

GUANGDONG JOURNAL OF ANIMAL AND VETERINARY SCIENCE

Established in March 1976(Bimonthly)

AUG.2016 Volume 41, Number 4 (Total No.188)

Main Content

Research Progress of Genetic Engineering Live Vector Vaccines.....	ZOU Weibin, CHEN Dan, et al(1)
Development of the Small-scale Livestock and Poultry Farms under the Strict Environmental Protection Policy	XIAO Xiang, XIE Huamei (6)
Research Progress of gB Gene in Pseudorabies Virus	ZOU Weibin, CHEN Xiaozhen, et al (9)
Brief Analysis on Technical Requirements of Energy Conservation and Emission Reduction of Large-scaled Farms in Guangdong.....	YAN Xia, GUO Fuyou, et al (14)
Bactericidal Effect of Composite Sodium Chlorite Fumigants on Fowl Typhoid Salmonella	LENG Shuzhen, XU Xiang, et al(18)
Diagnosis and Treatment of Hepatic Fascioliasis in Black Goats.....	ZHAI Shaolun, ZHANG He, et al(20)
Report of Diagnosis And Treatment of the Blue Peacock Infected with Newcastle Disease in the Brood Stage	GAN Lu, LIU Kejun, et al (22)
Immune Effect of H5N1 Vaccine Against Highly Pathogenic Avian Influenza Virus.....	ZHANG Tingfen, CAO Yuyu, et al (24)
Investigation and Analysis of PRRSV Serum Antibody Level among Small-scale Pig Farms in Guangdong Province.....	TU Yurong, OUYANG Weixing, et al (26)
Surveillance and Analysis of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus and H7N9 Virus from Poultry for Hong Kong and Macao.....	TIAN Chunjian, GAO Jiahui, et al (29)
The Conventional Comparative Analysis of the Semen between the Debao Pony and the United States Pearl Horse.....	CHEN Zhengyu, LIU Kejun , et al(33)
Comparison of the Immune Effects of Classical Swine Fever Live Vaccines from Five Different Biopharmaceutical Companies	HUANG Qiuxue, WU Wenfu, et al(36)
Comparative Analysis of Growth Curve between Two Serotypes of Pseudomonas Aeruginosa from Minks	YANG Pengxin, DING Guojie, et al (41)
Curative Effect Observation of Lithospermum Ointment on Ulcerative Dermatitis in Dogs.....	RUAN Pengfei, QIU Zhuoxi, et al (44)
Research on Agricultural Science and Technology Service System Based on Multiplex Development of Service Principal.....	LIN Qun, ZHAO Cheng, et al(47)

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

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

Chief Editor:JIANG Zongyong

Vice Chief Editor:LIN Weijun

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

Post Code: 510500

Tel:(020)38319957 38319211

Fax:(020)38319211

E-mail:gdxmsykj@163.com

基因工程活载体疫苗的研究进展

邹伟斌, 陈丹, 谢少霞, 朱炜斌, 齐冬梅

(广东永顺生物制药股份有限公司, 广东 广州 511356)

摘要: 作为分子生物技术发展的新兴产物, 基因工程疫苗与传统疫苗相比, 具有生产成本低、免疫途径广泛、安全性高等优点, 已成为生物制品产业发展的一种趋势。而基因工程活载体疫苗具有其独特的优点, 是当今与未来疫苗研制与开发的重要方向之一。根据选用的载体类型, 基因工程活载体疫苗分为病毒活载体疫苗和细菌活载体疫苗。简要概述了病毒活载体疫苗和细菌活载体疫苗的特点及研究进展。

关键词: 基因工程; 活载体疫苗; 病毒; 细菌

中图分类号: S852.5²

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2016)04-0001-05

Research Progress of Genetic Engineering Live Vector Vaccines

ZOU Weibin, CHEN Dan, XIE Shaoxia, ZHU Weibin, QI Dongmei

(Guangdong Winsun Bio-pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 511356, China)

Abstract: As the new products of the molecular biological technology development, genetic engineering vaccine has low production cost, immune way widely, high security compared with the traditional vaccines. It has become a trend in the development of biological products industry. The genetic engineering live vector vaccine which has its unique advantages is one of the important directions in the research and development of vaccine nowadays and future. There is a brief overview of the characteristics and research progress of virus and bacteria live vector vaccines.

Key words: genetic engineering; live vector vaccine; virus; bacteria

疫苗接种是控制人类与动物传染病的一种极为有效的手段。目前已有数千种疫苗应用在各种疾病的预防和治疗中。但传统疫苗(灭活苗、弱毒苗)的诸多局限性表明传统疫苗已经难以满足当前相关产业发展的要求。随着DNA重组技术的出现和快速发展, 基因工程疫苗作为一种崭新的疫苗, 为疫苗技术的发展带来了新的突破。

基因工程疫苗主要包括亚单位疫苗(subunit vaccine)、重组活载体疫苗(live recombinant vaccine)、合成肽疫苗(synthetic peptide vaccine)、DNA疫苗(DNA vaccine)和转基因植物疫苗(transgenic plant vaccine)等。其中, 基因工程重组活载体疫苗是利用基因工程技术将非致病性微生物(病毒或细菌)携带并表达某种特定病原的保护性抗原基因的活疫苗。该类疫苗诱导免疫

动物产生的免疫比较广泛, 包括体液免疫和细胞免疫, 甚至黏膜免疫, 因此可以避免重组亚单位疫苗的很多缺点。如果载体中同时插入多个不同病原的外源基因, 就能实现一针防多病的目的。基因工程活载体疫苗兼具灭活疫苗的安全性好及活疫苗的免疫效果好、成本低等优点, 是今后疫苗研发的主要方向之一, 也是基因工程疫苗中最具发展意义的疫苗之一^[1]。

根据选用的载体类型, 基因工程活载体疫苗分为病毒活载体疫苗和细菌活载体疫苗。

1 病毒活载体疫苗

病毒活载体疫苗的载体通常为弱毒力的病毒, 将其他病原的保护性抗原基因插入到载体基因组的非必需区基因中, 形成新的重组病毒, 外源基因在合适的启动子驱动下随载体的复制而表

收稿日期: 2016-06-10

作者简介: 邹伟斌(1989-), 男, 硕士, 兽医师, E-mail: weibinzousysu@126.com

达。目前,用于病毒活载体的病毒主要有痘病毒(poxvirus)、腺病毒(adenovirus, AdV)、疱疹病毒(herpesviruses)、小 RNA 病毒等。

1.1 痘病毒活载体疫苗

痘病毒是研究最早最成功的载体病毒之一,它具有宿主范围广、增殖滴度高、稳定性好、基因容量大以及非必需区基因多等特点。因此,选择痘病毒作为载体构建活载体疫苗便于进行基因工程操作,易于构建和分离重组病毒。痘病毒还可以插入多个外源基因,且有较高的表达水平。

目前,应用痘病毒载体已成功表达了人类免疫缺陷病毒(HIV)^[2]、流感病毒^[3-4]、鸡新城疫病毒^[5]、传染性支气管炎病毒^[6]、马立克氏病毒^[7-8]、传染性喉气管炎病毒^[9]和小反刍兽疫病毒^[10-11]等的保护性抗原基因,且免疫后攻毒保护效果良好。哈尔滨兽医研究所研制的鸡传染性喉气管炎重组鸡痘病毒基因工程疫苗和禽流感重组鸡痘病毒载体活疫苗(H5亚型)已通过新兽药注册,且临床上对两种疫苗的联合免疫程序进行了探索,并取得了良好的应用效果^[12]。由金丝雀痘病毒作为载体表达 HIV 主要囊膜蛋白 gp120 的活载体疫苗已于 2009 年在泰国完成了人体 III 期临床试验,且具有较好地免疫保护效果^[13-14],为 HIV 疫苗的研发带来了新曙光。

1.2 腺病毒活载体疫苗

腺病毒作为活载体具有许多优点:(1)腺病毒粒子稳定性良好;(2)安全性较好,不会引起人类感染;(3)基因组较大,约 36 kb,可以插入较大的外源基因;(4)宿主细胞较为广泛;(5)表达的蛋白具有天然活性。因此,腺病毒作为活载体用于基因工程疫苗的研发和肿瘤的治疗具有良好的应用前景。

目前已有许多病毒的抗原保护性基因通过腺病毒载体表达成功,如基于 ChAd3 的埃博拉病毒疫苗是利用腺病毒为载体表达埃博拉病毒的 GP 蛋白,该疫苗已进入临床试验阶段,并取得了较理想的实验效果^[15],有望成为控制埃博拉病毒的有效疫苗。此外,腺病毒成功表达了鸡传染性法氏囊病毒的 VP2 基因^[16]、鸡传染性支气管炎病毒的 S1 基因^[17]和禽流感病毒的 HA 基因^[18],并且都能起到良好的免疫保护效果。有关腺病毒作为活载体表达口蹄疫病毒^[19-20]、伪狂犬病毒、猪瘟病毒^[21-22]和猪繁殖与呼吸综合征病毒^[23]的保护性抗原基因的

研究报道也较多。

1.3 疱疹病毒活载体疫苗

疱疹病毒的基因组较大(约 150 kb),可以插入多个外源基因。疱疹病毒构建的活载体疫苗可诱导特异性黏膜免疫。作为载体用于基因工程疫苗研究的疱疹病毒主要包括伪狂犬病毒、火鸡疱疹病毒、I 型牛疱疹病毒、单纯疱疹病毒、河马疱疹病毒 I 型。其中,伪狂犬病毒活载体疫苗是病毒基因工程疫苗研究中的热点,火鸡疱疹病毒作为活载体在禽病基因工程疫苗的研究中应用较多。

1.3.1 伪狂犬病毒活载体疫苗 伪狂犬病毒属于疱疹病毒科、A 型疱疹病毒亚科、猪疱疹病毒 I 型。伪狂犬病毒以其特殊的基因组结构、宿主的广泛性和生物安全性成为研发活载体疫苗的重要载体工具。以伪狂犬病毒作为载体插入其他病原的抗原保护性基因构建的重组病毒不仅可以预防包括伪狂犬病在内的两种及以上病害,实现一针防多病的目的,而且还能简化免疫程序、降低免疫成本,具有良好的商业价值和应用前景。近年来报道用伪狂犬病毒表达了多种外源基因,如猪瘟病毒的 E2 蛋白^[24]、猪细小病毒的 VP2 基因^[25]、口蹄疫病毒的 P12A 和 3C 基因^[26]、猪繁殖与呼吸综合征病毒的 GP5 基因^[27]、猪圆环病毒 II 型 ORF2 基因^[28]和乙脑病毒的 NSI 基因^[29]等以及共表达两种不同病原的保护性抗原基因^[30-31]。Wang 等^[24]成功构建了表达猪瘟病毒 E2 蛋白的重组伪狂犬病毒,能够对猪瘟和伪狂犬病产生良好的免疫效果。Zhang 等^[32]构建的表达口蹄疫病毒 P12A 和 3C 基因的重组伪狂犬病毒,能够诱导产生高水平的中和抗体,且对仔猪有较好的免疫保护。

1.3.2 火鸡疱疹病毒活载体疫苗 火鸡疱疹病毒作为载体用于研究禽病毒重组疫苗具有其独特的优势:火鸡疱疹病毒对鸡及其他动物无致病性,安全性好;火鸡疱疹病毒与马立克氏病病毒有交叉免疫作用,因此构建的重组火鸡疱疹病毒疫苗也可以作为马立克氏病疫苗;与鸡痘病毒相比,重组火鸡疱疹病毒疫苗受母源抗体的干扰很小。近年来,以火鸡疱疹病毒作为载体成功表达了多种禽病毒保护性抗原基因,包括鸡传染性喉气管炎病毒的 gB 基因^[33]、传染性法氏囊病毒的 VP2 基因^[34]和禽流感病毒的 HA 基因^[35],动物实验结果表明这些重组病毒疫苗的免疫保护率很高。因而以火鸡疱疹

病毒为载体的基因工程疫苗具有良好的应用前景。

1.4 小 RNA 病毒活载体疫苗

近年来,随着反向遗传操作技术的发展,以 RNA 病毒为活载体的新型疫苗研究令人鼓舞。研究较多的是禽病毒中的新城疫病毒和猪病毒中的猪繁殖与呼吸综合征病毒,它们在 RNA 病毒活载体疫苗的研究领域中具有良好的应用前景。

1.4.1 新城疫病毒活载体疫苗 新城疫病毒作为载体具有很多优点:新城疫弱毒疫苗已经广泛使用且免疫保护效果很好;病毒重组率低,安全性高;可在鸡胚上增殖,生产成本低;比较稳定,可以通过饮水或气雾方式进行免疫;可以诱发黏膜免疫;表达蛋白少,对宿主的免疫干扰小。曹有才^[36]构建的表达 H9 亚型禽流感病毒野生型 HA 基因的重组新城疫病毒 rL-H9HA 具有同时预防 H9 亚型禽流感和新城疫的双价苗应用前景。以新城疫病毒为载体构建的表达 H5 亚型禽流感病毒 HA 基因的重组新城疫病毒所研制的禽流感、新城疫重组二联活疫苗(rL H5 株)已通过新兽药注册^[37]。另外,以新城疫病毒作为载体成功构建的表达鸡传染性法氏囊病毒的 VP2 基因^[38]、鸡传染性喉气管炎病毒的糖蛋白 gD^[39]的重组新城疫病毒具有良好的安全性和免疫保护。这些研究为研制禽类二联或多联活载体疫苗奠定了基础。

1.4.2 猪繁殖与呼吸综合征病毒活载体疫苗 猪繁殖与呼吸综合征病毒作为一种 RNA 病毒,较为广泛地应用于基因工程活载体疫苗的研究,如通常用来表达猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因^[40-41]、口蹄疫病毒的 P12A 和 3C 基因^[42]以及猪瘟病毒的 E2 蛋白^[43]。吴家强^[44]构建了表达猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因的重组猪繁殖与呼吸综合征病毒 PRRSV-PCV2,与 PRRSV 原始野毒相比,重组病毒 PRRSV-PCV2 引起实验仔猪的病毒血症明显缩短。以猪繁殖与呼吸综合征病毒为载体的重组基因工程猪用多价疫苗有望在很快得到广泛的应用,在临床上实现一针防多病的免疫功效。

2 细菌活载体疫苗

细菌活载体疫苗是使病原体的保护性抗原或表位插入的细菌基因组或质粒表达而获得的重组细菌。目前作为载体用于细菌活载体疫苗主要有沙门氏菌、乳酸菌、李斯特菌等。

2.1 沙门氏菌活载体疫苗

沙门氏菌是一种胞内菌,减毒后的沙门氏菌依然保持侵入巨噬细胞和树突细胞的能力。因此,减毒沙门氏菌是良好的细菌活疫苗载体。重组沙门氏菌疫苗能够有效刺激机体的全身免疫和局部黏膜免疫,且可以采用口服或滴鼻等非注射的方式进行免疫,具有良好的应用前景。

以减毒沙门氏菌为载体成功表达的猪病原外源抗原包括猪繁殖与呼吸综合征病毒的 gp5 蛋白^[45]、猪流行性腹泻病毒的 S 蛋白^[46]、猪圆环病毒的 Cap 蛋白^[47]和猪瘟病毒的 E2 蛋白^[48]等,动物实验结果表明这些口服的重组减毒沙门氏菌活疫苗均能诱导机体产生较强的细胞免疫应答,表现出良好的应用前景。

2.2 乳酸菌活载体疫苗

乳酸菌是人和大多数动物肠道内的常见菌群,能够调节肠道微生态平衡、促进营养物质吸收和增强免疫力,对维持机体的健康有重要作用。近年来随着活载体疫苗的不断发展和应用,乳酸菌作为载体用来表达外源蛋白已越来越受关注。以乳酸菌作为载体的活载体疫苗具有许多优势:乳酸菌活载体疫苗安全性能高;乳酸菌具有良好的生理活性,且是一种良好的佐剂,能够调节机体的免疫水平和提高抗原的免疫原性;乳酸菌活载体疫苗的生产工艺简单,成本低;通过滴鼻或口服方式进行免疫,使用方便。

乳酸菌的外源蛋白主要有细胞内表达、细胞外分泌及菌体表面展示 3 种方式,重组蛋白表达方式不同,其产量、活性以及在机体内的作用效果也会存在差异。乳酸菌作为载体被广泛用来表达病毒、细菌和寄生虫的主要保护性抗原,在预防病毒性、细菌性以及寄生虫性传染性疾病方面具有良好的研究价值和应用前景^[49]。另外,构建表达细胞因子的重组乳酸菌活载体疫苗的研究也非常广泛,如表达 IL-12、IL-10、表皮生长因子(EGF)和淋巴细胞趋化因子等细胞因子的重组乳酸菌活载体疫苗,这类疫苗能够增强免疫动物机体的特异性免疫,提高其他疫苗的免疫保护效果。

2.3 李斯特菌活载体疫苗

李斯特菌是一种革兰氏阳性小杆菌,弱毒化的李斯特菌作为载体表达外源抗原即得到李斯特菌活载体疫苗。李斯特菌携带外源抗原进入机体内,经 MHC I 类分子途径递呈,诱导机体产生相应的免疫保护反应。李斯特菌活载体疫苗能够诱导

机体产生细胞免疫和粘膜免疫,因此李斯特菌可以作为抗病毒、抗肿瘤基因工程疫苗研究的理想载体。用弱毒化的李斯特菌成功构建表达 HIV 和流感病毒抗原的重组李斯特菌疫苗株,具有较好的应用前景。

3 展望

基因工程活载体疫苗,包括病毒活载体疫苗和细菌活载体疫苗,可诱导免疫动物产生多种免疫,而且安全稳定、方便有效、生产成本低,许多活载体疫苗能够一针防多病,这些都是传统疫苗无法比拟的优势。利用基因工程技术的活载体疫苗在表达外源抗原上具有灵活的可操作性,而且能够有效地传递抗原。一些活载体本身具有佐剂的性质,在免疫动物体内能够产生有效的免疫应答。基因工程活载体疫苗克服了重组亚单位疫苗和合成多肽疫苗的诸多缺点,在防治多种传染性疾​​病上体现出良好的应用前景,是目前基因工程疫苗研究的热点领域。但是,作为一类新型疫苗,基因工程活载体疫苗在大规模的临床应用方面仍然存在一定的缺陷,如对宿主存在潜在的安全性,载体受母源抗体的干扰,针对活载体产生的中和抗体也可能会影响二次免疫效果。因此,选择针对某种或某些病原合适的活载体十分重要,进一步提高各种活载体系统的安全性、靶向性和有效性也是今后基因工程活载体疫苗研究的目标。

随着生物技术的发展与进步,基因工程疫苗的研究不断发展与创新,基因工程疫苗已开始广泛进入实际生产应用,并且成为生物制品产业发展的一种必然趋势。基因工程活载体疫苗具备的一系列显著优势必将得到更加深入和广泛的研究与应用,并将为畜禽等动物的传染性疾​​病以及人类的传染病和肿瘤的防治做出重要贡献,为人类和动物的健康、食品安全以及社会的进步发挥至关重要的作用。

参考文献:

- [1] 孟庆峰,徐展,王伟利.活载体疫苗的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2013(19):28-31.
- [2] Garcia-Arriaza J,Perdiguero B,Heeney J,et al. Head-to-Head Comparison of Poxvirus NYVAC and ALVAC Vectors Expressing Identical HIV-1 Clade C Immunogens in Prime-Boost Combination with Env Protein in Nonhuman Primate[J]. J Virol, 2015, 89(16):8525-8539.
- [3] de Vries R D,De Gruyter H L,Bestebroer T M,et al. Induction of influenza (H5N8) antibodies by modified vaccinia virus Ankara H5N1 vaccinia [J]. Emerg Infect Dis, 2015, 21(6):1086-1088.
- [4] Kamlangdee A,Kingstad-Bakke B,Anderson T K,et al. Broad protection against avian influenza virus by using a modified vaccinia Ankara virus expressing a mosaic hemagglutinin gen[J]. J Virol, 2014, 88(22):13300-13309.
- [5] 朱战波.表达 NDV、IBDV 及 FMDV 基因的重组 FPV 载体活疫苗构建和实验免疫研究[D].长春:吉林大学,2012.
- [6] 管倩,陈红英,崔保安,等.表达传染性支气管炎病毒 S1 基因与鸡 IL-18 基因重组禽痘病毒的构建[J].中国兽医学报,2010(11):1435-1439.
- [7] Omar A R,Schat K A,Lee L F,et al. Cytotoxic T lymphocyte response in chickens immunized with a recombinant fowlpox virus expressing Marek's disease herpesvirus glycoprotein B[J]. Vet Immunol Immunopathol, 1998, 62(1):73-82.
- [8] 卢军,胡传伟,金乔,等.表达鸡马立克氏病病毒 gB 基因重组鸡痘病毒的遗传稳定性及生物安全性评价[J].中国预防兽医学报,2007(5):327-331.
- [9] Chen H Y,Cui P,Cui B A,et al. Immune responses of chickens inoculated with a recombinant fowlpox vaccine co-expressing glycoprotein B of infectious laryngotracheitis virus and chicken IL-18[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2011, 63(2):289-295.
- [10] 李继东,蒙学莲,朱学亮,等.小反刍兽疫病毒 H 基因或 F 基因重组山羊痘病毒活载体疫苗的研究[J].中国兽医科学,2015(02):111-117.
- [11] 郭秀山.新型环保养猪模式 生物发酵床养猪技术简介[J].中国猪业,2008(9):45-48.
- [12] 王云峰,石星明,王玫,等.抗禽流感或传染性喉气管炎两种重组鸡痘病毒疫苗联合免疫的相互影响[J].中国动物传染病学报,2009(1):7-14.
- [13] 田美娟,邵一鸣. HIV 活载体疫苗临床试验进展[J].中国热带医学,2010(7):896-899.
- [14] Pantaleo G,Esteban M,Jacobs B,et al. Poxvirus vector-based HIV vaccines[J]. Curr Opin HIV AIDS, 2010, 5(5):391-396.
- [15] Gilbert S C. Adenovirus-vectored Ebola vaccines[J]. Expert Rev Vaccines, 2015, 14(10):1347-1357.
- [16] Francois A,Chevalier C,Delmas B,et al. Avian adenovirus CEL0 recombinants expressing VP2 of infectious bursal disease virus induce protection against bursal disease in chickens[J]. Vaccine, 2004, 22(17-18):2351-2360.
- [17] Toro H,Zhang J F,Gallardo R A,et al. S1 of distinct IBV population expressed from recombinant adenovirus confers protection against challenge [J]. Avian Dis, 2014, 58(2):211-215.
- [18] 王伟.表达 H5N1 禽流感病毒 HA 基因重组腺病毒的构建及免疫保护性研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2013.

- [19] Medina G N, Montiel N, Sturza D, et al. Evaluation in cattle of fiber-modified adenovirus vector-vaccine against foot-and-mouth disease[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2015, 23(2):125-136.
- [20] 高鹏. 0型 FMDV 多基因重组腺病毒的载体构建及免疫评[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.
- [21] 李河林. 猪瘟病毒重组腺病毒载体疫苗的构建及免疫保护试验[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [22] Sun Y, Tian D Y, Li S, et al. Comprehensive evaluation of the adenovirus/alphavirus-replicon chimeric vector-based vaccine rAdV-SFV-E2 against classical swine fever[J]. *Vaccine*, 2013, 31(3):538-544.
- [23] Zhou J X, Xue J D, Yu T, et al. Immune responses in pigs induced by recombinant canine adenovirus 2 expressing the glycoprotein 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *Vet Res Commun*, 2010, 34(4):371-380.
- [24] Wang Y, Yuan J, Cong X, et al. Generation and Efficacy Evaluation of a Recombinant Pseudorabies Virus Variant Expressing the E2 Protein of Classical Swine Fever Virus in Pigs[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2015, 22(10):1121-1129.
- [25] Chen Y, Guo W, Xu Z, et al. A novel recombinant pseudorabies virus expressing parvovirus VP2 gene: Immunogenicity and protective efficacy in swine[J]. *Virology*, 2011, 8:307.
- [26] 张丽. 共表达 FMDV P1-2A, 3C 基因重组 PRV TK⁻ 转移载体的构建及表达[D]. 长春: 吉林大学, 2007.
- [27] Qiu H J, Tian Z J, Tong G Z, et al. Protective immunity induced by a recombinant pseudorabies virus expressing the GP5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in piglets[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 106(3-4):309-319.
- [28] Zheng L L, Guo X Q, Zhu Q L, et al. Construction and immunogenicity of a recombinant pseudorabies virus co-expressing porcine circovirus type 2 capsid protein and interleukin 18[J]. *Virus Res*, 2015, 201:8-15.
- [29] Xu G, Xu X, Li Z, et al. Construction of recombinant pseudorabies virus expressing NS1 protein of Japanese encephalitis (SA14-14-2) virus and its safety and immunogenicity[J]. *Vaccine*, 2004, 22(15-16):1846-1853.
- [30] Hong Q, Qian P, Li X M, et al. A recombinant pseudorabies virus co-expressing capsid proteins precursor P1-2A of FMDV and VP2 protein of porcine parvovirus: a trivalent vaccine candidate[J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(11):1677-1683.
- [31] 邓晓辉. 共表达猪细小病毒 VP2 和猪圆环病毒 2 型 Cap 的重组伪狂犬病毒的构建及其鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- [32] Zhang K, Huang J, Wang Q, et al. Recombinant pseudorabies virus expressing P12A and 3C of FMDV can partially protect piglets against FMDV challenge [J]. *Res Vet Sci*, 2011, 91(1):90-94.
- [33] Esaki M, Noland L, Eddins T, et al. Safety and efficacy of a turkey herpesvirus vector laryngotracheitis vaccine for chickens[J]. *Avian Dis*, 2013, 57(2):192-198.
- [34] 李奇蒙. 表达 IBDV_{VP2} 蛋白的 rHVT 的构建及其免疫保护评价[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- [35] Gao H, Cui H, Cui X, et al. Expression of HA of HPAI H5N1 virus at US2 gene insertion site of turkey herpesvirus induced better protection than that at US10 gene insertion site[J]. *PLoS One*, 2011, 6(7):e22549.
- [36] 曹有才. 表达 H9 亚型禽流感病毒 HA 基因重组新城疫病毒的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2009.
- [37] Ge J, Deng G, Wen Z, et al. Newcastle disease virus-based live attenuated vaccine completely protects chickens and mice from lethal challenge of homologous and heterologous H5N1 avian influenza viruses [J]. *J Virol*, 2007, 81(1):150-158.
- [38] 葛金英, 温志远, 高宏雷, 等. 表达传染性法氏囊病毒超强毒流行株 VP2 基因重组新城疫病毒 LaSota 疫苗株的构建[J]. *中国农业科学*, 2008(1):243-251.
- [39] Kanabagatte B M, Kumar S, Khattar S K, et al. A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing infectious laryngotracheitis virus (ILT_V) surface glycoprotein D protects against highly virulent ILTV and NDV challenges in chickens[J]. *Vaccine*, 2014, 32(28):3555-3563.
- [40] 张挺杰, 刘星, 孙涛, 等. 表达猪圆环病毒 2 型 ORF2 基因的重组猪繁殖与呼吸综合征病毒的构建与鉴定[J]. *病毒学报*, 2015(1):65-73.
- [41] Zhang T, Liu X, Sun T, et al. Construction and identification of a recombinant PRRSV expressing ORF2 of porcine circovirus type 2[J]. *Bing Du Xue Bao*, 2015, 31(1):65-73.
- [42] Jeeva S, Lee J A, Park S Y, et al. Development of porcine respiratory and reproductive syndrome virus replicon vector for foot-and-mouth disease vaccine [J]. *Clin Exp Vaccine Res*, 2014, 3(1):100-109.
- [43] Xu Y Z, Zhou Y J, Tong W, et al. [Study on using NSP2 protein of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HuN4-F112) to express E2 neutralizing epitope of classical swine fever virus] [J]. *Bing Du Xue Bao*, 2013, 29(1):17-25.
- [44] 吴家强. 猪繁殖与呼吸综合征病毒分子遗传变异与疫苗研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2008.
- [45] 张淼丹. 重组 PRRSV ORF5 基因减毒猪霍乱沙门氏菌 C78-1 生物学及免疫学特性初步研究[D]. 洛阳: 河南科技大学, 2014.
- [46] 程渝. PEDV S 蛋白抗原表位基因重组减毒沙门氏菌的构建及免疫原性研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2012.

最严环保政策下小型畜禽养殖场的“破”与“立”

肖 湘¹, 谢华梅²

(1. 湖南省网岭监狱, 湖南 株洲 412307;
2. 湖南博海牧乐生物科技有限公司, 湖南 长沙 410019)

摘要: 介绍了在畜禽养殖污染与环境保护日益冲突的形势下, 新出台环保政策对小型畜禽养殖场的影响, 并分析小型畜禽养殖场在新的环保要求下如何寻找突破口, 通过环境保护、技术革新和规模提升, 从而实现小型畜禽养殖场的“破”与“立”。

关键词: 环保; 污染; 畜禽养殖场; 小规模

中图分类号: S812.95

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2016)04-0006-03

Development of the Small-scale Livestock and Poultry Farms under the Strict Environmental Protection Policy

XIAO Xiang¹, XIE Huamei²

(1.Prison of Wangling in Hunan, Zhuzhou 412307, China; 2.Hunan Vast Ocean Shepherd Biological Technology Co., Ltd, Changsha 410019, China)

Abstract: The article introduces the impact of the new environmental protection policy on small-scale livestock and poultry farms with the conflict between livestock pollution and environmental protection increasingly, and analyzes the small-scale livestock and poultry farms how to find a breakthrough in the new environmental requirements. Small-scale livestock and poultry farms can break stereotypes and achieve new development by protecting environment, innovating technology, enhancing the scale.

Key words: environmental protection; pollution; livestock and poultry farms; small scale

随着生活水平的提高, 人们对肉类的消费需求越趋旺盛, 供需倒逼促进了我国畜禽养殖业的高速发展。然而, 畜禽养殖业污染的管控相对滞后, 相关政策法规尚不完善, 因畜禽养殖业导致的环境污染问题日趋严重。相关数据表明, 1头生猪1年的排污量相当于1个人排污量的3.4倍; 2014年调查的全国畜禽养殖业的化学需氧量、氨氮排放量分别达到289.4万t、28.7万t, 分别占全国相应总量的12.61%、12.03%, 占农业源的26.25%、38.01%, 畜禽养殖已经成为我国环境污染的重要污染源^[1]。畜禽养殖与环境保护之间的矛盾越来越尖锐, 在此形势下, 2015年1月1日

国家新修订的《环境保护法》正式实施, 重拳打击畜禽养殖业污染。面对史上“最严格”的环保法规, 畜禽养殖业尤其是小型养殖场如何实现转型与突破成为行业寻求持续发展的关键。

1 新《环境保护法》对畜禽养殖业的影响

1.1 畜禽养殖成本增加

为加强污染防控, 源头控制是关键, 这必然导致畜禽养殖业在环保上的投入增加。据估算, 2009年重庆市规模化畜禽养殖的平均每个出栏猪单位的外部环境成本高达99.86元^[2]。目前, 根据环保的要求, 猪场建设环保投入比重已占40%~50%。在2015年新出台的环保政策标准下, 未来生猪养

收稿日期: 2016-06-10

作者简介: 肖湘(1987-), 男, 硕士, E-mail: manbuchuifeng@163.com

殖成本将再创新高,生猪成本价或将从行业公认的13元/kg上涨至14元/kg。

1.2 规模化养殖水平提高

目前我国畜禽养殖仍然以散养为主^[3],传统养殖方式大量冲水放大污染源,极大地增加了污水总量和治污成本。最严环保法虽然不等于“禁养令”,但在很大程度上制约了小型养殖场的发展。在行情、环保政策等多重压力下,在“互联网+”的风暴冲击中,养殖业已经进入高成本、高竞争、高效率的微利时代。养殖风险一方面促使大量的小散养殖户退出养殖业,另一方面促使养殖企业转型升级。我国农户散养的比例正逐渐缩小,规模化逐渐成为未来生猪养殖的发展趋势,并将成为农村生猪养殖的主力军^[4]。随着养殖规模的逐渐扩大,畜牧业加速集中到少数的大农场和养殖场^[5]。规模化养殖有利于促进产业化发展,推动标准化生产,有利于增加经济效益,增强风险抵御能力。在畜禽规模养殖优势、国家政策扶持共同推动下,养殖规模化趋势是我国畜禽产业发展的必然选择。

1.3 养殖产业区域转移

根据国家环保政策的要求,各省区陆续出台畜禽养殖区域划分相关规定,将所在行政区域划分为畜禽禁养区、退养区和适养区。通过政策法规的限定,对畜禽养殖业的区域发展进行规范引导,有利于推动畜禽养殖产业升级,促进产业的转移发展。研究表明,通常饲料产地的养殖规模要比其他传统的地区高。随着我国生猪养殖业规模化水平的提升,生猪养殖区域将向黄淮流域的玉米、小麦主产区,东北粮食主产区转移,经济发达地区养猪业将向山区、周边地区转移^[6]。养殖区域的划分进一步推动了养殖产业向饲料原料产区、山区边远地区等适养区域转移。

2 应对措施

根据国家生态文明建设理念的要求,为促进畜牧业健康持续发展,必须坚持“发展中保护、保护中发展”,以推动农牧结合、种养平衡、循环利用为根本手段,提高农业资源综合利用效益,减少污染物排放,推动行业转型升级。

2.1 源头控制,降低粪水排放总量

畜禽养殖场粪污主要来源于消化饲料后的排泄物,其中包含已消化和未消化的饲料以及冲洗粪便后形成的粪水,源头控制粪水排放量可多方

面着手。

2.1.1 污染物减量 首先要提高饲料的消化利用率,并减少重金属、抗生素的使用,尽量使用环保型饲料;其次改变传统粪便清扫模式,采用水泡粪、机械干清粪、高压冲洗等方式为主导,水冲粪作辅助的运作模式,尽量控制生产用水,减少养殖过程中的用水量;再次,优化养殖场管道网设计,参考城市管道分流设计进行雨污分流,对于场内污水深度处理后全部回用于场内粪沟或圈栏等冲洗,重复利用无排放。

2.1.2 粪便资源化利用 可利用猪粪进行厌氧发酵产生沼气,沼气渣则作种植肥料使用,根据国家农业畜牧及环保的要求,每出栏1万头生猪需配备66.7 hm²土地消纳^[7]。也可应用固液离心机处理粪污,干燥处理的粪渣可作为燃料使用,纯固体粪便可用于堆肥、栽培基质、牛床垫料、养殖蚯蚓蝇蛆等。

2.1.3 污染物实施养治分离 引入第三方公司集中对养殖业废水进行收集并固液分离,实现畜禽养殖零排放。仙桃市畜禽粪污综合利用的PPP模式,即主要由政府投资建设粪污处理和运输设施设备,由养殖户主出钱建设干粪池、三级沉淀池及粪水存储池,由合作社出力负责粪水处理和还田利用^[8],是粪污集中处理、污染物养治分离的成功案例。

2.2 技术革新,创新畜禽养殖模式

根据建设中国美丽乡村的需求实际,解决畜牧业环境污染问题,关键是要建立养种间的平衡。农牧结合、林牧结合、果牧结合、渔牧结合、牧菜结合等多种生态养殖模式,强化畜禽粪便无害化处理与综合利用,可实现显著的污染物减排效果和良好的经济效益^[9]。例如猪场和农田进行配套,实行“生态养殖+沼气+绿色种植”、“猪—沼—果(菜)”等循环经济生产模式;利用高架网床养殖模式,生产全程免水冲洗,达到无污水排放,猪生长环境清洁、舒适,提高了生长速度,缩短了出栏期达10~15 d^[10];利用生物发酵床养猪技术^[11]可实现零排放、无污染,节省人力物力,提高动物免疫力,改善肉质效果明显。此外,可利用生态农业,结合都市休闲旅游发展特色养殖,生态休闲农业亲子游成为新热点^[12]。同时,可借鉴国外养殖的先进经验与理念。智能农场建设已应用于丹麦养猪场,如利用猪场混合通风系统自动控制猪舍通风,将

猪舍内产生的臭气在排入大气前先进入空气过滤器,使得氨气、臭气排放量分别减少 75%和 50%,从而保证猪场获得环保许可证^[13]。

2.3 规模养殖,增强规范发展水平

规模养殖是现代畜牧业的重要标志,是畜牧业的引领力量,也是我国畜牧业各项工作的重要抓手^[14]。在“史上最严环保法”的新形势下,养猪业迎来了史无前例的禁养、限养和猪场拆迁大潮。这部零容忍的法律提升了养殖业准入门槛,使得很多污染严重和治污不达标的小猪场纷纷退出养殖业^[15]。在养猪行业 6000 万从业者中,绝大部分是农户以及养殖 10~100 头基础母猪的养殖户。在未来很长时间内,规模经济仍将驱动我国生猪产业的转型发展,有 56%的小规模生产者随时可能退出生猪行业,这个空间需要规模化养殖者来弥补^[16]。规模化养殖通过降低购进的饲料原料价格,减少养殖的饲料成本;通过自繁自育,在保证仔猪品质的同时,大大减轻补栏的资金压力;通过建立公共卫生防疫体系,实行严格的养殖、卫生防疫和环境控制标准,有效防止动物疫病,减少生猪死亡损失费用。政府应通过涉农资金重点支持标准化养殖小区建设,扶持小规模生猪养殖,发挥资本对劳动的替代优势,鼓励和引导散养农户向适度规模养殖过渡。规模化养殖有利于提高我国生猪养殖产业的市场竞争力,进一步缓解小生产与大市场之间的矛盾,提高生猪产业化经营水平。

3 结语

畜禽养殖业是既消耗资源又污染环境的行业之一,随着养殖业的发展,其对环境的污染也越来越大,因此在最严环保政策下,畜禽养殖产业向资源节约型和环境友好型发展更为迫切。小型畜禽养殖场的未来必须立足采用科学的适合当地的畜

禽生产工艺,选择恰当的养殖模式和适度的养殖规模,多点分散,走生态可持续的养殖之路,实现“破”与“立”,才是畜禽养殖产业稳定、健康、可持续发展的重要保证。

参考文献:

- [1] 环境保护部. 全国环境统计公报(2014 年)[R]. 2015.
- [2] 郭晓. 规模化畜禽养殖业控制外部环境成本的补贴政策研究[D]. 重庆:西南大学, 2012.
- [3] 王松伟. 农户生猪养殖不同规模的成本研究[D]. 重庆:西南大学, 2011.
- [4] 王奎. 生猪养殖规模及效益分析[D]. 重庆:西南大学, 2010.
- [5] Bishwa A, Steve H, Gerald S. Regional competitive position of pork industry[A]. American Agricultural Economics Association Annual Meeting[C]. Denver, Colorado, 2004.
- [6] 冯永辉. 我国生猪生产结构模式的特点及利弊分析[J]. 畜牧市场, 2006(12):17-19.
- [7] 《中国畜牧业》编辑部. 畜禽养殖粪污处理与综合利用技术模式(一)[J]. 中国畜牧业, 2016(1):46-49.
- [8] 《中国畜牧业》编辑部. 畜禽养殖粪污处理与综合利用技术模式(二)[J]. 中国畜牧业, 2016(2):35-38.
- [9] 孟祥海, 周海川, 张郁, 等. 农牧渔复合生态养殖系统能值分析[J]. 生态与农村环境学报, 2016, 32(1):133-142.
- [10] 邓锦, 毕朝斌. 一种自主创新的高架床生态养猪模式[J]. 中国畜牧业, 2016(3):78-79.
- [11] 郭秀山. 新型环保养猪模式 生物发酵床养猪技术简介[J]. 中国猪业, 2008(9):45-48.
- [12] 邓蓉. 周末带上孩子去宁乡和小花猪玩耍[N]. 潇湘晨报, 2016-5-22.
- [13] 刘宇. 丹麦养猪业现状与环保理念[J]. 猪业科学, 2016, 33(2):28.
- [14] 马有祥. “十三五”规划解读:新常态下我国畜牧业发展战略分析[J]. 2016(1):16-21.
- [15] 李锦田, 张家桂. 浅析中国规模养猪准入[J]. 湖南畜牧兽医, 2016, 191(1):4-6.
- [16] 周开锋. 中国养猪业现状及中小猪场转型之路[J]. 北方牧业, 2016(1):7.



(上接第 5 页)

[47] 赵红妮. 表达 PCV2 Cap 蛋白减毒鼠伤寒沙门氏菌活载体疫苗的构建及动物免疫试验[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2011.

[48] 许信刚, 王丹, 童德文. 表达猪瘟病毒 E2 蛋白重组减毒鼠伤寒沙门氏菌活载体疫苗株的构建及动物免疫试验[J]. 中国兽医科学, 2011(9):901-906.

[49] 曹海鹏, 王红宁, 张安云, 等. 乳酸菌活载体疫苗研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2014(9):258-264.

伪狂犬病毒 gB 基因的研究进展

邹伟斌, 陈晓珍, 陈丹, 谢少霞, 朱炜斌, 齐冬梅
(广东永顺生物制药股份有限公司, 广东 广州 511356)

摘要: 伪狂犬病毒 (Pseudorabies virus, PRV) 主要感染猪, 能够引起感染动物的死亡和流产, 给世界养猪业带来了严重危害。随着分子生物学的发展, 伪狂犬病毒的研究取得了显著进展。综述了 PRV 的主要保护性抗原基因 gB 的结构特点和功能研究进展以及其编码的糖蛋白 gB 在 PRV 疫苗研究和伪狂犬病防控研究中取得的进展。

关键词: 伪狂犬病毒; gB 基因; PCR 检测; ELISA 检测; 基因工程疫苗

中图分类号: S852.65[†].1

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2016)04-0009-05

Research Progress of gB Gene in Pseudorabies Virus

ZOU Weibin, CHEN Xiaozhen, CHEN Dan, XIE Shaoxia, ZHU Weibin, QI Dongmei
(Guangdong Winsun Bio-pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 511356, China)

Abstract: Pseudorabies virus (PRV), which affects mainly swine, can cause mortality and lost productivity of infected animal. With the development of molecular biology, the research of PRV has made significant progress in recent years. There is a review of gB gene which is the main protective antigen gene of PRV, including the structure characteristics and the function research progress, and the progress of its coding glycoprotein B (gB) in the research of PRV vaccine and controlling PR.

Key words: pseudorabies virus; gB gene; PCR detection; ELISA detection; genetic engineering vaccine

伪狂犬病毒 (Pseudorabies virus, PRV) 属于疱疹病毒科 (Herpesviridae)、 α 疱疹病毒亚科 (Alphaherpesvirinae)、水痘病毒属 (Varicellovirus), 也称为猪疱疹病毒 I 型 (Suid herpesvirus type I)。PRV 能够引起家畜和多种野生动物的伪狂犬病, 又名奥耶斯基氏病 (Aujeszky's disease, AD)。猪感染伪狂犬病后, 主要表现为仔猪的高死亡率和母猪的繁殖障碍。目前, 伪狂犬病在全球范围内广泛流行, 给世界养猪业带来了严重危害, 造成了巨大的经济损失。虽然一些国家通过使用 gE 缺失疫苗和区分感染与疫苗接种动物 (differentiating infected from vaccinated animals, DIVA) 的策略已经根除了商品猪群中的伪狂犬病, 但是伪狂犬病仍然是许多

国家中最重要的猪病之一, 尤其是在猪群密集的国家 (包括中国)。2011 年以来, 新的 PRV 变异致病病毒株在我国许多地区流行, 伪狂犬病的情况进一步恶化^[1]。gB 基因是 PRV 的主要保护性抗原基因之一, 与 PRV 的感染过程密切相关, 其表达的糖蛋白 gB 能够刺激机体产生中和抗体和病毒特异性的细胞免疫应答反应。本文通过对 PRV gB 基因的结构特点和功能以及 gB 基因在 PRV 疫苗研究和伪狂犬病防控研究中的应用进行综述, 为 PRV 疫苗的研发以及伪狂犬病的防控提供一定的参考。

1 PRV 的特征和基因组结构

1.1 PRV 的特征

PRV 病毒粒子呈椭圆形或圆形, 由核心、衣壳

收稿日期: 2016-06-27

作者简介: 邹伟斌 (1989-), 男, 硕士, 兽医师, E-mail: weibinzousysu@126.com

和囊膜 3 部分组成。核心直径约为 75 nm,核衣壳直径为 105~110 nm,包裹囊膜的完整病毒粒子直径约为 150~180 nm。核衣壳呈 20 面体对称,由 162 个壳粒组成,每一壳粒内含亚单位^[2]。PRV 囊膜表面有长约 8~10 nm、呈放射状排列的纤突,与病毒的感染有密切的关系。没有囊膜的裸露核衣壳也具有感染性^[3],但其感染力比带有囊膜的成熟病毒粒子的感染力约低 4 倍^[4]。

1.2 PRV 的基因组结构

PRV 的基因组为线状双链 DNA,大小约 143 kb,其 G+C 含量高达 74%,包含至少 72 个基因,编码至少 70 个蛋白^[5-6]。PRV 基因组排列成两个独特的蛋白编码区,即长独特区 (U_L) 和短独特区 (U_S)。 U_S 的两侧分别是内部重复序列 (IR) 与末端重复序列 (TR)^[7]。到目前为止,已有 11 种糖蛋白被鉴定,分别为糖蛋白 gB、gC、gD、gE、gG、gH、gI、gK、gL、gM 和 gN,编码这些蛋白的基因已被测序^[5]。其中,编码糖蛋白 gB、gD、gH、gK 和 gL 的基因为 PRV 复制所必需的。11 种糖蛋白基因除 gG 外,其他编码的糖蛋白均为 PRV 病毒粒子的结构成分。PRV 基因组的 U_L 区段中含有编码糖蛋白 gB、gC、gH、gK、gL、gM、gN、胸苷激酶 (TK)、DNA 结合蛋白 (DBP)、DNA 聚合酶 (POL) 和主衣壳蛋白 (MCP) 基因等;在 U_S 区段的基因是 gD、gE、gG、gI、蛋白激酶 (PK)、11K 和 28K 蛋白基因。gB、gC、gD、gE 和 gI 与病毒的毒力有关,此外,PK 和 TK 基因也与 PRV 的毒力密切相关,其中 TK 是 PRV 最主要的毒力基因^[8]。gB、gC、gD 基因与病毒的免疫诱导有关。

2 gB 基因的结构及其在 PRV 中的作用

2.1 gB 基因的结构特征

gB 基因位于 PRV 基因组的 U_L 区,在疱疹病毒成员中属于最保守的糖蛋白基因,在不同的疱疹病毒之间,糖蛋白 gB 的功能是可以相互取代的。gB 基因的 ORF 全长为 2742 bp,编码 913 个氨基酸,N 端的前 58 个氨基酸为糖蛋白 gB 的信号肽序列。gB 基因编码的糖蛋白 gB 以由二硫键连接构成的三聚糖蛋白复合体的形式存在,即 gBa (855aa, 59~913aa)、gBb (444aa, 59~502aa) 和 gBc (411aa, 503~913aa),其中,gBb 和 gBc 是 gBa 剪切后的产物^[9]。

2.2 gB 基因在 PRV 中的作用

PRV 的 gB 基因是病毒粒子结构蛋白编码基因,其编码的糖蛋白 gB 是病毒囊膜的主要成分之

一,也是 PRV 重要的中和抗原,能够刺激机体产生病毒特异性体液免疫和细胞免疫反应。gB 基因与病毒的毒力有关,gB 基因缺失的 PRV 由于丧失穿透能力而失去感染性。gB 基因与 PRV 感染细胞密切相关,其编码的糖蛋白 gB 参与病毒的入侵宿主细胞过程,与细胞融合有关。三聚体的糖蛋白 gB 被认为是疱疹病毒的核心融合蛋白,因为它与其他第三类病毒融合蛋白具有很高的结构同源性,如泡性口膜炎病毒 (VSV) 的糖蛋白 G^[10],gB 有效地诱导膜融合还需要 gH/gL 的参与^[11]。

对于许多囊膜病毒,囊膜表面的单个糖蛋白与受体结合后,在核体内的酸性环境中发生 pH 依赖性的构象变化,从而使病毒的双分子层靠近宿主细胞膜,促进膜融合。然而,疱疹病毒的入侵与膜融合需要病毒粒子的 3 个糖蛋白参与,即 gB 和 gH/gL 二聚体,它们发挥着“核心融合机器 (Core fusion machinery)”的功能^[12]。Klupp 等^[13]研究发现,分别缺失 gB、gD、gH 或 gL 的变异 PRV 病毒粒子在入侵过程中均不能与细胞质膜发生融合,表明 PRV 的糖蛋白 gD 参与了 gB 和 gH/gL 诱导的病毒融合过程。糖蛋白 gD 作为一种受体结合蛋白与细胞表面的受体结合从而激发 gB 和 gH/gL 与细胞发生融合。一些细胞,如兔细胞的表面存在 gB 或 gH/gL 的受体,在不需要 gD 存在的条件下,PRV 也能与细胞发生融合^[14]。另外,gC 在 gB 参与的 PRV 膜融合早期过程发挥了重要作用^[15],PRV 病毒粒子最初结合到细胞表面蛋白聚糖的硫酸肝素上是由 gC 介导完成的^[16]。

3 gB 基因在伪狂犬病防控研究中的应用

gB 基因编码的糖蛋白 gB 是 PRV 囊膜的主要成分之一,也是病毒主要保护性抗原,能够刺激机体产生中和抗体和病毒特异性细胞免疫应答反应。因此,gB 基因常用于 PRV 的 PCR 检测方法、间接 ELISA 方法和基因工程疫苗的研究。

3.1 gB 基因在 PRV 的 PCR 检测方法研究中的应用

目前,gB 基因用于 PRV PCR 检测的研究十分活跃。范克伟等^[17]和李艳等^[18]分别建立了 PCR 扩增 gB 和 gE 基因双重 PCR 检测方法,用以区分 PRV 野毒株和疫苗毒株,该方法可用于猪伪狂犬病野毒感染的快速诊断和流行病学调查。田青等^[19]和朱淑芬等^[20]分别建立了 PRV gB 基因的 Taq Man 荧光定量 PCR 方法,比常规 PCR 检测方法灵敏度高

100 倍以上,并且重复性好,为临床上对 PRV 的定量检测奠定了基础。杨红杰等^[21]和高嘉聪等^[22]分别建立了伪狂犬病毒 gB 基因的 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法,均有很好的敏感性、重复性和特异性,可用于研究病毒的复制动态或临床样品的检测。随着纳米 PCR 技术的出现及应用,PRV gB 基因等的纳米 PCR 检测方法也可用于鉴别 PRV 强弱毒株。Ma 等^[23]建立了分别扩增 gB、gE 和 gG 3 个基因的纳米 PCR 检测 PRV 强弱毒方法,该方法灵敏度高,对 PRV 感染的早期检测、野毒株和疫苗株的鉴别、疾病控制等有重要意义,而且也可以用于其他动物 PRV 感染的检测和早期诊断。

3.2 gB 基因在 PRV 的 ELISA 检测方法研究中的应用

gB 基因是 PRV 中十分保守的糖蛋白基因,糖蛋白 gB 的蛋白序列上存在多个抗原表位^[24],且具有良好的免疫原性,能够刺激机体产生中和抗体。检测猪血清中的 gB 抗体可用于 PRV 疫苗免疫效果的评价。杨涛涛等^[25]研究发现,gB-ELISA 抗体水平与 PRV 中和抗体效价有很好的相关性,表明 gB-ELISA 抗体水平可以用来评估生猪对当前流行 PRV 毒株的相对免疫保护力。因此,gB 基因是 PRV 的 ELISA 检测方法研究中良好的选择基因。

包新奇等^[26]完成了 PRV gB 基因在大肠杆菌中的分段表达,以获得的重组蛋白建立的间接 ELISA 方法与 IDEXX 公司的符合率较高。刘崇灵^[26]对 PRV gB 基因的主要抗原区域进行亲疏水性等分析,并根据表位分布将其分成 4 段克隆至原核表达载体,利用原核表达系统成功表达了 4 个重组蛋白,选出最适蛋白 gB3 作为抗原建立的 ELISA 检测方法具有很高的敏感性和特异性,可作为养殖场内 PRV 诊断监控的方法。王雨等^[27]将 gB 基因的主要抗原表位区大小为 768 bp 的序列克隆到原核表达载体,构建的重组表达质粒转化大肠杆菌进行表达,用纯化的重组蛋白作为包被抗原建立的间接 ELISA 检测方法具有良好的敏感性、特异性和重复性,为猪伪狂犬病疫苗免疫效果的评估奠定了基础。朱淑芬^[28]利用毕赤酵母表达系统分泌表达了 PRV gB 基因,表达的蛋白具有良好的反应原性和免疫原性,将重组蛋白 gB 作为抗原进行包被,建立了 gB-ELISA 检测方法,结果显示该方法特异性和重复性良好,可以用于 PRV gB 蛋白抗体的检测。

3.3 gB 基因在 PRV 基因工程疫苗研究中的应用

gB 基因编码的糖蛋白 gB 能够诱导机体产生中和抗体,注射抗 PRV 糖蛋白 gB 的单克隆抗体后的免疫猪和小鼠均能够抵抗 PRV 强毒株致死剂量的攻击。另外,gB 基因与病毒的感染细胞密切相关,其编码的糖蛋白 gB 参与 PRV 粒子入侵宿主细胞的过程,与细胞融合有关。因此,gB 基因是 PRV 疫苗研究的重要候选基因。

有研究阐明了以 gB 为主要抗原的 PRV DNA 疫苗能够刺激免疫动物产生有效免疫保护^[29]。早在 20 世纪 90 年代,有研究用杆状病毒表达的 gB 蛋白免疫小鼠,收集的抗体能够在体外中和 PRV,且免疫小鼠能够抵抗 PRV 的致死性攻击^[30]。之后,Takada 等^[31]构建的含 PRV gB 基因的质粒 DNA 能够使免疫小鼠通过呼吸道粘膜途径产生局部分泌性抗体,且免疫小鼠能够抵抗 PRV 致死浓度的滴鼻方式攻击。van Rooij 等^[32]以 PRV gB 基因构建的 DNA 疫苗能够诱导猪产生细胞毒性 T 细胞免疫反应,且在感染早期能够减少病毒的分泌。构建以弱毒沙门氏菌为载体携带 PRV gB 基因 DNA 疫苗的重组活疫苗,通过口服免疫小鼠能够诱导产生 Th2 型的免疫反应和粘膜免疫反应^[33],该研究为 PRV 的口服细菌活疫苗的研究奠定了一定的基础。Han 等^[34]通过对 PRV 的 3 个主要糖蛋白(gB、gC、gD)进行研究,发现 3 个蛋白都能诱导产生体液免疫和细胞介导的免疫反应。但是重组腺病毒表达 gB 基因的疫苗株保护效果最佳,能够诱导强烈的 Th1 型的体液和细胞免疫反应,能够保护免疫小鼠抵抗 PRV 感染致命的威胁。研究发现,表达 PRV gB 基因的 DNA 疫苗通过肌肉注射免疫的小鼠能够被诱导产生强烈的 PRV 特异性 IgG 反应,免疫小鼠能够抵抗 PRV 强毒的攻击;而通过鼻腔免疫的小鼠虽然能够被诱导产生系统性免疫和粘膜免疫,但免疫小鼠对于 PRV 的致死性感染不能被免疫保护^[35]。Le 等^[36]研究发现,肌肉注射表达 PRV gB 基因的质粒再结合电穿孔法能够促进抗 PRV 特异性抗体的产生,表明电穿孔法能够提高 DNA 疫苗在猪体中的免疫效果。

4 结语

gB 基因为 PRV 主要的结构蛋白基因,与 PRV 的毒力有着密切关系,gB 基因还与 PRV 病毒粒子

感染细胞密切相关,其编码的糖蛋白 gB 参与病毒入侵宿主细胞的过程,与细胞融合有关。鉴于此,研究 PRV gB 基因对于揭示疱疹病毒与宿主细胞之间的相互作用机制有着十分重要的意义,这些研究也将为阐明 PRV 及其他疱疹病毒侵染细胞的动力学以及控制该类病毒病害提供相应的依据。PRV gB 基因的高度保守性及其编码的糖蛋白 gB 能够刺激机体产生中和抗体的特性,使得 gB 基因广泛应用于 PRV 的检测方法研究。基于 gB 基因建立各类 PRV PCR 检测方法和抗体 ELISA 检测方法对于 PRV 感染的早期检测、野毒株和疫苗株的鉴别以及猪伪狂犬病疫苗免疫效果的评估表现出了良好的应用价值,为伪狂犬病的控制和清除提供了重要的基础。一些基于 gB 基因建立的新检测方法也在进一步的研究中,如 Serena 等^[37]将杆状病毒-昆虫细胞表达系统表达的重组糖蛋白 gB 作为抗原建立琼脂凝胶免疫扩散 (Agar gel immunodiffusion, AGID) 法用于检测 PRV 的抗体,该检测方法的灵敏度和特异性与病毒中和实验法相当,且其生产成本较低,可以替代病毒中和实验法用于 PRV 抗体的检测。gB 基因作为伪狂犬病疫苗研究的重要候选基因,在 PRV 的 DNA 疫苗研究中应用较为广泛。这些研究将为 PRV 新型疫苗的研发提供重要的理论依据。

参考文献:

- [1] Sun Y, Luo Y, Wang C H, et al. Control of swine pseudorabies in China: Opportunities and limitations [J]. *Veterinary Microbiology*, 2015; 183: 119-124.
- [2] 丁宜宝. 兽医疫苗学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2008.
- [3] Pomeranz L E, Reynolds A E, Hengartner C J. Molecular biology of pseudorabies virus: impact on neurovirology and veterinary medicine [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2005, 69(3): 462-500.
- [4] Enquist L W, Husak P J, Banfield B W, et al. Infection and spread of alphaherpesviruses in the nervous system [J]. *Adv Virus Res*, 1998, 51: 237-347.
- [5] Dong B, Zarlenga D S, Ren X. An overview of live attenuated recombinant pseudorabies viruses for use as novel vaccines [J]. *J Immunol Res*, 2014, 2014: 824630.
- [6] Szpara M L, Tafuri Y R, Parsons L, et al. A wide extent of inter-strain diversity in virulent and vaccine strains of alphaherpesviruses [J]. *PLoS Pathog*, 2011, 7(10): e1002282.
- [7] Olah P, Tombacz D, Poka N, et al. Characterization of pseudorabies virus transcriptome by Illumina sequencing [J]. *BMC Microbiol*, 2015, 15: 130.
- [8] 史须斌. 猪伪狂犬病毒的分子生物学研究进展 [J]. *科技致富向导*, 2012(8): 116-132.
- [9] 包新奇, 黄绍华, 刘巧荣, 等. 猪伪狂犬病毒 gB 基因在大肠杆菌中的分段表达 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012(3): 12-16.
- [10] Schulz K S, Klupp B G, Granzow H, et al. Glycoproteins gB and gH are required for syncytium formation but not for herpesvirus-induced nuclear envelope breakdown [J]. *J Virol*, 2013, 87(17): 9733-9741.
- [11] Schroter C, Klupp B G, Fuchs W, et al. The highly conserved proline at position 438 in pseudorabies virus gH is important for regulation of membrane fusion [J]. *Journal Virology*, 2014, 88: 13064-13072.
- [12] Eisenberg R J, Atanasiu D, Cairns T M, et al. Herpesvirus fusion and entry: a story with many characters [J]. *Viruses*, 2012, 4(5): 800-832.
- [13] Klupp B, Altenschmidt J, Granzow H, et al. Glycoproteins Required for Entry Are Not Necessary for Egress of Pseudorabies Virus [J]. *J Virol*, 2008, 82(13): 6299-6309.
- [14] Klupp B G, Nixdorf R, Mettenleiter T C. Pseudorabies virus glycoprotein M inhibits membrane fusion [J]. *J Virol*, 2000, 74(15): 6760-6768.
- [15] Connolly S A, Jackson J O, Jardetzky T S, et al. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(5): 369-381.
- [16] Bohm S W, Eckroth E, Backovic M, et al. Structure-based functional analyses of domains II and III of pseudorabies virus glycoprotein H [J]. *J Virol*, 2015, 89(2): 1364-1376.
- [17] 范克伟, 戴爱玲, 吴德峰, 等. 猪伪狂犬病毒野毒感染的 PCR 检测方法建立及应用 [J]. *家畜生态学报*, 2015(10): 66-69.
- [18] 李艳, 李段, 向蓉, 等. 猪伪狂犬病病毒双重 PCR 鉴别方法的建立 [J]. *广东农业科学*, 2015(17): 130-133.
- [19] 田青, 郑浩, 童武, 等. 伪狂犬病毒实时荧光定量 PCR 方法的建立 [J]. *中国动物传染病学报*, 2015(3): 1-6.
- [20] 朱淑芬, 朱瑞良, 乔彩霞, 等. 检测伪狂犬病毒 gB 基因荧光定量 PCR 方法的建立 [J]. *中国兽医学报*, 2012(10): 1413-1417.
- [21] 杨红杰, 于长青, 林树伯, 等. 伪狂犬病病毒 gB 基因荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. *北京农学院学报*, 2015(3): 48-51.
- [22] 高嘉聪, 叶超, 赵款, 等. 猪源伪狂犬病病毒 gB 基因 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国兽医科学*, 2015(11): 1166-1170.
- [23] Ma X, Cui Y, Qiu Z, et al. A nanoparticle-assisted PCR assay to improve the sensitivity for rapid detection and differentiation of wild-type pseudorabies virus and gene-deleted vaccine strains [J]. *J Virol Methods*, 2013, 193(2): 374-378.
- [24] Zaripov M M, Morenkov O S, Shmatchenko V V, et al. Immunological and functional characteristics of epitopes and regions of gB glycoprotein of Aujeszky's

- disease virus][J]. Vopr Virusol, 2001, 46(2):41-45.
- [25] 杨涛涛,刘崇灵,刘晓波,等. 生猪伪狂犬病毒 gB 抗体与中和抗体的相关性分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2015(3):303-306.
- [26] 刘崇灵. 猪伪狂犬病毒 gB 基因的原核表达及其间接 ELISA 方法的建立[D]. 长沙:湖南农业大学, 2014.
- [27] 王雨,吉艺宽,程艺,等. 伪狂犬病毒 gB 基因的原核表达及间接 ELISA 方法的建立[J]. 动物医学进展, 2015(6):19-23.
- [28] 朱淑芬. 伪狂犬病毒 gB 基因在毕赤酵母中的表达及初步应用[D]. 泰安:山东农业大学, 2012.
- [29] Yoon H A, Aleyas A G, George J A, et al. Differential segregation of protective immunity by encoded antigen in DNA vaccine against pseudorabies virus[J]. Immunol Cell Biol, 2006, 84(6):502-511.
- [30] Xuan X, Nakamura T, Ihara T, et al. Characterization of pseudorabies virus glycoprotein gII expressed by recombinant baculovirus[J]. Virus Res, 1995, 36(2-3):151-161.
- [31] Takada A, Okazaki K, Kida H. Protective effects of intranasal vaccination with plasmid encoding pseudorabies virus glycoprotein B in mice[J]. Jpn J Vet Res, 1999, 47(1-2):25-33.
- [32] van Rooij E M, Haagmans B L, Glansbeek H L, et al. A DNA vaccine coding for glycoprotein B of pseudorabies virus induces cell-mediated immunity in pigs and reduces virus excretion early after infection[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2000, 74(1-2):121-136.
- [33] Eo S K, Yoon H A, Aleyas A G, et al. Systemic and mucosal immunity induced by oral somatic transgene vaccination against glycoprotein B of pseudorabies virus using live attenuated Salmonella typhimurium[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006, 47(3):451-461.
- [34] Han Y W, Aleyas A G, George J A, et al. Polarization of protective immunity induced by replication-incompetent adenovirus expressing glycoproteins of pseudorabies virus[J]. Exp Mol Med, 2008, 40(6):583-595.
- [35] Yoon H A, Han Y W, Aleyas A G, et al. Protective immunity induced by systemic and mucosal delivery of DNA vaccine expressing glycoprotein B of pseudorabies virus[J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(3):591-599.
- [36] Le Moigne V, Cariolet R, Beven V, et al. Electroporation improves the immune response induced by a DNA vaccine against pseudorabies virus glycoprotein B in pigs[J]. Res Vet Sci, 2012, 93(2):1032-1035.
- [37] Serena M S, Geisler C, Metz G E, et al. Production of pseudorabies virus recombinant glycoprotein B and its use in an agar gel immunodiffusion (AGID) test for detection of antibodies with sensitivity and specificity equal to the virus neutralization assay[J]. J Virol Methods, 2016, 230:9-12.

我国构建现代畜禽育种体系

畜禽种业是国家战略性、基础性核心产业,是畜牧业生产的基础。在畜禽养殖过程中,饲料营养进展、现代设施设备、先进技术工艺等只有借助优良的品种才能切实提高生产效率。现阶段,畜禽良种对畜牧业发展的贡献率超过 40%,从一定意义上说,畜牧业的核心竞争力主要体现在畜禽良种上。加快发展畜禽种业,是建设现代畜牧业的内在要求,是提高畜牧业生产水平和生产效率的重要途径,对于加快畜牧业转型升级、提升综合竞争力意义重大。

从国外引进到主动创新

我国畜禽种业发展至今,经历了起步、发展和转型 3 个阶段,在不断转型中取得很多了不起的成就。总体来看,在市场拉动、政策支持、科技带动下,我国畜禽种业走过了国外引进、被动育种、主动创新的发展阶段。

1994 年之前,我国畜牧业生产所用的良种主要来源于我国地方品种资源,育种主要是对地方品种资源开发利用基础上的持续选育。

1995 年至 2007 年,为尽快缩小我国农业科技与世界先进水平的差距,国家从“九五”期间开始启动“948”计划,支持引进国外优良畜禽品种。这期间,主要是推广国外引进的高产品种来增加畜产品产量,满足城乡居民“菜篮子”产品的消费需求。每年大约从国外引进种猪 3000 头、种鸡 41 万套、种牛 4 万头、种羊 7000 只,支撑了我国畜牧业生产的快速发展。

2008 年以来,畜牧业生产从数量增长向提高质量、效益转变,畜产品消费需求呈现出多元化、差异化的趋势。为适应现代畜牧业发展需要,我国奶牛、生猪等主要畜种的遗传改良计划相继发布,畜禽种业进入进口品种国产化与自主培育品种并重的发展阶段。这些年来,通过国家畜禽遗传资源委员会审

(下接第 52 页)

浅析广东规模化养殖场节能减排技术要求

严霞^{1,2}, 郭福有^{1,2}, 李重生^{1,2}

(1. 广东省农业科学院动物科学研究所, 广东 广州 510640;

2. 广东智威农业科技股份有限公司, 广东 广州 510640)

摘要: “节能减排, 挖潜增效”是畜牧业在很长一段时间内面临的严峻挑战之一。介绍了我国畜禽养殖业环境管理相关政策法规, 以及广东省节能减排的总体要求和主要目标。结合环境部门的核查内容, 简要分析广东省规模化养殖场节能减排的技术要点, 指出了节能减排实施过程中存在的问题, 并提出相关对策建议。

关键词: 规模化养殖场; 节能减排; 干清粪; 污水处理

中图分类号: S812.95

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2016)04-0014-04

Brief Analysis on Technical Requirements of Energy Conservation and Emission Reduction of Large-scaled Farms in Guangdong

YAN Xia^{1,2}, GUO Fuyou^{1,2}, LI Chongsheng^{1,2}

(1. Institute of Animal Science, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China;

2. Guangdong WIZ Agricultural Science & Technology Co.Ltd, Guangzhou 510640, China)

Abstract: "Increasing efficiency by Energy conservation and emission reduction" is one of the most serious challenges for the animal husbandry in a long time. The paper introduced that policies and regulations on the environmental management of livestock and poultry breeding industry in China, and introduced the overall requirement and main target of energy conservation and emission reduction in Guangdong. Combined with the inspection of environmental protection departments, the paper brief analyzed on technical requirements of energy conservation and emission reduction of large-scaled farms in Guangdong, pointed out the problems of energy conservation and emission reduction in the process, and put forward the related countermeasures.

Key words: large-scaled farms; energy conservation and emission reduction; dried dung cleaning; wastewater treatment

我国 2008 年开展了第一次全国污染源普查和 2009、2010 年连续两年开展了污染源普查动态更新调查工作后, 将畜禽养殖业污染减排工作正式纳入国家“十二五”节能减排工作体系^[1], 畜禽养殖污染防治工作也正式列入了国家生态省、市、县建设考核内容。“节能减排, 挖潜增效”是畜牧业在很长一段时间内面临的严峻挑战之一。2015 年是“十二五”规划收官之年, 本单位近年所做的节能减排工作已通过环保部门的核查。结合环保部门

的核查内容, 简要分析广东省规模化养殖场节能减排的技术要点, 指出了节能减排实施过程中存在的问题, 并提出相关对策建议。

1 我国畜禽养殖业环境管理相关政策法规

在 2014 年以前, 我国还没有国家层面上专门的农业环境保护类法律法规, 仅有原环保总局 2001 年颁布的《畜禽养殖污染防治管理办法》, 但无法作为强化环境监管的依据。为有效减少环境

收稿日期: 2016-06-12

作者简介: 严霞(1976-), 女, 硕士, 助理研究员, E-mail: yanxia1@126.com

污染,国家陆续出台了《中华人民共和国农业法》、《固体废物污染环境防治法》、《中华人民共和国畜牧法》和《中华人民共和国水污染防治法》等法规,以及《畜禽养殖业污染物排放标准》、《畜禽粪便无害化处理技术规范》、《畜禽场环境污染控制技术规范》、《畜禽养殖业污染防治技术规范》、《畜禽养殖业污染物治理工程技术规范》和《畜禽粪便还田技术标准》等多个标准规范,我国的畜禽养殖业环境管理制度体系逐渐构建起来,标准规范日臻完善。2013年10月8日国务院第26次常务会议通过了《畜禽规模养殖污染防治条例》,对产业的布局选址、环评审批、污染防治配套设施建设、废弃物的处理方式和利用途径等环节作出了明确规定^[2]。该条例是我国农村和农业环保领域第一部国家级行政法规,是农村和农业环保制度建设的里程碑,对推动畜禽养殖环境问题的解决、促进畜禽养殖业健康可持续发展具有深远的意义。2015年新《环境保护法》进一步明确政府对环境保护监督管理职责,强化企业污染防治责任,补充重点污染物排放总量控制,加大对环境违法行为的法律制裁,被称为“史上最严”的环境保护法。

广东省在畜牧业节能减排工作中,已率先做出了多种的政策调整,如在全省各地陆续划分畜禽养殖的“禁养区、限养区、准养区”,2009年实施新的《畜禽养殖业污染物排放标准》,2012年出台《广东省规模化畜禽养殖场(小区)主要污染物减排技术指南》^[3]。这些宏观政策的调整,意味着畜牧业由粗放型向集约化、现代化农业转型升级,提高市场准入条件,要求规模化养殖场(小区)必须投入更多的资金和精力到节能减排工作中。

2 广东省节能减排的总体要求和主要目标

2012年《广东省“十二五”节能减排综合性工作方案》^[4]要求推动养殖废弃物的肥料化和沼气化处理,鼓励实施规模化畜禽养殖场有机肥生产利用工程;到2015年,全省规模化畜禽养殖场和养殖小区配套建设固体废弃物和污水贮存处理设施;对未实现达标排放的养殖场(小区),责令限期治理。

同年8月出台《广东省“十二五”主要污染物总量减排实施方案的通知》^[5],明确细化了农业源主要污染物排放总量控制的指标,要求2015年农业源化学需氧量和氨氮排放量比2010年分别减

少8%和10%。到2015年,年出栏量5000头以上的规模化生猪养殖场(小区)要采取“干清粪、粪便生产有机肥或粪便沼气处理、污水进行厌氧-好氧-深度处理达标排放”的模式进行治理;所有规模化养鸡场(小区)要采取“干清粪方式、粪便全部生产有机肥且无废水排放”的模式进行治理。鼓励有条件的规模化畜禽养殖场(小区)安装废水处理在线监测、固体废弃物处理设施视频监控等设备,并与环保部门联网。这与畜禽养殖污染减排总体思路提出的鼓励模式1和3相一致,达到环境保护部的《“十二五”主要污染物总量减排核算细则》^[6]要求。

3 节能减排的技术要求

按广东省节能减排的总体要求,广东省农业厅与环境保护厅于2012年5月24日共同编制出台了《广东省规模化畜禽养殖场(小区)主要污染物减排技术指南》(以下简称《指南》),作为“十二五”及今后广东省规模化养殖场(小区)实施减排的技术支撑,同时也作为农业、环保管理部门在减排工程设计、施工、运行与管理 and 环境评价等方面的技术依据^[3]。该《指南》充分体现了广东省要大力推进生态与健康养殖的强大决心,加快促进了畜牧产业转型升级的步伐。

3.1 干清粪

规模化畜禽养殖场(小区),必须采用干清粪工艺,并实现雨水和污水的分流^[3]。目前规模化养鸡场多采用刮板式清粪机、带式清粪机等机械设备或人工铲粪实现干清粪,而规模化猪场则以漏缝地板水冲粪的方式为主。由于人工干清粪需要大量的劳动力,劳动强度大,相对适合中小型养猪场采用;而大型养猪场仍需提高机械化设备装置,选择合适的干清工艺。

3.2 粪便堆肥处理

粪便堆肥还田是处理和利用畜禽粪便的最好途径(图1),特别适合粤北、粤东和粤西的山区种植地。粪便堆肥是在一定的温度、湿度等条件下,加入一定比例的辅料,经过微生物发酵作用,高温堆肥,使粪便腐熟,成为一种深褐色、质地疏松、安全又稳定的有机肥料^[7]。《指南》明确了堆肥的起始水分、温度、持续时间等技术指标,并要求固体粪渣堆肥场需防雨防渗,容积为能容纳3个月的粪渣量。猪场每出栏10头猪需配备1m³粪便堆肥场所,鸡场(小区)每出栏2000只肉鸡或每500

只存栏种(蛋)鸡需配备 1 m³ 粪便堆肥场所^[3]。畜禽场的干粪和由粪水中分离出的干物质堆肥处理

是最佳的固体粪便处置方式。

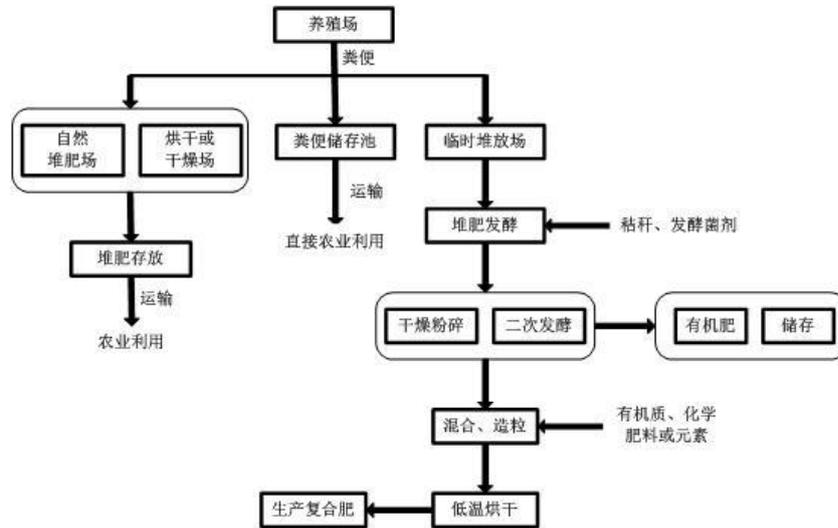


图 1 规模化养殖场粪便处理和利用的主要方式

3.3 粪便沼气处理

沼气法的原理是利用厌氧细菌的分解作用，将有机物经过厌氧消化作用转化为沼气和二氧化碳。粪便沼气既能治理环境污染，又能开发新能源，并为农户提供优质无害的肥料，从而取得综合利用效益。沼气工程发酵技术可以分为干法发酵和湿法发酵。干法发酵因其水分停留时间较短，所需的发酵装置体积只有湿法发酵的一半，但产气量却只有湿法发酵的 1/4。沼气池进出料难依然是瓶颈问题，且原料产气量不稳定，产气率仍有待提高。

3.4 污水处理

年出栏量 5000 头以上或存栏母猪 1000 头以上的规模化养猪场的污水需进行厌氧-好氧-深度处理达标排放，强调厌氧发酵生产沼气，供生产或生活用能^[3]。《指南》对污水处理每一步的工艺流程都列出了技术要点，并要求各环节的相关参数参照国家和省有关法规和技术规程的要求。工艺流程如下：干清粪格栅→沉砂池→固液分离→酸化调节池→厌氧反应器好氧处理深度处理→达标排放。规模化养殖场污水处理和利用方式见图 2。

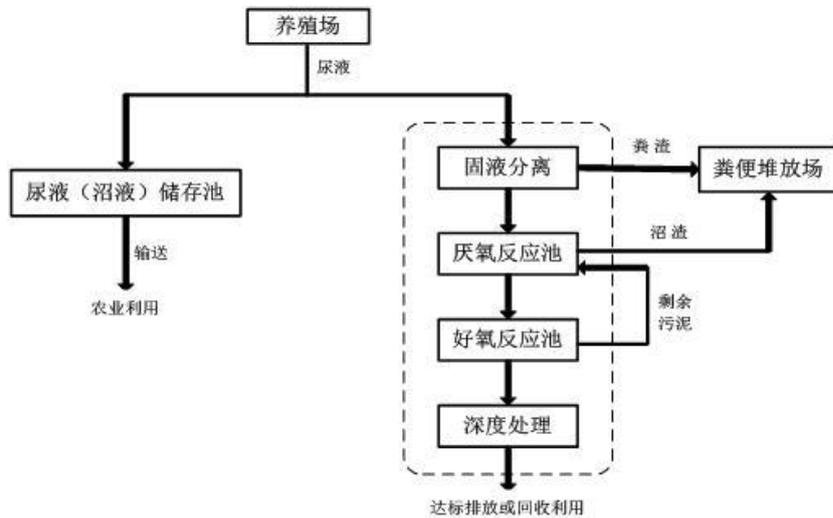


图 2 规模化养殖场污水处理和利用方式^[6]

4 节能减排核查内容要点

按照环境保护管理部门的核查要求,首先,养殖场应按相应的选项填写《规模化畜禽养殖场(小区)主要污染物减排核查表》,具体内容包括项目简介、项目排放量计算过程、新建治污工程情况、废弃物贮存处理设施情况、废弃物去向情况、资金配套情况、新建项目环评报告及验收材料等7个内容。然后,按照核查表内容逐一提供相应的台帐资料,如项目简介,主要介绍养殖场名称、地址、规模等基本情况、治污设施建设运行情况和清洁生产、综合利用措施采取情况以及减排的成效。污染治理设施有关材料包括粪污废水治理设施合同和方案、治污工艺流程图、治污现场照片、治污运行记录台帐、农田消纳证明、发票凭证。若有有机肥生产的,必须有明确的粪便出入库单、原材料采购单、有机肥出库单和销售合同证明等相关凭证材料。畜禽存、出栏的销售合同和台帐、饲料兽药疫苗购进和使用的台帐等。新建项目需提供项目选址规划、项目环评报告及验收材料,主要包括项目环境影响报告(表)、“三同时”验收登记表、环保验收表以及环评验收批复、排污许可证等文件资料。养殖场当地的农业主管部门需协助提供养殖量证明材料。最后,还需提供每季度环境部门监察记录、养殖场相关的营业证件、环保管理制度、环保应急预案等资料。

5 节能减排实施过程中存在的问题

5.1 干清粪问题

干清粪是最环保的,规模化养鸡场相对较容易实现干清粪,可采用刮板式清粪机、带式清粪机等清粪机械设备实现。但是对于养猪场而言,干清粪工艺意味着需要付出更多的劳动力,且劳动强度大。这对劳动力资源匮乏的广东地区而言,不仅需要加大人力投入,还需要寻求更符合养殖场现状的干清粪工艺设备并加大设备投入。

5.2 匹配农业土地面积问题

《指南》要求只建有储存设施,无污水排放口,粪便、污水完全农业利用,每出栏5头肉猪配套667 m²土地;建有治污设施,无污水排放口,所生产的废弃物完全农业综合利用,每出栏10头肉猪配套667 m²土地;规模化鸡场按10只存栏种(蛋)鸡、40只出栏肉鸡换算成1头出栏猪计算^[3,9]。目前要申请建设规模化养殖场合理选址用地已非常

困难,若要再申请匹配农业土地无疑更加困难。假设新建1个年存栏10万套的种鸡场,生产和配套的生活设施一般需要用地13.3 hm²即可满足生产需要,但若配套农业用地则需增加667 hm²。即新建1个年存栏10万套的种鸡场至少需要用地680 hm²。笔者认为匹配的农业土地面积更适合小规模养殖场(小区)采用;规模化养殖场在申请选址时,当地的农业和规划部门应长远地充分考虑匹配农业土地面积,将当地种植业和养殖业合理配置,使得资源利用最大化。

5.3 环保设施建设问题

规模化畜禽养殖场配套环保设施,如干清粪设备、沼气池、有机肥处理车间、废水污水贮存处理设施等,需要一次性投入数十万,甚至高达几百万。原本已是微利的畜牧产业,在畜禽产品价格不断压低和减排成本不断上涨的情况下,养殖场的运营非常艰难。虽然广东省每年对农业部认定的标准化规模养殖场、生猪核心育种场、菜篮子基地等给予一定的奖励补贴主要用于规模化、机械化、粪污无害化处理建设,同时还积极开展清洁生产、世界银行贷款等专项,但所获得的扶持资金对养殖场而言杯水车薪。此外,环保设备的后续维护也是一笔很大的开支。

5.4 环保人才问题

目前规模化养殖场的人才基本是畜牧、兽医专业方向,真正掌握畜禽场废弃物处理的资源环境保护专业人才寥寥无几,养殖场在节能减排工作中可以说是摸着石头过河。即使是通过了核查,在今后的减排工作落实中,仍需环保专业的人员做好后续工作,如指导规划设计新改建工程、运行有机肥和沼气生产、统计台帐等。

6 对策建议

6.1 合理规划,研究制定畜禽养殖污染防治补偿措施

各地政府主管部门应根据当地环境承载能力和总量控制要求,合理规划、选址、划定禁养区,优化畜禽养殖业的总体布局,做到种植业和养殖业平衡,保证畜禽废弃物最大限度的循环利用。畜禽养殖标准化是畜禽养殖业污染总量减排工作实现的重要途径,应减少散养规模,加大扶持规模化、标准化养殖场的建设。同时制定并落实因划定禁

复合亚氯酸钠熏蒸剂对鸡伤寒沙门氏菌的杀菌效果试验

冷淑珍¹, 许 详¹, 黄 元², 尹曲平¹, 郑庆禄¹

(1. 广州迈高化学有限公司, 广东 广州 510990;

2. 广东省农业科学院动物卫生研究所, 广东 广州 510640)

摘要: 测试复合亚氯酸钠熏蒸剂对鸡伤寒沙门氏菌的杀菌效果, 培养基表面涂布法测定结果表明, 熏蒸消毒后鸡沙门氏菌均全部杀灭; 玻片法测定结果表明, 该熏蒸剂对鸡沙门氏菌的杀菌率为99.995%。试验结果表明, 复合亚氯酸钠熏蒸剂熏蒸消毒对鸡沙门氏菌的杀菌效果显著。

关键词: 复合亚氯酸钠熏蒸剂; 鸡伤寒沙门氏菌; 杀菌效果

中图分类号: S852.61⁺2; S859.79⁺9.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8567(2016)04-0018-02

Bactericidal Effect of Composite Sodium Chlorite Fumigants on Fowl Typhoid Salmonella

LENG Shuzhen¹, XU Xiang¹, HUANG Yuan², YIN Quping¹, ZHENG Qinglu¹

(1. Guangzhou Mako Chemical Co., Ltd., Guangzhou 510990, China; 2. Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract We carried out the trial about the bactericidal effect of composite sodium chlorite fumigants on fowl typhoid salmonella. The result of the medium surface coating method showed that all the fowl typhoid salmonella were killed; and the result based on slide method showed that the sterilizing rate of fowl typhoid salmonella is 99.995%. The results showed that the composite sodium chlorite fumigant has a remarkable bactericidal effect on fowl typhoid salmonella.

Key words: composite sodium chlorite fumigant; fowl typhoid salmonella; bactericidal effect

鸡伤寒是由鸡伤寒沙门氏菌感染引起的败血性传染病。该病呈世界性分布, 主要危害6月龄以下的鸡, 死亡率可达10%~50%甚至更高^[1]。一旦发病, 治疗效果不佳且经济损失极大, 因此, 对该病关键在于预防, 做好空栏的鸡舍消毒工作至关重要。本试验模拟了空栏的鸡舍环境, 在环境清洁后用复合亚氯酸钠熏蒸剂对空间进行熏蒸消毒处理, 测试复合亚氯酸钠熏蒸剂对鸡伤寒沙门氏菌的杀菌效果, 以期为实际养殖生产寻找一种高效、环保的熏蒸消毒方法, 有效预防鸡伤寒。

1 材料与方

1.1 试验材料

1.1.1 消毒剂 复合亚氯酸钠熏蒸剂(商品名“力保安”), 由广州迈高化学有限公司提供。

1.1.2 细菌 鸡伤寒沙门氏菌GD株, 由广东省农业科学院动物卫生研究所分离和保存。

1.1.3 培养基 鸡伤寒沙门氏菌GD株的培养使用2×LB液体培养基和LB营养琼脂。

1.2 试验方法

1.2.1 消毒方法 进行熏蒸消毒实验^[2]时, 将所需消毒空间密闭并将相关材料准备好, 取上述消毒剂, 将B组分(固体部分)均匀铺于适当玻璃容

收稿日期: 2016-06-12

作者简介: 冷淑珍(1982-), 女, 硕士, 执业兽医师, E-mail: 181943849@qq.com

通讯作者: 郑庆禄(1972-), 男, 本科, 经济师, E-mail: mako666@163.net

器(平铺厚度不超过0.5 cm),然后倒入A组分(液体部分),30 min后即完成熏蒸消毒。用量按每立方米空间使用A组分25 g,B组分25 g。

1.2.2 培养基表面涂抹法测定^[3] (1)分别挑取鸡沙门氏菌单菌落至5 mL LB培养液中37℃振荡过夜。

(2)进行细菌梯度稀释,取上述0.5 mL菌液加到4.5 mL LB培养液中,如此类推进行10倍梯度稀释。

(3)吸取各梯度的细菌稀释液各0.2 mL,分别涂布6个LB板,在室温下放置30 min阴干。其中3个为实验组(熏蒸消毒),3个为对照组(不消毒)。

(4)将以上平板和培养皿放于11.25 m³的密闭房间中,开盖。

(5)按照厂家提供的消毒方法,分别称取A组分281 g和B组分281 g,在敞口容器中混合,放置在该密闭空间中,密闭熏蒸消毒30 min。

(6)将所有平板放置于37℃倒置培养24 h后,数菌落数(只数菌落数在30~300之间的平板),计算杀菌率。

1.2.3 玻片涂抹法测定 (1)分别挑取鸡沙门氏菌单菌落至5 mL LB培养液中37℃振荡过夜。

(2)分别吸取上述菌液0.1 mL均匀涂布到6个灭菌载玻片上,放入培养皿,在室温下放置30 min阴干。其中3个为实验组(熏蒸消毒),3个为对照组(不消毒)。

(3)将以上平板和培养皿放于11.25 m³的密闭房间中,开盖。

(4)按照厂家提供的消毒方法,分别称取A组分281 g和B组分281 g,在敞口容器中混合,放置在该密闭空间中,密闭熏蒸消毒30 min。

(5)将熏蒸后的盖玻片用2 mL LB培养液冲洗,对冲洗下来的液体进行10倍梯度稀释。然后吸取各个梯度的稀释液各0.2 mL,分别涂布LB平板。

(6)将所有平板放置于37℃下倒置培养24 h后,数菌落数(只数菌落数在30~300之间的平板),计算杀菌率。

2 结果与分析

2.1 培养基表面涂抹法的测定结果

从表1可知,对照组(未消毒)平均存活菌落数为 2.2×10^8 个,而熏蒸消毒实验组平均存活菌

落数为0个,杀菌率为100%。

表1 培养基表面涂抹法测定复合亚氯酸钠熏蒸剂对鸡沙门氏菌的杀菌效果

稀释倍数	实验组(熏蒸消毒) 存活菌落数(个)			对照组(未消毒) 存活菌落数(个)		
	1	2	3	1	2	3
10	0	0	0	>300	>300	>300
10 ²	0	0	0	>300	>300	>300
10 ³	0	0	0	>300	>300	>300
10 ⁴	0	0	0	>300	>300	>300
10 ⁵	0	0	0	>300	>300	>300
10 ⁶	0	0	0	215	254	199
10 ⁷	0	0	0	26	29	18
10 ⁸	0	0	0	2	3	5
10 ⁹	0	0	0	0	0	0

2.2 玻片涂抹法的测定结果

从表2可知,对照组(未消毒)平均存活菌落数为 1.4×10^6 个,而熏蒸实验组平均存活菌落数为63个,杀菌率为99.995%。

表2 玻片涂抹法测定复合亚氯酸钠熏蒸剂对鸡沙门氏菌的杀菌效果

稀释倍数	实验组(熏蒸消毒) 存活菌落数(个)			对照组(未消毒) 存活菌落数(个)		
	1	2	3	1	2	3
1	57	82	49	>300	>300	>300
10	11	6	9	>300	>300	>300
10 ²	0	0	0	>300	>300	>300
10 ³	0	0	0	>300	>300	>300
10 ⁴	0	0	0	213	125	78
10 ⁵	0	0	0	15	13	9
10 ⁶	0	0	0	0	0	0
10 ⁷	0	0	0	0	0	0

3 结语

复合亚氯酸钠熏蒸剂熏蒸消毒对鸡沙门氏菌的杀菌效果显著。培养基表面涂布法测定结果表明,复合亚氯酸钠熏蒸剂熏蒸消毒后,鸡沙门氏菌均全部杀灭;玻片法测定结果表明,复合亚氯酸钠熏蒸剂熏蒸消毒后,鸡沙门氏菌的杀菌率为99.995%。

(下转第28页)

一例黑山羊肝片吸虫病的诊治

翟少伦, 张贺, 周霞, 吕殿红, 魏文康

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

摘要: 2016年7月5日, 广东省某黑山羊养殖场(存栏约200只)发生山羊不明原因发病及死亡情况, 发病率和死亡率分别约为50%和20%。剖检病死山羊, 可见严重腹水、肝脏损伤等病变, 其他脏器无明显病变; 在肝脏组织及胆囊中发现大量肝片吸虫。结合发病情况和病死羊的剖检特征等, 确定该群山羊发病及死亡原因为肝片吸虫感染。按照肝片吸虫病感染治疗原则, 采取药物治疗及羊群隔离等综合防控处理措施, 1周后回访, 除此前严重感染的羊只死亡外, 未有新增发病和死亡病例, 羊群逐步恢复健康。

关键词: 黑山羊; 肝片吸虫病; 诊断; 治疗

中图分类号: S858.265.99

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2016)04-0020-02

Diagnosis and Treatment of Hepatic Fascioliasis in Black Goats

ZHAI Shaolun, ZHANG He, ZHOU Xia, LV Dianhong, WEI Wenkang

(Animal Disease Diagnostic Center, Institute of Animal Health, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Guangdong Key Laboratory of Animal Disease Prevention/Guangdong Open Laboratory of Veterinary Public Health, Guangzhou 510640, China)

Abstract: On July 5, 2016, the unexplained disease and mortality occurred on a black goat farm (about 200 goats), the morbidity and mortality rates were approximately 50% and 20%, respectively. Necropsy showed that there were visible severe ascites and liver damage in abdominal cavity of one dead goat, but no obvious lesions in other organs. Interestingly, there were plenty of *Fasciola hepatica* in liver and gall bladder. According to the incidence and pathological changes, the incidence and cause of death for goats were determined as the infection of *Fasciola hepatica*. Comprehensive prevention and control measures (including drug treatment and limit goat movement) were taken, after a week, follow-up study showed that there were no new cases and deaths in goat herds except for some previous serious infections and deaths of goats.

Key words: black goat; fasciolosis; diagnosis; treatment

肝片吸虫病(Hepatic Fascioliasis),又称肝蛭病、掉水腮,是由肝片吸虫(*Fasciola hepatica*)引起的常见的人畜共患病^[1]。肝片吸虫是一种寄生在牛、羊和其他哺乳动物肝胆管内的常见寄生虫,人亦可感染。临床症状表现为精神不振,食欲减退,贫血,消瘦,眼睑、下颌、胸前、腹下水肿等^[2-5],发病严重时,死亡率较高。该病遍及世界各

地,严重阻碍了畜牧养殖业的健康发展,对食品安全、公共卫生安全和环境生态安全构成了极大威胁,同时造成严重的经济损失^[1]。该病多发于阴雨季节、低洼潮湿地区^[5]。广东省是主要疫区之一。近期,我们临床上遇到一例黑山羊感染肝片吸虫的典型病例,现将诊治过程报道如下,以期对广东省养羊业防治肝片吸虫病有所帮助。

收稿日期: 2016-07-25

基金项目: 国家星火计划项目(2015GA780010); 广东省科技计划项目(2013B060500063, 2014B040404061, 2016A040403083, 2016A040401012); 广东省农业科学院院长基金(201531)

作者简介: 翟少伦(1983-),男,博士,助理研究员,E-mail: zhaishaolun@163.com

通讯作者: 吕殿红(1969-),女,博士,高级兽医师,E-mail: gdred@163.com

1 病例描述

2016年7月5日,广东省某黑山羊养殖场(存栏约200只)的山羊出现严重腹水、肝脏损伤等病症,发病率和死亡率分别约为50%和20%,经多种药物治疗均未无良好疗效。场主送检1只病死山羊,我们通过解剖及实验室化验分析病因及治疗方案。

2 疾病诊断

2.1 临床诊断

对病死山羊进行剖检,发现其腹腔积水,肝脏变性并发生破裂(图1),且伴有纤维素性渗出物和血块,其他脏器无明显病理变化。对肝脏及胆囊等作进一步观察发现,这些组织中均有大量的吸虫(图2和图3)。



图1 病死山羊肝脏变性破裂



图2 病死山羊肝内吸虫



图3 病死山羊胆囊内吸虫

2.2 实验室诊断

收集病死山羊肝内的一些吸虫进行实验室观察,根据吸虫形态学特征,最终确定为肝片吸虫(图4)。



图4 病死山羊体内的肝片吸虫

3 治疗及预后

对羊群全群交替使用硝氯酚6 mg/kg和三氯苯达唑8~12 mg/kg,每天用药2~3次,连用5~7 d。此外,禁止羊群去低洼水塘边、沼泽地等地放牧。

采用以上治疗方案,治疗1周后,除此前严重感染的羊只死亡外,未有新增发病和死亡病例,羊群逐步恢复健康。

4 预防措施

防治羊肝片吸虫病必须遵循“预防为主,防重于治”的方针,将该病与病毒性、细菌性疫病同等对待,一旦羊场有该病发生,应采取以下多种预防措施:

4.1 消灭或隔离中间宿主(螺类)

于5月份和7月份选用硫酸铜、氨水、石灰、五氯酚钠等药物对牧场、沼泽地、沟渠等场地进行灭螺。此外,也可在低洼水塘及沼泽地大群饲养水禽(鸭、鹅等)消灭椎实螺^[6-7]。

在药物、生物灭螺措施不理想的情况下,采用围栏、院墙等把螺类的滋生地进行隔离,防止羊群接触疫源地。

4.3 防止羊接触感染性幼虫(囊蚴)

放牧羊群尽量避开低洼沼泽地带;牧场要有配套水井和清洁水源,防止羊饮用有螺类滋生污染过的水;洼地、沼泽地的牧草应晒干后饲用。在发病地区,尽量饮用自来水、井水或流动的河水等^[6]。

蓝孔雀育雏期感染新城疫的诊疗报告

甘露, 刘克俊, 李秀良, 王自豪, 陈政谕
(广西壮族自治区畜牧研究所, 广西 南宁 530001)

摘要:新城疫疾病传染性和致死率较高, 危害大, 防治该病对蓝孔雀的健康成长有着重要作用。介绍了 1 例蓝孔雀育雏期感染新城疫病例, 通过实验室细菌学培养, 病毒性诊断, 确诊蓝孔雀感染新城疫。在饲料中添加阿莫西林粉、饮水中添加葡萄糖, 并用克隆 30* 对孔雀群紧急免疫, 有效控制了病情。

关键词:蓝孔雀; 育雏期; 感染; 新城疫; 诊疗

中图分类号: S854.4*6, S858.93 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8567(2016)04-0022-02

新城疫 (Newcastle disease, ND), 又称亚洲鸡瘟、伪鸡瘟, 是由新城疫病毒引起的禽类急性、高度接触性传染病, 各成长期的禽类都能感染。该病传染性和致死率较高, 危害大, 由此为养殖户造成重大损失。防治新城疫疾病对蓝孔雀的健康成长有着重要作用。现介绍 1 例蓝孔雀育雏期感染新城疫的病例, 通过在饲料中添加阿莫西林粉、饮水中添加葡萄糖, 并用克隆 30* 对孔雀群进行紧急免疫而有效控制了病情。

1 发病情况

南宁市某养殖场于 2015 年 6 月 28 日从广东江门购进 500 羽 10 日龄蓝孔雀, 利用高床式栏舍进行保育喂养, 采用红外线灯悬挂保温, 提供电解多维饮水, 饲料中拌入保健药物等进行常规保健。饲养到第 6 天即 7 月 3 日早上出现病情。

发病初期有数只蓝孔雀幼雏精神不振, 嗜睡, 采食量下降, 有的食欲废绝, 并伴有拉稀。发现病情及时使用阿奇菌素、双黄连喂水, 饲料中拌入氟苯尼考, 连用 2 d, 治疗效果不佳; 改用双抗蛋黄液加入头孢噻吩钠肌肉注射, 连续使用 3 d, 病情看似有所好转, 用电解多维喂水, 饲料中拌入保健药物, 使用多次, 病情反复; 到 7 月 15 日孔雀群发病率上升至 50%, 开始出现张口呼吸、咳嗽, 鼻腔和眼睛有卡他性渗出物, 严重的病雏眼睛肿大无法睁开, 甚至有淡黄色干酪样物质。期间怀疑为传染性鼻炎, 用了磺胺类药物, 每天 1.5 mL 复合磺

胺 + 多维混饮, 效果不佳, 且死亡率上升。8 月 5 日, 养殖场抽取两只生病孔雀送到广西大学禽病研究所进行病检、实验室诊断, 最后确诊为新城疫病。

2 临床症状

患病蓝孔雀临床症状主要表现为精神萎靡不振, 羽毛松乱, 翅膀下垂, 食欲不佳, 下痢, 呼吸有啰音, 鼻腔和眼睛有卡他性渗出物, 独自缩在角落, 或被其他孔雀叮啄, 个别病雏拉青绿色粪便等。

3 剖检病变

剖检前期病死的孔雀 6 只, 发现肌肉无出血点, 腹腔有少许黄色积液, 心脏有轻微结节, 肝脏边缘有轻度病变白斑, 肺轻度充血水肿, 肾有出血点, 气管、喉管、法氏囊、胃、肠道等器官没有明显病变。解剖后期病死的孔雀 (约 90 日龄) 4 只, 发现病禽腹腔有积液和干酪样物质, 心包膜肥厚, 肝脏有出血点, 肾脏肿大, 胃正常, 肠道壁膜变薄, 直肠和盲肠内有出血, 肺部及支气管中充满黄色干酪样物, 气管出血, 喉管有少量黏液, 在个别孔雀肠道内检出蛔虫。

4 实验室诊断

首先进行支原体 (MS) 检测, 先培养后 PCR 检测, 结果均为阴性; 然后进行细菌分离, 结果表明为革兰氏阴性球菌; 检测病样细菌对各药物的敏感性, 细菌药敏结果见表 1。进一步检测新城疫抗

收稿日期: 2016-06-28

作者简介: 甘露 (1990-), 女, 本科, 助理畜牧师, E-mail: 261771679@qq.com

通讯作者: 刘克俊 (1962-), 男, 本科, 高级畜牧师, E-mail: liukejun515@126.com

体,以 Lasota 作为抗原检测 HI 抗体滴度为 $5\log_2$,最终确诊为新城疫病。

表 1 病样细菌对各药物的敏感性检测

药物名称	抑菌圈(mm)	药物名称	抑菌圈(mm)
氨苄西林	14	链霉素	12
阿莫西林	25	卡那霉素	10
头孢他啶	8	环丙沙星	10
头孢曲松	17	甲氧嘧啶	8
复方新诺明	8	呋喃妥因	8
萘啶酸	10	四环素	9
庆大霉素	14	阿卡米星	20

注:表中数值越大,药物的敏感性越高。

5 发病原因

(1)可能是引进的孔雀种苗有新城疫免疫缺失,或者没有新城疫免疫抗体,引进回来后没有及时进行疫苗免疫;(2)孔雀饲养的保温措施不当,导致饲养幼孔雀空间温度不稳定;(3)孔雀发病后诊断不准确,药物使用不当。

6 综合防治措施

针对孔雀发病原因分析,结合临床症状及实验室诊断,制定孔雀治疗保健方案,在饲料中添加

阿莫西林粉,饮水中添加葡萄糖,用克隆 30* 对孔雀群进行紧急免疫,控制病情。截至 11 月 12 日,已死亡 376 只蓝孔雀,剩下 124 只,14 只仍有病症表现,死亡率接近 75%。

7 结语

新城疫是一种高度接触性传染病,孔雀新城疫没有特别的药物治疗,新城疫疫苗免疫是孔雀养殖成功的关键。因此,在购买孔雀幼雏前需了解清楚免疫情况,按禽类免疫程序进行免疫,防止漏免或免疫失败风险,待产生免疫抗体后起运(不能与其他禽类混车装运,防止交叉感染)。回场后及时在饮水中添加抗应激药物和保健药品。饲养至第 5~6 天,孔雀生长正常,应该重新加强新城疫等免疫。

此外,养殖户应该做好孔雀饲养管理以及预防接种的工作。养殖户应该根据孔雀群的实际情况及检测抗体水平来制定一套适合本场的免疫程序。在日常饲养管理中,饲养空间温度不宜变化太大。若发现孔雀群有异样应及时用药,用药后仍然不能控制病情甚至病情恶化的,应立即给病禽做病理诊断,以制定科学合理有效的用药计划,并及时淘汰或隔离病禽,避免造成损失。

(上接第 17 页)

养区导致养殖场(小区)和养殖专业户搬迁和关闭的补偿措施。

6.2 提高规模化养殖场的准入条件,加强现有养殖场的治污整改力度

相关行政管理部门对新建项目严格执行项目选址规划、项目环境影响评价和“三同时”制度,必须获得环评验收批复和排污许可证,保证新建养殖场基本达到“零排放”。对原有养殖场(小区),应落实好“以奖促治、以奖代补”政策措施,进行综合治理和整改,提高治污效果。

6.3 加强环保技术指导

因养殖场缺乏环境保护专业的人才,当地环保部门应对规模化畜禽场提供相应的帮助,如指导废弃物处理工艺的设计与建设,定期开展污染治理技术培训,培养污染治理技术人才等。

参考文献:

- [1] 环境保护部,农业部.全国畜禽养殖污染防治“十二五”规划[Z].环发正(2012)135号,2012.
- [2] 国务院第26次常务会议.畜禽规模养殖污染防治条例[Z].中华人民共和国国务院令643号,2013.
- [3] 广东省农业厅,广东省环境保护厅.广东省规模化畜禽养殖场(小区)主要污染物减排技术指南[Z].粤农[2012]140号,2012.
- [4] 广东省人民政府.广东省“十二五”节能减排综合性工作方案[Z].粤府办(2012)14号,2012.
- [5] 广东省人民政府.广东省“十二五”主要污染物总量减排实施方案的通知[Z].粤府函(2012)238号,2012.
- [6] 环境保护部.“十二五”主要污染物总量减排核算细则(环发[2011]148号)[Z].2011.
- [7] 张东,徐甦,陈斌,等.畜禽粪便沼气工程处理技术[J].浙江农业科学,2012(2):223-227.
- [8] 吴根义.畜禽养殖污染防治探讨[Z].广东清远培训教程,2015.
- [9] 庄捷生.我省畜牧业积极推动节能减排[J].广东饲料,2012,21(6):15-18.

高致病性禽流感 H5N1 疫苗的免疫效果

张婷芬, 曹裕裕, 肖国雄, 黄柳明

(梅州市梅县区动物卫生监督所, 广东 梅州 514700)

摘要: 禽流感 H5N1 是由禽流感病毒引起的禽类传染病, 是危害世界养鸡业的主要疫病之一。国家对禽流感 H5N1 实行强制免疫。对相隔 10 km 的两个养鸡场的鸡群使用高致病性禽流感 H5N1 亚型疫苗进行免疫, 测定禽流感 H5 抗体, 分析免疫后抗体的消长规律, 以期有效掌握免疫效果和疫病动态。

关键词: 禽流感; H5N1 亚型; 母源抗体; 抗体水平; 免疫效果; 鸡

中图分类号: S852.5²

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2016)04-0024-02

H5N1 禽流感病毒属于甲型流感病毒的一个高致病性亚型, 其宿主范围极为广泛, 可感染野生禽类、家禽、人或其他哺乳动物, 严重威胁人类健康和社会稳定, 造成巨大的经济损失。高致病性禽流感 H5N1 的传播途径主要有 2 种: 一种是与病鸡直接接触; 另一种是与病鸡污染物接触。健康鸡可通过呼吸道、消化道、皮肤创伤及眼结膜感染该病毒而引起发病, 禽流感潜伏期从几小时到几天不等, 其长短与病毒的致病性、感染剂量、感染途径和被感染鸡的品种有关。

笔者所在地区属于梅州市梅县区, 地势四周高、中间低, 全区丘陵地占 80%。随着市场经济的不断发展, 农村养鸡专业户作为畜牧业的重要补充, 小型养鸡业的短、平、快特点, 很快被我区广大农民所接受, 养鸡业出现了令人振奋的发展势头。据统计, 梅县区 2015 年养殖数量达 2000 只鸡以上的养殖户有 295 户, 存栏数达到 221.7 万只以上, 出栏数达到 498.5 万只以上, 全年共注射高致病性禽流感疫苗 905 万羽次。根据我国《动物防疫法》规定, 对高致病性禽流感 H5N1 实行强制免疫。免疫目前已成为广大专业户的共识, 但免疫效果需要监测数据说明。本试验使用高致病性禽流感 H5N1 亚型疫苗对两个养鸡场的鸡群进行免疫后, 依托本区动物卫生监督所兽医实验室, 依据高致病性禽流感诊断技术(GB/T18936-2003.3), 测定禽流感 H5 抗体, 根据鸡群在免疫高致病性禽流感 H5 亚型疫苗前后抗体的变化, 以期有效掌握免疫

效果和疫病动态。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 在同一个镇选取相隔 10 km 的两个养鸡场(凯胜养鸡场和富通养鸡场)。这两个养鸡场规模相当, 存栏数量均在 2000 只左右, 所养雏鸡从广东广源鸡苗销售服务中心购进。选取凯胜养鸡场 8 日龄土 1 黄鸡、富通养鸡场 8 日龄清远麻鸡各 500 只作为试验对象, 试验前鸡只均未进行过高致病性禽流感的免疫。每次抗体监测随机采血 100 份。

1.1.2 疫苗 重组禽流感病毒灭活疫苗(H5N1 亚型、Re-6 株), 由乾元浩生物股份有限公司郑州生物药厂生产(生产批号 2015084)。

1.1.3 标准试剂 禽流感 H5N1 抗原、禽流感 H5N1 阳性血清、禽流感 H5N1 阴性血清, 检测试剂厂家为哈尔滨维科生物技术开发有限公司(生产批号为 2015005)。

1.2 试验方法

1.2.1 雏鸡母源抗体测定 对两个养鸡场的 10 日龄雏鸡采血各 98 份, 检测母源抗体(禽流感 H5 抗体)。

1.2.2 免疫后抗体消长规律分析 首次免疫时间为 10 日龄, 第 2 次免疫时间为 40 日龄, 肌注高致病性禽流感疫苗 0.3 mL/只, 分别于 20、30、40、50、60 日龄采血检测禽流感 H5 抗体。

1.2.3 血凝抑制试验 参照《高致病性禽流感诊

收稿日期: 2016-06-23

作者简介: 张婷芬(1990-), 女, 本科, 助理兽医师, E-mail: zting.fen@163.com

断技术》(GB/T18936-2003.3)的规定,将上述血样及时分离血清,采用血凝抑制(HI)试验,集中对血清样品进行禽流感 H5 抗体检测。

2 结果与分析

2.1 雏鸡母源抗体情况

从表 1 可知,鸡高致病性禽流感母源抗体在鸡 10 日龄时已基本为 0,母源抗体对免疫已不造成影响。

2.2 免疫后抗体消长规律分析

本试验对鸡首次接种高致病性禽流感疫苗 10 d 后(20 日龄)、20 d 后(30 日龄)、30 d 后(40

日龄)以及鸡第 2 次接种高致病性禽流感疫苗 10 d 后(50 日龄)、20 d 后(60 日龄)的样本开展采样检测,对鸡群免疫后抗体消长规律进行分析。结果(表 1)表明,在首次免疫后 10 d 能检测到抗体,但免疫抗体普遍不高;首次免疫后 20 d 时抗体较高,全群免疫合格率达 90%以上;首次免疫后 30 d 时抗体仍较高,全群免疫合格率达 90%以上。鸡在第 2 次免疫后 10 d 时抗体较高,全群免疫合格率达 95%以上;第 2 次免疫后 20 d 时抗体极高,全群免疫合格率达 100%。

表 1 血凝抑制试验结果

养鸡场	10 日龄 (首免前)	20 日龄(首 免后 10 d)	30 日龄(首 免后 20 d)	40 日龄(首 免后 30 d)	50 日龄(二 免后 10 d)	60 日龄(二 免后 20 d)
凯胜	0log ₂	69	37	0	0	0
养鸡 场	1log ₂	29	43	0	0	0
	2log ₂	0	12	0	0	0
	3log ₂	0	6	25	57	0
	4log ₂	0	0	42	25	0
	5log ₂	0	0	19	12	55
	6log ₂	0	0	8	4	25
	7log ₂	0	0	4	0	12
	8log ₂	0	0	0	0	6
	9log ₂	0	0	0	0	0
	≥10log ₂	0	0	0	0	0
	合格率(%)	0	0	85	100	100
富通 养鸡 场	0log ₂	71	37	0	0	0
	1log ₂	27	39	0	0	0
	2log ₂	0	18	0	0	0
	3log ₂	0	4	20	0	0
	4log ₂	0	0	36	48	0
	5log ₂	0	0	22	27	48
	6log ₂	0	0	12	12	24
	7log ₂	0	0	8	11	15
	8log ₂	0	0	0	0	11
	9log ₂	0	0	0	0	0
	≥10log ₂	0	0	0	0	0
合格率(%)	0	0	85	100	100	100

注:阳性对照为 9,与已知值差为 0,以上实验均成立。

3 结论与讨论

从以上免疫后抗体消长规律可知,鸡在首免 20 d 后其抗体达到较高的峰值,免疫抗体合格率达到 90%以上,而二免后 20 d 其抗体达到极高水平,免疫抗体合格率达到 100%。试验证明,疫苗合格有效,免疫疫苗对鸡群有极好的保护,即使只进

行 1 次免疫,免疫抗体合格率也能达到 90%以上,如果有条件的鸡场能对鸡群进行第 2 次加强免疫,免疫抗体合格率能达到 100%。

根据母源抗体、首免、二免抗体变化规律,确

(下转第 40 页)

广东地区小型猪场 PRRSV 血清抗体水平调查和分析

涂玉蓉^{1,2}, 欧阳伟星^{1,2}, 李美娣^{1,2}, 陈素珍^{1,2}, 武力^{1,2}

(1. 广州华农大实验兽药有限公司, 广东 广州 510642;
2. 广东省现代养猪数据化工程技术研究中心, 广东 广州 510642)

摘要: 在广东省8个地区的40个猪场采集血样, 进行了PRRSV血清抗体水平调查, 结果表明, 受检的714份血清中, 523份为PRRSV抗体阳性, 总体阳性率为73.25%, 其中佛山、河源、清远、江门、茂名送检的样本PRRSV抗体阳性率均在70%以上, 合格率高于农业部规定的70%; 但湛江、肇庆、惠州送检的样本PRRSV抗体阳性率在70%以下, 在这些地区猪场群体免疫不合格。

关键词: PRRSV; 广东; 猪场; 血清抗体; 流行病学

中图分类号: S851.31⁺3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2016)04-0026-03

Investigation and Analysis of PRRSV Serum Antibody Level among Small-scale Pig Farms in Guangdong Province

TU Yurong^{1,2}, OUYANG Weixing^{1,2}, LI Meidi^{1,2}, CHEN Suzhen^{1,2}, WU Li^{1,2}

(1. Guangzhou Huanongda Experimental Veterinary Drug Co., LTD., Guangzhou 510642, China; 2. Guangdong Province Modern Pig Data Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510642, China)

Abstract: We investigated and analyzed the PRRSV serum antibody level among 40 small-scale pig farms from 8 areas in Guangdong province. The results showed that PRRSV antibody positive rate was 73.25%. The results of Foshan, Heyuan, Qingyuan, Jiangmen and Maoming were more than 70%, which was the reference value setted by the ministry of agriculture, and the results of other regions were less than 70%. Pig herd immunity was unqualified in Zhanjiang, Zhaoqing and Huizhou.

Key words: PRRSV; Guangdong; pig farm; serum antibody; epidemic

猪蓝耳病是一种以引起母猪繁殖障碍和不同生长阶段猪呼吸道疾病为特征的高度接触性传染病, 其病原为猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)。猪蓝耳病于1987年在美国首次发现, 目前几乎已传播到世界上所有养猪的国家, 给世界养猪业造成了巨大的经济损失, 严重阻碍了世界养猪业的发展^[1]。自2006年夏季以来, 高致病性PRRSV变异株引起的猪繁殖与呼吸综合征首先在我国南方地区发生与流行, 然后迅速波及全国大部分养猪地区。该病以病猪体温升高、皮肤发紫和呼吸急促

等为主要临床症状, 剖检病变以弥散性、出血性间质肺炎, 淋巴结和各内脏器官不同程度出血为主要特征^[2]。该病的暴发与流行给我国养猪业带来了巨大的经济损失。本研究调查了广东省佛山、惠州、肇庆、茂名、湛江、河源、江门等地区小型猪场猪只血清PRRSV抗体的情况, 以了解广东省PRRSV流行病学特征, 为广东省小型养猪户科学养猪提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 调查时间和地区

收稿日期: 2016-07-01

作者简介: 涂玉蓉(1984-), 女, 硕士, 兽医师, E-mail: tuyurong29@163.com

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

2014年3~12月,针对分布于清远、惠州、湛江、茂名、河源、佛山、肇庆和江门等地区的存栏300~1000头左右的40个小型猪场进行调查,抗体水平监测对象为已免疫PRRSV疫苗的猪。

1.2 主要试剂

猪繁殖与呼吸综合征病毒ELISA抗体检测试剂盒,购自北京爱德士元亨生物科技有限公司。

1.3 血样采集及处理

采集猪只前腔静脉、颈静脉或者耳缘静脉血液,注入采血管内,静置30 min后,以3000 r/min离心5 min分离血清,将血清装入2 mL离心管中,并放入冰盒内带回实验室,-80℃保存待检。血清样品714份,具体采集信息见表1。

表1 广东省小型猪场血清样本采集情况

采集地区 / 时间		血清数量(份)
采集地区	佛山	74
	河源	44
	惠州	103
	清远	40
	茂名	129
	肇庆	126
	江门	81
	湛江	117
	合计	714
采集时间	3~6月	162
	7~9月	342
	10~12月	210

1.4 抗体检测

采用美国爱德士猪繁殖与呼吸综合征病毒抗体检测试剂盒检测血清中的抗体,严格按照说明书操作。

2 结果与分析

2.1 不同地区 PRRSV 抗体阳性率

从表2可知,在受检的8个地区的样本中,PRRSV抗体阳性率从高到低依次为佛山、河源、清远、江门、茂名、湛江、肇庆、惠州,阳性率分别为91.89%、86.36%、82.50%、74.07%、73.64%、68.38%、65.87%、64.08%。其中,佛山、河源、清远、江门、茂名的样本PRRSV抗体阳性率在70%以上,合格率高于农业部的70%;湛江、肇庆、惠州的样本PRRSV抗体阳性率在70%以下,这些地区猪场群体免疫不合格。

表2 广东省小型猪场血清样本 PRRSV 抗体阳性情况

猪场分布地区	血清样品数(份)	阳性血清数量(份)	抗体阳性率(%)
佛山	74	68	91.89
河源	44	38	86.36
惠州	103	66	64.08
清远	40	33	82.50
茂名	129	95	73.64
肇庆	126	83	65.87
江门	81	60	74.07
湛江	117	80	68.38

2.2 不同采样时间的样本 PRRSV 抗体阳性情况

从表3可知,3~6月检测血样162份,其中140份呈阳性,阳性率为86.42%;7~9月检测342份,其中231份呈阳性,阳性率为67.54%;10~12月检测210份,其中152份呈阳性,阳性率为72.38%;10个月共检测714份血清,其中523份呈阳性,总体阳性率为73.25%。

表3 不同采样时间的样本 PRRSV 抗体阳性情况

采样时间	血清样品数(份)	阳性血清数量(份)	抗体阳性率(%)	总阳性率(%)
3~6月	162	140	86.42	73.25
7~9月	342	231	67.54	
10~12月	210	152	72.38	

3 结论与讨论

我国自2006年开始多地区先后暴发以无名高热、高发病率、高死亡率为特征的猪繁殖与呼吸综合征,即蓝耳病。自暴发以来,对我国各地区的养猪业带来沉重的打击和巨大的经济损失。目前防治猪繁殖与呼吸综合征最有效的方案是疫苗免疫,但在免疫接种过程中,大部分猪场仅仅注重免疫接种的数量(免疫密度),而忽视了免疫接种的质量^[3]。评估猪群群体免疫水平的重要方法是免疫监测,免疫监测对受检猪群是否需要加强免疫和制定合理的免疫程序提供重要依据^[4]。ELISA检测血清中PRRSV抗体敏感度高,特异性强,在许多兽医实验室广泛应用。

2014年3~12月,我们调查了广东佛山、河源、惠州、清远、茂名、肇庆、江门、湛江8个地区40个免疫猪场,采集了714份血清,其中523份受检血清为PRRSV抗体阳性,总体阳性率为73.25%。

可见 40 个中小型猪场的免疫情况整体较好(免疫合格率高于农业部 70% 的标准), 但仍有 26.75% 的 PRRSV 抗体阴性猪群存在很大程度感染 PRRSV 的风险。此外, 3~6 月、7~9 月、10~12 月这 3 个时间段检测的样本中, 阳性率最高的是 3~6 月的 86.42%, 而阳性率最低的是 7~9 月的 67.54%, 由此可见, 受检地区猪场 7~9 月的 PRRSV 抗体免疫情况不乐观, 免疫不及格的猪群暴发蓝耳病的风险非常大, 应该引起猪场管理者和有关养殖管理部门的高度重视, 积极加强蓝耳病的预防。在受检的 8 个地区的样本中, PRRSV 抗体阳性率从高到低依次为佛山、河源、清远、江门、茂名、湛江、肇庆、惠州, 其中湛江、肇庆、惠州的样本 PRRSV 抗体阳性率在 70% 以下, 这 3 个地区猪场群体免疫不合格, 有必要加强 PRRSV 疫苗的筛选、免疫程序的优化, 并且加强对猪群免疫状况的检测, 以提高猪群整体的免疫效果和健康水平, 将蓝耳病暴发的风险降到最低。建议猪场每季度至少进行 1 次 PRRSV 抗体水平检测, 对 PRRSV 抗体不达标的, 进行二次免疫。

从调查采样登记的情况可以看出, PRRSV 抗体阳性率高的猪场, 如佛山、河源地区的猪场, 都有稳定的猪群来源, 很多都是自繁自养, 有较完善的免疫程序。此外, 对猪舍定期消毒^[5], 能减少病原微生物的传播, PRRSV 抗体水平维持的时间也相对较长, 抗体效价高。

参考文献:

- [1] 陈健雄. 猪夏季无名高热病的发生与防控[J]. 养猪, 2006(3): 31-32.
- [2] 冷子玲, 迟玉华, 卢新存, 等. 高致病性蓝耳病流行特点、危害及预防策略[J]. 山东畜牧兽医, 2011, 32(9): 72-75.
- [3] Yijun Du, Dongwan Yoo, Marie Anne Paradis, et al. Antiviral Activity of Tilmicosin for Type 1 and Type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cultured porcine alveolar macrophages[J]. Antivir Antiretrovir, 2011(3): 28-33.
- [4] Andre G Buret. Immuno-modulation and anti-inflammatory benefits of antibiotics: The example of tilmicosin[J]. Vet Res, 2010, 74(1): 1-10.
- [5] 彭彩兰. 猪高致病性蓝耳病的特点与防治[J]. 江西畜牧兽医杂志, 2008(1): 36-37.

(上接第 19 页)

传统的畜禽用熏蒸剂一般采用甲醛 + 高锰酸钾^[4], 药物残留对环境影响较大, 且对动物和操作人员的身心健康构成较大威胁。本试验采用了清洁环保的复合亚氯酸钠为熏蒸药物, 在注重环保的同时, 保证了消毒效果, 对实际养殖生产具有切实可行的应用推广意义。

参考文献:

- [1] 鸡伤寒沙门氏菌病的诊断及病理形态学观察[A]. 全国兽医病理留学、动物病理生理学学术会议论文集[C]. 2011: 119-121.
- [2] 刘子鑫. 消毒及消毒剂简介[J]. 中国兽医杂志, 2004(7): 37-38.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 消毒技术规范[S]. 2002.
- [4] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典[S]. 2010.

供港澳家禽高致病性禽流感及 H7N9 病毒监测与分析

田纯见, 高佳卉, 王宏, 罗琼, 林志雄

(广东出入境检验检疫局检验检疫技术中心 / 广东省动植物与食品进出口技术措施研究重点实验室 / 国家质量监督检验检疫总局国家禽流感检测重点实验室·广东, 广东 广州 510623)

摘要: 采集供港澳家禽喉头、泄殖腔拭子进行禽流感病毒监测, 建立一步法荧光 RT-PCR 检测 A 型和 H5、H7、H9 亚型及 H7N9 病毒, 所用高通量核酸提取和基因扩增体系可适应活禽出口快速检测通关的要求。2006—2015 年共检测约 150 万份拭子, 结果 H5 和 H7 亚型高致病性禽流感全部为阴性, H9 亚型等 A 型流感病毒阳性率约 0.035%, 冬、春季节检出率较高, H9 亚型病毒 HA 基因与 H7N9 病毒广东流行毒株具有亲缘关系。供港澳禽流感病毒监测体系快速高效、生物安全性好, 结合抗体监测和临床检查, 可保证出口家禽处于无禽流感状态。

关键词: 高致病性禽流感; 荧光 RT-PCR; 监测; 家禽; 供港澳

中图分类号: S852.659.3; S858.315.3 文献标识码: A 文章编号: 1005-8567(2016)04-0029-04

Surveillance and Analysis of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus and H7N9 Virus from Poultry for Hong Kong and Macao

TIAN Chunjian, GAO Jiahui, WANG Hong, LUO Qiong, LIN Zhixiong

(Guangdong Inspection and Quarantine Technology Center / Guangdong Provincial Key Laboratory of Animal and Plant and Food Import and Export Technology / AQSIQ State Key Laboratory of Avian Influenza, Guangzhou 510623, China)

Abstract: One-step fluorescence RT-PCR was established for detection of avian influenza virus type A and H5, H7 and H9 subtypes and H7N9 virus in throat, cloacal swabs from poultry for Hong Kong and Macao. The high flux system can meet the requirements of nucleic acid extraction and gene amplification for rapid export customs clearance of live poultry. About 150 millions of the swabs were detected in recent ten years and all results of highly pathogenic avian influenza H5 and H7 subtype were negative. Meanwhile positive rate of influenza virus type A, including H9 subtype was about 0.035%, with a higher positive rate in winter and spring. The close genetic relationship of HA gene was found between epidemic strains of subtype H9 virus and H7N9 virus in Guangdong province. The avian influenza virus monitoring system of poultry for Hong Kong and Macao is fast and efficient with good biological safety, combined with antibody monitoring and clinical examination, ensuring the state of non avian influenza of the exported poultry for Hong Kong and Macao.

Key words: Highly pathogenic avian influenza; fluorescence PCR; surveillance; poultry; Hong Kong and Macao

高致病性禽流感是 A 型流感病毒引起的禽类烈性传染病, 在我国属于一类动物疫病, 对动物和动物产品市场及国际贸易具有重大影响。20 世纪 90 年代初, 经血清学调查发现禽流感开始在广东流行, 后来证实鸡群禽流感阳性是由 H9N2 病毒感染引起的, 此后, 该亚型禽流感病毒在广东持续流

行。近年调查显示, 在广东活禽交易市场该亚型病毒阳性率达到 2.38%^[1], 分子流行病学研究显示其流行毒株属于 h9.4.2 支系第 II 群, 与供港澳家禽禽流感监测的基因测序结果一致^[2-4]。而来源于华东的 H7N9 病毒在广东传播过程中, 与广东本地的 H9N2 毒株发生基因重组, 这对于禽流感防控和公

收稿日期: 2016-06-28

基金项目: 国家出入境检验检疫科研项目(2015IK054)

作者简介: 田纯见(1965-), 男, 博士, 高级兽医师, Email:gzvettian@163.com

公共卫生具有重要意义^[5-10],引起港澳市场高度关注。因为 1997 年香港发生了高致病性 H5N1 禽流感事件^[11-12],H5 亚型禽流感病毒首次攻击人类致死,事件中扑杀超过 140 万鸡只,费用超过 10 亿港元。至今高致病性禽流感病毒在我国和其他国家家禽中流行,并出现人类感染禽流感死亡的情况^[3]。同时,H9 亚型等各种低致病性禽流感病毒共同感染,发生交叉重组^[14-15],给公共安全带来重大威胁。

为促进家禽业生产和出入境贸易发展,保障公共卫生安全,应按规定开展禽流感监测活动。除临床和血清学监测外,病原学检测是高致病性禽流感确诊的重要依据。其中荧光 PCR 作为现行禽流感病毒检测和分型的国内外标准,对新型流感病毒快速检测发挥了重要作用^[16]。目前,港澳特区上市的活禽和禽类产品主要依赖广东进口,为保障特区的政治经济稳定和出口贸易发展,广东出入境检验检疫局建立和优化了一步法荧光 RT-PCR,开展了供港澳家禽高致病性禽流感及 H7N9 病毒监测,现将检测和分析结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品采集 样品采集自供港澳家禽注册场,家禽及其产品出口前按规定抽取部分禽只,用棉拭子分别伸入口腔、泄殖腔刮取咽喉分泌物和粪便,加入含双抗 PBS 中,低温保存。

1.1.2 仪器和试剂 主要仪器为罗氏 LIGHTCY-CLER 480 定量 PCR 仪和 MagNA Pure LC 全自动液体分装及核酸自动纯化系统。动物 A 型流感病毒荧光 RT-PCR 检测试剂,禽流感 H5、H7、H9 亚型荧光 RT-PCR 检测试剂,禽流感 H7N9 亚型荧光 RT-PCR 检测试剂,均含阳性和阴性对照,分别购自北京森康生物技术开发有限公司、深圳凯杰生物工程有限公司、深圳澳东检验检测科技有限公司等。

1.2 试验方法

1.2.1 核酸提取 采用高通量磁珠法进行全自动核酸纯化,按照罗氏试剂说明进行操作,取洗脱板内核酸用于病毒检测。

1.2.2 RT-PCR 检测 利用流感病毒和禽流感荧光 RT-PCR 检测试剂建立反应体系,其中酶混合物 1 μ L、引物探针溶液 14 μ L 或 19 μ L、RNA 溶液 10 μ L 或 5 μ L,总体积 25 μ L。

按下列条件进行一步法反应:42 $^{\circ}$ C 30 min;94 $^{\circ}$ C 2 min;94 $^{\circ}$ C 15 s、53 $^{\circ}$ C 10 s、60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环,荧光收集在每个循环的 60 $^{\circ}$ C 延伸时进行;最后,40 $^{\circ}$ C 2 min 完成全部反应。

反应完成后调整本底线,计算 Cp 值。在 A、H5、H7、H9 亚型和 H7N9 病毒全部阳性和阴性对照成立时,待检样品出现特征的 S 型扩增曲线和 Cp 值 ($C_p \leq 35$, 变异系数 $\leq 15\%$),判为禽流感荧光 RT-PCR 阳性。

1.2.3 基因测序 取阳性样品核酸进行 HA 基因 RT-PCR 扩增和产物测序,由大连宝生物(TaKaRa)工程有限公司完成。出现进化树特征基因序列,判为禽流感病毒阳性。

2 结果与分析

利用禽流感荧光 RT-PCR 检测试剂,成功建立了一步法检测 A、H5、H7、H9 亚型和 H7N9 禽流感的供港澳家禽监测方法(图 1)。2006—2015 年采用该监测方法共检测拭子约 150 万份(图 2),H5 亚型禽流感病毒全部为阴性。近 3 年来共检测拭子约 30 万份,H7 亚型禽流感和 H7N9 病毒全部为阴性。H9 亚型禽流感和其他 A 型流感病毒检测约 10 万份,A 型病毒(含 H9 亚型)阳性率约 0.035%。其中春季和冬季检出率较高,分别占检出阳性样品的 59%和 21%(图 3),与华南地区禽流感流行情况调查一致。检出 H9 亚型禽流感病毒基因分型为 h9.4.2 支系第 II 群,与 H7N9 病毒流行毒株基因变异有关(图 4)。

经统计,各种亚型阳性对照 Cp 值的变异系数(CV)均小于 15%(表 1),处于许可的误差范围之内,表明供港澳家禽禽流感监测一步法荧光 RT-PCR 技术稳定可靠。

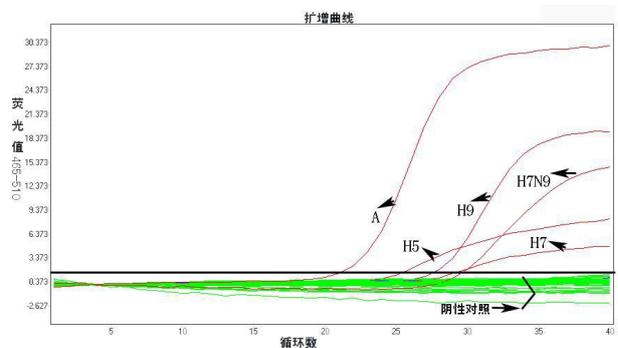


图 1 禽流感不同亚型病毒荧光 RT-PCR 一步法结果判定

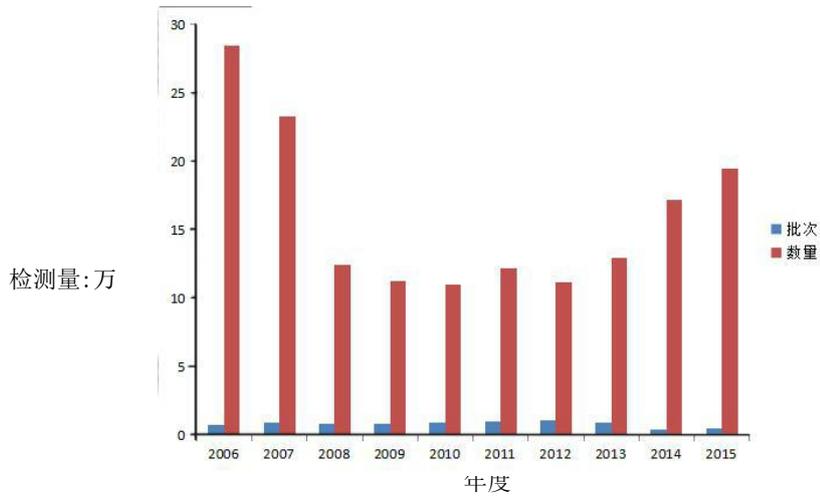


图 2 2006—2015 年供港澳家禽禽流感病毒荧光 RT-PCR 监测样品的数量

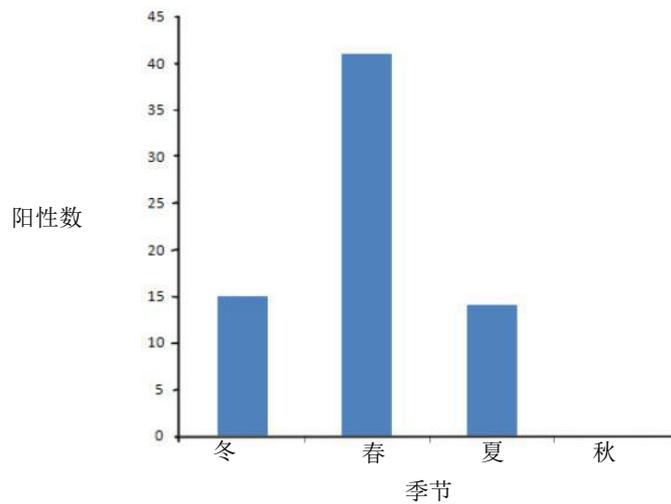


图 3 通用型荧光 RT-PCR 检测供港澳家禽禽流感不同季节阳性结果分布

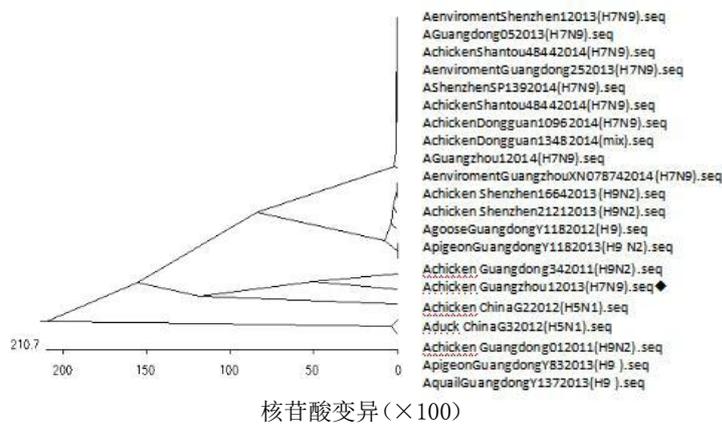


图 4 供港澳家禽禽流感病毒 H9 亚型流行毒株 HA 基因进化树分析

(◆提示 H7N9 病毒与本地 H9N2 流行毒株发生重组)

表 1 不同亚型禽流感病毒一步法荧光 RT-PCR 检测 Cp 值分析

亚型	平均 Cp	SD	CV%
A	27.23	4.08	14.93
H5	25.81	2.58	9.98
H7	29.31	2.18	7.44
H7N9	29.32	3.10	10.57
H9	24.27	3.57	14.71

3 讨论

高致病性禽流感严重危害养禽业生产,影响我国禽类及其产品的出口贸易。开展出口活禽禽流感监测工作,应符合高通量快速检测技术的要求。建立和优化一步法荧光 RT-PCR^[17],可同时对多种禽流感病毒亚型进行检测。检测通用型流感病毒,可同时区分 H5、H7 和 H9 亚型,检测方法具有简便、高效的特点,可充分适应供港澳活禽快速通关的业务需求。传统的鸡胚分离病毒血凝试验分型的方法,所需时间太长,不能适应活禽出口的时限要求。而 RT-LAMP 等新型禽流感病毒检测技术,目前尚无有关标准支撑,不能作为法定检疫检测技术。采取一步法荧光 RT-PCR 监测的家禽及其产品出口到港澳特区,经抽检均为合格,说明检测技术可靠,可进一步推广应用^[18]。

采用一步法荧光 RT-PCR,应注意设立阳性和阴性对照,与待检样品同时进行核酸提取和荧光 RT-PCR 检测,只有对照全部成立时才能判定结果。经统计,各种亚型阳性对照 Cp 值的变异系数(CV)均小于 15%,表明供港澳家禽禽流感监测一步法荧光 RT-PCR 技术稳定可靠。不同的反应体系在相同的反应条件下,一步完成多种亚型禽流感的检测工作,其特异性和敏感性不受影响。应注意排除 Cp 值异常和非 S 型扩增曲线引起的假阳性结果。A 型检测结果应与其他亚型结果互相配合进行判定,可确保结果可靠。

此外,采集禽流感监测样品时,应注意选取出口家禽同群内出现死亡、出血等症状的禽只,分别将棉拭子插入泄殖腔、咽喉部旋转擦拭 3~5 次,采取粪便和气管分泌物。剪下沾有样品的棉花,放入含双抗的 PBS 塑料管内,5 只禽的样品合并为 1 管,封口后贴上标签。标签应注明采样时间、地点和临床症状,并有兽医师签名。禽流感病毒检测应按照规定,在满足生物安全二级实验室的条件下

进行^[19],采取相应的废弃物处置、人员防护和意外处理措施,防止员工感染和疫情扩散,做到不散毒、不污染、无假阳性,结果准确可靠。

参考文献:

- [1] 陆巧芬,曹建伟,冯秀红,等.广东江门地区 2011—2013 年活禽交易市场禽流感病原学监测数据分析[J].广东畜牧兽医科技,2014,39(4):18-19.
- [2] Jiang W,Liu S,Hou G,et al.Chinese and global distribution of H9 subtype avian influenza viruses[J].PLoS One,2012,7(12):e52671.
- [3] Peng Y,Xie ZX,Liu JB,et al.Epidemiological surveillance of low pathogenic avian influenza virus (LPAIV) from poultry in Guangxi Province,Southern China[J].PLoS One.2013,8(10):e77132.
- [4] Sun Y,Liu J.H9N2 influenza virus in China: a cause of concern[J].Protein Cell,2015,6(1):18-25.
- [5] To K K,Ng K H,Que T L,et al.Avian influenza A H5N1 virus: a continuous threat to humans[J].Emerg Microbes Infect,2012,1(9):e25.
- [6] Poovorawan Y,Pyungporn S,Prachayangprecha S,et al.Global alert to avian influenza virus infection: from H5N1 to H7N9[J].Pathog Glob Health,2013,107(5):217-223.
- [7] Pfeiffer D U,Otte M J,Roland-Holst D,et al.Implications of global and regional patterns of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 clades for risk management[J].Vet J,2011,190(3):309-316.
- [8] Wan X F.Lessons from emergence of A/goose/Guangdong/1996-like H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses and recent influenza surveillance efforts in southern China[J].Zoonoses Public Health,2012,59(S1/2):32-42.
- [9] Sonnberg S,Webby R J,Webster R G.Natural history of highly pathogenic avian influenza H5N1[J].Virus Res,2013,178(1):63-77.
- [10] Abdelwhab E M,Veits J,Mettenleiter T C.Prevalence and control of H7 avian influenza viruses in birds and humans[J].Epidemiol Infect,2014,142(5):896-920.
- [11] 于康震,陈化兰,唐秀英.97 香港禽流感[J].中国畜禽传染病,1998,20(3):187-191.
- [12] 黄建珍,胡木枝.香港禽流感事件[J].广东畜牧兽医科技,1998,23(3):7-9.
- [13] 宋建德,朱迪国,袁丽萍,等.2013 年全球禽流感流行状况[J].中国动物检疫,2014,31(6):6-9.
- [14] Gao R,Cao B,Hu Y,et al.Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus[J].N Engl J Med,2013,16:368(20):1888-1897.

德保矮马与美国珍珠马精液常规对比分析

陈政谕, 刘克俊, 李秀良, 甘露, 王自豪

(广西壮族自治区畜牧研究所, 广西南宁 530001)

摘要: 对德保矮马和美国珍珠矮马进行人工采精, 对两品种矮马的精液进行常规检测, 结果表明, 两品种矮马的精液量差别不显著; 长时间未采精的马, 首次采精的精子活力指标低; 美国珍珠马的精液质量比德保矮马的精液质量稍高。

关键词: 德保矮马; 美国珍珠马; 精液; 质量

中图分类号: S821.89

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2016)04-0033-03

近年来随着娱乐和运动型马业的兴起, 市场对矮马的需求不断增加, 对矮马的繁育研究也日益突显。德保矮马是世界两大矮马源流之一, 主要产于广西德保, 平均体(身)高只有100 cm左右, 最矮的仅有85 cm。据考证, 德保矮马是西汉时期“果下马”的后代。德保矮马体型秀美、性情温驯、灵巧耐驮、健壮, 德最明显的特征之一是色纯, 主要有棕黑、棕红、淡棕、灰黄、灰白数种色。长期以来, 德保矮马都是以农户自然放牧的形式进行养殖, 缺乏统一管理和系统科学的选育。德保县畜牧局虽然对德保矮马进行了少量的集中饲养和登记工作, 但材料不全, 经费和措施不到位, 农民饲养效益不大, 饲养积极性不高, 马的存栏数无法提高, 甚至出现下降趋势。目前德保矮马存栏不足2000匹, 该物种种质资源处于濒危状态。应采取积极的保护性措施和产业化策略, 对德保矮马的遗传和生理规律等开展基础研究; 采用系统工程的方法进行优秀个体间纯繁和导入“美国珍珠马”外血杂交培育, 达到保种和提纯复壮的目的。本试验选取德保矮马和美国珍珠马进行精液常规检测对比分析, 以期为后续相关研究奠定基础。

1 材料与方法

德保矮马是世界两大矮马源之一, 主要产于广西德保, 平均体(身)高只有100cm左右, 最矮的仅有85cm。据考证, 它是西汉时期“果下马”的后

代。德保矮马最明显的特征之一是色纯, 主要有棕黑、棕红、淡棕、灰黄、灰白数种。德保矮马以矮、体型秀美、性情温驯、灵巧耐驮、健壮等特征。长期以来, 德保矮马都是分散在农户家中以自然放牧的形式进行养殖, (没有) 缺乏统一管理和系统科学选育工作。目前德保县畜牧局虽然对德保矮马进行了少量的集中饲养和登记工作, 但材料不全, 经费和有些措施不到位, 农民得到经济利益不大, 饲养积极性不高, 马的存栏数也无法提高, 甚至出现急剧下降趋势, 目前德保矮马存栏数不足2000匹, 对矮马新物种种质资源保护处于濒临危险^[1]。应采取积极的保护性措施和产业化策略, 开展广西德保矮马遗传规律和生理及分子的基础研究, 加大对德保矮马饲养、选育和培育的投资力度, 采用系统工程的方法进行优秀个体间纯繁和导入“美国珍珠马”外血杂交培育, 达到保种和提纯复壮的目的(来培育); 并尽快建立德保矮马遗传资源的保种基地和保护区^[2]。

1.1 试验动物

德保矮马种公2匹, 取名小白、黑黑。小白10岁, 身高90 cm, 体重86 kg, 健康, 膘情适中; 黑黑11岁, 身高96 cm, 体重90 kg, 健康, 膘情适中。美国珍珠马种公1匹, 取名小嘟嘟, 11岁, 身高76 cm, 体重73 kg, 健康, 膘情较好。

试验在广西畜牧研究所德保矮马基地进行。供试马单栏饲养, 喂饲相同的饲料。根据体重、膘

收稿日期: 2016-06-28

作者简介: 陈政谕(1990-), 女, 专科, 初级畜牧师, E-mail: 2425438085@qq.com

通讯作者: 刘克俊(1962-), 男, 本科, 高级畜牧师, E-mail: liukejun515@126.com

情,德保矮马饲喂量稍多,每天喂饲草料 10 kg、精饲料 2 kg;珍珠马小嘟嘟,膘情好,个体矮,每天喂饲草料 8 kg、精饲料 1.5 kg。试验期间,每次采精后每天日粮增加 1 个生鸡蛋,喂饲 1 周后再进行下一次采精。

1.2 人工采精

人工采精采用小型号牛采精用假阴道。由于德保矮马种公阴茎相对美国珍珠马种公的要粗大且长,因此小型号牛采精用假阴道用于美国珍珠马种公时可以吹足气,用于德保矮马种公时则不能吹满气。马的正常体温是 37.5~38.5℃,按照精液保存温度宜贴近体温的原则,假阴道注入热水温度宜保持在 40~42℃ 之间。人工采精使用假阴道前在假阴道口涂上适量石蜡油以润滑。准备工作完成后,把发情母马固定在保定架上,辅以一人帮忙固定母马,在种公马爬跨在母马身上且阴茎露出准备进入母马阴道时,采精员在侧面迅速用假阴道套住种公马的阴茎。套稳后一手持假阴道一手按住公马后腰部帮助固定并感觉种公马动作,在感觉种公马阴茎软化回缩后,抽离假阴道。取出采集管,记录精液容量数据,把表层有脏污的精液倒掉一点后装进已消毒并保温到 39~40℃ 的试管内。用干净的毛巾包好试管,遮光保温,迅速送往实验室。

1.3 检测指标及方法

检验精液过程要做好保温遮光工作,并尽量少晃动装精液的试管,以降低精子的死亡率。用恒温水箱保温精液,精液恢复活力后用高倍电子显微镜和精液密度测量仪进行检验。检测的指标有精液容量、外观颜色、精子活力、畸形率、精子密度。

2 结果与分析

德保矮马和美国珍珠马的精液味道均带有特殊的腥味,颜色呈乳白色或者乳灰白色。在高倍电子显微镜下观察,结果(表 1)表明,美国珍珠马直线运动的正常精子比德保矮马多且速度更快;德保矮马的精子畸形率为 64.9~69.8%,显著高于美国珍珠马的精子畸形率(36.3%)。在镜检观察中还发现,美国珍珠马的精子尾巴比德保矮马的精子尾巴要长一点。从表 2 可以看出,德保矮马和美国珍珠马第 1 次采精检测结果都不理想,精液的质量很差。德保矮马小白第 1 次精液检测出现大量死精现象;德保矮马黑黑精液基本正常。在休息 1 周并每天加喂 1 个生鸡蛋后精液质量均有明显提高,第 2 次精液检测的各项指标都比第 1 次好,且美国珍珠马的精液容量、精子活力、精子密度各项指标均比德保矮马的要高。之后重复检测,各项指标结果相对比较稳定。

表 1 精子形态学分析

供试马匹	直线运动精子		异常精子	
	精子数	占比(%)	精子数	占比(%)
德保矮马小白	76	30.2	177	69.8
德保矮马黑黑	75	35.1	140	64.9
美国珍珠矮马小嘟嘟	150	63.7	86	36.3

表 2 精液质量检测结果

供试马匹	检测次数	精液容量 (mL)	pH 值	精液颜色	液化时间 (min)	精子活力	精子密度 (亿/mL)	畸形率 (%)
德保矮马种公小白	第 1 次	25	7.2	乳白色	25	0.10	1.36	85
	第 2 次	28	7.1	乳白色	22	0.25	1.43	70
	第 3 次	28	7.1	乳白色	25	0.24	1.45	67
	第 4 次	32	7.2	乳白色	24	0.25	1.48	65
	第 5 次	28	7.2	乳白色	25	0.24	1.42	62

德保矮马种公黑黑	第 1 次	25	7.1	乳灰白色	24	0.21	1.45	67.1
	第 2 次	25	7.3	乳灰白色	25	0.23	1.51	65.3
	第 3 次	26	7.3	乳灰白色	25	0.22	1.53	64.5
	第 4 次	25	7.2	乳灰白色	25	0.25	1.53	60.6
	第 5 次	27	7.3	乳灰白色	25	0.24	1.58	61.2
美国珍珠马种公小嘟嘟	第 1 次	28	7.5	乳白色	23	0.20	1.60	39.5
	第 2 次	32	7.4	乳白色	23	0.35	1.64	36.7
	第 3 次	29	7.5	乳白色	23	0.29	1.61	35.2
	第 4 次	31	7.4	乳白色	22	0.35	1.64	34.7
	第 5 次	32	7.5	乳白色	23	0.32	1.62	35.8

3 结论与讨论

本研究结果发现,两品种矮马的精液量差别不显著,但长时间未采精的马,首次采精的精子活力指标低。在营养水平均衡的条件下,最好 1 周内采精 1~2 次,各项指标镜检合格后,可以分装制成细管冻精,进行母马人工受精或本交应用。美国珍珠马的精液质量稳定时,宜用其与德保矮母马杂交配种,突显出两品种的杂交优势,达到降低矮马体型的效果。

本试验美国珍珠马的精液质量比德保矮马的精液质量稍高,但与之前其他马精液质量相比较,这次检测的精液质量都不太高,究其原因:一是精液采集检测的时间在 8 月份,受到高温高热季节热应激的影响,动物的精液质量都不会太高;二是

这 3 匹马之前从未进行过人工采精,动物第 1 次人工采精,精液质量大多偏低,活力低,死精率、畸形率高,精子密度差;三是采用了牛而非马的采精设备,建议使用马专用的采精仪器,有利于提高公马的舒适度和射精量;四是采用了牛精液的稀释液,其渗透压等对马的精液存在一定影响。在高倍显微镜下观察两个品种矮马的精子,精子形态稍有不同,运动速度也不一样,这种差别是否是品种差异原因还需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 杨膺白,许典新,韦显熙,等.广西德保矮马调查报告[J].中国畜牧兽医文摘,2005,(2):46-57.
- [2] 刘克俊,王自豪.广西马产业发展现状研究[J].中国畜牧杂志,2014,(22):37-39.

(上接第 21 页)

4.4 粪便堆肥发酵

对于半圈养-半放养的羊场,圈舍内的粪便及驱虫后排出的粪便,应进行堆肥处理,利用粪便发酵产热杀死吸虫虫卵以防止污染羊舍和草场而引起再感染发病^[4]。

4.5 患病器官的处理

对病死羊的肝脏不能乱弃,禁止在河水中清洗或把洗肝的水到处乱泼,对有严重病变的肝脏立即进行深埋或焚烧等销毁处理。

4.6 做好科普工作,定期驱虫

加强该病的相关知识科普工作。对散养、自由放牧的养殖场,应定期用硝氯酚、三氯苯达唑(肝蛭净)、吡喹酮、溴酚磷(蛭得净)等药物进行驱虫,

防止该病发生^[6]。

参考文献:

- [1] 张吉丽,朱阵,李冰,等.肝片吸虫病的研究进展[J].黑龙江畜牧兽医,2016(6):58-61,65.
- [2] 杨会萍.羊肝片吸虫病诊断与治疗[J].中国畜禽种业,2016(6):111.
- [3] 何强.一例羊肝片吸虫病的诊治[J].现代农业科技,2014(16):278-279.
- [4] 龚金阶.一起山羊肝片吸虫病的诊[J].湖北畜牧兽医,2015(36):12.
- [5] 柳岩.一例羊肝片吸虫病的诊治[J].山东畜牧兽医,2016(37):68.
- [6] 谢风云,张钦凯,王百川,等.肝片吸虫的特性及肝片吸虫病的预防与治疗[J].畜牧与饲料科学,2014,35(1):72-73.
- [7] 张广义,周秀平.牛羊肝片形吸虫病的防治[J].养殖与饲料,2016(4):64-66.

五个不同厂家猪瘟活疫苗免疫效果对比试验

黄秋雪, 吴文福, 赖月辉, 牛晓芸, 牛贝贝

(广东永顺生物制药股份有限公司, 广东 广州 511356)

摘要: 对市面上常见的5个厂家生产的猪瘟活疫苗进行免疫效果比较试验, 并通过兔体热反应法比较不同疫苗间的效价。选取75头30日龄未免疫猪瘟疫苗的健康仔猪, 根据不同的母源抗体水平进行分组免疫, 于免前及一免后7、14、21、28、35、42 d, 二免后7、14、21、35、49、63、77、91、126 d进行采血并进行抗体检测, 比较不同厂家猪瘟活疫苗的免疫效果。结果表明, A、B厂家的疫苗效价最高, 其次为C、E厂家疫苗, 最后为D厂家疫苗; 不同厂家的猪瘟活疫苗免疫不同水平母源抗体的仔猪, 所产生的免疫效果为A厂家疫苗最优, 表现出较高的抗体水平和较长的持续期, 其后依次为C、B、E、D厂家疫苗。

关键词: 猪瘟; 活疫苗; 免疫效果; 母源抗体

中图分类号: S858.28

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2016)04-0036-05

Comparison of the Immune Effects of Classical Swine Fever Live Vaccines from Five Different Biopharmaceutical Companies

HUANG Qiuxue, WU Wenfu, LAI Yuehui, NIU Xiaoyun, NIU Beibei

(Guangdong Win-sun Bio-pharmaceutical Co., Ltd, Guangzhou 511356, China)

Abstract: This study was carried out to estimate the immune effects of five widely used live vaccines against classical swine fever virus (CSFV) produced by five biopharmaceutical companies. The vaccines titer was determined and compared by using rabbit fever test. Seventy-five 30-day-old and CSFV-negative pigs were randomly selected, and then divided into groups for immunization based on their maternal antibody levels. Blood samples were collected and tested for antibodies before immunization and at day 7, 14, 21, 28, 35, 42 after the first immunization, and day 7, 14, 21, 35, 49, 63, 77, 91, 125 after the second immunization. The immune effects from different biopharmaceutical companies were compared and evaluated consequently. The results demonstrated that the vaccines from company A and B were the highest titer, followed by the vaccines from company C and E, while the vaccine from company D showed the lowest titer. The vaccine from company A showed the best immune effect, the highest level of antibodies, and the greatest stability, followed by the vaccines from company C, B, E, D.

Key words: classical swine fever; live vaccine; immune effects; maternal antibody

猪瘟(Classical Swine Fever, CSF)是由猪瘟病毒引起的一种高度接触性传染病,于19世纪30年代首次发现于美国,目前呈世界性流行,给养猪业造成巨大的经济损失^[1]。我国对于猪瘟的防控主要采取大规模的疫苗免疫为主,但该病仍在一些局部地区发生,《国家中长期动物疫病防控

规划2012—2020》将猪瘟列为优先防治的5种重大动物疫病之一^[2]。常规使用的猪瘟疫苗以弱毒活疫苗为主,其中猪瘟兔化弱毒疫苗是现今世界上使用最为广泛的猪瘟疫苗^[3]。目前国内应用的猪瘟兔化弱毒疫苗主要有兔脾淋组织疫苗、牛睾丸原代细胞疫苗和ST传代细胞疫苗。不同厂家生

收稿日期: 2016-08-11

作者简介: 黄秋雪(1987-),女,硕士研究生,兽医师, E-mail: hqxialing@163.com

通讯作者: 吴文福(1960-),男,本科,高级兽医师, E-mail: wuwf18@163.com

产的疫苗之间免疫效果存在差异,疫苗种类的选择与猪瘟的防控效果密切相关^[4]。因此我们选择市面上常见的5个厂家生产的猪瘟活疫苗进行免疫效果比较试验。现将试验情况报告如下:

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物 惠州某猪场30日龄未免疫猪瘟疫苗的健康仔猪75头,经检测,CSFV、PRRSV、PRV、PCV抗原均呈阴性;新西兰大耳白兔100只,购自广东省实验动物中心。

1.1.2 试验疫苗 猪瘟疫苗选自市场上常见的5种猪瘟疫苗,分别标记如下:A组,广东某厂ST猪瘟活疫苗(传代细胞源);B组,广东某厂猪瘟活疫苗(传代细胞源);C组,湖北某厂猪瘟活疫苗(传代细胞源);D组,河南某厂猪瘟活疫苗(细胞源);E组,北京某厂猪瘟活疫苗(细胞源)。

1.1.3 检测试剂盒 猪瘟抗体阻断ELISA检测试剂盒购自美国爱德士(IDEXX)公司。

1.2 试验方法

1.2.1 疫苗效价测定 将各组猪瘟疫苗用灭菌生理盐水进行1.5万倍、2万倍、2.5万倍、3万倍、3.5万倍、4万倍、5万倍、6万倍、7万倍、8万倍不同浓度的稀释,将各稀释倍数疫苗分别耳静脉注射2只兔,每只注射1.0 mL。接种后,上、下午各测体温1次,48 h后,每隔6 h测体温1次,测温观察5~7 d后进行疫苗效价结果判定。

1.2.2 猪群分组 75头健康仔猪按照猪瘟母源抗体分为高中低抗体水平组,每个母源抗体水平组25头,再将不同母源抗体水平组仔猪分别分为5组(A~E组),每组5头仔猪。

1.2.3 免疫程序 所有仔猪在30日龄进行一免,72日龄进行二免,耳后肌肉注射1头份/头。每天观察试验猪对免疫的反应,包括精神状态、饮水情况、食欲、皮肤及被毛色泽、粪便性状,以及有无其他异常情况。

1.2.4 抗体检测和判断标准 于免前及一免后7、14、21、28、35、42 d,二免后7、14、21、35、49、63、77、91、126 d进行采血。每次采血3~5 mL,分离血清。按照猪瘟抗体阻断ELISA检测试剂盒说明书,对血清样品进行猪瘟抗体检测。判定标准:阻断率<30%判为阴性,30%≤阻断率≤40%判为可疑,阻断率>40%判为阳性。

2 结果与分析

2.1 疫苗效价测定结果

对各组猪瘟疫苗进行效价测定,从结果(表1)可以看出兔热反应合格的稀释倍数:A组=B组>C组=E组>D组。

表1 猪瘟疫苗效价测定结果

稀释倍数 (万倍)	A组	B组	C组	D组	E组
1.5	++,++	++,++	++,++	++,	+,++
2	++,++	++,+	++,++	++,	++,++
2.5	++,+	++,++	+,++	+,++	++,+
3	++,++	++,+	++,++	++,+	++,++
3.5	++,++	++,++	++,+	++,	+,++
4	++,++	+,++	++,++	++,	+,++
5	++,+	++,+	++,++	+,++	++,++
6	+,++	++,++	++,++	-,+	++,+
7	++,++	++,+	-,-	-,+	-,-
8	-,+	+,-	-,+	+,-	+,-

注:“++”表示兔热反应结果为定型热反应;“+”表示轻热反应;“±”表示可疑反应;“-”表示无反应。

2.2 猪瘟抗体消长规律

检测发现,所有仔猪的抗体平均值在一免后都呈先下降再上升的趋势,并且在一免后35 d达到一免抗体高峰,二免后达到另一个抗体水平高峰,二免后35 d开始有所下降。不同厂家猪瘟疫苗在二免后抗体水平出现较大差异,A组最高,C组次之,最后为B组、E组和D组(图1)。在抗体阳性率方面,各试验组均在一免后35 d达到一免抗体高峰,二免后14~21 d达到二免抗体高峰,二免后35 d开始下降。只有A组和C组在二免后出现100%阳性率,尤其是A组在试验结束时依然维持较高的抗体阳性率。不同厂家猪瘟疫苗在抗体阳性率方面表现出较大差异,A组最优,C组次之,最后为B组、E组和D组(图2)。

2.3 猪瘟抗体维持时间

由图1和图2可知,仔猪197日龄时,即一免后167 d、二免后125 d,只有A组的抗体平均值一直为阳性,抗体阳性率均在82%以上,表明A组疫苗的高抗体水平至少维持167 d;C组和B组在二免后63 d抗体平均值开始在阳性与可疑之间波动,抗体阳性率分别在58%和42%以上;E组和D组在二免后63 d抗体平均值开始下降,抗体阳性率分别在33%和27%以上。在猪瘟抗体维持时间长短上,A组最长,C组和B组次之,最后为E组和D组。

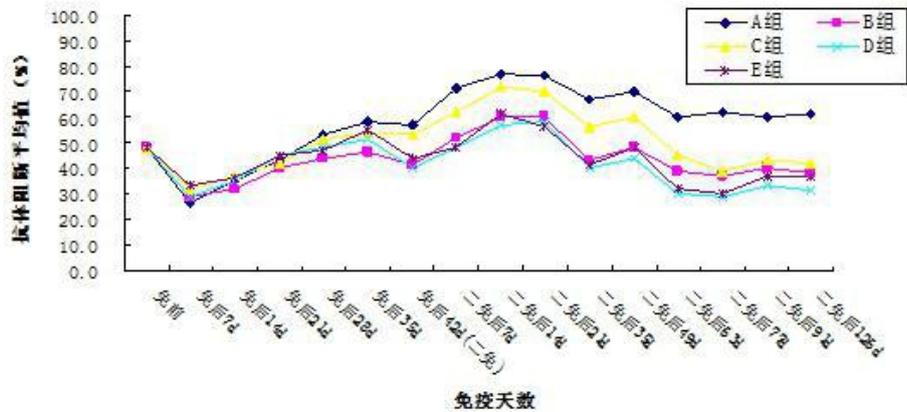


图 1 不同厂家猪瘟疫苗免疫后的抗体平均值

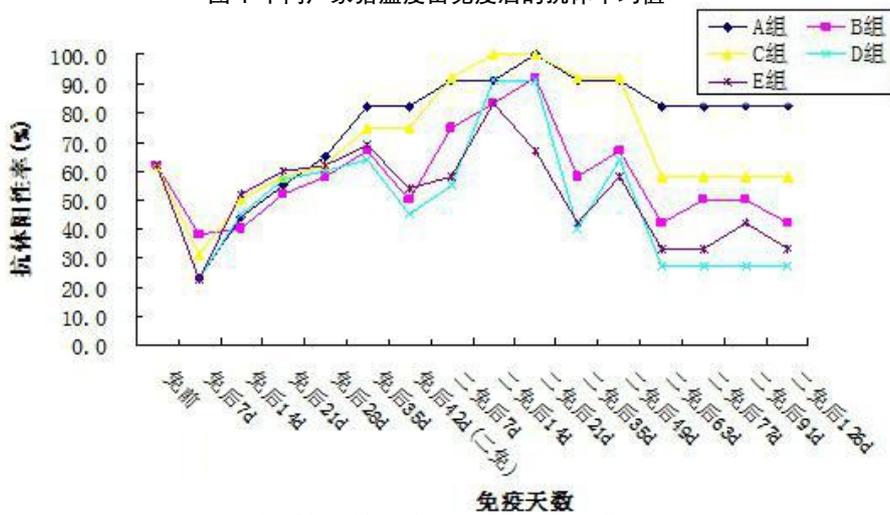


图 2 不同厂家猪瘟疫苗免疫后的抗体阳性率

2.4 免疫后不同母源抗体的仔猪抗体变化情况

2.4.1 高水平母源抗体组 如图 3 所示, 在高水平母源抗体影响下, 只有 A 组和 D 组在免疫前后抗体平均值全为阳性, 在一免后 35 d 达到首免抗体水平高峰, 在二免后抗体水平达到更高峰并在二免后 63 d 开始下降; C 组呈现 A 组、D 组相似的变化规律, 不同的是 A 组、D 组直至试验结束仍

为阳性, 而 C 组在二免后 63 d 已出现可疑; B 组和 E 组在一免后抗体水平下降, 直至一免后 35 d 达到高峰后又下降为可疑, 二免后 14 d 重新达到二免后 21 d; D 组只在一免后 21~35 d 和二免后 14~21 d 出现阳性。总之, 在中水平母源抗体影响下, 产生抗体水平高低依次为: C 组 > A 组 > B 组 > E 组 > D 组。

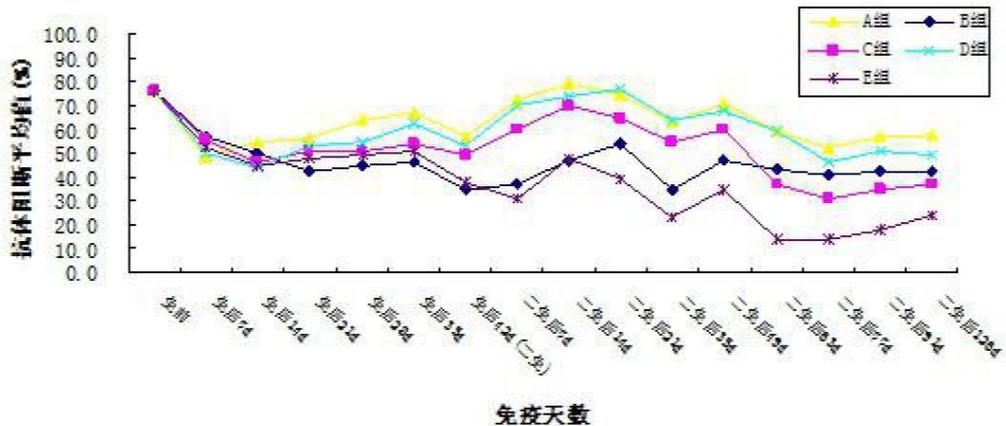


图 3 高母源抗体仔猪免疫后的抗体平均值

阳性,但二免后B组的抗体水平比E组高且持续期更长。总之,在高水平母源抗体影响下,产生抗体水平高低依次为:A组>D组>C组>B组>E组。

2.4.2 中水平母源抗体组 如图4所示,在中水平母源抗体影响下,C组、A组和B组在一免后抗体平均值由免前的阳性先下降为阴性,一免后15d升为阳性并持续至试验结束,仅从数值上来说,

在二免后C组略高于A组和B组,但在二免后63d之后A组的抗体下降幅度最小,保持较高的抗体水平;E组与前3组有相似的规律,抗体水平出现先下降后上升,一免后21d升为阳性并持续至二免后21d;D组只在一免后21d~35d和二免后14~21d出现阳性。总之,在中水平母源抗体影响下,产生抗体水平高低的排名为产生抗体水平高低依次为:C组>A组>B组>E组>D组。

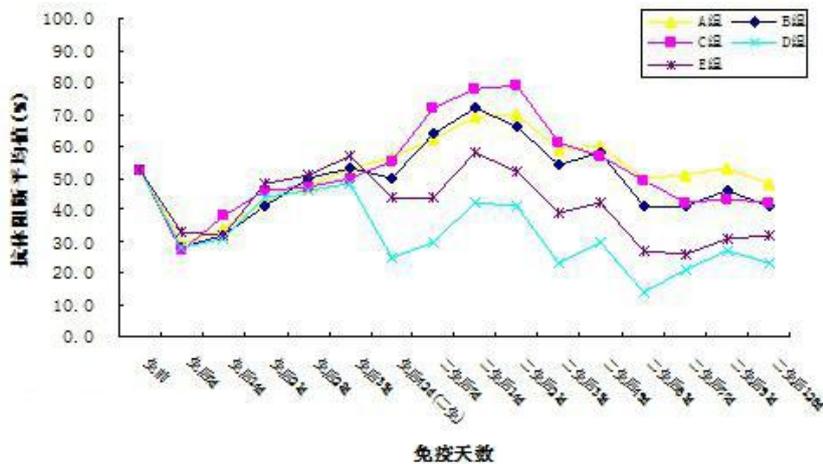


图4 中母源抗体仔猪免疫后的抗体平均值

2.4.3 低水平母源抗体组 如图5所示,在低水平母源抗体影响下,5组的抗体水平总体呈现在一免后先下降后上升的规律。A组、C组、E组和D组在一免后28d开始出现阳性,除D组在二免后35d下降为可疑外,其余3组阳性值均维持至试

验结束,而B组在一免后42d出现阳性并在二免后35d下降为可疑。从数值上来说,二免后A组产生的抗体水平最高,之后依次为E组、C组、B组和D组。

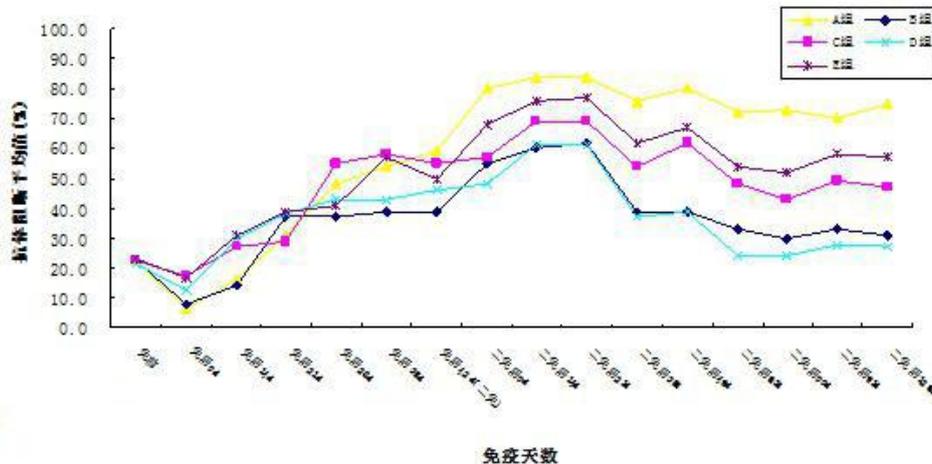


图5 低母源抗体仔猪免疫后的抗体平均值

2.5 免疫后各组试验猪无明显不良反应

临床观察表明,试验期间所有试验猪没有出现不良反应和死亡,精神状态良好,食欲、饮水情况正常,生长发育良好。

3 结论与讨论

将不同厂家的猪瘟活疫苗进行RID测定,结果为A组=B组>C组=E组>D组。免疫不同水平母源抗体的仔猪,所产生的免疫效果为A组最优,表现出较高的抗体水平和较长的持续期,其后依次为C组、B组、E组和D组。

我国自主研发的猪瘟兔化弱毒疫苗(HCLV)是世界上公认免疫保护力最好的毒株之一,对目前我国流行的所有基因型野毒均能提供良好的免疫保护^[5]。我国对猪瘟疾病的有效防控,归功于猪瘟兔化弱毒疫苗的广泛应用^[6]。有研究表明,接种疫苗的剂量与保护水平密切相关,病毒较低的疫苗会导致疫苗被机体母源抗体中和,从而无法达到免疫效果。病毒含量较高的疫苗则可以更好地提高抗体水平,提供更好地保护效果^[7]。传统疫苗生产方法是利用牛睾丸细胞(原代细胞)来制备猪瘟疫苗,但由于每次疫苗生产所需的细胞来源于不同的牛睾丸,牛的个体差异会导致疫苗质量不稳定、免疫效果有差异等^[8]。此外,用牛睾丸细胞制备疫苗还有潜在的BVDV污染风险。由于ST细胞是猪的同源细胞,更适合于猪瘟病毒的繁殖,用猪睾丸传代细胞系(ST细胞系)生产猪瘟疫苗,可以显著提高病毒滴度。同时由于其可传代的特点,不仅生产工艺更加稳定,批间差异减小,而且能够更好地控制BVDV污染问题^[9]。

本试验所采用的5个厂家疫苗包括了猪瘟活疫苗(传代细胞源)和猪瘟活疫苗(细胞源)两大类。兔体热反应结果显示,传代细胞源疫苗生产工艺的稳定使得其具有比原代细胞源疫苗更高的病毒滴度。免疫效果试验结果表明,所有猪瘟活疫苗都具有一定的免疫效果,3个厂家的猪瘟活疫苗(传代细胞源)一次免疫之后能达到67%~82%的抗体合格率,2个厂家的猪瘟活疫苗(细胞源)一次免疫之后能达到64%~69%的抗体合格率,说明传代细胞苗产生的保护性较原代细胞源疫苗更强,产生抗体水平更稳定。由于试验中使用的是有母

源抗体的仔猪,与实际生产中的情况相似,产生的抗体效价会因母源抗体干扰而有所改变。含有高滴度的疫苗可以突破已有的中和作用,进一步促进机体产生高水平的抗体,因此选择使用猪瘟活疫苗(传代细胞源)会达到更好的免疫保护效果。

对不同水平母源抗体的仔猪进行加强免疫保护试验,结果发现,全部免疫仔猪的抗体阻断率平均值在加强免疫后明显上升,从二免前的46%~58%升高到57%~77%,抗体合格率从64%~82%升为83%~100%。这一结果说明,猪瘟活疫苗在进行加强免疫时,可以有效提高对猪群保护。本试验结果均说明传代细胞源猪瘟活疫苗较原代细胞源猪瘟活疫苗不论在首免或加免中均具有更高的抗体水平和更长的持续期。

参考文献:

- [1] 涂长春. 中国猪瘟流行病学现状与防制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [2] 夏军, 凡坤. 规模化猪场常见疾病免疫抗体监测及分析[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2011(5): 7-9.
- [3] 仇华吉, 董光志, 沈荣显. 猪瘟兔化弱毒疫苗——半个世纪的回顾[J]. 中国农业科学, 2005(8): 1675-1685.
- [4] 孙彦伟, 查云峰, 田云, 等. 三个厂家猪瘟活疫苗免疫效果比较试验[J]. 广东畜牧兽医科技, 2012, 37(2): 29-32.
- [5] 丘惠深, 郎洪武, 王在时, 等. 猪瘟兔化弱毒疫苗与我国近年猪瘟野毒的免疫相关性试验[Z]. 中国兽药监察所研究报告汇编(13辑), 1988: 140-142.
- [6] 丁壮. 猪瘟及其防制[M]. 北京: 金盾出版社, 2005: 1-8.
- [7] 虞德屏, 杜根成, 龚建培, 等. 猪瘟疫苗抗原含量与免疫效果相关性试验[J]. 养猪, 2012(5): 3-4.
- [8] 谢文强. 猪瘟活疫苗生产工艺改进现状[J]. 广东畜牧兽医科技, 2012, 37(4): 5-7.
- [9] 宁宜宝, 吴文福. 我国猪瘟流行新特点与疫苗免疫研究[J]. 中国兽药杂志, 2011, 45(8): 33-37.

(上接第25页)

定鸡高致病性禽流感免疫程序为:10日龄时用高致病性禽流感疫苗进行首次免疫,胸部肌注,剂量为0.3 mL/只;40日龄进行第2次免疫,肌注,剂量为0.3 mL/只。

我区动物防疫工作人员在禽流感病毒高发的春秋两季为全区所有鸡群注射疫苗,以此防止禽流感发生。今年以来我区对鸡禽流感抗体抽检了382份,阳性率达到95%,有效掌握了免疫效果和疫病动态。

貂源绿脓杆菌 2 个血清型生长曲线的比较分析

杨朋欣, 丁国杰, 刘可姝, 张春媛, 王 彬

(哈药集团生物疫苗有限公司, 黑龙江 哈尔滨 150069)

摘要: 为比较 2 种血清型绿脓杆菌生长特性的差异, 采用分光光度法和活菌计数法测定绿脓杆菌血清 B 型分离株 SD004 株和血清 C 型分离株 WD013 株的生长曲线, 对两种方法绘制的生长曲线进行比较。结果表明, 两种方法绘制曲线有差异, 对数生长期和稳定期菌液 OD_{600nm} 值与活菌计数对数之间呈现一元二次多项式回归关系。该试验为貂源绿脓杆菌生物学特性的比较研究及疫苗制备提供参考。

关键词: 绿脓杆菌; 血清型; 生长曲线; 生长特性

中图分类号: S855.1¹²

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2016)04-0041-03

Comparative Analysis of Growth Curve between Two Serotypes of *Pseudomonas Aeruginpsa* from Minks

YANG Pengxin, DING Guojie, LIU Keshu, ZHANG Chunyuan, WANG Bin

(Harbin Pharmaceutical Group Bio-vaccine Co., Ltd., Harbin 150069, China)

Abstract: To compare the growth characteristics between two serotypes of *Pseudomonas aeruginpsa*, growth curves of both isolates was detected by spectrophptmetry method and colony count method. The results showed that two curves were different for the two methods. The relationships between OD_{600nm} value and Log₁₀ CFU/mL was quadratic polynomial with one variable at logarithmic phase and stationary phase. The results of the study was prepared for biological characteristics and vaccine of *P. aeruginpsa* from the Minks.

Key words: *Pseudomonas aeruginpsa*; serotype; growth curve; growth characteristic

绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginpsa*), 属于 γ 变性菌门假单胞菌科, 为需氧或兼性厌氧菌的革兰氏阴性杆菌, 是重要的条件致病菌, 广泛存在于环境中, 如土壤、笼具、饲料以及饮用水中^[1-2]。日本科学家 Homma 根据 O 抗原将绿脓杆菌分为 A~N 群。目前根据此系统形成的试剂盒广泛应用。我国于 20 世纪 80 年代初首次报道了水貂出血性肺炎病例, 此后相继有该病报道^[3-4]。

细菌生长曲线的绘制方法主要有分光光度法和活菌计数法两种。本研究采用以上两种方法检测两个不同血清型貂源绿脓杆菌分离株的生长情况, 通过生长曲线的绘制, 了解其生长特性并比较

菌株之间的差异, 并评价是否可以用分光光度法的 OD_{600nm} 值来衡量菌液中的活菌数量, 为绿脓杆菌的生物特性比较研究和疫苗生产提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株 貂源绿脓杆菌血清 B 型分离株 SD004 株和血清 C 型分离株 WD013 株, 其甘油菌由哈药集团生物疫苗有限公司研发中心鉴定保存。

1.1.2 培养基 2%牛血清肉汤培养基、2%牛血清肉汤琼脂平板和 TSB 培养基。

1.2 试验方法

收稿日期: 2016-08-11

作者简介: 杨朋欣(1985-), 女, 硕士, 中级兽医师, E-mail: 492557342@qq.com

通讯作者: 丁国杰(1974-), 女, 硕士, 高级兽医师, E-mail: 445298136@qq.com

1.2.1 细菌培养 甘油菌接种于 2%牛血清肉汤琼脂平板,37℃过夜培养,次日刮取菌泥划线培养,挑取单个菌落转接至 5 mL 2%牛血清肉汤培养基,180 r/min 37℃过夜培养,再按体积 2%接种至 200 mL TSB 培养基进行扩大培养,180 r/min 37℃培养 24 h。

1.2.2 生长曲线绘制 在无菌条件下每隔 2 h 取少量菌液,测定 OD_{600nm} 值,并用灭菌生理盐水进行梯度稀释后各取 3 个稀释浓度的菌液 100 μ L 涂布 2%牛血清肉汤琼脂平板,37℃培养过夜,根据

稀释倍数和平板上的菌落数计算活菌数(CFU/mL),绘制相关曲线并进行比较。

2 结果与分析

2.1 分光光度法绘制 2 个血清型菌株的生长曲线

以菌液 OD_{600nm} 值为纵坐标绘制 2 个血清型分离菌株的生长曲线,从图 1 可知,2 个血清型分离菌株的生长规律基本一致,在监测 4 h 即进入对数生长期,14 h 开始进入稳定期,持续至 22 h OD_{600nm} 值开始缓慢下降,但下降比较缓慢。

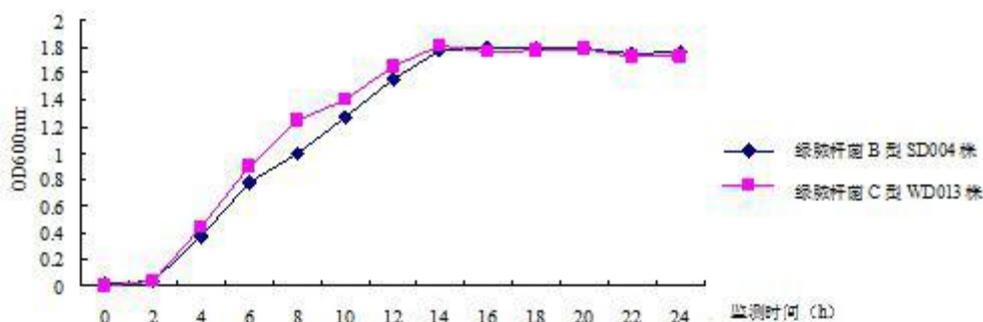


图 1 2 个血清型绿脓杆菌的生长曲线(分光光度法)

2.2 活菌计数法绘制 2 个血清型菌株的生长曲线

以活菌计数值(CFU/mL)的对数为纵坐标分别绘制 2 个血清型分离菌株的生长曲线,从图 2 可

知,2 个血清型分离菌株在监测 4 h 即进入对数生长期,两菌株达到生长高峰的时间较短、为 6~8 h,但是 C 型较 B 型略高,生长速度略快,2 个血清型菌株的生长稳定期都较长(图 2)。

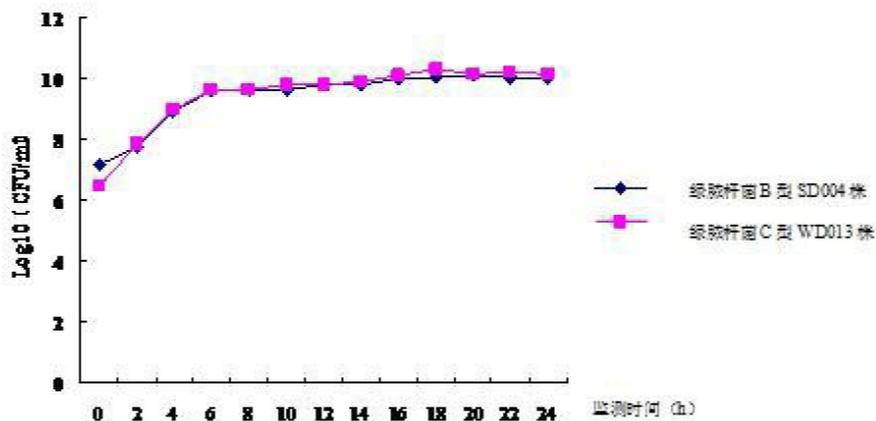


图 2 2 个血清型绿脓杆菌的生长曲线(活菌计数法)

2.3 菌株对数生长期和稳定期 OD_{600nm} 值与活菌数间的函数关系

由图 1 和图 2 可看出,分光光度法和活菌计数法绘制的菌株生长曲线有一定差异,在细菌生长过程中二者不呈线性关系,因此取 2 个血清型

对数生长期至稳定期(6~14 h)的数据,以 OD_{600nm} 值为横坐标,活菌数对数为纵坐标,分别绘制两者的回归曲线(图 3 和图 4),B 型 SD004 株回归方程为 $y = 0.1123x^2 - 0.0519x + 9.5763$,相关指数 $R^2 = 0.929$;C 型 WD013 株回归方程为 $y =$

$0.2128x^2 - 0.2892x + 9.7177$, 相关指数 $R^2 = 0.9098$ 。可见, 2 个血清型回归方程的拟合度均较高, 其中, 以 B 型回归方程估测的可靠程度较高。

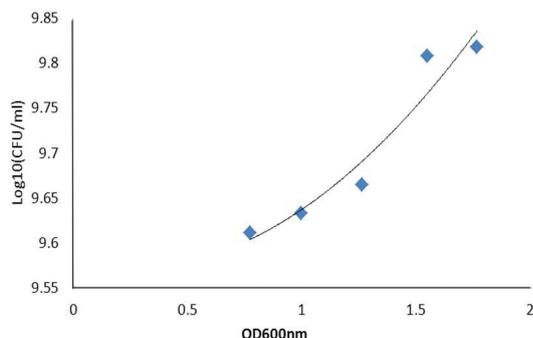


图 3 B 型 SD004 株 OD_{600nm} 值与活菌数对数间的函数关系

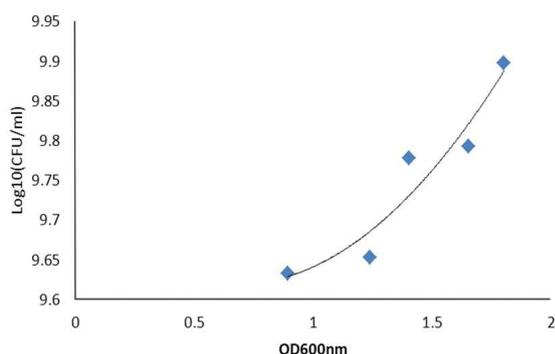


图 4 C 型 WD013 株 OD_{600nm} 值与活菌数对数间的函数关系

3 结语

为了更好地体现细菌在培养过程中生长、繁殖和衰亡的规律, 一般选择对其生长过程的相应指标进行监测同时绘制生长曲线。细菌生长曲线会经历延滞期、对数生长期、稳定期和衰退期 4 个阶段^[5]。在研究细菌的各种特性时, 生长曲线有助于选择到生长状态比较一致的细菌, 一般选择对数后期平台前期的细菌。

本试验分别采用分光光度计和活菌计数两种方法对 2 个不同血清型绿脓杆菌菌株的生长进行测绘生长曲线, 经比较分析, 在对数生长期和稳定期, 菌液 OD_{600nm} 值和活菌数之间呈现较为复杂的一元二次多项式回归关系, 该结果对绿脓杆菌生物学特性的研究和疫苗的研发生产提供了理论依据。

参考文献:

[1] Kaszab E, Szoboszlay S, Dobolyi C, et al. Antibiotic resistance profiles and virulence markers of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from composts[J]. *Bio Tech*, 2011, 102(2):1543-1548.

[2] Rahme L G, Stevens E J, Wolfort S F, et al. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals[J]. *Science*, 1995, 268(5219):1899-1902.

[3] 白雪, 柴秀丽, 闫喜军. 水貂出血性肺炎流行病学调查及绿脓杆菌疫苗研究进展[J]. *现代农业科技*, 2011(15):317-318.

[4] 赵乃听, 马子行. 假单孢菌属的分类现状[M]. *国外医学微生物学分册*, 1996, 19(2):20-23.

[5] 李颖, 杨帆, 胡付品. 肺炎链球菌适应性评价的方法学探索[J]. *中国感染与化疗杂志*, 2010, 10(3):194-199.

(上接第 32 页)

[15] 陈兵, 马智超, 朱奕, 等. 香港 1 例人感染 H7N9 禽流感病例的流行病学调查[J]. *预防医学情报杂志*, 2015, 31(7):505-508.

[16] Xu X, Bao H, Ma Y, et al. Simultaneous detection of novel H7N9 and other influenza A viruses in poultry by multiplex real-time RT-PCR[J]. *Virology*, 2015, 30(12):69.

[17] Fan J, Cui D, Lau S, et al. Detection of a novel avian influenza A (H7N9) virus in humans by multiplex one-step real-time RT-PCR assay[J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14:541.

[18] 康伟, 陈永泰, 方葵, 等. 供港澳活禽检验检疫体系的建立[J]. *中国畜牧兽医文摘*, 2015, 31(10):106-107.

[19] 刘静, 刘俊辉, 范钦磊, 等. 生物安全隔离区划在禽流感防控中的应用[J]. *中国动物检疫*, 2015, 32(7):50-54.

紫草膏治疗犬溃疡性皮肤病的疗效观察

阮鹏飞, 丘倬希, 吴晓斌, 张志宏, 谢东

(江门市动物疫病预防控制中心, 广东, 江门 529000)

摘要: 中药紫草在治疗皮肤疾病中疗效确切, 可有效减轻症状, 缩短病程。在宠物诊疗中心病例库中, 随机抽取犬溃疡性皮肤病病例 268 例, 经常规清创处理后治疗组 168 例采用紫草膏进行治疗, 对照组 100 例采用抗生素治疗, 观察治疗效果。结果表明, 紫草膏治疗组疗效极显著优于对照组。紫草膏具有无毒副作用、无刺激性、可加快创面愈合、抗感染、价格低廉等优点, 值得推广应用。

关键词: 犬; 紫草膏; 溃疡性皮肤病; 疗效

中图分类号: S858.2927.5 文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2016)04-0044-03

Curative Effect Observation of Lithospermum Ointment on Ulcerative Dermatitis in Dogs

RUAN Pengfei, QIU Zhuoxi, WU Xiaobin, ZHANG Zhihong, XIE Dong

(Jiangmen Animal Disease Control Center, Jiangmen 529000, China)

Abstract: Lithospermum with curative effect on the treatment of skin diseases, can relieve symptoms, shorten the course of disease. In the pet center of diagnosis and treatment of the case library, randomly selected 268 dogs ulcerative skin disease cases, including 168 cases treated with ointment after routine cleaning, 100 cases treated with antibiotic therapy. The results showed that the polar ointment group was significantly better than the control group. Lithospermum ointment has no toxic side effect, no irritation, accelerating wound healing, anti infection, low price and other advantages, is worthy of popularization and application.

Key words: canine; Lithospermum ointment; ulcerative dermatitis; curative effect

溃疡性皮肤病, 指的是皮肤或粘膜深达真皮甚至皮下组织的局限性缺损, 是由于组织坏死或创伤所致^[1]。其表面常覆盖有脓液、坏死组织或痂皮, 预后留有瘢痕, 可由感染、外伤、结节或肿瘤的破溃等所致, 其大小、形态、深浅、发展过程等也不一致, 常合并慢性感染, 可能经久不愈。皮肤溃疡的成因主要分为感染性与非感染性^[2]。感染性溃疡一般是由外伤、微生物感染等引起的局限性皮肤组织缺损。外伤性溃疡往往是由物理和化学因素直接作用于组织引起, 如烧伤、冻疮及咬伤等。微生物感染性疾病多由细菌、真菌、螺旋体、病毒等引起组织破坏。

紫草(Lithospermum erythrorhizon)为紫草科紫草属宿根性草本植物, 性寒, 味甘、咸, 归心、肝经, 药用其干燥根部, 为止血、凉血、清热解毒药^[3]。功能主治凉血, 活血, 解毒透疹, 常用于血热毒盛、斑疹紫黑、麻疹不透、疮疡、湿疹、水火烫伤, 热结便秘。对金黄色葡萄球菌、化脓杆菌、大肠杆菌有抑制作用。近年来, 中药紫草在治疗皮肤疾病中的疗效得到肯定。紫草有效减轻症状, 缩短病程, 在广泛使用抗生素治疗犬皮肤病的今天, 使用紫草膏治疗犬皮肤病对减少抗生素耐药性方面有积极作用。

1 紫草膏处方与制备

收稿日期: 2016-07-25

作者简介: 阮鹏飞(1982-), 男, 本科, 助理兽医师, E-mail: 944900339@qq.com

紫草膏处方:紫草 100 g,当归 200 g,生地 200 g,白芷 100 g,乳香 100 g,没药 100 g,儿茶 400 g,大黄炭 400 g,地榆炭 400 g,锻炉甘石 500 g,冰片 30 g,蜜蜡 500 g,植物油 6000 g,95%乙醇 5000 mL。

紫草膏制备^[4]:(1)将乳香、没药、大黄炭、地榆炭、锻炉甘石、儿茶粉碎后,过 120 目筛,混匀备用;(2)将冰片粉碎后过 120 目筛,备用;(3)紫草用 95%乙醇 5000 mL 浸泡 4 h,滤液蒸去乙醇,得紫草中有效成分左旋紫草素^[5];(4)当归、生地、白芷于 6000 g 植物油中炸枯,去渣备用;(5)待上述油温降至 50℃左右,加入粉末,蜜蜡及左旋紫草素,搅匀;(6)制好的膏剂经消毒处理后冷却即成。

2 紫草膏的临床应用

2.1 病例选择

笔者在宠物诊疗中心病例库中,随机抽取 2015 年 6 月至 2016 年 6 月犬溃疡性皮肤病病例 268 例,经常规清创处理后治疗组 168 例采用紫草膏进行治疗,对照组 100 例采用抗生素治疗,以观察治疗效果。

治疗组:168 例,其中雄性 92 例、雌性 76 例,年龄最大 12 岁、最小 5 月龄,其中 3~4 岁占 78%。溃疡面积最小 1.5 cm²、最大 24 cm²。其中溃疡面积 1~5 cm² 的 92 例,5~10 cm² 的 46 例,10~20 cm² 的 20 例,20 cm² 以上的 10 例。单纯性细菌感染 107 例,继发真菌感染 61 例。

对照组:100 例,雄性 66 例、雌性 34 例,年龄最大 11 岁、最小 8 月龄,3~4 岁占 75%,溃疡面积最小 1 cm²、最大 28 cm²。其中 1~5 cm² 的 45 例,5~10 cm² 的 36 例,10~20 cm² 的 14 例,20 cm² 以上的 5 例。单纯性细菌感染 74 例,继发真菌感染 26 例。

2.2 使用方法

治疗组:对溃疡皮肤彻底清创,剪除坏死组织,生理盐水冲净后用乳酸依沙吡啶溶液喷洒伤口,浸泡 3~5 min,然后以紫草膏外敷创面。在溃疡的渗出期局部宜包扎,吸收期暴露治疗,隔日换药 1 次,病情重者每天换药 1 次。

对照组:对溃疡皮肤彻底清创,剪除坏死组织,生理盐水冲净后用乳酸依沙吡啶溶液喷洒伤口,浸泡 3~5 min,常规使用抗生素控制继发感染。

2.3 疗效分析

治愈:用药后溃疡面消失,伤口愈合,无疤痕。有效:用药后疼痛缓解,伤口缓慢愈合。无效:用药后溃疡面不消失,伤口基本不愈合。

治疗组单纯细菌感染 107 例经治疗全部治愈,治愈时间 6.8(±1.2)d,对照组单纯细菌感染 74 例治愈时间 10.5(±0.9)d,经统计学分析差异极显著(P < 0.01)。治疗组混合真菌感染 61 例,治愈时间 10.2(±0.8)d,对照组混合真菌感染 26 例,治愈时间 14.3(±0.9)d,经统计学分析差异极显著(P < 0.01)。结果均显示治疗组的疗效优于对照组。

3 典型病例

3.1 病例概况

丁丁(动物名),混种犬,5 岁,雄性,有完整免疫史及驱虫史。主诉:2016 年 4 月 23 日主人误将洗洁精当宠物沐浴露给该犬洗澡。洗完澡后该犬出现瘙痒、烦躁不安、咬毛等症状。第 2 天带至动物诊疗中心就诊。

3.2 临床检查与诊断

该犬体温正常,精神状态佳。但瘙痒症状明显,不断啃咬尾根部以及用后脚抓挠颈部。不轻易让人触碰其抓挠的部位,触碰后有明显的疼痛反应。经剃去患部毛发后,发现全身有 5 处大小不一的溃疡性创面,创面边缘不规则,直径大小 1~3 cm 不等。表面红肿、有多量炎性渗出物,有的已伤及真皮层,表面覆盖一层腥臭脓液。取创面渗出物涂片,经革兰氏染色后镜检,视野见大量金黄色葡萄球菌。经诊断,该犬患接触性溃疡性皮肤病。

3.3 治疗措施

对溃疡皮肤彻底清创,生理盐水冲净后,用乳酸依沙吡啶溶液喷洒伤口,浸泡 3~5 min,然后以紫草膏外敷创面。暴露治疗,每天换药 1 次。

口服阿莫西林胶囊,每天 1 次,每次 250 mg,连用 5 d;扑尔敏片,每天 1 次,每次 4 mg,连用 5 d;维生素 B2 片,每天 1 次,每次 5 mg,连用 5 d。1 疗程后,复诊。

3.4 预后

该犬于 5 月 2 日回动物诊疗中心复诊。主诉用药后第 2 天犬只瘙痒症状明显减少,不再啃咬和抓挠患部;第 3 天后创面明显干燥,不再有炎性渗出物渗出。复诊当天创面愈合良好,溃疡面消失,无疤痕,有少量毛发长出(图 1、图 2)。



敷药前

敷药后 5 d

图 1 背部外敷紫草膏前后对比 5 d 后效果



敷药前

敷药后 5 d

图 2 颈部外敷紫草膏前后对比 5 d 后效果

4 结语

中药紫草膏所含成分有去痂、降温、收敛、活血、消肿、生肌、止痛、消炎、解毒、抗菌、营养等诸

多功效,对创面的治疗作用有以下优点^[6]:(1)无毒副作用,安全性好;(2)对创面无刺激性,不损伤新生上皮细胞,且各种成分有协同作用,止痛效果好,可加速上皮生长,(3)紫草膏治疗可大大缩短疗程;(4)创面引流好,所含植物油不易粘附创面,换药方便无痛,不损伤新生上皮,植物油的油性薄膜有保护作用,减少渗出和感染;(5)创面痊愈后瘢痕形成少,新生皮肤较光滑润泽;(6)创面不易干燥结痂,上皮生长后药物所形成痂皮很快自然脱落,也减少感染化脓机会;(7)价格低廉,自制方法简便。

经动物诊疗中心多年临床实践证明,中药紫草膏对犬猫溃疡性皮肤病有确切疗效,值得推广应用。

参考文献:

- [1] 何黎. 溃疡性皮肤病的诊断思路及典型病例分析[A]. 中华医学会第 14 次全国皮肤性病学术年会论文汇编[C]. 2008.
- [2] 何勤国. 常见皮肤溃疡性创面的治疗体会[J]. 海军医学杂志, 2000(2):182-183.
- [3] 袁慧勤, 胡迪. 紫草的药理作用及单味药临床外用概述[J]. 医学综述, 2015(3):504-506.
- [4] 刘惠文, 杨兆凤, 刘红英. 紫草油的制备及临床应用[J]. 宁夏医学杂志, 2003(9):223-224.
- [5] 杨晓笛, 卢锋, 黄美充, 等. 中药紫草有效成分的提取[J]. 汕头大学学报(自然科学版), 2002(4):67-70.
- [6] 罗学娅, 李明辉, 吕莉, 等. 紫草的药理作用与应用研究进展[J]. 大连大学学报, 2004(2):80-83.

科学家发现鸡带有抗禽流感基因

英国 - 皮尔布莱特研究所实施的最新研究揭示,一些鸡的基因几乎能使它们对抗禽流感。发表在科学报告上的研究结果显示,鸡容易受到致命病毒的感染还是会对病毒产生抵抗力,基因的作用至关重要。

林肯大学生物兽医科学副教授 Colin Butter 博士实施了这项研究,他说:“对我们来说了解鸟类不同的遗传基因对禽流感的反应是非常重要的,这样我们就能了解疾病是如何传播的。”“我们的研究结果对于强调‘寄主’在禽流感传播过程中的重要作用是非常有价值的,同时对突出传染链的一系列因素和受感染途径影响的控制机制也有重要的作用。”

他们发现,携带病毒但从遗传学上对疾病有抵抗力的鸡会在很短的时间内通过呼吸系统排出病毒,而那些容易受到感染的鸡,也会通过粪便排出病毒,但是需要花费的时间比较长。研究人员发现,这是病毒传播唯一相关的途径,因此有抵抗力的鸡不会开启或维持病毒的传播途径。

进一步的研究结果认为,这可能是由于动物体内的遗传限制阻碍了病毒在动物体内的传播。他们计划发现和研究遗传抗体背后的生物学机制。这对未来实施家禽育种以及人类禽流感的治疗都有重要的意义。

(信息来源:《The Poultry Site》)

基于主体多元化发展的农业科技服务体系研究

林 群, 赵 程, 古秋霞, 陈燕苹, 熊瑞权

(广东省农科院彩田农业科技信息中心, 广东 广州 510640)

摘要: 随着社会经济的快速发展与市场体制的逐步完善, 各类农业科技服务主体如政府农业推广部门、高等院校、科研机构、龙头企业、农民专业合作社、专业技术协会及其他社会服务组织的服务水平与服务意识也不断提高, 逐渐形成了多主体共同参与的农业社会化服务格局。重点总结了国内目前普遍采用的6种农业科技服务模式, 分析其存在的主要问题, 提出相应的对策建议, 以期进一步促进国内农业科技服务体系的发展完善。

关键词: 农业科技; 服务主体; 多元化发展; 服务体系

中图分类号: F323.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-8567(2016)04-0048-05

Research on Agricultural Science and Technology Service System Based on Multiplex Development of Service Principal

LIN Qun, ZHAO Cheng, GU Qiuxia, CHEN Yanping, XIONG Ruiquan

(Caitian Information Center of Agricultural Science and Technology, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China)

Abstract: With the constant improvement of market economic system, all kinds of service main body, such as government department of agriculture, institutions of higher learning, scientific research institutions, farmers' professional co-operatives, professional and technical associations, and other social services organizations continue to grow stronger, gradually formed the main body participation pattern. In this paper, we summarized six kinds of agricultural science and technology information service mode, and pointed out existing problems and shortcomings, put forward some corresponding countermeasures and suggestions, in order to further promote the development of agricultural science and technology service system in China.

Keywords: agriculture science and technology; service principal; multiplex development; service system

农业科技服务是一种创新、推广和应用农业科技, 改善农业科技资源配置和提高科技成果转化效率, 最终推动农业科技创新并及时有效传播应用的重要手段。为主动适应经济发展新常态, 适应加快现代“三农”建设的新形势, 国内也逐步建立起以政府农业科技推广部门为主导, 农民专业合作社、专业协会等农村经济合作组织为基础, 农业科研院所、教育单位、农业企业及其他社会服务

组织广泛参与的多元化农业科技服务体系, 并具有各服务主体各司其职、相互协作、服务到位、充满活力的特点^[1]。为进一步健全和完善我国农业科技服务体系, 协调好各服务主体相互关系, 充分发挥各自功能, 可促进农业科技最新成果及时转化运用, 使农业生产、加工、销售的全产业链中出现的问题能及时反馈并得以解决, 对加快推动农业现代化发展, 实现农业增产、农民增收、农村发

收稿日期: 2016-05-04

基金项目: 广东省省级科技计划项目(2014A040401050), 粤科规财字[2015]72号

作者简介: 林群(1985-), 男, 硕士, 助理研究员, E-mail: 171962856@qq.com

通讯作者: 熊瑞权(1983-), 男, 硕士, 高级农业经济师, E-mail: 173949189@qq.com

展具有重要意义。

1 多主体参与的农业科技服务体系基本形成

国内现行农业科技服务体系为促进农业科技成果转化,解决人民的温饱问题,实现农业历史性跨越做出了重要贡献。当前,国内参与农业科技信息服务的单位与服务模式均呈多元化发展趋势,按照“政府主导的多元化供给”构建原则,根据不同的服务主体、受体、供给途径以及推广方式,分类总结现行的农业科技服务模式,形成了以公益性、营利性、自主性和混合性为基本特征的多元化供给服务体系,具体可总结归纳为6种。

1.1 创新示范与特派员型

主要是通过建立农业科普示范基地,或委派科技推广特派员到各乡、镇(街)、村等形式进行农业科技示范与推广。一般由农业科研创新机构、农技推广中心、畜牧兽医水产推广机构等农业科技推广部门申请农业技术创新示范类项目,审批后在实施过程中,以现场观摩指导、技术讲座、远程教育、发放科技资料等形式对农户进行农业科技培训,具体服务内容有机试验、示范与推广农业投入品与优良新品种新技术等,组织开展农业重大病虫害的预警监测与防治工作,农业投入品与农产品质量安全检验检测,动植物检疫与品种区域试验,农业气象信息预报,以及农业可持续发展相关政策法规、规划等^[2]。

1.2 基层服务站与技术能人型

通过依托种养加经销经营大户、村(组)委会、农业科技信息服务中心、农业科技推广站、乡镇文化站等分别建立信息服务点,形成县、乡(镇)、村三级农业信息服务网络,主要由各级政府下属的农业科技推广部门组成,能较好地执行国家、省、市农业发展规划。按照国家农业部有关规定和要求,保证一定的农业科技服务经费,通过推荐当地的科技能人,或经考核合格获得《农村信息员资格证书》的技术员,直接服务于区域内农民,并形成了项目推动型、承包责任制、农业技术咨询、技术培训、科技示范等多种推广方式相结合的服务类型,具体包括2种主要类型即“项目带动型”(政府+科研或教育单位+农民)和“科技网络型”(政府+推广部门+科技服务机构+农民)^[3]。推广主体自上而下,非常便于宏观管理。

1.3 合作社与种养大户型

在农村家庭承包经营基础上,由同类农产品的生产经营者或者同类农业生产经营服务的提供者、利用者,自愿联合成立农民专业合作社,有效依托并整合政府、科研院所和教育单位等的资金、技术、信息资源,通过示范推广等措施广泛招纳会员,提供农业生产资料的购买,农产品的加工、运输、销售、贮藏以及与农业生产经营有关的技术、信息等服务,引导其成员持续稳定增收致富,并辐射带动周边市县区农民进行规模化、标准化生产。在实际应用中,通常是农民专业合作社或农业种养大户带头,采取以技术、信息或资金等自愿合作的方式,在合作社内或种养大户所在镇域内等一定范围内以生产技术、最新科技信息或成本资金等形式为农民提供农业科技信息服务。该种形式是最贴近农民的一种带动模式,其农业科技服务的供给主体在当地具有较高知名度和威望,对社员及周边农民的示范带动效应较大。

1.4 农业类企业与农户型

以农业类企业作为科技服务供给主体,通过建立示范推广基地,以观摩示范、现场指导、专业技术培训等方式,不仅在农业生产过程中为农户提供技术指导,还通过统一收购,负责农产品加工贮藏、物流配送、包装销售、品牌宣传等农业产中、产后环节信息技术服务,联结成“企业+示范基地+农户”的农业生产共同体,并在当地及周边地区形成示范带动效应,实现企业盈利、农民增收的双赢目标。农业企业通过聘请专家教授组织培训讲座、远程教育与现场观摩相结合等方式,为农户提供优良新品种、新技术、生产资料等最新农业科技成果,同时签订生产协议,确定收购保护价格,并以高于市场价收购农民生产产品。该科技服务形式主要由企业以市场为导向进行运作,通过在农业产前、产中、产后较为完整的产业链为农户提供技术服务,指导农户按照企业提供的技术标准进行标准化、集约化的生产。

1.5 传统媒体推广服务型

传统媒体传播平台包括广播电台、电视台、影像资料、黑板报、宣传画(栏)、报纸期刊等,主要发布主体为政府农业主管部门及相关单位、农业类企业或专业协会等。一般经由该传播渠道发布的信息,全部是经过大量阅览、筛选分类、整理组织后再传播或分发给广大农民,信息的真实性、趣味性、时效性、通用性较高。同时结合以批发市场、种

子农药经销站为主的口头相传的直接传播路径,即由以政府等相关部门为主导、企业相辅助等形式建立区域性农产品批发市场,由购买农产品的零售商或二级批发商将农产品市场信息、政策法规信息、品种信息、病虫害防控信息等传播给广大农民,形成农产品批发大户、零售商与二级批发商、农民的层级传播模式,对提高农民采纳农业科技新成果的自愿性有重要促进作用^[2]。

1.6 互联网络自助服务型

主要依托政府相关部门或农业龙头企业建立门户网站和微信公众平台等,联合农业专家、专业协会等作为农业信息的传播主体,推广的资金来源于各级政府财政拨款或是自筹经费,通过PC互联网、智能手机移动网等打造农业生产与农产品加工销售综合服务平台和电子商务平台,定期更新发布或推送农业相关政策法规、产学研合作项目、农业最新科技成果转化示范项目,以及包括新品种新技术信息、农产品加工新工艺新设备、病虫害防控预警、农业气象信息、农产品市场信息、土地确权流转信息等在内的农业产前、产中和产后一系列科技服务信息,从而架设起政府与科技创新服务机构,农业企业与其他经济合作组织,以及农业企业和农民之间的沟通桥梁^[4]。在市场化驱动的大环境下,该服务模式可充分发挥农民的自主能动性,且具有较高的实时性、实效性、便捷性、可操作性等特点。

2 存在的主要问题

2.1 缺乏完善的农科教协同衔接的管理机制

目前,我国涉农技术服务推广部门、农业科研院所、农业教育单位、农业企业及农业经济合作组织等之间独立设置,各成体系,资源配置分散,沟通协作机制尚待完善。农业科研单位和农业类高校偏重于农业科学技术创新研究,而忽视农业科研成果的转化推广,不能及时发现和解决推广实践中的技术推广难题;政府涉农技术推广部门以技术传播、推广应用为己任,也未能及时关注了解农业科研进展,满足不了农民日益增长的科技需求,技术转化率较低^[1]。尤其是农业科研院所和教育单位与农业科技推广部门之间的体制分割现象较为显著,彼此独立运行,相互间工作内容与服务方式相互分离,推广服务成果缺少交流分享,存在多轨道同时运行,农科教协同衔接较为困难,是造成我国农业科技推广成果转化率不高的主要因

素。

2.2 多元农业科技服务主体间合作关系薄弱

农业企业、农民专业合作社和专业协会等农业生产经营合作组织是最贴近农民与农业生产的农业科技推广服务载体,也是连接政府农业科技推广部门、农业科研院所和教育单位以及农民之间的桥梁和纽带。由于现行的三大农业科技服务主体因其机构性质可争取到部分政府财政支持,资金压力较小,农业服务性质也多以公益性为主,相比较之下,农业生产经营合作组织通常是自主经营、自负盈亏,因此多以盈利性服务为主,偏向于经营风险较低、有较高投资回报率的农业科技、创新项目,经营服务内容主要包括统一供应种子种苗、农药化肥、耕作方法、农机装备、品牌包装以及信贷咨询等^[5]。总体来看,公益性与盈利性农业科技服务主体相互间合作关系薄弱,缺少有效的利益联结机制,且存在信息不对称、反馈不及时等问题,难以有效地满足农民的农业科技服务需求。

2.3 未形成良性的互动协调和自我发展机制

国内现行的农业科技服务体系主要根据行业类型不同设置的,各行业服务自成体系,并逐步延伸到基层组织。机构设置存在过多过细、协调配合能力较差、部门分割各自为战的散乱局面,缺乏对技术市场统一有效的引导、调控、激励与监督机制,因此较难提供农业和农民所需的综合性、配套性和全面性的科技服务。在自我发展机制方面,仍较多停留在口号性鼓励发展、争取更多部门利益、概括性总结先进推广经验等阶段,并未注重于如何建立促进自我发展的内部机制^[6]。即:如何最大程度地发挥推广服务体系的总体优势,实现纵向联结和横向耦合的服务网络;如何建立和改善产权制度、分配制度、激励和风险应急机制等来提高自身竞争力,持续保障服务主体机构的健康发展。

3 农业科技推广多元化服务主体发展对策与建议

3.1 创造发展环境,加快农业科技服务体系改革

政府农业部门的农业科技推广服务体系是现代农业科技服务体系的重要组成部分。应当制定确保各农业科技推广服务机构和组织合法地位的相关配套政策和措施,不断强化各机构和组织的规范化管理,创造健康发展的政策环境;按照国家提出的农业科技服务相关政策法规要求,以“强化

公益性职能,放活经营性服务”为原则,积极探索可有效分类管理公益性服务与经营性服务的方法与措施,加大农业科技推广体系改革的力度,完善社会化服务机制。重点改革机构设置、职能定位、编制核定、经费保障、候补人员安置以及债务分解等方面,逐步理顺完善其体制和机制,形成政府引导与市场调控相互补充、联动发展的农业科技推广体系新格局,建立体制合理、机制完善、队伍精干、服务高效、多元化服务主体间功能互补的新型农业科技服务体系。

3.2 强化组织管理,加大财政和社会资金支持力度

坚持“放扶并举”和市场化运作原则,减少政府的行政化干预,加强扶持引导作用,培养农业科技服务体系各服务供给主体的自主自生能力,鼓励各服务机构和组织自行发展、自主管理、高效运作。对于特色鲜明、充满活力、上规模、推广价值高的新型农业科技服务组织和模式给予重点关注,并能相应地出台一定的扶持优惠政策和法规,加大财政资金扶持力度。以“政府为主,多元投入”为原则,通过设立农业科技服务专项基金、制定税收优惠政策、增加信贷投入和政策借贷,以及建立多渠道融资途径等措施,不断吸引政府和社会金融资本投入,建立农业科技服务经费多渠道投入的新机制,形成政府主导、企业和合作组织等社会力量参与的多元化投融资体系,不断推进农业科技推广服务体系的现代化发展和完善。

3.3 明确职能定位,强化服务机构公益性职能

加强政府引导和推动作用,积极促进各服务供给主体间及其与农业生产经营合作组织的利益联结和协同合作联系,充分发挥农业科技推广服务体系各主体的服务效用优势和能动性,提高农业科技推广体系发展的活力。首先,紧密结合目前农业的生产现状和科技发展实际需求,以明确机构发展的定位和设置为前提,积极摸索建立改善集农业科研、教育和推广服务为一体的现代服务体系;其次,激励农业科技推广服务机构、农业科研院所和教育单位、各种农业生产经营合作组织等,以相互协调补充,公平市场化竞争的形式积极开展农业科技推广服务事宜,进一步探索优化特色明显、运作高效、充满活力的公益性农业科技推广服务网络;此外,应在改革完善农业科技推广服务体系、培育多元化服务主体的同时,建立以政府

宏观调控为主导、市场化调节手段与适当行政干预相结合的农业科技推广运行机制。

3.4 加强队伍建设,建立配套教育培训机制

先进的农业生产技术和与之配套的高素质农业科技服务队伍是推动农业科技服务发展的关键,因此政府需提高对农业科教的高度重视。加强政策引导和宣传,在已建立的一体化农业科技推广服务机构中,采用聘任、项目申报与管理、绩效评定等方式,建立健全有效的激励机制、竞争机制、评价反馈机制和惩罚淘汰机制等,改善和提高基层服务人员薪资待遇,不断推进和完善农业科技推广人员队伍建设工作。有效落实定岗定责,与岗位职责相匹配的薪资待遇优惠鼓励政策,不断吸引农业科研院所毕业生加入农业科技推广服务队伍。同时,通过特招委培、科技培训、专家讲座、定期进修、现代远教与现场观摩相结合等形式,加快做好农业科技服务人员的继续教育和人才培养工作,从而整体提高农技推广队伍的专业水平,更好地适应市场和技术变化。

3.5 促进有效合作,建立多种利益联结机制

为进一步促进农业科技推广服务体系的发展和完善,迫切需要在各农技推广服务主体与农业生产经营组织之间建立合理有效的利益联结机制,以委托制、联合培养制、合作制、股份合作制和合同协议制等方式,实现多方在制度安排、机制建设、领导管理等方面的有效联结,并加强在农业科研、生产、加工、营销、品牌推广等过程的合作关系,形成农业产、加、销等过程一体化发展的新型产业化经营格局。一方面,在农业科技推广服务过程中,农业科研院所和教育单位等农业科技力量支撑单位与农民专业合作社、专业协会和种养大户等农业生产经营组织之间可通过建立以合同约定、股份合作、利益牵引、风险承担等多种形式为主的有效联结机制,并建设农业科技成果转化示范基地,确立长期稳定的合作关系,组成利益共同体。另一方面,在农业科技推广服务机构的支持和农业科研创新单位的技术指导下,农业生产经营组织可自主性、有计划地进行各项生产和技术活动,开展多层次、多角度、多阶段的农业信息服务,为当地农民引进和示范推广优良新品种、新技术,传播新的经营理念,加快促进农业生产标准化和新技术成果的普及应用。同时,加强政府及其他社会组织对其监督管理,实现国内农业科技推广

服务体系的纵深发展。

参考文献:

[1] 孙萍,王丹.我国农业科技推广服务机构多元化主体发展对策[J].辽宁经济对策研究,2010,2:52-53.
[2] 刘佳,张荣亨,张秀兰,等.国内主要农业科技信息服务模式比较研究[J].农业技术经济,2012,6:63-72.
[3] 曾福生,匡远配,刘辉.中国基层农业科技服务体系的运行机

制创新[J].湖南农业大学学报(社会科学版),2006,7(2):1-6.

[4] 王朝良,王仲梅,张娜.特色农业发展中的科技服务制度安排[J].农业科技管理,2006,25(6):90-93.
[5] 曾朝辉,王奎武,谭洁,等.创新我国农业科技服务体系的思路 and 对策[J].河北农业大学学报(农林教育版),2010,12(3):428-431.
[6] 张丽莉.国外农业科技服务模式及经验探析[J].新西部,2011,9:258-259.

《广东畜牧兽医科技》(双月刊)

(1976年创刊,大16开本,正文52页)

主管单位:广东省农业科学院

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

订 价:每期定价10元,全年60.00元(含平寄邮费)。

订阅方式:本刊实行自办发行。读者可通过银行汇款至本刊编辑部。

(1) 开户银行:农行广州市五山支行;

(2) 收款人全称:广东省农科院彩田农业科技信息中心;

(3) 帐号:44-056901040003081

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

地 址:广州市天河区五山金颖路31号《广东畜牧兽医科技》编辑部(邮编:510640)

电 话:020-38319957、020-38319211、020-38319958

E-mail:gdxmsy@163.com

欢迎订阅

欢迎投稿

欢迎刊登广告

(上转第13页)

定的畜禽新品种和配套系共计85个,这些畜禽新品种、配套系大多以地方品种为素材,具有适应性强、风味独特等特性,受到市场的青睐。

经过多年的发展,畜禽育种取得了显著成效,畜禽良种繁育体系逐步健全完善,为畜牧业持续健康发展作出了积极贡献,也逐步夯实了现代种业建设基础。在育种机制上,正逐步从科研单位主导的科研育种向企业主导的商业育种转变,初步建立起以企业为主体、市场为导向、产学研相结合的商业化育种体系。在育种路径上,正逐步从引进品种仅扩繁、不选育向引进品种“本土化”、注重系统选育转变,良种登记、性能测定等针对引进品种的基础性育种工作开始启动。

在科技支撑上,正逐步从常规育种向常规育种和分子育种并重转变,基因组选择技术在奶牛和生猪育种中开始逐步应用。

市场为导向、企业作主体,建立商业化育种体系

当前,我国经济发展进入新常态,畜牧业发展也进入了由数量增长为主转到数量质量效益并重的新阶段。近年来,畜产品进口快速增长,发展畜禽种业提升我国畜牧业竞争力的要求更为迫切。一批实力雄厚的产业化龙头企业参与育种的内在动力不断增强,主动适应市场,不断加大投入,成为引领我国畜禽育种的“火车头”。以企业为主体、市场为导向、产学研相结合的商业化育种体系逐步形成,有力地推动了我国畜禽育种从重引进、扩繁多、选育少向引进品种“本土化”、注重系统选育转变。

温氏股份1992年与华南农业大学合作,开启了长达20多年的产学研合作创新之路,每年育种研发经费超过一亿元,在分子标记辅助选择、全基因选择、冷冻精液等前沿技术方面保持与国际先进技术发展同步,选育了猪、禽配套系20个,其中9个通过国家审定。2015年,温氏股份出栏纯种猪10万头、父母代种猪55万头,出栏祖代种鸡50万套、父母代种鸡1200万套,建立了年产3000万头肉猪、12亿只肉鸡的大规模繁育体系,形成了面向全国的强大辐射带动能力。

在家禽育种方面,北京华都峪口禽业公司首先发力,通过引进、消化、吸收,培育出了具有自主知识产权的京粉1号、京红1号蛋鸡配套系,打破了国外公司对我国蛋鸡种源的垄断。2000年以来,我国自主培育的72个家禽新品种配套系中,企业主导的育种占80%。截至目前,共有4家蛋鸡育种企业培育出高产蛋鸡配套系10个,蛋鸡良种国产化比例达到50%,全国共有20多个蛋鸡祖代场和1500余个父母代场,常年存栏祖代蛋种鸡50余万套,良种供应能力不断提高。

到2025年,基本建成与现代畜牧业相适应的良种繁育体系

“十三五”是建设现代畜牧业的关键时期,也是建设现代畜禽种业的重要机遇期。近些年,我国畜禽种业产业规模从小变大、综合实力从弱到强,取得了明显成效。但是,与建设现代畜牧业的要求相比,与欧美种业发达国家相比仍有一定的差距,畜禽种业长期积累的矛盾和问题愈发凸显。近日,为加快畜禽育种自主创新,提升畜牧业综合竞争力,农业部发布了《关于促进现代畜禽种业发展的意见》,提出要形成以育种企业为主体、产学研相结合、育繁推一体化的畜禽种业发展机制。

《意见》提出了6项重点任务,其中包括进一步培育壮大龙头企业。将畜禽种业纳入现代种业发展基金支持范围,采取股权投资等方式,重点支持育种基础好、创新能力强、市场占有率高的种畜禽企业,整合资源、人才、技术等要素,培育一批大型畜禽种业集团。鼓励种业企业建设现代化育种科研平台,推动企业与科研院校共建高标准实验室、育种研发中心和良繁基地。以优势品种为基础,以优势种畜禽企业为载体,通过繁育推广、市场推介、产业开发、媒体宣传等形式,打造一批具有国际竞争力的畜禽种业品牌。

今后一个时期,我国将建立以市场为导向、企业为主体的商业化育种体系。一方面,畜禽种业发展更加突出企业主体地位,发挥市场在资源配置中的基础作用,构建符合市场规律和产业需求的畜禽种业发展机制。另一方面,政府部门将加大引导和扶持力度,特别是在政策创设、规划引领、科技支撑和市场监管等多个方面发力,为畜禽种业发展营造更加宽松的发展环境。到2025年,主要畜种核心种源自给率达到70%,国家级保护品种有效保护率达到95%以上,基本建成与现代畜牧业相适应的良种繁育体系。

(信息来源:中国农业新闻网)