特异性扩增的情况需要人工自主降低^[33-34]。云熙白等针对N基因设计LAMP引物集,对140份其他呼吸道疾病病毒和14份SARS-CoV-2样本进行鉴别,准确率可达98.70%^[35]。吕仁飞等针对病毒的N、S和RdRP基因分别设计引物,与qRT-PCR方法的SARS-CoV-2临床阳性样本检出率保持一致^[36]。黄卫东等采用RT-LAMP技术可在30 min内靶向COVID-19病毒的ORF1ab、S和N基因,加强检测特异性^[37]。

LAMP等温扩增技术由于涉及到多对引物和酶,往往需要大量的优化验证。LAMP技术中采取的DNA聚合酶效率对温度变化较为敏感,当反应温度超过65℃时敏感性会变得不稳定,容易出现假阳性结果,而且在实验室环境中也容易形成不易消除的气溶胶^[38]。因此,一步反应的LAMP成为优化的新目标,而达到一步反应则必须要进行病毒RNA纯化,才能保证样本检测的敏感性,同时降低处理感染病毒的风险^[39]。

3.3.2 重组酶聚合酶恒温扩增(RPA)

RPA是2006年由英国科学家开发的一种超过指数级扩增的核酸等温扩增技术。在RPA反应体系中,DNA和RNA均可作为模板。与传统PCR相比,RPA是一种设备需求简单的恒温反应,主要依赖能结合引物的重组酶、单链DNA结合蛋白和链置换DNA聚合酶。不需要利用高温或变温进行变性过程,反应温度介于37~42℃之间,在10~20 min即可完成反应^[40]。

基于RPA反应体系,其反应扩增产物结果可结合实时荧光定量、侧流层析试纸条,数字芯片等多种方法进行判定。RPA技术的应用十分广泛包括了登革热病毒、埃博拉病毒、非洲猪瘟病毒、诺如病毒、布鲁氏菌、结核杆菌^[41-46]、隐孢子虫和弓形虫等病原微生物的检测^[47]。Lau团队开发并优化了结合SYBR Green I或侧流层析试纸条的RPA反应

体系,该体系最低可检测限为7.659 copies/ μL ,且与SARS-CoV等其他病毒无交叉反应,临床样本检测的灵敏度达到98.7%^[48]。Choi等研究员利用RPA反应扩增N基因,基于rkDNA-氧化石墨烯系统,设计能与RPA扩增序列互补的rkDNA探针,从而达到放大荧光信号的目的^[49]。

RPA技术通过增加相配套的一组或几组引物和探针,完成一次性检测多个反应产物,实现多重RPA。而引物、探针设计是开发相应技术的重点,其设计质量对扩增速度、检测灵敏度影响较大,因此尚未普及成为新发传染病的检测方案。

4 免疫检测

早期核酸筛查是控制COVID-19传播的重要干预措施之一,而抗原抗体免疫检测技术优势在于特异性强,灵敏度可观,对于疑似病例采取免疫方法作进一步检测,可辅助核酸诊断进行确诊。基于病毒抗原、宿主抗体的方法有常见的血清学检测、酶联免疫吸附试验(Enzyme linked Immunosorbent assay, ELISA)、胶体金免疫层析技术(Gold immunochromatography assay, GICA)和化学发光免疫分析法(Chemiluminescence immunoassay, CLIA)等。

4.1 血清学检测

机体在病毒入侵后启动适应性免疫应答,有研究指出,机体初次抵抗SARS-CoV-2感染,特异性IgM、IgG和IgA抗体在发病1周内阳性检出率均较低,IgM最早可在发病后第3 d被检测到,第2周前后达到高峰期,IgG及IgA抗体在发病后第4 d由阴性转为阳性,且IgG抗体滴度较恢复期高出4倍及以上^[50, 51]。依据新冠诊疗方案,因抗体检测受到COVID-19无症状感染者排毒期,即窗口期的影响,血清学检测是辅助诊断指标之一,不能代替核酸检测。

4.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)

ELISA原理是通过在酶标反应板上包被抗原或抗体,利用抗原抗体反应,将待检抗原或抗体结合到酶标反应板上,在酵素等催化物催化下产生肉眼可见的颜色或仪器可读取色的深浅进行定量分析。Zahra等研究员开发了3种ELISA方法,分

别针对病毒S蛋白的IgA、IgG和N蛋白的IgG,对疫情暴发前鉴定的300份流感病例及100份COVID-19确诊病例进行检测并评价,分析结果提示ELISA检测方法特异性保持在98%以上,而敏感性约90%,同期对比其他商品化ELISA试剂盒,平均存在15%假阳性结果^[52]。刘万兵等以N和S蛋白作为检测对象,对214例COVID-19病患进行IgM/IgG抗体检测,IgM/IgG抗体阳性检出率为80%~82%,且集中在发病10 d后^[53]。ELISA作为开发程度较高的免疫技术,具有高灵敏度,高效率的特点,同时操作较为简易,对医护人员的保护性较好,因此用于检测SARS-CoV-2的ELISA试剂盒已广泛投入临床应用,显而易见的缺点是不能实现早期诊断的目的。

4.3 胶体金免疫层析技术(GICA)

胶体金是一种在氯金酸被枸橼酸钠等还原剂还原后聚合成不同直径的金颗粒。在弱碱性环境中携带高聚集性负电子,通过光镜观测到鲜艳樱红色的胶金液,可与抗体结合作为示踪标记物^[54]。呼吸疾病国家重点实验室采取胶体金间接免疫层析技术研制出IgM单抗体快速检测,仅需采取一滴血就有望在15 min左右肉眼观察获得检测结果,且病患的血浆稀释500~1 000倍仍可保证阳性检出率,可与核酸检测形成互证,协助筛选防线前移^[55]。刘海森等人开发的SARS-CoV-2的IgG/IgM二联胶体金抗体检测卡已获得授权^[56]。相较于现有技术,该检测卡具有灵敏度高、操作简便、结果判读直观、特异性好以及成本低的特点。与其他检测方法相比,一方面,胶体金检测试纸条可以不依赖专业的医护人员操作而自主完成检测,有效遏制处于社区扩散阶段的COVID-19,另一方面,有助于调度医疗资源,分级分类治疗。

4.4 化学发光免疫分析法(CLIA)

化学发光是在特殊化学反应中,由于吸收反应释放的化学能而处于电子激发态的中间体或产物回到基态时产生的一种光辐射,偶联免疫反应发展为CLIA^[57]。南开大学与多个科研团队联合研制出在15 min完成基于聚集诱导发光和胶体金等技术的SARS-CoV-2 IgM/IgG抗体联合检测的试剂盒,初步临床检测中抗体阳性检出率为75%^[58]。

Makoto Hiki 等对临床症状轻、中、重症 COVID-19 患者采集血清标本进行化学发光微粒子免疫检测,可监测不同症状患者体内不同发病程度的抗体含量变化^[59]。基于病毒抗原的免疫检测能保证良好的临床特异性,但这类免疫技术试剂的灵敏度受到试验线性制约,受个体内特异性病毒抗原表达量差异影响较明显,且存在一定的检测窗口期,有 COVID-19 患者在发病后病毒核酸转阴,而后期复诊出现延迟显阳的现象,可能存在假阴性^[60]。免疫检测的内源性及外源性的干扰因素会导致分析物浓度或者使反应活力出现偏移,因此,还需结合流行病学史、临床表现和基础疾病等情况进行综合判断。

5 医学影像生物学检测

除了从病原、核酸及免疫方面上的检测,医学影像生物学以非侵入方式取得 COVID-19 患者肺内部组织影像也是十分重要的诊断依据。COVID-19 患者肺部早期影像学检查中可观察到多发性小斑片影及间质病变。随病程发展,可见双肺后区双侧弥漫性肺泡损伤及黏液性渗出。从胸部 CT 检查可见多处斑驳和玻璃液混浊,重症病例发展为肺实变,其病理变化表现为肺内胀大,最终导致肺组

织功能性通气失效,形成低氧血症^[2]。在学科结合创新下,融合了人工智能的影像学不仅能降低人工阅片的工作量和主观影响,还能建立量化标准,精准锁定病变部位^[61]。

6 总结与展望

目前,国内重点试剂盒生产企业包括华大基因、达安基因、捷诺生物、广州万孚和丽珠集团等在对 CoV 研究积累上,积极响应并研发了针对 SARS-CoV-2 检测的近 10 种诊断试剂盒。表 1 阐述的检测方法各有优势,亦有其不足之处,理论上包括 COVID-19 感染者排毒量、采样质量、检测试剂盒品质以及实验室操作等诸多因素影响检测结果。因此,一方面要不断开发高灵敏度及高特异性的检测方法;另一方面,正确采集标本,标本采集质量与检测结果的关系密不可分。此外,受窗口期影响,在排查过程中也可能存在漏诊风险。SARS-CoV、MERS-CoV 及 SARS-CoV-2 引起的 3 次人类 CoV 疫情都具有突发性和扩散快的特点,而专利技术趋势也往往呈现波动性而非持续性,使得 CoV 的预防及治疗药物研究发展受阻。

COVID-19 大流行给全球带来了灾难性的医疗难题,破坏公共卫生安全、损害经济和社会的后果

表 1 检测方法汇总

检测方法	优点	缺点	适用范围
病原学检测	鉴定病原体的金标准,获取病毒粒子超微结构信息	专业性高、难负荷大规模检测量	解决溯源问题
全基因组测序	无偏好性病原检测,高通量高效率	专业性高、难负荷大规模检测量	解决溯源问题
qRT-PCR	高特异性、高灵敏度、检测成本低、耗时短,可以实时监测扩增产物	需要变性步骤,易发生交叉污染	大规模检测
DIG-PCR	纳升级检测限、多基因检测、耗时短	检测成本高	获取病毒演化进程信息
LAMP	高特异性、高灵敏度、时效性强、多基因检测、恒温反应、结果可视化	体系建立难度高、产物复杂,易受气溶胶污染	社区医院等现场筛查
RPA	高特异性、高灵敏度、时效性强、多基因检测、恒温反应、结果可视化	体系建立难度高、酶种类多,易受气溶胶污染	社区医院等现场筛查
血清学检测	获取病毒的免疫动态过程信息	受窗口期影响大	辅助诊断
ELISA	高特异性、高灵敏度、操作简易,对医护保护性高,产品开发周期短	受窗口期影响大,机体内外源性因素干扰	大规模检测
GICA	高特异性、高灵敏度、多重抗体检测、结果可视化	难以进行定量试验	社区医院等现场筛查,自主检测
CLIA	时效性强,获取病毒的免疫动态过程信息	受窗口期、机体内外源性因素干扰	辅助诊断
医学影像	无创口检测	人工阅片的工作量大,主观性强	辅助诊断,快速筛查

十分严重。SARS-CoV-2虽然对包括猪、鸡等家养畜禽的致病情况不如包括猫、水貂、鼠、非人类灵长动物等哺乳动物敏感,但对“人-畜禽-场”这一闭环系统仍存在潜在威胁。在经济动物、野生动物界内的逃逸毒株每天都可能在交叉传播过程中发生基因突变。目前针对SARS-CoV-2的特效药尚未研制成功,疫苗的有效性在变异毒株面前也可能受到一定打击。鉴于人类CoV所产生的生物安全破坏力与全球公共卫生危害性,提示CoV可作为常规疫病监测系统的新成员。高效精准的检测方法与物理隔离病例仍是遏制疫情暴发的重要手段,因此需要进一步提高核酸检测的准确性、增进检测技术,为加快早期排查、提高日核酸检测能力提供基础保障。同时,检测技术的升级有利于降低检测成本;便利性检测技术的普及有利于检测产品的规模化生产;了解各种检测方法的优缺点和适用范围,能顺利地在畜禽产业链各个环节中衔接检测项,也为品质检测环节提供基础理论知识体系;对于监测系统发现的异常情况要做好应对措施,更早、更快、更简化地向上报告,必要时或采取临时跨级报告。

参考文献:

- [1] ACTER T, UDDIN N, DAS J, et al. Evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (sars-cov-2) as coronavirus disease 2019 (covid-19) pandemic: a global health emergency [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 730:138996.
- [2] CHEN N, ZHOU M, DONG X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in wuhan, China: a descriptive study [J]. *The Lancet*, 2020, 395(10223):507-513.
- [3] FWCA B, SY A, KHK A, et al. A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster [J]. *The Lancet*, 2020, 395(10223):514-523.
- [4] SBRANA M F, FORNAZIERI M A, BRUNI-CARDOSO A, et al. Olfactory dysfunction in frontline health care professionals during covid-19 pandemic in brazil [J]. *Frontiers in Physiology*, 2021, 12:622987.
- [5] SOFI M S, BHAT S, HAMID A. Sars-cov-2: a critical review of its history, pathogenesis, transmission, diagnosis and treatment [J]. *Biosafety and Health*, 2020, 2(4):217-225.
- [6] WAN Y, SHANG J, GRAHAM R, et al. Receptor recognition by the novel coronavirus from wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of sars coronavirus [J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(7):e127-e146.
- [7] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 579(7798):270-273.
- [8] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tracking sars - cov - 2 variants [EB/OL]. [2022/3/21]. <https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>.
- [9] SIT T, BRACKMAN C J, IP S M, et al. Infection of dogs with sars-cov-2 [J]. *Nature*, 2020, 586:7831.
- [10] MCALOOSE D, LAVERACK M, WANG L, et al. From people to panthera: natural sars-cov-2 infection in tigers and lions at the bronx zoo [J]. *MBio*, 2020, 11(5):e2220.
- [11] MUNNINK B, SIKKEMA R S, NIEUWENHUIJSE D F, et al. Transmission of sars-cov-2 on mink farms between humans and mink and back to humans [J]. *Science*, 2020, 371(6525):e5901.
- [12] HOBBS E C, REID T J. Animals and sars - cov - 2: species susceptibility and viral transmission in experimental and natural conditions, and the potential implications for community transmission [J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2021, 4(68):1850-1867.
- [13] LIU C, MENDONA L, YANG Y, et al. The architecture of inactivated sars-cov-2 with postfusion spikes revealed by cryo-em and cryo-et - sciencedirect [J]. *Structure*, 2020, 28(11):1218-1224.
- [14] ZHU N, ZHANG D, WANG W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *New England Journal of Medicine*, 2020, 382(8):727-733.
- [15] EYMIEUX S, ROUILLE Y, TERRIER O, et al. Ultrastructural modifications induced by sars - cov - 2 in vero cells: a kinetic analysis of viral factory formation, viral particle morphogenesis and virion release [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2021, 78(7):3565-3576.
- [16] WU F, ZHAO S, YU B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China [J]. *Nature*, 2020, 579(7798):1-8.
- [17] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 579(7798):270-273.
- [18] LAM T, JIA N, ZHANG Y, et al. Identifying sars-cov-2-related coronaviruses in malayan pangolins [J]. *Nature*, 2020, 583(7815):282-285.
- [19] REN L L, WANG Y M, WU Z Q, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study [J]. *Chinese Medical Journal*, 2020, 133(9):1015-1024.
- [20] 英伟达. NVIDIA 为 COVID-19 研究人员免费提供 Parabricks [EB/OL]. [2022/3/21]. <https://blogs.nvidia.cn/2020/03/26/>

- coronavirus-research-parabricks/.
- [21] WANG M, FU A, HU B, et al. Nanopore targeted sequencing for the accurate and comprehensive detection of sars-cov-2 and other respiratory viruses[J]. *Small*, 2020, 16(32):e2002169.
- [22] 陶悦, 傅启华, 莫茜. 病原宏基因组测序在新型冠状病毒检测中的应用与挑战[J]. *中华检验医学杂志*, 2020, 43(3): 217-218.
- [23] 国家卫生健康委办公厅. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版修订版)的通知[EB/OL]. [2022/3/21]. http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2021-04/15/content_5599795.htm.
- [24] CORMAN V M, LANDT O, KAISER M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-ncov) by real-time rt-pcr[J]. *Eurosurveillance*, 2020, 25(3):2000045.
- [25] OKAMAOTO K, SHIRATO K, NAO N N, et al. An assessment of real-time rt-pcr kits for sars-cov-2 detection[J]. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2020, 73(5):366-368.
- [26] YIP C Y, SRIDHAR S, CHENG K W, et al. Evaluation of the commercially available lightmix modular e-gene kit using clinical and proficiency testing specimens for sars-cov-2 detection[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2020, 129:104476.
- [27] VOGELSTEIN B, KINZLER K W. Digital pcr[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(16):9236-9241.
- [28] 郑子繁, 柳方方, 刘卫晓, 等. 数字PCR技术在核酸标准物质研制中的应用[J]. *生物技术进展*, 2020, 10(6):579-584.
- [29] 天津中检科健. 国家药监局应急审批新型冠状病毒快速检测产品[EB/OL]. [2022/3/21]. <http://www.caiqcast.com/news/188.html>.
- [30] 于祥春, 龚建, 郑祖亮, 等. 用于新型冠状病毒核酸检测的数字PCR试剂盒: CN212955181U[P]. 2021.
- [31] 蒋天伦. 链置换扩增术(SDA)及其进展[J]. *国际检验医学杂志*, 1999, 020(5):196-198.
- [32] 马丽敏, 卢亦愚, 徐昌平, 等. 依赖解旋酶恒温扩增技术快速检测麻疹病毒核酸[J]. *中国疫苗和免疫*, 2012, 18(6):4.
- [33] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of dna[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12):E63.
- [34] ZHU N, WONG P K. Advances in viral diagnostic technologies for combating covid-19 and future pandemics[J]. *SLAS Technology*, 2020, 25(6):513-521.
- [35] BAEK Y H, UM J, ANTIGUA K J C, et al. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel sars-cov-2[J]. *Emerging Microbes and Infections*, 2020, 9(1):998-1007.
- [36] LU R, WU X, WAN Z, et al. A novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of sars-cov-2[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(8):2826.
- [37] HUANG W E, LIM B, HSU C, et al. Rt-lamp for rapid diagnosis of coronavirus sars-cov-2[J]. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(4):950-961.
- [38] 梁瑞英, 梁琳, 贾亚雄, 等. 新型冠状病毒一步法可视化恒温快速检测方法的建立[J]. *病毒学报*, 2020, 36(6):983-988.
- [39] THOMPSON D, YU L. Mini review: recent progress in rt-lamp enabled covid-19 detection[J]. *Sensors and Actuators Reports*, 2020, 1(2):100017.
- [40] 徐昌平, 余蓓蓓, 卢亦愚, 等. 重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J]. *病毒学报*, 2020, 36(3):11.
- [41] TEOH B T, SAM S S, TAN K K, et al. Early detection of dengue virus by use of reverse transcription-recombinase polymerase amplification[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2015, 53(3):830.
- [42] JAMES A S, TODD S, POLLAK N M, et al. Ebolavirus diagnosis made simple, comparable and faster than molecular detection methods: preparing for the future[J]. *Virology Journal*, 2018, 15(1):75.
- [43] 哈登楚日亚, 樊晓旭, 赵永刚, 等. 非洲猪瘟病毒实时荧光重组酶聚合酶扩增技术(RPA)检测方法的建立[J]. *中国畜牧兽医*, 2017, 44(11):8.
- [44] 马磊, 曾繁文, 丛锋, 等. 小鼠诺如病毒逆转录重组酶聚合酶扩增检测方法的初步建立[J]. *中国兽医学报*, 2019, 39(5): 853-859.
- [45] GUMAA M M, CAO X, LI Z, et al. Establishment of a recombinase polymerase amplification (rpa) assay for the detection of brucella spp[J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2019, 47:101434.
- [46] SINGPANOMCHAI N, AKEDA Y, TOMONO K, et al. Naked eye detection of the mycobacterium tuberculosis complex by recombinase polymerase amplification-sybr green i assays[J]. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2019, 33(2):e22655.
- [47] WU Y, ZHOU D, ZHANG L, et al. Recombinase polymerase amplification (rpa) combined with lateral flow (lf) strip for equipment-free detection of cryptosporidium spp. oocysts in dairy cattle feces[J]. *Parasitology Research*, 2016, 115(9):3551-3555.
- [48] LAU Y L, ISMAIL I B, MUSTAPA N I B, et al. Development of a reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid and direct visual detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (sars-cov-2)[J]. *PLoS One*, 2021, 16(1):e245164.
- [49] CHOI M H, LEE J, SEO Y J. Combined recombinase polymerase amplification / rkdna-graphene oxide probing system for detection of sars-cov-2[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2021, 1158:338390.

饲用酵母产品及应用研究进展

夏俊良, 张永亮, 陈婷*

(华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 酵母菌及其代谢产物具有提高动物机体免疫力、饲料转化率, 促进动物生长以及提高动物产品品质的效果。目前酵母菌及其产物作为添加剂已在饲料中得到广泛应用。本文主要就目前市场出现的酵母产品种类如饲料酵母、酵母细胞壁、酵母抽提物、酵母培养物、活性干酵母等酵母产品及其作用特点进行综述, 旨在为酵母产品的研究以及应用提供一定的参考依据。

关键词: 酵母产品; 种类; 应用

中图分类号: S816.7 **文献标识码:** B **文章编码:** 1005-8567(2022)02-0051-07

Research progress in the application of feed yeast product

XIA JunLiang, ZHANG YongLiang, CHEN Ting

(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou Guangdong, 510642, China)

Abstract: Yeast and its metabolites have many biological functions, such as improving animal immunity, feed conversion rate, promoting animal growth, and improving the quality of animal products. Until now, yeast and its products have been widely used as additives in feed. In the paper, the types of yeast products currently in the market, (such as feed yeast, yeast cell wall, yeast extract, yeast culture, active dry yeast, and other yeast products) and their function characteristics were reviewed, with the aim to provide theoretical basis for the research and application of yeast products reference basis.

Keywords: yeast products; types; applications

1 前言

酵母菌是一类以芽殖或裂殖进行无性繁殖的单细胞真核生物的通称。酵母菌与人类有十分密切的关系, 是目前工业上最重要, 应用最广泛的一类工程菌, 在酿造、食品、医药工业、饲料添加剂等领域均有重要作用。

酵母菌具有细胞体积大, 杂食性, 易于分离培养等特点; 属于兼性厌氧菌, 能对糖类物质进行发酵产生酒精、维生素、甘油、有机酸等具有广泛工业

用途的产品。酵母菌包含细胞壁、细胞膜、细胞核、液泡等细胞结构; 其细胞内含有丰富的蛋白质(35%~50%)、核酸(5%~10%)、碳水化合物(35%~40%)、矿物质、类脂物质(2.8%~3.0%)、维生素以及多种氨基酸, 具有非常高的营养价值^[1]。此外, 酵母菌所含多糖物质对动物的免疫调节、抗肿瘤、抗病毒以及抗氧化等方面都具有重要生物学功能^[2]。

据报道, 在饲料工业发展中酵母菌及其产物发挥巨大的潜能。虽然目前市面上存在许多作为

收稿日期: 2022-01-14

基金项目: 广东省饲料产业体系

作者简介: 夏俊良(2000-), 男, 广东佛山人, 华南农业大学动物科学学院“温氏班”。E-mail: xjl465181167@126.com

*通讯作者: 陈婷(1984-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 饲料资源开发。E-mail: chent@scau.edu.cn

饲料或添加剂的酵母产品,但在实际应用上,由于缺乏对不同酵母产品作用特点的认识和没有相关的使用标准,养殖户使用该类产品时难以充分发挥其最大的价值。因此,本文根据目前广泛应用的酵母产品的种类对其作用特点和应用效果进行综述,以期对酵母类饲料产品的开发和应用提供参考依据。

2 酵母产品的种类及应用

2.1 饲料酵母

饲料酵母是指用作畜禽饲料的酵母菌,也被称为单细胞蛋白。食用酵母粉含有近50%的蛋白质、7%的粗灰分以及1.5%的粗纤维等。饲料酵母也含有较高的游离氨基酸;除此之外还含有27种风味物质,包括乙酸乙酯等^[3]。在营养方面,饲料酵母可用于替代价格高、原料少的鱼粉,也能增加饲料的风味、适口性和诱食性。在调节肠道菌群方面,酵母菌对肠道微生物的功能也发挥着重要的影响,研究表明,日粮中添加酵母菌能够在不影响双歧杆菌、乳酸菌等有益菌的正常生长下,有效抑制肠道系统中沙门氏菌、大肠杆菌等有害菌的增殖^[4-7]。在饲料转化率方面,研究表明,日粮中添加酵母活性物质能够有效提高反刍动物瘤胃内纤维素酶等的酶活性,从而促进瘤胃对纤维素的利用,提高其饲料转化率,改善肉牛增重效益,降低养殖成本^[8-11]。

饲料酵母不论是作为添加剂或者部分或全部替代蛋白日粮都已经得到了广泛的应用,但在实际生产中还需要注意所使用生产单细胞蛋白的菌株,培养基的选择以及成本的控制等问题。目前使用较多的是假丝酵母、红酵母等生产单细胞蛋白^[12-14];尽管在同类原料一致的情况下,采用不同的菌株发酵所产生的单细胞蛋白含量以及品质也会出现不同程度的差异;同时不同的发酵原料在同类酵母发酵下所产产物的品质也不尽相同^[15-18];再者也难以确保不同批次所生产单细胞蛋白的营养、品质的一致性。实际生产中,不同的企业使用的培养原料不统一则无法明确原料的安全性,原料中有害物质是否会累积到菌体内,通过食物链进入到畜禽机体,然后产出不健康的畜禽产品。这些都是潜在的问题,也是阻碍饲料酵母全面推广

的难点。因此,规划一个高效、安全、相对低成本的生产方案以及一个合理的产品营养价值评定标准是目前该类产品的一个重要发展方向。

2.2 酵母细胞壁

酵母细胞壁占细胞干物质重量的20%~30%,其主要由葡聚糖(35%~45%)、甘露寡糖(40%~45%)、蛋白质(5%~10%)、几丁质(1%~2%)、脂类(3%~8%)、无机盐(1%~3%)等构成^[19]。Šperanda等研究表明,提取啤酒酵母中的细胞壁等有效成分喂养仔猪能够促进中性粒细胞等淋巴细胞的增殖,提高其免疫力^[20]。其细胞壁所包含的多糖类物质具有增强机体免疫力、提高病原物质的抗原性、缓解应激、促进生长发育等多种生物学功能;同时酵母产品具有无残留、无抗药性、对环境无污染等特点。因此,酵母菌细胞壁在饲料中可用作绿色添加剂,该类产品主要成分甘露寡糖和 β -葡聚糖^[21]。

2.2.1 甘露寡糖

甘露寡糖(Mannan Oligosaccharides, MOS),是酵母菌细胞壁的重要组成部分,目前已有研究表明MOS具有促进动物胃肠道发育,调节肠道菌群,提高动物免疫力,提高动物生长性能以及促进生长等保健作用^[22-26]。除此之外,MOS耐高温,能在高温高压的饲料加工制粒条件下保持其结构和功能的完整,这也有利于其作为饲料添加剂用于畜禽养殖上^[27]。

谢明欣等在饲料中添加酵母甘露寡糖对绵羊血清中免疫和炎症指标影响的试验中发现,饲料中添加MOS能够提高血清中IgM、LBP、IL-6以及SAA(均为动物机体免疫和抗炎反应的重要指标)含量,有效增强免疫能力以及缓解炎症^[28]。杭苏琴等发现日粮中添加MOS在提高断奶仔猪的饲料转化率同时降低了因大肠杆菌引起的腹泻率^[29]。黄俊文等发现日粮中添加MOS和纳豆菌能增加18日龄断奶仔猪CD3⁺等免疫细胞数量,有效提高仔猪的免疫力;同时纳豆菌和MOS能有效促进结肠中乳酸杆菌和双歧杆菌的生长,抑制引起腹泻等疾病的大肠杆菌的增殖^[30]。阎桂玲等通过研究发现,饲料中添加0.1%啤酒酵母MOS能显著提高1~21日龄肉仔鸡T细胞转化率、巨噬细胞吞噬指数以及血清新城疫抗体效价,说明MOS能够有效增强

机体免疫力^[31]。另外,由于MOS化学结构较为复杂,表面有许多氢键,能够与毒素、病毒等病原结合,增强其免疫原性。因此MOS能够有效减缓肠道对抗原的吸收、提高抗原的免疫效价,从而增强动物机体的细胞和体液免疫应答。

2.2.2 β -葡聚糖

β -葡聚糖又称右旋糖酐,是一类非淀粉多糖。其复杂的化学结构为其多样化的生物学功能奠定了一定的基础。近年来许多研究均表明 β -葡聚糖具有促进胃肠道黏膜发育、平衡肠道菌群,促进免疫器官发育,增强机体免疫力,促进采食、提高生产性能等生物学功能^[32-34]。

周怿等通过探究酵母 β -葡聚糖对早期断奶犊牛肠胃道发育的影响发现,添加75 mg/kg酵母 β -葡聚糖可增加早期断奶犊牛的小肠绒毛高度,调节肠道菌群结构,提高其免疫功能,从而减少犊牛腹泻等消化系统疾病,促进生长发育^[32]。陈琼等指出,对免疫器官发育缺陷的小鼠(使用环磷酸腺苷诱导其免疫器官发育缺陷)使用酵母 β -葡聚糖加锌配方饲养一段时间后,机体的IL-2等淋巴因子浓度有明显升高,而这些淋巴因子升高能激活Th2细胞,进而提高机体的免疫应答反应,同时机体血液中的IFN- γ 浓度得到升高并活化Th1细胞进而提高细胞免疫反应^[33, 35-36]。在水产养殖上,陈超然等发现 β -葡聚糖能显著提高异育银鲫的凝集抗体效价和溶菌酶活性,从而增强其免疫力;同时添加 β -葡聚糖的试验组异育银鲫日增重明显增加,说明 β -葡聚糖在一定程度上可以促进异育银鲫的生长^[34]。李燕平等在试验中发现,日粮中添加0.05%的 β -葡聚糖能够提高肉兔的采食量和平均日增重,也能通过提高血清中IgG、IgA、IgM等抗体的含量、免疫器官指数从而提高机体的免疫力^[37]。

对于猪禽而言,由于其体内缺乏对多糖分解的酶,添加过量的多糖等抗营养因子会产生抗营养作用,会引起动物消化率降低,饲养成本增加等问题。因此在生猪饲养过程中往往需要添加 β -葡聚糖酶等混合酶制剂降解多余的多糖类物质,以提高饲料的转化效率和日增重^[38]。

2.3 酵母抽提物

酵母抽提物是食品级酵母经酶解自溶和分离提出后得到的产品,其富含氨基酸、肽、多肽等成分。

酵母抽提物含有种类丰富的氨基酸,尤其是谷物饲料中含量不足的赖氨酸。除此之外还含有Ca、Fe、Zn、Se等微量元素和VB1、VB2等B族维生素^[39]。因此酵母提取物可广泛应用于饲料和食品工业中^[40-42]。

研究表明,缺乏B族维生素会引起动物厌食、日增重下降、发育不良等问题。冯静芳等指出,缺乏VB2会降低禽类生长率和饲料利用率;生长鸡在缺乏VB2会引起“曲趾症”和皮炎;VB2通过影响禽类机体的内分泌系统从而调节生长发育^[43-44]。酵母菌中富含B族维生素,其VB1(硫胺素)、VB2(核黄素)、VB6(吡哆醇)的含量分别为10.6836 ug/mL、0.9889 ug/mL、0.9889 ug/mL,此外还含有VB12以及泛酸等功能物质^[45-47]。因此,日粮中添加酵母培抽提物能够有效促进畜禽生长,降低应激反应(断奶、运输等),在一定程度上提升产蛋率以及产蛋品质^[43]。Leung等研究表明日粮中添加500 g/mt富含核苷酸的酵母抽提物对1日龄肉鸡的免疫器官发育有促进作用^[48]。得益于酵母抽提物里丰富的呈味氨基酸,其作为饲料添加剂能够有效促进动物采食。Upadhaya等研究表明在1周龄断奶仔猪日粮中添加4%的酵母提取物比添加0.4%的对照组采食量更高,日增重显著提高^[49]。

目前国外酵母抽提物获得技术已经较为成熟,食品级的酵母抽提物作为呈味添加剂广泛用于食品工业中^[50]。但国内的工艺仍不完善,很多产品仍需要进口,因此在畜牧业的应用上较少,或者其提取物纯度较低,成分含杂质较多,因此提取技术问题成为当前亟待突破的瓶颈^[51]。

2.4 酵母培养物

酵母培养物(Yeast Culture, YC)是指酵母菌在特定的培养基上进行充分厌氧发酵后制成的微生物生态制剂。这类产品的主要成分为酵母代谢产物、发酵后的培养基和部分失活的酵母^[52]。该类产品在肉牛、肉鸡以及生猪等主要畜禽上已有大量研究,如在肉牛饲养日粮中添加酵母培养物能显著提高肉牛瘤胃的木聚糖酶、内切葡聚糖酶、纤维二糖苷酶和纤维素酶等降解纤维素的酶的活性^[53-54]。这说明酵母培养物能通过提高瘤胃内的酶活从而提高反刍动物对饲料的消化率,具有重要的促生长作用。在肉鸡养殖上,肖曼等使用0.20%酵母培养物饲喂1~21日龄肉仔鸡后,其十二指肠、空肠以及

回肠的绒毛高度显著提高, 肠道隐窝深度明显降低; 另外其实验还表明 YC 具有调节肠道菌群的功能, 如促进肠道中乳酸菌等益生菌的繁殖, 抑制有害菌大肠杆菌等增殖^[55]。高俊等指出日粮中增加适当剂量的 YC 可以提高肉仔鸡对钙、磷的消化利用率; 改善肠粘膜形态, 增加肠绒毛高度和 VCR (绒毛高度与隐窝深度的比值), 降低肠隐窝深度; 球虫应激下, YC 可以增加肉仔鸡的体液免疫和细胞免疫, 使得其免疫功能在非应激情况下更强烈, 因此能够更好地抵抗球虫感染, 缓解球虫对肉仔鸡生产性能的抑制作用^[56]。YC 也具有提高断奶仔猪的生长也具有重要影响, 肖正中等研究表明, 日粮中添加 YC 能够增加仔猪的采食量, 同时添加 YC 后仔猪对断奶的应激能力增强, 出现喘气或死亡仔猪的数量下降。这说明 YC 具有提高仔猪的生长性能的作用, 同时也能降低应激带来的危害^[57]。

酵母培养物作为饲料添加剂主要通过酵母代谢产物发挥补充营养、增强肠道消化酶的活性、促进机体消化吸收和增强代谢活动等作用, 从而提高饲料转化率和动物的生产性能。但有研究指出低水平的 YC 添加对肉仔鸡的生产性能影响并不大, 因此仍需要探究出最适合的添加比例以及添加标准^[55-56]。同时由于酵母培养物的成分复杂, 不同菌株的代谢产物不尽相同, 具体的作用机理目前尚未研究清楚。不同动物的肠道生理环境不一样, 使得同一菌株产生的 YC 在不同动物上的使用效果不同, 尤其在单胃动物上的变异较大^[54]。因此, 对酵母培养物有效成分的提取、解析以及筛选出对某种动物具有专一性使用效果的菌株是目前该产品主要研究方向。

2.5 活性干酵母

区别于酵母培养物, 活性干酵母 (Active Dry Yeast, ADY) 的制作过程能够更好地保留酵母本身的活性。工业上制作活性干酵母首先需要选择特殊的菌种进行培养, 目前使用最广泛的是酿酒酵母, 其中布拉迪酵母是目前研究比较深入的一种, 也已被广泛应用到动物营养行业。选择合适的菌株后经特殊的培养过程增加其菌的数量和酵母产物, 再经压榨、干燥、脱水后制成颗粒, 尽管经过多项加工处理, 其中的酵母菌仍可以保持强的发酵能力^[58]。实际生产中, 活性酵母经过现代生物技

术和工艺处理后, 再经干燥后充入惰性气体或进行真空包装。否则活性干酵母产品的活性下降很快, 品质大大降低^[59]。

饲料中添加的 ADY 经动物摄食进入到胃肠道能够进行发酵, 菌体大量繁殖时形成无氧条件, 有利于乳酸菌、双歧杆菌等益生菌的生长。一般大肠杆菌、沙门氏菌等有害菌均对酸性环境不耐受, 而增殖的乳酸菌能大量产酸, 降低肠道的 pH 值, 结合肠道内形成的无氧环境进一步抑制有害菌的繁殖; 而且饲料中添加一定的 ADY 有利于提高动物肠道内淀粉酶、脂肪酶等消化酶活性, 进而提高对饲料的消化率, 促进畜禽生长发育^[60-62]。林映才等指出, 每克饲料添加耐高温活性酵母数大于 10^{10} CFU 能显著提高断奶仔猪的生产性能, 采食量有提高的趋势; 其试验表明单独添加耐高温活性酵母菌组比添加普通酵母菌+金霉素组的仔猪腹泻率更低, 同时添加耐高温活性酵母菌和普通活性酵母菌均能提高仔猪血液中 CD4⁺/CD8⁺ 比例, 说明饲料中添加 ADY 能有效抑制断奶仔猪腹泻, 显著提高断奶仔猪的 T-淋巴细胞转化率, 通过促进淋巴细胞的快速增殖, 提高其细胞免疫反应进而提高仔猪的免疫力^[63]。芮于明等研究表明, 母猪采食活性干酵母后胃内双歧杆菌等益生菌大幅上升, 对改善母猪肠道健康有重要影响作用^[64]。

相较于其他几种酵母产物, 活性干酵母作为畜禽养殖饲料添加剂有着更高的微生物活性, 使得其能够在调节畜禽肠道菌群、发挥其胞内酶的活性、促进畜禽对营养物质消化吸收发挥更好的效果。但目前也有研究表明, 在生产母猪饲料中添加过高或过低的活性干酵母都不利于母猪采食, 最适添加量应为 $0.5 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ CFU/g^[63]。该产品目前仍缺乏对应的使用标准, 因此, 针对动物品种、日龄等因素提出具体的标准是目前该产品待解决的问题之一。此外, 在目前养殖场的高生物安全防控要求下, 尤其在非洲猪瘟后, 进入猪场的饲料必须经过高温消毒。高温消毒手段会严重降低活性干酵母等微生物制品活性, 难以发挥其最好的效果^[65-66]。因此, 筛选出具有活性高, 耐高温的菌株是解决这一问题的关键; 同时目前缺乏对市场上售卖的活性酵母产品的活性检测技术, 无法评定其活性等级, 导致产品效果参差不齐, 这也是

该类产品的一大缺陷。

3 其他酵母产品

除了上述几种主要酵母产品以外,仍有一些还处在试验研发阶段的产品。目前国内外都在发掘酵母菌作为生物反应器的功能,如富集一些能促进动物生长发育,调节动物生长性能的元素如硒、铬等。Mousaie A等研究表明,饲料中添加富硒酵母能够提高羔羊的饲料转化率和血液抗氧化能力^[67]。Mohrekesh等研究表明,泌乳奶牛口服富硒酵母能够把硒元素通过母乳传递到牛犊体内,提高牛犊血液内球蛋白和总蛋白浓度,有效改善牛犊的生长和健康情况^[68]。除了对动物本身生长有良好的促进作用以外,硒元素还能通过食物链沉积到畜禽产品中,使人类获得高硒产品。研究表明在蛋鸡的饲料中添加0.3 mg/kg的富硒酵母能使得其硒元素沉积到所产的蛋中,产出富硒鸡蛋;在肉猪的饲料中添加0.9 mg/kg的酵母硒,猪肉产品中硒含量能达到0.29 mg/kg^[69-70]。且与添加亚硒酸钠(SS)组相比,其沉积硒的速率更快,有机硒含量更高。铬元素对于动物吸收葡萄糖、蛋白质和脂类都有重要作用,而铬又容易通过尿液、汗液以及胆汁(泌乳母畜也能通过乳汁)排出,引起铬流失,降低其生产性能^[71]。直接在饲料中添加无机铬难以被动物机体利用,因此富铬酵母成为了目前酵母产品研究的热点之一^[72-73]。单强等在产奶量、泌乳天数等基本一致的中国荷斯坦奶牛的日粮中添加不同水平的富铬酵母以检测其对奶牛热应激、血清指标等的影响,发现添加0.8 mg/kg富铬酵母后能有效降低皮质醇等应激激素分泌水平,降低直肠温度和呼吸频率,有效缓解热应激^[74]。另外富铬酵母也能够辅助性地与胰岛素结合,促进血糖的吸收,也能够调节肠系膜微血管的直径和血液流速从而促进血糖吸收,达到降低血糖浓度的效果^[71, 75]。这一生物学功能用于动物生产上能够有效提高动物对能量饲料的转化率和生长性能,同时也可用于人类糖尿病的治疗。

目前在富硒酵母培养方面的研究报道较多,主要是通过富含硒元素的地区筛选富硒酵母菌株,再利用化学诱导的方法促进酵母菌合成能被动物机体吸收利用的有机硒,选择其中含硒量高

的菌株再进行大规模扩增培养,从而获得富硒酵母产物^[76-78]。尽管利用酵母菌为生物反应器能够富集某些特殊元素,然后作为添加剂使用到饲料中去,但目前仍未筛选出较为高效的菌株,也缺乏有效提纯的技术;同时面临着生产成本高、出品安全性不清楚等问题,目前仍难以在实际生产中广泛应用。

4 小结

上述所介绍的饲料酵母、活性干酵母等都是目前已经在养殖业广泛应用的一些产品,这些产品在提高动物生长性能、免疫力、饲料转化率等方面有良好的效果,但目前这些产品仍存在着以下的问题:一是安全性仍值得考量,培养基原料的有害物质是否会随酵母产品通过食物链累积到畜禽产品,如何进行检测等系列问题仍待解决。二是缺乏相应的行业生产标准,不同的企业采用不同的生产工艺导致产出的产品质量参差不齐,不同批次的产品营养价值也不尽相同,也缺乏检测产品活性、效价的技术,全凭养殖户使用结果体现其效用。三是目前没有针对某种动物的专一性菌株,而同种菌株在不同动物上使用效果不一。因此能否针对性地开发一类适用于猪或其他动物的酵母菌株和产品是目前研究的重要方向。四是对酵母培养物等产品的成分解析不足,有效成分占比少,饲喂效率不高。五是在生产工艺上仍需改进,尽管酵母产品蛋白含量高,但其生产原料价格较高、制作工艺相较复杂使得其生产成本较高,因此,酵母产品在部分替代传统的豆粕、鱼粉仍需解决这些问题。六是对于富集元素型酵母仍未筛选出良好的菌株,导致该产品成本过高,难以在市场上广泛应用。预期通过基因工程改造获得突变菌株对某类特殊元素进行富集,获取其有效产物可能是解决这一问题的有效途径之一。同时,酵母作为目前研究最多且最深入的一类微生物,与其相关的产品仍在继续开发。但实验室产品研发需结合实际生产应用,根据实际生产中的问题,进一步改进产品,才能让酵母产品越做越好。

参考文献:

[1] 晏志云.酵母抽提物的研究[D].博士学位论文.广州:华南理

- 工大学, 1999:3.
- [2] 陈梁城. 酵母多糖(β -葡聚糖和甘露寡糖)对动物抗病作用的调控作用研究[D]. 博士学位论文. 长春: 吉林农业大学, 2015.
- [3] 许琦, 李志刚等. 酵母抽提物成分分析及其代脂作用研究[J]. 中国食品添加剂, 2021, 8:95-100.
- [4] 刘艳平, 吴海侠, 霍亚男. 复合酵母菌制剂对肉羊生长性能、粪便微生物菌群及免疫机能的影响[J]. 中国饲料, 2020(9): 74-77.
- [5] 潘迪子, 李国军, 胡贵丽, 等. 活性酵母对脂多糖应激黄羽肉鸡肠道健康的影响[J]. 动物营养学报, 2017, 29(7):2520-2534.
- [6] 楚杰, 张大伟, 郝永任, 等. 布拉酵母菌对肠道菌群紊乱的调整作用研究[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(7):87-89.
- [7] 张金宝等. 酵母多糖对断奶仔猪生长性能、免疫功能和肠道菌群的影响[J]. 中国饲料, 2018, 16:46-50.
- [8] 梁金逢等. TMR日粮添加寡糖和复合益生菌对育成牛生长性能、免疫功能及抗氧化功能的影响[J]. 饲料工业, 2019, 40(15):41-44.
- [9] 黄庆生, 王加启. 添加不同酵母培养物对瘤胃纤维分解菌群和纤维素酶活的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2005(2):144-148.
- [10] 冯伟业, 刘大程, 卢德勋, 等. 不同品质粗饲料日粮及添加酵母培养物对绵羊瘤胃内主要纤维素酶及纤维物质降解的影响[J]. 动物营养学报, 2008(1):108-114.
- [11] 刘彩娟, 孙满吉, 孙金艳, 等. 饲料中添加复合益生菌对奶牛瘤胃发酵及纤维素酶活的影响[J]. 动物营养学报, 2011, 23(5):821-827.
- [12] 仇武松, 王彦芦, 张振威, 等. 日粮添加产朊假丝酵母与枯草芽孢杆菌对湖羊生长性能及养分消化率的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2017, 53(2):106-109.
- [13] 赵明远, 杨开伦, 姚刚, 等. 日粮添加产朊假丝酵母对15月龄新疆褐牛杂交育肥增重性能的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2021, 57(2):177-181.
- [14] 汪洋, 孔维宝, 韩锐, 等. 红酵母简介[J]. 生物学通报, 2015, 50(4):15-17.
- [15] 贺克勇, 杨帆, 薛泉宏, 等. 鲜苹果渣蛋白饲料发酵工艺研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2007, 35(11):90-94.
- [16] 薛祝林, 黄必志. 混合菌种发酵苹果渣生产蛋白饲料的工艺参数优化研究[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(3):128-131.
- [17] 黄和, 王玲, 陈仰真. 菠萝皮发酵生产饲料蛋白优良菌种的筛选[J]. 中国饲料, 2010(9):36-39.
- [18] 杨丽华, 张婷婷, 孟建宇. 混菌固态发酵白酒糟制蛋白饲料的研究[J]. 中国饲料, 2021(13):135-138.
- [19] 杨翠竹, 李艳, 阮南, 等. 酵母细胞破壁技术研究与应用进展[J]. 食品科技, 2006(07):138-142.
- [20] Marcela Š, Mislav Đ, Tomislav Š, et al. Hydrolyzed brewery yeast product like immunomodulator in weaned piglets [J]. Archiva Zootechnica, 2008, 11 (2008): 52-60.
- [21] 刘辉, 季海峰, 王四新, 等. 益生菌对生长猪生长性能、粪便微生物数量、养分表观消化率和血清免疫指标的影响[J]. 动物营养学报, 2015, 27(3):829-837.
- [22] SANTOS F S D L, DONOGHUE A M, FA R NELL M B, et al. Gastrointestinal maturation is accelerated in turkey poultlets supplemented with a mannan - oligosaccharide yeast extract (Alphamune).[J]. Poultry Science, 2007, 86(5):921-30.
- [23] 温若竹, 江芸, 刘泽兴, 等. 甘露寡糖对肉仔鸡肠道微生物区系发育的影响[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版, 2011, 37(1):83-90.
- [24] 王定发, 黄代勇, 晏邦富. 甘露寡糖对犊牛血液免疫球蛋白的研究[J]. 饲料研究, 2004(3):41-42.
- [25] 王权, 陈永军, 钱应娟, 等. 甘露寡糖对鸡外周血液淋巴细胞免疫功能的影响[J]. 中国兽医科技, 2002, 32(1):28-29.
- [26] 王彬, 黄瑞林, 印遇龙, 等. 半乳甘露寡糖对育肥猪的应用效果[J]. 中国科学院研究生院学报, 2006, 23(3):364-369.
- [27] 陈小兵, 丁宏标, 乔宇. 甘露寡糖的益生作用、免疫机制与应用技术[J]. 中国畜牧兽医, 2005, 32(8):6-8.
- [28] 谢明欣等. 酵母甘露寡糖对蒙古绵羊生长性能、血清免疫和炎症以及抗氧化指标的影响[J]. 动物营养学报, 2018, 30(1):219-226.
- [29] 杭苏琴等. 甘露寡糖对断奶仔猪生产性能和血液生化指标的影响[J]. 中国兽医学报, 2009, 29(2):220-223.
- [30] 黄俊文, 林映才, 冯定远, 等. 益生菌、甘露寡糖对早期断奶仔猪生长、免疫和抗氧化机能的影响[J]. 动物营养学报, 2005(4):16-20.
- [31] 阎桂玲, 袁建敏, 闵于明, 等. 啤酒酵母甘露寡糖对肉鸡肠道微生物及免疫机能的影响[J]. 中国农业大学学报, 2008(6): 85-90.
- [32] 周怿等. 酵母 β -葡聚糖对早期断奶犊牛胃肠道发育的影响[J]. 动物营养学报, 2009, 21(6):846-852.
- [33] 陈琼, 陈朋, 李俊颖, 等. 酵母 β -葡聚糖加锌复合配方对免疫抑制幼龄小鼠的免疫调节作用[J]. 食品工业科技, 2021, 42(8):313-319.
- [34] 陈超然等. 酵母 β -葡聚糖对受免异育银鲫免疫应答的增强作用[J]. 华中农业大学学报, 2003, 22(4):380-384.
- [35] LIAO W, LIN J X, LEONARD W J. IL-2 family cytokines: New insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. Current opinion in immunology, 2011, 23(5): 598-604.
- [36] DESMEDT M, ROTTIERS P, DOOMS H, et al. Macrophages induce cellular immunity by activating Th1 cell responses and suppressing Th2 cell responses [J]. Journal of Immunology, 1998, 160(11):5300-5308.
- [37] 李燕平等. β -葡聚糖对肉兔生长性能、免疫器官指数、血清生化和免疫指标的影响[J]. 动物营养学报, 2020, 32(11): 5365-5372.
- [38] 郭小权, 胡国良等. β -葡聚糖的抗营养作用及 β -葡聚糖酶在饲料中的应用[J]. 营养研究, 2001, 2:11-13.
- [39] 晏志云, 蔡奕文, 赵谋明, 等. 天然调味料——酵母抽提物的

- 研究进展[J].食品与发酵工业,1998(6):44-50.
- [40] LI G, WANG Y, PAN D, et al. Physiological function of yeast extract and its application in poultry production[J]. Feed Industry, 2016.
- [41] 孙丹丹,陶正国,吴秀丽,等.酵母提取物对断奶仔猪生产性能的影响[J].饲料工业,2013(4):15-17.
- [42] 于冬玲,李小桥.酵母提取物在养鸡生产中应用效果研究进展[J].养禽与禽病防治,2012(6):42-44.
- [43] 冯静芳.维生素B2对鸡的作用及缺乏症的诊治[J].国外畜牧学(猪与禽),2001,6:26-28.
- [44] 王艳辉等.维生素B2对笼养蛋雏鸭生长性能、内分泌及抗氧化能力的影响[J].动物营养学报,2009,21(1):31-35.
- [45] 王秋菊.酵母菌中维生素B1含量的测定[J].中国饲料,2006,13:35-37.
- [46] 王秋菊,许丽,崔一喆,等.酵母菌中核黄素含量的测定[J].饲料博览,2006(07):22-23.
- [47] 王秋菊,许丽,崔一喆,等.酵母菌中维生素B₆含量的测定[J].黑龙江畜牧兽医,2006(11):73.
- [48] LEUNG H, PATTERSON R, BARTA J R., et al. Nucleotide-rich yeast extract fed to broiler chickens challenged with Eimeria: impact on growth performance, jejunal histomorphology, immune system, and apparent retention of dietary components and caloric efficiency [J]. Poultry Science, 2019, 98(10):4375-4383.
- [49] UPADHAYA S D, JIAO Y, KIM I H. Yeast extract complex as non-antibiotic functional product in weaning pigs [J]. Canadian Journal of Animal Science, 2019, 99(3):
- [50] 周秀琴.日本酵母调味品的开发与应用[J].发酵科技通讯,2006(3):39-41.
- [51] 石拓,刘晓倩,徐庆阳.酵母抽提物生产工艺的研究进展[J].发酵科技通讯,2019,48(1):5-8.
- [52] 肖曼,高振华,张少成,等.酵母培养物对肉仔鸡免疫功能、抗氧化及血清生化指标的影响[J].广东农业科学,2013,40(5):103-106.
- [53] 龙玲.酵母培养物对肉牛瘤胃发酵及纤维素消化的影响[D].硕士学位论文.杨凌:西北农林科技大学,2003.
- [54] 黄庆生,王加启.添加不同酵母培养物对瘤胃纤维分解菌群和纤维素酶活的影响[J].畜牧兽医学报,2005(2):144-148.
- [55] 肖曼等.酵母培养物对肉仔鸡生长性能、黏膜结构及肠道菌群的影响[J].动物营养学报,2013,25(7):1624-1631.
- [56] 高俊.酵母培养物对肉仔鸡的作用及其机理[D].博士学位论文.北京:中国农业科学院,2008.
- [57] 何若钢,肖正中,周晓倩,等.日粮中添加酵母培养物对断奶仔猪生长性能的影响[J].中国畜牧兽医,2009,36(3):25-27.
- [58] 张弦,章亭洲,瞿明仁.活性干酵母及酵母培养物在反刍动物中的研究进展与应用[J].动物营养学报,2022,34(1):20-29.
- [59] 闫轶洁,冯占雨.畜禽饲料中活性酵母产品的应用[J].饲料博览,2010(10):34-37.
- [60] 景小平,彭全辉,邹华围,等.活性干酵母对肉牛瘤胃纤维降解率的影响[J].中国畜牧杂志,2015,51(S1):52-55.
- [61] 高志刚,穆国东,龙森,等.活性干酵母对瘤胃微生态系统的作用[J].中国饲料,2009(7):5-7.
- [62] 牛建康,李妍,高艳霞,等.饲料中添加活性干酵母对泌乳牛瘤胃发酵特性和营养物质观消化率的影响[J].动物营养学报,2019,31(7):3338-3345.
- [63] 胡友军,林映才,郑黎,等.活性酵母对早期断奶仔猪生产性能和免疫机能的影响[J].动物营养学报,2003(4):49-53.
- [64] 王学东,芮于明,姚娟,等.活性干酵母对生产母猪生产性能的影响[J].中国饲料,2006(17):17-19.
- [65] 高开国,王丽,杨雪芬,等.非洲猪瘟疫情下饲料安全和品质的思考[J].中国畜牧杂志,2020,56(7):181-183.
- [66] 周泽辉.浅谈非洲猪瘟对饲料行业的影响及其科学防控措施[J].湖南饲料,2019(4):16-21.
- [67] MOUSAIE A . Dietary supranutritional supplementation of selenium - enriched yeast improves feed efficiency and blood antioxidant status of growing lambs reared under warm environmental condition [J]. Tropical Animal Health and Production, 2021, 53(1):1-7.
- [68] MOHREKESH M, FOROOZANDEH SHAHRAKI A D, GHALAMKARI G R, et al. Effects of three methods of oral selenium - enriched yeast supplementation on blood components and growth in Holstein dairy calves [J].Animal Production Science, 2018, 59(2):260-265.
- [69] LU J , QU L , SHEN M M , et al. Comparison of dynamic change of egg selenium deposition after feeding sodium selenite or selenium-enriched yeast [J]. Poultry Science, 2018, 97(9) : 3102-3108
- [70] 李毓华,谢建亮,张国坪,等.富硒酵母饲喂生长肥育猪对其猪肉硒含量的影响[J].畜牧兽医杂志,2020,39(2):34-36.
- [71] PECHOVA A, PAVLATA L. Chromium as an essential nutrient: A review [J]. Veterinarni Medicina - UZPI (Czech Republic), 2007, 52(1):1-18.
- [72] Spears J W, Lloyd K E, Krafska K. Chromium concentrations in ruminant feed ingredients [J]. Journal of Dairy Science, 2017, 100(5):3584-3590.
- [73] FORBES R M, ERDMAN J W. Bioavailability of trace mineral elements[J]. Annual Review of Nutrition, 1983, 3(1):213-221.
- [74] 单强,马峰涛,金宇航,等.富铬酵母对热应激奶牛生产性能、血清指标及血浆和牛奶中微量元素含量的影响[J].动物营养学报,2020,32(5):2198-2208.
- [75] 李军,杨梅,张宏馨,等.富铬酵母对实验性糖尿病大鼠肠系膜微循环的影响[J].时珍国医国药,2012,23(6):1406-1407.
- [76] 帅超群,向极钎,谈弋,等.恩施州渔塘坝硒矿区天然富硒微生物的筛选与鉴定[J].化学与生物工程,2016,33(4):51-54.
- [77] 孙朝阳,张玉英,潘利华,等.高富硒酵母菌株的筛选及其富硒特性分析[J].中国酿造,2020,39(9):116-120.
- [78] 朱威,高兆建,李勇,等.富硒酵母菌的筛选及其富硒条件的优化[J].安徽农业科学,2017,45(33):87-89.

DOI:10.19978/j.cnki.xmsy.2022.02.11

猪瘟病毒抗体检测方法的研究进展

张璞^{1,2}, 陈建凯^{1,2}, 吴浩平², 赖月辉², 李复坤^{1,2}, 周晓敏², 侯高伟², 齐冬梅^{2*}

(1.佛山科学技术学院生命科学与工程学院, 广东 佛山 528231;

2.广东永顺生物制药股份有限公司, 广东 广州 511356)

摘要:猪瘟是由猪瘟病毒引起的一种猪的高度传染性和致死性病毒病, 具有传染性强、流行广泛、发病率和死亡率高等特点, 对养猪业危害极大。目前, 疫苗免疫仍然是防控猪瘟的重要手段, 而抗体检测是免疫效果的主要评价依据。现将猪瘟病毒抗体的主要检测方法: 病毒中和试验、正向间接血凝试验、酶联免疫吸附试验、胶体金免疫层析法等进行综述, 以期为猪瘟疫苗的免疫效果评价和该病的防控提供理论参考。

关键词:猪瘟病毒; 抗体检测; 病毒中和试验; 正向间接血凝试验; 酶联免疫吸附试验; 胶体金免疫层析法

中图分类号:S852.65*1 文献标识码:B 文章编码:1005-8567(2022)02-0058-05

Research progress in the antibody detection of Swine Fever Virus

ZHANG Pu^{1,2}, CHEN Jiankai^{1,2}, WU Haoping², LAI Yuehui², LI Fukun^{1,2}, ZHOU Xiaomin²,
HOU Gaowei², QI Dongmei^{2*}

(1.School of Life Science and Engineering, Foshan University, Foshan, 528231, China

2.Guangdong Winsun Bio-Pharmaceutical Co., Ltd, Guangzhou, 511356, China)

Abstract: Classical swine fever (CSF) is a highly infectious and fatal disease of pigs caused by Classical swine fever virus (CSFV). It has high contact-infectivity, widespread epidemic, high morbidity and mortality, and great economic damage to pig industry. At present, vaccination is still the main means to control CSF in most countries of the world and CSFV antibody detection is used to evaluate immune efficiency. In order to provide new ideas for the prevention and control of CSF, the main methods of antibody detection of CSFV, such as Virus Neutralization Test (VN)、Indirect Hemagglutination (IHA)、Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)、Gold-Immunochromatography Assay (GICA) were reviewed.

Keywords: Classical swine fever virus; Antibody detection; Virus Neutralization Test; Indirect Hemagglutination; Enzyme-linked Immunosorbent Assay; Gold-Immunochromatography Assay

猪瘟(Classical swine fever, CSF)亦称猪霍乱(Hog cholera, HC), 是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus, CSFV)引起的一种猪的高度传染性和

致死性病毒病。在临床上可表现为死亡率很高的急性型和死亡率变化不定的亚急性型、慢性型、隐性型及持续感染型。CSF具有传染性强、流行广

收稿日期:2021-12-07

作者简介:张璞,男,硕士研究生,研究方向为动物疫病防控。E-mail:1400486243@qq.com

*通讯作者:齐冬梅,女,博士,研究员,研究方向为动物生物制品研发与应用研究。E-mail:qidongmei07@163.com

泛、发病率和死亡率高等特点,危害极大。OIE将该病毒列为最重要的法定报告传染病之一,在我国被列为“一类动物传染病”^[1]。目前,CSF疫苗免疫仍然是我国防控CSF的重要手段,而CSFV抗体检测结果通常作为疫苗免疫效果的主要评价依据。现将主要的抗体检测方法综述如下,以期对猪瘟疫疫苗的免疫效果评价和该病的防控提供理论参考。

1 病毒中和试验(Virus Neutralization Test, VNT)

猪瘟疫病毒VNT试验是将已知浓度的猪瘟疫病毒与不同稀释度的血清混合,再接种易感细胞(如ST细胞、PK细胞等)进行培养,然后进行荧光抗体检查。根据抗体标记物的不同,猪瘟疫病毒的中和试验可分为荧光抗体中和试验(Fluorescent antibody neutralization test, FAVN)和过氧化物酶联中和试验(Neutralization peroxidase-linked assay, NPLA)。或将病毒与血清的混合物接种健康易感兔,观察兔体温变化以此确定血清的终点滴度。VNT方法准确性高,是猪瘟疫病毒抗体检测方法敏感性和特异性评价的金标准。它可以用于非免疫猪的猪瘟疫临床病例确诊、流行病学调查和免疫猪疫苗免疫效果评价等^[2-4]。然而,VNT试验需要涉及到细胞培养、病毒培养或者试验兔等,需要配置专用设备处理猪瘟疫病毒的实验室和具有相关工作经验的技术人员等。不但工作成本高、费时费力,而且目前还未能实现高通量和自动化检测,不适用大量临床样品的处理与分析。为了克服VNT方法的缺点,Tetsuo等利用具有小报告标签的重组猪瘟疫病毒开发了高通量VNT荧光素酶系统作为替代方法^[5]。该系统可以方便、快速地监测CSFV的生长状态,使其快速、简便的利用光度计测定VNT滴度,可作为替代传统VNT方法的有力工具,实现高通量抗体检测。

2 正向间接血凝试验(Indirect Hemagglutination, IHA)

正向间接血凝试验即用已知血凝抗原检测未知血清抗体的试验。用鞣酸处理过的红细胞与浓缩纯化的CSFV制成致敏红细胞,所得复合物用于

血凝试验检测抗体滴度。IHA是一种操作简单、检测快速、无需仪器设备的血清学诊断技术,可作为猪瘟疫抗体临床检测的常用方法^[6]。通常IHA血凝价达到1:16以上的猪可具有保护力^[7]。IHA在猪群大面积采集检测中抗体有突出的优越性。王戈平等利用IHA方法对对西宁地区猪场进行了猪瘟疫抗体检测,结果显示抗体保护率77.63%^[8]。刘杰标等利用IHA方法检测广西河池地区790份猪血清中的猪瘟疫免疫抗体,709份猪血清1:16稀释度凝集价达到了“++”或以上,免疫合格率达到89.7%(709/790)^[7]。但IHA检测方法通常会受到病毒抗原制备、浓缩纯化、致敏红细胞等中间品和待检血清灭活处理效果等的影响,继而影响IHA的稳定性和重复性。同时,结果为肉眼判读、主观性比较强,适用于对检测结果要求不高的小养殖场或养殖散户的需求,不能满足需要准确检测猪瘟疫抗体水平的调查研究。

3 酶联免疫吸附试验(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

ELISA指将可溶性的抗原或抗体结合在固相载体上,利用抗原抗体特异性结合进行免疫反应的定性和定量检测的方法。ELISA作为一种快速、简便、应用广泛的血清学诊断技术,在CSF血清学调查中,起到了非常重要的作用。国内外已开发出多种猪瘟疫病毒抗体检测试剂盒产品,国外常用商业化猪瘟疫抗体ELISA检测试剂盒包括美国爱德士公司(IDEXX Laboratories)、荷兰百测公司(BioChek)、德国勃林格殷格翰制药公司(Boehringer Ingelheim)、赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific)等研发,具体见表1^[9]。国内注册的猪瘟疫抗体检测试剂盒有3个,进口注册1个,生产批文4个,具体见表2。以上猪瘟疫抗体检测试剂盒类型主要包括间接ELISA、竞争性ELISA或阻断ELISA等,主要针对CSFV全病毒或结构蛋白E2或Erns产生的抗体;多数试剂盒以基因工程手段表达蛋白产物作为包被抗原,大大的提高了检测CSFV抗体的敏感性和特异性^[10-12]。另外,徐璐等利用化学发光竞争ELISA抗体检测方法对2200份临床样品进行CSFV抗体检测,检测结果表明此方法与IDEXX公司产品结果一致,并与FAVN

表1 国外商业化猪瘟疫抗体ELISA检测试剂盒^[9]

试剂盒名称	试剂盒类型及检测靶标	生产厂商
BioChek CSFV E2 Antibody ELISA	间接ELISA, 检测E2抗体	荷兰百测公司
Classical Swine Fever Virus Antibody (IgG) ELISA Kit	间接ELISA, 检测CSFV抗体	Cusabio Technology LLC
IDEXX CSFV Ab	阻断ELISA, 检测CSFV抗体	美国爱德士公司
ID Screen® Classical Swine Fever E2 Competition	竞争ELISA, 检测E2抗体	法国爱迪威公司
Pigtype CSFV Erns ELISA	双抗原ELISA, 检测Erns抗体	Indical Bioscience, GMBH
PrioCHECK™ CSFV Antibody ELISA kit	阻断ELISA, 检测E2抗体	赛默飞世尔公司
PrioCHECK™ CSFV Erns Antibody ELISA Kit	阻断ELISA, 检测Erns抗体	赛默飞世尔公司
SV ANOVIR® CSFV-Ab	间接ELISA, 检测E2抗体	德国勃林格殷格翰制药公司
VDPPro® CSFV AB C-ELISA	阻断ELISA, 检测E2抗体	韩国Median Diagnostics公司
VDPPro® CSFV Erns Ab b-ELISA	阻断ELISA, 检测Erns抗体	韩国Median Diagnostics公司

表2 国内注册猪瘟疫抗体检测试剂盒

试剂盒名称	生产单位	新兽药注册证书号	生产批文兽药生字
猪瘟疫病毒间接ELISA抗体检测试剂盒	哈尔滨元亨生物药业有限公司	(2016)新兽药证字5号	80398833
猪瘟疫病毒间接ELISA抗体检测试剂盒	中牧实业股份有限公司成都药械厂	(2016)新兽药证字5号	220058833
猪瘟疫病毒阻断ELISA抗体检测试剂盒	武汉科前生物股份有限公司	(2020)新兽药证字63号	170048885
猪瘟疫病毒阻断ELISA抗体检测试剂盒	洛阳普泰生物技术有限公司	(2019)新兽药证字66号	163698875
猪瘟疫病毒化学发光ELISA抗体检测试剂盒	洛阳莱普生信息科技有限公司	(2021)新兽药证字07号	无
猪瘟疫病毒ELISA抗体检测试剂盒	美国爱德士生物科技有限公司	(2020)外新兽药证字37号	-

注:数据来源于中国兽药信息网, 国家兽药基础数据库(查询时间:2022年02月01日)

方法检测的中和抗体效价更接近^[13]。ELISA抗体检测方法的局限性主要有以下几个方面:(1)可能存在着与瘟疫病毒属其它病毒如牛病毒性腹泻病毒(BVDV)、边界病病毒(BDV)的交叉反应;(2)无法识别弱毒疫苗或E2蛋白亚单位疫苗接种产生的抗体;(3)ELISA方法是针对特异性结合的抗原+抗体复合物进行检测而非中和抗体, 结合抗体和中和抗体效价二者的相关性根据方法不同而有所差异^[14-15]。因此如果需要准确的抗体确认仍应采用VNT金标准方法检测, 或根据建立的相应ELISA与VNT方法检测结果的相关性进行判断。

4 胶体金免疫层析法 (Gold - Immunochromatography Assay, GICA)

GICA技术是结合多种试验技术而建立的一种体外快速诊断技术, 如:酶联免疫吸附、单克隆抗体技术、胶体金免疫技术等^[16]。GICA是通过微孔滤膜的渗滤浓缩和毛细层析作用, 以固相膜上特

异性的抗原抗体反应作为基础, 以胶体金颗粒作为显示标记物, 阳性反应呈现红色或粉红色, 阴性不显色。GICA具有操作方便快捷、特异性和灵敏度好、稳定性强、所需样本量少, 不依赖特殊仪器设备和试剂、对操作人员要求不高, 结果判断直观等优点, 因此特别适合于基层以及批量检测等。尹梅利用大肠杆菌原核表达CSFV E2蛋白, 制备了检测CSFV抗体的双抗原夹心胶体金免疫层析试纸条^[16]。与IDEXX公司的猪瘟疫抗体ELISA检测试剂盒共同检测80份血清样品, 符合率为90.3%。尹清清利用大肠杆菌表达CSFV的E2部分蛋白, 并以胶体金标记和量子点耦联此重组蛋白, 研制了检测CSFV抗体免疫层析试纸条^[17];两种试纸条具有良好的特异性和重复性, 与IDEXX公司生产的CSFV抗体检测ELISA试剂盒阳性结果符合率分别为92.1%和95%。万颖等制备的检测CSFV E2蛋白抗体的胶体金免疫层析试纸条, 该试纸条检测用时短(5~10分钟), 与多种猪常见病病原阳性血清

无交叉反应;试纸条对ELISA效价为1:128的CSFV阳性血清的检测限可达1:64^[18]。与IDEXX公司的猪瘟疫抗体ELISA检测试剂盒共同检测101份血清样品,符合率为96%,kappa值为0.92。但GICA也存在着只能定性不能定量的缺点,所以如需准确定量还需要其它方法的辅助检测。

5 小结与展望

现代养猪业以集约化和规模化养殖为主要发展趋势,群发性疾病尤其是传染病是阻碍养猪业健康发展的主要因素,预防为主的猪瘟疫防控策略决定了CSFV抗体检测的不可或缺和重要。本文对主要的CSFV抗体检测方法如VNT、IHA、ELISA、GICA等进行了综述,可以根据检测目的和要求的不同,选择一种或多种方法联合应用^[13, 19, 21],对猪瘟疫疫苗免疫猪进行免疫抗体和群体免疫状态监测,对非免疫猪可作为猪瘟疫病毒感染筛查和感染流行情况调查^[22-23]。上述方法中VNT和ELISA为OIE推荐的抗体检测方法和国际贸易指定试验^[24]。目前我国ELISA已成为监测免疫后猪只CSFV抗体保护水平、评价猪群免疫效果的主要手段,而且拥有一批检测水平高、检测能力强的检测机构^[25]。

鉴于CSF对全球养猪业构成的持续威胁,做好CSF的防控,继续致力于开发新型快速可靠的诊断方法和试剂产品,以促进猪瘟疫病的监测和控制是非常必要的。虽然现已有很多猪瘟疫病毒抗体检测的商品化试剂盒或适用于试验室诊断的方法可使用,但仍有很大进步空间。一是当前猪疫病复杂,临床症状不典型或多种疫病混合感染,应不断提高试剂盒的敏感性、特异性、批内和批间的可重复性、质控品的标准等;二是加强自动化和智能化检测仪器设备的开发,降低检测成本、提高检测速度、早日实现高通量、自动化检测,大力发展临床即时检测;三是有效解决交叉反应、难以鉴别等问题。因此,开发与相同病毒属其它病毒无交叉反应、可识别自然感染与疫苗免疫、识别全抗原疫苗、亚单位疫苗等抗体的诊断方法或试剂产品势在必行。

参考文献:

[1] 夏业才,陈光华,丁家波.兽医生物制品学[M].北京:中国农业出版社,2018.

- [2] MADERA R, GONG W J, WANG L H, et al. Pigs immunized with a novel E2 subunit vaccine are protected from heterologous classical swine fever virus challenge [J]. BMC Veterinary Research, 2016, 12(1):197.
- [3] MADERA R F, WANG LIHUA, GONG W J, et al. Towards the development of a one - dose classical swine fever subunit vaccine: Antigen titration, onset and duration of immunity [J]. Journal of Veterinary Science, 2018, 19: 393-405.
- [4] LAUGHLIN R C, MADERA R, PERES Y, et al. Plant-made E2 glycoprotein single - dose vaccine protects pigs against classical swine fever [J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17: 410-420.
- [5] TETSUO M, MATSUNO K, TAMURA T, et al. Development of a high-throughput serum neutralization test using recombinant pestiviruses possessing a small reporter tag [J]. Pathogens, 2020, 9(3):188.
- [6] 吕晓娟,郭伟,赵佳,等.正向间接血凝试验检测猪瘟疫免疫抗体的应用[J].畜牧与兽医,2015,47(11):138.
- [7] 刘杰标,周立平,韦庄备,等.用正向间接血凝试验检测猪瘟疫免疫抗体[J].中国兽医科技,2002(1):38-39.
- [8] 王戈平.用正向间接血凝试验检测猪瘟疫免疫抗体[J].青海畜牧兽医杂志,2004(2):12.
- [9] WANG L H, MADERA R, LI Y Z, MCVEY D S, et al. Recent Advances in the Diagnosis of Classical Swine Fever and Future Perspectives [J]. Pathogens, 2020, 9(8):658.
- [10] MOSER C, RUGGLI N, TRATSCHIN J D, et al. Detection of antibodies against classical swine fever virus in swine sera by indirect ELISA using recombinant envelope glycoprotein E2 [J]. Veterinary Microbiology, 1996, 51(1-2):41-53.
- [11] CHENG T C, PAN C H, CHEN C S, et al. Direct coating of culture medium from cells secreting classical swine fever virus E2 antigen on ELISA plates for detection of E2 - specific antibodies [J]. Veterinary Journal, 2015, 205:107-109.
- [12] CLAVIJO A, LIN M, RIVA J, et al. Development of a competitive ELISA using a truncated E2 recombinant protein as antigen for detection of antibodies to classical swine fever virus. Research in Veterinary Science [J], 2001, 70:1-7.
- [13] 徐璐,张乾义,夏应菊,等.猪瘟疫病毒化学发光竞争ELISA抗体检测试剂盒的应用研究[J].中国兽医杂志,2020,56(11):31-34.
- [14] SHIN S K, HA S K, LEE K W, et al. Application of a bridging ELISA for detection of anti - erythropoietin binding antibodies and a cell - based bioassay for neutralizing antibodies in human sera [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2010, 52:289-293.
- [15] MUHAMUDA K, MADHUSUDANA S N, RAVI V. Development and evaluation of a competitive ELISA for estimation of rabies neutralizing antibodies after post - exposure

- rabies vaccination in humans [J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2007, 11(5): 441-445.
- [16] 尹梅. 猪瘟疫病毒抗体胶体金免疫层析快速检测试纸条的研制及初步应用[D]. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学, 2013.
- [17] 尹清清. 基于猪瘟疫E2蛋白胶体金和量子点免疫层析试验研究[D]. 硕士学位论文. 雅安: 四川农业大学, 2019.
- [18] 万颖, 罗俊聪, 石正旺, 等. 猪瘟疫病毒抗体胶体金免疫层析试纸条的研制及初步应用[J]. *中国兽医科学*, 2022, 52(1):1-5.
- [19] 刘炜, 张代宝, 贾松涛, 等. 三种猪瘟疫抗体检测方法的比对试验[J]. *当代畜牧*, 2016(24):41-42.
- [20] 郑教雀. 两种猪瘟疫抗体检测方法的应用比较[J]. *养猪*, 2014(2):94-95.
- [21] 肖华春, 尤宗耀, 张绍线, 等. 应用三种方法筛选猪瘟疫抗体阴性猪的比较试验[J]. *广西畜牧兽医*, 2016, 32(1):6-8.
- [22] BLOME S, MOß C, REIMANN I, et al. Classical swine fever vaccines - State-of-the art [J]. *Veterinary Microbiology*, 2017, 206:10-20.
- [23] BROWN V R, BEVINS S N. A review of classical swine fever virus and the routes of introduction into the United States and potential for virus establishment [J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2018, 5:31.
- [24] World Organization for Animal Health. Classical Swine Fever (Infection with Classical Swine Fever Virus) [M]// World Organization for Animal Health. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris: OIE, 2019.
- [25] 徐璐, 夏应菊, 张乾义, 等. 猪瘟疫病毒抗体ELISA检测国家级能力验证结果与分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2020, 51(9):2250-2256.

上接第50页

- [50] LI G, FAN Y, LAI Y, et al. Coronavirus infections and immune responses [J]. *Journal of Medical Virology*, 2020, 92(4): 424-432.
- [51] LEE C Y, LIN R T P, RENIA L, et al. Serological approaches for covid - 19: epidemiologic perspective on surveillance and control[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11:879.
- [52] TEHRANI Z R, SAADAT S, SALEH E, et al. Performance of nucleocapsid and spike-based sars-cov-2 serologic assays [J]. *PLoS One*, 2020, 15(11):e237828.
- [53] LIU W, LIU L, KOU G, et al. Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies against sars-cov-2 [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2020, 58(6).
- [54] 孙莉, 王军. 胶体金免疫定性试剂质量评价和问题浅析[J]. *首都食品与医药*, 2020, 27(2):182-184.
- [55] 杨致亭, 王传新, 杜鲁涛, 等. 一种新型冠状病毒(2019-nCoV) IgM, IgG 抗体检测试纸条, 试剂盒及方法: CN111856003A[P].2020.
- [56] 刘海森, 宁波, 蒋永青, 等. 一种新型冠状病毒IgG/IgM二联胶体金抗体检测卡:CN212321630U[P]. 2021.
- [57] 谭阳通, 冯敏莎, 王峰, 等. 禽流感检测技术研究进展[J]. *养禽与禽病防治*, 2016(1):5-9.
- [58] 南开大学. 15分钟快速检测 南开大学团队研获新冠病毒抗体检测试剂盒[EB/OL]. [2022/3/21]. <http://news.nankai.edu.cn/ywzd/system/2020/02/15/030037569.shtml>.
- [59] HIKI M, TABE Y, AI T, et al. Seroprevalence of anti-sars-cov-2 antibodies in japanese covid-19 patients[J]. *PLoS One*, 2021, 16(4):e249449.
- [60] 孔祥亘, 布学慧, 王彬, 等. 新型冠状病毒病患者病毒核酸反复阳性超60天2例报告[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2020, 58(10):117-119.
- [61] 曹玉坤, 韩小雨, 刘佳, 等. 人工智能辅助影像学在新型冠状病毒肺炎诊治中的研究进展[J]. *中华放射学杂志*, 2021, 55(3):304-308.

鹅星状病毒病研究进展及防控策略

黄培宏¹, 贾汝敏², 阳梦婷¹, 何仁诗¹, 冯欣怡¹, 邓诗文¹, 刘晓曦^{1*}

(1. 广东海洋大学滨海农业学院动物医学系, 广东 湛江 524000;

2. 广东海洋大学滨海农业学院动物科学系, 广东 湛江 524000)

摘要:鹅星状病毒主要感染3周龄以内的雏鹅, 感染初期会表现食欲下降、精神不振、四肢无力, 随着病情恶化会出现排泄物呈白色、小腿关节肿大、尿酸沉积及瘫痪等症状, 发病率较高, 死亡率高达30%, 给我国养鹅业造成了严重危害。本文从病原学、流行病学与致病性、症状表现、实验室诊断、防控、展望等六个部分对鹅星状病毒病展开综述。取病料进行鹅胚接种、病毒传代培养等方法分离病毒, 用RT-PCR等方法鉴定病毒, 经非易感动物多代传代有望培养出有效的弱毒疫苗。在实际生产中, 建议从业者通过注射有效疫苗、切断传播途径和合理使用药物等措施防治鹅星状病毒病。

关键词:雏鹅; 星状病毒; 痛风; 防控

中图分类号:S852.65+7 文献标识码:B 文章编码:1005-8567(2022)02-0063-04

Goose astrovirus disease: the research progress, prevention and control strategies

HUANG Peihong¹, JIA Rumin², YANG Mengting¹, HE Renshi¹, FENG Xinyi¹, DENG Shiwen¹, LIU Xiaoxi^{1*}

(1. Department of Veterinary Medicine, Coastal Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524000, China;

2. Department of Animal Science, Coastal Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524000, China)

Abstract: The goose astrovirus mainly infects the goslings within 3 weeks old. At the initial stage of infection, goslings show loss of appetite, listlessness and weakness of limbs. As the disease deteriorates, they show symptoms such as white feces, swelling of leg joints, uric acid deposition and paralysis, etc. The high incidence and up to 30% mortality rate would cause serious harm to the goose industry in China. In this article, it reviews the research process of goose astrovirus disease from six parts: etiology, epidemiology and pathogenicity, symptomatology, laboratory diagnosis, prevention and control, and prospect. The astrovirus was separated by taking diseased material for goose embryo inoculation and virus transmission culture, and identified by RT-PCR and other methods. It is expected that an effective attenuated vaccine will be cultivated by multi-generation subculture in non-susceptible animals. Practitioners are recommended to prevent and control goose astrovirus disease through measures such as injecting effective vaccine, cutting off the transmission route and rational use of drugs in the geese production.

Keywords: Gosling; Astrovirus; Gout; Prevention

收稿日期:2021-08-22

基金项目:广东海洋大学2020年校级大学生创新训练项目(CXXL2020170);广东省企业科技特派员项(GDKTP2020057400)

作者简介:黄培宏,男,本科生,研究方向水禽疾病病原学检测。E-mail:826286889@qq.com

*通信作者:刘晓曦(1988-),男,讲师,博士,硕士生导师,研究方向为中兽医药开发与利用。E-mail:liuxiaoxi_06@163.com

星状病毒常见于人与动物的肠胃炎疾病,还与肠外感染有关,如小鸭肝炎、鸡肾炎,以及人类和其他哺乳动物的致命性脑膜炎和脑炎。从2014年至今,在中国雏鹅和小鸭中暴发了以内脏痛风 and 肾脏肿胀为特征的疾病,分离到一种新型的禽星状病毒——鹅星状病毒(GoAstV)^[1]。自2020年起,以关节痛和内脏痛风为特征的致命鹅星状病毒感染的全中国范围内持续出现^[2]。

1 病原学

1.1 鹅星状病毒特性

GoAstV属于禽星状病毒属,单股正链RNA病毒,直径约为28~30 nm,因其核衣壳呈二十面体球形对称结构,且在电镜观察下为五角或六角星状,故命名为星状病毒^[3]。星状病毒的抵抗力较强,对多数常用消毒剂不敏感;对热处理稳定,能在60℃下抵抗10 min;对酸稳定,0.3%甲醛、1.5%卫可、90%甲醇完全灭活。因此,针对GoAstV的感染,需要选择合适的消毒剂^[4]。

2 流行病学与致病性

GoAstV可通过直接接触和间接接触途径传播^[3]。该病的主要传播途径是消化道感染,患鹅排出的粪便可以感染健康鹅,也能污染水源或食物。该病一年四季都可流行,在恶劣的饲养环境和不当的饲养管理条件下容易造成病毒的传播。GoAstV主要攻击家禽的胃肠道,但在脑、心脏、肝脏和肾脏等器官也可分离到该病毒。GoAstV与其他种属星状病毒同源性很低,致病性存在显著的差异^[3]。

1965年我国首次报道在家禽中分离到GoAstV,但直至2016~2017年,才逐渐在山东、河北、江苏、四川、福建、黑龙江等地区内发生并流行^[5-6]。2~25日龄雏鹅发病率较高,其中最易感的日龄为15日龄以内,死亡率为15%~36%,最高可达50%^[7]。每年11月份到次年5月份为发病高峰期,病鹅携毒的时间长达15天^[8]。感染耐过鹅仍然携带大量病毒,在未表现出临床症状的鹅体内也可检测GoAstV^[6,9]。

3 症状表现

GoAstV会引发鹅痛风病,痛风病是尿酸在动物血液内聚集,导致内脏、皮下组织和关节等部位出现尿酸盐沉积。鹅痛风病以关节肿大、腹泻,行动不便为特征。

3.1 痛风的分类

根据尿酸盐积聚的部位,该病分内脏型和关节型。内脏型痛风一般是急性发作,死亡率高,剖检时主要病变是心脏、肝、肾等器官的膜表面、肠系膜和腹膜等的尿酸盐积聚。关节型痛风多为散发和慢性发作,其临床表现具体为关节肿胀,行动迟缓、不便,难以直立,病理变化表现为动物的关节腔内出现白色的尿酸盐沉积^[10]。

3.2 临床症状与病理变化

雏鹅感染初期出现食欲下降,精神不振,四肢无力、瘫痪,毛发凌乱等症状,病情逐步恶化,直至死亡。病鹅临床表现主要为排泄物白色、小腿关节肿大、尿酸沉积及瘫痪。雏鹅腿关节切开后充满了白色浆液,剖检明显可见心脏、肝脏、肺脏以及输尿管出现尿酸盐沉积现象,最明显的是肾脏上出现针尖状大小白点,俗称“花斑肾”。此外,病理变化还包括心肌水肿,肝脏细胞出现空泡、变性,脾脏呈弥漫性出血、坏死,肾脏肾小管上皮发生间质性出血、坏死,肾小球肿胀、崩解等现象^[10-13]。

4 实验室诊断方法

通过鹅胚接种、RT-PCR检测技术,病毒的分离传代培养等实验方法分离鉴定病毒。

4.1 病毒学检查

首先利用鸭瘟病毒(DEV)、禽流感病毒(H1、H5、H9)、鸭肝炎病毒1型(DHV-1)、鸭坦布苏病毒病(DTMUV)、番鸭细小病毒(MDPV)、鸭肝炎病毒3型(DHV-3)、新城疫病毒(NDV)、减蛋综合征病毒(EDSV)和小鹅瘟病毒(GPV)的特异性引物对采集样品进行诊断检测。

4.1.1 病毒分离

一般情况下可用原代或传代细胞培养、胚胎接种或动物接种分离病毒。因缺少适合GoAstV生长

的原代细胞,可采用鹅胚接种法分离病毒。具体操作方式如下:将病料上清液除菌后经绒毛尿囊膜接种9日龄~11日龄SPF鹅胚,0.2 mL/胚,放入37℃的孵化箱中,每日定点照胚两次,观察胚死亡情况并记录;弃去24 h内死亡鹅胚,其余胚放4℃冰箱过夜冻胚,无菌收集鹅胚的尿囊膜研磨液上清液,将其接种下一代鹅胚按同样的方式在鹅胚中连续盲传五代;提取样品中病毒RNA,进行RT-PCR鉴定和测序^[14]。用蔗糖密度梯度离心法对收集的尿囊液及组织研磨液中的GoAstV进行纯化,于透射电镜下观察病毒形态。

4.1.2 病毒鉴定

提取病毒基因组,并对病毒的基因片段进行扩增,根据GenBank收录的GoAstV的基因组序列设计特异性引物进行病毒基因片段扩增,得到完整基因组序列。普通PCR扩增:利用鸭瘟病毒(DEV)、禽流感病毒(H1、H5、H9)、鸭肝炎病毒1型(DHV-1)、小鹅瘟病毒(GPV)、鸭坦布苏病毒病(DTMUV)、鸭肝炎病毒3型(DHV-3)、新城疫病毒(NDV)、减蛋综合征病毒(EDSV)和番鸭细小病毒(MDPV)特征引物对样品进行检测,将得到的PCR产物进行测序^[15];也可将病料匀浆,传代培养,收获的病毒液离心后取上清液,用核酸提取试剂盒提取病毒RNA并反转录成cDNA,用GAstV ORF2基因的特异性引物对病料上清液及收获的胚液体进行PCR检测,建立快速检测GoAstV的方法^[16]。

对收集的鹅胚尿囊液进行红细胞凝集试验检测,检测其血凝活性。具体操作方式:以对照组为参考,按照比例添加尿囊液和PBS缓冲液,最后每孔加入鸡血红细胞悬液,室温作用15 min左右观察结果;收集鹅星状病毒致死的鹅胚尿囊液,用PBS缓冲液进行10倍梯度稀释,经绒毛尿囊膜接种健康鹅胚,放进孵化箱中设置箱内温度为37℃孵化,记录鹅胚的死亡情况,以进行GoAstV毒价测定。

5 综合防控措施

5.1 注射有效疫苗

对于GoAstV感染的病鹅最早可于1日龄发

病,因此一般采取以抗体防治为主,常规药物治疗效果不佳。因该病毒复制滴度低,也相对难培养,导致疫苗抗体产品的效价差异较大^[11]。对患有GoAstV的雏鹅紧急接种相应抗体,或服用抗生素可以有效地降低死亡率。将GoAstV通过非易感动物多代传代后可培养出弱毒疫苗,对雏鹅群的保护率高达100%。以新城疫病毒为载体表达GoAstV Cap蛋白的载体疫苗,免疫保护效果优于传统疫苗^[3]。

5.2 切断传播途径

坚持以预防为主、及早发现、及早扑灭的措施。水禽疫病一旦发生便呈现直线增长趋势,扩散速度快。因此建议采用片区分点饲养、全进全出的模式。对疑似病例,及时进行严格诊断隔离,防止该病向外传播扩散;对病死鹅进行彻底焚烧填埋处理,并对养殖场的墙壁、地面、饲料盘、饮水机等设备设施进行彻底消毒,所有受污染的垃圾和粪便进行无害化处理,做到从根源上切断传播途径。监测挑选优良品种,提升种苗品质,“高进高出”,提高养殖水平和经济效益。

5.3 合理使用药物

因沉积的尿酸盐属碱性物质,若使用碳酸氢钠治疗,会引发机体代谢性碱中毒导致病情加剧,所以该病切忌使用碳酸氢钠类药物。当用高剂量抗生素治疗该病时会造成耐药性和病情的复杂化。王利华等用中药治疗雏鹅痛风病取得一定疗效,该组方有:党参、白术、茯苓、栀子、黄芩、黄连、板蓝根、川木通、车前草、滑石等,白水煎煮3次后合并药液,连续给药5天,可基本恢复鹅群健康^[17]。此外,还要确保饲料营养全面,不随意提高饲料中蛋白质和钙的含量,避免尿酸在体内的积累,还要控制合理的饲养密度,保证雏鹅有一定的活动空间以增强雏鹅体质^[3]。

6 展望

本文从病原学、流行病学与致病性、症状表现与病理变化、实验室诊断等方面介绍了GoAstV;可通过注射有效疫苗、切断传播途径、合理使用药物等措施有效防控该病的扩散。近期有报道发现新

型的鹅星状病毒株, 表明 GoAstV 存在高度变异性。因此, 在实际生产中, 建议养殖者采取以预防为主, 治疗为辅的防控策略。希望为从业人员防控 GoAstV 感染提供指导性意见, 并促进肉鹅产业的健康发展。

参考文献:

- [1] LI J Y, HU W Q, LIU T N, et al. Isolation and evolutionary analyses of gout-associated goose astrovirus causing disease in experimentally infected chickens [J]. Poultry Science, 2021, 100(2):543-552.
- [2] ZHANG X Z, DENG T W, SONG Y Z, et al. Identification and genomic characterization of emerging goose astrovirus in central China [J]. Transboundary and emerging diseases, 2021, 00: 1-10.
- [3] 侯展鹏, 高智均, 江丹莉, 等. 新型鹅星状病毒致雏鹅痛风及其综合防控[J]. 广东饲料, 2021, 30(1): 49-51.
- [4] 李甜甜, 王钺华, 朱国强, 等. 鹅星状病毒的分离鉴定及其致病性研究[J]. 中国家禽, 2020, 42(10): 116-120.
- [5] ASPLIN F D. Duck hepatitis: vaccination against two serological types [J]. Veterinary Record, 1965, 77(50): 1529-30.
- [6] MATTHEW D K, STACEY S C. Avian astroviruses [J]. Avian Pathology, 2002, 31(3): 213-227.
- [7] WAN C H, CHEN C T, CHENG L F, et al. A novel group of avian Avastrovirus in domestic geese, China [J]. The Journal of veterinary medical science, 2018, 80(5): 798-801.
- [8] ZHANG Q S, CAO Y X, WANG J, et al. Isolation and characterization of an astrovirus causing fatal visceral gout in domestic goslings [J]. Emerging microbes & infections, 2018, 7(1): 71.
- [9] 金美玲, 冯崇伦, 王笑言, 等. 雏鹅痛风相关病原的分子检测和鉴定 [C]. 中国畜牧兽医学学会 2018 年学术年会禽病学分会第十九次学术研讨会论文集, 2018.
- [10] 田家军. 致雏鹅痛风新型鹅星状病毒的分离鉴定及对雏鹅的致病性 [D]. 硕士学位论文. 济南: 山东农业大学, 2019.
- [11] 孙敏华, 广东省水禽主要传染病的流行现状及防控思考 [J]. 广东畜牧兽医科技, 2019, 44(1): 8-11.
- [12] YANG J, TIAN J J, TANG Y, et al. Isolation and genomic characterization of gosling gout caused by a novel goose astrovirus [J]. Transboundary and Emerging Diseases, 2018, 65(6): 1689-1696.
- [13] YU Z R, ZHANG D, YANG K K, et al. A simple and rapid diagnostic method to detect new goose astrovirus using reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification [J]. 3 Biotech, 2019, 10(1): 20.
- [14] 张玉杰, 孙宁, 刘东, 等. 鹅星状病毒的分离鉴定及全基因组序列分析 [J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(11): 2765-2777.
- [15] 蒲路莎, 鹅源星状病毒的分离鉴定及相关生物学特性的研究 [D]. 硕士学位论文. 哈尔滨: 黑龙江八一农垦大学, 2020.
- [16] ZHANG X Z, DENG T W, SONG Y Z, et al. Identification and genomic characterization of emerging goose astrovirus in central China, 2020 [J]. Transboundary and emerging diseases, 2021. doi:10.1111/tbed.14060.
- [17] 王丽华. 鹅副粘病毒病的发生及综合诊治 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2020, (6): 170.

关于《一例猫痹症型后肢瘫痪的针灸疗法诊治》的勘误

《广东畜牧兽医科技》杂志 2021 年第 46 卷第 6 期中论文《一例猫痹症型后肢瘫痪的针灸疗法诊治》一文中图 2B 更正为“治疗前”, 图 2 的图题更正为“针灸治疗前”。其它内容无更改。

给读者造成的不便, 敬请谅解。

《广东畜牧兽医科技》编辑部
2022 年 4 月 12 日

牛结核病的诊断与处理

刘腾声¹, 闭璟珊², 陆芳莲¹, 林云¹, 郑卓¹, 何奇松², 熊毅², 马琳^{2*}

(1. 桂平市动物疫病预防控制中心, 广西 贵港 537200;

2. 广西壮族自治区动物疫病预防控制中心, 广西 南宁 530001)

摘要:牛结核病是一种由牛型结核分枝杆菌引起的慢性人兽共患传染病, 该病一年四季均可发生, 被我国列为二类动物疫病。2020年, 桂平市某奶牛场发生疑似牛结核病, 经皮内变态反应检测出阳性样品16份。采集这16份皮内变态反应阳性牛的抗凝血样采用ELISA方法进行牛结核病 γ -干扰素检测, 结果诊断出8头牛结核病阳性奶牛。感染奶牛由桂平市动物疫病预防控制中心进行扑杀处理。据此建议, 养殖场应该做好检疫和生物安全措施, 防止该病的发生, 在监测环节中可先用皮内变态反应检疫牛群, 对于阳性牛再结合 γ -干扰素ELISA方法进行综合判断, 将更有利于牛结核病的检测和净化。

关键词:牛结核病; 诊断; 处理

中图分类号:S855.2 **文献标识码:**B **文章编码:**1005-8567(2022)02-0067-04

A case on diagnosis and treatment of bovine tuberculosis

LIU Tengsheng¹, GUAN Jingshan², LU Fanglian¹, Lin Yun¹, ZHENG Zhuo¹, HE Qisong², XIONG Yi², MA Lin^{2*}

(1. Guiping Center for Animal Disease Prevention and Control, Guigang 537200, Guangxi, China;

2. Guangxi Center for Animal Disease Prevention and Control, Nanning 530001, China)

Abstract: Bovine tuberculosis is a chronic zoonotic infectious disease caused by *Mycobacterium bovis* tuberculosis, which can occur all the year round and is classified as a class II animal disease in China. In 2020, A case of bovine tuberculosis occurred in a dairy farm in Guiping City, 16 positive samples were detected by intradermic allergy test. And then, the anticoagulant blood samples of 16 positive cows were collected and tested with ELISA of bovine tuberculosis interferon gamma (IFN), the results showed 8 positive cows. Infected cows were culled by Guiping center for animal disease prevention and control. Therefore, it is suggested that quarantine and biosafety measures should be taken to prevent the occurrence of bovine tuberculosis. In the monitoring link, intradermal allergy can be used to quarantine cattles, and then retesting positive cattles using IFN- γ ELISA method. It will be more conducive to the detection and purification of bovine tuberculosis.

Keywords: Bovine tuberculosis; Diagnosis; Management

牛结核病是一种由牛型结核分枝杆菌引起的慢性的人兽共患传染病, 在我国被列为二类动物疫病^[1]。病理变化以组织器官的结核结节性肉芽

肿和干酪样、钙化的坏死病灶为主要特征。OIE将其列为B类疫病。结核分枝杆菌主要分三个型:牛分枝杆菌(牛型)、结核分枝杆菌(人型)和禽分枝杆

收稿日期:2021-05-17

基金项目:河池市科技攻关与新产品试制项目(河科A1842-1-1.2)

作者简介:刘腾声(1964-), 广西桂平人, 学士, 高级畜牧师, 主要从事动物疫病防控和畜牧兽医技术推广工作。E-mail:Ok200809@163.com

*通讯作者:马琳(1983-), 广西桂林人, 硕士, 高级兽医师, 主要从事动物疫病防控工作。E-mail:59253780@qq.com

菌(禽型);牛对牛型菌易感,其中奶牛最易感,水牛易感性也很高,黄牛和牦牛次之;人也能感染,且与牛互相传染。本病一年四季均可发生。当畜舍拥挤、阴暗、潮湿、污秽时,或过度使役、挤乳、饲养不良等条件下,均可以促进本病的发生和传播。患病动物是主要的传染源,结核分枝杆菌能存在于机体各个器官的病灶内,可由粪便、乳汁、尿和分泌物等排出病菌,从而污染周围环境。本文对2020年发生的一起牛结核病诊断和处理措施进行了总结,以供同行参考。

1 基本情况

桂平市蒙圩镇龙门桥头某奶牛场建于2007年5月,2020年存栏奶牛442头,母牛均采用人工配种方式。采用圈养式粗粮+精料饲养,饲养管理情况良好。该场采用益生菌发酵垫料,内环境管理和卫生状况较好;距村级公路约1.5 km,周边没有其他养殖场。发病前奶牛已进行口蹄疫(O型、A型)疫苗免疫。该场具有牛结核病病史:2010年5月曾经检测出6头阳性奶牛,已做扑杀无害化处理;2011~2017年连续7年没有检出阳性;2018年5月检测出10头阳性奶牛,已做扑杀无害化处理。2020年8月发现有疑似病例。

2 试验方法

2.1 牛分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验

2020年8月13日~15日由桂平市动物疫病预防控制中心对该场442头奶牛采用结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验进行检测,牛型结核菌素购于哈药集团生物疫苗有限公司,批号:201802。根据国标中规定,在颈部注射牛型 PPD,注射部位出现明显的炎性反应,皮皱厚差值大于或等于4 mm,判为阳性。

2.2 牛结核病 γ -干扰素 ELISA 方法

对牛分枝杆菌 PPD 皮内变态反应阳性的牛采集抗凝血样品,由广西壮族自治区动物疫病预防控制中心采用牛结核病 γ 干扰素 ELISA 方法进行复检。BOVIGAM 牛分枝杆菌 IFN- γ 检测试剂盒购于瑞士 PRIONICS 公司,批号为 6332001401。判定标准:计算每个样品阴性抗原、禽 PPD 和牛 PPD 的平均 OD 值。阳性=牛型 PPD 刺激抗原上清的 OD-PBS 的刺激抗原上清 OD \geq 0.1 且牛型 PPD 的刺激抗原上清 OD-禽型 PPD 刺激抗原上清的 OD \geq 0.1。

3 检测结果

3.1 结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应试验结果

442头奶牛的牛分枝杆菌 PPD 皮内变态反应

表1 阳性样品皮内变态反应试验结果

奶牛编号	检测注射部位	注射前皮厚(毫米)	注射后皮厚(毫米)			结果判断
			72小时	96小时	120小时	
1234	颈部皮内	6	11.04	11.26	11.03	+
GP7115	颈部皮内	6.92	25.16	23.48	31.51	+
GP7099	颈部皮内	4.82	11.84	/	/	+
GP8007	颈部皮内	6.22	11.6	/	/	+
GP7110	颈部皮内	6.18	10.2	/	/	+
GP8023	颈部皮内	6.02	14.52	/	/	+
GP181212	颈部皮内	6.1	16.96	/	/	+
GP8102	颈部皮内	8.3	23.94	/	/	+
GP181112	颈部皮内	4.88	10.96	/	/	+
1241	颈部皮内	6.62	14.88	/	/	+
GP7078	颈部皮内	8.72	13.64	/	/	+
SS5150	颈部皮内	6.76	22.76	/	/	+
GP190108	颈部皮内	8.04	17.04	/	/	+
190207	颈部皮内	9.84	20.56	/	/	+
GP8078	颈部皮内	8.66	20.9	/	/	+
GP190109	颈部皮内	6.84	18.3	/	/	+

试验检测发现呈现阳性的牛有16头(编号为:1243、GP7115、GP7099、GP8007、GP7110、GP8023、GP181212、GP8102、GP181112、1241、GP7078、SS5150、GP190108、190207、GP8078、GP190109)。具体结果如表1所示。

3.2 牛结核病 γ -干扰素ELISA方法试验结果

采集结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应检出阳性的牛血样,送至广西区动物疫病预防控制中心进行牛结核病 γ -干扰素ELISA方法试验。结果显示其中有8份样品为阳性(编号为:1243、GP7110、GP8023、GP181112、1241、GP190108、190207、GP190109),其他8份样品为阴性。结果如表2所示。

4 疫情情况分析 with 处理

该场始建于2007年5月,奶牛为本地其他牛场调入。2010年,从外省调入部分奶牛,由于当时法律法规不完善,执法力度欠佳,调入的奶牛没有经过动物防疫机构检疫和检测,无法追溯健康状况。2017、2019年分别从贵港市根竹镇、独山县上思镇调入了部分奶牛,其调运手续齐全,奶牛经过相关检疫并报备当地兽医部门。本次检出阳性的8头奶牛,均是原来在场内的奶牛。其中有3头(耳号:GP190108、190207、GP190109)是后备牛,2019年因为年龄小,没有做到检测,其余5头(耳号:1243、GP7110、GP8023、GP181112、1241)2019年检测的结果是阴性。

经广西区动物疫病预防控制中心最后复核检测确认的8头结核病阳性奶牛全部由业主按《病死及病害动物无害化处理技术规范》(农医发[2017]

25号)的要求进行了扑杀无害化处理。当地动物卫生监督所和疫控中心派人到现场作了监督和指导,并将有关情况和材料报告了上级主管部门。

5 分析

通过现场流行病学调查发现,由于当时法律法规不完善,而且养殖场场主对防疫意识认识不足,以至该场调入的牛只没有经过动物疫病的检疫和检测,存在极大的疫情隐患。据分析,该场结核病发生的原因主要有4点:(1)牛只来源问题,调入地的牛只没有经过检疫或检测;(2)奶牛场没有设隔离牛舍,调入的奶牛直接混群,引起疫病的传染;(3)奶牛场是敞开式的,没有防蚊、蝇、鼠、鸟等设施;(4)奶牛场场主防疫意识不强、自主监测净化没有做好。

对监测结果为阳性的奶牛必须按照国家防控策略全部扑杀并按要求进行无害化处理。建议养殖场平时做好清洁消毒工作,提高牛场的基础设施建设,保证良好的饲养环境。加强动物防疫检疫,对新引进的奶牛需要严格检疫和隔离观察。提高奶牛场自主监测能力和意识。本场2020年8月13日~15日监测时结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应阳性而牛结核病 γ -干扰素ELISA阴性的牛只,在间隔了半年后,再次进行结核分枝杆菌 PPD 皮内变态反应,结果全为阴性。

两种检测方法中:皮内变态反应方法具有低成本的优点,适用于基层检测^[3]。牛结核病 γ -干扰素ELISA方法具有敏感性高、特异性强、并且可以有效区分牛、禽型结核分枝杆菌以及假阳性牛的优点,对于奶牛牛结核病的检测和防控具有重要作

表2 牛结核病 γ 干扰素ELISA方法试验结果

样品编号	禽型 PPD 刺激孔上清 OD 值	牛型 PPD 刺激孔上清 OD 值	PBS 刺激孔上清 OD 值	结果判定	样品编号	禽型 PPD 刺激孔上清 OD 值	牛型 PPD 刺激孔上清 OD 值	PBS 刺激孔上清 OD 值	结果判定
1234	0.991	2.537	0.0956	+	GP181112	1.152	3.368	0.0829	+
GP7115	1.220	0.827	0.0739	-	1241	0.280	0.808	0.068	+
GP7099	0.172	0.109	0.0814	-	GP7078	0.220	0.198	0.0739	-
GP8007	0.207	0.173	0.1329	-	SS5150	0.222	0.209	0.0655	-
GP7110	0.901	2.751	0.0723	+	GP190108	0.257	1.144	0.0751	+
GP8023	0.883	1.727	0.0814	+	190207	0.164	1.178	0.0766	+
GP181212	0.227	0.116	0.0665	-	GP8078	0.248	0.335	0.075	-
GP8102	0.210	0.158	0.079	-	GP190109	0.403	1.280	0.077	+

用,但成本高,难以大范围推广使用^[4]。所以建议在监测环节中,先用皮内变态反应检疫牛群,对于阳性样品再结合 γ -干扰素ELISA方法进行综合判断,将更有利于牛结核病的检测和净化。

6 小结

牛结核病一旦感染,不易恢复。感染牛只和被污染的奶源成为主要的传染源危害人体健康。所以,牛场应做好防疫和生物安全措施。一旦发现感染,应配合兽医部门进行扑杀处理。

参考文献:

- [1] 蔡宝祥. 2001. 家畜传染病学[M]. 第4版. 北京: 中国农业出版社: 110-114.
- [2] 徐贤坤, 熊毅, 韦达有, 等. γ -干扰素ELISA检测方法在广西牛结核病流行病学调查中的应用[J]. 南方农业学报, 2013(4): 667-670.
- [3] 徐贤坤, 黄小武, 蓝纪, 等. 两种奶牛结核病检测方法的比较研究[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(2): 29-33.
- [4] 马琳, 闭璟珊, 何奇松, 等. 两种牛结核病检测方法对经济效益影响的比较[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2020(2): 24-25.

上接第25页

- [7] 张云茜, 邓菲, 路美玉. 加米霉素注射液特殊安全性试验研究[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(5): 66-74.
- [8] 张倩, 刘刚, 马晓玲, 等. 加米霉素注射液对小鼠的急性毒性试验[J]. 现代畜牧科技, 2017(3): 4-5.
- [9] 冯言言, 魏秀丽, 郑莉, 等. 加米霉素对大鼠的经口急性毒性(LD50)试验[J]. 山东畜牧兽医, 2018, 39(5): 8-9.
- [10] 颜晓冬, 齐鹏, 宋敏, 等. 加米霉素注射液的靶动物安全性试验[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(11): 102-107.
- [11] 康彦, 王艳艳, 邓菲. 加米霉素注射液对奶牛安全性的试验研究[J]. 中国奶牛, 2018(7): 55-58.
- [12] 王海, 邓菲, 耿雅丽. 加米霉素注射液对靶动物猪的安全性试验研究[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 043(12): 1538-1542.
- [13] 肖天石, 丁久恒, 于泓潇, 等. 加米霉素注射液在靶动物猪的安全性试验[J]. 中国兽医杂志, 2018, 54(8): 109-111.
- [14] 国家食品药品监督管理总局. 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则2014年版[S]. 2014: 53-63.
- [15] 张倩. 中试加米霉素注射液体外抑菌试验及实验动物安全性评价[D]. 硕士学位论文. 石河子: 石河子大学, 2017.

上接第29页

- [3] BRITTLE E E, REYNOLDS A E, ENQUIST L W. Two modes of pseudorabies virus neuroinvasion and lethality in mice [J]. Journal of virology, 2004, 78(23): 12951-12963.
- [4] 朱庆虎, 黄骏明. 近10年我国猪伪狂犬病研究进展[J]. 中国畜禽传染病, 1996(6): 59-61.
- [5] 孔德江, 何晓玲, 易栋, 等. 规模化猪场猪伪狂犬病的筛查与防控[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(10): 37-39.
- [6] 樊振华, 姚敬明, 孟帆, 等. 山西部分种猪场猪伪狂犬病分子流行病学调研[J]. 山西农业科学, 2012, 40(9): 989-992.
- [7] 邓仕伟, 汪勇, 薛春芳. 我国伪狂犬病流行现状及新特点[J]. 动物医学进展, 2006(9): 105-107.
- [8] 白丽丽, 王旭荣, 刘建营, 等. 伪狂犬病毒GDSH株的分离鉴定及gF基因的序列分析[J]. 中国动物检疫, 2008(1): 23-26.
- [9] 王凤求, 何永龙, 侯月娥, 等. 广东一株猪伪狂犬病毒野毒的分离鉴定和致病性初步研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(1): 144-147.
- [10] 邹伟斌, 赖月辉, 牛贝贝, 等. 猪伪狂犬病病毒变异株GD株的分离鉴定及TK和gF基因的进化分析[J]. 现代畜牧兽医, 2019(10): 8-15.